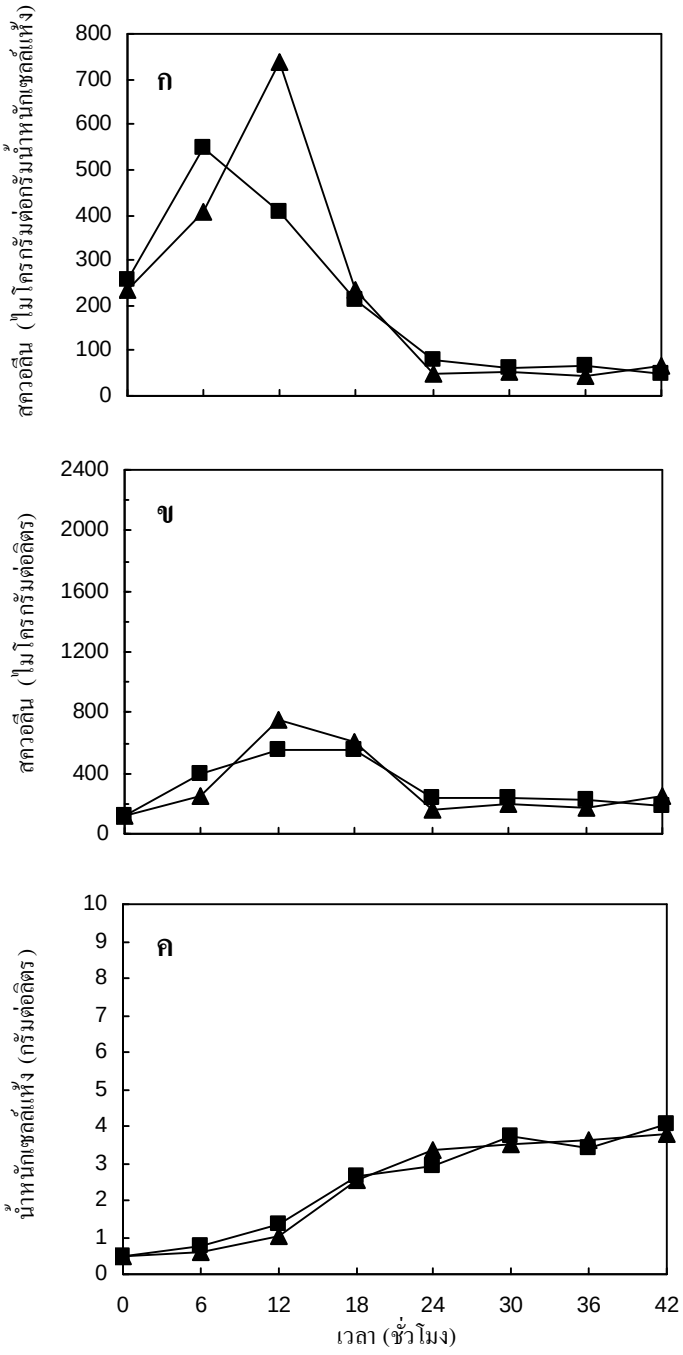
ส่วนการเจริญของยีสต์ทั้ง 30 ไอโซเลต ยีสต์สายพันธุ์เดิม RV51 และสายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 ที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่าไอโซเลต SK82 มีการเจริญสูงสุด คือ ให้เซลล์เท่ากับ 7.27 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร รองลงมาคือ SK58 และ SK125 ให้เซลล์เท่ากับ 7.24 และ 7.18 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนไอโซเลตที่ให้เซลล์อยู่ในช่วง 6.17 - 6.82 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร คือ SK109, SK108, SK129, SK83, SK245 และ SK128 ไอโซเลตที่ให้เซลล์อยู่ในช่วง 5.17 - 5.82 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร คือ SK131, SK169, SK167, SK66, SK110, SK205, SK169 และ SK196 สำหรับอีก 11 ไอโซเลตให้เซลล์อยู่ในช่วง 3.76 - 4.99 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ส่วนยีสต์สายพันธุ์เดิม RV51 และสายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 ให้เซลล์ค่อนข้างต่ำ คือ 3.50 และ 3.36 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ไอโซเลต SK22 และ SK23 มีการเจริญต่ำสุด คือ ให้เซลล์เท่ากับ 2.40 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ตามลำดับ ที่เวลา 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 6ค)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ายีสต์สายพันธุ์เดิม RV51 และสายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 เป็นสายพันธุ์ที่มีการสะสมสควอลีนในเซลล์ได้สูงกว่าไอโซเลตที่แยกและคัดเลือกมาใหม่มาก ดังนั้นจึงคัดเลือกยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์มาศึกษาปริมาณสควอลีนที่สะสม เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลซึ่งใช้เป็นซับสเตรตสำหรับการผลิตสควอลีนต่อไป

**4. <u>การคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่สะสมสควอลีนได้สูงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาล เพื่อใช้ในการผลิตสควอลีน</u>**

จากการนำยีสต์สายพันธุ์เดิม RV 51 และสายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 ที่มีการสะสมสควอลีนในเซลล์สูงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YPD มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 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 เก็บตัวอย่างทุก ๆ 6 ชั่วโมง โดยวัดการเจริญในรูปความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร และหาน้ำหนักแห้งของเซลล์จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งกับความขุ่นของเซลล์ นำเซลล์ไปสกัดไขมันและวิเคราะห์ปริมาณสควอลีนโดยวิธี HPLC พบว่า ยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 มีการสะสมสควอลีนเท่ากับ 739.6 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 12 ชั่วโมง ส่วนยีสต์สายพันธุ์เดิม RV51 สะสมสควอลีนเท่ากับ 549.3 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 6 ชั่วโมง (ภาพที่ 7ก)




ภาพที่ 7 การสะสมสควอลีนในเซลล์ (ก) การผลิตสควอลีน (ข) และการเจริญ (ค) ของยีสต์สายพันธุ์เดิม RV51 (■) และสายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 (▲) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 4.5 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 0.5 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ความเร็วการเขย่า 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

จากผลการทดลองพบว่ายีสต์ทั้งสองสายพันธุ์มีการสะสมสควอลีนสูงขึ้นที่เวลา 6 - 12 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะที่เชื้อเตรียมพร้อมเพื่อการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน ดังนั้นจึงมีการสร้างสควอลีน ซึ่งเป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์เออร์กอสเตรอลเพื่อเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้มีปริมาณสควอลีนสูงขึ้นในช่วงนี้ และภายหลังจากชั่วโมงที่ 6 - 12 พบว่าการสะสมสควอลีนของยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์ค่อย ๆ ลดปริมาณลง และเนื่องจากในการเพาะเลี้ยงครั้งนี้เป็นการเพาะเลี้ยงแบบมีออกซิเจน เชื้อจึงมีการเจริญตลอดเวลา ดังนั้นสควอลีนที่สร้างขึ้นจึงอาจถูกเปลี่ยนไปเป็นสเตรอลอื่น ๆ ต่อไปได้อย่างรวดเร็ว (Jahnke and Klein, 1983) จึงพบว่าสควอลีนมีปริมาณลดลงเป็นลำดับ

เมื่อพิจารณาปริมาณของสควอลีนที่สกัดจากเซลล์ยีสต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ปริมาตรเท่ากันพบว่า ยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 ผลิตสควอลีนปริมาณสูงสุด คือ 754.4 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง ส่วนยีสต์สายพันธุ์เดิม RV51 ผลิตสควอลีนเท่ากับ 552.3 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เวลา 18 ชั่วโมง (ภาพที่ 7ข)

ส่วนการเจริญของยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์นั้นพบว่ามีการเจริญใกล้เคียงกัน โดยยีสต์สายพันธุ์เดิมให้เซลล์เท่ากับ 4.03 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร และสายพันธุ์กลายให้เซลล์เท่ากับ 3.80 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ตามลำดับ ที่เวลา 42 ชั่วโมง (ภาพที่ 7ค)

จากผลการทดลองเนื่องจากยีสต์สายพันธุ์เดิม RV51 และสายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 มีการสะสมสควอลีนในเซลล์ปริมาณใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงได้นำยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์มาศึกษาองค์ประกอบของอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสควอลีนในอาหารเหลวกากน้ำตาลต่อไป

**5. <u>การศึกษาองค์ประกอบของอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสควอลีนในอาหารเหลวกากน้ำตาลของยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้</u>**

การศึกษาทำในอาหารเหลวกากน้ำตาล ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 1.0 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เป็นเวลา 60 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง วัดการเจริญในรูปความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร และหาน้ำหนักแห้งของเซลล์จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์

แห้งกับความขุ่นของเซลล์ นำเซลล์ไปสกัดไขมันและวิเคราะห์ปริมาณสควอลีนโดยวิธี HPLC ซึ่งองค์ประกอบของอาหารและสภาวะที่เชื้อมีการผลิตสควอลีน (สควอลีนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารปริมาตรเท่ากัน) สูงสุด คือ องค์ประกอบและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสควอลีน

5.1 องค์ประกอบของอาหาร

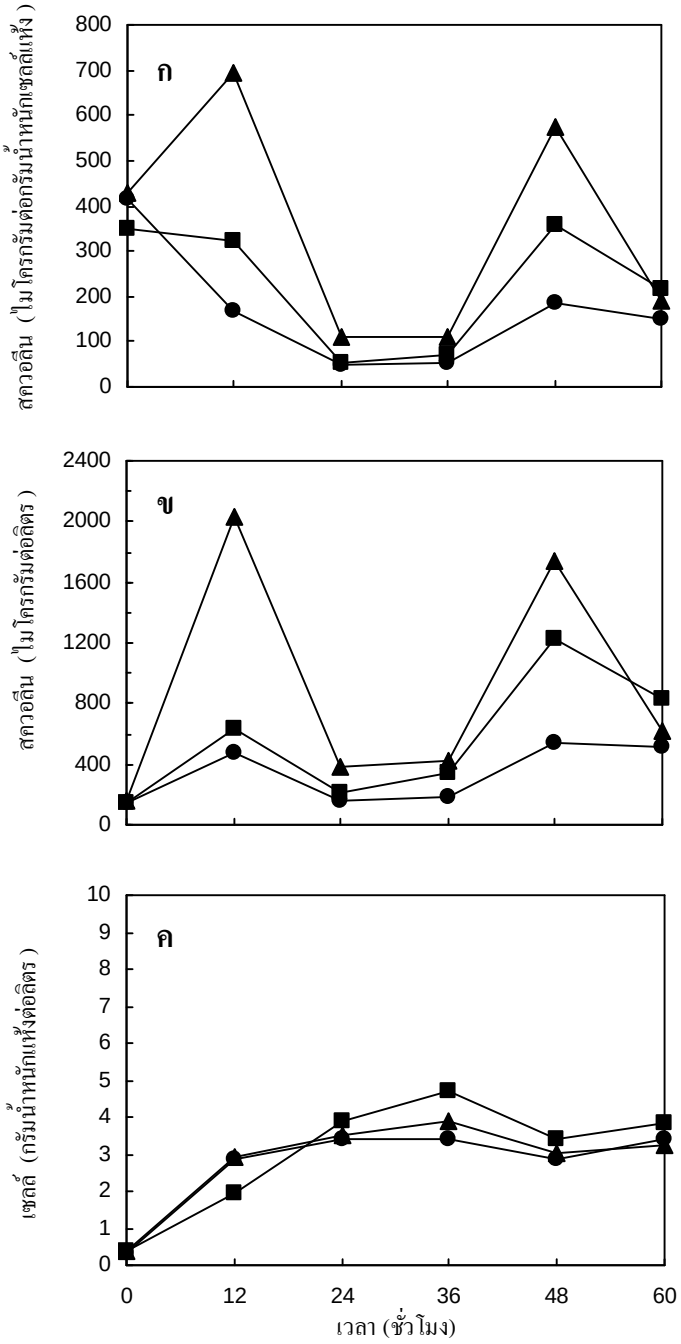
5.1.1 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

