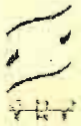
PDF4280029 ดร. นันทนา สีสุข



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การสะสมซิลีเนียมโดยเมธิลโลโทรฟิกยีสต์ที่แยกได้ในประเทศไทย

(Selenium Accumulation by Methylotrophic Yeasts Isolated in Thailand)

โดย ดร. นันทนา สีสุข และ รศ.ดร. สาวิตรี ลิ่มทอง (นักวิจัยพี่เลี้ยง)

ตุลาคม 2546

สัญญาเลขที่ PDF/29/2542

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การสะสมซิลีเนียมโดยเมธิลโลโทรฟิกยีสต์ที่แยกได้ในประเทศไทย

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. ดร. นันทนา สีสุข	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
2. รศ.ดร. สาวิตรี ลิ่มทอง (นักวิจัยพี่เลี้ยง)	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยหลังปริญญาเอก ปี 2542 จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ดร. สาวิตรี ลิ่มทอง รองศาสตราจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่กรุณาเป็นนักวิจัยพี่เลี้ยง ซึ่งได้ให้ความช่วยเหลือทั้งในด้านให้คำแนะนำในการทำวิจัย และให้ความเอื้อเฟื้อด้านอุปกรณ์และห้องปฏิบัติการวิจัยด้วยดีตลอดมา

สารบัญ

สารบัญ	หน้า
บทคัดย่อ	3
Abstract	4
สารบัญตาราง	5
สารบัญภาพ	6
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	7
การตรวจเอกสาร	9
วัตถุประสงค์และขอบเขตของการวิจัย	27
ประโยชน์ที่ได้รับ	27
วิธีดำเนินการวิจัย	28
ผลการวิจัย	34
สรุปและข้อเสนอแนะ	59
เอกสารอ้างอิง	62

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : PDF/29/2542
ชื่อโครงการ : การสะสมซิลีเนียมโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่แยกได้ในประเทศไทย
ชื่อนักวิจัย : ดร. นันทนา สีสุข ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
E-mail Address : fscints@ku.ac.th
ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี (1 กรกฎาคม 2542 – 30 มิถุนายน 2544)

การแยกเชื้อและคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์จำนวน 60 ไอโซเลท พบว่าไอโซเลท N007 มีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงที่สุด คือ 0.52 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ซึ่งเมื่อเหนี่ยวนำให้ยีสต์ N007 เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสาร NTG แล้วคัดเลือกยีสต์กลายพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อเอทไธโอนีนและมีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงขึ้น ได้ยีสต์กลายพันธุ์ MN007-67 ที่มีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงที่สุด คือ 1.06 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และเมื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ครั้งที่สองด้วยสาร NTG ได้ยีสต์กลายพันธุ์ ND035 และ ND213 ที่มีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูง 2.37 และ 1.55 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ เมื่อทำการผันแปรปริมาณเมทานอลและแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ายีสต์กลายพันธุ์ ND035 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีเมทานอล 3 เปอร์เซ็นต์ และแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.15 เปอร์เซ็นต์ สะสมเมทไธโอนีนได้สูงกว่าสภาวะอื่น ขณะที่ยีสต์กลายพันธุ์ ND213 สะสมเมทไธโอนีนได้สูงกว่าสภาวะอื่น เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเมทานอล 2 เปอร์เซ็นต์ และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.94 เปอร์เซ็นต์ แต่ยังคงพบว่าปริมาณเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์มีค่าค่อนข้างต่ำ การทดลองเติมสารประกอบอนินทรีย์ซิลีเนียมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ายีสต์กลายพันธุ์ ND035 ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมซิลีเนต 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สะสมซิลีเนียมภายในเซลล์ได้สูงสุด เท่ากับ 760 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ขณะที่เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมซิลีไนต์ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบซิลีเนียมสะสมภายในเซลล์สูงสุด เท่ากับ 590 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีโซเดียมซิลีไนต์ 10 และ 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่พบการเจริญของยีสต์ ND035 เลย ส่วนยีสต์กลายพันธุ์ ND213 ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมซิลีเนต 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบการสะสมซิลีเนียมภายในเซลล์สูงสุด เท่ากับ 150 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ขณะที่เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมซิลีไนต์ 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจพบซิลีเนียมภายในเซลล์สูงถึง 2720 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์

คำหลัก : เมทิลโลโทรฟิกยีสต์ การกลายพันธุ์ เมทไธโอนีนอิสระ การสะสมซิลีเนียม

Abstract

Project Code : PDF/29/2542

Project Title : Selenium Accumulation by Methylotrophic Yeasts Isolated in Thailand

Investigator : Dr. Nantana Srisuk Department of Microbiology Faculty of Science Kasetsart University

E-mail Address : fscints@ku.ac.th

Project Period : 2 years (1 July 1999 – 30 June 2001)

Isolation and screening of 60 isolates of methylotrophic yeasts revealed that the isolate N007 possesses the highest free methionine content as 0.52 milligram per gram dry weight when cultivated in the culture medium containing 1% (v/v) methanol as sole carbon and energy sources. To increase free methionine content of the isolate N007, NTG induced mutation was carried out and the mutant namely MN007-67 was found to be the best methionine producer. The mutant possesses methionine content of 1.06 milligram per gram dry weight. Second NTG mutation was induced to the mutant MN007-67 in order to obtain higher level of methionine content. The second mutants designated as ND035 and ND213 were selected for further studies according to their high methionine content of 2.37 and 1.55 milligram per gram dry weight respectively. Methanol concentration as well as nitrogen source contained in the medium culture was optimized for each individual mutant. Results showed that the mutant ND035 preferred 3% (v/v) methanol and 0.15% ammonium chloride whereas the medium contains 2% (v/v) methanol and 0.94% ammonium sulphate was found to be favorable to the mutant ND213. However, free methionine content observed under these conditions was unexpectedly low. Accumulation of selenium in the mutant cells was investigated. The mutant ND035 showed maximum selenium accumulation of 760 microgram per gram dry weight when cultivated under the supplement of 15 microgram of sodium selenate per milliliter of medium. This mutant also showed selenium accumulation of 590 microgram per gram dry weight when grown under the supplement of 5 microgram of sodium selenite per milliliter of medium. Growth of the mutant ND035 was obviously inhibited by 10 microgram of sodium selenite per milliliter of medium. The mutant ND213 showed maximum selenium accumulation of 150 and 2720 microgram per gram dry weight when cultivated under under the supplement of 30 microgram of sodium selenate and 15 microgram of sodium selenite per milliliter of medium, respectively.

Keywords : methylotrophic yeast, mutation, free methionine, selenium accumulation

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การแบ่งกลุ่มเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่รวบรวมได้ ตามการสร้างและไม่สร้างเส้นใยเทียมบนอาหารแข็ง	35
2	การเจริญ โปรตีน และเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ 24 ไอโซเลท เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว 1% methanol medium ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส	36
3	การเจริญ โปรตีน และเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ N007 กลาย พันธุ์ ทั้ง 142 ไอโซเลท เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว 1% methanol medium ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส	38
4	การเจริญ โปรตีน และเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ N007, MN007-67และ MN007-67 กลายพันธุ์จำนวน 19 ไอโซเลท เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว 1% methanol medium ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส	44
5	การเจริญของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ ND035 และ ND213 (กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร) เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว methanol broth ที่มีความเข้มข้นของเมทานอล ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ และเติมสารประกอบอนินทรีย์ซิลีเนียมความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส	53
6	การเจริญ เมทไธโอนีนอิสระ โปรตีน และซิลีเนียมภายในเซลล์ของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ ND035 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 30 ชม. ในอาหารเหลว methanol broth ที่มีเมทานอล 3 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.15 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และเติมโซเดียมซิลีเนตหรือโซเดียมซิลีไนต์ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส	55
7	การเจริญ เมทไธโอนีนอิสระ โปรตีน และซิลีเนียมภายในเซลล์ของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ ND213 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 30 ชม. ในอาหารเหลว methanol broth ที่มีเมทานอล 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน แอมโมเนียมซัลเฟต 0.94 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน และเติมโซเดียมซิลีเนตหรือโซเดียมซิลีไนต์ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส	59

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	วิถีดิสสิมิเลชันของการเปลี่ยนแปลงเมทานอลโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์	11
2	วิถีแอสสิมิเลชันของการเปลี่ยนแปลงเมทานอลโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์	14
3	ความเข้มข้นของเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ (ก) โปรตีนภายในเซลล์ (ข) และการเจริญ (ค) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ N007 และเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ MN007-67, ND035 และ ND213 เมื่อเลี้ยงในอาหาร methanol medium ที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส	46
4	ความเข้มข้นของเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ (ก และ ง) โปรตีนภายในเซลล์ (ข และ จ) และการเจริญ (ค และ ฉ) ที่เวลาต่าง ๆ ของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ ND035 (ก-ค) และ ND213 (ง-ฉ) เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเมทานอลเข้มข้น 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส	48
5	ความเข้มข้นของเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ (ก และ ง) โปรตีนภายในเซลล์ (ข และ จ) และการเจริญ (ค และ ฉ) ที่เวลาต่าง ๆ ของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ ND035 (ก-ค) และ ND213 (ง-ฉ) เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเมทานอลความเข้มข้น 3 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีแอมโมเนียมคลอไรด์เข้มข้น 0.76 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต เข้มข้น 0.94 เปอร์เซ็นต์ หรือยูเรีย 4.29 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส	50
6	ความเข้มข้นของเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ (ก และ ง) โปรตีนภายในเซลล์ (ข และ จ) และการเจริญ (ค และ ฉ) ที่เวลาต่าง ๆ ของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ ND035 (ก-ค) และ ND213 (ง-ฉ) เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเมทานอลความเข้มข้น 3 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสำหรับยีสต์ ND035 มีแอมโมเนียมคลอไรด์เข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ 0.76 เปอร์เซ็นต์ หรือ 1.53 เปอร์เซ็นต์ สำหรับยีสต์ ND213 มีแอมโมเนียมซัลเฟต เข้มข้น 0.19 เปอร์เซ็นต์ 0.94 เปอร์เซ็นต์ หรือ 1.88 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส	52

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ซิลีเนียมเป็นแร่ธาตุที่จำเป็นสำหรับมนุษย์และสัตว์ โดยจัดเป็น essential trace element ที่สำคัญต่อการทำงานและระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์ ซิลีเนียมเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเอนไซม์ glutathione peroxidase ซึ่งทำหน้าที่ช่วยป้องกันเซลล์และองค์ประกอบอื่นๆ ของเซลล์จาก peroxide ซึ่งเป็นสารพิษที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาชีวเคมีภายในเซลล์ ซิลีเนียมยังทำหน้าที่ร่วมกับวิตามินอี ในการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันภายในเซลล์ ป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง ปัจจุบันมีการนำซิลีเนียมไปใช้ในวงการปศุสัตว์ เพื่อเสริมสร้างภูมิต้านทานให้กับสัตว์ ช่วยป้องกันการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรค white muscle disease ในวัวและแกะ โรค mulbury heart disease ในหมู และโรค exudative diathesis ในไก่ เป็นต้น นอกจากนี้เกษตรกรยังมีการนำซิลีเนียมไปใช้กับการเลี้ยงปลา เพื่อปรับปรุงการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของปลา โดยพบว่าปลาที่ได้รับซิลีเนียมควบคู่ไปกับวิตามินอี จะมีอัตราการตายลดลง และมีความต้านทานต่อโรคสูงขึ้น ซิลีเนียมจึงน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่อาจนำมาใช้เพื่อช่วยเพิ่มระบบภูมิต้านทาน และอัตราการรอดของกุ้งกุลาดำ ซึ่งเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย การให้ซิลีเนียมแก่สัตว์อาจให้ในรูปที่เป็นสารประกอบอินทรีย์หรือสารประกอบอนินทรีย์ แต่พบว่าซิลีเนียมที่อยู่ในรูปสารประกอบอินทรีย์มีประสิทธิภาพมากกว่าซิลีเนียมในรูปสารประกอบอนินทรีย์ คือ sodium selenite ซึ่งอาจเป็นสารก่อมะเร็ง และสาร oxidant ปัจจุบันมีการผลิตซิลีเนียมที่เป็นสารประกอบอินทรีย์ในรูปของซิลีเนียมยีสต์ในเชิงการค้าโดยใช้ brewer's yeast ซึ่งนอกจากสัตว์จะได้รับซิลีเนียมในรูปที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์แล้ว สัตว์ยังได้รับคุณค่าทางโภชนาการจากตัวเซลล์ยีสต์ด้วย เนื่องจากยีสต์จัดเป็นจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพสำหรับใช้เป็นแหล่งของโปรตีน โดยพบว่าเซลล์ยีสต์มีปริมาณโปรตีนสูง มีเกลือแร่หลายชนิดที่เป็น trace element ที่สำคัญสำหรับคนและสัตว์ เช่น โครเมียม ซิลีเนียม และสังกะสี เป็นต้น รวมทั้งวิตามินหลายชนิดโดยเฉพาะวิตามินบีรวม (Reed and Nagodawithana, 1991) ยีสต์สามารถสะสมซิลีเนียมไว้ภายในเซลล์ในรูปของกรดอะมิโนประเภท selenium-containing amino acids (ส่วนใหญ่ที่พบ คือ selenomethionine) โดยเกิดจากการแทนที่ซัลเฟอร์ที่เกาะอยู่กับกรดอะมิโนเมทไธโอนีน ด้วยซิลีเนียมที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อในรูปของสารประกอบอนินทรีย์ ผู้วิจัยจึงคาดว่าเมทไธโอนีนน่าจะเป็นตัวกลางสำคัญ ที่นำไปสู่การเพิ่มประสิทธิภาพการสะสมซิลีเนียมในเซลล์ยีสต์

ยีสต์ส่วนใหญ่รวมทั้ง brewer's yeast สามารถเพิ่มจำนวนได้ดีในอาหารที่มีน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน แต่ยังมียีสต์บางชนิดที่สามารถเจริญได้ในสารอาหารชนิดอื่น เช่น สารประกอบคาร์บอนหนึ่งอะตอม (C_1 compounds) ซึ่งหมายถึงสารประกอบคาร์บอนที่ไม่มีพันธะคาร์บอน-คาร์บอนในโครงสร้างของโมเลกุลเลย (Colby and Zatman, 1972) เช่น มีเธน เมทานอล ไดเมทิลอีเธอร์ เป็นต้น ยีสต์กลุ่มนี้เรียกว่า เมทิลโลโทรฟิกยีสต์ (methylotrophic yeasts) ได้แก่ ยีสต์ในยีนัส Candida และ Pichia ยีสต์เหล่านี้มีปริมาณโปรตีนภายในเซลล์สูง แต่มีกรดนิวคลีอิคต่ำ ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่เหมาะสม ในการนำมาใช้เป็นอาหารได้ เนื่องจากกรดนิวคลีอิคปริมาณสูง ๆ อาจก่อให้เกิดโรคเกี่ยวกับไตและโรคเกาท์ได้ เมื่อเลี้ยงเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ในสภาวะที่มีเมทานอลเป็นแหล่ง

คาร์บอนและแหล่งพลังงาน พบว่าจะมีการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเพอร์ออกซิโซมขึ้นจำนวนมาก ภายในเซลล์ยีสต์ ซึ่งเพอร์ออกซิโซมเป็นออร์แกเนลล์ของเซลล์ที่มีชั้นเมมเบรนหุ้มเพียงชั้นเดียว ทำหน้าที่จัดเก็บโปรตีนที่เซลล์สังเคราะห์ขึ้น ทำให้โปรตีนเหล่านั้นไม่ถูกทำลายโดยเอนไซม์โปรตีเอสที่อยู่ภายในเซลล์ ภายในเพอร์ออกซิโซมของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ จะพบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบคาร์บอนหนึ่งอะตอม ที่มีอยู่ในสภาวะแวดล้อมของการเจริญ เช่น ในกรณีของยีสต์ที่เจริญบนเมทานอล ก็จะพบเอนไซม์ alcohol oxidase เอนไซม์ catalase และเอนไซม์ dihydroxyacetone synthase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญของกระบวนการเปลี่ยนแปลงเมทานอลเพื่อการเจริญของยีสต์ ส่วนโปรโมเตอร์ที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ alcohol oxidase (*AOX* promoter) นี้ พบว่ามีศักยภาพสูงมาก ในการทำให้เกิดการแสดงออกของยีนจากแหล่งอื่น ในเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ ดังนั้นนอกจากความสามารถในการใช้เมทานอลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก และหาได้ง่ายแล้ว ปัจจุบันเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ยังได้รับความสนใจจากนักวิทยาศาสตร์ในการนำไปใช้ประโยชน์ด้าน recombinant DNA technology อีกด้วย ดังนั้นการใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญของยีสต์ จึงมีความสำคัญเพิ่มขึ้น นอกเหนือไปจากการใช้เป็นเพียงวัตถุดิบตั้งต้นของการผลิตยีสต์เพื่อใช้เป็นแหล่งโปรตีนเท่านั้น แต่ถึงแม้เมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่สามารถใช้เมทานอลเพื่อการเจริญได้จะมีคุณสมบัติที่น่าสนใจดังกล่าวข้างต้นก็ตาม การนำยีสต์กลุ่มนี้ไปใช้ประโยชน์ในการผลิตซิลีเนียมยีสต์ก็อาจมีข้อจำกัด เนื่องจากยีสต์มีปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นบางชนิด เช่น เมทไธโอนีนและทริปโตเฟนค่อนข้างต่ำ เช่นเดียวกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น (Nelson *et al.*, 1959) ดังนั้นการทำให้ยีสต์มีปริมาณเมทไธโอนีนภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้น น่าจะส่งผลให้เซลล์ยีสต์สามารถรับซิลีเนียม เข้าไปสะสมภายในเซลล์ในรูปของซิลีโนเมทไธโอนีน ได้มากขึ้นกว่าสภาวะปกติ ผู้วิจัยเล็งเห็นว่าเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่สามารถใช้เมทานอลเพื่อการเจริญ อาจนำมาใช้เป็นแหล่งผลิตซิลีเนียมในลักษณะที่เป็นสารอินทรีย์ที่มีศักยภาพได้ ซึ่งข้อมูลเบื้องต้นที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ อาจเป็นประโยชน์ต่อการผลิตซิลีเนียมยีสต์จากเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ต่อไปในอนาคต

การตรวจเอกสาร (Literatures Review)

เมทิลโลโทรฟิกยีสต์

เมทิลโลโทรฟิกยีสต์ หมายถึงยีสต์ที่สามารถย่อยสลาย สาร C_1 compounds ได้ ซึ่งตามปกติแล้วยีสต์ทั่วไปจะสามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้ดีในอาหารที่มีน้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนแต่นอกจากน้ำตาลและคาร์โบไฮเดรทแล้ว เมทิลโลโทรฟิกยีสต์ยังสามารถเจริญได้ในสารอาหารชนิดอื่นได้แก่ แอลกอฮอล์ น้ำตาลแอลกอฮอล์ สารประกอบไฮโดรคาร์บอน สารประกอบพวก C_1 compounds เป็นต้น สาร C_1 compounds ที่กล่าวนี้หมายถึงสารประกอบคาร์บอนที่มีคาร์บอนเพียงหนึ่งอะตอมหรือในสารประกอบคาร์บอนที่ไม่มีพันธะคาร์บอน-คาร์บอนในโครงสร้างของโมเลกุลเลย (Colby and Zatman, 1972) สาร C_1 compounds ที่อาจพบแพร่กระจายอยู่ในธรรมชาติ ได้แก่ มีเธน เมทานอล ไดเมทิลอีเธอร์ เป็นต้น ยีสต์ *Candida boidinii* (เดิมคือ *Kloeckera* sp.) เป็นเมทิลโลโทรฟิกยีสต์และสิ่งมีชีวิตประเภทยูคาริโอทชนิดแรกที่พบว่าสามารถใช้เมทานอลเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนหลักของเซลล์ได้ (Ogata *et al.*, 1969)

การศึกษาเกี่ยวกับยีสต์ที่ใช้เมทานอลเพื่อการเจริญ มีที่มาจากการคัดเลือกหาสายพันธุ์ยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ methyl acetate esterase โดย Ogata *et al.* (1969) ซึ่งพบว่ายีสต์ *Kloeckera* sp.2201 (ปัจจุบันเปลี่ยนชื่อเป็น *Candida boidinii*) สามารถใช้เมทานอลเพื่อการเจริญได้ Hazeu *et al.* (1972) ทดสอบความสามารถในการใช้เมทานอลของยีสต์ที่เก็บรวบรวมไว้ พบว่ายีสต์ที่ใช้เมทานอล (methanol utilizing yeasts) ส่วนใหญ่ เป็นยีสต์ที่แยกได้จากเปลือกไม้หรือแมลงที่อาศัยอยู่บนต้นไม้ โดยบริเวณที่มีสารประกอบลิกนินซึ่งอุดมไปด้วยหมู่เมธอกซี (methoxy) อาจส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของยีสต์เหล่านี้ อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบระหว่างยีสต์กับแบคทีเรียอาจพบว่า ในตัวอย่างจากธรรมชาติมีเมทิลโลโทรฟิกยีสต์น้อยกว่าเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียมาก (van Dijken and Harder, 1974; Ogata *et al.*, 1975)

Hazeu *et al.* (1972) และ Oki *et al.* (1972) รายงานการแยกเชื้อเมทิลโลโทรฟิกยีสต์จากแหล่งธรรมชาติและทำการคัดเลือกจาก type-culture collection ด้วย พบว่ามียีสต์ทั้งหมด 15 สปีชีส์ ใน 4 ยีนัส คือ *Candida, Hansenula, Pichia* และ *Torulopsis* ส่วนการแยกเชื้อเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่ใช้เมทานอลโดยวิธีการทำ batch-type enrichment culture และ continuous-flow enrichment culture ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (van Dijken and Harder, 1974; Levine and Cooney, 1973; Pal and Hamdan, 1979) พบยีสต์ *P. pinus* และ *C. boidinii* มากกว่ายีสต์ตัวอื่น และเมื่อทำการแยกเชื้อโดยวิธีเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องในสภาวะที่มีเมทานอลในปริมาณจำกัดที่ 37 องศาเซลเซียส จะพบยีสต์ *H. polymorpha* ได้บ้าง ส่วนยีสต์ *Torulopsis* นั้นจะพบเมื่อมีการแยกเชื้อแบบ batch-type enrichment culture (Oki *et al.*, 1972) สำหรับลักษณะการเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง 37 องศาเซลเซียส นี้อาจพบไม่บ่อยนักในเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ มีรายงานว่าพบยีสต์เพียง 7 สายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากเชื้อยีสต์ที่พบว่าใช้เมทานอลเพื่อการเจริญได้ทั้งสิ้น 55 สายพันธุ์ (Ogata *et al.*, 1975) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ายีสต์ *H. polymorpha* หลายสายพันธุ์สามารถทน

อุณหภูมิได้สูงถึง 40 องศาเซลเซียส และมีหนึ่งสายพันธุ์สามารถทนอุณหภูมิได้ถึง 45 องศาเซลเซียส (Levine and Cooney, 1973)

Lee and Komagata (1980) ศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อยีสต์ 75 ไอโซเลทที่สามารถใช้เมทานอลเพื่อการเจริญ ได้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Hazeu *et al.* (1972) และ Oki *et al.* (1972) ว่าในกลุ่มของยีสต์ที่ศึกษาประกอบด้วยยีสต์ทั้งหมด 4 ยีนัส คือ *Candida, Hansenula, Pichia* และ *Torulopsis* โดยพบว่าเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ ในยีนัส *Hansenula* spp. และ *Pichia* spp. มีลักษณะที่ใกล้เคียงกันมากซึ่งอาจบอกความแตกต่างระหว่างสองยีนัสนี้ได้จากความสามารถในการใช้ไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนหลักเท่านั้น ส่วนเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ในยีนัส *Candida* และ *Torulopsis* อาจกล่าวว่าเป็น imperfect form ของยีนัส *Hansenula* และ *Pichia* เนื่องจากลักษณะเกี่ยวกับ GC content ของดีเอนเอ, ระบบ ubiquinone, proton magnetic resonance spectra ของสารแมนแนน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ รวมทั้งลักษณะทางสรีรวิทยาอื่นๆด้วย ทั้งนี้จากข้อมูลในหนังสือ The Yeast: A Taxonomic Study 4th edition (Kurtzman and Fell, 1998) และหนังสือ Yeasts: Characteristica and Identification 3rd edition (Barnett *et al.*, 2000) มีการจัดจำแนกยีสต์ในสกุล *Hansenula* และ *Torulopsis* เป็นสกุลอื่นๆ ซึ่งในปัจจุบันนี้ เมทิลโลโทรฟิกยีสต์จึงกระจายอยู่ใน 2 สกุล คือ *Candida* และ *Pichia* เท่านั้น เช่น *H. polymorpha* ถูกจัดจำแนกใหม่เป็น *P. angusta* เป็นต้น

นอกจากนี้ Lee and Komagata (1980) ยังพบว่าเชื้อยีสต์ที่นำมาศึกษาส่วนใหญ่สามารถย่อยสลายเพคตินได้จึงคาดว่าเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ ที่พบตามธรรมชาตินั้นได้รับเมทานอลมาจากการย่อยสลายซากพืชและต้นไม้ เนื่องจากการย่อยสลายสารประกอบพวกเมทิล เอสเทอร์ของเพคติน ทำให้เกิดเมทานอลเป็นผลิตภัณฑ์ ดังนั้นจึงพบเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ ได้ตามซากพืชที่เน่าเปื่อยและตัวอย่างดินที่มีการทับถมของอินทรีย์วัตถุในธรรมชาติ

เมทิลโลโทรฟิกยีสต์บางชนิดสามารถใช้สารประกอบคาร์บอนหนึ่งอะตอมตัวอื่น เช่น มีเทน เมทิลอามีน ฟอร์มาลดีไฮด์ และฟอร์เมท เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนได้ด้วย (Colby *et al.*, 1979; van der Walt, 1962; van Dijken and Bos, 1981; Wolf and Hanson, 1979) แต่อย่างไรก็ตามพบว่ายีสต์ที่สามารถใช้เมทานอลเพื่อการเจริญมักจะไม่สามารถเจริญได้บนสารอาหารดังกล่าวข้างต้น (Harder and Veenhuis, 1989) ดังนั้นเมื่อกล่าวถึงเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ จึงมักจะหมายถึงยีสต์ที่สามารถใช้เมทานอลเพื่อการเจริญได้มากกว่าที่จะหมายถึงสารประกอบคาร์บอนหนึ่งอะตอมตัวอื่นๆ

