



## Research Article

ยีสต์สายพันธุ์ใหม่ *Nakaseomyces glabratus* DL5 ที่แยกได้จากป่าชายเลน  
ในจังหวัดชลบุรี และศักยภาพสำหรับการผลิตไขมัน

A New Yeast Strain, *Nakaseomyces glabratus* DL5, Isolated from a Mangrove  
Forest in Chonburi Province and Its Potential for Lipid Production

นิสราตน์ สิทธิสม วรนิษฐา วรเวช และ พัชรนันท์ อมรรัตนพันธ์ \*

Nisarath Sitthisom, Voranittha Vorawech and Patcharanan Amornrattanapan \*

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20131

Department of Microbiology, Faculty of Science, Burapha University, Mueang, Chonburi 20131, Thailand.

## ABSTRACT

## Article history:

Received: 2023-05-03

Revised: 2023-10-16

Accepted: 2023-11-13

## Keywords:

oleaginous yeasts;

isolation of yeasts;

mangrove forest;

lipid production

This research aimed to search for oleaginous yeasts from mangrove forest resources and primarily investigated their potentials for lipid production. Ten of soil and decaying leaf samples from the Nature Education Center for Mangrove Conservation in Chonburi province were collected and used for the isolation of yeasts on Yeast extract peptone dextrose medium. A total of 38 yeast strains were isolated in which 11 yeast isolates (DL1-DL11) and 27 yeast isolates (S1-S27) were obtained from decaying leaf and soil samples, respectively. These yeast isolates were screened for their high lipid accumulation by Nile red fluorescence assay. Of 38 yeast isolates, five isolates, DL5, S7, S8, S10 and S2, showed the possibility of being oleaginous strains. Those five isolates of yeast were selected based on their potentials of lipid accumulation and further visualized for their ability to accumulate intracellular lipid by Sudan Black B staining. Results showed that isolate DL5 obtained from the decaying leaf sample had the most distinct intracellular lipid accumulation in comparison with the other isolates. Identification of isolate DL5 was found to be *Nakaseomyces glabratus* on the basis of ITS1- 5.8S rDNA - ITS2 sequence. Further investigation of lipid production by *N. glabratus* DL5 showed that this strain achieved a lipid content of  $9.61 \pm 2.17$  % of dry biomass weight at 120 hours of growth in DMY broth. These results are important preliminary data for further optimization to improve lipid production and accumulation in the yeast for future applications.

© 2025 Sitthisom, N., Vorawech, V. and Amornrattanapan, P. Recent Science and Technology published by Rajamangala University of Technology Srivijaya

\* Corresponding author.

E-mail address: [patcharanan@go.buu.ac.th](mailto:patcharanan@go.buu.ac.th)

## Cite this article as:

Sitthisom, N., Vorawech, V. and Amornrattanapan, P. 2025. A New Yeast Strain, *Nakaseomyces glabratus* DL5, Isolated from a Mangrove Forest in Chonburi Province and Its Potential for Lipid Production. *Recent Science and Technology* 17(1): 258832.

## บทคัดย่อ

งานวิจัยครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อแสวงหายีสต์ไขมันสูงจากทรัพยากรป่าชายเลนและศึกษาศักยภาพเบื้องต้นในการผลิตไขมันของยีสต์ จึงได้ทำการเก็บตัวอย่างดินและซากใบไม้จากบริเวณศูนย์ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลน จังหวัดชลบุรี จำนวน 10 ตัวอย่าง เพื่อนำมาแยกยีสต์ พบว่ายีสต์ได้ทั้งหมด 38 ไอโซเลท แบ่งเป็นไอโซเลทของยีสต์ที่แยกได้จากซากใบไม้และดิน จำนวน 11 ไอโซเลท (DL1- DL11) และ 27 ไอโซเลท (S1-S27) ตามลำดับ เมื่อนำยีสต์ที่แยกได้มาคัดกรองยีสต์ไขมันสูงโดยประเมินการสะสมไขมันภายในเซลล์ด้วยวิธี Nile red fluorescence assay จากยีสต์ทั้งหมด 38 ไอโซเลท มียีสต์ 5 ไอโซเลท ได้แก่ DL5, S7, S8, S10 และ S26 ที่มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นยีสต์ไขมันสูง จากนั้นจึงนำยีสต์ทั้ง 5 ไอโซเลทที่มีศักยภาพดังกล่าวมาตรวจดูการสะสมไขมันภายในเซลล์ด้วยการย้อมสี Sudan Black B พบว่ายีสต์ DL5 ที่แยกได้จากซากใบไม้แสดงการสะสมไขมันภายในเซลล์สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลทอื่น ๆ ซึ่งไอโซเลทนี้ถูกจำแนกได้เป็น *Nakaseomyces glabratus* จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1- 5.8S rDNA - ITS2 ต่อมาเมื่อวิเคราะห์การผลิตไขมันของ *N. glabratus* DL5 พบว่ามีปริมาณไขมัน  $9.61 \pm 2.17$  เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักชีวมวลแห้ง ที่เวลา 120 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว DMY ผลเหล่านี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สำคัญสำหรับการนำไปศึกษาต่อยอดเพื่อปรับปรุงการผลิตและการสะสมไขมันของยีสต์สำหรับการพัฒนาเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

**คำสำคัญ:** ยีสต์ไขมันสูง, การแยกยีสต์, ป่าชายเลน, การผลิตไขมัน

## 1. บทนำ

ปัจจุบันสภาวะทางเศรษฐกิจทั่วโลกมีการฟื้นตัวดีขึ้นหลังจากการระบาดใหญ่ของโควิด-19 ส่งผลให้หลายประเทศกลับมามีการลงทุนทางด้านพลังงานเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนของการพลังงานสะอาดซึ่งเป็นพลังงานทดแทนที่มีความยั่งยืน (IEA, 2023) ในส่วนของประเทศไทยนั้นมีการใช้พลังงานขั้นสุดท้ายเพิ่มขึ้นในช่วง 5 เดือนแรกของปี พ.ศ. 2566 เมื่อเทียบกับช่วงเวลาเดียวกันของปีที่ผ่านมา อีกทั้งยังมีแนวโน้มในการใช้พลังงานทดแทนที่มากขึ้นด้วย (Department of Alternative Energy Development and Efficiency, 2023) โดยทั่วไปแล้วพลังงานทดแทนที่สามารถนำมาใช้แทนเชื้อเพลิงฟอสซิลนั้นจะต้องมีราคาถูก เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และมีคุณสมบัติที่คล้ายคลึงกับเชื้อเพลิงฟอสซิล (Pankin *et al.*, 2011; Müller-Langer *et al.*, 2014) “ไบโอดีเซล” เป็นหนึ่งในพลังงานทดแทน ซึ่งเป็นพลังงานสะอาดและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม สามารถผลิตได้จากน้ำมันพืช ไขมันสัตว์ หรือแม้แต่ไขมันที่ผ่านการเปลี่ยนสภาพโดยการปรุงอาหาร ทุกวันนี้การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชและไขมันสัตว์ไม่สามารถตอบสนองความต้องการของประชากรโลกเนื่องจากไม่เพียงพอและไม่ยั่งยืนทั้งทางด้านเศรษฐกิจและสิ่งแวดล้อม (Chang *et al.*, 2013) ดังนั้นการแสวงหาแหล่งวัตถุดิบทางเลือกเพื่อการผลิตไบโอดีเซลที่มีต้นทุนต่ำจึงกำลังเป็นที่สนใจและหลายประเทศให้ความสำคัญ หนึ่งในทางเลือกของแหล่งวัตถุดิบที่มีความเป็นไปได้คือไขมันจากยีสต์ไขมันสูง เนื่องจากสามารถผลิตและสะสมไขมันภายในเซลล์ได้มากกว่าจุลินทรีย์ไขมันสูงชนิดอื่น (Saran *et al.*, 2017)

