
ผลของสภาวะการเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมันสูงด้วยน้ำทิ้งโรงงานขนมจีน
Effect of Culture Condition on Oleaginous Yeasts Using
Rice Noodle Wastewater

^{1*}กุสุมาวดี ฐานเจริญ, ¹อัสมา การะทุม, ¹วันทนา ธารวาวแว และ ¹ปิยะธิดา บุตรวงศ์

^{1*}Kusumawadee Thancharoen, ¹Assama Karatoom, ¹Wantana Thanwawwaew and

¹Piyathida Budwong

¹สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม

¹Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Rajabhat Maha Sarakham University, Mueng, Maha Sarakham

*ผู้นิพนธ์หลัก: Kthancharoen@gmail.com

*Corresponding author: Kthancharoen@gmail.com

Received : 2020-05-12

Revised : 2020-05-22

Accepted : 2020-06-10

บทคัดย่อ

จังหวัดกาฬสินธุ์มีโรงผลิตขนมจีนซึ่งพบว่า กระบวนการผลิตขนมจีนมีการใช้น้ำเป็นจำนวนมาก ทำให้มีปริมาณน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตมากตามไปด้วย น้ำทิ้งมีองค์ประกอบต่าง ๆ มากมาย ส่วนใหญ่เป็นสารประกอบอินทรีย์ เช่น คาร์โบไฮเดรต จำพวกแป้ง และน้ำตาล รวมทั้งโปรตีนและธาตุอาหาร เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซึ่งสามารถเป็นแหล่งคาร์บอนและธาตุอาหารสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ปัจจุบันไบโอดีเซลได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในฐานะพลังงานทดแทนที่สำคัญในการแก้ปัญหาวิกฤติพลังงานและสภาวะโลกร้อน โดยน้ำมันจากจุลินทรีย์ได้รับความสนใจใช้เป็นวัตถุดิบทดแทนวัตถุดิบดั้งเดิมในการผลิตไบโอดีเซล ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมันสูง *Candida tropicalis* KS103 และ *Rhodotorula mucilaginosa* BJMK43 เพื่อให้มีการสะสมไขมันในเซลล์มากที่สุด ยีสต์สะสมไขมันสูง *C. tropicalis* KS103 มีการสะสมไขมันภายในเซลล์สูงสุด เท่ากับ 69.09 ± 3.18 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง โดยการเพาะเลี้ยงใน lipid accumulation medium เป็นเวลา 8 วัน มีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.0 อุณหภูมิในการบ่มเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหาร

เลี้ยงเชื้อ ผู้วิจัยคาดหวังว่า ผลสำเร็จที่ได้จากการวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการพัฒนากระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากยีสต์ไขมันสูง

คำสำคัญ: ไบโอดีเซล, น้ำทิ้งโรงงานขนมจีน, ยีสต์สะสมไขมันสูง

Abstract

In Kalasin Province, the rice noodle making process uses large amounts of water with considerable wastage. Most organic compounds such as carbohydrates, starch and sugar, and proteins and nutrients such as nitrogen and phosphorus can be used as sources of carbon for microbial growth. Recently, biodiesel has attracted increasing attention as an important renewable power source to ameliorate the energy crisis and reduce global warming. Microbial oil can be used as an alternative raw material in biodiesel production instead of conventional oils. So, this study of culture conditions for microbial oils were determined using *Candida tropicalis* KS103 and *Rhodotorula mucilaginosa* BJMK43 in lipid accumulation medium for 8 days. Initial pH was set at 5.0 with incubation temperature of 30 °C. The nitrogen source was ammonium sulfate $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ at 1.0 g/L. Results indicated that *C. tropicalis* KS103 gave optimal accumulation at $69.09 \pm 3.18\%$ dry weight. Our results will contribute to knowledge concerning biodiesel development from oleaginous yeast.

Keyword: Biodiesel, Rice Noodle Wastewater, Oleaginous Yeast

บทนำ

ไบโอดีเซลเป็นพลังงานทดแทนที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบันสามารถผลิตจากแหล่งทรัพยากรธรรมชาติหมุนเวียน เช่น น้ำมันพืช ไขมันสัตว์ น้ำมันพืชหรือสัตว์ที่ใช้แล้ว จากรายงานของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) เกี่ยวกับปัญหาและความต้องการในการผลิตและใช้ไบโอดีเซลในประเทศไทย พบว่า วัตถุดิบ เช่น พืชไขมันต่าง ๆ มีปริมาณจำกัด ไม่เพียงพอต่อการตอบสนองตามยุทธศาสตร์ของชาติในการผลิตไบโอดีเซลได้ ทั้งนี้เนื่องจากพืชบางชนิด