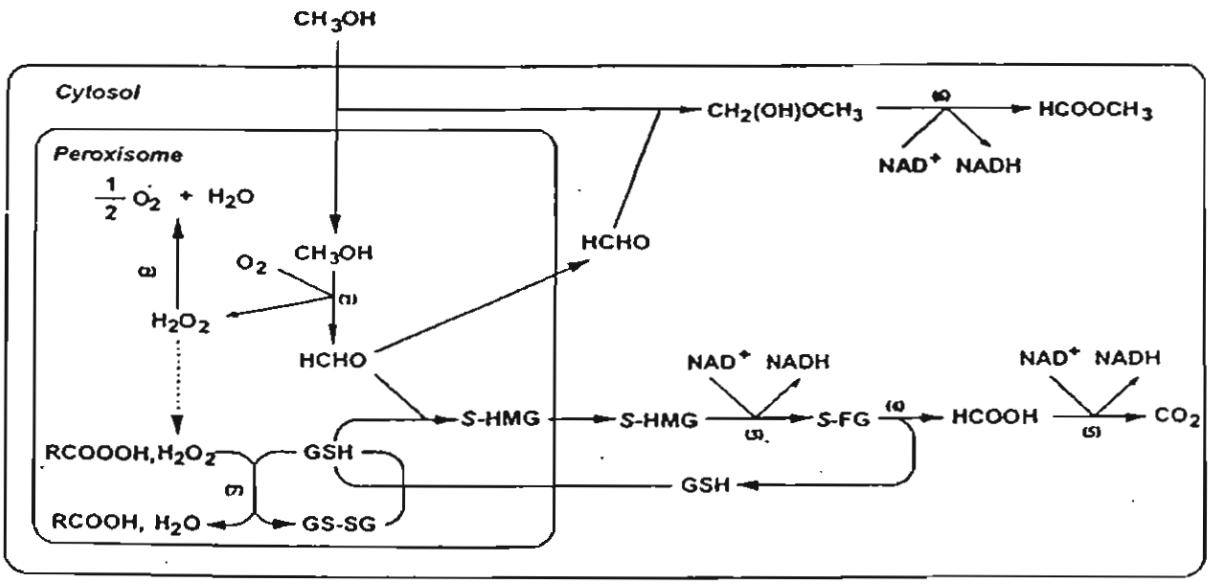
มีการนำเมทานอลไปใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในกระบวนการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากยีสต์ เนื่องจากเมทานอลเป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูก จึงทำให้มีการศึกษาการเพิ่มจำนวนเซลล์ยีสต์ให้ได้ปริมาณมากโดยใช้วัตถุดิบชนิดนี้ และยังมีการศึกษาเพื่อพัฒนาการผลิตสารเคมีที่เป็นประโยชน์ตัวอื่นโดยใช้ C_1-metabolism ของยีสต์ด้วย (Kato *et al.*, 1983)

กระบวนการเปลี่ยนแปลงเมทานอลโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ (Yurimoto *et al.*, 2002)

การเปลี่ยนแปลงเมทานอลเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนในเมทิลโลโทรฟิกยีสต์เริ่มจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของเมทานอล (CH_3OH) ไปเป็นฟอร์มาลดีไฮด์ (HCOH) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกิดขึ้น

โดยมีเอนไซม์ alcohol oxidase (AOD; EC 1.1.3.13) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน (Kato *et al.*, 1976; Tani, 1985;) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์นั้นถูกเปลี่ยนต่อไปเป็นน้ำและออกซิเจน โดยมีเอนไซม์ catalase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา การเปลี่ยนแปลงเมทานอลไปเป็นฟอร์มาลดีไฮด์นี้ เกิดขึ้นภายในเพอร์ออกซิโซม ซึ่งฟอร์มาลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นจัดเป็นสารตัวกลางที่เป็นศูนย์กลางของเมทานอลเมแทบอลิซึม โดยฟอร์มาลดีไฮด์เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อไปได้โดย 2 วิถีคือ

1. วิถีดิสสิมิเลชัน เป็นวิถีที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงเมทานอลเป็นคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อผลิต NADH สำหรับสร้างพลังงานในรูป ATP โดยผ่านสารตัวกลางคือ ฟอร์มาลดีไฮด์และฟอร์เมท (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 วิถีดิสสิมิเลชันของการเปลี่ยนแปลงเมทานอลดดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์
เอนไซม์: (1) alcohol oxidase, (2) catalase, (3) glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase, (4) *S*-formylglutathione hydrolase, (5) formate dehydrogenase, (6) methylformate synthase, (7) Pmp20
คำย่อ: *S*-HMG, *S*-hydroxymethylglutathione; *S*-FG, *S*-formylglutathione; GSH, รูปรีดิวซ์ของกลูดาไธโอน; GS-SG; รูปออกซิไดซ์ของกลูดาไธโอน
ที่มา: Yurimoto *et al.* (2002)

ในวิถีดิสสิมิเลชันนี้ ฟอร์มาลดีไฮด์จะรวมตัวกับกลูดาไธโอน รูปรีดิวซ์ (GSH) ได้เป็น S-hydroxymethylglutathione (*S*-HMG; $HOCH_2$-SG) ปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นได้เองโดยไม่ต้องใช้ตัวเร่ง และเกิดขึ้นภายในเพอร์ออกซิโซม

$$HCHO + GSH \longrightarrow HOCH_2\text{-}SG$$

ต่อมา *S*-HMG ถูกส่งไปยังไซโทพลาสซึมด้วยกลไกการขนส่งแบบจำเพาะ จากนั้น *S*-HMG เปลี่ยนเป็น *S*-formylglutathione (*S*-FG) และ NADH + H^+ โดยมีเอนไซม์ glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase ช่วยเร่งปฏิกิริยา และมี NAD^+ เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (Schutte *et al.*, 1976)

$$HOCH_2\text{-}SG + NAD^+ \longrightarrow HCO\text{-}SG + NADH + H^+$$

จากนั้น *S*-FG เปลี่ยนเป็นฟอร์เมท (HCOOH) และ GSH โดยมีเอนไซม์ *S*-formylglutathione hydrolase เร่งปฏิกิริยา

$$HCO\text{-}SG + H_2O \longrightarrow HCOOH + GSH$$

GSH ที่เกิดขึ้นสามารถเข้ารวมตัวกับฟอร์มาลดีไฮด์ได้อีก นอกจากนี้ยังพบว่า GSH ทำหน้าที่เป็น reductant สำหรับโปรตีนขนาด 20 กิโลดาลตัน ที่อยู่ระหว่างชั้นของเยื่อหุ้มเพอร์ออกซิโซม (peroxisomal peripheral membrane protein) อีกด้วย

วิถีออกซิเดชันของฟอร์มาลดีไฮด์อาจเกิดโดยไม่เกี่ยวข้องกับ GSH (GSH-independent formadehyde oxidation pathway) ก็ได้ โดยที่หมู่อัลดีไฮด์ของฟอร์มาลดีไฮด์ทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลของเมทานอลเกิดเป็นเฮมิอะวิทาล [$CH_2(OH)OCH_3$] จากนั้นเปลี่ยนไปเป็นเมทิลฟอร์เมท โดยมีเอนไซม์ methylformate synthase เร่งปฏิกิริยา และมี NAD^+ เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (Murdanoto *et al.*, 1997; Sakai *et al.*, 1999b) ฟอร์เมทที่เกิดขึ้นถูกเปลี่ยนไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และ NADH + H^+ โดยมีเอนไซม์ formate dehydrogenase ช่วยเร่งปฏิกิริยา และมี NAD^+ เป็นตัวรับอิเล็กตรอน

$$HCOOH + NAD^+ \longrightarrow CO_2 + NADH + H^+$$

มีการตรวจพบเมทิลฟอร์เมทปริมาณมาก สะสมในระหว่างการเจริญของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์หลายสายพันธุ์ ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีเมทานอลเป็นสารอาหารหลัก และเมื่อเติมฟอร์มาลดีไฮด์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะพบว่ามีการสะสมเมทิลฟอร์เมทเพิ่มขึ้น (Sakai *et al.*, 1995) จึงมีการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์ methyl formate synthase (MFS) ของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ *C. boidinii* และ *P. methanolica* พบว่า MFS เป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มของ class 3 alcohol dehydrogenase ซึ่งในหนึ่งหน่วยย่อย (subunit) ของเอนไซม์ประกอบด้วยสังกะสีสองอะตอมและสามารถเร่งปฏิกิริยาที่มีแอลกอฮอล์โครงสร้างเป็นโซ่ยาว เช่น octanol หรือ hemiacetal เป็นสารตั้งต้นได้ดี เอนไซม์ MFS นี้เร่งปฏิกิริยา NAD^+-dependent dehydrogenation ของ hemiacetal (ซึ่งเกิดจากการรวมตัวกันของเมทานอลและฟอร์มาลดีไฮด์) ทำให้เกิดเมทิลฟอร์เมทเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา ซึ่งการเกิดเมทิลฟอร์เมทขึ้นนี้แสดงให้เห็นว่า ในเมทิลโลโทรฟิกยีสต์นั้น นอกจากฟอร์มาลดีไฮด์จะเกิดการเปลี่ยนแปลง โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase แล้ว ฟอร์มาลดีไฮด์ยังอาจถูกออกซิไดซ์โดยการทำงานของเอนไซม์ MFS ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงแบบที่ไม่เกี่ยวข้องกับกลูตาไธโอนได้ด้วย ซึ่งการเปลี่ยนแปลงแบบหลังนี้ทำให้เกิดเมทิลฟอร์เมทขึ้น

ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของเมทานอล (Murdanoto *et al.*, 1997) การที่เมทิลโลโทรฟิกยีสต์มีกระบวนการเปลี่ยนแปลงฟอร์มาลดีไฮด์ได้ถึงสองแบบนี้ อาจช่วยให้เซลล์ยีสต์กลุ่มนี้ทนต่อฟอร์มาลดีไฮด์ได้ดีกว่ายีสต์กลุ่มอื่น เพราะมีการเปลี่ยนแปลงฟอร์มาลดีไฮด์ไปเป็นสารอื่นที่ไม่เป็นพิษได้เร็วกว่ายีสต์ทั่วไป

วิถีดิสสิมิเลชันของการเปลี่ยนแปลงเมทานอลโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์นี้ จะให้พลังงานแก่เซลล์ในรูปของ NADH 2 โมเลกุล (เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของฟอร์มาลดีไฮด์และฟอร์เมทปฏิกิริยาละ 1 โมเลกุล และ NADH จะถูกนำไปใช้สำหรับการสร้างพลังงานในรูป ATP ต่อไป

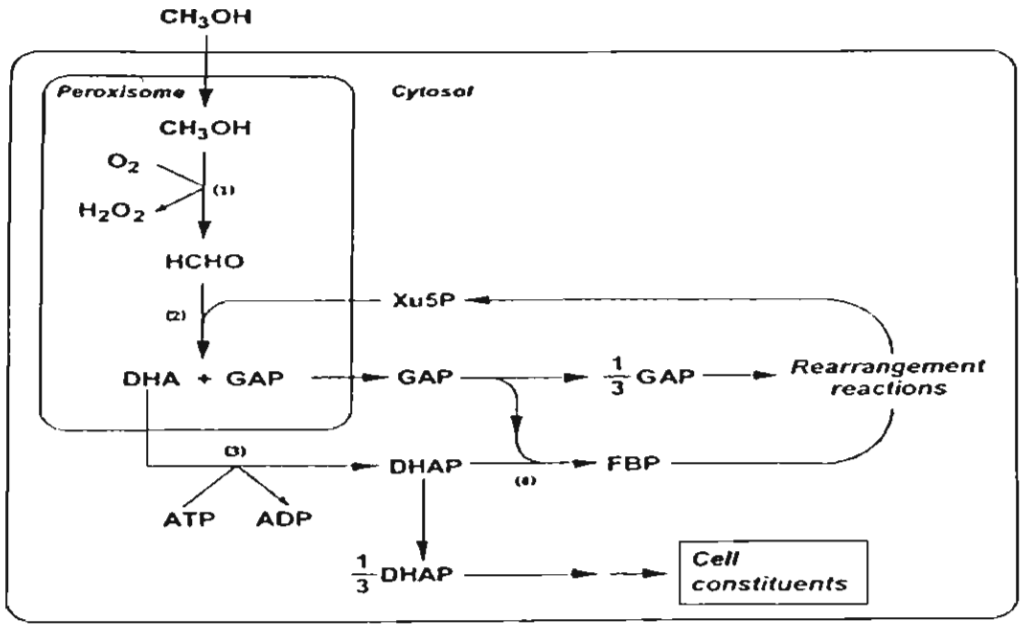
2. วิถีแอสสิมิเลชัน เป็นวิถีที่เกี่ยวข้องกับการตรึงสารประกอบคาร์บอนหนึ่งอะตอม รวมเข้ากับน้ำตาลคาร์บอนห้าอะตอม เกิดเป็นสารประกอบคาร์บอนสามอะตอมสองโมเลกุล คือ dihydroxyacetone (DHA) และ glyceraldehyde-3-phosphate (GAP) ดังแสดงในภาพที่ 2 เมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่เจริญจากเมทานอล ใช้วิถีเมแทบอลิซึมนี้ในการสร้างสารประกอบที่มีพันธะระหว่างคาร์บอนกับคาร์บอนขึ้น เพื่อสังเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์ เนื่องจากเมทานอลเป็นสารประกอบคาร์บอนหนึ่งอะตอม จึงไม่มีพันธะดังกล่าวในโมเลกุล (Anthony, 1962; Tani, 1985; Harder and Veenhuis, 1989; Harder and Brooke, 1990; Yurimoto *et al.*, 2002)

ฟอร์มาลดีไฮด์ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของเมทานอลเข้ารวมตัวกับ xylulose-5-phosphate (Xu5P) ภายในเพอร์ออกซิโซม ได้เป็น GAP โดยมีเอนไซม์ dihydroxyacetone synthase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

จากนั้น GAP และ DHA จะผ่านเยื่อหุ้มเพอร์ออกซิโซมออกสู่ไซโทพลาสซึม ต่อมามีการเติมหมู่ฟอสเฟตให้แก่ DHA ได้เป็น dihydroxyacetone phosphate (DHAP) โดยมีเอนไซม์ dihydroxyacetone kinase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและมี ATP เป็นตัวให้หมู่ฟอสเฟต จากนั้น DHAP จะเข้ารวมกับ GAP เป็น fructose 1,6-bisphosphate (FBP) โดยมีเอนไซม์ fructose bisphosphatase เร่งปฏิกิริยา

วัฏจักรเพนโทสฟอสเฟตในไซโทพลาสซึม ทำให้เกิดการจัดเรียงตัวใหม่ของโมเลกุลของ GAP และ FBP ทำให้ได้ Xu5P ซึ่งสามารถผ่านเยื่อหุ้มเพอร์ออกซิโซมกลับเข้าไปได้ นอกจากนี้พบว่าหนึ่งในสามของโมเลกุลของ DHAP ที่สร้างขึ้น จะถูกนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์กลูโคสของเซลล์ (gluconeogenesis)

จุลินทรีย์แต่ละประเภทที่เจริญได้ด้วยเมทานอล มีวิถีแอสสิมิเลชันของเมทานอลที่แตกต่างกัน คือ เมทิลโลโทรฟิกยีสต์จะใช้วิถี xylulose monophosphate (XMP) pathway เป็นวิถีหลักของการเปลี่ยนแปลง ขณะที่เมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียและเชื้อราใช้วิถี ribulose monophosphate (RMP) pathway และวิถี serine pathway



ภาพที่ 2 วิถีแอสสิมิเลชันของการเปลี่ยนแปลงเมทานอลโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์
เอนไซม์: (1) alcohol oxidase, (2) dihydroxyacetone synthase,
(3) dihydroxyacetone kinase, (4) fructose bisphosphatase
คำย่อ: DHA, dihydroxyacetone; GAP, glyceraldehyde 3-phosphate;
DHAP, dihydroxyacetone phosphate; Xu5P, xylulose-5-phosphate
ที่มา: Yurimoto *et al.* (2002)

จากภาพที่ 1 และ 2 จะพบว่าฟอร์มาลดีไฮด์เป็นสารตัวกลางหลักซึ่งอยู่ในตำแหน่งศูนย์กลางระหว่างวิถีที่เป็นดิสสิมิเลชันและแอสสิมิเลชันของกระบวนการเปลี่ยนแปลงเมทานอลเพื่อการเจริญ ฟอร์มาลดีไฮด์เป็นสารพิษที่ก่อให้เกิดความผิดปกติที่โปรตีนและดีเอนเอของเซลล์ยีสต์ได้ (Chanet and Von-Borstel, 1979) ปริมาณของฟอร์มาลดีไฮด์จึงมีความสำคัญต่อการเจริญและ กระบวนการเมแทบอลิซึมของยีสต์ทั่วไปรวมทั้งเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ โดยพบว่าถ้าเติมเมทานอลปริมาณมากๆ ลงในการเลี้ยงเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ ในสภาพที่มีเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนแล้ว จะมีการสะสมฟอร์มาลดีไฮด์ ซึ่งในบางกรณีอาจทำให้การเจริญหยุดชะงักลงได้ การเป็นพิษของฟอร์มาลดีไฮด์ต่อการเจริญนี้ อาจทำให้เกิดปัญหาในการใช้เมทิลโลโทรฟิกยีสต์เพื่อการผลิตโปรตีนที่เป็นประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากไม่สามารถเลี้ยงให้มีเซลล์ปริมาณมากได้ (Cregg, 1993; Gellissen *et al.*, 1991; Sakai *et al.*, 1996) อย่างไรก็ตามพบว่า เมทิลโลโทรฟิกยีสต์สามารถทนต่อพิษของฟอร์มาลดีไฮด์ ได้ดีกว่ายีสต์ทั่วๆไป โดยสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟอร์มาลดีไฮด์ปริมาณสูงถึง 16 mM (Kato *et al.*, 1983)

การศึกษากระบวนการเปลี่ยนแปลงฟอร์มาลดีไฮด์ในยีสต์ แสดงให้เห็นว่าการที่เมทิลโลโทรฟิกยีสต์สามารถทนต่อความเป็นพิษของฟอร์มาลดีไฮด์ได้นั้น อาจเนื่องมาจากปฏิกิริยาการทำลาย

ความเป็นพิษ (detoxification) ในเซลล์ยีสต์ ที่ทำให้มีการเปลี่ยนฟอร์มาลดีไฮด์ ไปเป็นสารที่ไม่เป็นพิษ โดยอาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์ glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase นอกจากนี้ยังอาจเนื่องมาจากเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดฟอร์มาลดีไฮด์ (คือเอนไซม์ alcohol oxidase) และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายฟอร์มาลดีไฮด์ (คือเอนไซม์ dihydroxyacetone synthase) ซึ่งมีกระบวนการ compartmentalization ภายในเพอร์ออกซิโซมในเซลล์ยีสต์ (Douma *et al.*, 1985; Goodman, 1985; Goodman *et al.*, 1984)

การนำเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ไปใช้ประโยชน์

เมทิลโลโทรฟิกยีสต์ได้รับความสนใจ เนื่องจากสามารถเจริญโดยใช้เมทานอล ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูก นอกจากนี้ยังสามารถใช้น้ำตาลหลายชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพด้วย ในระหว่างการเจริญของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ด้วยเมทานอล จะพบโปรตีนหลักได้แก่ เอนไซม์ alcohol oxidase เอนไซม์ CAT และ เอนไซม์ dihydroxyacetone synthase อยู่ในส่วนของ matrix mass เกือบทั้งหมดของเพอร์ออกซิโซม คิดเป็นปริมาณ 60 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนทั้งหมดในเซลล์ ทั้งเอนไซม์ alcohol oxidase และ dihydroxyacetone synthase มีความสำคัญทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพค่อนข้างมากในแง่ของการนำไปใช้ประโยชน์ โดยส่วนโปรโมเตอร์ของยีน *AOD* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ alcohol oxidase นั้นได้ถูกนำไปใช้อย่างกว้างขวางในการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนจากแหล่งอื่น (heterologous gene expression) นำไปสู่กจรผลิตโปรตีนซึ่งมีที่มาจากสิ่งมีชีวิตอื่นได้ในเซลล์ยีสต์ (Gellisen *et al.*, 1991; Cregg, 1993; Sakai *et al.*, 1994; Sakai *et al.*, 1995) Yanase *et al.* (1995) ประสบผลสำเร็จในการเตรียม ^{13}C-labeled dihydroxyacetone phosphate โดยใช้ระบบการทำปฏิกิริยาร่วมกันของเอนไซม์ alcohol oxidase และ dihydroxyacetone synthase สารติดฉลากกัมมันตรังสีนี้ใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นสำหรับการผลิตน้ำตาลติดฉลากด้วย ^{13}C (^{13}C sugar) ซึ่งเป็นสารที่มีประโยชน์มากกับการวินิจฉัยด้วยเทคนิค ^{13}C-NMR (Syrota and Jehensen, 1991)

การผลิตสารเมแทบอไลท์โดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์

<u>กรดอะมิโน</u>

Okumura *et al.* (1970) ได้จดสิทธิบัตรการผลิตกรดอะมิโนหลายชนิด โดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ เช่น แอล-อะลานีน แอล-กลูตามิค แอล-ไลซีน แอล-ทรีโอนีน และ แอล-แวลีน ต่อมา Sanchez and Demain (1978) รายงานว่าเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ *H. polymorpha* สามารถสร้าง แอล-ทริปโตเฟนแล้วขับออกนอกเซลล์ได้ เมื่อเลี้ยงให้เจริญในอาหารที่มี เมทานอลความเข้มข้น 2% เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน ซึ่งต่อมาจึงทราบว่าการปล่อยแอล-ทริปโตเฟนออกนอกเซลล์ได้นี้ เป็นผลสืบเนื่องมาจากการที่สายพันธุ์กลายของ *H. polymorpha* สามารถด้านทานแอนติเมแทบอไลท์ของทริปโตเฟน เช่น 5-fluorotryptophan หรือ anthranilate ทำให้เกิดการสะสมแอล-ทริปโตเฟน และสารตัวกลางหลายชนิดที่เป็นประโยชน์ต่อการผลิตกรดอะมิโนทริปโตเฟน (Denenu and Demain, 1981)

โคเอนไซม์

เมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่เจริญบนเมทานอล มีปริมาณเอนไซม์ alcohol oxidase สูงเกินกว่า 10% ของโปรตีนที่ละลายได้ของเซลล์ (soluble protein) ซึ่งเอนไซม์ alcohol oxidase 1 โมลจะมี FAD อยู่ถึง 8 โมล (Sahm, 1977; Tani *et al.*, 1978) นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเซลล์เจริญบนเมทานอลจะพบว่ามี FAD เพิ่มขึ้น พร้อมทั้งเกิดการปลดปล่อยการกดดัน (derepression) การสร้างเอนไซม์ FAD pyrophosphorylase ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวสุดท้ายของกระบวนการสังเคราะห์ FAD (Shimizu *et al.*, 1977a; Shimizu *et al.*, 1977b; Eggeling *et al.*, 1977) การที่เมทานอลสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์ FAD นำไปสู่การผลิต FAD โดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ ได้โดยพบว่า ถ้าเติม FMN หรือ riboflavin ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ที่มี เมทานอล เป็นองค์ประกอบหลักจะสามารถเพิ่มผลผลิต FAD ได้อย่างน่าพอใจ (Shimizu *et al.*, 1977c)

เอนไซม์

จากที่กล่าวแล้วข้างต้นว่าเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ มีระบบเอนไซม์ที่ค่อนข้างจำเพาะสำหรับการใช้สาร C_1 compounds ดังนั้นการนำเอนไซม์เหล่านี้ซึ่งได้แก่ alcohol oxidase, formaldehyde dehydrogenase และ formate dehydrogenase ไปประยุกต์ใช้ จึงได้รับความสนใจจากวงการอุตสาหกรรมทั้งทางการวิเคราะห์และทางการแพทย์เช่น บริษัทผู้ผลิตน้ำยาสำหรับใช้ในการตรวจวิเคราะห์บางบริษัทเป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเพื่อผลิต formaldehyde จากเมทานอลในระดับโรงงานต้นแบบโดยใช้เอนไซม์ alcohol oxidase จาก *H. polymorpha* ทั้งในรูปเอนไซม์ที่ละลายได้ (soluble enzyme) และในรูปเอนไซม์ที่ถูกตรึง (immobilized enzyme) (Baratti *et al.*, 1978)

สารอื่นๆ

มีรายงานการใช้เมทิลโลโทรฟิกยีสต์เป็นแหล่งผลิต methyl formate ซึ่งเป็นสารประกอบเอสเทอร์ประเภทหนึ่งได้ เนื่องจากยีสต์กลุ่มนี้มีเอนไซม์ MFS ที่สามารถเปลี่ยน formaldehyde ที่เกิดขึ้นในวิถีการเปลี่ยนแปลงเมทานอลไปเป็น methyl formate ได้ ซึ่งกระบวนการผลิตเอสเทอร์โดยทั่วไปนั้น จะต้องใช้ปฏิกิริยาของเอนไซม์ lipase ใน hydrophobic solvent จึงไม่อาจใช้กระบวนการเช่นเดียวกันนี้เพื่อผลิต methyl formate ได้เนื่องจากทั้ง hemiacetal ซึ่งเป็นสารตั้งต้นและ methyl formate เองเป็นสารที่ละลายน้ำได้ดี ดังนั้นการเปลี่ยนแปลง hemiacetal โดยเอนไซม์ MFS ซึ่งเป็นเอนไซม์ประเภท NAD^+-dependent dehydrogenase ที่พบนี้ อาจเป็นการขั้นตอนใหม่ของปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ในเซลล์ยีสต์ก็ได้ ซึ่งการผลิตเอสเทอร์โดยจุลินทรีย์เป็นกระบวนการผลิตที่ประหยัดพลังงานและปราศจากผลิตผลอื่นที่เป็นอันตรายด้วย (Murdanoto *et al.*, 1997)

นอกจากนี้อาจใช้เมทิลโลโทรฟิกยีสต์ *P. pastoris* ในการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เนื่องจากพบว่าเซลล์ที่มีชีวิตของยีสต์ *P. pastoris* ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ alcohol oxidase สูง มักจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ CAT สูงตามไปด้วย ซึ่งเป็นกลไกการปกป้องเซลล์จากการถูกออกซิไดซ์ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นผลผลิตของปฏิกิริยาออกซิเดชันของเมทานอลภายในเซลล์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ภายในเซลล์จึงมีอยู่ภายในเซลล์ในระดับที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นการผลิต

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จึงจำเป็นต้องใช้ยีสต์สายพันธุ์ที่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ CAT ได้หรือสร้างได้แต่ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ Zhang and Wang (1994) รายงานการใช้สารเคมีประเภท cationic detergent ทำให้ผนังเซลล์ของ *P. pastoris* เสียคุณสมบัติไป และการใช้สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CAT เช่น sodium azide ซึ่งเมื่อเลี้ยงยีสต์ *P. pastoris* YB4290 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเมทานอลความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ จะผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ 10 มิลลิโมลาร์ เช่นกันภายในเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และหากมีการเติมออกซิเจนบริสุทธิ์เข้าไปในระบบแทนการเติมอากาศ จะได้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 50 ถึง 80 มิลลิโมลาร์ ภายในเวลา 3 ชั่วโมง โดยมีอัตราการผลิตสูงสุดเท่ากับ 2.6 โมลาร์ ต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ต่อชั่วโมง และภายหลังจากการเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส จำนวน 5 ครั้ง ยังคงพบว่าเซลล์ยีสต์มีกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเพียงครึ่งหนึ่งของค่าเริ่มต้น

Bruin *et al.* (2002) รายงานการใช้เมทิลโลโทรฟิกยีสต์ *H. polymorpha* เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการผลิตเจลาตินและคอลลาเจน ซึ่งเป็นสารที่มีความสำคัญในทางการแพทย์และเภสัชกรรม เช่น แคปซูล อุปกรณ์ยางที่ใช้ในการผ่าตัดและตกแต่งบาดแผล รวมทั้งอุปกรณ์ทางการแพทย์เพื่อให้ยาแก่ผู้ป่วย รวมทั้งการปลูกถ่ายอวัยวะ นอกจากนี้ในอุตสาหกรรมอาหาร ยังมีการใช้เจลาตินเป็นสารที่ทำให้กลายเป็นวุ้นด้วย ซึ่งเจลาตินและคอลลาเจนที่ผลิตจากสัตว์เช่น หมู และวัว พบว่ามีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้อวัวบ้า (bovine spongiform encephalopathy) และไวรัสก่อโรคในสัตว์ แม้แต่คอลลาเจนที่ผลิตโดยมนุษย์ก็มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนจากไวรัสเอช ไอ วี ได้เช่นกัน

