

การผลิตน้ำมันจุลินทรีย์สำหรับผลิตไบโอดีเซลทางเลือกด้วย
Pseudozyma parantarctica CHC28 โดยใช้กลีเซอรอลดิบจาก
การผลิตไบโอดีเซลเป็นวัตถุดิบ

MICROBIAL OIL PRODUCTION FOR ALTERNATIVE BIODIESEL
MANUFACTURING WITH *Pseudozyma parantarctica* CHC28
USING BIODIESEL-DERIVED CRUDE GLYCEROL
AS A RAW MATERIAL

ชุตินา รักกิจการพล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

การผลิตน้ำมันจุลินทรีย์สำหรับผลิตไบโอดีเซลทางเลือกด้วย
Pseudozyma parantarctica CHC28 โดยใช้กลีเซอรอลดิบจาก
การผลิตไบโอดีเซลเป็นวัตถุดิบ

ชุตินา รักกิจการพูล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตน้ำมันจุลินทรีย์สำหรับผลิตไบโอดีเซลทางเลือกด้วย <i>Pseudozyma parantarctica</i> CHC28 โดยใช้กลีเซอรอลดิบจากการผลิตไบโอดีเซลเป็นวัตถุดิบ Microbial Oil Production for Alternative Biodiesel Manufacturing with <i>Pseudozyma parantarctica</i> CHC28 Using Biodiesel-Derived Crude Glycerol as a Raw Material
ชื่อ - นามสกุล	นางสาวชุติมา รักกิจการพล
สาขาวิชา	ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์อัมภาวุธ อารีสิริสุข, Ph.D.
ปีการศึกษา	2562

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิดา ฌ ระนอง ธรรมสิทธิรงค์, ประ.ด.)

..... กรรมการ
(อาจารย์อัมภาวุธ อารีสิริสุข, Ph.D.)

..... กรรมการ
(อาจารย์จันทิมา ทิฆะ, Ph.D.)

..... กรรมการ
(อาจารย์อารณี โชติโก, Ph.D.)

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อนุมัติวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นิพัทธ์ จงสวัสดิ์, ประ.ด.)
วันที่ 24 เดือน กันยายน พ.ศ. 2562

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตน้ำมันจุลินทรีย์สำหรับผลิตไบโอดีเซลทางเลือกด้วย <i>Pseudozyma parantarctica</i> CHC28 โดยใช้กลีเซอรอลดิบจากการผลิตไบโอดีเซลเป็นวัตถุดิบ
ชื่อ – นามสกุล	นางสาวชุตินา รักกิจการพล
สาขาวิชา	ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์อัมภาวุธ อารีสิริสุข, Ph.D.
ปีการศึกษา	2562



บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือการปรับปรุงสภาพกลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล (Biodiesel-Derived Crude Glycerol, BDCG) ด้วยวิธีการปรับให้เป็นกรด (Acidification) สำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์น้ำมัน *Pseudozyma parantarctica* CHC28 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำมันของยีสต์ด้วยกระบวนการพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM) และกระบวนการเพาะเลี้ยงยีสต์ความเข้มข้นสูง (High Cell Density) ด้วยกระบวนการหมักแบบกะซ้ำ (Repeated Batch Fermentation, RBF) เพื่อศึกษาแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ในการเลียนแบบการผลิตน้ำมันของยีสต์ รวมถึงคุณสมบัติของไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันจุลินทรีย์

ขั้นแรกนำ BDCG จากน้ำมันทอดไก่ที่ผ่านกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมาปรับปรุงสภาพด้วยวิธีการทางเคมี พบว่ากรดไฮโดรคลอริก (HCl) ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 3.5 สามารถทำให้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่ปรับปรุงแล้ว (Pretreated-BDCG, PT-BDCG) เท่ากับ 467.89 กรัมต่อลิตร ต่อมาทำการศึกษาความเป็นไปได้ของ PT-BDCG ด้วยยีสต์น้ำมัน *P. parantarctica* CHC28 เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนในระดับฟลาสก์ พบว่ายีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ดีและผลิตน้ำมันได้เท่ากับ 11.10 และ 4.07 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 168 ชั่วโมง การทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการทำให้เป็นกรดสามารถนำไปใช้ในการกำจัดสิ่งเจือปนใน BDCG ได้ ขั้นถัดมาทำการศึกษาอิทธิพลของปัจจัยทางเคมีและทางกายภาพต่อการเจริญ และการผลิตน้ำมันยีสต์ *P. parantarctica* จาก BDCG พบว่าความเข้มข้นกลีเซอรอล ปริมาณโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และอุณหภูมิ เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโต และการผลิตน้ำมันจุลินทรีย์ของยีสต์ จากนั้นนำสภาวะที่เหมาะสมมาศึกษาการเพาะเลี้ยงการหมักแบบกะ พบว่าการผลิตชีวมวลยีสต์ การผลิตน้ำมัน และปริมาณน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์ เท่ากับ 4.93 กรัมต่อลิตร 1.82 กรัมต่อลิตร และ 36.92 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักชีวมวลแห้ง โดยค่าการทดลองจริง เท่ากับ 5.65 กรัมต่อลิตร 2.06 กรัมต่อลิตร และ 36.70 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักชีวมวลแห้ง ตามลำดับ จากการเพาะเลี้ยง 72 ชั่วโมง นอกจากนี้เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในระดับถังหมัก 5 ลิตร ทำให้การผลิตชีวมวลยีสต์ และน้ำมันเพิ่มขึ้นเป็น 16.18 และ 6.60 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ 168 ชั่วโมง จากนั้นดำเนินการหมักแบบกะซ้ำ (RBF) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการผลิตน้ำมันจาก PT-BDCG พบว่าชีวมวลยีสต์และการผลิตน้ำมันเท่ากับ 5.64 และ 2.80 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อถ่ายอาหารออก 90 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรเริ่มต้น ขั้นตอนถัดมาใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์เพื่อเลียนแบบพฤติกรรม

เพาะเลี้ยงยีสต์น้ำมัน *P. parantarctica* CHC28 สามารถอธิบายการเจริญเติบโต การผลิตน้ำมันและการใช้สารตั้งต้นได้เป็นอย่างดีประสิทธิภาพ อีกทั้งกรดไขมันที่สำคัญในน้ำมันของยีสต์ประกอบด้วยกรดไขมันชนิด C16 และ C18 ที่มีคุณสมบัติคล้ายกับน้ำมันพืช จากการประเมินคุณสมบัติของไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันยีสต์พบว่ามีคุณสมบัติเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานน้ำมันไบโอดีเซล

ดังนั้น BDCG ซึ่งเป็นวัตถุดิบราคาไม่แพง จึงเป็นวัตถุดิบที่น่าสนใจสำหรับนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตน้ำมันจุลินทรีย์ นอกจากนี้ น้ำมันจุลินทรีย์ที่ผลิตได้ยังสามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบทางเลือกสำหรับการผลิตไบโอดีเซลได้

คำสำคัญ: น้ำมันจุลินทรีย์ กลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล กระบวนการฟื้นฟื้ตอบสนอง กระบวนการหมักแบบกะช้า แบบจำลองทางจลนพลศาสตร์ ไบโอดีเซล



Thesis Title	Microbial Oil Production for Alternative Biodiesel Manufacturing with <i>Pseudozyma parantarctica</i> CHC28 Using Biodiesel-Derived Crude Glycerol as a Raw Material
Name – Surname	Miss Chutima Rakkitkanphun
Program	Applied Biology
Thesis Advisor	Mr. Atsawawut Areesirisuk, Ph.D.
Academic Year	2019

ABSTRACT

The aims of this study were (1) to pretreat the biodiesel-derived crude glycerol (BDCG) using acidification for cultivating the oleaginous yeast *Pseudozyma parantarctica* CHC28, (2) to investigate an optimum of microbial oil production by response surface methodology (RSM) and the microbial oil production with high cell density cultivation by repeated batch fermentation (RBF), and (3) to study the kinetic modelling of microbial oil production by oleaginous yeast and properties of biodiesel produced by microbial oil.

Firstly, the BDCG was chemically pretreated to remove the impurities. It was found that hydrochloric acid (HCl) with the pH level of 3.5 made the glycerol concentration in pretreated biodiesel-derived crude glycerol (PT-BDCG) obtain at 467.89 g/L under this condition. Then, the feasibility of using the PT-BDCG as a carbon source of *P. parantarctica* CHC28 was evaluated in a flask scale. The results presented that the oleaginous yeast could grow well and produce the biomass and microbial oil for 11.10 g/L and 4.07 g/L, respectively at 168 hrs of cultivation. This experiment showed that the acidification process could be used for the practical removal of impurities in BDCG. Secondly, the chemical and physical factors affecting the growth and the production of microbial oil *P. parantarctica* CHC28 from BDCG by using RSM was studied. It was revealed that the glycerol concentration, KH_2PO_4 , and temperature were the important factors affecting the growth and the production of microbial oil of yeast. The optimum condition of microbial oil production from PT-BDCG was investigated in batch fermentation. It was found that the maximum biomass, oil concentration, and oil content were at 4.93 g/L, 1.82 g/L, and 36.92% w/w (The actual experimental values equaled 5.65 g/L, 2.06 g/L, and 36.70% w/w of biomass dry weight), respectively, at 72 hrs in a flask scale. Moreover, the biomass and oil concentration were increased to 16.18 g/L and 6.60 g/L, respectively in 5L bioreactor (at 168 hrs). The 4-cycles repeated batch

fermentation was conducted. Some parts of the cultivated medium were decanted and refilled with the same volume of the new medium into the fermentation flask. The result demonstrated that total biomass and oil production were 5.64 and 2.80 g/L, respectively at a drained volume of 90% v/v. Finally, the kinematic model was applied to simulate microbial cultivation behavior. The model could describe the growth, microbial oil production, and reactant consumption effectively. In addition, the major fatty acids (FAs) in microbial oil of oleaginous yeast *P. parantarctica* CHC28 consisted of C16 and C18 which were similar to FAs profile in vegetable oil. The biodiesel properties related to FAs profile of microbial oil from yeast were in line with the biodiesel ASTM standard.

In conclusion, the BDCG is an interesting inexpensive raw material used as a carbon source to produce microbial oil. Furthermore, the produced microbial oil can be possibly utilized as an alternative feedstock for biodiesel production.

Keywords: microbial oil, biodiesel-derived crude glycerol, response surface methodology, repeated batch fermentation, kinetic modelling, biodiesel



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ประสบความสำเร็จได้ดีด้วยความกรุณาจาก ดร.อัษฎา อารีศิริสุข อาจารย์ที่ปรึกษาหลักในการทำวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้คำปรึกษาที่ดีเสมอมา ชี้แนะแนวทางการแก้ปัญหาตลอดระยะเวลาการทำวิจัย ทั้งในเรื่องทฤษฎีและปฏิบัติการ รวมถึงสนับสนุนอุปกรณ์ อาหาร เลี้ยงเชื้อ และสารเคมีในการทำการทดลองเป็นอย่างดี ตลอดจนตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.จันทิมา ชีวะ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ และกรรมการสอบในครั้งนี้ที่ให้คำปรึกษาในระหว่างการทำวิจัยตลอดระยะเวลาการทำวิทยานิพนธ์ รวมถึงให้คำแนะนำในเรื่องปฏิบัติการและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทธิยา ณ ระนอง ธรรมสิทธิรงค์ ที่กรุณาเป็นประธานสอบในครั้งนี้และคอยชี้แนะให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบคุณ ดร.อารณี โชติโก ที่กรุณามาเป็นกรรมการสอบในครั้งนี้ ผู้ดำเนินการวิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณ คุณสาคร ทวรรณกุล รองกรรมการผู้จัดการกิจการไก่อะระง บริษัทซีพีเอฟ (ประเทศไทย) จำกัด ผู้อนุเคราะห์ให้เมล็ดพันธุ์ไก่จากกระบวนการผลิตไปโอติเซลสำหรับนำมาใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ที่เอื้อเฟื้อสถานที่รวมทั้งวัสดุอุปกรณ์ต่าง ๆ ในการวิจัย

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณครอบครัวรักกิจการพูล เพื่อนๆ และบุคคลใกล้ชิดทุกท่านที่คอยให้การสนับสนุน ให้กำลังใจ และเป็นแรงผลักดันทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยดี

ชุตินา รักกิจการพูล

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	(3)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	(5)
กิตติกรรมประกาศ.....	(7)
สารบัญ.....	(8)
สารบัญตาราง.....	(10)
สารบัญรูป.....	(12)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	(14)
บทที่ 1 บทนำ.....	16
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	16
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	17
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	17
1.4 กรอบแนวคิดการวิจัย.....	18
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	19
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	20
2.1 ไบโอดีเซล.....	20
2.2 วัตถุดิบที่ใช้ผลิตน้ำมันไบโอดีเซล.....	23
2.3 จุลินทรีย์สะสมน้ำมัน.....	25
2.4 คุณสมบัติที่สำคัญของไบโอดีเซล.....	33
2.5 การปรับสภาพกลีเซอรอลดิบ.....	34
2.6 การออกแบบการทดลอง.....	36
2.7 วิธีการพื้นผิวตอบสนอง.....	39
2.8 แบบจำลองจลนพลศาสตร์.....	40
2.9 กระบวนการหมักแบบกะช้า.....	41
2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	42
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	44
3.1 วัสดุและอุปกรณ์.....	44
3.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	45
3.3 สายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในการศึกษา.....	47
3.4 กลีเซอรอลดิบที่ใช้ในการศึกษา.....	47
3.5 วิธีการทดลอง.....	47

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลองและการวิจารณ์.....	62
4.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการปรับสภาพกลีเซอรอลเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงยีสต์น้ำมัน <i>P. parantarctica</i> CHC28.....	62
4.2 การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์ <i>P. parantarctica</i> CHC28 จากกลีเซอรอลที่ผ่านการปรับสภาพ.....	70
4.3 การศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ความเข้มข้นสูง (High Cell Density) ด้วยกระบวนการหมักแบบกะซ้ำ (Repeated Batch Fermentation).....	84
4.4 การศึกษาแบบจำลองทางจลนพลศาสตร์ในการเลียนแบบการผลิตน้ำมันของยีสต์.....	93
4.5 คุณสมบัติของไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันจุลินทรีย์.....	109
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	115
บรรณานุกรม.....	116
ภาคผนวก.....	123
ภาคผนวก ก.....	124
ภาคผนวก ข.....	127
ภาคผนวก ค.....	130
ภาคผนวก ง.....	132
ประวัติผู้เขียน	135

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 วัตถุดิบหลักของกระบวนการผลิตน้ำมันไบโอดีเซล	24
ตารางที่ 2.2 การผลิตไขมันของยีสต์สะสมไขมันต่างชนิดกันในแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน	31
ตารางที่ 3.1 ปัจจัยและระดับของปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาการปรับสภาพ BDCG ด้วยแผนการทดลองแบบ 3^2 Full Factorial Design.....	48
ตารางที่ 3.2 แผนการทดลองแบบ 3^2 Full Factorial Design.....	50
ตารางที่ 3.3 ปัจจัยทางเคมี ปัจจัยทางกายภาพ และระดับของปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง.....	51
ตารางที่ 3.4 แผนการทดลองแบบ Plackett-Burman design.....	52
ตารางที่ 3.5 ปัจจัยและระดับของปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาการผลิตน้ำมันของ <i>P. parantarctica</i> CHC28 ด้วยการวางแผนการทดลองแบบ Box-Behnken design	53
ตารางที่ 3.6 แผนการทดลองแบบ Box-Behnken design.....	55
ตารางที่ 4.1 การปรับสภาพกลีเซอรอลด้วยวิธีการปรับให้เป็นกรด (Acidification) โดยวางแผนการ ทดลองแบบ 3^2 Full Factorial Design.....	63
ตารางที่ 4.2 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของปัจจัยที่มีอิทธิพล ต่อความเข้มข้นกลีเซอรอลของ กระบวนการปรับสภาพกลีเซอรอล.....	64
ตารางที่ 4.3 การทวนสอบผลการทดลองที่ได้จากสมการกำลังสอง.....	67
ตารางที่ 4.4 ประสิทธิภาพการผลิตน้ำมันของยีสต์ <i>P. parantarctica</i> CHC28 ด้วยกลีเซอรอลทำการ ปรับสภาพ.....	67
ตารางที่ 4.5 แผนการทดลองแบบ Plackett Burman design.....	71
ตารางที่ 4.6 ค่าทางสถิติของปัจจัยที่ศึกษา.....	72
ตารางที่ 4.7 แผนทดลองแบบ Box-Behnken design	75
ตารางที่ 4.8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อชีวมวลยีสต์และการผลิตน้ำมัน	77
ตารางที่ 4.9 ประสิทธิภาพการผลิตน้ำมันของ <i>P. parantarctica</i> CHC28 ด้วยกระบวนการ หมักแบบกะช้า.....	86
ตารางที่ 4.10 การเพาะเลี้ยง <i>P. parantarctica</i> CHC28 แบบกะช้าร่วมกับการหมุนเวียนเซลล์	90
ตารางที่ 4.11 ค่าจลนพลศาสตร์ของอัตราการเจริญชีวมวลยีสต์ การผลิตน้ำมันและการใช้กลีเซอรอล ของยีสต์น้ำมัน <i>P. parantarctica</i> CHC28 ใน PG และ PT-BDCG	94
ตารางที่ 4.12 การเลียนแบบพฤติกรรมอัตราการผลิตน้ำมัน จากยีสต์ผลิตน้ำมัน <i>P. Parantarctica</i> ด้วยสมการ Gompertz.....	96
ตารางที่ 4.13 ค่าจลนพลศาสตร์ของอัตราการเจริญชีวมวลยีสต์ การผลิตน้ำมันและอัตราการใช้ กลีเซอรอลของยีสต์น้ำมัน <i>P. parantarctica</i> CHC28 ในระดับถังหมัก.....	99

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 4.14 ค่าจลนพลศาสตร์ของอัตราการเจริญชีวมวลยีสต์ การผลิตน้ำมันและอัตราการ ใช้กลีเซอรอลของยีสต์น้ำมัน <i>P. parantarctica</i> CHC28 ที่เพาะเลี้ยงแบบกะช้า.....	102
ตารางที่ 4.15 แบบจำลองทางจลนพลศาสตร์ของอัตราการเจริญชีวมวลยีสต์ การผลิตน้ำมัน และอัตราการใช้กลีเซอรอลของยีสต์น้ำมัน <i>P. parantarctica</i> CHC28 ที่เพาะ เลี้ยงแบบกะช้าในถังหมัก	106
ตารางที่ 4.16 องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันที่ผลิตจากยีสต์ซึ่งเพาะเลี้ยงด้วย PT-BDCG.....	109
ตารางที่ 4.17 การประเมินคุณสมบัติของไบโอดีเซลที่ผลิตจากยีสต์ซึ่งเพาะเลี้ยงด้วย PT-BDCG	110
ตารางที่ 4.18 องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันที่ผลิตจากยีสต์ซึ่งเพาะเลี้ยงด้วยกระบวนการหมัก แบบกะและกะช้า	111
ตารางที่ 4.19 การประเมินคุณสมบัติของไบโอดีเซลที่ผลิตจากยีสต์ซึ่งเพาะเลี้ยงด้วยกระบวนการหมัก แบบกะและกะช้า	113



สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 2.1 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน (Transesterification).....	20
รูปที่ 2.2 ประเภทของเชื้อเพลิงชีวภาพ	21
รูปที่ 2.3 การเปลี่ยน Citrate/Malate ภายในไซโตซอลิก (Cytosolic).....	26
รูปที่ 2.4 การสังเคราะห์กรดไขมันปาล์มมิติกในไซโทพลาสซึม	27
รูปที่ 2.5 การสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์และฟอสโฟกลีเซอไรด์	28
รูปที่ 2.6 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและสะสมไขมันของ <i>R. mucilaginosa</i> TJY15a.....	30
รูปที่ 2.7 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและสะสมไขมันของ <i>R. mucilaginosa</i> TJY15a.....	32
รูปที่ 2.8 การแยกกรดไขมันและตัวเร่งปฏิกิริยาออกจากกลีเซอรอลดิบ.....	35
รูปที่ 2.9 ปัจจัยและพารามิเตอร์ของกระบวนการ	38
รูปที่ 2.10 พื้นผิวตอบสนองแบบสามมิติ	39
รูปที่ 2.11 เส้นโครงร่างของพื้นผิวตอบสนอง.....	40
รูปที่ 2.12 ขั้นตอนหลักของกระบวนการสร้างแบบจำลองจลนพลศาสตร์.....	41
รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการปรับสภาพ BDCG	49
รูปที่ 4.1 ความสัมพันธ์ของค่าที่ได้จากการทดลองจริงและการทำนายของความเข้มข้นกลีเซอรอล	65
รูปที่ 4.2 อิทธิพลร่วมของชนิดของกรด และความเป็นกรดต่าง ต่อความเข้มข้นกลีเซอรอล.....	66
รูปที่ 4.3 การเจริญของยีสต์ การผลิตน้ำมันและการใช้กลีเซอรอลของยีสต์ ในอาหารที่ใช้ PG และ PT-BDCG เป็นแหล่งคาร์บอน.....	69
รูปที่ 4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อชีวมวลยีสต์ และการผลิตน้ำมัน	73
รูปที่ 4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่ได้จากการทดลองจริงและค่าที่ได้จากการทำนายของชีวมวลยีสต์ และการผลิตน้ำมัน	78
รูปที่ 4.6 อิทธิพลร่วมของความเข้มข้นกลีเซอรอล และอุณหภูมิ ต่อการผลิตชีวมวลยีสต์	79
รูปที่ 4.7 อิทธิพลร่วมของปริมาณ KH_2PO_4 และอุณหภูมิ ต่อการผลิตชีวมวลยีสต์.....	80
รูปที่ 4.8 อิทธิพลร่วมของความเข้มข้นกลีเซอรอล และปริมาณ KH_2PO_4 ต่อการผลิตชีวมวลยีสต์	81
รูปที่ 4.9 อิทธิพลร่วมของปัจจัยต่าง ๆ ต่อการผลิตน้ำมันจากยีสต์	82
รูปที่ 4.10 การเจริญของยีสต์ <i>P. parantarctica</i> CHC28 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	83
รูปที่ 4.11 การเจริญของยีสต์ <i>P. parantarctica</i> CHC28 ด้วยการหมักแบบกะช้า ที่อัตราส่วนการเปลี่ยนถ่ายอาหารเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรเริ่มต้น.....	85

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 4.12	การเจริญของยีสต์ <i>P. parantarctica</i> CHC28 ด้วยการหมักแบบกะช้า ที่อัตราส่วนการเปลี่ยนถ่ายอาหารเมื่อเปลี่ยนถ่ายอาหารออกเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรเริ่มต้น ...88	88
รูปที่ 4.13	การเจริญของยีสต์ <i>P. parantarctica</i> CHC28 ด้วยการหมักแบบกะช้า ที่อัตราส่วนการเปลี่ยนถ่ายอาหารเมื่อเปลี่ยนถ่ายอาหารออกเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรเริ่มต้น ...88	88
รูปที่ 4.14	การเจริญของยีสต์ <i>P. parantarctica</i> ความเข้มข้นสูง ด้วยการหมักแบบกะช้าร่วมกับการหมุนเวียนเซลล์ในระดับฟลาสก์ เมื่อเปลี่ยนถ่ายอาหารเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรเริ่มต้น.....92	92
รูปที่ 4.15	พฤติกรรมของการเจริญของยีสต์ <i>P. parantarctica</i> ความเข้มข้นสูง ด้วยการหมักแบบกะช้าร่วมกับการหมุนเวียนเซลล์ในถังหมัก เมื่อเปลี่ยนถ่ายอาหารออกเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรเริ่มต้น92	92
รูปที่ 4.16	การเลียนแบบพฤติกรรมของการเจริญของชีวมวลยีสต์ การผลิตน้ำมันและอัตราการใช้กลีเซอรอล ในอาหารที่ใช้ PG และ PT-BDCG เป็นแหล่งคาร์บอน.....95	95
รูปที่ 4.17	การเลียนแบบการผลิตน้ำมันของยีสต์ <i>P. parantarctica</i> ด้วยสมการ Gompertz ในสถานะที่ใช้ PG และ PT-BDCG เป็นแหล่งคาร์บอน.....97	97
รูปที่ 4.18	การเลียนแบบพฤติกรรมของการเจริญของยีสต์เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในระดับถังหมัก 5 ลิตร...98	98
รูปที่ 4.19	การเลียนแบบพฤติกรรมของการเจริญ การผลิตน้ำมัน และอัตราการใช้กลีเซอรอลของยีสต์ ในการหมักแบบกะช้า เมื่อเปลี่ยนถ่ายอาหารออกเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตร..... 104	104
รูปที่ 4.20	การเลียนแบบพฤติกรรมของการเจริญ การผลิตน้ำมัน และอัตราการใช้กลีเซอรอลของยีสต์ ในการหมักแบบกะช้า เมื่อเปลี่ยนถ่ายอาหารออกเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตร..... 104	104
รูปที่ 4.21	การเลียนแบบพฤติกรรมของการเจริญ การผลิตน้ำมัน และอัตราการใช้กลีเซอรอลของยีสต์ ในการหมักแบบกะช้า เมื่อเปลี่ยนถ่ายอาหารออกเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตร..... 105	105
รูปที่ 4.22	การเลียนแบบพฤติกรรมของการเจริญ การผลิตน้ำมัน และอัตราการใช้กลีเซอรอลของ ด้วยการหมักแบบกะช้าร่วมกับการหมุนเวียนเซลล์ในระดับฟลาสก์ เมื่อเปลี่ยนถ่ายอาหารออกเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรเริ่มต้น..... 108	108
รูปที่ 4.23	การเลียนแบบพฤติกรรมของการเจริญ การผลิตน้ำมัน และอัตราการใช้กลีเซอรอลของยีสต์ด้วยการหมักแบบกะช้าร่วมกับการหมุนเวียนเซลล์ในระดับถังหมัก เมื่อเปลี่ยนถ่ายอาหารออกเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรเริ่มต้น..... 108	108
รูปที่ ค1	กราฟมาตรฐานสารละลายกลีเซอรอล 131	131
รูปที่ ง1	โครมาโทแกรมของกรดไขมันมาตรฐานในรูปเมทิลเอสเทอร์ (FAME).....131	131
รูปที่ ง2	โครมาโทแกรมของกรดไขมันในตัวอย่างน้ำมันยีสต์ 134	134

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

BDCG	กลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล (Biodiesel Derived Crude Glycerol)
PT-BDCG	กลีเซอรอลที่ปรับปรุงสภาพแล้ว (Pretreated-Biodiesel Derived Crude Glycerol)
PG	กลีเซอรอลบริสุทธิ์ (Pure Glycerol)
RSM	กระบวนการพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology)
RBF	กระบวนการหมักแบบกะซ้ำ (Repeated Batch Fermentation)
FAME	เมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (Fatty Acid Methyl Esters)
dX/dt	อัตราการเจริญของชีวมวลยีสต์ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
dP/dt	อัตราการผลิตน้ำมันยีสต์ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
dS/dt	อัตราการใช้กลีเซอรอล (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
μ	อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)
μ_{max}	อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (ต่อชั่วโมง)
ΔS	ผลต่างของความเข้มข้นกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)
X	ความเข้มข้นชีวมวลยีสต์ (กรัมต่อลิตร)
S	ความเข้มข้นกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)
P	ความเข้มข้นน้ำมัน (กรัมต่อลิตร)
X_{max}	ความเข้มข้นชีวมวลยีสต์สูงสุด (กรัมต่อลิตร)
P_{max}	ความเข้มข้นน้ำมันสูงสุด (กรัมต่อลิตร)
t	ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)
K_i	ค่าคงที่ของการยับยั้ง (กรัมต่อลิตร)
t_L	ระยะเวลาเริ่มต้นก่อนการผลิตน้ำมัน (ชั่วโมง)
$Y_{x/s}$	ผลผลิตของชีวมวลยีสต์ (กรัมของชีวมวลยีสต์ต่อกรัมของสารตั้งต้น)
$Y_{p/s}$	ผลผลิตของน้ำมันยีสต์ (กรัมของน้ำมันต่อกรัมของสารตั้งต้นที่ถูกใช้ไป)
$Y_{p/x}$	ปริมาณน้ำมันทั้งหมด (กรัมของน้ำมันต่อกรัมของชีวมวลยีสต์)
m_s	ค่าสัมประสิทธิ์การบำรุงรักษาชีวมวลยีสต์ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
α	ค่าสัมประสิทธิ์ของการสังเคราะห์น้ำมันที่สัมพันธ์กับการเจริญของชีวมวลยีสต์
β	ค่าสัมประสิทธิ์ของการสังเคราะห์น้ำมันที่ไม่สัมพันธ์กับการเจริญของชีวมวลยีสต์
$r_{x,max}$	อัตราการผลิตชีวมวลยีสต์สูงสุด (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
$r_{p,max}$	อัตราการผลิตน้ำมันสูงสุด (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
q_{pre}	ค่าที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรม
q_{exp}	ค่าที่ได้จากการทดลองจริง
$\overline{q_{exp}}$	ค่าเฉลี่ยของค่าที่ได้จากการทดลองจริง
N	จำนวนการทดลอง
FA_i	องค์ประกอบของกรดไขมัน (เปอร์เซ็นต์) ของ FAME

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

A_{FAi}	พื้นที่ใต้กราฟของ FAME
A_{IS}	พื้นที่ใต้กราฟของ Internal Standard
$\sum_{i=1}^n A$	ผลรวมพื้นที่ใต้กราฟทั้งหมดของ FAME (C4 ถึง C24:1)
$\sum_{i=1}^N$	ผลรวมของสมการ Second Order Polynomial Quadratic Equation
Y	ค่าการตอบสนองจากการทำนาย (ตัวแปรตาม)
X_i และ X_j	ค่าการตอบสนองจากการทำนาย (ตัวแปรอิสระ)
β_0	จุดตัดแกน Y
β_i	ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเดียว
β_{ii}	ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของสมการกำลังสอง
β_{ij}	ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยความสัมพันธ์ของตัวแปร
R^2	ค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ
RMSE	ค่าความคลาดเคลื่อนกำลังสองเฉลี่ย



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ช่วงเวลาที่ผ่านมามีความต้องการพลังงานเชื้อเพลิงจากฟอสซิล (Fossil) สูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ในขณะที่ปริมาณการผลิตเชื้อเพลิงดังกล่าวมีจำกัดและลดลงอย่างรวดเร็วทำให้เกิดปัญหาพลังงานในปัจจุบัน [1] พลังงานหมุนเวียน (Renewable Energy) ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานทางเลือกใหม่จึงได้รับความสนใจนำมาใช้ทดแทนพลังงานจากฟอสซิล เนื่องจากสามารถผลิตขึ้นใหม่ได้อย่างต่อเนื่อง น้ำมันไบโอดีเซลเป็นพลังงานหมุนเวียนชนิดหนึ่งที่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เนื่องจากปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซเรือนกระจกต่าง ๆ สู่ชั้นบรรยากาศน้อยกว่าน้ำมันปิโตรเลียม [2] โดยน้ำมันไบโอดีเซลสามารถผลิตได้จากน้ำมันพืช และน้ำมันสัตว์ด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน (Transesterification) ระหว่างไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) ในน้ำมันกับแอลกอฮอล์สายสั้น เช่น เมทานอล (Methanol) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมเกิดเป็นสารประกอบเมทิลเอสเทอร์ (Methylester) หรือน้ำมันไบโอดีเซล เป็นสารประกอบหลัก และได้กลีเซอรอล (Glycerol) เป็นผลพลอยได้ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของการผลิตน้ำมันไบโอดีเซล อย่างไรก็ตามต้นทุนในการผลิตไบโอดีเซลนั้นมาจากราคาของวัตถุดิบประมาณ 70-90 เปอร์เซ็นต์ [3] เมื่อราคาของวัตถุดิบสูงขึ้นจึงทำให้ราคาของน้ำมันไบโอดีเซลสูงขึ้นด้วย นอกจากนี้วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลยังนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารด้วย ทำให้มีวัตถุดิบไม่เพียงพอต่อการผลิตตลอดทั้งปี

ปัจจุบันกระบวนการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลโดยใช้วัตถุดิบชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพ และสามารถทดแทนการใช้ไขมันจากพืชหรือสัตว์ในการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลได้รับความสนใจมากขึ้น โดยน้ำมันจากจุลินทรีย์ (Microbial Oil) หรือน้ำมันเซลล์เดียว (Single Cell Oil) เป็นน้ำมันที่ได้รับความสนใจนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลทดแทนไขมันจากพืชและสัตว์ เนื่องจากมีองค์ประกอบของกรดไขมันคล้ายคลึงกับในน้ำมันพืช [4] ซึ่งมีงานวิจัยรายงานว่าจุลินทรีย์บางชนิดสามารถสร้างและสะสมไขมันไว้ในเซลล์มากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (Oleaginous Microorganisms) และความสามารถในการสะสมไขมันขึ้นอยู่กับความแตกต่างของชนิดจุลินทรีย์ นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตน้ำมันยังไม่ขึ้นอยู่กับฤดูกาลทำให้สามารถผลิตได้ตลอดทั้งปี และใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูกในการเพาะเลี้ยงยีสต์ดังกล่าวได้ โดยได้ทำการคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตและสะสมไขมันภายในเซลล์สำหรับนำมาใช้ในการผลิตน้ำมันไบโอดีเซล ผลการทดลองพบว่ายีสต์ *Pseudozyma parantarctica* CHC28 มีความสามารถในการสะสมไขมันภายในเซลล์ได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และน้ำมันดังกล่าวยังประกอบด้วยกรดไขมัน (Fatty Acid) ที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลอีกด้วย [5] อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพการผลิตน้ำมันจุลินทรีย์ยังขึ้นอยู่กับสภาวะและต้นทุนของวัตถุดิบที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง งานวิจัยในปัจจุบันจึงมุ่งเน้นการนำของเหลือทิ้งหรือผลพลอยได้จากภาคอุตสาหกรรมและการเกษตร ซึ่งไม่มีราคาหรือมีราคาถูกมาใช้เป็นวัตถุดิบในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ทดแทนวัตถุดิบที่มีราคาสูง

ในปัจจุบันมีรายงานว่ากลีเซอรอลซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล (Biodiesel-Derived Crude Glycerol, BDCG) เป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูกและมีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตน้ำมันได้ [6] โดยยีสต์จะนำกลีเซอรอลเข้าสู่เซลล์และเปลี่ยนเป็นกลีเซอรอลดีไฮด์-ทรีฟอสเฟต (Glyceroldehyde-3-Phosphate, G-3-P) ก่อนเข้าสู่กระบวนการไกลโคไลซิส (Glycolysis) และวัฏจักรการผลิตน้ำมันในไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) และเอนโดพลาสมิก เรติคูลัม (Endoplasmic Reticulum, ER) จนได้สารไตรเอซิลกลีเซอรอล (Triacylglycerol, TG) [7] อย่างไรก็ตามการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเหลือทิ้งที่แตกต่างกันจะทำให้ BDCG ที่มีสิ่งเจือปนแตกต่างกันซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพและการผลิตน้ำมันของยีสต์ได้ งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาอิทธิพลของปัจจัยทางเคมีและกายภาพที่ส่งผลกระทบต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์ *P. parantarctica* CHC28 โดยใช้ BDCG ที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลด้วยน้ำมันพืชเหลือทิ้งจากโรงงานแปรรูปเนื้อไก่ปรุงสุกเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อลดต้นทุนในกระบวนการผลิตน้ำมันจุลินทรีย์และการลดภาระในการนำ BDCG ไปกำจัดอีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการปรับสภาพกลีเซอรอลเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงยีสต์น้ำมัน *P. parantarctica* CHC28

1.2.2 เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันของ *P. parantarctica* CHC28 จาก BDCG ด้วยการออกแบบการทดลอง (Design of Experiment)

1.2.3 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ความเข้มข้นสูง (High Cell Density) ด้วยกระบวนการหมักแบบกะซ้ำ (Repeated Batch Fermentation)

1.2.4 เพื่อศึกษาแบบจำลองทางจลนพลศาสตร์ในการเลียนแบบการผลิตน้ำมันของยีสต์

1.2.5 เพื่อศึกษาคุณสมบัติของน้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันยีสต์

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 ขอบเขตของสถานที่ทำการวิจัย

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

1.3.2 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.2.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการปรับสภาพกลีเซอรอลด้วยวิธีการปรับให้เป็นกรด (Acidification) สำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์น้ำมัน *P. parantarctica* CHC28

1.3.2.2 ศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตน้ำมันของ *P. parantarctica* CHC28 จากกลีเซอรอลดิบด้วยวิธี Plackett-Burman design โดยแปรผันปัจจัยทางเคมีและทางกายภาพ เช่น ความเข้มข้นกลีเซอรอล ปริมาณ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ปริมาณ KH_2PO_4 ปริมาณ MgSO_4 ปริมาณกล้ำเชื้อ อัตราการเขย่า และอุณหภูมิ

1.3.2.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำมันของ *P. parantarctica* CHC28 จาก กลีเซอรอลดิบด้วยกระบวนการพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology) โดยการวางแผนการทดลองแบบ Box-Behnken design

1.3.2.4 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการผลิตน้ำมันของ *P. parantarctica* CHC28 แบบขยายขนาดในถังหมักขนาด 5 ลิตร

1.3.2.5 ศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์แบบความเข้มข้นสูง (High Cell Density) ของ *P. parantarctica* CHC28 ด้วยการหมักแบบกะซ้ำ (Repeated Batch Fermentation) ในระดับฟลาสก์และระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

1.3.2.6 ศึกษาแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ในการเลียนแบบการเจริญและการผลิตน้ำมันของยีสต์ด้วยสมการคณิตศาสตร์ (Mathematic Equation)

1.3.2.7 ศึกษาการทำนายคุณสมบัติของน้ำมันไบโอดีเซลที่สัมพันธ์กับกรดไขมันของน้ำมันจากยีสต์

1.4 กรอบแนวคิดการวิจัย

อุตสาหกรรมที่เพิ่มขึ้นในปัจจุบันก่อให้เกิดแหล่งเชื้อเพลิงจากฟอสซิลมีอัตราลดลง รวมถึงมีราคาสูงขึ้น อีกทั้งเชื้อเพลิงฟอสซิลได้สร้างความกังวลด้านสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ เช่น ภาวะโลกร้อน สถานการณ์นี้ได้ก่อให้เกิดความสนใจเพิ่มขึ้นในด้านพลังงานทดแทน โดยเฉพาะพลังงานชีวภาพ ซึ่งไบโอดีเซลเป็นพลังงานชีวภาพที่สามารถทดแทนน้ำมันดีเซลจากปิโตรเลียมได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ยังคงมีอุปสรรคสำคัญของการผลิตไบโอดีเซลคือต้นทุนการผลิตที่สูงซึ่งส่วนใหญ่เนื่องจากต้นทุนน้ำมันที่สูงขึ้นจากการผลิตประมาณ 70-90 เปอร์เซ็นต์ของต้นทุนการผลิตไบโอดีเซลสอดคล้องกับวัตถุดิบน้ำมันพืช [3] อย่างไรก็ตามวัตถุดิบจากไขมันสัตว์หรือน้ำมันพืชที่ใช้แล้วมีปริมาณไม่เพียงพอต่อความต้องการพลังงานที่เพิ่มขึ้น [8] ดังนั้นกลีเซอรอลดิบซึ่งเป็นของเหลือใช้จากอุตสาหกรรมผลิตไบโอดีเซลจึงได้รับความสนใจมาใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์สะสมน้ำมัน (Oleaginous Microorganism) หรือน้ำมันเซลล์เดี่ยว (Single Cell Oil) [9] ซึ่งเป็นทางเลือกที่สามารถทดแทนพืชน้ำมันในการผลิตไบโอดีเซลได้ โดยจุลินทรีย์จะมีการผลิตและสะสมน้ำมันอยู่ในรูปหยดน้ำมันเล็ก ๆ (Microdroplet Oils) ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ ส่วนใหญ่มักพบการสะสมน้ำมันของจุลินทรีย์เมื่อเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเกินพอและแหล่งไนโตรเจนจำกัด รวมถึงปริมาณสารอาหารอื่น ๆ ที่มีผลต่อการสะสมน้ำมันในเซลล์จุลินทรีย์ [10]

อย่างไรก็ตามการสะสมน้ำมันของจุลินทรีย์นั้นมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสปีชีส์ (Species) และสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง และกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันจากจุลินทรีย์ก็ยังคงมีความแตกต่างกัน โดยในปี 2015 Areesirisuk และคณะ [11] ได้รายงานว่ายีสต์ *P. parantarctica* CHC28 ที่คัดแยกได้จากเปลือกผลไม้มีความสามารถในการผลิตและสะสมน้ำมันภายในเซลล์ได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และน้ำมันจาก *P. parantarctica* CHC28 ยังประกอบด้วยกรดไขมันที่มีคาร์บอนจำนวน 16 และ 18 อะตอมเป็นหลัก (C16:C18 Fatty Acid) มากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ เช่น กรดปาล์มมิติก (Palmitic Acid) กรดสเตียริก (Stearic Acid) และกรดโอเลอิก (Oleic Acid) ซึ่งมีความ

คล้ายคลึงกับองค์ประกอบของกรดไขมันในพืช ดังนั้น *P. parantarctica* CHC28 จึงถูกนำมาใช้ศึกษาการผลิตน้ำมันสำหรับผลิตไบโอดีเซลโดยใช้กลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ทราบสถานะที่เหมาะสมต่อการทำให้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่จำเป็นต่อการเพาะเลี้ยงยีสต์น้ำมัน *P. parantarctica* CHC28

1.5.2 ทราบปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตน้ำมันของ *P. parantarctica* CHC28 จากกลีเซอรอลดิบด้วยวิธี Plackett-Burman design

1.5.3 ทราบสถานะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำมันจุลินทรีย์จากกลีเซอรอลดิบด้วยกระบวนการพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology)

1.5.4 ทราบประสิทธิภาพการผลิตยีสต์น้ำมันแบบขยายขนาดในถังหมักขนาด 5 ลิตร

1.5.5 ทราบการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ความเข้มข้นสูง (High Cell Density) ด้วยกระบวนการหมักแบบกะซ้ำ (Repeated Batch Fermentation) ในระดับฟลาสก์และระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

1.5.6 ทราบการประยุกต์ใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ในการเลียนแบบการเจริญและการผลิตน้ำมันของยีสต์ในสถานะต่าง ๆ

1.5.7 ทราบคุณสมบัติของน้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันยีสต์



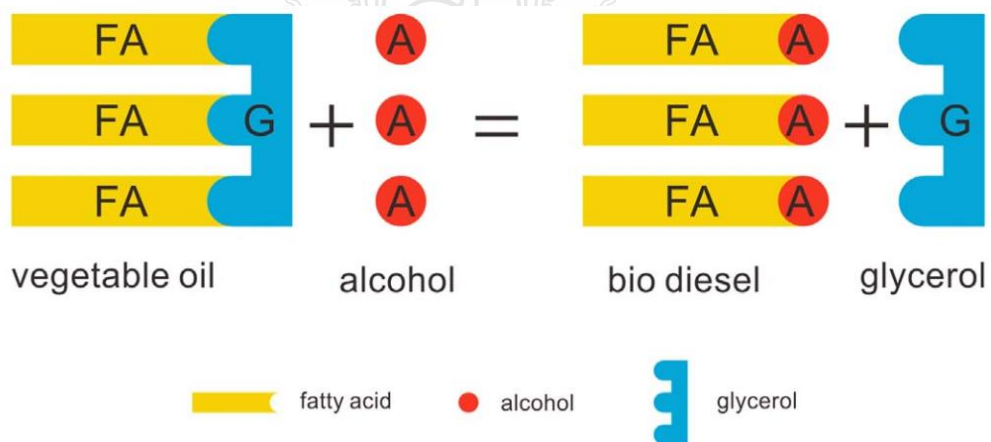
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไบโอดีเซล

2.1.1 ความหมายและความสำคัญของไบโอดีเซล

การเพิ่มขึ้นของอุตสาหกรรมต่าง ๆ ในปัจจุบันทำให้มีความต้องการใช้พลังงานจากฟอสซิลมากขึ้น ปริมาณเชื้อเพลิงจากฟอสซิลจึงมีอัตราการลดลงอย่างรวดเร็ว รวมถึงมีราคาสูงขึ้นอีกทั้งการใช้เชื้อเพลิงฟอสซิลยังส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เช่น ภาวะโลกร้อน จึงทำให้เกิดความสนใจในการนำพลังงานทดแทน โดยเฉพาะพลังงานชีวภาพมาใช้มากขึ้น น้ำมันไบโอดีเซลเป็นพลังงานชีวภาพชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ทดแทนน้ำมันดีเซลจากปิโตรเลียมได้อย่างมีประสิทธิภาพ [3] โดยสามารถผลิตได้จากน้ำมันพืช ไขมันสัตว์หรือน้ำมันที่ใช้แล้วด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Transesterification) ดังรูปที่ 2.1 โดยน้ำมันในรูปไตรกลีเซอไรด์ (Vegetable Oils/Animal Fats) จะทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์สายสั้นจำนวน 3 โมล ทำให้เกิดสารประกอบเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (Fatty Acid Methyl Esters, FAME) หรือไบโอดีเซล จำนวน 3 โมล และกลีเซอรอล (Glycerol) จำนวน 1 โมล เป็นผลพลอยได้สุดท้าย [12] ซึ่งกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจำนวน 1 ตันจะเกิดกลีเซอรอลดิบเป็นผลพลอยได้ประมาณ 100 กิโลกรัม (10 เปอร์เซ็นต์) [9]



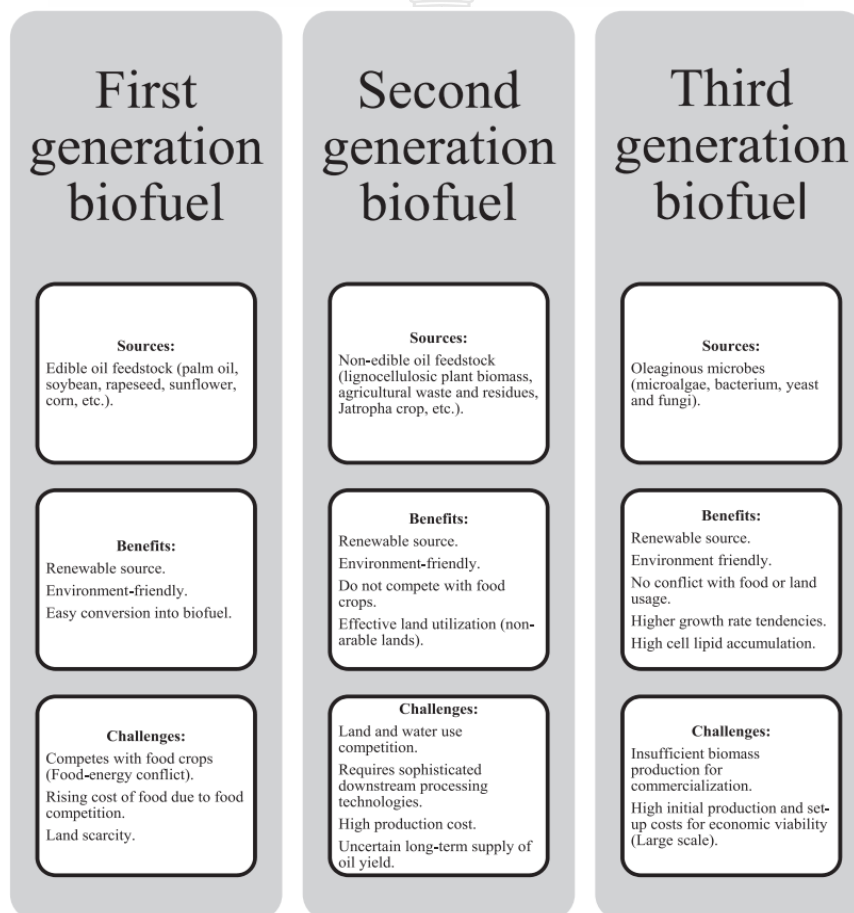
รูปที่ 2.1 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Transesterification)

ที่มา: He และคณะ (2017) [12]

การผลิตไบโอดีเซลเป็นการทำให้โครงสร้างของน้ำมันถูกเปลี่ยนจากไตรกลีเซอไรด์ให้เป็นโมโนอัลคิลเอสเทอร์ (Mono Alkyl Ester) ได้แก่ เมทิลเอสเทอร์ (Methyl Ester) หรือเอทิลเอสเทอร์ (Ethyl Ester) และกลีเซอริน (Glycerine หรือ Glycerol) ดังนั้นการนำน้ำมันมาใช้เป็นเชื้อเพลิงจึงจำเป็นต้องผ่านกระบวนการเพื่อเปลี่ยนโครงสร้างให้เป็นกรดไขมันสายยาว (Long-Chain Fatty Acid) ให้เป็น FAME ด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันได้เป็นน้ำมันชนิด B100 หรือน้ำมันไบโอดีเซล

บริสุทธิ์ 100 เปอร์เซ็นต์ [13, 14] นอกจากนี้ยังมีน้ำมันชนิด B20 ที่เป็นการผสมของน้ำมันไบโอดีเซล 20 เปอร์เซ็นต์กับน้ำมันดีเซลธรรมดาอีก 80 เปอร์เซ็นต์ เป็นต้น [13]

