



## โครงการ การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

**ชื่อโครงการ** การคัดกรองและตรวจสอบยีน ACC1 ของยีสต์ที่สามารถผลิตน้ำมันจาก  
ตะกอนดินบริเวณป่าชายเลน อ. เทพา จ. สงขลา

Screening and detecting ACC1 gene of oleaginous yeast from soil  
sediment in mangrove forest, Thepha district, Songkhla province

**ชื่อนิสิต** นางสาว เฉลิมชานุส บุตรคำโชติ **เลขประจำตัวนิสิต** 5832111423

**ภาควิชา** พฤษศาสตร์

**ปีการศึกษา** 2561

**คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the senior project authors' files submitted through the faculty.

การคัดกรองและตรวจสอบหิน ACC1 ของยีสต์ที่สามารถผลิตน้ำมันจากตะกอน  
ดินบริเวณป่าชายเลน อ. เทพา จ. สงขลา

เมธอญานุส บุตรคำโชติ

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2561

Screening and detecting *ACC1* gene of oleaginous yeast from soil sediment  
in mangrove forest, Thepha district, Songkhla province

CHERYANUS BUTKUMCHOTE

A SENIOR PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE

REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

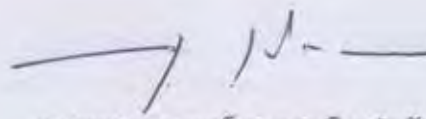
PROGRAM GENETICS, DEPARTMENT OF BOTANY

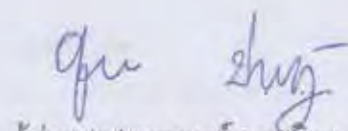
FACULTY OF SCIENCE, CHULALONGKORN UNIVERSITY

ACADEMIC YEAR 2018

ชื่อโครงการวิทยาศาสตร์	การคัดกรองและตรวจสอบยีน ACC1 ของยีสต์ที่สามารถผลิตน้ำมัน จากตะกอนดินบริเวณป่าชายเลน อ. เทพา จ. สงขลา Screening and detecting ACC1 gene of oleaginous yeast from soil sediment in mangrove forest, Thepha district, Songkhla province
ชื่อนิสิต	นางสาวเมธญาณัฐ บุตรคำโชติ
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ	รองศาสตราจารย์ ดร. วรวิมล จุฬาลักษณ์านุกุล
ปีการศึกษา	2561

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ยินยอมให้ นิสิต  
วิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต  
สาขาวิชาพันธุศาสตร์

 อาจารย์ที่ปรึกษา  
รองศาสตราจารย์ ดร. วรวิมล จุฬาลักษณ์านุกุล)

 กรรมการ  
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนิตา ปาลิยะวูฒิ)

 กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชมภูนุช กลืนวงษ์)

ลิขสิทธิ์ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิทยาศาสตร์	การคัดกรองและตรวจสอบยีน ACC1 ของยีสต์ที่สามารถผลิตน้ำมันจากตะกอนดินบริเวณป่าชายเลน อ. เทพา จ. สงขลา
ชื่อนิสิต	นางสาวเมธอญานุส บุตรคำชาติ
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ	รองศาสตราจารย์ ดร.วรวิมล จุฬาลักษณ์มานุกูล
ปีการศึกษา	2561

### บทคัดย่อ

ป่าชายเลนเป็นอีกหนึ่งแหล่งที่เหมาะสมสำหรับการคัดกรองยีสต์ที่สามารถผลิตและสะสมน้ำมัน (oleaginous yeasts) ได้มากกว่าร้อยละ 20 ของน้ำหมักเซลล์แห้ง ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ คือ การคัดกรองยีสต์ที่สามารถผลิตน้ำมันจากตะกอนดินป่าชายเลน อำเภอเทพา จังหวัดสงขลา จากการคัดกรองพบว่าได้ยีสต์จำนวน 18 ไอโซเลต มียีสต์จำนวน 5 ไอโซเลตที่สามารถระบุได้ว่าเป็นยีสต์ที่ผลิตน้ำมันได้ (oleaginous yeasts) จากการย้อมด้วยเทคนิค Sudan black B ได้แก่ ยีสต์ไอโซเลต TEP6 TEP11 TEP12 TEP17 และ TEP18 เนื่องจากเมื่อสกัดน้ำมันด้วยวิธี Bligh and Dyer ยีสต์ทั้ง 5 ไอโซเลต มีการสะสมของน้ำมันร้อยละ 40.6 32.5 28.0 28.8 และ 87.1 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ซึ่งการระบุชนิดของยีสต์ทั้ง 5 ไอโซเลต บริเวณยีน 18S rRNA แสดงให้เห็นว่าไอโซเลต TEP6 TEP11 และ TEP17 มีความใกล้เคียงกับ *Candida tropicalis* ส่วนไอโซเลต TEP12 มีความใกล้เคียงกับ *Candida maltosa* และไอโซเลต TEP18 มีความใกล้เคียงกับ *Hanseniaspora* sp. นอกจากนี้เมื่อทำการตรวจสอบองค์ประกอบของกรดไขมันของยีสต์ที่มีการผลิตและสะสมน้ำมันมากที่สุด 3 อันดับ คือ *C. tropicalis* ไอโซเลต TEP6 และ TEP11 และ *Hanseniaspora* sp. ไอโซเลต TEP 18 พบว่ามีกรดไขมันหลักที่ยีสต์ *Hanseniaspora* sp. ไอโซเลต TEP18 ผลิตได้ คือ กรดปาล์มิโทเลอิก (C16:1) ส่วนในยีสต์ *C. tropicalis* ไอโซเลต TEP6 และ TEP11 มีองค์ประกอบของกรดไขมันที่เหมือนกัน คือ มีกรดโอเลอิก (C18:1) มากที่สุด จากการตรวจสอบยีน ACC1 ของยีสต์ทั้ง 5 ไอโซเลต พบแถบของดีเอ็นเอบริเวณ 7000 คู่เบส ของยีสต์ *C. tropicalis* ไอโซเลต TEP6 TEP11 และ TEP17 ซึ่งเป็นตำแหน่งของยีน ACC1 โดยการศึกษาครั้งนี้จะเป็นฐานข้อมูลในการศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมัน เพื่อใช้ประโยชน์ได้ต่อไปในอนาคต

**คำค้นหา :** ยีสต์ที่สามารถผลิตน้ำมันได้, ตะกอนดินป่าชายเลน, อำเภอเทพา จังหวัดสงขลา, เทคนิค Sudan Black B, วิธี Bligh and Dyer

Title	Screening and detecting <i>ACC1</i> gene of oleaginous yeast from soil sediment in mangrove forest, Thepha district, Songkhla province
Student name	Miss.Cheryanus Butkumchote
Program	Genetics
Department	Botany
Advisor	Assoc. Prof. Dr. Warawut Chulalaksananukul
Academic year	2018

---

### Abstract

The mangrove forests is one of the appropriated sources for screening of oleaginous yeasts which can be able to accumulate lipids up to 20% of their cellular dry weight. Consequently, the aim of this study is to screen oleaginous yeast from soil sediments at mangrove forest, Thepha district, Songkhla province. Among 18 isolates, five isolates namely TEP6 TEP11 TEP12 TEP17 and TEP18 were identified as an oleaginous yeasts by using Sudan black B staining technique and extracted lipid using Bligh and Dyer method with 40.6% 32.5% 28.0% 28.8% and 87.1% lipid per dry cell weight respectively. The identification of five isolates based on the 18S rRNA gene showed that isolate TEP6 TEP11 and TEP17 are closely related to *Candida tropicalis*. Isolate TEP12 was closely related to *Candida maltosa* and isolate TEP18 was closely related to *Hanseniaspora* sp. Moreover, fatty acid profile of *Hanseniaspora* sp. isolate TEP18 revealed that major fatty acid content is palmitoleic (C16:1). *C. tropicalis* isolate TEP6 and TEP11 revealed that oleic acid (C18:1) was detect as a major fatty acid. Lastly, the DNA band of *ACC1* gene were detected at 7000 base pairs of *C. tropicalis* isolate TEP6 TEP11 and TEP17. In this study, lipid profile of *C. tropicalis* isolate TEP6 and TEP11 and *Hanseniaspora* sp. isolate TEP18 can be applied for database in future study.

**Keywords** : oleaginous yeasts, sediments mangrove forest, Thepha district Songkhla province, Sudan black B staining, Bligh and Dyer method

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องด้วยความกรุณาของผู้เกี่ยวข้องทุกท่าน ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วรุฒิ จุฬาลักษณ์านุกูล อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิทยาศาสตร์ที่กรุณาให้ปรึกษา ให้การช่วยเหลือและตรวจสอบเกี่ยวกับโครงการวิทยาศาสตร์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนิตา ปาติยะวุฒิ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชมภูษุท กลิ่นวงษ์ ที่กรุณาเสียสละเวลาเป็นกรรมการในการสอบโครงการวิทยาศาสตร์ครั้งนี้ นอกจากนี้ยังช่วยเหลือและตรวจสอบเล่มโครงการวิทยาศาสตร์เล่มนี้ให้ออกมาสมบูรณ์ที่สุด

ขอขอบพระคุณ ดร.วรรณพร วัฒนสุนทร และนางสาว ณีฐฐา จึงเจริญพานิชย์ ที่คอยช่วยเหลือทั้งด้านการให้ข้อมูล การทำงานในห้องปฏิบัติการ ตรวจสอบเล่มโครงการวิทยาศาสตร์

ขอขอบพระคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อประสบการณ์ของคนะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาสับสนุนงานวิจัย

ขอขอบพระคุณหน่วยปฏิบัติการเชื้อเพลิงชีวภาพ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ใช้อุปกรณ์และสถานที่สำหรับการศึกษาวิจัยในโครงการวิทยาศาสตร์นี้

ขอขอบพระคุณคณะจารย์ทุกท่านและผู้มีส่วนเกี่ยวข้องทุกคนที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัว ที่คอยให้การช่วยเหลือ ให้กำลังใจและสนับสนุนในทุกด้านอย่างเต็มที่

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญภาพ	ช
สารบัญตาราง	ฅ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสารของงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 วัตถุประสงค์ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการ	8
บทที่ 4 ผลการทดลอง	14
บทที่ 5 อภิปรายการทดลอง	36
บทที่ 6 ผลการทดลอง	39
เอกสารอ้างอิง	40
ภาคผนวก	43



## สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 สัณฐานวิทยาของโคโลนีในจุลชีพ	3
รูปที่ 2 ไตรกลีเซอไรด์	5
รูปที่ 3 กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันในยีสต์	6
รูปที่ 4 การทำให้ยีน ACC1 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น	7
รูปที่ 5 จุดที่เก็บตะกอนดินบนแผนที่	9
รูปที่ 6 จุดที่เก็บตะกอนดินบนพื้นที่จริง	9
รูปที่ 7 ตะกอนดินที่เก็บจากป่าชายเลน อำเภอเทพา จังหวัดสงขลา	14
รูปที่ 8 ยีสต์ที่คัดกรองได้จากตะกอนดิน	16
รูปที่ 9 ลักษณะเซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และ ย้อมด้วย Sudan Black b	21
รูปที่ 10 ลักษณะเซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง และ ย้อมด้วย Sudan Black b	25
รูปที่ 11 องค์ประกอบของกรดไขมัน	31
รูปที่ 12 ค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ACC1 ของ <i>Y. lipolytica</i> และ <i>C. tropicalis</i>	32
รูปที่ 13 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก PCR ของยีน ACC1 ของ <i>C. tropicalis</i>	35

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ลักษณะตะกอนดินจากแต่ละบริเวณที่เก็บตัวอย่าง	14
ตารางที่ 2 สันฐานวิทยาของยีสต์ที่ได้จากการคัดกรอง	15
ตารางที่ 3 ปริมาณหยดน้ำมันที่ยีสต์สะสมเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง	20
ตารางที่ 4 ปริมาณหยดน้ำมันที่ยีสต์สะสมเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง	24
ตารางที่ 5 ชนิดของยีสต์	25
ตารางที่ 6 การสกัดน้ำมันของยีสต์ที่เลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง	30
ตารางที่ 7 การสกัดน้ำมันของยีสต์ที่เลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง	30
ตารางที่ 8 องค์ประกอบของกรดไขมัน	30
ตารางที่ 9 ไพรเมอร์ที่ใช้ในกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่	33
ตารางที่ 10 ค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร	34

## บทที่ 1

### บทนำ

จุลินทรีย์โกลีเอจินัส (Oleaginous microorganism) คือ จุลชีพที่สามารถสะสมน้ำมันในรูปไตรกลีเซอไรด์ได้มากกว่าร้อยละ 20 ของชีวมวล ซึ่งไตรกลีเซอไรด์ที่พบในจุลินทรีย์เหล่านี้มีคุณสมบัติคล้ายกับน้ำมันที่พบในเมล็ดพืช (Carsamba, Papanikolaou and Erten, 2018) จุลชีพที่สามารถสะสมน้ำมันได้ ได้แก่ แบคทีเรีย และยีสต์ นอกจากนั้นยังมีสิ่งมีชีวิตที่สามารถสะสมน้ำมันได้ คือ สาหร่ายและพืช แม้ว่าสาหร่ายจะสามารถผลิตและเก็บสะสมน้ำมันไว้ในเซลล์ได้เป็นจำนวนมาก แต่สาหร่ายมีข้อจำกัด คือ จำเป็นต้องใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงและระยะเวลาในการเติบโตมากกว่าสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ เช่นเดียวกับในพืชที่มีการเก็บสะสมน้ำมันไว้ในเมล็ดพืชและมีการใช้ประโยชน์จากน้ำมันในเมล็ดพืชเป็นจำนวนมาก แต่พืชมีข้อจำกัดเช่นเดียวกับสาหร่าย คือ ต้องการพื้นที่และระยะเวลาในการเติบโตที่มาก นอกจากนี้ปริมาณน้ำมันที่สะสมในพืชยังขึ้นกับปริมาณน้ำ ทำให้พืชมีการสะสมน้ำมันที่มากขึ้นหรือน้อยแตกต่างกันในแต่ละฤดูกาล ส่วนแบคทีเรียแม้จะมีข้อได้เปรียบกว่าสาหร่ายและพืช คือ มีอัตราการเจริญเติบโตที่สูง ใช้พื้นที่ในการเลี้ยงและระยะเวลาในการเจริญเติบโตน้อยกว่า ในขณะที่เดียวกันจากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียเพียงบางชนิดเท่านั้นที่มีการสะสมของน้ำมันได้ร้อยละ 20-40 ภายในเซลล์ ซึ่งมีประสิทธิภาพในการสะสมน้ำมันได้น้อยกว่าในสาหร่ายและยีสต์ (Meng et al., 2009)

ยีสต์ที่สามารถผลิตน้ำมันได้ (oleaginous yeast) สามารถเก็บสะสมน้ำมันได้ถึงร้อยละ 20-70 ขึ้นอยู่กับภาวะที่ใช้ในการเจริญเติบโต ยีสต์มีข้อดีกว่าสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น คือ ใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงและระยะเวลาในการเจริญเติบโตสั้น (Lamers et al., 2016) โดยยีสต์ที่ได้จากตะกอนดินบริเวณป่าชายเลนจะมีความหลากหลายสูงมาก เนื่องจากป่าชายเลนเป็นพื้นที่ที่มีความอุดมสมบูรณ์มาก (Kaewwichian and Khamthaiklang, 2017) ซึ่งปริมาณการผลิตและสะสมของน้ำมันภายในเซลล์ยีสต์จะขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยภายนอก คือ สภาพแวดล้อมที่ยีสต์อาศัยอยู่ และ อาหารที่ยีสต์ใช้ในการเจริญ และปัจจัยภายในเซลล์ยีสต์ คือ ยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตและสะสมน้ำมันภายในเซลล์ (Sha, 2013)

ยีน ACC1 เป็นยีนที่สร้างเอนไซม์ acetyl-CoA carboxylase-1 ซึ่งมีหน้าที่ในการเปลี่ยน acetyl-CoA เป็น malonyl-CoA โดยขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนกำหนดปฏิกิริยา (rate limiting step) ที่สำคัญในการสังเคราะห์กรดไขมัน (fatty acid synthesis) ในสิ่งมีชีวิตเกือบทุกชนิด (Hablacher et al., 1993) โดยยีน ACC1 อาจจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันไปในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดรวมทั้งยีสต์ จึงใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ACC1 ในการเปรียบเทียบยีสต์ที่สามารถผลิตน้ำมันได้จากตะกอนดินบริเวณป่าชายเลน

การทดลองนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อคัดกรองยีสต์ที่สามารถผลิตน้ำมันได้จากตะกอนดินบริเวณป่าชายเลน อ.เทพา จ.สงขลา และนำยีสต์ที่มีปริมาณการสะสมน้ำมันมากที่สุด โดยการสกัดน้ำมันและวัดปริมาณด้วยวิธีของ Bligh and Dyer (Neema and Kumari, 2013) หลังจากนั้นนำมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน ACC1 แล้วจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับ

ยีสต์ *Yarrowia lipolytica* ซึ่งเป็นยีสต์ต้นแบบที่สามารถผลิตน้ำมันที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในงานวิจัยจำนวนมาก

### **วัตถุประสงค์ของงานวิจัย**

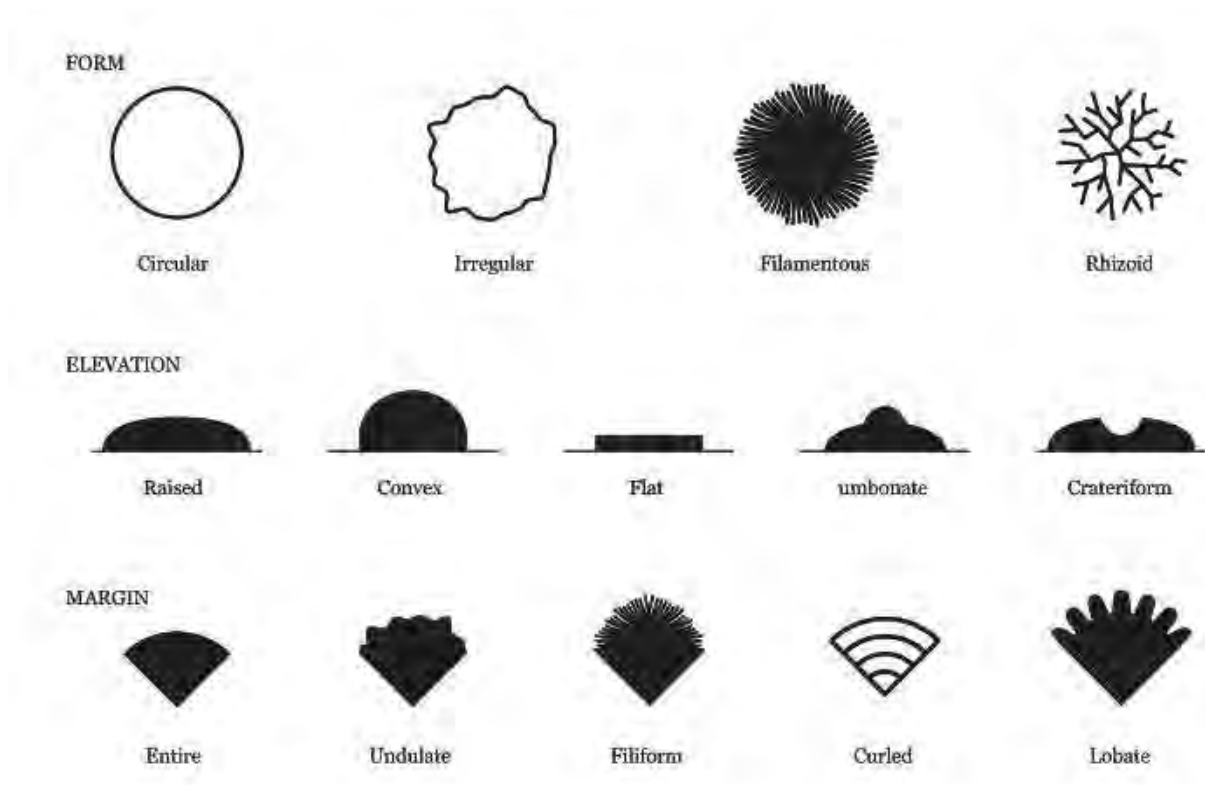
1. เพื่อคัดกรองยีสต์ที่สามารถผลิตน้ำมันได้จากตะกอนดินบริเวณป่าชายเลน อ.เทพา จ.สงขลา
2. เพื่อตรวจสอบยีน *ACC1* จากยีสต์ที่คัดกรองได้