จากการนำยีสต์สายพันธุ์เดิม RV51 และสายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ และปรับพีเอชเป็น 4.5 บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์สายพันธุ์กลายมีการสะสมสควอลีนภายในเซลล์สูงกว่ายีสต์สายพันธุ์เดิม โดยเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ มีการสะสมสควอลีนสูงสุด คือ 693.8 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 12 ชั่วโมง ส่วนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ สะสมสควอลีนเท่ากับ 187.5 และ 358.0 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ ที่เวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์กลายในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ เชื้อมีการสะสมสควอลีนสูงขึ้น 2 ระยะ คือ ที่เวลา 12 และ 48 ชั่วโมง โดยระยะแรกที่เวลา 12 ชั่วโมงนั้นเป็นช่วงที่เชื้อมีการเตรียมพร้อมในการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนจึงมีการสร้างสควอลีนซึ่งเป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์เออร์กอสเตรอลเพื่อเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้พบการสะสมสควอลีนเพิ่มสูงขึ้น และภายหลังจากเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าเชื้อมีการสะสมสควอลีนลดลง อาจเนื่องมาจากสควอลีนที่สร้างขึ้นนั้นถูกเปลี่ยนไปเป็นเออร์กอสเตรอลจึงทำให้สควอลีนมีปริมาณลดลง และที่เวลา 48 ชั่วโมงกลับพบว่ามีการสะสมสควอลีนในเซลล์สูงขึ้นอีกครั้ง ซึ่งอาจอธิบายได้ว่า เมื่อเชื้อเจริญจนถึงระยะสเตชันนารี (stationary phase) เชื้อมีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนน้อยลง ดังนั้นสารตัวกลาง คือ สควอลีนไม่ถูกเปลี่ยนไปเป็นเออร์กอสเตรอล จึงเป็นผลให้เชื้อมีการสะสมสควอลีนภายในเซลล์สูงขึ้นอีกครั้งที่เวลา 48 ชั่วโมง หรืออีกเหตุผลหนึ่งอาจเป็นไปได้ว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง ปริมาณไนโตรเจนที่มีอยู่ในอาหารเหลวกากน้ำตาลทั้ง 3 ความเข้มข้นนั้นมีปริมาณจำกัด และเมื่อพิจารณาการเจริญก็พบว่าที่เวลา 48 ชั่วโมงเชื้อมีการเจริญเพิ่มจำนวนลดลงด้วยเช่นกัน ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าเชื้ออาจใช้แหล่งคาร์บอนคือน้ำตาลในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เหลืออยู่เปลี่ยนเป็นลิพิดและเออร์กอสเตรอล

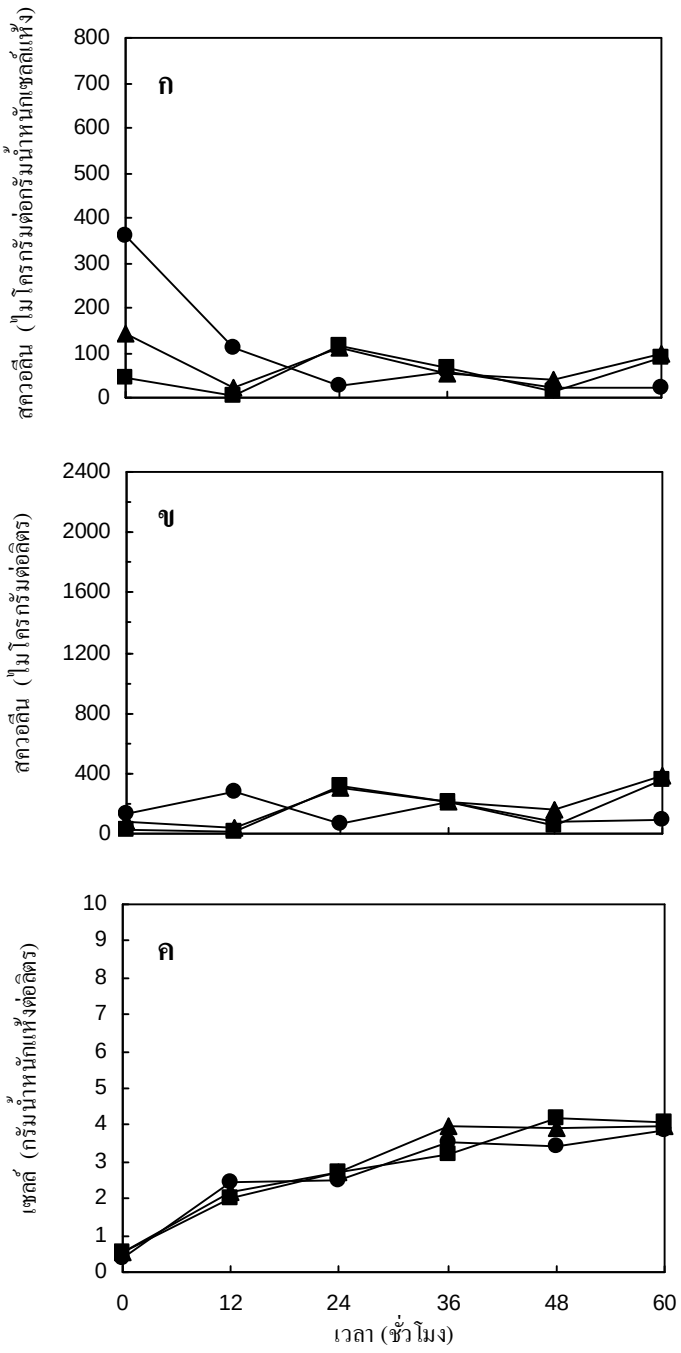
ได้โดยตรง จึงทำให้พบสควอลีนซึ่งเป็นสารตัวกลางมีปริมาณสูงขึ้นอีกครั้ง และการที่หลังจาก 48 ชั่วโมง เชื้อกลับมีการสะสมสควอลีนลดลงอีกครั้ง อาจเป็นเพราะว่าน้ำตาลในอาหารเริ่มหมดลง ซึ่งเชื้อยังคงมีการเจริญอยู่แต่ค่อนข้างต่ำ ดังนั้นจึงทำให้พบการสร้างสควอลีนซึ่งเป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์เออร์กอสเตรอลเพื่อเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ลดลงตามไปด้วย ในขณะที่ยีสต์สายพันธุ์เดิมเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ เชื้อมีการสะสมสควอลีนในเซลล์ใกล้เคียงกัน คือ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ สะสมสควอลีน 116.6 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 12 ชั่วโมง ส่วนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ มีการสะสมสควอลีนเท่ากับ 113.0 และ 115.2 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ที่เวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 8ก และ 9ก) และเมื่อพิจารณาการสะสมสควอลีนภายในเซลล์ที่เวลา 0 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณที่สูงเกินความเป็นจริงเนื่องจากมีปริมาณเซลล์เริ่มต้นต่ำมาก ทำให้การคำนวณค่าการสะสมสควอลีนต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งนั้นมีค่าสูงตามไปด้วย ดังนั้นจึงไม่พิจารณาถึงปริมาณสควอลีนที่เวลา 0 ชั่วโมง ในทุก ๆ การทดลอง

เมื่อพิจารณาการผลิตสควอลีนพบว่ายีสต์ทั้งสองสายพันธุ์ผลิตสควอลีนปริมาณสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ โดยยีสต์สายพันธุ์กลายผลิตสควอลีนสูงกว่าสายพันธุ์เดิม คือ ผลิตสควอลีนเท่ากับ 2,030.8 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง ในขณะที่สายพันธุ์เดิมผลิตสควอลีนเพียง 378.3 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เวลา 60 ชั่วโมง ส่วนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์สายพันธุ์กลายผลิตสควอลีนเท่ากับ 541.9 และ 1,224.4 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่เวลา 48 ชั่วโมง ในขณะที่สายพันธุ์เดิมผลิตสควอลีน 275.7 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง และ 358.6 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เวลา 60 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 8ข และ 9ข)

สำหรับผลของความเข้มข้นกากน้ำตาลที่มีต่อการเจริญของยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์ พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงขึ้นมีผลให้การเจริญของยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์สูงขึ้นเป็นลำดับ โดยเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 4 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์สายพันธุ์กลายให้เซลล์เท่ากับ 4.70 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ที่เวลา 36 ชั่วโมง และยีสต์สายพันธุ์เดิมให้เซลล์ 4.17 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง ในขณะที่ยีสต์สายพันธุ์กลายเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ให้เซลล์ 3.41 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง และ 3.87 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ที่เวลา 36 ชั่วโมง ตาม




ภาพที่ 8 การสะสมสควอลีนในเซลล์ (ก) การผลิตสควอลีน (ข) และการเจริญ (ค) ของยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2 (●), 3 (▲) และ 4 (■) เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 4.5 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 1.0 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ความเร็วการเขย่า 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส




<u>ภาพที่ 9</u> การสะสมสควอลีนในเซลล์ (ก) การผลิตสควอลีน (ข) และการเจริญ (ค) ของยีสต์สายพันธุ์เดิม RV51 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2 (●), 3 (▲) และ 4 (■) เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 4.5 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 1.0 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ความเร็วการเขย่า 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ลำดับ ส่วนสายพันธุ์เดิมให้เซลล์เท่ากับ 3.87 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ที่เวลา 60 ชั่วโมง และ 3.98 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ที่เวลา 36 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 8ค และ 9ค)

