

รายงานเรื่องเต็ม ผลการทดลองสิ้นสุด ปีงบประมาณ 2560

1. แผนงานวิจัย

2. โครงการวิจัย

กิจกรรมที่

กิจกรรมย่อย.....

3. ชื่อการทดลองที่ (ภาษาไทย) การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันและถ่ายเข้าสู่สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* สำหรับผลิตไบโอดีเซล

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) Cloning of Genes Involved in Fatty Acid synthesis and Transformed into *Chlamydomonas reinhardtii* for Ethanol Production

4. คณะผู้ดำเนินงาน

นางสาวรุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล¹

นางสุภาวดี ง้อเหรียญ¹

นางสาวอรุณทัย ชาววา²

นางสาวภรณ์ สว่างศรี¹

5. บทคัดย่อ

สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* เป็นสาหร่ายโมเดลที่นิยมนำมาศึกษาการถ่ายยีน สามารถผลิตไบโอเอทานอลและไบโอดีเซล การทดลองนี้จึงได้โคลนยีน *Stearoyl-ACP Desaturase (SAD)* ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันเพื่อนำไปถ่ายยีนเข้าสู่สาหร่ายโมเดลในลักษณะ Overexpression เพื่อผลิตไบโอดีเซล จาก การโคลนยีน *ChSAD* พบว่า ได้ขนาดยีนบนดีเอ็นเอ 2898 เบส รวมส่วนของ CDS และ Non CDS การเพิ่มปริมาณจากอาร์เอ็นเอพบว่าได้ขนาดยีน 1206 เบส สามารถแปลงเป็นลำดับอะมิโนแอซิดได้ขนาด 401 อะมิโน เมื่อ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพบว่ามี ความเหมือนกับยีน *C. reinhardtii* plastid acyl-ACP desaturase (FAB2) มีค่าความเหมือน (identity) 100 เปอร์เซ็นต์ และลำดับอะมิโนแอซิดพบว่ามี ความเหมือนกับโปรตีน plastid acyl-ACP desaturase มีค่าความเหมือน (identity) 83 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งยีน *FAB2* ในสาหร่าย *C. reinhardtii* ก็คือยีน *SAD* ดังนั้น ยีน *ChSAD* ที่โคลนได้จะถูกนำไปสร้างคอนสตรัคเข้ากับเวกเตอร์ pChlamy3 สำหรับถ่ายยีนเข้าสู่สาหร่ายต่อไป

Chlamydomonas reinhardtii is a green alga that has been famous as a model organism in genes transformation. It has also been used in ethanol and biodiesel production. This study aims to clone gene *Stearoyl-ACP Desaturase (SAD)* involved in fatty acid synthesis for gene transformation into the model alga using overexpression method for biodiesel production. The result of *ChSAD* cloning shows that the length of gene on DNA is 2,898 base pairs, including CDS and non-CDS. The amplification of RNA yields the gene in length of 1,260 base pairs which could be translated into 401 amino acids. When searching the DNA sequences against databases, they are homologous to *C. reinhardtii* plastid acyl-ACP desaturase (FAB2) having the identity score of 100%. The amino acid sequences search against databases gives the result that

they are homologous to plastid acyl-ACP desaturase with identity score of 83%. Therefore, *FAB* in *C. reinhardtii* is *SAD* and the cloned *ChSAD* will be constructed into a vector pChlamy3 for gene transformation into alga in the future study.

^{1/} สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

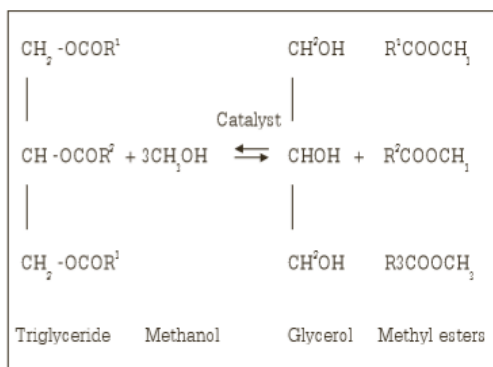
6. คำนำ

ไบโอดีเซล (Biodiesel) เป็นพลังงานทดแทนที่ได้รับการส่งเสริมจากภาครัฐ ให้ผลิตขึ้นใช้เองอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ทั้งนี้เนื่องจากคุณสมบัติเด่นหลายอย่าง เช่น สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ ไม่ก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศ และไม่ปล่อยสารประกอบของกำมะถัน เช่น ก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ซึ่งเป็นตัวการที่ทำให้เกิดฝนกรด (acid rain) ในบรรยากาศ (Miao *et al.*, 2004) การนำเอาตะไคร่น้ำ สาหร่าย (Algae) มาเปลี่ยนเป็นเชื้อเพลิงดีเซลมีมาตั้งแต่ปี 1980 พร้อมๆกับนักวิจัยจำนวนมากที่พยายามจะหาคำตอบในการที่จะทำให้สิ่งมีชีวิตขนาดเล็กกลายเป็นแหล่งพลังงานขนาดใหญ่โดยตะไคร่น้ำและสาหร่าย (Algae) ที่พูดถึงในเรื่องการผลิตไบโอดีเซลนี้ รวมทั้งสาหร่ายน้ำจืดและสาหร่ายน้ำเค็ม ที่พบเห็นตามโขดหิน หรือ ในห้วย หนอง คลอง บึง และชายฝั่งทะเลทั่วไป สิ่งมีชีวิตจำพวกตะไคร่น้ำและสาหร่ายนี้ จะมีทั้งเมือกและส่วนที่เป็นน้ำมัน ทำให้เรารู้สึกลื่น เวลาสัมผัส จากรายงานประจำปีของสถาบันวิจัยพลังงานแสงอาทิตย์ (Solar Energy Research Institute) เมื่อเกือบ 25 ปีที่แล้ว รายงานว่า น้ำมันจากสาหร่ายนั้นมีความเหมาะสมต่อการนำมากลั่นเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิง และในช่วงขาดแคลนน้ำมันปิโตรเลียม เชื้อเพลิงทางเลือกจากการสกัดน้ำมันจากสาหร่ายก็ได้ถูกหยิบขึ้นมาใช้เพื่อแก้ไขสถานการณ์ เทียบกับพืชชนิดอื่นๆแล้ว เมื่อนำมากลั่นเป็นไบโอดีเซล ถั่วเหลือง จะให้น้ำมัน 50 แกลลอน ในขณะที่แคนโนล่า (พืชน้ำมันชนิดหนึ่ง) ให้น้ำมัน 130 แกลลอน ส่วนสาหร่ายนั้นให้น้ำมัน 4,000 แกลลอน ในระยะเวลา 1 ปี ในพื้นที่การผลิต 1 เอเคอร์เท่านั้น แกลมสาหร่ายนั้นยังต้องการเพียงแค่แสงอาทิตย์และน้ำที่ดื่มไม่เหมาะสำหรับการบริโภคเท่านั้น ในบ่อทดลองพบว่าสาหร่ายเล็กๆเหล่านั้นสามารถเจริญเติบโตได้แม้จะอยู่ในอุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส สาหร่ายเซลล์เดียวหรือ ไดอะตอม (diatom) และแพลงตอนชนิดอื่นๆที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ (phytoplankton) ก็สามารถดูดซับเอาคาร์บอนไดออกไซด์ที่อยู่ใต้น้ำ หรือในมหาสมุทรมาใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงเช่นเดียวกับต้นไม้ แต่แพลงตอนทั้งหมดที่อยู่ในท้องทะเลนั้น สามารถกำจัดคาร์บอนไดออกไซด์จากกระบวนการสังเคราะห์แสงได้มากพอๆกับต้นไม้ทุกต้นในโลกรวมกัน ในขณะที่บริษัทเชลล์ (Royal Dutch Shell and HR Biopetroleum) ได้แถลงข่าวเรื่องการก่อสร้างห้องปฏิบัติการบนเกาะ Kona ในฮาวาย เพื่อเพาะปลูกสาหร่ายทะเลสำหรับการวิจัยเรื่องไบโอดีเซล เมื่อวันที่ 11 ธันวาคม 2551 ไม่เพียงพลังไบโอดีเซลจากสาหร่ายจะช่วยลดปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่จะถูกปล่อยออกไปในชั้นบรรยากาศ หากไบโอดีเซลจากสาหร่ายได้รับการยอมรับและนำมาพัฒนาเพื่อใช้งานอย่างจริงจังเท่านั้น แต่ด้วยตัวของสาหร่าย ที่สามารถจัดคาร์บอนไดออกไซด์ทางตรงด้วยการสังเคราะห์แสงได้อีกด้วย