## บทที่ 2

### การตรวจเอกสารของงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 1. ยีสต์ (Yeast)

ยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตประเภทยูแคริโอต (eukaryote) ที่สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ได้แก่ ดิน น้ำ หรือแม้กระทั่งในสิ่งมีชีวิต เช่น พืช แมลง หรือกระเพาะของสัตว์ เป็นต้น ยีสต์จัดเป็นรากลุ่มหนึ่งที่มีส่วนใหญ่มักมีการดำรงชีวิตเป็นเซลล์เดี่ยว (unicellular form) มีรูปร่างหลายแบบ เช่น รูปร่างแบบกลม รูปร่างแบบรี รูปร่างแบบสามเหลี่ยม หรือรูปร่างแบบทรงกระบอกที่มีปลายมน เป็นต้น (รูปที่ 1) เซลล์ยีสต์มีความยาว 2-3 ไมโครเมตร แต่ยีสต์บางชนิดอาจมีความยาวได้มากถึง 20-50 ไมโครเมตร ส่วนความกว้างของเซลล์ยีสต์นั้น จะอยู่ระหว่าง 1-10 ไมโครเมตร ซึ่งหากมองด้วยตาเปล่าเซลล์ยีสต์มักจะมีขนาดเซลล์ที่ใหญ่กว่าเซลล์แบคทีเรีย ยีสต์ส่วนใหญ่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยใช้วิธีการแตกหน่อ (budding) นอกจากนี้ยีสต์ยังมีลักษณะของโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงยีสต์แตกต่างกันไปในยีสต์แต่ละชนิดและในยีสต์ชนิดเดียวกันก็สามารถมีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงอายุด้วย (Granek and Magwene, 2010)



รูปที่ 1 สัณฐานวิทยาของโคโลนีในจุลชีพ (Klingberg et al., 2008)

## 2. จุลินทรีย์โกลิเอจินัส (Oleaginous microorganism)

จุลินทรีย์โกลิเอจินัส คือ จุลชีพที่สามารถสะสมน้ำมันได้มากกว่าร้อยละ 20 และอาจสะสมได้มากถึงร้อยละ 70 ของชีวมวล ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมแก่การเจริญของจุลินทรีย์ โดยในสิ่งมีชีวิตแบบยูแคริโอต ได้แก่ ยีสต์ รา และสาหร่าย สามารถผลิตและสะสมน้ำมันได้ในรูปของไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ซึ่งคล้ายคลึงกับน้ำมันที่พืชสะสมไว้ในเซลล์ แต่ในสิ่งมีชีวิตแบบโพรแคริโอต (prokaryote) คือ แบคทีเรีย จะผลิตและสะสมน้ำมันได้ในรูปของน้ำมันที่จำเพาะ โดยจุลินทรีย์ที่สะสมน้ำมันต้องมีคุณสมบัติในการผลิต acetyl CoA (AcCoA) ได้อย่างต่อเนื่องภายในเซลล์ (Liang and Jiang, 2013) ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการสังเคราะห์กรดไขมัน

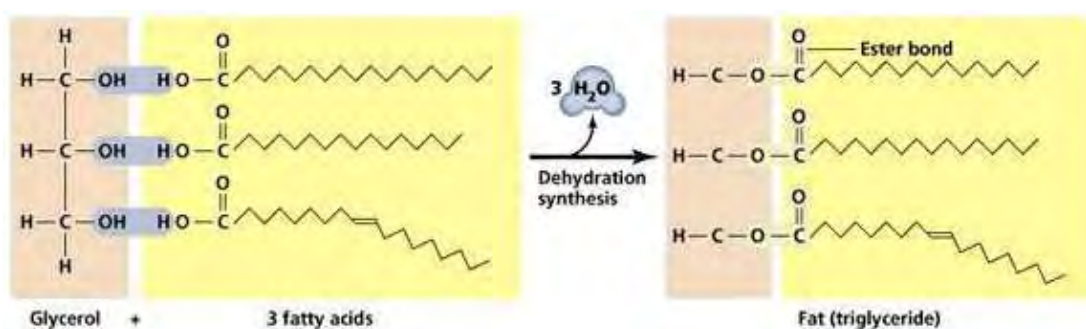
### ยีสต์ที่สามารถผลิตน้ำมันได้ (Oleaginous yeast)

ยีสต์ที่สามารถผลิตน้ำมันได้มีส่วนประกอบของน้ำมันถึงร้อยละ 20 ของน้ำหนักแห้ง ยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตที่เจริญเติบโตได้เร็วและสามารถสะสมน้ำมันไว้ในเซลล์ได้มาก ยีสต์ที่สามารถผลิตน้ำมันได้ส่วนใหญ่สามารถสะสมน้ำมันได้มากกว่าร้อยละ 20 หรืออาจสูงถึงร้อยละ 70 ของน้ำหนักแห้ง ภายใต้ภาวะที่มีสารอาหารอย่างจำกัด ซึ่งโครงสร้างของน้ำมันจะแตกต่างกันในยีสต์แต่ละสปีชีส์ ยีสต์ที่สามารถผลิตน้ำมันได้พบได้ในสกุล *Candida* *Cryptococcus* *Lipomyces* *Rhodospiridium* *Rhodotorula* *Rhizopus* *Trichosporon* และ *Yarrowia* (Beopoulos and Nicaud, 2012) ส่วนแหล่งคาร์บอนที่ยีสต์สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตน้ำมัน ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส กลีเซอรอล แป้ง เซลลูโลสไฮโดรไลเสต (cellulose hydrolysate) ของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม และของเสียอินทรีย์จากเทศบาล (Sitepu et al., 2015) ในภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินไปยีสต์จะสามารถเปลี่ยนคาร์บอนให้สะสมในรูปของน้ำมันได้ ปัจจัยที่มีผลต่อการสะสมน้ำมันภายในเซลล์ยีสต์ คือ แหล่งคาร์บอนแต่ละแหล่งที่ยีสต์ใช้ในการเจริญเติบโตจะให้ปริมาณของการสะสมน้ำมันแตกต่างกัน นอกจากแหล่งคาร์บอนจะมีผลต่อการสะสมของน้ำมันภายในยีสต์แล้ว อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N) เป็นอีกปัจจัยที่ส่งผลให้ยีสต์สะสมน้ำมันแตกต่างกันด้วย เมื่อใช้อาหารที่มีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่มากขึ้น จะส่งผลทำให้ยีสต์มีการสะสมน้ำมันเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากไนโตรเจนมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ต่างๆที่อยู่ในภายในเซลล์ยีสต์ (Fontanille et al., 2012)

## 3. ไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) หรือ ไตรเอซิลกลีเซอไรด์ (Triacylglyceride)

ไตรกลีเซอไรด์เป็นน้ำมันชนิดหนึ่งซึ่งเกิดจากการรวมตัวกันของกรดไขมัน (fatty acid) 3 โมเลกุล กับ กลีเซอรอล (glycerol) 1 โมเลกุล ด้วยพันธะเอสเทอร์ (ester bond) ผลผลิตที่ได้คือ ไตรกลีเซอไรด์ 1 โมเลกุล และน้ำ 3 โมเลกุล (รูปที่ 2) ไตรกลีเซอไรด์เป็นแหล่งสะสมพลังงานในระยะยาวและเป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันของพืช (Cox and Garcia-Palmieri, 1990) ไตรกลีเซอไรด์เป็นโมเลกุลที่ไม่มีขั้ว มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 8-24 อะตอม ไตรกลีเซอไรด์จะพบมากที่สุด ในรูปของกรดปาล์มิติก (palmitic acid) ที่มีคาร์บอนอะตอมเท่ากับ 16 อะตอม และ กรดโอเลอิก (oleic acid) ที่มีคาร์บอนอะตอมเท่ากับ 18 อะตอม ซึ่งมีทั้งกรดไขมันชนิดอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว นอกจากนี้ จะพบอยู่ในรูปของฟอสโฟลิปิด (phospholipid) สเตียรอยด์ (steroids) และเอสเทอร์ของส

เต็ยรอยด์ น้ำมันที่พบในสัตว์ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของแข็งสะสมอยู่ในเมมเบรนของสัตว์ แต่ในยีสต์ที่สามารถผลิตและสะสมน้ำมันได้จะสะสมน้ำมันในรูปของหยดน้ำมัน (fat droplet) หรือหยดน้ำมัน (oil droplet) อยู่ในเซลล์ ดังนั้นเมื่อนำเซลล์ยีสต์ไปย้อมและส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จึงเห็นเป็นหยดน้ำมันภายในเซลล์ยีสต์และเห็นสีล้อมติดล้อมรอบเมมเบรนของเซลล์ยีสต์ ซึ่งน้ำมันที่ได้จากยีสต์จะมีองค์ประกอบของกรดไขมันคล้ายคลึงกับน้ำมันในพืช คือ กรดโอเลอิก (C18:1) ส่วนน้ำมันที่พบได้ในพืชทั่วไปจะมีลักษณะเป็นของเหลว เรียก น้ำมัน (oil) และพบการสะสมของน้ำมันได้ในเมล็ดพืช (Schwartz and Wolins, 2007)

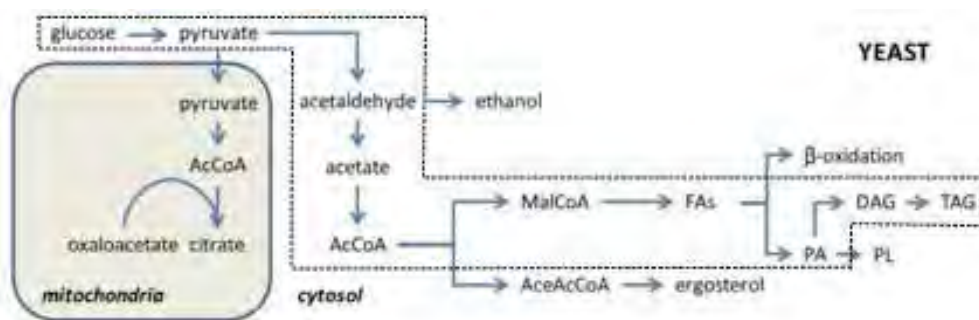


**รูปที่ 2** การรวมตัวของกลีเซอรอล 1 โมเลกุลและกรดไขมัน 3 โมเลกุลได้เป็นไตรกลีเซอไรด์ 1 โมเลกุล

(ที่มา : <https://krukoongchemistry.wordpress.com/tag/ไตรกลีเซอไรด์/>)

#### 4. กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน (Fatty acid synthesis หรือ FAS)

กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน (fatty acid synthesis) ในยีสต์ของยีสต์ที่สามารถผลิตน้ำมันได้เกิดขึ้นเมื่อยีสต์ถูกเลี้ยงในภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคสมากเกินไป และถูกจำกัดปไนโตรเจน ยีสต์จะนำน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่เซลล์และในขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน น้ำตาลกลูโคสจะถูกเปลี่ยนเป็นไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride : TAG) สะสมไว้ในเซลล์ (รูปที่ 3) โดยมีกระบวนการดังนี้ เมื่อเลี้ยงยีสต์ในภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคสมากเกินไป ยีสต์จะนำน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่เซลล์ และเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นไพรูเวท จากนั้นไพรูเวทจะถูกเปลี่ยนให้เป็นอะซีทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) และ อะซิเตท (acetate) ตามลำดับ ต่อมา acetate จะถูกเปลี่ยนเป็นอะซีติลโคเอนไซม์เอ (acetyl CoA : AcCoA) จากนั้นอะซีติลโคเอนไซม์เอ จะถูกเปลี่ยนให้เป็นมาโลนิลโคเอนไซม์เอ (malonyl CoA : MalCoA) ในขั้นตอนนี้ยีน ACC1 ซึ่งเป็นยีนที่สร้างเอนไซม์เอนไซม์อะซีติลโคเอนไซม์เอคาร์บอกซิเลส 1 (acetyl-CoA carboxylase-1) จะเข้ามาเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนจากอะซีติลโคเอนไซม์เอให้เป็นมาโลนิลโคเอนไซม์เอ ซึ่งในขั้นตอนนี้ถือเป็นขั้นกำหนดปฏิกิริยา (rate limiting step) ของกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน เนื่องจากมาโลนิลโคเอนไซม์เอเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดไขมัน (Tehlivets, Scheuringer and Kohlwein, 2007)

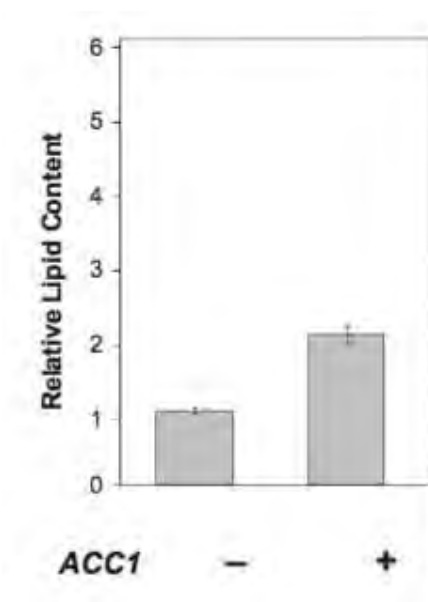


**รูปที่ 3** กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันในยีสต์ (Nielsen, 2009) (น้ำตาลกลูโคสจะถูกทำให้เปลี่ยนเป็นไพรูเวท จากนั้นไพรูเวทจะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิติลโคเอนไซม์เอ แล้วถูกเร่งด้วยเอนไซม์อะซิติลโคเอนไซม์เอคาร์บอกซิเลส1 เพื่อเปลี่ยนให้เป็นมาโลนิลโคเอนไซม์เอ และสุดท้ายจะถูกเปลี่ยนให้เป็นไตรกลีเซอไรด์สะสมไว้ภายในเซลล์)

## 5. ยีน ACC1

เนื่องจากยีน *ACC1* มีบทบาทสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันของสิ่งมีชีวิตเกือบทุกชนิด โดยยีน *ACC1* ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์อะซิติลโคเอนไซม์เอคาร์บอกซิเลส1 ซึ่งทำหน้าที่ในการเปลี่ยนอะซิติลโคเอนไซม์เอให้เป็นมาโลนิลโคเอนไซม์เอ และในขั้นตอนสุดท้ายจะถูกเปลี่ยนให้เป็นไตรกลีเซอไรด์สะสมไว้ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต จากงานวิจัยที่มีมาก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *ACC1* กับปริมาณน้ำมันที่ยีสต์ *Y. lipolytica* สะสมได้ ในการทดลองได้มีการทำให้ยีน *ACC1* มีการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้น (overexpression) จากนั้นจึงวัดปริมาณน้ำมันที่ยีสต์ชนิดนั้นสะสมได้เทียบกับยีสต์ที่ไม่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นของยีน *ACC1* จากการทดลองพบว่ายีสต์ที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นของยีน *ACC1* มีการสะสมของน้ำมันเพิ่มขึ้นถึง 1 เท่า เมื่อเทียบกับยีสต์ที่ไม่มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของยีน *ACC1* (Tai and Stephanopoulos, 2012) (รูปที่ 4) ซึ่งหมายความว่ายีน *ACC1* มีผลต่อการสะสมน้ำมันของยีสต์ *Y. lipolytica* เมื่อยีน *ACC1* มีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นส่งผลให้ปริมาณน้ำมันที่ยีสต์สะสมมากขึ้นด้วย





**รูปที่ 4** การทำให้ยีน ACC1 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (สัญลักษณ์บวก) ในยีสต์ *Y. lipolytica* เทียบกับยีสต์ *Y. lipolytica* ที่มีการแสดงออกของยีน ACC1 แบบปกติ (สัญลักษณ์ลบ) พบว่ายีสต์ *Y. lipolytica* ที่มีการแสดงออกของยีน ACC1 เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้มีการสะสมน้ำมันเพิ่มมากขึ้นถึง 1 เท่า (Tai and Stephanopoulos, 2012)

### บทที่ 3

## วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการ

#### วัสดุอุปกรณ์

- Flask (Sovirel, France)
- Tube (Pyrex, USA)
- Rack
- Micropipette (Gilson, France)
- Pipette tip (IVD, Germany)
- Plate (Merck KGaA, Germany)
- Loop
- Glass spreader
- Spatula
- Shaker (Gibthai, Thailand)
- Incubator (Mettler, France)
- Balance 4 digit (Ohaus corporation, USA)
- Slide (Sail brand, China)
- Cover slip
- Light microscope (Olympus, Japan)
- Gas chromatography GC-2010 (Bara Scientific, Thailand)

#### สารเคมี

##### 1. สารเคมีที่ใช้เลี้ยงเชื้อ

- Yeast extract (HiMedia Laboratodries Pvt. Ltd., India)
- Glucose (Ajax Finechem, Australia)
- Peptone (HiMedia Laboratodries Pvt. Ltd., India)
- Agar
- Chloramphenicol (Sigma, China)

##### 2. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบการสะสมน้ำมันของยีสต์

- Safranin O (Suvchem, India)
- Sudan Black B (Sigma-aldrich, USA)
- 95% และ 70% ethanol
- น้ำกลั่นที่ผ่านกระบวนการ autoclave

## วิธีการดำเนินงาน

### 1. เก็บตะกอนดินจากป่าชายเลน อำเภอกงหรา จังหวัดสงขลา

เก็บตะกอนดินบริเวณใต้ต้นไม้บริเวณป่าชายเลนจำนวน 3 จุด (รูปที่ 5) ได้แก่

จุดที่ 1 TP1 พิกัด 6.85281 N, 101.00228 E

จุดที่ 2 TP2 พิกัด 6.84844 N, 101.01639 E

จุดที่ 3 TP3 พิกัด 6.8482851 N, 101.0161597 E

ตะกอนดินจาก 3 แหล่งที่แตกต่างกัน (รูปที่ 6) ถูกเก็บด้วยอุปกรณ์เก็บดิน grab Ekman ที่ระดับความลึก 0-15 เซนติเมตร จากผิวดิน จุดละ 1 ครั้ง ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เก็บใส่ screw cap tube แขนในน้ำแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อขนย้าย แล้วจึงย้าย screw cap tube ทั้ง 3 หลอด เก็บไว้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส



รูปที่ 5 จุดที่เก็บตะกอนดิน บริเวณ TP1 TP2 และ TP3 บนแผนที่



รูปที่ 6 จุดที่เก็บตะกอนดิน บริเวณ TP1 TP2 และ TP3 เรียงจากซ้ายไปขวาตามลำดับ

## 2. คัดกรองยีสต์จากตะกอนดิน

2.1. นำตะกอนดินจากแต่ละจุดที่เก็บไว้ ปริมาตร 1 กรัมมาเลี้ยงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่ผสม Chloramphenicol จุดละ 1 flask เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ต่อมาจึงนำอาหารเหลว YPD ที่มีตะกอนดินไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส รอบปั่น 170 รอบต่อนาที

2.1. จากนั้นจึงนำอาหารเหลว YPD ที่มีตะกอนดินหลังจากบ่มมาทำ serial dilution แล้วจึงนำมา spread ลงบนอาหารแข็ง YPD โดย 1 dilution จะทำซ้ำทั้งหมด 3 เฟลท นำเข้าตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.2. สังเกตลักษณะฐานวิทยาของโคโลนีที่เจริญเติบโตได้บนอาหารแข็ง YPD โดยโคโลนีของยีสต์จะมีลักษณะกลม โคโลนีใหญ่ มีสีขาวขุ่น จากนั้นจึงนำโคโลนีที่คาดว่าจะโคโลนีของยีสต์มา streak ลงบน อาหารแข็ง YPD แล้วนำไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

## 3. เลี้ยงยีสต์ในภาวะที่มีกลูโคสมากเกินพอ เพื่อให้ยีสต์สะสมน้ำมันไว้ในเซลล์

นำยีสต์ที่เจริญเติบโตบนอาหารแข็ง YPD มาเลี้ยงในอาหารเหลว enrichment ที่ประกอบด้วย yeast extract 5 กรัม, peptone 5 กรัม และ glucose 70 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร (Sriwicha and Leesing, 2010) จากนั้นจึงนำเข้าตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และ 120 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส รอบปั่น 170 รอบต่อนาที

## 4. ตรวจสอบการสะสมของน้ำมันภายในเซลล์ยีสต์

นำยีสต์ที่เจริญเติบโตในอาหารเหลว enrichment มา smear ลงบนสไลด์แล้วจึงนำไปย้อมด้วยสี Sudan Black B จากนั้นจึงนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ถ้าหากยีสต์มีการสะสมของหยดน้ำมันภายในเซลล์ จะเห็นเป็นจุดสีม่วงถึงดำของสีย้อม Sudan Black B อยู่ภายในเซลล์ยีสต์

## 5. เปรียบเทียบปริมาณน้ำมันภายในยีสต์แต่ละชนิด

### 5.1 ขั้นตอนการสกัดน้ำมัน

คัดเลือกยีสต์ที่มีการสะสมของหยดน้ำมันมากที่สุดจำนวน 5 ไอโซเลตที่ได้จากการย้อมดูหยดน้ำมันด้วยเทคนิค Sudan Black B มาสกัดน้ำมันด้วยวิธี Bligh and Dyer (Pan et al., 2009) ซึ่งเป็นวิธีสกัดน้ำมันที่ได้รับการยอมรับ และเป็นวิธีที่ใช้หลักการของตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว (คลอโรฟอร์ม) และตัวทำละลายที่มีขั้ว (เมทานอล) ในการแยกน้ำมันออกมา โดยการแบ่งอาหารเหลว enrichment ที่มียีสต์เจริญเติบโตอยู่ ออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งปริมาตร 2 มิลลิลิตรนำมาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ใช้เป็นน้ำหนักเซลล์แห้งหรือชีวมวล (กรัมต่อลิตร) อีกส่วนปริมาตร 50 มิลลิลิตรนำมาสกัดน้ำมัน โดยการทำให้ผนังเซลล์ของยีสต์แตกด้วยการบ่มในกรดไฮโดรคลอริกปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส รอบปั่น 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงใส่เมทานอลต่อ

คลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส รอบปั่น 170 รอบต่อนาที ต่อมาสารละลายจะแยกออกเป็น 2 ชั้น ชั้นล่างเป็นชั้นคลอโรฟอร์ม เนื่องจากน้ำมันไม่มีขั้วจึงละลายอยู่ในชั้นนี้ และชั้นบนเป็นส่วนของเมทานอล สุดท้ายทำการดูดสารละลายชั้นคลอโรฟอร์มออกมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จะทำให้ได้ผลได้ของน้ำมัน (กรัมต่อลิตร) แล้วจึงนำมาคำนวณเพื่อให้ได้เป็นร้อยละปริมาณน้ำมันสะสมดังสมการ

$$\text{ร้อยละปริมาณน้ำมันสะสม (lipid content)} = \frac{\text{ผลได้ของน้ำมัน (กรัมต่อลิตร)}}{\text{ชีวมวล (กรัมต่อลิตร)}} \times 100\%$$

## 5.2 การตรวจสอบองค์ประกอบของกรดไขมัน

หลังจากสกัดน้ำมันตามวิธีของ Bligh and dyer (2009) แล้ว จึงเลือกยีสต์ 3 ไอโซเลตที่มีการผลิตและสะสมน้ำมันมากที่สุด มาเปลี่ยนน้ำมันให้เป็น fatty acid methyl ester (FAME) ด้วยกระบวนการทรานเอสเทอริฟิเคชัน (transesterification) (Kuan et al., 2018) จากนั้นจึงตรวจสอบองค์ประกอบของกรดไขมันด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี GC-2010

## 6. วิเคราะห์ชนิดของยีสต์

นำยีสต์ที่สังเกตเห็นว่ามีการสะสมของหยดน้ำมันส่งเพื่อระบุชนิดของยีสต์ด้วยลำดับเบสบริเวณยีน 18S rRNA ที่บริษัท กิ๊ปไทย จำกัด ประเทศไทย

## 7. ตรวจสอบยีน ACC1 จากยีสต์ที่คัดกรองได้

หลังจากคัดกรองยีสต์จากตะกอนดินและตรวจสอบการสะสมน้ำมันภายในเซลล์ยีสต์แล้ว ขั้นตอนต่อมาเป็นขั้นตอนการตรวจสอบยีน ACC1 จากยีสต์ที่คัดกรองได้ โดยเริ่มจากการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน ACC1 เพื่อใช้ในกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase chain reaction) ต่อไป ซึ่งมีขั้นตอนโดยละเอียด ดังต่อไปนี้

### 7.1 ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์

1. ดาวน์โหลดลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ACC1 จาก

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>

2. ออกแบบไพรเมอร์ให้ครอบคลุมบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ACC1 โดยคำนึงถึง

- ไพรเมอร์ต้องจำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ต้องการศึกษา
- ความยาวของไพรเมอร์ควรอยู่ระหว่าง 18-26 เบส
- สัดส่วนเบสไซโตซีนและกวานีน ในไพรเมอร์ควรอยู่ระหว่างร้อยละ 50-60

d. ค่า melting temperature (Tm) ของ forward primer และ reverse primer ไม่ควรต่างกันเกิน 5 องศาเซลเซียส

e. ภายในไพรเมอร์ไม่ควรมีลำดับเบสที่สามารถเกิด primer dimers และ primer hairpins และระหว่างไพรเมอร์ทั้งสองไม่ควรเกิด self-complementarity

หมายเหตุ : ข้อ b c d และ e สามารถตรวจสอบได้จาก

<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>

## 7.2 สกัดดีเอ็นเอ

สกัดจีโนมมิกดีเอ็นเอของยีสต์ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอจากยีสต์ Yeast DNA kit (Omega, USA) ตามคำอธิบายในคู่มือ จากนั้นนำไปตรวจวัดความบริสุทธิ์และตรวจสอบปริมาณของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer (Biotek, USA) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยใช้ปริมาณของดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตร

## 7.3 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่

เมื่อสกัดจีโนมมิกดีเอ็นเอของยีสต์แล้วจะทำการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอด้วยกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โดยใช้ปริมาตรต่อปฏิกิริยา 50 ไมโครลิตร ใช้สารเคมีดังนี้

5X Phusion taq	10	ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	1	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ 10 $\mu$ M CtACC1F (5'-CTT ACT TGT ACA TAG ACT CCC ACG-3')	2.5	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ 10 $\mu$ M CtACC1R (5'-CAG AAG CAG CAT TTG ATG GAT C-3')	2.5	ไมโครลิตร
DNA template	0.5	ไมโครลิตร
Phusion DNA polymerase	0.5	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	33	ไมโครลิตร
รวมปริมาตร	50	ไมโครลิตร

โดยใช้กระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ ทั้งหมด 20 cycles ตั้งค่าโปรแกรมดังต่อไปนี้

Pre-denature	98	องศาเซลเซียส	30	วินาที
Denature	98	องศาเซลเซียส	10	วินาที
Annealing	57	องศาเซลเซียส	30	วินาที
Extension	72	องศาเซลเซียส	30	วินาที
Final extension	72	องศาเซลเซียส	10	วินาที
Hold	15	องศาเซลเซียส		

7.4 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ ด้วยวิธี gel electrophoresis

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ ด้วยอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8% โดยเตรียมอะกาโรส 0.8 กรัม ละลายใน 1X TAE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และย้อมดีเอ็นเอด้วย Maestrosafe nucleic acid stains loading dye (Mastro) 1 ไมโครลิตร ต่อปริมาณของดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร และเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน VC 1 kb DNA ladder (Vivantis, USA) ใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เวลา 40 นาที ใน 1X TAE buffer จากนั้นเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ของกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ ทั้ง 17 ตัวอย่างที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในขั้นต่อไป

7.5 ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ACC1

ส่งผลิตภัณฑ์กระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่เพื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ACC1 ที่ปรากฏบนเจลหลังจากการทำ gel electrophoresis ที่บริษัท แปซิฟิก ไฮเอนซ์ ประเทศไทย

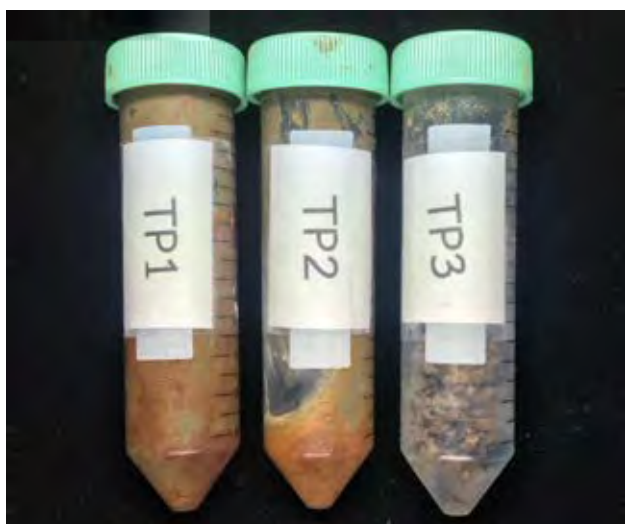
## 8. สรุปผลและเขียนรายงาน

นำข้อมูลการทดลองที่ได้ทั้งหมดมาสรุปผล วิเคราะห์ผล และเขียนเป็นรูปเล่มรายงาน ครงงานวิทยาศาสตร์

## บทที่ 4 ผลการทดลอง

### 1. เก็บตะกอนดินจากป่าชายเลน อำเภอกะทู้ จังหวัดสงขลา

จากการเก็บตะกอนดินที่ระดับความลึกไม่เกิน 15 เซนติเมตร บริเวณป่าชายเลน อำเภอกะทู้ จังหวัดสงขลา พบว่าตะกอนทั้ง 3 จุด (รูปที่ 7) ลักษณะสีและอนุภาคแตกต่างกันดังตารางที่ 1



**รูปที่ 7** ตะกอนดินที่เก็บจากป่าชายเลน อำเภอกะทู้ จังหวัดสงขลา จากบริเวณที่แตกต่างกัน 3 ที่ (โดยเก็บจากจุด TP1 TP2 และ TP3 เรียงตามลำดับจากซ้ายไปขวา)

**ตารางที่ 1** ลักษณะตะกอนดินจากแต่ละบริเวณที่เก็บตัวอย่าง

จุดที่เก็บตัวอย่าง	บริเวณที่เก็บ	พิกัด GPS	ลักษณะตะกอนดิน
จุดที่ 1 : TP1	ไต้ต้น โกงกาง	6.85281 N, 101.00228 E	ดินมีสีเทาเข้ม อนุภาคดินค่อนข้างละเอียดมีลักษณะเป็นดินเหนียว
จุดที่ 2 : TP2	ไต้ต้น โกงกาง	6.84844 N, 101.01639 E	ดินมีสีเทาปนส้ม อนุภาคดินค่อนข้างละเอียดมีลักษณะเป็นดินเหนียว
จุดที่ 3 : TP3	ไต้ต้นเสม	6.8482851 N, 101.0161597 E	ดินมีสีดำคล้ำ อนุภาคดินค่อนข้างใหญ่ มีลักษณะเป็นดินร่วน

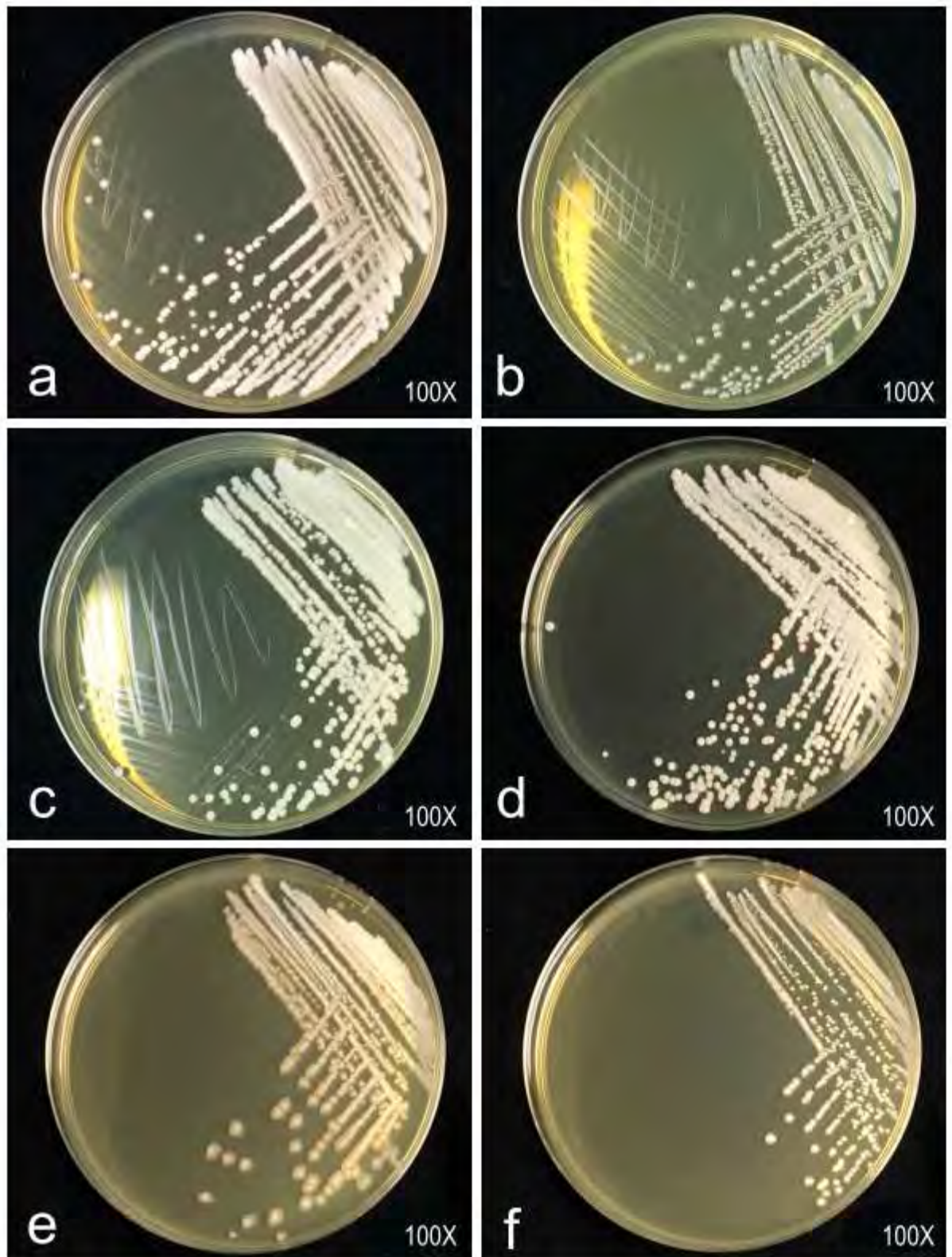


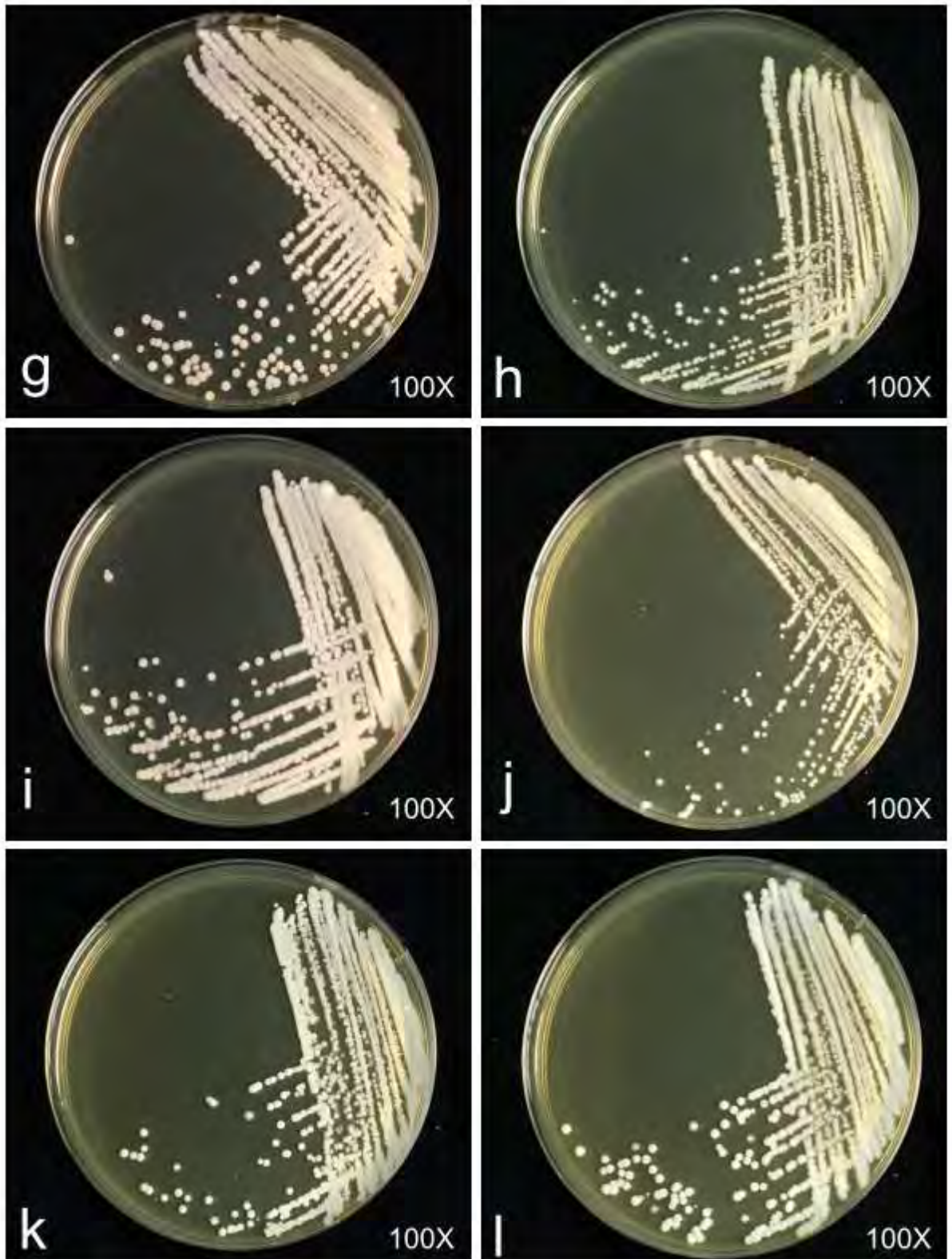
## 2. คัดกรองยีสต์จากตะกอนดิน

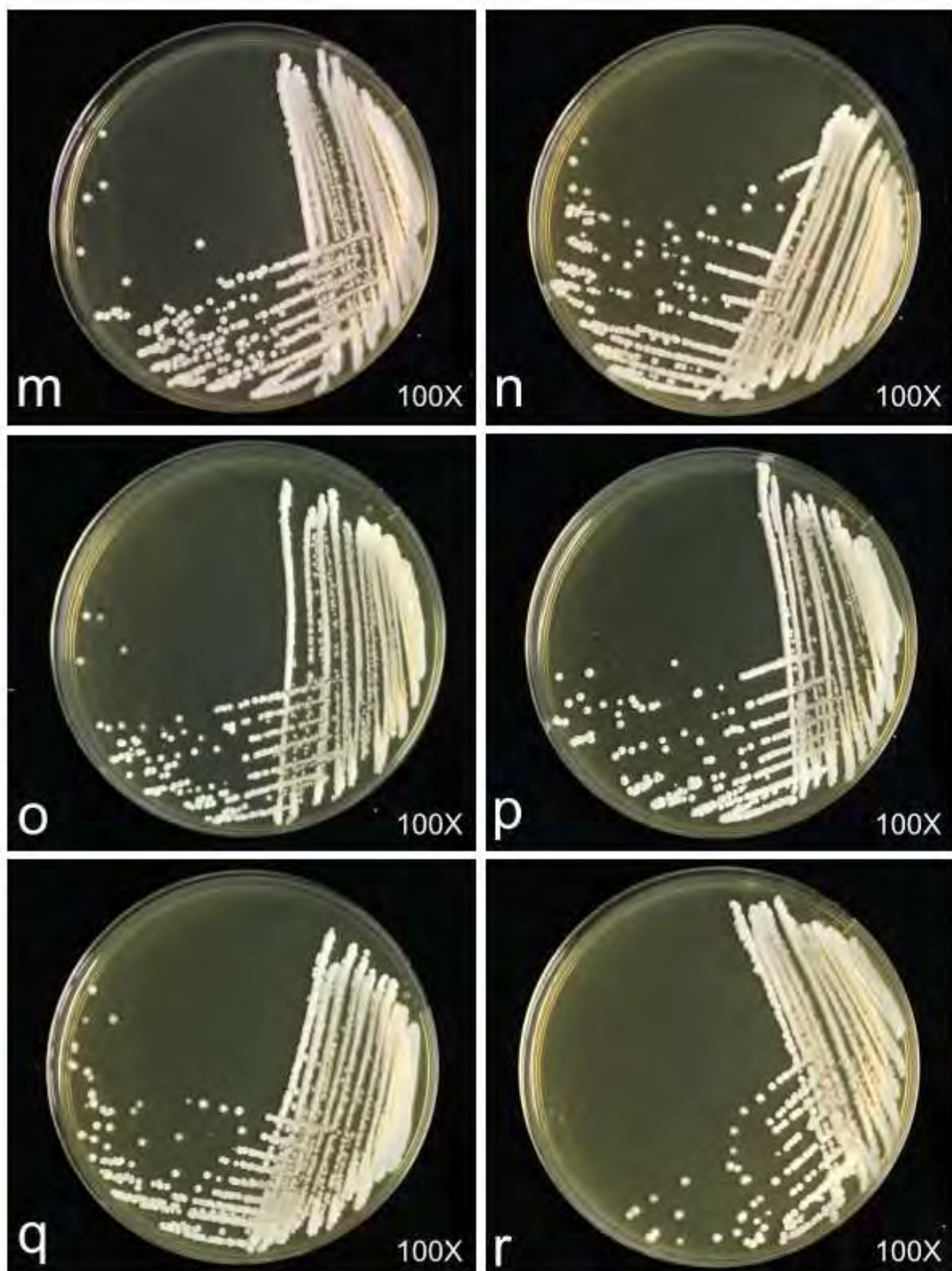
จากการคัดกรองยีสต์จากตะกอนดินทั้ง 3 จุด พบว่าได้ยีสต์จำนวน 18 ไอโซเลต (รูปที่ 8) โดยได้จากบริเวณ TP1 จำนวน 8 ไอโซเลต TP2 จำนวน 4 ไอโซเลต และจากบริเวณ TP3 จำนวน 6 ไอโซเลต ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สัณฐานวิทยาของยีสต์ที่ได้จากการคัดกรอง

