

ผลการวิจัย (Results)

1. การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์จากยีสต์ที่เก็บรักษาไว้แล้ว

การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์จากยีสต์ที่เก็บรักษาอยู่ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จำนวน 459 ไอโซเลทและยีสต์ที่เก็บรักษาอยู่ที่หน่วยจุลชีววิทยาประยุกต์ ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยเรือนปลูกพืชทดลอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จำนวน 212 ไอโซเลท รวมจำนวนยีสต์ที่นำมาคัดเลือกทั้งสิ้น 671 ไอโซเลท โดยนำมาคัดเลือกลหเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ 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 ปริมาณโปรตีนและเมทิลโอโนนอิสระภายในเซลล์ของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลุ่มที่สร้างเส้นใยเทียมทั้ง 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 และเมื่อพิจารณาปริมาณเมทิลโอโนนอิสระ พบว่าไอโซเลท N007 มีเมทิลโอโนนอิสระภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 0.52 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์

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

เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของโปรตีนและเมทิลโอโนนอิสระภายในเซลล์ของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่นำมาศึกษาทั้ง 24 ไอโซเลท พบว่าไอโซเลท N007 มีเมทิลโอโนนอิสระในเซลล์สูงสุด คือ 0.52 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ขณะที่มีการเจริญเท่ากับ 2.82 กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร และโปรตีนภายในเซลล์เท่ากับ 21.18 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง เมื่อเลี้ยงนาน 72 ชม. จึงเลือกยีสต์ไอโซเลท N007 มาทำการปรับปรุงพันธุกรรมเพื่อเพิ่มการสะสมเมทิลโอโนนภายในเซลล์ให้สูงขึ้นต่อไป

ตารางที่ 2 การเจริญ โปรตีน และเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ของเมทิลโลโทรฟิกายีสต์ 24 ไอโซเลท
เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว 1% methanol medium ปริมาตร 50 มล. บรรจุในฟลาस्कขนาด
250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุน ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28-30 องศา
เซลเซียส 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. การปรับปรุงพันธุกรรมของเมทิลโลโทรฟิกายีสต์ให้มีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงขึ้น โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี N-methy-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG)

ทำการปรับปรุงพันธุกรรมของเมทิลโลโทรฟิกายีสต์ N007 โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG โดยนำเซลล์แขวนลอยของยีสต์ N007 เข้มข้น 4.47×10^7 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. การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกายีสต์กลายพันธุ์ที่มีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูง

การคัดเลือกยีสต์กลายพันธุ์ที่มีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูง อาศัยหลักการที่เชื้อกลายพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อเอทไธโอนีน (ethionine) ซึ่งเป็น analogue ของเมทไธโอนีนอิสระ ที่ระดับสูงเกินกว่าสายพันธุ์เดิม อาจมีความเข้มข้นของเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงเกินกว่าสายพันธุ์เดิมด้วย (Brigidi *et al.*, 1988) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Wang *et al.* (1979) ที่ระบุว่า การที่เชื้อกลายพันธุ์บางตัวต้านทานต่อ amino acid analogue นั้น เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ หรือเกิดจากระบบการสร้างเอนไซม์ที่เปลี่ยนแปลงไป ทำให้เชื้อกลายพันธุ์ต้านทานต่อการเกิด feedback repression ได้ ซึ่งส่งผลให้เชื้อกลายพันธุ์สามารถสร้างกรดอะมิโนได้สูงขึ้นด้วย

5.1 การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกายีสต์กลายพันธุ์ที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีนสูงเกินกว่าเดิม

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 การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกายีสต์กลายพันธุ์ที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีนและมีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงเกินกว่าสายพันธุ์เดิม

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. พบว่าเมทิลโลโทรฟิกายีสต์กลายพันธุ์ที่ทนต่อเอทไธโอนีนได้สูงเกินกว่านั้น ส่วนใหญ่จะผลิตและสะสมเมทไธโอนีนอิสระได้สูงเกินด้วย 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 (6.02 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์) ซึ่งศึกษาโดย Tani *et al.* (1988) อยู่มาก

ตารางที่ 3 การเจริญ โปรตีน และเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ของเมทิลโลโทรฟิเคียส N007 กลายพันธุ์ ทั้ง 142 ไอโซเลท เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว 1% methanol medium ปริมาตร 50 มล. บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุน ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่ อุณหภูมิ 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'	โปรตีนภายในเซลล์'	เมทิลไฮดรอกซีอะซิเตทภายในเซลล์'
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	เมทไซโอนีนอิสระภายในเซลล์ 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. การปรับปรุงพันธุ์กรรมของเมทิลโลโทรฟิกายีสต์กลายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ให้มีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงขึ้น โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ครั้งที่สองด้วยสาร NTG

เนื่องจากเมทิลโลโทรฟิกายีสต์กลายพันธุ์ MN007-67 ที่ได้จากการกลายพันธุ์เมทิลโลโทรฟิกายีสต์ N007 มีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงขึ้นจากเดิมเพียงเล็กน้อย จึงได้ทำการกลายพันธุ์ยีสต์กลายพันธุ์ MN007-67 ซ้ำอีกครั้ง เพื่อให้สามารถสะสมเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ได้สูงขึ้น โดยการนำเซลล์แขวนลอยของยีสต์ MN007-67 ความเข้มข้น 3.17×10^7 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. การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกายีสต์กลายพันธุ์สองครั้งที่ให้เมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูง

7.1 การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกายีสต์กลายพันธุ์สองครั้งที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีนสูงขึ้นกว่าเดิม

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 การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกายีสต์กลายพันธุ์สองครั้งที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีนและมีเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงกว่าสายพันธุ์เดิม

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 จึงนำยีสต์กลายพันธุ์สองครั้งที่ทั้ง 19 สายพันธุ์นี้มาเลี้ยงพร้อมกับยีสต์กลายพันธุ์ MN007-67 และยีสต์สายพันธุ์เดิมคือ N007 โดยเลี้ยงในอาหารเหลว 1% methanol medium ภายใต้สภาวะดังกล่าวข้างต้น แล้วตรวจวัดการเจริญ ปริมาณโปรตีนและเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชม. พบว่า เมทิลโลโทรฟิกายีสต์กลายพันธุ์ 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) ผู้วิจัยจึงได้คัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกายีสต์กลายพันธุ์ ND035 และ ND213 ไว้ศึกษาต่อไป

ตารางที่ 4 การเจริญ โปรตีน และเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ของเมทิลโลโทรฟิกายีสต์ N007, MN007-67 และ MN007-67 กลายพันธุ์จำนวน 19 ไอโซเลท เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว 1% methanol medium ปริมาตร 50 มล. บรรจุในฟลasks ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่า แบบหมุน 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 กรัม น้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร

² กรัมโปรตีนต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้งของเซลล์ (เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง)

³ มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้งของเซลล์

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

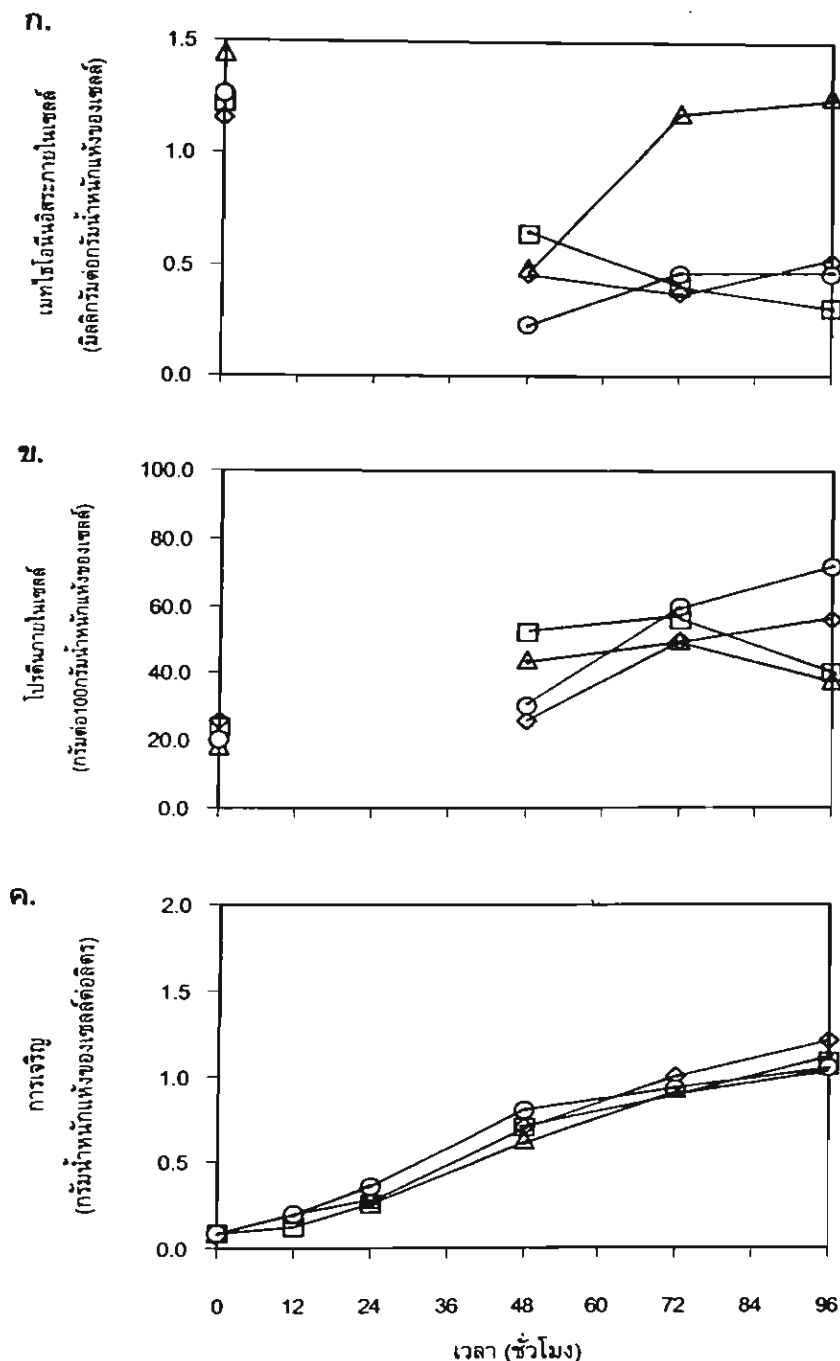
(2539) ที่ได้คัดเลือกยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่สามารถผลิตและสะสมเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูง เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน แล้วเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์สองครั้ง ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต โดยระบุว่าพบยีสต์ *S. cerevisiae* NJ-42 ที่มีความสามารถในการผลิตและสะสมเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงถึง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

8. การศึกษาการเจริญ การสะสมเมทไธโอนีนอิสระและ โปรตีนภายในเซลล์ของเมทิลโลโทรฟิกลีส์ต์กลายพันธุ์ ที่เวลาต่าง ๆ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิม

เมื่อนำเมทิลโลโทรฟิกลีส์ต์ 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 และยังมียีสต์เอนกซ์แทรกเป็นองค์ประกอบอีกด้วย

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 พบว่าเมทิลโลโทรฟิกลีส์ต์ 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 ของเมทิลโลโทรฟิกายีสต์ N007 (◇) และเมทิลโลโทรฟิกายีสต์กลายพันธุ์ MN007-67 (□) ND035 (Δ) และ ND213 (○) เมื่อเลี้ยงในอาหาร methanol medium ที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ปริมาตรอาหาร 100 มล. บรรจุในพลาสติกขนาด 500 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส

9. การศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้างเมทาไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ยีสต์กลายพันธุ์

