รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตไบโอดีเซลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ด้วยกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ

Biodiesel production from agricultural wastes by using biotechnological process

สาลินี ศรีวงษ์ชัย

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบปราณ พ.ศ. ๒๕๖๐
มหาวิทยาลัยบูรพา

สัญญาเลขที่ 32/2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
การผลิตไบโอดีเซลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ด้วยกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ
Biodiesel production from agricultural wastes by using biotechnological process

สาลินี ศรีวงษ์ชัย
คณะวิทยาศาสตร์และสังคมศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 32/2560

หัวข้อวิจัย การผลิตไบโอดีเซลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ
ชื่อผู้วิจัย สาลินี ศรีวงษ์ชัย
หน่วยงาน คณะวิทยาศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว
ปี 2560

บทคัดย่อ

ก้อนเชื้อเห็ดเก่าเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจากอุตสาหกรรมการผลิตเห็ดซึ่งเป็นวัสดุลิกโนเซลลูโลสที่ประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) และก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางนวล (*Pleurotus djamor*) โดยการปรับสภาพด้วยความร้อนชื้นภายในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ความดันบรรยากาศ เวลา 15 นาที สารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 1 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 1 ความร้อนชื้นร่วมกับสารละลายกรดซัลฟูริกและความร้อนชื้นร่วมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของก้อนเชื้อเห็ดเก่า พบว่าการใช้ความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ความดันบรรยากาศ เวลา 15 นาที ร่วมกับสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 1 ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 1,255 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 591 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินลดลงหลังจากการปรับสภาพ การผลิตลิพิดของยีสต์ไขมันสูง *R. mucilaginosa* ที่คัดแยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลนบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลง lipid accumulation medium (LAM) ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์เป็นแหล่งคาร์บอน ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0 และบ่มเพาะเลี้ยงแบบเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 120 ชั่วโมง พบว่ายีสต์ไขมันสูงสามารถเจริญและผลิตลิพิดได้เท่ากับ 1.08±0.07 และ 0.53±0.02 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และ 0.21±0.05 และ 0.10±0.07 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ องค์ประกอบของลิพิดที่สกัดได้ มีกรดไขมันชนิดสายยาวเป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ กรดปาล์มิติก กรดสเตียริกและกรดโอเลอิกเช่นเดียวกับที่พบในน้ำมันพืช ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาจะใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการพัฒนาการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ของก้อนเชื้อเห็ดเก่าร่วมกันระหว่างการปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพ ทางเคมีและทางชีวภาพต่อไป

คำสำคัญ: ก้อนเชื้อเห็ดเก่า การปรับสภาพ น้ำตาลรีดิวซ์ ยีสต์ไขมันสูง ลิพิด

The Title Biodiesel production from agricultural wastes by using biotechnological process
The Researcher Salinee Sriwongchai
Office Faculty of Science and Social Science
Year 2017

Abstract

Spent mushroom substrate (SMS), the agricultural waste is a remnant of the production of mushroom industry and lignocellulosic byproducts containing cellulose, hemicellulose and lignin. This study aimed to produce sugar reducing from SMS produced by *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus djamor* cultivation by using liquid hot water in autoclave with temperature and pressure at 121 $^{\circ}$C and 15 atm for 15 min, 1% sulfuric acid solution, 1% sodium hydroxide solution, and combination of acid and alkali treatment in autoclave with temperature and pressure at 121 $^{\circ}$C and 15 atm for 15 min, and determined the chemical composition. The results showed that under the best treatment condition at 1% sulfuric acid solution at 121 $^{\circ}$C, 15 atm for 15 min lend the highest total reducing sugar 1,255 µg/ml, and 591 µg/ml, respectively. The amount of cellulose hemicelluloses and lignin was reduced after pretreatment compared to SMS before treatment. Lipid production of oleaginous yeast derived-soil mangrove on modified lipid accumulation medium (LAM) contained extracted reducing sugar as carbon source at 150 rpm; room temperature for 120 hours with initial pH 5.0. The results showed that the dry biomass and lipid yield were 1.08$\pm$0.07 g/L and 0.53$\pm$0.02 g/L, respectively, and 0.21$\pm$0.05 g/L and 0.10$\pm$0.07 g/L, respectively. The accumulated lipids predominantly contained long chain fatty acids such as palmitic acid, stearic acid and oleic acid that comparable to conventional vegetable oils. Based on the data is useful for developing to enhance reducing sugar production of SMS.

Keywords: Spent mushroom substrate, treatment, reducing sugar, oleaginous yeast, lipid

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	27
บทที่ 4 ผลการวิจัย	37
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย	46
ผลผลิต	51
เอกสารอ้างอิง	60
ภาคผนวก	65
ภาคผนวก ก	66
ภาคผนวก ข	68
ประวัติผู้วิจัย	70

สารบัญตาราง

ตาราง **หน้า**

2-1 ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินที่พบในผลพลอยได้อุตสาหกรรมและการเกษตร 7

2-2 ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์ไขมันสูงเพื่อการผลิตลิพิด 17

2-3 องค์ประกอบกรดไขมันของลิพิดของยีสต์ไขมันสูงชนิดต่างๆ 18

3-1 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา 29

4-1 ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินของตัวอย่างก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางรมก่อนและหลังการปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพและเคมี 38

4-2 ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินของตัวอย่างก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางนวลก่อนและหลังการปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพและเคมี 39

4-3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดของตัวอย่างก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางรมหลังจากปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพและเคมี 41

4-4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดของตัวอย่างก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางนวลหลังจากปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพและเคมี 42

4-5 ปริมาณชีวมวลแห้ง ลิพิดและลิพิดทั้งหมดของยีสต์ไขมันสูง *R. mucilaginosa* ที่คัดแยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลง LAM ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ที่สกัดได้จากก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางรมและก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางนวลเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มแบบเพาะเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 120 ชั่วโมง 44

สารบัญภาพ

ภาพ **หน้า**

2-1 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไตรเอซิลกลีเซอรอลในจุลินทรีย์ 17

2-2 กลไกการสร้าง TAG 19

2-3 ยีสต์ไขมันสูงที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนต่ำและไนโตรเจนสูง 20

3-1 ตัวอย่างก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางนวลและโรงเรือนเพาะเห็ด ศูนย์การเรียนรู้เศรษฐกิจพอเพียงและสิ่งแวดล้อมศึกษา จังหวัดสระแก้ว 27

3-2 ยีสต์ไขมันสูง *R. mucilaginosa* ที่คัดแยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน 28

4-1 การเจริญของยีสต์ไขมันสูง *R. mucilaginosa* ที่คัดแยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลง LAM ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ที่สกัดได้จากก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางนวลและก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางนวลเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มเพาะแบบเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 120 ชั่วโมง 44

4-4 ชนิดและปริมาณกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของลิพิดที่สกัดได้จากยีสต์ไขมันสูง *R. mucilaginosa* ที่คัดแยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลง LAM ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ที่สกัดได้จากก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางรมและก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางนวลเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มเพาะแบบเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 120 ชั่วโมง 45

บทที่ 1
บทนำ

ก้อนเชื้อเห็ดเก่า (spent mushroom substrate; SMS) เป็นวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตเห็ด ผลผลิตจากอุตสาหกรรมการผลิตเห็ดทุก 1 กิโลกรัม จะเกิดก้อนเชื้อเห็ดเก่าซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งสูงถึง 5 กิโลกรัม (Lin et al., 2014) ปัญหาสำคัญจากอุตสาหกรรมการผลิตเห็ด คือ การกำจัดก้อนเชื้อเห็ดเก่า ซึ่งส่วนใหญ่มักใช้วิธีการฝังกลบและการนำมาผลิตเป็นปุ๋ยชนิดต่างๆ ได้แก่ ปุ๋ยหมักและปุ๋ยชีวภาพ วิธีการกำจัดก้อนเชื้อเห็ดเก่าดังกล่าวยังไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควรและเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะปัญหาการปนเปื้อนของน้ำใต้ดินและการชะล้างของฟอสฟอรัสและไนเตรตซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดปรากฏการณ์ยูโทรฟิเคชั่น (eutrophication) (Finney et al., 2009) ปัจจุบัน มีการนำก้อนเชื้อเห็ดเก่ามาใช้ประโยชน์ใหม่ ไม่ว่าจะเป็นการนำก้อนเชื้อเห็ดเก่ากลับมาเพาะเห็ดใหม่ การนำก้อนเชื้อเห็ดเก่ามาทำเป็นอาหารสัตว์ การนำก้อนเชื้อเห็ดเก่ามาบำบัดพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนสารมลพิษ เช่น โพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbon; PAHs) หรือแม้แต่การนำก้อนเชื้อเห็ดเก่ามาถมที่ เป็นต้น (Kamei et al., 2014) ก็ยังไม่สามารถรองรับกับอุตสาหกรรมผลิตเห็ดที่เพิ่มมากขึ้น รวมไปถึงก้อนเชื้อเห็ดเก่าที่เพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย จึงทำให้มีความน่าสนใจที่จะนำก้อนเชื้อเห็ดเก่ามาใช้ประโยชน์โดยการเพิ่มมูลค่าในรูปแบบอื่น เช่น การนำโพลีแซ็คคาร์ไรด์ที่มีอยู่ในก้อนเชื้อเห็ดเก่ามาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเป็นสารต้านแบคทีเรีย สารต้านไวรัส (Tong et al., 2009; Yang et al., 2005) การผลิตเป็นแหล่งเชื้อเพลิงแอลกอฮอล์ หรือสารอาหารเสริมในคนและสัตว์ (สุดาทิพย์ ฐิตะโภคา, 2552: Howard et al., 2003) ซึ่งการเพิ่มมูลค่าก้อนเชื้อเห็ดเก่าซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยวิธีนี้จะต้องมีการปรับสภาพก่อน (pretreatment) เพื่อปรับปรุงโครงสร้างของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรนั้นๆ ให้อยู่ในรูปที่ง่ายต่อการนำไปใช้และเพื่อให้ได้ผลผลิตที่เป็นน้ำตาลสูงขึ้นด้วย (Mosier et al., 2005) การปรับสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมีทั้งการใช้วิธีทางกายภาพ เช่น การบด การใช้ความร้อนชื้น วิธีทางเคมี เช่น การใช้กรดหรือด่าง และวิธีทางชีวภาพ เช่น การใช้เอนไซม์ (สุดาทิพย์ จันทร และคณะ, 2556) ก้อนเชื้อเห็ดเก่า เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีลิกโนเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบหลักและมีโครงสร้างอย่างเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสมากกว่าร้อยละ 50 ของน้ำหนักแห้ง นอกจากนี้ ยังพบว่าก้อนเชื้อเห็ดเก่ายังคงมีเชื้อราลงเหลืออยู่และอุดมไปด้วยโพลีแซคคาร์ไรด์ วิตามินหลายชนิดและธาตุอาหารบางชนิดที่จำเป็น ได้แก่ เหล็ก แคลเซียม ทองแดงและแมกนีเซียม (Zhu et al., 2012) โดยโครงสร้างของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสมีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวอย่างน้ำตาลกลูโคส แมนโนส ไซโลสและกาแลคโตสเป็นส่วนประกอบสำคัญ (พิชามญชุ์ แดงพราม และคณะ, 2556) งานวิจัยนี้ จึงมุ่งเน้นที่จะนำก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) และก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางนวล (*Pleurotus djamor*) มาผ่านปรับสภาพด้วยความร้อนชื้นร่วมกับสารละลายกรดและด่าง เพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ เช่น กลูโคส ไซโลส อะราบิ

โน แมนโนสหรือกาแลคโตส ซึ่งนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตวัตถุดิบสำหรับการผลิตไบโอดีเซลโดยยีสต์ไขมันสูงต่อไป และเพื่อให้การกำจัดและการนำกลับมาใช้ใหม่ของก้อนเชื้อเห็ดเก่ามีประสิทธิภาพและยั่งยืนต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย

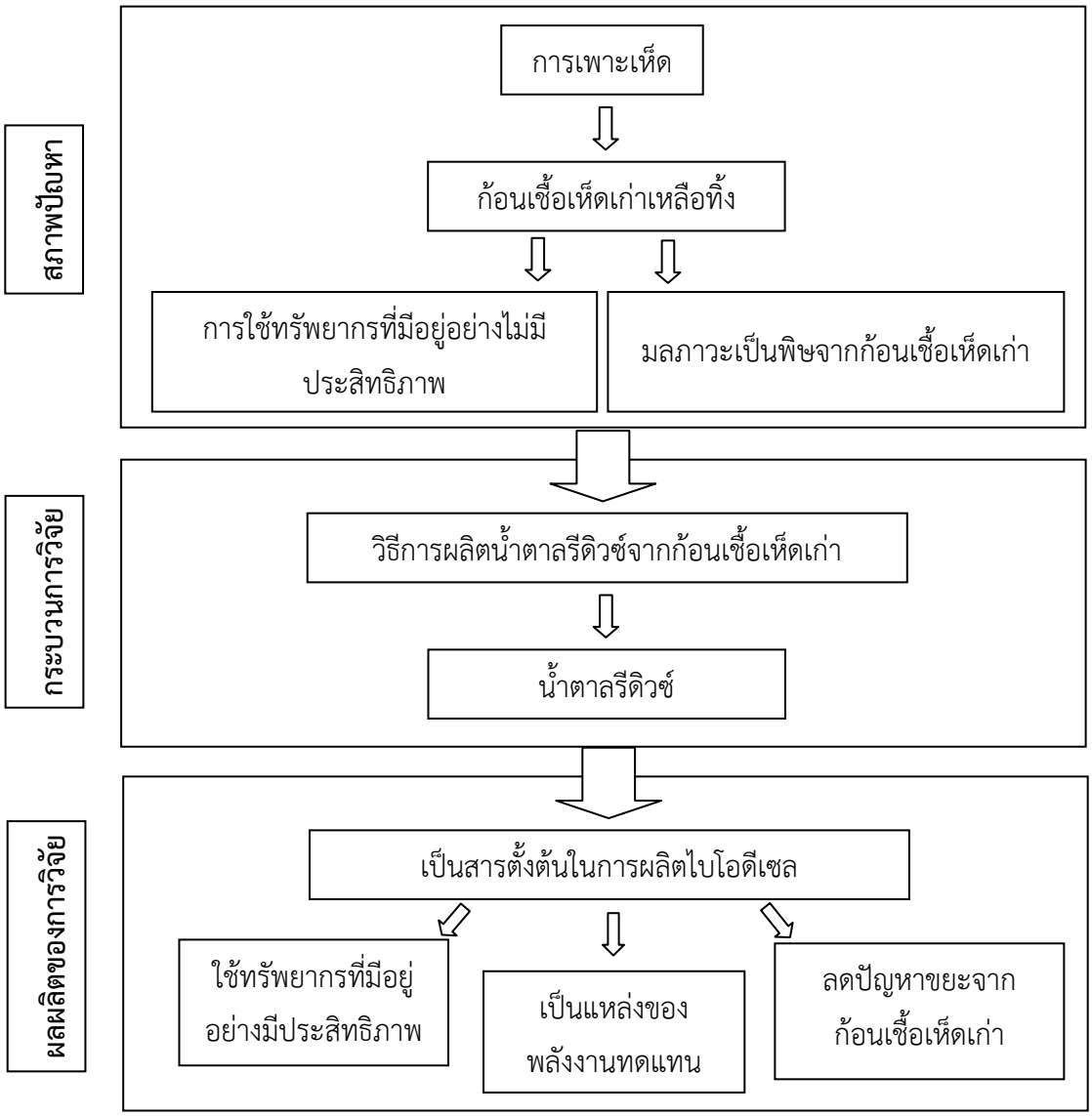
1. เพื่อศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการเปลี่ยนลิกโนเซลลูโลสจากก้อนเชื้อเห็ดเก่าเป็นน้ำตาลรีดิวซ์
2. เพื่อศึกษาการเพาะเลี้ยงยีสต์ไขมันสูง *Rhodotorula muciliginosa* บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพก้อนเชื้อเห็ดเก่าเป็นแหล่งคาร์บอน
3. เพื่อตรวจสอบองค์ประกอบหลักของกรดไขมันของลิพิดที่สกัดได้จากการเพาะเลี้ยงยีสต์ไขมันสูง *R. muciliginosa* ถึงความเป็นไปได้ในการนำไปใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล โดยทำการเปรียบเทียบกับกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันพืช

ทฤษฎี สมมติฐาน และ/หรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

สมมติฐาน

ก้อนเชื้อเห็ดเก่าที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว จะมีน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ต่อไปได้

กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย



ขอบเขตของโครงการวิจัย

ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสจากก้อนเชื้อเห็ดเก่า ทั้งวิธีการทางกายภาพ เคมี และวิธีทางกายภาพและเคมี เพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ เช่น กลูโคส ไซโลส อะราบิโน แมนโนส หรือกาแลคโตส จากนั้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จะนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นหรือแหล่งคาร์บอนสำหรับเพาะเลี้ยงยีสต์ไขมันสูงเพื่อผลิตลิปิดที่มีองค์ประกอบของกรดไขมันคล้ายคลึงกับพืชน้ำมัน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้น้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเพาะเลี้ยงยีสต์ไขมันสูงเพื่อการผลิตไบโอดีเซลต่อไป
2. ลดปัญหามลภาวะที่เกิดจากก้อนเชื้อเห็ดเก่า
3. มีผลงานวิจัยเพื่อนำเสนอหรือตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับชาติหรือนานาชาติ

บทที่ 2
การทบทวนวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การทบทวนวรรณกรรม

1. วัสดุเพาะเห็ด

1) ขี้เลื่อยไม้ยางพารา ได้มาจากการตัดเนื้อไม้ยางพาราด้วยเลื่อยหรือเครื่องตัดไม้ โดยอาจนำมาบดให้ละเอียดก่อนที่จะนำไปใช้เป็นวัตถุดิบ มีความชื้นประมาณ 49 เปอร์เซ็นต์ โดยปกติแล้ว ขี้เลื่อยยางพารา จะประกอบด้วยเซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) นิยมนำขี้เลื่อยมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเห็ดชนิดต่างๆ ซึ่งเห็ดนางรมจะใช้เวลาในการย่อยสลายสารประกอบเหล่านี้ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตของเส้นใยและการผลิตดอกเห็ด

2) ฟางข้าว เป็นผลพลอยได้จากการปลูกข้าว มีมากหลังฤดูเก็บเกี่ยวข้าว เป็นแหล่งอาหารหยาบ สำหรับโค-กระบือในช่วงแล้ง มีคุณค่าทางอาหารต่ำ มีส่วนประกอบทางเคมีดังนี้ คือ วัตถุแห้ง 90.0 เปอร์เซ็นต์ โปรตีนรวมร้อยละ 2.76 เยื่อใยร้อยละ 38.13 เถ้าร้อยละ 14.54 ไขมันร้อยละ 2.0 คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 32.27 โภชนะย่อยได้ทั้งหมดร้อยละ 40.2 การย่อยได้ของวัตถุแห้งร้อยละ 50.0

3) กากอ้อย เป็นกากที่เหลือจากการบีบน้ำอ้อยแล้วผ่านการบดย่อยจากโรงงานน้ำตาล ปกติแล้ว กากอ้อยมีความชื้นประมาณร้อยละ 46-52 เมื่อนำมาตากแห้งความชื้นจะลดลง มีส่วนประกอบทางเคมีดังนี้ คือ วัตถุแห้งร้อยละ 95.30 เยื่อใยร้อยละ 37.4 โปรตีนร้อยละ 2.7 ของแข็งที่ละลายน้ำได้ (ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาล) ร้อยละ 2-6 กรดอะมิโน ได้แก่ aspatic acid 13.25 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ theonine 5.58 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ methionine 7.84 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ valine 3.33 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ leucine 5.75 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ tyosine 1.51 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ alanine 3.56 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ ของโปรตีนทั้งหมด และยังมีสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเนื้องอก (Antitumor sustrances, 0.1 เปอร์เซ็นต์) อาจเป็นสารพวก Polysaccharide ซึ่งประกอบด้วยน้ าตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม (hexose) และ น้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม (pentose)