Lali (2008) ได้รายงานไว้ว่า วิวัฒนาการของการผลิตพลังงานชีวมวล (biofuels) แบ่งออกเป็น 4 Generation ได้แก่ Generation 1 ได้แก่ ข้าวโพด อ้อย ผ่านกระบวนการหมักด้วยยีสต์ถึงจะได้เอทานอล (มีคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำเป็น by-products) กว่าจะได้น้ำมันไบโอดีเซล 1 แกลลอน ต้องใช้ข้าวโพด 21

ปอนด์ กว่าจะได้ข้าวโพด 21 ปอนด์ การปลูก ปุ๋ย การขนส่ง ฯลฯ ต้องใช้น้ำมันปิโตรเลียม 1/2 แกลลอน หมัก ออกมาแล้วคุณภาพก็ยังไม่เท่าน้ำมันปิโตรเลียม ต้องนำมาผสมใช้ร่วมกัน ทำให้ราคาพืชแพงขึ้น Generation 2 เซลลูโลสจากพืชผ่านกระบวนการหมักยีสต์หรือแบคทีเรียจึงจะได้เอทานอล หรือ บิวทานอล (มี คาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ เป็น by-products) Generation 3 สาหร่ายหรือแบคทีเรียที่ดูดพลังงานจาก คาร์บอนไดออกไซด์และแสงแดด สังเคราะห์แสงแล้วแปลงเป็นไขมันสะสมไว้ จากนั้นใช้สารเคมีทำละลายเพื่อ สกัดเอาไขมันออกมา ให้ได้ไบโอดีเซล เต็มๆ เลย (ไม่มีคาร์บอนไดออกไซด์จากการผลิต) ข้อเด่นของเงินนี้ก็คือ สาหร่าย/แบคทีเรียพวกนี้โตเร็วมากๆ สกัดไขมันออกมาได้มากกว่า มากกว่าการผลิตไขมันจากถั่ว 250 เท่าตัวใน พื้นที่เท่าๆ กัน แต่ถึงกระนั้นก็ตาม ก็ยังคงมีความยุ่งยากในการปลูกเจ้าสาหร่ายพวกนี้ให้ได้มากพอใช้งานและไม่ กระทบกับพืชอาหารอื่นๆ และไม่ถูกสาหร่ายและแบคทีเรียอื่นๆ ที่เราไม่ต้องการมาปนเปื้อนในแปลงปลูก และ Generation 4 สาหร่ายและแบคทีเรียที่ถูกตัดแปลงพันธุกรรมซึ่งสามารถสังเคราะห์แสงแล้วแปลงเป็นไขมัน จากนั้นไขมันถูกสกัดออกมาเองโดยไม่ต้องใส่สารเคมีทำละลาย และได้ไบโอดีเซล โดยที่สาหร่าย/แบคทีเรียอื่นๆ ยังไม่ตาย ยังคงสังเคราะห์แสงและปล่อยไขมันออกมาให้เราใช้ต่อไปได้เรื่อยๆ ไม่ต้องใช้เนื้อที่เพาะปลูกมากมาย และสาหร่าย/แบคทีเรียเหล่านี้จะตายถ้าไม่ได้รับสารเคมีที่เลี้ยงมันและช่วยให้มันสกัดไขมันออกมาได้นี้ แปลว่ามัน จะไม่แพร่พันธุ์ ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมข้างนอก ซึ่งสอดคล้องกับ Scientific American EARTH (2009) ได้กล่าว ไว้ว่า พลังงานทางเลือกเพื่อใช้ทดแทนน้ำมันได้ถูกพัฒนาอย่างต่อเนื่อง มาถึงเจนเนอเรชั่นที่ 4 นั่นคือ การผลิต เชื้อเพลิงจากสาหร่าย ซึ่งจะไม่กระทบพืชเศรษฐกิจ อย่างข้าวโพด/ถั่ว ที่มนุษย์ยังต้องใช้เป็นอาหาร มีข้อถกเถียง กันว่า หันมาใช้พลังงานทางเลือก ไบโอดีเซล สกัดน้ำมันออกมาจากพืชไม่ใช้น้ำมันดิบที่อีกไม่เกิน 30 ปี จะขาด แคลนอย่างแน่นอน

น้ำมันไบโอดีเซล ในความหมายของการผลิตในระดับอุตสาหกรรม หมายถึง การนำน้ำมันพืชและสัตว์ซึ่ง มีองค์ประกอบทางเคมีเป็นไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) และแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ เช่น เอทานอล หรือเมทา นอล ในปริมาณที่มากเกินพอ มาทำปฏิกิริยาเคมี “ทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน” (Tranesterification) โดยใช้กรด ต่าง หรือการใช้เอนไซม์ที่ได้จากเชื้อจุลินทรีย์ เช่น เอนไซม์ไลเปส ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เพื่อเกิดการ รวมตัวของไตรกลีเซอไรด์ และแอลกอฮอล์ เปลี่ยนวัตถุดิบตั้งต้นไปเป็นเอทิลเอสเทอร์ (Fatty acid esters : FAEs) หรือ เมทิลเอสเทอร์ (Fatty acid methyl esters : FAMES) ดังภาพที่ 1 แสดงปฏิกิริยาเคมีทรานส์เอ สเทอริฟิเคชัน หรือไบโอดีเซล และกลีเซอรอล (glycerol) ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ต่อไป ในอุตสาหกรรมอาหารและยา (พินดา และ ผกาวดี, 2551)

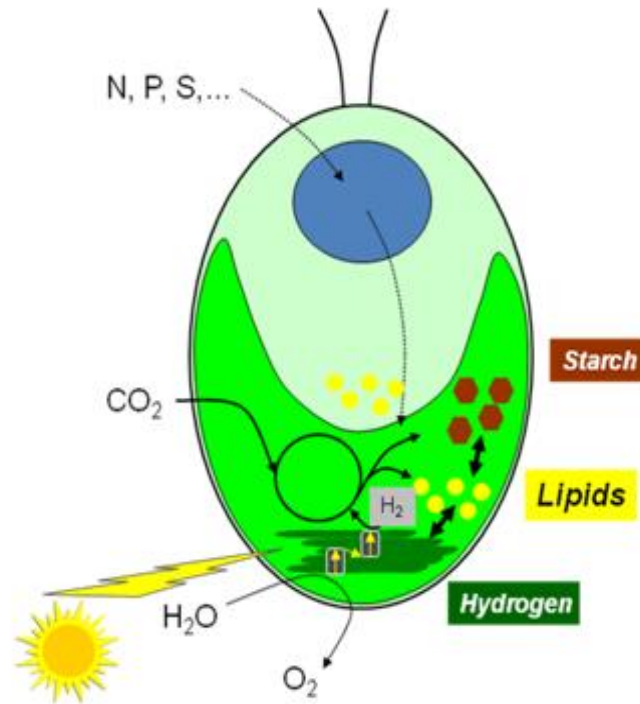


ภาพที่ 1 ปฏิกริยาเคมีทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันที่เกิดขึ้นในการผลิตไบโอดีเซล