ยีสต์ (Yeast) จัดเป็นจุลินทรีย์ชนิดยูคาริโอตในกลุ่มฟังไจ มีการดำรงชีวิตเป็นแบบเซลล์เดี่ยว รูปร่างกลมรูปไข่ หรือเหมือนผลเลมอน มีการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ทั้งบนบกและในน้ำ รวมทั้งแหล่งที่อยู่ที่มีสภาพรุนแรง เช่น มีความเค็มสูง และมีความเย็นจัด นอกจากนี้ ยีสต์ยังมีความคงตัวทางพันธุกรรมสูงและไม่ก่อโรค (Limtong, 2006) ยีสต์ไขมันสูง (oleaginous yeasts) คือ ยีสต์ที่สามารถผลิตและสะสมไขมันหรือที่เรียกว่าลิพิด (lipid) ไว้ภายในเซลล์สูงกว่าร้อยละ 20 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เช่น *Rhodotorula spp.*, *Candida spp.*, *Lipomyces starkeyi*, *Cryptococcus curvatus* และ *Yarrowia lipolytica* ซึ่งสามารถสะสมไขมันได้ 40-70 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Ratledge, 1997; Ratledge, 2001; Papanikolaou *et al.*, 2001) ปริมาณการผลิตและการสะสมไขมันภายในเซลล์ยีสต์จะแตกต่างกันตามสายพันธุ์และสภาวะในการเพาะเลี้ยง (Fakankun *et al.*, 2019) ทั้งนี้ยังขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยภายนอก คือ สภาพแวดล้อมที่ยีสต์อาศัยอยู่ และอาหารที่ยีสต์ใช้ในการเจริญ และปัจจัยภายในเซลล์ยีสต์ คือ ยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตและสะสมไขมันภายในเซลล์ (Sha, 2013) ไขมันชนิดหลักที่ยีสต์ไขมันสูงผลิตและสะสมไว้ในเซลล์ ได้แก่ ไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides) ซึ่งอยู่ในรูปของหยดไขมัน (lipid droplets) ภายในเซลล์และมีองค์ประกอบเป็นกรดไขมันชนิดสายยาว เช่น กรดปาล์มมิติก (palmitic acid; C16:0) กรดโอเลอิก (oleic acid; C18:1) และกรดสเตียริก (stearic acid; C18:0) ซึ่งเป็นกรดไขมันที่มีความคล้ายคลึงกับกรดไขมันที่พบในน้ำมันพืช (Kumar *et al.*, 2017) นอกจากนี้ยีสต์ไขมันสูงยังสามารถเจริญในแหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด เช่น กลูโคส กรด

ไขมัน สารประกอบไฮโดรคาร์บอน กรดอินทรีย์และกลีเซอรอล รวมทั้งของเสียจากอุตสาหกรรมและเกษตรกรรม เช่น กลีเซอรอลดิบ กากน้ำตาลหรือเศษพืชผัก เป็นต้น และยังมีส่วนได้เปรียบมากกว่าการปลูกพืชน้ำมัน เช่น การเพาะเลี้ยงได้ตลอดปีไม่ขึ้นกับฤดูกาลและสภาพอากาศ เจริญเร็ว ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงสั้นและใช้พื้นที่น้อย สามารถควบคุมการผลิตได้ (Ageitos *et al.*, 2011) ยีสต์ไขมันสูงพบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป รวมถึงสภาพแวดล้อมในป่าชายเลน เช่น Sriwongchai *et al.* (2018) รายงานการพบยีสต์ไขมันสูง *Rhodotorula mucilaginosa* จากดินที่เก็บจากป่าชายเลนในเขตภาคตะวันออกของประเทศไทย (ฉะเชิงเทรา จันทบุรี ชลบุรี สมุทรปราการ และตราด) และ Jaingam *et al.* (2016) รายงานการพบยีสต์ไขมันสูง *Pichia kudriavzevii* จากตัวอย่างใบไม้ที่เน่าเปื่อยจากพื้นที่ป่าชายเลนในจังหวัดต่าง ๆ (เช่น กรุงเทพฯ จ.สมุทรสาคร และ จ.ระนอง เป็นต้น) ในขณะที่ Chanklan *et al.* (2012) รายงานการพบยีสต์ *P. kudriavzevii* จากตัวอย่างดิน ซากใบไม้จมเลน ขอนไม้ลอยน้ำ น้ำ ใบและดอกแสมดำ ใบแสมดำที่มีแมลงกัดแทะ รวมทั้งกิ่งไม้ เปลือกและรากหายใจของต้นโกงกาง รวมถึงใบไม้แห้งที่ตกหล่นในป่าชายเลนในจังหวัดชลบุรี

ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะแยกและคัดกรองยีสต์ไขมันสูงจากดินและซากใบไม้บริเวณป่าชายเลน จังหวัดชลบุรี และนำไปตรวจสอบปริมาณไขมันที่ยีสต์ผลิตได้ เพื่อเก็บรวบรวมเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการศึกษาและพัฒนาเพื่อนำไขมันจากยีสต์มาใช้ประโยชน์เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตไบโอดีเซลในอนาคต

## 2. วิธีดำเนินการวิจัย

### 2.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างดินและซากใบไม้มาจากศูนย์ศึกษาธรรมชาติและอนุรักษ์ป่าชายเลน จังหวัดชลบุรี โดยสุ่มเก็บตัวอย่างดินบริเวณใต้ต้นไม้ที่ต่างกันอย่างจำนวน 5 จุด โดยขุดดินให้ลึกลงไปจากผิวน้ำดินประมาณ 5-10 เซนติเมตร เก็บใส่ในถุงพลาสติกปิดเชื้อ และสุ่มเก็บตัวอย่างซากใบไม้จากบริเวณที่ต่างกันอย่าง 5 จุด โดยเก็บใบไม้ที่มีสีเหลืองน้ำตาลที่ร่วงหล่นอยู่บนพื้นจำนวน 20 ใบต่อ 1 บริเวณที่เก็บ นำใบไม้ใส่ในถุงพลาสติกปิดเชื้อ จากนั้นนำตัวอย่างมาแยกเชื้อยีสต์ที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทันที

### 2.2 การแยกยีสต์

ใส่ตัวอย่างดินปริมาณ 5 กรัม ลงในอาหารเหลว YEPD (yeast extract 10 กรัมต่อลิตร, peptone 20 กรัมต่อลิตร, dextrose 20 กรัมต่อลิตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และใส่ตัวอย่างซากใบไม้ปริมาณ 2 กรัม ลงในอาหารเหลว YEPD ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน โดยการเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อยีสต์ในอาหาร นำตัวอย่างเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YEPD แต่ละตัวอย่างมาเจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาเกลี่ย (Spread plate) ลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง YEPD บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วัน คัดเลือกโคโลนีของยีสต์ที่มีลักษณะแตกต่างกันมาแยกให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์โดยการ cross streak บนผิวหน้าอาหารแข็ง YEPD สังเกตสัณฐานวิทยาของโคโลนี (รูปร่าง ความหนา ขอบ ผิว และสีโคโลนี) ที่เจริญบนผิวหน้าอาหารแข็ง YEPD จากนั้นศึกษารูปร่างของเซลล์ยีสต์โดยการทำ wet mount และนำสไลด์ไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 40X

