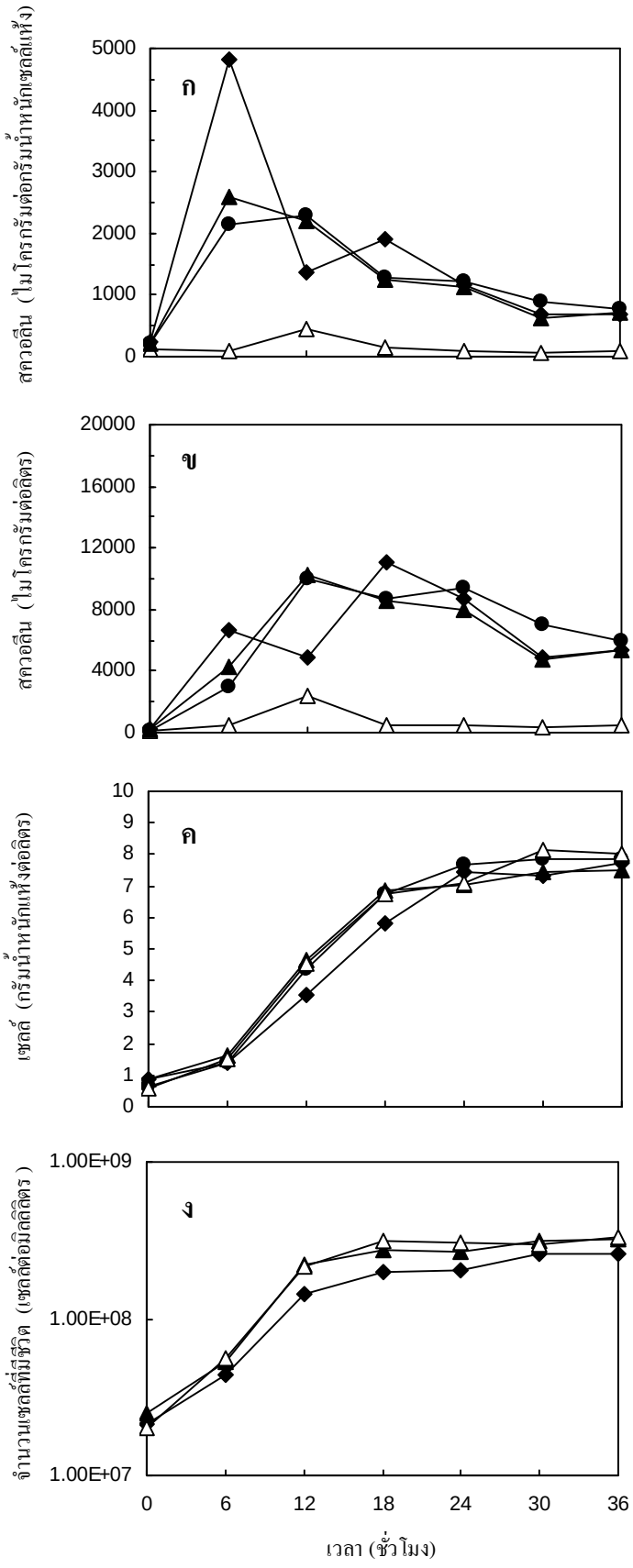

ก
ข
ค
ง
สควอลีน (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง)
สควอลีน (ไมโครกรัมต่อลิตร)
เซลล์ (กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร)
จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)
เวลา (ชั่วโมง)

