การคัดแยกยีสต์ไขมันสูงที่สามารถใช้ไซโลสจากน้ำหมักชีวภาพเพื่อผลิตน้ำมันจุลินทรีย์

Screening of Xylose-Utilizing Oleaginous Yeasts from Fermented Bio-extracts for Microbial Oil Production

สาลินี ศรีวงษ์ชัย[1*], ชนิศา อักษรสมัย[1] และ รุจิรัตน์ กิจเลิศพรไพโรจน์[2]

Salinee Sriwongchai[1*], Chanisa Aksornsamai[1] and Rujirat Kitleartpornpairoat[2]

[1]*สาขาวิชาทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว*

[2]*ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี*

[1]*Natural Resources and Environment Program, Faculty of Science and Social Sciences, Burapha University Sakaeo Campus*

[2]*Center for Scientific and Technological Equipment, Suranaree University of Technology*

Received : 30 November 2018

Revised : 31 January 2019

Accepted : 20 February 2019

บทคัดย่อ

ไบโอดีเซลเป็นพลังงานทดแทนทางเลือกเชื้อเพลิงดีเซลที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมผลิตได้จากน้ำมันพืชชนิดต่างๆ ไขมันสัตว์ รวมไปถึงน้ำมันพืชหรือน้ำมันสัตว์ที่ผ่านการใช้แล้วด้วยกระบวนการทรานซ์เอสเทอริฟิเคชั่น ปัจจุบัน น้ำมันจุลินทรีย์จากจุลินทรีย์ไขมันสูงเป็นที่ยอมรับว่าเป็นแหล่งวัตถุดิบทางเลือกเพื่อการผลิตไบโอดีเซล โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำมันจุลินทรีย์จากยีสต์ไขมันสูง การศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการคัดแยกยีสต์ไขมันสูงจากตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพที่สามารถย่อยสลายไซโลสเพื่อผลิตน้ำมันจุลินทรีย์ โดยทำการคัดเลือกยีสต์ที่มีความแตกต่างกันทางสัณฐานวิทยาบนอาหารแข็ง YPD ได้ยีสต์ที่มีความแตกต่างกัน 19 ไอโซเลท และเมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนบนอาหารไซโลส พบยีสต์ที่สามารถเจริญได้ จำนวน 12 ไอโซเลท จากนั้นนำมาทดสอบการผลิตน้ำมันบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำกัดปริมาณแหล่งไนโตรเจนและมีไซโลส 30.0 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.5 บ่มแบบเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 120 ชั่วโมง พบว่ายีสต์ไอโซเลท FBY3-3 สามารถสะสมลิพิดภายในเซลล์ร้อยละ 23.21 โดยน้ำหนักแห้ง จัดเป็นยีสต์ไขมันสูงและจัดจำแนกได้เป็น *Pichia kudriavzevii* FBY3-3 องค์ประกอบของน้ำมันที่สกัดได้จาก *P. kudriavzevii* FBY3-3 มีกรดไขมันชนิดสายยาวเป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ กรดปาล์มิติกและกรดโอเลอิกเช่นเดียวกับที่พบในน้ำมันพืช จากผลการศึกษา *P. kudriavzevii* FBY3-3 มีศักยภาพในการผลิตน้ำมันจุลินทรีย์และน่าที่จะเป็นแหล่งวัตถุดิบทางเลือกสำหรับการผลิตไบโอดีเซลได้

คำสำคัญ : ยีสต์ไขมันสูง, ไซโลส, น้ำมันจุลินทรีย์, การคัดแยก

***Corresponding author. E-mail** : salinee@buu.ac.th

Abstract

Biodiesel is a renewable alternative to petroleum-based diesel fuel and environment friendly energy which made from various vegetable oils, animal fats and waste cooking oils through transesterification. Nowadays, microbial oils from oleaginous microorganisms are recognized as promising alternative biodiesel feedstock, especially, oleaginous yeast oils. In this study, oleaginous xylose-utilizing yeasts which produce microbial oil were screened from fermented bio-extract samples. Nineteen differently morphological yeast isolates were isolated on YPD agar medium and twelve yeast isolates could grow and utilize xylose as carbon sources on xylose medium. Microbial oil production of xylose-utilizing yeasts was investigated on nitrogen-limiting medium containing 30.0 g/L of xylose as a sole carbon source; initial pH 5.5; temperature at 30°C and orbital shaking at 150 rpm for 120 h. It was found that the yeast isolate FBY3-3 accumulated the intracellular lipid about 23.21% by dry cell weight that called oleaginous yeast. The isolate FBY3-3 was identified as a *Pichia kudriavzevii* FBY3-3. The extracted oils of *P. kudriavzevii* FBY3-3 predominantly contained long chain fatty acids such as palmitic acid (C16:0) and oleic acid (C18:1) that comparable to conventional vegetable oils. The results suggest that *P. kudriavzevii* FBY3-3 has a potential for microbial oil production and could be used as alternative biodiesel feedstock.

Keywords : oleaginous yeasts, xylose, microbial oils, screening

บทนำ

จากวิกฤตการณ์ความไม่แน่นอนของราคาน้ำมันดิบและปริมาณสำรองของพลังงานเชื้อเพลิงฟอสซิลที่กำลังลดลงอย่างต่อเนื่อง สวนทางกับความต้องการการใช้น้ำมันที่มากขึ้นตามจำนวนประชากรโลกที่เพิ่มขึ้น รวมถึงปัญหาภาวะโลกร้อนที่เกิดจากการใช้พลังงานเชื้อเพลิงฟอสซิล ทำให้มีการมองหาพลังงานที่สามารถนำมาทดแทนพลังงานเชื้อเพลิงฟอสซิล ซึ่งพลังงานทดแทนนั้นจะต้องมีราคาถูก มีคุณสมบัติที่คล้ายคลึงกับเชื้อเพลิงฟอสซิลและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม พลังงานทดแทนอย่างไบโอดีเซลจึงได้รับความสนใจในหลายประเทศ “ไบโอดีเซล” เป็นพลังงานทดแทนทางเลือกชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาทดแทนน้ำมันปิโตเลียมอย่างน้ำมันดีเซลได้ ไบโอดีเซลผลิตได้จากน้ำมันพืช เช่น น้ำมันจากเมล็ดสบู่ดำ น้ำมันปาล์ม น้ำมันมะพร้าว น้ำมันงา น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันจากเมล็ดเรพและน้ำมันทานตะวัน เป็นต้น หรือน้ำมันจากไขมันสัตว์ หรือแม้แต่น้ำมันพืชหรือน้ำมันสัตว์ที่ผ่านการใช้งานแล้ว (Arous *et al*., 2016) โดยผ่านกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น (transesterification) เพื่อให้มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลโดยไม่ต้องดัดแปลงเครื่องยนต์แต่อย่างใด นอกจากนี้ ไบโอดีเซลยังเป็นพลังงานสะอาดและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากองค์ประกอบของไบโอดีเซลไม่มีธาตุกำมะถันแต่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก (KU-Biodiesel Project, 2008) จึงช่วยให้การเผาไหม้ดีขึ้นสามารถลดมลพิษซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) ไฮโดรคาร์บอน (HC) คาร์บอนมอนนอกไซด์ (CO) และฝุ่นละอองได้อีกด้วย สามารถย่อยสลายได้เองตามกระบวนการทางชีวภาพ (biodegradable) และไม่มีพิษ (nontoxic) (Sankh *et al*., 2013) การใช้น้ำมันพืชมาเป็นแหล่งวัตถุดิบเพื่อผลิตไบโอดีเซลเป็นสิ่งที่สามารถทำได้ในยุคปัจจุบัน แต่การปลูกพืชต้องใช้พื้นที่จำนวนมาก อาศัยภูมิอากาศที่เหมาะสมและใช้เวลาในการเพาะปลูกยาวนาน ทำให้ต้นทุนในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชเพิ่มสูงขึ้นได้ และยังส่งผล