ในน้ำมันพืชจะมีองค์ประกอบหลักคือ กรดไขมัน ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ กรดไขมันอิ่มตัว (Saturated Fatty acid) และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (Unsaturated Fatty acid) ในปริมาณที่แตกต่างกัน จึงทำให้น้ำมันพืชแต่ละชนิดมีคุณสมบัติแตกต่างกัน ซึ่งกรดไขมันที่พบในน้ำมันพืชส่วนใหญ่ จะเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว และโดยทั่วไปกรดไขมันจะมีจำนวนคาร์บอนในโมเลกุลเป็นเลขคู่เสมอ ซึ่งมีปริมาณตั้งแต่ 12-24 คาร์บอนในโมเลกุล แต่ที่พบเป็นจำนวนมากจะมีจำนวนคาร์บอน 16 (C_{16}) และ 18 (C_{18}) (He *et al.*, 2007) และที่พบโดดเด่นมากในน้ำมันมะพร้าวคือ lauric acid (12:0)

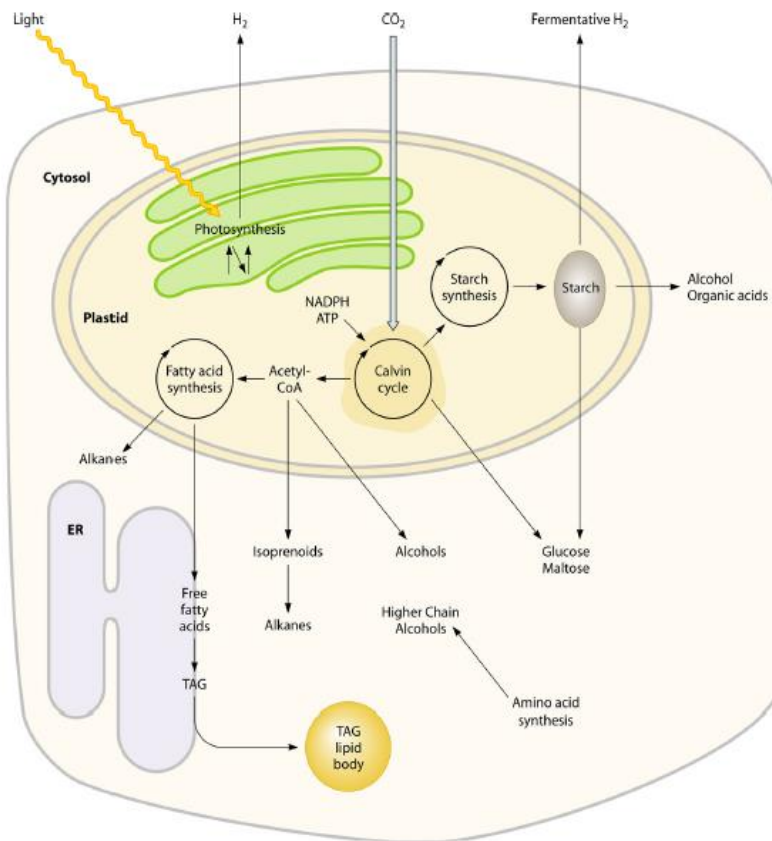
Pathways การสร้างลิพิด จะประกอบด้วย การสังเคราะห์กรดไขมัน ซึ่งอยู่ในพลาสติด ถูกสังเคราะห์มาจาก acetyl-Coenzyme A (acetyl-CoA) และ Triacylglycerols (TAGs) ซึ่งในสาหร่ายก็มีวิธีการสังเคราะห์เหมือนพืชชั้นสูง TAGs มีจำนวนคาร์บอนสูงเป็นแหล่งเก็บสะสมพลังงานในพืชจะพบมากในส่วนของเมล็ด มีกลุ่ม acyl อยู่ที่ผนังเมมเบรนลิพิด กรดไขมันที่พบมากได้แก่ palmitic acid (16:0), stearic acid (18:0), oleic acid (18:1), linoleic acid (18:2) และ α -linoleic acid (18:3) (Alexandro *et al.*, 2011)

สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* เป็นสาหร่ายเซลล์เดียวสีเขียวที่นำมาใช้เป็นโมเดลทางด้านพันธุศาสตร์ บ่อยครั้งที่มีการใช้คำว่า “the green yeast” แทน *C. reinhardtii* เป็นชนิดที่มีการเลี้ยงและเจริญเติบโตได้ง่ายและแบ่งเซลล์เร็วมาก มีการศึกษาถอดรหัสทั้งจีโนมของสาหร่ายชนิดนี้ไว้สมบูรณ์แล้ว (Merchant *et al.*, 2007) ทำให้รู้ถึงฐานข้อมูลของยีน EST และนักวิทยาศาสตร์จึงนิยมนำมาใช้เป็นโมเดลในการถ่ายยีนบริเวณส่วนของคลอโรพลาสต์ เพราะมีจุดเริ่มต้นในการสังเคราะห์กรดไขมัน สาหร่ายขนาดเล็กจัดอยู่ในกลุ่มยูคาริโอต มีการสังเคราะห์ลิพิดได้สูงกว่าในกลุ่มโปรคาริโอตและในกลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ดังนั้น *C. reinhardtii* จึงนำมาใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับการสังเคราะห์แสง การสังเคราะห์แป้ง การผลิตไฮโดรเจน และขบวนการเมแทบอลิซึมของลิพิด ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ลักษณะโครงสร้างของเซลล์สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* ซึ่งปัจจุบันนำมาใช้เป็นโมเดลในการวิจัยในการสังเคราะห์ลิพิด แป้ง และ bio-hydrogen ซึ่งอยู่บนคลอโรพลาสต์ บริเวณรูปถ้วย (cup-shaped) (http://lipidlibrary.aocs.org/plantbio/tag_algae/index.htm)

การผลิตพลังงานทดแทนจากสาหร่ายกำลังเป็นที่น่าสนใจ ช่วยลดปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศ โดยใช้กระบวนการสังเคราะห์แสง ทั้งสาหร่ายขนาดเล็กและขนาดใหญ่เหมาะที่จะนำมาผลิตเป็นชีวมวล และที่สำคัญสาหร่ายขนาดเล็กในกลุ่มยูคาริโอตจะมีแหล่งเก็บพลังงานได้สูงมาก เช่น triacylglycerol (TAG) และแป้ง (starch) สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการนำมาผลิตเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพ (biofuels) ทั้งไบโอดีเซลและเอทานอล เริ่มต้นของ crude oil มาจากสาหร่ายขนาดเล็กในกลุ่มไดอะตอมและเป็นที่น่าสนใจในการผลิตสารในกลุ่มลิพิด (Ramachandra *et al.*, 2009) สาหร่ายขนาดเล็กมีสิ่งพิเศษที่สามารถดึงพลังงานจากธรรมชาติมาเก็บไว้ในเซลล์ได้โดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์มาใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงเปลี่ยนเป็นพลังงาน และเจริญเติบโตได้ทุกสภาพแหล่งน้ำทั้งน้ำจืด น้ำเค็ม น้ำเสีย (Dismukes *et al.*, 2008) ซึ่งสาหร่ายขนาดเล็กมี metabolic pathways สามารถผลิตพลังงานเชื้อเพลิงได้ ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 Metabolic pathways ของสาหร่ายขนาดเล็กที่สามารถผลิตเป็นพลังงานเชื้อเพลิงชีวภาพซึ่งอยู่ในส่วนของเอนโดพลาสมิก เรติคูลัม (Endoplasmic Reticulum : ER)

Randor *et al.* (2010) ได้ศึกษาการใช้พันธุวิศวกรรมในการผลิตพลังงานเชื้อเพลิงชีวภาพของสาหร่าย พบว่ามีจุดที่น่าสนใจที่สามารถดัดแปลงนำมาใช้ได้ในการผลิตลิพิด แอลกอฮอล์ และไฮโดรคาร์บอน ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีการดึงพลังงานแสงอาทิตย์มาสังเคราะห์แสงได้ ได้มีการพัฒนาในเรื่องของการผลิตลิพิดและคาร์โบไฮเดรตให้สูงขึ้น และที่สำคัญขบวนการในสาหร่ายในกลุ่มยูคาริโอตมีจุดเด่นของเมแทบอลิซึมในการผลิตพลังงานเชื้อเพลิงชีวภาพในเรื่องของการสะสมปริมาณ triacylglycerol และการสังเคราะห์สะสมปริมาณแป้งทั้งอะมิโลส และอะมิโลเพคตินเหมือนกับพืชชั้นสูง