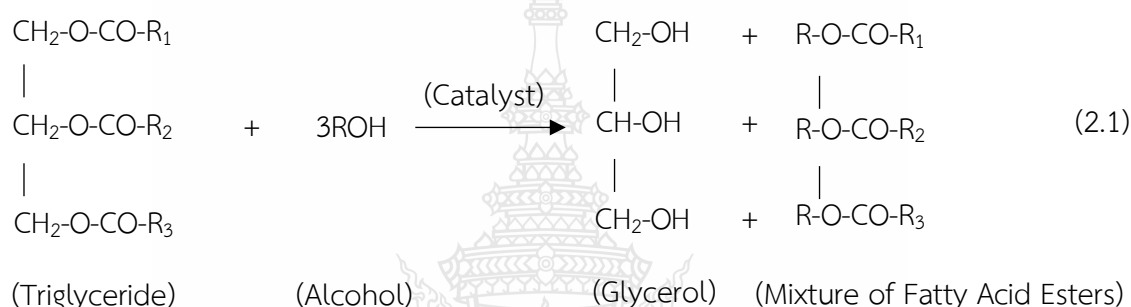
นอกจากนี้เชื้อเพลิงชีวภาพที่ถูกนำมาใช้นั้นสามารถแบ่งออกตามลักษณะของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตได้เป็นเชื้อเพลิงชีวภาพรุ่นที่ 1 (1st Generation Biofuel) เชื้อเพลิงชีวภาพรุ่นที่ 2 (2nd Generation Biofuel) และเชื้อเพลิงชีวภาพรุ่นที่ 3 (3rd Generation Biofuel) ดังรูปที่ 2.2 โดย “1st Generation” เป็นเชื้อเพลิงที่ผลิตจากผลิตผลทางการเกษตรที่สามารถใช้เป็นอาหาร เช่น พืชเกษตรที่ผลิตอาหาร จำพวกข้าวโพด อ้อย มันสำปะหลัง ปาล์มน้ำมัน หรือเมล็ดทานตะวัน เป็นต้น เมื่อเข้าสู่ “2nd Generation” เป็นพัฒนาการของเชื้อเพลิงชีวภาพที่ไม่ได้จากน้ำตาลหรือแป้ง แต่มาจากสิ่งที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ เช่น ขยะหรือของเหลือใช้จากอุตสาหกรรมเกษตร เช่น ชังข้าวโพดหรือจากไตรกลีเซอไรด์ที่รับประทานไม่ได้ เช่น สับดำ (Jatropha) และ “3rd Generation” เป็นแหล่งเชื้อเพลิงชีวภาพที่ได้รับความสนใจในปัจจุบัน เนื่องจากน้ำมันที่ผลิตได้มาจากจุลินทรีย์มีคุณสมบัติสะสมน้ำมันภายในเซลล์ได้สูง เช่น สาหร่ายขนาดเล็ก แบคทีเรีย ยีสต์และเชื้อรา [15]



รูปที่ 2.2 ประเภทของเชื้อเพลิงชีวภาพ
ที่มา: Leong และคณะ (2018) [15]

2.1.2 ปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน หรือปฏิกริยาแอลกอฮอล์ไลซิส (Alcoholysis)

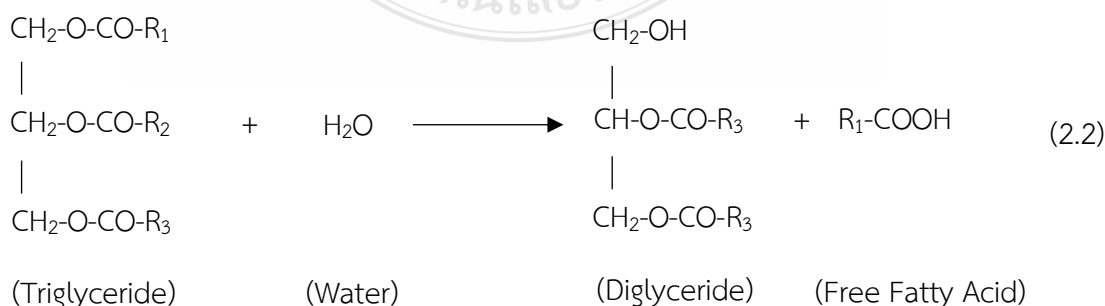
น้ำมันพืชและไขมันสัตว์จัดเป็นกรดไขมันอิ่มตัว ประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิล (Carboxylic Group) ที่ไม่อิ่มตัวกับแอลกอฮอล์ที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl Group) 3 หมู่เรียกว่า ไตรไฮดริกแอลกอฮอล์ (Trihydric Alcohol) ทำปฏิกริยาเคมีระหว่างไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์ โดยมีตัวเร่งปฏิกริยาร่วมด้วย ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมัน หรือไบโอดีเซลกับ กลีเซอรอลซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิต ดังสมการ 2.1 [14] สำหรับตัวเร่งปฏิกริยาถูกนำมาใช้ในการเพิ่มอัตราการเกิดปฏิกริยา (Reaction Rate) และผลผลิต (Yield) เนื่องจากปฏิกริยาเป็นแบบผันกลับได้ จึงมักใช้แอลกอฮอล์ที่มากเกินไป (Excess Alcohol) เพื่อให้ปฏิกริยาเกิดได้อย่างสมบูรณ์



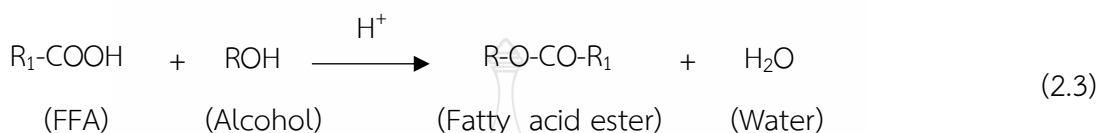
เมื่อให้ R_1 R_2 และ R_3 เป็นไฮโดรคาร์บอนสายยาวที่เรียกว่ากรดไขมัน โดยทั่วไปชนิดของกรดไขมันที่สำคัญมี 5 ชนิด ได้แก่ กรดปาล์มิติก (Palmitic Acid, $C_{16:0}$) กรดสเตียริก (Stearic Acid, $C_{18:0}$) กรดโอเลอิก (Oleic Acid, $C_{18:1}$) กรดไลโนเลอิก (Linoleic Acid, $C_{18:2}$) และกรดลิโนเลนิก (Linolenic Acid, $C_{18:3}$) [14] เมื่อไตรกลีเซอไรด์ถูกเปลี่ยนเป็นไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ และกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ ตามลำดับ (3 โมลของกรดไขมันเอสเทอร์จาก 1 โมลของไตรกลีเซอไรด์)

2.1.3 กลไกการเกิดปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน

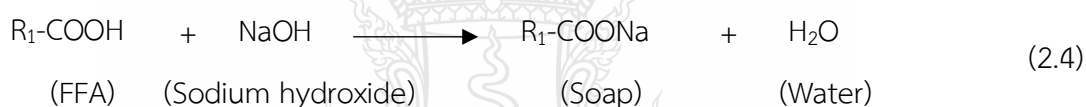
ประกอบด้วยปฏิกริยาย่อยแบบผันกลับ (Reversible Reaction) ได้ 3 ขั้นตอนย่อย ดังสมการ 2.2 โดยไตรกลีเซอไรด์จะเปลี่ยนเป็นไดกลีเซอไรด์ (Diglyceride) มอนอกลิเซอไรด์ (Monoglyceride) และกลีเซอรอล ตามลำดับ โดยแต่ละปฏิกริยาย่อยจะได้กรดไขมันเอสเทอร์ 1 โมลออกมา



อย่างไรก็ตามกรดไขมันอิสระ (FFA) สามารถทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์เพื่อสร้างเอสเทอร์ (ไบโอดีเซล) โดยมีกรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเรียกว่าปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน (Esterification) ทำให้ได้ปริมาณน้ำมันหรือไขมันที่ปริมาณกรดไขมันอิสระสูง ดังสมการ 2.3 โดยทั่วไปตัวเร่งปฏิกิริยานี้เป็นกรดความเข้มข้นสูง เนื่องจากอัตราการเกิดปฏิกิริยาช้าและปริมาณเมทานอลมากต่ออัตราส่วนของโมเลกุลน้ำมัน ดังนั้นปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันจึงได้รับความสนใจน้อยกว่าการทำปฏิกิริยาทรานส์-เอสเทอร์ฟิเคชันที่มีเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา [16]



น้ำมันที่นำมาใช้สำหรับผลิตไบโอดีเซลจะต้องมีปริมาณกรดไขมันอิสระที่เหมาะสม โดยถ้าใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นเบส น้ำมันที่ใช้จะต้องมีปริมาณกรดไขมันน้อยกว่า เนื่องจากถ้าใช้น้ำมันที่มีปริมาณกรดไขมันอิสระมีค่ามาก จะต้องใช้เบสในปริมาณที่มากขึ้นเพื่อปรับสภาพของกรดไขมันอิสระให้กลายเป็นกลาง และได้ผลิตภัณฑ์ร่วมเป็นสบู่ ดังสมการ 2.4 [16]



2.2 วัตถุดิบที่ใช้ผลิตน้ำมันไบโอดีเซล

ทั่วโลกมีพืชที่มีน้ำมันมากกว่า 350 ชนิด เป็นแหล่งในการผลิตไบโอดีเซลที่มีศักยภาพ ดังตารางที่ 2.1 วัตถุดิบที่มีอยู่สำหรับการผลิตไบโอดีเซลเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญของการผลิตไบโอดีเซล ซึ่งต้องคำนึงถึงต้นทุนการผลิตต่ำและสามารถผลิตในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ได้ ความพร้อมของวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ ตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ สภาพดิน และอุตสาหกรรมเกษตร สามารถแบ่งวัตถุดิบไบโอดีเซลออกเป็น 4 ประเภทหลัก [17] ได้แก่

- 1) น้ำมันพืชที่รับประทานได้ (Edible Vegetable Oil): ถั่วเหลือง (Soybean) ถั่วเปลือกแข็ง (Peanut) เมล็ดทานตะวัน (Sunflower) เมล็ดปาล์ม (Palm) และน้ำมันมะพร้าว (Coconut Oil)
- 2) น้ำมันพืชที่ไม่สามารถรับประทานได้ (Non-Edible Vegetable Oil): สบู่ดำ (Jatropha)
- 3) น้ำมันเสียหรือน้ำมันใช้แล้ว (Waste or Recycled Oil)
- 4) ไขมันสัตว์ (Animal Fats): ไขมันวัว (Tallow) และไขมันไก่ (Chicken Fat)

ตารางที่ 2.1 วัตถุดิบหลักของกระบวนการผลิตน้ำมันไบโอดีเซล

น้ำมันที่บริโภคได้	น้ำมันที่บริโภคไม่ได้	ไขมันสัตว์	แหล่งอื่น ๆ
Soybeans (<i>Glycine max</i>)	<i>Jatropha curcas</i>	Pork lard	Bacteria
Safflower	Pongamia (<i>Pongamia pinnata</i>)	Poultry fat	Microalgae (<i>Chlorella vulgaris</i>)
Rice bran oil (<i>Oryza sativum</i>)	Camelina (<i>Camelina Sativa</i>)	Fish oil	Algae (<i>Cyanobacteria</i>)
Barley	Cotton seed (<i>Gossypium hirsutum</i>)	Chicken fat	Poplar
Groundnut	Cumaru	Beef tallow	Miscanthus
Sorghum	<i>Cynara cardunculus</i>		Latexes
Wheat	<i>Abutilon muticum</i>		Fungi
Corn	Neem (<i>Azadirachta indica</i>)		Tarpenes
Coconut	Jojoba (<i>Simmondsia chinensis</i>)		
Canola	Passion seed (<i>Passiflora edulis</i>)		
Peanut	Moringa (<i>Moringa oleifera</i>)		
Palm and palm kernel (<i>Elaeis guineensis</i>)	Tobacco seed		
Sunflower (<i>Helianthus annuus</i>)	Rubber seed tree (<i>Hevea brasiliensis</i>)		

ที่มา: Atabani และคณะ (2012) [17]

2.3 จุลินทรีย์สะสมน้ำมัน

น้ำมันเซลล์เดี่ยว (Single Cell Oils, SCOs) เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตและสะสมน้ำมันได้ภายในเซลล์มากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักชีวมวลแห้ง เรียกว่าจุลินทรีย์สะสมน้ำมัน (Oleaginous microorganism) ซึ่งการสะสมน้ำมันของจุลินทรีย์พบได้ทั้งในสาหร่าย ยีสต์ รา และแบคทีเรีย โดยจุลินทรีย์จะมีการผลิตและสะสมน้ำมันอยู่ในรูปของหยดน้ำมันเล็ก ๆ (Microdroplet Oils) ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ ส่วนใหญ่มักพบการสะสมน้ำมันของจุลินทรีย์เมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเกินพอ และจำกัดแหล่งไนโตรเจน รวมถึงปริมาณสารอาหารอื่น ๆ ที่มีผลต่อการสะสมไขมันในเซลล์จุลินทรีย์อย่างเหมาะสม [11, 18]

โดยองค์ประกอบของน้ำมันประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์เป็นไตรกลีเซอไรด์หรือไตรเอซิลกลีเซอรอล (Triacylglycerol, TAG) ที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันจากเมล็ดพืช และมีศักยภาพสูงสำหรับการพัฒนาการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลได้ และพบว่ามียีสต์บางสายพันธุ์สามารถสะสมน้ำมันได้สูงมากถึง 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เรียกว่ายีสต์สะสมน้ำมัน (Oleaginous Yeast) ตัวอย่างเช่น *Rhodospiridium* sp. และ *Rhodotorula* sp. โดยการสะสมน้ำมันของยีสต์จะมีการสะสมไว้ในไซโทพลาสซึมเป็นหยดน้ำมันเล็ก ๆ และการสะสมน้ำมันของยีสต์จะมีความแตกต่างกันตามสายพันธุ์และอาหารในการเพาะเลี้ยง [10] โดยการเจริญและการสะสมหรือผลิตน้ำมันของยีสต์ รวมไปถึงแหล่งวัตถุดิบที่นำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงถือเป็นปัจจัยในการทำให้การสะสมและการผลิตไขมันของยีสต์แต่ละสายพันธุ์แตกต่างกันไปด้วย [19]

2.3.1 กลไกการผลิตไตรกลีเซอไรด์ในยีสต์สะสมน้ำมัน จุลินทรีย์จะสะสมน้ำมันเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนที่มากเกินไปและปริมาณแหล่งไนโตรเจนจำกัด ดังนั้นจุลินทรีย์ที่สามารถสะสมน้ำมันและผลิตได้ในปริมาณมาก เซลล์ต้องสามารถเข้าสู่การสังเคราะห์น้ำมันได้ทันที โดยจุลินทรีย์ที่สังเคราะห์น้ำมันต้องมีคุณสมบัติในการผลิตอะซิติล-โคเอ (Acetyl-CoA) ได้อย่างต่อเนื่องภายในเซลล์ซึ่งจะเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์กรดไขมัน และมีความสามารถในการผลิต NADPH มากเพียงพอเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ การสังเคราะห์ Acetyl-CoA ในจุลินทรีย์สะสมน้ำมันจะเกิดขึ้นเมื่อมีเอนไซม์เอทีพี ซิเตรต ไลเอส (ATP Citrate Lyase, ACL) ดังสมการ 2.5 [20, 21]

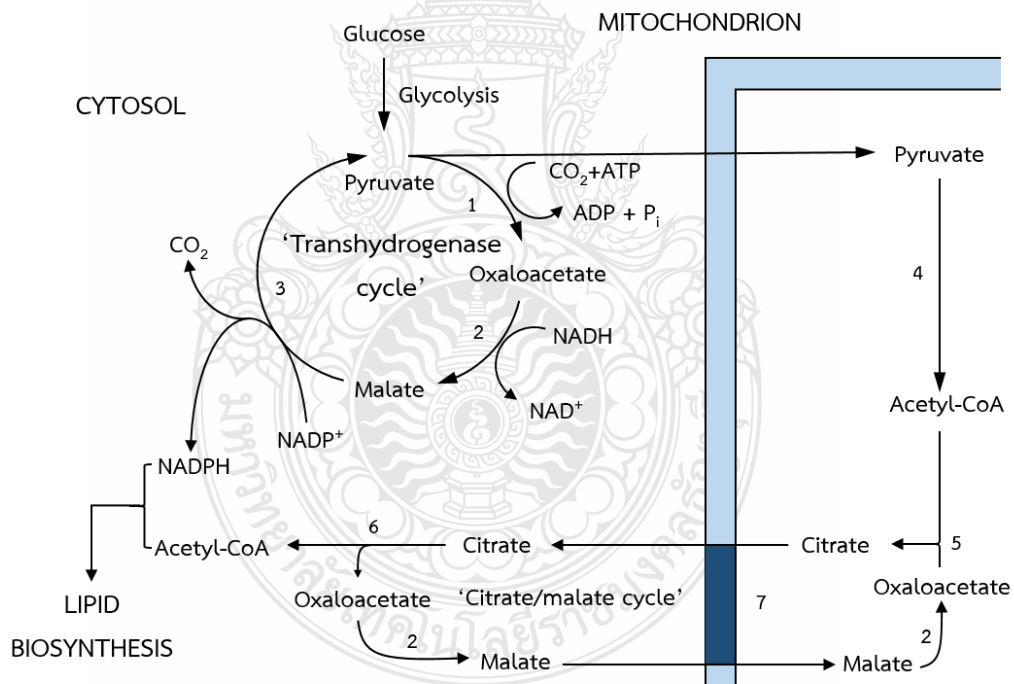


การผลิตน้ำมันในยีสต์ผลิตน้ำมันสูงเมื่อถูกจำกัดปริมาณไนโตรเจนจะทำให้ภายในเซลล์มีความเข้มข้นของอะดีโนซีนโมโนฟอสเฟต (AMP) และเปลี่ยนเป็นอินโนซีนโมโนฟอสเฟต (IMP) และแอมโมเนียมไอออน (NH_3^+) โดยเอนไซม์เอเอ็มพี ดีอะมิเนส (AMP Deaminase) มีความเข้มข้นต่ำ ดังสมการ 2.6 ส่งผลต่อเอนไซม์ไอโซซิเตรต-ดีไฮโดรจีเนส (Isocitrate Dehydrogenase, NAD) ซึ่งเมตาบอลิซึมซิเตรต (Citrate) จะผ่านวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (Tricarboxylic Acid Cycle, TCA) ในไมโทคอนเดรียถูกยับยั้ง ทำให้ Isocitrate ถูกสะสมในรูปของ Citrate จากนั้นเอนไซม์ ACL จะเปลี่ยน Citrate ไปเป็น Acetyl-CoA ซึ่งต้องอาศัย ATP สูงและออกซาโลอะซิเตต (Oxaloacetate,

OAA) จะถูกเปลี่ยนเป็นมาเลท (Malate) โดยเอนไซม์มาเลท-ดีไฮโดรจีเนส (Malate Dehydrogenase, MDH) จากนั้นจะถูกส่งเข้าไปในไมโทคอนเดรีย เพื่อทำหน้าที่ในการส่ง Citrate จากไมโทคอนเดรียเข้าสู่ไซโทพลาสซึม



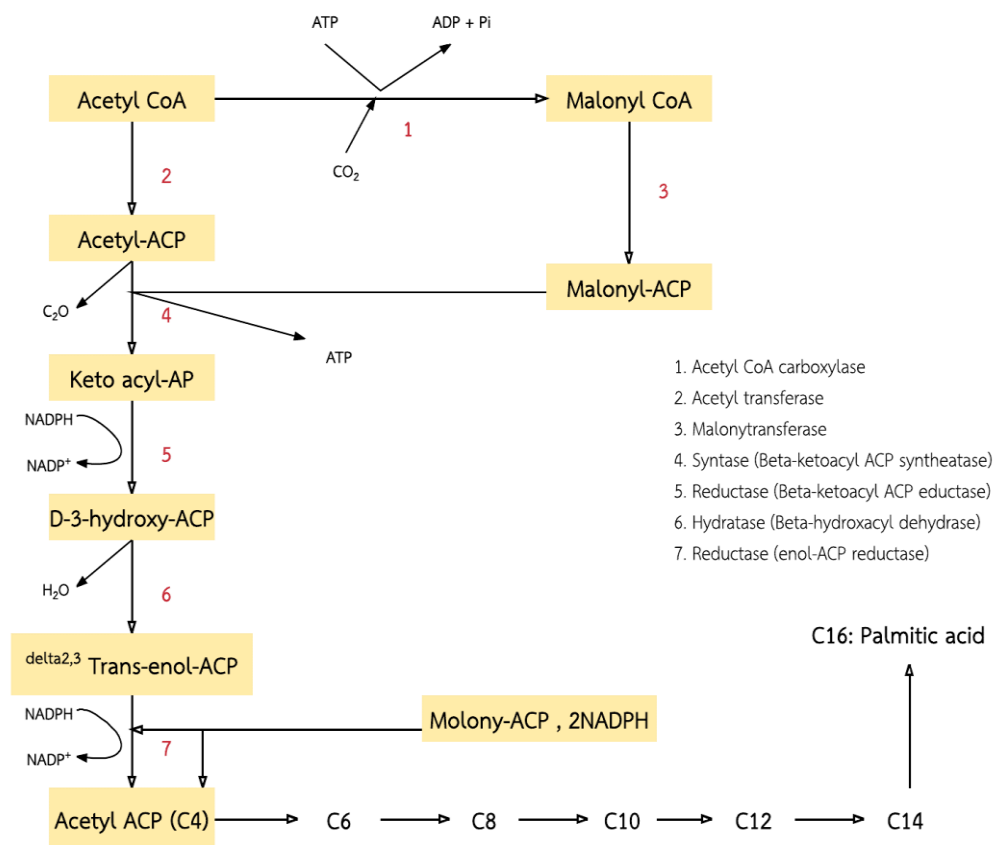
จากรูปที่ 2.3 แสดงเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ 1. ไพรูเวต-คาร์บอกซิเลส (Pyruvate Decarboxylase) 2. มาเลท-ดีไฮโดรจีเนส (Malate Dehydrogenase) 3. มาลิก เอนไซม์ (Malic Enzyme) 4. ไพรูเวต-ดีไฮโดรจีเนส (Pyruvate Dehydrogenase) 5. ซิเตรต ซินเทส (Citrate Synthase) 6. เอทีพี ซิเตรต ไลเอส (ATP Citrate Lyase, ACL) และ 7. ซิเตรต/มาเลท ทรานส์โลเคส (Citrate/Malate Translocase, CMT) นอกจากนี้พบว่าเอนไซม์ ACC มีบทบาทในการควบคุมอัตราการผลิตน้ำมันของยีสต์ อัตราการผลิตจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ ACC โดยจะพบเอนไซม์ชนิดนี้เฉพาะในองค์ประกอบของเซลล์จุลินทรีย์ที่น้ำมันสูงเมื่อไนโตรเจนมีปริมาณลดลงเท่านั้นซึ่งช่วงการผลิตน้ำมัน เอนไซม์นี้จะมีกิจกรรมเพิ่มขึ้น [20, 21]



รูปที่ 2.3 การเปลี่ยน Citrate/Malate ภายในไซโตซอลิก (Cytosolic) หรือของเหลวภายในเซลล์ บริเวณวัฏจักรทรานส์ไฮโดรจีเนส (Transhydrogenase Cycle) ทำให้การนำ Acetyl-CoA และ NADPH จากไมโทคอนเดรียเข้าสู่ไซโทพลาสซึมเพื่อการสังเคราะห์กรดไขมัน (Lipogenesis)

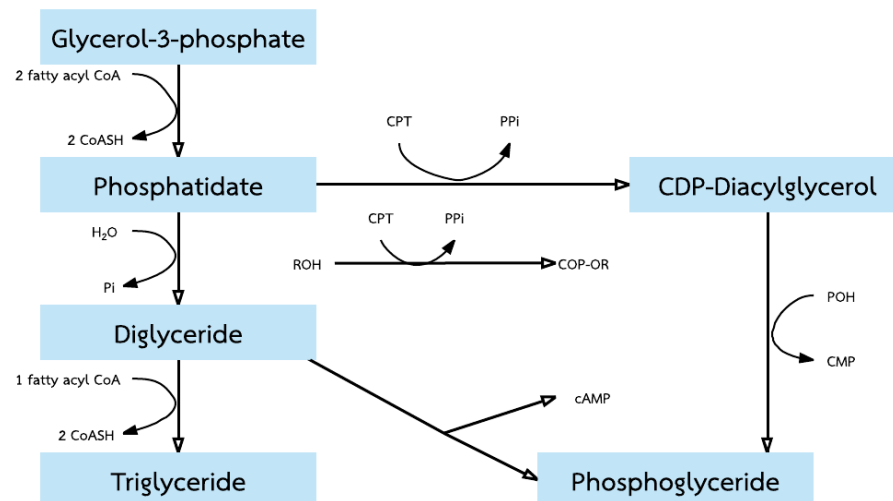
ที่มา: Ratledge และ Wynn (2002) [21]

กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันจะเริ่มจากการสังเคราะห์กรดพาล์มิติก (Palmitic Acid, C_{16:0}) จาก Acetyl-CoA ซึ่งใช้พลังงานจาก ATP และ NADPH จาก Pentose Phosphate Pathway ขบวนการนี้เกิดขึ้นในไซโทพลาสซึม เริ่มจากการนำเอา Acetyl-CoA ที่สังเคราะห์ได้จากวิถีไกลโคไลซิสซึ่งอยู่ในไมโทคอนเดรียเข้าสู่ไซโทพลาสซึม จากนั้นเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันในไซโทพลาสซึมซึ่งถูกควบคุมโดยเอนไซม์สังเคราะห์กรดไขมัน (Fatty Acid Synthase, FAS) เริ่มจาก Acetyl-CoA ทำปฏิกิริยากับ CO₂ ได้เป็น Malonyl CoA โดยใช้พลังงานจาก ATP จากนั้น Acetyl-CoA และ Malonyl CoA จะทำปฏิกิริยากับ Acyl Carrier Protein (ACP) ได้เป็น Acetyl -ACP และ Malonyl-ACP ซึ่งจะรวมกันได้ Acyl ACP (C4) ซึ่งจะต้องใช้ NADPH 2 โมเลกุล จากนั้นปฏิกิริยาก็ดำเนินซ้ำแบบเดิม 4 ขั้นตอน คือ มีการเพิ่มคาร์บอนครั้งละ 2 อะตอม จนได้กรดพาล์มิติก ดังรูปที่ 2.4 การสังเคราะห์กรดไขมันต้องใช้ ATP และ NADP เป็นจำนวนมาก ซึ่ง ATP นี้ได้มาจาก Catabolism ส่วน NADPH ได้มาจาก Malic Enzyme และ Pentose Phosphate Pathway [21]



รูปที่ 2.4 การสังเคราะห์กรดไขมันพาล์มิติกในไซโทพลาสซึม
ที่มา: Ratledge และ Wynn (2002) [21]

สิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่สังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีคาร์บอน 16 หรือ 18 อะตอม จากนั้นกรดไขมันเหล่านี้จะถูกเปลี่ยนเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวโดยเอนไซม์ Desaturases และ Elongases การเพิ่มพันธะคู่ในกรดไขมันจะเริ่มจาก Palmitoyl-CoA (Palmitic Acid, $C_{16:0}$) เปลี่ยนเป็น Stearoyl-CoA (Stearic acid, $C_{18:0}$) จากนั้นถูกเปลี่ยนเป็น Oleoyl-CoA (Oleic Acid, $C_{18:1}$) การเพิ่มพันธะคู่ในกรดไขมันจะมีปฏิกิริยา Chain Elongation โดยเอนไซม์ Elongase ทำหน้าที่เพิ่มจำนวนคาร์บอนอะตอม และ Desaturation โดยเอนไซม์ Desaturase ทำหน้าที่ในการเพิ่มหรือเติมพันธะคู่ ตามลำดับ จากนั้นกระบวนการก็จะดำเนินการในการเพิ่มจำนวนคาร์บอนอะตอมและพันธะคู่ไปเรื่อย ๆ จนได้กรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว (Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids) ในการสร้างพันธะคู่ในกรดไขมันโดยการใช้ออกซิเจน อาศัย Electron Transport System (ETC) เรียกกระบวนการนี้ว่า Microsomal Desaturase System ยีสต์มีแนวโน้มในการผลิตเพียง Mono-unsaturated Fatty Acid และ Di-unsaturated Fatty Acid ของ C_{16} และ C_{18} กรดไขมันที่สังเคราะห์ได้จากจุลินทรีย์จะเก็บสะสมในรูปของไตรกลีเซอไรด์และฟอสโฟกลีเซอไรด์เนื่องจากกรดไขมันละลายน้ำได้ยากและจะอยู่ในรูปไมเซลล์ (Micelle) อีกทั้งคุณสมบัติของการเป็นกรดและเป็นพิษต่อเซลล์ จึงสร้างพันธะเอสเทอร์กับสารประกอบอื่น ๆ ซึ่งพบว่าส่วนใหญ่เป็นกลีเซอรอลได้เป็นกลีเซอไรด์ โดย Fatty acyl-CoA รวมตัวกับ Glycerol-3-phosphate เกิดเป็น Phosphatidate เมื่อกำจัดหมู่ฟอสเฟตออกจะได้ กลีเซอไรด์ซึ่งสามารถรวมตัวกับสารอื่น เช่น โคลีน (Choline) ซีรีน (Serine) และอินซิทอล (Inositol) กลายเป็นฟอสโฟกลีเซอไรด์ (Phosphoglyceride) แต่การรวมตัวกันนั้น Phosphatidate จะถูกเปลี่ยนไปเป็นรูป Active form ในรูปอนุพันธ์ของ Cytidine Diphosphate (CDP) คือ CDP-diacylglycerol แล้วจึงรวมตัวกับสารอื่น ๆ ดังรูปที่ 2.5



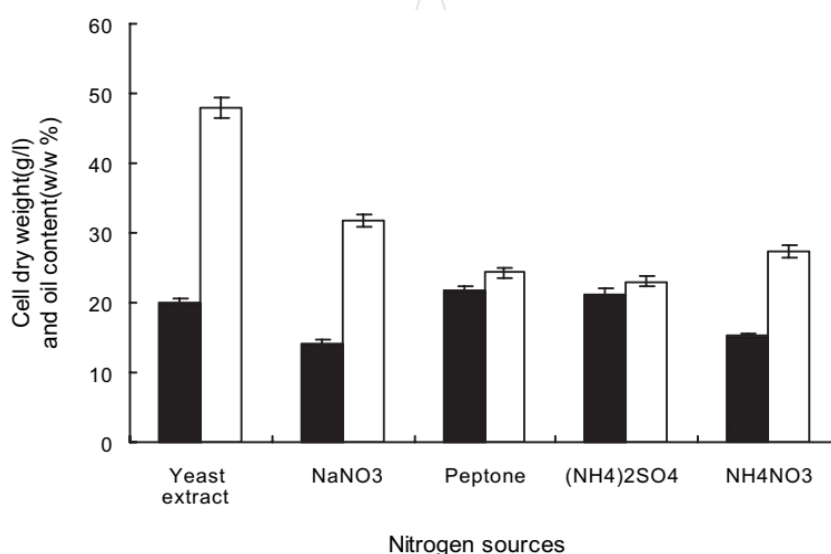
รูปที่ 2.5 การสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์และฟอสโฟกลีเซอไรด์
ที่มา: Evans และ Ratledge (1984) [18]

2.3.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมัน

การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญและการผลิตไขมันของยีสต์ เป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับอัตราการเจริญ ปริมาณและองค์ประกอบของไขมันในเชื้อยีสต์ ประกอบด้วยปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ สภาวะการเพาะเลี้ยง อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดต่าง ปริมาณออกซิเจน และปัจจัยทางเคมี ได้แก่ องค์ประกอบของสารอาหาร แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน โดยปัจจัยเหล่านี้มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต และการผลิตน้ำมันของจุลินทรีย์ โดยควรมีการใช้สภาวะที่เหมาะสมเพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของจุลินทรีย์ เพื่อให้มีประสิทธิภาพตามต้องการ โดยตามธรรมชาติของจุลินทรีย์แต่ละชนิดแต่ละสายพันธุ์จะมีสภาวะการเจริญที่แตกต่างกัน ทำให้มีการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ชนิดนั้น ๆ เพื่อให้จุลินทรีย์ทำงานอย่างมีประสิทธิภาพตามต้องการ ปัจจัยทางด้านเคมีขององค์ประกอบอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงและวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน รวมทั้งแหล่งไนโตรเจนที่ควรมีปริมาณที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์สะสมไขมัน โดยทั่วไปแล้วยีสต์สะสมไขมันมีการเจริญได้ดีในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ เช่น กลีเซอรอล น้ำตาลชนิดต่าง ๆ จำพวกน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส น้ำตาลซูโครส เป็นต้น และมีแหล่งไนโตรเจนที่จำกัดซึ่งถือเป็นปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อการสะสมไขมันและการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ได้ จากการศึกษาถึงการเจริญของเชื้อยีสต์ การสะสมไขมันรวมไปถึงองค์ประกอบของกรดไขมันของยีสต์สะสมไขมันชนิดต่าง ๆ จะเห็นได้ว่าการเจริญ การสะสมไขมัน ปริมาณและองค์ประกอบของกรดไขมันที่พบในยีสต์สะสมไขมันมีความแตกต่างกันตามปัจจัยในการเพาะเลี้ยง ทั้งปัจจัยทางกายภาพและปัจจัยทางเคมี [22]

2.3.2.1 ปัจจัยทางเคมี ได้แก่ องค์ประกอบของสารอาหาร แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน โดยสารอาหารหลักที่มีผลต่อการผลิตไขมันของยีสต์สะสมไขมัน คือ แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน โดยเมื่อเลี้ยงยีสต์ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน ปริมาณและชนิดของกรดไขมันที่ผลิตโดยยีสต์สายพันธุ์นั้น ๆ จะแตกต่างกัน การเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมันในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยวัตถุดิบที่ใช้แทนน้ำตาลเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญและการสะสมไขมันของยีสต์สะสมไขมัน โดยวัตถุดิบแต่ละชนิดก็จะมีผลต่อการเจริญและการสะสมไขมันของยีสต์ชนิดที่ต่างกันเพราะอยู่ในแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน ในการเลือกใช้วัตถุดิบเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของยีสต์ควรให้มีปริมาณและองค์ประกอบที่เหมาะสมกับยีสต์สะสมไขมัน เพื่อให้การเพาะเลี้ยงยีสต์มีศักยภาพในการสะสมไขมันและผลิตไขมันได้ในปริมาณมาก [19] ดังตารางที่ 2.2 วัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนให้แก่จุลินทรีย์ควรเป็นวัตถุดิบที่มีราคาต่ำเพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิต เช่น วัตถุดิบทางการเกษตรก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำมาเป็นวัตถุดิบเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับจุลินทรีย์ และยังเป็นการใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูกและเพิ่มมูลค่าวัตถุดิบทางการเกษตรอีกด้วย โดยวัตถุดิบที่เลือกใช้นำมาใช้ทดแทนน้ำตาลได้เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนให้แก่จุลินทรีย์ในการเจริญและการสะสมไขมัน [23] ยีสต์สามารถเจริญและสะสมไขมันได้ในแหล่งคาร์บอนที่หลากหลาย แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตไขมันเซลล์เดียวส่วนใหญ่เป็นกลูโคส หรือแหล่งวัตถุดิบที่ใช้แทนกลูโคสได้ เช่น ซูโครส ไซโลส และแหล่งวัตถุดิบทางการเกษตรที่สามารถแทนน้ำตาลได้ เช่น มันสำปะหลัง มันเทศ อ้อย และหัวแค้นตะวัน เป็นต้น ซึ่งแหล่งคาร์บอนเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อยีสต์เพื่อนำไปใช้ในการเจริญและการผลิตไขมัน

นอกจากนี้แหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการเจริญและการสะสมไขมันของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยเช่นกัน โดย Li และคณะ [24] ได้ศึกษาการผลิตไขมันเซลล์เดียวจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังโดยยีสต์ *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a ได้ทดสอบผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการสะสมไขมันและการเจริญของ *R. mucilaginosa* TJY15a โดยในการเพาะเลี้ยงใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจนที่ต่างกัน คือ สารสกัดจากยีสต์ โซเดียมไนเตรต เปปโตน แอมโมเนียซัลเฟต และแอมโมเนียมไนเตรตพบว่าแหล่งไนโตรเจนที่สามารถทำให้ยีสต์ *R. mucilaginosa* TJY15a เจริญและการสะสมไขมันได้ดีที่สุดมากกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่น คือ สารสกัดจากยีสต์ โดยมีการสะสมไขมันภายในเซลล์ที่ 47.9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักชีวมวลแห้ง และน้ำหนักชีวมวลยีสต์เท่ากับ 20.2 กรัมต่อลิตร รูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและสะสมไขมันของ *R. mucilaginosa* TJY15a, ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน 0.33 เปอร์เซ็นต์ (w/w)
 แท่งสีดำ: น้ำหนักชีวมวลยีสต์ (กรัมต่อลิตร); แท่งสีขาว: ไขมันสะสม (w/w, เปอร์เซ็นต์)
 ที่มา: Li และคณะ (2010) [24]

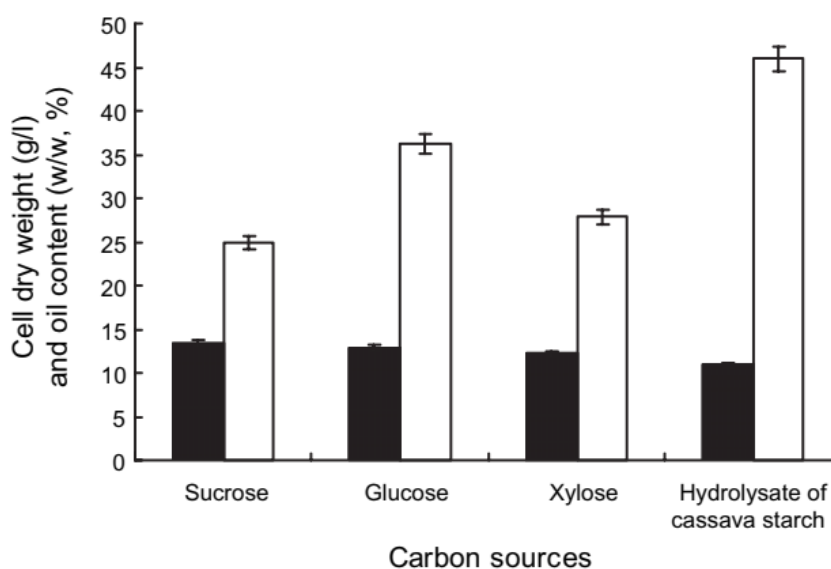
2.3.2.2 ปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ สภาพการเพาะเลี้ยง อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดต่าง ปริมาณออกซิเจนเป็นองค์ประกอบและปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตไขมันของยีสต์สะสมเป็นอย่างมาก ซึ่งปัจจัยเหล่านี้จะให้ผลที่แตกต่างกันในสายพันธุ์ของยีสต์สะสมไขมันที่แตกต่างกันไปด้วย โดยการให้อากาศเพิ่มขึ้นพบว่ายีสต์มีการผลิตเซลล์และปริมาณไขมันเพิ่มขึ้น อุณหภูมิลดลงพบว่าจะมีผลทำให้ปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวมีปริมาณเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 2.2 การผลิตไขมันของยีสต์สะสมไขมันต่างชนิดกันในแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน

สายพันธุ์ยีสต์	แหล่งคาร์บอน	ชีวมวลยีสต์ (g/L)	น้ำมัน (g/L)	ปริมาณน้ำมัน ภายในเซลล์ (%w/w)	แหล่งอ้างอิง
<i>R. fluvialis</i> DMKU-SP314	Sugarcane top enzymatic hydrolysate and crude glycerol	20.9	13.9	66.6	[22] ^a
<i>C. curvatus</i> ATCC 20509	Corn stover enzymatic hydrolysate and crude glycerol	21.7	10.8	49.7	[25] ^b
<i>R. toruloides</i> CCT 0783	Sugarcane bagasse acid hydrolysate and simulating raw glycerol	8.0	3.3	41.7	[26] ^c
<i>R. glutinis</i> BCRC 22360	Rice straw enzymatic hydrolysate and crude glycerol	21.4	10.8	58.5	[27] ^d

เอกสารอ้างอิง; ^aPoontawee และคณะ (2018), ^bGong และคณะ (2016), ^cBonturi และคณะ (2017), ^dYen และคณะ (2015)

การศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงเป็นสิ่งสำคัญในการกำหนดการเจริญและการสะสมไขมันของยีสต์สะสมไขมัน ดังนั้นแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดต่าง ค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนและค่าปัจจัยอื่น ๆ ควรมีการใช้ในสภาวะที่เหมาะสม จากงานวิจัยของ Li และคณะ [24] ทำการศึกษาการผลิตกรดไขมันจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังโดยเชื้อยีสต์ *R. mucilaginosa* TJY15a ที่คัดเลือกได้จากธรรมชาติ เมื่อทดสอบการเพาะเลี้ยงเชื้อในแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน พบว่าแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยสามารถทำให้ยีสต์ *R. mucilaginosa* TJY15a สะสมไขมันได้มากกว่าแหล่งคาร์บอนที่เป็นกลูโคส ซูโครส และไซโลส ในส่วนของแหล่งไนโตรเจนพบว่าเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีความเหมาะสมกับการสะสมไขมันของยีสต์ แต่ไม่เหมาะต่อการเจริญเติบโต ซึ่งสอดคล้องกับการใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N Ratio) ที่เหมาะสม และจากงานวิจัยนี้ยังกล่าวไว้ว่า ยีสต์สะสมไขมันจะสามารถสะสมไขมันได้สูง เมื่อมีแหล่งคาร์บอนที่เพียงพอและมีแหล่งไนโตรเจนที่จำกัด คือควรมีค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N Ratio) ที่สูง โดยมีการสะสมน้ำมันภายในเซลล์ (Oil Content) สูงถึง 48.8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง และมีชีวมวลยีสต์เท่ากับ 14.8 กรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและสะสมไขมันของ *R. mucilaginosa* TJY15a, ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน 2.0 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และเพาะเลี้ยง 72 ชั่วโมง
 แท่งสีดำ: น้ำหนักชีวมวลยีสต์ (กรัมต่อลิตร); แท่งสีขาว: ไขมันสะสม (w/w, เปอร์เซ็นต์)
 ที่มา: Li และคณะ (2010) [24]

ปัจจัยทางกายภาพถือว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญมาก เช่น การเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตไขมันของ Zhu และคณะ [28] ได้ศึกษาประสิทธิภาพการผลิตไขมันของเชื้อ *Trichosporon fermentans* เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลโดยทำการศึกษาค่าประกอบของอาหารและสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง โดยทำการหาสภาวะที่เหมาะสมที่สามารถทำให้ยีสต์ไขมันสูง *T. fermentans*

มีประสิทธิภาพในการผลิตและสะสมไขมันมากที่สุด พบว่าสภาวะที่แตกต่างกันในการเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมัน *T. fermentans* จะมีผลต่อการเจริญ การสะสมไขมันและปริมาณไขมันที่ได้มีความแตกต่างกัน จากงานวิจัยนี้สามารถสรุปสภาวะที่เหมาะสมได้ดังนี้ อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 25 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นที่เหมาะสมอยู่ที่ 6.5 และยังมีรายงานการศึกษาแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม โดยการเพาะเลี้ยง *T. fermentans* ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่าง 6.0 ความเร็วรอบในการเขย่า 160 รอบต่อนาที และใช้ระยะเวลาในการบ่ม 7 วัน จากการรายงานผลพบว่า เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สามารถให้ปริมาณไขมันดีกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่น ๆ โดยสามารถสะสมไขมันได้ 10.8 กรัมต่อลิตร หรือ 54.9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักชีวมวลแห้ง ส่วนแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดคือน้ำตาลกลูโคส ที่สามารถทำให้ *T. fermentans* ผลิตไขมันได้สูงสุดโดยปริมาณความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ที่ 100 กรัมต่อลิตรสามารถสะสมไขมันได้ 13.6 กรัมต่อลิตร หรือ 56.6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักชีวมวลแห้ง ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับการใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมันควรมีการใช้สภาวะที่เหมาะสม ทั้งปัจจัยทางด้านกายภาพและปัจจัยทางด้านเคมีกับยีสต์สะสมไขมันนั้นเพื่อให้ได้มีประสิทธิภาพมากที่สุด

2.4 คุณสมบัติที่สำคัญของไบโอดีเซล

เพื่อส่งเสริมให้เกิดการใช้ไบโอดีเซลอย่างแพร่หลาย หลายประเทศทั่วโลกจึงต้องกำหนดมาตรฐานสำหรับคุณภาพน้ำมันไบโอดีเซลขึ้น เช่น ในประเทศสหรัฐอเมริกา มีมาตรฐาน American Society for Testing and Materials (ASTM D 6751) เข้ามาประเมินศักยภาพของน้ำมัน หรือทวีปยุโรปมี EN 14214 เป็นมาตรฐาน ทั้งนี้คุณสมบัติต่าง ๆ ยังต้องคำนึงถึงสภาพของน้ำมัน เช่น ความสมบูรณ์ของการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันหรือสภาพการเก็บรักษา ปัจจัยที่ส่งผลต่อองค์ประกอบของกรดไขมัน เป็นต้น [29] การประเมินศักยภาพของไบโอดีเซลแทนน้ำมันดีเซลจะพิจารณาคูสมบัติของไบโอดีเซล เช่น ค่าซีเทน ความหนืด ความหนาแน่น และค่าความร้อนสูง เป็นต้น [30]

2.4.1 ค่าซีเทน (Cetane Number, CN) เป็นตัวเลขบ่งชี้คุณภาพด้านคุณสมบัติในการจุดติดไฟ (Ignition) อย่างรวดเร็วเมื่อเกิดการสุมติดของเครื่องยนต์ จำนวนค่าซีเทนที่สูงแสดงให้เห็นว่าการเผาไหม้มีคุณภาพที่ดี โดยหลักการจำนวนค่าซีเทนจะสัมพันธ์กับเวลาหน่วงการจุดติดไฟ (Ignition Delay Time) คือเวลาที่เชื้อเพลิงฉีดผ่านเข้าสู่ห้องเผาไหม้ถึงจุดติดไฟ เมื่อค่าซีเทนสูง เวลาหน่วงการจุดติดไฟจะมีค่าสั้น รวมถึงปัจจัยจากเมทิลเอสเทอร์ยังส่งผลให้เพิ่มค่าซีเทน เพิ่มความยาวของกรดไขมันและความอึดตัวการทดสอบจำนวนค่าซีเทน ซึ่งผลที่ได้ต้องให้ค่าไม่ต่ำกว่า 47 ตามมาตรฐานการทดสอบค่าซีเทน ASTM D 6751 หรือไม่ต่ำกว่า 51 ตามมาตรฐานการทดสอบค่าซีเทน EN 14214 [17]

2.4.2 ความหนืด (Kinematic Viscosity, KV) เป็นตัวแปรที่บ่งชี้ถึงความสามารถการไหลของน้ำมันที่ใช้และการพ่นออกไปจากหัวฉีดเชื้อเพลิง ดังนั้นการทำงานของอุปกรณ์หัวฉีดและตัวพ่นที่มีหน้าที่ทำให้พลังงานความร้อนจากเปลวไฟ (Spray Atomization) ไม่เหมาะสมเมื่ออยู่ในสภาวะ

อุณหภูมิต่ำ ทำให้ความหนืดของน้ำมันเพิ่มขึ้นยากต่อการไหลของน้ำมัน ดังนั้นน้ำมันที่มีความหนืดต่ำ จะมีผลโดยตรงต่อรูปแบบของละอองน้ำมันที่ฉีดเข้าไปในห้องเผาไหม้ ซึ่งผลที่ได้จะอยู่ระหว่าง 1.9-6.0 mm²/s ตามมาตรฐานการทดสอบค่าความหนืด ASTM D 6751 หรืออยู่ระหว่าง 3.5-5.0 mm²/s ตามมาตรฐานการทดสอบค่าความหนืด EN 14214 อย่างไรก็ตามน้ำมันจะต้องมีหนืดสูงพอสำหรับการหล่อลื่นปั๊มและหัวฉีดเชื้อเพลิง แต่จะต้องไม่สูงเกินไปจนเกิดหยดน้ำมันขนาดใหญ่ที่ยากต่อการลุกไหม้ นอกจากนั้นน้ำมันที่มีความหนืดมากเกินไปยังอาจทำให้ประจุน้ำมันเข้าสู่ปั๊มทำได้ไม่เต็มที่ที่ความเร็วสูง อันทำให้เกิดการสูญเสียกำลังได้ [17]

2.4.3 ความหนาแน่น (Density, D) เป็นค่าที่ระบุคุณสมบัติเบื้องต้นทางกายภาพของไบโอดีเซล ซึ่งผลที่ได้จะอยู่ในช่วง 0.86–0.90 g/cm³ มีผลต่อการเผาไหม้ ตามมาตรฐานการทดสอบค่าความหนาแน่น EN 14214 [31]

2.4.4 ค่าความร้อนสูง (Higher Heating Value, HHV) คือความร้อนที่ปล่อยออกมาจากการไหม้ของหน่วยกรัมน้ำมันเชื้อเพลิงในการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) และน้ำออกมาจากที่อุณหภูมิเริ่มต้น ซึ่งผลที่ได้จะต้องไม่ต่ำกว่า 35 เมกะจูลต่อกิโลกรัม (MJ/kg) ตามมาตรฐานการทดสอบค่าความหนาแน่น EN 14213 [30]

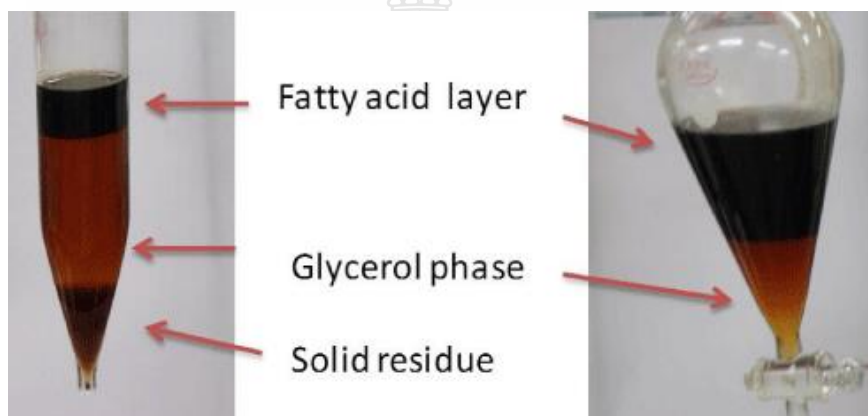
2.4.5 ค่าไอโอดีน (Iodine Value, IV) เป็นค่าบ่งชี้ความไม่อิ่มตัวของเชื้อเพลิง ดังนั้นค่าไอโอดีนจะเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มขึ้นจำนวนพันธะคู่ ค่าไอโอดีนมาตรฐาน EN 14214 และ EN 14213 กำหนดให้ค่าไอโอดีนของไบโอดีเซลสูงกว่า 120 และ 130 กรัมไอโอดีนต่อ 100 กรัมของไบโอดีเซลตามลำดับ [32, 33]

2.4.6 ค่าสะaponิฟิเคชัน (Saponification Value, SV) คือมิลลิกรัมของโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ต่อ 1 กรัมของตัวอย่างน้ำมัน รวมถึงมีความเกี่ยวข้องกับน้ำหนักโมเลกุล ดังนั้นค่าสะaponิฟิเคชัน ของน้ำมันจะลดลงและเพิ่มขึ้นตามน้ำหนักโมเลกุล [32]