จุดที่เก็บ ตัวอย่าง	สัณฐานวิทยาของยีสต์ที่ได้				
	ไอโซเลต (Isolate)	รูปร่าง (Form)	การยกตัว (Elevation)	ขอบ (Margin)	สี (Color)
จุดที่ 1 : TP1	1 : TEP1	กลม	นูน	เรียบ	ขาวขุ่น
	2 : TEP3	กลม	นูน	หยัก	ขาวขุ่น
	3 : TEP6	กลม	นูนกลม	เรียบ	ขาวขุ่น
	4 : TEP7	กลม	นูนกลม	หยัก	ขาวขุ่น
	5 : TEP11	กลม	แบน	เรียบ	ขาวขุ่น
	6 : TEP14	กลม	แบน	หยัก	ขาวขุ่น
	7 : TEP15	รูปร่างไม่แน่นอน	แบน	เรียบ	ขาวขุ่น
	8 : TEP16	รูปร่างไม่แน่นอน	แบน	หยัก	ขาวขุ่น
จุดที่ 2 : TP2	1 : TEP2	กลม	นูน	เรียบ	ขาวขุ่น
	2 : TEP5	กลม	นูนกลม	เรียบ	ขาวขุ่น
	3 : TEP9	กลม	แบน	เรียบ	ขาวขุ่น
	4 : TEP12	รูปร่างไม่แน่นอน	แบน	เรียบ	ขาวขุ่น
จุดที่ 3 : TP3	1 : TEP4	กลม	นูน	เรียบ	ขาวขุ่น
	2 : TEP8	กลม	นูน	หยัก	ขาวขุ่น
	3 : TEP10	กลม	นูนกลม	เรียบ	ขาวขุ่น
	4 : TEP13	กลม	แบน	เรียบ	ขาวขุ่น
	5 : TEP17	รูปร่างไม่แน่นอน	แบน	เรียบ	ขาวขุ่น
	6 : TEP18	รูปร่างไม่แน่นอน	นูน	เรียบ	ขาวขุ่น







**รูปที่ 8** ยีสต์ที่คัดกรองได้จากตะกอนดินบริเวณ TP1 ได้แก่รูป a b c d e f g และ h จากตะกอนดินบริเวณ TP2 ได้แก่รูป i j k และ l และจากตะกอนดินบริเวณ TP3 ได้แก่รูป m n o p q และ r

### 3. เลี้ยงยีสต์ในภาวะกลูโคสมากเกินไปและตรวจสอบการสะสมน้ำมันภายในเซลล์ยีสต์

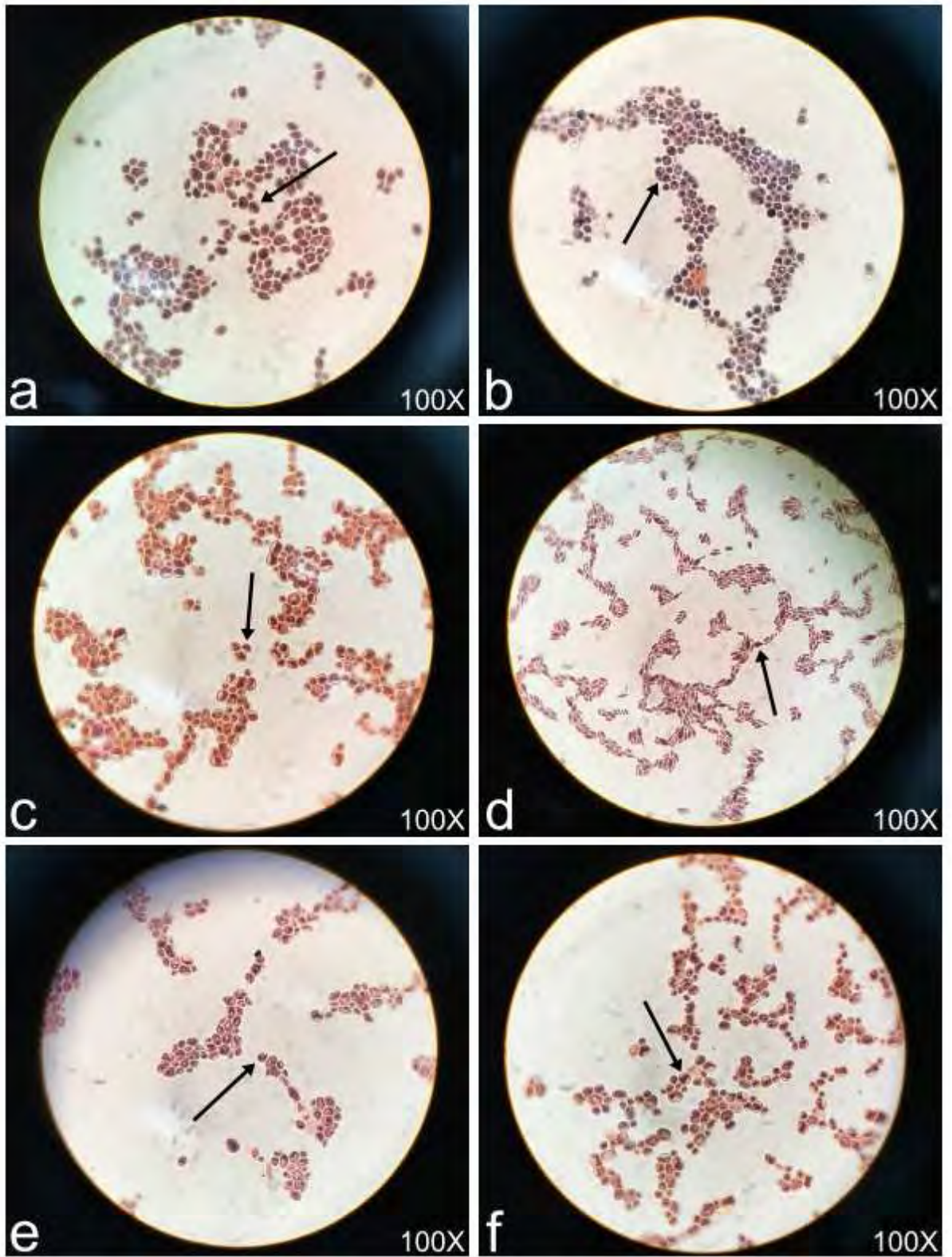
จากการตรวจสอบการสะสมของหยดน้ำมันภายในเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการเลี้ยงด้วยอาหารเหลว enrichment เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (รูปที่ 9) ด้วยสีย้อม Sudan Black B ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่าเซลล์ยีสต์ที่คัดกรองได้จากตะกอนดินบริเวณจุด TP1 TP2 และ TP3 ยีสต์บางไอโซเลตมีการสะสมของหยดน้ำมันค่อนข้างมาก ได้แก่ ไอโซเลต TEP6 TEP11 TEP12 TEP17 และ TEP18 (ตารางที่ 3) ซึ่งได้จากการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงพบว่าเห็นจุดของหยดน้ำมันสีม่วงถึงดำภายในเซลล์ยีสต์

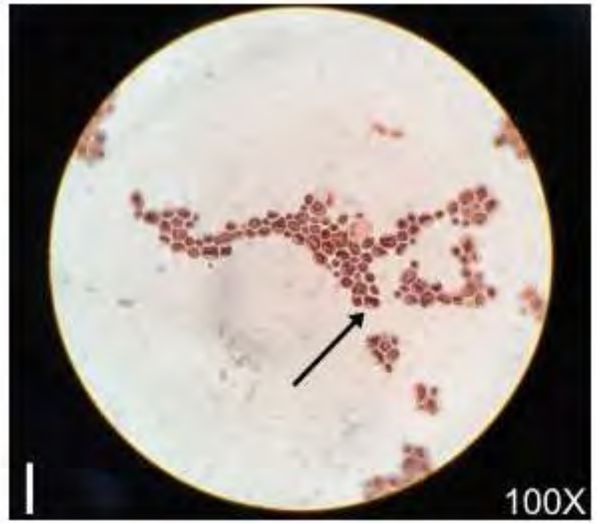
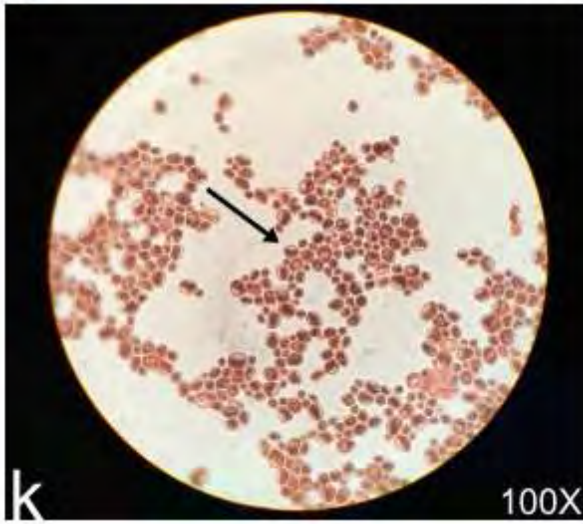
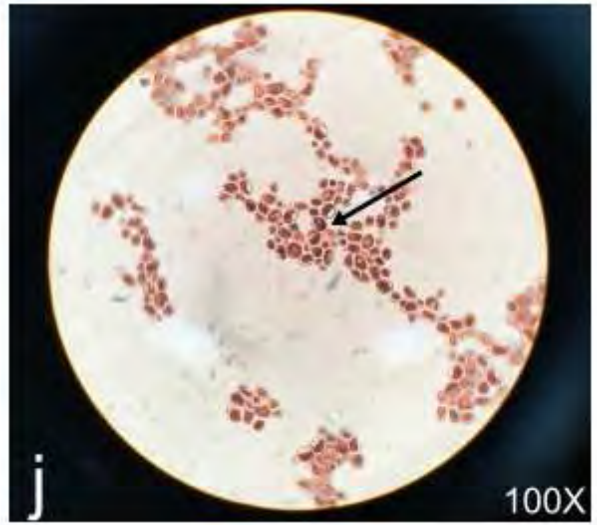
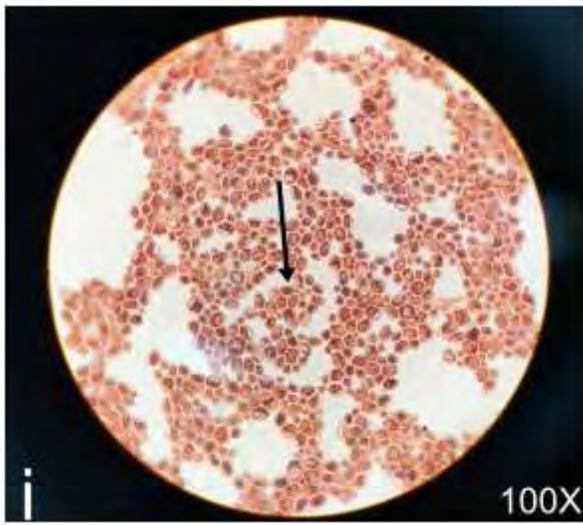
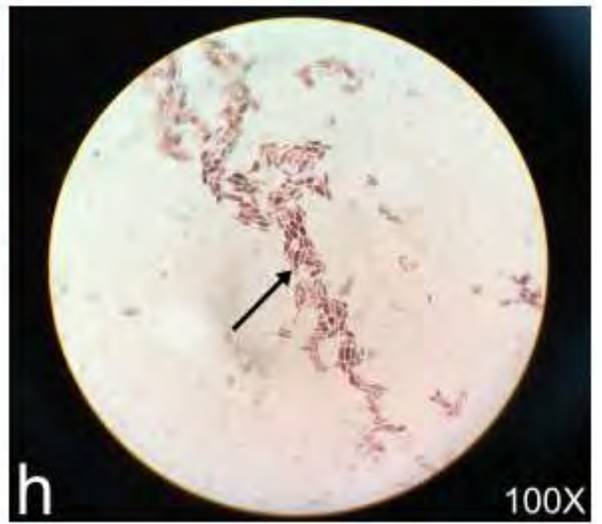
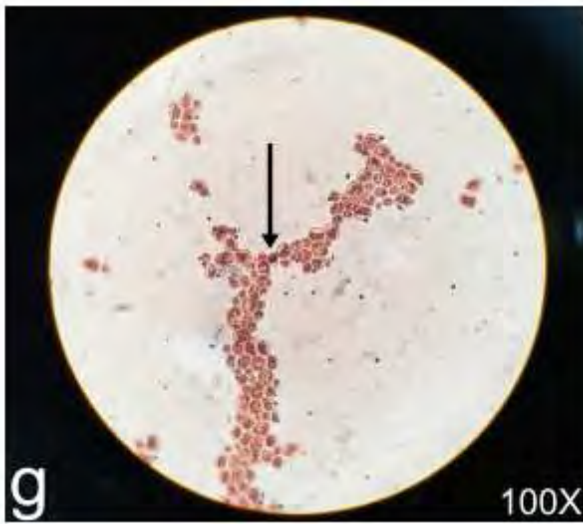
จากการตรวจสอบการสะสมของหยดน้ำมันภายในเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการเลี้ยงด้วยอาหารเหลว enrichment เป็นเวลา 120 ชั่วโมง (รูปที่ 10) ด้วยสีย้อม Sudan Black B ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่ายีสต์ทั้ง 18 ไอโซเลตมีการสะสมของหยดน้ำมันลดลง ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 3 ปริมาณหยดน้ำมันที่ยีสต์สะสมเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

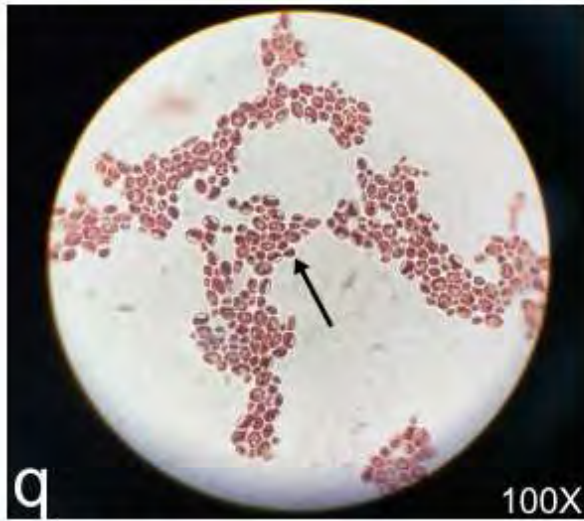
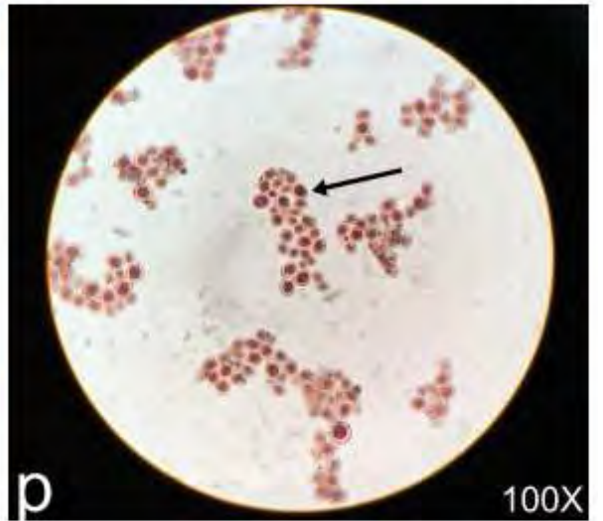
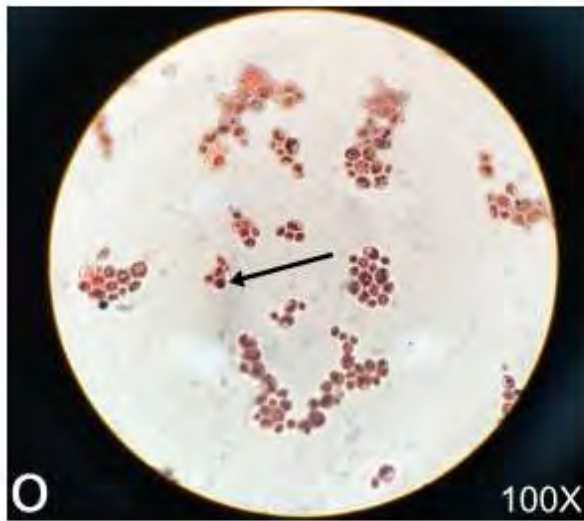
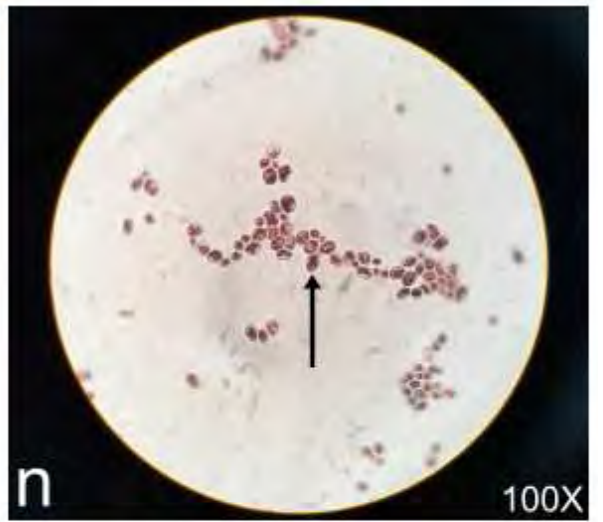
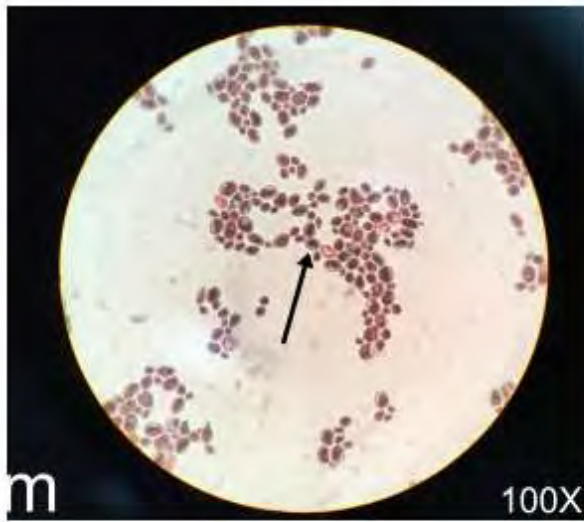
จุดที่เก็บตัวอย่าง	ไอโซเลต (Isolate)	ชนิดของยีสต์	ปริมาณหยดน้ำมัน
จุดที่ 1 : TP1	1 : TEP1	<i>Candida tropicalis</i>	+
	2 : TEP3	<i>Candida tropicalis</i>	+++
	3 : TEP6	<i>Candida tropicalis</i>	++++
	4 : TEP7	<i>Candida tropicalis</i>	+
	5 : TEP11	<i>Candida tropicalis</i>	++++
	6 : TEP14	<i>Candida tropicalis</i>	+++
	7 : TEP15	<i>Candida tropicalis</i>	+
	8 : TEP16	<i>Candida tropicalis</i>	+
จุดที่ 2 : TP2	1 : TEP2	<i>Candida sp.</i>	+++
	2 : TEP5	<i>Candida tropicalis</i>	++
	3 : TEP9	<i>Candida tropicalis</i>	++
	4 : TEP12	<i>Candida maltosa</i>	++++
จุดที่ 3 : TP3	1 : TEP4	<i>Candida tropicalis</i>	+
	2 : TEP8	<i>Candida sp.</i>	++
	3 : TEP10	<i>Candida tropicalis</i>	+
	4 : TEP13	<i>Candida tropicalis</i>	++
	5 : TEP17	<i>Candida tropicalis</i>	++++
	6 : TEP18	<i>Hanseniaspora sp.</i>	++++

โดยกำหนดให้สัญลักษณ์ + หมายถึง เซลล์ยีสต์ที่มีการสะสมหยดน้ำมันภายในเซลล์เป็นจุดเล็กๆ 1-2 จุด ++ หมายถึง เซลล์ยีสต์ที่มีการสะสมของหยดน้ำมันเป็นจุดเล็กๆ มากกว่า 2 จุด และมีการสะสมหยดน้ำมันทุกเซลล์ +++ หมายถึง เซลล์ยีสต์ที่มีการสะสมหยดน้ำมันขนาดใหญ่ มากกว่าครึ่งหนึ่งของเซลล์ทั้งหมด และ สัญลักษณ์ ++++ หมายถึง เซลล์ยีสต์ที่มีการสะสมหยดน้ำมันขนาดใหญ่ เกือบทุกเซลล์







