



ความหลากหลายของยีสต์สะสมไขมันในจังหวัดเชียงรายและการพัฒนากระบวนการผลิตลิพิด
จากสายพันธุ์ที่คัดเลือก

DIVERSITY OF OLEAGINOUS YEAST IN CHIANG RAI AND DEVELOPMENT
OF A LIPID PRODUCTION PROCESS FROM A SELECTED STRAIN

สิราวิชญ์ เสพศิริสุข

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2565

ความหลากหลายของอีสต์สะสมไขมันในจังหวัดเชียงรายและการพัฒนากระบวนการผลิตลิปิด
จากสายพันธุ์ที่คัดเลือก



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ปีการศึกษา 2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

DIVERSITY OF OLEAGINOUS YEAST IN CHIANG RAI AND DEVELOPMENT
OF A LIPID PRODUCTION PROCESS FROM A SELECTED STRAIN



SIRAWICH SAPSIRISUK

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of MASTER OF SCIENCE
(Applied Microbiology)

Faculty of Science, Srinakharinwirot University

2022

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

ความหลากหลายของยีสต์สะสมไขมันในจังหวัดเชียงรายและการพัฒนากระบวนการผลิตลิปิดจากสายพันธุ์ที่

คัดเลือก

ของ

สิริวิชญ์ เสพศิริสุข

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก ประธาน
(อาจารย์ ดร.วัลลภา หล่อเหลี่ยม) (อาจารย์ ดร.สุริษา สุวรรณรังษี)

..... ที่ปรึกษาร่วม กรรมการ
(อาจารย์ ดร.พิรพรรณ พลบุรี) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุขุมารณ์ กระจ่างสังข์)

| | |
|----------------------|--|
| ชื่อเรื่อง | ความหลากหลายของยีสต์สะสมไขมันในจังหวัดเชียงรายและการพัฒนากระบวนการผลิตลิพิดจากสายพันธุ์ที่คัดเลือก |
| ผู้วิจัย | สิริวิชญ์ เสพศิริสุข |
| ปริญญา | วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต |
| ปีการศึกษา | 2565 |
| อาจารย์ที่ปรึกษา | อาจารย์ ดร. วัลลภา หล่อเหลี่ยม |
| อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม | อาจารย์ ดร. พิรพรรณ พลบุรี |

ยีสต์สะสมไขมันเป็นทางเลือกที่เหมาะสมสำหรับผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพที่ยั่งยืน ปัจจุบันมียีสต์ประมาณ 160 สปีชีส์ที่ถูกรายงานว่าสามารถสะสมไขมันได้มากกว่า 20% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และมียีสต์เพียง 10% เท่านั้นที่สามารถสะสมไขมันได้มากกว่า 50% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังนั้นในงานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ที่จะศึกษาความหลากหลายของยีสต์สะสมไขมันในจังหวัดเชียงรายและเพิ่มศักยภาพการผลิตไขมันจากยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกด้วยกระบวนการหมักแบบ 2 ขั้นตอน ผลการคัดแยกเชื้อพบว่าจากดิน 22 ตัวอย่าง จากภูเขาที่ต่างกัน ได้แก่ ดอยบุญ ดอยผาอี และ ภูชี้ฟ้า สามารถคัดแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 127 ไอโซเลท และจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยลำดับเบสบริเวณ D1/D2 ของ large subunit rRNA (LSU rRNA) gene พบว่าสามารถจัดจำแนกยีสต์ได้ 5 สปีชีส์ 3 สกุล ในไฟลัมแอสโคไมโคตา ตามด้วย 8 สปีชีส์ 7 สกุล ในไฟลัมเบสิดิโอไมโคตา และมียีสต์ 5 ไอโซเลท ที่อาจเป็นสปีชีส์ใหม่ ในการทดสอบความสามารถในการสะสมไขมันพบว่ายีสต์ 78 ไอโซเลท ที่สามารถสะสมไขมันได้มากกว่า 20% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ในบรรดาสายพันธุ์ของยีสต์สะสมไขมัน *Papiliotrema terrestris* และ *Papiliotrema flavescens* ยังไม่เคยถูกรายงานว่าเป็นยีสต์สะสมไขมันมาก่อน นอกจากนี้ยังไม่เคยมีสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Piskurozyma* และ *Hannaella* ที่เป็นยีสต์สะสมไขมันมาก่อน ซึ่งในงานวิจัยนี้พบว่า *Hannaella* sp. SWU-YGP 11-1 and *Piskurozyma* sp. SWU-NATP 4-12 เป็น 2 ไอโซเลท ที่มีคุณสมบัติเป็นยีสต์สะสมไขมัน งานวิจัยนี้พบว่ายีสต์ *Lipomyces mesembrius* SWU-NGP 14-6 สามารถผลิตไขมันสูงที่สุดเท่ากับ 5.20 ± 0.03 g/L และปริมาณเซลล์สูงที่สุดเท่ากับ 9.13 ± 0.36 g/L ดังนั้น ยีสต์สายพันธุ์ *L. mesembrius* SWU-NGP 14-6 จึงถูกเลือกเพื่อปรับปรุงการผลิตไขมันด้วยวิธี การหมักแบบ 2 ขั้นตอน ในขั้นที่ 1 ยีสต์ถูกเลี้ยงในอาหารเหลว 2G2M เป็นระยะเวลา 3 วัน และ ในขั้นที่ 2 ยีสต์จะถูกเลี้ยงในอาหาร 6G เป็นระยะเวลา 3 วัน (D3 condition at 200 rpm) และ สามารถผลิต biomass, lipid production และ lipid content เท่ากับ 22.30 ± 0.20 g/L 7.70 ± 0.20 g/L และ $34.60 \pm 0.90\%$ ตามลำดับ งานวิจัยนี้พบว่าตัวอย่างดินในจังหวัดเชียงรายมีความหลากหลายของยีสต์สะสมไขมันที่สูง และยังมีศักยภาพที่สามารถคัดแยกและจัดจำแนกยีสต์สายพันธุ์ใหม่ รวมถึงยีสต์ที่สามารถผลิตไขมันได้สูงและการผลิตไขมันจาก *L. mesembrius* ด้วยกระบวนการหมักแบบ 2 ขั้นตอนเป็นรายงานแรกและองค์ประกอบของกรดไขมันหลักที่ยีสต์ผลิตได้ประกอบไปด้วย กรดไขมัน oleic acid และ palmitic acid ที่สามารถประยุกต์ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลคุณภาพสูงในแง่ของการนำประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร กรดไขมันที่ยีสต์ผลิตได้ยังอุดมไปด้วยกรดไขมันที่จำเป็น ได้แก่ โอเมกา 3 6 และ 9 ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นอาหารเสริมได้

คำสำคัญ : ยีสต์สะสมไขมัน, Lipomyces, การผลิตไขมัน, ดิน, Papiliotrema, การคัดแยกเชื้อ

| | |
|----------------|--|
| Title | DIVERSITY OF OLEAGINOUS YEAST IN CHIANG RAI AND DEVELOPMENT OF A LIPID PRODUCTION PROCESS FROM A SELECTED STRAIN |
| Author | SIRAWICH SAPSIRISUK |
| Degree | MASTER OF SCIENCE |
| Academic Year | 2022 |
| Thesis Advisor | Dr. Wanlapa Lorliam |
| Co Advisor | Dr. Pirapan Polburee |

Oleaginous yeast is an alternative platform for the sustainable production of oleochemicals and biofuels. Approximately 160 species have been reported to produce lipids over 20% of their dry weight, and only 10% of these species produce lipids over 50% of their dry weight. Therefore, the purpose of this research was to discover the diversity of oleaginous yeast in the Chiang Rai province and to enhance the production of lipids in the selected strain. A total of 127 yeasts were isolated from 22 samples collected from different mountainous regions of Chiang Rai (Doi Pui, Doi Phahee, and Phu Chee Fah). By analyzing the D1/D2 domain of the large subunit rRNA (LSU rRNA) gene sequences, 127 isolates were identified as five species among the genera of Ascomycota, eight species in seven genera of Basidiomycota, and five isolates as a potential new species. 78 of 127 isolates were oleaginous yeast, which accumulated lipids for more than 20% of their dry weight. Among the oleaginous species detected, *Papiliotrema terrestris* and *Papiliotrema flavescens* have never been reported as oleaginous yeasts before. Also, none of the species in the genera *Piskurozyma* and *Hannaella* were found to be oleaginous yeast. For five isolates as potential new species had two isolates revealed oleaginous yeasts, *Hannaella* sp. SWU-YGP 11-1 and *Piskurozyma* sp. SWU-NATP 4-12. Based on the cellular lipid content determination, *Lipomyces mesembrius* SWU-NGP 14-6 revealed the highest lipid quantity at 5.20 ± 0.03 g/L and a highest biomass production of 9.13 ± 0.36 g/L. Therefore, this strain was selected to improve lipid production by the two-stage fermentation. In the first stage, *L. mesembrius* SWU-NGP 14-6 was grown on 2G2M medium for three days, and in the second stage, it was grown on 6% glucose for three days (D3 condition at 200 rpm) and produced the highest biomass, lipid production and lipid content of 22.30 ± 0.20 g/L, 7.70 ± 0.20 g/L and $34.60 \pm 0.90\%$ of dry cell weight, respectively. The research investigated that the soil of Chiang Rai province had a high diversity of oleaginous yeast, a potential source of novel species, and high lipid production strains. The first report of lipid production by *L. mesembrius* with two-stage fermentation, and the main fatty acid composition of this strain includes oleic acid and palmitic acid, which have properties that make them useful as raw materials for producing high-quality biodiesel. Additionally, this yeast strain produces essential fatty acids such as omega 3, 6, and 9 that can be utilized as supplements in food applications.

Keyword : Oleaginous yeast, Lipomyces, Lipid production, Soil, Papiliotrema, Screening

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญาานิพนธ์นี้สำเร็จได้อย่างราบรื่นเนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างยิ่งจากอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ดร.วัลลภา หล่อเหลี่ยม และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร.พิรพรรณ พลบุรี ทั้งสองท่านได้ทุ่มเทเสียสละเวลาอันมีค่าเพื่อให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการทำวิจัย ไม่ว่าจะในด้านความรู้ จริยธรรม รวมถึงการแก้ไขปัญหาในชีวิตประจำวัน ด้วยความอบอุ่นและความเข้าใจในตัวของคุณข้าพเจ้า ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคุณ ศาสตราจารย์สาวิตรี ลิ้มทอง และ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่และอุปกรณ์สำหรับทำงานวิจัย ขอขอบพระคุณคุณ ดร.สุริษา สุวรรณรังษี ที่ให้เกียรติเสียสละเวลาอันมีค่ามาเป็นประธานกรรมการสอบปริญญาานิพนธ์ และ ขอขอบพระคุณคุณ ผศ.ดร. สุชมาภรณ์ กระจำจั่งษ์ ให้เกียรติเสียสละเวลาอันมีค่ามาเป็นกรรมการสอบปริญญาานิพนธ์ในครั้งนี้ และทั้ง 2 ท่านได้ช่วยแนะนำแก้ไขปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ ทุกๆท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่คอยให้ความรู้ความเข้าใจในการทำปริญญาานิพนธ์ ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ทุกคนในภาควิชาจุลชีววิทยา สำหรับมิตรภาพที่ดีงาม และความมีน้ำใจเอื้อเฟื้อเผื่อแผ่ที่มีให้กันและกันตลอดระยะเวลาที่ทำปริญญาานิพนธ์

ท้ายที่สุดข้าพเจ้าขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว เสพศิริสุข ที่คอยสนับสนุนให้กำลังใจแก่ข้าพเจ้าเสมอมาตั้งแต่เริ่มทำปริญญาานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ และขอขอบคุณผู้มีพระคุณทุกท่านที่มีได้กล่าวนามในที่นี้จนสำเร็จปริญญาานิพนธ์

สิราวิชญ์ เสพศิริสุข

สารบัญ

| | หน้า |
|--|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย | ง |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | จ |
| กิตติกรรมประกาศ..... | ฉ |
| สารบัญ | ช |
| สารบัญตาราง..... | ฅ |
| สารบัญรูปภาพ | ๗ |
| บทที่ 1 บทนำ..... | 1 |
| ภูมิหลัง | 1 |
| วัตถุประสงค์ของงานวิจัย | 3 |
| ขอบเขตของงานวิจัย | 3 |
| ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... | 3 |
| บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... | 4 |
| 1. ประวัติและความเป็นมาของยีสต์สะสมไขมัน | 4 |
| 2. กระบวนการสังเคราะห์ไขมันของยีสต์สะสมไขมันภายใต้สภาวะแหล่งไนโตรเจนจำกัด..... | 6 |
| 3. สายพันธุ์ของยีสต์สะสมไขมันที่โดดเด่น | 9 |
| 3.1. <i>Yarrowia lipolytica</i> | 9 |
| 3.2. <i>Rhodotorula toruloides</i> | 9 |
| 3.3. <i>Cutaneotrichosporon oleaginosus</i> | 10 |
| 3.4. <i>Lipomyces starkeyi</i> | 11 |
| 3.5. <i>Rhodotorula glutinis</i> | 11 |
| 3.6. <i>Metschnikowia pulcherrima</i> | 11 |

| | |
|---|----|
| 4. การคัดแยกยีสต์สะสมไขมัน..... | 12 |
| 4.1. Fluorometric method | 12 |
| 4.1.1 Sudan Black B..... | 12 |
| 4.1.2. Nile Red..... | 13 |
| 4.1.3. LipidTOX™ Green..... | 13 |
| 4.1.4. Rhodamine B..... | 13 |
| 4.2. Gravimetry method..... | 14 |
| 5. ความหลากหลายของยีสต์สะสมไขมันที่คัดแยกและจัดจำแนกได้ในประเทศไทย..... | 15 |
| 6. กระบวนการหมักแบบ 2 ขั้นตอน (Two-stage fermentation) | 22 |
| 6.1. Two-stage fermentation..... | 22 |
| 6.2. Two-stage fed-batch fermentation | 23 |
| 6.3. Two-stage continuous fermentation | 24 |
| 7. องค์ประกอบของกรดไขมันที่ผลิตได้จากยีสต์สะสมไขมัน..... | 27 |
| 7.1. Myristic acid | 27 |
| 7.2. Palmitic acid (Hexadecanoic acid) | 27 |
| 7.3. Palmitoleic acid | 28 |
| 7.4. Stearic acid (Octadecanoic acid) | 28 |
| 7.5. Oleic acid | 28 |
| 7.6. Linoleic acid | 29 |
| บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมีและวิธีการทดลอง..... | 30 |
| 1. วัสดุอุปกรณ์..... | 30 |
| 2. อาหารและสารเคมี..... | 31 |
| 3. วิธีการทดลอง | 33 |

| | |
|--|----|
| 1. การเก็บตัวอย่างดิน | 33 |
| 2. การคัดแยกยีสต์ด้วยวิธีการแยกยีสต์จากตัวอย่างดินโดยตรง (Direct method) | 33 |
| 3. การคัดเลือกยีสต์สะสมไขมันโดยการย้อมสี Nile red | 33 |
| 4. ศึกษาปริมาณไขมันของยีสต์สะสมไขมัน..... | 35 |
| 4.1 การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์..... | 35 |
| 4.2 การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง | 35 |
| 4.3 การวิเคราะห์ปริมาณของไขมัน | 36 |
| 5. การจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับ นิวคลีโอไทด์ บริเวณ D1/D2 domain ของ large subunit (LSU) 26S rRNA gene | 37 |
| 5.1 การสกัดดีเอ็นเอจากยีสต์..... | 37 |
| 5.2 เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ บริเวณ D1/D2 domain ของ large subunit (LSU) 26S rRNA gene ด้วยกระบวนการ Polymerase Chain Reaction (PCR) | 37 |
| 5.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ D1/D2 domain ของ large subunit (LSU) 26S rRNA gene และการสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ | 39 |
| 6. การคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับวิธีเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน..... | 39 |
| 6.1 การเตรียมหัวเชื้อ | 39 |
| 6.2 การศึกษาผลของระยะเวลาในการผลิตไขมันของยีสต์สายพันธุ์ <i>L. mesembrius</i> SWU-NGP 14-6 ที่เจริญในอาหารที่แตกต่างกัน..... | 40 |
| 6.3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเหลวด้วยวิธี Dinitro salicylic acid (DNS method) | 40 |
| 6.4. การวิเคราะห์พารามิเตอร์ของข้อมูล..... | 40 |
| 7. การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไขมันด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน..... | 41 |
| 7.1 การเตรียมหัวเชื้อ | 41 |

| | |
|--|-----|
| 7.2 การผลิตไขมันแบบ 2 ขั้นตอน | 41 |
| 7.2.1 ขั้นที่ 1: เลี้ยงบนอาหาร 2G2M | 42 |
| 7.2.2 ขั้นที่ 2: เลี้ยงบนอาหาร 6G | 42 |
| 7.2.3 การเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์ | 42 |
| 8. การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันของยีสต์สะสมไขมัน | 43 |
| 8.1 การเตรียมเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (Fatty acid methyl ester) | 43 |
| 8.2 วิเคราะห์องค์ประกอบไขมันด้วย Gas-Chromatography | 43 |
| 9. การวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติ | 44 |
| บทที่ 4 ผลการทดลอง | 45 |
| 1. การคัดแยกเชื้อยีสต์จากตัวอย่างดิน | 45 |
| 2. การคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถสะสมไขมันได้สูง | 48 |
| 2.1 การคัดเลือกยีสต์สะสมไขมันโดยการย้อมสี Nile red | 48 |
| 2.2 ศึกษาปริมาณไขมันของยีสต์สะสมไขมัน | 49 |
| 3. การจัดจำแนกยีสต์ที่โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับ นิวคลีอไทด์ บริเวณ D1/D2 domain ของ large subunit (LSU) 26S rRNA gene | 53 |
| 4. การคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับวิธีเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน | 61 |
| 5. การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไขมันด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน | 66 |
| ระยะแรก (First stage) | 66 |
| ระยะที่สอง (Second stage) | 66 |
| 6. การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันที่ผลิตโดย <i>L. mesembrius</i> SWU-NGP 14-6 การเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน | 71 |
| บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง | 74 |
| บรรณานุกรม | 92 |
| ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ | 104 |

ภาคผนวก ข สารเคมี..... 107

ภาคผนวก ค 110

ภาคผนวก ง..... 112

ประวัติผู้เขียน..... 122



สารบัญตาราง

| | หน้า |
|--|------|
| ตาราง 1 ข้อมูลความหลากหลายของยีสต์สะสมไขมันที่คัดแยกได้ในพื้นที่ของประเทศไทย..... | 19 |
| ตาราง 2 ข้อมูลงานวิจัยที่ใช้กระบวนการหมักแบบ 2 ขั้นตอน (two-stage fermentation) ในการผลิตไขมันจากยีสต์สะสมไขมัน..... | 25 |
| ตาราง 3 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง..... | 30 |
| ตาราง 4 อาหารและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง..... | 31 |
| ตาราง 5 หลักเกณฑ์การพิจารณาขนาดของไขมันที่สะสมภายในเซลล์ยีสต์ (Lipid body) | 34 |
| ตาราง 6 องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่บริเวณ D1/D2 domain ของ large subunit (LSU) 26S rRNA gene | 38 |
| ตาราง 7 สภาวะในการเพิ่มขึ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเครื่อง PCR..... | 38 |
| ตาราง 8 การออกแบบการผลิตไขมันแบบ 2 ขั้นตอน..... | 42 |
| ตาราง 9 แสดงสภาวะการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง แก๊สโครมาโตกราฟี | 43 |
| ตาราง 10 ข้อมูลของตัวอย่างดินและจำนวนยีสต์ที่แยกได้จากอาหาร NDM-agar และ NDM-gellan gum..... | 47 |
| ตาราง 11 ผลการผลิตไขมันของยีสต์ที่สามารถสะสมไขมันได้มากกว่า 40% ของน้ำหนักเซลล์ .. | 51 |
| ตาราง 12 องค์ประกอบของกรดไขมันที่วิเคราะห์จากตัวแทนของยีสต์ที่แยกได้..... | 52 |
| ตาราง 13 ความถี่ของสายพันธุ์ยีสต์ที่สามารถคัดแยกและจัดจำแนกได้จากตัวอย่างดิน..... | 54 |
| ตาราง 14 การจัดจำแนกยีสต์สายพันธุ์ใหม่ และศักยภาพในการผลิตไขมันของยีสต์..... | 58 |
| ตาราง 15 ผลของสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอนของยีสต์สายพันธุ์ตัวแทน L. mesembrius SWU-NGP 14-6..... | 68 |
| ตาราง 16 องค์ประกอบของกรดไขมันที่ผลิตขึ้นโดย L. mesembrius SWU-NGP 14-6 ในการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอนในสภาวะต่างๆ | 72 |

| | |
|---|----|
| ตาราง 17 ผลการทดลองของการผลิตไขมันด้วยกระบวนการหมักแบบ 2 ขั้นตอนของงานวิจัยก่อนหน้า | 86 |
|---|----|



สารบัญรูปภาพ

หน้า

| | |
|--|----|
| ภาพประกอบ 1 กลไกการสังเคราะห์ไขมันของยีสต์สะสมไขมันในสภาวะที่มีแหล่งไนโตรเจนจำกัด (1) | 8 |
| ภาพประกอบ 2 ตัวอย่างของเซลล์ยีสต์ที่ย้อมสี Nile Red และส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ (A) เฟสคอนทราสต์ (Phase contrast microscope) และ (B) ฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence microscope) ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า, ลิพิดบอดีที่ถูกย้อมด้วยสี Nile red และเกิดการเรืองแสง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ เส้นสีดำแสดง Scale bar ที่มีความยาว 10 μm | 34 |
| ภาพประกอบ 3 ภาพจำลองขนาดลิพิดบอดีของยีสต์ ลิพิดบอดีขนาดเกือบเต็มเซลล์ (3+), ลิพิดบอดี ขนาด 2 ใน 3 ของเซลล์ (2+), ลิพิดบอดีขนาด 1 ใน 3 ของเซลล์ (1+) และ ลิพิดบอดีขนาดน้อย กว่า 1 ใน 3 ของเซลล์ยีสต์ (-)..... | 35 |
| ภาพประกอบ 4 (A) โคโลนีของยีสต์ที่เจริญอยู่รอบตัวอย่างดิน บนอาหารแข็ง NDM เมื่อส่อง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (B) ลักษณะโคโลนีของยีสต์ ไอโซเลท SWU-NGP 14-6 ที่ บริสุทธิ์ บนอาหารแข็ง NDM..... | 45 |
| ภาพประกอบ 5 แผนที่จังหวัดเชียงราย และตำแหน่งของภูเขาที่เก็บตัวอย่างดินได้แก่ ดอยปู่ ดอยผานี้ และ ภูชี้ฟ้า..... | 46 |
| ภาพประกอบ 6 จำนวนสายพันธุ์ของยีสต์ที่แบ่งตามขนาดของลิพิดบอดี โดย ยีสต์ที่มีลิพิดบอดี ขนาดเกือบเต็มเซลล์ยีสต์ (■), ยีสต์ที่มีลิพิดบอดีมีขนาด 2 ใน 3 ของเซลล์ (■), ยีสต์ที่มีลิพิดบอดี ขนาด 1 ใน 3 ของเซลล์ (■) และ ยีสต์ที่มีลิพิดบอดีขนาดเล็กกว่า 1 ใน 3 ของเซลล์ (■)..... | 48 |
| ภาพประกอบ 7 เซลล์ยีสต์และลิพิดบอดีภายในเซลล์ยีสต์ (A, B) สายพันธุ์ SWU-NGP 2-5 และ (C, D) SWU-NGP 14-6 ที่เจริญในอาหารเหลว 2G2M เป็นระยะเวลา 7 วัน โดย (ภาพ B และ D) ลักษณะของเซลล์ยีสต์ที่มีลิพิดบอดีขนาดใหญ่เกือบเต็มเซลล์เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence microscope) ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า ภายหลังจากการย้อม สี Nile red (A และ C) ลักษณะของเซลล์ยีสต์ที่เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเฟสคอน ทราสต์ (phase contrast microscope) ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า..... | 49 |

ภาพประกอบ 8 จำนวนยีสต์สะสมไขมันที่คัดแยกได้โดยแบ่งตามค่า lipid content (%) ยีสต์ที่มีค่า lipid content (%) อยู่ในช่วง 20-25% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (■), ยีสต์ที่มีค่า lipid content (%) อยู่ในช่วง 25-30% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (■), ยีสต์ที่มีค่า lipid content (%) อยู่ในช่วง 30-40% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (■) และ ยีสต์ที่มีค่า lipid content (%) >40% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (■) 50

ภาพประกอบ 9 ข้อมูลของยีสต์ทั้ง 13 สกุล ที่สามารถแยกได้จากดินภูเขาในจังหวัดเชียงราย ประเทศไทย, ●ค่าเฉลี่ยของการสะสมไขมันของยีสต์, ■ช่วงของการสะสมไขมันของยีสต์, ■จำนวนของยีสต์สะสมไขมันได้มากกว่า 20% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และ ■จำนวนของยีสต์ที่มีความสามารถสะสมไขมันได้ต่ำกว่า 20% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง..... 55

ภาพประกอบ 10 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีสต์แต่ละสปีชีส์ที่สามารถคัดแยกและจัดจำแนกได้ในงานวิจัยนี้ สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ D1/D2 domain ของ Large subunit (LSU) 26S rRNA gene ตามวิธีของ Tamura K. และ Nei M. (1993) โดยใช้ Maximum-likelihood method และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า Bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (แสดงค่า Bootstrap มากกว่า 50%), โดยมี *Schizosaccharomyces pombe* NRRL Y-12796^T CBS 4214 เป็น out group 56

ภาพประกอบ 11 (A) แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีสต์ไอโซเลท SWU-YGP 11-1, SWU-NAPS 5-1 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ D1/D2 domain ของ Large subunit (LSU) 26S rRNA gene ตามวิธีของ Tamura K. และ Nei M. (1993) โดยใช้ Maximum-likelihood method และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า Bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (แสดงค่า Bootstrap มากกว่า 50%), โดยมี *Dioszegia hungarica* CBS 4214T เป็น out group (B) ภาพเซลล์ยีสต์สายพันธุ์ *Hannaella* sp. SWU-YGP 11-1 เจริญในอาหาร YM agar เป็นระยะเวลา 2 วัน ส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 1,000 เท่า (C) ลักษณะโคโลนีของยีสต์ สายพันธุ์ *Hannaella* sp. SWU-YGP 11-1 เจริญในอาหาร YM agar เป็นระยะเวลา 2 วัน..... 59

ภาพประกอบ 12 (A) แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีสต์ไอโซเลท SWU-NGP 14-3-4, SWU-NGP 14-3-2, SWU-NATP 4-12 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับ นิวคลีโอไทด์ บริเวณ D1/D2 domain ของ Large subunit (LSU) 26S rRNA gene ตามวิธีของ Tamura K. และ Nei M. (1993) โดยใช้ Maximum-likelihood method และประเมินความ

นำเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า Bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (แสดงค่า Bootstrap มากกว่า 50%), โดยมี *Holtermannia corniformis* CBS 6979^T เป็น out group, (B) ภาพเซลล์ยีสต์ สายพันธุ์ *Piskurozyma* sp. SWU-NATP 4-12 เจริญในอาหาร YM agar เป็นระยะเวลา 2 วัน ส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 1,000 เท่า (C) ลักษณะโคโลนีของยีสต์ สายพันธุ์

Piskurozyma sp. SWU-NATP 4-12 เจริญในอาหาร YM agar เป็นระยะเวลา 2 วัน..... 60

ภาพประกอบ 13 การเจริญ, การผลิตไขมัน และการใช้น้ำตาล ของ *Lipomyces mesembrius* SWU-NGP 14-6 เจริญในอาหารเหลว YM ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยใช้ความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 150 rpm ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นระยะเวลา 168 ชั่วโมง, = Lipid production (g/L) ■, = Biomass production (g/L) ■, = Lipid content (%) ■, เส้นกราฟสีน้ำเงิน แสดงค่า OD_{600nm} และ เส้นกราฟสีแดงแสดงการใช้น้ำตาลคาร์บอน (glucose) g/L 63

ภาพประกอบ 14 การเจริญ, การผลิตไขมัน และการใช้น้ำตาล ของ *Lipomyces mesembrius* SWU-NGP 14-6 เจริญในอาหารเหลว 2G2M ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยใช้ความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 150 rpm ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นระยะเวลา 168 ชั่วโมง, Lipid production (g/L) ■, Biomass production (g/L) ■, Lipid content (%) ■, กราฟเส้นสีน้ำเงินแสดงค่า OD_{600nm} และ กราฟเส้นสีแดงแสดง การใช้น้ำตาลคาร์บอน (glucose) g/L..... 64

ภาพประกอบ 15 การเปรียบเทียบ ผลผลิตไขมัน (g/L) แสดงในกราฟแท่งสีเหลือง ■, ผลผลิตน้ำหนักรวมเซลล์แห้ง (g/L) แสดงในกราฟแท่งสีเขียว ■ และ ปริมาณไขมันทั้งหมด (%) แสดงในกราฟแท่งสีเทา ■ ของยีสต์สายพันธุ์ *L. mesembrius* NGP 14-6 เมื่อเจริญในอาหารเหลว YM และ 2G2M เป็นระยะเวลา 7 วัน ตัวอักษรแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยใช้สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOWA) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้สถิติ Tukey test เมื่อ $p < 0.05$ โดยมีจำนวนการทดลอง 3 ซ้ำ (n=3)..... 65

ภาพประกอบ 16 ผลของสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอนของยีสต์สายพันธุ์ตัวแทน *L. mesembrius* SWU-NGP 14-6 เมื่อใช้ความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 150 rpm กราฟสีเขียว (■) Biomass production (g/L), (■) Lipid production (g/L), (■) Lipid content (%) ตัวอักษรแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยใช้สถิติ วิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOWA) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้สถิติ Tukey test เมื่อ $p < 0.05$ โดยมีจำนวนการทดลอง 3 ซ้ำ (n=3) 69

| | |
|---|----|
| ภาพประกอบ 17 ผลของสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ชั้นตอนของยีสต์สายพันธุ์ตัวแทน <i>L. mesembrius</i> SWU-NGP 14-6 เมื่อใช้ความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 200 rpm กราฟสี่เหลี่ยม (■) Biomass production (g/L), (■) Lipid production (g/L), (■) Lipid content (%) ตัวอักษรแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยใช้สถิติ วิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้สถิติ Tukey test เมื่อ $p < 0.05$ โดยมีจำนวนการทดลอง 3 ซ้ำ ($n=3$) | 70 |
| ภาพประกอบ 18 องค์ประกอบของกรดไขมันที่ผลิตโดย <i>L. mesembrius</i> SWU-NGP 14-6 ในการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ชั้นตอนภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน | 73 |



บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ปัจจุบันความต้องการพลังงานทางเลือกชีวภาพ (green bio-based energy) มีแนวโน้มสูงขึ้น ประกอบไปด้วย พลังงานชีวภาพ ได้แก่ ไบโอดีเซล รวมถึง การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับน้ำมันหลายอย่าง^(1, 2) ส่งผลให้มีความต้องการวัตถุดิบในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพสูงขึ้น เช่น พืชน้ำมัน เป็นต้น⁽³⁾ อย่างไรก็ตาม ความต้องการน้ำมันที่เพิ่มขึ้นอาจทำให้ราคาพืชอาหารสูงขึ้น โดยน้ำมันที่ได้จากพืชจัดเป็นวัตถุดิบที่ไม่ยั่งยืนสำหรับผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ เนื่องจากพืชเหล่านี้ยังสามารถนำไปใช้เป็นอาหารสำหรับบริโภคได้อีกด้วย ทำให้มีความต้องการทางการตลาดที่สูง^(4, 5) โดยไม่สามารถควบคุมราคาที่ผันผวนได้ เมื่อพืชน้ำมันมีปริมาณน้อยกว่าความต้องการในท้องตลาด ก็จะส่งผลให้ราคาของพลังงานรวมถึงอาหารเพิ่มสูงขึ้น ในทางกลับกัน เมื่อพืชน้ำมันมีปริมาณมากกว่าความต้องการในท้องตลาดก็ส่งผลให้ราคาพืชน้ำมันตกต่ำเกษตรกรขาดรายได้ไม่คุ้มกับเงินที่ลงทุน เป็นต้น ดังนั้นการหาวัตถุดิบสำหรับใช้เป็นพลังงานทางเลือกที่ยั่งยืน จะช่วยบรรเทาปัญหาที่เกิดจากความต้องการพลังงานชีวภาพจากพืชน้ำมันในท้องตลาดได้ ซึ่ง 1 ใน วัตถุดิบสำหรับผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ น้ำมันเซลล์เดี่ยว หรือ single cell oil (SCO) ที่ผลิตได้จากยีสต์สะสมไขมัน (oleaginous yeast) มีศักยภาพที่จะใช้ผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพแทนพืชน้ำมันได้^(1, 6-8)

ยีสต์สะสมไขมัน มีความสามารถในการสะสมไขมันได้มากกว่าร้อยละ 20 ของน้ำหนักเซลล์⁽⁹⁾ ซึ่งยีสต์เหล่านี้มีแนวโน้มที่จะถูกใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ หรือ ไบโอดีเซลได้ เนื่องจากองค์ประกอบของกรดไขมันที่ยีสต์เหล่านี้ผลิตมีความคล้ายคลึงกับองค์ประกอบของน้ำมันจากพืช⁽¹⁰⁾ โดยทั่วไปยีสต์เหล่านี้จะสะสมไขมันภายใต้สภาวะที่มีแหล่งไนโตรเจนจำกัด (nitrogen-limited condition) ที่มีค่าอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่สูง (high C/N ratio) ปัจจุบันมียีสต์เพียง 11% จาก 1,600 สายพันธุ์ ที่มีคุณสมบัติเป็นยีสต์สะสมไขมัน⁽¹⁰⁻¹²⁾ ซึ่งประกอบไปด้วย ยีสต์ 32 สกุล ใน ไฟลัม Basidiomycota ได้แก่ *Cutaneotrichosporon curvatum*, *Rhodospordiobolus fluvialis*, *Rhodotorula toruloides*, *Rhodotorula glutinis* และ *Sporidiobolus* อีก 27 สกุล ใน ไฟลัม Ascomycota ได้แก่ *Candida tropicalis*, *Candida utilis*, *Kodamaea ohmeri*, *Lipomyces starkeyi*, *Lipomyces lipofer* และ *Yarrowia lipolytica*⁽¹²⁾

ปัจจุบันยีสต์สกุล *Lipomyces* หลายสปีชีส์ เป็นที่ยอมรับเนื่องจากมีศักยภาพในการผลิตและสะสมไขมันได้มากกว่าร้อยละ 60 ของน้ำหนักเซลล์ และยังสามารถใช้แหล่งอาหารได้หลากหลาย⁽¹³⁻¹⁵⁾ โดยส่วนมากยีสต์ในสกุล *Lipomyces* สามารถตัดแยกได้จากดินตามธรรมชาติ⁽¹⁶⁻¹⁸⁾ ดินถือเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของยีสต์ในสภาพแวดล้อมใต้ดิน สายพันธุ์ยีสต์ในดินมีความแตกต่างทางอนุกรมวิธานจากสายพันธุ์ยีสต์ที่พบอยู่บนพื้นดินหรือผิวดิน โดยยีสต์เหล่านี้ได้ทำการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่หลากหลายตามพื้นที่อาศัยในแหล่งธรรมชาติ⁽¹⁹⁾ รวมถึงยีสต์ที่มีความสามารถในการสะสมไขมันได้สูงก็สามารถตัดแยกได้จากดิน ดังนั้นการตัดแยกยีสต์จากดินสามารถเพิ่มโอกาสในการหายีสต์สายพันธุ์ใหม่ (novel yeast species) และ ยีสต์สะสมไขมันสายพันธุ์ใหม่ (novel oleaginous yeast species) ได้อีกด้วย

ในประเทศไทยมีหลายรายงานเกี่ยวกับการค้นพบยีสต์สะสมไขมันสายพันธุ์ใหม่ เช่น *Pichia manshurica*, *Rh. fluvialis*, *Rhodotorula sphaerocarpa* และ *Saitozyma podzolica*⁽²⁰⁻²²⁾ อย่างไรก็ตามความสามารถในการผลิตไขมันของยีสต์จะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ไม่ได้ขึ้นอยู่กับสกุลหรือสปีชีส์^(20, 21, 23, 24) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจในการคัดแยกและจัดจำแนกยีสต์สะสมไขมันสายพันธุ์ใหม่ๆ รวมถึงคัดเลือกยีสต์สะสมไขมันได้สูง เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตไขมัน กระบวนการผลิตไขมันแบบ 2 ขั้นตอน (two-stage fermentation) เป็นกระบวนการที่ช่วยส่งเสริมและเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตและสะสมไขมันของยีสต์สะสมไขมัน^(25, 26) โดยในขั้นแรก (first stage) ยีสต์จะถูกเลี้ยงในอาหารที่มีค่าอัตราส่วน C/N ที่ต่ำ (nitrogen rich medium) เพื่อส่งเสริมให้ยีสต์ใช้สารอาหารสำหรับการเพิ่มจำนวนให้ได้ปริมาณมาก จากนั้นเซลล์ยีสต์ทั้งหมดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงขั้นแรกจะถูกถ่ายลงในอาหารที่มีค่าอัตราส่วน C/N ที่สูง (nitrogen-limited medium) เพื่อส่งเสริมให้ยีสต์ใช้สารอาหารสำหรับการผลิตและสะสมไขมัน⁽²⁷⁻²⁹⁾

ดังนั้นจุดมุ่งหมายของการศึกษานี้ คือ เพื่อคัดแยกและจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์สะสมไขมัน โดยคัดแยกตัวอย่างยีสต์จากดินป่าบนภูเขาทางภาคเหนือของประเทศไทย และประเมินคุณภาพการสะสมไขมันของยีสต์ อีกทั้งคัดเลือกหายีสต์สายพันธุ์ตัวแทนเพื่อนำไปพัฒนาความสามารถในการสะสมไขมันด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน (two-stage fermentation) รวมถึงศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันที่ยีสต์ผลิตได้

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายของยีสต์สะสมไขมันที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างดิน จังหวัด เชียงราย
2. เพื่อพัฒนากระบวนการผลิตไขมันจากยีสต์สะสมไขมันที่คัดเลือก

ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาความหลากหลายของยีสต์สะสมไขมันที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างดินในจังหวัด เชียงราย ทำการคัดเลือกยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างดิน 2 ขั้นตอน คือศึกษาการสะสมไขมันภายใน ยีสต์เซลล์ด้วยการทำ wet mount และย้อมสี Nile Red และส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ ฟลูออเรสเซนซ์ จากนั้นศึกษาการผลิตไขมันโดยเพาะเลี้ยงเชื้อในระบับพลาสติกแล้วสกัดไขมันที่ได้ จากเซลล์ยีสต์เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไขมันทั้งหมดที่ผลิตได้ และจัดจำแนกยีสต์สะสมไขมันที่ คัดเลือกได้โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 domain ของ large subunit (LSU) 26S rRNA gene จากนั้นนำยีสต์ที่คัดเลือกได้ว่ามี ศักยภาพสูงที่สุดในการผลิตไขมันไปศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการผลิตไขมันด้วยวิธีการ เพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน โดยจะวิเคราะห์ปริมาณของน้ำหนักรเซลล์แห้งและปริมาณของไขมันที่ เชื้อสามารถผลิตได้ อีกทั้งยังวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันที่เชื้อสามารถผลิตได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ข้อมูลความหลากหลายของยีสต์สะสมไขมันสายพันธุ์ไทยที่มีความสามารถในการ สะสมไขมัน ที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างดินในจังหวัดเชียงราย
2. แหล่งน้ำมันทางเลือกจากจุลินทรีย์เพื่อการพัฒนาในอุตสาหกรรมน้ำมันหรือ ผลิตภัณฑ์อาหารเสริม

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ประวัติและความเป็นมาของยีสต์สะสมไขมัน

จุลินทรีย์ (microorganisms) ทั่วไป ไม่ว่าจะเป็น แบคทีเรีย (bacteria), ยีสต์ (yeast) หรือ รา (mold) มักจะสามารถสะสมไขมันได้ประมาณ ร้อยละ 6 ถึง 8 ของน้ำหนักเซลล์⁽³⁰⁾ แต่จุลินทรีย์บางประเภท ไม่ว่าจะเป็น ยูคาริโอต (eukaryotic microorganism) เช่น ยีสต์, รา และสาหร่าย รวมถึง โพรคาริโอต (prokaryote microorganism) ได้แก่ แบคทีเรีย จะสามารถสะสมไขมันภายในเซลล์ได้มากกว่าร้อยละ 20 ของน้ำหนักเซลล์ จุลินทรีย์เหล่านี้จะถูกเรียกว่า จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสะสมไขมันได้สูง (oleaginous microorganism) โดย รูปแบบของไขมันหรือ ลิพิด ที่จุลินทรีย์เหล่านี้สร้างขึ้นจะอยู่ในรูปของ ไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol) จะถูกเก็บไว้ภายในลิพิดบอดี (lipid body) หรือ บางครั้งก็สามารถเรียกว่า lipid droplet ที่เก็บไว้ในเซลล์ได้เช่นกัน โดยหน้าที่ของออร์แกเนลล์เหล่านี้จะช่วยเป็นแหล่งคาร์บอน (carbon) หรือ แหล่งพลังงานสำรอง (energy storage) ให้กับเซลล์ในสภาวะแวดล้อมที่ขาดสารอาหาร⁽³¹⁾

น้ำมันจุลินทรีย์ (microbial oils) หรือ บางครั้งก็ถูกเรียกว่า น้ำมันเซลล์เดี่ยว (single cell oils: SCOs) ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์สะสมไขมัน ซึ่งน้ำมันเหล่านี้ไม่เพียงเป็นแหล่งน้ำมันสำหรับการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพเท่านั้น แต่ยังเป็นแหล่งอาหารของมนุษย์และสัตว์ด้วย ยีสต์สะสมไขมัน (oleaginous yeast) มักถูกรายงานว่ามีศักยภาพในการผลิตไขมันในเชิงพาณิชย์มากกว่าจุลินทรีย์สะสมไขมันชนิดอื่น เนื่องจาก เจริญเติบโตได้เร็ว, มีปริมาณไขมันในเซลล์ที่สูง (lipid content) และการขยายระดับการผลิตทำได้ง่าย กระบวนการผลิตไขมันจากยีสต์ถูก อีทติ้งค์ประกอบของกรดไขมันที่ผลิตได้ยังมีความคล้ายคลึงกับองค์ประกอบของกรดไขมันที่ผลิตได้จากพืช⁽¹²⁾

การค้นพบยีสต์สะสมไขมันครั้งแรกถูกรายงานในปี ค.ศ. 1878 โดย Nägeli C และ Loew O⁽³²⁾ ในปี ค.ศ. 1895 ยีสต์ *Torula pulcherrima* (ชื่อปัจจุบัน : *Metschnikowia pulcherrima*) ถูกค้นพบว่าสามารถสร้าง oil droplets⁽³³⁾ ในปี ค.ศ. 1973 เริ่มมีโรงงานในประเทศเยอรมัน เริ่มผลิตยีสต์ไขมันในระดับอุตสาหกรรม โดยมีค่า lipid content ประมาณ 20% ถึง 30% ของน้ำหนักเซลล์ และ พบว่ายีสต์ *M. reukaufii* ที่สามารถเจริญในอาหารที่มีโมลาส (molasses) และ เวย์ (whey) โดยมีค่า lipid content เท่ากับ 25.3% ของน้ำหนักเซลล์ ในไม่กี่ปีต่อมา หลายโรงงานในประเทศเยอรมัน ได้ทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ *Geotrichum candidum* (มีค่า lipid content % เท่ากับ 20% ของน้ำหนักเซลล์) พบว่าให้ผลผลิตไขมัน ได้ 60 ตัน/ปี โดยใช้ เวย์ (whey) (ซึ่งมูลค่าของเวย์ในสมัยนั้นไม่มีมีราคาแพงเหมือนในปัจจุบัน คนในสมัยก่อนคิดว่า

เวย์เป็นกากเสียเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมนม) และ มวลชีวภาพลิกโนเซลลูโลส ไฮโดรไลเซต (lignocellulose hydrolysate) โดยอุตสาหกรรมที่ใช้ยีสต์ในการผลิตไขมันในประเทศเยอรมัน ช่วงปลายปี ค.ศ. 1800s ถึง ต้นปี ค.ศ. 1900s จะเป็นในช่วงที่มีสงครามโลกครั้งที่ 1 และ 2 จะใช้ไขมันที่ได้ในการดำรงชีวิต เป็นอาหารสำหรับคนและสัตว์ รวมถึงเป็นเชื้อเพลิง^(34, 35) หลังจากจบสงครามโลกครั้งที่ 2 หลายทศวรรษต่อมา ได้มีการสร้างถังหมักแบบกวน (stirrer bioreactor tank) ซึ่งนำไปสู่ความก้าวหน้าของการผลิตไขมันจากยีสต์ ในปี ค.ศ. 1971 มีการวิจัยและพัฒนา ยีสต์ *Yarrowia lipolytica* ซึ่งเป็นยีสต์ที่มีศักยภาพในการผลิตไขมัน สำหรับผลิต Single cell protein (SCP) รวมถึง Cocoa butter equivalent: CBE (เป็นไขมันที่ยีสต์ผลิตได้โดยมีองค์ประกอบคล้ายกับไขมันจากต้นโกโก้) สามารถผลิตได้ถึง 100,000 ตัน/ปี สำหรับ SCP และ 10,000 ตัน/ปี สำหรับ CBE โดยใช้ถังหมักแบบอุตสาหกรรมในการเพาะเลี้ยง^(12, 36)

