

อิทธิพลของปัจจัยทางเคมีและทางกายภาพต่อการเพาะเลี้ยงยีสต์น้ำมันโดยใช้
กลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก
**Effect of Chemical and Physical Factors on Oleaginous Yeast Cultivation by
Using Biodiesel-Derived Crude Glycerol as a Main Carbon Source**

ชุตติมา รักษิกิจการพูล¹, ธนศักดิ์ ล้อมทอง^{1,2}, อภินันท์ วัลภา³,
จันทิมา ทีฆะ^{1,2}, อัษฎาวุธ อารีสิริสุข^{1,2*}
Chutima Rakkitkanphun¹, Thanasak Lomthong^{1,2}, Apinan wanlapa³,
Jantima Teeka^{1,2}, Atsawut Areesirisuk^{1,2*}

¹สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

¹Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi

²ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพและนาโน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

²Center of Excellence in Nano-Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Rajamangala
University of Technology Thanyaburi

³สาขาวิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

³Division of Food Engineering, Faculty of Engineering, Rajamangala University of Technology
Thanyaburi

*E-mail: atsawut_a@rmutt.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอิทธิพลของปัจจัยทางเคมีและปัจจัยทางกายภาพต่อการเพาะเลี้ยงยีสต์ที่มีคุณสมบัติสะสมน้ำมัน *Pseudozyma parantarctica* CHC28 โดยใช้กลีเซอรอลดิบซึ่งเป็นผลพลอยได้ของกระบวนการผลิตน้ำมันไบโอดีเซล (Biodiesel-Derived Crude Glycerol, BCG) เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งทำการทดลองโดยแปรผันปัจจัยทั้งหมด 7 ปัจจัย (ความเข้มข้นกลีเซอรอล ปริมาณ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ปริมาณ KH_2PO_4 ปริมาณ MgSO_4 ปริมาณกลีเซอรอล อัตราการเขย่าและอุณหภูมิ) ด้วยการวางแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman Design (PBD) ผลการทดลองพบว่ายีสต์สามารถใช้ BCG ในการเจริญเติบโตและผลิตน้ำมันได้ทุกการทดลอง โดยมีการผลิตชีวมวลยีสต์ การผลิตน้ำมัน ปริมาณน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์ และอัตราการผลิตน้ำมันสูงสุด เท่ากับ 4.68 กรัมต่อลิตร 2.53 กรัมต่อลิตร 54.06 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักชีวมวลแห้ง และ 0.84 กรัมต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ BCG ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกในการเพาะเลี้ยงยีสต์ *P. parantarctica* CHC28 ได้นอกจากนี้ยังพบว่าปัจจัยที่มีอิทธิพลสูงสุด 3 อันดับต่อการผลิตชีวมวลคือ ความเข้มข้นกลีเซอรอล ปริมาณ MgSO_4 และอัตราการเขย่า โดยมีค่าการกระจายของอิทธิพล (Contribution Effect) เท่ากับ 49.46

22.18 และ 2.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอล ปริมาณ KH_2PO_4 และอัตราการเขย่า เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลสูงสุด 3 อันดับแรกต่อการผลิตน้ำมัน ซึ่งมีค่า Contribution Effect เท่ากับ 34.79 11.22 และ 10.73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการทดลองยังพบว่าความเข้มข้นของกลีเซอรอล ปริมาณ MgSO_4 และอัตราการเขย่า เป็นปัจจัยที่แสดงอิทธิพลในทางบวก (Positive Effect) ต่อชีวมวลและน้ำมัน ในขณะที่ปริมาณ KH_2PO_4 แสดงอิทธิพลในทางลบ (Negative Effect) ต่อการผลิตน้ำมัน งานวิจัยนี้จึงแสดงให้เห็นถึง BCG เป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูกและน่าสนใจสำหรับใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการผลิตน้ำมันจากยีสต์

คำสำคัญ: กลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตน้ำมันไบโอดีเซล ยีสต์น้ำมัน *Pseudozyma parantarctic* การทดลองแบบ Plackett-Burman

Abstract

The research aimed to study the effect of chemical and physical factors for cultivating oleaginous yeast *Pseudozyma parantarctica* CHC28 by using biodiesel-derived crude glycerol (BCG) as a sole carbon source. The seven variables (Glycerol concentration, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , MgSO_4 , inoculum size, agitation rate, and temperature) were experimented and varied as two levels with Plackett-Burman experimental design (PBD). The maximum biomass, oil concentration, oil content, and oil production rate were obtained for 4.68 g/L, 2.53 g/L, 54.06% of dry biomass, and 0.84 g/L day, respectively. The results showed that yeast could utilize BCG for growing and producing microbial oil in all experiments. It demonstrated that the BCG could be used as a low-cost carbon source for cultivating *P. parantarctica*. Moreover, the experiment exhibited that glycerol concentration, MgSO_4 , and agitation rate were the first three highest contribution effect to biomass production for 49.46, 22.18, and 2.22%, respectively. While, glycerol concentration, KH_2PO_4 and agitation rate presented the first three highest contribution effect to oil concentration for 34.79, 11.22, and 10.73%, respectively. In addition, it was also observed that glycerol concentration, MgSO_4 , and agitation rate represented the positive effect on biomass and oil production while KH_2PO_4 provided a negative effect on oil production. This research demonstrated that BCG was an interesting inexpensive raw material for using as a carbon source of microbial oil production.