4) กากข้าวโพด เป็นต้นข้าวโพดที่เก็บเกี่ยวแล้วนำมาบดให้เละเอียด โดยต้นข้าวโพดแห้งจะมี ส่วนประกอบทางเคมีดังนี้ คือ วัตถุแห้ง (dry matter) ร้อยละ 25.3, โปรตีน (crude protein) ร้อยละ 8.8 – 9.7, เยื่อใยหยาบ (crude fiber) ร้อยละ 26.8, ไขมัน (ether extract) ร้อยละ 0.9, เถ้า (ash) ร้อยละ 7.5-8.5, Nitrogen free extract ร้อยละ 55.0, ADF ร้อยละ 37.2-37.4, NDF ร้อยละ 61.7-63.6, ลิกนินร้อยละ 3.8-4.3, แคลเซียมร้อยละ 0.4 และฟอสฟอรัสร้อยละ 0.2

5) เปลือกและกากสับปะรด เป็นวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการแปรรูปสับปะรด เช่น โรงงานผลิตน้ำสับปะรด บางส่วนจะถูกนำไปผลิตเป็นอาหารสัตว์ แต่ยังคงเหลือเปลือกและกากสับปะรด

เป็นจำนวนมาก ซึ่งเปลือกและกากสับปะรดเป็นกากใยที่มีเซลลูโลส ซึ่งเห็ดสามารถใช้เอ็นไซม์ในการย่อยสลายเพื่อการเจริญเติบโตได้ กลุ่มงานวิเคราะห์อาหารสัตว์กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ ได้วิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมีของเปลือกสับปะรดคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ทางวัตถุดิบแห้งร้อยละ 96.28 โดยเปลือกสับปะรดมีโปรตีนร้อยละ 6.37, ADF ร้อยละ 25.67, ไขมันร้อยละ 1.13, ฟอสฟอรัสร้อยละ 0.18 เส้นใยร้อยละ 20.60 แคลเซียมร้อยละ 0.33 เถ้าร้อยละ 6.62 และ NFE ร้อยละ 65.28 (จารุภา ศรีนาค และคณะ, 2555)

2. ลักษณะของผลพลอยได้อุตสาหกรรมเกษตรและการเกษตร

ผลพลอยได้อุตสาหกรรมและการเกษตรที่พบมากในประเทศไทย จัดเป็นวัสดุกลุ่มลิกโนเซลลูโลสที่มีองค์ประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน ในปริมาณที่แตกต่างกันตามชนิดของผลพลอยได้ เช่น กระดาษมีเซลลูโลสร้อยละ 85-99 ในขณะที่ใบไม้มีเฮมิเซลลูโลสร้อยละ 80-85 และเปลือกถั่วมีลิกนินร้อยละ 30-40 (ตารางที่ 2-1)

3. องค์ประกอบของวัสดุกลุ่มลิกโนเซลลูโลส

โครงสร้างของกลุ่มวัสดุลิกโนเซลลูโลสสามารถแบ่งได้เป็น 3 ส่วน คือ องค์ประกอบภายนอก พอลิแซ็กคาไรด์และลิกนิน ดังนี้

1) **องค์ประกอบภายนอก** หมายถึง องค์ประกอบที่ไม่มีผนังเซลล์ทั้งหมด ได้แก่สารเคมีภายในเซลล์ที่สามารถละลายได้ในน้ำและในตัวทำละลายอนิทรีย์ โดยจำแนกเป็นกลุ่มย่อยที่สามารถสกัดได้และไม่ได้ ซึ่งในส่วนที่สกัดได้ ได้แก่ เทอร์ปีน (terpene) เรซิน (resin) และฟีนอล (phenol) สำหรับสารที่สกัดและละลายน้ำไม่ได้ที่มีองค์ประกอบหลักคือ สารอนินทรีย์ในรูปของแร่ธาตุที่อยู่ในหมู่ที่ 1 และ 2 เช่น สารที่มีอยู่ในรูปของคาร์บอเนตและออกซาเลต

2) **พอลิแซ็กคาไรด์** องค์ประกอบในกลุ่มนี้เป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีมวลโมเลกุลสูง เช่น เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสที่มีอยู่ถึงร้อยละ 60-80 ของเนื้อวัสดุทั้งหมด โดยเซลลูโลสจัดเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์และมีโครงสร้างที่ทนทานต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์และกรด และไม่สลายตัวเมื่ออยู่ในน้ำ สำหรับเฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิแซ็กคาไรด์สายสั้น มีหน้าที่เชื่อมโยงระหว่างลิกนินและเซลลูโลส ในธรรมชาติเฮมิเซลลูโลสจะอยู่ในลักษณะที่ไม่มีรูปร่างแน่นอน (amorphous form)

3) **ลิกนิน** เป็นพอลิเมอร์ของสารประกอบที่โมเลกุลเป็นวงแหวนและจัดเป็นสารประกอบที่มีความซับซ้อนมากที่สุด ในวัสดุแต่ละชนิดมักพบลิกนินเป็นองค์ประกอบอยู่ร้อยละ 20-35 โดยทำหน้าที่รวมมัดของเส้นใยของพอลิเมอร์แซ็กคาไรด์ไว้ด้วยกัน

ตารางที่ 2-1 ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินที่พบในผลพลอยได้อุตสาหกรรมและการเกษตร

วัสดุลิกโนเซลลูโลส	เซลลูโลส (%)	เฮมิเซลลูโลส (%)	ลิกนิน (%)
ไม้เนื้อแข็ง (hardwood stem)	40-55	24-40	18-25
ไม้เนื้ออ่อน (softwood stem)	45-50	25-35	25-35
เปลือกถั่ว (nut shell)	25-30	25-30	30-40
ซังข้าวโพด (corn cob)	45	35	15
หญ้า (grass)	25-40	35-40	10-30
กระดาษ (paper)	85-99	0	0-15
ฟางข้าว (wheat straw)	30	50	15
ขยะประเภทต่างๆ (sorted refuse)	60	20	20
ใบไม้ (leaves)	15-20	80-85	0
ใยเมล็ดฝ้าย (cotton seed hair)	80-95	5-20	0
กระดาษหนังสือพิมพ์ (newspaper)	40-55	10-20	18-30
ของเสียทางเคมีจากการผลิตกระดาษ (waste papers from chemical pulp)	60-70	28	5-10
ของเสียจากสุกร (swine waste)	6.0	28	NA
มูลวัว ควาย (solid castle manure)	1.6-4.7	1.4-3.3	6.4

NA = Not Available

ที่มา: รัชพล พะวงศ์รัตน์ (2558)

4. โครงสร้างของผนังเซลล์พืชและหน้าที่

เป็นส่วนที่อยู่ภายนอกเยื่อหุ้มเซลล์ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตเป็นจำนวนมาก เมื่อสร้างใหม่ๆ ผนังเซลล์จะมีลักษณะบาง ต่อมาจะหนาขึ้นเพราะมีการสะสมสารต่างๆ โดยชั้นใหม่ที่เกิดจะติดกับส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ชั้นเก่าถูกดันห่างออกจากโปรโตพลาสต์ ชั้นใหม่นี้เรียกว่าผนังเซลล์ชั้นที่สอง (secondary cell wall) ซึ่งจะมีความหนาไม่เท่ากันตลอด ทำให้เกิดลักษณะที่เป็นรูเปิด เพื่อให้สารต่างๆ เคลื่อนผ่านได้เรียกว่า พิท (pit) ผนังเซลล์มีส่วนประกอบทางเคมีที่สำคัญ คือ

1) ไมโครไฟบริลลา โพลีแซ็กคาไรด์ (microfibrillar polysaccharides) ซึ่งกลุ่มที่พบมากที่สุด คือ เซลลูโลส (cellulose) และไคติน (chitin)

เซลลูโลส เป็นลูกโซ่ของดี-กลูโคส (D-glucose) ซึ่งเรียงตัวเกาะกันแบบพันธะ β-1,4-glycosidic ซึ่งมีความยาวต่างกันไป แต่โดยปกติจะมีกลูโคสอยู่ประมาณ 2,000-14,000 หน่วย ยาวประมาณ 1-7 มิลลิเมตร และจับกับลูกโซ่ข้างเคียงด้วยแขนแบบไฮโดรเจน (hydrogen bond) ทำให้เกิด

เป็นลักษณะที่เรียกว่า ไฟบริล (fibrils) ซึ่งหนาไม่เกิน 250° A และยาวหลายไมโครเมตร แต่ละไฟบริลจะเรียงต่อกันด้วยไฮโดรเจนบอนด์ ซึ่งทำให้เกิดการติดกันขึ้นมา เซลลูโลสจะฝังตัวอยู่ในของเหลวที่มีรูปร่างไม่แน่นอนเรียกแมทริกซ์ โพลีแซ็กคาไรด์ ส่วนของไฟบริลจะทนต่อการเข้าทำลายของเชื้อจุลินทรีย์และสารเคมี ผนังเซลล์จึงมีหน้าที่ป้องกันอันตรายและเพิ่มความแข็งแรงให้กับเซลล์ พืชในพืชชั้นต่ำที่มีเซลลูโลสน้อย เช่น เชื้อราจะมีไคติน (chitin)

ไคติน เป็นส่วนประกอบที่พบมากในผนังเซลล์ของเชื้อราและเป็นส่วนประกอบของสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง โมเลกุลของไคตินจะเรียงต่อกันยาว โดยไม่แตกสาขา สารประกอบทางเคมีเป็นพวก N-acetyl-D-glucosamine โดยเกาะกันแบบพันธะ β 1,4-glycosidic ทำให้เกิดเป็นไฟบริลเช่นเดียวกับเซลลูโลส

2) แมทริกซ์ โพลีแซ็กคาไรด์ (matrix polysaccharides) ส่วนนี้จะประกอบด้วย 2 ส่วนใหญ่ๆ คือ เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และเพคติน (pectin) ซึ่งแยกออกจากกันโดยคุณสมบัติในการละลายน้ำ เพราะเพคตินนั้นสามารถแยกได้โดยการต้มกับน้ำเป็นเวลานาน แต่เฮมิเซลลูโลสนั้นต้องแยกโดยใช้โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ แมทริกซ์ โพลีแซ็กคาไรด์มีลักษณะเป็นของเหลวที่มีรูปร่างไม่แน่นอน ทำหน้าที่หุ้มห่อส่วนของไมโครไฟบริลลา โพลีแซ็กคาไรด์

เฮมิเซลลูโลส ชื่อของเฮมิเซลลูโลสนั้นใช้เรียกเมื่อพบโพลีแซ็กคาไรด์ชนิดนี้ใหม่ๆ ซึ่งเข้าใจว่าเป็นสารเริ่มต้นที่จะทำให้เกิดเซลลูโลส ซึ่งในปัจจุบันพบว่าไม่จริงเฮมิเซลลูโลสประกอบด้วยไซแลนซ์ (xylans) ซึ่งมีน้ำตาลไซโลส (xylose) แมนแนน (mannans) ซึ่งมีน้ำตาลแมนโนส (mannose) และกาแลกแตน (galactans) ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกาแลคโตส (galactose) นอกจากนั้น ยังมีกลูโคแมนแนน ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลแมนโนส ไซโลกลูแคนประกอบด้วยน้ำตาลไซโลสและน้ำตาลกลูโคสและแคลโลส (callose) จัดเป็นเฮมิเซลลูโลสซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสที่เกาะกันแบบพันธะ β-1,3-glycosidic ซึ่งจะพบบริเวณปลายเซลล์ของท่ออาหาร (sieve tubes)

เพคติน ทำหน้าที่เชื่อมให้เซลลูโลสติดกัน เป็นส่วนประกอบที่มีมากในส่วนมิดเดิลลาเมลลา (Middle lamella) นอกจากนั้น เพคตินยังเกิดในน้ำผลไม้ต่างๆ สารเคมีที่พบในเพคตินคือ กรดแอลฟา ดี กาแลคตูโรนิค (α-D-galacturonic acid) อะราบิแนนส์ (arabinans) และกาแลคแตนส์ (galactans)

3) ลิกนิน (lignins) การเกิดลิกนินในพืชมักจะควบคู่ไปกับเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่ค้ำจุน และท่อน้ำท่ออาหาร จะพบในผนังเซลล์ทุติยภูมิซึ่งตายแล้ว การเกิดลิกนินทำให้เซลล์แข็งแรง ทำให้ไฟบริลไม่เคลื่อนที่และป้องกันอันตรายให้ไฟบริลด้วย อาจจะพบลิกนินในเนื้อผลไม้บางชนิด เช่น ฝรั่งและละมุด ลิกนินประกอบด้วยสารเคมีที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง พวกฟีโนลิคส์ (phenolics) ลิกนินทำให้เซลล์เกิดความแข็งแรงมากขึ้นและต้านทานต่อสารเคมีและการกระทบกระแทกต่างๆ

4) โปรตีน ในการพบโปรตีนในผนังเซลล์นั้นระยะแรกเข้าใจว่าเกิดจากการปนเปื้อนมาจากส่วนของไซโตพลาสต์ (cytoplasm) แต่ในปัจจุบันได้มีการสรุปแน่ชัดแล้วว่า ในเซลล์ที่กำลังเจริญเติบโตจะมีโปรตีนในผนังเซลล์ประมาณ 5-10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์พวกไฮโดรเสส (hydrolase) กลูคาเนส (glucanase) เพคติน เมทธิลเอสเตอเรส (pectin methylesterase) และเอทีพีเอส (ATPase) เป็นต้น นอกจากนั้นยังมีโปรตีนที่เป็นโครงสร้างเป็นพวกไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ซึ่งประกอบด้วยไฮดรอกซีโพรลีนเป็นส่วนใหญ่ (hydroxyproline) โดยเกาะกับโพลีแซคคาไรด์แบบ non covalent bond

5) น้ำ เป็นส่วนประกอบที่พบในส่วนของเพคตินที่มีลักษณะเป็นวุ้น (gel) และยังทำหน้าที่ลดปริมาณของไฮโดรเจนบอนด์ที่เกาะกันระหว่างไฟบริลและเฮมิเซลลูโลส ดังนั้น เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำจะทำให้การติดกันของไฟบริลกับเฮมิเซลลูโลสเปลี่ยนไปและน้ำยังเป็นตัวทำละลายสารเคมีในผนังเซลล์ด้วย โดยเฉพาะขณะที่เซลล์ขยายตัว

6) ส่วนที่หุ้มห่อภายนอก (incrusting substances) สิ่งที่หุ้มห่อข้างนอกของผนังเซลล์ของเซลล์ผิว (Epidermis) จะเป็นสารพวกคิวติเคิล (cuticle) เพื่อช่วยลดการสูญเสียน้ำ หรือรับน้ำเพิ่มมากขึ้นและยังป้องกันอันตรายจากสารเคมีและเชื้อจุลินทรีย์ได้ด้วย นอกจากนั้นยังมีสารประกอบอนินทรีย์บางชนิดพบในผนังเซลล์ของพืชบางชนิด สารเหล่านี้ เช่น แคลเซียมคาร์บอเนตและแคลเซียมซิลิเกต เป็นต้น

สามารถแบ่งผนังเซลล์ออกได้ เป็น 3 ชนิด ด้วยกันคือ

1) ผนังเซลล์ชั้นที่หนึ่งหรือผนังเซลล์ปฐมภูมิ (primary cell wall) เกิดขึ้นหลังจากที่เซลล์หยุดการขยายตัวแล้ว จะทำหน้าที่หุ้มห่อเยื่อหุ้มเซลล์อยู่อีกทีหนึ่ง

2) ผนังเซลล์ชั้นที่สองหรือผนังเซลล์ทุติยภูมิ (secondary cell wall) คือผนังเซลล์ที่อยู่ระหว่างผนังชั้นที่หนึ่ง และเยื่อหุ้มเซลล์ ประกอบด้วยเซลลูโลสและลิกนินเป็นส่วนใหญ่

3) มิดเดิลลาเมลลา คือ ส่วนที่เป็นผนังร่วมของเซลล์สองเซลล์ที่อยู่ติดกันเป็นส่วนของผนังเซลล์ที่เกิดขึ้นในขณะที่เซลล์แบ่งเป็นสองเซลล์ ทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมเซลล์สองเซลล์ให้ติดกัน ประกอบด้วยสารเพคติน

ผนังเซลล์พืชมีหน้าที่ทำให้โครงสร้างของพืชมีความแข็งแรงและมีความคงรูป แต่ทั้งนี้แรงดันน้ำภายในเซลล์มีส่วนทำให้ผนังเซลล์เกิดการขยายตัวและพองตัวได้ ในธรรมชาติ ผนังเซลล์ทำหน้าที่เป็นทางผ่านของไอออนและน้ำ เมื่อผนังเซลล์ถูกล้อมรอบด้วยน้ำ จึงทำให้เกิดการไหลเวียนของน้ำและสารละลายต่างๆ ผ่านเข้าออกเซลล์พืชได้ โดยเคลื่อนที่ผ่านผนังเซลล์ด้วยกระบวนการแพร่ ส่วนน้ำสามารถระเหยผ่านผนังเซลล์โดยตรงเช่นกัน ดังนั้น ผนังเซลล์พืชจึงทำหน้าที่เป็นช่องทางให้น้ำเกิดการเคลื่อนที่ผ่านเข้าออกด้วย (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงษ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์, ม.ป.ป.)

5. เซลลูโลส

เซลลูโลสเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ (cell wall) ในพืช เกิดจากกลูโคสประมาณ 50,000 โมเลกุล มาเชื่อมต่อกันเป็นสายยาว แต่ละสายของสายของเซลลูโลสเรียงขนานกันไป มีแรงยึดเหนี่ยวระหว่างสาย ทำให้มีลักษณะเป็นเส้นใย สะสมไว้ในพืช ไม่พบในเซลล์สัตว์

เซลล์ลูโลสไม่ละลายน้ำและร่างกายของมนุษย์ไม่สามารถย่อยสลายได้ แต่ในกระเพาะของวัว ควาย ม้า และสัตว์ที่เท้ามีกีบ มีแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นกลูโคสได้ ถึงแม้ว่าร่างกายของมนุษย์จะย่อยเซลลูโลสไม่ได้ แต่เซลลูโลสจะช่วยในการกระตุ้นลำไส้ใหญ่ให้เคลื่อนไหว เส้นใยบางชนิดสามารถดูดซับน้ำได้ดี จึงทำให้อุจจาระอ่อนนุ่ม ขับถ่ายง่าย ท้องไม่ผูก ลดโอกาสการการเกิดโรคริดสีดวงทวาร

เซลลูโลสเมื่อถูกย่อยจะแตกตัวออกให้น้ำตาลกลูโคสจำนวนมาก เป็นคาร์โบไฮเดรตที่เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างของเซลล์ (structural carbohydrate) ประกอบด้วยหน่วยย่อยคือโมเลกุลของกลูโคส (glucose subunits) 1,000-10,000 โมเลกุล มีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) 200,000-2,000,000 หน่วยย่อยพื้นฐาน (basic subunit) คือ เซลโลไบโอส (cellobiose) ซึ่งประกอบด้วยกลูโคส 2 โมเลกุล ต่อกันด้วยพันธะ β-1, 4 ไกลโคซิดิก โดยที่ไม่มีการแตกแขนง เซลลูโลสใน primary cell wall ประกอบด้วยกลูโคสยาวประมาณ 2,000 โมเลกุล และอย่างน้อย 14,000 โมเลกุลใน secondary cell wall โดยโมเลกุลของเซลลูโลสจะเกาะกันเป็นคู่ตามยาวและเรียงขนานกันเป็นกลุ่ม 40 คู่ เรียกว่า microfibril ทำหน้าที่ให้ความแข็งแรงกับผนังเซลล์ของพืช ปริมาณของเซลลูโลสอาจพบน้อยมากในส่วนที่สะสมอาหาร เช่น ในอินทผาลัมมีเพียงร้อยละ 0.8 ขณะที่ในส่วนของเส้นใยฝ้าย (cotton fibers) มีมากถึงร้อยละ 98 (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงษ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์, ม.ป.ป.)

6. เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose)

เฮมิเซลลูโลส เป็นคาร์โบไฮเดรตประเภทพอลิแซ็กคาไรด์ ในโมเลกุลของเฮมิเซลลูโลสเป็น heteropolysaccharide ที่ประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิด เช่น น้ำตาลไซโลสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ที่ตำแหน่ง เบต้า (1-4) เป็นโซ่หลัก อาจมีน้ำตาลแมนโนส กาแล็กโทส หรือกลูโคส มาต่อกันเป็นโซ่หลักด้วยและมีน้ำตาลชนิดอื่นมาต่อกันเป็นโซ่สาขาหรือโซ่แขนง ได้แก่ น้ำตาลอะราบิโนส กรดกลูคูโรนิก

เฮมิเซลลูโลส จัดเป็นเส้นใยอาหารที่ไม่ละลายน้ำ ไม่สามารถย่อยได้ด้วยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์กระเพาะเดี่ยว สามารถละลายได้ในสารละลายด่างเจือจาง สมบัติทางกายภาพที่สำคัญคือ มีความสามารถในการอุ้มน้ำ (water holding capacity) และแลกเปลี่ยนไอออนประจุบวก (cation exchange) เมื่ออยู่ในกระเพาะอาหารและลำไส้ของมนุษย์ แหล่งของเฮมิเซลลูโลสพบรวมอยู่กับเซลลูโลสที่ผนังเซลล์ของผักและผลไม้ (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงษ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์, ม.ป.ป.)

7. ลิกนิน (Lignin)

ลิกนิน หรือ lignen เป็นสารเคมีที่มีความซับซ้อนได้มากที่สุดที่ได้จากไม้และเป็นส่วนหนึ่งของผนังเซลล์ของพืช ลิกนินอยู่ในช่องว่างในผนังเซลล์ของระหว่างองค์ประกอบเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และเพคติน โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน tracheid, sclereid และเซลล์ไซเลม (xylem) เป็น covalently ที่เชื่อมโยงกับเฮมิเซลลูโลสและจึง crosslinks polysaccharides

ลิกนิน เป็นส่วนสำคัญในการดำเนินการของน้ำในลำต้นพืช ส่วนประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ของผนังเซลล์พืชเป็นส่วนที่ชอบน้ำมากและทำให้การซึมผ่านลงไปในน้ำ ในขณะที่ลิกนินเป็นส่วนที่ไม่ชอบ โดยลิกนินที่เป็นอุปสรรคสำหรับการดูดซึมน้ำที่ผนังเซลล์ ดังนั้น ลิกนินทำให้เนื้อเยื่อท่อลำเลียงของพืชที่จะดำเนินการได้อย่างมีผลต่อประสิทธิภาพในการลำเลียงน้ำ ลิกนินมีอยู่ในพืชที่มีท่อลำเลียงทั้งหมด แต่ไม่ได้อยู่ใน bryophytes

ลิกนินมีบทบาทสำคัญในวงจรคาร์บอน ในการแยกคาร์บอนในชั้นบรรยากาศที่จะเข้าไปในเนื้อเยื่อของพืชยืนต้นหรือไม้ยืนต้น ลิกนินเป็นหนึ่งในองค์ประกอบที่ย่อยสลายช้าที่สุดของพืชที่ตายแล้ว ซึ่งเมื่อสลายตัวจะกลายเป็นฮิวมัส

ลิกนินเป็นโมเลกุล racemic cross-linked กับกลุ่มโมเลกุลในส่วนที่เกิน 10,000 หน่วย จะค่อนข้างชอบน้ำและมีกลิ่นหอมในธรรมชาติ ปฏิกิริยาการเกิดลิกนิน (polymerization) ในธรรมชาติเป็นสิ่งที่ยากในการวัดเนื่องจากลิกนินอยู่อย่างกระจัดกระจาย และโมเลกุลประกอบด้วยโครงสร้างย่อย (substructures) ที่ซ้ำๆ กัน

ลิกนิกเป็นสารประกอบพอลิเมอร์ไม่มีรูปผลึก จะเกาะกันอยู่ในชั้นระหว่างเส้นใย (middle lamella) ซึ่งทำหน้าที่ยึดเกาะเส้นใยเข้าด้วยกัน และมีบางส่วนผสมอยู่ในเส้นใยด้วย โครงสร้างพื้นฐานของลิกนินคือ phenylpropane หรือสาร ประกอบ hydrocarbon ที่มี carbon 9 อะตอม ประมาณร้อยละ 65–67 ปัจจุบันยังไม่สามารถแยกลิกนินบริสุทธิ์ออกมาได้ (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงษ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์, ม.ป.ป.)

8. กระบวนการปรับสภาพ (Pretreatment) วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส

ในกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบจะกระตุ้นให้มีการเปลี่ยนคุณสมบัติทางด้านกายภาพ คือ ทำให้ชั้นแมทริกซ์ของวัสดุลิกโนเซลลูโลสถูกทำลายซึ่งมีผลทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพส่งผลต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสามารถทำงานได้ง่ายขึ้น จุดประสงค์ของการปรับสภาพวัตถุดิบ คือ เป็นการกำจัดลิกนิกและเฮมิเซลลูโลส ลดความเป็นผลึกของเซลลูโลสและเพิ่มความพรุนของวัสดุ ซึ่งกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบสามารถแบ่งออกเป็น 4 วิธีหลัก ดังนี้

1) วิธีทางกายภาพ (Physical pretreatment)

1.1) การใช้แรงทางกล (Mechanical communication) วิธีการทำให้วัตถุดิบมีขนาดเล็กลงสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การทุบ การบด การโม่ การเขย่าวัตถุดิบ เป็นต้น ซึ่งจะมีผลทำให้เกิดการลดผลึก (cellulose crystallinity) และเพิ่มพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยาให้มากกขึ้น ความสามารถในการลดขนาดจะขึ้นอยู่กับขนาดสุดท้ายของวัสดุและคุณสมบัติของวัสดุนั้น ซึ่งปกติขนาดของเศษวัตถุดิบจะทำให้มีขนาดประมาณ 0.2-2 มิลลิลิตร (Sun and Cheng, 2002)

1.2) การไพโรไลซิส (pyrolysis) วิธีการอบที่ใช้ความร้อนที่อุณหภูมิสูง ให้วัตถุดิบกลายเป็นแก๊สหรือของแข็ง กระบวนการจะทำได้ช้าและการระเหยจะต่ำถ้าใช้อุณหภูมิต่ำ จากการวิจัยพบว่าการใช้อุณหภูมิมากไปหรือน้อยไปจะไม่เป็นผลดี จึงต้องมีการวิจัยที่เหมาะสม (รัชพล พะวงศ์รัตน์, 2558)

1.3) การใช้ความร้อน (Thermal heat treatment) เป็นการปรับสภาพของวัตถุดิบเพื่อทำลายเนื้อเยื่อของเซลลูโลส ซึ่งโดยส่วนใหญ่มักจะใช้อุณหภูมิมากกว่า 150-180 องศาเซลเซียส แต่ต้องทำให้วัสดุมีขนาดที่เล็กลงก่อนเข้าสู่กระบวนการย่อยวัตถุดิบทางความร้อน (รัชพล พะวงศ์รัตน์, 2558)

2) วิธีการทางชีวภาพ (Biological pretreatment)

จุลินทรีย์สามารถใช้ในการปรับสภาพวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสและยังเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยวัตถุดิบด้วยเอนไซม์ ในการใช้จุลินทรีย์ในการปรับสภาพ ลิกนินและเฮมิเซลลูโลสจะถูกย่อย แต่เซลลูโลสจะถูกย่อยได้เพียงเล็กน้อย ซึ่งเซลลูโลสจะสามารถต้านทานการย่อยของจุลินทรีย์ได้ การใช้ Brown-, White-, และ Soft-rot fungi ในการปรับสภาพวัตถุดิบ White-rot fungi เช่น *Phanerochaete chrysosporidium, Ceriporia lacerate, Cyathus stercolerus, Pycnoporus cinnarbarinus* และ *Pleurotus ostreaus* เป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการปรับสภาพด้วยกระบวนการทางชีวภาพ (Kumar et al., 2011)

3) วิธีการทางเคมี

3.1) การทำปฏิกิริยากับโอโซน (Ozonolysis) โอโซนเป็นตัวออกซิเดชั่นที่มีประสิทธิภาพ และสามารถทำให้เกิดการแตกตัวของลิกนินและเฮมิเซลลูโลสในวัสดุพวกฟางข้าวได้ วิธีนี้มีจุดเด่น คือ เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการเอาลิกนินออกได้ดี ไม่มีสารพิษที่ยับยั้งการทำปฏิกิริยาในส่วนต่างๆ กระบวนการนี้สามารถทำได้ที่อุณหภูมิห้อง แต่ผลเสียคือค่าใช้จ่ายสูง (Sun and Cheng, 2002)

3.2) การทำปฏิกิริยาด้วยการใช้ด่าง (Alkaline pretreatment) การใช้ด่างในกระบวนการการปรับสภาพวัตถุดิบมีผลต่อวัสดุจำพวกลิกโนเซลลูโลส และผลของด่างที่ใช้ในกระบวนการแปลงสภาพจะขึ้นอยู่กับปริมาณของลิกนินที่มีอยู่ในวัสดุนั้นด้วย (McMillan, 1994) กลไกการทำงานของด่างนั้นเชื่อว่าจะไปเดิ่มการพองตัวภายในโมเลกุลต่อสายพันธะภายในของไซแลนในเฮมิเซลลูโลส ความพรุนของวัสดุจะเพิ่มขึ้นได้เมื่อทำการกำจัดสายโซ่ที่เชื่อมต่อภายใน การใช้ด่างเจือจางในวัสดุลิกโน

เซลลูโลสมีผลทำให้เกิดการบวมภายในเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสในการทำปฏิกิริยาทำให้วัสดุมีความพรุนเพิ่มขึ้นได้ ลดความเป็นโครงสร้างของเซลลูโลส ลดระดับความเป็นพอลิเมอร์ขนาดใหญ่และสามารถแยกสายโครงสร้างระหว่างลิกนินและคาร์โบไฮเดรต และเป็นการแยกองค์ประกอบหรือทำลายโครงสร้างของลิกนิน ด่างที่นิยมใช้ในการแยกลิกนินได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (รัชพล พะวงศ์รัตน์, 2558)

3.3) การทำปฏิกิริยาด้วยการใช้กรด (Acid pretreatment) กระบวนการปรับสภาพโดยการใช้กรดนั้นมีจุดประสงค์คือ เพื่อให้ได้น้ำตาลในปริมาณที่สูงจากวัสดุชีวมวล ชนิดของน้ำกรดที่นำมาปรับสภาพมีมากมายหลายประเภทได้แก่ กรดซัลฟูริก ไฮโดรคลอริก ไนตริกหรือฟอสฟอริก ในกระบวนการแปลงสภาพสามารถใช้ได้ทั้งกรดเข้มข้นและเจือจางเพื่อเพิ่มการทำงานของกระบวนการไฮโดรไลซีส (Palmqvist and Hahn-Hagerdal, 2002) ในกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบ การใช้กรดเจือจางเป็นวิธีหนึ่งที่ได้รับความสนใจศึกษากันมากและแพร่หลายที่สุด (Mussatto et al., 2005) การใช้กรดเจือจางเพื่อปรับสภาพวัสดุที่อุณหภูมิที่เหมาะสมโดยใช้กรดซัลฟูริกหรือกรดฟอสฟอริกมักจะถูกใช้สำหรับการเปลี่ยนวัสดุพวกลิกโนเซลลูโลส ซึ่งประกอบไปด้วยส่วนที่เป็นเฮมิเซลลูโลส ไปเป็นน้ำตาลที่ละลายได้ตามด้วยการใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเพื่อให้เกิดเป็นกลูโคส (Silverstein et al., 2007) ในการใช้กรดเจือจางจะมีอยู่ 2 รูปแบบ คือ 1) ปริมาณสารตั้งต้นน้อย (ร้อยละ 5-10 โดยน้ำหนัก) ที่อุณหภูมิสูง (T>433 องศาเคลวิน) และ 2) ปริมาณสารตั้งต้นมาก (ร้อยละ 10-40 โดยน้ำหนัก) ที่อุณหภูมิต่ำ (T<433 องศาเคลวิน) (รัชพล พะวงศ์รัตน์, 2558)

4) การปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพร่วมกับวิธีทางเคมี (Physicochemical pretreatment)

4.1) การระเบิดด้วยไอน้ำ (Steam explosion) วิธีการระเบิดด้วยไอน้ำเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมในการปรับสภาพวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส (McMillan, 1994) การระเบิดด้วยไอน้ำโดยส่วนใหญ่แล้วจะมีอุณหภูมิช่วง 160-260 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 0.69-4.82 เมกะปาสคาล วัตถุดิบจะถูกผสมกับไอน้ำอิ่มตัวที่ความดันสูง แล้วทำการลดความดันลงอย่างรวดเร็ว เป็นผลทำให้เกิดการแยกเอาเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินออกจากกันที่อุณหภูมิสูง โดยส่วนของเฮมิเซลลูโซสจะละลายในน้ำที่ควบแน่นจากไอน้ำปัจจัยที่มีผลในกระบวนการปรับสภาพด้วยวิธีนี้คือ เวลาที่ใช้อุณภูมิ ขนาดของวัสดุตั้งต้นที่ใช้และปริมาณมาณความชื้นที่อยู่ในวัตถุดิบ (Duff and Murray, 1996)

4.2) วิธีการระเบิดด้วยแอมโมเนีย (Liquid hot water) วิธีการนี้ใช้แอมโมเนียเหลวที่อุณหภูมิระหว่าง 60-100 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันระยะเวลาหนึ่ง แล้วทำการลดความดันลงซึ่งมีผลต่อวัตถุดิบโดยวัตถุดิบที่ผ่านกระบวนการนี้จะมีอัตราการเป็นน้ำตาลเพิ่มมากขึ้น แต่ไม่มีผลต่อปริมาณของเฮมิเซลลูโลส ไม่เหมาะสมกับพืชที่มีลิกนินอยู่มาก ในกระบวนการนี้สามารถนำแอมโมเนียกลับมาใช้ใหม่ได้และไม่ก่อให้เกิดตัวยับยั้งการเปิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เมื่อเปรียบเทียบกับการปรับสภาพด้วยวิธีอื่น (รัชพล พะวงศ์รัตน์, 2558)

4.3) ความร้อนชื้น (Liquid hot water) วิธีการนี้เป็นอีกกระบวนการที่มีการใช้ความร้อนชื้น ซึ่งจะดำเนินการอย่างช้าๆ และไม่ต้องการสารเคมีเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แต่ต้องอาศัยความดันเพื่อควบคุมสถานะของน้ำในสภาวะของเหลวอุณหภูมิที่ใช้จะอยู่ระหว่าง 160-240 องศาเซลลเซียส โดยจะส่งผลต่อเฮมิเซลลูโลส ตัวอย่างได้หลังจากการปรับสภาพจะอยู่ในรูปแบบกึ่งแข็งกึ่งเหลว (slurry) โดยส่วนที่เป็นของแข็งส่วนใหญ่จะเป็นเซลลูโลส ส่วนของเหลวส่วนใหญ่เป็นเฮมิเซลลูโลสและเกิดน้ำตาลบางส่วน ทั้งนี้ควรมีการปรับค่า pH ให้อยู่ระหว่าง 4-7 เนื่องจากว่าในช่วง pH ดังกล่าว ทำให้เฮมิเซลลูโลสยังคงอยู่ในรูปของโอลิโกเมอร์ (Oligermeric form) ช่วยลดปัญหาการเกิดรวมตัวเป็นพอลิเมอร์อีกครั้ง (Mosier et al., 2005)

4.4) การย่อยเปียก (Wet oxidation) วิธีการนี้ใช้ออกซิเจนและอากาศเป็นตัวกลางในการทำปฏิกิริยา นิยมใช้ถังหมักชีวภาพในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำภายใต้แรงดันและเวลาสั้น โดยทั่วไปจะใช้เวลา 10-15 นาที อุณหภูมิ 170-200 องศาเซลเซียสและความดันระหว่าง 10-12 บาร์ ของออกซิเจน (Ogbonna et al., 2001)

4.5) การปรับสภาพด้วยคลื่นไมโครเวฟ (Microwave pretreatment) วิธีการปรับสภาพโดยอาศัยคลื่นไมโครเวฟจัดเป็นวิธีการทางกายภาพร่วมกับทาเคมี เนื่องจากว่ามีการใช้ความร้อนจากคลื่นไมโครเวฟ และส่วที่ใช้สารเคมีเจือจางในการแช่วัสดุ การให้คลื่นไมโครเวฟจะแตกต่างกันไปตามชนิดและวัสดุใช้เวลาระหว่าง 5-20 นาที (Keshwani, 2009)

4.6) การปรับสภาพด้วยคลื่นความถี่สูงลอัตร้าซาวด์ (Ultrasonic Pretreatment) วิธีการปรับสภาพด้วยคลื่นความถี่สูงอัลตร้าซาว์ยังมีรายงานเกี่ยวกับวิธีดังกล่าวน้อย แต่ผลที่ได้จากการใช้คลื่นความถี่สูงอัลตร้าซาวด์พบว่าส่งผลให้เกิดการย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ได้มากขึ้น (รัชพล พะวงศ์รัตน์, 2558)

4.7) การระเบิดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 explosion) วิธีการนี้ใช้คาร์บอนไดออกไซด์จากรดคาร์บอนิกในการเพิ่มปฏิกิริยาย่อยสลายขั้นต่อไป นิยมใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ร่วมด้วย เช่น เอทานอล ช่วยในการกำจัดสารประเภทลิกนิน แต่วิธีการนี้ได้ผลผลิตต่ำกว่าการใช้ไอน้ำหรือแอมโมเนีย แต่ไม่เกิดตัวขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ในขั้นตอนไฮโดรไลซิสเหมือนวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ (รัชพล พะวงศ์รัตน์, 2558)

9. ลิพิดจากจุลินทรีย์

ลิพิดเป็นองค์ประกอบหลักของเซลล์จุลินทรีย์ โดยจะพบในส่วนของเยื่อหุ้มต่างๆ ของส่วนประกอบของเซลล์จุลินทรีย์ เช่น เยื่อหุ้มเซลล์ เยื่อหุ้มไซโตพลาสซึม เยื่อหุ้มไมโตคอนเดรีย เยื่อหุ้มนิวเคลียส นอกจากนี้ ลิพิดยังมีบทบาทที่สำคัญในเซลล์ เช่น ตัวนำอิเล็กตรอน โคแฟกเตอร์เป็นต้น จุลินทรีย์บางชนิดสามารถผลิตไขมันได้ซึ่งไขมันที่ได้จากจุลินทรีย์จะเรียกว่าไขมันเซลล์เดี่ยว (single cell oil) ส่วนใหญ่เป็นไขมันที่บริโภคได้มีองค์ประกอบของไขมันคล้ายกับไขมันจากพืชจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต

ไขมันได้เรียกว่าจุลินทรีย์ไขมันสูง (oleaginous microorganisms) จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไขมันได้มีทั้งยีสต์ราสาหร่ายและแบคทีเรีย