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์ในอาหารเหลวกากน้ำตาลเชื้อมีการเจริญค่อนข้างต่ำ โดยรายงานของ Dulaney *et al.* (1954) ได้ศึกษาการเจริญและการสร้างเออร์กอสเตรอลของ *S. cerevisiae* MY14 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 10 เปอร์เซ็นต์และเติมมอลโตสเปรียบเทียบกับเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ไม่เติมมอลโตส เป็นเวลา 7 วัน พบว่า *S. cerevisiae* MY14 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมมอลโตส เชื้อมีการเจริญสูงขึ้น คือ ให้เซลล์ถึง 15.16 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร แต่กลับมีระดับของเออร์กอสเตรอลภายในเซลล์ต่ำเพียง 0.79 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ในขณะเมื่อเพาะเลี้ยงที่อาหารเหลวกากน้ำตาลไม่เติมมอลโตส กลับพบว่า เชื้อมีการเจริญค่อนข้างต่ำ โดยให้เซลล์เพียง 2.93 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร แต่มีระดับของเออร์กอสเตรอลภายในเซลล์สูงกว่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีมอลโตสอยู่ คือ ให้เออร์กอสเตรอลสูงถึง 14.2 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งคณะผู้วิจัยพบว่าอาหารเหลวกากน้ำตาลปกติที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนอื่น ๆ นั้นช่วยเพิ่มผลผลิตของเออร์กอสเตรอลได้เป็นอย่างดี

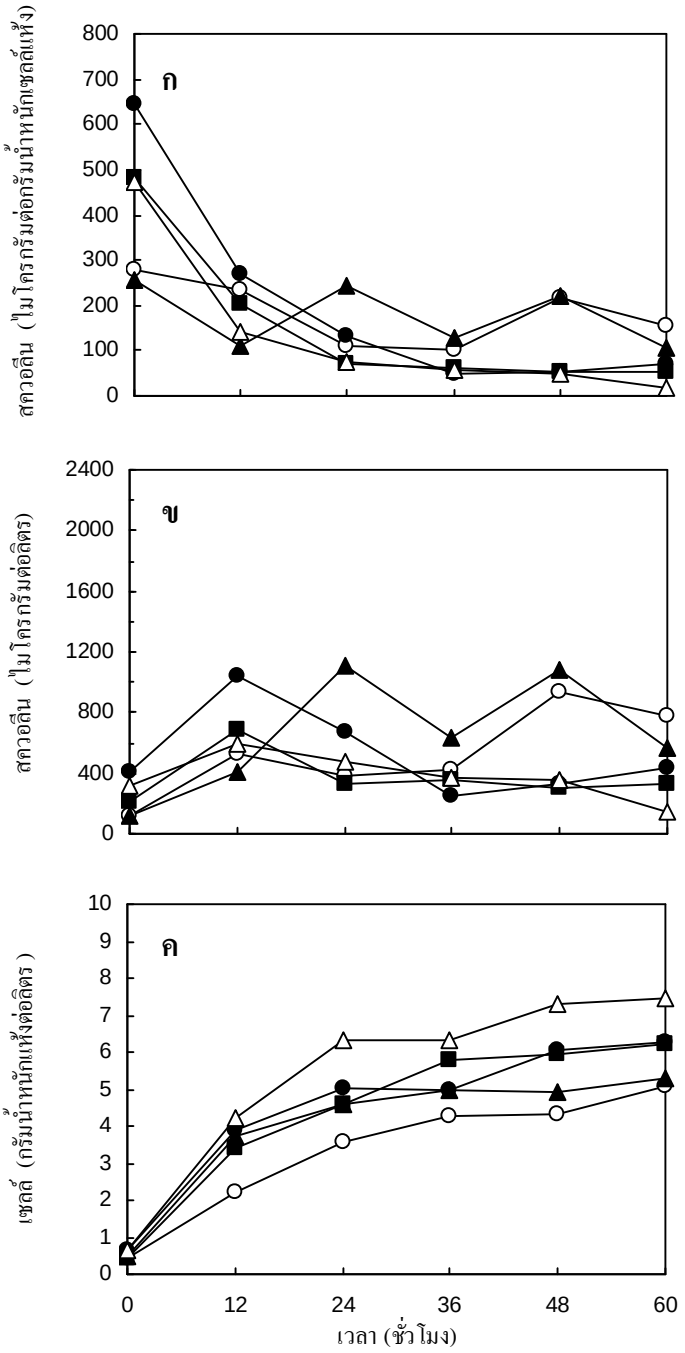
เมื่อพิจารณาผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์มีสควอลีนปริมาณสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ โดยยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 มีสควอลีนปริมาณสูงกว่าสายพันธุ์เดิม RV51 อย่างชัดเจน ดังนั้นจึงเลือกเฉพาะยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 และอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ไปใช้สำหรับการทดลองในขั้นต่อไป

5.1.2 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

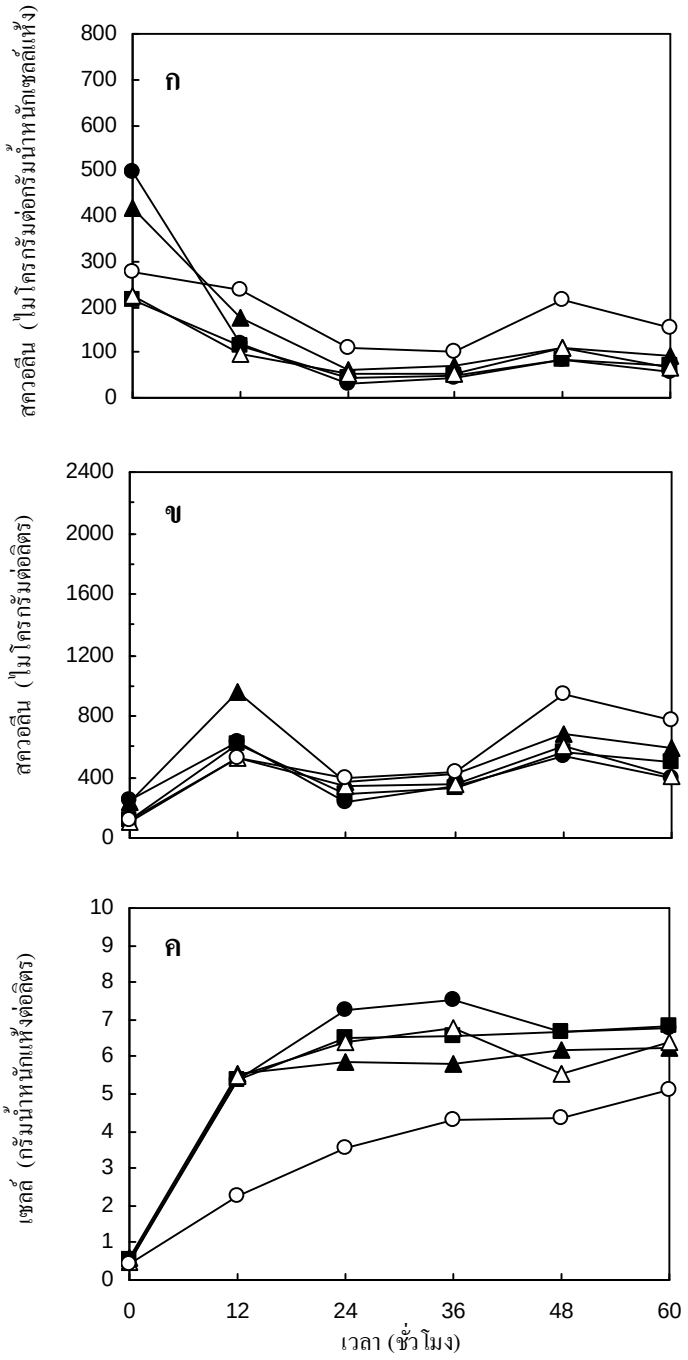
จากการนำยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ เติมแอมโมเนียมซัลเฟตหรือยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ และปรับพีเอชเป็น 4.5 บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า ยีสต์สายพันธุ์กลายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตมีการสะสมสควอลีนสูงกว่าในอาหารเหลวกาก

น้ำตาลที่เติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.15 เปอร์เซ็นต์ เชื้อมีการสะสมสควอลีนสูงสุดเท่ากับ 268.9 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 12 ชั่วโมง ส่วนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ เชื้อสะสมสควอลีน 243.7 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารกากน้ำตาลที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจนและที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.10 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ สะสมสควอลีนเท่ากับ 236.2, 201.2 และ 140.3 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ที่เวลา 12 ชั่วโมง ส่วนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้น 0.05, 0.10 และ 0.15 เปอร์เซ็นต์ เชื้อมีการสะสมสควอลีนเท่ากับ 173.9, 113.7 และ 116.8 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ที่เวลา 12 ชั่วโมง ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมยูเรีย 0.20 เปอร์เซ็นต์ เชื้อสะสมสควอลีนต่ำสุด 108.4 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 10ก และ 11ก)

ส่วนปริมาณสควอลีนที่สกัดจากเซลล์ยีสต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ปริมาตรเท่ากัน พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนผลิตสควอลีนปริมาณสูงกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ผลิตสควอลีนสูงสุด คือ 1,113.7 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง ส่วนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.15 เปอร์เซ็นต์ เชื้อมีการสะสมสควอลีนสูงกว่าเล็กน้อย แต่เชื้อสามารถผลิตสควอลีนได้ใกล้เคียงกัน คือ 1,046.0 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.10 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ เชื้อผลิตสควอลีนใกล้เคียงกัน คือ เท่ากับ 680.1 และ 588.0 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่เวลา 12 ชั่วโมง ส่วนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน เชื้อผลิตสควอลีนได้ค่อนข้างสูงแต่ต้องใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงนาน คือ 941.1 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน 0.05, 0.10 และ 0.15 เปอร์เซ็นต์ ผลิตสควอลีนเท่ากับ 961.5, 610.7 และ 629.6 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่เวลา 12 ชั่วโมง ส่วนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมยูเรีย 0.20 เปอร์เซ็นต์ ผลิตสควอลีนต่ำสุด 601.6 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 10ข และ 11ข)




ภาพที่ 10 การสะสมสควอลีนในเซลล์ (ก) การผลิตสควอลีน (ข) และการเจริญ (ค) ของยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0 (o), 0.05 (▲), 0.10 (■), 0.15 (●) และ 0.20 (Δ) เปอร์เซ็นต์ พีเอช 4.5 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 1.0 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ความเร็วการเขย่า 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส




ภาพที่ 11 การสะสมสควอลีนในเซลล์ (ก) การผลิตสควอลีน (ข) และการเจริญ (ค) ของยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0 (o), 0.05 (▲), 0.10 (■), 0.15 (●), 0.20 (Δ) เปอร์เซ็นต์ พีเอช 4.5 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 1.0 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ความเร็วการเขย่า 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

