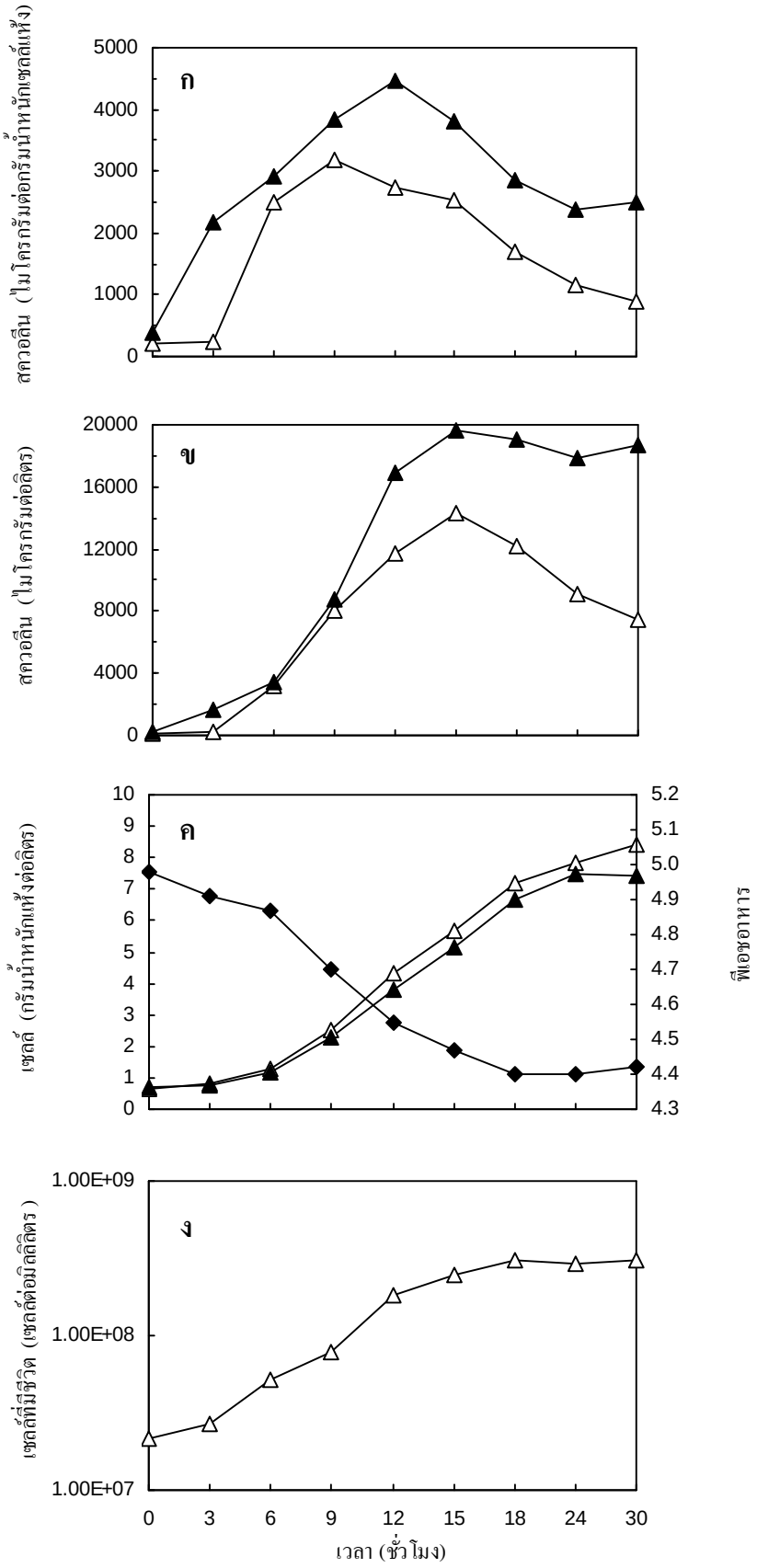
ก
ข
ค
ง
สควอลีน (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง)
สควอลีน (ไมโครกรัมต่อลิตร)
เซลล์ (กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร)
พีเอชอาหาร
เซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)
เวลา (ชั่วโมง)