Wei-Luen *et al.* (2011) ได้ศึกษาการดัดแปลงวิถีเมแทบอลิซึม (metabolic pathways) ของการผลิตลิพิดและ triacylglycerol ในสาหร่ายขนาดเล็ก ซึ่งพบว่าสาหร่ายขนาดเล็กเป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถนำมาใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิงได้ดีและมีการสะสมในส่วนของลิพิดซึ่งจุดที่สำคัญในการสร้างอยู่ที่ triacylglycerol ต้องศึกษาในส่วนของเอนไซม์ซึ่งจำเป็นต้องใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเข้าช่วยปรับปรุงและพัฒนา

Lei *et al.* (2012) ได้กล่าวว่าการผลิตพลังงานเชื้อเพลิงชีวภาพจากสาหร่ายเป็นที่น่าสนใจมากในช่วง 2-3 ปีที่ผ่านมา ซึ่งจัดอยู่ในยุคที่ 4 (4th generation) ในเรื่องการ metabolic engineering ในการผลิตพลังงานเชื้อเพลิงชีวภาพ และได้มีศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมัน และการสะสมกรดไขมันในสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ภายใต้สภาวะเครียดต่างกันเพื่อดูศักยภาพในการผลิตไบโอดีเซล

โดยการวัดปริมาณค่า FA จากเครื่อง GC-MS ภายใต้การทดลองความเครียด เช่น ขาดไนโตรเจน ความเค็มสูง หรืออุณหภูมิต่ำ พบว่าการใช้อุณหภูมิสูง ความเค็มสูง และขาดไนโตรเจน พบว่าการสังเคราะห์ FA แตกต่างกัน

Gong *et al.* (2011) ได้ศึกษาคูณลักษณะของยีน thioesterase (PtTE) จากไดอะตอมชนิด *Phaeodeactylum tricorutum* พบว่ามีขนาด 648 bp ในส่วนของ open reading frame (ORF) และมีลำดับเปปไทด์จำนวน 216 amino acid และถ่ายยีนเข้าสู่ *E. coli* และตรวจสอบการแสดงออกของ cDNA ด้วย XL1-Blue และ K27fadD88 พบว่า fatty acid β -oxidation pathway มีการเปลี่ยนแปลงไปได้กรดไขมัน C18:0 และ C18:1 ซึ่งทำให้อัตราส่วนของกรดไขมันมีค่าสูงขึ้นถึง 72%

ได้มีรายงานการพัฒนาการใช้ Thioesterase ในสาหร่ายขนาดเล็กให้จำนวนคาร์บอนของกรดไขมันให้มีความยาวอยู่ระหว่าง 14-20 ซึ่งปกติที่พบมากจะเป็นชนิด C16:1, C16:0 และ C18:1 แต่ว่าการผลิตไบโอดีเซลที่ดีควรอยู่ที่ C12:0 และ C14:0 ในการควบคุมความยาวของคาร์บอนของกรดไขมันจะถูกควบคุมโดย acyl-ACP thioesterase ซึ่งพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั่วไป และการถ่ายยีน thioesterase ให้เกิด overexpression สามารถที่จะเปลี่ยนความยาวของกรดไขมันได้ (Oilgae club, 2010)

จากแนวโน้มความต้องการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง และวิกฤติราคาน้ำมันแพงที่ส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจทั่วโลกในขณะนี้ ทำให้รัฐบาลตระหนักถึงปัญหาดังกล่าวและได้แสวงหาแหล่งและการผลิตพลังงานทดแทนในรูปแบบต่างๆ เช่น พลังงานชีวมวล แก๊สชีวภาพ เอทานอล และไบโอดีเซล และไบโอดีเซลจะได้รับการส่งเสริมให้มีการผลิตกันอย่างแพร่หลายไปทั่วทุกภาคของประเทศ ทั้งนี้เพราะประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมจึงเอื้อต่อการนำผลิตผลทางการเกษตรชนิดต่างๆ โดยเฉพาะพืชน้ำมัน เช่น ปาล์มน้ำมัน ถั่วเหลือง มะพร้าว ทานตะวัน และสบู่ดำ เพื่อนำมาผลิตไบโอดีเซล น้ำมันเชื้อเพลิงจากพืชสาหร่ายถือเป็นพืชน้ำมันอีกประเภทหนึ่งที่มีศักยภาพสูงของโลกในอนาคต ปัจจุบันบรรดาประเทศชั้นนำต่างๆ เช่น สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย จีน ฯลฯ ต่างให้ความสนใจและทุ่มงบประมาณในการคิดค้นวิจัยพัฒนาสายพันธุ์และเทคโนโลยีการสกัดน้ำมันจากสาหร่ายอย่างจริงจัง และปัจจุบันการศึกษาวิวัฒนาการระดับโมเลกุลมีความสำคัญมากโดยเฉพาะเรื่องการควบคุมการแสดงออกของยีน หรือการตัดแปลงพันธุกรรมพืช/จุลินทรีย์ ให้ได้สายพันธุ์ใหม่ที่ดีกว่าเดิมและหนึ่งในนั้นเรื่องการโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันและถ่ายเข้าสู่สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* สำหรับผลิตไบโอดีเซล จัดอยู่ในยุคที่ 3 ในเรื่องของวิวัฒนาการในการผลิตพลังงานจากชีวมวล จัดเป็นพลังงานจากพืช หรือพลังงานสะอาด ไม่ใช่พืชอาหาร ตลอดจนกระบวนการผลิตมีความบริสุทธิ์ สามารถย่อยสลายได้ เป็นเทคโนโลยีที่สะอาดอย่างแท้จริง ขณะที่ชีวมวลจากพืช มีโครงสร้างทำลายยาก ทำให้มีของเสียหลงเหลือจากกระบวนการผลิตดังนั้นสาหร่ายเป็นทางเลือกที่เหมาะสมในการลดปัญหาสภาวะแวดล้อม และการผลิตชีวมวล (biomass) สำหรับเชื้อเพลิงชีวภาพ (bio-fuels) ที่เป็นไปได้ในเชิงพาณิชย์ ดังนั้นการทดลองนี้จึงได้ทำการศึกษาการโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันเพื่อใช้สำหรับถ่ายยีนเข้าสู่สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* เพื่อศึกษาเทคโนโลยีการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายที่ได้จากการโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันในระดับห้องปฏิบัติการ

7. วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

อุปกรณ์

1. สารเคมีที่ใช้ในงานทางชีววิทยาโมเลกุลและจุลชีววิทยาและอาหารเลี้ยงสาหร่าย
2. อุปกรณ์ในการเลี้ยงสาหร่าย
3. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ lamina flow
4. เครื่อง spectrophotometer (PARKIN ELMER MBA2000)
5. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (GeneAmp PCR System 9700)
6. ชุดถ่ายภาพ และ UV Transilluminators (BIORAD)
7. เครื่องหมุนเหวี่ยงตะกอนความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (SORVALL RC28C)
8. เครื่องส่งถ่ายกระแสไฟฟ้าด้วยวิธีอิเล็กโตรโพรเซส electro cell manipulator 600 (BTX San Diego, California)
9. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส

วิธีดำเนินการ

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii*

นำเซลล์สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* สายพันธุ์ C.137 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Tris-Acetate-Phosphate (TAP medium) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที จากนั้นนำเซลล์สาหร่ายไปปั่นเหวี่ยงในหลอด 50 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เก็บตะกอนสาหร่ายที่ -80 เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอต่อไป

2. การสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอจากสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii*

- การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* ดังนี้ เตรียม Extraction buffer [20 mM sodium EDTA and 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 2%(W/V) CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)] เติม 0.2% β -mercaptoethanol ก่อนใช้บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส นำสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* บดในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดจนเป็นผงแป้ง ใส่หลอด 15 มิลลิลิตร เติม Extraction buffer 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (นำมาเขย่าทุก 20 นาที) แล้วนำตัวอย่างออกมาวางที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วเติม Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) 5 มิลลิลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใส 750 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) 750 ไมโครลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใสใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติม 3M NaOAc 0.1 เท่า และ Isopropanol 0.6 เท่า แล้วนำไปตกตะกอนดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol 750 ไมโครลิตร สองครั้ง ทิ้งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้ว

ละลายด้วย TE 100 ไมโครลิตร และเติม RNaseA (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 4 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปวัดค่า (O.D) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น A260/A280 ให้อยู่ในช่วง 1.8-2.0 แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทำปฏิกิริยา PCR เก็บที่เย็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

- การสกัดอาร์เอ็นเอ

ทำการสกัดอาร์เอ็นเอสำหรับ *Chlamydomonas reinhardtii* ด้วยชุด Nucleo Spin kit[®] ยี่ห้อ MACHERY-NAGEL โดยการบดตัวอย่าง *Chlamydomonas reinhardtii* ด้วยไนโตรเจนเหลว ใส่ในหลอดที่มีบัปเฟอร์ RA1 ผสมให้เข้ากัน นำของเหลวที่ได้ใส่ลงไปในหลอด Nucleospin[®] filter unit แล้วปั่นที่ 11000 xg นาน 1 นาที เพื่อกรองเอาส่วนใส 400 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติม 70 เปอร์เซ็นต์เอทานอล 400 ไมโครลิตร แล้ววางบนน้ำแข็ง นำของเหลวทั้งหมดใส่ลงใน Nucleospin[®] RNA plant แล้วปั่นที่ 11000 xg นาน 30 วินาที ที่ห้องเหลว เติมบัปเฟอร์ที่มี DNaseI บน membrane ตัวอย่างละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ล้างเมมเบรน 3 ครั้ง

ครั้งที่ 1 ล้างด้วย RA2 200 ไมโครลิตร แล้วปั่นที่ 11000 xg นาน 30 วินาที แล้วทิ้งของเหลว

ครั้งที่ 2 ล้างด้วย RA3 600 ไมโครลิตร แล้วปั่นที่ 11000 xg นาน 30 วินาที แล้วทิ้งของเหลว

ครั้งที่ 3 ล้างด้วย RA3 250 ไมโครลิตร แล้วปั่นที่ 11000 xg นาน 2 นาที

ย้ายเมมเบรนใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม RNase free water+Ribolock 40 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วปั่นที่ 11000 xg นาน 1 นาที นำอาร์เอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบ และเก็บรักษาไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส

3. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายผสม (cDNA synthesis) จากอาร์เอ็นเอรวม

ทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายผสมด้วยชุด RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit ยี่ห้อ Thermo โดยนำอาร์เอ็นเอรวมความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร 5 ไมโครลิตร เติมไพรเมอร์ oligo(dT)₁₈ 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DEPC 6.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้ววางบนน้ำแข็งนาน 5 นาที จากนั้นนำมาเติมบัปเฟอร์ 5X reaction 4.5 ไมโครลิตร Ribolock[™] RNase inhibitor 1 ไมโครลิตร 10mM dNTP mix 2 ไมโครลิตร และ RevertAid M-MuLV 1 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

4. การเพิ่มปริมาณยีน *Stearoyl-ACP Desaturase (SAD)*

ทำการเพิ่มปริมาณยีน *SAD* ด้วยวิธีพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction) โดยใช้ไพรเมอร์ ChSADF: 5'-ATG GCT CTG GGC CAG CAG GCG AT-3' และ ChSADR: 5'-TTA CAG GGC CAC CTC GCG GTT G-3' ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังต่อไปนี้

cDNA template	1	ไมโครลิตร
5x Buffer	5	ไมโครลิตร

dNTPs (2mM)	2	ไมโครลิตร
MgCl ₂ (25mM)	2	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ Forward (10 μM)	1	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ Reverse (10 μM)	1	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase, Pomega	0.1	ไมโครลิตร
Distilled water	12.9	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	25	ไมโครลิตร

ดูสารละลายที่กล่าวมาข้างต้นลงในหลอดพีซีอาร์ แล้วนำเข้าเครื่อง thermal cycle, Gene Amp 9700 ตั้งโปรแกรมดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นตั้งที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที 1 รอบ แล้วตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จากนั้นโคลนเข้าพีซีอาร์เวกเตอร์

5. การโคลนยีนที่ได้เข้าสู่พีซีอาร์เวกเตอร์

นำชิ้นยีนที่ได้จากพีซีอาร์มาทำปฏิกิริยา ligation ด้วยวิธีโคลนปลายทู่ (blunt-End Cloning) โดยใช้ชุด CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas) (ภาพผนวกที่ 1) ประกอบด้วย 2X reaction buffer 10 ไมโครลิตร ผลผลิตพีซีอาร์ 2 ไมโครลิตร DNA blunting enzyme 1 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย Water nuclease-free ให้ได้ 18 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่น 3-5 วินาที บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้ววางบนน้ำแข็ง จากนั้นเติม pJET 1.2/blunt cloning vector (50 ng/ul) 1 ไมโครลิตร และ T4 DNA ligase (5U/ul) 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่น 3-5 วินาที บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที (สามารถบ่มได้นานถึง 30 นาที) นำปฏิกิริยา ligation ที่ได้ไปฝากถ่ายเข้าเก็บเซลล์แบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ DH5α จากนั้นสกัดพลาสมิดแล้วนำส่งวิเคราะห์ลำดับเบส

ระยะเวลาการทดลอง (เริ่มต้น – สิ้นสุด)

ระยะเวลาเริ่มต้น ตุลาคม 2558 สิ้นสุด กันยายน 2560 รวม 2 ปี (เดิมสิ้นสุดปี 2562 รวม 4 ปี)

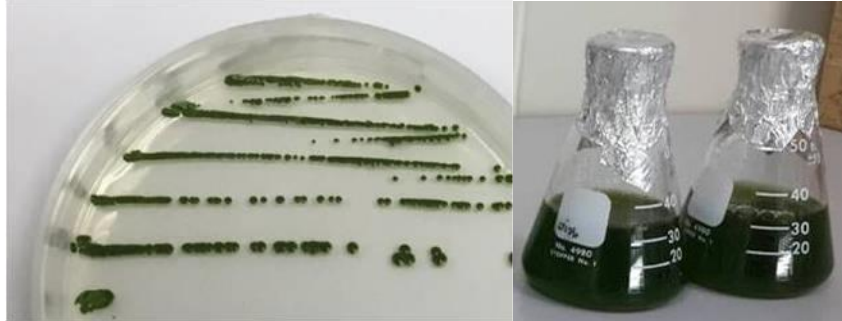
สถานที่ดำเนินการทดลอง

ห้องปฏิบัติการด้านชีวโมเลกุล สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จังหวัดปทุมธานี

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

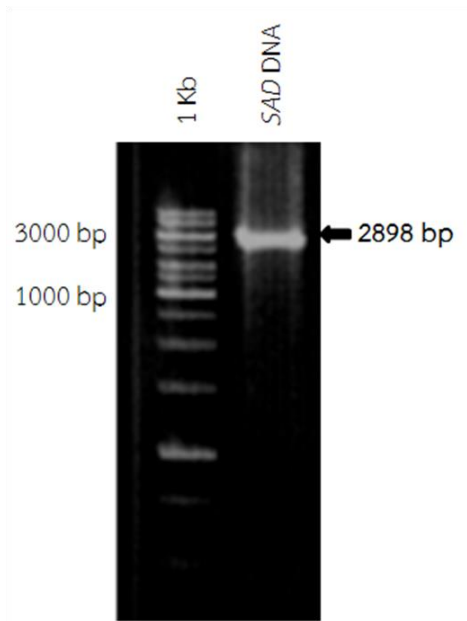
จากการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่าย *C. Reinhardtii* สายพันธุ์ C.137 พบว่า สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารแข็ง TAP ภายใน 5-6 วัน เมื่อนำโคโลนีเดี่ยวไปเลี้ยงในอาหารเหลวพบว่า มีการเจริญเติบโตภายใน 6-7 วัน (ภาพที่ 1) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 110 รอบต่อนาที การเลี้ยงเชื้อปริมาตร 250 มิลลิลิตร นาน 7 วัน พบว่าเซลล์ตะกอนของสาหร่ายเพียงพอต่อการสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ การเลี้ยงในอาหาร

