การผลิตสควอลีนโดยยีสต์

Squalene Production by Yeast

คำนำ

สควอลีน คือ ลิพิดที่ไม่มีขั้วชนิดหนึ่งที่มีโครงสร้างทางเคมีเป็นสารประกอบอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดไม่อิ่มตัว (unsaturated aliphatic hydrocarbon) มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{30}H_{50}$ ปัจจุบันได้มีการนำสควอลีนมาใช้เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอางหลายประเภท เช่น โลชั่น ครีมบำรุงผิว ลิปสติก น้ำหอม และน้ำมันใส่ผม (Springer and Gold, 1989) ซึ่งในการนำสควอลีนมาใช้ในเครื่องสำอางนั้นมุ่งเน้นเพื่อให้ความชุ่มชื้นแก่ผิวหนัง จากการศึกษาพบว่าสควอลีนจัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ที่มีประสิทธิภาพสูงในการช่วยปกป้องผิวจากการทำลายของรังสีอัลตราไวโอเลตจากแสงอาทิตย์ได้ นอกจากนั้นในทางการแพทย์และเภสัชกรรมได้นำสควอลีนมาใช้ในการช่วยลดระดับคอเลสเตรอลในเลือด ลดอัตราเสี่ยงในการเกิดมะเร็ง และรักษาโรคต่าง ๆ เช่น โรคหัวใจ โรคข้ออักเสบ และโรคเรื้อนกวาง (กำพล, 2542; Kelly, 1999; Smith, 2000) แต่สควอลีนเป็นสารที่มีราคาค่อนข้างสูง เนื่องจากแหล่งที่พบสควอลีนในปริมาณสูงและมีการนำมาใช้มากที่สุดคือ น้ำมันจากตับปลาฉลามทะเลน้ำลึก ซึ่งปัจจุบันมีจำนวนน้อยลง นอกจากนั้นเมื่อนำมาทำการสกัดสควอลีนก็มีความยุ่งยากและมีค่าใช้จ่ายสูง (He *et al*., 2002) ดังนั้นจึงมีความสนใจที่จะหาแหล่งผลิตสควอลีนแหล่งอื่นที่มีราคาถูกและสามารถผลิตได้ปริมาณมาก

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ยูคาริโอตชนิดหนึ่งที่พบว่ามีการสังเคราะห์สควอลีนขึ้นเป็นสารตัวกลางในวิถีของการสังเคราะห์เออร์กอสเตรอล โดยปริมาณสควอลีนที่ยีสต์สะสมนั้นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ ดังนั้นจึงสามารถคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่สะสมสควอลีนได้สูงมาใช้ในการผลิตสควอลีน โดยยีสต์สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่าย เจริญเร็ว ใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงน้อย และสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสควอลีนโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีองค์ประกอบที่เหมาะสมและใช้สภาวะที่เหมาะสม รวมทั้งการเติมสารเคมีบางชนิดลงในอาหาร และการปรับปรุงกระบวนการเพาะเลี้ยง นอกจากนั้นการแยกเซลล์ยีสต์ออกมาสกัดสควอลีนทำได้ค่อนข้างง่าย เนื่องจากมีเซลล์ขนาดค่อนข้างใหญ่และมีเทคโนโลยีที่เหมาะสมอยู่แล้ว ด้วยเหตุผลต่าง ๆ ข้างต้นยีสต์จึงเป็นแหล่งที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสควอลีน ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาการผลิตสควอลีนจากยีสต์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่สะสมสควอลีนได้ปริมาณสูงเพื่อใช้ในการผลิตสควอลีน

2. เพื่อศึกษาองค์ประกอบของอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสควอลีนในอาหารเหลวกากน้ำตาลของยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

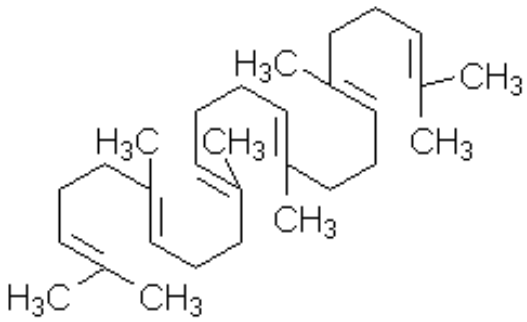
3. เพื่อศึกษาการผลิตสควอลีนในอาหารเหลวกากน้ำตาลของยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้โดยการเพาะเลี้ยงในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ

การตรวจเอกสาร

สควอลีน

สควอลีนพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1906 โดย Dr. Tsujimoto Mitsumaru นักเคมีชาวญี่ปุ่น ได้สกัดและแยกสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจากน้ำมันของตับปลาฉลามสีดำ ที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Gentroscyllium ritteri* สำเร็จเป็นครั้งแรก และได้ตั้งชื่อสารนี้ว่า “Squalene” โดยมีรากศัพท์มาจากภาษาละตินว่า “Squalus” ซึ่งแปลว่าปลาฉลาม (Budker, 1971; Anonymous, n.d.a.)

สควอลีนจัดเป็นลิพิดที่ไม่มีขั้วชนิดหนึ่ง และเป็นสารประเภทไทรเทอร์พีน (triterpenes) คือเป็นพอลิเมอร์ของไอโซพรีนจำนวน 6 โมเลกุลเรียงต่อกัน ซึ่งโครงสร้างทางเคมีจัดเป็นสารประกอบอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดไม่อิ่มตัว ชื่อทางเคมีคือ 2, 6, 10, 15, 19, 23-hexamethyl-2, 6, 10, 14, 18, 22-tetracosahexane และมีสูตรโมเลกุลคือ $C_{30}H_{50}$ โดยที่โครงสร้างทางเคมีนั้นประกอบไปด้วยพันธะคู่จำนวน 6 พันธะ ซึ่งแต่ละพันธะคู่มีหมู่เมทิลเกาะอยู่ ดังแสดงในภาพที่ 1 สควอลีนมีน้ำหนักโมเลกุล 410.72 กรัมต่อโมล และมีค่าความถ่วงจำเพาะ (specific gravity) 0.86 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส สควอลีนสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น คลอโรฟอร์ม แอลกอฮอล์ และแอซีโตน นอกจากนี้สควอลีนยังเป็นสารเฉื่อย ไม่มีพิษ ไม่มีสี และไม่ทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนัง (พิมพร, 2543; อุษณีย์, 2547; นิธิยา, 2548; Anonymous, 2003)



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของสควอลีน
ที่มา: Claff (2001)

การนำสควอลีนมาใช้ประโยชน์

1. บทบาทของสควอลีนในเครื่องสำอาง

ในวงการเครื่องสำอางได้มีการนำสควอลีนมาใช้เป็นเวลานานกว่า 25 ปี โดยการนำสควอลีนมาใช้เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอางนั้นมุ่งเน้นเพื่อให้ความชุ่มชื้นแก่ผิวหนัง ส่วนใหญ่สควอลีนที่นำมาใช้ในเครื่องสำอางจะอยู่ในรูปของสควอแลน (squalane) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสควอลีน มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{30}H_{62}$ โดยพบว่าสควอแลนนั้นจะมีความคงตัวมากกว่าสควอลีน (กำพล, 2542; พิมพร, 2543; Anonymous, n.d.b.) ทั้งนี้ได้มีการนำสควอแลนมาใช้เป็นส่วนประกอบของเครื่องสำอางต่าง ๆ หลายชนิด เช่น โลชั่น ครีมบำรุงผิว น้ำมันใส่ผม น้ำหอม และลิปสติก โดยพบว่าสควอแลนจะช่วยตรึงความหอมให้กับน้ำหอม และช่วยกระจายสี (dry-dispersion) ในลิปสติก (Springer and Gold, 1989; Anonymous, n.d.b.)

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบที่ใช้ในครีมให้ความชุ่มชื้น

ส่วนประกอบที่ใช้ในครีม	หน้าที่	เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก
beewax (ไขแข็ง)	เพิ่มความคงตัวของครีม	5.0
acetyl alcohol	เพิ่มความคงตัวของครีม	4.0
squalane	สารให้ความชุ่มชื้น	35.0
glyceryl monostearate	สารเพิ่มความหนืดและทำให้เกิดครีม	2.0
polyoxyethylene sorbitan monolaurate	สารลดแรงตึงผิว	2.0
methyl paraben	สารกันบูด	0.1
ethyl paraben	สารกันบูด	0.1
ethyl estradiol	ฮอร์โมน	0.005
soybean lecithin (ฟอสโฟลิพิด)	เพิ่มความคงตัวของครีม	0.5
propylene glycol	หล่อลื่นผิวและตัวทำละลาย	5.0
glycerine	สารให้ความชุ่มชื้น	8.0
น้ำหอม	ให้กลิ่นหอม	0.1
น้ำกลั่น	ตัวทำละลาย	100.0

ที่มา: ดัดแปลงจาก อรัญญาและจีระเดช (2545)

2. <u>บทบาทของสควอลีนต่อผิวหนัง</u>

จากการศึกษาพบว่าสควอลีนเป็นสารต้านอนุมูลอิสระหรือสารต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่มีคุณภาพสูง โดยจะช่วยปกป้องผิวหนังจากการทำลายของรังสีอัลตราไวโอเลตจากแสงอาทิตย์ เนื่องจากรังสีอัลตราไวโอเลตจะไปทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับลิพิดที่อยู่ในชั้นผิวหนัง ดังนั้นสควอลีนจึงมีบทบาทที่สำคัญอย่างยิ่งในการช่วยขจัดอนุมูลอิสระซึ่งเป็นอันตรายต่อผิวหนัง

นอกจากนี้สควอลีนยังมีคุณสมบัติในการฟื้นฟูสภาพผิวหนัง โดยจากการศึกษาพบว่าสควอลีนสามารถซึมผ่านผิวหนังได้ง่ายจึงช่วยให้ผิวหนังคงความชุ่มชื้นและมีความอ่อนนุ่มขึ้น และได้มีรายงานเกี่ยวกับการนำสควอลีนมาใช้ในการรักษาอาการผดผื่นคันตามผิวหนังที่เกิดจากการเป็นโรคเรื้อนกวาง ซึ่งภายหลังจากที่ได้ใช้สควอลีนทาที่ผิวหนังเป็นเวลา 2 - 3 เดือนพบว่าผิวหนังมีสภาพที่ดีขึ้น (กำพล, 2542)

3. <u>บทบาทของสควอลีนต่อการเมแทบอลิซึมของคอเลสเตรอล</u>

จากรายงานการศึกษาของ Standberg *et al.* (1990) พบว่า คนที่รับประทานสควอลีนเป็นอาหารเสริมประมาณ 900 มิลลิกรัมต่อวัน เป็นเวลา 7 - 30 วัน มีระดับของสควอลีนในซีรัมเพิ่มสูงขึ้นถึง 17 เท่า ซึ่งไม่มีนัยสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไทรกลีเซอรอลและคอเลสเตรอลในซีรัม นอกจากนี้ยังพบว่าสควอลีนที่ได้รับเข้านั้นมีผลทำให้มีการขับออกของคอเลสเตรอลในอุจจาระเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และจากการทดลองในหนูทดลองโดยการให้สควอลีนพบว่าช่วยลดระดับของคอเลสเตรอลและไทรเอซิลกลีเซอรอลได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (Kelly, 1999)

4. <u>บทบาทของสควอลีนในการกำจัดสารพิษ</u>

สควอลีนจัดเป็นลิพิดที่ไม่มีขั้วชนิดหนึ่ง ดังนั้นสควอลีนจึงมีความสามารถในการจับกับสารพิษพวกที่ไม่มีขั้วได้สูงและสามารถถูกกำจัดออกจากร่างกายได้ โดยจากการศึกษาของ Richer *et al*. (1982) ถึงการใช้สควอลีนร่วมกับพาราฟินในการกำจัดสารพิษ hexachlorobenzene (HCB) โดยมีการให้สควอลีนร่วมกับพาราฟินในหนูทดลอง พบว่าการขับออก HCB ในอุจจาระมีปริมาณสูงถึง 3 เท่า ซึ่งค่าที่ได้นั้นสูงกว่าค่าครึ่งชีวิตของ HCB ที่ถูกขับออกมาจากร่างกายของสัตว์ทดลอง คือ เมื่อให้สควอลีนร่วมกับพาราฟินนั้นใช้เวลาเพียง 34 - 38 วัน ในขณะที่เมื่อไม่ให้สควอลีนร่วม

กับพาราฟินใช้เวลาถึง 110 วันในการขับสารพิษออก

5. <u>บทบาทของสควอลีนในการรักษามะเร็ง</u>

จากการทดลองใช้สควอลีนไปกดการแสดงออกของเซลล์เนื้องอก พบว่าสควอลีนสามารถยับยั้งสารที่ส่งเสริมการเกิดเนื้องอก คือ 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate ซึ่งสารนี้เป็นสาเหตุให้เกิดมะเร็งผิวหนังในสัตว์ทดลอง (Murakoshi *et al*., 1992) นอกจากนี้พบว่าการรับประทานน้ำมันมะกอกซึ่งมีสควอลีนอยู่มีส่วนช่วยลดอัตราเสี่ยงในการเกิดมะเร็งหลายชนิด โดยจากการศึกษาในหนูทดลองที่ได้รับสควอลีน พบว่าสควอลีนสามารถช่วยยับยั้งสารเคมีที่ส่งเสริมการเกิดเนื้องอกในลำไส้ใหญ่ ปอด และผิวหนังได้ (Newmark, 1997; Smith, 2000)

<u>แหล่งที่พบสควอลีน</u>

1. <u>มนุษย์</u>

ในร่างกายของมนุษย์มีต่อมไขมัน (sebaceous glands) ที่พบอยู่ทั่วไปใต้ผิวหนังในชั้นหนังแท้ซึ่งมักอยู่ติดกับรากผมและรากขน โดยทุก ๆ ต่อมรากผมและรากขนจะมีต่อมไขมันมาเชื่อมต่อและห่อหุ้มไปจนสุดที่ปากรูขุมขน ซึ่งต่อมไขมันจะทำหน้าที่ในการขับน้ำมันหรือไขผิวหนัง (sebum) ออกมาหล่อลื่น เพื่อปกคลุมผิวหนัง ทำให้ผิวหนังมีความชุ่มชื้น ไม่แห้งหรือหยาบกร้าน และเส้นผมอ่อนนุ่ม แวววาว และมีสปริง (พิมพร, 2532) ซึ่งจากการศึกษาองค์ประกอบของลิพิดที่พบในไขผิวหนังนั้นประกอบไปด้วย ไทรเอซิลกลีเซอรอล แวกซ์เอสเทอร์ กรดไขมันอิสระ คอเลสเตรอล และสควอลีน (Gurr *et al*., 2002) สำหรับสควอลีนพบอยู่ประมาณ 12 เปอร์เซ็นต์ของไขผิวหนัง ทำหน้าที่ปกคลุมผิวหนัง และช่วยป้องกันการสูญเสียน้ำจากผิวหนัง จากการศึกษาพบว่าบริเวณผิวหนังนั้นเป็นแหล่งที่มีสควอลีนอยู่มากที่สุด (Kelly, 1999)

