โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ	การคัดกรองและตรวจสอบยีน *ACC1* ของยีสต์ผลิตไขมันในของเสียจากโรงงาน
ชื่อนิสิต	นายภูมิภัทร นิลทยา
เลขประจำตัวนิสิต	5832134923
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
ปีการศึกษา	2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

การคัดกรองและตรวจสอบยีน *ACC1* ของยีสต์ผลิตไขมันในของเสียจากโรงงาน

นายภูมิภัทร นิลทยา

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2561

Screening and detecting *ACC1* gene from oleaginous yeasts in waste from factory

Mr. Poompat Niltaya

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 2018

ชื่อเรื่อง	การคัดกรองและตรวจสอบยีน ACC1 ของยีสต์ผลิตไขมันในของเสียจากโรงงาน
ชื่อนิสิต	ภูมิภัทร นิลทยา
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล
ปีการศึกษา	2561

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ อนุมัติให้โครงงานวิทยาศาสตร์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์

คณะกรรมการสอบโครงงานวิทยาศาสตร์

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	การคัดกรองและตรวจสอบยีน *ACC1* ของยีสต์ที่สามารถผลิตไขมันในของเสียจากโรงงาน
ชื่อนิสิต	ภูมิภัทร นิลทยา
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน	รองศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล
ปีการศึกษา	2561

บทคัดย่อ

ยีสต์สะสมไขมันเป็นจุลินทรีย์ทางเลือกหนึ่งสำหรับการผลิตไขมันประเภทไตรเอซิลกลีเซอรอล ซึ่งมีปริมาณไขมันสะสมมากกว่าร้อยละ 20 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง จุดประสงค์ของการศึกษานี้คือการคัดกรองยีสต์สะสมไขมันจากของเสียและของเหลือจากการแปรรูปมะพร้าวจากบริษัท เทพผดุงพรมะพร้าว จำกัด จังหวัดนครปฐม ประเทศไทย หลังจากการทดสอบตัวอย่างยีสต์ที่คัดกรองได้ด้วย Sudan black B พบยีสต์ที่มีการติดสีของหยดน้ำมันทั้งหมด 4 ไอโซเลท คือ TPD1 TPD2 TPD3 และ TPD4 ซึ่งยีสต์ทั้ง 4 ไอโซเลทจะถูกเลือกสำหรับการทดสอบวัดปริมาณไขมันที่ผลิตได้ โดยผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่า ยีสต์ตัวอย่าง TPD2 TPD3 และ TPD4 ซึ่งเป็นตัวอย่างยีสต์ที่คัดกรองได้จาก กากมะพร้าวสีดำและบ่อน้ำเสียรวม ถูกระบุว่าเป็นยีสต์สะสมไขมันเนื่องจากยีสต์ TPD2 TPD3 และ TPD4 มีปริมาณไขมันสะสมร้อยละ 33.18 32.05 และ 28.87 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ นอกจากนี้จากการศึกษาลำดับเบสบนยีน 18S rRNA พบว่ายีสต์ TPD2 ถูกระบุว่าเป็นยีสต์ชนิด *Saccharomyces cerevisiae* ส่วนยีสต์ TPD3 และ TPD4 *Candida tropicalis* ผลการวิเคราะห์กรดไขมันซึ่งเป็นกรดไขมันหลักที่สกัดได้จากเชื้อ *S. cerevisiae* คือ กรดโอเลอิก กรดปาลมิโตเลอิก กรดปาลมิติก และ กรดสเตียริก และ กรดไขมันหลักที่สกัดได้จากเชื้อ *C. tropicalis* สายพันธุ์ TPD3 และ TPD4 คือ กรดโอเลอิก กรดลิโนเลอิก กรดปาลมิติก

คำสำคัญ: ยีสต์สะสมไขมัน, กรดไขมัน, ยีน *ACC1*

Title	Screening and detecting *ACC1* gene of oleaginous yeast in waste from factories
Student name	Poompat Niltaya
Program	Genetics
Department	Botany
Advisor	Assoc. Prof. Dr. Warawut Chulalaksananukul
Acardemic year	2018

Abstract

Oleaginous yeasts are one alternative microorganism that can accumulate high amount of triacylglycerol lipids greater than 20% of dry cell mass. The objective of this study is to screen oleaginous yeasts from wastes and coconut residue which collected from Theppadungporn coconut Co. Ltd. at Nakhon pathom province, Thailand. When applying Sudan black B tests, 4 isolates namely TPD1, TPD2, TPD3 and TPD4 were selected to test their lipid content and the results showed that stains TPD2, TPD3 and TPD4 isolated from black coconut residue, cesspool and equipment washed water, were identified as oleaginous yeasts with 33.18%, 32.05% and 28.87% of dry cell mass, respectively. In addition, based on the 18S rRNA gene, TPD2 was identified as *Saccharomyces cerevisiae* and and TPD3 and TPD4 were identified as *Candida tropicalis*. The major fatty acids of *S. cerevisiae* were oleic acid, palmitoleic acid, palmitic acid and stearic acid and *C. tropicalis* were oleic acid, linoleic acid and palmitic acid.

Keywords: oleaginous yeast, fatty acid, *ACC1* gene

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องด้วยความกรุณาของผู้ที่เกี่ยวข้องทุกฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานวิทยาศาสตร์ที่กรุณาให้คำแนะนำสั่งสอน ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการทำโครงงานวิทยาศาสตร์ และกรุณาช่วยเหลือเป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ ที่กรุณาเสียสละเวลาเป็นกรรมการสอบโครงงานวิทยาศาสตร์ พร้อมทั้งให้คำแนะนำ ช่วยตรวจสอบแก้ไขให้โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้มีความถูกต้องและสมบูรณ์

กราบขอบพระคุณ ดร.วรรณพร วัฒน์สุนธร และ นางสาว ณัฏฐา จึงเจริญพานิชย์ ที่ช่วยให้คำแนะนำตลอดการทำโครงงานวิทยาศาสตร์ และกรุณาช่วยเหลือในทุกด้านเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อประสบการณ์ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาสนับสนุนงานวิจัย

ขอขอบพระคุณหน่วยปฏิบัติการเชื้อเพลิงชีวภาพ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ใช้อุปกรณ์และสถานที่สำหรับการศึกษาวิจัยในโครงงานวิทยาศาสตร์นี้

ขอขอบพระคุณคณะจารย์ทุกท่านและผู้มีส่วนเกี่ยวข้องทุกคนที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้อง ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในทุกด้านอย่างเต็มที่

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
กิตกรรมประกาศ	ช
สารบัญ	ซ
สารบัญภาพ	ฌ
สารบัญตาราง	ญ
บทที่	
1 บทนำ	1
2 การตรวจเอกสาร	3
3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการศึกษา	9
4 ผลการศึกษา	16
5 อภิปรายผลการศึกษา	23
6 สรุปผลการศึกษา	25
เอกสารอ้างอิง	26
ภาคผนวก	30
ภาคผนวก ก	31
ภาคผนวก ข	33
ภาคผนวก ค	38

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การเปลี่ยนแปลงของสารในกระบวนการ Fatty acid biosynthesis	6
2	กระบวนการ TAG synthesis ของของยีสต์ *saccharomyces cerevisiae*	7
3	แผนภาพการทำงานของยีน *Acc1*	7
4	โครงสร้างของ Sudan black B และการย้อมติดสีภายในเซลล์	8
5	ภาพตัวอย่างจาก บริษัท เทพผดุงพรมะพร้าว จำกัด	9
6	ผลการคัดกรองเชื้อด้วยวิธี streak plate	16
7	ผลการย้อม sudan black B ของยีสต์ที่คัดกรองจากตัวอย่าง TPD 1	17
8	ผลการย้อม sudan black B ของยีสต์ที่คัดกรองจากตัวอย่าง TPD 2	17
9	ผลการย้อม sudan black B ของยีสต์ที่คัดกรองจากตัวอย่าง TPD 3	18
10	ผลการย้อม sudan black B ของยีสต์ที่คัดกรองจากตัวอย่าง TPD 4	18
11	ผลการทำ PCR ยีน *ACC1* จากยีสต์ที่จำแนกได้	20
12	โครมาโทรแกรม แสดงกรดไขมันที่สกัดได้จากยีสต์สายพันธุ์ TPD 2	21
13	โครมาโทรแกรม แสดงกรดไขมันที่สกัดได้จากยีสต์สายพันธุ์ TPD 3	22
14	โครมาโทรแกรม แสดงกรดไขมันที่สกัดได้จากยีสต์สายพันธุ์ TPD 4	23

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ร้อยละปริมาณน้ำมันที่ผลิตได้โดยน้ำหนักแห้งของจุลินทรีย์สะสมไขมันแต่ละชนิด	4
2	ประเภทของไขมันที่จุลินทรีย์สะสมไขมันแต่ละชนิดผลิตได้	4
3	ไพร์เมอร์ยีน *ACC1*ของยีสต์ทั้ง 3 ชนิด	19
4	ผลการสกัดไขมันด้วยวิธี Bligh and Dyer	21

บทที่ 1

บทนำ

ยีสต์สะสมไขมัน (oleaginous yeast) คือ ยีสต์ที่สามารถผลิตและสะสมไขมันได้ร้อยละ 20 ถึงร้อยละ 70 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง (Lamers et al., 2016) ไขมันที่ยีสต์สร้างขึ้นเป็นไตรเอซิลกลีเซอรอลถึงร้อยละ 90 ซึ่งประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัวร้อยละ 44 จึงมีคุณสมบัติคล้ายกับน้ำมันจากเมล็ดพืช (Ratledge, 2002) เมื่อเปรียบเทียบกับพืช ไขมันจากยีสต์มีข้อดี คือสามารถผลิตได้ทุกช่วงฤดูกาล เจริญได้เร็วในระยะเวลาอันสั้น ใช้พื้นที่น้อย สามารถควบคุมการผลิต และสามารถใช้วัตถุดิบราคาถูกในการเจริญได้หลายชนิด (Xue et al., 2006; Angerbauer et al., 2008) ไขมันจากยีสต์จึงเป็นไขมันทางเลือกสำหรับการใช้ทางอุตสาหกรรมได้

ไตรเอซิลกลีเซอรอล (Triacylglycerol) หรือ ไขมัน (lipid) เป็นสารชีวโมเลกุลที่สำคัญในสิ่งมีชีวิต โดยไตรเอซิลกลีเซอรอลเกิดจากหมู่ไฮดรอกซิลในโมเลกุลของกลีเซอรอลทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิลของกรดไขมัน 3 โมเลกุล สิ่งมีชีวิตส่วนมากจึงเก็บสะสมไตรเอซิลกลีเซอรอลอยู่ในรูปพลังงานสำรอง ในยีสต์ปริมาตรไตรเอซิลกลีเซอรอลที่เก็บสะสมมีผลจากความแตกต่างของการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน เช่น ความแตกต่างของการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ acetyl-CoA carboxylase (ACC) รวมถึงแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงก็เป็นปัจจัยทำให้การสะสมและการผลิตไขมันของยีสต์แตกต่างกันด้วย (Chao, Yen and Ku, 2009)

ยีน *ACC1* คือ ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ ACC ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่เปลี่ยน acetyl-CoA ให้เป็น malonyl-CoA กระบวนการนี้ถือเป็นขั้นกำหนดปฏิกิริยาของกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันในยีสต์ จากการศึกษาพบว่า การควบคุมการแสดงออกของยีน *ACC1* มีผลทำให้การเก็บสะสมไขมันของยีสต์มีความรวดเร็วและมีปริมาณการสะสมมากขึ้น ทั้งนี้มีรายงานว่า การสังเคราะห์และเก็บสะสมไขมันมีความเกี่ยวข้องกับลำดับนิวคลิโอไทด์บนยีน *ACC1* ของยีสต์แต่ละชนิด (Wang et al., 2016; Bredeweg et al., 2017)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์มีมากมาย เช่น อุณหภูมิ แหล่งคาร์บอน หรือค่าความเป็นกรด อีกทั้งยังมีการค้นพบว่าหากอัตราส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจนในสิ่งแวดล้อมสูงจะส่งผลให้อัตราการเจริญและการสะสมไขมันในยีสต์จะสูงขึ้น (Manikandan and Viruthagiri, 2010) ของเสียและของ

เหลือจากกระบวนการผลิตในโรงงานโดยเฉพาะโรงงานมะพร้าวจึงเป็นแหล่งที่คาดว่าสามารถพบยีสต์ได้มาก เนื่องจากมีอุณหภูมิ แหล่งคาร์บอน รวมถึงอัตราส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจนสูง

ด้วยเหตุผลดังที่กล่าวมา โครงงานนี้จึงศึกษายีน *ACC1* ของยีสต์สะสมไขมันที่ได้ โดยคัดกรองในของเสียและของเหลือจากกระบวนการผลิตของโรงงาน การศึกษานี้จะทำให้ทราบถึงชนิดของยีสต์สะสมไขมันที่พบในกระบวนการผลิตของโรงงาน ซึ่งมีปัจจัยเหมาะสมต่อการดำรงชีพของยีสต์ เช่น สารอินทรีย์ ค่า pH ที่เป็นกรด และความชื้น ทำให้พบความหลากหลายของยีสต์มาก และทราบถึงความแตกต่างของลำดับนิวคลิโอไทด์บนยีน *ACC1* โดยการเปรียบเทียบกับ *Yarrowia lipolytica* ซึ่งเป็นยีสต์สะสมไขมันที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในการวิจัย เพราะการสะสมไขมันที่สูงถึงร้อยละ 43 และสามารถใช้ในทางอุตสาหกรรมได้ดี (Aggelis and Papanikolaou, 2002) อีกทั้งนำมาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีสต์สะสมไขมันที่คัดกรองได้จากฐานข้อมูล ทั้งนี้เพื่อนำไปสู่การใช้ประโยชน์จากยีสต์สะสมไขมันในอุตสาหกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์

1. คัดกรองยีสต์ที่สามารถผลิตน้ำมันในของเสียจากโรงงาน
2. ตรวจสอบยีน *ACC1* จากยีสต์ที่สามารถคัดแยกได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถคัดกรองยีสต์ที่สามารถผลิตไขมัน จากน้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำตาล
2. สามารถวิเคราะห์ยีน *ACC1* ของยีสต์ที่สามารถคัดกรองได้

บทที่ 2

การตรวจเอกสารของงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. **จุลินทรีย์สะสมไขมัน** (Oleaginous microorganisms)

จุลินทรีย์สะสมไขมันคือจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไขมันได้มากกว่าร้อยละ 20 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปัจจุบันมีการนำไขมันจากจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์ในด้านการผลิตไบโอดีเซล โดยใช้ชื่อว่า single cell oils (SCO) ซึ่งจุลินทรีย์สะสมไขมันทุกชนิดสามารถผลิตน้ำมันชนิดนี้ได้ โดยในระยะเวลาหลายปีที่ผ่านมา ค่าใช้จ่ายในการใช้จุลินทรีย์สะสมไขมันก็เริ่มลดต่ำลงเนื่องจากมีงานวิจัยที่วิจัยเกี่ยวกับการลดต้นทุนในการเลี้ยงจุลินทรีย์เกิดขึ้นมากมาย (Ratledge, 2004) อีกทั้งจากการวิจัยน้ำมันจากจุลินทรีย์สะสมไขมัน พบว่าไขมันที่จุลินทรีย์สะสมมีคุณสมบัติคล้ายกับน้ำมันพืช (Aggelis and Sourdis, 1997) เมทิล-เอสเทอร์และสบู่ (Metzger and Largeau, 2005) หลายปีต่อมาการศึกษาที่เกี่ยวข้องเกี่ยวกับปริมาณการสะสมไขมัน ความเกี่ยวข้องด้านพันธุกรรมต่อการผลิตไขมัน รวมถึงสภาพแวดล้อมที่สามารถผลิตไขมันได้ดีที่สุดของจุลินทรีย์สะสมไขมันได้ถูกศึกษามาอย่างต่อเนื่องจนถึงในปัจจุบัน

1.1 **ประเภทของจุลินทรีย์สะสมไขมัน**

1.สาหร่ายขนาดเล็ก (Microalgaes) เป็นจุลินทรีย์สะสมไขมันที่สามารถสร้างน้ำมันได้จากการย่อยสลายคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเป็นต้นแบบของการใช้น้ำมันใช้แล้วมาเปลี่ยนเป็นน้ำมันใหม่โดยใช้สาหร่ายชนิดนี้เป็นตัวกลาง ข้อดีของการผลิตน้ำมันจากสาหร่ายคือ สามารถผลิตไขมันได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสาหร่ายสามารถผลิตไขมันได้มากถึง ร้อยละ 70 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ถ้าเลี้ยงในสภาพที่เหมาะสม แต่ข้อเสียของสาหร่ายนั้นต้องใช้พื้นที่ในการเลี้ยงมากและใช้เวลามากในการผลิตน้ำมันเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์สะสมไขมันชนิดอื่น โดยสาหร่ายขนาดเล็กที่พบว่าสะสมไขมันในปริมาณมากแสดงดังตารางที่ 1 และส่วนประกอบกรดไขมันที่พบแสดงดังตารางที่ 2 (Anderson, 1992)

2.แบคทีเรีย (Bacteria) เป็นจุลินทรีย์สะสมไขมันที่มีข้อดีคือสามารถเจริญเติบโตได้เร็ว ได้ผลผลิตเร็ว และใช้ทรัพยากรในการเลี้ยงต่ำ เมื่อเทียบกับจุลินทรีย์สะสมไขมันชนิดอื่น แต่แบคทีเรียผลิตไขมันไม่นิยมในทางอุตสาหกรรมเพราะการสกัดน้ำมันจากแบคทีเรียนั้นเป็นไปได้ยาก เป็นผลมาจากการผลิตไขมันที่ถูกส่งออกมาจากเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกร่วมกับสารชนิดอื่น ทำให้น้ำมันนั้นปนเปื้อนได้ง่าย โดยแบคทีเรียที่พบว่าสะสมไขมันในปริมาณมากแสดงดังตารางที่ 1 และส่วนประกอบกรดไขมันที่พบแสดงดังตารางที่ 2 ((Alvarez and Steinbuchel, 2002)

3.ยีสต์ (Yeasts) เป็นจุลินทรีย์สะสมไขมันที่นิยมใช้มากที่สุดในทางอุตสาหกรรมเนื่องจากการผลิตและสะสมไขมันที่มากแม้จะไม่เทียบเท่ากับสาหร่ายแต่ทดแทนได้ด้วยการใช้พื้นที่และทรัพยากรในการเลี้ยงที่ต่ำ ใช้เวลาได้รวดเร็วกว่าสาหร่าย รวมถึงการที่ยีสต์และรานั้นสะสมไขมันไว้ภายในเซลล์ทำให้การสกัดไขมันนั้นสามารถทำได้ง่ายและมีการปนเปื้อนต่ำกว่าแบคทีเรีย โดยยีสต์ที่พบว่าสะสมไขมันในปริมาณมากแสดงดังตารางที่ 1 และส่วนประกอบกรดไขมันที่พบแสดงดังตารางที่ 2 (Ratledge, 1982)

ตารางที่ 1 ร้อยละปริมาณน้ำมันที่ผลิตได้โดยน้ำหนักแห้งของจุลินทรีย์สะสมไขมันแต่ละชนิด (Meng et al., 2009)

Microorganism	Oil content (% dry weight)	Microorganisms	Oil content (% dry weight)
Microalgae		**Yeast**	
Botryococcus braunll	25-75	*Candida curvata*	58
Cylindrotheca sp.	16-37	*Cryptococcus albidus*	65
Nitzschia sp.	45-47	*Lipomyces starkeyi*	64
Schizochytrium sp.	50-77	*Rhodotorula glutinis*	72
Bacterium		**Fungi**	
Arthrobacter sp.	>40	*Aspergillus oryzae*	57
Acinetobacter calcoaceticus	27-38	*Mortierella isabellina*	86
Rhodococcus opacus	24-25	*Humicola lanuginose*	75
Bacillus alcalophilus	18-24	*Mortierella vinacea*	66

ตารางที่ 2 ประเภทของไขมันที่จุลินทรีย์สะสมไขมันแต่ละชนิดผลิตได้ (Meng et al., 2009)

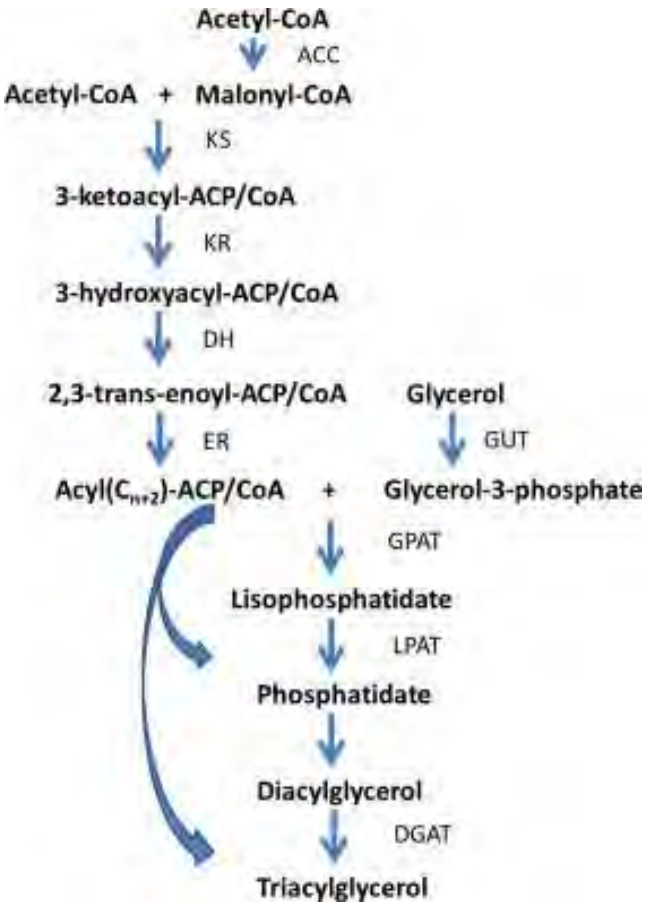
Microorganisms	Lipid composition (w/total lipid)					
	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Microalgae	12-21	55-57	1-2	58-60	4-20	14-30
Yeast	11-37	1-6	1-10	28-66	3-24	1-3
Fungi	7-23	1-6	2-6	19-81	8-40	4-42
Bacterium	8-10	10-11	11-12	25-28	14-17	-

1.2 **ยีสต์สะสมไขมัน** (Oleaginous yeasts)

ยีสต์สะสมไขมัน คือยีสต์ที่สามารถสร้างและเก็บสะสมไขมันได้ร้อยละ 20 ถึงร้อยละ 70 โดยน้ำหนักแห้ง ไขมันที่ยีสต์สะสมร้อยละ 80 ถึงร้อยละ 90 จะเป็นไตรเอซิลกลีเซอรอล (TAGs) ซึ่งไตรเอซิลกลีเซอรอลที่ยีสต์ผลิตได้มีคุณสมบัติคล้ายกับน้ำมันพืชที่ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล โดยคุณสมบัติของไขมันนั้นมีความหลากหลายไปตามชนิดของยีสต์ ปัจจุบันยีสต์สะสมไขมันที่เป็นที่รู้จักคือยีสต์ในวงศ์ *Candida Cryptococcus Lipomyces Rhodosporidium Rhodotorula Trichosporon* และ *Yarrowia* การที่ยีสต์มีการเจริญเติบโตเร็ว ผลิตไขมันได้ปริมาณมาก และควบคุมปัจจัยการเจริญเติบโตได้ง่าย ทำให้ยีสต์เป็นทางเลือกที่ดีในการใช้ผลิตไบโอดีเซลในปัจจุบัน (Evans and Ratledge, 1984)

2. **การสังเคราะห์กรดไขมัน**

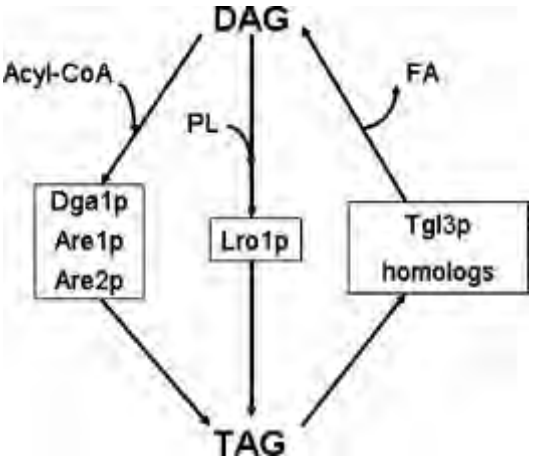
การสังเคราะห์ไขมัน (Fatty acid biosynthesis) เกิดขึ้นในไซโตซอล (cytosol) กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันมีสารตั้งต้นคือ acetyl-CoA จนได้ผลิตภัณฑ์คือ กรดไขมันสายยาวที่มีคาร์บอนมากกว่า 14 อะตอม ขั้นตอนแรกของการสังเคราะห์กรดไขมันคือการเปลี่ยน acetyl-CoA เป็น malonyl-CoA โดยใช้เอนไซม์ acetyl-CoA carboxylase ขั้นที่ 2 จะเป็นการเปลี่ยน malonyl-CoA ให้กลายเป็น ester-CoA สายยาวโดยเริ่มจากการควบแน่นระหว่าง malonyl-CoA และ acetyl-CoA จนกลายเป็น 3-keto-acyl-ACP จากนั้นจะถูกรีดิวส์เป็น 3-kydroxyacyl-ACP ต่อมาจะเกิด dehydration ของ 3-hydroxyacyl-ACP ให้ผลผลิตคือ 2,3-trans-enoyl-ACP แล้วเกิดรีดักชันเป็น butyryl-ACP ขั้นตอนที่ 2 จะทำให้คาร์บอนใน acyl-ACP chain เพิ่มจาก malonyl-CoA 2 อะตอม เมื่อเกิดปฏิกิริยาซ้ำเป็นระยะเวลาหนึ่งจะได้ acyl chains อิ่มตัวที่มี คาร์บอน 16(palmitoyl-CoA) และ 18 อะตอม(stearoyl-CoA) เมื่อเกิด desaturated จะให้ผลผลิตคือ palmitoleyl-CoA (C16:1) และ oleoyl-CoA (C18:1) การเปลี่ยนแปลงชนิดและคุณสมบัติของไขมันจะขึ้นอยู่กับความสามารถของเอนไซม์ที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ทำให้ไขมันที่สะสมในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันแสดงดังภาพที่ 1 (Tehlivets et al., 2007)



