



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

ปริญญา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การผลิตสควอลีนโดยยีสต์

Squalene Production by Yeast

นามผู้วิจัย นางสาวสุริดา ตันติคำชน

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์สาวิตรี ลิ้มทอง, Dr.Eng.)

กรรมการ

(อาจารย์วิเชียร ขงมานิตชัย, Ph.D.)

กรรมการ

(อาจารย์ประชุมพร คงเสรี, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์ ร้อยเอก ชัยวัฒน์ กิตติกุล, วท.ม.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

()

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่

เดือน

พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การผลิตสควอลีนโดยยีสต์

Squalene Production by Yeast

โดย

นางสาวสุธิดา ตันติกำธน

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

พ.ศ. 2550

สุธิตา ดันติกำธน 2550: การผลิตสควอลีนโดยยีสต์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา ปรธานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์สาวตรี ลี้มทอง, Dr.Eng. 111 หน้า

จากตัวอย่าง ดิน ผลไม้ ขางไม้ ดอกไม้ เห็ด และมอส จำนวน 75 ตัวอย่าง แยกได้ยีสต์ 248 ไอโซเลต เมื่อนำมาคัดเลือกรวมพบว่ามี 30 ไอโซเลตที่สะสมสควอลีนภายในเซลล์ได้ จึงนำทุกไอโซเลต รวมทั้งยีสต์สายพันธุ์เดิม RV51 และสายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 ซึ่งเคยมีรายงานว่ามีการสะสมสควอลีนได้สูง (อุทัยพร, 2547) มาศึกษาปริมาณสควอลีนที่สะสมเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Yeast extract peptone dextrose พบว่า ยีสต์สายพันธุ์เดิม RV51 และสายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 สะสมสควอลีนได้สูงกว่าไอโซเลตที่แยกและคัดเลือกมาใหม่มาก จึงคัดเลือกยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์มาศึกษาการสะสมสควอลีนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวจากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่า มีการสะสมสควอลีนปริมาณใกล้เคียงกัน จึงนำยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวจากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ พบว่ายีสต์ทั้งสองสายพันธุ์ให้สควอลีนสูงสุดในอาหารเหลวจากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ โดยยีสต์สายพันธุ์กลายให้สควอลีนที่ผลิตได้สูงกว่าสายพันธุ์เดิมมาก ดังนั้นในการศึกษาองค์ประกอบของอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสควอลีนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวจากน้ำตาลในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตรและบ่มแบบเขย่า จึงใช้เฉพาะยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 และพบว่า อาหารเหลวจากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โคโคพอสเทมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 5.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 1.5 ที่ 550 นาโนเมตร ความเร็วการเขย่า 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเหมาะสมสำหรับการสะสมและการผลิตสควอลีน โดยยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 มีการสะสมสควอลีน 360.6 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และผลิตสควอลีนได้ 1,784.9 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่า การเติมเทอร์บินาฟีน 2.5 - 7.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลให้มีการสะสมสควอลีนภายในเซลล์เพิ่มขึ้น 5 - 10 เท่า ในขณะที่มีการผลิตสควอลีนเพิ่มขึ้น 5 เท่า ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่า การนำเซลล์ที่เจริญอยู่ในอาหารเหลวจากน้ำตาลไปแช่เยือกแข็งทันทีที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง มีผลให้เซลล์สะสมสควอลีนได้สูงขึ้น โดยทำให้มีการผลิตสควอลีนเพิ่มขึ้น 3 - 4 เท่า สำหรับการผลิตสควอลีนของยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 เมื่อเพาะเลี้ยงแบบแบดซ์ในถังหมักแบบถังกวนขนาด 5 ลิตร ในอาหารเหลวจากน้ำตาลที่มีองค์ประกอบอาหารและสภาวะที่ได้จากการศึกษาในพลาสติก ปริมาตร 3 ลิตร พบว่า การเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมเทอร์บินาฟีน 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรแล้วแช่เยือกแข็งเซลล์ที่เจริญอยู่ในอาหารเหลวจากน้ำตาลทันทีที่ -20 องศาเซลเซียส ผลิตสควอลีนได้ 19,700.6 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เวลา 15 ชั่วโมง ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมเทอร์บินาฟีนแล้วแช่เยือกแข็งเซลล์แบบเดียวกัน ผลิตสควอลีนเพียง 3,741.4 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง

Sutida Tuntigumton 2007: Squalene Production by Yeast. Master of Science (Microbiology),
Major Field: Microbiology, Department of Microbiology. Thesis Advisor: Associate Professor
Savitree Limtong, Dr.Eng. 111 pages.