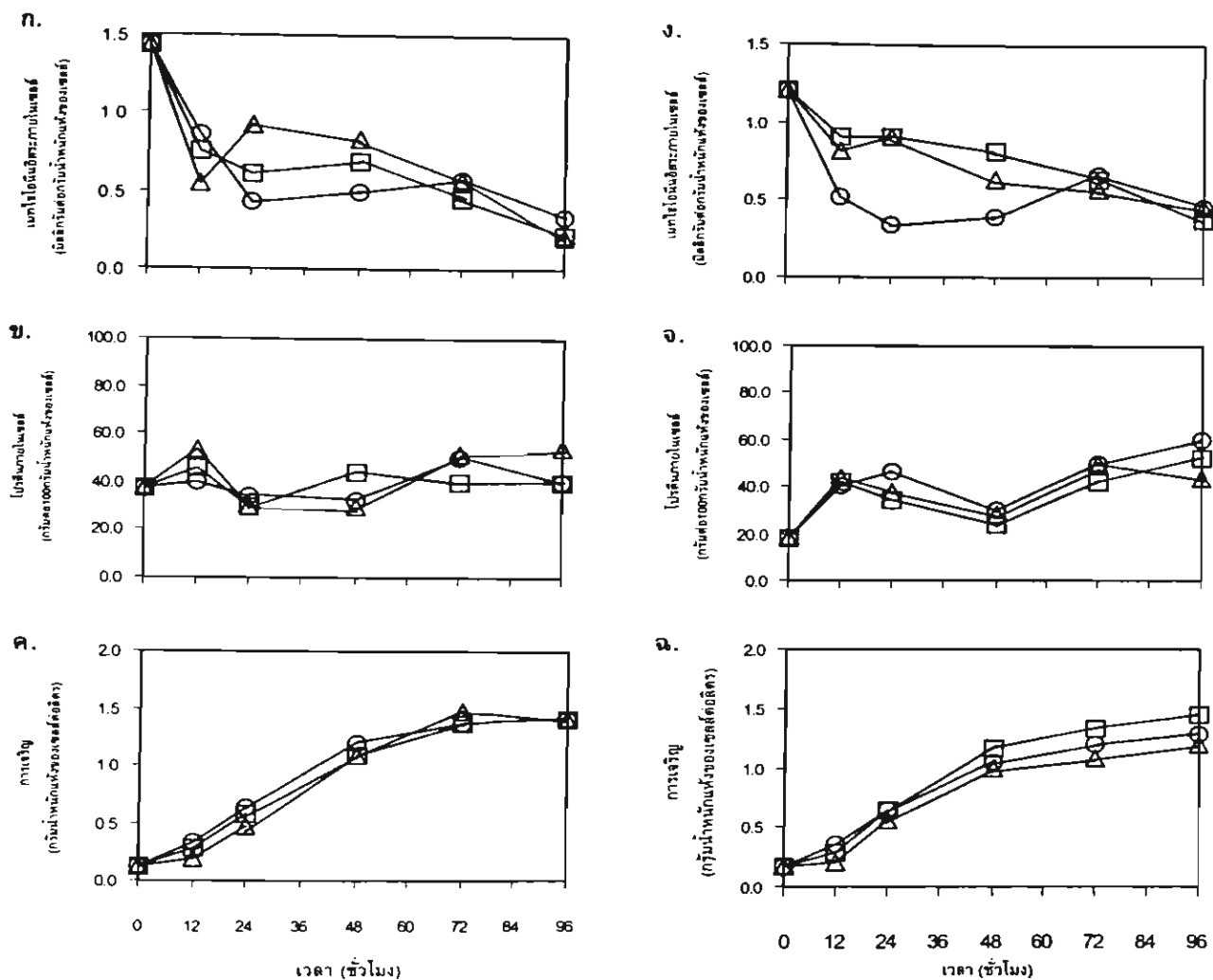
9.1 ความเข้มข้นของเมทานอล

นำเมทิลโลโทรฟิกายีสต์กลายพันธุ์ 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 4ด) แต่สังเกตได้ว่า ยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์มีการเจริญเข้าสู่ระยะ exponential phase ภายหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชม. ซึ่งในระยะเวลาก่อนหน้านั้นพบว่ายีสต์มีเมทาไธโอนีนอิสระและโปรตีนภายในเซลล์ค่อนข้างสูง ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการที่ยีสต์สร้างเมทาไธโอนีนและโปรตีนสะสมไว้ตั้งแต่ขั้นตอนการเตรียมกล้าเชื้อในอาหาร YPD ซึ่งมีกลูโคสและยีสต์เอกซ์แทรกเป็นองค์ประกอบสำคัญ ดังนั้นเพื่อศึกษาการสร้างเมทาไธโอนีนอิสระ และโปรตีนภายในเซลล์ ภายใต้สภาวะที่มีเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน จึงควรพิจารณาภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชม. ซึ่งยีสต์มีการปรับตัวให้อยู่ในสภาวะที่ต้องการศึกษา มาเป็นระยะเวลาพอสมควรแล้ว

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

ผลของความเข้มข้นของเมทานอลต่อปริมาณโปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์ของเมทิลโลโทรฟิกายีสต์กลายพันธุ์ 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 พบว่ามีโปรตีนภายใน



ภาพที่ 4 ความเข้มข้นของเมทาไซโอเนินอิสระภายในเซลล์ (ก และ ง) โปรตีนภายในเซลล์ (ข และ จ) และการเจริญ (ค และ ฉ) ที่เวลาต่าง ๆ ของเมทิลโลโทรฟิกายีสต์กลายพันธุ์ ND035 (ก-ค) และ ND213 (ง-ฉ) เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเมทานอลเข้มข้น 1 (○) 2 (□) และ 3 (Δ) เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ปริมาตรอาหาร 100 มล. บรรจุในฟลasks ขนาด 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 สำหรับเลี้ยงเมทิลโลโทรฟิกายีสต์กลายพันธุ์ ND035 คือ 3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งภายหลังจากเลี้ยงเชื้อ 24 ชม. พบเมทาไซโอเนินอิสระภายในเซลล์สูงสุด