Keywords: Biodiesel-Derived Crude Glycerol, Oleaginous Yeast, *Pseudozyma parantarctica*, Plackett-Burman Design

บทนำ

ช่วงเวลาที่ผ่านมามีความต้องการพลังงานเชื้อเพลิงจากฟอสซิล (Fossil) มีอัตราการสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ในขณะที่ปริมาณการผลิตเชื้อเพลิงดังกล่าวมีจำกัดและลดลงอย่างรวดเร็วทำให้เกิดปัญหาพลังงานในปัจจุบัน (Lin *et al.*, 2009) พลังงานหมุนเวียน (Renewable Energy) ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานทางเลือกใหม่จึงได้รับความสนใจนำมาใช้ทดแทนพลังงานจากฟอสซิล เนื่องจากสามารถผลิตขึ้นใหม่ได้อย่างต่อเนื่อง น้ำมันไบโอดีเซลจึงเป็นพลังงานหมุนเวียนชนิดหนึ่งที่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมเนื่องจากปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซเรือนกระจกต่าง ๆ สู่ชั้นบรรยากาศน้อยกว่าน้ำมันปิโตรเลียม (Antolín *et al.*, 2002) โดยน้ำมันไบโอดีเซลสามารถผลิตได้จากน้ำมันพืช และน้ำมันจากสัตว์ด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน (Transesterification) ระหว่างไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) ในน้ำมันกับแอลกอฮอล์สายสั้น เช่น เมทานอล (Methanol) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมเกิดเป็นสารประกอบเมทิลเอสเทอร์ (Methylester) หรือน้ำมันไบโอดีเซล เป็นสารประกอบหลัก และได้กลีเซอรอล (Glycerol) เป็นผลพลอยได้ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของการผลิตน้ำมันไบโอดีเซล อย่างไรก็ตามต้นทุนในการผลิตไบโอดีเซลนั้นมาจากราคาของวัตถุดิบประมาณ 70-90 เปอร์เซ็นต์ (Saran *et al.*, 2017) เมื่อราคาของวัตถุดิบสูงขึ้นจึงทำให้ราคาของน้ำมันไบโอดีเซลสูงขึ้นด้วย นอกจากนี้วัตถุดิบในการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลยังได้มีการใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหาร ทำให้มีวัตถุดิบไม่เพียงพอต่อการผลิตตลอดทั้งปี

ปัจจุบันกระบวนการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลโดยใช้วัตถุดิบชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพ และสามารถทดแทนการใช้ไขมันจากพืชหรือสัตว์ในการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลได้รับความสนใจมากขึ้น โดยน้ำมันจากจุลินทรีย์ (Microbial Oil) หรือน้ำมันเซลล์เดี่ยว (Single Cell Oil) เป็นน้ำมันที่ได้รับความสนใจนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลทดแทนน้ำมันจากพืชและสัตว์ เนื่องจากมีองค์ประกอบของกรดไขมันคล้ายคลึงกับในน้ำมันพืช (Sitepu *et al.*, 2014) ซึ่งมีงานวิจัยรายงานว่าจุลินทรีย์บางชนิดสามารถสร้างและสะสมไขมันไว้ในเซลล์มากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (Oleaginous Microorganisms) และความสามารถในการสะสมไขมันขึ้นอยู่กับความแตกต่างของชนิดจุลินทรีย์ นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตน้ำมันยังไม่ขึ้นอยู่กับฤดูกาลทำให้สามารถผลิตได้ตลอดทั้งปี และใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูกในการเพาะเลี้ยงยีสต์ดังกล่าวได้ โดยได้ทำการคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตและสะสมไขมันภายในเซลล์สำหรับนำมาใช้ในการผลิตน้ำมันไบโอดีเซล ผลการทดลองพบว่ายีสต์ *Pseudozyma parantarctica* CHC28 มีความสามารถในการสะสมไขมันภายในเซลล์ได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และน้ำมันดังกล่าวยังประกอบด้วยกรดไขมัน (Fatty Acid) ที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลอีกด้วย อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพการผลิตน้ำมันจุลินทรีย์ยังขึ้นอยู่กับสภาวะและต้นทุนของวัตถุดิบที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง งานวิจัยในปัจจุบันจึงมุ่งเน้นการนำของเหลือทิ้งหรือผลพลอยได้จากภาคอุตสาหกรรมและการเกษตร ซึ่งไม่มีราคาหรือมีราคาถูกมาใช้เป็นวัตถุดิบในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ทดแทนวัตถุดิบที่มีราคาสูง

ในปัจจุบันมีรายงานว่ากลีเซอรอลซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล (Biodiesel-Derived Crude Glycerol, BCG) เป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูกและมีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตน้ำมันได้ (Mathiazhakan *et al.*, 2016) โดยยีสต์จะนำกลีเซอรอลเข้าสู่เซลล์และเปลี่ยนเป็นกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต (Glyceroldehyde-3-Phosphate, G-3-P)