ในช่วงปี ค.ศ. 1990 – 2000 ความรู้และเทคโนโลยีเกี่ยวกับการปรับปรุงพันธุกรรม (genetic engineering) มีการเติบโตแบบก้าวกระโดดและถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์สะสมไขมัน *Yarrowia lipolytica* ให้มีความสามารถในการผลิตไขมันได้สูง เท่ากับร้อยละ 35 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง อีกทั้งสามารถปรับปรุงให้ยีสต์สร้างกรดไขมัน eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5) โดยมีปริมาณถึงร้อยละ 15 ของไขมันทั้งหมดที่ผลิตได้ ซึ่งกรดไขมัน eicosapentaenoic เป็น 1 ใน 4 ของกรดไขมันที่จำเป็น ที่สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์ โดยกรดไขมันชนิดนี้ถูกผลิตโดยบริษัท CPKelco (Atlanta, USA) ซึ่งถูกใช้สำหรับเป็นอาหารเสริมสำหรับคน และ เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงปลาแซลมอน เพื่อส่งเสริมให้ตัวปลาสะสมกรดไขมันที่จำเป็นในร่างกาย อย่างไรก็ตาม กรดไขมัน eicosapentaenoic ถูกรับรองความปลอดภัยจาก Generally Recognized As Safe (GRAS) by the U.S. Food and Drug Administration (GRN00035) อย่างไรก็ตามก็มีคำวิจารณ์จากผู้บริโภคที่พบสารตกค้างเช่น เฮกเซน (hexane) และ กรดไขมันชนิดนี้ถูกผลิตจากสิ่งมีชีวิตที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรม (GMO)⁽³⁷⁾

เมื่อเข้าสู่การวิจัยในศตวรรษที่ 21 มีความพยายามอย่างมากในการพัฒนาสายพันธุ์ยีสต์เพื่อใช้ในการผลิตเชื้อเพลิงทางชีวภาพเพื่อใช้ทดแทนน้ำมันปาล์มและน้ำมันถั่วเหลือง อย่างไรก็ตามยีสต์สะสมไขมันยังไม่ได้รับความสนใจเท่าที่ควร เนื่องจากยังมีปัญหาด้านของแหล่งอาหารและค่าใช้จ่ายในการเพาะเลี้ยงที่สูง แต่ในปี ค.ศ. 2010 ยีสต์สะสมไขมันถูกเสนอให้ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล จึงเป็นผลให้เกิดการผลักดันงานวิจัยเกี่ยวกับน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์สะสมไขมัน โดย ยีสต์สะสมไขมัน *Y. lipolytica* ถูกนำมาใช้เป็นเครื่องมือทางพันธุกรรม (genetic tools) สำหรับการศึกษาการผลิตไขมัน เนื่องจาก มีการศึกษาจีโนมทั้งหมดของยีสต์สายพันธุ์นี้ รายงาน

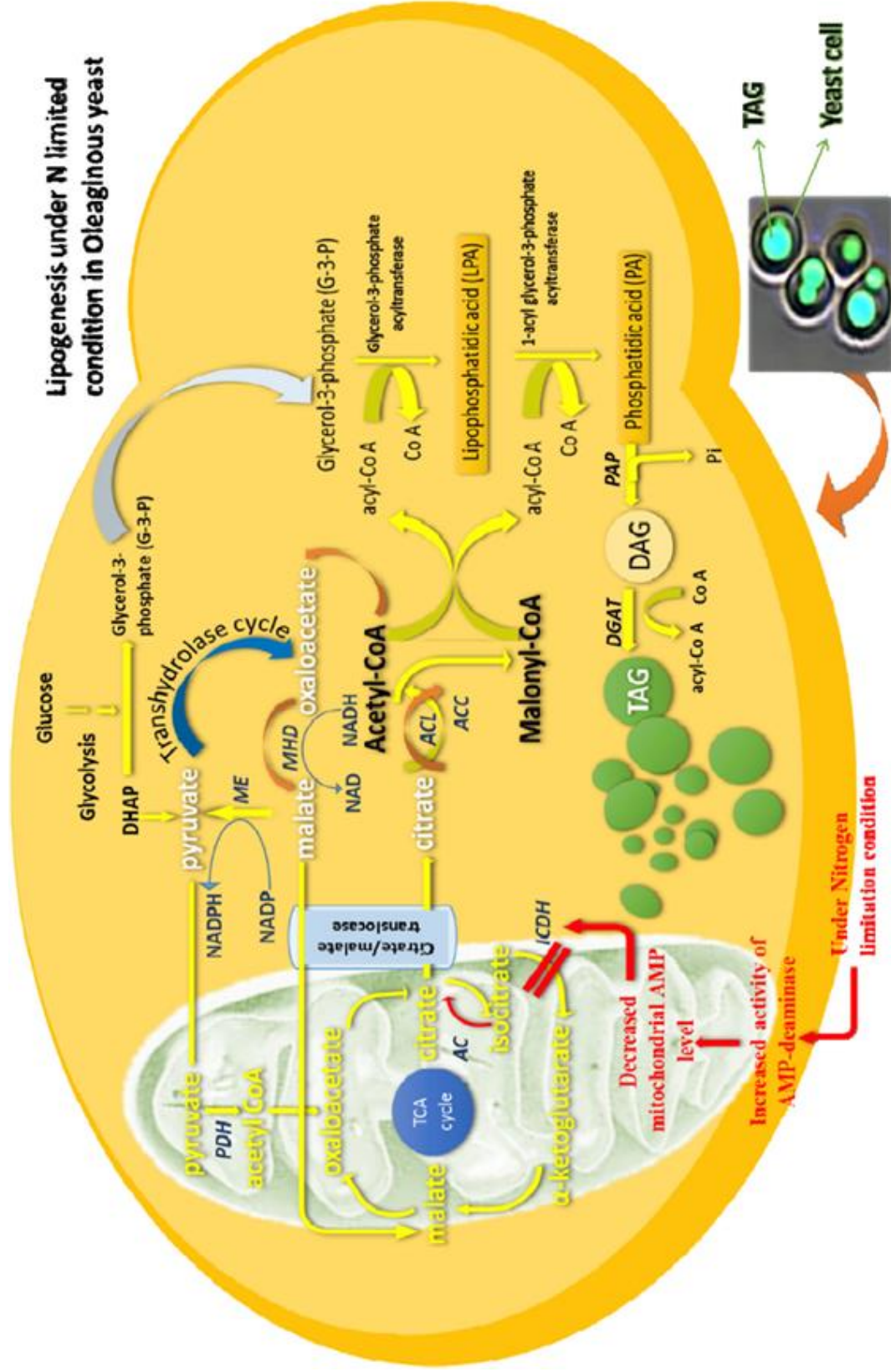
ของ Huang XF และคณะ (2018) พบว่า ยีสต์สะสมไขมัน *Y. lipolytica* ที่ถูกปรับปรุงพันธุกรรม สามารถผลิตน้ำมันโดยปล่อยออกนอกเซลล์สู่อาหารเหลว acetate ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกันกับ *C. oleagnosus*⁽³⁸⁾ รายงานของ Ledesma-Amaro R และคณะ (2016) พบว่า พบว่า ยีสต์สะสมไขมัน *Y. lipolytica* ที่ถูกปรับปรุงพันธุกรรม สามารถผลิตไขมันได้สูงที่สุด โดยมีค่า lipid content (%) เท่ากับ 120.4% ของน้ำหนักเซลล์⁽³⁹⁾ รายงานของ Qiao K และคณะ (2017) พบว่า ยีสต์สะสมไขมัน *Y. lipolytica* ที่ถูกปรับปรุงพันธุกรรม สามารถผลิตไขมันโดยมีค่า lipid productivity เท่ากับ 1.2 g/L/h โดยกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ (fed-batch fermentation)⁽⁴⁰⁾ เป็นต้น

2. กระบวนการสังเคราะห์ไขมันของยีสต์สะสมไขมันภายใต้สภาวะแหล่งไนโตรเจนจำกัด

กระบวนการสะสมไขมันเป็นกระบวนการพื้นฐานของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด แต่จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตและสะสมไขมันได้มากกว่า 20% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง จะถูกเรียกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตและสะสมไขมันได้สูง (oleaginous microorganisms) โดยความพิเศษของยีสต์สะสมไขมัน (oleaginous yeast) มีกลไกในการสร้างไขมันในยีสต์สะสมไขมัน คือ de novo fatty acid biosynthesis pathway จะอาศัยการสะสมซิเตรต (citrate) ที่เกิดในวัฏจักรเครบส์ (Krebs's cycle) ภายในไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) เป็นสารตั้งต้นหลักในผลิตไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol) คือ มีเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์ไขมัน คือ AMP-deaminase ซึ่งยีสต์ทั่วไปไม่มีเอนไซม์ชนิดนี้ โดย เอนไซม์ชนิดนี้จะทำงานทันทีต่อเมื่อยีสต์ อยู่ในสภาวะที่ปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่จำกัด จำกัด (nitrogen limited condition) แต่มีปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เพียงพอ

เริ่มจากในสภาวะที่มีปริมาณของแหล่งไนโตรเจนจำกัด (nitrogen limited condition) จะไปกระตุ้นเอนไซม์ อะดีโนซีนโมโนฟอสเฟตดีอะมิเนส (adenosine Monophosphate deaminase; AMP-deaminase) ทำให้ลดปริมาณของ AMP ในไมโทคอนเดรีย และเมื่อปริมาณ AMP ลดลง AMP- deaminase จะเปลี่ยนไปเป็น อิโนซีนโมโนฟอสเฟตดีอะมิเนส (Inosine monophosphate deaminase; IMP-deaminase) และ แอมโมเนีย (ammonia) โดยแอมโมเนีย จะใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำรองของเซลล์ยีสต์ในสภาวะที่แหล่งไนโตรเจนจำกัด ซึ่งเอนไซม์ IMP-deaminase ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ไอโซซิเทรตดีไฮโดรจีเนส (isocitrate dehydrogenase) ซึ่งทำหน้าที่ในการเปลี่ยน ไอโซซิเทรต (Isocitrate) ไปเป็น แอลฟา-คีโต กลูตาเรท (α -ketoglutarate) ใน Krebs's cycle จึงทำให้ isocitrate ไม่สามารถเปลี่ยนไปเป็น α -Ketoglutarate ได้และ isocitrate ถูกเอนไซม์ อะโคนิเทส (aconitase) เปลี่ยนไปเป็น ซิเตรต

(citrate) จนกระทั่งมีปริมาณ citrate สะสมภายในไมโทคอนเดรียจำนวนมากและถูกนำออกไปสู่ไซโทพลาสซึมผ่าน ซีเทรต-มาเลต ทรานสโลเคส (citrate-malate translocase) หลังจากนั้น citrate จะถูกเอนไซม์ เอทีพี-ซีเทรต ไลเอส (ATP-citrate lyase) ย่อยกลายเป็น ออกซาโลแอซิเตต (oxaloacetate) และ อะซีทิล-โคเอ (acetyl CoA) จากนั้น acetyl CoA จะเปลี่ยนไปเป็น เอซิล-โคเอ (acyl CoA) แล้วจะไปรวมกับ กลีเซอรอลดีไฮด์-ไตร-ฟอสเฟต (glyceraldehyde triphosphate; G3P) ด้วยเอนไซม์ กลีเซอรอลดีไฮด์-ไตร-ฟอสเฟต เอซิลทรานเฟอเรส (glyceraldehyde triphosphate acyltransferase) กลายเป็น ไลโซฟอสฟาติค แอซิด (lysophosphatidic acid) จากนั้น lysophosphatidic acid ก็จะรวมกับ acyl CoA ด้วยเอนไซม์ เอซิล กลีเซอรอลดีไฮด์-ไตร-ฟอสเฟต เอซิลทรานเฟอเรส (glyceraldehyde triphosphate acyltransferase) เป็น ฟอสฟาติค แอซิด (phosphatidic acid) จากนั้น phosphatidic acid จะถูกเอนไซม์ ฟอสฟาติค แอซิด ฟอสฟาเทส (phosphatidic acid phosphatase) เปลี่ยนไปเป็น ไดเอซิลกลีเซอรอล (diacylglycerol) จากนั้นจะมี acetyl CoA มารวมด้วยโดยเอนไซม์ ไดกลีเซอไรด์ เอซิลทรานเฟอเรส (diglyceride acyl transferase) จนกลายเป็น ไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol) จากนั้นก็จะมี การต่อสายของไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol) อย่างต่อเนื่อง จนถึงสุดโดยมีจำนวนคาร์บอนในสายของกรดไขมันเท่ากับ 16 ถึง 18 อะตอม สะสมภายในลิพิดบอดีของยีสต์สะสมไขมัน⁽¹⁾ ดังแสดงในภาพประกอบ 1



ภาพประกอบ 1 กลไกการสังเคราะห์ไขมันของยีสต์สะสมไขมันในสภาวะที่มีแหล่งไนโตรเจนจำกัด⁽¹⁾

3. สายพันธุ์ของยีสต์สะสมไขมันที่โดดเด่น

ปัจจุบันมียีสต์เพียง 160 สปีชีส์ จากทั้งหมด 1,600 สปีชีส์ (well-known species) ที่มีความสามารถในการสะสมไขมันได้มากกว่าร้อยละ 20 ของน้ำหนักเซลล์ หรือ มีเพียงแค่อ้อยละ 10 เท่านั้นที่เป็นยีสต์สะสมไขมัน โดยสปีชีส์ของยีสต์สะสมไขมันที่เคยมีรายงานว่ามีศักยภาพในการผลิตและสะสมไขมันได้สูง ประกอบไปด้วย *Y. lipolytica*, *R. toruloides*, *C. oleaginosus*, *L. starkeyi* และ *R. glutini* เป็นต้น ซึ่งบางสายพันธุ์ของยีสต์เหล่านี้สามารถสะสมไขมันได้มากกว่าร้อยละ 50 ของน้ำหนักเซลล์ โดยยีสต์สะสมไขมันที่โดดเด่นและมีแนวโน้มที่จะสามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล

3.1. *Yarrowia lipolytica*

ยีสต์ *Yarrowia lipolytica* โดยมีชื่อก่อนหน้านี้นี้ ได้แก่ *Candida lipolytica*, *Saccharomycopsis lipolytica* และ *Endomycopsis lipolytica*⁽⁴¹⁾ โดยยีสต์สายพันธุ์นี้สามารถค้นพบได้ในธรรมชาติที่หลากหลาย อย่างไรก็ตามเป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไป *Y. lipolytica* มักจะพบในผลิตภัณฑ์พวกไขมัน, แหล่งอาหารที่อุดมไปด้วยโปรตีน หรือ ผลิตภัณฑ์ที่ทำจากนม เช่น ชีส เป็นต้น⁽⁴²⁾ โดยความสามารถของยีสต์ *Y. lipolytica* ที่ต่างจากยีสต์สะสมไขมันชนิดอื่นคือ สามารถที่จะใช้สารตั้งต้นที่เป็นสารจำพวกไม่ชอบน้ำ (hydrophobic substrate) เช่น น้ำมัน หรือ ไขมันในระบบบำบัดน้ำเสีย เป็นต้น โดยผ่านกระบวนการ *ex novo* fatty acid biosynthesis pathway อย่างไรก็ตามมีบางสายพันธุ์เท่านั้นของ *Y. lipolytica* ที่สามารถใช้ *de novo* fatty acid biosynthesis pathway ในการสะสมไขมันได้มากกว่าร้อยละ 20 ของน้ำหนักเซลล์⁽⁴³⁾ ในสถานะที่มีแหล่งไนโตรเจนจำกัด (nitrogen-limited condition) ยีสต์ *Y. lipolytica* ถูกรายงานว่าไม่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้บางประเภท เช่น galactose, sucrose, starch (แป้ง) และ Inulin เป็นต้น⁽⁴⁴⁾ อย่างไรก็ตามเมื่อถูกเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส (glucose) หรือแหล่งคาร์บอนที่มีองค์ประกอบใกล้เคียง ยีสต์ *Y. lipolytica* จะสามารถสะสมไขมันจำพวก linoleic acid (โอเมกา 6) และ alpha-linoleic acid (โอเมกา 3, 6 และ 9) ได้ปริมาณสูง ซึ่งเป็นกรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกาย อย่างไรก็ตามปริมาณของกรดไขมัน oleic acid จะลดลง^(43, 45) และยังมีอีกหลายงานวิจัยที่ปรับปรุงพันธุกรรมของยีสต์ *Y. lipolytica* ให้สามารถผลิตไขมันได้สูงถึง 70% น้ำหนักเซลล์แห้ง⁽¹²⁾

3.2. *Rhodotorula toruloides*

ยีสต์ *Rhodotorula toruloides* ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1944 ซึ่งยีสต์สายพันธุ์นี้เคยถูกเรียกว่า *Rhodosporidium toruloides*, *Rhodotorula rubescens* หรือ

Rhodotorula gracilis ซึ่งยีสต์ *R. toruloides* เป็นที่รู้จักกันดีเนื่องจากมีความสามารถในการผลิตไขมันได้สูงรวมถึง แคโรทีนอยด์ (carotenoid) และ เอนไซม์ต่างๆ ลักษณะเด่นของยีสต์ *R. toruloides* คือมีโคไลนีนเป็นสีแดง เนื่องจากสามารถผลิต carotenoid ได้ โดยสายพันธุ์ตัวแทนที่สามารถผลิตไขมันได้มากกว่าร้อยละ 25 ของน้ำหนักเซลล์ได้แก่ *R. toruloides* DSM 4444 และ *R. toruloides* AS 2.1389 ยีสต์ *R. toruloides* สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลาย ไม่ว่าจะเป็น น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) หรือ สารในกลุ่มให้ความหวานแทนน้ำตาล (polyols) รวมถึงยังสามารถใช้กลีเซอรอล (glycerol) เป็นแหล่งคาร์บอนได้อีกด้วย รายงานของ Bommarreddy RR และคณะ (2015) พบว่า เมื่อใช้กลีเซอรอลดิบ (crude glycerol) ในการเพาะเลี้ยง *R. toruloides* สามารถผลิตไขมันได้สูง โดยมีค่า lipid yield เท่ากับ 0.27 g/g⁽⁴⁶⁾ อย่างไรก็ตามผลผลิตไขมันจะลดลงเมื่อมีสารยับยั้งการเจริญ (Inhibitor) ของเชื้อ ซึ่งมักพบในอาหารจำพวก ลิกโนเซลลูโลสไฮโดรไลเซต (lignocellulose hydrolysate) รายงานของ Wiebe MG และคณะ (2012) พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยง *R. toruloides* ในอาหารผสมที่มี น้ำตาล 3 ชนิด ได้แก่ glucose, xylose และ arabinose พบว่า เมื่อน้ำตาล arabinose ในส่วนผสมของอาหารส่งผลให้ยีสต์ผลิตไขมันได้ลดลงรวมถึง ถ้ามีสารยับยั้ง (Inhibitor) ก็ส่งผลกระทบต่อการเจริญและการสะสมไขมันของเชื้อ⁽⁴⁷⁾ อย่างไรก็ตาม การปรับปรุงพันธุกรรมจะช่วยแก้ไขปัญหานี้ได้ ส่งผลให้ยีสต์ ทดต่อสารยับยั้งที่เกิดจากขั้นตอนการปรับสภาพได้ดีขึ้น⁽¹²⁾

3.3. *Cutaneotrichosporon oleaginosus*

ยีสต์ *Cutaneotrichosporon oleaginosus* หรือ อีกชื่อหนึ่งที่รู้จักกันดี คือ *Candida curvatus* และ *Cryptococcus curvatus* (ชื่อเก่า)⁽⁴⁸⁾ และในปัจจุบันยีสต์ *Apiotrichum curvatum*, *Trichosporon cutaneum* และ *Trichosporon oleaginosus* ถูกเปลี่ยนชื่อใหม่ เป็น *C. oleaginosus*⁽⁴⁹⁾ ยีสต์สะสมไขมันสายพันธุ์นี้ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1978 ซึ่งสามารถคัดแยกได้จากพื้นและท่อระบายน้ำในฟาร์มนม แสดงให้เห็นว่ายีสต์สายพันธุ์นี้สามารถสร้าง single cell protein: SCP และ Single cell oil: SCO จาก เวย์ (whey)⁽⁵⁰⁾ *C. oleaginosus* มีความสามารถที่เจริญได้รวดเร็ว และสามารถสะสมไขมันได้สูง อีกทั้งยังใช้แหล่งคาร์บอนในการเจริญได้หลายชนิด โดยมีหลายรายงานพบว่า *C. oleaginosus* สามารถใช้ xylose, oligosaccharide, fatty acid, volatile fatty acid (VFA), whey และ Lactose ได้⁽¹²⁾ รวมถึงยังทนต่อสารยับยั้ง (Inhibitor) ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการปรับสภาพมวลชีวภาพลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose hydrolysate) รายงานของ Zhang J และคณะ (2011) เพาะเลี้ยง *C. oleaginosus* แบบกึ่งกะ (fed-batch fermentation) พบว่าได้ปริมาณเซลล์เท่ากับ 104 g/L และ ได้ปริมาณไขมัน (lipid content)

เท่ากับ 87.4% ของน้ำหนักเซลล์⁽⁵¹⁾ จะเห็นได้ว่า *C. oleagnosus* เป็นยีสต์สะสมไขมันมีศักยภาพในการใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเชื้อเพลิงทางชีวภาพ⁽¹²⁾

3.4. *Lipomyces starkeyi*

ยีสต์ *Lipomyces starkeyi* เป็นหนึ่งในยีสต์สะสมไขมันที่มีความโดดเด่นในการผลิตน้ำมันได้สูง ถูกค้นพบครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1946⁽⁵²⁾ ยีสต์ในครอบครัว Lipomycetaceae ถูกพบว่ามีความสามารถในการผลิตไขมันได้สูง และ *L. starkeyi* ถือเป็นสายพันธุ์ที่มีคุณค่าทาง biotechnology สูงที่สุด อย่างไรก็ตาม *L. starkeyi* เป็นที่รู้จักกันดีอยู่ว่ามีอัตราการเจริญเติบโตที่ต่ำ แต่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่ผสมกันในไฮโดรไลเซต เช่น xylose, glucose, cellobiose และ acetate เป็นต้น แต่ไม่สามารถใช้ arabinose ได้ อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าจะสามารถใช้แหล่งคาร์บอนในไฮโดรไลเซตได้ แต่เมื่อมีสารยับยั้ง (Inhibitor) ความเข้มข้นสูง ก็จะส่งผลกระทบต่ออัตราการเจริญของยีสต์ดังนั้นการจะแก้ไขปัญหานี้จึงต้องนำไฮโดรไลเซตที่ได้มาปรับสภาพ (detoxification) หรือ เจือจางเพื่อที่จะส่งเสริมการเจริญ และผลิตไขมัน ของยีสต์ *L. starkeyi*^(53, 54) รายงานของ Lin J และคณะ (2011) สามารถผลิตเซลล์ของ *L. starkeyi* ได้สูงสุด เท่ากับ 104.6 g/L และได้ ผลผลิตไขมันต่อหน่วยเวลา (Lipid productivity) เท่ากับ 0.79 g/L/h ภายใต้กระบวนการหมักแบบ 2 ขั้นตอน (two-stage fermentation)⁽¹⁵⁾

3.5. *Rhodotorula glutinis*

ยีสต์ *Rhodotorula glutinis* เป็นอีกสปีชีส์หนึ่งของยีสต์สกุล *Rhodotorula* ซึ่งมีความสามารถในการผลิตไขมันได้สูง และ ยังสามารถผลิตเอนไซม์ที่สำคัญทางการค้าได้ โดยในก่อนหน้า *R. glutinis* รู้จักในชื่อ *Rhodotorula terrea*, *Torula glutinis*, *Saccharomyces glutinis* หรือ *Cryptococcus glutinis* (ชื่อเก่า) ซึ่งถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1943⁽⁵⁵⁾ มีหลายงานวิจัยที่นำเสนอศักยภาพของยีสต์ *Rhodotorula glutinis* ในการผลิตไขมัน รวมถึงใช้เป็นสารควบคุมศัตรูพืชในธรรมชาติ⁽⁵⁶⁾ รายงานของ Spier F และคณะ (2015) เพาะเลี้ยง *R. glutinis* ได้ผลผลิตไขมัน (Lipid yield) เท่ากับ 0.19 g/g เมื่อเลี้ยงในอาหารกลีเซอรอลดิบ (crude glycerol)⁽⁵⁷⁾ ยิ่งไปกว่านั้นยังมีหลายงานวิจัยที่รายงานว่า *R. glutinis* สามารถเจริญโดยใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด เช่น กากน้ำตาลโมลาส (molasses), syrup, sucrose, น้ำตาล C5 เช่น xylose หรือน้ำตาลผสมในไฮโดรไลเซตเป็นต้น⁽¹²⁾

3.6. *Metschnikowia pulcherrima*

ยีสต์ *Metschnikowia pulcherrima* สามารถตัดแยกได้จาก ดอกไม้, ผลไม้ หรือน้ำหวานจากเกสร *M. pulcherrima* ถูกจัดจำแนกอนุกรมวิธานใหม่ (re-classification) โดยเคยมีชื่อเก่าหลายชื่อ ได้แก่ *Candida pulcherrima*, *Torula pulcherrima*, *Torulopsis pulcherrima*,

Rhodotorula pulcherrima, *Saccharomyces pulcherrimus* และ *Cryptococcus castellanii* รายงานของ Abeln F และคณะ (2020) พบว่าได้ผลผลิตไขมัน (lipid yield) เท่ากับ 0.17 g/g, ผลผลิตไขมันต่อหน่วยเวลา (lipid productivity) เท่ากับ 0.29 g/L/h และได้น้ำหนักเซลล์ (biomass) เท่ากับ 122.6 g/L⁽⁵⁸⁾ ยีสต์ *M. pulcherrima* นอกจากจะมีความสามารถในการสะสมไขมันได้สูงแล้วยังถูกใช้เป็น biocontrol สำหรับต้าน จุลินทรีย์ก่อโรคในพืชได้อีกด้วย⁽¹²⁾

4. การคัดแยกยีสต์สะสมไขมัน

พื้นฐานในการคัดแยกยีสต์สะสมไขมันจำเป็นต้องวัดขนาดหรือปริมาณของไขมันภายในเซลล์ยีสต์⁽³³⁾ วิธีดั้งเดิม (conventional method) ในการคัดเลือกยีสต์สะสมไขมัน คือต้องทำการแยกยีสต์ให้บริสุทธิ์ก่อน จากนั้นจะทำการเลี้ยงยีสต์ในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนจำกัดและทำการสกัดไขมันด้วยตัวทำละลาย โดยไขมันหรือน้ำมันที่ได้จะถูกวิเคราะห์ด้วยการชั่งน้ำหนักของไขมันทั้งหมด (gravimetry method) ข้อดีของวิธีนี้คือสามารถทราบปริมาณไขมันทั้งหมด ที่ยีสต์ผลิตได้ และสามารถนำไขมันหรือน้ำมันที่สกัดได้ไปวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน (lipid profiles) ต่อไปได้ อย่างไรก็ตาม วิธีนี้มีข้อเสียมาก ไม่ว่าจะเป็นใช้ทรัพยากร, ระยะเวลา และแรงงาน จำนวนมากในการทดลอง อีกทั้งยังเกิดของเสียที่เป็นพิษ เช่น chloroform และ methanol ที่ใช้ในการสกัดไขมัน ในการแก้ไขปัญหาดังกล่าว วิธี colorimetric และ fluorometric ด้วยสีย้อม Sudan Black B และ Nile red จึงถูกนำมาใช้เป็นวิธีแรก หรือ ขั้นแรก (primary screening) ในการคัดเลือกยีสต์สะสมไขมัน โดย ใช้ในการสังเกตขนาดของลิพิดบอดีของยีสต์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence microscope) จากนั้นยีสต์ที่ผ่านการคัดเลือกรั้งแรก (primary screening) จะถูกนำมาคัดเลือกรั้งที่ 2 (เป็น secondary screening) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณของไขมันที่ยีสต์ผลิตได้โดยวิธี gravimetry

4.1. Fluorometric method

4.1.1 Sudan Black B

Sudan Black B นิยมใช้ในการย้อมสี ไขมัน ไม่ว่าจะเป็น phospholipids, sterols และ neutral triglycerides เป็นต้น Sudan Black B ถูกใช้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1946 โดยใช้ในการย้อมสี ไขมัน ใน แบคทีเรีย (bacteria) และ ฟังไจ (fungi) หรือ เส้นใย (hypha) ที่ถูกเตรียมบนสไลด์⁽⁵⁹⁾ และในปี ค.ศ. 1985 Evans CT และคณะ ได้ใช้สีย้อม Sudan Black B และ replica printing สำหรับย้อมดูลิพิดบอดี (lipid body) ใน ยีสต์สะสมไขมัน⁽⁶⁰⁾ อย่างไรก็ตาม Sudan Black B ยังมีข้อเสียเนื่องจาก องค์ประกอบของ Sudan Black B เป็นสารจำพวก lipophilic ซึ่งมี

คุณสมบัติในการละลายในองค์ประกอบที่ไม่มีขั้ว เช่น phospholipid ของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) จึงทำให้แยกองค์ประกอบของไขมันที่ต่างกันได้ง่าย^(61, 62) อย่างไรก็ตาม Sudan Black B เป็นสีที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการเนื่องจากความง่ายสะดวกและรวดเร็วในการใช้งาน⁽⁶³⁾

4.1.2. Nile Red

Nile Red เป็นสีย้อมที่มีความนิยมสูงและถูกใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากสามารถมองเห็นได้ชัดเจนจึงสามารถทำให้ดูขนาดของลิพิดบอดีในเซลล์ยีสต์ได้ค่อนข้างง่าย^(34, 64) Nile Red มีความสามารถในการละลายและเรืองแสงในตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆได้หลายชนิด ไม่ว่าจะเป็น phosphate buffer solution (PBS), dimethyl sulfoxide (DMSO; 4 ถึง 25%), สารละลายผสม PBS และ Isopropyl alcohol, Glycerol (0.1 ถึง 0.125 mg/mL) และ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; 3.0 ถึง 3.8 mg/mL) ซึ่งตัวทำละลายเหล่านี้ยังช่วยให้สี Nile Red ซึมผ่านเซลล์ได้ง่ายขึ้น อย่างไรก็ตามสี Nile Red จะมีความสามารถละลายและเรืองแสงได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้นเมื่อนำเป็นน้ำเป็นตัวทำละลาย⁽⁶⁴⁾ สี Nile Red แสดงให้เห็นถึงการแพร่ผ่านผ่านผนังเซลล์ (cell wall) ในช่วงอุณหภูมิ ระหว่าง 30 ถึง 40 องศาเซลเซียส Nile Red สามารถเข้าจับกับไขมัน เมื่อใช้อัตราส่วน สี Nile Red ต่อ เซลล์ที่ต่ำ โดยอย่างน้อยความเข้มข้นของเซลล์ที่นำมาย้อมสี Nile Red ควรจะมีปริมาณเซลล์มากกว่า 5×10^4 cell/mL⁽⁶³⁾ อย่างไรก็ตาม Nile Red มีข้อเสียเนื่องจากสลายตัวค่อนข้างง่ายเมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ โดยจะเกิดการ bleaching ทำให้สีที่เรืองแสง (emission) จางหายไป จึงต้องคำนวณระยะเวลาในการเตรียมตัวอย่างและการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ให้พอดี⁽⁶²⁾ อย่างไรก็ตามระยะเวลาในการบ่มเซลล์และสีย้อม Nile Red ให้เหมาะสมควรจะผสมทั้ง 2 อย่าง ให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นอย่างน้อย 20 ถึง 40 นาที เพื่อให้สีย้อม Nile Red มีความเสถียรและเพิ่มแม่นยำในการสังเกตผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ อย่างไรก็ตามระยะเวลาในการบ่มก็จะขึ้นกับชนิดของตัวทำละลายและสายพันธุ์ของเชื้อด้วย⁽⁶⁵⁾

4.1.3. LipidTOX™ Green

LipidTOX™ Green เป็นสารจำพวก Lipophilic ที่สามารถใช้ในการย้อมไตรเอซิลกลีเซอรอล (Triacylglycerol: TAGs) LipidTOX™ Green สามารถจับกับ TAGs ได้อย่างจำเพาะ และมีความสามารถในการเรืองแสง (emission) ได้สูง จึงทำให้มองเห็นการแพร่ของสีได้ชัดเจนจึงทำให้แยกตัวอย่างออกจากภาพพื้นหลังได้ดีกว่าสีย้อม Nile Red

4.1.4. Rhodamine B

Rhodamine B ถูกใช้ในการย้อมเพื่อดูไขมันภายในเซลล์ โดยลดขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างออกไป ได้แก่ heat fixed, incubation และ โดยไม่ต้องเติมสารละลาย หรือ

reagent ตัวอื่นๆ เพิ่มเติม รายงานงานของ Niehus X และคณะ (2018) ได้ทำการคัดแยกยีสต์สะสมไขมันโดยเลี้ยงบนอาหารแข็งที่ผสมสีย้อม Rhodamine B ในจานเพาะเชื้อ ซึ่งเมื่อยีสต์เจริญเต็มโตเป็นโคโลนีบนอาหารแข็ง (ซึ่งสีย้อม Rhodamine B จะเข้าจับจำเพาะกับ ไตรเอซิลกลีเซอรอล; Triacylglycerol: TAGs ภายในเซลล์ยีสต์) เมื่อนำจานเพาะเชื้อไปส่องด้วยแสงสีขาว (visible light) หรือ ภายใต้แสงยูวี (UV light) โคโลนีของยีสต์ที่สามารถสะสมไขมันจะเป็นสีแดง (reddish-pigmented colonies) ส่วนยีสต์ทั่วไปโคโลนีจะไม่มีสี (colorless)⁽⁶⁶⁾ ซึ่งข้อดีของวิธีนี้ช่วยลดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง รวมถึงระยะเวลาในการสังเกตคัดเลือดยีสต์ไขมัน ลดอุปกรณ์ขั้นตอนที่ใช้ ที่สำคัญยังช่วยลดค่าใช้จ่ายในการคัดแยกยีสต์สะสมไขมัน อย่างไรก็ตามการใช้ Rhodamine B ยังไม่เป็นที่นิยมนักเนื่องจาก ยีสต์บางสายพันธุ์ก็ไม่สามารถใช้วิธีนี้ในการคัดแยกได้ จึงจำเป็นต้องใช้ร่วมกับวิธีอื่นๆ ควบคู่กันไป⁽⁶³⁾

4.2. Gravimetry method

วิธี Gravimetry method นิยมในการวัดปริมาณไขมันเนื่องจากสามารถคำนวณหาน้ำหนักปริมาณไขมันที่ยีสต์ผลิตได้ทั้งหมดโดยทำการชั่ง ไขมัน (dried fatty acid) หรือน้ำมัน (oil) ได้ ซึ่งไขมัน หรือน้ำมัน จะถูกสกัดจากยีสต์ด้วยวิธีการสกัดไขมันด้วยตัวทำละลายต่างๆ เช่น การปรับปรุงวิธี การสกัดไขมัน ของ Bligh EG, Dyer WJ (1959)⁽⁶⁷⁾ โดย เซลล์ยีสต์จะถูกแยกออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อผ่านการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ประมาณ 1 ถึง 2 รอบ จากนั้นเซลล์ยีสต์จะถูกทำให้แตกออก อาจจะใช้วิธีในการทำละลายเซลล์ด้วย วิธีทางกายภาพ หรือวิธีทางเคมี ก็ได้ โดยมีจุดประสงค์เพื่อให้เซลล์แตก จากนั้น สารละลายเซลล์ยีสต์แขวนลอย (ที่ผ่านการทำให้เซลล์แตกแล้ว) จะถูกเติมด้วย chloroform และ methanol ซึ่ง ไขมัน หรือน้ำมัน จะละลายในสารที่ไม่มีขั้วก็คือ chloroform ส่วนสารที่มีขั้ว เช่น protein และ อื่นๆ จะละลายในชั้นของน้ำ และ methanol ซึ่งสารละลายทั้ง 2 ชั้นจะแยกออกจากกันโดยอาศัยความไม่มีขั้ว ซึ่ง ชั้นของ chloroform ที่มี ไขมัน หรือน้ำมันละลายอยู่จะอยู่ชั้นล่าง เนื่องจาก chloroform หนักกว่า น้ำ และ methanol จึงถ่ายชั้น ของ chloroform ไปสู่ภาชนะใหม่ และนำไประเหยเพื่อดึงตัวทำละลาย (chloroform) ออกจนเหลือแต่ ไขมัน หรือน้ำมัน จากนั้นจะถูกนำไปชั่งน้ำหนักต่อไป ซึ่งข้อดีของวิธีนี้คือ สามารถรู้ปริมาณน้ำหนักของ ไขมัน หรือน้ำมันที่ยีสต์ผลิตได้ทั้งหมด ทำให้คำนวณค่าต่างๆ ได้ เช่น lipid content, lipid yield หรือ lipid productivity เป็นต้น รวมถึงนำ ไขมันหรือน้ำมันที่ได้ไปวิเคราะห์องค์ประกอบ (lipid profiles) ด้วยเครื่อง gas-chromatography ต่อไป อย่างไรก็ตามข้อเสียของวิธีนี้คือ ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด ทั้ง chloroform และ methanol เป็นพิษอันตรายต่อผู้ทำการทดลอง และ สิ่งแวดล้อม รวมถึงต้องใช้เวลาและขั้นตอนที่มากในการทดลอง

5. ความหลากหลายของยีสต์สะสมไขมันที่คัดแยกและจัดจำแนกได้ในประเทศไทย

ยีสต์สะสมไขมันสามารถพบได้ทั้งใน ไฟลัมแอสโคไมโคตา (Ascomycota) และ ไฟลัมเบสิดิโอไมโคตา (Basidiomycota) มีความหลากหลายทางอนุกรมวิธานของยีสต์สะสมไขมันที่สูง ในไฟลัมแอสโคไมโคตาพบว่า ลำดับแซคคาไรโดไมซีทาเลส (Saccharomycetales) เป็นตัวแทนกลุ่มซึ่งแสดงถึงความหลากหลายของยีสต์สะสมไขมันมากที่สุด ไม่ว่าจะเป็นสกุล *Yarrowia*, *Myxozyma* และ *Lipomyces* เป็นต้น และ ไฟลัมเบสิดิโอไมโคตา ลำดับสปอริดิโอบอลาเลส (Sporidiobolales) ประกอบด้วยสายพันธุ์ยีสต์สะสมไขมันที่ส่วนมากจะอยู่ในสกุล *Rhodospidium* และ *Rhodotorula* เป็นต้น โดยยีสต์สะสมไขมัน จากการรายงานข้างต้นจะมีทั้งหมด 5 อันดับ (order) ได้แก่ อันดับ Saccharomycetales เช่น *Myxozyma melibiose* และ *Lipomyces starkeyi*, อันดับ Sporidiobolales เช่น *Rhodotorula* และ *Sporidiobolus*, อันดับ Tremellales เช่น *Cyptococcus curvatus*, อันดับ Trichosporonales, เช่น *Trichosporon cutaneum* และ *Trichosporon oleaginosus*, อันดับสุดท้ายคือ Cystobasidiales เช่น *Cystobasidium iriomotense* โดยทั่วไปแล้วยีสต์สะสมไขมันจะสามารถคัดแยกได้จากดิน ไม่ว่าจะเป็น อันดับ Saccharomycetales, Trichosporonales Tremellales และ Cystobasidiales แต่ในทางกลับกันยีสต์สะสมไขมันใน อันดับ Sporidiobolales เช่น *Rhodotorula* ส่วนมากสามารถแยกได้จากผิวของใบพืช⁽¹¹⁾

ปัจจุบันการศึกษาคความหลากหลายและศักยภาพของยีสต์สะสมไขมันในประเทศไทย ยังคงมีค่อนข้างน้อย อย่างไรก็ตามในไม่กี่ปีที่ผ่านมาได้มีงานวิจัยรายงานเกี่ยวกับความหลากหลายของยีสต์สะสมไขมันในประเทศไทย

รายงานของ Hoondee P และคณะ (2019) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายของยีสต์สะสมไขมันที่แยกได้จากตัวอย่าง ดิน, น้ำทะเล และ โคลน จาก สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลน จังหวัดระนอง, จังหวัดสมุทรสงคราม, จังหวัดตราด, จังหวัดจันทบุรี, วนอุทยานแห่งชาติปรางมนบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และ เขตอนุรักษ์ชีวมวล จังหวัดระนอง พบว่าสามารถแยกยีสต์ที่มีความสามารถสะสมไขมันได้ทั้งหมด 43 สายพันธุ์ และมี 11 สายพันธุ์ที่สามารถสะสมไขมันได้สูง ได้แก่ *Rhodotorula sphaerocarpa* 11-14.4, *Rhodotorula paludigena* BW7.3, *Rhodotorula paludigena* 11-14.7, *Rhodotorula paludigena* MTW11.1, *Rhodotorula paludigena* BW1.3, *Rhodotorula paludigena* BW8.1, *Rhodotorula paludigena* WW1.2, *Saitozyma podzolica* 11-11.3.1, *Papilliotrema laurentii* MTT4.1, *Prototheca* sp. NSP10-2 และ *Debaromyces nepalensis* NSB6-1⁽²¹⁾ (แสดงในตารางที่ 1)

รายงานของ Polburee P และคณะ (2015) ได้ทำการคัดแยกยีสต์สะสมไขมันจาก ดิน, ของเสียจากโรงงานน้ำมันปาล์ม, ผลปาล์ม และ ดอกของต้นปาล์มเทศเมีย ในจังหวัดต่างๆของ ประเทศไทย โดยใช้อาหารที่ต่างกัน 2 ชนิด ได้แก่ อาหารที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจนและอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนจำกัด ซึ่งอาหารทั้ง 2 ชนิด จะมีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว พบว่าสามารถคัดแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 323 ไอโซเลท จากตัวอย่างทั้งหมด 142 ตัวอย่าง โดยยีสต์ 178 ไอโซเลท แยกได้จากอาหารที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน และ ยีสต์ 145 ไอโซเลท จากอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนจำกัด และพบว่ามียีสต์ 23 ไอโซเลทจากทั้งหมด 323 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการสะสมไขมันมากกว่า 20 %ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ได้แก่ *Rhodotorula taiwanensis* 14 สายพันธุ์, *Pichia manshurica* 1 สายพันธุ์, *Cryptococcus cf. podzolicus* 1 สายพันธุ์, *Rhodosporidium fluviale* 1 สายพันธุ์, *Meyerozyma caribbica* 1 สายพันธุ์, *Candida silvae* 1 สายพันธุ์, *Cryptococcus laurentii* 1 สายพันธุ์, *Kodamaea ohmeri* 1 สายพันธุ์, *Sporidiobolus ruineniae* 1 สายพันธุ์, *Cryptococcus curvatus* 1 สายพันธุ์ และ *Rhodosporidium toruloides* 1 สายพันธุ์⁽²⁰⁾ (แสดงในตารางที่ 1)

รายงานของ Tsai YY และคณะ (2017) พบว่ายีสต์สะสมไขมันสายพันธุ์ *Rhodosporidium toruloides* DMKU3-TK16 ที่คัดแยกได้ในประเทศไทย สามารถสะสมไขมันได้สูงถึง 70 %ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง⁽⁶⁸⁾ (แสดงในตารางที่ 1)

รายงานของ Polburee P และคณะ (2020) ได้ศึกษากระบวนการผลิตไขมันแบบ 2 ขั้นตอน ภายใต้สภาวะไม่ปราศเชื้อ โดยยีสต์สะสมไขมันสายพันธุ์ *Rhodosporidiobolus fluvialis* DMKU-RK253 ที่สามารถคัดแยกได้จากผิวใบของต้นอ้อยที่เก็บในประเทศไทย (แสดงในตารางที่ 1)⁽²⁷⁾

รายงานของ Srisuwan W และคณะ (2016) ได้ทำการคัดแยกยีสต์สะสมไขมันจาก ดอกไม้, ผลไม้ และ ใบไม้ ที่ได้จาก อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย โดยใช้อาหารสารสกัดจากยีสต์และมอลต์ พบว่าสามารถแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 67 ไอโซเลท และมียีสต์มีปริมาณไขมันมากกว่า 20 %ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Rhodotorula* sp. C7 และ *Rhodosporidium paludigenum* C10⁽⁶⁹⁾ (แสดงในตารางที่ 1)

รายงานของ Kraisintu P และคณะ (2010) ได้คัดแยกยีสต์สะสมไขมันจากตัวอย่างดินในประเทศไทย โดยใช้อาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนจำกัด โดยสามารถแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 63 สายพันธุ์ ได้แก่ *Rhodotorula mucilaginoso* 61 สายพันธุ์, *Rhodotorula glutinis* 1 สายพันธุ์ และ *Rhodotorula* sp. 1 สายพันธุ์⁽⁷⁰⁾ (แสดงในตารางที่ 1)

รายงานของ Papone T และคณะ (2016) ได้ทำการศึกษาการผลิตไขมันจากเชื้อผสมระหว่างสาหร่ายเซลล์เดียวและยีสต์สะสมไขมัน ได้แก่ยีสต์สายพันธุ์ *Torulaspota maleeae* Y30 และ *Torulaspota globosa* YU5/2 ที่แยกได้จากตัวอย่างดินที่จังหวัด ชัยภูมิ และ อุตรดิตถ์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ประเทศไทย ตามลำดับ⁽⁷¹⁾ (แสดงในตารางที่ 1)