กระทบต่ออุตสาหกรรมอาหารที่ต้องใช้น้ำมันพืชเป็นวัตถุดิบในการผลิต ซึ่งจะทำให้ราคาอาหารมีการปรับตัวสูงขึ้นตามไปอีกด้วย แม้ว่าการเลือกใช้ไขมันจากสัตว์หรือแม้แต่น้ำมันพืชหรือน้ำมันสัตว์ที่ผ่านการใช้แล้วเป็นแหล่งวัตถุดิบสำหรับการผลิตไบโอดีเซลเพื่อเป็นการลดต้นทุน แต่แหล่งวัตถุดิบดังกล่าวก็ยังไม่เพียงพอต่อการผลิตไบโอดีเซล (Poontawee *et al*., 2016; Sriwongchai *et al*., 2013; Taskin *et al*., 2016) การแสวงหาแหล่งวัตถุดิบทางเลือกเพื่อการผลิตไบโอดีเซลที่มีต้นทุนต่ำจึงเป็นเรื่องที่หลายประเทศให้ความสำคัญและมุ่งเน้นให้ความสนใจ ซึ่งหนึ่งในทางเลือกของแหล่งวัตถุดิบที่มีความเป็นไปได้นั่นคือ น้ำมันจุลินทรีย์

น้ำมันจุลินทรีย์ (microbial oils) หรือน้ำมันเซลล์เดียว (single cell oils : SCO) คือ ลิพิดที่สร้างขึ้นจากจุลินทรีย์ไขมันสูง (oleaginous microorganisms) ได้แก่ แบคทีเรีย จุลสาหร่าย ราและยีสต์ จุลินทรีย์เหล่านี้สามารถสร้างและสะสมลิพิดภายในเซลล์ได้มากกว่าร้อยละ 20 โดยน้ำหนักแห้ง (Gao *et al*., 2013; Qin *et al*., 2017) น้ำมันจุลินทรีย์มีองค์ประกอบหลักของลิพิดที่พบเป็นไตรกลีเซอไรด์ซึ่งอยู่ในรูปหยดน้ำมันเล็กๆ ภายในเซลล์และมีกรดไขมันชนิดสายยาว เช่น กรดปาล์มิติก (palmitic acid; C16:0) กรดโอเลอิก (oleic acid; C18:1) และกรดสเตียริก (stearic; C18:0) เป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันที่สกัดได้ ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับกรดไขมันที่สกัดได้จากพืชน้ำมัน (Kumar *et al*., 2017) ในช่วงสิบปีที่ผ่านมา นักวิจัยมุ่งความสนใจที่จะนำน้ำมันจากจุลินทรีย์ไขมันสูงมาใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบเพื่อการผลิตไบโอดีเซล โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำมันจากยีสต์ไขมันสูง ด้วยศักยภาพของยีสต์ไขมันสูงที่สร้างและสะสมลิพิดภายในเซลล์ได้มากกว่าจุลินทรีย์ไขมันสูงชนิดอื่น (Saran *et al*., 2017) ยีสต์ไขมันสูงบางสายพันธุ์สร้างและสะสมลิพิดภายในเซลล์ได้มากกว่าร้อยละ 50 โดยน้ำหนักแห้ง เช่น *Rhodosporidium* sp. *Rhodotorula* sp., *Rhodosporidium toruloides*, *Cryptococcus curvatus*, *Rhodosporidium kratochvilovae* และ *Yarrowia lipolytica* (Sriwongchai *et al*., 2013) และนอกจากองค์ประกอบของกรดไขมันที่มีความคล้ายคลึงกับน้ำมันพืชแล้ว (Sankh *et al*., 2013) ยีสต์ไขมันสูงยังมีความสามารถในการเจริญบนแหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด เช่น กลูโคส กรดไขมัน สารประกอบไฮโดรคาร์บอน กรดอินทรีย์และกลีเซอรอล รวมทั้งของเสียจากกระบวนการอุตสาหกรรมอุตสาหกรรมเกษตรและเกษตรกรรม เช่น กลีเซอรอลดิบ กากน้ำตาลหรือเศษพืชผัก เป็นต้น และยังมีข้อได้เปรียบมากกว่าการปลูกพืชน้ำมัน เช่น การเพาะเลี้ยงได้ตลอดปีไม่ขึ้นอยู่กับฤดูกาลและสภาพอากาศ เจริญเร็ว ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงสั้นและใช้พื้นที่น้อยสามารถควบคุมการผลิตได้ (Sriwongchai, 2015) แม้จะมีการรายงานการคัดแยกยีสต์ไขมันสูงเพื่อการผลิตไบโอดีเซลจากแหล่งธรรมชาติ เช่น ตัวอย่างดิน (Pan *et al.,* 2009; Leesing & Nantaso, 2011; Taskin *et al*., 2016) ดินจากป่า (Chang *et al.,* 2013) ดินตะกอนจากป่าชายเลน (Sriwongchai *et al*., 2018) สลัดจ์จากระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานผลิตน้ำมันมะกอก (Arous *et al*., 2016) ของเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มและผลิตไบโอดีเซล (Kitcha& Cheirsilp, 2011) เศษซากใบไม้จากป่าชายเลน น้ำทะเล (Wang *et. al.,* 2014) ปลาทะเล *Synechogobius hasta* (Li *et al.,* 2010) หรือแม้แต่ผลไม้ที่เน่าเสีย (Sankh *et al*., 2013) หรือเปลือกผลไม้ที่เน่าเสีย (Saran *et al*., 2017) มาแล้ว แต่การคัดแยกยีสต์ไขมันสูงเพื่อการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำหมักชีวภาพยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน ซึ่งน้ำหมักชีวภาพน่าจะเป็นอีกหนึ่งแหล่งตัวอย่างที่สามารถคัดแยกยีสต์ไขมันสูงได้ เนื่องจากในกระบวนการหมักน้ำหมักชีวภาพจะมีจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เกิดขึ้นมากมาย ทั้งที่เป็นจุลินทรีย์ที่ได้มาจากธรรมชาติและจุลินทรีย์ที่ติดมากับวัตถุดิบที่นำมาหมัก เช่น แบคทีเรียในสกุลบาซิลัส กลุ่มแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก กลุ่มแบคทีเรียผลิตกรดอะซิติก ราและยีสต์ (Tancho, 2013) ในงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาการคัดแยกยีสต์ไขมันสูงจากตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพที่ผลิตจากวัสดุลิกโนเซลลูโลส ซึ่งยีสต์ไขมันสูงที่คัดแยกได้จะนำมาทดสอบการสร้างลิพิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแหล่งไนโตรเจนจำกัด โดยมีน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน

ส่วนน้ำมันที่สกัดได้จากยีสต์ไขมันสูงจะนำไปตรวจสอบองค์ประกอบของกรดไขมันเพื่อเปรียบเทียบกับกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันพืช ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะสามารถนำไปพัฒนาการเพาะเลี้ยงยีสต์ไขมันสูงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรอย่างลิกโนเซลลูโลสเป็นสารตั้งต้นต่อไปได้ในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ

ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพจากโครงการ "วิถีเกษตรอินทรีย์สู่การพึ่งพาตนเองอย่างยั่งยืนสัญจร ครั้งที่ 1" ของคณะวิทยาศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว ผลิตจากวัสดุเหลือทิ้งจำพวกลิกโนเซลลูโลสซึ่งส่วนประกอบที่สำคัญ ได้แก่ เศษผักกาดขาว เศษหัวไชเท้า เศษผักกวางตุ้ง เศษกะหล่ำปลีและมะเขือเทศ หมักร่วมกับน้ำและน้ำตาลทรายแดง อัตราส่วนระหว่างวัตถุดิบที่นำมาหมัก น้ำและน้ำตาลทรายแดงเท่ากับ 3 : 3 : 1 ระยะเวลา 30 วัน จำนวน 5 ตัวอย่าง สีของตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพมีสีน้ำตาลเข้มถึงสีดำ ตะกอนสีน้ำตาลเข้มกลิ่นคล้ายแอลกอฮอล์และมีค่าความเป็นกรดด่างอยู่ระหว่าง 3.83-3.90

2. การคัดแยกยีสต์เบื้องต้น

นำตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ 1 มิลลิลิตร ทำการเจือจางลำดับส่วน (serial dilution) ในน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เลือกระดับการเจือจางที่เหมาะสม (10^{-6} ถึง 10^{-8}) โดยปิเปต 0.1 มิลลิลิตร มาคัดแยกยีสต์ด้วยเทคนิคการคัดแยกเชื้อ (spread plate technique) บนอาหารแข็ง YPD (ยีสต์สกัด 10.0 กรัม เปปโตน 20.0 กรัม กลูโคส 10.0 กรัม และวุ้น 15.0 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร) นำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลือกโคโลนีของยีสต์ที่เกิดขึ้นบนจานเพาะเชื้อ โดยสังเกตลักษณะภายนอกของโคโลนีของยีสต์ที่มีความแตกต่างกัน และแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ (cross streak plate technique) บนอาหารแข็ง YPD บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง โคโลนีเดี่ยว (single colony) ที่ได้จะถูกเก็บรักษาไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อผิวหน้าเอียง YPD ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. คัดแยกยีสต์ที่มีความสามารถในการใช้ไซโลส

นำยีสต์ที่ผ่านการคัดแยกจนได้โคโลนีเดี่ยวมาทำเป็นเชื้อตั้งต้น (starter) โดยเขี่ยโคโลนียีสต์ 1 ลูป (loop) ผสมลงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 50.0 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อตั้งต้นปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร (ร้อยละ 5 โดยปริมาตร) ถ่ายลงในอาหารไซโลส (xylose medium) (สารสกัดยีสต์ 3.0 กรัม สารสกัดมอลต์ 3.0 กรัม เปปโตน 5.0 กรัม และไซโลส 10.0 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร) (Suriyapan *et al*., 2011) ปริมาตร 50.0 มิลลิลิตร ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.5 บ่มแบบเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และวัดการเจริญของยีสต์ทุก 24 ชั่วโมง ด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

4. การคัดแยกยีสต์ไขมันสูงจากยีสต์ที่สามารถใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน

นำยีสต์ที่มีความสามารถในการใช้ไซโลสจากข้อ 3. มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำกัดปริมาณแหล่งไนโตรเจน (nitrogen-limiting medium) ($(NH_4)_2SO_4$ 0.1 กรัม สารสกัดยีสต์ 0.75 กรัม KH_2PO_4 0.4 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 1.5 กรัม $CaCl_2.2H_2O$ 0.22 กรัม $ZnSO_4.7H_2O$ 0.55 ไมโครกรัม $MnCl_2.4H_2O$ 24.2 ไมโครกรัม และ $CuSO_4.5H_2O$ 25.0 ไมโครกรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร) (Kraisintu *et al*., 2010) ที่มีน้ำตาลไซโลส 30.0 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 50.0 มิลลิลิตร ความ

เป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.5 ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง และวัดการเจริญของยีสต์ทุก 24 ชั่วโมง ด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณชีวมวลแห้งและปริมาณลิพิด

5. การหาปริมาณชีวมวลแห้งของยีสต์

นำสารละลายเซลล์ยีสต์จากข้อ 4. ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำตะกอนเซลล์มาล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อแล้วปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์ ซ้ำ 3 ครั้ง จนกระทั่งเซลล์สะอาด จากนั้นนำเซลล์ยีสต์ผสมด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเทลงบนถ้วยระเหยที่ทราบน้ำหนักและนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนักถ้วยระเหยที่รวมกับเซลล์ยีสต์จนน้ำหนักคงที่ บันทึกน้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์แล้วนำไปคำนวณหาชีวมวลแห้ง (dry biomass) (กรัมต่อลิตร) (Sriwongchai *et al.,* 2013)

6. การสกัดลิพิดจากยีสต์

นำสารละลายเซลล์ยีสต์จากข้อ 4. ปริมาตร 20.0 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 20 นาที เทสารละลายใสส่วนที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบนทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง นำตะกอนเซลล์ยีสต์ไปชั่งและบันทึกน้ำหนักเปียกที่ได้และนำมาสกัดน้ำมันโดยชั่งตะกอนเซลล์ยีสต์ 100-1,000 มิลลิกรัม เติมสารละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเมทานอลอัตราส่วน 2 : 1 ปริมาตร 3.75 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (vortex) 15 นาที และเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร เขย่า 15 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร เขย่า 1 นาที แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใสด้านล่างในหลอดทดลองที่ทราบน้ำหนักและนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำหลอดทดลองที่แห้งแล้วมาชั่งน้ำหนักและบันทึกปริมาณลิพิดที่ได้นำไปคำนวณหาปริมาณลิพิด (lipid yield) (กรัมต่อลิตร) และร้อยละปริมาณลิพิดทั้งหมดโดยน้ำหนักแห้ง (lipid content, % w/w) (Sriwongchai *et al.,* 2013)

7. การวิเคราะห์น้ำตาลไซโลส

ปิเปตสารละลายใสจากการแยกเซลล์ยีสต์ออกแล้ว นำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลไซโลสที่เหลือด้วยวิธี DNS (3,5-dinitrosalicylic acid method) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (OD_{540}) และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณปริมาณน้ำตาลไซโลสที่เหลือเปรียบเทียบกราฟมาตรฐานของน้ำตาลไซโลส (Miller, 1959)

8. การวิเคราะห์กรดไขมัน

วิเคราะห์หาชนิดของกรดไขมันตามวิธีของ Sriwongchai *et al*. (2012) ลิพิดทั้งหมดจะนำไปผ่านปฏิกิริยาทรานส์เมทิเลชั่น (transmethylation) เพื่อให้เป็นเมทิลเอสเทอร์ (methyl esters) และนำไปวิเคราะห์หาชนิดของกรดไขมันด้วย GC/FID ภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ถึง 260 องศาเซลเซียส ที่ 2 องศาเซลเซียสต่อนาที อุณหภูมิของส่วนฉีดสาร (injector) คงที่ที่ 250 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของอุปกรณ์วัดสัญญาณ (detector) เท่ากับ 280 องศาเซลเซียส ก๊าซตัวพา คือ ก๊าซฮีเลียม (He) มีอัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที

9. การจัดจำแนกยีสต์

จัดจำแนกคุณลักษณะทางชีวเคมีและทางกายภาพของยีสต์ไอโซเลท FBY3-3 ตามวิธีของ Kurtzman& Fell (2000) การคัดแยกจีโนมิกดีเอ็นเอของยีสต์ไอโซเลท FBY3-3 และทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีของ Sambrook *et al*.(1989)จากนั้นจะนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในส่วน D1/D2 ของ 26s rDNAโดยใช้ไพรเมอร์ NL1 (5'-CATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-

3') และ NL4 (5'-GTCCGTGTTTCAAGACGG-3') โดยใช้สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR ตามวิธีของ Kurztman & Robnett (1998) และนำไปวิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับเบสในส่วน D1/D2 ของ 26s rDNA โดยใช้โปรแกรม Nucleotide Blast จากฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI, http://www.ncbi.nim.nih.gov/BLAST/)

10. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และนำข้อมูลทั้งหมดวิเคราะห์ทางสถิติโดยหาค่าเฉลี่ย (mean) และค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

ผลการวิจัย

1. การคัดแยกยีสต์ที่สามารถใช้ไซโลสจากตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ

การคัดแยกยีสต์จากตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ จำนวน 5 ตัวอย่าง บนอาหารแข็ง YPD พบยีสต์ที่มีความแตกต่างกันทางสัณฐานวิทยาทั้งหมด 19 ไอโซเลท (ตารางที่ 1) จากนั้นนำยีสต์ทั้งหมดมาคัดแยกยีสต์ที่มีความสามารถในการใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนบนอาหารไซโลส ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.5 บ่มแบบเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 72 ชั่วโมง สามารถคัดแยกยีสต์ที่สามารถใช้ไซโลสได้ทั้งหมด 12 ไอโซเลท ได้แก่ FBY1-1, FBY1-2, FBY1-6, FBY1-7, FBY2-1, FBY2-2, FBY3-2, FBY3-3, FBY4-2, FBY4-3, FBY5-1 และ FBY5-2 ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพบนอาหารไซโลส

ไอโซเลท	ลักษณะสัณฐานวิทยา						การเจริญบนอาหารไซโลส (OD_{600})	
	เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (มิลลิเมตร)	รูปร่างของโคโลนี	ระดับความนูนของโคโลนี	ลักษณะผิวหน้าของโคโลนี	ขอบของโคโลนี	สี	0 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
FBY1-1*	2.0	กลม	นูน	เกลี้ยงมันวาว	เรียบ	ครีม	0.091±0.05	2.811±0.07
FBY1-2*	7.0	กลม	แบน	เกลี้ยงด้าน	หยัก	ครีม	0.086±0.08	3.072±0.11
FBY1-3	3.0	กลม	นูน	เกลี้ยงมันวาว	เรียบ	ครีม	0.102±0.08	0.412±0.04
FBY1-4	5.0	กลม	นูน	เกลี้ยงด้าน	หยัก	ขาวขุ่น	0.101±0.03	0.256±0.04
FBY1-5	4.0	กลม	นูน	เกลี้ยงมันวาว	เรียบ	ขาวขุ่น	0.083±0.02	0.244±0.06

* ยีสต์ที่สามารถเจริญได้บนอาหารไซโลส

ค่าที่แสดง คือ ค่าเฉลี่ย ± SD (n=3)

ตารางที่ 1 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพบนอาหารไซโลส

ไอโซเลท	ลักษณะสัณฐานวิทยา						การเจริญบนอาหารไซโลส (OD_{600})	
	เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (มิลลิเมตร)	รูปร่างของโคโลนี	ระดับความนูนของโคโลนี	ลักษณะผิวหน้าของโคโลนี	ขอบของโคโลนี	สี	0 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
FBY1-6*	3.0	กลม	แบน	เกลี้ยงด้าน	เรียบ	ขาวขุ่น	0.094±0.01	1.907±0.04
FBY1-7*	2.0	กลม	นูน	เกลี้ยงด้าน	หยัก	ครีม	0.091±0.02	2.135±0.09
FBY2-1*	2.0	กลม	นูน	เกลี้ยงมันวาว	เรียบ	เหลือง	0.102±0.05	2.078±0.13
FBY2-2*	4.0	กลม	นูน	เกลี้ยงมันวาว	เรียบ	ครีม	0.102±0.08	1.975±0.12
FBY2-3	3.0	กลม	แบน	เกลี้ยงมันวาว	เรียบ	ครีม	0.078±0.07	2.033±0.10
FBY2-4	4.0	กลม	นูน	เกลี้ยงมันวาว	หยัก	ครีม	0.083±0.02	0.421±0.01
FBY3-1	2.0	กลม	แบน	เกลี้ยงมันวาว	เรียบ	ครีม	0.087±0.04	0.317±0.01
FBY3-2*	3.0	กลม	นูน	เกลี้ยงมันวาว	เรียบ	ขาวขุ่น	0.099±0.03	2.105±0.08
FBY3-3*	4.0	กลม	แบน	ขรุขระด้าน	หยัก	ขาวขุ่น	0.101±0.08	3.113±0.07
FBY4-1	2.0	กลม	แบน	เกลี้ยงด้าน	เรียบ	ขาวขุ่น	0.083±0.02	0.384±0.02
FBY4-2*	4.0	กลม	นูน	เกลี้ยงมันวาว	เรียบ	ครีม	0.088±0.03	1.861±0.07
FBY4-3*	3.0	กลม	นูน	เกลี้ยงมันวาว	เรียบ	ส้ม	0.103±0.05	3.249±0.08
FBY5-1*	4.0	กลม	นูน	ขรุขระด้าน	หยัก	ครีม	0.108±0.05	3.013±0.11
FBY5-2*	4.0	กลม	นูน	ขรุขระด้าน	หยัก	ขาวขุ่น	0.086±0.01	2.741±0.07

* ยีสต์ที่สามารถเจริญได้บนอาหารไซโลส

ค่าที่แสดง คือ ค่าเฉลี่ย ± SD (n=3)

2. การคัดแยกยีสต์ไขมันสูงจากยีสต์ที่สามารถใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการคัดแยกยีสต์ที่มีความสามารถในการใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนบนอาหารไซโลส ได้ยีสต์ที่สามารถใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนทั้งหมด 12 ไอโซเลท เมื่อนำยีสต์แต่ละไอโซเลทมาทดสอบความสามารถในการสร้างและสะสมลิพิดภายในเซลล์ โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำกัดปริมาณแหล่งไนโตรเจนและมีไซโลส 30.0 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.5 บ่มแบบเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 120 ชั่วโมง พบว่ายีสต์ไอโซเลท FBY3-3 สามารถเจริญและสะสมลิพิดภายในเซลล์ได้มากกว่าร้อยละ 20 โดยน้ำหนักแห้ง (ปริมาณลิพิดทั้งหมดเท่ากับร้อยละ 23.21 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง) โดยปริมาณชีวมวลแห้งของยีสต์ไอโซเลท FBY3-3 เท่ากับ 2.93 ± 0.03 กรัมต่อลิตร ปริมาณลิพิดเท่ากับ 0.68 ± 0.07 กรัมต่อลิตร และการใช้ไซโลสเท่ากับ 27.02±0.17 กรัมต่อลิตร ส่วนยีสต์ไอโซเลท FBY2-2, FBY3-2, FBY4-2, FBY4-3, FBY5-1 และ FBY5-2 สะสมลิพิดภายในเซลล์น้อยกว่าร้อยละ 20 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ในขณะที่ FBY1-1, FBY1-2, FBY1-6, FBY1-7 และ FBY2-1 สามารถเจริญได้ แต่ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณลิพิดภายในเซลล์ได้ การใช้ไซโลสของยีสต์ 11 ไอโซเลท มีค่าอยู่ในช่วง 14.97-26.20 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ชีวมวลแห้ง ปริมาณลิพิดและปริมาณลิพิดทั้งหมดโดยน้ำหนักแห้งของยีสต์ที่สามารถใช้ไซโลส