เชื้อบริสุทธิ์ของไอโซเลตยีสต์ที่แยกได้ ถูกเก็บรักษาไว้ในอาหารแข็ง YEPD ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเป็น stock สำหรับใช้ในการทดลอง และเก็บรักษาเชื้อยีสต์ในระยะยาวโดยนำยีสต์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว YEPD ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วันมาผสมกับสารละลายกลีเซอรอลให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 20 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

### 2.3 การคัดกรองยีสต์ไขมันสูงโดยใช้วิธี Nile red fluorescence assay

วิธีนี้ถูกนำมาใช้เพื่อตรวจสอบศักยภาพของยีสต์ในการสะสมไขมันโดยเป็นวิธี high throughput ที่สามารถทำการทดสอบกับยีสต์ได้ครั้งละหลายไอโซเลต (Sitepu *et al.*, 2012) จึงเหมาะสำหรับนำมาใช้ในการคัดกรองคุณสมบัติของยีสต์ที่ต้องการ วิธีนี้ทำได้โดยเริ่มจากการเตรียมหัวเชื้อโดยนำไอโซเลตของยีสต์จากตัวอย่างดินและซากใบไม้ที่แยกได้ และ *Saccharomyces cerevisiae* (ชุดควบคุมผลลบ) โดยเชื้อโคโลนีเดี่ยวของแต่ละไอโซเลต ๆ ละ 2-3 โคโลนี ใส่ลงในอาหารเหลว YEPD 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที จากนั้นย้ายหัวเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลว DMY (dextrose 40 กรัมต่อลิตร,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 กรัมต่อลิตร, yeast extract 3 กรัมต่อลิตร,  $KH_2PO_4$  8 กรัมต่อลิตร) 20 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน โดยการเขย่า

ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เมื่อบ่มครบ 3 วัน ให้ย้ายเชื้อยีสต์มาใส่ในอาหารเหลว DMY 10 มิลลิลิตร และปรับให้มีค่าความขุ่น ( $OD_{600\text{ nm}}$ ) เริ่มต้นเท่ากับ 1.0 จากนั้นเตรียมชุดทดสอบ (ไอโซเลทละ 3 ข้าง) (Sitepu *et al.*, 2012) โดยเปิดเซลล์แขวนลอยของไอโซเลทยีสต์ที่ปรับค่าความขุ่น ( $OD_{600\text{ nm}}$ ) เริ่มต้นเท่ากับ 1.0 แล้วปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมกับ DMSO/อาหารเหลว DMY (1:1, โดยปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Nile red ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียมชุดควบคุมผลลบโดยใช้เซลล์แขวนลอยของเชื้อ *S. cerevisiae* แทนยีสต์แต่ละไอโซเลท จากนั้นเปิดเซลล์แขวนลอยของเชื้อยีสต์ที่เป็นชุดทดลองและชุดควบคุมผลลบ ตัวอย่างละ 200 ไมโครลิตร ใส่ลงไปในหลุมของ 96-well black microplate แล้วนำไปตรวจดูการสะสมไขมันของยีสต์โดยวัดค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ เพื่อประเมินปริมาณไขมันภายในเซลล์ยีสต์ด้วยเครื่อง Fluorescence spectrophotometer (Cary Eclipse, Agilent Technologies, USA) โดยตั้งค่าความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้นที่ 530 นาโนเมตร และค่าความยาวคลื่นที่คายแสงที่ 590 นาโนเมตร คัดเลือกไอโซเลทของยีสต์ที่มีความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงกว่าชุดควบคุมผลลบ (*S. cerevisiae*) ไปตรวจดูการสะสมไขมันโดยการย้อมสี Sudan Black B ต่อไป

#### 2.4 การวิเคราะห์ความสามารถในการสะสมไขมันของยีสต์ด้วยวิธีย้อมสี Sudan Black B

นำไอโซเลทยีสต์ที่ถูกคัดกรองมาแล้วโดยวิธี Nile red fluorescence assay มาทำการย้อมสี Sudan Black B เพื่อยืนยันความสามารถของยีสต์ในการสะสมไขมันภายในเซลล์ (Burdon, 1946; Jape *et al.*, 2014) วิธีนี้ทำได้โดยเริ่มจากการนำไอโซเลทของยีสต์มาเลี้ยงในอาหารเหลว DMY 20 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เก็บเซลล์ยีสต์มาเกลี่ยบนแผ่นสไลด์ รอแห้ง จากนั้นนำสไลด์ไปผ่านเปลวไฟเพื่อตรึงเซลล์ จากนั้นทำการย้อมสี 0.3 เปอร์เซ็นต์ Sudan Black B ทั้งไว้ให้ท่วมรอยเกลี่ย ทั้งไว้ 15 นาที เทสีทิ้งแล้วชะด้วยสีย้อม 0.5 เปอร์เซ็นต์ Safranin O จากนั้นหยดสีย้อม 0.5 เปอร์เซ็นต์ Safranin O ทั้งไว้ 30 วินาที ล้างออกด้วยน้ำ แล้วซับให้แห้ง (Burdon, 1946; Jape *et al.*, 2014) ตรวจดูสไลด์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 100X ตรวจดูการสะสมไขมันภายในเซลล์ยีสต์ซึ่งจะติดสีเทาเข้มหรือดำของสีย้อม Sudan Black B และภายในไซโทพลาสซึมที่ติดสีแดงของ Safranin O

#### 2.5 การวิเคราะห์การเจริญและการสะสมไขมันของยีสต์โดยการเพาะเลี้ยงแบบ Batch

เตรียมหัวเชื้อยีสต์โดยเชื้อโคโลนีเดี่ยวของยีสต์ลงในอาหารเหลว YEED 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว DMY 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน เก็บเซลล์ทั้งหมดในแต่ละฟลasks มาใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ ล้างเซลล์โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อ จำนวน 2 ครั้ง ๆ ละ 20 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 5000 x g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแขวนลอยเซลล์ในน้ำกลั่นอีกครั้งแล้วนำไปอบแห้งในตู้อบลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ บันทึกน้ำหนักชีวมวลแห้ง

นำเซลล์แห้งมาสกัดไขมัน (Castanha *et al.*, 2013; Tapia *et al.*, 2012) โดยเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 2 โมลาร์ ในอัตราส่วน 10:1 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก ตั้ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ 6000 x g เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาแขวนลอยในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ, เมทานอล และคลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 4:10:5 โดยปริมาตร ปั่นเหวี่ยงที่ 180 x g อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที เก็บของเหลวในชั้นคลอโรฟอร์มมาระเหยคลอโรฟอร์มออกให้หมด แล้วเก็บส่วนไขมันมาอบแห้งในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ นำตัวอย่างไขมันที่ได้มาชั่งน้ำหนัก คำนวณปริมาณไขมันจากน้ำหนักไขมันที่ได้ต่อปริมาตรอาหาร 1 ลิตร และคำนวณน้ำหนักไขมันที่ได้ต่อน้ำหนักชีวมวลแห้ง 100 กรัม

#### 2.6 การจำแนกชนิดของยีสต์โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1- 5.8S rDNA - ITS2

##### 2.6.1 การเลี้ยงเชื้อยีสต์และการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

เชื้อโคโลนีเดี่ยวของยีสต์ที่อยู่บนอาหารแข็ง YEED มา 2-3 โคโลนี ใส่ลงในอาหารเหลว YEED ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 วัน เก็บเซลล์มาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Nucleic acid extraction kit (Vivantis, Malaysia) เก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (template) ในปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)