2.5 การปรับสภาพกลีเซอรอลดิบ

วิธีการปรับสภาพเพื่อลดปริมาณกรดไขมันอิสระ (FFA) เพื่อเพิ่มปริมาณน้ำมันมีหลายวิธี อาทิ เช่น การสกัดโดยการกลั่นด้วยไอน้ำ (Steam Distillation) การสกัดด้วยแอลกอฮอล์ (Extraction by Alcohol) และปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (Esterification) โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นกรด [14] โดยกลีเซอรอลดิบ (Crude Glycerin) เป็นวัตถุดิบที่เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์จากน้ำมันพืช ไขมันจากสัตว์หรือน้ำมันที่ใช้แล้วกับแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอลและเอทานอล ซึ่งมีโซเดียมไฮดรอกไซด์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์หรือกรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา [8] โดยทั่วไปการผลิตไบโอดีเซลทุก 10 กิโลกรัม จะให้กลีเซอรอลดิบประมาณ 1 กิโลกรัม ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักของไบโอดีเซลที่ผลิตได้ [34] กลีเซอรอลดิบที่ได้จะมีปริมาณกลีเซอรอลประมาณร้อยละ 50 ซึ่งผสมอยู่กับเมทานอลที่เหลือจากการทำปฏิกิริยา ตัวเร่งปฏิกิริยาและสบู่ ดังนั้นการนำกลีเซอรอลดิบไปใช้เป็นวัตถุดิบจะต้องมีการทำให้บริสุทธิ์ก่อน มีกระบวนการหลายกระบวนการที่ทำให้กลีเซอรอลดิบบริสุทธิ์ขึ้น เช่น การกลั่นลำดับส่วน (Fractional Distillation) การแลกเปลี่ยนประจุ (Ion-Exchange) การดูดซับ (Adsorption) การตกตะกอน (Precipitation) การสกัด

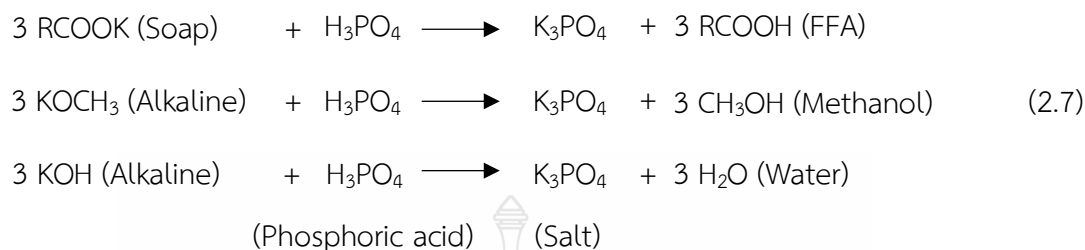
(Extraction) การตกผลึก (Crystallization) และไดอะไลซิส (Dialysis) เป็นต้น ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับขั้นตอนการแยกที่สำคัญ 2 ขั้นตอน คือ การกำจัดเกลือและกำจัดเมทานอล โดยจะต้องมีการแยกส่วนของสบู่ออกไปก่อน วิธีการทำให้กลีเซอรอลดิบมีความบริสุทธิ์ขึ้นมีหลายวิธี เช่น วิธีการกำจัดสบู่ออกจากกลีเซอรอลดิบโดยใช้กรด เป็นการทำให้สบู่แตกตัว ในขั้นตอนนี้เป็นการใช้กรดปรับความเป็นกรดต่างของกลีเซอรอลดิบให้เป็นกลาง จะเป็นการแยกตัวแรงปฏิกิริยาและสบู่ออกจากกลีเซอรอลดิบ ปฏิกิริยาของกรดกับสบู่จะทำให้ได้กรดไขมันอิสระและเกลือ ซึ่งกรดไขมันอิสระไม่ละลายในกลีเซอรอล โดยจะแยกชั้นลอยตัวขึ้นไปข้างบนมีลักษณะคล้ายครีม เกลือบางส่วนซึ่งไม่ละลายในกลีเซอรอลจะตกตะกอนออกมา ดังรูปที่ 2.8 หลังจากนั้นทำการระเหยเมทานอลออกจากกลีเซอรอล ในขั้นตอนนี้จะทำให้ได้กลีเซอรอลที่มีความบริสุทธิ์ประมาณร้อยละ 85 ในขั้นตอนสุดท้ายกลีเซอรอลถูกทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น (99.5 เปอร์เซ็นต์) โดยการใช้หลากหลายวิธี เช่น การดูดซับ (Adsorption) การกลั่นภายใต้สุญญากาศ (Vacuum Distillation) และกระบวนการแลกเปลี่ยนไอออน (Ion Exchange Process) [35]



รูปที่ 2.8 การแยกกรดไขมันและตัวแรงปฏิกิริยาออกจากกลีเซอรอลดิบ
ที่มา: Nanda และคณะ (2014) [35]

ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลด้วยตัวแรงปฏิกิริยาแอลคาไลน์ สบู่จะเกิดขึ้นและจำนวนส่วนมากจะอยู่ในชั้นของกลีเซอรอล ดังนั้นการสะเทินตัวแรงปฏิกิริยาและสบู่ที่มีอยู่ในกลีเซอรอลก่อนด้วยกรด ดังสมการ 2.7 เมื่อตั้งทิ้งไว้ตัวแรงปฏิกิริยาแอลคาไลน์นี้จะทำปฏิกิริยาสะพอนิฟิเคชันอย่างช้า ๆ กับเอสเทอร์หรือกลีเซอไรด์ที่มีอยู่ในชั้นของกลีเซอรอล ในการสะเทินปกติจะนิยมใช้กรดซัลฟิวริก 98 เปอร์เซ็นต์ เพราะมีน้ำปนอยู่น้อยกว่ากรดเกลือและไม่ใช้กรดไนตริกเพราะเสี่ยงต่อเกิดไนโตรกลีเซอริน กรดฟอสฟอริกทางการค้าจะเข้มข้นประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถใช้ได้แต่จะแตกตัวไม่ดีเท่ากรดซัลฟิวริก แต่จะได้เกลือฟอสเฟตซึ่งเมื่อใช้ตัวแรงปฏิกิริยาโพแทสเซียมจะได้เกลือโพแทสเซียมฟอสเฟต รวมถึงกรดไขมันอิสระซึ่งมีคุณสมบัติไม่ละลายในกลีเซอรอลและไม่มีอิมัลซิฟายเออร์ (เช่น สบู่) เป็นตัวกลางก็จะแยกชั้นลอยขึ้นด้านบน รวมทั้งเอสเทอร์และกลีเซอไรด์อื่น ๆ

จะแยกชั้นออกมาด้วย สารอินทรีย์ที่แยกออกมาสามารถนำกลับไปผลิตเป็นไบโอดีเซลได้ใหม่ด้วย ปฏิกิริยา ทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน



2.6 การออกแบบการทดลอง

การออกแบบการทดลอง (Design and Analysis of Experiment, DOE) เป็นเทคนิคทางสถิติขั้นสูงที่ใช้ในการปรับค่าสภาวะของกระบวนการเพื่อให้ได้ผลตอบสนองเป็นไปตามที่เราต้องการซึ่งข้อแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดระหว่างวิธีการโดยทั่วไปกับเทคนิคของการออกแบบการทดลอง คือวิธีการโดยทั่วไปมักเป็นการทดลองแบบลองผิดลองถูก หรือใช้การทดลองปรับตั้งค่ากระบวนการทีละค่า (One Factor at a Time, OFAT) จะให้ผลตอบสนองเข้าสู่จุดมุ่งหมายที่ต้องการได้ช้ามาก และสิ้นเปลืองทรัพยากรในการวิเคราะห์รวมถึงต้องเก็บข้อมูลมาก และยังไม่เหมาะสมอย่างยิ่งกับกระบวนการที่มีอันตรกิริยาระหว่างตัวแปรของกระบวนการด้วยตัวเอง [36]

2.6.1 ขั้นตอนการออกแบบการทดลอง

การใช้หลักการสถิติในการออกแบบ และวิเคราะห์การทดลองเป็นสิ่งที่จำเป็นที่ผู้ทำการทดลองต้องมีความเข้าใจวิธีการเก็บข้อมูลตลอดจนการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้มา ซึ่งขั้นตอนของการออกแบบการทดลอง [36] สามารถสรุปได้ดังนี้

2.6.1.1 การนิยามปัญหา (Statement of the Problem) เป็นการระบุว่าความต้องการในการผลิตคืออะไร และต้องการรู้อะไรบ้างในการผลิต ซึ่งการนิยามปัญหานี้จะเกี่ยวข้องไปถึงวัตถุประสงค์ของการทดลอง

2.6.1.2 การเลือกปัจจัย และระดับของปัจจัย (Choice of Factors, Levels and Ranges) เป็นการใช้หลักการทางทฤษฎี และประสบการณ์จากงานวิจัยต่าง ๆ เพื่อระบุว่าปัจจัยใดบ้างที่น่าจะมีผลต่อการทดลอง และในแต่ละปัจจัยนั้นควรจะมีช่วงในการทดลองอย่างไร (Range)

การกำหนดระดับของปัจจัยสามารถแบ่งได้ 3 แบบดังนี้

1) แบบกำหนด (Fixed Effect) หมายถึงระดับของปัจจัยที่สามารถควบคุมหรือกำหนดค่าได้แน่นอนโดยผู้ทดลองกำหนดเอง

2) แบบสุ่ม (Random Effect) หมายถึงระดับของปัจจัยที่ไม่สามารถควบคุมหรือกำหนดค่าของปัจจัยได้แน่นอน ซึ่งผลการทดลองที่ได้จะเป็นตัวแทนของทั้งปัจจัยมิได้เป็นตัวแทนของระดับใดระดับหนึ่ง

3) แบบผสม (Mixed Effect) หมายถึงการผสมผสานระดับของปัจจัยที่เป็นทั้งแบบกำหนดและแบบสุ่มรวมกัน

2.6.1.3 การเลือกตัวแปรตอบสนอง (Selection of the Response Variable) ในการเลือกตัวแปรตอบสนอง ผู้วิจัยจะต้องเลือกตัวแปรที่สามารถให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการศึกษา และการวัดค่านั้นจะต้องมีความแม่นยำ และถูกต้อง ซึ่งหมายถึงเครื่องมือวัดจะต้องมีความแม่นยำ และถูกต้องด้วย

2.6.1.4 การเลือกแบบการทดลอง (Choice of Experimental Design) เมื่อกำหนด ทรีทเมนต์ (Treatment) และตัวแปรตอบสนอง (Response Variables) แล้ว ต้องทำการตัดสินใจ เกี่ยวกับขนาดของการทดลองซึ่งหมายถึง จำนวนซ้ำของการทดลอง (Replicate) ความเหมาะสมของ ลำดับในการทดลองข้อจำกัดในการสุ่ม (Randomization) และการบล็อก (Blocking) ที่เกี่ยวข้อง ทั้งนี้ ต้องนำมาเกี่ยวข้องกันในด้านความเสี่ยง และต้นทุนที่ใช้ในการทดลอง

2.6.1.5 การดำเนินการทดลอง (Performing the Experiment) ในระหว่าง การดำเนินการทดลองผู้วิจัยจะต้องศึกษาดูแลอย่างใกล้ชิด ปฏิบัติตามหลักการที่ได้ออกแบบไว้ ข้อควรระวัง ในขณะที่ทำการทดลอง คือความถูกต้องของเครื่องมือวัด และความสม่ำเสมอในการทดลองเพื่อให้เกิด ความคลาดเคลื่อนน้อยที่สุด ซึ่งจะมีเทคนิคแตกต่างกันไปในแต่ละสาขาวิจัย

2.6.1.6 การวิเคราะห์ข้อมูล (Statistical Analysis of Data) ในการวิเคราะห์ข้อมูล จะใช้ความรู้ทางด้านสถิติเข้ามาวิเคราะห์ และสรุปผลรวมทั้งตัดสินความถูกต้องของข้อมูลที่เกิดขึ้น ก่อนที่จะตีความข้อมูล และวิธีการทางสถิติไม่สามารถบอกได้ว่าปัจจัยมีผล (Effect) เท่าใดแน่นอน แต่ เป็นเพียงเครื่องมือที่ให้แนวทางในการวิเคราะห์ภายใต้ช่วงของความเชื่อมั่นในการสรุปผล

2.6.1.7 การสรุปผลและข้อเสนอแนะ (Conclusions and Recommendations) เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลแล้วจะต้องสรุปผลการวิเคราะห์ อาจแสดงในรูปกราฟ ตาราง แผนภูมิ ฯลฯ และให้ข้อเสนอแนะเพื่อปรับปรุงกระบวนการผลิตให้ดีขึ้น เมื่อสรุปผลแล้วควรมีการทดสอบเพื่อยืนยัน ผลจากการทดลองอีกครั้งหนึ่ง [36]

2.6.2 ส่วนประกอบต่าง ๆ ของการทดลอง

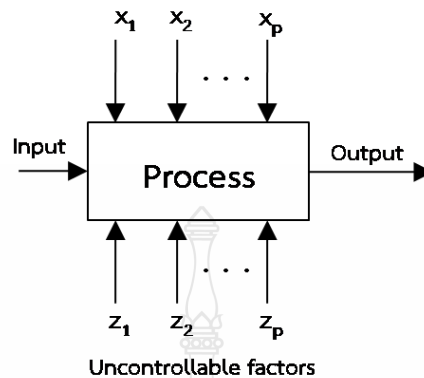
2.6.2.1 วิธีปฏิบัติหรือทรีทเมนต์ (Treatment) คือสิ่งหรือวิธีที่ผู้ดำเนินการทดลอง ปฏิบัติต่อสิ่งทดลองเพื่อวัดผลเปรียบเทียบตามวัตถุประสงค์ของการทดลอง

2.6.2.2 ปัจจัย (Factor) หมายถึงสิ่งที่คิดว่ามีผลต่อตัวแปรตอบสนอง และนำมา พิจารณาในการทดลอง ปัจจัยอาจมีลักษณะเป็นเชิงคุณภาพหรือเชิงปริมาณก็ได้ กลุ่มของทรีทเมนต์ ทั้งหลายที่มีความเกี่ยวข้องกัน (A Particular Class of Related Treatment) อาจใช้คำว่าตัวแปร อิสระแทนก็ได้ โดยปัจจัยแสดงดังรูปที่ 2.9 สามารถแบ่งออกได้เป็น

1) ปัจจัยที่ควบคุมได้ (Controllable Factors) หมายถึงปัจจัยที่สามารถ กำหนดค่าของปัจจัยนั้นได้ในการดำเนินการทดลอง ซึ่งเป็นผลดีต่อการทดลองเพราะโดยส่วนใหญ่ผู้ทำ การทดลองต้องการกำหนดค่าต่าง ๆ ที่คิดว่ามีตอบสนองที่สนใจ

2) ปัจจัยที่ไม่สามารถควบคุมได้ (Uncontrollable Factors) หมายถึงปัจจัย ที่ไม่สามารถกำหนดค่าของปัจจัยได้ อาจเนื่องมาจากมีข้อจำกัดทางด้านเทคโนโลยี และต้นทุน แบ่ง ออกเป็น ตัวแปรรบกวน (Noise Variable หรือ Background Variable) หมายถึงตัวแปรที่มีผลต่อตัว

แปรตอบสนอง (Response Variable) และ Nuisance Variable คือตัวแปรที่มีผลต่อตัวแปรตอบสนอง แต่เราไม่ทราบมาก่อน สามารถกำจัดอิทธิพลได้โดยการสุ่ม



รูปที่ 2.9 ปัจจัยและพารามิเตอร์ของกระบวนการ

ที่มา: Montgomery (2012) [36]

2.6.2.3 ตัวแปรตอบสนอง (Response Variable) คือ ตัวแปรที่ถูกสังเกตหรือวัดค่าในการทดลอง หรือเรียกอีกอย่างว่าตัวแปรตาม ซึ่งเป็นตัวแปรที่สะท้อนให้เห็นถึงอิทธิพลของตัวแปรอิสระในการทดลองหนึ่งๆ อาจวัดค่าตัวแปรตามมากกว่า 1 ก็ได้ การเลือกตัวแปรตามที่ดีควรพิจารณาจากความไว (Sensitivity) ความเชื่อถือได้ (Reliability) การแจกแจงของตัวแปร และความเป็นไปได้ในทางปฏิบัติ นอกจากนี้ในการเลือกตัวแปรตามจะต้องพิจารณาว่าค่าสังเกตที่ได้จากทรีทเมนต์หนึ่งๆ ควรมีการแจกแจงแบบปกติโดยประมาณ ซึ่งข้อสมมติในเรื่องความเป็นปกติ (Normality) นี้เป็นสิ่งจำเป็นในการออกแบบการทดลอง ซึ่งอาจจะใช้การแปลงข้อมูล (Transformation) ค่าสังเกตที่มีการแจกแจงไม่ปกติเป็นแบบปกติได้ [37]

2.6.3 หลักการพื้นฐาน 3 ประการ สำหรับการออกแบบการทดลอง คือ

2.6.3.1 การทดลองซ้ำ (Replication) คือทำให้การทดลองสามารถหาค่าประมาณความผิดพลาดในการทดลองได้ และถ้าค่าเฉลี่ยถูกนำมาใช้เพื่อประมาณผลที่เกิดจากปัจจัยหนึ่ง การทดลองซ้ำทำให้ผู้ทดลองสามารถหาตัวประมาณที่ถูกต้องยิ่งขึ้นในการประมาณผลกระทบนี้

2.6.3.2 การทำแบบสุ่ม (Randomization) คือการทดลองที่มีทั้งวัสดุที่ใช้ในการทดลอง และลำดับของการทดลองแต่ละครั้งเป็นแบบสุ่ม วิธีการเชิงสถิติกำหนดว่าข้อมูลจะต้องเป็นปัจจัยแบบสุ่มที่กระจายแบบอิสระ การสุ่มการทดลองทำให้สามารถลดผลของปัจจัยภายนอกที่อาจปรากฏในการทดลองได้ วัตถุประสงค์เพื่อจัดอคติหรือความเอนเอียงของผู้ทดลอง และเพื่อให้แน่ใจได้ว่าทรีทเมนต์ต่าง ๆ จะไม่ได้เปรียบ และเสียเปรียบกันในเรื่องที่เกี่ยวกับการทดลอง รวมถึงการวิเคราะห์และทดสอบทางสถิติ มีข้อกำหนดว่าความคลาดเคลื่อน (Error) จะต้องเกิดขึ้นโดยสุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน และช่วยจัดหรือเฉลี่ยความผันแปรภายนอกที่ควบคุมไม่ได้ให้เกิดขึ้นกับหน่วยทดลองด้วยโอกาสเท่า ๆ กัน

2.6.3.3 การจัดกลุ่มแบบบล็อก (Blocking) เป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับเพิ่มความเที่ยงตรงให้แก่การทดลอง [36]

2.7 วิธีการพื้นผิวตอบสนอง

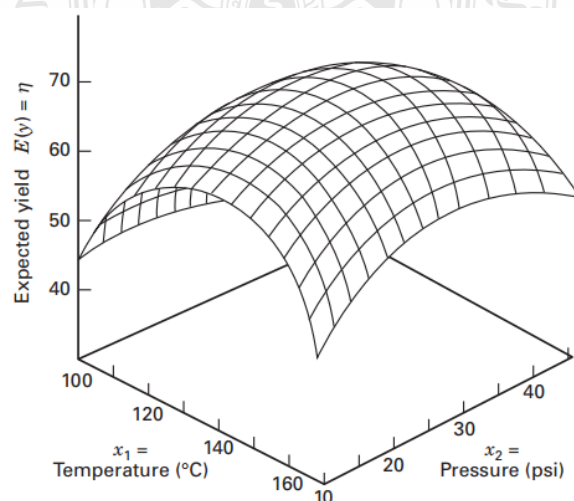
วิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM) เป็นวิธีการรวบรวมเอาเทคนิคทั้งทางคณิตศาสตร์ และทางสถิติที่มีประโยชน์ต่อการสร้างแบบจำลอง และการวิเคราะห์ปัญหา โดยที่ผลตอบสนองที่เราสนใจขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย และผู้ทดลองมีวัตถุประสงค์ที่จะหาค่าที่ดีที่สุดที่เหมาะสมของผลตอบสนองนี้ เช่น ผลตอบสนอง y เป็นฟังก์ชันของ x_1 และ x_2 ดังนั้นจะสามารถเขียนในรูปแบบสมการ 2.8 [36]

$$\eta = f(x_1, x_2) + \varepsilon \quad (2.8)$$

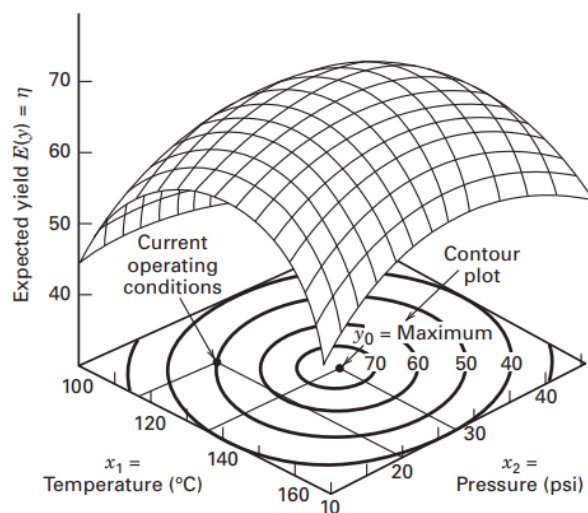
เมื่อ ε คือค่าความผิดพลาดของผลตอบแทน y ที่มีผลมาจากการทดลอง ถ้าเรากำหนดว่า $E(y) = f(x_1, x_2) = \eta$ ดังนั้นสามารถเขียนสมการพื้นผิวได้ดังสมการ 2.9

$$\eta = f(x_1, x_2) \quad (2.9)$$

โดยมากแล้วจะแสดงพื้นผิวตอบสนองในรูปของกราฟิก ดังรูปที่ 2.10 ซึ่ง η จะถูกพล็อตกับระดับของ x_1 และ x_2 เพื่อช่วยให้มองเห็นรูปร่างของพื้นที่ผิวตอบสนองได้ดีขึ้น ซึ่งการพล็อตเส้นโครงร่าง (Contour Plot) ของพื้นผิวตอบสนองในการสร้างนี้เส้นที่มีค่าของผลตอบสนองคงที่จะถูกวาดอยู่บนระนาบ x_1 และ x_2 เส้นโครงร่างแต่ละเส้นจะมีความสูงของพื้นผิวตอบสนองที่เท่ากันค่าหนึ่ง ดังรูปที่ 2.11 [36]



รูปที่ 2.10 พื้นผิวตอบสนองแบบสามมิติ
ที่มา: Montgomery (2012) [36]



รูปที่ 2.11 เส้นโครงร่างของพื้นผิวตอบสนอง
ที่มา: Montgomery (2012) [36]

ในปัญหาเกี่ยวกับพื้นที่ผิวตอบสนองส่วนมากมักจะไม่นิยามความสัมพันธ์ระหว่างผลตอบสนอง และตัวแปรอิสระ ดังนั้นขั้นแรกผู้ทดลองต้องหาตัวประมาณที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นตัวแทนสำหรับแสดงความสัมพันธ์ที่แท้จริงระหว่าง y และกลุ่มของตัวแปรอิสระ ซึ่งตามปกติแล้วใช้ฟังก์ชันพหุนามที่มีกำลังต่ำ ๆ อยู่ภายใต้อาณาเขตบางส่วนของตัวแปรอิสระ ถ้าแบบจำลองของผลตอบสนองมีความสัมพันธ์แบบเชิงเส้นกับตัวแปรอิสระ ฟังก์ชันที่ใช้ในการประมาณความสัมพันธ์นี้ คือแบบจำลอง First-Order Model ดังสมการ 2.10 [36]

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k + \epsilon \quad (2.10)$$

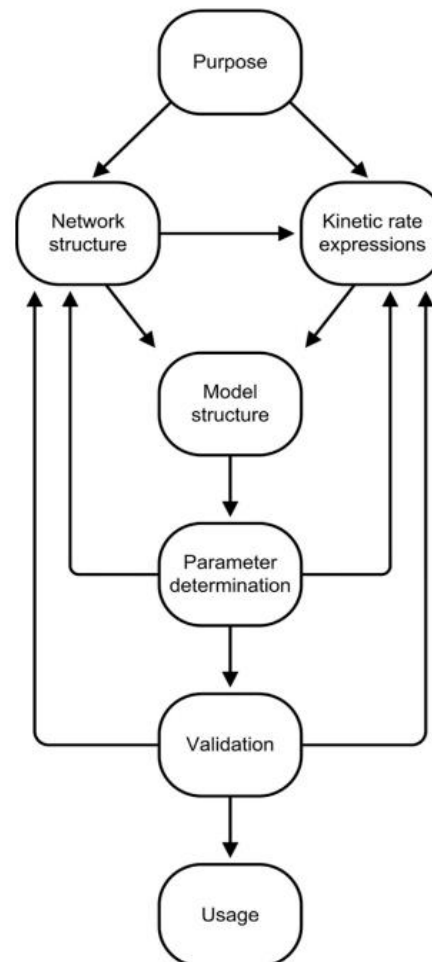
กรณีมีส่วนโค้งเข้ามาเกี่ยวข้องในระบบ จะใช้ฟังก์ชันพหุนามที่มีกำลังสูงขึ้น เช่นแบบจำลองแบบ Second-Order Model ดังสมการ 2.11 [36]

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j + \epsilon \quad (2.11)$$

2.8 แบบจำลองจลนพลศาสตร์

แบบจำลองจลนพลศาสตร์ (Kinetic Modeling) มีวัตถุประสงค์เพื่อจำลองแบบระบบชีวภาพ โดยเป็นวิธีการรวบรวม จัดระเบียบ และการเป็นตัวกำหนดความรู้และทดสอบสมมติฐานของการทดลองแบบจำลองสามารถอธิบายพฤติกรรมของกระบวนการด้วยนิยามทางคณิตศาสตร์ เพื่อให้เข้าใจสามารถเข้าใจการทำงานของระบบทางชีวภาพได้มากขึ้นซึ่งมีความสำคัญต่องานวิจัยด้านเทคโนโลยีชีวภาพ

อุตสาหกรรม เช่น สามารถใช้ในการทำนายเกี่ยวกับผลกระทบของพันธุวิศวกรรม การปรับปรุงการทำงานของเอนไซม์ และสำหรับปรับการออกแบบและสภาวะการทดลองของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพหรือกระบวนการหมักให้มีความเหมาะสม หรือการพิจารณารายละเอียดของการให้อาหารแบบกึ่งกะ (Fed-Batch Fermentation) เป็นต้น ดังรูปที่ 2.12 แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ประกอบด้วยโครงสร้างเครือข่าย ตัวแปรที่ต้องการแสดงออกและปัจจัยที่เกี่ยวข้อง [37]



รูปที่ 2.12 ขั้นตอนหลักของกระบวนการสร้างแบบจำลองจลนพลศาสตร์
ที่มา: Almquist และคณะ (2014) [37]

2.9 กระบวนการหมักแบบกะซ้ำ

การหมักแบบกะซ้ำหรือ Repeated Batch Fermentation (RBF) เป็นการพัฒนาการของวิธีที่มีอยู่ และเป็นทางเลือกสำหรับการเพาะเลี้ยง โดยอาหารเพาะเลี้ยงจะถูกถ่ายออกและมีอาหารใหม่กลับเข้าสู่ระบบการหมักเป็นระยะหรือซ้ำ ๆ โดยไม่ต้องเปลี่ยนอาหารที่มีอยู่ ข้อดีของการหมักแบบ RBF คือ ลดเวลาของกระบวนการหมัก และลดการใช้กล้าเชื้อ (Inoculum) อีกทั้ง RBF ได้รับการแสดงเพื่อปรับปรุงผลผลิตของการหมักจุลินทรีย์ เนื่องจากต้องใช้เวลาน้อยลงในการล้างและฆ่าเชื้อเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ [38]

2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กลีเซอรอลเป็นสารประกอบทางเคมีที่มีการใช้งานหลากหลายในด้านเภสัชกรรม เทคโนโลยีชีวภาพ เครื่องสำอางและอุตสาหกรรมอาหาร เป็นวัตถุดิบทดแทนที่สำคัญและผลิตภัณฑ์ร่วมในอุตสาหกรรมการผลิตไบโอดีเซลขนาดใหญ่ ความต้องการพลังงานเชื้อเพลิงอย่างต่อเนื่องส่งผลให้มีการใช้น้ำมันดิบในการผลิตไบโอดีเซลมากขึ้น พลังงานชีวภาพจากไบโอดีเซลถือเป็นทางเลือกที่เหมาะสมสำหรับปิโตรเลียมเพราะมีคุณสมบัติของไบโอดีเซลที่คล้ายคลึงกัน การผลิตไบโอดีเซลเกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน (Transesterification) ของไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) ในน้ำมันจากพืชหรือสัตว์ทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์สายสั้น เช่น เมทานอลหรือการเร่งปฏิกิริยาด้วยเบส กระบวนการนี้จะเกิดการสร้างกลีเซอรอลดิบในปริมาณมากประมาณ 100 กิโลกรัมของน้ำมันกลีเซอรอลดิบที่ผลิตได้ทุก ๆ 1 ตันของน้ำมันไบโอดีเซล [9] โดยจากการรายงานของ Hajek และ Skopal ในปี 2010 พบว่ากลีเซอรอลดิบยังมีการปนเปื้อนของเกลือ สบู่ แอลกอฮอล์และสี ที่เกิดจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล [39] ทำให้ Manosak และคณะ ในปี 2011 มีการศึกษาการทำให้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ ด้วยวิธีการทางเคมีและกายภาพ เช่น การปรับให้เป็นกรด หรือการสกัดด้วยตัวทำละลาย เป็นต้น [40] เนื่องจากสายพันธุ์จุลินทรีย์สามารถเจริญจากความเข้มข้นกลีเซอรอลที่ต่างกัน [41] ทำให้การหาแหล่งวัตถุดิบสำหรับผลิตน้ำมันจุลินทรีย์ (Microbial Oil) จากกลีเซอรอลดิบเป็นวัตถุดิบที่มีความน่าสนใจ เนื่องจากเป็นผลพลอยได้จากการผลิตไบโอดีเซลที่มีต้นทุนต่ำ ทั้งนี้ยังมีอุตสาหกรรมอื่น ๆ ที่มีผลิตกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ ได้แก่ อุตสาหกรรมปิโตรเคมีและอุตสาหกรรมสบู่ ปัจจุบันการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการนำกลีเซอรอลดิบไปประยุกต์ใช้มีมากขึ้น [6]

ในปี 2012 Cui และคณะ [42] ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำมันของ *Cryptococcus curvatus* ด้วยกลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล โดยใช้แผนการทดลองแบบ Box-Behnken design และกระบวนการพื้นผิวตอบสนอง การทดลองพบว่าอุณหภูมิ 30.2 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดต่าง 6.0 และความเข้มข้นกลีเซอรอล 9.8 กรัมต่อลิตร เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำมัน สามารถผลิตชีวมวลยีสต์ได้ 7.11 กรัมต่อลิตร และการสะสมน้ำมันภายในเซลล์ 38.53 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักชีวมวลแห้ง

ในปี 2016 Mathiazhakan และคณะ [6] ศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ของการผลิตน้ำมันด้วยยีสต์ *Yarrowia lipolytica* SKY7 ภายในถังหมักขนาด 15 ลิตร พบว่าการผลิตน้ำมันสูงสุดเมื่อใช้ความเข้มข้นกลีเซอรอลเท่ากับ 85.5 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนของมวลโมเลกุลระหว่างคาร์บอนกับไนโตรเจนเท่ากับ 75 และปริมาณกล้ำเชื้อเท่ากับ 6.25 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ทำให้ชีวมวลยีสต์และปริมาณน้ำมันเท่ากับ 29.5 กรัมต่อลิตร และ 51.39 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักชีวมวลแห้ง ตามลำดับ

ในปี 2017 Saran และคณะ [3] ศึกษาการผลิตน้ำมันจุลินทรีย์จากยีสต์ *Rhodospiridium toruloides* A29 พบว่าปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตน้ำมัน คือปริมาณยีสต์สกัด ปริมาณกลูโคส ปริมาณโซเดียมไนเตรท และปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต เท่ากับ 2.5 2.75 0.5 และ 75 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อนำสภาวะที่เหมาะสมมาทำการเพาะเลี้ยงภายในถังหมักขนาด 30 ลิตร สามารถให้ชีวมวลยีสต์และปริมาณน้ำมันเท่ากับ 14.0 กรัมต่อลิตร และ 42.86 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักชีวมวลแห้ง ตามลำดับ นอกจากนี้ Saran และคณะ ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำมันที่เกี่ยวข้อง

กับปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่ออิทธิพล ด้วยวิธีการออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman design (PBD) ด้วยการกระบวนการทางคณิตศาสตร์ มาประยุกต์ใช้เพื่อลดระยะเวลาการทดลอง และประหยัดค่าใช้จ่าย อย่างไรก็ตามควรมีการวิเคราะห์ด้านเทคโนโลยีและความคุ้มค่าด้านเศรษฐศาสตร์ (Techno-Economic Analysis) เพื่อปรับปรุงกระบวนการผลิตน้ำมัน [43] ในปี 2016 Polburee และคณะ ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ความเข้มข้นสูง (High Cell Density) พบว่ายีสต์ *R. fluviale* DMKU-RK253 ที่มีคุณสมบัติในการผลิตน้ำมันสำหรับผลิตไบโอดีเซลโดยใช้กลีเซอรอลดิบเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนและเจริญในสถานะที่แหล่งไนโตรเจนจำกัด พบว่าสามารถผลิตชีวมวลยีสต์ ปริมาณน้ำมัน และการสะสมน้ำมันภายในเซลล์เท่ากับ 22.93 กรัมต่อลิตร 15.98 กรัมต่อลิตร และ 69.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักชีวมวลแห้ง ตามลำดับ และจากการผลิตกรดไขมันคาร์บอน 18 ตัว แสดงให้เห็นถึงยีสต์มีการปรับตัวเมื่ออยู่ในสภาวะอุณหภูมิต่ำ ส่งผลให้กรดไขมันมีสายคาร์บอนที่ยาวขึ้น และเมื่อทำการเปรียบเทียบกรดไขมันที่ผลิตได้จาก European Standard EN 14214 เพื่อประเมินคุณภาพของน้ำมันในการเป็นน้ำมันไบโอดีเซล โดยน้ำมันที่มีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะเดี่ยว กรดไขมันอิ่มตัว และกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่สำหรับเป็นตัวบ่งชี้คุณภาพของน้ำมันไบโอดีเซล [8]

น้ำมันไบโอดีเซลที่เหมาะสมสำหรับใช้ในเครื่องยนต์ดีเซลนั้น ต้องมีคุณสมบัติที่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานตามที่กำหนด เช่น มาตรฐานของประเทศสหรัฐอเมริกา (ASTM D6751) และมาตรฐานของทวีปยุโรป (EN 14214) [13] อย่างไรก็ตามการวัดคุณสมบัติต่าง ๆ ของน้ำมันไบโอดีเซลนั้นต้องใช้เครื่องมือเฉพาะทาง และมีค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นจึงมีการสร้างสมการทางคณิตศาสตร์เพื่อใช้ในการประเมินคุณสมบัติของไบโอดีเซลในเบื้องต้นก่อนนำไปวัดตามวิธีมาตรฐาน (Standard Method) ต่อไปเพื่อประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย การประเมินหรือทำนายคุณสมบัติของไบโอดีเซลสามารถทำได้โดยการวัดปริมาณกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันหรือไขมันที่ผลิตได้ จากนั้นนำมาคำนวณด้วยสมการทางคณิตศาสตร์ [13, 30]

ในปี 2012 Ramírez-Verduzco และคณะ [30] ได้พัฒนาสมการที่ใช้ในการประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของไบโอดีเซลที่สัมพันธ์กับกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันนั้น ได้แก่ ค่าซีเทน (Cetane) ค่าความหนืดไคเนมาติกส์ (Kinematic Viscosity) ความหนาแน่น (Density) และค่าความร้อนสูง (Higher Heating Value) โดยค่าซีเทน ความหนืดไคเนมาติกส์ และค่าความร้อนสูงจะเพิ่มขึ้นตามน้ำหนักโมเลกุลของกรดไขมันในน้ำมัน แต่ค่าดังกล่าวจะลดลงเมื่อปริมาณของพันธะคู่ในกรดไขมันสูงขึ้น ในขณะที่ความหนาแน่นของไบโอดีเซลจะลดลงเมื่อน้ำหนักโมเลกุลของกรดไขมันเพิ่มขึ้น และความหนาแน่นจะเพิ่มขึ้นตามค่าความไม่อิ่มตัว (Degree of Unsaturation) ของกรดไขมัน

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

- 3.1.1 กระบอกตวง; Cylinder (Isolab, Germany)
- 3.1.2 กล่องเก็บไมโครทิวป์; Freezer storage rack (ExtraGene, Taiwan)
- 3.1.3 เข็มฉีดยา; Syringe and needle (Nipro, Thailand)
- 3.1.4 ขวดเตรียมสารละลาย; Laboratory bottle (Duran, Germany)
- 3.1.5 ขวดเก็บสารละลาย; Glass vials (National Scientific, USA)
- 3.1.6 ขวดปริมาตร; Volumetric flask (Favorit, Malaysia)
- 3.1.7 ขวดรูปชมพู่; Erlenmeyer flask (Pyrex, USA)
- 3.1.8 คีมคีบ; Forcep
- 3.1.9 เครื่องกวนสารละลาย (รุ่น MS-H-S, Dragon Lab, China)
- 3.1.10 เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปคโตรเมทรี; Gas Chromatograph-Mass Spectrometry (รุ่น QP2010 SE, Shimadzu, Japan)
- 3.1.11 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (รุ่น NB-205V, N-Biotek, Korea)
- 3.1.12 เครื่องชั่งไฟฟ้า (รุ่น PL3002, Mettler Toledo, Thailand)
- 3.1.13 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (รุ่น HVA-85, Hirayama, Japan)
- 3.1.14 เครื่องปั่นเหวี่ยง (รุ่น 3-18KS, Sigma, Germany)
- 3.1.15 เครื่องผสมสารละลาย (รุ่น G560E, Scientific Industries, America)
- 3.1.16 เครื่องระเหยแบบหมุน (รุ่น R-300, Buchi, Switzerland)
- 3.1.17 เครื่องล้างความถี่สูง (รุ่น GT-2227QTS, GT SONIC, China)
- 3.1.18 เครื่องวัดความหวาน (รุ่น RBX32A, Trans Instrument, Singapore)
- 3.1.19 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (รุ่น DR 6000, HACH, Germany)
- 3.1.20 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบถาด (รุ่น EZ Read 2000, Biochrom, USA)
- 3.1.21 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (รุ่น Starter 3100 pH Bench, OHAUS, USA)
- 3.1.22 จานเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดพลาสติก; Plastic petri dish (Hycon Plastics, Thailand)
- 3.1.23 ช้อนตักสาร; Spatula
- 3.1.24 ตะเกียงแอลกอฮอล์; Alcohol burner
- 3.1.25 ตู้แช่เยือกแข็ง; Freezer
- 3.1.26 ตู้ดูดความชื้น; Desiccator (Eureka, Taiwan)
- 3.1.27 ตู้ปลอดเชื้อ (รุ่น AC2, ESCO, USA)
- 3.1.28 ตู้เย็น; Refrigerator
- 3.1.29 ตู้อบลมร้อน (รุ่น FD Series, Binder, Germany)

- 3.1.30 ตัวกรองสำหรับกระบอกฉีดยา; Syringe filters (National Scientific, USA)
- 3.1.31 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (รุ่น MS-F1, Major Science, Taiwan)
- 3.1.32 ถุงมือ; Rubber glove (SriTrang, Thailand)
- 3.1.33 ที่วางไมโครทิวป์; Microtube rack
- 3.1.34 ที่วางหลอดทดลอง; Test tube rack
- 3.1.35 แท่งแก้วคนสาร; Stirring rod
- 3.1.36 แท่งแม่เหล็กคนสาร; Magnetic bar
- 3.1.37 ปีกเกอร์; Beaker (Pyrex, USA)
- 3.1.38 แผ่นสไลด์ พร้อมกระจกปิดสไลด์; Microscope slide and cover glass
- 3.1.39 ฝาเกลียวพร้อมตัวกัน; Caps and septum (National Scientific, USA)
- 3.1.40 ไมโครทิวป์; 2.0 mL Microtube (ExtraGene, Taiwan)
- 3.1.41 ไมโครปิเปต; Micropipette (รุ่น Pipetman, Gilson, USA)
- 3.1.42 ไมโครปิเปตทิป; Micropipette tip (รุ่น Diamond, Gilson, USA)
- 3.1.43 ไมโครเวลเพลทชนิด 96 ช่อง; Microwell plate (Thermo Scientific, China)
- 3.1.44 หลอดทดลองพร้อมฝาปิด; Test tube with cap (Pyrex, USA)
- 3.1.45 หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยง; Centrifuge tube (Corning, Mexico)
- 3.1.46 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ; Water bath (FALC, Italy)
- 3.1.47 อลูมิเนียมฟอยล์; Aluminium foil

3.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.2.1 Acetic acid; CH_3COOH (Ajax Finechem, Australia)
- 3.2.2 Acetone; $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ (VWR Chemicals BDH, France)
- 3.2.3 Acetylacetone; $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$ (Sigma Aldrich, Japan)
- 3.2.4 Agar (SRL, India)
- 3.2.5 Ammonium acetate; $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (Ajax Finechem, Australia)
- 3.2.6 Ammonium sulfate; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Ajax Finechem, Australia)
- 3.2.7 Chloroform; CHCl_3 (RCI Labscan, Thailand)
- 3.2.8 Disodium phosphate; NaH_2PO_4 (Ajax Finechem, Australia)
- 3.2.9 Ethanol; $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (Chemipan, Thailand)
- 3.2.10 Fatty acid methyl esters standard; FAME Mix (Restek, USA)
 - 3.2.10.1 Butanoic acid, methyl ester ($\text{C}_{4:0}$)
 - 3.2.10.2 Hexanoic acid, methyl ester ($\text{C}_{6:0}$)
 - 3.2.10.3 Octanoic acid, methyl ester ($\text{C}_{8:0}$)
 - 3.2.10.4 Decanoic acid, methyl ester ($\text{C}_{10:0}$)
 - 3.2.10.5 Undecanoic acid, methyl ester ($\text{C}_{11:0}$)

- 3.2.10.6 Dodecanoic acid, methyl ester ($C_{12:0}$)
- 3.2.10.7 Tridecanoic acid, methyl ester ($C_{13:0}$)
- 3.2.10.8 Methyl tetradecanoate ($C_{14:0}$)
- 3.2.10.9 Methyl myristoleate ($C_{14:1}$)
- 3.2.10.10 Pentadecanoic acid, methyl ester ($C_{15:0}$)
- 3.2.10.11 Methyl pentadecanoate ($C_{15:1}$)
- 3.2.10.12 Hexadecanoic acid, methyl ester ($C_{16:0}$)
- 3.2.10.13 9-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)- ($C_{16:1}$)
- 3.2.10.14 Heptadecanoic acid, methyl ester ($C_{17:0}$)
- 3.2.10.15 Methyl heptadecanoate ($C_{17:1}$)
- 3.2.10.16 Methyl stearate ($C_{18:0}$)
- 3.2.10.17 9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester ($C_{18:1n9c}$)
- 3.2.10.18 Methyl octadecenoate ($C_{18:1n9t}$)
- 3.2.10.19 Methyl linoleate ($C_{18:2n6c}$)
- 3.2.10.20 Methyl linolelaidate ($C_{18:2n6t}$)
- 3.2.10.21 Methyl linolenate ($C_{18:3n6}$)
- 3.2.10.22 Methyl linolenate ($C_{18:3n3}$)
- 3.2.10.23 Eicosanoic acid, methyl ester ($C_{20:0}$)
- 3.2.10.24 cis-Methyl 11-eicosenoate ($C_{20:1}$)
- 3.2.10.25 11,14-Eicosadienoic acid, methyl ester ($C_{20:2}$)
- 3.2.10.26 Methyl eicosatrienoate ($C_{20:3n6}$)
- 3.2.10.27 Methyl arachidonate ($C_{20:4n6}$)
- 3.2.10.28 Methyl heneicosanate ($C_{21:0}$)
- 3.2.10.29 Methyl eicosatrienoate ($C_{20:3n3}$)
- 3.2.10.30 5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid, methyl ester, (all-Z)- ($C_{20:5n3}$)
- 3.2.10.31 Docosanoic acid, methyl ester ($C_{22:2}$)
- 3.2.10.32 13-Docosenoic acid, methyl ester, (Z)- ($C_{22:1n9}$)
- 3.2.10.33 Methyl docosadienoate ($C_{22:2}$)
- 3.2.10.34 Tricosanoic acid, methyl ester ($C_{23:0}$)
- 3.2.10.35 Tetracosanoic acid, methyl ester ($C_{24:0}$)
- 3.2.10.36 15-Tetracosenoic acid, methyl ester, (Z)- ($C_{24:1}$)
- 3.2.10.37 4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid, methyl ester, (all-Z)- ($C_{22:6n9}$)
- 3.2.11 Glucose; $C_5H_{12}O_6$ (SRL, India)
- 3.2.12 Glycerol; $C_3H_8O_3$ (QRëC, New Zealand)

- 3.2.13 Heptadecanoic acid (Sigma Aldrich, Japan)
- 3.2.14 Hexane; C_6H_{14} (KemAus, Australia)
- 3.2.15 Hydrochloric acid; HCl (QRëC, New Zealand)
- 3.2.16 Malt extract (SRL, India)
- 3.2.17 Magnesium sulfate; $MgSO_4$ (Ajax Finechem, Australia)
- 3.2.18 Methanol; CH_3OH (VWR Chemicals BDH, France)
- 3.2.19 Peptone (SRL, India)
- 3.2.20 Phosphoric acid; H_3PO_4 (QRëC, New Zealand)
- 3.2.21 Potassium dihydrogen orthophosphate; KH_2PO_4 (SRL, India)
- 3.2.22 Potassium hydroxide; KOH (Ajax Finechem, Australia)
- 3.2.23 Sodium chloride; NaCl (Ajax Finechem, Australia)
- 3.2.24 Sodium hydroxide; NaOH (Ajax Finechem, Australia)
- 3.2.25 Sodium periodate; $NaIO_4$ (Ajax Finechem, Australia)
- 3.2.26 Sulfuric acid; H_2SO_4 (Ajax Finechem, Australia)
- 3.2.27 Yeast extract (iYeast, Japan)

3.3 สายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในการศึกษา

Pseudozyma parantarctica CHC28 [5]

3.4 กลีเซอรอลดิบที่ใช้ในการศึกษา

กลีเซอรอลดิบซึ่งเป็นผลพลอยได้ของกระบวนการผลิตน้ำมันไบโอดีเซล (Biodiesel-Derived Crude Glycerol, BDCG) ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท ซีพีเอฟ (ประเทศไทย) จำกัด สำนักงานไก่กระทรงบวงจร อำเภอแก่งคอย จังหวัดสระบุรี

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การเก็บรักษายีสต์ และการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อ

นำยีสต์ *P. parantarctica* CHC28 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YM Agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อเชื้อ 1 ลูบ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM Broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อยีสต์ที่ได้ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร ลงในหลอดไมโครทิวป์ (Microtube) ขนาด 2.0 มิลลิลิตร ดูดสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ลงไป 0.2 มิลลิลิตร ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส สำหรับใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในการทดลอง

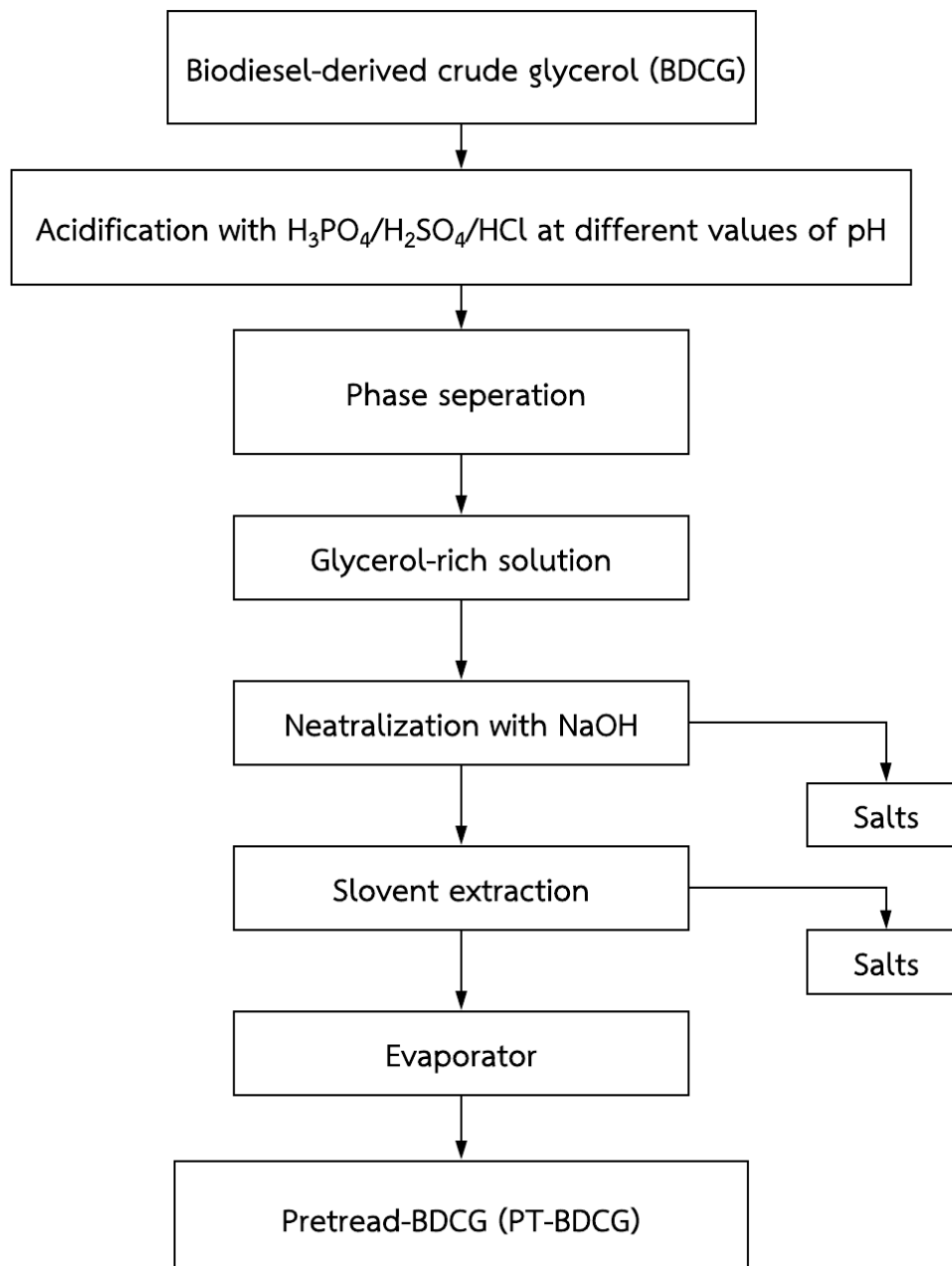
3.5.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการปรับสภาพกลีเซอรอลเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงยีสต์น้ำมัน *P. parantarctica* CHC28