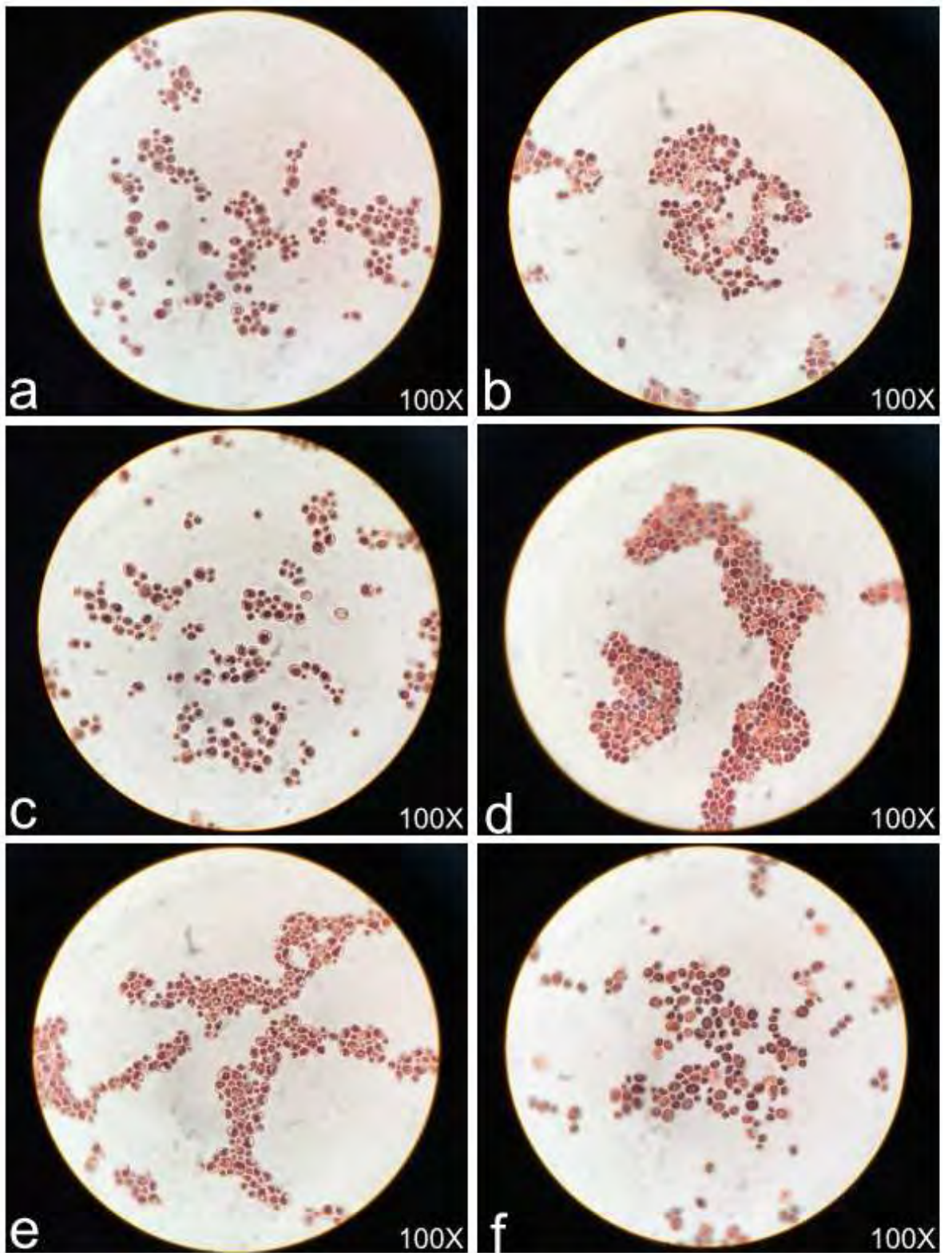


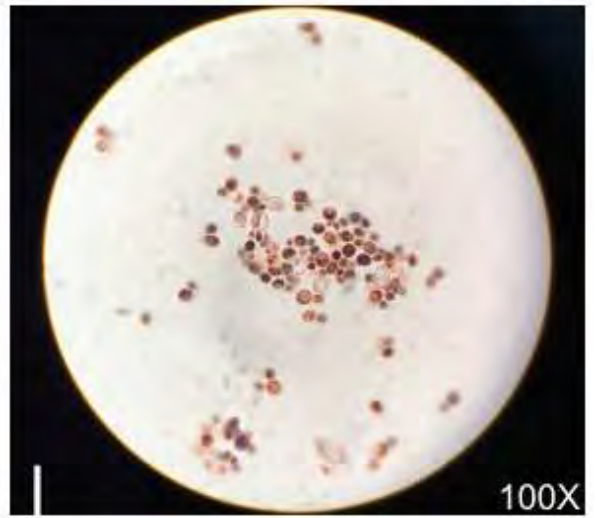
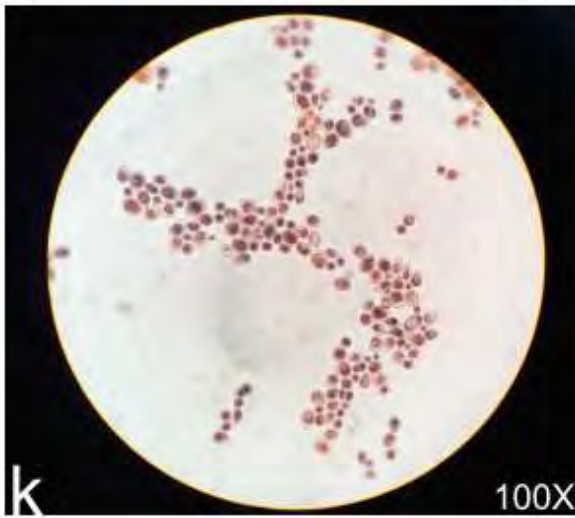
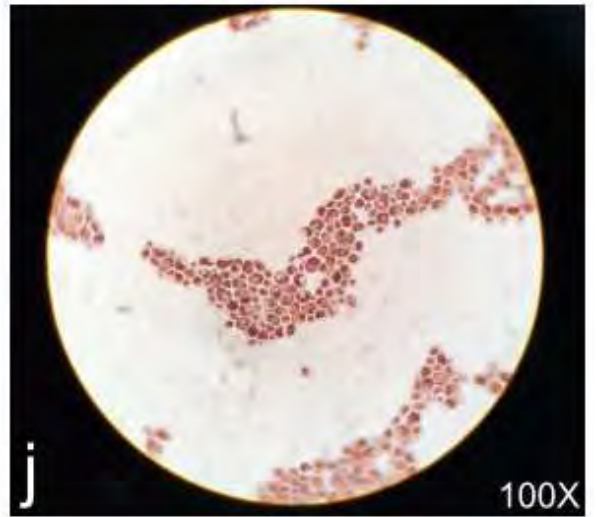
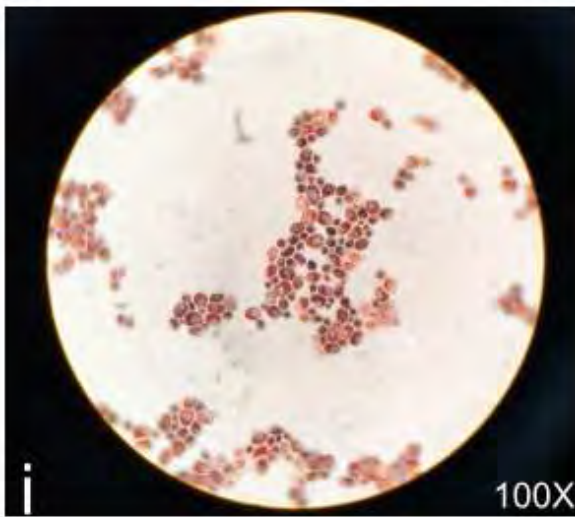
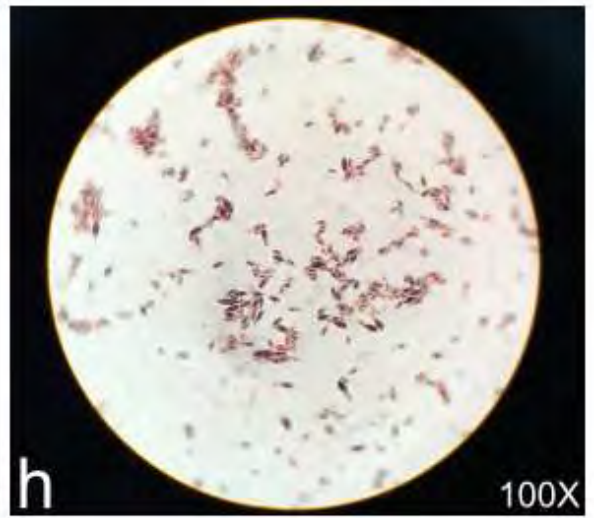
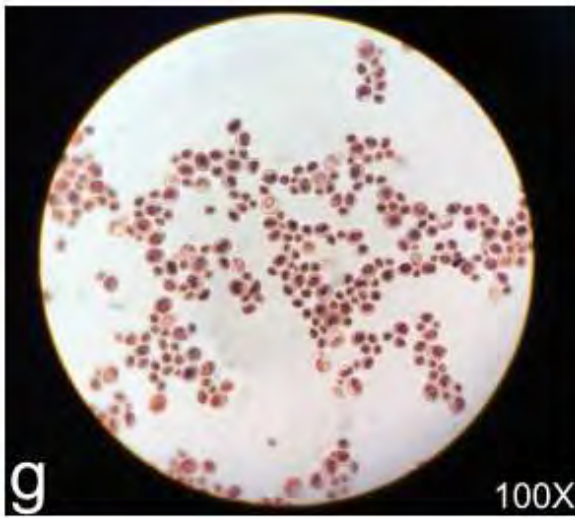
**รูปที่ 9** ยีสต์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลว enrichment เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่ติดสีย้อมของ Sudan Black B จึงเห็นเป็นจุดสีม่วงถึงดำอยู่ภายในเซลล์ตามลูกศร จากตะกอนดินทั้ง 3 แหล่ง คือ TP1 ได้แก่รูป a b c d e f g และ h จากตะกอนดินบริเวณ TP2 ได้แก่รูป i j k และ l และจากตะกอนดินบริเวณ TP3 ได้แก่รูป m n o p q และ r

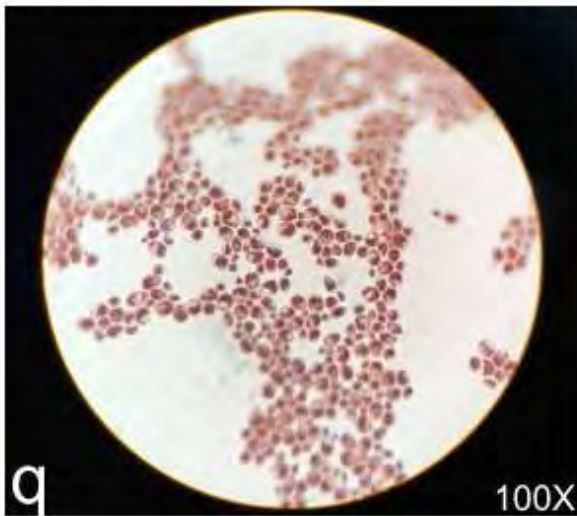
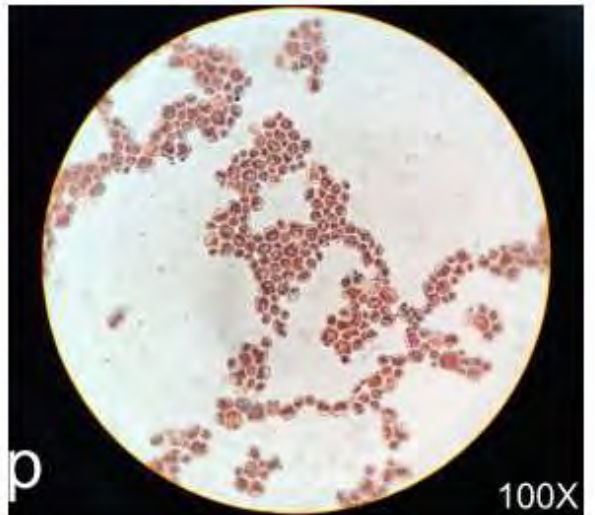
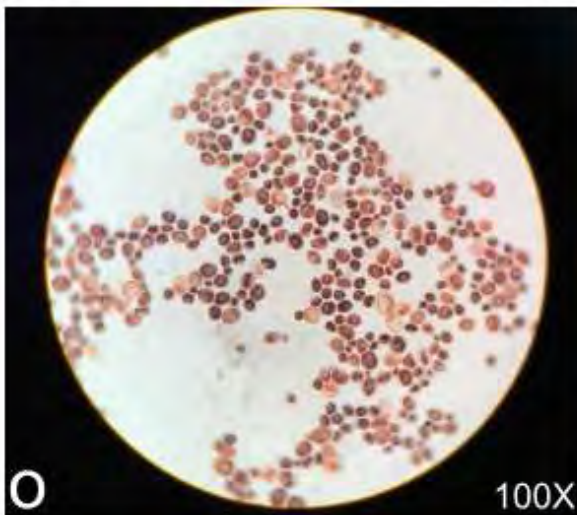
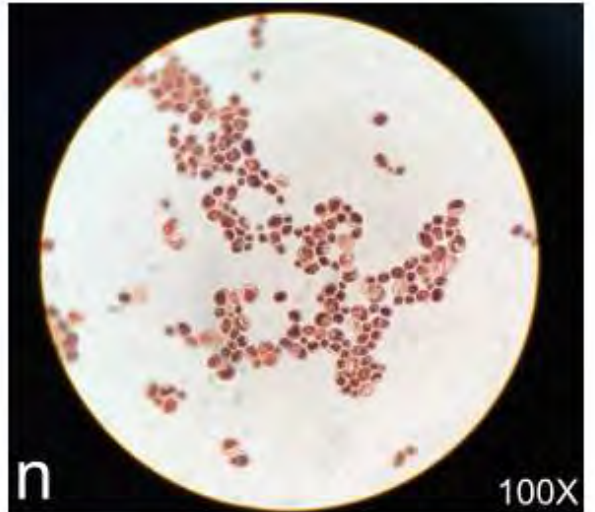
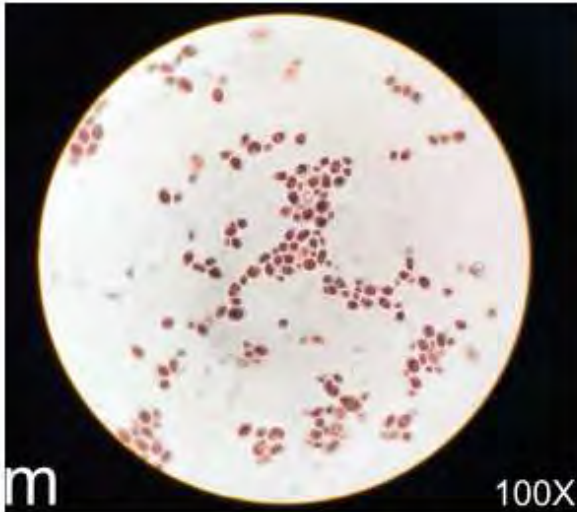
**ตารางที่ 4** ปริมาณหยดน้ำมันที่ยีสต์สะสมเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

จุดที่เก็บตัวอย่าง	ไอโซเลต (Isolate)	ชนิดของยีสต์	ปริมาณหยดน้ำมัน
จุดที่ 1 : TP1	1 : TEP1	<i>Candida tropicalis</i>	-
	2 : TEP3	<i>Candida tropicalis</i>	+
	3 : TEP6	<i>Candida tropicalis</i>	++
	4 : TEP7	<i>Candida tropicalis</i>	-
	5 : TEP11	<i>Candida tropicalis</i>	++
	6 : TEP14	<i>Candida tropicalis</i>	+
	7 : TEP15	<i>Candida tropicalis</i>	-
	8 : TEP16	<i>Candida tropicalis</i>	-
จุดที่ 2 : TP2	1 : TEP2	<i>Candida sp.</i>	+
	2 : TEP5	<i>Candida tropicalis</i>	+
	3 : TEP9	<i>Candida tropicalis</i>	+
	4 : TEP12	<i>Candida maltosa</i>	++
จุดที่ 3 : TP3	1 : TEP4	<i>Candida tropicalis</i>	-
	2 : TEP8	<i>Candida sp.</i>	+
	3 : TEP10	<i>Candida tropicalis</i>	-
	4 : TEP13	<i>Candida tropicalis</i>	+
	5 : TEP17	<i>Candida tropicalis</i>	++
	6 : TEP18	<i>Hanseniaspora sp.</i>	++

โดยกำหนดให้สัญลักษณ์ - หมายถึง เซลล์ยีสต์ไม่มีการสะสมของหยดน้ำมันภายในเซลล์ + หมายถึง เซลล์ยีสต์ที่มีการสะสมหยดน้ำมันภายในเซลล์เป็นจุดเล็กๆ 1-2 จุด ++ หมายถึง เซลล์ยีสต์ที่มีการสะสมของหยดน้ำมันเป็นจุดเล็กๆ มากกว่า 2 จุด และมีการสะสมหยดน้ำมันทุกเซลล์ +++ หมายถึง เซลล์ยีสต์ที่มีการสะสมหยดน้ำมันขนาดใหญ่ มากกว่าครึ่งหนึ่งของเซลล์ทั้งหมด และสัญลักษณ์ ++++ หมายถึง เซลล์ยีสต์ที่มีการสะสมหยดน้ำมันขนาดใหญ่ เกือบทุกเซลล์







**รูปที่ 10** ยีสต์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลว enrichment เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ที่มีการติดสีย้อมของ Sudan Black B น้อยลง จากตะกอนดินทั้ง 3 แหล่ง คือ TP1 ได้แก่วงroup a b c d e f g และ h จากตะกอนดินบริเวณ TP2 ได้แก่วงroup i j k และ l และจากตะกอนดินบริเวณ TP3 ได้แก่วงroup m n o p q และ r

#### 4. วิเคราะห์ชนิดของยีสต์

เมื่อตรวจสอบหยดน้ำมันภายในเซลล์ยีสต์ทั้ง 18 ไอโซเลต แล้วจึงส่งตรวจเพื่อระบุชนิดของยีสต์ที่บริษัท กิ๊ปไทย จำกัด ประเทศไทย พบว่ายีสต์ที่คัดกรองได้มีความใกล้เคียงกับ *Candida tropicalis* จำนวน 14 ไอโซเลต โดยแบ่งเป็นจากบริเวณ TP1 จำนวน 8 ไอโซเลต ได้แก่ TEP1 TEP3 TEP6 TEP7 TEP11 TEP14 TEP15 และ TEP16 จากบริเวณ TP2 จำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ TEP5 และ TEP9 และจากบริเวณ TP3 จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ TEP4 TEP10 TEP13 และ TEP17 นอกจากนี้ยังพบว่าใกล้เคียงกับ *Candida sp.* จำนวน 2 ไอโซเลต แบ่งเป็น จาก TP2 จำนวน 1 ไอโซเลต คือ TEP2 และ จากบริเวณ TP3 1 ไอโซเลต คือ TEP8 ยีสต์ที่ได้มีความใกล้เคียงกับ *Candida maltosa* จำนวน 1 ไอโซเลต จากบริเวณ TP2 คือ TEP12 และพบยีสต์ที่ใกล้เคียงกับ *Hanseniaspora sp.* จากบริเวณ TP3 จำนวน 1 ไอโซเลต คือ TEP18 ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ชนิดของยีสต์

จุดที่เก็บตัวอย่าง	ไอโซเลต (Isolate)	ชนิดของยีสต์	ความใกล้เคียง (%)
จุดที่ 1 : TP1	1 : TEP1	<i>Candida tropicalis</i>	99
	2 : TEP3	<i>Candida tropicalis</i>	100
	3 : TEP6	<i>Candida tropicalis</i>	99
	4 : TEP7	<i>Candida tropicalis</i>	99
	5 : TEP11	<i>Candida tropicalis</i>	100
	6 : TEP14	<i>Candida tropicalis</i>	100
	7 : TEP15	<i>Candida tropicalis</i>	99
	8 : TEP16	<i>Candida tropicalis</i>	100
จุดที่ 2 : TP2	1 : TEP2	<i>Candida</i> sp.	99
	2 : TEP5	<i>Candida tropicalis</i>	100
	3 : TEP9	<i>Candida tropicalis</i>	99
	4 : TEP12	<i>Candida maltosa</i>	91
จุดที่ 3 : TP3	1 : TEP4	<i>Candida tropicalis</i>	100
	2 : TEP8	<i>Candida</i> sp.	99
	3 : TEP10	<i>Candida tropicalis</i>	100
	4 : TEP13	<i>Candida tropicalis</i>	100
	5 : TEP17	<i>Candida tropicalis</i>	99
	6 : TEP18	<i>Hanseniaspora</i> sp.	98

## 5. เปรียบเทียบปริมาณน้ำมันภายในยีสต์แต่ละชนิด

### 5.1 การสกัดน้ำมัน

จากการสังเกตปริมาณหยดน้ำมันของยีสต์ด้วยเทคนิค Sudan Black B ภายใต้จุลทรรศน์แบบใช้แสงแล้ว จึงเลือกยีสต์ที่มีการสะสมของหยดน้ำมันมากที่สุด 5 ไอโซเลต มาสกัดน้ำมันด้วยวิธี Bligh and Dyer ได้แก่ ยีสต์ *C. tropicalis* ไอโซเลต TEP6 TEP11 และ TEP17 *C. maltosa* ไอโซเลต TEP12 และ *Hanseniaspora* sp. ไอโซเลต TEP18 ที่ผ่านการเลี้ยงด้วยอาหารเหลว enrichment เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และ 120 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเลี้ยงยีสต์ด้วยอาหารเหลว enrichment เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ยีสต์ *Hanseniaspora* sp. ไอโซเลต TEP18 มีการผลิตและสะสมน้ำมันมากที่สุดอยู่ที่ร้อยละ  $87.1 \pm 5.6$  รองลงมาเป็น *C. tropicalis* ไอโซเลต TEP6 มีการผลิตและสะสมน้ำมันร้อยละ  $40.6 \pm 1.2$  และยีสต์ที่มีการผลิตและสะสมน้ำมันเป็นอันดับที่สาม คือ *C. tropicalis* ไอโซเลต TEP11 อยู่ที่ร้อยละ  $32.5 \pm 8.7$  ดังตารางที่ 6 นอกจากนี้เมื่อเลี้ยงยีสต์ด้วยอาหารเหลว enrichment เป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่ายีสต์ทุกไอโซเลตมีการผลิตและสะสมน้ำมันน้อยลง ดังตารางที่ 7