1) ชนิดของลิพิดที่พบในเซลล์ของจุลินทรีย์

1.1) ไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol: TAG) เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันกับกลีเซอรอล ซึ่งหมู่ไฮดรอกซิลของกลีเซอรอลอาจถูกแทนที่ด้วยกรดไขมันตั้งแต่ 1, 2 และ 3 ตำแหน่งซึ่งอาจเรียกว่า โมโน ไดหรือไตรกลีเซอรไรด์ ตามลำดับ โดยไตรเอซิลกลีเซอรอล เป็นผลผลิตหลักที่อยู่ในรูปหยดไขมันเล็กๆภายในเซลล์ต้องทำให้เซลล์แตกก่อนจึงสกัดออกมาได้ ไตรเอซิลกลีเซอรอลที่ได้จะมีกรดโอเลอิค (C18:1) ร้อยละ 40-50 กรดปาลมิติค (C16:1) ร้อยละ 20-30 กรดสเตียริค (C18:0) ร้อยละ 15และกรดลิโนเลอิค (C18:2) กลีเซอไรด์เป็นไขมันที่พบมากที่สุดในเซลล์ คือ มีร้อยละ 80 ของไขมันทั้งหมด กลีเซอไรด์ที่พบมากที่สุดในยีสต์ คือ ไตรเอซิลกลีเซอรอล ซึ่งกรดไขมันในไตรเอซิลกลีเซอรอล ในยีสต์ที่พบนั้นมีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 8-24 อะตอม โดยชนิดที่มีคาร์บอน 16-18 อะตอม จะพบมากที่สุดซึ่งมีทั้งกรดไขมันชนิดอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว องค์ประกอบของไขมันในยีสต์ไขมันสูงและเมื่อเปรียบเทียบกรดไขมันจากยีสต์ไขมันสูงกับกรดไขมันจากพืชพบว่าจะมีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน (จิดาภา ทิน้อย และคณะ, 2553)

1.2) ฟอสโฟลิพิด (phospholipid) เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันและกลีเซอรอล และมีหมู่กรดฟอสฟาติคฟอสโฟลิปิดที่พบในธรรมชาติเป็น L- form เป็นส่วนสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์เมมเบรน โดยฟอสโฟลิพิดในยีสต์เป็นฟอสฟาติดิลโคลีน (phosphatidyl choline) เป็นส่วนใหญ่ซึ่งพบว่ามีปริมาณร้อยละ 25-35 ของฟอสโฟลิพิดทั้งหมด และส่วนน้อยจะเป็นพวกฟอสฟาติดิลอินโนซิทอล (phosphatidyl inositol) และฟอสฟาติดิลเซอรีน (phosphatidyl serine) (จิดาภา ทิน้อย และคณะ, 2553)

1.3) ไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) ในยีสต์พบไฮโดรคาร์บอนในปริมาณไม่มากนักมีรายงานว่าพบสควอรีน (squaline) (C30) ในยีสต์ *Sacchromyces cerevisiae* และใน *Sacchromyces carlsbergensis* สควอรีนนั้นเป็นสารตั้งต้นของสเตียรอยด์ (จิดาภา ทิน้อย และคณะ, 2553)

1.4) สฟิงโกลิพิด (sphingolipid)เป็นไขมันที่มีสายยาว (long chain base) ซึ่งมีกรดไขมันต่อกับหมู่อะมิโนด้วยพันธะเอ-ไมด์ ซึ่งรวมเรียกว่า เซราไมด์ (ceramide) และมีหมู่เพิ่มเข้ามา คือ หมู่ฟอสเฟต (PO_4) และไนโตรเจนเบส (nitrogen base) เช่น โคลีน (choline) สฟิงโกลิพิดเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเซลล์เมมเบรน สฟิงโกลิพิดแบ่งออกเป็น 3 ชนิดด้วยกันคือ สฟิงโกไมอีลิน (sphigomyelin) เซเรโบรไซด์ (cerebrosides) และแกงกลิโอไซด์ (gangliosides) ในยีสต์พบเฉพาะเซเรโบรไซด์สฟิงโกลิพิดที่พบส่วนใหญ่เป็นอนุพันธ์ของไฟโตสฟิงโกซีน (phytosphingosines) และไดไฮโดรสฟิงโกซีน (dihydrosphingosine) อย่างไรก็ตาม การพบสฟิงโกซีนในยีสต์มักจะอยู่รวมกับสารประกอบอื่นๆ ในรูปไกลคอล (glycol) และอินโนสิทอล ฟอสฟอริลสฟิงโกลิพิด (inositerol phosphorylsphingolipids) (จิดาภา ทิน้อย และคณะ, 2553)

1.5) สเตียรอยด์ (steroid compound) เป็นอนุพันธ์ของไซโคลเพนตาโนไฮโดรฟีแนนทรีน (cyclopentanohydrophenanthrene) โดยในยีสต์พบทั้งในรูปอิสระและในรูปเอสเทอร์ประมาณร้อยละ 0.1-1.0 ของไขมันทั้งหมดในยีสต์ ซึ่งพบว่าส่วนใหญ่เป็นเออโกสเตอรอล (ergosterol) และไซโมสเตอรอล (zymosterol) (จิดาภา ทิน้อย และคณะ, 2553)

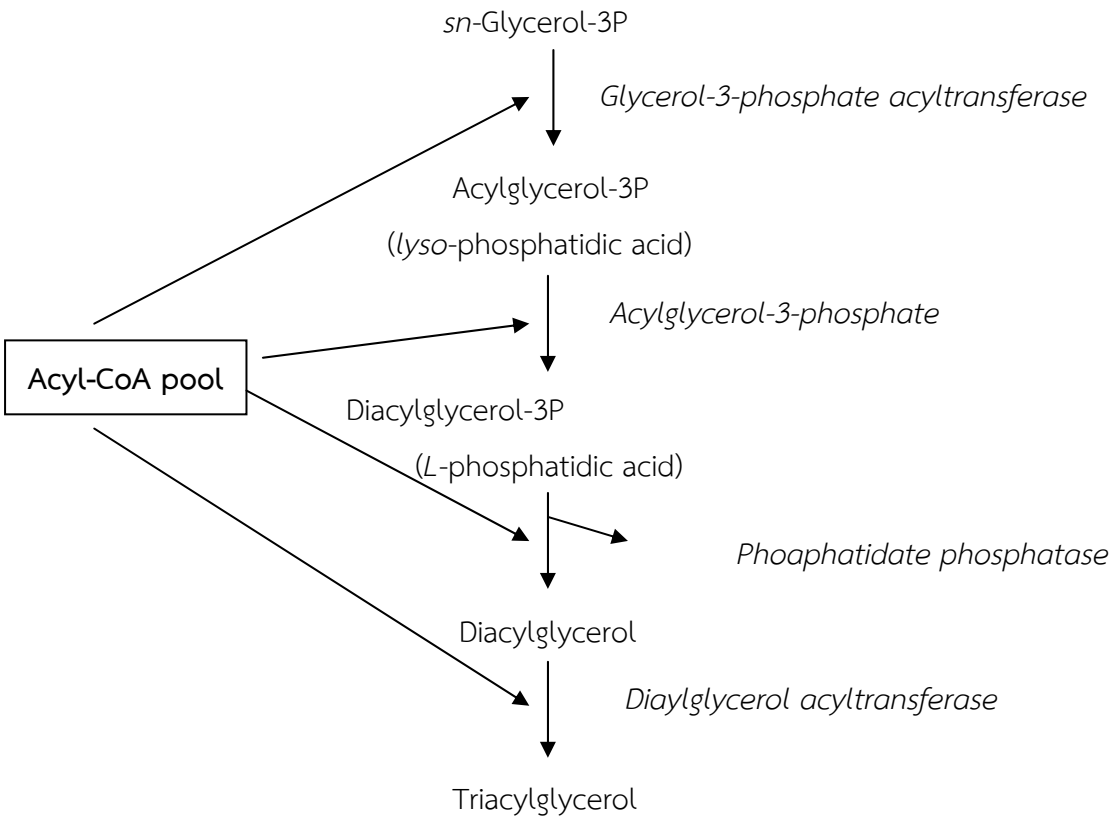
2) การสะสมลิพิดในจุลินทรีย์

การสะสมลิพิดในจุลินทรีย์ เกิดขึ้นได้เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในสภาวะที่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนเกินพอและจำกัดปริมาณไนโตรเจน จุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ลิพิดได้จะต้องมีเอนไซม์อะดีโนซีน ไตรฟอสเฟต:ซิเตรท ไลเอส (ATP:citratelyase: ACL) ผลิตอะซิติล-โคเอ (acetyl-CoA) ได้อย่างต่อเนื่องภายในเซลล์ ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้จะไม่พบในจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่จุลินทรีย์ไขมันสูง (รัตนภรณ์ ลีสิงห์และคณะ, 2556) ซึ่ง acetyl-CoA เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์กรดไขมัน และจุลินทรีย์จะต้องมีความสามารถในการผลิตนิโคตินาไมด์อะดีนีน ไดนิวคลีโอไทด์ ฟอสเฟต(NADPH)มากเพียงพอ การสะสมลิพิดของจุลินทรีย์จะเกิดขึ้นในระหว่างที่จุลินทรีย์เจริญในช่วงอัตราการเพิ่มมวลชีวภาพเป็นศูนย์ (stationary phase) วิถีการสร้างลิพิดในเซลล์จุลินทรีย์ไขมันสูงมีชื่อเรียกต่างกัน เช่น ในเซลล์ของแบคทีเรียเรียกวิถีเคนเนดี้ (kennedy pathway) ในเซลล์ยีสต์เรียกการสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ (*de novo* synthesis) โดยมี 3 ปฏิกิริยาหลัก ดังนี้ 1) การสร้างสารประกอบ fatty acyl 2) การสร้าง glycerol 3) การเชื่อมต่อกรดไขมันกับกลีเซอรอลด้วยปฏิกิริยา esterification ดังภาพที่ 2-1

10. ยีสต์ไขมันสูง

1) ลักษณะของไขมันจากยีสต์ไขมันสูง

หลายๆ สกุลของยีสต์สามารถสร้างและสะสมไขมัน (lipid) ได้มากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งจัดให้อยู่ในกลุ่มยีสต์ที่เรียกว่า ยีสต์ไขมันสูง (oleaginous yeasts) เช่น *Cryptococcus, Yarrowia, Rhodotorula, Rhodosporidium, Lipomyces* และ *Trichosporon* เป็นต้น ยีสต์บางชนิด เช่น *Rhodotorula* sp., *Rhodosporidium* sp., *Yarrowialipo lytica* และ *Cryptococcus curvatus* สร้างและสะสมไขมันได้สูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณไนโตรเจนอยู่อย่างจำกัด ความสามารถของยีสต์ไขมันสูงในการสร้างและสะสมไขมันจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของยีสต์และแหล่งคาร์บอนที่เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ตารางที่ 2-1) นอกจากนี้สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ ได้แก่ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน (C/N ratio) แหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง ปริมาณออกซิเจนและความเข้มข้นของแร่ธาตุที่พบน้อยแต่จำเป็น (trace element) และเกลือแร่ ถือว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญสำหรับการสร้างและสะสมไขมันในเซลล์ยีสต์ด้วย ความสามารถของยีสต์ในการใช้แหล่งคาร์บอนที่หลากหลาย การลดต้นทุนในการผลิตไขมันจากยีสต์ไขมันสูงด้วยการใช้แหล่งคาร์บอนที่ไม่มีมูลค่า เช่น ของเสียจากภาคอุตสาหกรรมและเกษตรกรรม จึงเป็นเรื่องที่เป็นไปได้สำหรับการพัฒนายีสต์ไขมันสูงต่อไป (สาลินี ศรีวงษ์ชัย, 2558)



ภาพที่ 2-1 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไตรเอซิลกลีเซอรอลในจุลินทรีย์
ที่มา: Alvarez และ Steinbüchel (2002)

ตารางที่ 2-2 ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์ไขมันสูงเพื่อการผลิตลิพิด

Yeasts	Carbon Sources	Lipid content (%wt/wt)
Y. lipolytica	Glycerol	54.4
R. toruloides	Glucose	57
C. curvatus	Waste spent yeast from brewery industry	37.7
T. cutaneum	Corncob residues hydrolysate	32.1
R. graminis	Raw glycerol	34
L. starkeyi	Flour-rich waste streams	40.4

ที่มา: สาลินี ศรีวงษ์ชัย (2558)

เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันของน้ำมันที่สกัดได้จากยีสต์ไขมันสูง พบกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ กรดไมสเตียริค (C14:0) กรดปาล์มิติก (C16:0) กรดปาล์มิโตเลอิค (C16:1)

กรดสเตียริค (C18:0) กรดโอเลอิค (C18:1) กรดไลโนเลอิค (C18:2) และกรดไลโนเลนิค (C18:3) (ตารางที่ 2-3) และน้ำมันยีสต์นี้สามารถนำมาผ่านกระบวนการ transesterification ด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมีหรือชีวภาพเป็นไบโอดีเซลได้

ตารางที่ 2-3 องค์ประกอบกรดไขมันของลิพิดของยีสต์ไขมันสูงชนิดต่างๆ

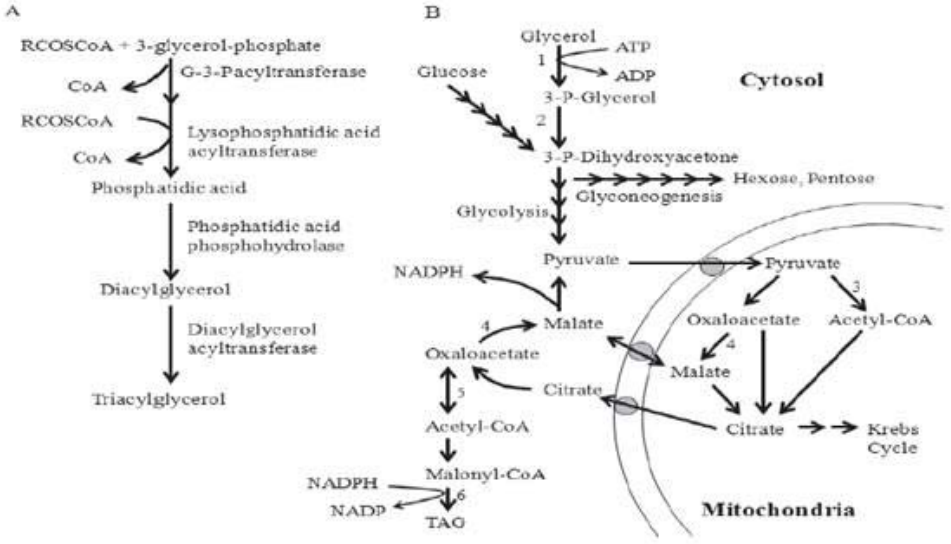
Yeasts	Palmitic acid (C16:0)	Palmitoleic acid (C16:1)	Stearic acid (C18:0)	Oleic acid (C18:1)	Linoleic acid (C18:2)	Linolenic acid (C18:3)
L. starkeyi	33.0	4.8	4.7	55.1	1.6	n.d.
R. toruloides	24.3	1.1	7.7	54.6	2.1	n.d.
C. albidus	16	1	3	56	n.d.	3
L. lipofera	37	4	7	48	3	n.d.
R. glutinis	18	1	6	60	12	2
T. pullula	15	n.d.	10	57	7	n.d.
Y. lipolytica	11	6	1	28	51	1

ที่มา: สาลินี ศรีวงษ์ชัย (2558)

2) การสร้างและสะสมไขมันในยีสต์

ส่วนมากการสะสมไขมันในสิ่งมีชีวิตจะอยู่ในรูปของไตรเอซิลกลีเซอรอล ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีขั้วไม่ละลายน้ำ การเก็บสะสมไขมันในรูปนี้มีข้อดี เพราะถูกออกซิไดส์ได้น้อย มีค่าพลังงานสะสมสูง TAGs จะพบมากในยูคาริโอต (eukaryote) ในพืชจะมีการสะสม TAGs ในเมล็ด ส่วนในสัตว์จะสะสมในรูปของเซลอะดิโปไซต์ (adipocyte) โดยปกติไขมันจะมีการสะสมเมื่อเซลล์ได้รับปริมาณอาหารที่มากเกินพอ แต่เมื่อขาดแคลนอาหาร ไขมันที่สะสมไว้จะถูกเคลื่อนย้ายไปใช้เป็นพลังงาน เนื่องจากกระบวนการผลิตไขมันเป็นกระบวนการพื้นฐานของทุกสิ่งมีชีวิต แต่สิ่งมีชีวิตที่มีการเก็บสะสมไขมันมากกว่าร้อยละ 20 โดยน้ำหนักแห้ง จะเรียกว่าพวกมีปริมาณไขมันสูง (oleaginous organisms) กระบวนการสะสมไขมันในเซลล์ในรูปของไตรเอซิลกลีเซอรอลเกิดได้จากสองกระบวนการใหญ่ ดังแสดงในภาพที่ 2-2 (1) การนำเข้าของสับเสรตกลีเซอรอล (*ex novo* accumulation pathway) และ (2) การสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ (*de novo* synthesis) การสังเคราะห์ไขมันเป็นปฏิกิริยาต่อเนื่องโดยจะเริ่มจากอะซิทิลโคเอเปลี่ยนไปเป็นกลีเซอรอลทรีฟอสเฟต (glycerol-3-phosphase) หรือไดไฮดรอกซีอะซิโทนฟอสเฟต (dihydroxyacetonephosphaste) ซึ่งผลผลิตที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมนี้จะได้กรดไขมันอิสระและถูกเปลี่ยนไปเป็นอนุพันธ์ต่างๆเช่นฟอสโฟลิปิด (phospholipids) หรือไตรเอซิลกลีเซอรอล ส่วนกระบวนการนำเข้ากลีเซอรอลจากภายนอกจะต้องมีการเปลี่ยนกลีเซอรอลเป็นกลีเซอรอลทรีฟอสเฟตก่อน

เพื่อสามารถนำเข้าเซลล์ได้จากนั้นก็จะถูกเปลี่ยนไปเป็นไดไฮดรอกซอะซีอะซิโทนฟอสเฟต เพื่อสร้างไตรเอซิลกลีเซอรอลต่อไป (มาลินี ศรีอริยนันท์ และคณะ, 2557)

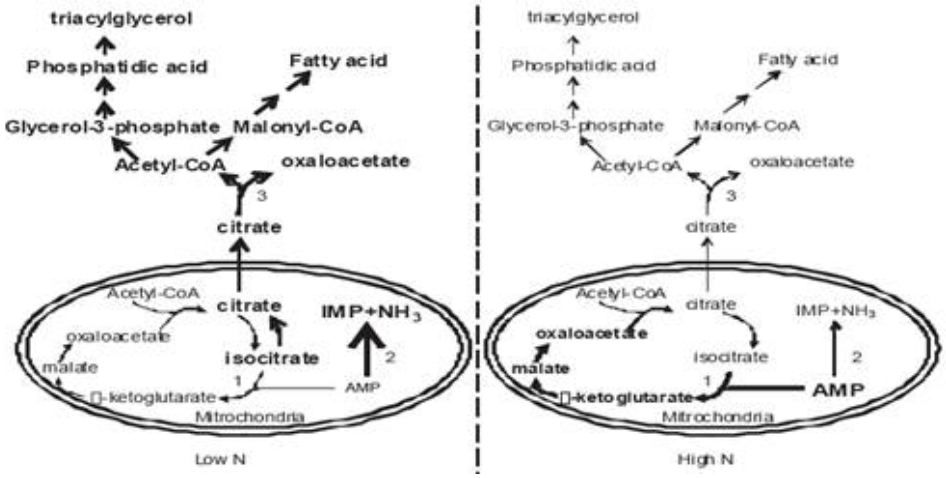


ภาพที่ 2-2 กลไกการสร้าง TAG; *ex novo* accumulation pathway (A) *de novo* synthesis (B)
ที่มา: มาลินี ศรีอริยนันท์ และคณะ (2557)