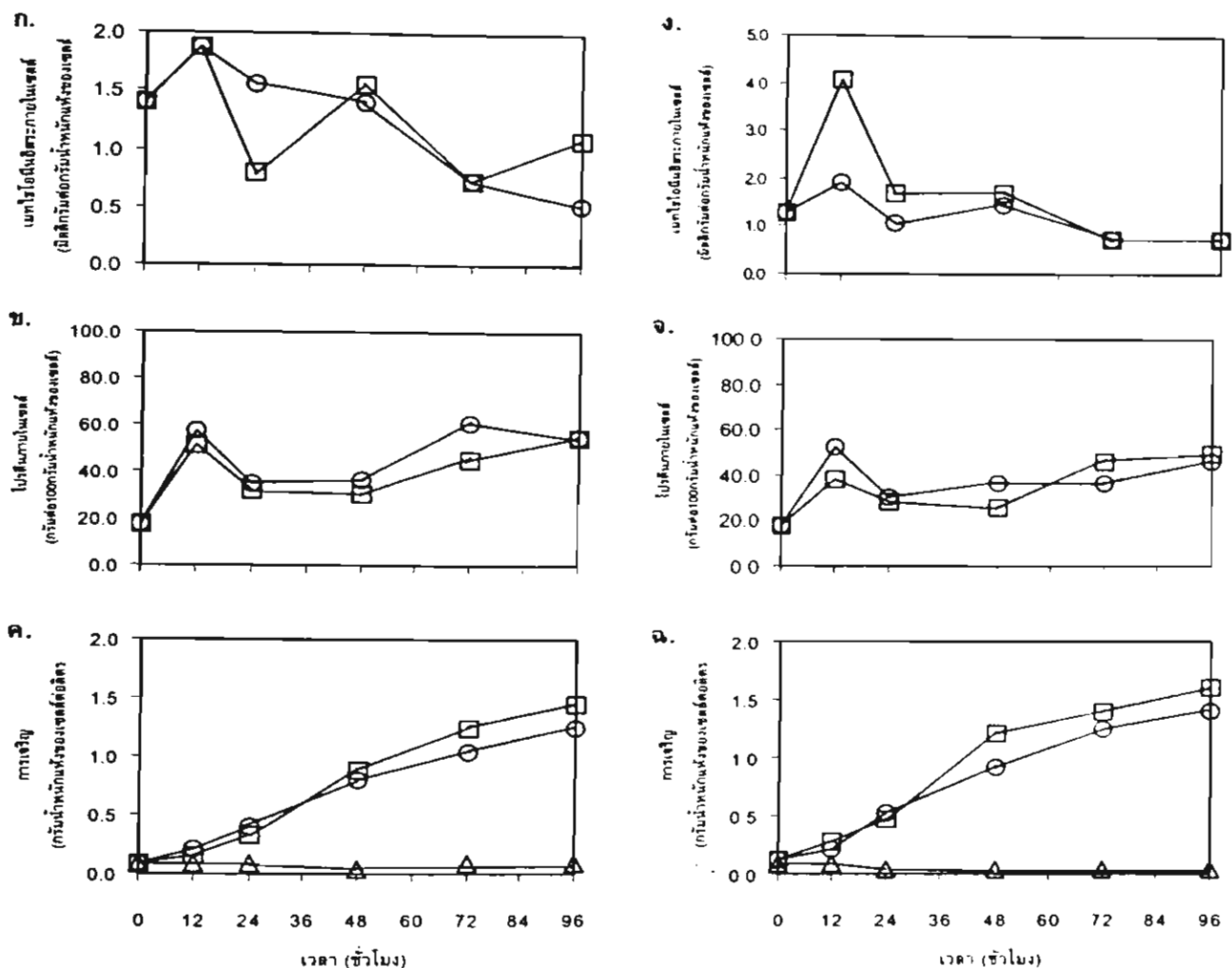
เท่ากับ 0.91 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ โปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์เท่ากับ 31.51 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง และการเจริญเท่ากับ 0.50 กรัม/น้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร ส่วนอาหาร methanol medium สำหรับเลี้ยงเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กลายพันธุ์ ND213 ควรมีเมทานอล 2 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชม. พบเมทิลโฮอินินอิสระภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 0.93 มิลลิกรัมต่อกรัม/น้ำหนักแห้งของเซลล์ โปรตีนภายในเซลล์เท่ากับ 34.14 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง และมีการเจริญเท่ากับ 0.64 กรัม/น้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร ซึ่งความเข้มข้นของเมทิลโฮอินินอิสระที่เวลา 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 ต่อการผลิตเมทิลโฮอินินและการเจริญของยีสต์ ผู้วิจัยใช้หลักการเดียวกันกับการพิจารณาผลของความเข้มข้นของเมทานอล คือ จะพิจารณาเมื่อยีสต์ มีการเจริญเข้าสู่ระยะ 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 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้างเมทิลโฮอินินอิสระภายในเซลล์ พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจนนั้น ยีสต์กลายพันธุ์ ND035 มีเมทิลโฮอินินอิสระภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 1.55 มิลลิกรัมต่อกรัม/น้ำหนักแห้งของเซลล์ ที่เวลา 24 ชม. ขณะที่เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ตรวจพบเมทิลโฮอินินอิสระภายในเซลล์สูงสุดเท่ากัน แต่ต้องเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชม. (ภาพที่ 5ก) ส่วนการเลี้ยงยีสต์กลายพันธุ์ ND213 ในอาหารที่มีเมทานอล 2 เปอร์เซ็นต์ และใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน ตรวจพบเมทิลโฮอินินอิสระภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 1.43 มิลลิกรัมต่อกรัม/น้ำหนักแห้งของเซลล์ ที่เวลา 48 ชม. ของการเพาะเลี้ยง ขณะที่เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ตรวจพบเมทิลโฮอินินอิสระภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 1.69 มิลลิกรัมต่อกรัม/น้ำหนักแห้งของเซลล์ ที่เวลา 24 ชม. ของการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 5ง)



ภาพที่ 5 ความเข้มข้นของเมทาโนลอิสระภายในเซลล์ (ก และ ง) โปรตีนภายในเซลล์ (ข และ จ) และการเจริญ (ค และ ฉ) ที่เวลาต่าง ๆ ของเมทิลโลโทรฟิเคียสติกกลายพันธุ์ 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 (Δ) เป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาตรอาหาร 100 มล. บรรจุในพลาสติกขนาด 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

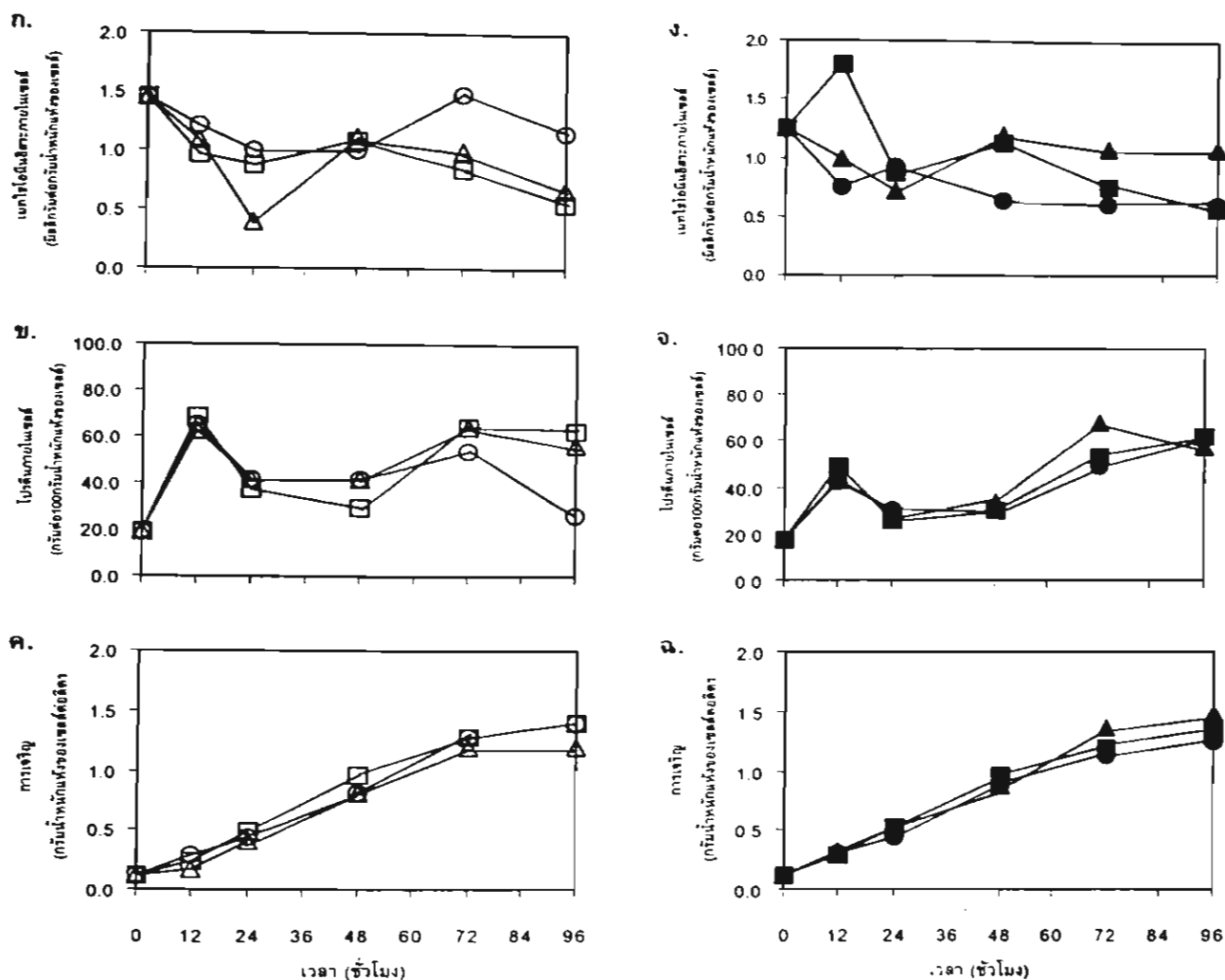
เฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน พบโปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 50.10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ที่เวลา 96 ชม. (ภาพที่ 5จ)