ก่อนเข้าสู่กระบวนการไกลโคไลซิส (Glycolysis) และวัฏจักรการผลิตน้ำมันในไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) และเอนโดพลาสมิก เรติคูลัม (Endoplasmic Reticulum, ER) จนได้สารไตรเอซิลกลีเซอรอล (Triacylglycerol, TG) (Rymowicz *et al.*, 2010; Tai & Stephanopoulos, 2013) อย่างไรก็ตามการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเหลือทิ้งที่แตกต่างกันจะทำให้ BCG ที่ได้มีสิ่งเจือปนแตกต่างกันซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อเจริญและการผลิตน้ำมันของยีสต์ได้ งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาอิทธิพลของปัจจัยทางเคมีและกายภาพที่ส่งผลต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์ *P. parantarctica* CHC28 โดยใช้ BCG ที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลด้วยน้ำมันพืชเหลือทิ้งจากโรงงานแปรรูปเนื้อไก่ปรุงสุกเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อลดต้นทุนในกระบวนการผลิตและการลดภาระในการนำ BCG ไปกำจัดทิ้งอีกด้วย

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. สายพันธุ์ยีสต์ การเก็บรักษายีสต์ และการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อ

ยีสต์น้ำมันที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้คือยีสต์ *P. parantarctica* CHC28 ซึ่งนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YM Agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อเชื้อ 1 หลบ 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 ตูตสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ลงไป 0.2 มิลลิลิตร ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส สำหรับใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในการทดลอง

2. การกำจัดสารเจือปนในกลีเซอรอลดิบที่ได้จากการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลด้วยวิธีการปรับสภาพให้เป็นกรด

นำ BCG ที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท ซีพีเอฟ (ประเทศไทย) จำกัด สำนักงานไກ่กระทรวงครวงจร อำเภอก่งคอย จังหวัดสระบุรี มาทำการปรับให้เป็นกรด (Acidification) ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (37 เปอร์เซ็นต์ Hydrochloric Acid, HCl) ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 1.70 ± 0.01 ผสมให้เข้ากันด้วยแท่งแม่เหล็กกวนสารเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และตั้งทิ้งไว้ อีก 12 ชั่วโมง กลีเซอรอลดิบจะเกิดการแยกชั้น โดยชั้นบนเป็นชั้นของกรดไขมัน ชั้นกลางเป็นกลีเซอรอล และชั้นล่างเป็นตะกอนของเกลือ (Inorganic Salt) จากนั้นนำกลีเซอรอลในชั้นกลางมาปรับความเป็นกรดต่างให้เท่ากับ 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 10 นอร์มอล แล้วผสมเอทานอลลงไปในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 (โดยปริมาตร) ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที (Manosak *et al.*, 2011) แยกส่วนใสที่ได้ไประเหยเอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Vacuum Evaporator) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นำกลีเซอรอลที่ได้ไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของอาหารเพาะเลี้ยงยีสต์น้ำมันในการทดลองขั้นถัดไป

3. การศึกษาอิทธิพลของปัจจัยทางเคมีและกายภาพต่อประสิทธิภาพการผลิตน้ำมันของยีสต์ด้วยกลีเซอรอลดิบจากโรงงานอุตสาหกรรม

ถ่ายเชื้อยีสต์ตั้งต้น *P. parantarctica* CHC28 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ Glycerol-YM Broth ซึ่งมีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพูนขนาด 125 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อยีสต์ลงในอาหาร Seed Medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพูนขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเพาะเลี้ยงที่สภาวะเดิมอีกครั้ง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อยีสต์ที่ได้ลงในอาหาร Oil Production Medium ที่ใช้ BCG จากการทดลองข้างต้นเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก โดยแปรผันปัจจัยทางเคมีและกายภาพ ได้แก่ ความเข้มข้นกลีเซอรอล (X_1) ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (X_2) ปริมาณโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (X_3) ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต (X_4) ปริมาณกล้าเชื้อ (X_5) อัตราการเขย่า (X_6) และอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง (X_7) (ตารางที่ 1) ตามแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman (Ghorbel-Bellaaj *et al.*, 2011) (ตารางที่ 2) ที่ปริมาตร 150 มิลลิลิตร บรรจุในขวดรูปชมพูนขนาด 500 มิลลิลิตร โดยทำการทดลองแบบ 2 ขั้ว 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 BCG จากโรงงานอุตสาหกรรมเป็นวัตถุดิบ

ตารางที่ 1 ปัจจัยและระดับของปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง

ปัจจัย	หน่วย	สัญลักษณ์	ระดับการทดลอง	
			ต่ำสุด (-1)	สูงสุด (+1)
ความเข้มข้นกลีเซอรอล	กรัมต่อลิตร	X_1	10	50
ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต	กรัมต่อลิตร	X_2	1	4
ปริมาณโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	กรัมต่อลิตร	X_3	1	7
ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต	กรัมต่อลิตร	X_4	0	1.5
ปริมาณกล้าเชื้อ	เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร	X_5	2	10
อัตราการเขย่า	รอบต่อนาที	X_6	100	250
อุณหภูมิ	องศาเซลเซียส	X_7	25	35