สามารถเพาะปลูกได้ยาก ไม่สามารถเพาะปลูกได้ทุกพื้นที่ในประเทศไทย ทำให้จำกัดอยู่ในบางพื้นที่เท่านั้น ผลผลิตที่ได้ในแต่ละปีจึงไม่เพียงพอต่อความต้องการ นอกจากนี้ในการเพาะปลูกพืชบางชนิดจะให้ผลผลิตตามฤดูกาล และพบว่า ดินฟ้าอากาศยังเป็นปัจจัยสำคัญในการเพาะปลูกด้วย ซึ่งส่งผลทำให้ราคาของวัตถุดิบของพืชน้ำมันมีราคาสูงและทำให้การผลิตไบโอดีเซลจากพืชน้ำมันมีต้นทุนสูงตามไปด้วย รวมถึงสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในการแปรรูปน้ำมันพืชยังมีราคาสูงด้วย จากข้อจำกัดในการผลิตไบโอดีเซลจากพืชน้ำมัน การสังเคราะห์ไขมันจากจุลินทรีย์อาจเป็นทางเลือกอีกทางหนึ่งในการแก้ปัญหา โดยเฉพาะจุลินทรีย์กลุ่มยีสต์ซึ่งมีศักยภาพสูงในการผลิตไบโอดีเซล เนื่องจากผลิตและสะสมไขมันภายในเซลล์ได้สูงถึง 60-70 เปอร์เซ็นต์ และไขมันเป็นไตรกลีเซอไรด์ที่มีองค์ประกอบของกรดไขมันส่วนใหญ่ คือ กรดปาล์มมิติก กรดโอเลอิก และกรดสเตียริก ซึ่งมีความคล้ายกับน้ำมันจากเมล็ดพืช ข้อได้เปรียบของยีสต์ในด้านการเพาะเลี้ยง คือเจริญเร็ว ใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูกได้ เช่น ผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการเกษตร หรือน้ำตาลจากวัสดุทางการเกษตร ฯลฯ (รัตนภรณ์ ลีสิงห์, 2556) จากรายงานวิจัยพบยีสต์ที่มีความสามารถผลิตไขมันได้ เช่น *Rhodotorula glutinis*, *R. acheniorum*, *R. aurantiaca*, *R. bacarum*, *R. fujisanensis* (Perrier et al; 1995), *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae* (Xue et al; 2014), *C. tropicalis* (Ma et al., 2018), *Cryptococcus albidus*, *C. carvata*, *Lipomyces lipoter*, *L. starkeyi*, *Yarrowia lipolytica*, *Trichosporon pullulans*, *T. ceutanium* และ *Rhodospiridium toruloides* (Ratledge; 2004) และพบว่าไขมันทั้งหมดที่ผลิตได้เมื่อผ่านกระบวนการทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันจะได้ปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (fatty acid methyl ester) คิดเป็น 92 เปอร์เซ็นต์ของไขมันทั้งหมด โดยเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่ผลิตได้ถือว่าเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล (จิตาภา ทิน้อย และคณะ, 2553)

น้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีนเป็นของเสียจากอุตสาหกรรมเกษตรที่มาจากโรงงานผลิตขนมจีนซึ่งใช้วัตถุดิบจากแป้งข้าวเจ้ามีอยู่ทั่วประเทศทั้งในระดับอุตสาหกรรมครัวเรือน ขนาดย่อม และขนาดใหญ่ หากโรงงานระบายน้ำทิ้งดังกล่าวลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะจะส่งผลต่อคุณภาพน้ำและระบบนิเวศวิทยาทางน้ำ รวมทั้งยังเกิดกลิ่นเหม็นรบกวนสร้างความเดือดร้อนให้ชาวบ้านใกล้เคียง เนื่องจากน้ำทิ้งกระบวนการผลิตขนมจีนมีสารอินทรีย์ปนเปื้อนปริมาณที่สูงโดยเฉพาะแป้ง (Siripattanakul-Ratpukdi, 2012) จากรายงานวิจัยของศรีอุบล ทองประดิษฐ์ และสุภาจิต ชุกกลิ่น (2557) พบว่าปริมาณแป้งทั้งหมดและปริมาณของแข็งทั้งหมดในน้ำทิ้งขนมจีน มีค่าเท่ากับ 32.73 ± 0.01 และ 35.57 ± 0.60 กรัมต่อลิตร ทำให้มีความน่าสนใจในการเป็นวัตถุดิบใช้เป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากราคาถูกที่เป็นของ

เหลือทิ้งและยังมีน้ำตาลที่เหลือที่จุลินทรีย์ใช้เพื่อการเจริญได้มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญและผลิตไขมัน

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีน (Puangbut et al., 2016)

น้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีน ได้จากโรงผลิตขนมจีนชุมชนบ้านกลางดง ตำบลห้วยโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดกาฬสินธุ์ (น้ำต้ม และน้ำล้างขนมจีน) ทำการย่อยคาร์โบไฮเดรตที่หลงเหลือด้วยการผสมกับกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที กำจัดของแข็ง และเก็บส่วนของเหลวโดยการกรองผ่าน vacuum filtration ทิ้งให้เย็นลง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้งาน วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS method (Miller, 1995)

2. การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์สะสมไขมันสูง

ยีสต์สะสมไขมันสูง ได้แก่ *C. tropicalis* KS103 และ *R. mucilaginosa* BJMK43 ได้จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม โดยการคัดแยกจากขานอ้อยและผลไม้สุก ในท้องถิ่นจังหวัดมหาสารคามและผ่านการทดสอบว่ามีศักยภาพในการผลิตไขมันสูง โดยเก็บในอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast extract-Peptone-Dextrose (YPD) slant ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ใช้เชื้อยีสต์อายุ 18 ชั่วโมง ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YPD (กำหนดความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิเมตร) ปริมาตร 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร)

3. การผลิตไขมันและศึกษาสภาวะที่เหมาะสม

3.1 การเตรียมอาหาร

การเตรียมอาหารผลิตไขมัน Lipid Accumulation (LA) (กรัมต่อลิตร) (ประกอบด้วยกลูโคส 50, แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1, ยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ 0.75, แมกนีเซียมซัลเฟต เฮปตะไฮเดรต 1.5, โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.4, ซิงค์ซัลเฟต 4.4, แคลเซียมคลอไรด์ 25, แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต 0.05, คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต 0.3) โดยใช้ น้ำทิ้งแป้งขนมจีนเป็นแหล่งคาร์บอน พีเอชเริ่มต้น 5.0

3.2 การเพาะเลี้ยง

เพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมันสูงทั้งสองสายพันธุ์ โดยบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ การเติมแหล่งไนโตรเจน $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.0 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6, 8 และ 10 วัน

3.3 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณไขมัน

เก็บตัวอย่างโดยการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงความเร็วรอบ 5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที วิเคราะห์ปริมาณไขมันด้วยการนำเซลล์แห้งของยีสต์เติมสารผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเมทานอล (2:1) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และเขย่าบนเครื่องเขย่าอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 25 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 5 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงความเร็วรอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แยกชั้นล่างซึ่งเป็นสารผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับน้ำมันเก็บไว้ นำไประเหยคลอโรฟอร์มออกภายใต้สุญญากาศ จะได้น้ำมันของน้ำมันที่สกัดได้ (Bligh and Dyer, 1959) ซึ่งน้ำหนักไขมัน จากนั้นนำค่าน้ำหนักไขมันกับค่าน้ำหนักแห้งไปหาความสัมพันธ์ดังนี้ (กุสุมาวดี ฐานเจริญ และคณะ, 2561)

Lipid titer (g/L) = ไขมันที่สกัดได้ต่อตัวอย่างปริมาตร 1 ลิตร

Lipid content (% w/w) =
$$\frac{\text{Lipid titer (g/L)}}{\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)}}$$

3.4 การวิเคราะห์ชีวมวล

วิเคราะห์ชีวมวลด้วยการหาน้ำหนักแห้งโดยอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสจนกว่าน้ำหนักจะคงที่

3.5 การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Miller (1959)

4. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนด้วยวิธี One Way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 17.0

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

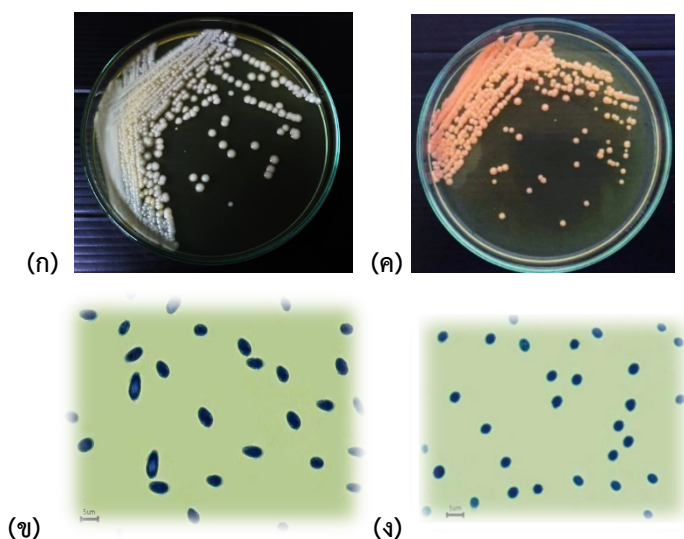
หลังจากการย่อยน้ำทั้งขนมจีนด้วยการผสมกับกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที วัดพีเอชและน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำทั้งจากโรงงานขนมจีน ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงค่าพีเอชและน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำทิ้งจากโรงงานนมจีน