เหลวต่ำกว่า 7 วัน จะได้ตะกอนเซลล์น้อย แต่ถ้าหากเลี้ยงนานกว่า 9 วัน เซลล์สาหร่าย *C. Reinhardtii* สายพันธุ์ C.137 เริ่มแก่อาจมีผลต่อการสกัดอาร์เอ็นเอได้



ภาพที่ 1 การเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่าย *C. reinhardtii* C.137 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน

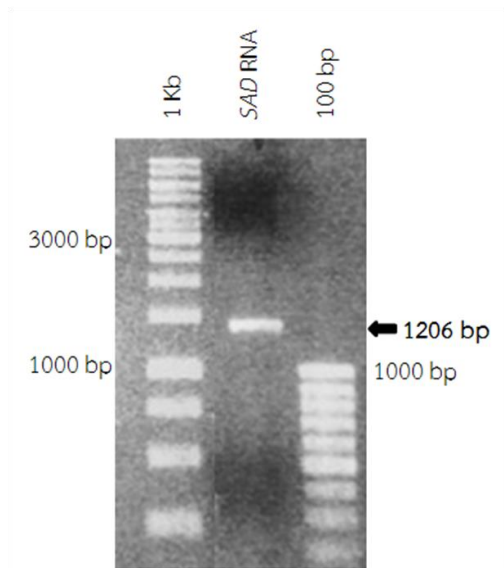
จากการเพิ่มปริมาณยีน *ChSAD* ในสาหร่าย *C. reinhardtii* และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า การเพิ่มปริมาณยีนจากดีเอ็นเอได้ขนาดยีนบนดีเอ็นเอ 2898 คู่เบส (ภาพที่ 2 และภาพที่ 3) รวมส่วนของ CDS (Coding Sequence) และ Non CDS (Non Coding Sequence) และการเพิ่มปริมาณยีนจากอาร์เอ็นเอได้ขนาด ยีน 1290 คู่เบส (ภาพที่ 4 และภาพที่ 5) สามารถแปลงเป็นลำดับอะมิโนแอซิดได้ขนาด 429 อะมิโน (ภาพที่ 6) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพบที่มีความเหมือนกับยีน *Chlamydomonas reinhardtii* plastid acyl-ACP desaturase (*FAB2*) มีค่าความเหมือน (identity) 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4) และลำดับอะมิโนแอซิดพบที่มีความเหมือนกับโปรตีน plastid acyl-ACP desaturase มีค่าความเหมือน (identity) 83 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 5) จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสเมื่อนำยีน *ChSAD* ไปเปรียบเทียบกับ ฐานข้อมูล NCBI พบตรงกับยีน *FAB2* ซึ่ง Hwangbo และคณะ (2014) และ Jaejer และคณะ (2017) ได้รายงาน ไว้ว่า ยีน *FAB2* และยีน *SAD* คือยีนเดียวกัน ดังนั้นยีน *ChSAD* ที่โคลนได้จึงจะถูกนำไปโคลนเข้าเวกเตอร์ pChlamy3 เพื่อถ่ายฝากเข้าสู่สาหร่าย *C. reinhardtii* และศึกษาการผลิตไบโอดีเซลต่อไป



ภาพที่ 2 การเพิ่มปริมาณยีน *ChSAD* จากดีเอ็นเอของสาหร่าย *C. Reinhardtii* มีขนาด 2898 คู่เบส

ATGGCTCTGGGCCAGCAGGGCGATGCAGCGCAAGGGTAAGCAGGCCCTTACGCGTCTCCAGCGTATGGAGCCCGGCCAGCAACGCTTGCCTGGCGAAGT
 CTGTTGGGCAGGCGTTTAGTGGGCGGGAGGGTCGCGTGCACATAATTGGGTTGAATTGGTGGCTCAATTGTCGCGCCAGCTGCGGCAACCGCCTA
 AGCGGGACTGGCCAGGCTTGAGGACCGGATGCTCTGCAGTGTCTCTGCGTGCAGTTCGCGCTATGCGTTACTACGCCACCTGCATATGTTGAATTGC
 GCGCTGGTGATCTAAGCTTGATGCGGGCTCGCAACTGCTGCTGCAGG**CGCCCTTAACGCCAACAGGGCCCTCGCGCAAGGCTTGGCTCGTCCGCGCG**
CAGGGCGTTCGCTCGGCTCCCAACAGCCGGCCACTGCTTCGCGATATGTTTCCTCACGTCACAGGGCCCGATCATCATGAATGGTCAGGTGCTGCACA
GCATCACGGCTGAGCGCCTGGATGTGGTGCAGCAGCCTGGAGGACGGCTACCTGCAGAGCCAGGTAAGCTTCAATACATCTCAGATATCTCTCGTGTG
 CTCCACTCGCCGAGCGTGTGCCCCGAGTCAAGCCCGACTGGGCTGAAAGGGGCGGTGACATGGATGTAGGCGGTACACATCGGCTTACGTAGCGTGT
 GTCTCTTACCTGTCCACCCGACGTCGCGCAG**GTGGTGCCTCTGCTGAAGCCCGTGGAGAAGTGTGGCAGCCCGCCGACTTCCTGCCGCCCTCGGA**
GGACCCCGACTTCCTGGACAAGGTGAGAGCATCCATCCTTCCCGTCAACCGGGCGGCGGGCTGCCCGAGGACCGGACACGTTCCGCGCTTGGGTT
 GCAGCTTAGCAGCAGCGAACAGACCCTGACACGTATGCACCTCTGCTCACGCTGTGTTGCTTTATAACCTACAG**GTGCGCGAGCTGCAGCAAGCGCGC**
TGCCAACCTGCCCGATGACTACCTGGTGGTCTTCAACCGGCGACATGATCACCGAGGAGGCGCTGCCACCTACATGACCATGCTCAACACCCCTGGAC
GGCGTTCGCGATGAGACCGGCGCCAGCCAGACCCTGGGCCAAGTGGACGCGCGAGTGGACCGCCGAGGAGAACCGCCACGGCGACGTATGAACC
GCTACATGTACCTGACTGGCCGCGTCAACATGAAGGCGGTGGAGGTGACCGTGCAGAACCTGATTGGCTCCGGCATGGACCCCAAGACCGAGAACAA
CCCTACCTGGGCTTCTGCTACACCTCCTTCCAGGAGCGGCCACCAAGGTGAGGGGCTGGGCTGGGTTCCGGGTCAGGAGGGGGAGATGAAAGGG
 CGCACAAGGGAGGCGAAGGGTGGGAGGTGTCAAGGAGCAGCCTGCCAGCAGCGGACGACAGCGCTAAATGCATCGGAGCAAGGACGGCTGTTGCCA
 AGCTGCTGGCTGTATGGGTCACAACTCAGCATCACCGGGTGCAATTTGAGCAAAGCCTTGGGGGCCACACACCGTAACGCTCCATCCCCAACCCCA
 TCCCATCCCCACCTCCAAACCGCACCGCCCTCATCCCCGCTGTCCAGGT**TCCCACGGCAACACCGCCCGCCACGCTCTGGAGCACGGCGAC**
GACGTGCTGGCCAAGATCTGCGGCTCCATCGCCTCGGACGAGGGCCGCCACGAGATCGCCTACTGCAAGGTGGGTGCCGGTGGCTCCACAGGCGCAT
 GCCCCATGCATGACGTGATCGTTGCCGCCCCGGGGGGGGGAGCGGCTGCAAGCGAGGCATGCTCTGGCACATGGTCTGCTGCTCCGGGGCCCG
 TCAAGTTCCCAACATAAAGCGCTGCAAACCCGTGCGCCGCTCTATACTCTACAGTGTCTAACCTCGCACCTGCACACCTCCAACCTCCATGCGC**AGAT**
CATGGACGGCCTGTTTGAAGCGGACCCAGCGGCGCCATGATTGCGTTCGGCGACATGATGAAGAAGCAGATCGTGATGCCCGCCACCTCATGAAC
GACAACGCTGCACCACGCCAACACCGGCGCAACCTGTTTCGCGGTGGGTCCCAGGCGGAGGGCGTGGGGCGGGCGGGACAGGAGGCGGGTCAAGTCAAG
 GAGGACTGAAGGTGTAAGCTGGACACGGCGTTGCGGGAGTGCAGGAGTCCAGTCCAGTTCAGGCTGATCTTTCATACCTGCTCGCGCACTC
 AAGACACAGGGCACGTGCGCGCCCCCTGACCCCTCACCCCTCTCACCTGACCTACCCACCCACGTCGCCCCAACACATCTGACTCCCCACC
 CCGCCTCCACGCTCCACGCCCCACAG**GACTTCTCCGCTGTGGCTGAGAACACGGGCACCTACACCGCCATGGACTACGCTGACATCATGGAGCA**
CCTGGTGGGCCGCTGGAACGCTCAAGAACCTGACCGGCTCAACGGCGACGCCCGCCATGCAGGAGTACGTCATCAAGCTGCCCGACCGCATCCGC
AAGCTGGCGGAGAAGGCCACCGTGCGCAGGAGGGGGAGGGGGTAGGGGGCAAAGGGGGGGTAGGGGGTTAGCAAAGAGCGCAGGGAGGA
 TGGAGGAAGGAGATTGTAAGGAATAGCTGTGGTGGTGGACGACGCGCTTGGGGGAACCATGCTGATGATGTGGCGGAAAGACTTTGGGGCTGGT
 GGGGAGAGCGGAAGCACAGGAGCTGTGTACCGGTATCTGAAATGCCCGTCTGTGCGTGGGCGCAGCACTCTCATTGACCTCTCCCTCTGCCGT
 GTTCTTCCCGCAG**CCCGCCGGAAGAAGGGCAAGGTCGTGCACGCGCCCTTACGCTGGGTGTTCAACCGGAGGTGGCCCTGTAA**