ภาพที่ 1. การเปลี่ยนแปลงของสารในกระบวนการ Fatty acid biosynthesis(Tang, Lee and chem, 2015)

2.1 การสังเคราะห์ไตรเอซิลกลีเซอรอลในยีสต์

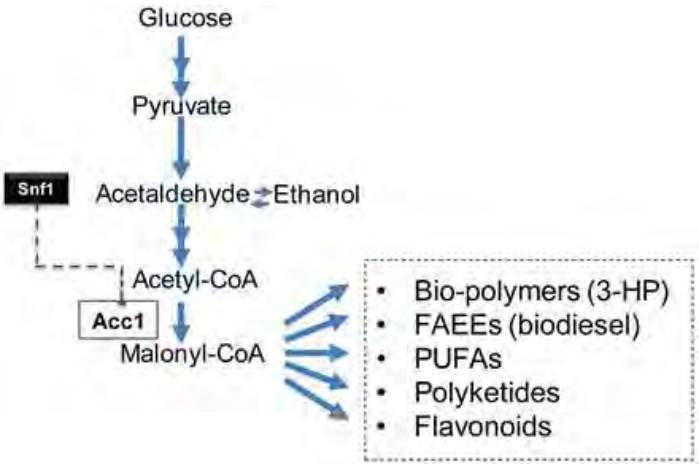
การสังเคราะห์ไตรเอซิลกลีเซอรอล (TAG biosynthesis) เป็นกระบวนการเปลี่ยน diacylglecerol (DAG) ให้กลายเป็น ไตรเอซิลกลีเซอรอล โดยเอนไซม์ที่ทำให้มีปฏิกิริยาเกิดขึ้นคือ acyl-CoA diacylglycerol O-acyltranferase (DGAT) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ถูกสร้างต่างกันในยีสต์แต่ละชนิดเช่นในยีสต์สะสมไขมัน *Yarrowian lipolytica* จะใช้ยีน *DGA1* และ*DGA2* สำหรับสร้างเอนไซม์ DGAT แสดงดังภาพที่ 2 (Athenstaedt, 2011)



ภาพที่ 2. กระบวนการ TAG synthesis ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (Wagner and Daum, 2005)

2.2 ยีน *ACC1*

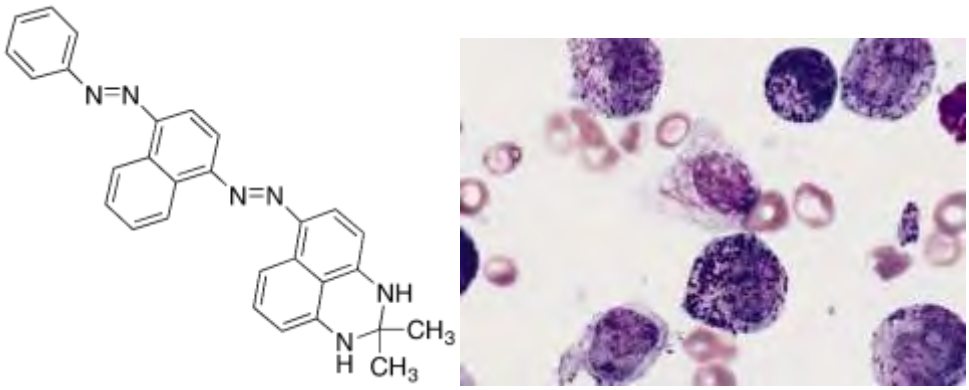
ACC1 เป็นยีนที่มีความสำคัญในการสร้าง acetyl-CoA carboxylase ซึ่งเป็นขั้นตอนแรกของการสังเคราะห์กรดไขมันมีหน้าที่เปลี่ยน acetyl-CoA เป็น malonyl-CoA และยังเป็นขั้นกำหนดปฏิกิริยาของการผลิตและสะสมไขมันในยีสต์สะสมไขมัน ซึ่ง *ACC1* นั้นถูกนำไปใช้สำหรับกระบวนการทางพันธุวิศวกรรมในการเพิ่มปริมาณการสร้างและเก็บสะสมไขมันในยีสต์ชนิดต่าง ๆ โดยการทำให้มีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้น รวมถึงการถ่ายยีนจากต่างสิ่งมีชีวิตก็มีผลทำให้สิ่งมีชีวิตที่ถูกตัดต่อยีนมีการสังเคราะห์และสะสมไขมันเพิ่มสูงขึ้นแสดงดังภาพที่ 3 (Hasslasher et al., 1992)



ภาพที่ 3. แผนภาพการทำงานของยีน *Acc1* (Shi et al., 2014)

3.Sudan black B

Sudan black B เป็นสารที่ไม่มีขั้วและมีขนาดเล็กจึงสามารถละลายได้ดีในไขมัน ทำให้สามารถนำสีย้อมชนิดนี้ไปย้อมไขมันในเซลล์ขนาดเล็กที่ต้องการได้ การย้อมติดสี sudan black B จะเกิดสีม่วงเข้มติดบริเวณที่เป็นไขมันภายในเซลล์หรือนอกเซลล์ที่ทำการย้อมแสดงดังภาพที่ 4 (Bain, 2017)



ภาพที่ 4. โครงสร้างของ Sudan black B และการย้อมติดสีภายในเซลล์

(ที่มา: https://atomscientific.com/product/Sudan-Black-B-Stain-Kit-Haematology-Version และ

http://www.polysciences.com/default/catalog-products/life-sciences/histology-microscopy/certified-dyes-stains/sudan-black-b-ci-26150-certified/)

4. **การสกัดน้ำมันด้วยวิธี** Bligh and Dyer

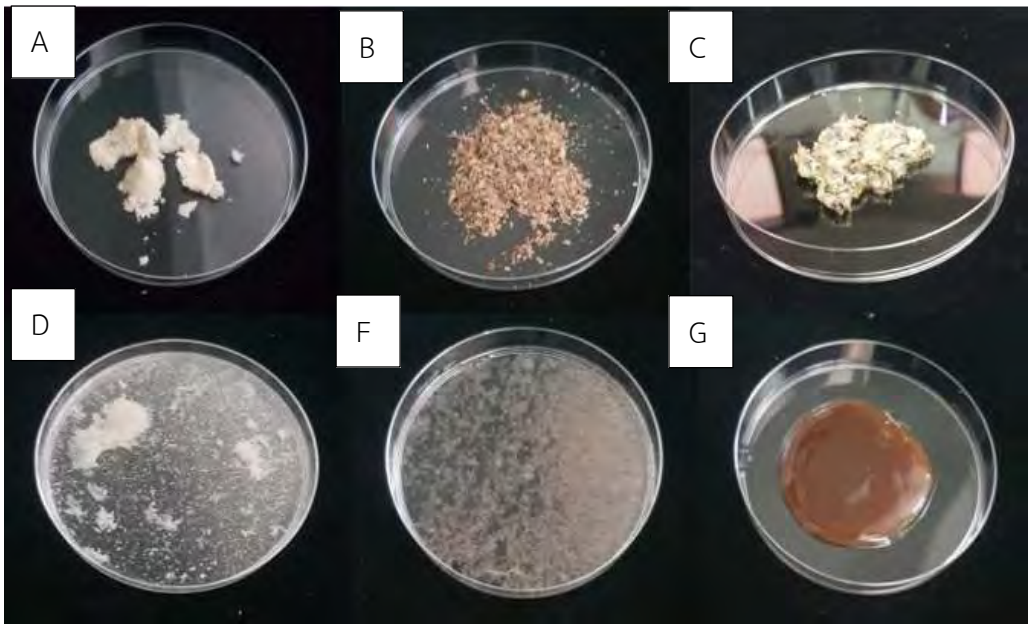
วิธี Bligh and Dyer เป็นวิธีการสกัดและแยกไขมันจากจุลินทรีย์และเนื้อเยื่อ โดยการใช้คลอโรฟอร์ม เมทานอล หรือน้ำ โดยวิธีการนี้ได้รับการทำซ้ำและถูกใช้ในงานวิจัยจำนวนมาก จึงถือว่าเป็น “gold standards” สำหรับการสกัดน้ำมัน โดยหลักการของวิธี Bligh and Dyer จะใช้หลักการทำละลายของตัวทำละลายที่มีขั้วและไม่มีขั้ว ไขมันซึ่งเป็นสารที่มีขั้วจะละลายอยู่ในชั้นคลอโรฟอร์ม ซึ่งเมื่อทำการระเหยคลอโรฟอร์ม จะได้ไขมันจากจุลินทรีย์ (Briel et al., 2017)

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ของเสียและของเหลือจากกระบวนการผลิตกะทิและน้ำมะพร้าว 6 ตัวอย่าง คือ กากมะพร้าวสีขาว (TPD 1) กากมะพร้าวสีดำ (TPD 2) บ่อน้ำเสียรวม (TPD 3) น้ำล้างจากกระบวนการผลิต (TPD 4) ของเสียจากกระบวนการ aeration (TPD 5) และบ่อพักน้ำเสียบ่อสุดท้าย (TPD 6) จาก บริษัท เทพผดุงพรมะพร้าว จำกัด จังหวัดนครปฐม เพื่อใช้เป็นตัวอย่างในการคัดกรองยีสต์ผลิตไขมัน โดยลักษณะของตัวอย่างแต่ละชนิดแสดงดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 (A) กากมะพร้าวสีขาว (B) กากมะพร้าวสีดำ (C) บ่อน้ำเสียรวม (D) น้ำล้างจากกระบวนการผลิต (E) ของเสียจากกระบวนการ aeration และ (F) บ่อพักน้ำเสียบ่อสุดท้าย

วัสดุและอุปกรณ์

- Beaker
- Flask
- Micropipette (Axygen, USA)
- Vortex machine (Gienie-2, USA)
- Micro centrifuge Mikro 185 (Hettich, Germany)
- Centrifuge Combi – 514R (Hamil, south korea)
- Autoclave SX-500E (Tomy, Indonesia)
- Electrophoresis chamber set
- Electrophoresis power supply EPS -300X (C.B.S. scientific, USA)
- PCR machine TC9610-AXY-230 (Axygen, USA)
- ตู้บ่มเชื้อ (Memmert, Germany)
- เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่ง GM-1100 (Universal weight enterprice, Taiwan)
- เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง PA214 (Ohaus, USA)

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ
   - Glucose
   - Peptone
   - Yeast extract
   - Chloramphenicol
2. สารเคมีที่ใช้ในการย้อมสีไขมัน
   - Sudan black b
   - 70% Ethanol
   - Safranin O
3. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ
   - SE Buffer
   - Lyticase solution
   - TL Buffer

- Grass beads
- Proteinase K solution
- RNase
- BL Buffer
- HB Buffer
- DNA wash Buffer
- น้ำกลั่นที่ผ่านกระบวนการ autoclave

4. สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR

- 5x Phusion taq
- dNTPs set
- DNA template
- Phusion DNA polymerase
- น้ำกลั่นที่ผ่านกระบวนการ autoclave

5. สารเคมีที่ใช้สำหรับการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

- 1 kbp DNA ladders
- 1X Tri-Borate-EDTA (1X TEB buffer)
- agar

6. สารเคมีที่ใช้สำหรับการสกัดน้ำมันด้วยวิธี Bligh and Dyer

- 4 M HCl
- Methanol
- Chloroform

7. สารเคมีที่ใช้สำหรับการทำ gas chromatography

- hexane

วิธีการดำเนินการ

1. การคัดกรองยีสต์จากตัวอย่างของเสีย

ชั่งตัวอย่าง 1 กรัมในอาหาร Yeast extract-peptone-dextrose ปริมาตร 25 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่บ่มแล้ว มาเจือจางความเข้มข้นที่ความเข้มข้น 10^{-1} ถึง 10^{-8}เท่า แล้วนำอาหารที่เจือจาง

แล้ว มาทำให้เชื้อกระจายในอาหารแข็ง YPD และนำอาหารที่มีตัวอย่างบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 วัน จากนั้นคัดแยกความเข้มข้นที่มีเชื้อไม่หนาแน่นสามารถเห็นโคโลนีเดี่ยวได้

การคัดเลือกยีสต์เบื้องต้นจะเลือก โคโลนีเดี่ยวที่มีลักษณะกลม สีขาวขุ่น จากนั้นนำมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายเลนส์ใกล้วัตถุขนาด 100 เท่า และสังเกตลักษณะเซลล์ ขนาดของเซลล์ รวมถึงการแตกหน่อของเซลล์ มาขีดเพลทลงบน อาหารแข็ง YPD และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง แบ่งเก็บตัวอย่างเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำเก็บที่อุณภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บตัวอย่างเชื้อ และส่วนที่สอง นำเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทดลองในขั้นตอนต่อไป

