

การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นจาก *Saccharomyces cerevisiae*
ที่เจริญในแหล่งอาหารเป็นของเหลือทิ้งโรงงานผลิต
High fructose corn syrup (HFCS)

The coenzyme Q10 production by
Saccharomyces cerevisiae cultivated on medium source
containing waste from High fructose corn syrup
(HFCS) manufacturing.

วิเมเลื่อง สิงห์ทองท้าว
อัจฉราภักษ์ น้ามะลิ

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นจาก *Saccharomyces cerevisiae*
ที่เจริญในแหล่งอาหารเป็นของเหลือทิ้งโรงงานผลิต
High fructose corn syrup (HFCS)

The coenzyme Q10 production by
Saccharomyces cerevisiae cultivated on medium source
containing waste from High fructose corn syrup
(HFCS) manufacturing.

วิเมเลื่อง สิงห์ทองห้าว

อัครารักษ์ น้ามะลิ

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2560

THE COENZYME Q10 PRODUCTION BY
Saccharomyces cerevisiae CULTIVATED ON MEDIUM
SOURCE CONTAINING WASTE FROM HIGH FRUCTOSE
CORN SYRUP (HFCS) MANUFACTURING.

WIMELUEANG SINGTHONGHOW
ACHARARAK NAMMALI

A SPACIAL PROJECT SUBMITTED PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
(INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2017

หัวข้อโครงการพิเศษ การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นจาก *Saccharomyces cerevisiae* ที่เจริญใน แหล่งอาหารที่เป็นของเหลือทิ้งโรงงานผลิต High fructose corn syrup (HFCS)

The coenzyme Q10 production by *Saccharomyces cerevisiae* cultivated on medium source containing waste from High fructose corn syrup (HFCS) manufacturing.

ชื่อนักศึกษา นางสาววิเมเลียง สิงห์ทองห้าว รหัสนักศึกษา 57050894

นางสาวอัครารักษ์ น้ามะลิ รหัสนักศึกษา 57050919


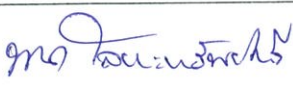
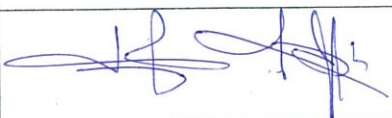
ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2560

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้ โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา อุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2560

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี กรรมการ	
ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงการพิเศษ	การผลิตโคเอนไซม์คิวเทินจาก <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ที่เจริญในแหล่งอาหารเป็นของเหลือทิ้งโรงงานผลิต High fructose corn syrup (HFCS)
ชื่อนักศึกษา	นางสาววิเมเลื่อง สิงห์ทองห้าว รหัสนักศึกษา 57050894 นางสาวอรรารักษ์ น้ามะลิ รหัสนักศึกษา 57050919
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์

บทคัดย่อ

ศึกษาการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหารเหลือที่ใช้ของเหลือทิ้งจากโรงงานผลิต High fructose corn syrup (HFCS) เป็นแหล่งอาหาร โดยพบว่าของเหลือทิ้งที่มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 40 เปอร์เซ็นต์ และมีกลูโคส 2.2 เปอร์เซ็นต์ การเจริญของ *S. cerevisiae* ในอาหารเหลือ YM ที่แปรผันความเข้มข้นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน พบว่าการเจริญใน fructose syrup และโซเดียมไนเตรท 2 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ให้ปริมาณเซลล์ 0.6856 กรัม/น้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร เนื่องจากของเหลือทิ้งที่นำมาใช้ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว น้ำตาลโมเลกุลคู่ และน้ำตาลหลายโมเลกุล ซึ่งเชื้อยีสต์สามารถใช้ได้เพียงน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ต่อมาจึงใช้การเลี้ยงเชื้อแบบป้อนอาหารเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญและการใช้น้ำตาล พบว่าการเลี้ยงเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 25 และ 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเติมอาหารเหลือครั้งละ 25 และ 50 มิลลิลิตร ตามลำดับ ที่เวลา 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ พบว่าให้ปริมาณเซลล์ยีสต์สูงขึ้นเป็น 0.7462 กรัม/น้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการลดลงของอิทธิพลของการยับยั้งด้วยสับสเตรท เมื่อนำเซลล์ยีสต์มาย่อยสลายเพื่อสกัดโคเอนไซม์คิวเทิน พบว่าการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 นอร์มอล ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 180 นาที ให้ผลการย่อยสลายเซลล์ยีสต์สูงสุด และเมื่อนำมาสกัดโคเอนไซม์คิวเทินด้วยเอทานอล พบว่ามีความเข้มข้น 0.907 ไมโครกรัมต่อกรัม/น้ำหนักเซลล์แห้ง

คำสำคัญ: โคเอนไซม์คิวเทิน น้ำเชื่อมชนิด High fructose corn syrup (HFCS) น้ำเชื่อมฟรุคโตสยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

Title	The coenzyme Q10 production by <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cultivated on medium source containing waste from High fructose corn syrup (HFCS) manufacturing.	
Students	Miss Wimelueang Singthonghow	Student ID 57050894
	Miss Achararak Nammali	Student ID 57050919
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)	
Department	Biology	
Faculty	Science	
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)	
Academic Year	2017	
Advisor	Asst. Prof. Dr. Somchai Krirak	

Abstract

The cultivation of *S. cerevisiae* on medium containing waste from High fructose corn syrup (HFCS) manufacture was studied. The HFCS waste contained 40% of total sugar and 2.2% of glucose. The cultivation was carried on YM broth at various concentrations of carbon and nitrogen of 2% HFCS and 0.5% sodium nitrate, respectively, that gave 0.6856 g-DCW/L due to the HFCS contained monosaccharide, disaccharide and polysaccharide. *S. cerevisiae* had a capability of monosaccharide utilization. The fed-batch cultivation was applied to maximize the growth and sugar assimilation. The result showed that, cell yield was raised to 0.7462 g-DCW/L when the cultivation of *S. cerevisiae* had been carried on initial volume of 25 and 50 mL (in 250 mL flask) and medium feeding at 12, 24, 36 and 48 hr of cultivation, respectively. It was concluded that the influence of substrate inhibition was reduced. Furthermore, yeast cell was digested for the coenzyme Q10 extraction. The maximum cell hydrolyzed was received by using 2 N of sodium hydroxide at 80 °C for 180 minutes. Then coenzyme Q10 was extracted by ethanol. It was found that the amount of coenzyme Q10 was 0.907 mg/g-DCW.

Keyword: Coenzyme Q10, fructose syrup, High fructose corn syrup (HFCS), *Saccharomyces cerevisiae*

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษเล่มนี้ สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีด้วยความช่วยเหลือ และอนุเคราะห์จากคณาจารย์ ผู้ทรงคุณวุฒิ ตลอดจนบุคลากรทางการศึกษาหลายฝ่ายที่เป็นประโยชน์ยิ่งต่อความสมบูรณ์ของโครงการพิเศษ ผู้จัดทำและศึกษาโครงการพิเศษเล่มนี้ขอกราบขอบพระคุณผู้ให้ความช่วยเหลือและให้ความอนุเคราะห์ดังรายนามต่อไปนี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษาและช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของโครงการพิเศษตลอดจนให้ความรู้ และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษาโครงการพิเศษนี้ ผู้จัดทำได้ตระหนักถึงความตั้งใจจริงและความทุ่มเทของอาจารย์ ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

กราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์ฤกษ์ ประธานกรรมการโครงการพิเศษ และ ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี กรรมการโครงการพิเศษ ผู้ตรวจสอบและให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการพิเศษเล่มนี้

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ภาคชีววิทยาที่อำนวยความสะดวกในด้านสารเคมี เครื่องมือ ตลอดจนสถานที่ที่ปฏิบัติสำหรับการศึกษาและจัดทำโครงการพิเศษนี้

ขอขอบคุณ เพื่อนในภาควิชาชีววิทยาที่ให้การช่วยเหลือ ตรวจสอบ แนะนำตลอดจนให้กำลังใจในการศึกษาและจัดทำโครงการพิเศษนี้

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การสนับสนุน ส่งเสริมการศึกษาตลอดเป็นกำลังใจอย่างดีตลอดมา จนทำให้ผู้ศึกษาประสบความสำเร็จในชีวิต

วิเมเลียง สิงห์ทองห้าว

อัครารักษ์ น้ามะลิ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ.....	ฉ
คำย่อ/สัญลักษณ์.....	ณ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 HFCS.....	4
2.1.1 อันตรายจาก HFCS (Axe, 2018).....	4
2.1.1.1 มะเร็ง.....	4
2.1.1.2 โรคเบาหวาน.....	5
2.1.1.3 ความดันโลหิตสูง.....	5
2.1.1.4 โรคหัวใจ.....	5
2.2 ยีสต์.....	5
2.3 โครงสร้างของเซลล์ยีสต์.....	6
2.3.1 ผนังเซลล์ (cell wall).....	6
2.3.2 เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane).....	7

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.3.3 เพอริพลาสซึม (periplasm)	8
2.3.4 นิวเคลียส (nucleus)	8
2.3.5 ไมโทคอนเดรีย (mitochondrion).....	8
2.3.6 เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (endoplasmic reticulum; ER).....	9
2.3.7 แวกิวโอล (vacuole)	9
2.3.8 กอลจิบอดี (golgi body).....	9
2.3.9 ไซโทพลาสซึม (cytoplasm).....	9
2.4 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction).....	10
2.4.1 การแตกหน่อ.....	10
2.4.2 การแบ่งเซลล์แบบฟิสชัน.....	13
2.4.3 การสร้างเส้นใย	14
2.5 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproduction).....	15
2.5.1 ระบบเมติง (mating system).....	16
2.5.2 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้าง ascospore	16
2.5.3 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้าง basidiospore.....	17
2.6 วงจรชีวิตของยีสต์.....	18
2.7 แหล่งสารอาหารสำหรับยีสต์.....	20
2.7.1 คาร์บอน (carbon)	20
2.7.2 ไนโตรเจน (nitrogen).....	20
2.7.3 ฟอสฟอรัส (phosphorus)	21
2.7.4 ซัลเฟอร์ (sulphur).....	21
2.8 ประโยชน์ที่ได้จากยีสต์ในอนาคต	21
2.9 ประวัติของโคเอนไซม์คิวเท็น	22

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.10 โครงสร้างทางเคมีของโคเอนไซม์คิวเท็น.....	22
2.11 ความสำคัญและประโยชน์ของโคเอนไซม์คิวเท็น	23
2.12 การสังเคราะห์โคเอนไซม์คิวเท็น	24
2.13 แหล่งที่มาของโคเอนไซม์คิวเท็นในพืชและสัตว์	24
2.14 การศึกษาแหล่งที่มาของโคเอนไซม์คิวเท็นในจุลินทรีย์	26
2.15 การสกัดโคเอนไซม์คิวเท็น.....	27
2.16 การประยุกต์ใช้โคเอนไซม์คิวเท็นในทางการแพทย์.....	30
2.16.1 บทบาทของโคเอนไซม์คิวเท็นที่มีต่อระบบหัวใจ และหลอดเลือด	30
2.16.2 บทบาทของโคเอนไซม์คิวเท็น เมื่อรับประทานร่วมกับยาลดคอเลสเตอรอล.....	30
2.16.3 บทบาทการป้องกันความเสื่อมของระบบประสาท อันเนื่องมาจาก ภาวะเครียดออกซิเดชัน.....	30
2.16.4 บทบาทการบำรุงผิวหนัง	31
2.15 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	31
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	33
3.1 เชื้อจุลินทรีย์	33
3.2 สารเคมี.....	33
3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์	34
3.4 วิธีการทดลอง	34
3.4.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i>	34
3.4.1.1 ศึกษาลักษณะของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ด้วยวิธี wet mount	34
3.4.1.2 ศึกษาการเจริญของยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ในอาหาร YM ที่แหล่งคาร์บอน เป็นน้ำตาลกลูโคส และ fructose syrup.....	35
3.4.2 คุณสมบัติของ fructose syrup	35

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.4.3	ศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ในอาหาร YM ที่แปรผันแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน.....	35
3.4.3.1	การเตรียม inoculum เชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i>	35
3.4.3.2	ศึกษาการเจริญและการใช้น้ำตาลของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ในอาหาร YM ที่แปรผันความเข้มข้นแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน เปรียบเทียบระหว่างเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร.....	35
3.4.3.3	ศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ในอาหาร YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น fructose syrup และไนโตรเจนชนิดต่างๆ.....	36
3.4.3.4	ศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ในอาหาร YM ที่แปรผันความเข้มข้นแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน	36
3.4.3.5	เลี้ยงเชื้อแบบ fed batch ในอาหาร YM ที่มีแหล่งคาร์บอน fructose syrup และแหล่งไนโตรเจนโซเดียมไนเตรต.....	36
3.4.4	ศึกษาการสกัด และวิเคราะห์โคเอนไซม์คิวเทินด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography ; HPLC).....	37
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล		38
4.1	ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i>	38
4.1.1	ศึกษาลักษณะของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	38
4.1.2	ศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ในอาหาร YM ที่แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส และ fructose syrup.....	39
4.2	คุณสมบัติของ fructose syrup.....	40
4.3	ศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ในอาหาร YM.....	43
4.3.1	ศึกษาการเจริญและการใช้น้ำตาลของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ในอาหาร YM ที่แปรผันความเข้มข้นแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน	43

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3.2	ศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ในอาหาร YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น fructose syrup และไนโตรเจนชนิดต่างๆ.....	46
4.3.3	ศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ในอาหาร YM ที่แปรผันความเข้มข้นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน	48
4.3.4	เลี้ยงเชื้อแบบ fed batch ในอาหาร YM ที่มีแหล่งคาร์บอน fructose syrup และแหล่งไนโตรเจนโซเดียมไนเตรท.....	50
4.4	ศึกษาการสกัด และปริมาณโคเอนไซม์คิวเทิน	51
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ		53
5.1	สรุปผลการวิจัย.....	53
5.2	ข้อเสนอแนะ	54
เอกสารอ้างอิง.....		55
ภาคผนวก.....		63
ภาคผนวก ก		64
ภาคผนวก ข		67

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ภาพรวมของโคเอนไซม์คิวเท็นในอาหารต่างๆ.....	25
2.2 ปริมาณของโคเอนไซม์คิวเท็นในพืชต่างๆ.....	25
2.3 การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นในสายพันธุ์ wild types การกลายพันธุ์ทางเคมี และ recombinant strain.....	32
4.3 แสดงการเจริญ (OD660) ของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> และ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	47
4.4 แสดงการเจริญ (OD660), ปริมาณเซลล์ของยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> , ปริมาณน้ำตาล ในอาหาร และค่า yield ณ ชั่วโมงที่ 0 และ 44.....	49
4.5 ปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็นในตัวอย่าง ที่ย่อยเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่อุณหภูมิต่างๆ จากสมการเส้นตรงจากกราฟสารละลายมาตรฐานโคเอนไซม์คิวเท็น $y = 3955.2x + 178.1$ เมื่อ y คือ retention time และ x คือความเข้มข้นของ โคเอนไซม์คิวเท็น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (ภาคผนวก ข-4.2).....	52
ข-1 แสดงปริมาณ fructose syrup 40 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	65

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 กระบวนการผลิต HFCS จากแป้งข้าวโพด	4
2.2 รูปร่างลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ยีสต์	6
2.3 ภาพวาดแสดงโครงสร้างภายในเซลล์ยีสต์ <i>S. cerevisiae</i>	7
2.4 ภาพแสดงลักษณะเซลล์ของ <i>S. cerevisiae</i>	8
เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ SEM	8
2.5 การแตกหน่อแบบขั้วเดียวของ <i>Malassezia pachydermatis</i> (ภาพ A), การแตกหน่อแบบสองขั้วของ <i>Hanseniaspora osmophila</i> (ภาพ B) และการแตกหน่อแบบหลายขั้วของ <i>Pichia nakasei</i> (ภาพ C)	11
2.6 ไดอะแกรมการแตกหน่อในเซลล์ยีสต์	12
2.7 ภาพแสดงการแตกหน่อของยีสต์ ที่ประกอบด้วย bud และ birth scar	13
2.8 รูปแบบตำแหน่งการแตกหน่อของ <i>S. cerevisiae</i> แบ่งเป็นการแตกหน่อตามแกน (axial budding) และแตกหน่อสองขั้ว (bipolar budding); M (mother cell) เซลล์แม่ และ D (daughter cell) เซลล์ลูก	13
2.9 การแบ่งเซลล์แบบฟิสชันใน <i>S. pombe</i>	14
2.10 ลักษณะเส้นใยเทียมของยีสต์ <i>S. cerevisiae</i>	15
2.11 วงจรชีวิตการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของ <i>S. ludwigii</i>	15
2.12 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของ <i>S. cerevisiae</i>	17
2.13 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ชนิด TEM แสดง ascus และ ascospore ของ <i>S. cerevisiae</i>	17
2.14 แสดงวงจรชีวิตของ <i>S. cerevisiae</i>	19
2.15 โครงสร้างของโคเอนไซม์คิวเท็น	22
2.16 บทบาทสำคัญของโคเอนไซม์คิวเท็นในห่วงโซ่การขนส่งอิเล็กตรอน	23
2.17 โคเอนไซม์คิวเท็นที่ลดลงตามอายุ	24

สารบัญรูปร่างภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.1 แสดงลักษณะเซลล์ของยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่าและการแตกหน่อ (budding) (A), ลักษณะ ascospore (B) และลักษณะโคโคเนียบนอาหาร YM agar plate (C).....	38
4.2 การเจริญ (OD ₆₆₀) ของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ที่ช่วงโม่งต่างๆ ในอาหาร YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส (YM) และ fructose syrup (P1) ตามลำดับ	39
4.3 ลักษณะของ fructose syrup.....	40
4.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร และสารละลายมาตรฐานน้ำตาลฟรุกโตสความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	41
4.5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร และสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....	42
4.6 แสดงการเจริญ (OD ₆₆₀) ของยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ที่ช่วงโม่งต่างๆ ในอาหาร YM สูตรปกติ (YM) และอาหาร YM ที่มีแหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมไนเตรท และแหล่งคาร์บอนคือ fructose syrup ที่ความเข้มข้น 1, 10, 15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ (A1, A10, A15, A20 และ A25 ตามลำดับ) ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร.....	44
4.7 แสดงการเจริญ (OD ₆₆₀) ของยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ที่ช่วงโม่งต่างๆ ในอาหาร YM สูตรปกติ (YM) และอาหาร YM ที่มีแหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมไนเตรท และแหล่งคาร์บอนคือ fructose syrup ที่ความเข้มข้น 1, 10, 15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ (A1, A10, A15, A20 และ A25 ตามลำดับ) ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร.....	44
4.8 แสดงการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลทั้งหมดในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ <i>S. cerevisiae</i> ที่เจริญในอาหาร YM สูตรปกติ (YM) และอาหาร YM ที่มีแหล่งไนโตรเจน คือแอมโมเนียมไนเตรท และแหล่งคาร์บอน คือ fructose syrup ที่ความเข้มข้น 1, 10, 15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร (A10S, A15S, A20S และ A25S ตามลำดับ) และในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร (A10L, A15L, A20L และ A25L ตามลำดับ).....	45

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.9 แสดงการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลกลูโคสในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ <i>S. cerevisiae</i> ที่เจริญในอาหาร YM สูตรปกติ (YM) และอาหาร YM ที่มีแหล่งไนโตรเจน คือแอมโมเนียมไนเตรท และแหล่งคาร์บอน คือ fructose syrup 40เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 1, 10, 15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ ใน ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร (A10S, A15S, A20S และ A25S ตามลำดับ) และในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร (A10L, A15L, A20L และ A25L ตามลำดับ).....	45
4.10 แสดงค่า yield และปริมาณเซลล์จากการเลี้ยงเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ในอาหาร YM ที่แปรผันความเข้มข้นแหล่งคาร์บอนคือ fructose syrup และแหล่งไนโตรเจนคือ โซเดียมไนเตรท ในอัตราส่วน 1:0.5, 1:0.7, 1:1, 1:1.5, 1.5:0.5, 1.5:0.7, 1.5:1, 1.5:1.5, 2:0.5, 2:0.7, 2:1 และ 2:1.5 (B1, B2, B3, B4, C1, C2, C3, C4, D1, D2, D3 และ D4 ตามลำดับ).....	48
4.11 ปริมาณเซลล์จากการเลี้ยงยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ในอาหาร YM ที่มี fructose syrup และ โซเดียมไนเตรท ความเข้มข้น 1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (B4) และความเข้มข้น 2 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (D1) ที่ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 25 และ 50 มิลลิลิตร ทำการเติมอาหารเมื่อเลี้ยงเซลล์ยีสต์ครบ 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง	50
4.12 แสดง chromatogram ลักษณะ peak ของโคเอนไซม์คิวเทินที่ retention time เท่ากับ 9.7 นาที โดยใช้คอลัมน์ชนิด Luna 5u C18(2) 100A ขนาด 250x4.60 มิลลิเมตร (Phenomenex) และ mobile phase คือ เมทานอล: เอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1:9 ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที.....	51
4.13 ลักษณะของเซลล์ยีสต์ <i>s. cerevisiae</i> ที่เลี้ยงในอาหาร YM ที่เปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็น fructose syrup และแหล่งไนโตรเจนเป็น โซเดียมไนเตรท ที่กำลังขยาย 400 เท่า	52
ข-1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร และสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	68
ข-2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร และสารละลายมาตรฐานน้ำตาลฟรุกโตสความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	69
ข-3 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD) ที่ 660 นาโนเมตร และน้ำหนักเซลล์แห้ง (dry cell weight, DCW) (กรัมต่อมิลลิลิตร).....	71

สารบัญรูปลูกภาพ (ต่อ)

รูปที่

หน้า

ข-4 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตร และ ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานโคเอนไซม์คิวเทิน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	72
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
YM	อาหาร YM ที่มีแหล่งคาร์บอน คือน้ำตาลกลูโคส
P1	อาหาร YM ที่มีแหล่งคาร์บอน คือ fructose syrup ที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร และแหล่งไนโตรเจน คือ เปปโตน
A1	อาหาร YM ที่มีแหล่งคาร์บอน คือ fructose syrup ที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร (1 เปอร์เซ็นต์) และมีแหล่งไนโตรเจน คือ แอมโมเนียมไนเตรท
A10	อาหาร YM ที่มีแหล่งคาร์บอน คือ fructose syrup ที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร (10 เปอร์เซ็นต์) และมีแหล่งไนโตรเจน คือ แอมโมเนียมไนเตรท
A15	อาหาร YM ที่มีแหล่งคาร์บอน คือ fructose syrup ที่ความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร (15 เปอร์เซ็นต์) และมีแหล่งไนโตรเจน คือ แอมโมเนียมไนเตรท
A20	อาหาร YM ที่มีแหล่งคาร์บอน คือ fructose syrup ที่ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร (20 เปอร์เซ็นต์) และมีแหล่งไนโตรเจน คือ แอมโมเนียมไนเตรท
A25	อาหาร YM ที่มีแหล่งคาร์บอน คือ fructose syrup ที่ความเข้มข้น 250 กรัมต่อลิตร (25 เปอร์เซ็นต์) และมีแหล่งไนโตรเจน คือ แอมโมเนียมไนเตรท
S	พลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร
L	พลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร
B1	อาหาร YM ที่มีแหล่งคาร์บอน คือ fructose syrup ที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร (1 เปอร์เซ็นต์) และมีแหล่งไนโตรเจน คือโซเดียมไนเตรท 5 กรัมต่อลิตร (0.5 เปอร์เซ็นต์)
B2	อาหาร YM ที่มีแหล่งคาร์บอน คือ fructose syrup ที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร (1 เปอร์เซ็นต์) และมีแหล่งไนโตรเจน คือโซเดียมไนเตรท 7 กรัมต่อลิตร (0.7 เปอร์เซ็นต์)
B3	อาหาร YM ที่มีแหล่งคาร์บอน คือ fructose syrup ที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร (1 เปอร์เซ็นต์) และมีแหล่งไนโตรเจน คือโซเดียมไนเตรท 10 กรัมต่อลิตร (1 เปอร์เซ็นต์)

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ปัจจุบันผู้คนส่วนใหญ่ได้หันมาดูแลสุขภาพตัวเองกันมากขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะปัญหาความเครียดจากการทำงานหรือจากกิจกรรมต่างๆ ในชีวิตประจำวันที่ต้องใช้เวลามาก จึงส่งผลให้มีการพักผ่อนที่ไม่เพียงพอ รวมไปถึงมลพิษต่างๆ ที่ต้องเจอมาตลอดทั้งวัน ทำให้ร่างกายของเราต้องการการดูแลเป็นพิเศษ ถ้าหากขาดการดูแลอาจก่อให้เกิดริ้วรอยต่างๆ บนร่างกาย โดยเฉพาะบนใบหน้าซึ่งทำให้ดูแก่กว่าวัย โรคภัยต่างๆ ได้แก่ โรคหัวใจ โรคความดันโลหิตสูง ร่างกายอ่อนเพลีย อันเนื่องมาจากร่างกายได้รับพลังงานไม่เพียงพอ ในปัจจุบันได้มีการผลิตอาหารเสริมต่างๆ เช่น collagen, vitamin, zinc, ginkgo, น้ำมันตับปลา (fish oil) และเวย์ (whey protein) เป็นต้น ในจำนวนนี้โคเอนไซม์คิวเท็นเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของอาหารเสริม เนื่องจากโคเอนไซม์คิวเท็นเป็นองค์ประกอบสำคัญในไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ผลิตพลังงานให้แก่เซลล์โดยพลังงานดังกล่าวอยู่ในรูปของ ATP (adenosine triphosphate) เป็นพลังงานพื้นฐานของเซลล์ หน้าที่หลักของโคเอนไซม์คิวเท็นช่วยในการเร่งปฏิกิริยาผลิตพลังงานภายในร่างกายทั้งหมด นอกจากนี้มีประโยชน์อย่างมากทั้งในเรื่องของการช่วยในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) (รัศมี และจารุพงษ์, 2556) และช่วยในการรักษาโรคต่างๆ มากมาย เช่น ช่วยในเรื่องระบบหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular disease) ภาวะหัวใจล้มเหลวเนื่องจากเลือดไปเลี้ยงหัวใจไม่เพียงพอ (congestive heart failure) ความดันโลหิตสูง (hypertension) กล้ามเนื้อหัวใจอ่อนแรงหัวใจโต (cardiomyopathy) มะเร็ง (cancer) รวมถึงช่วยลดผลข้างเคียงจากการรับประทานยาในกลุ่มสเตตินได้ (Shults, 2002; Hodgson, 2002; Dhanasekaran และ Ren, 2005; Caso, 2007) และโคเอนไซม์คิวเท็นยังเป็นที่นิยมใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางอีกด้วย (Hoppe, 1999)