สำหรับผลของแหล่งไนโตรเจนที่เติมลงในอาหารเหลวกากน้ำตาลต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตเชื้อมีการเจริญต่ำกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ ให้เซลล์เท่ากับ 5.29, 6.23, 6.28 และ 7.47 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ตามลำดับ ที่เวลา 60 ชั่วโมง ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจนให้เซลล์ต่ำสุด คือ 5.09 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ที่เวลา 60 ชั่วโมง และเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนนั้นพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมยูเรีย 0.15 เปอร์เซ็นต์ ให้เซลล์สูงสุด 7.52 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ที่เวลา 36 ชั่วโมง ส่วนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมยูเรีย 0.05 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ ให้เซลล์เท่ากับ 6.21 และ 6.85 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ตามลำดับ ที่เวลา 60 ชั่วโมง ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมยูเรีย 0.20 เปอร์เซ็นต์ ให้เซลล์ 6.78 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ที่เวลา 36 ชั่วโมง (ภาพที่ 10ค และ 11ค)

เมื่อพิจารณาการผลิตสควอลีนของยีสต์สายพันธุ์กลายพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมแหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมซัลเฟตหรือยูเรีย 0.05 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดของแหล่งไนโตรเจนทั้งสองชนิดที่ใช้ในการทดลองนี้ เชื้อผลิตสควอลีนได้สูงสุดเมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่น ๆ ของแหล่งไนโตรเจนชนิดเดียวกัน ในขณะที่เมื่อเติมแอมโมเนียมซัลเฟตหรือยูเรีย 0.20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดของแหล่งไนโตรเจนทั้งสองชนิดที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ พบว่า เชื้อผลิตสควอลีนได้ต่ำสุด ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ He *et al.* (2000) ซึ่งศึกษาผลของการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตหรือยูเรีย 0 – 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเหลวกลูโคสต่อการผลิตเออร์กอสเตรอลของยีสต์ลูกผสม YEH-56 ที่ได้จากการผสมระหว่างสายพันธุ์กลายของ *S. cerevisiae* YE244-28-55 และสายพันธุ์กลายของ *S. kluyveri* YE39-16-21 และพบว่าเมื่อใช้แอมเนียมซัลเฟตหรือยูเรียความเข้มข้นสูงขึ้นเชื้อมีเออร์กอสเตรอลปริมาณลดลงตามลำดับ สำหรับผลการทดลองครั้งนี้ยังพบว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนมีผลให้ยีสต์สายพันธุ์กลายมีการสะสมและผลิตสควอลีนสูงกว่าการใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน นอกจากนี้การที่พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์กลายในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน เชื้อมีการเจริญและผลิตสควอลีนได้ค่อนข้างสูงแต่ต้องใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงนาน ทั้งนี้น่าจะเนื่องจากในกากน้ำตาลมีแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญของยีสต์อยู่แล้วเพียงแต่มีปริมาณค่อนข้างต่ำดังเช่นผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาลที่รายงานโดยวิศัลย์ (2546) และอาจอธิบายได้ว่าในระยะแรกเชื้อใช้ไนโตรเจนที่มีอยู่ในอาหารเหลวกากน้ำตาลเพื่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ไนโตรเจนในอาหารเหลว

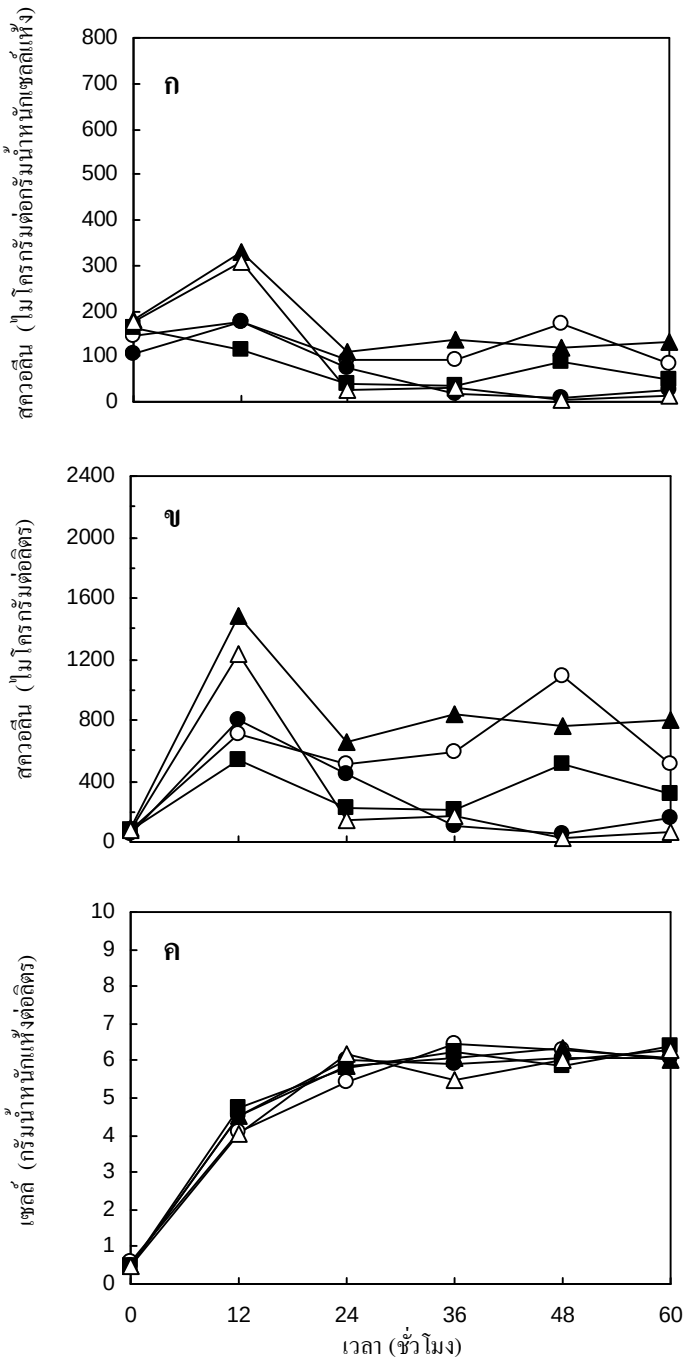
กากน้ำตาลมีปริมาณจำกัด เชื้อจึงเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวกากน้ำตาลเป็นเออร์กอสเตรอล เป็นผลให้ยีสต์มีการสะสมเออร์กอสเตรอลภายในเซลล์มากขึ้น ดังนั้นจึงทำให้มีการสร้างสควอลีนซึ่งเป็นสารตัวกลางในวิถีของการสังเคราะห์เออร์กอสเตรอลสูงขึ้น นอกจากนี้ Shang *et al.* (2006) ยังรายงานว่าการสะสมเออร์กอสเตรอลของยีสต์สูงขึ้นเมื่ออัตราการเจริญจำเพาะลดลง ซึ่งเมื่อพิจารณาการเจริญของยีสต์สายพันธุ์กลายในการทดลองครั้งนี้พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจนเชื้อมีการเจริญให้เซลล์ที่ต่ำกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมแหล่งไนโตรเจน ทั้งนี้ในทางปฏิบัติการใช้หรือทำให้ไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณจำกัด ในขณะที่ยังคงมีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอมีผลให้คาร์บอนถูกแอสซิมิเลตและถูกเปลี่ยนเป็นลิพิดได้โดยตรง ทั้งนี้เพราะไม่สามารถสังเคราะห์สารอื่นที่จำเป็นต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ เช่น โปรตีน และกรดนิวคลีอิก เนื่องจากแหล่งไนโตรเจนหมด (สาวิตรี, 2549)

ดังนั้นชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ทำให้ยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 ผลิตสควอลีนสูงสุด คือ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ จึงเลือกนำไปใช้สำหรับการทดลองในขั้นต่อไป

5.1.3 ความเข้มข้นของแหล่งฟอสฟอรัส

จากการนำยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ เติมไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($K_2HPO_4$) เป็นแหล่งฟอสฟอรัส ที่ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ และปรับพีเอชเป็น 4.5 บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ เชื้อมีการสะสมสควอลีนสูงสุดเท่ากับ 328.6 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 12 ชั่วโมง ส่วนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมแหล่งฟอสฟอรัสและที่เติมไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.10, 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ มีการสะสมสควอลีน 175.0, 115.0, 176.2 และ 305.8 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ที่เวลา 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 12ก)

ส่วนการผลิตสควอลีนของยีสต์สายพันธุ์กลายพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ เชื้อผลิตสควอลีนได้สูงสุด คือ 1,478.9 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง ส่วนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม




ภาพที่ 12 การสะสมสควอลีนในเซลล์ (ก) การผลิตสควอลีน (ข) และการเจริญ (ค) ของยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0 (o), 0.05 (▲), 0.10 (■), 0.15 (●) และ 0.20 (Δ) เปอร์เซ็นต์ พีเอช 4.5 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 1.0 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ความเร็วการเขย่า 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.10, 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ ผลิตสควอลีนเท่ากับ 543.9, 798.3 และ 1,229.1 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่เวลา 12 ชั่วโมง ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมแหล่งฟอสฟอรัสผลิตสควอลีนได้ค่อนข้างสูง คือเท่ากับ 1,083.3 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 12ข)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดของแหล่งฟอสฟอรัสที่ใช้ในการทดลองนี้ เชื้อมีการสะสมและผลิตสควอลีนสูงสุด โดยมีรายงานของ Schulze (1956) ที่ศึกษาผลของแหล่งฟอสฟอรัสต่ออัตราการผลิตไขมันของยีสต์ พบว่าการใช้ฟอสเฟตความเข้มข้นต่ำช่วยส่งเสริมการสังเคราะห์ไขมันได้เป็นอย่างดี

สำหรับผลของการเติมไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่มีต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์กลาย พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ไม่เติมแหล่งฟอสฟอรัสและเติมแหล่งฟอสฟอรัสเชื้อมีการเจริญไม่แตกต่างกันนัก โดยในอาหารที่ไม่เติมไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ให้เซลล์เท่ากับ 6.46 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ที่เวลา 36 ชั่วโมง ส่วนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ให้เซลล์เท่ากับ 6.33 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง ในขณะเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.10, 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ ให้เซลล์เท่ากับ 6.41, 6.09 และ 6.29 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ตามลำดับ ที่เวลา 60 ชั่วโมง (ภาพที่ 12ค)

ผลการศึกษาพบว่าแหล่งฟอสฟอรัสที่เหมาะสมต่อการผลิตสควอลีนของยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 คือ ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงเลือกไปใช้สำหรับการทดลองในขั้นต่อไป