### 2.6.2 การเพิ่มปริมาณยีน ITS1- 5.8S rDNA - ITS2 โดยวิธี PCR

เตรียมส่วนผสมสำหรับปฏิกิริยา PCR โดยมีจิโนมิก ดีเอ็นเอของยีสต์ 500 นาโนกรัม เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3') และ ITS4 (5'- TCCTCCGCTTAT TGATATGC -3') (White *et al.*, 1990) อย่างละ 0.5 ไมโครโมลาร์, 2.5 U *Taq* polymerase, 0.2 ไมโครโมลาร์ dNTP และ 1.5 มิลลิโมลาร์  $MgCl_2$  ดำเนินปฏิกิริยา PCR ในเครื่อง Thermal cycler (T-Gradient, Biometra®, Germany) ภายใต้สภาวะดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที (1 รอบ); 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที, 53 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 45 วินาที (30 รอบ); และ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที (1 รอบ) ตรวจสอบขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ 1.2 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล โดยมี SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, USA) ในการย้อมดีเอ็นเอ และใช้ VC 100 bp plus DNA ladder เป็น marker สำหรับเทียบขนาดดีเอ็นเอ และให้กระแสไฟฟ้าโดยใช้ความต่างศักย์ที่ 80 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาทีและถ่ายภาพโดยใช้ Omega Fluor Plus™ Gel Documentation System (Aplegen, USA)

### 2.6.3 การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลผลิตพีซีอาร์มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย PCR clean-up kit (Vivantis, Malaysia) ก่อนส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ถูกนำมาตรวจสอบแก้ไขโดยใช้โปรแกรม BioEdit 7.2 (Hall, 2013) แล้วนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล Genbank โดยใช้โปรแกรม nucleotide BLAST เพื่อระบุแทกซอนของยีสต์ไขมันสูงที่ศึกษา และดำเนินการฝากเก็บข้อมูลลำดับ นิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1- 5.8S rDNA - ITS2 ของยีสต์ที่ศึกษาไว้ในฐานข้อมูล Genbank โดยมี Accession No. OR658437

## 3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

### 3.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกยีสต์จากดินและซากใบไม้บริเวณป่าชายเลน

จากการแยกยีสต์จากตัวอย่างดินและซากใบไม้ที่เก็บจากบริเวณป่าชายเลน จำนวน 10 ตัวอย่าง มาเติมลงในอาหารเหลว YEPD บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ภายใต้สภาวะเขย่า จากนั้นนำตัวอย่างมา

เจือจางและเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง YEPD บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน สามารถคัดเลือกโคโลนียีสต์ที่มีลักษณะแตกต่างกันบนอาหารแข็ง YEPD มาแยกให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 38 ไอโซเลท โดยแบ่งเป็นยีสต์ที่แยกได้จากซากใบไม้จำนวน 11 ไอโซเลท ได้แก่ DL1-DL11 และยีสต์ที่แยกได้จากดินจำนวน 27 ไอโซเลท ได้แก่ S1-S27 เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนียีสต์ทั้ง 38 ไอโซเลท พบว่ามีลักษณะโคโลนีที่ต่างกัน 7 แบบ โดยทุกไอโซเลทมีโคโลนีสีขาว ทึบแสง และไอโซเลทยีสต์ส่วนใหญ่ (คิดเป็น 42.11 เปอร์เซ็นต์ของไอโซเลทยีสต์ทั้งหมด) มีโคโลนีรูปร่างกลม (circular) หนูนูนมาจากผิวหน้าอาหารเล็กน้อย (convex) ขอบเรียบ (entire) ผิวหน้าเรียบ (smooth) มีขนาดตั้งแต่ 2.8-4.0 มิลลิเมตร (Table 1) และเมื่อศึกษาลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยการทำเว็ทเมาท์ (wet mount) พบว่าทุกไอโซเลทมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศด้วยการแตกหน่อ (budding) ไอโซเลทส่วนใหญ่ (คิดเป็น 42.11 เปอร์เซ็นต์ของไอโซเลทยีสต์ทั้งหมด) มีเซลล์รูปร่างรี (ellipsoidal) และมีไอโซเลทยีสต์ร้อยละ 47.36 ของไอโซเลททั้งหมดสามารถสร้างเส้นใยเทียม (pseudohyphae) (Table 2) ยีสต์เป็นฟงไจที่มีการดำรงชีพแบบเซลล์เดี่ยว โดยมีทั้งชนิดที่มีการแบ่งเซลล์โดยการแตกหน่อและชนิดที่มีการแบ่งเซลล์ตามขวาง (fission) อีกทั้งยังมียีสต์หลายชนิดที่สามารถสร้างเส้นใยแท้และเส้นใยเทียมได้ (Satyanarayana and Kunze, 2009) ยีสต์สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งบนบกและในน้ำ โดยก่อนหน้านี้มีรายงานการพบยีสต์จากตัวอย่างหลายชนิดจากป่าชายเลน เช่น กิ่งไม้ร่วง เปลือกไม้ และลูกไม้ร่วง (Prasatsri, 2006) ตัวอย่างน้ำ ตะกอนดิน น้ำกร่อย ใบไม้ ดอกไม้ รากไม้ ซากใบไม้ (Chanklan *et al.*, 2012) น้ำ ดิน วัสดุชีวภาพที่เน่าเปื่อย (Hoondee *et al.*, 2019) ตะกอนดิน ใบผล และรากหายใจของต้นลำแพน (*Sonneratia alba*) (Lee *et al.*, 2020) เป็นต้น เช่นเดียวกับในการศึกษาครั้งนี้ที่พบยีสต์จากตัวอย่างดินและซากใบไม้ที่เก็บมาจากป่าชายเลน

**Table 1** Colony morphology of yeasts isolated from soil and decaying leaf samples when grown on YEPD agar at 30°C for 2 days. Frequency of yeast isolates for each colony morphology are also shown here.

| Colony morphology |           |          |            |                   |           | No. of yeast isolates | Frequency of yeast isolates |
|-------------------|-----------|----------|------------|-------------------|-----------|-----------------------|-----------------------------|
| Form              | Elevation | Margin   | Surface    | Color/<br>Opacity | Size (mm) |                       |                             |
| circular          | convex    | entire   | smooth     | white / opaque    | 2.8 – 4.0 | 16                    | 42.11                       |
| circular          | convex    | entire   | glistening | white / opaque    | 2.7 – 3.0 | 5                     | 13.16                       |
| circular          | convex    | entire   | rough      | white / opaque    | 2.8 – 3.3 | 2                     | 5.26                        |
| circular          | umbonate  | entire   | smooth     | white / opaque    | 2.8 – 3.5 | 3                     | 7.89                        |
| spindle           | convex    | erose    | rough      | white / opaque    | 3.0 – 3.5 | 7                     | 18.42                       |
| irregular         | raised    | undulate | wrinkled   | white / opaque    | 4.0 - 4.8 | 2                     | 5.26                        |
| irregular         | umbonate  | undulate | rough      | white / opaque    | 2.7 – 4.0 | 3                     | 7.89                        |
| Total             |           |          |            |                   |           | 38                    | 100                         |

**Table 2** Microscopic characteristics of isolated yeasts when grown on YEPD agar at 30°C for 2 days. Frequency of yeast isolates for each cell morphology are also shown here.

| Cell shape                | Presence of Budding | Pseudohyphae formation | No. of yeast isolates | Frequency of yeast isolates |
|---------------------------|---------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| ellipsoidal               | +                   | -                      | 16                    | 42.11                       |
| ellipsoidal               | +                   | +                      | 15                    | 39.47                       |
| spherical                 | +                   | -                      | 4                     | 10.53                       |
| spherical                 | +                   | +                      | 2                     | 5.26                        |
| ellipsoidal and spherical | +                   | +                      | 1                     | 2.63                        |
| Total                     |                     |                        | 38                    | 100                         |

