โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายแบบสุ่มของยีสต์ *Yarrowia lipolytica* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไขมัน โดยรังสีอัลตราไวโอเลต
Randomization mutagenesis of *Yarrowia lipolytica* to increase lipid production by ultraviolet radiation

ชื่อนิสิต นางสาวปิยะพร มีศรีแก้ว **เลขประจำตัว** 5932130423

ภาควิชา พฤกษศาสตร์

ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายแบบสุ่มของยีสต์ *Yarrowia lipolytica* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไขมัน โดยรังสีอัลตราไวโอเลต

นางสาวปิยะพร มีศรีแก้ว

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2562

Randomization mutagenesis of *Yarrowia lipolytica* to increase lipid production by ultraviolet radiation

Miss Piyaporn Meesrikaew

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

ชื่อเรื่อง	การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายแบบสุ่มของยีสต์ *Yarrowia lipolytica* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไขมัน โดยรังสีอัลตราไวโอเลต
ชื่อนิสิต	นางสาวปิยะพร มีศรีแก้ว
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล
ปีการศึกษา	2562

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ อนุมัติให้โครงงานวิทยาศาสตร์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์

คณะกรรมการสอบโครงงานวิทยาศาสตร์

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี)

อัญชิษฐา สัจจารักษ์.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร.อัญชิษฐา สัจจารักษ์)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงงานวิทยาศาสตร์	การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายแบบสุ่มของยีสต์ *Yarrowia lipolytica* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไขมัน โดยรังสีอัลตราไวโอเลต
นิสิตผู้ดำเนินงาน	นางสาวปิยะพร มีศรีแก้ว
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน	รองศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล
ปีการศึกษา	2562

บทคัดย่อ

Yarrowia lipolytica เป็นยีสต์ที่มีคุณสมบัติสามารถสะสมไขมันได้ภายในเซลล์ อย่างไรก็ตาม *Y. lipolytica* สายพันธุ์ *YLNatXynA* มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส แต่พบว่ายังมีการสะสมไขมันที่ต่ำ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อเพิ่มปริมาณการสะสมไขมันของยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์ *YLNatXynA* โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต เมื่อฉายรังสีเป็นเวลา 15 นาที พบว่ามียีสต์จำนวน 60 ไอโซเลท ที่มีอัตราการอยู่รอดในช่วงร้อยละ 5-10 จากนั้นทำการคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์กลายบนอาหาร YPD ที่ผสม cerulenin เข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และย้อมเซลล์ยีสต์ด้วยสี Sudan black B พบว่าไอโซเลท YLCe15_03 YLCe15_05 YLCe15_07 YLCe15_09 และ YLCe15_14 มีการสะสม oil droplet มากที่สุด ผลการวิเคราะห์ปริมาณร้อยละไขมันที่สะสมพบว่า ยีสต์สายพันธุ์กลายไอโซเลท YLCe15_07 มีปริมาณร้อยละไขมันที่สะสมสูงกว่าสายพันธุ์เดิม (ร้อยละ 25.53 ± 2.72 และ 20.14 ± 1.95 ตามลำดับ) แต่ไอโซเลท YLCe15_14 มีปริมาณไขมันที่สะสมร้อยละ 16.27 ± 0.79 ซึ่งน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิม และพบว่า ไอโซเลท YLCe15_03 YLCe15_05 และ YLCe15_09 มีปริมาณร้อยละไขมันสะสมไม่แตกต่างจากสายพันธุ์เดิม เมื่อวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันที่ผลิตจากยีสต์สายพันธุ์กลายไอโซเลท YLCe15_07 และ YLCe15_14 พบว่าชนิดกรดไขมันไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์สายพันธุ์เดิม โดยประกอบด้วยกรดไขมันชนิดกรดปาล์มิติก กรดปาลมิโตเลอิก กรดสเตียริก กรดโอเลอิก และกรดไลโนเลอิก เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน Acetyl Co-A Carboxylase1 ในไอโซเลท YLCe15_07 พบว่าไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองไม่มีความจำเพาะต่อยีน *ACC1* ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ลำดับเบสที่เปลี่ยนไปได้ อย่างไรก็ตาม ยีสต์มีแนวโน้มถูกนำไปใช้ในการผลิตพลังงานชีวภาพทั้งในระยะสั้นและระยะยาว

คำสำคัญ: *Yarrowia lipolytica,* เหนี่ยวนำให้เกิดการกลาย, Ceruienin, ยีน *ACC1*

Senior project	Randomization mutagenesis of *Yarrowia lipolytica* to increase lipid production by ultraviolet radiation
Student name	Miss Piyaporn Meesrikaew
Department	Botany
Program	Genetics
Senior project advisor	Assoc. Prof. Dr. Warawut Chulalaksananukul
Academic year	2019

Abstract

Yarrowia lipolytica is well known for intracellular lipid accumulation. *Y. lipolytica* strain *YLNatXynA*, the engineered yeast, can produce xylanase but the ability of lipid accumulation is low. This research aims to enhance lipid accumulation by induced mutagenesis in *Y. lipolytica* strain *YLNatXynA* using ultraviolet irradiation. After 15 minutes of irradiation, 60 mutant isolates were found with 5-10 percentage of survival rate. Then, growing mutants were randomly selected by using yeast-peptone-dextrose (YPD) medium supplemented with 2 µg/ml cerulenin for this study. The Sudan black B staining revealed that strain YLCe15_03, YLCe15_05, YLCe15_07, YLCe15_09, and YLCe15_14 showed the highest oil droplets accumulation. The lipid content of YLCe15_07 (25.53 ± 2.72%) was higher than the wildtype strain (20.14 ± 1.95%) whereas the YLCe15_14 showed the lipid content of 16.27 ± 0.79%, which lower than the wildtype strain. While the lipid contents of YLCe15_03, YLCe15_05, and YLCe15_09 were significantly similar to the wildtype strain. The major fatty acid profiles of YLCe15_07 and YLCe15_14 composed of palmitic acid, palmitoleic acid, stearic acid, oleic acid, and linoleic acid which were similar to the wildtype strain. The YLCe15_07 was selected as a suitable candidate to study on DNA sequencing analysis of Acetyl Co-A Carboxylase1 gene. The result indicated that the designed primer was not specific to the *ACC1* gene, so any changed base was not detected. However, yeast is most promising in the near and long term for bioenergy production.

Keywords: *Yarrowia lipolytica*, Induced mutagenesis, Cerulenin, *ACC1* gene

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องด้วยความกรุณาของผู้ที่เกี่ยวข้องทุกฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานวิทยาศาสตร์ที่กรุณาให้คำแนะนำสั่งสอน ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการทำโครงงานวิทยาศาสตร์ และกรุณาช่วยเหลือเป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี และอาจารย์ ดร.อัญชิษฐา สัจจารักษ์ ที่กรุณาเสียสละเวลาเป็นกรรมการสอบโครงงานวิทยาศาสตร์ พร้อมทั้งให้คำแนะนำ ช่วยตรวจสอบแก้ไขให้โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้มีความถูกต้องและสมบูรณ์

กราบขอบพระคุณนางสาวภาวดี บัวทอง ดร.วรรณพร วัฒน์สุนธร และนางสาวณัฏฐา จึงเจริญพานิชย์ ที่ช่วยให้คำแนะนำตลอดการทำโครงงานวิทยาศาสตร์ และกรุณาช่วยเหลือในทุกด้านเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อประสบการณ์ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาสนับสนุนงานวิจัย

ขอขอบพระคุณหน่วยปฏิบัติการวิจัยเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ใช้อุปกรณ์และสถานที่สำหรับการศึกษาวิจัยในโครงงานวิทยาศาสตร์นี้

ขอขอบพระคุณคณะอาจารย์ทุกท่านและเพื่อนพ้องทุกคนที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจมาโดยตลอด

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติผู้ใหญ่ รวมทั้งพี่น้องที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในทุกด้านอย่างเต็มที่

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณตัวเอง ที่พยายามฝ่าฟันอุปสรรคต่าง ๆ ที่ผ่านเข้ามาในช่วงที่ทำโครงงานวิทยาศาสตร์ ทุ่มเทเวลาเพื่อทำการทดลอง นำเสนอ รวมทั้งเขียนเล่มโครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้ และทำให้ได้ความรู้รวมทั้งประสบการณ์ต่าง ๆ เพิ่มขึ้น

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
กิตติกรรมประกาศ	ช
สารบัญ	ซ
สารบัญภาพ	ฌ
สารบัญตาราง	ฎ
บทที่	
1 บทนำ	1
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
3 วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และวิธีดำเนินการศึกษา	11
4 ผลการศึกษา	19
5 อภิปรายผลการศึกษา	34
6 สรุปผลการศึกษา	37
เอกสารอ้างอิง	38
ภาคผนวก	42
ภาคผนวก ก	43
ภาคผนวก ข	45
ภาคผนวก ค	54

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน (Fatty Acid Synthesis)	6
2.2	กระบวนการสังเคราะห์ไตรเอซิลกลีเซอรอล (Triacylglycerol Synthesis)	7
2.3	กระบวนการสังเคราะห์ไตรเอซิลกลีเซอรอลใน *Y. lipolytica*	7
2.4	malonyl-CoA เป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในกระบวนการผลิตอนุพันธ์ของไขมันชนิดต่าง ๆ	8
4.1	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์ *YLNatXynA* ที่เจริญบนอาหารเหลว YPD	19
4.2	กราฟการเติบโต (Growth Curve) ของยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์ *YLNatXynA*	20
4.3	กราฟอัตราการอยู่รอดของยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์ *YLNatXynA* หลังได้รับการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตที่ระยะเวลา 0 30 60 90 120 150 และ 180 นาที	21
4.4	กราฟอัตราการอยู่รอดของยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์ *YLNatXynA* หลังได้รับการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตที่ระยะเวลา 0 5 10 15 20 25 และ 30 นาที	21
4.5	ยีสต์ *Y. lipolytica* ไอโซเลท YLCe15_03 YLCe15_05 YLCe15_07 YLCe15_09 และ YLCe15_14 หลังจากย้อมสีเซลล์ยีสต์ด้วยวิธี Sudan black B staining เปรียบเทียบกับเซลล์ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม (WT)	23
4.6	กราฟค่าเฉลี่ยน้ำหนักชีวมวล (Biomass Production) และค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโต (Cell Growth) ของยีสต์ *Y. lipolytica* ไอโซเลท YLCe15_03 YLCe15_05 YLCe15_07 YLCe15_09 และ YLCe15_14 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (WT)	24
4.7	กราฟค่าเฉลี่ยผลผลิตไขมัน (Lipid Yield) ของยีสต์ *Y. lipolytica* ไอโซเลท YLCe15_03 YLCe15_05 YLCe15_07 YLCe15_09 และ YLCe15_14 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (WT)	25
4.8	กราฟค่าเฉลี่ยปริมาณไขมัน (Lipid Content) ของยีสต์ *Y. lipolytica* ไอโซเลท YLCe15_03 YLCe15_05 YLCe15_07 YLCe15_09 และ YLCe15_14 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (WT)	26
4.9	กราฟชนิดและสัดส่วนของกรดไขมัน (Fatty Acid Profile) ของยีสต์ *Y. lipolytica* ไอโซเลท YLCe15_07 และ YLCe15_14 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (WT)	27
4.10	กราฟค่า OD_{600} เฉลี่ยของยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) ไอโซเลท YLCe15_03 YLCe15_05 YLCe15_07 YLCe15_09 และ YLCe15_14 เปรียบเทียบระหว่างเชื้อรุ่นที่ 1 และรุ่นที่ 3	28

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
4.11	กราฟค่าเฉลี่ยน้ำหนักชีวมวล (Biomass Production) ของยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) ไอโซเลท YLCe15_03 YLCe15_05 YLCe15_07 YLCe15_09 และ YLCe15_14 เปรียบเทียบระหว่างเชื้อรุ่นที่ 1 และรุ่นที่ 3	29
4.12	กราฟค่าเฉลี่ยผลผลิตไขมัน (Lipid Yield) ของยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) ไอโซเลท YLCe15_03 YLCe15_05 YLCe15_07 YLCe15_09 และ YLCe15_14 เปรียบเทียบระหว่างเชื้อรุ่นที่ 1 และรุ่นที่ 3	30
4.13	กราฟค่าเฉลี่ยปริมาณไขมัน (Lipid Content) ของยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) ไอโซเลท YLCe15_03 YLCe15_05 YLCe15_07 YLCe15_09 และ YLCe15_14 เปรียบเทียบระหว่างเชื้อรุ่นที่ 1 และรุ่นที่ 3	31
4.14	ลักษณะสัณฐานวิทยาของไอโซเลท YLCe15_07 และ YLCe15_14 รุ่นที่ 3 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (WT)	32
4.15	ผลการตรวจสอบการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Gel electrophoresis ของยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) และไอโซเลท YLCe15_07 จากการใช้ไพรเมอร์ทั้งสองคู่	33
ค.1	ผล Gas Chromatography จากไขมันที่สกัดได้จากยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) รุ่นที่ 1	55
ค.2	ผล Gas Chromatography จากไขมันที่สกัดได้จากยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) รุ่นที่ 3	56
ค.3	ผล Gas Chromatography จากไขมันที่สกัดได้จากยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์กลายไอโซเลท YLCe15_07 รุ่นที่ 1	57
ค.4	ผล Gas Chromatography จากไขมันที่สกัดได้จากยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์กลายไอโซเลท YLCe15_07 รุ่นที่ 3	58
ค.5	ผล Gas Chromatography จากไขมันที่สกัดได้จากยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์กลายไอโซเลท YLCe15_14 รุ่นที่ 1	59
ค.6	ผล Gas Chromatography จากไขมันที่สกัดได้จากยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์กลายไอโซเลท YLCe15_14 รุ่นที่ 3	60

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ปริมาณการสะสมไขมันของเชื้อจุลินทรีย์สะสมไขมันแต่ละชนิด เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง	4
3.1	ส่วนประกอบในปฏิกิริยา PCR	17
ข.1	การคัดเลือกสายพันธุ์กลายโดย Oil Droplet Screening	46

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ

ไขมัน เป็นสารประกอบชีวโมเลกุลที่มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิต เนื่องจากไขมันมีหน้าที่หลายประการด้วยกัน เช่น เป็นส่วนประกอบหลักภายในเยื่อหุ้มเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เป็นฮอร์โมนที่มีความสำคัญต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในร่างกาย และเป็นแหล่งพลังงานสำรองที่สำคัญของสิ่งมีชีวิต (Rakicka et al., 2015) ในปัจจุบันไขมันมีความสำคัญต่อภาคอุตสาหกรรมอย่างมาก เนื่องจากไขมันสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพแทนการใช้เชื้อเพลิงจากฟอสซิล (Zhu et al., 2016)

เชื้อจุลินทรีย์สะสมไขมัน (Oleaginous Microorganisms) ถูกใช้เป็นทางเลือกในการผลิตไขมันที่มีมูลค่าสูงในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากมีข้อดีหลายประการ ได้แก่ ใช้พื้นที่ในการเลี้ยงเชื้อน้อย มีอัตราการเจริญเติบโตสูง มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนที่หลากหลาย (Meng et al., 2009) อีกทั้ง เชื้อจุลินทรีย์กลุ่มนี้มีน้ำมันเป็นองค์ประกอบในสัดส่วนที่สูงเมื่อเทียบกับน้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำมันยังมีความคล้ายคลึงกับน้ำมันที่ได้จากพืช (Zhao et al., 2010)

เชื้อจุลินทรีย์สะสมไขมัน จะมีการสะสมไขมันไว้ภายในเซลล์หลายระดับขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ ซึ่งจะสะสมไขมันอย่างน้อย 20 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง จุลินทรีย์สะสมน้ำมันในกลุ่มยีสต์ (Oleaginous Yeast) ได้แก่ *Rhodosporidium* sp. *Rhodotorula* sp. *Lipomyces* sp. และ *Yarrowia lipolytica* ซึ่งมีการสะสมน้ำมันภายในเซลล์ประมาณ 20 ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Thevenieau and Nicaud, 2013) โดยน้ำมันภายในเซลล์อยู่ในกลุ่มไตรกลีเซอไรด์ประกอบด้วย long-chain fatty acids ที่มีจำนวนคาร์บอนอยู่ระหว่าง 16 ถึง 18 อะตอม (Beopoulos et al., 2009) อย่างไรก็ตาม เชื้อ *Y. lipolytica* สายพันธุ์ *YLNatXynA* มีการสะสมน้ำมันภายในเซลล์ในปริมาณที่น้อยเมื่อเทียบกับปริมาณการสะสมน้ำมันในยีสต์สะสมน้ำมันชนิดอื่น ๆ (Lamers et al., 2016) แต่ในขณะเดียวกัน เชื้อ *Y. lipolytica* สายพันธุ์ *YLNatXynA* ก็มีความสามารถในการผลิตสารชีวภาพที่หลากหลาย นอกเหนือจากการสะสมไขมันภายในเซลล์ เช่น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ สารที่ให้กลิ่นหอม กรดซิตริก เอนไซม์ไลเพส และเอนไซม์ไซลาเนส อีกทั้งเป็นเชื้อที่จัดอยู่ในกลุ่มที่ไม่ก่อให้เกิดโรค สามารถพบได้ทั่วไป และคัดแยกได้ง่ายจากสิ่งแวดล้อม ทำให้เชื้อ *Y. lipolytica* เป็นที่นิยมในอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ (Gonçalves et al., 2014) ดังนั้นจึงควรหาวิธีในการปรับปรุงให้เชื้อ*Y. lipolytica* สายพันธุ์ *YLNatXynA* มีการผลิตไขมันมากขึ้น

เทคนิคการทำให้เกิดการกลายอย่างสุ่ม (Random Mutagenesis) เป็นกระบวนการที่อาจกระตุ้นให้มีการเปลี่ยนแปลงไปของลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ทำให้มีการสร้างโปรตีนที่มีลักษณะต่างไป

จากเดิมและส่งผลให้โปรตีนมีประสิทธิภาพในการทำงานที่เปลี่ยนไป โดยบริเวณที่เกิดการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์นั้นเกิดขึ้นอย่างสุ่ม เช่น การใช้รังสีอัลตราไวโอเลต ที่เหนี่ยวนำให้เกิดไพริมิดีนไดเมอร์ เกิดการกลายจากการแทนที่เบส (Base Substitution) ที่มีผลให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ดีและไม่ก่อให้เกิดการตายที่สูงจนเกินไป (Tipia et al., 2012)

ยีน acetyl-CoA carboxylase1 (*ACC1*) เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน มีหน้าที่ในการสร้างเอนไซม์ acetyl-CoA carboxylase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่ในการเปลี่ยน acetyl-CoA เป็น malonyl-CoA โดย malonyl-CoA นั้น จัดเป็นเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิตกรดไขมัน (Wang et al., 2016)

Cerulenin เป็นสารประกอบที่สกัดได้จาก *Cephalosporium caerulens* จัดเป็นยาปฏิชีวนะต้านเชื้อรา มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์กรดไขมันที่จำเป็นต่อการมีชีวิตของเซลล์ ดั้งนั้นเซลล์ที่สามารถมีชีวิตบนอาหารที่มีส่วนผสมของ cerulenin จึงมีแนวโน้มที่จะเป็นสายพันธุ์กลาย (Heath, White and Rock, 2001) ทำให้ cerulenin ถูกนำมาใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายในยีสต์ *Rhodotorula glutinis* (Satoshi, 1976) อีกทั้ง เคยมีการศึกษาพบว่า celulenin เป็นสารที่ถูกนำมาใช้เพื่อเพิ่มการสร้างกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (Polyunsaturated Fatty Acids) (Morita et al., 2005)

เพื่อคัดเลือกยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตไขมันได้มากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์ดั้งเดิม งานวิจัยนี้จึงต้องการคัดเลือกยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์ *YLNatXynA* ที่เกิดการกลายภายหลังจากการฉายด้วยรังสีรังสีอัลตราไวโอเลต โดยใช้วิธี cerulenin screening (Tipia et al., 2012)

วัตถุประสงค์

เพื่อเหนี่ยวนำให้ *Y. lipolytica* เกิดสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตไขมันได้มากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม ด้วยวิธีฉายรังสีอัลตราไวโอเลต

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำเชื้อ *Y. lipolytica* สายพันธุ์กลายไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิตไขมัน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไขมันในอุตสาหกรรม

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อจุลินทรีย์สะสมไขมัน (Oleaginous Microorganisms)

เชื้อจุลินทรีย์สะสมไขมัน คือจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตและสะสมไขมันไว้ภายในเซลล์ ซึ่งจะสะสมไขมันอย่างน้อย 20 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ขึ้นอยู่กับเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด (Thevenieau and Nicaud, 2013) ในปัจจุบันมีการนำเชื้อจุลินทรีย์มาใช้เป็นทางเลือกในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ เนื่องจากมีการพัฒนาหาแนวทางในการลดต้นทุนการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้อย่างต่อเนื่อง (Ratledge, 2004)

2.2 ประเภทของเชื้อจุลินทรีย์สะสมไขมัน

เชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตและสะสมไขมันมีหลายชนิด ดังตารางที่ 2.1 ซึ่งประกอบด้วย

2.2.1 แบคทีเรีย (Bacteria) เป็นเชื้อจุลินทรีย์สะสมไขมันที่สามารถเจริญเติบโตได้เร็ว และใช้ต้นทุนในการเลี้ยงเชื้อต่ำ แต่ไขมันที่แบคทีเรียสร้างจะถูกส่งออกมาภายนอกเซลล์ร่วมกับสารชนิดอื่น ทำให้ไขมันที่ได้ไม่มีความบริสุทธิ์ จึงจัดว่าแบคทีเรียเป็นพวก lipoid โดยไขมันจะไม่เหมือนกับที่พบในพืช (Alvarez and Steinbuchel, 2002) อีกทั้งในแบคทีเรียแกรมลบ มักจะพบไขมันในกลุ่ม lipopolysaccharides (LPS) ซึ่งจัดเป็นสารที่มีพิษต่อสัตว์ จึงทำให้ไขมันจากแบคทีเรียไม่เป็นที่นิยมในระดับอุตสาหกรรม