3) กลไกการสร้างไขมันในยีสต์

กลไกการผลิตไขมันในยีสต์ไขมันสูงยีสต์ชนิดที่มีปริมาณไขมันสูงมีกลไกการผลิตไขมันเริ่มต้นจากกรดซิตริคในกระบวนการไตรคาร์บอกซิลิกเอซิดไซเคิล (tricarboxylic acid cycle) ดังแสดงในภาพที่ 2-3 เป็นผลของไอโซซิเตรตดีไฮโดรจีเนส (isocitrate dehydrogenase) ซึ่งจะต้องใช้อะดีโนซีนโมโนฟอสเฟต (adenosine monophosphase(AMP)) โดยจะมีเอเอ็มพีดีอะมิเนส (AMP desaminase) ที่จะถูกผลิตมากในสภาวะที่เซลขาดไนโตรเจน ทำหน้าที่เปลี่ยนอะดีโนซีนโมโนฟอสเฟตไปเป็นอิโนซีนไฟว์โมโนฟอสเฟต (inosine-5-monophosphate) และแอมโมเนีย ซึ่งแอมโมเนียนั้นจะทำหน้าที่เป็นแหล่งไนโตรเจนของเซลล์ในภาวะขาดแคลนสารอาหารดังกล่าวในกรณีที่เซลล์เกิดภาวะขาดแคลนไนโตรเจนอะดีโนซีนโมโนฟอสเฟตจะถูกย่อยสลายเป็นจำนวนมากเพื่อผลิตแอมโมเนียมาใช้ ทำให้การไอโซซิเตรตดีไฮโดรจีเนสทำงานได้น้อยและมีปริมาณสะสมของไอโซซิเตรตและกรดซิตริคสูงในไมโทคอนเดรีย จากนั้นกรดซิตริคจะเคลื่อนที่ไปยังไซโตซอล (cytosol) แล้วจะถูกเปลี่ยนเป็นออกซาโลอะซิเตต (oxaloacetate) และอะซิติลโคเอ ด้วยการทำงานของเอนไซม์เอทีพีซิเตรตไลเอส (ATP citrate lyase) นั่นหมายความว่าหากมีปริมาณอะซิติลโคเอสูงก็จะมีการสังเคราะห์กรดไขมันและไตรเอซิลกลีเซอรอลสูงตามไปด้วย ส่วนในพวกยีสต์ชนิดที่มีปริมาณไขมันต่ำ เช่น *Saccharomyces cerevisiae*ไม่มีการผลิตเอทีพีซิเตรตไลเอส

ถึงแม้จะมีการสะสมกรดซิตริคมากก็จะไม่มีการสะสมของอะซิติลโคเอสูง (มาลินี ศรีอริยนันท์ และคณะ, 2557)



ก. **ข.**

ภาพที่ 2-3 ยีสต์ไขมันสูงที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนต่ำ (ก.) ไนโตรเจนสูง (ข.)
ที่มา: มาลินี ศรีอริยนันท์ และคณะ (2557)

11. แหล่งอาหารสำหรับยีสต์

เซลล์จุลินทรีย์สามารถเพิ่มจำนวนจากการเพาะเลี้ยงในสารอาหารที่ธรรมดาๆ โดยภายในเซลล์ของจุลินทรีย์มีวิถีสำหรับเมแทบอลิซึมสารอาหารเป็นจำนวนมาก รวมทั้งมีเอ็นไซม์จำนวนเป็นหลายชนิดที่เร่งปฏิกิริยาในวิถีเหล่านี้ทำให้เซลล์เกิดเมแทบอลิซึมออย่างสมดุลไม่มีผลผลิตใดของวิถีที่มากหรือน้อยเกินไปจากที่เซลล์ต้องการ ความเข้าใจเกี่ยวกับความต้องการสารอาหาร และการควบคุมการขนส่งสารอาหารที่มีความสำคัญสำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์ไม่เพียงเฉพาะในห้องปฏิบัติการแต่ยังช่วยหาสภาวะที่เหมาะสม (optimization) ของกระบวนการหมักในอุตสาหกรรมด้วย สำหรับการเจริญและพัฒนาของยีสต์นั้นยีสต์ต้องการสารอาหารซึ่งทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงาน แหล่งคาร์บอน รวมทั้งธาตุอาหารหลัก (major element) อื่นๆ ได้แก่ ไฮโดรเจน ออกซิเจน ไนโตรเจน ซัลเฟอร์และฟอสฟอรัส นอกจากนี้ยังต้องการสารอาหารบางชนิดในปริมาณค่อนข้างมากธาตุอาหารเหล่านั้นจัดเป็น macroelement ประกอบด้วย แมกนีเซียม และโพแทสเซียม ในขณะที่ธาตุอาหารบางชนิดยีสต์ต้องการในปริมาณต่ำ ไดแก่ แคลเซียม แม็กนีเซียม สังกะสี นิเกิล โคบอลต์และโบดีนัม ยิ่งไปว่านั้นยีสต์ ยังต้องการสารประกอบบางชนิดเพื่อต้องการทำหน้าที่เป็น growth factor เช่น วิตามิน พิวรีน (purine) ไพริมิดีน (pyrimidine) นิวคลีโอไทด์ (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

1) คาร์บอน

ภายในเซลล์ยีสต์มีคาร์บอนประมาณร้อยละ 50 ของน้ำหนังแห้งเซลล์ ยีสต์เป็นคีโมออร์กาโนไทรฟ (chemoorganotroph) ซึ่งต้องใช้แหล่งประกอบสารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ส่วนใหญ่สารอินทรีย์ที่ใช้คือน้ำตาล กลูโคสเป็นน้ำตาลที่ยีสต์ทุกชนิดสามารถเมแทบอลิซึมได้ ยีสต์บางชนิดสามารถเมแทบอลิซึมกลูโคสโดยการหมักได้ด้วย โดยปกติถ้ายีสต์ชนิดใดไม่สามารถหมักกลูโคสจะไม่สามารถหมักฟรุกโทสและแมนโนสด้วย แต่กลูโคสอาจไม่ได้เป็นน้ำตาลที่เกิดเมแทบอลิซึมได้อย่างประสิทธิภาพที่สุดในยีสต์ทุกชนิด โดยปกติในธรรมชาติกลูโคสจะไม่ได้มีอยู่อย่างอิสระแต่อยู่ในรูปของพอลิเมอร์จำพวกเซลลูโลส แป้ง และพอลิแซ็กคาร์ไรด์อื่น อีกทั้งยังปกติกลูโคสไม่ได้ใช้เป็นซับสเตรตสำหรับการหมักในอุตสาหกรรมโดยซับสเตรตสำหรับการหมักในอุตสาหกรรมชนิดที่เป็นน้ำตาลหมักเป็นมอลโตสซูโครสฟรุกโตสไซโลสและแลกโตส นอกจากนั้นกลูโคสมักแสดงการกดดัน (repression) และมีผลยับยั้ง (inhibitory effect) การแอสซิมิเลตน้ำตาลอื่นของยีสต์ (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

2) ไนโตรเจน

ยีสต์มีไนโตรเจนภายในเซลล์ประมาณร้อยละ 10 โดยน้ำหนักแห้ง ไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบของอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์ที่มีปริมาณมากรองมาจากคาร์บอน สารหลายชนิดสามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ โดยแหล่งไนโตรเจนที่มีโมเลกุลขนาดเล็กและใช้ได้ง่าย เช่น แอมโมเนียไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมไนเตรต (NH_3) แอมโมเนียมคลอไรด์และแอมโมเนียมซัลเฟตมักใช้ในอุตสาหกรรมการหมักโดยยีสต์ โดยเฉพาะแอมโมเนียมซัลเฟตมักใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงยีสต์ เพราะนอกจากให้ไนโตรเจนแล้วยังให้ซัลเฟตด้วย ยีสต์บางชนิดใช้ไนเตรต เช่น *Citeromyces* และบางสายพันธุ์ของ *Pichia* และ *Candida* ในขณะที่บางชนิดไม่ใช้ไนเตรต เช่น *Debaryomyce, Kluyveromyces, Sassharomyces* และบางสายพันธุ์ของ *Pichia* และ *Candida* ยีสต์ที่ใช้ไนเตรตได้อาจใช้ไนเตรตที่มีความเข้มข้นต่ำกว่าความเข้มข้นที่เป็นพิษกับยีสต์ได้ นอกจากอินทรีย์ไนโตรเจนแล้วยังมีอินทรีย์ไนโตรเจนหลายชนิด เช่น กรดอะมิโนเพปไทด์พิวรีนและเอมีนใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนของยีสต์บางชนิดได้ (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

ยีสต์ไขมันสูงจะสร้างไขมันภายในเซลล์ได้ในปริมาณสูงขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น แหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจน อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง ปริมาณออกซิเจน ความเข้มข้นของแร่ธาตุและเกลืออนินทรีย์ เป็นต้น

2.1) อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจน

อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจน เป็นปัจจัยที่สำคัญมากสำหรับการสร้างไขมันของยีสต์ไขมันสูง ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนสูงปริมาณไขมันในเซลล์ของยีสต์จะต่ำ Papanikolaou *et al.* (2004) รายงานว่า เมื่ออัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เพิ่มขึ้นจาก 83.5 ถึง 133.5 ทำให้น้ำมันในเซลล์ของ *Cunninghamella echimulata* และ

Mortierella isabellina เพิ่มขึ้น โดย *C. echimulata* เพิ่มจากร้อยละ 36 ถึง 47 ของน้ำหนักแห้ง และ *M. isabellina* ร้อยละ 50 ถึง 56 ของน้ำหนักแห้ง

2. 2) แหล่งไนโตรเจน

ชนิดของแหล่งไนโตรเจน มีอิทธิพลต่อการเจริญและการสร้างน้ำมันในเซลล์ของยีสต์ไขมันสูง ไม่ว่าจะเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และไนโตรเจนอนินทรีย์ ไนโตรเจนอนินทรีย์จะดีสำหรับการเจริญเพื่อการสร้างมวลชีวภาพ ในขณะที่แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์จะดีสำหรับการสร้างน้ำมันในเซลล์ของยีสต์ไขมันสูง Zhao *et al.* (2008) แสดงให้เห็นว่า การเติมยีสต์เอ๊กซ์แทร็กซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เพาะเลี้ยงยีสต์ไขมันสูง ทำให้สร้างมวลชีวภาพ 17 กรัมต่อลิตร และน้ำมันร้อยละ 44.6 ของน้ำหนักแห้ง

2.3) ความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตามปกติ ยีสต์ไขมันสูงจะสร้างไขมันภายในเซลล์ได้ในช่วงความเป็นกรดด่างที่กว้างมาก การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลเล็กน้อยต่อการสร้างไขมัน *Rhodotorula glutinis* IIP-30 เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีการปรับความเป็นกรดด่างในช่วง 3.0 ถึง 6.0 พบว่า ไขมันที่สร้างภายในเซลล์จะลดลง เมื่อค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นกรด (Johnson *et al.,* 1992)

2.4) ความเข้มข้นของแร่ธาตุ

แร่ธาตุมีผลต่อการสะสมของไขมันภายในเซลล์ของยีสต์ไขมันสูง Li *et al.* (2006) รายงานว่า มวลชีวภาพและไขมันภายในเซลล์จะเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อมีการเติม Mg^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+} และ Ca^{2+} ในปริมาณที่เหมาะสม

2.5) ปัจจัยอื่นๆ

ออกซิเจนละลาย, อุณหภูมิและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง จะมีอิทธิพลต่อการเจริญและสร้างน้ำมันในเซลล์ของจุลินทรีย์น้ำมัน (El-Fadaly *et al.,* 2009; Liang *et al.,* 2006; Yan & Chen, 2003; Yi & Zheng, 2006).

12. อิทธิพลของสภาวะแวดล้อมต่อการผลิตชีวมวล

1) อุณหภูมิ

ปกติจุลินทรีย์จะเจริญเร็วขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจนถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ การเลี้ยงยีสต์ส่วนใหญ่มักบ่มที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส โดยการเจริญจะลดมากที่ 20 องศาเซลเซียส และไม่เจริญที่ 60-70 องศาเซลเซียส (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

2) พีเอช

พีเอชมีผลต่อกิจกรรมทางชีวภาพของเซลล์น้อยกว่าอุณหภูมิเพราะว่าเซลล์สามารถควบคุมความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนภายในเซลล์ได้อย่างดีเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงพีเอชภายนอกเซลล์ พีเอชของอาหารภายนอกอาจมีผลต่อโครงสร้างและสภาพให้ซึมผ่านได้ของเซลล์ (cell permeability) พีเอชมีบทบาทช่วยลดการปะปนของจุลินทรีย์อื่นในระหว่างการหมัก โดยปกติอาหารที่ใช้สำหรับการเจริญของยีสต์มีพีเอชอยู่ในช่วง 4-5 (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

3) ออกซิเจนละลาย

ออกซิเจนทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในลูกโซ่ขนส่งอิเล็ตรอนและทำหน้าที่เป็น growth factor ของยีสต์ โดยร่วมในการสังเคราะห์กรดโอลีอิก (oleic acid) เออร์กอสเตรอลและกรดนิโคตินิกซึ่งส่งเสริมการเจริญของยีสต์ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

4) คาร์บอนไดออกไซด์

S. cerevisiae ต้องการคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้นต่ำสำหรับกระบวนการบางอย่างในเซลล์ เช่น การสร้างสารประกอบสี่คาร์บอน มีรายงานว่าการใช้คาร์บอนไดออกไซด์เพียง 2.5 เปอร์เซ็นต์ของอากาศทั้งหมดสามารถเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้อากาศ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญของยีสต์คือ 5 เปอร์เซ็นต์ของอากาศทั้งหมด (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สุดาทิพย์ จันทร กุลวดี พิศลยบุตร และรินรดา รัตนพรรณทอง (2556) ศึกษาการผลิตโอลิโกแซคคาร์ไรด์จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร 5 ชนิด ได้แก่ กากอ้อย กากกาแฟ กากถั่วเหลือ กากมะพร้าว และเปลือกมันฝรั่ง ด้วยสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบจาก *Penicillium oxalicum* KUB-SN2-1 โดยเปรียบเทียบผลการศึกษาระหว่างปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ระหว่างการปรับสภาพและไม่ปรับสภาพ ซึ่งการปรับสภาพเป็นการใช้กรดร่วมกับการใช้ความร้อน ผลการวิจัยพบว่ากากกาแฟปรับสภาพให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดเท่ากับ 51.33$\pm$4.47 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 36 ชั่วโมง ในขณะที่เปลือมันฝรั่งที่ไม่ผ่านการปรับสภาพให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดที่เวลา 18 ชั่วโมง เท่ากับ 44.67$\pm$4.23 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนั้นเมื่อวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ได้จากการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยวิธี thin layer chromatography (TLC) พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน ผลิตภัณฑ์ที่ได้ประกอบด้วยแมนโนส น้ำนาลแมนโนไบโอส น้ำตาลที่มีขนาดโมเลกุลระหว่างแมนโนไบโอสและแมนโนไตรโอส และน้ำตาลที่มีขนาดใหญ่กว่าแมนนาไตรโอส

วัชรี คตินนท์ และเจนจิรา ภูริรักษ์พิติกร (2556) ศึกษาการปรับสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ เปลือกข้าวโพดและเปลือกมะพร้าวด้วยวิธีการใช้ของเหลวไอออนิก ทั้งนี้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพร้อยละการคืนกลับของน้ำตาลกลูโคสโดยของเหลงไอออนิกที่ใช้ในการศึกษามี 2 ชนิด คือ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียมคลอไรด์ (1-ethyl-3-methylimidazolium chloride, BmimCl) และ 1-เอทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียมอะซิเตต (1-ethyl-3-methylimidazolium acetate, EmimOAc) ภายหลังจากที่วัสดุผ่านการปรับสภาพแล้วจะถูกนำไปย่อยด้วยเอนไซม์โดยเอนไซม์ที่ใช้คือ Celluclast 1.5L และ Novozyme 188 ซึ่งพบว่าสภาวะการปรับสภาพที่มีประสิทธิภาพสูงสุดสำหรับเปลือกข้าวโพดและเปลือกมะพร้าวในการช่วยเพิ่มปริมาณน้ำตาลกลูโคสในรูปของร้อยละคืนกลับสูงสุดคือ การใช้ของเหลวไอออนิกชนิด EmimOAc ปรับสภาพที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งจะให้ผลร้อยละคืนกลับน้ำตาลกลูโคสสูงสุดที่ 68.2 และ 62.8 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการปรับสภาพดังกล่าวสามารถลดปริมาณลิกนินที่มีอยู่ในโครงสร้างของเปลือกข้าวโพดและเปลือกมะพร้าวได้มากถึงร้อยละ 9.2 และ 14.6 ตามลำดับ

พิชามญชุ์ แดงพราม และสุดาทิพย์ จันทร (2556) ศึกษาอิทธิพลของชนิดและปริมาณของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่อการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบจาก *Pennicilium oxalicum* KUB-SN2-1 พบว่า สารละลายเอนไซม์สกัดหยาบชนิดออกนอกเซลล์จาก *P. oxalicum* KUB-SN2-1 ประกอบด้วยเซลลูเลส ไซลาเนสและแมนนาเนสที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 2.82+0.17 (เมื่อใช้คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสเป็นสับสเตรต) 1.50$\pm$0.04 (เมื่อใช้เบริ์ชทวูดไซแลนเป็นสับสเตรต) และ 36.01$\pm$0.13 (เมื่อใช้โลคัสบีนกัมเป็นสับสเตรต) หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นต้น วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร 5 ชนิด คือ กากกาแฟ กากชานอ้อย กากถั่วเหลือง กากเนื้อมะพร้าวและเปลือกมันฝรั่ง ถูกใช้เป็นสับสเตรตสำหรับการผลิตน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบดังกล่าว โดยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรแต่ละชนิดละลายอยู่ในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 4.0 บ่มกับสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 60 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเมื่อทำการย่อยากากเนื้อมะพร้าวนาน 30 ชั่วโมงมีปริมาณสูงที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 7.51$\pm$0.52 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเมื่อย่อยากากกาแฟ เปลือกมันฝรั่ง กากชานอ้อยและกากถั่วเหลืองมีค่าเท่ากับ 3.35$\pm$0.16 (48 ชั่วโมง) 3.31$\pm$1.43 (48 ชั่วโมง) 4.10$\pm$0.40 (48 ชั่วโมง) 2.32$\pm$0.15 (48 ชั่วโมง) มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร พบว่า ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรของกากเนื้อมะพร้าว กากกาแฟ เปลือกมันฝรั่งและกากชานอ้อย ให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด ในขณะที่ 8 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรของกากถั่วเหลืองให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด จากนั้นวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นพบว่า ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือ คือ แมนโนส กากาชานอ้อยและเปลือกมันฝรั่งคือกลูโคส ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยกากเนื้อมะพร้าวและกากกาแฟ คือน้ำตาลที่ยังไม่ทราบชนิดแน่ชัด

Li et al. (2011) ศึกษาการปรับสภาพก้อนเชื้อเห็ดเก่าด้วยกระบวนการการใช้กรดย่อยสลายสองขั้นตอน (two-step acid hydrolysis) โดยในขั้นตอนแรก ลิกโนเซลลูโลสจะถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยการใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้นทั้ง one-step acid hydrolysis และ/หรือ two-step acid hydrolysis จากนั้น น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จะถูกนำไปแยกด้วยวิธีการแลกเปลี่ยนประจุ (anion exchange resin) และพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดได้จาก one-step acid hydrolysis ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เวลา 20 นาที กรดซัลฟูริกร้อยละ 55.0 ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 74.49 ส่วน two-step acid hydrolysis ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เวลา 20 นาที กรดซัลฟูริกร้อยละ 6.9 เได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 96.79