ชนิดของน้ำทิ้ง	พีเอช		น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	
	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง
น้ำต้มนมจีน	1.98	5.00	48.69±0.57	70.00±0.00
น้ำล้างนมจีน	1.87	5.00	48.18±0.57	70.00±0.00

จากตารางที่ 1 ค่าพีเอชของน้ำทิ้งทั้งสองชนิด (ต้มนมจีนและน้ำล้างนมจีน) มีค่าต่ำหลังการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก จึงปรับสภาพให้มีค่าพีเอชเท่ากัน คือ 5.0 โดยพีเอชดังกล่าวมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของยีสต์สะสมไขมันสูงทั้งสองสายพันธุ์ และค่าน้ำตาลรีดิวซ์ของน้ำต้มนมจีนและน้ำล้างนมจีนหลังการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกมีค่า 48.69 48.18 กรัมต่อลิตรตามลำดับ จึงปรับด้วยน้ำตาลกลูโคสให้มีค่าน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 70.00 กรัมต่อลิตร เพื่อให้มีค่าเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนเป็นไขมันในเซลล์ของยีสต์สะสมไขมันสูงทั้งสองสายพันธุ์

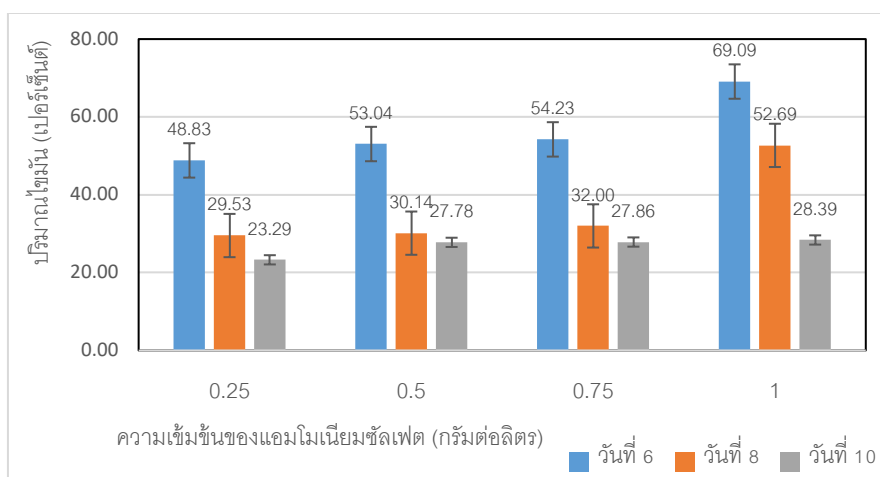
สัณฐานวิทยาของยีสต์สะสมไขมันสูงทั้งสองสายพันธุ์ แสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 สัณฐานวิทยาและรูปร่างเซลล์ได้กล้องจุลทรรศน์ (400X) ของ (ก-ข) *C. tropicalis* KS103 และ (ค-ง) *R. mucilaginosa* BJMK43 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD agar plate

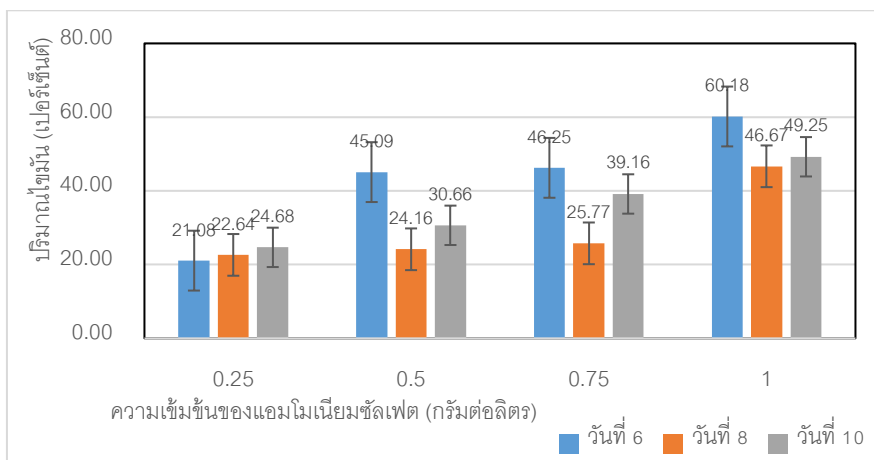
จากภาพที่ 1 สัณฐานวิทยาของ *C. tropicalis* KS103 โคโลนีมีสีครีม รูปร่างกลม (circular) ความนูนโค้ง (convex) ขอบเรียบ (entire) เนื้อเรียบ (smooth) และรูปร่างเซลล์รี (ellipsoidal) สำหรับ *R. mucilaginosa* BJMK43 โคโลนีมีสีส้มแดง รูปร่างกลม (circular) ความนูนโค้ง (convex) ขอบเรียบ (entire) เนื้อเรียบ (smooth) และรูปร่างเซลล์กลมเหมือนไข่ (oval)