2.2.2 สาหร่ายขนาดเล็ก (Microalgae) เป็นจุลินทรีย์สะสมไขมันที่มีความสามารถในการผลิตและสะสมไขมันมากถึง 70 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่การเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กชนิดนี้จำเป็นต้องใช้เวลามากในการเจริญ อีกทั้งต้องใช้พื้นที่มาก เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสให้สาหร่ายได้รับแสง รวมทั้งแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อใช้ในการสร้างอาหารภายในเซลล์ (Anderson, 1992)

2.2.3 ยีสต์ (Yeast) เป็นเชื้อจุลินทรีย์สะสมไขมันที่นิยมนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรม แม้ว่าจะมีปริมาณการสร้างและสะสมไขมันที่น้อยกว่าสาหร่ายขนาดเล็ก แต่สามารถชดเชยได้ด้วยเหตุที่ยีสต์ไม่ใช้พื้นที่มากในการเลี้ยง ใช้ทรัพยากรในการเลี้ยงต่ำกว่าสาหร่ายขนาดเล็ก อีกทั้งไขมันที่ยีสต์สร้างจะถูกสะสมอยู่ภายในเซลล์ ทำให้ง่ายต่อการสกัดไขมันเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ และมีการปนเปื้อนต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับไขมันที่ได้จากแบคทีเรีย (Ratledge, 1982)

ตารางที่ 2.1 ปริมาณการสะสมไขมันของเชื้อจุลินทรีย์สะสมไขมันแต่ละชนิด เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (Subramaniam et al., 2010)

Microorganisms	Oil content (% dry weight)
Microalgae	
Botryococcus braunii	25–75
Cylindrotheca sp.	16–37
Chlorella sp.	28–32
Crypthecodinium cohnii	20
Dunaliella primolecta	23
Isochrysis sp.	25–33
Monallanthus salina	>20
Nannochloris sp.	20–35
Nannochloropsis sp.	31–68
Neochloris oleoabundans	35–54
Nitzschia sp.	45–47
Phaeodactylum tricornutum	20–30
Schizochytrium sp.	50–77
Tetraselmis sueica	15–23
Bacteria	
Arthrobacter sp.	>40
Acinetobacter calcoaceticus	27–38
Rhodococcus opacus	24–25
Bacillus alcalophilus	18–24
Yeast	
Candida curvata	58
Cryptococcus albidus	65

2.3 ยีสต์สะสมน้ำมัน (Oleaginous Yeast)

ยีสต์สะสมไขมัน คือ ยีสต์ที่มีความสามารถในการสร้างและเก็บสะสมไขมันได้ 20 ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งไขมันที่ยีสต์สะสมส่วนใหญ่ 80 ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ จะอยู่ในรูปของไตรเอซิลกลีเซอรอล (TAGs) โดยไตรเอซิลกลีเซอรอลที่ยีสต์ผลิตมีสมบัติคล้ายกับน้ำมันพืชที่ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล อย่างไรก็ตามคุณสมบัติของไขมันนั้นมีความหลากหลายไปตามชนิดของยีสต์ ซึ่งยีสต์สะสมไขมันที่เป็นที่รู้จักคือยีสต์ในสกุล *Candida Cryptococcus Lipomyces Rhodosporidium Rhodotorula Trichosporon* และ *Yarrowia* ซึ่งการที่ยีสต์มีการเจริญเติบโตเร็ว ผลิตไขมันได้ปริมาณมาก และสามารถควบคุมปัจจัยการเจริญเติบโตได้ง่าย ทำให้ยีสต์เป็นทางเลือกที่ดีในการใช้ผลิตไบโอดีเซลในปัจจุบัน (Evans and Ratledge, 1984)

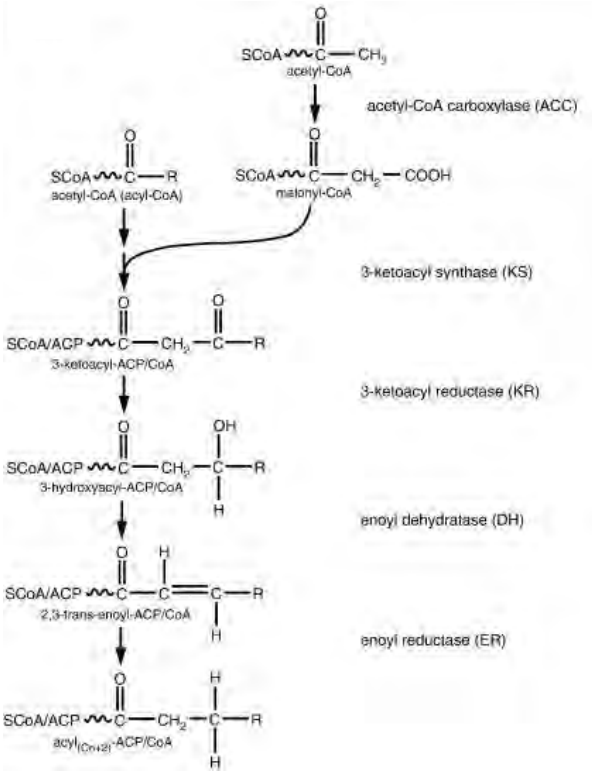
2.4 ยีสต์ *Yarrowia lipolytica*

Y. lipolytica เป็นยีสต์สะสมไขมันที่มีลักษณะเป็น dimorphic aerobic yeast คือยีสต์ที่สามารถเจริญเติบโตในรูปแบบที่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นเส้นใย ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน และยังถูกจัดเป็นเชื้อจุลินทรีย์ใน biosafety level 1 (BSL1) คือ เป็นเชื้อที่ไม่ก่อโรค อีกทั้งยีสต์ *Y. lipolytica* เป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตสารชีวภาพที่หลากหลาย เช่น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ สารที่ให้กลิ่นหอม (เช่น γ-decalactone) กรดซิตริก เอนไซม์ไลเพส และไขมัน (Intracellular Lipids) เป็นต้น ทำให้ยีสต์ *Y. lipolytica* ถูกนำมาใช้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพอย่างแพร่หลาย (Goncalves et al., 2014)

2.5 กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน (Fatty Acid Synthesis)

กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในไซโตซอล ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนหลักคือ ขั้นตอนแรกเปลี่ยน acetyl-CoA เป็น malonyl-CoA โดยใช้การทำงานของเอนไซม์ acetyl-CoA carboxylase (ACC) ขั้นตอนที่สองคือ การเปลี่ยน malonyl-CoA ให้ได้ ester-CoA ซึ่งหากเกิดปฏิกิริยาขั้นที่สองซ้ำไปเรื่อย ๆ จะได้ acyl chains อิ่มตัวที่มีคาร์บอน 16 อะตอม (palmitoyl-CoA) และ 18 อะตอม (stearoyl-CoA) หรืออาจจะมีพันธะคู่เพิ่มขึ้น คือ palmitoyl-CoA (C16:1) และ oleoyl-CoA (C18:1) ซึ่งการจะเปลี่ยนเป็นกรดไขมันชนิดใด ขึ้นอยู่กับเอนไซม์ที่มีในแต่ละสิ่งมีชีวิต ส่งผลให้สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีการสะสมกรดไขมันที่ต่างกันออกไป (Tehlivets, Scheuringer and Kohlwein, 2007)

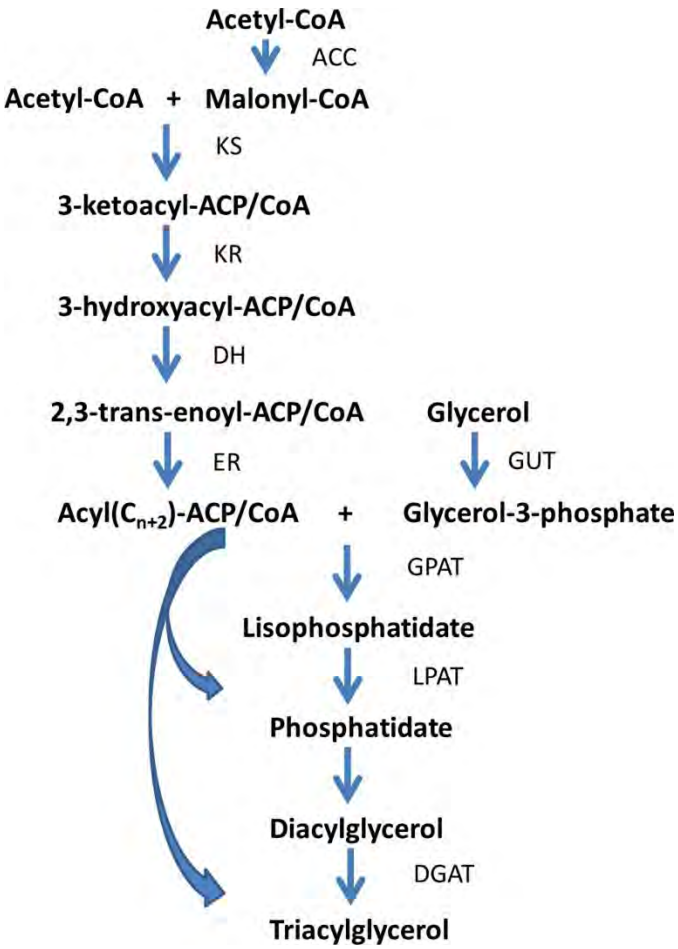
กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันมีสารตั้งต้นคือ acetyl-CoA แล้วเปลี่ยนเป็น malonyl-CoA ด้วยเอนไซม์ ACC จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาการควบแน่นของ malonyl-CoA และ acetyl-CoA ได้เป็น 3-keto-acyl-CoA จากนั้นถูกรีดิวซ์ได้ 3-hydroxyacyl-CoA แล้ว 3-hydroxyacyl-CoA จะเกิดปฏิกิริยาดีไฮเดรชันได้ 2,3-trans-enoyl-CoA แล้วจากนั้นเกิดปฏิกิริยารีดักชันได้เป็น acyl-CoA ซึ่งท้ายที่สุดแล้วจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของ triacylglycerol (Heath, White and Rock, 2001) ดังภาพที่ 2.1



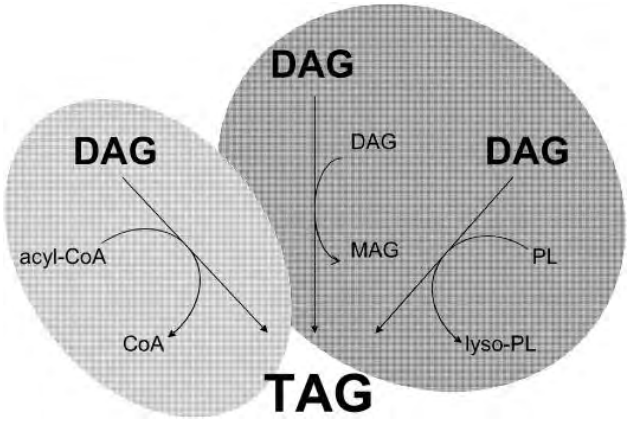
ภาพที่ 2.1 กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน (Fatty Acid Synthesis) (Tehlivets, Scheuringer and Kohlwein 2007)

2.6 กระบวนการสังเคราะห์ไตรเอซิลกลีเซอรอล (Triacylglycerol Synthesis)

กระบวนการสังเคราะห์ไตรเอซิลกลีเซอรอลเป็นกระบวนการในการเปลี่ยน diacylglycerol (DAG) เป็น triacylglycerol (TAG) ซึ่งเป็นรูปแบบของไขมันที่ยีสต์เก็บสะสม กระบวนการนี้เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ acyl-CoA diacylglycerol O-acyltransferase (DGAT) (Tang, Lee and Chen, 2015) ดังภาพที่ 2.2 ซึ่งในยีสต์แต่ละชนิดจะมีเอนไซม์ DGAT แตกต่างกันออกไป เช่น ใน *Y. lipolytica* มียีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ DGAT 2 ยีน ได้แก่ *DGA1* และ *DGA2* เป็นต้น (Athenstaedt, 2011) ดังภาพที่ 2.3



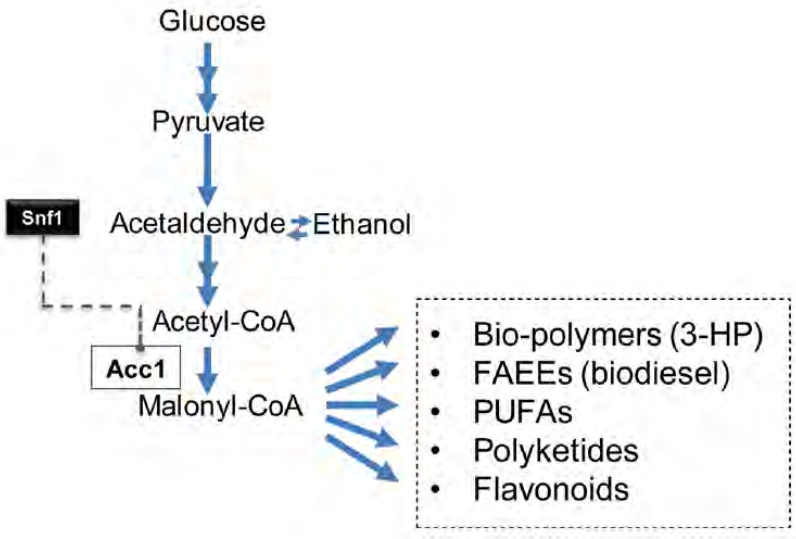
ภาพที่ 2.2 กระบวนการสังเคราะห์ไตรเอซิลกลีเซอรอล (Triacylglycerol Synthesis) (Tang, Lee and Chen, 2015)



ภาพที่ 2.3 กระบวนการสังเคราะห์ไตรเอซิลกลีเซอรอลใน *Y. lipolytica* ซึ่งเกิดได้ 2 แบบคือ acyl-CoA dependent จาก *DGA1* (สีอ่อน) และ acyl-CoA independent จาก *DGA2* (สีเข้ม) โดย MAG คือ monoacylglycerol และ PL คือ phospholipid (Athenstaedt, 2011)

2.7 ยีน *ACC1*

ยีน *ACC1* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ acetyl-CoA carboxylase (E.C. 6.4.1.2) มีหน้าที่เร่งกระบวนการเปลี่ยน acetyl-CoA เป็น malonyl-CoA โดยกระบวนการนี้เป็นขั้นกำหนดปฏิกิริยาของการสังเคราะห์กรดไขมันในยีสต์ อีกทั้ง malonyl-CoA ยังเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในกระบวนการผลิตอนุพันธ์ของกรดไขมันชนิดต่าง ๆ ดังภาพที่ 2.4 จึงมีการนำยีน *ACC1* มาใช้ในกระบวนการพันธุวิศวกรรมเพื่อเพิ่มปริมาณการสร้างและสะสมไขมันในยีสต์ชนิดต่าง ๆ (Hasslacher et al., 1993)



ภาพที่ 2.4 malonyl-CoA เป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในกระบวนการผลิตอนุพันธ์ของไขมันชนิดต่าง ๆ (Hasslacher et al., 1993)

2.8 การกลายพันธุ์ (Mutation)

การกลายพันธุ์ คือการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรม ส่งผลให้สารพันธุกรรมมีโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงไป และมีความสามารถในการถ่ายทอดสารพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปให้กับรุ่นต่อไป โดยการกลายพันธุ์สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท (วราภรณ์ มลิลาศ, 2549) ได้แก่

2.8.1 การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (Spontaneous Mutation) เป็นการกลายที่เกิดจากการจับคู่ผิดของเบสในสายดีเอ็นเอ ระหว่างที่เกิดกระบวนการจำลองสายดีเอ็นเอ (DNA Replication) ภายในเซลล์ แล้วไม่มีกระบวนการซ่อมแซมสายดีเอ็นเอ ซึ่งสายดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิด จะทำหน้าที่เป็นสายต้นแบบในการจำลองสายดีเอ็นเอของรุ่นถัดไป ส่งผลทำให้เซลล์รุ่นถัดไปมีสารพันธุกรรมแตกต่างไปจากรุ่นเดิม โดยการกลายที่เกิดขึ้นอาจเป็นผลมาจากรังสี หรือสารเคมี ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ ซึ่งการกลายพันธุ์ชนิดนี้ มีอัตราการเกิดที่ต่ำมาก

2.8.2 การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (Induced Mutation) เป็นการกลายพันธุ์ที่มนุษย์

มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายด้วยปัจจัยภายนอกอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ความผิดพลาดจากการจำลองสายดีเอ็นเอของเซลล์เอง เพื่อเพิ่มอัตราการกลายพันธุ์ให้มากกว่าที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ โดยใช้สารก่อการกลาย (Mutagen) เช่น การใช้สารเคมีที่มีโครงสร้างคล้ายกับเบสแต่ละชนิดในสายดีเอ็นเอ การใช้สารเคมีที่มีการเติมหมู่อัลคิลให้กับเบสในสายดีเอ็นเอ และการใช้รังสีเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสายดีเอ็นเอ เป็นต้น

2.9 การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสี

การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีเป็นตัวก่อการกลาย สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทตามความรุนแรงของรังสีที่ใช้ ได้แก่

2.9.1 รังสีที่ไม่ก่อให้เกิดไอออน (Non-ionizing Radiation) ได้แก่ รังสีอัลตราไวโอเลต เป็นรังสีที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายที่มีประสิทธิภาพ โดยที่ความยาวคลื่นประมาณ 260 นาโนเมตร เบสในสายดีเอ็นเอจะมีความสามารถในการดูดกลืนรังสีได้ดี ส่งผลให้เกิดเป็นไพริมีดีนไดเมอร์ ซึ่งพบมากในรูปไทมีนไดเมอร์ และเมื่อเกิดกระบวนการจำลองดีเอ็นเอ จะมีการนำเบสเข้าไปจับแบบสุ่มบริเวณที่เป็นไทมีนไดเมอร์ ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรมในรุ่นถัดไป จึงนิยมใช้เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเชื้อจุลินทรีย์ (Fantini, 1975) เช่น ใน *Bacillus subtilis* สามารถสร้างสายพันธุ์กลายด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ protease ทำให้เป็นที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเอนไซม์ protease ในปัจจุบัน (Demirkan et al., 2018)

2.9.2 รังสีที่ก่อให้เกิดไอออน (Ionizing radiation) เช่น รังสีเอ็กซ์ รังสีแกมมา ซึ่งเป็นรังสีที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายที่รุนแรงกว่ารังสีชนิดแรก โดยอาจมีผลทำให้โครงสร้างทางเคมีของเบสในสายดีเอ็นเอเปลี่ยนไป ไปจนถึงทำให้สายดีเอ็นเอแตกหักอย่างรุนแรง (Brock, 1974) เช่น ใน *Serratia marcescens* สามารถสร้างสายพันธุ์กลายด้วยรังสีแกมมา เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างรงควัตถุสีแดง (Prodigiosin) ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านมะเร็ง สารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านจุลชีพ และเป็นรงควัตถุที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอด้วย (Elkenawy et al., 2017)

2.10 กระบวนการซ่อมแซมสายดีเอ็นเอ (DNA Repair)

การซ่อมแซมสายดีเอ็นเอภายหลังจากโดนรังสีอัลตราไวโอเลต ส่งผลให้เกิดเป็นไทมีนไดเมอร์ เซลล์โดยทั่วไปจะมีกระบวนการซ่อมแซมสายดีเอ็นเอ โดยมีกลไกที่เกี่ยวข้อง ได้แก่

2.10.1 กระบวนการโฟโตรีแอคทิเวชัน (Photoreactivation) เป็นกระบวนการซ่อมแซมสายดีเอ็นเอแบบใช้แสงในช่วง visible light เป็นตัวกระตุ้น โดยมีการทำงานของแสงในช่วงความยาวคลื่นแสงสีน้ำเงินจะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ photolyase ให้เข้าไปทำลายพันธะโควาเลต์ของไทมีนไดเมอร์ ทำให้เบสไทมีนสามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับเบสอะดีนีนในสายตรงข้ามได้ตามปกติ (Zhao and Mu, 1998) ดังนั้น หลังจากเหนี่ยวนำให้เชื้อจุลินทรีย์เกิดการกลายแล้ว จำเป็นต้องบ่มเชื้อในที่มืด เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อจุลินทรีย์เกิดกระบวนการไฟโตรีแอคทิเวชัน (Resnick and Setlow,

1972)

2.10.2 กระบวนการเอ็กซ์ซิชันรีแพร์ (Excision Repair) เป็นกระบวนการซ่อมแซมสายดีเอ็นเอแบบไม่ต้องมีแสงเป็นตัวกระตุ้น พบในเซลล์ชนิดยูคาริโอต โดยมีเอนไซม์ endonuclease มาจับที่ตำแหน่งที่เป็นไทมีนไดเมอร์แล้วตัดพันธะระหว่างน้ำตาลและหมู่ฟอสเฟต (Phosphodiester Bond) ในสายดีเอ็นเอบริเวณก่อนหน้าที่จะถึงไทมีนไดเมอร์ จากนั้นเอนไซม์ helicase จะเข้ามาแยกสายดีเอ็นเอทั้งสองสาย แล้วเอนไซม์ DNA polymerase จะเข้ามาสังเคราะห์สายดีเอ็นเอจากปลาย 3'-OH โดยมีดีเอ็นเอสายตรงข้ามเป็นสายต้นแบบ ต่อไปเอนไซม์ ligase จะเข้ามาเชื่อมพันธะระหว่างน้ำตาลและหมู่ฟอสเฟตของปลาย 3'-OH และ 5'-PO^{-4} ซึ่งถ้ากระบวนการนี้มีการผิดพลาด คือมีการจับคู่เบสผิด สามารถส่งผลทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้เช่นกัน (Friedberg and Wood, 1996)