Liu et al. (2013) ศึกษาผลของอุณหภูมิและความเป็นกรดด่าง (pH) ของกรดและด่างต่อโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลสของก้อนเชื้อเห็ดเก่าพบว่า การปรับสภาพก้อนเชื้อเห็ดเก่าด้วยวิธีการใช้อุณหภูมิต่ำและด่างร่วมกัน (Low temperature alkali; LTA) และอุณหภูมิสูงและกรดร่วมกัน (High temperature acid; HTA) ให้ผลที่แตกต่างกัน โดยการปรับสภาพด้วยวิธี LTA สามารถกำจัดลิกนินได้สูงร้อยละ 67.6 และความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยสลายร้อยละ 85.6 ซึ่งดีกว่าวิธี HTA ในขณะที่ การปรับสภาพด้วยวิธี HTA สามารถลดปริมาณของเฮมิเซลลูโลสร้อยละ 85.3 ได้ดีกว่า แต่ความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยลดลงร้อยละ 43.5 โครงสร้างทางกายภาพของก้อนเชื้อเห็ดเก่าถูกทำลายเมื่อปรับสภาพด้วย LTA และ HTA ปริมาณลิกนินจากวิธีการปรับสภาพก้อนเชื้อเห็ดเก่าด้วย LTA น่าที่จะให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสได้มากกว่า จากการศึกษาครั้งนี้ การปรับสภาพด้วยวิธี LTA น่าจะมีศักยภาพในการลดค่าใช้จ่ายในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรได้

Kapu et al. (2012) ศึกษาการพัฒนาการผลิตไบโอเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพก้อนเชื้อเห็ดเก่าด้วยกระบวนการปรับสภาพด้วยกรดเจือจางและการใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายก้อนเชื้อเห็ดเก่าที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบมีพอลิแซ็กคาไรด์ประมาณร้อยละ 30 โดยน้ำหนัก/น้ำหนัก และมีกลูแคนร้อยละ 66 โดยน้ำหนัก/น้ำหนัก เมื่อผ่านกระบวนการปรับสภาพจากวิธีข้างต้นในสภาวะที่มี PEG 6000 ได้น้ำตาลกลูแคนร้อยละ 97 โดยน้ำหนัก/น้ำหนัก และน้ำตาลไซแลนร้อยละ 44 โดยน้ำหนัก/น้ำหนัก นอกจากนี้ PEG 6000 ลดการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส (cellulose) ร้อยละ 77

Zhu et al. (2012) ศึกษาการสกัด การทำบริสุทธิ์และการต้านกิจกรรมของแบคทีเรียจากพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากก้อนเชื้อเห็ดเก่า ซึ่งสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์มีชื่อว่า PL ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและองค์ประกอบของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) จะถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีฟีนอล-กรดซัลฟูริก (phenol-sulfuric acid) แคปพิลารี อิเล็กโตรโฟลิซิส (capillary electrophoresis) และอินฟาเรดสเปคโตรสโคปี (infrared spectroscopy) ผลการวิเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์ดิบ (crude polysaccharide) ร้อยละ 25.8 จากก้อนเชื้อเห็ดเก่า ประกอบด้วย 2 ส่วน (PL1 และ PL2) องค์ประกอบหลักเป็นน้ำตาลกลูโคส แรมโนสและแมนโนส อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 1:3.13:1.16 ทั้ง PL1 และ PL2 มีโครงสร้างเป็นไกลโคไซดิก (glycosidic structure) และสเปกตรัมของ FT-IR ของ PL2 และเลนติแนน

(lentinan) มีความคล้ายคลึงกัน และเมื่อทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย (minimal inhibitory concentrations (MICs) ของพอลิแซ็กคาไรด์จากก้อนเชื้อเห็ดเก่า พบว่าสามารถยับยั้ง *Escherichia coli* ได้ดีที่สุด

Wu et al. (2013) ศึกษาวิธีการปรับสภาพก้อนเชื้อเห็ดเก่าเพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งจะนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus thruringiensis* (Bt.) ด้วยวิธีดังต่อไปนี้ 1) กรดซัลฟูริก (sulfuric acid) ร้อยละ 0.5-2.0 โดยปริมาตร/ปริมตร (% v/v) 50-121 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง 2) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) ร้อยละ 0.5-2.0 โดยน้ำหนัก/ปริมตร (% w/v) 50-121 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง 3) แคลเซียมไฮดรอกไซด์ (calcium hydroxide) ร้อยละ 0.2-4.0 โดยน้ำหนัก/ปริมตร (% w/v) 50-121 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง และ 4) hot water 50-121 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง จากนั้นตามด้วยวิธีการปรับสภาพด้วยเอนไซม์ไฮดรอไลซิส (enzymatic hydrolysis) และการหมัก (fermentation) พบว่า เซลลูโลสจะถูกย่อยสลายได้สูงที่สูดเมื่อใช้ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกเท่ากับร้อยละ 2 โดยปริมาตร/ปริมาตร อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด 284.24 กรัมต่อกิโลกรัมก้อนเชื้อเห็ดเก่า

Zhu et al. (2013) ได้ศึกษาการปรับสภาพก้อนเชื้อเห็ดเก่าด้วยการใช้ด่างและกรดร่วมกัน ซึ่งด่างที่ใช้ ได้แก่ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ปูนขาว (lime) และแอมโมเนีย (NH_3) จะไปส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์แซ็กคาไรด์ (enzymatic saccharification) พบว่า ภายใต้สภาวะที่ดีที่สุดในการปรับสภาพก้อนเชื้อเห็ดเก่า (1 M KOH 80 องศาเซลเซียส 90 นาที; 1 M lime 80 องศาเซลเซียส 120 นาที; 10 M NH_3 70 องศาเซลเซียส 120 นาที) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมด (TRS) เท่ากับ 258.6, 204.2 และ 251.2 มิลลิกรัมต่อกรัม คิดเป็น 6.15, 4.86 และ 5.98 เท่าของก้อนเชื้อเห็ดเก่าที่ไม่ได้ปรับสภาพ การปรับสภาพก้อนเชื้อเห็ดเก่าด้วยวิธีการใช้ด่างและกรดร่วมกัน (combined alkali and acid, CAA) และตามด้วยการใช้เอนไซม์ไฮดรอไลซิส (enzymatic hydrolysis) นับเป็นวิธีการใหม่ที่สามารถลดต้นทุนในการผลิตและปัญหาสิ่งแวดล้อม ก้อนเชื้อเห็ดเก่าหลังจากผ่านกระบวนการนี้แล้ว สามารถนำไปทำเป็นปุ๋ยชีวภาพได้ด้วยการทำงานของ *Pichia farinose* FL7 ต่อไปได้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุทดลอง

1. ตัวอย่างก้อนเชื้อเห็ดเก่าของเห็ดนางรม

ก้อนเชื้อเห็ดเก่าของเห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) และก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางนวล *(Pleurotus djamor)* ที่ใช้ในการศึกษา เป็นวัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดของนิสิตคณะเทคโนโลยีทางการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว โดยทำการสุ่มเก็บก้อนเชื้อเห็ดเก่าจากโรงเรือนเพาะเห็ด ศูนย์การเรียนรู้เศรษฐกิจพอเพียงและสิ่งแวดล้อมศึกษา จังหวัดสระแก้ว

ก) **ข)**

ภาพที่ 3-1 ก) ตัวอย่างก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางนวล และ ข) โรงเรือนเพาะเห็ด ศูนย์การเรียนรู้เศรษฐกิจพอเพียงและสิ่งแวดล้อมศึกษา จังหวัดสระแก้ว

2. จุลินทรีย์

Rhodotorula mucilaginosa ซึ่งคัดแยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน โดยเก็บรักษาบนอาหาร yeast extract peptone dextrose (YPD) ผิวหน้าเอียง (slant) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อใหม่ (sub-culture) ทุกๆ 1 เดือน

ภาพที่ 3-2 ยีสต์ไขมันสูง *R. mucilaginosa* ที่คัดแยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน

3. สารเคมี

รายชื่อสารเคมีที่ใช้ในการศึกษา แสดงในตารางที่ 3-1

ตารางที่ 3-1 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

Chemical name	Chemical formula	Source
Acetone	C_3H_6O	Hi-Media
Acetic acid	$C_2H_4O_2$	Hi-Media
Calcium chloride	$CaCl_2$	UNILAB
Calcium carbonate	$CaCO_3$	Ajax Finechem
Chloroform	$CHCl_3$	UNIVAR
Copper (II) sulfate	$CuSO_4.5H_2O$	UNIVAR
3, 5-dinitrosalicylic acid	$(O_2N)_2C_6H_2$-2-$(OH)CO_2H$	Hi-Media
Calcium carbonate	$CaCO_3$	Ajax Finechem
D-glucose	$C_6H_{12}O_6$	Ajax Finechem
Magnesium sulfate heptahydrate	$MgSO_4.7H_2O$	UNIVAR
Manganese (II) chloride monohydrate	$MnSO_4.H_2O$	UNIVAR
Methanol	CH_3OH	UNIAR
Potassium dihydrogenphosphate	KH_2PO_4	CARLOERBA
Sodium Chloride	NaCl	Hi-Media
Sodium hydroxide	NaOH	Hi-Media
Sodium potassium tartrate	$KNaC_4H_4O_6{\cdot}4H_2O$	Hi-Media
Sulfuric acid	H_2SO_4	Hi-Media
Zinc sulfate	$ZnSO_4$	UNIVAR

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- yeast extract peptone dextrose agar (YPDA)
- yeast extract peptone dextrose broth (YPD)
- lipid accumulation medium (LAM)

5. เครื่องมือและอุปกรณ์

5.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา มีดังนี้

1) Autoclave: Isuzu model 20-5030/5040

2) Centrifuge: Beckman Coulter model Allegra™ X-22R Centrifuge

3) Electronic balance: Mettler Toledo model AX205 Data Range

4) Hot plate and stirrer: Yhana model HMS-10

5) Incubator: Shel-lab model 2020

6) Incubator shaker: Lab-line model 3530-2, Ratex model OM11

7) Magnetic stirrer: IKA MAG model Reo

8) pH Meter: Hanna model(pH211) Microprocessor pH meter

9) Sieve 45 μm

10) Shaking water bath: Memmert

11) Suction pump

12) Reflux set

13) Spectrophotometer UV/VIS: Hitachi

5.2 เครื่องแก้ว

1) ขวดรูปชมพู (Erlenmeyer flask)

2) หลอดทดลอง (test tube)

3) ปิเปต (pipette)

4) บิกเกอร์ (beaker)

5) กระบอกตวงแก้ว (cylinder)

6) จานเพาะเชื้อ (petri dish)

7) แท่งแก้วสามเหลี่ยม (spreader)

8) พาสเจอร์ปิเปต (pasteur pipette)

5.3 อุปกรณ์

1) ลูปเขี่ยเชื้อ (loop)

2) ตะเกียงบุนเสน (bunsen burner)

3) หลอดเซนติฟิวพลาสติก (centrifuge tube)

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยแบ่งเป็น 2 การทดลองหลัก คือ

การทดลองที่ 1 รายละเอียดดังนี้

ตอนที่ 1 หาองค์ประกอบของก้อนเชื้อเห็ดเก่า

1. การเตรียมวัตถุดิบ

ตัวอย่างก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางรม (*P. ostreatus*) และก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางนวล *(P. djamor)* ที่ใช้เป็นวัตถุดิบที่เตรียมในครั้งเดียวกันและใช้ตลอดงานวิจัย นำมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้น ก้อนเชื้อเห็ดเก่าแต่ละชนิดมาทำให้มีขนาดเล็กลงด้วยเครื่องปั่น (Blender) และแยกด้วยตะแกรงร่อน (sieve plate) ขนาด 45 ไมโครเมตร (พิชามญชุ์ แดงพราม และคณะ, 2556) เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

2. วิเคราะห์หาปริมาณของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน

2.1 วิเคราะห์หาปริมาณโฮโลเซลลูโลสด้วยวิธี acid chlorite ตามวิธีของ Browing (1963)

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางรมประมาณ 3 กรัม ใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 160 มิลลิลิตร กรดอะซิติก 0.5 มิลลิลิตร และโซเดียมคลอไรด์ 1.5 $\pm$ 0.1 กรัม ตามลำดับ นำขวดก้นกลมไปตั้งในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่มีอุณหภูมิประมาณ 70 - 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยเขย่าขวดอย่างสม่ำเสมอ หลังจากครบ 1 ชั่วโมง เติมกรดอะซิติก 0.5 มิลลิลิตร และโซเดียมคลอไรด์ 1.5 กรัม ลงในสารละลายที่ยังร้อนอยู่แล้วเขย่า หลังจากครบ 2 ชั่วโมง และ 3 ชั่วโมง เติมกรดอะซิติกและโซเดียมคลอไรด์ตามปริมาตรข้างต้น เมื่อครบ 1 ชั่วโมง นำขวดก้นกลมมาวางในอ่างน้ำแข็งจนกระทั่งสารละลายในขวดมีอุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส แล้วนำสารละลายมากรองล้างตะกอนด้วยน้ำเย็นและอะซีโตน หลังจากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส แล้วนำมาชั่งน้ำหนักและคำนวณหาปริมาณเฮโลเซลลูโลสจากสมการ

$$\% \text{ โฮโลเซลลูโลส} = \frac{\text{น้ำหนักแห้งของโฮโลเซลลูโลสหลังการอบ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักแห้งของตัวอย่างก้อนเชื้อเห็ดเก่า (กรัม)}} \times 100$$

2.2 วิเคราะห์หาปริมาณเซลลูโลสตามวิธี TAPPI (1999)

ชั่งตัวอย่างจากการวิเคราะห์หาโฮโลเซลูโลสหนัก 1.5 $\pm$ 0.1 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 40 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 75 มิลลิลิตร ลงไปโดยให้อุณหภูมิของสารละลายอยู่ที่ 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส พร้อมคนสารละลายจนกระทั่งเยื่อกระจายสมบูรณ์ หลังจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์โดยให้ปริมาตรรวมของสารละลายเท่ากับ 100

มิลลิลิตร คนสารละลายต่อเป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำกลั่นลงในสารละลายปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วคนสารละลายต่อเป็นเวลา 30 นาที กรองสารละลายแล้วล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นและตามด้วยสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นำไปอบที่ 80 องศาเซลเซียส และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของเซลลูโลสจากสมการ

$$\% \text{ เซลลูโลส} = \frac{\text{น้ำหนักแห้งของเซลลูโลสหลังการอบ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักแห้งของตัวอย่างก้อนเชื้อเห็ดเก่า (กรัม)}} \times 100$$

2.3 วิเคราะห์หาปริมาณลิกนินตามวิธี TAPPI (2002)

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางรม 1.0 $\pm$ 0.1 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร และนำไปวางลงในอ่างน้ำควบคุมที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แล้วค่อยๆ เติม 72 เปอร์เซ็นต์กรดซัลฟูริกที่แช่เย็นอุณหภูมิ 10 – 15 องศาเซลเซียส ลงไป 15 มิลลิลิตร พร้อมคนอย่างสม่ำเสมอ ทุกๆ 15 นาที เพื่อให้ผสมกันดีขึ้น ปิดบีกเกอร์ด้วยกระจกนาฬิกา แล้วนำออกจากอ่างน้ำแข็งมาตั้งทิ้งไว้ที่อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 20 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พร้อมคนสารละลายอย่างสม่ำเสมอ เติมน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลมขนาด 1000 มิลลิลิตร แล้วเทสารละลายในบีกเกอร์ลงไปในขวดก้นกลม พร้อมทั้งเติมน้ำกลั่นลงไปจนถึงปริมาตร 575 มิลลิลิตร ทำการสกัดแบบไหลย้อนกลับ (reflux) สารละลายเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นเทสารละลายทั้งหมดใส่ในบีกเกอร์ขนาด 1000 มิลลิลิตร ตั้งบีกเกอร์ทิ้งไว้ 1 คืน แล้วนำไปกรองและล้างตะกอนด้วยน้ำร้อน นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส แล้วนำออกมาทำให้เย็นลงในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักพร้อมคำนวนหาเปอร์เซ็นต์ลิกนิน ตามสมการ

$$\% \text{ ลิกนิน} = \frac{\text{น้ำหนักแห้งของตะกอนหลังการอบ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักแห้งของตัวอย่างก้อนเชื้อเห็ดเก่า (กรัม)}} \times 100$$

2.4 การคำนวณหาปริมาณเฮมิเซลลูโลส

จากการวิเคราะห์หาปริมาณโฮโลเซลลูโลสและเซลลูโลสดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น สามารถนำมาคำนวณหาปริมาณเฮมิเซลลูโลสตามสมการ

$$\text{Hemicellulose} = \text{Holocellulose} - \text{Cellulose}$$

ตอนที่ 2 การปรับสภาพก้อนเชื้อเห็ดเก่าด้วยกระบวนการทางกายภาพและเคมี

1. การปรับสภาพก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางรมด้วยความร้อนชื้น

นำตัวอย่างก้อนเชื้อเห็ดเก่าหนัก 5 กรัม ผสมน้ำกลั่นด้วยอัตราส่วนของแข็งต่อของเหลว 1 : 10 และนำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ความดันบรรยากาศ เวลา 15 นาที จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการนึ่งด้วยความร้อนชื้นไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที (Wu et al., 2013) และเก็บสารละลายตัวอย่างใสส่วนบนไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS (พรรณราย ชื่นครุฑ และอัจฉรา แกล้วเกล้า, 2558)

2. การปรับสภาพก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางรมด้วยกรด

นำตัวอย่างก้อนเชื้อเห็ดเก่าหนัก 5 กรัม ผสมสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 1 ด้วยอัตราส่วนของแข็งต่อของเหลว 1 : 10 นำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง (Qiao et al., 2011) จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างไปทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้องและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที ทำการเก็บสารละลายตัวอย่างใสส่วนบนไปปรับความเป็นกรด-ด่างให้เป็นกลาง จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS ส่วนของแข็งที่เหลือให้ปรับสภาพกรดด่างเท่ากับ 7 และนำไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างก้อนเชื้อเห็ดเก่าต่อไป (Wu et al., 2013)

3. การปรับสภาพก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางรมด้วยด่าง

นำตัวอย่างก้อนเชื้อเห็ดเก่าหนัก 5 กรัม ผสมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 1 ด้วยอัตราส่วนของแข็งต่อของเหลว 1 : 10 นำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง (Qiao et al., 2011) จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างไปทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้องและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที ทำการเก็บสารละลายตัวอย่างใสส่วนบนไปปรับความเป็นกรดด่างให้เป็นกลาง จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS ส่วนของแข็งที่เหลือให้ปรับสภาพกรดด่างเท่ากับ 7 และนำไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างก้อนเชื้อเห็ดเก่าต่อไป (Zhu et al., 2013)

4. การปรับสภาพก้อนเชื้อเห็ดเก่าด้วยความร้อนชื้นร่วมกับสารเคมี

นำตัวอย่างก้อนเชื้อเห็ดเก่าหนัก 5 กรัม ผสมสารละลายกรดซัลฟูริกและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 1 ด้วยอัตราส่วนของแข็งต่อของเหลว 1 : 10 และนำไปนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดันเท่ากับ 20 ความดันบรรยากาศ เวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างไปทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้องและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที ทำการเก็บสารละลายตัวอย่างใสส่วนบนไปปรับความเป็นกรดด่างให้เป็นกลาง จากนั้นนำไปวิเคราะห์หา