สควอลีนที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและมนุษย์นั้น พบว่าถูกสังเคราะห์ขึ้นเป็นสารตัวกลางในวิถีของการสังเคราะห์คอเลสเตรอล โดยหลังจากที่สังเคราะห์ได้สควอลีนแล้ว พบว่าสควอลีนจะถูกขนส่งไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกายเพื่อเก็บไว้ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ หรือนำไปใช้ในการสังเคราะห์สารเมแทบอไลต์อื่น ๆ เช่น คอเลสเตรอลและสเตียรอยด์ โดยพบว่าประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของสควอลีนที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นใหม่นั้นจะถูกเก็บสะสมอยู่ในอนุภาคลิพิด (lipid

particle) และมีเพียง 10 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่ถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์คอเลสเตรอล (Kelly, 1999)

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของลิพิดที่พบในต่อมไขมันและไขผิวหนังของมนุษย์

องค์ประกอบของลิพิด	ตำแหน่งและปริมาณ (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)	
	ต่อมไขมัน	ไขผิวหนัง
ไทรเอซิลกลีเซอรอล	63.6	57.5
แวกซ์เอสเทอร์	19.0	26.0
สควอลีน	13.6	12.0
กรดไขมันอิสระ	1.2	-
คอเลสเตรอลเอสเทอร์	2.0	3.0
คอเลสเตรอล	0.6	1.5

ที่มา: ดัดแปลงจาก พิมพร (2532); Möller (2002)

จากการศึกษาปริมาณของสควอลีนที่พบในเนื่อเยื่อไขมัน (adipose tissue) พบว่าเนื้อเยื่อไขมันเป็นแหล่งที่มีปริมาณสควอลีนสูงมาก โดยสควอลีนประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์พบที่ตรงกลางของอนุภาคลิพิด ขณะที่อีก 20 เปอร์เซ็นต์พบที่เยื่อหุ้มไมโครโซม (microsomal membrane-bound) ซึ่งจากการทดลองชี้ให้เห็นว่า สควอลีนที่พบตรงเยื่อหุ้มไมโครโซมเท่านั้นที่เกิดกิจกรรมเมแทบอลิซึมได้ (Kelly, 1999)

ส่วนการรับประทานอาหารที่มีสควอลีนในปริมาณสูง เช่น น้ำมันตับปลาฉลามและน้ำมันมะกอก พบว่าสควอลีนประมาณ 60 - 85 เปอร์เซ็นต์ได้ถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย และมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ของสควอลีนที่ได้รับนั้นถูกส่งผ่านซีรัมไปยังเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของร่างกายต่อไป (Kelly, 1999)

2. น้ำมันตับปลาฉลามทะเลน้ำลึก (Deep-sea shark liver oil)

จากการศึกษาและรายงานพบว่า น้ำมันที่สกัดได้จากตับของปลาฉลามทะเลน้ำลึกนั้นเป็นแหล่งที่มีสควอลีนอยู่มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสควอลีนที่พบจากแหล่งธรรมชาติโดยทั่ว ๆ ไป โดยสควอลีนมีปริมาณมากถึง 5 - 15 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว ซึ่งลิพิดที่พบเป็นองค์ประกอบในน้ำมันตับปลาฉลามได้แก่ อัลคิลกลีเซอรอล (alkylglycerol) สควอลีน สควอลามีน (squalamine) ไทรเอซิลกลีเซอรอล กรดไขมันชนิดโอไมก้า 3 (omaga 3 fatty acid) กรดไขมันอิสระ และวิตามินต่าง ๆ (Anonymous, n.a.c.) และพบว่ามีการนำสควอลีนที่ได้จากน้ำมันตับปลาฉลามมาใช้เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอางสำหรับการดูแลผิวพรรณ โดยเฉพาะในประเทศญี่ปุ่นและนอร์เวย์ที่นำสควอลีนที่สกัดได้จากตับปลาฉลามมาใช้อย่างแพร่หลายในเครื่องสำอางและทางเภสัชกรรม (Kreuzer and Ahmed, 1978)

สควอลีนและลิพิดที่พบในปลาฉลามนั้นจะถูกเก็บสะสมไว้ในแวคิวโอลขนาดใหญ่ของเซลล์ตับ ซึ่งมีปริมาณมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรตับ โดยลิพิดที่พบเหล่านี้จะใช้เป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญสำหรับกิจกรรมการทำงานของกล้ามเนื้อและการลอยตัวของปลาฉลาม (Tota, 1999)

จากรายงานการศึกษาพบว่าน้ำมันจากตับปลาฉลามใน Family Squalidae จำนวน10 สปีชีส์ มีปริมาณของลิพิดพวกอันสะพอนิไฟด์ (unsaponified lipid) อยู่มากถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใหญ่อยู่ในรูปของสควอลีน ซึ่งปริมาณสควอลีนที่ได้จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของปลาฉลาม โดยสปีชีส์ของปลาฉลามที่พบการสะสมสควอลีน ได้แก่ *Centropholus lusitanicus*, *C. niaukango, C. artomarginatus* และ *C. squamatus* (Budker, 1971; Kreuzer and Ahmed, 1978) ส่วนใหญ่ปลาฉลามที่พบสควอลีนจะอาศัยในทะเลที่มีความลึกมากกว่า 1,500 เมตรแถบฝั่งตะวันตกของมหาสมุทรแปซิฟิก หรือพบที่ระดับความลึกประมาณ 1,800 - 6,000 ฟุต หรือห่างจากชายฝั่งประเทศนิวซีแลนด์ และขอบเขตทะเลลงไปทางทิศใต้ซึ่งเป็นส่วนของมหาสมุทรที่ลึกที่สุดในโลกโดยมีความลึกถึง 28,000 ฟุต แต่ไม่พบสควอลีนในตับปลาฉลามที่อาศัยอยู่ในทะเลน้ำตื้น (นิรนาม, 2543) และในระยะ 10 ปีที่ผ่านมาพบว่าในตับของปลาฉลามสายพันธุ์เอ็ทมอพเทอรัส (Etmopterus) มีปริมาณสควอลีนสูงที่สุดเท่าที่มีการค้นพบมา (กำพล, 2542) ในขณะที่ *Squalus acanthias* เป็นสายพันธุ์ที่มีปริมาณสควอลีนที่ค่อนข้างต่ำ (Kreuzer and Ahmed, 1978)

ส่วนปัญหาที่พบจากการสกัดน้ำมันจากตับปลาฉลามและการเก็บรักษา คือ การสกัดจะต้องทำในเวลาอันรวดเร็วเพื่อหลีกเลี่ยงการสูญเสียสควอลีน โดยต้องทำการสกัดภายในเวลา 15 นาที หลังจากที่ปลาฉลามตาย (Kreuzer and Ahmed, 1978) และนอกจากนี้ขั้นตอนของการสกัดก็ค่อนข้างยุ่งยากและมีค่าใช้จ่ายสูง (He *et al*., 2002)

3. <u>น้ำมันมะกอก (Olive oil)</u>

มนุษย์รู้จักการใช้ประโยชน์จากต้นมะกอกและผลมะกอกมาเป็นเวลาช้านาน โดยที่ต้นมะกอกปลูกกันมากในประเทศแถบเมดิเตอร์เรเนียน เช่น สเปน อิตาลี กรีซ โปรตุเกส และตูนีเซีย ซึ่งมักนำผลมะกอกที่สุกมาบีบเพื่อเอาน้ำมันออกมา โดยที่มะกอกทั้งผลให้ปริมาณของน้ำมันประมาณ 35 - 70 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้ง (นิธิยา, 2548) ซึ่งจากการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันมะกอกพบว่ามีสควอลีนอยู่ถึง 0.1 - 0.7 เปอร์เซ็นต์ของน้ำมันทั้งหมด และจากผลการศึกษาคนในประเทศแถบเมดิเตอร์เรเนียนที่รับประทานน้ำมันมะกอกในปริมาณสูงจะได้รับสควอลีนสูงถึง 200 - 400 มิลลิกรัมต่อวัน ส่วนคนในสหรัฐอเมริกาพบว่าได้รับสควอลีนเฉลี่ย 30 มิลลิกรัมต่อวัน (Smith, 2000) สควอลีนจัดเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนหลักที่พบมากถึง 90 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณสารประกอบไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดที่แยกได้จากน้ำมันมะกอก โดยปริมาณสควอลีนที่พบอยู่ในช่วง 200 - 750 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำมัน หรืออาจมีค่าสูงถึง 800 - 12,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำมัน (Psumidou and Tsimidou, 1999) นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณของสควอลีนเพิ่มขึ้น 10 - 30 เปอร์เซ็นต์เมื่อผ่านกระบวนการกำจัดสารที่ให้กลิ่นและรสชาติออก (deodorization) ในขั้นตอนสุดท้ายของการสกัด (Hamm and Hamilton, 2000)

Psumidou and Tsimidou (1999) ศึกษาและพบว่าสควอลีนที่มีอยู่ในน้ำมันมะกอกนั้นมีประโยชน์ในการทำหน้าที่เป็นสารต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในระหว่างกระบวนการเกิดออโตออกซิเดชัน (autooxidation) ในน้ำมันมะกอก ซึ่งเป็นผลทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันลดลง ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าสควอลีนมีบทบาทที่สำคัญอย่างยิ่งในการช่วยรักษาความคงตัวของน้ำมันมะกอกไว้ได้

นอกจากนี้ยังพบสควอลีนจากน้ำมันที่ได้จากพืชชนิดอื่น ๆ เช่น น้ำมันจมูกข้าวสาลี (wheat germ oil) น้ำมันรำข้าว (rice bran oil) น้ำมันถั่วลิสง น้ำมันถั่วเหลือง (นิธิยา, 2548; He *et al*., 2002)

ตารางที่ 3 ปริมาณสควอลีนในไขมันและน้ำมันบางชนิด

ชนิดของไขมันและน้ำมัน	ปริมาณสควอลีน (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของน้ำมัน)	
	ค่าเฉลี่ย	ช่วงปริมาณ
น้ำมันมะกอก	383	136 - 708
น้ำมันข้าวโพด	28	16 - 42
น้ำมันถั่วลิสง	27	8 - 49
น้ำมันเรพสีด	26	24 - 28
น้ำมันเมล็ดทานตะวัน	12	8 - 19
น้ำมันถั่วเหลือง	12	5 - 22
น้ำมันเมล็ดฝ้าย	8	3 - 15
น้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด	7	7
น้ำมันงา	5	3 - 9
น้ำมันลินสีด	4	4
น้ำมันมะพร้าว	2	2
โคคาบัตเตอร์	0	0

ที่มา: นิธิยา (2548)

4. น้ำมันอะมาแร็นท์ (Amaranth oil)

อะมาแร็นท์เป็นพืชน้ำมันชนิดหนึ่งที่ปลูกมากที่สุดในสหรัฐอเมริกาโดยเฉพาะทางตอนใต้ของประเทศ ซึ่งปัจจุบันมีการปลูกในหลายพื้นที่ทั่วโลก เช่น แอฟริกา อินเดีย และจีน จากการนำเอาเมล็ดของอะมาแร็นท์มาสกัดเอาน้ำมันพบว่ามีสควอลีนและกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวในปริมาณที่สูง น้ำมันอะมาแร็นท์ให้สควอลีนมากถึง 2.4 - 8.0 เปอร์เซ็นต์ของน้ำมัน ซึ่งมากกว่าน้ำมันจากพืชทั่ว ๆ ไป เช่น *Amanthus crenthus* มีสควอลีนอยู่ประมาณ 0.43 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเมล็ดทั้งหมด *A. hupochondriacus* มีสควอลีนประมาณ 0.73 เปอร์เซ็นต์ของเมล็ด และ *A. pumilus* มีสควอลีนอยู่ประมาณ 1.32 เปอร์เซ็นต์ของเมล็ด (He *et al*., 2002)

โดยส่วนใหญ่สควอลีนที่ได้จากเมล็ดอะมาแร็นท์นั้นมักถูกนำมาใช้เป็นส่วนประกอบในการผลิตเครื่องสำอาง น้ำมันหล่อลื่น และในทางเภสัชกรรม แต่ปัญหาที่พบคือ เมล็ดของอะมาแร็นท์นั้นมีราคาค่อนข้างสูงหากจะนำมาใช้เป็นแหล่งของสควอลีน (Becker, 1994)

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของกรดไขมันหลักและสควอลีนที่พบในน้ำมันอะมาแร็นท์

องค์ประกอบ	ปริมาณ (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของน้ำมัน)
กรดปาล์มมิติก (C16:1)	20
กรดสเตียริก (C18:0)	3
กรดโอเลอิก (C18:1)	22 - 26
กรดลิโนเลอิก (C18:2)	46 - 50
สควอลีน	5 - 6

ที่มา: Anonymous (n.d.d.)