ส่วนผลของเทอร์บินาฟีนต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของยีสต์สายพันธุ์กลายจากการทำ wet mount เซลล์ซัสเพนชันในสีเมทิลลีนบูล และนับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X ถ้าเซลล์ไม่ติดสีน้ำเงินแสดงว่ายังคงมีชีวิตอยู่ และเซลล์ที่ติดสีน้ำเงินแสดงว่าเป็นเซลล์ที่ตายแล้ว เมื่อทำการนับจำนวนเซลล์ทั้งหมด คือ เซลล์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต พบว่าเซลล์ที่นับได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เกือบทั้งหมดเป็นเซลล์ที่มีชีวิต นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ที่มีชีวิตส่วนใหญ่เป็นเซลล์ที่มีขนาดเซลล์เล็กกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมเทอร์บินาฟีน โดยเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมเทอร์บินาฟีน 7.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 2.59×10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 30 ชั่วโมง ซึ่งต่ำกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมเทอร์บินาฟีน 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ในที่นี้ไม่ได้แสดงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อเติมเทอร์บินาฟีน 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมเทอร์บินาฟีนและเติมเทอร์บินาฟีน 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 2.18×10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง และ 3.24×10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 36 ชั่วโมง (ภาพที่ 18ง) ซึ่งจากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของเทอร์บินาฟีนที่ใช้ในการทดลองในครั้งนี้มีผลเพียงยับยั้งการเจริญเท่านั้น แต่ไม่สามารถฆ่ายีสต์สายพันธุ์กลายให้ตายได้ ดังมีรายงานของ Ryder (1992) ที่ทดสอบผลของเทอร์บินาฟีนในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ squalene epoxidase ใน *Candida albicans* พบว่า เมื่อมีเทอร์บินาฟีนการเจริญของเชื้อถูกยับยั้ง เนื่องจากมีระดับของเออร์กอสเตรอลที่ต่ำลงและไม่เพียงพอต่อการพัฒนาของเยื่อหุ้มเซลล์

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าการเติมเทอร์บินาฟีนลงไปในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ใช้เพาะเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์กลายมีผลทำให้การสะสมสควอลีนภายในเซลล์เพิ่มขึ้นประมาณ 5 - 10 เท่าของเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมเทอร์บินาฟีน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Leber *et al.* (1995) ที่เพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* X2180-1A ในอาหารเหลวที่ไม่มีสเตรอล (sterol-free medium) และเติมเทอร์บินาฟีน 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่ามีการสะสมสควอลีนภายในอนุภาคลิพิดเท่ากับ 4.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเดียวกันที่ไม่เติมเทอร์บินาฟีนพบว่ามีสควอลีนภายในอนุภาคลิพิดเพียง 1.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมโปรตีน ต่อมา Leber *et al.* (2001) รายงานว่า *S. cerevisiae* A_2EZ475 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YPD และเติมเทอร์บินาฟีน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เซลล์มีการสะสมสควอลีนสูงถึง 14.9 ± 2.1 นาโนโมลต่อค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร คิดเป็นสควอลีนที่เพิ่มขึ้นถึง 100 เท่า

ของเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YPD ที่ไม่เติมเทอร์บินาฟีนที่มีการสะสมสควอลีนเพียง 0.14 ± 0.05 นาโนโมลต่อค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