Kaszyki *et al.* (2001) อาศัยคุณสมบัติในการออกซิไดซ์เมทานอลและฟอร์มาลดีไฮด์ของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ *H. polymorpha* มาประยุกต์ใช้กับการบำบัดน้ำเสีย เพื่อการกำจัดเมทานอลและฟอร์มาลดีไฮด์ที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำเสีย พบว่าเมื่อใช้เซลล์ยีสต์แขวนลอยปริมาณ $1x10^7$ เซลล์ต่อ มล. ที่เลี้ยงให้มีการปรับตัวมาก่อนแล้วนั้น สามารถกำจัดฟอร์มาลดีไฮด์ที่มีความเข้มข้นในระดับที่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ทั่วไป คือ 1750 มก. ต่อ มล. จึงมีแนวคิดที่จะสร้างเชื้อเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ที่มีความทนทานต่อฟอร์มาลดีไฮด์มากขึ้น

การแสดงออกของยีนจากแหล่งอื่น (heterologous gene expression) โดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์

มีการศึกษาวิจัยการแสดงออกของยีนจากแหล่งอื่นโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ *H. polymorpha* และ *P. pastoris* ซึ่งพบว่ามีความหลากหลายทั้งในแง่ของแหล่งที่มาของยีน ได้แก่ พืช สัตว์ จุลินทรีย์ และมนุษย์ และในแง่ของชนิดของโปรตีนที่ต้องการให้มีการผลิตขึ้น เช่น เอนไซม์ แอนติบอดี้ พลาสมา และฮอร์โมน เป็นต้น (Gellissen, 2000)

มีการศึกษาวิจัยการแสดงออกของยีนจากแหล่งอื่นโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ *H. polymorpha* และ *P. pastoris* ซึ่งพบว่ามีความหลากหลายทั้งในแง่ของชนิดของโปรตีนที่ต้องการให้มีการผลิตขึ้นและแหล่งที่มาของยีน (Gellissen, 2000) เช่น tetanus toxin จากแบคทีเรีย *Clostridium* (Clare *et al.*, 1991) เอนไซม์กลูโคอมิเลสจากยีสต์ในสกุล *Schwanniomyces* หรือรา (Gellissen *et al.*, 1991; Fierobe *et al.*, 1997; Sakai *et al.*, 1996) เอนไซม์ invertase จากยีสต์ *Saccharomyces* (Trimble

et al., 1991; Naciandi *et al.*, 1995) เอนไซม์ penicillin G amidase จากรา *Providencia rettgeri* (Sevo *et al.*, 2002) โปรตีนเรืองแสงสีเขียวจากแมงกระพรุน (Monosov *et al.*, 1996) phytochrome จากข้าวโอ๊ต (Mozley *et al.*, 1997) สาร aprotinin จากวัว (Zurek *et al.*, 1996) โปรตีน leptin จากมนุษย์ (Raymond, 1998) เป็นต้น

นอกจากการแสดงออกของยีนจากแหล่งอื่นโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ *H. polymorpha* และ *P. pastoris* แล้ว ได้มีการพัฒนาระบบการถ่ายโอนยีน (transformation system) สำหรับใช้ในการศึกษาทางด้านพันธุวิศวกรรมของยีสต์ *C. boidinii* โดยพัฒนาให้สามารถใช้ plasmid vector ได้ทั้งชนิดที่เป็น chromosomal integrative vector และ autonomous replicating vector โดยอาศัยความต้องการกรดอะมิโนยูราซิลเป็นตัวคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ (Sakai *et al.*, 1991; Sakai *et al.*, 1993) Sakai and Tani (1992a) รายงานการใช้เทคนิค one-step gene disruption สำหรับการตัดยีนในโครโมโซมของ *C. boidinii* ในกรณีที่ยีนนั้นไม่เกี่ยวข้องกับการดำรงชีพของเซลล์ยีสต์ นอกจากนี้ Sakai and Tani (1992b) ยังทำการโคลนยีนซึ่งควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ alcohol oxidase (*AOD1*) จากยีโนมของ *C. boidinii* และพบว่ายีนนี้มีการแสดงออกได้ดีเมื่อยีสต์เจริญบนเมทานอลแต่การแสดงออกของยีนจะถูกกดดัน (repress) ไว้ เมื่อมีน้ำตาลกลูโคสหรือเอทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อ

การสังเคราะห์เมทไธโอนีนและกลไกการควบคุมในยีสต์

จุลินทรีย์สังเคราะห์กรดอะมิโนเมทไธโอนีน ทรีโอนีน และไอโซลูซีน โดยใช้วิถีร่วม (common pathway) ซึ่งมีกรดอะมิโนแอสปาร์เดทเป็นสารตั้งต้น และวิถีร่วมนี้ไม่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม การควบคุมวิถีเมแทบอลิซึมที่มีการแยกย่อยหลายทางแบบวิถีร่วมที่ใช้สำหรับการผลิตกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ต้องอาศัยกระบวนการที่ซับซ้อน โดยมีแบบแผนในการควบคุม คือ ในขั้นตอนการสังเคราะห์กรดอะมิดนแต่ละตัว กรดอะมิดนที่สังเคราะห์ขึ้น จะยับยั้งขั้นตอนแรกของแขนงการสังเคราะห์กรดอะมิโนชนิดนั้น เช่น เมทไธโอนีนยับยั้งปฏิกิริยา O-succinylation ของโฮโมซีรีน ซึ่งกลไกที่ปรากฏนี้เป็นแบบ simple feedback inhibition (Bender, 1975)

การสังเคราะห์เมทไธโอนีนในเซลล์ของยีสต์ ประกอบด้วยกระบวนการที่เกี่ยวข้องกัน 3 กระบวนการ ดังนี้

1. กระบวนการสังเคราะห์สารประกอบคาร์บอน 4 อะตอม มีแอสปาร์เดทเป็นสารตั้งต้น แอสปาร์เดทนี้ได้มาจากปฏิกิริยาทรานส์อะมิเนชัน (transamination) ของออกซาโลอะซิเดท ซึ่งเป็นสารตัวกลางหนึ่งในวัฏจักรกรดซิตริก ในกระบวนการสังเคราะห์เมทไธโอนีน แอสปาร์เดทจะถูกเปลี่ยนไปเป็น β-aspartyl phosphate โดยมีเอนไซม์ aspartokinase เป็นตัวเร่ง หลังจากนั้น β-aspartyl phosphate จะเปลี่ยนไปเป็น β-aspartate semialdehyde โดยใช้ aspartate semialdehyde dehydrogenase เป็นตัวเร่งและ β-aspartate semialdehyde จะเปลี่ยนไปเป็นโฮโมซีรีน โดยอาศัยเอนไซม์ homoserine dehydrogenase จากนั้นโฮโมซีรีนจะถูกเร่งด้วย homoserine-O-transacetylase ไปเป็น O-acetyl homoserine

ในยีสต์มี trans-sulphuration pathway ที่อาศัยกิจกรรมของ cystathionine β-synthase จึงทำให้ยีสต์ สามารถใช้ทั้งเมทไธโอนีนและซีสเตอีนเป็นแหล่งของซัลเฟอร์ได้ นอกจากนี้ยังสามารถใช้สารเมแทบอไลท์ที่เป็นสารอินทรีย์อื่น ๆ เช่น โฮโมซีสเตอีน และ S-adenosylmethionine หรือสารประกอบซัลเฟอร์ที่เป็นสารอนินทรีย์ เช่น ซัลเฟต ซัลไฟต์ ซัลไฟด์ หรือไธโอซัลเฟต เป็นแหล่งซัลเฟอร์ได้ โดยไธโอซัลเฟตจะแตกตัวเป็นซัลไฟต์และซัลไฟด์ ก่อนนำเข้าสู่ sulphate assimilation pathway ซึ่งต้องอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ sulphite reductase (Thomas *et al.*, 1990)

2. กระบวนการ sulphur assimilation เริ่มจากการนำอนุมูลซัลเฟต (SO_4^{2-}) เข้าเซลล์โดยการทำงานของเอนไซม์ sulphate permease และผ่านวิถีแอสสิมิเลชัน โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ จนกระทั่งได้ซัลเฟอร์อิออน (S^-) ซึ่งซัลเฟอร์อิออนจะเข้ารวมกับ O-acetyl homoserine ซึ่งได้จากกระบวนการสังเคราะห์สารประกอบคาร์บอน 4 อะตอม แล้วถูกเปลี่ยนเป็นโฮโมซีสเตอีน โดยอาศัยเอนไซม์ O-acetyl homoserine sulfhydralase และเปลี่ยนเป็นเมทไธโอนีน โดยการเร่งของเอนไซม์ homocysteine synthetase

3 การเติมหมู่เมทิล เป็นขั้นตอนสุดท้ายของการสังเคราะห์เมทไธโอนีนในยีสต์ เกิดขึ้นโดยการเติมหมู่เมทิลของ S-adenosylmethionine ให้กับโฮโมซีสเตอีนได้เป็นเมทไธโอนีน โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ homocysteine methyltransferase

Methionine analogue และผลของ methionine analogue

โดยทั่วไปกรดอะมิโนที่ได้จากการสังเคราะห์ จะไปยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ หรือมีการกดการสังเคราะห์เอนไซม์ และการนำกรดอะมิโนไปสังเคราะห์โปรตีน ในขณะที่ amino acid analogue ก็สามารถยับยั้งหรือกดการสร้างเอนไซม์ด้วยเช่นกัน แต่ไม่สามารถนำไปใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน เซลล์ส่วนใหญ่ที่ได้รับ amino acid analogue จะตายเนื่องจากการขาดกรดอะมิโนชนิดที่มี analogue แต่เชื้อกลายพันธุ์ที่ไม่ไวต่อ amino acid analogue ยังคงสร้างกรดอะมิโนชนิดนั้น และสามารถเจริญขึ้นมาเป็นโคโลนีได้ การที่เชื้อกลายพันธุ์บางตัวด้านทานต่อ amino acid analogue เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ (เชื้อกลายพันธุ์ที่ด้านทานต่อการเกิด feedback inhibition) หรือเกิดจากระบบการสร้างเอนไซม์ที่เปลี่ยนแปลงไป (เชื้อกลายพันธุ์ที่ด้านทานต่อการเกิด feedback repression) ซึ่งการควบคุมที่เปลี่ยนแปลงไปนี้ ทำให้เชื้อกลายพันธุ์สร้างกรดอะมิโนได้สูงขึ้น (Wang *et al.*, 1979)

หลักเกณฑ์การเลือก amino acid analogue มี 2 ประการ คือ

1 โมเลกุลของสารที่เลือกมีรูปร่างและขนาดใกล้เคียงกับกรดอะมิโนนั้น

2 สามารถเกิดอิออนชนิดเดียวกับกรดอะมิโนนั้น

methionine analogues ที่ใช้ในการคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ที่สามารถสร้างเมทไธโอนีนได้สูงขึ้น ได้แก่ เอทไธโอนีน (ethionine) ซึ่งมีการเพิ่มความยาวของโมเลกุล ด้วยการเติมหมู่เมทิล หรือการแทนที่ของ amino acid backbone เช่น นอร์ลูซีน (norleucine) ซึ่งมีหมู่เมทิลแทนที่ตำแหน่งของซัลเฟอร์ เมทโธซีนีน (methoxinine หรือ O-methylhomoserine) ซึ่งมีออกซิเจนแทนที่ตำแหน่งของซัล

เฟอร์ และซิลีโนเมทไธโอนีน (selenomethionine) ซึ่งมีซิลีเนียมเข้าแทนที่ตำแหน่งของซัลเฟอร์ (Richmond, 1962)

methionine analogue เช่น เอทไธโอนีน ซิลีโนเมทไธโอนีน และไตรฟลูออโรเมทไธโอนีน (trifluoromethionine) มีผลยับยั้งการเจริญ และการสังเคราะห์เมทไธโอนีนของ *Saccharomyces cerevisiae* ทำให้เชื้อมี generation time ยาวขึ้น และทำให้ความเข้มข้นของเมทไธโอนีนภายในเซลล์ลดลงอย่างรวดเร็ว โดย analogue นี้จะถูกส่งไปยัง methionyl tRNA ก่อนเข้าไปรวมกับสายโปรตีน และยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ methionyl-tRNA synthase และ methionine adenosyl transferase นอกจากนี้เอทไธโอนีนและซิลีโนเมทไธโอนีน ยังถูกใช้เป็นสารตั้งต้นในการสร้าง S-adenosylmethionine และ seleno-adenosylmethionine เพื่อใช้ในการสังเคราะห์เมทไธโอนีนต่อไป ซึ่ง methionine analogue ที่เติมลงไปในระหว่างการเจริญของเชื้อนั้น จะเป็นตัวกดดันการสังเคราะห์เมทไธโอนีน (Colombani *et al.*, 1975)

วิธีที่ง่ายที่สุดในการคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ที่ต้านทานต่อกระบวนการ feedback inhibition หรือ feedback repression คือ การคัดเลือกเชื้อที่ต้านทานต่อความเป็นพิษของ analogue ของกรดอะมิโนที่ทำให้เกิด feedback inhibition หรือ feedback repression นั้น โดยนำเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ มาเลี้ยงในอาหารที่มี analogue นั้น เซลล์ส่วนใหญ่จะถูกฆ่า ในขณะที่บางเซลล์เกิดการกลายพันธุ์ ได้เป็นเซลล์ที่ต้านทานต่อสารเมแทบอไลท์นั้นได้มากขึ้น

Yoshiki *et al.* (1988) พบเชื้อกลายพันธุ์ของยีสต์ *Candida boidinii* E500-78 ซึ่งต้านทานต่อดีแอล-เอทไธโอนีนเข้มข้น 500 มิลลิโมลต่อลิตร และสะสมเมทไธโอนีนได้ 0.8 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเมทานอล ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

Lim *et al.* (1990) ได้ทำการกลายพันธุ์ยีสต์ *C. boidinii* และคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ที่มี แอล-เมทไธโอนีน สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมถึง 10 เท่า โดยการคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อเอทไธโอนีนเช่นกัน ขณะที่ Heiland *et al.* (1993) พบยีสต์ *S. cerevisiae* กลายพันธุ์ที่สะสม S-adenosyl methionine สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมถึง 6 เท่า

การปรับปรุงพันธุกรรมของยีสต์ให้สามารถสร้างและสะสมเมทไธโอนีนภายในเซลล์สูง

การปรับปรุงพันธุกรรมของยีสต์ เพื่อให้สร้างและสะสมเมทไธโอนีนภายในเซลล์ได้สูง สามารถทำได้โดยวิธีการต่าง ๆ ต่อไปนี้

1 การกลายพันธุ์โดยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตและสัมผัสกับสารเคมี

รังสีอัลตราไวโอเลตและสารเคมีหลายชนิด สามารถเหนี่ยวนำให้ยีสต์เกิดการกลายพันธุ์ได้ ดังนั้นจึงได้มีความพยายามที่จะนำรังสีอัลตราไวโอเลต และสารเคมีที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ มาใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดยีสต์กลายพันธุ์ ที่สามารถสังเคราะห์และสะสมเมทไธโอนีนภายในเซลล์สูง สารเคมีที่เคยมีรายงานว่าสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดเซลล์ยีสต์กลายพันธุ์ ที่มีการสร้างและสะสมเมทไธโอนีนภายในเซลล์ได้สูงขึ้น ได้แก่ กรดไนตรัส และ N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) เป็นต้น

ในปี ค.ศ. 1970 Okanishi and Gregory ทำการเหนี่ยวนำเซลล์ยีสต์ *Candida tropicalis* ATCC1369 ให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยใช้กรดไนตรัส และพบว่าเซลล์ยีสต์กลายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ มีเมทไธโอนีนในเซลล์เพิ่มขึ้นมากกว่าเดิมถึง 41 เปอร์เซ็นต์

Morzycka et al. (1976) ได้ทำการปรับปรุงพันธุกรรมของยีสต์ *Saccharomyces lipolytica* โดยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต ให้เหลือเซลล์รอดชีวิตในช่วง 4-7 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีเชื้อกลายพันธุ์จำนวน $5x10^4$ เซลล์ที่มีความต้านทานต่อซิลีโนเมทไธโอนีน และมีเชื้อกลายพันธุ์ 5 สายพันธุ์ จากเชื้อกลายพันธุ์ทั้งหมด 70 สายพันธุ์ ผลิตเมทไธโอนีนได้สูงกว่าสายพันธุ์เดิม 1.5-18 เท่า Dunyak and Cook (1985) ทำการปรับปรุงพันธุกรรมของยีสต์ *C. utilis* ATCC8205 โดยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตจนทำให้มีเซลล์รอดชีวิต 1 เปอร์เซ็นต์ และคัดเลือกได้เชื้อกลายพันธุ์ ER-8 ซึ่งสามารถสร้างและสะสมเมทไธโอนีนได้สูงกว่าสายพันธุ์เดิม

Tarka and Fields (1986) ทำการศึกษาและปรับปรุงพันธุกรรมของยีสต์ *C. tropicalis* ATCC9968 และ *C. utilis* ATCC9950 โดยใช้กรดไนตรัส รังสีอัลตราไวโอเลต และเอทไธโอนีน พบว่าเชื้อกลายพันธุ์ที่ได้จากการใช้กรดไนตรัสสามารถสร้างและสะสมเมทไธโอนีนในเซลล์สูงกว่าเดิมถึง 71 เปอร์เซ็นต์ และรองลงมาคือเชื้อกลายพันธุ์ ที่ได้จากการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต และสัมผัสกับเอทไธโอนีน ตามลำดับ

ในปี ค.ศ. 1988 Tani *et al.* ทำการปรับปรุงพันธุกรรมของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ *C. boidinii* No.2201 โดยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต ได้เชื้อกลายพันธุ์ E500-78 ซึ่งสามารถสร้างและสะสมเมทไธโอนีนในเซลล์ได้สูงถึง 6.02 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์

Kitamoto and Nakahara (1994) ศึกษาความสามารถในการสร้างและการสะสมเมทไธโอนีนของยีสต์ *Kluyveromyces* sp. ซึ่งเป็นยีสต์สกุลที่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสสำหรับการเจริญได้จำนวน 9 สายพันธุ์ และทำการคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตแอล-เมทไธโอนีนในเซลล์ได้สูง ในอาหารที่ใช้ whey permeate เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *K. lactis* IFO1267 เป็นสายพันธุ์ที่มีปริมาณแอล-เมทไธโอนีนทั้งหมดในเซลล์สูงถึง 6.9 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ และเมื่อเหนี่ยวนำให้ยีสต์ดังกล่าวเกิดการกลายพันธุ์ โดยวิธีการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต แล้วคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ซึ่งมีการสะสมเมทไธโอนีนในเซลล์ได้สูง และมีความต้านทานต่อแอล-เอทไธโอนีนเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ได้เชื้อกลายพันธุ์ m-8 แล้วจึงนำเชื้อกลายพันธุ์นี้ มาเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์อีกต่อหนึ่งด้วย ethyl methanesulfonate ได้เชื้อกลายพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อแอล-เอทไธโอนีนเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และสะสมแอล-เมทไธโอนีนในเซลล์ทั้งหมดเท่ากับ 14.2 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์เดิม 2 เท่า

รัฐดา (2539) ทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของ *S. cerevisiae* N1 ซึ่งมีปริมาณเมทไธโอนีนภายในเซลล์ เท่ากับ 0.58 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต จากนั้นคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีน และสร้างเมทไธโอนีนภายในเซลล์ได้สูงขึ้น ได้เชื้อกลายพันธุ์ *S. cerevisiae* NJ-42 ที่มีเมทไธโอนีนภายในเซลล์เท่ากับ 4.21 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ แล้วจึงนำเชื้อกลายพันธุ์ *S. cerevisiae* NJ-42 มาเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์อีกครั้งหนึ่ง ด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตซ้ำ ได้เชื้อกลายพันธุ์ *S. cerevisiae* MR-195 ที่มีเมทไธ

โอนีนภายในเซลล์ทั้งหมดเท่ากับ 19.44 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์เดิม 33.28 เท่า

2 การใช้เทคนิคโปรโตพลาสต์ฟิวชัน (protoplast fusion)

โปรโตพลาสต์ฟิวชัน เป็นเทคนิคสร้างเวลล์ลูกผสมที่เรียกว่า รีคอมบิแนนท์ (recombinant) หรือฟิวแซนท์ (fusant) โดยการนำโปรโตพลาสต์ที่ได้จากการแยกผนังเซลล์ออกอย่างสมบูรณ์มาผสมกัน และทำการเหนี่ยวนำให้โปรโตพลาสต์หลอมรวมกัน โดยเยื่อหุ้มเซลล์บางส่วน มีการหลอมรวมกันและสลายไป ทำให้ไซโทพลาซึมและส่วนประกอบต่าง ๆ ของเซลล์รวมทั้งสารพันธุกรรม เข้ามาอยู่ด้วยกันในโปรโตพลาสต์เดียว ซึ่งฟิวแซนท์ที่ได้จะแสดงลักษณะทางพันธุกรรมรวมของสายพันธุ์พ่อแม่ เทคนิคนี้นิยมใช้ในการปรับปรุงพันธ์ยีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรม เนื่องจากสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้สะดวก โดยเซลล์ที่ใช้ไม่จำเป็นต้องมีเพศ ไม่ขึ้นกับจำนวนชุดของโครโมโซม และยังสามารถใช้ในการสร้างลูกผสม ระหว่างยีสต์ที่มีพันธุกรรมแตกต่างกันมาก ทั้งต่างสปีชีส์ และต่างยีนัสกันได้

ได้มีผู้ทำการปรับปรุงพันธุกรรมของยีสต์ ให้สามารถผลิตเมทไธโอนีนในเซลล์ได้สูง โดยใช้เทคนิคโปรโตพลาสต์ฟิวชัน เช่น Brigidi *et al.* (1988) นำโปรโตพลาสต์ของเชื้อกลายพันธุ์ ER108 ของ *S. uvarum* ATCC26602 ที่มีความด้านทานต่อสารปฏิชีวนะคลอแรมฟีนิคอล และเป็น petite mutant มาหลอมรวมกับโปรโตพลาสต์ของ *S. cerevisiae* X2928 ซึ่งมี genetic marker ที่มีความไวต่อสารปฏิชีวนะคลอแรมฟีนิคอล และเป็น auxotroph (ade$^-$, ura$^-$, met$^-$, his$^-$ และ trp$^-$) ลูกผสมที่ได้สามารถสร้างเมทไธโอนีนได้สูงขึ้น และมีความคงตัวเมื่อมีการถ่ายเชื้อในอาหาร complete medium 10 ครั้ง

ชุดิมา (2542) ทำโปรโตพลาสต์ฟิวชันระหว่าง *S. cerevisiae* MR-195 ซึ่งเป็นยีสต์กลายพันธุ์ที่มีการสะสมเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ได้สูง กับ *S. cerevisiae* RL-6 ซึ่งเป็นยีสต์กลายพันธุ์ที่มีความเข้มข้นของไลซีนอิสระในเซลล์สูง พบฟิวแซนท์ที่ได้ คือ MR-F44 มีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูง 21.63 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ซึ่งสูงกว่า *S. cerevisiae* MR-195 เท่ากับ 1.8 เท่า และมีความเข้มข้นของไลซีนอิสระในเซลล์ เท่ากับ 10.99 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ซึ่งสูงกว่า *S. cerevisiae* RL-6 เท่ากับ 1.13 เท่า

ซิลีเนียม

1. คุณสมบัติของซิลีเนียม

ซิลีเนียมเป็นธาตุกึ่งโลหะ มีเลขอะตอมและมวลอะตอมเท่ากับ 34 และ 78.96 ตามลำดับ เป็นธาตุที่อยู่ระหว่างธาตุเทลลูเรียมและโปโลเนียม และระหว่างธาตุแท้ที่ไม่ใช่โลหะ คือ ออกซิเจนและซัลเฟอร์ ซิลีเนียมสามารถถูกรีดิวซ์ให้อยู่ในรูป –2 (oxidation state) ซิลีไนด์ (selenide) หรือถูกออกซิไดซ์ไปเป็น +4 (selenite) หรือ +6 (selenate) เป็นธาตุที่มีปริมาณค่อนข้างต่ำ พบกระจายอยู่ทั่วไป โดยมีปริมาณเฉลี่ยในผิวเปลือกโลก 0.09 ส่วนต่อล้านส่วน ซึ่งพบได้ในหิน พืช น้ำ และดิน McDowell, 1992)

คุณสมบัติทางเคมีของซิลีเนียมจะคล้ายกับซัลเฟอร์ โดยซิลีเนียมในรูปสารอนินทรีย์ ได้แก่ ไฮโดรเจนซิลีไนด์ ซิลีเนียมซัลไฟด์ และซิลีเนียมซัลเฟต มีความสอดคล้องกับรูปอนินทรีย์ของซัลเฟอร์ คือ ไฮโดรเจนซัลไฟด์ ซัลไฟต์ และซัลเฟต ขณะที่รูปอินทรีย์ของซิลีเนียม ได้แก่ ซิลีโนซิสเตอีน ซิลีโนเมทไธโอนีน มีความใกล้เคียงกันกับอนุพันธ์ของซัลเฟอร์ที่เป็นที่รู้จักกันดี คือ ซิสเตอีน และเมทไธโอนีน นอกจากนี้อาจพบซิลีเนียมเป็นองค์ประกอบในพืช เช่น กระเทียม ถั่วเหลือง และข้าวสาลี และอาจพบได้ในไข่และอาหารทะเล โดยอยู่ในรูปของซิลีโนเมทไธโอนีนเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งองค์ประกอบของซิลีโนเมทไธโอนีนจะเหมือนกับเมทไธโอนีนเกือบทุกประการ ยกเว้นการที่ซิลีเนียมเข้าแทนที่ตรงตำแหน่งของซัลเฟอร์เท่านั้น

2. ความสำคัญของซิลีเนียม

ซิลีเนียมในร่างกายมนุษย์และสัตว์ปรากฏอยู่ในรูปของซิลีโนโปรตีนชนิดต่าง ๆ แต่ละชนิดก็มีหน้าที่ในทางชีววิทยาที่แตกต่างกัน (Arther, 1997) โดยซิลีโนโปรตีนที่สำคัญ ได้แก่ ซิลีโนโปรตีนดับบลิว (selenoprotein w) การขาดสารนี้จะทำให้เกิดโรคเนื้อตายในกล้ามเนื้อของแกะ ปัญหาเนื้อสุกรแฉะ ปัญหาท้องมานในไก่กระทง; ซิลีโนโปรตีน พี (selenoprotein p) มีบทบาทสำคัญในการขนส่งซิลีเนียมภายในน้ำเลือด; ซิลีโนโปรตีนที่อยู่ในถุงหุ้มตัวอสุจิ มีบทบาทต่อโครงสร้างของตัวอสุจิ