**ตารางที่ 6** การสกัดน้ำมันของยีสต์ที่เลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ไอโซเลต	ชีวมวล (กรัมต่อ ลิตร)	ผลได้ของน้ำมัน (กรัมต่อ ลิตร)	ร้อยละปริมาณน้ำมันที่ สะสม
TEP6	4.3	1.8	40.6 ± 1.2
TEP11	5.1	1.7	32.5 ± 8.7
TEP12	6.9	1.9	28.0 ± 6.3
TEP17	5.2	1.5	28.8 ± 5.2
TEP18	5.6	1.5	87.1 ± 5.6

**ตารางที่ 7** การสกัดน้ำมันของยีสต์ที่เลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

ไอโซเลต	ชีวมวล (กรัมต่อ ลิตร)	ผลได้ของน้ำมัน (กรัมต่อ ลิตร)	ร้อยละปริมาณน้ำมันที่ สะสม
TEP6	7.2	0.6	9.3 ± 1.1
TEP11	5.6	0.5	9.8 ± 1.4
TEP12	7.2	0.7	9.8 ± 1.4
TEP17	5.7	0.6	11.1 ± 1.2
TEP18	1.5	0.6	39.7 ± 4.9

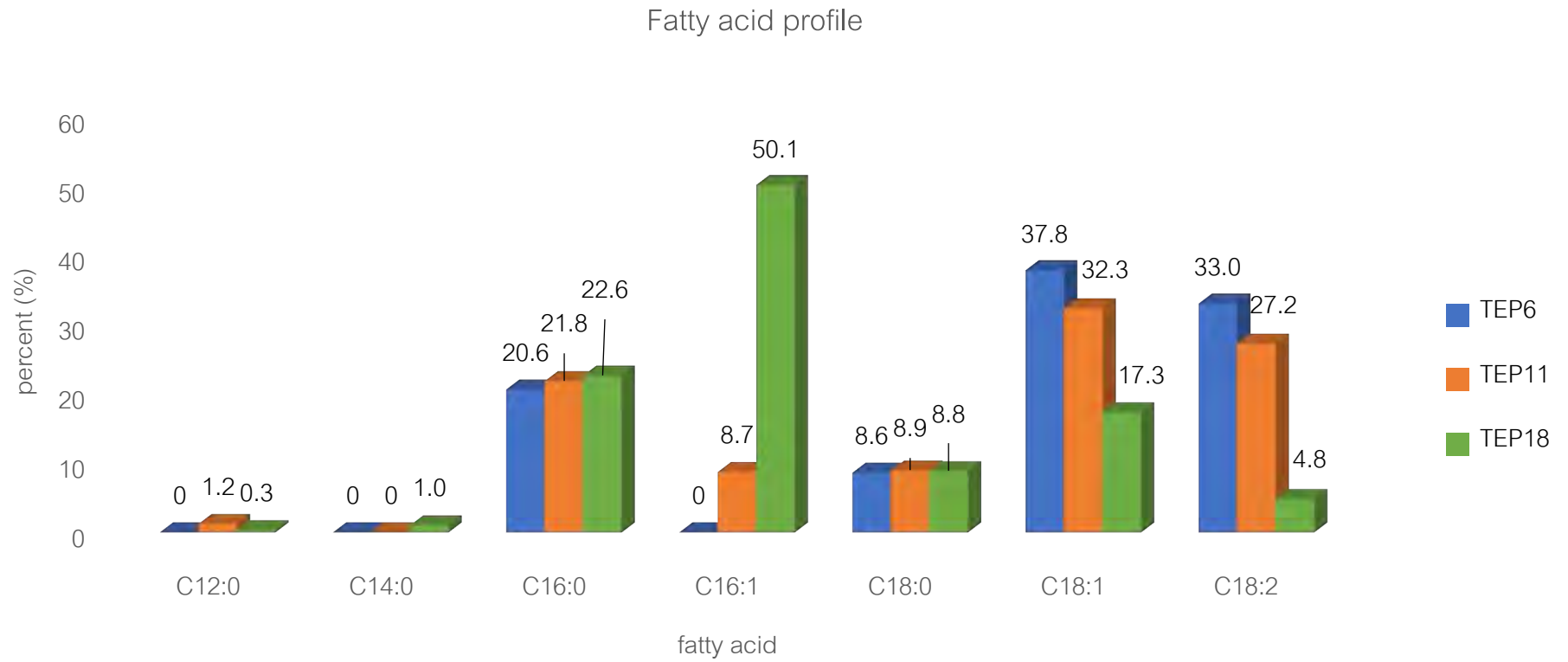
## 5.2 การตรวจสอบองค์ประกอบของกรดไขมัน

จากการเลือกยีสต์จำนวน 3 ไอโซเลตที่มีการผลิตและสะสมน้ำมันมากที่สุด คือ ไอโซเลต TEP6 TEP11 และ TEP18 มาตรวจสอบองค์ประกอบของน้ำมันโดยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีพบว่ายีสต์ *Hanseniaspora* sp. ไอโซเลต TEP18 มีองค์ประกอบของกรดปาล์มิโทเลอิก (C16:1) มากที่สุด รองลงมาเป็นกรดปาล์มิติก (C16:0) และกรดโอเลอิก (C18:1) ตามลำดับ ส่วนในยีสต์ *C. tropicalis* ไอโซเลต TEP6 และ TEP11 มีองค์ประกอบของกรดโอเลอิก (C18:1) รองลงมาเป็นกรดลิโนลิลิก (18:2) และ กรดปาล์มิติก (C16:0) ตามลำดับ (รูปที่ 11) ดังตารางที่ 8

**ตารางที่ 8** องค์ประกอบของกรดไขมัน

ไอโซเลต	C12:0 (%)	C14:0 (%)	C16:0 (%)	C16:1 (%)	C18:0 (%)	C18:1 (%)	C18:2 (%)	รวม (%)
TEP6	0.00	0.00	20.55	0.00	8.64	37.77	33.05	100.01
TEP11	1.18	0.00	21.76	8.68	8.89	32.33	27.17	94.01
TEP18	0.29	0.99	22.62	50.08	3.81	17.26	4.44	99.49





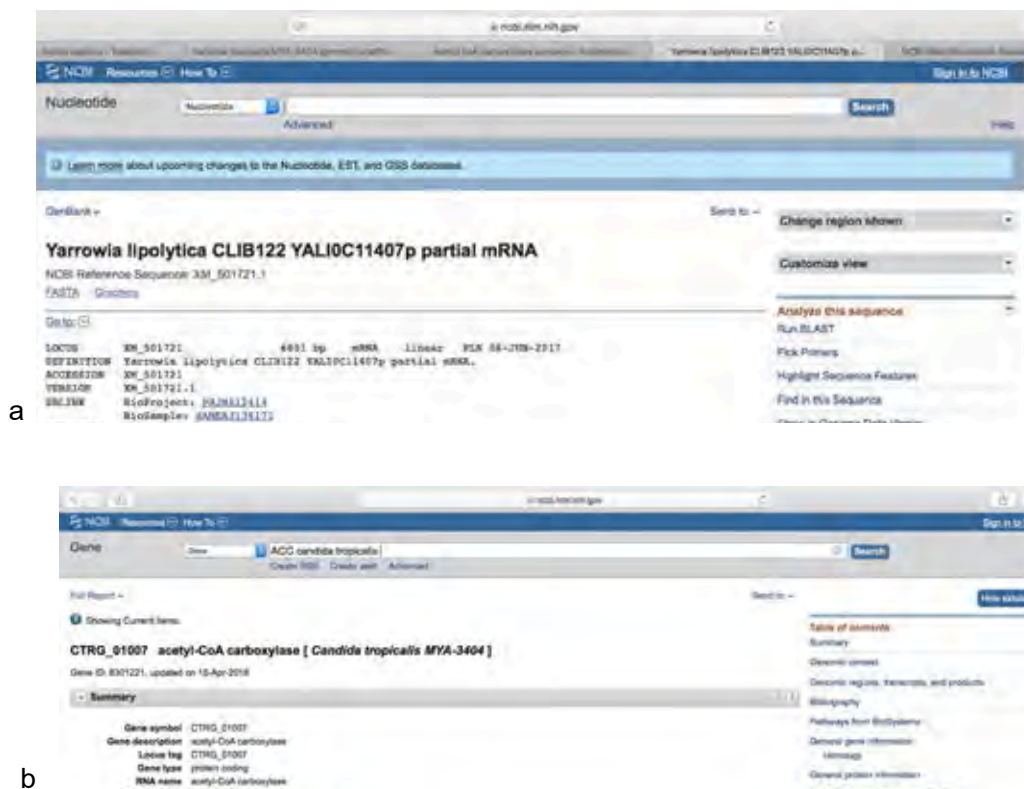
**รูปที่ 11** องค์ประกอบของกรดไขมันของยีสต์ไฮโซเลต TEP6 (สีน้ำเงิน) TEP11 (สีส้ม) ซึ่งมีองค์ประกอบของกรดโอเลอิก (C18:1) มากที่สุด และไฮโซเลต TEP18 (สีเขียว) มีองค์ประกอบของกรดปาล์มิโทเลอิกมากที่สุด (C16:1)

## 6. ตรวจสอบยีน ACC1 จากยีสต์ที่คัดกรองได้

จากการวิเคราะห์พื้นฐานข้อมูล NCBI ของยีสต์ 5 ไอโซเลตที่มีการผลิตและสะสมน้ำมันมากที่สุด คือ ยีสต์ *Hanseniaspora* sp. ไอโซเลต TEP18 *C. tropicalis* ไอโซเลต TEP6 TEP11 และ TEP17 และ *C. maltosa* ไอโซเลต TEP12 โดยการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ACC1 ยีสต์ทั้ง 3 ชนิด รวมถึง *Y. lipolytica* เพื่อใช้เปรียบเทียบกับยีสต์ที่คัดกรองได้ จากนั้นจึงตรวจสอบยีน ACC1 และไพรเมอร์ที่ใช้ด้วยกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่

### 6.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ACC1 ของ *Y. lipolytica* ในการเปรียบเทียบกับยีสต์ที่คัดกรองได้ จึงจำเป็นต้องออกแบบไพรเมอร์จากยีน ACC1 ของ *Y. lipolytica* *C. tropicalis* *C. maltosa* และ *Hanseniaspora* sp. โดยขั้นตอนแรกจะทำการค้นหาและดาวน์โหลดลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ACC1 ของยีสต์ *Y. lipolytica* และยีสต์ *C. tropicalis* จาก <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> (รูปที่ 12)



รูปที่ 12 ค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ACC1 ของ *Y. lipolytica* (รูป a) และ *C. tropicalis* (รูป b) จาก <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

จากนั้นจึงทำการออกแบบ forward primer และ reverse primer คร่อมบริเวณยีน ACC1 ของ *Y. lipolytica* และ *C. tropicalis* ทำให้ได้ forward primer และ reverse primer ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ไพรเมอร์ที่ใช้ในกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาแลงก์ไธ

ชนิดของยีสต์	Primer	Primer sequence (5' to 3')	Tm (°C)	GC content (%)	PCR products size (bp)
<i>Y. lipolytica</i>	Forward primer	5'-ATG CGA CTG CAA TTG AGG ACA C-3'	54.8	50	6801
	Reverse primer	5'-TCA CAA CCC CTT GAG CAG CTC A-3'	56.7	55	
<i>C. tropicalis</i>	Forward primer	5'- CTT ACT TGT ACA TAG ACT CCC ACG-3'	55.7	46	6825
	Reverse primer	5'- CAG AAG CAG CAT TTG ATG GAT C-3'	54	45	

แต่เนื่องจากมีฐานข้อมูล NCBI ของยีสต์ *C. maltosa* และ *Hanseniaspora* sp. มีค่อนข้างน้อย จึงไม่สามารถออกแบบไพรเมอร์ของยีสต์ทั้ง 2 ชนิดนี้ได้

## 6.2 สกัดดีเอ็นเอ

หลังจากสกัดดีเอ็นเอของยีสต์ทั้ง 5 ไอโซเลตที่มีการผลิตและสะสมน้ำมันมากที่สุด คือ ยีสต์ *C. tropicalis* ไอโซเลต TEP6 TEP11 และ TEP17 *C.maltosa* ไอโซเลต TEP12 และ *Hanseniaspora* sp. ไอโซเลต TEP 18 ด้วย Yeast DNA kit (Omega, USA) ทำให้ได้ดีเอ็นเอจากยีสต์ปริมาตรดีเอ็นเอหลอดละ 50 ไมโครลิตร

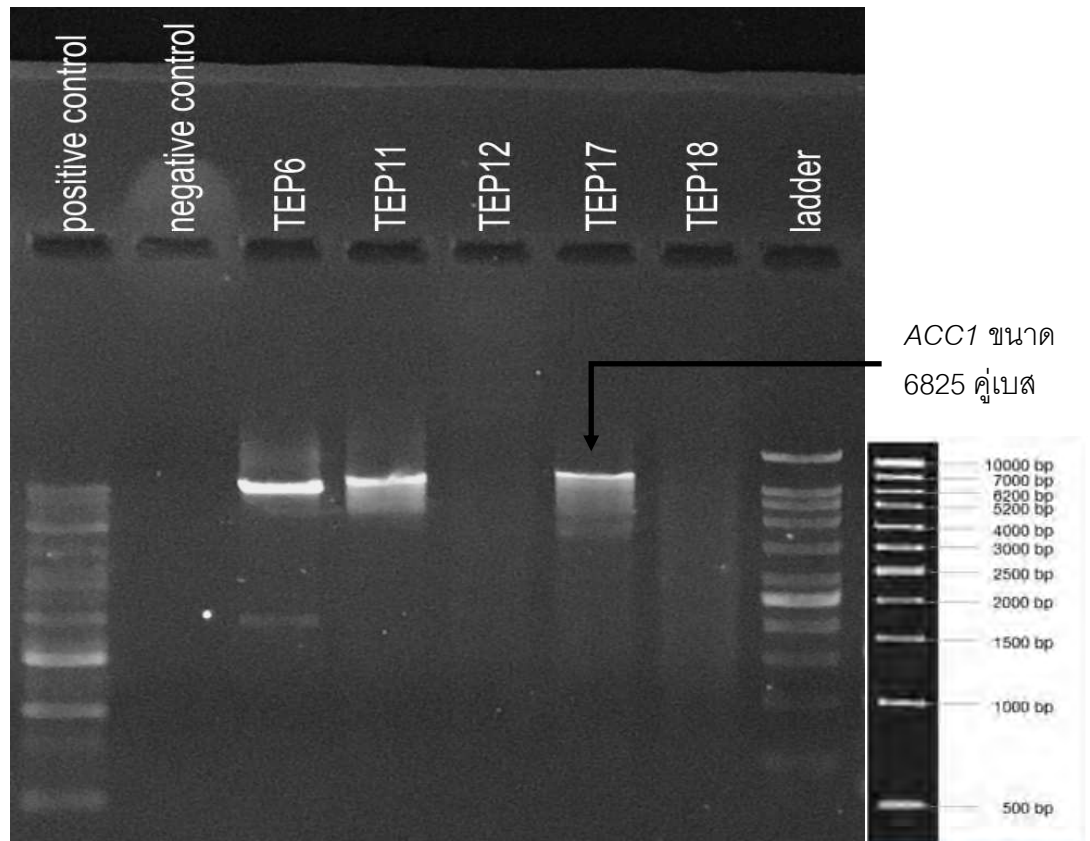
ผลจากการตรวจค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอ และตรวจค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีน ทำให้สามารถคำนวณค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอและความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) ของยีสต์ทั้ง 5 ไอโซเลต ได้ดังตารางที่ 4 พบว่าจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260/280 ส่วนใหญ่อยู่ที่ค่า 1.8-2.0 ซึ่งถือว่าดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์ และความเข้มข้นของดีเอ็นเอของยีสต์ทั้ง 5 ไอโซเลต มีความเข้มข้นมากที่สุดอยู่ที่ 246.211 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร คือ TEP6 และความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดอยู่ที่ 105.914 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร คือ TEP18 ดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร

ตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260/280	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)
YL	0.293	0.142	2.071	293.030
TEP6	0.246	0.130	1.897	246.211
TEP11	0.234	0.122	1.923	233.608
TEP12	0.158	0.084	1.886	158.298
TEP17	0.150	0.076	1.960	149.534
TEP18	0.106	0.057	1.857	105.914

### 6.3 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่

หลังจากตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา ลูกโซ่ ด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ไพรเมอร์ของ *C. tropicalis* พบแถบของดีเอ็นเอบริเวณประมาณ 7000 คู่เบส จำนวน 3 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 5 ตัวอย่าง ได้แก่ TEP6 TEP11 และ TEP17 (รูปที่ 13) ซึ่งใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ACC1* ของ *C. tropicalis* ที่มีจำนวน 6825 คู่เบส ส่วนยีสต์อีก 2 ไอโซเลตที่ไม่พบแถบของดีเอ็นเอ คือ TEP12 และ TEP18 เนื่องจากเป็นยีสต์ *C. maltosa* และ *Hanseniaspora* sp. ตามลำดับ ซึ่งไม่สามารถออกแบบไพรเมอร์ของยีสต์ทั้ง 2 ชนิดนี้ได้ จึงทดลองโดยใช้ไพรเมอร์ของ *C. tropicalis* เช่นเดียวกัน



รูปที่ 13 ผลิตรหัสดีเอ็นเอของกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่บนเจลของยีน ACC1 ของ *C. tropicalis* พบแถบของดีเอ็นเอบริเวณประมาณ 7000 คู่เบส จำนวน 3 ตัวอย่างจาก 5 ตัวอย่าง ได้แก่ TEP6 TEP11 และ TEP17

## บทที่ 5 อภิปรายการทดลอง

### 5.1 เก็บตะกอนดินจากป่าชายเลน อำเภอกงเทพา จังหวัดสงขลา

จากการเก็บตะกอนดินบริเวณป่าชายเลนในพื้นที่อำเภอกงเทพา จังหวัดสงขลา โดยเก็บทั้งหมด 3 จุดในบริเวณที่มีสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน ส่งผลให้ลักษณะของตะกอนดินที่ได้จากแต่ละบริเวณมีความแตกต่างกัน ซึ่งตะกอนดินที่เก็บจากบริเวณ TP1 เป็นบริเวณที่อยู่ใกล้กับน้ำทะเลมากที่สุด ทำให้ตะกอนดินที่ได้มีลักษณะเป็นดินเหนียว มีอนุภาคของดินที่ละเอียดและแน่นกว่าบริเวณอื่นๆ ซึ่งเกิดจากการที่ได้รับอิทธิพลของน้ำขึ้นลงอยู่เสมอ ส่วนตะกอนดินที่เก็บจากบริเวณ TP2 มีความละเอียดน้อยกว่าตะกอนดินจากบริเวณ TP1 เนื่องจากบริเวณ TP2 นี้ อยู่ไกลจากน้ำทะเลมากกว่าดินบริเวณ TP1 ส่งผลให้ได้รับอิทธิพลของน้ำทะเลน้อยกว่า ดินจึงมีความละเอียดน้อยกว่า และสุดท้ายตะกอนดินจากบริเวณ TP3 จะมีความละเอียดน้อยที่สุด เนื้อดินเป็นดินร่วนมากกว่าบริเวณอื่น เนื่องจากบริเวณ TP3 อยู่ไกลจากน้ำทะเลมากที่สุด จึงได้รับอิทธิพลของน้ำที่ทะเลน้อยที่สุด ซึ่งลักษณะของดินและพื้นที่ที่แตกต่างกันนี้ส่งผลให้พบยีสต์ที่แตกต่างกันไปในแต่ละบริเวณ

### 5.2 คัดกรองยีสต์จากตะกอนดิน

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ที่ได้จากตะกอนดินลงบนอาหาร YPD agar พบว่าตะกอนดินที่ได้จากบริเวณ TP3 มีความหลากหลายมากที่สุด เนื่องจากบริเวณนี้อยู่ไกลจากน้ำทะเลมากที่สุด จึงส่งผลให้มีจุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจน (aerobic microorganism) อยู่ในบริเวณนี้มาก ส่วนตะกอนดินที่ได้จากบริเวณ TP2 มีความหลากหลายน้อยรองลงมา และตะกอนดินที่ได้จากบริเวณ TP1 มีความหลากหลายน้อยที่สุด ซึ่งเป็นไปได้ว่าในบริเวณนี้ได้รับอิทธิพลของน้ำทะเลอยู่เสมอ จึงพบจุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจนได้น้อยกว่าบริเวณอื่นๆ ซึ่งแตกต่างจากการงานวิจัยของ Fell, Statzell-Tallman และ Kurtzman ในปี 2004 ที่ได้มีการศึกษายีสต์จากป่าชายเลนบริเวณหมู่เกาะบาฮามาส แล้วพบว่ามียีสต์จำนวนมากที่บริเวณแหล่งเก็บตัวอย่างที่อยู่ใกล้กับน้ำทะเล และหนองน้ำในป่าชายเลน