หลังจากชั่วโมงที่ 18 - 30 ชั่วโมง เชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ทำให้พีเอชของอาหารไม่ค่อยเปลี่ยนแปลงนัก คือ มีพีเอชอยู่ระหว่าง 4.40 - 4.42 (ภาพที่ 21ค)

สำหรับผลของเทอร์บินาฟีนต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์ยีสต์สายพันธุ์กลายที่ไม่ได้แช่เยือกแข็งที่ -20 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมเทอร์บินาฟีน 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนั้นให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตไม่แตกต่างไปจากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมเทอร์บินาฟีนมากนัก คือ ให้เซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 3.08×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 30 ชั่วโมง ในขณะที่ในอาหารที่ไม่เติมเทอร์บินาฟีนให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 3.21×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง (ในที่นี้ไม่ได้แสดงผลจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตจากเซลล์ที่แช่เยือกแข็งทันทีที่ -20 องศาเซลเซียส) (ภาพที่ 21ง)

สรุป

1. <u>การเก็บตัวอย่างและการแยกยีสต์</u>

เก็บตัวอย่าง ดิน ผลไม้ ดอกไม้ ยางไม้ เห็ด และมอส จากป่าบริเวณสถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช สถานีฝึกวิจัยนิสิตวนศาสตร์วังน้ำเขียว ศูนย์รวบรวมพันธุกรรมพันธุ์ไม้เฉลิมพระเกียรติ ร. 9 อำเภอวังน้ำเขียว และดินบริเวณเขื่อนลำพระเพลิง อำเภอปักธงชัย จังหวัดนครราชสีมา ได้ตัวอย่างทั้งหมด 75 ตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างทั้งหมดมาแยกยีสต์โดยวิธี enrichment ในอาหารเหลว YM ที่เติมคลอแรมฟีนิคอลและโซเดียมโพรพิโอเนต และปรับพีเอชเป็น 3.7 - 3.8 บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง สามารถแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 248 ไอโซเลต

2. <u>การคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่สะสมสควอลีนได้สูง</u>

นำยีสต์จำนวน 248 ไอโซเลตมาทำการคัดเลือกไอโซเลตที่มีการสะสมสควอลีนในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเซลล์ไปสกัดไขมัน และวิเคราะห์หาสควอลีนด้วยวิธี TLC พบว่า ยีสต์จำนวน 12 ไอโซเลตสะสมสควอลีนปริมาณมากใกล้เคียงสควอลีนมาตรฐานความเข้มข้น 0.005 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ส่วนยีสต์ 5 ไอโซเลตสะสมสควอลีนปริมาณปานกลาง และ 13 ไอโซเลตสะสมสควอลีนปริมาณน้อย ในขณะที่อีก 218 ไอโซเลตไม่พบการสะสมสควอลีน ดังนั้นจึงเลือกยีสต์ที่มีการสะสมสควอลีนภายในเซลล์ทั้งหมด 30 ไอโซเลต เพื่อศึกษาปริมาณสควอลีนที่สะสมต่อไป

นำยีสต์ที่มีการสะสมสควอลีนทั้ง 30 ไอโซเลต ยีสต์สายพันธุ์เดิม RV51 และสายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 ที่เคยรายงานว่ามีการสะสมสควอลีนได้สูง (อุทัยพร, 2547) มาศึกษาปริมาณสควอลีนที่สะสม เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเซลล์ไปสกัดไขมันและวิเคราะห์ปริมาณสควอลีนโดยวิธี HPLC พบว่า ยีสต์สายพันธุ์เดิม RV51 และสายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 มีการสะสมสควอลีนเท่ากับ 827.9 และ 826.4 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าการสะสม

สควอลีนของยีสต์ทั้ง 30 ไอโซเลตที่แยกและคัดเลือกใหม่มาก ดังนั้นจึงได้คัดเลือกยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์มาศึกษาการสะสมสควอลีนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาล เพื่อใช้ในการผลิตสควอลีนต่อไป

3. <u>การคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่สะสมสควอลีนได้สูงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาล เพื่อใช้ในการผลิตสควอลีน</u>