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 ภายหลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 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 6ด) 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 ภายหลังจากเพาะเลี้ยง 24 ชม. (ภาพที่ 6ง) สำหรับปริมาณโปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์ยีสต์ ND213 พบว่าไม่แตกต่างกันมากนัก เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (ภาพที่ 6จ)



ภาพที่ 6 ความเข้มข้นของเมทไธโอไนน์อิสระภายในเซลล์ (ก และ ง) โปรตีนภายในเซลล์ (ข และ จ) และการเจริญ (ค และ ฉ) ที่เวลาต่าง ๆ ของเมทิลโลโทรฟิเคียสติกกลายพันธุ์ 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 (Δ) 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 เปอร์เซ็นต์เหมาะสมสำหรับเลี้ยงเมทิลโลโทรฟิเคียสติกกลายพันธุ์ ND035 เนื่องจากพบเมทไธโอไนน์อิสระภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 1.51 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ โปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 55.07 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง และการเจริญเท่ากับ 1.29 กรัม/น้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร ที่เวลา 72 ชม.ของการเพาะเลี้ยง ส่วนเมทิลโลโทรฟิเคียสติกกลายพันธุ์ ND213 นั้น ควรใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0.94 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน เพื่อลดต้นทุนการผลิต เนื่องจากยีสต์มีเมทไธโอ

นีนอิสระภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 1.15 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการเลี้ยงเมื่อมีแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 1.88 เปอร์เซ็นต์ (1.23 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์)

10. การศึกษาอิทธิพลของสารประกอบอินทรีย์ซิลีเนียมต่อการเจริญของเมทิลโลโทรฟิกายีสต์กลายพันธุ์

เมื่อเลี้ยงเมทิลโลโทรฟิกายีสต์กลายพันธุ์ ND035 ในอาหารเหลว methanol medium ที่มีเมทานอล 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน มีแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.15 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน และเติมโซเดียมซัลไฟต์ ให้มีความเข้มข้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 30, 300 และ 3000 ไมโครกรัมต่อมล. แล้วเลี้ยงเชื้อตามวิธีการข้อ 10.1 พบว่ายีสต์กลายพันธุ์ ND035 สามารถเจริญได้ เมื่อมีโซเดียมซัลไฟต์เข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อ มล. โดยมีค่าการเจริญเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า และตรวจไม่พบการเจริญของเชื้อนี้เมื่อมีโซเดียมซัลไฟต์เข้มข้น 300 และ 3000 ไมโครกรัมต่อ มล. ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมโซเดียมซัลไฟต์ ก็ไม่พบการเจริญของเชื้อนี้เช่นกันในทุกความเข้มข้นที่ทำการทดสอบ (30, 300 และ 3000 ไมโครกรัมต่อมล.)

ส่วนเมทิลโลโทรฟิกายีสต์กลายพันธุ์ ND213 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว methanol medium ที่มีเมทานอล 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน มีแอมโมเนียมซัลเฟต 0.94 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน และเติมโซเดียมซัลไฟต์ หรือโซเดียมซัลไฟต์ ความเข้มข้น 30, 300 และ 3000 ไมโครกรัมต่อมล. พบว่ายีสต์ ND213 สามารถเจริญเพิ่มขึ้นเป็น 4.5 และ 3 เท่า เมื่อเติมโซเดียมซัลไฟต์ 30 และ 300 ไมโครกรัมต่อมล. แต่ตรวจไม่พบการเจริญเลยเมื่อเติมโซเดียมซัลไฟต์ 3000 ไมโครกรัมต่อมล. และโซเดียมซัลไฟต์ ทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 การเจริญของเมทิลโลโทรฟิกายีสต์กลายพันธุ์ ND035 และ ND213 (กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร)เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชม. ในอาหารเหลว methanol broth ที่มีความเข้มข้นของเมทานอล ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างเมทาโซอินอิสระภายในเซลล์ และเติมสารประกอบอินทรีย์ซิลีเนียมความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยใช้ปริมาตรอาหาร 100 มล. ในฟลasks ขนาด 500 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุน ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส

รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นของโซเดียมซัลไฟต์ (ไมโครกรัมต่อมล.)			ความเข้มข้นของโซเดียมซัลไฟต์ (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 กรัม/น้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร

จากผลการทดลองข้างต้นแสดงว่า ยีสต์กลายพันธุ์ ND035 ถูกยับยั้งการเจริญเมื่อมีโซเดียมซัลเฟตความเข้มข้น 300 และ 3000 ไมโครกรัมต่อมล. ส่วนยีสต์กลายพันธุ์ ND213 ถูกยับยั้งการเจริญเมื่อเติมโซเดียมซัลเฟต 3000 ไมโครกรัมต่อมล. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับโซเดียมซัลเฟตนั้นก็มีผลยับยั้งการเจริญของยีสต์กลายพันธุ์ทั้งสองสายพันธุ์ ที่ทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ ดังนั้นเพื่อป้องกันการยับยั้งการเจริญของยีสต์โดยสารประกอบอินทรีย์ซัลเฟต ในการทดลองต่อไปผู้วิจัยจึงลดความเข้มข้นของสารประกอบอินทรีย์ซัลเฟตทั้งสองชนิดลง โดยเลือกใช้โซเดียมซัลเฟตหรือโซเดียมซัลไฟด์เข้มข้น 5, 10 และ 15 ไมโครกรัมต่อมล. สำหรับเติมลงในอาหารเลี้ยงยีสต์กลายพันธุ์ ND035 ส่วนอาหารเลี้ยงยีสต์กลายพันธุ์ ND213 เติมโซเดียมซัลเฟตเข้มข้น 10, 20 และ 30 ไมโครกรัมต่อมล. หรือโซเดียมซัลไฟด์ 5, 10 และ 15 ไมโครกรัมต่อมล. เพื่อศึกษาการสะสมซัลเฟต การสร้างเมทาโซอีโนอิสระ และโปรตีนภายในเซลล์ยีสต์ต่อไป