2.11 การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายเพื่อการปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์

การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายเพื่อปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ มีวิธีการปรับปรุงสายพันธุ์โดยอาศัยความรู้ทางพันธุศาสตร์ 2 วิธี (Baltz, 1986) ได้แก่

2.11.1 การใช้ความรู้ทางด้านพันธุวิศวกรรม (Genetic Engineering) เป็นวิธีการที่มีการตัดต่อยีนที่มีความจำเพาะ เพื่อควบคุมกระบวนการสร้างเอนไซม์ ซึ่งวิธีการนี้จำเป็นต้องอาศัยความชำนาญทางด้านเทคนิคเป็นอย่างมาก

2.11.2 การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายแบบสุ่ม (Random Mutagenesis) เป็นวิธีการที่เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายที่ไม่จำเพาะ แล้วมีการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีลักษณะเฉพาะที่ต้องการ ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย ไม่ต้องมีอาศัยความชำนาญทางด้านเทคนิค เช่น ในยีสต์ *Lipomyces starkeyi* ที่เกิดการกลายแบบสุ่มโดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต มีความสามารถในการสะสมไขมันเพิ่มขึ้น 30.7 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (Tipia et al., 2012)

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และวิธีดำเนินการศึกษา

วัสดุอุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์แบบสองตา (Olympus, Japan)
- เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (Barnstead, USA)
- เครื่องกำเนิดรังสีอัลตราไวโอเลต (Vilber lourmat, Germany)
- เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Vision Scientific Co.,Ltd)
- เครื่องเขย่าผสมสาร (Vision Sciencetific, Korea)
- เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่ง GM-1100 (Universal weight enterprice, Taiwan)
- เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง PA214 (Ohaus, USA)
- เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อความดันสูง (Tomy, Indonesia)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (AnthosZenyth 200, USA)
- เครื่อง PCR TC9610-AXY-230 (Axygen, USA)
- ตู้บ่มเชื้อ (Memmert, Germany)
- ตู้ปลอดเชื้อ (Clean model, Lab service Ltd)
- ตู้อบฆ่าเชื้อ (Memmert, Germany)
- หลอดรังสีอัลตราไวโอเลต (Sylvania, Japan)

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ
   - เพปโทน (Scherlau, Spain)
   - น้ำตาลกลูโคส (Fluka, Switzerland)
   - สารสกัดจากยีสต์ (Hi media, India)

2. สารเคมีที่ใช้ในการย้อมสีเพื่อดูลักษณะสัณฐานวิทยา
   - สีย้อมแลคโตฟีนอลคอตตอนบลู (Sigma, USA)

3. สารเคมีที่ใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย
   - เพปโทน (Scherlau, Spain)
   - น้ำตาลกลูโคส (Fluka, Switzerland)
   - สารสกัดจากยีสต์ (Hi media, India)
   - cerulenin (Sigma, USA)

4. สารเคมีที่ใช้ในการย้อมสีดู oil droplet

- สีย้อมซาฟรานินโอ (Sigma, USA)
- สีย้อมซูดาน แบลคบี (Sigma, USA)
- เอทานอล 70%

5. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

- น้ำกลั่นที่ผ่านกระบวนการ autoclave
- เม็ดกันเดือด (Invitrogen, USA)
- สารละลายบัฟเฟอร์ล้างดีเอ็นเอ (Invitrogen, USA)
- สารละลายบัฟเฟอร์ BL (Invitrogen, USA)
- สารละลายบัฟเฟอร์ HB (Invitrogen, USA)
- สารละลายบัฟเฟอร์ SE (Invitrogen, USA)
- สารละลายบัฟเฟอร์ TL (Invitrogen, USA)
- สารละลายโปรติเนสเค (Invitrogen, USA)
- สารละลายไลติเคส (Invitrogen, USA)
- เอนไซม์อาร์เอ็นเอส (Invitrogen, USA)

6. สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR

- ชุด dNTPs (Omega, USA)
- น้ำกลั่นที่ผ่านกระบวนการ autoclave
- สารละลายบัฟเฟอร์ HF (Omega, USA)
- เอนไซม์ฟิวชั่นดีเอ็นเอพอลิเมอเลส (Omega, USA)
- ไพรเมอร์ (Pacific Science, Thailand)

7. สารเคมีที่ใช้สำหรับการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

- ดีเอ็นเอมาตรฐาน ขนาด 1 kb (Omega, USA)
- วุ้นผงอะกาโรส (Sigma, USA)
- สารละลายบัฟเฟอร์ TBE 1X
- สีย้อมดีเอ็นเอ (Omega, USA)

8. สารเคมีที่ใช้สำหรับการสกัดน้ำมันด้วยวิธี Bligh and Dyer

- กรดไฮโดรคลอริก 4 M
- คลอโรฟอร์ม
- เมทานอล

9. สารเคมีที่ใช้สำหรับการทำ gas chromatography

- 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)
  - กรดไขมันเบฮินิก (C22:0)
  - กรดไขมันลิกโนซีริก (C24:0)
- สารละลายเมทานอลผสมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.01 M
- เฮกเซน

วิธีดำเนินการศึกษา

3.1 ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของ *Y. lipolytica* สายพันธุ์ *YLNatXynA*

เลี้ยงยีสต์ที่ได้จากนางสาวชนิกา เอื้อพาณิชย์ (Ouephanit et al., 2019) ในอาหารเหลว YPD ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน ทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา โดยย้อมเซลล์ด้วยสีย้อมแลคโตฟีนอลคอตตอนบลู จากนั้นนำเซลล์ไปส่องดูลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ด้วยกำลังขยายเลนส์ใกล้วัตถุ 100 เท่า

3.2 ศึกษากราฟการเติบโต (Growth curve) ของยีสต์

เลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลว YPD ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ทุก 2 ชั่วโมง โดยกำหนดให้หัวเชื้อมีค่า OD_{600} เริ่มต้น เท่ากับ 2.0 ทำการเก็บข้อมูลเป็นเวลา 52 ชั่วโมง หรือจนกว่ากราฟจะเข้าสู่ระยะ death phase เพื่อหาจำนวนชั่วโมงที่ทำให้เชื้อมี cell density อยู่กึ่งกลางระยะ exponential (Mid-exponential Phase)

3.3 เหนี่ยวนำให้ยีสต์เกิดการกลายด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต

เลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน

เตรียมหัวเชื้อยีสต์ในอาหารเหลว YPD นำสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์มาวัด OD_{600} โดยกำหนดให้หัวเชื้อมีค่า OD_{600} เริ่มต้น เท่ากับ 2.0 จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หรือช่วงเวลาที่เชื้อมีการเติบโตอยู่กึ่งกลางระยะ exponential จากนั้นนำหัวเชื้อยีสต์มาวัดค่า OD_{600} เริ่มต้นก่อนฉายรังสี นำหัวเชื้อยีสต์ลงในจานเพาะเชื้อพลาสติกเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จากนั้นนำสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์ไปฉายรังสีในตู้ฉายรังสี ที่มีหลอด UV-C ความเข้มแสง 10 วัตต์ จำนวน 5 หลอด เป็นเวลา 0 30 60 90 120 150 และ 180 นาที (ภัณฑิรา เครือใหญ่, 2555) โดยมีระยะห่างระหว่างจานเพาะเชื้อถึงหลอดฉายรังสี 22 เซนติเมตร และระหว่างการฉายรังสี ต้องกวนด้วยแท่งแม่เหล็กที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วตลอดการฉายรังสี เพื่อให้เซลล์ได้รับรังสีอย่างทั่วถึง

นำสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์ที่ได้รับการฉายรังสีทุกระยะเวลา ทำการลดระดับการเจือจางโดยวิธี 10-fold serial dilution เพื่อคัดแยกโคโลนีเดี่ยวจากนั้นเกลี่ยเชื้อลงบนอาหารแข็ง YPD บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่ได้รับการฉายรังสีที่เวลาต่าง ๆ เทียบกับที่เวลา 0 นาที นำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดและระยะเวลาที่ใช้ในการฉายรังสี เพื่อคัดเลือกเชื้อที่มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดอยู่ในช่วง 5-10 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหารแข็ง YPD เพื่อนำไปทดลองในขั้นต่อไป

3.4 คัดเลือกโดยใช้ cerulenin screening และ oil droplet screening จากนั้นเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตไขมันในยีสต์ที่ได้รับการฉายรังสีที่ระยะเวลาต่าง ๆ

นำเชื้อที่มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดในช่วง 5-10 เปอร์เซ็นต์ มาคัดเลือกสายพันธุ์กลายด้วยวิธี cerulenin screening โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง YPD ที่มีส่วนผสมของ cerulenin ความเข้มข้น 2 µg/ml ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน เพื่อหาเชื้อสายพันธุ์กลายที่สามารถเจริญได้บนอาหารที่มี cerulenin ผสมอยู่

คัดเลือกสายพันธุ์กลายด้วยวิธี oil droplet screening โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร Lipid production medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์ย้อมด้วยสีย้อม Sudan black B แล้วนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ด้วยกำลังขยายเลนส์ใกล้วัตถุ 100 เท่า เพื่อเปรียบเทียบดูสัดส่วนของ oil droplet ภายในเซลล์ของเชื้อแต่ละไอโซเลท แล้วคัดเลือก 5 ไอโซเลทที่มีการสะสม oil droplet มากที่สุด

นำยีสต์สายพันธุ์กลายทั้ง 5 ไอโซเลท วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) เตรียมหัวเชื้อโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว YPD ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นคำนวณให้หัวเชื้อมีความเข้มข้นเริ่มต้นที่ ค่า OD_{600} เท่ากับ 4.0 ในอาหารเหลว Lipid Production Medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแต่ละไอโซเลทจะมีชุดการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Lipid Production Medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์ไปทำการทดลองในขั้นต่อไป ดังนี้

3.4.1 วัดการเจริญเติบโต

นำสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์ เจือจางความเข้มข้นในสัดส่วนของสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์ต่ออาหารเหลว Lipid production Medium ในสัดส่วนเท่ากับ 1:9 จากนั้น นำไปวัดค่า OD_{600} โดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นคำนวณค่า OD_{600} ที่ได้ในความเข้มข้นเริ่มต้นก่อนเจือจาง

3.4.2 วัดชีวมวล

นำสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ (อบและชั่งน้ำหนักหลอดเปล่าแล้ว) ขนาด 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,300 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง เทน้ำกลั่นออก นำหลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 2 วันหรือจนกว่าน้ำหนักหลอดจะคงที่ นำหลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์มาพักในตู้ดูดความชื้นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์มาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง จากนั้นนำมาคำนวณค่าผลผลิตชีวมวล (Biomass Production) ดังสมการที่ 1 ดังนี้

$$\text{Biomass Production} = \frac{\text{น้ำหนักหลอดที่มีเซลล์ยีสต์} - \text{น้ำหนักหลอดเปล่า (กรัม)}}{\text{ปริมาตรของสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์ที่ใช้ (ลิตร)}} \quad (1)$$

3.4.3 สกัดและวัดปริมาณไขมัน

นำสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตรใส่ในหลอดเซ็นตริฟิวก์ (ที่ไม่ได้อบ) ขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,300 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง เทน้ำกลั่นออก จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 4M ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติม chloroform : methanol ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดชั้น organic phase (ชั้นล่าง) ออกมาใส่หลอด Eppendorf ก้นตัด ขนาด 5 มิลลิลิตร (อบและชั่งน้ำหนักหลอดเปล่าแล้ว) โดยเปิดฝาหลอดปล่อยให้ตัวทำละลายระเหยภายในตู้ปลอดเชื้อเป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน แล้วนำไปพักในตู้ดูดความชื้นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอด Eppendorf ก้นตัดไปชั่งน้ำหนักไขมันแห้งด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Bligh and Dyer, 1959) เพื่อคำนวณค่าผลผลิตไขมัน (Lipid Yield) ดังสมการที่ 2 และคำนวณค่าปริมาณไขมันที่สะสมภายในเซลล์ (Lipid Content) ดังสมการที่ 3

$$\text{Lipid Yield} = \frac{\text{น้ำหนักหลอดที่มีไขมันแห้ง} - \text{น้ำหนักหลอดเปล่า (กรัม)}}{\text{ปริมาตรของสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์ที่ใช้ (ลิตร)}} \quad (2)$$

$$\text{Lipid Content} = \frac{\text{ผลผลิตไขมัน } (\boldsymbol{Lipid\ Yield}) \text{ (กรัมต่อลิตร)}}{\text{ผลผลิตชีวมวล } (\boldsymbol{Biomass\ Production}) \text{ (กรัมต่อลิตร)}} \quad (3)$$

3.4.4 วัดสัดส่วนของกรดไขมัน

นำสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตรใส่ในหลอดเซ็นตริฟิวก์ (ที่ไม่ได้อบ) ขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,300 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง เทน้ำกลั่นออก จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 4M ปริมาตร 5 มิลลิตร แล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติม chloroform : methanol ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดชั้น organic phase (ชั้นล่าง) ออกมาใส่หลอด Eppendorf ก้นตัด ขนาด 5 มิลลิลิตร โดยเปิดฝาหลอดปล่อยให้ตัวทำละลายระเหยภายในตู้ปลอดเชื้อเป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำไขมันที่แห้งแล้วไปเปลี่ยนเป็น Fatty acid methyl ester (FAME) เพื่อวิเคราะห์ Fatty acid profile โดยนำไขมันแห้งมาเติม สารละลายเมทานอลผสมโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.01 M ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอด Eppendorf ก้นตัดมาวางพักบนน้ำแข็งเพื่อ cool down เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติมเฮกเซน ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าหลอด Eppendorf โดยใช้เครื่องเขย่าผสมสาร แล้วบ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ดูดชั้นบนซึ่งมี FAME อยู่ใส่ในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ใหม่ ขนาด 2 มิลลิลิตร เปิดฝาทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายระเหยภายในตู้ปลอดเชื้อ เป็นเวลา 1 คืน เมื่อแห้งจะได้ FAME จากนั้นนำ FAME ที่แห้งแล้วมาเติมเฮกเซน ปริมาตร 750 ไมโครลิตร เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่องเขย่าผสมสาร ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ในขวด vial พร้อมกับปิดฝาให้เรียบร้อย จากนั้นนำไปวิเคราะห์ fatty acid profile ด้วยเครื่อง Gas Chromatography

นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี one-way analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบชุดการทดลองที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม SPSS Statistics (IBM Corp., United States)

3.5 ทดสอบความเสถียรในการผลิตไขมันของไอโซเลทที่คัดเลือกเป็นเวลา 3 รุ่น และทดสอบลักษณะสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

3.5.1 ทดสอบความเสถียรในการผลิตไขมันของไอโซเลทที่คัดเลือกเป็นเวลา 3 รุ่น เปรียบเทียบระหว่างการผลิตไขมันของไอโซเลทที่คัดเลือกในรุ่นที่ 1 และไอโซเลทที่คัดเลือกในรุ่นที่ 3

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว YPD บ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อรุ่นที่ 1 ใส่ในอาหารเหลว YPD ชุดใหม่เลี้ยงเชื้อตามสภาวะที่ใช้ในรุ่นที่ 1 จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว YPD ชุดใหม่จนกระทั่งได้สารแวนลอยเซลล์ยีสต์รุ่นที่ 3 จากนั้นทำการทดลองเหมือนกับที่ทำในยีสต์รุ่นที่ 1 คือ วัดการเจริญเติบโต วัดชีวมวลสกัดและวัดปริมาณไขมัน รวมทั้งวัดสัดส่วนของกรดไขมัน แล้วเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างเชื้อรุ่นที่ 1 และรุ่นที่ 3 เพื่อทดสอบความสามารถในการส่งต่อทางพันธุกรรม จากนั้น คัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการส่งต่อความสามารถในการผลิตไขมันที่ดีขึ้นไปยังรุ่นต่อไปได้ ไปทดสอบลำดับเบส

ของยีน *ACC1* ต่อไป

3.5.2 ทดสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของไอโซเลตที่คัดเลือกเป็นเวลา 3 รุ่น เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว YPD บ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อรุ่นที่ 1 ใส่ในอาหารเหลว YPD ชุดใหม่เลี้ยงเชื้อตามสภาวะที่ใช้ในรุ่นที่ 1 จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว YPD ชุดใหม่จนกระทั่งได้สารแวนลอยเซลล์ยีสต์รุ่นที่ 3 จากนั้นนำสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์รุ่นที่ 3 มาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา โดยย้อมเซลล์ด้วยสีย้อมแลคโตฟีนอลคอตตอนบลู จากนั้นนำเซลล์ไปส่องดูลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ด้วยกำลังขยายเลนส์ใกล้วัตถุ 100X เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (WT)

3.6 เปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *ACC1* ระหว่าง *Y. lipolytica* สายพันธุ์ *YLNatXynA* สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ที่ได้รับการฉายรังสีแล้วถูกคัดเลือก

3.6.1 สกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ยีสต์ด้วย yeast DNA extraction kit (Invitrogen, USA) จากนั้นเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยออกแบบให้มีไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *ACC1* ด้วยโปรแกรม Primer3 (ver.0.4.0) โดยไพรเมอร์ที่ใช้มีทั้งหมด 2 คู่ ได้แก่

	F#1 (forward) 5’-TCAGGATCTTCAACGCCAGA-3’	20 bp
	R#1 (reverse) 5’-TGGTGGTAGTTGATGTCCAG-3’	20 bp
และ	F#2 (forward) 5’-TCTCAAGGAGGTTGTCGACT-3’	20 bp
	R#2 (reverse) 5’-AGAAAGAGAAGCGAGAGCCT-3’	20 bp

โดยมีส่วนประกอบของปฏิกิริยาทั้งหมดจำนวน 50 ไมโครลิตรดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบในปฏิกิริยา PCR

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	1 ปฏิกิริยา (WT)	1 ปฏิกิริยา (YLCe15_07)
น้ำกลั่น	32.5 µl	33 µl
HF buffer	10 µl	10 µl
10 µM forward primer	2.5 µl	2.5 µl
10 µM reverse primer	2.5 µl	2.5 µl
ดีเอ็นเอต้นแบบ	1 µl	0.5 µl
10 µM dNTPs	1 µl	1 µl
Phusion DNA polymerase	0.5 µl	0.5 µl
รวมทั้งหมด	50 µl	50 µl

จากนั้นเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Thermocycler (Axygen, USA) โดยกำหนดสภาวะ ดังต่อไปนี้

ไพรเมอร์คู่ที่ 1

Initial denaturation	98 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
Denaturation	98 องศาเซลเซียส	10 วินาที	30 รอบ
Annealing	52 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final extension	72 องศาเซลเซียส	10 นาที	
Hold	15 องศาเซลเซียส	15 นาที	

ไพรเมอร์คู่ที่ 2

Initial denaturation	98 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
Denaturation	98 องศาเซลเซียส	10 วินาที	30 รอบ
Annealing	53.5 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final extension	72 องศาเซลเซียส	10 นาที	
Hold	15 องศาเซลเซียส	15 นาที	

และตรวจสอบผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Gel electrophoresis โดยนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ มาตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอบนแผ่นวุ้นอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1X TBE โดยให้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 50 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาทีและใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder) 1 kb เป็นตัวเปรียบเทียบ ตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ภายใต้แสงจากหลอด LED โดยชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณยีน *ACC1* มีขนาด 6,801 bp ซึ่งชิ้นส่วนที่ได้จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์คู่แรกมีขนาดเท่ากับ 3,356 bp และชิ้นส่วนที่ได้จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์คู่ที่สองมีขนาดเท่ากับ 3,514 bp จากนั้นส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบส (Pacific Science, Thailand)

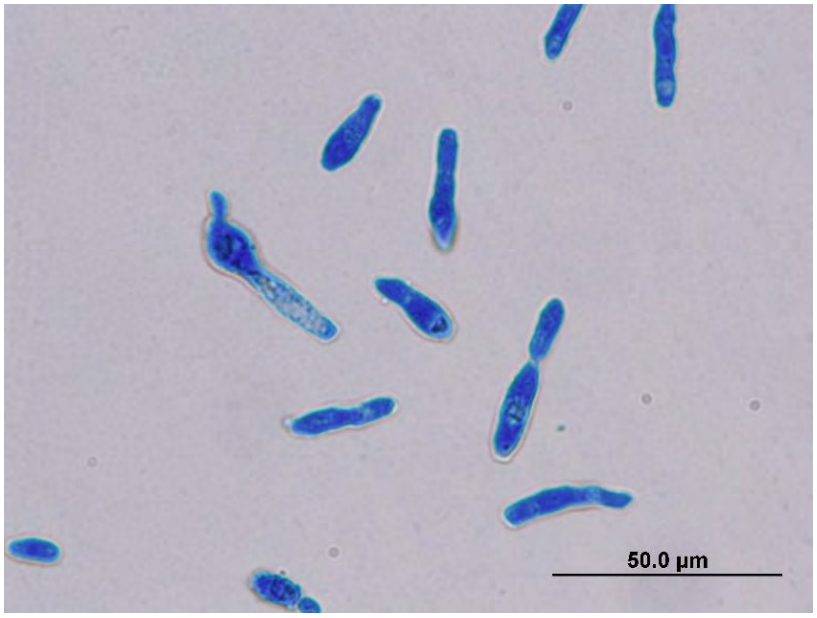
3.6.2 เปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *ACC1* สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายที่ได้รับจากการฉายรังสีแล้วถูกคัดเลือกด้วยการทำ sequence alignment โดยใช้ ClustalW algorithm

บทที่ 4
ผลการศึกษา

จากการศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายแบบสุ่มของยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์ *YLNatXynA* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไขมันโดยรังสีอัลตราไวโอเลต ได้ผลการทดลองดังนี้

4.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของ *Y. lipolytica* สายพันธุ์ *YLNatXynA*