ไอโซเลท	ชีวมวลแห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณลิพิด (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณลิพิดทั้งหมด (ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง)	การใช้ไซโลส (กรัมต่อลิตร)
FBY1-1	1.28 ± 0.02	-	-	18.20±0.22
FBY1-2	1.37 ± 0.02	-	-	19.41±0.50
FBY1-6	1.31 ± 0.03	-	-	18.67±0.18
FBY1-7	0.97 ± 0.01	-	-	14.97±0.62
FBY2-1	1.18 ± 0.01	-	-	13.06±0.38
FBY2-2	2.59 ± 0.01	0.17 ± 0.01	6.56	24.73±0.48
FBY3-2	2.86 ± 0.04	0.54 ± 0.03	18.88	25.22±0.70
FBY3-3	2.93 ± 0.03	0.68 ± 0.07	23.21	27.02±0.17
FBY4-2	1.79 ± 0.00	0.12 ± 0.02	6.70	21.06±0.12
FBY4-3	2.43 ± 0.01	0.28 ± 0.04	11.52	23.10±0.55
FBY5-1	2.91 ± 0.02	0.18 ± 0.01	18.99	26.20±0.43
FBY5-2	2.90 ± 0.01	0.50 ± 0.01	17.24	25.11±0.31

– คือ ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณลิพิดภายในเซลล์ได้

ค่าที่แสดง คือ ค่าเฉลี่ย ± SD (n=3)

การจัดจำแนกยีสต์ไขมันสูงไอโซเลท FBY3-3 โดยนำยีสต์มาคัดแยกจีโนมิกดีเอ็นเอ แล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในส่วน D1/D2 ของ 26 rDNA gene โดยใช้ไพรเมอร์ NL1 (5'-CATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') และ NL4

(5'-GTCCGTGTTTCAAGACGG-3') จากนั้นนำผลผลิต PCR ไปวิเคราะห์บนวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่ายีสต์ไขมันสูงไอโซเลท FBY3-3 มีความคล้ายคลึงกับ *Pichia kudriavzevii* ร้อยละ 99 และจัดจำแนกเป็นยีสต์ *Pichia kudriavzevii* FBY3-3

3. การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมัน

ชนิดและปริมาณกรดไขมันของน้ำมันที่สกัดได้จากยีสต์ไขมันสูง *P. kudriavzevii* FBY3-3 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่จำกัดปริมาณแหล่งไนโตรเจนและมีน้ำตาลไซโลส 30.0 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มแบบเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา120 ชั่วโมง นำน้ำมันที่สกัดได้ไปผ่านปฏิกิริยา transmethylation และนำไปวิเคราะห์ด้วย GC/FID พบว่าประกอบด้วยกรดไขมันหลัก คือ กรดโอเลอิก (C18:1) ร้อยละ 42.11 และกรดปาล์มิติก (C16:0) ร้อยละ 28.22 และกรดไขมันชนิดอื่นที่พบ ได้แก่ กรดปาล์มิโตเลอิก (palmitoleic acid; C16:1) กรดไลโนเลอิก (linoleic acid; C18:2) และกรดสเตียริก (stearic acid; C18:0) ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ชนิดและปริมาณกรดไขมันของน้ำมันที่สกัดได้จากยีสต์ไขมันสูง *P. kudriavzevii* FBY3-3 เปรียบเทียบกับชนิดและปริมาณกรดไขมันของน้ำมันที่สกัดได้จากยีสต์ไขมันสูงสายพันธุ์อื่นและน้ำมันพืช

	ชนิดของกรดไขมัน (ร้อยละ)						
	C14:0	C16:1	C16:0	C18:3	C18:2	C18:1	C18:0
P. kudriavzevii FBY3-3		0.91±0.02	28.22±0.17	-	10.73±0.21	42.11±0.83	9.54±0.22
P. kudriavzevii MTCC 5493[a]	-	1.0	29.3	-	9.2	41.9	8.9
P. guilliermondii Pcla22[b]	0.4	12.2	21.9	-	1.7	57.9	5.8
C. curvatus[a]	0.6	1.0	32	-	9.0	48.0	8.0
Jatropha oil[c]	0.1	0.7	14.2	0.30	32.8	44.7	7.0
Palm oil[d]	-	-	43.0	-	10.0	41.0	5.0
Rapeseed[d]	-	-	3.5	8.2	22.3	64.4	0.9
Soybean oil[d]	-	-	11.8	6.3	55.5	23.3	3.2
Sun flower oil[d]	-	-	6.1	-	73.7	16.9	3.3

[a] ข้อมูลจาก Sankh *et al*. (2013)

[b] ข้อมูลจาก Wang *et al*. (2012)

[c] ข้อมูลจาก Saran *et al*. (2017)

[d] ข้อมูลจาก Ma & Hanna (1999)

– คือ ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้

วิจารณ์ผลการวิจัย

น้ำตาลไซโลสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) ที่มีคาร์บอนในโมเลกุล 5 อะตอม (pentose) ไม่พบเป็นอิสระ แต่พบเป็นโครงสร้างของโพลีแซคคาร์ไรด์ (polysaccharide) ในโมเลกุลของเฮมิเซลลูโลส (hemicelluloses) ซึ่งเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลักของลิกโนเซลลูโลส (Polprasert, 2014) การศึกษาการคัดแยกยีสต์ไขมันสูงที่สามารถย่อยสลายไซโลสได้จากน้ำหมักชีวภาพครั้งนี้ เมื่อพิจารณาวัตถุดิบที่นำใช้ในการหมักน้ำหมักชีวภาพ ได้แก่ เศษผักกาดขาว