3.5.2.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการปรับสภาพกลีเซอรอลด้วยวิธีการปรับให้เป็นกรด (Acidification)

นำ BDCG ที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร มาปรับด้วยกรด (X_1) จนได้ความเป็นกรดต่าง (X_2) ที่ต้องการ (ตารางที่ 3.1) ผสมให้เข้ากันด้วยแท่งแม่เหล็กกวนสารเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge Tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 12 ชั่วโมง กลีเซอรอลดิบจะเกิดการแยกชั้น โดยชั้นบนเป็นชั้นของกรดไขมัน ชั้นกลางเป็นกลีเซอรอล และชั้นล่างสุดเป็นตะกอนของเกลือ (Inorganic Salt) จากนั้นนำกลีเซอรอลในชั้นกลางมาปรับความเป็นกรดต่างให้เท่ากับ 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide; NaOH) ความเข้มข้น 10 โมลาร์ จากนั้นเติมเอทานอลลงไปในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แยกส่วนใสที่ได้ไประเหยเอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Vacuum Evaporator) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จนได้สารละลายกลีเซอรอลปริมาตรเท่าเดิม ดังรูปที่ 3.1 นำกลีเซอรอลที่ปรับสภาพแล้ว (Pretreated-Biodiesel Derived Crude Glycerol, PT-BDCG) มาวิเคราะห์หาความเข้มข้นกลีเซอรอล (Glycerol Concentration; Y) โดยปัจจัยและระดับของปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง แสดงดังตารางที่ 3.1 และการวางแผนการทดลองแบบ 3^2 Full Factorial Design แสดงดังตารางที่ 3.2 นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้วิธี Regression Analysis เพื่อหาความสัมพันธ์ของปัจจัยทั้ง 2 ชนิดกับความเข้มข้นของกลีเซอรอล นำสภาวะที่เหมาะสมมาปรับสภาพกลีเซอรอลเพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของอาหารเพาะเลี้ยงยีสต์น้ำมันในการทดลองขั้นถัดไป

ตารางที่ 3.1 ปัจจัยและระดับของปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาการปรับสภาพ BDCG ด้วยแผนการทดลองแบบ 3^2 Full Factorial Design

ปัจจัย	สัญลักษณ์	ระดับของการทดลอง		
		ต่ำสุด (-1)	กลาง (0)	สูงสุด (+1)
ชนิดของกรด	X_1	H ₃ PO ₄	H ₂ SO ₄	HCl
ความเป็นกรดต่าง	X_2	1.0	3.5	6.0



รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการปรับสภาพ BDCG

ตารางที่ 3.2 แผนการทดลองแบบ 3^2 Full Factorial Design

การทดลอง	ระดับของการทดลอง	
	ชนิดของกรด (X_1)	ความเป็นกรดต่าง (X_2)
1	H ₂ SO ₄	1.0
2	HCl	1.0
3	H ₃ PO ₄	1.0
4	H ₂ SO ₄	3.5
5	HCl	3.5
6	H ₃ PO ₄	3.5
7	H ₂ SO ₄	6.0
8	HCl	6.0
9	H ₃ PO ₄	6.0
10	HCl	3.5
11	HCl	3.5

3.5.2.2 การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ PT-BDCG เป็นแหล่งคาร์บอนในเพาะเลี้ยงยีสต์น้ำมัน

ถ่ายเชื้อยีสต์ตั้งต้น *P. parantarctica* CHC28 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ Glycerol-YM broth (GYM) [8] ซึ่งมีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อยีสต์ที่ได้ลงในอาหาร Glycerol-Seed Medium (GSM) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเพาะเลี้ยงที่สภาวะเดิม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อยีสต์ลงในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงแยกส่วนใสและเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนเซลล์มาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ผสมให้เข้ากันแล้วถ่ายกล้าเชื้อยีสต์ลงในอาหารผลิตน้ำมัน (Oil Production Medium) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่ใช้ PT-BDCG จากการทดลอง 3.5.2.1 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันความเข้มข้นของ PT-BDCG ที่ 50 หรือ 70 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ชีวมวลยีสต์ ปริมาณน้ำมัน และความเข้มข้นของกลีเซอรอล

3.5.3 การคัดเลือกปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตน้ำมันของ *P. parantarctica* CHC28 ด้วย PT-BDCG ในระดับพลาซกด้วย Plackett-Burman design

ถ่ายเชื้อยีสต์ตั้งต้น *P. parantarctica* CHC28 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ GYM [8] ซึ่งมี PT-BDCG เป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อยีสต์ลงในอาหาร GSM [8] ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเพาะเลี้ยงที่สภาวะเดิมอีกครั้ง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อยีสต์ที่ได้ลงในอาหารผลิตน้ำมัน (Oil Production Medium) [8] ที่ใช้ PT-BDCG จากการทดลองข้างต้นเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก โดยแปรผันปัจจัยทางเคมีและทางกายภาพ ได้แก่ ความเข้มข้น กลีเซอรอล (X_1) ปริมาณ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (X_2) ปริมาณ KH_2PO_4 (X_3) ปริมาณ MgSO_4 (X_4) ปริมาณกล้าเชื้อ (X_5) อัตราการเขย่า (X_6) และอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง (X_7) ตามแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman design [44] (ตารางที่ 3.3 และ 3.4) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยทำการทดลองแบบ 2 ข้าง และเก็บตัวอย่างที่เวลา 72 ชั่วโมง มาวิเคราะห์ชีวมวลยีสต์ (Biomass, Y_1) ปริมาณน้ำมัน (Oil Concentration, Y_2) การสะสมน้ำมันภายในเซลล์ (Oil Content, Y_3) และอัตราการผลิตน้ำมัน (Oil Production Rate, Y_4) นำค่าที่ได้มาคำนวณค่าทางสถิติด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Design Expert version[®] 7.0 (Stat-Ease, USA) เพื่อศึกษาอิทธิพลของปัจจัยทั้งหมดต่อประสิทธิภาพการผลิตน้ำมันของยีสต์ *P. parantarctica* เมื่อใช้ PT-BDCG จากโรงงานอุตสาหกรรมเป็นวัตถุดิบ

ตารางที่ 3.3 ปัจจัยทางเคมี ปัจจัยทางกายภาพ และระดับของปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง

ปัจจัย	หน่วย	สัญลักษณ์	ระดับของการทดลอง	
			ต่ำสุด (-1)	สูงสุด (+1)
ความเข้มข้นกลีเซอรอล	กรัมต่อลิตร	X_1	10	50
ปริมาณ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	กรัมต่อลิตร	X_2	1	4
ปริมาณ KH_2PO_4	กรัมต่อลิตร	X_3	1	7
ปริมาณ MgSO_4	กรัมต่อลิตร	X_4	0	1.5
ปริมาณกล้าเชื้อ	เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร	X_5	2	10
อัตราการเขย่า	รอบต่อนาที	X_6	100	250
อุณหภูมิ	องศาเซลเซียส	X_7	25	35

ตารางที่ 3.4 แผนการทดลองแบบ Plackett-Burman design

การทดลอง	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	Dummy 1	Dummy 2	Dummy 3
1	50	4	1	1.5	10	250	25	-1	1	-1
2	10	4	7	0	10	250	35	-1	-1	1
3	50	1	7	1.5	2	250	35	-1	-1	-1
4	10	4	1	1.5	10	100	35	1	-1	-1
5	10	1	7	0	10	250	25	1	1	-1
6	10	1	1	1.5	2	250	35	1	1	1
7	50	1	1	0	10	100	35	-1	1	1
8	50	4	1	0	2	250	25	1	-1	1
9	50	4	7	0	2	100	35	1	1	-1
10	10	4	7	1.5	2	100	25	-1	1	1
11	50	1	7	1.5	10	100	25	1	-1	1
12	10	1	1	0	2	100	25	-1	-1	-1

X_1 คือ ความเข้มข้นกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร); X_2 คือ ปริมาณ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (กรัมต่อลิตร); X_3 คือ ปริมาณ KH_2PO_4 (กรัมต่อลิตร); X_4 คือ ปริมาณ MgSO_4 (กรัมต่อลิตร); X_5 คือ ปริมาณกล้าเชื้อ (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร); X_6 คือ อัตราการเขย่า (รอบต่อนาที); X_7 คือ อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)

3.5.4 การศึกษาระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์จาก PT-BDCG ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology)

เพาะเลี้ยงยีสต์น้ำมัน *P. parantarctica* CHC28 ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ โดยควบคุม อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อ ยีสต์น้ำมันที่ไถลงในอาหารที่แปรผันปัจจัยที่สำคัญจากการทดลองที่ผ่านมาในระดับต่าง ๆ โดยใช้วางแผนการทดลองแบบ Box-Behnken design [67] ดังตารางที่ 3.5 และ 3.6 จากนั้นทำการเก็บตัวอย่าง เป็นระยะ ๆ เป็นเวลา 6 วัน วิเคราะห์ชีวมวลยีสต์ และปริมาณน้ำมัน ทำการคำนวณค่าทางสถิติด้วย โปรแกรม Design Expert version 7.0 นำข้อมูลที่ได้มาสร้างแบบหุ่น (Model) ด้วยสมการ Second Order Polynomial Quadratic Equation ดังสมการ 3.1 นำสมการที่ได้มาทำนายสภาวะที่เหมาะสม ในการผลิตน้ำมันจากยีสต์ และนำสภาวะดังกล่าวมาทำการทดลองจริงเพื่อทวนสอบ (Validation) ผลการ ทดลองอีกครั้ง

ตารางที่ 3.5 ปัจจัยและระดับของปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาการผลิตน้ำมันของ *P. parantarctica* CHC28 ด้วยการวางแผนการทดลองแบบ Box-Behnken design

ปัจจัย	หน่วย	สัญลักษณ์	ระดับของการทดลอง		
			ต่ำสุด (-1)	กลาง (0)	สูงสุด (+1)
ความเข้มข้นกลีเซอรอล	กรัมต่อลิตร	X_1	10	50	90
ปริมาณ KH_2PO_4	กรัมต่อลิตร	X_2	0	3.5	7
อุณหภูมิ	องศาเซลเซียส	X_3	20	30	40

3.5.5 การทวนผลการทดลอง (Validation)

นำผลการทดลองที่ได้จากการทดลองจริงมาเปรียบเทียบกับผลการทดลองจากสมการ แล้วทดสอบค่า One Sample T-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรม SPSS version 15.0

$$Y = \sum_{i=1}^N \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^N \sum_{j>1}^N \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^N \beta_i X_i + \beta_0 \quad (3.1)$$

โดย $\sum_{i=1}^N$ คือ ผลรวมของสมการ Second Order Polynomial Quadratic equation
 Y คือ ค่าการตอบสนองจากการทำนาย (ตัวแปรตาม)
 X_i และ X_j คือ ค่าการตอบสนองจากการทำนาย (ตัวแปรอิสระ)

β_0	คือ จุดตัดแกน Y
β_i	คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเดียว
β_{ii}	คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของสมการกำลังสอง
β_{ij}	คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยความสัมพันธ์ของตัวแปร

เมื่อกำหนดให้ตัวแปรอิสระมีสัญลักษณ์เป็น X_1 , X_2 และ X_3 จะได้สมการ Second order polynomial quadratic equation ดังสมการ 3.2

$$Y = \sum \beta_{11} X_1^2 + \sum \beta_{22} X_2^2 + \sum \beta_{33} X_3^2 + \sum \beta_{12} X_1 X_2 + \sum \beta_{13} X_1 X_3 + \sum \beta_{23} X_2 X_3 + \sum \beta_1 X_1 + \sum \beta_2 X_2 + \sum \beta_3 X_3 + \beta_0 \quad (3.2)$$

3.5.6 การศึกษาการผลิตน้ำมันของยีสต์แบบขยายขนาดในถังหมักขนาด 5 ลิตร

นำสภาวะที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.5.5 มาเตรียมอาหารที่เหมาะสมโดยใช้ PT-BDCG เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงยีสต์น้ำมัน *P. parantarctica* CHC28 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงปริมาตร 2.7 ลิตร ถ่ายกล้าเชื้อปริมาณ 0.3 มิลลิลิตร ลงไป (รวมเป็นปริมาตร 3 ลิตร) ควบคุมอัตราการให้อากาศที่ 1.0 vvm และใช้อัตราการเขย่าเท่ากับ 200 รอบต่อนาที จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างระยะตลอดการทดลอง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักชีวมวลยีสต์แห้ง ปริมาณน้ำมันทั้งหมด และความเข้มข้นกลีเซอรอล

3.5.7 การศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ความเข้มข้นสูง (High Cell Density) ด้วยกระบวนการหมักแบบกะซ้ำ (Repeated Batch Fermentation)

3.5.7.1 การศึกษาการเพาะเลี้ยงยีสต์ด้วยการหมักแบบกะซ้ำในระดับฟ्लास्क

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ *P. parantarctica* CHC28 ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ Glycerol-YM broth ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อยีสต์ลงในอาหาร Seed Medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อยีสต์ลงในอาหารผลิตน้ำมัน (Oil Production Medium) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีกลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการเพาะเลี้ยงด้วยสภาวะเดิม เมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลในอาหารลดลงจะทำการหยุดกระบวนการหมัก จากนั้นถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อเดิมออกเท่ากับ 50 70 หรือ 90 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรเริ่มต้น และทำการเติมอาหารใหม่ที่มีปริมาตรเท่ากับปริมาตรที่ถ่ายออกเข้าไปแทนที่อีกครั้ง ทำการเพาะเลี้ยงด้วยสภาวะเดิมอีกครั้งจนกว่าประสิทธิภาพกระบวนการหมักจะลดลง เก็บตัวอย่างเป็นระยะตลอดการทดลอง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักชีวมวลยีสต์แห้ง ปริมาณน้ำมันทั้งหมด และความเข้มข้นกลีเซอรอล

ตารางที่ 3.6 แผนการทดลองแบบ Box-Behnken design

การทดลอง	X_1	X_2	X_3
1	10	0	30
2	90	0	30
3	10	7	30
4	90	7	30
5	10	3.5	20
6	90	3.5	20
7	10	3.5	40
8	90	3.5	40
9	50	0	20
10	50	7	20
11	50	0	40
12	50	7	40
13	50	3.5	30
14	50	3.5	30
15	50	3.5	30
16	50	3.5	30
17	50	3.5	30

เมื่อกำหนดให้ X_1 คือ ความเข้มข้นกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร); X_2 คือ ปริมาณ KH_2PO_4 (กรัมต่อลิตร); X_3 คือ อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)

3.5.7.2 การศึกษาการเพาะเลี้ยงยีสต์ความเข้มข้นสูงด้วยการหมักแบบกะดักในระดับพลาสติก

ถ่ายเชื้อยีสต์ *P. parantarctica* CHC28 ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อตามการทดลอง 3.5.7.1 โดยนำสภาวะความเข้มข้นของอาหารผลิตน้ำมันเริ่มต้นที่เหมาะสม (จากข้อ 3.5.7.1) มาทำการทดลอง โดยแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจน ปริมาตร 150 มิลลิลิตร อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลในอาหารลดลงจะทำการหยุดกระบวนการหมัก จากนั้นถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อเดิมออกด้วยอัตราส่วนที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 3.5.7.1 และนำอาหารหมักที่ถ่ายออกไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว

10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยสภาวะปลอดเชื้อนำอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ปริมาตรเท่ากับอาหารเดิมที่ถ่ายออกมาละลายตะกอนเซลล์ จากนั้นถ่ายลงไปรวมกับฟลาสก์เดิม และทำการเพาะเลี้ยงด้วยสภาวะเดิมอีกครั้ง ทำซ้ำไปเรื่อย ๆ จนกว่าประสิทธิภาพกระบวนการหมักจะลดลง เก็บตัวอย่างเป็นระยะตลอดการทดลองเพื่อวิเคราะห์ น้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้ง ปริมาณน้ำมันทั้งหมด และความเข้มข้นกลีเซอรอล

3.5.7.3 การศึกษาการเพาะเลี้ยงยีสต์ความเข้มข้นสูงด้วยการหมักแบบกะช้าในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ถ่ายเชื้อยีสต์ *P. parantarctica* CHC28 ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อตามการทดลอง 3.5.7.2 โดยนำสภาวะความเข้มข้นของอาหารผลิตน้ำมันเริ่มต้นที่เหมาะสม (จากข้อ 3.5.7.1) มาทำการทดลองในถังหมักขนาด 5 ลิตร ปริมาตรการทำงาน 2 ลิตร อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที และควบคุมอัตราการให้อากาศ โดยทำสภาวะการทดลองเหมือนข้อ 3.5.7.2 เก็บตัวอย่างเป็นระยะตลอดการทดลอง เพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นของกลีเซอรอล น้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้ง และปริมาณน้ำมันทั้งหมด [46] ทำการเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จากระดับฟลาสก์และถังหมัก

3.5.8 การตรวจสอบคุณสมบัติของน้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันยีสต์

วิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันในน้ำมันยีสต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยสภาวะที่เหมาะสมด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (Gas Chromatography-Mass Spectrometry; GC-MS) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำมันของไบโอดีเซลที่สัมพันธ์กับปริมาณกรดไขมัน [31] ด้วยโปรแกรม Biodiesel Analyzer version 2.2 [47] เช่น องค์ประกอบกรดไขมันอิ่มตัว กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หลายอัน กรดไขมันไม่อิ่มตัวยาว ค่าสปอนนิฟิเคชัน ค่าไอโอดีน ค่าซีเทน ค่าความร้อนสูง ค่าความหนืด ค่าโคเนมาติกส์และค่าความหนาแน่น เป็นต้น ตามมาตรฐานไบโอดีเซล ASTM 6751 และ EN 14214

3.5.9 การวิเคราะห์

3.5.9.1 การวิเคราะห์ความเข้มข้นกลีเซอรอล

1) การเตรียมสารละลายเพื่อวิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอล (Working Reagent)
สารละลาย A: เตรียมสารละลายกรดอะซิติก (Acetic Acid; CH_3COOH) ความเข้มข้น 1.6 โมลาร์ (กรดอะซิติกปริมาตร 9.16 มิลลิลิตร ในน้ำ 100 มิลลิลิตร) สารละลาย B: เตรียมสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตท (Ammonium Acetate; $\text{CH}_3\text{COONH}_4$) ความเข้มข้น 4.0 โมลาร์ (ซิงก์แอมโมเนียมอะซิเตท 30.8 กรัม ละลายในน้ำและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร) นำสารละลาย A และ B อย่างละ 50 มิลลิลิตร ผสมเข้าด้วยกันจะได้สารละลายบัฟเฟอร์ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.5 เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สารละลาย C: เตรียมสารละลายอะซีติลอะซีโตน (Acetylacetone; $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ โดยเติมสารละลายอะซีติลอะซีโตนปริมาตร 200 ไมโครลิตร (195 มิลลิกรัม) ลงในสารละลาย C ปริมาตร 10 มิลลิลิตร สารละลาย D: เตรียมสารละลายโซเดียมเพอร์ไอโอดेट (Sodium Periodate; NaIO_4) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ โดยชั่งจำนวน 21 มิลลิกรัม (0.021 กรัม) เติมน้ำลงในสารละลาย A ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จนละลาย จากนั้นเติมสารละลาย B ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตามลงไปผสมให้เข้ากัน โดยเตรียมแล้วใช้ทันที [45]

3.5.9.2 น้ำหนักชีวมวลยีสต์แห้ง

นำหลอดปั่นเหวี่ยง ขนาด 2.0 มิลลิลิตร อบในเครื่องอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปตั้งไว้ในตู้ดูดความชื้น 30 นาที จากนั้นใช้ที่คีบน้ำหลอดมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง บันทึกน้ำหนักที่ชั่งได้ ดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอด นำไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนใสนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นกลีเซอรอล (ข้อ 3.5.9.1) และนำส่วนเซลล์มาล้างด้วยน้ำกลั่น นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อล้างเซลล์จำนวน 1 ครั้ง จากนั้นอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักเซลล์แห้งคงที่ (ประมาณ 24 ชั่วโมง) นำไปใส่ในตู้ดูดความชื้นเป็นเวลา 30 นาที จนอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง นำมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง และบันทึกน้ำหนักที่ชั่งได้ คำนวณค่าน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ค่าผลผลิตของเซลล์ ($Y_{x/s}$) และปริมาณน้ำมัน ($Y_{p/x}$)

3.5.9.3 ปริมาณน้ำมันทั้งหมด

ดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นล้างเซลล์ด้วยน้ำ และปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์อีกครั้ง นำมาเติมกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 4 นอร์มอล ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงไปและผสมให้เข้ากัน นำไปย่อยเซลล์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อผสมตัวอย่างทุก ๆ 20 นาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายผสมระหว่างเมทานอลและคลอโรฟอร์ม (Methanol : Chloroform, อัตราส่วน 1 ต่อ 1) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงไปผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดชั้นคลอโรฟอร์มชั้นล่างสุดที่มีน้ำมันอยู่มาถ่ายใส่หลอดทดลองใหม่ที่ทราบน้ำหนักคงที่ จากนั้นเติมคลอโรฟอร์มบริสุทธิ์ (Chloroform) ลงไปในตัวอย่างเดิมอีกครั้งปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ดูดชั้นล่างสุดนำไปรวมกับตัวอย่างคลอโรฟอร์มในชั้นแรกและนำไประเหยคลอโรฟอร์มออก นำหลอดทดลองที่มีน้ำมันไปอบแห้งที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในตู้ดูดความชื้น นำมาชั่งน้ำหนักของน้ำมันที่สกัดได้ คำนวณปริมาณน้ำมันทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) ค่าผลผลิตของน้ำมัน ($Y_{p/s}$) ปริมาณน้ำมัน ($Y_{p/x}$) และการสะสมน้ำมันภายในเซลล์ (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักชีวมวลยีสต์)

3.5.9.4 ความเป็นกรดต่าง

นำตัวอย่างสารละลายมาวัดค่าความเป็นกรดต่าง ด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH Meter)

3.5.9.5 ค่าความขุ่นของยีสต์

นำตัวอย่างสารละลายยีสต์มาวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

3.5.9.6 ชนิดของกรดไขมันในน้ำมันจากยีสต์

1) การเตรียมสารละลายเพื่อวิเคราะห์รูปแบบของกรดไขมัน

เตรียมสารละลาย Internal Standard จากกรดเฮปตาเดคาโนอิก (Heptadecanoic Acid; C17:0) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ซึ่งกรดเฮปตาเดคาโนอิก 0.3 กรัม ในคลอโรฟอร์ม 15 มิลลิลิตร) นำสารละลาย Internal Standard ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสม

กับสารละลายผสมระหว่างเมทานอลและคลอโรฟอร์ม (อัตราส่วน 1 ต่อ 1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เตรียมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassium Hydroxide; KOH) ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล (ซึ่งโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 2.805 มิลลิลิตร ในเมทานอล 100 มิลลิลิตร) เตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric Acid; HCl) ความเข้มข้น 0.7 นอร์มอล (กรดไฮโดรคลอริก 2.147 มิลลิลิตร ในเมทานอล 100 มิลลิลิตร) เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเตรียมสารละลายเกลืออิมิตัวของโซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride; NaCl) จากการชั่งโซเดียมคลอไรด์ละลายในน้ำ จนกว่าสารละลายเกลือจะอิมิตัว [11]

2) การเตรียมเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (Fatty Acid Methyl Ester)

นำตัวอย่างน้ำมัน (0.05 กรัม) ผสมกับคลอโรฟอร์ม (Chloroform; CHCl_3)

ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และสารละลาย Internal Standard (C17:0) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไประเหยตัวทำละลายให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน (N_2) จากนั้นเติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดให้แน่น ผสมสารละลาย 30 วินาที จากนั้นนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปแช่ในน้ำเย็นเพื่อหยุดปฏิกิริยา ทำการเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และสารละลายโบรอนไตรฟลูออไรด์ (Boron Trifluoride; BF_3) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดให้แน่น ผสมสารละลาย 30 วินาที จากนั้นนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิอีกครั้งเป็นเวลา 10 นาที ก่อนนำไปแช่ในน้ำเย็น ตามด้วยเติมสารละลายเกลืออิมิตัว ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และเฮกเซน (Hexane; C_6H_{14}) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นจะเกิดการแยกเป็น 2 ชั้น ดูดสารละลายชั้นบนสุดซึ่งเป็นส่วนผสมระหว่างเฮกเซนกับเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน มารองด้วยแผ่นกรองชนิด Polyvinylidene Fluoride (PVDF) ขนาด 0.22 ไมโครลิตร ถ่ายลงในขวดเก็บตัวอย่างของเครื่อง HPLC (HPLC Vial)

3) การวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมัน

ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS คอลัมน์ชนิด InterCap WAX ความยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร และความหนา 0.25 ไมโครเมตร ตัวตรวจวัดสัญญาณ (Detector) ชนิด Mass Spectrometry โดยใช้สภาวะของเครื่อง GC ดังนี้ อุณหภูมิของ Injection: 250 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของ Detector: 250 องศาเซลเซียส และใช้อุณหภูมิของคอลัมน์แบบ Temperature Program โดยใช้อุณหภูมิเริ่มต้น 50 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิขึ้น 50 ถึง 200 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาที และเพิ่มอุณหภูมิจนถึง 250 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 3 องศาเซลเซียสต่อนาที ใช้แก๊สฮีเลียม (He) เป็นตัวพาตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์ ใช้ค่า Split ratio ที่ 1 ต่อ 80 นำข้อมูลที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเพื่อวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมัน

3.5.10 ค่าจลนพลศาสตร์ของการเจริญ

ทำการคำนวณค่าทางจลนพลศาสตร์ของการเจริญ ด้วยโปรแกรม Berkeley Madonna version 8.3 เพื่อสร้างแบบจำลองและการเลียนแบบการเจริญของยีสต์ ดังสมการ 3.3 ถึง 3.7

3.5.10.1 อัตราการเจริญของยีสต์ ตามแบบจำลอง Logistic [46]

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \left(1 - \frac{X}{X_{\max}} \right) \left(\frac{1}{1 + S/K_i} \right) \quad (3.3)$$

โดย dX/dt คือ อัตราการเจริญของชีวมวลยีสต์ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

$\mu_{\max}$ คือ อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (ต่อชั่วโมง)

t คือ ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)

X คือ ความเข้มข้นชีวมวลยีสต์ (กรัมต่อลิตร)

$X_{\max}$ คือ ความเข้มข้นชีวมวลยีสต์สูงสุด (กรัมต่อลิตร)

K_i คือ ค่าคงที่ของการยับยั้ง (กรัมต่อลิตร)

S คือ ความเข้มข้นกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)

3.5.10.2 อัตราการผลิตน้ำมันยีสต์ตามแบบจำลอง Luedeking–Piret [47]

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (3.4)$$

โดย dP/dt คือ อัตราการผลิตน้ำมันยีสต์ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

α คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของการสังเคราะห์น้ำมันที่สัมพันธ์กับการเจริญของชีวมวลยีสต์

β คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของการสังเคราะห์น้ำมันที่ไม่สัมพันธ์กับการเจริญของชีวมวลยีสต์

$$Y_{p/s} = \alpha Y_{x/s} \quad (3.5)$$

โดย $Y_{p/s}$ คือ ผลผลิตของน้ำมันยีสต์ (กรัมของน้ำมันต่อกรัมของสารตั้งต้นที่ถูกใช้ไป)

$Y_{x/s}$ คือ ผลผลิตของชีวมวลยีสต์ (กรัมของชีวมวลยีสต์ต่อกรัมของสารตั้งต้น)

α คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของการสังเคราะห์น้ำมันที่สัมพันธ์กับการเจริญของชีวมวลยีสต์

3.5.10.3 อัตราการใช้กลีเซอรอล [48]

$$\frac{dS}{dt} = - \left[\left(\frac{1}{Y_{X/S}} \right) \frac{dX}{dt} + m_S X \right] \quad (3.6)$$

โดย dS/dt คือ อัตราการใช้กลีเซอรอล (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

$Y_{X/S}$ คือ ผลผลิตของชีวมวลยีสต์ (กรัมของชีวมวลยีสต์ต่อกรัมของสารตั้งต้นที่ถูกใช้ไป)

m_S คือ ค่าสัมประสิทธิ์การบำรุงรักษาชีวมวลยีสต์ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

X คือ ความเข้มข้นชีวมวลยีสต์ (กรัมต่อลิตร)

3.5.10.4 อัตราการผลิตน้ำมันสูงสุดตามแบบจำลองของ Gompertz [49]

$$P = P_m \cdot \exp \left\{ - \exp \left[\frac{r_{p,m} \cdot \exp(1)}{P_m} \right] \cdot (t_L - t) + 1 \right\} \quad (3.7)$$

โดย P คือ ความเข้มข้นน้ำมัน (กรัมต่อลิตร)

P_m คือ ความเข้มข้นน้ำมันสูงสุด (กรัมต่อลิตร)

$r_{p,m}$ คือ อัตราการผลิตน้ำมันสูงสุด (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

t_L คือ ระยะเวลาเริ่มต้นก่อนการผลิตน้ำมัน (ชั่วโมง)

t คือ ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)

3.5.10.5 การวิเคราะห์คุณภาพของแบบจำลองทางจลนพลศาสตร์

วิเคราะห์ความเข้ากันได้ของแบบจำลองทางจลนพลศาสตร์กับข้อมูลจากการทดลอง ด้วยค่าสัมประสิทธิ์ (R^2) และค่า Non-Normalized Root Mean Square Error (Non-Normalized RMSE) ดังสมการ 3.8 และ 3.9 ตามลำดับ [48, 49]

$$R^2 = \frac{\sum (q_{pre} - \overline{q_{exp}})^2}{\sum (q_{pre} - \overline{q_{exp}})^2 + \sum (q_{pre} - q_{exp})^2} \quad (3.8)$$

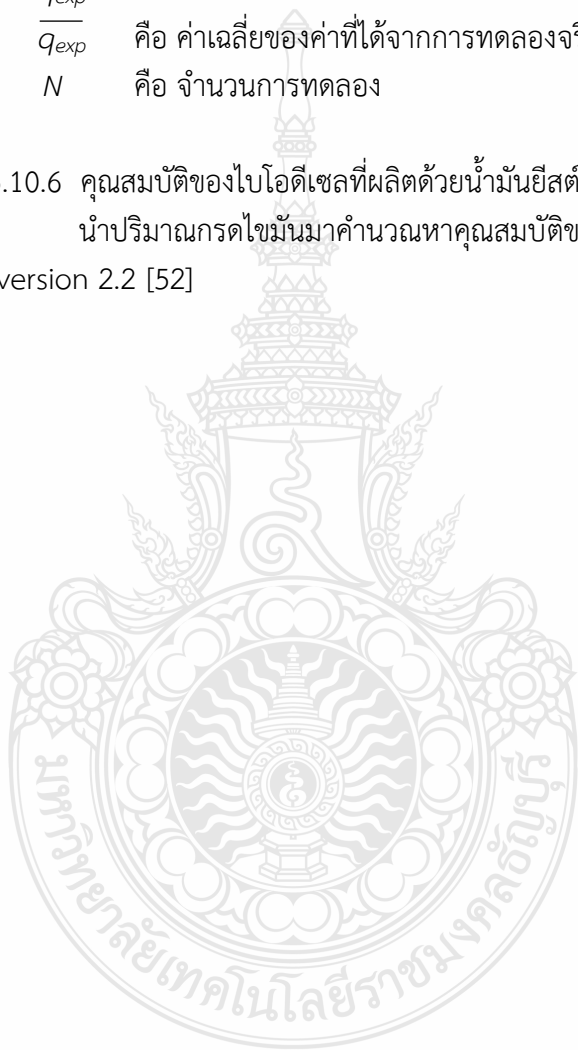
$$\text{Non - normalized } RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (q_{pre} - q_{exp})^2}{N}} \quad (3.9)$$

โดยที่ q_{pre} คือ ค่าที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรม
 q_{exp} คือ ค่าที่ได้จากการทดลองจริง
 $\frac{q_{exp}}{q_{exp}}$ คือ ค่าเฉลี่ยของค่าที่ได้จากการทดลองจริง
 N คือ จำนวนการทดลอง

3.5.10.6 คุณสมบัติของไบโอดีเซลที่ผลิตด้วยน้ำมันยีสต์

นำปริมาณกรดไขมันมาคำนวณหาคุณสมบัติของไบโอดีเซลด้วยโปรแกรม

Biodiesel Analyzer version 2.2 [52]



บทที่ 4

ผลการทดลองและการวิจารณ์

4.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการปรับสภาพกลีเซอรอลเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงยีสต์น้ำมัน *P. parantarctica* CHC28

4.1.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการปรับสภาพกลีเซอรอล

จากการนำ BDCG มาผ่านขั้นตอนการปรับสภาพ ด้วยการออกแบบการทดลอง 3^2 Full Factorial Design เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการปรับสภาพกลีเซอรอลด้วยวิธีการปรับให้เป็นกรด (Acidification) ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.1 เมื่อทำการวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยวิธี Regression Analysis เพื่อหาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการทำให้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ ผลการทดลองพบว่า ชนิดของกรด (Type of Acid, X_1) และความเป็นกรดต่าง (pH, X_2) เป็นปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นกลีเซอรอลใน BDCG ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นกลีเซอรอลมีค่าอยู่ในช่วง 212.41-467.89 กรัมต่อลิตร โดยสภาวะการทดลองที่สามารถทำได้ความเข้มข้นกลีเซอรอลต่ำสุดและสูงสุด คือ การทดลองที่ 9 และ 11 โดยมีความเข้มข้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 212.41 และ 464.89 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) จากการรายงาน Sadhukhan และคณะ ในปี 2016 [53] พบว่ากรดแก่ (pH 1.0) ทำให้มีกลีเซอรอลมีความบริสุทธิ์สูงขึ้น รวมถึงการใช้กรดที่มีฤทธิ์อ่อนจะส่งผลต่อกระบวนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ในระหว่างขั้นตอนการแยกชั้นของสารละลายกลีเซอรอล นอกจากนี้ Manosak และคณะ ในปี 2011 ได้ศึกษาการปรับสภาพกลีเซอรอลโดยการปรับให้อยู่ในสภาวะกรด พบว่าเกิดการแยกชั้นของตัวอย่างกลีเซอรอลได้ออกเป็น 3 ชั้น ได้แก่ กรดไขมัน (Fatty Acid) อยู่ชั้นบนสุด สารละลายกลีเซอรอล (Glycerol-Rich) อยู่ชั้นกลางและตะกอนของเกลือ (Inorganic Salt) อยู่ล่างสุด เนื่องจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเกิดจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาแอลคาไลน์ จะเกิดสบู่ขึ้นและจะปนเปื้อนอยู่ในส่วนสารละลายกลีเซอรอล เมื่อกรดฟอสฟอรัสและเบสจากโซเดียมไฮดรอกไซด์ทำปฏิกิริยากันจะเกิดการสะเทินของปฏิกิริยาเคมี ทำให้ได้เกลือปริมาณมาก รวมถึงโครงสร้างของสบู่มีกลุ่มของกรดไขมัน ซึ่งมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic Core) ไม่ละลายน้ำจึงเข้าจับกับไฮโดรเจนไอออน (H^+) ที่แตกตัวมาจากการดลยแยกชั้นสบู่ [40] ดังสมการ 4.1

ปฏิกิริยาทางเคมีพื้นฐานของสบู่ ;



เมื่อให้หมู่ R- (Side Chain) คือ เอสเทอร์กรดไขมันของกลีเซอรอลซึ่งมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ

ทั้งนี้การทดลองยังมีความสอดคล้องกับ Hajek และ Skopal ในปี 2010 [40] ซึ่งทำการเติมกรดแก่ลงไปทำให้สบู่กลายเป็นกรดไขมันอิสระ (Free Fatty Acid) กับเกลือ (Inorganic Salt) โดยปฏิกิริยาดังสมการ 4.2 ได้ใช้กรดไฮโดรคลอริก (HCl) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (กรดเกลือ)



ตารางที่ 4.1 การปรับสภาพกลีเซอรอลด้วยวิธีการปรับให้เป็นกรด (Acidification) โดยวางแผนการทดลองแบบ 3^2 Full Factorial Design

การทดลอง	ระดับของการทดลอง		ความเข้มข้นกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)
	ชนิดของกรด (X_1)	ความเป็นกรดต่าง (X_2)	
1	H ₂ SO ₄	1.0	350.31
2	HCl	1.0	447.06
3	H ₃ PO ₄	1.0	365.88
4	H ₂ SO ₄	3.5	361.06
5	HCl	3.5	461.89
6	H ₃ PO ₄	3.5	338.45
7	H ₂ SO ₄	6.0	312.50
8	HCl	6.0	374.78
9	H ₃ PO ₄	6.0	212.41
10	HCl	3.5	464.89
11	HCl	3.5	467.89

หมายเหตุ: ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การวิเคราะห์ข้อมูลตามแผนการทดลองของ 3^2 Full Factorial Design โดยใช้สมการกำลังสอง (Second Order Quadratic Equation) ซึ่งเป็นแบบสมการที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรที่ศึกษากับความเข้มข้นกลีเซอรอล โดยกำหนดให้ X_1 คือ ชนิดของกรด (-1 ถึง +1) X_2 คือ ความเป็นกรดต่าง (-1 ถึง +1) และ Y คือ ความเข้มข้นของกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร) ดังสมการ 4.3

$$Y = 461.84 - 17.86X_1 - 43.93X_2 - 28.91X_1X_2 - 107.51X_1^2 - 46.34X_2^2 \quad (4.3)$$

จากการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) เพื่อหาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นกลีเซอรอล ดังตารางที่ 4.2 แสดงให้เห็นว่าตัวแปรที่ศึกษาที่มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของกลีเซอรอล ตามความสัมพันธ์ดังสมการที่ 4.3 และมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9926 แสดงว่าสมการดังกล่าวสามารถอธิบายผลการทดลองที่เกิดขึ้นได้ถึง 99.26 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ค่า Adjusted R^2 และค่า P-value เท่ากับ 0.9851 และ 0.0001 ตามลำดับ แสดงว่าปัจจัยที่ศึกษาที่มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นกลีเซอรอลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P-value < 0.05) และมีค่า P-value ของการทดสอบความเหมาะสมของสมการถดถอย (Lack of Fit) มีค่าเท่ากับ 0.058 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (Lack of Fit > 0.05) แสดงให้เห็นว่ารูปแบบการจำลองการถดถอยที่ได้มีความเหมาะสมกับข้อมูล และสามารถยอมรับรูปแบบการถดถอยนั้นได้ ดังนั้นสมการกำลังสองที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลจากการทดลองจึงสามารถใช้อธิบายอิทธิพลของปัจจัยที่ทดสอบต่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลได้อย่างเหมาะสม บอกได้ว่าปัจจัยทำให้ผลการทดลองจริงมีค่าใกล้เคียงกับผลที่ได้จากสมการ (รูปที่ 4.1)

ตารางที่ 4.2 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของปัจจัยที่มีอิทธิพล ต่อความเข้มข้นกลีเซอรอลของกระบวนการปรับสภาพกลีเซอรอล

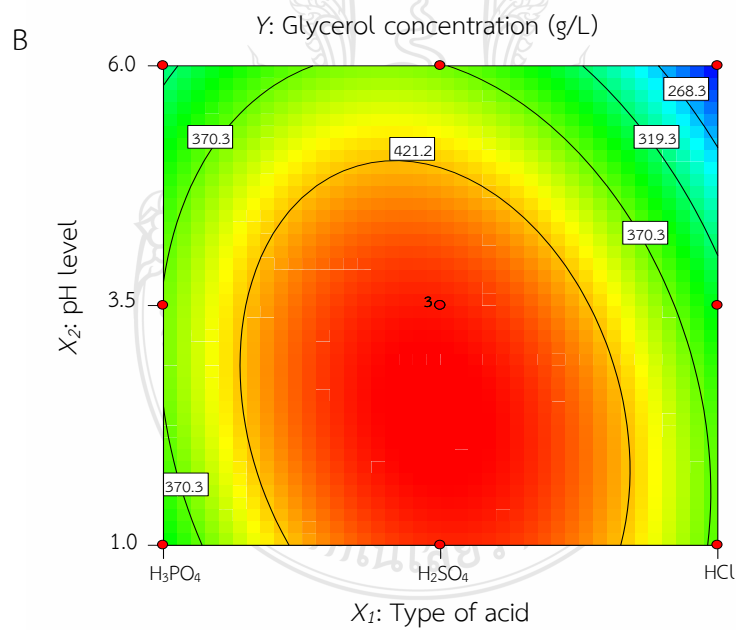
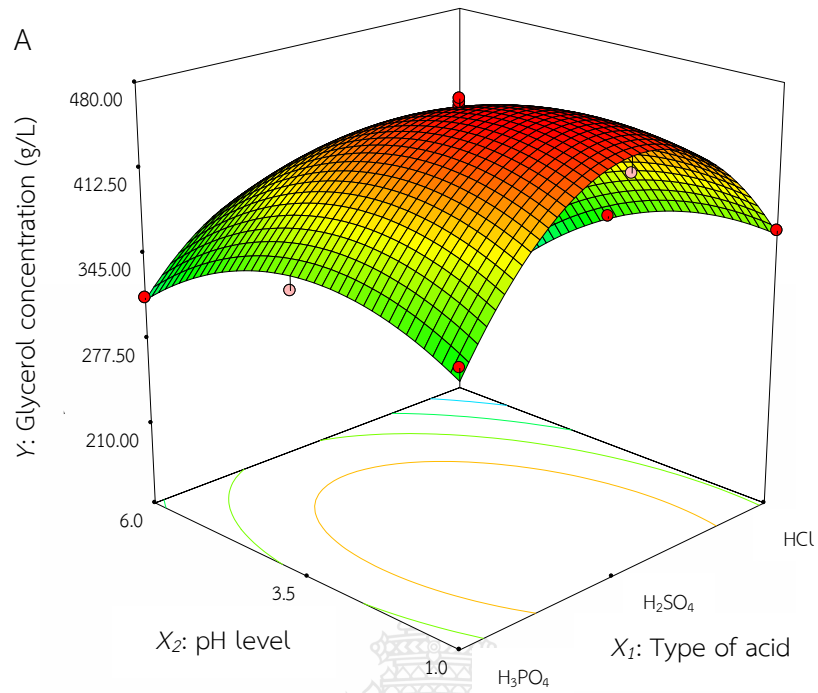
Source	SS	DF	MS	F-value	P-value
Model	61462.40	5	12292.48	133.29	0.00 ^{sig}
X_1 - ชนิดของกรด	1912.89	1	1912.89	20.74	0.01
X_2 - ความเป็นกรดต่าง	11577.98	1	11577.98	125.54	0.00
X_1X_2	3344.21	1	3344.21	36.26	0.00
X_1^2	29281	1	29281	317.51	0.00
X_2^2	5441.01	1	5441.01	59.00	0.00
Lack of Fit	443.098565	3	147.70	16.42	0.06 ^{not sig}

SS คือ Squares of Squares; DF คือ Degree of Freedom; MS คือ Mean Square $R^2=0.9926$; ^{sig}ค่า Sig < 0.05 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์; Adj- R^2 = 0.9851

A scatter plot comparing Predicted glycerol concentration (g/L) on the y-axis against Actual glycerol concentration (g/L) on the x-axis. The plot includes a diagonal line representing perfect agreement. Data points are colored squares: blue for the first point, green for the next four, orange for the next, and red for the last three. The background features a faint watermark of a traditional Thai temple structure.