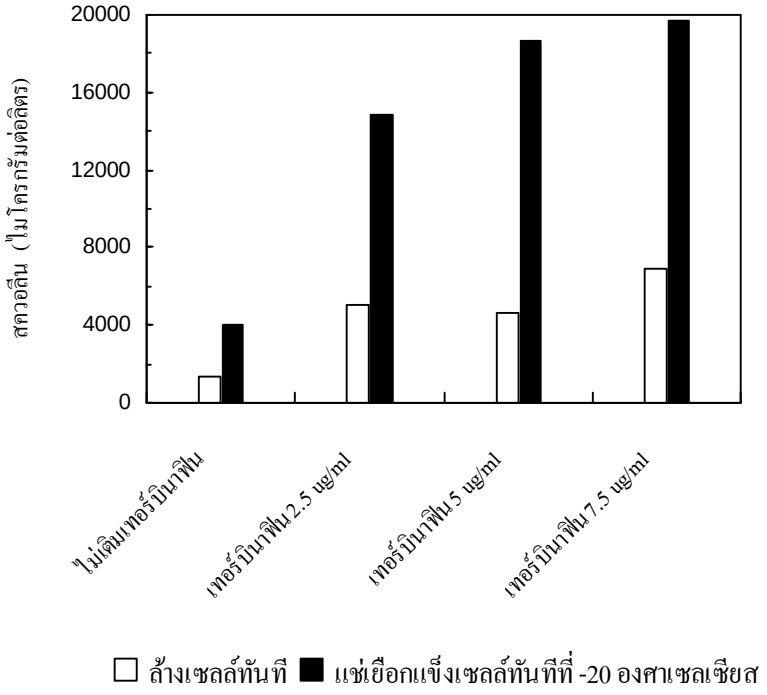
เมื่อพิจารณาผลของเทอร์บินาฟีนต่อการสะสมสควอลีนพบว่าความเข้มข้นของเทอร์บินาฟีน 7.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่เติมลงไปในอาหารทำให้ยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 มีการสะสมสควอลีนสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับเทอร์บินาฟีน 2.5 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อพิจารณาถึงการผลิตสควอลีนพบว่าปริมาณสควอลีนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมเทอร์บินาฟีนทั้ง 3 ความเข้มข้นนั้นใกล้เคียงกันไม่แตกต่างกันมากนัก คิดเป็นการเพิ่มขึ้นของสควอลีนประมาณ 5 เท่าของการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมเทอร์บินาฟีน ดังนั้นเพื่อความเหมาะสมในแง่ของต้นทุนการผลิตสควอลีนของยีสต์สายพันธุ์กลาย จึงเลือกเทอร์บินาฟีน 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดของการทดลองครั้งนี้ เพื่อใช้สำหรับการทดลองในการผลิตสควอลีนในถังหมักขนาด 5 ลิตรต่อไป

7. <u>ผลของการแช่เยือกแข็งเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลต่อการผลิตสควอลีนของยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2</u>

เนื่องจากในการทดลองที่ผ่านมาบังเอิญพบว่า เมื่อนำยีสต์สายพันธุ์กลายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมเทอร์บินาฟีน 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 42 ชั่วโมง ไปแช่เยือกแข็งทันทีที่ -20 องศาเซลเซียสก่อนทำการวิเคราะห์สควอลีน โดยไม่ได้เซนตริฟิวจ์แยกเอาอาหารเหลวกากน้ำตาลออก เชื้อมีการสะสมและผลิตสควอลีนที่สูงขึ้น (ไม่ได้แสดงผล) ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาผลของการแช่เยือกแข็งเซลล์ในอาหารเหลวกากน้ำตาลโดยใช้สภาวะของการเพาะเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์กลายเช่นเดียวกับการทดลองที่ผ่านมา

จากการนำยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 มาเพาะเลี้ยงอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ และเติมเทอร์บินาฟีน 0, 2.5, 5 และ 7.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 5.0 อาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 1.5 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 42 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตัวอย่างมาทำการศึกษา 2 แบบ คือ (1) เก็บตัวอย่างโดยไม่ได้แช่เยือกแข็งเซลล์ แต่เซนตริฟิวจ์แยกเอาอาหารออกและล้างเซลล์ทันที แล้วนำเซลล์ไปสกัดและ

วิเคราะห์สควอลีน และ (2) เก็บตัวอย่างเซลล์พร้อมอาหารนำไปแช่เยือกแข็งทันทีที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเซนตริฟิวจ์แยกเอาอาหารออกและล้างเซลล์ นำเซลล์ไปสกัดและวิเคราะห์สควอลีนเช่นเดียวกับวิธีแรก โดยเมื่อนำเซลล์ยีสต์สายพันธุ์กลายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมและเติมเทอร์บินาฟีนมาแช่เยือกแข็งทันทีที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นเซนตริฟิวจ์แยกเอาอาหารออกและล้างเซลล์ พบว่า เซลล์มีการผลิตสควอลีนสูงขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้แช่เยือกแข็งแต่มีการเซนตริฟิวจ์แยกเอาอาหารออกและล้างเซลล์ทันที โดยเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมเทอร์บินาฟีน 0, 2.5, 5 และ 7.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 42 ชั่วโมง แล้วนำมาแช่เยือกแข็งทันทีที่ -20 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 19 การผลิตสควอลีนของยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 โดยไม่ได้แช่เยือกแข็งเซลล์ (ล้างเซลล์ทันที) และนำเซลล์พร้อมอาหารแช่เยือกแข็งทันทีที่ -20 องศาเซลเซียส โดยเซลล์ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ และเติมเทอร์บินาฟีน 0, 2.5, 5 และ 7.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พีเอช 5.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 1.5 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ความเร็วการเขย่า 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ที่เวลา 42 ชั่วโมง