รายงานของ Kitcha S และคณะ (2011) ได้ทำการคัดแยกยีสต์จาก ดิน, ของเสียที่เกิดจากปาล์มน้ำมัน และ ฟืนน้ำมัน จากภาคใต้ของประเทศไทย พบว่าสามารถคัดแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 889 สายพันธุ์ โดยใช้อาหารที่มี กลีเซอรอล หรือ กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีค่า pH เท่ากับ 4.0 และ 6.0 จากสายพันธุ์ยีสต์ที่คัดแยกได้ทั้งหมดพบว่ามี 23 สายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติสะสมไขมันได้สูง และพบว่ายีสต์สะสมไขมันสายพันธุ์ *Kodamaea ohmeri* BY4-523 สามารถสะสมไขมันได้สูงถึง 53.28 % ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และ ยีสต์สะสมไขมันสายพันธุ์ *Trichosporonoides spathulata* JU4-57 ที่เจริญได้เร็วกว่า แต่สามารถสะสมไขมันได้ 41.5% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง⁽⁷²⁾ (แสดงในตารางที่ 1)

รายงานของ Watsuntorn W และคณะ (2021) ได้รายงานสายพันธุ์ยีสต์สะสมไขมันชนิดใหม่ *Saccharomyces cerevisiae* CU-TPD4 ที่คัดแยกได้จากขยะกากมะพร้าว จากโรงงานมะพร้าว จังหวัดนครปฐม ประเทศไทย โดย *S. cerevisiae* CU-TPD4 สามารถผลิตไขมันได้สูงถึง 52.96 ± 1.15 % เมื่อเจริญในอาหารที่มีกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน และมีค่าอัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน (C/N ratio) เท่ากับ 125⁽⁷³⁾ (แสดงในตารางที่ 1)

รายงานของ Kitcha S และคณะ (2014) ได้ทำการคัดแยกและจัดจำแนกยีสต์สะสมไขมันสายพันธุ์ *Trichosporonoides spathulata* JU4-57 ที่คัดแยกได้จากดินบริเวณพื้นที่ปลูกพืช น้ำมัน จังหวัดสงขลา ประเทศไทย⁽⁷⁴⁾ (แสดงในตารางที่ 1)

รายงานของ Paserakung A และคณะ (2015) สามารถคัดแยกยีสต์สะสมไขมัน *Trichosporon asahii* GSY10 ได้จากดิน โดยสามารถสะสมไขมันได้ เท่ากับ 33% ของน้ำหนักเซลล์ อีกทั้งยังค้นพบยีสต์สะสมไขมันสายพันธุ์อื่นๆที่ยังไม่ได้จัดจำแนก ได้แก่ unknown sp. GSY2, GSY3, GSY4, GSY5 และ GSY6 ที่แยกได้จากดิน โดย มีค่า lipid content % เท่ากับ 35.8%, 35.8%, 37.5%, 28.9% และ 29.0% ตามลำดับ ยีสต์สะสมไขมันที่แยกได้จากอาหารสัตว์ที่ใช้เลี้ยงวัวนม ได้แก่ unknown sp. FDY2, FDY12 และ FDY14 โดย มีค่า lipid content เท่ากับ 47.4%, 59.9% และ 23.2% ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม พบว่ายีสต์ที่คัดแยกได้จากของเหลวจากลำไส้วัวนม (rumen fluid) มีความสามารถสะสมไขมันได้น้อยกว่าร้อยละ 20 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

แสดงให้เห็นว่ายีสต์สะสมไขมันโดยส่วนมากจะสามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมในธรรมชาติมากกว่าทางเดินอาหารของสัตว์⁽⁷⁵⁾ (แสดงในตารางที่ 1)

จากรายงานทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าประเทศไทยมีพื้นที่อุดมสมบูรณ์สามารถคัดแยกยีสต์สะสมไขมันได้จากแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติ ไม่ว่าจะเป็น ดิน, น้ำทะเล, น้ำกร่อย, โคลน, ดินบริเวณต้นพืชน้ำมัน, ผิวใบพืช, ดอกไม้ และของเสียที่เกิดจากอุตสาหกรรม เป็นต้น อีกทั้งยังสามารถจัดจำแนกยีสต์สะสมไขมันได้หลากหลายสายพันธุ์



ตาราง 1 ข้อมูลความหลากหลายของยีสต์สะสมไขมันที่คัดแยกได้ในพื้นที่ของประเทศไทย

| สายพันธุ์ของยีสต์ | แหล่งที่พบ | อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง | Lipid content (%) | อ้างอิง |
|---|------------------------|---|-------------------|---------|
| <i>Rhodotorula sphaerocarpa</i> 11-14.4 | ดิน | nitrogen-depleted medium (NDM) | 27.3 ± 0.006 | (21) |
| <i>Saitozyma podzolica</i> 11-11.3.1 | มวลชีวภาพที่เน่าเปื่อย | nitrogen-depleted medium (NDM) | 24.0 ± 0.01 | (21) |
| <i>Rhodotorula taiwanensis</i> DMKU-RK65 | ผิวใบช้อย | nitrogen-limited medium containing glycerol | 71.0 | (20) |
| <i>Rhodotorula taiwanensis</i> DMKU-RK180 | ผิวใบช้อย | nitrogen-limited medium containing glycerol | 69.5 | (20) |
| <i>Rhodotorula taiwanensis</i> DMKU-RK58 | ผิวใบข้าว | nitrogen-limited medium containing glycerol | 58.7 | (20) |
| <i>Rhodotorula taiwanensis</i> DMKU-RK174 | ผิวใบช้อย | nitrogen-limited medium containing glycerol | 49.9 | (20) |
| <i>Rhodotorula taiwanensis</i> DMKU-RK231 | ผิวใบข้าว | nitrogen-limited medium containing glycerol | 45.0 | (20) |
| <i>Rhodotorula taiwanensis</i> DMKU-RK148 | ผิวใบข้าว | nitrogen-limited medium containing glycerol | 33.8 | (20) |
| <i>Rhodotorula taiwanensis</i> DMKU-RK229 | ผิวใบข้าว | nitrogen-limited medium containing glycerol | 33.2 | (20) |
| <i>Rhodotorula taiwanensis</i> DMKU-RK172 | ผิวใบข้าว | nitrogen-limited medium containing glycerol | 31.8 | (20) |
| <i>Rhodotorula taiwanensis</i> DMKU-RK182 | ผิวใบช้อย | nitrogen-limited medium containing glycerol | 28.3 | (20) |
| <i>Rhodotorula taiwanensis</i> DMKU-RK100 | ผิวใบข้าว | nitrogen-limited medium containing glycerol | 27.1 | (20) |
| <i>Rhodotorula taiwanensis</i> DMKU-RK113 | ผิวใบข้าว | nitrogen-limited medium containing glycerol | 26.3 | (20) |

| สายพันธุ์ของยีสต์ | แหล่งที่พบ | อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง | Lipid content (%) | อ้างอิง |
|---|--------------|---|-------------------|---------|
| <i>Rhodotorula taiwanensis</i> DMKU-RK227 | ผิวใบข้าว | nitrogen-limited medium containing glycerol | 25.4 | (20) |
| <i>Rhodotorula taiwanensis</i> DMKU-RK191 | ผิวใบค้อย | nitrogen-limited medium containing glycerol | 23.9 | (20) |
| <i>Rhodotorula taiwanensis</i> DMKU-RK242 | ผิวใบข้าวโพด | nitrogen-limited medium containing glycerol | 21.9 | (20) |
| <i>Rhodotorula taiwanensis</i> DMKU-P5(1) | - | nitrogen-limited medium containing glycerol | 34.7 | (68) |
| <i>Pichia manshurica</i> DMKU-Ubc9(2) | - | nitrogen-limited medium containing glycerol | 64.8 | (68) |
| <i>Cryptococcus cf. podzolicus</i> DMKU-PTC7(2) | - | nitrogen-limited medium containing glycerol | 64.4 | (68) |
| <i>Meyerozyma caribbica</i> DMKU-RK258 | ผิวใบค้อย | nitrogen-limited medium containing glycerol | 37.6 | (27) |
| <i>Candida sylvae</i> DMKU-CPC19 | - | nitrogen-limited medium containing glycerol | 30.1 | (27) |
| <i>Cryptococcus laurentii</i> DMKU-AmC14 | - | nitrogen-limited medium containing glycerol | 28.4 | (27) |
| <i>Sporidiobolus ruineniae</i> DMKU-P3(1) | - | nitrogen-limited medium containing glycerol | 21.3 | (27) |
| <i>Rhodospiridium toruloides</i> DMKU3-TK16 | ดิน | nitrogen-limited medium | 71.3 | (27) |

| สายพันธุ์ของยีสต์ | แหล่งที่พบ | อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง | Lipid content (%) | อ้างอิง |
|--|-----------------------|---|-------------------|---------|
| <i>Rhodospiridiobolus fuvialis</i> DMKU-RK253 | ผิวใบช้อย | non-sterile crude glycerol solution | 71.42 | (27) |
| <i>Rhodotorula</i> sp. C7(1) | ดอกเฒ่า/ใบเฒ่า | acid-rice residue hydrolysate | 21.84 ± 0.56 | (69) |
| <i>Rhodospiridium paludigenum</i> C10 | ดอกเฒ่า/ใบเฒ่า | acid-rice residue hydrolysate | 22.41 ± 0.23 | (69) |
| <i>Diozegia</i> sp. TISTR5792 | ดอกเฒ่า/ใบเฒ่า | enzymatic-rice residue hydrolysate | 22.43± 1.09 | (69) |
| <i>Rhodotorula</i> sp. C7(2) | ดอกเฒ่า/ใบเฒ่า | enzymatic-rice residue hydrolysate | 24.26 ± 0.56 | (69) |
| <i>Rhodospiridium paludigenum</i> C10 | ดอกเฒ่า/ใบเฒ่า | enzymatic-rice residue hydrolysate | 23.69 ± 0.91 | (69) |
| <i>Kodamaea ohmer</i> BY4-523 | ดิน | crude glycerol based medium | 53.28 | (70) |
| <i>Trichosporonoides pathulate</i> JU4-57 | ดิน | crude glycerol based medium | 41.5 | (70) |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CU-TPD4 | ของเสียจาก มะพร้าว | modified YPD medium | 52.96 ± 1.15 | (73) |
| <i>Trichosporonoides spathulata</i> JU4-57 | ดิน | Crude glycerol-based medium (Co-culture with microalgae) | 47 | (72) |
| <i>Trichosporon asahii</i> GSY10 | ดิน | Molasses | 33.0 | (75) |

6. กระบวนการหมักแบบ 2 ขั้นตอน (Two-stage fermentation)

กระบวนการ หรือ วิธีในการที่จะส่งเสริมให้ยีสต์สะสมไขมัน (oleaginous yeast) สามารถสะสมไขมันได้สูงขึ้นนั้นมีหลายวิธี ซึ่งแนวโน้มงานวิจัยในปัจจุบัน ใช้กระบวนการหมักแบบ 2 ขั้นตอน (two-stage fermentation) มักถูกนำมาใช้ในการพัฒนาปรับปรุงกระบวนการผลิตไขมัน โดยอาหารที่ใช้สำหรับเลี้ยงยีสต์ทั่วไปมักจะมีปริมาณของค่าอัตราส่วน C/N ที่ต่ำ (มีปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่สูง) ซึ่งจะทำให้ยีสต์นั้นใช้แหล่งอาหารในการผลิตและสร้างจำนวนเซลล์ อย่างไรก็ตามอาหารที่ใช้เลี้ยงยีสต์สะสมไขมันจะต่างออกไป ซึ่งรายงานของ Zhang L และคณะ (2021) ในก่อนหน้านี้นี้พบว่า เมื่อใช้กระบวนการผลิตไขมันแบบ การหมักแบบกะ: batch fermentation (one-stage fermentation) โดยใช้อาหารที่มีค่าอัตราส่วนของ C/N ที่สูง (มีปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่จำกัด) ยีสต์สะสมไขมันจะสามารถสะสมไขมันได้สูง เพราะ ยีสต์ถูกส่งเสริมให้ใช้ *de novo fatty acid biosynthesis pathway*^(1, 76) ในการผลิตไขมัน เมื่อแหล่งไนโตรเจนในอาหารเริ่มหมด หรือ เหลือน้อยลง ยีสต์จะเปลี่ยนจากการใช้แหล่งคาร์บอน สำหรับการเจริญ เป็นใช้สำหรับการผลิตไขมันในรูปของ ไตรเอซิลกลีเซอรอลภายในลิพิดบอดี (triacyl glycerol: TAGs) แต่เมื่อ ใช้กระบวนการหมักแบบ 2 ขั้นตอน พบว่ายีสต์สามารถสะสมไขมันได้มากกว่า การหมักแบบ ขั้นตอนเดียว batch fermentation (one-stage fermentation) ถึง 2 เท่า⁽²⁵⁾ โดยหลักการของ กระบวนการหมักแบบ 2 ขั้นตอน (two-stage fermentation) คือ ขั้นแรกจะเป็นระยะที่ส่งเสริมการเจริญของยีสต์ให้ได้จำนวนเซลล์มากที่สุด ซึ่งอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจะเป็นอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนที่สูงเหมาะสำหรับการเจริญ (nitrogen rich medium) เมื่อเข้าสู่ขั้นที่ 2 จะเป็นระยะที่ยีสต์จะเข้าสู่ช่วงที่สะสมไขมันมากกว่าการเจริญ อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจะเป็นอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนสูง แหล่งไนโตรเจนต่ำ (nitrogen limited medium) หรือ อาจจะเป็นสารละลายที่มีแต่แหล่งคาร์บอนอย่างเดียว เช่น glucose solution หรือ lignocellulose hydrolysate ที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจนเพิ่มเติม เป็นต้น งานวิจัยของ Poontawe R และคณะ (2023)⁽⁶³⁾ ได้รายงานชนิดของกระบวนการหมักแบบ 2 ขั้นตอน ดังนี้

6.1. Two-stage fermentation

จากที่ได้กล่าวไว้ในบทความข้างต้น ในกระบวนการหมักแบบ 2 ขั้นตอน (two-stage fermentation) การเพาะเลี้ยงขั้นแรกและขั้นที่ 2 จะถูกแยกออกจากกัน ในขั้นตอนแรก (first stage) ของการเพาะเลี้ยง ยีสต์จะถูกเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม (Nutrient-rich medium) สำหรับการเจริญเพื่อเพิ่มจำนวน จากนั้นเซลล์ทั้งหมดที่ได้จะถูกแยกออกจากอาหารในขั้นแรกของการเพาะเลี้ยง และถูกถ่ายลงในอาหารในขั้นที่ 2 (second stage)

ซึ่งอาหารในขั้นที่ 2 จะเป็นแหล่งอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนจำกัด (nitrogen limited medium) หรืออาหารที่มีแต่แหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว (sole carbon source solution) ซึ่งจะส่งเสริมให้ยีสต์สะสมไขมัน⁽²⁵⁾ อย่างไรก็ตาม เมื่อได้ปริมาณของจำนวนเซลล์ที่มากกว่าขั้นแรกของการเพาะเลี้ยงก็จะส่งผลให้ได้ปริมาณไขมันในขั้นที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงสูงขึ้นไปด้วย⁽⁷⁷⁾ ในการเพิ่มประสิทธิภาพกระบวนการหมักแบบ 2 ขั้นตอน (two-stage fermentation) วัสดุทดแทนแทนและแหล่งอาหารต้นทุนต่ำถูกนำมาใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมันทั้งในขั้นแรกและขั้นที่ 2 รายงานของ Boonyarit J และคณะ (2020) ใช้กากอ้อยไฮโดรไลเซต (sugar cane hydrolysate) เพื่อใช้เป็นอาหารในการเพาะเลี้ยงขั้นแรก และ กลีเซอรอลดิบ (crude glycerol) ที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเลียม จะถูกใช้เป็นอาหารในการเพาะเลี้ยงขั้นที่ 2 โดยยีสต์ *Rhodospiridiobolus fluvialis* DMKU-SP314⁽²⁸⁾ รายงานของ Qian X และคณะ (2021) เพาะเลี้ยงยีสต์ *Apiotrichum porosum* DSM27194 ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน โดยใช้ อาหารที่มีแหล่งคาร์บอน เป็นน้ำตาลกลูโคส (Glucose) ในขั้นแรก และ volatile fatty acid (VFA) ที่ผสมกับ กรดชนิดต่าง ได้แก่ Acetic, Propionic และ Butyric acid ในอัตราส่วนต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงขั้นที่ 2⁽⁷⁸⁾ อย่างไรก็ตามในปัจจุบัน วิธีการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน ยังเป็นวิธีที่ค่อนข้างยุ่งยากและใช้แรงงานจึงไม่คุ้มทุนสำหรับผลิตในระดับอุตสาหกรรม⁽⁶³⁾

6.2. Two-stage fed-batch fermentation

กระบวนการหมักแบบ กึ่งกะ (fed-batch fermentation) ถูกนำมาประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มความสามารถในการผลิตไขมันของยีสต์ ร่วมกับการหมักแบบ 2 ขั้นตอน ในการเพาะเลี้ยงขั้นแรกยีสต์จะถูกเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมเพื่อเจริญ (nutrient-rich medium) เหมือนการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอนปกติ แต่เมื่อเข้าสู่ขั้นที่ 2 สารละลายที่มีแต่แหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวจะถูกถ่ายลงในถังหมัก หรือ ภาชนะในการหมักโดยไม่มี การนำเซลล์และอาหารเก่าออก เพื่อทำให้ค่าอัตราส่วน C/N ในอาหารเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้ยีสต์สามารถสะสมไขมันได้เพิ่มขึ้น ซึ่งวิธีนี้ช่วยลดขั้นตอนและเวลาในการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอนแบบปกติ ส่งผลให้ช่วยลดค่าใช้จ่ายในกระบวนการผลิตไขมัน อีกทั้งยังช่วยลดการสูญเสียเซลล์ก่อนเข้าสู่ขั้นที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง และช่วยลดการปนเปื้อนเชื้ออื่น เพราะไม่ได้แยกเซลล์ออกจากอาหารเก่า ดังนั้นกระบวนการหมักแบบ 2 ขั้นตอน แบบ กึ่งกะ (two-stage fed-batch fermentation) เหมาะสมที่จะช่วยในการผลิตไขมันปริมาณมากกว่ายีสต์สะสมไขมัน⁽⁷⁷⁾ อย่างไรก็ตามการที่เติมอาหารในขั้นที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงส่งผลให้ความเข้มข้นของจำนวนเซลล์นั้นลดลง อีกทั้งอาจส่งผลให้เชื้อปรับสภาพไม่ทัน เป็นผลให้ผลิตไขมันลดลง ดังนั้นวิธีการแก้ปัญหาคือ ต้องหาสภาวะที่เหมาะสม,

ต้องกำหนดระยะเวลาเริ่มต้นในการเติมอาหารลงในถังหมัก (feeding starting time points), ความเร็วของอัตราการเติมอาหาร (Feeding rate), ความเข้มข้นของอาหาร (feeding concentration) เป็นต้น⁽⁶³⁾

6.3. Two-stage continuous fermentation

ถึงแม้ว่ากระบวนการหมักต่อเนื่องแบบดั้งเดิม (conventional continuous fermentation) จะสามารถให้อัตราผลผลิตที่สูง (high productivity rate) แต่มีข้อจำกัดคือ มี dilution rate ที่ต่ำ จึงส่งผลให้ความเข้มข้นของปริมาณเซลล์ต่ำ⁽⁷⁹⁾ รายงานของ Poontawe R และ คณะ (2023) กล่าวไว้ว่า การหมักต่อเนื่องแบบดั้งเดิมแสดงให้เห็นว่าไม่เพียงพอสำหรับการผลิตไขมัน และ ส่งผลให้มีความเข้มข้นของมวลเซลล์ต่ำ⁽⁶³⁾ ในการประยุกต์กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง ใช้ร่วมกับ กระบวนการหมักแบบ 2 ขั้นตอน จะออกแบบโดยความต่างของค่าอัตราส่วนของ C/N ในอาหารขั้นแรกสำหรับการเพาะเลี้ยงจะมีค่าอัตราส่วน C/N ที่ต่ำ (Nutrient-rich medium) เมื่อเข้าสู่ขั้นที่ 2 อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงในขั้นแรกจะค่อยๆถูกถ่ายออกจากถังหมัก และ อาหารที่มีค่าอัตราส่วน C/N สูงจะถูกถ่ายเข้าสู่ถังหมัก โดยมี อัตราการถ่ายอาหารเข้า เท่ากับ อัตราการถ่ายอาหารออกในถังหมัก ซึ่งวิธีนี้ให้ผลผลิตไขมันที่สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องขั้นตอนเดียว (One-stage continuous fermentation)⁽⁷⁹⁾

กุญแจที่สำคัญในการเพิ่มผลผลิตไขมัน (lipid yield) และ ผลผลิตไขมันต่อหน่วยเวลา (lipid productivity) คือ 1. ปัจจัยทางกายภาพ เช่น ความเร็วของการกวน (agitation speed), อุณหภูมิ (temperature), อายุของหัวเชื้อ (inoculum age), ปริมาณของหัวเชื้อ (inoculum size), การให้อากาศและปริมาณของออกซิเจนที่ละลายในอาหาร (aeration/dissolved oxygen), โหมดสำหรับการเพาะเลี้ยง (operation modes), วิธีในการเติมอาหารเข้าสู่ภาชนะการเพาะเลี้ยง (Feeding strategies) และ ชนิดของการหมัก (fermentation period) 2. ปัจจัยทางเคมี เช่น แหล่งคาร์บอน, แหล่งไนโตรเจน, อัตราส่วนระหว่าง แหล่งคาร์บอน ต่อ แหล่งไนโตรเจน (C/N ratio), ค่าพีเอช, แร่ธาตุอาหารรอง และ สารยับยั้งที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (inhibitor) ยกตัวอย่าง เช่น การปรับปรุงกระบวนการหมัก แบบ fed-batch หรือ continuous ด้วยกระบวนการหมักแบบ 2 ขั้นตอน (two-stage fermentation) ช่วยเพิ่ม ผลผลิตไขมันต่อหน่วยเวลา (lipid productivity) มากกว่า การเพาะเลี้ยงแบบขั้นตอนเดียว (batch fermentation) ถึง 2 เท่า^(25, 77, 80) อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันกระบวนการหมักแบบ 2 ขั้นตอน ยังต้องพัฒนาและวิจัยเพิ่มเติม เพื่อนำไปใช้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรมต่อไป⁽⁶³⁾ โดยในปัจจุบันมีหลายงานวิจัยที่นำกระบวนการหมักแบบ 2 ขั้นตอน มาเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมันเพื่อเพิ่มผลผลิตไขมัน แสดงในตารางที่ 2

ตาราง 2 ข้อมูลงานวิจัยที่ใช้กระบวนการหมักแบบ 2 ขั้นตอน (two-stage fermentation) ในการผลิตไขมันจากยีสต์สะสมไขมัน

| สายพันธุ์ยีสต์ | อาหารในขั้นแรก (ระยะเวลา) | อาหารในขั้นที่สอง (ระยะเวลา) | Biomass (g/L) | Lipid (g/L) | Lipid content (%) | ชนิด (ปริมาณการเพาะเลี้ยง) | อ้างอิง |
|---|---|--|------------------|-------------|-------------------|---|---------|
| <i>Rhodospiridiobolus fluvialis</i> DMKU-SP314 | sugarcane top hydrolysate (48 ชั่วโมง) | crude glycerol solution (148 ชั่วโมง) | 21.07 | 15.85 | 73.04 | ฟลาสก์ ขนาด 500 mL (100 mL) | (28) |
| <i>Rhodospiridiobolus fluvialis</i> DMKU-RK253 | nitrogen-rich medium: Crude glycerol, Monosodium glutamate, micro-nutrients (96 ชั่วโมง) | non-sterile crude glycerol solution (120 ชั่วโมง) | 39.14±0.08 | 27.81±1.86 | 71.42 | ฟลาสก์ ขนาด 500 mL (100 mL) | (77) |
| <i>Rhodospiridium fluviale</i> DMKU-RK253 | nitrogen limited IV medium: Crude glycerol, Monosodium glutamate, micro-nutrients (36 ชั่วโมง) | crude glycerol solution (150 ชั่วโมง) | 22.93 | 15.98 | 69.5 | ชั้นที่ 1: ฟลาสก์ ขนาด 500 mL (100 mL) ชั้นที่ 2: ถังหมักขนาด 5 L (3 L) | (29) |
| <i>L. starkeyi</i> AS 2.1560 | YEPD medium (30 ชั่วโมง) | 120 g/L non-sterile glucose solution (40 ชั่วโมง) | 104.6 | 67.9 | 64.9 | ชั้นที่ 1: ถังหมักขนาด 15 L (10 L) ชั้นที่ 2: ถังหมักขนาด 7 L (4 L) | (15) |

| สายพันธุ์ยีสต์ | อาหารในขั้นแรก (ระยะเวลา) | อาหารในขั้นที่สอง (ระยะเวลา) | Biomass (g/L) | Lipid (g/L) | Lipid content (%) | ชนิด (ปริมาณการเพาะเลี้ยง) | อ้างอิง |
|-----------------------------------|---|---|------------------|-------------|----------------------|---|---------|
| <i>L. starkeyi</i> AS 2.1560 | YPD medium (30 ชั่วโมง) | 40 g/L non-sterile mixed glucose and xylose (2:1 v/v) solution (46 ชั่วโมง) | 98.3 | 62.7 | 63.8 | ขั้นที่ 1: ถึงหมักแบบใบพัดขนาด 10 L (8 L) | (26) |
| | | 60 g/L glucose solution (24 ชั่วโมง) | - | 17.58 | 61.6 | ขั้นที่ 2: ถึงหมักแบบใบพัดขนาด 7 L (4.2 L) | |
| <i>L. starkeyi</i> NRRL Y-1388 | YPD medium (120 ชั่วโมง) | 60 g/L glucose solution (24 ชั่วโมง) | - | 2.75 | 27.13 | ถึงหมัก (ไม่ระบุ) | (25) |
| | | orange peel hydrolysate (120 ชั่วโมง) | - | 7.58 | 46.35 | ถึงหมัก (ไม่ระบุ) | |
| <i>L. starkeyi</i> NRRL Y-1388 | YPD medium and orange peel hydrolysate (1:1 v/v) (120 ชั่วโมง) | 60 g/L glucose solution (24 ชั่วโมง) | - | 7.58 | 46.35 | ถึงหมัก (ไม่ระบุ) | (25) |
| | | orange peel hydrolysate (120 ชั่วโมง) | - | 7.58 | 46.35 | ถึงหมัก (ไม่ระบุ) | |

7. องค์ประกอบของกรดไขมันที่ผลิตได้จากยีสต์สะสมไขมัน

โดยทั่วไปยีสต์สะสมไขมันจะสามารถสังเคราะห์ไขมันให้อยู่ในรูปของ ไดเอซิลกลีเซอรอล (diacylglycerols) และ ไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerols) ซึ่งจะมีองค์ประกอบของไขมันหลายชนิดส่วนมากจะเป็น กรดไขมันคาร์บอน 16 และ 18 เป็นหลัก เช่น กรดไขมันปาล์มิติก (C16:0), กรดไขมันสเตียริก (C18:0), กรดไขมันโอเลอิก (C18:1), กรดไขมันลิโนเลอิก (C18:2) และ กรดไขมันไมริสติก (C14:0) เป็นต้น กรดไขมันเหล่านี้สามารถพบได้ในยีสต์สะสมไขมันสกุลต่างๆ เช่น *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Yarrowia*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Lipomyces* และ *Trichosporon* เป็นต้น จากรายงานของ Blomqvist J และคณะ (2018)⁽⁸¹⁾ พบว่า *Lipomyces starkeyi* ที่เจริญเติบโตในอาหารข้าวสาลีไฮโดรไลเซต พบว่ามีองค์ประกอบของกรดไขมันทั้งหมด 7 ชนิดโดยพบ กรดไขมันลิโนเลอิก (C18:2) มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ จากรายงานของ Zhengang M และคณะ (2020)⁽⁸²⁾ พบว่า *Rhodotorula taiwanensis* AM2352 ที่เพาะเลี้ยงได้บนอาหารซังข้าวโพดไฮโดรไลเซต มีองค์ประกอบของกรดไขมันทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ C14:0 (กรดไขมันไมริสติก), C16:0 (กรดไขมันปาล์มิติก), C16:1 (กรดไขมันปาล์มิโตเลอิก), C18:0 (กรดไขมันสเตียริก), C18:2 (กรดไขมันโอเลอิก) และ C18:2 (กรดไขมันลิโนเลอิก) โดยมีปริมาณเท่ากับ 16.7, 24.4, 1.4, 2.9, 46.8 และ 6.5 % ตามลำดับ จากรายงานของ Neelamegam A และคณะ (2018)⁽⁸³⁾ พบว่า *Cryptococcus curvatus* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเปปเปอร์มิลไฮโดรไลเซต โดยพบองค์ประกอบของกรดไขมันหลัก ได้แก่ C16:0 (กรดไขมันปาล์มิติก), C18:0 (กรดไขมัน สเตียริก), C18:1 (กรดไขมันโอเลอิก) และ C18:2 (กรดไขมันลิโนเลอิก)

7.1. Myristic acid

กรดไขมันไมริสติก (myristic acid) เป็นกรดไขมันชนิดอิ่มตัวที่มีคาร์บอน 14 อะตอม $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}]$ เรียงกันเป็นโซ่ตรง ส่วนมากพบได้ในน้ำมันจากพืช เช่น น้ำมันมะพร้าว (coconut oil), น้ำมันจากลูกจันทน์เทศ (nutmeg oil) หรือ น้ำมันปาล์ม (palm seed oil) นอกจากนี้ยังพบในน้ำมัน (Milk fat) ของสัตว์บางชนิด ลักษณะของกรดไขมันชนิดนี้เป็นผลึกสีขาวหรือสีเหลืองอ่อนๆ⁽⁸⁴⁾

7.2. Palmitic acid (Hexadecanoic acid)

กรดไขมันปาล์มิติก (palmitic acid) เป็นกรดไขมันอิ่มตัวที่มีคาร์บอน 16 อะตอม $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}]$ เรียงกันเป็นโซ่ตรง เป็นกรดไขมันหลักในน้ำมันพืชและไขมันสัตว์ พบกรดไขมันปาล์มิติกมีปริมาณถึง 44 % ในน้ำมันปาล์ม อีกทั้งยังพบใน เนื้อสัตว์, ซีส, เนย, และผลิตภัณฑ์นมอื่นๆ ซึ่งคิดเป็น 50 ถึง 60 % ต่อไขมันทั้งหมด ลักษณะของกรดไขมันชนิดนี้เป็น

ของแข็งผลึกสีขาวจนถึงสีเหลืองอ่อน มันวาวเล็กน้อย ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมอาหารของกรดไขมันปาล์มติก พบในการผลิตภัณฑ์พวกนม เช่น เนย, โกล์บัตเตอร์ และ ชีส เป็นต้น⁽⁸⁴⁾

7.3. Palmitoleic acid

กรดไขมันปาล์มโตเลอิก (palmitoleic acid) เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีคาร์บอน 16 อะตอม และมีพันธะคู่ 1 ตำแหน่ง $[CH_3(CH_2)_5CH=CH(CH_2)_7COOH]$ กรดไขมันชนิดนี้มีส่วนสำคัญสำหรับเนื้อเยื่อของมนุษย์และสัตว์เนื่องจากพบใน เนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) เป็นส่วนสำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมของร่างกาย(85) นอกจากนี้กรดไขมันปาล์มโตเลอิกยังพบได้ในพืชและผลไม้หลายชนิด ได้แก่ น้ำมันแมคคาเดเมีย (*Macadamia integrifolia*), Sea buckthorn oil และ ผลทุเรียน เป็นต้น⁽⁸⁶⁾

7.4. Stearic acid (Octadecanoic acid)

กรดไขมันสเตียริก (stearic acid) เป็นกรดไขมันชนิดอิ่มตัวที่มีคาร์บอน 18 อะตอม $[C_{18}H_{36}O_2]$ กรดไขมันชนิดนี้พบมากในสัตว์รองจาก กรดไขมันปาล์มติก (palmitic acid) เช่น ไขมันจากสัตว์ และ น้ำมันหมู เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบในน้ำมันพืชแต่มีปริมาณน้อย ลักษณะของกรดไขมันชนิดนี้เป็นของแข็งสีขาวหรือสีเหลืองอ่อนๆ ค่อนข้างมันวาว กรดไขมันสเตียริกมีบทบาทสำคัญในด้านอุตสาหกรรมเนื่องจากสามารถใช้เป็น สารลดแรงตึงผิว (detergent), สารหล่อลื่น และ สารเพิ่มความคงตัว (stabilizer)⁽⁸⁴⁾

7.5. Oleic acid

กรดไขมันโอเลอิก (oleic acid) เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีคาร์บอน 18 อะตอม มีพันธะคู่ 1 ตำแหน่ง $[CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH]$ จัดอยู่ในกลุ่มกรดไขมันที่มี โอเมกา 9 (omega-9 family) โดยส่วนมากกรดไขมันชนิดนี้พบในน้ำมันจากพืช ได้แก่ น้ำมันมะกอก, น้ำมันวอลนัท, น้ำมันแมคคาเดเมีย, น้ำมันพีแคน และ น้ำมันทานตะวัน เป็นต้น ลักษณะของกรดไขมันชนิดนี้เป็นของเหลวเมื่ออยู่ในอุณหภูมิสูงกว่า 5-7 °C ขึ้นไป ไม่มีสีหรือมีสีเหลืองซีด แต่เมื่ออยู่ในอุณหภูมิต่ำกว่า 4 °C จะเริ่มแข็งตัว และจะละลายตัวเมื่ออยู่ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 80-100 °C อีกทั้งการเสถียรภาพของกรดไขมันชนิดนี้จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) กับออกซิเจน (oxygen) ในบรรยากาศ ทำให้เกิดการเหม็นหืน (Acid L. และคณะ, 1987)⁽⁸⁴⁾ ประโยชน์ทางด้านสุขภาพ จากรายงานของ Sales-Campos H และคณะ (2013)⁽⁸⁷⁾ กรดไขมันโอเลอิกสามารถช่วยลดคอเลสเตอรอลในกระแสเลือดได้สามารถลดความเสี่ยงต่อการอุดตันของไขมันในกระแสเลือดได้ และช่วยลดการใช้ยาในกลุ่ม lovastatin ในผู้ป่วยโรคคอเลสเตอรอลสูงได้ นอกจากนี้กรดโอเลอิกยังช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกัน และสามารถต้านการอักเสบได้อีกด้วย

7.6. Linoleic acid

กรดไขมันลิโนเลอิก (linoleic acid) เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีคาร์บอน 18 อะตอม และมีพันธะคู่ 2 ตำแหน่ง จัดอยู่ในกลุ่มกรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกาย โอเมกา 6 (omega-6 family) $[\text{COOH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3]$ กรดไขมันชนิดนี้พบในน้ำมันจากพืช ได้แก่ น้ำมันทานตะวัน, น้ำมันข้าวโพด, น้ำมันวอลนัท และ น้ำมันมะกอก เป็นต้น ลักษณะของกรดไขมันชนิดนี้ เป็นของเหลวเมื่อเก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง, ไม่มีสีหรือสีขาว, ไม่ละลายในน้ำ แต่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิด กรดไขมันลิโนเลอิกเป็น 1 ใน 2 กรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกาย ประโยชน์ทางด้านสุขภาพ จากรายงานของ Sales-Campos H และคณะ (2013)⁽⁸⁸⁾ กรดไขมันลิโนเลอิกสามารถช่วยลดความเสี่ยงต่อโรคหัวใจ (cardiovascular disease) เป็นต้น



บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมีและวิธีการทดลอง

1. วัสดุอุปกรณ์

ตาราง 3 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

| อุปกรณ์และเครื่องมือ | บริษัท | ประเทศผู้ผลิต |
|---|-------------------|---------------|
| กระบอกตวงแบบแก้ว | Pyrex | USA |
| กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ | Olympus | Japan |
| กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (ส่องผ่าน) | Zeiss | Germany |
| กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ (ส่องผ่าน) | Olympus | Japan |
| แก๊ส ไครมาโตกราฟี | Shimizu | Japan |
| ขวดรูปชมพู่แบบแก้ว (พลาสติก) | Pyrex | USA |
| เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ | Forma Scientific | USA |
| เครื่องเขย่าแบบไม่ควบคุมอุณหภูมิ | Biobase | China |
| เครื่องเขย่าสาร | Cubic B | China |
| เครื่องชั่งสาร | Satorius | Germany |
| เครื่องถ่ายภาพเจล | Bio-rad | USA |
| เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ | Kubota | Japan |
| เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม | PCRmax | China |
| เครื่องยิวี-วีสิบิล สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ | Shimizu | Japan |
| เครื่องวัดค่า pH | Suntex | Taiwan |
| เครื่องสั่นด้วยเสียง (Ø3 mm, 65 KHz) | Shanghai yanyong | China |
| เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส | ENDURO | Germany |
| จานเพาะเชื้อแบบพลาสติก (ปราศจากเชื้อ) | MicroQC | China |
| ตู้ดูดควัน | NEWLAB | Thailand |
| ตู้ปัมเชื้อ | Accuplus | Thailand |
| ตู้ปลอดเชื้อ ระดับ 2 | CRYSTE | South Korea |
| ตู้อบฆ่าเชื้อด้วยความร้อนแห้ง | Fisher Scientific | USA |

| อุปกรณ์และเครื่องมือ | บริษัท | ประเทศผู้ผลิต |
|---|----------|---------------|
| เตาให้ความร้อนแบบหมუნด้วยแม่เหล็ก | Diahan | South Korea |
| ทิปพลาสติก ขนาด 10, 200, 1,000, 5,000 μ L | Biologix | China |
| ปีกเกอร์แบบแก้ว | Pyrex | USA |
| พาราฟิล์ม | Bemis | USA |
| หม้อนิ่งความดันไอน้ำ | Tomy | Japan |
| หลอดทดลองแบบแก้ว | Pyrex | USA |
| หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงแบบพลาสติก (ปราศจากเชื้อ) | Biologix | China |
| หลอดสำหรับเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ | Biologix | China |
| ออโตปีเปตต์ | Gilson | France |

2. อาหารและสารเคมี

ตาราง 4 อาหารและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

| อาหารและสารเคมี | บริษัท | ประเทศผู้ผลิต |
|--|---------------|---------------|
| 6X loading dye | Vivantis | Malaysia |
| Absolute Ethanol | Emsure | Germany |
| Agar | Bio-AGARs | UK |
| Agarose | Invitrogen | USA |
| CaCl ₂ •6H ₂ O (Calcium chloride hexahydrate) | Ajax Finechen | Australia |
| Chloramphenicol | Bio-Basic | Canada |
| Chloroform | RCI Labscan | Thailand |
| Citric acid anhydrous | Fluka | USA |
| CuSO ₄ •4H ₂ O (Copper sulfate tetrahydrate) | Ajax Finechen | Australia |
| D-glucose (Dextrose) | SRL | India |
| EDTA | Bio-Basic | Canada |
| FeCl ₃ •6H ₂ O (Iron (III) chloride hexahydrate) | Ajax Finechen | Australia |

| อาหารและสารเคมี | บริษัท | ประเทศผู้ผลิต |
|--|---------------|---------------|
| Gel/PCR purification kit | Vivantis | Malaysia |
| Gellan gum | SRL | India |
| Glycerol | Q Rec | New Zealand |
| H ₃ BO ₃ (Boric acid) | Ajax Finechen | Australia |
| Isoamyl alcohol | Q Rec | New Zealand |
| K ₂ HPO ₄ | SRL | India |
| KH ₂ PO ₄ | SRL | India |
| KI (Potassium iodide) | Ajax Finechen | Australia |
| Malt extract (สำหรับ 2G2M) | Bacto | USA |
| Malt extract (สำหรับ YM) | SRL | India |
| Methanol | Emsure | Germany |
| MgSO ₄ •7H ₂ O (Magnesium sulfate heptahydrate) | Ajax Finechen | Australia |
| MnSO ₄ •H ₂ O (Manganese (II) Sulfate monohydrate) | Ajax Finechen | Australia |
| Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O (Sodium molybdate dihydrate) | Ajax Finechen | Australia |
| NaCl (Sodium chloride) | Ajax Finechen | Australia |
| Peptone | SRL | India |
| Petroleum ether | RCI Labscan | Thailand |
| Redsafe™ | iNTron | South Korea |
| SDS | Bio-Basic | Canada |
| Sulfuric acid | RCI Labscan | Thailand |
| Taq DNA polymerase | Vivantis | Malaysia |
| Tris | Bio-Basic | Canada |
| Tri-Sodium citrate | UNILAB | Netherland |
| VC 100 bp DNA ladder | Vivantis | Malaysia |
| Yeast extract | Conda | Spain |
| ZnSO ₄ •7H ₂ O (Zinc sulfate heptahydrate) | Ajax Finechen | Australia |

3. วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างดิน

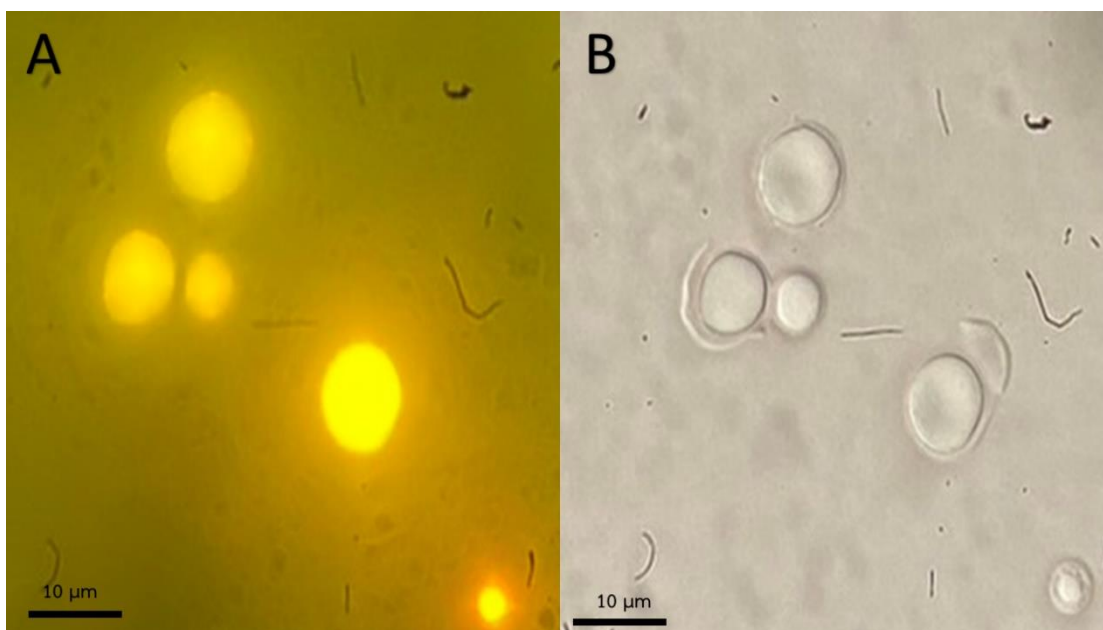
สำรวจและเก็บตัวอย่างดินบนภูเขาในจังหวัดเชียงราย จำนวน 22 ตัวอย่าง จากดอยปุย, ดอยผาฮี้ และ ภูเขาฟ้า โดยขุดลึกลงไปประมาณ 3 เซนติเมตร จากผิวดิน โดยจะเลือกบริเวณที่เก็บที่มีต้นไม้ใหญ่และมีหญ้าปกคลุม จากนั้นทำการจดบันทึก อุณหภูมิ, ความชื้น, ค่า pH, และ พิกัดของสถานที่เก็บตัวอย่างดิน

2. การคัดแยกยีสต์ด้วยวิธีการแยกยีสต์จากตัวอย่างดินโดยตรง (Direct method)

นำตัวอย่างดิน ประมาณ 1 ช้อนชา โรยลงบนอาหารแข็ง 2 ชนิด คือ อาหาร nitrogen depleted medium agar (NDM agar) (ภาคผนวก ก) และ nitrogen depleted medium gellan gum (NDM gellan gum) (ภาคผนวก ก) โรยให้ทั่วจานอาหารจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7-14 วัน คัดเลือกโคโลนีของยีสต์ที่มีลักษณะเป็นเมือกเยิ้ม โดยทำการคัดเลือกโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ และแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร yeast extract malt extract agar (YM agar) (ภาคผนวก ก) ที่เติม chloramphenicol ความเข้มข้นเท่ากับ 0.25 g/L เก็บรักษาเชื้อในอาหารแข็ง YM agar และ -80°C ในอาหาร YM broth (ภาคผนวก ก) ที่เติม glycerol ความเข้มข้น 10% (v/v) เพื่อใช้ในการจัดจำแนกชนิดของเชื้อ และใช้ทดสอบต่อไป

3. การคัดเลือกยีสต์สะสมไขมันโดยการย้อมสี Nile red

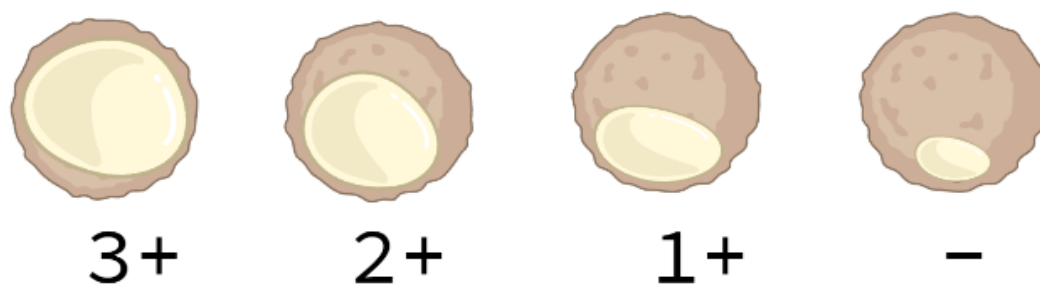
นำยีสต์บริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหารแข็ง YM agar เป็นระยะเวลา 2-3 วัน ถ่ายลงในอาหารเหลว 2G2M (ภาคผนวก ก) เขย่าให้อากาศด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 150 rpm ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้น ดูดตัวอย่างเชื้อไปทำ Wet mount โดยใช้สี Nile red และส่องกล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่าและบันทึกภาพถ่ายเซลล์ยีสต์ โดยไขมันที่สะสมภายในเซลล์ยีสต์ หรือ ลิพิดบอดี (Lipid body) จะเรืองแสงสีเหลืองทอง (Golden emission) ดังภาพประกอบ 2 เทคนิคการให้คะแนนสามารถพิจารณาจากขนาดของไขมันที่สะสมภายในเซลล์ยีสต์ ดังตารางที่ 5 และ ดังภาพประกอบ 3 แสดงตัวอย่างของไขมันที่สะสมภายในเซลล์ยีสต์