4. การวิเคราะห์

วิเคราะห์น้ำหนักชีวมวลยีสต์ โดยนำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติมน้ำเพื่อล้างเซลล์และปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง จากนั้นนำตะกอนเซลล์มาอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักเซลล์คงที่ (Areesirisuk *et al.*, 2015) และวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันทั้งหมดโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายตามวิธีของ Bligh & Dyer (1959)

5. การคำนวณ

ปริมาณน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์ (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักชีวมวลแห้ง)

$$Y_{p/x} (\%w/w) = \frac{(\text{Oil Concentration, g/L}) \times 100 \%}{(\text{Biomass, g/L})}$$

อัตราการผลิตน้ำมัน (กรัมของน้ำมันต่อลิตรต่อวัน)

$$Q_p (\text{g/L day}) = \frac{(\text{Oil Concentration, g/L})}{(\text{Incubation Time, day})}$$

ผลการวิจัย

1. การเจริญเติบโตและการผลิตน้ำมันของยีสต์จากกลีเซอรอลดิบที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

ผลการศึกษาการเจริญและการผลิตน้ำมันของยีสต์เมื่อใช้ BCG จากกระบวนการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน แสดงดังตารางที่ 2 พบว่ายีสต์ *P. parantarctica* CHC28 สามารถเจริญเติบโตและผลิตน้ำมันในอาหารที่มี BCG เป็นแหล่งคาร์บอนได้ในทุกสภาวะการทดลอง โดยยีสต์มีการเจริญเติบโตและผลิตน้ำมันได้แตกต่างกันในแต่ละสภาวะ ซึ่งยีสต์สามารถผลิตชีวมวลได้ในช่วง 0.72-5.45 กรัมต่อลิตร และผลิตน้ำมันได้ในช่วง 0.11-2.53 กรัมต่อลิตร และยังพบว่ายีสต์สามารถสะสมน้ำมันไว้ในเซลล์ได้สูงที่สุดในสภาวะที่ 1 (ตารางที่ 2) โดยสามารถสะสมได้เท่ากับ 54.06 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักชีวมวลแห้ง คิดเป็นอัตราการผลิตน้ำมันสูงสุดเท่ากับ 0.84 กรัมต่อลิตรต่อวัน

2. อิทธิพลของปัจจัยทางเคมีและกายภาพต่อการเจริญ และการผลิตน้ำมันของยีสต์จากกลีเซอรอลดิบ

ผลการศึกษาอิทธิพลของปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการผลิตน้ำมันของยีสต์ด้วยแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman แสดงดังตารางที่ 3 พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตชีวมวลยีสต์ (Y_1) *P. parantarctica* CHC28 สูงสุด 3 อันดับแรก คือความเข้มข้นของกลีเซอรอล (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 คือความเข้มข้นของกลีเซอรอล (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 ความเข้มข้นของกลีเซอรอล (X_1) ปริมาณ KH_2PO_4 (X_3) และอัตราการเขย่า (X_6) โดยมีค่าสัดส่วนอิทธิพล เท่ากับ 34.79 11.22 และ 10.73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 2 แผนการทดลองแบบ Plackett-Burman

การทดลอง	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	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	0.26

หมายเหตุ: Y_1 : ชีวมวลของยีสต์ (กรัมต่อลิตร); Y_2 : ปริมาณน้ำมันทั้งหมด (กรัมต่อลิตร); Y_3 : ปริมาณน้ำมัน (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักชีวมวลแห้ง); Y_4 : อัตราการผลิตน้ำมัน (กรัมของน้ำมันต่อลิตรต่อวัน)

3. อิทธิพลหลัก (Main Effect) ของการเจริญและการผลิตน้ำมันของยีสต์

เมื่อพิจารณาอิทธิพลของปัจจัยหลักต่อการสร้างชีวมวล (Y_1) และปริมาณน้ำมัน (Y_2) ซึ่งเป็นตัวแปรหลักที่แสดงถึงประสิทธิภาพการผลิตน้ำมันของยีสต์ *P. parantarctica* CHC28 ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 1 พบว่าความเข้มข้นของกลีเซอรอล ปริมาณ $MgSO_4$ และอัตราการเขย่า มีอิทธิพลในทางบวก (Positive Effect) ต่อการผลิตชีวมวลยีสต์ (ภาพที่ 1A-1C) โดยเมื่อระดับของแต่ละปัจจัยเพิ่มขึ้นจะทำให้ความเข้มข้นของชีวมวลยีสต์สูงขึ้นด้วย เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำมันพบว่าความเข้มข้นของกลีเซอรอลและอัตราการเขย่ามีอิทธิพลในทางบวกต่อการผลิตน้ำมัน แต่ปริมาณ KH_2PO_4 มีอิทธิพลในทางลบ (Negative Effect) ต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์ในระดับที่ทำการทดลอง ซึ่งการผลิตน้ำมันจะลดลงเมื่อปริมาณ KH_2PO_4 ในการเพาะเลี้ยงสูงขึ้น (ภาพที่ 1D-1F) ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่าง ๆ กับการสร้างชีวมวลยีสต์และปริมาณน้ำมันแสดงดังสมการที่ (1) และ (2) ตามลำดับ

$$\text{ชีวมวลของยีสต์ } (Y_1) = 1.90X_1 - 0.16X_2 - 0.25X_3 + 1.27X_4 + 0.29X_5 + 0.40X_6 + 0.30X_7 \quad (1)$$

$$\text{ปริมาณน้ำมันทั้งหมด } (Y_2) = 0.80X_1 + 0.08X_2 - 0.46X_3 + 0.21X_4 + 0.21X_5 + 0.45X_6 - 0.41X_7 \quad (2)$$

อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

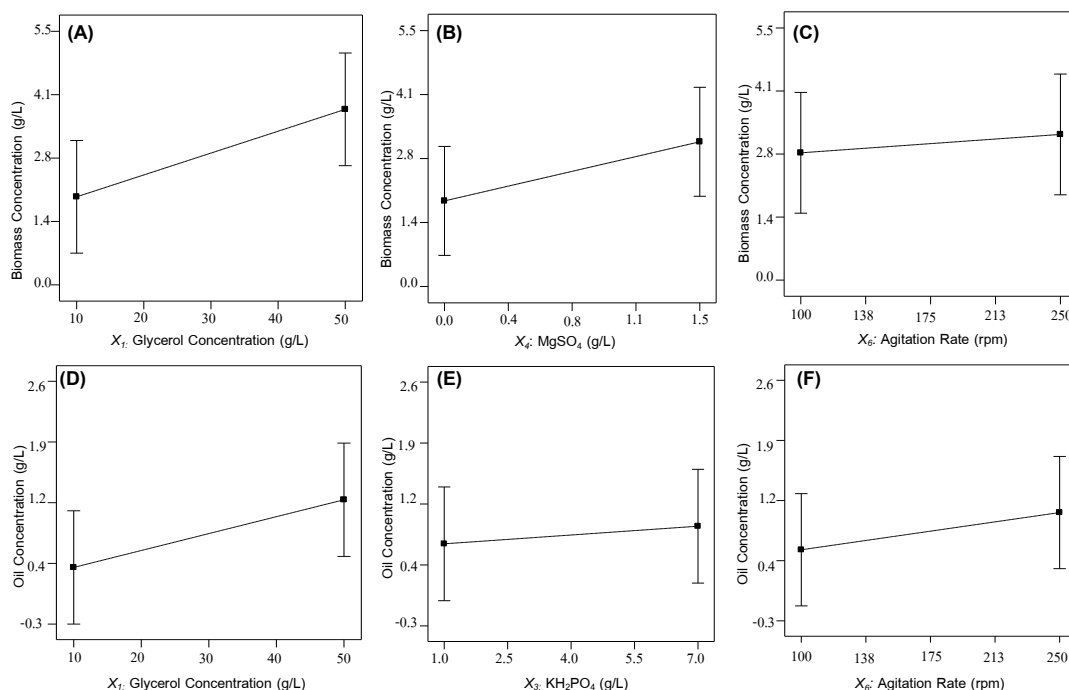
1. การเจริญเติบโตและการผลิตน้ำมันของยีสต์จากกลีเซอรอลดิบที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

การศึกษาการเจริญและการผลิตน้ำมันของยีสต์ *P. parantarctica* CHC28 ด้วย BCG พบว่ายีสต์สามารถเจริญเติบโตและผลิตน้ำมันในสภาวะที่มี BCG เป็นแหล่งคาร์บอนได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Dobrowolski *et al.* (2016) และ Mathiazhakan *et al.* (2016) ซึ่งศึกษาการเพาะเลี้ยงยีสต์

Y. lipolytica พบว่ายีสต์สามารถเจริญเติบโตและผลิตน้ำมันในอาหารที่มี BCG เป็นแหล่งคาร์บอนได้เช่นกัน โดยยีสต์น้ำมัน (Oleaginous Yeast) สามารถนำกลีเซอรอลมาใช้เป็นแหล่งพลังงานหลักในการเจริญเติบโตสร้างชีวมวลเซลล์ และสะสมน้ำมันไว้ในเซลล์ได้เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นสูง หรือมีแหล่งคาร์บอนมากเกินไปและมีสารอาหารจากแหล่งไนโตรเจนอย่างจำกัด (Dobrowolski *et al.*, 2016; Mathiazhakan *et al.*, 2016) ยีสต์จะสามารถนำแหล่งคาร์บอนเข้าสู่การสังเคราะห์น้ำมันได้ทันที โดยกลีเซอรอลจะถูกเปลี่ยนเป็นกลีเซอรอลดีไฮด์-ทรีฟอสเฟต (Glyceroldehyde-3-Phosphate, G-3-P) และกรดไพรูวิก (Pyruvic Acid) จากนั้น Pyruvic Acid จะถูกนำเข้าสู่ไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) และเปลี่ยนเป็นอะซิติล-โคเอ (Acetyl-CoA) ซึ่งจะรวมตัวกับออกซาโลอะซิเตต (Oxaloacetate, OAA) เกิดเป็นซิเตรต (Citrate) เมื่อมีการสะสม Citrate มากขึ้นจะถูกปลดปล่อยเข้าสู่ไซโทพลาสซึม (Cytoplasm) และถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์เอทีพี ซิเตรต ไลเอส (ATP Citrate Lyase, ACL) กลายเป็นไซโตโซลิก อะซิติล-โคเอ (Cytosolic Acetyl-CoA) และ Oxaloacetate จากนั้น Cytosolic Acetyl-CoA จะถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์อะซิติล-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 (Tai & Stephanopoulos, 2013) จากผลการศึกษาพบว่าสามารถนำ BCG มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตน้ำมันได้