จากการศึกษาการสะสมสควอลีนของยีสต์สายพันธุ์เดิม RV 51 และสายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ และปรับพีเอชเป็น 4.5 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 0.5 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 42 ชั่วโมง พบว่ายีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 สะสมสควอลีน 739.6 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 12 ชั่วโมง ส่วนยีสต์สายพันธุ์เดิม RV51 สะสมสควอลีน 549.3 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 6 ชั่วโมง เนื่องจากยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์มีการสะสมสควอลีนปริมาณใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงเลือกยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์เพื่อนำมาศึกษาองค์ประกอบของอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสควอลีนในอาหารเหลวกากน้ำตาลต่อไป

4. <u>การศึกษาองค์ประกอบของอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสควอลีนในอาหารเหลวกากน้ำตาลของยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้</u>

จากการศึกษาองค์ประกอบของอาหารเหลวกากน้ำตาลและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสควอลีนของยีสต์สายพันธุ์เดิม RV51 และสายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 พบว่า ยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์ผลิตสควอลีนปริมาณสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ โดยยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 มีปริมาณสควอลีนสูงกว่าสายพันธุ์เดิม RV51 อย่างชัดเจน ดังนั้นจึงได้เลือกเฉพาะยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 มาศึกษาและพบว่า องค์ประกอบของอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสควอลีนของยีสต์สายพันธุ์กลาย คือ อาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 5.0 อาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 1.5 ที่

ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 มีการสะสมสควอลีน 360.6 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และผลิตสควอลีนได้ 1,784.9 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่เวลา 12 ชั่วโมง

5. <u>การศึกษาผลของเทอร์บินาฟีนต่อการสะสมสควอลีนในยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2</u>

จากการศึกษาผลของเทอร์บินาฟีนต่อการสะสมสควอลีนในเซลล์ยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 พบว่า การเติมเทอร์บินาฟีนลงไปในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ใช้เพาะเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์กลายมีผลทำให้การสะสมสควอลีนภายในเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมเทอร์บินาฟีน โดยเมื่อเติมเทอร์บินาฟีน 7.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรลงไปในอาหารทำให้ยีสต์สายพันธุ์กลายมีการสะสมสควอลีนสูงสุดเท่ากับ 4,835.3 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนเมื่อเติมเทอร์บินาฟีน 2.5 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีการสะสมสควอลีน 2,292.0 และ 2,592.8 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ คิดเป็นการเพิ่มขึ้นของสควอลีนประมาณ 5 - 10 เท่าของการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมเทอร์บินาฟีน แต่เมื่อพิจารณาถึงการผลิตสควอลีนแล้วพบว่า ปริมาณสควอลีนที่ได้จากเติมเทอร์บินาฟีน 2.5, 5 และ 7.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนั้นใกล้เคียงกันไม่แตกต่างกันมากนัก คือ 10,268.1, 9,947.2 และ 11,057.6 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นการเพิ่มขึ้นของสควอลีนประมาณ 5 เท่าของการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมเทอร์บินาฟีน ในขณะที่หากไม่เติมเทอร์บินาฟีนมีการสะสมสควอลีนเพียง 452.9 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งและผลิตสควอลีนได้ 2,056.3 ไมโครกรัมต่อลิตร ดังนั้นเพื่อความเหมาะสมในแง่ของต้นทุนการผลิตสควอลีนของยีสต์สายพันธุ์กลาย จึงเลือกเทอร์บินาฟีน 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดของการทดลองครั้งนี้ เพื่อใช้สำหรับการผลิตสควอลีนในถังหมักขนาด 5 ลิตรต่อไป

6. <u>ผลของการแช่เยือกแข็งเซลล์ในอาหารเหลวกากน้ำตาลต่อการผลิตสควอลีนของยีสต์สายพันธุ์กลายRV51-UV2-NTG2</u>

จากการศึกษาผลการแช่เยือกแข็งเซลล์ในอาหารเหลวกากน้ำตาลต่อการผลิตสควอลีนของยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 โดยเก็บตัวอย่างมาศึกษาการผลิตสควอลีน 2 แบบ คือ (1) เก็บตัวอย่างโดยไม่ได้แช่เยือกแข็งเซลล์แต่เซนตริฟิวจ์แยกเอาอาหารออกแล้วล้างเซลล์ทันที นำ