2. การย้อมสีหยดน้ำมันของยีสต์ที่คัดกรองได้

นำยีสต์ที่คัดกรองได้ส่วนที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ถ่ายลงในอาหารเหลว YPD และ Enrichment media ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ได้เพิ่มอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน บ่มด้วยตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อบ่มตัวอย่างเสร็จแล้วทำการย้อมสีหยดน้ำมันของยีสต์ที่คัดกรองได้ โดยนำตัวอย่าง smear บนสไลด์ แล้วทำการ heat fix สไลด์ด้วยการผ่านเปลวไฟต่อด้วย air dry จนสไลด์แห้ง เมื่อสไลด์ตัวอย่างแห้งล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น หลังจากสไลด์แห้ง หยดสี sudan black B จนทั่วรอยเชื้อบนสไลด์และทิ้งไว้ 15 นาที เมื่อครบเวลาล้างสไลด์ตัวอย่างด้วย 70% ethanol เป็นระยะเวลา 5 วินาทีและรอจนสไลด์แห้ง ต่อมาหยดสี safranin O ลงบนสไลด์ตัวอย่างให้ทั่วรอยเชื้อและทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 15 วินาที จากนั้นล้างสีที่ติดอยู่บนสไลด์ด้วยน้ำกลั่นและใช้แผ่นปิดสไลด์ปิดส่วนที่เป็นรอยเชื้อ นำสไลด์ส่องใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายเลนส์ใกล้วัตถุ 100 เท่า

3. การจำแนกชนิดของยีสต์ที่คัดกรองได้

นำยีสต์ที่คัดกรองได้มาทำการ streak ลงบนอาหารแข็ง YPD แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 วัน จากนั้นนำอาหารแข็งที่บ่มแล้ว ส่งจำแนกชนิดยีสต์ที่บริษัท บริษัท กิบไทย จำกัด, ประเทศไทย

4. ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *ACC1*

ใช้ข้อมูลยีนจากฐานข้อมูล https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ (NCBI) ในการออกแบบไพรเมอร์ของยีสต์ที่ถูกระบุชนิดแล้ว และนำลำดับนิวคลิโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ได้ส่งออกแบบที่ บริษัท แปซิฟิค ไซเอ็นซ์ จำกัด

5. การสกัด DNA

ตัวอย่างยีสต์เลี้ยงในอาหารเหลว YPD นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ได้ค่าเท่ากับ 10 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 4000 x g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดส่วนใสออก ใช้ตะกอนที่ได้สกัดดีเอ็นเอด้วย E.Z.N.A. Yeast DNA kit protocols (Omega bio-tek, USA) จากนั้นจึงปิเปตต์ดีเอ็นเอ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร มาวัดค่าการดูดกลืนแสงดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง nanodrop ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอ ต่อ ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีน เทียบเป็นสัดส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร โดยดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์จะต้องมีค่านี้มากกว่า 1.8 เสร็จแล้วจึงเก็บหลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ที่บรรจุดีเอ็นเอไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

6.การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยกระบวนการ PCR

ใช้กระบวนการ PCR ด้วยวิธีการของ Phusion high-fidelity PCR kit โดยสัดส่วน Master mix ที่ใช้ในการทำ PCR มีปริมาณสาร Master Mix (1X) ประกอบด้วย น้ำกลั่นที่ผ่านกระบวนการ autoclave ปริมาตร 0.47 ไมโครลิตร dNTPs ปริมาตร 0.02 ไมโครลิตร forward primer ความเข้มข้น10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.05 ไมโครลิตร reverse primer ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.05 ไมโครลิตร 5X Phusion taqปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร Phusion DNA polymerase ปริมาตร 0.01 ไมโครลิตร และ DNA template ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร ต่อปริมาตร Master Mix 1 ไมโครลิตร ขั้นตอนในกระบวนการ PCR ประกอบด้วย ขั้น Pre-denature ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ขั้น Denature ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที ขั้น Annealing ที่อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ขั้น Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 300 วินาที โดยในขั้น Denature Annealing และ Extension จะเกิดเป็น cycles จำนวน 25 รอบ ต่อมาขั้น Final extension ที่อุณภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที และสุดท้าย Hold ไว้ที่ 15 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำตัวอย่าง PCR ออกจากเครื่อง PCR

7. ตรวจสอบ PCR products ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis)

นำ PCR products หลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมาตรวจสอบขนาดด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส การทดลองนี้ใช้ agarose gel ความเข้มข้น 1.8% ในการตรวจสอบ โดยมี 1 kbp DNA ladderเป็น DNA marker ที่ใช้ในการเทียบขนาดของ PCR products และใช้ Electrophoresis power supply ที่มีกำลังไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที

8. **ตรวจสอบลำดับเบสของ** PCR products

หลังจากกระบวนการตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ตัวอย่างที่มี PCR products จะถูกนำส่งบริษัท แปซิฟิก ไซเอ็นซ์ จำกัด เพื่อหาลำดับนิวคลิโอไทด์ของ PCR products จากนั้นนำลำดับนิวคลิโอไทด์ที่ได้เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลิโอไทด์บนยีน *ACC1* ของยีสต์สะสมไขมันที่คัดกรองได้ จากฐานข้อมูล https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ (NCBI)

9. **สกัดน้ำมันจากยีสต์ที่คัดกรองได้ด้วยวิธี** Bligh and Dyer (Pan et al., 2009)

นำยีสต์เลี้ยงในอาหารเหลว YPD เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง มาถ่ายลงใน enrichment media และบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง การหาน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้นด้วยการยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร enrichment medium ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองแบบมีฝาปิดแล้วทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8300 รอบต่อนาที จากนั้นเทอาหารส่วนบนออก เติมน้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิตร เพื่อล้างเซลล์ จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8300 รอบต่อนาที เทน้ำออก หลังจากนั้นนำหลอดที่มีเซลล์ยีสต์จากการปั่นเหวี่ยงระเหยน้ำออกที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ต่อมานำหลอดทดลองใส่ในตู้ดูดความชื้นเป็นระยะเวลา 1.30 ชั่วโมง แล้วจึงชั่งหาน้ำหนัก

การสกัดน้ำมันจากยีสต์เริ่มต้นด้วยการนำเชื้อที่เพาะเลี้ยงในอาหาร enrichment medium ปริมาตร 25 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดแล้วทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8300 รอบต่อนาที 5 นาที เทส่วนอาหารออก และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตร เพื่อล้างเซลล์จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8300 รอบต่อนาที 5 นาที เทน้ำออก จากนั้นเติม 4 M HCl ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เพื่อทำให้เซลล์แตก นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำหลอดที่ผ่านการบ่ม เติมสารผสม (เมทานอล : คลอโรฟอร์ม 1 : 1) เพื่อแยกสร้างที่มีคุณสมบัติมีขั้วและไม่มีขั้วออกจากกัน บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และดูดสารละลายชั้น organic phase (เมทานอล) ซึ่งเป็นชั้นที่มีน้ำมันที่สกัดได้ แล้วนำไปเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง และนำเข้าตู้ดูดความชื้นเป็นระยะเวลา 1.30 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่งหาน้ำหนักไขมันที่สกัดได้ ทำการทดลองซ้ำจำนวน 3 รอบ หาค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำมันที่สกัดได้และหาร้อยละของอัตราส่วนระหว่างปริมาณน้ำมันจากการสกัดและน้ำหนักเซลล์แห้ง

10. **การหาส่วนประกอบของกรดไขมันที่สกัดจากยีสต์ที่คัดกรองได้ด้วย** Gas chromatography

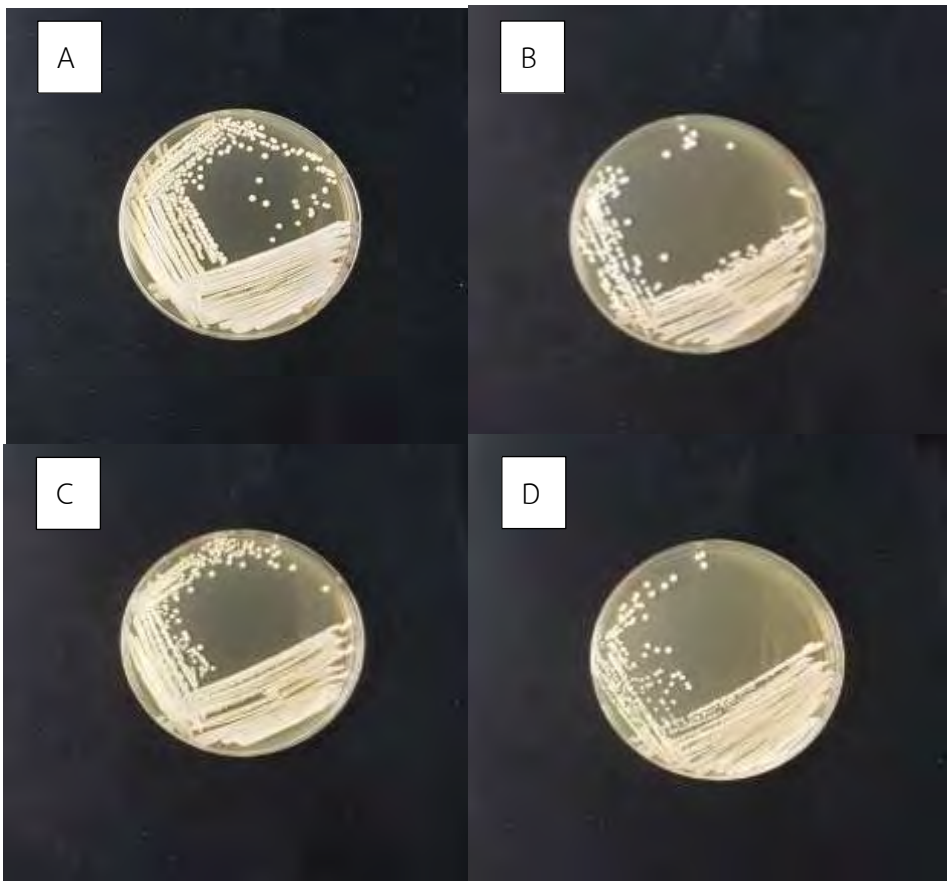
ใช้น้ำมันตัวอย่างที่สกัดได้จากยีสต์เติม 2 มิลลิลิตร สารละลาย 0.01 M NaOH ใน methanol เขย่าให้เข้ากันจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำหลอดทดลองไปวางในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ต่อมาเติม hexane ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแล้วทำการดูดสารชั้น hexane ลงในหลอดสำหรับการทำ gas chromatography

บทที่ 4

ผลการศึกษา

ผลการคัดกรองยีสต์ในตัวอย่างของเสียและของเหลือจากบริษัท เทพผดุงพรมะพร้าว จำกัด จังหวัดนครปฐม

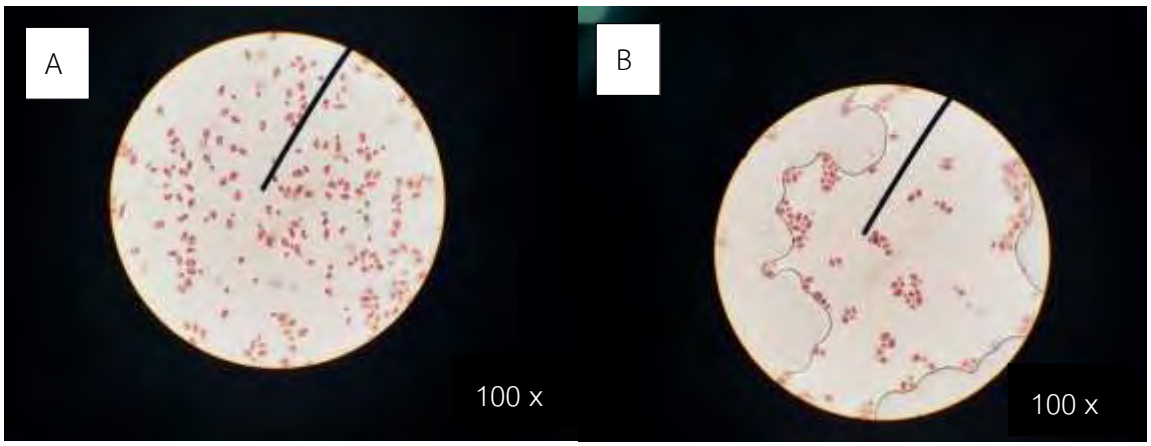
จากการคัดกรองเชื้อที่ได้ทั้งหมด พบจุลชีพที่มีลักษณะโคโลนีคล้ายยีสต์ทั้งหมด 4 ตัวอย่าง จากเชื้อที่คัดกรองได้ 15 ตัวอย่าง ในตัวอย่างของเสียและของเหลือ 6 ตัวอย่าง คือ TPD 1 (กากมะพร้าวสีขาว) TPD 2 (กากมะพร้าวสีดำ) TPD 3 (น้ำล้างจากกระบวนการผลิต) และ TPD 4 (บ่อน้ำเสียรวม)