นอกจากนี้ซิลีเนียมยังมีบทบาทสำคัญในอาร์เอ็นเอ เพราะซิลีเนียมสามารถรวมกันในเบสเพียวรีนและไพริมิดีนได้ มีบทบาทจำเพาะต่อการสังเคราะห์พรอสตาแกลนดิน และเมแทบอลิซึมของกรดไขมันที่จำเป็น และมีบทบาทสำคัญต่อการสร้างภูมิคุ้มกัน (McDowell, 1992)

Pehrson (1993) รายงานอาการของโรคและความผิดปกติหลายอย่าง อันเป็นผลจากการขาดเอนไซม์กลูตาไธโอนเพอรอกซิเดส สืบเนื่องจากการขาดซิลีเนียม เช่น โรคกล้ามเนื้อลีบในสุกร โค แกะ ม้า ไก่งวง และไก่ โรคท้องมานในไก่และไก่งวง โรคเต้านมอักเสบในโค โรคมะเร็งในมนุษย์ โรคระบบหัวใจและเส้นเลือดในมนุษย์ สุกร ไก่ และไก่งวง เป็นต้น มาลินี (2527) กล่าวว่าการขาดซิลีเนียมและวิตามินอี เป็นสาเหตุของการเกิดโรคกล้ามเนื้อขาว (white muscie disease) ในวัว แพะ แกะ โรคดับฝ่อในสุกร และโรคระบบประสาทในสัตว์ปีก สิรินทร์และคณะ (2538) รายงานว่าประชากรที่บริโภคซิลีเนียมน้อย มีอัตราการเกิดโรคมะเร็งและโรคหัวใจสูง ซึ่งการขาดซิลีเนียมในมนุษย์นี้จะเกิดขึ้นในผู้ป่วยที่ได้รับอาหารไม่เหมาะสม โดยจะมีอาการปวดกล้ามเนื้อ ซึ่งอาจทำให้กลับสู่สภาวะปกติโดยการให้อาหารที่มีซิลีเนียม ในรูปของซิลีโนเมทไธโอนีน 100 ไมโครกรัมต่อวัน เป็นเวลา 1 สัปดาห์ การขาดซิลีเนียมจะพบได้ในบริเวณพื้นที่ที่มีปริมาณซิลีเนียมในดินต่ำ เช่น ประเทศจีน นิวซีแลนด์ และฟินแลนด์

Golstein and Scott (1956) และ Latshaw and Osman (1974) พบว่าอาการท้องมานในไก่เกิดจากการขาดวิตามินอี หรือ ซิลีเนียม ทำให้น้ำซึมจากเส้นเลือดฝอยมากขึ้น เนื่องจากพลาสมาโปรตีนเข้าไปอยู่ระหว่างเนื้อเยื่อ และพบว่าสัดส่วนของอัลบูมินต่อโกลบูลินลดลงด้วย

Cantor and Scott (1974) ศึกษาการเสริมซิลีเนียมที่ระดับ 0.10 ส่วนต่อล้านส่วน ในอาหารไก่ไข่ที่ขาดซิลีเนียม พบว่าสามารถป้องกันการขาดเอนไซม์กลูตาไธโอนเพอรอกซิเดส และทำให้ผลผลิตไข่กลับสู่ระดับปกติ

Combs and Scott (1977) รายงานว่าแม่ไก่ไข่ที่ได้รับอาหารที่มีซิลีเนียมต่ำ มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเพอรอกซิเดส ซึ่งมีความสำคัญต่อการทำหน้าที่ในเมแทบอลิซึม เพื่อป้องกันการเกิดความเครียดเนื่องจากโปรออกซิเดชัน (pro-oxidation) และการขาดซิลีเนียมมีผลทำให้สัตว์ได้รับผลกระทบจากการติดเชื้อจากสภาพแวดล้อม และทำให้เกิดโรคอื่นตามมา

Fidler *et al.* (1984) ศึกษาผลของเพอรอกไซด์ต่อการเจริญเติบโตภาวะท้องมาน และการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเพอรอกซิเดส พบว่าไฮโดรเจนเพอรอกไซด์มีผลลดการเจริญเติบโต และลดการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเพอรอกซิเดสในตับและพลาสมา แต่ความรุนแรงของภาวะท้องมานจะลดลง เมื่อสัตว์ได้รับซิลีเนียมในอาหาร โดยผลของไฮโดรเจนเพอรอกไซด์นี้จะสัมพันธ์กับการดูดซึมซิลีเนียมที่ลดน้อยลงด้วย

ปริมาณและชนิดของซิลีเนียมในอาหาร มีผลต่อการสะสมซิลีเนียมในร่างกายอย่างมีนัยสำคัญ โดยในอาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์ทั่วไป พบว่าปริมาณซิลีเนียมในเนื้อเยื่อ มีสัดส่วนแปรผันโดยตรงกับปริมาณของซิลีเนียมในอาหาร (Ku *et al.*, 1972)

Scott and Tompson (1971) พบการสะสมซิลีเนียมในเลือด กล้ามเนื้อ ตับ ไต และผิวหนังของลูกไก่และแม่ไก่อย่างคล้ายคลึงกัน เมื่อทดลองเสริมซิลีเนียมในรูปสารประกอบอนินทรีย์ที่ระดับ 0.2-0.3 ส่วนต่อล้านส่วน

Lathaw (1975) รายงานว่าเมื่อเสริมซิลีเนียมในรูปอนินทรีย์มากถึงระดับ 0.8 ส่วนต่อล้านส่วน จะมีผลทำให้ระดับซิลีเนียมในตับและไตเพิ่มสูงขึ้น และเมื่อเสริมซิลีเนียมในรูปสารประกอบอินทรีย์ที่ระดับ 0.67 ส่วนต่อล้านส่วน ในอาหารกากถั่วเหลือง ปลาป่น และข้าวสาลี จะช่วยทำให้ระดับซิลีเนียมในกล้ามเนื้อและเลือด สูงกว่าเมื่อเสริมซิลีเนียมในรูปของซิลีไนต์ที่ระดับเท่ากัน และจากการเปรียบเทียบผลของการเสริมโซเดียมซิลีไนต์และซิลีเนียมยีสต์ (Sel-Plex 50) ต่อการงอกของขนไก่กระทงเพศผู้ ปรากฏว่าการเสริมซิลีเนียมยีสต์ ให้ผลดีกว่า ในด้านการงอกของขน และน้ำหนักของขนไก่กระทงเพศผู้ในช่วงอายุ 3 5 และ 6 สัปดาห์ (Edens *et al.*, 1996a) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าซิลีเนียมยีสต์ ช่วยลดการสูญเสียน้ำของเนื้อหน้าอกด้วย (Edens *et al.*, 1996b)

Chow and Tappel (1974) ศึกษาผลของซิลีโนเมทไธโอนีนต่อการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเพอรอกซิเดส ในเนื้อเยื่อของหนูทดลอง พบว่าการเสริมซิลีโนเมทไธโอนีนที่ระดับ 2 ส่วนต่อล้านส่วน มีผลให้การทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเพอรอกซิเดสในพลาสมา เพิ่มสูงกว่าในไต หัวใจ เม็ดเลือดแดง ปอด และในตับ จะเพิ่มสูงกว่าในลูกอัณฑะ

Cantor (1974) พบการสะสมซิลีเนียมในไข่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ 5 ของการเสริมซิลีเนียมในอาหารไก่งวงแม่พันธุ์ โดยกลุ่มไก่งวงแม่พันธุ์ที่ได้รับซิลีเนียมเสริมในอาหาร จะให้ไข่ที่มีปริมาณซิลีเนียมเท่ากับ 0.154 ส่วนต่อล้านส่วน ส่วนกลุ่มที่ไม่ได้รับซิลีเนียมเสริม จะให้ไข่ที่มีปริมาณซิลีเนียมเพียง 0.095 ส่วนต่อล้านส่วน

สมปอง (2543) พบว่าการเสริมซิลีเนียมยีสต์ที่ระดับต่าง ๆ ในอาหารไก่ที่มีไอโอดีน 4000 ส่วนต่อล้านส่วน ทำให้ปริมาณซิลีเนียมในไข่แดงและไข่ขาวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง และพบว่าการเสริมซิลีเนียมยีสต์ในระดับที่สูงขึ้น ไม่มีผลต่อปริมาณไอโอดีนที่สะสมในไข่แดง

3. ซิลีเนียมยีสต์

ซิลีเนียมยีสต์ คือ ยีสต์ที่สามารถสะสมซิลีเนียมไว้ภายในเซลล์ ซึ่งการผลิตซิลีเนียมยีสต์ทำได้โดย การเติมซิลีเนียมที่เป็นสารประกอบอนินทรีย์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อขณะที่ยีสต์เจริญ ในสภาวะที่เหมาะสม โดยซิลีเนียมจะเข้าไปจับกับกรดอะมิโนภายในสายโปรตีน เช่น ซิลีโนเมทไธโอนีน และ ซิลีโนซิสเตอีน ได้เป็นซิลีโนโปรตีน จากการศึกษาการเข้าจับ และการแพร่กระจายของซิลีเนียม ในยีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตขนมปัง โดยการติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี (^{75}Se) พบว่าซิลีเนียมกระจายอยู่ในส่วนของโปรตีนที่ละลายน้ำภายในเซลล์ โดยสารประกอบซิลีเนียมที่มีปริมาณมากที่สุดภายในเซลล์ยีสต์ คือ ซิลีโนเมทไธโอนีน (Kohola *et al.*, 1986)

Nagodawithana et al. (1985) ศึกษาการผลิตซิลีเนียมยีสต์ โดยใช้โซเดียมซิลีไนต์เป็นแหล่งของซิลีเนียม พบว่าสามารถผลิตซิลีเนียมยีสต์ ที่มีซิลีเนียมสะสมอยู่ 1000 ไมโครกรัมต่อกรัมมวลชีวภาพยีสต์

Mahan (1995) รายงานเกี่ยวกับผลของปริมาณซัลเฟอร์ ที่มีต่อการสะสมซิลีเนียมภายในเซลล์ว่า กระบวนการผลิตยีสต์ที่อุดมด้วยซิลีเนียม จะเกี่ยวข้องกับการให้อาหาร และความต้องการซัลเฟอร์ของยีสต์ เนื่องจากซัลเฟอร์และซิลีเนียมมีลักษณะทางเคมีที่คล้ายคลึงกัน ในสภาวะที่เซลล์มีความต้องการซัลเฟอร์สูง ซิลีเนียมจะเข้าแทนที่ซัลเฟอร์ในโครงสร้างที่เป็นโปรตีนของเซลล์ยีสต์ได้มาก ซึ่งจากการวิเคราะห์ปริมาณซิลีเนียมเทียบกับค่ามาตรฐาน พบว่าซิลีเนียมสามารถจะเข้าไปรวมภายในเซลล์ยีสต์ได้ถึง 1000 ส่วนต่อล้านส่วน

Isakova *et al.* (1996) ศึกษาการขนย้าย การสะสม และการแพร่กระจายของซิลีเนียมภายในเซลล์ยีสต์ *Candida* sp. พบว่าปริมาณซิลีเนียมที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ ขึ้นอยู่กับความสามารถในการแข่งขันระหว่าง ซิลีเนียมกับซัลเฟอร์ในการเข้าจับกับกรดอะมิโน และความไวต่อผลผลิตจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของซิลีเนียม โดยพบว่าซิลีเนียมสะสมอยู่ ในผนังเซลล์ 16-20 เปอร์เซ็นต์ ในยื่อหุ้มเซลล์ประมาณ 32 เปอร์เซ็นต์ และเป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่อยู่ในไซโทซอลถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ในกรณีของยีสต์ *Saccharomyces uvarum* พบว่าการสังเคราะห์ซิลีโนโปรตีนในรูปของแอล-ซิลีโนซิสเตอีน ในไมโตคอนเดรียและไซโทซอล แปรผันกับปริมาณของโซเดียมซิลีไนต์ ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Hass and Velten, 1992)

Demirci *et al.* (1999) ศึกษาการสะสมซิลีเนียมในรูปของสารประกอบอินทรีย์ในเซลล์ยีสต์ S. cerevisiae โดยการเปรียบเทียบกรรมวิธีการหมักในอาหารกากน้ำตาลแบบ fed-batch fermentation 4 ลักษณะ คือ การหมักโดยการเติมเกลืออนินทรีย์โซเดียมซิลีเนต ความเข้มข้นสูง (63.2 กรัมต่อลิตร) แบบเติมครั้งเดียว (single dose) และแบบเติมต่อเนื่อง (continuous addition) การหมักโดยการเติมเกลือโซเดียมซิลีเนต ความเข้มข้นต่ำ (31.6 กรัมต่อลิตร) แบบเติมครั้งเดียว และแบบเติมต่อเนื่องเช่นกัน ผลการศึกษาพบว่าที่ระดับความเข้มข้นโซเดียมซิลีเนตสูง การหมักแบบเติมสารอาหารครั้งเดียวสามารถผลิตมวลชีวภาพได้ 24 กรัมต่อลิตร และมีการสะสมซิลีเนียม 1382 ไมโครกรัมต่อกรัมมวลชีวภาพ ขณะที่การเติมสารอาหารแบบต่อเนื่อง สามารถผลิตมวลชีวภาพได้ 40 กรัมต่อลิตร และมีการสะสมซิลีเนียม 1491 ไมโครกรัมต่อกรัมมวลชีวภาพ และที่ความเข้มข้นของโซเดียมซิลีเนตต่ำ การหมักโดยการเติมสารอาหารครั้งเดียว ให้ผลผลิตมวลชีวภาพได้ 37 ไมโครกรัมต่อกรัมมวลชีวภาพ

และมีการสะสมซิลีเนียม 2846 ไมโครกรัมต่อกรัมมวลชีวภาพ ขณะที่ถ้าเติมสารอาหารแบบต่อเนื่อง สามารถผลิตมวลชีวภาพได้ 45 กรัมต่อลิตร และมีซิลีเนียม 2495 ไมโครกรัมต่อกรัมมวลชีวภาพ

นอกจากนี้ Demirci and Pometto (1999) ได้ทำการศึกษาการรับซิลีเนียมในรูปสารประกอบอนินทรีย์ ได้แก่ โซเดียมซิลีเนต และโซเดียมซิลีไนต์ เข้าไว้ในมวลชีวภาพของยีสต์ *S. cerevisiae* โดยวิธีการหมักแบบต่อเนื่อง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณซัลเฟอร์และเมทไธโอนีนต่ำ พบว่าที่อัตราการเจือจาง 0.2 ต่อชั่วโมง และความเข้มข้นของโซเดียมซิลีไนต์ที่เติมเข้าถังหมักเท่ากับ 0.69 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตมวลชีวภาพได้ 1.89 กรัมต่อลิตร และมีซิลีเนียมสะสมอยู่ 1904 ไมโครกรัมต่อกรัมมวลชีวภาพ แต่เมื่อวิเคราะห์สัดส่วนของซิลีเนียมที่ถูกสะสมไว้นั้น พบว่าซิลีเนียมส่วนใหญ่อยู่ในรูปของสารประกอบอนินทรีย์ ในทางตรงกันข้ามเมื่อเปลี่ยนมาเลี้ยงเซลล์ โดยการเติมโซเดียมซิลีเนตเข้าถังหมัก ความเข้มข้น 0.28 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถผลิตมวลชีวภาพได้เพียง 0.76 กรัมต่อลิตร และมีซิลีเนียมเท่ากับ 687 ไมโครกรัมต่อกรัมมวลชีวภาพ ซึ่งมีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้โซเดียมซิลีไนต์ แต่ซิลีเนียมส่วนใหญ่จะสะสมในรูปของสารประกอบอินทรีย์ และในการศึกษาครั้งนี้ ยังพบด้วยว่า สัดส่วนของซิลีเนียมต่อซัลเฟอร์ (Se/S ratio) ภายในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อ การรับซิลีเนียมเข้าไว้ในมวลชีวภาพของยีสต์ โดยสภาวะที่จัดว่าเหมาะสมที่สุดต่อการผลิตซิลีเนียยีสต์ โดยการหมักแบบต่อเนื่อง คือ สภาวะที่มีซิลีเนียมต่อซัลเฟอร์เท่ากับ 3.9 : 1

Ponce de Leon *et al.* (2002) ศึกษาการสะสมซิลีเนียมในยีสต์ S. cerevisiae ที่เลี้ยงให้อยู่ในช่วงที่มีการเจริญ (growth phase) และช่วงที่ไม่มีการเจริญ (non-growth phase) ในอาหารที่เติมกลูโคสและกลีเซอรอล เป็นแหล่งคาร์บอน และเติมโซเดียมซิลีไนต์ความเข้มข้นต่าง ๆ พบการสะสมซิลีเนียมได้ดีกว่าในอาหารที่เติมกลูโคส และเมื่อยีสต์อยู่ในช่วงที่มีการเจริญ ตรวจพบการสะสมแอล-ซิลีโนเมทไธโอนีนมากกว่า

ปัจจุบันมีการผลิตซิลีเนียมยีสต์ในเชิงการค้าออกมาเป็นจำนวนมาก โดยส่วนใหญ่ผลิตจาก *S. cerevisiae* ซึ่งซิลีเนียมในผลิตภัณฑ์ซิลีเนียมยีสต์ส่วนใหญ่ อยู่ในรูปสารประกอบอินทรีย์ (ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์) โดยพบมากที่สุด คือ ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ในรูปของซิลีโนเมทไธโอนีน ส่วนที่เหลือจะอยู่ในรูปของ ซิลีโนซิสเตอีน ซิลีโนซิสตาไธโอน เมทิลซิลีโนซิสเตอีน และซิลีโนซิสตีน

วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

1. เพื่อรวบรวมสายพันธุ์เมทิลโลโทรฟิกยีสต์ในประเทศไทยที่สามารถใช้เมทานอลเพื่อการเจริญ

2. เพื่อคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ที่มีเมทไธโอนีนภายในเซลล์สูงเมื่อเจริญในอาหารที่มีเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก

3. เพื่อศึกษาการสะสมซิลีเนียมโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ที่มีเมทไธโอนีนภายในเซลล์สูงเมื่อเจริญในอาหารที่มีเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก

การดำเนินงานวิจัย

1. การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่สามารถใช้เมทานอลเพื่อการเจริญ จากเชื้อยีสต์ที่เก็บรักษาอยู่ที่ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มก. และที่หน่วยจุลชีววิทยาประยุกต์ ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยเรือนปลูกพืชทดลอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยทั้งหมด และการแยกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์จากตัวอย่างธรรมชาติ

2. การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่มีโปรตีนและเมทไธโอนีนภายในเซลล์สูงเมื่อเจริญในอาหารที่มีเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก

3. การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์และการคัดเลือกเชื้อยีสต์กลายพันธุ์ที่มีเมทไธโอนีนภายในเซลล์สูงเมื่อเจริญในอาหารที่มีเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก

4. การศึกษาการสะสมซิลีเนียมภายในเซลล์เมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ที่มีเมทไธโอนีนภายในเซลล์สูงเมื่อเจริญในอาหารที่มีเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก

ประโยชน์ที่ได้รับ

การวิจัยครั้งนี้มีการรวบรวมเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่สามารถใช้เมทานอลเพื่อการเจริญ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้ทั้งสิ้น 60 ไอโซเลท โดยวิธีการแยกเชื้อจากธรรมชาติ และการคัดเลือกจากเชื้อยีสต์ที่เก็บรักษาไว้แล้ว จากนั้นจึงนำมาคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่มีโปรตีนและเมทไธโอนีนภายในเซลล์สูงเมื่อเจริญในอาหารที่มีเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก และได้ปรับปรุงพันธุกรรมของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่คัดเลือกได้ โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี ทำให้ได้ยีสต์กลายพันธุ์ที่มีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงขึ้น แล้วนำยีสต์กลายพันธุ์ที่ได้มาเลี้ยงในสภาพที่มีการผันแปรปริมาณของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสะสมเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ ถึงแม้ว่ายีสต์กลายพันธุ์ที่ได้ยังคงมีปริมาณเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ไม่สูงกว่าค่าที่เคยมีรายงานในยีสต์ชนิดอื่นมากนัก ผู้วิจัยก็ได้ทำการศึกษาการสะสมซิลีเนียมภายในเซลล์เมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาทางสรีรวิทยา การปรับปรุงสายพันธุ์ รวมทั้งการประยุกต์ใช้เมทิลโลโทรฟิกยีสต์ เพื่อการผลิตซิลีเนียมยีสต์หรือการผลิตสารเมแทบอไลท์ที่มีประโยชน์ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย (Materials and Methods)

1. การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์จากยีสต์ที่เก็บรักษาไว้แล้ว

นำยีสต์ที่เก็บรักษาอยู่ที่ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และหน่วยจุลชีววิทยาประยุกต์ ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยเรือนปลูกพืชทดลอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่ง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน มาคัดเลือกหาเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ ดังนี้

1.1 ใช้ลวดเขี่ยเชื้อถ่ายเชื้อลงบนอาหารแข็ง YPD (ข้อ2.6) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1-2 วัน เพื่อเป็นกล้าเชื้อ

1.2 ถ่ายเชื้อจากข้อ 1.1 ลงบนอาหารแข็ง 1%methanol YNB agar (อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย yeast nitrogen base 6.7 กรัม วุ้น Difco 20 กรัม เมทานอล 10 มล.) โดยวิธี simple streak

1.3 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 วัน

1.4 เก็บเชื้อที่สามารถเจริญได้ไว้ศึกษาต่อไป

2. การแยกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์จากตัวอย่างธรรมชาติ

ใช้เทคนิคการแยกเชื้อแบบ enrichment culture ดังนี้

2.1 ชั่งตัวอย่างประมาณ 1-2 กรัมใส่ลงในอาหาร 1% methanol medium (อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย yeast nitrogen base 6.7 กรัม และเมทานอล 10 มล.) ปริมาตร 50 มล. ในฟลาสก์ขนาด 250 มล.

2.2 บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

2.3 ถ่ายตัวอย่างปริมาตร 5 มล. จากข้อ 2.2 ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1% methanol medium เช่นเดียวกับข้อ 1.1 บ่มเชื้อในสภาวะเดียวกับข้อ 2.2

2.4 ทำซ้ำข้อ 2.3

2.5 นำตัวอย่างจากข้อ 2.4 มาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค cross streak บนอาหารแข็ง 1% methanol medium (องค์ประกอบของอาหารเช่นเดียวกับข้อ 2.1 แต่เติมวุ้น 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส จนกว่าจะตรวจพบโคโลนีของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์เจริญขึ้นมา

2.6 เก็บเชื้อบริสุทธิ์ของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ในอาหารแข็งผิวหน้าเอียง YPD (อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย yeast extract 10 กรัม peptone 20 กรัม glucose 20 กรัม และ agar 20 กรัม) ไว้เพื่อศึกษาต่อไป

3. การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่มีโปรตีนและเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูง

นำเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่รวบรวมได้จากข้อ 1 และ 2 มาคัดเลือกไอโซเลทที่มีโปรตีนและเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงดังนี้

3.1 ใช้ลวดเขี่ยเชื้อถ่ายเชื้อลงบนอาหารแข็ง YPD (ข้อ2.6) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1-2 วัน เพื่อเป็นกล้าเชื้อ

3.2 ถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว YPD (อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย yeast extract 10 กรัม, peptone 20 กรัม และ glucose 20 กรัม) ปริมาตร 50 มล. ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุน ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชม. แยกเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นเตรียมเซลล์แขวนลอยในน้ำกลั่นปลอดเชื้อเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ

3.3 เพาะกล้าเชื้อลงในอาหารเหลว 1% methanol medium (อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย NH_4Cl 7.63 กรัม KH_2PO_4 2.81 กรัม EDTA.2Na 0.45 กรัม $MgSO_4.7\ H_2O$ 0.59 กรัม $CaCl_2.2\ H_2O$ 0.055 กรัม $FeCl_3.6\ H_2O$ 0.0575 กรัม เมทานอล 10 มล. vitamin solution* 1 มล. และ metal solution** 10 มล. ปรับ pHเป็น 6.0; * ในน้ำ 100 มล. มี biotin 5 มก. และ thiamine 500 มก.; ** ในน้ำ 500 มล. ประกอบด้วย $MnSO_4.3\ H_2O$ 0.85 กรัม $ZnSO_4.7\ H_2O$ 1.10 กรัม $CuSO_4.5\ H_2O$ 0.2 กรัม $CuCl_4\ .2H_2O$ 0.14 กรัม $Na_2MoO_4.2H_2O$ 0.13 กรัม H_3BO_3 0.2 กรัม และ KI 0.03 กรัม) ปริมาตร 50 มล. ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. โดยปรับปริมาณเชื้อเริ่มต้นให้มีความขุ่นที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร (OD_{610})เท่ากับ 0.1 โดยการคำนวณจากสูตร

$N_1V_1 = N_2V_2$ เมื่อ

N_1 = ค่าความขุ่นของเซลล์แขวนลอยของกล้าเชื้อ

N_2 = ค่าความขุ่นของเซลล์แขวนลอยในอาหารสำหรับหมัก

V_1 = ปริมาตรกล้าเชื้อที่ต้องใช้

V_2 = ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับหมัก

3.4 บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชม.

3.5 วัดค่าการเจริญในรูปความขุ่นของเซลล์แขวนลอย (OD_{610}) และวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนและ เมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ ดังนี้

3.5.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนภายในเซลล์

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนภายในเซลล์ ใช้วิธีดัดแปลงของ Lowry (Norris and Ribbon, 1971) ดังนี้

1. การเตรียมสารเคมี

I. สารละลาย Na_2CO_3 เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์

II. สารละลาย $CuSO_4.5H_2O$ เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย sodium potassium tartrate เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์

III. ผสมสารละลายในข้อ I ปริมาตร 50 มล. และสารละลายในข้อ II ปริมาตร 2 มล. โดยเตรียมทันทีก่อนใช้

IV. เจือจาง Folin-Ciocalteu reagent ให้มีความเข้มข้นของกรดรวม (total acidity) เท่ากับ 1.0 นอร์มอล โดยไตเตรทกับสารละลาย NaOH เข้มข้น 0.1 นอร์มอล

V. เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน โดยใช้ bovine serum albumin เข้มข้น 0, 50, 100, 150 และ 200 ไมโครกรัมต่อมล.

2. การวิเคราะห์

I. แยกเซลล์ตัวอย่างออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์สองครั้งด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปรับเซลล์แขวนลอยของยีสต์ให้มีปริมาตร 0.5 มล.