ทั้งนี้กระบวนการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นมีอยู่ด้วยกันหลายวิธี ทั้งการสังเคราะห์ทางเคมี วิธีสังเคราะห์กึ่งเคมี หรือวิธีทางชีวภาพโดยการผลิตจากจุลินทรีย์ (Ndikubwimana และ Lee, 2014) แต่ในที่นี้จะกล่าวถึงการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นจากจุลินทรีย์ (coenzyme Q10 biosynthetic) ซึ่งในปัจจุบันการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นจากจุลินทรีย์เป็นวิธีที่นิยมในเชิงพาณิชย์มากที่สุด (Choi และคณะ, 2005) เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถเลือกใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลายชนิด โดยอาศัยผลผลิตของจุลินทรีย์ แบ่งออกได้เป็น การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นโดยอาศัยอะโอบาκτηที่เรียกว่า (agrobacterium) การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นโดยอาศัยแบคทีเรียสังเคราะห์แสง (photosynthetic bacteria) และการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นโดยอาศัยยีสต์ (yeast) การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นจากจุลินทรีย์มีจุดเด่นหลายประการที่สามารถเพิ่มผลผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นได้สูงขึ้น เช่น การกลายพันธุ์

และการตัดต่อพันธุกรรม ผลิตด้วยวิธีทางวิศวกรรมเมตาบอลิก (metabolic engineering) การปรับปรุงแหล่งพลังงานเป็นการเติมสารหรือแร่ธาตุเพื่อส่งเสริมการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น รวมไปถึงการปรับปรุงสภาวะการเพาะเลี้ยง เป็นต้น (Jeya และคณะ, 2010; Cluis และคณะ, 2012) ในขณะที่วิธีการสังเคราะห์ทางเคมีจำเป็นต้องใช้สารเคมีที่มีความจำเพาะ ราคาแพง และยังมีขั้นตอนการดำเนินการซับซ้อน

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ชนิดแรกที่มีมนุษย์นำมาใช้อย่างแพร่หลายตั้งแต่อดีตกาล ทำให้เกิดเทคโนโลยีการผลิตเบียร์ ไวน์ และขนมปังถ่ายถอดมาจนถึงปัจจุบัน นอกจากนี้ยีสต์ถูกนำมาใช้ผลิตผลิตภัณฑ์ในอุตสาหกรรมมากมาย รวมไปถึงผลิตภัณฑ์ที่สกัดจากเซลล์ยีสต์ เช่น วิตามินบี และวิตามินดี ทั้งการผลิตสารต่างๆ สำหรับการรักษาและดูแลสุขภาพ เช่น ยารักษาโรค วัคซีน ฮอโรโมน ยีสต์มีลักษณะการดำรงชีวิตเป็นเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างหลายแบบ ตัวอย่างเช่น กลมรี รูปไข่ สามเหลี่ยม เป็นต้น การสืบพันธุ์ของยีสต์มีด้วยกันหลายรูปแบบ เช่น การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เช่น การแตกหน่อ (budding), ฟิสชัน (fission) และยังพบการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศที่เรียกว่า หน่อ-ฟิสชัน (bud-fission) และลักษณะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้าง ascospore และ basidiospore เป็นต้น แหล่งสารอาหารที่สำคัญสำหรับการเจริญของยีสต์ ได้แก่ แหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน รวมทั้งธาตุอาหารหลัก (major element) อื่นๆ ศึกษาความสามารถในการนำแหล่งคาร์บอนที่เป็นของเหลือทิ้งจากโรงงานผลิต high fructose corn syrup (HFCS) ซึ่งเป็นน้ำตาลที่ให้ความหวานมากที่สุดในธรรมชาติ ได้ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตขนมหวานต่างๆ และผลิตเครื่องดื่มกันอย่างแพร่หลาย มาใช้เพื่อศึกษาการผลิตเซลล์ยีสต์ และการสกัดโคเอนไซม์คิวเท็นโดยใช้วิธีทางชีวภาพ เพื่อนำของเหลือทิ้งจากโรงงานผลิต HFCS มาใช้ให้เป็นประโยชน์

ในงานวิจัยนี้จะกล่าวถึงการศึกษาการนำของเหลือทิ้งจากการผลิต HFCS มาเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนแหล่งคาร์บอนอื่นๆ เพื่อมุ่งเน้นการศึกษาการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนในการเพิ่มผลผลิตปริมาณเซลล์ โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* เพื่อศึกษาการเจริญในสภาวะที่เหมาะสมเมื่อแปรผันความเข้มข้นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน อนินทรีย์ชนิดต่างๆ รวมถึงการเพาะเลี้ยงแบบ Fed batch เพื่อลดผลกระทบจากการยับยั้งโดยสับสเตรท (substrate inhibition)

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 ศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* โดยใช้ของเหลือทิ้งจากโรงงานผลิต HFCS
- 1.2.2 ศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลกระทบต่อการเจริญของเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae*
- 1.2.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของปริมาณสารอาหารเพื่อเพิ่มปริมาณของเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae*
- 1.2.4 ศึกษาการย่อยเซลล์ และสกัดโคเอนไซม์คิวเทินจาก *S. cerevisiae*

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* โดยใช้ของเหลือทิ้งจากโรงงานผลิต HFCS ทดแทนการใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลกลูโคส และศึกษาการย่อยเซลล์และสกัดโคเอนไซม์คิวเทิน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

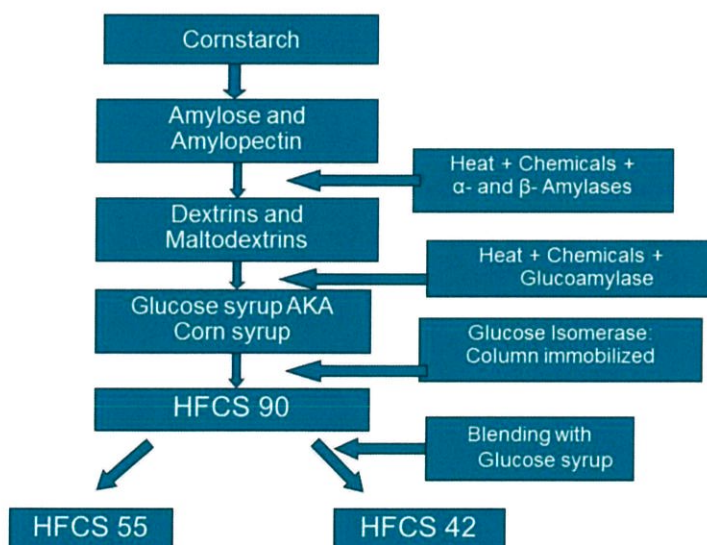
- 1.4.1 นำของเหลือทิ้งจากโรงงานผลิต HFCS มาใช้ในการผลิตเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae*
- 1.4.2 สามารถลดต้นทุนการผลิตโดยการใช้ของเหลือทิ้งจากโรงงานผลิต HFCS มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคส
- 1.4.3 ทราบวิธีการย่อยเซลล์และการสกัดโคเอนไซม์คิวเทินจากเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae*

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 HFCS

ข้าวโพดเป็นวัตถุดิบที่ใช้ผลิต HFCS โดยนำแป้งข้าวโพดที่ประกอบด้วย อะไมโลส (amylose) และอะไมโลเพกติน (amylopectin) ผ่านกระบวนการทางเคมี และเอนไซม์ ได้เป็น HFCS (รูปที่ 2.1) ที่ ประกอบด้วย โมโนแซ็กคาไรด์ (monosaccharide) เช่น กลูโคส ฟรุคโตส และ กาแล็กโทส ไดแซ็กคาไรด์ (disaccharide) เช่น ซูโครส แลคโทส และมอลโทส รวมทั้ง higher saccharides (poly- และ oligosaccharide) (White และคณะ, 2015) HFCS-55 ประกอบไปด้วย ฟรุคโตส 55 และกลูโคส 45 เปอร์เซ็นต์ HFCS ถูกใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตขนมหวาน และ เครื่องดื่มอย่างแพร่หลาย เช่น แยม ผลิตภัณฑ์พวกธัญพืช โยเกิร์ต ขนมปัง ลูกอม และเครื่องดื่มต่างๆ HFCS สามารถพัฒนาอุตสาหกรรมผลิตโดยเพิ่มรสชาติ เพิ่มความคงตัว ผิวสัมผัสของขนมปังให้ดีขึ้น และยังสามารถนำ HFCS ผสมกับส่วนผสมอื่นๆ ในการผลิตเครื่องดื่ม (Khattab และ Kodaki, 2015)



รูปที่ 2.1 กระบวนการผลิต HFCS จากแป้งข้าวโพด
ที่มา : Parker และคณะ, 2010

2.1.1 อันตรายจาก HFCS (Axe, 2018)

2.1.1.1 มะเร็ง

HFCS ประกอบไปด้วย น้ำตาลฟรุคโตส จากการวิจัยในปี 2010 โดย American Association for Cancer Research พบว่าฟรุคโตสส่งเสริมการเจริญของเซลล์มะเร็ง

โดยเฉพาะมะเร็งในตับอ่อน เซลล์มะเร็งสามารถนำฟรุกโตสไปใช้ในการเจริญ และเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว

2.1.1.2 โรคเบาหวาน

เซลล์ในร่างการสามารถเผาผลาญน้ำตาลกลูโคส สำหรับน้ำตาลฟรุกโตส จะถูกเผาผลาญในเซลล์ตับ ฟรุกโตสใน HFCS ต่างจากในผลไม้เนื่องจากผลไม้มีสารอาหารและเส้นใย จึงเป็นประโยชน์ในการช่วยให้ร่างการเผาผลาญฟรุกโตส การบริโภค HFCS นำไปสู่การสะสมของไขมันประเภท visceral fat ที่อวัยวะภายใน มีความสำคัญในการควบคุมไขมันในเส้นเลือด เช่น คอเลสเตอรอล (cholesterol) ไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides) และมีผลกระทบต่อระดับอินซูลิน ส่งผลต่อความเสี่ยงในการเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2

2.1.1.3 ความดันโลหิตสูง

พบว่าระดับความดันโลหิตสูงขึ้นเมื่อดื่มเครื่องดื่มที่ผสม HFCS เมื่อเทียบกับเครื่องดื่มที่ใช้กลูโคส แสดงให้เห็นว่าการบริโภคฟรุกโตส 60 กรัม สามารถเพิ่มความดันโลหิต แต่ไม่พบในการบริโภคกลูโคสในปริมาณเท่ากัน จากการบริโภค HFCS มีความสัมพันธ์กับความดันโลหิตสูง เนื่องจากการดูดซึมโซเดียมที่เพิ่มขึ้นในลำไส้ การยับยั้งการทำงานของหลอดเลือดในระบบ และการกระตุ้นระบบประสาท อาจทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของระดับฟอสฟอรัสในรูปของระดับกรดยูริกในร่างกาย

2.1.1.4 โรคหัวใจ

ความดันโลหิตสูงเป็นส่วนหนึ่งของกลุ่มปัญหาสุขภาพที่เรียกว่า metabolic syndrome ซึ่งจะเพิ่มความเสี่ยงต่อโรคหัวใจ โรคหลอดเลือดสมอง และโรคเบาหวาน

2.2 ยีสต์

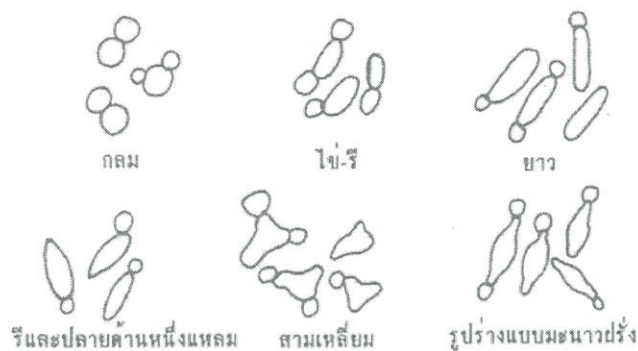
ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ชนิดแรกที่มีมนุษย์นำมาใช้ เริ่มจากการผลิตเบียร์ชนิดหนึ่งที่เรียกว่า Boozah ต่อมาได้นำยีสต์มาใช้ผลิตไวน์ เมื่อ 2,000 ปีก่อนคริสต์ศักราชมีรายงานที่แสดงให้เห็นว่าขนมปังที่ใช้ยีสต์ขึ้นฟูกว่าที่ไม่ใช้อย่างชัดเจน จากนั้นเทคโนโลยีการผลิตเบียร์ ไวน์ และขนมปัง ถูกถ่ายทอดมาจนถึงปัจจุบัน

ปัจจุบันยีสต์ใช้ผลิตผลิตภัณฑ์ในอุตสาหกรรมที่มีการผลิตปริมาณมาก แบ่งได้เป็น (1) เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่นไวน์ เบียร์ (2) ผลิตภัณฑ์จากการหมัก เช่น กลีเซอรอล และเอทานอล (3) ผลิตภัณฑ์ในรูปของเซลล์ยีสต์ เช่น ยีสต์อาหารคน อาหารสัตว์ และ (4) ผลิตภัณฑ์ที่สกัดจากเซลล์ยีสต์ เช่น วิตามินบี และวิตามินดี เอนไซม์ เช่น อินเวอร์เทส (invertase) แล็กเทส (lactase) และไลเปส (lipase) นอกจากนี้ยังใช้ยีสต์ผลิตผลิตภัณฑ์หลายชนิด เช่น น้่านมที่ปราศจากแลคโทส

(lactose-free milk) สารให้ความหวาน เช่น อะราบิทอล (arabitol) รวมทั้งสารต่างๆ สำหรับการรักษาและดูแลสุขภาพ เช่น ยารักษาโรค วัคซีน และฮอร์โมน

2.3 โครงสร้างของเซลล์ยีสต์

ยีสต์ส่วนใหญ่มีลักษณะการดำรงชีวิตเป็นเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างหลายแบบคือ กลมรี รูปไข่ สามเหลี่ยม รีและปลายด้านหนึ่งแหลม ทรงกระบอกที่มีปลายมน รูปร่างแบบมะนาวฝรั่ง รูปคนโท หรือ ฟลาสก์ยาวเป็นสาย (รูปที่ 2.2) ความยาวและความกว้างของเซลล์มีขนาดระหว่าง 2-50 และ 1-10 ไมโครเมตร ตามลำดับ เซลล์ยีสต์ประกอบด้วยโครงสร้างต่างๆ ดังนี้ (สาวิตรี, 2549) คือ



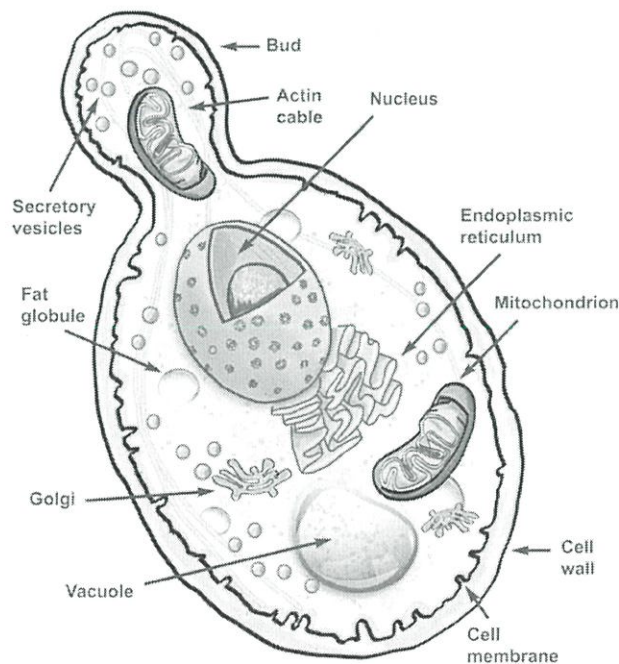
รูปที่ 2.2 รูปร่างลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ยีสต์
ที่มา : สาวิตรี, 2549

2.3.1 ผนังเซลล์ (cell wall)

มีความหนาประมาณ 100-200 นาโนเมตร และมีน้ำหนัก 10-25 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ประกอบด้วยโพลิแซ็กคาไรด์ประมาณ 80-90 เปอร์เซ็นต์ของผนังเซลล์ คือกลูแคน แมนแนน และไคติน กลูแคนเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสอยู่ที่ด้านในของผนังเซลล์เป็นส่วนประกอบที่เกี่ยวกับการกำหนดรูปร่างและทำให้เซลล์คงรูปร่าง แมนแนนเป็นโพลิแซ็กคาไรด์ที่มีแมนโนสเป็นองค์ประกอบอยู่เป็นส่วนใหญ่อยู่ที่ด้านนอกของผนังเซลล์ ทำหน้าที่ยึดเกาะส่วนประกอบต่างๆ ของผนังเซลล์ให้คงอยู่ด้วยกัน ปกติจะเกาะอยู่กับโปรตีนโดยพันธะโควาเลนต์ เรียกว่า แมนโนโปรตีน (mannoprotein) ส่วนไคตินเป็นพอลิเมอร์ของ N-acetyl glucosamine พบมากที่ผนังกันแยกหน่อออกจากเซลล์แม่ และบริเวณรอยแผลจากการแตกหน่อ (รูปที่ 2.3 และ 2.4) นอกจากโพลิแซ็กคาไรด์แล้วองค์ประกอบส่วนน้อยที่พบในผนังเซลล์ยีสต์ คือ โปรตีน ไขมัน และสารอนินทรีย์ เช่น ฟอสเฟต

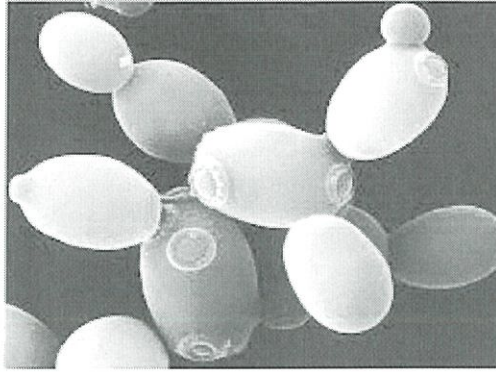
2.3.2 เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane)

มีความหนาประมาณ 7.5 นาโนเมตร บางส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ยื่นเข้าไปในไซโทพลาสซึม ทำให้ต่างจากเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ส่วนที่ยื่นเข้าไปมีความยาวแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิด อายุ และระยะการเจริญของเซลล์ ถึงแม้ว่าเซลล์เปลี่ยนเป็นโปรโตพลาสก็ยังคงตรวจพบส่วนที่ยื่นเข้าไปในไซโทพลาสซึม แต่ไม่พบในหน่อที่มีอายุน้อย ส่วนประกอบทางเคมีของเยื่อหุ้มเซลล์ยีสต์ เป็นไขมัน 2 ชั้น และมีโปรตีนที่ขดเป็นก้อนกลมๆ กระจายอยู่โดยไขมันส่วนใหญ่เป็นชนิดฟอสโฟลิพิด ชนิดที่พบมากคือ ฟอสฟาติดีลโคลีน (phosphatidylcholine) และฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) (รูปที่ 2.3 และ 2.4) หน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ คือเป็นตัวกำหนดว่าสารใดผ่านเข้า หรือออกจากไซโทพลาสซึมได้โดยเลือกนำสารอาหารบางชนิดเข้าสู่เซลล์ เช่น น้ำตาล กรดอะมิโน และวิตามิน รวมทั้งควบคุมการปลดปล่อยสารบางชนิดออกจากเซลล์ เช่น เอทานอล และสารอื่นๆ ที่สร้างจากการหมัก โดยโมเลกุลที่ไม่มีประจุบางชนิด เช่น น้ำ ออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์ กรดแอสติกที่ไม่แตกตัว และเอทานอล สามารถเคลื่อนที่ผ่านเซลล์ได้ค่อนข้างอิสระ ในขณะที่ไอออนและโมเลกุลส่วนใหญ่ไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านผนังเซลล์ได้ นอกจากนั้นยังช่วยป้องกันการสูญเสียสารประกอบที่มีความเข้มข้นต่ำจากไซโทพลาสซึม หน้าที่อีกอย่าง คือการนำเข้าของน้ำตาล แหล่งไนโตรเจน และไอออน โดยวิธีการขนส่งแบบใช้พลังงาน



รูปที่ 2.3 ภาพวาดแสดงโครงสร้างภายในเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae*

ที่มา : Graeme และ Graham. 2016



รูปที่ 2.4 ภาพแสดงลักษณะเซลล์ของ *S. cerevisiae*

เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ SEM

ที่มา : Rasha, 2014

2.3.3 เพอริพลาสซึม (periplasm)

อยู่ระหว่างผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ หรือเรียกว่า ช่องว่างเพอริพลาสซึม (periplasmic space) ประกอบด้วยโปรตีนที่ไม่สามารถแทรกผ่านผนังเซลล์ออกไปได้ เช่น แมนแนน โปรตีน รวมทั้งเอนไซม์ คือ อินเวอร์เทส และแอซิดฟอสฟาเทส (acid phosphatase) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของซัสเตรตที่ไม่สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปภายในเซลล์ได้

2.3.4 นิวเคลียส (nucleus)

รูปร่างกลมรี (รูปที่ 2.3) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.5 ไมโครเมตร เป็นโครงสร้างของยีสต์ที่เห็นได้ชัดด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบเฟสคอนทราสต์ (phase contrast microscope) นิวเคลียสแบ่งเป็น 2 ส่วนคือ

1) นิวคลีโอลัส ทึบแสงมากกว่า รูปร่างแบบเลนส์หรือแบบดวงจันทร์ครึ่งซีก อยู่บริเวณส่วนล่างของนิวเคลียส แล้วจะหายไปในช่วงไมโทซิส นิวคลีโอลัส ประกอบด้วย ribosomal DNA

2) นิวคลีโอพลาสซึม เป็นส่วนที่ทึบแสงน้อยกว่ารูปร่างเป็นโดมและอยู่ที่ด้านบนของนิวเคลียส ประกอบด้วยโครมาทินประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของดีเอ็นเอในเซลล์ นอกจากนี้ยังพบอาร์เอ็นเอ และโปรตีน คือ โพรทามีน และฮิสโตน

2.3.5 ไมโทคอนเดรีย (mitochondrion)

ไมโทคอนเดรียมีหน้าที่สร้างพลังงานในรูปของ ATP (adenosine triphosphate) จากการหายใจในสภาพที่มีออกซิเจน มีโครงสร้างที่ล้อมรอบด้วยเยื่อ 2 ชั้น ชั้นนอกประกอบด้วยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเมทาบอลิซึมของกรดไขมัน (รูปที่ 2.3) และเยื่อชั้นในประกอบด้วยไซโทโครมของลูกโซ่หายใจ ATP succinate dehydrogenase และ H^+ -ATPase เยื่อชั้นในส่วนที่เรียกว่า

คริสตา (crista) เกิดจากการยื่นของผนังชั้นในเข้าไปในไมโทคอนเดรียที่เรียกว่า สโตรมา (stroma) ในสโตรมามีเอนไซม์สำหรับออกซิเดชันไขมัน และเอนไซม์ในวัฏจักรเครบส์ (Krebs cycle หรือ tricarboxylic acid cycle; TCA cycle หรือ citric acid cycle) รวมทั้งส่วนประกอบสำหรับการสังเคราะห์โปรตีน ไรโบโซม และดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรีย

2.3.6 เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (endoplasmic reticulum; ER)

เอนโดพลาสมิกเรติคูลัมเป็นโครงสร้างภายในไซโทพลาสซึมที่ล้อมรอบด้วยเยื่อสองชั้น ช่องว่างระหว่างเยื่อทั้งสอง เรียกว่า ลูเมน (lumen) ภายในบรรจุด้วยถุงน้ำ เรียกว่า เอนไคเลอมา (enchylema) ที่ผิวของเยื่อมีลักษณะเป็นอนุภาคจำนวนมาก ประกอบด้วยเม็ดเล็ก ๆ ซึ่งอาจอยู่เดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่ม (รูปที่ 2.3) หน้าที่ของเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมช่วยในช่วงเริ่มต้นของการแตกหน่อ โดยการสร้างเวสิเคิล (vesicle) ที่บรรจุเอนไซม์ชนิดต่างๆ เอนโดพลาสมิกเรติคูลัมมี 2 ชนิด คือ

1) เอนโดพลาสมิกเรติคูลัมแบบผิวเรียบ (smooth endoplasmic reticulum; SER) เป็นบริเวณที่ไรโบโซมสังเคราะห์โปรตีน โดยโปรตีนที่ไรโบโซมสังเคราะห์จะบรรจุอยู่ในเวสิเคิลและมีการลำเลียงออกไปสู่นอกเซลล์หรือถูกส่งต่อไปยังกอลจิบอดี

2) เอนโดพลาสมิกเรติคูลัมแบบผิวขรุขระ (rough endoplasmic reticulum; RER) ทำหน้าที่สังเคราะห์สารสเตอรอยด์เช่น ไตรกลีเซอไรด์ และสารประกอบของคอเลสเตอรอล

2.3.7 แวกิวโอล (vacuole)

แวกิวโอลเป็นโครงสร้างหลักในการขนส่งโปรตีนในเซลล์ยีสต์ นอกจากนั้นยังทำหน้าที่คล้ายไลโซโซมในการย่อยโปรตีนต่างๆ ไปในเซลล์ (รูปที่ 2.3)

2.3.8 กอลจิบอดี (golgi body)

ทำหน้าที่รับโปรตีนจากเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมแบบผิวเรียบ และสร้างคาร์โบไฮเดรตจับกับโปรตีนกลายเป็นไกลโคโปรตีน (glycoprotein) แล้วสร้างเยื่อหุ้มไว้โดยรอบได้โปรตีนที่จะส่งออกไปนอกเซลล์

2.3.9 ไซโทพลาสซึม (cytoplasm)

เป็นของเหลวที่มีลักษณะคล้ายวุ้นและมีความเป็นกรด ส่วนที่พบแขวนลอยอยู่ในไซโทพลาสซึม คือไมโครบอดี (microbodies) โปรทีโซม (proteasome) และอนุภาคลิพิด นอกจากนั้นยังพบไมโครทิวบูล (microtubule) และไมโครฟิลาเมนต์ (microfilament) ซึ่งเป็นโครงร่างของเซลล์ยีสต์

2.4 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction)

การสืบพันธุ์ที่ไม่มีกระบวนการปฏิสนธิ เนื่องจากไม่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์จะได้เซลล์ใหม่ที่เกิดขึ้นจากการแบ่งตัวแบบไมโทซิสของเซลล์ปกติ หรือโครงสร้างพิเศษที่ทำหน้าที่สืบพันธุ์ (กิตติพันธุ์, 2546)

การเจริญของเซลล์ยีสต์เกิดโดยการเพิ่มขนาดจนถึงขนาดวิกฤต (critical size) เซลล์จะมีการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวน ในระหว่างนั้นนิวเคลียสมีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส การสังเคราะห์ไซโทพลาสซึม และออร์แกเนลล์ต่างๆ เกิดขึ้น สำหรับการแบ่งเซลล์ของยีสต์เป็นการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศส่วนใหญ่เกิดโดยการแตกหน่อ (budding) นอกจากการแตกหน่อยังพบการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยวิธีฟิสชัน (fission) โดยขยายเซลล์ตามยาว ออร์แกเนลล์ต่างๆ รวมทั้งนิวเคลียสและไซโทพลาสซึมเพิ่มเป็น 2 เท่า จากนั้นมีการสร้างผนังกัน (septum หรือ cross wall) แบ่งเป็น 2 ส่วนเท่าๆ กัน และแบ่งออกเป็นสองเซลล์ นอกจากนั้นยังพบการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศที่อยู่ระหว่างการแตกหน่อและฟิสชัน เรียกว่า หน่อ-ฟิสชัน (bud-fission) ยีสต์ที่พบการสืบพันธุ์แบบนี้ เช่น *Saccharomyces*, *Nadsonia* และ *Pityrosporum* ปกติการเพิ่มจำนวนจะเกิดในสภาวะที่เหมาะสมเท่านั้น