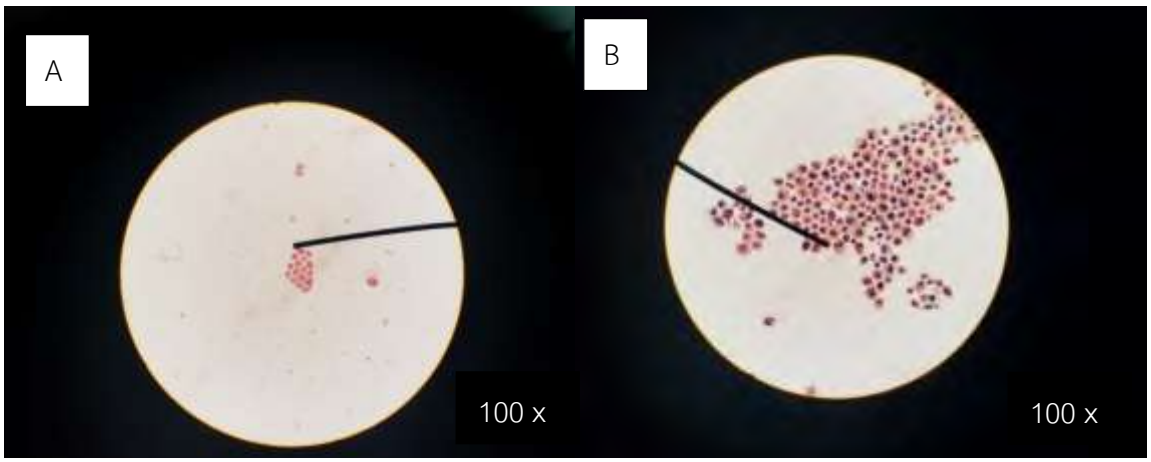
ภาพที่ 6.ผลการคัดกรองเชื้อ (A) สายพันธุ์ TPD 1 (B) สายพันธุ์ TPD 2 (C) สายพันธุ์ TPD 3 (D) สายพันธุ์ TPD 4

ผลการย้อมสีหยดน้ำมันในยีสต์ที่คัดกรองได้

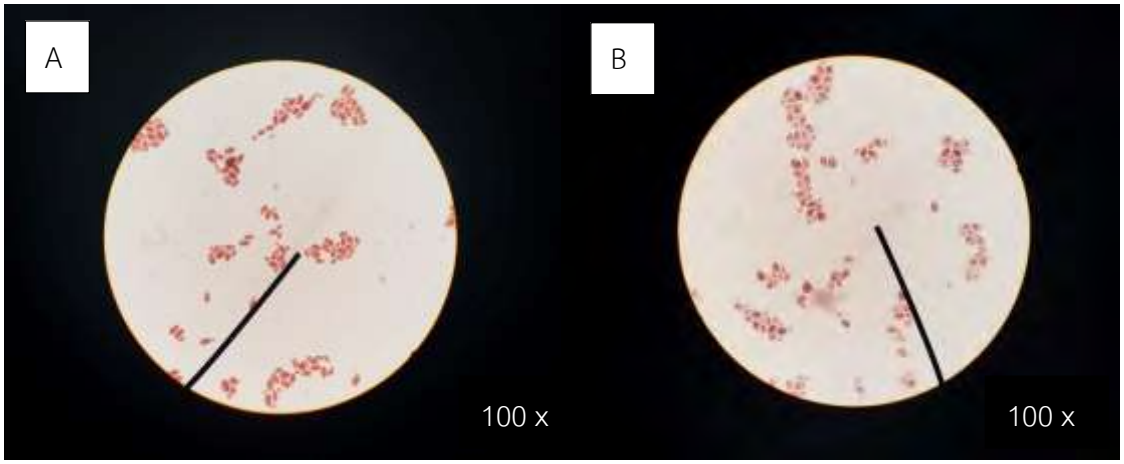
จากการย้อมด้วย Sudan black B แล้วทำการส่องใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายเลนส์ใกล้วัตถุ 100 เท่า พบหยดน้ำมันในยีสต์ทั้ง 4 ชนิดในอาหาร enrichment media แสดงดังภาพที่ 7 8 9 และ 10 โดยยีสต์ทีเห็นการติดสีของ Sudan black B มากที่สุดคือ TPD 2



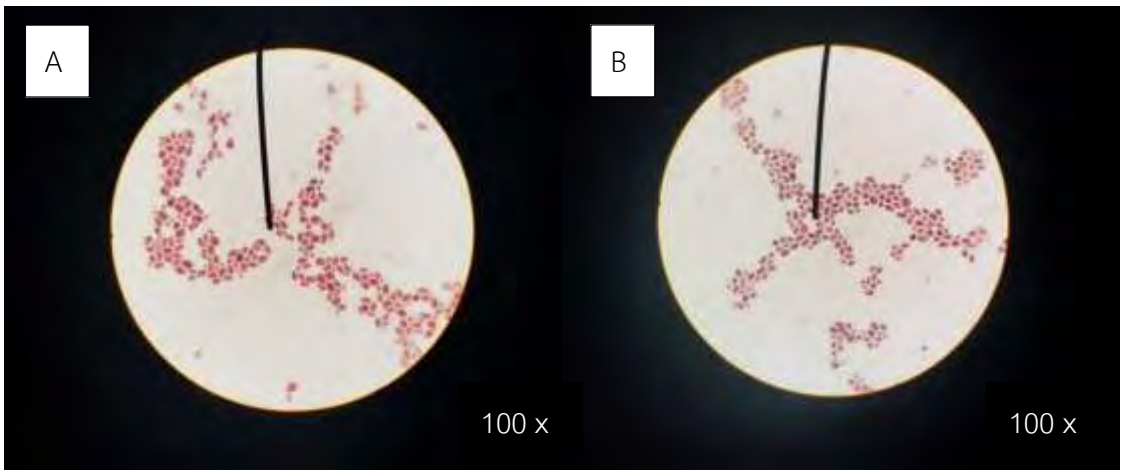
ภาพที่ 7. ผลการย้อม Sudan black B ยีสต์ที่คัดกรองจากตัวอย่าง TPD 1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างกัน (A) อาหารเลี้ยงเชื้อ YPD (B) enrichment medium



ภาพที่ 8. ผลการย้อม Sudan black B ยีสต์ที่คัดกรองจากตัวอย่าง TPD 2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างกัน (A) อาหารเลี้ยงเชื้อ YPD (B) enrichment medium



ภาพที่ 9. ผลการย้อม sudan black B ยีสต์ที่คัดกรองจากตัวอย่าง TPD 3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างกัน (A) อาหารเลี้ยงเชื้อ YPD (B) enrichment medium



ภาพที่ 10. ผลการย้อม sudan black B ยีสต์ที่คัดกรองจากตัวอย่าง TPD 4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างกัน (A) อาหารเลี้ยงเชื้อ YPD (B) enrichment medium

ผลจากการระบุชนิดของเชื้อ

จากการส่งจำแนกชนิดเชื้อที่บริษัท บริษัท กิบไทย จำกัด ผลการจำแนกพบว่า ตัวอย่าง TPD 1 TPD 3 และ TPD 4 ถูกระบุว่าเป็นเชื้อชนิดเดียวกันคือ *Candida tropicalis* แสดงดังภาพที่ ข3 และข4 ส่วนการระบุเชื้อจากตัวอย่าง TPD 2 พบว่าเป็นเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* แสดงดังภาพที่ ข2

ผลการออกแบบไพรเมอร์

จากการระบุชนิดของเชื้อพบว่าเชื้อที่ได้จากการคัดกรองเป็นยีสต์ชนิด *S. cerevisiae* และ *C. tropicalis* จึงสืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *ACC1* ของยีสต์ทั้ง 2 ชนิดบนฐานข้อมูล NCBI และได้ใช้ฐานลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *ACC1* ของยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ S288C gene id : 855750 และ *C. tropicalis* สายพันธุ์ MYA-3404 gene id : 8301221 สำหรับออกแบบไพร์เมอร์ในการทดลองแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3. ไพร์เมอร์ยีน *ACC1* ของยีสต์ทั้ง 2 ชนิด

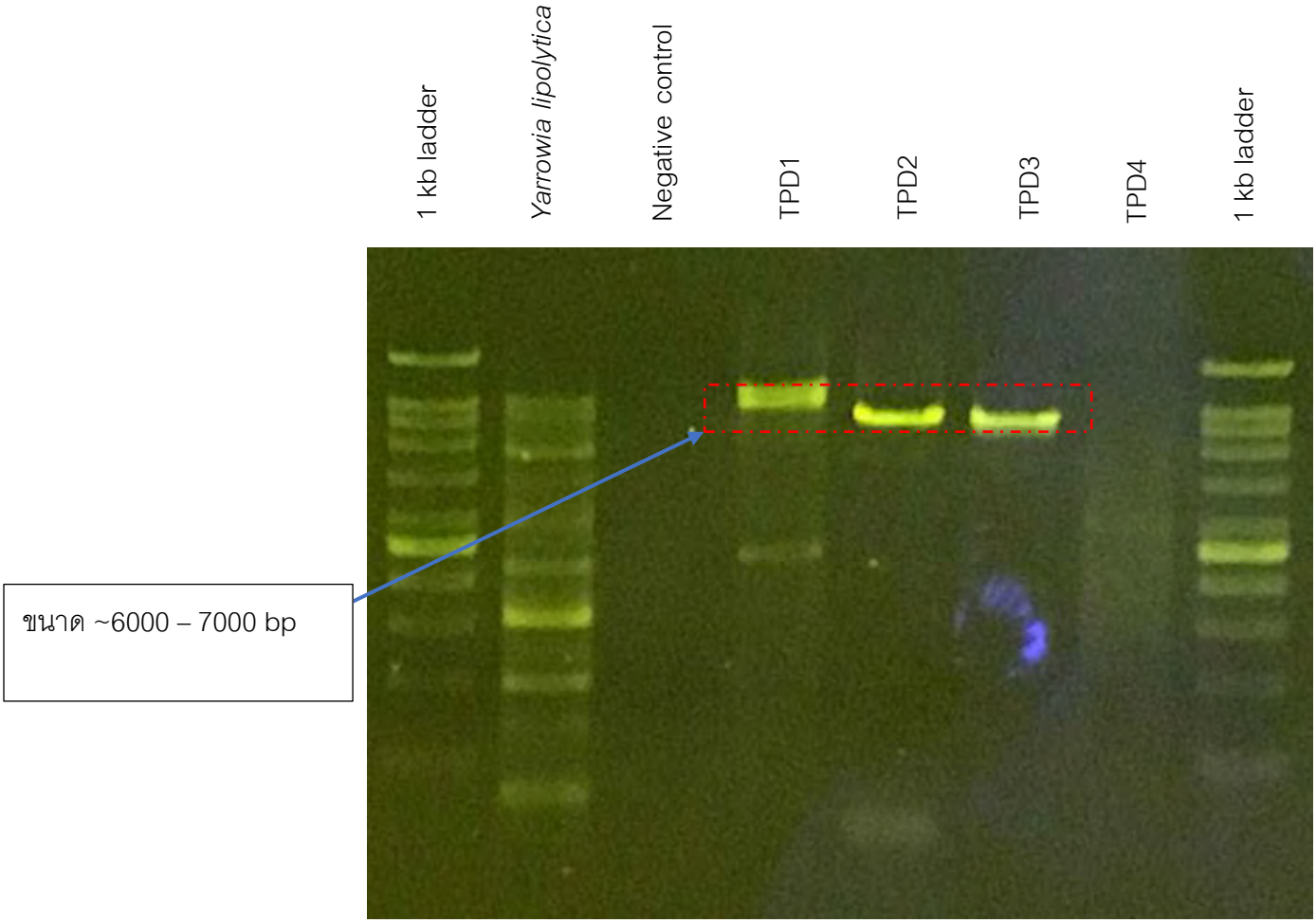
Name	Sequence (5'-3')
Saccharomyces cerevisiae ACC1 forward primer	ATG AGC GAA GAA AGC TTA TTC GAG
Saccharomyces cerevisiae ACC1 Reverse primer	CTT GAT ACC TTC AGA TAA TCC ATC
Candida tropicalis ACC1 forward primer	ATG AGA TGC AAA GTA TCT CAA CCA G
Candida tropicalis ACC1 reverse primer	CAT AAC AGA AGC AGC ATT TGA TGG

ผลการสกัดดีเอ็นเอ

หลังจากสกัดดีเอ็นเอแล้วจึงนำดีเอ็นมาวัดกับเครื่อง nanodrop พบว่าดีเอ็นเอมีค่าการดูดกลืนแสง OD 260 / OD 280 อยู่ในช่วง 1.6-1.9 ซึ่งถือว่ามีความบริสุทธ์สามารถนำมาใช้ในการทดลองได้

ผลการตรวจสอบความถูกต้องของ PCR products ด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

หลังจากกระบวนการ PCR แล้วจึงนำ PCR products มาตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่า PCR products เกิดแถบขึ้นบริเวณความยาว 6200 ถึง 7000 คู่เบส ทั้งหมด 3 ตัวอย่างจาก 4 ตัวอย่างยีสต์แสดงดังภาพที่ 11