II. เติมสารละลาย NaOH เข้มข้น 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 0.5 มล. ต้มใน water bath อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำมาทำให้เย็นทันที

III. เติมสารละลายในข้อ 1 (III) ปริมาตร 2.5 มล. ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที

IV. เติม reagent ในข้อ 1 (IV) ปริมาตร 0.5 มล. เขย่าให้เข้ากันทันที ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (OD_{750})

3.5.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์

วิเคราะห์ความเข้มข้นของเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ โดยวิธี microbiological tube assay (Difco, 1984) โดยใช้แบคทีเรีย *Pediococcus acidilacti* TISTR 51 (*P. cerevisiae* TISTR 51) เป็น assay microorganism

I. ถ่ายเชื้อจาก stock culture ลงในอาหาร Bacto microassay culture (อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย proteose peptone 5 กรัม yeast extract 20 กรัม glucose 10 กรัม KH_2PO_4 2 กรัม sorbitan monooleate complex 0.1 กรัม และวุ้น 10 กรัม) โดยวิธี stab inoculation บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. ถ่ายเชื้อต่อเนื่องกันทุก 2 สัปดาห์

II. เตรียมกล้าเชื้อ โดยถ่ายเชื้อจากข้อ 1 ลงในอาหาร Bacto micro inoculum broth (อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย) ปริมาตร 10 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-20 ชม. จากนั้นแยกเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์สองครั้งด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ปราศจากเชื้อ แล้วเจือจางให้เป็น 1:20 เท่าด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ปราศจากเชื้อ

III. เตรียมสารละลาย แอล-เมทไธโอนีนมาตรฐาน ความเข้มข้น 1200 ไมโครกรัมต่อมล. โดยละลายแอล-เมทไธโอนีน 1.2 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร แล้วเจือจางต่อโดยดูดสารละลายมาตรฐานเข้มข้นนี้ ปริมาตร 1 มล. ใส่ใน volumetric flask เติมน้ำกลั่นจนครบ 100 มล. จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีแอล-เมทไธโอนีนความเข้มข้น 12 ไมโครกรัมต่อมล. จากนั้นทำการเจือจางต่อ โดยดูดสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 12 ไมโครกรัมต่อมล. นี้ ปริมาตร 0,0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0 และ 5.0 มล. เติม Bacto methionine assay medium หลอดละ 5 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 10 มล. ทุกหลอด จะได้สารละลายแอล-เมทไธโอนีนความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 48 และ 60 ไมโครกรัมต่อ 10 มล.

IV. การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์เมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ ทำโดยดูดตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์มาแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์สองครั้งด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปรับเซลล์แขวนลอยของยีสต์ให้มีปริมาตร 3 มล. โดยมีเซลล์เท่ากับ 10 มก. ของมวลชีวภาพ นำไปต้มในน้ำเดือดอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ทำตัวอย่างให้เย็นแล้วแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เจือจางสารละลายตัวอย่างเพื่อให้มีปริมาณเมทไธโอนีนอิสระอยู่ในช่วงความเข้มข้นที่อ่านค่าได้ โดยทำควบคู่ไปกับแอล-เมทไธโอนีนมาตรฐานในข้อ III นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 10 นาที เมื่อทิ้งให้เย็นแล้วจึงใส่เชื้อที่เตรียมไว้จากข้อ 2 หลอดละ 0.1 มล. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-20 ชม. ตรวจวัดค่าการเจริญในรูปความขุ่นของเซลล์แขวนลอย (OD_{610}) ซึ่งการเจริญของแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นเมื่ออาหารมีความเข้มข้นของเมทไธโอนีนอิสระสูงขึ้น

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของเมทไธโอนีนอิสระแต่ละครั้ง เป็นการทำควบคู่ไปกับกราฟมาตรฐานของแอล-เมทไธโอนีนทุกครั้ง เนื่องจากสภาพการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำและอุณหภูมิที่ใช้บ่มเชื้ออาจมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย

3.6 คัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่มีโปรตีนและเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงไว้ศึกษาต่อไป

4. การปรับปรุงพันธุกรรมของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ให้มีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงขึ้นโดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี N-methy-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG)

4.1 เตรียมเซลล์แขวนลอยของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.6 ตามวิธีการข้อ 3.1-3.2

4.2 ปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้อยู่ในช่วง 10^7-10^8 เซลล์ต่อมล. โดยการนับจำนวนเซลล์โดยตรงด้วยสไลด์นับเม็ดเลือด (hemacytometer)

4.3 เติมสารละลาย NTG ลงในเซลล์แขวนลอย (ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของ NTG เท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมล.) ผสมให้เข้ากัน แล้วเก็บเซลล์แขวนลอยปริมาตร 1 มล. ทุก 15 นาที จนครบ 60 นาที

4.4 ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง แล้วนำไปนับจำนวนเซลล์รอดชีวิต โดยวิธี dilution plate count บนอาหาร minimal medium agar (อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย yeast nitrogen base 6.7 กรัม และ agar 20 กรัม) ที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชม.

4.5 คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต หลังจากได้รับสารเคมี NTG ทุกช่วงเวลา

4.6 ทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ด้วยสารเคมี NTG ตามวิธีในข้อ 4.1-4.2 โดยให้เซลล์ยีสต์สัมผัสกับ NTG เป็นเวลาที่คำนวณอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ0.1-1 เปอร์เซ็นต์ (ข้อมูลจากข้อ 4.5)

4.7 เก็บโคโลนีของยีสต์ที่รอดชีวิตไว้ศึกษาต่อไป

5. การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ที่มีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูง

5.1 นำโคโลนีของยีสต์จากข้อ 4.7 มาทำ replica plating ลงบนอาหาร minimal medium agar ที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์และ เอทไธโอนีนความเข้มข้นต่าง ๆ กัน บ่มที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชม. เปรียบเทียบการเจริญกับสายพันธุ์เดิม

5.2 เลี้ยงยีสต์กลายพันธุ์ที่เจริญได้บนอาหารที่มีเอทไธโอนีนสูงสุดและสูงกว่าสายพันธุ์เดิม ในอาหารเหลว 1% methanol medium ตามวิธีในข้อ 3.1-3.4

5.3 วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนและ เมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ เปรียบเทียบกับค่าการเจริญในรูปความขุ่นของเซลล์แขวนลอย (OD_{610})

5.4 คัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ที่มีโปรตีนและเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงกว่าสายพันธุ์เดิมไว้ศึกษาต่อไป

6. การปรับปรุงพันธุกรรมของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ให้มีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงขึ้น โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ครั้งที่สองด้วยสาร NTG

ทำการกลายพันธุ์เมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 5 อีกครั้ง โดยใช้สาร NTG ตามวิธีในข้อ 4

7. การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์สองครั้งที่มีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูง

คัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์สองครั้งที่มีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงกว่าสายพันธุ์เดิม ตามวิธีในข้อ 5 แล้วเก็บไว้เพื่อศึกษาต่อไป

8. การศึกษาการเจริญ การสะสมเมทไธโอนีนอิสระและ โปรตีนภายในเซลล์ของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ ที่เวลาต่าง ๆ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิม

8.1 เลี้ยงเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 5 และข้อ 7 และสายพันธุ์เดิมตามวิธีในข้อ 3.1-3.4 แต่เก็บตัวอย่างที่เวลา 12, 24, 48, 72 และ 96 ชม.

8.2 วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนและ เมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ เปรียบเทียบกับค่าการเจริญในรูปความขุ่นของเซลล์แขวนลอย (OD_{610})

9. การศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้างเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ยีสต์กลายพันธุ์

9.1 นำเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 7 มาเลี้ยงในอาหาร methanol broth ตามวิธีในข้อ 3 ที่ผันแปรความเข้มข้นของเมทานอลเป็น 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยใช้ปริมาตรอาหาร 100 มล. ในฟลาสก์ขนาด 500 มล. และปรับให้ความเข้มข้นของเซลล์

แขวนลอยเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลาการเพาะเลี้ยง 12, 24, 48, 72 และ 96 ชม. เพื่อตรวจวัดการเจริญในรูป OD_{610} และวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนและ เมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์

9.2 นำเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 7 มาเลี้ยงในอาหาร methanol broth ตามวิธีในข้อ 9.1 แต่ใช้อาหาร methanol broth ที่มีความเข้มข้นของเมทานอลที่เหมาะสมจากข้อ 9.1 และผันแปรชนิดของแหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต หรือยูเรีย ความเข้มข้น 0.76, 0.94 และ 4.25 เปอร์เซ็นต์ ทำการเก็บตัวอย่างและตรวจวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 9.1

9.3 นำเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 7 มาเลี้ยงในอาหาร methanol broth ตามวิธีในข้อ 9.1 แต่ใช้อาหาร methanol broth ที่มีความเข้มข้นของเมทานอลที่เหมาะสมจากข้อ 9.1 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 9.2 และผันแปรความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนเป็น 0.2, 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ทำการเก็บตัวอย่างและตรวจวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 9.1

10. การศึกษาอิทธิพลของสารประกอบอนินทรีย์ซิลีเนียมต่อการเจริญของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์

10.1 นำเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 7 มาเลี้ยงในอาหาร methanol broth ตามวิธีในข้อ 9.1 แต่ใช้อาหาร methanol broth ที่มีความเข้มข้นของเมทานอลที่เหมาะสมจากข้อ 9.1 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 9.2 และความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 9.3 โดยเติมสารประกอบอนินทรีย์ซิลีเนียมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อคือ โซเดียมซิลีเนต หรือโซเดียมซิลีไนต์ ความเข้มข้นต่างๆ กันคือ 30, 300 และ 3000 ไมโครกรัมต่อ มล.

10.2 วัดค่าการเจริญในรูป OD_{610} หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชม.

11. การศึกษาการสะสมซิลีเนียมภายในเซลล์เมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์

11.1 นำเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 7 มาเลี้ยงในอาหาร methanol broth ตามวิธีในข้อ 10.1 โดยเติมโซเดียมซิลีเนต หรือโซเดียมซิลีไนต์ ในช่วงความเข้มข้นที่ยีสต์สามารถเจริญได้

11.2 เก็บตัวอย่างหลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 30 ชม. เพื่อตรวจวัดค่าการเจริญในรูป OD_{610} ความเข้มข้นของโปรตีนและเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ ตามวิธีในข้อ 3 และวิเคราะห์ปริมาณซิลีเนียมภายในเซลล์ ตามวิธีการดัดแปลงของ AOAC official method 986.15 (1996) ดังนี้

11.2.1 แยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง

11.2.2 ส่งตัวอย่างเพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณซิลีเนียมภายในเซลล์ ที่ห้องปฏิบัติการสารปนเปื้อน ศูนย์ตรวจสอบและออกใบรับรองคุณภาพสินค้าเกษตรเพื่อการส่งออก (ศตอ.) กองเกษตรเคมี กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ผลการวิจัย (Results)

1. การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์จากยีสต์ที่เก็บรักษาไว้แล้ว

การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์จากยีสต์ที่เก็บรักษาอยู่ที่ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จำนวน 459 ไอโซเลทและยีสต์ที่เก็บรักษาอยู่ที่หน่วยจุลชีววิทยาประยุกต์ ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยเรือนปลูกพืชทดลอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จำนวน 212 ไอโซเลท รวมจำนวนยีสต์ที่นำมาคัดเลือกทั้งสิ้น 671 ไอโซเลท โดยนำมาคัดเลือกหาเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ ที่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่มีเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่ามีเมทิลโลโทรฟิกยีสต์เพียง 1 ไอโซเลทเท่านั้น

2. การแยกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์จากตัวอย่างธรรมชาติ

เมื่อทำการแยกและคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์จากแหล่งธรรมชาติ โดยการเก็บตัวอย่างจากธรรมชาติได้แก่ ดิน น้ำ ดอกไม้ ลูกไม้ จำนวนทั้งสิ้น 185 ตัวอย่าง นำมาแยกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์โดยวิธีการ enrichment ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก จำนวน 3 ครั้ง เพื่อเปิดโอกาสให้เมทิลโลโทรฟิกยีสต์ ซึ่งอาจมีจำนวนน้อยในตัวอย่างจากธรรมชาติได้เพิ่มจำนวนให้มากเพียงพอที่จะตรวจพบได้ แล้วจึงนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก พบว่าจากตัวอย่างทั้งหมดที่นำมาแยกเชื้อ ได้เมทิลโลโทรฟิกยีสต์ ที่สามารถใช้เมทานอลเพื่อการเจริญจำนวน 59 ไอโซเลท

ผู้วิจัยจึงได้รวบรวมเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่สามารถใช้เมทานอลเพื่อการเจริญ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (จากข้อ 1 และ 2) จำนวนทั้งสิ้น 60 ไอโซเลท ไว้เพื่อการคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่มีโปรตีนและเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงต่อไป

3. การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่มีโปรตีนและเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูง

เมื่อพิจารณาการเจริญของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ทั้ง 60 ไอโซเลทที่รวบรวมได้ บนอาหารแข็งที่มีเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก พบว่าสามารถแบ่งยีสต์ได้เป็น 2 กลุ่มตามลักษณะการสร้างและไม่สร้างเส้นใยเทียม (pseudomycelium) โดยพบยีสต์ที่สร้างเส้นใยเทียม จำนวน 36 ไอโซเลท และยีสต์ที่ไม่สร้างเส้นใยเทียม จำนวน 24 ไอโซเลท (ตารางที่ 1) และพบว่ายีสต์กลุ่มที่สร้างเส้นใยเทียมทุกไอโซเลทไม่สามารถเจริญในอาหารเหลว 1% methanol medium (ข้อ 3.3) ส่วนกลุ่มที่ไม่สร้างเส้นใยเทียมนั้นสามารถเจริญได้

ตารางที่ 1 การแบ่งกลุ่มเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่รวบรวมได้ ตามการสร้างและไม่สร้างเส้นใยเทียมบนอาหารแข็ง

ไอโซเลทที่สร้างเส้นใยเทียม					ไอโซเลทที่ไม่สร้างเส้นใยเทียม				
N001	N010	N011	N013	N019	N003	N004	N005	N007	N008
N020	N021	N022	N023	N026	N016	N017	N025	N033	N036
N027	N029	N032	N034	N039	N051	S003	S004	S005	S007-1
N041	N044	N048	N049	N050	S007-1	S009	S010	S014	FS26
N052	N054	N056	N057	N058	FS27	FS28	FS29	FS30	
N059-1	N060	N061	N062	S026					
ST009	ST013	ST014	ST016	M1					
M4									

เมื่อวิเคราะห์การเจริญ ปริมาณโปรตีนและเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลุ่มที่สร้างเส้นใยเทียมทั้ง 24 ไอโซเลท เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว 1% methanol medium เป็นเวลา 72 ชม. (ตารางที่ 2) พบว่าไอโซเลท N017 มีโปรตีนสูงสุดเท่ากับ 78.63 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (กรัมโปรตีนต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์) สำหรับการเจริญของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ พบว่าไอโซเลท S004 เจริญได้ดีที่สุด โดยมีค่าการเจริญเท่ากับ 7.69 กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร และเมื่อพิจารณาปริมาณเมทไธโอนีนอิสระ พบว่าไอโซเลท N007 มีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 0.52 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้กับรายงานการเพาะเลี้ยงยีสต์ Kluyveromyces lactis ในอาหารที่ประกอบด้วย whey permeate ซึ่งสามารถสะสมเมทไธโอนีนอิสระได้ถึง 6-9 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ (Kitomoto and Nagahara, 1994) พบว่าเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้มีปริมาณเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ต่ำกว่ามาก แต่อย่างไรก็ตามเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ของไอโซเลท N007 ก็มีค่าใกล้เคียงกับปริมาณที่พบจากยีสต์ *Candida boidinii* No. 2201 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (0.54 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์) ตามที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้ (Tani *et al.*, 1988)

เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของโปรตีนและเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่นำมาศึกษาทั้ง 24 ไอโซเลท พบว่าไอโซเลท N007 มีเมทไธโอนีนอิสระในเซลล์สูงที่สุด คือ 0.52 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ขณะที่มีการเจริญเท่ากับ 2.82 กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร และโปรตีนภายในเซลล์เท่ากับ 21.18 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง เมื่อเลี้ยงนาน 72 ชม. จึงเลือกยีสต์ไอโซเลท N007 มาทำการปรับปรุงพันธุกรรมเพื่อเพิ่มการสะสมเมทไธโอนีนภายในเซลล์ให้สูงขึ้นต่อไป

ตารางที่ 2 การเจริญ โปรตีน และเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ 24 ไอโซเลท เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว 1% methanol medium ปริมาตร 50 มล. บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุน ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชม.

รหัสเชื้อ	การเจริญ[1]	โปรตีนภายในเซลล์[2]	เมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์[3]
N003	2.29	31.20	0.24
N004	3.59	22.75	0.29
N005	1.18	67.31	0.11
N007	2.82	21.18	0.52
N008	3.15	23.44	0.26
N016	1.99	43.47	0.31
N017	1.09	78.63	0.89
N025	1.02	17.46	0.03
N033	3.78	16.62	0.06
N036	2.82	23.59	0.04
N051	1.31	78.37	0.14
S003	4.21	14.19	0.08
S004	7.69	6.87	0.05
S005	2.87	20.45	0.12
S007-1	2.29	20.45	0.33
S007-2	2.07	19.17	0.23
S009	4.34	5.10	0.16
S010	1.59	11.11	0.35
S014	3.09	17.67	0.23
FS26	2.67	17.71	0.51
FS27	2.47	21.30	0.12
FS28	1.15	31.55	0.10
FS29	1.78	14.98	0.26
FS30	3.97	12.05	0.13

หมายเหตุ [1] กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร

[2] กรัมโปรตีนต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ (เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง)

[3] มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์

4. การปรับปรุงพันธุกรรมของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ให้มีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงขึ้น โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี N-methy-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG)

ทำการปรับปรุงพันธุกรรมของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ N007 โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG โดยนำเซลล์แขวนลอยของยีสต์ N007 เข้มข้น 4.47 x 107 เซลล์ต่อมล. มาสัมผัสกับ NTG ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมล. พบว่าที่เวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที เหลือเซลล์รอดชีวิตเท่ากับ 19.02, 8.50, 2.19 และ 0.17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จึงเลือกเซลล์รอดชีวิตในช่วงเวลา 60 นาที ซึ่งเหลือเซลล์รอดชีวิตอยู่ในช่วง 0.1-1.0 เปอร์เซ็นต์ มาทำการคัดเลือกต่อไป

5. การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ที่มีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูง

การคัดเลือกยีสต์กลายพันธุ์ที่มีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูง อาศัยหลักการที่เชื้อกลายพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อเอทไธโอนีน (ethionine) ซึ่งเป็น analogue ของเมทไธโอนีนอิสระ ที่ระดับสูงขึ้นกว่าสายพันธุ์เดิม อาจมีความเข้มข้นของเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงขึ้นกว่าสายพันธุ์เดิมด้วย (Brigidi *et al.*, 1988) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Wang *et al.* (1979) ที่ระบุว่าการที่เชื้อกลายพันธุ์บางตัวต้านทานต่อ amino acid analogue นั้น เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์หรือเกิดจากระบบการสร้างเอนไซม์ที่เปลี่ยนแปลงไป ทำให้เชื้อกลายพันธุ์ต้านทานต่อการเกิด feedback repression ได้ ซึ่งส่งผลให้เชื้อกลายพันธุ์สามารถสร้างกรดอะมิโนได้สูงขึ้นด้วย

5.1 การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีนสูงขึ้นกว่าเดิม

เก็บโคโลนีของเชื้อที่รอดชีวิต จากการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ด้วยสารเคมี NTG ที่เวลา 60 นาที จำนวน 416 โคโลนี มาทำ replica plating ลงบนอาหารแข็ง minimal medium ที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (ข้อ 4.4) และเอทไธโอนีนเข้มข้น 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350 และ 1400 ไมโครกรัมต่อมล. ตรวจการเจริญที่ 72 ชม. เปรียบเทียบการเจริญกับสายพันธุ์เดิม (N007) บนอาหารชนิดเดียวกัน พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีผลยับยั้งการเจริญของยีสต์ N007 คือ 1000 ไมโครกรัมต่อมล. โดยพบเชื้อกลายพันธุ์จำนวน 390 โคโลนี ที่สามารถต้านทานเอทไธโอนีนได้ดีกว่าสายพันธุ์เดิม ซึ่งในจำนวนนี้มี 142 โคโลนี ที่สามารถต้านทานต่อเอทไธโอนีนความเข้มข้น 1400 ไมโครกรัมต่อมล. จึงนำเชื้อกลายพันธุ์ทั้ง 142 โคโลนี มาทำการคัดเลือกต่อไป

5.2 การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีนและมีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงกว่าสายพันธุ์เดิม

เมื่อนำเชื้อกลายพันธุ์ที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีนเข้มข้น 1400 ไมโครกรัมต่อมล. จำนวน 142 โคโลนี จากข้อ 5.1 มาเลี้ยงในอาหารเหลว 1% methanol medium (ข้อ 3.3) โดยเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบหมุน ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชม. พบว่าเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ที่ทนต่อเอทไธโอนีนได้สูงขึ้นนั้น ส่วนใหญ่จะผลิตและสะสมเมทไธโอนีนอิสระได้สูงขึ้นด้วย อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ เชื้อกลายพันธุ์ของ N007 ยังคงมีปริมาณเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์อยู่ในระดับต่ำ และบางส่วนมีการเจริญในอาหารเหลว 1% methanol medium น้อยกว่า N007 มาก โดยเชื้อกลายพันธุ์ที่ตรวจพบเมทไธโอนีนอิสระสูงที่สุดคือ MN007-67 ซึ่งพบ

เมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์เท่ากับ 1.71 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ และมีโปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์เท่ากับ 18.31 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 3) จึงคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ MN007-67 ไว้ศึกษาต่อไป

เมื่อเปรียบเทียบเมทไธโอนีนอิสระในเซลล์พบว่ายีสต์ MN007-67 มีเมทไธโอนีนอิสระในเซลล์ต่ำกว่าปริมาณที่ตรวจพบในยีสต์กลายพันธุ์ของ *C. boidinii* No. 2201 (6.02มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์) ซึ่งศึกษาโดย Tani *et al.* (1988) อยู่มาก

ตารางที่ 3 การเจริญ โปรตีน และเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ N007 กลายพันธุ์ ทั้ง 142 ไอโซเลท เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว 1% methanol medium ปริมาตร 50 มล. บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุน ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชม.

รหัสเชื้อ	การเจริญ[1]	โปรตีนภายในเซลล์[2]	เมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์[3]
MN007-1	1.07	67.60	1.46
MN007-2	0.02	ND	ND
MN007-3	0.88	69.01	1.26
MN007-4	1.11	57.06	1.31
MN007-5	1.11	53.38	0.66
MN007-6	1.05	63.34	1.45
MN007-7	1.10	59.41	1.26
MN007-8	1.22	52.60	0.51
MN007-9	1.03	72.88	1.52
MN007-10	1.75	53.46	1.04
MN007-11	1.48	48.15	0.66
MN007-12	1.60	35.32	0.85
MN007-13	1.90	38.52	0.78
MN007-14	1.74	46.47	0.41
MN007-15	1.56	39.86	0.51
MN007-16	1.71	47.67	0.23
MN007-17	1.75	42.92	0.05
MN007-18	1.04	65.05	0.64
MN007-19	1.04	64.35	0.70
MN007-20	1.00	67.99	1.55
MN007-21	0.99	67.42	0.54
MN007-22	0.86	ND	ND

ตารางที่ 3 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	การเจริญ[1]	โปรตีนภายในเซลล์[2]	เมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์[3]
MN007-23	0.97	ND	ND
MN007-24	0 95	ND	ND
MN007-25	0.92	ND	ND
MN007-26	1.04	72 90	0 23
MN007-27	1.01	64 56	0 47
MN007-28	1.65	49 03	0 17
MN007-29	1.88	49028	0 44
MN007-30	1 58	45 23	0 46
MN007-31	1 62	46 72	0 20
MN007-32	1.70	51 51	0 28
MN007-33	1.61	51 57	0 20
MN007-34	1 89	46 63	0 06
MN007-35	1.65	51 58	0 13
MN007-36	1 63	53 34	0 05
MN007-37	1 98	26 85	0 01
MN007-38	2 00	32 38	0 04
MN007-39	0 23	ND	ND
MN007-40	2 08	28 62	0 03
MN007-41	1.60	41 57	0 01
MN007-42	2 01	31 35	0 10
MN007-43	1 64	40 58	0 15
MN007-44	1 95	45 01	0 11
MN007-45	2 05	27 01	0 30
MN007-46	2 20	47 88	0 17
MN007-47	1 88	49 50	0 09
MN007-48	1 75	44 39	0 19
MN007-49	1 87	45 97	0 08
MN007-50	1 41	58 64	0 30
MN007-51	1 60	54 30	0 21
MN007-52	1 79	48 76	0 07
MN007-53	1 91	36 69	0 27
MN007-54	1 64	29 37	0 29

ตารางที่ 3 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	การเจริญ[1]	โปรตีนภายในเซลล์[2]	เมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์[3]
MN007-55	2.19	23.10	0.22
MN007-56	1.49	58.15	0.31
MN007-57	1.45	63.25	0.27
MN007-58	2.30	33.06	0.12
MN007-59	2.09	24.89	0.83
MN007-60	1.71	34.00	0.14
MN007-61	2.61	22.20	0.06
MN007-62	1.21	41.55	0.30
MN007-63	1.22	57.62	0.34
MN007-64	1.84	29.04	0.26
MN007-65	1.82	28.72	0.65
MN007-66	2.07	22.50	0.61
MN007-67	0.52	18.31	1.71
MN007-68	1.99	26.52	0.08
MN007-69	1.90	24.76	0.52
MN007-70	2.03	26.45	0.67
MN007-71	1.87	29.20	0.79
MN007-72	0.37	ND	ND
MN007-73	0.24	ND	ND
MN007-74	0.39	ND	ND
MN007-75	0.05	ND	ND
MN007-76	0.39	ND	ND
MN007-77	2.05	30.91	0.06
MN007-78	1.80	11.04	0.15
MN007-79	1.66	30.63	0.26
MN007-80	2.00	30.21	0.25
MN007-81	2.13	29.30	1.27
MN007-82	0.23	ND	ND
MN007-83	0.01	ND	ND
MN007-84	0.12	ND	ND
MN007-85	1.05	56.08	0.44
MN007-86	1.92	31.28	0.70

ตารางที่ 3 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	การเจริญ[1]	โปรตีนภายในเซลล์[2]	เมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์[3]
MN007-87	0.20	ND	ND
MN007-88	0.41	ND	ND
MN007-89	0.03	ND	ND
MN007-90	1.93	28.63	0.22
MN007-91	2.01	12.92	0.05
MN007-92	1.90	17.95	0.07
MN007-93	2.26	17.80	0.10
MN007-94	2.19	5.68	0.04
MN007-95	1.95	17.05	0.07
MN007-96	2.16	24.03	0.07
MN007-97	2.05	31.27	0.34
MN007-98	1.75	36.98	0.13
MN007-99	2.19	8.13	0.29
MN007-100	2.41	14.10	0.05
MN007-101	0.23	ND	ND
MN007-102	0.45	ND	ND
MN007-103	1.84	36.54	0.29
MN007-104	2.24	42.41	0.58
MN007-105	0.18	ND	ND
MN007-106	2.33	23.89	0.73
MN007-107	1.86	43.84	0.65
MN007-108	2.00	31.89	0.71
MN007-109	1.99	22.97	0.45
MN007-110	1.49	30.27	0.78
MN007-111	1.40	42.70	1.40
MN007-112	1.44	44.92	0.23
MN007-113	2.06	28.53	0.42
MN007-114	1.55	28.54	0.28
MN007-115	1.59	22.32	0.16
MN007-116	1.67	26.03	0.44
MN007-117	1.81	30.79	0.36
MN007-118	2.19	25.09	0.23

