



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ	การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายแบบส่มของยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไขมันโดยรังสีอัลตราไวโอเล็ต
ชื่อนิสิต	นางสาวปณัสยา ฤกษ์กว้าง เลขประจำตัวนิสิต 5932127623
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
ปีการศึกษา	2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายแบบสุ่มของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*
เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไขมันโดยรังสีอัลตราไวโอเล็ต

นางสาวปณัสยา ถากว้าง

โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2562

Randomization mutagenesis of *Saccharomyces cerevisiae*
to increase lipid production by ultraviolet radiation

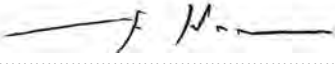
Mrs. Panassaya Thakwang

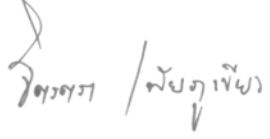
A Senior Project in Partial Fulfillment of the Requirements
For the Degree of Bachelor of Science in Genetics
Department of Botany Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2019

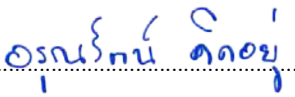
ชื่อโครงการวิทยาศาสตร์	การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายแบบสุ่มของยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไขมันโดยรังสีอัลตราไวโอเล็ต
ชื่อนิสิต	ปณัสยา ถากว้าง
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์.ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณ์านุกูล
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
ปีการศึกษา	2562

ภาควิชาพฤกษศาสตร์อนุมัติให้โครงการวิทยาศาสตร์นี้เป็นส่วนหนึ่งของภาคการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์

คณะกรรมการสอบโครงการวิทยาศาสตร์


อาจารย์ที่ปรึกษา
 (รองศาสตราจารย์.ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณ์านุกูล)


กรรมการ
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตรตรา เพ็ญเขียว)


กรรมการ
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรุณรัตน์ คัดอยู่)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิทยาศาสตร์	การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายแบบสุ่มของยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไขมันโดยรังสีอัลตราไวโอเล็ต
ชื่อนิสิต	ปณัสยา ธากว้าง
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์.ดร. วรวิทย์ จุฬาลักษณ์านุกูล
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
ปีการศึกษา	2562

บทคัดย่อ

Saccharomyces cerevisiae เป็นยีสต์ที่มีการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวาง เนื่องจากมีความสามารถในการผลิตเอทานอลและผลิตสารประกอบประเภทไขมันที่มีมูลค่าทางการตลาด โครงการนี้มีจุดประสงค์เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไขมันของยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TPD2 โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายแบบสุ่มด้วยวิธีการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต และคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่กลายด้วย cerulenin ผลการทดลองเมื่อฉายรังสีเป็นระยะเวลา 9 - 25 นาที พบยีสต์ที่มีอัตราการรอดน้อยกว่าร้อยละ 5 จำนวน 109 ไอโซเลท จากนั้นคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่กลายโดยนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง yeast-extract-peptone ผสม cerulenin และทำการคัดเลือกยีสต์ที่เจริญบนอาหารดังกล่าวแบบสุ่ม เพื่อนำมาทดสอบต่อไป จากผลการทดลองสามารถคัดเลือก *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TPD2 สายพันธุ์ที่กลายได้ 1 ไอโซเลท คือ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่กลาย CE9.5 โดยมีร้อยละปริมาณน้ำมันต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (ร้อยละ 9.37 ± 0.19) เพิ่มขึ้นร้อยละ 2.25 อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (ร้อยละ 11.62 ± 1.23) จากผลการวิเคราะห์ชนิดกรดไขมัน พบว่ายีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่กลาย CE9.5 มีการสร้างกรดไขมันชนิดโอเลอิก (C18:1), กรดปาล์มิโตเลอิก (C16:1), กรดปาล์มิติก (C16:0) และกรดสเตียริก (C18:0) เป็นส่วนใหญ่ ทั้งนี้พบกรดไขมันชนิดไมริสติก (C14:0) ด้วย (ร้อยละ 0.51 ± 0.02) เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในยีน *acetyl-CoA carboxylase (ACC1)* ซึ่งเป็นยีนที่มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน พบว่า *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่กลาย CE9.5 มีการเปลี่ยนแปลงแทนที่เบส 2 ตำแหน่งคือ G3477T และ G3484T

คำสำคัญ: ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*, กรดไขมัน, ยีน *acetyl-CoA carboxylase (ACC1)*,
ฉายรังสี

Title	Randomization mutagenesis of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> to increase lipid production by ultraviolet radiation
Student name	Panassaya Thakwang
Program	Genetics
Department	Botany
Advisor	Assoc. Prof. Dr. Warawut Chulalaksananukul
Academic year	2019

Abstract

Saccharomyces cerevisiae is widely applied in the industrial sectors because of its capability of ethanol production as well as synthesis of value-added oleochemical products. The objective of this study is to increase the potential of lipid production in *S. cerevisiae* strain TPD2 through induced random mutagenesis using ultraviolet radiation (UV) and mutant selection by cerulenin. After 9 - 25 minutes irradiation, the survival rate was less than 5 % with 109 colonies. Mutants showing the growth on yeast-extract-peptone agar supplemented with cerulenin were selected as a promising candidate for further studies. From that strategy, only one mutant of *S. cerevisiae* strain TPD2, namely mutant CE9.5 was selected. The lipid content produced by mutant CE9.5 (11.62 ± 1.23 %) was higher than the wild type strain ($9.37 \pm 0.19\%$). The major fatty acids produced by the mutant were oleic acid (C18:1), palmitoleic acid (C16:1), palmitic acid (C16:0), stearic acid (C18:0), and myristic acid (14:0) ($0.51 \pm 0.02\%$). Based on DNA sequencing of *acetyl-CoA carboxylase (ACC1)* gene, which is essential for fatty acid synthesis, it was found that *S. cerevisiae* mutant strain CE9.5 had base substitution at G3477T and G3484T, respectively.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, fatty acid, *acetyl-CoA carboxylase (ACC1)* gene, UV radiation

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องด้วยความกรุณาของผู้เกี่ยวข้องทุกส่วน ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์.ดร. วรวิทย์ จุฬาลักษณ์านุกูล อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่ให้คำแนะนำ คำปรึกษา ข้อเสนอแนะ ช่วยตรวจสอบแก้ไขโครงการวิทยาศาสตร์เรื่องนี้และให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย ทำให้โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตรตรา เพ็ญเขียว ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรุณรัตน์ คีตอยู่ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงศ์ธาริน โส้ตระกูล กรรมการและอาจารย์ผู้ตรวจแก้ไขโครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ และอาจารย์ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความรู้และได้นำมาประยุกต์ใช้ในการวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณนางสาวภาวดี บัวทอง ดร. วรณพร วัฒนสุนทร นางสาว ณีฐฐา จีจเรณูพานิชย์ และพี่ ๆ ในหน่วยปฏิบัติการเชื้อเพลิงชีวภาพ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้กำลังใจ ช่วยให้คำแนะนำ ช่วยสอนเทคนิคต่าง ๆ ตลอดการทำโครงการวิทยาศาสตร์ และกรุณาช่วยเหลือในทุกด้านเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ คุณย่า คุณป้า คุณน้า ที่เลี้ยงดูผู้วิจัยมาอย่างดี เคารพการตัดสินใจและเชื่อใจในตัวผู้วิจัย ทั้งเป็นกำลังใจตลอดการทำโครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้

ขอขอบคุณนางสาวปิยะพร มีศรีแก้ว นายจิรณ ดำรงธรรมรี เพื่อน ๆ เรารักพ่อ รุ่นพี่ภาควิชาพฤกษศาสตร์ และโดยเฉพาะอย่างยิ่งเพื่อน ๆ ในภาควิชาพฤกษศาสตร์ ที่คอยให้กำลังใจ รับฟังปัญหา และให้คำปรึกษาซึ่งกันและกันเสมอมา

ขอขอบคุณ นายชิตพล ลิ้มทรัพย์กุล จอง ยุนโอ มาร์ค ลี และ NCT ทุกคนที่เป็นกำลังใจและให้คำแนะนำให้ผู้วิจัยพยายามและรับฟังปัญหาตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณตัวผู้วิจัยเองที่ไม่ย่อท้อ เชื่อใจ ไม่ละทิ้งตัวเอง และพยายามอย่างถึงที่สุด เพื่อให้โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ช
กิตติกรรมประกาศ	ซ
สารบัญ	ฅ
สารบัญภาพ	ญ
สารบัญตาราง	ฎ
บทที่	
1 บทนำ	1
2 การตรวจเอกสารของงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการศึกษา	11
4 ผลการศึกษา	19
5 อภิปรายผลการศึกษา	29
6 สรุปผลการทดลอง	32
เอกสารอ้างอิง	33
ภาคผนวก	37
ภาคผนวก ก	38
ภาคผนวก ข	45

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.5	แผนภาพการทำงานของยีน <i>ACC1</i>	8
2.6	แผนภาพการยับยั้งของ cerulenin ที่จำเพาะกับกระบวนการผลิตกรดไขมัน	9
4.1	การเจริญเติบโตของ <i>S. cerevisiae</i> ในช่วง 0 - 48 ชั่วโมง	19
4.2	อัตราการอยู่รอดของ <i>S. cerevisiae</i> หลังจากฉายรังสี	20
4.3	ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมและสารพันธุ์กลายบนอาหารแข็ง YPD ที่ประกอบด้วย cerulenin	21
4.4	การย้อมหยดน้ำมัน	22
4.5	ผลการสกัดไขมันด้วยวิธี Bligh and Dyer	24
4.6	กรดไขมันที่สกัดได้จากสายพันธุ์กลาย CE9.05 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม	25
4.7	โครมาโทแกรมกรดไขมันที่สกัดได้จากยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม	26
4.8	โครมาโทแกรมกรดไขมันที่สกัดได้จากยีสต์สายพันธุ์กลาย CE9.05	26
4.9	ชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณยีน <i>ACC1</i> บน 1% Agarose gel	27
4.10	ผล alignment ของยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย สายพันธุ์ CE9.05	28
5.3	การคัดเลือกสายพันธุ์กลายด้วยวิธี cerulenin screening	22

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า	
2.6	คุณสมบัติทางกายภาพของ cerulenin	10
3.7.1	ไพรเมอร์	17
3.7.2	ส่วนประกอบปฏิกิริยา PCR สำหรับสายพันธุ์ดั้งเดิม	38
3.7.3	ส่วนประกอบปฏิกิริยา PCR สำหรับสายพันธุ์กลาย สายพันธุ์ CE9.05	38
3.7.4	สภาวะ Thermocycling	17
4.1	ผลการคัดเลือกสายพันธุ์กลายโดย cerulenin	39
4.2	การย้อมสีหยดน้ำมัน	42
4.3	ผลการสกัดไขมันด้วยวิธี Bligh and Dyer	23
5.1	จำนวนโคโลนีสต์ที่มีชีวิตรอดหลังจากฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตช่วง 0 – 180 นาที	43
5.2	จำนวนโคโลนีสต์ที่มีชีวิตรอดหลังจากฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตช่วง 0 – 30 นาที	44

บทที่ 1

บทนำ

ไขมัน เป็นสารชีวโมเลกุลที่มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตมีหน้าที่หลากหลาย เช่น ฮอโมน เป็นส่วนประกอบในเยื่อหุ้มเซลล์ และเป็นแหล่งพลังงาน (Bhagavan and Ha, 2015) นอกจากนี้ยังมีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรม คือเป็นส่วนประกอบของสารเคลือบผิว สี ผลิตภัณฑ์ของใช้ส่วนตัว และนำมาใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ (Lamers et al., 2016; Schmid, 1987) ไขมันสามารถผลิตได้จากพืชและจุลินทรีย์ (แบคทีเรีย ยีสต์ และจุลสาหร่าย) แต่การผลิตน้ำมันจากพืชในระดับอุตสาหกรรมนั้นมีต้นทุนการผลิตสูง และส่งผลต่อภาวะขาดแคลนอาหารเนื่องจากพืชที่ใช้ในการผลิตน้ำมันส่วนใหญ่ใช้เป็นอาหารของมนุษย์ (Hill et al., 2006) การผลิตไขมันโดยใช้จุลสาหร่าย (microalgae) จุลสาหร่ายบางชนิดสามารถผลิตและเก็บสะสมไขมันไว้ในเซลล์ในรูปไตรกลีเซอไรด์ได้มากกว่าร้อยละ 80 แต่มีข้อจำกัด คือ จำเป็นต้องใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงมาก ในขณะที่แบคทีเรียแม้จะมีอัตราการเจริญเติบโตที่สูง ใช้พื้นที่ในการเลี้ยงและระยะเวลาในการเจริญเติบโตน้อย แต่พบว่ามีประสิทธิภาพในการสะสมไขมันภายในเซลล์ได้น้อยกว่าในสาหร่ายและยีสต์ (Meng et al., 2009) ดังนั้นยีสต์จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจเนื่องจากใช้ต้นทุนต่ำ ใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงและระยะเวลาในการเจริญเติบโตน้อย สามารถเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงที่มี pH ต่ำจึงสามารถลดปัญหาในการปนเปื้อนจากแบคทีเรียได้ และลดการเกิดปัญหาการแย่งชิงพื้นที่ทางการเกษตร (Lamers et al., 2016; Tapia et al., 2012)