ผลิตสควอลีนเท่ากับ 4,045.3, 14,865.2, 18,663.2 และ 19,735.9 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์ที่ไม่ได้แช่เยือกแข็งผลิตสควอลีนเพียง 1,331.7, 5,002.6, 4,663.7 และ 6,878.3 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 19) ซึ่งการแช่เยือกแข็งเซลล์ทันทีที่ -20 องศาเซลเซียสทำให้สควอลีนที่ผลิตได้สูงขึ้นประมาณ 3 - 4 เท่าของเซลล์ที่ไม่ได้แช่เยือกแข็ง

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เซลล์ของยีสต์สายพันธุ์กลายที่แช่เยือกแข็งทันทีที่ -20 องศาเซลเซียสโดยไม่เซนตริฟิวจ์แยกเอาอาหารออกนั้นให้สควอลีนที่ผลิตได้สูงกว่าเซลล์ที่ไม่ได้แช่เยือกแข็งแต่เซนตริฟิวจ์เอาอาหารออกและล้างเซลล์ทันทีอย่างชัดเจนในทั้งการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมและเติมเทอร์บินาฟีน โดยเมื่อพิจารณาการผลิตสควอลีนที่สูงขึ้นของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมเทอร์บินาฟีนแล้วแช่เยือกแข็งทันทีที่ -20 องศาเซลเซียสเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้แช่เยือกแข็ง อาจเป็นไปได้ว่า การที่นำเซลล์ไปแช่เยือกแข็งทันทีที่ -20 องศาเซลเซียส เซลล์ต้องมีการปรับตัวให้เหมาะสมในการต้านทานต่อความเย็นเยือกแข็ง ดังที่มีรายงานการต้านทานต่อความเย็นเยือกแข็งของ *Torulaspora delbrueckii* PYCC 5323 พบว่า เชื้อสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้โดยการแช่เยือกแข็งที่ -20 องศาเซลเซียสเมื่อเวลาผ่านไป 120 วัน ในขณะที่ *S. cerevisiae* มีอัตราการตายกว่า 80 เปอร์เซ็นต์หลังจากแช่เยือกแข็งผ่านไปเพียง 15 วัน ซึ่งการที่ *T. delbrueckii* สามารถต้านทานต่อความเย็นเยือกแข็งได้นั้นขึ้นอยู่กับการปรับตัวของเชื้อ โดยพบว่าเยื่อหุ้มเซลล์สามารถทนต่อความเค้นเยือกแข็ง (freeze stress) และต้านทานต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิพิดได้ (Alves-Araújo *et al*., 2004) ซึ่งการต้านทานต่อความเย็นอาจเกี่ยวข้องกับไขมันที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยไขมันของยีสต์ที่พบส่วนใหญ่เป็นพวกฟอสโฟลิพิด นอกจากนี้ยังมีสเตรอลโดยเฉพาะเออร์กอสเตรอลและไซโมสเตรอล (สาวิตรี, 2549) ส่วน Murakami *et al.* (1995) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ขององค์ประกอบลิพิดบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์และการทนต่อความเย็นเยือกแข็งของ *T. delbrueckii* D2-4 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ทนต่อความเย็นเยือกแข็ง (freeze-tolerant strain) และ *T. delbrueckii* 60B3 สายพันธุ์กลายที่ไวต่อความเย็นเยือกแข็ง (freeze-sensitive strain) ซึ่งได้จากการกลายพันธุ์ยีสต์สายพันธุ์ D2-4 โดยพบว่าปริมาณของลิพิดทั้งหมดของยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์นั้นไม่แตกต่างกัน ในขณะที่พบความแตกต่างกันของปริมาณฟอสโฟลิพิดและลิพิดที่เป็นกลาง และยังพบว่ายีสต์สายพันธุ์ D2-4 มีอัตราส่วนของสเตรอลต่อฟอสโฟลิพิดคิดเป็น 60 เปอร์เซ็นต์ของสายพันธุ์กลาย 60B3 นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบลิพิดบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ D2-4 มีปริมาณของฟอสโฟลิพิด คือ ฟอสฟาทิดิลเอทานอลามีน(phosphatidylethanolamine) ฟอสฟาทิดิลคอลีน (phosphatidylcholine) และฟอสฟาทิดิลอินนอซิทอล (phosphatidylinositol) สูงกว่าสายพันธุ์กลาย 60B3 ซึ่งอัตราส่วนของสเตรอลต่อฟอสโฟลิพิดและปริมาณฟอสโฟลิพิดที่แตกต่าง