Actual glycerol concentration (g/L)	Predicted glycerol concentration (g/L)	Color
212.41	210.00	Blue
325.00	325.00	Green
340.15	340.00	Green
350.00	340.00	Green
360.00	350.00	Green
370.00	350.00	Green
460.00	470.00	Orange
467.89	470.00	Red
468.00	470.00	Red
469.00	470.00	Red

ทั้งนี้สามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย และความเข้มข้นกลีเซอรอลได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $\alpha=0.05$ (P-value) และพจน์อิทธิพลหลัก (Main Effect) ของ X_1 และ X_2 พจน์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยของ $X_1 X_2$ และพจน์กำลังสองของ X_1^2 และ X_2^2 แสดงอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $\alpha=0.05$ ด้วยเช่นกัน เมื่อกำหนดให้ชนิดของกรด (X_1) คือ HCl และความเป็นกรดต่าง (X_2) มีค่าเท่ากับ 3.5 โดยระดับของ X_1 และ X_2 ที่ให้ระดับความเข้มข้นกลีเซอรอลสูงจะอยู่ในบริเวณพื้นที่สีแดงของ รูปที่ 4.2 สอดคล้องกับค่า Significant Level ของรูปแบบจำลอง $X_1, X_2, X_1 X_2, X_1^2$ และ X_2^2 จากการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) มีค่า P-value น้อยกว่า 0.05 เมื่อนำสมการกำลังสองดังกล่าวมาหาสภาวะที่เหมาะสมในการหาความบริสุทธิ์ของกลีเซอรอล พบว่ากรดไฮโดรคลอริกที่ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 1.71 ± 0.01 ให้ความเข้มข้นกลีเซอรอลเท่ากับ 469.52 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.3) และสภาวะดังกล่าวให้ผลใกล้เคียงกับผลการทดลองจริง (ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ) ซึ่งให้ค่าความเข้มข้นกลีเซอรอลเท่ากับ 460.55 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 4.2 อิทธิพลร่วมของชนิดของกรด และความเป็นกรดต่าง ต่อความเข้มข้นกลีเซอรอล
(A) แผนรูป 3 มิติ (B) แผนรูป 2 มิติ

ตารางที่ 4.3 การทวนสอบผลการทดลองที่ได้จากสมการกำลังสอง

การทดลอง	สภาวะที่เหมาะสม		ความเข้มข้นกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)	
	ชนิดของกรด	ความเป็นกรดต่าง	ค่าจากการทดลอง	ค่าจากการทำนาย
1	HCl	2.28	470.49	416.98
2	HCl	1.71	469.52	460.55
3	HCl	2.70	471.14	432.38

4.1.2 การศึกษาความเป็นไปได้ของการผลิตน้ำมันจากชีวมวลยีสต์ด้วยกลีเซอรอลที่ปรับสภาพแล้ว (PT-BDCG)

การเจริญของยีสต์น้ำมัน *P. parantarctica* CHC28 ในอาหารผลิตน้ำมันที่ใช้ PT-BDCG เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันความเข้มข้นเท่ากับ 50 และ 70 กรัมต่อลิตร และใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ (Pure Glycerol, PG) ที่ความเข้มข้นกลีเซอรอล 50 กรัมต่อลิตร เป็นการทดลองชุดควบคุม ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.4 พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ด้วย PG จะได้ชีวมวลยีสต์ ปริมาณน้ำมัน และการสะสมน้ำมันภายในเซลล์ เท่ากับ 6.48 กรัมต่อลิตร 2.77 กรัมต่อลิตร และ 42.7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักชีวมวลแห้ง ตามลำดับ และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ด้วย PT-BDCG ที่ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร จะได้ชีวมวลยีสต์ ปริมาณน้ำมัน และการสะสมน้ำมันภายในเซลล์ เท่ากับ 11.10 กรัมต่อลิตร 4.07 กรัมต่อลิตร และ 36.7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักชีวมวลแห้ง รวมถึงเมื่อใช้ PT-BDCG ที่ความเข้มข้น 70 กรัมต่อลิตร จะได้ชีวมวลยีสต์ ปริมาณน้ำมัน และการสะสมน้ำมันภายในเซลล์ เท่ากับ 7.77 กรัมต่อลิตร 2.27 กรัมต่อลิตร และ 29.2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักชีวมวลแห้ง ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้ PT-BDCG ทำให้การสร้างชีวมวลยีสต์ และการผลิตน้ำมันสูงกว่าการใช้ PG เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก รวมถึงผลผลิตของชีวมวลยีสต์ ($Y_{x/s}$) และผลผลิตของน้ำมัน ($Y_{p/s}$) ของ PT-BDCG 50 กรัมต่อลิตร เท่ากับ 0.445 และ 0.163 ตามลำดับ มีการผลิตมากกว่า PG จากการรายงานของ Polburee และคณะ ปี 2015 กล่าวว่ากลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมีอิทธิพลทางบวกต่อการผลิตชีวมวลและการผลิตน้ำมัน [54] และเมื่อทำการเปรียบเทียบการทดลองระหว่าง PT-BDCG ที่ความเข้มข้น 50 และ 70 กรัมต่อลิตร พบว่า PT-BDCG ที่ 50 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตชีวมวลยีสต์ และน้ำมันได้สูงกว่า PT-BDCG ที่ 70 กรัมต่อลิตร อีกทั้งเมื่อพิจารณาการสะสมน้ำมันภายในเซลล์ของการใช้ PT-BDCG ที่ 50 สามารถทำให้ปริมาณน้ำมันทั้งหมด ($Y_{p/x}$) มีค่าเท่ากับ 0.367 ซึ่งสูงกว่า PT-BDCG ที่ 70 กรัมต่อลิตร โดย Karamerou และคณะ ในปี 2016 รายงานว่ากลีเซอรอลที่มีความเข้มข้นสูงจะเกิดการยับยั้งต่อการเจริญต่อจุลินทรีย์เนื่องจากความเครียดออสโมติก (Osmotic Stress) และเมื่อมีกลีเซอรอลที่มีความเข้มข้นต่ำเซลล์จุลินทรีย์จะสามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ง่ายกว่า [55]

การศึกษากการเจริญและการผลิตน้ำมันของยีสต์ *P. parantarctica* CHC28 ด้วย PT-BDCG พบว่ายีสต์สามารถเจริญและผลิตน้ำมันในสภาวะที่มี PT-BDCG เป็นแหล่งคาร์บอนได้ เนื่องจากเป็นสารตั้งต้นซึ่งจะถูกเปลี่ยนไปเป็นน้ำมันด้วยกระบวนการทางชีวเคมีในจุลินทรีย์ สอดคล้องกับการศึกษาของ Dobrowolski และคณะ (2016) รวมทั้ง Mathiazhakan และคณะ (2016) จากการ

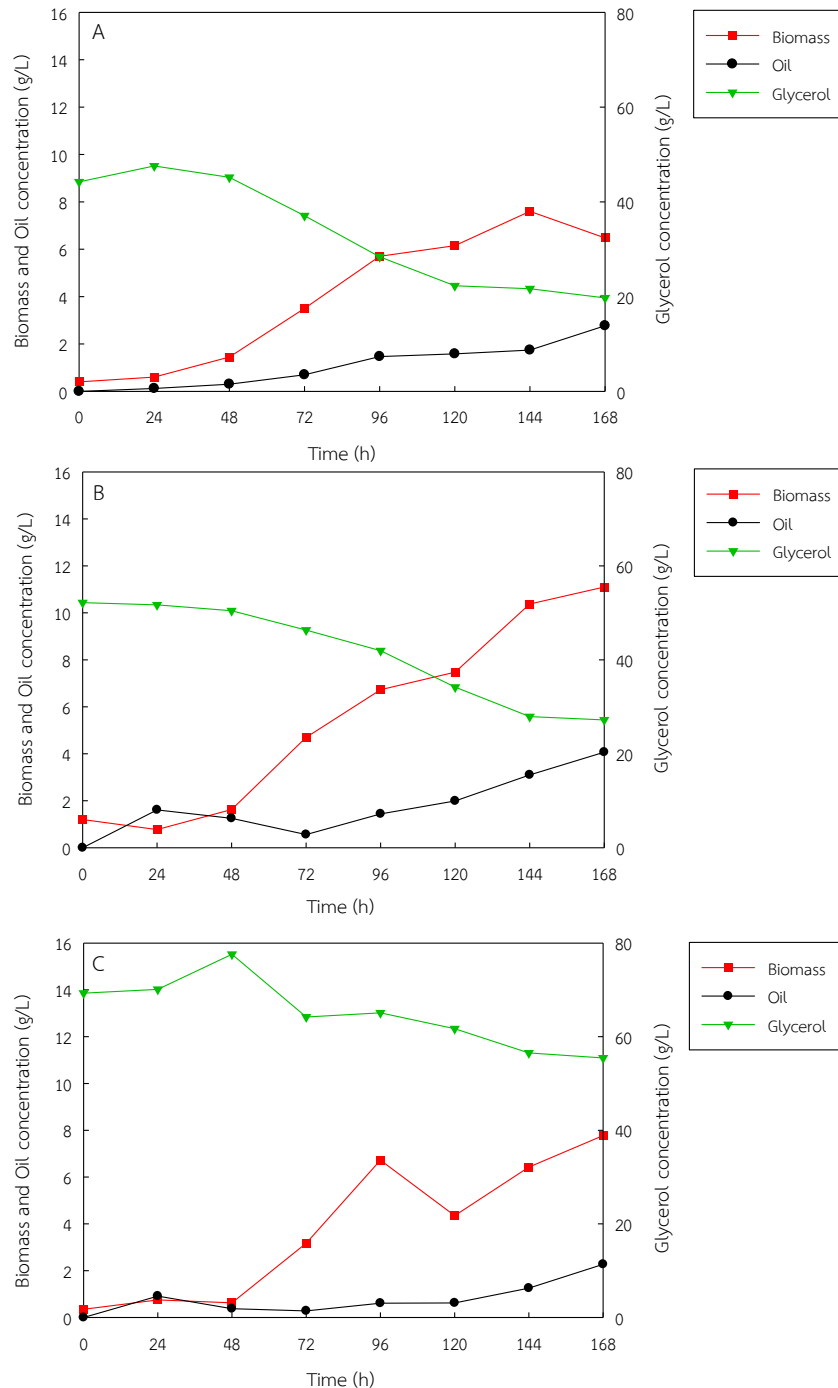
ตารางที่ 4.4 ประสิทธิภาพการผลิตน้ำมันของยีสต์ *P. parantarctica* CHC28 ด้วยกลีเซอรอลที่ผ่านการปรับสภาพ

สภาวะการทดลอง	ค่าจลนพลศาสตร์ของเซลล์ยีสต์					
	X_{max}	P_{max}	ΔS	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$	$Y_{p/x}$
PG 50 กรัมต่อลิตร	6.48	2.77	24.49	0.265	0.113	0.427
PT-BCDG 50 กรัมต่อลิตร	11.10	4.07	24.96	0.445	0.163	0.367
PT-BCDG 70 กรัมต่อลิตร	7.77	2.27	13.86	0.561	0.164	0.292

X_{max} คือ ความเข้มข้นชีวมวลยีสต์สูงสุด (กรัมต่อลิตร); P_{max} คือ ความเข้มข้นน้ำมันสูงสุด (กรัมต่อลิตร); ΔS คือ ผลต่างของความเข้มข้นกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร); $Y_{x/s}$ คือ ผลผลิตของชีวมวลยีสต์ (กรัมของเซลล์ยีสต์ต่อกรัมของกลีเซอรอล); $Y_{p/s}$ คือ ผลได้ของน้ำมันยีสต์ (กรัมของน้ำมันต่อกรัมของกลีเซอรอล); $Y_{p/x}$ คือ ปริมาณน้ำมันทั้งหมด (กรัมของน้ำมันต่อกรัมของเซลล์ยีสต์); PG คือ กลีเซอรอลบริสุทธิ์; PT-BCDG คือ กลีเซอรอลที่ปรับสภาพ

เพาะเลี้ยงยีสต์ *Y. lipolytica* พบว่าสามารถเจริญและผลิตน้ำมันในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยยีสต์ที่มีคุณสมบัติผลิตน้ำมัน (Oleaginous Yeast) สามารถนำกลีเซอรอลมาใช้เป็นแหล่งพลังงานหลักในการเจริญ การสร้างชีวมวลยีสต์ และสะสมน้ำมันไว้ในเซลล์ได้ เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นสูงหรือมีแหล่งคาร์บอนมากเกินไป รวมถึงมีสารอาหารจากแหล่งไนโตรเจนอย่างจำกัด [6, 9] ยีสต์จะสามารถนำแหล่งคาร์บอนเข้าสู่การสังเคราะห์น้ำมันได้ทันที โดยกลีเซอรอลจะถูกเปลี่ยนเป็นกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต (Glyceroldehyde-3-Phosphate, G-3-P) และกรดไพรูวิก (Pyruvic Acid) จากนั้น Pyruvic acid จะถูกนำเข้าสู่ไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) และเปลี่ยนเป็นอะซีทิล-โคเอ (Acetyl-CoA) ซึ่งจะรวมตัวกับออกซาโลอะซีเตต (Oxaloacetate, OAA) เกิดเป็นซิเตรต (Citrate) เมื่อมีการสะสม Citrate มากขึ้นจะถูกปลดปล่อยเข้าสู่ไซโทพลาสซึม (Cytoplasm) และถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์เอทีพี ซิเตรต ไลเอส (ATP Citrate Lyase, ACL) กลายเป็นไซโตโซลิก อะซีทิล-โคเอ (Cytosolic Acetyl-CoA) และ Oxaloacetate จากนั้น Cytosolic Acetyl-CoA จะถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์อะซีทิล-โคเอ คาร์บอกซิเลส (Acetyl-CoA Carboxylase, ACC) เปลี่ยนเป็นมาโลนิล-โคเอ (Malonyl-CoA) ตามลำดับ ซึ่ง Malonyl-CoA เป็นสารตั้งต้นของกระบวนการสร้างสายกรดไขมัน (Fatty Acid Chain) เมื่อเกิด Fatty Acyl-CoA อย่างสมบูรณ์จะถูกเคลื่อนย้ายเข้าสู่ Endoplasmic Reticulum (ER) เพื่อรวมกับกลีเซอรอลที่อยู่ในรูป G-3-P เกิดเป็นน้ำมันในรูปไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride, TG) ด้วยวัฏจักร Kennedy Pathway และรวมกันเป็นหยดน้ำมัน (Oil Droplets) สะสมไว้ในเซลล์ต่อไป [7] จากผลการศึกษาทั้งหมดพบว่ามี

ความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้ BDCG ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลมาเป็นแหล่งวัตถุดิบสำหรับการผลิตน้ำมันด้วยยีสต์ *P. parantarctica* CHC28



รูปที่ 4.3 การเจริญของยีสต์ การผลิตน้ำมันและการใช้กลีเซอรอลของยีสต์ ในอาหารที่ใช้ PG ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร (A) และใช้ PT-BDCG ความเข้มข้น 50 (B) และ 70 กรัมต่อลิตร (C) เป็นแหล่งคาร์บอน

4.2 การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์ *P. parantarctica* CHC28 จากกลีเซอรอลที่ผ่านการปรับสภาพ

4.2.1 การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์ *P. parantarctica* CHC28 จาก PT-BDCG ด้วยวิธี Plackett-Burman design โดยแปรผันปัจจัยทางเคมีและทางกายภาพ

ผลการศึกษาการเจริญและการผลิตน้ำมันของยีสต์เมื่อใช้ PT-BDCG จากกระบวนการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน ดังตารางที่ 4.5 พบว่ายีสต์ *P. parantarctica* CHC28 สามารถเจริญและผลิตน้ำมันในอาหารที่มี PT-BDCG เป็นแหล่งคาร์บอนได้ในทุกสภาวะการทดลอง โดยยีสต์มีการเจริญและผลิตน้ำมันได้แตกต่างกันในแต่ละสภาวะ ซึ่งยีสต์สามารถผลิตชีวมวลยีสต์ได้ในช่วง 0.72-5.45 กรัมต่อลิตร และผลิตน้ำมันได้ในช่วง 0.11-2.53 กรัมต่อลิตร และยังพบว่ายีสต์สามารถสะสมน้ำมันภายในเซลล์ได้สูงที่สุดในสภาวะที่ 1 (ตารางที่ 4.5) โดยสามารถสะสมได้เท่ากับ 54.06 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักชีวมวลแห้ง คิดเป็นอัตราการผลิตน้ำมันสูงสุดเท่ากับ 0.84 กรัมต่อลิตรต่อวัน

ผลการศึกษาอิทธิพลของปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการผลิตน้ำมันของยีสต์ด้วยแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman design ดังตารางที่ 4.6 พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตชีวมวลยีสต์ (Y_1) *P. parantarctica* CHC28 สูงสุด 3 อันดับแรก คือความเข้มข้นกลีเซอรอล (X_1) ปริมาณ $MgSO_4$ (X_4) และอัตราการเขย่า (X_6) โดยมีการกระจายของอิทธิพล (Contribution Effect) เท่ากับ 49.46 22.18 และ 2.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตน้ำมัน (Y_2) 3 อันดับแรก คือความเข้มข้นกลีเซอรอล (X_1) ปริมาณ KH_2PO_4 (X_3) และอัตราการเขย่า (X_6) ซึ่งมีสัดส่วนของอิทธิพล เท่ากับ 34.79 11.22 และ 10.73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ปัจจัยที่มีผลต่อการสะสมน้ำมันภายในเซลล์ (Y_3) สูงสุด 3 อันดับแรกคืออุณหภูมิ (X_7) ปริมาณ $MgSO_4$ (X_4) และอัตราการเขย่า (X_6) มีค่าสัดส่วนอิทธิพล เท่ากับ 44.59 13.27 และ 8.86 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และปัจจัยที่มีอิทธิพลต่ออัตราการผลิตน้ำมัน (Y_4) 3 อันดับแรกคือ ความเข้มข้นกลีเซอรอล (X_1) ปริมาณ KH_2PO_4 (X_3) และอัตราการเขย่า (X_6) โดยมีค่าสัดส่วนอิทธิพล เท่ากับ 34.79 11.22 และ 10.73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อพิจารณาอิทธิพลของปัจจัยหลักต่อการสร้างชีวมวลยีสต์ (Y_1) และปริมาณน้ำมัน (Y_2) ซึ่งเป็นตัวแปรหลักที่แสดงถึงประสิทธิภาพการผลิตน้ำมันของยีสต์ *P. parantarctica* CHC28 ผลการทดลอง ดังรูปที่ 4.4 พบว่าความเข้มข้นกลีเซอรอล ปริมาณ $MgSO_4$ และอัตราการเขย่า มีอิทธิพลในทางบวก (Positive Effect) ต่อการผลิตชีวมวลยีสต์ (รูปที่ 4.4A-4.4C) โดยเมื่อระดับของแต่ละปัจจัยเพิ่มขึ้นจะทำให้ชีวมวลยีสต์สูงขึ้นด้วย เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำมันพบว่าความเข้มข้นกลีเซอรอลและอัตราการเขย่ามีอิทธิพลในทางบวกต่อการผลิตน้ำมัน แต่ปริมาณ KH_2PO_4 มีอิทธิพลในทางลบ (Negative Effect) ต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์ในระดับที่ทำการทดลอง ซึ่งการผลิตน้ำมันจะลดลงเมื่อปริมาณ KH_2PO_4 ในการเพาะเลี้ยงสูงขึ้น (รูปที่ 4.4D-4.4F)

ตารางที่ 4.5 แผนการทดลองแบบ Plackett Burman design

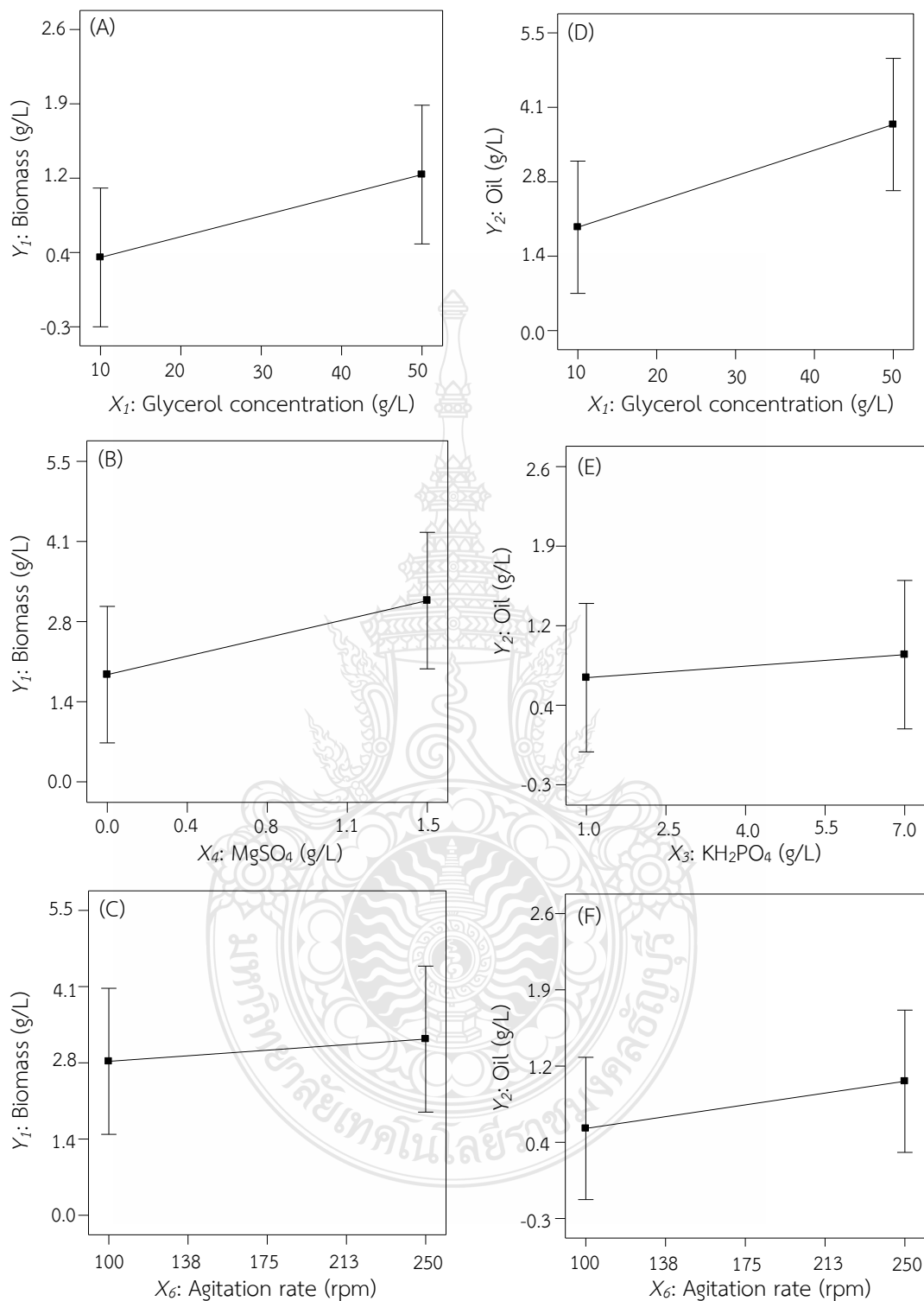
การทดลอง	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	ค่าการตอบสนอง			
								Y_1	Y_2	Y_3	Y_4
1	50	4	1	1.5	10	250	25	4.68	2.53	54.06	0.84
2	10	4	7	0	10	250	35	1.63	0.45	27.69	0.15
3	50	1	7	1.5	2	250	35	5.45	1.42	26.06	0.47
4	10	4	1	1.5	10	100	35	2.51	0.22	8.56	0.07
5	10	1	7	0	10	250	25	0.72	0.32	44.14	0.11
6	10	1	1	1.5	2	250	35	1.46	0.11	7.75	0.04
7	50	1	1	0	10	100	35	3.33	1.22	36.54	0.41
8	50	4	1	0	2	250	25	2.48	1.25	50.54	0.42
9	50	4	7	0	2	100	35	1.75	0.09	5.43	0.03
10	10	4	7	1.5	2	100	25	1.70	0.45	26.47	0.15
11	50	1	7	1.5	10	100	25	3.23	0.65	20.00	0.22
12	10	1	1	0	2	100	25	1.50	0.79	52.67	0.28

Y_1 คือ ชีวมวลของยีสต์ (กรัมต่อลิตร); Y_2 คือ ปริมาณน้ำมัน (กรัมต่อลิตร); Y_3 คือ การสะสมน้ำมันภายในเซลล์ (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักชีวมวลแห้ง); Y_4 คือ อัตราการผลิตน้ำมัน (กรัมต่อลิตรต่อวัน)

ตารางที่ 4.6 ค่าทางสถิติของปัจจัยที่ศึกษา

ปัจจัย	ค่าคาดคะเน	กราฟค่าคาดคะเน	ค่าสัดส่วนอิทธิพล*	F-value	P-value
ชีวมวลยีสต์ (Y_1)					
X_1	1.90		49.46	8.78	0.04
X_2	-0.16		0.34	0.06	0.82
X_3	-0.25		0.84	0.15	0.72
X_4	1.27		22.18	3.94	0.12
X_5	0.29		1.17	0.21	0.67
X_6	0.40		2.22	0.39	0.56
X_7	0.30		1.26	0.22	0.66
ปริมาณน้ำมัน (Y_2)					
X_1	0.80		34.79	4.80	0.09
X_2	0.08		0.36	0.05	0.83
X_3	-0.46		11.22	1.55	0.28
X_4	0.21		2.34	0.32	0.60
X_5	0.21		2.35	0.32	0.60
X_6	0.45		10.73	1.48	0.29
X_7	-0.41		9.21	1.27	0.32
การสะสมน้ำมันภายในเซลล์ (Y_3)					
X_1	4.22		1.55	0.29	0.62
X_2	-2.40		0.50	0.09	0.77
X_3	-10.05		8.79	1.65	0.27
X_4	-12.35		13.27	2.5	0.19
X_5	3.68		1.18	0.22	0.66
X_6	10.09		8.86	1.67	0.27
X_7	-22.64		44.59	8.39	0.04
อัตราการผลิตน้ำมัน (Y_4)					
X_1	0.27		34.79	4.80	0.09
X_2	0.03		0.36	0.05	0.83
X_3	-0.15		11.22	1.55	0.28
X_4	0.07		2.34	0.32	0.60
X_5	0.07		2.35	0.32	0.60
X_6	0.15		10.73	1.48	0.29
X_7	-0.14		9.21	1.27	0.32

หมายเหตุ: *เปอร์เซ็นต์การเปรียบเทียบของค่าสัดส่วนของอิทธิพลทั้งหมด



รูปที่ 4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย เมื่อ A คือ ความเข้มข้นกลีเซอรอล B คือ ปริมาณ $MgSO_4$ และ C คือ อัตราการเขย่า ที่มีอิทธิพลต่อชีวมวลยีสต์ และ D คือ ความเข้มข้นกลีเซอรอล E คือ ปริมาณ KH_2PO_4 และ F คือ อัตราการเขย่าที่มีอิทธิพลต่อการผลิตน้ำมัน

เมื่อพิจารณาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตชีวมวลยีสต์ (Y_1) และการผลิตน้ำมัน (Y_2) พบว่าความเข้มข้นกลีเซอรอล (X_1) เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตชีวมวลยีสต์สูงสุด เนื่องจากยีสต์สามารถนำกลีเซอรอลมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนหลักในการเจริญ การสร้างชีวมวลยีสต์ และการผลิตน้ำมันได้ และเมื่อพิจารณาความเข้มข้นกลีเซอรอล (X_1) และอัตราการเขย่า (X_6) พบว่าปัจจัยทั้งสองชนิดแสดงอิทธิพลในทางบวกต่อการสร้างชีวมวลยีสต์และการผลิตน้ำมันซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการเจริญของยีสต์ *Rhodotorula graminis* TISTR 5124 และ *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 [41, 54] โดยพบว่าเมื่อให้ปัจจัยทั้งสองชนิดร่วมกัน ชีวมวลยีสต์และการผลิตน้ำมันจะเพิ่มขึ้น และทำให้ปริมาณน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์ (Y_3) สูงขึ้นด้วย เนื่องจากการเพาะเลี้ยงยีสต์ในสภาวะที่มีการเขย่าจะทำให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่ม ทำให้มีออกซิเจนซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนจากการย่อยสลายโมเลกุลของกลีเซอรอลเพิ่มขึ้น ซึ่งส่งผลให้การมีออกซิเจนสูงและเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ ยีสต์จึงมีการเจริญเติบโตมากขึ้น นอกจากนี้ยังทำให้มีการสร้างเอทีพี (ATP) ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานในการสร้างน้ำมันเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ยีสต์สามารถผลิตน้ำมันได้สูงขึ้นด้วย [9]

เมื่อพิจารณาอิทธิพลของอุณหภูมิ (X_7) ที่มีต่อปริมาณน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์ (Y_3) และอัตราการผลิตน้ำมัน (Y_4) พบว่าเมื่อระดับของอุณหภูมิต่ำลงทำให้ปริมาณน้ำมัน และอัตราการผลิตน้ำมันสูงขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Polburee และคณะ [8] ที่ศึกษาผลของอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง *Rhodosporidium fluviale* DMKU-RK253 พบว่าเมื่ออุณหภูมิจาก 30 เป็น 25 องศาเซลเซียส ยีสต์มีการสะสมน้ำมันภายในเซลล์เพิ่มขึ้น และยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Rossi และคณะ (2009) [57] ซึ่งรายงานว่ายีสต์จะมีการปรับตัวและสังเคราะห์ไขมันเพิ่มขึ้นเมื่อเจริญอยู่ในสภาวะอุณหภูมิต่ำ

นอกจากนี้ผลการทดลองยังพบว่าปริมาณ KH_2PO_4 (X_3) และ MgSO_4 (X_4) มีผลต่อการเจริญ และการสะสมน้ำมันของยีสต์ โดย Chen และคณะ (2013) [58] รายงานว่าไอออนของโลหะในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อจะส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสะสมของน้ำมัน ของยีสต์แตกต่างกัน อีกทั้ง Wu และคณะ (2011) [59] ได้พบว่าการเพาะเลี้ยงยีสต์ในสภาวะที่มีปริมาณฟอสฟอรัสจำกัด (Phosphorus Limitation) และมีแหล่งคาร์บอนที่มากเกินไปจะทำให้ยีสต์ผลิตน้ำมันมากขึ้น เนื่องจากการเจริญของจุลินทรีย์จะเกิดกระบวนการสังเคราะห์อะดีโนซีน โมโน-ฟอสเฟต (Adenosine Monophosphate, AMP) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิต ATP ลดลง ยีสต์จึงมีการย่อยสลายแหล่งคาร์บอนได้ไม่สมบูรณ์ ทำให้เกิดการสะสมแหล่งคาร์บอนเอาไว้ภายในเซลล์ในรูปของน้ำมันมากขึ้น [21]

4.2.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันของ *P. parantarctica* CHC28 จาก PT-BDCG ด้วยกระบวนการพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology)

การออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken design เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ *P. parantarctica* CHC28 จาก 17 สภาวะการทดลอง ดังตารางที่ 4.7 เมื่อทำการวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยวิธี Regression Analysis เพื่อหาอิทธิพลของแต่ละปัจจัยต่อชีวมวลยีสต์ และการผลิตน้ำมัน ผลการทดลองพบว่าปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อชีวมวลยีสต์และการผลิตน้ำมัน คือ ความเข้มข้นของกลีเซอรอล (X_1) ปริมาณ KH_2PO_4 (X_2) และอุณหภูมิ (X_3) โดยยีสต์สามารถผลิตชีวมวลยีสต์

ได้ในช่วง 0.05–5.23 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของน้ำมันได้ในช่วง 0.10–2.37 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.7) การวิเคราะห์ข้อมูลตามแผนการทดลองของ Box-Behnken โดยใช้สมการกำลังสอง (Second Order Quadratic Equation) เป็นแบบสมการจำลองเพื่อสร้างความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรที่มีอิทธิพลต่อชีวมวลยีสต์และการผลิตน้ำมัน โดยกำหนดให้ X_1 คือ ความเข้มข้นกลีเซอรอล X_2 คือ ปริมาณ KH_2PO_4 และ X_3 คือ อุณหภูมิ จะได้ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่าง ๆ กับการสร้างชีวมวลยีสต์ (Y_1) และปริมาณน้ำมัน (Y_2) ดังสมการ 4.4 และ 4.5 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.7 แผนทดลองแบบ Box-Behnken design

การทดลอง	X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2
1	10	0	30	2.30	0.91
2	90	0	30	2.35	0.57
3	10	7.0	30	2.19	0.67
4	90	7.0	30	3.83	0.77
5	10	3.5	20	1.41	0.38
6	90	3.5	20	5.17	0.99
7	10	3.5	40	0.05	0.10
8	90	3.5	40	0.55	0.19
9	50	0	20	3.21	0.64
10	50	7.0	20	5.03	1.07
11	50	0	40	0.34	0.09
12	50	7.0	40	0.64	0.10
13	50	3.5	30	4.50	2.00
14	50	3.5	30	5.23	2.37
15	50	3.5	30	3.88	0.98
16	50	3.5	30	3.60	1.24
17	50	3.5	30	3.38	0.99

เมื่อกำหนดให้ X_1 คือ ความเข้มข้นกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร); X_2 คือ ปริมาณ KH_2PO_4 (กรัมต่อลิตร) และ X_3 คือ อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส); Y_1 คือ ชีวมวลยีสต์ (กรัมต่อลิตร); Y_2 คือ ปริมาณน้ำมัน (กรัมต่อลิตร)

$$Y_1 = 4.12 + 0.81X_1 - 1.66X_3 - 0.87X_1X_3 - 0.94X_1^2 - 1.33X_3^2 \quad (4.4)$$

$$Y_2 = 1.87 - 0.31X_3 - 0.68X_1^2 - 0.47X_2^2 - 0.87X_3^2 \quad (4.5)$$

จากการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) เพื่อหาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความชื้นมวลยีสต์และปริมาณน้ำมัน ดังตารางที่ 4.8 แสดงให้เห็นข้อมูลจากการทดลองสามารถบ่งบอกถึงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรที่นำมาทดสอบว่ามีเหมาะสมต่อกระบวนการหมัก สามารถผลิตชีวมวลยีสต์และน้ำมันได้ พบว่ามีค่า R^2 เท่ากับ 0.9364 และ 0.9295 ตามลำดับ โดยสมการดังกล่าวสามารถอธิบายผลการทดลองที่เกิดขึ้นได้ 93.64 และ 92.95 เปอร์เซ็นต์ มีการผลิตชีวมวลยีสต์ได้ดี โดยค่า R^2 จากการทดลองยังสามารถบ่งชี้ค่า P-value ของรูปแบบ (Model) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.0020 และ 0.0028 ตามลำดับ แสดงว่าปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัยมีอิทธิพลต่อการชีวมวลยีสต์และน้ำมันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 (P-Value < 0.05) และค่า P-value ของการทดสอบความเหมาะสมของสมการถดถอย (Lack of Fit) มีค่าเท่ากับ 0.6784 และ 0.6713 ตามลำดับ ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 (Lack of Fit > 0.05) แสดงให้เห็นว่ารูปแบบการจำลองการถดถอยที่ได้มีความเหมาะสมกับข้อมูล และสามารถยอมรับรูปแบบการถดถอยนั้นได้ ดังนั้นสมการกำลังสองที่ได้จากการวิเคราะห์ผลการทดลองสามารถอธิบายได้ว่าปัจจัยที่ทำการทดลองมีความสำคัญต่อการเจริญและผลิตน้ำมันยีสต์ โดยการจัดการรูปแบบแผนภาพ (ภาพ 2 และ 3 มิติ) จะทำให้ได้แผนภาพที่ลักษณะที่แตกต่างกันออกไปในระหว่างความสัมพันธ์ของปัจจัยในการทดลอง (ความเข้มข้นกลีเซอรอล ปริมาณ KH_2PO_4 และอุณหภูมิ) สามารถนำไปใช้ผลิตชีวมวลและน้ำมันยีสต์ได้

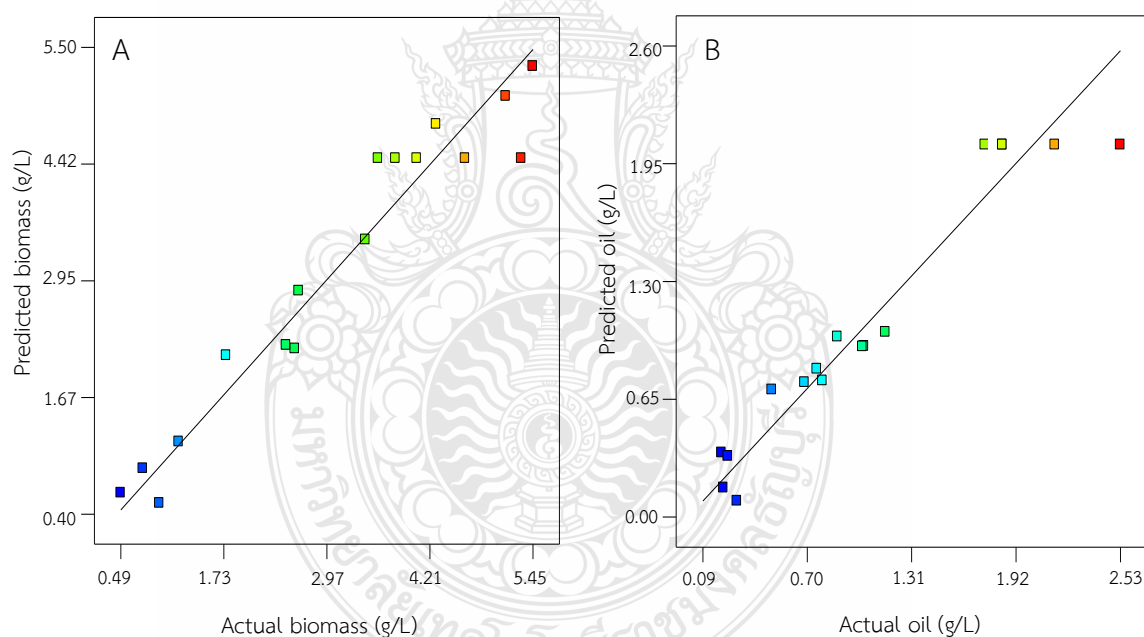
ทั้งนี้สามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยและชีวมวลยีสต์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $\alpha=0.05$ (P-value) และพจน์อิทธิพลหลัก (Main Effect) ของ X_1 และ X_3 พจน์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยของ X_1X_3 และพจน์กำลังสองของ X_1^2 และ X_3^2 รวมทั้งความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยและการผลิตน้ำมัน เมื่อพจน์อิทธิพลหลักของ X_3 และพจน์กำลังสองของ X_1^2 , X_2^2 และ X_3^2 แสดงอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $\alpha=0.05$ ด้วยเช่นกัน เมื่อกำหนดให้ความเข้มข้นกลีเซอรอล (X_1) มีค่าเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร และอุณหภูมิ (X_3) มีค่าเท่ากับ 7.0 กรัมต่อลิตร โดยบริเวณพื้นที่สีแดงเป็นสภาวะที่มีการผลิตชีวมวลยีสต์สูง (รูปที่ 4.6) สอดคล้องกับค่า Significant Level ของรูปแบบจำลอง X_1 , X_3 , X_1X_3 , X_1^2 และ X_3^2 จากการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) มีค่า P-Value น้อยกว่า 0.05 นอกจากนี้พบว่าความสัมพันธ์ระหว่าง 3 ปัจจัย ที่ได้กล่าวมาข้างต้น ไม่ส่งผลต่อการผลิตน้ำมันจากยีสต์เมื่อทำงานร่วมกัน จากค่า Significant Level ของรูปแบบจำลอง X_3 , X_1^2 , X_2^2 และ X_3^2 ดังตารางที่ 4.8 นอกจากนี้กราฟแสดงความสัมพันธ์ค่าที่ได้จากการทดลองและค่าจากการทำนาย ด้วยการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken design ดังรูปที่ 4.5

ตารางที่ 4.8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อชีวมวลยีสต์และการผลิตน้ำมัน

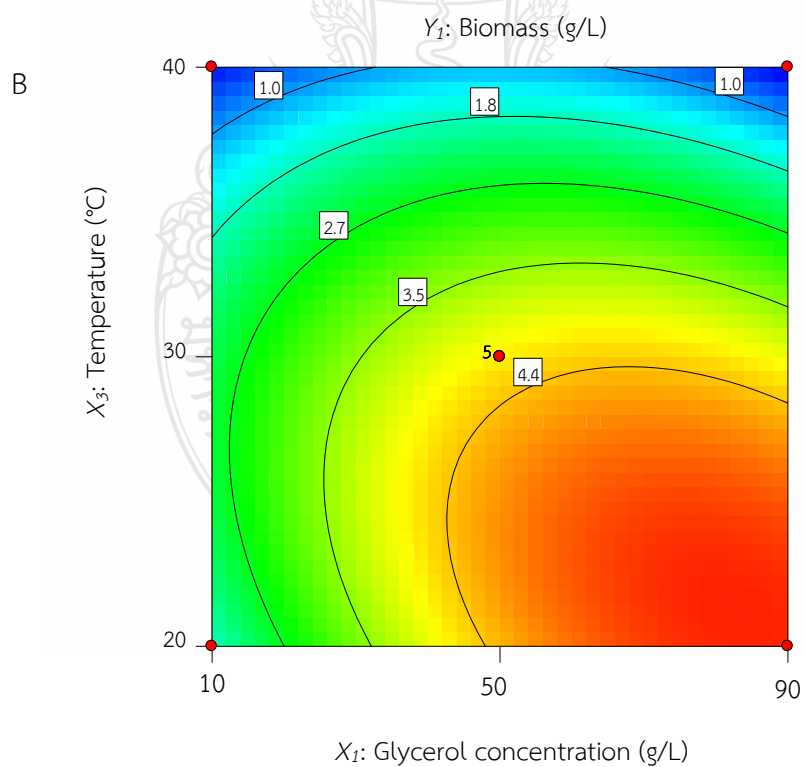
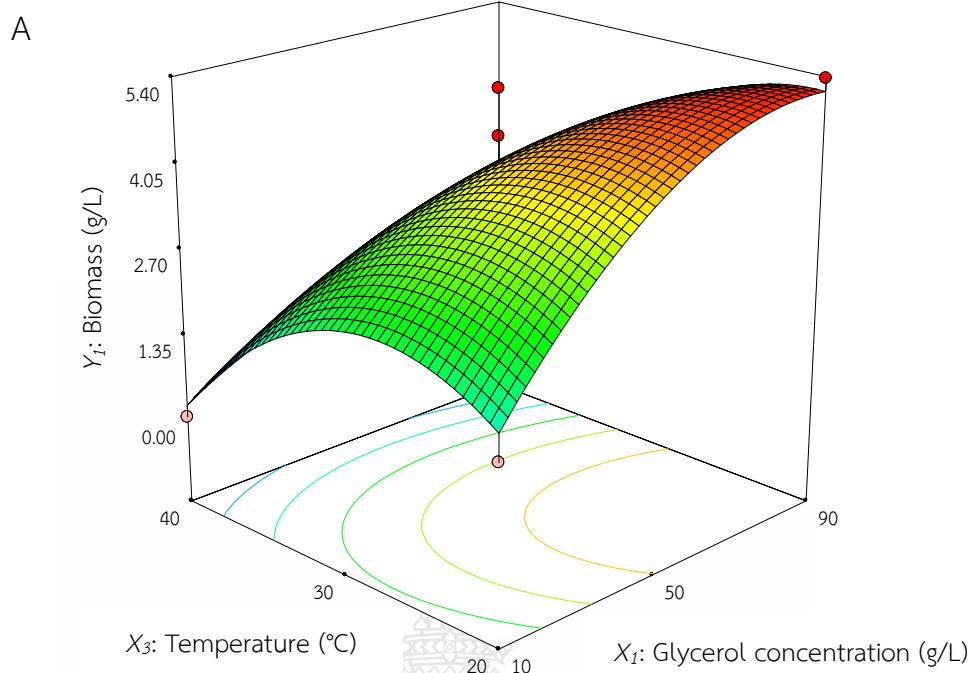
Source	SS	DF	MS	F-value	P-value
การผลิตชีวมวลยีสต์ (Y_1)					
Model	46.65	9	5.18	11.45	0.00 ^{sig}
X_1 - ความเข้มข้นกลีเซอรอล	5.20	1	5.20	11.49	0.01
X_2 - ปริมาณ KH_2PO_4	1.94	1	1.94	4.28	0.08
X_3 - อุณหภูมิ	22.07	1	22.07	48.77	0.00
X_1X_2	0.89	1	0.89	1.97	0.20
X_1X_3	3.00	1	3.00	6.62	0.04
X_2X_3	0.46	1	0.46	1.01	0.35
X_1^2	3.69	1	3.69	8.15	0.03
X_2^2	0.81	1	0.81	1.79	0.22
X_3^2	7.48	1	7.48	16.52	0.00
Lack of Fit	0.92	3	0.31	0.54	0.68 ^{not sig}
การผลิตน้ำมัน (Y_2)					
Model	7.52	9	0.84	10.25	0.00 ^{sig}
X_1 - ความเข้มข้นกลีเซอรอล	0.00	1	0.00	0.01	0.92
X_2 - ปริมาณ KH_2PO_4	0.00	1	0.00	0.02	0.89
X_3 - อุณหภูมิ	0.75	1	0.75	9.16	0.02
X_1X_2	0.05	1	0.05	0.55	0.48
X_1X_3	0.01	1	0.01	0.10	0.76
X_2X_3	0.00	1	0.00	0.03	0.87
X_1^2	1.95	1	1.95	23.97	0.00
X_2^2	0.93	1	0.93	11.36	0.01
X_3^2	3.18	1	3.18	39.02	0.00
Lack of Fit	0.17	3	0.06	0.56	0.67 ^{not sig}

*SS คือ Squares of Squares; DF คือ Degree of Freedom; MS คือ Mean Square
 $R^2 = 0.9364$; ^{sig}ค่า Sig < 0.05 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์; Adj- $R^2 = 0.8547$ และ
 $R^2 = 0.9295$; ^{sig}ค่า Sig < 0.05 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์; Adj- $R^2 = 0.8388$

จากการวิเคราะห์สามารถสรุปได้ว่าความเข้มข้นกลีเซอรอล อุณหภูมิ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อการผลิตชีวมวลยีสต์มากกว่าปริมาณ KH_2PO_4 แผนรูป 3 มิติ แสดงพื้นที่ผิวตอบสนองของความสัมพันธ์ระหว่างชีวมวลยีสต์และปัจจัยต่าง ๆ ดังรูปที่ 4.6-4.8 เมื่อกำหนดให้ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกลีเซอรอล (X_1) และอุณหภูมิ (X_3) ต่อชีวมวลยีสต์ พบว่าเมื่อปัจจัยทั้งสองเพิ่มขึ้นจนอยู่ในช่วง 50 ถึง 90 กรัมต่อลิตร และ 20 ถึง 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (รูปที่ 4.6) ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและปริมาณ KH_2PO_4 ต่อชีวมวลยีสต์พบว่า เมื่อปัจจัยทั้งสองเพิ่มขึ้นจนอยู่ในช่วง 20 ถึง 30 องศาเซลเซียส และ 3.5 ถึง 7.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.7) และความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกลีเซอรอลและปริมาณ KH_2PO_4 ต่อชีวมวลยีสต์พบว่า เมื่อปัจจัยทั้งสองเพิ่มขึ้นจนอยู่ในช่วง 50 ถึง 90 กรัมต่อลิตร และ 3.5 ถึง 7.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.8) ยีสต์จะสามารถสร้างชีวมวลในได้ในช่วง 0.05 ถึง 5.38 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าอุณหภูมิมิ้อิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์มากกว่าความเข้มข้นกลีเซอรอล และปริมาณ KH_2PO_4 แผนรูป 3 มิติ แสดงพื้นที่ผิวตอบสนองของความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นน้ำมันจากยีสต์และปัจจัยต่าง ๆ ดังรูปที่ 4.9 ยีสต์จะสามารถผลิตน้ำมันได้ในช่วง 0.091 ถึง 2.375 กรัมต่อลิตร

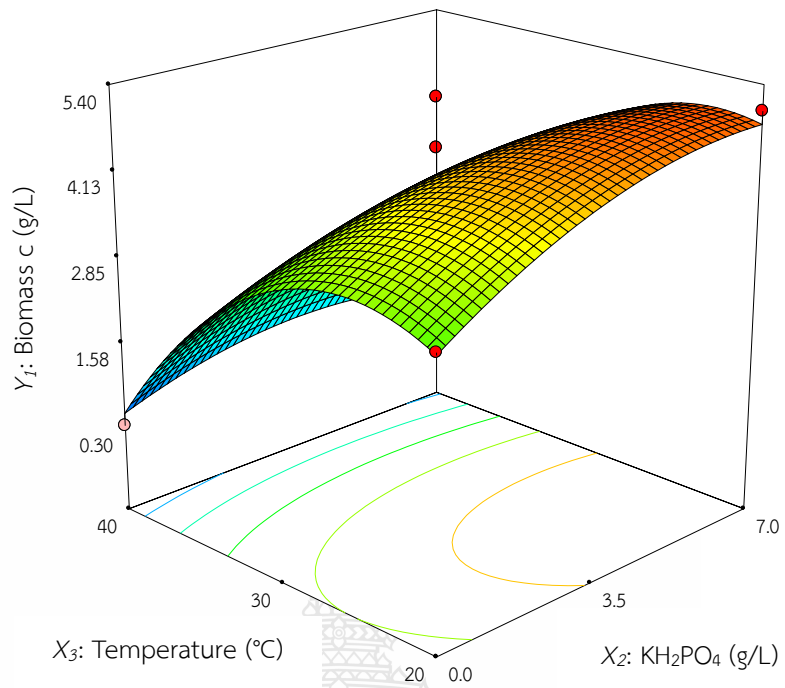


รูปที่ 4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่ได้จากการทดลองจริงและค่าที่ได้จากการทำนายของชีวมวลยีสต์ (A) และการผลิตน้ำมัน (B)

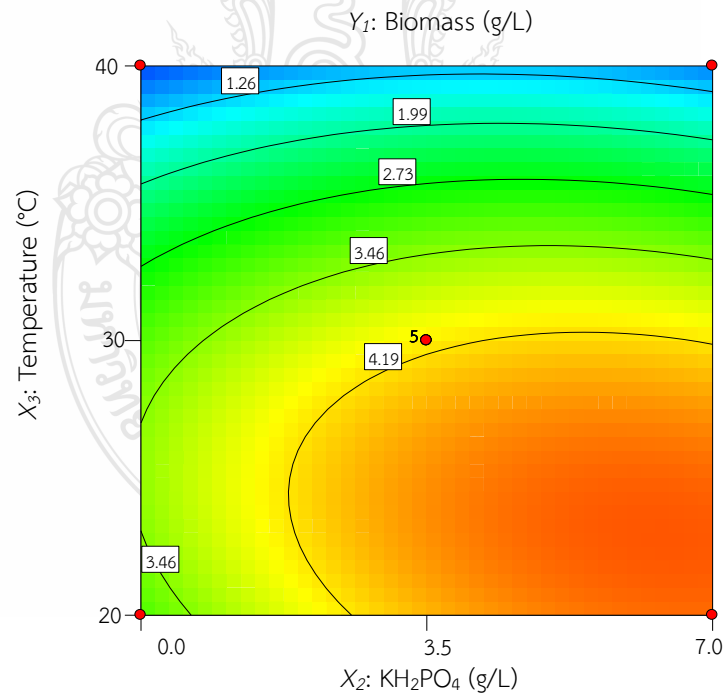


รูปที่ 4.6 อิทธิพลร่วมของความเข้มข้นกลีเซอรอล และอุณหภูมิ ต่อการผลิตชีวมวลยีสต์
(A) แผนรูป 3 มิติ (B) แผนรูป 2 มิติ

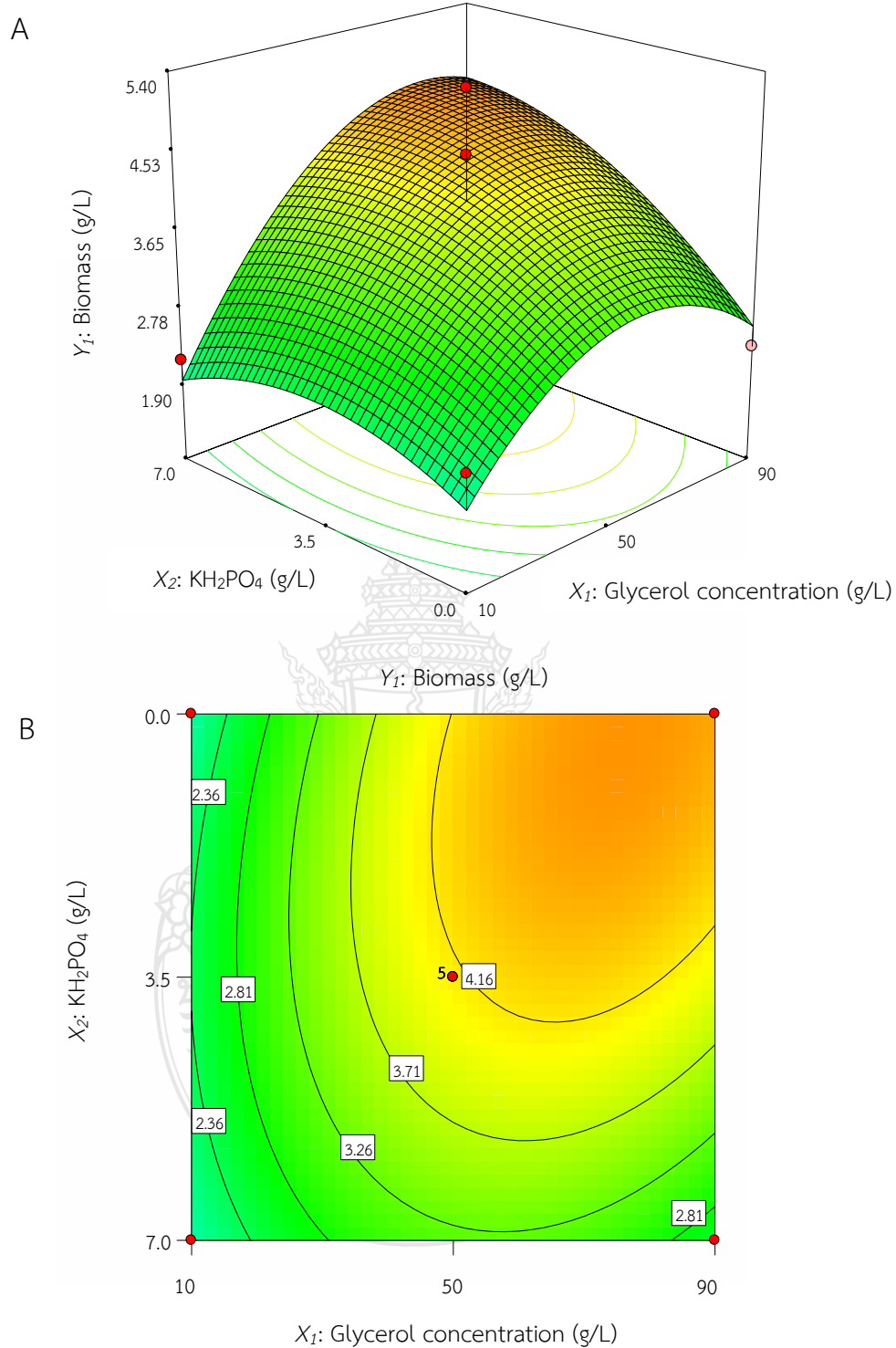
A



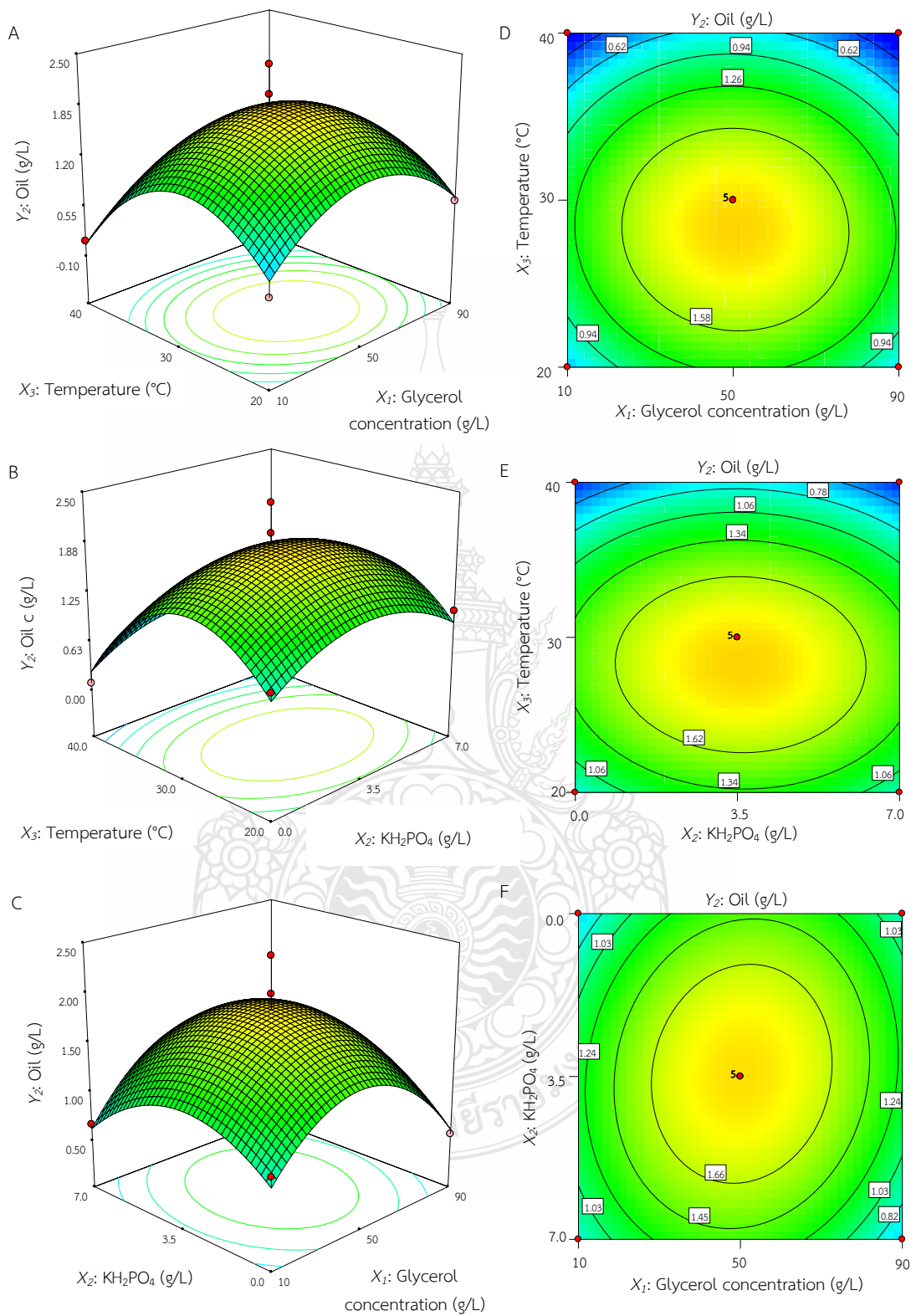
B



รูปที่ 4.7 อิทธิพลร่วมของปริมาณ KH₂PO₄ และอุณหภูมิ ต่อการผลิตชีวมวลยีสต์
(A) แผนรูป 3 มิติ (B) แผนรูป 2 มิติ