ตารางที่ 3 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	การเจริญ[1]	โปรตีนภายในเซลล์[2]	เมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์[3]
MN007-119	2.16	17.11	0.01
MN007-120	1.55	30.37	0.41
MN007-121	2.18	10.60	0.30
MN007-122	2.18	4.58	0.27
MN007-123	2.26	20.69	0.04
MN007-124	1.96	9.64	0.30
MN007-125	1.94	25.99	0.06
MN007-126	1.41	48.65	0.50
MN007-127	1.42	21.01	0.23
MN007-128	1.73	24.89	0.11
MN007-129	1.93	15.34	0.23
MN007-130	1.92	37.00	0.62
MN007-131	2.18	26.24	0.07
MN007-132	2.31	20.19	0.07
MN007-135	1.41	12.43	0.22
MN007-137	1.70	19.89	0.32
MN007-138	1.57	47.31	0.09
MN007-139	2.39	14.68	0.06
MN007-140	1.73	44.77	0.55
MN007-141	1.92	24.23	0.18
MN007-142	1.74	46.32	0.05
MN007-143	2.02	35.18	0.04
MN007-144	1.95	23.46	0.15
MN007-145	2.30	21.46	0.13

หมายเหตุ [1] กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร

[2] กรัมโปรตีนต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ (เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง)

[3] มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์

ND หมายถึงไม่ได้ทำการทดสอบ

6. การปรับปรุงพันธุกรรมของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ให้มีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงขึ้น โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ครั้งที่สองด้วยสาร NTG

เนื่องจากเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ MN007-67 ที่ได้จากการกลายพันธุ์เมทิลโลโทรฟิกยีสต์ N007 มีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงขึ้นจากเดิมเพียงเล็กน้อย จึงได้ทำการกลายพันธุ์ยีสต์กลายพันธุ์ MN007-67 ซ้ำอีกครั้ง เพื่อให้สามารถสะสมเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ได้สูงขึ้น โดยการนำเซลล์แขวนลอยของยีสต์ MN007-67 ความเข้มข้น 3.17 x 10^7 เซลล์ต่อมล. มาทำการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมล. พบว่าที่เวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที เหลือเซลล์รอดชีวิตเท่ากับ 18.11, 5.49, 2.68 และ 0.55 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จึงเลือกเซลล์รอดชีวิตในช่วงเวลา 60 นาที ที่มีค่า 0.1-1.0 เปอร์เซ็นต์ มาทำการคัดเลือกต่อไป

7. การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์สองครั้งที่มีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูง

7.1 การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์สองครั้งที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีนสูงขึ้นกว่าเดิม

เก็บโคโลนีของเชื้อที่รอดชีวิต จากการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ครั้งที่สอง ด้วยสารเคมี NTG ที่เวลา 60 นาที ซึ่งเหลือเซลล์รอดชีวิตเท่ากับ 0.55 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 700 โคโลนี มาทำ replica plating ลงบนอาหารแข็ง minimal medium ที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (ข้อ 4.4) และเอทไธโอนีนเข้มข้น 1500, 1600, 1700, 1800, 1200, 1900 และ 2000 ไมโครกรัมต่อมล. ตรวจการเจริญที่ 72 ชม. พบว่ามีเชื้อกลายพันธุ์ซ้ำจำนวน 309 โคโลนี ที่สามารถต้านทานต่อเอทไธโอนีนที่ความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัมต่อมล. จึงนำเชื้อกลายพันธุ์ทั้ง 309 โคโลนี มาทำการคัดเลือกต่อไป

7.2 การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์สองครั้งที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีนและมีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงกว่าสายพันธุ์เดิม

เมื่อนำเชื้อกลายพันธุ์สองครั้งที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีนเข้มข้น 2000 ไมโครกรัมต่อมล. จำนวน 309 โคโลนี มาเลี้ยงในอาหารเหลว 1% methanol medium (ข้อ 3.3) โดยเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบหมุน ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชม. พบว่ามียีสต์กลายพันธุ์เพียง 19 สายพันธุ์ที่มีการเจริญมากพอที่จะทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและเมทไธโอนีนอิสระได้ จึงนำยีสต์กลายพันธุ์สองครั้งทั้ง 19 สายพันธุ์นี้มาเลี้ยงพร้อมกับยีสต์กลายพันธุ์ MN007-67 และยีสต์สายพันธุ์เดิมคือ N007 โดยเลี้ยงในอาหารเหลว 1% methanol medium ภายใต้สภาวะดังกล่าวข้างต้น แล้วตรวจวัดการเจริญ ปริมาณโปรตีนและเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชม. พบว่า เมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ ND035 มีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงที่สุด คือ 2.37 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ และยีสต์กลายพันธุ์ ND213 มีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงเป็นอันดับสอง คือ 1.55 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ขณะที่โปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์ของยีสต์ ND035 และ ND213 เท่ากับ 29.18 และ 18.14 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (ตารางที่ 4) ผู้วิจัยจึงได้คัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ ND035 และ ND213 ไว้ศึกษาต่อไป

ดารางที่ 4 การเจริญ โปรตีน และเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ N007, MN007-67และ MN007-67 กลายพันธุ์จำนวน 19 ไอโซเลท เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว 1% methanol medium ปริมาตร 50 มล. บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุน ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชม.

รหัสเชื้อ	การเจริญ[1]	โปรตีนภายในเซลล์[2]	เมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์[3]
N007	1.20	24.65	0.54
MN007-67	0.93	22.87	1.06
ND009	0.70	20.32	0.19
ND022	1.00	25.89	1.19
ND033	0.40	30.58	0.93
ND035	1.08	29.18	2.37
ND038	1.28	20.69	1.29
ND041	0.97	32.01	0.26
ND042	0.58	20.98	0.80
ND164	1.16	17.36	0.84
ND184	0.75	19.68	0.59
ND194	0.74	29.80	0.37
ND213	1.96	18.14	1.55
ND215	0.77	22.84	1.04
ND216	1.11	20.36	0.89
ND221	0.78	20.46	1.03
ND251	0.97	33.61	1.21
ND256	1.77	28.47	0.30
ND262	1.66	29.12	1.41
ND264	0.93	28.69	0.88
ND269	1.16	30.45	1.12

หมายเหตุ [1] กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร
[2] กรัมโปรตีนต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ (เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง)
[3] มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์

จากการเปรียบเทียบยีสต์กลายพันธุ์สองครั้ง ND035 และ ND213 กับยีสต์ MN007-67 พบว่า ยีสต์ ND035 และ ND213 สามารถผลิตและสะสมเมทไธโอนีนอิสระสูงกว่ายีสต์ MN007-67 เท่ากับ 1.2 และ 0.5 เท่า ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบผลที่ได้ในการศึกษาครั้งนี้กับผลการศึกษาของรัฐดา

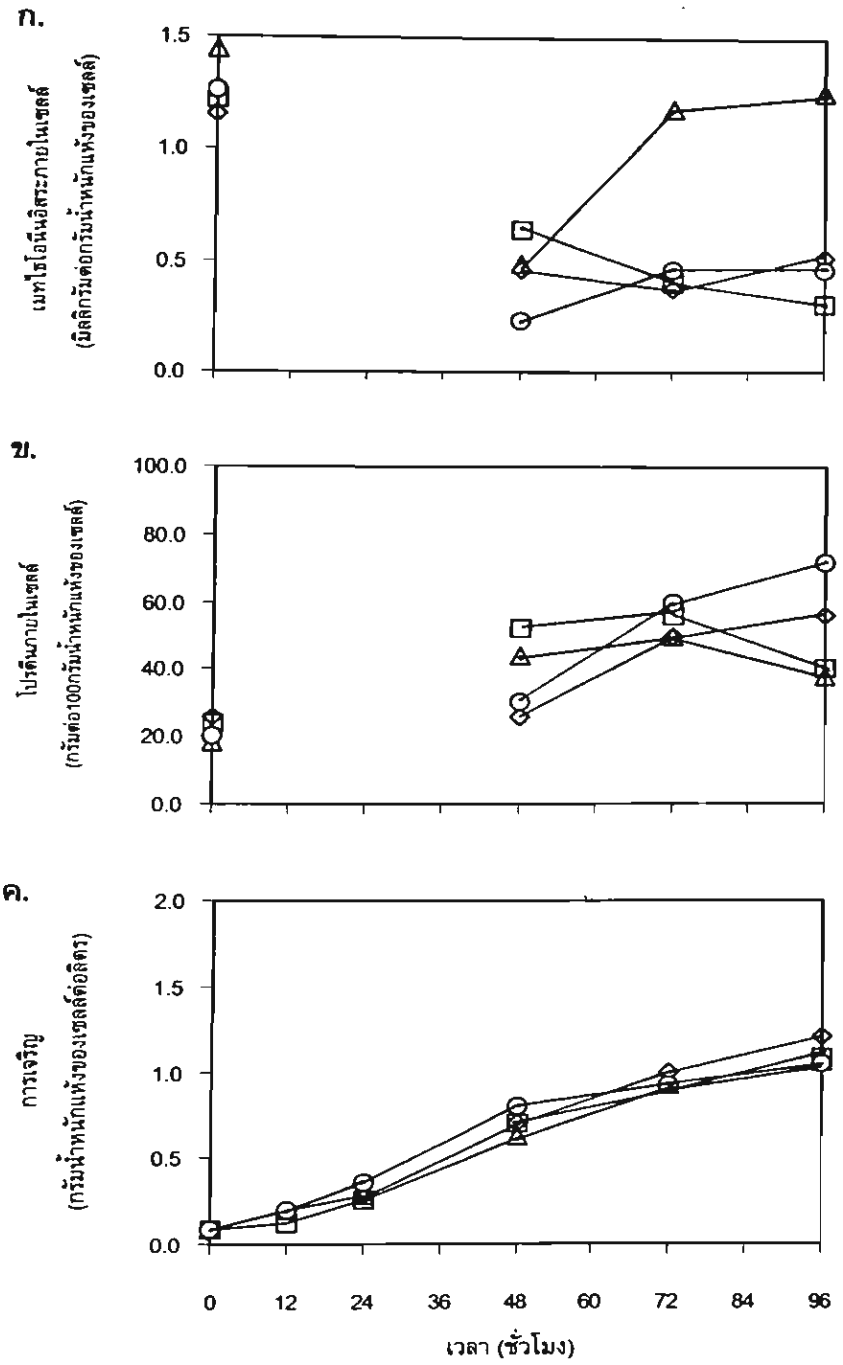
(2539) ที่ได้คัดเลือกยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่สามารถผลิตและสะสมเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูง เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน แล้วเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์สองครั้ง ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต โดยระบุว่าพบยีสต์ *S. cerevisiae* NJ-42 ที่มีความสามารถในการผลิตและสะสมเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงถึง 5.78 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชม. จะเห็นว่ายีสต์กลายพันธุ์สองครั้ง ND035 และ ND213 ยังมีความสามารถในการผลิตและสะสมเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ต่ำกว่ายีสต์ *S. cerevisiae* NJ-42 อยู่มาก

8. การศึกษาการเจริญ การสะสมเมทไธโอนีนอิสระและ โปรตีนภายในเซลล์ของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ ที่เวลาต่าง ๆ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิม

เมื่อนำเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ N007 และยีสต์กลายพันธุ์ MN007-67, ND035 และ ND213 มาเลี้ยงในอาหารเหลว 1% methanol medium ตามวิธีในข้อ 8 เพื่อวิเคราะห์การเจริญ เมทไธโอนีนอิสระ และโปรตีนภายในเซลล์ พบว่าการเจริญของยีสต์ที่นำมาศึกษา ไม่มีความแตกต่างกันมากนัก (ภาพที่ 3ค) โดยในช่วงเวลา 48 ชม. แรกของการเพาะเลี้ยงนั้น ยีสต์มีการเจริญค่อนข้างน้อย จึงได้เริ่มทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นของเมทไธโอนีนอิสระและโปรตีนภายในเซลล์ ตั้งแต่ 48 ชม.ของการเพาะเลี้ยงเป็นต้นไป อย่างไรก็ตามสังเกตได้ว่า ยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์มีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ค่อนข้างสูงเมื่อเริ่มต้นเพาะเลี้ยง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณเมทไธโอนีนที่ยีสต์สร้างขึ้นในช่วงของการเตรียมกล้าเชื้อ ซึ่งใช้อาหารเหลว YPD ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน และยังมียีสต์เอกซ์แทรกเป็นองค์ประกอบอีกด้วย

หากพิจารณาความเข้มข้นของเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ในช่วงเวลา 48-96 ชม.ของการเพาะเลี้ยง จะพบว่ายีสต์ N007 มีความเข้มข้นของเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 0.51 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ที่เวลา 96 ชม. ขณะที่ยีสต์กลายพันธุ์ MN007-67, ND035 และ ND213 มีปริมาณเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 0.64, 1.27 และ 0.46 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48, 96 และ 96 ชม. ตามลำดับ (ภาพที่ 3ก)

เมื่อพิจารณาปริมาณโปรตีนภายในเซลล์ พบว่าเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ N007 มีความเข้มข้นของโปรตีนภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 55.64 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ที่เวลา 96 ชม. ขณะที่ยีสต์กลายพันธุ์ MN007-67, ND035 และ ND213 มีปริมาณโปรตีนภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 56.55, 50.08 และ 72.05 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ที่เวลา 72, 72 และ 96 ชม. ตามลำดับ (ภาพที่ 3ข)



ภาพที่ 3 ความเข้มข้นของเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ (ก) โปรตีนภายในเซลล์ (ข) และการเจริญ (ค) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ N007 (◇) และเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ MN007-67 (□) ND035 (△) และ ND213 (○) เมื่อเลี้ยงในอาหาร methanol medium ที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ปริมาตรอาหาร 100 มล. บรรจุในฟลาสก์ขนาด 500 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส

9. การศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้างเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ยีสต์กลายพันธุ์

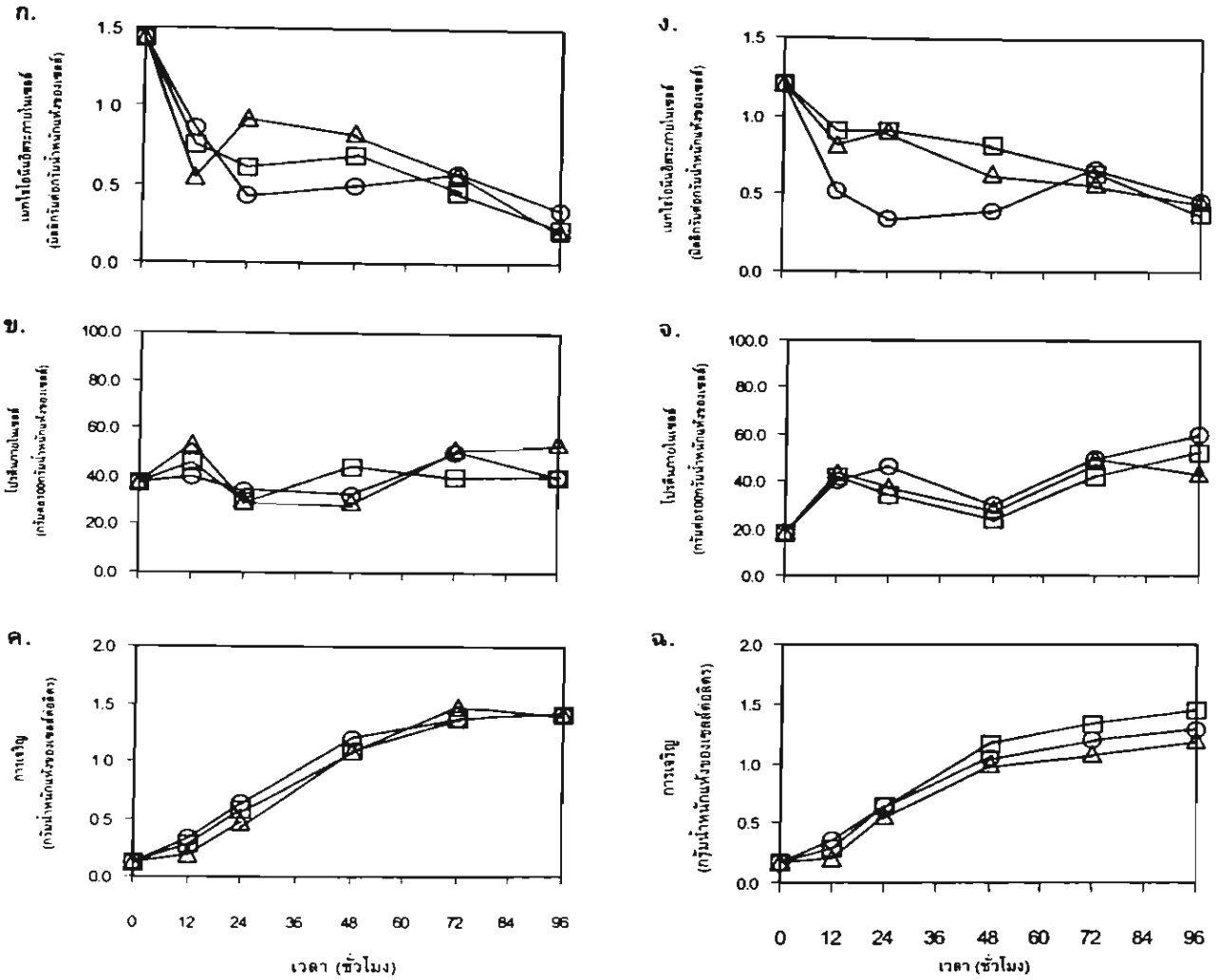
9.1 ความเข้มข้นของเมทานอล

นำเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ ND035 และ ND213 มาเลี้ยงในอาหารเหลว methanol medium ที่ผันแปรความเข้มข้นของเมทานอลเป็น 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ แล้วเพาะเลี้ยงตามวิธีในข้อ 9.1

เมื่อพิจารณาผลของความเข้มข้นของเมทานอลที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญของยีสต์ พบว่ายีสต์กลายพันธุ์ ND035 และ ND213 มีการเจริญไม่แตกต่างกันเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเมทานอล 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4ค และ 4ฉ) แต่สังเกตได้ว่า ยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์มีการเจริญเข้าสู่ระยะ exponential phase ภายหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชม. ซึ่งในระยะเวลาก่อนหน้านั้นพบว่ายีสต์มีเมทไธโอนีนอิสระและโปรตีนภายในเซลล์ค่อนข้างสูง ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการที่ยีสต์สร้างเมทไธโอนีนและโปรตีนสะสมไว้ตั้งแต่ขั้นตอนการเตรียมกล้าเชื้อในอาหาร YPD ซึ่งมีกลูโคสและยีสต์เอกซ์แทรกเป็นองค์ประกอบสำคัญ ดังนั้นเพื่อศึกษาการสร้างเมทไธโอนีนอิสระ และโปรตีนภายในเซลล์ยีสต์ ภายใต้สภาวะที่มีเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน จึงควรพิจารณาภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชม. ซึ่งยีสต์มีการปรับตัวให้อยู่ในสภาวะที่ต้องการศึกษา มาเป็นระยะเวลาพอสมควรแล้ว

เมื่อพิจารณาในช่วงเวลาเพาะเลี้ยง 24-96 ชม. พบว่ายีสต์กลายพันธุ์ ND035 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ มีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 0.58 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ที่เวลา 72 ชม. ขณะที่เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเมทานอล 2 เปอร์เซ็นต์ มีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 0.67 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ที่เวลา 48 ชม. และเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเมทานอล 3 เปอร์เซ็นต์ มีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 0.91 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ที่เวลา 24 ชม. (ภาพที่ 4ก) ส่วนยีสต์กลายพันธุ์ ND213 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ มีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 0.70 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ที่เวลา 72 ชม. ขณะที่เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเมทานอล 2 เปอร์เซ็นต์ มีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 0.93 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ที่เวลา 24 ชม. และเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเมทานอล 3 เปอร์เซ็นต์ มีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 0.91 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ที่เวลา 24 ชม. (ภาพที่ 4ง)

ผลของความเข้มข้นของเมทานอลต่อปริมาณโปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์ของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ ND035 และ ND213 แสดงในภาพที่ 4ข และ 4จ ตามลำดับ พบว่ายีสต์กลายพันธุ์ ND035 มีโปรตีนภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 50.35 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ที่เวลา 72 ชม. เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเมทานอล 2 เปอร์เซ็นต์ พบโปรตีนภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 44.87 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ที่เวลา 48 ชม. และเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเมทานอล 3 เปอร์เซ็นต์ พบโปรตีนภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 53.59 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ที่เวลา 96 ชม. ของการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 4ข) ส่วนยีสต์กลายพันธุ์ ND213 พบว่ามีโปรตีนภาย



ภาพที่ 4 ความเข้มข้นของเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ (ก และ ง) โปรตีนภายในเซลล์ (ข และ จ) และการเจริญ (ค และ ฉ) ที่เวลาต่าง ๆ ของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ ND035 (ก-ค) และ ND213 (ง-ฉ) เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเมทานอลเข้มข้น 1 (○) 2 (□) และ 3 (△) เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ปริมาตรอาหาร 100 มล. บรรจุในฟลาสก์ขนาด 500 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส

ในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 59.37 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ที่เวลา 96 ชม. เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเมทานอล 2 เปอร์เซ็นต์ มีโปรตีนภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 53.16 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ที่เวลา 96 ชม. และเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเมทานอล 3 เปอร์เซ็นต์ มีโปรตีนภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 52.84 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ที่เวลา 72 ชม. ของการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 4จ)

จากผลการทดลองข้างต้นสรุปได้ว่า ความเข้มข้นของเมทานอลที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในอาหาร methanol medium สำหรับเลี้ยงเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ ND035 คือ 3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งภายหลังจากเลี้ยงเชื้อ 24 ชม. พบเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงสุด

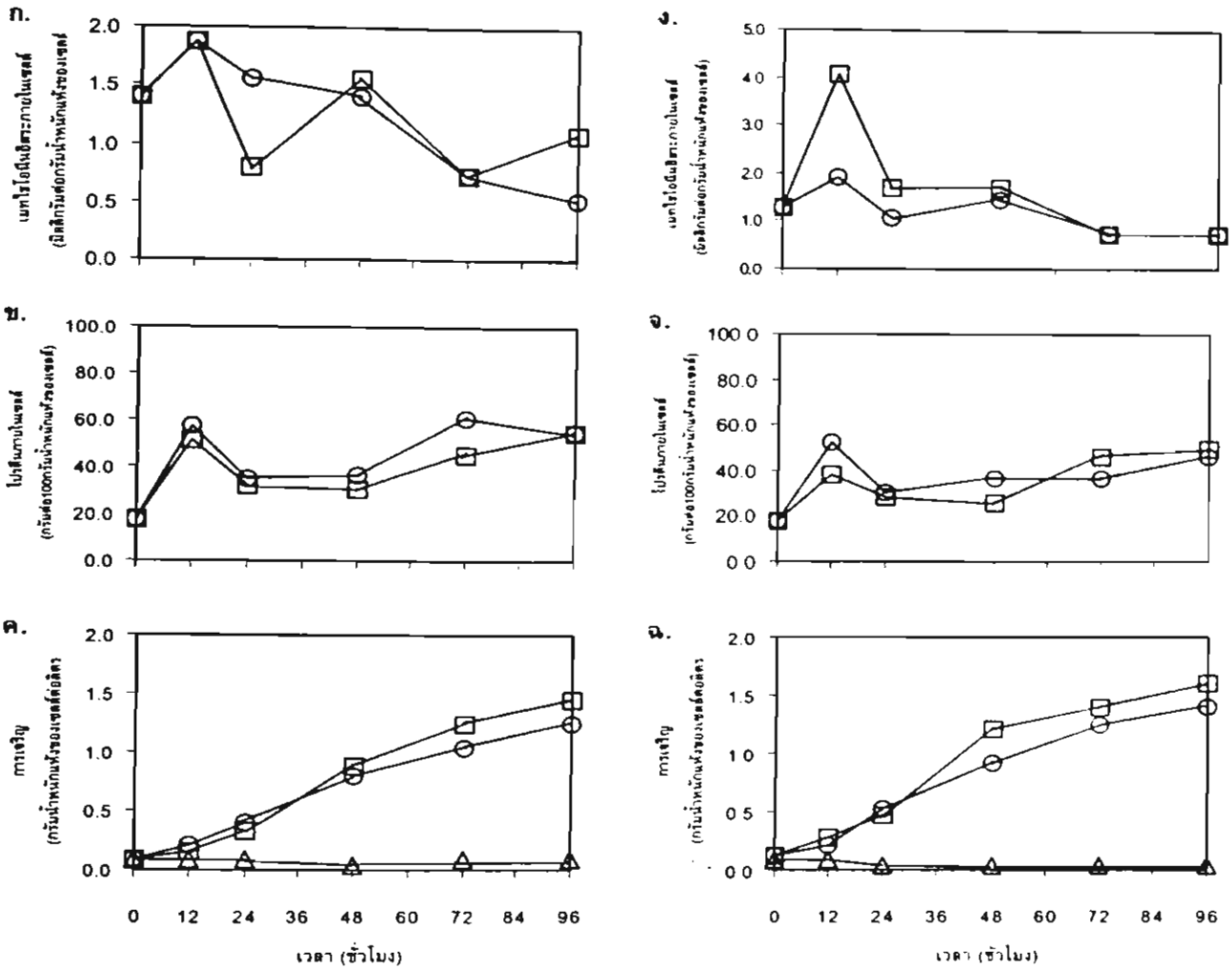
เท่ากับ 0.91 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ โปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์เท่ากับ 31.51 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง และการเจริญเท่ากับ 0.50 กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร ส่วนอาหาร methanol medium สำหรับเลี้ยงเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ ND213 ควรมีเมทานอล 2 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชม. พบเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 0.93 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ โปรตีนภายในเซลล์เท่ากับ 34.14 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง และมีการเจริญเท่ากับ 0.64 กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร ซึ่งความเข้มข้นของเมทไธโอนีนอิสระที่เวลา 24 ชม.นี้ มีค่าไม่แตกต่างจากค่าสูงสุดที่พบเมื่อเลี้ยงยีสต์ ND213 ในอาหารที่มีเมทานอล 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชม. เช่นกัน ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้เมทานอล 2 เปอร์เซ็นต์ เพื่อประหยัดต้นทุนการผลิต รวมทั้งเพื่อป้องกันการยับยั้งการเจริญของยีสต์โดยเมทานอลความเข้มข้นสูง ๆ ด้วย

9.2 ชนิดของแหล่งไนโตรเจน

นำเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ ND035 และ ND213 มาเลี้ยงในอาหารเหลว methanol medium ที่มีเมทานอล 3 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แล้วเพาะเลี้ยงตามวิธีในข้อ 9.2

การพิจารณาผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจน ต่อการผลิตเมทไธโอนีนและการเจริญของยีสต์ ผู้วิจัยใช้หลักการเดียวกันกับการพิจารณาผลของความเข้มข้นของเมทานอล คือ จะพิจารณาเมื่อยีสต์มีการเจริญเข้าสู่ระยะ exponential phase ซึ่งเริ่มต้นตั้งแต่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 24 ชม. เป็นต้นไป เพื่อป้องกันการแปรผลที่คลาดเคลื่อน อันเนื่องมาจากกล้าเชื้อที่เจริญในอาหาร YPD ที่มีกลูโคสและยีสต์เอกซ์แทรกเป็นองค์ประกอบสำคัญ