**Note :** + means presence, - means absence

### 3.2 การคัดกรองยีสต์ไขมันสูงและการวิเคราะห์ความสามารถในการสะสมไขมันของยีสต์

เมื่อนำยีสต์ที่แยกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว DMY บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ภายใต้สภาวะเขย่า แล้วเก็บเซลล์ยีสต์มาคัดกรองยีสต์ไขมันสูงโดยวิธี Nile red fluorescence assay พบว่าจากยีสต์ทั้งหมด 38 ไอโซเลท มีเพียง 5 ไอโซเลท ได้แก่ DL5, S7, S8, S10 และ S26 ที่มีค่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์สูงกว่า *S. cerevisiae* ที่เป็นชุดควบคุมผลลบบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยไอโซเลท DL5 มีค่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์สูงที่สุด ซึ่งเป็นการบ่งชี้ว่าไอโซเลท DL5 มีศักยภาพในการสะสมไขมันสูงกว่าไอโซเลทอื่น ๆ (Figure 1) วิธี Nile red fluorescence assay เป็นเทคนิคของการใช้สี Nile red ที่มีคุณสมบัติละลายได้ในไขมันและเรืองแสงได้ เป็นเทคนิครวดเร็วที่ใช้

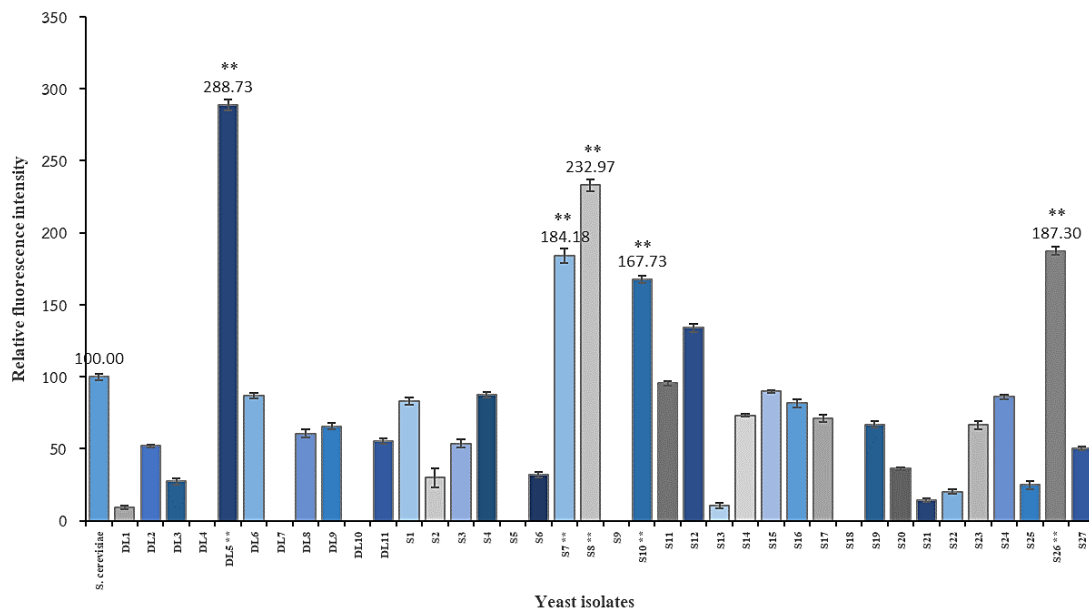
ประเมินการสะสมไขมันภายในเซลล์ยีสต์ได้ โดยระดับความเข้มแสงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จะแปรผันตรงกับปริมาณไขมันภายในเซลล์ ทำให้สามารถคัดเลือกไอโซเลทของยีสต์ที่มีศักยภาพสูงสุดในการสะสมไขมันได้ (Sitepu *et al.*, 2012)

ต่อมาเมื่อนำยีสต์ทั้ง 5 ไอโซเลทมาวิเคราะห์ความสามารถในการสะสมไขมันภายในเซลล์ด้วยการย้อมสี Sudan Black B โดยหากยีสต์มีความสามารถในการสะสมไขมันได้จะพบการติดสีเทาเข้มหรือดำของสีย้อม Sudan Black B และบริเวณอื่นภายในไฮโดพลาสซึมที่ไม่มีการสะสมไขมันจะติดสีแดงของ Safranin O ซึ่งผลการทดลองที่ได้คือมีเพียงไอโซเลท DL5 ที่พบการสะสมไขมันภายในเซลล์ที่ชัดเจนกว่ายีสต์ไอโซเลทอื่น ๆ เนื่องจากสังเกตเห็นถุงสะสมไขมันรูปร่างกลม ติดสีเทาเข้มของ Sudan Black B อย่างชัดเจน (Figure 2) Sudan Black B เป็นสีย้อมที่นิยมใช้สำหรับการย้อมดูการสะสมไขมันภายในเซลล์ โดยเป็นสี

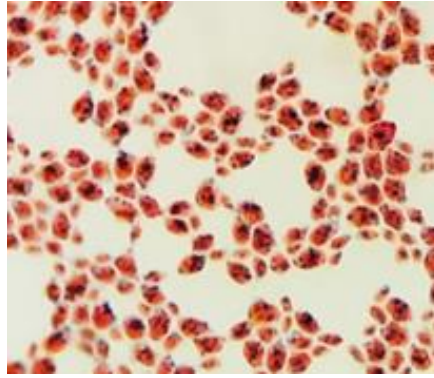
ชนิด Azo dye ที่ใช้ย้อมไขมันได้ทั้งชนิดที่เป็นไตรกลีเซอไรด์ และฟอสโฟลิพิด โดยเมื่อสังเกตดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงจะเห็นไขมันที่สะสมอยู่ในถุงสะสมไขมันของเซลล์ติดสีดำของ Sudan Black B และบริเวณอื่นภายในไซโทพลาสซึมติดสีแดงของ Safranin O (Mokobi, 2022)

มีงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ใช้วิธีข้างต้นในการคัดกรองยีสต์ไขมันสูง ดังรายงานของ Amornrattanapan and Thongthep (2019) ที่ใช้สีย้อม Sudan Black B ร่วมกับวิธี Nile red fluorescence assay ในการวิเคราะห์ความสามารถในการสะสมไขมันภายในเซลล์ยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างใบไม้และดินบริเวณป่าชายเลน จังหวัดชลบุรี พบว่ามียีสต์ 7 ไอโซเลทจากทั้งหมด 26 ไอโซเลท ที่พบการสะสมไขมันภายในเซลล์ งานวิจัยของ Chomchuen *et al.* (2021) ที่ใช้สีย้อม Sudan Black B ร่วมกับวิธี Nile red fluorescence assay ในการคัดกรองยีสต์ไขมันสูงที่แยกได้จากดินบริเวณอ่างเก็บน้ำบางพระ จังหวัดชลบุรี พบว่ามียีสต์ 8 ไอโซเลทจากทั้งหมด 39 ไอโซเลทที่มีศักยภาพในการสะสมไขมันสูง งานวิจัยของ Sriwongchai *et al.* (2018) ที่ใช้สีย้อม Sudan Black B ย้อมไขมันภายในเซลล์ยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินป่าชายเลนในเขตภาคตะวันออกของประเทศไทย พบว่ามียีสต์ 23 ไอโซเลทจากทั้งหมด 51