11. การศึกษาการสะสมซัลเฟตภายในเซลล์เมทิลโลโทรฟิกลี ยีสต์กลายพันธุ์

11.1 เมทิลโลโทรฟิกลี ยีสต์กลายพันธุ์ ND035

เมื่อเลี้ยงยีสต์กลายพันธุ์ ND035 เป็นเวลา 30 ชม. ในอาหารที่มีเมทานอล 3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน มีแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.15 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และเติมโซเดียมซัลเฟตเข้มข้น 5, 10 และ 15 ไมโครกรัมต่อมล. พบซัลเฟตภายในเซลล์ยีสต์ เท่ากับ 240, 570 และ 760 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ตามลำดับ และเมื่อเติมโซเดียมซัลไฟด์เข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมล. พบซัลเฟตภายในเซลล์ยีสต์ เท่ากับ 590 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ (ซัลเฟตภายในเซลล์เริ่มต้นมีเพียง 0.64 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) และพบว่าโซเดียมซัลไฟด์เข้มข้น 10 และ 15 ไมโครกรัมต่อมล. มีผลยับยั้งการเจริญของยีสต์กลายพันธุ์ ND035 ถ้าเปรียบเทียบอัตราการสะสมซัลเฟตภายในเซลล์กับซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า ยีสต์สะสมซัลเฟตภายในเซลล์ได้สูงสุด คือ 34.95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมซัลไฟด์เข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมล. ขณะที่เมื่อเติมโซเดียมซัลเฟต 5, 10 และ 15 ไมโครกรัมต่อมล. ยีสต์สะสมซัลเฟตได้เท่ากับ 17.61, 15.68 และ 14.60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

สำหรับการเจริญของยีสต์กลายพันธุ์ ND035 ในอาหารที่มีสารประกอบอินทรีย์ซัลเฟตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่ายีสต์มีการเจริญสูงสุด (0.56 กรัม/น้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร) เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมซัลเฟต 5 ไมโครกรัมต่อมล. และมีการเจริญเท่ากับ 0.42 และ 0.44 กรัม/น้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมซัลเฟต 10 และ 15 ไมโครกรัมต่อมล. ตามลำดับ ขณะที่เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมซัลไฟด์ 5 ไมโครกรัมต่อมล. ยีสต์มีการเจริญ 0.49 กรัม/น้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร ส่วนอาหารที่เติมโซเดียมซัลไฟด์ 10 และ 15 ไมโครกรัมต่อมล. นั้นไม่พบการเจริญของยีสต์ (ตารางที่ 6)

เมื่อพิจารณาผลของสารประกอบอินทรีย์ซัลเฟต ต่อความเข้มข้นของโปรตีนภายในเซลล์ พบว่ายีสต์มีปริมาณโปรตีนสูงสุด เท่ากับ 50.57 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมซัลเฟต 10 ไมโครกรัมต่อมล. เมื่อเติมโซเดียมซัลเฟต 5 และ 15 ไมโครกรัมต่อมล. พบโปรตีนภายในเซลล์ เท่ากับ 41.82 และ 38.75 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และเมื่อเติม

โซเดียมซัลไฟด์ 5 ไมโครกรัมต่อมล. พบโปรตีนภายในเซลล์ เท่ากับ 64.98 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง

การศึกษาผลของสารประกอบอินทรีย์ซัลไฟด์ต่อการสะสมเมทไธโอเนอินอิสระภายในเซลล์ พบเมทไธโอเนอินอิสระภายในเซลล์สูงสุด เท่ากับ 0.47 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมซัลไฟด์ 10 ไมโครกรัมต่อมล. ขณะที่เมื่อเติมโซเดียมซัลไฟด์ 5 และ 15 ไมโครกรัมต่อมล. พบเมทไธโอเนอินอิสระภายในเซลล์ เท่ากับ 0.08 และ 0.46 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ตามลำดับ และเมื่อเติมโซเดียมซัลไฟด์ 5 ไมโครกรัมต่อมล. พบเมทไธโอเนอินอิสระภายในเซลล์ เท่ากับ 1.31 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์

ตารางที่ 6 การเจริญ เมทไธโอเนอินอิสระ โปรตีน และซัลไฟด์ภายในเซลล์ของเมทิลโลโทรฟิกายีสต์ กลายพันธุ์ ND035 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 30 ชม. ในอาหารเหลว methanol broth ที่มี เมทานอล 3 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.15 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และเติมโซเดียมซัลไฟด์หรือโซเดียมซัลไฟด์ ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ปริมาตรอาหาร 100 มล. ในฟลาสก์ขนาด 500 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุน ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส

ตัวแปร	โซเดียมซัลไฟด์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)			โซเดียมซัลไฟด์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	5	10	15	5	10	15
การเจริญ ¹	0.56	0.42	0.44	0.49	0.12	0.12
เมทไธโอเนอินอิสระภายในเซลล์ ²	0.08	0.47	0.46	1.31	ND	ND
โปรตีนภายในเซลล์ ³	41.82	50.57	38.75	64.98	ND	ND
ซัลไฟด์ภายในเซลล์ ⁴	240	570	760	590	ND	ND
ซัลไฟด์ในเซลล์ต่อซัลไฟด์ในอาหาร 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 เมทิลโลโทรฟิเคียสติกกลายพันธุ์ ND213

เมื่อเลี้ยงยีสต์กลายพันธุ์ ND213 ในอาหารที่มีเมทานอล 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และมีแอมโมเนียมซัลเฟต 0.94 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยเติมโซเดียมซัลไฟด์เข้มข้น 10, 20 และ 30 ไมโครกรัมต่อมล. พบซีสเต็มภายในเซลล์ยีสต์ เท่ากับ 60, 100 และ 150 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ตามลำดับ เมื่อเติมโซเดียมซัลไฟด์เข้มข้น 5, 10 และ 15 ไมโครกรัมต่อมล. พบซีสเต็มภายในเซลล์เท่ากับ 1290, 2190 และ 2720 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ตามลำดับ ขณะที่ปริมาณซีสเต็มภายในเซลล์เริ่มต้นมีเพียง 0.54 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการสะสมซีสเต็มภายในเซลล์กับซีสเต็มในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเมื่อใช้โซเดียมซัลไฟด์เป็นแหล่งอินทรีย์ซีสเต็ม อัตราการสะสมซีสเต็มภายในเซลล์มีค่าต่ำมาก คือ 2.04, 1.70 และ 1.67 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเติมโซเดียมซัลไฟด์ 10, 20 และ 30 ไมโครกรัมต่อมล. ตามลำดับ ขณะที่เมื่อเติมโซเดียมซัลไฟด์ 5, 10 และ 15 ไมโครกรัมต่อมล. ยีสต์มีอัตราการสะสมซีสเต็มสูงกว่ามาก คือ 76.41, 64.86 และ 50.42 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 7)

ยีสต์กลายพันธุ์ ND213 มีการเจริญไม่แตกต่างกัน เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีโซเดียมซัลไฟด์ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ทดสอบ (ค่าการเจริญ 0.51-0.52 กรัม/น้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร) เช่นเดียวกับเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมซัลไฟด์ ความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งมีค่าการเจริญอยู่ในช่วง 0.46-0.49 กรัม/น้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร

เมื่อพิจารณาผลของสารประกอบอินทรีย์ซีสเต็มต่อความเข้มข้นของโปรตีนภายในเซลล์ พบว่ายีสต์กลายพันธุ์ ND213 มีปริมาณโปรตีนภายในเซลล์สูงสุด เท่ากับ 43.00 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมซัลไฟด์ 5 ไมโครกรัมต่อมล. และในอาหารที่เติมโซเดียมซัลไฟด์ 10 และ 15 ไมโครกรัมต่อมล. พบโปรตีนภายในเซลล์ เท่ากับ 32.84 และ 22.88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมซัลไฟด์ 10 ไมโครกรัมต่อมล. ยีสต์ ND213 มีปริมาณโปรตีนภายในเซลล์ เท่ากับ 34.56 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ในอาหารที่เติมโซเดียมซัลไฟด์ 20 และ 30 ไมโครกรัมต่อมล. พบปริมาณโปรตีนภายในเซลล์ เท่ากับ 26.76 และ 32.14 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การศึกษาผลของสารประกอบอินทรีย์ซีสเต็ม ต่อปริมาณเมทาไธโอนีนอิสระภายในเซลล์พบว่า ยีสต์กลายพันธุ์ ND213 มีปริมาณเมทาไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูงสุด เท่ากับ 4.08 มิลลิกรัมต่อกรัม/น้ำหนักแห้งของเซลล์ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมซัลไฟด์ 10 ไมโครกรัมต่อมล. แต่ปริมาณเมทาไธโอนีนอิสระภายในเซลล์มีค่าลดลงเป็น 3.63 และ 3.44 มิลลิกรัมต่อกรัม/น้ำหนักแห้งของเซลล์ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมซัลไฟด์ 20 และ 30 ไมโครกรัมต่อมล. ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงยีสต์ ND213 ในอาหารที่เติมโซเดียมซัลไฟด์ พบว่ามีปริมาณเมทาไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมซัลไฟด์ โดยมีค่าเมทาไธโอนีนอิสระเท่ากับ 0.25, 0.15 และ 1.34 มิลลิกรัมต่อกรัม/น้ำหนักแห้ง ในสภาวะที่มีโซเดียมซัลไฟด์ 5, 10 และ 15 ไมโครกรัมต่อมล. ตามลำดับ

ตารางที่ 7 การเจริญ เมทไธโอนีนอิสระ โปรตีน และซิลิเนียมภายในเซลล์ของเมทิลโลทรฟิกลีสต์ กลายพันธุ์ ND213 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 30 ชม. ในอาหารเหลว methanol broth ที่มี เมทานอล 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน แอมโมเนียม ซัลเฟต 0.94 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และเติมโซเดียมซิลิเนตหรือโซเดียมซิลิไนด์ ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ปริมาตรอาหาร 100 มล. ในฟลาสก์ขนาด 500 มล. บ่มบนเครื่อง เขย่าแบบหมุน ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส

ตัวแปร	โซเดียมซิลิเนต (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)			โซเดียมซิลิไนด์ (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
ซิลิเนียมภายในเซลล์ ⁴	60	100	150	1290	2190	2720
ซิลิเนียมในเซลล์ต่อซิลิเนียมในอาหาร 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

เมื่อพิจารณาผลของสารประกอบอินทรีย์ซิลิเนียม จากผลการทดลองในตารางที่ 6 และ 7 พบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมซิลิไนด์ ยีสต์กลายพันธุ์ทั้งสองสายพันธุ์มีแนวโน้ม ที่จะสะสมซิลิเนียมภายในเซลล์ได้ สูงกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมซิลิเนตที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน อย่างไรก็ตามโซเดียมซิลิไนด์เข้มข้น 10 และ 15 ไมโครกรัมต่อมล. มีผลยับยั้งการเจริญของยีสต์ กลายพันธุ์ ND035 ดังนั้นหากต้องการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง ความเข้มข้นของโซเดียมซิลิไนด์ ต่อปริมาณซิลิเนียมภายในเซลล์ของยีสต์กลายพันธุ์ ND035 อาจต้องลดปริมาณโซเดียมซิลิไนด์ที่เติม ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยอาจใช้ความเข้มข้น 1, 3, 5, 7 และ 9 ไมโครกรัมต่อมล. เป็นต้น นอกจากนี้เมื่อใช้โซเดียมซิลิไนด์ 15 ไมโครกรัมต่อมล. ตรวจพบปริมาณซิลิเนียมภายในเซลล์ของยีสต์ กลายพันธุ์ ND213 สูงถึง 2720 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ซึ่งมีค่าสูงกว่าปริมาณซิลิ นีเนียมภายในเซลล์ซิลิเนียมยีสต์ที่จำหน่ายในเชิงการค้า ซึ่งมีค่าเท่ากับ 210 ไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่าง (Wolf et al., 2001) และสูงกว่าค่าที่ตรวจพบภายในเซลล์ *Saccharomyces cerevisiae* (1200-1400

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

สรุปผลการวิจัย (Results)

ผู้วิจัยได้รวบรวมเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่สามารถใช้เมทานอลเพื่อการเจริญ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จำนวนทั้งสิ้น 60 ไอโซเลท ไว้เพื่อการคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่มีโปรตีนและเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์สูง (1 ไอโซเลท จากการคัดเลือกจากยีสต์ที่เก็บรักษาอยู่ที่ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จำนวน 459 ไอโซเลทและยีสต์ที่เก็บรักษาอยู่ที่ หน่วยจุลชีววิทยาประยุกต์ ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยเรือนปลูกพืชทดลอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่ง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 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 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้งของเซลล์ มีการเจริญเท่ากับ 2.82 กรัม/น้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร 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 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้งของเซลล์ และมีโปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์เท่ากับ 18.31 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 3) จึงคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ MN007-67 มาทำการกลายพันธุ์ซ้ำอีกครั้ง เพื่อให้สามารถสะสมเมทไธโอนีนอิสระภายในเซลล์ได้สูงขึ้น พบว่ามีเชื้อกลายพันธุ์สองครั้งจำนวน 309 โคโลนี ที่สามารถต้านทานต่อเอทไธโอนีนที่ความเข้มข้นสูง 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

ไลโทรฟิเคชันสลายพันธุ์ ND035 มีเมทาโซอินินอิสระภายในเซลล์สูงสุด คือ 2.37 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้งของเซลล์ และยีสต์สลายพันธุ์ ND213 มีเมทาโซอินินอิสระภายในเซลล์สูงเป็นอันดับสอง คือ 1.55 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้งของเซลล์ ขณะที่โปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์ของยีสต์ ND035 และ ND213 เท่ากับ 29.18 และ 18.14 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (ตารางที่ 4) ผู้วิจัยจึงได้คัดเลือกเมทิลไลโทรฟิเคชันสลายพันธุ์ ND035 และ ND213 ไว้ศึกษาต่อไป