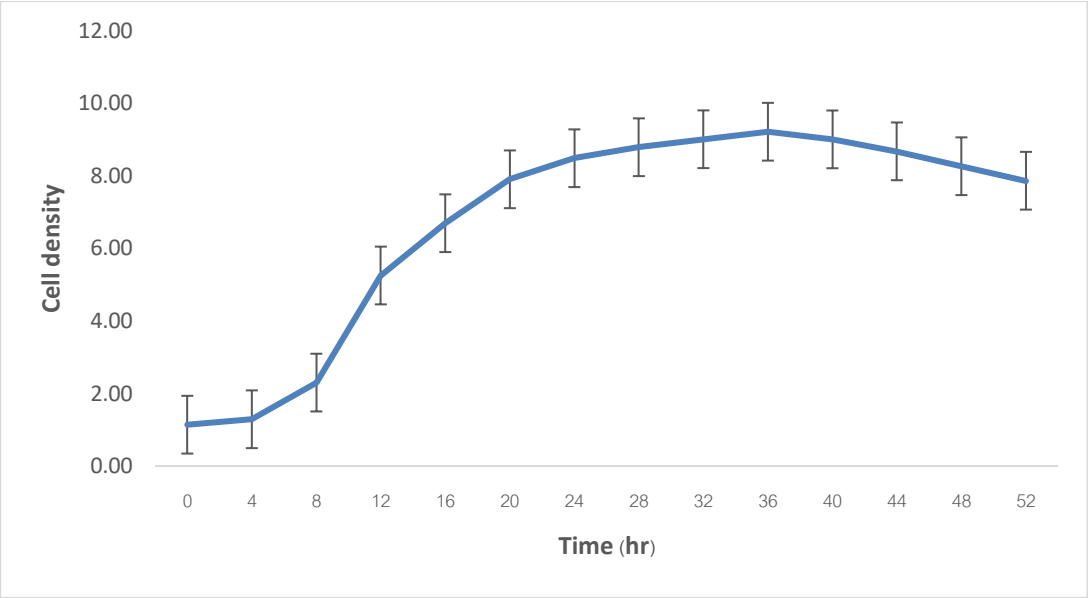
การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว YPD บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน แล้วย้อมเซลล์ด้วยสีย้อมแลคโตฟีนอลคอตตอนบลู จากนั้นนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายเลนส์ใกล้วัตถุ 100 เท่า พบว่า ยีสต์มีลักษณะเซลล์เดี่ยว (Single Cell) มีรูปร่างเซลล์ลักษณะเซลล์รูปร่างรี ปลายด้านหนึ่งมนและอีกด้านจะเรียวแหลมกว่าเล็กน้อย ดังภาพ 4.1



ภาพที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์ *YLNatXynA* ที่เจริญบนอาหารเหลว YPD

4.2 การศึกษากราฟการเติบโต (Growth Curve) ของยีสต์ *Y. lipolytica*

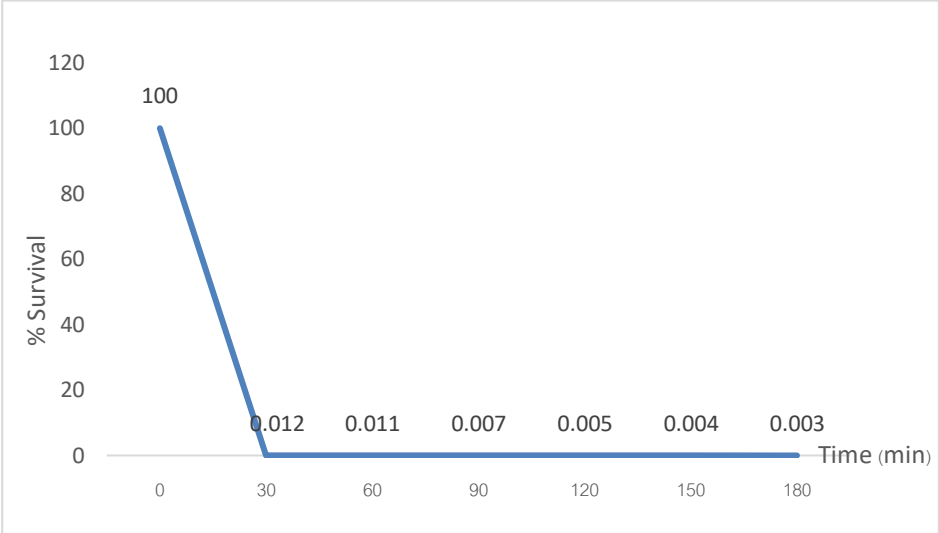
จากการศึกษากราฟการเติบโตของยีสต์ *Y. lipolytica* โดยเลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลว YPD เป็นเวลา 52 ชั่วโมง และวัดค่า OD_{600} ทุก 2 ชั่วโมง โดยกำหนดให้หัวเชื้อมีค่า OD_{600} เริ่มต้น เท่ากับ 0.2 พบว่า ระหว่างช่วงชั่วโมงที่ 8 ถึง 20 เชื้อมีการเติบโตอย่างรวดเร็ว เซลล์ยีสต์มีการเพิ่มจำนวนแบบ exponential ดังภาพที่ 4.2 และพบว่า mid exponential phase อยู่ในช่วงชั่วโมงที่ 16 ดังภาพที่ 4.2



ภาพที่ 4.2 กราฟการเติบโต (Growth Curve) ของยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์ *YLNatXynA*

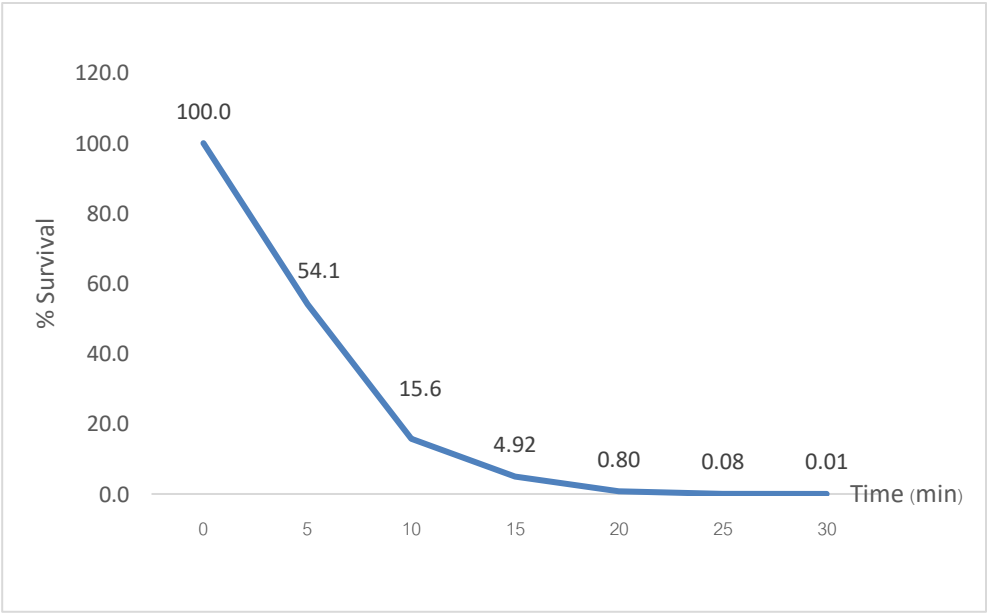
4.3 การเหนี่ยวนำให้ยีสต์เกิดการกลายด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต

นำสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์ไปฉายรังสีในตู้ฉายรังสี ที่มีหลอด UV-C ความเข้มแสง 10 วัตต์ จำนวน 5 หลอด เป็นเวลา 0 30 60 90 120 150 และ 180 นาที โดยมีระยะห่างระหว่างจานเพาะเชื้อถึงหลอดฉายรังสี 22 เซนติเมตร ได้อัตราการอยู่รอดของเชื้อที่ได้รับการฉายรังสีอัตราไวโอเลต คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด ได้แก่ 100 0.012 0.011 0.007 0.005 0.004 และ 0.003 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่า การฉายรังสีเป็นเวลาแตกต่างกัน 0 30 60 90 120 150 และ 180 นาที ทำให้เชื้อมีอัตราการอยู่รอดต่ำกว่า 5 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ จึงต้องมีการปรับเปลี่ยนช่วงเวลาที่ใช้ในการฉายรังสี ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นว่า การฉายรังสีนาน 30 นาที เชื้อมีอัตราการอยู่รอด เท่ากับ 0.012 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น อัตราการอยู่รอดช่วง 5 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ จึงอยู่ในช่วง 0 ถึง 30 นาที ดังภาพที่ 4.3



ภาพที่ 4.3 กราฟอัตราการอยู่รอดของยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์ *YLNatXynA* หลังได้รับการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตที่ระยะเวลา 0 30 60 90 120 150 และ 180 นาที

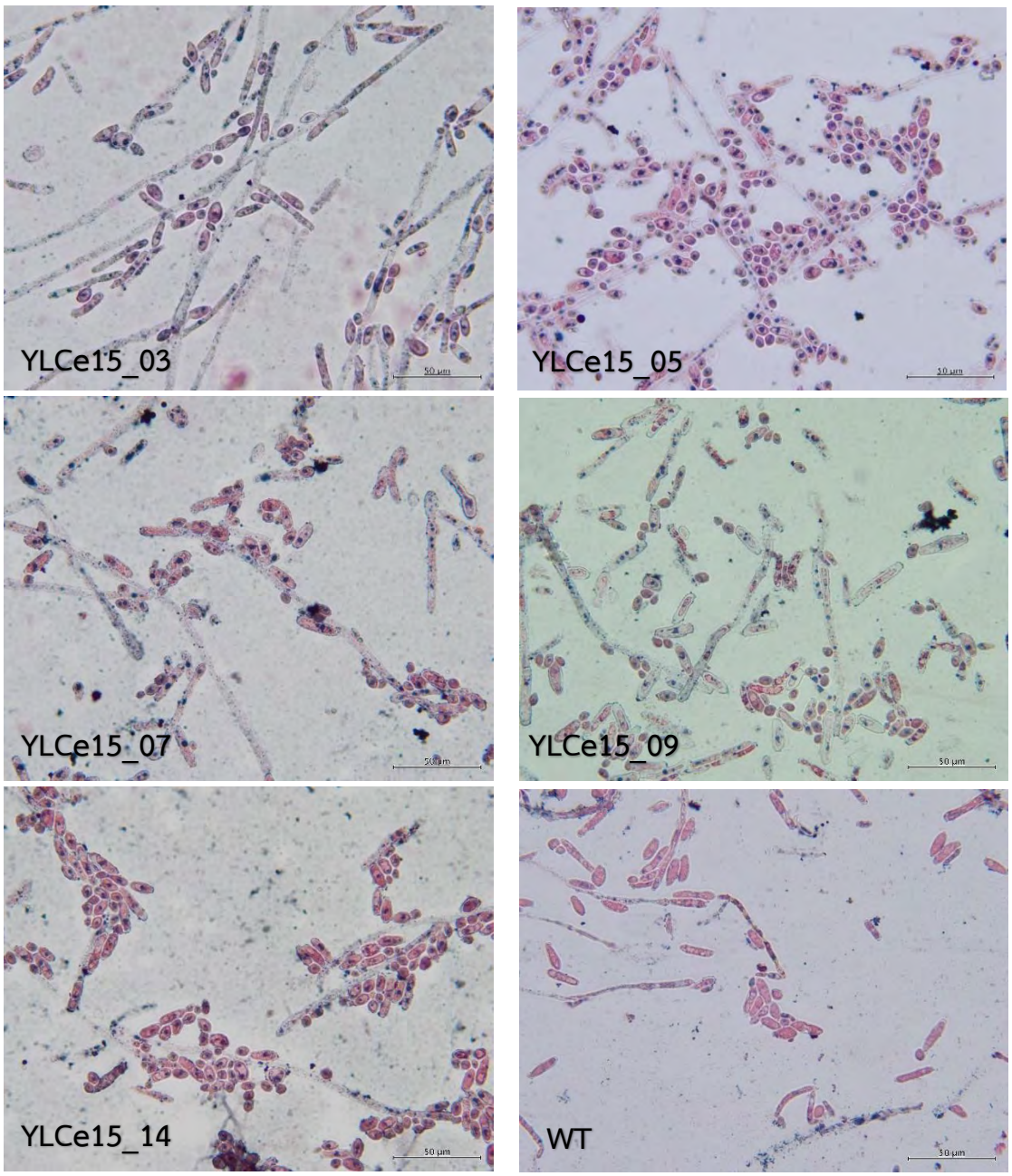
นำสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์ไปฉายรังสีในตู้ฉายรังสี ที่มีหลอด UV-C ความเข้มแสง 10 วัตต์ จำนวน 5 หลอด เป็นเวลา 0 5 10 15 20 25 และ 30 นาที โดยมีระยะห่างระหว่างจานเพาะเชื้อถึงหลอดฉายรังสี 22 เซนติเมตร ได้อัตราการอยู่รอดของเชื้อที่ได้รับการฉายรังสีอัตราไวโอเลต คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด ได้แก่ 100 54.1 15.6 4.92 0.80 0.08 และ 0.01 ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.4



ภาพที่ 4.4 กราฟอัตราการอยู่รอดของยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์ *YLNatXynA* หลังได้รับการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตที่ระยะเวลา 0 5 10 15 20 25 และ 30 นาที

4.4 การคัดเลือกโดยใช้ cerulenin screening และเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตไขมันในยีสต์ที่ได้รับการฉายรังสีที่ระยะเวลาต่าง ๆ

นำเชื้อที่ได้รับการฉายรังสีอัตราไวโอเลตเป็นเวลา 15 นาที (มีอัตราการอยู่รอดอยู่ในช่วง 5-10 เปอร์เซ็นต์) มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง YPD ที่มี cerulenin ความเข้มข้น 2 µg/ml (Tipia et al., 2012) เพื่อคัดเลือกหาเชื้อที่สามารถเจริญได้บนอาหารที่มี cerulenin ผสมอยู่ จากการทดลองพบว่ามียีสต์สายพันธุ์กลายเจริญบนอาหารแข็ง YPD ที่มี cerulenin ผสมอยู่ทั้งหมด 60 ไอโซเลท แต่จากการทดลองนี้ไม่สามารถคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายจากการวิเคราะห์ความสามารถในการเจริญบนอาหารดังกล่าวได้ เนื่องจากพบว่ามีเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม ซึ่งเป็นชุดการทดลองควบคุมผลลบ ทั้งหมด 20 ไอโซเลท เจริญได้บนอาหารแข็ง YPD ที่มี cerulenin ผสมอยู่เช่นกัน เนื่องจากการคัดเลือกด้วยวิธี cerulenin screening ไม่สามารถคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายได้ จึงต้องคัดเลือกสายพันธุ์กลายด้วยวิธี oil droplet screening โดยใช้สีย้อม Sudan black B เพื่อคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่มีการผลิตไขมันมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยคัดเลือกตัวอย่างแบบสุ่มมาทั้งหมด 20 ไอโซเลท จากทั้งหมด 60 ไอโซเลท จากนั้นนำเชื้อทั้ง 20 ไอโซเลทมาเลี้ยงในอาหาร Lipid production medium เพื่อเปรียบเทียบดูสัดส่วนของ oil droplet ภายในเซลล์ของเชื้อแต่ละไอโซเลท พบว่า มีเชื้อสายพันธุ์กลายทั้งหมด 5 ไอโซเลท ที่มีสัดส่วนของ oil droplet สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบจากทั้งหมด 20 ไอโซเลท ได้แก่ YLCe15_03 YLCe15_05 YLCe15_07 YLCe15_09 และ YLCe15_14 คือ มีการติดสีน้ำเงินเข้มของสีย้อม Sudan black B ซึ่งมีความจำเพาะต่อการย้อมเซลล์เพื่อดูการสะสมไขมัน ดังภาพ 4.5



ภาพที่ 4.5 ยีสต์ *Y. lipolytica* ไอโซเลท YLCe15_03 YLCe15_05 YLCe15_07 YLCe15_09 และ YLCe15_14 หลังจากย้อมสีเซลล์ยีสต์ด้วยวิธี Sudan black B staining เปรียบเทียบกับเซลล์ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม (WT)

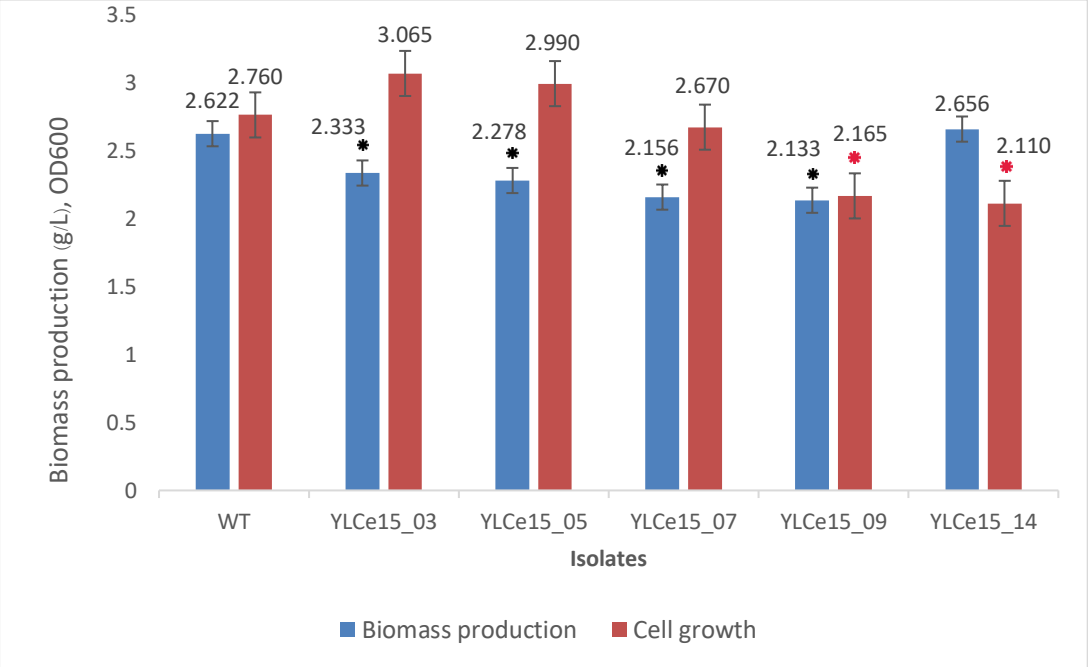
4.4.1 วัดการเจริญเติบโต

จากการวัดการเจริญเติบโตเซลล์ยีสต์ทั้ง 5 ไอโซเลท พบว่า ไอโซเลท YLCe_03 YLCe15_05 YLCe_07 YLCe15_09 และ YLCe15_14 มีค่า OD_{600} เฉลี่ยเท่ากับ 3.065 2.990 2.670 2.165 และ 2.110 ตามลำดับ ในขณะที่สายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) มีค่าเท่ากับ 2.760 ซึ่งจะเห็นว่าเซลล์ยีสต์สายพันธุ์กลาย 2 สายพันธุ์ ได้แก่ YLCe15_09 และ YLCe15_14 มีการเจริญเติบโต (Cell

Growth) ลดลงจากสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วน 3 ไอโซเลทที่เหลือ ได้แก่ YLCe15_03 YLCe15_05 และ YLCe15_07 ไม่แตกต่างจากสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังภาพ 4.6

4.4.2 วัดชีวมวล

จากการวัดชีวมวลเซลล์ยีสต์ทั้ง 5 ไอโซเลท พบว่า ไอโซเลท YLCe15_03 YLCe15_05 YLCe15_07 YLCe15_09 และ YLCe15_14 มีน้ำหนักชีวมวล (Biomass Production) เฉลี่ยเท่ากับ 2.333 2.278 2.156 2.133 และ 2.656 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่สายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) มีค่าเท่ากับ 2.622 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะเห็นว่า เซลล์ยีสต์สายพันธุ์กลายจำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ YLCe15_03 YLCe15_05 YLCe15_07 และ YLCe15_09 มีน้ำหนักชีวมวลลดลงจากสายพันธุ์ดั้งเดิม และเมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า ทั้ง 4 ไอโซเลทมีน้ำหนักชีวมวลลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม ส่วนไอโซเลท YLCe15_14 มีน้ำหนักชีวมวลเฉลี่ยเพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์ดั้งเดิม แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ดังภาพ 4.6

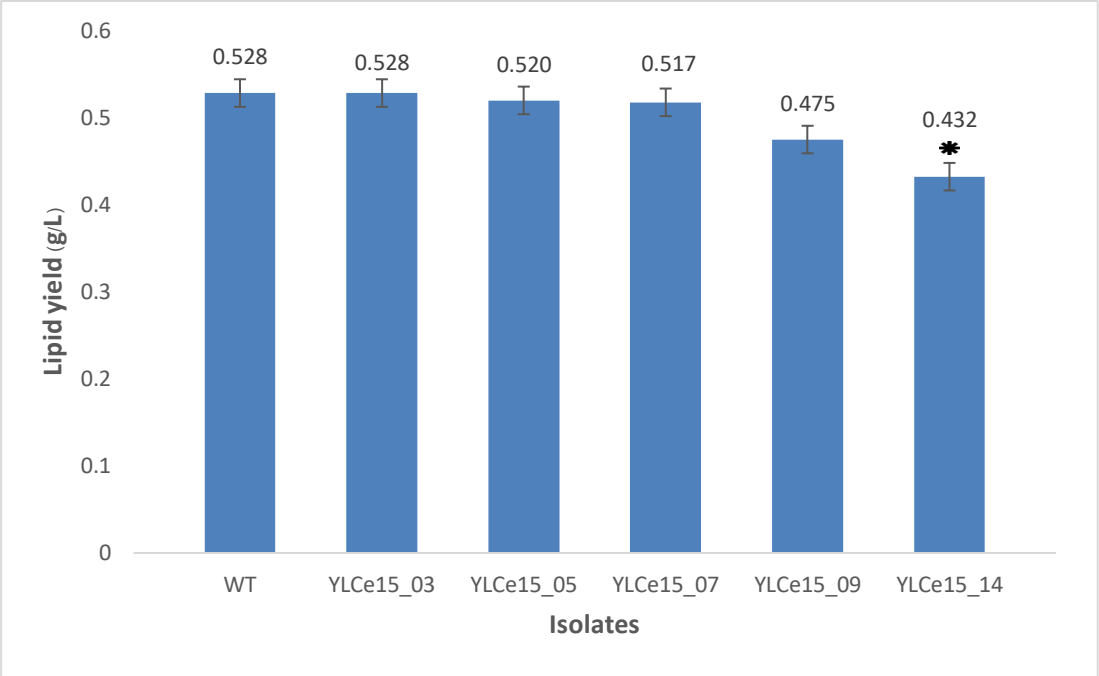


ภาพที่ 4.6 กราฟค่าเฉลี่ยน้ำหนักชีวมวล (Biomass Production) และค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโต (Cell Growth) ของยีสต์ *Y. lipolytica* ไอโซเลท YLCe15_03 YLCe15_05 YLCe15_07 YLCe15_09 และ YLCe15_14 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (WT)

* * แสดงผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

4.4.3 สกัดและวัดปริมาณไขมัน

ทำการสกัดและวัดปริมาณไขมัน (Bligh and Dyer, 1959) จากเซลล์ยีสต์ทั้ง 5 ไอโซเลท ได้แก่ YLCe15_03 YLCe15_05 YLCe15_07 YLCe15_09 และ YLCe15_14 จากการทดลองพบว่า ยีสต์ ไอโซเลท YLCe15_03 มีค่าเฉลี่ยผลผลิตไขมัน (Lipid Yield) เท่ากับ 0.528 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณค่าเฉลี่ยผลผลิตไขมัน (Lipid Yield) เท่ากับยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม แต่พบว่ายีสต์ไอโซเลท YLCe15_05 YLCe15_07 YLCe15_09 และ YLCe15_14 มีค่าเฉลี่ยผลผลิตไขมัน (Lipid Yield) ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (0.520 0.517 0.475 และ 0.432 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า มีเพียงไอโซเลท YLCe15_14 ที่มีค่าเฉลี่ยผลผลิตไขมันลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

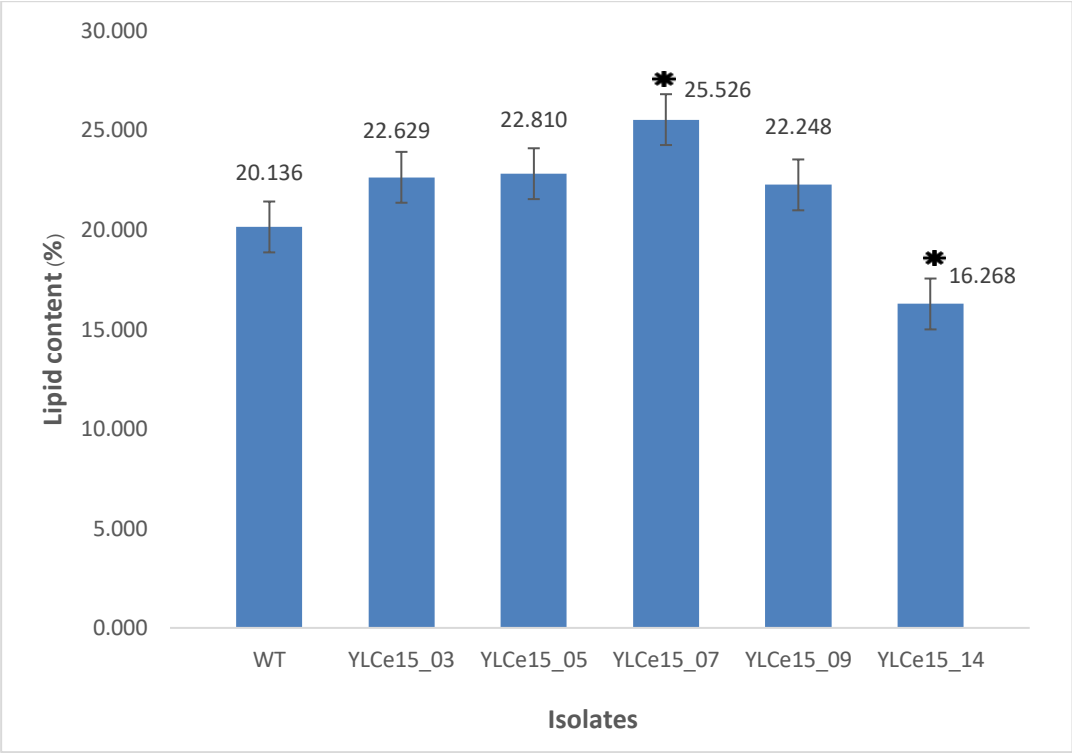


ภาพที่ 4.7 กราฟค่าเฉลี่ยผลผลิตไขมัน (Lipid Yield) ของยีสต์ *Y. lipolytica* ไอโซเลท YLCe15_03 YLCe15_05 YLCe15_07 YLCe15_09 และ YLCe15_14 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (WT)

* แสดงผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

ผลจากการวิเคราะห์น้ำหนักชีวมวลและผลผลิตไขมันของยีสต์ *Y. lipolytica* ทั้ง 5 ไอโซเลท ได้แก่ YLCe15_03 YLCe15_05 YLCe15_07 YLCe15_09 และ YLCe15_14 สามารถนำมาวิเคราะห์ดูปริมาณไขมัน (Lipid Content) ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 22.629 22.810 25.526 22.248 และ 16.268 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ดั้งเดิมมีปริมาณไขมันเฉลี่ยเท่ากับ 20.136 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า ไอโซเลท YLCe15_07 มีปริมาณไขมันสูงกว่า เมื่อเทียบกับสายพันธุ์

ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนไอโซเลท YLCe15_14 มีปริมาณไขมันลดลง เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่อีก 3 ไอโซเลท ได้แก่ YLCe15_03 YLCe15_05 และ YLCe15_09 มีปริมาณไขมันไม่แตกต่างจากสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญ ดังภาพ 4.8



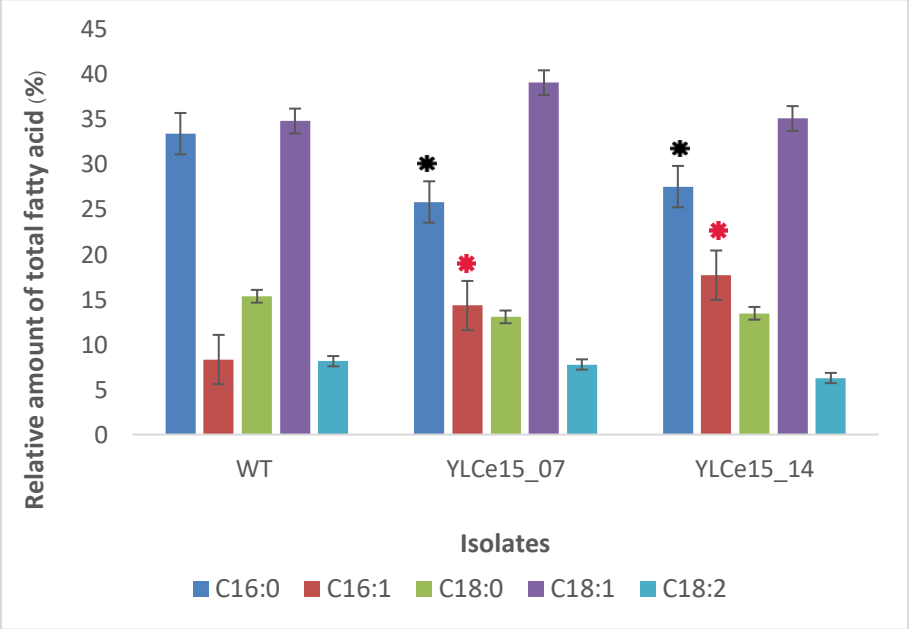
ภาพที่ 4.8 กราฟค่าเฉลี่ยปริมาณไขมัน (Lipid Content) ของยีสต์ *Y. lipolytica* ไอโซเลท YLCe15_03 YLCe15_05 YLCe15_07 YLCe15_09 และ YLCe15_14 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (WT)

* แสดงผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

4.4.4 วัดสัดส่วนของกรดไขมัน

จากผลการวัดปริมาณไขมัน (Lipid Content) ดังภาพที่ 4.8 จะเห็นว่า มีเพียง 2 ไอโซเลท คือ YLCe15_07 และ YLCe15_14 ที่มีปริมาณไขมันแตกต่างจากสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญ จึงคัดเลือกทั้ง 2 ไอโซเลทมาวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน (Fatty Acid Composition) ที่ผลิตโดยยีสต์สายพันธุ์กลาย ไอโซเลท YLCe15_07 และ YLCe15_14 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม พบว่าทั้ง 3 ไอโซเลทประกอบด้วยชนิดกรดไขมันที่เหมือนกัน ได้แก่ กรดกรดปาล์มิติก (C16:0) กรดปาลมิโตเลอิก (C16:1) กรดสเตียริก (C18:0) กรดโอเลอิก (C18:1) และกรดไลโนเลอิก (C18:2) แต่มีสัดส่วนของกรดไขมันที่แตกต่างกัน คือ ไอโซเลต YLCe15_07 มีสัดส่วนของกรดไขมันปาล์มิติก (C16:0) 25.81 เปอร์เซ็นต์ กรดปาลมิโตเลอิก (C16:1) 14.31 เปอร์เซ็นต์ กรดสเตียริก (C18:0)

13.06 เปอร์เซ็นต์ กรดโอเลอิก (C18:1) 39.04 เปอร์เซ็นต์ และกรดไลโนเลอิก (C18:2) 7.78 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไอโซเลท YLCe15_14 มีสัดส่วนของกรดไขมันปาล์มิติก (C16:0) 27.52 เปอร์เซ็นต์ กรดปาลมิโตเลอิก (C16:1) 17.69 เปอร์เซ็นต์ กรดสเตียริก (C18:0) 13.45 เปอร์เซ็นต์ กรดโอเลอิก (C18:1) 35.07 เปอร์เซ็นต์ และกรดไลโนเลอิก (C18:2) 6.27 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สายพันธุ์ดั้งเดิมมีสัดส่วนของกรดไขมันปาล์มิติก (C16:0) 33.39 เปอร์เซ็นต์ กรดปาลมิโตเลอิก (C16:1) 8.33 เปอร์เซ็นต์ กรดสเตียริก (C18:0) 15.35 เปอร์เซ็นต์ กรดโอเลอิก (C18:1) 34.80 เปอร์เซ็นต์ และกรดไลโนเลอิก (C18:2) 8.14 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะเห็นว่า แนวโน้มสัดส่วนของกรดไขมันของสายพันธุ์กลายทั้งสองไอโซเลทเป็นไปในทิศทางเดียวกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์กลายทั้งสองไอโซเลทและสายพันธุ์ดั้งเดิม พบว่า สายพันธุ์กลายทั้งสองไอโซเลทมีสัดส่วนของกรดปาล์มิติก (C16:0) ลดลงจากสายพันธุ์ดั้งเดิม และมีสัดส่วนของกรดปาลมิโตเลอิก (C16:1) เพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์ดั้งเดิม ส่วนกรดสเตียริก (C18:0) กรดโอเลอิก (C18:1) และกรดไลโนเลอิก (C18:2) มีสัดส่วนที่ไม่แตกต่างจากสายพันธุ์ดั้งเดิม ดังภาพ 4.9



ภาพที่ 4.9 กราฟชนิดและสัดส่วนของกรดไขมัน (Fatty Acid Profile) ของยีสต์ *Y. lipolytica* ไอโซเลท YLCe15_07 และ YLCe15_14 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (WT)

✱ ✱ แสดงผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

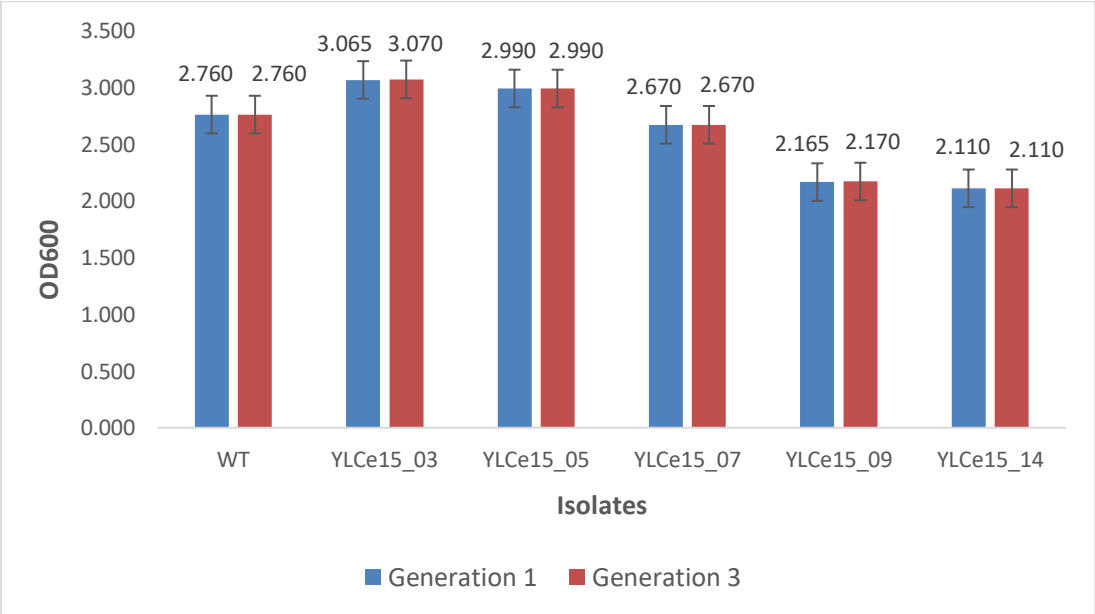
4.5 การทดสอบความเสถียรในการผลิตไขมันของไอโซเลทที่คัดเลือกเป็นเวลา 3 รุ่น และทดสอบลักษณะสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

4.5.1 ทดสอบความเสถียรในการผลิตไขมันของไอโซเลทที่คัดเลือกเป็นเวลา 3 รุ่น เปรียบเทียบระหว่างการผลิตไขมันของไอโซเลทที่คัดเลือกในรุ่นที่ 1 และไอโซเลทที่คัดเลือกในรุ่นที่ 3

ผลจากการนำยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์กลายทั้ง 5 ไอโซเลท ได้แก่ YLCe15_03 YLCe15_05 YLCe15_07 YLCe15_09 และ YLCe15_14 มาทดสอบความเสถียรในการผลิตไขมันโดยเลี้ยงเชื้อจนได้รุ่นที่ 3 จากนั้น วัดการเจริญเติบโต วัดชีวมวล สกัดและวัดปริมาณไขมัน และวัดสัดส่วนของกรดไขมัน เปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์เดียวกันในรุ่นที่ 1

4.5.1.1 วัดการเจริญเติบโต

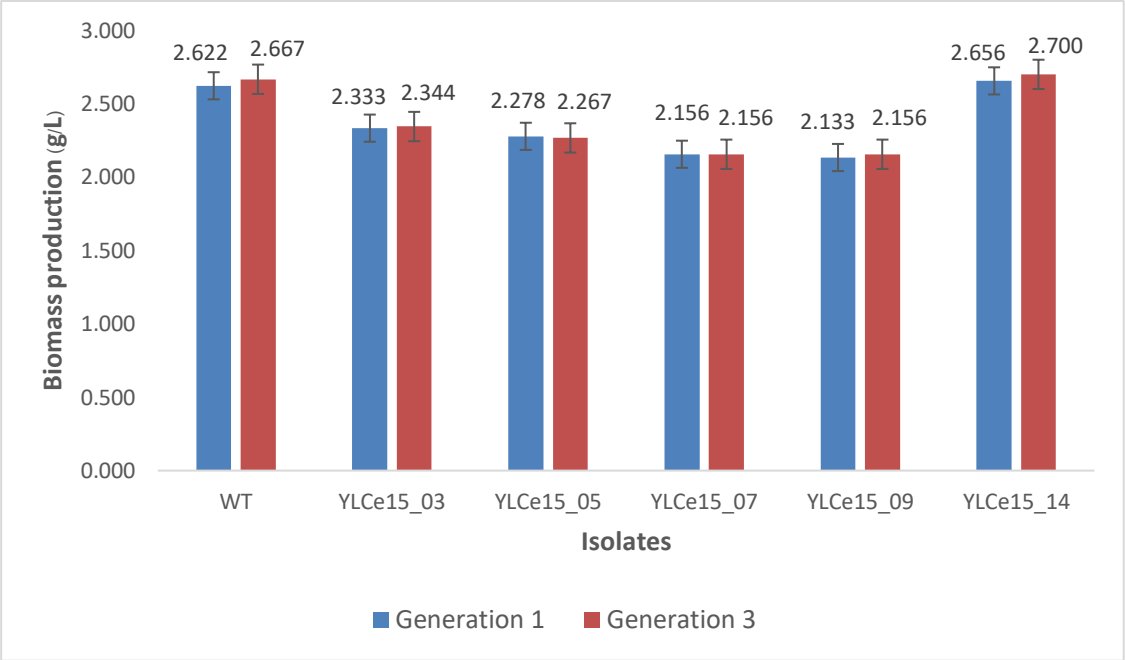
ผลการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อสายพันธุ์กลายทั้ง 5 ไอโซเลท ได้แก่ YLCe15_03 YLCe15_05 YLCe15_07 YLCe15_09 และ YLCe15_14 ในเชื้อรุ่นที่ 1 เปรียบเทียบกับรุ่นที่ 3 พบว่า ค่า OD_{600} ของยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์กลายทั้ง 5 ไอโซเลท ในรุ่นที่ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.070 2.990 2.670 2.170 และ 2.110 ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ดั้งเดิมมีค่าเท่ากับ 2.760 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับค่า OD_{600} ของเซลล์ยีสต์ไอโซเลทเดียวกันในรุ่นที่ 1 พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายทั้ง 5 ไอโซเลท มีการเจริญเติบโตเฉลี่ยไม่แตกต่างกันระหว่างรุ่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่า ยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์กลายทั้ง 5 ไอโซเลทมีความเสถียรในการเจริญเติบโต ดังภาพ 4.10



ภาพที่ 4.10 กราฟค่า OD_{600} เฉลี่ยของยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) ไอโซเลท YLCe15_03 YLCe15_05 YLCe15_07 YLCe15_09 และ YLCe15_14 เปรียบเทียบระหว่างเชื้อรุ่นที่ 1 และรุ่นที่ 3

4.5.1.2 วัดชีวมวล

ผลการเปรียบเทียบชีวมวลของเชื้อสายพันธุ์กลายทั้ง 5 ไอโซเลท ได้แก่ YLCe15_03 YLCe15_05 YLCe15_07 YLCe15_09 และ YLCe15_14 ในเชื้อรุ่นที่ 1 เปรียบเทียบกับรุ่นที่ 3 พบว่า น้ำหนักชีวมวลของยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์กลายทั้ง 5 ไอโซเลท ในรุ่นที่ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.344 2.267 2.156 2.156 และ 2.700 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ดั้งเดิมมีค่าเท่ากับ 2.667 กรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักชีวมวลของเซลล์ยีสต์ไอโซเลทเดียวกันในรุ่นที่ 1 พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายทั้ง 5 ไอโซเลท มีน้ำหนักชีวมวลเฉลี่ยไม่แตกต่างกันระหว่างรุ่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่า ยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์กลายทั้ง 5 ไอโซเลทมีความเสถียรในการผลิตชีวมวล ดังภาพ 4.11

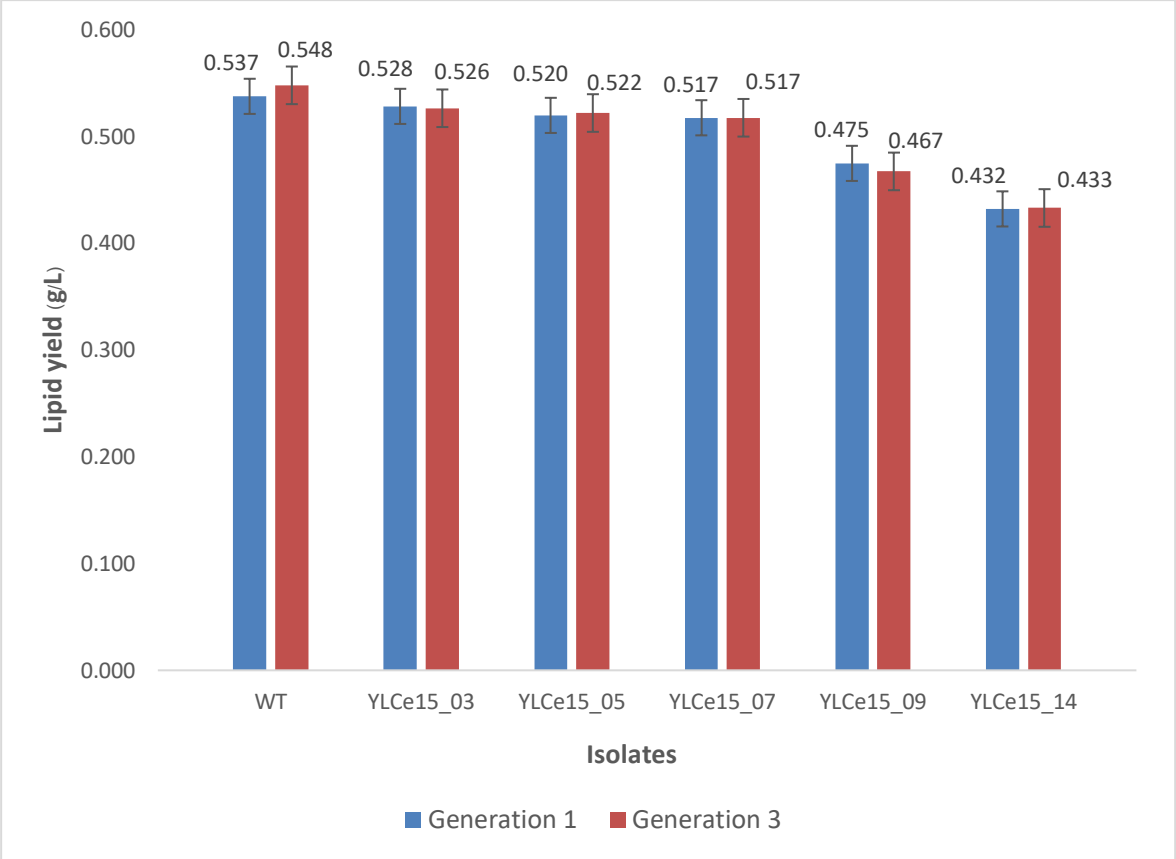


ภาพที่ 4.11 กราฟค่าเฉลี่ยน้ำหนักชีวมวล (Biomass Production) ของยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) ไอโซเลท YLCe15_03 YLCe15_05 YLCe15_07 YLCe15_09 และ YLCe15_14 เปรียบเทียบระหว่างเชื้อรุ่นที่ 1 และรุ่นที่ 3