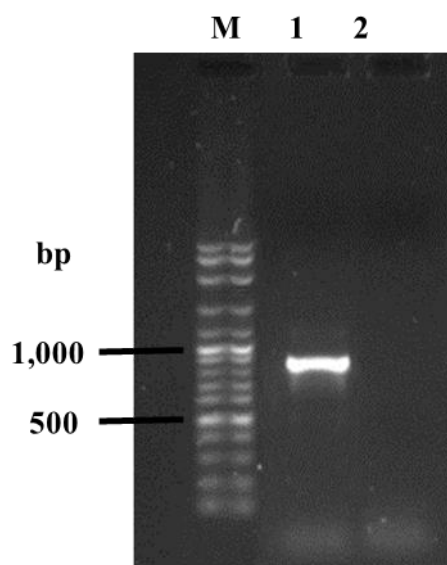
ไอโซเลทที่พบการสะสมไขมันภายในเซลล์ งานวิจัยของ Berikten *et al.* (2021) ที่ใช้ Sudan Black B ในการตรวจสอบการสะสมไขมันในยีสต์ 92 สายพันธุ์ พบว่ามียีสต์ 62 สายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการสะสมไขมันภายในเซลล์ และงานวิจัยของ Miranda *et al.* (2020) ที่ใช้วิธี Nile red fluorescence assay ในการตรวจสอบการสะสมไขมันของยีสต์จำนวน 366 ไอโซเลท พบว่ามียีสต์ 19 ไอโซเลทที่มีความสามารถในการสะสมไขมันสูง โดยวิธีที่ใช้ Sudan Black B และ Nile red ในการตรวจสอบการสะสมไขมันในเซลล์ยีสต์นี้ให้ผลสอดคล้องกับปริมาณไขมันของยีสต์ที่สกัดออกมาจากเซลล์ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีเหล่านี้สามารถใช้ในการคัดกรองศักยภาพในการสะสมไขมันของยีสต์ได้ (Sitepu *et al.*, 2012; Miranda *et al.*, 2020; Jape *et al.*, 2014) อย่างไรก็ตาม ไม่มีงานวิจัยใดที่เปรียบเทียบวิธีที่ใช้ Sudan Black B และ Nile red กับวิธีอื่น เช่น Gas chromatography ในการตรวจสอบปริมาณไขมันภายในเซลล์ เนื่องจากวิธี Gas chromatography เหมาะสำหรับการนำมาใช้ในการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของไขมันที่สร้างโดยยีสต์ (Schulze *et al.*, 2014; Berikten *et al.*, 2021)



**Figure 1** Relative fluorescence intensity of Nile red-stained isolated yeasts in comparison with that of a negative control, *S. cerevisiae*. Symbol \*\* indicates yeast isolates that showed significantly higher fluorescence intensity than *S. cerevisiae* ( $p < 0.05$ ); Error bar represents the standard deviation of three replicates.



**Figure 2** Microscopic image showing intracellular lipid accumulation in the isolate DL5 that were grown in DMY broth for 6 days and stained with Sudan Black B. (Total magnification; 1,000X)



**Figure 3** Agarose gel electrophoresis of PCR amplicon of ITS1- 5.8S rDNA - ITS2 of the isolate DL5. Lane M: VC 100 bp plus DNA ladder; Lane 1: PCR amplicon of ITS1- 5.8S rDNA - ITS2 using genomic DNA of the isolate DL5 as template; Lane 2: NTC (no template control)

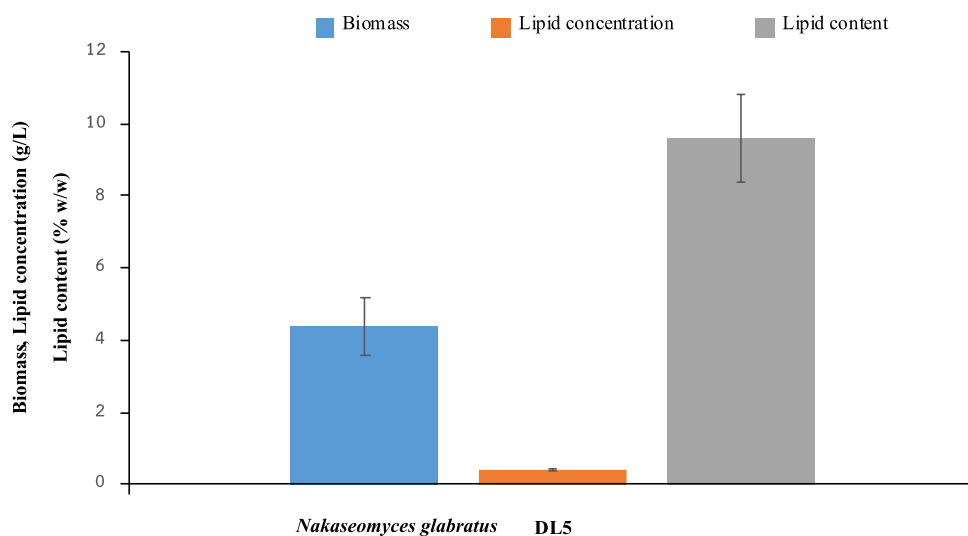
### 3.3 การจำแนกชนิดของยีสต์โดยวิธีทางอณูชีววิทยา

เนื่องจากไอโซเลท DL5 แสดงศักยภาพในการสะสมไขมันที่โดดเด่นกว่ายีสต์ไอโซเลทอื่น ๆ จึงได้นำไอโซเลท DL5 มาจัดจำแนกโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1- 5.8S rDNA - ITS2 พบว่าผลผลิตพีซีอาร์ มีขนาดประมาณ 850 คู่เบส (Figure 3)

จากการวิเคราะห์พบว่าบริเวณ ITS1- 5.8S rDNA - ITS2 ของไอโซเลท DL5 มีความคล้ายคลึงสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับ *Nakaseomyces glabratus* (*Candida glabrata*) หลายสายพันธุ์รวมถึงสายพันธุ์ที่เป็น Type strain ได้แก่ CBS 138 และ ATCC 2001 (Table 3) จึงระบุแทกซอนของยีสต์ไอโซเลท DL5 เป็น *Nakaseomyces glabratus* (*Candida glabrata*)

**Table 3** BLAST search results for nucleotide sequence of ITS1- 5.8S rDNA - ITS2 of the isolate DL5 in comparison with closely related strains in Genbank database.

| No. | Accession no. | Genus / Species / Strains                         | %Coverage<br>(279 bp) | %Identity |
|-----|---------------|---------------------------------------------------|-----------------------|-----------|
| 1   | MH545922.1    | <i>Nakaseomyces glabratus</i> CBS 138             | 100                   | 100       |
| 2   | CP048130.1    | <i>Nakaseomyces glabratus</i> ATCC 2001           | 100                   | 100       |
| 3   | MN699479.1    | <i>Nakaseomyces glabratus</i> isolate ITG22       | 100                   | 100       |
| 4   | MN540214.1    | <i>Nakaseomyces glabratus</i> isolate L-3329/2012 | 100                   | 100       |

**Figure 4** Biomass (g/L), lipid concentration (g/L) and lipid content (% of cell dry weight) of *N. glabratus* DL5 that was grown in DMY broth for 120 hours under a shaking condition. Error bar represents the standard deviation of three replicates.