เศษหัวไชเท้า เศษผักกวางตุ้ง เศษกะหล่ำปลีและมะเขือเทศจัดเป็นวัสดุลิกโนเซลลูโลสที่มีเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลัก โดยโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสจะมีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวอย่างน้ำตาลไซโลสและน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวชนิดอื่น เช่น น้ำตาลกลูโคส แมนโนสและกาแลคโตสเป็นส่วนประกอบสำคัญ (Dangpram *et al.,* 2013) จากการมีไซโลสเป็นส่วนประกอบในวัตถุดิบที่นำมาหมักน้ำหมักชีวภาพ ทำให้น้ำหมักชีวภาพมีความเหมาะสมในการเป็นแหล่งตัวอย่างเพื่อการคัดแยกยีสต์ไขมันสูงที่สามารถย่อยสลายไซโลสได้ โดยขั้นตอนแรกของการศึกษา คือ การคัดแยกยีสต์จากตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพจากโครงการ “วิถีเกษตรอินทรีย์สู่การพึ่งพาตนเองอย่างยั่งยืนสัญจร ครั้งที่ 1” คณะวิทยาศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว ระยะเวลาหมัก 30 วัน บนอาหารแข็ง YPD ด้วยเทคนิค spread plate และนำยีสต์ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค cross streak plate เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวของยีสต์บนอาหารแข็ง YPD ซึ่งพบยีสต์ที่มีความแตกต่างกันทางสัณฐานวิทยาจำนวน 19 ไอโซเลท (ตารางที่ 1) ในขั้นตอนต่อมาของการศึกษา นำยีสต์ไปทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลไซโลสบนอาหารไซโลส โดยบ่มแบบเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 72 ชั่วโมง และวัดการเจริญของยีสต์โดยวัดจากค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทุก 24 ชั่วโมง พบยีสต์ที่สามารถเจริญบนอาหารไซโลสได้จำนวน 12 ไอโซเลท (ตารางที่ 1) ซึ่งการที่ยีสต์ทั้ง 12 ไอโซเลท สามารถเจริญได้บนอาหารไซโลสนั้นอาจเนื่องมาจากการมีวิถีเมตาบอลิซึมของการหมักน้ำตาล ซึ่งน้ำตาลไซโลสจะถูกเปลี่ยนไปเป็นไซลูโลส (xylulose) และมีการเติมหมู่ฟอสเฟสเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ไซลูโลไคเนส (xylulokinase) ได้ไซลูโลส-5-ฟอสเฟต (xylulose-5-phosphate, X-5-P) จากนั้น X-5-P จะเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟส (pentose phosphate pathway, PPP) ต่อไป (Hahn-Hägergal *et al.,* 2007) การศึกษาในขั้นตอนต่อมา คือ การนำยีสต์ที่สามารถเจริญได้บนอาหารไซโลส จำนวน 12 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการเจริญและการสะสมลิพิดภายในเซลล์บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำกัดปริมาณแหล่งไนโตรเจนและมีน้ำตาลไซโลส 30.0 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.5 บ่มแบบเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 120 ชั่วโมง พบยีสต์จำนวน 7 ไอโซเลท สามารถเจริญและสะสมลิพิดภายในเซลล์ได้ ได้แก่ ยีสต์ไอโซเลท FBY2-2, FBY3-2, FBY3-3, FBY4-2, FBY4-3, FBY5-1 และ FBY5-2 และพบว่ายีสต์ไอโซเลท FBY3-3 สามารถสร้างและสะสมลิพิดภายในเซลล์ได้มากกว่าร้อยละ 20 โดยน้ำหนักแห้ง ซึ่งปริมาณลิพิดที่สะสมอยู่ภายในเซลล์เท่ากับร้อยละ 23.21 โดยน้ำหนักแห้ง ดังนั้น ยีสต์ไอโซเลท FBY3-3 จึงถูกจัดเป็นยีสต์ไขมันสูง (Beopoulos *et al.,* 2009) สาเหตุที่ยีสต์ไอโซเลท FBY3-3 สามารถสะสมลิพิดภายในเซลล์ได้มากกว่าร้อยละ 20 โดยน้ำหนักแห้ง อาจเกิดจากประการที่แรก X-5-P ถูกเมตาบอไลท์โดยเอนไซม์ทรานส์คีโตเลส (transketolase) และเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลส (transaldolase) ไปเป็นกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟส (glyceroldehyde-3-phosphate, G-3-P) ซึ่งเป็นสารตัวกลาง (intermediate) ที่จะไปรวมตัวกับเอซิล-โคเอ (acyl-CoA) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้างลิพิดของยีสต์ไขมันสูงในวิถี *ex novo* (*ex novo* pathway) (Davies & Holdsworth, 1992) ประการที่สอง ตามปกติการสร้างและการสะสมลิพิดของยีสต์ไขมันสูงจะเกิดขึ้นในช่วงสุดท้ายของการเจริญระยะแบ่งตัวทวีคูณ (exponential phase) หรือระยะเริ่มต้นของระยะคงจำนวนเซลล์ (early stationary phase) และเกิดขึ้นในสภาวะที่มีแหล่งไนโตรเจนจำกัดและมีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอซึ่งแหล่งคาร์บอนจะถูกแอสซิมิเลต (assimilate) และถูกเปลี่ยนไปเป็นลิพิดภายในเซลล์ได้โดยตรง โดยอาศัยเอนไซม์ที่จำเป็นที่ยีสต์ไขมันสูงสร้างขึ้น ซึ่งขั้นตอนในการสร้างลิพิดของยีสต์ไขมันสูงเริ่มจากเอนไซม์เอเอ็มพีดีอะมิเนส (AMP desaminase) จะถูกสร้างขึ้นในปริมาณมากในสภาวะที่เซลล์ขาดแหล่งไนโตรเจน และทำหน้าที่เปลี่ยนอะดีโนซีนโมโนฟอสเฟต (adenosine monophosphase, AMP) ไปเป็นอิโนซีนไฟว์โมโนฟอสเฟต (inosine-5-monophosphate) และแอมโมเนีย (NH_3) ซึ่งแอมโมเนียที่เกิดขึ้นจะทำหน้าที่เป็นแหล่งไนโตรเจน