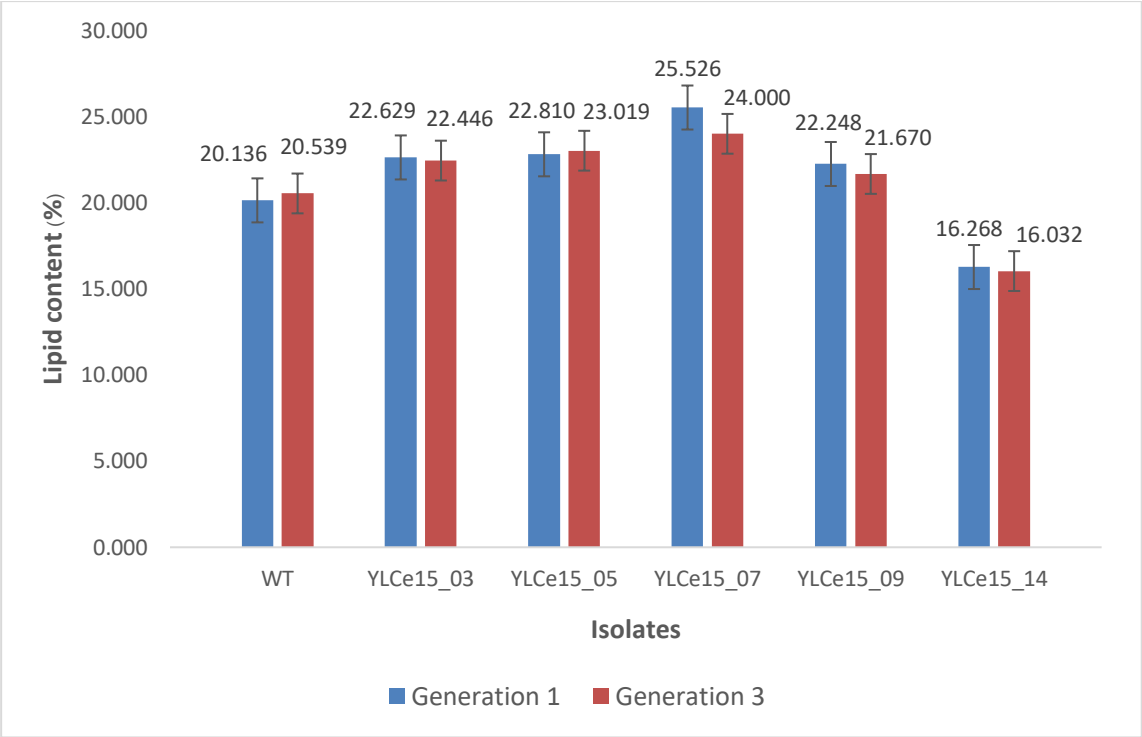
4.5.1.3 สกัดและวัดปริมาณไขมัน

ผลการเปรียบเทียบผลผลิตไขมันของเชื้อสายพันธุ์กลายทั้ง 5 ไอโซเลท ได้แก่ YLCe15_03 YLCe15_05 YLCe15_07 YLCe15_09 และ YLCe15_14 ในเชื้อรุ่นที่ 1 เปรียบเทียบกับรุ่นที่ 3 พบว่า ผลผลิตไขมัน (Lipid Yield) ของยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์กลายทั้ง 5 ไอโซเลท ในรุ่นที่ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.526 0.522 0.512 0.467 และ 0.432 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ดั้งเดิมมีค่าเท่ากับ 0.548 กรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักชีวมวลของเซลล์ยีสต์ไอโซเลทเดียวกันในรุ่นที่ 1 พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายทั้ง 5 ไอโซเลท มีค่าเฉลี่ยผลผลิตไขมันไม่แตกต่างกัน

ระหว่างรุ่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่า ยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์กลายทั้ง 5 ไอโซเลทมีความเสถียรของผลผลิตไขมัน ดังภาพ 4.12 ซึ่งเมื่อนำน้ำหนักชีวมวลและผลผลิตไขมันมาวิเคราะห์เพื่อดูปริมาณไขมัน พบว่า ยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์กลายทั้ง 5 ไอโซเลท มีค่าเฉลี่ยปริมาณไขมันที่ไม่แตกต่างกันระหว่างรุ่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กล่าวคือ เชื้อสายพันธุ์กลายทั้ง 5 ไอโซเลทมีความเสถียรในการผลิตไขมัน ดังภาพ 4.13



ภาพที่ 4.12 กราฟค่าเฉลี่ยผลผลิตไขมัน (Lipid Yield) ของยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) ไอโซเลท YLCe15_03 YLCe15_05 YLCe15_07 YLCe15_09 และ YLCe15_14 เปรียบเทียบระหว่างเชื้อรุ่นที่ 1 และรุ่นที่ 3



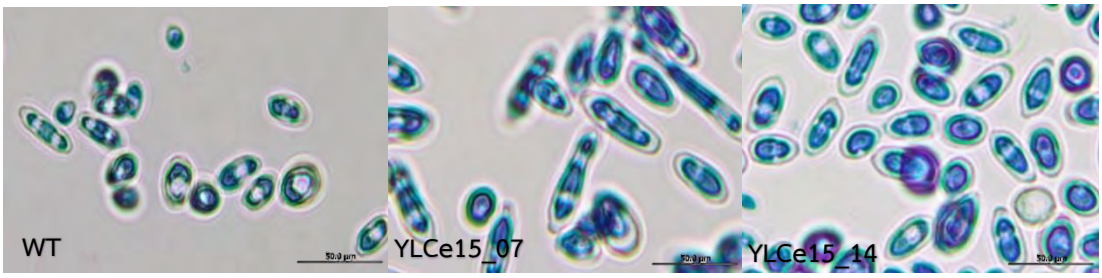
ภาพที่ 4.13 กราฟค่าเฉลี่ยปริมาณไขมัน (Lipid Content) ของยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) ไอโซเลท YLCe15_03 YLCe15_05 YLCe15_07 YLCe15_09 และ YLCe15_14 เปรียบเทียบระหว่างเชื้อรุ่นที่ 1 และรุ่นที่ 3

4.5.1.4 วัดสัดส่วนของกรดไขมัน

ผลการเปรียบเทียบชนิดและสัดส่วนของกรดไขมันของเชื้อสายพันธุ์กลายทั้ง 2 ไอโซเลท ได้แก่ YLCe15_07 และ YLCe15_14 ในเชื้อรุ่นที่ 1 เปรียบเทียบกับรุ่นที่ 3 พบว่า ชนิดกรดไขมันของยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์กลายทั้ง 2 ไอโซเลทและสายพันธุ์ดั้งเดิมต่างประกอบด้วยกรดปาล์มิติก (C16:0) กรดปาลมิโตเลอิก (C16:1) กรดสเตียริก (C18:0) กรดโอเลอิก (C18:1) และกรดไลโนเลอิก (C18:2) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับชนิดกรดไขมันของเซลล์ยีสต์ไอโซเลทเดียวกันในรุ่นที่ 1 พบว่าเชื้อสายพันธุ์กลายทั้ง 2 ไอโซเลท มีชนิดกรดไขมันไม่แตกต่างกันระหว่างรุ่น แสดงให้เห็นว่า ยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์กลายทั้ง 2 ไอโซเลทมีความเสถียรในการผลิตกรดไขมันแต่ละชนิด

4.5.2 ทดสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของไอโซเลทที่คัดเลือกเป็นเวลา 3 รุ่น เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

ผลการเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อสายพันธุ์กลายทั้ง 2 ไอโซเลท ได้แก่ YLCe15_07 และ YLCe15_14 รุ่นที่ 3 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม พบว่า ยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์กลายทั้ง 2 ไอโซเลทและสายพันธุ์ดั้งเดิม มีลักษณะคล้ายคลึงกันคือ เป็นเซลล์เดี่ยว ลักษณะเซลล์รูปร่างกลมรี ปลายทั้งสองด้านของเซลล์เรียวแหลม ดังตาราง 4.14



ภาพที่ 4.14 ลักษณะสัณฐานวิทยาของไอโซเลท YLCe15_07 และ YLCe15_14 รุ่นที่ 3 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (WT)

4.6 เปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *ACC1* ระหว่าง *Y. lipolytica* สายพันธุ์ *YLNatXynA* สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์ที่ได้รับการฉายรังสีแล้วถูกคัดเลือก

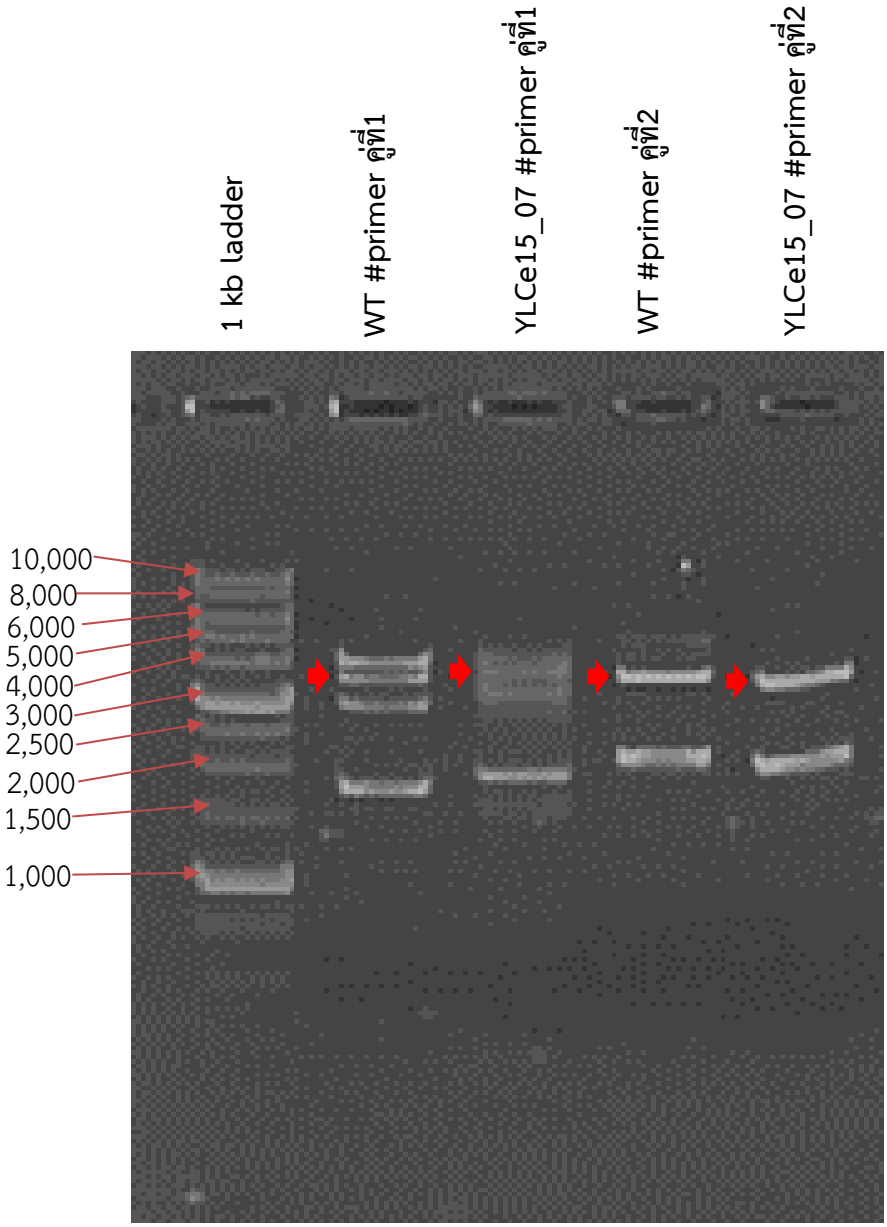
จากผลการวัดปริมาณไขมัน (Lipid Content) ดังภาพที่ 4.8 จะเห็นว่าไอโซเลท YLCe15_07 มีปริมาณไขมันมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนไอโซเลท YLCe15_14 มีปริมาณไขมันน้อยกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงเลือกไอโซเลท YLCe15_07 มาทำการศึกษา เพื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *ACC1* กับสายพันธุ์ดั้งเดิม

4.6.1 สกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ยีสต์ จากนั้นเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) และตรวจสอบการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Gel electrophoresis แล้ววิเคราะห์ลำดับเบส

จากการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ยีสต์สายพันธุ์กลายไอโซเลท YLCe15_07 และสายพันธุ์ดั้งเดิม พบว่า สายพันธุ์กลายมีค่า $OD_{260/280}$ และความเข้มข้นของดีเอ็นเอเท่ากับ 1.867 และ 287.463 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ ในขณะที่สายพันธุ์ดั้งเดิมมีค่าเท่ากับ 1.929 และ 100.105 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ

จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 2 คู่ แล้วตรวจสอบการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Gel electrophoresis พบว่า ชิ้นส่วนดีเอ็นที่ถูกเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์คู่แรกมีขนาดประมาณ 3,356 bp และชิ้นส่วนที่ถูกเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์คู่ที่สองมีขนาดประมาณ 3,514 bp จะเห็นได้ว่าไพรเมอร์ทั้งสองคู่ไม่มีความจำเพาะต่อยีน *ACC1* เนื่องจากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีแถบดีเอ็นเอปรากฏมากกว่า 1 แถบในแต่ละช่องเจล ดังภาพ 4.15

ผลการส่งตัวอย่างดีเอ็นเอทั้งสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ดั้งเดิมเพื่อวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่า ดีเอ็นเอทั้งสองสายพันธุ์ คือสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ดั้งเดิมนั้นไม่สามารถวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *ACC1* ออกมาได้



ภาพที่ 4.15 ผลการตรวจสอบการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Gel electrophoresis ของยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) และไอโซเลท YLCe15_07 จากการใช้ไพรเมอร์ทั้งสองคู่

4.6.2 เปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *ACC1* สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ที่ได้รับการฉายรังสีแล้วถูกคัดเลือกด้วย ClustalW algorithm

ไม่สามารถเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *ACC1* ระหว่างสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายได้

บทที่ 5

อภิปรายผลการศึกษา

การศึกษากราฟการเติบโต (Growth Curve) ของยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์ *YLNatXynA* เพื่อหาช่วงที่เซลล์ยีสต์มีการเติบโตแบบ exponential เนื่องจากเคยมีการศึกษาก่อนหน้านี้ในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่าในช่วงที่เซลล์ยีสต์เข้าสู่ช่วง exponential เซลล์จะมีสภาวะว่องไวต่อรังสีอัลตราไวโอเลตมากกว่าช่วงอื่น ๆ โดยจะมีบทบาทในการลดการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการโฟโตรีแอคทิเวชัน ซึ่งเป็นกระบวนการซ่อมแซมสายดีเอ็นเอของเซลล์ยีสต์ ส่งผลทำให้เซลล์ยีสต์มีอัตราการอยู่รอดน้อยลง (Resnick and Setlow, 1972)

จากการเหนี่ยวนำให้ยีสต์เกิดการกลายด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตที่ระยะเวลา 30 60 90 120 150 และ 180 นาที ให้อัตราการอยู่รอดของเชื้อต่ำกว่าช่วง 5 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่สอดคล้องกับผลการศึกษาในยีสต์ *Aureobasidium pullulans* ที่ให้อัตราการอยู่รอดของเชื้ออยู่ในช่วง 5 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ (ภัณฑิรา เครือใหญ่, 2555) ทำให้ต้องมีการเปลี่ยนแปลงระยะเวลาที่ใช้ในการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต เนื่องจากมีการศึกษาพบว่า ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายในเชื้อจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ มักใช้สารก่อการกลายเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายและมีอัตราการอยู่รอดในช่วง 5 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะให้เชื้อจุลินทรีย์ที่แตกต่างไปจากสายพันธุ์ดั้งเดิมและมีเสถียรภาพสูงในการถ่ายทอดลักษณะสู่รุ่นต่อไปได้ (วรภรณ์ มลิลาศ, 2549) แต่จากผลการทดลองจะเห็นว่า การฉายรังสีนาน 30 นาที เชื้อมีอัตราการอยู่รอด เท่ากับ 0.012 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น อัตราการอยู่รอดช่วง 5 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ จึงควรอยู่ในช่วง 0 ถึง 30 นาที จึงปรับเป็นฉายรังสีอัลตราไวโอเลตที่ระยะเวลา 5 10 15 20 25 และ 30 นาที

จากการคัดเลือกโดยใช้ cerulenin screening พบว่าเชื้อทุกไอโซเลท รวมทั้งสายพันธุ์ดั้งเดิม (Negative Control) สามารถเจริญได้บนอาหารแข็ง YPD ที่มี cerulenin ผสมอยู่ อาจเกิดจากอาหารแข็ง YPD ที่มี cerulenin 2 µg/ml (Tipia et al., 2012) นั้นมีปริมาณ cerulenin ไม่ถึง minimum inhibitory concentration (MIC) ซึ่งเป็นความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สารจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ โดยปริมาณ MIC ของ cerulenin จะแตกต่างกันออกไปขึ้นกับชนิดของเชื้อ (Omura, 1976) แต่จากข้อมูลที่มีอยู่ ยังไม่พบปริมาณ MIC ของ cerulenin ที่ใช้กับยีสต์ *Y. lipolytica* และปริมาณสาร cerulenin ที่มีอยู่นั้น ไม่เพียงพอที่จะหาค่า MIC

จากการเพิ่มประสิทธิภาพในการสะสมไขมันของยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์ *YLNatXynA* ด้วยการสร้างสายพันธุ์กลายโดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต พบว่า สายพันธุ์กลาย ไอโซเลท YLCe15_07 มีปริมาณไขมันสะสมภายในเซลล์เท่ากับ 25.53 ± 2.72 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ในขณะที่สายพันธุ์ดั้งเดิมมีปริมาณไขมันสะสมภายในเซลล์ 20.14 ± 1.95 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่ง

จากรายงานก่อนหน้านี้ พบว่า ยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์ ACA-DC 50109 มีความสามารถในการสะสมไขมันโดยการเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะและปัจจัยแวดล้อมที่เหมาะสมที่สุดในกระบวนการหมักที่ส่งผลต่อการสะสมไขมัน ส่งผลให้ยีสต์ *Y. lipolytica* มีปริมาณไขมัน (Lipid Content) สะสมภายในเซลล์สูงถึง 47.50 ± 1.20 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Bellou et al., 2016) ซึ่งอาจเป็นเพราะยีสต์ *Y. lipolytica* ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ผ่านกระบวนการปรับแต่งพันธุกรรมเพื่อให้สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ ซึ่งโดยทั่วไป *Y. lipolytica* ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้ ซึ่งในกระบวนการปรับแต่งพันธุกรรมนี้ อาจส่งผลกระทบต่อความสามารถในการสะสมไขมันภายในเซลล์ยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์ *YLNatXynA* ซึ่งต้องอาศัยการศึกษาต่อไปเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม เพื่อให้ยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์นี้สามารถสะสมไขมันภายในเซลล์ในปริมาณที่สูงขึ้น

จากการวัดสัดส่วนของกรดไขมันในยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์กลายไอโซเลท YLCe15_07 และ YLce15_14 ด้วย Gas Chromatography พบว่า สายพันธุ์กลายทั้งสองไอโซเลทมีการสะสมกรดไขมันชนิด กรดกรดปาล์มิติก (C16:0) และกรดโอเลอิก (C18:1) ในสัดส่วนที่มากที่สุดสองอันดับแรก ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ ที่มีการศึกษาสัดส่วนของกรดไขมันในยีสต์ที่นิยมใช้ในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ คือมีสัดส่วนของกรดปาล์มิติก (C16:0) และกรดโอเลอิก (C18:1) ในปริมาณสูง และยังเป็นคุณสมบัติที่ใกล้เคียงกับน้ำมันปาล์มที่มีการใช้อยู่ในอุตสาหกรรมในปัจจุบัน (Alexandre, 2017)

จากการออกแบบไพรเมอร์ในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR จากนั้นตรวจสอบการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Gel electrophoresis จะเห็นว่าไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง ไม่มีความจำเพาะต่อยีน *ACC1* สังเกตได้จากผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis พบว่า ชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีหลายขนาด เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองสามารถจับได้หลายตำแหน่งในดีเอ็นเอต้นแบบ ส่งผลให้ไม่สามารถวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *ACC1* ได้ อีกทั้งจากการหาข้อมูลพบว่า ยังไม่เคยมีการศึกษายีน *ACC1* ในยีสต์ *Y. lipolytica* มาก่อน อย่างไรก็ตาม สามารถแก้ไขได้ด้วยการออกแบบไพรเมอร์ใหม่ โดยการเพิ่มจำนวนเบสของไพรเมอร์เพื่อให้มีความจำเพาะต่อยีน *ACC1* มากขึ้น แต่เนื่องด้วยการระบาดของเชื้อไวรัส covid-19 และข้อจำกัดของเวลา ทำให้ไม่สามารถทำการทดลองในขั้นตอนนี้ต่อได้

