



ภาพที่ 5 ผลการวิเคราะห์สควอลีนที่สะสมของยีสต์บางไอโซเลต โดยวิธี Thin-layer chromatography (TLC) บนแผ่นซิลิกาเจล 60F₂₅₄ ที่ใช้เฮกเซนเป็น developing solvent และตรวจหาสควอลีนโดยแช่ในสารละลายผสมของกรดซัลฟูริกเข้มข้น น้ำ และเมทานอล (อัตราส่วน 1:1:18 โดยปริมาตร) แล้วนำไปอบที่ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (ก) สควอลีนมาตรฐานความเข้มข้น 0.005 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ($R_f = 0.46$) ให้จุดสีน้ำตาลเข้ม (+3) (ข) ไอโซเลตที่มีการสะสมสควอลีนระดับต่าง ๆ คือ SK12 (+3), SK108 (+2), SK37 (+3), SK14 (+1) และ SK81 (-)

ตารางที่ 6 การสะสมสควอลีนของยีสต์ 248 ไอโซเลต ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบ ต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำเซลล์มาสกัดไขมันและตรวจหาสควอลีนด้วยวิธี Thin-layer chromatography

ไอโซเลต	ความเข้มของจุดสี	ไอโซเลต	ความเข้มของจุดสี	ไอโซเลต	ความเข้มของจุดสี	ไอโซเลต	ความเข้มของจุดสี
SK1	-	SK28	-	SK55	-	SK82	+3
SK2	-	SK29	-	SK56	-	SK83	+3
SK3	-	SK30	-	SK57	+3	SK84	-
SK4	-	SK31	-	SK58	+3	SK85	-
SK5	-	SK32	-	SK59	-	SK86	-
SK6	-	SK33	-	SK60	-	SK87	-
SK7	-	SK34	-	SK61	-	SK88	-
SK8	-	SK35	-	SK62	-	SK89	-
SK9	-	SK36	-	SK63	-	SK90	-
SK10	-	SK37	-	SK64	+1	SK91	-
SK11	-	SK38	-	SK65	-	SK92	-
SK12	+3	SK39	+3	SK66	+3	SK93	-
SK13	-	SK40	-	SK67	-	SK94	-
SK14	+1	SK41	-	SK68	-	SK95	-
SK15	-	SK42	-	SK69	-	SK96	-
SK16	-	SK43	-	SK70	-	SK97	-
SK17	-	SK44	-	SK71	-	SK98	-
SK18	-	SK45	-	SK72	-	SK99	+1
SK19	-	SK46	-	SK73	+1	SK100	-
SK20	-	SK47	-	SK74	-	SK101	-
SK21	-	SK48	-	SK75	-	SK102	-
SK22	+3	SK49	-	SK76	-	SK103	-
SK23	+1	SK50	-	SK77	-	SK104	-
SK24	-	SK51	-	SK78	-	SK105	-
SK25	-	SK52	-	SK79	-	SK106	-
SK26	-	SK53	-	SK80	-	SK107	+3
SK27	-	SK54	-	SK81	-	SK108	+2

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ไอโซเลต	ความเข้ม ของจุดสี	ไอโซเลต	ความเข้ม ของจุดสี	ไอโซเลต	ความเข้ม ของจุดสี	ไอโซเลต	ความเข้ม ของจุดสี
SK109	+1	SK139	-	SK169	+1	SK199	-
SK110	+3	SK140	-	SK170	-	SK200	-
SK111	-	SK141	-	SK171	-	SK201	-
SK112	-	SK142	-	SK172	-	SK202	-
SK113	-	SK143	-	SK173	-	SK203	-
SK114	-	SK144	-	SK174	-	SK204	+2
SK115	-	SK145	-	SK175	-	SK205	-
SK116	-	SK146	-	SK176	+2	SK206	-
SK117	-	SK147	-	SK177	-	SK207	-
SK118	-	SK148	-	SK178	-	SK208	-
SK119	+1	SK149	-	SK179	-	SK209	-
SK120	-	SK150	-	SK180	-	SK210	-
SK121	-	SK151	-	SK181	-	SK211	-
SK122	-	SK152	-	SK182	-	SK212	-
SK123	-	SK153	-	SK183	-	SK213	-
SK124	-	SK154	-	SK184	-	SK214	-
SK125	+1	SK155	-	SK185	-	SK215	-
SK126	-	SK156	-	SK186	-	SK 216	-
SK127	-	SK157	-	SK187	-	SK217	-
SK128	+1	SK158	-	SK188	-	SK218	-
SK129	+1	SK159	-	SK189	-	SK219	-
SK130	-	SK160	-	SK190	-	SK220	-
SK131	+2	SK161	-	SK191	-	SK221	-
SK132	-	SK162	-	SK192	-	SK222	-
SK133	-	SK163	-	SK193	+3	SK223	-
SK134	-	SK164	-	SK194	-	SK224	-
SK135	-	SK165	-	SK195	-	SK225	-
SK136	-	SK166	-	SK196	+3	SK226	-
SK137	-	SK167	+1	SK197	-	SK227	-
SK138	-	SK168	+1	SK198	-	SK228	-

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ไอโซเลต	ความเข้มข้น ของจุดสี	ไอโซเลต	ความเข้มข้น ของจุดสี	ไอโซเลต	ความเข้มข้น ของจุดสี	ไอโซเลต	ความเข้มข้น ของจุดสี
SK229	-	SK234	-	SK239	-	SK244	-
SK230	-	SK235	-	SK240	-	SK245	+2
SK231	-	SK236	-	SK241	-	SK246	-
SK232	-	SK237	-	SK242	-	SK247	-
SK233	-	SK238	-	SK243	-	SK248	-