5. ยีสต์

สำหรับยีสต์นั้นมีสควอลีนเป็นองค์ประกอบในอนุภาคลิพิด (lipid particle) โดยจากการศึกษาองค์ประกอบในอนุภาคลิพิดของ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่าประกอบด้วยไทรเอซิลกลีเซอรอลและสเตรอลเอสเทอร์ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และมีสควอลีนอยู่ 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (Zweytick *et al*., 2000) ซึ่งใน *S. cerevisiae* นั้นมีกระบวนการสังเคราะห์เออร์กอสเตรอล (ergosterol) โดยผ่านสารตัวกลาง คือ สควอลีน แต่ปริมาณสควอลีนที่ตรวจวิเคราะห์ได้นั้นมีน้อยในเซลล์ที่เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน ดังนั้น Kamimura *et al*. (1994) จึงพยายามสร้างให้ *S. cerevisiae* สามารถสะสมสควอลีนได้สูงขึ้น โดยการทำให้ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนสควอลีนไปเป็นเออร์กอสเตรอลสูญเสียการทำงาน จากนั้นนำชิ้นส่วนยีนนั้นมาทำการเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ที่มียีน *LEU2* อยู่ แล้วทำการทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์โดยวิธีโฮโมโลกัสรีคอมบิเนชัน (homologous recombination) ซึ่งผลปรากฏว่าสามารถสร้างยีสต์สายพันธุ์ที่ได้รับชิ้นส่วนของยีนที่ต้องการจำนวนสองสายพันธุ์ โดยที่ยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์นั้นสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วแม้ว่ามีปริมาณของเออร์กอสเตรอลภายในเซลล์ต่ำลง และเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีออกซิเจนและมีการ

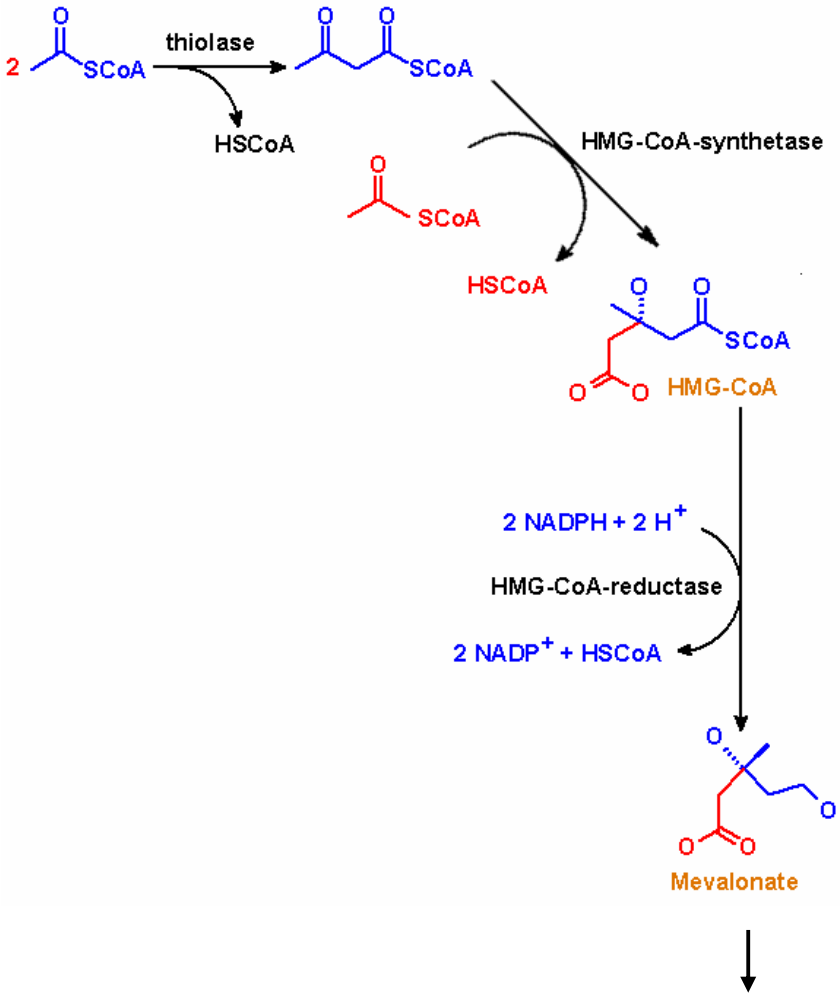
เติมเออร์กอสเตรอลลงไปในอาหาร พบว่ามีการสะสมสควอลีนเพิ่มขึ้นถึง 5 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง นอกจากนั้น Polakowski *et al*. (1998) รายงานว่า เมื่อนำยีน *HMG 1* ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase ของ *S. cerevisiae* มาทำการตัดลำดับเบสของกรดอะมิโนออกบางส่วน (*tHMG*) คือ กรดอะมิโนลำดับที่ 1 - 552 เป็นผลให้ยีนนี้มีการแสดงออกที่มากเกิน (overexpression) และมีการควบคุมที่ลดลง ส่งผลให้เซลล์มีการสะสมสควอลีนได้สูงถึง 5.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจากการที่เอนไซม์นี้เป็น rate-limiting enzyme ในขั้นตอนแรกของการสังเคราะห์เมวาโลเนต (mevalonate) ซึ่งเมวาโลเนตนี้เป็นสารตัวกลางที่นำไปสู่การสังเคราะห์สควอลีนและเออร์กอสเตรอลต่อไป

จากการวิเคราะห์ลิพิดของยีสต์ขนมปัง คือ *S. cerevisiae* ที่ใช้ในอุตสาหกรรมโดยใช้แก๊สโครมาโตกราฟี พบว่า มีสควอลีน ไซโมสเตรอล เออร์กอสเตรอล และลาโนสเตรอล ซึ่งปริมาณของสควอลีนที่พบนั้นเท่ากับ 15.1 เปอร์เซ็นต์ของลิพิดพวกอันสะพอนิฟิเคชัน (Šajbidor *et al*., 1994)

นอกจากนี้ได้มีการศึกษาองค์ประกอบของลิพิดในยีสต์ที่ใช้สำหรับการผลิตเบียร์ โดยเมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของลิพิดภายในเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของ *Saccharomyces carsbergensis* ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีออกซิเจน พบว่า มีกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวปริมาณสูง และมีเออร์กอสเตรอลมากถึง 10 เท่าของสเตรอลทั้งหมด แต่กลับพบว่ามีสควอลีนปริมาณต่ำ นอกจากนี้ยังพบว่า *S. carsbergensis* 4228 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่ไม่เติมวิตามินบี 6 แต่มีการเติมไทอามีนในสภาวะที่มีออกซิเจนนั้น มีการสะสมของสควอลีน ลาโนสเตรอล และสเตรอลที่ยังจัดจำแนกไม่ได้ แต่ไม่พบเออร์กอสเตรอลและไซโมสเตรอล ส่วนในอาหารที่ไม่เติมไทอามีนพบการสะสมของเออร์กอสเตรอลและไซโมสเตรอล ซึ่งจากผลการทดลองนี้ทำให้เห็นได้ว่าไทอามีนมีผลต่อการยับยั้งการสังเคราะห์เออร์กอสเตรอล แต่ทำให้มีการสะสมสควอลีนและลาโนสเตรอลเกิดขึ้น (Nurminen *et al*., 1974; Nishikawa *et al*., 1978)

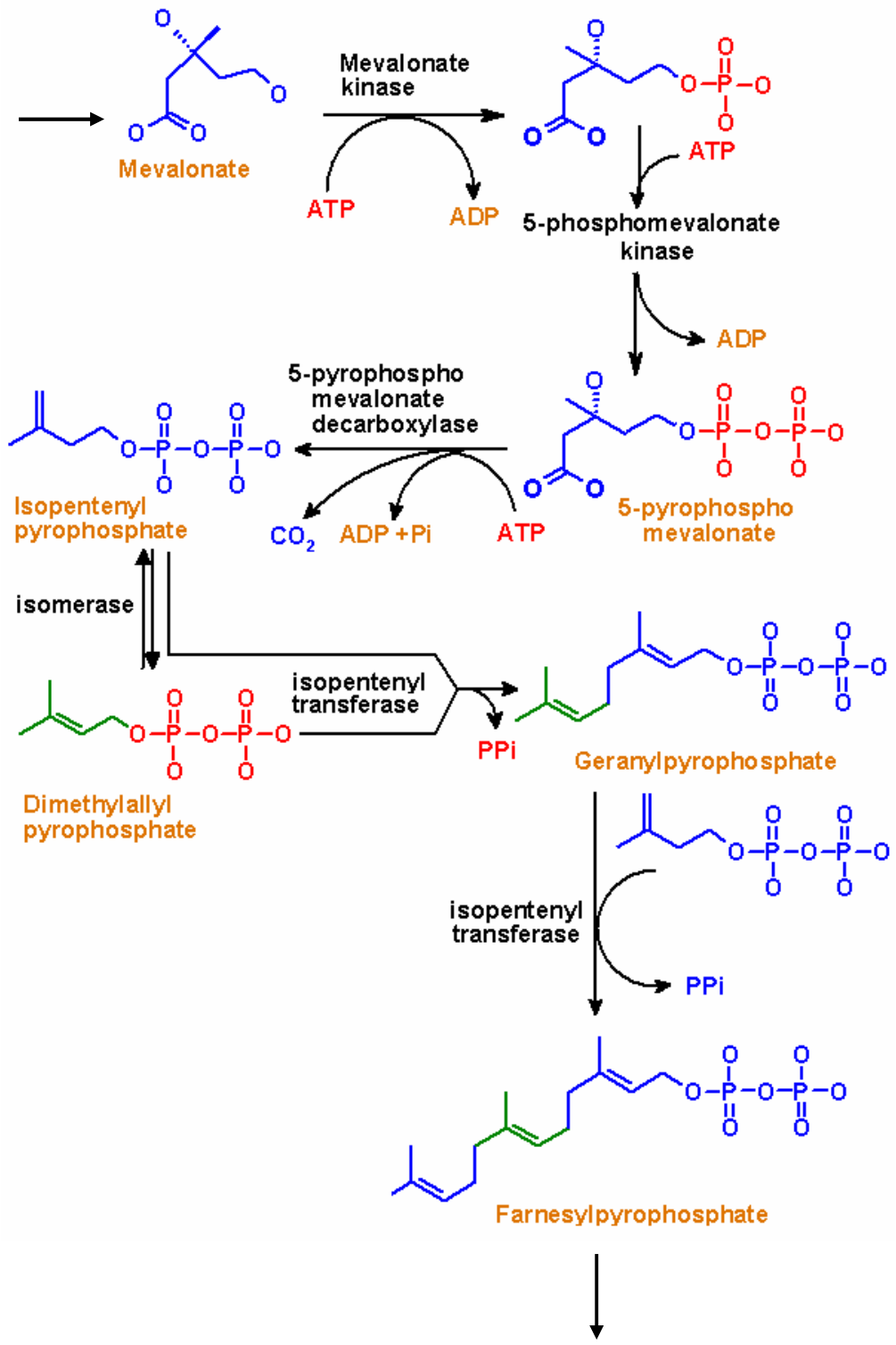
กระบวนการสังเคราะห์สควอลีนในยีสต์

สควอลีนเป็นสารตัวกลางของวิถีการสังเคราะห์เออร์กอสเตรอลในยีสต์ ซึ่งพบว่ากระบวนการสังเคราะห์สควอลีนและเออร์กอสเตรอลของยีสต์เกิดที่ไมโครโซม โดยสควอลีนที่สังเคราะห์ได้นั้นถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์เออร์กอสเตรอลต่อไป ในขณะที่บางส่วนถูกขนส่งไปเก็บไว้ในอนุภาคลิพิด (Leber *et al*., 1995) ขณะเดียวกันเออร์กอสเตรอลที่สังเคราะห์ได้ก็ถูกขนส่งเพื่อนำไปเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ต่อไป โดยวิถีกระบวนการสังเคราะห์เออร์กอสเตรอลในยีสต์ แสดงในภาพที่ 2

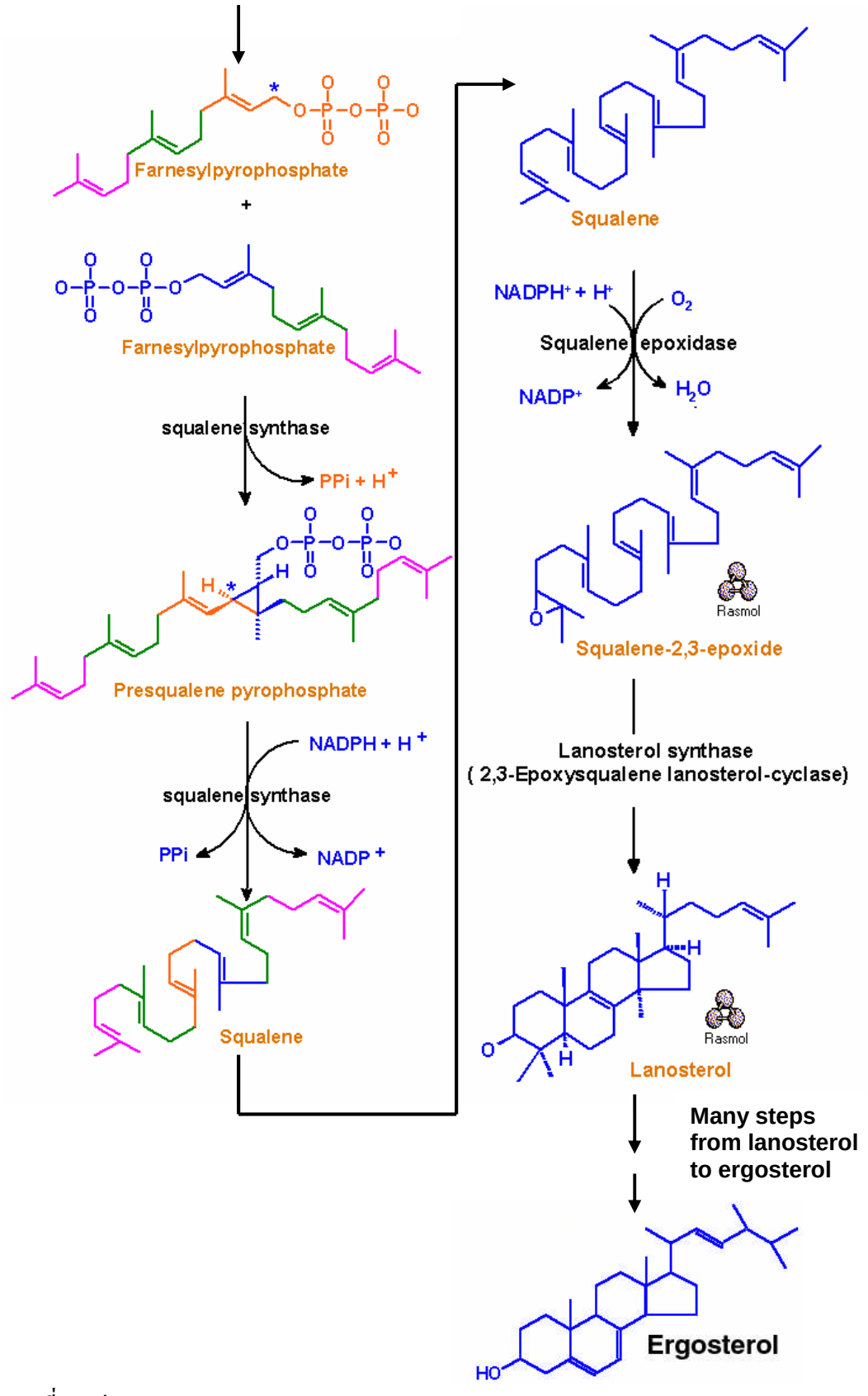


ภาพที่ 2 วิถีของการสังเคราะห์เออร์กอสเตรอลในยีสต์

ที่มา: ดัดแปลงจาก Anonymous (n.a.e.)