กันนี้ทำให้มีผลต่อสภาพการไหลของเมมเบรน (fluidity) ของยีสต์ทั้งสอง โดยพบว่ายีสต์สายพันธุ์ D2-4 มีสภาพการไหลของเมมเบรนสูงกว่าในสายพันธุ์กลาย 60B3 จึงเป็นผลให้การต้านทานต่อความเย็นเยือกแข็งของยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์แตกต่างกัน ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงอาจเป็นไปได้ว่า เซลล์ของยีสต์สายพันธุ์กลายจำเป็นต้องมีการสังเคราะห์ลิพิดและสเตรอลบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์เพิ่มมากขึ้นเพื่อให้มีชีวิตอยู่รอดต่อความเย็นเยือกแข็ง จึงอาจมีการสร้างสารตัวกลางคือสควอลีนเพื่อใช้ในการสังเคราะห์สเตรอลต่าง ๆ ที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ปริมาณสควอลีนเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้แช่เยือกแข็งที่ -20 องศาเซลเซียสแต่มีการเอาอาหารออกและเซนตริฟิวจ์ล้างเซลล์ทันที ส่วนการผลิตสควอลีนจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมเทอร์บินาฟีนแล้วแช่เยือกแข็งทันทีที่ -20 องศาเซลเซียสโดยไม่เซนตริฟิวจ์แยกเอาอาหารออกให้สควอลีนที่สูงกว่าเซลล์ที่ไม่ได้แช่เยือกแข็งแต่เซนตริฟิวจ์เอาอาหารออกและล้างเซลล์ทันทีนั้น สามารถอธิบายได้ในทำนองเดียวกันกับที่อธิบายข้างต้น คือ ในช่วงแรกที่เชื้อเริ่มมีการปรับตัวในการต้านทานต่อความเย็นนั้นอาจมีการสังเคราะห์ลิพิดและสเตรอลเพิ่มขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์ แต่เนื่องจากในอาหารมีเทอร์บินาฟีนอยู่ด้วย ซึ่งเทอร์บินาฟีนนั้นมีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อเอนไซม์ squalene epoxidase ในวิถีของการสังเคราะห์เออร์กอสเตรอล (Ryder, 1992) ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าเทอร์บินาฟีนมีผลไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ squalene epoxidase ทำให้สควอลีนเปลี่ยนไปเป็นสควอลีน-2,3-อีพอกไซด์ได้ลดลง จึงเป็นผลให้มีการสะสมสควอลีนภายในเซลล์เพิ่มสูงขึ้น และจากรายงานของ Alves-Araújo *et al*. (2004) ที่ศึกษาการปรับตัวของเซลล์ในระหว่างการแช่เยือกแข็งของ *T. delbrueckii* และ *S. cerevisiae* โดยนำเซลล์ที่เจริญในระยะสเตชันนารีใส่ลงในอาหารที่เติมไซโคลเฮกซิไมด์ 0.01 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปแช่เยือกแข็งที่ -20 องศาเซลเซียส พบว่า การมีไซโคลเฮกซิไมด์ในอาหารนั้นทำให้ *S. cerevisiae* มีอัตราการตายสูงขึ้น ในขณะที่ *T. delbrueckii* สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ โดยเมื่อนำเซลล์ของ *T. delbrueckii* ที่ผ่านการแช่เยือกแข็งที่ -20 องศาเซลเซียสกับเซลล์ซัสเพนชันที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีไซโคลเฮกซิไมด์ 0.01 เปอร์เซ็นต์แต่ไม่ได้นำไปแช่เยือกแข็งที่ -20 องศาเซลเซียสมาทำการเพาะเลี้ยงลงบนอาหารแข็ง YPDA พบว่า ไม่พบความแตกต่างของจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าไซโคลเฮกซิไมด์ไม่มีความเป็นพิษต่อ *T. delbrueckii* และการมีชีวิตรอดของ *T. delbrueckii* นั้นขึ้นอยู่กับการที่เชื้อสามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ในช่วงที่เชื้อต้องมีการปรับตัวอย่างช้า ๆ ในระยะแรกของการให้ความเย็นในกระบวนแช่เยือกแข็ง