รูปที่ 4.8 อิทธิพลร่วมของความเข้มข้นกลีเซอรอล และปริมาณ KH₂PO₄ ต่อการผลิตชีวมวลยีสต์
(A) แผนรูป 3 มิติ (B) แผนรูป 2 มิติ

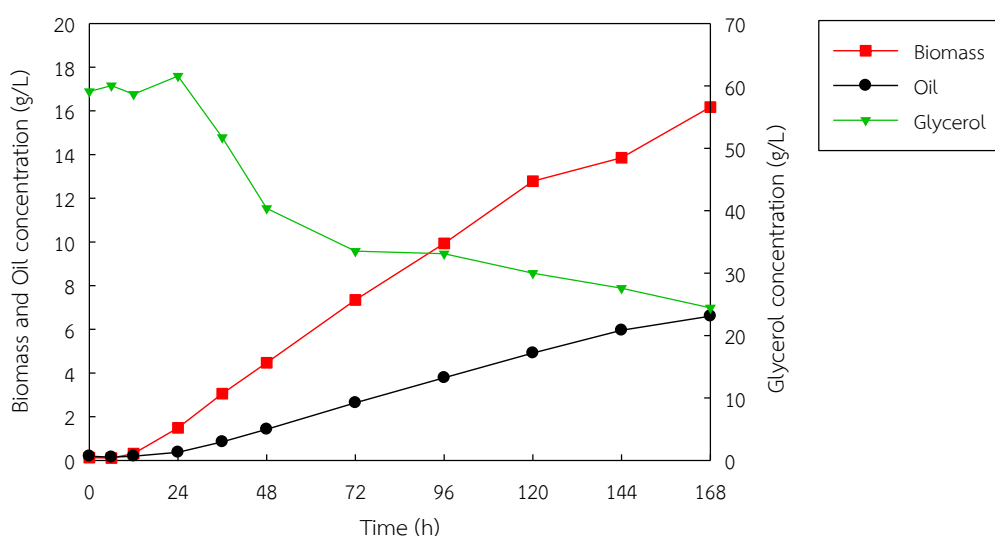


รูปที่ 4.9 อิทธิพลร่วมของปัจจัยต่าง ๆ ต่อการผลิตน้ำมันจากยีสต์
(A-C) แผนรูป 3 มิติ (D-F) แผนรูป 2 มิติ

เมื่อนำสมการกำลังสองของการผลิตชีวมวลและน้ำมันยีสต์ มาหาสภาวะที่เหมาะสม พบว่าความเข้มข้นกลีเซอรอล 59.77 กรัมต่อลิตร ปริมาณ KH_2PO_4 4.37 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 26.22 องศาเซลเซียส จะให้ชีวมวลยีสต์ และปริมาณน้ำมันเท่ากับ 4.93 และ 1.81 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อนำสภาวะดังกล่าวมาทำการทวนสอบรูปแบบของสมการของอิทธิพลต่อการผลิตชีวมวลและการผลิตน้ำมันจากยีสต์ในระดับฟลาคก์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าชีวมวลยีสต์ ปริมาณน้ำมันและปริมาณน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์ เท่ากับ 4.93 กรัมต่อลิตร 1.82 กรัมต่อลิตร และ 36.92 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักชีวมวลแห้ง ตามลำดับ พบว่าค่า P-value ที่ได้จากการทดลองจริงไม่แตกต่างกันกับผลการทดลองของค่าที่ได้ตั้งสมการ 4.4 เมื่อ Y_1 เท่ากับ $4.12 + 0.81X_1 - 1.66X_3 - 0.87X_1X_3 - 0.94X_1^2 - 1.33X_3^2$ และสมการ 4.5 เมื่อ Y_2 เท่ากับ $1.87 - 0.31X_3 - 0.68X_1^2 - 0.47X_2^2 - 0.87X_3^2$ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ($P\text{-value} > 0.05$)

4.2.3 การศึกษาการผลิตน้ำมันของยีสต์แบบขยายขนาดในถังหมักขนาด 5 ลิตร

จากการเพาะเลี้ยงยีสต์ด้วยสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันของ *P. parantarctica* CHC28 ด้วยวิธี RSM เพื่อรักษาอัตราการเจริญให้คงที่ตลอดการเพาะเลี้ยง จึงทำการควบคุมอัตราการให้อากาศที่ 1.0 วีวีเอ็ม ภายในถังหมัก ทำให้ชีวมวลยีสต์สูงสุด ปริมาณน้ำมันสูงสุด และปริมาณน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์เท่ากับ 16.18 กรัมต่อลิตร 6.60 กรัมต่อลิตร และ 40.8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักชีวมวลแห้ง ตามลำดับ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง ดังรูปที่ 4.10 คิดเป็นผลผลิตของชีวมวลยีสต์ ผลผลิตของน้ำมันยีสต์ และอัตราการผลิตน้ำมัน เท่ากับ 0.467 0.191 และ 0.408 ตามลำดับ รวมถึงยีสต์จะมีอัตราการเจริญและการผลิตน้ำมันเพิ่มขึ้นในช่วง Log Phase ตั้งแต่ช่วงเวลา 24-168 ชั่วโมง ก่อนเข้าสู่ช่วง Stationary Phase สอดคล้องกับงานวิจัยของ Polburee และคณะ (2016) [8] จากการเพาะเลี้ยงยีสต์ด้วยถังหมักขนาด 5 ลิตร ทำให้ชีวมวลยีสต์และการผลิตน้ำมันเพิ่มขึ้นตั้งแต่ช่วงเวลา 36 ชั่วโมง โดยในปี 2014 Yen และ Liu [60] รายงานพบว่าอากาศมีอิทธิพลต่อการเจริญของยีสต์ *Rhodotorula glutinis* เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจน



รูปที่ 4.10 การเจริญของยีสต์ *P. parantarctica* CHC28 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

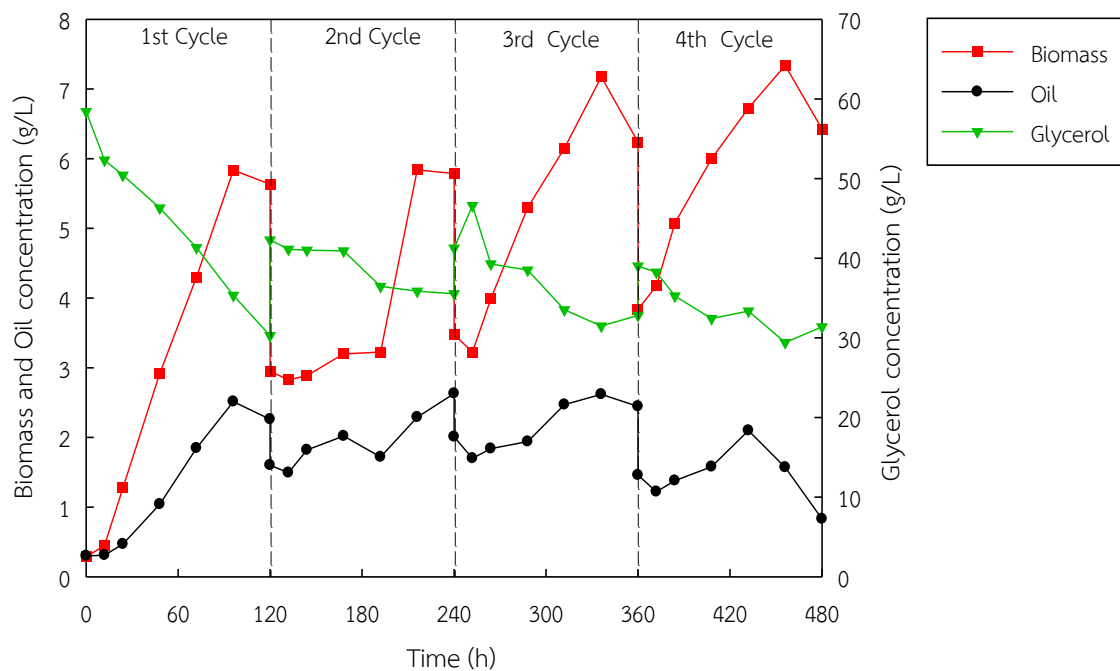
4.3 การศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ความเข้มข้นสูง (High Cell Density) ด้วยกระบวนการหมักแบบกะซ้ำ (Repeated Batch Fermentation)

4.3.1 การศึกษาการเพาะเลี้ยงยีสต์ด้วยการหมักแบบกะซ้ำในระดับฟลาสก์

จากการถ่ายกล้ำเชื้อยีสต์ลงในอาหารผลิตน้ำมัน (Oil Production Medium) ที่มี PT-BDCG เป็นแหล่งคาร์บอน ด้วยกระบวนการหมักแบบกะซ้ำ (Repeated Batch Fermentation, RBF) ซึ่งเป็นการนำจุลินทรีย์กลับมาใช้เป็นกล้ำเชื้อเริ่มต้นสำหรับการหมักครั้งต่อไป ทำให้ความเข้มข้นของเซลล์สูงขึ้นระหว่างการเพาะเลี้ยงและใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงสั้นลง [61] เมื่อกลีเซอรอลในอาหารหมักเริ่มลดลงจะทำการถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อเดิมออกเท่ากับ 50 70 หรือ 90 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรเริ่มต้น และทำการเติมอาหารใหม่ลงไปเท่ากับปริมาตรอาหารที่ถ่ายออก (125 175 หรือ 225 ของปริมาตรอาหารเริ่มต้น จากปริมาตรการทำงาน 250 มิลลิลิตร ตามลำดับ) ทำการเพาะเลี้ยงต่อด้วยสถานะเดิมอีกครั้งจนกว่าประสิทธิภาพกระบวนการหมักจะลดลง ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.9 พบว่าที่อัตราส่วนการเปลี่ยนถ่ายอาหารเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรเริ่มต้น ยีสต์สามารถผลิตชีวมวลความเข้มข้นเฉลี่ยสูงสุด (X_{max}) ความเข้มข้นน้ำมันสูงสุด (P_{max}) และการสะสมน้ำมันภายในเซลล์สูงสุด (Oil content_{max}) เท่ากับ 6.55 กรัมต่อลิตร 2.47 กรัมต่อลิตร และ 38.32 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักชีวมวลแห้ง ตามลำดับ รวมถึงชีวมวลยีสต์มีการสร้างเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เนื่องจากอัตราส่วนของอาหารที่นำออกเพียง 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ทำให้ภายในอาหารยังคงมีการสะสมของชีวมวลยีสต์ที่มีความเข้มข้นสูงอยู่ แต่ในทางกลับกันการผลิตน้ำมันมีอัตราการผลิตที่ลดลง (รูปที่ 4.11) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wan-Mohtar และคณะ (2016) ที่ได้ศึกษาการผลิต Exopolysaccharide (EPS) ของเชื้อรา *Ganoderma lucidum* ด้วยการหมักแบบ RBF เมื่อถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อเดิมออกที่ 50 70 หรือ 90 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตร และถ่ายอาหารใหม่ในปริมาตรเท่าเดิม (100 140 หรือ 180 ของปริมาตรอาหารเริ่มต้น จากปริมาตรการทำงาน 200 มิลลิลิตร ตามลำดับ) เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพการเจริญและการผลิต EPS ได้อย่างต่อเนื่องของ *G. lucidum* เมื่อพิจารณาที่อัตราส่วนอาหาร 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรเริ่มต้น พบว่าการเพาะเลี้ยงรอบที่ 4-5 ยังมีปริมาณชีวมวลมากขึ้นแต่การผลิต EPS ลดลงเนื่องจากมีการสลายบางส่วนของเม็ดที่หุ้ม EPS อยู่ ซึ่งคาดว่าเกิดจากการออโตไลซิส (Autolysis) ของเชื้อรา *G. lucidum* [60]

ในขณะที่อัตราส่วนการเปลี่ยนถ่ายอาหารเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรเริ่มต้น ยีสต์สามารถผลิตชีวมวลเฉลี่ยสูงสุด ความเข้มข้นน้ำมันสูงสุด และการสะสมน้ำมันภายในเซลล์สูงสุด (รูปที่ 4.12) เท่ากับ 5.98 กรัมต่อลิตร 2.75 กรัมต่อลิตร และ 46.11 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักชีวมวลแห้ง ตามลำดับ พบว่าชีวมวลยีสต์และการผลิตน้ำมันเพิ่มขึ้นตั้งแต่การเพาะเลี้ยงรอบที่ 1-2 และลดลงเมื่อเข้าสู่รอบที่ 3 (ตารางที่ 4.9) ซึ่งมีความสอดคล้องกับ Wan-Mohtar และคณะ เมื่อพิจารณาอัตราส่วนการเปลี่ยนถ่ายอาหารที่ 70 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรเริ่มต้น พบว่าการผลิตชีวมวลและการสร้าง EPS เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ในการเพาะเลี้ยงรอบที่ 1-3 และลดลงในรอบที่ 4 [60]

นอกจากนี้การเปลี่ยนถ่ายอาหารเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรเริ่มต้น สามารถผลิตชีวมวลยีสต์เฉลี่ยสูงสุด ความเข้มข้นน้ำมันสูงสุด และการสะสมน้ำมันภายในเซลล์ ได้เท่ากับ 5.64 กรัมต่อลิตร 2.80 กรัมต่อลิตร และ 49.16 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักชีวมวลแห้ง ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.13 เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองกับการเปลี่ยนถ่ายอาหารอัตราส่วนอื่น พบว่าอัตราส่วนเปลี่ยนถ่ายอาหารที่ 90 เปอร์เซ็นต์ ให้การเก็บเกี่ยวชีวมวลยีสต์สูงสุดและน้ำมันสูงสุดสูงกว่าอัตราส่วนอื่น โดยมีค่าเท่ากับ 5.07 กรัมต่อลิตร 2.52 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.9) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Cheirsilp และ Kittha (2015) ได้รายงานว่าการนำ Lignocellulosic ซึ่งเป็นของเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม มาทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus tubingensis* TSIP9 จากการถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อเดิมออกเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรเริ่มต้น จะทำให้มีผลผลิตของเอนไซม์และน้ำมันเพิ่มขึ้นได้อย่างต่อเนื่องและมีประสิทธิภาพ โดยไม่ต้องทำการเตรียมกล้าเชื้อใหม่ในการทดลองแต่ละรอบการเพาะเลี้ยง เนื่องจากสามารถเจริญได้ในแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสม [61]



รูปที่ 4.11 การเจริญของยีสต์ *P. parantarctica* CHC28 ด้วยการหมักแบบกะซ้ำ ที่อัตราส่วนการเปลี่ยนถ่ายอาหารเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรเริ่มต้น

ตารางที่ 4.9 ประสิทธิภาพการผลิตน้ำมันของ *P. parantarctica* CHC28 ด้วยกระบวนการหมักแบบกะซ้ำ

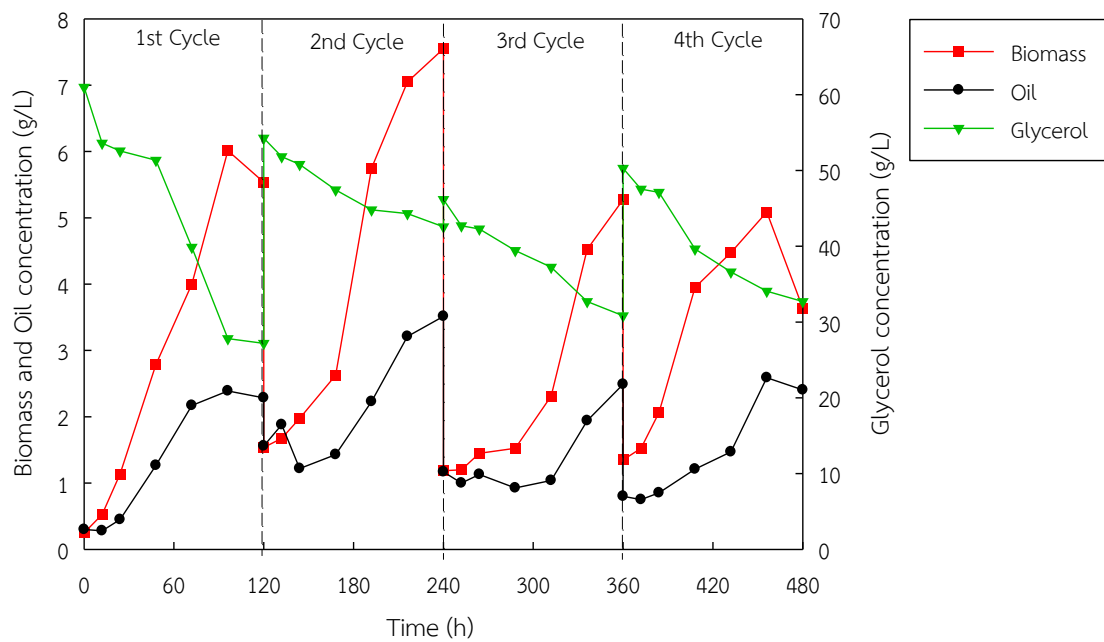
ค่าจลนพลศาสตร์	ปริมาณการถ่ายอาหาร (เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารเริ่มต้น)														
	50					70					90				
	รอบที่ 1	รอบที่ 2	รอบที่ 3	รอบที่ 4	ค่าเฉลี่ย	รอบที่ 1	รอบที่ 2	รอบที่ 3	รอบที่ 4	ค่าเฉลี่ย	รอบที่ 1	รอบที่ 2	รอบที่ 3	รอบที่ 4	ค่าเฉลี่ย
การเจริญของยีสต์															
X_{max} (g/L)	5.83	5.84	7.17	7.34	6.55	6.01	7.55	5.28	5.09	5.98	5.56	6.31	5.36	5.31	5.64
$r_{x,max}$ (g/L h)	0.06	0.03	0.02	0.02		0.06	0.03	0.01	0.01		0.06	0.03	0.01	0.01	
การผลิตน้ำมัน															
P_{max} (g/L)	2.51	2.63	2.62	2.10	2.47	2.39	3.52	2.49	2.59	2.75	2.59	3.74	2.68	2.17	2.80
$r_{p,max}$ (g/L h)	0.03	0.01	0.01	0.00		0.02	0.01	0.01	0.01		0.02	0.02	0.01	0.00	
Oil content _{max} (%w/w)	43.08	45.05	36.52	28.62	38.32	39.77	46.56	47.20	50.90	46.11	46.56	59.27	49.98	40.84	49.16
การใช้ไปของกลีเซอรอล															
ΔS (g/L)	28.12	6.73	8.46	7.63		33.80	11.71	15.36	17.57		30.31	27.98	25.60	22.38	
$Y_{x/s}$ (gBiomass/gGlycerol)	0.21	0.87	0.85	0.96	0.72	0.18	0.64	0.34	0.29	0.36	0.18	0.23	0.21	0.24	0.21
$Y_{p/s}$ (gOil/gGlycerol)	0.09	0.39	0.31	0.28	0.27	0.07	0.30	0.16	0.15	0.17	0.09	0.13	0.10	0.10	0.11
$Y_{p/x}$ (gOil/gBiomass)	0.43	0.45	0.37	0.29	0.38	0.40	0.47	0.47	0.51	0.46	0.47	0.59	0.50	0.41	0.49

X_{max} คือ ความเข้มข้นชีวมวลยีสต์สูงสุด (กรัมต่อลิตร); P_{max} คือ ความเข้มข้นน้ำมันสูงสุด (กรัมต่อลิตร); $r_{x,max}$ คือ อัตราการผลิตชีวมวลยีสต์สูงสุด (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง); $r_{p,max}$ คือ อัตราการผลิตน้ำมันสูงสุด (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง); Oil content_{max} คือ การสะสมน้ำมันในเซลล์สูงสุด (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักชีวมวลแห้ง); ΔS คือ ผลต่างของความเข้มข้นกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร); $Y_{x/s}$ คือ ผลผลิตของชีวมวลยีสต์ (กรัมของชีวมวลยีสต์ต่อกรัมของกลีเซอรอล); $Y_{p/s}$ คือ ผลผลิตของน้ำมัน (กรัมของน้ำมันต่อกรัมของกลีเซอรอล); $Y_{p/x}$ คือ ปริมาณน้ำมันทั้งหมด (กรัมของน้ำมันต่อกรัมของชีวมวลยีสต์)

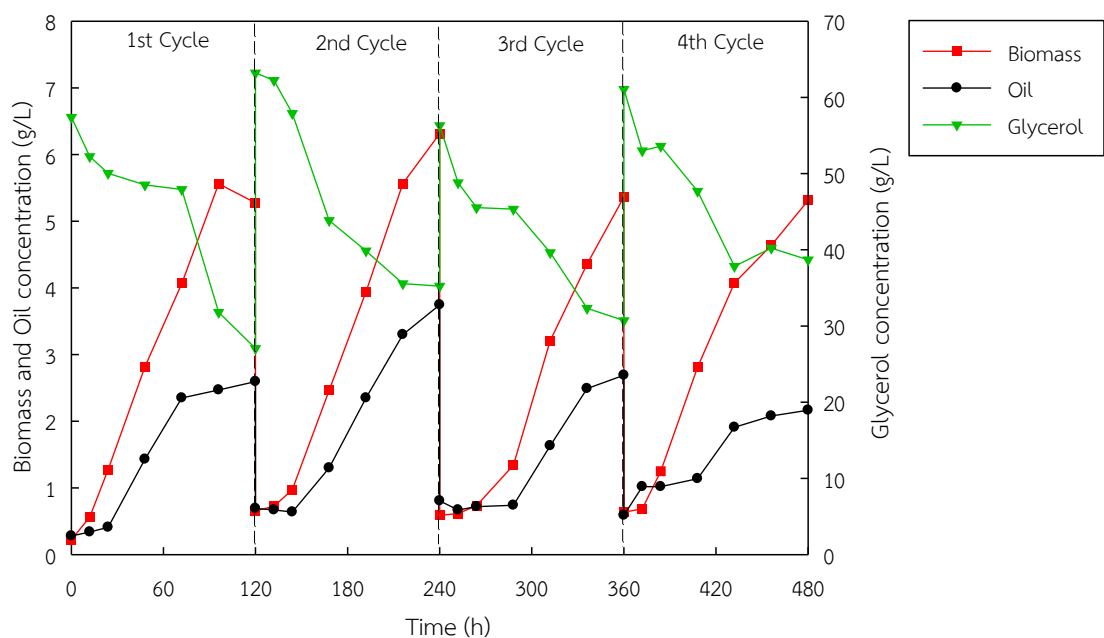
ตารางที่ 4.9 ประสิทธิภาพการผลิตน้ำมันของ *P. parantarctica* CHC28 ด้วยกระบวนการหมักแบบกะช้า (ต่อ)

ค่าจลนพลศาสตร์	ปริมาตรการถ่ายอาหาร (เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหารเริ่มต้น)														
	50					70					90				
	รอบที่ 1	รอบที่ 2	รอบที่ 3	รอบที่ 4	ค่า เฉลี่ย	รอบที่ 1	รอบที่ 2	รอบที่ 3	รอบที่ 4	ค่า เฉลี่ย	รอบที่ 1	รอบที่ 2	รอบที่ 3	รอบที่ 4	ค่า เฉลี่ย
การเก็บเกี่ยวผลผลิต															
<i>Recovery of X_{max}</i> (g/L)	0.73	0.73	0.90	0.92	3.27	1.05	1.32	0.92	0.89	4.19	1.25	1.42	1.21	1.20	5.07
<i>Recovery of P_{max}</i> (g/L)	0.31	0.33	0.33	0.26	1.23	0.42	0.62	0.44	0.45	1.92	0.58	0.84	0.60	0.49	2.52

Recovery of X_{max} คือ ปริมาณการเก็บเกี่ยวชีวมวลยีสต์สูงสุด (กรัมต่อลิตร); *Recovery of P_{max}* คือ ปริมาณการเก็บเกี่ยวน้ำมันยีสต์สูงสุด (กรัมต่อลิตร)



รูปที่ 4.12 การเจริญของยีสต์ *P. parantarctica* CHC28 ด้วยการหมักแบบกะซ้ำ ที่อัตราส่วนการเปลี่ยนถ่ายอาหารเมื่อเปลี่ยนถ่ายอาหารออกเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเริ่มต้น



รูปที่ 4.13 การเจริญของยีสต์ *P. parantarctica* CHC28 ด้วยการหมักแบบกะซ้ำ ที่อัตราส่วนการเปลี่ยนถ่ายอาหารเมื่อเปลี่ยนถ่ายอาหารออกเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเริ่มต้น

4.3.2 การศึกษาการเพาะเลี้ยงยีสต์ความเข้มข้นสูงด้วยการหมักแบบกะช้าร่วมกับการหมวนเวียนเซลล์ในระดับฟลาสก์และถังหมักขนาด 5 ลิตร

ผลการศึกษาการเจริญของยีสต์น้ำมัน *P. panrantarctica* CHC28 เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ความเข้มข้นสูงด้วยการหมักแบบกะช้าร่วมกับการหมวนเวียนเซลล์ในระดับฟลาสก์ (ตารางที่ 4.10) พบว่าค่าเฉลี่ยชีวมวลยีสต์สูงสุด การผลิตน้ำมันสูงสุด และปริมาณน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์มีค่าเท่ากับ 10.35 กรัมต่อลิตร 4.34 กรัมต่อลิตร และ 41.94 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักชีวมวลแห้ง ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.14 และเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูงด้วยการหมักแบบกะช้าร่วมกับการหมวนเวียนเซลล์ในระดับถังหมัก ผลการทดลองพบว่าการเพาะเลี้ยงทำให้ค่าเฉลี่ยชีวมวลยีสต์สูงสุด การผลิตน้ำมันสูงสุด และปริมาณน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์ เท่ากับ 16.57 กรัมต่อลิตร 5.62 กรัมต่อลิตร และ 33.88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.15 เมื่อพิจารณาการเก็บเกี่ยวชีวมวลยีสต์สูงสุดและการเก็บเกี่ยวน้ำมันยีสต์สูงสุดในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร มีค่าเท่ากับ 14.91 และ 5.05 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการเก็บเกี่ยวผลผลิตในระดับถังหมักของแต่ละรอบการเพาะเลี้ยงจะมีประสิทธิภาพมากกว่าในระดับฟลาสก์ เนื่องจากยีสต์อาจได้รับอากาศในการเจริญภายในระบบถังหมักคงที่ทำให้เจริญได้ดี สอดคล้องกับการศึกษาของ Dashti และ Abdeshtahian (2016) [62] ได้มีการรายงานวาระหว่างการเจริญของเชื้อรา *Cunninghamella bainieri* 2A1 สามารถเจริญได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอัตราความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที พบว่ามีการผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อภายในระบบการหมักที่ดี มีออกซิเจนสูงทำให้การถ่ายโอนสารอาหารที่ดีต่อเซลล์จุลินทรีย์ ส่งผลต่อกิจกรรมการเผาผลาญของ *C. bainieri* เพิ่มขึ้นสำหรับการสังเคราะห์น้ำมัน และเมื่อทำการเปรียบเทียบการหมักแบบกะช้ากับการหมักแบบกะช้า (RBF) พบว่าการหมัก RBF สามารถทำให้การผลิตชีวมวลยีสต์และน้ำมันสูงกว่า สอดคล้องกับ Dashti และ Abdeshtahian รายงานว่าการเพาะเลี้ยงแบบ RBF สามารถเพิ่มชีวมวลได้เท่ากับ 11.12 กรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับการหมักแบบกะ (8.1 กรัมต่อลิตร) และเพิ่มปริมาณการผลิตน้ำมันได้เท่ากับ 3.30 และ 2.96 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ [62]

ตารางที่ 4.10 การเพาะเลี้ยง *P. parantarctica* CHC28 แบบกะข้ำร่วมกับการหมุนเวียนเซลล์

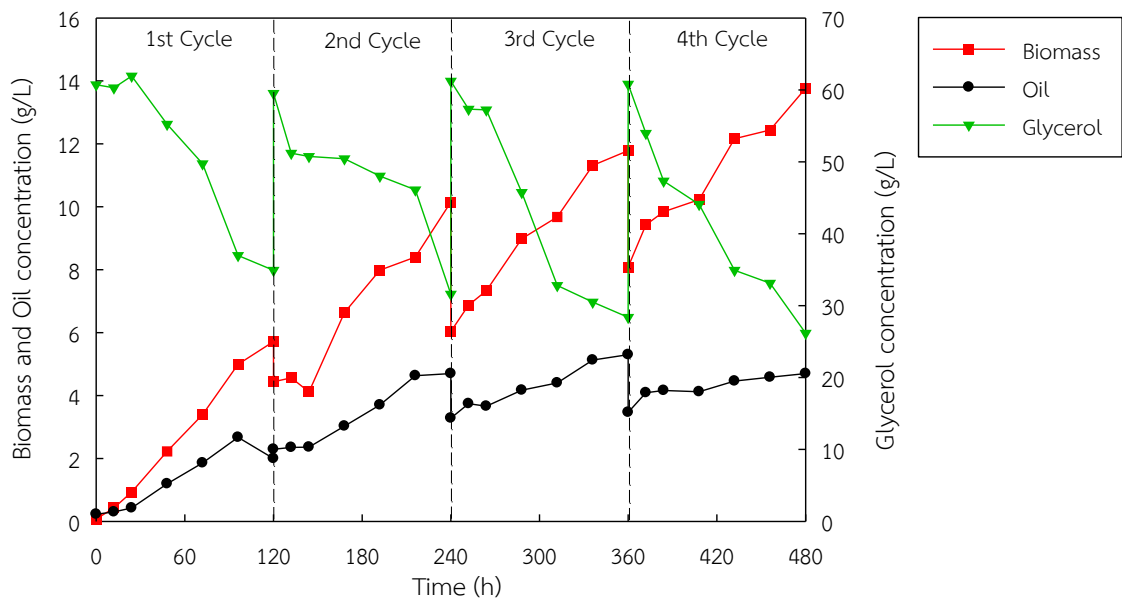
ค่าจลนพลศาสตร์	ปริมาตรการถ่ายอาหาร (เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหารเริ่มต้น)														
	RBF ในระดับฟลาสก์					RBF ด้วยการเพาะเลี้ยงยีสต์ความเข้มข้นสูงในระดับฟลาสก์					RBF ด้วยการเพาะเลี้ยงยีสต์ความเข้มข้นสูงในระดับถังหมัก				
	รอบที่	รอบที่	รอบที่	รอบที่	ค่าเฉลี่ย	รอบที่	รอบที่	รอบที่	รอบที่	ค่าเฉลี่ย	รอบที่	รอบที่	รอบที่	รอบที่	ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	4		1	2	3	4		1	2	3	4	
การเจริญของยีสต์															
X_{max} (g/L)	5.56	6.31	5.36	5.31	5.64	5.72	10.15	11.78	13.77	10.35	7.55	10.25	21.85	26.64	16.57
$r_{x,max}$ (g/L h)	0.06	0.03	0.01	0.01		0.05	0.04	0.03	0.03		0.10	0.07	0.10	0.14	
การผลิตน้ำมัน															
P_{max} (g/L)	2.59	3.74	2.68	2.17	2.80	2.67	4.70	5.30	4.70	4.34	3.11	4.43	6.78	8.15	5.62
$r_{p,max}$ (g/L h)	0.00	0.02	0.01	0.00		0.03	0.02	0.01	0.01		0.04	0.03	0.03	0.03	
Oil content _{max} (%w/w)	46.56	59.27	49.98	40.84	49.58	46.71	46.31	44.98	34.14	41.94	41.19	43.17	31.01	30.60	33.88

X_{max} คือ ความเข้มข้นชีวมวลยีสต์สูงสุด (กรัมต่อลิตร); P_{max} คือ ความเข้มข้นน้ำมันสูงสุด (กรัมต่อลิตร); $r_{x,max}$ คือ อัตราการผลิตชีวมวลยีสต์สูงสุด (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง); $r_{p,max}$ คือ อัตราการผลิตน้ำมันสูงสุด (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง); Oil content_{max} คือ การสะสมน้ำมันในเซลล์สูงสุด (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักชีวมวลแห้ง)

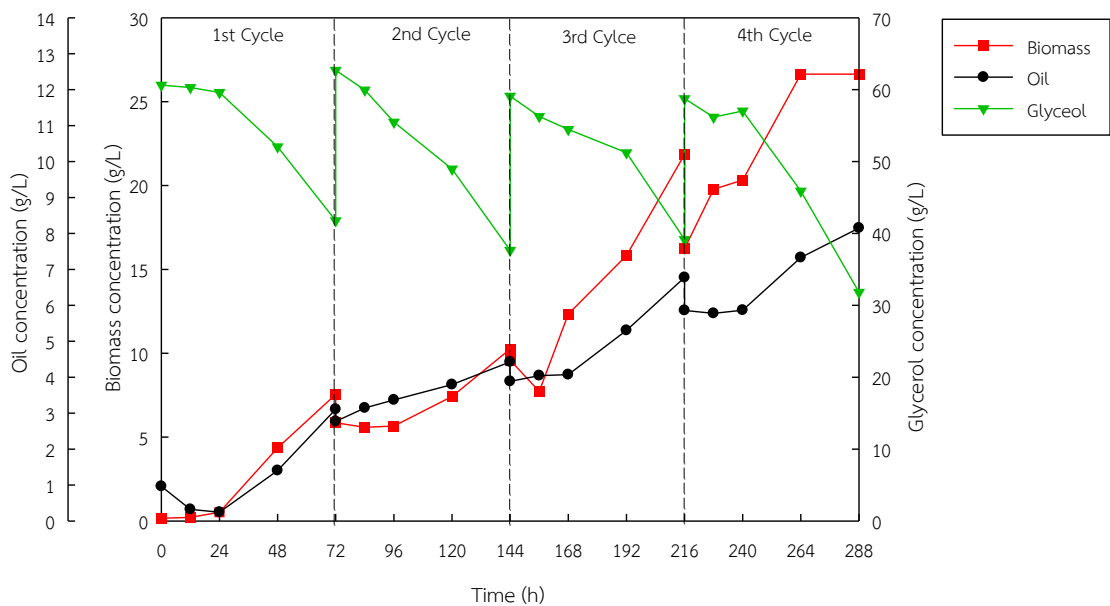
ตารางที่ 4.10 การเพาะเลี้ยง *P. parantarctica* CHC28 แบบกะข้ำร่วมกับการหมุนเวียนเซลล์ (ต่อ)

ค่าจลนพลศาสตร์	ปริมาตรการถ่ายอาหาร (เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหารเริ่มต้น)														
	RBF ในระดับฟลาสก์					RBF ด้วยการเพาะเลี้ยงยีสต์ความเข้มข้นสูงในระดับฟลาสก์					RBF ด้วยการเพาะเลี้ยงยีสต์ความเข้มข้นสูงในระดับถังหมัก				
	รอบที่	รอบที่	รอบที่	รอบที่	ค่าเฉลี่ย	รอบที่	รอบที่	รอบที่	รอบที่	ค่าเฉลี่ย	รอบที่	รอบที่	รอบที่	รอบที่	ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	4		1	2	3	4		1	2	3	4	
การใช้ไปของกลีเซอรอล															
ΔS (g/L)	30.31	27.98	25.60	22.38		25.81	27.92	32.84	34.63		18.86	25.04	19.94	26.92	
$Y_{x/s}$ (gBiomass/gGlycerol)	0.18	0.23	0.21	0.24	0.22	0.22	0.36	0.36	0.40	0.34	0.40	0.41	1.10	0.99	0.72
$Y_{p/s}$ (gOil/gGlycerol)	0.09	0.13	0.10	0.10	0.11	0.10	0.17	0.16	0.14	0.14	0.16	0.18	0.34	0.30	0.25
$Y_{p/x}$ (gOil/gBiomass)	0.47	0.59	0.50	0.41	0.49	0.47	0.46	0.45	0.34	0.43	0.41	0.43	0.31	0.31	0.36
การเก็บเกี่ยวผลผลิต															
$Recovery\ of\ X_{max}$ (g/L)	1.25	1.42	1.21	1.20	5.07	1.29	2.28	2.65	3.10	9.32	1.70	2.31	4.92	5.99	14.91
$Recovery\ of\ P_{max}$ (g/L)	0.58	0.84	0.60	0.49	2.52	0.60	1.06	1.19	1.06	3.91	0.70	1.00	1.52	1.83	5.05

ΔS คือ ผลต่างของความเข้มข้นกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร); $Y_{x/s}$ คือ ผลผลิตของชีวมวลยีสต์ (กรัมของชีวมวลยีสต์ต่อกรัมของกลีเซอรอล); $Y_{p/s}$ คือ ผลผลิตของน้ำมัน (กรัมของน้ำมันต่อกรัมของกลีเซอรอล); $Y_{p/x}$ คือ ปริมาณน้ำมันทั้งหมด (กรัมของน้ำมันต่อกรัมของชีวมวลยีสต์); Recovery of X_{max} คือ ปริมาณการเก็บเกี่ยวชีวมวลยีสต์สูงสุด (กรัมต่อลิตร); Recovery of P_{max} คือ ปริมาณการเก็บเกี่ยวน้ำมันยีสต์สูงสุด (กรัมต่อลิตร)



รูปที่ 4.14 การเจริญของยีสต์ *P. parantarctica* ความเข้มข้นสูง ด้วยการหมักแบบกะซ้ำร่วมกับการหมุนเวียนเซลล์ในระดับฟลาสก์ เมื่อเปลี่ยนถ่ายอาหารเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรเริ่มต้น



รูปที่ 4.15 พฤติกรรมการเจริญของยีสต์ *P. parantarctica* ความเข้มข้นสูง ด้วยการหมักแบบกะซ้ำร่วมกับการหมุนเวียนเซลล์ในถังหมัก เมื่อเปลี่ยนถ่ายอาหารออกเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรเริ่มต้น

4.4 การศึกษาแบบจำลองทางจลนพลศาสตร์ในการเลียนแบบการผลิตน้ำมันของยีสต์

4.4.1 การจำลองทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตน้ำมันจากชีวมวลยีสต์ด้วย PT-BDCG

แบบจำลองสมการ Logistic กับความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร (μ_{max} , X_{max} และ K_i) การผลิตน้ำมันด้วยแบบจำลองสมการ Luedeking–Piret (α , β และ $Y_{p/s}$) และแบบจำลองสมการการใช้กลีเซอรอล ($Y_{x/s}$ และ m_s) ถูกนำมาประยุกต์ใช้ศึกษาค่าทางจลนพลศาสตร์ของการเจริญ การผลิตน้ำมันและการใช้ไปของกลีเซอรอล (ตารางที่ 4.11) เมื่อนำข้อมูลการทดลองจริงมาเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้จากแบบจำลองทางจลนพลศาสตร์ พบว่าผลการทดลองมีความสอดคล้องกับรูปแบบจำลองของสมการ Logistic ดังรูปที่ 4.15 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร PG ที่ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร และ PT-BDCG ที่ความเข้มข้น 50 และ 70 กรัมต่อลิตร จากค่า R^2 ของการเจริญของชีวมวลยีสต์ เท่ากับ 0.872, 0.915 และ 0.816 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าข้อมูลมีความสอดคล้องกับแบบจำลองทางคณิตศาสตร์มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ทุกสภาวะการทดลอง โดยจากสภาวะ PT-BDCG ที่ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร การเจริญของชีวมวลยีสต์มีค่าเท่ากับ 11.19 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด 0.025 ต่อชั่วโมง แสดงให้เห็นว่ามีการเจริญที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะอื่น ๆ รวมถึงมีค่า K_i เท่ากับ 700 กรัมต่อลิตร จากการนำค่าที่ได้มาแทนสมการในพจน์ระหว่างค่า $[S]/K_i$ ทำให้เกิดการยับยั้งจากสารตั้งต้นน้อยกว่าสภาวะอื่น เนื่องจากมีความเข้มข้นของสารตั้งต้นต่ำและค่า K_i สูง ทำให้พจน์ของ $[S]/K_i$ หายไปจากสมการ ส่งผลให้มีค่า μ_{max} สูงขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Feng และคณะ (2014) ได้ทำการใช้แบบจำลอง Logistic เพื่อศึกษาการเจริญของชีวมวลเห็ด *Ganoderma lucidum* จากการใช้ตัวแปร μ_{max} ที่สามารถบ่งบอกพฤติกรรมการเจริญของชีวมวลเมื่อเข้าสู่ช่วงระยะ Log phase จากการเปรียบเทียบระหว่างการเจริญกับระยะเวลาการเพาะเลี้ยง และค่า K_i สามารถบ่งบอกถึงพฤติกรรมการยับยั้งของสารตั้งต้นที่ลดลงของสภาวะการทดลองที่ทำการเลียนแบบได้ [46]

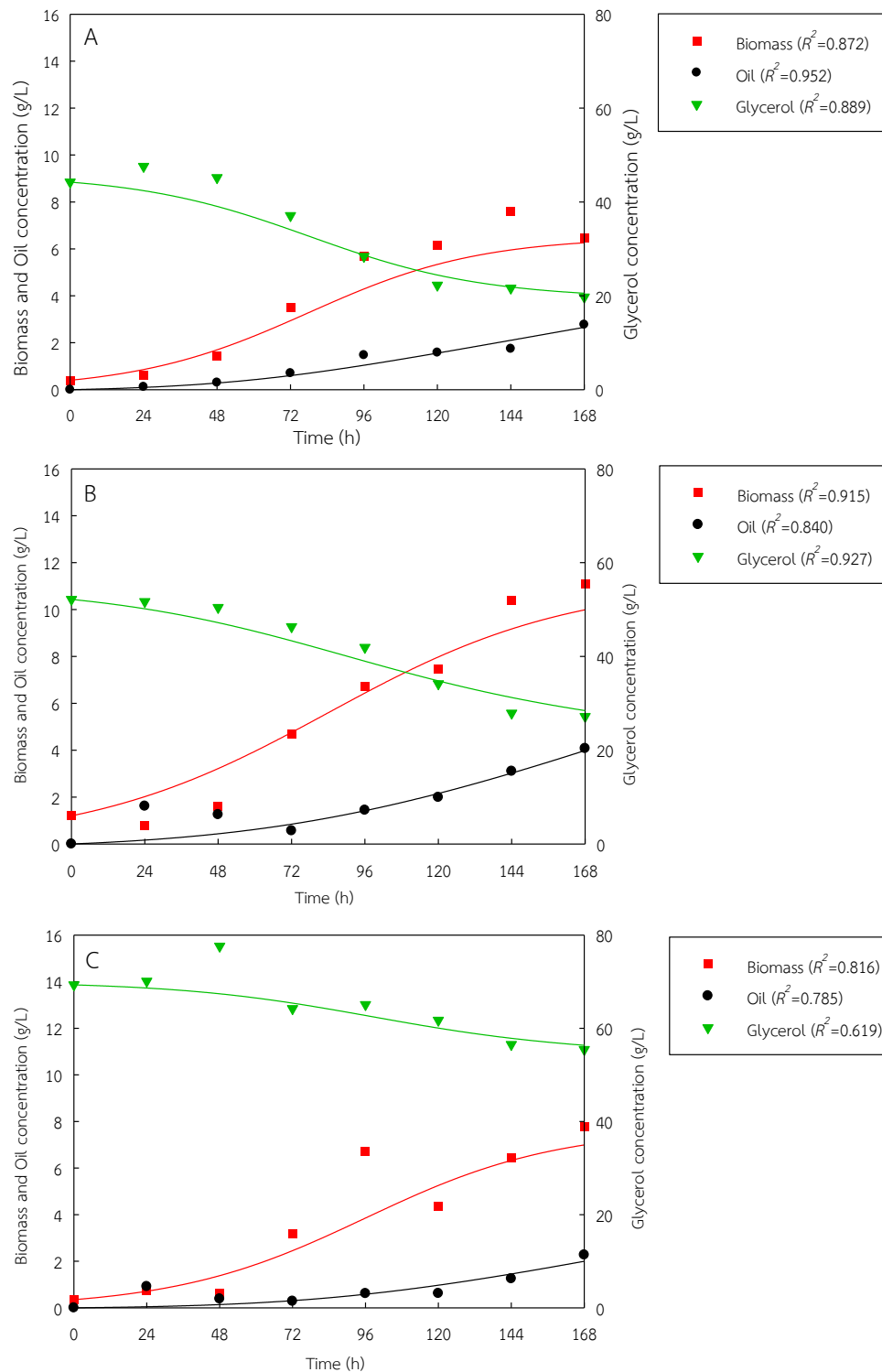
เมื่อพิจารณาค่า α และ β พบว่า α มีค่าเท่ากับ 0.096, 0.010 และ 0.017 ตามลำดับ และ β เท่ากับ 0.004, 0.004 และ 0.003 ตามลำดับ โดยเมื่อค่า α และ β ไม่เท่ากับศูนย์ มีความสอดคล้องกับเงื่อนไขของ Yang และคณะ (2011) [47] ว่าการผลิตน้ำมันมีความสัมพันธ์กับการเจริญของชีวมวลยีสต์เมื่อ α และ β มีค่าไม่เท่ากับศูนย์ และค่า α มากกว่า β อีกทั้งค่า R^2 ของการผลิตน้ำมันยีสต์ เท่ากับ 0.952, 0.840 และ 0.785 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าข้อมูลมีความสอดคล้องกับแบบจำลองทาง Luedeking–Piret มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์

อีกทั้งทั้งจากค่า R^2 ของสมการอัตราการใช้กลีเซอรอล 0.889, 0.927 และ 0.619 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่ารูปแบบสมการเมื่อใช้ PT-BDCG ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร สามารถทำให้ข้อมูลเข้ากันได้ดีมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ($R^2=0.927$) รวมถึงมีผลต่อการเจริญของยีสต์น้ำมัน *P. parantarctica* เมื่อความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรของผลผลิตชีวมวลยีสต์ ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.253 0.443 และ 0.560 ตามลำดับ และค่าสัมประสิทธิ์การบำรุงรักษาชีวมวล เท่ากับ 0.001 0.004 และ 0.002 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.11) สอดคล้องกับงานวิจัย Marudkla และคณะ (2018) ได้ทำการใช้แบบจำลอง Luedeking–Piret ศึกษาผลผลิต Poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) และแบบจำลองการใช้สารตั้งต้นจากความเข้มข้นของกลูโคสเพื่อศึกษาการใช้ไปของสารตั้งต้น [48]

ตารางที่ 4.11 ค่าจลนพลศาสตร์ของอัตราการเจริญชีวมวลยีสต์ การผลิตน้ำมันและการใช้กลีเซอรอลของยีสต์น้ำมัน *P. parantarctica* CHC28 ใน PG และ PT-BDCG

รูปแบบ สมการ	ค่าจลนพลศาสตร์	สภาวะการทดลอง		
		PG 50 กรัมต่อลิตร	PT-BDCG 50 กรัมต่อลิตร	PT-BDCG 70 กรัมต่อลิตร
การเจริญของยีสต์				
$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right) \left(\frac{1}{1 + S/K_i}\right)$	$\mu_{\max} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0.037	0.025	0.032
	$X_{\max} \text{ (g/L)}$	6.50	11.19	7.70
	$K_i \text{ (g/L)}$	685.33	700.00	699.94
	R^2	0.872	0.915	0.816
	RMSE	0.855	0.945	1.160
การผลิตน้ำมัน				
$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X$	α	0.096	0.010	0.017
	β	0.004	0.004	0.003
$Y_{p/s} = \alpha(Y_{x/s})$	$Y_{p/s} \text{ (gOil/gGlycerol)}$	0.024	0.004	0.010
	R^2	0.952	0.840	0.785
	RMSE	0.206	0.599	0.361
การใช้กลีเซอรอลของยีสต์				
$\frac{dS}{dt} = -\left[\left(\frac{1}{Y_{x/s}}\right) \frac{dX}{dt} + m_s X\right]$	$Y_{x/s} \text{ (gBiomass/gGlycerol)}$	0.253	0.443	0.560
	$m_s \text{ (g/L h)}$	0.001	0.004	0.002
	R^2	0.889	0.927	0.619
	RMSE	3.132	2.335	3.855