ภาพประกอบ 2 ตัวอย่างของเซลล์ยีสต์ที่ย้อมสี Nile Red และส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ (A) เฟสคอนทราสต์ (Phase contrast microscope) และ (B) ฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence microscope) ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า, ลิพิดบอดีที่ถูกย้อมด้วยสี Nile red และเกิดการเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ เส้นสีดำแสดง Scale bar ที่มีความยาว 10 µm

ตาราง 5 หลักเกณฑ์การพิจารณาขนาดของไขมันที่สะสมภายในเซลล์ยีสต์ (Lipid body)

| ขนาดไขมันที่สะสมภายในเซลล์ยีสต์ (Lipid body) | ระดับคะแนน |
|--|------------|
| มีขนาดเกือบเต็มเซลล์ยีสต์ | 3+ |
| มีขนาด 2 ใน 3 ของเซลล์ยีสต์ | 2+ |
| มีขนาด 1 ใน 3 ของเซลล์ยีสต์ | 1+ |
| มีขนาดน้อยกว่า 1 ใน 3 ของเซลล์ยีสต์ | - |



ภาพประกอบ 3 ภาพจำลองขนาดลึบอดดีของยีสต์ ลึบอดดีขนาดเกือบเต็มเซลล์ (3+), ลึบอดดีขนาด 2 ใน 3 ของเซลล์ (2+), ลึบอดดีขนาด 1 ใน 3 ของเซลล์ (1+) และ ลึบอดดีขนาดน้อยกว่า 1 ใน 3 ของเซลล์ยีสต์ (-)

4. ศึกษาปริมาณไขมันของยีสต์สะสมไขมัน

4.1 การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

นำยีสต์บริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหารแข็ง YM agar เป็นระยะเวลา 2-3 วัน ถ่ายลงในอาหาร YM broth ปริมาตร 5 mL เขย่าให้อากาศด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 150 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ (seed culture) หลังจากนั้นถ่ายหัวเชื้อ ปริมาตร 5 mL โดยมีความเข้มข้นของเชื้อที่ OD_{600nm} ประมาณ 0.6 ถึง 0.8 ลงในอาหารเหลว 2G2M ปริมาตร 45 mL (ปริมาตรสุทธิเท่ากับ 50 mL) และเขย่าให้อากาศด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 150 rpm ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นเก็บตัวอย่างโดยการปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบเท่ากับ 5,800 x g เป็นระยะเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อเก็บตะกอนเซลล์ เพื่อใช้ในการวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง และหาปริมาณไขมันต่อไป

4.2 การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง

นำตัวอย่างเซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงไว้ในหัวข้อ 4.1 ปริมาตร 10 mL ปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบเท่ากับ 5,800 x g เป็นระยะเวลา 10 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 5 mL ลงในตะกอนเซลล์ เขย่าเพื่อให้ตะกอนเซลล์แขวนลอยในน้ำกลั่น จากนั้นเทลงในภาชนะที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จนน้ำหนักของภาชนะคงที่ นำตัวอย่างไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 °C จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ นำมาใส่ในโหลดูดความชื้น (desiccator) ให้มีอุณหภูมิเย็นลง นำไปชั่ง

น้ำหนักที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่งชนิดละเอียด 4 ตำแหน่ง นำไปคำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามสมการที่ 1 ดังนี้

$$\text{Biomass production (g/L)} = \frac{\text{น้ำหนักเซลล์แห้งที่ชั่งได้ (g)}}{10 \text{ mL (ปริมาตรที่เก็บตัวอย่าง)}} \times 1,000 \text{ ----- (1)}$$

4.3 การวิเคราะห์ปริมาณของไขมัน

นำตัวอย่างเซลล์ที่ได้จากขั้นตอนที่ 4.1 ปริมาตร 25 mL ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5,800 x g เป็นระยะเวลา 10 นาที แล้วทำการล้างตะกอนเซลล์ 2 ครั้งด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จากนั้นทำการแตกเซลล์ด้วยด้วยเครื่องเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง เป็นระยะเวลา 10 นาที แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณไขมันโดยการสกัดด้วยตัวทำละลาย โดยดัดแปลงวิธีของ Bligh และ Dyer (1959)⁽⁶⁷⁾ ดังนี้ สกัดไขมันด้วยสารละลายผสม คลอโรฟอร์ม และ เมทานอล (chloroform : methanol) อัตราส่วน 2:1 (v/v) ปริมาตร 11.25 mL เขย่าให้เข้ากันจากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 10 นาที เติมสารละลาย คลอโรฟอร์ม เขย่าให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 3.75 mL ผสมให้เข้ากันนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,275 x g เป็นระยะเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 10 °C ตัวอย่างที่ได้จะแยกออกเป็น 3 ชั้น คือ ชั้นบนเป็นส่วนของสารละลายมีขี้ผึ้ง ได้แก่ น้ำและเมทานอล ชั้นที่ 2 เป็นชั้นของตะกอนเซลล์ และชั้นล่างเป็นส่วนสารละลายไม่มีขี้ผึ้ง ได้แก่ คลอโรฟอร์ม ซึ่งประกอบไปด้วยไขมันที่สกัดได้จากเซลล์ยีสต์ ทำการดูดสารละลายในชั้น คลอโรฟอร์ม ลงในภาชนะใหม่ ทำการสกัดซ้ำ เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดไขมัน จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยโหลดูดแบบสุญญากาศ วิเคราะห์หาปริมาณไขมันที่สกัดได้ โดยนำส่วนของไขมันที่ระเหยคลอโรฟอร์มออกหมดแล้ว ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งแบบละเอียด 4 ตำแหน่ง โดยปริมาณของไขมันที่ได้จะคำนวณเป็นค่าของ Lipid production ดังสมการที่ 2 และ ค่าของ Lipid content ดังสมการที่ 3 นอกจากนี้ยังวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันตามวิธีการของ Polburee P และคณะ 2015⁽²⁰⁾

$$\text{Lipid production (g/L)} = \frac{\text{น้ำหนักไขมันชั่งได้ (g)}}{25 \text{ mL (ปริมาตรที่เก็บตัวอย่าง)}} \times 1,000 \text{ (2)}$$

$$\text{Lipid content (\%)} = \frac{\text{Lipid production (g/L)}}{\text{Biomass production (g/L)}} \times 100 \text{ (3)}$$

5. การจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ D1/D2 domain ของ large subunit (LSU) 26S rRNA gene

5.1 การสกัดดีเอ็นเอจากยีสต์

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างยีสต์สะสมไขมันโดยดัดแปลงจากวิธีของ Manitis และคณะ 1982⁽⁸⁹⁾ โดยนำยีสต์ที่เพาะบนอาหาร YM agar อายุ 24-48 ชั่วโมง มาทำให้เซลล์แตกด้วยสารละลาย lysis buffer (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 200 μ L โดยนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม potassium acetate ความเข้มข้น 2.5 M ปริมาตร 200 μ L ผสมให้เข้ากัน นำไปแช่เย็นที่ -20°C เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 18,000 x g เป็นระยะเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ เก็บส่วนใส (supernatant) ย้ายใส่หลอดใหม่ เติมสารละลายผสม คลอโรฟอร์ม และ ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ (chloroform : isoamyl alcohol) ในอัตราส่วน (24 : 1 v/v) ปริมาตร 400 μ L ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ 18,000 x g เป็นระยะเวลา 5 นาที จากนั้น เก็บส่วนใสด้านบน ถ่ายลงในภาชนะใหม่ ทำซ้ำอีกรอบด้วยขั้นตอนเดิม จากนั้น ทำการตกตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วย ไอโซโพรพานอล (isopropanol) ที่เย็น ปริมาตร 200 μ L ทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนดีเอ็นเอที่ 18,000 x g เป็นระยะเวลา 20 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% และ 99% เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol: EtOH) ตามลำดับ ทิ้งตะกอน DNA ไว้ให้แห้ง จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำบริสุทธิ์คุณภาพสูง (MiliQ water) ปริมาตร 20 μ L

5.2 เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ บริเวณ D1/D2 domain ของ large subunit (LSU) 26S rRNA gene ด้วยกระบวนการ Polymerase Chain Reaction (PCR)

ในการเพิ่มขึ้นส่วนของดีเอ็นเอบริเวณ D1/D2 domain ของ large subunit (LSU) 26S rRNA gene ของยีสต์ ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Kurtzman และ Robnett 1998⁽⁹⁰⁾ โดยใช้ primers ประกอบไปด้วย NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') และ NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') ในการเตรียม master mix สำหรับการทำปฏิกิริยาของ PCR ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต Tag polymerase (Vivantis™, Malaysia) ดังตาราง 6 มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ D1/D2 domain ของ large subunit (LSU) 26S rRNA gene ด้วยเครื่อง PCR (PCR Max™, China) ที่กำหนดโปรแกรม ดังตารางที่ 7 จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย agarose gel electrophoresis (0.8 % ของ agarose gel)

PCR product ที่ได้ นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Gel/PCR purification kit (Vivantis™, Malaysia) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต ดังนี้ นำ PCR product ปริมาตร 100 μ L

ผสมกับ PB buffer ปริมาตร 500 μ L ถ่ายลงในหลอดคอลัมน์ (Column tube) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 x g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทำการล้างสิ่งเจือปนด้วย Wash buffer ปริมาตร 500 μ L แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 x g เป็นเวลา 1 นาที เติม Elution buffer ปริมาตร 20 μ L เพื่อชะ PCR product ที่บริสุทธิ์ออกมาเพื่อนำส่งวิเคราะห์หาลำดับเบสต่อไป

ตาราง 6 องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่บริเวณ D1/D2 domain ของ large subunit (LSU) 26S rRNA gene

| องค์ประกอบ | ปริมาตร (μ L) |
|----------------------------|--------------------|
| 1. 10X Taq buffer | 3.00 |
| 2. 50 mM MgCl ₂ | 1.20 |
| 3. 10 mM mix dNTP | 0.60 |
| 4. 10 pmol NL1 (primer) | 0.90 |
| 5. 10 pmol NL4 (primer) | 0.90 |
| 6. ddH ₂ O | 20.25 |
| 7. Taq DNA polymerase | 0.15 |
| 8. DNA template | 3.00 |
| รวม | 30.00 |

ตาราง 7 สภาวะในการเพิ่มขึ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเครื่อง PCR

| ขั้นตอน | อุณหภูมิ ($^{\circ}$ C) | เวลา (วินาที) | จำนวนรอบ |
|------------------|--------------------------|---------------|----------|
| Pre-denaturation | 94 | 300 | 1 |
| Denaturation | 94 | 60 | 29 |
| Annealing | 52 | 90 | |
| Extension | 72 | 150 | |
| Final extension | 72 | 600 | 1 |

5.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ D1/D2 domain ของ large subunit (LSU) 26S rRNA gene และการสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

PCR product ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ ส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ บริษัท MacroGen™ , ประเทศเกาหลีใต้ โดยใช้ primer NL1 และ NL4 และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI 3730xl DNA sequencers, Fisher Scientific™ , USA (Sanger sequencing) จากนั้นนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ บริเวณ D1/D2 domain ของ Large subunit (LSU) 26S rRNA gene มาวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับ ข้อมูลที่ปรากฏในฐานข้อมูล GenBank ซึ่งอยู่บน NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) โดยโปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST®)

เกณฑ์การพิจารณาการจำแนก จะใช้การเปรียบเทียบการแทนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide substitution) ของ 2 สายพันธุ์ ในบริเวณ D1/D2 domain ของ Large subunit (LSU) 26S rRNA gene ซึ่งมีขนาด 600 นิวคลีโอไทด์ โดยมีเกณฑ์ในการจัดจำแนกดังนี้ หากมีการแทนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ มากกว่าหรือเท่ากับ 6 นิวคลีโอไทด์ สามารถจัดจำแนกได้เป็นสปีชีส์ที่แตกต่างกัน แต่หากมีนิวคลีโอไทด์ต่างกันไม่เกิน 3 นิวคลีโอไทด์ สามารถจัดเป็นสปีชีส์เดียวกัน หรือสปีชีส์ที่ใกล้เคียงกันมาก (Kurtzman และ Robnett, 1998)⁽⁹⁰⁾

จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับสปีชีส์ที่ใกล้เคียงกันมากที่สุดโดยใช้ Multiple alignment program ในโปรแกรม MEGAX Ver 11.0.10 แล้วจึงสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยใช้รูปแบบการวิเคราะห์ Maximum likelihood tree (Tamura K. และ Nei M. 1993)⁽⁹¹⁾ โดยกำหนดค่า Bootstraps เท่ากับ 1,000

6. การคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับวิธีเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน

6.1 การเตรียมหัวเชื้อ

ยีสต์สายพันธุ์ *L. mesembrius* SWU-NGP 14-6 ที่เจริญบนอาหารแข็ง YM agar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถ่ายลงในอาหารเหลว YM ปริมาตร 50 mL เขย่าให้อากาศด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 150 rpm ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบเท่ากับ 5,800 x g เป็นระยะเวลา 10 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการทดสอบต่อไป

6.2 การศึกษาผลของระยะเวลาในการผลิตไขมันของยีสต์สายพันธุ์

L. mesembrius SWU-NGP 14-6 ที่เจริญในอาหารที่แตกต่างกัน

นำหัวเชื้อที่เตรียมได้จากการทดลองที่ 6.1 มาปรับให้มีความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นที่ค่า OD_{600nm} เท่ากับ 1.0 ในอาหารเหลว YM และ 2G2M ปริมาตร 50 mL จากนั้นนำไปเขย่าให้อากาศด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 150 rpm ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นระยะเวลา 168 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างปริมาตร 1 mL ทุก 12 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไป ด้วยวิธี dinitro salicylic acid และวิเคราะห์ปริมาณไขมัน น้ำหนักเซลล์แห้ง ตามการทดลองที่ 4.2-4.3 จากนั้นนำค่าวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหาค่าตามการวิเคราะห์ข้อมูลในหัวข้อที่ 6.4

6.3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเหลวด้วยวิธี Dinitro salicylic acid (DNS method)

นำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงในขั้นตอนการเก็บตะกอนเซลล์ จากการทดลองที่ 6.2 นำมาทำให้เจือจางให้ความเข้มข้นลดลง 10 เท่า ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จากนั้นจะนำไปผสมกับสารละลาย DNS (dinitro salicylic acid) (ภาคผนวก ข) ในอัตราส่วน 1:2 (v/v) นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นระยะเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในน้ำเย็นเป็นระยะเวลา 5 นาที ตามด้วยเติมน้ำกลั่น 5 mL แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ OD_{540nm} ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์โดยปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์สามารถคำนวณได้จากกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส (ภาคผนวก ค)

6.4. การวิเคราะห์พารามิเตอร์ของข้อมูล

การวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ทั้งหมดในการทดลองนี้จะคำนวณหาได้จากสมการที่ดังสูตรที่แสดงด้านล่าง

$$\text{Biomass production (g/L)} = \frac{\text{น้ำหนักเซลล์แห้งที่ซึ่งได้ (g)}}{10 \text{ mL (ปริมาตรที่เก็บตัวอย่าง)}} \times 1,000 \quad (1)$$

$$\text{Lipid production (g/L)} = \frac{\text{น้ำหนักไขมันซึ่งได้ (g)}}{25 \text{ mL (ปริมาตรที่เก็บตัวอย่าง)}} \times 1,000 \quad (2)$$

$$\text{Lipid content (\%)} = \frac{\text{Lipid production (g/L)}}{\text{Biomass production (g/L)}} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{Lipid productivity (g/L/D)} = \frac{\text{Lipid production (g/L)}}{\text{Time (Day)}} \quad (4)$$

$$\text{Lipid yield (g/g)} = \frac{\text{Lipid production (g/L)}}{\text{Carbon source consumption (g/L)}} \quad (5)$$

$$\text{Biomass productivity (g/L/D)} = \frac{\text{Biomass production (g/L)}}{\text{Time (Day)}} \quad (6)$$

$$\text{Biomass yield (g/g)} = \frac{\text{Biomass production (g/L)}}{\text{Carbon source consumption (g/L)}} \quad (7)$$

7. การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไขมันด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน

7.1 การเตรียมหัวเชื้อ

ยีสต์สายพันธุ์ *L. mesembrius* SWU-NGP 14-6 ที่เจริญบนอาหารแข็ง YM agar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถ่ายลงในอาหารเหลว YM broth ปริมาตร 50 mL เขย่าให้อากาศด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 150 rpm ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบเท่ากับ 5,800 x g เป็นระยะเวลา 10 นาที แล้วล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการทดลองถัดไป

7.2 การผลิตไขมันแบบ 2 ขั้นตอน

เพิ่มผลผลิตไขมันจากยีสต์สะสมไขมันที่คัดเลือกได้ โดยเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน ในอาหารเหลว 2G2M และ 6G (ภาคผนวก ก) โดยปรับระยะเวลาการเลี้ยงในอาหารทั้ง 2 ชนิด ดังตารางที่ 8 โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าที่ 150-200 rpm ระยะเวลา 6 วัน เทียบกับชุดการทดลองควบคุม สภาวะ B6 ซึ่งเป็นการเพาะเลี้ยงแบบขั้นตอนเดียว (one stage fermentation) บนอาหาร 2G2M ชนิดเดียว เป็นระยะเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าที่ความเร็วรอบเท่ากับ 150 และ 200 rpm

ตาราง 8 การออกแบบการผลิตไขมันแบบ 2 ขั้นตอน

| Condition | Type of fermentation | Type of media and incubation time (Day) | |
|-----------|----------------------|---|----------------------|
| | | First stage | Second stage |
| D3 | Two-stage | 2G2M broth (3 Days) | 6G broth (3 Days) |
| D4 | Two-stage | 2G2M broth (4 Days) | 6G broth (2 Days) |
| D5 | Two-stage | 2G2M broth (5 Days) | 6G broth (1 Day) |
| B6 | One-tage | 2G2M broth (6 Days) | - |

7.2.1 ขั้นที่ 1: เลี้ยงบนอาหาร 2G2M

จากหัวเชื้อที่เตรียมไว้ใน การทดลองที่ 7.1 นำมาปรับให้มีความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นที่ OD_{600nm} เท่ากับ 1.0 ในอาหาร 2G2M ปริมาตร 100 mL ในพลาสติกขนาด 500 mL เขย่าให้อากาศด้วยความเร็วรอบที่ต่างกัน ได้แก่ 150 และ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 30 °C โดยใช้ระยะเวลาในการหมักต่างกันแสดงในตารางที่ 8 จากนั้นเมื่อสิ้นสุดการหมักในขั้นที่ 1 จะทำการเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบเท่ากับ 5,800 x g เป็นระยะเวลา 10 นาที โดยปราศจากการล้างตะกอนเซลล์ จากนั้นตะกอนเซลล์ทั้งหมดจะถูกถ่ายลงในอาหาร 6G ในการทดลองที่ 7.2.2

7.2.2 ขั้นที่ 2: เลี้ยงบนอาหาร 6G

นำตะกอนเซลล์ทั้งหมดที่ได้จากการทดลองที่ 7.2.1 ถ่ายลงในอาหารเหลว 6G ปริมาตร 100 mL ในพลาสติกขนาด 500 mL เขย่าให้อากาศด้วยความเร็วรอบที่ต่างกัน ได้แก่ 150 และ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 30 °C โดยใช้ระยะเวลาในการหมักต่างกันแสดงใน ตารางที่ 8

7.2.3 การเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์

เก็บตัวอย่างภายหลังจากการเพาะเลี้ยงในอาหาร 2G2GM (ขั้นตอนที่ 7.2.1) และ อาหาร 6G (ขั้นตอนที่ 7.2.2) อย่างละ 10 mL นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5,800 x g เป็นระยะเวลา 10 นาที ทำการล้างตะกอนเซลล์ 2 ครั้งด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน นำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณของน้ำตาลที่ถูกใช้ไป จากนั้นจะนำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหาค่าพารามิเตอร์ในการทดลองหัวข้อที่ 6.4

8. การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันของยีสต์สะสมไขมัน

8.1 การเตรียมเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (Fatty acid methyl ester)

นำไขมันที่สกัดออกจากเซลล์ยีสต์จากการทดลองเพาะเลี้ยงแบบ 2 ชั้นตอน และไขมันที่สกัดออกมาจากยีสต์ตัวแทนแต่ละสปีชีส์ ตามวิธีการข้างต้น มาวิเคราะห์หาองค์ประกอบของไขมัน โดย ตัวอย่างไขมันที่สกัดได้ จะถูกเตรียมให้อยู่ในรูปของ Fatty acid methyl esters (FAMES) ตามวิธีการดัดแปลงของ Polburee P และคณะ 2015⁽²⁰⁾ ดังนี้

นำไขมันที่สกัดได้จะเติม internal standard (pentadecanoic acid C15:0) เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์ปริมาณของกรดไขมัน จากนั้นนำไขมันไปทำปฏิกิริยา transesterification โดยเติม sulfuric acid ความเข้มข้น 6% (v/v) ใน methanol ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปให้ความร้อนในตู้อบลมร้อน ที่ 80 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อสารเย็นลงจะสกัด FAMES ออกโดยการเติม petroleum ether และ DI water จากนั้นดูดเอาชั้นของ petroleum ether มาระเหยให้แห้งในเครื่องดูดสุญญากาศ

8.2 วิเคราะห์องค์ประกอบไขมันด้วย Gas-Chromatography

FAMES ที่สังเคราะห์ได้ นำมาละลายในเฮกเซน (Hexane) เพื่อให้ FAMES สามารถระเหยไปพร้อมกับเฮกเซนจึงสามารถวิเคราะห์โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีได้ โดยสภาวะในการวิเคราะห์แสดงใน ตารางที่ 9

ตาราง 9 แสดงสภาวะการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง แก๊สโครมาโตกราฟี

| | |
|--------------------------------|-------------------------------|
| อุณหภูมิของแคปิลลารีคอลัมน์ | 200 °C |
| อุณหภูมิของ Injector | 250 °C |
| อุณหภูมิของ Detector | 250 °C |
| แก๊สตัวพา และ อัตราการไหล | ฮีเลียม (Helium), 3.0 mL/นาที |
| ระยะเวลาในการวิเคราะห์ตัวอย่าง | 8 นาที ต่อ 1 ตัวอย่าง |

9. การวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติ

การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของชุดข้อมูลที่ได้จากการทดลอง ได้แก่ ศึกษาปริมาณไขมันของยีสต์สะสมไขมัน (Oleaginous yeast), การคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับวิธีเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน และการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไขมันด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One Way ANOVA) ร่วมกับวิเคราะห์ความแตกต่างของชุดข้อมูลด้วย Tukey's HSD (honestly significant difference) test กำหนดค่าความเชื่อมั่นเท่ากับ 95% (P value $<$ 0.05) และจำนวนของชุดข้อมูลมี n เท่ากับ 3 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistic Ver.25

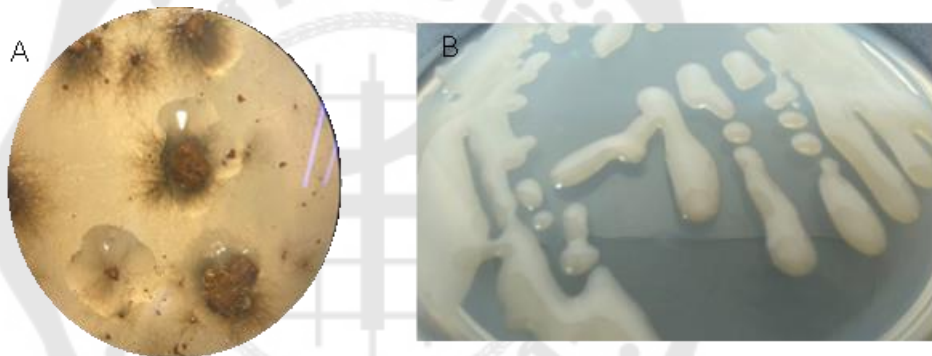


บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การคัดแยกเชื้อยีสต์จากตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินทั้งหมด 22 ตัวอย่าง จากดินบริเวณภูเขาใน จังหวัดเชียงราย ดังภาพประกอบ 5 พบว่า สามารถคัดแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 127 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จาก อาหาร NDM agar จำนวน 56 ไอโซเลท และแยกจากอาหาร NDM gellan gum จำนวน 71 ไอโซเลท ดังตารางที่ 11 โดยคัดเลือกลักษณะโคโลนีที่มีเมือกเยิ้ม ดังภาพประกอบ 4 โดยยีสต์ที่แยกได้ทั้งหมด 127 ไอโซเลท พบว่าสามารถแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณดอยปู่ย ได้จำนวน 4 ไอโซเลท ตัวอย่างดินจากดอยผาฮี้จำนวน 1 ไอโซเลท และตัวอย่างดินจากภูชี้ฟ้าได้มากที่สุดเท่ากับ 122 ไอโซเลท ซึ่งแสดงให้เห็นว่าดินจากภูชี้ฟ้ามีความหลากหลายของประชากรยีสต์มากที่สุด



ภาพประกอบ 4 (A) โคโลนีของยีสต์ที่เจริญอยู่รอบตัวอย่างดิน บนอาหารแข็ง NDM เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (B) ลักษณะโคโลนีของยีสต์ ไอโซเลท SWU-NGP 14-6 ที่บริสุทธิ์ บนอาหารแข็ง NDM

จากการศึกษาลักษณะของดินบริเวณที่เก็บตัวอย่างพบว่าลักษณะดินบนภูเขามีลักษณะที่แตกต่างกันดังต่อไปนี้ ในช่วงปลายเดือนธันวาคม ถึง ต้นเดือนมกราคม ซึ่งเป็นฤดูหนาว พบว่าลักษณะดินของดอยปู่ยเป็นดินร่วนปนทรายค่อนข้างแห้งมีเศษซากพืชปกคลุมผิวน้ำดิน อุณหภูมิของดินมีค่าประมาณ 20 ถึง 22 °C มีค่าความชื้นของดินประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ และมีค่า pH อยู่ในช่วง 6.5 ถึง 7.0 ในส่วนของลักษณะดินของดอยผาฮี้เป็นดินแดงค่อนข้างเหนียวจับกันเป็นก้อน อุณหภูมิของดินมีค่าประมาณ 15 ถึง 20 °C มีค่าความชื้นของดินประมาณ 15 ถึง 18 เปอร์เซ็นต์ และมีค่า pH ประมาณ 7.0 และดินจากภูชี้ฟ้าพบว่า ลักษณะดินของเป็นดินร่วนปนดินเหนียวค่อนข้างมีความชื้นสูง มีเศษซากพืชปกคลุมผิวน้ำดิน อุณหภูมิของดินมีค่าประมาณ

15 ถึง 25 °C มีค่าความชื้นของดินประมาณ 15 ถึง 45 เปอร์เซ็นต์ และมีค่า pH อยู่ในช่วง 4.0 ถึง 8.0 (แสดงในตาราง 10)



ภาพประกอบ 5 แผนที่จังหวัดเชียงราย และตำแหน่งของภูเขาที่เก็บตัวอย่างดินได้แก่ ดอยปุย ดอยผาฮี้ และ ภูชี้ฟ้า

ตาราง 10 ข้อมูลของตัวอย่างดินและจำนวนยีสต์ที่แยกได้จากอาหาร NDM-agar และ NDM-gellan gum

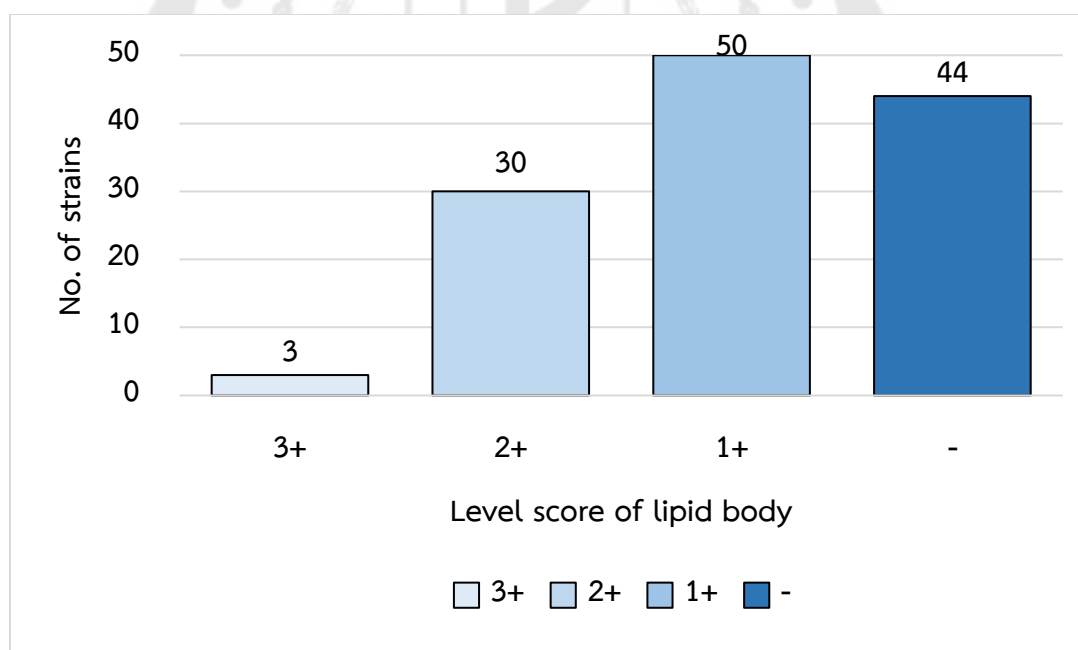
| ตัวอย่างดิน | สภาวะของดิน | | | จำนวนยีสต์ที่แยกได้ | | ยีสต์ทั้งหมด |
|---------------------|---------------|--------------|-----|---------------------|----------------|--------------|
| | อุณหภูมิ (C°) | ความชื้น (%) | pH | NDM agar | NDM gellan gum | |
| 1. Doi Pui 2 | 20 | 15 | 6.5 | 1 | - | 1 |
| 2. Doi Pui 12 | 21 | 15 | 7.0 | 1 | 1 | 2 |
| 3. Doi Pui 14 | 22 | 15 | 7.0 | 1 | - | 1 |
| 4. Doi Pha Hee 3 | 15 | 18 | 7.0 | 1 | - | 1 |
| 5. Phu Chee Fah 1 | 18 | 20 | 7.0 | 1 | 6 | 7 |
| 6. Phu Chee Fah 2 | 20 | 30 | 6.5 | 3 | 5 | 8 |
| 7. Phu Chee Fah 3 | 25 | 15 | 7.0 | 1 | 5 | 6 |
| 8. Phu Chee Fah 4 | 18 | 30 | 7.5 | 4 | 2 | 6 |
| 9. Phu Chee Fah 5 | 18 | 20 | 7.0 | 12 | 12 | 24 |
| 10. Phu Chee Fah 6 | 19 | 30 | 8.5 | - | 5 | 5 |
| 11. Phu Chee Fah 8 | 19 | 30 | 4.0 | 3 | 1 | 4 |
| 12. Phu Chee Fah 9 | 19 | 45 | 6.0 | 2 | 1 | 3 |
| 13. Phu Chee Fah 10 | 19 | 30 | 6.5 | 1 | 1 | 2 |
| 14. Phu Chee Fah 11 | 18 | 40 | 7.0 | - | 3 | 3 |
| 15. Phu Chee Fah 12 | 19 | 40 | 7.0 | 1 | - | 1 |
| 16. Phu Chee Fah 13 | 19 | 30 | 6.5 | 4 | - | 4 |
| 17. Phu Chee Fah 14 | 20 | 20 | 7.0 | 1 | 8 | 9 |
| 18. Phu Chee Fah 15 | 19 | 45 | 6.5 | 2 | - | 2 |
| 19. Phu Chee Fah 16 | 18 | 15 | 7.0 | 4 | 1 | 5 |
| 20. Phu Chee Fah 17 | 19 | 15 | 7.0 | 2 | 1 | 3 |
| 21. Phu Chee Fah 18 | 18 | 15 | 6.5 | 11 | 13 | 24 |
| 22. Phu Chee Fah 19 | 15 | 19 | 7.0 | - | 6 | 6 |
| รวม | | | | 56 | 71 | 127 |

2. การคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถสะสมไขมันได้สูง

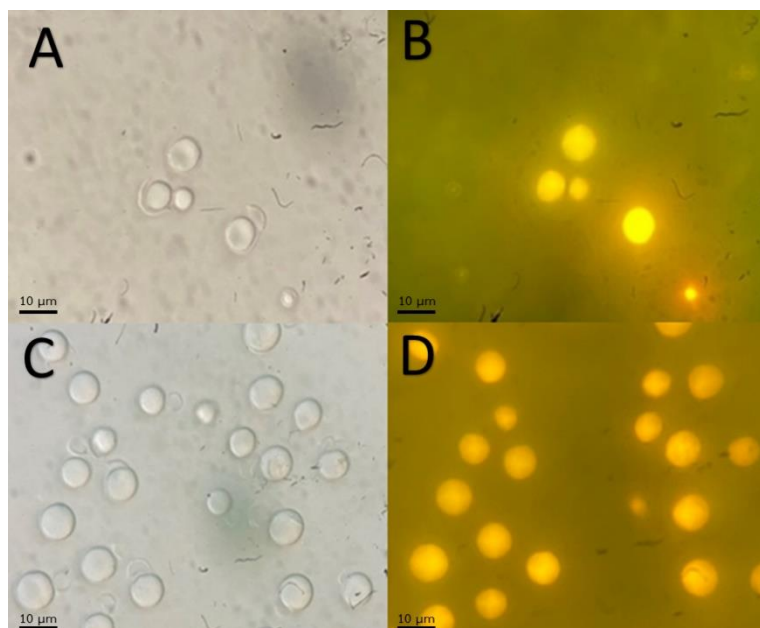
2.1 การคัดเลือกยีสต์สะสมไขมันโดยการย้อมสี Nile red

เซลล์ยีสต์ที่แยกได้ทั้งหมดจะถูกเลี้ยงในอาหารเหลว 2G2M ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วัน เพื่อนำมาศึกษาความสามารถในการสะสมไขมันโดยการย้อมสี Nile red และส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ สังเกตขนาดของลิพิดบอดี (lipid body) สะท้อนแสงฟลูออเรสเซนซ์สีเหลือง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ (ภาพประกอบ 7)

จากผลวิจัยพบว่ายีสต์ที่คัดแยกได้ทั้งหมด 127 ไอโซเลท มียีสต์ 78 ไอโซเลท ที่พบลิพิดบอดีภายในเซลล์มีขนาดมากกว่า 1 ใน 3 ของเซลล์ (มากกว่าระดับ 1+) ดังภาพประกอบ 6 และผลการทดลองดัง ภาคผนวก ง นอกจากนี้ยังพบว่ายีสต์ที่มีขนาดของลิพิดบอดีระดับ 3+ ซึ่งพบไขมันสะสมเต็มเซลล์ มีจำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ SWU-NGP 2-5 , SWU-NAP 4-1 และ SWU-NGP 14-6 ดังภาพประกอบ 7 แสดงให้เห็นถึงขนาดของลิพิดบอดีขนาดใหญ่ของยีสต์ที่มีพื้นที่เกือบเต็มเซลล์ ซึ่งบ่งบอกได้ว่ายีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลทสามารถสะสมไขมันได้สูง



ภาพประกอบ 6 จำนวนสายพันธุ์ของยีสต์ที่แบ่งตามขนาดของลิพิดบอดี โดย ยีสต์ที่มีลิพิดบอดีขนาดเกือบเต็มเซลล์ยีสต์ (■), ยีสต์ที่มีลิพิดบอดีมีขนาด 2 ใน 3 ของเซลล์ (■), ยีสต์ที่มีลิพิดบอดีขนาด 1 ใน 3 ของเซลล์ (■) และ ยีสต์ที่มีลิพิดบอดีขนาดเล็กกว่า 1 ใน 3 ของเซลล์ (■)



ภาพประกอบ 7 เซลล์ยีสต์และลิพิดบอดี้ภายในเซลล์ยีสต์ (A, B) สายพันธุ์ SWU-NGP 2-5 และ (C, D) SWU-NGP 14-6 ที่เจริญในอาหารเหลว 2G2M เป็นระยะเวลา 7 วัน โดย (ภาพ B และ D) ลักษณะของเซลล์ยีสต์ที่มีลิพิดบอดี้ขนาดใหญ่จนเกือบเต็มเซลล์เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence microscope) ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า ภายหลังจากการย้อมสี Nile red (A และ C) ลักษณะของเซลล์ยีสต์ที่เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเฟสคอนทราสต์ (phase contrast microscope) ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

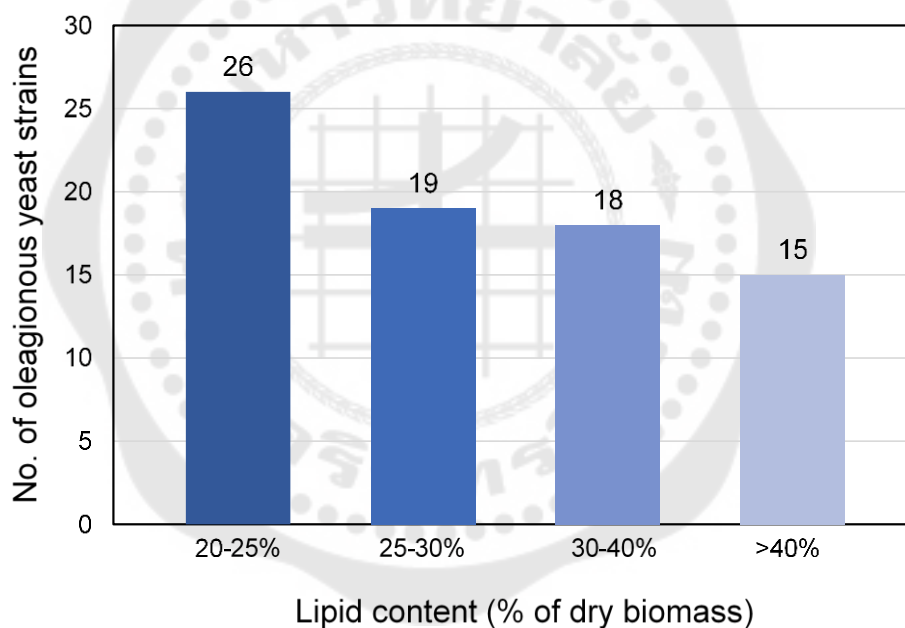
2.2 ศึกษาปริมาณไขมันของยีสต์สะสมไขมัน

เพื่อคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตไขมันได้สูง ได้ทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ที่คัดแยกได้จำนวน 127 ไอโซเลท ในอาหารเหลว 2G2M เชย้าที่ความเร็วรอบเท่ากับ 150 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นสกัดไขมันจากเซลล์ยีสต์ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไขมันโดยคำนวณค่าต่างๆ ได้แก่ lipid production , biomass production และ lipid content

จากผลวิจัยพบว่ายีสต์จำนวน 78 ไอโซเลท จากยีสต์ที่แยกได้ทั้งหมด 127 ไอโซเลท สามารถผลิตไขมันได้มากกว่า 20 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยพบยีสต์ที่สามารถผลิตไขมันได้ lipid content ในช่วง 20-25% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง จำนวน 26 ไอโซเลท ผลิตไขมันได้ 25-30% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง จำนวน 19 ไอโซเลท ผลิตไขมันได้ 30-40% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง จำนวน 18 ไอโซเลท และผลิตไขมันได้สูงถึง 40%-74% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง มีจำนวน 15 ไอโซเลท (ภาพประกอบ 8 และภาคผนวก ง)

นอกจากนี้ยังพบว่ายีสต์ 15 ไอโซเลทที่ผลิตไขมันได้สูง ได้แก่ ไอโซเลท SWU-NGP 2-5 สามารถผลิตไขมันได้ lipid content สูงถึง $74.26 \pm 6.30\%$ ของน้ำหนักเซลล์แห้ง รองลงมาคือ

ไอโซเลท SWU-NAP 4-1 ที่ผลิตไขมันได้ lipid content สูงถึง $57.10 \pm 1.82\%$ ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ ไอโซเลท SWU-NGP 14-6 ที่ผลิตไขมันได้ lipid content เท่ากับ $57.10 \pm 1.89\%$ ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังตารางที่ 11 แต่เมื่อพิจารณาถึงค่าการผลิตไขมัน และน้ำหนักเซลล์แห้งของ ยีสต์สะสมไขมันพบว่า ยีสต์ไอโซเลท SWU-NGP 14-6 มีค่าการผลิตไขมัน ได้สูงสุดคือ 5.20 ± 0.03 g/L และมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุดเท่ากับ 9.13 ± 0.36 g/L ในขณะที่ ยีสต์ SWU-NGP 2-5 ที่มีค่า lipid content สูงที่สุด แต่กลับมีปริมาณของไขมันเท่ากับ 1.10 ± 0.06 g/L และน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.49 ± 0.05 g/L ซึ่งมีปริมาณที่น้อยกว่าที่พบในยีสต์ไอโซเลท SWU-NGP 14-6 อย่างมาก ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกยีสต์ไอโซเลท SWU-NGP 14-6 นำไปศึกษาในการทดลองต่อไป



ภาพประกอบ 8 จำนวนยีสต์สะสมไขมันที่คัดแยกได้โดยแบ่งตามค่า lipid content (%) ยีสต์ที่มีค่า lipid content (%) อยู่ในช่วง 20-25% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (■), ยีสต์ที่มีค่า lipid content (%) อยู่ในช่วง 25-30% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (■), ยีสต์ที่มีค่า lipid content (%) อยู่ในช่วง 30-40% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (■) และ ยีสต์ที่มีค่า lipid content (%) >40% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (■)

ตาราง 11 ผลการผลิตไขมันของยีสต์ที่สามารถสะสมไขมันได้มากกว่า 40% ของน้ำหนักเซลล์

| Yeast strains | Biomass (g/L) | Lipid (g/L) | Lipid content (%) |
|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|
| <i>L. tetrasporus</i> SWU-NGP 2-5 | 1.49±0.05 ^g | 1.10±0.06 ^{gh} | 74.26±6.30 ^a |
| <i>L. tetrasporus</i> SWU-NAP 4-1 | 4.50±0.08 ^{ef} | 2.57±0.04 ^d | 57.10±1.82 ^b |
| <i>L. mesembrius</i> SWU-NGP 14-6 | 9.13±0.36 ^a | 5.20±0.03 ^a | 57.10±1.89 ^b |
| <i>L. mesembrius</i> SWU-NGP 6-4 | 7.83±0.17 ^b | 3.98±0.02 ^b | 50.80±0.80 ^b |
| <i>L. tetrasporus</i> SWU-NGP 5-8-1 | 9.07±0.16 ^a | 4.27±0.01 ^b | 47.06±0.66 ^{bcd} |
| <i>Sa. podzolica</i> SWU-NAP 5-4-2 | 3.88±0.19 ^{ef} | 1.81±0.19 ^{ef} | 46.63±2.51 ^{cde} |
| <i>L. starkeyi</i> SWU-NGP 14-3-1 | 3.53±0.56 ^f | 1.47±0.07 ^{fg} | 42.49±4.65 ^{cde} |
| <i>L. starkeyi</i> SWU-NGTP 4-5 | 5.92±0.14 ^{cd} | 2.45±0.22 ^d | 41.56±4.67 ^{de} |
| <i>L. starkeyi</i> SWU-NGP 5-7 | 8.39±0.85 ^{ab} | 3.35±0.00 ^c | 40.30±4.11 ^e |
| <i>Cy. saturnus</i> SWU-NGTP 5-3-3 | 1.00±0.04 ^{gh} | 0.4±0.014 ^{ij} | 40.00±0.00 ^e |
| <i>Sa. podzolica</i> SWU-NGP 5-3-8 | 6.59±0.89 ^c | 2.63±0.35 ^d | 40.00±0.00 ^e |
| <i>P. flavescens</i> SWU-NGTP 4-1 | 1.87±0.24 ^g | 0.74±0.10 ^{hi} | 40.00±0.00 ^e |
| <i>Sa. podzolica</i> SWU-NGP 14-2-2 | 4.99±0.19 ^{de} | 1.99±0.07 ^e | 40.00±0.00 ^e |
| <i>M. guilliermondii</i> SWU-NATP 2-4 | 0.25±0.04 ^h | 0.10±0.02 ^j | 40.00±0.00 ^e |
| <i>P. flavescens</i> SWU-NATP 3-3 | 1.15±0.06 ^{gh} | 0.46±0.02 ^{ij} | 40.00±0.00 ^e |

ยีสต์ทั้ง 15 ไอโซเลท เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 2G2M เป็นระยะเวลา 7 วัน ที่ความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 150 rpm ตัวอักษรแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (แนวคอลัมน์) โดยใช้สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้สถิติ Tukey test เมื่อ $p < 0.05$ โดยมีจำนวนการทดลอง 3 ซ้ำ ($n=3$)