8. <u>การศึกษาการผลิตสควอลีนในอาหารเหลวกากน้ำตาลของยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 ในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ</u>

8.1 การผลิตสควอลีนในอาหารที่ไม่เติมเทอร์บินาฟีน

จากการนำยีสต์สายพันธุ์กลาย RV51-UV2-NTG2 มาศึกษาการผลิตสควอลีน โดยทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมักแบบถังกวน (stirred tank fermentor) ขนาด 5 ลิตร ในอาหารเหลวกากน้ำตาลปริมาตร 3 ลิตรที่มีน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ และปรับพีเอชเป็น 5.0 โดยปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 1.5 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ในระหว่างการเพาะเลี้ยงทำการกวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที และให้อากาศ 1 vvm อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างมาศึกษา 2 แบบ พบว่า การสะสมสควอลีนของเซลล์ที่นำมาแช่เยือกแข็งทันทีที่ -20 องศาเซลเซียสโดยไม่เซนตริฟิวจ์แยกเอาอาหารออกสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้แช่เยือกแข็งแต่มีการเซนตริฟิวจ์แยกเอาอาหารออกและล้างเซลล์ทันที โดยเซลล์มีการสะสมสควอลีนเท่ากับ 838.9 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 12 ชั่วโมง ในขณะที่เซลล์ที่ไม่ได้แช่เยือกแข็งมีการสะสมสควอลีนเพียง 472.9 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 12 ชั่วโมง และภายหลังจากชั่วโมงที่ 12 การสะสมสควอลีนค่อย ๆ ลดลง (ภาพที่ 20ก) ส่วนการผลิตสควอลีนของเซลล์ที่แช่เยือกแข็งทันทีที่ -20 องศาเซลเซียส เท่ากับ 3,741.4 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าเซลล์ที่ไม่ได้แช่เยือกแข็งที่ผลิตสควอลีนได้ 2,213.2 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 20ข)

เมื่อพิจารณาการผลิตสควอลีนจากเซลล์ที่ไม่ได้แช่เยือกแข็งของยีสต์สายพันธุ์กลายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ไม่เติมเทอร์บินาฟีนในถังหมักแบบถังกวนเปรียบเทียบกับเมื่อทดลองในฟลาสก์ (ข้อ 5) พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์กลายในถังหมักผลิตสควอลีนได้เท่ากับ 2,213.2 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง ส่วนเมื่อเพาะเลี้ยงในฟลาสก์เชื้อผลิตสควอลีนได้ต่ำกว่าเล็กน้อย คือ 1,784.9 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เวลาเดียวกัน จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า ถึงแม้การเพาะเลี้ยงในถังหมักจะมีการกวนและการให้อากาศ แต่การผลิตสควอลีนก็ไม่แตกต่างกันมากนัก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสภาวะการกวนและการให้อากาศยังไม่เหมาะสม ดังนั้นหากมีการปรับการกวนและการให้อากาศให้เหมาะสมแล้ว อาจทำให้ยีสต์สายพันธุ์กลายมีการผลิตสควอลีนเพิ่มขึ้นได้