Mevalonate
Mevalonate kinase
ATP
ADP
5-phosphomevalonate
ATP
5-phosphomevalonate kinase
ADP
5-pyrophospho mevalonate decarboxylase
Isopentenyl pyrophosphate
CO2
ADP +Pi
ATP
5-pyrophospho mevalonate
isomerase
isopentenyl transferase
PPi
Geranylpyrophosphate
Dimethylallyl pyrophosphate
isopentenyl transferase
PPi
Farnesylpyrophosphate

ภาพที่ 2 (ต่อ)


Farnesylpyrophosphate
+
Farnesylpyrophosphate
squalene synthase
PPi + H+
Presqualene pyrophosphate
NADPH + H +
squalene synthase
PPi
NADP +
Squalene
Squalene
NADPH+ + H+
O2
Squalene epoxidase
NADP+
H2O
Rasmol
Squalene-2,3-epoxide
Lanosterol synthase
(2,3-Epoxysqualene lanosterol-cyclase)
Rasmol
Lanosterol
Many steps
from lanosterol
to ergosterol
Ergosterol
HO

ภาพที่ 2 (ต่อ)

จากภาพที่ 2 วิถีการสังเคราะห์เออร์กอสเตรอลในยีสต์นั้น เริ่มต้นจากปฏิกิริยาแรกโดยเป็นการรวมกันของแอซีติลโคเอ (acetyl CoA) จำนวน 2 โมเลกุลได้เป็นแอซีโตแอซีติลโคเอ (acetoacetyl CoA) ต่อมาแอซีติลโคเอโมเลกุลที่ 3 จะเข้ามารวมกันกับแอซีโตแอซีติลโคเอ ได้เป็น β-hydroxy-β-methylglutaryl CoA (HMG-CoA) ซึ่งปฏิกิริยานี้เร่งด้วยเอนไซม์ hydroxymethylglutaryl CoA synthase และมีการปล่อย CoASH ออกมา 1 โมเลกุล ในปฏิกิริยาต่อไปของการสังเคราะห์เมวาโลเนตจะมีเอนไซม์ hydroxymethylglutaryl CoA reductase รีดิวซ์ตรงคาร์บอนที่มีหมู่ของ CoASH เกาะอยู่ใน hydroxymethylglutaryl CoA และมีการปล่อย CoASH ออกมา 1 โมเลกุล

การสังเคราะห์ไอโซพรีนอยด์ (isoprenoid) จากเมวาโลเนต โดยปฏิกิริยาฟอสโฟริเลชัน (phosphorylation) ดีคาร์บอกซิเลชัน (decarboxylation) และดีฟอสโฟริเลชัน (dephosphorylation) ซึ่งปฏิกิริยาฟอสโฟริเลชันทั้งสามต้องใช้พลังงาน ATP เข้ามาเกี่ยวข้อง ได้เป็น 3-phospho-5-pyrophosphomevalonate ที่ไม่เสถียรจึงเกิดปฏิกิริยาดีฟอสโฟริเลชันและดีคาร์บอกซิเลชันได้เป็นสาร isopentenyl pyrophosphate (คาร์บอน 5 อะตอม) ซึ่งสามารถที่จะจัดรูปใหม่เป็น dimethylallyl pyrophosphate ที่เร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ isopentenyl pyrophosphate isomerase

การรวมกันของหน่วยไอโซพรีน (isoprene) ทำให้มีการสังเคราะห์สควอลีน (คาร์บอน 30 อะตอม) เกิดขึ้น โดยเมื่อเอนไซม์ dimethylallyl transferase เร่งปฏิกิริยาการรวมกันของ isopentenyl pyrophosphate กับ dimethylallyl pyrophosphate ได้เป็น geranyl pyrophosphate (คาร์บอน 10 อะตอม) จากนั้น geranyl pyrophosphate รวมกับหน่วยไอโซพรีนที่มีคาร์บอน 5 อะตอมอีกจะได้ farnesyl pyrophosphate (คาร์บอน 15 อะตอม) จากนั้นเอนไซม์ squalene synthase จะเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์สควอลีนจาก farnesyl pyrophosphate จำนวน 2 โมเลกุล

การเปลี่ยนจากสควอลีนไปเป็นเออร์กอสเตรอลนั้นเกิดขึ้นโดยปฏิกิริยาขั้นแรกเป็นการเปลี่ยนสควอลีนไปเป็นสควอลีน-2,3-อีพอกไซด์ (squalene-2,3-epoxide) ซึ่งเร่งด้วยเอนไซม์ squalene epoxidase โดยใช้ออกซิเจนและ NADPH เป็นโคเอนไซม์ จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาไซคลิกเซชัน (cycliczation) ของสควอลีน-2,3-อีพอกไซด์ ที่เร่งด้วยเอนไซม์ squalene epoxide cyclase ได้เป็นลาโนสเตรอล (lanosterol) (วิไล, 2542) หลังจากนั้นลาโนสเตรอลจะผ่านปฏิกิริยาต่าง ๆ อีกหลายขั้นตอนจนกระทั่งเปลี่ยนเป็นเออร์กอสเตรอลในที่สุด

ปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์ลิพิดและสควอลีน

1. องค์ประกอบของอาหาร

1.1 แหล่งคาร์บอน

องค์ประกอบของอาหารที่สำคัญในการเจริญของยีสต์ คือ แหล่งของคาร์บอน โดยกลูโคสเป็นน้ำตาลที่ยีสต์ทุกชนิดสามารถเมแทบอลิซึมได้ แต่กลูโคสอาจไม่ได้เป็นน้ำตาลที่เกิดเมแทบอลิซึมได้อย่างมีประสิทธิภาพที่สุดในยีสต์ทุกชนิด อีกทั้งปกติกลูโคสไม่ได้ใช้เป็นซับสเตรตสำหรับการหมักในอุตสาหกรรม ซึ่งซับสเตรตสำหรับการหมักในอุตสาหกรรมชนิดที่เป็นน้ำตาลมักเป็นมอลโตส ซูโครส ฟรุกโตส ไซโลส และกาแลกโตส (สาวิตรี, 2549) นอกจากนี้ยังมีการนำผลผลิตพลอยได้จากทางอุตสาหกรรมที่มีแหล่งของคาร์โบไฮเดรต เช่น กากน้ำตาล มาใช้เป็นแหล่งซับสเตรตสำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์ ซึ่งกากน้ำตาลมีองค์ประกอบของอาหารที่ซับซ้อน ประกอบไปด้วย ซูโครส กลูโคส ฟรุกโตส วิตามิน และเกลือแร่หลายชนิด เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม โพแทสเซียม และเหล็ก นอกจากนี้ยังมีสารอื่นที่ไม่ใช่น้ำตาลที่ละลายในด่างได้ (ปนิดา, 2546) และจากการศึกษาพบว่ามีการใช้ซับสเตรตหลายชนิดเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตลิพิดของยีสต์ โดยมีรายงานของ Dulaney *et al.* (1954) ถึงการศึกษาการเจริญและการสร้างเออร์กอสเตรอลของ *S. cerevisiae* MY14 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 10 เปอร์เซ็นต์และเติมมอลโตสลงไปเปรียบเทียบกับเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลไม่เติมมอลโตส เป็นเวลา 7 วัน พบว่า *S. cerevisiae* MY14 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมมอลโตส เชื้อมีการเจริญสูงขึ้น แต่กลับมีระดับของเออร์กอสเตรอลภายในเซลล์ต่ำ โดยให้เซลล์ถึง 15.16 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร แต่มีเออร์กอสเตรอลเพียง 0.79 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ไม่เติมมอลโตสกลับพบว่า เชื้อมีการเจริญค่อนข้างต่ำ แต่มีระดับของเออร์กอสเตรอลภายในเซลล์สูงกว่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีมอลโตสอยู่ โดยให้เซลล์เพียง 2.93 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร แต่มีเออร์กอสเตรอลถึง 14.2 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งคณะผู้วิจัยยังรายงานไว้ว่าอาหารเหลวกากน้ำตาลปกติที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนอื่น ๆ นั้นช่วยเพิ่มผลผลิต (yield) ของเออร์กอสเตรอลได้เป็นอย่างดี ส่วน Johnson *et al.* (1995) ได้นำ *Rhodotorula glutinis* IIP30 ซึ่งเป็นยีสต์โอลีเอจินัส (oleaginous yeast) ที่มีลิพิดภายในเซลล์สูง มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาล กลูโคส และซูโครส ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนที่มีไนโตรเจนปริมาณจำกัด พบว่า เชื้อมีการเจริญจำเพาะสูงสุดในอาหารเหลวกากน้ำตาล กลูโคส และซูโครส

เท่ากับ 0.40, 0.34 และ 0.31 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ และมีการสะสมลิพิดภายในเซลล์เท่ากับ 0.78, 0.38 และ 0.39 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ He *et al.* (2000) ได้ศึกษาการสะสมเออร์กอสเตรอลของยีสต์ลูกผสม YEH-56 ที่ได้จากการผสมระหว่างยีสต์สายพันธุ์กลาย *S. cerevisiae* YE244-28-55 (a, leu) ที่ผลิตเซลล์ได้สูง และยีสต์สายพันธุ์กลาย *S. kluyveri* YE39-16-21 (α, trp) ที่สะสมเออร์กอสเตรอลได้สูง โดยใช้แหล่งคาร์บอน คือ กลูโคส ซูโครส และน้ำอ้อย 2 เปอร์เซ็นต์ เติมลงในอาหารเหลว Yeast extract peptone dextrose (YEPD) พบว่า แหล่งคาร์บอนทั้ง 3 ชนิดไม่มีผลต่อการผลิตมวลเซลล์ของเชื้อ แต่พบว่าเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งของคาร์บอนเชื้อมีการสะสมเออร์กอสเตรอลสูงสุดเท่ากับ 40.6 ± 0.7 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยความเข้มข้นของกลูโคสที่เหมาะสมต่อการผลิตเออร์กอสเตรอล คือ 10 เปอร์เซ็นต์

1.2 แหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบของอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์ที่มีปริมาณมากรองลงมาจากคาร์บอน สารหลายชนิดสามารถใช้เป็นแหล่งของไนโตรเจนได้ โดยแหล่งไนโตรเจนที่มีโมเลกุลขนาดเล็กและใช้ได้ง่าย เช่น แอมโมเนียมไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ และแอมโมเนียมซัลเฟต มักใช้ในอุตสาหกรรมการหมักโดยยีสต์ โดยเฉพาะแอมโมเนียมซัลเฟตมักใช้เป็นแหล่งของไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงยีสต์ ซึ่งนอกจากอนินทรีย์ไนโตรเจนแล้วอินทรีย์ไนโตรเจนหลายชนิด เช่น กรดอะมิโน เปปไทด์ พิวรีน เอมีน รวมทั้งยูเรียยังใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนของยีสต์บางชนิดได้ (สาวิตรี, 2549) และจากการศึกษาพบว่าชนิดและปริมาณไนโตรเจนซึ่งเป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นมีความสำคัญต่อการเจริญและการสะสมเออร์กอสเตรอลบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของยีสต์ โดยไนโตรเจนที่มีปริมาณเพียงพอจะช่วยส่งเสริมให้ได้เซลล์ปริมาณสูงขึ้นแต่ทำให้การสะสมเออร์กอสเตรอลภายในเซลล์ต่ำลง (Shang *et al.*, 2006)

สำหรับชนิดของแหล่งไนโตรเจนมีการศึกษาทั้งสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ไนโตรเจน โดยแหล่งของสารอินทรีย์ไนโตรเจน เช่น น้ำแช่ข้าวโพด (corn-steep liquor) ยีสต์เอกซ์แทรกต์ ยูเรีย และเปปโตนที่มีผลต่อการผลิตเออร์กอสเตรอลนั้น ดังมีรายงานของ Ghanem *et al.* (1990) ที่ศึกษาการผลิตเออร์กอสเตรอลจาก *Penicilium crustosum* Thom เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลจากหัวผักกาดหวาน (beet molasses) ที่เติมน้ำแช่ข้าวโพด 3 เปอร์เซ็นต์ (คิดเป็นปริมาณไนโตรเจนเท่ากับแอมโมเนียมซัลเฟต 2.33 เปอร์เซ็นต์) พบว่าเชื้อเจริญสูงถึง 16.23 กรัมน้ำหนัก

แห้งต่อลิตร และให้สเตรอลทั้งหมดและเออร์กอสเตรอลเท่ากับ 9.9 และ 6.1 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ที่เวลา 8 วัน ซึ่งคณะผู้วิจัยพบว่าอาหารกากน้ำตาลที่เติมน้ำแช่ข้าวโพดเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อราคาถูกซึ่งช่วยส่งเสริมการเจริญและการผลิตเออร์กอสเตรอลได้เป็นอย่างดี

ส่วนผลการศึกษาทั้งอินทรีย์ไนโตรเจนและอนินทรีย์ไนโตรเจนต่อการสะสมเออร์กอสเตรอลของ *Rhodotorula glutinis* IIP30 ในอาหารเหลวกลูโคสที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต ยูเรีย และโพแทสเซียมไนเตรต เป็นแหล่งไนโตรเจนนั้น พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต เชื้อมีการสะสมเออร์กอสเตรอลสูงสุด 4.1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมยูเรียหรือโพแทสเซียมไนเตรตเชื้อมีการสะสมเออร์กอสเตรอลลดลงอย่างมีนัยสำคัญ คือ เท่ากับ 1.7 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Johnson *et al.*, 1994) ส่วน He *et al.* (2000) ได้รายงานผลการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ และยูเรีย 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเหลวกลูโคส ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ลูกผสม YEH-56 ที่ได้จากการผสมระหว่างสายพันธุ์กลายของ *S. cerevisiae* YE244-28-55 และสายพันธุ์กลายของ *S. kluyveri* YE39-16-21 พบว่า เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้นสูงขึ้นเชื้อมีการเจริญและสะสมเออร์กอสเตรอลลดลงตามลำดับ ในขณะที่ Shang *et al.* (2006) ได้เพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* (Y-E-1) ในอาหารที่เติมแหล่งของไนโตรเจนแตกต่างกัน 6 ชนิด คือ น้ำแช่ข้าวโพด ยีสต์เอกซ์แทรกต์ ยูเรีย เปปโตน แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมไนเตรต โดยมีไนโตรเจนปริมาณเท่ากัน พบว่า เมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรตหรือยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อมีการสะสมเออร์กอสเตรอลสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน ส่วนในอาหารที่เติมน้ำแช่ข้าวโพด ยีสต์เอกซ์แทรกต์ ยูเรีย เปปโตน และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนนั้นช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อ แต่ทำให้มีการสะสมเออร์กอสเตรอลภายในเซลล์ต่ำลง