Saccharomyces cerevisiae เป็นยีสต์ที่มีการนำมาใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาจำนวนมาก นอกจากนี้ยังมีการศึกษาทั้งหมดของยีสต์ชนิดนี้แล้วอีกด้วยจึงทำให้มีฐานข้อมูลรองรับการศึกษา *S. cerevisiae* เป็นจำนวนมากและยีสต์ชนิดนี้มีต้นทุนในการเพาะเลี้ยงต่ำ สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่หลากหลาย (Wang et al., 2016; Wei, 2006) *S. cerevisiae* มีการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวางเนื่องจากมีความสามารถในการเกิดกระบวนการหมักน้ำตาลให้ผลผลิตเป็นเอทานอล (del Castillo Agudo, 1992) และมีคุณสมบัติในการผลิตสารประกอบประเภทไขมันได้เองภายในเซลล์ซึ่งมีมูลค่าทางการตลาดสูง (Veen and Lang, 2004) แต่เนื่องจากข้อจำกัดในการผลิตไขมันในสายพันธุ์ดั้งเดิมคือ ให้ผลผลิตไขมันต่ำ (Wang et al., 2016) ทำให้ยีสต์ *S. cerevisiae* ไม่คุ้มค่าทางเศรษฐกิจ

จากรายงานที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า *S. cerevisiae* เป็นยีสต์ที่สามารถใช้เซลล์ผลิตสารชีวเคมีที่ต้องการ (cell factorial) ในอุตสาหกรรมได้แต่มีประสิทธิภาพในการผลิตไขมันได้น้อย โดยมีการสะสมไขมันภายในเซลล์ในรูปของไตรกลีเซอไรด์ได้เพียงร้อยละ 1 ต่อน้ำหนักชีวมวลแห้ง (Ferreira et al., 2018) โครงการนี้จึงมีความสนใจที่จะพัฒนาพันธุกรรมของยีสต์ *S. cerevisiae* โดยมุ่งเน้นที่การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไขมันของยีสต์ชนิดดังกล่าว โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายแบบสุ่มด้วยวิธีการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต และคัดเลือกโดยวิธี cerulenin screening (Tapia et al., 2012)

Cerulenin เป็นสารประกอบที่สกัดได้จาก *Cephalosporium caerulens* (Omura, 1976) จัดเป็นสารประกอบที่เป็นตัวยับยั้งที่จำเพาะกับกระบวนการผลิตกรดไขมัน (Heath, White, and Rock 2001) จากการศึกษาของ Morita และคณะในปี 2005 โดยเลี้ยง *Moritella marina* ในอาหารที่มี cerulenin พบว่า cerulenin สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หลายตำแหน่ง จึงมีการนำมาใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายของเชื้อ *Rhodotorula glutinis* ซึ่งเป็นยีสต์ที่สามารถผลิตน้ำมันได้ปริมาณสูง (Wang et al., 2009) การใช้วิธีการคัดเลือกโดย cerulenin screening ใน *S. cerevisiae* จึงนำมาใช้คัดเลือกยีสต์สายพันธุ์กลายที่มีคุณสมบัติในการผลิตไขมันได้มากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม ดังนั้นยีสต์สายพันธุ์ที่ได้รับการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่สามารถเจริญเติบโตได้อย่างปกติในอาหารเลี้ยงที่มี cerulenin จะถูกคัดเลือกและนำไปทดสอบความสามารถในการผลิตไขมันโดยศึกษา น้ำหนักชีวมวล การเจริญเติบโต ปริมาณไขมัน และสัดส่วนของกรดไขมันโดยเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (Tapia et al., 2012) และนำยีสต์สายพันธุ์กลายที่ได้ไปตรวจสอบการกลายในยีน *acetyl-CoA carboxylase (ACC1)*

ACC1 เป็นยีนที่สำคัญทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันโดย *ACC1* จะผลิตเอนไซม์ acetyl-CoA carboxylase เป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยน acetyl-CoA เป็น malonyl-CoA ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไขมันโดยขั้นตอนนี้เป็นขั้นกำหนดปฏิกิริยาของการสังเคราะห์กรดไขมัน (Haslasher et al., 1993) โครงการนี้จึงมุ่งเน้นการตรวจสอบการกลายในยีน *ACC1* นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยโดย Ferreira และคณะในปี 2018 ที่ทำให้เกิดการกลายในยีนดังกล่าวแล้วได้ปริมาณไขมันที่เพิ่มขึ้น

วัตถุประสงค์

เพื่อเหนี่ยวนำให้ *S. cerevisiae* เกิดสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตไขมันได้มากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ยีสต์สายพันธุ์กลายที่มีคุณสมบัติในการผลิตไขมันได้มากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิม
2. สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่ผลิตไขมันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไขมัน และนำไปประยุกต์ใช้ในงานอื่น ๆ ได้

บทที่ 2

การตรวจเอกสารของงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol) หรือ ไขมัน (lipid)

ไตรเอซิลกลีเซอรอล สารชีวโมเลกุลที่มีความสำคัญในสิ่งมีชีวิต สารชีวโมเลกุลในกลุ่ม ไตรเอซิลกลีเซอรอลได้แก่ ไขมัน น้ำมัน สเตอรอลรวมถึงคอเลสเตอรอล โดยไตรเอซิลกลีเซอรอลเกิดจากหมู่ไฮดรอกซิลในโมเลกุลของกลีเซอรอลทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิลของกรดไขมัน 3 โมเลกุล สิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่เก็บสะสมไตรเอซิลกลีเซอรอลอยู่ในรูปพลังงานสำรอง การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันทำให้ปริมาณไตรเอซิลกลีเซอรอลที่เก็บสะสมมีความแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ของจุลชีพ เช่น ความแตกต่างของการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ acetyl-CoA carboxylase (ACC) นอกจากนี้แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงก็เป็นปัจจัยที่ทำให้การสะสมและการผลิตไขมันของยีสต์แตกต่างกัน (Chao, Yen, and Ku, 2009)

2. ความสำคัญของไขมันในระดับอุตสาหกรรม

ไขมันนอกจากจะมีความสำคัญกับการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตแล้วยังมีบทบาทสำคัญในระดับอุตสาหกรรมอีกด้วย เนื่องจากความหลากหลายของอนุพันธ์ของไขมัน เช่น ไตรเอซิลกลีเซอรอลและกลีเซอรอลฟอสโฟลิปิด ความหลากหลายของสารประกอบเหมือนไฮโดรคาร์บอนที่มีอะตอมของคาร์บอนต่อกันเป็นวงแหวน (aromatic and hydrocarbon-like compounds) เช่น สเตอรอยด์ แครทีนอยด์ เทอร์ปีนและไซ (Tao, 2007) จึงมีความนิยมในการนำมาประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมอย่างหลากหลาย ยกตัวอย่างเช่นอุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมเสริมสุขภาพ อุตสาหกรรมการแปรรูปอุตสาหกรรมอาหาร และนำมาประยุกต์ใช้เป็นพลังงานทดแทน

ไขมันสามารถผลิตได้จากพืชไร่ พืชสวน เช่น ถั่วเหลือง ข้าวโพด และคาโนลา แต่การผลิตน้ำมันจากพืชในระดับอุตสาหกรรมนั้นมีต้นทุนการผลิตสูงต้องใช้พื้นที่ในการเพาะปลูกมาก และเนื่องจากพืชที่ใช้ในการผลิตน้ำมันส่วนใหญ่ใช้เป็นอาหารของมนุษย์การนำพืชมาอาหารมาใช้ในระดับอุตสาหกรรมทำให้เกิดการแก่งแย่งทรัพยากรและส่งผลกระทบต่อภาวะขาดแคลนอาหาร (Hill et al., 2006) จุลินทรีย์จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีศักยภาพนอกเหนือจากการผลิตจากแหล่งดั้งเดิมจากพืช

และสัตว์ ช่วยแก้ไขปัญหาคาร์บอนไดออกไซด์ในการเพาะปลูกและปัญหาภาวะขาดแคลนอาหาร สามารถเพาะเลี้ยงได้ทุกช่วงเวลาและสามารถใช้อาหารในการเจริญเติบโตได้หลากหลาย นอกจากนี้ไขมันที่ผลิตได้ยังมีลักษณะเดียวกันกับที่ผลิตได้จากพืช (Zhu et al., 2008)

2.1 ประเภทของจุลินทรีย์สะสมไขมัน

2.1.1. จุลสาหร่าย (microalgae) เป็นจุลินทรีย์สะสมไขมันที่สามารถสร้างน้ำมันได้จากการย่อยสลายคาร์บอนไดออกไซด์ สามารถผลิตไขมันได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสาหร่ายสามารถผลิตไขมันได้ร้อยละ 70 โดยน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงในสภาพที่เหมาะสม แต่ข้อเสียของสาหร่ายนั้นต้องใช้พื้นที่ในการเลี้ยงมากและต้องบำรุงรักษาให้อยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมและใช้เวลามากในการผลิตน้ำมันเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์สะสมไขมันชนิดอื่น และยังมีค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงและบำรุงพื้นที่ในการเพาะเลี้ยงค่อนข้างสูง (Anderson, 1992)

2.2.2. แบคทีเรีย (bacteria) เป็นจุลินทรีย์สะสมไขมันที่เจริญเติบโตได้เร็ว ได้ผลผลิตเร็ว และใช้ทรัพยากรในการเลี้ยงต่ำ เมื่อเทียบกับจุลินทรีย์สะสมไขมันชนิดอื่น แต่ไม่นิยมใช้แบคทีเรียผลิตไขมันในทางอุตสาหกรรมเนื่องจากการสกัดน้ำมันจากแบคทีเรียนั้นเป็นไปได้ยากเนื่องจากการผลิตไขมันที่ถูกส่งออกมาจากเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกพร้อมกับสารชนิดอื่นทำให้น้ำมันปนเปื้อนได้ง่าย (Alvarez and Steinbuchel, 2002)

2.2.3. ยีสต์ (yeasts) เป็นจุลินทรีย์สะสมไขมันที่นิยมใช้มากที่สุดในทางอุตสาหกรรมเนื่องจากการผลิตและการสะสมไขมันที่มาก มีการใช้พื้นที่และทรัพยากรในการเลี้ยงที่ต่ำใช้เวลาได้รวดเร็วกว่าสาหร่าย รวมถึงการที่ยีสต์และราน้ำนั้นสะสมไขมันไว้ภายในเซลล์ทำให้การสกัดไขมันนั้นสามารถทำได้ง่ายและมีการปนเปื้อนต่ำกว่าแบคทีเรีย (Ratledge, 1982)

3. *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae หรือชื่อสามัญ ยีสต์ขนมปัง (Baker's yeast) เป็นยูคาริโอตที่มีลักษณะเซลล์เดี่ยว มีการนำมาใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาจำนวนมากเนื่องจากการศึกษาจีโนมทั้งหมดของยีสต์ชนิดนี้แล้ว ทำให้มีฐานข้อมูลรองรับการศึกษายีสต์ *S. cerevisiae* เป็นจำนวนมาก ยีสต์ชนิดนี้มีต้นทุนในการเลี้ยงต่ำ เลี้ยงง่าย สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่หลากหลาย (Wang et al., 2016; Wei, 2006) *S. cerevisiae* มีการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวางเนื่องจากมีความสามารถในการเกิดกระบวนการหมักน้ำตาลให้ผลผลิตเป็นเอทานอล (del Castillo Agudo, 1992) และมีคุณสมบัติในการผลิตสารประกอบประเภทไขมันได้เองภายในเซลล์ซึ่งมีมูลค่าทางการตลาดสูง (Veen and Lang, 2004) สามารถใช้เซลล์ผลิตสารชีวเคมีที่ต้องการ (cell factorial) ในอุตสาหกรรมได้

การจัดจำแนกยีสต์ *S. cerevisiae*

Kingdom : Fungi

Division : Ascomycota

Class : Saccharomycetes

Order : Saccharomycetales

Family : Saccharomycetaceae

Genus : *Saccharomyces*

Species : *S. cerevisiae*

4. การกลายพันธุ์

การกลายพันธุ์เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติแบบสุ่ม (spontaneous mutation) หรือจากการเหนี่ยวนำโดยมนุษย์หรือสิ่งแวดล้อม (induced mutation) ทำให้ยีนหรือ DNA มีการเปลี่ยนแปลงในลำดับและจำนวนของเบสใน DNA ส่งผลให้สิ่งมีชีวิตมีลักษณะที่เปลี่ยนไป และเกิดการแปรผันทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากร เมื่อมีการถ่ายทอดลักษณะที่แปรผันนี้ไปยังรุ่นต่อ ๆ ไปซึ่งอาจก่อให้เกิดลักษณะที่ดีขึ้นหรืออาจเกิดผลร้ายหรือไม่มีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตก็ได้