นอกจากนี้ในการทดลองนี้ยังได้สุ่มตัวแทนของแต่ละไอโซเลทไปศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมัน ดังตารางที่ 12 พบว่าไขมันของยีสต์สะสมไขมันประกอบด้วยกรดไขมัน myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0), palmitoleic acid (C16:1), stearic acid (C18:0), oleic acid (C18:1), linoleic acid (C18:2), alpha-linolenic acid (C18:3 α) และ beta-linolenic acid (C18:3 β) โดยองค์ประกอบหลักของกรดไขมันที่พบมากที่สุด คือ กรดไขมัน Linoleic acid (C18:2) และ Palmitic acid (C16:0) โดยมีสัดส่วนของ กรดไขมัน linoleic acid (C18:2) 19-40% และ palmitic acid (C16:0) มีสัดส่วนของกรดไขมันที่ 15.7% ถึง 63.0% โดยในทุกไอโซเลทมักพบ กรดไขมัน linoleic acid (C18:2) มากที่สุดรองลงมาคือ palmitic acid (C16:0), Stearic acid (C18:1) และตามด้วย Beta-linolenic acid (C18:3 β) กับ oleic acid (C18:1) ยกเว้น *L. mesembrius* SWU-NAP 3-4 และ *P. terrestris* SWU-NAPui 14-5 พบ กรดไขมัน palmitic acid (C16:0) มากที่สุด นอกจากนี้ ในบางสายพันธุ์อาจจะไม่พบองค์ประกอบของกรดไขมันบางชนิด เช่น *P. terrestris* SWU-NGPui 12-9 ไม่พบกรดไขมัน palmitoleic acid (C16:1) และ *P. terrestris* SWU-NAPui 14-5 ที่ไม่พบกรดไขมัน myristic acid (C14:0) และ palmitoleic acid (C16:1) อีกทั้งยีสต์ *Sa. podzolica* SWU-YGP 8-1-2 ไม่พบกรดไขมัน myristic acid (C14:0), palmitoleic acid (C16:1) และ alpha-linolenic acid (C18:3 α) ตาราง 12 องค์ประกอบของกรดไขมันที่วิเคราะห์จากตัวแทนของยีสต์ที่แยกได้

| Isolates | Relative content of fatty acid (% w/w) | | | | | | | |
|-------------------------------------|--|-------|-------|-------|-------|-------|----------------|---------------|
| | C14:0 | C16:0 | C16:1 | C18:0 | C18:1 | C18:2 | C18:3 α | C18:3 β |
| <i>L. mesembrius</i> SWU-NAP 3-4 | 0.55 | 41.7 | 1.5 | 8 | 0.7 | 15.7 | - | 1.6 |
| <i>L. mesembrius</i> SWU-NAP 8-4 | 0.38 | 33.4 | 0.1 | 7.7 | 1 | 55.1 | 0.3 | 1.9 |
| <i>L. tetrasporus</i> SWU-NAP 5-3-1 | 0.32 | 41.1 | 0.6 | - | 6.8 | 48.6 | 0.9 | 1.6 |
| <i>L. tetrasporus</i> SWU-NAP 13-8 | 0.22 | 34.5 | 0.3 | 11.4 | 3.2 | 47.1 | 0.6 | 2.6 |
| <i>P. terrestris</i> SWU-NGPui 12-9 | 0.24 | 19.5 | - | 17.9 | 0.8 | 49.1 | - | 12.4 |
| <i>P. terrestris</i> SWU-NAPui 14-5 | - | 30.2 | - | 24.8 | 13.8 | 23.4 | 1.3 | 6.5 |
| <i>Sa. podzolica</i> SWU-YGP 8-1-2 | - | 20.3 | - | 11.6 | 0.3 | 63.1 | - | 4.6 |
| <i>Sa. podzolica</i> SWU-NGP 5-3-2 | 0.13 | 19.4 | 0.2 | 17.0 | 0.6 | 55.8 | - | 6.9 |

*หมายเหตุ: C14:0 = myristic acid, C16:0 = palmitic acid, C16:1 = palmitoleic acid, C18:0 = stearic acid, C18:1 = oleic acid, C18:2 = linoleic acid, C18:3 α = alpha-linolenic acid, C18:3 β = beta-linolenic acid

3. การจัดจำแนกยีสต์ที่โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ D1/D2 domain ของ large subunit (LSU) 26S rRNA gene

จากการนำยีสต์ทั้งหมด 127 ไอโซเลทถูกจัดจำแนกโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ D1/D2 domain ของ large subunit (LSU) 26S rRNA gene พบว่าสามารถจัดจำแนกยีสต์ได้ทั้งหมด 12 สปีชีส์ จัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota จำนวน 5 สปีชีส์ ได้แก่ *Cyberlindnera saturnus*, *Lipomyces mesembrius*, *Lipomyces starkeyi*, *Lipomyces tetrasporus* และ *Meyerozyma guilliermondii* และ ไฟลัม Basidiomycota จำนวน 8 สปีชีส์ ที่สามารถระบุสปีชีส์ได้ ได้แก่ *Rhodotorula mucilaginosa*, *Cystobasidium slooffiae*, *Naganishia diffluens*, *Papiliotrema flavescens*, *Papiliotrema terrestris*, *Saitozyma podzolica*, *Piskurozyma* sp. และ *Hannaella* sp. แสดงดังตาราง 13 และ ภาพประกอบ 9 และ ในภาพประกอบ 10 ยังแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีสต์ตัวแทนแต่ละสปีชีส์ที่สามารถตัดแยกและจัดจำแนกได้ในงานวิจัยนี้

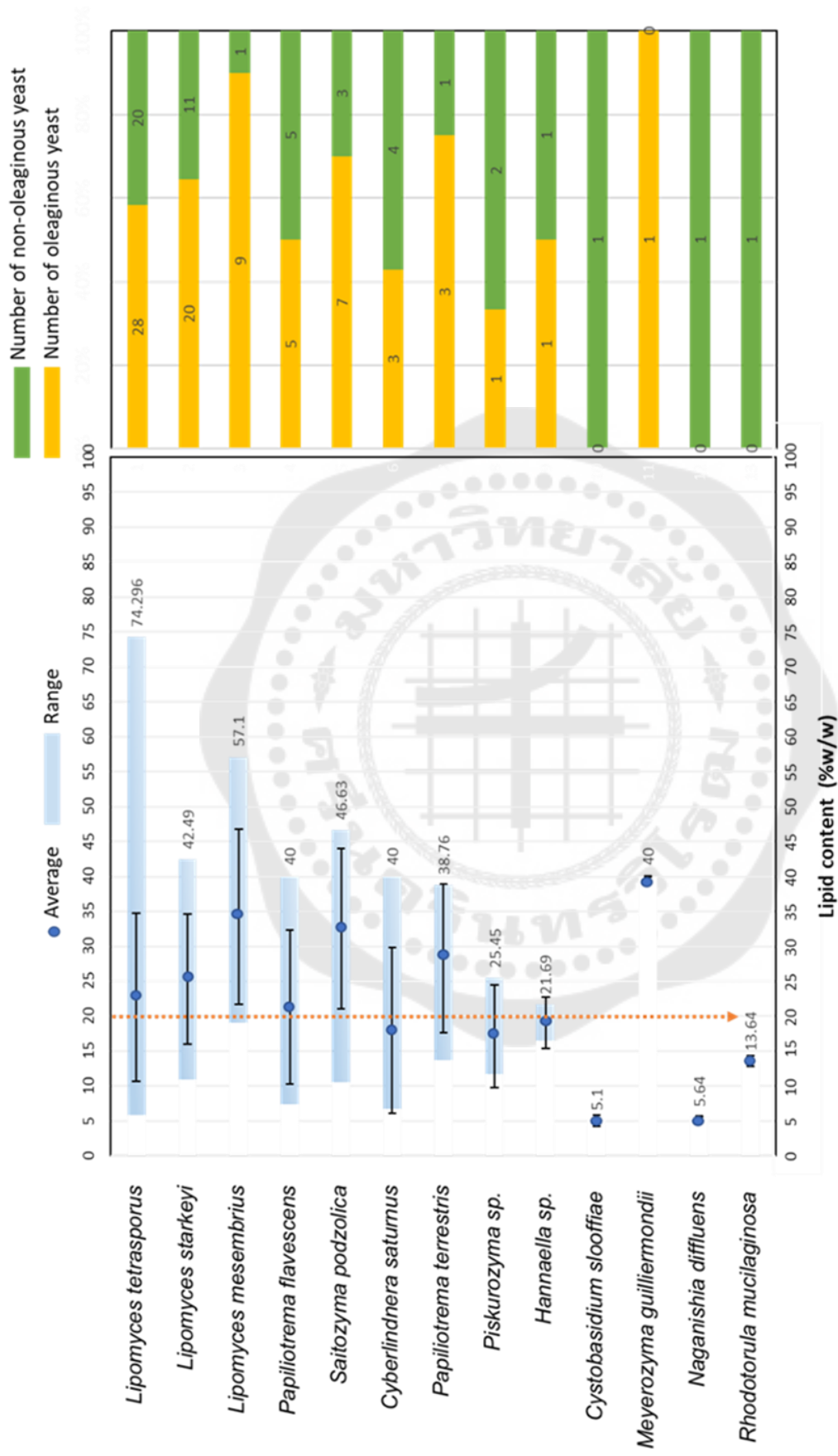
จากการศึกษาความถี่ของการตัดแยกยีสต์จากตัวอย่างดินภูเขา ในจังหวัดเชียงราย ด้วยอาหารคัดเลือกที่มีปริมาณของแหล่งไนโตรเจนต่ำ คือ อาหาร Nitrogen-depleted medium (NDM) พบว่า สกุลของยีสต์ที่ตัดแยกได้มากที่สุด คือ *Lipomyces* คิดเป็น ร้อยละ 70.1 จากยีสต์ทั้งหมด โดยแบ่งเป็น *Lipomyces tetrasporus* จำนวน 48 ไอโซเลท (34.8%), *Lipomyces starkeyi* จำนวน 31 ไอโซเลท (24.4%) และ *Lipomyces mesembrius* จำนวน 10 ไอโซเลท (7.9%) รองลงมาคือ *Papiliotrema flavescens* จำนวน 10 ไอโซเลท คิดเป็นความถี่ในการตัดแยกได้เท่ากับ 7.9%, *Papiliotrema terrestris* จำนวน 4 ไอโซเลท คิดเป็นความถี่ในการตัดแยกได้เท่ากับ 3.2%, *Saitozyma podzolica* จำนวน 8 ไอโซเลท คิดเป็นความถี่ในการตัดแยกได้เท่ากับ 6.3%, *Cyberlindnera saturnus* จำนวน 7 ไอโซเลท คิดเป็นความถี่ในการตัดแยกได้เท่ากับ 5.5% และ *Meyerozyma guilliermondii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Cystobasidium slooffiae*, *Naganishia diffluens* จำนวน อย่างละ 1 ไอโซเลท คิดเป็นความถี่ในการตัดแยกได้เท่ากับ 0.8% ดังตารางที่ 13

ตาราง 13 ความถี่ของสายพันธุ์ยีสต์ที่สามารถคัดแยกและจัดจำแนกได้จากตัวอย่างดิน

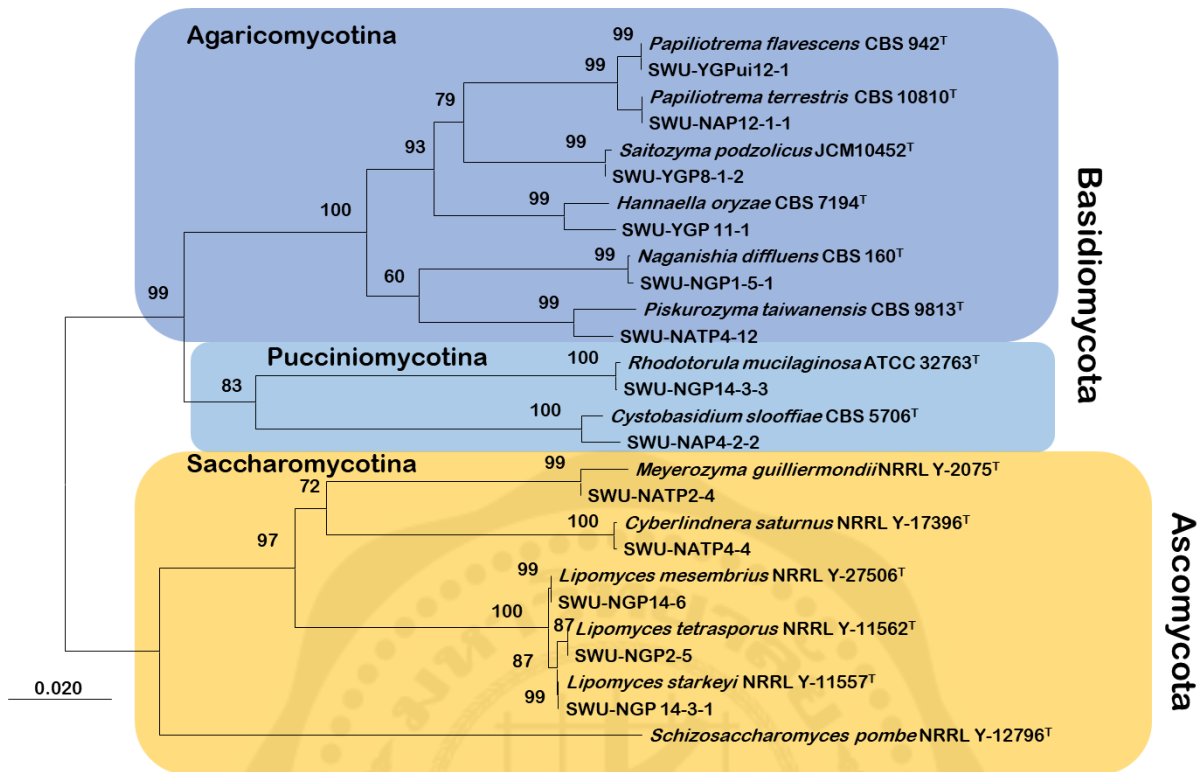
| Phylum | Species | No. | FO (%) ^a | Source ^b | | |
|------------------|----------------------------------|-----|---------------------|---------------------|----|----|
| | | | | PU | PH | PF |
| Ascomycota | <i>Cyberlindnera saturnus</i> | 7 | 0.5 | | | ● |
| Saccharomycotina | <i>Lipomyces mesembrius</i> | 10 | 7.9 | | ● | ● |
| | <i>Lipomyces starkeyi</i> | 31 | 24.4 | ● | | ● |
| | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 48 | 37.8 | ● | | ● |
| | <i>Meyerozyma guilliermondii</i> | 1 | 0.8 | | | ● |
| Basidiomycota | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | 1 | 0.8 | | | ● |
| Pucciniomycotina | <i>Cystobasidium slooffiae</i> | 1 | 0.8 | | | ● |
| Agaricomycotina | <i>Naganishia diffluens</i> | 1 | 0.8 | | | ● |
| | <i>Papiliotrema flavescens</i> | 10 | 7.9 | | | ● |
| | <i>Papiliotrema terrestris</i> | 4 | 3.2 | ● | | ● |
| | <i>Saitozyma podzolica</i> | 8 | 6.3 | ● | | ● |
| | <i>Piskurozyma</i> sp. | 3 | 2.4 | | | ● |
| | <i>Hannaella</i> sp. | 2 | 1.6 | | | ● |
| | รวม | | 127 | 100.0 | | |

FO (%)^a: frequency of occurrence (%) = ร้อยละของความถี่ที่สามารถพบยีสต์ชนิดนั้นๆได้ในตัวอย่างดิน, Source^b (ตัวอย่างดินที่พบ) ได้แก่ PU = ดอยปู่ย, PH = ดอยผาฮี้ และ PF = ภูชี้ฟ้า,

● แสดงยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างดิน



ภาพประกอบ 9 ข้อมูลของยีสต์ทั้ง 13 สกูล ที่สามารถแยกได้จากดินภูเขาในจังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย, ● ค่าเฉลี่ยของการสะสมไขมันของยีสต์, ■ ช่วงของการสะสมไขมันของยีสต์, ■ จำนวนของยีสต์สะสมไขมันได้มากกว่า 20% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และ ■ จำนวนของยีสต์ที่มีความสามารถสะสมไขมันได้ต่ำกว่า 20% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง



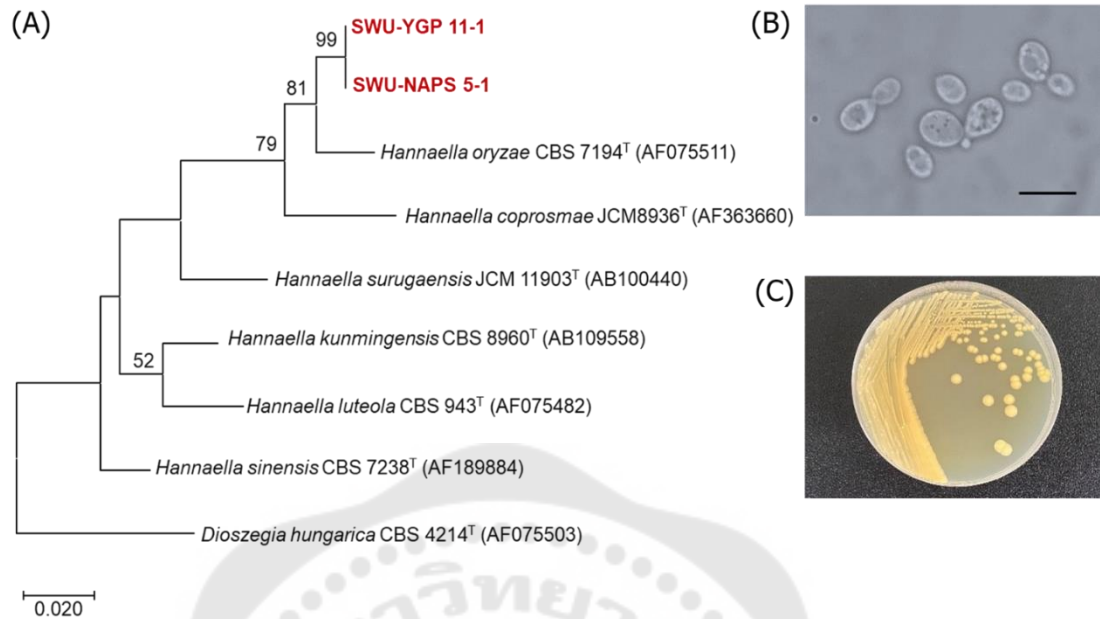
ภาพประกอบ 10 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีสต์แต่ละสปีชีส์ที่สามารถคัดแยกและจัดจำแนกได้ในงานวิจัยนี้ สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ D1/D2 domain ของ Large subunit (LSU) 26S rRNA gene ตามวิธีของ Tamura K. และ Nei M. (1993) โดยใช้ Maximum-likelihood method และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า Bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (แสดงค่า Bootstrap มากกว่า 50%), โดยมี *Schizosaccharomyces pombe* NRRL Y-12796^T CBS 4214 เป็น out group

และจากผลการศึกษาปริมาณไขมันก่อนหน้านี้ พบว่า ยีสต์สะสมไขมัน ต้องมีคุณสมบัติในการสะสมไขมันได้มากกว่า 20% ของน้ำหนักเซลล์แห้งมาพิจารณา จะพบว่าสามารถแยกยีสต์สะสมไขมัน (Oleaginous yeast) มีทั้งหมด 78 สปีชีส์ และพบว่ายีสต์ที่ไม่จัดเป็น ยีสต์สะสมไขมัน (non- Oleaginous yeast) มีทั้งหมด 49 สปีชีส์ โดยสายพันธุ์ที่จัดเป็น Oleaginous yeast ได้แก่ *L. tetrasporus*, *L. starkeyi*, *L. mesembrius*, *Cyb. Saturnus*, *M. guilliermondii*, *S. podzolica*, *P. flavescens*, และ *P. terrestris*, รวมถึง *Piskurozyma* sp. SWU-NATP 4-12 และ *Hannaella* sp. SWU-YGP 11-1 ซึ่งเป็นสปีชีส์ใหม่ที่แยกได้ ส่วนสายพันธุ์ที่ผลิตไขมันได้ต่ำกว่า 20% ของน้ำหนักเซลล์ (non- Oleaginous yeast) ได้แก่ *C. slooffiae*, *N. diffluens* และ *R. mucilaginoso* (ภาพประกอบ 9) นอกจากนี้ในผลการทดลองนี้จะเห็นว่า ยีสต์ในสปีชีส์เดียวกัน แต่ต่างไอโซเลทกัน หรือต่างสายพันธุ์กันให้ผลในการผลิตไขมันได้แตกต่างกัน เนื่องจากคุณสมบัติในการสะสมไขมันของยีสต์จะขึ้นอยู่กับแต่ละสายพันธุ์ หรือแต่ละไอโซเลท ที่เรียกว่า “Strain-dependent lipid accumulation”

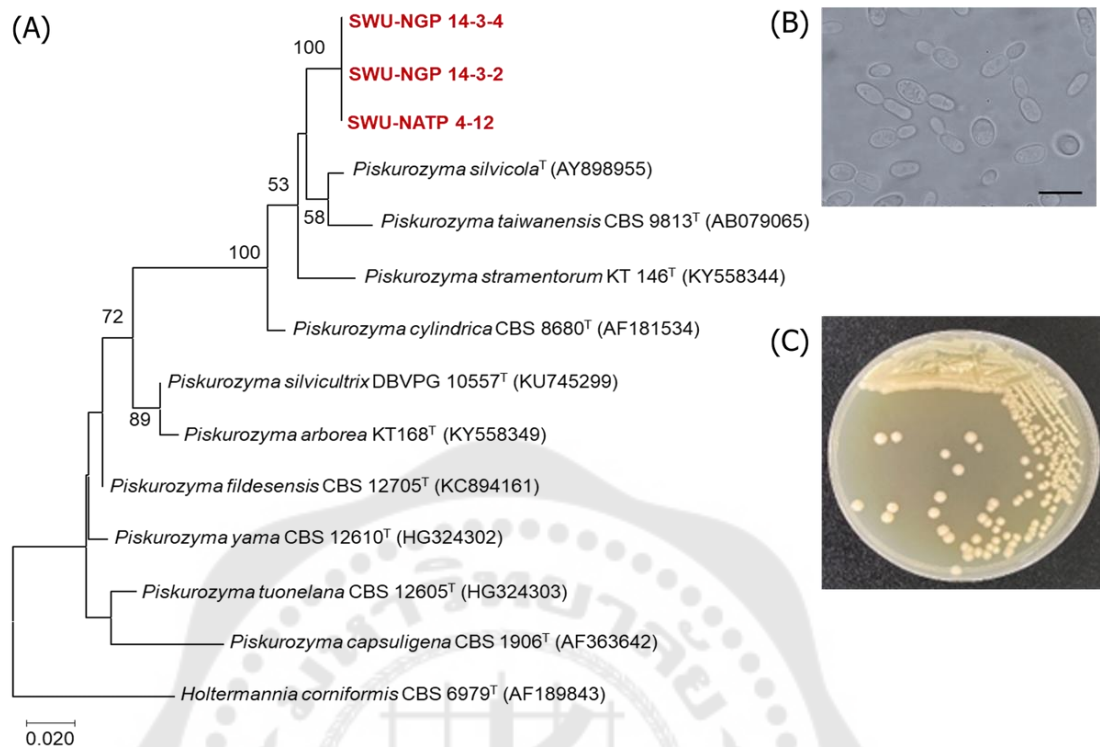
จากงานวิจัยนี้ได้ค้นพบยีสต์ที่คาดว่าเป็นสายพันธุ์ใหม่จำนวน 5 ไอโซเลท โดยยังไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้ เนื่องจากมี % identity เท่ากับ 96-98% และมีการแทนที่ลำดับเบส (nucleotide substitution) จำนวน 12-20 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งหากคิดเป็น % ความถี่ของการค้นพบสายพันธุ์ใหม่ จะพบว่า มี 3.9% จากจำนวนจุลินทรีย์ที่แยกได้ทั้งหมด ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของจุลินทรีย์ รวมถึงจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติที่ยังไม่เคยค้นพบมาก่อนในประเทศไทยอีกมาก ยีสต์ไอโซเลท SWU-YGP 11-1 และ SWU-NAPS 5-1 เมื่อจำแนกโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ D1/D2 domain ของ large subunit (LSU) 26S rRNA gene เทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank โดย BLASTN homology search program พบว่าใกล้เคียงกับ *Hannaella oryzae* CBS 7194^T (AF075511) โดย % identity เท่ากับ 98.88 และ 98.08 ตามลำดับ ดังตารางที่ 14 และภาพประกอบ 10 ส่วนยีสต์ไอโซเลท SWU-NGP 14-3-2, SWU-NGP 14-3-4 และ SWU-NATP 4-12 พบว่าใกล้เคียงกับ *Piskurozyma taiwanensis* CBS 9813^T (AB079065) โดยมีค่า % identity เท่ากับ 96.52, 96.75 และ 96.84 ตามลำดับ (ตารางที่ 14 และภาพประกอบ 11) จากตารางที่ 13 พบว่ามี 2 ไอโซเลท จากยีสต์สายพันธุ์ใหม่ทั้งหมด 5 สายพันธุ์ สามารถผลิตไขมันได้สูงกว่า 20% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ได้แก่ *Hannaella* sp. SWU-YGP 11-1 สามารถผลิตไขมันได้ lipid content เท่ากับ 21.70% และ *Piskurozyma* sp. SWU-NATP 4-12 สามารถผลิตไขมันได้ lipid content เท่ากับ 25.45%

ตาราง 14 การจัดจำแนกยีสต์สายพันธุ์ใหม่ และศักยภาพในการผลิตไขมันของยีสต์

| Yeast strain | Closely related species (Accession number) | Similarity (%) | Gaps/total nucleotide | Nucleotide substitution | Biomass (g/L) | Lipid (g/L) | Lipid content (%) |
|--|--|-------------------|--------------------------|----------------------------|------------------|----------------|----------------------|
| <i>Hannaella</i> sp. SWU-YGP 11-1 | <i>Hannaella oryzae</i> CBS 7194T (AF075511) | 98.9 | 1/613 | 12 | 1.70 ± 0.15 | 0.36 ± 0.08 | 21.70 |
| <i>Hannaella</i> sp. SWU-NAPS 5-1 | <i>Hannaella oryzae</i> CBS 7194T (AF075511) | 98.0 | 1/501 | 12 | 6.41 ± 0.65 | 1.10 ± 0.15 | 16.46 |
| <i>Piskurozyma</i> sp. SWU-NATP 4-12 | <i>Piskurozyma taiwanensis</i> CBS 9813T (AF079035) | 96.5 | 2/517 | 18 | 2.92 ± 0.24 | 0.74 ± 0.04 | 25.45 |
| <i>Piskurozyma</i> sp. SWU-NGP 14-3-2 | <i>Piskurozyma taiwanensis</i> CBS 9813T (AF079035) | 96.8 | 2/584 | 19 | 0.53 ± 0.15 | 0.07 ± 0.01 | 14.12 |
| <i>Piskurozyma</i> sp. SWU-NGP 14-3-4 | <i>Piskurozyma taiwanensis</i> CBS 9813T (AF079035) | 96.8 | 2/597 | 20 | 0.67 ± 0.01 | 0.08 ± 0.01 | 11.72 |



ภาพประกอบ 11 (A) แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีสต์ไอโซเลท SWU-YGP 11-1, SWU-NAPS 5-1 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ D1/D2 domain ของ Large subunit (LSU) 26S rRNA gene ตามวิธีของ Tamura K. และ Nei M. (1993) โดยใช้ Maximum-likelihood method และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ ค่า Bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (แสดงค่า Bootstrap มากกว่า 50%), โดยมี *Dioszegiaa hungarica* CBS 4214T เป็น out group (B) ภาพเซลล์ยีสต์สายพันธุ์ *Hannaella* sp. SWU-YGP 11-1 เจริญในอาหาร YM agar เป็นระยะเวลา 2 วัน ส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 1,000 เท่า (C) ลักษณะโคโลนีของยีสต์ สายพันธุ์ *Hannaella* sp. SWU-YGP 11-1 เจริญในอาหาร YM agar เป็นระยะเวลา 2 วัน



ภาพประกอบ 12 (A) แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีสต์ไอโซเลท SWU-NGP 14-3-4, SWU-NGP 14-3-2, SWU-NATP 4-12 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ D1/D2 domain ของ Large subunit (LSU) 26S rRNA gene ตามวิธีของ Tamura K. และ Nei M. (1993) โดยใช้ Maximum-likelihood method และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า Bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (แสดงค่า Bootstrap มากกว่า 50%), โดยมี *Holtermannia corniformis* CBS 6979^T เป็น out group, (B) ภาพเซลล์ยีสต์สายพันธุ์ *Piskurozyma* sp. SWU-NATP 4-12 เจริญในอาหาร YM agar เป็นระยะเวลา 2 วันส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 1,000 เท่า (C) ลักษณะโคโลนีของยีสต์สายพันธุ์ *Piskurozyma* sp. SWU-NATP 4-12 เจริญในอาหาร YM agar เป็นระยะเวลา 2 วัน

4. การคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับวิธีเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน

จากผลการวิจัยในการคัดเลือกไอโซเลทที่สามารถผลิตไขมันได้สูงที่สุด พบว่า *Lipomyces mesembrius* SWU-NGP 14-6 ให้ค่าผลผลิตไขมันได้สูงที่สุด เท่ากับ 5.20 ± 0.03 g/L และมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุด เท่ากับ 9.13 ± 0.36 โดยคิดเป็น Lipid content เท่ากับ 57.10 ± 1.82 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง จึงคัดเลือก เพื่อนำมาศึกษาการเพิ่มผลผลิตไขมัน โดยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน โดยในการคัดเลือกแหล่งอาหารที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน ได้ทำการเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ อาหารเหลว YM ซึ่งเป็นอาหารที่มีปริมาณของแหล่งไนโตรเจนสูง โดยมีค่าอัตราส่วน C/N เท่ากับ 6.7 และ อาหาร 2G2M ซึ่งเป็นอาหารที่มีปริมาณของแหล่งไนโตรเจนต่ำกว่าอาหาร YM โดยมีอัตราส่วน C/N เท่ากับ 39.0 โดยมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาแหล่งอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไขมัน เพื่อนำมาปรับสภาวะการเพาะเลี้ยงต่อไป

จากผลการวิจัยพบว่า การเพาะเลี้ยงยีสต์ *L. mesembrius* SWU-NGP 14-6 ในอาหารเหลว YM และอาหารเหลว 2G2M ในช่วงเวลา 0 ถึง 36 ชั่วโมง ยีสต์สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสในอาหารทั้ง 2 ชนิด ได้อย่างรวดเร็วสำหรับการเจริญและเพิ่มปริมาณเซลล์ ดังภาพประกอบ 12 และ 13 พบว่า ปริมาณของน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็ว ในช่วง 36 ชั่วโมง และน้ำตาลถูกใช้หมด ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อเจริญในอาหารเหลว YM ในขณะที่ยีสต์ใช้น้ำตาลในอาหารเหลว 2G2M หมดที่เวลา 96 ชั่วโมง

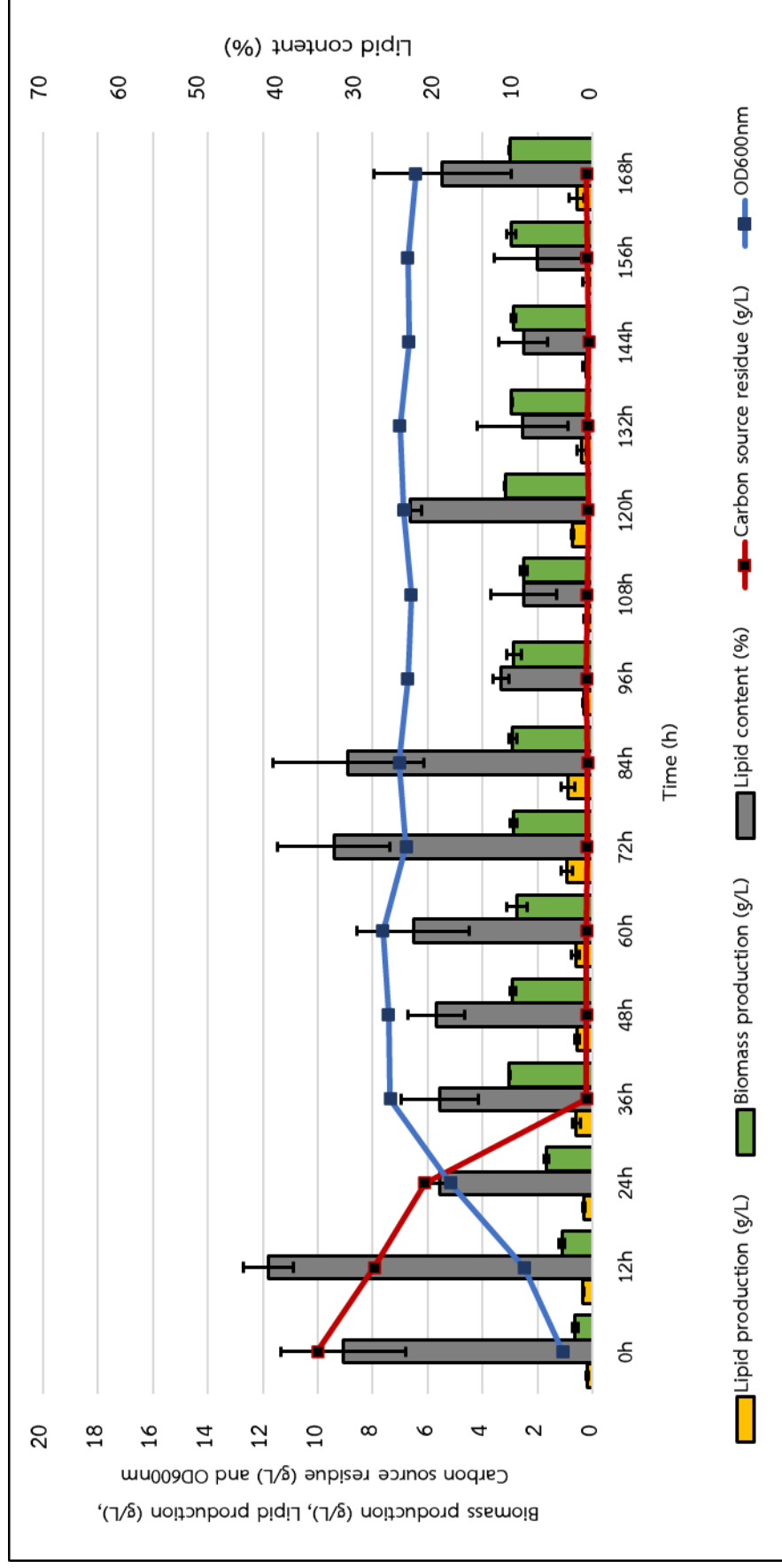
นอกจากนี้ยังพบ *L. mesembrius* SWU-NGP 14-6 ที่เจริญในอาหารเหลว YM เมื่อปริมาณน้ำตาลถูกใช้จนหมดที่ 36 ชั่วโมง หลังจากนั้นยีสต์มีการเจริญเติบโตคงที่ สอดคล้องกับประสิทธิภาพในการสะสมไขมันลดลง โดยเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักที่ 168 ชั่วโมง พบว่า มีค่า biomass production เท่ากับ 3.01 ± 0.02 g/L ค่า lipid production เท่ากับ 0.58 ± 0.03 g/L โดยคำนวณได้ lipid content เท่ากับ $19.11 \pm 0.03\%$ และมีค่า biomass yield เท่ากับ 0.3 g/g คิดเป็นค่า productivity ของ biomass ได้ 0.42 g/L/D

และเมื่อศึกษาการเจริญและการผลิตไขมันในอาหารเหลว 2G2M ในช่วงแรกที่ 36 ชั่วโมง ที่มีการใช้น้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็วจะพบว่าการเจริญของยีสต์ และการสะสมไขมันสูงกว่าเมื่อใช้อาหารเหลว YM โดยมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 3.8 ± 0.14 g/L และมี lipid production เท่ากับ 2.09 ± 0.08 g/L โดยเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักที่ 168 ชั่วโมง พบว่า มีค่า biomass production เท่ากับ 7.82 ± 0.25 g/L มีค่าปริมาณไขมัน lipid production เท่ากับ 4.82 ± 0.16 g/L โดยคำนวณ

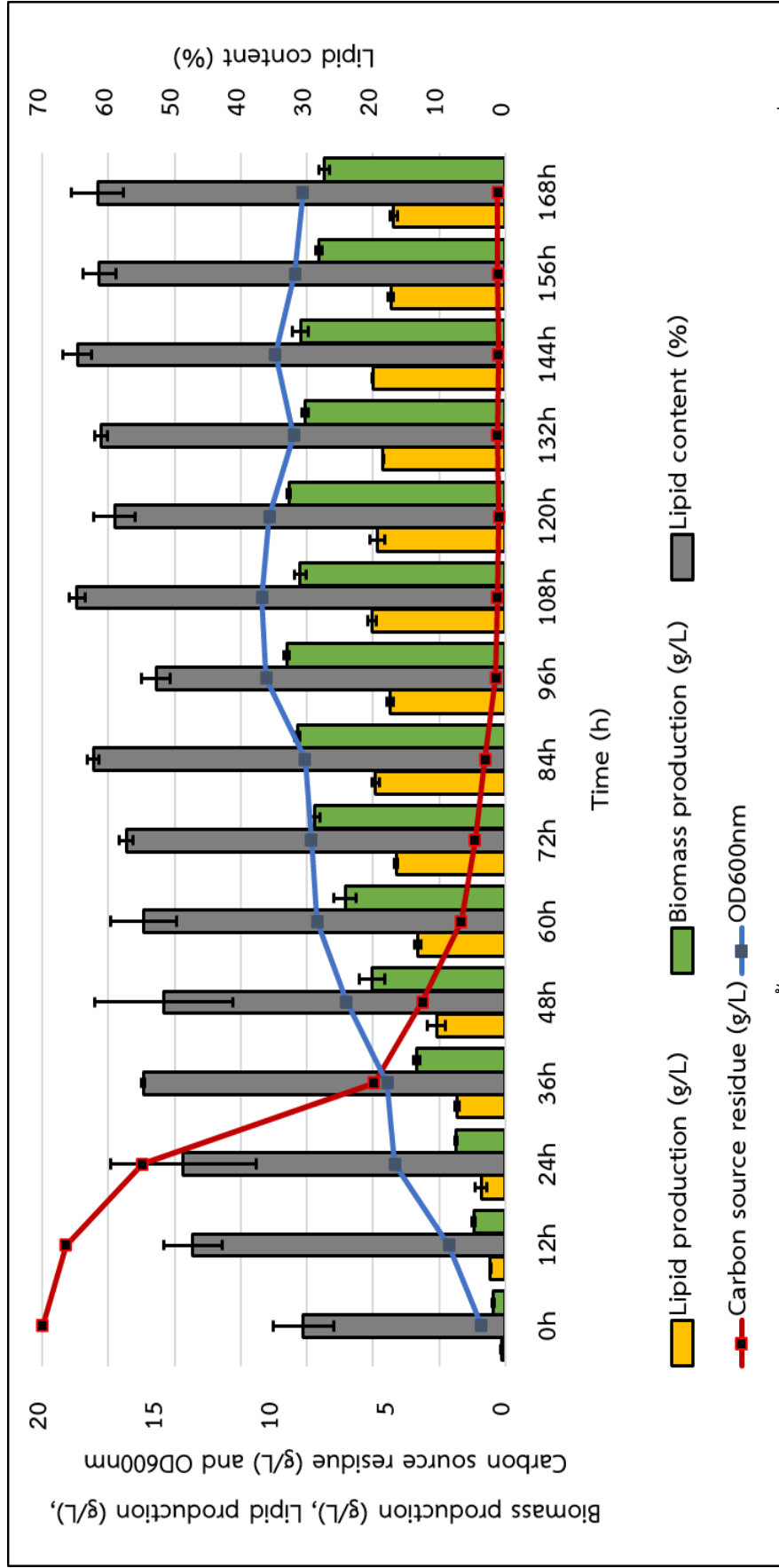
ได้ lipid content เท่ากับ $61.61 \pm 0.24\%$ และมีค่า biomass yield เท่ากับ 0.40 g/g คิดเป็นค่า productivity ของ biomass ได้ 1.10 g/L/D

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเจริญและการผลิตไขมันของยีสต์ *L. mesembrius* SWU-NGP 14-6 ที่เจริญในอาหารเหลวทั้ง 2 พบว่า อาหารเหลว 2G2M ให้ค่า biomass production, lipid production, lipid content, biomass yield และ ค่า productivity ของ biomass สูงกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเหลว YM อย่างมีนัยสำคัญ ดังภาพประกอบ 15 ดังนั้น ในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้อาหารเหลว 2G2M เพื่อใช้เป็นอาหารในขั้นตอนแรก (first stage) ของการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน (two-stage fermentation) ในการทดลองถัดไป

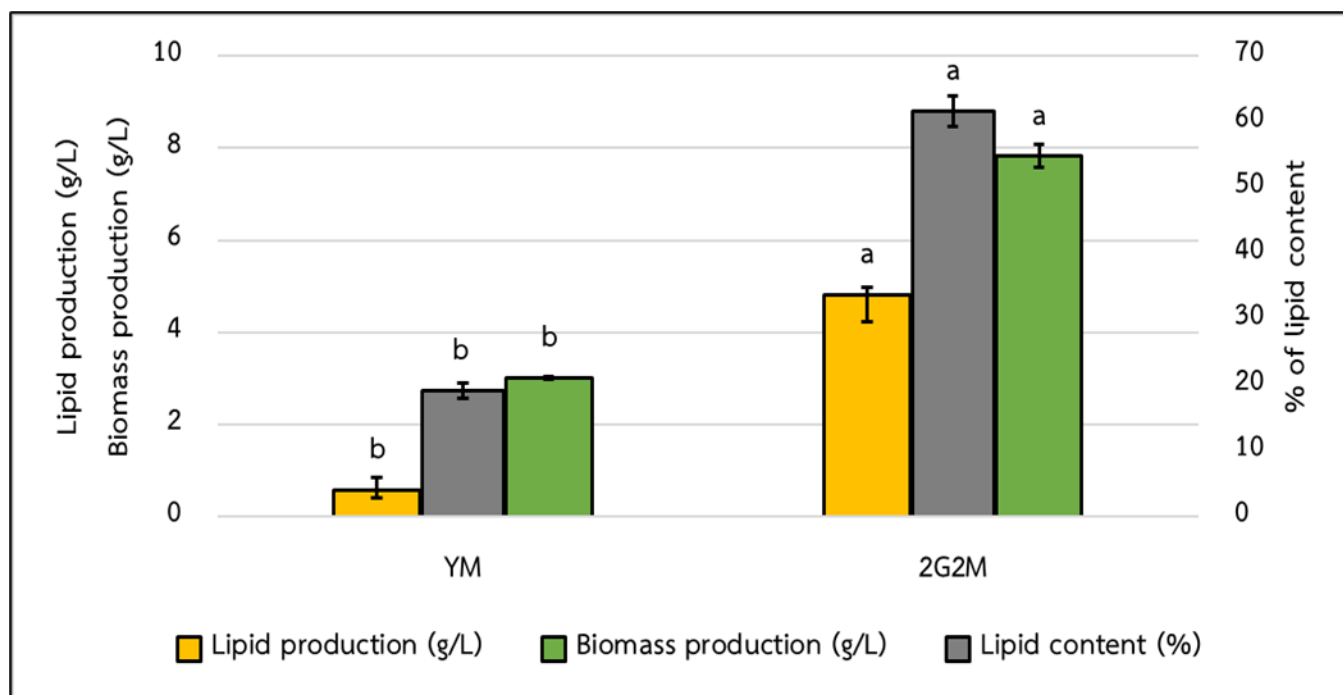




ภาพประกอบ 13 การเจริญ, การผลิตไขมัน และการใช้น้ำตาล ของ *Lipomyces mesembrius* SWU-NGP 14-6 เจริญในอาหารเหลว YM ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยใช้ความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 150 rpm ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นระยะเวลา 168 ชั่วโมง, = Lipid production (g/L) ■, = Biomass production (g/L) ■, = Lipid content (%) ■, เส้นกราฟสีเงิน แสดงค่า OD_{600nm} และ เส้นกราฟสีแดงแสดงการใช้แหล่งคาร์บอน (glucose) g/L



ภาพประกอบ 14 การเจริญ, การผลิตไขมัน และการใช้น้ำตาล ของ *Lipomyces mesembrius* SWU-NGP 14-6 เจริญในอาหารเหลว 2G2M ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยใช้ความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 150 rpm ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นระยะเวลา 168 ชั่วโมง, Lipid production (g/L) ■, Biomass production (g/L) ■, Lipid content (%) ■, กราฟเส้นสีน้ำเงินแสดงค่า OD_{600nm} และ กราฟเส้นสีแดงแสดง การใช้แหล่งคาร์บอน (glucose) g/L



ภาพประกอบ 15 การเปรียบเทียบ ผลผลิตไขมัน (g/L) แสดงในกราฟแท่งสีเหลือง ■, ผลผลิตน้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L) แสดงในกราฟแท่งสีเขียว ■ และ ปริมาณไขมันทั้งหมด (%) แสดงในกราฟแท่งสีเทา ■ ของยีสต์สายพันธุ์ *L. mesembrius* NGP 14-6 เมื่อเจริญในอาหารเหลว YM และ 2G2M เป็นระยะเวลา 7 วัน ตัวอักษรแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยใช้สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้สถิติ Tukey test เมื่อ $p < 0.05$ โดยมีจำนวนการทดลอง 3 ซ้ำ (n=3)

5. การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไขมันด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน

จากการนำ *L. mesembrius* SWU-NGP 14-6 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 2G2M เพื่อใช้สำหรับเป็นอาหารในการเพาะเลี้ยงขั้นแรก (first stage) จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว 6G (ขั้นตอนที่ 2) ที่มีน้ำตาลกลูโคสเพียงอย่างเดียว ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 6% (w/v) เพื่อให้ค่าอัตราส่วน C/N ในอาหารเหลวสูงขึ้น สำหรับส่งเสริมการผลิตไขมันของยีสต์ โดยทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ในระดับฟลasks เป็นระยะเวลา 6 วัน โดยมีตัวแปรต้น คือ ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (time shift) ได้แก่ เพาะเลี้ยงขั้นแรก (first stage) 3 วัน (D3), 4 วัน (D4) และ 5 วัน (D5) ต่อด้วยขั้นที่ 2 (second stage) เป็นระยะเวลา 3 วัน, 2 วัน และ 1 วัน ตามลำดับ (แสดงในตารางที่ 7) และความเร็วรอบในการเขย่าที่ต่างกัน ได้แก่ 150 rpm และ 200 rpm

ระยะแรก (First stage)

จากผลการทดลองตารางที่ 15 ในระยะแรก (first stage) ของสภาวะการเพาะเลี้ยงด้วยความเร็วรอบที่ 150 rpm และ 200 rpm พบว่า สภาวะ D3 (เพาะเลี้ยงขั้นแรก 3 วัน), D4 (เพาะเลี้ยงขั้นแรก 4 วัน) และ D5 (เพาะเลี้ยงขั้นแรก 5 วัน) ค่า biomass yield ของแต่ละความเร็วรอบไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนี้คือ ที่ความเร็วรอบ 150 rpm สภาวะ D3, D4 และ D5 ค่า biomass yield มีค่าเท่ากับ 0.45 ± 0.10 g/g, 0.50 ± 0.01 g/g และ 0.53 ± 0.03 g/g ตามลำดับ ส่วนที่ความเร็วรอบ 200 rpm สภาวะ D3, D4 และ D5 ค่า biomass yield มีค่าเท่ากับ 1.10 ± 0.00 , 1.20 ± 0.00 และ 1.20 ± 0.00 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบค่า biomass yield ของทั้งสามสภาวะที่ความเร็วรอบต่างกันจะพบว่า เมื่อใช้ความเร็วรอบในการเขย่าที่ 200 rpm ของระยะแรก first stage ให้ค่าการผลิตน้ำหนักเซลล์แห้งที่สูงกว่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm ในส่วนการสะสมไขมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในระยะแรกพบว่า สภาวะ D3 จะให้ค่า lipid yield น้อยที่สุด ที่ความเร็วรอบ 150 และ 200 rpm เมื่อเทียบกับสภาวะ D4 และ D5 ที่ให้ค่า lipid yield ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่แต่ละความเร็วรอบ โดยพบว่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm จะพบค่าการสะสมไขมันสูงกว่า 200 rpm อย่างมีนัยสำคัญ คือ D4 มีค่า Lipid yield เท่ากับ 0.28 ± 0.02 g/g และ D5 มีค่าค่า lipid yield เท่ากับ 0.24 ± 0.02 g/g นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการใช้น้ำตาลกลูโคส ที่ความเร็วรอบ 150 และ 200 rpm ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตาราง 14)

ระยะที่สอง (Second stage)

หลังจากสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในขั้นที่ 1 (first stage) เซลล์ยีสต์ทั้งหมดจะถูกส่งต่อมายังสภาวะเพาะเลี้ยงในขั้นที่สอง โดยเซลล์ทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อจากการเพาะเลี้ยงช่วงแรกนำไปปั่นเหวี่ยงและเก็บเซลล์ทั้งหมด ถ่ายสู่อาหารเหลว 6G โดยบ่มต่อจนครบระยะเวลา 6 วัน ผลการทดลองตารางที่ 15 พบว่า ค่า biomass yield (ของทั้ง 3 สภาวะ ที่ความเร็วรอบ 150 และ

200 rpm ในการเพาะเลี้ยงระยะที่สอง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยสภาวะ D5 จะมีค่า biomass yield สูงที่สุด โดยเฉพาะที่ความเร็วรอบ 200 rpm คือ 1.21 ± 0.06 g/g เช่นเดียวกับค่า lipid yield ที่สภาวะ D5 ให้ผลค่า lipid yield สูงที่สุดทั้ง 2 ความเร็วรอบ แต่จะให้ค่าสูงที่สุดที่ความเร็วรอบ 150 rpm คือ 0.47 ± 0.00 g/g การที่สภาวะ D5 ให้ค่า yield ของ biomass และ lipid สูงอาจเนื่องมาจากปริมาณการใช้น้ำตาลกลูโคสที่ต่ำ คือ 10-15 g/L จึงส่งผลให้ค่า yield ที่ได้สูงกว่าที่สภาวะ D3 และ D4 แต่อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้ จะเห็นว่าผลของ lipid yield ในระยะที่สองทุกๆสภาวะ มีค่าสูงขึ้นมากกว่าค่า lipid yield ในระยะแรก (ตาราง 14)

จากผลรวมของการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอนที่ ระยะเวลา 6 วัน เปรียบเทียบกับสภาวะ B6 ที่การเพาะเลี้ยงแบบขั้นตอนเดียว (ตารางที่ 15) พบว่า ค่า lipid production และ ค่า biomass ของสภาวะ D3 และ D4 จะสูงกว่าสภาวะ B6 อย่างมีนัยสำคัญ โดยพบว่ามีค่า biomass production ของสภาวะ D3 และ D4 ที่ 200 rpm มีค่าเท่ากับ 22.30 ± 0.20 g/L, 22.00 ± 1.10 g/L และ 18.40 ± 0.20 g/L ตามลำดับ ในขณะที่ความเร็วรอบ 150 rpm จะให้ค่า biomass production ต่ำกว่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm คือ 11.40 ± 0.40 g/L, 12.80 ± 1.70 g/L และ 9.30 ± 0.20 g/L ตามลำดับ (ตาราง 14)

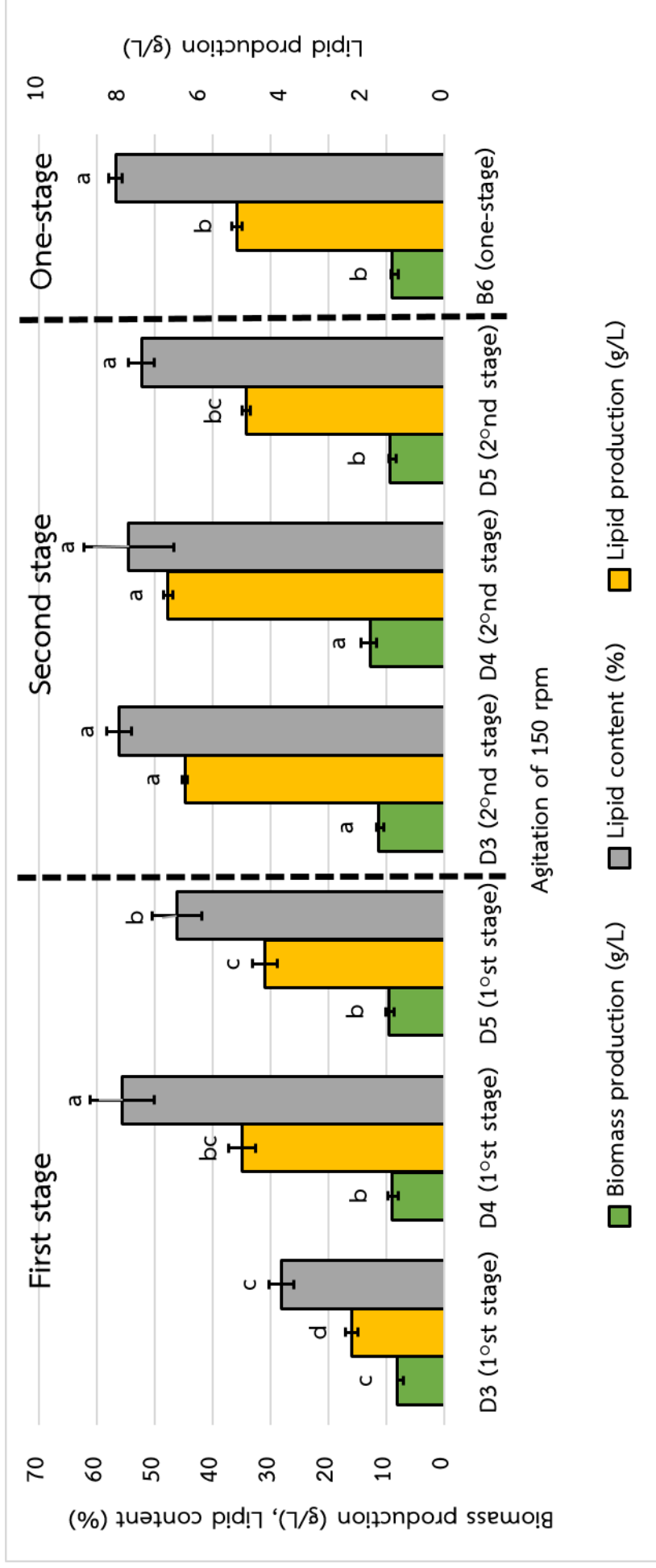
สำหรับค่า Lipid production ที่วันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน จะพบว่า สภาวะ D3 และ D4 มีค่าสูงที่สุดที่ความเร็วรอบ 150 และ 200 rpm โดยมีค่าของ lipid production ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยค่าจะอยู่ในช่วง 6.40-7.70 g/L ในขณะที่การเพาะเลี้ยงแบบขั้นตอนเดียว (B6) ได้ค่า lipid production อยู่ที่ 5.13-5.60 g/L เมื่อพิจารณาว่า lipid productivity ของการผลิตไขมัน จะพบว่าทั้งสภาวะ D3 และ D4 มีค่า lipid productivity สูงเท่ากับ 1.28-1.07 g/L/D (ตาราง 14)

จากรูปประกอบ 14 และ 15 แสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน ของสภาวะ D3 และ D4 ช่วยเพิ่มค่า lipid production และ biomass production ให้สูงขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบการเพาะเลี้ยงแบบขั้นตอนเดียว (one-stage) ในสภาวะ B6 ในขณะที่สภาวะ D5 ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงแบบขั้นตอนเดียว (B6) นอกจากนี้จากการทดลองจะพบว่า การเพิ่มขึ้นของความเร็วรอบ จาก 150 เป็น 200 rpm ไม่ได้ส่งผลต่อค่า lipid production แต่ส่งผลต่อค่า biomass production ที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ตาราง 14)

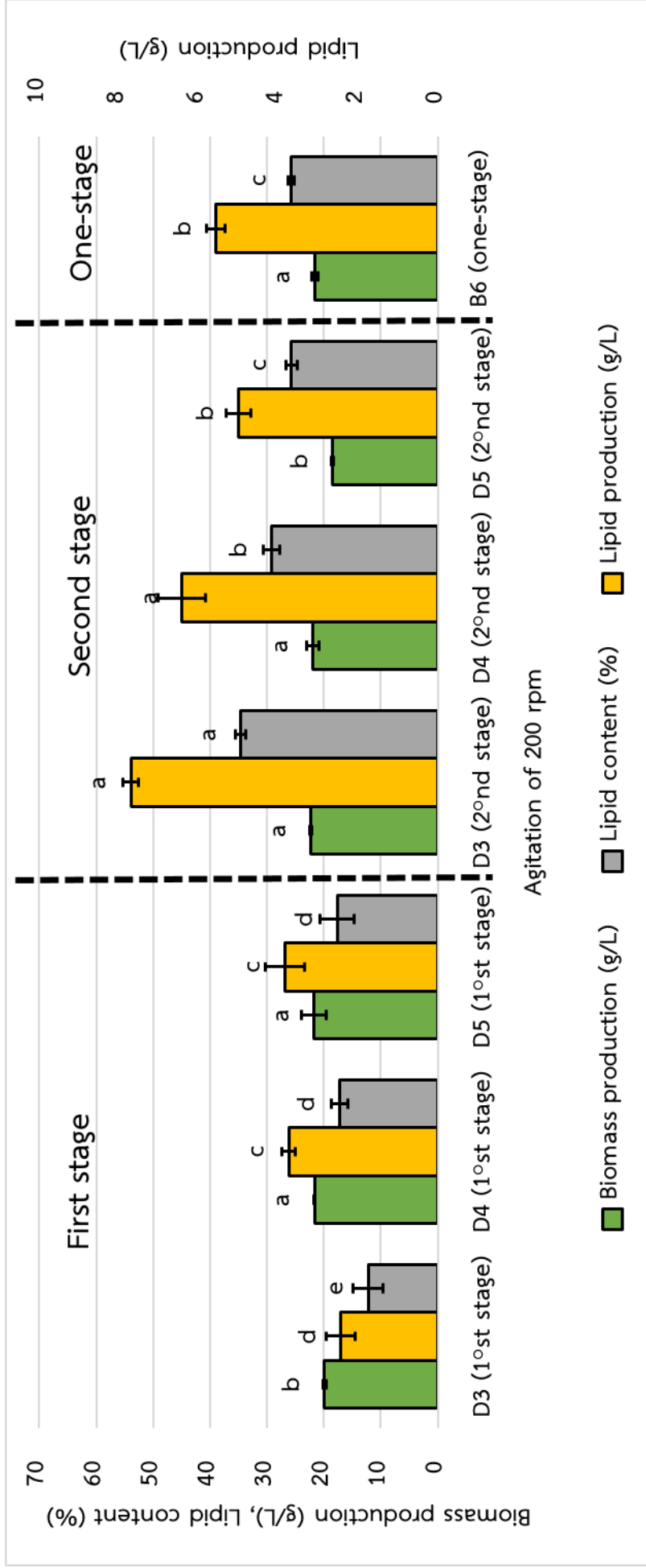
ตาราง 15 ผลของสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอนของยีสต์สายพันธุ์ตัวแทน *L. mesembrius* SWU-NGP 14-6

| Condition | The first stage | | | | The second stage | | | | Final fermentation (6 days) | | | | | |
|----------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | G _c (g/L) | Y _x (g/g) | Y _L (g/g) | G _c (g/L) | Y _x (g/g) | Y _L (g/g) | Biomass (g/L) | Lipid (g/L) | Lipid content (%) | G _c (g/L) | Y _x (g/g) | Y _L (g/g) | P _x (g/L/D) | P _L (g/L/D) |
| 150 rpm | | | | | | | | | | | | | | |
| D3 | 18.01±0.10 ^a | 0.45±0.10 ^b | 0.13±0.01 ^c | 34.0±0.30 ^a | 0.34±0.00 ^d | 0.19±0.01 ^c | 11.40±0.40 ^c | 6.40±0.06 ^a | 56.3±2.20 ^a | 52.00±0.20 ^a | 0.22±0.01 ^c | 0.12±0.00 ^b | 1.90±0.01 ^{cd} | 1.07±0.01 ^{bc} |
| D4 | 18.01±0.10 ^a | 0.50±0.01 ^b | 0.28±0.02 ^a | 24.9±1.55 ^b | 0.51±0.01 ^c | 0.27±0.01 ^c | 12.80±1.70 ^c | 6.80±0.11 ^a | 54.6±7.80 ^a | 42.90±1.10 ^b | 0.30±0.05 ^{bc} | 0.16±0.01 ^b | 2.13±0.29 ^c | 1.14±0.02 ^{ab} |
| D5 | 18.01±0.10 ^a | 0.53±0.03 ^b | 0.24±0.02 ^a | 10.4±0.12 ^d | 0.89±0.02 ^b | 0.47±0.00 ^a | 9.30±0.20 ^d | 4.90±0.11 ^c | 52.4±2.30 ^a | 28.40±0.10 ^c | 0.33±0.01 ^b | 0.17±0.00 ^b | 1.56±0.04 ^d | 0.81±0.02 ^d |
| B6 | - | - | - | - | - | - | 9.03±0.30 ^d | 5.13±0.13 ^c | 56.8±1.20 ^a | 18.01±0.00 ^d | 0.50±0.01 ^a | 0.28±0.00 ^a | 1.50±0.05 ^d | 0.85±0.02 ^d |
| 200 rpm | | | | | | | | | | | | | | |
| D3 | 17.7±0.40 ^a | 1.10±0.00 ^a | 0.10±0.00 ^c | 36.3±3.60 ^a | 0.61±0.04 ^c | 0.21±0.03 ^c | 22.30±0.20 ^a | 7.70±0.20 ^a | 34.60±0.90 ^b | 54.00±4.40 ^a | 0.42±0.03 ^b | 0.14±0.01 ^b | 3.71±0.04 ^a | 1.28±0.03 ^a |
| D4 | 17.7±0.40 ^a | 1.20±0.00 ^a | 0.20±0.00 ^b | 30.5±3.50 ^b | 0.72±0.01 ^{bc} | 0.21±0.01 ^c | 22.00±1.10 ^a | 6.40±0.60 ^a | 29.20±1.50 ^c | 48.20±4.20 ^a | 0.46±0.05 ^b | 0.13±0.01 ^b | 3.66±0.18 ^a | 1.07±0.01 ^{bc} |
| D5 | 17.7±0.40 ^a | 1.20±0.00 ^a | 0.20±0.00 ^b | 15.2±2.20 ^c | 1.21±0.06 ^a | 0.33±0.03 ^b | 18.40±0.20 ^b | 5.00±0.30 ^c | 25.70±1.00 ^d | 32.90±3.60 ^c | 0.57±0.06 ^b | 0.16±0.03 ^b | 3.07±0.06 ^b | 0.83±0.05 ^d |
| B6 | - | - | - | - | - | - | 21.60±0.60 ^a | 5.60±0.20 ^b | 25.80±0.50 ^d | 17.70±0.40 ^d | 1.22±0.07 ^a | 0.32±0.01 ^a | 3.60±0.11 ^a | 0.93±0.04 ^{cd} |

*หมายเหตุ: G_c = ปริมาณของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ (g/L), Y_x = Biomass yield (g/g), Y_L = Lipid yield (g/g), P_x = Biomass productivity (g/L/D), Lipid productivity (g/L/D), T_L = Lipid content (%), X = Biomass และ L = Lipid, ตัวอักษรแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยใช้สถิติ วิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้สถิติ Tukey test เมื่อ $p < 0.05$ โดยมีจำนวนการทดลอง 3 ซ้ำ (n=3)



ภาพประกอบ 16 ผลของสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอนของยีสต์สายพันธุ์ตัวแทน *L. mesembryus* SWU-NGP 14-6 เมื่อใช้ความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 150 rpm กราฟสีเขียว (■) Biomass production (g/L), (■) Lipid production (g/L), (■) Lipid content (%) ตัวอักษรแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยใช้สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้สถิติ Tukey test เมื่อ $p < 0.05$ โดยมีจำนวนการทดลอง 3 ซ้ำ ($n=3$)



ภาพประกอบ 17 ผลของสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอนของยีสต์สายพันธุ์ตัวแทน *L. mesembryus* SWU-NGP 14-6 เมื่อใช้ความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 200 rpm กราฟสีเขียว (■) Biomass production (g/L), (■) Lipid production (g/L), (■) Lipid content (%) ตัวอักษรแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยใช้สถิติ วิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้สถิติ Tukey test เมื่อ $p < 0.05$ โดยมีจำนวนการทดลอง 3 ซ้ำ (n=3)

6. การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันที่ผลิตโดย *L. mesembrius* SWU-NGP 14-6 การเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน

จากผลการทดลองพบว่า *L. mesembrius* SWU-NGP 14-6 เมื่อเจริญในสภาวะเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน ได้แก่ D3, D4 และ D5 และการเพาะเลี้ยงแบบขั้นตอนเดียว (สภาวะ B6) พบว่า องค์ประกอบของกรดไขมันที่ได้ไม่แตกต่างกัน โดยประกอบด้วยกรดไขมัน 10 ชนิด ได้แก่ myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0), palmitoleic acid (C16:1n7), stearic acid (C18:0), oleic acid (C18:1n9), elaidic acid (C18:1n9t), linoleic acid (C18:2n6), arachidic acid (C20:0), behenic acid (C22:0) และ lignoceric acid (C24:0) นอกจากนี้ องค์ประกอบหลักของกรดไขมันที่สภาวะต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกัน โดยพบ กรดไขมัน oleic acid (C18:1n9) และ palmitic acid (C16:0) ที่มีสัดส่วนของกรดไขมันมากที่สุด รองลงมาคือ stearic acid (C18:0) ยกเว้น สภาวะ D3 ที่ความเร็วรอบ 200 rpm ที่มีองค์ประกอบของกรดไขมัน elaidic acid (C18:1n9t) สูงกว่าสภาวะอื่นๆ โดยมีสัดส่วนเท่ากับ 4.74% w/w ดังภาพประกอบ 17

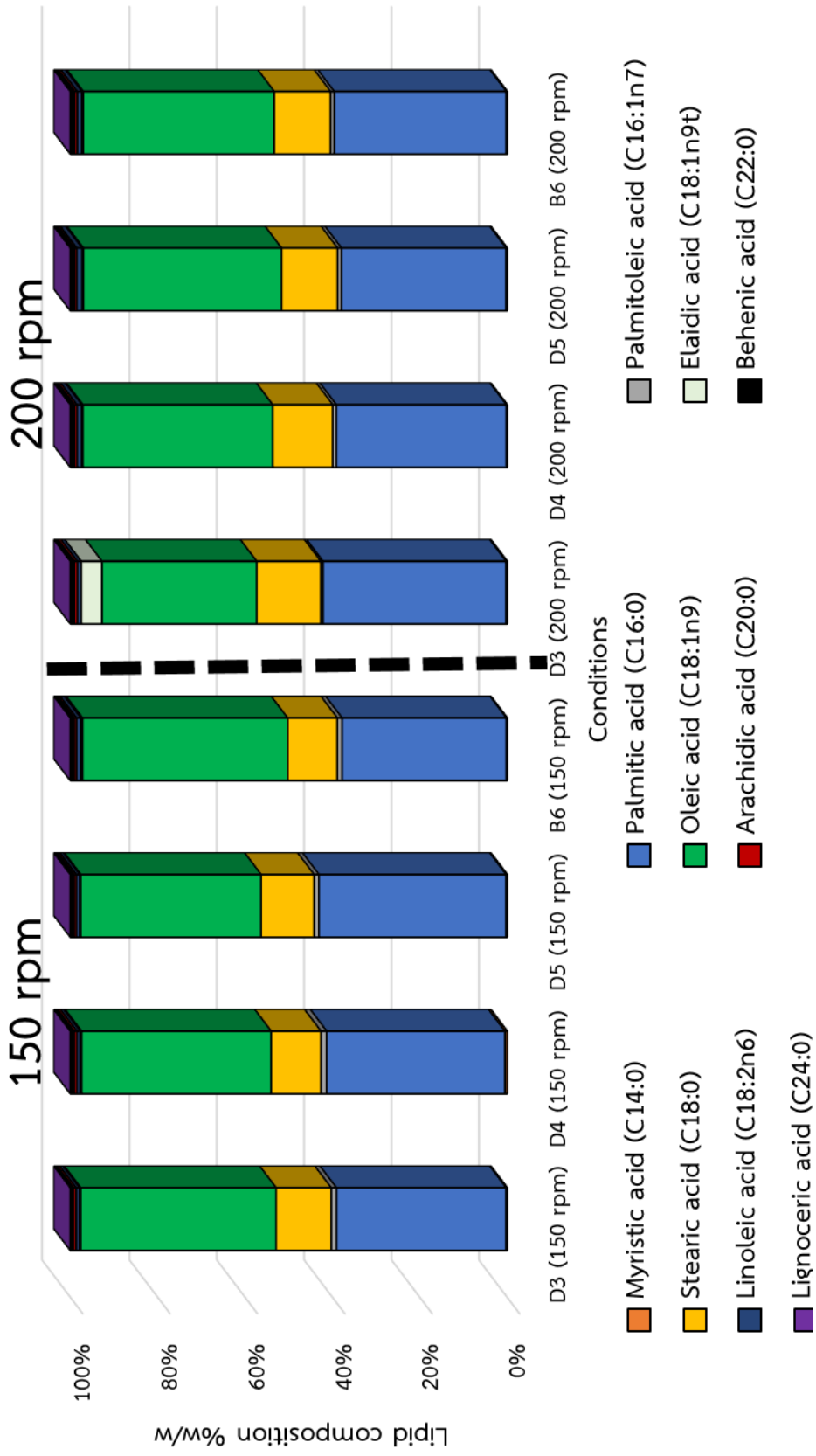
จากตารางที่ 16 พบว่าการเพาะเลี้ยง *L. mesembrius* SWU-NGP 14-6 โดยการเขย่า ที่ความเร็วรอบเท่ากับ 150 rpm จะพบว่ามีสัดส่วนของกรดไขมัน palmitoleic acid (C16:1n7) ที่สูงกว่าการเพาะเลี้ยงที่ความเร็วรอบเท่ากับ 200 rpm ในทางกลับกันการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะ D4, D5 และ B6 ที่ความเร็วรอบ 200 rpm กลับให้สัดส่วนของ กรดไขมัน linoleic acid (C18:2n6) ที่สูงกว่า เมื่อใช้ความเร็วรอบ 150 rpm

ตาราง 16 องค์ประกอบของกรดไขมันที่ผลิตขึ้นโดย *L. mesembrius* SWU-NGP 14-6 ในการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอนในสภาวะต่างๆ

| Condition | Fatty acid composition (%w/w) | | | | | | | | | |
|----------------|-------------------------------|--------|----------|--------|----------|-----------|----------|--------|--------|--------|
| | C:14:0 | C:16:0 | C:16:1n7 | C:18:0 | C:18:1n9 | C:18:1n9t | C:18:2n6 | C:20:0 | C:22:0 | C:24:0 |
| 150 rpm | | | | | | | | | | |
| D3 | 0.28 | 38.85 | 1.18 | 12.62 | 44.73 | 0.30 | 0.75 | 0.59 | 0.44 | 0.27 |
| D4 | 0.56 | 40.79 | 1.31 | 11.40 | 43.41 | 0.32 | 0.74 | 0.63 | 0.44 | 0.40 |
| D5 | 0.29 | 42.85 | 1.11 | 12.12 | 41.28 | 0.25 | 0.74 | 0.53 | 0.43 | 0.39 |
| B6 | 0.23 | 37.62 | 1.08 | 11.39 | 46.92 | 0.40 | 0.97 | 0.53 | 0.45 | 0.39 |
| 200 rpm | | | | | | | | | | |
| D3 | 0.29 | 41.91 | 0.52 | 14.66 | 35.43 | 4.74 | 0.88 | 0.68 | 0.55 | 0.34 |
| D4 | 0.24 | 38.92 | 0.81 | 13.74 | 43.47 | 0.27 | 1.07 | 0.60 | 0.52 | 0.37 |
| D5 | 0.29 | 37.69 | 0.89 | 12.83 | 45.37 | 0.30 | 1.22 | 0.53 | 0.48 | 0.41 |
| B6 | 0.25 | 39.38 | 0.84 | 12.90 | 43.72 | 0.32 | 1.04 | 0.61 | 0.49 | 0.45 |

*หมายเหตุ: C:14:0 = Myristic acid, C:16:0 = Palmitic acid, C:16:1n7 = Palmitoleic acid, C:18:0 = Stearic acid, C:18:1n9 = Oleic acid,

C:18:1n9t = Elaidic acid, C:18:2n6 = Linoleic acid, C:20:0 = Arachidic acid, C:22:0 = Behenic acid และ C:24:0 = Lignoceric acid



ภาพประกอบ 18 องค์ประกอบของกรดไขมันที่ผลิตโดย *L. mesembrius* SWU-NGP 14-6 ในการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอนภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

จากตัวอย่างดิน 22 ตัวอย่างที่เก็บจากในดินบนภูเขา ได้แก่ ดอยผาฮี้ ดอยปู่ และ ภูชี้ฟ้า จังหวัดเชียงราย สามารถคัดแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 127 ไอโซเลท โดยตัวอย่างดินที่เก็บจาก ภูชี้ฟ้าสามารถคัดแยกยีสต์ได้จำนวนมากที่สุด เท่ากับ 122 ไอโซเลท โดยคิดเป็น 96.06% อาจเนื่องมาจากตัวอย่างดินจากภูชี้ฟ้ามีความชื้นสูงกว่าตัวอย่างดินที่ได้จาก ดอยผาฮี้และดอยปู่ โดยมีความชื้นมากกว่า 20% และมีอุณหภูมิที่อยู่ในช่วง 18 ถึง 20°C รวมทั้งดินบริเวณนี้มีเศษซากพืชซากไม้ปกคลุมอยู่ในปริมาณมาก ส่งผลให้มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงกว่าตัวอย่างดินจากดอยผาฮี้ ซึ่งมีลักษณะเป็นดินเหนียว และดอยปู่ที่เป็นดินทรายร่วน และความชื้นต่ำกว่า

ยีสต์ทั้งหมดที่สามารถคัดแยกได้จำนวน 127 ไอโซเลท สามารถคัดแยกได้จากอาหารแข็ง Nitrogen depleted medium agar (NDM agar) จำนวน 56 ไอโซเลท และ อาหารแข็ง Nitrogen depleted medium gellan gum (NDM gellan gum) จำนวน 71 ไอโซเลท โดยพบว่าการแยกเชื้อบนอาหาร NDM-gellan gum สามารถแยกเชื้อยีสต์ได้มากกว่า NDM-agar เนื่องจากอาหาร NDM gellan gum เป็นอาหารที่มีความนุ่มลักษณะคล้ายเจลลี่ และมีความใส ซึ่งแตกต่างจาก NDM agar ที่มีความขุ่นและแข็งกว่า จึงทำให้สามารถคัดแยกยีสต์ได้ง่าย นอกจากนี้ ยังพบว่าการเจริญของเชื้อราที่ปนเปื้อนในดินบนอาหาร NDM-gellan gum จะเจริญได้ช้ากว่าอาหาร NDM-agar จึงทำให้สามารถแยกเชื้อยีสต์ออกจากเชื้อราบนอาหาร NDM-gellan gum ได้ง่ายกว่าอาหาร NDM-agar โดยปกติ gellan gum สามารถใช้ทดแทน agar ในการเป็นสารก่อให้เกิดเจลในอาหารแข็งได้ เช่น ใช้เป็นอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ทั่วไป และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้⁽⁹²⁾ และยังมีรายงานของ Zhang และคณะ 2018 พบว่าอาหาร glucose-YNB medium ที่มีการเติม acyl gellan gum ความเข้มข้นเท่ากับ 0.9% w/v เหมาะสำหรับการเจริญ *Saccharomyces* ได้มากกว่า glucose-YNB medium ที่ผสมกับ agar ความเข้มข้นเท่ากับ 20% w/v (GYA20 agar) เนื่องจากอาหารมีความใสมากกว่า และใช้ปริมาณของสารที่ก่อให้เกิดเจลต่ำกว่า⁽⁹³⁾ และ รายงานของ Tamaki H และคณะ (2009) ทำการศึกษาเกี่ยวกับผลของสารก่อให้เกิดเจลที่ทำให้อาหารแข็งตัว ได้แก่ ภู่น (agar) และ gellan gum ต่อการเจริญของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตะกอนจากทะเลสาบ (lake sediment) ทั้งหมด 108 ไอโซเลท พบว่าแบคทีเรีย 52 ไอโซเลท เจริญได้รวดเร็วบนอาหารแข็ง NM-1 gellan gum มากกว่าอาหารแข็ง NM-1 agar นอกจากนี้ แบคทีเรีย *Gemmatimonas aurantiaca* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ช้า พบว่าสามารถเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วบนอาหารแข็ง NM-1 gellan gum⁽⁸⁹⁾ เช่นเดียวกับรายงานของ Janssen

และคณะ (2004) ที่ศึกษาผลของ gellan gum ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่แยกได้จาก ดินและตะกอนจากทะเลสาบ พบว่าการใช้ gellan gum เป็นสารที่ก่อให้เกิดเจลในอาหารช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่โตช้าได้ดีกว่าการใช้ agar และไม่ส่งผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เจริญได้ยาก ดังนั้นการใช้ gellan gum เป็นสารที่ก่อให้เกิดเจลในอาหารจึงสามารถแยกจุลินทรีย์ได้หลากหลายชนิด⁽⁹⁴⁾

ในการจัดจำแนกยีสต์อาศัยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ D1/D2 domain ของ large subunit (LSU) 26S rRNA gene เนื่องจากบริเวณ D1/D2 domain มีขนาด 500 ถึง 600 นิวคลีโอไทด์ เป็นส่วนที่มีการวิวัฒนาการมาก เรียกว่า บริเวณผันแปร (variable region) ทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณนี้แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างยีสต์แต่ละสายพันธุ์ได้อย่างชัดเจน ซึ่งความแตกต่างในบริเวณนี้พอเพียงที่ใช้ในการจัดจำแนกในระดับสปีชีส์ของยีสต์ได้^(95, 96) จากผลการวิจัยนี้พบว่า จากยีสต์ที่คัดแยกได้ทั้งหมด 127 ไอโซเลท สามารถจัดจำแนกได้เป็น 11 สปีชีส์ และ 2 สปีชีส์ใหม่ (novel species) ที่ไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้ นอกจากนี้ยังพบว่ายีสต์ที่คัดแยกได้ 127 ไอโซเลท จัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota จำนวน 97 ไอโซเลท คิดเป็น 76.3% ถูกจัดจำแนกเป็น 5 สปีชีส์ ได้แก่ *Cyberlindnera saturnus*, *Lipomyces mesembrius*, *Lipomyces starkeyi*, *Lipomyces tetrasporus* และ *Meyerozyma guilliermondii* และ พบว่ายีสต์ที่แยกได้จำนวน 30 ไอโซเลท จัดอยู่ในไฟลัม Basidiomycota คิดเป็น 23.6% จัดจำแนกเป็น 8 สปีชีส์ ได้แก่ *Rhodotorula mucilaginosa*, *Cystobasidium slooffiae*, *Naganishia diffluens*, *Papiliotrema flavescens*, *Papiliotrema terrestris*, *Saitozyma podzolica*, *Piskurozyma* sp. และ *Hannaella* sp.

จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างดิน โดยพบว่ายีสต์สกุล *Lipomyces* เป็นสกุลที่พบมากที่สุดในตัวอย่างดินที่แยกได้ คิดเป็น 70.1% ของยีสต์ทั้งหมด แบ่งเป็น *L. tetrasporus* มีค่า %Frequency of occurrence (%FO) เท่ากับ 37.8 *L. starkeyi* มีค่า %FO เท่ากับ 23.6 และ *L. mesembrius* มีค่า %FO เท่ากับ 7.9 โดยทั่วไปยีสต์ในสกุล *Lipomyces* จัดเป็นยีสต์ที่มีแหล่งที่อยู่ในดิน และแยกได้จากตัวอย่างดินเป็นหลัก⁽¹⁶⁾ ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงสามารถแยกยีสต์กลุ่มนี้ได้มากที่สุด นอกจากนี้ยังพบยีสต์ในสกุล *Papiliotrema flavescens*, *Papiliotrema terrestris*, *Saitozyma podzolica* และ *Cyberlindnera saturnus* โดยคิดเป็น %FO เท่ากับ 7.9 , 3.2, 6.3 และ 5.5 ตามลำดับ ที่สามารถคัดแยกได้จากตัวอย่างดิน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Glushakova AM และคณะ (2017) และ งานวิจัยของ Boekhout T และคณะ (2022) ที่พบว่า กลุ่มของยีสต์ Anamorphic basidiomycetous ได้แก่ *S. podzolica*,

Solicoccozyma terricola, *Apiotrichum* spp., และ *Rhodotorula* spp สามารถคัดแยกได้จาก ตัวอย่างดินหลายบริเวณของระบบนิเวศ^(97, 98) รายงานของ Liu Z และคณะ (2021), Junyapate K และคณะ (2014) และ Kunthiphun S และคณะ (2018) สามารถคัดแยกยีสต์ *S. podzolica*, *Rhodotorula mucilaginoso*, *P. flavescens* และ *P. terrestris* จากดินป่าภูเขา^(21, 24, 98) รายงานของ Junyapate K และคณะ (2014) สามารถคัดแยก *Cyb. saturnus* จากดิน ในประเทศไทย ซึ่งเป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิต xylitol เช่นเดียวกับงานวิจัยนี้ที่สามารถคัดแยก *Cyb. saturnus* ได้จากตัวอย่างดินป่าภูเขา⁽⁹⁸⁾

นอกจากนี้ผู้วิจัยสามารถคัดแยกและค้นพบยีสต์สายพันธุ์ใหม่ คือ SWU-NGP 14-3-2, SWU-NGP 14.-3-4 และ SWU-NATP 4-12 พบว่าใกล้เคียงกับ *Piskurozyma taiwanensis* CBS 9813^T โดยมี %identity เท่ากับ 96.52%, 96.75% และ 96.84% ตามลำดับ และ มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ (nucleotide substitution) ประมาณ 18-20 นิวคลีโอไทด์ ในขณะที่ 2 ไอโซเลท ได้แก่ SWU-YGP 11-1 และ SWU-NAPS 5-1 พบว่าใกล้เคียงกับ *Hannaella oryzae* CBS 7194^T โดยมี %identity เท่ากับ 98.88% และ 98.04% ตามลำดับ และ มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ (nucleotide substitution) ประมาณ 12 นิวคลีโอไทด์

จากรายงานของ Kurtzman CP และคณะ (1998) ทำการศึกษาการจัดจำแนกยีสต์ในไฟลัม Ascomycota พบว่าเมื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีสต์ บริเวณ D1/D2 domain หากเกิดการแทนที่ของ นิวคลีโอไทด์ 0 ถึง 3 ตำแหน่ง สามารถสรุปได้ว่า ยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์นั้น เป็นสปีชีส์เดียวกัน หรือ อาจจะเป็นสปีชีส์ที่มีความใกล้ชิดกันมาก (sister species) แต่หากมีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์มากกว่า หรือ เท่ากับ 6 ตำแหน่ง ยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์จัดเป็นสปีชีส์ที่แตกต่างกัน⁽¹⁰⁰⁾ สอดคล้องกับรายงานของ Fell JW และคณะ (2000) ที่ทำการศึกษการจัดจำแนกยีสต์ในไฟลัม Basidiomycota พบว่าเมื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีสต์ บริเวณ D1/D2 domain มีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันมากกว่า หรือ เท่ากับ 2 นิวคลีโอไทด์ส่งผลให้ ยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์เป็นสปีชีส์ที่แตกต่างกัน⁽¹⁰¹⁾ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้จะเห็นได้ว่ายีสต์ ทั้ง 5 ไอโซเลท จัดจำแนกได้ 2 สปีชีส์ มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่ ได้แก่ *Piskurozyma* sp. SWU-NGP 14-3-2, *Piskurozyma* sp SWU-NGP 14-3-4, *Piskurozyma* sp SWU-NATP 4-1 2 และ *Hannaella* sp. SWU-YGP 11-1 และ *Hannaella* sp. SWU-NAPS 5-1 แต่อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องศึกษาการจัดจำแนกเพิ่มเติม รวมถึงศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และยีน ในตำแหน่งอื่นควบคู่ไปด้วย เพื่อพิสูจน์ว่าเป็นสปีชีส์ใหม่ต่อไป

ในการศึกษาคัดเลือกยีสต์สะสมไขมัน จากยีสต์ที่คัดแยกได้ทั้งหมด 127 ไอโซเลท พบว่า ยีสต์ 85 ไอโซเลท มีขนาดของลิวทิบอดีขนาดใหญ่ภายในเซลล์ มากกว่า ระดับ 1 ใน 3 ของเซลล์ จากการย้อมเซลล์ด้วยสี Nile Red แล้วนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ ซึ่งคิดเป็น 66.93% จากจำนวนยีสต์ที่คัดแยกได้ทั้งหมดโดยการเกิดปฏิกิริยาของ Nile Red จะใช้เป็นสารสำหรับย้อมสารจำพวกลิวทิบอดี เนื่องจาก Nile Red จะสามารถเข้าไปจับกับลิวทิบอดีภายในเซลล์ได้ เมื่อจะอยู่ในสภาวะ rich lipid condition (สภาวะที่ไม่มีไขมัน) ทำให้เกิดการเรืองแสงสีเหลืองทอง (strong yellow-gold emission) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ แต่ในทางกลับกัน เมื่อ Nile Red อยู่ในสภาวะที่มีไขมัน จะไม่เกิดการเรืองแสงเช่น น้ำ หรือ ตัวทำละลายที่มีไขมัน เป็นต้น (62)

วิธีการย้อมสีเหมาะสมที่จะใช้ในการคัดเลือกยีสต์สะสมไขมันเบื้องต้น แต่ไม่สามารถบอกปริมาณของไขมันได้อย่างแม่นยำ ซึ่งจากงานวิจัยนี้พบว่าการพิจารณาปริมาณไขมันจากการติดสีย้อมเรืองแสงด้วยสายตาในการแบ่งระดับของความสามารถในการสะสมไขมันนั้น ทำได้ค่อนข้างยาก สามารถสรุปได้เพียงแค่สัดส่วนของไขมันที่สะสมอยู่ภายในเซลล์ ซึ่งอาจจะมีขนาดเซลล์ที่แตกต่างกันออกไป ดังนั้นวิธีนี้จึงเป็นวิธีในการคัดเลือกยีสต์สะสมไขมันได้เบื้องต้น เท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาคัดเลือกยีสต์สะสมไขมันด้วย Nile Red นั้นจัดว่าเป็นวิธีการที่นิยมใช้ในการคัดเลือกยีสต์สะสมไขมัน หรือสำหรับยีสต์ที่สะสมไขมันเบื้องต้น เนื่องจากเป็นวิธีการที่ง่าย รวดเร็ว ไม่ใช้ระยะเวลา (1)

ดังนั้นในการทดลองต่อมาจึงศึกษาปริมาณไขมันที่ยีสต์สามารถผลิตได้ โดยกระบวนการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 2G2M และสกัดไขมันออกมาจากตัวเซลล์ พบว่า ยีสต์จำนวน 78 ไอโซเลท สามารถสะสมไขมันได้มากกว่า 20% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งค่าจัดความของยีสต์คือยีสต์ที่สามารถสะสมไขมัน หรือ โอลิจินัสยีสต์ จะต้องสะสมไขมันได้มากกว่าหรือเท่ากับ 20% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (76) ดังนั้น ในงานวิจัยนี้สามารถแยกยีสต์สะสมไขมัน ได้ทั้งหมด 78 ไอโซเลท คิดเป็น 61.42% ของยีสต์ที่แยกได้ทั้งหมด ซึ่งจัดจำแนกได้เป็น *L. tetrasporus*, *L. starkeyi*, *L. mesembrius*, *Cyb. saturnus* *M. guilliermondii*, *S. podzolica*, *P. flavescens*, และ *P. terrestris* ที่เป็น ยีสต์สะสมไขมัน และมีเพียง 38.58% ของยีสต์ที่แยกได้ ไม่จัดเป็นยีสต์สะสมไขมัน คือ *C. slooffiae*, *N. diffluens* และ *R. mucilaginosa* ซึ่งจากงานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จเนื่องจากสามารถคัดแยกเชื้อสะสมไขมันได้สูงมากถึง 61.4% ซึ่งสูงกว่างานวิจัยก่อนหน้านี้ที่สามารถแยกเชื้อสะสมไขมันได้เพียงแค่ 5% จากยีสต์ที่แยกได้ทั้งหมด (20)

โดยยีสต์สะสมไขมันที่คัดแยกได้เคยมีรายงานการค้นพบว่าถูกจัดอยู่ในกลุ่มของยีสต์สะสมไขมัน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *L. starkeyi* ซึ่งเป็นยีสต์สะสมไขมันที่มีความสามารถในการผลิตไขมันสูงและมีประโยชน์ทางเทคโนโลยีชีวภาพหลากหลาย ซึ่งยีสต์สายพันธุ์นี้สามารถทนต่อสารยับยั้งได้หลายชนิด อีกทั้งยังสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลาย ซึ่งรวมถึง แหล่งคาร์บอนที่จัดเป็นองค์ประกอบของ lignocellulose hydrolysate เช่น glucose และ xylose เป็นต้น^(12, 95-97) และยังมีรายงานของ Caporusso และคณะ 2021, Dien และคณะ 2016 พบว่า *L. tetrasporus* สายพันธุ์ Li-0407 และ สายพันธุ์ Y-11562 สามารถสะสมไขมันได้สูงถึง 41.1%–68.6% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเจริญในสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมัน ในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนจำกัด^(98, 99) อีกทั้ง ยีสต์ *S. Podzolica* และ *M. guilliermondii* ได้มีการรายงานว่าสามารถผลิตไขมันได้สูงเมื่อเพาะเลี้ยงในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ผ่านการปรับสภาพและกลีเซอรอลดิบ^(40, 65, 78, 100, 101) ในขณะที่ ยีสต์ *Cy. Saturnus* มีรายงานว่าสามารถใช้ volatile fatty acid (VFA) เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตไขมันได้⁽¹⁰²⁾

ในขณะที่สายพันธุ์ *P. terrestris* และ *P. flavescens* เป็นสายพันธุ์ที่ยังไม่เคยมีรายงานสามารถสะสมไขมันได้ รวมถึงยังไม่มีรายงานว่าเป็นยีสต์สะสมไขมัน ซึ่งจากผลการทดลองนี้พบว่า มียีสต์จำนวน 6 ไอโซเลท ซึ่งจัดจำแนกเป็น *P. terrestris* และ *P. flavescens* ที่สามารถสะสมไขมันมีค่า lipid content อยู่ในช่วง 20-40% ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นงานวิจัยแรกที่รายงานการเป็นยีสต์สะสมไขมันของยีสต์ทั้ง 2 สปีชีส์นี้ ซึ่งจากรายงานก่อนหน้านั้นในสกุล *Papiliotrema* พบว่ามีเพียง คือ *Papiliotrema laurentii* เท่านั้นที่มีรายงานศึกษาการสะสมไขมัน โดยจากงานวิจัยของ Vieira NM และคณะ (2020) ได้รายงานเกี่ยวกับ ยีสต์สามารถสะสมไขมันสปีชีส์ใหม่ *Papiliotrema laurentii* UFV-1 และ UFV-2 ที่สามารถสะสมไขมันได้สูงโดยมีค่า lipid content เท่ากับ 63% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง⁽¹⁰²⁾