ในกรณีของ *S. cerevisiae* ถ้ามีอาหารเพียงพอจะเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่าภายในระยะเวลาสั้นๆ แต่ถ้าอาหารไม่เพียงพอยีสต์จะเข้าสู่ระยะที่ไม่มีการแตกหน่อเป็นระยะที่เซลล์ยังคงมีชีวิต เมื่อมีอาหารเซลล์สามารถเจริญต่อไปได้

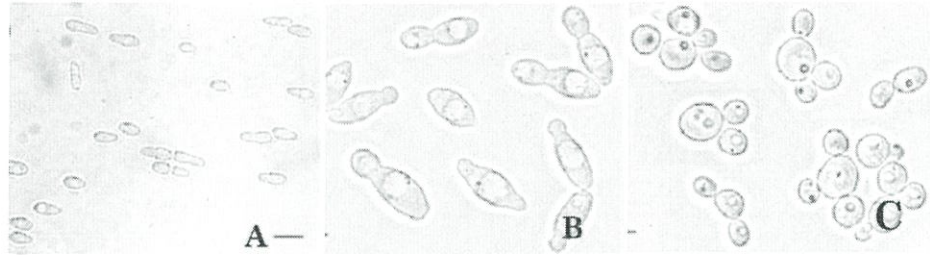
2.4.1 การแตกหน่อ

การแตกหน่อเป็นการแบ่งเซลล์ที่มีลักษณะค่อนข้างจำเพาะต่างจากการแบ่งเซลล์ยูคาริโอตชนิดอื่น ๆ การแตกหน่อของยีสต์แบ่งตามตำแหน่งที่เกิดหน่อได้เป็น 3 แบบ ดังแสดงในรูปที่ 2.5

1. การแตกหน่อขั้วเดียว (monopolar budding) เป็นการแตกหน่อที่เกิดที่ขั้วหรือปลายเพียงด้านเดียว โดยการแตกหน่อจะเกิดขึ้นซ้ำๆ ที่ตำแหน่งเดิม ยีสต์ที่มีการแตกหน่อแบบนี้ เช่น *Pityrosporum*

2. การแตกหน่อสองขั้ว (bipolar budding) การแตกหน่อแบบนี้เกิดขึ้นที่ขั้วหรือปลายทั้งสองด้านของเซลล์ ปกติจะเกิดที่ละขั้วหรืออาจจะเกิดพร้อมกันทั้งสองขั้วก็ได้ ยีสต์ที่มีการแตกหน่อแบบนี้ เช่น *Hanseniaspora*, *Nadsonia* และ *Saccharomyces*

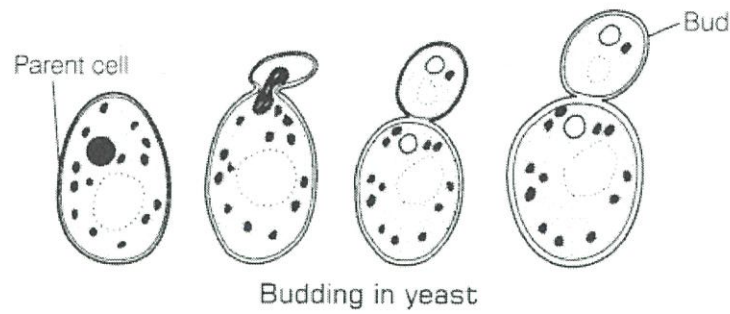
3. การแตกหน่อหลายขั้ว (multipolar หรือ multilateral budding) ยีสต์ส่วนใหญ่มีการแตกหน่อแบบนี้ โดยการแตกหน่อเกิดได้โดยรอบเซลล์ทุกๆ ด้าน ยีสต์ที่มีการแตกหน่อแบบนี้ เช่น *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Pichia* และ *Hansenula*



รูปที่ 2.5 การแตกหน่อแบบขั้วเดียวของ *Malassezia pachydermatis* (ภาพ A), การแตกหน่อแบบสองขั้วของ *Hanseniaspora osmophila* (ภาพ B) และการแตกหน่อแบบหลายขั้วของ *Pichia nakasei* (ภาพ C)

ที่มา : Kurtzman และ Sugiyama, 2011

การแตกหน่อเริ่มขึ้นโดยมีเวซิเคิลซึ่งเกิดจากเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมมาสะสมบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ตรงตำแหน่งที่จะมีการสร้างหน่อ ในเวซิเคิลมีไลติกเอนไซม์ (lytic enzyme) บรรจุอยู่ทำหน้าที่ย่อยสลายองค์ประกอบของผนังเซลล์ โดยเฉพาะกลูแคนที่เป็นโพลีแซ็กคาไรด์ ซึ่งทำให้ผนังเซลล์มีความแข็งแรง โดยเอนไซม์ทำให้ผนังเซลล์อ่อนตัวลง นอกจากนี้ยังพบเวซิเคิลที่บรรจุเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างผนังเซลล์ หรือเวซิเคิลที่มีสารตั้งต้น (precursor) สำหรับการสังเคราะห์ผนังเซลล์บรรจุอยู่ เอนไซม์ที่บรรจุภายในถูกปล่อยออกมาทำงาน ผลจากไลติกเอนไซม์ทำให้ผนังเซลล์อ่อนตัวลงตามด้วยการพองและยืดออกเป็นหน่อ ซึ่งเกิดได้เนื่องจากการเจริญเพิ่มขนาดของผนังเซลล์โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างผนังเซลล์ และสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ผนังเซลล์ การเจริญของผนังเซลล์นั้นพบเฉพาะที่หน่อ จากนั้นด้วยแรงดันจากความเต่ง (turgor pressure) ทำให้ไซโทพลาสซึมดันโป่งจนออกไปในพื้นที่ที่ล้อมรอบด้วยผนังเซลล์ซึ่งสร้างขึ้นใหม่ ในระหว่างที่หน่อมีการพัฒนานั้นผนังของเซลล์แม่และเซลล์ลูกยังติดกันอยู่ตลอด ออร์แกเนลล์ต่างๆ หนึ่งชุด และนิวเคลียส 1 นิวเคลียส ที่ได้จากการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสเข้าไปในหน่อตามด้วยการสร้างผนังกันระหว่างเซลล์แม่และหน่อ โดยการสร้างผนังกันชั้นแรก (primary septum) ประกอบด้วยไคติน และสร้างผนังกันชั้นที่สอง (secondary septum) ที่มีกลูแคนเป็นองค์ประกอบ เมื่อสร้างผนังกันจนสมบูรณ์เซลล์ลูกจะแยกออกจากเซลล์แม่ โดยปกติเซลล์ลูกจะมีขนาดประมาณ 1 ใน 3 ของเซลล์แม่จึงจะแยกตัวออกจากเซลล์แม่ เซลล์แม่สามารถแตกหน่อใหม่ได้ทันทีที่ส่วนเซลล์ลูกต้องมีการเจริญเพิ่มขนาดจนถึงขนาดวิกฤตก่อนจึงจะแตกหน่อได้ (รูปที่ 2.6) เมื่อเซลล์ลูกแยกออกจากเซลล์แม่แล้วบนเซลล์แม่จะปรากฏเป็นรอยเรียกว่า รอยแผลจากการแตกหน่อ (bud scar) ซึ่งเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) เห็นเป็นส่วนโค้งงอประกอบด้วยส่วนประกอบของผนังเซลล์และล้อมรอบด้วยวงแหวนไคติน (chitin ring) ที่มีไคตินปริมาณมาก ส่วนเซลล์ลูกจะปรากฏรอยที่เรียกว่า รอยแผลจากการเกิดหน่อ (birth scar) ซึ่งมีไคตินน้อยกว่า และไม่บุนเท่ารอยแผลจากการแตกหน่อ

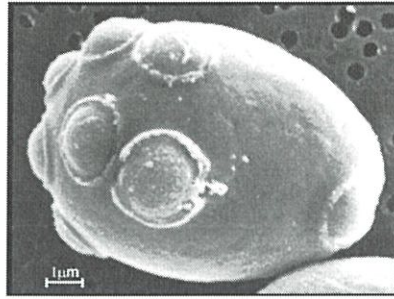


รูปที่ 2.6 ไดอะแกรมการแตกหน่อในเซลล์ยีสต์

ที่มา : Sastry, 2015

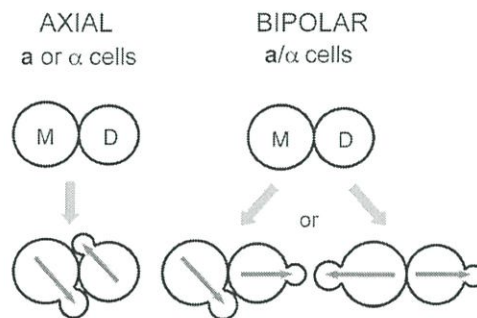
สำหรับ *S. cerevisiae* ตำแหน่งที่แตกหน่ออาจทับกับรอยแผลจากการเกิดหน่อแต่จะไม่ใช่ตำแหน่งเดียวกับรอยแผลจากการเกิดหน่อเสมอ จำนวนรอยแผลบนผิวของเซลล์ยีสต์จากการแตกหน่อหลายชั่วมีประโยชน์สำหรับการระบุอายุของเซลล์และหน่อที่สร้างได้มีจำนวนจำกัด เช่น *S. cerevisiae* ส่วนใหญ่บนผิวของเซลล์หนึ่งเซลล์ในระยะ stationary phase จะมีรอยแผลจากการแตกหน่อ 9-43 รอยแผล แต่อาจเป็นไปได้ที่อาจพบได้มากถึง 50 หรือ 100 รอยแผล และในกรณีของยีสต์ที่มีการแตกหน่อชั่วเดียวตำแหน่งที่แตกหน่อใหม่เกิดขึ้นเหนือรอยแผลจากการแตกหน่อเดิม ทำให้เกิดเป็นเยื่อมีลักษณะเป็นสันวงแหวนหรือเป็นปลอกซ้อนกัน (รูปที่ 2.7)

การแตกหน่อของ *S. cerevisiae* พบว่าไม่ได้เกิดแบบสุ่มรูปทรงของเซลล์ยีสต์มีความสำคัญในการกำหนดจุดที่มีการแตกหน่อ โดยทั่วไปเซลล์รูปร่างรีการแตกหน่อเกิดบริเวณที่มีความโค้งมากที่สุด หรือที่ปลายสุดของเซลล์ซึ่งมีรูปร่างแบบลูกกรอกบี้ ส่วนในเซลล์รูปร่างกลม เช่น *Debaryomyces* การแตกหน่อเกิดขึ้นที่ตำแหน่งต่างๆ แบบสุ่ม การเลือกตำแหน่งสำหรับการแตกหน่อใน *S. cerevisiae* พบว่ามีปัจจัยทางสรีรวิทยาและพันธุศาสตร์หลายอย่างเกี่ยวข้อง สำหรับปัจจัยทางพันธุศาสตร์นั้นพบว่าเมดิติงไทป์ (mating type) ของเซลล์มีความสำคัญ ทั้งนี้เซลล์ที่มีโครโมโซมหนึ่งชุดและมีเมดิติงไทป์เป็นเอ (a) หรืออัลฟา (α) มีรูปแบบการแตกหน่อตามแกน (axial budding pattern) โดยตำแหน่งที่แตกหน่อใหม่อยู่ใกล้กับหน่อเดิม การแตกหน่อตามแกน คือเมื่อเซลล์แม่และเซลล์ลูกจะแตกหน่อใหม่เซลล์แม่สร้างหน่อใกล้รอยแผลจากการแตกหน่อครั้งก่อน ส่วนเซลล์ลูกแตกหน่อใกล้รอยแผลจากการเกิดหน่อ ในกรณีของเซลล์ที่มีโครโมโซมสองชุด และมีเมดิติงไทป์เป็นเอ/อัลฟา (a/ α) เซลล์จะแสดงรูปแบบการแตกหน่อแบบสองขั้ว (bipolar budding pattern) คือรูปแบบการแตกหน่อซึ่งเกิดที่ทั้งสองขั้วหรือสองด้านของเซลล์ โดยเมื่อเซลล์ลูกแตกหน่อครั้งแรกจะเกิดที่ขั้วซึ่งไกลจากรอยแผลจากการเกิดหน่อ ในขณะที่เซลล์แม่จะแตกหน่อใกล้รอยแผลจากการแตกหน่อครั้งก่อน (รูปที่ 2.8)



รูปที่ 2.7 ภาพแสดงการแตกหน่อของยีสต์ ที่ประกอบด้วย bud และ birth scar

ที่มา : Graham, 2016



รูปที่ 2.8 รูปแบบตำแหน่งการแตกหน่อของ *S. cerevisiae* แบ่งเป็นการแตกหน่อตามแกน (axial budding) และแตกหน่อสองขั้ว (bipolar budding); M (mother cell) เซลล์แม่

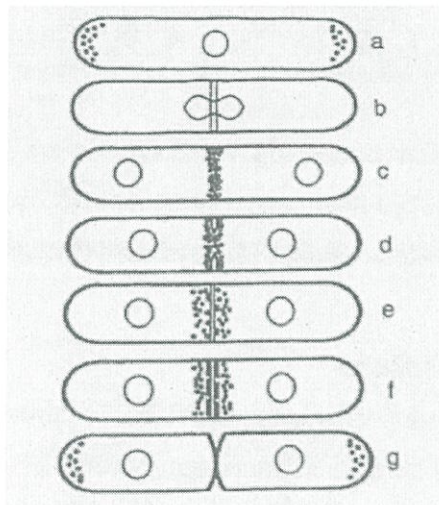
และ D (daughter cell) เซลล์ลูก

ที่มา : Park และ Bi, 2007

2.4.2 การแบ่งเซลล์แบบฟิสชัน

การแบ่งเซลล์แบบนี้พบในยีสต์สกุลเดียว คือ *Schizosaccharomyces* ซึ่งมีรูปร่างยาวหรือทรงกระบอก (cylindrical shaped) มีปลายทั้งสองด้านเป็นครึ่งวงกลม (hemi-spherical) ผลจากการแบ่งเซลล์แบบฟิสชันจะได้สองเซลล์ที่มีขนาดเท่ากัน การแบ่งเซลล์แบบนี้เหมือนกับที่พบในยูคาริโอตอื่นๆ มากกว่าการแตกหน่อ จากการศึกษาใน *Schizosaccharomyces pombe* เซลล์ลูกที่มีขนาดยาวประมาณ 8 ไมโครเมตร เจริญไปทางด้านยาวจากขั้วหรือปลายด้านเก่าของเซลล์ซึ่งเป็นด้านที่ไม่มีรอยแผลโดยใช้เวลาประมาณ 1 ใน 3 ของวงจรเซลล์ จากนั้นเปลี่ยนเป็นการเจริญไปทั้งสองขั้วของเซลล์ (bipolar growth) จากปลายด้านใหม่ซึ่งใช้เวลาอีกประมาณ 3 ใน 4 ของวงจรเซลล์ จนกระทั่งเริ่มไมโทซิสซึ่งเป็นตอนที่เซลล์มีความยาวคงที่ คือประมาณ 4 ไมโครเมตร ในขณะที่เซลล์หยุดขยายยาว ไมโทซิสจะดำเนินต่อไปจนได้สองนิวเคลียส แต่ละนิวเคลียสเคลื่อนไปยังปลายทั้งสองด้านและไปอยู่ที่ตำแหน่งประมาณ 1 ใน 4 ของความยาวเซลล์จากปลายแต่ละด้าน จากนั้นสร้างผนังกันและเกิดการแบ่งไซโทพลาสซึม ที่เรียกว่า ไซโทคิเนซิส (cytokinesis) ซึ่งการสร้างผนังกันมีความสัมพันธ์กับการจัดเรียงตัวของแอกติน (actin) และไมโครทิวบูลร่วมกับการเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์บริเวณตรงกลาง

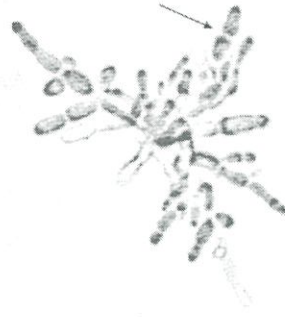
เซลล์ ในเซลล์ระยะอินเตอร์เฟส (interphase) แอ็กตินอยู่ที่ปลายทั้งสองด้านซึ่งกำลังเจริญ (รูปที่ 2.9a) กลุ่มของไมโครทิวบูลปรากฏตลอดความยาวของเซลล์จากปลายด้านหนึ่งจนถึงอีกด้านหนึ่ง เมื่อเริ่มไมโทซิสมีการจัดเรียงใหม่ของแอ็กติน และทิวบูลิน (tubulin) ของโครงสร้างเซลล์ (cytoskeleton) ไมโครทิวบูลหายไปมีสปินเดิล (spindle) สั้นๆ ในนิวเคลียสซึ่งขยายยาวเมื่อไมโทซิสดำเนินต่อไป แอ็กตินจากปลายทั้งสองด้านของเซลล์ย้ายที่เพื่อสร้างวงแหวนที่กลางเซลล์ทับนิวเคลียส (รูปที่ 2.9b) โดยตำแหน่งของวงแหวนนี้เป็นตำแหน่งที่จะสร้างผนังกัน เมื่อไมโทซิสสมบูรณ์ผนังกันชั้นแรกเริ่มเจริญจากช่องว่างเพอริพลาสมิกนอกเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อมีการสังเคราะห์ผนังกันวงแหวนที่เป็นสายจะกลายเป็นจุดของแอ็กตินเวจิกเคิล (รูปที่ 2.9c-e) จากนั้นสร้างผนังกันชั้นที่สองทั้งสองด้านของผนังกันชั้นแรก (รูปที่ 2.9e-f) เมื่อสมบูรณ์เกิดการแบ่งไซโทพลาสซึมและแอ็กตินกลับไปอยู่ที่ปลายทั้งสองด้าน



รูปที่ 2.9 การแบ่งเซลล์แบบฟิสชันใน *S. pombe*
ที่มา : Walker, 1998

2.4.3 การสร้างเส้นใย

การสร้างเส้นใย (filamentation) พบในยีสต์หลายสปีชีส์ โดยบางชนิดสร้างเส้นใยแท้ เช่น *Candida albicans* และ *Trichosporon* ยีสต์บางชนิดสร้างเส้นใยเทียม กระบวนการสร้างเส้นใยแท้และเทียมในยีสต์แตกต่างกัน นอกจากนั้นยีสต์ที่สร้างเส้นใยเหล่านี้เมื่อกลับไปอยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญยีสต์จะเจริญเป็นเซลล์เดี่ยว แสดงว่าการเจริญเป็นเส้นใยเป็นการปรับตัวของยีสต์เมื่อขาดแคลนอาหาร เช่น *S. cerevisiae* และ *Kluyveromyces marines* ซึ่งเป็นยีสต์ที่เพิ่มจำนวนโดยการแตกหน่อ พบว่าการมีแหล่งไนโตรเจนจำกัด และการมีหรือไม่มีออกซิเจนมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเส้นใย (รูปที่ 2.10)

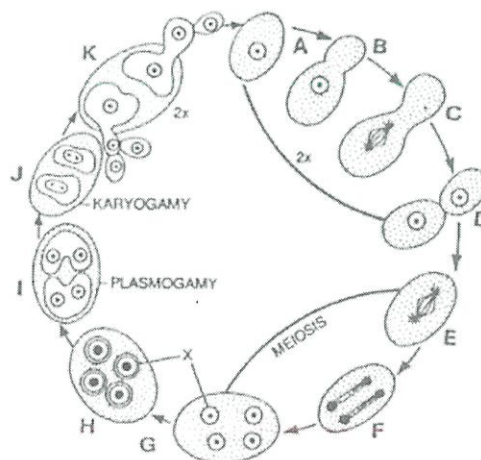


รูปที่ 2.10 ลักษณะเส้นใยเทียมของยีสต์ *S. cerevisiae*

ที่มา : Antonini และ Sudbery, 2004

2.5 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproduction)

ยีสต์ที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศแบ่งเป็น 2 พวก คือ ascomycetous yeast และ basidiomycetous yeast ระยะที่พบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เรียกว่า perfect state ส่วนระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเรียกว่า imperfect state การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของยีสต์ เกิดจากเซลล์หรือสปอร์ที่นิวเคลียสมีโครโมโซมหนึ่งชุด และมีเมดิติงไทป์ตรงกันข้ามที่เข้ากันได้มารวมกัน เกิดการรวมกันของไซโทพลาสซึม (plasmogamy) ตามด้วยการรวมตัวของนิวเคลียส (karyogamy) สร้างเป็นไซโกต และเซลล์ที่มีโครโมโซมสองชุดตามลำดับ ต่อจากนั้นนิวเคลียสที่มีโครโมโซมสองชุดมีการแบ่งไมโอซิสได้นิวเคลียสที่มีโครโมโซมหนึ่งชุดจำนวน 4 นิวเคลียส แต่ละนิวเคลียสพัฒนาต่อไปเป็นแอสโคสปอร์ (ascospore) หรือ แบสิดิโอสปอร์ (basidiospore) วงจรชีวิตการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของ *S. ludwigii* แสดงดังรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 วงจรชีวิตการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของ *S. ludwigii*

ที่มา : กิ่งจันทร์, 2557

2.5.1 ระบบเมตติง (mating system)

สำหรับระบบเมตติงของยีสต์แบ่งได้เป็น 2 ระบบ คือ

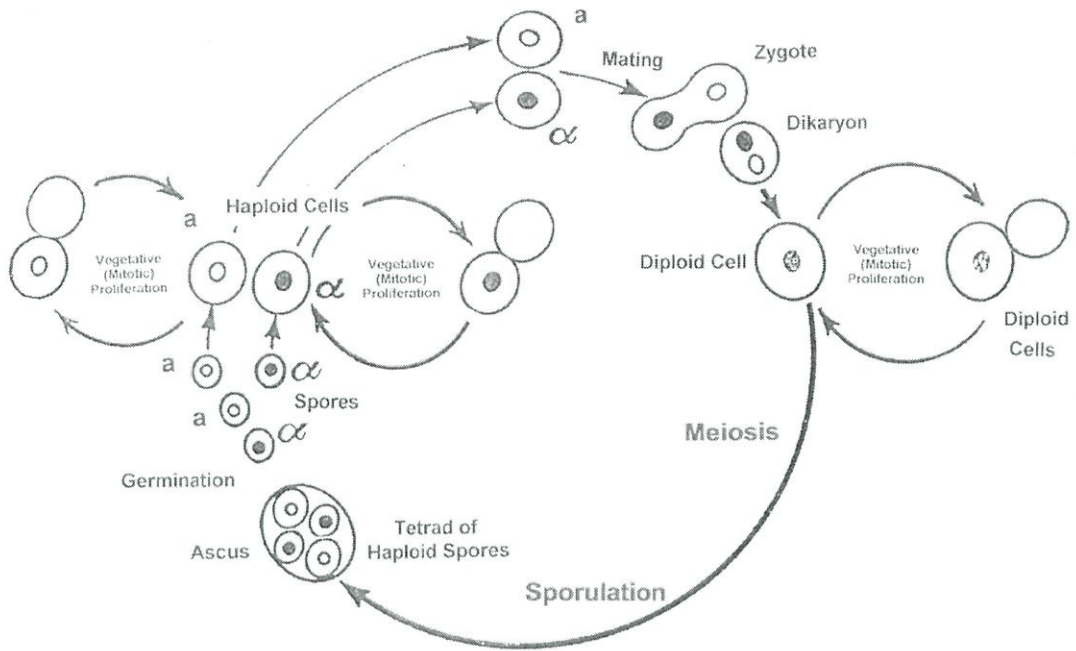
1. ระบบเมตติงสองขั้ว (bipolar mating system) คือระบบที่เมตติงไทป์ถูกกำหนดโดย incompatibility (mating) factor 1 แฟกเตอร์ ซึ่งอาจมี 2 อัลลีล ยีสต์ที่มีระบบเมตติงแบบสองขั้ว มีเมตติงไทป์ได้ 2 แบบ เช่น *S. cerevisiae* มีสายพันธุ์สองแบบคือ สายพันธุ์ที่เซลล์มีเมตติงไทป์เอ (a mating strain) และสายพันธุ์ที่มีเมตติงไทป์อัลฟา (α mating strain)
2. ระบบเมตติงสี่ขั้ว (tetrapolar mating system) คือระบบเมตติงที่กำหนดโดย incompatibility (mating) factor 2 แฟกเตอร์ ซึ่งแต่ละแฟกเตอร์มี 2 อัลลีล และแฟกเตอร์ทั้งสองสามารถเข้าคู่และแยกจากกันอย่างอิสระ ยีสต์ที่มีระบบเมตติงแบบนี้มีเมตติงไทป์ได้ 4 แบบ คือ A_1B_1 , A_1B_2 , A_2B_1 และ A_2B_2 พบใน ยีสต์ ที่สร้าง basidiospore เช่น *Leucosporidium scottii*, *Rhodosporidium dactyloideum* และ *Sakaguchi dactyloides*

2.5.2 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้าง ascospore

การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของยีสต์เกิดได้ทั้งระหว่างเซลล์ และระหว่าง ascospore หรือ basidiospore ในกรณีของ *S. cerevisiae* เซลล์ที่นิวเคลียสมีโครโมโซมหนึ่งชุดซึ่งมีเมตติงไทป์เข้ากันได้ คือถ้าเซลล์หนึ่งเป็นเมตติงไทป์เออีกเซลล์หนึ่งต้องเป็นเมตติงไทป์อัลฟา การที่เซลล์หลอมรวมกันโดยอาศัยเมตติงไทป์นี้อาจเรียกว่า เมตติง (mating) (รูปที่ 2.12)

ถ้านำเซลล์ที่มีโครโมโซม 2 ชุดที่กำลังเจริญไปเลี้ยงบนอาหารสำหรับการสร้างสปอร์ (sporulation medium) เซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงจนนิวเคลียสมีการแบ่งแบบไมโอซิส ได้นิวเคลียสที่มีโครโมโซมหนึ่งชุด 4 นิวเคลียส ซึ่งต่อมาพัฒนาเป็น ascospore ปกติเซลล์ที่มีโครโมโซมสองชุดของ *S. cerevisiae* ค่อนข้างคงที่ เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเกิดการแตกหน่อเพิ่มจำนวนแต่เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับสร้างสปอร์การแตกหน่อจะหยุด และเริ่มสร้าง ascospore โดยใช้เวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อม ในขณะที่การแตกหน่อใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง โดยช่วงเริ่มต้นของการสร้างสปอร์นั้นน้ำหนักของเซลล์จะเพิ่มแต่ระดับของดีเอ็นเอยังคงที่ หลังจากนั้นเกิดการถ่ายแบบของดีเอ็นเอ และดีเอ็นเอเพิ่มเป็นสองเท่าในเวลาประมาณ 4-8 ชั่วโมง ตามด้วยการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซิส ขั้นสุดท้ายของการสร้างสปอร์คือ มาทิวเรชัน (maturation) ของสปอร์