4.1 รูปแบบการกลายพันธุ์

4.1.1 การกลายพันธุ์ที่เซลล์ร่างกาย (somatic cell) ซึ่งเกิดขึ้นในบางเซลล์ระหว่างการดำรงชีวิตการกลายดังกล่าวจะไม่ถ่ายทอดลักษณะการกลายสู่รุ่นต่อไป

4.2.2 การกลายพันธุ์ที่เซลล์สืบพันธุ์ (germline cell) ซึ่งเกิดขึ้นในเซลล์สืบพันธุ์ของรุ่นพ่อแม่โดยสามารถถ่ายทอดลักษณะการกลายไปสู่รุ่นต่อไป (Genetics Home Reference, 2020 : online)

4.2 ตัวกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagen)

ตัวกระตุ้นหรือตัวเหนี่ยวนำให้ดีเอ็นเอเกิดการกลายพันธุ์เรียกว่าตัวกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagen) มี 2 ประเภทคือ สารเคมีและรังสี (Schradler, 2003)

4.2.1 สารเคมี (chemical) เช่น สารโคลชิซิน (colchicine) มีผลทำให้มีการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซม

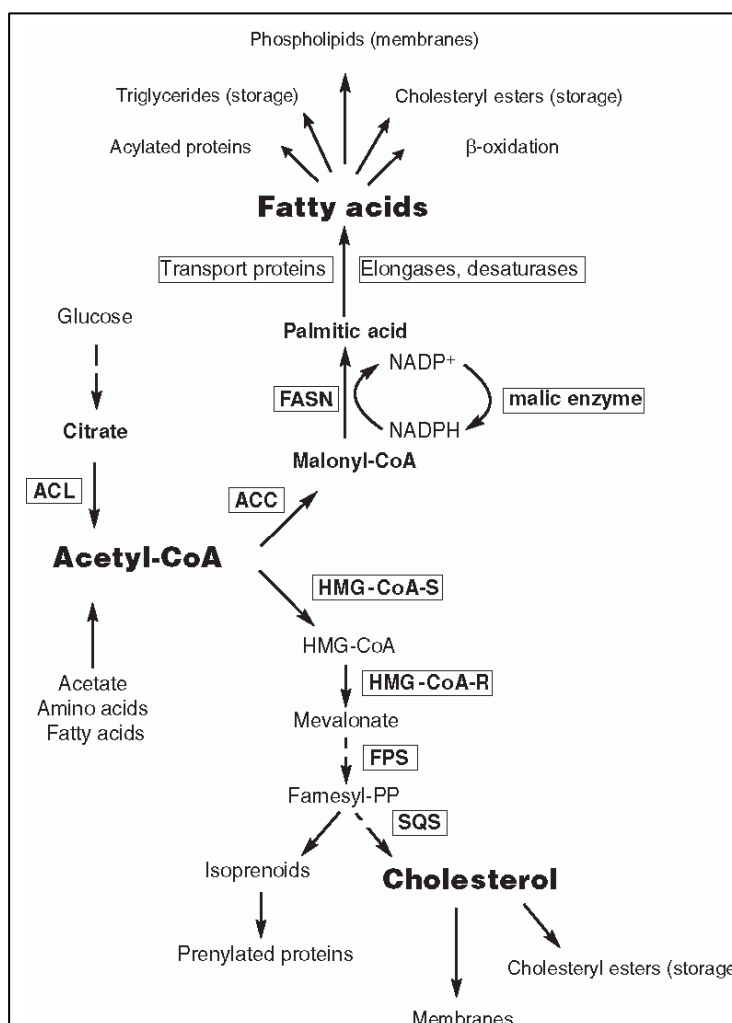
4.2.2 รังสี (radiation) รังสีที่กระตุ้นให้เกิดมิวเทชันมี 2 ชนิดคือ

4.2.2.1 รังสีที่ก่อให้เกิดไอออน (ionizing radiation) เช่น รังสีบีต้า รังสีแกมมา รังสีเอกซ์ มีผลทำให้ DNA แตกหักเกิดความเสียหายอย่างมาก

4.2.2.2 รังสีที่ไม่ก่อให้เกิดไอออน (non-ionizing radiation) เช่น รังสีอัลตราไวโอเล็ต มีความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 260 นาโนเมตร มีผลทำให้ DNA เกิดความเสียหาย เกิดไพริมีดีนไดเมอร์ ซึ่งส่วนใหญ่พบไทมีนไดเมอร์ เมื่อเกิดการกระบวนการซ่อมแซมและจำลองตัวเองของ DNA จะมีการนำเบสแบบสุ่มเข้ามาจับบริเวณไดเมอร์ส่งผลให้เกิดการกลายได้

5. ยีน *ACC1*

ACC1 เป็นยีนที่มีความสำคัญในการสร้าง acetyl-CoA carboxylase ซึ่งเป็นขั้นตอนแรกของการสังเคราะห์กรดไขมัน มีหน้าที่เปลี่ยน acetyl-CoA เป็น malonyl-CoA ซึ่งเป็นขั้นกำหนดปฏิกิริยาของการผลิตและสะสมไขมันในยีสต์ *ACC1* มีการนำไปใช้สำหรับกระบวนการทางพันธุวิศวกรรมในการเพิ่มปริมาณการสร้างและเก็บสะสมไขมันในยีสต์ชนิดต่าง ๆ โดยการทำให้มีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้น รวมถึงการถ่ายยีนจากต่างสิ่งมีชีวิตก็มียุทธวิธีทำให้สิ่งมีชีวิตที่ถูกตัดต่อยีนมีการสังเคราะห์และสะสมไขมันเพิ่มสูงขึ้น (Haslshar et al., 1993)

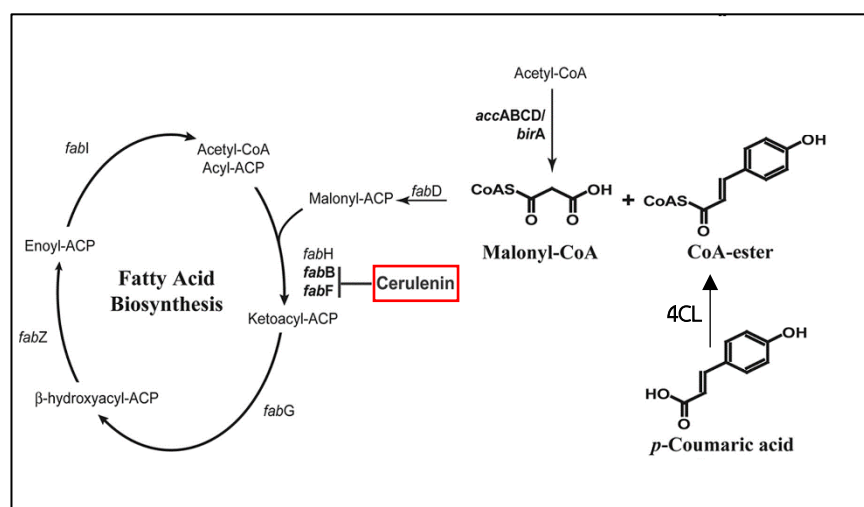


ภาพที่ 2.5 แผนภาพการทำงานของยีน *ACC1* (Swinnen et al., 2009)

6. Cerulenin

Cerulenin ($C_{12}H_{17}NO_3$) เป็นสารต้านจุลชีพถูกค้นพบโดย Hata และคณะในปี ค.ศ. 1960 ซึ่งเป็นสารประกอบที่สามารถสกัดได้จาก *Cephalosporium caerulens* (Omura, 1976) มีคุณสมบัติต้านจุลชีพ ต้านเชื้อรา และเป็นสารประกอบที่เป็นตัวยับยั้งที่จำเพาะกับกระบวนการผลิตกรดไขมันและสเตอรอล (Heath et al., 2001) โดยสร้างพันธะโคเวเลนต์กับบริเวณเร่งปฏิกิริยา (catalytic site) ของกระบวนการผลิตกรดไขมันและไปรบกวนปฏิกิริยาการควบแน่น (condensation reaction) ของ acetyl-CoA และ malonyl-CoA ทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการผลิตกรดไขมัน กระบวนการผลิตสเตอรอลและกระบวนการผลิต HMG-CoA ในยีสต์และแบคทีเรีย

นอกจากนี้ cerulenin ยังสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หลายตำแหน่ง (polyunsaturated fatty acids) ทำให้ lipid profile เปลี่ยนแปลงได้ เช่น เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตของ docosahexaenoic acid (DHA) ใน *Moritella marina* strain MP-1 และเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตของ eicosapentaenoic acid (EPA) ใน *Shewanella marinintestina* strain IK-1 (Morita et al., 2005) และเนื่องจากคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์อย่างมากคือสามารถเพิ่มปริมาณของกรดไขมันที่สะสมภายในเซลล์ชนิดไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หลายตำแหน่ง (intracellular polyunsaturated fatty acids) จึงมีการนิยมนำมาใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายและศึกษากระบวนการการทำงานของผนังเซลล์ (Omura, 1976)



ภาพที่ 2.6 การยับยั้งของ cerulenin ที่จำเพาะกับกระบวนการผลิตกรดไขมัน (Lim et al., 2011)

ตาราง 2.6 คุณสมบัติทางกายภาพของ cerulenin

คุณสมบัติ	คำอธิบาย
สูตรเคมี	$C_{12}H_{17}NO_3$
มวลโมเลกุล	223.26
จุดเดือด	93 - 94 °C
การละลาย	ละลายใน $CHCl_3$, CCl_4 , EtOAc, benzene ละลายน้ำเล็กน้อย

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ TPD2 (ภูมิภัทร นิลทยา, 2561)

วัสดุและอุปกรณ์

- Microplate reader (Epoch, South Korea)
- Vortex machine (Gienie-2, USA)
- Autoclave SX-500E (Tomy, Indonesia)
- Shaker (Wiggens, Germany)
- Hotplate stirrer (Scienceware, USA)
- UV radiation cabinet
- Incubator (Mettler, Germany)
- 4 decimal places analytical balance PA214 (Ohaus, USA)
- Centrifuge Combi – 514R (Hamil, South Korea)
- PCR machine (Axygen, USA)
- Gas chromatography GC-2010 Plus (Shimadzu, Japan)

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ
 - Glucose (Kemaus, Australia)
 - Peptone (Himedia, India)
 - Yeast extract (Himedia, India)
 - Cerulenin (Sigma, USA)
 - Agar
2. สารเคมีที่ใช้ย้อมเซลล์
 - Sudan black B (Sigma, USA)
 - Safranin O (Suvchem, India)

- 70% Ethanol
3. สารเคมีที่ใช้สำหรับการสกัดน้ำมันด้วยวิธี Bligh and Dyer
- Chloroform
 - Methanol
 - HCl
4. สารเคมีที่ใช้สำหรับการทำ gas chromatography
- Hexane
 - กรดไขมันมาตรฐานดังนี้ กรดไขมันลอริก (C12:0) กรดไขมันกรดไมริสติก (C14:0) กรดไขมันปาล์มมิติก (C16:0) กรดไขมันปาล์มมิโตเลอิก (C16:1) กรดไขมันสเตียริก (C18:0), กรดไขมันโอเลอิก (C18:1) กรดไขมันลิโนเลอิก (C18:2) กรดไขมันลิโนเลอิก (C18:3) กรดไขมันอะราคิดิก (C20:0) กรดไขมันอีโคซีโนอิก (C20:1) กรดไขมันเบฮนิก (C22:0) และกรดไขมันลิกโนซีริก (C24:0)
5. สารเคมีที่ใช้สำหรับการสกัด DNA
- SE Buffer (Invitrogen, USA)
 - Lyticase solution (Invitrogen, USA)
 - TL Buffer (Invitrogen, USA)
 - Grass beads (Invitrogen, USA)
 - Proteinase K solution (Invitrogen, USA)
 - RNase (Invitrogen, USA)
 - BL Buffer (Invitrogen, USA)
 - HB Buffer (Invitrogen, USA)
 - DNA wash Buffer (Invitrogen, USA)
 - Nuclease- Free Water
4. สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR
- 5x Phusion taq (BioLabs, USA)
 - dNTPs set
 - DNA template
 - Primer (Pacific science, Thailand)

- Phusion DNA polymerase
 - Nuclease- Free Water
5. สารเคมีที่ใช้สำหรับการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส
- 1 Kp DNA ladders (Vivantis, Malaysia)
 - 1X Tri-Borate-EDTA (1X TEB buffer)
 - Agarose gel 1.0% (Sigma, USA)

วิธีการดำเนินการ

1. เพาะเลี้ยงเชื้อ *S. cerevisiae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD

1.1. นำ *S. cerevisiae* ที่เก็บรักษาไว้ใน glycerol 20% (w/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหาร Yeast Extract Peptone Glucose (YPD) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร (ประกอบด้วย Glucose, Peptone และ Yeast extract) ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เพื่อทำเป็นหัวเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C ความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ 1 ลูบ มาขีดแบบตัดกัน (cross streak) บนอาหารแข็ง YPD เพื่อเก็บไว้เป็นเชื้อต้นแบบ โดยนำมาบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วจึงเก็บรักษาเชื้อไว้ที่ 4 °C

1.2. เลี้ยง *S. cerevisiae* ในอาหาร YPD ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C ความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที และทำการวัดการเติบโตโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทุก ๆ 2 ชั่วโมง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนกระทั่งการเจริญเติบโตของเชื้อจะเข้าสู่ระยะ stationary หรือ ลดลง