เมื่อทดลองเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมันสูง *C. tropicalis* KS103 และ *R. mucilaginosa* BJMK43 โดยแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เท่ากับ 0.25-1.0 กรัมต่อลิตรในอาหาร LA ที่มีน้ำตาลขมจีน ผลปรากฏว่า มีปริมาณไขมันสะสมอยู่ระหว่าง 21.08 ± 4.34 – 69.09 ± 3.18 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยวันที่ 6 ของการทดลอง *C. tropicalis* KS103 ให้ค่าปริมาณไขมันสูงสุดเท่ากับ 69.09 ± 3.18 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาพที่ 2) และในอาหาร LA ที่มีน้ำตาลขมจีน ผลปรากฏว่า มีปริมาณไขมันอยู่ระหว่าง 18.75 ± 0.44 – 60.13 ± 5.91 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยวันที่ 6 ของการทดลอง *C. tropicalis* KS103 ให้ค่า ปริมาณไขมันสูงสุดเท่ากับ 60.13 ± 5.91 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาพที่ 3) จากการเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตรในน้ำทิ้งขมจีน



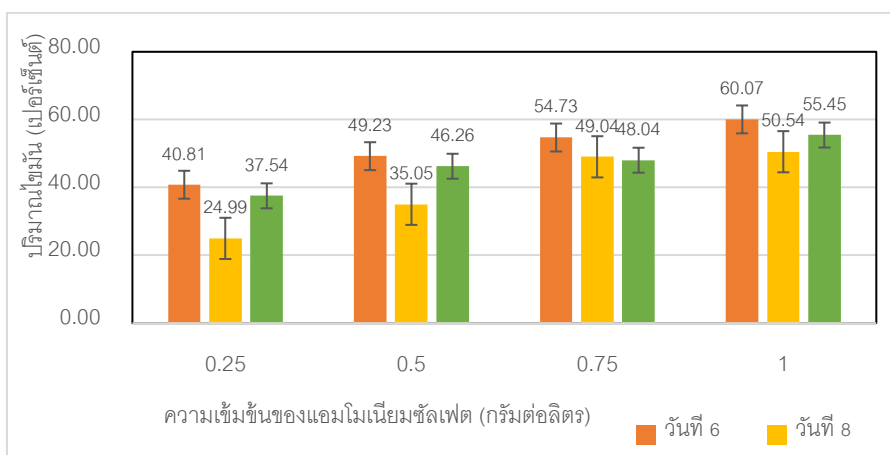
(ก)

ภาพที่ 2 ปริมาณไขมันของ (ก) *C. tropicalis* KS103 และ (ข) *R. mucilaginosa* BJMK43 ในน้ำดักขมจีน



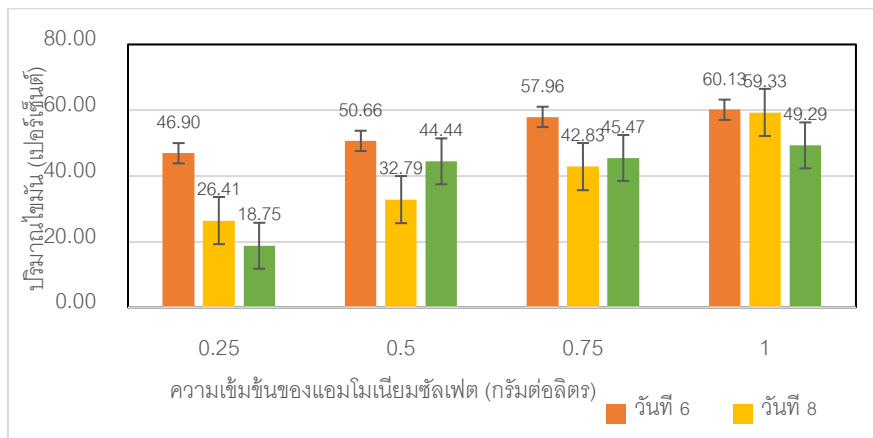
(ข)

ภาพที่ 2 ปริมาณไขมันของ (ก) *C. tropicalis* KS103 และ (ข) *R. mucilaginosa* BJMK43
ในน้ำต้มขมิ้น (ต่อ)



(ก)

ภาพที่ 3 ปริมาณไขมันของ (ก) *C. tropicalis* KS103 และ (ข) *R. mucilaginosa* BJMK43
ในน้ำล้างขมิ้น



(ข)

ภาพที่ 3 ปริมาณไขมันของ (ก) *C. tropicalis* KS103 และ (ข) *R. mucilaginosa* BJMK43
ในน้ำล้างนมจีน (ต่อ)