## 5.2 สภาวะแวดล้อม

### 5.2.1 พีเอชเริ่มต้นของอาหาร

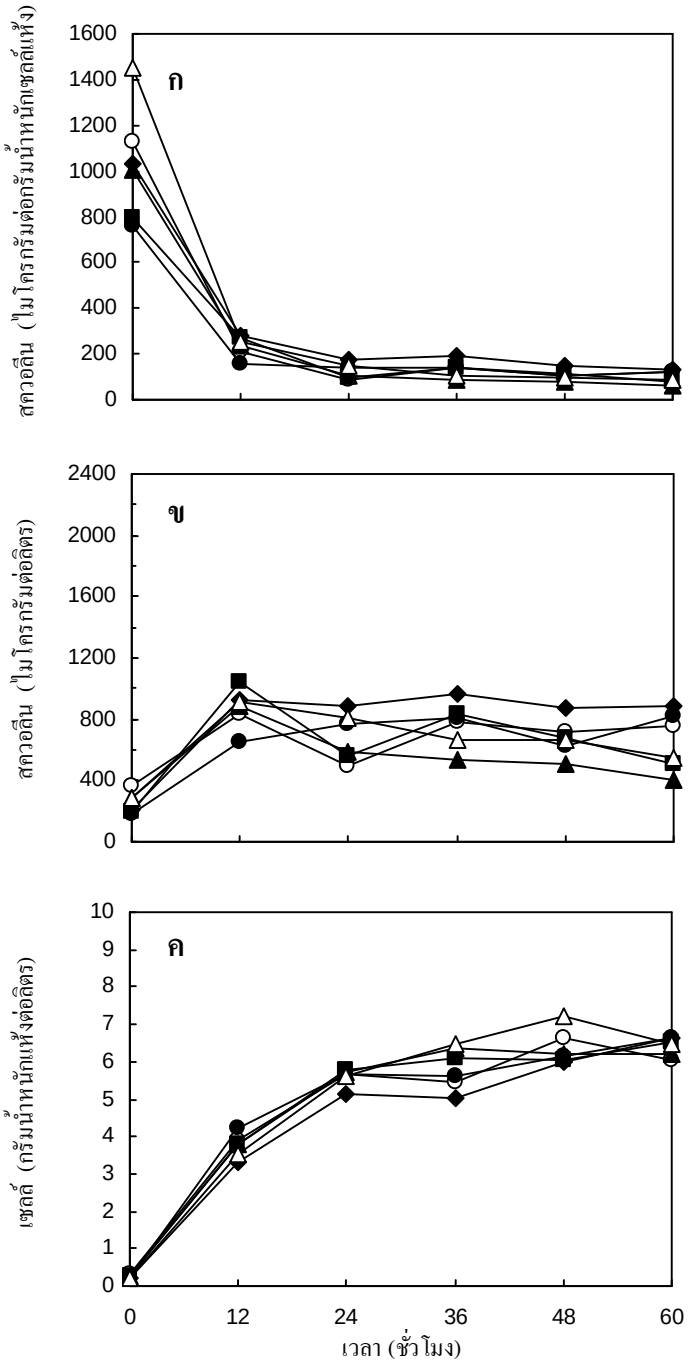
จากการนำยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจน

ฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5 และไม่ปรับพีเอช (พีเอช 5.23) โดยปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 1.0 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า ยีสต์สายพันธุ์กลายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีพีเอชเริ่มต้น 5.0 และ 6.0 มีการสะสมสควอลีนสูงใกล้เคียงกัน คือ 272.8 และ 279.8 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ที่เวลา 12 ชั่วโมง ส่วนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีพีเอชเริ่มต้น 4.5, 5.5, 6.5 และไม่ปรับพีเอช เชื้อสะสมสควอลีนเท่ากับ 232.8, 153.7, 256.5 และ 213.0 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ที่เวลา 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 13ก)

สำหรับการผลิตสควอลีนของยีสต์สายพันธุ์กลายเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ปรับพีเอชเริ่มต้น 5.0 พบว่า มีการผลิตสควอลีนสูงสุดเท่ากับ 1,042.0 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง ส่วนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่ปรับพีเอชและพีเอชเริ่มต้น 4.5 เชื้อผลิตสควอลีน 834.8 และ 882.4 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่เวลา 12 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 5.5 ผลิตสควอลีน 816.1 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เวลา 60 ชั่วโมง ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 6.0 ผลิตสควอลีน 962.2 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เวลา 36 ชั่วโมง และเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ผลิตสควอลีน 907.8 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 13ข)

เมื่อพิจารณาพีเอชเริ่มต้นของอาหารต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์กลายพบว่า การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีพีเอชเริ่มต้นสูงขึ้นการเจริญสูงขึ้นตามลำดับ โดยเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ซึ่งเป็นพีเอชเริ่มต้นสูงสุดในการทดลองครั้งนี้ เชื้อมีการเจริญสูงสุด คือ ให้เซลล์เท่ากับ 7.22 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่ปรับพีเอช และปรับพีเอชเริ่มต้น 4.5 - 6.0 ให้เซลล์ไม่แตกต่างกันมากนัก คือ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่ปรับพีเอชให้เซลล์เท่ากับ 6.61 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง ส่วนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่พีเอชเริ่มต้น 4.5 ให้เซลล์ 6.34 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ที่เวลา 36 ชั่วโมง และเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 5.0, 5.5 และ 6.0 ให้เซลล์เท่ากับ 6.51, 6.61 และ 6.64 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ตามลำดับ ที่เวลา 60 ชั่วโมง และ (ภาพที่ 13ค)

จากผลการทดลองพบว่ายีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 4.5, 5.5, 6.0, 6.5 และไม่ปรับพีเอช ผลิตสควอลีนปริมาณค่อนข้างใกล้เคียงกัน ยกเว้นในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 5.0 เท่านั้นที่เชื้อผลิตสควอลีนสูงกว่า




<u>ภาพที่ 13</u> การสะสมสควอลีนในเซลล์ (ก) การผลิตสควอลีน (ข) และการเจริญ (ค) ของยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 4.5 (▲), 5.0 (■), 5.5 (●), 6.0 (♦), 6.5 (Δ) และไม่ปรับพีเอช (พีเอช 5.23) (o) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 1.0 ความเร็วการเขย่า 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

พีเอชอื่น ๆ ซึ่งต่างจากการศึกษาของอุทัยพร (2547) ที่เพาะเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 ในอาหารเหลว YPD ที่มีพีเอชเริ่มต้น 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และไม่ปรับพีเอช (6.32) พบว่ายีสต์สายพันธุ์กลายมีการสะสมสควอลีนได้ต่ำเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอชในช่วง 4.5 - 5.5 แต่มีการสะสมสควอลีนได้สูงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอชอยู่ในช่วง 6.0 - 6.5 และเมื่อพิจารณาการเจริญในการทดลองครั้งนี้พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีพีเอชเริ่มต้นของอาหารสูงขึ้นการเจริญสูงขึ้นเป็นลำดับ ซึ่งไม่สอดคล้องกับผลการศึกษาของอุทัยพร (2547) ที่รายงานว่ายีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YPD ที่มีพีเอชเริ่มต้น 4.5 - 5.5 มีการเจริญดีกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 6.0 - 6.5 โดยอาหารเหลว YPD ที่มีพีเอชเริ่มต้น 5.5 มีการเจริญของเชื้อสูงสุด และจากรายงานของ Johnson *et al*. (1992) ที่ศึกษาการเจริญและการสะสมเออร์กอสเตรอลใน *Rhodotorula glutinis* IIP30 ที่เพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และมีไนโตรเจนปริมาณจำกัด ปรับพีเอชเท่ากับ 3, 4, 5 และ 6 พบว่า ที่พีเอช 3 เชื้อมีการเจริญให้เซลล์ต่ำสุดเท่ากับ 9.5 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร และมีเออร์กอสเตรอลปริมาณสูงสุดเท่ากับ 11.7 เปอร์เซ็นต์ของลิพิด ส่วนที่พีเอช 6 พบว่าให้เซลล์สูงกว่าคือ 15.3 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร แต่กลับมีเออร์กอสเตรอลต่ำสุด คือ 2.8 เปอร์เซ็นต์ของลิพิด

ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 ผลิตสควอลีนได้สูงสุด คือ พีเอชเริ่มต้น 5.0 ดังนั้นจึงเลือกพีเอชนี้ไปใช้สำหรับการทดลองในขั้นต่อไป

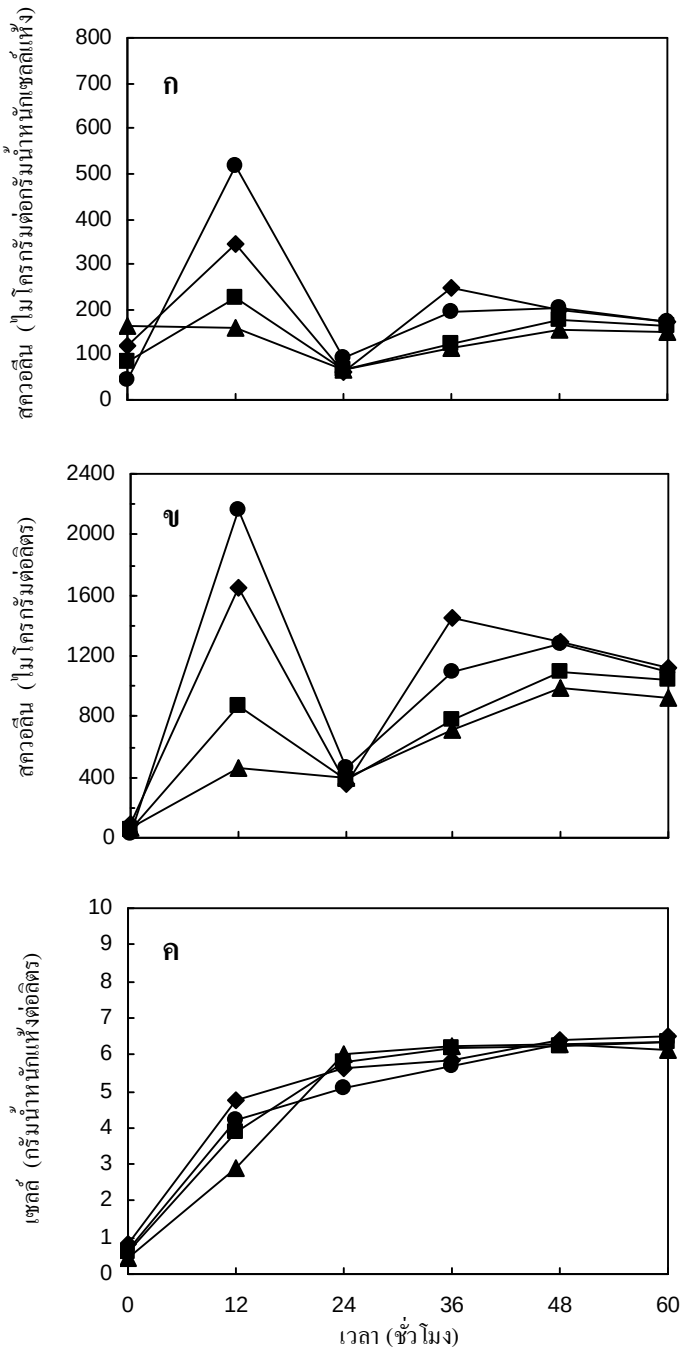
5.2.2 ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น

จากการนำยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ และปรับพีเอชเป็น 5.0 โดยปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 1.5 เชื้อมีการสะสมสควอลีนสูงสุดเท่ากับ 515.1 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 12 ชั่วโมง ในขณะที่เมื่อปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 0.5, 1.0 และ 2.0 เชื้อ