2. เตรียมเชื้อที่จะนำมาฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต

เพาะเลี้ยงยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหารเหลว YPD ปริมาตรรวม 25 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยกำหนดปริมาณหัวเชื้อยีสต์เริ่มต้นเท่ากับ 0.4 ที่ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C ความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 ชั่วโมง

3. เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายโดยฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต

3.1 นำหัวเชื้อยีสต์เหลวในงานเพาะเชื้อเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร กวนด้วยแท่งกวนแม่เหล็ก เพื่อให้หัวเชื้อยีสต์ได้รับรังสีอย่างทั่วถึง

3.2 ฉายรังสีที่มีหลอด UV-C ความเข้มแสง 10 วัตต์ จำนวน 5 หลอด โดยมีระยะห่างระหว่างงานเพาะเชื้อถึงหลอดฉายรังสี 22 เซนติเมตร ฉายรังสีเป็นระยะเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที

3.3 เก็บตัวอย่างนาที่ที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที โดยถ่ายเชื้อ 1 มิลลิลิตร ลงไมโครทิวป์ (Microtube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่หุ้มด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ เจือจางความเข้มข้นที่ความเข้มข้น 10^{-1} ถึง 10^{-6} เท่า นำไปเกลี่ยบนอาหารแข็ง YPD (spread plate) หุ้มงานเพาะเชื้อด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นระยะเวลา 2 วัน

3.4 นับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏบนแต่ละงานเพาะเชื้อ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟอัตราการอยู่รอด โดยเปรียบเทียบกับนาที่ที่ 0 เพื่อหาระยะเวลาการฉายรังสีที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์

4. คัดเลือกสายพันธุ์กลาย

4.1 คัดเลือกยีสต์ที่ได้รับการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตแล้วมีอัตราการอยู่รอดน้อยกว่าร้อยละ 5 แบบสุ่ม มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง YPD ที่ประกอบด้วย cerulenin 15 ไมโครโมลาร์ (IC_{50}) (Junji et al., 1994) เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์กลาย จากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นระยะเวลา 2 วัน

4.2 คัดเลือกยีสต์ที่อยู่รอดเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง YPD ที่ประกอบด้วย cerulenin อย่างสุ่ม นำมาย้อมสีเพื่อดูหยดน้ำมัน โดยถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว YPD และ อาหารเหลว YPD Lipid production media สัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) เท่ากับ 26 ปริมาตรรวม 25 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C ความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมงและ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ หลังจากนั้นนำมาเกลี่ยบนสไลด์ ปล่อยให้แห้งในอากาศ (air dry) แล้วตรึงด้วยความร้อน (heat fix) โดยนำไปผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง เมื่อสไลด์แห้งแล้วจึงนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น หยดสี Sudan black B จนทั่วสไลด์และทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นล้างสไลด์

ตัวอย่างด้วย 70% ethanol เป็นระยะเวลา 5 วินาที ต่อมาจึงหยดสี Safranin O ลงบนสไลด์ตัวอย่างให้ทั่ว ทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 15 วินาที จากนั้นล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่นและซับให้แห้ง นำไปตรวจดูหยดน้ำมันด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายเลนส์ใกล้วัตถุ 100 เท่า เพื่อคัดเลือกไอโซเลทที่มีปริมาณหยดน้ำมันมากที่สุด 5 ลำดับแรกเพื่อนำไปทำการทดลองต่อไป

5. ทดสอบความสามารถในการผลิตไขมัน

5.1 วัดปริมาณไขมันด้วยวิธี Bligh-Dyer's method (Bligh and Dyer, 1959; Manirakiza, Covaci, and Schepens, 2001) โดยเลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลว YPD 25 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 30 °C ความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อลงใน Lipid production media 100 มิลลิลิตร กำหนดปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.4 ที่ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C ความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแบบมีฝาปิด ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8300 รอบต่อนาที ที่ 25 °C 5 นาที เทส่วนใสออก ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8300 รอบต่อนาที ที่ 25 °C 5 นาที เทน้ำออก ทำซ้ำ 2 รอบ จากนั้นเติม HCL 4M ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จึงนำมาเติมสารผสม (เมทานอล : คลอโรฟอร์ม อัตราส่วน 1:1) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6000 รอบต่อนาที ที่ 25 °C 5 นาที แล้วดูดเอาไขมัน (ชั้นล่าง) ใส่ไมโครทิวป์ นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนักไขมันที่สกัดได้

ปิเปตอาหารเลี้ยง Lipid production media ที่มียีสต์ข้างต้น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักแห้ง ถ่ายลงไมโครทิวป์ (microtube) ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8300 รอบต่อนาที ที่ 25 °C 5 นาที เทส่วนบนออก เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อล้างเซลล์จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8300 รอบต่อนาที ที่ 25 °C 5 นาที เทน้ำออก ทำซ้ำ 2 รอบ จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อระเหยน้ำออก แล้วจึงชั่งน้ำหนักแห้ง

5.2. วัดสัดส่วนของกรดไขมัน โดยการทำให้ gas chromatography (Tapia et al., 2012) โดยใช้ตัวอย่างน้ำมันที่สกัดได้จากขั้นตอนการวัดปริมาณไขมันด้วยวิธี Blich-Dyer's method เติมสารละลาย 0.01 M NaOH ใน methanol 2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 °C ในอ่างต้มน้ำร้อน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวางบนน้ำแข็ง 30 นาที จึงเติม Hexane (HPLC Grade) 2 มิลลิลิตร เขย่าแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที แล้วดูดชั้นบนใส่หลอดทดลอง ปล่อยให้ระเหย 24 ชั่วโมง แล้วจึงเติม Hexane (HPLC Grade) 750 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปิดเตลง Vial แล้วนำไปวิเคราะห์กรดไขมันด้วย gas chromatography GC-2010 Plus โดยมีกรดไขมันมาตรฐานดังนี้ กรดไขมันลอริก (C12:0) กรดไขมันกรดไมริสติก (C14:0) กรดไขมันปาล์มมิติก (C16:0) กรดไขมันปาล์มมิโตเลอิก (C16:1) กรดไขมันสเตียริก (C18:0), กรดไขมันโอเลอิก (C18:1) กรดไขมันลิโนเลอิก (C18:2) กรดไขมันลิโนเลอิก (C18:3) กรดไขมันอะราคิติก (C20:0) กรดไขมันอีโคซีโนอิก (C20:1) กรดไขมันเบฮนิก (C22:0) และกรดไขมันลิกโนซีริก (C24:0)

6. วิเคราะห์ผลทางสถิติ

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของน้ำหนักชีวมวล และ ปริมาณไขมันที่ผลิตได้ของสายพันธุ์กลาย เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมโดยใช้การวิเคราะห์แบบ one-way ANOVA กำหนดค่าความน่าจะเป็น ≤ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS 22 (SPSS Inc., USA)

7. ตรวจสอบการกลายในยีน ACC1

7.1 สกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย สายพันธุ์ CE9.05 ซึ่งมีร้อยละปริมาณน้ำมันต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มมากขึ้นจากสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญ โดยเลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลว YPD 25 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 30 °C ความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13000 g เป็นเวลา 1 นาที นำตะกอนที่ได้มาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด PureLink Genomic DNA Kits (Invitrogen, USA) จากนั้นเปิดดีเอ็นเอปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง nanodrop ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอและค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนตามลำดับ เปรียบเทียบเป็นสัดส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ซึ่งดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์ค่าดังกล่าวอยู่ในช่วง 1.8 – 2.0 แล้วจึงเก็บดีเอ็นเอได้ที่อุณหภูมิ -20 °C

7.2 เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน *ACC1* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction หรือ PCR) โดยออกแบบไพรเมอร์ 2 คู่ที่จำเพาะกับยีน *ACC1* ด้วยโปรแกรม OligoCalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) โดยใช้ข้อมูลยีน *ACC1* ของยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ S288C จากฐานข้อมูล NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ในการออกแบบไพรเมอร์ โดยไพรเมอร์ที่ใช้ดังตารางที่ 3.7.1

ตารางที่ 3.7.1 ไพรเมอร์

ตัวอย่าง	ลำดับเบส (5'-3')	Tm (°C)	ความยาว (bp)
Forward primer 1	CTC CAC AGA AGA TGG AGT AC	51.8	20
Reverse primer 1	GCA ACC TTC ACA ACA GAG GA	51.8	20
Forward primer 2	CTA AGG TCG CTC TAC AAG CA	51.8	20
Reverse primer 2	CAT TGT CAT GGT CGC TTC TG	51.8	20

โดยส่วนประกอบของปฏิกิริยาทั้งหมด 50 ไมโครลิตรแสดงในตารางที่ 3.7.2 ส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR สำหรับสายพันธุ์ดั้งเดิม (ภาคผนวก) และตารางที่ 3.7.3 ส่วนประกอบปฏิกิริยา PCR สำหรับสายพันธุ์กลาย สายพันธุ์ CE9.05 (ภาคผนวก) โดยกำหนดสภาวะดังตารางที่ 3.7.4

ตารางที่ 3.7.4 สภาวะ Thermocycling

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา
Initial	98 °C	30 วินาที
Denature	98 °C	10 วินาที
25 - 35 Cycles (Annealing)	52 °C	30 วินาที
Final Extension	72 °C	1 นาที
Hold	4 °C	1 นาที

7.3 ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอเบื้องต้นโดยการทำให้เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel electrophoresis) โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้นร้อยละ 1 ใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาทีและใช้ 1 Kb DNA ladder เป็น DNA marker ในการเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR โดยดีเอ็นเอบริเวณยีน *ACC1* มีขนาด 6,702 bpจากนั้นส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่บริษัท Pacific Science ประเทศไทย

8. เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ACC1*

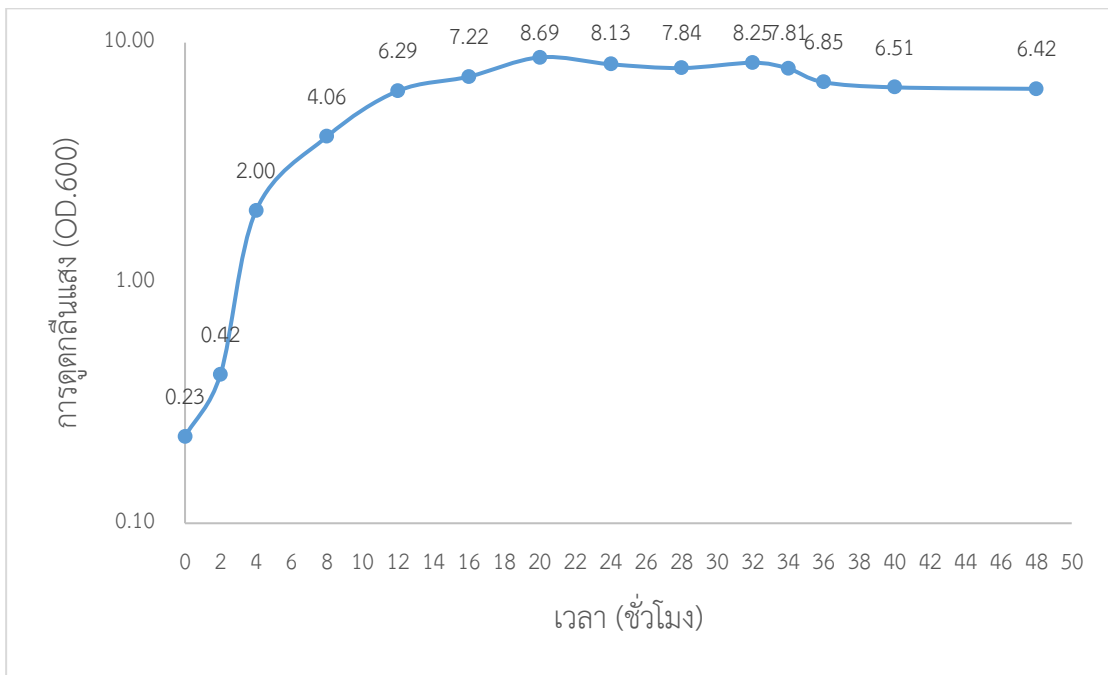
นำผลวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ACC1* ในสายพันธุ์ดั้งเดิม (TPD2) กับสายพันธุ์กลาย สายพันธุ์ CE9.05 โดยใช้โปรแกรม Benchling (<https://www.benchling.com>)