1.3 แหล่งฟอสฟอรัส

ฟอสฟอรัสเป็นปัจจัยที่สำคัญสำหรับการเจริญของยีสต์ แต่การเพิ่มความเข้มข้นของฟอสเฟตในอาหารมีผลเพียงเล็กน้อยต่อองค์ประกอบของฟอสโฟลิพิดใน *Schizosaccharomyces pombe* (Rattray, 1975) ฟอสฟอรัสสามารถถูกแอสซิมิเลตในรูปของไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไอออนหรือออร์โทฟอสเฟตไอออนเท่านั้น โดยฟอสเฟตในเซลล์ยีสต์มีอยู่ประมาณ 3 - 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในรูปออร์โทฟอสเฟต (สาวิตรี, 2549)

2. <u>สภาวะแวดล้อม</u>

2.1 พีเอช

ยีสต์สามารถเจริญได้ดีที่พีเอชระหว่าง 3.5 และ 6.5 โดยช่วงพีเอชที่ยีสต์เจริญได้นั้นค่อนข้างกว้าง คือ พีเอช 3 - 11 (สาวิตรี, 2549) และโดยทั่วไปยีสต์สามารถสะสมลิพิดได้ในช่วงพีเอชที่กว้าง ซึ่งพบว่าการเปลี่ยนแปลงพีเอชของอาหารมีผลเพียงเล็กน้อยต่อการสะสมลิพิดและองค์ประกอบของลิพิดในยีสต์ (Rattray *et al*., 1975)

สำหรับการศึกษาปริมาณลิพิดของ *S. cerevisiae* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอช 3 พบกรดไขมันในปริมาณสูง ส่วนที่พีเอชมากกว่า 6 พบปริมาณของฟอสโฟลิพิดที่สูง แต่ไม่มีผลต่อปริมาณของสเตรอลภายในเซลล์ ขณะที่พีเอช 9 พบไกลโคลิพิดปริมาณสูงขึ้น (Singh *et al*., 1990) นอกจากนี้ได้มีการศึกษาผลของพีเอชต่อการผลิตลิพิดของยีสต์โอลีเอจินัส ซึ่งมีลิพิดภายในเซลล์สูง โดยมีรายงานว่า *Rhodotorula glutinis* IIP30 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกลูโคสที่มีไนโตรเจนปริมาณจำกัด และมีพีเอช 3, 4, 5 และ 6 พบว่า เมื่อพีเอชอาหารเพิ่มขึ้นปริมาณเออร์กอสเตรอลลดลงเป็นลำดับ โดยให้เออร์กอสเตรอลเท่ากับ 11.7, 6.2, 4.2 และ 2.9 เปอร์เซ็นต์ของลิพิด ตามลำดับ (Johnson *et al*., 1992) ในขณะที่ *Rhodosporidium toruloides* Y4 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YEPD ที่มีพีเอช 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 นั้น พบว่า พีเอชของอาหารที่เปลี่ยนไปนั้นไม่มีนัยสำคัญต่อการสะสมลิพิดของเชื้อ ซึ่งเชื้อสามารถเจริญและสะสมลิพิดได้ในช่วงพีเอชที่กว้าง คือ พีเอช 3 - 10 และพีเอชที่เหมาะสมต่อการสะสมลิพิด คือ ที่พีเอช 6 โดยมีการสะสมเท่ากับ 72 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Li *et al*., 2006)

2.2 ความเข้มข้นของกล้าเชื้อ

เมื่อทำการศึกษาความเข้มข้นของกล้าเชื้อพบว่ามีผลต่อการสะสมสควอลีนของ *S. cerevisiae* และ *Torulaspora delbrueckii* โดยเตรียมกล้าเชื้อด้วยการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีออกซิเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเพาะกล้าเชื้อ 1, 2, 3, 5, 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหาร ลงในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและปิดทับผิวหน้าอาหารด้วยพาราฟินหนา 1 เซนติเมตร เพื่อให้เป็นสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน และบ่มเป็นเวลา 24 - 72 ชั่วโมง พบว่า ยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์ผลิตสควอลีนสูงสุดเมื่อใช้กล้าเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ *T. delbrueckii* ผลิตสควอลีน

เท่ากับ 1.89 ± 0.06 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์เปียก ที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งสูงกว่า *S .cerevisiae* ที่ผลิตสควอลีนเพียง 1.38 ± 0.06 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์เปียก ที่เวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งจากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า การใช้กล้าเชื้อ 1 - 5 เปอร์เซ็นต์ทำให้สารอาหารต่าง ๆ ที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเพียงพอต่อการเจริญและการผลิตสควอลีนของเชื้อในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนได้เป็นอย่างดี ในขณะที่เมื่อใช้กล้าเชื้อ 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์นั้น การเจริญของเชื้ออาจถูกยับยั้งเนื่องจากเชื้อต้องใช้สารอาหารที่มีอยู่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเพื่อให้ยังคงรอดชีวิตอยู่ได้มากกว่าที่จะเป็นใช้เป็นแหล่งในการผลิตสควอลีน (Bhattacharjee *et al*., 2001)

2.3 อุณหภูมิ

ยีสต์ส่วนใหญ่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic yeast) และเจริญได้ดีที่ 20 - 28 องศาเซลเซียส ซึ่งการเพาะเลี้ยงยีสต์ส่วนใหญ่มักบ่มที่อุณหภูมิ 30 - 35 องศาเซลเซียส โดยการเจริญจะลดลงมากที่ 20 องศาเซลเซียส และไม่เจริญที่ 60 - 70 องศาเซลเซียส (สาวิตรี, 2549)

ผลของอุณหภูมิต่อการสะสมสควอลีนนั้นพบว่าขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ โดย Shimizu and Katsuki (1975) รายงานถึง *S. cerevisiae* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยในช่วงแรกมีการให้ออกซิเจนเป็นเวลา 7 ชั่วโมง และบ่มที่อุณหภูมิ 20, 30 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสในช่วงที่มีออกซิเจนเท่านั้นที่เชื้อมีการสังเคราะห์สควอลีนและสเตรอลประมาณ 32 - 35 เปอร์เซ็นต์ แต่สควอลีนมีปริมาณที่ต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 20 และ 30 องศาเซลเซียส เหตุผลเนื่องมาจากว่าเมื่อบ่มอุณหภูมิสูงขึ้นเกิดการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแอซีติลโคเอไปเป็นเมวาโลเนต ดังนั้นจึงเป็นผลให้ปริมาณสควอลีนและสเตรอลลดลงตามลำดับ ส่วนการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อปริมาณลิพิดของ *Rhodotorula glutinis* IIP30 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกลูโคสที่มีไนโตรเจนปริมาณจำกัด และบ่มที่อุณหภูมิ 26, 28, 30, 32, 35 และ 38 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 28 และ 30 องศาเซลเซียส เชื้อมีปริมาณลิพิดสูงใกล้เคียงกัน คือ 65 และ 66 เปอร์เซ็นต์ต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ และที่อุณหภูมิเดียวกันนี้ยังทำให้เชื้อมีการสะสมเออร์กอสเตรอลสูงสุดเท่ากันคือ 4.1 เปอร์เซ็นต์ต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง (Johnson *et al.*, 1994)

2.4 ออกซิเจน

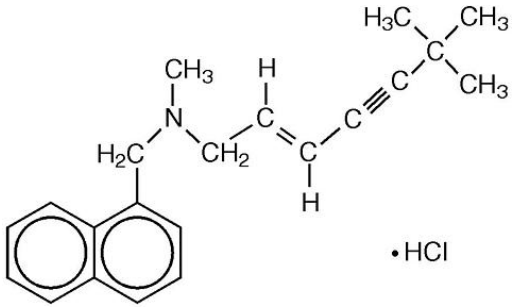
แม้ว่า *S. cerevisiae* สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน แต่ความต้องการออกซิเจนก็ยังมีความจำเป็นสำหรับการสังเคราะห์ลิพิดที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญภายในเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น สเตรอลและกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว ซึ่งระหว่างการเจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ยีสต์ไม่สามารถสังเคราะห์เออร์กอสเตรอลที่มีความจำเป็นต่อเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ขณะเดียวกันกลับพบว่าภายในเซลล์มีการสะสมสควอลีนมากขึ้น แต่เมื่อมีออกซิเจนในการเจริญสควอลีนที่สะสมไว้นั้นถูกเปลี่ยนไปเป็นสเตรอลอื่น ๆ ต่อไปได้อย่างรวดเร็ว (Jahnke and Klein, 1983) ซึ่งจากการแยกลิพิดพวกสารประกอบไฮโดรคาร์บอนใน *S. cerevisiae*LK2G12 ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน พบว่าลิพิดจำพวกสารประกอบไฮโดรคาร์บอนมีมากถึง 80 - 90 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณลิพิดทั้งหมด และสเตรอลมีประมาณ 65 - 71 เปอร์เซ็นต์ของลิพิดทั้งหมด ซึ่งจากผลการทดลองชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ว่า ภายในเซลล์มีการสะสมสารตัวกลางที่ใช้ในการสังเคราะห์สเตรอลได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ซึ่งสารตัวกลางนั้นก็คือ สควอลีน (Klein, 1955) ต่อมา Jahnke and Klein (1983) ศึกษาถึงระดับของออกซิเจนที่มีผลต่อปริมาณลิพิดที่พบภายในเซลล์ของ *S. cerevisiae* LK2G12 เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยออกซิเจนที่ตรวจวัดนั้นมีอยู่เพียง 0.03 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร หรือเท่ากับมีปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ 0.34 ไมโครโมลาร์ เป็นผลให้พบว่ามีสควอลีนปริมาณสูงขึ้นถึง 7.22 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ในขณะที่เออร์กอสเตรอลมีอยู่เพียง 1.16 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนรายงานของ Valero *et al.* (2001) ที่ศึกษาอิทธิพลของออกซิเจนในระหว่างการเจริญของ *S. cerevisiae* ต่อการสังเคราะห์ลิพิด ในระหว่างกระบวนการหมักในสภาวะที่มีออกซิเจน กึ่งไม่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน เป็นเวลา 20 วัน พบว่าในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนนั้นเชื้อมีปริมาณเออร์กอสเตรอลลดลง แต่มีการสะสมสควอลีนสูงขึ้น ซึ่งสควอลีนที่พบนั้นสูงกว่าการหมักในสภาวะที่มีออกซิเจนและกึ่งไม่มีออกซิเจนที่ระยะเวลาการหมักเดียวกัน

สำหรับการศึกษา *Schizosaccharomyces pombe* ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีออกซิเจน พบว่า มีระดับของเออร์กอสเตรอล ลาโนสเตรอล และสเตรอล 2 ชนิดที่ยังจัดจำแนกไม่ได้ลดลง แต่มีการเพิ่มขึ้นของสควอลีนเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน และเมื่อมีการเติมเอทานอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีสเตรอลเพิ่มขึ้นถึง 3 เท่า (Koukkou *et al*., 1993)

สารที่มีผลต่อการสะสมสควอลีนในยีสต์

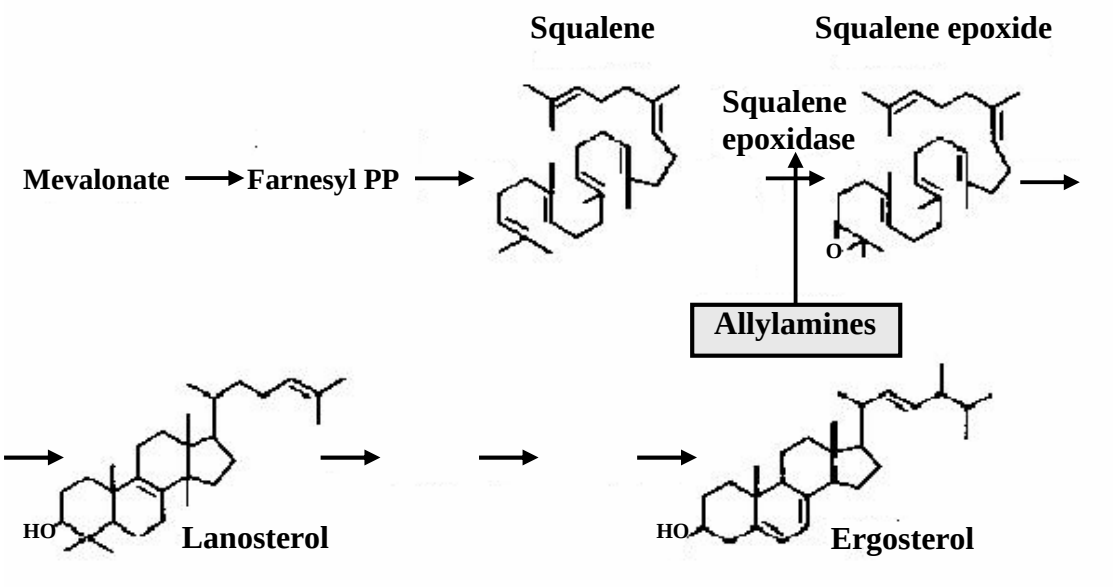
1. เทอร์บินาฟีน (Terbinafine)

เทอร์บินาฟีน คือ ยาที่ใช้ในการต่อต้านเชื้อรา (antifungal) ซึ่งโครงสร้างทางเคมีจัดอยู่ในกลุ่ม allylamine มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{21}H_{26}ClN$ และโครงสร้างทางเคมีแสดงดังภาพที่ 3 เทอร์บินาฟีนสามารถออกฤทธิ์ได้กว้างในการใช้ฆ่าเชื้อราชนิด dermatophyte ที่พบตามบริเวณผิวหนัง ผม และเล็บ ได้แก่ *Trichophyton* (เช่น *T. rubum*), *Microsporum* (เช่น *M. caris*) และยีสต์ *Candida* (เช่น *C. albicans*) สำหรับเทอร์บินาฟีนที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ จะมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อราชนิด dermatophyte, ราเส้นใย และ dimorphic fungi ซึ่งพบว่าฤทธิ์ของยาในการฆ่าเชื้อราหรือยีสต์นั้นขึ้นอยู่กับสปีชีส์ของเชื้อ (บริษัทโนวาติส, 2544)



ภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของเทอร์บินาฟีน
ที่มา: Anonymous (2005)

กลไกการออกฤทธิ์ของเทอร์บินาฟีนคือ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ squalene epoxidase ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนสควอลีนไปเป็นสควอลีน-2,3-อีพอกไซด์ในวิถีของการสังเคราะห์เออร์กอสเตรอล ดังนั้นเมื่อเอนไซม์นี้ถูกยับยั้งทำให้การสังเคราะห์เออร์กอสเตรอลลดลง แต่มีการสะสมสควอลีนภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้น (Leber, 2001) โดยปริมาณเออร์กอสเตรอลที่ลดลงนั้นส่งผลทำให้เชื้อราไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ตามปกติ และเป็นผลให้เชื้อราตายไปในที่สุด



ภาพที่ 4 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ squalene epoxidase โดยเทอร์บินาฟีนใน *S. cerevisiae*
ที่มา: ดัดแปลงจาก Jandrositz *et al.* (1991)

จากการศึกษาพบว่าเทอร์บินาฟีนมีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อเอนไซม์ squalene epoxidase ซึ่งพบอยู่บริเวณเยื่อหุ้มไมโครโซมของเชื้อรา โดยเอนไซม์ squalene epoxidase เป็นเอนไซม์ตัวแรกในวิถีของการสังเคราะห์เออร์กอสเตรอลที่ต้องการโมเลกุลของออกซิเจนและ NADPH ในปฏิกิริยาการเปลี่ยนสควอลีนไปเป็นสควอลีน-2,3-อีพอกไซด์ และพบว่าเอนไซม์ squalene epoxidase ของมนุษย์นั้นไม่ใช่เอนไซม์ที่อยู่ในไซโตโครมพี 450 (cytochrome P-450) ดังนั้นจึงไม่มีองค์ประกอบของฮีม (heme) และไม่ถูกยับยั้งด้วยตัวยับยั้ง เช่น คาร์บอนมอนอกไซด์เหมือนดังเช่นเอนไซม์ที่อยู่ในไซโตโครมพี 450 ซึ่งด้วยเหตุผลนี้เองจึงมีการใช้เทอร์บินาฟีนในการฆ่าหรือยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในมนุษย์ เพราะเทอร์บินาฟีนจะยับยั้งเฉพาะเอนไซม์ squalene epoxidase ของเชื้อราเท่านั้น แต่ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่มีอยู่ในไซโตโครมพี 450 ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในร่างกายมนุษย์ (Ryder *et al*., 1992)

สำหรับการยับยั้งของเทอร์บินาฟีนในการทำงานของเอนไซม์ squalene epoxidase ใน *Candida albicans* พบว่า เมื่อใช้เทอร์บินาฟีนทำให้การเจริญของเชื้อถูกยับยั้ง เนื่องจากมีระดับของเออร์กอสเตรอลที่ต่ำลงและไม่เพียงพอต่อการพัฒนาเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อ (Ryder, 1992)

ส่วนผลของเทอร์บินาฟีนต่อการสะสมสควอลีนของ *S. cerevisiae* พบว่า การเติมเทอร์บินาฟีนลงไปในอาหารทำให้เชื้อมีการสะสมสควอลีนสูงขึ้น เช่น *S. cerevisiae* X2180-1A ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่ไม่มีสเตรอล (sterol-free medium) และเติมเทอร์บินาฟีน 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมงในสภาวะที่มีออกซิเจน จากนั้นทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของลิพิดในอนุภาคลิพิด พบว่า เชื้อมีการสะสมสควอลีนภายในอนุภาคลิพิดเท่ากับ 4.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมโปรตีน ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมเทอร์บินาฟีนเชื้อสะสมสควอลีนภายในอนุภาคลิพิดเพียง 1.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมโปรตีน (Leber *et al*., 1995) และ *S. cerevisiae* A_2EZ475 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YPD ที่เติมเทอร์บินาฟีน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมงในสภาวะที่มีออกซิเจน เชื้อสะสมสควอลีนปริมาณสูงถึง 14.9 ± 2.1 นาโนโมลต่อค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ส่วนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YPD ที่ไม่เติมเทอร์บินาฟีนเชื้อสะสมสควอลีนเพียง 0.14 ± 0.05 นาโนโมลต่อค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (Leber *et al*., 2001)

2. <u>6-Amino-2-n-pentylthiobenzothiazole (APB)</u>

APB เป็นยาที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อราซึ่งพบว่ามีผลส่งเสริมการสะสมสควอลีน โดย Kuchta *et al.* (1997) ได้ศึกษาการสะสมสควอลีน *S. cerevisiae* FL200 (ACTT 32119) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YPD ที่เติม APB 40 ไมโครโมลาร์ พบว่า APB ไปยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์เออร์กอสเตรอล ทำให้มีเออร์กอสเตรอลภายในเซลล์ลดลง แต่มีการสะสมลาโนสเตรอล 4,4-ไดเมทริลไซโมสเตรอล และสควอลีนเพิ่มขึ้น โดยสควอลีนเพิ่มขึ้นเท่ากับ 0.32 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YPD ที่ไม่เติม APB พบสควอลีนเพียง 0.07 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง

3. <u>เอทานอล</u>

การเติมเอทานอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้มีการสะสมสควอลีนมากขึ้นหากเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดย Koukkou *et al.* (1993) รายงาน *Schizosaccharomyces pombe* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมเอทานอล 0.8 และ 1.2 โมลาร์ในสภาวะที่มีออกซิเจน มีสควอลีนภายในเซลล์เท่ากับ 15.50 ± 1.00 และ 28.70 ± 1.50 เปอร์เซ็นต์ของสเตรอลทั้งหมด ตามลำดับ ส่วนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมเอทานอลเซลล์มีปริมาณสควอลีนเท่ากับ 7.80 ± 0.80 เปอร์เซ็นต์ของ

สเตรอลทั้งหมด ในขณะที่สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนการเติมเอทานอล 0.8 และ 1.2 โมลาร์ เซลล์มีการสะสมสควอลีนลดต่ำลงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมเอทานอล คือ 56.70 ± 1.50 และ 53.90 ± 1.10 เปอร์เซ็นต์ของสเตรอลทั้งหมด ตามลำดับ ส่วนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมเอทานอล เซลล์มีสควอลีนเท่ากับ 61.90 ± 3.00 เปอร์เซ็นต์ของสเตรอลทั้งหมด

4. <u>โซเดียมคลอไรด์</u>

โซเดียมคลอไรด์มีผลต่อเพิ่มการผลิตสควอลีนของยีสต์ โดย Turk *et al.* (2003) ศึกษาปริมาณสเตรอลใน *S. cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ที่มีความไวต่อเกลือ (salt-sensitive) โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YNB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0, 5, 10, 17 และ 25 เปอร์เซ็นต์ พบว่า *S. cerevisiae* สามารถเจริญได้ที่เกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณสเตรอลเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่สูงขึ้น เหตุผลเนื่องมาจากเซลล์มีการสะสมสารตัวกลางที่ใช้ในการสังเคราะห์เออร์กอสเตรอลเพิ่มขึ้นกว่าปกติ ซึ่งทุกความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เชื้อสามารถเจริญได้นั้นมีสควอลีนภายในเซลล์ปริมาณผิดปกติไป โดยพบสควอลีนอยู่ประมาณ 0.5 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง

<u>งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสควอลีนของยีสต์ที่ได้จากกระบวนการหมัก</u>

ยีสต์หลายสกุลสามารถผลิตลิพิดในเซลล์ได้ในปริมาณที่สูงใกล้เคียงพืชน้ำมัน เช่น ในสกุล *Rhodotorula, Lipomyces* และ *Candida* ซึ่งยีสต์ที่ผลิตลิพิดจะใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ลิพิด โดยพบว่าองค์ประกอบ ชนิด และปริมาณของลิพิดนั้นจะเปลี่ยนแปลงไปตามสปีชีส์ของยีสต์ ระยะของการเจริญ ความเหมาะสมของสารอาหารที่ใช้ และสภาวะที่ใช้ในการหมัก ซึ่งการที่จะทำให้ยีสต์มีอัตราการผลิตลิพิดภายในเซลล์สูงขึ้นนั้นจำเป็นต้องควบคุมวิถีของเอนไซม์ โดยการควบคุมนั้นต้องทำอย่างจำเพาะเจาะจง ซึ่งอาจทำได้โดย (1) การกระตุ้นหรือยับยั้งวิถีเมแทบอลิซึมภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญในขณะที่มีสารตั้งต้นหรือซับสเตรตในปริมาณที่สูง (2) การโคลนนิ่งและทำให้มีแสดงออกของยีนที่ต้องการ (3) การเปลี่ยนแปลงชีวเคมีของลิพิดที่เป็นผลผลิตสุดท้ายโดยการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์หรือการหมักโดยตรงด้วยจุลินทรีย์ที่เหมาะสม และ (4) การเปลี่ยนแปลงโดยใช้สารเคมี (Jacob, 1993)

Beltran *et al.* (n.d.) ได้รายงานองค์ประกอบของสเตรอลในไวน์ยีสต์ *S. cerevisiae* ระหว่างกระบวนการหมักในระดับห้องปฏิบัติการและระดับอุตสาหกรรม ที่อุณหภูมิ 13 และ 25 องศาเซลเซียส พบว่า ลิพิดส่วนใหญ่ที่พบ คือ สควอลีน ซึ่งเป็นสารตัวกลางในวิถีของการสังเคราะห์เออร์กอสเตรอล โดยการหมักในระดับอุตสาหกรรมของ *S. cerevisiae* มีสควอลีนปริมาณสูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ของสเตรอลทั้งหมด ส่วนการหมักในระดับห้องปฏิบัติการมีสควอลีน 50 เปอร์เซ็นต์ของสเตรอลทั้งหมด ซึ่งสควอลีนมีปริมาณเพิ่มขึ้นมากในช่วงท้ายของการหมักที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและอุตสาหกรรม ในขณะที่ลาโนสเตรอลและเออร์กอสเตรอลมีปริมาณสูงขึ้นในช่วงท้ายของการหมักที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส ซึ่งสูงกว่าในช่วงท้ายของการหมักที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและอุตสาหกรรม

Valero *et al*. (2001) ศึกษาถึงอิทธิพลของออกซิเจนในระหว่างการหมักของ *S. cerevisiae* $M_3$30-9 ต่อการสังเคราะห์ลิพิดภายในเซลล์ พบว่า ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนนั้นมีการยับยั้งการสังเคราะห์สเตรอลเกิดขึ้นเป็นผลทำให้ระดับของเออร์กอสเตรอลภายในเซลล์ต่ำลง แต่ส่งผลให้มีการสะสมสควอลีนเพิ่มสูงขึ้น โดยปริมาณสควอลีนที่ได้จากการหมักในวันที่ 2, 5 และ 20 เท่ากับ $1,080 \pm 63.6$, $1,122 \pm 110$ และ $3,142 \pm 111$ ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ซึ่งปริมาณสควอลีนที่ได้นี้สูงกว่าการหมักในสภาวะที่มีออกซิเจนและกึ่งไม่มีออกซิเจนที่ระยะเวลาการหมักเดียวกัน

Fornairon-Bonnefond *et al*. (2002) ศึกษาผลของออกซิเจนต่อการสะสมสควอลีนและสเตรอลของ *S. cerevisiae* K1 ระหว่างการหมักเอทานอล พบว่า การหมักในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนมีสควอลีนปริมาณสูงสุดเท่ากับ 548 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนการหมักในสภาวะที่มีออกซิเจน 7 มิลลิกรัมต่อลิตร สควอลีนลดลงเล็กน้อยเหลือ 534 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง เนื่องจากว่าสควอลีนบางส่วนถูกเปลี่ยนไปเป็นลาโนสเตรอล 5 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อมีออกซิเจนเท่ากับ 37 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสควอลีนลดลงเหลือ 271 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และมีลาโนสเตรอลเพิ่มขึ้นเป็น 37 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การหมักในสภาวะที่มีออกซิเจนตลอดเวลานั้นพบว่ามีสควอลีนปริมาณต่ำสุดเพียง 98 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และในเวลาต่อมา Fornairon-Bonnefond *et al*. (2003) ได้ทำการศึกษาถึงอิทธิพลของออกซิเจนที่มีผลต่อการสังเคราะห์สควอลีนและสเตรอลของ *S. cerevisiae* S_3 ภายหลังจากการหมักเอทานอล พบว่า ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนมีสควอลีนปริมาณเท่ากับ 6.14 มิลลิกรัมต่อความเข้มข้นเซลล์ 10^{-12} ส่วนการหมักในสภาวะที่มีออกซิเจน 7 มิลลิกรัมต่อลิตร มีสควอลีน 7.53 มิลลิกรัมต่อความเข้มข้น

เซลล์ 10^{-12} ในขณะที่เมื่อมีออกซิเจน 37 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า มีสควอลีน 7.27 มิลลิกรัมต่อความเข้มข้นเซลล์ 10^{-12}