น้ำเสียที่ใช้ในการศึกษาเป็นน้ำเสียจากกระบวนการผลิตนมจีน ณ บ้านกลางดง ตำบลห้วยโพธิ์ อำเภอมือง จังหวัดกาฬสินธุ์ จากลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำเสียจากกระบวนการผลิตนมจีนพบว่าลักษณะทางกายภาพมีลักษณะเป็นสีขาวขุ่นมีกลิ่นเปรี้ยว ซึ่งกลิ่นที่เหม็นเปรี้ยวนั้นหมายถึงน้ำเสียเกิดการย่อยสลายโดยแบคทีเรียภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนและเกิดขึ้นระหว่างช่วง Intermediate volatile acids โดยแบคทีเรียกลุ่ม Fermentative bacteria หรือ acidogens ทำการย่อยสลายสารอินทรีย์ประเภทพอลิแซ็กคาไรด์ภายใต้สภาวะที่ไร้ออกซิเจน (ซิณุพงษ์ ประทุม, 2557) และมีค่าความเป็นกรดต่างที่ค่อนข้างต่ำ (พีเอช 1.87-1.98) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของวรพจน์ รัตนพันธุ์ (2550) ซึ่งการที่ความเป็นกรดต่ำ โดยส่วนใหญ่ น้ำเสียที่เกิดขึ้นเป็นน้ำที่เกิดจากการหมักด้วยข้าวจึงส่งผลให้มีค่าพีเอชต่ำ แต่ด้วยลักษณะของน้ำเสียที่มีสารอินทรีย์ซึ่งมาจากแป้งและข้าวซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายได้ง่าย (ซิณุพงษ์ ประทุม, 2557) จึงสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญของจุลินทรีย์ได้ แต่ต้องทำการปรับพีเอชให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการทำงานของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปการย่อยสลายทำได้ 2 ลักษณะ คือ การใช้กรดหรือเอนไซม์ งานวิจัยนี้เลือกใช้กรดเนื่องจากมีประสิทธิภาพสูงและสะดวกในการใช้งานจริง โดยการศึกษาขั้นตอนนี้ (ไม่ได้แสดงผล) เพื่อให้ทราบความเข้มข้นของกรดที่เหมาะสมในการย่อยน้ำทิ้งจากโรงงานนมจีนสำหรับเปลี่ยนแบ่งให้เป็นน้ำตาล การพิจารณาความเหมาะสมมุ่งเน้นให้ได้ปริมาณกลูโคสสูงที่สุด จากผลการทดลอง พบว่าการ

ย้อยที่ความเข้มข้นของกรดสูงขึ้นส่งผลให้ค่ากลูโคสสูงขึ้นจนถึงความเข้มข้นกรดซัลฟิวริก 1 เปอร์เซนต์ โดยปริมาตร เนื่องจากกรดทำลายพันธะของแป้งซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างซับซ้อนให้กลายเป็นน้ำตาล กลูโคสซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อน ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริก 1 เปอร์เซนต์ ให้ ปริมาณกลูโคสสูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้การย้อยที่ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริก 1 เปอร์เซนต์ โดย ปริมาตร ผลการศึกษาการย้อยที่พบในงานวิจัยนี้มีลักษณะแนวโน้มเดียวกับงานวิจัยของ Siripattanakul et al. (2010) ศึกษาการบำบัดน้ำทิ้งโรงงานขนมเงินและศักยภาพของการตรึงเซลล์ยีสต์สำหรับการผลิต เอทานอล พบว่า ปริมาณกลูโคสที่ผ่านการย้อยด้วยกรดซัลฟิวริกจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกรดที่ สูงขึ้นตั้งแต่ 0.25 เปอร์เซนต์ จนถึง 1 เปอร์เซนต์ การไฮโดรไลซิสด้วยกรดที่มีความเข้มข้นมากกว่า 1 เปอร์เซนต์ จะมีปริมาณกลูโคสลดลงเนื่องจากกลูโคสจะถูกทำลายด้วยกรด