2. อิทธิพลของปัจจัยทางเคมีและกายภาพต่อการเจริญ และการผลิตน้ำมันของยีสต์จากกลีเซอรอลดิบที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

เมื่อพิจารณาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตชีวมวลยีสต์ (Y_1) และการผลิตน้ำมัน (Y_2) พบว่าความเข้มข้นของกลีเซอรอล (X_1) เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตชีวมวลสูงสุด เนื่องจากยีสต์สามารถนำกลีเซอรอลมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนหลักในการเจริญเติบโต การสร้างชีวมวลยีสต์ และการผลิตน้ำมันได้ และเมื่อพิจารณาความเข้มข้นของกลีเซอรอล (X_1) และอัตราการเขย่า (X_6) พบว่าปัจจัยทั้งสองชนิดแสดงอิทธิพลในทางบวกต่อการสร้างชีวมวลและการผลิตน้ำมันซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการเจริญของยีสต์ *Rhodotorula graminis* TISTR 5124 และ *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 (Cui *et al.*, 2012; Towijit *et al.*, 2014) โดยพบว่าเมื่อให้ปัจจัยทั้งสองชนิดร่วมกันชีวมวลยีสต์และการผลิตน้ำมันจะเพิ่มขึ้นและยังทำให้ปริมาณน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์ (Y_3) สูงขึ้นด้วย เนื่องจากการเพาะเลี้ยงยีสต์ในสภาวะที่มีการเขย่าจะทำให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่ม ทำให้มีออกซิเจนซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนจากการย่อยสลายโมเลกุลของกลีเซอรอลเพิ่มขึ้น ซึ่งส่งผลให้มีการย่อยสลายกลีเซอรอลสูงและเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ ยีสต์จึงมีการเจริญเติบโตมากขึ้น นอกจากนี้ยังทำให้มีการสร้างเอทีพี (ATP) ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานในการสร้างน้ำมันเพิ่มขึ้น ทำให้ยีสต์สามารถผลิตน้ำมันได้สูงขึ้นด้วย (Polburee *et al.*, 2016)



ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย เมื่อ A คือ ความเข้มข้นของกลีเซอรอล (X_1) B คือ ปริมาณ $MgSO_4$ (X_4) และ C คือ อัตราการเขย่า (X_6) ที่มีอิทธิพลต่อชีวมวลยีสต์ และ D คือ ความเข้มข้นของกลีเซอรอล (X_1) E คือ ปริมาณ KH_2PO_4 (X_3) และ F คือ อัตราการเขย่า (X_6) ที่มีอิทธิพลต่อการผลิตน้ำมัน

เมื่อพิจารณาอิทธิพลของอุณหภูมิ (X_7) ที่มีต่อปริมาณน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์ (Y_3) และอัตราการผลิตน้ำมัน (Y_4) พบว่าเมื่อระดับของอุณหภูมิต่ำลงทำให้ปริมาณน้ำมัน และอัตราการผลิตน้ำมันสูงขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Polburee *et al.* (2016) ที่ศึกษาผลของอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง *Rhodosporidium fluviale* DMKU-RK253 พบว่า เมื่ออุณหภูมิจาก 30 เป็น 25 องศาเซลเซียส ยีสต์มีการสะสมน้ำมันภายในเซลล์เพิ่มขึ้น และยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Rossi *et al.* (2009) ซึ่งรายงานว่ายีสต์จะมีการปรับตัวและสังเคราะห์ไขมันเพิ่มขึ้นเมื่อเจริญเติบโตอยู่ในสภาวะอุณหภูมิต่ำ

นอกจากนี้ผลการทดลองยังพบว่าปริมาณ KH_2PO_4 (X_3) และ $MgSO_4$ (X_4) มีผลต่อการเจริญเติบโต และการสะสมน้ำมันของยีสต์ โดย Chen *et al.* (2013) รายงานว่าไอออนของโลหะในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อจะส่งผลกระทบต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสะสมของน้ำมันของยีสต์แตกต่างกัน และ Wu *et al.* (2011) ยังพบว่าการเพาะเลี้ยงยีสต์ในสภาวะที่มีปริมาณฟอสฟอรัสจำกัด (Phosphorus Limitation) และมีแหล่งคาร์บอนที่มากเกินไปจะทำให้ยีสต์ผลิตน้ำมันมากขึ้น เนื่องจากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะเกิดกระบวนการสังเคราะห์อะดีโนซีน โมโนฟอสเฟต (Adenosine Monophosphate, AMP) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิต ATP ลดลง ยีสต์จึงมีการย่อยสลายแหล่งคาร์บอนได้ไม่สมบูรณ์ ทำให้เกิดการสะสมแหล่งคาร์บอนเอาไว้ภายในเซลล์ในรูปของน้ำมันมากขึ้น (Ratledge & Wynn, 2002)