A total of 248 yeast isolates were obtained from 75 samples of soils, fruits, exudates, flowers, mushrooms and mosses. Among these isolates, thirty isolates were found to accumulate squalene within cell. All 30 isolates together with a wild type strain RV51 and a mutant strain RV51-UV2-NTG2, which were previously reported to accumulate high squalene content (Uthaiporn, 2004), were subjected to quantitative determination of squalene accumulation when cultivation in yeast extract peptone dextrose broth. The results indicated that the wild type strain RV51 and the mutant strain RV51-UV2-NTG2 were able to accumulate much more squalene than the other 30 isolates. Therefore, both strains were selected for determination of squalene accumulation when cultivation in molasses medium containing 2% sugar. The results revealed that the amount of squalene accumulated by both strains was not different. Both strains were cultivated in molasses medium containing 2, 3 and 4% sugar and they could produce the highest concentration of squalene in molasses medium containing 3% sugar. However, the mutant strain RV51-UV2-NTG2 produced much higher squalene than did the wild type strain RV51. Therefore, only the mutant strain RV51-UV2-NTG2 was studied on its optimal medium compositions and cultivation conditions for squalene production in molasses medium by shaking cultivation. Molasses medium containing 3% sugar, 0.05% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.05% K_2HPO_4 , and pH 5.0, with 100 ml of medium, initial cell concentration as optical density 1.5 at 550 nm and orbital shaking at 100 rpm, 28 °C were optimal for squalene accumulation and production. The maximal squalene accumulation and production obtained were 360.6 µg/g dry cell weight and 1,784.9 µg/l, respectively at 12 hours. Addition of 2.5 - 7.5 µg/ml terbinafine to cultivation medium resulted in increasing of squalene accumulation by 5 - 10 times and squalene production by 5 times. Freezing of culture broth at -20 °C immediately after sampling for 6 hours, resulted in increasing squalene production by 3 - 4 times. Cultivation of the mutant RV51-UV2-NTG2 in 5 liter jar-fermentor with 3 liter working volume using molasses medium containing the optimal medium compositions and optimal cultivation conditions obtained in shaking flask cultivation with addition of 2.5 µg/ml terbinafine and freezing culture broth at -20 °C immediately for 6 hours, resulted in squalene production at 19,700.6 µg/l at 15 hours, while only 3,741.4 µg/l was obtained at 12 hours in medium without addition of terbinafine.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. สาวิตรี ลิ้มทอง ประธานกรรมการที่ปรึกษาเป็นอย่างสูง ที่กรุณาให้คำแนะนำ ปรึกษา ช่วยเหลือ และสนับสนุนอุปกรณ์เครื่องมือในการทำวิจัย รวมทั้งช่วยแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในงานวิจัย ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณ ดร. วิเชียร ยงมานิตชัย กรรมการวิชาเอก ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ และช่วยแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ในการใช้เครื่องมือให้ผ่านลุล่วงไปได้ด้วยดี และขอกราบขอบพระคุณ ดร. ประชุมพร คงเสรี กรรมการวิชารอง และ ผศ.ดร.วีระสิทธิ์ สรรพมงคลไชย ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้เสร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อสมนึก คุณแม่ยุพิน ตันติคำธน และครอบครัวที่คอยให้กำลังใจและกำลังใจเพื่อสนับสนุนการศึกษาแก่ข้าพเจ้ามาโดยตลอด

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา และครูอาจารย์ในอดีตจนถึงปัจจุบันที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้แก่ข้าพเจ้า

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนและส่งเสริมวิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้เงินทุนสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณที่ ๆ เพื่อน ๆ น้อง ๆ และสมาชิกห้อง 4311 ทุกคนที่คอยให้กำลังใจ และความช่วยเหลือมาโดยตลอด

สุธิดา ตันติคำธน

มกราคม 2550