เซลล์ไปสกัดไขมันและวิเคราะห์สควอลีน และ (2) เก็บตัวอย่างเซลล์พร้อมอาหารนำไปแช่เยือกแข็งทันทีที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วนำมาเซนตริฟิวจ์แยกเอาอาหารออกและล้างเซลล์เช่นเดียวกับวิธีแรก จากนั้นนำเซลล์ไปสกัดไขมันและวิเคราะห์สควอลีน พบว่า ยีสต์สายพันธุ์กลายทั้งที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมและเติมเทอร์บินาฟีนแล้วนำเซลล์พร้อมอาหารมาแช่เยือกแข็งทันทีที่ -20 องศาเซลเซียส มีการผลิตสควอลีนสูงขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้แช่เยือกแข็งแต่เซนตริฟิวจ์แยกเอาอาหารออกและล้างเซลล์ทันที โดยเมื่อนำเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมเทอร์บินาฟีน 0, 2.5, 5 และ 7.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 42 ชั่วโมง มาแช่เยือกแข็งทันทีที่ -20 องศาเซลเซียส ผลิตสควอลีนเท่ากับ 4,045.3, 14,865.2, 18,663.2 และ 19,735.9 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนเซลล์ที่ไม่ได้แช่เยือกแข็งผลิตสควอลีนได้เพียง 1,331.7, 5,002.6, 4,663.7 และ 6,878.3 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นการเพิ่มขึ้นของสควอลีนประมาณ 3 - 4 เท่า

7. การศึกษาการผลิตสควอลีนในอาหารเหลวกากน้ำตาลของยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 ในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ

จากการศึกษาการผลิตสควอลีนโดยเพาะเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 แบบแบตช์ในถังหมักแบบถังกวนขนาด 5 ลิตร ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชเป็น 5.0 ปริมาตร 3 ลิตร โดยปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 1.5 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ในระหว่างการเพาะเลี้ยงทำการกวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที และให้อากาศ 1 vvm อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างมาศึกษาการผลิตสควอลีน 2 แบบ พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์กลายในอาหารที่ไม่เติมเทอร์บินาฟีน และนำเซลล์พร้อมอาหารแช่เยือกแข็งทันทีที่ -20 องศาเซลเซียส ผลิตสควอลีนได้ 3,741.4 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าเซลล์ที่ไม่ได้แช่เยือกแข็งที่ผลิตสควอลีน 2,213.2 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง ส่วนการผลิตสควอลีนของยีสต์สายพันธุ์กลายเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมเทอร์บินาฟีน 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีการผลิตสควอลีนสูงขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมเทอร์บินาฟีน โดยเมื่อนำเซลล์พร้อมอาหารมาแช่เยือกแข็งทันทีที่ -20 องศาเซลเซียส ผลิตสควอลีนได้เท่ากับ 19,700.6 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เวลา 15 ชั่วโมง ส่วนเซลล์ที่ไม่ได้แช่เยือกแข็งผลิตสควอลีน 14,376.1 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เวลา 15 ชั่วโมง ซึ่งเท่ากับการแช่เยือกแข็งเซลล์ทันทีที่ -20 องศาเซลเซียสจากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมเทอร์บินาฟีน 2.5 ไมโคร

กรัมต่อมิลลิลิตรมีการผลิตสควอลีนเพิ่มขึ้นประมาณ 5.3 เท่าของการแช่เยือกแข็งเซลล์ทันทีที่ -20 องศาเซลเซียสจากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมเทอร์บินาฟีน

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กำพล ศรีวัฒนกุล. 2542. **น้ำมันตับปลาฉลาม: มหัศจรรย์ธรรมชาติบำบัด**. สำนักพิมพ์ยู-เอสคอร์เปเรชั่น. กรุงเทพฯ แปลจาก N. Solomon, R. Passwater and I. Joelsson. Shark Liver Oil. Kensington Publish Corp.

นิรนาม. 2543. น้ำมันตับปลาฉลาม “เอสเซนเชี่ยส มารีน” แหล่งที่มา http://www.eyi.co.th./eyi 2000/product/marine.htm., 20 มีนาคม , 2545

นิธิยา รัตนาปนนท์. 2548. **วิทยาศาสตร์การอาหารของไขมันและน้ำมัน.** สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพ ฯ.