$\mu_{\max}$ คือ อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (ต่อชั่วโมง); $X_{\max}$ คือ ความเข้มข้นชีวมวลยีสต์สูงสุด (กรัมต่อลิตร); K_i คือ ค่าคงที่ของการยับยั้ง (กรัมต่อลิตร); α คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของการสังเคราะห์น้ำมันที่สัมพันธ์กับการเจริญของชีวมวลยีสต์; β คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของการสังเคราะห์น้ำมันที่ไม่สัมพันธ์กับการเจริญของชีวมวลยีสต์; $Y_{p/s}$ คือ ผลผลิตของน้ำมันยีสต์ (กรัมของน้ำมันต่อกรัมของกลีเซอรอล); $Y_{x/s}$ คือ ผลผลิตของชีวมวลยีสต์ (กรัมของเซลล์ยีสต์ต่อกรัมของกลีเซอรอล); m_s คือ ค่าสัมประสิทธิ์การบำรุงรักษาชีวมวลยีสต์ (กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง); R^2 คือ ค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ; RMSE คือ ค่าความคลาดเคลื่อนกำลังสองเฉลี่ย; PG คือ กลีเซอรอลบริสุทธิ์ ; PT-BDCG คือ กลีเซอรอลที่ปรับสภาพ



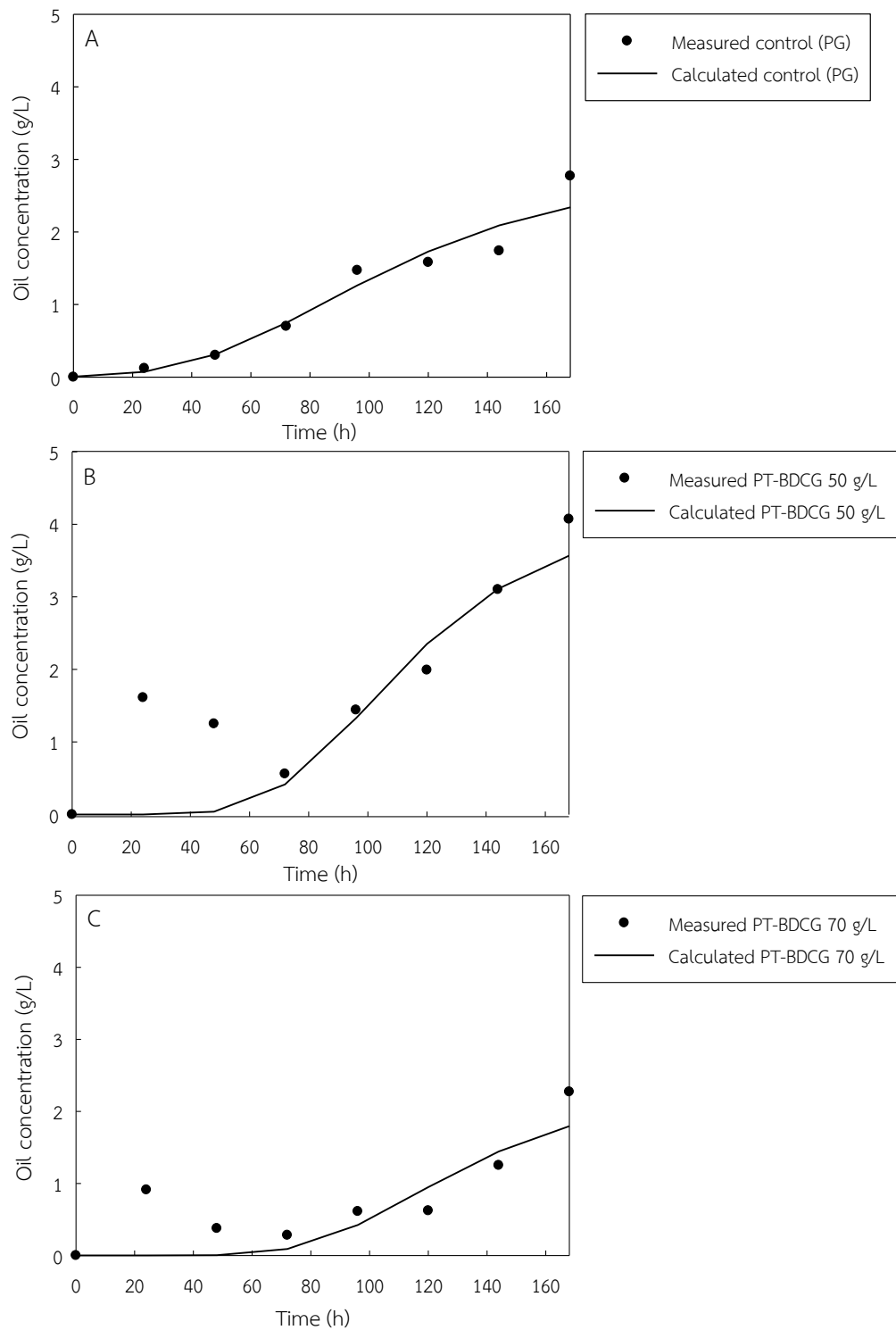
รูปที่ 4.16 การเลียนแบบพฤติกรรมกรรมการเจริญของชีวมวลยีสต์ การผลิตน้ำมันและอัตราการใช้กลีเซอรอล ในอาหารที่ใช้ PG 50 กรัมต่อลิตร (A) และใช้ PT-BDCG ความเข้มข้น 50 (B) และ 70 กรัมต่อลิตร (C) เป็นแหล่งคาร์บอน

นอกจากนี้ได้มีการใช้แบบจำลองสมการ Gompertz เพื่อศึกษาความเข้มข้นน้ำมันสูงสุด (P_{max}) ดังตารางที่ 4.12 พบว่ามีค่า P_{max} เท่ากับ 2.77, 4.07 และ 2.27 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ อัตราการผลิตน้ำมันสูงสุด ($r_{p,max}$) ของ PG ที่ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร เท่ากับ 0.02 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อมีระยะเวลาเริ่มต้นในการผลิตน้ำมัน (t_L) ที่ 37.74 ชั่วโมง ($R^2=0.940$) เพื่อเข้าสู่ระยะ Log Phase ทำการเปรียบเทียบกับ PT-BDCG ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร พบว่า $r_{p,max}$ มีค่าเท่ากับ 0.04 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมี t_L เท่ากับ 66.13 ชั่วโมง ($R^2=0.787$) ทำให้มีอัตราการผลิตน้ำมันซึ่งเป็นสารเมแทบอไลต์ (Primary Metabolite) และผลิตขึ้นในช่วง Log Phase ระหว่างเจริญของชีวมวลยีสต์ รวมถึง PT-BDCG ที่ความเข้มข้น 70 กรัมต่อลิตร มี $r_{p,max}$ เท่ากับชุดควบคุม (0.02 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) แต่มี t_L เท่ากับ 78.38 ชั่วโมง (ดังรูปที่ 4.17) ทำให้ใช้เวลาในการผลิตน้ำมันเริ่มต้นช้ากว่าสภาวะอื่น อาจเกิดจากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นกลีเซอรอลสูง ส่งผลให้มีการยับยั้งสารตั้งต้นจากการพิจารณา K_i สอดคล้องกับงานวิจัยของ Rorke และ Kana (2017) [62] ร่วมกับ Phukoetphim และคณะ (2017) [63] ทำการใช้แบบจำลอง Gompertz เพื่อศึกษาอัตราการผลิตเอทานอลของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่าเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของค่า P_{max} และ $r_{p,max}$ ยังมีการผลิตน้ำมันมากขึ้น ทำให้ P_{max} และ $r_{p,max}$ สูงขึ้นตามไปด้วย แสดงถึงการผลิตน้ำมันที่มีประสิทธิภาพ เมื่ออยู่ในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิต รวมถึงค่า t_L แสดงถึงระยะเวลาเริ่มต้นในการผลิตน้ำมัน เมื่อมีค่าน้อยทำให้การเข้าสู่การสังเคราะห์น้ำมันของชีวมวลยีสต์สามารถผลิตได้เร็ว ณ เวลานั้น ๆ

ตารางที่ 4.12 การเลียนแบบพฤติกรรมอัตราการผลิตน้ำมัน จากยีสต์ผลิตน้ำมัน *P. Parantarctica* ด้วยสมการ Gompertz

สภาวะการทดลอง	ค่าจลนพลศาสตร์ของการผลิตน้ำมัน				
	P_{max}	$r_{p,max}$	t_L	R^2	RMSE
PG 50 กรัมต่อลิตร	2.77	0.02	37.74	0.940	0.217
PT-BDCG 50 กรัมต่อลิตร	4.07	0.04	66.13	0.787	0.748
PT-BDCG 70 กรัมต่อลิตร	2.27	0.02	78.38	0.737	0.420

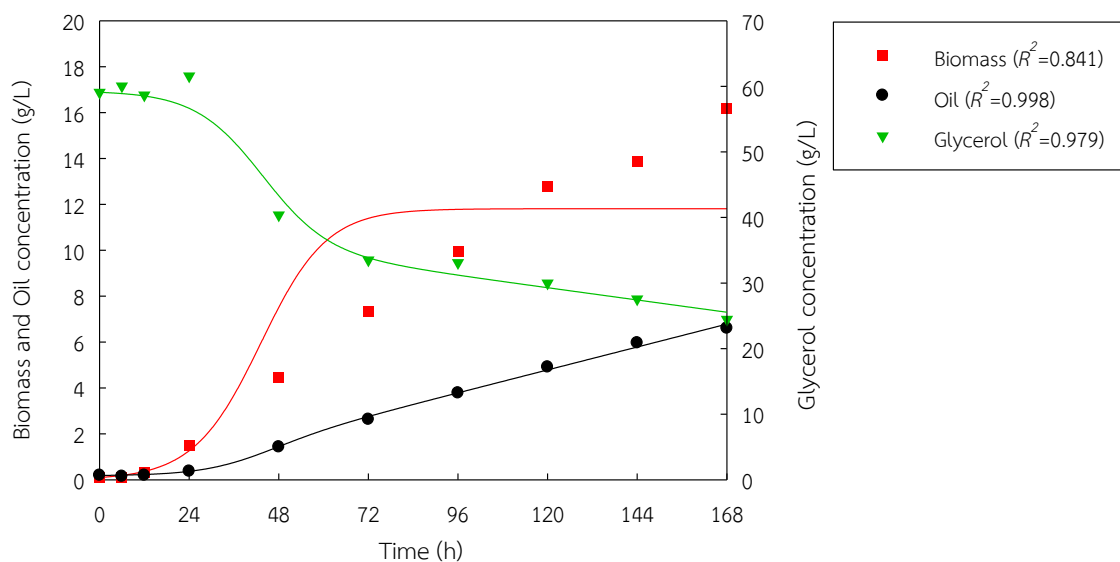
P_{max} คือ ความเข้มข้นน้ำมันสูงสุด (กรัมต่อลิตร); $r_{p,max}$ คือ อัตราการผลิตน้ำมันสูงสุด (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง); t_L คือ ระยะเวลาเริ่มต้นก่อนการผลิตน้ำมัน (ชั่วโมง); R^2 คือ ค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ; RMSE คือ ค่าความคลาดเคลื่อนกำลังสองเฉลี่ย; PG คือ กลีเซอรอลบริสุทธิ์; PT-BDCG คือ กลีเซอรอลที่ปรับสภาพ



รูปที่ 4.17 การเลียนแบบการผลิตน้ำมันของยีสต์ *P. parantarctica* ด้วยสมการ Gompertz ในสถานะที่ใช้ PG 50 กรัมต่อลิตร (A) และใช้ PT-BDCG 50 กรัมต่อลิตร (B) และ 70 กรัมต่อลิตร (C) เป็นแหล่งคาร์บอน

4.4.2 การจำลองทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตน้ำมันจากชีวมวลยีสต์แบบขยายขนาดในถังหมักขนาด 5 ลิตร

แบบจำลองสมการ Logistic กับความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร (μ_{max} , X_{max} และ K_i) การผลิตน้ำมันด้วยแบบจำลองสมการ Luedeking–Piret (α , β และ $Y_{p/s}$) และแบบจำลองสมการการใช้กลีเซอรอล ($Y_{x/s}$ และ m_s) ถูกนำมาประยุกต์ใช้ศึกษาค่าทางจลนพลศาสตร์ของการเจริญ การผลิตน้ำมันและการใช้ไปของกลีเซอรอล ดังรูปที่ 4.18 แสดงการเลียนแบบพฤติกรรมผลการเจริญของยีสต์ในระดับถังหมัก ด้วยสมการ Logistic ทำให้ค่า X_{max} เท่ากับ 11.81 กรัมต่อลิตร ที่ค่า μ_{max} 0.123 ต่อชั่วโมง และมีค่า K_i เท่ากับ 484.47 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยง 168 ชั่วโมง สามารถอธิบายได้ว่า อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดในระดับถังหมักยังมีการเจริญอย่างต่อเนื่องอยู่ในช่วง Log phase ก่อนที่จะเข้าสู่ช่วง Stationary phase มีความเข้ากันได้กับข้อมูลเท่ากับ 84.1 เปอร์เซ็นต์ ($R^2=0.841$) เนื่องจากรูปแบบของสมการทำให้พจน์ของ S และ K_i แสดงค่าของข้อมูลจริงกับแบบจำลองสมการ Logistic เข้ากันได้น้อย (รูปที่ 4.18) อีกทั้งการเลียนแบบพฤติกรรมผลการผลิตน้ำมันด้วยสมการ Luedeking–Piret ทำให้ตัวแปร α และ β เท่ากับ 0.119 และ 0.004 ตามลำดับ โดยค่า α และ β มีค่าไม่เท่ากับศูนย์ และมีค่า α มากกว่า β แสดงว่าการผลิตน้ำมันของยีสต์มีความสัมพันธ์กับการเจริญของเซลล์ยีสต์ [47] และแบบจำลองมีความเข้ากันได้กับผลการทดลองจริงเท่ากับ 99.8 เปอร์เซ็นต์ ($R^2=0.998$) นอกจากนี้ตัวแปร m_s แสดงค่าสัมประสิทธิ์การบำรุงรักษาเซลล์ เท่ากับ 0.007 ต่อชั่วโมง ความเข้ากันได้กับข้อมูล 97.9 เปอร์เซ็นต์ ($R^2=0.979$) ดังตารางที่ 4.13



รูปที่ 4.18 การเลียนแบบพฤติกรรมผลการเจริญของยีสต์เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในระดับถังหมัก 5 ลิตร

ตารางที่ 4.13 ค่าจลนพลศาสตร์ของอัตราการเจริญชีวมวลยีสต์ การผลิตน้ำมันและอัตราการใช้กลีเซอรอลของยีสต์น้ำมัน *P. parantarctica* CHC28 ในระดับถังหมัก

รูปแบบสมการ	ค่าจลนพลศาสตร์	ถังหมัก 5 ลิตร
การเจริญของยีสต์		
$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right) \left(\frac{1}{1 + S/K_i}\right)$	$\mu_{\max} (\text{h}^{-1})$	0.123
	$X_{\max} (\text{g/L})$	11.81
	$K_i (\text{g/L})$	484.47
	R^2	0.841
	RMSE	2.311
การผลิตน้ำมัน		
$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X$	α	0.119
	β	0.004
$Y_{p/s} = \alpha(Y_{x/s})$	$Y_{p/s} (\text{gOil/gGlycerol})$	0.059
	R^2	0.998
	RMSE	0.100
การใช้กลีเซอรอลของยีสต์		
$\frac{dS}{dt} = -\left[\left(\frac{1}{Y_{x/s}}\right) \frac{dX}{dt} + m_s X\right]$	$Y_{x/s} (\text{gBiomass/gGlycerol})$	0.492
	$m_s (\text{g/L h})$	0.007
	R^2	0.979
	RMSE	1.995

$\mu_{\max}$ คือ อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (ต่อชั่วโมง); $X_{\max}$ คือ ความเข้มข้นชีวมวลยีสต์สูงสุด (กรัมต่อลิตร); K_i คือ ค่าคงที่ของการยับยั้ง (กรัมต่อลิตร); α คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของการสังเคราะห์น้ำมันที่สัมพันธ์กับการเจริญของชีวมวลยีสต์; β คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของการสังเคราะห์น้ำมันที่ไม่สัมพันธ์กับการเจริญของชีวมวลยีสต์; $Y_{p/s}$ คือ ผลผลิตของน้ำมันยีสต์ (กรัมของน้ำมันต่อกรัมของกลีเซอรอล); $Y_{x/s}$ คือ ผลผลิตของชีวมวลยีสต์ (กรัมของเซลล์ยีสต์ต่อกรัมของกลีเซอรอล); m_s คือ ค่าสัมประสิทธิ์การบำรุงรักษาชีวมวลยีสต์ (กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง); R^2 คือ ค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ; RMSE คือ ค่าความคลาดเคลื่อนกำลังสองเฉลี่ย; PG คือ กลีเซอรอลบริสุทธิ์; PT-BDCG คือ กลีเซอรอลที่ปรับสภาพ

4.4.3 การจำลองทางจลนพลศาสตร์ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ความเข้มข้นสูงด้วยกระบวนการหมักแบบกะซ้ำ

4.4.3.1 การจำลองทางจลนพลศาสตร์ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ความเข้มข้นสูงด้วยกระบวนการหมักแบบกะซ้ำในระดับฟลอสก์

ในการศึกษานี้ใช้สมการแบบจำลองชนิด Logistic เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร μ_{max} , X_{max} และ K_i ในขณะที่สมการแบบจำลองชนิด Luedeking–Piret ใช้ในการอธิบาย α , β และ $Y_{p/s}$ และสมการแบบจำลองการใช้กลีเซอรอล ใช้อธิบาย $Y_{x/s}$ และ m_s โดยสมการทั้งสามชนิดถูกนำมาประยุกต์ใช้ศึกษาค่าทางจลนพลศาสตร์ของการเจริญ การผลิตน้ำมัน และการใช้กลีเซอรอล ตามลำดับ (ตารางที่ 4.14) ผลการทดลองพบว่าแบบจำลองชนิด Logistic สามารถเลียนแบบการเจริญของยีสต์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่อัตราส่วนอาหารต่าง ๆ โดยมีค่า R^2 ของการเจริญของชีวมวลยีสต์ เมื่อใช้อัตราส่วน 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตร เท่ากับ 0.989, 0.566, 0.870 และ 0.906 ตามลำดับ เมื่อใช้อัตราส่วน 70 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตร เท่ากับ 0.973, 0.839, 0.748 และ 0.834 ตามลำดับ เมื่อใช้อัตราส่วน 90 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตร เท่ากับ 0.863, 0.924, 0.872 และ 0.900 ตามลำดับ (ดังรูปที่ 4.19-4.21) แสดงให้เห็นว่าข้อมูลมีความสอดคล้องกับแบบจำลองทางจลนพลศาสตร์มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งการเลียนแบบพฤติกรรมของการเจริญของยีสต์ เมื่อใช้อัตราส่วน 90 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตร ทำให้ค่าเฉลี่ยของ X_{max} เท่ากับ 5.71 กรัมต่อลิตร ที่ค่า μ_{max} 0.053 ต่อชั่วโมง รวมถึงมีค่า K_i เท่ากับ 706.34 กรัมต่อลิตร สูงกว่าอัตราส่วนการเปลี่ยนอาหารอื่น ๆ (ดังตารางที่ 4.14) จากการนำค่าที่ได้มาแทนสมการในพจน์ระหว่างค่า $[S]/K_i$ ทำให้เกิดการยับยั้งจากสารตั้งต้นน้อยกว่าสถานะอื่น เนื่องจากมีความเข้มข้นของสารตั้งต้นต่ำและค่า K_i สูง ทำให้พจน์ของ $[S]/K_i$ หายไปจากสมการ ส่งผลให้มีค่า μ_{max} สูงขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Feng และคณะ (2014) ได้ทำการใช้แบบจำลอง Logistic เพื่อศึกษาการเจริญของชีวมวลเห็ด *Ganoderma lucidum* จากการใช้ตัวแปร μ_{max} ที่สามารถบ่งบอกพฤติกรรมการเจริญของชีวมวลเมื่อเข้าสู่ช่วงระยะ Log phase จากการเปรียบเทียบระหว่างการเจริญกับระยะเวลาการเพาะเลี้ยง และค่า K_i สามารถบ่งบอกถึงพฤติกรรมการยับยั้งของสารตั้งต้นที่ลดลงของสถานะการทดลองที่ทำการเลียนแบบได้ [46]

เมื่อใช้รูปแบบจำลองของสมการ Luedeking–Piret พบว่ามีความสอดคล้องกัน ดังตารางที่ 4.14 เมื่อพิจารณาค่า R^2 จากการเพาะเลี้ยงด้วยอัตราส่วนอาหารต่าง ๆ ของการผลิตน้ำมัน เมื่อใช้อัตราส่วน 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหาร เท่ากับ 0.955, 0.569, 0.324 และ 0.221 ตามลำดับ เมื่อใช้อัตราส่วน 70 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหาร เท่ากับ 0.993, 0.717, 0.532 และ 0.889 ตามลำดับ เมื่อใช้อัตราส่วน 90 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหาร เท่ากับ 0.838, 0.973, 0.887 และ 0.932 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าข้อมูลบางส่วนมีความสอดคล้องกับแบบจำลองมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และมีข้อมูลที่ทำให้การแบบจำลองสมการส่งผลต่อค่า R^2 ได้น้อย อีกทั้งการเลียนแบบพฤติกรรมการผลิตน้ำมัน ทำให้ค่าเฉลี่ยของตัวแปร α แสดงความสัมพันธ์ของการผลิตน้ำมันที่สัมพันธ์กับการเจริญของชีวมวลยีสต์ รวมถึงตัวแปร β แสดงความสัมพันธ์ของการผลิตน้ำมันที่ไม่สัมพันธ์กับการเจริญของชีวมวลยีสต์ เท่ากับ 0.149 และ 0.005 ตามลำดับ โดยค่า α และ β มีค่าไม่เท่ากับศูนย์ และมีค่า α มากกว่า β แสดงว่าการผลิตน้ำมันมีความสัมพันธ์กับการเจริญของชีวมวลยีสต์ [47] นอกจากนี้

เมื่อใช้รูปแบบจำลองสมการการใช้กลีเซอรอล ดังตารางที่ 4.14 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงด้วยอัตราส่วนอาหารต่าง ๆ ค่า R^2 ของการใช้กลีเซอรอล เมื่อใช้อัตราส่วน 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหาร เท่ากับ 0.929, 0.780, 0.484 และ 0.871 ตามลำดับ เมื่อใช้อัตราส่วน 70 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหาร 0.944, 0.969, 0.968 และ 0.988 ตามลำดับ เมื่อใช้อัตราส่วน 90 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหาร เท่ากับ 0.892, 0.981, 0.888 และ 0.929 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าข้อมูลบางส่วนมีความสอดคล้องกับแบบจำลองทางคณิตศาสตร์มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และมีข้อมูลที่ทำให้การแบบจำลองสมการส่งผลต่อค่า R^2 ได้น้อยเช่นเดียวกัน อีกทั้งค่าเฉลี่ยของ m_s แสดงให้เห็นว่าชีวมวลยีสต์มีการนำกลีเซอรอลไปใช้ในการเจริญเพื่อบำรุงรักษาเซลล์เท่ากับ 0.001 ต่อชั่วโมง และทำให้ผลผลิตของชีวมวลยีสต์สูงถึง 0.187 กรัมของชีวมวลยีสต์ต่อกรัมของกลีเซอรอล เมื่อใช้อัตราส่วน 90 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหาร (ตารางที่ 4.14)



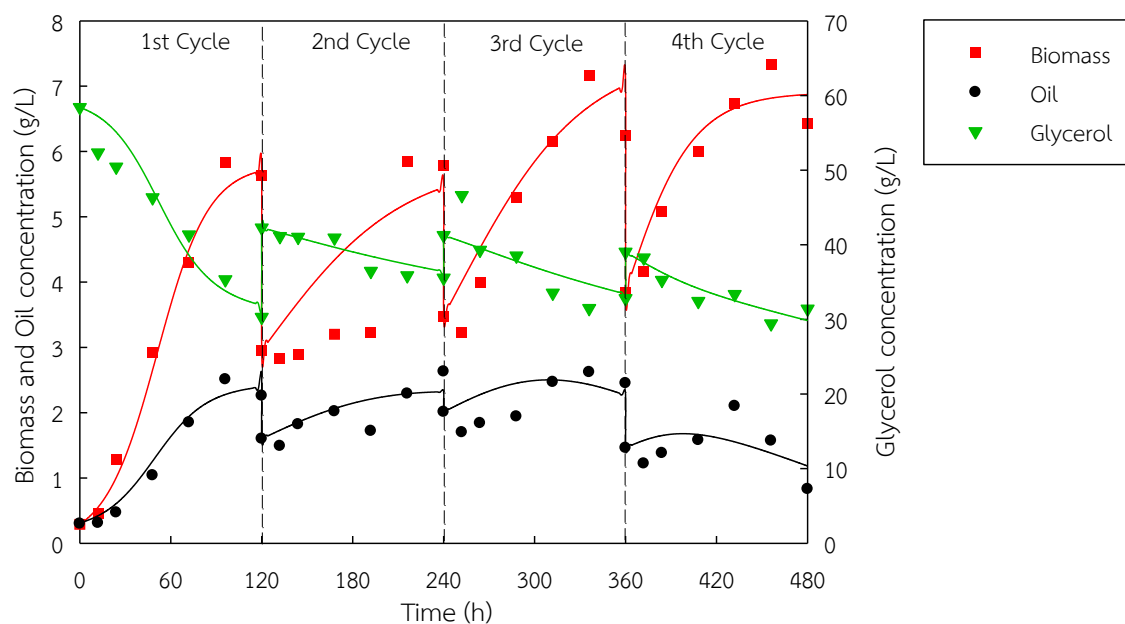
ตารางที่ 4.14 ค่าจลนพลศาสตร์ของอัตราการเจริญชีวมวลยีสต์ การผลิตน้ำมันและอัตราการใช้กลีเซอรอลของยีสต์น้ำมัน *P. parantarctica* CHC28 ที่เพาะเลี้ยงแบบกะซ้ำ

ค่าจลนพลศาสตร์	ปริมาตรการถ่ายอาหาร (เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหารเริ่มต้น)														
	50					70					90				
	รอบที่ 1	รอบที่ 2	รอบที่ 3	รอบที่ 4	ค่า เฉลี่ย	รอบที่ 1	รอบที่ 2	รอบที่ 3	รอบที่ 4	ค่า เฉลี่ย	รอบที่ 1	รอบที่ 2	รอบที่ 3	รอบที่ 4	ค่า เฉลี่ย
การเจริญของยีสต์															
μ_{max} (h ⁻¹)	0.063	0.023	0.025	0.045	0.039	0.058	0.044	0.031	0.037	0.043	0.049	0.052	0.046	0.066	0.053
X_{max} (g/L)	5.80	5.84	7.50	6.90	6.51	6.21	7.61	5.20	5.02	6.01	5.77	6.01	5.75	5.30	5.71
K_i (g/L)	649.26	694.25	626.79	648.62	654.73	669.88	665.16	627.42	682.95	661.35	699.16	696.18	720.00	710.00	706.34
R^2	0.989	0.566	0.870	0.906		0.973	0.839	0.748	0.834		0.863	0.924	0.872	0.900	
RMSE	0.230	0.871	0.501	0.356		0.375	1.007	0.789	0.575		0.795	0.590	0.754	0.636	
การผลิตน้ำมัน															
α	0.375	0.400	0.426	0.216	0.354	0.571	0.100	0.010	0.019	0.175	0.249	0.096	0.059	0.194	0.149
β	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.002	0.004	0.002	0.006	0.006	0.004	0.002	0.005
$Y_{p/s}$ (gOil/gGlycerol)	0.082	0.333	0.384	0.173	0.243	0.097	0.065	0.003	0.004	0.042	0.046	0.015	0.012	0.040	0.028
R^2	0.955	0.569	0.324	0.221		0.992	0.717	0.532	0.889		0.838	0.973	0.887	0.932	
RMSE	0.189	0.238	0.322	0.309		0.078	0.412	0.332	0.223		0.499	0.201	0.249	0.172	

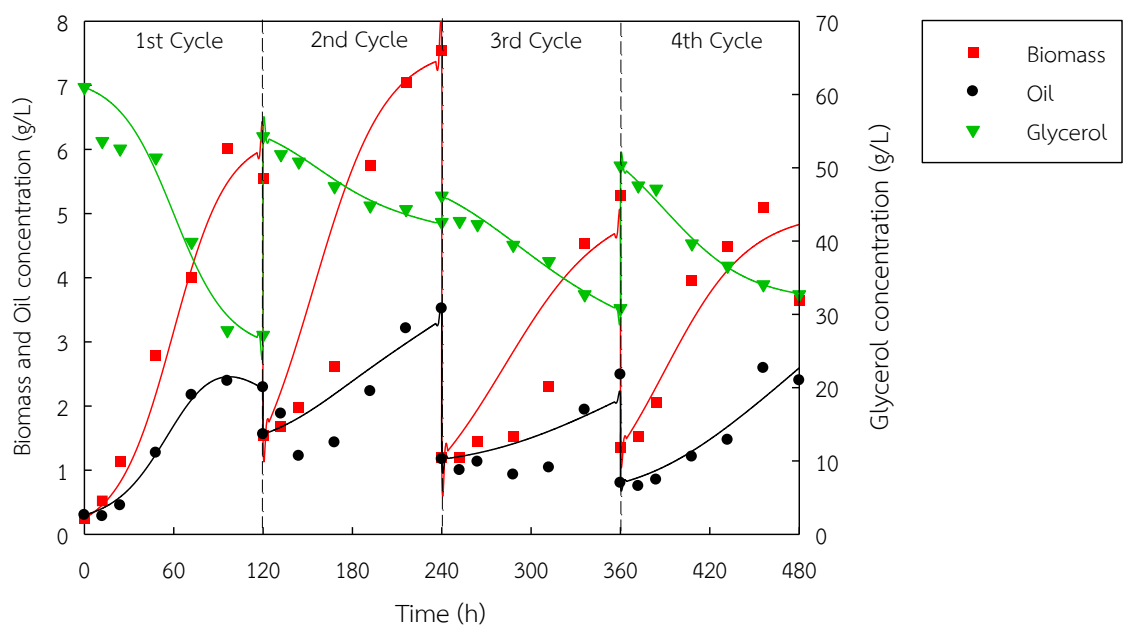
ตารางที่ 4.14 ค่าจลนพลศาสตร์ของอัตราการเจริญชีวมวลยีสต์ การผลิตน้ำมันและอัตราการใช้กลีเซอรอลของยีสต์น้ำมัน *P. parantarctica* CHC28 ที่เพาะเลี้ยงแบบกะขี้ (ต่อ)

ค่าจลนพลศาสตร์	ปริมาณการถ่ายอาหาร (เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารเริ่มต้น)														
	50					70					90				
	รอบที่ 1	รอบที่ 2	รอบที่ 3	รอบที่ 4	ค่า เฉลี่ย	รอบที่ 1	รอบที่ 2	รอบที่ 3	รอบที่ 4	ค่า เฉลี่ย	รอบที่ 1	รอบที่ 2	รอบที่ 3	รอบที่ 4	ค่า เฉลี่ย
การใช้กลีเซอรอลของยีสต์															
$Y_{x/s}$ (gBiomass/gGlycerol)	0.220	0.832	0.900	0.800	0.688	0.171	0.650	0.326	0.200	0.337	0.184	0.157	0.201	0.208	0.187
m_s (g/L h)	0.005	0.005	0.006	0.007	0.006	0.002	0.005	0.013	0.000	0.005	0.002	0.000	0.001	0.002	0.001
R^2	0.929	0.780	0.484	0.871		0.944	0.969	0.968	0.988		0.892	0.981	0.888	0.929	
RMSE	2.908	1.124	2.846	1.221		3.282	0.790	1.024	0.699		3.672	1.531	3.443	2.543	

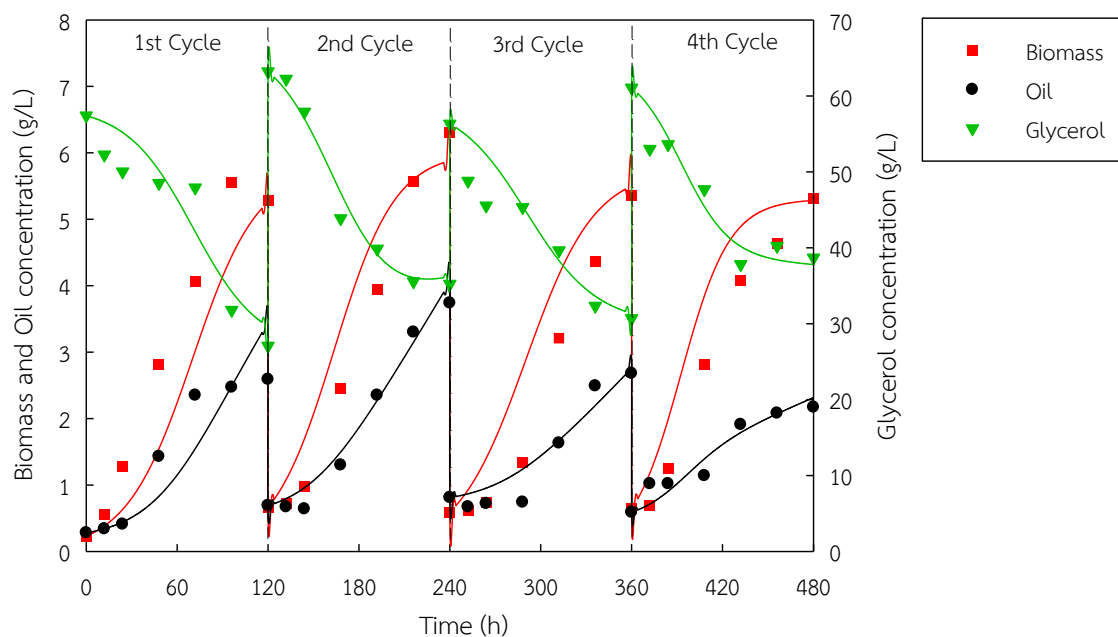
μ_{max} คือ อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (ต่อชั่วโมง); X_{max} คือ ความเข้มข้นชีวมวลยีสต์สูงสุด (กรัมต่อลิตร); K_i คือ ค่าคงที่ของการยับยั้ง (กรัมต่อลิตร); α คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของการสังเคราะห์น้ำมันที่สัมพันธ์กับการเจริญของชีวมวลยีสต์; β คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของการสังเคราะห์น้ำมันที่ไม่สัมพันธ์กับการเจริญของชีวมวลยีสต์; $Y_{p/s}$ คือ ผลผลิตของน้ำมันยีสต์ (กรัมของน้ำมันต่อกรัมของกลีเซอรอล); $Y_{x/s}$ คือ ผลผลิตของชีวมวลยีสต์ (กรัมของเซลล์ยีสต์ต่อกรัมของกลีเซอรอล); m_s คือ ค่าสัมประสิทธิ์การบำรุงรักษาชีวมวลยีสต์ (กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง); R^2 คือ ค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ; RMSE คือ ค่าความคลาดเคลื่อนกำลังสองเฉลี่ย; PG คือ กลีเซอรอลบริสุทธิ์; PT-BDCG คือ กลีเซอรอลที่ปรับสภาพ



รูปที่ 4.19 การเลียนแบบพฤติกรรมกรเจริญ การผลิตน้ำมัน และอัตราการใช้กลีเซอรอลของยีสต์ ในการหมักแบบกะซ้ำ เมื่อเปลี่ยนถ่ายอาหารออกเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตร



รูปที่ 4.20 การเลียนแบบพฤติกรรมกรเจริญ การผลิตน้ำมัน และอัตราการใช้กลีเซอรอลของยีสต์ ในการหมักแบบกะซ้ำ เมื่อเปลี่ยนถ่ายอาหารออกเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตร



รูปที่ 4.21 การเลียนแบบพฤติกรรมของการเจริญ การผลิตน้ำมัน และอัตราการใช้กลีเซอรอลของยีสต์ ในการหมักแบบกะซ้ำ เมื่อเปลี่ยนถ่ายออกเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตร

4.4.3.2 การจำลองทางจลนพลศาสตร์ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ความเข้มข้นสูงด้วย กระบวนการหมักแบบกะซ้ำร่วมกับการหมุนเวียนเซลล์ในระดับฟ्लास्कและระดับถังหมัก

ในการศึกษานี้ใช้สมการแบบจำลองชนิด Logistic เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร μ_{max} , X_{max} และ K_i ในขณะที่สมการแบบจำลองชนิด Luedeking–Piret ใช้ในการอธิบาย α , β และ $Y_{p/s}$ และสมการแบบจำลองการใช้กลีเซอรอล ใช้อธิบาย $Y_{x/s}$ และ m_s โดยสมการทั้งสามชนิดถูกนำมาประยุกต์ใช้ศึกษาค่าทางจลนพลศาสตร์ของการเจริญ การผลิตน้ำมัน และการใช้กลีเซอรอล ตามลำดับ (ดังตารางที่ 4.15) แสดงผลการเลียนแบบพฤติกรรมของการเจริญของยีสต์โดยการทดลองในระดับฟ्लास्कให้ค่าเฉลี่ย X_{max} และ μ_{max} เท่ากับ 10.24 กรัมต่อลิตร และ 0.042 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.22) ในขณะที่การทดลองในระดับถังหมักมีค่าเฉลี่ย X_{max} และ μ_{max} เท่ากับ 16.59 กรัมต่อลิตร และ 0.043 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.23) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ในระดับฟ्लास्कจะมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงในระดับถังหมัก แต่ให้ปริมาณชีวมวลยีสต์สูงสุดน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงในระดับถังหมัก และเมื่อพิจารณาค่า α และ β เพื่อศึกษาพฤติกรรมการผลิตน้ำมัน พบว่าค่าเฉลี่ย α มากกว่า β ในทุกสภาวะการเพาะเลี้ยง แสดงให้เห็นว่าการผลิตน้ำมันยีสต์ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะซ้ำร่วมกับการหมุนเวียนเซลล์นั้นมีความสัมพันธ์กับการผลิตชีวมวลยีสต์ [47] รวมถึงเมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักแสดงให้เห็นค่าเฉลี่ย m_s เท่ากับ 0.014 ต่อชั่วโมง และทำให้ผลผลิตของชีวมวลยีสต์สูงถึง 0.721 กรัมของชีวมวลยีสต์ต่อกรัมของกลีเซอรอล (ตารางที่ 4.15)

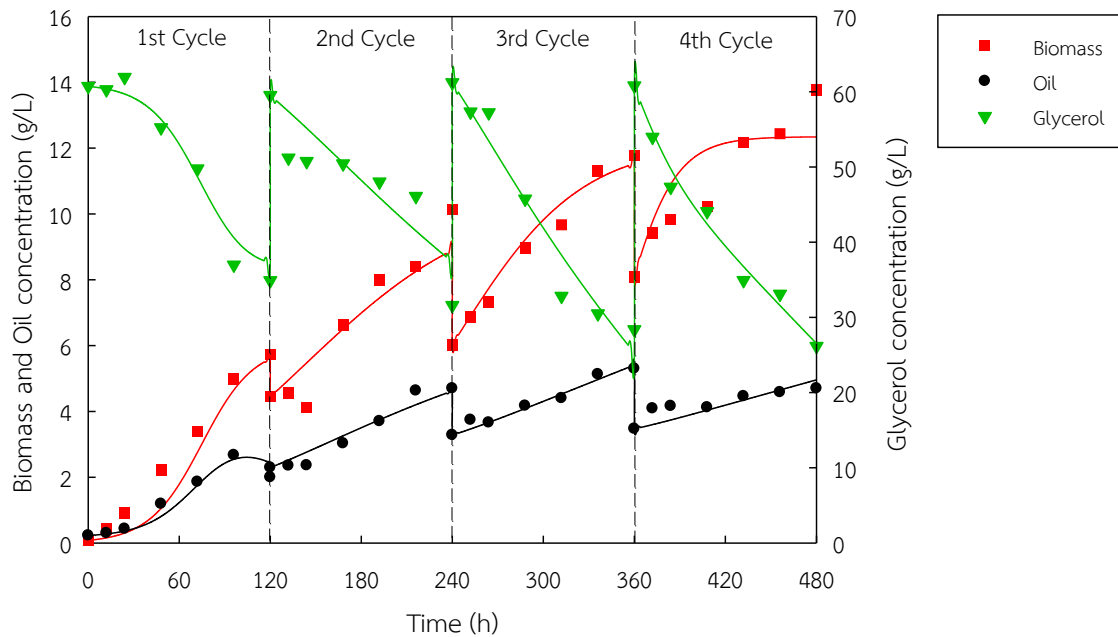
ตารางที่ 4.15 แบบจำลองทางจลนพลศาสตร์ของอัตราการเจริญชีวมวลยีสต์ การผลิตน้ำมันและอัตราการใช้กลีเซอรอลของยีสต์น้ำมัน *P. parantarctica* CHC28 ที่เพาะเลี้ยงแบบกะช้าในถังหมัก

ค่าจลนพลศาสตร์	ปริมาตรการถ่ายอาหาร (เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหารเริ่มต้น)														
	RBF ในระดับฟลาสก์					RBF ด้วยการเพาะเลี้ยงยีสต์ความเข้มข้นสูงในระดับฟลาสก์					RBF ด้วยการเพาะเลี้ยงยีสต์ความเข้มข้นสูงในระดับถังหมัก				
	รอบที่	รอบที่	รอบที่	รอบที่	ค่า	รอบที่	รอบที่	รอบที่	รอบที่	ค่า	รอบที่	รอบที่	รอบที่	รอบที่	ค่า
	1	2	3	4	เฉลี่ย	1	2	3	4	เฉลี่ย	1	2	3	4	เฉลี่ย
การเจริญของยีสต์															
μ_{max} (h ⁻¹)	0.049	0.052	0.046	0.066	0.053	0.062	0.019	0.026	0.062	0.042	0.085	0.018	0.028	0.041	0.043
X_{max} (g/L)	5.77	6.01	5.75	5.30	5.71	5.99	10.50	12.14	12.35	10.24	7.55	10.50	21.65	26.65	16.59
K_i (g/L)	699.16	696.18	720.00	710.00	706.34	710.00	401.88	710.00	661.73	620.90	640.12	473.13	656.94	463.90	558.52
R^2	0.863	0.924	0.872	0.900		0.932	0.817	0.972	0.722		0.937	0.439	0.651	0.651	
RMSE	0.795	0.59	0.754	0.636		0.584	0.746	0.333	0.950		0.628	1.036	2.289	2.289	
การผลิตน้ำมัน															
α	0.249	0.096	0.059	0.194	0.150	0.716	0.351	0.081	0.010	0.290	0.010	0.951	0.115	0.176	0.313
β	0.006	0.006	0.004	0.002	0.005	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.010	0.000	0.001	0.000	0.003
$Y_{p/s}$ (gOil/gGlycerol)	0.046	0.015	0.012	0.04	0.028	0.152	0.117	0.029	0.004	0.076	0.004	0.375	0.127	0.174	0.170
R^2	0.838	0.973	0.887	0.932		0.944	0.915	0.966	0.794		0.725	0.977	0.873	0.873	
RMSE	0.499	0.201	0.249	0.172		0.231	0.250	0.139	0.270		0.503	0.087	0.350	0.350	

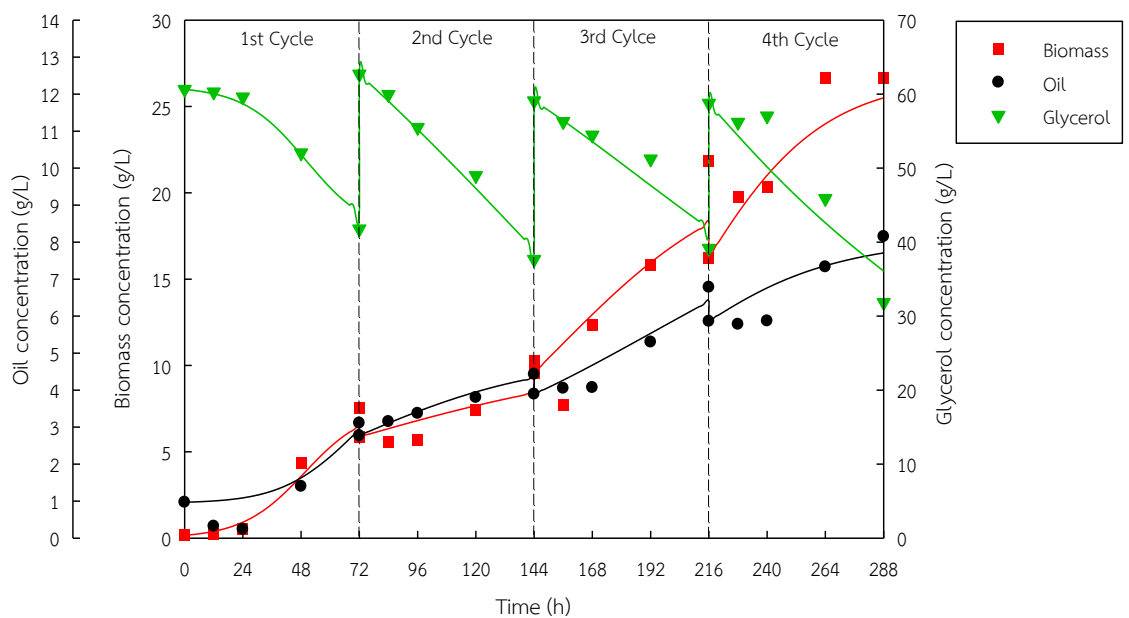
ตารางที่ 4.15 แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของอัตราการเจริญชีวมวลยีสต์ การผลิตน้ำมันและอัตราการใช้กลีเซอรอลของยีสต์น้ำมัน *P. parantarctica* CHC28 ที่เพาะเลี้ยงแบบกะช้าในถังหมัก (ต่อ)

ค่าพารามิเตอร์	ปริมาณการถ่ายอาหาร (เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารเริ่มต้น)														
	RBF ในระดับพลาสติก					RBF ด้วยการเพาะเลี้ยงยีสต์ความเข้มข้นสูงในระดับพลาสติก					RBF ด้วยการเพาะเลี้ยงยีสต์ความเข้มข้นสูงในระดับถังหมัก				
	รอบที่	รอบที่	รอบที่	รอบที่	ค่า	รอบที่	รอบที่	รอบที่	รอบที่	ค่า	รอบที่	รอบที่	รอบที่	รอบที่	ค่า
	1	2	3	4	เฉลี่ย	1	2	3	4	เฉลี่ย	1	2	3	4	เฉลี่ย
การใช้ไปของกลีเซอรอล															
$Y_{x/s}$ (gBiomass/gGlycerol)	0.184	0.157	0.201	0.208	0.188	0.213	0.334	0.361	0.395	0.326	0.401	0.394	1.100	0.990	0.721
m_s (g/L h)	0.002	0.000	0.001	0.002	0.001	0.000	0.011	0.018	0.017	0.011	0.005	0.033	0.009	0.008	0.014
R^2	0.892	0.981	0.888	0.929		0.957	0.788	0.953	0.984		0.970	0.985	0.903	0.903	
RMSE	3.672	1.531	3.443	2.543		1.931	4.080	2.791	1.466		1.108	1.057	2.042	2.042	

μ_{max} คือ อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (ต่อชั่วโมง); X_{max} คือ ความเข้มข้นชีวมวลยีสต์สูงสุด (กรัมต่อลิตร); K_i คือ ค่าคงที่ของการยับยั้ง (กรัมต่อลิตร); α คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของการสังเคราะห์น้ำมันที่สัมพันธ์กับการเจริญของชีวมวลยีสต์; β คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของการสังเคราะห์น้ำมันที่ไม่สัมพันธ์กับการเจริญของชีวมวลยีสต์; $Y_{p/s}$ คือ ผลผลิตของน้ำมันยีสต์ (กรัมของน้ำมันต่อกรัมของกลีเซอรอล); $Y_{x/s}$ คือ ผลผลิตของชีวมวลยีสต์ (กรัมของเซลล์ยีสต์ต่อกรัมของกลีเซอรอล); m_s คือ ค่าสัมประสิทธิ์การบำรุงรักษาชีวมวลยีสต์ (กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง); R^2 คือ ค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ; RMSE คือ ค่าความคลาดเคลื่อนกำลังสองเฉลี่ย; PG คือ กลีเซอรอลบริสุทธิ์; PT-BDCG คือ กลีเซอรอลที่ปรับสภาพ



รูปที่ 4.22 การเลียนแบบพฤติกรรมกรการเจริญ การผลิตน้ำมัน และอัตราการใช้กลีเซอรอลของ ด้วยการหมักแบบกะซ้ำร่วมกับการหมุนเวียนเซลล์ในระดับฟลาสก์ เมื่อเปลี่ยนถ่ายอาหารออกเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรเริ่มต้น



รูปที่ 4.23 การเลียนแบบพฤติกรรมกรการเจริญ การผลิตน้ำมัน และอัตราการใช้กลีเซอรอลของยีสต์ด้วยการหมักแบบกะซ้ำร่วมกับการหมุนเวียนเซลล์ในระดับถังหมัก เมื่อเปลี่ยนถ่ายอาหารออกเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรเริ่มต้น

4.5 คุณสมบัติของไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันจุลินทรีย์

4.5.1 กรดไขมันของน้ำมันยีสต์ และคุณสมบัติของไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันยีสต์ ด้วย PT-BDCG เป็นแหล่งคาร์บอน

องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันยีสต์ *P. parantarctica* CHC28 ที่เพาะเลี้ยงด้วย PG และ PT-BDCG ที่ความเข้มข้นกลีเซอรอล 50 และ 70 กรัมต่อลิตร แสดงดังตารางที่ 4.16 โดยพบว่าน้ำมันของยีสต์มีกรดไขมันชนิดที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบจำนวน 16 และ 18 อะตอม (C16 และ C18) เท่ากับ 86.04, 88.64 และ 85.31 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Areesirisuk และคณะ (2015) [11] ที่ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันยีสต์ *P. parantarctica* จากการเพาะเลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคส พบว่ามีกรดไขมันชนิด 16 และ 18 อะตอม เป็นองค์ประกอบหลัก โดยพบอยู่ระหว่าง 86.62 ถึง 90.79 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้ำมันดังกล่าวมีองค์ประกอบของกรดไขมันคล้ายคลึงกับน้ำมันพืชที่ใช้ในการผลิตน้ำมันไบโอดีเซล แสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่จะใช้น้ำมันที่ผลิตจากยีสต์ชนิดนี้ในการผลิตไบโอดีเซลเช่นเดียวกับน้ำมันจากพืช [5, 11]