การเลี้ยงเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ ND035 ในอาหารเหลว methanol medium ที่มีเมทานอล 3 เปอร์เซ็นต์ และผันแปรแหล่งไนโตรเจน 3 ชนิด โดยคำนวณให้ความเข้มข้นสุดท้ายของแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดมีปริมาณไนโตรเจนเท่ากัน คือ แอมโมเนียมคลอไรด์เข้มข้น 0.76 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0.94 เปอร์เซ็นต์ หรือยูเรียเข้มข้น 4.29 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการเจริญของยีสต์กลายพันธุ์ ND035 และ ND213 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์และแอมโมเนียมซัลเฟต มีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก ขณะที่ตรวจไม่พบการเจริญของยีสต์กลายพันธุ์ ND035 และ ND213 เมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน (ภาพที่ 5ค และ 5ฉ) เมื่อพิจารณา ชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้างเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจนนั้น ยีสต์กลายพันธุ์ ND035 มีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 1.55 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ที่เวลา 24 ชม. ขณะที่เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ตรวจพบเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงสุดเท่ากัน แต่ต้องเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชม. (ภาพที่ 5ก) ส่วนการเลี้ยงยีสต์กลายพันธุ์ ND213 ในอาหารที่มีเมทานอล 2 เปอร์เซ็นต์ และใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน ตรวจพบเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 1.43 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ที่เวลา 48 ชม. ของการเพาะเลี้ยง ขณะที่เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ตรวจพบเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 1.69 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ที่เวลา 24 ชม. ของการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 5ง)



ภาพที่ 5 ความเข้มข้นของเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ (ก และ ง) โปรตีนภายในเซลล์ (ข และ จ) และการเจริญ (ค และ ฉ) ที่เวลาต่าง ๆ ของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ ND035 (ก-ค) และ ND213 (ง-ฉ) เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเมทานอลความเข้มข้น 3 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีแอมโมเนียมคลอไรด์เข้มข้น 0.76 เปอร์เซ็นต์ (○) แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0.94 เปอร์เซ็นต์ (□) หรือยูเรีย 4.29 เปอร์เซ็นต์ (△) เป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาตรอาหาร 100 มล. บรรจุในฟลาสก์ขนาด 500 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส

เมื่อเลี้ยงยีสต์กลายพันธุ์ ND035 ในอาหารเหลว methanol medium ที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน ตรวจพบโปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 61.64 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ที่เวลา 72 ชม. ขณะที่เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน พบโปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 54.31 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ที่เวลา 96 ชม. (ภาพที่ 5ข) ส่วนการเลี้ยงยีสต์กลายพันธุ์ ND213 ในอาหารที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน พบโปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 47.00 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ที่เวลา 96 ชม. ขณะที่เมื่อใช้แอมโมเนียมซัล

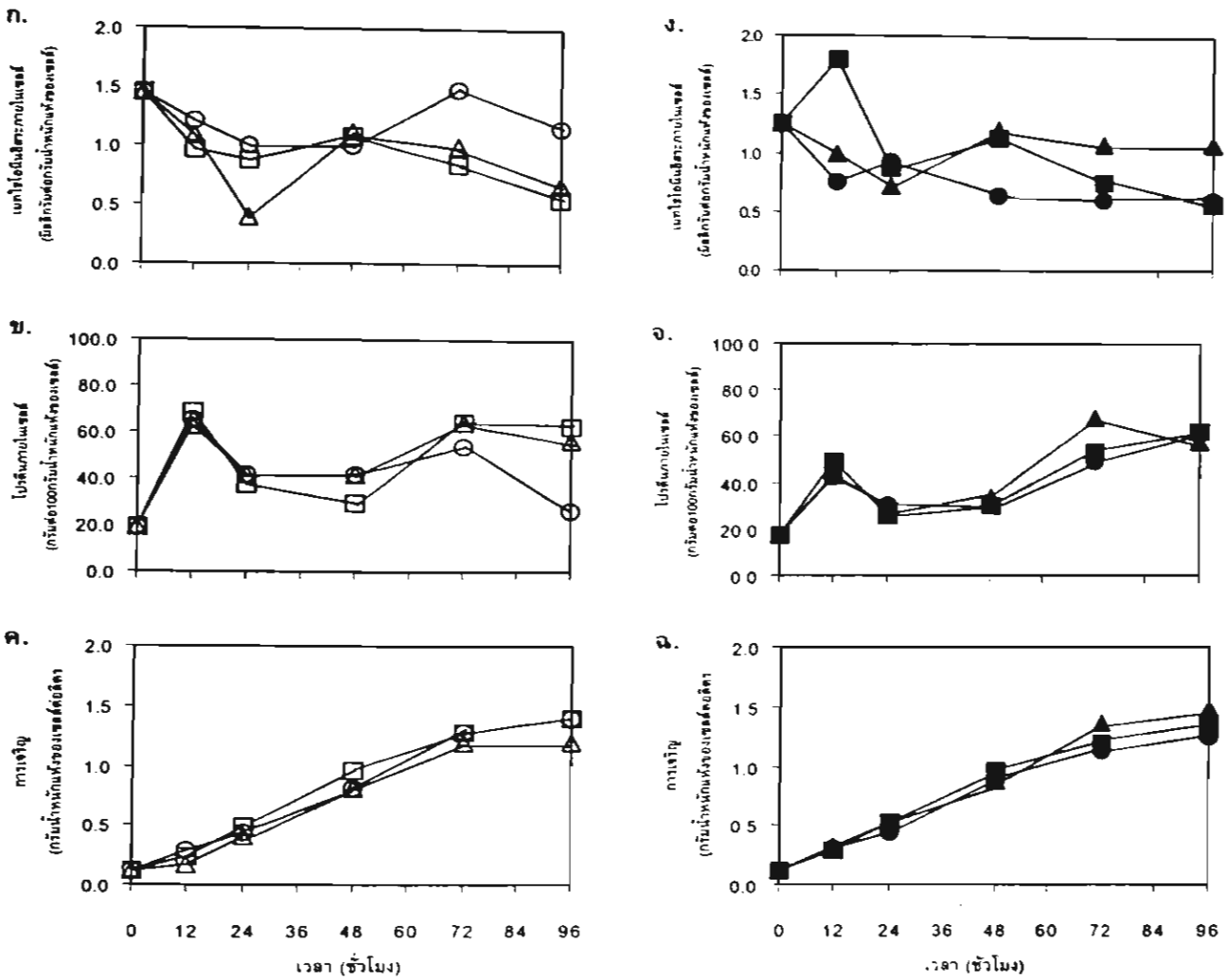
เฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน พบโปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 50.10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ที่เวลา 96 ชม. (ภาพที่ 5จ)

ผลการทดลองจากภาพที่ 5 สรุปได้ว่า เมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ ND035 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แอมโมเนียมคลอไรด์และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนนั้น ตรวจพบเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงสุดเท่ากัน คือ 1.55 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ แต่เมื่อใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ใช้เวลาเพาะเลี้ยงสั้นกว่า ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์กลายพันธุ์ ND035 ต่อไป และได้เลือกแอมโมเนียมซัลเฟตสำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์กลายพันธุ์ ND213 ต่อไป เนื่องจากพบเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์เท่ากับ 1.69 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ที่เวลา 24 ชม.ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งค่าที่ตรวจพบนี้ไม่แตกต่างมากนักจากค่าสูงสุดที่ตรวจพบที่เวลา 48 ชม.ของการเพาะเลี้ยง (1.74 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์)

9.3 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

การเลี้ยงยีสต์กลายพันธุ์ ND035 ในอาหารเหลว methanol medium ที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.15, 0.76 และ 1.52 เปอร์เซ็นต์ เพื่อศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อการเจริญ การสร้างโปรตีน และการสะสมเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ (ตามวิธีในข้อ 9.3) พบว่าการเจริญของยีสต์ ND035 ไม่แตกต่างกันมากนักเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่าง ๆ ในช่วงที่ทำการทดลอง (ภาพที่ 6ค) เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของเมทไธโอนีนอิสระ และโปรตีนภายในเซลล์ ภายหลังเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชม.ไปแล้ว พบว่าเมื่อเลี้ยงยีสต์ในอาหารที่เติมแอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ ตรวจพบเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 1.51 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ และโปรตีนภายในเซลล์เท่ากับ 55.07 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ที่เวลา 72 ชม. ซึ่งมีค่าสูงกว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้นอื่น

ส่วนการเลี้ยงยีสต์กลายพันธุ์ ND213 ในอาหารเหลว methanol medium ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 0.19, 0.94 และ 1.88 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการเจริญของยีสต์ ND213 ไม่แตกต่างกันมากนักเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่าง ๆ ในช่วงที่ทำการทดลอง (ภาพที่ 6ฉ) เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ยีสต์ ND213 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชม. ในอาหารที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.94 และ 1.88 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีเมทไธโอนีนอิสระใกล้เคียงกัน คือ 1.15 และ 1.23 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ตรวจพบนี้สูงกว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0.19 เปอร์เซ็นต์ ที่พบเมทไธโอนีนอิสระสูงสุดเท่ากับ 0.92 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ภายหลังเพาะเลี้ยง 24 ชม. (ภาพที่ 6ง) สำหรับปริมาณโปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์ยีสต์ ND213 พบว่าไม่แตกต่างกันมากนัก เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (ภาพที่ 6จ)



ภาพที่ 6 ความเข้มข้นของเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ (ก และ ง) โปรตีนภายในเซลล์ (ข และ จ) และการเจริญ (ค และ ฉ) ที่เวลาต่าง ๆ ของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ ND035 (ก-ค) และ ND213 (ง-ฉ) เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเมทานอลความเข้มข้น 3 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสำหรับยีสต์ ND035 มีแอมโมเนียมคลอไรด์เข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ (○) 0.76 เปอร์เซ็นต์ (□) หรือ 1.53 เปอร์เซ็นต์ (△) สำหรับยีสต์ ND213 มีแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0.19 เปอร์เซ็นต์ (●) 0.94 เปอร์เซ็นต์ (■) หรือ 1.88 เปอร์เซ็นต์ (▲) เป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาตรอาหาร 100 มล. บรรจุในฟลาสก์ขนาด 500 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส

จากผลการทดลองข้างต้นอาจสรุปได้ว่า แอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมสำหรับเลี้ยงเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ ND035 เนื่องจากพบเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 1.51 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ โปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 55.07 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง และการเจริญเท่ากับ 1.29 กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร ที่เวลา 72 ชม.ของการเพาะเลี้ยง ส่วนเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ ND213 นั้น ควรใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0.94 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน เพื่อลดต้นทุนการผลิต เนื่องจากยีสต์มีเมทไธโอ

นีนอิสระภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 1.15 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการเลี้ยงเมื่อมีแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 1.88 เปอร์เซ็นต์ (1.23 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์)

10. การศึกษาอิทธิพลของสารประกอบอนินทรีย์ซิลีเนียมต่อการเจริญของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์

เมื่อเลี้ยงเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ ND035 ในอาหารเหลว methanol medium ที่มีเมทานอล 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน มีแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.15 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน และเติมโซเดียมซิลีเนต ให้มีความเข้มข้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 30, 300 และ 3000 ไมโครกรัมต่อมล. แล้วเลี้ยงเชื้อตามวิธีการข้อ 10.1 พบว่ายีสต์กลายพันธุ์ ND035 สามารถเจริญได้ เมื่อมีโซเดียมซิลีเนตเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อ มล. โดยมีค่าการเจริญเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า และตรวจไม่พบการเจริญของเชื้อนี้เมื่อมีโซเดียมซิลีเนตเข้มข้น 300 และ 3000 ไมโครกรัมต่อ มล. ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมโซเดียมซิลีไนด์ ก็ไม่พบการเจริญของเชื้อนี้เช่นกันในทุกความเข้มข้นที่ทำการทดสอบ (30, 300 และ 3000 ไมโครกรัมต่อมล.)

ส่วนเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ ND213 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว methanol medium ที่มีเมทานอล 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน มีแอมโมเนียมซัลเฟต 0.94 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน และเติมโซเดียมซิลีเนต หรือโซเดียมซิลีไนด์ ความเข้มข้น 30, 300 และ 3000 ไมโครกรัมต่อมล. พบว่ายีสต์ ND213 สามารถเจริญเพิ่มขึ้นเป็น 4.5 และ 3 เท่า เมื่อเติมโซเดียมซิลีเนต 30 และ 300 ไมโครกรัมต่อมล. แต่ตรวจไม่พบการเจริญเลยเมื่อเติมโซเดียมซิลีเนต 3000 ไมโครกรัมต่อมล. และโซเดียมซิลีไนด์ ทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 การเจริญของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ ND035 และ ND213 (กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร)เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชม. ในอาหารเหลว methanol broth ที่มีความเข้มข้นของเมทานอล ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ และเติมสารประกอบอนินทรีย์ซิลีเนียมความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยใช้ปริมาตรอาหาร 100 มล. ในฟลาสก์ขนาด 500 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุน ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส

รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นของโซเดียมซิลีเนต (ไมโครกรัมต่อมล.)			ความเข้มข้นของโซเดียมซิลีไนด์ (ไมโครกรัมต่อมล.)		
	30	300	3000	30	300	3000
ND035	0.42	0.25	0.21	0.23	0.21	0.21
ND213	0.85	0.56	0.17	0.24	0.23	0.23

หมายเหตุ ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น เท่ากับ 0.19 กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร

จากผลการทดลองข้างต้นแสดงว่า ยีสต์กลายพันธุ์ ND035 ถูกยับยั้งการเจริญเมื่อมีโซเดียมซิลิเนตความเข้มข้น 300 และ 3000 ไมโครกรัมต่อมล. ส่วนยีสต์กลายพันธุ์ ND213 ถูกยับยั้งการเจริญเมื่อเติมโซเดียมซิลิเนต 3000 ไมโครกรัมต่อมล. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับโซเดียมซิลิไนต์นั้นมีผลยับยั้งการเจริญของยีสต์กลายพันธุ์ทั้งสองสายพันธุ์ ที่ทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ ดังนั้นเพื่อป้องกันการยับยั้งการเจริญของยีสต์โดยสารประกอบอนินทรีย์ซิลิเนียม ในการทดลองต่อไปผู้วิจัยจึงลดความเข้มข้นของสารประกอบอนินทรีย์ซิลิเนียมทั้งสองชนิดลง โดยเลือกใช้โซเดียมซิลิเนตหรือโซเดียมซิลิไนต์เข้มข้น 5, 10 และ 15 ไมโครกรัมต่อมล. สำหรับเติมลงในอาหารเลี้ยงยีสต์กลายพันธุ์ ND035 ส่วนอาหารเลี้ยงยีสต์กลายพันธุ์ ND213 เติมโซเดียมซิลิเนตเข้มข้น 10, 20 และ 30 ไมโครกรัมต่อมล. หรือโซเดียมซิลิไนต์ 5, 10 และ 15 ไมโครกรัมต่อมล. เพื่อศึกษาการสะสมซิลิเนียม การสร้างเมทไธโอนีนอิสระ และโปรตีนภายในเซลล์ยีสต์ต่อไป

11. การศึกษาการสะสมซิลิเนียมภายในเซลล์เมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์

11.1 เมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ ND035

เมื่อเลี้ยงยีสต์กลายพันธุ์ ND035 เป็นเวลา 30 ชม. ในอาหารที่มีเมทานอล 3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน มีแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.15 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และเติมโซเดียมซิลิเนตเข้มข้น 5, 10 และ 15 ไมโครกรัมต่อมล. พบซิลิเนียมภายในเซลล์ยีสต์ เท่ากับ 240, 570 และ 760 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ตามลำดับ และเมื่อเติมโซเดียมซิลิไนต์เข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมล. พบซิลิเนียมภายในเซลล์ยีสต์ เท่ากับ 590 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ (ซิลิเนียมภายในเซลล์เริ่มต้นมีเพียง 0.64 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) และพบว่าโซเดียมซิลิไนต์เข้มข้น 10 และ 15 ไมโครกรัมต่อมล. มีผลยับยั้งการเจริญของยีสต์กลายพันธุ์ ND035 ถ้าเปรียบเทียบอัตราการสะสมซิลิเนียมภายในเซลล์กับซิลิเนียมในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า ยีสต์สะสมซิลิเนียมภายในเซลล์ได้สูงสุด คือ 34.95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมซิลิไนต์เข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมล. ขณะที่เมื่อเติมโซเดียมซิลิเนต 5, 10 และ 15 ไมโครกรัมต่อมล. ยีสต์สะสมซิลิเนียมได้เท่ากับ 17.61, 15.68 และ 14.60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

สำหรับการเจริญของยีสต์กลายพันธุ์ ND035 ในอาหารที่มีสารประกอบอนินทรีย์ซิลิเนียมชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่ายีสต์มีการเจริญสูงสุด (0.56 กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร) เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมซิลิเนต 5 ไมโครกรัมต่อมล. และมีการเจริญเท่ากับ 0.42 และ 0.44 กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมซิลิเนต 10 และ15 ไมโครกรัมต่อมล. ตามลำดับ ขณะที่เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมซิลิไนต์ 5 ไมโครกรัมต่อมล. ยีสต์มีการเจริญ 0.49 กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร ส่วนอาหารที่เติมโซเดียมซิลิไนต์ 10 และ 15 ไมโครกรัมต่อมล. นั้นไม่พบการเจริญของยีสต์ (ตารางที่ 6)

เมื่อพิจารณาผลของสารประกอบอนินทรีย์ซิลิเนียม ต่อความเข้มข้นของโปรตีนภายในเซลล์ พบว่ายีสต์มีปริมาณโปรตีนสูงสุด เท่ากับ 50.57 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมซิลิเนต 10 ไมโครกรัมต่อมล. เมื่อเติมโซเดียมซิลิเนต 5 และ 15 ไมโครกรัมต่อมล. พบโปรตีนภายในเซลล์ เท่ากับ 41.82 และ 38.75 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และเมื่อเติม

โซเดียมซิลีไนด์ 5 ไมโครกรัมต่อมล. พบโปรตีนภายในเซลล์ เท่ากับ 64.98 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง

การศึกษาผลของสารประกอบอนินทรีย์ซิลีเนียมต่อการสะสมเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ พบเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงสุด เท่ากับ 0.47 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมซิลีเนต 10 ไมโครกรัมต่อมล. ขณะที่เมื่อเติมโซเดียมซิลีเนต 5 และ 15 ไมโครกรัมต่อมล. พบเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ เท่ากับ 0.08 และ 0.46 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ตามลำดับ และเมื่อเติมโซเดียมซิลีไนด์ 5 ไมโครกรัมต่อมล. พบเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ เท่ากับ 1.31 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์

ตารางที่ 6 การเจริญ เมทไธโอนีนอิสระ โปรตีน และซิลีเนียมภายในเซลล์ของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ ND035 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 30 ชม. ในอาหารเหลว methanol broth ที่มีเมทานอล 3 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.15 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และเติมโซเดียมซิลีเนตหรือโซเดียมซิลีไนด์ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ปริมาตรอาหาร 100 มล. ในฟลาสก์ขนาด 500 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุน ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส

ตัวแปร	โซเดียมซิลีเนต (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)			โซเดียมซิลีไนด์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	5	10	15	5	10	15
การเจริญ[1]	0.56	0.42	0.44	0.49	0.12	0.12
เมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์[2]	0.08	0.47	0.46	1.31	ND	ND
โปรตีนภายในเซลล์[3]	41.82	50.57	38.75	64.98	ND	ND
ซิลีเนียมภายในเซลล์[4]	240	570	760	590	ND	ND
ซิลีเนียมในเซลล์ต่อซิลีเนียมในอาหาร[5]	17.61	15.68	14.60	34.95	ND	ND

หมายเหตุ [1] กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร โดยความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น เท่ากับ 0.19 กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร

[2] มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์

[3] เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง

[4] ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์

[5] เปอร์เซ็นต์

ND หมายถึงไม่ได้ทำการทดสอบ

11.2 เมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ ND213

เมื่อเลี้ยงยีสต์กลายพันธุ์ ND213 ในอาหารที่มีเมทานอล 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และมีแอมโมเนียมซัลเฟต 0.94 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยเติมโซเดียมซิลีเนตเข้มข้น 10, 20 และ 30 ไมโครกรัมต่อมล. พบซิลีเนียมภายในเซลล์ยีสต์ เท่ากับ 60, 100 และ 150 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ตามลำดับ เมื่อเติมโซเดียมซิลีไนต์เข้มข้น 5, 10 และ 15 ไมโครกรัมต่อมล. พบซิลีเนียมภายในเซลล์เท่ากับ 1290, 2190 และ 2720 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ตามลำดับ ขณะที่ปริมาณซิลีเนียมภายในเซลล์เริ่มต้นมีเพียง 0.54 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบอัตราการสะสมซิลีเนียมภายในเซลล์กับซิลีเนียมในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเมื่อใช้โซเดียมซิลีเนตเป็นแหล่งอนินทรีย์ซิลีเนียม อัตราการสะสมซิลีเนียมภายในเซลล์มีค่าต่ำมาก คือ 2.04, 1.70 และ 1.67 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเติมโซเดียมซิลีเนต 10, 20 และ 30 ไมโครกรัมต่อมล. ตามลำดับ ขณะที่เมื่อเติมโซเดียมซิลีไนต์ 5, 10 และ 15 ไมโครกรัมต่อมล. ยีสต์มีอัตราการสะสมซิลีเนียมสูงกว่ามาก คือ 76.41, 64.86 และ 50.42 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 7)

ยีสต์กลายพันธุ์ ND213 มีการเจริญไม่แตกต่างกัน เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีโซเดียมซิลีเนตความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ทดสอบ (ค่าการเจริญ 0.51-0.52 กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร) เช่นเดียวกับเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมซิลีไนต์ ความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งมีค่าการเจริญอยู่ในช่วง 0.46-0.49 กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร

เมื่อพิจารณาผลของสารประกอบอนินทรีย์ซิลีเนียมต่อความเข้มข้นของโปรตีนภายในเซลล์ พบว่ายีสต์กลายพันธุ์ ND213 มีปริมาณโปรตีนภายในเซลล์สูงสุด เท่ากับ 43.00 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมซิลีไนต์ 5 ไมโครกรัมต่อมล. และในอาหารที่เติมโซเดียมซิลีไนต์ 10 และ 15 ไมโครกรัมต่อมล. พบโปรตีนภายในเซลล์ เท่ากับ 32.84 และ 22.88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมซิลีเนต 10 ไมโครกรัมต่อมล. ยีสต์ ND213 มีปริมาณโปรตีนภายในเซลล์ เท่ากับ 34.56 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ในอาหารที่เติมโซเดียมซิลีเนต 20 และ 30 ไมโครกรัมต่อมล. พบปริมาณโปรตีนภายในเซลล์ เท่ากับ 26.76 และ 32.14 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การศึกษาผลของสารประกอบอนินทรีย์ซิลีเนียม ต่อปริมาณเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์พบว่า ยีสต์กลายพันธุ์ ND213 มีปริมาณเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงสุด เท่ากับ 4.08 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมซิลีเนต 10 ไมโครกรัมต่อมล. แต่ปริมาณเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์มีค่าลดลงเป็น 3.63 และ 3.44 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมซิลีเนต 20 และ 30 ไมโครกรัมต่อมล. ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงยีสต์ ND213 ในอาหารที่เติมโซเดียมซิลีไนต์ พบว่ามีปริมาณเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมซิลีเนต โดยมีค่าเมทไธโอนีนอิสระเท่ากับ 0.25, 0.15 และ 1.34 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในสภาวะที่มีโซเดียมซิลีไนต์ 5, 10 และ 15 ไมโครกรัมต่อมล. ตามลำดับ

ตารางที่ 7 การเจริญ เมทไธโอนีนอิสระ โปรตีน และซิลีเนียมภายในเซลล์ของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ ND213 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 30 ชม. ในอาหารเหลว methanol broth ที่มีเมทานอล 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน แอมโมเนียมซัลเฟต 0.94 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และเติมโซเดียมซิลีเนตหรือโซเดียมซิลีไนต์ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ปริมาตรอาหาร 100 มล. ในฟลาสก์ขนาด 500 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุน ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส

ตัวแปร	โซเดียมซิลีเนต (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)			โซเดียมซิลีไนต์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	10	20	30	5	10	15
การเจริญ[1]	0.52	0.52	0.51	0.49	0.49	0.46
เมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์[2]	4.08	3.63	3.44	0.25	0.15	1.34
โปรตีนภายในเซลล์[3]	34.56	26.76	32.14	43.00	32.84	22.68
ซิลีเนียมภายในเซลล์[4]	60	100	150	1290	2190	2720
ซิลีเนียมในเซลล์ต่อซิลีเนียมในอาหาร[5]	2.04	1.70	1.67	76.41	64.86	50.42

หมายเหตุ [1] กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร โดยความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น เท่ากับ 0.19 กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร

[2] มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์

[3] เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง

[4] ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์

[5] เปอร์เซ็นต์

ND หมายถึงไม่ได้ทำการทดสอบ

เมื่อพิจารณาผลของสารประกอบอนินทรีย์ซิลีเนียม จากผลการทดลองในตารางที่ 6 และ 7 พบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมซิลีไนต์ ยีสต์กลายพันธุ์ทั้งสองสายพันธุ์มีแนวโน้ม ที่จะสะสมซิลีเนียมภายในเซลล์ได้ สูงกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมซิลีเนตที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน อย่างไรก็ตามโซเดียมซิลีไนต์เข้มข้น 10 และ 15 ไมโครกรัมต่อมล. มีผลยับยั้งการเจริญของยีสต์กลายพันธุ์ ND035 ดังนั้นหากต้องการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง ความเข้มข้นของโซเดียมซิลีไนต์ต่อปริมาณซิลีเนียมภายในเซลล์ของยีสต์กลายพันธุ์ ND035 อาจต้องลดปริมาณโซเดียมซิลีไนต์ที่เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยอาจใช้ความเข้มข้น 1, 3, 5, 7 และ 9 ไมโครกรัมต่อมล. เป็นต้น นอกจากนี้เมื่อใช้โซเดียมซิลีไนต์ 15 ไมโครกรัมต่อมล. ตรวจพบปริมาณซิลีเนียมภายในเซลล์ของยีสต์กลายพันธุ์ ND213 สูงถึง 2720 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ซึ่งมีค่าสูงกว่าปริมาณซิลีเนียมภายในเซลล์ซิลีเนียมยีสต์ที่จำหน่ายในเชิงการค้า ซึ่งมีค่าเท่ากับ 210 ไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่าง (Wolf *et al.*, 2001) และสูงกว่าค่าที่ตรวจพบภายในเซลล์ *Saccharomyces cerevisiae* (1200-1400

ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์) ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมซิลีไนด์เข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมล. (Suhajda *et al.*, 2000)

สรุปผลการวิจัย (Results)

ผู้วิจัยได้รวบรวมเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่สามารถใช้เมทานอลเพื่อการเจริญ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จำนวนทั้งสิ้น 60 ไอโซเลท ไว้เพื่อการคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่มีโปรตีนและเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูง (1 ไอโซเลท จากการคัดเลือกจากยีสต์ที่เก็บรักษาอยู่ที่ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จำนวน 459 ไอโซเลทและยีสต์ที่เก็บรักษาอยู่ที่หน่วยจุลชีววิทยาประยุกต์ ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยเรือนปลูกพืชทดลอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จำนวน 212 ไอโซเลท และอีก 59 ไอโซเลท ได้มาจากการแยกและคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์จากตัวอย่างธรรมชาติได้แก่ ดิน น้ำ ดอกไม้ ลูกไม้ จำนวนทั้งสิ้น 185 ตัวอย่าง)

เมื่อพิจารณาการเจริญของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ทั้ง 60 ไอโซเลทที่รวบรวมได้ บนอาหารแข็งที่มีเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก พบว่าสามารถแบ่งยีสต์ได้เป็น 2 กลุ่มตามลักษณะการสร้างและไม่สร้างเส้นใยเทียม (pseudomycelium) โดยพบยีสต์ที่สร้างเส้นใยเทียม จำนวน 36 ไอโซเลท และยีสต์ที่ไม่สร้างเส้นใยเทียม จำนวน 24 ไอโซเลท และพบว่ายีสต์กลุ่มที่สร้างเส้นใยเทียมทุกไอโซเลทไม่สามารถเจริญในอาหารเหลว 1% methanol medium ส่วนกลุ่มที่ไม่สร้างเส้นใยเทียมนั้นสามารถเจริญได้ โดยพบว่าไอโซเลท N007 มีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงที่สุด คือ 0.52 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ มีการเจริญเท่ากับ 2.82 กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร และโปรตีนภายในเซลล์เท่ากับ 21.18 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง เมื่อเลี้ยงนาน 72 ชม. จึงเลือกยีสต์ไอโซเลท N007 มาทำการปรับปรุงพันธุกรรมเพื่อเพิ่มการสะสมเมทไธโอนีนภายในเซลล์ให้สูงขึ้นต่อไป

การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ N007 ด้วยสารเคมี NTG แล้วคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ที่มีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูง โดยอาศัยหลักการที่เชื้อกลายพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อเอทไธโอนีน (ethionine) ซึ่งเป็น analogue ของเมทไธโอนีนอิสระ ที่ระดับสูงขึ้นกว่าสายพันธุ์เดิม อาจมีความเข้มข้นของเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงขึ้นกว่าสายพันธุ์เดิม พบเชื้อกลายพันธุ์ที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีนเข้มข้น 1400 ไมโครกรัมต่อมล. จำนวน 142 โคโลนี เมื่อนำมาเลี้ยงเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ พบว่าเชื้อกลายพันธุ์ MN007-67 มีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงที่สุด คือ 1.71 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ และมีโปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์เท่ากับ 18.31 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 3) จึงคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ MN007-67 มาทำการกลายพันธุ์ซ้ำอีกครั้ง เพื่อให้สามารถสะสมเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ได้สูงขึ้น พบว่ามีเชื้อกลายพันธุ์สองครั้งจำนวน 309 โคโลนี ที่สามารถต้านทานต่อเอทไธโอนีนที่ความเข้มข้นสูงขึ้น คือ 2000 ไมโครกรัมต่อมล. จึงนำเชื้อกลายพันธุ์ทั้ง 309 โคโลนี มาเลี้ยงในอาหารเหลว 1% methanol medium เป็นเวลา 72 ชม. พบว่ามียีสต์กลายพันธุ์เพียง 19 สายพันธุ์ที่มีการเจริญมากพอที่จะทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและเมทไธโอนีนอิสระได้ จึงนำยีสต์กลายพันธุ์สองครั้งทั้ง 19 สายพันธุ์นี้มาเลี้ยงพร้อมกับยีสต์กลายพันธุ์ MN007-67 และยีสต์สายพันธุ์เดิมคือ N007 แล้วตรวจวัดการเจริญ ปริมาณโปรตีนและเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชม. พบว่า เมทิล

โลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ ND035 มีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงที่สุด คือ 2.37 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ และยีสต์กลายพันธุ์ ND213 มีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงเป็นอันดับสอง คือ 1.55 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ขณะที่โปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์ของยีสต์ ND035 และ ND213 เท่ากับ 29.18 และ 18.14 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (ตารางที่ 4) ผู้วิจัยจึงได้คัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ ND035 และ ND213 ไว้ศึกษาต่อไป

เมื่อนำเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ N007 และยีสต์กลายพันธุ์ MN007-67, ND035 และ ND213 มาเลี้ยงในอาหารเหลว 1% methanol medium เพื่อวิเคราะห์การเจริญ เมทไธโอนีนอิสระ และโปรตีนภายในเซลล์ พบว่ายีสต์ N007 มีความเข้มข้นของเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 0.51 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ที่เวลา 96 ชม. ขณะที่ยีสต์กลายพันธุ์ MN007-67, ND035 และ ND213 มีปริมาณเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 0.64, 1.27 และ 0.46 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48, 96 และ 96 ชม. ตามลำดับ

การศึกษาอิทธิพลขององค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสะสมเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ ND035 และ ND213 พบว่ายีสต์กลายพันธุ์ ND035 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเมทานอล 3 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน และมีแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.15 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน มีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 1.51 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ โปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์เท่ากับ 55.07 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง และการเจริญเท่ากับ 1.29 กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร ที่เวลา 72 ชม. ของการเพาะเลี้ยง ส่วนยีสต์กลายพันธุ์ ND213 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเมทานอล 2 เปอร์เซ็นต์ และมีแอมโมเนียมซัลเฟต 0.94 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน มีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงสุด 1.15 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ โปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์เท่ากับ 30.13 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง และมีการเจริญเท่ากับ 0.99 กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร ที่เวลา 48 ชม. ของการเพาะเลี้ยง

การทดลองเติมสารประกอบอนินทรีย์ซิลีเนียม ในรูปโซเดียมซิลีเนตและโซเดียมซิลีไนต์ พบว่าโซเดียมซิลีเนตเข้มข้น 300 และ 3000 ไมโครกรัมต่อมล. ยับยั้งการเจริญของยีสต์กลายพันธุ์ ND035 และความเข้มข้น 3000 ไมโครกรัมต่อมล. ยับยั้งการเจริญของยีสต์ ND213 ส่วนโซเดียมซิลีไนต์ความเข้มข้น 30, 300 และ 3000 ไมโครกรัมต่อมล. ยับยั้งการเจริญของยีสต์กลายพันธุ์ทั้งสองสายพันธุ์ การศึกษาความสามารถในการสะสมซิลีเนียมในเซลล์ของยีสต์กลายพันธุ์ ND035 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีองค์ประกอบเหมาะสม และมีโซเดียมซิลีเนตหรือโซเดียมซิลีไนต์ ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 ไมโครกรัมต่อมล. พบว่ายีสต์ ND035 สะสมซิลีเนียมภายในเซลล์ได้สูงสุด เท่ากับ 760 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมซิลีเนตเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมล. (อัตราการสะสมซิลีเนียมเท่ากับ 14.60 เปอร์เซ็นต์) ขณะที่เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีโซเดียมซิลีไนต์เข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมล. พบซิลีเนียมภายในเซลล์เท่ากับ 590 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ (อัตราการสะสมซิลีเนียมเท่ากับ 34.95 เปอร์เซ็นต์) และไม่พบการเจริญของยีสต์กลายพันธุ์ ND035 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมซิลีไนต์เข้มข้น 10 และ 15 ไมโครกรัมต่อมล. ส่วนยีสต์กลายพันธุ์ ND213 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีองค์ประกอบเหมาะสม และมีโซเดียมซิลีเนต ความ

เข้มข้น 10, 20 และ 30 ไมโครกรัมต่อมล. หรือโซเดียมซิลีไนด์ ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 ไมโครกรัมต่อมล. พบว่ามีซิลีเนียมภายในเซลล์สูงสุดเพียง 150 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ (อัตราการสะสมซิลีเนียมเท่ากับ 1.67 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีโซเดียมซิลีเนตเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมล. ขณะที่เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมซิลีไนด์เข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมล. มีซิลีเนียมภายในเซลล์สูงสุดถึง 2720 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ (อัตราการสะสมซิลีเนียมเท่ากับ 50.42 เปอร์เซ็นต์)

ถึงแม้ว่าเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ยีสต์กลายพันธุ์ที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ ยังคงมีปริมาณเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ไม่สูงกว่าค่าที่เคยมีรายงานในยีสต์ชนิดอื่นมากนัก ผู้วิจัยคาดว่าข้อมูลที่ได้รับจากการศึกษาการสะสมซิลีเนียมภายในเซลล์ยีสต์กลายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ จะสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาทางสรีรวิทยา การปรับปรุงสายพันธุ์ รวมทั้งการประยุกต์ใช้เมทิลโลโทรฟิกยีสต์ เพื่อการผลิตซิลีเนียมยีสต์หรือการผลิตสารเมแทบอไลท์ที่มีประโยชน์จากยีสต์กลุ่มนี้ ต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง (References)

ชุติมา ดิษเย็น. 2542. การสร้างยีสต์สายพันธุ์ใหม่ที่มีเมทไธโอนีนและไลซีนอิสระสูงเพื่อใช้เป็นแหล่งโปรตีนคุณภาพสูงโดยเทคนิคโปรโตพลาสฟิวชัน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

มาลินี ลิ้มโภคา. 2537. พิษวิทยาและปัญหาที่พบในสัตว์. กรุงเทพฯ. 364 น.

รัฐดา จันกลั่น. 2539. การปรับปรุงพันธุกรรมและการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยง *Saccharomyces cerevisiae* ที่มีเมทไธโอนีนภายในเซลล์สูง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สมปอง พูลทั่วญาติ. 2543. ผลการเสริมซิลีเนียมยีสต์ในอาหารไก่ไข่ต่อสมรรถภาพการผลิต คุณภาพไข่ และการสะสมซิลีเนียมในไข่. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สิรินทร์ พิบูลนิยม, เครือวัลย์ โสภาสรรค์, ธนิต คูสำราญ และพิณทิพ รื่นวงษา. 2538. ชีวเคมีพื้นฐาน. มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช. 1038 น.

Anthony, C. 1982. The Biochemistry of Methylotrophs. Academic Press, London. pp. 269-295

Arthur, J.R. 1997. Nonglutathione peroxidase function of selenium, pp. 143-154. *In* T.P. Lyons and K.A. Jackques (eds.) Biotechnology in the Feed Industry. Proceeding of altech Symposium. Nottingham University Press, United Kingdom.

Baratti, J., R. Couderc, C. L. Cooney and D. I. C. Wang 1978. Preparation and properties of immobilized methanol oxidase. Biotech. Bioeng. 20: 333.

Barnett, J. A., R. W. Payne and D. Yarrow 2000. Yeasts: Characteristics and Identification. 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge. 1139p.

Bender, D.A. 1975. Amino acid synthesized from aspartate, lysine, methionine (and cysteine), threonine and isoleucine (and leucine) and valine. Amino acid metabolism. Wiley, London. 234 p.

Brigidi, P. D., Matteuzzi and F. Fava. 1988. Use of protoplast fusion to introduce methionine overproduction into *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28: 268-271.

Cantor, A.H. and M.L. Scott. 1974. The effect of selenium in the hens' diet on egg production, hatchability, performance of progeny and selenium concentration in eggs. Poultry Sci. 53: 1870-1880.

Chanet, R. and R. C. Von-Borstel 1979. Genetic effects of formaldehyde in yeast III. Nuclear and cytoplasmic effects. Mutat. Res. 62: 239-253.

Chow, C.K. and A.L. Tappel. 1974. Response of glutathione peroxidase to dietary selenium in rats. J. Nutr. 104: 444-451.

Clare, J. J., F. B. Rayment, S. P. Ballantine, K. Sreekrishna and M. A. Romanos 1991. High level expression of tetanus toxin fragment C in Pichia pastoris strains containing multiple tandem integrations of the gene. Biotechnology 9: 455-460.

Colby, J., H. Dalton and R. Whittenbury 1979. Annual Rev. Microbiol. 33: 481.

Colby, J. and L.J. Zatman 1972. Biochem. J. 128: 1373.

Colombani, F., H. Cherest and H. de Robichon-Szulmajster. 1975. Biochemical and regulatory effects of methionine analogues in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 122: 375-384.

Combs, G. F. Jr. and M.L. Scott. 1977. Nutritional interrelationships of vitamin E and selenium. Bio. Sci. 27: 467-473.

Cregg, J. M. 1993. Recent advances in the expression of the foreign in *Pichia pastoris*. Bio/Technology. 11: 905-910.

Demirci, A. and A.L. Pometto III. 1999. Production of organically bound selenium yeast by continuous fermentation. J. Agric. Food Chem. 42: 2491-2495.

Demirci, A., A.L. Pometto III. And J.C. Donald. 1999. Enhanced organically bound selenium yeast production by fed-batch fermentation. J. Agric. Food Chem. 42: 2496-2500.

Denenu, E.D. and A. L. Demain 1981. Regulationship between genetic deregulation of *Hansenula polymorpha* and production of tryptophan metabolites. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 13: 202.

Douma, A.C., M. Veenhuis, W. de Koning, M. Evers and W. Harder 1985. Dihydroxyacetone synthase is localized in the peroxisomal matrix of methanol-grown *Hansenula polymorpha*. Arch. Microbiol. 143: 237-243.

Dunyak, S.A. and I.M. Cook. 1985. Continuous fermentor growth of a methionine overproducing mutant of *Candida uitilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 21: 182-186.

Eden, F.W., T.A. Carter and A. E. Sefton. 1996a. Improved feathering with dietary organic selenium and its modification due to litter material. Poulty Sci. 75 (suppl. 1): 114.

Eden, F.W., T.A. Carter and A. E. Sefton. 1996b. Influence of dietary selenium sources on post-mortem drip loss breast meat of broilers on different litters. Poulty Sci. 75 (suppl. 2): 60.

Eggeling, L., H. Sahm and F. Wagner 1977. Induction of FMN adenylyltransferase in the methanol utilizing yeast *Candida boidinii*. FEMS Microbiol. Lett. 1: 205.

Fidler, J.W., E.C. Naber and J.D. Latshaw. 1980. Effect of peroxides administration on selenium utilization, growth. Deficiency symptoms and glutathione peroxidase activity

in chicks fed control led selenium diet. Poulty Sci. 59: 141-148.

Fierobe, H.P., E. Mirgorodskaya, T. P. Frandsen, P. Roepstorff and B. Svensson 1997. Overexpression and characterization of *Aspergillus awamori* wild-type and mutant glucoamylase secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: Comparison with wild-type recombinant glucoamylase produced using *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus niger* as hosts. 1997. Protein Expression and Purification. 9: 159-170.

Gellissen, G., Z. A. Janowicz, A. Merckelbach, M, Piontek, P. Keup, U. Weydemann, C. P. Hollenberg and A. W. M. Strasser 1991. Heterologous gene expression in *Hansenula polymorpha*: efficient secretion of glucoamylase. Bio/Technol. 9: 291-295.

Gellissen, G. 2000. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. Appl. Microbiol. Biotechnol. 54: 741-750.

Golstein, J. and M.L. Scott. 1956. An electropholetic study of exudative diathesis in chicks. J. Nutr. 60: 349-359.

Goodman, J. M. 1985. Dihydroxyacetone synthase is an abundant constituent of the methanol-induced peroxisome of *Candida boidinii*. J. Biol. Chem. 260: 7108-7113.

Goodman, J. M., C. W. Scott, P. N. Donahue and J. P. Atherton 1984. Alcohol oxidase assembles post-translationally into the เพอร์ออกซิโซม of Candida boidinii. J. Biol. Chem. 259: 8485-8493.

Harder. W and A. G. Brooke 1990. Methylotrophic Yeast, pp. 395-428. In De Mot, H. V. R. Yeast: Biotechnology and Biocatalysis. Marcel dekker, New York.

Harder, W. and M. Veenhuis 1989 Metabolism of one-carbon compounds. Pp. 289-316. *In*. A.H. Rose and J.S. Harrison (eds) The Yeasts, Volume 3: Metabolism and physiology of yeasts. (2^{nd} ed) Academic Press, London.

Hazeu, W., J. C. de Bruijn and P. Bos 1972. Arch. Mikrobio. 87: 185.

Heiland, P.C. and F.F.Hill. 1993. Accumulation of S-adenosyl-homocystein and S-adenosyl-methionine by an ethionine-resistant mutant of baker yeasts. Process Biochem. 28: 171-177.

Isakova, E.P., L.V. Gorpenko, G.A. Zinchenko and A.P. Belov. 1996. Accumulation of selenium by yeast of the genus *Candida*. Mikrobiologiya. 65: 171-175.

Kaszyki, P., M. Tyszka, P. malec and H. Kooczek 2001. Formaldehyde and methanol biodegradation with the methylotrophic yeast Hansenula polymorpha. An application to real water treatment. Biodegradation 12(3): 169-177.

Kato, N., N. Miyawaki and C. Sakazawa 1983. Formaldehyde dehydrogenase from formaldehyde-resistant *Debaryomyces vanriji* FT-1 and *Pseudomonas putida* F61. Agric. Biol. Chem. 47: 415-416.

Kitamoto, H.K. and T. Nakahara. 1994. Isolation of L-methionine enriched mutant of Kluyveromyces lactis grown on whey permeate. Proc. Biochem. 29: 127-131.

Korhola, M., A. Vinio and K. Eddman. 1986. Selenium yeast. Ann. Clin. Res. 18: 65.

Ku, P.K., W.T. Ely, A.W. Groce and D.C. Ulrey. 1972. Natural dietary selenium, α-tocopherol and effect on tissue selenium. J. Anim. Sci. 34: 208-211.

Kurtzman, C. P. and J. W. Fell 1998. The yeasts: A taxonomic study. 4th ed. Elsevier Science, Amsterdam. 1055 p.

Latshaw, J.D. 1975. Natural and selenite selenium in the hen and egg. J. Nutr. 105: 32-37.

Lee, J. D. and K. Komagata 1980. J. Gen. Appl. Microbiol. 26: 133.

Levine, D. W. and C. L. Cooney 1973. Appl. Microbiol. 26: 982.

Lim, W.J., H. tani and H. C. Yang. 1990. Biochemical characterization of an L-methionine enriched mutant of a methylotrophic yeast, candida boidinii. J. Ferment. Bioeng. 69: 271-275.

Mahan, D.C. 1995. Selenium metabolism in animals: What role does selenium yeast have? pp. 257-267. In T.P. Lyons and K.A. Jackques (eds.) Biotechnology in the feed industry. Proceeding of Altech's 11th annual symposium., Nottingham University Press, UK

McDowell, L.R. 1992. Minerals in animal and human nutrition. Academic Press, Inc. San Diego, California. 524 p.

Monosov, E. Z., T. J. Wenzel, G. H. Luers, J. A. Heyman and S. Subramani 1996. Labelling of peroxisomes with green fluorescent protein in living P. pastoris cells. J. Histochem. Cytochem. 44: 581-589.

Morzycka, E. et al. 1976. Methionine overproduction by *Saccharomyces lipolytica*. Appl. Environ. Microbiol. 32: 125-130.

Mozley, D. A. Remberg and W. Gartner 1997. Large-scale generationof affinity-purified recombinant phytochrome chromopeptide. Photochem. Photobiol. 66: 710-715.

Murdanoto, A. P., Y. Sakai, T. Konishi, F. Yasuda, Y. Tani and N. Kato 1997a. Purification and properties of methylformate synthase, a mitochondrial alcohol dehydrogenase, participating in formaldehyde oxidation in methylotrophic yeasts. Appl. Environ. Microbiol. 63(5): 1715-1720.

Murdanoto, A. P., Y. Sakai, L. Sembiring, Y. Tani and N. Kato 1997b. Ester synthesis by NAD^+-dependent dehydrogenaseof hemiacetal: Production of methyl formate by cells of methylotrophic yeasts. Biosci. Biotech. Biochem. 61(8): 1391-1393.

Naciandi, R. E., L. Rodriguez, E. Rodriguez, R. Diaz, J. Delgado and L. Herrera 1995. High level production of recombinant invertase in *Hansenula polymorpha*. Biotechnol. Lett

17: 949-952.

Nagodawithana, T. and F. Gutmunis. 1985. Method for the production of selenium yeasts. US. Patent. 4: 846.

Ogata, K., H. Nishikawa and M. Ohsugi, 1969. A yeast capable of utilizing methanol. Agric Biol. Chem. 33: 1517-1520.

Ogata, K., Y. Tani and N. Kato 1975. *In* G. Terui (ed) Microbial growth on C1 compounds" pp.99-159. The Society of Fermentation Technology. Japan.

Okanishi, M. and K.F. Gregory. 1970. Isolation of mutant of *Candida tropicalis* with increased methionine content. Can. J. Microbiol. 16: 1139-1143.

Oki, T., K. Kuono, A. Kitai and A. Ozaki 1972. J. Gen. Appl. Microbiol. 18: 295.

Pal, H. S. and I. Y. Hamdan 1979. Enz. Microb. Technol. 1: 265.

Pehrson, B.G. 1993. Selenium in nutrition with special reference to the biopotency of organic selenium compounds, pp. 71-89. In Biotechnology in Feed Industry. Proceedings of Alltech's 9th Annual symposium, Alltech Technical publications, Nicholasville, Kentucky.

Ponce de leon, C.A., M.M. Bayon, C. Paquin and J.A. Caruso. 2002. Selenium incorporation into *Saccharomyces cerevisiae* cells: A study of dufferent incorporation methods. J. Appl. Microbiol. 92: 602-610

Raymond, C. K., T. Bukowski, S.D. Holderman, A. F. T. Ching, E. Vanaja and M. R. Stamm 1998. Development of the methylotrophic yeast, *Pichia methanolica*, for the expression of the 65-kilodalton isoform of human glutamate decarboxylase. Yeast. 14: 11-23.

Richmond, M.H. 1962. The effect of amino acid analogues on growth and protein synthesis in microorganisms. Bacterial Rev. 26: 398-420.

Sahm, H. 1977. Metabolism of methanol by yeasts. Adv. Biochem. Eng. 6: 77.

Sakai, Y., M. Akiyama, H. Kondoh, Y. Shibano and N. Kato 1996. High-level secretion of fungal glucoamylase using the *Candida boidinii* gene expression system. Biochim. Biophy. Acta. 1308: 81-87.

Sakai, Y., T. K. Goh and Y. Tani 1993. High frequency transformation of a methylotrophic yeast, *Candida boidinii*, with autonomously replicating plasmid which are also functional in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 175: 3556-3562.

Sakai, Y., T. Kazarimoto and Y. Tani 1991. Transformation system for an asporogenous methylotrophic yeast, *Candida boidinii*: cloning of the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene (*URA3*), isolation of uracil auxotrophic mutants for integrative transformation. J. Bacteriol. 173: 7458-7463.

Sakai, Y., A. P. Murdanoto, L. Sembiring, Y. Tani and N. Kato 1995. A novel formaldehyde oxidation pathway in methylotrophic yeasts: methyl formate as a possible intermediate. FEMS Microbiol. Lett. 127: 229-234.

Sakai, Y. and , Y. Tani 1992a. Directed mutagenesis in an asporogenous methylotrophic yeast: Cloning, sequencing, and one-step gene disruption of the 3-isopropylmalate dehydrogenase gene (*LEU2*) of *Candida boidinii* to derive doubly auxotrophic marker strains. J. Bacteriol. 174: 5988-5993.

Sakai, Y. and Y. Tani 1992b. Cloning and sequencing of the alcohol oxidase-encoding gene (*AOD1*) from the formaldehyde producing asporogenous methylotrophic yeast, *Candida boidinii* S2. Gene. 114: 67-73.

Sakai, Y., T. Rogi, T. Yonehara, N. Kato and Y. Tani 1994. High-level ATP production by a genetically-engineered *Candida* yeast. Bio/Technology 12: 291-293.

Schutte, H., J. Flossdorf, H. Sahm and M. R. Kula 1976. Purification and properties of formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase from *Candida boidinii*. Eur. J. Biochem. 62: 151-160.

Scott, M.L. and I.N. Thompson. 1971. Selenium content of feed stuffs and effects of dietary selenium levels upon tissue selenium in chicks and poults. Poultry Sci. 50: 1742-1748.

Sevo, M., G. Degrassi, N. Skoko, V. Venturi and G. Ljubijankic 2002. Production of glycosylated thermostable *Providencia rettgeri* penicillin G amidase in *Pichia pastoris*. FEMS Yeast Research. 1: 271-277.

Shimizu, S., M. Ishida, N. Kato, Y. Tani and K. Ogata 1977a. Derepression of FAD pyrophosphory-lase and flavin changes during growth of *Kloeckera* sp. No.2201 on methanol. Agri. Biol. Chem. 41: 2215.

Shimizu, S., M. Ishida, Y. Tani and K. Ogata 1977b. Flavin changes of *Kloeckera* sp. No.2201 during adaptation to methanol. Agri. Biol. Chem. 41: 423.

Shimizu, S., M. Ishida, Y. Tani and K. Ogata, 1977c. Production of flavin adenine dinucleotide by methanol utilizing yeasts. J. Ferment. Technol. 55: 630.

Suhajda *et al.*, 2000

Syrota, A. and P. Jehensen 1991. Eur. J. Nucl. Med. 18: 897-923.

Tani, Y. 1985. Methylotroph for biotechnology: methanol as a raw material for fermentative production. Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 3: 111-135.

Tani, Y., W.J. Lim and H.C. Yang. 1988. Isolation of L-methionine enriched mutant of a methylotrophic yeast, *Candida boidinii* No. 2201. J. ferment. Technol. 66: 153-158.

Tani, Y., Y. Kato and H. Yamada 1978. Utilization of methanol by yeasts. Adv. Appl.

Microbiol. 24: 165.

Tarka, E.F. and M.L. Fields. 1986. Yeasts mutants containing elevated methionine. J. Food Sci. 51: 1273-1275.

Thomas, D., R. Barbey and Y. Surdin-Kerjan. 1990. Gene-enzyme relationship in sulfate assimilation pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 265: 15518-15524.

Trimble, R. B., P. H. Atkinson, J. F. Tschopp, R. R. Townsend and F. Maley 1991. Structure of oligosaccharides on *Saccharomyces SUC2* invertase secreted by the methylotrophic yeasts *Pichia pastoris*. J. Biol. Chem. 266: 22807-22817.

Van de Walt, J. P. 1962. Antonie van Leeuwenhoek. 28: 91.

Van Dijken, J. P. and P. Bos 1981. Arch. Microbiol. 128: 320.

Van Dijken, J. P. and W. Harder 1972. J. Gen. Microbiol. 84: 409.

Wang, D.I.C., C.I. Cooney, A.L. Demain, P. Dunnill, A.E. Humphrey and M.D. Lilly. 1979. Fermentation and Enzyme Technology. Willey, USA. 374 p.

Wolf, H. J. and R. S. Hanson 1979. J. Gen. Microbiol. 114: 187.

Yanase, H., M. Okuda, K. Kita, Y. Sato, K. Shibata, Y. Sakai and N. Kato 1995. Enzymatic preparation of [1,3-^{13}C] dihydroxyacetone phosphate from [^{13}C]methanol and hydroxypyruvate using the methanol-assimilating system of methylotrophic yeasts. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 228-234.

Yoshiki, T., L.W. Jin and Y.H. Chul. 1988. Isolation of L-methionine enriched mutant of a methylotrophic yeast *Candida boidinii* No. 2201. J. Ferment. Technol. 66: 153-158.

Yurimoto, H. Y. Sakai and N. Kato 2002. Methanol metabolism. Pp. 61-75. In G. Gellissen (ed) Hansenula polymorpha: Biology and Applications. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.

Zhang, M. and H. Y. Wang 1994. Hydrogen peroxide production using chemically treated *Pichia pastoris* cells. Enzyme Microb. Technol. 16: 10-17.

Zurek, C. E. Kubis, P. Keup, D. Horlein, J. Beunink, J. Thommes, R-M. Kula, C. P. Hollenberg and G. Gellissen 1996. Production of two aprotinin variants in *Hansenula polymorpha*. Process Biochem. 31: 679-689.