บทที่ 4

ผลการศึกษา

ผลจากการวัดการเติบโต

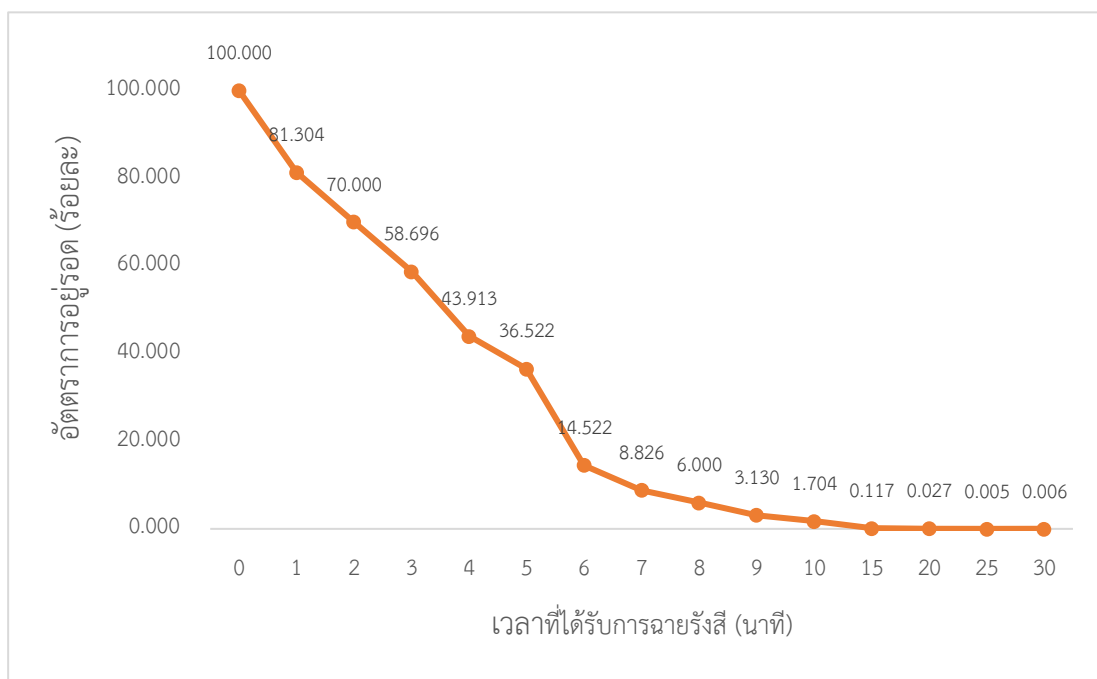
จากการวัดการเติบโตของยีสต์ *S. cerevisiae* โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทุก ๆ 2 ชั่วโมง เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนกว่าค่าการดูดกลืนแสงจะคงที่ หรือลดลงพบว่า ช่วง 0 - 2 ชั่วโมงแรกเป็นช่วง lag phase ยีสต์ปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ มีการแบ่งเซลล์ไม่มาก ในช่วง 2 - 20 ชั่วโมงยีสต์เข้าสู่ช่วง log phase มีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว เป็นช่วงที่มีอัตราการเติบโตสูง จากนั้นช่วง 20 - 32 ชั่วโมงเป็นช่วงที่มีการแบ่งเซลล์สูงที่สุดและค่อนข้างคงที่หรือ stionary phase ไม่มีการแบ่งจำนวนเพิ่มอีกหรืออาจมีอัตราการเกิดเท่ากับอัตราการตาย และช่วง 32 - 48 ชั่วโมงเข้าสู่ช่วง death phase ไม่มีการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นและมีค่าการดูดกลืนแสงลดลงดังแสดงในภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 การเจริญเติบโตของ *S. cerevisiae* ในอาหารเลี้ยง YPD ในช่วง 0 - 48 ชั่วโมง

ผลจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายโดยฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต

จากการนำสารแขวนลอยไปฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตในตู้ฉายรังสี ที่มีหลอด UV-C ความเข้มแสง 10 วัตต์ จำนวน 5 หลอด เป็นระยะเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที พบว่าช่วงเวลาที่ทำให้ยีสต์มีอัตราการอยู่รอดน้อยกว่าร้อยละ 5 อยู่ในช่วง 9 - 25 นาที โดยระยะเวลาการฉายรังสี 9 นาที คัดแยกยีสต์ได้ 33 ไอโซเลท ระยะเวลาการฉายรังสี 10 นาที คัดแยกยีสต์ได้ 32 ไอโซเลท ระยะเวลาการฉายรังสี 15 นาที คัดแยกยีสต์ได้ 21 ไอโซเลท ระยะเวลาการฉายรังสี 20 นาที คัดแยกยีสต์ได้ 12 ไอโซเลท และระยะเวลาการฉายรังสี 25 นาที คัดแยกยีสต์ได้ 11 ไอโซเลท ดังแสดงในภาพที่ 4.2

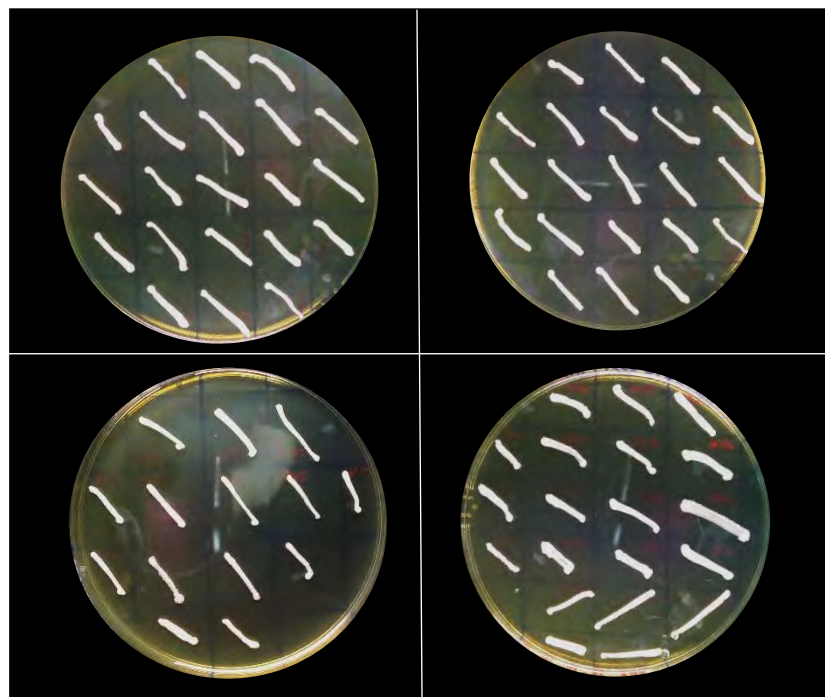


ภาพที่ 4.2 อัตราการอยู่รอดของ *S. cerevisiae* ในอาหารเลี้ยง YPD หลังจากฉายรังสี

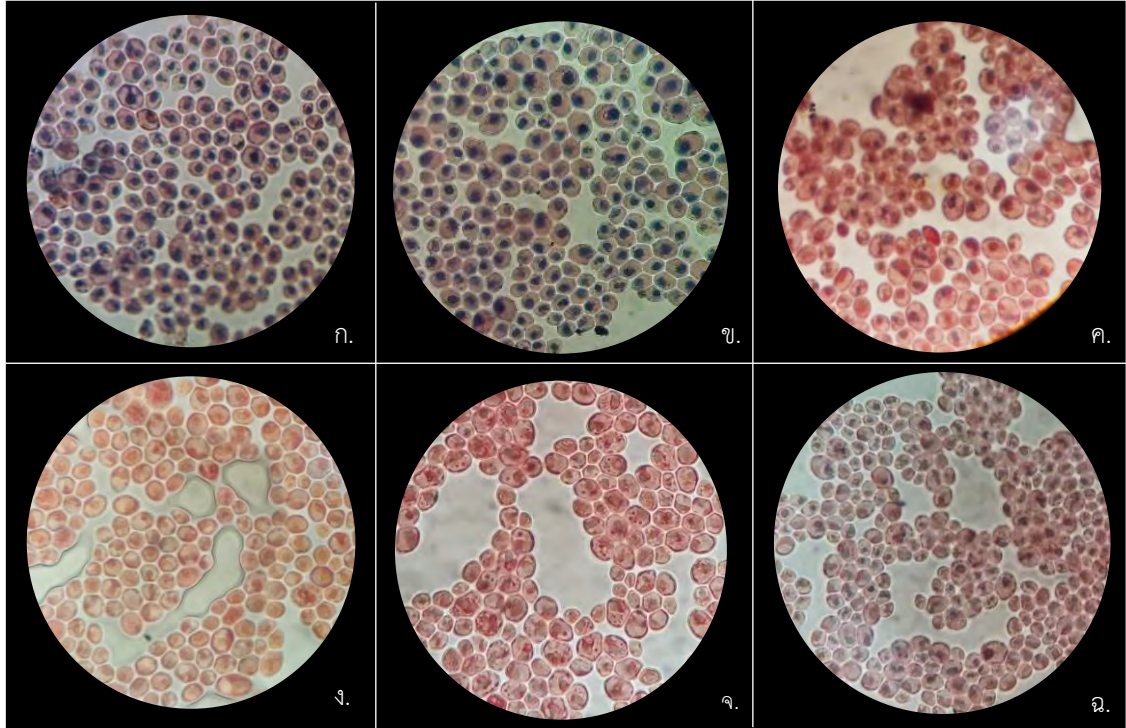
ผลจากการคัดเลือกสายพันธุ์กลายโดย cerulenin และย้อมสีหยดน้ำมัน

เมื่อนำสายพันธุ์กลายที่มีอัตราการอยู่รอดน้อยกว่าร้อยละ 5 และมีโคลนเดี่ยว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคลนมากกว่า 2 มิลลิเมตร มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง YPD ประกอบด้วย cerulenin พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายสามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มี cerulenin ได้ไม่แตกต่างกันดังตารางที่ 4.1 (ภาคผนวก)

หลังจากนั้นย้อมสีหยดน้ำมันด้วย Sudan black B และ Safranin O แล้วตรวจสอบ ด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าไอโซเลท CE9.05, CE10.37, CE15.16, CE25.08 และ CE25.10 มี ปริมาณหยดน้ำมันมากที่สุด 5 ลำดับแรกดังตารางที่ 4.2 (ภาคผนวก)



ภาพที่ 4.3 ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายบนอาหารแข็ง YPD ที่ประกอบด้วย cerulenin



ภาพที่ 4.4 การย้อมหยดน้ำมัน

- ก. สายพันธุ์ดั้งเดิมบนอาหารแข็ง YPD ข. สายพันธุ์ CE9.05 บนอาหารแข็ง YPD ที่มี cerulenin
 ค. สายพันธุ์ CE10.37 บนอาหารแข็ง YPD ที่มี cerulenin ง. สายพันธุ์ CE15.16 บนอาหารแข็ง YPD ที่มี cerulenin
 จ. สายพันธุ์ CE25.08 บนอาหารแข็ง YPD ที่มี cerulenin ฉ. สายพันธุ์ CE25.10 บนอาหารแข็ง YPD ที่มี cerulenin

ผลการทดสอบการผลิตไขมัน

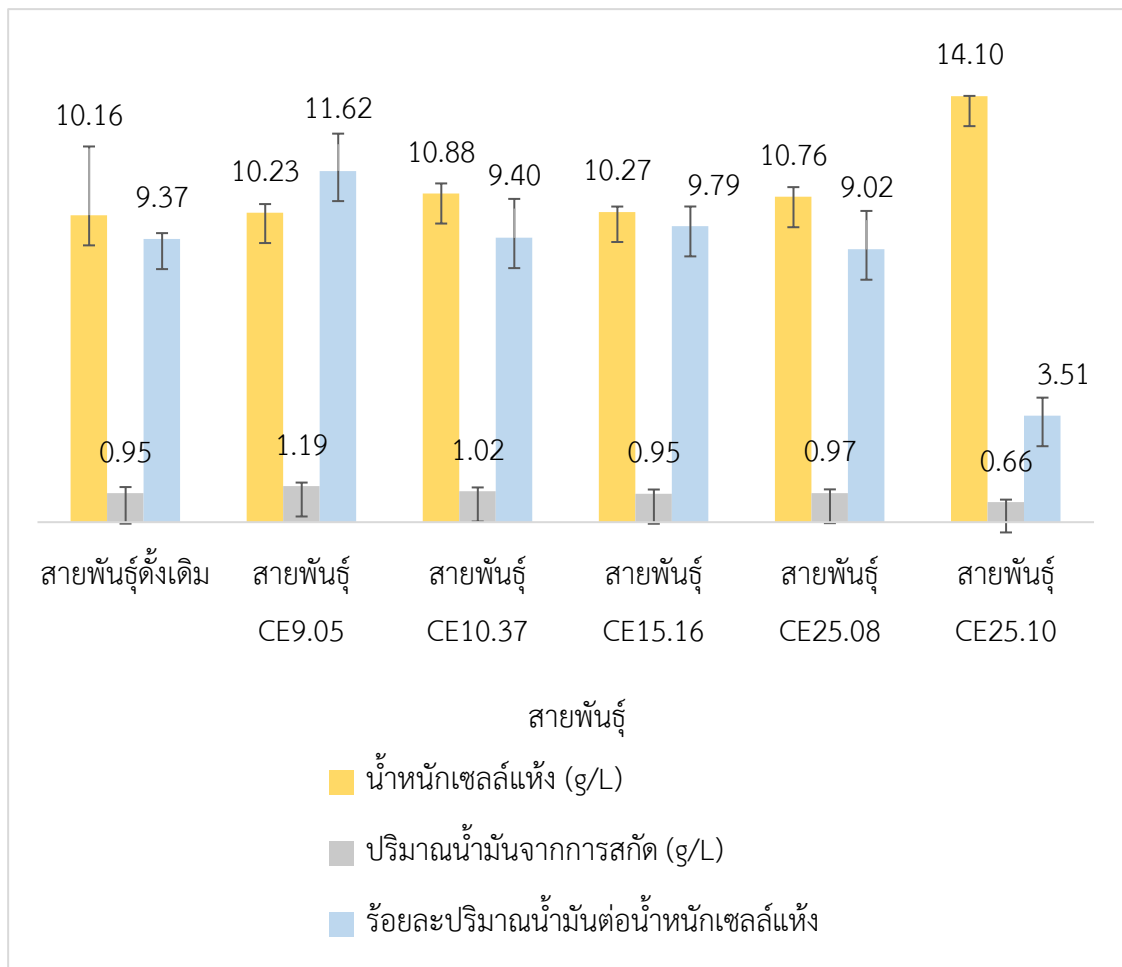
จากการคัดเลือกเบื้องต้นโดยการเลี้ยงบนอาหารแข็ง YPD ที่ประกอบด้วย cerulenin และย้อมสี Sudan black B เพื่อพิจารณาปริมาณหยดน้ำมันภายในเซลล์ยีสต์ทำให้คัดเลือกไอโซเลทที่มีปริมาณหยดน้ำมันภายในเซลล์มากที่สุด 5 อันดับแรกมาทำการทดลองคือ สายพันธุ์ CE9.05, CE10.37, CE15.16, CE25.08, และ CE25.10 โดยเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยผลการสกัดไขมันดังตาราง 4.3 และภาพที่ 4.5

จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS 22 (SPSS Inc., USA) ด้วยวิธี One-way ANOVA test วางแผนการทดลองแบบ CRD พบว่าสายพันธุ์ CE9.05 มีค่าเฉลี่ยร้อยละ ปริมาณน้ำมันต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้น ร้อยละ 2.25 แตกต่างกับสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 % ในขณะที่ สายพันธุ์ CE25.10 ค่าเฉลี่ยร้อยละปริมาณน้ำมันต่อน้ำหนักเซลล์แห้งลดลง ร้อยละ 3.85 แตกต่างกับสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 ทั้งนี้ค่าเฉลี่ยน้ำหนักเซลล์แห้งของทุกสายพันธุ์ไม่แตกต่างกับสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 % จึงสามารถคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์กลายที่มีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำมันต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นแตกต่างกับสายพันธุ์ดั้งเดิมได้ 1 ไอโซเลท คือ สายพันธุ์ CE9.05

เมื่อทำการทดสอบ 3 ชั่วโมงเพื่อทดสอบความเสถียรในการผลิตไขมันพบว่าค่าเฉลี่ย ร้อยละปริมาณน้ำมันต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าเฉลี่ยน้ำหนักเซลล์แห้งของทุกสายพันธุ์ไม่แตกต่างกับสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 %

ตารางที่ 4.3 ผลการสกัดไขมันด้วยวิธี Bligh and Dyer

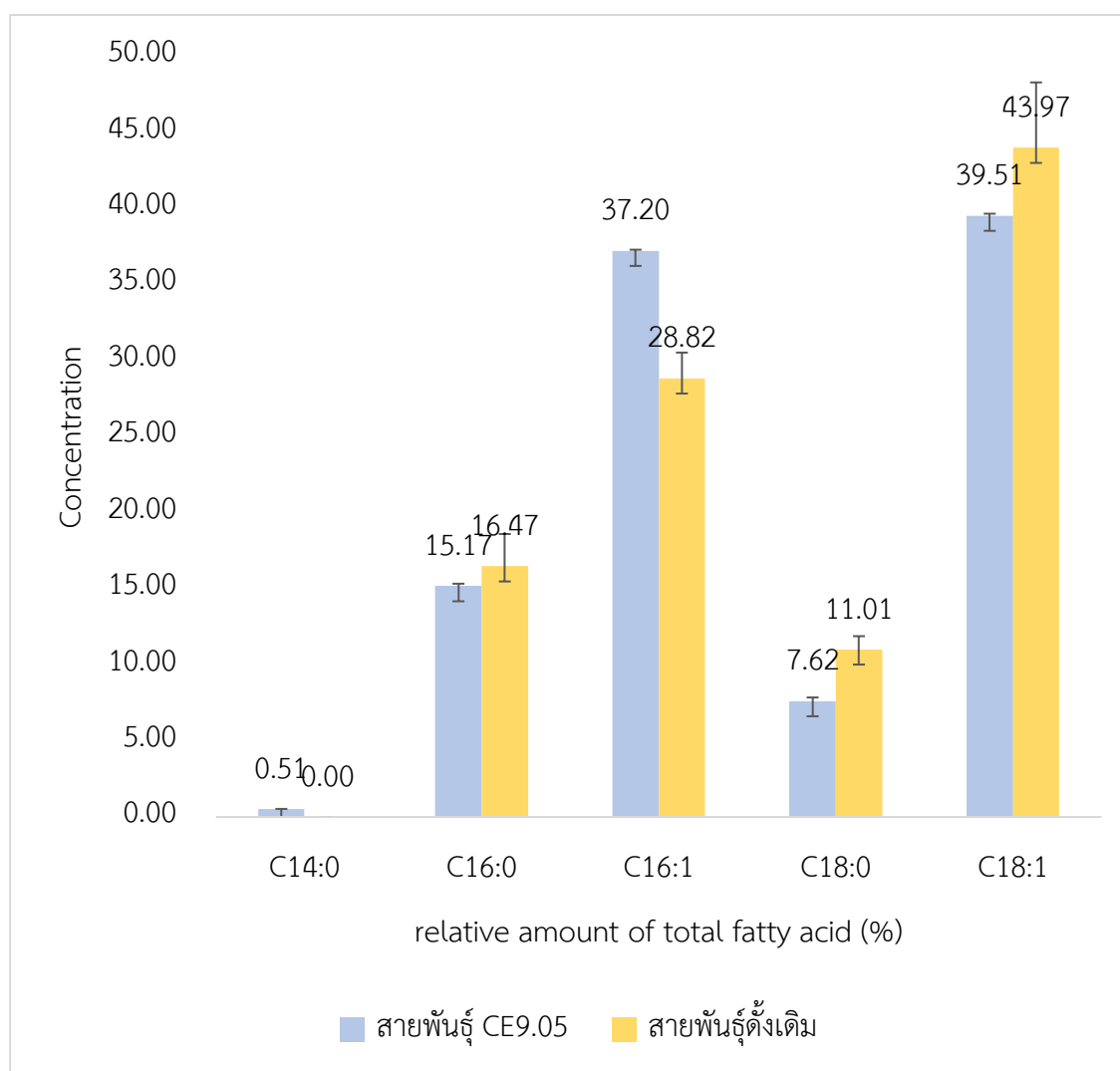
ตัวอย่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)	ปริมาณน้ำมันจากการสกัด (g/L)	ร้อยละปริมาณน้ำมันต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง
สายพันธุ์ดั้งเดิม	10.156	0.951	9.371 ± 0.190
สายพันธุ์ CE9.05	10.233	1.188	11.620 ± 1.232
สายพันธุ์ CE10.37	10.878	1.0213	9.403 ± 1.290
สายพันธุ์ CE15.16	10.267	0.948	9.792 ± 0.650
สายพันธุ์ CE25.08	10.756	0.948	9.020 ± 1.275
สายพันธุ์ CE25.10	11.822	0.6289	5.521 ± 0.946



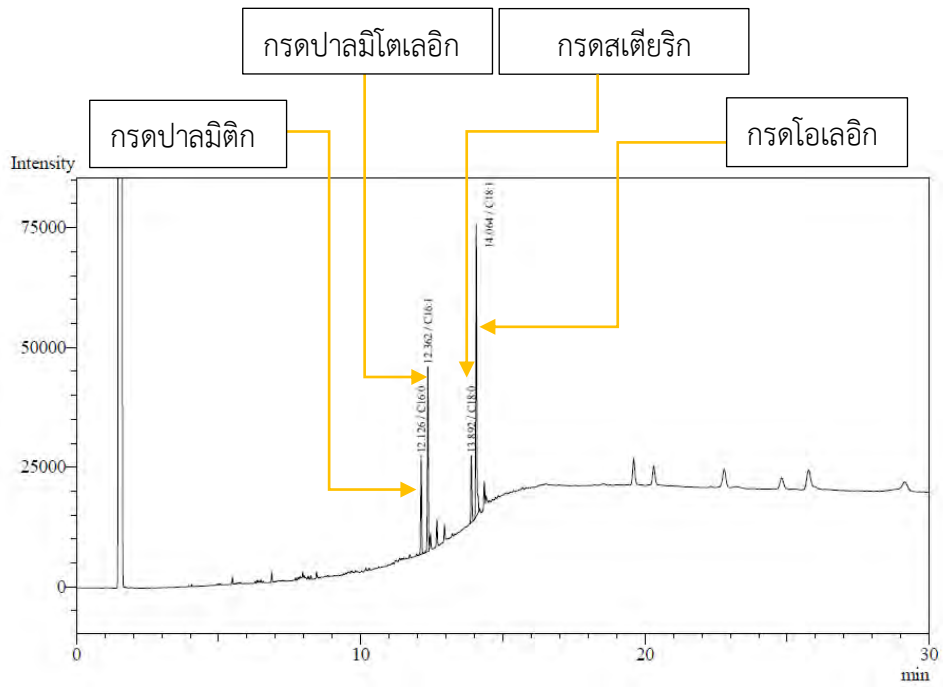
ภาพที่ 4.5 ผลการสกัดไขมันด้วยวิธี Bligh and Dyer ในแต่ละสายพันธุ์

จากผลการวิเคราะห์ชนิดกรดไขมันด้วยวิธี gas chromatography พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมมีการสะสมกรดไขมันชนิด กรดปาล์มิติก (C16:0) กรดปาล์มิโตเลอิก (C16:1) กรดสเตียริก (C18:0) และกรดไขมันชนิดโอเลอิก (C18:1) ร้อยละ 16.47 ± 2.12 , ร้อยละ 28.82 ± 1.69 , ร้อยละ 11.01 ± 0.86 และร้อยละ 43.97 ± 4.29 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.6 และ 4.7

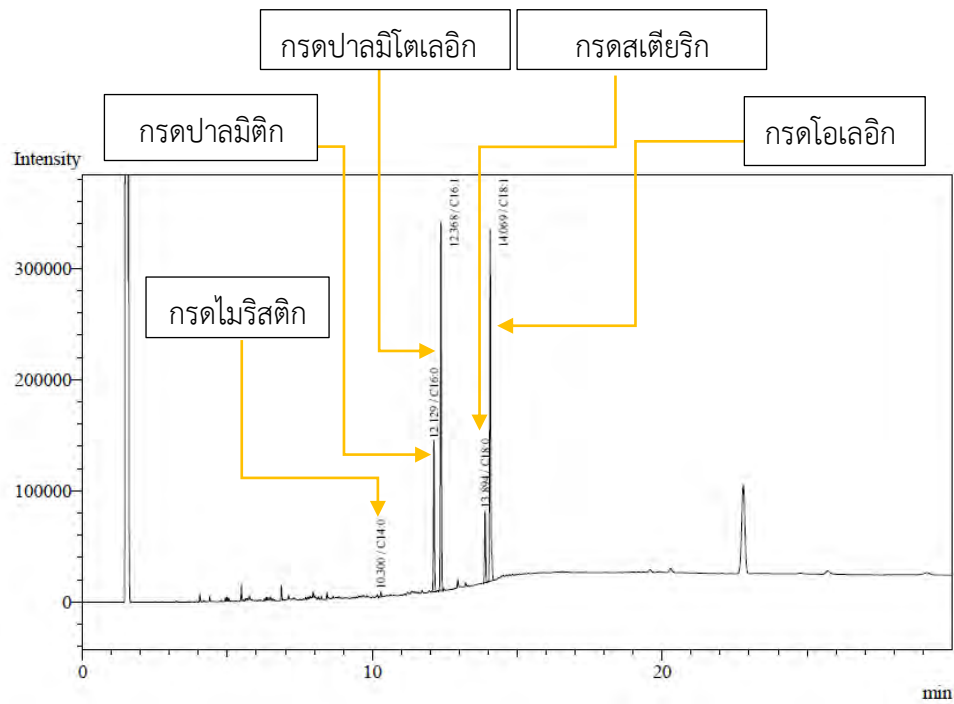
ในขณะที่ยีสต์สายพันธุ์กลาย สายพันธุ์ CE9.05 มีการสะสมกรดไขมันชนิด ไมริสติก (C14:0) กรดปาล์มิติก (C16:0) กรดปาล์มิโตเลอิก (C16:1) กรดสเตียริก (C18:0) และกรดไขมันชนิดโอเลอิก (C18:1) ร้อยละ 0.51 ± 0.02 , ร้อยละ 15.17 ± 0.15 , ร้อยละ 37.20 ± 0.07 , ร้อยละ 7.62 ± 0.24 และร้อยละ 39.51 ± 0.12 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.6 และ 4.8



ภาพที่ 4.6 กรดไขมันที่สกัดได้จากสายพันธุ์กลาย CE9.05 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม



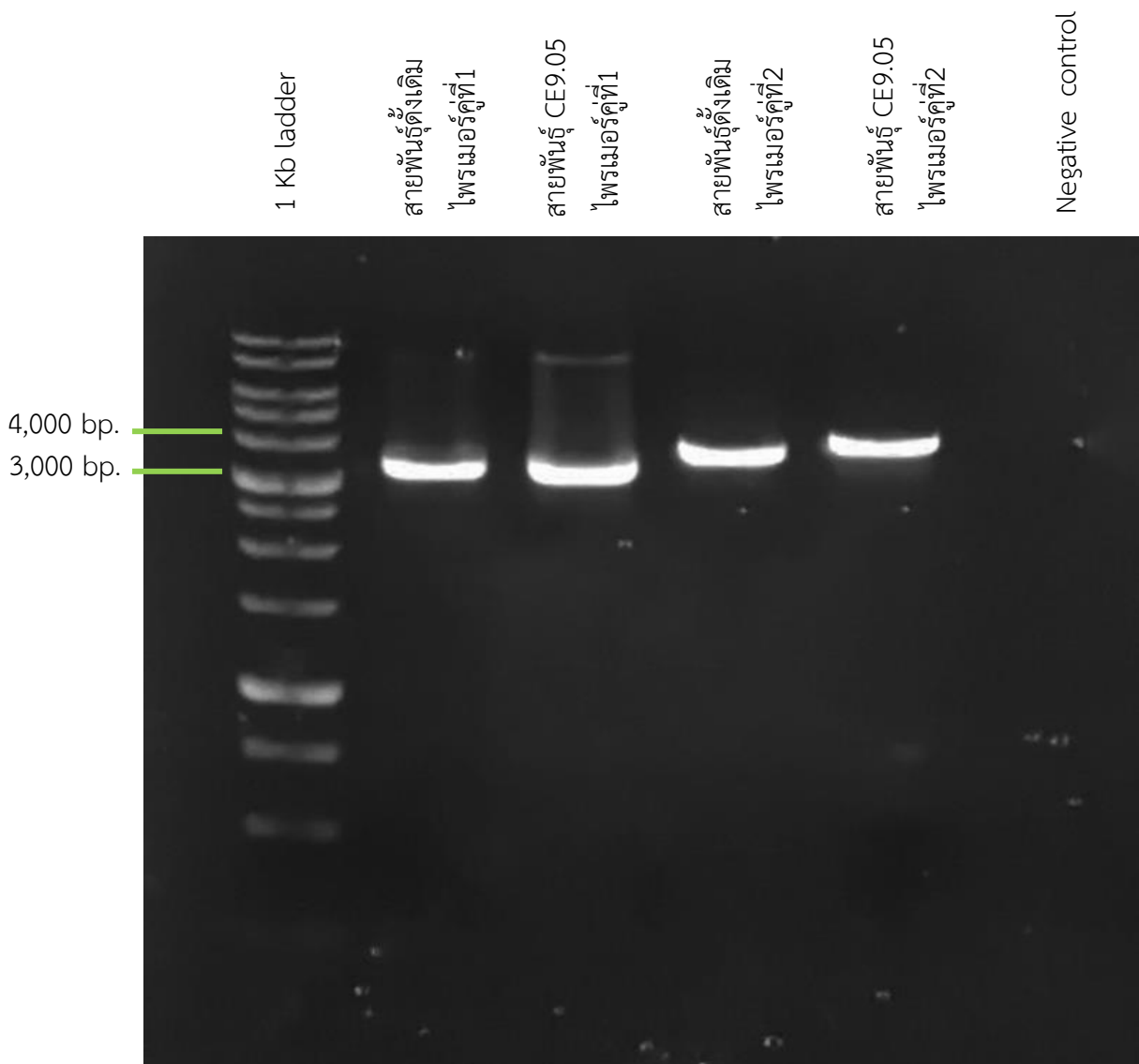
ภาพที่ 4.7 โครมาโทแกรมกรดไขมันที่สกัดได้จากยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม



ภาพที่ 4.8 โครมาโทแกรมกรดไขมันที่สกัดได้จากยีสต์สายพันธุ์กลาย CE9.05

ผลตรวจสอบการกลาย ในยีน ACC1

เมื่อนำยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายมาทำการสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอขึ้นบริเวณความยาวประมาณ 3,000 – 4,000 คู่เบส ทั้งหมด 4 ตัวอย่างจากยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย และใช้น้ำกลั่นเป็น Negative control แสดงดังภาพที่ 4.9



ภาพที่ 4.9 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณยีน ACC1 บน 1% Agarose gel

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ACC1* ในยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม (*S. cerevisiae* สายพันธุ์ TPD2) เปรียบเทียบกับยีสต์สายพันธุ์กลาย สายพันธุ์ CE9.05 โดยใช้โปรแกรม Benchling (<https://www.benchling.com>) ร่วมกับการดูกราฟโครมาโทแกรมโดยใช้โปรแกรม BioEdit (Bioedit Ltd., England) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงแทนที่เบส 2 ตำแหน่ง ได้แก่ G3477T และ G3484T ดังแสดงในภาพที่ 4.10



ภาพที่ 4.10 ผล alignment ของยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย สายพันธุ์ CE9.05

บทที่ 5

อภิปรายผลการศึกษา

1. การวัดการเติบโต

จากการวัดการเติบโตของยีสต์ *S. cerevisiae* โดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทุก ๆ 2 ชั่วโมง เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนกว่าค่าการดูดกลืนแสงจะคงที่หรือลดลง ช่วง stationary phase ชั่วโมงที่ 20 - 28 มีการดูดกลืนแสงลดลง และเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 32 ซึ่งอาจเกิดจากยีสต์มีอัตราการแบ่งเซลล์น้อยกว่าอัตราการตายหรืออาจเกิดจากการตกตะกอนของสารละลายยีสต์ที่นำไปตรวจสอบจึงทำให้ค่าไม่คงที่ตามอุดมคติ เมื่อนำข้อมูลจากการทดลองมาทำกราฟพบว่าการแปรผันของค่าที่วัดได้น้อยเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงอื่น ๆ จึงถือว่าช่วงชั่วโมงที่ 20 - 32 เป็นช่วง stationary phase และจากการวิจัยของ Resnick และ Setlow ในปี ค.ศ. 1972 พบว่าเซลล์ยีสต์เมื่อเข้าสู่ช่วง log phase และ stationary phase เซลล์จะมีความไวต่อรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV sensitivity) มากกว่าปกติ และมีการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการโฟโตรีแอคทีเวชัน (Photoreactivation) ลดลง จากกราฟการเติบโตจึงเลือกใช้ยีสต์ อายุ 14 ชั่วโมงซึ่งอยู่ในช่วง log phase มาทำการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต

2. การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายโดยฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต

จากการนำยีสต์ไปฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตในตู้ฉายรังสีที่มีหลอด UV-C ความเข้มแสง 10 วัตต์ จำนวน 5 หลอด เป็นระยะเวลา 0, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที พบว่าจากการฉายรังสียีสต์สามารถมีชีวิตอยู่ได้ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับนาที่ที่ 0 โดยมีอัตราการอยู่รอดน้อยกว่าร้อยละ 5 - 10 (ตาราง 5.1) ตั้งแต่การฉายรังสีเป็นเวลา 30 นาที จึงมีการเปลี่ยนช่วงเวลาในการฉายรังสีให้แคบลง คือฉายรังสีเป็นระยะเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาทีพบว่าช่วงเวลาที่ทำให้ยีสต์มีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 5 - 10 อยู่ในช่วง 7 และ 8 นาที โดยมีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 8.8 และร้อยละ 6.0 ตามลำดับ ระยะเวลาดังกล่าวสามารถคัดแยกยีสต์ได้จำนวนที่มากกว่าจะตรวจสอบการกลายได้ทั้งหมดจึงปรับเกณฑ์การคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์กลาย

โดยคัดเลือกไอโซเลทที่มีอัตราการอยู่รอดน้อยกว่าร้อยละ 5 จึงคัดเลือกยีสต์ที่ได้รับการฉายรังสีตั้งแต่ 9 นาที่ขึ้นไปมาทำการทดลอง

3. การคัดเลือกสายพันธุ์กลายด้วยวิธี cerulenin screening

จากการคัดเลือกยีสต์ที่ได้รับการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตแบบสุ่ม มาเลี้ยงบนอาหารแห้ง YPD ที่ประกอบด้วย cerulenin 15 ไมโครโมลาร์ (Junji et al., 1994) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นระยะเวลา 2 วัน ซึ่งตัดแปลงจากวิธีของ Tapia และคณะ 2012 ที่ใช้เชื้อ *Lipomyces staekeyi* เลี้ยงบนอาหารแห้ง YPX ประกอบด้วย cerulenin บ่มเป็นระยะเวลา 5 - 8 วัน พบว่ายีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายทุกไอโซเลทสามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี cerulenin ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณของ cerulenin 15 ไมโครโมลาร์ ซึ่งเป็นปริมาณที่น้อยที่สุดที่ยีสต์สามารถอยู่รอดได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) ที่ตัดแปลงวิธีจาก Junji และคณะ 1994 ซึ่งใช้ในยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ S288C ยังไม่ถึง IC₅₀ ใน *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TPD2 ซึ่งยังไม่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้

4. ผลการทดสอบการผลิตไขมัน

จากการตรวจสอบการสะสมไขมันของสายพันธุ์กลาย CE9.05 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมพบว่า ยีสต์สายพันธุ์กลาย CE9.05 มีการสะสมกรดไขมันชนิดไมริสติก (C14:0) ในขณะที่ไม่พบการสะสมกรดไขมันชนิดนี้ในยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม จากการศึกษาของ Keith และคณะในปี 1973 อ้างอิงใน Schweizer, Werkmeister, และ Jain ในปี 1978 พบว่าการสะสมกรดไขมันของยีสต์ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น อุณหภูมิ อาหาร ระยะเวลาและปริมาณที่เลี้ยง แหล่งคาร์บอน เป็นต้น ยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์กลายสามารถสร้างกรดไขมันอิ่มตัวสายยาวได้แต่มีเพียงการสร้างกรดไขมันอิ่มตัวสายยาวนั้นยีสต์ไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ จึงมีการสร้างกรดไขมันอิ่มตัวสายสั้นที่มีคาร์บอนอะตอม 13 - 17 อะตอม ขึ้นมาเพื่อความอยู่รอดในการดำรงชีวิต ดังนั้นจึงเป็นเหตุผลของการพบการสะสมกรดไขมันชนิดไมริสติก (C14:0) ในยีสต์สายพันธุ์กลาย CE9.05

5. ตรวจสอบการกลาย ในยีน ACC1

เนื่องจากยีน ACC1 เป็นยีนขนาดใหญ่ มีขนาด 6,702 คู่เบส การออกแบบไพรเมอร์ 2 คู่จึงไม่เพียงพอที่จะทำให้เพิ่มปริมาณยีนได้ทั้งหมด ทำให้ผลการส่งวิเคราะห์ลำดับเบสในยีน ACC1 ได้ลำดับเบสไม่ครบทั้งหมดของยีน และถึงแม้ว่าการวัดความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอจะช่วง 1.8 – 2.0 ซึ่งถือเป็นช่วงที่ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์แต่ผลโครมาโตแกรมพบว่ากราฟมีความทับซ้อนกันอย่างมากในบางบริเวณจึงไม่นำบริเวณดังกล่าวมาพิจารณาการกลายเนื่องจากไม่สามารถยืนยันได้ว่าเกิดการกลายจริงหรือเกิดจากความผิดพลาดของผลวิเคราะห์ลำดับเบส ทั้งนี้ไม่สามารถทำการทดลองเพิ่มเติมได้ เนื่องจากติดสถานการณ์การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรค COVID-19

บทที่ 6

สรุปผลการศึกษา

การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายแบบสุ่มของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไขมันโดยการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต คัดเลือกโดยเลี้ยงบนอาหารที่ประกอบด้วย cerulenin และการข่มสีหยดน้ำมัน สามารถคัดแยกยีสต์ *S. cerevisiae* ได้ 1 ไอโซเลท คือ สายพันธุ์ CE9.05 ที่มีค่าเฉลี่ยร้อยละปริมาณน้ำมันต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นร้อยละ 2.25 แตกต่างกับสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 % โดยมีการสะสมกรดไขมันชนิดโมริสติก (C14:0) กรดปาล์มติก (C16:0) กรดปาล์มโทเลอิก (C16:1) กรดสเตียริก (C18:0) และกรดไขมันชนิดโอเลอิก (C18:1) ร้อยละ 0.51 ± 0.02 , ร้อยละ 15.17 ± 0.15 , ร้อยละ 37.20 ± 0.07 , ร้อยละ 7.62 ± 0.24 และร้อยละ 39.51 ± 0.12 ตามลำดับ เมื่อทำการตรวจสอบการกลายในยีน *ACC1* พบว่าสามารถระบุตำแหน่งการเปลี่ยนแปลงแทนที่เบสได้ 2 ตำแหน่ง คือ G3477T และ G3484T ทั้งนี้ยีสต์ *S. cerevisiae* มีการศึกษาอย่างหลากหลายทำให้มีข้อมูลรองรับการทำงานทดลองและนอกจากนี้ยังเลี้ยงง่ายและใช้ระยะเวลาสั้น นอกจากนี้ไขมันที่ผลิตได้มีองค์ประกอบเหมือนกับไขมันที่ผลิตได้จากพืชจึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างหลากหลาย