Mycogen corporation (2003) ของประเทศสหรัฐอเมริกามีความสนใจในการหาวิธีที่ใช้ปรับปรุงยีสต์โอลีเอจินัสที่มีลิพิดภายในเซลล์สูง เพื่อให้สามารถผลิตสควอลีนและสารไอโซพรีนอยด์อื่น ๆ ในปริมาณที่สูงขึ้นและมีราคาถูกลง เนื่องจากสควอลีนที่สกัดได้จากตับของปลาฉลามมีราคาแพงถึง 32 ดอลลาร์สหรัฐต่อปอนด์ นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำมันหล่อลื่นราคาถูกที่ผลิตได้จากน้ำมันปิโตรเลียมนำเข้านั้นมีความเป็นพิษและย่อยสลายได้ยาก ซึ่งเป็นปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมอย่างมาก ดังนั้นทางบริษัทจึงได้ทำการวิจัยในระหว่างปี ค.ศ. 1995 ถึง ค.ศ. 1998 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการผลิตสควอลีนจากกระบวนการหมักของยีสต์ โดยทำการดัดแปลงยีนที่เกี่ยวข้องกับสังเคราะห์สควอลีนในยีสต์ *Yarrowia lipolytica* เพื่อให้มีการผลิตสควอลีนที่สูงขึ้น และได้นำเอาวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมที่มีราคาถูก เช่น หางนมจากโรงงานนมหรือวัสดุเหลือทิ้งจากอ้อยมาใช้เป็นซับสเตรต โดยมีการออกแบบกระบวนการหมักในระดับอุตสาหกรรมเพื่อผลิตสควอลีน และมีความคาดหวังว่าหากประสบผลสำเร็จจะทำให้สควอลีนที่ผลิตได้จากยีสต์นั้นเข้ามาแทนที่ผลิตภัณฑ์น้ำมันหล่อลื่นที่ผลิตได้จากน้ำมันปิโตรเลียมนำเข้า โดยในช่วงแรกนั้นนักวิจัยได้ทำการปรับปรุงกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สควอลีนของยีสต์ *Y. lipolytica* โดยการดัดแปลงยีนที่ใช้ในการสังเคราะห์เอนไซม์ 4 ชนิด คือ ACCase, hydroxymethylglutaryl CoA reductase, squalene synthase และ squalene epoxidase เพื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ squalene synthase และ hydroxymethylglutaryl CoA reductase และลดปริมาณเอนไซม์ ACCase และ squalene epoxidase ซึ่งจากผลการวิจัยพบว่าประสบผลสำเร็จในการปรับปรุงเอนไซม์ 2 ชนิด คือ ACCase และ hydroxymethylglutaryl CoA reductase ในขณะที่ไม่ประสบความสำเร็จในเอนไซม์ squalene synthase และ squalene epoxidase นอกจากนี้บริษัทยังประสบผลสำเร็จสามารถผลิตสควอลีนเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า คือ จากเดิมสามารถผลิตสควอลีนได้ 0.45 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เพิ่มขึ้นเป็น 0.90 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยยีสต์สายพันธุ์ที่ปรับปรุงเอนไซม์แล้วสามารถผลิตสควอลีนได้สูงขึ้น 1.3 - 2.7 เท่าของสายพันธุ์เดิม จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1998 บริษัทได้สรุปผลการวิจัยพบว่า ยีสต์สายพันธุ์ที่ปรับปรุงเอนไซม์สามารถผลิตลิพิดทั้งหมด (total lipid)ได้ 16 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และผลิตสควอลีนได้ 2 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยมีต้นทุนการผลิต 22 ดอลลาร์สหรัฐต่อปอนด์ เนื่องจากไม่ประสบผลสำเร็จในการดัดแปลงยีนของเอนไซม์ทั้งสองตัวที่กล่าวมาแล้ว และต้นทุนการผลิตยังสูงกว่าที่ต้องการ (3 ดอลลาร์สหรัฐต่อปอนด์) ดังนั้นทางบริษัทจึงได้ยุติการทำวิจัยนี้ไปในที่สุด

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างเพื่อแยกยีสต์

เก็บตัวอย่าง ดิน ผลไม้ ดอกไม้ ยางไม้ เห็ด และมอส จากป่าบริเวณสถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช สถานีฝึกวิจัยนิสิตวนศาสตร์ และศูนย์รวบรวมพันธุกรรมพันธุ์ไม้เฉลิมพระเกียรติ ร. 9 อำเภอวังน้ำเขียว และดินบริเวณเขื่อนลำพระเพลิง อำเภอปักธงชัย จังหวัดนครราชสีมา เพื่อทำการแยกยีสต์

2. การแยกยีสต์

นำตัวอย่างที่เก็บได้จากข้อ 1 มาทำการแยกยีสต์ ด้วยวิธี enrichment โดยใส่ตัวอย่าง 1 - 2 กรัมลงในอาหารเหลว YM (Yeast extract malt broth) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอลให้มีความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และเติมโซเดียมโพรพิโอเนตความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อยับยั้งการเจริญของราเส้นใย และปรับพีเอชเป็น 3.7 - 3.8 เพื่อให้เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ นำไปบ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง นำมาสตรีก (streak) ลงบนอาหารแข็ง YM (Yeast extract malt agar)ที่ปรับพีเอชให้เท่ากับ 3.7 - 3.8 จนได้ยีสต์เจริญเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ สังเกตลักษะโคโลนี แล้วใช้ลูปแตะเชื้อจากโคโลนีมาทำ wet mount ลงบนแผ่นสไลด์แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ จากนั้นสังเกตลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X เพื่อยืนยันว่าเป็นยีสต์ แล้วนำมาสตรีกซ้ำบนอาหารแข็ง YM อีกอย่างน้อย 2 ครั้งจนได้โคโลนีเดี่ยวของเชื้อบริสุทธิ์ แล้วเก็บเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารแข็งเอียง YM เพื่อศึกษาต่อไป

3. การคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่สะสมควอลีนได้สูง

3.1 การคัดเลือกขั้นแรก

3.1.1 การเตรียมกล้าเชื้อ เขี่ยเชื้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง YPD (Yeast extract peptone dextrose agar) บ่มอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง ถ่ายลงในอาหารเหลว YPD

(Yeast extract peptone dextrose broth) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อต่อไป

3.1.2 การเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อตรวจการสะสมสควอลีน ปิเปตกล้าเชื้อจากข้อ 3.1.1 นำไปเจือจางจนได้ความเจือจางที่เหมาะสม แล้วนำไปวัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ จากนั้นคำนวณหาปริมาณของกล้าเชื้อที่จะต้องใช้เติมลงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 0.5 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำเซลล์ไปสกัดไขมันตามวิธีในข้อ 10.1 และ 10.2 และตรวจหาสควอลีนโดยวิธี Thin-layer chromatography (TLC) ตามวิธีข้อ 10.3 คัดเลือกยีสต์ที่สะสมสควอลีนได้ไว้ศึกษาในขั้นต่อไป

สูตรคำนวณปริมาตรกล้าเชื้อ

$$V_1 = (N_2 \times V_2)/ N_1$$

V_1 = ปริมาตรกล้าเชื้อที่ต้องใช้

V_2 = ปริมาตรอาหารหมัก

N_1 = ค่าความขุ่นของกล้าเชื้อ

N_2 = ค่าความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นในอาหารสำหรับลงหมัก

3.2 การคัดเลือกขั้นที่สอง

นำยีสต์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.1 ทำการเตรียมกล้าเชื้อตามข้อ 3.1.1 แล้วเพาะเลี้ยงเชื้อตามข้อ 3.1.2 โดยใช้อาหารเหลว YPD ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 0.5 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ทำการเพาะเลี้ยง 3 ซ้ำในแต่ละตัวอย่าง) วัดการเจริญในรูปความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร และหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ จากนั้นนำเซลล์ไปสกัดไขมันตามวิธีในข้อ 10.1 และ 10.2 แล้ววิเคราะห์ปริมาณสควอลีนโดยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC) ตามวิธีในข้อ

10.4 โดยปริมาณของสควอลีนที่วิเคราะห์ได้จาก HPLC นั้นรายงานผลเป็นค่าการผลิตสควอลีน (หน่วยไมโครกรัมต่อลิตร) จากนั้นนำค่าการผลิตสควอลีนมาคำนวณต่อค่าการเจริญ คือ น้ำหนักเซลล์แห้ง (หน่วยกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร) แล้วรายงานผลเป็นค่าการสะสมสควอลีน (หน่วยไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง) จากนั้นคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่สะสมสควอลีนได้สูงไว้ศึกษาในขั้นต่อไป

4. <u>การคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่สะสมสควอลีนได้สูงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลเพื่อใช้ในการผลิตสควอลีน</u>

นำยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 ทำการเตรียมกล้าเชื้อตามวิธีในข้อ 3.1.1 แล้วเพาะเลี้ยงเชื้อตามข้อ 3.1.2 แต่ใช้อาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 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 (ทำการเพาะเลี้ยง 3 ซ้ำในแต่ละตัวอย่าง) เก็บตัวอย่างทุก ๆ 6 ชั่วโมง วัดการเจริญในรูปความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร และหาน้ำหนักแห้งของเซลล์จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งกับความขุ่นของเซลล์ตามวิธีในข้อ 9.3 จากนั้นนำเซลล์ไปสกัดไขมันตามวิธีในข้อ 10.1 และ 10.2 แล้ววิเคราะห์ปริมาณสควอลีนโดยวิธี HPLC ตามวิธีในข้อ 10.4 คัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่สะสมสควอลีนได้สูงไว้ศึกษาในขั้นต่อไป

5. <u>การศึกษาองค์ประกอบของอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสควอลีนในอาหารเหลวกากน้ำตาลของยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้</u>

นำยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 4 มาศึกษาองค์ประกอบของอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสควอลีน โดยเตรียมกล้าเชื้อตามวิธีในข้อ 3.1.1 แล้วเพาะเลี้ยงเชื้อตามข้อ 3.1.2 โดยใช้อาหารเหลวกากน้ำตาล บรรจุในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วการเขย่า และอุณหภูมิต่าง ๆ (ทำการเพาะเลี้ยง 3 ซ้ำในแต่ละสภาวะการทดลอง) วัดการเจริญในรูปความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร และหาน้ำหนักแห้งของเซลล์จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งกับความขุ่นของเซลล์ จากนั้นนำเซลล์ไปสกัดไขมันตามวิธีในข้อ 10.1 และ 10.2 แล้ววิเคราะห์ปริมาณสควอลีนโดยวิธี HPLC ตามวิธีในข้อ 10.4

5.1 องค์ประกอบของอาหาร

5.1.1 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

นำยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 4 มาเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ และปรับพีเอชเป็น 4.5 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เพาะกล้าเชื้อโดยปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 1.0 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง วัดการเจริญและการผลิตสควอลีน เลือกอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตสควอลีน คือ ให้สควอลีนปริมาณสูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ศึกษาในขั้นต่อไป

5.1.2 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

นำยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.1.1 มาเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 5.1.1 เติมแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 2 ชนิด คือ แอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรีย ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 0, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ และปรับพีเอชเป็น 4.5 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เพาะกล้าเชื้อโดยปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 1.0 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง วัดการเจริญและการผลิตสควอลีน เลือกชนิดของแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตสควอลีน คือ ให้สควอลีนปริมาณสูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ศึกษาในขั้นต่อไป

5.1.3 ความเข้มข้นของแหล่งฟอสฟอรัส

นำยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.1.1 มาเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 5.1.1 ชนิดและความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 5.1.2 เติมแหล่งฟอสฟอรัส คือ ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 0, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ และปรับพีเอชเป็น 4.5 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เพาะกล้าเชื้อโดยปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 1.0 ที่ความยาว

คลื่น 550 นาโนเมตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง วัดการเจริญและการผลิตสควอลีน เลือกไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตสควอลีน คือ ให้สควอลีนปริมาณสูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ศึกษาในขั้นต่อไป

5.2 สภาวะแวดล้อม

5.2.1 พีเอชเริ่มต้นของอาหาร

นำยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.1.1 มาเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีองค์ประกอบที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.1.1 - 5.1.3 ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และไม่ปรับพีเอช (พีเอช 5.23) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เพาะกล้าเชื้อโดยปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 1.0 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง วัดการเจริญและการผลิตสควอลีน เลือกพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตสควอลีน คือ ให้สควอลีนปริมาณสูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ศึกษาในขั้นต่อไป

5.2.2 ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น

นำยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.1.1 มาเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีองค์ประกอบที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.1.1 - 5.1.3 และปรับพีเอชที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.2.1 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เพาะกล้าเชื้อโดยปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง วัดการเจริญและการผลิตสควอลีน เลือกความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตสควอลีน คือ ให้สควอลีนปริมาณสูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ศึกษาในขั้นต่อไป

5.2.3 อุณหภูมิ

นำยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.1.1 มาเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีองค์ประกอบที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.1.1 - 5.1.3 และปรับพีเอชที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.2.1 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เพาะกล้าเชื้อโดยปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.2.2 บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25, 28 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง วัดการเจริญและการผลิตสควอลีน เลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสควอลีน คือ ให้สควอลีนปริมาณสูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ศึกษาในขั้นต่อไป

5.2.4 ปริมาตรอาหาร

นำยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.1.1 มาเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีองค์ประกอบที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.1.1 - 5.1.3 และปรับพีเอชที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.2.1 อาหารปริมาตร 100, 150, 200 และ 250 มิลลิลิตร เพาะกล้าเชื้อโดยปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.2.2 บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.2.3 เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก ๆ 6 ชั่วโมง วัดการเจริญและการผลิตสควอลีน เลือกปริมาตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตสควอลีน คือ ให้สควอลีนปริมาณสูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ศึกษาในขั้นต่อไป

5.2.5 ความเร็วของการเขย่า

นำยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.1.1 มาเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีองค์ประกอบที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.1.1 - 5.1.3 และปรับพีเอชที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.2.1 ปริมาตรอาหารที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.2.4 เพาะกล้าเชื้อโดยปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.2.2 บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 70, 100, 130 และ 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.2.3 เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก ๆ 6 ชั่วโมง วัดการเจริญและการผลิตสควอลีน เลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสควอลีน คือ ให้สควอลีนปริมาณสูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ศึกษาในขั้นต่อไป

6. <u>การศึกษาผลของเทอร์บินาฟีนต่อการสะสมสควอลีนในยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้</u>

นำยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 5 มาเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีองค์ประกอบที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.1.1 - 5.1.3 และเติมเทอร์บินาฟีนให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0, 2.5, 5, 7.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 5.2.1 - 5.2.5 เป็นเวลา 36 ชั่วโมง (ทำการเพาะเลี้ยง 3 ซ้ำในแต่ละสภาวะการทดลอง) เก็บตัวอย่างทุก ๆ 6 ชั่วโมง วัดการเจริญและการผลิตสควอลีน รวมทั้งนับจำนวนเซลล์ทั้งหมดตามวิธีในข้อ 9.4 เลือกความเข้มข้นของเทอร์บินาฟีนที่เหมาะสมต่อการผลิตสควอลีน เพื่อใช้สำหรับการทดลองในการผลิตสควอลีนในถังหมักขนาด 5 ลิตรต่อไป

7. <u>ผลของการแช่เยือกแข็งเซลล์ในอาหารเหลวกากน้ำตาลต่อการสะสมสควอลีนของยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้</u>

นำยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 5 มาเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีองค์ประกอบที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.1.1 - 5.1.3 และเติมเทอร์บินาฟีนให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0, 2.5, 5, 7.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 5.2.1 - 5.2.5 เป็นเวลา 42 ชั่วโมง (ทำการเพาะเลี้ยง 3 ซ้ำในแต่ละสภาวะการทดลอง) โดยเก็บตัวอย่างมาทำการศึกษา 2 แบบ คือ (1) เก็บตัวอย่างโดยไม่ได้แช่เยือกแข็งเซลล์แต่เซนตริฟิวจ์แยกเอาอาหารออกและล้างเซลล์ทันที และ (2) เก็บตัวอย่างเซลล์พร้อมอาหารนำไปแช่เยือกแข็งทันทีที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเซนตริฟิวจ์แยกเอาอาหารออกและล้างเซลล์เช่นเดียวกับการเก็บตัวอย่างในวิธีแรก แล้วศึกษาการผลิตสควอลีน