บริษัทโนวาติส (ประเทศไทย) จำกัด. 2544. **ลามิซิล ยารักษาเชื้อราชนิดรับประทาน**. 25 มีนาคม 2545

ปนิดา กิตติรัตน์หมาย. 2546. **การปรับปรุงประสิทธิภาพการหมักเอทานอลโดยใช้ยีสต์ตกตะกอนและเทคนิครีพีทเฟดแบทช์**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พิมพร ลีลาพรพิสิฐ. 2532. **อิมัลชันทางเครื่องสำอาง.** สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพ ฯ.

_____2543. **เครื่องสำอางธรรมชาติ ผลิตภัณฑ์สำหรับผิวหนัง.** สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพ ฯ.

วิเชียร ยงมานิตชัย. 2542. เอกสารบทปฏิบัติการวิชายีสต์และยีสต์เทคโนโลยี (419427). ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ ฯ.

วิไล สันติโสภาศรี. 2542. **ชีวเคมี 2.** ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ ฯ.

วิศัลย์ อินชนบท. 2546. **การผลิตยีสต์อาหารสัตว์ด้วยถังหมักระบบออกซิเจนลอยตัวร่วมกับการหมักแบบเฟด-แบทซ์ โดยใช้ยีสต์ตกตะกอนที่ทนอุณหภูมิสูง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมบรูณ์ ธนาศุภวัฒน์. 2544. **เทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์.** พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรงเทพ ฯ.

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2549. **ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ**. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ ฯ.

อรัญญา มโนสร้อย และ จีระเดช มโนสร้อย. 2545. **ไลโปโซมทางยาและเครื่องสำอาง.** สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพ ฯ.

อุทัยพร อัครานุภาพพงศ์. 2547. **การปรับปรุงพันธุกรรมยีสต์สำหรับการผลิตไขมันสควอลีนและการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อุษณีย์ วินิจเขตคำนวณ. 2547. **ชีวเคมีของลิปิดและไลโปโปรทีน.** พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์ดาวคอมพิวกราฟิก, เชียงใหม่.

Alves-Araújo, C., M.J. Almaida, M.J. Sousa and C. Leão. 2004. Freeze tolerance of the yeast *Torulaspora delbrueckii*: cellular and biochemical basis**. FEMS Microbial. Lett**. 240: 7-14

Anonymous. n.d.a. History of squalene. Available Source:http://www.isshogeinki.com/history2.html, March 24, 2005

_____n.d.b. Squalene. Available Source: http://www.portalmarkel.com/Shark.html, November 14, 2004

_____n.d.c. Deep sea shark live oil fats. Available Source: http://www.lovelyheath.com/ Shark%20Liver%20Oil html, March 24, 2005

_____n.d.d. Amaranth oil. Available Source: http://www.amomaplus.de/1Amaranth%20Oil. html, March 27, 2005

_____n.d.e. Cholesterol and bile metabolism. Available Source: http://www.med.unibs.it/ ~marchesi/cholest.html, April 24, 2005

_____2003. Squalene, purified. Available Source: http://www.echelon-inc.com, December 12, 2004

_____2005. PDR drug information for lamisil tablets. Available Source: http://www.Lamisil Tablets Professional Drug Information.htm, May 5, 2005

Becker, R. 1994. Amaranth oil: Composition, Processing and Nutritional Qualities, pp. 131-141. *In* O. Paredes-López, ed**. Amararanth Biology, Chemistry and Technology.** CRC Press, Inc.

Beltran, G., M. Novo, J.M. Guillamón, A. Mas and N. Rozès. n.d. Effect of fermentation temperature and culture media on the lipid composition and volatile compounds in wine. Chapter1. pp. 75-96 (submitted for publication), Spain.

Bhattacharjee, V.B., R.S. Shukla and P.R. Kulkani. 2001. Studies on fermentative production of squalene. **World J. Microbiol. Biotechnol**. 17: 811-816

Bligh, E.G. and W.J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.** 37: 911-917

Budker, P. 1971. **The Life of Sharks.** Columbia University Press, New York, USA.