ตารางที่ 4.16 องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันที่ผลิตจากยีสต์ซึ่งเพาะเลี้ยงด้วย PT-BDCG

สภาวะการทดลอง	กรดไขมัน* (เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด)							
	≤C14	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	≥C20	C16-C18
PG 50 กรัมต่อลิตร	3.45	38.14	0.48	33.24	11.29	2.89	7.84	86.04
PT-BDCG 50 กรัมต่อลิตร	3.46	46.19	1.71	19.77	17.52	3.44	5.31	88.64
PT-BDCG 70 กรัมต่อลิตร	3.38	37.27	0.83	26.53	17.85	2.82	7.66	85.31

*กรดไขมัน (Fatty Acid) คำนวณจากเปอร์เซ็นต์พื้นที่ใต้กราฟทั้งหมดของกรดไขมัน; ≤C14, ตั้งแต่ C₄ ถึง C₁₄; ≤C20, ตั้งแต่ C₂₀ ถึง C₂₄; PG คือ กลีเซอรอลบริสุทธิ์; PT-BDCG คือ กลีเซอรอลที่ปรับสภาพ

ในปี 2012 Ramírez-Verduzco และคณะ [30] ได้พัฒนาสมการที่ใช้ในการประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของไบโอดีเซลที่สัมพันธ์กับกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันนั้น ได้แก่ ค่าซีเทน ค่าความหนืดไคเนมาติกส์ ความหนาแน่นและค่าความร้อนสูง โดยค่าซีเทน และความหนืดไคเนมาติกส์ โดยคุณสมบัติดังกล่าวขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลและจำนวนพันธคู่ของกรดไขมันในน้ำมันยีสต์ โดยพบว่าน้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันยีสต์ในทุกสภาวะ มีคุณสมบัติเป็นไปตามมาตรฐานน้ำมันไบโอดีเซล ASTM 6751 และ EN 14214 ดังตารางที่ 4.17

ตารางที่ 4.17 การประเมินคุณสมบัติของไบโอดีเซลที่ผลิตจากยีสต์ซึ่งเพาะเลี้ยงด้วย PT-BDCG

สภาวะการทดลอง	คุณสมบัติไบโอดีเซล*					
	CN	HHV	KV	D	SV	IV
PG 50 กรัมต่อลิตร	69.26	39.54	4.37	0.87	204.68	15.87
PT-BDCG 50 กรัมต่อลิตร	67.16	39.42	4.15	0.87	208.20	23.79
PT-BDCG 70 กรัมต่อลิตร	67.98	39.56	4.34	0.87	204.96	21.99
EN 14214 ^a	≥51	≥35	3.5-5.0	0.86-0.90	-	≤120
ASTM 6751 ^a	≥47	39.3-39.8	1.9-6.0	-	-	-

*คุณสมบัติไบโอดีเซล; CN คือ ค่าซีเทน (Cetane Number); HHV คือค่าความร้อนสูง (Higher Heating Value); KV คือ ความหนืดไคเนมาติก (Kinematic Viscosity); D คือ ค่าความหนาแน่น (Density); SV คือ ค่าสะพอนิฟิเคชัน (Saponification Value); IV คือค่าไอโอดีน (Iodine Value) โดยทำการเปรียบเทียบกับข้อกำหนดตามมาตรฐาน EN 14214 และ ASTM 6751; ^aASTM D675-US Biodiesel Standard และ EN 14214-EU Biodiesel Standard; PG คือ กลีเซอรอลบริสุทธิ์; PT-BDCG คือ กลีเซอรอลที่ปรับสภาพ

4.5.2 กรดไขมันของน้ำมันยีสต์ และคุณสมบัติของไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันยีสต์ที่เพาะเลี้ยงด้วยกระบวนการหมักแบบกะและกะช้า

องค์ประกอบของกรดไขมันของยีสต์น้ำมัน *P. parantarctica* CHC28 จากการเพาะเลี้ยงจาก PT-BDCG ด้วยกระบวนการหมักแบบกะและกะช้า แสดงดังตารางที่ 4.18 พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยการหมักแบบกะในถังหมักขนาด 5 ลิตร น้ำมันของยีสต์มีกรดไขมันชนิด C16 และ C18 เป็นองค์ประกอบหลัก เท่ากับ 95.23 เปอร์เซ็นต์ และยังพบว่าน้ำมันยีสต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงยีสต์แบบกะช้าร่วมกับการหมุนเวียนเซลล์ ในระดับฟลอสก์และถังหมักมีกรดไขมันชนิด C16 และ C18 เป็นองค์ประกอบหลักเช่นเดียวกัน โดยมีค่าอยู่ในช่วง 60-90 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่ากระบวนการผลิตไม่ส่งผลต่อองค์ประกอบของน้ำมันยีสต์ และเมื่อเปรียบเทียบกับกรดไขมันของน้ำมันจากพืช [64] พบว่ามีค่าใกล้เคียงกับกรดไขมันของน้ำมันจากจุลินทรีย์ โดยอยู่ในช่วง 99-100 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนี้ Ramírez-Verduzco และคณะ [30] ได้รายงานค่า CN ค่า HHV ค่า KV ค่า D และ ค่า IV ของน้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตจากยีสต์ซึ่งเพาะเลี้ยงด้วยกระบวนการหมักแบบกะและกะช้าที่อัตราการใช้อาหาร 90 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารเริ่มต้น เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติของน้ำมันไบโอดีเซลของน้ำมันจากพืชและไขมันจากสัตว์ พบว่าเป็นไปตามมาตรฐานคุณภาพของน้ำมันไบโอดีเซล ASTM 6751 และ EN 14214 ดังตารางที่ 4.19

ตารางที่ 4.18 องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันที่ผลิตจากยีสต์ซึ่งเพาะเลี้ยงด้วยกระบวนการหมักแบบกะและกะขำ

การเพาะเลี้ยงยีสต์น้ำมัน	กรดไขมัน* (เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด)							
	≤C14	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	≥C20	C16-C18
การเพาะเลี้ยงแบบกะในถังหมักขนาด 5 ลิตร								
PT-BDCG ^a	5.53	28.54	14.45	26.47	21.70	4.07	11.21	95.23
RBF ในระดับฟลาสก์								
รอบที่ 1	1.59	24.72	0.10	42.17	13.42	2.51	15.10	82.92
รอบที่ 2	1.79	29.58	0.21	35.16	15.01	3.82	13.93	83.78
รอบที่ 3	4.84	27.65	0.27	31.36	14.89	1.81	18.80	75.98
รอบที่ 4	15.96	21.25	0.40	28.28	11.92	1.72	20.35	63.57
RBF ด้วยการเพาะเลี้ยงยีสต์ความเข้มข้นสูงในระดับฟลาสก์								
รอบที่ 1	1.60	24.43	0.10	42.39	14.47	2.63	13.83	84.03
รอบที่ 2	2.38	23.57	0.15	35.91	17.27	2.18	18.18	79.07
รอบที่ 3	3.42	21.62	0.12	33.87	17.49	2.47	20.67	75.58
รอบที่ 4	3.45	20.95	0.11	35.70	16.56	2.59	20.26	75.91

ตารางที่ 4.18 องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันที่ผลิตจากยีสต์ซึ่งเพาะเลี้ยงด้วยกระบวนการหมักแบบกะและกะขี้ (ต่อ)

การเพาะเลี้ยงยีสต์น้ำมัน	กรดไขมัน* (เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด)							
	≤C14	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	≥C20	C16-C18
RBF ด้วยการเพาะเลี้ยงยีสต์ความเข้มข้นสูงในระดับถึงหมัก								
รอบที่ 1	0.31	43.03	0.60	20.67	15.65	9.36	8.28	89.31
รอบที่ 2	0.27	39.14	0.40	25.63	14.21	7.87	10.64	87.26
รอบที่ 3	0.24	30.55	0.26	33.03	12.80	6.93	14.65	83.58
รอบที่ 4	0.43	27.88	0.19	36.61	11.13	5.95	16.20	81.76
น้ำมันจากพืช (Vegetable Oil)								
น้ำมันจากสบู่ดำ (<i>Jatropha curcas</i>) ^b	-	14.60	0.60	7.60	44.60	31.90	-	99.30
น้ำมันปาล์ม (Palm Oil) ^b	-	40.30	4.10	-	43.40	12.20	-	100.00

*กรดไขมัน (Fatty Acid) คำนวณจากเปอร์เซ็นต์พื้นที่ใต้กราฟทั้งหมดของกรดไขมัน; ≤C14, ตั้งแต่ C₄ ถึง C₁₄; ≤C20, ตั้งแต่ C₂₀ ถึง C₂₄; เอกสารอ้างอิง, ^aการวิจัยที่ทำการศึกษานี้จากน้ำมันของยีสต์ *Pseudozyma parantarctica* CHC28, ^bMofijur และคณะ (2013) [64]

ตารางที่ 4.19 การประเมินคุณสมบัติของไบโอดีเซลที่ผลิตจากยีสต์ซึ่งเพาะเลี้ยงด้วยกระบวนการหมักแบบกะและกะซ้ำ

การเพาะเลี้ยงยีสต์น้ำมัน	คุณสมบัติไบโอดีเซล*					
	CN	HHV	KV	D	SV	IV
การเพาะเลี้ยงแบบกะในถังหมักขนาด 5 ลิตร						
PT-BDCG ^a	66.71	39.53	4.34	0.87	203.73	28.36
RBF ในระดับฟลาสก์						
รอบที่ 1	69.96	39.76	4.72	0.87	198.98	16.76
รอบที่ 2	68.83	39.69	4.59	0.87	200.68	20.77
รอบที่ 3	69.46	39.63	4.59	0.87	202.13	17.06
รอบที่ 4	68.40	39.22	4.09	0.87	215.72	14.23
RBF ด้วยการเพาะเลี้ยงยีสต์ความเข้มข้นสูงในระดับฟลาสก์						
รอบที่ 1	69.63	39.73	4.67	0.87	199.52	17.91
รอบที่ 2	69.30	39.75	4.72	0.87	198.98	19.69
รอบที่ 3	69.13	39.72	4.72	0.87	199.07	20.37
รอบที่ 4	69.28	39.71	4.73	0.87	198.97	19.81

ตารางที่ 4.19 การประเมินคุณสมบัติของไบโอดีเซลที่ผลิตจากยีสต์ซึ่งเพาะเลี้ยงด้วยกระบวนการหมักแบบกะและกะซ้ำ (ต่อ)

การเพาะเลี้ยงยีสต์น้ำมัน	คุณสมบัติไบโอดีเซล*					
	CN	HHV	KV	D	SV	IV
RBF ด้วยการเพาะเลี้ยงยีสต์ความเข้มข้นสูงในระดับถังหมัก						
รอบที่ 1	65.74	39.52	4.23	0.87	205.25	31.79
รอบที่ 2	66.94	39.57	4.36	0.87	203.29	27.59
รอบที่ 3	68.07	39.68	4.57	0.87	200.11	24.45
รอบที่ 4	68.95	39.71	4.65	0.87	199.26	21.06
น้ำมันจากพืช (Vegetable Oil)						
น้ำมันปาล์ม ^b	59.00	-	4.62	0.86	206.00	61.00
น้ำมันมะพร้าว ^c	59.30	38.10	2.75	0.87	-	18.50
ไขมันจากสัตว์ (Animal fats)						
ไขมันจากไก่ ^d	52.3-57.0	-	5.3	0.89	-	-
ไขมันจากวัว ^d	60.2-64.8	-	5.3	0.87-0.89	-	-
EN 14214	≥51	-	3.5-5.0	0.86-0.90	-	≤120
ASTM 6751	≥47	39.3-39.8	1.9-6.0	-	-	-

*คุณสมบัติของไบโอดีเซล (Biodiesel Property); CN คือ ค่าซีเทน (Cetane Number); HHV คือ ค่าความร้อนสูง (Higher Heating Value); KV คือ ความหนืดไคเนมาติก (Kinematic Viscosity); D คือ ค่าความหนาแน่น (Density); SV คือ ค่าสะพอนิฟิเคชัน (Saponification Value); IV คือ ค่าไอโอดีน (Iodine Value) โดยทำการเปรียบเทียบกับข้อกำหนดตามมาตรฐาน EN 14214 และ ASTM 6751; เอกสารอ้างอิง, ^aการวิจัยที่ทำการศึกษาค้างนี้จากน้ำมันของยีสต์ *Pseudozyma parantarctica* CHC28, ^bMofijur และคณะ (2013) [64] , ^cHoekman และคณะ (2012) [13], ^dRajak และ Verma (2018) [66]

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำให้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ด้วยวิธีการปรับให้เป็นกรดและการตกตะกอน พบว่าการปรับสภาพของ BDCG ให้มีความกรดต่างเท่ากับ 1.71 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกสามารถทำให้สามารถแยกสิ่งเจือปนออกจาก BDCG และทำให้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลสูงขึ้นเท่ากับ 460.55 กรัมต่อลิตร และ PT-BDCG ที่ได้สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงยีสต์น้ำมัน *P. parantarctica* CHC28 ได้ การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำมันยีสต์ด้วย PT-BDCG พบว่าสภาวะที่มีการใช้ PT-BDCG ความเข้มข้นเท่ากับ 59.77 กรัมต่อลิตร ปริมาณโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 4.37 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส โดยสภาวะดังกล่าวจะให้ความเข้มข้นของชีวมวลยีสต์ และน้ำมันยีสต์ เท่ากับ 4.93 กรัมต่อลิตร และ 1.81 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ด้วยกระบวนการหมักแบบกะช้าทำให้สามารถผลิตชีวมวลยีสต์และน้ำมันยีสต์ได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะ 0.87 และ 0.64 เท่า ตามลำดับ และน้ำมันยีสต์มีกรดไขมันชนิด C16 และ C18 เป็นองค์ประกอบหลักซึ่งองค์ประกอบดังกล่าวคล้ายคลึงกับองค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันพืชที่ใช้ในการผลิตน้ำมันไบโอดีเซล เมื่อทำนายคุณสมบัติของน้ำมันไบโอดีเซลที่สัมพันธ์กับองค์ประกอบของกรดไขมันพบว่าน้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันยีสต์มีคุณสมบัติเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐาน European Standard EN 14214 และ American Society of Testing Materials, ASTM 6751 แสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่จะใช้น้ำมันยีสต์นี้มาเป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลทดแทนน้ำมันจากพืชอาหารต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

- 5.2.1 ศึกษาองค์ประกอบอื่น ๆ ของกลีเซอรอลดิบ เช่น ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณแอมโมเนีย สารอินทรีย์ตัวอื่น ๆ เป็นต้น
- 5.2.2 ศึกษาการพัฒนากระบวนการหมักแบบกะช้าเพื่อเพิ่มการผลิตน้ำมัน

ภาคผนวก



ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ



1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast-Malt extract (YM) ประกอบด้วย

Yeast extract	3.0	กรัม
Malt extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ หรือสารละลายไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อทำการเตรียมอาหารแข็งให้เติม Agar 15 กรัมต่อลิตร ลงไป

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Glycerol Yeast-Malt extract (GYM) broth ประกอบด้วย

Yeast extract	3.0	กรัม
Malt extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Pure glycerol	10.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ หรือสารละลายไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Glycerol-Seed medium (GSM) ประกอบด้วย [11]

Yeast extract	0.5	กรัม
Magnesium sulfate	0.5	กรัม
Ammonium sulfate	5.0	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	1.0	กรัม
Pure glycerol	20	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ หรือสารละลายไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. การเตรียมอาหารผลิตน้ำมัน Oil production medium ประกอบด้วย [8]

Yeast extract	1.0	กรัม
Magnesium sulfate	1.5	กรัม
Ammonium sulfate	2.0	กรัม
Potassium dihydrogenphosphate	7.0	กรัม
Monosodium phosphate	2.0	กรัม
PT-BDCG	130.68	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ หรือสารละลายไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที



ภาคผนวก ข
การคำนวณ



1. ชีวมวลยีสต์

1.1) น้ำหนักแห้งของชีวมวลยีสต์ (กรัมต่อลิตร)

$$\text{น้ำหนักชีวมวลแห้งของยีสต์} = \frac{\text{น้ำหนักหลอดที่มีตะกอนเซลล์} - \text{น้ำหนักหลอดเปล่า}}{\text{ปริมาตรของตัวอย่างสารละลาย}} \times 1000$$

1.2) ผลผลิตของชีวมวลยีสต์; $Y_{x/s}$ (กรัมของชีวมวลยีสต์ต่อกรัมของกลีเซอรอล; $g_{\text{Biomass}}/g_{\text{Glycerol}}$)

$$Y_{x/s} = \frac{(\text{ความเข้มข้นของชีวมวลยีสต์สุดท้าย} - \text{ความเข้มข้นของชีวมวลยีสต์เริ่มต้น})}{(\text{ความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้น} - \text{ความเข้มข้นของกลีเซอรอลสุดท้าย})}$$

2. ปริมาณน้ำมัน

2.1) ปริมาณน้ำมัน (กรัมต่อลิตร)

$$\text{ปริมาณน้ำมัน} = \frac{\text{น้ำหนักหลอดที่มีตะกอนเซลล์} - \text{น้ำหนักหลอดเปล่า}}{\text{ปริมาตรของตัวอย่างสารละลาย}} \times 1000$$

2.2) ปริมาณน้ำมันทั้งหมด; $Y_{p/x}$ (กรัมของน้ำมันต่อกรัมของชีวมวลยีสต์; $g_{\text{Oil}}/g_{\text{Biomass}}$)

$$Y_{p/x} = \frac{(\text{ความเข้มข้นของน้ำมันสุดท้าย} - \text{ความเข้มข้นของน้ำมันเริ่มต้น})}{(\text{ความเข้มข้นของชีวมวลยีสต์สุดท้าย} - \text{ความเข้มข้นของชีวมวลยีสต์เริ่มต้น})}$$

2.3) ปริมาณน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์ (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักชีวมวลแห้ง)

$$Y_{p/x} = \frac{\text{ปริมาณน้ำมัน (กรัมต่อลิตร)} \times 100 \text{ เปอร์เซ็นต์}}{\text{น้ำหนักแห้งของชีวมวลยีสต์ (กรัมต่อลิตร)}}$$

2.4) ผลผลิตของน้ำมัน; $Y_{p/s}$ (กรัมของน้ำมันต่อกรัมของกลีเซอรอล; $g_{\text{Oil}}/g_{\text{Glycerol}}$)

$$Y_{p/s} = \frac{(\text{ความเข้มข้นของน้ำมันสุดท้าย} - \text{ความเข้มข้นของน้ำมันเริ่มต้น})}{(\text{ความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้น} - \text{ความเข้มข้นของกลีเซอรอลสุดท้าย})}$$

2.5) อัตราการผลิตน้ำมัน; q_p (กรัมของน้ำมันต่อลิตรต่อชั่วโมง; g/L h)

$$q_p = \frac{\text{ปริมาณน้ำมัน (กรัมต่อลิตร)}}{\text{ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)}}$$

3. องค์ประกอบของกรดไขมัน

ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (FAME) สามารถแสดงออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์และ Methyl Heptadecanoate (C17:0) ใช้เป็นสาร Internal Standard [11] ดังสมการ ข.1

$$FA_i = \frac{A_{FA}}{\sum_{i=1}^n A - A_{IS}} \times 100 \quad (\text{ข.1})$$

โดย FA_i คือ องค์ประกอบของกรดไขมัน (เปอร์เซ็นต์) ของ FAME

A_{FA_i} คือ พื้นที่ใต้กราฟของ FAME

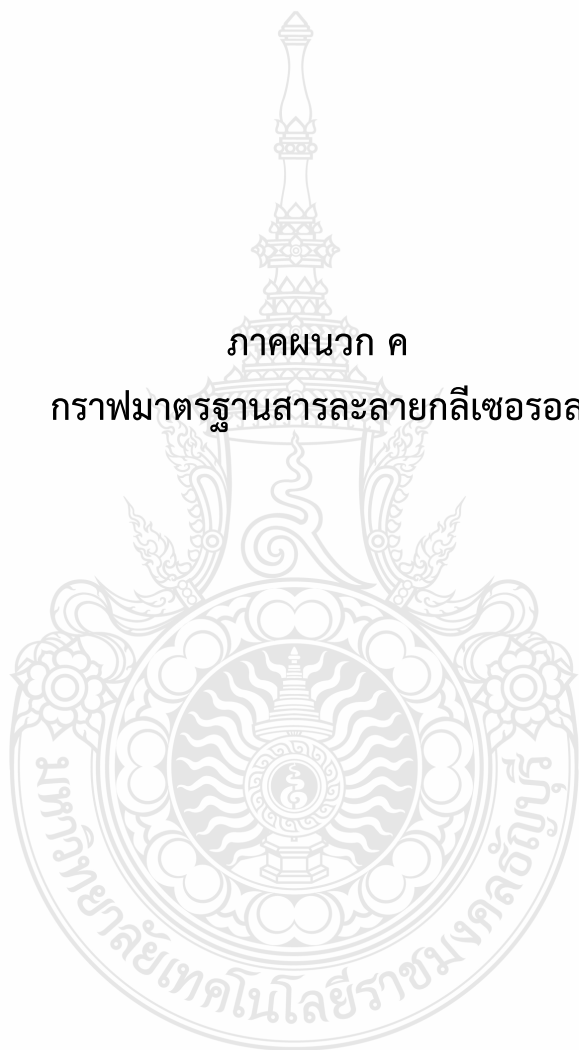
A_{IS} คือ พื้นที่ใต้กราฟของ Internal standard

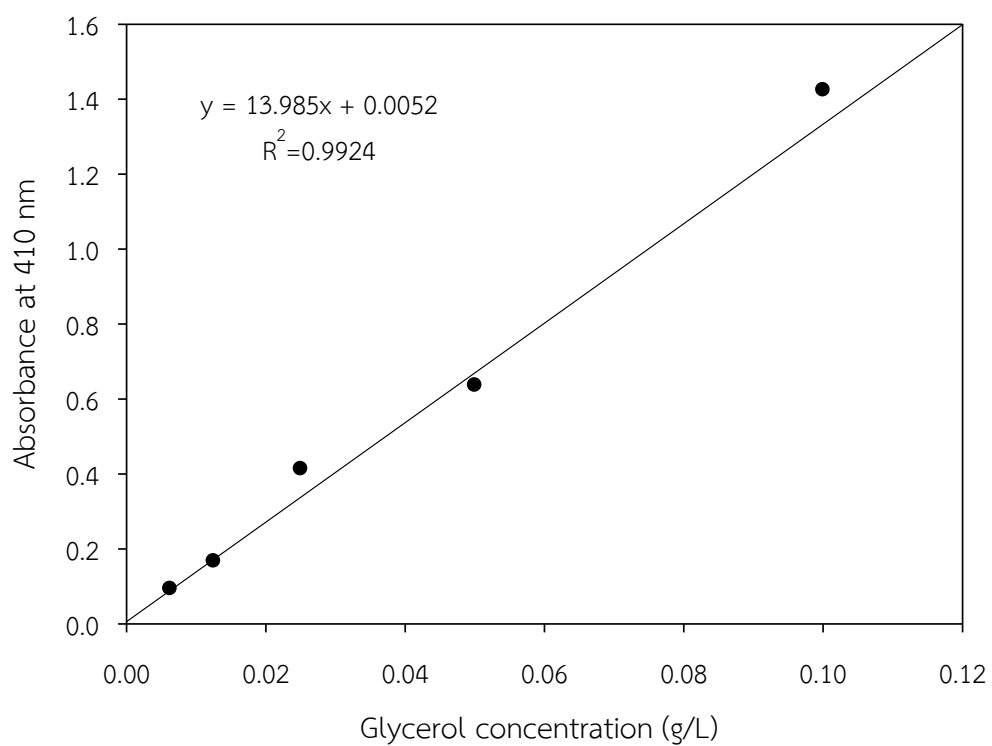
$\sum_{i=1}^n A$ คือ พื้นที่ใต้กราฟทั้งหมดของ FAME (C4 ถึง C24:1)

4. คุณสมบัติทางกายภาพของไบโอดีเซล

นำ M_i คือ น้ำหนักโมเลกุลของ FAME และ N คือ จำนวนพันธะคู่ใน FAME ดังนั้น N เท่ากับ 0, 1, 2 และ 3 จาก C18:0, C18:1, C18:2 และ C18:3 Methyl ester ตามลำดับ ด้วยโปรแกรม Biodiesel Analyzer version 2.2

ภาคผนวก ค
กราฟมาตรฐานสารละลายกลีเซอรอล

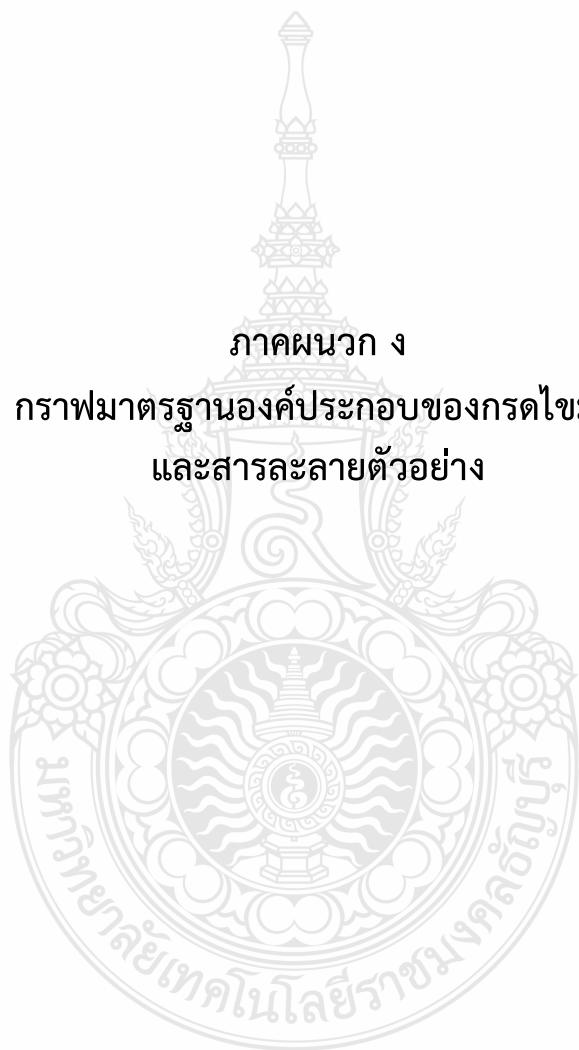


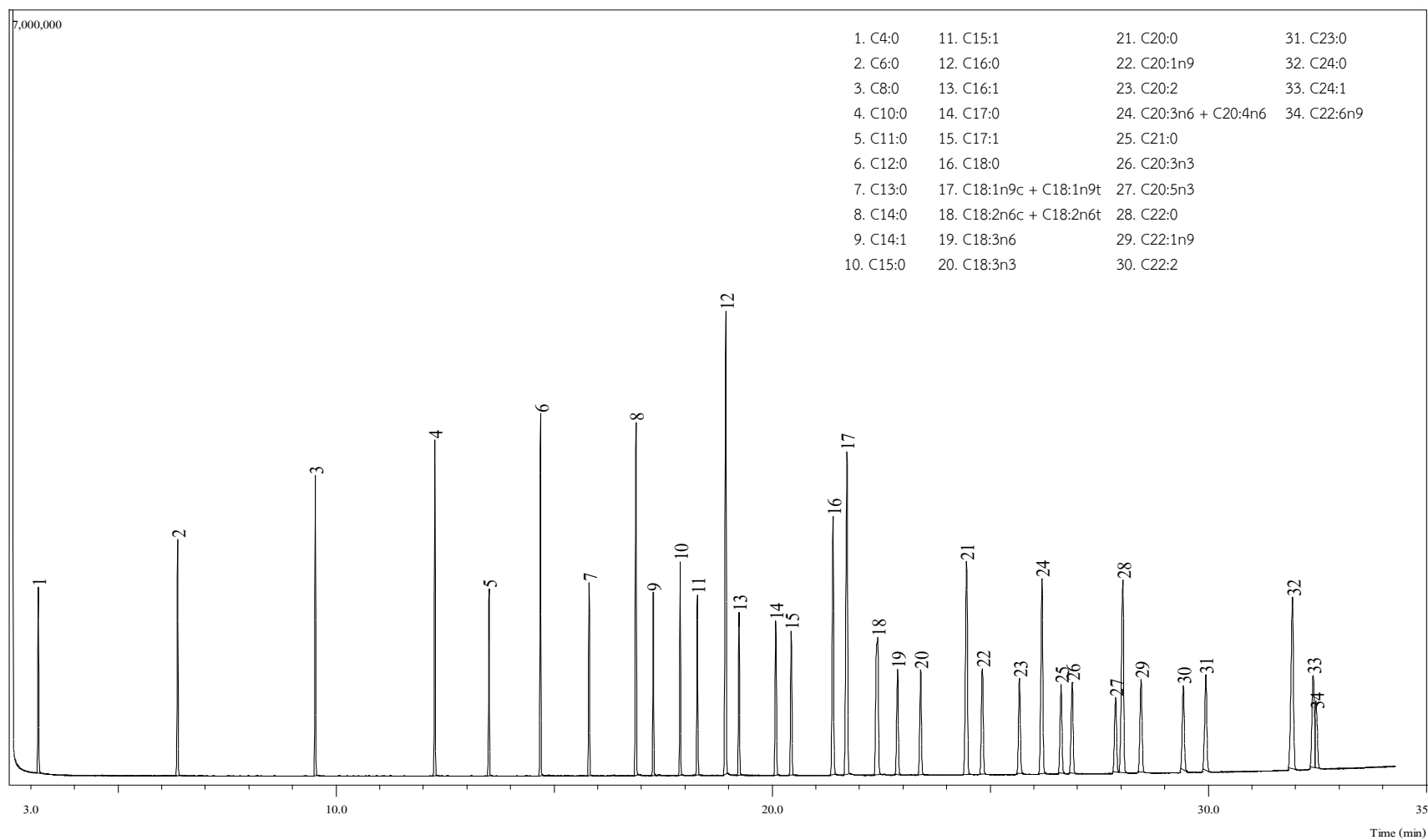


รูปที่ ค1 กราฟมาตรฐานสารละลายกลีเซอรอล

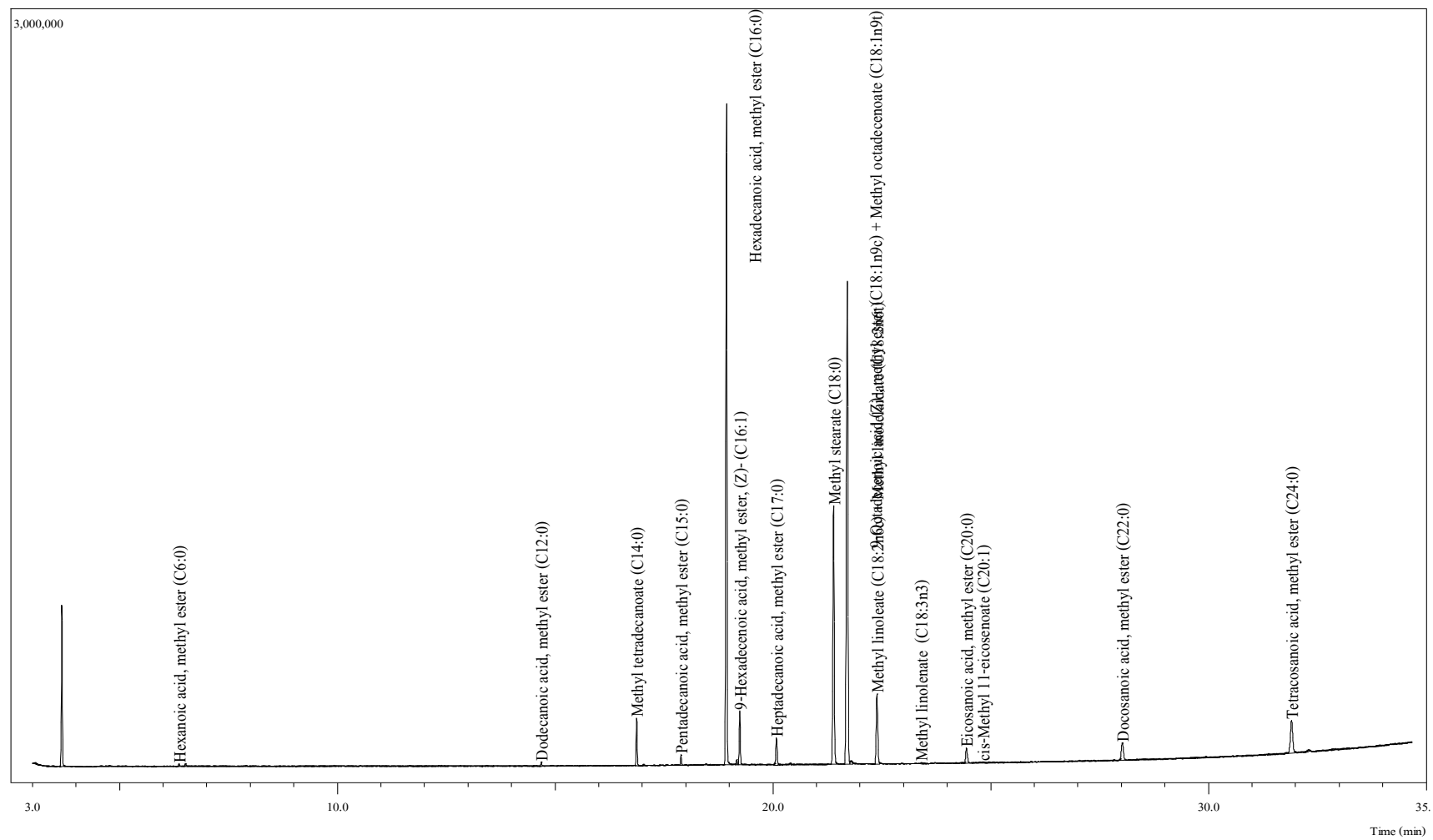


ภาคผนวก ง
กราฟมาตรฐานองค์ประกอบของกรดไขมัน
และสารละลายตัวอย่าง





รูปที่ ง1 โครมาโทแกรมของกรดไขมันมาตรฐานในรูปเมทิลเอสเทอร์ (Fatty Acid Methyl Esters)



รูปที่ ๖2 โครมาโทแกรมของกรดไขมันในตัวอย่างน้ำมันยีสต์

บรรณานุกรม

- [1] L. Lin, D. Ying, S. Chaitep, and S. Vittayapadung, "Biodiesel production from crude rice bran oil and properties as fuel," *Applied Energy*, vol. 86, no. 5, pp. 681–688, May 2009.
- [2] G. Antolín, F. V. Tinaut, Y. Briceño, V. Castaño, C. Pérez, and A. I. Ramírez, "Optimisation of biodiesel production by sunflower oil transesterification," *Bioresource Technology*, vol. 83, no. 2, pp. 111–114, Jun. 2002.
- [3] S. Saran, A. Mathur, J. Dalal, and R. K. Saxena, "Process optimization for cultivation and oil accumulation in an oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides* A29," *Fuel*, vol. 188, pp. 324–331, Jan. 2017.
- [4] I. R. Sitepu *et al.*, "Oleaginous yeasts for biodiesel: Current and future trends in biology and production," *Biotechnology Advances*, vol. 32, no. 7, pp. 1336–1360, Nov. 2014.
- [5] A. Areesirisuk, C. Chiu, C. Liu, and J. Guo, "A novel oleaginous yeast strain with high lipid productivity and its application to alternative biodiesel production," *Applied Biochemistry and Microbiology*, vol. 51, no. 4, pp. 411–418, Jul 2015a.
- [6] K. Mathiazhakan, D. Ayed, and R. D. Tyagi, "Kinetics of lipid production at lab scale fermenters by a new isolate of *Yarrowia lipolytica* SKY7," *Bioresource Technology*, vol. 221, pp. 234–240, Dec. 2016.
- [7] M. Tai and G. Stephanopoulos, "Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production," *Metabolic Engineering*, vol. 15, pp. 1–9, Jan. 2013.
- [8] P. Polburee *et al.*, "Lipid production from biodiesel-derived crude glycerol by *Rhodosporidium fluviale* DMKU-RK253 using temperature shift with high cell density," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 112, pp. 208–218, Aug. 2016.
- [9] A. Dobrowolski, P. Mituła, W. Rymowicz, and A. M. Mironczuk, "Efficient conversion of crude glycerol from various industrial wastes into single cell oil by yeast *Yarrowia lipolytica*," *Bioresource Technology*, vol. 207, pp. 237–243, May 2016.
- [10] G. Munch, R. Sestric, R. Sparling, D. B. Levin, and N. Cicek, "Lipid production in the under-characterized oleaginous yeasts, *Rhodosporidium babjevae* and *Rhodosporidium diobovatum*, from biodiesel-derived waste glycerol," *Bioresource Technology*, vol. 185, pp. 49–55, Jun. 2015.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [11] A. Areesirisuk, C. H. Chiu, T. B. Yen, C. H. Liu, S. Pongswat, and J. H. Guo, "Influence of substrate concentration on microbial oil production by *Pseudozyma parantarctica* CHC28 and its fatty acid characterization," in *International Conference on Science and Technology*, 2015b, pp. 121–125.
- [12] Q. (Sophia) He, J. McNutt, and J. Yang, "Utilization of the residual glycerol from biodiesel production for renewable energy generation," *Renewable and Sustainable Energy Review*, vol. 71, pp. 63–76, May 2017.
- [13] S. K. Hoekman, A. Broch, C. Robbins, E. Cenicerros, and M. Natarajan, "Review of biodiesel composition, properties, and specifications," *Renewable and Sustainable Energy Review*, vol. 16, no. 1, pp. 143–169, Jan. 2012.
- [14] D. Y. C. Leung, X. Wu, and M. K. H. Leung, "A review on biodiesel production using catalyzed transesterification," *Applied Energy*, vol. 87, no. 4, pp. 1083–1095, Apr. 2010.
- [15] W.-H. Leong, J.-W. Lim, M.-K. Lam, Y. Uemura, and Y.-C. Ho, "Third generation biofuels: A nutritional perspective in enhancing microbial lipid production," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 91, pp. 950–961, Aug. 2018.
- [16] N. U. Soriano, R. Venditti, and D. S. Argyropoulos, "Biodiesel synthesis via homogeneous Lewis acid-catalyzed transesterification," *Fuel*, vol. 88, no. 3, pp. 560–565, Mar. 2009.
- [17] A. E. Atabani, A. S. Silitonga, I. A. Badruddin, T. M. I. Mahlia, H. H. Masjuki, and S. Mekhilef, "A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 16, no. 4, pp. 2070–2093, May 2012.
- [18] C. T. Evans and C. Ratledge, "Influence of nitrogen metabolism on lipid accumulation by *Rhodospiridium toruloides* CBS 14," *Microbiology*, vol. 130, no. 7, pp. 1705–1710, 1984.
- [19] C. Huang, M. Zong, H. Wu, and Q. Liu, "Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*," *Bioresource Technology*, vol. 100, no. 19, pp. 4535–4538, Oct. 2009.
- [20] C. Ratledge, "Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production," *Biochimie*, vol. 86, no. 11, pp. 807–815, Nov. 2004.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [21] C. Ratledge and J. P. Wynn, "The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms," *Advances in Applied Microbiology*, vol. 51, pp. 1–51, 2002.
- [22] R. Poontawee, W. Yongmanitchai, and S. Limtong, "Efficient oleaginous yeasts for lipid production from lignocellulosic sugars and effects of lignocellulose degradation compounds on growth and lipid production," *Process Biochemistry*, vol. 53, pp. 44–60, Feb. 2017.
- [23] C.-H. Zhao, W. Cui, X.-Y. Liu, Z.-M. Chi, and C. Madzak, "Expression of inulinase gene in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* and single cell oil production from inulin-containing materials," *Metabolic Engineering*, vol. 12, no. 6, pp. 510–517, Nov. 2010.
- [24] M. Li, G.-L. Liu, Z. Chi, and Z.-M. Chi, "Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marine-derived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a," *Biomass and Bioenergy*, vol. 34, no. 1, pp. 101–107, Jan. 2010.
- [25] Z. Gong *et al.*, "Co-utilization of corn stover hydrolysates and biodiesel-derived glycerol by *Cryptococcus curvatus* for lipid production," *Bioresource Technology*, vol. 219, pp. 552–558, Nov. 2016.
- [26] N. Bonturi, A. Crucello, A. J. C. Viana, and E. A. Miranda, "Microbial oil production in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate without nutrient supplementation by a *Rhodospiridium toruloides* adapted strain," *Process Biochemistry*, vol. 57, pp. 16–25, Jun. 2017.
- [27] H.-W. Yen, J.-T. Chang, and J.-S. Chang, "The growth of oleaginous *Rhodotorula glutinis* in an internal-loop airlift bioreactor by using mixture substrates of rice straw hydrolysate and crude glycerol," *Biomass and Bioenergy*, vol. 80, pp. 38–43, Sep. 2015.
- [28] L. Y. Zhu, M. H. Zong, and H. Wu, "Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation," *Bioresource Technology*, vol. 99, no. 16, pp. 7881–7885, Nov. 2008.
- [29] G. Knothe, "'Designer' Biodiesel: Optimizing Fatty Ester Composition to Improve Fuel Properties," *Energy and Fuels*, vol. 22, no. 2, pp. 1358–1364, Mar. 2008.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [30] L. F. Ramírez-Verduzco, J. E. Rodríguez-Rodríguez, and A. del R. Jaramillo-Jacob, "Predicting cetane number, kinematic viscosity, density and higher heating value of biodiesel from its fatty acid methyl ester composition," *Fuel*, vol. 91, no. 1, pp. 102–111, Jan. 2012.
- [31] G. Knothe and L. F. Razon, "Biodiesel fuels," *Progress in Energy and Combustion Science*, vol. 58, pp. 36–59, Jan. 2017.
- [32] G. Martínez, N. Sánchez, J. M. Encinar, and J. F. González, "Fuel properties of biodiesel from vegetable oils and oil mixtures. Influence of methyl esters distribution," *Biomass and Bioenergy*, vol. 63, pp. 22–32, Apr. 2014.
- [33] X. Meng, J. Yang, X. Xu, L. Zhang, Q. Nie, and M. Xian, "Biodiesel production from oleaginous microorganisms," *Renewable Energy*, vol. 34, no. 1, pp. 1–5, Jan. 2009.
- [34] S. Sadhukhan and U. Sarkar, "Production of purified glycerol using sequential desalination and extraction of crude glycerol obtained during transesterification of *Crotalaria juncea* oil," *Energy Conversion and Management*, vol. 118, pp. 450–458, Jun. 2016.
- [35] M. Nanda, W. Qin, M. Poirier, and X. Chunbao, "Purification of crude glycerol using acidification: Effects of acid types and product characterization," 2014.
- [36] D. C. Montgomery, *Design and analysis of experiments*, 8 edition. Hoboken, NJ: Wiley, 2012.
- [37] J. Almquist, M. Cvijovic, V. Hatzimanikatis, J. Nielsen, and M. Jirstrand, "Kinetic models in industrial biotechnology – Improving cell factory performance," *Metabolic Engineering*, vol. 24, pp. 38–60, Jul. 2014.
- [38] M. Hajek and F. Skopal, "Treatment of glycerol phase formed by biodiesel production," *Bioresource Technology*, vol. 101, no. 9, pp. 3242–3245, May 2010.
- [39] R. Manosak, S. Limpattayanate, and M. Hunsom, "Sequential-refining of crude glycerol derived from waste used-oil methyl ester plant via a combined process of chemical and adsorption," *Fuel Processing Technology*, vol. 92, no. 1, pp. 92–99, Jan. 2011.
- [40] A. Chatzifragkou *et al.*, "Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species," *Energy*, vol. 36, no. 2, pp. 1097–1108, Feb. 2011.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [41] Y. Cui, J. W. Blackburn, and Y. Liang, "Fermentation optimization for the production of lipid by *Cryptococcus curvatus*: Use of response surface methodology," *Biomass and Bioenergy*, vol. 47, pp. 410–417, Dec. 2012.
- [42] C. G. Chol, R. Dhabhai, A. K. Dalai, and M. Reaney, "Purification of crude glycerol derived from biodiesel production process: Experimental studies and techno-economic analyses," *Fuel Processing Technology*, vol. 178, pp. 78–87, Sep. 2018.
- [43] O. Ghorbel-Bellaaj *et al.*, "Shrimp waste fermentation with *Pseudomonas aeruginosa* A2: Optimization of chitin extraction conditions through Plackett–Burman and response surface methodology approaches," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 48, no. 4, pp. 596–602, May 2011.
- [44] P. Bondioli and L. Bella, "An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel," *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 107, no. 3, pp. 153–157, Mar. 2005.
- [45] J. Feng, J.-S. Zhang, W. Jia, Y. Yang, F. Liu, and C.-C. Lin, "An unstructured kinetic model for the improvement of triterpenes production by *Ganoderma lucidum* G0119 based on nitrogen source effect," *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, vol. 19, no. 4, pp. 727–732, Jul. 2014.
- [46] J. Yang, E. Rasa, P. Tantayotai, K. M. Scow, H. Yuan, and K. R. Hristova, "Mathematical model of *Chlorella minutissima* UTEX2341 growth and lipid production under photoheterotrophic fermentation conditions," *Bioresource Technology*, vol. 102, no. 3, pp. 3077–3082, Feb. 2011.
- [47] J. Marudkla, W.-C. Lee, S. Wannawilai, Y. Chisti, and S. Sirisansaneeyakul, "Model of acetic acid-affected growth and poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* DSM 545," *Journal of Biotechnology*, vol. 268, pp. 12–20, Feb. 2018.
- [48] K. V. Kumar, "Pseudo-second order models for the adsorption of safranin onto activated carbon: Comparison of linear and non-linear regression methods," *Journal of Hazardous Materials*, vol. 142, no. 1, pp. 564–567, Apr. 2007.
- [49] X. Yang and B. Al-Duri, "Kinetic modeling of liquid-phase adsorption of reactive dyes on activated carbon," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 287, no. 1, pp. 25–34, Jul. 2005.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [50] A. F. Talebi, M. Tabatabaei, and Y. Chisti, "BiodieselAnalyzer: a user-friendly software for predicting the properties of prospective biodiesel," *Biofuel Research Journal*, vol. 1, no. 2, pp. 55–57, Jun. 2014.
- [51] S. Sadhukhan, R. Villa, and U. Sarkar, "Microbial production of succinic acid using crude and purified glycerol from a *Crotalaria juncea* based biorefinery," *Biotechnology Reports*, vol. 10, pp. 84–93, Jun. 2016.
- [52] P. Polburee, W. Yongmanitchai, N. Lertwattanasakul, T. Ohashi, K. Fujiyama, and S. Limtong, "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*, vol. 119, no. 12, pp. 1194–1204, Dec. 2015.
- [53] E. E. Karamerou, C. Theodoropoulos, and C. Webb, "A biorefinery approach to microbial oil production from glycerol by *Rhodotorula glutinis*," *Biomass and Bioenergy*, vol. 89, pp. 113–122, Jun. 2016.
- [54] U. Towijit, C. Amponpi boon, M. Sriariyanun, and S. Kongruang, "Optimization of lipid production by oleaginous yeast using response surface methodology," *Suranaree Journal of Science and Technology*, vol. 21, pp. 321–328, Jan. 2014.
- [55] M. Rossi *et al.*, "Growth, lipid accumulation, and fatty acid composition in obligate psychrophilic, facultative psychrophilic, and mesophilic yeasts," *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 69, no. 3, pp. 363–372, Sep. 2009.
- [56] X.-F. Chen, C. Huang, X.-Y. Yang, L. Xiong, X.-D. Chen, and L.-L. Ma, "Evaluating the effect of medium composition and fermentation condition on the microbial oil production by *Trichosporon cutaneum* on corncob acid hydrolysate," *Bioresource Technology*, vol. 143, pp. 18–24, Sep. 2013.
- [57] S. Wu, X. Zhao, H. Shen, Q. Wang, and Z. K. Zhao, "Microbial lipid production by *Rhodospiridium toruloides* under sulfate-limited conditions," *Bioresource Technology*, vol. 102, no. 2, pp. 1803–1807, Jan. 2011.
- [58] H.-W. Yen and Y. X. Liu, "Application of airlift bioreactor for the cultivation of aerobic oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with different aeration rates," *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 118, no. 2, pp. 195–198, Aug. 2014.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [59] B. Cheirsilp and S. Kitcha, "Solid state fermentation by cellulolytic oleaginous fungi for direct conversion of lignocellulosic biomass into lipids: Fed-batch and repeated-batch fermentations," *Industrial Crops and Products*, vol. 66, pp. 73–80, Apr. 2015.
- [60] W. A. A. Q. I. Wan-Mohtar, S. Ab Kadir, and N. Saari, "The morphology of *Ganoderma lucidum* mycelium in a repeated-batch fermentation for exopolysaccharide production," *Biotechnology Reports*, vol. 11, pp. 2–11, Sep. 2016.
- [61] M. G. Dashti and P. Abdesahian, "Batch culture and repeated-batch culture of *Cunninghamella bainieri* 2A1 for lipid production as a comparative study," *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 23, no. 2, pp. 172–180, Mar. 2016.
- [62] D. Rorke and G. Kana, "Kinetics of bioethanol production from waste sorghum leaves using *Saccharomyces cerevisiae* BY4743," *Fermentation*, vol. 3, p. 19, May 2017.
- [63] N. Phukoetphim, A. Salakkam, P. Laopaiboon, and L. Laopaiboon, "Kinetic models for batch ethanol production from sweet sorghum juice under normal and high gravity fermentations: Logistic and modified Gompertz models," *Journal of Biotechnology*, vol. 243, pp. 69–75, Feb. 2017.
- [64] M. Mofijur, H. H. Masjuki, M. A. Kalam, and A. E. Atabani, "Evaluation of biodiesel blending, engine performance and emissions characteristics of *Jatropha curcas* methyl ester: Malaysian perspective," *Energy*, vol. 55, pp. 879–887, Jun. 2013.
- [65] U. Rajak and T. N. Verma, "Effect of emission from ethylic biodiesel of edible and non-edible vegetable oil, animal fats, waste oil and alcohol in CI engine," *Energy Conversion and Management*, vol. 166, pp. 704–718, Jun. 2018.
- [66] U. Rajak and T. N. Verma, "A comparative analysis of engine characteristics from various biodiesels: Numerical study," *Energy Conversion and Management*, vol. 180, pp. 904–923, Jan. 2019.