ภาพที่ 11. ผลการทำ PCR ยีน *ACC1* จากยีสต์ที่จำแนกได้ (Negative แทนน้ำกลั่น)

ผลการสกัดน้ำมันด้วยวิธี Bligh and Dyer

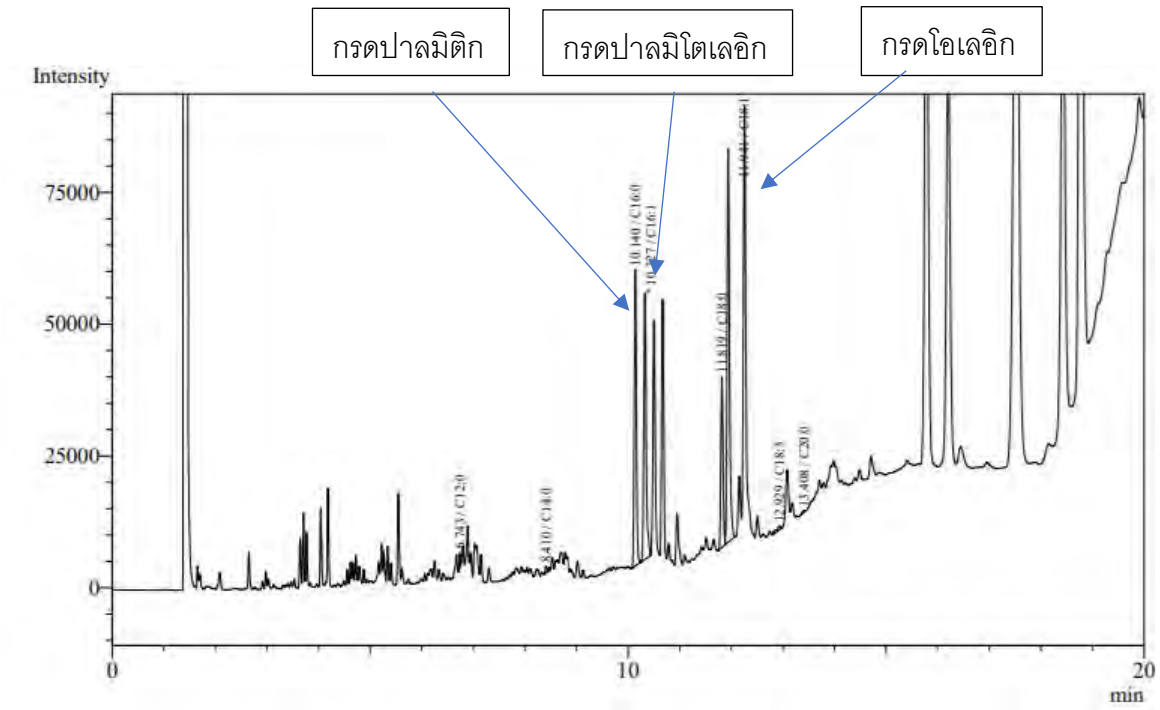
หลังจากสกัดน้ำมันด้วยวิธีการ Bligh and Dyer และระบุอัตราส่วนปริมาณน้ำมันที่สกัดได้ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งพบว่าตัวอย่างยีสต์เป็นยีสต์สะสมไขมัน ซึ่งมีปริมาณไขมันสะสมมากกว่าร้อยละ 20 จำนวน 3 ตัวอย่าง แสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4. ผลการสกัดไขมันด้วยวิธี Bligh and Dyer

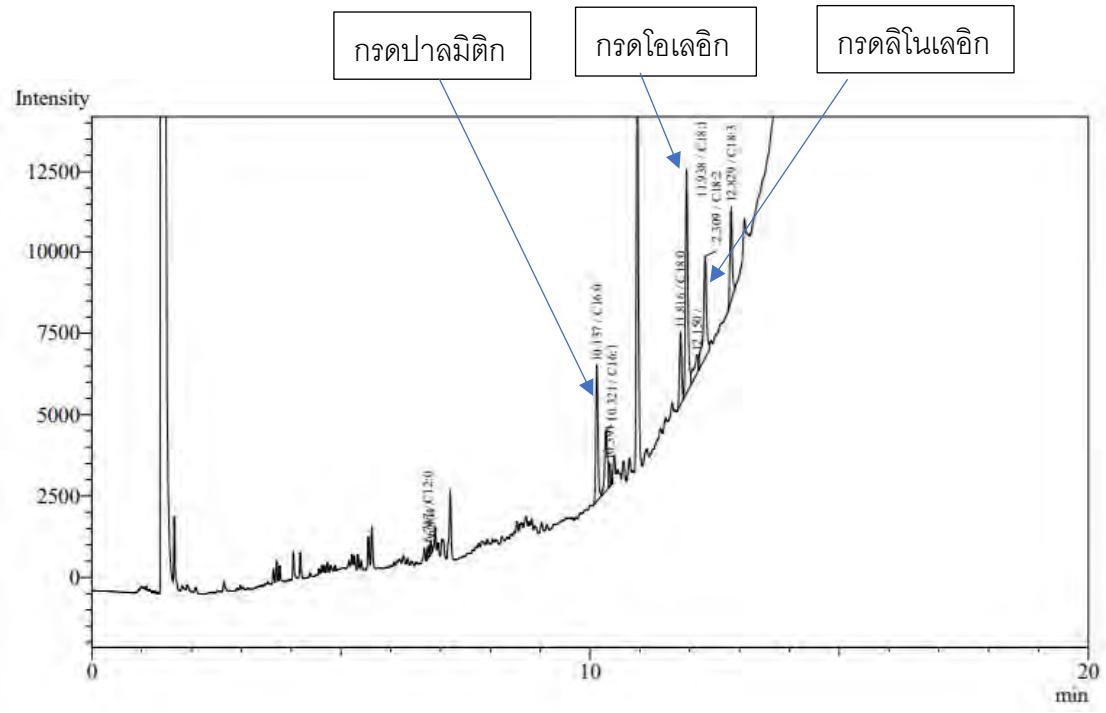
ตัวอย่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)	ปริมาณน้ำมันจากการสกัด (g/L)	ร้อยละปริมาณน้ำมันต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง
สายพันธุ์ TPD1	6.07	1.18	19.48 ± 0.32
สายพันธุ์ TPD2	5.45	1.81	33.18 ± 1.50
สายพันธุ์ TPD3	3.63	1.16	32.05 ± 2.83
สายพันธุ์ TPD4	3.95	1.14	28.87 ± 0.29

ผลการจำแนกกรดไขมันที่สกัดได้จากยีสต์ตัวอย่าง

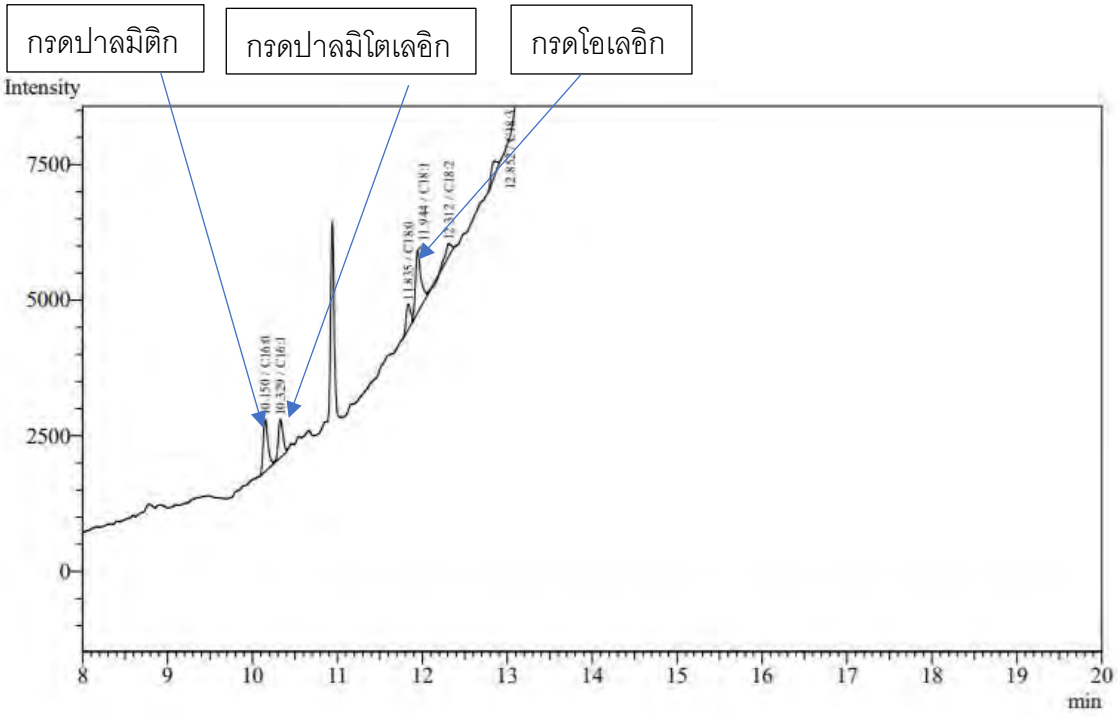
หลังจากการจำแนกกรดไขมันที่สกัดได้จากยีสต์ตัวอย่างด้วย gas chromatography พบว่าไขมันจาก *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TPD 2 ประกอบด้วย กรดโอเลอิก กรดปาลมิโตเลอิก และ กรดปาลมิติก เป็นส่วนใหญ่ แสดงดังภาพที่ 12 ต่อมาไขมันจาก *C. tropicalis* สายพันธุ์ TPD 3 ประกอบด้วย กรดโอเลอิก กรดลิโนเลอิก และ กรดปาลมิติก เป็นส่วนใหญ่ แสดงดังภาพที่ 13 และไขมันจาก *C. tropicalis* สายพันธุ์ TPD 4 ประกอบด้วย กรดโอเลอิก กรดปาลมิติก และกรดปาลมิโตเลอิก เป็นส่วนใหญ่ แสดงดังภาพที่ 14



ภาพที่ 12. โครมาโทรแกรม แสดงกรดไขมันที่สกัดได้จากยีสต์สายพันธุ์ TPD 2



ภาพที่ 13. โครมาโทรแกรม แสดงกรดไขมันที่สกัดได้จากยีสต์สายพันธุ์ TPD 3



ภาพที่ 14. โครมาโทรแกรม แสดงกรดไขมันที่สกัดได้จากยีสต์สายพันธุ์ TPD 4

บทที่ 5

อภิปรายผลการศึกษา

1. การคัดกรองยีสต์ในตัวอย่างของเสียและของเหลือ

จากการคัดรกองยีสต์จากตัวอย่างของเสียและของเหลือจำนวน 6 ตัวอย่าง จากบริษัท เทพผดุงพรมะพร้าว จำกัด จังหวัดนครปฐม พบยีสต์จำนวน 4 สายพันธุ์ จากเชื้อที่พบทั้งหมด 15 ตัวอย่าง โดยจากอาหารที่ใช้ในการคัดกรองยีสต์ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ซึ่งมี กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับเชื้อ สาเหตุที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้เนื่องจากกลูโคส เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่สามารถพบได้ในธรรมชาติและมีงานวิจัยเกี่ยวกับการนำวัตถุดิบทางธรรมชาติมาแปรสภาพให้กลายเป็นกลูโคสทางอุตสาหกรรม เชื้อที่สามารถใช้กลูโคสได้ดีจึงเป็นเชื้อที่สามารถนำไปใช้ได้ในอุตสาหกรรมได้ดี

2. การย้อมสีหยดน้ำมันในยีสต์ที่คัดกรองได้

จากการย้อมสีหยดน้ำมันในยีสต์ 4 สายพันธุ์ที่คัดกรองได้ คือ สายพันธุ์ TPD 1 สายพันธุ์ TPD 2 สายพันธุ์ TPD 3 และสายพันธุ์ TPD 4 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD และ enrichment medium พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD มีการเจริญเติบโตของเชื้อได้ดี แต่ไม่พบการติดสีของหยดน้ำมันของยีสต์ทั้ง 4 ชนิด สาเหตุมาจากอัตราส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจนที่ไม่เหมาะสมแก่การสะสมไขมันของยีสต์ และในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium พบว่ายีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์มีการเจริญเติบโตได้ดีเช่นกัน และพบการติดสีของหยดน้ำมันในยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยเฉพาะ สายพันธุ์ TPD 2 ที่มีการติดสีของหยดน้ำมันมากที่สุด สาเหตุมาจากในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium มีการเพิ่มอัตราส่วนคาร์บอนและไนโตรเจนสูงกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD จึงสามารถพิสูจน์ได้ว่าอัตราส่วนคาร์บอนและไนโตรเจนมีผลต่อการผลิตและสะสมไขมันในยีสต์

3. การระบุชนิดของยีสต์

การระบุชนิดของยีสต์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน 18S rRNA พบว่าเชื้อสายพันธุ์ TPD 1 สายพันธุ์ TPD 3 และสายพันธุ์ TPD 4 ถูกระบุว่าเป็นเชื้อ *C. tropicalis* ซึ่งเป็นยีสต์ที่สามารถพบได้ทั่วไป เนื่องจากการทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดี โดย *C. tropicalis* ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเชื้อ biosafety level 2 เนื่องจาก *C. tropicalis* สามารถทำให้เกิดโรคติดเชื้อราแบบลุกลามได้ จึงไม่นิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรม (Zuza et al., 2017) ส่วนเชื้อสายพันธุ์ TPD 2 ถูกระบุว่าเป็นเชื้อ *S. cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ที่มีการใช้ในอุตสาหกรรม