ยีสต์ไอโซเลท DL5 จัดจำแนกได้เป็น *Nakaseomyces glabratus* จัดอยู่ใน Phylum Ascomycota, Class Saccharomycetes, Order Saccharomycetales และ Family Saccharomycetaceae เมื่อก่อนถูกเรียกว่า *Cryptococcus glabrata* จากนั้นถูกเปลี่ยนเป็น *Torulopsis glabrata* ต่อมาเป็น *Candida glabrata* และปัจจุบันเป็น *Nakaseomyces glabratus* ตามลำดับ (Kumar *et al.*, 2019) *N. glabratus* (*C. glabrata*) สามารถพบได้บริเวณพื้นผิวเยื่อของมนุษย์ เช่น ช่องปาก ทางเดินอาหาร ช่องคลอด ผิวหนัง หรือในอุจจาระ ซึ่งอาจปนเปื้อนไปอยู่ในสิ่งแวดล้อมทางธรรมชาติได้ (Gabaldón and Fairhead, 2018) จึงสามารถพบยีสต์ชนิดนี้ในตัวอย่างจากป้าชายเลนที่งานวิจัยนี้ศึกษา

#### 3.4 การศึกษาการผลิตชีวมวลและการสะสมไขมันของยีสต์ *Nakaseomyces glabratus* DL5

จากการนำยีสต์ *N. glabratus* DL5 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว DMY บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน ภายใต้สภาวะเขย่า จากนั้นเก็บเซลล์ทั้งหมดมาวิเคราะห์ชีวมวล พบว่า *N. glabratus* DL5 มีชีวมวลเท่ากับ  $4.37 \pm 0.82$  กรัมต่อลิตร และเมื่อนำชีวมวลแห้งมาสกัดไขมันโดยใช้เมทานอลและคลอโรฟอร์ม พบว่ามีการผลิตไขมัน  $0.41 \pm 0.02$  กรัมต่อลิตร และคิดเป็นปริมาณของไขมันต่อน้ำหนักชีวมวลแห้ง  $9.61 \pm 2.17$  เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงใน Figure 4

มีงานวิจัยที่ศึกษาการสะสมไขมันของ *N. glabratus* (*Candida glabrata*) มาก่อน โดย Berikten *et al.* (2021) รายงานว่า *C. glabrata* ที่นำมาศึกษาสามารถใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและสามารถสะสมไขมันได้  $5.54 \pm 0.17$  กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณไขมันเท่ากับ  $44.34 \pm 1.33$  % ของน้ำหนักชีวมวลแห้ง ในสภาวะเขย่า 150 รอบต่อนาที ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และมีงานวิจัยอื่น ๆ ที่แสดงให้เห็นปริมาณไขมันที่แตกต่างกันใน *Candida* สปีชีส์ต่าง ๆ โดย Thangavelu *et al.* (2021) รายงานว่า *Candida tropicalis* ASY2 สามารถผลิตและสะสมไขมันได้ 1.20 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณไขมันเท่ากับ 48 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักชีวมวลแห้งเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะเขย่า 150 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน Kolouchová *et al.* (2015) รายงานว่า *Candida* sp. สามารถผลิตและสะสมไขมันได้ 1.58 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณไขมันเท่ากับ 35.40 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักชีวมวลแห้งเมื่อมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะเขย่า 150 รอบต่อนาที ที่ 28 องศาเซลเซียส จนถึง stationary phase การที่ปริมาณไขมันที่สะสมภายในเซลล์ยีสต์มีค่าแตกต่างกันนั้นอาจเป็นผลมาจากความแตกต่างของสายพันธุ์ยีสต์ การขาดแคลนสารอาหารบางชนิด และสภาวะในการเพาะเลี้ยงที่ต่างกัน เช่น อุณหภูมิ ค่าพีเอช ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง เป็นต้น (Sha, 2013; Fakankun *et al.*, 2019) อีกทั้งยังขึ้นอยู่กับปัจจัยภายในเซลล์ยีสต์ได้แก่ ยีนสำหรับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของการผลิตและสะสมไขมันภายในเซลล์ยีสต์ (Dourou *et al.*, 2018) อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองนี้ *N. glabratus* DL5 ยังมีปริมาณไขมันภายในเซลล์ที่สูงไม่ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักชีวมวลแห้งที่เป็นขีดจำกัดขั้นต่ำของปริมาณไขมันที่นิยามให้พบในจุลินทรีย์ไขมันสูง ทั้งนี้เนื่องจากสภาวะที่เพาะเลี้ยงยีสต์ในงานวิจัยนี้อาจยังไม่เหมาะสมที่จะกระตุ้นให้ยีสต์สะสมไขมันได้ดี ดังนั้น การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อให้สามารถผลิตและสะสมไขมันได้ในปริมาณสูงจึงเป็นประเด็นสำคัญที่ควรนำไปศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

#### 4. สรุป

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าดินและซากใบไม้จากป่าชายเลนเป็นแหล่งอาศัยที่นาสนใจของยีสต์ที่มีประโยชน์ในทางเทคโนโลยีชีวภาพ โดยสามารถแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 38 ไอโซเลท แบ่งเป็นยีสต์ที่แยกได้จากซากใบไม้ จำนวน 11 ไอโซเลท และยีสต์ที่แยกได้จากดิน จำนวน 27 ไอโซเลท เมื่อนำยีสต์ที่แยกได้ไปคัดกรองการสะสมไขมันโดยวิธี Nile

red fluorescence assay และตรวจดูการสะสมไขมันภายในเซลล์ยีสต์ด้วยการย้อมสี Sudan Black B พบว่า ไอโซเลท DL5 มีการสะสมไขมันภายในเซลล์สูงสุด ซึ่งจัดจำแนกได้เป็น *Nakaseomyces glabratus* จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1- 5.8S rDNA - ITS2 เมื่อนำ *N. glabratus* DL5 ไปวิเคราะห์การผลิตชีวมวลและการสะสมไขมัน พบว่าที่เวลา 120 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว DMY *N. glabratus* DL5 ผลิตชีวมวลได้เท่ากับ  $4.37 \pm 0.82$  กรัมต่อลิตร สะสมไขมันได้เท่ากับ  $0.41 \pm 0.02$  กรัมต่อลิตร และคิดเป็นปริมาณไขมัน  $9.61 \pm 2.17$  เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักชีวมวลแห้ง ซึ่งหากต้องการที่จะปรับปรุงการผลิตและสะสมไขมันของยีสต์สายพันธุ์นี้ ควรที่จะต้องศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยต่าง ๆ เช่น อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ ค่าพีเอช และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง เป็นต้น เพื่อให้สามารถนำไขมันจากยีสต์ไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพหรือประโยชน์ในด้านอื่น ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

#### 5. เอกสารอ้างอิง

- Ageitos, J.M., Vallejo, J.A., Veiga-Crespo, P. and Villa, T.G. 2011. Oily yeasts as oleaginous cell factories. **Applied Microbiology and Biotechnology** 90(4): 1219-1227.
- Amornrattanapan, P. and Thongthep, P. 2019. Isolation and screening of oleaginous yeasts capable of using glycerol as a carbon source. **Ramkhamhaeng Research Journal of Sciences and Technology** 22(2): 61-70.
- Berikten, D., Hoşgün, E.Z., Gökdağ Otuzbiroğlu, A., Bozan, B. and Kivanç, M. 2021. Lipid production from crude glycerol by newly isolated oleaginous yeasts: Strain selection, molecular identification and fatty acid analysis. **Waste and Biomass Valorization** 12: 5461-5470.
- Burdon, K.L. 1946. Fatty material in bacteria and fungi revealed by staining dried and fixed slide preparations. **Journal of Bacteriology** 52(6): 665-678.
- Castanha, R.F., Morais, L.A.S., Mariano, A.P. and Monteiro, R.T.R. 2013. Comparison of two lipid extraction methods production methods