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS ส่วนของแข็งที่เหลือให้ปรับสภาพกรดด่างเท่ากับ 7 และนำไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างก้อนเชื้อเห็ดเก่าต่อไป (Wu et al., 2013)

5. การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) จากการปรับสภาพก้อนเชื้อเห็ดเก่า

นำส่วนใสของสารละลายที่ได้จากการกรองจากกระบวนการปรับสภาพก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางรมและก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางนวลด้วยวิธีทางกายภาพและเคมีจากข้อ 1. ถึงข้อ 4. ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรเติมสารละลาย 3,5– dinitrosalicylic acid (DNS) 1.0 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วแช่ในน้ำเย็นทันทีนาน 5 นาที เติมน้ำกลั่น 10.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยเปรียบเทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส (จิดาภา ทิน้อย และคณะ, 2553)

การทดลองที่ 2 มีรายละเอียดดังนี้

1. การทำเชื้อตั้งต้น (starter)

นำโคโลนีของยีสต์ไขมันสูง *R. mucilaginosa* ที่คัดแยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน 1 ลูป (loop) ผสมลงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเพาะด้วยเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องด้วยความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที นาน 48 ชั่วโมง

2. การเพาะเลี้ยงไขมันสูง *R. mucilaginosa* ที่คัดแยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลนบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลง lipid accumulation medium (LAM) ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์จากการปรับสภาพก้อนเชื้อเห็ดเก่าเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตลิพิด

นำเชื้อตั้งต้นของยีสต์ไขมันสูง *R. mucilaginosa* ที่คัดแยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร (5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลง lipid accumulation medium (LAM) ปริมาตร 47.5 มิลลิลิตร ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางรมและเห็ดนางนวลที่สภาวะที่เหมาะสมในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0 เพาะบ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เวลา 120 ชั่วโมง จากนั้น วัดการเจริญ ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหลือและเก็บเซลล์เพื่อนำไปหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำมันที่สกัดได้และวิเคราะห์หาองค์ประกอบของกรดไขมัน

3. การวัดการเจริญของยีสต์ไขมันสูง

ทำการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง โดยปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (optical density: OD_{600})

4. การเก็บเกี่ยวเซลล์และการหาปริมาณน้ำหนักแห้งจากยีสต์ไขมันสูง

นำสารละลายเซลล์ยีสต์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 3 ครั้งจากนั้นนำเซลล์ยีสต์ผสมด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเทลงบนถ้วยระเหยที่ทราบน้ำหนักและนำไปอบข้ามคืนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนักถ้วยระเหยที่รวมกับเซลล์ยีสต์จนน้ำหนักจะคงที่ บันทึกน้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ไขมันสูง แล้วนำไปคำนวณหาชีวมวลแห้ง (Sriwongchai *et al.*, 2013)

$$\text{ชีวมวลแห้ง (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{ถ้วยระเหยที่ทราบน้ำหนักและแซลล์แห้ง (กรัม)} - \text{น้ำหนักถ้วยระเหย (กรัม)}}{\text{ปริมาตรที่เพาะเลี้ยง (ลิตร)}}$$

5. การสกัดลิพิดจากยีสต์ไขมันสูง

นำสารละลายเซลล์ยีสต์ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 20 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ด้านบนทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นเทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง นำตะกอนเซลล์ยีสต์ไปชั่งและบันทึกน้ำหนักเปียกที่ได้และนำมาสกัดน้ำมันโดยชั่งตะกอนเซลล์ยีสต์ระหว่าง 100 – 1,000 มิลลิกรัม เติมสารละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเมธานอลอัตราส่วน 2 ต่อ 1 (2 : 1) ปริมาตร 3.75 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (vortex) 15 นาที เติมสารละลายคลอโรฟอร์มปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร เขย่า 15 นาที และนำไปเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร เขย่า 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใสด้านล่างในหลอดทดลองที่ทราบนำหนักและนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้น นำหลอดทดลองที่แห้งแล้วมาชั่งน้ำหนักและบันทึกปริมาตรลิพิดที่ได้ แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณลิพิด (กรัมต่อลิตร) และปริมาณลิพิดทั้งหมดโดยน้ำหนักแห้ง (Sriwongchai *et al.,* 2013)

$$\text{ปริมาณลิพิด (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักลิพิดที่สกัดได้ (กรัม)}}{\text{ปริมาตรที่เพาะเลี้ยง (ลิตร)}}$$

$$\text{ปริมาณลิพิดทั้งหมดโดยน้ำหนักแห้ง (กรัมต่อกรัม)} = \frac{\text{น้ำหนักของลิพิด (กรัม)}}{\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)}} \times 100$$

6. การวิเคราะห์กรดไขมัน

วิเคราะห์หาชนิดของกรดไขมันตามวิธีของ Sriwongchai et al. (2012) ลิพิดทั้งหมดจะนำไปผ่านกระบวนการทรานซ์เอสเทอริฟิเคชั่น เพื่อให้เป็น methyl esters และนำไปวิเคราะห์หาชนิดของกรดไขมันด้วย GC/MSD ภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ถึง 260 องศาเซลเซียส ที่ 2 องศาเซลเซียสต่อนาที อุณหภมิของ injector คงที่ที่ 250 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของ detector เท่ากับ 280 องศาเซลเซียส ก๊าซตัวพา H_2 มีอัตราการไหล 2 มิลลิลิตร/นาที

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลด้วยการหาค่าความแปรปรวนแบบ One way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของชุดการทดลองในแต่ละพารามิเตอร์ด้วย Turkey's HSD (Honestly Significant Difference)

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากผลการวิจัย เมื่อทำการปรับสภาพตัวอย่างก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางรมและก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางนวลด้วยกระบวนการทางกายภาพและเคมี พบว่าการปรับสภาพก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางรมและก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางนวลด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 1 ร่วมกับอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ความดันบรรยากาศ เวลา 15 นาที ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 1,255 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 591 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพก้อนเชื้อเห็ดเก่าทั้งสองชนิดมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการผลิตลิพิดของยีสต์ไขมันสูง *R. mucilaginosa* ที่คัดแยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลนบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลง LAM ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0 และบ่มเพาะเลี้ยงแบบเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 120 ชั่วโมง พบว่ายีสต์ไขมันสูง *R. mucilaginosa* สามารถเจริญและผลิตลิพิดได้ โดยปริมาณชีวมวลแห้งเท่ากับ 1.08$\pm$0.07 กรัมต่อลิตร และ 0.53$\pm$0.02 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปริมาณลิพิดเท่ากับ 0.21$\pm$0.05 กรัมต่อลิตร และ 0.10$\pm$0.07 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และปริมาณลิพิดทั้งหมดเท่ากับร้อยละ 19.44 โดยน้ำหนักแห้ง และร้อยละ 17.18 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ส่วนองค์ประกอบของลิพิดที่สกัดได้มีกรดไขมันชนิดสายยาวเป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ กรดปาล์มิติก กรดสเตียริกและกรดโอเลอิกเช่นเดียวกับที่พบในน้ำมันพืช

5.2 อภิปรายผลการวิจัย

การปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสมีวัตถุประสงค์เพื่อการกำจัดลิกนินซึ่งมีสมบัติในการห่อหุ้มโครงสร้างของเซลลูโลสและเพื่อเพิ่มขนาดรูพรุนของตัววัตถุดิบและลดการเกิดผลึกของเซลลูโลส (cellulose crystallinity) ทำให้เอ็นไซม์สามารถเข้าถึงวัตถุดิบได้ง่ายขึ้น ช่วยลดค่าใช้จ่ายสำหรับใช้เอ็นไซม์ในการย่อยสลายเซลลูโลส (สุภาวดี ผลประเสริฐ, 2557) การปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสทำได้หลายวิธีการ เช่น ทางกล (บด ปั่นหรือทำให้มีขนาดเล็กลง) การให้ความร้อน ทางเคมี เช่น การใช้ด่างและการใช้กรด เป็นต้น (สุดาทิพย์ จันทร และคณะ, 2556) และทางชีวภาพ เช่น การใช้เอ็นไซม์ (รัชพล พะวงศ์รัตน์, 2558) ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการปรับสภาพตัวอย่างก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางรมและก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางนวลด้วยวิธีทางกายภาพ เคมีและทางกายภาพร่วมกับเคมี ซึ่งการ

ปรับสภาพก้อนเชื้อเห็ดเก่าด้วยวิธีทางกายภาพ โดยการใช้ความร้อนชื้นนั้น เป็นกระบวนการที่ไม่ต้องมีการเติมสารเคมีเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและใช้พลังงานต่ำ ซึ่งผลผลิตที่ได้หลังจากการปรับสภาพจะอยู่ในรูปแบบกึ่งแข็งกึ่งเหลว (slurry) โดยส่วนที่เป็นของแข็งส่วนใหญ่จะเป็นเซลลูโลส ส่วนของเหลวส่วนใหญ่จะเป็นเฮมิเซลลูโลสและเกิดน้ำตาลรีดิวซ์บางส่วน (รัชพล พะวงศ์รัตน์, 2558) ผลจากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางรมและก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางนวลก่อนการนำไปปรับสภาพ พบองค์ประกอบทางเคมีที่เป็นโครงสร้างหลัก ได้แก่ เซลลูโลส (ร้อยละ 32.02 และร้อยละ 24.83 ตามลำดับ) เฮมิเซลลูโลส (ร้อยละ 15.14 และร้อยละ 56.77 ตามลำดับ) และลิกนิน (ร้อยละ 21.05 และร้อยละ 22.33 ตามลำดับ) (ตารางที่ 4-1 และตารางที่ 4-2) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น เปลือกข้าวโพดและเปลือกมะพร้าว (วัชรี คตินนท์กุล และเจนจิรา ภูริรักษ์พิติกร, 2013) ก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดเข็มทอง (Wu et al., 2013) และก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดหอม (Kamei et al., 2014) ปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสที่มีอยู่ในตัวอย่างก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางรมและก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางนวลสามารถเปลี่ยนเป็นไปน้ำตาลรีดิวซ์ได้หลังจากการปรับสภาพด้วยความร้อนชื้น (ตารางที่ 4-1 และตารางที่ 4-2) ส่วนปริมาณลิกนินที่พบในโครงสร้างของตัวอย่างก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางรมและก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางนวลประมาณร้อยละ 20 สามารถขัดขวางการเข้าทำปฏิกิริยาในการเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้ เนื่องจากลิกนินทำหน้าที่ห่อหุ้มโครงสร้างของเซลลูโลส (พรรณราย ชื่นครุฑ และอัจฉรา แกล้วกล้า, 2558) ในการกำจัดหรือลดปริมาณของลิกนิน สามารถทำได้ด้วยวิธีการให้ความร้อนและเพิ่มระยะเวลาในการปรับสภาพ (สุภาวดี ผลประเสริฐ, 2557) และเมื่อทำการปรับสภาพตัวอย่างก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางรมและก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางนวลด้วยความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ความดันบรรยากาศ เป็นกระบวนการที่ทำให้เกิดการแยกเอาเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินออกจากกันได้ที่อุณหภูมิสูง (รัชพล พะวงศ์รัตน์, 2558) โดยส่วนของเฮมิเซลลูโลสจะเกิดการย่อยสลายและลิกนินจะถูกเปลี่ยนรูปไป และที่อุณหภูมิสูงจะเป็นการเพิ่มศักยภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (สุภาวดี ผลประเสริฐ, 2557) ส่วนความดันจะเป็นตัวควบคุมสถานะของน้ำในสภาวะของเหลวที่อุณหภูมิสูง โดยจะส่งผลต่อเฮมิเซลลูโลส ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพด้วยความร้อนชื้นของตัวอย่างก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางรมและก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางนวลที่อุณหภูมิและความดันต่างกันมีค่าแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจะขึ้นกับระยะเวลาอุณหภูมิ ขนาดของชิ้วมวลและความดัน (รัชพล พะวงศ์รัตน์, 2558)

การปรับสภาพตัวอย่างก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางรมและก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางนวลด้วยวิธีทางเคมี คือ การใช้สารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 1 มีผลไปทำให้โครงสร้างของลิกโนเซลลูโลสเปลี่ยนแปลงไป โดยจุดประสงค์ของการใช้กรดคือเพื่อให้ได้น้ำตาลในปริมาณที่สูงจากวัสดุลิกโนเซลลูโลส ในกระบวนการแปลงสภาพสามารถใช้ได้ทั้งกรดเข้มข้นและกรดเจือจางเพื่อเพิ่มของ

กระบวนการไฮโดรไลซีส (รัชพล พะวงศ์รัตน์, 2558) การใช้กรดเจือจางเพื่อปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสที่อุณหภูมิเหมาะสม มักจะทำให้เฮมิเซลลูโสเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลที่ละลายได้ แต่การใช้กรดเข้มข้นมีฤทธิ์กัดกร่อน มีความเป็นพิษและเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้น การเจือจางกรดในการปรับสภาพจึงได้รับความนิยมสูงและพบว่ามีอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูง สามารถเพิ่ประสิทธิภาพการย่อยเซลลูโลสได้ดี (สุภาวดี ผลประเสริฐ, 2557) นอกจากความเข้มข้นของกรดแล้ว อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเกิดปฏิกิริยากับสารพิษ ซึ่งอุณหภูมิน้อยกว่า 160 องศาเซลเซียส มีความพอเหมาะต่อการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสขององค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลส การทำงานร่วมกันระหว่างกรดเจือจางกับอุณหภูมิที่เหมาะสมจะไปมีผลต่อกระบวนการย่อยเฮมิเซลลูโลสที่สามารถผลิตเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวได้โดยตรง (รัชพล พะวงศ์รัตน์, 2558) ดังนั้น ในการปรับสภาพก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางรมและก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางนวลด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 1 ร่วมกับอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ความดันบรรยากาศ เวลา 15 นาที จึงให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่ได้มีค่าสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับการปรับสภาพด้วยวิธีการอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 4-3 และตารางที่ 4-4)

การปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นสารเคมีที่นิยมใช้ในกระบวนการปรับสภาพด้วยด่าง ซึ่งด่างจะไปแตกโครงสร้างของลิกนินและลดการเกิดผลึกของเซลลูโลส (Sun and Cheng, 2002) ลดระดับความเป็นพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ สามารถแยกสายโครงสร้างระหว่างลิกนินและคาร์โบไฮเดรต และเป็นการแยกองค์ประกอบหรือทำลายโครงสร้างของลิกนิน (รัชพล พะวงศ์รัตน์, 2558) จากผลการทดลองการปรับสภาพตัวอย่างก้อนเชื้อเห็ดเก่าด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 1 สามารถลดปริมาณลิกนินได้มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการปรับสภาพด้วยกรด และเมื่อใช้สารละลายด่างร่วมกับการเพิ่มอุณหภูมิสามารถแยกสกัดปริมาณลิกนินได้เพิ่มสูงขึ้น Kim et al. (2008) ได้ศึกษาการปรับสภาพข้าวบาร์เลย์ด้วยแอมโมเนียที่ความเข้มข้นร้อยละ 15 อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เวลา 24 - 72 ชั่วโมง สามารถสกัดแยกเอาส่วนของลิกนิน ออกร้อยละ 50-66

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงยีสต์ไขมันสูง *R. mucilaginousa* ที่คัดแยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลนบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลง LAM ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์จากการปรับสภาพก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางรมและก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางนวลเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตลิพิด โดยนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่สกัดได้จากการปรับสภาพก้อนเชื้อเห็ดเก่าทั้งสองชนิดที่สภาวะที่ให้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด พบว่ายีสต์ไขมันสูง *R. mucilaginosa* ที่คัดแยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลนสามารถเจริญและสะสมลิพิดภายในเซลล์ได้ ซึ่งการที่ยีสต์ไขมันสูง *R. mucilaginosa* ที่คัดแยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลนสามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์ได้ อาจเนื่องมาจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่สกัดได้จากก้อนเชื้อเห็ดเก่าทั้งสองชนิดมีองค์ประกอบของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส น้ำตาลอะราบิโนส (Wu et

al., 2013) น้ำตาลแมนโนสและน้ำตาลแมนโนไบโอส (สุดาทิพย์ จันทร และคณะ, 2556) ที่ยีสต์ไขมันสูง *R. mucilaginosa* ที่คัดแยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลนสามารถนำน้ำตาลเหล่านี้ไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญได้ อาจเนื่องมาจากการมีเอ็นไซม์หรือวิถีเมตาบอลิซึมของน้ำตาลเหล่านั้น ซึ่งน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเหล่านี้สามารถลำเลียงเข้าสู่เซลล์ยีสต์ไขมันสูงได้แตกต่างกัน เช่น น้ำตาลกลูโคสจะเข้าสู่เซลล์ยีสต์ไขมันสูงได้ด้วยกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) เพื่อให้ได้พลังงานของเซลล์ได้ทันที (สุนัดดา โยมญาติ, 2556) หรือการนำไซโลสเข้าสู่เซลล์ของยีสต์ไขมันสูง *R. mucilaginosa* ที่คัดแยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน อาจเกิดจากวิถีเมตาบอลิซึมของการหมักไซโลสในยีสต์ ซึ่งไซโลสจะถูกเปลี่ยนไปเป็นไซลูโลสและมีการเติมหมู่ฟอสเฟตโดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไซลูโลไคเนสได้ไซลูโลส-5-ฟอสเฟต (X-5-P) และจะเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟตต่อไป (Lertwattanasakul, 2559) และการที่ยีสต์ไขมันสูง *R. mucilaginosa* ที่คัดแยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลนสามารถสะสมลิพิดภายในเซลล์ได้ อาจเกิดจากการมีวิถี *de novo* (*de novo* pathway) (Alvarez and Steinbüchel, 2002) จากการรายงานของ Patel et al. (2015) พบว่า *Rhodosporidium kratochvilovae* สามารถใช้ 3.87 กรัมต่อลิตร ของไซโลสซึ่งเป็นน้ำตาลผสมที่สกัดได้จากเปลือกต้นคูณและผลิตลิพิดได้สูงถึง 53.18 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันของลิพิดที่สกัดได้จากยีสต์ไขมันสูง *R. mucilaginosa* ที่คัดแยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน พบว่าประกอบด้วยกรดไขมันหลัก คือ กรดปาล์มิติก (paimitic acid; C16:0) และกรดโอเลอิก (oleic acid; C18:1) กรดไขมันชนิดอื่นที่พบ คือ กรดสเตียริก (stearic acid; C18:0) กรดไมรีสติก (myristic acid; C14:0) กรดเฮบตาเดคาโนอิก (heptadecanoic acid; C17:0) และเพนตะเดคาโนอิก (pentadecanoic acid; C15:0) และ กรดปาล์มิโตเลอิก (palmitoleic acid; C16:1) ดังแสดงในภาพที่ 4-2 ชนิดและปริมาณของกรดไขมันของยีสต์ไขมันสูงที่คัดแยกได้ พบกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของลิพิดที่สกัดได้มีความคล้ายคลึงกับกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของลิพิดที่สกัดได้จากยีสต์ไขมันสูงที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดิน (รัตนภรณ์ ลีสิงห์, 2551: Pan et al., 2009) และสอดคล้องกับการรายงานของ Sriwongchai et al. (2013) ซึ่งเป็นกรดไขมันที่องค์ประกอบหลักของลิพิดที่สกัดได้จากยีสต์ *Yarrowia lipolytica* DSM70561 และ *Yarrowia lipolytica* JDC335 เช่นกัน นอกจากนี้ ยังพบว่ากรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักของลิพิดที่สกัดได้จากยีสต์ไขมันสูง คือ กรดโอเลอิก กรดปาล์มิติกและกรดสเตียริก ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับน้ำมันพืช เช่น น้ำมันปาล์ม น้ำมันโคโนล่าหรือน้ำมันจากเมล็ดทานตะวัน (Li et al., 2007; Sawangkaew and Ngamprasertsith, 2013) จากผลการทดลองทำให้ทราบว่าลิพิดที่สกัดได้จากยีสต์ไขมันสูงที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินตะกอนน่าที่จะใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลต่อไป

5.3 ข้อเสนอแนะ

ควรศึกษาการปรับสภาพก้อนเชื้อเห็ดเก่าเห็ดนางรมด้วยความร้อนชื้นร่วมกับสารละลายกรดซัลฟูริกและการปรับสภาพทางชีวภาพ เช่น การใช้เอนไซม์ เพื่อเพิ่มผลผลิตของน้ำตาลรีดิวซ์ในการนำไปทำเป็นสารตั้งต้นเพื่อการผลิตไบโอดีเซล

เอกสารอ้างอิง

จารุภา ศรีนาค, รสสุคนธ์ ศรีสุขใจ, วาสนา อยู่มั่น และอุรนิตย์ ผาจันทร์. (2555). การเพาะเห็ด (นางฟ้าภูฐาน) ด้วยกากใยสับปะรดจากโรงงาน ทิปโก้ฟูดส์ ประเทศไทย (จำกัด). *โครงงานด้านชีววิทยา.* วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชมงคลธัญบุรี.