แหล่งไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารสำคัญที่มีในน้ำหมักกรองจากแหล่งคาร์บอน โดยแหล่งไนโตรเจนใน รูปที่ assimilate ประมาณ 140–150 มิลลิกรัมต่อลิตร ก็เพียงพอต่อความต้องการของยีสต์ นอกจากนี้ Arrizon และ Gschaedler (2002) พบว่าการเติมไนโตรเจนลงในถังหมักจะส่งผลดี คือเพิ่มอัตราการ ผลิตสูงสุด มีการใช้น้ำตาลในปริมาณสูงในระยะเวลาสั้นซึ่งจะทำให้การหมักมีประสิทธิภาพสูงขึ้น และ ระยะเวลาการหมักลดลง โดยทั่วไปมีสารหลายชนิดที่สามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ เช่น แอมโมเนียม ไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ และแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นต้น โดยเฉพาะแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งนิยมใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพราะมีซัลเฟอร์ เป็นองค์ประกอบด้วย (นพวรรณ ด่านบำรุงตระกูล และคณะ, 2557) ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลต่อการเจริญของยีสต์ โดยไนโตรเจนจะทำให้ปริมาณเซลล์ยีสต์เพิ่มขึ้น แต่ใน ยีสต์ที่มีปริมาณเซลล์มากจะมีการผลิตและสะสมไขมันต่ำ จึงจำกัดความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนใน อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้มีการสะสมไขมันสูงขึ้น (รัตนภรณ์ ลิสิงห์, 2550) การสะสมไขมันในยีสต์จะอยู่ใน รูปของไตรเอซิลกลีเซอไรด์เป็นส่วนใหญ่ โดยเก็บไว้ออร์แกนอลล์จำเพาะ จะเห็นได้ว่าอะซิติลโคเอที่เป็น สับสเตรทในการสร้างไขมันจะถูกเปลี่ยนแปลงได้ 2 รูปแบบ คือ กรดไขมันหรือไตรเอซิลกลีเซอไรด์ ซึ่ง ผลผลิตทั้ง 2 รูปแบบนั้นต่างก็สามารถเป็น วัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลได้ โดยปกติไขมันจะมีการสะสม เมื่อเซลล์ได้รับปริมาณอาหารที่มากเกินไปและเซลล์เกิดภาวะขาดแคลนไนโตรเจน ทำให้อะดีโนซีนโมโน ฟอสเฟต (AMP) ถูกย่อยสลายเป็นจำนวนมากเพื่อผลิตแอมโมเนียมมาใช้ ทำให้เอนไซม์ไอโซซิเตรท ดีไฮโดรจีเนสทำงานได้น้อยและมีการสะสมปริมาณของไอโซซิเตรทและกรดซิตริกสูงในไมโทคอนเดรีย จากนั้นกรดซิตริกจะเคลื่อนที่ไปยังไซโตซอล แล้วจึงถูกเปลี่ยนเป็นออกซาโลอะซีเตตและอะซิติลโคเอ ด้วยการทำงานของเอนไซม์ไอโซซิเตรทไลเอส (ATP citrate lyase) นั้นหมายความว่า หากมีปริมาณอะ

ซิติลโคเอสูงก็จะมีการสังเคราะห์กรดไขมันและไตรเอซิลกลีเซอรอลสูงตามไปด้วย (กุสุมาวดี ฐานเจริญ และคณะ, 2561) ความเข้มข้นของคาร์บอนและไนโตรเจนเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการสะสมไขมันของยีสต์ที่มีไขมัน จากงานวิจัยของ อานนท์ ปะเสระกัง และคณะ (2556) ศึกษาผลของระดับกากน้ำตาลและแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการผลิตไขมันในเซลล์ยีสต์ *T. asahii* พบว่า การผลิตไขมันสูงสุดเท่ากับ 31.40 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้สภาวะของกากน้ำตาลและ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เท่ากับ 12 เปอร์เซ็นต์ และ 0.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ การศึกษาระยะเวลาในการสะสมไขมันสูงสุดของยีสต์จะอยู่ในช่วงของระยะการเจริญคงที่ (stationary phase) ซึ่งอยู่ในช่วงวันที่ 8 ของการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของอภิเชษฐ์ ศรีวิชา และรัตนภรณ์ ลิสิงห์ (2553) ศึกษาการผลิตไขมันโดยยีสต์ไขมันสูง โดยแปรผันระยะเวลาเก็บตัวอย่าง วันที่ 0, 2, 4, 6, 8, 10 พบว่า ปริมาณ lipid content สูงสุดอยู่ระหว่าง 12.0–15.0 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ในช่วงวันที่ 6-8 ของการบ่มเป็นช่วงที่มีการสะสมไขมันสูงสุด หลังจากวันที่มีการสะสมไขมันสูงสุดจะเห็นว่าปริมาณไขมันที่สะสมในเซลล์ลดลง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะปริมาณน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนลดลงและปริมาณสารเมแทบอลิต์ที่เชื้อผลิต อาจมีส่วนทำให้การเจริญและมีปริมาณไขมันในเซลล์ลดลง

สรุปการวิจัย

น้ำเสียที่ใช้ในการศึกษาเป็นน้ำเสียจากกระบวนการผลิตขนมจีน ณ บ้านกลางดง ตำบลห้วยโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดกาฬสินธุ์ จากลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำเสียจากกระบวนการผลิตขนมจีน พบว่ามีลักษณะเป็นสีขุ่น มีกลิ่นเปรี้ยว และมีค่าความเป็นกรดต่างที่ค่อนข้างต่ำ ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกที่เหมาะสมในการย่อยน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีนสำหรับเปลี่ยนแปงให้เป็นน้ำตาล คือ 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และการแปรผันความเข้มข้นของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ พบว่าความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตรในน้ำทิ้งขนมจีนการเพาะเลี้ยง *C. tropicalis* KS103 มีปริมาณlipid content สูงสุดเท่ากับ 69.33 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ณ วันที่ 8 ของการทดลอง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโรงงานผลิตขนมจีนบ้านกลางดง ตำบลห้วยโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดกาฬสินธุ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างน้ำทิ้งขนมจีน และสาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีในการให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและสถานที่เพื่อให้งานวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์