ภาพที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ChSAD* บนดีเอ็นเอ ขนาด 2898 คู่เบส โดยแถบสีเหลืองคือส่วนของ CDS



ภาพที่ 4 การเพิ่มปริมาณยีน *ChSAD* จากอาร์เอ็นเอของสาหร่าย *C. Reinhardtii* มีขนาด 1206 คู่เบส

```

ATGGCTCTGGGCCAGCAGGCGATGCAGCGCAAGGGCGCCCTTAACGCCAACAGGGCCTCGCGCAAGGCTTGCCTCGTCCGCGCGCAGGCGGTTGCCT
CGGCTCCCCAACAGCCGGCCACTGCTTCGCAGTATGTTCTCAGTCCAGGGCCCGATCATCATGAATGGTCAGGTGCTGCACAGCATCACGGCTGA
GCGCCTGGATGTGGTGCGCAGCCTGGAGGACGGCTACCTGCAGAGCCAGGTGGTGCCTCTGCTGAAGCCCGTGGAGAAGTGTGGCAGCCCGCCGAC
TTCCTGCCGCCCTCGGAGGACCCCGACTCCTGGACAAGGTGCGCGAGCTGCGCAAGCGCGCTGCCAACCTGCCCGATGACTACCTGGTGGTCTTCA
CCGGGACATGATCACCGAGGAGGCGCTGCCACCTACATGACCATGCTCAACACCCTGGACGGCGTTCCGGATGAGACCGGCGCCAGCCAGACCCC
CTGGGCCAAGTGGACGCGGAGTGGACCGCCGAGGAGAACCGCCACGGCGACGTCATGAACCCGTACATGTACCTGACTGGCCGCGTCAACATGAAG
GCGGTGGAGGTGACCGTGCAGAACCTGATTGGCTCCGGCATGGACCCCAAGACCAGAGAACAACCCCTACCTGGGCTTCTGCTACACCTCCTTCCAGG
AGCGCGCCACCAAGGTGTCCACCGCAACACCGCCCGCCACGCTTGGAGCACGGCGACGACGCTGGCCAAAGATCTGCGGCTCCATCGCCTCGGA
CGAGGGCCGCCACGAGATCGCCTACTGCAAGATCATGGACGGCTGTTTGGAGCGGACCCAGCGGCCCATGATTGCGTTCGGCGACATGATGAAG
AAGCAGATCGTGTATGCCCGCCACCTCATGAACGACAACGTGCACACGCCAACACCGCCGCAACCTGTTCGCGGACTTCTCCGCTGTGGCTGAGA
ACACGGGCACCTACACCGCCATGGACTACGCTGACATCATGGAGCACCTGGTGGGCGGCTGGAACGTCAAGAACCTGACCGGCCCTCAACGGCGACGC
CGCCGCCATGCAGGAGTACGTCAATCAAGCTGCCGACCGCATCCGCAAGCTGGCGGAGAAGGCCACCGCCCGCCGGAAGAAGGGCAAGGTGCTGCAC
GCGCCCTTACGCTGGGTGTTCAACCGCGAGGTGGCCCTGTAA

```

ภาพที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ChSAD* บนอาร์เอ็นเอ ขนาด 1206 คู่เบส

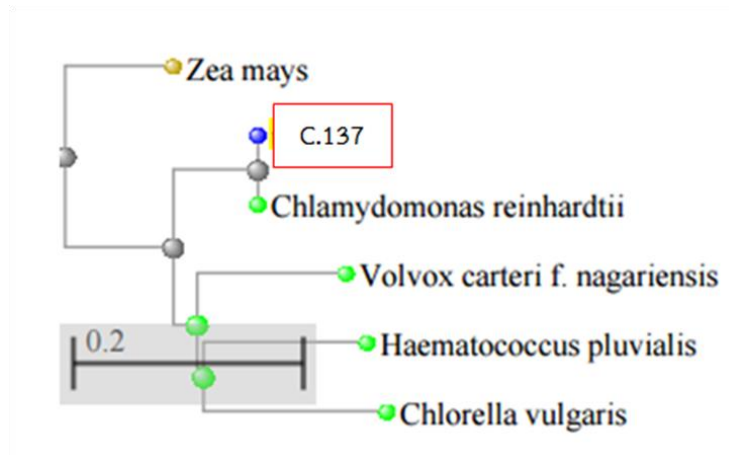
```

MALGQQAMQRK GALNANRASRKACVVRAQAVASAPQQPATASQYVPHVQGP IIMNGQVLHSITAEERLDVVRSLEDGY
LQSQVVPLLPVEKWCQPADFLPSPEDPDFLDKVRRLKRAANLPDDYLVVFTGDMIT EEALPTYMTMLNLTLDGVRD
ETGASQTPWAKWTREWTA EENRHGDVMNRYMYLTGRVNMKAVEVTQNLIGSGMDPKTENNPYLGFCYTSFQERATK
VSHGNTARHALEHGDDV LAKICGSIASDEGRHEIAYCKIMDGLFERDPSGAMIAFGDMMKKQIVMPAHLMNDNVHHA
NTGRNLFADFSVAENTGT YTYTAMDYADIMEHLVGRWNVKNLTGLNGDAAAMQ EYVIKLPDIRKLAEKATARRKKGK
VVHAPFSWVFNREVAL-

```

ภาพที่ 6 ลำดับอะมิโนเอซิดของยีน *ChSAD* ขนาด 401 อะมิโน

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ChSAD* ของ *C. Reinhardtii* สายพันธุ์ C.137 ไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) พบว่ามีความเหมือนกันกับ *C. Reinhardtii* และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับ *Volvox carteri* *Haematococcus pluviialis* และ *Chlorella vulgaris* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มสาหร่าย และจะเห็นว่า *Zea mays* จะมีความห่างทางพันธุกรรมมากที่สุด (ภาพที่ 7) ทั้งนี้เนื่องจากเป็นพืชลำดับสารพันธุกรรมจึงมีความต่างกัน