- produced by yeast in cheese whey. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 56(4): 629-636.
- Chang, Y.H., Chang, K.S., Hsu, C.L., Chuang, L.T., Chen, C.Y., Huang, F.U. and Jang, H.D. 2013. A comparative study on batch and fed-batch cultures of oleaginous yeast *Cryptococcus* sp. in glucose-based media and corn cob hydrolysate for microbial oil production. **Fuel** 105(1): 711-717.
- Chanklan, R., Kungkaew, P., Am-In, S. and Jindamorakot, S. 2012. Diversity of yeasts in the Nature Education Center for mangrove Conservation and Ecotourism, Chonburi Province. **Thai Journal of Science and Technology** 1(3): 155-168. (in Thai)
- Chomchuen, S., Arkornnak, M. and Amornrattanapan, P. 2021. Isolation and identification of oleaginous yeasts from soils at Bang Phra Reservoir, Chonburi province. **Burapha Science Journal** 26(2): 886-906. (in Thai)
- Department of Alternative Energy Development and Efficiency. 2023. **Energy Situation in Thailand from January to May 2023**. Available Source: <https://kc.dede.go.th/knowledge-view.aspx?p=478>, September 20, 2023. (in Thai)
- Dourou, M., Aggeli, D., Papanikolaou, S. and Aggelis, G. 2018. Critical steps in carbon metabolism affecting lipid accumulation and their regulation in oleaginous microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology** 102(6): 2509-2523.
- Fakankun, I., Mirzaei, M. and Levin, D.B. 2019. Impact of culture conditions on neutral lipid production by oleaginous yeast, pp. 311-325. In Balan, V., eds. **Microbial Lipid Production. Methods in Molecular Biology, Vol. 1995**. Humana, New York.
- Gabaldón, T. and Fairhead, C. 2018. Genomes shed light on the secret life of *Candida glabrata*: not so asexual, not so commensal. **Current Genetics** 65(1): 93-98.
- Hall, T. 2013. **BioEdit V7.2**. Available Source: <https://bioedit.software.informer.com/versions/>, February 10, 2022.
- Hoonddee, P., Wattanagonniyom, T., Weeraphan, T., Tanasupawat, S. and Savarajara, A. 2019. Occurrence of oleaginous yeast from mangrove forest in Thailand. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 35(7): 108.
- IEA. 2023. **World Energy Investment 2023**. Available Source: <https://www.iea.org/reports/world-energy-investment-2023>, September 20, 2023.
- Jaingam, S., Sanevas, N. and Sirikhachornkit, A. 2016. Lipid production of a yeast strain isolated from a mangrove forest in Thailand, pp. 553-557. In **The Proceedings of the 5<sup>th</sup> Marine Science Conference 2016**. Bangkok. (in Thai)
- Jape, A., Harsulkar, A. and Sapre, V.R. 2014. Modified Sudan Black B staining method for rapid screening of oleaginous marine yeasts. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences** 3(9): 41-46.
- Kolouchová, I., Schreiberová, O., Sigler, K., Masák, J. and Řezanka, T. 2015. Biotransformation of volatile fatty acids by oleaginous and non-oleaginous yeast species. **FEMS Yeast Research** 15(7): fov076.
- Kumar, D., Singh, B. and Korstad, J. 2017. Utilization of lignocellulosic biomass by oleaginous yeast and bacteria for production of biodiesel and renewable diesel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 73: 654-671.
- Kumar, K., Askari, F., Sahu, M. and Kaur R. 2019. *Candida glabrata*: A lot more than meets the eye. **Microorganisms** 7(2): 39.
- Lee, N.L.Y., Huang, D., Quek, Z.B.R., Lee, J.N. and Wainwright, B.J. 2020. Distinct fungal communities associated with different organs of the mangrove *Sonneratia alba* in the Malay Peninsula. **IMA Fungus** 11: 17.
- Limtong, S. 2006. **Yeasts: Diversity and Biotechnology**. Kasetsart University Press, Bangkok. (in Thai)

- Miranda, C., Bettencourt, S., Pozdniakova, T., Pereira, J., Sampaio, P., Franco-Duarte, R. and Pais, C. 2020. Modified high-throughput Nile red fluorescence assay for the rapid screening of oleaginous yeasts using acetic acid as carbon source. **BMC Microbiology** 20: 60.
- Mokobi, F. 2022. **Sudan Black B staining**. Available Source: <https://microbenotes.com/sudan-black-b-staining/>, October 28, 2022.
- Müller-Langer, F., Majer, S. and O'Keeffe, S. 2014. Benchmarking biofuels - a comparison of technical, economic and environmental indicators. **Energy Sustainability and Society** 4: 20.
- Pankin, K.E., Ivanova, Y.V., Kuz'mina, R.I. and Shtykov, S.N. 2011. Comparison of the physicochemical characteristics of biofuels and petroleum fuels. **Chemistry and Technology of Fuels and Oils** 47: 7-11.
- Papanikolaou, S., Chevalot, I., Komaitis, M., Marc, I. and Aggelis, G. 2001. Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology** 58(3): 308-312.
- Prasatsri, K. 2006. Identification of yeast isolated from organic matters in mangrove forests by conventional and molecular taxonomy. Master of Science (Microbiology), Kasetsart University. (in Thai)
- Ratlledge, C. 1997. Microbial Lipids, pp. 133-197. In Rehm, H.J., Reed, R., Pulher, A., Stadler, P., Kleinkauf, H. and von Dohren, H., eds. **Biotechnology: Products of Secondary Metabolism**. Wiley-VCH, Weinheim.
- Ratlledge, C. 2001. Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. **Biochemical Society Transactions** 30: 1047-1050.
- Saran, S., Mathur, A., Dalal, J. and Saxena, R.K. 2017. Process optimization for cultivation and oil accumulation in an oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* A29. **Fuel** 188: 324-331.
- Satyanarayana, T. and Kunze, G. 2009. **Yeast biotechnology: Diversity and applications** (1<sup>st</sup> ed). Springer, Dordrecht.
- Schulze, I., Hansen, S., Großhans, S., Rudszyk, T., Ochsenreither, K., Syldatk, C. and Neumann, A. 2014. Characterization of newly isolated oleaginous yeasts - *Cryptococcus podzolicus*, *Trichosporon porosum* and *Pichia segobiensis*. **AMB Express** 4: 24.
- Sha, Q. 2013. A comparative study on four oleaginous yeasts on their lipid accumulating capacity. Master of Science (Microbiology), Swedish University of Agricultural Science.
- Sitepu, I.R., Ignatia, L., Franz, A.K., Wong, D.M., Faulina, S.A., Tsui, M., Kanti, A. and Mills, K.B. 2012. An improved high-throughput Nile red fluorescence assay for estimating intracellular lipids in a variety of yeast species. **Journal of Microbiological Methods** 91: 321-328.
- Sriwongchai, S., Prasongsuk, S., Leerat, N. and Kitleartpornpaioat, R. 2018. Possibility of soil mangrove-derived oleaginous yeast *Rhodotorula mucilaginosa* on nutritionally optimized medium for lipid production for alternative biodiesel feedstock. **Burapha Science Journal** 23(1): 304-317. (in Thai)
- Tapia, E.V., Anschau, A.A., Coradini, A.L., Franco, T.T. and Deckmann, A.C. 2012. Optimization of lipid production by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* by random mutagenesis coupled to cerulenin screening. **AMB Express** 2: 64.
- Thangavelu, K., Sundararaju, P., Srinivasan, N. and Uthandi, S. 2021. Bioconversion of sago processing wastewater into biodiesel: Optimization of lipid production by an oleaginous yeast, *Candida tropicalis* ASY2 and its transesterification process using response surface methodology. **Microbial Cell Factories** 20: 167.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S.J.W.T. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics,

pp. 315 - 322. *In* Innis, M.A., Gelfand, D.H.,  
Sninsky, J.J. and White, T.J., eds. **PCR  
protocols: A Guide to Methods and  
Applications**. Academic Press, New York.