Claff, C.E. 2001. **A translator's guide to organic chemical nomenclature**. Available Source: http://accurapid.com/journal/15org.htm, May 5, 2005

Dulaney, E.L., E.O. Stapley and K. Simpf. 1954. Studies on ergosterol production by yeasts. **Appl. Microbiol**. 8: 371-379

Fornairon-Bonnefond, C., E. Aguera, C. Deytieux, J.M. Sablayrolles and J.M. Salmon. 2003. Impact of oxygen addition during enological fermentation on sterol contents in yeast lees and their reactivity towards oxygen. **J. Biosci. Bioeng.** 95: 496-503

_____V. Demaretz, E. Rosenfeld and J.M. Salmon. 2002. Oxygen addition and sterol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* during enological fermentation**. J. Biosci. Bioeng.** 93: 176-182

Ghanem, K.M., N.B. Ghanem and A.H. EL-Refai. 1990. Ergosterol production under optimized conditions by *Penicilium crustosum* Thom. **Journal of Islamic Academy of Science**. 3:1: 30-34

Gurr, M.I., J.L. Harwood and K.N. Frayn. 2002. 5th ed. **Lipid Biochemistry,.** Blackwell Science, Inc., USA.

Hamm, W. and R.J. Hamilton. 2000. Composition and properties of edible oils, p. 10. **Edible Oil Processing.** Sheffeild Acedemic Press, UK.

He, H.P., Y. Cat, M. Sun and H. Corke. 2002. Extraction and purification of squalene from *Amanthus* grain. **J. Agric. Food Chem.** 50: 368-372

He, X., W. Huai, C. Tie, Y. Liu and B. Zhang. 2000. Breeding of high ergosterol producing yeast strains. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 25: 39-44

Jacob, Z. 1993. Yeast lipid biotechnology. **Adv. Appl. Microbiol.** 39: 185-212

Jahnke, L. and H.P. Klein. 1983. Oxygen requirements for formation and activity of the squalene epoxidase in *Saccharomyces cerevisiae.* **J. Becteriol.** 155: 488-492

Jandrositz, A., F. Turnowsky and G. Högenauer. 1991. The gene encoding squalene epoxidase from *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and characterization. **Gene.** 107: 155-160.

Jonhson, V., M. Singh, and N.K. Yadav. 1994. Influence of growth conditions on the accumulation of ergosterol by *Rhodotorula glutinis*. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 10: 114-115

_____, _____V.S. Sani, D.K. Adhikari, V. Sista and N.K. Yadav. 1995. Utilization of molasses for the production of fat by an oleaginous yeast, *Rhodotorula glutinis* IIP-30. **J. Inst. Microbial**. 14: 1-4

_____, _____, _____V.R. Sista and N.K. Yadav. 1992. Effect of pH on lipid accumulation by an oleaginous yeast: *Rhodotorula glutinis* IIP-30. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 8: 382-384

Kamimura, N., M. Hidaka, H. Masaki and T. Uozumi. 1994. Construction of squalene-accumulating *Saccharomyces cerevisiae* through homologous recombination. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 42: 353-357

Kelly, G.S. 1999. Squalene and its potential clinical use. **Altern. Med. Rev.** 4: 29-36

Klein, H.P. 1955. Synthesis of lipid in resting cell of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Bacteriol.** 69: 620-627

Koukkou, A.I., D. Tsoukatos and C. Drainas. 1993. Effect of ethanol on the sterols of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe.* **FEMS Lett.** 111: 171-175

Kreuzer, R. and R. Ahmed. 1978. **Shark Utilization and Marketing.** International trade center UNCTAD/GATT, Rome, Italy.

Kuchta, T., C. Léka, R. Kubinec and N.J. Russell. 1997. Inhibition of ergosterol biosynthesis is not accompanied by a change in fatty acid composition in *Saccharomyces cerevisiae*. teated with the antifungal agent 6-amino-2-n-pentylthiobenzothiazole. **FEMS Lett.** 150: 43-47

Leber, R., E. Zinser, C. Hrastnik, F. Paltauf and G. Daum. 1995. Export of steryl esters from lipid partic and release of free sterol in yeast, *Saccharomyces cerevisiae.* **Biochim. Biophys. Acta.** 1234: 119-226

_____R. Zenz, K. Schrottner, S. Fuchsbichler, B. Puhringer and F. Turnowsky. 2001. A novel sequence element is involved in the transcriptional regulation of expression of the *ERG1* (squalene epoxidase) gene in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eur. J. Biochem.** 268: 914-924

Li, Y.H., B. Liu, Z.B. Zhao and F.W. Bai. 2006. Optimization of culture conditions for lipid production by *Rhodosporidium toruloides*. **Chin. J. Biotech**. 22(4): 650-656

Möller, H. 2002. The chemistry of natural and synthetic skin barrier lipids, p. 6. *In* T. Förster, ed. **Cosmetic Lipids and the Skin Barrier.** Marcel Dekker, Inc., USA.