### 5.3 ตรวจสอบการสะสมน้ำมันภายในเซลล์ยีสต์

การตรวจสอบการสะสมของหยดน้ำมันภายในเซลล์ยีสต์ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเหลว enrichment โดยการย้อมด้วยเทคนิค Sudan Black B และสังเกตหยดน้ำมันภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง หรือ การวัดปริมาณน้ำมันที่สกัดด้วยวิธี Bligh and Dyer พบว่าหยดน้ำมันและปริมาณน้ำมันแต่ละไอโซเลตแตกต่างกันแม้จะเป็นเชื้อชนิดเดียวกัน ซึ่งตรงกับการศึกษาของ Dey, Banerjee และ Maiti ในปี 2011 พบว่ายีสต์แต่ละไอโซเลตมีความสามารถในการสะสมหยดน้ำมันภายในเซลล์ที่แตกต่างกันแม้ว่าจะเป็นเชื้อชนิดเดียวกัน เกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น ยีสต์ที่คัดกรองได้เป็นชนิดเดียวกันแต่คนละไอโซเลต อาหารเหลว enrichment ที่เกิดจากการเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสอาจไม่เหมาะสมสำหรับยีสต์บางไอโซเลตที่จะทำให้ยีสต์สะสมน้ำมันไว้ภายใน

เซลล์ได้ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Chi และคณะในปี 2006 ที่ได้มีการทดสอบอาหารที่เหมาะสมสำหรับยีสต์ที่คัดกรองได้จากทะเล พบว่ายีสต์ที่คัดกรองได้จากแหล่งน้ำทะเลจะเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงยีสต์ที่ประกอบด้วยน้ำทะเลดีกว่าอาหารเลี้ยงยีสต์ที่ประกอบด้วยน้ำจืด ซึ่งโครงการนี้ใช้อาหารที่ประกอบด้วยน้ำจืดในการทดลองจึงอาจส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและสะสมน้ำมันของยีสต์ที่ได้ จากนั้นเมื่อได้ทำการตรวจสอบคุณภาพน้ำมันภายในเซลล์ของยีสต์แล้ว จึงทำการส่งตรวจเพื่อระบุชนิดของยีสต์ทั้ง 18 ไอโซเลตที่มีการสะสมน้ำมัน พบว่ายีสต์ทั้งหมด 3 ชนิด คือ *C. tropicalis*, *C. maltosa* และ *Hanseniaspora* sp. ซึ่งอาจมีสาเหตุจากในบริเวณที่เก็บตะกอนดินมีความหลากหลายของยีสต์ที่ค่อนข้างน้อย เนื่องจากมีการเจริญเติบโตของยีสต์ *C. tropicalis* มาก *C. tropicalis* เป็นยีสต์ที่สามารถพบได้ทั่วไปภายในดิน ทั้งดินที่อยู่บนบกหรือดินที่อยู่ในน้ำ มีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงนอกจากนี้ยังสามารถทนความเค็มได้ดีกว่ายีสต์ชนิดอื่น จากการศึกษาของ Bastos และคณะ ในปี 2000 โดยทำการศึกษากลูซิฟิที่สามารถทนความเค็มได้จากดินแถบลุ่มน้ำอเมซอน พบว่ายีสต์ *C. tropicalis* สามารถทนความเค็มได้ดีกว่ายีสต์ชนิดอื่นๆ ด้วยสาเหตุนี้ในพื้นที่ป่าชายเลนยีสต์ชนิดอื่นจึงไม่สามารถเจริญเติบโตได้ดีเท่ากับ *C. tropicalis* ส่วนยีสต์ *C. maltosa* เป็นยีสต์ที่อยู่ในสกุล *ascmycota* ซึ่งยีสต์ในสกุลนี้ถูกระบุว่าเป็นยีสต์ที่มีความไวต่อโลหะเป็นพิษและสามารถอยู่ในพื้นที่ที่มีโลหะเป็นพิษได้ดีกว่ายีสต์สกุลอื่นๆ แต่ก็สามารถพบยีสต์นี้ในแหล่งธรรมชาติในบางพื้นที่ได้เช่นเดียวกัน เช่น ดิน หรือ ใบไม้ (*Vadkertiova and Slavikova, 2006*) และ *Hanseniaspora* sp. เป็นยีสต์ที่สามารถพบได้ทั่วไปในแหล่งธรรมชาติ ไม่ว่าจะเป็นพืชและผลไม้ที่สามารถหมักและทำเป็นไวน์ได้ เช่น องุ่น ผลไม้ตระกูลเบอร์รี่ หรือพืชที่เป็นรากและหัว เป็นต้น ในงานวิจัยที่มีมาก่อนหน้านี้เคยมีการคัดกรองยีสต์ *Hanseniaspora* sp. จากแหล่งธรรมชาติ ได้แก่ ดิน อากาศ ใบองุ่น และผลองุ่น เป็นต้น (*Raspor et al., 2006*) ยีสต์ *C. tropicalis* ถูกระบุว่าเป็นเชื้อที่ไม่ก่อโรค (*Fernandes et al., 2016*) ดังนั้นความปลอดภัยด้านการนำไปใช้งาน หรือนำไปต่อยอดจึงถือว่าเป็นเชื้อที่ค่อนข้างปลอดภัยสามารถใช้ในการศึกษาทั่วไปได้โดยไม่ต้องมีการป้องกันเป็นพิเศษ เช่นเดียวกับยีสต์ *C. maltosa* และยีสต์ *Hanseniaspora* sp. ที่มีความปลอดภัยทางชีวภาพอยู่ในระดับที่ 1 ซึ่งถือว่าเป็นเชื้อที่มีความปลอดภัยในการใช้งานและไม่ก่อโรคเช่นเดียวกัน (*Fleet, 2007*)

นอกจากนี้ในขั้นตอนการสกัดน้ำมันด้วยวิธี *Bligh and Dyer* พบว่าเมื่อเลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลว enrichment เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ยีสต์มีการสะสมน้ำมันที่ค่อนข้างมากเกือบทุกไอโซเลต แต่เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่ายีสต์ทุกไอโซเลตมีการผลิตและสะสมน้ำมันลดลง จากการศึกษาของ Tai และ Stephanopoulos ในปี 2012 พบว่ายีสต์ส่วนใหญ่จะมีการผลิตน้ำมันสูงที่สุดในช่วง 48 ชั่วโมงถึง 96 ชั่วโมง เมื่อเลยช่วงที่ยีสต์มีการผลิตและสะสมน้ำมันมากที่สุดแล้วอาหารที่ใช้เลี้ยงยีสต์จะหมดลง ทำให้ยีสต์ต้องนำน้ำมันที่ผลิตและสะสมไว้ภายในเซลล์ออกมาใช้เพื่อดำรงชีวิตต่อ ทำให้เมื่อเวลาผ่านไปจนถึง 120 ชั่วโมง ปริมาณน้ำมันที่ยีสต์ผลิตและสะสมลดลง ซึ่งกระบวนการที่ยีสต์นำน้ำมันที่ผลิตและสะสมไว้มาใช้กลับมาใช้เพื่อดำรงชีวิตต่อเรียกว่า กระบวนการ *ex novo* (*Papanikolaou, 2011*)

ขั้นตอนการวัดองค์ประกอบน้ำมันพบว่ายีสต์ *Hanseniaspora* sp. ไอโซเลต TEP18 มีองค์ประกอบของกรดปาล์มมิโทเลอิก (C16:1) มากที่สุด รองลงมาเป็นกรดปาล์มมิติก (C16:0) และ

กรดโอเลอิก (C18:1) ตามลำดับ ส่วนในยีสต์ *C. tropicalis* ไอโซเลต TEP6 และ TEP11 มีองค์ประกอบของกรดไขมันที่เหมือนกัน คือ มีกรดโอเลอิก (C18:1) มากที่สุด รองลงมาเป็นกรดลิโนลิก (18:2) และ กรดปาล์มิติก (C16:0) ตามลำดับ คล้ายคลึงกับน้ำมันที่พบในพืชส่วนใหญ่ เช่น มะพร้าว และ ปาล์ม เป็นต้น โดยจะพบองค์ประกอบของกรดปาล์มิติกซึ่งเป็นกรดไขมันอิ่มตัวมากที่สุด และรองลงมาเป็นกรดโอเลอิกที่เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว (Haun et al., 2014) น้ำมันที่ประกอบด้วยกรดไขมันเหล่านี้จะถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร หรือ อุตสาหกรรมไบโอดีเซล เพื่อใช้ทดแทนน้ำมันจากปิโตรเลียมได้

#### 5.4 ยีน ACC1 จากยีสต์ที่คัดกรองได้

จากการศึกษาสามารถออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการตรวจสอบยีน ACC1 ของยีสต์ *C. tropicalis* ที่มีความยาวถึง 6825 คู่เบส โดยออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์เริ่มต้นของยีน ไปจนถึงความยาวของยีน จากนั้นจึงทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่บนเจล พบแถบของดีเอ็นเอบริเวณประมาณ 7000 คู่เบสของยีสต์ *C. tropicalis* จำนวน 3 ไอโซเลต คือ TEP6 TEP11 และ TEP17 ซึ่งตรงกับจำนวนของยีน ACC1 ของ *C. tropicalis* ส่วนยีสต์ *C. maltosa* และ *Hanseniaspora* sp. เนื่องจากฐานข้อมูลทางชีวสารสนเทศเกี่ยวกับยีน ACC1 ของยีสต์ทั้ง 2 ชนิดนี้ค่อนข้างน้อยมาก จึงทำให้ไม่สามารถออกแบบไพรเมอร์ของยีน ACC1 ของยีสต์ทั้ง 2 ชนิดนี้ได้ นอกจากนี้ยีสต์ *Y. lipolytica* ที่จะใช้ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน ACC1 เทียบกับยีสต์ที่คัดกรองได้นั้น เมื่อทำการออกแบบไพรเมอร์และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่บนเจลแล้ว พบแถบของดีเอ็นเอขึ้นเป็นจำนวนมากตั้งแต่ 500 คู่เบสจนถึง 10000 คู่เบส เป็นไปได้ว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบไปนั้นไม่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ACC1 ของยีสต์ *Y. lipolytica* จากการศึกษาของ Arora และคณะ ในปี 2016 ได้มีการทำให้ยีน ACC1 มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในยีสต์ *Chlorella sorokiniana* พบว่ายีสต์ที่ถูกทำให้ยีน ACC1 มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นนี้มีการเปลี่ยนแปลงการเจริญเติบโตโดยทำให้เข้าสู่ระยะที่มีการเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase) ช้าลง ซึ่งส่งผลทำให้ยีสต์ชนิดนี้มีการสะสมของน้ำมันมากขึ้น หมายความว่า การแสดงออกของยีน ACC1 มีผลต่อการสะสมน้ำมันของยีสต์



## บทที่ 6

### สรุปผลการทดลอง

การคัดกรองยีสต์จากตะกอนดินทั้ง 3 จุด คือ TP1 TP2 และ TP3 พบว่าได้ยีสต์จำนวน 18 ไอโซเลต โดยได้จากบริเวณ TP1 จำนวน 8 ไอโซเลต TP2 จำนวน 4 ไอโซเลต และจากบริเวณ TP3 จำนวน 6 ไอโซเลต และเมื่อระบุชนิดของยีสต์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 18s rRNA พบว่าได้ยีสต์ *C. tropicalis* จำนวน 14 ไอโซเลต จากตะกอนดินบริเวณ TP1 จำนวน 8 ไอโซเลต บริเวณ TP2 จำนวน 2 ไอโซเลต และบริเวณ TP3 จำนวน 4 ไอโซเลต พบยีสต์ *Candida* sp. จำนวน 2 ไอโซเลต จากบริเวณ TP2 และ TP3 จุดละไอโซเลต นอกจากนี้ยังพบยีสต์ *C. maltosa* จากบริเวณ TP2 และยีสต์ *Hanseniaspora* sp. จากบริเวณ TP3

การตรวจสอบหาค่าดัชนีด้วยเทคนิค Sudan Black B และสังเกตหยดน้ำมันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ามียีสต์จำนวน 5 ไอโซเลตที่มีการสะสมหยดน้ำมันมากที่สุด ได้แก่ *C. tropicalis* ไอโซเลต TEP6 TEP11 และ TEP17 *C. maltosa* ไอโซเลต TEP12 และยีสต์ *Hanseniaspora* sp. ไอโซเลต TEP18 จากนั้นเมื่อทำการสกัดน้ำมันด้วยวิธี Bligh and Dyer พบว่ายีสต์ *Hanseniaspora* sp. ไอโซเลต TEP18 มีการผลิตและสะสมน้ำมันมากที่สุดอยู่ที่ร้อยละ  $87.1 \pm 5.6$  และ *C. maltosa* ไอโซเลต TEP12 มีการผลิตและสะสมน้ำมันน้อยที่สุดอยู่ที่ร้อยละ  $28.0 \pm 6.3$

การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันพบว่ายีสต์ *Hanseniaspora* sp. ไอโซเลต TEP18 มีองค์ประกอบของกรดปาล์มิโทเลอิก (C16:1) มากที่สุด รองลงมาเป็นกรดปาล์มิติก (C16:0) และกรดโอเลอิก (C18:1) ตามลำดับ ส่วนในยีสต์ *C. tropicalis* ไอโซเลต TEP6 และ TEP11 มีองค์ประกอบของกรดไขมันที่เหมือนกัน คือ มีกรดโอเลอิก (C18:1) มากที่สุด รองลงมาเป็นกรดลิโนลิอิก (18:2) และ กรดปาล์มิติก (C16:0) ตามลำดับ

การตรวจสอบยีน *ACC1* ของยีสต์ *C. tropicalis* พบฐานข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับยีน *ACC1* ของยีสต์ *C. tropicalis* ทำให้สามารถออกแบบไพรเมอร์ของไอโซเลต TEP6 TEP11 และ TEP17 ด้วยกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase chain reaction) และตรวจสอบผลิตภัณฑ์นั้นบนเจล พบแถบของดีเอ็นเอบริเวณ 7000 คู่เบส ซึ่งตรงกับจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่พบในฐานข้อมูลของยีสต์ชนิดนี้มีจำนวน 6825 คู่เบส จากการทดลองจึงสรุปได้ว่า

จากการศึกษาสามารถสรุปได้ว่ายีสต์ที่มีการผลิตและสะสมน้ำมันได้จะมียีน *ACC1* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันอยู่ภายในเซลล์ ดังนั้นขั้นตอนการระบุยีสต์ที่สามารถผลิตและสะสมน้ำมันได้จึงสามารถใช้ในการตรวจสอบยีน *ACC1* ร่วมกับการตรวจสอบด้วยเทคนิค Sudan Black B การสกัดน้ำมันที่ต้องมีปริมาณน้ำมันเกินร้อยละ 20 ของน้ำหนักแห้ง และการวัดองค์ประกอบของกรดไขมัน เพื่อใช้ในการบ่งบอกว่ายีสต์ชนิดนั้นเป็นยีสต์ที่มีการผลิตและสะสมน้ำมันได้

### เอกสารอ้างอิง

- ปิยะวรรณ ภูสินแก่น. 2556. *ไตรกลีเซอไรด์*. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา : <https://krukoongchemistry.wordpress.com/tag/ไตรกลีเซอไรด์/> [6 ตุลาคม 2561]
- Arora, N., Patel, A., Pruthi, A.P. and Pruthi, V. 2016. Boosting TAG accumulation with improved biodiesel production from novel oleaginous microalgae *Scenedesmus* sp. IITRIND2 utilizing waste sugarcane bagasse aqueous extract (SBAE). *Applied Biochemistry and Biotechnology* 180 : 109-121.
- Bastos, E.R.A., Moon, H.D., Rossi, A., Trevors, T.J. and Tsai, M.S. 2000. Salt-tolerant phenol-degrading microorganisms isolated from Amazonian soil samples. *Archives of Microbiology* 174 : 346-352.
- Beopoulos, A. and Nicaud J.M. 2012. Yeast: A new oil producer. *Oilseeds and Fats, Crops and Lipids* 19 : 22-28.
- Carsanba, E., Papanikolaou, S. and Erten, H. 2018. Production of oils and fats by oleaginous microorganisms with and emphasis given to the potential of the nonconventional yeast *Yarrowia lipolytica*. *Critical Reviews in Biotechnology* 1 : 1-14.
- Chi, Z., Ma, C., Wang, P. and Li H.F. 2006. Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aurerobasidium pullilans*. *Bioresource technology* 98 : 534-538.
- Cox, R. and Garcia-Palmieri, M.R. 1990. Cholesterol, triglycerides and associated lipoproteins. *The Cardiovascular System* 3 : 153-160.
- Dey, P., Banerjee, J. and Maiti, M.K. 2011. Comparative lipid profiling of two endophytic fungal isolates – *Colletotrichum* sp. and *Alternaria* sp. having potential utilities as biodiesel feedstock. *Bioresource Technology* 102 : 5815-5823.
- Fell, W.J., Statzell-Tallman, A. and Kurtzman, P.C. 2004. *Lanhankea meyersii* sp. nov., and ascosporogenous yeast from mangrove regions in the Bahama Islands. *Studies in Mycology* 50 : 359-363.
- Fernandes, A.L.J., et al. 2016. Evolution and application of inteins in *Candida* species: A review. *Frontiers in Microbiology* 7 : 1-15.
- Fleet, H.G. 2007. Yeasts in foods and beverages : impact on product quality and safety. *Current Option in Biotechnology* 18 : 170-175.
- Fontanille, P., Kumar, V., Christophe, G., Nouaille, R. and Larroche, C. 2012. Bioconversion of volatile fatty acids into lipids by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology* 114 : 443-449.

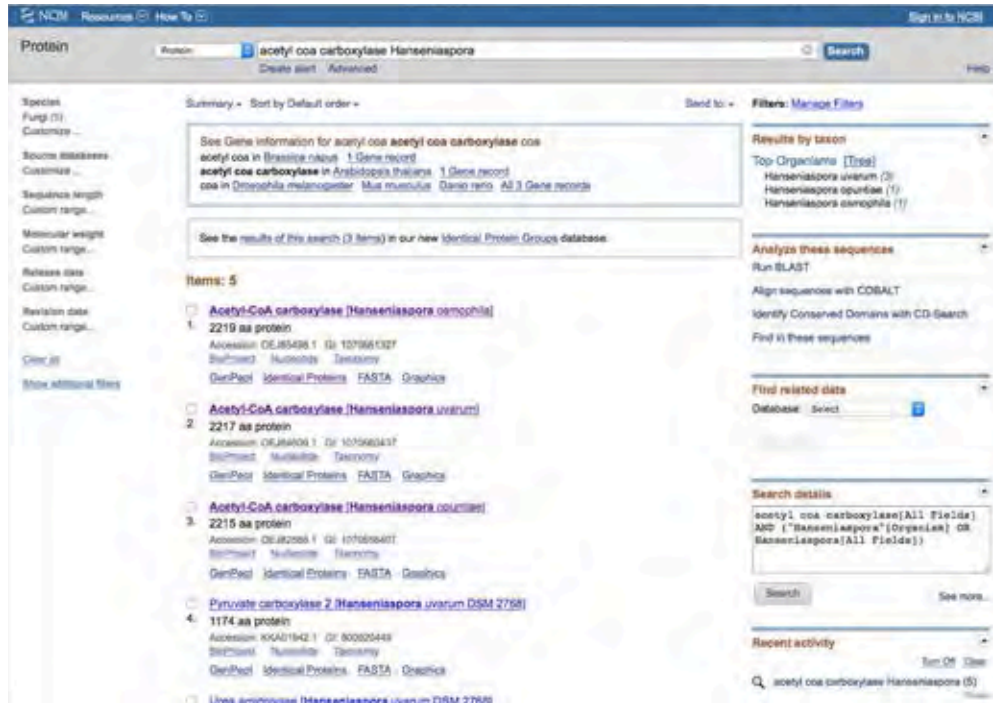
- Granek, A.J. and Magwene, M.P. 2010. Environmental and genetic determinants of colony morphology in yeast. *Plos Genetics* 6 : 1-12.
- Hablacher, M., Ivessa, A.S., Paltauf, F. and Kohlwein, S.D. 1993. Acetyl-CoA carboxylase from yeast is an essential enzyme and is regulated by factors that control phospholipid metabolism. *Biological Chemistry* 268 : 10946-10952.
- Haun, W., et al. 2014. Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family. *Plant Biotechnology Journal* 12 : 934-940.
- Kaewwichian, R. and Khamthaiklang, S. 2017. Yeast in mangrove forest soil from the central Thailand and its ability in the degradation of starch, carboxymethylcellulose and xylan. *Burapha Science Journal* 1 : 411-422.
- Klingberg, T.D., Lesnik, U., Arneborg, N., Raspor, P. and Jespersen, L. 2008. Comparison of *Saccharomyces cerevisiae* strains of clinical and nonclinical origin by molecular typing and determination of putative virulence traits. *Federation of European Microbiological Societies Yeast Research* 8 : 631-640.
- Kuan, I.C., Kao, W.C., Chen, C.L. and Yu, C.Y. 2018. Microbial biodiesel production by direct transesterification of *Rhodotorula glutinis* biomass. *Energies* 11 : 1-9.
- Lamers, D., et al. 2016. Selection of oleaginous yeasts for fatty acid production. *BMC Biotechnology* 16 : 1-15.
- Liang, M.H. and Jiang, J.G. 2013. Advancing Oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology. *Progress in Lipid Reserch* 52 : 395-408.
- Meng, X., et al. 2009. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy* 34 : 1-5.
- Neema, P.M. and Kumari, A. 2013. Isolating of lipid producing yeast and fungi from secondary sewage sludge and soil. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 7 : 283-285.
- Nielsen, J. 2009. Systems biology of lipid metabolism: From yeast to human. *Federation of European Biochemical Societies Letter* 583 : 3905-3913.
- Pan, L.X., et al. 2009. Isolation of the oleaginous yeasts from the soil and studies of their lipid-producing capacities. *Food Technology and Biotechnology* 47 : 215-220.
- Papanikolaou, S. 2011. Oleaginous yeasts: biochemical events related with lipid synthesis and potential biotechnological applications. *Fermentation technology* 1 : 1-3.
- Qier Sha. 2013. *A Comparative Study on Four Oleaginous Yeasts on Their Lipid Accumulating Capacity*. Master's Thesis, Department of Microbiology, Faculty of

Natural Resources and Agricultural Science, Swedish university of agricultural science.