เมื่อนำเมทิลไลโทรฟิเคชัน N007 และยีสต์สลายพันธุ์ MN007-67, ND035 และ ND213 มาเลี้ยงในอาหารเหลว 1% methanol medium เพื่อวิเคราะห์การเจริญ เมทาโซอินินอิสระ และโปรตีนภายในเซลล์ พบว่ายีสต์ N007 มีความเข้มข้นของเมทาโซอินินอิสระภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 0.51 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้งของเซลล์ ที่เวลา 96 ชม. ขณะที่ยีสต์สลายพันธุ์ MN007-67, ND035 และ ND213 มีปริมาณเมทาโซอินินอิสระภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 0.64, 1.27 และ 0.46 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้งของเซลล์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48, 96 และ 96 ชม. ตามลำดับ

การศึกษาอิทธิพลขององค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสะสมเมทาโซอินินอิสระภายในเซลล์ของเมทิลไลโทรฟิเคชันสลายพันธุ์ ND035 และ ND213 พบว่ายีสต์สลายพันธุ์ ND035 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเมทานอล 3 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน และมีแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.15 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน มีเมทาโซอินินอิสระภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 1.51 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้งของเซลล์ โปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์เท่ากับ 55.07 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง และการเจริญเท่ากับ 1.29 กรัม น้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร ที่เวลา 72 ชม. ของการเพาะเลี้ยง ส่วนยีสต์สลายพันธุ์ ND213 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเมทานอล 2 เปอร์เซ็นต์ และมีแอมโมเนียมซัลเฟต 0.94 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน มีเมทาโซอินินอิสระภายในเซลล์สูงสุด 1.15 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้งของเซลล์ โปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์เท่ากับ 30.13 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง และมีการเจริญเท่ากับ 0.99 กรัม น้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร ที่เวลา 48 ชม. ของการเพาะเลี้ยง

การทดลองเติมสารประกอบอินทรีย์ซึ่เลี้ยง ในรูปโซเดียมซึ่เลนด์และโซเดียมซึ่ไนด์ พบว่าโซเดียมซึ่เลนด์เข้มข้น 300 และ 3000 ไมโครกรัมต่อมล. ยับยั้งการเจริญของยีสต์สลายพันธุ์ ND035 และความเข้มข้น 3000 ไมโครกรัมต่อมล. ยับยั้งการเจริญของยีสต์ ND213 ส่วนโซเดียมซึ่ไนด์ความเข้มข้น 30, 300 และ 3000 ไมโครกรัมต่อมล. ยับยั้งการเจริญของยีสต์สลายพันธุ์ทั้งสองสายพันธุ์ การศึกษาความสามารถในการสะสมซึ่เลนด์ในเซลล์ของยีสต์สลายพันธุ์ ND035 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีองค์ประกอบเหมาะสม และมีโซเดียมซึ่เลนด์หรือโซเดียมซึ่ไนด์ ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 ไมโครกรัมต่อมล. พบว่ายีสต์ ND035 สะสมซึ่เลนด์ภายในเซลล์ได้สูงสุด เท่ากับ 760 ไมโครกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้งของเซลล์ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมซึ่เลนด์เข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมล. (อัตราการสะสมซึ่เลนด์เท่ากับ 14.60 เปอร์เซ็นต์) ขณะที่เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีโซเดียมซึ่ไนด์เข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมล. พบซึ่เลนด์ภายในเซลล์เท่ากับ 590 ไมโครกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้งของเซลล์ (อัตราการสะสมซึ่เลนด์เท่ากับ 34.95 เปอร์เซ็นต์) และไม่พบการเจริญของยีสต์สลายพันธุ์ ND035 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมซึ่ไนด์เข้มข้น 10 และ 15 ไมโครกรัมต่อมล. ส่วนยีสต์สลายพันธุ์ ND213 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีองค์ประกอบเหมาะสม และมีโซเดียมซึ่เลนด์ ความ

เข้มข้น 10, 20 และ 30 ไมโครกรัมต่อมล. หรือโซเดียมซัลไฟด์ ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 ไมโครกรัมต่อมล. พบว่ามีซัลไฟเนียมภายในเซลล์สูงสุดเพียง 150 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ (อัตราการสะสมซัลไฟเนียมเท่ากับ 1.67 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีโซเดียมซัลไฟเนดเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมล. ขณะที่เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมซัลไฟด์เข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมล. มีซัลไฟเนียมภายในเซลล์สูงสุดถึง 2720 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ (อัตราการสะสมซัลไฟเนียมเท่ากับ 50.42 เปอร์เซ็นต์)

ถึงแม้ว่าเมทิลโลโทรฟิเคียสดีสดีกลายพันธุ์ที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ ยังคงมีปริมาณเมทิลโอซินอิสระภายในเซลล์ไม่สูงกว่าค่าที่เคยมีรายงานในยีสต์ชนิดอื่นมากนัก ผู้วิจัยคาดว่าข้อมูลที่ได้รับจากการศึกษาการสะสมซัลไฟเนียมภายในเซลล์ยีสต์กลายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ จะสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาทางสรีรวิทยา การปรับปรุงสายพันธุ์ รวมทั้งการประยุกต์ใช้เมทิลโลโทรฟิเคียสดี เพื่อการผลิตซัลไฟเนียมยีสต์หรือการผลิตสารเมแทบอไลต์ที่มีประโยชน์จากยีสต์กลุ่มนี้ ต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง (References)

- ชุตินันท์ ดิษเยิน. 2542. การสร้างยีสต์สายพันธุ์ใหม่ที่มีเมทไธโอนีนและไลซีนอิสระสูงเพื่อใช้เป็นแหล่งโปรตีนคุณภาพสูงโดยเทคนิคโปรโตพลาสฟิวชัน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- มาลีณี ลิ้มโกคา. 2537. พืชวิทยาและปัญหาที่พบในสัตว์. กรุงเทพฯ. 364 น.
- รัฐดา จันกลิ่น. 2539. การปรับปรุงพันธุกรรมและการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยง *Saccharomyces cerevisiae* ที่มีเมทไธโอนีนภายในเซลล์สูง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สมปอง พูลทั่วญาติ. 2543. ผลการเสริมซิลีนียมยีสต์ในอาหารไก่ไข่ต่อสมรรถภาพการผลิต คุณภาพไข่ และการสะสมซิลีนียมในไข่. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สิรินทร์ พิบูลนิยม, เครือวัลย์ โสภาสรรค์, ธนิต กุศลราญ และพิณทิพย์ รื่นวงษา. 2538. ชีวเคมีพื้นฐาน. มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช. 1038 น.
- Anthony, C. 1982. The Biochemistry of Methyloprophs. 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. Jacques (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 utilis*. *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. *Poultry 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. *Poultry 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. Poultry 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 electrophoretic 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 peroxisome 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. (2nd 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 generation of 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 dehydrogenase of 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 different 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. Biophys. 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 pyrophosphorylase 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 [1,3-¹³C] dihydroxyacetone phosphate from [¹³C]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.