เอกสารอ้างอิง

- Alvarez, H.M., and Steinbuchel, A. 2002. Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60 : 367-376.
- Anderson, R.A. 1992. Diversity of eukaryotic algae. *Biodiversity and Conservation* 1 : 267-292.
- Bhagavan, N.V., and Ha, C.E. 2015. Lipids I : Fatty acids and eicosanoids. In J. Leonard and. Gonzalez (eds.), *Essentials of medical biochemistry*, pp. 269-297. China : Elsevier.
- Bligh, E.G., and Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37 : 911-917.
- Chao, H.F., Yen, Y.F., and Ku, M.S. 2009. Characterization of a salt-induced DhAHP, a gene coding for alkyl hydroperoxide reductase from the extremely halophilic yeast *Debaryomyces hansenii*. *BMC Microbiology* 9 : 1-14.
- del Castillo Agudo, L. 1992. Lipid content of *Saccharomyces cerevisiae* strains with different degrees of ethanol tolerance. *Applied Microbiology and Biotechnology* 37 : 647-651.
- Ferreira, R., et al. 2018. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for overproduction of triacylglycerols. *Metabolic Engineering Communications* 6 : 22-27.
- Genetics Home Reference. *What is a gene mutation and how do mutations occur?* [Online]. 2020. Available from : <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/mutationsanddisorders/genemutation> [2020,Jan 1]

- Hasslacher, 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. *Journal Biology Chemistry* 268 : 10946–10952.
- Heath, R.J., White, S.W., and Rock, C.O. 2001. Lipid biosynthesis as a target for antibacterial agents. *Progress in Lipid Research* 40 : 467–497.
- Hill, J., Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S., and Tiffany, D. 2006. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America* 103 : 11206–11210.
- Junji, I., et al. 1994. Cerulenin-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with an altered fatty acid synthase gene. *Molecular and General Genetics* 244 : 90–96.
- Keith, A.D., Wisnieski, B.J., Henry, S., and Williams, J.C. 1973. Membranes of Yeast and Neurospora : Lipid Mutants and Physical Studies. In J. Erwin (eds), *Lipids and Biomembranes of Eucaryotic Microorganisms*, pp. 259-321. New York : Academic Press. Cited in Schweizer, E., Werkmeister, K., and Jain, M.K. 1978. Fatty acid biosynthesis in yeast. *Molecular and Cellular Biochemistry* 21 : 95–107.
- Lamers, D., et al. 2016. Selection of oleaginous yeasts for fatty acid production. *BMC Biotechnology* 16 : 45.
- Lim, C.G., Fowler, Z.L., Hueller, T., Schaffer, S., and Koffas, M.A., 2011. High-yield resveratrol production in engineered *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 77 : 3451-3460.
- Manirakiza, P., Covaci, A., and Schepens, P. 2001. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer and modified Bligh & Dyer extraction methods. *Journal of Food Composition and Analysis* 14 : 93–100.

- Meng, X., et al. 2009. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy* 34 : 1-5.
- Morita, N., Nishida, T., Tanaka, M., Yano, Y., and Okuyama, H. 2005. Enhancement of polyunsaturated fatty acid production by cerulenin treatment in polyunsaturated fatty acid-producing bacteria. *Biotechnology Letters* 27 : 389–393.
- Omura, S. 1976. The antibiotic cerulenin, a novel tool for biochemistry as an inhibitor of fatty acid synthesis. *Bacteriological reviews* 40 : 681–697.
- Ratledge C. 1982. Microbial oil and fats: an assessment of their commercial potential. *Professional Industry Microbial* 16 : 119-206.
- Resnick, M.A., and Setlow, J.K. 1972. Repair of pyrimidine dimer damage induced in yeast by ultraviolet light. *Journal of Bacteriology* 109 : 979-986.
- Schmid, R.D. 1987. Biotechnology of lipids in Industry. In P.K. Stumpf, J.B. Mudd and W.D. Nes (eds.), *The metabolism, structure, and function of plant lipids*, pp. 587-596. New York : Springer.
- Schrader, T.J. 2003. Mutagens. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* : 4059-4067.
- Swinnen, J.V., Brusselmans, K., Heemers, H.V., and Verhoeven, G. 2009. Androgens and the Lipogenic Switch in Prostate Cancer. In J. Mohler and D. Tindall (eds.), *Androgen Action in Prostate Cancer*, pp. 723–739. New York : Springer
- Tapia, E.V., et al. 2012. Optimization of lipid production by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* by random mutagenesis coupled to cerulenin screening. *AMB Express* 2 : 64.
- Tao, BY. 2007. Industrial Applications for Plant Oils and Lipids. *New Technologies and Applications* 24 : 611-627.

- Veen, M., and Lang, C. 2004. Production of lipid compounds in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63 : 635-646.
- Wang, J., Xu, R., Wang, R., Haque, M.E., and Liu, A. 2016. Overexpression of *ACC* gene from oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* enhanced the lipid accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* with increased levels of glycerol 3-phosphate substrates. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 80 : 1214-1222. Cited in Wei, X. 2006. Yeast protocols. In E.F. Nicole and M. Caravella (eds.), *Methods in molecular biology*, pp. 1-15. United States of America : Humana Press.
- Wang, J.F., et al. 2009. A quick isolation method for mutants with high lipid yield in oleaginous yeast. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25 : 921–925.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตารางที่ 3.7.2 ส่วนประกอบปฏิกิริยา PCR สำหรับสายพันธุ์ดั้งเดิม

components	50 μ l RXN
5X Phusion HF or GC Buffer	10 μ l
10 mM dNTPs	1 μ l
10 μ M Forward Primer	2.5 μ l
10 μ M Reverse Primer	2.5 μ l
Template DNA	2 μ l
Phusion DNA Polymerase	0.5 μ l
Nuclease- Free Water	31.5 μ l

ตารางที่ 3.7.3 ส่วนประกอบปฏิกิริยา PCR สำหรับสายพันธุ์กลาย สายพันธุ์ CE9.05

components	50 μ l RXN
5X Phusion HF or GC Buffer	10 μ l
10 mM dNTPs	1 μ l
10 μ M Forward Primer	2.5 μ l
10 μ M Reverse Primer	2.5 μ l
Template DNA	1 μ l
Phusion DNA Polymerase	0.5 μ l
Nuclease- Free Water	32.5 μ l

ตาราง 4.1 ผลการคัดเลือกสายพันธุ์กล้วยโดย cerulenin

ไอโซเลข	เวลาที่ได้รับการฉายรังสี (นาที)	ผลการอยู่รอด	ไอโซเลข	เวลาที่ได้รับการฉายรังสี (นาที)	ผลการอยู่รอด
CE9.1	9	+	CE9.24	9	+
CE9.2	9	+	CE9.25	9	+
CE9.3	9	+	CE9.26	9	+
CE9.4	9	+	CE9.27	9	+
CE9.5	9	+	CE9.28	9	+
CE9.6	9	+	CE9.29	9	+
CE9.7	9	+	CE9.30	9	+
CE9.8	9	+	CE9.31	9	+
CE9.9	9	+	CE9.32	9	+
CE9.10	9	+	CE9.33	9	+
CE9.11	9	+	CE10.11	10	+
CE9.12	9	+	CE10.12	10	+
CE9.13	9	+	CE10.13	10	+
CE9.14	9	+	CE10.14	10	+
CE9.15	9	+	CE10.15	10	+
CE9.16	9	+	CE10.16	10	+
CE9.17	9	+	CE10.17	10	+
CE9.18	9	+	CE10.18	10	+
CE9.19	9	+	CE10.19	10	+
CE9.20	9	+	CE10.20	10	+
CE9.21	9	+	CE10.21	10	+
CE9.22	9	+	CE10.22	10	+
CE9.23	9	+	CE10.23	10	+

ไอซีเลข	เวลาที่ได้รับการ ฉายรังสี (นาที)	ผลการอยู่รอด
CE10.25	10	+
CE10.26	10	+
CE10.27	10	+
CE10.28	10	+
CE10.29	10	+
CE10.30	10	+
CE10.31	10	+
CE10.32	10	+
CE10.33	10	+
CE10.34	10	+
CE10.35	10	+
CE10.36	10	+
CE10.37	10	+
CE10.38	10	+
CE10.39	10	+
CE10.40	10	+
CE10.41	10	+
CE10.42	10	+
CE10.33	10	+
CE10.34	10	+
CE10.35	10	+
CE10.36	10	+
CE10.37	10	+
CE10.38	10	+

ไอซีเลข	เวลาที่ได้รับการ ฉายรังสี (นาที)	ผลการอยู่รอด
CE10.39	10	+
CE10.40	10	+
CE10.41	10	+
CE10.42	10	+
CE15.1	15	+
CE15.2	15	+
CE15.3	15	+
CE15.4	15	+
CE15.5	15	+
CE15.6	15	+
CE15.7	15	+
CE15.8	15	+
CE15.9	15	+
CE15.10	15	+
CE15.11	15	+
CE15.12	15	+
CE15.13	15	+
CE15.14	15	+
CE15.15	15	+
CE15.16	15	+
CE15.17	15	+
CE15.18	15	+
CE15.19	15	+
CE15.20	15	+

ไอโซเลข	เวลาที่ได้รับการ ฉายรังสี (นาที)	ผลการอยู่รอด
CE15.21	15	+
CE20.1	20	+
CE20.2	20	+
CE20.3	20	+
CE20.4	20	+
CE20.5	20	+
CE20.6	20	+
CE20.7	20	+
CE20.8	20	+
CE20.9	20	+
CE20.10	20	+
CE20.11	20	+
CE20.12	20	+
CE25.1	25	+
CE25.2	25	+
CE25.3	25	+
CE25.4	25	+
CE25.5	25	+
CE25.6	25	+
CE25.7	25	+
CE25.8	25	+
CE25.9	25	+
CE25.10	25	+
CE25.11	25	+

หมายเหตุ + หมายถึง สามารถดำรงชีวิตอยู่รอดได้

ตาราง 4.2 การย้อมสีหยดน้ำมัน

ไอโซเลท	เวลาที่ได้รับการฉายรังสี (นาที)	ปริมาณหยดน้ำมัน
WT	0	+
WT+CE	0	+
CE8.10	8	++
CE8.15	8	+
CE8.16	8	+
CE9.1	9	++
CE9.5	9	+++
CE9.17	9	+
CE10.11	10	++
CE10.37	10	+++
CE15.05	15	+
CE15.12	15	+
CE15.16	15	+++
CE20.06	20	+
CE20.07	20	++
CE20.09	20	++
CE20.11	20	++
CE20.12	20	+
CE25.03	25	+
CE25.04	25	+
CE25.08	25	+++
CE25.09	25	++
CE25.10	25	+++

หมายเหตุ : + หมายถึงพบน้อย, ++ หมายถึงพบมาก, +++ หมายถึงพบมากที่สุด
เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

ตาราง 5.1 จำนวนโคโลนียีสต์ที่มีชีวิตรอดหลังจากฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตช่วง 0 – 180 นาที

dilution/time	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
0 mins.	>300	>300	>300	>300	>300	148	20
30 mins.	>300	>300	27	7	0	0	0
60 mins.	109	23	0	0	0	0	0
90 mins.	0	0	0	0	0	0	0
120 mins.	0	0	0	0	0	0	0
150 mins.	0	0	0	0	0	0	0
180 mins.	0	0	0	0	0	0	0

ตาราง 5.2 จำนวนโคโลนียีสต์ที่มีชีวิตรอดหลังจากฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตช่วง 0 – 30 นาที

dilution/time	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
0 mins.	>300	>300	>300	>300	>300	230	13	3	0
1 mins.	>300	>300	>300	>300	>300	187	19	2	0
2 mins.	>300	>300	>300	>300	>300	161	15	0	0
3 mins.	>300	>300	>300	>300	>300	135	15	0	0
4 mins.	>300	>300	>300	>300	>300	101	15	0	0
5 mins.	>300	>300	>300	>300	>300	84	7	0	0
6 mins.	>300	>300	>300	>300	298	37	0	0	0
7 mins.	>300	>300	>300	>300	203	23	0	0	0
8 mins.	>300	>300	>300	>300	138	21	0	0	0
9 mins.	>300	>300	>300	>300	72	14	0	0	0
10 mins.	>300	>300	>300	224	56	2	0	0	0
15 mins.	>300	>300	268	26	0	0	0	0	0
20 mins.	>300	>300	62	10	0	0	0	0	0
25 mins.	>300	113	8	2	0	0	0	0	0
30 mins.	>300	146	6	3	0	0	0	0	0

ภาคผนวก ข
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเหลว YPD

Yeasts extract	10 g/L
Peptone	20 g/L
Glucose	20 g/L

Lipid production media

Yeasts extract	5 g/L
Peptone	5 g/L
Glucose	70 g/L

อาหารเหลว YPD ประกอบด้วย Cerulenin

Yeasts extract	10 g/L
Peptone	20 g/L
Glucose	20 g/L
Cerulenin	15 M