- Raspor, P., Milek, M.D., Polanc, J., Mozina, S.S. and Cadez, N. 2006. Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. *International Journal of Food Microbiology* 109 : 97-102.
- Schwartz, D.M. and Wolins, N.E. 2007. A simple and rapid method to assay triacylglycerol in cells and tissues. *Journal of Lipid Research* 48 : 2514-2520.
- Sitepu, I., Selby, T., Lin, T., Zhu, S. and Boundy-Mills, K. 2015. Carbon source utilization and inhibitor tolerance of 45 oleaginous yeast species. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 41 : 1061-1070.
- Sriwicha, A. and Leesing, R. 2010. Lipid production by oleaginous yeast and its use as feedstock for biodiesel preparation in *the 11<sup>th</sup> graduate research conference*, 837-843. Khon Kaen university.
- Tai, M. and Stephanopoulos, G. 2012. Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. *Metabolic Engineering* 15 : 1-9.
- Tehlivets, O., Scheuringer, K. and Kohlwein S.D. 2007. Fatty acid synthesis and elongation in yeast. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1771 : 255-270.
- Vadkertiova, R. and Slaviokava, E. 2006. Metal tolerance of yeasts isolated from water, soil and plant environments. *Journal of Basic Microbiology* 46 : 145-152.

ภาคผนวก

ฐานข้อมูลยีน ACC1 ของยีสต์ *Hanseniaspora* sp.



ภาพการระบุชนิดยีสต์ด้วยยีน 18S rRNA ของ *C. maltosa* ไอโซเลต TEP12

Gene	Accession	Length	GC	Strain	Gene	Accession	Length	GC	Strain	Accession	Length	GC	Strain	Accession	Length	GC	Strain	Accession	Length	GC	Strain
190222-04	1179	5	1177	-	EF122909	1725	45	1202	1521	51	5.0	1562	1188	51	PlusPlus						
190222-04	1281	5	569	-	AF764713	1721	4687	949	1602	567	5.2	556	564	57	PlusMinus						

ภาพการระบุชนิดยีสต์ด้วยยีน 18S rRNA ของ *Hanseniaspora* sp. ไอโซเลต TEP18

Gene	Accession	Length	GC	Strain	Gene	Accession	Length	GC	Strain	Accession	Length	GC	Strain	Accession	Length	GC	Strain	Accession	Length	GC	Strain
190409-04	1176	5	1172	-	JJ289985	1580	7	1176	5208	1113	5.0	1154	1172	55	PlusPlus						
190409-04	1210	5	1165	-	JJ289985	1680	574	566	5071	1121	5.0	1103	1101	50	PlusMinus						

ภาพการระบุชนิดยีสต์ด้วยยีน 18S rRNA ของ *C. tropicalis* ไอโซเลต TEP6

## Standard ID



### 18S rRNA service report

Order Number : 190122FN-090

Sample name : TEP6\_contig\_1

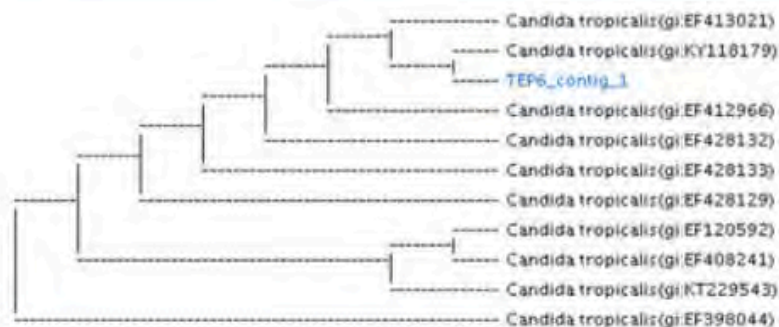
#### Information

##### Primer Information

Sequencing Primer Name	Primer Sequences	PCR Primer Name	Primer Sequences
NS1 5'	(GTA GTC ATA TGC TTG TCT C) 3'	NS1 5'	(GTA GTC ATA TGC TTG TCT C) 3'
NS8 5'	(TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA) 3'	NS8 5'	(TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA) 3'

Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E-Value	Match/Total	Pct. Id.
KY118179.1	Candida tropicalis	1715	33	1682	96	3040	0.0	1649/1650	99

Kingdom	Family	Genus	Species
Eukaryota	Debaryomycetaceae	Candida	Candida tropicalis

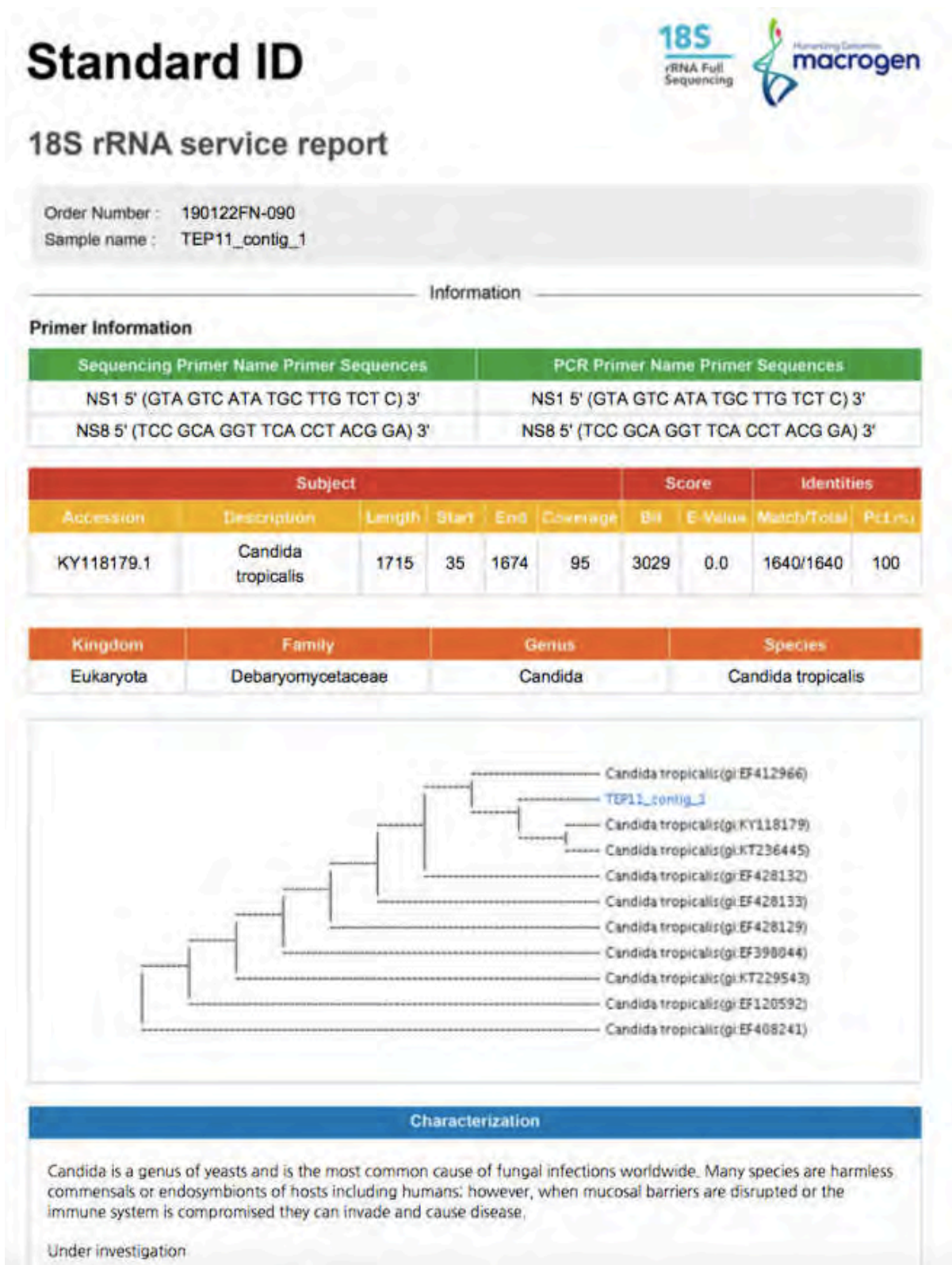


#### Characterization

*Candida* is a genus of yeasts and is the most common cause of fungal infections worldwide. Many species are harmless commensals or endosymbionts of hosts including humans; however, when mucosal barriers are disrupted or the immune system is compromised they can invade and cause disease.

Under investigation

ภาพการระบุชนิดยีสต์ด้วยยีน 18S rRNA ของ *C. tropicalis* ไอโซเลต TEP11



ภาพการระบุชนิดยีสต์ด้วยยีน 18S rRNA ของ *C. tropicalis* ไอโซเลต TEP17

## Standard ID



### 18S rRNA service report

Order Number : 190122FN-090  
Sample name : TEP17\_contig\_1

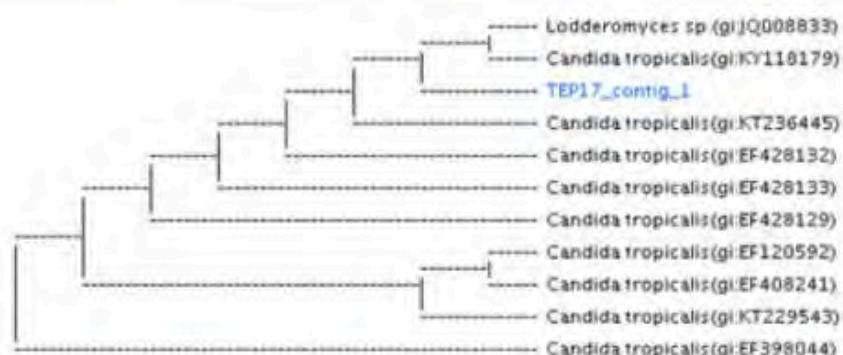
#### Information

##### Primer Information

Sequencing Primer Name	Primer Sequences	PCR Primer Name	Primer Sequences
NS1	5' (GTA GTC ATA TGC TTG TCT C) 3'	NS1	5' (GTA GTC ATA TGC TTG TCT C) 3'
NS8	5' (TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA) 3'	NS8	5' (TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA) 3'

Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E-Value	Match/Total	Pct.(%)
KY118179.1	Candida tropicalis	1715	34	1682	96	3038	0.0	1648/1649	99

Kingdom	Family	Genus	Species
Eukaryota	Debaryomycetaceae	Candida	Candida tropicalis



#### Characterization

Candida is a genus of yeasts and is the most common cause of fungal infections worldwide. Many species are harmless commensals or endosymbionts of hosts including humans; however, when mucosal barriers are disrupted or the immune system is compromised they can invade and cause disease.

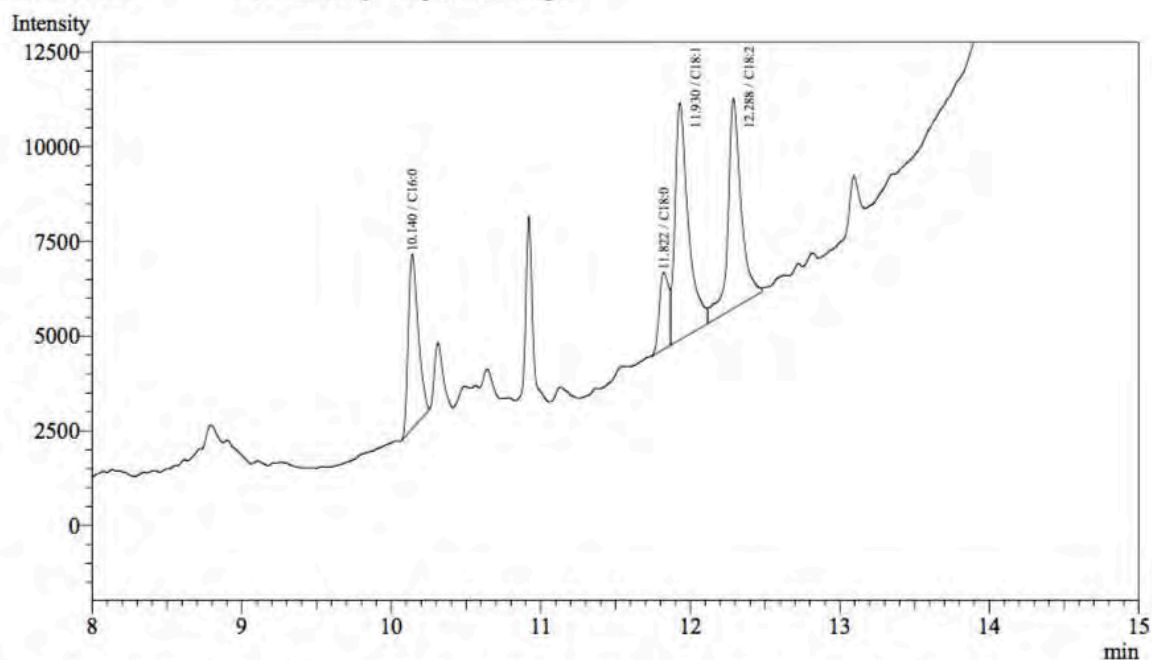
Under investigation



ภาพ chromatogram ของ *C. tropicalis* ไขมันเล็ด TEP6

Analysis Date & Time : 2/5/2562 16:39:33  
 User Name : Admin  
 Vial# : 10  
 Sample Name : TEP6 new  
 Sample ID :  
 Sample Type : Unknown  
 Injection Volume : 1.00  
 ISTD Amount :

Data Name : D:\mink\2.05.19\TEP6 new edit.gcd  
 Method Name : D:\mink\Fatty acid profiles used.gcm

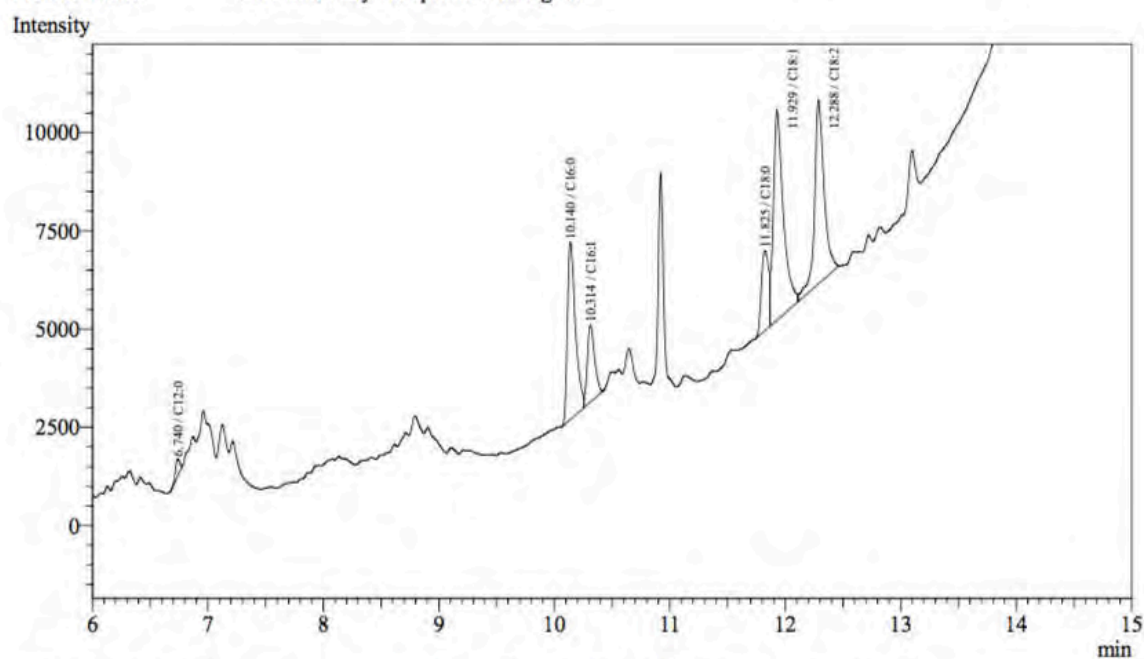


Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	10.140	21281	4606	20.547	%		3	C16:0
2	11.822	8944	2027	8.636	%		5	C18:0
3	11.930	39120	6250	37.771	%	V	6	C18:1
4	12.288	34225	5535	33.046	%	V	7	C18:2
<b>Total</b>		<b>103570</b>	<b>18418</b>					

ภาพ chromatogram ของ *C. tropicalis* ใต้เซลล์ TEP11

Analysis Date & Time : 2/5/2562 16:09:40  
 User Name : Admin  
 Vial# : 9  
 Sample Name : TEP11 new  
 Sample ID :  
 Sample Type : Unknown  
 Injection Volume : 1.00  
 ISTD Amount :

Data Name : D:\mink\2.05.19\TEP11 new edit.gcd  
 Method Name : D:\mink\Fatty acid profiles used.gcm

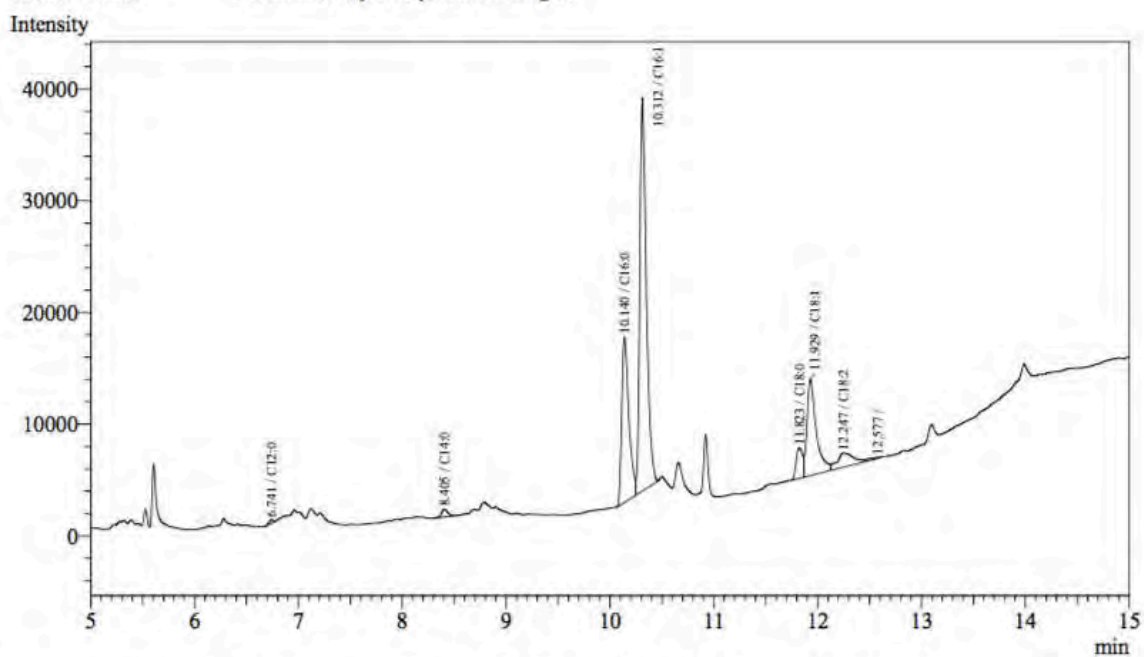


Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	6.740	1173	419	1.180 %			1	C12:0
2	10.140	21611	4504	21.755 %			3	C16:0
3	10.314	8618	1960	8.676 %	V		4	C16:1
4	11.825	8829	2044	8.888 %			5	C18:0
5	11.929	32113	5325	32.327 %	V		6	C18:1
6	12.288	26994	4670	27.174 %	V		7	C18:2
<b>Total</b>		<b>99338</b>	<b>18922</b>					

ภาพ chromatogram ของ *Hanseniaspora* sp. ไอลิเชต TEP18

Analysis Date & Time : 2/5/2562 15:39:49  
 User Name : Admin  
 Vial# : 8  
 Sample Name : TEP18 new  
 Sample ID :  
 Sample Type : Unknown  
 Injection Volume : 1.00  
 ISTD Amount :

Data Name : D:\mink\2.05.19\TEP18 new edit.gcd  
 Method Name : D:\mink\Fatty acid profiles used.gcm



Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	6.741	910	298	0.294	%		1	C12:0
2	8.405	3061	705	0.990	%		2	C14:0
3	10.140	69921	14815	22.620	%		3	C16:0
4	10.312	154814	35195	50.084	%	V	4	C16:1
5	11.823	11785	2727	3.813	%		5	C18:0
6	11.929	53357	8627	17.261	%	V	6	C18:1
7	12.247	13731	1258	4.442	%	V	7	C18:2
8	12.577	1531	117	0.495	%	V		
Total		309110	63742					