Murakami, Y., K. Yokoigawa and H. Kawai. 1995. Lipid composition of a freeze-tolerant, *Torulaspora delbrueckii*, and its freeze-sensitive mutant. **Appl. Microbiol. Biotechnol**. 44: 167-171

Murakoshi, M., H. Nishino and H. Tokuda. 1992. Inhibition by squalene of the tumor-promoting activity of 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate in mouse skin carcinogenesis. **Int. J. Cancer.** 52: 950-952

Mycogen corporation. 2003. Using yeast fermentation to produce cost-effective and biodegradable lubricants. Available Source: http://statusreport-atp.nist. g.PDF, November 25, 2004

Newmark, H.L. 1997. Squalene, olive oil and cancer risk: a review and hypothesis. **Cancer Epidemol. Biomarkers. Prev.** 6: 1101-1103

Nishikawa, Y., T. Kamihara and S. Fukui. 1978. Thiamine-indued alteration in sterol composition of *Saccharomyces carlsbergensis* 4228. **Biochim. Biophys. Acta.** 25: 86-95

Nurminen, T., K. Konttinen and H. Suomalainen. 1974. Neutral lipid in the cell and cell envelope fractions of aerobic baker's yeast and anaerobic brewer's yeast. **Chem. Phys. Lipid.** 14: 15-32

Polakowski, T., U. Staht and C. Lang. 1998. Overexpression of a cytosolic hydroxymethylglutaryl-CoA reductase lead to squalene accumulation in yeast. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 49: 66-71

Pfisterer, E., I. Hancock and I. Garrison. 1976. Effect of fermentation environment on yeast lipid synthesis**. ASBC Journal**. 35: 49.54

Psomiadou, E. and M. Tsimidou. 1999. On the role of squalene in olive oil stability. **J. Agric. Food Chem.** 47: 4025-4032

Rattray, J.B.M., A. Schibeci and D.K. Kidby. 1975. Lipid of yeasts. **Bacteriol. Rev.** 39: 197-231

Richer, E. and S.G. Schafer. 1982. The effect of squalene on the absorption of dietary cholesterol by the rat. **Res. Exp. Med.** 180: 189-191

Ryder, N.S. 1992. Terbinafine mode of action and properties of the squalene epoxidase inhibition. **Br. J. Dermatol.** 39: 2-7

_____A. Stuets and P. Nussbaumer. 1992. Squalene epoxidase inhibitors, pp. 192-204. *In* W.D. Nes, E.J. Panish, J.M. Trzaskos, eds. **Regulation of Isoprenoid Metabolism.** American chemical Society, Washington, D.C.

Šajbidor, J., M. Čertik and J. Grego. 1994. Lipid analysis of baker's yeast. **J. Chromatography A.** 665: 191-195

Schulze, K.L. 1956. The effect of phosphate supply on the rate of growth and fat formation in yeasts. Michican state university. 4: 207-211

Shang, F., S. Wen, X. Wang and T. Tan. 2006. Effect of nitrogen limitation on the ergosterol production by fed-batch culture of *Sacchromyces cerevisiae***. J. Biotechnol**. 122: 285-292

Shimizu, I. and H. Katsuki. 1975. Effect of temperature on ergosterol biosynthesis in yeast. **J. Biochem.** 77: 1023-1027

Singh, B., G.K. Oberoi and S.C. Sharma. 1990. Effect of pH stress on lipid composition of *Saccharomyces cerevisiae*. **Indian J. Exp. Biol.** 28: 430-433

Smith, T.J. 2000. Squalene: potential chemopreventive agent. **Expert. Opin. Investig. Drugs**. 9(8): 1841-1848

Springer, V.G. and J.P. Gold. 1989. The Smithsonian answer book: part two. pp. 125-126. *In* M.K. Smith, ed. **Sharks in Question**. Smithsonian Institution press, USA.

Strandberg, T.E., R.S. Tilvis and T.A. Miettinen. 1990. Metabolic of cholesterol during squalene feeding in humans: comparison with cholesterol treatment. **J. Lipid Res.** 34: 1637-1642

Tota, B. 1999. Liver and gallblodder, p. 159. *In* W.C. Hamlett, ed. **Sharks, Skates and Rays, The Biology of Elasmobranch Fishes.** Johns Hopkins University Press, Inc.

Turk, M., L. Méjanelle, M. Šentjurc, J.O. Grimalt, N. Gude-Cimerman and A. Plemenitaš. 2003. Salt-induced changes in lipid composition and membrane fluidity of halophilic yeast-like melanized fungi. **Extremophiles.** 8: 53-61

Valero, E., C. Millan and J.M. Ortega. 2001. Influence of oxygen addition during growth phase on the biosynthesis of lipid in *Saccharomyces cerevisiae* ($M_3$30-9) in enological fermentation. **J. Biosci. Bioeng.** 92: 33-38

Zweytick, D., K. Athenstaedt and G. Daum. 2000. Intracellular lipid particles of eukaryotic cell. **Biochim. Biophys. Acta.** 1412: 101-120

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อปรับพีเอชให้มีค่าตามความต้องการด้วย 1N HCl หรือ 1N NaOH แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1. อาหารแข็ง YM (Yeast extract malt agar)

ยีสต์เอกซ์แทรกต์ (yeast extract)	3 กรัม
มอลท์ (malt)	3 กรัม
เปปโตน (peptone)	5 กรัม
เดรกโทรส (dextrose)	10 กรัม
วุ้น (agar)	15 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

2. อาหารเหลว YM (Yeast extract malt broth)

สูตรเตรียมเหมือนอาหารแข็ง YM แต่ไม่ต้องเติมวุ้น

3. อาหารแข็ง YPD (Yeast extract peptone dextrose agar)

ยีสต์เอกซ์แทรกต์ (yeast extract)	10 กรัม
เปปโตน (peptone)	10 กรัม
เดรกโทรส (dextrose)	20 กรัม
วุ้น (agar)	15 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

4. อาหารเหลว YPD (Yeast extract peptone dextrose broth)

สูตรเตรียมเหมือนอาหารแข็ง YPD แต่ไม่ต้องเติมวุ้น

5. <u>อาหารเหลวกากน้ำตาล</u>

การคำนวณความเข้มข้นของอาหารเหลวกากน้ำตาล

V1 = (N2V2)/N1
V1 = ปริมาตรกากน้ำตาลที่ต้องใช้
V2 = ปริมาตรอาหารเหลวกากน้ำตาลสำหรับลงหมัก
N1 = ความเข้มข้นของน้ำตาลในกากน้ำตาล
N2 = ความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารเหลวกากน้ำตาลสำหรับลงหมัก

ความเข้มข้นของน้ำตาลในกากน้ำตาลวิเคราะห์โดยใช้ HPLC ซึ่งใช้น้ำตาลซูโครส กลูโคส และฟรุกโตส เป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์ตามวิธีของวิศัลย์ (2546) โดยความเข้มข้นของน้ำตาลในกากน้ำตาลเท่ากับผลรวมของน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด คือ น้ำตาลซูโครส กลูโคส และฟรุกโตส

6. <u>การเตรียมเทอร์บินาฟีน</u>

นำยาเทอร์บินาฟีนชนิดรับประทานขนาด 250 มิลลิกรัม จำนวน 1 เม็ด มาละลายในตัวทำละลายแอลกอฮอล์ 99.99 เปอร์เซ็นต์ ใส่ในขวดสีชาหรือเก็บให้พ้นแสง และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

<u>หมายเหตุ</u> เนื่องจากเทอร์บินาฟีนเป็นยาที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้น ซึ่งส่วนประกอบของเม็ดยามีแป้งเป็นองค์ประกอบอยู่ ดังนั้นการละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับแอลกอฮอล์เป็นไปได้ยาก ทำให้มีส่วนที่ไม่ละลายหลงเหลืออยู่ และในการเตรียมไม่ได้ทำการกรองเอาส่วนที่ไม่ละลายออก ดังนั้นก่อนการใช้จึงต้องเขย่าขวดทุกครั้ง