ภาพที่ 7 Phylogenetic tree ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ChSAD* ของ *C. Reinhardtii* สายพันธุ์ C.137

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่าย *C. Reinhardtii* สายพันธุ์ C.137 มีการเจริญเติบโตภายใน 5-7 วัน ระยะเวลา 7 วัน ได้ปริมาณเซลล์ที่เพียงพอต่อการสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ เมื่อนำไปเพิ่มปริมาณยีน *ChSAD* พบว่า ได้ขนาดยีนบนดีเอ็นเอ 2898 เบส จากดีเอ็นเอ ในส่วนของ CDS และ Non CDS และได้ขนาดยีน 1290 เบส จากอาร์เอ็นเอ สามารถแปลงเป็นลำดับอะมิโนเอซิดได้ขนาด 429 อะมิโน เมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล พบว่ามีความเหมือนกับยีน *C. reinhardtii* plastid acyl-ACP desaturase (*FAB2*) มีค่าความเหมือน (identity) 100 เปอร์เซ็นต์ และลำดับอะมิโนเอซิดพบว่ามีค่าความเหมือนกับโปรตีน plastid acyl-ACP desaturase มีค่าความเหมือน (identity) 83 เปอร์เซ็นต์ จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสเมื่อนำยีน *ChSAD* ไป Blast ในฐานข้อมูล NCBI พบตรงกับยีน *FAB2* ซึ่งก็คือยีน *SAD* เช่นกัน เนื่องจากการทดลองนี้ได้วางแผนการทดลองไว้ 4 ปี ซึ่งได้ดำเนินการเพียงแค่ 2 ปี ดังนั้นยีน *ChSAD* ที่โคลนได้จึงจะถูกนำไปโคลนเข้าเวกเตอร์ pChlamy3 เพื่อถ่ายฝากเข้าสาหร่าย *C. reinhardtii* และศึกษาการผลิตไบโอดีเซลต่อไป

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์:

สามารถนำเอายีน *SAD* ที่โคลนได้ไปถ่ายยีนเข้า *Chlamydomonas reinhardtii* แบบ Overexpression เพื่อศึกษาการผลิตไบโอดีเซลต่อไป

11. คำขอบคุณ

-

12. เอกสารอ้างอิง

กลุ่มพัฒนามาตรฐานน้ำมันเชื้อเพลิง สำนักคุณภาพน้ำมันเชื้อเพลิง. 2557. ความรู้เกี่ยวกับน้ำมันเชื้อเพลิงจากสาหร่าย. 4 น.

- พนิดา รัตนพลที และ ผกาวดี แก้วกันเนตร. 2551. ศักยภาพการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายขนาดเล็ก. วารสาร ศูนย์บริการวิชาการ. ปีที่ 16 ฉบับที่ 1. น. 9-13
- Alexandro, C., R. Margis, F.S. Maraschin, A.C. Turchetto-Zolet, G. Loss, M. Margis. 2011. Biosynthesis of Triacylglycerols (TAGs) in plant and algae. *Plant Biology*, 2 : 10, 40-52.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae, *Biotechnology Advance*. 25, 294-306.
DBT-UICT centre of energy biosciences. Institute of chemical technology. Matunga, Mumbai.
- Gong, Y., X. Guo, X. Wan, Z. Liang, M. Jiang. 2011. Characterization of a novel thioesterase (PtTE) from *Phaeodactylum tricornutum*. *Basic Microbiol.* 51(6):666-72.
- He, H., Wang, T. and Zhu, S. 2007. Continunous production of biodiesel fuel from vegetable oil using supercritical methanol process. *Fuel*. 86, 442-447.
- Hwangbo, K., J. Ahn, J. Lim, Y. Park. J.R. Liu and W. Jeong. 2014. Overexpression of stearyl-ACP desaturase enhances accumulations of oleic acid in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Biotechnol Rep V.8 Issue2*. pp 135–142.
- Jaeger, L., J.Springer, H.Wolbert, D.E.Martens and R.H.Wijffels. 2017. Gene silencing of stearyl-ACP desaturase enhances the stearic acid content in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bioresource Technology V. 245*: pp 1616-1626.
- Lali, A. 2008. Biotechnology for next generation biofuels/bioenergy. ICS Workshop Trieste.
- Lei, A., H. Chen, G. Shen, Z. Hu, L. Chen and J. Wang. 2012. Expression of fatty acid synthesis genes and fatty acid accumulation in *Haematococcus pluvialis* under different stressors. *Biotechnology for Biofuels*. 5 : 18.
- Merchant, S.S., Prochnik, S.E., Vallon, O., Harris, E.H., Karpowicz, S.J., Witman, G.B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L.M., Marechal-Drouard, L. 2007. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*. 318, 245-250.
- Miao, X.L., Wu, Q.Y. and Yang, C. 2004. Fast pyrolysis of microalgae to produce renewable fuels. *Anal. Appl. Pyrolysis*. 71, 855-865.
- Oilgae Club. 2010. An online community for algae fuel enthusiasts worldwide.
<http://oilgae.com/club/users/Aayush/blogs/465>.
- Ramachandra, T.V., D.M. Mahapatra, B.Karthic, and R. Gordon. 2009. Milking diatoms for sustainable energy : biochemical engineering versus gasoline-secreting diatom solar panels. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48 : 8769-8788.
- Randor, R., R.E. Jinkerson, A. Darzins and M.C. Posewitz. 2010. Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. *Eukaryotic cell*, 486-501.

Scientific American EARTY. 2009. น้ำมันในขนาดตสกัดจากสาหร่าย. Vol.19, No.1, 2 น.

<http://www.Green.in.th>.

Wei-Luen, Y.,W, Ansari, N.G. Schoepp, M.J. Hannon, S.P. Mayfield and M.D. Burkart. 2011.

Modifications of the metabolic pathways of lipid and triacylcerol production in microalgae. Microbial cell factories, 10 : 91.

Yong, L.B. 2014. Triacylglycerol biosynthesis in eukaryotic microbiology. The AOCS Lipid

Library. http://lipidlibrary.aocs.org/plantbio/tag_algae/index.htm

13. ภาคผนวก

สูตรการเตรียมอาหาร TAP medium

เริ่มเตรียม stock สาร ดังนี้

1. TAP salts	1	L	2	L
NH ₄ Cl	15	g	30	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	4	g	8	g
CaCl ₂ .2H ₂ O	2	g	4	g
	เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร		เติมน้ำให้ครบ 2 ลิตร	
2. Phosphate solution	100	ml	200	ml
K ₂ HPO ₄	28.8	g	57.6	g
KH ₂ PO ₄	14.4	g	18.8	g
	เติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร		เติมน้ำให้ครบ 200 มิลลิลิตร	
3. Trace elements solution (Hutner's trace elements)	1	L	2	L
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	5	g	10	g
ZnSo ₄ .7H ₂ O	2.2	g	4.4	g
H ₃ BO ₃	1.14	g	2.28	g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.5	g	1	g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.5	g	1	g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.16	g	0.32	g

CuSO ₄ .5H ₂ O	0.16 g	0.32 g
(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0.11 g	0.22 g

เติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร เติมน้ำให้ครบ 200 มิลลิลิตร

ละลาย Na₂EDTA.2H₂O ในน้ำร้อน 60-80 องศาเซลเซียส ปรับ pH เป็น 5.0 ด้วย KOH จากนั้นค่อยๆ เติมแต่ละสารลงไป เก็บในขวดพลาสติก PET ที่ -20 องศา

จากนั้นนำ stock ที่ได้มาเตรียม TAP medium ดังนี้

Tris base	2.42 g
TAP-salts	25 ml
Phosphate solution	1 ml
Trace elements solution	1 ml
Acetic acid	1 ml

เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร

แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยการ Autoclave