นอกจากนี้ ยังพบว่า ยีสต์ที่คาดว่าจะ เป็นสายพันธุ์ใหม่ 2 ชนิด ได้แก่ *Hannaella* sp. SWU-YGP 11-1 และ *Piskurozyma* sp. SWU-NATP 4-12 มีความสามารถในการสะสมไขมัน เท่ากับ 21.7% และ 25.42% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ จากการศึกษาก่อนหน้าพบว่า สกุล *Hannaella* สามารถแยกได้จาก ดิน, พืช และ น้ำ^(102,103) สำหรับการรายงานที่เกี่ยวข้องกับยีสต์สะสมไขมัน พบว่ามีเพียงแค่สายพันธุ์ *Hannaella* aff. *zeae* ที่มีคุณสมบัติเป็นยีสต์สะสมไขมัน จากงานวิจัยของ Park Y และคณะ (2020) รายงานเกี่ยวกับยีสต์สกุล *Hannaella* ว่าสามารถสะสมไขมันได้⁽¹⁰³⁾ ในส่วนของสกุล *Piskurozyma* ยังไม่เคยถูกรายงานเกี่ยวกับความสามารถในการสะสมไขมันได้สูง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นรายงานแรกที่รายงานเกี่ยวกับการ

สะสมไขมันของยีสต์ในสกุล *Piskurozyma* ดังนั้นจากงานวิจัยนี้จะพบว่า พื้นฐานข้อมูลของจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตไขมันให้เพิ่มมากขึ้นจากฐานข้อมูลเดิมที่มีอยู่ในปัจจุบัน และเห็นได้ว่ายีสต์สะสมไขมันที่แยกได้จากเมืองไทย ในจังหวัดเชียงใหม่มีความหลากหลายของสายพันธุ์อีกทั้งยังมีสายพันธุ์ใหม่ ที่ยังไม่มีการค้นพบอยู่อีกมาก

จากผลสรุปความหลากหลายของยีสต์สะสมไขมัน จะพบว่ายีสต์แต่ละสปีชีส์จะมีความสามารถในการสะสมไขมันได้แตกต่างกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งยีสต์ที่จัดเป็นสปีชีส์เดียวกัน ยังพบว่าสามารถสะสมไขมันได้แตกต่างกันในบางชนิดสะสมไขมันได้ต่ำกว่า 20% ยกตัวอย่างเช่น *L. tetrasporus* ทั้งหมด 48 สายพันธุ์ พบว่า 28 สายพันธุ์ (คิดเป็น 58.3%) ที่สะสมไขมันได้สูงกว่า 20% และถูกจัดว่าเป็นยีสต์สะสมไขมัน หรือ สายพันธุ์ *L. starkeyi* ทั้งหมด 31 สายพันธุ์ พบว่าจัดเป็นยีสต์สะสมไขมัน 20 สายพันธุ์ (คิดเป็นร้อยละ 64.5) และที่น่าสนใจคือ สายพันธุ์ *L. mesembrius* ทั้งหมด 10 สายพันธุ์ มีถึง 9 สายพันธุ์ (คิดเป็น 90%) ที่จัดเป็นยีสต์สะสมไขมัน เช่นเดียวกับ ยีสต์ *S. podzolica* ที่มีทั้งหมด 10 สายพันธุ์ มีถึง 7 สายพันธุ์ (คิดเป็น 70%) ที่จัดเป็นยีสต์สะสมไขมัน จากผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Polburee P และ คณะ (2015) ที่รายงานว่าความสามารถในการสะสมไขมันของยีสต์ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ แต่ไม่ได้ขึ้นอยู่กับสกุล หรือ สปีชีส์⁽²⁰⁾ โดยมีรายงานของ Ngamsirisomsakul M และคณะ (2021) ที่ให้การสนับสนุนรายงานข้างต้น โดยค้นพบว่า *Y. lipolytica* สองสายพันธุ์ ได้แก่ TISTR 5212 และ TISTR 5054 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี xylose เป็นแหล่งคาร์บอน จะสามารถสะสมไขมันได้แตกต่างกันโดยมีค่า lipid content ได้เท่ากับ 14% และ 4% ตามลำดับ เช่นเดียวกับ *Trichosporon cutaneum* ที่แต่ละสายพันธุ์ก็มีปริมาณ lipid content แตกต่างกัน ดังนี้ สายพันธุ์ TISTR 5040 มีค่า lipid content เท่ากับ 11%, สายพันธุ์ TISTR 5083 มีค่า lipid content เท่ากับ 18% และ สายพันธุ์ TISTR 5133 มีค่า lipid content เท่ากับ 19% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง⁽²³⁾

จากรายงานนี้ค้นพบว่า ยีสต์สะสมไขมันที่มีศักยภาพในการสะสมไขมันได้สูงกว่า 40% มีทั้งหมด 15 สายพันธุ์ ได้แก่ *Cyb. saturnus*, *L. mesembrius*, *L. starkeyi*, *L. tetrasporus*, *M. guilliermondii*, *P. flavescens* และ *S. podzolica* โดยพบว่ามี 2 สายพันธุ์ คือ *L. tetrasporus* SWU-NGP 2-5 เป็นสายพันธุ์ที่ให้ค่า lipid content สูงที่สุดเท่ากับ $74.26 \pm 6.30\%$ ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยมีค่า lipid production เท่ากับ 1.10 ± 0.06 g/L และน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.49 ± 0.05 g/L และอีกหนึ่งสายพันธุ์คือ *L. mesembrius* SWU-NGP 14-6 เป็นสายพันธุ์ที่ให้ค่า lipid production สูงที่สุด คือ 5.20 ± 0.03 g/L และมีค่ามีน้ำหนักเซลล์แห้งที่สูงที่สุดเท่ากับ 9.13 ± 0.36 g/L แต่มีค่า lipid content เท่ากับ $57.10 \pm 1.89\%$ ซึ่งเชื้อยีสต์ทั้ง 2 ชนิดจัดได้ว่าเป็น

เชื้อที่มีศักยภาพในการผลิตไขมัน และที่น่าสนใจคือ ปริมาณ lipid content ของ *L. tetrasporus* SWU-NGP 2-5 พบว่าสูงกว่าที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้ ที่รายงานว่ามีปริมาณ lipid content มักอยู่ในช่วง 20.0-63.7% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง⁽¹²⁾

และยังมีอีกหลายงานวิจัยที่ศึกษาการผลิตไขมันจากไฮโดรไลเสทของลิกโนเซลลูโลส ด้วยเชื้อ *L. tetrasporus* เช่น รายงานของ Xue และคณะ (2015) พบว่า *L. tetrasporus* NRRL Y-11562 สามารถเจริญได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร เปลือกข้าวโพดไฮโดรไลเซต ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยแอมโมเนีย แต่ก็ยังผลิตไขมันได้น้อยเมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อทางการค้า⁽⁹⁶⁾ หรือ รายงานของ Slininger PJ และคณะ (2016) ที่พบว่า *L. tetrasporus*, *Lipomyces kononenkoae* และ *Saitoella coloradoensis* สามารถผลิตไขมันได้อยู่ในช่วง 25 ถึง 30 g/L เมื่อเพาะเลี้ยงด้วย อาหารเปลือกข้าวโพดไฮโดรไลเซต ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยแอมโมเนีย (Corn stover hydrolysate) และ หญ้าสวิตช์กราสไฮโดรไลเซต (switchgrass hydrolysate) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไขมันด้วยกระบวนการผลิตไขมันแบบ 2 ขั้นตอน (two-stage process) ซึ่งพบว่า *L. tetrasporus* Y-11562 สามารถผลิตไขมันโดยมีค่า lipid content (%) เท่ากับ 16.3 ถึง 20.8 g/L เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร glucose และ xylose ในอัตราส่วน 1:1⁽⁹⁷⁾ นอกจากนี้รายงานของ Caporusso A และคณะ (2021) ยังพบว่า *L. tetrasporus* Li-0407 สามารถผลิตไขมันได้สูงโดยมีค่า Lipid content เท่ากับ 47% เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเสตจากต้นคาร์ดูน (พืช Cardoon: *Cynara cardunculus*)⁽⁹⁹⁾

สำหรับ *L. mesembrius* เป็นสายพันธุ์ที่มีรายงานวิจัยอยู่น้อยมาก โดยเฉพาะการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไขมัน หรือการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการปรับปรุงสภาวะในการผลิตไขมันยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังเป็นงานวิจัยแรกที่รายงานเกี่ยวกับการสะสมไขมันของสายพันธุ์นี้ ว่าสามารถสะสมไขมันโดยมีค่า lipid content สูงกว่า 50% โดยก่อนหน้านี้ Juanssilfero AB และคณะ (2018) ได้รายงานที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่จำกัดปริมาณของแหล่งไนโตรเจน (nitrogen-limited mineral medium) โดยมีกลูโคสและไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าให้ปริมาณของ Lipid content ประมาณ $41.89 \pm 1.94\%$ ของน้ำหนักเซลล์แห้ง⁽⁵³⁾

นอกจากนี้ยังพบว่ายีสต์สายพันธุ์ *L. tetrasporus* SWU-NGP 2-5 และ *L. mesembrius* SWU-NGP 14-6 มีศักยภาพในการผลิตไขมันคล้ายคลึงกันเนื่องจากมีค่า lipid content สูงกว่า 50% เช่นเดียวกับรายงานที่ก่อนหน้านี้ โดยพบว่าการคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์เพื่อใช้ในการศึกษาปรับปรุงการผลิตไขมัน มักนิยมใช้เชื้อที่มีศักยภาพในการสะสมไขมันโดยมีค่า lipid content

ที่สูงกว่า 50% เช่น สายพันธุ์ *Y. lipolytica*, *R. toruloides*, *L. starkeyi*, และ *R. glutinis* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่รู้จักกันดีและนิยมใช้ในการศึกษาปรับปรุงกระบวนการผลิต^(12, 34, 53, 104) และจากข้อมูลเบื้องต้นจะพบว่า *L. mesembrius* SWU-NGP 14-6 ไม่เพียงแต่มีค่า lipid content สูงกว่า 50% คือมีค่าเท่ากับ 57.1% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่ยังให้ค่า lipid Production สูงที่สุด คือ 5.20 ± 0.03 g/L เช่นเดียวกับค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่มากที่สุด 9.13 ± 0.36 g/L และที่สำคัญยังมีรายงานการนำเชื้อสายพันธุ์นี้ ไปประยุกต์ใช้ในการผลิตไขมันอยู่น้อย ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงคัดเลือกสายพันธุ์ *L. mesembrius* SWU-NGP 14-6 เพื่อเป็นตัวแทนในการศึกษากระบวนการผลิตไขมันต่อไป

จากการทดลองการศึกษาระบวนการผลิตไขมันแบบ 2 ขั้นตอน ด้วย *L. mesembrius* SWU-NGP 14-6 มีจุดประสงค์ คือ ขั้นแรก (first-stage) เป็นการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ให้ได้มากที่สุดซึ่งอาหารที่ใช้ในขั้นตอนนี้จะต้องส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ยีสต์และในขั้นที่ 2 (second stage) เป็นการเพาะเลี้ยงเพื่อส่งเสริมการผลิตไขมันของยีสต์โดยอาหารที่ใช้ในขั้นตอนนี้ต้องเป็นอาหารที่มีค่าอัตราส่วน C/N ที่สูง จึงส่งผลให้ยีสต์สามารถใช้แหล่งคาร์บอนในอาหารสำหรับการผลิตและสะสมไขมันภายในเซลล์ด้วย กลไก *de novo* fatty acid biosynthesis pathway⁽¹⁾ ในขั้นตอนการคัดเลือกแหล่งอาหารที่เหมาะสมสำหรับใช้ในขั้นแรกของกระบวนการหมักแบบ 2 ขั้นตอน ระหว่าง อาหารเหลว YM ซึ่งเป็นอาหารประเภท nitrogen-rich medium มีอัตราส่วน C/N เท่ากับ 6.7 และ อาหารเหลว 2G2M ซึ่งเป็นอาหารประเภท nitrogen-limited medium มีอัตราส่วน C/N เท่ากับ 39.0 พบว่าอาหารเหลว 2G2M ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตให้ปริมาณ biomass สูงกว่าอาหาร YM อย่างมีนัยสำคัญ แต่อาจจะเนื่องมาจาก ปริมาณของน้ำตาลกลูโคสในอาหารทั้ง 2 ชนิดแตกต่างกัน โดยอาหาร YM มีปริมาณของน้ำตาลกลูโคสน้อยกว่าอาหาร 2G2M ปริมาณ 10 กรัม ส่งผลให้ยีสต์ใช้กลูโคสหมดก่อนที่ 36 ชั่วโมง ในอาหารเหลว YM ในขณะที่ 2G2M ยีสต์ใช้น้ำตาลกลูโคสหมดที่ 96 ชั่วโมง แต่อย่างไรก็ตามหากเปรียบเทียบผลของ productivity ในการผลิตน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่า อาหาร YM มีค่า productivity biomass เท่ากับ 0.42 g/L/D ในขณะที่ 2G2M มีค่า productivity biomass เท่ากับ 1.10 g/L/D นอกจากนี้ หากเปรียบเทียบความสามารถในการสะสมไขมันจะพบว่า lipid production และ lipid content ของอาหาร 2G2M สูงกว่า YM อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่ง 2G2M เป็นอาหารที่มีค่า C/N สูงกว่า YM จึงส่งผลให้ยีสต์สามารถสะสมไขมันได้สูงขึ้น ซึ่งตรงกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ที่พบว่าเมื่อค่าอัตราส่วน C/N ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่สูงจะส่งเสริมการสะสมไขมันของยีสต์สะสมไขมัน แต่เมื่อค่าอัตราส่วน C/N ต่ำจะส่งเสริมการเจริญของเชื้อแทน รายงานของ Annamalai N และคณะ (2018) กล่าวว่าเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ *Cryptococcus curvatus* ในอาหารที่มีปริมาณแหล่ง

ไนโตรเจนสูง (อัตราส่วนของ C/N ต่ำ) ช่วยส่งเสริมการเจริญของยีสต์ แต่เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณแหล่งไนโตรเจนต่ำ (อัตราส่วนของ C/N สูง) จะส่งเสริมการผลิตไขมันของยีสต์ อย่างไรก็ตาม ค่าอัตราส่วน C/N ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของยีสต์จะอยู่ในช่วง 20 ถึง 40 แต่เมื่อเพิ่มค่าอัตราส่วน C/N ในช่วงระหว่าง 40 ถึง 80 ยีสต์ *Cryptococcus curvatus* สามารถผลิตไขมันได้สูงที่สุดที่ อัตราส่วน C/N เท่ากับ 80 อย่างไรก็ตามเมื่อ ค่าอัตราส่วน C/N สูงเกินกว่า 120 ยีสต์จะผลิตไขมันได้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ⁽⁸³⁾ รายงานของ Patel A และคณะ (2016) ได้ทำการเพาะเลี้ยง *Lipomyces starkeyi* AS 2.1560 ในอาหารเหลว YPD ที่มีปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่สูง (yeast peptone dextrose medium) พบว่า ยีสต์ใช้แหล่งไนโตรเจนในการเจริญเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ได้รวดเร็ว เมื่อแหล่งไนโตรเจนเริ่มหมดยีสต์จะหยุดการเจริญและเปลี่ยนไปสะสมไขมันในรูปของ triacylglycerol ต่อไป⁽¹⁾ ดังนั้นจากเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้นอาหาร 2G2M จึงเป็นอาหารที่เหมาะสมในการนำไปใช้ผลิตไขมันต่อไป

จากการออกแบบกระบวนการหมักแบบ 2 ขั้นตอน (two-stage fermentation) โดยในขั้นตอนแรกใช้อาหาร 2G2M ที่ปรับเปลี่ยนระยะเวลาในการหมักตั้งแต่ 3 วันจนถึง 5 วัน และในขั้นตอนที่ 2 ใช้อาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวเท่านั้นคือ กลูโคสความเข้มข้น 6% (6G) หรือ 60 g/L และปรับเปลี่ยนระยะเวลาในการหมักตั้งแต่ 1 วัน จนถึง 3 วัน ตามตารางการออกแบบ

การออกแบบระยะเวลาการหมักในขั้นตอนแรก ในอาหาร 2G2M ใช้เกณฑ์การปรับเปลี่ยนเวลา โดยเลือกระยะเวลาที่อยู่ในช่วง late logarithm phase (D3), early stationary phase (D4) และ stationary phase (D5) ตามลำดับ ซึ่งยีสต์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในช่วงระยะเวลาที่แตกต่างกันในขั้นตอนแรก จะนำตะกอนเซลล์ทั้งหมดมาเป็นหัวเชื้อใน ขั้นตอนที่ 2 ในอาหาร กลูโคส 6% (6G) ส่งผลให้ค่าอัตราส่วน C/N ของการเพาะเลี้ยงขั้นที่ 2 (Second stage) สูงขึ้นอย่างมากเพราะเติมแค่แหล่งคาร์บอนลงไปอย่างเดียว แต่ในการทดลองนี้ไม่ได้วัดปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหลือจากการเพาะเลี้ยงขั้นแรก จึงไม่สามารถระบุค่าอัตราส่วน C/N ของการเพาะเลี้ยงขั้นที่ 2 ได้

จากขั้นตอนแรก (first stage) จะพบว่า สภาวะ D3 (เพาะเลี้ยงขั้นแรก 3 วัน), D4 (เพาะเลี้ยงขั้นแรก 4 วัน) และ D5 (เพาะเลี้ยงขั้นแรก 5 วัน) ค่า biomass yield ที่ความเร็วรอบ 150 rpm ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับ สภาวะทั้ง 3 ที่ ความเร็วรอบ 200 rpm ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกันแสดงให้เห็นว่า ระยะเวลาเริ่มต้นของเชื้อที่ระยะต่างๆ ได้แก่ late logarithm phase (D3), early stationary phase (D4) และ stationary phase

(D5) ไม่ได้ส่งผลต่อค่า biomass yield แต่กลับส่งผลต่อค่า lipid yield โดยพบว่า สภาวะ D3 มีค่า lipid yield น้อยกว่าสภาวะ D4 และ D5 ทั้งการทดสอบที่ความเร็วรอบ 200 และ 150 rpm แสดงให้เห็นว่า ระยะเวลา 3 วันแรก เป็นระยะเวลาที่เชื้อใช้เพื่อการเจริญเติบโตสูงที่สุด หลังจากนั้น เซลล์จะปรับเปลี่ยนกลไกการเจริญเติบโตไปเพื่อการพัฒนาเป็นการสะสมไขมันในตัวเซลล์ ต่อไป เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Polburee P และคณะ (2016) เพาะเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ *Rhodospiridium fluviale* DMKU-RK 253 โดยใช้กระบวนการหมักแบบ 2 ขั้นตอน พบว่าใน First stage ยีสต์สามารถเจริญได้ปริมาณเซลล์สูงที่สุด (biomass) เมื่อใช้ระยะเวลา 72 ชั่วโมง (3 วัน) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร crude glycerol-YM medium⁽²⁹⁾

อย่างไรก็ตาม งานวิจัยของ Zhang L และคณะ (2021) พบว่า *L. starkeyi* NRRL Y-11557 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 50% เปลือกส้มไฮโดรไลเซต (orange peel hydrolysate) + 50% YPD (yeast extract peptone dextrose medium) เป็นระยะเวลา 5 วัน ให้ปริมาณจำนวนเซลล์และปริมาณไขมันที่สูงที่สุด ในการเพาะเลี้ยงขั้นแรก (first stage)⁽²⁵⁾ ซึ่งจากรายงานวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อการเจริญ (biomass) ของเชื้อและแต่ละสายพันธุ์ก็มีระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงขั้นแรก (first stage) ที่ต่างกันอาจขึ้นอยู่กับความสามารถในการเจริญของเชื้อ อาหาร และ สภาวะในการเพาะเลี้ยง

ในส่วนของ การเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ที่ความเร็วรอบ 150 rpm และ 200 rpm ในขั้นตอนแรก จะเห็นได้ชัดชัดเจนว่าความเร็วรอบในการเขย่า 200 rpm มีปริมาณของ biomass yield สูงกว่าที่ 150 rpm อย่างมีนัยสำคัญ ในทางตรงกันข้าม การผลิต lipid yield จะพบว่าต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงที่ความเร็วรอบ 150 rpm อย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน แสดงให้เห็นว่าเมื่อเพิ่มความเร็วรอบในการเขย่ายีสต์จะสร้างเซลล์เพิ่มมากขึ้นกว่าการสะสมไขมันภายในเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Calvey CH และคณะ (2016) รายงานว่า *L. starkeyi* NRRL Y-11557 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว DMM medium ด้วยความเร็วรอบในการเขย่าที่ต่างกัน ได้แก่ 150 rpm, 200 rpm และ 300 rpm พบว่า เมื่อเพิ่มความเร็วรอบในการเขย่ายีสต์จะใช้ glyucose ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้ในการเจริญสร้างเซลล์ใหม่อย่างรวดเร็ว มากกว่าการผลิตและสะสมไขมัน⁽¹⁰⁴⁾ เช่นเดียวกันกับรายงานก่อนหน้าของ Yen HW และคณะ (2011 และ 2014) พบว่า เมื่อเพิ่มอัตราการกวนในถังหมักจะทำให้ค่า DO (dissolve oxygen) ในอาหารสูงขึ้นส่งผลให้ยีสต์ *Rhodotorula glutinis* สร้างจำนวนเซลล์ได้ปริมาณสูงขึ้น ในทางกลับกัน ค่าปริมาณไขมันทั้งหมดต่อเซลล์ (lipid content) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อความเร็วรอบในการกวนที่สูงขึ้น^(105, 106)

ในขั้นตอนที่ 2 ของกระบวนการหมัก (second stage fermentation) มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มการสะสมไขมันของเซลล์ยีสต์ และการผลิตไขมันให้สูงเพิ่มมากขึ้นกว่าการเพาะเลี้ยงแบบขั้นตอนเดียวที่ระยะเวลา 6 วัน (B6) โดยพบว่า การเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน ของ สภาวะ D3 และ D4 ช่วยเพิ่มค่า lipid production เป็น 6.40-7.70 g/L เมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงแบบขั้นตอนเดียว (one-stage) ในสภาวะ B6 ที่พบว่ามีค่า lipid production เท่ากับ 5.13-5.16 g/L และส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ยีสต์โดยมีค่า biomass เพิ่มมากขึ้น จาก 11.40-22.30 g/L ในสภาวะ D3 และ D4 ส่วนสภาวะ B6 มีค่า biomass เท่ากับ 9.30-21.60 g/L และจากค่า lipid productivity ที่แสดงถึงค่าการผลิตไขมันต่อวัน จะพบว่า สภาวะ D3 ที่ความเร็วรอบ 150 rpm มีค่า lipid productivity สูงที่สุด คือ 1.28 g/L/D รองลงมาคือ สภาวะ D4 ที่ความเร็วรอบ 150 rpm พบว่ามีค่า lipid productivity เท่ากับ 1.14 ± 0.02 g/L/D ส่วนสภาวะ D3 ที่ 150 rpm และสภาวะ D4 ที่ 200 rpm พบว่า มีค่า Lipid productivity ที่เท่ากันคือ 1.07 g/L/D

นอกจากนี้จากการศึกษาความเร็วรอบ 200 และ 150 rpm ในขั้นตอนที่ 2 พบว่าให้ผลไม่แตกต่างจากขั้นตอนแรก คือ ที่ 200 rpm ปริมาณเซลล์สูงมากกว่าที่ 150 rpm อย่างมีนัยสำคัญ โดยปริมาณของไขมันสะสม หรือ ค่า lipid production ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ 150 และ 200 rpm ดังนั้น ความเร็วรอบส่งผลต่อการเจริญของเซลล์แต่ไม่ส่งผลต่อการสะสมไขมัน ดังที่กล่าวไปแล้วข้างต้น จากการศึกษากการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอนจะเห็นว่า สภาวะ D5 ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการเพาะเลี้ยงแบบขั้นตอนเดียว (B6) อาจจะเป็นเนื่องจากช่วงเวลาในการเพาะเลี้ยงขั้นที่ 2 (second stage) ของสภาวะ D5 มีแค่ 24 ชั่วโมง ซึ่งน้อยกว่าสภาวะ D3 และ D4 จึงทำให้ยีสต์ยังไม่สามารถปรับตัวหรือใช้น้ำตาลความเข้มข้นที่สูง (60 g/L) ในอาหารเพื่อใช้ในการผลิตไขมันได้เต็มความสามารถ จึงทำให้ค่าการผลิตไขมันไม่แตกต่างกับสภาวะควบคุม คือ การเพาะเลี้ยงแบบขั้นตอนเดียว (one-stage fermentation) ที่ สภาวะ B6

ดังนั้นการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน การออกแบบระยะเวลาใน ขั้นตอนที่ 2 เพื่อยืดระยะเวลาในการสะสมไขมัน มีความสำคัญที่อาจจะส่งผลต่อการสะสมไขมันของเซลล์ยีสต์ได้ ดังเช่น งานวิจัยของ Polburee P และคณะ ในปี 2016 และ 2020 พบว่าเมื่อใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงขั้นที่ 2 (second stage) เท่ากับ 144 ชั่วโมง และ 120 ชั่วโมง ของยีสต์สายพันธุ์ *Rhodospiridiobolus fluvialis* DMKU-RK 253 ที่ เจริญในกลีเซอรอลดิบ (70 g/L และ 57 g/L ตามลำดับ) สามารถผลิตไขมันได้สูง โดยมีค่า lipid production เท่ากับ 15.98 g/L และ 27.81 g/L ตามลำดับ และ ได้ค่า lipid content เท่ากับ 69.69% และ 71.42% ตามลำดับ^(29, 77)

แต่อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน จัดว่าเป็นอีกกระบวนการหนึ่งซึ่งสามารถเพิ่มผลผลิตของ *L. mesembrius* SWU-NGP 14-6 ให้มีค่าการผลิตไขมัน และค่าการผลิตน้ำหนักรวมเซลล์แห้งได้สูงขึ้น กว่า การเพาะเลี้ยงแบบขั้นตอนเดียว ที่ถูกจำกัดการสะสมไขมันเนื่องจากปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ไม่มากพอ และจากรายงานก่อนหน้า^{นี้} ของ สายพันธุ์ *Lipomyces starkeyi* ในการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอนที่ขยายกระบวนการผลิตในถังหมักพบว่า มีปริมาณการผลิตไขมันที่สูง ดังตารางที่ 17

ดังนั้นจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน (two-stage fermentation) ช่วยส่งเสริมการผลิตไขมันของยีสต์สายพันธุ์ *L. mesembrius* SWU-NGP 14-6 ได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงแบบขั้นตอนเดียว (one-stage fermentation) โดยยังไม่ได้ อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไขมัน (non-optimum condition)



ตาราง 17 ผลการทดลองของการผลิตไขมันด้วยกระบวนการหมักแบบ 2 ขั้นตอนของงานวิจัยก่อนหน้า

| สายพันธุ์ยีสต์ | อาหารในขั้นแรก (ระยะเวลา) | อาหารในขั้นที่สอง (ระยะเวลา) | Biomass (g/L) | Lipid (g/L) | Lipid content (%) | ชนิด (ระดับการ เพาะเลี้ยง) | อ้างอิง |
|-----------------------------------|---|--|------------------|----------------|----------------------|------------------------------------|---------|
| <i>L. starkeyi</i> AS 2.1560 | YEPD medium (30 ชั่วโมง) | 120 g/L Non-sterile glucose solution (40 ชั่วโมง) | 104.6 | 67.9 | 64.9 | ถึงหมัก แบบใบพัด (15 L และ 7 L) | (15) |
| <i>L. starkeyi</i> AS 2.1560 | YPD medium (30 ชั่วโมง) | 40 g/L Non-sterile glucose and xylose solution (2:1 v/v) (46 ชั่วโมง) | 98.3 | 62.7 | 63.8 | ถึงหมัก แบบใบพัด (10 L และ 7 L) | (26) |
| <i>L. starkeyi</i> NRRL Y-1388 | YPD medium (120 ชั่วโมง) | 60 g/L Glucose solution (24 ชั่วโมง) | - | 17.58 | 61.6 | ถึงหมัก (ไม่ระบุ) | (25) |
| <i>L. starkeyi</i> NRRL Y-1388 | OP hydrolysate (120 ชั่วโมง) | 60 g/L Glucose solution (24 ชั่วโมง) | - | 2.75 | 27.13 | ถึงหมัก (ไม่ระบุ) | (25) |
| <i>L. starkeyi</i> NRRL Y-1388 | YPD medium + OP hydrolysate 1:1 v/v (120 ชั่วโมง) | 60 g/L Glucose solution (24 ชั่วโมง) | - | 7.58 | 46.35 | ถึงหมัก (ไม่ระบุ) | (25) |
| <i>Rh. fluviale</i> DMKU-RK253 | 70 g/L Crude glycerol YM medium (72 ชั่วโมง) | 70 g/L Crud glycerol (144 ชั่วโมง) | 22.93 | 15.98 | 69.69% | ฟลาस्क 500 ml (100 ml) | (29) |

| สายพันธุ์ยีสต์ | อาหารในชั้นแรก (ระยะเวลา) | อาหารในชั้นที่สอง (ระยะเวลา) | Biomass (g/L) | Lipid (g/L) | Lipid content (%) | ชนิด (ระดับการ เพาะเลี้ยง) | อ้างอิง |
|--------------------------------------|---|---|------------------|----------------|----------------------|-------------------------------|-----------------|
| | 30 g/L Crude glycerol | | | | | | |
| <i>Rh. fluvialis</i> DMKU-RK253 | + 5 g/L MSG medium (Sterile) (96 ชั่วโมง) | 57 g/L Crud glycerol (non-sterile) (120 ชั่วโมง) | 39.14 | 27.81 | 71.42% | ฟลาस्क 500 ml (100 ml) | (77) |
| <i>L. mesembrius</i> SWU-NGP 14-6 | 2G2M medium 150 rpm (72 ชั่วโมง) | 6G medium 150 rpm (72 ชั่วโมง) | 11.4 | 6.4 | 56.3 | ฟลาस्क 500 ml (100 ml) | งาน วิจัยนี้ |
| <i>L. mesembrius</i> SWU-NGP 14-6 | 2G2M medium 200 rpm (72 ชั่วโมง) | 6G medium 200 rpm (72 ชั่วโมง) | 22.3 | 7.7 | 34.6 | ฟลาस्क 500 ml (100 ml) | งาน วิจัยนี้ |

โดยรายงานของ Lin J และคณะ (2011) พบว่าการเพาะเลี้ยง *Lipomyces starkeyi* AS 2.1560 ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน (two-stage fermentation) ในสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไขมัน โดยใช้อาหาร YEPD (nitrogen rich medium) สำหรับการหมักขั้นแรก ในถังหมักแบบไบปัดขนาด 15 ลิตร (stirrer bioreactor) เมื่อเข้าสู่ขั้นที่ 2 ของการหมักถ่ายเซลล์ทั้งหมดลงในสารละลายกลูโคสที่ไม่ปราศจากเชื้อความเข้มข้น เท่ากับ 120 g/L ในถังหมักแบบไบปัด ขนาด 7 ลิตร เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักขั้นที่ 2 พบว่า ยีสต์ให้ผลผลิตไขมัน ผลผลิตน้ำหนักเซลล์แห้ง และ ปริมาณไขมันทั้งหมด เท่ากับ 67.9 g/L, 104.6 g/L และ 64.9% ตามลำดับ⁽¹⁵⁾

เช่นเดียวกับ รายงานของ Liu W และคณะ (2020) พบว่าการเพาะเลี้ยง *Lipomyces starkeyi* AS 2.1560 ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน (two-stage fermentation) ในสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไขมัน โดยใช้อาหาร YPD (nitrogen rich medium) สำหรับการหมักขั้นแรกในถังหมักขนาด 10 ลิตร (stirrer bioreactor) เมื่อเข้าสู่ขั้นที่ 2 ของการหมักเซลล์ทั้งหมดจะถูกถ่ายลงในสารละลายกลูโคสและไซโลสในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 โดยไม่ปราศจากเชื้อ ที่มีความเข้มข้น เท่ากับ 120 g/L ในถังหมักแบบไบปัด ขนาด 7 ลิตร เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักขั้นที่ 2 พบว่า ยีสต์ให้ผลผลิตไขมัน (lipid production), ผลผลิตน้ำหนักรวมเซลล์แห้ง (biomass production) และ ปริมาณไขมันทั้งหมด (lipid content) เท่ากับ 62.7 g/L, 98.3 g/L และ 63.8% ตามลำดับ⁽²⁶⁾

และจากรายงานของ Zhang L และคณะ (2021) เพาะเลี้ยง *Lipomyces starkeyi* NRRL Y-1388 ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน (two-stage fermentation) ในสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไขมัน โดยใช้อาหารในขั้นแรกของกระบวนการหมักต่างกัน ได้แก่ อาหารเหลว YPD medium ที่มีส่วนผสมระหว่าง 50% YPD + 50% เปลือกส้มไฮโดรไลเซต (orange peel hydrolysate (OP) ซึ่งประกอบไปด้วยน้ำตาลกลูโคส และ น้ำตาลไซโลส และ อาหารเหลวเปลือกส้มไฮโดรไลเซต (orange peel hydrolysate: OP) ในถังหมัก (ไม่ได้ระบุขนาดการเพาะเลี้ยงและ ขนาดของถังหมัก) โดยจะเลี้ยงระยะแรกเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเซลล์ที่ได้ในขั้นแรกจะถูกล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 2 รอบ จึงนำไปละลายในสารละลายกลูโคสที่ปราศจากเชื้อ (มีความเข้มข้น เท่ากับ 60 g/L) ในถังหมัก (ไม่ได้ระบุขนาดการเพาะเลี้ยงและ ขนาดของถังหมัก) เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักขั้นที่ 2 พบว่า ยีสต์ให้ผลผลิตไขมัน (lipid production) และ ปริมาณไขมันทั้งหมด (lipid content) เท่ากับ 17.58 g/L และ 61.6% (อาหารในขั้นแรก YPD และ อาหารในขั้นที่สอง 60 g/L glucose), 2.75 g/L และ 27.13% (อาหารในขั้นแรก 50% YPD + 50% orange peel (OP) hydrolysate และ อาหารในขั้นที่สอง 60 g/L glucose) ตามด้วย 7.58

g/L และ 46.35% (อาหารในขั้นแรก orange peel (OP) hydrolysate และ อาหารในขั้นที่สอง (60 g/L glucose) ตามลำดับ⁽²⁵⁾)

จากงานวิจัยข้างต้นจะเห็นได้ว่าการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอนที่มีการขยายขนาดของการเพาะเลี้ยงจะส่งเสริมให้การผลิตไขมันเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นในงานวิจัยนี้ *L. mesembrius* SWU-NGP 14-6 ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะ D3 ที่ 200 rpm โดยให้ค่า biomass production, lipid production และ lipid content เท่ากับ 22.30 ± 0.20 g/L, 7.70 ± 0.20 g/L และ $34.60 \pm 0.90\%$ ตามลำดับสามารถที่จะส่งเสริมการผลิตไขมันให้สูงขึ้นได้ โดยการศึกษาการปรับสภาวะในการเพาะเลี้ยงและขยายขนาดการผลิตในถังหมักต่อไปในอนาคตได้ นอกจากนี้ งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่รายงานเกี่ยวกับการผลิตไขมันของยีสต์ในสปีชีส์ *Lipomyces mesembrius* ดังนั้นสายพันธุ์นี้จึงเป็นสายพันธุ์ที่น่าจะศึกษาต่อไปในอนาคต

สำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันที่ยีสต์สายพันธุ์ตัวแทน *L. mesembrius* SWU-NGP 14-6 สามารถผลิตได้ ในระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน (two-stage fermentation) จะเห็นได้ว่าองค์ประกอบของกรดไขมันที่ยีสต์สายพันธุ์ตัวแทนผลิตได้ ไม่ได้มีความแตกต่างกัน ในแต่ละสภาวะ ได้แก่ D3, D4, D5 และ B6 ทั้ง 2 ความเร็วรอบในการเขย่า (150 rpm และ 200 rpm) ผลการทดลองจะเห็นได้ว่าองค์ประกอบของกรดไขมันที่ยีสต์สายพันธุ์ตัวแทนผลิตได้ส่วนมากจะเป็น oleic acid (C18:1n9), palmitic acid (C16:0) และ stearic acid (C18:0) รายงานการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่ายีสต์สะสมไขมันโดยส่วนมากจะสะสมไขมันจำพวก Linoleic acid (C18:2) และ palmitic acid (C16:0) เป็นหลัก ตามด้วย oleic acid (C18:1n9) และ stearic acid (C18:0)⁽¹⁾ งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของกรดไขมันที่ยีสต์ตัวแทนสามารถผลิตได้ จึงสามารถใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตไบโอดีเซลได้ รายงานของ Miao Z และคณะ (2020) เพาะเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ *Rhodotorula taiwanensis* AM2352 เพื่อใช้ในการผลิตไบโอดีเซล พบว่าองค์ประกอบของกรดไขมันที่ยีสต์สายพันธุ์นี้มี กรดไขมันแบบไม่อิ่มตัว oleic acid (C18:1n9) มีปริมาณ 46.8 %w/w ของกรดไขมันทั้งหมด และ กรดไขมันที่อิ่มตัว palmitic acid (C16:0) มีปริมาณ 24.4 %w/w ของกรดไขมันทั้งหมด ผลการทดลองพบว่าไบโอดีเซลที่ได้จากยีสต์ AM2352 มีคุณสมบัติที่ดีผ่านมาตรฐานของ US biodiesel ASTM, ประเทศสหรัฐอเมริกา⁽⁸²⁾ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ ซึ่งองค์ประกอบของกรดไขมันหลักที่ ยีสต์ *L. mesembrius* SWU-NGP 14-6 ผลิตได้ ได้แก่ oleic acid (C18:1n9) และ palmitic acid (C16:0) โดยมีปริมาณ 35.43-46.92 %w/w และ 37.62-42.85 %w/w ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีสต์ *L. mesembrius* SWU-NGP 14-6 มีศักยภาพสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล

จากผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของยีสต์ที่คัดแยกและจัดจำแนกได้จากดินในป่าภูเขา จังหวัดเชียงราย, ประเทศไทย โดยพบ 13 สปีชีส์ จัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota และ Basidiomycota โดยยีสต์ทั้งหมด 127 สายพันธุ์ มียีสต์ 78 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสะสมไขมันได้สูง (lipid content % \geq 20%) คิดเป็น 61.42% ซึ่งยีสต์เหล่านี้ถูกจัดเป็นยีสต์สะสมไขมัน หรือ oleaginous yeast จากผลการจัดจำแนกบริเวณ D1/D2 domain ของ large subunit (LSU) 26S rRNA gene ได้พบความหลากหลายของสายพันธุ์ยีสต์ ได้แก่ *L. tetrasporus*, *L. starkeyi*, *L. mesembrius*, *Cyb. saturnus*, *M. guilliermondii*, *S. podzolica*, *P. flavescens* และ *P. terrestris* ที่น่าสนใจ ทางผู้วิจัยได้ค้นพบยีสต์สปีชีส์ (novel yeast species) ใหม่ ได้แก่ *Piskurozyma* sp. และ *Hannaella* sp. อีกทั้งงานวิจัยนี้ยังค้นพบยีสต์สะสมไขมันสปีชีส์ใหม่ (Novel oleaginous yeast species) ที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อน ได้แก่ *P. flavescens*, *P. terrestris*, *Piskurozyma* sp. และ *Hannaella* sp. อีกทั้งงานวิจัยนี้ยังค้นพบยีสต์ที่มีศักยภาพในการผลิตและสะสมไขมันได้สูง ได้แก่ *L. tetrasporus* SWU-NGP 2-5 ที่ให้ค่า lipid content สูงที่สุด เท่ากับ $74.26 \pm 6.30\%$ และ *L. mesembrius* SWU-NGP 14-6 ที่ให้ค่า lipid production สูงที่สุด เท่ากับ 5.20 ± 0.03 g/L และในงานวิจัยนี้ได้ทำการประยุกต์นำยีสต์สายพันธุ์ตัวแทน *L. mesembrius* SWU-NGP 14-6 มาศึกษาการผลิตไขมันในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน (two-stage fermentation) เป็นงานวิจัยแรก พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะ D3 ด้วยความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 200 rpm จะให้ผลผลิตน้ำหนักเซลล์ (biomass production) แห้งสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ เท่ากับ 22.3 g/L แต่เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะ D3 โดยใช้ความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 150 rpm พบว่า ได้ผลผลิตน้ำหนักเซลล์แห้ง (biomass production) ลดลง เท่ากับ 11.4 g/L อย่างไรก็ตามเมื่อลดความเร็วรอบในการเขย่ากับให้ ผลผลิตไขมัน (lipid production) ที่สูง และ ปริมาณ ไขมัน ทั้งหมด ต่อเซลล์ (lipid content) ที่สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ เท่ากับ 6.4 g/L และ 56.3% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามสภาวะที่นำไปทดลองยังไม่ใช่สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไขมันของยีสต์สายพันธุ์ตัวแทน ดังนั้นจึงต้องศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมรวมถึงการขยายระดับการผลิตไขมันในอนาคตต่อไป องค์ประกอบของกรดไขมันที่ยีสต์สายพันธุ์สร้าง ในสภาวะต่างๆ ระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอนมีองค์ประกอบที่ไม่แตกต่างกัน โดยองค์ประกอบของกรดไขมันที่ยีสต์ผลิตมีความคล้ายคลึงกับองค์ประกอบไขมันที่ผลิตได้จากพืช ดังนั้น ยีสต์สายพันธุ์ตัวแทนจึงมีศักยภาพที่จะนำไปผลิตใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตไบโอดีเซลหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารอื่นๆ ต่อไปได้ในอนาคต

บรรณานุกรม

1. Patel A, Arora N, Sartaj K, Pruthi V, Pruthi PA. Sustainable biodiesel production from oleaginous yeasts utilizing hydrolysates of various non-edible lignocellulosic biomasses. *Renewable and sustainable energy reviews*. 2016;62:836-55.
2. Mohanty AK, Misra M, Drzal L. Sustainable bio-composites from renewable resources: opportunities and challenges in the green materials world. *Journal of Polymers and the Environment*. 2002;10(1):19-26.
3. Singh RL. Principles and applications of environmental biotechnology for a sustainable future: Springer; 2017.
4. Hoffmann HK. Bioenergy, development and food security in Sub-Saharan Africa. 2016.
5. Anuar MR, Abdullah AZ. Challenges in biodiesel industry with regards to feedstock, environmental, social and sustainability issues: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2016;58:208-23.
6. Uthandi S, Kaliyaperumal A, Srinivasan N, Thangavelu K, Muniraj IK, Zhan X, et al. Microbial biodiesel production from lignocellulosic biomass: new insights and future challenges. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 2022;52(12):2197-225.
7. Szczepańska P, Hapeta P, Lazar Z. Advances in production of high-value lipids by oleaginous yeasts. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2022;42(1):1-22.
8. Shi S, Zhao H. Metabolic engineering of oleaginous yeasts for production of fuels and chemicals. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:2185.
9. Ratledge C. Microorganisms for lipids. *Acta Biotechnologica*. 1991;11(5):429-38.
10. Sajish S, Singh S, Nain L. Yeasts for Single Cell Oil Production from Non-conventional Bioresources. *Microbial Biotechnology for Renewable and Sustainable Energy*: Springer; 2022. p. 337-64.
11. Sreeharsha RV, Mohan SV. Obscure yet promising oleaginous yeasts for fuel and chemical production. *Trends in biotechnology*. 2020;38(8):873-87.

12. Abeln F, Chuck CJ. The history, state of the art and future prospects for oleaginous yeast research. *Microbial cell factories*. 2021;20(1):1-31.
13. Wang R, Wang J, Xu R, Fang Z, Liu A. Oil production by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* using diverse carbon sources. *BioResources*. 2014;9(4):7027-40.
14. Lin X, Liu S, Bao R, Gao N, Zhang S, Zhu R, et al. Development of an *Agrobacterium*-mediated transformation method and evaluation of two exogenous constitutive promoters in oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2017;183(3):867-75.
15. Lin J, Shen H, Tan H, Zhao X, Wu S, Hu C, et al. Lipid production by *Lipomyces starkeyi* cells in glucose solution without auxiliary nutrients. *Journal of Biotechnology*. 2011;152(4):184-8.
16. Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. *The yeasts: a taxonomic study*: Elsevier; 2011.
17. Yurkov AM. Yeasts of the soil—obscure but precious. *Yeast*. 2018;35(5):369-78.
18. Yamazaki A, Lorliam W, Kawasaki H, Uchino M, Suzuki K-i. Fourteen novel lipomycetaceous yeast species isolated from soil in Japan and transfer of *Dipodascopsis anomala* to the genus *Babjevia* based on ascospore production phenotype. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2020;70(2):1372-97.
19. Botha A. Yeasts in soil. *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*: Springer; 2006. p. 221-40.
20. Polburee P, Yongmanitchai W, Lertwattanasakul N, Ohashi T, Fujiyama K, Limtong S. Characterization of oleaginous yeasts accumulating high levels of lipid when cultivated in glycerol and their potential for lipid production from biodiesel-derived crude glycerol. *Fungal biology*. 2015;119(12):1194-204.
21. Hoondee P, Wattanagonniyom T, Weeraphan T, Tanasupawat S, Savarajara A. Occurrence of oleaginous yeast from mangrove forest in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2019;35(7):1-17.
22. PLANONTH S, CHANTARASIRI A. The oleaginous yeast *Pichia manshurica* isolated from *Lansium domesticum* fruit in Thailand and its fatty acid composition of single cell oil. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*. 2022;23(2).