ตารางที่ 3 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	0.09
X_2	-2.40		0.50	0.09	0.83
X_3	-10.05		8.79	1.65	0.28
X_4	-12.35		13.27	2.5	0.60
X_5	3.68		1.18	0.22	0.60
X_6	10.09		8.86	1.67	0.29
X_7	-22.64		44.59	8.39	0.32
อัตราการผลิตน้ำมัน (Y_4)					
X_1	0.27		34.79	0.22	0.09
X_2	0.03		0.36	0.00	0.83
X_3	-0.15		11.22	0.07	0.28
X_4	0.07		2.34	0.01	0.60
X_5	0.07		2.35	0.02	0.60
X_6	0.15		10.73	0.07	0.29
X_7	-0.14		9.21	0.06	0.32

หมายเหตุ: การเปรียบเทียบของค่าสัดส่วนของอิทธิพลทั้งหมด

จากผลการวิจัยนี้พบว่า BCG ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลสามารถนำมาใช้ในการผลิตน้ำมันจากจุลินทรีย์ได้เช่นเดียวกับวัตถุดิบชนิดอื่นๆ (ตารางที่ 4) โดยประสิทธิภาพการผลิตขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ สภาพการเพาะเลี้ยงและวัตถุดิบที่ใช้ นอกจากนี้การใช้ BCG เป็นวัตถุดิบยังสามารถช่วยลดต้นทุนการผลิตได้อีกด้วย

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบการผลิตน้ำมันด้วยยีสต์ที่มีคุณสมบัติสะสมน้ำมันจากแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ

แหล่งคาร์บอน	สายพันธุ์ยีสต์	ปริมาณน้ำมัน ^a	การสะสมน้ำมันภายในเซลล์ ^b	เอกสารอ้างอิง
Glucose	<i>R. toruloides</i> A29	6.5	43.6	Saran <i>et al.</i> (2017)
Rice Straw Acid Hydrolysate	<i>T. fermentans</i> CICC 1368	12.1	39.0	Chen <i>et al.</i> (2013)
Corn Stover Enzymatic Hydrolysate and Crude Glycerol	<i>C. curvatus</i> ATCC 20509	10.8	49.7	Gong <i>et al.</i> (2016)
Sugarcane Bagasse Acid Hydrolysate and Simulating Raw	<i>R. toruloides</i> CCT 0783	3.3	41.7	Bonturi <i>et al.</i> (2017)
Crude Glycerol	<i>Candida</i> sp. LEB-M3	9.9	50.2	Duarte <i>et al.</i> (2013)
Crude Glycerol	<i>Y. lipolytica</i> SKY7	3.8	50.8	Mathiazhakan <i>et al.</i> (2016)
BCG	<i>R. fluviale</i> DMKU-RK253	4.5	47.5	Polburee <i>et al.</i> (2016)
BCG	<i>P. parantarctica</i> CHC28	2.5	54.1	This study

หมายเหตุ: ^aหน่วยกรัมต่อลิตร; ^bหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักชีวมวลแห้ง

จากการศึกษาพบว่ายีสต์สามารถใช้ BCG ที่เหลือจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลในการเจริญเติบโตและผลิตน้ำมันได้ โดยการเพาะเลี้ยงยีสต์ด้วย BCG ในสภาวะที่แตกต่างกันยีสต์จะมีการเจริญเติบโตและการผลิตน้ำมันได้แตกต่างกัน ซึ่งความเข้มข้นของกลีเซอรอล ปริมาณ KH_2PO_4 และอุณหภูมิมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตน้ำมันของยีสต์ *P. parantarctica* CHC28 มากที่สุด โดยปัจจัยดังกล่าวจะถูกนำไปศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม (Optimal Condition) ในการผลิตน้ำมันของยีสต์โดยใช้กลีเซอรอลเป็นวัตถุดิบเสริมหรือวัตถุดิบทดแทนเพื่อลดต้นทุนในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลได้ อย่างไรก็ตามควรวิเคราะห์ถึงต้นทุนด้านเทคโนโลยีและความคุ้มค่าด้านเศรษฐศาสตร์ (Techno-Economic Analysis) ในการนำ BCG มาใช้เป็นวัตถุดิบในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วย (Chol *et al.*, 2018) เนื่องจากจะต้องมีการปรับสภาพ (Pretreatment) BCG ก่อนนำมาใช้ ซึ่งหากสามารถลดต้นทุนในขั้นตอนดังกล่าว ด้วยการใช้องค์ประกอบที่เหมาะสม รวมถึงผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้จาก BCG มีมูลค่าสูงกว่าต้นทุนการ Pretreatment ของ BCG ก็จะมีความเป็นไปได้ในการนำ BCG มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการเพาะเลี้ยงยีสต์น้ำมันต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ด้วยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2560 และขอขอบคุณสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรีที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ อุปกรณ์ และสถานที่ตลอดการทำวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