จิดาภา ทิน้อย และนวลศรี รักอริยธรรม. (2553). การผลิตไบโอดีเซลจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้วในอาหารที่เตรียมได้จากกากสับปะรด. *รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์.* สาขาวิชาชีววิทยาคณะวิทยาศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พรรณราย ชื่นครุฑ และอัจฉรา แกล้วเกล้า. (2558). การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากฟางข้าวและซังข้าวโพดโดยกระบวนการไฮโดรไลซีสด้วยกรด. *การประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต ครั้งที่ 4: 2558*, 890-900.

พิชามญชุ์ แดงพราม, สุดาทิพย์ จันทร และสุนีย์ นิธิสินประเสริฐ. (2556). อิทธิพลของชนิดและปริมาณของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่อการผลิตการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบจาก *Penicillium oxalicum* KUB-SN2-1. *วารสารวิจัยและพัฒนา มจธ.*, 36(1) : 73-84.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงษ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์ (ม.ป.ป.). ศูนย์ข้อมูลเครือข่ายอาหารครบวงจร. [ระบบออนไลน์]. http://www.foodnetworksolution.com/wiki. (10 ตุลาคม 2560).

มาลินี ศรีอริยนันท์, จิรภา เพชรสม และศศิธร คงเรือง. (2557). การผลิตไขมันจากยีสต์ที่มีไขมันสูงเพื่อใช้เป็นไบโอดีเซลยุคที่สอง. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม,* 33, 3: (พฤษภาคม-มิถุนายน) 300-306.

รัตนภรณ์ ลีสิงห์. 2551. การผลิตลิปิดจากจุลินทรีย์โดยยีสต์พื้นถิ่นไขมันสูง. *วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น*, 36: 129-138.

รัชพล พะวงศ์รัตน์. (2558). กระบวนการปรับสภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส. *Veridian E-journal, Science and Technology Silapakorn Unuversity,* 2(1): 143-157.

วัชรี คตินนท์กุล และเจนจิรา ภูริรักษ์พิติกร. (2013). การปรับสภาพเปลือกข้าวโพดและเปลือกมะพร้าวด้วยของเหลวไอออนิกเพื่อเพิ่มผลผลิตน้ำตาลกลูโคส. *Bulletin of Applied Science*, 2(2) : 26-34.

สาวิตรี ลิ่มทอง. (2549). *ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ.* สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ : กรุงเทพฯ.

สาลินี ศรีวงษ์ชัย. (2558). น้ำมันจุลินทรีย์วัตถุดิบใหม่เผื่อการผลิตไบโอดีเซลล์: ทางเลือกสำหรับ พลังงานทดแทน. *วารสารวิทยาศาสตร์ แห่งมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี,* 12(1): 72-83.

สุดาทิพย์ ฐิตะโภคา. (2552). พรีไบโอติก. *วารสารวิทยาศาสตร์ มข.* 37: 366-375.

สุดาทิพย์ จันทร, กุลวดี พิศลยบุตร, รินรดา รัตนพรรณทอง และสุนีย์ นิธิสินประเสริฐ์. (2556). การผลิตโอลิโกแซคคาร์ไรด์จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบจาก *Penicillium oxalicum* KUB-SN2-1. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี,* 21 (2): 104-112.

สุภาวดี ผลประเสริฐ. (2557). การปรับสภาพวัตถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลสำหรับการผลิตเอทานอล. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 22(5): 641-649.

Alvarez, H. M. and Steinbüchel, A. (2002). Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms**.** *Applied Microbiology and Biotechnology,* 60(4): 367-376.

Browing, B. L. (1963). Chlorite Holocellulose. *Handbook of Wood Chemistry and Wood Composite*. New York,Interscience Publishers.

Duff, S. J. B. and Murray, W. D. (1996). Bioconversion of forest products industry waste cellulosic to fuel ethanol. *Bioresource Technology*, 55: 1-33.

El-Fadaly, H. A., El-Naggar, N. El-Ahmady and Marwan, El-Sayed M. (2009) Oleaginous yeast strains in a low cost cultivation medium. *Research Journal of Microbiology,* 4(8): 301-313.

Finney, K. N., Ryu, C., Sharifi, V. N. and Swithenbank J. (2009). The reuse of spent mushroom compost and coal tailings for energy recovery: Comparison of thermal treatment technologies. *Bioresource Technology,* 100 (1): 310-315.

Howard, R. L., Abotsi, E., Jansen, van Rensberg, E. L. and Howard, S. (2003). Lignocellulaose biotechnology: Issues of bioconversion and enzyme production, *African Journal of Biotechnology*. 2: 602-619.

Johnson V., Singh, M., Saini, V. S., Sista, V. R. and Yada,. N. K. (1992). Effect of pH on lipid accumulation by an oleaginous yeast: *Rhodotorula glutinis* IIP-30. *World of Journal Microbiology and Biotechnology,* 8: 382-384.

Kamei, I., Nitta, T., Nagano, Y., Yamagichi, M.,Yamsakai, Y. & Meguro, S. (2014). Evaluation of spent mushroom waste from *Lentinula edodes* cultivation for consolidated bioprocessing fermentation by *Phlebia* sp. MG-60. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 94: 57-62.

Kapu, N. U. S., Manning, M., Hurley, T. B., Voigt, J., Cosgrove, D. J., Rommaine, C. P. (2012). Surfactant-assisted pretreatment and enzymatic hydrolysis of spent mushroom compost for the production of sugars. *Bioresource Technology,* 114: 399-405.

Keshwani, D. R. (2009). Microwave pretreatment of switchgrass for bioethanol production. *Thesis Dissertation*. North Carolina State University.

Kim, T. H., Taylor, F., Hicks, K. B. (2008). Bioethanol production from barley hull using SSA (soaking in aqueous ammonia) pretreatment. *Bioresource Technology*, 99: 5694-5702.

Kumar, S., Sigh, S. P., Mishra, I. M., Adhikari, D. K. (2011). Continuous ethanol production by *Kluyveromyces* sp. IIPE453 Immobilized on baggasse chips in packed bed reactor. *Journal of Pretoleum Technology and Alternative Fuels,* 2: 1-6.

Lertwattanasakul, N. การหมักเอทานอลจากน้ำตาลไซโลส, [ระบบออนไลน์] https://omnimicrobes.wordpress.com/tag/ (10 กุมภาพันธ์ 2559).

Liang, X. A., Dong, W. B., Miao, X. J. and Dai, C. J. (2006). Production technology and influencing factors of microorganism grease. *Food Research and Development,* 27(37): 46-47.

Li, Y. C., Wu, S. Y., Chu, C. Y., Huang, H. C. (2011). Hydrogen production from mushroom farm waste with a two-step acid hydrolysis process. *International Journal of Hydrogen Energy*, 26, 14245-14251.

Li, Y. H., Zhao, Z. B., and Bai, F. W. 2007. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 41: 312-317

Lin, Y., Ge, X. and Li, Y. (2014). Solid-state anaerobic co-digestion of spent mushroom substrate with yard trimmings and wheat straw for biogas production. *Bioresource Technology.* 169: 468-474.

Liu, J. H., Sun, L. F., Hu, Z. F., Wang, S. P., Zhu, H. J. Qiao, J. J. (2013). A Comparison of low and high temperature acid pretreatments for improving saccharification of spent mushroom substrate. *IERI Procedi,* 5: 184-188.

McMillan, J. D. (1994). Pretreatment of lignocellulosic biomass. In:Himmel, M.E. Baker, J.O., Overend, R.P. (Eds.), Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production. *American Chemistry Society*, Washington, D.C. 292-324.

Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M., Ladisch M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 97: 673-686.

Mussatto, S. I., Dragone, G., Roberto, I. C. (2005). Influence of the toxic compounds present in brewer's spent grain hemicellulosic hydrolysate on xylose-toxylitol bioconversion by *Candida guilliekrmondii*. *Process Biochemistry,* 40: 3801-3806.

Ogbonna, J. C., Mahsima, H., Takana, H. (2001). Scale up of fuel ethanol production from sugar beet juice using loofa sponge immobilized bioreactor. *Bioresource Technology,* 76: 1-8.

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

Palmqvist, E. and Hahn-Hagerdal, B. (2002). Fermentation of lignocel-lulosic hydrolysate I: Inhibition and Detoxification. *Bioresource Technology*, 74: 17-24.

Papanikolaou, S., Komaitis, M. and Aggelis, G. (2004) Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. *Bioresource Technology,* 95(3): 287-291.

Patel, A., Sindhu, D. K., Arora, N., Singh, R. P., Pruthi, V. and Pruthi, P. (2015). Biodiesel production from non-edible lignocellulosic biomass of *Cassia fistula* L. fruit pulp using oleaginous yeast *Rhodosporidium kratochvilovae* HIMPA1. *Bioresource Technology*, 197: 91-98.

Ragg, P. L. and Fields, P. R. (1987). The development of a process for the hydrolysis of lignocelluloses waste. *Phil Trans R Soc Lond A321*, 537-547

Sawangkeaw, R. and Ngamprasertsith, S. 2013. A review of lipid-based biomasses as feedstocks for biofuels production. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 25: 97–108.

Silverstein, R. A., Chen, Y., Sharma-Shivappa, R. R., Boyette, M. D., Osborne, J. (2007). A comparison of chemical pre-treatmentmethods for improving saccharification of cotton silks. *Bioresource Technology*, 98: 3000-3011.

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

Sriwongchai S., Pokethitiyook, P., Pugkaew, W., Kruatrachue, M. and Lee, H. 2012. Optimization of lipid production in the oleaginous bacterium *Rhodococcus*

erythropolis growing on glycerol as the sole carbon source. *African Journal of Biotechnology,* 11: 14440-14447.

Sun, Y. and Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. *Bioresource Technology*, 83: 1-11.

Technical Association of the Pulp and Paper Industry. (1999). *Alpha, beta and gamma cellolose in pulp. Tappi Rule T203 om-88.* Atlanta, Tappi Technology.

_____. (2002). *Acid-insolube lignin in wood and pulp. Tappi Rule T222 om-88.* Atlanta, Tappi Technology.

Tong, H. B., Xia, F. G., Feng, K., Sun, G. G., Gao, X. X. and Sun, L. W. (2009). Structural characterization and in vitro antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostereatus*. *Bioresource Technology,* 100 (4): 1682-1686.

Wu, S., Lan, Y., Wu, Y., Peng, Y., Chen, S., Huang, Z., Xu, L., Gelbič, I., Guan, X., Zhang, L., Zou, S. (2013). Pretreatment of spent mushroom substrate for enhancing the conversion of fermentable sugar. Bioresource Technology, 148: 596-600.

Yan, Z. and Chen, J. (2003). Research advance on microbial oils and their exploitation and utilization. *Journal of Cereals & Oils,* 7: 13-15.

Yang, J. H., Du, Y. M., Haung, R. H., Sun, L. P., Liu, H., Gao, X. H. (2005). *Carbohydrate Polymer.* 59: *101-107.*

Zhao, X., Wu, S., Hu, C., Wang, Q., Hua, Y. and Zhao, Z. K. (2010). Lipid production from Jerusalem artichoke by *Rhodosporidium toruloides* Y4. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology,* 37(6): 581-585.

Zhu, H., Sheng, K., Yan, E., Qiao, J., Feng Lv. (2012). Extraction, purification and antibacterial activities of a polysaccharide from spent mushroom substrate. *International Journal of Biological Macromolecules.* 50: 840-843.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

ภาคผนวก ก-1 Lipid accumulation medium (LAM) เพื่อการคัดแยกยีสต์ไขมันสูงจากดินตะกอนป่าชายเลน

glucose	70	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	0.1	กรัม
yeast extract	0.75	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	1.5	กรัม
KH_2PO_4	0.4	กรัม
$ZnSO_4$	4.4	มิลลิกรัม
$CaCl_2$	25	มิลลิกรัม
$MnSO_4.H_2O$	0.05	มิลลิกรัม
$CuSO_4.5H_2O$	0.3	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร
pH	5.0	

นำส่วนผสมต่างๆ ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 ลิตร ให้เข้ากัน จากนั้น ปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น เท่ากับ 5.0 บรรจุอาหาร LAM ลงในหลอดเซนติฟิวปริมาตรหลอดละ 40 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

ภาคผนวก ก-2 Yeast extract peptone dextrose (YPD)

glucose	20	กรัม
yeast extract	10	กรัม
peptone	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
pH	4.0	

นำส่วนผสมต่างๆ ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 ลิตร ให้เข้ากัน จากนั้น บรรจุอาหาร YPD broth ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

ภาคผนวก ก-3 Yeast extract peptone dextrose agar (YPDA)

glucose	20	กรัม
yeast extract	10	กรัม
agar	15	กรัม
peptone	20	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร
pH	4.0	

นำส่วนผสมต่างๆ ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 ลิตร ให้เข้ากัน จากนั้น บรรจุอาหาร YPDA ลงในหลอดทดลองนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

ภาคผนวก ข-1 สารเคมี

3, 5-dinitrosalicylic acid

sodium hydroxide

sodium potassium tartrate

distilled water

ภาคผนวก ข-2 การเตรียมสารละลาย

1. DNS (3, 5-dinitrosalicylic acid) reagent

เตรียมโดยชั่ง DNS 20 กรัม ละลายน้ำ 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันบน hot plate ค่อยๆ เติมสารละลาย sodium hydroxide 32 กรัม ละลายในน้ำ 300 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันแล้วเติม sodium potassium tartrate จำนวน 600 กรัม จากนั้น เติมน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ปรับปริมาตรให้เป็น 2,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาอุณหภูมิ

2. สารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 และ 1.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาคผนวก ข-3 การเตรียมกราฟมาตรฐาน

1. ใช้ปิเปตดูดสารละลายกลูโคสมาตรฐานชนิดละ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียวสะอาดที่อบแล้วขนาด 20 มิลลิลิตร

2. ใช้ปิเปตดูดสารละลาย DNS (3, 5-dinitrosalicylic acid) reagent1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายมาตรฐาน ผสมให้เข้ากัน

3. นำหลอดทดลองดังกล่าวไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที

4. นำไปแช่น้ำเย็น 5 นาที

5. เติมน้ำกลั่นลงไปในหลอดทดลองผสมนี้ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (optical density: OD_{540}) อ่านค่า OD

6. นำค่า OD และความเข้มข้น เขียนกราฟมาตรฐาน

ภาคผนวก ข-4 วิธีการหาน้ำตาลในตัวอย่าง

1. ใช้ปิเปตดูดสารละลายตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียวสะอาดที่อบแล้วขนาด 20 มิลลิลิตร

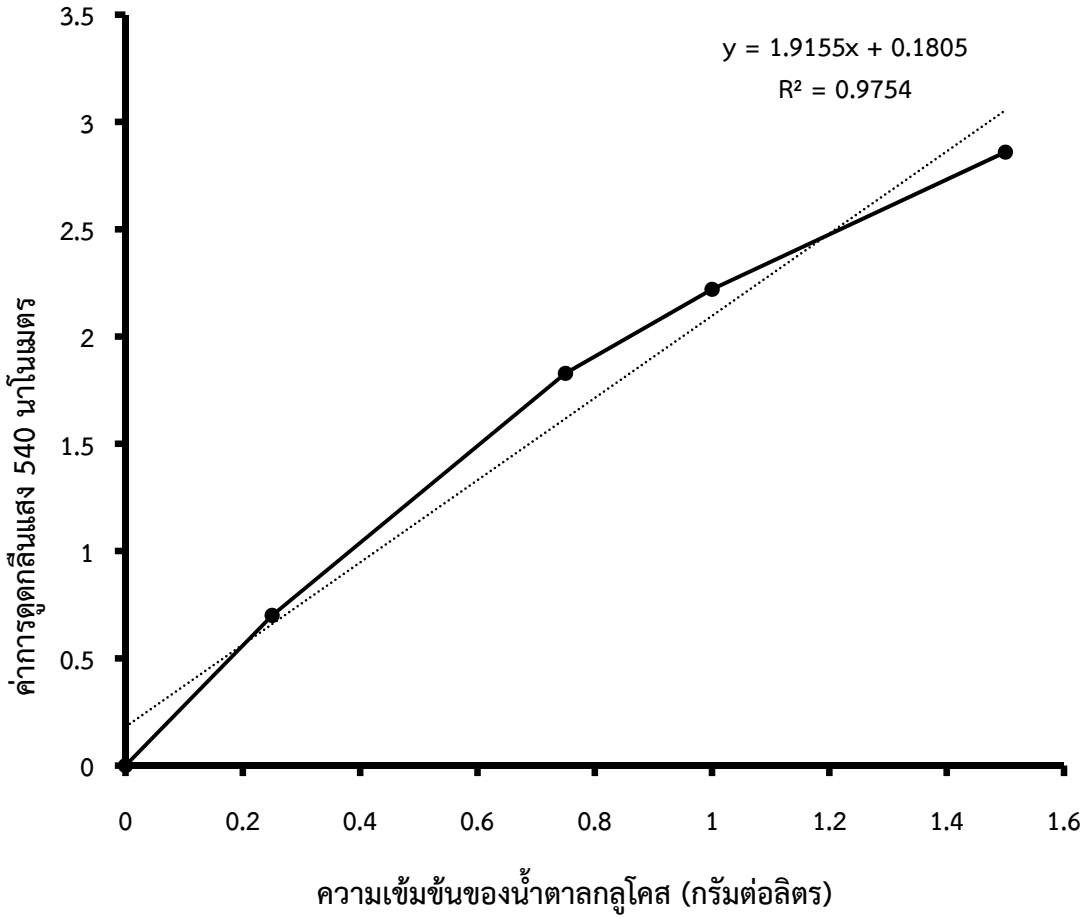
2. ใช้ปิเปตดูดสารละลาย DNS (3, 5-dinitrosalicylic acid) reagent1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองข้อ 1 ผสมให้เข้ากัน

3. นำหลอดทดลองในข้อ 2 ไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที

4. นำไปแช่น้ำเย็น 5 นาที

5. เติมน้ำกลั่นลงไปในหลอดทดลองผสมนี้ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (optical density: OD_{540}) อ่านค่า OD

6. เมื่อได้ค่า OD นำไปหาปริมาณน้ำตาลเทียบกับกราฟมาตรฐาน



ภาพที่ ข-1 กราฟสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้น 0.2 – 1.6 กรัมต่อลิตร