สะสมสควอลีนเท่ากับ 160.1, 226.4 และ 344.1 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ที่เวลา 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 14ก)

เมื่อพิจารณาการผลิตสควอลีนพบว่ายีสต์สายพันธุ์กลายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 1.5 ผลิตสควอลีนได้สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นอื่น ๆ โดยผลิตสควอลีนเท่ากับ 2,158.4 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง ส่วนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 2.0 ผลิตสควอลีนรองลงมา คือ 1,644.7 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 0.5 และ 1.0 ผลิตสควอลีนเท่ากับ 988.1 และ 1,091.1 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่เวลา 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 14ข) โดยจากรายงานของ Bhattacharjee *et al.* (2001) ที่ศึกษาการผลิตสควอลีนของ *S. cerevisiae* และ *Torulaspora delbrueckii* โดยเตรียมกล้าเชื้อด้วยการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีออกซิเจนเป็นเวลา 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* ผลิตสควอลีนเท่ากับ 1.89 ± 0.06 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์เปียก ที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งสูงกว่า *S. cerevisiae* ที่ผลิตสควอลีนเพียง 1.38 ± 0.06 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์เปียก ที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยคณะผู้วิจัยให้เหตุผลที่ไม่สามารถรายงานผลเป็นหน่วยมิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งได้นั้น เนื่องจากไม่สามารถกำจัดอาหารเหลวที่มีพาราฟินผสมอยู่ออกได้ทั้งหมด จึงต้องรายงานหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์เปียก และจากการทดลองพบว่า เมื่อใช้กล้าเชื้อ 1 - 5 เปอร์เซ็นต์สารอาหารต่าง ๆ ที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นมีเพียงพอต่อการเจริญและการผลิตสควอลีนของเชื้อในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนได้เป็นอย่างดี ในขณะที่เมื่อใช้กล้าเชื้อ 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์นั้น การเจริญอาจถูกยับยั้ง เนื่องจากเชื้อต้องใช้สารอาหารที่มีอยู่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเพื่อให้ยังคงรอดชีวิตอยู่ได้มากกว่าที่จะเป็นใช้เป็นแหล่งในการผลิตสควอลีน

สำหรับผลของความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นต่อการเจริญพบว่า ถึงแม้เพิ่มความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นให้สูงขึ้นการเจริญของยีสต์สายพันธุ์กลายก็ไม่แตกต่างกันมากนัก โดยเมื่อความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 1.0, 1.5 และ 2.0 ให้เซลล์เท่ากับ 6.36, 6.34 และ 6.48 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ตามลำดับ ที่เวลา 60 ชั่วโมง ในขณะที่เมื่อความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น




ภาพที่ 14 การสะสมสควอลีนในเซลล์ (ก) การผลิตสควอลีน (ข) และการเจริญ (ค) ของยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 5.0 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 0.5 (▲), 1.0 (■), 1.5 (●) และ 2.0 (♦) ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ความเร็วการเขย่า 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เท่ากับความขุ่น 0.5 ให้เซลล์ต่ำสุด คือ 6.30 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 14ค)

จากผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่ยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 ผลิตสควอลีนได้สูงสุด คือ ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 1.5 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ดังนั้นจึงเลือกไปใช้สำหรับการทดลองในขั้นต่อไป

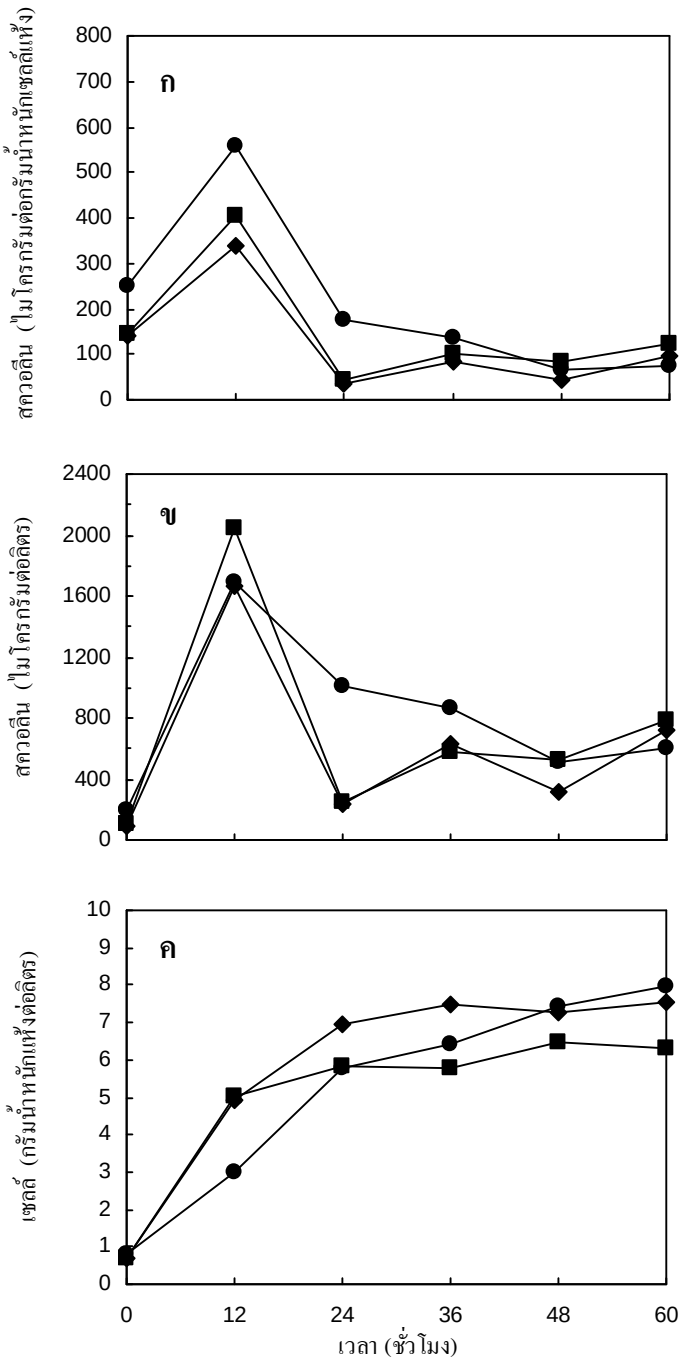
5.2.3 อุณหภูมิ

จากการนำยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ และปรับพีเอชเป็น 5.0 โดยความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 1.5 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25, 28 และ 30 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ยีสต์สายพันธุ์กลายมีการสะสมสควอลีนสูงสุดเท่ากับ 560.0 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 12 ชั่วโมง ในขณะที่เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 28 และ 30 องศาเซลเซียส เชื้อมีการสะสมสควอลีนใกล้เคียงกัน คือ 406.4 และ 339.9 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ที่เวลา 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 15ก)

ส่วนการผลิตสควอลีนของยีสต์สายพันธุ์กลายพบว่าเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เชื้อผลิตสควอลีนได้สูงสุดเท่ากับ 2,052.2 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง ในขณะที่เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณสควอลีนใกล้เคียงกัน คือ 1,691.0 และ 1,665.5 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่เวลา 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 15ข)

สำหรับผลของอุณหภูมิต่อการเจริญพบว่าเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ยีสต์สายพันธุ์กลายมีการเจริญสูงสุด โดยให้เซลล์เท่ากับ 7.98 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ที่เวลา 60 ชั่วโมง ในขณะที่เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 28 และ 30 องศาเซลเซียส ให้เซลล์ 6.47 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง และ 7.56 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ที่เวลา 60 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 15ค)

เมื่อพิจารณาการเจริญของยีสต์สายพันธุ์กลายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลและบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อมีการเจริญสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิ 28 และ 30 องศาเซลเซียส โดยสอดคล้องกับการศึกษาของอุทัยพร (2547) ที่รายงานว่ายีสต์สายพันธุ์




ภาพที่ 15 การสะสมสควอลีนในเซลล์ (ก) การผลิตสควอลีน (ข) และการเจริญ (ค) ของยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 5.0 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 1.5 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ความเร็วการเขย่า 100 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 25 (●), 28 (■) และ 30 (♦) องศาเซลเซียส

กลาย RV51-UV2-NTG2 มีการเจริญสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YPD และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

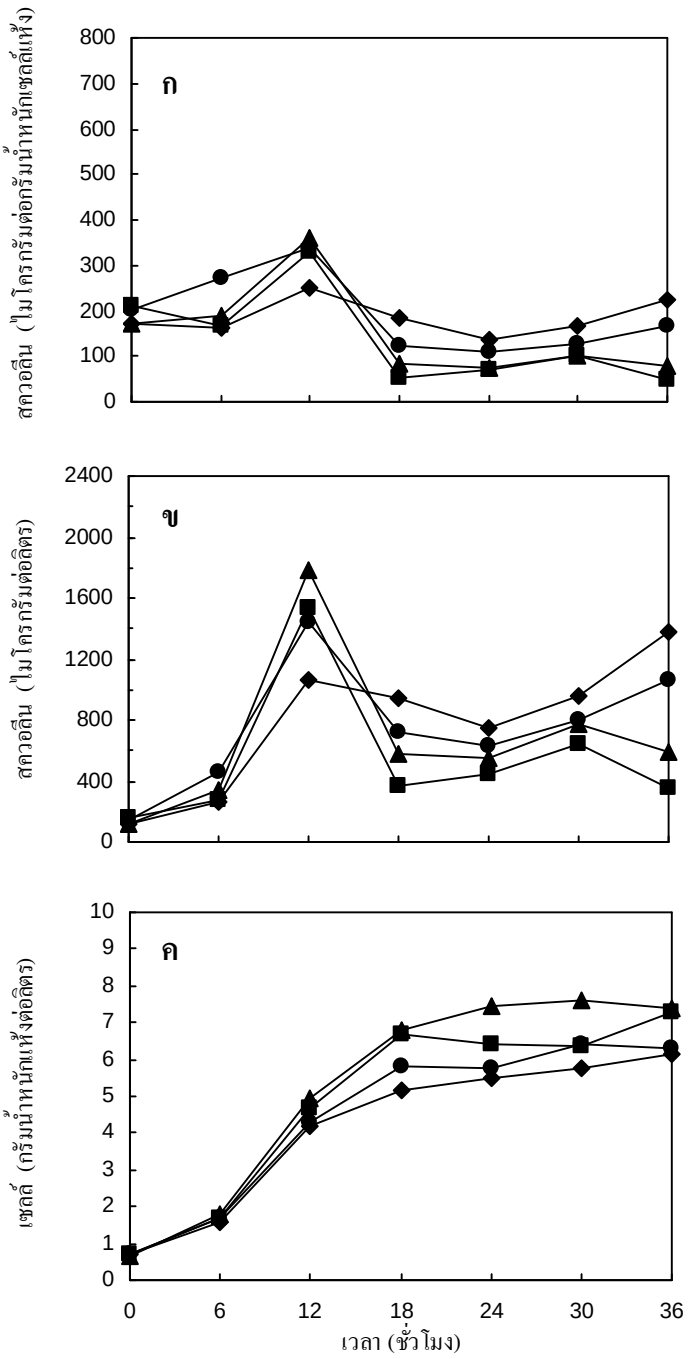
จากผลการทดลองพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสควอลีนของยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 คือ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมินี้ไปใช้สำหรับการทดลองในขั้นต่อไป