ของเซลล์ในสภาวะที่ยีสต์ไขมันสูงขาดแคลนแหล่งไนโตรเจน ในกรณีที่เซลล์เกิดภาวะขาดแคลนแหล่งไนโตรเจนอะดีโนซีนโมโนฟอสเฟตจะถูกย่อยสลายเป็นจำนวนมากเพื่อผลิตแอมโมเนียมาใช้ ทำให้เอนไซม์ไอโซซิเตรตดีไฮโดรจีเนส (isocitrate dehydrogenase) ทำงานได้น้อยและมีปริมาณสะสมของไอโซซิเตรต (isocitrate) และกรดซิตริค (citric acid) สูงในไมโทคอนเดรีย กรดซิตริคจะเคลื่อนที่ไปยังไซโตซอล (cytosol) แล้วจะถูกเปลี่ยนเป็นออกซาโลอะซิเตต (oxaloacetate) และอะซิติล-โคเอ (acetyl-CoA) ด้วยการทำงานของเอนไซม์เอทีพีซิเตรตไลเอส (ATP citrate lyase) ซึ่งอะซิติล-โคเอที่เกิดขึ้นเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดไขมันและไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol) ของยีสต์ไขมันสูง (Papanikolaou & Aggelis, 2011) ในวิถี *de novo* (*de novo* pathway) โดยทั่วไปเอนไซม์เอทีพีซิเตรตไลเอสจะไม่พบในยีสต์ที่มีปริมาณลิพิดสะสมในเซลล์ต่ำ เช่น *Saccharomyces cerevisiae* (Sriariyanun *et al.,* 2014) เมื่อจัดจำแนกยีสต์ไขมันสูงไอโซเลท FBY3-3 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีสต์ *P. kudriavzevii* ร้อยละ 99 และจัดจำแนกเป็นยีสต์ *P. kudriavzevii* FBY3-3 ซึ่งยีสต์ *P. kudriavzevii* สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน ผลไม้ น้ำผลไม้ เครื่องดื่มที่ผ่านกระบวนการหมัก อาหารหมักดอง ไข่ไก่ ปัสสาวะ หมู เลือดและอุจจาระของมนุษย์ (Chan *et al.,* 2012; Kurtzman *et al.,* 2011) จากการรายงานของ Chanklan *et al.* (2012) พบยีสต์ *P. Kudriavzevii* กระจายตัวและพบได้มากในป่าชายเลน เช่น จากตัวอย่างดิน ซากใบไม้จมเลน ขอนไม้ลอยน้ำ น้ำ ใบและดอกแสมดำ ใบแสมดำที่มีแมลงกัดแทะ รวมทั้งกิ่งไม้ เปลือกและรากหายใจของต้นโกงกาง รวมถึงใบไม้แห้งที่ตกหล่นในป่าชายเลน ในขณะที่ Sankh *et al.* (2013) ได้ทำการคัดแยกยีสต์ไขมันสูงจากตัวอย่างผลไม้เน่าเสีย เช่น มะม่วง ฝรั่ง ส้ม ทับทิม องุ่น กล้วยและมะละกอ พบยีสต์ไขมันสูงสายพันธุ์ *P. kudriavzevii* MTCC 5493 สามารถสร้างและสะสมลิพิดภายในเซลล์ได้ถึงร้อยละ 23 โดยน้ำหนักแห้ง เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน (C/N ratio) เท่ากับ 200 ยีสต์ไขมันสูงหลายชนิดและหลายสายพันธุ์ถูกค้นพบว่าสามารถใช้น้ำตาลไซโลสเพื่อการเจริญและสร้างลิพิดภายในเซลล์ได้ เช่น *C. curvatus*, *Lipomyces starkeyi*, *R. toruloides* และ *R. glutinis* (Yamada *et al.,* 2017) จากผลการศึกษายีสต์ไขมันสูง *P. kudriavzevii* FBY3-3 มีความสามารถในการใช้ไซโลสเพื่อการเจริญและการสร้างลิพิดภายในเซลล์ได้เช่นเดียวกับยีสต์ไขมันสูงชนิดอื่นที่ได้มีรายงานมาก่อนหน้านี้ นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่า *P. kudriavzevii* สามารถใช้น้ำตาลและแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นเพื่อการเจริญและการสร้างลิพิดภายในเซลล์ได้ เช่น น้ำตาลกลูโคส กาแลกโตส ฟรุกโตสอะราบิโนส แมนนิทอล ซูโครส แป้งและกลีเซอรอลอีกด้วย (Sankh *et al.,* 2013) และด้วยความสามารถในการใช้น้ำตาลไซโลสและแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นของยีสต์ไขมันสูง *P. kudriavzevii* ทำให้สามารถนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ไปพัฒนาการเพาะเลี้ยงยีสต์ไขมันสูง *P. kudriavzevii* FBY3-3 เพื่อการผลิตน้ำมันจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรอย่างลิกโนเซลลูโลสต่อไปได้ในอนาคต และจากการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันของน้ำมันที่สกัดได้จากยีสต์ไขมันสูง *P. kudriavzevii* FBY3-3 พบกรดไขมันชนิดสายยาวคาร์บอนอะตอม 16 (C16) และคาร์บอนอะตอม18 (C18) เป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ กรดโอเลอิกและกรดปาล์มิติก โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดโอเลอิก (ตารางที่ 3) เมื่อเปรียบเทียบชนิดและปริมาณกรดไขมันของน้ำมันที่สกัดได้จากยีสต์ไขมันสูง *P. kudriavzevii* MTCC 5493 (Sankh *et al.,* 2013) และ *P. guilliermondii* Pcla22 (Wang *et al.,* 2012) พบว่ามีความคล้ายคลึงกัน และเมื่อเปรียบเทียบชนิดและปริมาณกรดไขมันของน้ำมันที่สกัดได้จากยีสต์ไขมันสูง *C. curvatus* ซึ่งเป็นยีสต์ไขมันสูงที่เป็นที่รู้จักและเป็นแหล่งวัตถุดิบสำหรับการผลิตไบโอดีเซล ชนิดและปริมาณกรดไขมันมีความคล้ายคลึงกัน โดยจะพบกรดไขมันชนิดสายยาวคาร์บอนอะตอม 16 และคาร์บอนอะตอม 18 เป็นองค์ประกอบหลัก (Sankh *et al.,* 2013) นอกจากนี้ ยังพบว่าชนิดและปริมาณกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันที่สกัดได้จากยีสต์ไขมันสูง *P. kudriavzevii* FBY3-3 มีความคล้ายคลึงกับน้ำมันพืช เช่น น้ำมันสบู่ดำ (Saran *et al.,* 2017)

น้ำมันปาล์ม น้ำมันจากเมล็ดเรพ น้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันทานตะวัน (Ma & Hanna,1999) โดยทั่วไป วัตถุดิบที่จะนำมาใช้ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจำเป็นจะต้องมีกรดไขมันชนิดสายยาวคาร์บอนอะตอม 16 และคาร์บอนอะตอม18 เป็นองค์ประกอบหลัก (Steen *et al.,* 2010) ซึ่งน้ำมันที่สกัดได้จากยีสต์ไขมันสูง *P. kudriavzevii* FBY3-3 ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพครั้งนี้ มีศักยภาพเป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลได้เช่นเดียวกับน้ำมันพืช

สรุปผลการวิจัย

จากผลการศึกษาการคัดแยกยีสต์ไขมันสูงที่สามารถใช้ไซโลสจากน้ำหมักชีวภาพเพื่อผลิตน้ำมันจุลินทรีย์จากตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ จำนวน 5 ตัวอย่าง จากโครงการ “วิถีเกษตรอินทรีย์สู่การพึ่งพาตนเองอย่างยั่งยืนสัญจร ครั้งที่ 1” คณะวิทยาศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว ระยะเวลาหมัก 30 วัน พบยีสต์ที่มีความแตกต่างกันทางสัณฐานวิทยาทั้งหมด 19 ไอโซเลท เป็นยีสต์ที่สามารถใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ 12 ไอโซเลท ได้แก่ FBY1-1, FBY1-2, FBY1-6, FBY1-7, FBY2-1, FBY2-2, FBY3-2, FBY3-3, FBY4-2, FBY4-3, FBY5-1 และ FBY5-2 และเป็นยีสต์ที่สามารถสร้างและสะสมลิพิดภายในเซลล์ได้มากกว่าร้อยละ 20 โดยน้ำหนักแห้ง 1 ไอโซเลท คือ FBY3-3 ปริมาณลิพิดทั้งหมดที่สร้างและสะสมภายในเซลล์เท่ากับร้อยละ 23.21 โดยน้ำหนักแห้ง และเมื่อจัดจำแนกยีสต์ไขมันสูงที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ พบว่าเป็น *P. kudriavzevii* FBY3-3 สำหรับชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันที่สกัดได้จากยีสต์ไขมันสูง *P. kudriavzevii* FBY3-3 พบกรดปาล์มิติกและกรดโอเลอิกเช่นเดียวกับที่พบในน้ำมันพืช ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถนำไปสู่การพัฒนาการเพาะเลี้ยงยีสต์ไขมันสูงบนอาหารที่มีวัสดุลิกโนเซลลูโลสต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 และขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และสังคมศาสตร์ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอำนวยความสะดวกในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Arous, F., Frikha, F., Triantaphyllidou, L-E., Aggelis, G., Nasri, M. and Mechichi, T. (2016). Potential utilization of agro-industrial wastewaters for lipid production by the oleaginous yeast *Debaryomyces etchellsii*. *Journal of Cleaner Production, 133*, 899-909.

Beopoulos A., Cescut, J., Haddouche, R., Uribelarrea, J. L. Moilna-Jouve, C. and Nicaud, J. M. (2009).Yarrowia lipolytica as a model for bio-oil production.*Progress in Lipid Research, 48*(6), 375-387.

Chan, G. F., Gan, H. M., Ling, H. L. and Rashid, N. A. (2012) Genome sequence of *Pichia kudriavzevii*M12, a potential producer of bioethanol and phytase. *Eukaryotic Cell, 11*(10), 1300-1301.

Chang, Y. H., Chang, K. S., Hsu, C. L., Chuang, L. T., Chen, C. Y., Huang, F. U. and Jang, H. D. (2013). A comparative study on batch and fed-batch cultures of oleaginous yeast *Cryptococcus* sp. in glucose-based media and corncob hydrolysate for microbial oil production.*Fuel, 105*(1), 711-717.