- Antolín, G., Tinaut, F. V., Briceño, Y., Castaño, V., Pérez, C., & Ramírez, A. I. (2002). Optimisation of biodiesel production by sunflower oil transesterification. *Bioresource Technology*, 83(2), 111–114.
- Areesirisuk, A., Chiu, C., Liu, C., & Guo, J. (2015). A novel oleaginous yeast strain with high lipid productivity and its application to alternative biodiesel production. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 51(4), 411–418.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911–917.
- Bonturi, N., Crucello, A., Viana, A. J. C., & Miranda, E. A. (2017). Microbial oil production in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate without nutrient supplementation by a *Rhodospiridium toruloides* adapted strain. *Process Biochemistry*, 57, 16–25.
- Chen, X.-F., Huang, C., Yang, X.-Y., Xiong, L., Chen, X.-D., & Ma, L.-L. (2013). Evaluating the effect of medium composition and fermentation condition on the microbial oil production by *Trichosporon cutaneum* on corncob acid hydrolysate. *Bioresource Technology*, 143, 18–24.
- Cui, Y., Blackburn, J. W., & Liang, Y. (2012). Fermentation optimization for the production of lipid by *Cryptococcus curvatus*: Use of response surface methodology. *Biomass and Bioenergy*, 47, 410–417.
- Dobrowolski, A., Mituła, P., Rymowicz, W., & Mirończuk, A. M. (2016). Efficient conversion of crude glycerol from various industrial wastes into single cell oil by yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology*, 207, 237–243.
- Duarte, S. H., Ghiselli, G., & Maugeri, F. (2013). Influence of culture conditions on lipid production by *Candida* sp. LEB-M3 using glycerol from biodiesel synthesis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2(4), 339–343.
- Ghorbel-Bellaaj, O., Hmidet, N., Jellouli, K., Younes, I., Maâlej, H., Hachicha, R., & Nasri, M. (2011). 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*, 48(4), 596–602.

- Gong, Z., Zhou, W., Shen, H., Zhao, Z. K., Yang, Z., Yan, J., & Zhao, M. (2016). Co-utilization of corn stover hydrolysates and biodiesel-derived glycerol by *Cryptococcus curvatus* for lipid production. *Bioresource Technology*, 219, 552–558.
- Lin, L., Ying, D., Chaitep, S., & Vittayapadung, S. (2009). Biodiesel production from crude rice bran oil and properties as fuel. *Applied Energy*, 86(5), 681–688.
- Manosak, R., Limpattayanate, S., & Hunsom, M. (2011). Sequential-refining of crude glycerol derived from waste used-oil methyl ester plant via a combined process of chemical and adsorption. *Fuel Processing Technology*, 92(1), 92–99.
- Mathiazhakan, K., Ayed, D., & Tyagi, R. D. (2016). Kinetics of lipid production at lab scale fermenters by a new isolate of *Yarrowia lipolytica* SKY7. *Bioresource Technology*, 221, 234–240.
- Polburee, P., Yongmanitchai, W., Honda, K., Ohashi, T., Yoshida, T., Fujiyama, K., & Limtong, S. (2016). Lipid production from biodiesel-derived crude glycerol by *Rhodospiridium fluviale* DMKU-RK253 using temperature shift with high cell density. *Biochemical Engineering Journal*, 112, 208–218.
- Ratledge, C., & Wynn, J. P. (2002). The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*, 51, 1–51.
- Rossi, M., Buzzini, P., Cordisco, L., Amaretti, A., Sala, M., Raimondi, S., Matteuzzi, D. (2009). Growth, lipid accumulation, and fatty acid composition in obligate psychrophilic, facultative psychrophilic, and mesophilic yeasts. *FEMS Microbiology Ecology*, 69(3), 363–372.
- Rymowicz, W., Fatykhova, A. R., Kamzolova, S. V., Rywińska, A., & Morgunov, I. G. (2010). Citric acid production from glycerol-containing waste of biodiesel industry by *Yarrowia lipolytica* in batch, repeated batch, and cell recycle regimes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(3), 971–979.
- Saran, S., Mathur, A., Dalal, J., & Saxena, R. K. (2017). Process optimization for cultivation and oil accumulation in an oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* A29. *Fuel*, 188, 324–331.
- Sitepu, I. R., Garay, L. A., Sestric, R., Levin, D., Block, D. E., German, J. B., & Boundy-Mills, K. L. (2014). Oleaginous yeasts for biodiesel: Current and future trends in biology and production. *Biotechnology Advances*, 32(7), 1336–1360.
- Tai, M., & Stephanopoulos, G. (2013). Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. *Metabolic Engineering*, 15, 1–9.

- Towijit, U., Amponpiboon, C., Sriariyanun, M., & Kongruang, S. (2014). Optimization of lipid production by oleaginous yeast using response surface methodology. *Suranaree Journal of Science and Technology*, 21, 321–328.
- Wu, S., Zhao, X., Shen, H., Wang, Q., & Zhao, Z. K. (2011). Microbial lipid production by *Rhodospiridium toruloides* under sulfate-limited conditions. *Bioresource Technology*, 102(2), 1803–1807.

วันที่รับบทความ 18 เม.ย. 62, วันที่แก้ไขบทความ 30 พ.ค. 62, วันที่ตอบรับบทความ 17 มิ.ย. 62