หมายเหตุ +3 คือ ให้จุดสีน้ำตาลเข้ม หมายถึง มีการสะสมควอลินปริมาณมากเท่ากับสควอลินมาตรฐานความเข้มข้น 0.005 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)
+2 คือ ให้จุดสีน้ำตาล หมายถึง มีการสะสมควอลินปริมาณปานกลาง
+1 คือ ให้จุดสีน้ำตาลอ่อน หมายถึง มีการสะสมควอลินปริมาณน้อย
- คือ ไม่พบจุดสีน้ำตาล หมายถึง ไม่มีการสะสมสควอลิน

จากผลการทดลองพบว่ามีอีสต์จำนวน 12 ไอโซเลตที่ให้จุดสีน้ำตาลเข้มปริมาณมากใกล้เคียงสควอลินมาตรฐานความเข้มข้น 0.005 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งถือว่ามี การสะสมสควอลินปริมาณมาก (+3) ได้แก่ ไอโซเลต SK12, SK22, SK37, SK57, SK58, SK66, SK82, SK83, SK107, SK110, SK193 และ SK196 ส่วนไอโซเลตที่ให้จุดสีน้ำตาล ซึ่งจัดว่าสะสมสควอลินปริมาณปานกลาง (+2) จำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ SK108, SK131, SK176, SK205 และ SK245 และ ไอโซเลตที่ให้จุดสีน้ำตาลอ่อน (+1) ซึ่งถือว่ามี การสะสมสควอลินปริมาณน้อยจำนวน 13 ไอโซเลต คือ SK14, SK23, SK64, SK73, SK99, SK109, SK119, SK125, SK128, SK129, SK167, SK168 และ SK169 ในขณะที่ไอโซเลตที่ไม่พบการสะสมสควอลินมีจำนวนทั้งหมด 218 ไอโซเลต (ตารางที่ 6)

จากผลการทดลองดังกล่าวจึงได้คัดเลือกอีสต์ทุกไอโซเลตที่มีการสะสมสควอลินภายในเซลล์ เพื่อคัดเลือกในขั้นที่สองต่อไป

3.2 การคัดเลือกขั้นที่สอง

นำยีสต์ที่พบว่ามี การสะสมสควอลินจำนวน 30 ไอโซเลตที่ได้จากการคัดเลือกขั้นแรก ยีสต์สายพันธุ์เดิม 51 และสายพันธุ์กลาย UV51-2NTG2 ซึ่งได้จากการกลายพันธุ์สายพันธุ์เดิม 51 สองครั้งด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตและ N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) และเป็นสายพันธุ์ที่เคยมีรายงานว่ามีการสะสมสควอลินได้สูง (อุทัยพร, 2547) โดยในวิทยานิพนธ์เล่มนี้ได้เปลี่ยนรหัสของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ใหม่ เป็นสายพันธุ์เดิม RV51 และสายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 ตามลำดับ มาศึกษาปริมาณสควอลินที่สะสม โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บรรจุในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัดการเจริญโดยการหาน้ำหนักแห้งของเซลล์และเก็บเซลล์ไปสกัดไขมัน แล้ววิเคราะห์ปริมาณสควอลินโดยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC)

จากการทดลองพบว่ายีสต์ที่มีการสะสมสควอลินภายในเซลล์ปริมาณสูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมง คือ ยีสต์สายพันธุ์เดิม RV51 ซึ่งสะสมสควอลินเท่ากับ 827.9 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และสายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 มีการสะสมสควอลินเท่ากับ 826.4 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนยีสต์ที่คัดเลือกมาใหม่ทั้ง 30 ไอโซเลตนั้นพบว่ามี การสะสมสควอลินต่ำกว่าสายพันธุ์ทั้งสองมาก โดยไอโซเลตที่มีการสะสมสควอลินสูงในบรรดา 30 ไอโซเลต คือ SK66 และ SK193 มีการสะสมสควอลิน 72.6 และ 69.7 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ในขณะที่อีก 28 ไอโซเลตนั้นมีการสะสมสควอลินต่ำกว่ามาก คือ อยู่ในช่วง 3.9 - 45.0 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาพที่ 6ก)

เมื่อพิจารณาปริมาณของสควอลินที่สกัดจากเซลล์ยีสต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ปริมาตรเท่ากันที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ยีสต์สายพันธุ์เดิม RV51 และสายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 ยังคงผลิตสควอลินสูงเมื่อเทียบกับไอโซเลตอื่น ๆ โดยผลิตสควอลินเท่ากับ 2,897.8 และ 2,772.5 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ไอโซเลต SK66, SK193, SK108, SK83, SK110, SK57, SK109, SK82, SK131, SK125 และ SK128 ผลิตสควอลินต่ำกว่ามาก คือ เท่ากับ 403.0, 346.9, 285.0, 227.8, 198.3, 180.3, 172.0, 154.5, 141.5, 117.0, และ 100.8 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับยีสต์อีก 19 ไอโซเลตผลิตสควอลินในปริมาณที่ต่ำลงไปอีก คือ อยู่ในช่วง 19.5 - 87.5 ไมโครกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 6ข)