สำหรับ ascospore ของ *S. cerevisiae* มีรูปร่างกลมมีผนังค่อนข้างหนา ประกอบด้วย กลูแคนและแมนแนน แต่แตกต่างและแข็งแรงกว่าผนังเซลล์ปกติทำให้ ascospore ค่อนข้างทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมบางอย่าง เช่น ความร้อน และตัวทำละลาย ในแอสคัส (ascus) มี 4 สปอร์ที่จัดเรียงตัวเป็นรูปทรงสี่ด้าน (tetrahedron) (รูปที่ 2.13) แต่อาจพบว่ามีเพียง 2 หรือ 3 สปอร์



รูปที่ 2.12 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของ *S. cerevisiae*

ที่มา : Godfrey, 2016



รูปที่ 2.13 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ชนิด TEM แสดง ascus และ ascospore ของ

S. cerevisiae

ที่มา : BIOPHOTO ASSOCIATES, 2018

2.5.3 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้าง basidiospore

ยีสต์ที่สร้าง basidiospore บางชนิดมีวงจรชีวิตแบบที่มีสองระยะการเจริญ คือระยะที่เซลล์ยีสต์มีหนึ่งนิวเคลียสและมีโครโมโซมหนึ่งชุด และระยะที่เป็นเส้นใยซึ่งแต่ละเซลล์มีสองนิวเคลียส (dikaryotic hypha phase)

ยีสต์ที่สร้าง basidiospore มีทั้งพวกที่มีวงจรชีวิตแบบเฮเทอโรทาลลิก (heterothallic) และโฮโมทาลลิก (homothallic) สำหรับพวกที่มีวงจรชีวิตแบบเฮเทอโรทาลลิกนั้น การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเกิดจากคอนจูเกชัน (conjugation) สร้างเส้นใยที่เซลล์มีสองนิวเคลียสซึ่งมักมีการเชื่อมแคลมป์ (clamp connection) จากนั้นเกิดการรวมของนิวเคลียส และการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโทซิส สำหรับกระบวนการเมดิ้งในยีสต์ที่สร้าง basidiospore อาศัยฟีโรโมนเช่นเดียวกับที่พบในยีสต์ที่สร้าง ascospore

สำหรับวงจรชีวิตแบบโฮโมทาลลิกต่างจากวงจรชีวิตแบบเฮเทอโรทาลลิกคือเส้นใยที่เซลล์มีสองนิวเคลียส ซึ่งมีการเชื่อมแคลมป์สร้างจากเซลล์ที่มีโครโมโซมสองชุดโดยไม่มีคอนจูเกชัน

2.6 วงจรชีวิตของยีสต์

วงจรชีวิต (life cycle) ของยีสต์พบว่าบางระยะเซลล์มีโครโมโซมหนึ่งชุด และระยะที่เซลล์มีโครโมโซมสองชุด นอกจากนั้นยีสต์ที่สร้าง basidiospore พบว่าในวงจรชีวิตมีระยะที่เซลล์มีสองนิวเคลียสแยกกันที่ เรียกว่า ไดคารีออน (dikaryon) ระยะนี้คือ ระยะไดคารีโอติก (dikaryotic phase) ในวงจรเซลล์ของยีสต์ชนิดต่างๆ ระยะต่างๆ มีความสำคัญแตกต่างกันทำให้สามารถแบ่งยีสต์ออกเป็นหลายแบบ

ใน ค.ศ. 1984 Beckerich แบ่งวงจรชีวิตของยีสต์เป็น 4 แบบ ดังนี้

วงจรชีวิตแบบที่ 1 เป็นวงจรชีวิตที่ระยะแฮพลอยด์มีความสำคัญมาก และมีระยะดิพลอยด์สั้นมาก คือในช่วงที่เป็นไซโกตเท่านั้น โดยไซโกตจะมีการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซิสทันทีที่นิวเคลียสรวมกัน วงจรแบบนี้พบในสกุล *Debaryomyces*, *Lipomyces*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces* และ *Schwanniomyces* เป็นต้น

วงจรชีวิตแบบที่ 2 สำหรับวงจรชีวิตแบบนี้ระยะแฮพลอยด์ และระยะดิพลอยด์มีความสำคัญเท่ากัน ในยีสต์บางชนิด เช่น *S. cerevisiae* มีระยะไดคารีโอติกสั้นๆ เพราะว่าการรวมตัวของนิวเคลียสเกิดในไซโกตเท่านั้น *Hansenula wingei* เกิดการรวมกันของนิวเคลียสอย่างรวดเร็วในระหว่างคอนจูเกชัน นอกจากยีสต์ทั้งสองชนิดดังกล่าวแล้วยังมียีสต์ชนิดอื่นๆ ที่มีวงจรชีวิตแบบนี้ เช่น *Pichia burtonii*, *Saccharomycopsis fibuligera* และ *Kluyveromyces lactis*

สำหรับ *S. cerevisiae* มีทั้งสายพันธุ์ที่เป็นเฮเทอโรทาลลิก และสายพันธุ์โฮโมทาลลิก โดยในสายพันธุ์เฮเทอโรทาลลิก มี 2 ชนิด คือ สายพันธุ์เฮเทอโรทาลลิกเอ และสายพันธุ์เฮเทอโรทาลลิกอัลฟา เซลล์ที่พบในสายพันธุ์เฮเทอโรทาลลิกทั้งสองสายพันธุ์มีอยู่ 3 ชนิด คือ เซลล์แฮพลอยด์เอ เซลล์แฮพลอยด์อัลฟา และเซลล์ดิพลอยด์เอ/อัลฟา การผสมพันธุ์แบบอาศัยเพศเกิดโดยเซลล์ที่มีเมดิ้งไทป์ต่างกันเข้ามาหลอมรวมกัน ปรากฏการณ์นี้เกิดเนื่องจากเซลล์สามารถเปลี่ยนเมดิ้งไทป์ในระหว่างการเจริญเกิดเป็นระยะที่มี 2 นิวเคลียสสั้นๆ ต่อจากนั้นจึงมีการรวมของนิวเคลียสได้ไซโกตที่เป็นเฮเทอโรไซโกตเอ/อัลฟา ซึ่งต่อไปแตกหน่อให้เซลล์ที่มีโครโมโซมสองชุดแบบเอ/อัลฟา โดยปกติเซลล์เอ และเซลล์

อัลฟาจะหลอมรวมกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ เซลล์ที่มีโครโมโซมสองชุดแบบเอ/อัลฟา แบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซิส และสร้าง ascospore ภายใต้สภาวะที่ขาดแคลนสารอาหาร โดย ascospore ที่ได้ 2 สปอร์มีเมตติ้งไทป์เอ และอีก 2 สปอร์มีเมตติ้งไทป์อัลฟา ส่วนสายพันธุ์โฮโมทาเลติกนั้นเมื่อนำสปอร์เดี่ยวมาเลี้ยง หลังจากเซลล์เจริญระยะหนึ่งจะพบทั้งเซลล์เอ และเซลล์อัลฟาทำให้สามารถหลอมรวมกันสร้างไซโกตที่มีโครโมโซมสองชุดได้ไม่ว่าสปอร์เดี่ยวนั้นเดิมจะมีเมตติ้งไทป์เป็นเอหรืออัลฟา ปรากฏการณ์นี้เกิดเนื่องจากเซลล์สามารถเปลี่ยนเมตติ้งไทป์ในระหว่างการเจริญ ดังนั้นในธรรมชาติสายพันธุ์โฮโมทาเลติกของ *S. cerevisiae* มีเซลล์ที่มีโครโมโซมสองชุดเป็นส่วนใหญ่ (รูปที่ 2.14)

วงจรชีวิตแบบที่ 3 เป็นวงจรชีวิตที่มีระยะดิพลอยด์ยาว แต่มีระยะแฮพลอยด์สั้นมาก เช่น *Saccharomyces ludwigii* ซึ่งเป็นยีสต์ที่มีรูปร่างแบบมะนาวฝรั่ง

วงจรชีวิตแบบที่ 4 พบใน *Rodosporidium dactyloideum* พบทั้งระยะที่เป็นเส้นใย (mycelium phase) และระยะที่เป็นเซลล์ยีสต์ เป็นสายพันธุ์เฮเทอโรทาเลติกที่มีระบบเมตติ้งไทป์เป็นระบบเมตติ้ง 4 ขั้ว มีเซลล์แบ่งตามเมตติ้งไทป์ 4 ชนิด คือ A_1B_1 , A_1B_2 , A_2B_1 และ A_2B_2



รูปที่ 2.14 แสดงวงจรชีวิตของ *S. cerevisiae*

ที่มา : สาวิตรี, 2549

2.7 แหล่งสารอาหารสำหรับยีสต์

สำหรับการเจริญของยีสต์ต้องการสารอาหารซึ่งทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงาน แหล่งคาร์บอน รวมทั้งธาตุอาหารหลัก (major element) อื่นๆ ได้แก่ ไฮโดรเจน ออกซิเจน ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ และ ฟอสฟอรัส ต้องการธาตุอาหารบางชนิดในปริมาณค่อนข้างมาก (macroelement) ประกอบด้วย โพแทสเซียม และแมกนีเซียม ในขณะที่ธาตุอาหารบางชนิดยีสต์ต้องการในปริมาณน้อย (trace element) ได้แก่ แคลเซียม เหล็ก ทองแดง แมงกานีส สังกะสี โคบอลต์ และโมลิบดีนัม นอกจากนี้ยีสต์ยังต้องการสารประกอบบางชนิดเพื่อทำหน้าที่เป็น growth factor เช่น วิตามิน พิวรีน (purine) ไพริมิดีน (pyrimidine) และนิวคลีโอไทด์

2.7.1 คาร์บอน (carbon)

ภายในเซลล์ยีสต์ประกอบไปด้วยคาร์บอนประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ยีสต์เป็น chemoorganotroph ซึ่งใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงาน ส่วนใหญ่ สารอินทรีย์ที่ใช้ คือ น้ำตาลที่หาได้ง่าย ได้แก่ กากน้ำตาล น้ำอ้อย ข้าวฟ่างหวาน และน้ำตาลจากหัวบีท น้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ ได้แก่ แป้งมันชนิดต่างๆ รวมทั้งข้าวโพด และธัญพืชชนิดต่างๆ กลูโคสเป็นน้ำตาลที่ยีสต์ทุกชนิดสามารถเมแทบอลิซึมได้ แต่กลูโคสอาจไม่ได้เป็นน้ำตาลที่เมแทบอลิซึมได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด ในยีสต์ทุกชนิด โดยปกติในธรรมชาติกลูโคสจะไม่ได้มีอยู่อย่างอิสระแต่อยู่ในรูปของ พอลิเมอร์จำพวกเซลลูโลส แป้ง และโพลีแซ็กคาไรด์อื่นๆ นอกจากนี้กลูโคสมีผลยับยั้งการแอสซิมิเลตน้ำตาลชนิดอื่นของยีสต์

เมื่อยีสต์เจริญในอาหารที่มีกลูโคสความเข้มข้นสูงหน้าที่ของไมโทคอนเดรียจะถูกกดตันที่เรียกว่า Crabtree effect หรือ glucose effect หรือ catabolite repression ทำให้ยีสต์เปลี่ยนแปลงการเจริญเป็นแบบภายใต้สภาวะที่ไร้อากาศ นอกจากนี้ในสภาวะที่กลูโคสความเข้มข้นสูง ยีสต์แสดงการเจริญแบบ 2 ระยะ (diphasic) คือหลังจาก Lag phase ถึงระยะ Exponential phase กลูโคสจะถูกหมักเป็นเอทานอล โดยเมแทบอลิซึมแบบไม่ใช้ออกซิเจน ช่วงการเจริญที่สองยีสต์จะใช้เอทานอลสำหรับการเจริญโดยเมแทบอลิซึมแบบใช้ออกซิเจน ได้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลผลิตสุดท้าย

2.7.2 ไนโตรเจน (nitrogen)

ยีสต์มีไนโตรเจนในเซลล์ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบของอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์ที่มีปริมาณรองลงมาจากคาร์บอน สารหลายชนิดสามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ โดยแหล่งไนโตรเจนที่มีโมเลกุลขนาดเล็กและใช้ได้ง่าย เช่น แอมโมเนียม ในรูปของแอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ และแอมโมเนียมซัลเฟตมักใช้ในอุตสาหกรรมหมัก โดยเฉพาะแอมโมเนียมซัลเฟต เพราะนอกจากให้ไนโตรเจนแล้วยังให้ซัลเฟอร์ด้วย นอกจากนี้ไนโตรเจนอนินทรีย์แล้ว ยังมีไนโตรเจนอินทรีย์หลายชนิด เช่น กรดอะมิโน เปปไทด์ พิวรีน และเอมีน (amine) ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนของยีสต์บางชนิดได้ ยีสต์บางชนิดใช้เปปไทด์ขนาดเล็กได้ และการนำเปปไทด์เข้าสู่เซลล์ยีสต์ถูกจำกัดด้วยขนาดโมเลกุล โดยเปปไทด์จะถูกย่อยโดย

เอนไซม์เปปติเดส (peptidase) หลังจากผ่านเข้าไปในเซลล์ เช่น *S. cerevisiae* ใช้เปปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 2 โมเลกุล (dipeptide) และเปปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 3 โมเลกุล (tripeptide)

ในอาหารเลี้ยงยีสต์ถ้ามีแหล่งไนโตรเจนมากกว่าหนึ่งชนิด ไนโตรเจนเหล่านั้นจะถูกใช้ในอัตราส่วนที่ต่างกัน ยีสต์จะเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดก่อนเป็นอันดับแรก

2.7.3 ฟอสฟอรัส (phosphorus)

ยีสต์ใช้ฟอสฟอรัสในการสร้างพลังงานในรูป ATP สังเคราะห์นิวคลีโอโปรตีนภายในเซลล์ การแตกตัวของฟอสเฟตจะทำให้สารละลายมีสภาพเป็นบัฟเฟอร์ (buffer) ซึ่งช่วยรักษา pH ให้คงที่ และกรณีที่เซลล์ของยีสต์ขาดฟอสเฟตเซลล์จะอ่อนแอ โดยทั่วไปยีสต์ใช้ฟอสฟอรัสในรูปของเกลือฟอสเฟต

2.7.4 ซัลเฟอร์ (sulphur)

ยีสต์มีซัลเฟอร์ในเซลล์ประมาณ 0.4 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซัลเฟอร์เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของเซลล์ยีสต์ แหล่งซัลเฟอร์ที่ยีสต์ใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพคือ เกลือซัลเฟตในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งมีราคาถูก และเป็นแหล่งไนโตรเจนอีกด้วย (รัชนิกร, 2552)

2.8 ประโยชน์ที่ได้จากยีสต์ในอนาคต

เซลล์ยีสต์ประกอบด้วย กรดอะมิโน โปรตีน เกลือแร่ วิตามิน และธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของมนุษย์และสัตว์ ยีสต์จึงถูกนำมาเป็นอาหารคนและอาหารสัตว์ที่มากด้วยคุณค่าของวิตามิน เช่น การดื่มไวน์เพียงวันละนิดจะช่วยให้ร่างกายแข็งแรง ต้านทานโรค ทำให้มีอายุยืน เพราะมีสารอาหารและแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญ และการต้านทานโรค

ปัจจุบันนี้มีการศึกษาวิจัยเพื่อนำยีสต์ไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ โดยเริ่มต้นการศึกษาจากพื้นฐานเกี่ยวกับการค้นหาสายพันธุ์ของยีสต์ ซึ่งปัจจุบันพบมากกว่า 2500 สายพันธุ์ (150 ชนิด 50 สกุล) ในจำนวนนี้ คาดว่าจะเป็นยีสต์ที่มีการค้นพบใหม่เป็นครั้งแรกของโลกกว่า 100 ชนิด ซึ่งการศึกษาและค้นหาจำนวนยีสต์ในประเทศไทยนี้จะมีการเก็บรักษาไว้ในธนาคารจุลินทรีย์ของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ หรือ ไบโอเทค (BIOTEC Culture Collection) และสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (TISTR Culture Collection) การค้นหายีสต์ชนิดใหม่ๆ นี้ นำไปสู่การค้นหาศักยภาพของยีสต์ในรูปแบบต่างๆ เพื่อนำมาใช้ประโยชน์นอกเหนือจากเป็นอาหารและเครื่องดื่ม เช่น ยีสต์ที่สามารถผลิตแอลกอฮอล์จากเซลลูโลส ยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตสารโอเมก้า3 (omega 3) ซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว ช่วยบำรุงสุขภาพ และลดความดันโลหิต ยีสต์ในกระบวนการผลิตโคเอนไซม์คิวเทิน (coenzyme Q10) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น ความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีสมัยใหม่ทำให้ยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่นำมาใช้ประโยชน์อย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่ 7,000 ปีก่อน

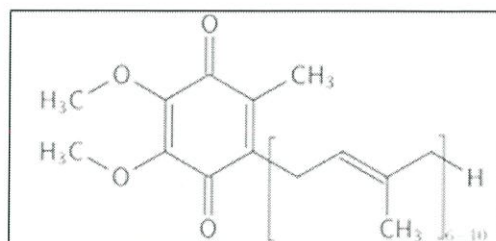
คริสต์ศักราช และส่งผ่านภูมิปัญญาจากรุ่นสู่รุ่น จวบจนปัจจุบัน จึงทำให้จุลินทรีย์ที่ชื่อว่า “ยีสต์” นี้เป็นจุลินทรีย์ที่มีการใช้งานอย่างแพร่หลาย (จุมพล, 2553)

2.9 ประวัติของโคเอนไซม์คิวเท็น

โคเอนไซม์คิวเท็นมีการค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ.1957 สกัดได้จากไมโทคอนเดรีย ในเซลล์หัวใจวัว โดนนักวิทยาศาสตร์ Frederick L. Crane มหาวิทยาลัย Wisconsin-Madison ประเทศสหรัฐอเมริกา สามารถสกัดโคเอนไซม์คิวเท็นออกมาในลักษณะเป็นผงละเอียดสีส้ม จากการศึกษารายละเอียดเพิ่มเติมพบว่า เป็นสารประกอบคล้ายวิตามิน ที่มีคุณสมบัติละลายในไขมันได้ (fat soluble vitamin-like substance) Morton นักวิทยาศาสตร์ชาวอังกฤษได้ทำการสกัดสารชนิดหนึ่งจากตับของหนู และตั้งชื่อสารนี้ว่า ยูบิควิโนน (ubiquinone) Dr.Karl Folker ได้ศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารนี้ พบว่าโคเอนไซม์คิวเท็นและยูบิควิโนนเป็นสารชนิดเดียวกัน Peter Mitchell ได้พบหน้าที่ของโคเอนไซม์คิวเท็นในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ ทำให้ได้รับรางวัลโนเบล (Nobel prize)

2.10 โครงสร้างทางเคมีของโคเอนไซม์คิวเท็น

โคเอนไซม์คิวเท็นมีชื่อเรียกตามรูปแบบที่พบโดยในรูปออกซิไดซ์ คือ Ubiquinone-10 หรือ CoQ₁₀ ในรูปรีดิวซ์ คือ Ubiquinole-10 หรือ CoQ₁₀ H₂ (Littarru และ Lambrechts, 2011) โคเอนไซม์คิวเท็นมีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับวิตามินเค (Vitamin K) โดยโคเอนไซม์คิวเท็นเกิดจากการรวมกันของวงแหวน benzoquinone กับสายยาวของ isoprenoid (รูปที่ 2.15) มีชื่อเรียกทางเคมีว่า 2,3-dimethoxy-5-methyl-6-decaprenyl benzoquinone โคเอนไซม์คิวเท็นมีสูตรโครงสร้างทางเคมี คือ C₅₉H₉₀O₄ ประกอบด้วยคาร์บอน 82.08 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรเจน 10.51 เปอร์เซ็นต์ และออกซิเจน 7.41 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 863.34 กรัมต่อโมล



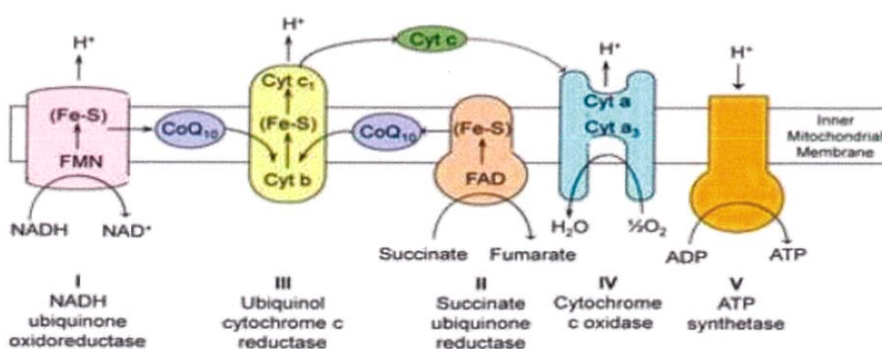
รูปที่ 2.15 โครงสร้างของโคเอนไซม์คิวเท็น

ที่มา : Jankowski และคณะ, 2016

2.11 ความสำคัญและประโยชน์ของโคเอนไซม์คิวเท็น

การนำโคเอนไซม์คิวเท็นมาใช้ในอาหาร และเนื้อเยื่อสัตว์ได้รับความสนใจเป็นพิเศษ เนื่องจากมีบทบาทสำคัญในกระบวนการทางชีวเคมีต่างๆ (Estrada และคณะ, 2006) โคเอนไซม์คิวเท็นแสดงในรูปที่ 2.16 เป็นส่วนประกอบหลักของการผลิตพลังงานในเซลล์ โคเอนไซม์คิวเท็นมีผลต่อการทำงานของเซลล์ทุกเซลล์ในร่างกาย มีความสำคัญต่อเนื้อเยื่อและอวัยวะทั้งหมด (Ndikubwimana และ Lee, 2014) โคเอนไซม์คิวเท็นทำหน้าที่รับอิเล็กตรอนจาก NADH และ $FADH_2$ ในการหายใจแบบใช้ออกซิเจน จะมีลำดับการทำงานดังนี้ อิเล็กตรอนจาก NADH และ $FADH_2$ ถูกส่งไปยัง enzyme complex I และ enzyme complex II จากนั้นโคเอนไซม์คิวเท็นที่อยู่ในรูปรีดิวซ์เป็นตัวรับอิเล็กตรอน enzyme complex IV และออกซิเจนจะมารับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย

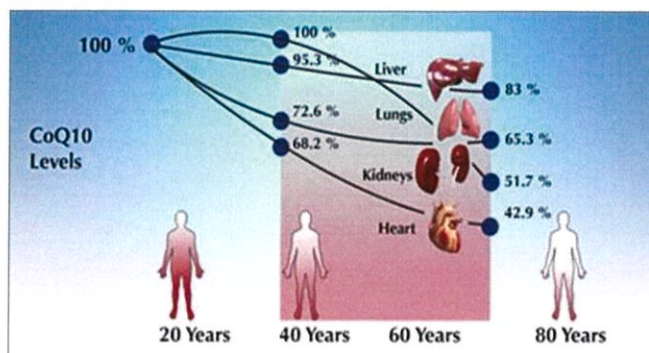
โคเอนไซม์คิวเท็นมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอย่างมีประสิทธิภาพป้องกันปฏิกิริยาออกซิเจนและความเสียหายอนุมูลอิสระ ปกป้องร่างกายจากความเสียหายที่เกิดจากโมเลกุลที่เป็นอันตราย (Jiménez และคณะ, 2007) ป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์และโปรตีนจากการเกิดออกซิเดชัน (Cluis, 2012) มีการพบหลักฐานว่า โคเอนไซม์คิวเท็นมีบทบาทในการควบคุมการถอดรหัสยีนบางส่วน และสามารถตอบสนองต่อการอักเสบและการเผาผลาญของคอเลสเตอรอล (Schmelzer และคณะ, 2007) นอกจากนี้โคเอนไซม์คิวเท็นได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในทางการแพทย์ เนื่องจากมีประโยชน์ในการรักษาโรกระบบประสาทและโรคหลอดเลือดหัวใจเสื่อม (Weant และ Smith, 2005)



รูปที่ 2.16 บทบาทสำคัญของโคเอนไซม์คิวเท็นในห่วงโซ่การขนส่งอิเล็กตรอน

ที่มา : Prathamesh, 2016

ในร่างกายมีการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นได้เองตามธรรมชาติแต่ระดับของโคเอนไซม์คิวเท็นจะลดลงเมื่ออายุมากขึ้นดังแสดงในภาพที่ 2.17 และพบโคเอนไซม์คิวเท็นปริมาณน้อยในผู้ที่เป็นโรคมะเร็ง โรคทางพันธุกรรม โรคเบาหวาน โรคหัวใจ และโรคพาร์กินสัน



รูปที่ 2.17 โคเอนไซม์คิวเทินที่ลดลงตามอายุ
ที่มา: Littarru และ Lambrechts, 2011

อาการของการขาดโคเอนไซม์คิวเทินได้แก่ ภาวะหัวใจล้มเหลว ความดันโลหิตสูงและอาการเจ็บหน้าอก ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินในร่างกายลดลงเมื่อมนุษย์อายุเพิ่มมากขึ้น ด้วยเหตุนี้ผู้สูงอายุจึงพึ่งพาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารโคเอนไซม์คิวเทินปริมาณของโคเอนไซม์คิวเทินที่แนะนำต่อวันประมาณ 12 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว (Rujiralai และคณะ, 2014) ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารโคเอนไซม์คิวเทินมีผลในเชิงบวกต่อผู้ป่วยที่เป็นโรคหัวใจวายร่วมกับมีภาวะกล้ามเนื้อหัวใจตายเฉียบพลัน (Hodgson และคณะ, 2002; Yang และคณะ, 2010) จากการศึกษาพบว่าโคเอนไซม์คิวเทินสามารถช่วยรักษาโรคกล้ามเนื้อ และโรคปริทันต์ (Yang และคณะ, 2010; Mancini และ Balercia, 2011)

2.12 การสังเคราะห์โคเอนไซม์คิวเทิน

โคเอนไซม์คิวเทินสามารถผลิตโดยการสังเคราะห์ทางเคมี การสกัดจากเนื้อเยื่อชีวภาพ (พืชและสัตว์) และการหมักจากจุลินทรีย์ (Laplante และคณะ, 2009) การผลิตโคเอนไซม์คิวเทินโดยการสังเคราะห์ทางเคมีไม่ได้รับความนิยม เนื่องจากใช้ตัวทำละลายและสารเคมีในกระบวนการสังเคราะห์มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และสารสกัดที่ได้ปนเปื้อนสารพิษจากการสกัด (Tokdar และคณะ, 2014)

2.13 แหล่งที่มาของโคเอนไซม์คิวเทินในพืชและสัตว์

โคเอนไซม์คิวเทินมีอยู่ตามธรรมชาติแต่พบได้ในปริมาณน้อยสามารถพบได้ในอาหารหลากหลายชนิด โดยเฉพาะในเนื้อสัตว์จะพบปริมาณมาก เช่น ตับ ไต เนื้อวัว เช่นเดียวกับน้ำมันถั่วเหลือง ปลาซาร์ดีน ปลาทู และถั่วลิสง (Langsjoen, 1994) ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินพบมากที่สุดใในเนื้อสัตว์ เนื้อปลา และอวัยวะภายใน เนื่องจากมีไมโทคอนเดรียปริมาณมาก (Reig และคณะ, 2015) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาโคเอนไซม์คิวเทินในเกสรผึ้ง (Xue และคณะ, 2012) การศึกษาโคเอนไซม์คิวเทินในอวัยวะสัตว์และพืชต่างๆ (ตารางที่ 2.1 และ 2.2)