แพร่หลาย และมีงานวิจัยด้านพันธุ์ศาสตร์สำหรับพัฒนา *S. cerevisiae* อยู่มากเนื่องจากเป็นยีสต์ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม generally recognized as safe (GRAS) และถูกจัดอยู่ในกลุ่มเชื้อ biosafety level 1 จึงมีความปลอดภัยในการนำมาใช้วิจัยและใช้ในอุตสาหกรรม (Peris D., Torrado R.P. and Barrio E., 2017)

4. การตรวจสอบความถูกต้องของ PCR products ด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

จากการตรวจสอบความถูกต้องของ PCR products ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟริซิส พบว่ายีสต์สายพันธุ์ TPD 1 สายพันธุ์ TPD 2 และสายพันธุ์ TPD 3 มีการพบแถบของ PCR products ที่มีความยาว 6200- 7000 คู่เบส ซึ่งมีความใกล้เคียงกับยีน *ACC1* จากฐานข้อมูลของ NCBI ส่วนยีสต์สายพันธุ์ TPD 4 การไม่มีแถบของ PCR products อาจเกิดจากไพรเมอร์ไม่สามารถจับกำดีเอ็นเอในช่วงที่ได้ออกแบบไว้ สาเหตุอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในช่วงบริเวณนั้น หรือเกิดจากดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความเสียหาย

5. การสกัดน้ำมันด้วยวิธี Bligh and Dyer

จากการสกัดน้ำมันด้วยวิธี Bligh and Dyer ยีสต์สายพันธุ์ที่มีร้อยละไขมันสะสมต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 3 อันดับคือ TPD 2 TPD 3 และ TPD 4 ตามลำดับ ซึ่งมีร้อยละไขมันสะสมต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 33.18 32.05 และ 28.87 ตามลำดับ ซึ่งการมีร้อยละไขมันสะสมต่อน้ำหนักเซลล์แห้งมากกว่าร้อยละ 20 จะถูกระบุว่ายีสต์ชนิดนั้น เป็นยีสต์สะสมไขมัน (oleaginous yeast) ดังนั้นยีสต์สายพันธุ์ TPD 2 TPD 3 และ TPD 4 จึงถูกระบุว่าเป็นยีสต์สะสมไขมัน อีกทั้งยีสต์สายพันธุ์ TPD 2 ซึ่งเป็นยีสต์ *S. cerevisiae* โดยจากการคัดกรองยีสต์สะสมไขมัน และการวิจัยก่อนหน้า ยังไม่มีการพบยีสต์ *S. cerevisiae* ที่มีร้อยละไขมันสะสมต่อน้ำหนักเซลล์มากกว่าร้อยละ 20 หรือถูกระบุว่าเป็นยีสต์สะสมไขมันในสายพันธุ์ธรรมชาติมาก่อน

6. การจำแนกกรดไขมันที่สกัดได้จากยีสต์ตัวอย่าง

จากการจำแนกชนิดกรดไขมันจากไขมันที่สกัดได้ในยีสต์ตัวอย่างด้วย Gas chromatography พบว่ายีสต์ทั้ง 3 ชนิด มีอัตราส่วนไขมันไม่อิ่มตัวต่อไขมันอิ่มตัว และมีกรดไขมันประเภท โอเลอิก และปาลมิติก อยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันปาล์มที่มีการใช้อยู่ในอุตสาหกรรมในปัจจุบัน (Alexandre, 2017)

บทที่ 6

สรุปผลการศึกษา

การคัดกรองยีสต์จากตัวอย่างของเสียและของเหลือจากโรงงานมะพร้าว จากการทดลองย้อมสีหยดน้ำมัน ระบุชนิดของเชื้อ ตรวจสอบยีน *ACC1* สกัดไขมันที่ยีสต์สะสม และหาส่วนประกอบของกรดไขมันที่ยีสต์สะสม พบยีสต์ที่มีการสะสมไขมันสูงที่สุด 3 ชนิดคือ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TPD 2 จากตัวอย่างกากมะพร้าวสีดำ *C. tropicalis* สายพันธุ์ TPD 3 จากตัวอย่างบ่อน้ำเสียรวม และ *C. tropicalis* สายพันธุ์ TPD 4 จากน้ำล้างจากกระบวนการผลิต ซึ่งมีปริมาณไขมันสะสมร้อยละ 33.18 32.05 และ 28.87 โดยน้ำหนักแห้งตามลำดับ และการตรวจสอบยีน *ACC1* ของยีสต์ตัวอย่างพบแถบ DNA ของ *ACC1* ในตัวอย่าง TPD 2 และ TPD 3 โดยเชื้อที่คัดกรองได้มีคุณสมบัติไขมันสะสมใกล้เคียงกับน้ำมันปาล์มจึงอาจนำไปใช้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับอุตสาหกรรมในอนาคต โดยเฉพาะเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TPD 2 ที่เป็นครั้งแรกที่มีการพบ *S. cerevisiae* ที่มีร้อยละไขมันต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงกว่าร้อยละ 20 และ *S. cerevisiae* เป็นเชื้อที่มีข้อมูลทางพันธุศาสตร์มาก จึงสามารถนำไปพัฒนาสายพันธุ์ทางอุตสาหกรรมได้ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

Aggelis, G. and Sourdis, J. 1997. Prediction of lipid accumulation degradation in oleaginous micro-organisms growing on vegetable oils. Antonie van Leeuwenhock 72 : 159-165.

Aggelis, G. and Papanikolaou, S. 2002. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. Biology resource Technology 82. : 43-49.

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. BiodiversConserv1 : 267-292.

Angerbauer, C.M., Siebenhofer, M., Mittelbach, M. and Guebitz, G.M. 2008. Conversion of sewage sludge into lipid my *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. Bioresource Technology 99 : 3051-3056.

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

Atom scientific. Sudan Black B Stain Kit[online]. Available from : https://atomscientific.com/product/Sudan-Black-B-Stain-Kit-Haematology-Version [2018October15]

Bain, B.J. 2017. Erythocyte and Leucocyte Cytochemistry. Dacie and Lewis Practical Haematology12 : 312-329.

Bredeweg, E.L., et al. 2017. A molecular genetic toolbox for *Yarrowia lipolytica.* Biotechnology Biofuels 2017 : 1-22.

Breil, C., Vian, M.A., Zemb, T., Kunz, W. and Chemat, F. 2017. "Bligh and Dyer" and Folch Methods for Solid–Liquid–Liquid Extraction of Lipids from Microorganisms. Comprehension of Solvatation Mechanisms and towards Substitution with Alternative Solvents. International Journal of Melecular Sciences 18 : 708.

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.

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

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 Chemistry268 : 10946–10952.

Lamers, D. et al. 2016. Selection of oleaginous yeasts for fatty acid production. BMC Biotechnology16 : 1-15.

Manikandan, K. and Viruthagiri, T. 2010. Optimization of C/N ratio of the medium and Fermantation condition of Ethanol Production from Tapioca starch using Co – Culture of Aspergillus niger and Saccharomyces cerevisiae. International Journal of Chemical Technology 2 : 947-955

Meng, X. et al. 2009. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. Renewable Energy 34 : 1-5

Metzger, P., Largeau, C. 2005. Botryococcus braunii: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. Application Microbiology Biotechnology : 486-490.

Pan, L.X et al. 2009. Isolation of the Oleaginous Yeasts from the Soil and Studies of Their Lipid-Producing Capacities. Biotechnology 47 : 215-220

Paris, D., Torrado, R.P. and Barrio, E. 2017. On the origins and industrial applications of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii* hybrids. Yeast 35 : 51-69

Polyscience. Sudan Black B [online]. Available from :http://www.polysciences.com/default/catalog-products/life-sciences/histology-microscopy/certified-dyes-stains/sudan-black-b-ci-26150-certified/[2018October15]

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

Ratledge, C. 2002. Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. Biochemistry Society Transactions 2002 : 1047-1050.

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

Shi, S., Chen, Y., Siewers, V. and Nielsen, J. Improving Production of Malonyl Coenzyme A-Derived Metabolites by Abolishing Snf1-Dependent Regulation of *Acc1*. mBio : 1-8

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 Biolology 1771 : 255–270.

Wagner, A. and Daum, G. 2005. Formation and mobilization of neutral lipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemical Society Transaction : 1174-1177.

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 substrate. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 2016 : 1214-1222.

Xue, C. et al. 2006 G protein-coupled receptor Gpr4 sense amino acids and activates the cAAMP-PKA pathway in *Cryptococcus neoformans*. Molecular Biology of the Cell 17 : 667-679.

ZuZa, D.L. et al., 2017. An update on *Candida tropicalis* based on basic and clinical approaches. Front Microbiology 2017 : 1927

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหาร

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการคัดกรองยีสต์

YPD selective media ประกอบด้วย

Yeasts extract	10 g/L
Peptone	20 g/L
Glucose	20 g/L
Chloramphenicol	200 ppm

YPD media ประกอบด้วย

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

Enrichment media ประกอบด้วย

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

ภาคผนวก ข

ผลการระบุชนิด

Standard ID

18S rRNA Full Sequencing

macrogen

18S rRNA service report

Order Number : 180927FN-115
Sample name : TPW_contig_1

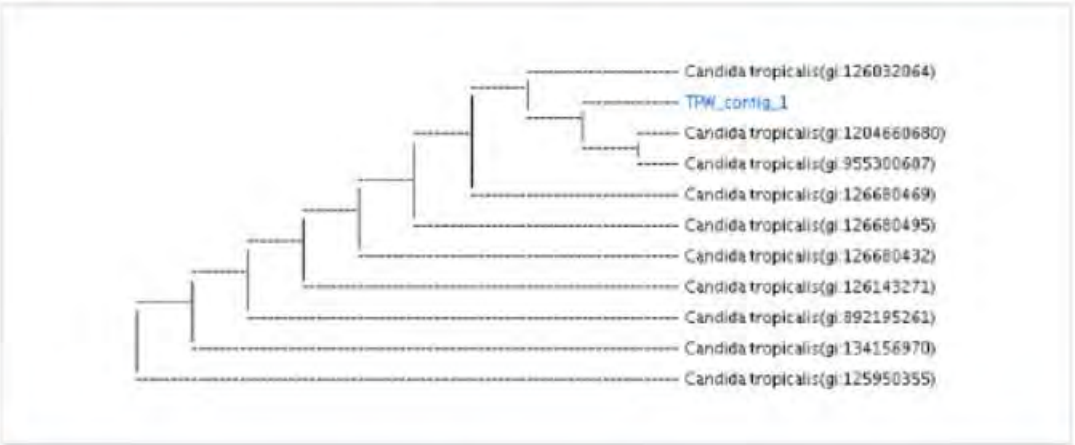
Information

Primer Information

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

Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E Value	Match/Total	Pct.(%)
KY118179.1	Candida tropicalis	1715	34	1674	95	3020	0.0	1640/1642	99

Kingdom	Family	Genus	Species
Eukaryota	Debaryomycetaceae	Candida	Candida tropicalis



Characterization

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

under investigation

ภาพที่ ข1. ผลการจำแนกชนิดเชื้อจากตัวอย่าง TPD 1

Standard ID

18S rRNA Full Sequencing — macrogen

18S rRNA service report

Order Number : 180927FN-115
Sample name : TPD_contig_1

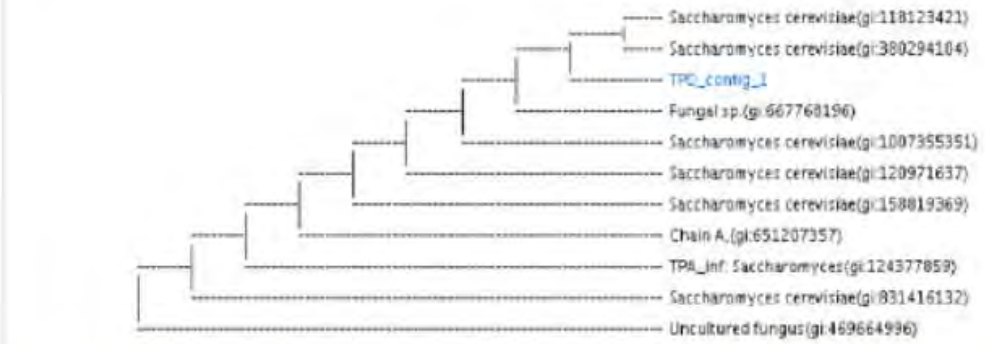
Information

Primer Information

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

Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E-Value	Match/Total	PCI.(%)
KU058167.1	Saccharomyces cerevisiae	1689	13	1669	98	3061	0.0	1657/1657	100

Kingdom	Family	Genus	Species
Eukaryota	Saccharomycetaceae	Saccharomyces	Saccharomyces cerevisiae



Characterization

Saccharomyces is a genus of fungi that includes many species of yeasts. Many members of this genus are considered very important in food production. It is known as the brewer's yeast or baker's yeast.