8. <u>การศึกษาการผลิตสควอลีนในอาหารเหลวกากน้ำตาลของยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ</u>

ศึกษาการผลิตสควอลีนของยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 5 โดยใช้ถังหมักแบบถังกวน (stirred tank fermentor) ขนาด 5 ลิตร (5L Microferm; NewBrunwick, USA) ทำการเตรียมกล้าเชื้อตามวิธีในข้อ 3.1.1. เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีองค์ประกอบที่เหมาะสมตามที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.1.1 - 5.1.3 โดยไม่เติมเทอร์บินาฟีนและเติมเทอร์บินาฟีนความเข้มข้นที่เหมาะสมซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 6 และสภาวะที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.2.1 - 5.2.3 ปริมาตร 3 ลิตร ใน

ระหว่างการเพาะเลี้ยงทำการกวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที และให้อากาศ 1 vvm เป็นเวลา 30 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก ๆ 3 ชั่วโมง (เก็บตัวอย่าง 2 ซ้ำในแต่ละการทดลอง) โดยทำการเก็บตัวอย่างมาทำศึกษา 2 แบบเช่นเดียวกับข้อ 7 เพื่อวัดการเจริญ พีเอชของอาหาร และการผลิตสควอลีน

9. <u>การวัดการเจริญ</u>

9.1 การวัดความขุ่นของเซลล์

โดยนำเซลล์ยีสต์ที่แยกได้หลังการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น แล้ววัดความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-1600/1700; UV-VIS Spectrophotometer; Shimadzu, Japan)

9.2. การหาน้ำหนักแห้งของเซลล์

กรองตัวอย่างที่มีเซลล์แขวนลอยผ่านแผ่นกรองเมมเบรนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิลิตร ที่มีขนาดรูกรอง 0.45 ไมโครเมตร โดยแผ่นกรองเมมเบรนชั่งหาน้ำหนักไว้ก่อนใช้ แล้วนำแผ่นกรองเมมเบรนใส่ในจานเพาะเชื้อ อบที่ 105 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง นำไปเก็บในโถดูดความชื้น (dessicator) จนอุณหภูมิลดลงจนถึงระดับอุณหภูมิห้อง แล้วนำไปชั่งน้ำหนักแผ่นกรองเมมเบรนและจานเพาะเชื้อ เมื่อนำเซลล์แขวนลอยที่เตรียมได้มากรองผ่านแผ่นกรองเมมเบรน ล้างเซลล์บนแผ่นกรองเมมเบรนด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ๆ ละ 50 มิลลิลิตร ใช้ปากคีบนำแผ่นกรองออกจากชุดกรองใส่กลับลงในจานเพาะเชื้อเดิม นำไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง นำไปเก็บในโถดูดความชื้นจนอุณหภูมิลดลงจนถึงระดับอุณหภูมิห้อง แล้วนำไปชั่งหาน้ำหนักรวมของเซลล์แห้ง แผ่นกรองเมมเบรน และจานเพาะเชื้อ (วิเชียร, 2542) และนำค่าที่ได้ไปคำนวณตามสูตร

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)} = \frac{Wf - Wi}{V} \times 1000$$

โดยที่ Wf = น้ำหนักของเซลล์แห้ง แผ่นกรองเมมเบรน และจานเพาะเชื้อ (กรัม)

Wi = น้ำหนักแผ่นกรองเมมเบรน และจานเพาะเชื้อ (กรัม)

V = ปริมาตรตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

9.3 การหาน้ำหนักแห้งของเซลล์จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งกับความขุ่นของเซลล์

โดยเตรียมเซลล์แขวนลอยแล้วเจือจางให้มีค่าความขุ่นในช่วง 0.05 - 0.50 จากนั้นวัดความขุ่นของเซลล์ตามวิธีในข้อ 9.1 และหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ตามวิธีในข้อ 9.2 แล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งกับความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร จากนั้นหาน้ำหนักแห้งของเซลล์จากค่าความขุ่นของเซลล์ โดยเทียบค่าความขุ่นของเซลล์กับกราฟที่ได้

9.4 การนับจำนวนเซลล์ยีสต์ทั้งหมดโดยตรง (direct total count)

นำฮีมาไซโตมิเตอร์ (Heamacytometer; Improved Neubauer) และกระจกปิดสไลด์มาทำความสะอาด จากนั้นวางกระจกปิดสไลด์ให้อยู่ตรงกลางสไลด์ นำตัวอย่างจากข้อ 9.1 ผสมกับสีเมทิลลีนบูล (methylene blue) ทิ้งไว้ประมาณ 1 - 2 นาที แล้วใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดสารละลายตัวอย่างมาแตะที่ขอบของกระจกปิดสไลด์ ปล่อยให้สารละลายตัวอย่างแทรกไประหว่างกระจกปิดสไลด์และสไลด์จนเต็มพอดี แล้วนับจำนวนเซลล์ทั้งหมดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X โดยนับจำนวนเซลล์ทั้งหมด คือ ถ้าเซลล์ไม่ติดสีน้ำเงินแสดงว่ายังคงมีชีวิตอยู่ และเซลล์ที่ติดสีน้ำเงินแสดงว่าเป็นเซลล์ที่ตายแล้ว โดยทำการนับเซลล์ที่อยู่ในพื้นที่ช่องใหญ่ (5 x 5 = 25 ช่องใหญ่) และเซลล์ที่อยู่คาบเส้นในทั้ง 4 ด้าน โดยนับแบบแทยงซ้ายขวารวมทั้งหมด 9 ช่องใหญ่ แล้วนำมาคำนวณดังนี้

ขนาดพื้นที่ 1 ช่องใหญ่ของฮีมาไซโตมิเตอร์เท่ากับ 0.2 x 0.2 = 0.04 ตารางมิลลิเมตร

ความลึกของฮีมาไซโตมิเตอร์ที่ใช้เท่ากับ 0.1 มิลลิเมตร

ดังนั้นฮีมาไซโตมิเตอร์ที่ใช้มีปริมาตรแต่ละช่องใหญ่เท่ากับ 0.04 x 0.1 = 0.004 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

y คือ ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ทั้งหมดที่นับได้จาก 9 ช่องใหญ่รวมกัน

จำนวนเซลล์ทั้งหมดต่อมิลลิลิตร = $(y /0.004) \times 10^3 \times$ ระดับความเจือจางที่ใช้

10. <u>การวิเคราะห์สควอลีน</u>

10.1 การเตรียมตัวอย่าง นำตัวอย่างปริมาตร 20 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร 2 ครั้ง แล้วนำเซลล์ที่ได้ไปสกัดไขมันในขั้นต่อไป

10.2 การสกัดไขมันเพื่อวิเคราะห์สควอลีนโดยใช้วิธีที่ปรับปรุงจากวิธีของ Bligh and Dyer (1959) ซึ่งขั้นตอนการสกัดมีดังนี้ นำตัวอย่างจากข้อ 10.1 มาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ โดยเติมสารละลายคลอโรฟอร์มผสมเมทานอล (อัตราส่วน 1:2) 3.75 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันนาน 1 นาที โดยใช้ vortex mixer แล้วเติมคลอโรฟอร์ม 1.25 มิลลิลิตรลงไป เขย่าต่อ 1 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่น 1.25 มิลลิลิตร เขย่าประมาณ 15 วินาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เกิดการตกตะกอนของเซลล์และการแยกชั้นของสารละลาย เก็บชั้นคลอโรฟอร์มแยกใส่หลอดขนาดเล็ก (vial) ซึ่งมีฝาปิดที่ภายในเคลือบด้วยสารเทฟลอน เพื่อป้องกันการระเหยของตัวทำละลาย จากนั้นนำไปวิเคราะห์สควอลีนในขั้นต่อไป

10.3 การวิเคราะห์สควอลีนด้วยวิธี Thin-layer chromatography (TLC)

10.3.1 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC โดยการนำตัวอย่างจากข้อ 10.2 ไประเหยแห้งใน vacuum oven ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 - 5 ชั่วโมง จนเหลือไขมันแห้งติดก้นหลอด จากนั้นเติมเฮกเซน 200 ไมโครลิตร เพื่อละลายไขมัน เขย่าให้เข้ากันก่อนจากนั้นนำไปตรวจหาปริมาณสควอลีนด้วยวิธี TLC ต่อไป

10.3.2 การวิเคราะห์สควอลีนด้วยวิธี TLC โดยใช้แผ่นซิลิกาเจล (Siliga gel $60F_{254}$; Merck, Germany) ขนาด 20 x 20 เซนติเมตร จากนั้นเตรียมสควอลีนมาตรฐานความเข้มข้น 0.005 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) แล้ว spot สควอลีนมาตรฐานและตัวอย่าง โดยใช้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร โดยทำการ spot ห่างจากขอบล่าง 1.5 เซนติเมตร และแต่ละจุดที่ spot นั้นห่างกัน 1 เซนติเมตร รอจนแห้ง แล้วนำแผ่น TLC ใส่ในถัง TLC ที่มีเฮกเซนซึ่งเป็น developing solvent ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แช่ไว้จนกระทั่ง developing solvent เคลื่อนที่ไปจนถึงเส้นซึ่งห่างจากขอบบน 1 เซนติเมตร หลังจากนั้นนำแผ่น TLC ออกจากถัง นำไปจุ่มลงในสารละลายผสมของกรดซัลฟูริกเข้มข้น น้ำ และเมทานอล (อัตราส่วน 1:1:18 โดยปริมาตร) และนำไปอบที่อุณหภูมิ 120 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยถ้าตัวอย่างมีสควอลีนอยู่บนแผ่น TLC จะปรากฏเป็นจุดสีน้ำตาล โดยจะต้องอยู่ในระดับเดียวกันกับสารละลายสควอลีนมาตรฐานความเข้มข้น 0.005 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) (Leber *et al*., 1995) รายงานผลตามความเข้มของจุดสีน้ำตาลที่ปรากฏกับสควอลีนมาตรฐานความเข้มข้น 0.005 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ดังนี้

+3 คือ ให้จุดสีน้ำตาลเข้ม หมายถึง มีการสะสมควอลีนปริมาณมาก
+2 คือ ให้จุดสีน้ำตาล หมายถึง มีการสะสมควอลีนปริมาณปานกลาง
+1 คือ ให้จุดสีน้ำตาลอ่อน หมายถึง มีการสะสมควอลีนปริมาณน้อย
- คือ ไม่พบจุดสีน้ำตาล หมายถึง ไม่มีการสะสมสควอลีน

10.4 การวิเคราะห์ปริมาณสควอลีนด้วยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC)

10.4.1 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC โดยนำตัวอย่างจากข้อ 10.2 ไประเหยแห้งใน vacuum oven ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 - 5 ชั่วโมง จนเหลือไขมันแห้งติดก้นหลอด จากนั้นเติมคลอโรฟอร์มผสมเมทานอล (อัตราส่วน 2:1) ลงไป 200 ไมโครลิตร เพื่อละลายไขมัน เขย่าให้เข้ากันก่อน จากนั้นนำไปตรวจหาปริมาณสควอลีนด้วยวิธี HPLC ต่อไป

10.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณสควอลีน โดยใช้เครื่อง High performance liquid chromatography (Series 200 Ic Pump; Perkin Elmer, USA) คอลัมน์ XDB-C18 (Eclipse 5 μm, 4.6 x 150 mm, USA) และ 785A UV/VIS Detector (Perkin Elmer, USA) (ที่ความยาวคลื่น 205 นาโนเมตร) mobile phase ประกอบด้วย เมทานอล 2-โพรพานอล และกรดแอซีติก (อัตราส่วน 91.95:8:0.05 โดยปริมาตร) ปริมาตรที่ฉีด 20 ไมโครลิตร อัตราการไหลคงที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และเตรียมสควอลีนมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยใช้ตัวทำละลายคลอโรฟอร์มผสมเมทานอล (อัตราส่วน 2:1) เช่นเดียวกันกับที่เติมลงในตัวอย่าง เพื่อทำกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสควอลีนมาตรฐานและพื้นที่พีค (peak area) ที่วิเคราะห์ได้

ผลและวิจารณ์

1. การเก็บตัวอย่างเพื่อแยกยีสต์

เก็บตัวอย่าง ดิน ผลไม้ ดอกไม้ ยางไม้ เห็ด และมอส จากป่าบริเวณสถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช สถานีฝึกวิจัยนิสิตวนศาสตร์วังน้ำเขียว และศูนย์รวบรวมพันธุกรรมพันธุ์ไม้เฉลิมพระเกียรติ ร. 9 อำเภอวังน้ำเขียว และดินบริเวณเขื่อนลำพระเพลิง อำเภอปักธงชัย จังหวัดนครราชสีมา รวมจำนวน 75 ตัวอย่าง ดังรายละเอียดในตารางที่ 5

2. การแยกยีสต์

นำตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 75 ตัวอย่างมาทำการแยกยีสต์โดยวิธี enrichment ในอาหารเหลว YM ที่เติมคลอแรมฟีนิคอลและโซเดียมโพรพิโอเนต และปรับพีเอชเป็น 3.7 - 3.8 บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง สามารถแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 248 ไอโซเลต ดังรายละเอียดในตารางที่ 5

3. การคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่สะสมสควอลีนได้สูง

3.1 การคัดเลือกขั้นแรก

นำยีสต์ที่แยกได้จำนวน 248 ไอโซเลต มาทำการคัดเลือกไอโซเลตที่มีการสะสมสควอลีนในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเซลล์ไปสกัดไขมันโดยใช้วิธีที่ปรับปรุงมาจากวิธีการของ Bligh and Dyer (1959) และนำไขมันที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์หาสควอลีนด้วยวิธี Thin-layer chromatography (TLC) ตรวจจุดสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นบนแผ่น TLC โดยถ้าจุดน้ำตาลที่เกิดขึ้นอยู่ในระดับเดียวกับจุดสีน้ำตาลที่เกิดจากสควอลีนมาตรฐานความเข้มข้น 0.005 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) แสดงว่าจุดสีน้ำตาลที่ปรากฏนั้นเป็นสควอลีน และแสดงว่าไอโซเลตนั้นสะสมสควอลีนภายในเซลล์ (ภาพที่ 5)