เอกสารอ้างอิง

- กุสุมาวดี ฐานเจริญ, นิตยา นาอะเมฆ และอัศนี แสนมา. (2561). “การผลิตไบโอดีเซลจากยีสต์สะสมไขมันสูงโดยใช้ไฮโดรไลเซตซึ่งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน”. *วารสารเกษตรพระวรุณ*. 15 (2): 345-354.
- จิตาภา ทิน้อย และนวลศรี รักอริยธรรม. (2553). “การผลิตไบโอดีเซลจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้วในอาหารที่เตรียมได้จากกากสับปะรด”. รายงานการวิจัย สถาบันพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง: กรุงเทพฯ.
- ชิษณุพงษ์ ประทุม. (2557). *การบำบัดน้ำเสียโรงงานผลิตขนมจีนด้วยเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพร่วมกับการบำบัดน้ำเสียแบบธรรมชาติ*. กรุงเทพฯ: วิทยานิพนธ์ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นพวรรณ ด้านบำรุงตระกูล, อีราพร ตังเจริญ และประมุข ภาระกุลสุขสถิตย์. (2557). “ผลของยูเรียต่อการผลิตเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae* Sc90”. การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 52: 1-8.
- รัตนภรณ์ ลีสิงห์. (2550). “เอกสารประกอบการสอน วิชา 317438 เชื้อเพลิงชีวภาพ”. ขอนแก่น: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น: ขอนแก่น.
- วรพจน์ รัตนพันธุ์. (2550). “สภาวะการบำบัดน้ำเสียจากการผลิตเส้นขนมจีนโดยระบบแอนแอโรโรบิคคอนแทค”. กรุงเทพฯ: วิทยานิพนธ์ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศรีอุบล ทองประดิษฐ์ และสุภาษิต ชุกกลิ่น. (2557). “การผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงจากน้ำทิ้งโรงงานผลิตแป้งขนมจีน”. รายงานการวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย: สงขลา.
- อภิเชษฐ์ ศรีวิชา และรัตนภรณ์ ลีสิงห์. (2553). “การผลิตลิปิดโดยยีสต์ไขมันสูงเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล”. The 11th Graduate Research Conference Khon Kaen University 2010, Khon Kaen, Thailand: 837-843.
- อานนท์ ปะเสระกัง, วิโรจน์ ภัทรจินดา, คณิต วิชิตพันธุ์ และ รัตนภรณ์ ลีสิงห์. (2556). “ศึกษาผลของระดับกากน้ำตาลและแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการผลิตไขมันในเซลล์ยีสต์ *Trichosporon asahii*”. *แก่นเกษตร*. 41 (ฉบับพิเศษ 1): 100-104.
- 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.

- Ma, S., Ye, L., Liu, C., Xia, N. & Deng, L. (2018). "Lipid engineering combined with systematic metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for high-yield production of lycopene". *Metabolic Engineering*. 52 (22): 134-142.
- Miller, G. L. (1959). "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar". *Analytical Chemistry*. 31 (3): 426-428.
- Perrier, V., Dubreucq, E., Galzy & Arch, P. (1995). "Fatty acid and Carotenoid composition of *Rhodotorula* strains". *Archives of Microbiology*. 164 (3): 173-179.
- Puangbut, M., Rattanachan S., Paine, T. & Leesing, R. (2016). "Conversion of Fermented Rice Noodle Wastewater to Microbial Lipid by Mixed Culture of *Micrococcus* and Yeast". *Journal of Clean Energy Technologies*. 4 (4): 257-261.
- Ratlidge, C. (2004). "Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production". *Biochimie*. 86(11): 807-815.
- Siripattanakul, S., Ratanapongleka, K., Sangthean, P., Yoottachana, K. & Pimwongnok, K. (2010). "Fermented rice noodle wastewater treatment and ethanol production potential using entrapped yeast cells". *Water Practice & Technology*. 5: 1-8.
- Siripattanakul-Ratpukdi, S. (2012). "Ethanol production potential from fermented rice noodle wastewater treatment using entrapped yeast cell sequencing batch reactor". *Applied Water Science*. 2: 47-53.
- Xu P., Li L., Zhang F., Stephanopoulos G. & Koffas M. (2014). "Improving fatty acids production by engineering dynamic pathway regulation and metabolic control". *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 111: 11299-11304.