ตารางที่ 2.1 ภาพรวมของโคเอนไซม์คิวเท็นในอาหารต่างๆ

Animalorgan	CoQ10 concentration[mg/kg]
Beef	
Heart	113
Liver	39-50
Muscle	26-40
Pork	
Heart	11.8-128.2
Liver	22.7-54.0
Muscle	13.8-45.0
Chicken	
Heart	116.2-132.2
Fish	
Sardine	5-64
Redflesh	43-67
Whiteflesh	11-16
Salmon	4-8
Tuna	5

ที่มา : Pravstและคณะ, 2010

ตารางที่ 2.2 ปริมาณของโคเอนไซม์คิวเท็นในพืชต่างๆ

Plant	CoQ10 concentration (g/kg)
Oils	
Soybean	54-280
Olive	4-160
Grapeseed	64-73
Sunflower	4-15
Nuts	
Peanuts	27
Walnuts	19
Hazelnuts	17
Almond	5-14
Vegetables	
Parsley	8-26
Broccoli	6-9

ตารางที่ 2.2 ปริมาณของโคเอนไซม์คิวเท็นในพืชต่างๆ (ต่อ)

Plant	CoQ10concentration[g/kg]
Vegetables	
Spinach	upto 10
Grape	6-7
Fruit	
Avocado	10
Blackcurrant	3
Strawberry	1
Orange	1-2
Grapefruit	1
Apple	1

ที่มา: Pravst และคณะ, 2010

2.14 การศึกษาแหล่งที่มาของโคเอนไซม์คิวเท็นในจุลินทรีย์

โคเอนไซม์คิวเท็นสามารถผลิตได้โดยการหมักของเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ เชื้อรา เช่น *Candida*, *Sporidobolus*, *Rhodotorula*, *Neurospora*, *Aspergillus* และ แบคทีเรีย เช่น *Agrobacterium*, *Paracoccus*, *Cryptococcus*, *Rhodobacter*, *Tricosporon* นอกจากนี้ยังมีการศึกษาโคเอนไซม์คิวเท็นในตัวอย่างอาร์ทีเมีย (Rujiralai และคณะ, 2014) ดังนั้นการผลิตโดยใช้จุลินทรีย์จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งโดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมีของเอนไซม์ในระดับเซลล์เพื่อใช้ผลิตโคเอนไซม์คิวเท็น

อย่างไรก็ตามเนื่องจากข้อจำกัดของการผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นในเซลล์จุลินทรีย์จึงมีการปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้วิธีทางพันธุวิศวกรรม (recombinant nucleic acid technology) การกลายพันธุ์ทางเคมี (chemical mutagenesis) และการรักษาความดันสูง (high hydrostatic pressure treatment) (Kim และคณะ, 2015)

การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่อาศัยการกลายพันธุ์ของแบคทีเรียและยีสต์ เนื่องจากสามารถผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นได้ปริมาณสูง (Tokdar และคณะ, 2014) การแยกสายพันธุ์โดยการกลายพันธุ์ และการเลือกสรรยับยั้งเป็นวิธีที่ประสบความสำเร็จมากที่สุดในการเพิ่มปริมาณของโคเอนไซม์คิวเท็น (Yen และ Shih, 2009) การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นโดยการกลายพันธุ์ทางเคมี และสายพันธุ์ recombinant บางชนิด แสดงดังตารางที่ 2.3

2.15 การสกัดโคเอนไซม์คิวเท็น

การสกัดด้วยของเหลว (liquid-liquid extraction) โดยใช้ส่วนผสมของเฮกเซนและ 2-โพรพานอล พบว่าเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการสกัดโคเอนไซม์คิวเท็นจากตัวอย่าง เช่นการสกัดโคเอนไซม์คิวเท็นจากใบยาสูบ สกัดโคเอนไซม์คิวเท็นในเส้นใยลินจี่โดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยเอทานอลและเฮกเซน และมีการใช้วิธีอัลตราโซนิค (Rujiralai และคณะ, 2014)

วิธีการสกัดทั้งสองวิธีนี้ก่อให้เกิดสารพิษจำนวนมากภายในกระบวนการ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และสุขภาพ ดังนั้นจึงต้องมีการกำจัดสารพิษ เพื่อให้ได้สารสกัดที่บริสุทธิ์ โดยการขจัดตัวทำละลายออก (Xue และคณะ, 2012)

การสกัดด้วยตัวทำละลายแบบเร่ง (accelerated solvent extraction, ASE) ได้รับการพัฒนาขึ้นครั้งแรกโดย Dionex Corporation ในปีพ.ศ. 2539 และได้มีการตรวจสอบความถูกต้องของระบบการสกัดด้วยตัวทำละลายแบบเร่ง ASE ซึ่งมีขั้นตอนการสกัดแบบใหม่เพื่อเป็นการเตรียมสารตัวอย่าง ประกอบด้วยอุณหภูมิและความดันที่เพิ่มขึ้นกับตัวทำละลายเหลว วิธีนี้ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ภายใต้สภาวะความดันสูงและอุณหภูมิสูงกว่าจุดเดือด ระบบ ASE ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการสกัดสูงใช้ปริมาณตัวทำละลายต่ำและระยะเวลาสั้นในการสกัด เมื่อเทียบกับเทคโนโลยีการสกัดแบบคลาสสิก เช่นการสกัดด้วยของเหลว และการสกัดด้วยซอกเลต ระบบ ASE กับเอทานอลนำมาใช้สำหรับสกัดโคเอนไซม์คิวเท็นจากเกสรผึ้ง และ acid-thermal treatment ด้วยสารสกัดจากน้ำมันปิโตรเลียมนำมาใช้สำหรับสกัดโคเอนไซม์คิวเท็นจาก *Agrobacterium tumefaciens* (Richter และคณะ, 1996)

ตารางที่ 2.3 การผลิตโคเอนไซม์คิวเท็นในสายพันธุ์ wild types การกลายพันธุ์ทางเคมี และ recombinant strain

Source Specific	CoQ10 content (mg/g DCW)	Reference
Wild type		
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ATCC 4452	1.9	Jeyaและคณะ (2010)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> KY-8593	1.2	Cluisและคณะ (2007)
<i>Paracoccusdenitrificans</i> ATCC 19367	0.86	Choi และคณะ (2005)
<i>Protaminobacterruber</i>	1.52	Jeyaและคณะ (2010)
<i>Pseudomonas</i> N84	1.2	Jeyaและคณะ (2010)
<i>Rhizobium radiobacter</i> ATCC 4452	5.3	Choi และคณะ(2005)
<i>Rhizobium radiobacter</i> A603-35-gapA	5.27	Koo และคณะ(2010)
<i>Rhizobium radiobacter</i> KCCM 10413	11.84	Ha และคณะ(2009)
<i>Rhizobium radiobacter</i> T6102	1.95	Seoและ Kim (2010)
<i>Rhizobium radiobacter</i> WSH 2601	1.91	Wu และคณะ (2003)
<i>Rhodobactersphaeroides</i> BCRC 13100	8	Yen และ Chiu (2007)

ตารางที่ 2.3 การผลิตโคเอนไซม์ควิเทินในสายพันธุ์ wild types การกลายพันธุ์ทางเคมี และ recombinant strain (ต่อ)

Source Specific	CoQ10 content (mg/g DCW)	Reference
<i>Rhodobactersphaeroides</i> BCRC 13100	4.5	
<i>Rhodobactersphaeroides</i> FERM-P4675	2.7	Yen และคณะ (2010)
Wild type		Choi และคณะ (2005)
<i>Sporidiobolusjohnsonii</i>	10.5	
Recombinant strain		Dixson และคณะ (2011)
<i>Escherichia coli</i>	0.51	
<i>Escherichia coli</i>	0.19	Zhang และคณะ (2007)
<i>Escherichia coli</i>	0.77	Zhang และคณะ (2007)
<i>Rhizobium radiobacter</i>	5.27	Zhang และคณะ (2007)
<i>Rhizobium radiobacter</i>	8.3	Koo และคณะ (2010)
<i>Escherichia coli</i>	0.29	Lee และคณะ (2007)
<i>Escherichia coli</i>	1.41	Choi และคณะ (2005)
<i>Escherichia coli</i>	2.428	Choi และคณะ (2009)

ที่มา : Tokdar และคณะ, 2014

2.16 การประยุกต์ใช้โคเอนไซม์คิวเท็นในทางการแพทย์

เนื่องจากโคเอนไซม์คิวเท็นมีหน้าที่หลากหลายในเซลล์สิ่งมีชีวิต จึงมีการศึกษาเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการป้องกัน รักษา และบรรเทาพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นจากโรคภัยต่างๆ ดังนี้

2.16.1 บทบาทของโคเอนไซม์คิวเท็นที่มีต่อระบบหัวใจ และหลอดเลือด

โคเอนไซม์คิวเท็นสามารถป้องกันความเสียหายของกล้ามเนื้อหัวใจระหว่างผ่าตัด โดยมีการทดลองให้โคเอนไซม์คิวเท็นกับผู้ป่วยก่อนผ่าตัดพบว่าการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจหลังผ่าตัดฟื้นฟูก้าวดีขึ้น และลดความเสียหายที่เกิดขึ้นกับกล้ามเนื้อหัวใจ (Quinzii และคณะ, 2007) นอกจากนี้ยังพบว่า การให้โคเอนไซม์คิวเท็นร่วมกับกระบวนการฟื้นฟูผู้ป่วยทำให้ผู้ป่วยมีการฟื้นฟูของระบบประสาทได้ดีขึ้น (Belardinelli และคณะ, 2005) โดยมีการตั้งสมมุติฐานว่า โคเอนไซม์คิวเท็นสามารถลดความรุนแรงของการบาดเจ็บจากการขาดเลือด (reperfusion injury) ของเนื้อเยื่อประสาท ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เซลล์ประสาทบาดเจ็บและตายจากสภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) โคเอนไซม์คิวเท็นมีความสามารถเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ยังมีบทบาทต่อการทำงานของหลอดเลือด มีผลต่อการทำหน้าที่ของเยื่อหลอดเลือด (endothelial cell) ถ้าปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็นในเลือดสูง สามารถช่วยรักษาระดับของไนตริกออกไซด์ (NO) ซึ่งทำหน้าที่ขยายหลอดเลือด ป้องกันการทำปฏิกิริยาระหว่างไนตริกออกไซด์ และซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2^-) โคเอนไซม์คิวเท็นอาจเกี่ยวข้องกับการเพิ่มระดับเอนไซม์ superoxide dismutase ซึ่งในการกำจัดอนุมูลอิสระของออกซิเจนที่อยู่ในรูปของซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (Quinzii และคณะ, 2007; Silver และคณะ, 2004)

2.16.2 บทบาทของโคเอนไซม์คิวเท็น เมื่อรับประทานร่วมกับยาลดคอเลสเตอรอล

ชีวสังเคราะห์ของโคเอนไซม์คิวเท็นมีวิถีร่วมกันกับชีวสังเคราะห์ของคอเลสเตอรอล ดังนั้นการให้ยายับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล ในกลุ่มยาสเตติน (statin) จึงมีผลต่อการลดระดับของโคเอนไซม์คิวเท็น และคาดว่าอาการข้างเคียงจากการใช้ยาสเตติน เช่น การปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ อาจมาจากผลของการลดระดับโคเอนไซม์คิวเท็น แม้ประเด็นผลข้างเคียงของยากับการลดระดับของโคเอนไซม์คิวเท็นยังคงเป็นประเด็นที่ถกเถียงกันอยู่ แต่การให้โคเอนไซม์คิวเท็นรูปแบบรับประทาน ร่วมกับการใช้ยาสเตติน พบว่าช่วยลดภาวะเครียดออกซิเดชัน ลดอัตราส่วนระหว่างคอเลสเตอรอล และไขมันชนิด HDL (high density lipoprotein) และช่วยรักษาระดับไนตริกออกไซด์ในเลือดของผู้ป่วย ซึ่งจะส่งผลดีต่อระบบหัวใจและหลอดเลือดได้

2.16.3 บทบาทการป้องกันความเสื่อมของระบบประสาท อันเนื่องมาจากภาวะเครียดออกซิเดชัน

โรคความเสื่อมของระบบประสาท (neurodegenerative disease) พบว่ามีความสัมพันธ์กับภาวะเครียดออกซิเดชันของเซลล์ประสาท และความเสียหายต่อไมโทคอนเดรีย

นำไปสู่การตายของเซลล์ประสาท มีรายงานว่าสาเหตุของโรคพาร์กินสัน (parkinson's disease) นั้นสัมพันธ์กับความเสียหายจากภาวะเครียดออกซิเดชันร่วมกับการสูญเสียหน้าที่ของไมโทคอนเดรีย ซึ่งทำให้โคเอนไซม์คิวเทินสามารถช่วยป้องกันความเสียหายที่จะเกิดขึ้น รวมทั้งการป้องกันความเสียหายต่อไมโทคอนเดรียเพื่อป้องกันการปลดปล่อยสารที่เป็นอันตรายต่อเซลล์

2.16.4 บทบาทการบำรุงผิวหนัง

ผิวหนังเป็นบริเวณที่ได้รับผลกระทบจากรังสีอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet; UV) จากการสัมผัสกับแสงแดดโดยตรงโดยรังสี UV สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระในชั้นผิวหนัง ก่อให้เกิดการชราภาพและการตายของเซลล์ผิวหนัง ดังนั้นโคเอนไซม์คิวเทินจึงใช้คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระป้องกันความเสียหายที่อาจเกิดขึ้นกับผิวหนังจากการสัมผัสกับรังสี UV ได้จึงนำมาผลิตผลิตภัณฑ์บำรุงผิวพรรณ ถึงแม้ว่าร่างกายจะสามารถสังเคราะห์โคเอนไซม์คิวเทินได้แต่การบริโภคอาหารที่มีโคเอนไซม์คิวเทินร่วมด้วยก็จำเป็นในผู้สูงอายุ เนื่องจากเมื่ออายุเพิ่มมากขึ้นความสามารถในการสังเคราะห์โคเอนไซม์คิวเทินลดลง และในปัจจุบันนี้บทบาทของโคเอนไซม์คิวเทินในทางการแพทย์ยังคงมีการศึกษาเพื่อนำไปใช้ในหลายๆ ด้าน สำหรับการเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาออกเหนือจากการรักษาที่มีอยู่ในปัจจุบัน

2.15 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Tronchoni และคณะ (2009) ศึกษาประสิทธิภาพในการใช้ high fructose ของยีสต์ มีความสำคัญมากสำหรับการผลิตไวน์ เพื่อแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นต่อการผลิตที่ทำให้กระบวนการหมักช้าลง หรือหยุดกระบวนการหมัก พบว่าอุณหภูมิในกระบวนการมีผลต่อการใช้น้ำตาลของยีสต์ *S. cerevisiae* ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 28 องศาเซลเซียส

Yasuo และคณะ (1978) ได้นำ high fructose corn syrup มาทำขนมปังโดยศึกษาผลกระทบของ high fructose corn syrup ต่อกระบวนการหมักด้วยยีสต์ขนมปัง และผลกระทบต่อคุณภาพของขนมปัง พบว่า high fructose corn syrup ไม่มีผลกระทบต่อคุณภาพของขนมปัง และยังเพิ่มผลผลิตในการหมักช่วงแรกของยีสต์ขนมปัง

Swiecito (2008) ศึกษาผลกระทบของโซเดียมไนเตรทต่อการต้านอนุมูลอิสระ และกระบวนการเมตาบอลิซึมของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ในเนตรทเป็นสารประกอบทางเคมีที่พบในธรรมชาติ มักนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารที่ผลิตเนื้อที่ผ่านการหมัก ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป และชีส ถ้าสิ่งมีชีวิตได้รับไนเตรทปริมาณมากจะเป็นอันตราย โซเดียมไนเตรทจะชักนำสมดุลของ prooxidative-antioxidative ในเซลล์ เมื่อนำเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* เลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณโซเดียมไนเตรทที่ปริมาณต่างๆ พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทในอาหารเลี้ยงเชื้ออัตราการรอดชีวิตต่อเซลล์ยีสต์ลดลง เนื่องจากโซเดียมมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ catalase และ dismutase

Rujiralai และคณะ (2014) ได้ศึกษาเกี่ยวกับวิธีการสกัดและการวิเคราะห์ที่เหมาะสมสำหรับโคเอนไซม์คิวเท็นในอาหารที่แตกต่างกัน พบว่าวิธีที่ใช้กันทั่วไปในการสกัดโคเอนไซม์คิวเท็น จากตัวอย่างต่างๆ คือการสกัดด้วยของเหลว และการสกัดอัลตราโซนิก

Clarke และคณะ (1991) ศึกษาการสังเคราะห์ยูบิควิโนนใน *S. cerevisiae* โดยใช้ตัวทำละลายระหว่างเฮกเซน และเอทานอล อัตราส่วน 5:2 ในการย่อยเซลล์และสกัดโคเอนไซม์คิวเท็น

Bacon และคณะ (1969) การสกัดเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* 1 ใน 3 ของสารประกอบกลูแคน ในผนังเซลล์สามารถทำลายได้โดย 3 เปอร์เซ็นต์ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ wild type

3.2 สารเคมี

3.2.1 HFCS (สถานบำบัดน้ำทิ้ง, นิคมอุตสาหกรรมสหพัฒน์ปิบูล (ศรีราชา ชลบุรี))

3.2.2 แอมโมเนียมไนเตรท (ammonium nitrate, $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$)

3.2.3 โพแทสเซียมไนเตรท (potassium nitrate, KNO_3)

3.2.4 แอมโมเนียมคลอไรด์ (ammonium chloride, NH_4Cl)

3.2.5 แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulphate, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)

3.2.6 2-แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (di-ammonium hydrogen phosphate, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$)

3.2.7 โซเดียมไนเตรท (sodium nitrate, NaNO_3)

3.2.8 โซเดียมไนไตรท์ (sodium nitrite, NaNO_2)

3.2.9 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide, NaOH)

3.2.10 เฮกเซน (hexane, AR grade Macron)

3.2.11 เอทานอล (ethanol absolute 99.9% denatured, AR grade QRec)

3.2.12 เมทานอล 99.9 เปอร์เซ็นต์ (HPLC grade SIGMA -ALDRICH)

3.2.13 สารมาตรฐานโคเอนไซม์คิวทีน (Sigma-Aldrich, USA)

3.2.14 ฟีนอล 5 เปอร์เซ็นต์

3.2.15 กรดซัลฟิวริก 98 เปอร์เซ็นต์ (sulfuric acid)

3.2.16 ไดเบสิกโซเดียมฟอสเฟต (dibasic sodium phosphate, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)

3.2.17 โซเดียมโพแทสเซียมทาทเรต (sodium potassium tartrate, $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)

3.2.18 คอปเปอร์ซัลเฟต (copper (II) sulfate, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

3.2.19 แอมโมเนียมโมลิบเดต (ammonium molybdate $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)

3.2.20 โซเดียมอาซีนเนทไดเบสิกเฮปตาไฮเดรต (sodium arsenate dibasic heptahydrate, $\text{Na}_2\text{AsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

3.2.21 โซเดียมซัลเฟต (sodium sulfate, Na_2SO_4)

3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 3.3.1 หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave, HIRAYAMA)
- 3.3.2 ตู้ปลอดเชื้อ (lamina air flow, Microtech)
- 3.3.3 เครื่องชั่ง 3 และ 4 ตำแหน่งรุ่น GF-800 AND
- 3.3.4 เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter, Mettler Toledo)
- 3.3.5 กล้องจุลทรรศน์ (microscope, Nikon Eclipse Ci, Japan)
- 3.3.6 ตู้อบลมร้อน (hot air oven, Memmerk)
- 3.3.7 ตู้บ่มเชื้อ (incubator, Contherm polar 1000 incubator)
- 3.3.8 ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (incubator shaker, Contherm polar 1000 incubator)
- 3.3.9 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge, Hermle Labortechnile GmbH)
- 3.3.10 เครื่องหมุนวนผสมสาร (MINI Labroller Edison NJ USA)
- 3.3.11 สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV spectrophotometer, UV-18000 SHIMADZU)
- 3.3.12 microplate reader (BMG Lantech)
- 3.3.13 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography ; HPLC)
- 3.3.14 คอลัมน์ Luna 5u C18(2) 100A ขนาด 250×4.60 มิลลิเมตร (Phenomenex)
- 3.3.15 UV spectrophotometer (UV-1800 SHIMADZU)
- 3.3.16 Column oven (CTO-10AS VP SHIMADZU)
- 3.3.17 Controller (CMB 20A SHIMADZU)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae*

3.4.1.1 ศึกษาลักษณะของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ด้วยวิธี wet mount

นำเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ที่เลี้ยงบนอาหาร YM agar plate (ภาคผนวก ก-1.1) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อลงบนสไลด์ที่ล้างสะอาดพร้อมหยดน้ำ 1 หยดบนสไลด์ และปิดด้วย cover slip ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า และสังเกตลักษณะโคโลนีของเชื้อยีสต์บนอาหาร YM agar plate

3.4.1.2 ศึกษาการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหาร YM ที่แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส และ fructose syrup

เตรียมอาหาร YM สูตรปกติ (ภาคผนวก ก-1.2) และ YM สูตรที่เปลี่ยนแปลงแหล่งคาร์บอนเป็น fructose syrup (ภาคผนวก ก-1.3) ใส่พลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร นำสารละลายเชื้อใส่ลงในอาหารปริมาณเชื้อ 3 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

3.4.2 คุณสมบัติของ fructose syrup

นำ fructose syrup วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) สังเกตลักษณะ และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลด้วยวิธี Somogyi-Nelson และ Phenol sulfuric (ภาคผนวก ข-2.1 และ 2.2)

3.4.3 ศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหาร YM ที่แปรผันแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน

3.4.3.1 การเตรียม inoculum เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae*

เลี้ยงเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* บนอาหาร YM broth (ภาคผนวก ก-1.1) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1

3.4.3.2 ศึกษาการเจริญและการใช้น้ำตาลของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหาร YM ที่แปรผันความเข้มข้นแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน เปรียบเทียบระหว่างเลี้ยงในพลาสติกขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร

เตรียมอาหาร YM โดยมีแหล่งคาร์บอนเป็น fructose syrup ที่ความเข้มข้น 10, 15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ แหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมไนเตรท 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก-2) ใส่พลาสติกขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหารพลาสติกละ 100 มิลลิลิตร นำสารละลายเชื้อใส่ลงในอาหารปริมาณเชื้อ 3 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และวิเคราะห์น้ำตาลด้วยวิธี Somogyi-Nelson และ Phenol sulfuric

3.4.3.3 ศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหาร YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น fructose syrup และไนโตรเจนชนิดต่างๆ

เตรียมอาหาร YM ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร โดยแหล่งคาร์บอนคือ fructose syrup ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และแหล่งไนโตรเจน 0.5 เปอร์เซ็นต์ คือ แอมโมเนียมไนเตรท, แอมโมเนียมคลอไรด์, แอมโมเนียมซัลเฟต, 2-แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต, โซเดียมไนไตรท์, โซเดียมไนเตรท และโพแทสเซียมไนเตรท (ภาคผนวก ก-3) นำสารละลายเชื้อใส่ลงในอาหารปริมาณเชื้อ 3 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0 และ 48 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และวัด pH

3.4.3.4 ศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหาร YM ที่แปรผันความเข้มข้นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน

เตรียมอาหาร YM ที่แปรผันความเข้มข้นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน ใส่พลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร โดยแหล่งคาร์บอนคือ fructose syrup ที่ความเข้มข้น 1, 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ และแหล่งไนโตรเจนคือ โซเดียมไนเตรท (NaNO_3) ที่ความเข้มข้น 0.5, 0.7, 1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก-4) นำสารละลายเชื้อใส่ลงในอาหารปริมาณเชื้อ 3 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0 และ 48 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และวัด pH

3.4.3.5 เลี้ยงเชื้อแบบ fed batch ในอาหาร YM ที่มีแหล่งคาร์บอน fructose syrup และแหล่งไนโตรเจนโซเดียมไนเตรท

เลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหาร YM ที่มีอัตราส่วนของ fructose syrup และโซเดียมไนเตรท คือ 1:1.5 และ 2:0.5 เปอร์เซ็นต์ เตรียมอาหารแต่ละสูตรในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร

พลาสติกที่ 1 ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 25 มิลลิลิตร (จำนวน 4 พลาสติก)

พลาสติกที่ 2 ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 50 มิลลิลิตร (จำนวน 4 พลาสติก)

นำสารละลายเชื้อใส่ลงในอาหารปริมาณเชื้อ 3 เปอร์เซ็นต์ โดยพลาสติกที่ 1 เติมเชื้อ 0.75 มิลลิลิตร และพลาสติกที่ 2 เติมเชื้อ 1.5 มิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที

ฟลาสก์ที่ 1	(1.1) เมื่อเลี้ยงเชื้อยีสต์ครบ 12 ชั่วโมง	เติมอาหาร 25 มิลลิลิตร
	(1.2) เมื่อเลี้ยงเชื้อยีสต์ครบ 24 ชั่วโมง	เติมอาหาร 25 มิลลิลิตร
	(1.3) เมื่อเลี้ยงเชื้อยีสต์ครบ 36 ชั่วโมง	เติมอาหาร 25 มิลลิลิตร
	(1.3) เมื่อเลี้ยงเชื้อยีสต์ครบ 48 ชั่วโมง	เติมอาหาร 25 มิลลิลิตร
เติมอาหาร 25 มิลลิลิตร ทุกๆ 12 ชั่วโมง จนปริมาณอาหารสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิลิตร		
ฟลาสก์ที่ 2	(2.1) เมื่อเลี้ยงเชื้อยีสต์ครบ 12 ชั่วโมง	เติมอาหาร 50 มิลลิลิตร
	(2.2) เมื่อเลี้ยงเชื้อยีสต์ครบ 24 ชั่วโมง	เติมอาหาร 50 มิลลิลิตร
	(2.3) เมื่อเลี้ยงเชื้อยีสต์ครบ 36 ชั่วโมง	เติมอาหาร 50 มิลลิลิตร
	(1.3) เมื่อเลี้ยงเชื้อยีสต์ครบ 48 ชั่วโมง	เติมอาหาร 50 มิลลิลิตร

เก็บตัวอย่าง 2 มิลลิลิตร ทุกๆ 12 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

3.4.4 ศึกษาการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography ; HPLC)

นำสารละลายเชื้อที่เลี้ยงในอาหาร YM ที่มีแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนเป็น fructose syrup และโซเดียมไนเตรท ปั่นเหวี่ยงที่ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนตะกอนเซลล์มาทำการย่อยเซลล์ด้วย 2 วิธี

1. ผสมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2 นอร์มอล ปริมาณ 50 มิลลิลิตร และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 180 นาที หลังจากนั้นนำเซลล์มาล้างด้วยน้ำกลั่นจน pH เป็นกลาง และสกัดโคเอนไซม์คิวเทินด้วยเอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 120 นาที