under investigation

ภาพที่ ข2. ผลการจำแนกชนิดยีสต์จากตัวอย่าง TPD 2

Standard ID

18S rRNA Full Sequencing

macrogen

18S rRNA service report

Order Number : 180927FN-115
Sample name : TPS_contig_1

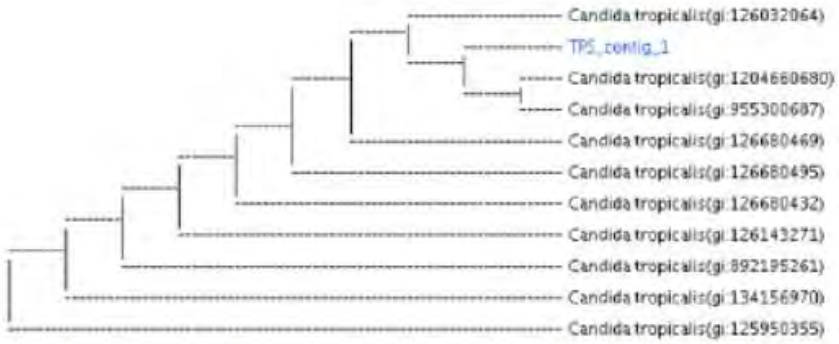
Information

Primer Information

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

Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E-Value	Match/Total	PCI(%)
KY118179.1	Candida tropicalis	1715	34	1674	95	3031	0.0	1641/1641	100

Kingdom	Family	Genus	Species
Eukaryota	Debaryomycetaceae	Candida	Candida tropicalis



Characterization

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

under investigation

ภาพที่ ข3. ผลการจำแนกชนิดยีสต์จากตัวอย่าง TPD 3

Standard ID

18S rRNA Full Sequencing

macrogen

18S rRNA service report

Order Number : 180927FN-115
Sample name : TPL_contig_1

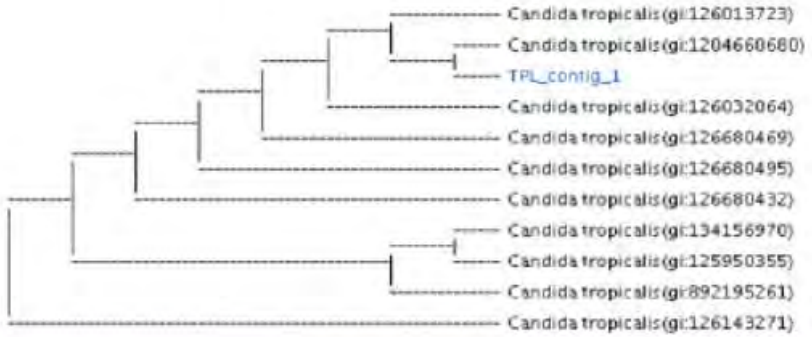
Information

Primer Information

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

Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E-Value	Match/Total	Pct.(%)
KY118179.1	Candida tropicalis	1715	33	1674	95	3025	0.0	1641/1642	99

Kingdom	Family	Genus	Species
Eukaryota	Debaryomycetaceae	Candida	Candida tropicalis



Characterization

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

under investigation

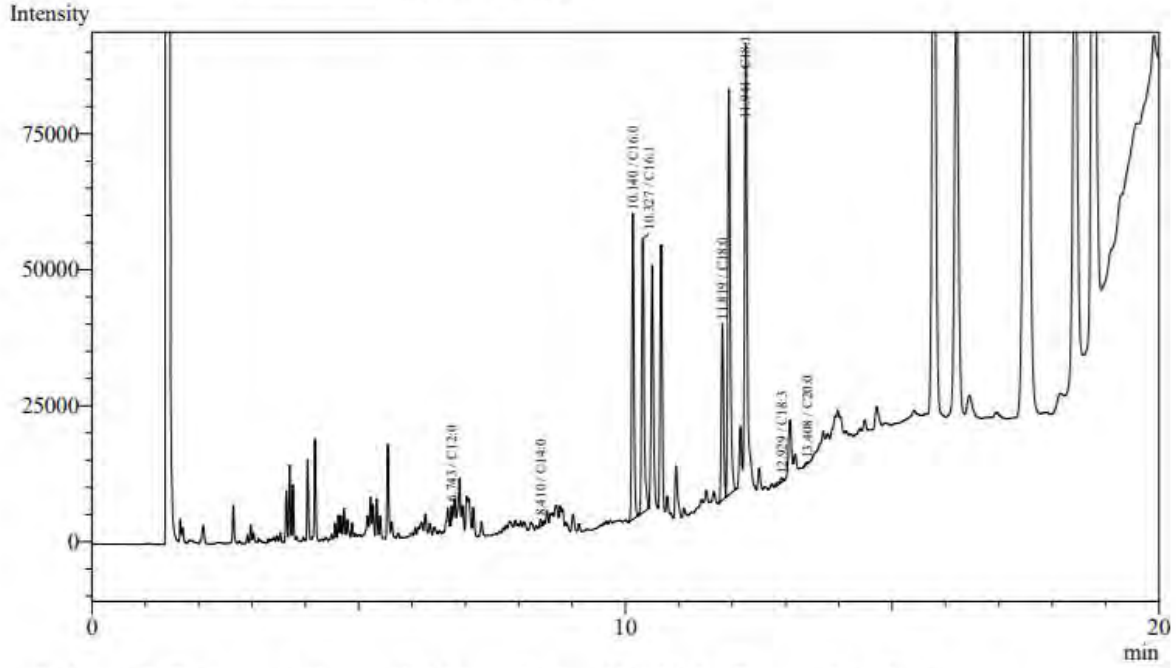
ภาพที่ ข4. ผลการจำแนกชนิดยีสต์จากตัวอย่าง TPD 4

ภาคผนวก ค

ผล gas chromatography

Analysis Date & Time : 1/3/2562 17:08:03
User Name : Admin
Vial# : 8
Sample Name : black-2
Sample ID :
Sample Type : Unknown
Injection Volume : 1.00
ISTD Amount :

Data Name : D:\mink\black-2 edit 3 days.gcd
Method Name : D:\mink\Fatty acid profiles used.gcm

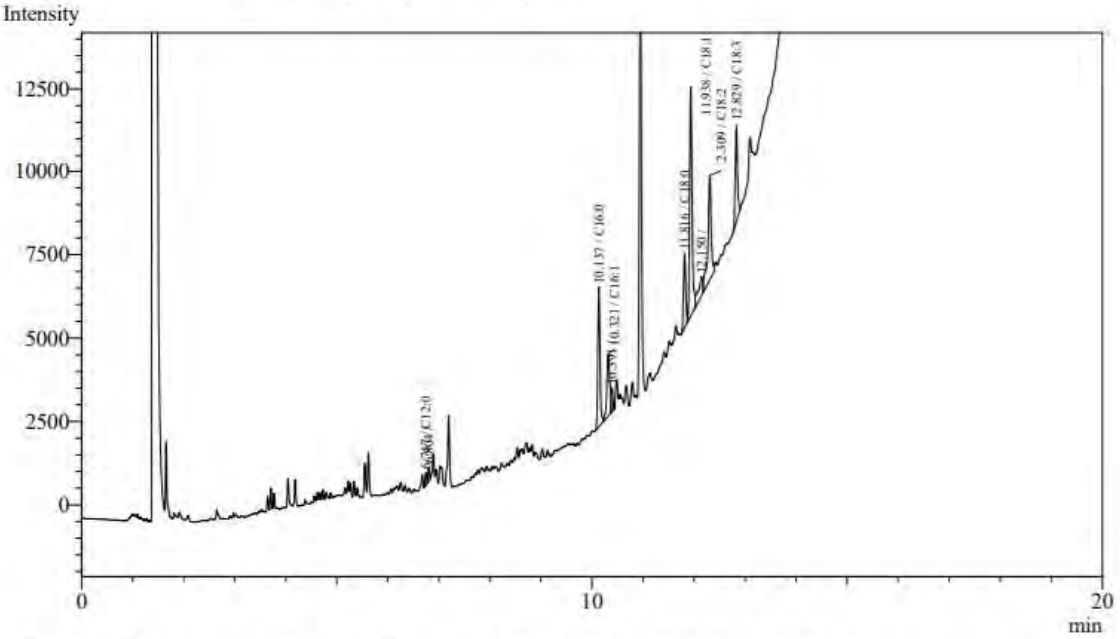


Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	6.743	4653	2669	0.698	%		1	C12:0
2	8.410	2975	1261	0.446	%		2	C14:0
3	10.140	158547	56031	23.787	%		3	C16:0
4	10.327	160740	50198	24.116	%		4	C16:1
5	11.819	94097	32363	14.118	%		5	C18:0
6	11.941	239788	74441	35.976	%	V	6	C18:1
7	12.929	4623	789	0.694	%		8	C18:3
8	13.408	1096	271	0.165	%		9	C20:0
Total		666519	218023					

ภาพที่ ค1. ผล gas chromatography จากไขมันที่สกัดได้จากตัวอย่าง TPD 2

Analysis Date & Time : 1/3/2562 17:37:32
User Name : Admin
Vial# : 9
Sample Name : sum
Sample ID :
Sample Type : Unknown
Injection Volume : 1.00
ISTD Amount :

Data Name : D:\mink\sum edit 3 days.gcd
Method Name : D:\mink\Fatty acid profiles used.gcm

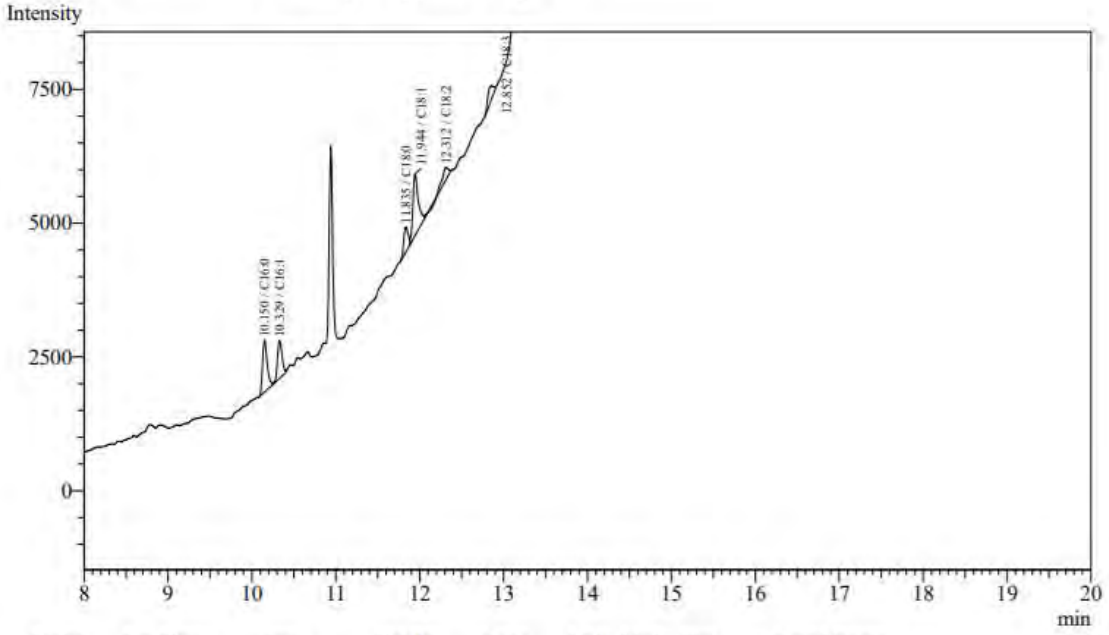


Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	6.747	768	378	0.974	%		1	C12:0
2	6.804	887	406	1.125		V		
3	10.137	12332	4152	15.632	%		3	C16:0
4	10.321	7391	1848	9.368	%	V	4	C16:1
5	10.391	1645	708	2.086		V		
6	11.816	6707	2228	8.501	%		5	C18:0
7	11.938	22833	6852	28.942	%	V	6	C18:1
8	12.150	3836	555	4.862		V		
9	12.309	13906	3120	17.627	%	V	7	C18:2
10	12.829	8586	2776	10.883	%		8	C18:3
Total		78891	23023					

ภาพที่ ค2. ผล gas chromatography จากไขมันที่สกัดได้จากตัวอย่าง TPD 3

Analysis Date & Time : 9/4/2562 13:14:23
User Name : Admin
Vial# : 5
Sample Name : line
Sample ID :
Sample Type : Unknown
Injection Volume : 1.00
ISTD Amount :

Data Name : D:\mink\9.4.19\line_edited.gcd
Method Name : D:\mink\Fatty acid profiles used.gcm



Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	10.150	3762	958	23.877	%		3	C16:0
2	10.329	2682	705	17.022	%	V	4	C16:1
3	11.835	1673	463	10.618	%		5	C18:0
4	11.944	5118	1149	32.485	%	V	6	C18:1
5	12.312	1187	229	7.537	%	V	7	C18:2
6	12.852	1333	264	8.460	%		8	C18:3
Total		15755	3768					

ภาพที่ ค3. ผล gas chromatography จากไขมันที่สกัดได้จากตัวอย่าง TPD 4