23. Ngamsirisomsakul M, Reungsang A, Kongkeitkajorn MB. Assessing oleaginous yeasts for their potentials on microbial lipid production from sugarcane bagasse and the effects of physical changes on lipid production. *Bioresource Technology Reports*. 2021;14:100650.
24. Kunthiphun S, Chokreansukchai P, Hondee P, Tanasupawat S, Savarajara A. Diversity and characterization of cultivable oleaginous yeasts isolated from mangrove forests. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2018;34(9):1-11.
25. Zhang L, Lim EY, Loh K-C, Dai Y, Tong YW. Two-Stage Fermentation of *Lipomyces starkeyi* for Production of Microbial Lipids and Biodiesel. *Microorganisms*. 2021;9(8):1724.
26. Liu W, Mao W, Zhang C, Lu X, Xiao X, Zhao Z, et al. Co-fermentation of a sugar mixture for microbial lipid production in a two-stage fermentation mode under non-sterile conditions. *Sustainable Energy & Fuels*. 2020;4(5):2380-5.
27. Polburee P, Limtong S. Economical lipid production from crude glycerol using *Rhodospiridiobolus fluvialis* DMKU-RK253 in a two-stage cultivation under non-sterile conditions. *Biomass and Bioenergy*. 2020;138:105597.
28. Boonyarit J, Polburee P, Khaenda B, Zhao ZK, Limtong S. Lipid production from sugarcane top hydrolysate and crude glycerol with *Rhodospiridiobolus fluvialis* using a two-stage batch-cultivation strategy with separate optimization of each stage. *Microorganisms*. 2020;8(3):453.
29. Polburee P, Yongmanitchai W, Honda K, Ohashi T, Yoshida T, Fujiyama K, et al. Lipid production from biodiesel-derived crude glycerol by *Rhodospiridium fluviale* DMKU-RK253 using temperature shift with high cell density. *Biochemical Engineering Journal*. 2016;112:208-18.
30. Schulze I, Hansen S, Großhans S, Rudsuck T, Ochsenreither K, Syltatk C, et al. Characterization of newly isolated oleaginous yeasts-*Cryptococcus podzolicus*, *Trichosporon porosum* and *Pichia segobiensis*. *AMB Express*. 2014;4:1-11.
31. Ratledge C, Wynn JP. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in applied microbiology*. 2002;51:1-52.

32. Nägeli C, Loew O. Ueber die chemische Zusammensetzung der Hefe. Justus Liebigs Annalen der Chemie. 1878;193(2):322-48.
33. Lindner P. Das problem der biologischen fettbildung und fettgewinnung. Angewandte Chemie. 1922;35(19):110-4.
34. Sitepu IR, Garay LA, Sestric R, Levin D, Block DE, German JB, et al. Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production. Biotechnology advances. 2014;32(7):1336-60.
35. Vasconcelos B, Teixeira JC, Dragone G, Teixeira JA. Oleaginous yeasts for sustainable lipid production—from biodiesel to surf boards, a wide range of “green” applications. Applied microbiology and biotechnology. 2019;103:3651-67.
36. Kyle DJ, Ratledge C. Industrial applications of single cell oils: AOCS Publishing; 1992.
37. Berge G, Hatlen B, Odom J, Ruyter B. Physical treatment of high EPA *Yarrowia lipolytica* biomass increases the availability of n-3 highly unsaturated fatty acids when fed to Atlantic salmon. Aquaculture Nutrition. 2013;19:110-21.
38. Huang X-f, Shen Y, Luo H-j, Liu J-n, Liu J. Enhancement of extracellular lipid production by oleaginous yeast through preculture and sequencing batch culture strategy with acetic acid. Bioresource technology. 2018;247:395-401.
39. Ledesma-Amaro R, Dulermo R, Niehus X, Nicaud J-M. Combining metabolic engineering and process optimization to improve production and secretion of fatty acids. Metabolic engineering. 2016;38:38-46.
40. Qiao K, Wasylenko TM, Zhou K, Xu P, Stephanopoulos G. Lipid production in *Yarrowia lipolytica* is maximized by engineering cytosolic redox metabolism. Nature biotechnology. 2017;35(2):173-7.
41. Groenewald M, Boekhout T, Neuvéglise C, Gaillardin C, van Dijck PW, Wyss M. *Yarrowia lipolytica*: safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. Critical reviews in microbiology. 2014;40(3):187-206.
42. Wolf K. Nonconventional yeasts in biotechnology: a handbook: Springer Science & Business Media; 2012.

43. Papanikolaou S, Aggelis G. Microbial products from wastes and residues. Oxford University Press; 2020. p. fnaa156.
44. Hapeta P, Rakicka M, Dulermo R, Gamboa-Meléndez H, Cruz-Le Coq AM, Nicaud JM, et al. Transforming sugars into fat-lipid biosynthesis using different sugars in *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*. 2017;34(7):293-304.
45. Papanikolaou S, Chatzifragkou A, Fakas S, Galiotou-Panayotou M, Komaitis M, Nicaud JM, et al. Biosynthesis of lipids and organic acids by *Yarrowia lipolytica* strains cultivated on glucose. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2009;111(12):1221-32.
46. Bommareddy RR, Sabra W, Maheshwari G, Zeng A-P. Metabolic network analysis and experimental study of lipid production in *Rhodospiridium toruloides* grown on single and mixed substrates. *Microbial cell factories*. 2015;14(1):1-13.
47. Wiebe MG, Koivuranta K, Penttilä M, Ruohonen L. Lipid production in batch and fed-batch cultures of *Rhodospiridium toruloides* from 5 and 6 carbon carbohydrates. *BMC biotechnology*. 2012;12:1-10.
48. Liu X-Z, Wang Q-M, Göker M, Groenewald M, Kachalkin A, Lumbsch HT, et al. Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes. *Studies in mycology*. 2015;81(1):85-147.
49. Yaguchi A, Rives D, Blenner M. New kids on the block: emerging oleaginous yeast of biotechnological importance. *AIMS microbiology*. 2017;3(2):227.
50. Moon NJ, Hammond E, Glatz BA. Conversion of cheese whey and whey permeate to oil and single-cell protein. *Journal of Dairy Science*. 1978;61(11):1537-47.
51. Zhang J, Fang X, Zhu X-L, Li Y, Xu H-P, Zhao B-F, et al. Microbial lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* O3 grown in fed-batch culture. *Biomass and Bioenergy*. 2011;35(5):1906-11.
52. Starkey RL. Lipid production by a soil yeast. *Journal of bacteriology*. 1946;51(1):33-50.
53. Juanssilfero AB, Kahar P, Amza RL, Miyamoto N, Otsuka H, Matsumoto H, et al. Selection of oleaginous yeasts capable of high lipid accumulation during challenges from

- inhibitory chemical compounds. *Biochemical Engineering Journal*. 2018;137:182-91.
54. Van Rensburg EJ, Kock J, Coetzee D, Botha A, Botes P. Lipid composition and DNA band patterns in the yeast family Lipomycetaceae. *Systematic and applied microbiology*. 1995;18(3):410-24.
55. Nilsson R, Enebo L, Lundin H, Myrback K. Mikrobielle Fettsynthese unter Verwendung von *Rhodotorula glutinis* nach dem Lufthefeverfahren. *Sven Kem Tidskr*. 1943;55:41-51.
56. Zhang H, Wang L, Ma L, Dong Y, Jiang S, Xu B, et al. Biocontrol of major postharvest pathogens on apple using *Rhodotorula glutinis* and its effects on postharvest quality parameters. *Biological Control*. 2009;48(1):79-83.
57. Spier F, Buffon JG, Burkert CA. Bioconversion of raw glycerol generated from the synthesis of biodiesel by different oleaginous yeasts: lipid content and fatty acid profile of biomass. *Indian Journal of Microbiology*. 2015;55:415-22.
58. Abeln F, Chuck CJ. The role of temperature, pH and nutrition in process development of the unique oleaginous yeast *Metschnikowia pulcherrima*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2020;95(4):1163-72.
59. Burdon KL. Fatty material in bacteria and fungi revealed by staining dried, fixed slide preparations. *Journal of bacteriology*. 1946;52(6):665-78.
60. Evans CT, Ratledge C, Gilbert SC. A rapid screening method for lipid-accumulating yeast using a replica-printing technique. *Journal of Microbiological Methods*. 1985;4(3-4):203-10.
61. Cooksey KE, Guckert JB, Williams SA, Callis PR. Fluorometric determination of the neutral lipid content of microalgal cells using Nile Red. *Journal of microbiological methods*. 1987;6(6):333-45.
62. Greenspan P, Mayer EP, Fowler SD. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *The Journal of cell biology*. 1985;100(3):965-73.
63. Poontawee R, Lorliam W, Polburee P, Limtong S. Oleaginous yeasts: Biodiversity and cultivation. *Fungal Biology Reviews*. 2023;44:100295.
64. Sitepu I, Ignatia L, Franz A, Wong D, Faulina S, Tsui M, et al. An improved high-

throughput Nile red fluorescence assay for estimating intracellular lipids in a variety of yeast species. *Journal of microbiological methods*. 2012;91(2):321-8.

65. Ramírez-Castrillón M, Jaramillo-García VP, Lopes Barros H, Pegas Henriques JA, Stefani V, Valente P. Nile red incubation time before reading fluorescence greatly influences the yeast neutral lipids quantification. *Frontiers in Microbiology*. 2021;12:619313.

66. Niehus X, Casas-Godoy L, Vargas-Sánchez M, Sandoval G. A fast and simple qualitative method for screening oleaginous yeasts on agar. *Journal of Lipids*. 2018;2018.

67. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*. 1959;37(8):911-7.

68. Tsai Y-Y, Ohashi T, Kanazawa T, Polburee P, Misaki R, Limtong S, et al. Development of a sufficient and effective procedure for transformation of an oleaginous yeast, *Rhodospiridium toruloides* DMKU3-TK16. *Current genetics*. 2017;63:359-71.

69. Srisuwan W, Techapun C, Seesuriyachan P, Watanabe M, Chaiyaso T. Screening of oleaginous yeast for lipid production using rice residue from food waste as a carbon source. *KKU Res J*. 2016;22:116-26.

70. Kraisintu P, Yongmanitchai W, Limtong S. Selection and optimization for lipid production of a newly isolated oleaginous yeast, *Rhodospiridium toruloides* DMKU3-TK16. *Agriculture and Natural Resources*. 2010;44(3):436-45.

71. Papone T, Kookkhunthod S, Paungbut M, Leesing R. Producing of microbial oil by mixed culture of microalgae and oleaginous yeast using sugarcane molasses as carbon substrate. *J Clean Energy Technol*. 2016;4(4):253-6.

72. Kitcha S, Cheirsilp B. Screening of oleaginous yeasts and optimization for lipid production using crude glycerol as a carbon source. *Energy Procedia*. 2011;9:274-82.

73. Watsuntorn W, Chuengcharoenphanich N, Niltaya P, Butkumchote C, Theerachat M, Glinwong C, et al. A novel oleaginous yeast *Saccharomyces cerevisiae* CU-TPD4 for lipid and biodiesel production. *Chemosphere*. 2021;280:130782.

74. Kitcha S, Cheirsilp B. Enhanced lipid production by co-cultivation and co-encapsulation of oleaginous yeast *Trichosporonoides spathulata* with microalgae in

alginate gel beads. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2014;173:522-34.

75. Paserakung A, Pattarajinda V, Vichitphan K, Froetschel M. Selection and identification of oleaginous yeast isolated from soil, animal feed and ruminal fluid for use as feed supplement in dairy cattle. *Letters in Applied Microbiology*. 2015;61(4):325-32.

76. Papanikolaou S, Aggelis G. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2011;113(8):1031-51.

77. Poontawee R, Limtong S. Feeding strategies of two-stage fed-batch cultivation processes for microbial lipid production from sugarcane top hydrolysate and crude glycerol by the oleaginous red yeast *Rhodospiridiobolus fluvialis*. *Microorganisms*. 2020;8(2):151.

78. Qian X, Zhou X, Chen L, Zhang X, Xin F, Dong W, et al. Bioconversion of volatile fatty acids into lipids by the oleaginous yeast *Apiotrichum porosum* DSM27194. *Fuel*. 2021;290:119811.

79. Fu R, Fei Q, Shang L, Brigham CJ, Chang HN. Enhanced microbial lipid production by *Cryptococcus albidus* in the high-cell-density continuous cultivation with membrane cell recycling and two-stage nutrient limitation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2018;45(12):1045-51.

80. Li Q, Wang D, Liu X, Li A, Chandran K. Enhanced lipid accumulation in *Metschnikowia pulcherrima* using volatile fatty acids under non-sterile repeated batch cultivation. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2021;163:105256.

81. Blomqvist J, Pickova J, Tilami SK, Sampels S, Mikkelsen N, Brandenburg J, et al. Oleaginous yeast as a component in fish feed. *Scientific reports*. 2018;8(1):1-8.

82. Miao Z, Tian X, Liang W, He Y, Wang G. Bioconversion of corncob hydrolysate into microbial lipid by an oleaginous yeast *Rhodotorula taiwanensis* AM2352 for biodiesel production. *Renewable Energy*. 2020;161:91-7.

83. Annamalai N, Sivakumar N, Oleskowicz-Popiel P. Enhanced production of microbial lipids from waste office paper by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. *Fuel*. 2018;217:420-6.

84. Acid L. Final report on the safety assessment of oleic acid, laurie acid, palmitic acid, myristic acid, and stearic acid. *Journal of the American College of toxicology*. 1987;6(3):321-401.
85. ไพโรจน์ อ, ผ่อง ป. ฮอริโมน จาก เนื้อเยื่อ ไชมัน: เลป ทิน อติ โฟ เน ค ทิน และ วี ซี ส ทิน. *Thai Bulletin of Pharmaceutical Sciences*. 2011;6(1):139-54.
86. Mohd HN, Noor Q, Hasmadi M. Proximate and fatty acid composition of Sabah yellow durian (*Durio graveolens*). *Sains Malaysiana*. 2013;42(9):1283-8.
87. Sales-Campos H, Reis de Souza P, Crema Peghini B, Santana da Silva J, Ribeiro Cardoso C. An overview of the modulatory effects of oleic acid in health and disease. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2013;13(2):201-10.
88. Yang B, Chen H, Stanton C, Ross RP, Zhang H, Chen YQ, et al. Review of the roles of conjugated linoleic acid in health and disease. *Journal of Functional Foods*. 2015;15:314-25.
89. Maniatis T, Fritch E, Sambrook J. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, NY. 1982.
90. Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1998;73(4):331-71.
91. Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular biology and evolution*. 1993;10(3):512-26.
92. Prajapati VD, Jani GK, Zala BS, Khutliwala TA. An insight into the emerging exopolysaccharide gellan gum as a novel polymer. *Carbohydrate polymers*. 2013;93(2):670-8.
93. Zhang L, Du J, Jiang Y. Low acyl gellan gum as a gelling agent in medium of *Saccharomyces* yeasts. *International Journal of Food Engineering*. 2018;14(4).
94. Tamaki H, Sekiguchi Y, Hanada S, Nakamura K, Nomura N, Matsumura M, et al. Comparative analysis of bacterial diversity in freshwater sediment of a shallow eutrophic lake by molecular and improved cultivation-based techniques. *Applied and environmental*

microbiology. 2005;71(4):2162-9.

95. Sitepu I, Selby T, Lin T, Zhu S, Boundy-Mills K. Carbon source utilization and inhibitor tolerance of 45 oleaginous yeast species. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2014;41(7):1061-70.

96. Xue Y-P, Jin M, Orjuela A, Slininger PJ, Dien BS, Dale BE, et al. Microbial lipid production from AFEX™ pretreated corn stover. *RSC advances*. 2015;5(36):28725-34.

97. Slininger PJ, Dien BS, Kurtzman CP, Moser BR, Bakota EL, Thompson SR, et al. Comparative lipid production by oleaginous yeasts in hydrolyzates of lignocellulosic biomass and process strategy for high titers. *Biotechnology and bioengineering*. 2016;113(8):1676-90.

98. Dien BS, Slininger PJ, Kurtzman CP, Moser BR, O'Bryan PJ. Identification of superior lipid producing *Lipomyces* and *Myxozyma* yeasts. *AIMS Environ Sci*. 2016;3(1):1-20.

99. Caporusso A, De Bari I, Valerio V, Albergo R, Liuzzi F. Conversion of cardoon crop residues into single cell oils by *Lipomyces tetrasporus* and *Cutaneotrichosporon curvatus*: Process optimizations to overcome the microbial inhibition of lignocellulosic hydrolysates. *Industrial Crops and Products*. 2021;159:113030.

100. Ganapathy B, Yahya A, Ibrahim N. Bioremediation of palm oil mill effluent (POME) using indigenous *Meyerozyma guilliermondii*. *Environmental Science and Pollution Research*. 2019;26:11113-25.

101. Yan W, Gao H, Qian X, Jiang Y, Zhou J, Dong W, et al. Biotechnological applications of the non-conventional yeast *Meyerozyma guilliermondii*. *Biotechnology Advances*. 2021;46:107674.

102. Llamas M, Dourou M, González-Fernández C, Aggelis G, Tomás-Pejó E. Screening of oleaginous yeasts for lipid production using volatile fatty acids as substrate. *Biomass and bioenergy*. 2020;138:105553.

103. Park Y, Maeng S, Srinivasan S. Isolation and characterization of unrecorded yeasts species in the family Metschnikowiaceae and Bulleribasidiaceae in Korea. *Journal of Species Research*. 2020;9(3):198-203.

104. Calvey CH, Su Y-K, Willis LB, McGee M, Jeffries TW. Nitrogen limitation, oxygen limitation, and lipid accumulation in *Lipomyces starkeyi*. *Bioresource technology*. 2016;200:780-8.
105. Yen H-W, Liu YX. Application of airlift bioreactor for the cultivation of aerobic oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with different aeration rates. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2014;118(2):195-8.
106. Yen H-W, Zhang Z. Effects of dissolved oxygen level on cell growth and total lipid accumulation in the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2011;112(1):71-4.





ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Nitrogen-depleted medium (NDM)

| องค์ประกอบ | ปริมาณ |
|--|----------|
| Glucose | 20.00 g |
| KH_2PO_4 | 0.85 g |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.50 g |
| NaCl | 0.10 g |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0.10 g |
| H_3BO_3 | 0.5 g |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 0.04 mg |
| $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.20 mg |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.40 mg |
| Chloramphenicol | 0.25 g |
| Sodium propionate | 0.25 g |
| น้ำกรอง | 1,000 mL |

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดัน 15 PSI ในกรณีที่ต้องใช้ Agar powder เป็นสารทำให้อาหารคงรูป ชั่ง 20 g และ ในกรณีที่ต้องการใช้ Gellan gum powder เป็นสารทำให้อาหารคงรูป ชั่ง 7.2 g

2. Yeast extract malt extract broth (YM broth)

| องค์ประกอบ | ปริมาณ |
|-----------------|----------|
| Glucose | 10.00 g |
| Peptone | 5.00 g |
| Malt extract | 3.00 g |
| Yeast extract | 3.00 g |
| Chloramphenicol | 0.25 g |
| น้ำกรอง | 1,000 mL |

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดัน 15 PSI ในกรณีที่ต้องเตรียม

YM agar ใช้ Agar powder เป็นสารทำให้อาหารคงรูป ชั่ง 20 g

3. 2G2M broth

| องค์ประกอบ | ปริมาณ |
|--------------|----------|
| Glucose | 20 g |
| Malt extract | 20 g |
| น้ำกรอง | 1,000 mL |

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดัน 15 PSI

4. 6G broth

| องค์ประกอบ | ปริมาณ |
|------------|----------|
| Glucose | 60 g |
| น้ำกรอง | 1,000 mL |

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 °C เป็นเวลา 10 นาที ที่ความดัน 15 PSI



ภาคผนวก ข

ภาคผนวก ข สารเคมี

1. Lysis buffer

| องค์ประกอบ | ปริมาณ |
|---|--------|
| 100 mM Tris buffer (pH 8) | 5 mL |
| 30 mM EDTA (Ethylene diamine tetraacetic acid) (pH 8) | 15 mL |
| 10% SDS (Sodium dodecyl sulphate) (pH 8) | 25 mL |

ขั้นตอนการเตรียม 100 mM Tris buffer (pH 8) ซึ่ง Tris powder ปริมาณ 6.06 g ละลายในน้ำกลั่น 50 mL (สำหรับใช้เป็น stock), ขั้นตอนการเตรียม 30 mM EDTA (pH 8) ซึ่ง EDTA powder ปริมาณ 1.86 g ละลายในน้ำกลั่น 50 mL (สำหรับใช้เป็น stock) และ ขั้นตอนการเตรียม 10% SDS ซึ่ง SDS powder ละลายใน 5 g ละลายในน้ำกลั่น 50 mL (สำหรับใช้เป็น stock) จากนั้นสารละลายทั้ง 3 ชนิด จะถูกปรับค่า pH โดยวัดด้วยเครื่อง pH meter (SunTex[®], Taiwan) โดยมี HCl (cont.) และ NaOH (cont.) สำหรับใช้เป็นสารในการปรับค่า pH เมื่อเตรียมสารละลายครบทั้ง 3 ชนิดแล้ว จะถูกผสมให้เข้ากันโดยใช้ปริมาณดังที่แสดง แล้วนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดัน 15 PSI

2. 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS)

| องค์ประกอบ | ปริมาณ |
|---------------------------|--------|
| 3,5 dinitrosalicylic acid | 1 g |
| 2 M NaOH | 20 mL |
| Sodium potassium tartrate | 30 g |

ขั้นตอนการเตรียม 2 M NaOH ซึ่ง 1.64 g ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 20 mL ผสมให้เข้ากันด้วยแท่งแก้วคนสาร จากนั้นค่อยๆเติม 3,5 dinitrosalicylic acid powder ปริมาณ 1 g ผสมให้เข้ากันด้วยแท่งแก้วคนสาร และ ค่อยๆเติม Sodium potassium tartrate ปริมาณ 30 g ผสมให้เข้ากันด้วยแท่งแก้วคนสาร (ทำใน water bath, Memmert[®], Germany โดยตั้งอุณหภูมิที่ 45 °C) จนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วจึงปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนเท่ากับ 100 mL โดยใช้ขวดปรับปริมาตร (Volume metric flask, Pyrex[®], USA)

3. คลอโรฟอร์ม-ไอโซ เอมีล แอลกอฮอล์ (Chloroform-isoamyl alcohol)

| องค์ประกอบ | ปริมาณ |
|-----------------|--------|
| Chloroform | 50 mL |
| Isoamyl alcohol | 50 mL |

ตวงสารละลายทั้ง 2 ชนิด ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ด้วย กรวยกรองและกระบอกตวงแก้ว (Pyrex[®], USA) ทำภายในตู้ดูดควัน (Fume hood, NEW LAB[®], Thailand) ผสมให้เข้ากันด้วยการเขย่า และเก็บสารละลายไว้ในภาชนะแก้วที่มีฝาปิด





ภาคผนวก ค

ภาคผนวก ค

การทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส (Glucose standard)

เตรียมน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 1 g/L โดยหั่ง Glucose ปริมาณ 0.1 g ละลายในน้ำ ล้น 100 mL จากนั้นทำการเจือจางโดยให้มีระดับความเข้มข้นได้แก่ 1.0, 0.8, 0.6, 0.4 และ 0.2 g/L ตามลำดับ จากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ reducing sugar ด้วยวิธี DNS (ในการทดลอง ที่ 7) จากนั้นจะนำสารละลายที่ได้มาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ OD_{540nm} ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Shimadzu UV-1280, Japan) นำค่า OD_{540nm} ที่ได้มาสร้างกราฟ มาตรฐานด้วยโปรแกรม Microsoft Excel 2019





ภาคผนวก ง

ภาคผนวก ง

ผลการผลิตไขมันของยีสต์ทั้งหมด 127 สายพันธุ์เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว 2G2M ที่ 30 °C ด้วยความเร็วรอบ 150 rpm เป็นระยะเวลา 7 วัน

| Strains | Species | Biomass production (g/L) | Lipid production (g/L) | Lipid content (%) | Size of lipid body |
|--------------------|--------------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------|--------------------|
| 1. SWU-NGP 2-5 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 1.49±0.05 | 1.10±0.06 | 74.26±6.30 | 3+ |
| 2. SWU-NAP 4-1 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 4.50±0.08 | 2.57±0.04 | 57.10±1.82 | 3+ |
| 3. SWU-NGP 14-6 | <i>Lipomyces mesembrius</i> | 9.13±0.36 | 5.20±0.03 | 57.10±1.89 | 3+ |
| 4. SWU-NGP 6-4 | <i>Lipomyces mesembrius</i> | 7.83±0.17 | 3.98±0.02 | 50.80±0.80 | 2+ |
| 5. SWU-NGP 5-8-1 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 9.07±0.16 | 4.27±0.01 | 47.06±0.66 | 2+ |
| 6. SWU-NAP 5-4-2 | <i>Saitozyma podzolica</i> | 3.88±0.19 | 1.81±0.19 | 46.63±2.51 | 2+ |
| 7. SWU-NGP 14-3-1 | <i>Lipomyces starkeyi</i> | 3.53±0.56 | 1.47±0.07 | 42.49±4.65 | 2+ |
| 8. SWU-NGTP 4-5 | <i>Lipomyces starkeyi</i> | 5.92±0.14 | 2.45±0.22 | 41.56±4.67 | 2+ |
| 9. SWU-NGP 5-7 | <i>Lipomyces starkeyi</i> | 8.39±0.85 | 3.35±0.002 | 40.30±4.11 | 2+ |
| 10. SWU-NGTP 5-3-3 | <i>Cyberlindhera saturnus</i> | 1.00±0.04 | 0.4±0.014 | 40.00±0.00 | 2+ |
| 11. SWU-NGP 5-3-8 | <i>Saitozyma podzolica</i> | 6.59±0.89 | 2.63±0.35 | 40.00±0.00 | 2+ |
| 12. SWU-NGTP 4-1 | <i>Papiliotrema flavescens</i> | 1.87±0.24 | 0.74±0.10 | 40.00±0.00 | 2+ |
| 13. SWU-NGP 14-2-2 | <i>Saitozyma podzolica</i> | 4.99±0.19 | 1.99±0.07 | 40.00±0.00 | 2+ |

| Strains | Species | Biomass production (g/L) | Lipid production (g/L) | Lipid content (%) | Size of lipid body |
|---------------------|----------------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------|--------------------|
| 14. SWU-NATP 2-4 | <i>Meyerozyma guilliermondii</i> | 0.25±0.04 | 0.10±0.02 | 40.00±0.00 | 2+ |
| 15. SWU-NATP 3-3 | <i>Papiliotrema flavescens</i> | 1.15±0.06 | 0.46±0.02 | 40.00±0.00 | 2+ |
| 16. SWU-NGTP 4-3 | <i>Lipomyces starkeyi</i> | 6.03±0.15 | 2.40±0.18 | 39.69±2.00 | 2+ |
| 17. SWU-NAP 12-1-1 | <i>Papiliotrema terrestris</i> | 3.46±0.04 | 1.34±0.25 | 38.76±7.80 | 2+ |
| 18. SWU-NAP 3-4 | <i>Lipomyces mesembrius</i> | 8.40±0.20 | 3.25±0.33 | 38.64±3.03 | 2+ |
| 19. SWU-NATP 4-2 | <i>Lipomyces starkeyi</i> | 2.93±0.09 | 1.13±0.13 | 38.60±5.62 | 2+ |
| 20. SWU-NGP 5-3-2-1 | <i>Saitozyma podzolica</i> | 2.42±0.02 | 0.92±0.05 | 38.00±1.89 | 2+ |
| 21. SWU-NAP 8-4 | <i>Lipomyces mesembrius</i> | 7.88±0.02 | 2.86±0.12 | 36.32±1.59 | 2+ |
| 22. SWU-NGP 14-8 | <i>Lipomyces mesembrius</i> | 9.87±0.05 | 3.54±0.10 | 35.92±0.85 | 2+ |
| 23. SWU-NGTP 5-7 | <i>Lipomyces starkeyi</i> | 9.50±0.46 | 3.38±0.09 | 35.71±2.66 | 2+ |
| 24. SWU-NGP 6-6 | <i>Lipomyces starkeyi</i> | 4.88±0.11 | 1.71±0.13 | 35.04±3.45 | 2+ |
| 25. SWU-NATP 1-4 | <i>Lipomyces mesembrius</i> | 2.42±0.01 | 0.84±0.29 | 34.68±11.77 | 2+ |
| 26. SWU-NAP 9-2 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 8.82±0.17 | 2.95±0.54 | 33.32±5.48 | 2+ |
| 27. SWU-NAPui 12-9 | <i>Papiliotrema terrestris</i> | 5.99±0.38 | 1.96±0.36 | 32.57±3.97 | 2+ |
| 28. SWU-NAP 13-8 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 7.60±0.90 | 2.39±0.15 | 32.14±5.83 | 2+ |
| 29. SWU-NATP 2-6 | <i>Lipomyces starkeyi</i> | 5.22±0.15 | 1.66±0.08 | 31.91±2.41 | 2+ |

| Strains | Species | Biomass production (g/L) | Lipid production (g/L) | Lipid content (%) | Size of lipid body |
|---------------------|--------------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------|--------------------|
| 30. SWU-NGP 5-3-2 | <i>Saitozyma podzolica</i> | 7.35±0.13 | 2.33±0.11 | 31.71±0.90 | 2+ |
| 31. SWU-NAP 13-4 | <i>Lipomyces starkeyi</i> | 9.93±0.22 | 3.12±0.07 | 31.47±1.36 | 2+ |
| 32. SWU-NAP 5-2-2 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 2.76±0.21 | 0.86±0.14 | 30.94±2.71 | 2+ |
| 33. SWU-NAP 5-3-1-1 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 8.69±0.85 | 2.76±1.26 | 30.59±11.51 | 2+ |
| 34. SWU-YGP 8-1-2 | <i>Saitozyma podzolica</i> | 3.30±0.00 | 0.97±0.19 | 29.33±5.81 | 2+ |
| 35. SWU-NATP 2-12 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 3.58±0.42 | 1.01±0.15 | 28.98±7.48 | 1+ |
| 36. SWU-NGP 14-9 | <i>Lipomyces starkeyi</i> | 6.27±0.04 | 1.80±0.01 | 28.68±0.09 | 1+ |
| 37. SWU-NGTP 4-8 | <i>Lipomyces starkeyi</i> | 8.42±0.24 | 2.38±0.02 | 28.23±0.52 | 1+ |
| 38. SWU-NAP 12-1-12 | <i>Papiliotrema terrestris</i> | 7.12±0.48 | 2.01±0.34 | 28.06±2.88 | 1+ |
| 39. SWU-NAP 2-2 | <i>Lipomyces starkeyi</i> | 2.12±0.15 | 0.59±0.03 | 27.93±0.50 | 1+ |
| 40. SWU-NAP 5-2-1 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 7.34±0.22 | 2.04±0.71 | 27.61±8.90 | 1+ |
| 41. SWU-NGTP 4-11 | <i>Lipomyces starkeyi</i> | 6.63±0.57 | 1.78±0.09 | 27.22±3.67 | 1+ |
| 42. SWU-NGP 6-5 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 3.47±0.17 | 0.93±0.01 | 26.94±1.55 | 1+ |
| 43. SWU-NGP 9-3 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 10.15±0.20 | 2.73±0.21 | 26.93±2.62 | 1+ |
| 44. SWU-NGP 11-1 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 10.95±0.06 | 2.90±0.13 | 26.45±1.31 | 1+ |
| 45. SWU-NGP 3-7 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 8.89±0.11 | 2.35±0.14 | 26.44±1.25 | 1+ |

| Strains | Species | Biomass production (g/L) | Lipid production (g/L) | Lipid content (%) | Size of lipid body |
|--------------------|--------------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------|--------------------|
| 46. SWU-NGP 4-2-2 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 9.37±0.86 | 2.44±0.17 | 26.42±4.27 | 1+ |
| 47. SWU-NGP 2-1-1 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 5.87±0.04 | 1.54±0.11 | 26.27±2.07 | 1+ |
| 48. SWU-NAP 2-1 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 8.87±0.10 | 2.30±0.08 | 25.88±0.66 | 1+ |
| 49. SWU-NAPui 2-1 | <i>Lipomyces starkeyi</i> | 1.35±0.08 | 0.35±0.04 | 25.83±1.58 | 1+ |
| 50. SWU-NATP 4-12 | <i>Piskurozyma sp.</i> | 2.92±0.24 | 0.74±0.04 | 25.45±0.82 | 1+ |
| 51. SWU-NGTP 4-4 | <i>Lipomyces starkeyi</i> | 7.16±1.26 | 1.81±0.28 | 25.42±0.62 | 1+ |
| 52. SWU-NGP 3-6 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 8.81±0.10 | 2.21±0.08 | 25.16±1.20 | 1+ |
| 53. SWU-NGP 5-10-2 | <i>Saitozyma podzolica</i> | 1.71±0.12 | 0.42±0.01 | 24.54±2.12 | 1+ |
| 54. SWU-NAP 8-1 | <i>Lipomyces starkeyi</i> | 8.60±0.58 | 2.11±0.20 | 24.49±0.65 | 1+ |
| 55. SWU-NATP 4-13 | <i>Lipomyces mesembrius</i> | 2.72±0.19 | 0.66±0.05 | 24.15±0.12 | 1+ |
| 56. SWU-NATP 4-5 | <i>Lipomyces starkeyi</i> | 6.78±0.11 | 1.60±0.13 | 23.62±1.53 | 1+ |
| 57. SWU-YGPui 12-1 | <i>Papiliotrema flavescens</i> | 5.81±1.51 | 1.25±0.06 | 23.43±7.18 | 1+ |
| 58. SWU-NATP 4-11 | <i>Lipomyces mesembrius</i> | 3.59±0.25 | 0.83±0.02 | 23.32±2.07 | 1+ |
| 59. SWU-NATP 4-4 | <i>Cyberlinthra saturnus</i> | 3.65±0.55 | 0.81±0.07 | 22.94±5.32 | 1+ |
| 60. SWU-NAP1-4 | <i>Papiliotrema flavescens</i> | 8.11±0.10 | 1.85±0.08 | 22.86±1.21 | 1+ |
| 61. SWU-NGP 2-6-2 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 2.31±0.14 | 0.53±0.05 | 22.86±0.74 | 1+ |

| Strains | Species | Biomass production (g/L) | Lipid production (g/L) | Lipid content (%) | Size of lipid body |
|---------------------|--------------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------|--------------------|
| 62. SWU-NAPH 3-6 | <i>Lipomyces starkeyi</i> | 3.93±0.31 | 0.9±0.018 | 22.62±2.73 | 1+ |
| 63. SWU-NATP 9-2 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 7.57±0.06 | 1.69±0.19 | 22.38±2.35 | 1+ |
| 64. SWU-NAP 8-2 | <i>Lipomyces mesembrius</i> | 5.37±0.15 | 1.19±0.01 | 22.13±0.86 | 1+ |
| 65. SWU-NAP 5-5 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 2.86±0.17 | 0.62±0.01 | 21.87±1.47 | 1+ |
| 66. SWU-NGP 2-2 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 6.15±0.75 | 1.33±0.12 | 21.77±0.75 | 1+ |
| 67. SWU-YGP 11-1 | <i>Hannaella sp.</i> | 1.70±0.15 | 0.36±0.08 | 21.69±6.69 | 1+ |
| 68. SWU-NGP 2-3 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 7.89±0.05 | 1.70±0.04 | 21.54±0.42 | 1+ |
| 69. SWU-NGP 5-3-3 | <i>Lipomyces starkeyi</i> | 6.52±0.17 | 1.39±0.16 | 21.44±3.00 | 1+ |
| 70. SWU-NAP 6-1 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 6.15±0.64 | 1.31±0.14 | 21.28±0.08 | 1+ |
| 71. SWU-NAP 5-6 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 3.24±0.92 | 0.66±0.09 | 21.18±2.62 | 1+ |
| 72. SWU-NGP 1-3 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 8.90±0.91 | 1.85±0.18 | 20.85±0.13 | 1+ |
| 73. SWU-NGTP 3-2 | <i>Papiliotrema flavescens</i> | 3.45±0.05 | 0.72±0.03 | 20.83±0.71 | 1+ |
| 74. SWU-NGTP 4-2 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 2.10±0.06 | 0.43±0.03 | 20.65±0.65 | 1+ |
| 75. SWU-NAP 4-2-1 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 8.27±0.32 | 1.68±0.64 | 20.60±8.54 | 1+ |
| 76. SWU-NGTP 4-12-1 | <i>Lipomyces starkeyi</i> | 5.29±0.04 | 1.08±0.19 | 20.48±3.82 | 1+ |
| 77. SWU-NAP 2-3 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 7.89±0.14 | 1.60±0.02 | 20.23±0.16 | 1+ |

| Strains | Species | Biomass production (g/L) | Lipid production (g/L) | Lipid content (%) | Size of lipid body |
|---------------------|--------------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------|--------------------|
| 78. SWU-NGTP 4-12-2 | <i>Cyberlindnera saturnus</i> | 1.98±0.16 | 0.40±0.01 | 20.13±0.97 | 1+ |
| 79. SWU-NGTP 4-14-2 | <i>Cyberlindnera saturnus</i> | 1.76±0.06 | 0.35±0.06 | 19.92±4.32 | 1+ |
| 80. SWU-NAP 5-3-3 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 5.46±0.34 | 1.07±0.16 | 19.87±4.19 | 1+ |
| 81. SWU-NAP 5-4 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 7.44±0.00 | 1.46±0.03 | 19.65±0.40 | 1+ |
| 82. SWU-NGP 5-9-2 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 8.19±0.25 | 1.59±0.05 | 19.40±1.15 | 1+ |
| 83. SWU-NATP 4-8 | <i>Lipomyces mesembrius</i> | 6.63±0.62 | 1.26±0.03 | 19.07±1.30 | 1+ |
| 84. SWU-NAP 5-4-1 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 9.56±0.22 | 1.80±0.18 | 18.84±1.45 | 1+ |
| 85. SWU-NATP 1-1 | <i>Lipomyces starkeyi</i> | 5.82±0.80 | 1.08±0.21 | 18.36±1.15 | 1+ |
| 86. SWU-NAP 14-4 | <i>Lipomyces starkeyi</i> | 2.28±0.13 | 0.40±0.07 | 17.87±4.09 | - |
| 87. SWU-NATP 4-3 | <i>Lipomyces starkeyi</i> | 5.45±0.26 | 0.95±0.10 | 17.61±2.66 | - |
| 88. SWU-NGP 4-14 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 9.48±0.24 | 1.66±0.15 | 17.55±1.98 | - |
| 89. SWU-NGP 10-3 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 8.37±0.12 | 1.46±0.04 | 17.44±0.69 | - |
| 90. SWU-NGP 11-2 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 9.33±0.03 | 1.62±0.10 | 17.39±1.11 | - |
| 91. SWU-NAP 3-2 | <i>Papiliotrema flavescens</i> | 1.66±0.50 | 0.29±0.09 | 17.32±0.08 | - |
| 92. SWU-NGP 5-10-8 | <i>Lipomyces starkeyi</i> | 6.75±0.12 | 1.16±0.20 | 17.15±2.73 | - |
| 93. SWU-NGP 5-3-1 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 8.82±0.02 | 1.49±0.01 | 16.95±0.18 | - |

| Strains | Species | Biomass production (g/L) | Lipid production (g/L) | Lipid content (%) | Size of lipid body |
|----------------------|---------------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------|--------------------|
| 94. SWU-NGP 1-5-4 | <i>Lipomyces starkeyi</i> | 0.9±0.11 | 0.15±0.03 | 16.85±1.15 | - |
| 95. SWU-NATP 2-7 | <i>Papiliotrema flavescens</i> | 6.23±0.28 | 1.03±0.02 | 16.63±1.12 | - |
| 96. SWU-NAPS 5-1 | <i>Hannaella sp.</i> | 6.41±0.65 | 1.06±0.15 | 16.46±0.72 | - |
| 97. SWU-NGTP 4-12-3 | <i>Lipomyces starkeyi</i> | 4.83±0.83 | 0.79±0.14 | 16.40±0.002 | - |
| 98. SWU-NGP 1-1 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 8.44±0.06 | 1.38±0.09 | 16.32±1.00 | - |
| 99. SWU-NAP 10-1 | <i>Lipomyces starkeyi</i> | 3.52±0.27 | 0.58±0.09 | 16.31±1.42 | - |
| 100. SWU-NATP 3-1 | <i>Lipomyces starkeyi</i> | 4.63±0.04 | 0.74±0.02 | 15.92±0.55 | - |
| 101. SWU-NGP 3-1 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 6.82±0.05 | 1.07±0.01 | 15.63±0.03 | - |
| 102. SWU-NGTP 2-6 | <i>Papiliotrema flavescens</i> | 6.00±0.74 | 0.86±0.04 | 14.47±1.12 | - |
| 103. SWU-NGP 14-3-2 | <i>Piskurozyma sp.</i> | 0.53±0.15 | 0.07±0.01 | 14.12±5.88 | - |
| 104. SWU-NAP 5-1-2 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 3.46±0.44 | 0.49±0.13 | 14.00±1.94 | - |
| 105. SWU-NGP 5-6-1 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 5.35±0.34 | 0.73±0.05 | 13.85±1.88 | - |
| 106. SWU-NAPui 14-5 | <i>Papiliotrema terrestris</i> | 8.25±1.15 | 1.15±0.28 | 13.70±1.53 | - |
| 107. SWU-NGP 14-3-3 | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | 6.04±0.11 | 0.82±0.06 | 13.64±0.69 | - |
| 108. SWU-NAP 5-3-1-2 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 5.73±0.23 | 0.74±0.20 | 12.76±2.94 | - |
| 109. SWU-NGP 14-1 | <i>Lipomyces starkeyi</i> | 6.95±1.04 | 0.89±0.19 | 12.72±0.87 | - |

| Strains | Species | Biomass production (g/L) | Lipid production (g/L) | Lipid content (%) | Size of lipid body |
|----------------------|--------------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------|--------------------|
| 110. SWU-NGP 1-4 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 8.51±0.03 | 1.07±0.05 | 12.58±0.67 | - |
| 111. SWU-NGTP 4-6 | <i>Lipomyces starkeyi</i> | 4.95±0.02 | 0.60±0.07 | 12.18±1.53 | - |
| 112. SWU-NGP 14-3-4 | <i>Piskurozyma sp.</i> | 0.67±0.01 | 0.08±0.01 | 11.72±0.81 | - |
| 113. SWU-NGP 6-3 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 8.72±0.20 | 0.96±0.04 | 11.06±0.30 | - |
| 114. SWU-NGTP 5-8 | <i>Lipomyces starkeyi</i> | 5.52±0.01 | 0.60±0.14 | 10.88±2.62 | - |
| 115. SWU-NGP 4-4 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 7.17±0.20 | 0.78±0.12 | 10.78±1.43 | - |
| 116. SWU-NATP 4-15 | <i>Papiliotrema flavescens</i> | 6.54±0.75 | 0.68±0.01 | 10.50±1.39 | - |
| 117. SWU-NGP 5-4-2 | <i>Saitozyma podzolica</i> | 5.13±0.08 | 0.52±0.14 | 10.06±2.53 | - |
| 118. SWU-NAP 13-7 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 5.97±0.04 | 0.58±0.04 | 9.75±0.64 | - |
| 119. SWU-NATP 4-6 | <i>Cyberlinchera saturnus</i> | 3.70±0.20 | 0.34±0.23 | 8.81±5.85 | - |
| 120. SWU-NGP 5-4-1 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 2.48±0.28 | 0.20±0.02 | 8.33±1.67 | - |
| 121. SWU-NGTP 2-5 | <i>Papiliotrema flavescens</i> | 9.43±0.42 | 0.68±0.13 | 7.33±1.72 | - |
| 122. SWU-NGP 1-5-2-1 | <i>Cystobasidium slooffiae</i> | 3.08±0.02 | 0.22±0.003 | 7.30±0.01 | - |
| 123. SWU-NGTP 4-14-3 | <i>Cyberlinchera saturnus</i> | 2.73±0.01 | 0.19±0.01 | 6.81±0.19 | - |
| 124. SWU-NGP 3-2 | <i>Cyberlinchera saturnus</i> | 3.45±0.15 | 0.21±0.07 | 5.96±1.71 | - |
| 125. SWU-NGTP 5-3-2 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 9.16±0.01 | 0.54±0.01 | 5.90±0.12 | - |

| Strains | Species | Biomass production (g/L) | Lipid production (g/L) | Lipid content (%) | Size of lipid body |
|--------------------|------------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------|--------------------|
| 126. SWU-NGP 1-5-1 | <i>Naganishia diffluens</i> | 2.72±0.00 | 0.15±0.01 | 5.64±0.00 | - |
| 127. SWU-NAP 4-2-2 | <i>Lipomyces tetrasporus</i> | 6.35±1.68 | 0.31±0.03 | 5.10±0.81 | - |



ประวัติผู้เขียน

| | |
|-------------------|--|
| ชื่อ-สกุล | สิราวิชญ์ เสพศิริสุข |
| วัน เดือน ปี เกิด | 27 มิถุนายน 2539 |
| สถานที่เกิด | จังหวัดลำปาง ประเทศไทย |
| ที่อยู่ปัจจุบัน | 999/228 สิริเพลส จรัญ-ปิ่นเกล้า ซอย 21 ตำบล มหาสวัสดิ์ อำเภอ บาง กรวย จังหวัด นนทบุรี 11130 |
| ผลงานตีพิมพ์ | Sapsirisuk S, Polburee P, Lorliam W, Limtong S. Discovery of Oleaginous Yeast from Mountain Forest Soil in Thailand. Journal of Fungi. 2022 Oct 18;8(10):1100. |