2. ด้วยสารละลายผสมระหว่างเฮกเซน และเอทานอลในอัตราส่วน 5:2 เป็นเวลา 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที

นำเฉพาะส่วนของเอทานอลมาวิเคราะห์ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography ; HPLC) มี mobile phase คือ เมทานอล:เอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1:9 ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินด้วย UV-detector ที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร (ภาคผนวก ข-4)

บทที่ 4

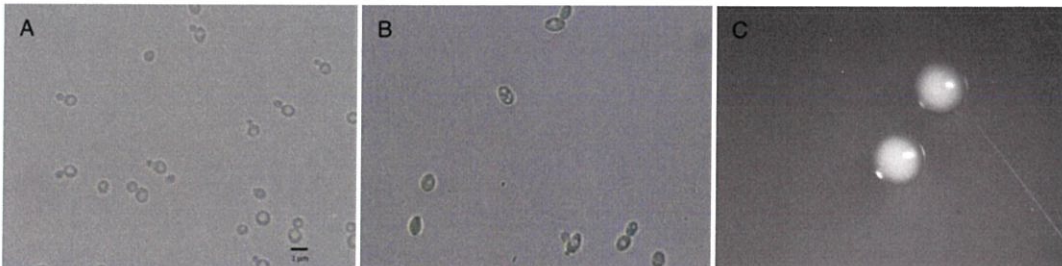
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae*

4.1.1 ศึกษาลักษณะของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การศึกษาลักษณะของเซลล์ยีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า (รูปที่ 4.1) ลักษณะของเซลล์มีรูปร่างกลม (spheroid) หรือค่อนข้างกลม (subglobose) ขนาดของเซลล์ประมาณ 1.487 ไมโครเมตร ลักษณะของเซลล์พบทั้งการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศคือ การแตกหน่อ (รูปที่ 4.1A) และการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศที่สร้างสปอร์คือ ascospore ภายในเซลล์ (รูปที่ 4.1B)

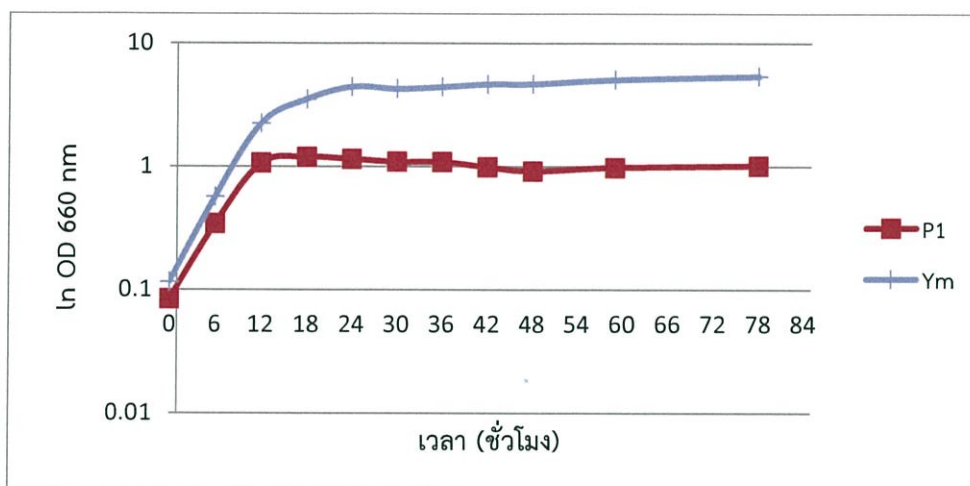
การศึกษาลักษณะของโคโลนีบนอาหาร YM agar plate โคโลนีมีลักษณะรูปร่างกลม (circular) ไม่แบนเรียบไปตามผิวหน้าของอาหาร (raised) ขอบโคโลนีมีลักษณะเรียบ (entire) ผิวของโคโลนีจะด้านกว่าโคโลนีของแบคทีเรีย สีโคโลนีเป็นสีครีม โคโลนีที่อายุ 48 ชั่วโมงมีขนาด 1.5 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.1C)



รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะเซลล์ของยีสต์ *S. cerevisiae* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า การแตกหน่อ (budding) (A) ลักษณะ ascospore (B) และลักษณะโคโลนีบนอาหาร YM agar plate (C)

4.1.2 ศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหาร YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส และ fructose syrup

เลี้ยงเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหาร YM สูตรที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส และ fructose syrup ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที แสดงการเจริญเติบโต (OD_{660}) ที่ชั่วโมงต่างๆ ดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 การเจริญ (OD_{660}) ของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ชั่วโมงต่างๆ ในอาหาร YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส (YM) และ fructose syrup (P1) ตามลำดับ

จากรูปที่ 4.2 แสดงการเจริญ (OD_{660}) โดยยีสต์ที่เจริญในอาหาร YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส เจริญได้ดีกว่ายีสต์ที่เลี้ยงในอาหาร YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น fructose syrup

จากผลการทดลองเชื้อยีสต์มีอัตราการใช้กลูโคสได้เร็วกว่าฟรุกโตส (Cason และ Reid 1987) เป็นผลทำให้อาหาร YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส ยีสต์มีการเจริญได้เร็วกว่าอาหาร YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น fructose syrup ซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากโรงงานผลิต HFCS ใน fructose syrup ประกอบไปด้วย น้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และ higher saccharides (di- และ oligosaccharide) เช่น ซูโครส (White และคณะ, 2015) การใช้น้ำตาลในช่วงแรกยีสต์จะใช้กลูโคส และฟรุกโตสอย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นจะหลั่งเอนไซม์อินเวอร์เทสออกมานอกเซลล์ย่อยซูโครสก่อนนำเข้าสู่เซลล์ในรูปของน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตส (Patrick และ John, 2006) การเจริญของยีสต์ในอาหาร YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น fructose syrup จึงเจริญช้า

4.2 คุณสมบัติของ fructose syrup

ลักษณะทั่วไปของ fructose syrup (รูปที่ 4.3) เป็นสารละลายใส สีเหลือง ชั้นหนืด มีตะกอนจึงต้องนำมากรองก่อนใช้งาน มี pH เท่ากับ 2.87



รูปที่ 4.3 ลักษณะของ fructose syrup

วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson เนื่องจากน้ำตาลรีดิวซ์มีหมู่แอลดีไฮด์อิสระสามารถถูกออกซิไดส์ได้ง่ายด้วยตัวออกซิไดส์อย่างอ่อนเช่น คอปเปอร์ (copper) วิธีนี้สามารถใช้วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวได้ เช่น กลูโคส ฟรุกโตส กาแล็กโตส ทั้งที่มีหมู่แอลดีไฮด์และคีโตนอิสระ เมื่อนำโมโนแซ็กคาไรด์ละลายในเบสจะเกิดปฏิกิริยา enolization และ keto-enol tautomerization และนำไปสู่การเกิด isomerization ฟรุกโตสจึงสามารถเปลี่ยนเป็นกลูโคสได้ เรียกปฏิกิริยาเหล่านี้ว่า Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein transformation (Topper, 1950) โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลฟรุกโตสความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร (รูปที่ 4.4) สำหรับ fructose syrup ทำการเจือจางที่ 100 เท่า และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร ได้ค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 0.613

จากรูปที่ 4.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร และสารละลายมาตรฐานน้ำตาลฟรุกโตสความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้สมการเส้นตรงคือ $y = 0.0028x - 0.0053$

เมื่อ y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

x คือ ความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุกโตส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

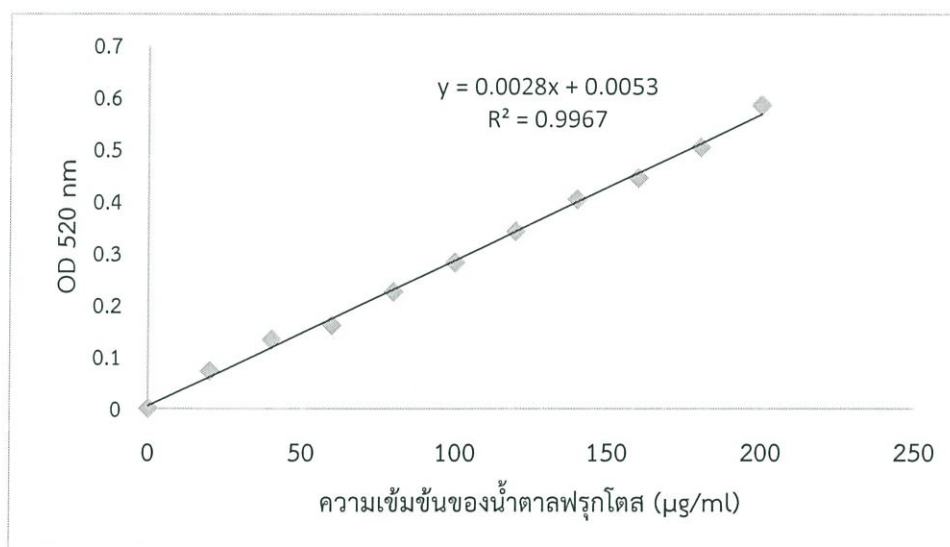
ความเข้มข้นของ fructose syrup

$$\text{จากสมการ } y = 0.0028x - 0.0053$$

$$x = 220.8214 \text{ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร}$$

ทำการเจือจางสารละลาย fructose syrup 100 เท่า

สารละลาย fructose syrup เข้มข้น 22,082.14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 22.08 กรัมต่อลิตร หรือ 2.2 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 4.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร และสารละลายมาตรฐานน้ำตาลฟรุกโตสความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol sulfuric ใช้วิเคราะห์คาร์โบไฮเดรตทั้งหมดในตัวอย่าง เช่น โมโนแซ็กคาไรด์ ไดแซ็กคาไรด์ โพลีแซ็กคาไรด์ และโอลิโกแซ็กคาไรด์ โดยกรดซัลฟิวริกจะสลายพันธะไกลโคซิดิกให้ได้เป็นน้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์ (Nielsen, 2009) โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลฟรุกโตสความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร (รูปที่ 4.5) สำหรับ fructose syrup ทำการเจือจางที่ 5000 เท่า และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร ได้ค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 0.491

จากรูปที่ 4.5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร และสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้สมการเส้นตรงคือ $y=0.0046x+0.0083$

เมื่อ y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

x คือ ความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุกโตส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

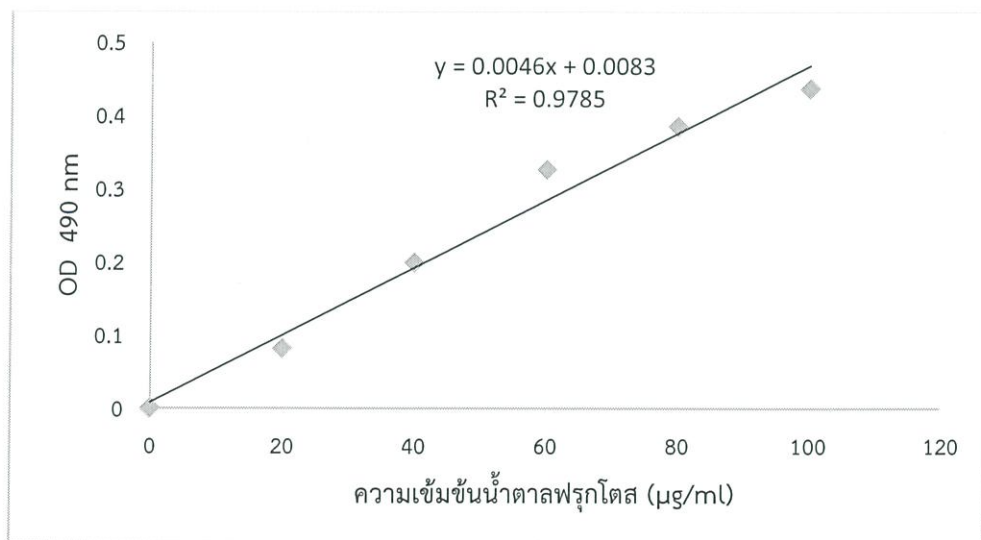
ความเข้มข้นของ fructose syrup

จากสมการ $y = 0.0046x + 0.0083$

$x = 83.41$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ทำการเจือจางสารละลาย fructose syrup 5000 เท่า

สารละลาย fructose syrup เข้มข้น 417,065.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 417.06 กรัมต่อลิตร หรือ 41.7 เปอร์เซ็นต์



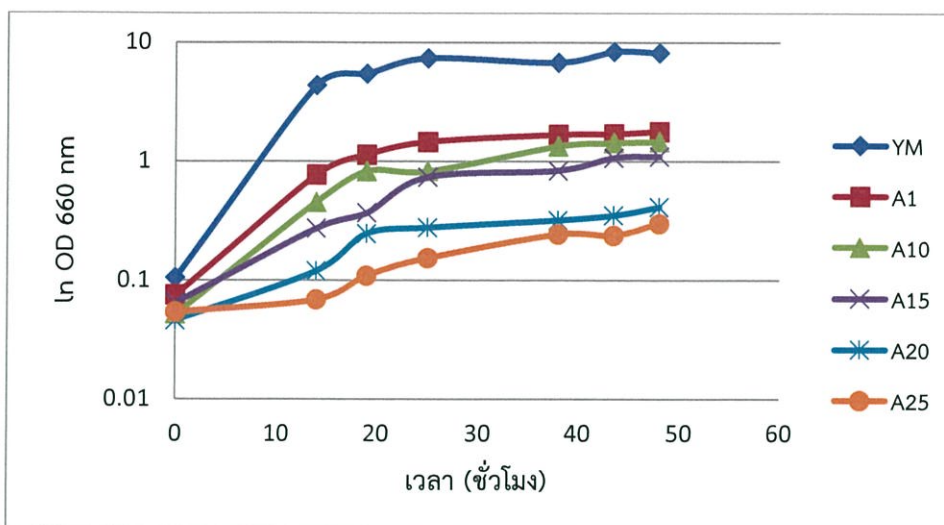
รูปที่ 4.5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร และสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.3 ศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหาร YM

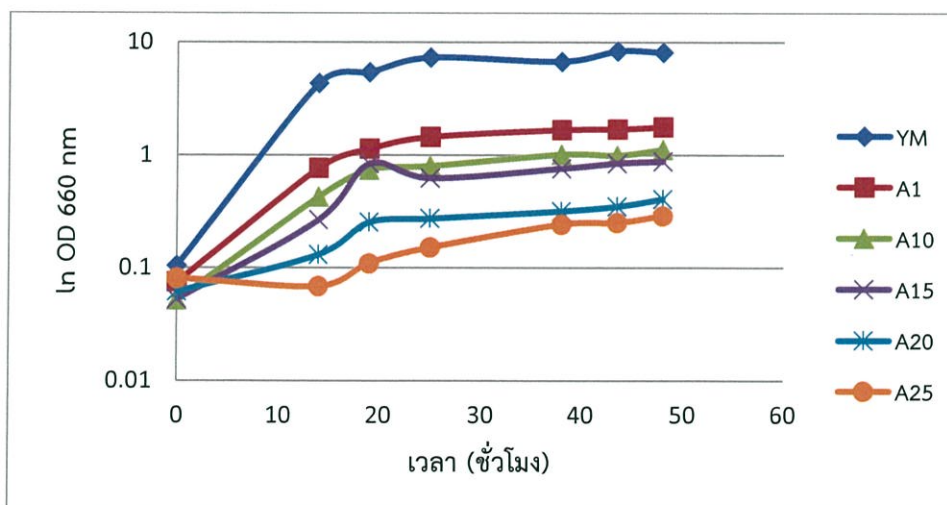
4.3.1 ศึกษาการเจริญและการใช้น้ำตาลของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหาร YM ที่แปรผันความเข้มข้นแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน

เลี้ยงเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหาร YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส และ fructose syrup ที่ความเข้มข้น 1, 10, 15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (YM, A1, A10, A15, A20 และ A25 ตามลำดับ) แหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมไนเตรท 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในพลาสติก ขนาด 250 (S) และ 500 (L) มิลลิลิตร ปริมาตรอาหารพลาสติกละ 100 มิลลิลิตร การเจริญ (OD₆₆₀) ของยีสต์ *S. cerevisiae* แสดงดังรูปที่ 4.6 และ 4.7 สังเกตได้ว่าการเลี้ยงเชื้อยีสต์ในพลาสติกขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร มีการเจริญของเชื้อใกล้เคียงกัน ในการทดลองนี้ใช้ fructose syrup เป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคส จากผลการทดลองศึกษาการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหาร YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส และ fructose syrup ในปริมาตรของแหล่งคาร์บอนเท่ากัน การเจริญของเชื้อยีสต์ที่ใช้ fructose syrup มีการเจริญน้อยกว่ายีสต์ที่ใช้น้ำตาลกลูโคส ในการทดลองนี้จึงเพิ่มปริมาณของ fructose syrup ขึ้นเป็น 10, 15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ การเจริญ (OD₆₆₀) ของยีสต์ *S. cerevisiae* แสดงดังรูปที่ 4.6 และ 4.7 เมื่อความเข้มข้นของ fructose syrup เพิ่มขึ้นการเจริญของเชื้อยีสต์ลดลง

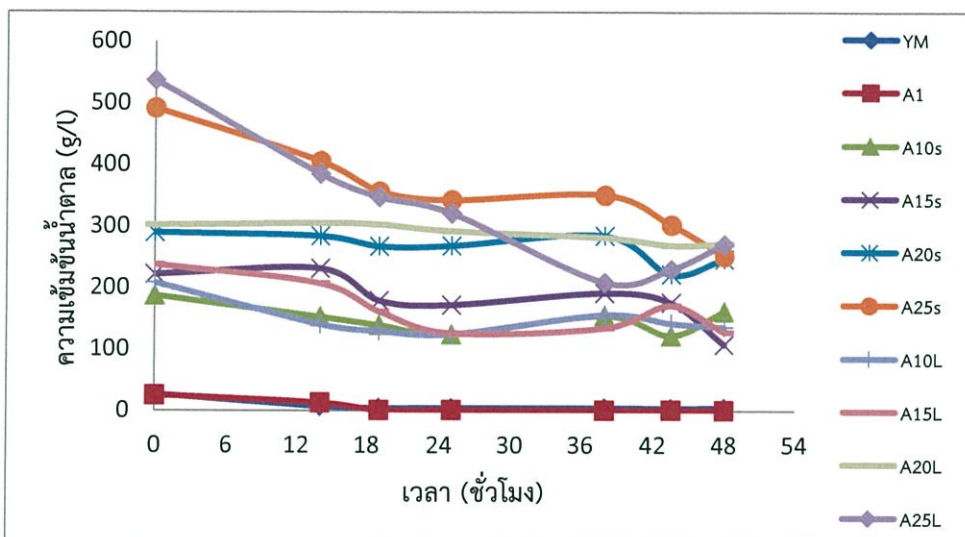
การใช้น้ำตาล fructose syrup ของยีสต์แสดงดังรูปที่ 4.8 และ 4.9 เมื่อวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol sulfuric พบว่าปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณสูง แต่เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0) มีปริมาณน้อย และเมื่อผ่านไป 48 ชั่วโมง น้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างรวดเร็ว



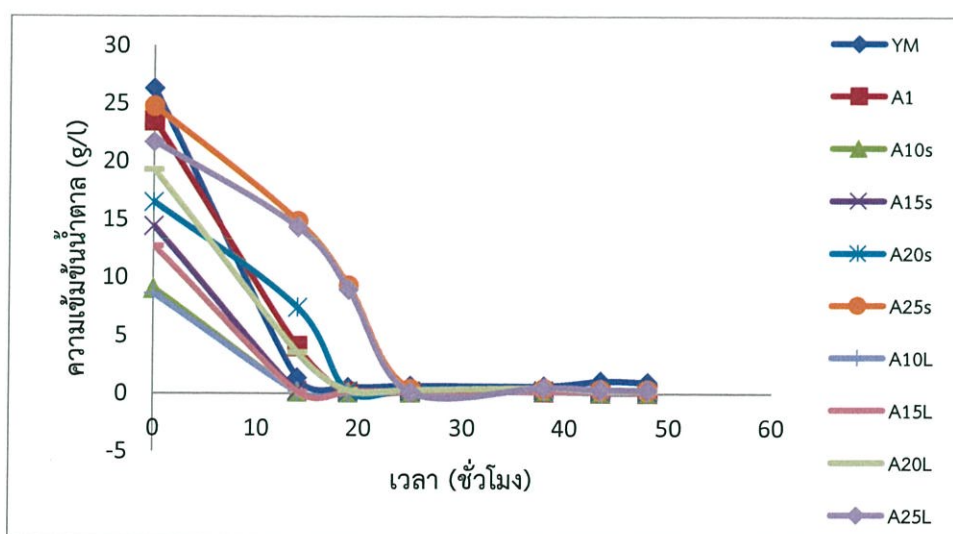
รูปที่ 4.6 แสดงการเจริญ (OD₆₆₀) ของยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ชั่วโมงต่างๆ ในอาหาร YM สูตรปกติ (YM) และอาหาร YM ที่มีแหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมไนเตรท และแหล่งคาร์บอนคือ fructose syrup ที่ความเข้มข้น 1, 10, 15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ (A1, A10, A15, A20 และ A25 ตามลำดับ) ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร



รูปที่ 4.7 แสดงการเจริญ (OD₆₆₀) ของยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ชั่วโมงต่างๆ ในอาหาร YM สูตรปกติ (YM) และอาหาร YM ที่มีแหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมไนเตรท และแหล่งคาร์บอนคือ fructose syrup ที่ความเข้มข้น 1, 10, 15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ (A1, A10, A15, A20 และ A25 ตามลำดับ) ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร



รูปที่ 4.8 แสดงการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลทั้งหมดในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ *S. cerevisiae* ที่เจริญในอาหาร YM สูตรปกติ (YM) และอาหาร YM ที่มีแหล่งไนโตรเจน คือแอมโมเนียมไนเตรท และแหล่งคาร์บอน คือ fructose syrup ที่ความเข้มข้น 1, 10, 15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร (A10S, A15S, A20S และ A25S ตามลำดับ) และในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร (A10L, A15L, A20L และ A25L ตามลำดับ)



รูปที่ 4.9 แสดงการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลกลูโคสในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ *S. cerevisiae* ที่เจริญในอาหาร YM สูตรปกติ (YM) และอาหาร YM ที่มีแหล่งไนโตรเจน คือแอมโมเนียมไนเตรท และแหล่งคาร์บอน คือ fructose syrup ที่ความเข้มข้น 1, 10, 15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ ใน พลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร (A10S, A15S, A20S และ A25S ตามลำดับ) และในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร (A10L, A15L, A20L และ A25L ตามลำดับ)

จากผลการทดลองปริมาณออกซิเจนภายในพลาสติกเพียงพอต่อการเจริญของเชื้อยีสต์เมื่อเพิ่มพื้นที่ภายในพลาสติก (head space) มากขึ้น ไม่มีผลต่อการเพิ่มการเจริญของเซลล์ยีสต์ในการทดลองต่อไปจึงเลี้ยงเชื้อยีสต์ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ fructose syrup ทำให้การเจริญของเชื้อยีสต์ลดลง เนื่องจากสารละลายภายนอกเซลล์มีความเข้มข้นมากกว่าภายในเซลล์จึงทำให้เกิด แรงดันออสโมติก (osmotic pressure) มีผลต่อการทำลายระบบเมตาบอลิซึมของเซลล์ยีสต์ และลดความสามารถในการเจริญ หรือที่เรียกว่า substrate inhibition (Pratt และคณะ, 2003) วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อผ่านไป 48 ชั่วโมง เหลือน้ำตาลอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณมาก แสดงว่าใน fructose syrup ประกอบไปด้วยน้ำตาลโมเลกุลใหญ่พวกโพลีแซ็กคาไรด์และโอลิโกแซ็กคาไรด์เป็นส่วนใหญ่ ทำให้ยีสต์ไม่สามารถนำน้ำตาลทั้งหมดใน fructose syrup มาใช้ในการเจริญได้

4.3.2 ศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหาร YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น fructose syrup และไนโตรเจนชนิดต่างๆ

เลี้ยงเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหาร YM แหล่งคาร์บอนคือ fructose syrup ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และแหล่งไนโตรเจน 0.5 เปอร์เซ็นต์ คือ แอมโมเนียมไนเตรท, แอมโมเนียมคลอไรด์, แอมโมเนียมซัลเฟต, 2-แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต, โซเดียมไนเตรท, โซเดียมไนเตรท และโพแทสเซียมไนเตรท โดย pH เริ่มต้นของอาหารอยู่ที่ 6.8-7.2 การเจริญ (OD₆₆₀) และ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อชั่วโมงที่ 48 แสดงดังตารางที่ 4.4 ปริมาณเซลล์ที่เจริญในอาหารที่ใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นไนโตรเจนอนินทรีย์ชนิดต่างๆ พบว่ายีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหาร YM ที่มีโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน มีปริมาณเซลล์ และอาหารมีความเป็นด่างมากที่สุด จึงนำโซเดียมไนเตรทมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อแปรผันปริมาณของแหล่งไนโตรเจนในการทดลองต่อไป

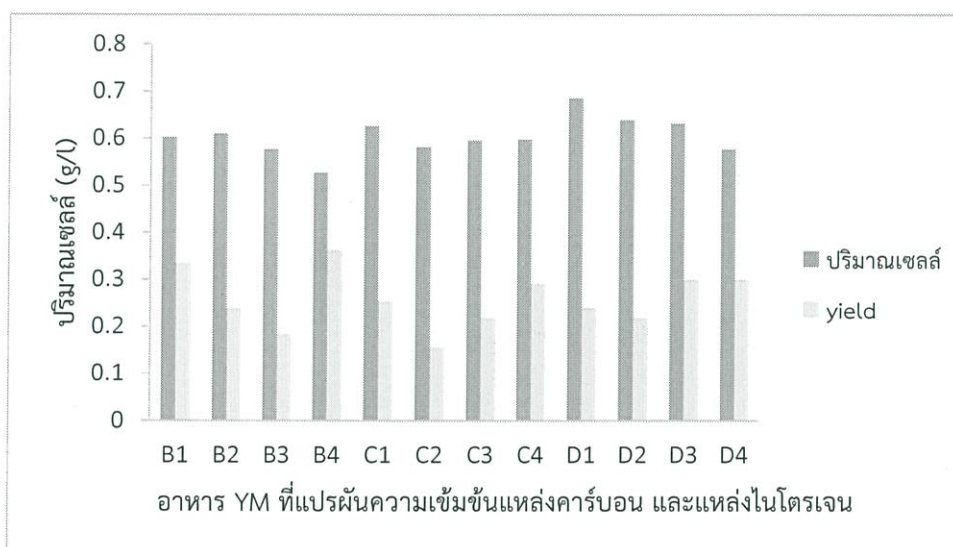
โซเดียมไนเตรทจะชักนำสมดุลของ prooxidative-antioxidative ในเซลล์ เมื่อนำเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* เลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณโซเดียมไนเตรทที่ปริมาณต่างๆ พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทในอาหารเลี้ยงเชื้ออัตราการรอดชีวิตต่อเซลล์ยีสต์ลดลง เนื่องจากโซเดียมมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ catalase และ dismutase จึงต้องเลี้ยงเซลล์ยีสต์ที่มีโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่เหมาะสม (Swiecito, 2008)