Chanklan, R., Kungkaew, P., Am-In, S. and Jindamorakot, Sasitorn.(2012) Diversity of yeasts in the nature education center for mangrove conservation and ecotourism, Chonburi Province.*Thai Journal of Science and Technology, 1*(3), 155-168.

Dangpram, P., Chantorn S. and Nitisinprasert, S. (2013). Effects of Types and Content of Agricultural Wastes for Oligosaccharide Production by Crude Enzyme from Penicillium oxalicum KUB-SN2-1. *KMUTT Research and Development Journal, 36*(1), 73-84.

Davies, R. and Holdsworth, J. E. (1992). Synthesis of lipids in yeasts: Biochemistry, physiology and production. *Advances in Applied Lipid Research, 1*, 119-159.

Gao, D., Zeng, J., Zheng, Y., Yu, X. and Chen, S. (2013). Microbial lipid production from xylose by *Mortierella isabellina*. Bioresource Technology, *133*, 315-321.

Hahn-Hägergal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Spencer-Martins, I. and Gorwa-Grauslund, M. F. (2007). Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Applied Microbiology and Biotechnology, 74*(5), 937-953.

Kitcha, S. and Cheirsilp, B. (2011).Screening of oleaginous yeasts and optimization for lipid production using crude glycerol as a carbon source.*Energy Procedia, 9*, 274-282.

Kraisintu, P., Yongmanitchai, W. and Limtong, S. (2010).Selection and optimization for lipid production of anewly isolated oleaginous yeast, Rhodosposidium toruloides DMKU3-TK16. *Kasetsart Journal (Natural Science), 44*, 436-445.

KU-Biodiesel Project. (2008). *Biodiesel*. Retrieved February 5, 2019, from http:// http://www.biodiesel.rdi.ku.ac.th/.

Kumar, D., Singh, B. and Korstad, J. (2017).Utilization of lignocellulosic biomass by oleaginous yeast and bacteria for production of biodiesel and renewable diesel.*Renewable and Sustainable Energy Reviews, 73,* 654-671.

Kurtzman, C. P. and Fell, J. W. (2000).*The yeasts.A Taxonomic study*.4th revised and enlarged edition. Amsterdum, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Singapore, Tokyo: Elsevier.

Kurtzman, C. P., Fell, J. W. and Boekhout, T.(2011). The Yeasts: a Taxonomic Study. 5th edition.San Diego: Elsevier.

Leesing, R. and Nantaso, N. (2011).Isolation and cultivation of oleaginous yeast for microbial oil production.*KKU Research Journal, 16*(2), 112-126.

Li, M., Liu, G. L., Chi, Z. and Chi, Z. M. (2010).Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marine-derived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TYJ15a.*Biomass and Bioenergy, 34*(1), 101-107.

Ma, F. and Hanna, M. A. (1999). Biodiesel production: A review. *Bioresource Technology, 70*(1), 1-15.

Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.*Analytical Chemistry, 31*(3), 426-428.

Pan, L. X., Yang, D. F., Shao, L., Li., W., Chen, G. G. and Liang, Z. Q. (2009).Isolation of the oleaginous yeasts from the soil and studies of their lipid-producing capacities.*Food Technology and Biotechnology, 47*(2), 215-220.

Papanikolaou, P. and Aggelis, G. (2011). Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. 113(8), *European Journal of Lipid Science and Technology, 113*(8), 1031 – 1051.

Polprasert, S. (2014). Pretreatment of lignocellulosic materials for ethanol production. *Thai Science and Technology Journal, 22*(5), 641-649.

Poontawee, R., Yongmanitchai, W. and Limtong, S. (2016). Efficient oleaginous yeasts for lipid production lignocellulosic sugars and effects of lignocelluloses degradation compounds on growth and lipid production. *Process Biochemistry, 53*, 44-60.

Qin, L., Lui, L. Zeng, A-P.and Wei, D. (2017). From low-cost substrate to single cell oils synthesized by oleaginous yeasts. *Bioresources Technology, 245*, 1507-1519.

Sankh, S., Thiru, M., Saran, S. and Rangaswamy, V. (2013). Biodiesel production from a newly isolated *Pichia kudriavzevii* strain. *Fuel, 106*, 690-696.

Saran, S., Mathur, A., Dalal, J. and Saxena, R. K. (2017). Process optimization for cultivation and oil accumulation in an oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides* A29. *Fuel, 188*, 324-331.

Sriariyanun, M., Phetsom, J. and Kongruang, S. (2014). "Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast.*Journal of Science and Technology Mahasarakham University,33(*3), 300-306.

Sriwongchai, S. (2015). Microbial oils as a new biodiesel feedstock: Alternative for renewable energy. *The Science Journal of Phetchaburi Rajabhat University, 12*(1), 72-83.

Sriwongchai, S., Pokethitiyook, P., Kruatrachue, M., Bajwa, P. K. and Lee, H. (2013).Screening of selected oleaginous yeasts for lipid production from glycerol and some factors which affect lipid production by *Yarrowia lipolytica* strains.*Journalof Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 2*(5), 2344-2348.

Sriwongchai S., Pokethitiyook, P., Pugkaew, W., Kruatrachue, M. and Lee, H. (2012).Optimization of lipid production in the oleaginous bacterium *Rhodococcus erythropolis* growing on glycerol as the sole carbon source*. African Journal of Biotechnology, 11*(79), 14440-14447.

Sriwongchai, S., Prasongsuk, S., Leerat, N. and Kitleartpornpairoat, R. (2018). Possibility of soil mangrove-derived oleaginous yeast *Rhodotorula mucilaginosa* on nutritionally optimized medium for lipid production for alternative biodiesel feedstock. *Burapha Science Journal, 23*(1), 304-317.

Steen, E. J., Kang, Y., Bokinsky, G., Hu, Z., Schirmer, A., McClure, A., Del Cardayre, S. B. and Keasling, J. D. (2010). Microbial Production of fatty-acid derived fuels and chemicals from plant biomass.*Nature, 463,* 559-562

Suriyapan, P., Virunanon, C., Chulalaksananukul, S and Chulalaksananukul, W. (2011).Screening of thermotolerant xylose-utilizing yeasts for ethanol production.*In Proceeding of 49th Kasetsart University Annual Conference: Science*. (pp 400-406). Thailand: Bangkok.

Tancho, A. (2013). *Applied Natural Agriculture Textbook: Principles of Practical Techniques in Thailand*. (3rd edition). Chiang Mai: Northern Natural Agriculture Network.

Taskin, M., Ortucu, S., Aydogan, M. N. and Arslan, N. P. (2016).Lipid from sugar beet molasses under non-aseptic culture conditions using the oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* TR29.*Renewable Energy, 99*, 198-204.

Wang, C. L., Li, Y., Xin, F. H., Liu, Y. Y. and Chi, Z. M. (2014). Evaluation of single cell oil from *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* P10 isolated from mangrove ecosystems for biodiesel production. *Process Biochemistry, 49*(5), 725-731.

Wang, G-Y., Chi, Z., Song, B., Wang, Z-P., Chi, Z-M. (2012). High level lipid production by a novel inulinase-producing yeast *Pichia guilliermondii* Pcla22. *Bioresource Technology, 124*, 77-82.

Yamada, R., Yammauchi, A., Kashihara, T. and Ogino, H. (2017). Evaluation of lipid production from xylose and glucose/xylose mixed sugar in various oleaginous yeasts and improvement of lipid production by UV mutagenesis. *Biochemical Engineering Journal, 128*, 76-82.