จากการศึกษาในงานวิจัยนี้ แม้ว่าจะไม่สามารถเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *ACC1* ในยีสต์ *Y. lipolytica* ระหว่างยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาพบว่า สายพันธุ์กลายที่ได้ คือ ไอโซเลท YLCe15_07 มีปริมาณไขมันสะสมภายในเซลล์มากขึ้น เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม อีกทั้งสัดส่วนของกรดไขมันในยีสต์สายพันธุ์กลายมีปริมาณของกรดปาล์มิติก (C16:0) และกรดโอเลอิก (C18:1) ในสัดส่วนที่สูงซึ่งสอดคล้องกับยีสต์ที่ถูกใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ ทำให้ยีสต์สายพันธุ์กลายนี้ มีแนว

โนวโน้มถูกนำไปใช้ในการผลิตพลังงานชีวภาพ ทั้งในระยะสั้นและระยะยาว

บทที่ 6

สรุปผลการศึกษา

การเหนี่ยวนำให้ *Y. lipolytica* สายพันธุ์ *YLNatXynA* เกิดสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตไขมันได้มากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม ด้วยวิธีฉายรังสีอัลตราไวโอเลต พบว่า ยีสต์สายพันธุ์กลายที่ถูกฉายรังสีอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 15 นาที มีอัตราการอยู่รอดในช่วง 5 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นคัดเลือกด้วยการย้อมสี Sudan black B เพื่อดูการสะสม oil droplets ภายในเซลล์ พบว่า สายพันธุ์กลาย 5 ไอโซเลต ที่มีการสะสม oil droplets มากที่สุด ได้แก่ ไอโซเลท YLCe15_03 YLCe15_05 YLCe15_07 YLCe15_09 และ YLCe15_14 โดยเมื่อนำทั้ง 5 ไอโซเลทมาทดสอบความเสถียรในการผลิตไขมัน 3 ชั่วรุ่น พบว่าความสามารถในการผลิตไขมันในสายพันธุ์กลายทั้ง 5 ไอโซเลทสามารถส่งต่อไปยังรุ่นต่อไปได้ รวมทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสายพันธุ์กลายมีลักษณะไม่แตกต่างไปจากสายพันธุ์ดั้งเดิมคือ เป็นเซลล์เดี่ยว ลักษณะเซลล์รูปร่างกลมรี ปลายทั้งสองด้านของเซลล์เรียวแหลม และเมื่อทำการวัดปริมาณไขมัน (Lipid Content) พบว่า ไอโซเลท YLCe15_07 มีปริมาณไขมันสะสมภายในเซลล์สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม คือ 25.53 ± 2.72 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนสายพันธุ์ดั้งเดิมมีปริมาณมีปริมาณไขมันสะสมภายในเซลล์ เท่ากับ 20.14 ± 1.95 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งเมื่อนำสายพันธุ์กลายไปวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *ACC1* เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม พบว่า ไม่สามารถวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *ACC1* ได้ จึงไม่สามารถเปรียบเทียบลำเบสของยีน *ACC1* ระหว่างสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ดั้งเดิมได้ อย่างไรก็ตาม ยีสต์มีแนวโน้มถูกใช้ในการผลิตพลังงานชีวภาพ ทั้งในระยะสั้นและระยะยาว

เอกสารอ้างอิง

ภัณฑิรา เครือใหญ่. 2555. **การกลายพันธุ์ที่ชักนำโดยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตใน *Aureobasidium pullulans* เพื่อเพิ่มการผลิตไลเพส**. วิทยานิพนธ์ปริญญาบัณฑิต. สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วราภรณ์ มลิลาศ. 2549. **การคัดเลือกและชักนำให้เกิดมิวเทชันของราที่ย่อยลิปิดเพื่อเพิ่มไฮโดรไลติกแอกทิวิตี**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Alexandre, A.A. et al. 2017. Effects of palm oil consumption on lipid profile among rural Ivorian youth. **Journal of Food Research** 6: 140-149.

Alvarez, H.M. and Steinbuchel, A. 2002. Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. **Application Microbiol Biotechnol** 60: 367-376.

Anderson, R.A. 1992. Diversity of eukaryotic algae. **BiodiversConserv** 1: 267-292.

Athenstaedt, K. 2011. YALI0E32769g (*DGA1*) and YALI0E16797g (*LRO1*) encode major triacylglycerol synthases of the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Acta Molecular Cell Biology** : 587–596.

Baltz, R. 1986. Strain improvement. In Demain, A.L., and Solomon, N.A. (eds.), **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology** New York: The United States of America Press. :154-169.

Bellou, S. et al. 2016. High lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica* cultivated under double limitation of nitrogen and magnesium. **Journal of Biotechnology** 234: 116-126.

Beopoulos, A. et al. 2016. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. **Progress in Lipid Research** 48: 375-387.

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.

Brock, T.D. 1974. Mechanism of mutagenesis. **Biology of Microorganisms** pp. 383-384

Demirkan, E. et al. 2018. Strain improvement by UV mutagenesis for protease overproduction from *Bacillus subtilis* E6-5 and nutritional optimization. **Original Research Article** 12: 69-77.

Elkenawy, N.M. et al. 2017. Optimization of prodigiosin production by *Serratia marcescens* using crude glycerol and enhancing production using gamma radiation. **Biotechnology Reports** 14: 47-53.

Evans, C.T. and Ratledge, C. 1984. Effect of nitrogen source on lipid accumulation in oleaginous yeasts. **Journal of General Mirobiology** 130: 1693-1704.

Fantini, A.A. 1975. Strain development. **Methods in Enzymology** 43: 24-41.

Friedberg, E.C., and Wood, R.D. 1996. DNA Excision repair pathways. **Cold Spring Harbor Monograph Series** pp. 249-269

Gonçalves, F. A. G. et al. 2014. *Yarrowia lipolytica* and its multiple applications in the biotechnological industry. **The Scientific World Journal** 10: 14.

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: 439-564.

Lamers, D. et al. 2016. Selection of oleaginous yeasts for fatty acid production. **BioMed Central Biotechnology** 16: 45.

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. **American Society for Microbiology** 40: 681-697.

Ouephanit, C. et al. 2019. Efficient expression and secretion of endo-1,4-β-xylanase from *Penicillium citrinum* in non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica* directed by the native and the preproLIP2 signal peptides. **Protein Expression and Purification** 160: 1-6.

Rakicka, M. et al. 2015. Lipid production by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* using industrial by-products under different culture conditions. **Biotechnology for Biofuels** 8: 104.

Ratledge, C. 1982. Microbial oil and fats: an assessment of their commercial potential. **Professional Industry Microbial** 16: 119-206.

Ratledge, C. 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. **Biochimie** pp. 1-9.

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.

Satoshi, O. 1976. The antibiotic cerulenin, a novel tool for biochemistry as an inhibitor of fatty acid synthesis. **Bacteriological Reviews** 40: 681-697.

Subramaniam, R. et al. 2010. Microbial lipids from renewable resources: production and characterization. **Journal of Industrial Microbiology** 37:1271–1287.

Tang, X., Lee, J. and Chen, W.N. 2015. Engineering the fatty acid metabolic pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for advanced biofuel production. **Metabolic Engineering Communication** 2: 58-66.

Tehlivets, O., Scheuringer, K. and Kohlwein, S. D. 2007. Fatty acid synthesis and elongation in yeast. **Biochim Biophys Acta Molecular Cell Biology** 1771: 255–270.

Thevenieau, F. and Nicaud, J. 2013. Microorganisms as sources of oils. **Edition Diffusion Presse Sciences** 6: 11-13.

Tipia, E.V. et al. 2012. Optimization of lipid production by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* by random mutagenesis coupled to cerulenin screening. **Annals Microbiology Express** 2: 64.

Wang, J. et al. 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.

Zhao, C. et al. 2010. Expression of inulinase gene in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* and single cell oil production from inulin-containing materials. **Metabolic Engineering** 12: 510-517.

Zhao, X., and Mu, D. 1998. Photolylase: Light-dependent repair of DNA damage. **Histology and Histopathology** 13: 1179-1182.

Zhu, L.D. et al. 2016. Strategies for lipid production improvement in microalgae as a biodiesel feedstock. **BioMed Research International** 10: 1155.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหาร

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารแข็ง YPD (YPD ager) ประกอบด้วย

สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
เพปโทน (peptone)	1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
เดกโตรส (dextrose)	1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
วุ้นผง (agar)	1.8% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

อาหารเหลว YPD (YPD broth)

สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
เพปโทน (peptone)	1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
เดกโตรส (dextrose)	1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

อาหารแข็งคัดเลือกสายพันธุ์กลาย YPD ผสม cerulenin (YPD agar supplement with cerulenin)

สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
เพปโทน (peptone)	1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
เดกโตรส (dextrose)	1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
วุ้นผง (agar)	1.8% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
เซอรูเลนนิน (cerulenin)	2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

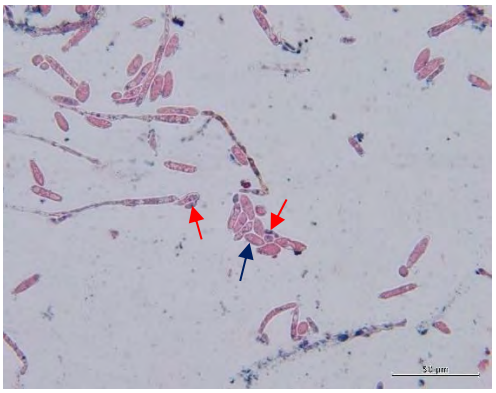
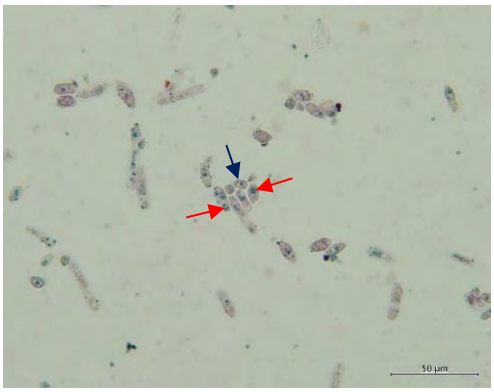
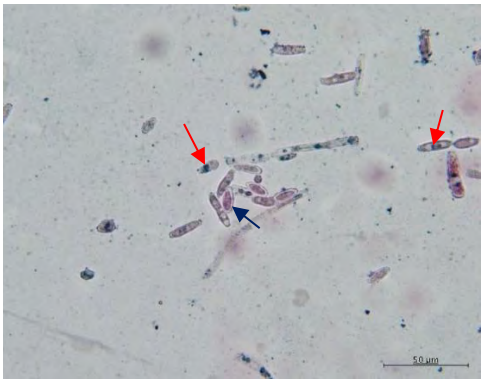
อาหารเหลว lipid production medium

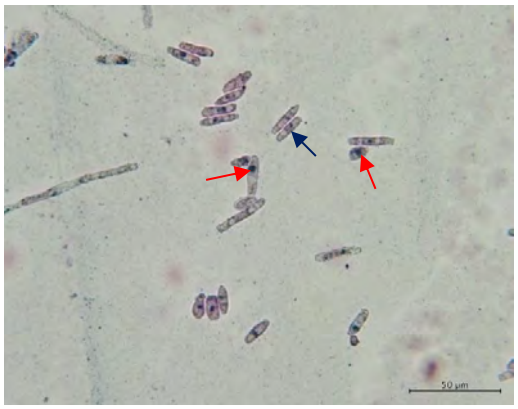
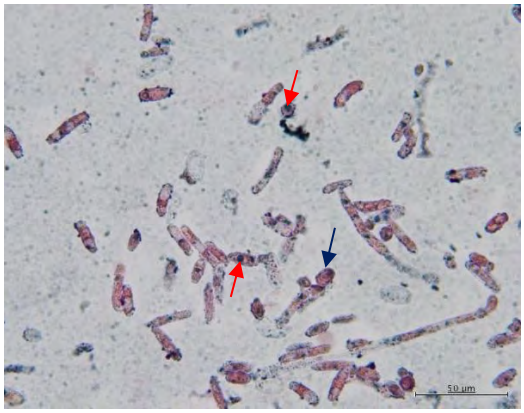
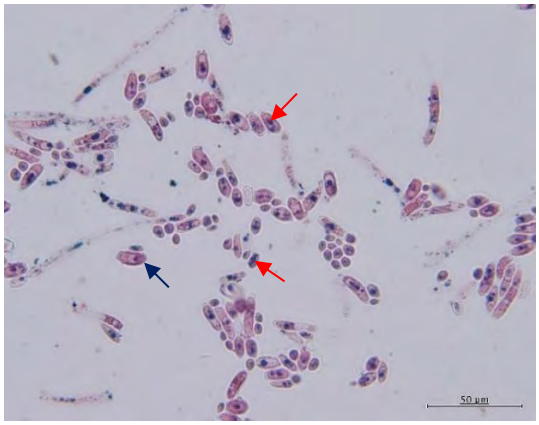
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
เพปโทน (peptone)	0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
เดกโตรส (dextrose)	7% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

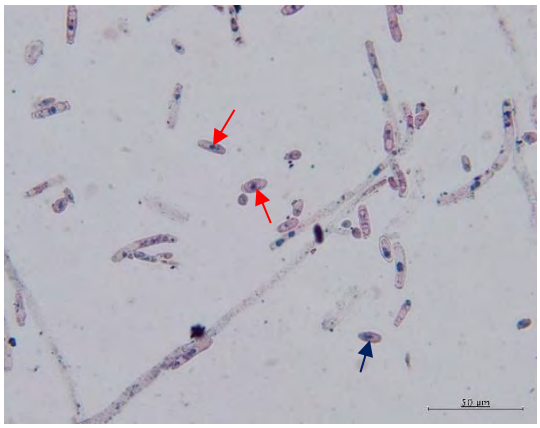
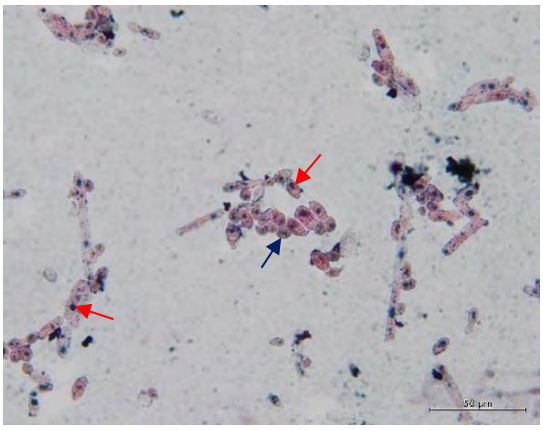
ภาคผนวก ข
การคัดเลือกสายพันธุ์กลายโดย oil droplet screening

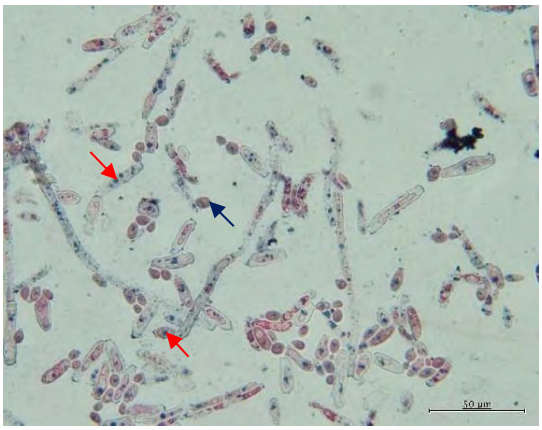
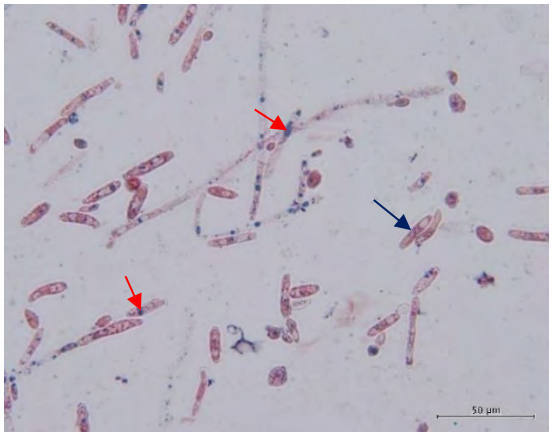
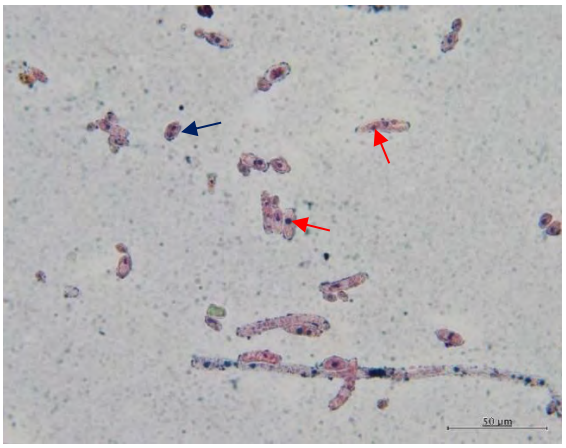
ภาคผนวก ข

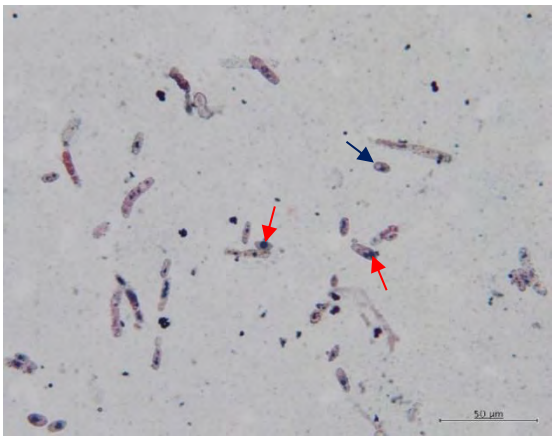
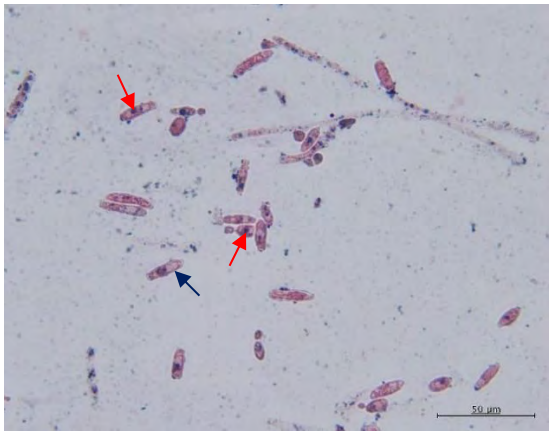
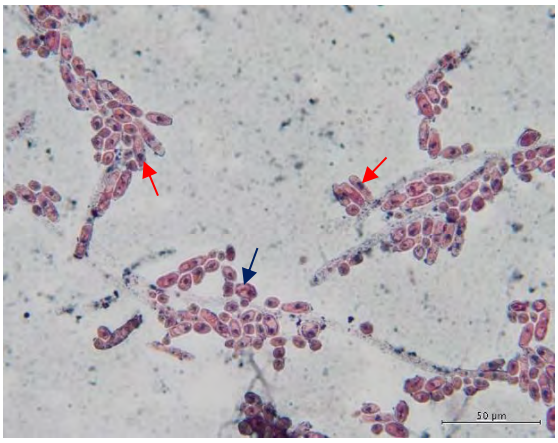
ตารางที่ ข.1 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายโดย oil droplet screening

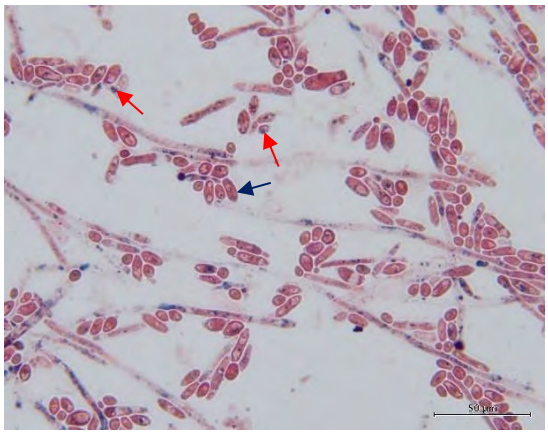
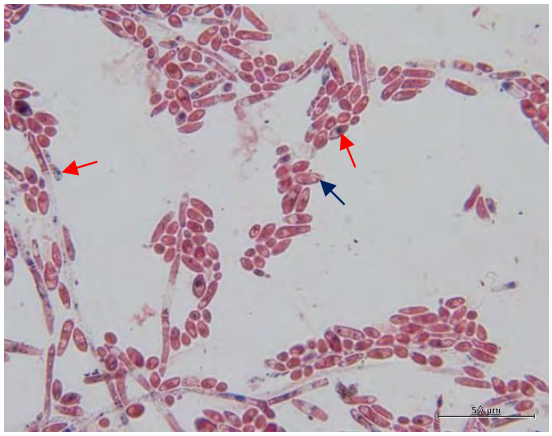
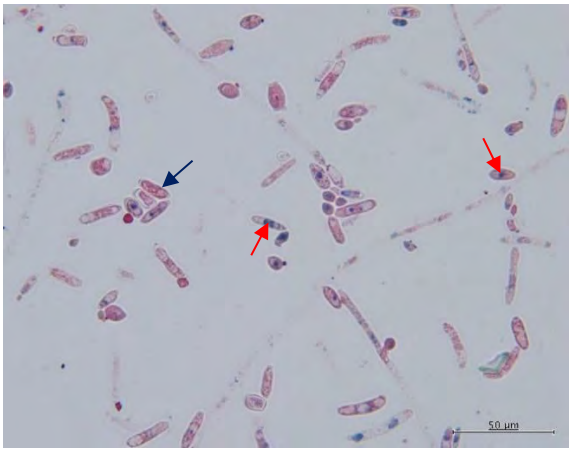
สายพันธุ์	รูปภาพ	ปริมาณไขมันในเซลล์	หมายเหตุ
WT		0	*
YLCe15_01		++	*
YLCe15_02		+	*

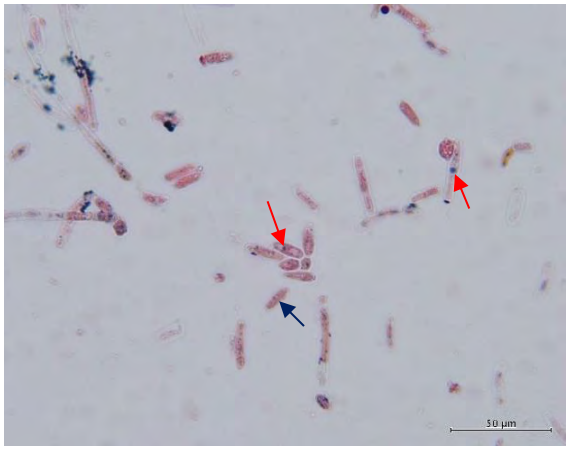
สายพันธุ์	รูปภาพ	ปริมาณไขมันในเซลล์	หมายเหตุ
YLCe15_03		+++	*
YLCe15_04		+	*
YLCe15_05		+++	*

สายพันธุ์	รูปภาพ	ปริมาณไขมันในเซลล์	หมายเหตุ
YLCe15_06		++	*
YLCe15_07		+++	*
YLCe15_08		+	*

สายพันธุ์	รูปภาพ	ปริมาณไขมันในเซลล์	หมายเหตุ
YLCe15_09		+++	*
YLCe15_10		++	*
YLCe15_11		+	*

สายพันธุ์	รูปภาพ	ปริมาณไขมันในเซลล์	หมายเหตุ
YLCe15_12		+	*
YLCe15_13		++	*
YLCe15_14		+++	*

สายพันธุ์	รูปภาพ	ปริมาณไขมันในเซลล์	หมายเหตุ
YLCe15_15		+	*
YLCe15_16		0	*
YLCe15_17		++	*

สายพันธุ์	รูปภาพ	ปริมาณไขมันในเซลล์	หมายเหตุ
YLCe15_18		++	*
YLCe15_19		+	*
YLCe15_20		0	*

*กำหนดให้ เครื่องหมาย + แทนปริมาณของ oil droplet ที่สะสมภายในเซลล์ยีสต์

โดย 0 คือ ปริมาณ oil droplet ที่สะสมในยีสต์เท่ากับสายพันธุ์ดั้งเดิม (WT)

\+ คือ ปริมาณ oil droplet มากกว่า WT 1 - 25 เปอร์เซ็นต์

++ คือ ปริมาณ oil droplet มากกว่า WT 26 - 50 เปอร์เซ็นต์

+++ คือ ปริมาณ oil droplet มากกว่า WT 51 - 75 เปอร์เซ็นต์

++++ คือ ปริมาณ oil droplet มากกว่า WT 76 - 100 เปอร์เซ็นต์

และกำหนดให้สัญลักษณ์ ดังนี้

→ แทน oil droplet

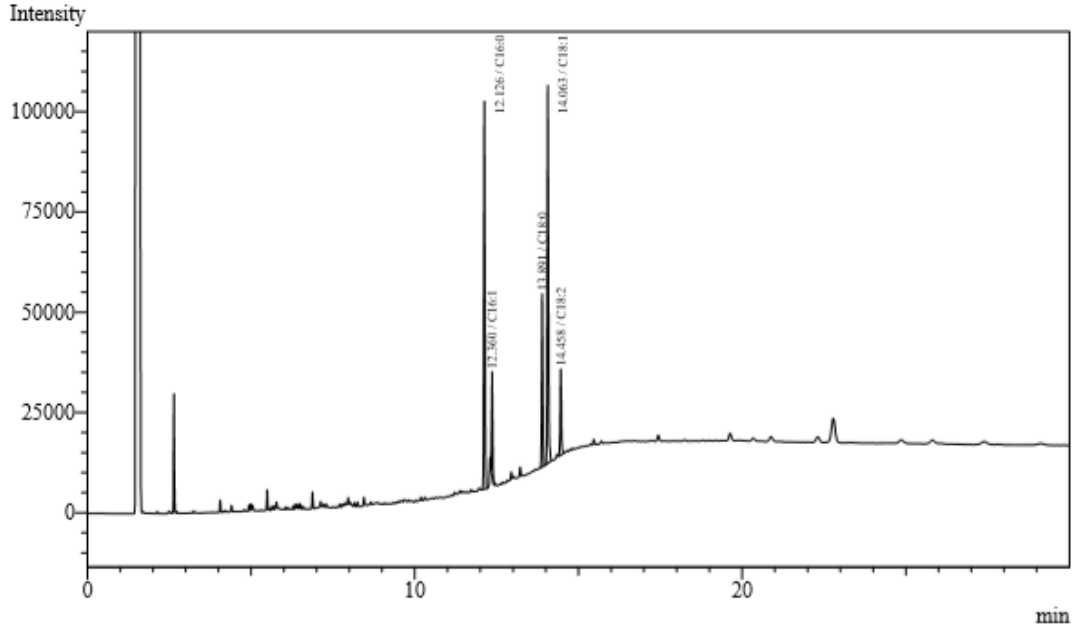
→ แทน เซลล์ยีสต์

ภาคผนวก ค

ผล Gas Chromatography

Analysis Date & Time : 6/1/2548 0:54:18
User Name : Admin
Vial# : 9
Sample Name : WT1
Sample ID :
Sample Type : Unknown
Injection Volume : 1.00
ISTD Amount :

Data Name : D:\NamPim\ÃÇÁ 10.03.2020\WT1 edit.gcd
Method Name : D:\mink\Fatty acid profiles used.gcm

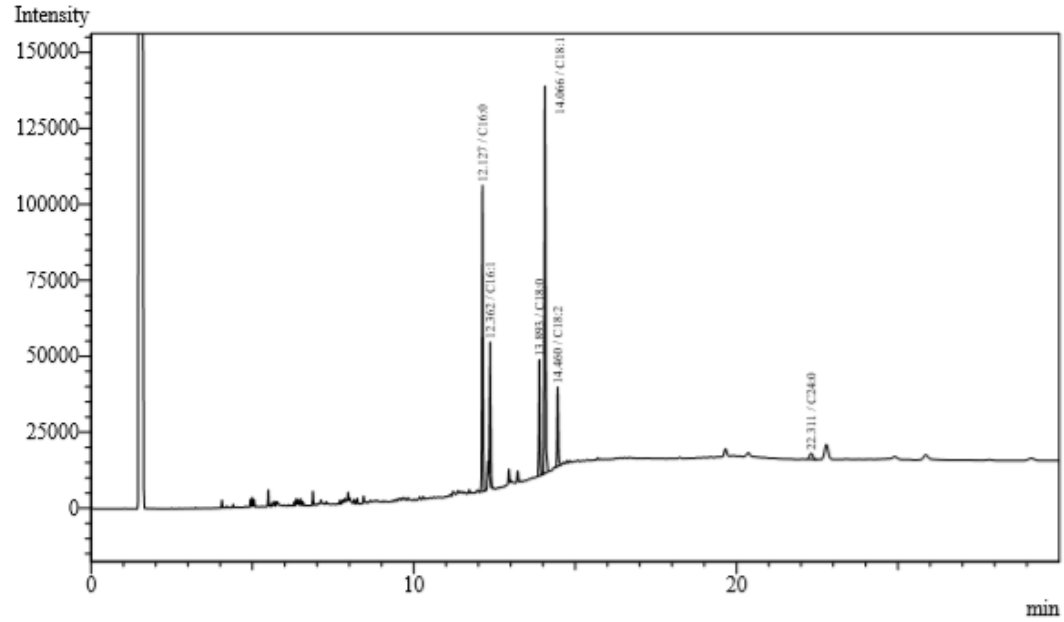


Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	12.126	220452	95856	33.388	%		3	C16:0
2	12.360	54967	25798	8.325	%		4	C16:1
3	13.891	101346	42958	15.349	%		5	C18:0
4	14.063	229760	93812	34.798	%		6	C18:1
5	14.458	53742	21170	8.139	%		7	C18:2
Total		660267	279594					

ภาพที่ ค.1 ผล Gas Chromatography จากไขมันที่สกัดได้จากยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) รุ่นที่ 1

Analysis Date & Time : 6/1/2548 2:47:09
User Name : Admin
Vial# : 12
Sample Name : WT3
Sample ID :
Sample Type : Unknown
Injection Volume : 1.00
ISTD Amount :

Data Name : D:\NamPim\ÃÇÁ 10.03.2020\WT3 edit.gcd
Method Name : D:\mink\Fatty acid profiles used.gcm

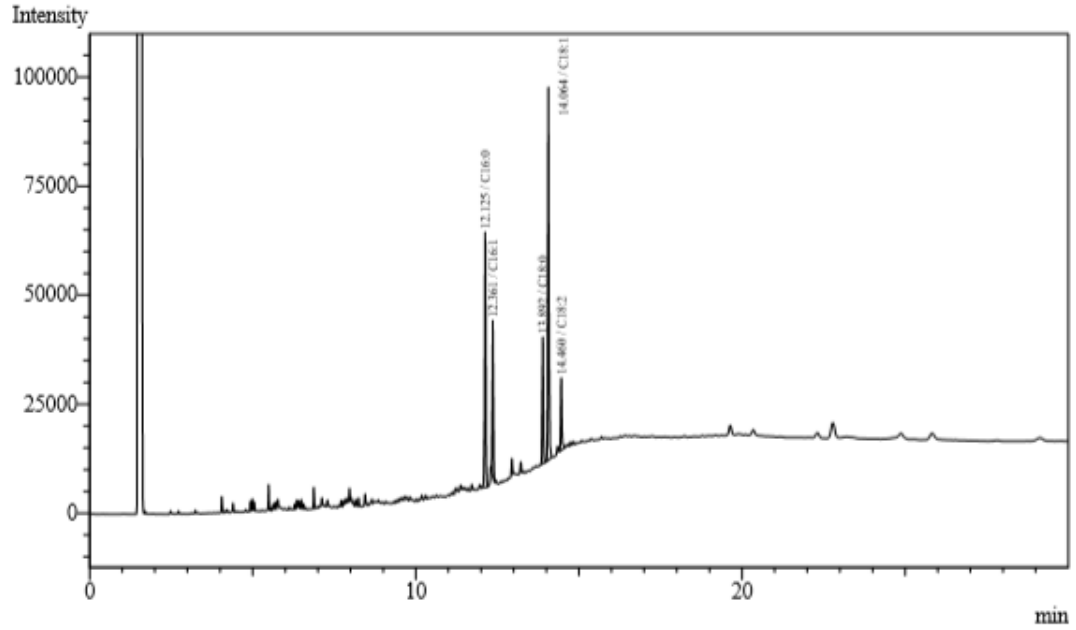


Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	12.127	233390	100299	28.790	%		3	C16:0
2	12.362	94950	44389	11.713	%		4	C16:1
3	13.893	89308	37797	11.017	%		5	C18:0
4	14.066	313950	125821	38.728	%		6	C18:1
5	14.460	64937	25999	8.010	%		7	C18:2
6	22.311	14129	1938	1.743	%		12	C24:0
Total		810664	336243					

ภาพที่ ค.2 ผล Gas Chromatography จากไขมันที่สกัดได้จากยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) รุ่นที่ 3

Analysis Date & Time : 6/1/2548 1:31:52
User Name : Admin
Vial# : 10
Sample Name : G1
Sample ID :
Sample Type : Unknown
Injection Volume : 1.00
ISTD Amount :

Data Name : D:\NamPim\ÃÇÀ 10.03.2020\G1 edit.gcd
Method Name : D:\mink\Fatty acid profiles used.gcm

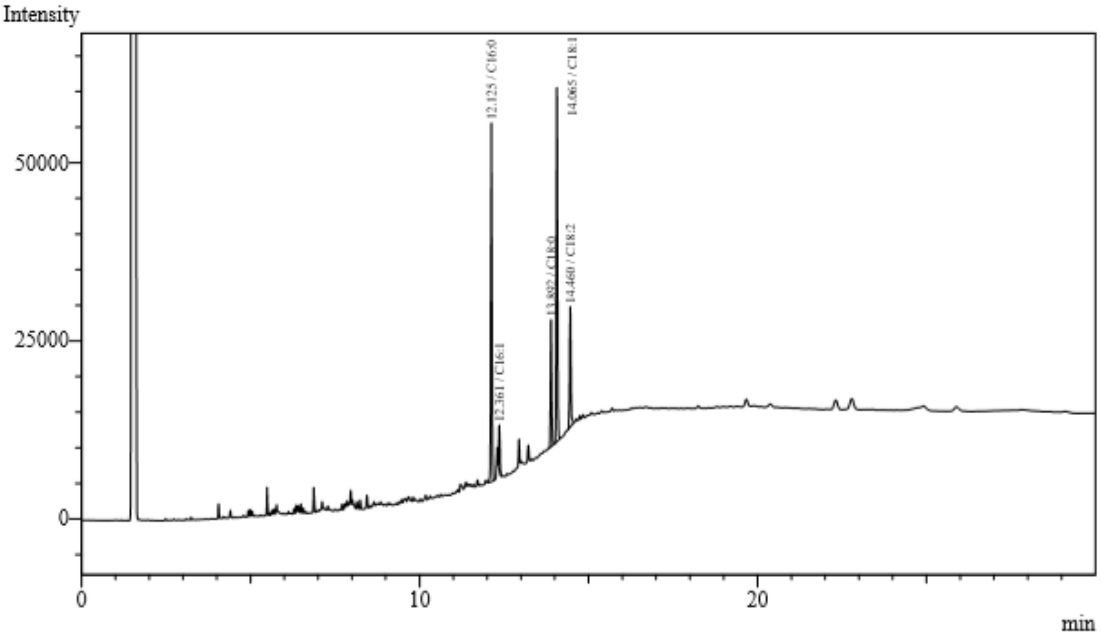


Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	12.125	137139	57974	25.807	%		3	C16:0
2	12.361	76067	35473	14.315	%		4	C16:1
3	13.892	69392	28874	13.058	%		5	C18:0
4	14.064	207476	85199	39.044	%		6	C18:1
5	14.460	41322	16468	7.776	%		7	C18:2
Total		531396	223988					

ภาพที่ ค.3 ผล Gas Chromatography จากไขมันที่สกัดได้จากยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์กลายไอโซเลต YLCe15_07 รุ่นที่ 1

Analysis Date & Time : 6/1/2548 3:24:41
User Name : Admin
Vial# : 13
Sample Name : G3
Sample ID :
Sample Type : Unknown
Injection Volume : 1.00
ISTD Amount :

Data Name : D:\NamPim\ÃÇÀ 10.03.2020\G3 edit.gcd
Method Name : D:\mink\Fatty acid profiles used.gcm

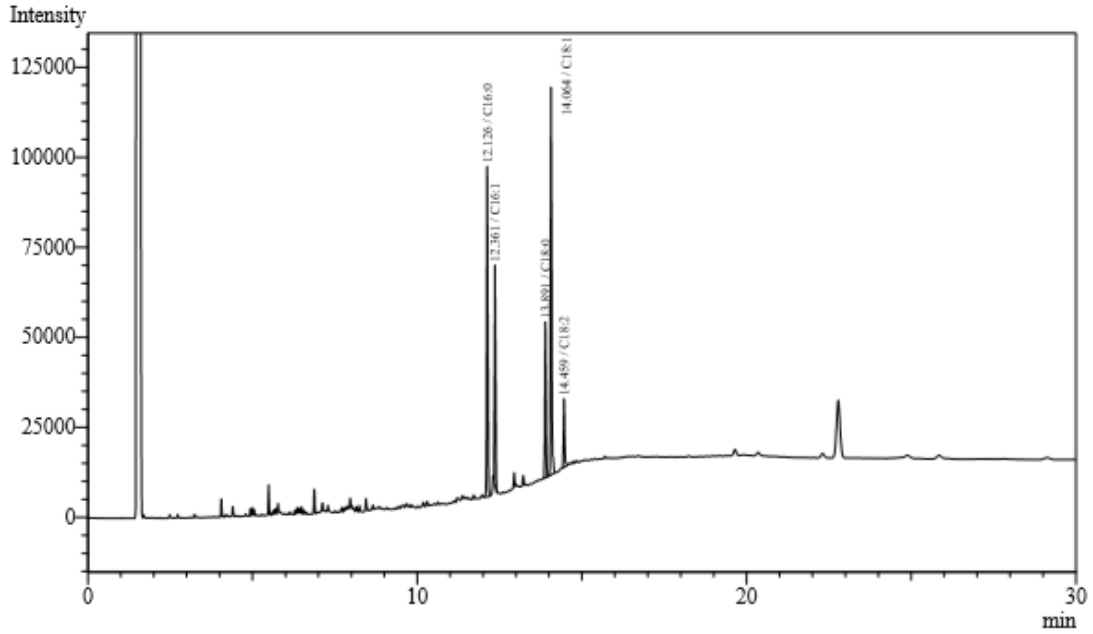


Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	12.125	117369	49681	35.031	%		3	C16:0
2	12.361	12394	6124	3.699	%		4	C16:1
3	13.892	42562	17728	12.703	%		5	C18:0
4	14.065	120172	49440	35.867	%		6	C18:1
5	14.460	42547	16793	12.699	%		7	C18:2
Total		335044	139766					

ภาพที่ ค.4 ผล Gas Chromatography จากไขมันที่สกัดได้จากยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์กลายไอโซเลต YLCe15_07 รุ่นที่ 3

Analysis Date & Time : 6/1/2548 2:09:31
User Name : Admin
Vial# : 11
Sample Name : N1
Sample ID :
Sample Type : Unknown
Injection Volume : 1.00
ISTD Amount :

Data Name : D:\NamPim\ÃÇÀ 10.03.2020\N1 edit.gcd
Method Name : D:\mink\Fatty acid profiles used.gcm

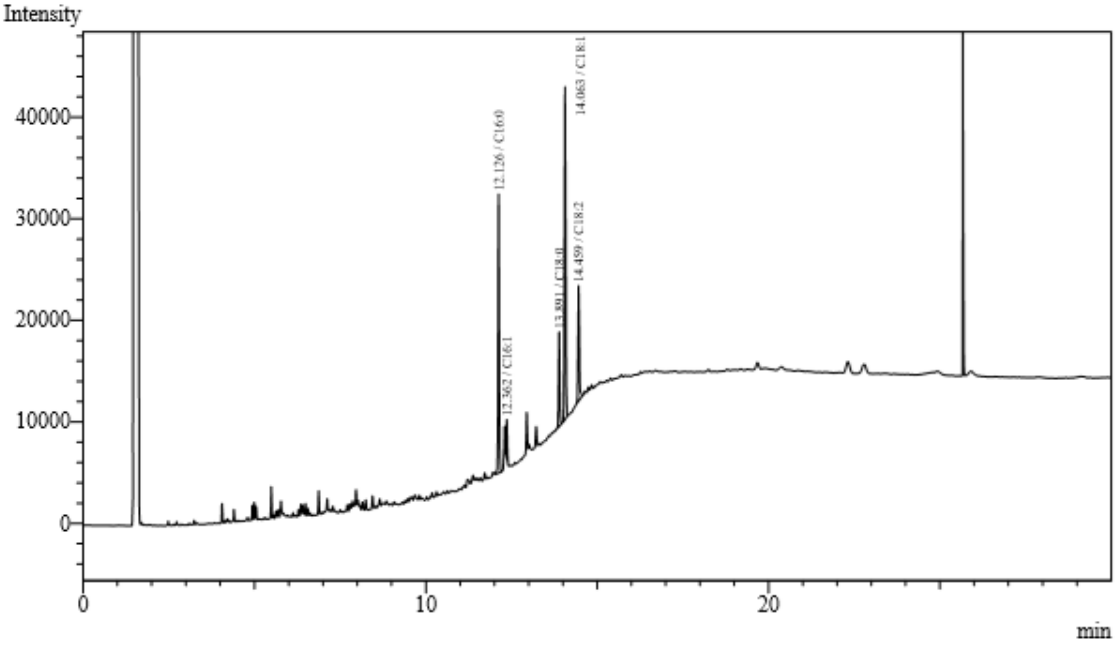


Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	12.126	208652	90854	27.515	%		3	C16:0
2	12.361	134117	60866	17.686	%		4	C16:1
3	13.891	102022	43076	13.454	%		5	C18:0
4	14.064	265947	107286	35.071	%		6	C18:1
5	14.459	47574	18790	6.274	%		7	C18:2
Total		758312	320872					

ภาพที่ ค.5 ผล Gas Chromatography จากไขมันที่สกัดได้จากยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์กลายไอโซเลต YLCe15_14 รุ่นที่ 1

Analysis Date & Time : 6/1/2548 4:02:12
User Name : Admin
Vial# : 14
Sample Name : N3
Sample ID :
Sample Type : Unknown
Injection Volume : 1.00
ISTD Amount :

Data Name : D:\NamPim\ÃÇÀ 10.03.2020\N3 edit.gcd
Method Name : D:\mink\Fatty acid profiles used.gcm



Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	12.126	63827	27221	31.830	%		3	C16:0
2	12.362	7263	3709	3.622	%		4	C16:1
3	13.891	22467	9279	11.204	%		5	C18:0
4	14.063	78344	32549	39.070	%		6	C18:1
5	14.459	28623	11260	14.274	%		7	C18:2
Total		200524	84018					

ภาพที่ ค.6 ผล Gas Chromatography จากไขมันที่สกัดได้จากยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์กลายไอโซเลต YLCe15_14 รุ่นที่ 3