ตารางที่ 4.3 แสดงการเจริญ (OD₆₆₀) ของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* และ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

แหล่งไนโตรเจน	OD ₆₆₀ ที่ 0 ชั่วโมง	ปริมาณเซลล์, X1 (g-DCW/L) ที่ 0 ชั่วโมง	OD ₆₆₀ ที่ 48 ชั่วโมง	ปริมาณเซลล์, X2 (g-DCW/L) ที่ 48 ชั่วโมง	ปริมาณเซลล์, X2-X1 (g/L)	pH ที่ 48 ชั่วโมง
ammonium chloride	0.006	0.1158	0.848	0.37084	0.25505	7.265
ammonium sulphate	0.0065	0.11595	0.904	0.387805	0.27185	7.14
di-ammonium hydrogen phosphate	0.004	0.115195	0.494	0.263615	0.1484	6.995
sodium nitrite	0.003	0.11489	0.2915	0.202275	0.0874	6.32
sodium nitrate	0.338	0.116405	1.118	0.452625	0.3362	7.77
potassium nitrate	0.005	0.115494	0.89	0.383565	0.26805	7.485
ammonium nitrate	0.075	0.1367	0.772	0.34782	0.2111	7.20

4.3.3 ศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหาร YM ที่แปรผันความเข้มข้นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน

เลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหาร YM ที่แปรผันความเข้มข้นแหล่งคาร์บอนคือ fructose syrup ที่ความเข้มข้น 1, 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ และแหล่งไนโตรเจนคือ โซเดียมไนเตรทที่ความเข้มข้น 0.5, 0.7, 1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ การเจริญ (OD₆₆₀) และปริมาณเซลล์ แสดงดังตารางที่ 4.5 ยีสต์ที่เลี้ยงในอาหาร YM ที่มี fructose syrup และโซเดียมไนเตรท ความเข้มข้น 1 และ 1.5, 2 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ผลที่ได้คือ มีค่า yield และปริมาณเซลล์สูงสุด ตามลำดับ ปริมาณน้ำตาลในอาหาร เริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0) และชั่วโมงที่ 44 แสดงดังตารางที่ 4.6 นำอาหารทั้ง 2 สูตรที่ให้ปริมาณเซลล์ และ yield สูงสุดไปทำการเลี้ยงเชื้อยีสต์แบบ fed batch เพื่อศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ และผลกระทบจากการยับยั้งโดยสับสเตรท (substrate inhibition)



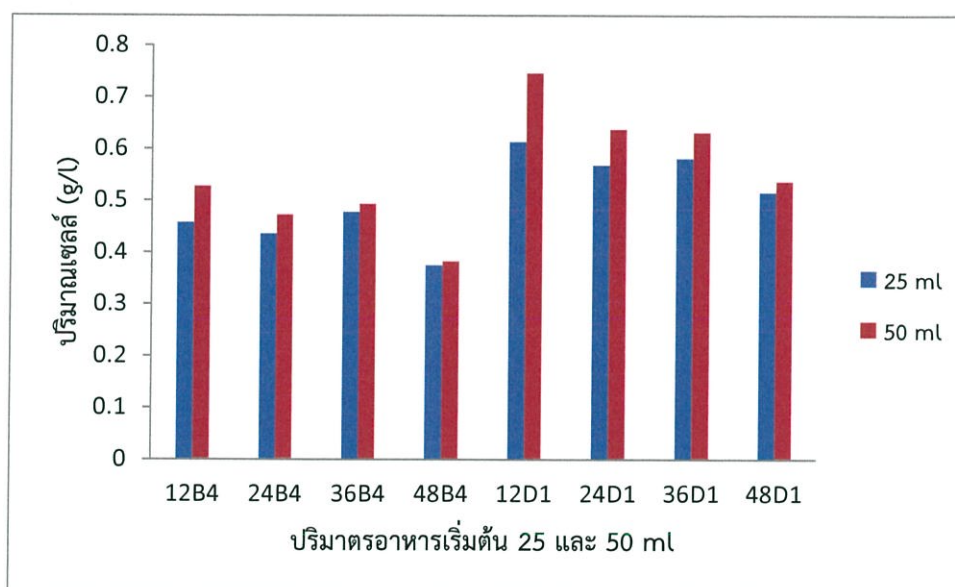
รูปที่ 4.10 แสดงค่า yield และปริมาณเซลล์จากการเลี้ยงเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหาร YM ที่แปรผันความเข้มข้นแหล่งคาร์บอนคือ fructose syrup และแหล่งไนโตรเจนคือโซเดียมไนเตรท ในอัตราส่วน 1:0.5, 1:0.7, 1:1, 1:1.5, 1.5:0.5, 1.5:0.7, 1.5:1, 1.5:1.5, 2:0.5, 2:0.7, 2:1 และ 2:1.5 (B1, B2, B3, B4, C1, C2, C3, C4, D1, D2, D3 และ D4 ตามลำดับ)

ตารางที่ 4.4 แสดงการเจริญ (OD₆₆₀), ปริมาณเซลล์ของยีสต์ *S. cerevisiae*, ปริมาณน้ำตาลในอาหาร และค่า yield ณ ชั่วโมงที่ 0 และ 44

อาหารสูตร	ปริมาณเซลล์ที่ 0 ชั่วโมง, X1 (g-DCW/L)	ปริมาณเซลล์ที่ 44 ชั่วโมง, X2 (g-DCW/L)	ปริมาณเซลล์ X2-X1 (g-DCW/L)	ปริมาณน้ำตาลชั่วโมงที่ 0, S1 (g/L)	ปริมาณน้ำตาลชั่วโมง ที่ 44, S2 (g/L)	ปริมาณน้ำตาลที่ยีสต์ใช้, S1-S2 (g/L)	Yield (X2-X1/S1-S2)
B1	0.177591	0.779942	0.602351	9.232609	7.431304	1.801304	0.334397
B2	0.154571	0.765403	0.610832	10.42826	7.866087	2.562174	0.238404
B3	0.170927	0.747228	0.576301	10.0913	6.948696	3.142609	0.183383
B4	0.172442	0.699067	0.526625	9.917391	8.461739	1.455652	0.361779
C1	0.166384	0.792664	0.62628	14.60217	12.12261	2.479565	0.252576
C2	0.1785	0.75995	0.58145	15.08043	11.3313	3.74913	0.155089
C3	0.171533	0.76722	0.595687	14.14565	11.81391	2.718696	0.219108
C4	0.16699	0.764494	0.597504	13.48261	11.42696	2.055652	0.290664
D1	0.150633	0.836282	0.685649	18.21087	15.34435	2.866522	0.239192
D2	0.166384	0.805386	0.639002	17.37717	14.45739	2.919783	0.218852
D3	0.165475	0.797207	0.631732	16.8087	14.69652	2.112174	0.299091
D4	0.174562	0.750863	0.576301	17.88478	15.96609	1.918696	0.300361

4.3.4 เลี้ยงเชื้อแบบ fed batch ในอาหาร YM ที่มีแหล่งคาร์บอน fructose syrup และแหล่งไนโตรเจนโซเดียมไนเตรท

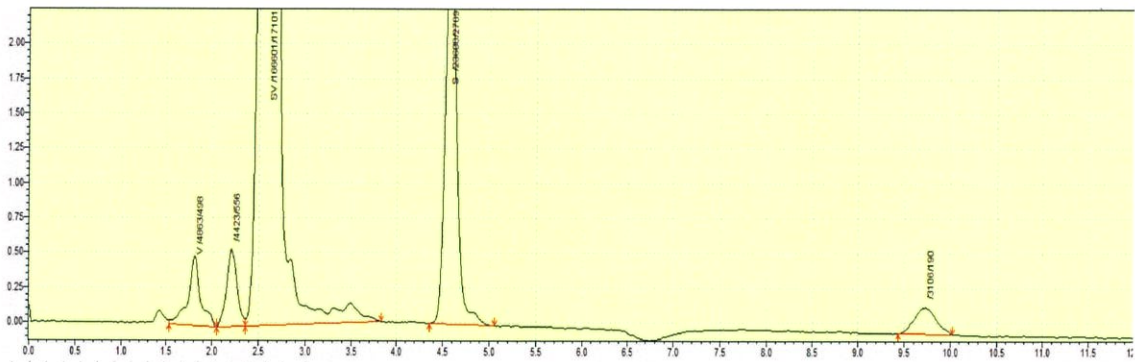
เลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหาร YM ที่มีแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนในอัตราส่วนของ fructose syrup และโซเดียมไนเตรท คือ 1:1.5 และ 2:0.5 เปอร์เซ็นต์ (B4 และ D1 ตามลำดับ) โดยมีปริมาตรอาหารเริ่มต้น 25 และ 50 มิลลิลิตร ตามลำดับ เติมน้ำอาหารเมื่อเลี้ยงเชื้อยีสต์ครบ 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ พบว่าปริมาตรอาหารเริ่มต้น 50 มิลลิลิตร ในอาหารทั้ง 2 สูตร และทำการเติมน้ำอาหาร 50 มิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเซลล์ครบ 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง มีการเจริญของเซลล์มากกว่า ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 25 มิลลิลิตร โดยที่เมื่อเลี้ยงเซลล์ครบ 12 ชั่วโมงเซลล์มีการเจริญมากกว่า 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ส่วนปริมาตรอาหารเริ่มต้น 25 มิลลิลิตร ในอาหารทั้ง 2 สูตร เมื่อเลี้ยงเซลล์ครบ 36 ชั่วโมง เซลล์มีการเจริญมากกว่า 12, 24 และ 48 ชั่วโมง และอาหารสูตร D1 เซลล์มีการเจริญมากกว่าอาหารสูตร B4 (รูปที่ 4.11)



รูปที่ 4.11 ปริมาณเซลล์จากการเลี้ยงยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหาร YM ที่มี fructose syrup และโซเดียมไนเตรท ความเข้มข้น 1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (B4) และความเข้มข้น 2 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (D1) ที่ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 25 มิลลิลิตร (■) และ 50 มิลลิลิตร (■) ทำการเติมน้ำอาหารเมื่อเลี้ยงเซลล์ยีสต์ครบ 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง

4.4 ศึกษาการสกัด และปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็น

เตรียมสารละลายมาตรฐานโคเอนไซม์คิวเท็น ที่ความเข้มข้น 0.25, 0.50, 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 และ mobile phase คือ เมทานอล:เอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1:9 ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็นด้วย UV-detector ที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร (คุณฉัญ และคณะ, 2558) ได้ค่า retention time ที่เวลา 9.7 นาที แสดงในรูปที่ 4.12



รูปที่ 4.12 แสดง chromatogram ลักษณะ peak ของโคเอนไซม์คิวเท็นที่ retention time เท่ากับ 9.7 นาที โดยใช้คอลัมน์ชนิด Luna 5u C18(2) 100A ขนาด 250×4.60 มิลลิเมตร (Phenomenex) และ mobile phase คือ เมทานอล: เอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1:9 ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที

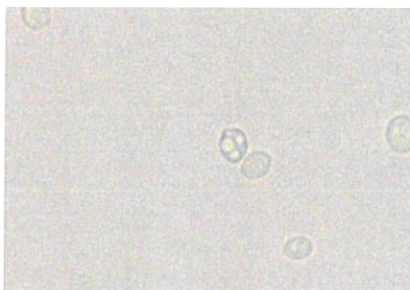
ศึกษาการย่อยเซลล์และสกัดโคเอนไซม์คิวเท็นจากยีสต์ที่เลี้ยงในอาหาร YM ทำการย่อยเซลล์ 2 วิธี ได้แก่ 1) ย่อยเซลล์ด้วยตัวทำละลาย โดยใช้สารละลายผสมระหว่างเฮกเซน และเอทานอล (5:2) เป็นเวลา 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที ตามลำดับ และ 2) ย่อยเซลล์ด้วยสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2 นอร์มอล ที่อุณหภูมิ 80 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 180 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเศษเซลล์ แล้วล้างให้สะอาดจนเศษเซลล์มีค่า pH เป็นกลาง แล้วจึงนำมาสกัดด้วยเอทานอลเป็นเวลา 120 นาที นำส่วนเอทานอลไปวิเคราะห์ปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็น พบว่าการย่อยเซลล์ด้วยตัวทำละลาย โดยใช้สารละลายผสมระหว่างเฮกเซน และเอทานอล ที่เวลาต่างๆ ไม่พบ peak ของโคเอนไซม์คิวเท็น ส่วนวิธีการย่อยสลายด้วยสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส พบ peak ของโคเอนไซม์คิวเท็น ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ไม่พบ peak ของโคเอนไซม์คิวเท็น แสดงดังตารางที่ 4.5 ความร้อนมีผลต่อความคงตัวของโคเอนไซม์คิวเท็น ซึ่งมีความคงตัวที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ยิ่งอุณหภูมิสูงขึ้นการสลายตัวก็สูงขึ้นแปรผันตามระยะเวลา (Thirumala และคณะ, 1999)

ตารางที่ 4.5 ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินในตัวอย่าง ที่ย่อยเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่อุณหภูมิต่างๆ จากสมการเส้นตรงจากกราฟสารละลายมาตรฐานโคเอนไซม์คิวเทิน $y = 3955.2x + 178.1$ เมื่อ y คือ retention time และ x คือความเข้มข้นของ โคเอนไซม์คิวเทิน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (ภาคผนวก ข-4.2)

ตัวอย่างสกัดด้วย NaOH 2 N ที่	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g-DCW/ml)	ปริมาณ โคเอนไซม์คิวเทิน (g/ml)	เซลล์ 1 g มี โคเอนไซม์คิวเทิน (mg)
80 °C	0.0055	4.99×10^{-6}	0.907
100 °C	0.0085	ND	ND

หมายเหตุ : ND หมายถึง ตรวจสอบไม่ได้

เมื่อนำเซลล์ยีสต์หลังจากทำการย่อยเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า พบว่าเซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงในอาหาร YM ที่เปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็น fructose syrup และแหล่งไนโตรเจนเป็น โซเดียมไนเตรท มีการสร้าง ascospore มากกว่าเซลล์ ซึ่งเซลล์จะสร้างเมื่อขาดแคลนแหล่งไนโตรเจน และแหล่งคาร์บอน เนื่องจาก fructose syrup ประกอบไปด้วยน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ที่ยีสต์ไม่สามารถใช้ในการเจริญได้ ซึ่งสปอร์จะมีผนังที่หนาเพื่อทนต่อสภาวะแวดล้อมที่แร้นแค้น (Aaron, 2005) สำหรับ ascospore ของ *S. cerevisiae* มีรูปร่างกลมมีผนังค่อนข้างหนา ประกอบด้วย กลูแคนและแมนแนน แต่แตกต่างและแข็งแรงกว่าผนังเซลล์ปกติ ทำให้ค่อนข้างทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมบางอย่าง เช่น ความร้อน และตัวทำละลาย (สาวิตรี, 2549) (รูปที่ 4.12



รูปที่ 4.13 ลักษณะของเซลล์ยีสต์ *s. cerevisiae* ที่เลี้ยงในอาหาร YM ที่เปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็น fructose syrup และแหล่งไนโตรเจนเป็น โซเดียมไนเตรท ที่กำลังขยาย 400 เท่า

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ของเหลือทิ้งจากโรงงานผลิต HFCS พบว่าสารละลาย fructose syrup มีคุณสมบัติเป็นของเหลวใส สีเหลือง ชันเหนียว มี pH 2.87 ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และน้ำตาลรีดิวิซ์ (กลูโคส) 41.7 และ 2.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหาร YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส เจริญได้ดีกว่ายีสต์ที่เลี้ยงในอาหาร YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น fructose syrup ยีสต์ *S. cerevisiae* มีอัตราการใช้กลูโคสได้เร็วกว่าฟรุกโตส (Cason และ Reid 1987) ใน fructose syrup ประกอบไปด้วย น้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และ higher saccharides เช่น ซูโครส (White และคณะ, 2015) ยีสต์จึงต้องมีการหลั่งเอนไซม์ออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยไคแซ็กคาไรด์ก่อนนำเข้าสู่เซลล์ในรูปของโมโนแซ็กคาไรด์ (Patrick และ John, 2006) การเจริญของยีสต์ในอาหาร YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น fructose syrup จึงเจริญช้า

การเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหาร YM เมื่อใช้ฟลาสก์ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุปริมาตรอาหารเท่ากัน ให้ผลเจริญไม่แตกต่างกัน แสดงว่าในสภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที ทำให้มีออกซิเจนละลายน้ำเพียงพอต่อความต้องการของเชื้อยีสต์ จึงให้ความเข้มข้นเซลล์ยีสต์ไม่แตกต่างกัน ปริมาณออกซิเจนภายในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เพียงพอต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ เมื่อความเข้มข้นของ fructose syrup เพิ่มมากขึ้นทำให้การเจริญของเชื้อยีสต์ลดลง เนื่องจากสารละลายภายนอกเซลล์มีความเข้มข้นมากกว่าภายในเซลล์จึงทำให้เกิดแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) มีผลต่อระบบเมตาบอลิซึมของเซลล์ยีสต์ และลดความสามารถในการเจริญหรือเรียกว่า substrate inhibition (Pratt และคณะ, 2003) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณมาก แสดงว่าใน fructose syrup ประกอบไปด้วยน้ำตาลโมเลกุลใหญ่พวก โพลีแซ็กคาไรด์ และโอลิโกแซ็กคาไรด์เป็นส่วนใหญ่ทำให้ยีสต์ไม่สามารถนำน้ำตาลทั้งหมดใน fructose syrup มาใช้ในการเจริญได้

เลี้ยงยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหาร YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น fructose syrup และไนโตรเจนชนิดต่างๆ *S. cerevisiae* ที่เลี้ยงในอาหาร YM ที่ใช้ไซโตเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน มีการเจริญ และอาหารมีความเป็นต่างมากที่สุด จึงนำไซโตเดียมไนเตรทมาเป็นแหล่งไนโตรเจนในการศึกษาการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน พบว่ายีสต์ที่เจริญในอาหารที่มี fructose syrup และไซโตเดียมไนเตรท ความเข้มข้น 1 และ 1.5, 2 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่า yield และปริมาณเซลล์สูงสุด ตามลำดับ นำอาหารทั้ง 2 สูตร มาทำการเลี้ยงเชื้อแบบ fed

batch พบว่าปริมาณเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารทั้ง 2 สูตร ที่ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 50 มิลลิลิตร และทำการเติมอาหาร 50 มิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเซลล์ครบ 12 ชั่วโมง ให้ปริมาณเซลล์มากที่สุด และอาหาร YM ที่มี fructose syrup และโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 2 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณเซลล์มากกว่าอาหาร YM ที่มี fructose syrup และ โซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์

การย่อยเซลล์และการสกัดโคเอนไซม์คิวเท็นจากยีสต์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น fructose syrup และแหล่งไนโตรเจนเป็นโซเดียมไนเตรท เมื่อนำเซลล์ยีสต์มาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์มีการสร้าง ascospore มากกว่าเซลล์ปกติ ซึ่งผนังค่อนข้างหนาและแข็งแรงกว่าผนังเซลล์ปกติ ทำให้ ascospore ค่อนข้างทนต่อสภาวะ (สาวิตรี, 2549) เมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซน และเอทานอล ที่เวลาต่างๆ จึงไม่พบโคเอนไซม์คิวเท็น เมื่อนำเซลล์มาย่อยสลายด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2 นอร์มอล ที่อุณหภูมิ 80 และ 100 องศาเซลเซียส ตามลำดับ พบโคเอนไซม์คิวเท็นที่ถูกสกัดที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส แสดงว่าความร้อนมีผลต่อความคงตัวของโคเอนไซม์คิวเท็น

5.2 ข้อเสนอแนะ

fructose syrup ประกอบไปด้วยน้ำตาลโมเลกุลใหญ่เป็นส่วนใหญ่ ควรนำไปทำการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส (amylase) เช่น แอลฟา-อะไมเลส (alpha-amylase), บีตา-อะไมเลส (beta-amylase) และกลูโคอะไมเลส (glucoamylase) ให้กลายเป็นโมโนแซ็กคาไรด์ เพื่อให้ยีสต์นำมาใช้ได้ง่าย และรวดเร็ว

ศึกษาต่อโดยนำยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์มิวแทนท์ (mutant) ทั้ง 8 isolate เลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ ข้างต้น เพื่อดูอัตราการเจริญ ปริมาณเซลล์ที่ผลิตได้ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา หลังจากเลี้ยงยีสต์มิวแทนท์ในอาหารที่ใช้ fructose syrup เป็นแหล่งคาร์บอน และโซเดียมไนเตรท เป็นแหล่งไนโตรเจน และวิเคราะห์โคเอนไซม์คิวเท็น