5.2.4 ปริมาตรอาหาร

ปริมาตรอาหารมีความสัมพันธ์กับปริมาณออกซิเจนที่ละลายลงในอาหาร คือ เมื่อปริมาตรอาหารเพิ่มขึ้นทำให้พื้นที่ผิวสัมผัสของอาหารกับออกซิเจนต่อปริมาตรอาหารลดลง เป็นผลให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายลงไปในอาหารลดลงด้วยเช่นกัน

จากการนำยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ และปรับพีเอชเป็น 5.0 โดยใช้อาหารปริมาตร 100, 150, 200 และ 250 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 1.5 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลปริมาตร 100 มิลลิลิตร เชื้อมีการสะสมสควอลีนสูงสุด คือ 360.6 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 12 ชั่วโมง ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาตร 150, 200 และ 250 มิลลิลิตร เชื้อสะสมสควอลีนเท่ากับ 329.0, 337.9 และ 252.1 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ที่เวลา 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 16ก)

ส่วนการผลิตสควอลีนของยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีปริมาตรอาหารเพิ่มขึ้นการผลิตสควอลีนลดลงตามลำดับ โดยเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลปริมาตร 100 มิลลิลิตร เชื้อผลิตสควอลีนสูงสุด คือ 1,784.9 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง ส่วนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารปริมาตร 150 และ 200 มิลลิลิตร เชื้อผลิตสควอลีนเท่ากับ 1,533.1 และ 1,446.3 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่เวลา 12 ชั่วโมง ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารปริมาตร 250 มิลลิลิตรผลิตสควอลีนต่ำสุด คือ 1,378.0 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เวลา 36 ชั่วโมง (ภาพที่ 16ข)




ภาพที่ 16 การสะสมสควอลีนในเซลล์ (ก) การผลิตสควอลีน (ข) และการเจริญ (ค) ของยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 5.0 โดยใช้อาหารปริมาตร 100 (▲), 150 (■), 200 (●) และ 250 (♦) มิลลิลิตร ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 1.5 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ความเร็วการเขย่า 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

สำหรับผลของปริมาตรอาหารที่มีต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์กลายพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีปริมาตรอาหารเพิ่มขึ้นการเจริญลดลงตามลำดับ คือ เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์กลายในอาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้เซลล์สูงสุดเท่ากับ 7.60 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ที่เวลา 30 ชั่วโมง ส่วนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารปริมาตร 150 และ 200 มิลลิลิตร ให้เซลล์เท่ากับ 7.29 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ที่เวลา 36 ชั่วโมง และ 6.43 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ที่เวลา 30 ชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารปริมาตร 250 มิลลิลิตร ให้เซลล์ต่ำสุด คือ 6.14 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ที่เวลา 36 ชั่วโมง (ภาพที่ 16ค)

จากผลการทดลองดังที่กล่าวมาในข้างต้นแสดงว่า เมื่อปริมาตรอาหารเพิ่มขึ้น ปริมาณออกซิเจนที่ละลายลงในอาหารลดลง เป็นผลให้ยีสต์สายพันธุ์กลายมีการเจริญลดลงตามลำดับ ซึ่งออกซิเจนนอกจากจะมีผลต่อการหายใจของยีสต์แล้วยังมีความจำเป็นสำหรับการสังเคราะห์ลิพิดที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญภายในเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของยีสต์ เช่น สเตรอล และกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (Jahnke and Klein, 1983) ดังนั้นเมื่อมีออกซิเจนลดลง ทำให้การสร้างสควอลีนที่เป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์เออร์กอสเตรอลเพื่อเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ลดลงตามไปด้วย แต่อย่างไรก็ตามหากมีออกซิเจนมากเกินไปการสังเคราะห์เออร์กอสเตรอลจะเกิดขึ้นมากจนไม่เหลือสควอลีนสะสม โดย He *et al.* (2000) ศึกษาการเจริญและการผลิตเออร์กอสเตรอลของยีสต์ลูกผสมสายพันธุ์ YEH-56 ที่ได้จากการผสมระหว่างยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* YE244-28-55 (a, leu) ที่ผลิตเซลล์ได้สูง และยีสต์สายพันธุ์กลาย *S. kluyveri* YE39-16-21 ($\alpha$, trp) ที่สะสมเออร์กอสเตรอลได้สูง โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Yeast extract peptone dextrose (YEPD) ที่มีอาหารปริมาตร 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ความเร็วการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง พบว่า เมื่ออาหารปริมาตรเพิ่มขึ้นมวลเซลล์ที่ได้ลดลงตามลำดับ โดยเมื่อใช้อาหารปริมาตร 60 มิลลิลิตร เชื้อผลิตเออร์กอสเตรอลสูงสุด นอกจากนี้ Li *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษาผลของออกซิเจนต่อการสะสมลิพิดภายในเซลล์ของ *Rhodosporidium toruloides* Y4 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YEPD ที่มีไนโตรเจนปริมาณจำกัด โดยใช้อาหารปริมาตร 25, 50, 75 และ 100 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ความเร็วการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่า เมื่อใช้อาหารปริมาตร 25 และ 50 มิลลิลิตร เชื้อสะสมลิพิดปริมาณใกล้เคียงกัน และยังพบว่าเมื่อใช้อาหารปริมาตรเพิ่มขึ้นการสะสมลิพิดลดลงเป็นลำดับ แสดงให้เห็นว่า *R. toruloides* ที่จัดเป็นยีสต์โอลีเอจินัสที่มีลิพิดภายในเซลล์สูง มีความต้องการออกซิเจนเพื่อส่งเสริมในกระบวนการสังเคราะห์ลิพิดภายในเซลล์

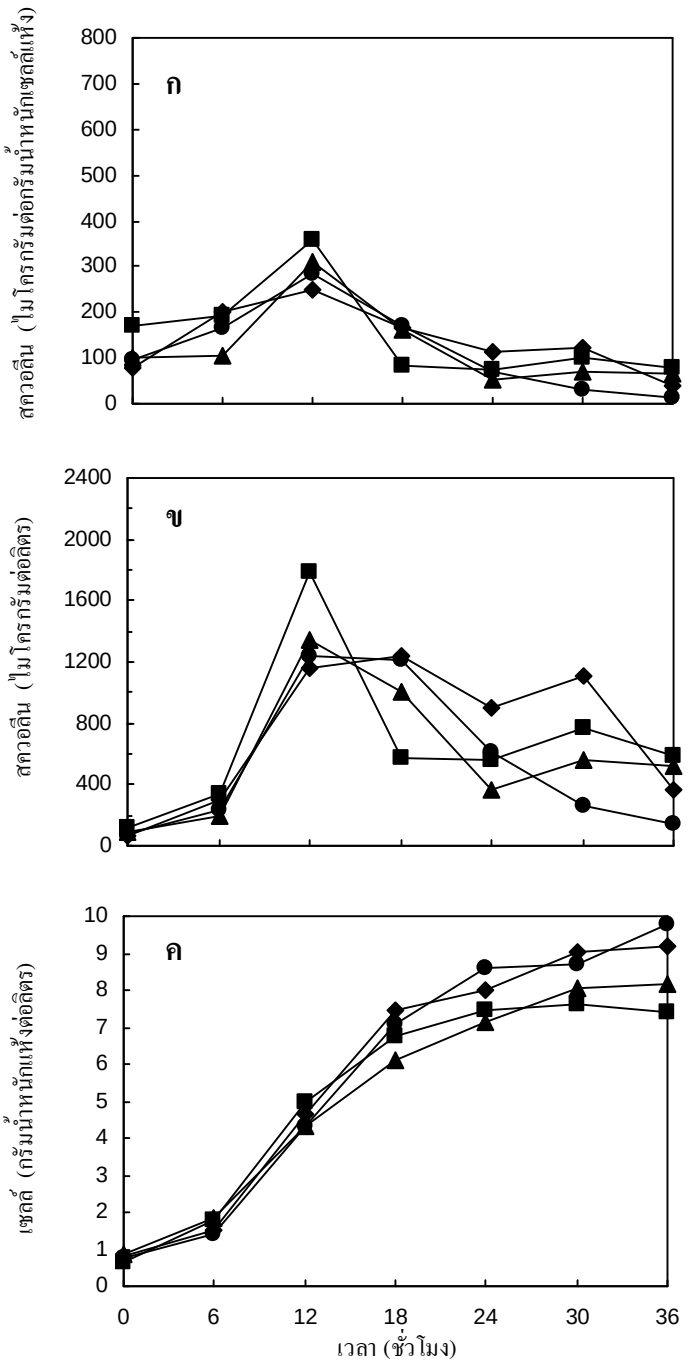
เมื่อพิจารณาปริมาตรอาหารที่ทำให้มีการผลิตสควอลีนของยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 สูงสุดคือ อาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร ดังนั้นจึงเลือกไปใช้สำหรับการทดลองในขั้นต่อไป

5.2.5 ความเร็วของการเขย่า

ความเร็วของการเขย่ามีผลต่อการกวนผสมของเชื้อกับอาหารและปริมาณออกซิเจน โดยเมื่อเพิ่มความเร็วของการเขย่านอกจากทำให้อาหารและเชื้อผสมกันได้ดีขึ้นแล้ว ยังเป็นการเพิ่มปริมาณออกซิเจนที่ละลายลงไปในอาหารให้สูงขึ้นด้วย

จากการนำยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ และปรับพีเอชเป็น 5.0 อาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 1.5 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 70, 100, 130 และ 160 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อใช้ความเร็วของการเขย่า 100 รอบต่อนาที ยีสต์สายพันธุ์กลายมีการสะสมสควอลีนสูงสุด คือ 360.6 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 12 ชั่วโมง ส่วนเมื่อใช้ความเร็วของการเขย่า 70 รอบต่อนาที เชื้อสะสมสควอลีนรองลงมาเท่ากับ 312.1 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 12 ชั่วโมง ในขณะที่เมื่อใช้ความเร็วของการเขย่า 130 และ 160 รอบต่อนาที เชื้อสะสมสควอลีนเท่ากับ 284.8 และ 248.9 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ที่เวลา 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 17ก)

เมื่อพิจารณาปริมาณสควอลีนทั้งหมดที่สกัดจากเซลล์ยีสต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ปริมาตรเท่ากันพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์กลายที่ความเร็วของการเขย่า 100 รอบต่อนาที เชื้อผลิตสควอลีนสูงสุดเท่ากับ 1,784.9 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง ในขณะเมื่อใช้ความเร็วของการเขย่า 70 รอบต่อนาที ให้สควอลีนรองลงมา คือ 1,342.2 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง ส่วนเมื่อเพาะเลี้ยงที่ความเร็วรอบของการเขย่า 130 และ 160 รอบต่อนาที เชื้อมีการผลิตสควอลีนใกล้เคียงกัน คือ 1,236.2 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง และ 1,242.1 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เวลา 18 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 17ข)




ภาพที่ 17 การสะสมสควอลีนในเซลล์ (ก) การผลิตสควอลีน (ข) และการเจริญ (ค) ของยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 5.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 1.5 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ความเร็วการเขย่า 70 (▲), 100 (■), 130 (●) และ 160 (♦) รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

สำหรับผลความเร็วของการเขย่าต่อการเจริญพบว่า เมื่อใช้ความเร็วของการเขย่า 130 รอบต่อนาที ยีสต์สายพันธุ์กลายมีการเจริญสูงสุด คือ ให้เซลล์ 9.77 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ที่เวลา 36 ชั่วโมง ส่วนเมื่อเพาะเลี้ยงที่ความเร็วของการเขย่า 160 รอบต่อนาที ให้เซลล์รองลงมา คือ 9.19 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ที่เวลา 36 ชั่วโมง ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงที่ความเร็วของการเขย่า 70 และ 100 รอบต่อนาที ให้เซลล์เท่ากับ 8.17 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ที่เวลา 36 ชั่วโมง และ 7.60 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ที่เวลา 30 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 17ค)

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อใช้ความเร็วของการเขย่า 100 รอบต่อนาที ยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 มีการผลิตสควอลีนสูงสุด และเมื่อใช้ความเร็วของการเขย่าสูงขึ้นสควอลีนลดลงเป็นลำดับ ที่เป็นเช่นนี้น่าจะเป็นเพราะการเพิ่มความเร็วของการเขย่าสูงขึ้นทำให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเพิ่มสูงขึ้นด้วย โดยออกซิเจนนั้นมีความจำเป็นสำหรับการสังเคราะห์สเตรอล ดังนั้นเมื่อมีออกซิเจนมาก ถึงแม้จะมีการสร้างสควอลีนมากแต่สควอลีนส่วนใหญ่ถูกเปลี่ยนเป็นสเตรอลอื่น ๆ ต่อไปทำให้สควอลีนมีปริมาณลดลง แต่ถ้าเชื้อเจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนทำให้เออร์กอสเตรอลมีปริมาณต่ำลง แต่มีการสะสมสควอลีนเพิ่มสูงขึ้น (Pfisterer *et al*., 1976) แต่จากผลการทดลองเห็นได้ว่า เมื่อใช้ความเร็วของการเขย่า 70 รอบต่อนาที ซึ่งเป็นความเร็วของการเขย่าที่ต่ำสุดของการทดลองครั้งนี้กลับพบว่ามีการผลิตสควอลีนที่ต่ำกว่าเมื่อใช้ความเร็วของการเขย่า 100 รอบต่อนาที ซึ่งเมื่อพิจารณาผลความเร็วของการเขย่าต่อการเจริญพบว่าการเจริญที่เวลา 12 ชั่วโมงเมื่อใช้ความเร็วของการเขย่า 70 รอบต่อนาทีให้เซลล์ต่ำกว่าเมื่อใช้ความเร็วของการเขย่า 100 รอบต่อนาที ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า เมื่อเชื้อมีการเจริญต่ำจึงเป็นผลให้การสร้างสควอลีนซึ่งเป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์เออร์กอสเตรอลเพื่อเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์มีปริมาณลดลงตามไปด้วย ซึ่งไม่สอดคล้องกับ Valero *et al.* (2001) ที่ศึกษาถึงอิทธิพลของออกซิเจนในระหว่างการหมักของ *S. cerevisiae* $M_3$30-9 ต่อการสังเคราะห์ลิพิดภายในเซลล์ พบว่า ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนนั้นมีการยับยั้งการสังเคราะห์สเตรอลเกิดขึ้นเป็นผลทำให้ระดับของเออร์กอสเตรอลภายในเซลล์ต่ำลง แต่ส่งผลให้พบการสะสมสควอลีนเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งสควอลีนที่ได้นี้สูงกว่าในการหมักในสภาวะที่มีออกซิเจนและกึ่งไม่มีออกซิเจนที่ระยะเวลาการหมักเดียวกัน

จากผลการทดลองพบว่าความเร็วของการเขย่าที่ทำให้ยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 มีการผลิตสควอลีนสูงสุด คือ ความเร็วของการเขย่า 100 รอบต่อนาที ดังนั้นจึงเลือกความเร็วรอบของการเขย่านี้ไปใช้สำหรับการทดลองในขั้นต่อไป

**6. <u>การศึกษาผลของเทอร์บินาฟีนต่อการสะสมสควอลีนในยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2</u>**

เทอร์บินาฟีน คือ ยาที่ใช้ต่อต้านเชื้อรา (antifungal) ที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้น ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีที่จัดอยู่ในกลุ่มของ allylamine (Novatis, 1999) โดยกลไกการต่อต้านเชื้อราของเทอร์บินาฟีนนั้นมีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อเอนไซม์ squalene epoxidase ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนสควอลีนไปเป็นสควอลีน-2,3-อีพอกไซด์ในวิถีของการสังเคราะห์เออร์กอสเตรอล ดังนั้นเมื่อเอนไซม์นี้ถูกยับยั้ง ทำให้มีการสะสมสควอลีนภายในเซลล์เพิ่มสูงขึ้น เป็นผลให้มีเออร์กอสเตรอลลดลง (Leber, 2001) ดังนั้นเพื่อเพิ่มการผลิตสควอลีน จึงได้ทดลองนำเทอร์บินาฟีนมาเติมลงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2

จากการนำยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 มาเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีองค์ประกอบเหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 5 คือ อาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ และเติมเทอร์บินาฟีน 0, 2.5, 5 และ 7.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงที่ได้จากการศึกษาในข้อ 5 คือ ปรับพีเอชเป็น 5.0 อาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 1.5 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์กลายในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมเทอร์บินาฟีน 7.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดของทดลองนี้ เชื้อมีการสะสมสควอลีนสูงสุดเท่ากับ 4,835.3 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 6 ชั่วโมง ส่วนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมเทอร์บินาฟีน 2.5 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีการสะสมสควอลีนใกล้เคียงกัน คือ 2,592.8 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 6 ชั่วโมง และ 2,292.0 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 12 ชั่วโมง ตามลำดับ คิดเป็นการสะสมสควอลีนภายในเซลล์เพิ่มขึ้นประมาณ 5 - 10 เท่าของเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมเทอร์บินาฟีน ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมเทอร์บินาฟีนนั้น เชื้อมีการสะสมสควอลีนต่ำสุดเพียง 452.9 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 18ก)

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์กลายในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมเทอร์บินาฟีนทำให้เชื้อมีการสะสมสควอลีนสูงสุดที่เวลา 6 ชั่วโมง โดยการสะสมสควอลีนสูงสุดนี้พบในเวลาที่เร็วกว่าและในปริมาณที่สูงกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมเทอร์บินาฟีนอย่างชัดเจน ซึ่งเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมเทอร์บินาฟีน ยีสต์สายพันธุ์กลายมีการสะสมสควอลีน

สูงสุดที่เวลา 12 ชั่วโมงและสะสมสควอลีนในปริมาณที่ต่ำกว่า ทั้งนี้เมื่อพิจารณาการเจริญของยีสต์สายพันธุ์กลายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมและไม่เติมเทอร์บินาฟีนที่เวลา 6 - 12 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้อมีการเตรียมพร้อมและเริ่มแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน จึงทำให้พบการสร้างสควอลีนซึ่งเป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์เออร์กอสเตรอลเพื่อเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ปริมาณสูงขึ้น ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า เมื่อเติมเทอร์บินาฟีนลงไปในอาหาร เทอร์บินาฟีนมีผลไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ squalene epoxidase ที่เร่งการเปลี่ยนสควอลีนไปเป็นสควอลีน-2,3-อีพอกไซด์ในวิถีของการสังเคราะห์เออร์กอสเตรอล ซึ่งเมื่อเอนไซม์นี้ถูกยับยั้งจึงทำให้สควอลีนเปลี่ยนไปเป็นสควอลีน-2,3-อีพอกไซด์ลดลง ทำให้มีการสะสมสควอลีนภายในเซลล์สูงขึ้น ในขณะที่การสังเคราะห์เออร์กอสเตรอลลดลง (Leber, 2001) ดังนั้นจึงพบว่ายีสต์สายพันธุ์กลายมีการสะสมสควอลีนสูงขึ้นอย่างรวดเร็วที่เวลา 6 ชั่วโมง ในขณะที่เมื่อไม่เติมเทอร์บินาฟีนลงไปในอาหารเชื้อมีการสะสมสควอลีนสูงขึ้นที่เวลา 12 ชั่วโมงเหมือนกับที่เคยพบในการทดลองที่ผ่าน ๆ มา

สำหรับการผลิตสควอลีนของยีสต์สายพันธุ์กลายเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมเทอร์บินาฟีน 2.5, 5 และ 7.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า เชื้อมีการผลิตสควอลีนไม่แตกต่างกันนัก โดยเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมเทอร์บินาฟีน 2.5 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีการผลิตสควอลีนเท่ากับ 10,268.1 และ 9,947.2 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่เวลา 12 ชั่วโมง ส่วนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมเทอร์บินาฟีน 7.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลิตสควอลีนเท่ากับ 11,057.6 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เวลา 18 ชั่วโมง คิดเป็นการเพิ่มขึ้นของสควอลีนประมาณ 5 เท่าของการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมเทอร์บินาฟีน ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมเทอร์บินาฟีน เชื้อมีการผลิตสควอลีนต่ำกว่ามาก คือ 2,056.3 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 18ข)

เมื่อพิจารณาผลของเทอร์บินาฟีนต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์กลายพบว่า ถึงแม้เพิ่มความเข้มข้นของเทอร์บินาฟีนให้สูงขึ้นการเจริญไม่ได้ลดต่ำลงมากนัก คือ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมเทอร์บินาฟีนให้การเจริญสูงสุด คือ ให้เซลล์ 8.16 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ที่เวลา 30 ชั่วโมง ส่วนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมเทอร์บินาฟีน 2.5 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้เซลล์เท่ากับ 7.50 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ที่เวลา 36 ชั่วโมง และ 7.85 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ที่เวลา 30 ชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมเทอร์บินาฟีน 7.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดของการทดลองครั้งนี้ มีการเจริญให้เซลล์ 7.74 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ที่เวลา 36 ชั่วโมง (ภาพที่ 18ค)