เอกสารอ้างอิง

- กิ่งจันทร์ มะลิซ้อน. 2557. คู่มือปฏิบัติการราวิทยา. อุดรธานี. มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.
- กิตติพันธ์ เสมอพิทักษ์. 2546. วิทยาเชื้อราพื้นฐาน. ขอนแก่น. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- คุณิษฐ์ คงสินธุ์, ณัฐพล ดอกดิน และ ฉัญญรัตน์ กุญชรชะคง และคณะ. 2558. "การผลิตโคเอนไซม์คิวเทินจาก *Rhodopseudomona* ssp. S12, OS33, 13 และ 14." ปรินญาวิทยา ศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- จุมพล เหมาะศรีรินทร์. 2553. ยีสต์ จุลินทรีย์เอื้อชีวิตมนุษย์. กรุงเทพฯ. สำนักงานปลัดกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.
- รัชนีกร หมวดพล. 2552. "การผลิตเอทานอลจากน้ำอ้อยผสมหมดอายุโดยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*." วิทยาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- รัศมี เหล็กพรหม และจารุพงษ์ แสงบุญมี. 2556. "โคเอนไซม์คิวเทิน จากเคมีพื้นฐานสู่การประยุกต์ในทางการแพทย์" ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สาวิตรี กิ่งจันทร์. 2549. ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Antonini, S.R.C. and Sudbery, P.E. 2004. "Filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*." *Brazilian Journal of Microbiology*. 35: 173-181.
- Axe. 2018. High Fructose Corn Syrup Dangers & Healthy Alternatives. [online]. Available: <https://draxe.com/high-fructose-corn-syrup-dangers/>.
- Bacon, J.S.D., Farmer, V.C., Jones, D. and Taylor I.F. 1969. "The glucan components of the cell wall of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) considered in relation to its ultrastructure." *Biochem.J.* 114(3): 557-567.
- Belardinelli, R., Muca, j.A., Lacalaprice, F. and Littarru, G.P. 2005. "Coenzyme Q10 Improves Contractility of Dysfunctional Myocardium in Chronic Heart Failure." *Biofactors.*, 25: 137-145.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- BIOPHOTO ASSOCIATES. 2018. Transmission electron micrograph (TEM) of *Saccharomyces cerevisiae*, showing a section of a cell acting as an ascus, delimiting four ascospores. This a species of yeast used in baking and brewing. [online]. Available : <https://www.gettyimages.co.uk/detail/photo/transmission-electron-micrograph-of-high-res-stock-photography/128624819>.
- Caso, G., Kelly, P., McNurlan, M. A. and Lawson, W. E. 2007. "Effect of Coenzyme Q10 on Myopathic Symptoms in Patients Treated with Statins." *Am. J. Cardiol.*, 99: 1409-1412
- Cason, D.T. and Reid, G.C. 1987. "On the differing rates of fructose and glucose utilisation in *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of the Institute of Brewing branding banner*. 93: 23-25.
- Choi, J.H., Y.W. Ryu and J.H. Seo. 2005. "Biotechnological Production and Applications of Coenzyme Q10." *Applied Microbiol. Biotechnol.* 68: 9-15.
- Choi, J.H., Y.W. Ryu, Y.C. Park and J.H. Seo. 2009. "Synergistic Effects of Chromosomal *ispB* Deletion and *dxs* Overexpression on Coenzyme Q10 Production in Recombinant *Escherichia coli* expressing *Agrobacterium tumefaciens dps* Gene." *J. Biotechnol.*, 144: 64-69
- Clarke, C.F., Williams, W. and Teruya, J.H. 1991. "Ubiquinone Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*." *The Journal of Biological Chemistry*. 266(25):16636-16644.
- Cluis, C.P., A.M. Burja and V.J. Martin. 2007. "Current Prospects for the Production of Coenzyme Q10 in Microbes." *Trends Biotechnol.*, 25: 514-521.
- Cluis, C.P., D. Pinel and V.J. Martin. 2012. "The Production of Coenzyme Q10 in Microorganisms." *Biochem.*, 64: 303-326
- Dhanasekaran, M. and Ren, J. 2005. "The Emerging Role of Coenzyme Q-10 in Aging, Neurodegeneration, Cardiovascular Disease, Cancer and Diabetes Mellitus." *Curr Neurovasc.*, 2: 447-459
- Dixon, D.D., C.N. Boddy and R.P. Doyle. 2011. "Reinvestigation of Coenzyme Q10 Isolation from *Sporidiobolus johnsonii*." *Chem. Biodiversity.*, 8: 1033-1051.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Estrada, R.M.T., A. Poerio, M. Mandrioli, G. Lercker, A. Trincherro, Tosi, M.R. and Tugnoli, V. 2006. "Determination of Coenzyme Q10 in Functional and Neoplastic Human Renal Tissues." *Analytical Biochem.* 357: 150-152.
- Godfrey, H. 2016. Life Cycle of the Budding Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. [online]. Available : <https://slideplayer.com/slide/9338381/>
- Graeme, M.W. and Graham, G.S. 2016. "Saccharomyces cerevisiae in the Production of Fermented Beverages." *Beverages.* 2(4): 30.
- Graham, G.S. 2016. "Saccharomyces species in the production of beer." *The International Centre for Brewing and Distilling.* 2(4): 34.
- Ha, S.J., S.Y. Kim, J.H. Seo, M. Jeya Y.W. Zhang, Ramu, T, Kim I.W, and J.K. Lee. 2009. "Caincreases the Specific Coenzyme Q10 Content in *Agrobacterium tumefaciens*." *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 32: 697-700.
- Hodgson, J.M., G.F. Watts, D.A. Playford, V. Burke and K.D. Croft. 2002. "Coenzyme Q10 Improves Blood Pressure and Glycaemic Control: A controlled trial in subjects with type 2 diabetes." *Eur. J. Clin. Nutr.*, 56: 1137-1142.
- Hoppe, U. 1999. "A Coenzyme Q10 Cutaneous Antioxidant and Energizer." *biofactor.*, 9(2-4): 371-378.
- Jankowski, J., K. Korzeniowska, A. CieŚlewicz and A. Jabłeczka. 2016. "Coenzyme Q10 A New Player in the Treatment of Heart Failure?Pharmacol." *Reports*, 68: 1015-1019.
- Jeya, M., H.J. Moon, J.L. Lee, I.W. Kim and J.K. Lee. 2010. "Current state of Coenzyme Q10 Production and Its Applications." *Applied Microbiol.Biotechnol.* 85: 1653-1663.
- Jiménez, J., F. Priego-Capote, J.M. Mata-Granados, J.M. Quesada and M.L. de Castro, 2007. "Determination of the ubiquinol-10 and ubiquinone-10 (coenzyme Q10) in human serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry to evaluate the oxidative stress." *J. Chromatography A.*, 1175: 242-248.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Khattab, S.M. and Kodaki, T. 2015. "A Novel Production Method for High-Fructose Glucose Syrup from Sucrose-Containing Biomass by a Newly Isolated of Osmotolerant *Meyerozyma guilliermondii*." *J. Microbiol. Biotechnol.*, 26(4): 675-683.
- Kim, T.S., J.H.Yoo, S.Y. Kim, C.H. Pan, V.C. Kalia Kang Y.C. and Lee, J.K. 2015. "Screening and Characterization of An *Agrobacterium tumefaciens* Mutant strain Producing High level of Coenzyme Q10." *Process Biochem.*, 50: 33-39.
- Koo, B.S., Y.J. Gong, S.Y. Kim, C.W. Kim and H.C. Lee. 2010. "Improvement of Coenzyme Q10 Production by Increasing the NADH/NAD⁺ Ratio in *Agrobacterium tumefaciens*." *Bioscience, Biotechnol.Biochem.*, 74: 895-898.
- Kurtzman, C.P. and Sugiyama, J. 2011. "Saccharomycotina and Taphrinomycotina: The Yeast and Yeast like Fungi of the Ascomycota." *Systematics and Evolution*. 3-33.
- Langsjoen, H., Langsjoen, P., Langsjoen, P., Willis, R. and Folkers, K. 1994. "Usefulness of Coenzyme Q10 in Clinical Cardiology: A Long-Term Study." *Mol Aspects Med.*, 15: 165-175
- Laplante, S., N. Souchet and P. Bry. 2009. "Comparison of production of coenzyme Q10 in recombinant *Escherichia coli* containing the decaprenyl diphosphate synthase gene from *Gluconobacter suboxydans*." *Applied Microbiol .Biotechnol.*, 67: 192-196.
- Lee, J.K., D.K. Oh and S.Y. Kim. 2007. "Cloning and Characterization of the DXS Gene, Encoding 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate Synthase from *Agrobacterium tumefaciens* and Its Overexpression in *Agrobacterium tumefaciens*." *J. Biotechnol.*, 128: 555-566.
- Littarru, G.P. and P. Lambrechts. 2011. "Coenzyme Q10: Multiple Benefits in One Ingredient." *Oléagineux, Corps Gras Lipides Journal.*, 18(2): 76-82.
- Mancini, A. and G. Balercia. 2011. "Coenzyme Q10 in Male Infertility: Physiopathology and therapy." *Biofactors.*, 37: 374-380.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Mwesigye, P.T. and Barford, J. 1996. "Mechanism of Sucrose Utilisation by *Saccharomyces cerevisiae*." *The Journal of General and Applied Microbiology*. 42(4): 297-306.
- Ndikubwimana, J. de D. and Lee, B.H. 2014. "Enhanced Production Techniques, Properties and Uses of Coenzyme Q10." *Biotechnol. Lett.*, 36: 1917-1926.
- Neiman, A.M. 2005. "Ascospore Formation in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Microbiology and molecular biology reviews*. 565-584.
- Nielsen, S.S. 2009. "Phenol-Sulfuric Acid Method for Total Carbohydrates." *Food Analysis Laboratory Manual*. 47-53.
- Park, E. and Bi, H.O. 2007. "Cell polarization and cytokinesis in budding yeast." *Cell signaling & development*. 191:347-387.
- Parker, K., Salas, M. and Nwosu, V.C. 2010. "High fructose corn syrup production uses and public health concerns." *Biotechnology and Molecular Biology Review*. 5(5): 71-77.
- Prathamesh. 2016. Mechanism and health benefits of coenzyme Q10. [online]. Available : <https://www.slideshare.net/prathameshkudalkar7/coenzyme-q10-59483409>.
- Pratt, P.L., Bryce, J.H. and Stewart, G.G. 2003. "The effect of osmotic pressure and ethanol on yeast viability and morphology." *Journal of the institute of brewing*. 109(3): 218-228.
- Pravst, I., K. Žmitek and J. Žmitek. 2010. "Coenzyme Q10 Contents in Foods and Fortification strategies." *Critical Rev. Food Sci. Nutr.*, 50: 269-280.
- Quinzii, C.M., DiMauro, S. and Hirano, M. 2007. "Human Coenzyme Q10 Deficiency." *Neurochem Res.*, 32: 723-727.
- Rasha, A. 2014. Comparative analysis of repressor interaction with pleiotropic corepressors Sin3 and Cyc8 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Bachelor in agricultural science. Cairo University. Egypt.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Reig, M., Aristoy, M.C. and Toldra, F. 2015. "Sources of Variability in the Analysis of Meat Nutrient Coenzyme Q10 for Food Composition Databases." *Food Control*, 48: 151-154.
- Richter, B.E., B.A. Jones, J.L. Ezzell, N.L. Porter, N. Avdalovic and C. Pohl. 1996. "Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation." *Analytical Chem.*, 68: 1033-1039.
- Rujiralai, T., R. Nirundorn, C. Wilairat, N. Heewasedtham and C. Chonlatee. 2014. "Development of an Effective Extraction Process for Coenzyme Q10 from Artemia." *Chem. Papers.*, 68: 1041-1048.
- Sastry, C.B. 2015. Reproduction in Organism Important Questions for CBSE Class 12 Biology Reproduction. [online]. Available : <http://biologylearner.com/article/details/mVBXp-Yeast%20Lifecycle>
- Schmelzer, C., I. Lindner, C. Vock, K. Fujii and F. Doring. 2007. "Functional Connections and Pathways of Coenzyme Q10-inducible Genes: An in-silico study." *IUBMB Life.*, 59: 628-633.
- Shults, C.W. 2002. "Effects of Coenzyme Q10 in Early Parkinson Disease: Evidence of Slowing of the Functional Decline." *Arch. Neurol.*, 59(10): 1541-1550.
- Silver, M.A., Langsjoen, P.H., Szabo, S., Patil, H. and Zelinger, A. 2004. "Effect of Atorvastatin on Left Ventricular Diastolic Function and Ability of Coenzyme Q10 to Reverse that Dysfunction." *Am J Cardiol.*, 94: 1306-1310.
- Swiecito, A. 2008. "Effect Sodium Nitrate (V) on *Saccharomyces cerevisiae* strains of different Antioxidative status and Energetic Metabolism." *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences.* 58(1): 41-44.
- Thirumala R.K., Ashraf, M., Khan, M.A. and Reddy, I.K. 1999. "Stability and Bioequivalence Studies of Two Marketed Formulations of Coenzyme Q10 in Beagle Dogs." *Chem Pharm Bull.*, 47(7): 1024-1028.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Tokdar, P., P. Ranadive, R. Kshirsagar, S.S. Khora and S.K. Deshmukh. 2014. "Influence of Substrate Feeding and Process Parameters on Production of Coenzyme Q10 Using *Paracoccus denitrificans* ATCC 19367 mutant strain P-87." *Adv. Biosci. Biotechnol.*, 5: 966-977.
- Topper, J.W. and D.W. Stetten, J.S. 1950. "The alkali-catalyzed conversion of glucose into fructose and mannose." *The Journal of Biological Chemistry*. 189: 191-202.
- Tronchoni, J., Gamero, A., Arroyo-López, F.N. Barrio, E. and Querol, A. 2009. "Differences in the glucose and fructose consumption profiles in diverse *Saccharomyces* wine species and their hybrids during grape juice fermentation." *International Journal of Food Microbiology*. 134(3): 237-243.
- Walker, M.G. 1998. **Yeast Physiology and Biotechnology**. John Wiley and Sons, Wesr Sussex
- Weant, K.A. and Smith, K.M. 2005. "The role of coenzyme Q10 in heart failure." *Ann Pharmacother.*, 39: 1522-1526
- White, J.S., Hobbs, L.J. and Fernandez, S. 2015. "Fructose content and composition of commercial HFCS-sweetened carbonated beverages." *International Journal of Obesity*. 39(1): 176-182.
- Xue, X., J. Zhao, L. Chen, J. Zhou, B. Yue, Y. Li and F.Lui. 2012. "Analysis of Coenzyme Q10 in Bee Pollen using Online Cleanup by Accelerated Solvent Extraction and High Performance Liquid Chromatography." *Food Chem.*, 133: 573-578.
- Yang, X., G. Dai, G. Li and E.S. Yang. 2010. "Coenzyme Q10 Reduces β -amyloid Plaque in An APP/PS1 Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease." *J. Molecular Neurosci.*, 41: 110-113.
- Yasuo, T. Saburo, K. Yoshi, K. Osamu, K. and Yasue, S. 1978. "Effect of High Fructose Corn Syrup on the Fermentation of Sweet Yeast Dough and Acceleration of the Sweet Dough Fermentation." *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*. 25(8): 458-464.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Yen, H.W. and C.H. Chiu. 2007. "The Influences of Aerobic-Dark and Anaerobic-Light Cultivation on CoQ10 Production by *Rhodobacter sphaeroides* in the Submerged Fermenter." *Enzyme Microbial Technol.*, 41: 600-604.
- Yen, H.W. and T.Y. Shih. 2009. "Coenzyme Q10 Production by *Rhodobacter sphaeroides* in Stirred Tank and in Airlift Bioreactor." *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 32: 711-716.
- Zhang, D., B. Shrestha, Z. Li and T. Tan. 2007. "Ubiquinone-10 Production Using *Agrobacterium tumefaciens* Gene in *Escherichia coli* by Coexpression System." *Molecular Biotechnol.*, 35: 1-14.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหาร YM

1.1 อาหาร YM สูตรปกติ มีส่วนประกอบ ดังนี้

Yeast extract	3	กรัม
Malt extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Glucose	10	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ปรับ pH อาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.8-7.2

1.2 อาหาร YM (ไม่เติม Malt extract) มีส่วนประกอบ ดังนี้

Yeast extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Glucose	10	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ปรับ pH อาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.8-7.2

1.3 อาหาร YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น fructose syrup ที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร (1 เปอร์เซ็นต์) มีส่วนประกอบ ดังนี้

Yeast extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม

Fructose syrup 40 เปอร์เซ็นต์ 25 มิลลิลิตร
 น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร
 ปรับ pH อาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.8-7.2

2. อาหาร YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น fructose syrup ที่ความเข้มข้น 100, 150, 200, 250 กรัมต่อลิตร (10, 15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) มีส่วนประกอบ ดังนี้

Yeast extract 3 กรัม
 แอมโมเนียมไนเตรท ((NH₄)₂NO₃) 5 กรัม

ตารางที่ ข-1 แสดงปริมาณ fructose syrup 40 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ

fructose syrup ที่ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ fructose syrup 40 เปอร์เซ็นต์ (มิลลิลิตร)
100	250
150	375
200	500
250	625

ปรับ pH อาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.8-7.2

3. อาหาร YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น fructose syrup ที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร (1 เปอร์เซ็นต์) และแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ มีส่วนประกอบ ดังนี้

Yeast extract 3 กรัม
 Fructose syrup 40 เปอร์เซ็นต์ 25 มิลลิลิตร
 แหล่งไนโตรเจน 5 กรัม *
 น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

ปรับ pH อาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.8-7.2

*แหล่งไนโตรเจน ประกอบด้วย แอมโมเนียมไนเตรท, แอมโมเนียมคลอไรด์, แอมโมเนียมซัลเฟต, 2-แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต, โซเดียมไนไตรท์, โซเดียมไนเตรทและโพแทสเซียมไนเตรท

4. อาหาร YM ที่แปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนคือ fructose syrup และไนโตรเจนคือ โซเดียมไนเตรท

4.1 Fructose syrup ที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร (1 เปอร์เซ็นต์)

Yeast extract	3	กรัม
Fructose syrup 40 เปอร์เซ็นต์	25	มิลลิลิตร
โซเดียมไนเตรท (NaNO ₃) และ 1.5 เปอร์เซ็นต์)	5, 7, 10 และ 15	กรัม (0.5, 0.7, 1
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
ปรับ pH อาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.8-7.2		

4.2 Fructose syrup ที่ความเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร (1.5 เปอร์เซ็นต์)

Yeast extract	3	กรัม
Fructose syrup 40 เปอร์เซ็นต์	37.5	มิลลิลิตร
โซเดียมไนเตรท (NaNO ₃) และ 1.5 เปอร์เซ็นต์)	5, 7, 10 และ 15	กรัม (0.5, 0.7, 1
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
ปรับ pH อาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.8-7.2		

4.3 Fructose syrup ที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร (2 เปอร์เซ็นต์)

Yeast extract	3	กรัม
Fructose syrup 40 เปอร์เซ็นต์	50	มิลลิลิตร
โซเดียมไนเตรท (NaNO ₃) และ 1.5 เปอร์เซ็นต์)	5, 7, 10 และ 15	กรัม (0.5, 0.7, 1
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
ปรับ pH อาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.8-7.2		

ภาคผนวก ข

สารเคมีและการวิเคราะห์

1. การเตรียมสารเคมี

1.1 Copper reagent

เตรียมโดยละลายไดเบสิกโซเดียมฟอสเฟต 71 กรัม และโซเดียมโพแทสเซียมทาเทรต 40 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 700 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1.0 นอร์มอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 10.0 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 80 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันและทำให้ร้อน จากนั้นเติมโซเดียมซัลเฟต 180 กรัม ละลายให้เข้ากันและเติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1000 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ถ้ามีตะกอนกรองก่อนนำไปใช้

1.2 Nelson reagent

เตรียมโดยละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต 50 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 900 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 21 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันเติมโซเดียมอาเซ็นเนทไดเบสิกเฮปตาไฮเดรต 6 กรัม ละลายในน้ำกลั่นคนให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้ามีตะกอนกรองก่อนนำไปใช้

1.3 ฟีนอล 5 เปอร์เซ็นต์

เตรียมโดยชั่งฟีนอล 5 กรัม ละลายให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปใช้

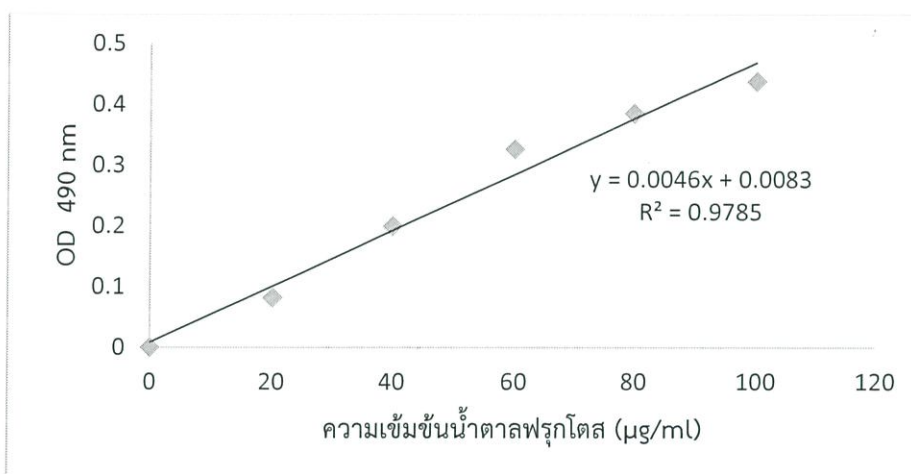
2. การวิเคราะห์น้ำตาล

2.1 การวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol sulfuric

2.1.1 การทำกราฟมาตรฐาน

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลฟรุคโตส โดยชั่งน้ำตาลฟรุคโตส 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ได้สารละลายฟรุคโตสเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
2. นำสารละลายมาตรฐานน้ำตาลฟรุคโตสมาทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. ปิเปตสารละลายน้ำตาลมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นลงในหลอดทดลอง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ
4. เติม 5 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายฟีนอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
5. เติมสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำการหยุดปฏิกิริยาโดยนำไปแช่ในน้ำเย็น เป็นเวลา 10 นาที
6. ดูดสารละลายปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ well plate นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร
7. นำข้อมูลมาทำกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานน้ำตาลฟรุคโตส



รูปที่ ข-1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร และสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในตัวอย่าง

1. นำตัวอย่างมาเจือจางให้เหมาะสม
2. ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเช่นเดียวกับวิเคราะห์สารมาตรฐานนำผลที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน คำนวณหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในตัวอย่างจากรูปที่ ข-2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร และสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้สมการเส้นตรงคือ $y = 0.0046x + 0.0083$

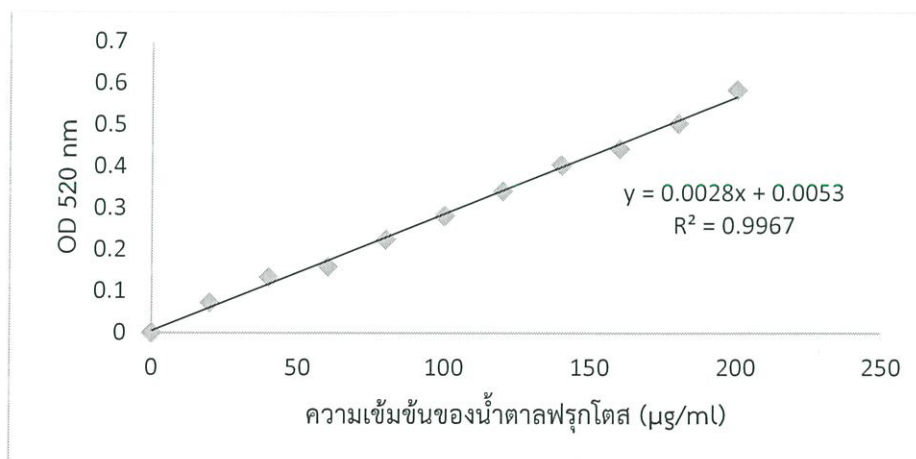
เมื่อ y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

x คือ ความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุคโตส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

2.2 การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson

2.2.1 การทำกราฟมาตรฐาน

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลฟรุคโตส โดยชั่งน้ำตาลฟรุคโตส 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายฟรุคโตสเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
2. นำสารละลายมาตรฐานน้ำตาลฟรุคโตสทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
3. ปิเปตสารละลายน้ำตาลมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นลงในหลอดทดลอง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ
4. เติมสารละลาย copper reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปแช่ในน้ำเย็น เป็นเวลา 10 นาที
5. เติม nelson reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
6. เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 15 นาที
7. ตูตสารละลายปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ well plate นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร
8. นำข้อมูลมาทำกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานน้ำตาลฟรุคโตส



รูปที่ ข-2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร และสารละลายมาตรฐานน้ำตาลฟรุคโตสความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่าง

1. นำตัวอย่างมาเจือจางให้เหมาะสม

2. ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เช่นเดียวกับวิเคราะห์สารมาตรฐานนำผลที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่างจากรูปที่ ข-2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร และสารละลายมาตรฐานน้ำตาลฟรุคโตสความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้สมการเส้นตรงคือ $y = 0.0028x - 0.0053$

เมื่อ y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

x คือ ความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุคโตส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

3. กราฟมาตรฐานระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง และค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร

1. เลี้ยงเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหาร YM broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเจือจางด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วนของเชื้อยีสต์ต่อน้ำกลั่น 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 และ 9:1 ตามลำดับ

2. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร

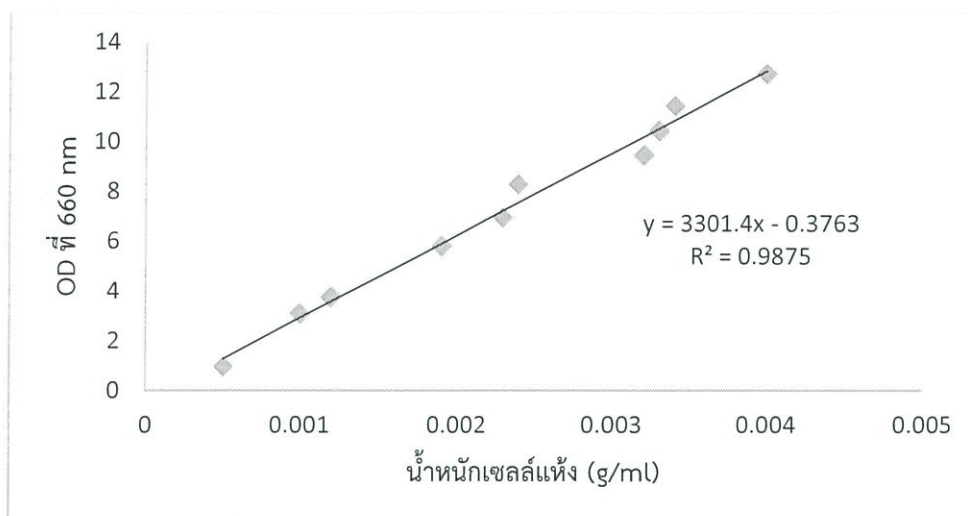
3. นำสารละลายเซลล์ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ทำการชั่งน้ำหนักหลอดแล้ว ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เอาส่วนเซลล์ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่

4. นำข้อมูลที่ได้มาทำกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อมิลลิลิตร) และค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร

5. คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้งในตัวอย่างจากรูปที่ ข-3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร และน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อมิลลิลิตร) ได้สมการเส้นตรงคือ $y = 3301.4x - 0.3763$

เมื่อ y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

x คือ น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อมิลลิลิตร)



รูปที่ ข-3 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD) ที่ 660 นาโนเมตร และน้ำหนักเซลล์แห้ง (dry cell weight, DCW) (กรัมต่อมิลลิลิตร)

4. การวิเคราะห์โคเอนไซม์คิวเทินด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography ; HPLC)

4.1 การเตรียม mobile phase

1. เตรียม mobile phase โดยใช้ เมทานอล: เอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1:9 โดยเตรียม mobile phase ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เมทานอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และ เอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ 900 มิลลิลิตร

2. นำสารละลายที่ผสมได้กรองด้วยกระดาษกรอง ขนาด 0.45 นาโนเมตร และ ไล้ฟองอากาศเป็นเวลา 30 วินาที

4.2 การทำกราฟมาตรฐานสารละลายโคเอนไซม์คิวเทิน

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานโคเอนไซม์คิวเทินโดยชั่งโคเอนไซม์คิวเทิน 12.5 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ และปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร ได้สารละลายมาตรฐานโคเอนไซม์คิวเทินความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

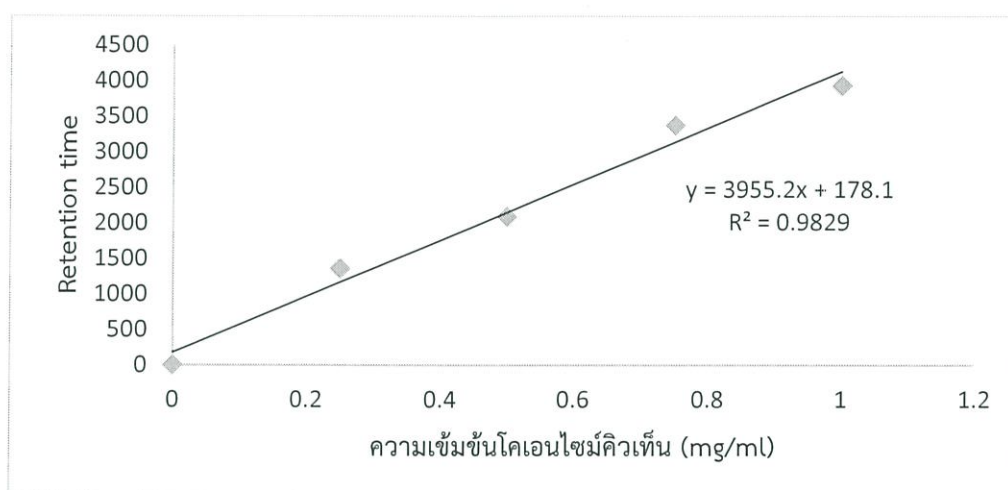
2. นำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมจากข้อ 1 มาทำการเจือจางด้วยเอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความเข้มข้น 0.25, 0.50, 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3. นำสารละลายมาตรฐานโคเอนไซม์คิวเทินที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ผสมกับเมทานอล 100 ไมโครลิตร

4. นำสารละลายที่ผสมได้กรองผ่านกระดาษกรอง ขนาด 0.45 นาโนเมตร

5. วิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 และ mobile phase คือ เมทานอล:เอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1:9 ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินด้วย UV-detector ที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร

6. นำข้อมูลที่ได้มาทำกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตร และความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานโคเอนไซม์คิวเทิน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)



รูปที่ ข-4 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตร และความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานโคเอนไซม์คิวเทิน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

4.3 การเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทิน

นำสารละลายเซลล์ยีสต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บั่นเหวี่ยงที่ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนตะกอนเซลล์มาทำการย่อยเซลล์ด้วยวิธี

1. ผสมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2 นอร์มอล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 180 นาที และหลังจากนั้นนำเซลล์มาล้างด้วยน้ำกลั่นจน pH เป็นกลาง และสกัดโคเอนไซม์คิวเทินด้วยเอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 120 นาที

2. ผสมกับสารละลายผสมระหว่างเฮกเซน และเอทานอล ในอัตราส่วน 5:2 เป็นเวลา 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที

นำเฉพาะส่วนของเอทานอลมาวิเคราะห์ปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography ; HPLC) มี mobile phase คือ เมทานอล:เอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1:9 ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดปริมาณโคเอนไซม์คิวเทินด้วย UV-detector ที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร

การคำนวณปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็นในตัวอย่างจากรูปที่ ข-4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตร และความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานโคเอนไซม์คิวเท็น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ได้สมการเส้นตรงคือ $y = 3955.2x + 178.1$

เมื่อ y คือ retention time

x คือ ความเข้มข้นของ โคเอนไซม์คิวเท็น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)



งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

คำรับรองเล่มโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว วิมลสิริ ลิ้มทองแข็ง รหัสประจำตัว ๕๗๐๕๐๘๙๘

นาย/นาง/นางสาว อัครวิทย์ วิมลเอ รหัสประจำตัว ๕๗๐๕๐๙๑๑

นาย/นาง/นางสาว..... รหัสประจำตัว.....

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา อุตสาหกรรมคอมพิวเตอร์ ภาควิชา วิทยา

ขอรับรองว่าโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา เรื่อง

ชื่อภาษาไทย การผลิตเอนไซม์จาก Saccharomyces cerevisiae ที่เลี้ยงในแหล่งอาหารที่เป็นของเสียจากโรงงานผลิต High fructose corn syrup (HFCS)

ชื่อภาษาอังกฤษ The amylase & α production by Saccharomyces cerevisiae cultivated on medium source containing waste from High fructose corn syrup (HFCS) manufacturing

ปีการศึกษา ๒๕๕๐

เป็นผลงานวิจัยที่ได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษาฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักษรวินิจฉัย.....% หรือโปรแกรม Turnitin.....%

ลงชื่อ วิมลสิริ ลิ้มทองแข็ง

ลงชื่อ อัครวิทย์ วิมลเอ

(นางสาววิมลสิริ ลิ้มทองแข็ง)

(นายอัครวิทย์ วิมลเอ)

นักศึกษา

นักศึกษา

ข้าพเจ้า ศ. / รศ. / ผศ. / ดร. / อ. อัครวิทย์ วิมลเอ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา ได้ตรวจสอบโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษาของนักศึกษาข้างต้น แล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ.....

ลงชื่อ.....

ลงชื่อ.....

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม