

ผลของสติกมาสเตอร์ลดต่อการแช่แข็งของยีสต์ทนร้อน

Kluyveromyces marxianus UBU1-11

นางสาวอภิญา แซ่ใจ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2555

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

Effects of Stigmasterol on Freezing of Thermotolerant Yeast

Kluyveromyces marxianus UBU1-11

Miss Apinya Saengow

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Food Technology

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของสติกมาสเตอร์ลดต่อการแช่แข็งของ ยีสต์พันธุ์ <i>Kluyveromyces marxianus</i> UBU1-11
โดย	นางสาวอภิญา แซ่ใจ้ว
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเถียร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชินจิต ประกิจชัยวัฒนา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรมภา คงเป็นสุข

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเถียร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชินจิต ประกิจชัยวัฒนา)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรมภา คงเป็นสุข)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทร์ประภา อิมจงใจรัก)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชวีดา ปุกหุด)

อภิญา แซ่ใจ : ผลของสติกมาสเตอรอลต่อการแช่แข็งของยีสต์ทนร้อน *Kluyveromyces marxianus*

UBU1-11 (EFFECTS OF STIGMASTEROL ON FREEZING OF THERMOTOLERANT YEAST

Kluyveromyces marxianus UBU1-11) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ดร. สุเมธ ตันตระเจียร, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ.ดร. ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา, ผศ.ดร. วรภา คงเป็นสุข, 73 หน้า.

Kluyveromyces marxianus เป็นยีสต์ทนร้อนที่มีบทบาทสำคัญ โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมเอทานอลเนื่องจากช่วยลดค่าใช้จ่ายในการหล่อเย็นเพื่อรักษาอุณหภูมิของถังหมักและยังสามารถใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ แต่การเก็บเชื้อโดยวิธีการถ่ายเชื้อเมื่อทำเป็นประจำอาจทำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมได้ และการเก็บรักษาเซลล์ด้วยการแช่แข็งอาจทำให้จำนวนเซลล์รอดชีวิตต่ำ ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสติกมาสเตอรอลต่อการอยู่รอดของ *K. marxianus* หลังการแช่แข็งโดยแปรระดับสติกมาสเตอรอลที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ 0-9 mg/L ต่อการเจริญของ *K. marxianus* พบว่าสติกมาสเตอรอลไม่มีผลในการเจริญ และพบสติกมาสเตอรอลในเซลล์เมื่อเติมใน YM broth ตั้งแต่ 5 mg/L จากนั้นจึงได้ศึกษาผลของปริมาณสติกมาสเตอรอลในเซลล์และอุณหภูมิในการแช่แข็งต่อเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของ *K. marxianus* พบว่า *K. marxianus* ที่มีสติกมาสเตอรอลมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังแช่แข็ง 38.12 – 44.10% และ *K. marxianus* ที่มีสติกมาสเตอรอลมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังแช่แข็ง 65.54 – 84.90% เมื่อพิจารณาอัตราเร็วของการแช่แข็งพบว่า *K. marxianus* ที่มีและไม่มีสติกมาสเตอรอลมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็งสูงสุดที่อัตราเร็วแช่แข็ง 10 °C/min โดยพบว่าสติกมาสเตอรอลมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็งเพิ่มขึ้นในทุกอัตราเร็ว เมื่อเก็บแช่แข็ง *K. marxianus* เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าการลดลงของจำนวนเซลล์มีชีวิตเมื่อเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำน้อยกว่าเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิสูง และ *K. marxianus* ที่มีสติกมาสเตอรอลมีการลดลงของจำนวนเซลล์มีชีวิตระหว่างการเก็บแช่แข็งน้อยกว่า *K. marxianus* ที่ไม่มีสติกมาสเตอรอลในทุกอุณหภูมิเก็บแช่แข็ง และนอกจากศึกษาผลของสติกมาสเตอรอลและการแช่แข็งต่อเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็งแล้วได้ศึกษากิจกรรมของเบตาไกลูโคซิเดสเพื่อเป็นตัวแทนกิจกรรมของเซลล์ พบว่าสติกมาสเตอรอลและการแช่แข็งไม่มีผลต่อเอนไซม์ดังกล่าว

ภาควิชา.....เทคโนโลยีทางอาหาร.....ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีทางอาหาร.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา.....2555.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5372557823 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORDS : THERMOTOLERANT YEAST / FREEZING / STIGMASTEROL

APINYA SAENGOW : EFFECTS OF STIGMASTEROL ON FREEZING OF

THERMOTOLERANT YEAST *Kluyveromyces marxianus* UBU1-11. ADVISOR : ASSOC.

PROF. SUMATE TANTRATIAN, Ph. D., ASSIT. PROF. CHEUNJIT PRAKITCHAIWATTANA,

Ph. D., ASSIT. PROF. VARAPHA KONGPENSOOK, Ph. D., 73 pp.

Kluyveromyces marxianus has an important role for industries, especially in alcohol industry because it is ability to save energy and expenses due to reduce cooling costs. To maintain culture, subculturing to a new medium oftenly may induce sapontaniuos mutation. Freezing could be an interesting method for culture maintenance. *K. marxianus* is a thermotolereant yeast, subzero temperature could be fatal. So, the objective for this research was to study the effect of stigmasterol on the survival of the culture after freezing. The addition of stigmasterol to the growth medium at 0-9 mg/L, it was found that, stigmasterol did not affect for the growth of *K. marxianus*. Stigmasterol in cell was found when added stigmasterol more than 5 mg/L. To study the effect of stigmasterol and temperature for freezing, it was found that the survival of *K. marxianus* cells contained no stigmasterol were 38.12 – 44.10% while *K. marxianus* cells contained stigmasterol were 65.54 – 84.90%. It was found that the freezing rate of 10 °C/min showed the highest survival rate in both groups of *K. marxianus*. The cells contained stigmasterol survived freezing injury better than the cells without stigmasterol. The storage of cells for 6 weeks, it was found that the lower temperature of storage gave the lower number of survival cell than higher storage temperatures. *K. marxianus* containing stigmasterol had the number of survival cell higher than *K. marxianus* didn't contain stigmasterol in all storage temperatures. Moreover, to study the effect of freezing and stigmasterol on cell activity, betagalactosidase was selected as representative. It was found that, stigmasterol and freezing didn't affect the activity.

Department :Food Technology.....Student's Signature.....

Field of Study : ...Food Technology.....Advisor's Signature.....

Academic Year : 2012.....Co-advisor's Signature.....

Co-advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเดียร ที่สละเวลาอันมีค่าเพื่อมาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ แนะนำแนวทางการทำงานวิจัยในทุกขั้นตอน รวมทั้งให้คำปรึกษา แนะนำแนวทางในการแก้ปัญหา ข้อคิดในด้านต่างๆทำให้เกิดประโยชน์แก่การทำวิจัยและวิทยานิพนธ์ ทำให้ผ่านไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรภา คงเป็นสุข ที่สละเวลาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม และให้คำแนะนำต่างๆ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จันท์ ประภา อิมจงใจรัก และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชรีดา ปุกहुต ที่สละเวลาให้เกียรติร่วมเป็นคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นที่มีประโยชน์ต่องานวิจัยของข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชิดพงศ์ ประดิษฐ์สุวรรณ ที่สละเวลาช่วยเหลือให้ความรู้เกี่ยวกับจรรยาบรรณศาสตร์ รวมทั้งแนะนำการคำนวณและการเขียนกราฟ

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณน้าของข้าพเจ้าที่คอยเป็นกำลังใจ ให้คำปรึกษาและพี่อำไพ ประจำห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหารที่ช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือและในด้านต่างๆ

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ และอาจารย์ในภาควิชาทุกท่าน โดยเฉพาะ ไพลิน สุขวงษ์, จารุพรรณ วาที และ อรพิมพ์ ภิรมย์หวาด ที่ช่วยและให้คำปรึกษาเกี่ยวกับงานวิจัยของข้าพเจ้า

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์.....	2
2.1 <i>Kluyveromyces</i> sp	2
2.2 สเตอรอล.....	7
2.3 การนับจำนวนเซลล์มีชีวิตด้วยวิธี Methylene blue staining.....	10
2.4 กระบวนการแช่แข็ง.....	11
2.4.1 ผลของสเตอรอลต่อการอยู่รอดของเซลล์ระหว่างแช่แข็ง.....	14
2.4.2 ผลของอัตราเร็วในการแช่แข็งต่อการอยู่รอดของเซลล์.....	15
2.5 การเก็บรักษาเยีสต์ด้วยวิธีแช่แข็ง.....	18

	หน้า
บทที่ 3 วิธีการทดลอง.....	20
3.1 อุปกรณ์.....	20
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	21
3.3 เชื้อจุลินทรีย์การเก็บรักษาและการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง.....	22
3.4 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	23
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....	28
4.1 การตรวจสอบความถูกต้อง (Validation) การนับจำนวนเซลล์ วิธี Methylene Blue Staining เทียบกับวิธี Total plate count	28
4.2 ผลของสติกมาสเตอร์รอลต่อ <i>K. marxianus</i>	30
4.3 ผลของปริมาณสติกมาสเตอร์รอลและอุณหภูมิแช่แข็งต่อการอยู่รอดของ <i>K. marxianus</i>	35
4.4 การศึกษาผลของสติกมาสเตอร์รอลและอัตราเร็วในการแช่แข็งต่อเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของ <i>K. marxianus</i>	35
4.5 การศึกษาผลของสติกมาสเตอร์รอลต่อการอยู่รอดของ <i>K. marxianus</i> ในระหว่างการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง.....	38
4.6 การศึกษาผลของสติกมาสเตอร์รอลและการแช่แข็งต่อกิจกรรมของเบตากาแลคโตซิเดสของ <i>K. marxianus</i>	45

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	47
เอกสารอ้างอิง.....	48
ภาคผนวก.....	58
ภาคผนวก ก.....	59
ภาคผนวก ข.....	61
ภาคผนวก ค.....	64
ภาคผนวก ง.....	70
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	73

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	การศึกษาด้านชีวภาพและเมตาบอลิซึมของ <i>K.marxianus</i>	3
2.2	ลักษณะเฉพาะของ <i>K. marxianus</i>	6
2.3	การใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมของยีสต์สกุล <i>Kluyveromyces</i> spp.....	6
2.4	กลไกการป้องกันการแช่แข็งของจุลินทรีย์.....	13
4.1	จำนวนเซลล์ <i>K. marxianus</i> ระดับต่างๆ เมื่อนับเซลล์ด้วยวิธี Total plate count agar (TPC) เทียบกับวิธี Methylene blue staining (MBS).....	28
4.2	จำนวนเซลล์ <i>K. marxianus</i> ในช่วง stationary phase (\log_{10} cells/mL) และ ปริมาณ สติกมาสเตอรอลในเซลล์ (mg/g dry weight cells) ที่เติม สติกมาสเตอรอลใน YM broth ระดับต่างๆ.....	31
4.3	สมการจลนพลศาสตร์ปฏิกิริยาอันดับหนึ่งเมื่อเก็บเซลล์ <i>K. marxianus</i> ที่ไม่มี และมีสติกมาสเตอรอลในเซลล์ ณ อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ โดย พล็อตกราฟ ระหว่าง เวลา (วัน) (แกน x) กับ $\ln(N/N_0)$ (แกน y).....	43
4.4	กิจกรรมของเอนไซม์เบตาไกลูโคซิเดส (unit) ของ <i>K. marxianus</i> ที่ไม่มี และมีสติกมาสเตอรอลในสภาวะต่างๆ.....	46
ค1	ปริมาณสติกมาสเตอรอลที่เยื่อหุ้มเซลล์ต่อเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของ <i>K. marxianus</i> หลังการแช่แข็งที่อุณหภูมิต่างๆ.....	67
ค2	อัตราเร็วในการแช่แข็ง <i>K. marxianus</i> ที่อุณหภูมิ -20°C ต่อเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของ <i>K. marxianus</i> ที่ไม่มีและมีสติกมาสเตอรอลที่เยื่อหุ้มเซลล์.....	68

ตารางที่	หน้า
ค3	จำนวนเซลล์ <i>K. marxianus</i> ที่ไม่มีสติกมาสเตอร์อล (\log_{10} cells/mL) ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา 6 สัปดาห์..... 69
ค4	จำนวนเซลล์ <i>K. marxianus</i> ที่มีสติกมาสเตอร์อลที่เยื่อหุ้มเซลล์ (\log cells/mL) ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์..... 69
ง1	การวิเคราะห์ทางสถิติ t-test ของจำนวนเซลล์ <i>K. marxianus</i> (\log_{10} cells/mL) เมื่อนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี total plate count เทียบกับวิธี Methylene blue ที่แปรจำนวนเซลล์ 10^6 cells/mL (A), 10^7 cells/mL (B) และ 10^8 cells/mL..... 70
ง2	การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของจำนวนเซลล์ <i>K. marxianus</i> (\log_{10} cells/mL) เมื่อแปรปริมาณสติกมาสเตอร์อลระดับต่างๆ (A) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95..... 70
ง3	การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของปริมาณสติกมาสเตอร์อลในเซลล์ <i>K. marxianus</i> (mg/g dry weight cell) เมื่อแปรปริมาณสติกมาสเตอร์อลในเซลล์ (A) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95..... 70
ง4	การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็ง ของ <i>K. marxianus</i> เมื่อแปรอุณหภูมิในการแช่แข็ง (A) และปริมาณสติกมาสเตอร์อลในเซลล์ (B) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95..... 71
ง5	การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็งที่ระดับความเชื่อมั่น 95..... 71

ตารางที่		หน้า
ง6	การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็ง <i>K. marxianus</i> ที่ไม่มีสติกมาสเตอร์อลเมื่อแปรอัตราเร็วในการแช่แข็ง (A) และปริมาณ สติกมาสเตอร์อล (B) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.....	71
ง7	การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็ง ของ <i>K. marxianus</i> ที่ไม่มีและมีสติกมาสเตอร์อลเมื่อแปรอัตราเร็วในการแช่แข็ง (A) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.....	72
ง8	การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของกิจกรรมของเอนไซม์ เบตาไกลูคอสิดาซของ <i>K. marxianus</i> (A) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.....	72

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างสเตอรอลชนิดต่างๆ (1) เออร์โกสเตอรอล (2) สติกมาสเตอรอล (3) เบต้าสிடอสเตอรอล (4) โคลเอสเตอรอล (5) โคลเอสตานอล.....	9
2.2	เซลล์ <i>S. cerevisiae</i> ที่ติดสีด้วยเมทิลีนบลู ประกอบด้วยเซลล์มีชีวิต (สีใส) และ เซลล์ตาย (สีฟ้า).....	10
2.3	ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ระหว่างการแช่แข็ง.....	12
2.4	อัตราเร็วในการแช่แข็งต่อเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของ <i>S. cerevisiae</i>	16
2.5	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ที่อัตราเร็วในการแช่แข็งต่างๆ.....	17
3.1	เซลล์ <i>K. marxianus</i> ที่ผ่านการติดสีด้วยเมทิลีนบลู ประกอบด้วยเซลล์มีชีวิต (สีใส)และ เซลล์ตาย (สีฟ้า).....	24
4.1	เปรียบเทียบการนับจำนวนเซลล์ <i>K. marxianus</i> (\log_{10} cells/mL) ระหว่าง วิธี TPC และวิธี MBS.....	29
4.2	ผลของปริมาณสติกมาสเตอรอลที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ(mg/L) ต่อการนำเข้าเซลล์ (mg/g dry weight cells) โดยการวิเคราะห์ด้วย HPLC.....	32
4.3	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของ <i>K. marxianus</i> ที่มีปริมาณสติกมาสเตอรอลที่ต่างกันหลังการแช่แข็งที่อุณหภูมิต่างๆ ด้วยเครื่อง cooling bath.....	35

รูปที่	หน้า	
4.4	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของ <i>K. marxianus</i> ที่ไม่มีและมีสติกมาสเตอร์รอด ในเซลล์เมื่อแปรอัตราเร็วในการแช่แข็ง ที่อุณหภูมิ -20°C เมื่อแช่แข็ง ด้วยเครื่อง DSC.....	37
4.5	ผลของสติกมาสเตอร์รอดต่อจำนวนเซลล์มีชีวิต (\log cells/mL) ที่เก็บไว้ที่ อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ของ <i>K. marxianus</i> ที่ไม่มีสติกมาสเตอร์รอด ที่เยื่อหุ้มเซลล์.....	40
4.6	ผลของสติกมาสเตอร์รอดต่อจำนวนเซลล์มีชีวิต (\log_{10} cells/mL) ที่เก็บไว้ที่ อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา 6 สัปดาห์ของ <i>K. marxianus</i> ที่มีสติกมาสเตอร์รอดที่ เยื่อหุ้มเซลล์.....	40
4.7	เวลาในการแช่แข็ง (วัน) กับค่า $\ln(N/N_0)$ ของ <i>K. marxianus</i> ที่ไม่มี สติกมาสเตอร์รอด.....	42
4.8	เวลาในการแช่แข็ง (วัน) กับค่า $\ln(N/N_0)$ ของ <i>K. marxianus</i> ที่มี สติกมาสเตอร์รอด.....	42
4.9	อุณหภูมิในการเก็บแช่แข็งต่อความชันของกราฟจลนพลศาสตร์ปฏิกิริยา อันดับ 1 ของเซลล์ที่ไม่มีและมีสติกมาสเตอร์รอด.....	44
ค1	กราฟมาตรฐานของปริมาณสติกมาสเตอร์รอด (mg/L) ต่อพื้นที่ได้กราฟเมื่อ วิเคราะห์ด้วย HPLC.....	64
ค2	กราฟการเจริญ (\log_{10} cells/mL) ของ <i>K. marxianus</i> UBU1-11.....	64
ค3	การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของสารละลายเซลล์ในหลอดปั่นเหวี่ยงปริมาตร 15 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิแช่แข็ง -10°C	65
ค4	การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของสารละลายเซลล์ในหลอดปั่นเหวี่ยงปริมาตร 15 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิแช่แข็ง -20°C	65

รูปที่	หน้า
ค5	
การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของสารละลายเซลล์ในหลอดปั่นเหวี่ยงปริมาตร 15 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิแช่แข็ง -30 °C.....	66
ค6	
การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของสารละลายเซลล์ในหลอด eppendoff ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิแช่แข็ง -30 °C.....	66

บทที่ 1

บทนำ

Kluyveromyces marxianus เป็นยีสต์ทนร้อนที่มีสมบัติน่าสนใจอยู่หลายประการ เช่น เจริญได้ที่อุณหภูมิสูง (45-50 °C) มีอัตราการเจริญเร็วและสามารถเจริญได้บนแหล่งคาร์บอนหลายชนิด (Fonseca และคณะ, 2008) และมีบทบาทในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น การผลิตสารอโรมา, การผลิตเอโนไซม์ ได้แก่ อินูลิเนส, เบตากาแลคโตสิเดส และอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลจากเวย์ (Karina และคณะ, 2013) แต่ในการเก็บรักษา *K. marxianus* ต้องมีการถ่ายเชื้อ (subculturing) เพื่อต่ออายุของเชื้อ และการเก็บเชื้อโดยการถ่ายเชื้อเป็นวิธีทำที่ง่ายแต่มีข้อเสียคืออายุในการเก็บสั้น, โอกาสปนเปื้อนสูงและมีโอกาสเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมได้ (สวาทวีร์ ลิ้มทอง, 2549) ดังนั้นจึงต้องการหาวิธีการเพื่อทำให้เซลล์มีอายุการเก็บนานขึ้น และวิธีที่น่าสนใจ ได้แก่ การแช่แข็ง (freezing) เนื่องจากการเก็บยีสต์ด้วยการแช่แข็งเป็นที่นิยมอย่างแพร่หลายทั้งในอุตสาหกรรมอาหารและยา เพราะเป็นวิธีที่ทำให้เซลล์มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูง เก็บได้นาน และองค์ประกอบทางพันธุกรรมไม่เปลี่ยนแปลง (Dumont, Pieere-Andre และ Patrick, 2003) แต่ในระหว่างการแช่แข็งจะมีการเกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เซลล์ขาดน้ำ โดยเฉพาะที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ โดยมีรายงานว่า ความสามารถในการทนการแช่แข็งของเซลล์จะเกี่ยวข้องกับไขมันไม่อิ่มตัว, สเตอรอลที่เยื่อหุ้มเซลล์ และเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็งแปรผันกับไขมันหรือสเตอรอลที่เยื่อหุ้มเซลล์ (Bostian และ Gilliland, 1981) นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราเร็วในการแช่แข็งเป็นอีกปัจจัยที่ใช้พิจารณาอัตราการอยู่รอดของเซลล์หลังแช่แข็ง ซึ่งอัตราเร็วในการแช่แข็งที่ต่ำและสูงเกินไปทำให้เซลล์เกิดการขาดน้ำได้ (Mazur, 1977) ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสติกมาสเตอรอลต่อการอยู่รอดและกิจกรรมบางอย่างภายในเซลล์หลังการแช่แข็งของ *K. marxianus*

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 *Kluyveromyces*

Kluyveromyces marxianus พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1888 โดย Hansen และให้ชื่อว่า *Saccharomyces marxianus* ต่อมา Lodder และ Kreger-van (1952) เป็นผู้แยกยีสต์ชนิดนี้ออกมาจากผลองุ่น และได้ศึกษา *S. marxianus* จำนวน 10 สายพันธุ์และสายพันธุ์ที่ได้รับความสนใจได้เปลี่ยนชื่อเป็น *Zygosaccharomyces marxianus* และขึ้นทะเบียนที่ Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) และในปี ค.ศ. 1922 H. Schnegg ได้ศึกษาสายพันธุ์ของ *S. marxianus* จำนวน 10 สายพันธุ์พบว่ามีความแตกต่างกัน เช่น การสร้าง pseudomycelium, ความสามารถในการหมักน้ำตาลแลคโตส เป็นต้น โดย Schaffrath และ Breunig (1939) รายงานว่า *S. marxianus* สามารถใช้อินูลินเป็นแหล่งคาร์บอนได้ นอกจากนี้แต่ละสายพันธุ์ยังมีความสามารถในการหมักน้ำตาลที่แตกต่างกัน รวมทั้งลักษณะทางกายภาพต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบกับ *Saccharomyces* ดังนั้นจึง reclassify โดย Van der Walt (Van der Walt, 1970) และตั้งชื่อสกุลใหม่เป็น *Kluyveromyces* และเปลี่ยน *S. marxianus* เป็น *K. marxianus* โดย *Kluyveromyces* ทั้งหมดมี 15 สปีชีส์ (Kurtzman และ Fell, 1988) ต่อมาเริ่มมีการศึกษาสมบัติด้านชีวภาพและเมตาบอลิซึมของ *K. marxianus* ในสายพันธุ์ต่างๆ พบว่า *K. marxianus* เป็นแหล่งของสารประกอบที่จำเพาะบางชนิด เช่น fructose-1,6-bisphosphatase, uridine diphosphate (UDP) glucose-4-epimerase, acid phosphatase, amine oxidase, protein phosphatases, carboxypeptidases และ aminopeptidases รวมถึงศึกษาการขนส่งของน้ำตาลบางประเภท เช่น แลคโตส, กลูโคส, ฟรุคโตส และไซโลส เป็นต้น สารอินทรีย์ เช่น กรดแลคติก, กรดมาลิก รวมทั้งการวิเคราะห์องค์ประกอบของผนังเซลล์, ความสามารถในการทนยาปฏิชีวนะ, autolysis (ตารางที่ 2.1) ซึ่งการศึกษาส่วนใหญ่จะควบคู่ไปกับ *S. cerevisiae*

ตารางที่ 2.1 การศึกษาด้านชีวภาพและเมตาบอลิซึมของ *K. marxianus*

สิ่งที่ศึกษา	Strain
Lactose symporter	<i>K. marxianus</i> CBS 397, IGC 2902
Transport of lactic acid	<i>K. marxianus</i> IGC 3014
Behaviour of <i>K. marxianus</i> during autolysis	<i>K. marxianus</i> CBS 397
composition of the cell wall	<i>K. marxianus</i> R157, 1586
Characterization of an amine oxidase	<i>K. marxianus</i> CBS 5795
The transport mechanism of xylose	<i>K. marxianus</i> ATCC 52486

ที่มา: Fonseca และคณะ (2008)

K. marxianus มีรูปร่างเซลล์เป็นแบบ Ellipsoidal หรือ Cylindrical มีขนาดของเซลล์ (2.0-6.0) x (3.0-10.0) μm สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูง และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 20-28 °C สามารถใช้แหล่งอาหารในการเจริญได้หลายชนิด เช่น กลูโคส ซูโครสอินูลินและแลคโตส (ตารางที่ 2.2) (Kurtzman และ Fell, 1998) มีอัตราการเจริญสูงและสามารถสร้างเอทานอลได้ในกรณีที่มีน้ำตาลมากเกินไป (Fonseca และคณะ, 2008) นอกจากนี้ *K. marxianus* เป็นยีสต์ประเภท facultatively fermentative และ Crabtree-negative (Van Dijken และคณะ, 1993) และไม่สามารถเจริญในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนได้ โดย *K. marxianus* จัดอยู่ในกลุ่มของ Generally-Recognized-as-Safe (GRAS) เช่นเดียวกับ *S. cerevisiae* และ *K. lactis* (Hensing และคณะ, 1995)

สำหรับการศึกษาทางกายภาพมีการศึกษาปัจจัยเกี่ยวกับสภาวะสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญของ *K. marxianus* โดย Chassang-Douillet และคณะ(1973) ศึกษาลักษณะทางกายภาพของ *K. marxianus* เทียบกับ *S. cerevisiae* เช่น ผลของ pH และความเข้มข้นของเอทานอลต่อ

จลนพลศาสตร์การเจริญของ *K. marxianus* และในปี 1990 มีการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการหายใจและการหมัก และพบว่า *K. marxianus* เป็น strong Crabtree-negative ซึ่งต่างจากยีสต์โดยทั่วไปเช่น *S. cerevisiae* และ *K. lactis* (Verduyn, Postma และ Scheffers, 1992) คือกระบวนการหายใจของยีสต์จะถูกยับยั้งเมื่อปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อสูงหรือที่เรียกว่ากระบวนการ Crabtree-effect

K. marxianus สามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายประเภท เช่น inulinase, β -galactosidase, β -glucosidase และ Endopolygalacturonases เป็นต้น (ตารางที่ 2.3) (Workman และ Day, 1984) รวมทั้งเอนไซม์บางชนิดที่นำไปใช้ในอุตสาหกรรม เช่น protein, phosphatases, carboxypeptidases และ aminopeptidases เป็นต้น

เบตาคาแลคโตสิเดสคือเอนไซม์ที่เปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสเป็นกลูโคสและกาแลคโตส โดยพบว่ามีสปีชีส์ยีสต์เพียง 2% ที่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ (Rajoka, Khan และ Shahid, 2003) และพบว่า *K. marxianus* สามารถสร้างเอนไซม์เบตาคาแลคโตสิเดส (Rajoka และคณะ, 2003) โดยมีการศึกษาการผลิตเอนไซม์เบตาคาแลคโตสิเดสด้วย *K. marxianus* โดยใช้ cheese whey (Sonawat, Agrawal และ Dutta, 1981; Nunes, Massaguer และ Alegre, 1993) พบว่า ในช่วง stationary phase กิจกรรมเอนไซม์ของ *K. marxianus* CBS 712 และ CBS 6556 มีค่าคงที่ (Rech Cassini และ Secchi, 1999) โดยกิจกรรมของเอนไซม์มากที่สุดเมื่อเซลล์เจริญที่อุณหภูมิ 37 °C และต่ำที่สุดเมื่อเจริญที่อุณหภูมิ 40 °C (Rech และคณะ, 1999) แต่ *K. marxianus* IMB3 มีกิจกรรมของเอนไซม์มากที่สุดเมื่อเจริญที่อุณหภูมิ 50 °C (Barron และคณะ, 1995) และพบว่าน้ำตาลแลคโตสเป็นสับสเตรตที่ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เบตาคาแลคโตสิเดสมากที่สุด (Rajoka และคณะ, 2003) และ pH 7.3 เป็นสภาวะเหมาะสมในการสร้างเอนไซม์เบตาคาแลคโตสิเดส ของ *K. marxianus* CCT 7082 and ATCC 16045 (Braga และคณะ, 2012)

นอกจากนี้ *K. marxianus* สามารถสร้างเอนไซม์อินูลิเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยโมเลกุลของอินูลินให้กลายเป็นฟรุคโตส โดยเอนไซม์นี้ต้องมีการเหนี่ยวนำให้ *K. marxianus* สร้าง โดยการใช้อินูลินหรือน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนและเอนไซม์ที่สร้างจะปลดปล่อยออกมาภายนอก (Rouwenhorst และคณะ, 1988) อินูลิเนสได้รับการศึกษาอย่างแพร่หลายเพื่อนำมาใช้

ในการผลิตฟรุคโตสไซรัปจากอินูลิน โดย Pessoa และ Vitolo (1999) พบว่ากิจกรรมอินูลิเนสของ *K. marxianus* DSM 70106 มากที่สุดเมื่อใช้อินูลินเป็นแหล่งคาร์บอน

การผลิตเอทานอลด้วย *K. marxianus* เป็นที่ได้รับความสนใจ เนื่องจากเป็นยีสต์ที่สามารถหมักเอทานอลได้ที่อุณหภูมิสูง การหายใจไม่ถูกยับยั้งด้วยกลูโคส กระบวนการหายใจและการหมักสามารถเกิดขึ้นพร้อมกัน (Fonseca และคณะ, 2008) โดยปกติในการผลิตเอทานอลจะใช้ *S. cerevisiae* ในกระบวนการหมัก แต่ในกระบวนการผลิตเอทานอลมีความร้อนเกิดขึ้นซึ่ง *S. cerevisiae* ไม่ทนความร้อน จึงต้องมีค่าใช้จ่ายในการหล่อเย็นถึงหมัก ดังนั้นการใช้ *K. marxianus* สามารถลดค่าใช้จ่ายระบบการทำความเย็น, มีอัตราเร็วในการหมักสูง, สามารถผลิตเอทานอลได้อย่างต่อเนื่องและโอกาสในการปนเปื้อนต่ำ (Banat และคณะ, 1998) ทำให้มีการศึกษาและแยกยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ใหม่ขึ้นเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ โดย Pukahuta และคณะ (2008) ได้แยกยีสต์ทนร้อนจากกากหมักของโรงงานน้ำตาลจาก 144 ไอโซเลต พบว่ามี 10 ไอโซเลต ที่เจริญและผลิตเอทานอลได้ดีที่อุณหภูมิ 45 °C ได้แก่ สายพันธุ์ UBU1-1, UBU1-2, UBU1-3, UBU1-4, UBU1-5, UBU1-6, UBU1-7, UBU1-8, UBU1-9 และ UBU1-10 และมีการทดสอบความเป็นไปได้ในการใช้ยีสต์สายพันธุ์ UBU ในการผลิตเอทานอลระดับโรงงานต้นแบบ (pilot scale) และพบว่า *K. marxianus* สามารถผลิตแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิมากกว่า 40 °C และเจริญอุณหภูมิได้มากที่สุด 52 °C (Anderson , Mcneil และ Watson, 1986)

K. marxianus มีประโยชน์ในอุตสาหกรรมอื่นๆ เช่น การผลิตสารอโรมา ได้แก่ fruit ester, carboxylic acid และ 2-phenyl ethanol (2-PE) ซึ่ง 2-PE เป็นสารชนิดหนึ่งที่มีกลิ่นเหมือนดอกกุหลาบ (Welsh, Murray และ Williams, 1989) โดยที่ 2-PE มีความสำคัญอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมเนื่องจากสามารถนำมาใช้ทดแทนกลิ่นกุหลาบจากธรรมชาติที่มีราคาสูง (1,000 ดอลลาร์ต่อกิโลกรัม)

ตารางที่ 2.2 ลักษณะเฉพาะของ *K. marxianus*

ลักษณะ	
รูปร่างเซลล์	Ellipsoidal, Cylindrical
ขนาดเซลล์	(2.0-6.0) x (3.0-10.0) μm
การสืบพันธุ์	budding
อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ	20-28 °C
แหล่งคาร์บอนในการเจริญ	กลูโคส, ซูโครส, อินูลิน, แลคโตส

ที่มา : Kurtzman และ Fell (1998)

ตารางที่ 2.3 การใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมของยีสต์สกุล *Kluyveromyces* spp.

เอนไซม์	การนำไปใช้	stain
Inulinase	ผลิตฟรุคโตสไซรัป	<i>K. fragilis</i> ATCC 12424
β -galactosidase	ลดปริมาณแลคโตสในอาหาร	<i>K. marxianus</i> CBS 6397, CBS 6556
β -glucosidase	ไฮโดรไลซิสของเซลลูโลส	<i>K. marxianus</i> NCYC 111
Endopolygalacturonase	ลดความหนืดของผลิตภัณฑ์ที่ทำ จากผลไม้	<i>K. marxianus</i> CCT 3172

ที่มา : Fonseca และคณะ (2008)

2.2 สเตอรอล

สารประกอบในกลุ่มของไขมันเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ยูคาริโอต เนื่องจากมีความสำคัญในการควบคุมความแตกต่างของ electrochemical และมีคุณสมบัติที่สำคัญในการเป็นเยื่อเลือกผ่านของสารต่างๆ เมื่อมีการเคลื่อนที่ของสารเข้า-ออกของเซลล์สัตว์, พืช และฟังไจ ซึ่งโครงสร้างและปริมาณของสเตอรอลบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ยูคาริโอต มีผลต่อกระบวนการทำงานที่แตกต่าง เช่น การสร้างเวสสิเคิล, การคัดขนาดโปรตีน, เอนโดไซโทสิส, homotypic membrane fusion, การรวมกลุ่มกันของโปรตีนและไขมัน และคุณสมบัติในการเป็นเยื่อเลือกผ่านของไอออนชนิดต่างๆ (Fonseca และคณะ, 2008)

การสังเคราะห์สเตอรอลในเซลล์เกิดที่เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (ER) โดยชนิดของสเตอรอลที่สังเคราะห์จะแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของเซลล์ เช่น โคเลสเตอรอลในเซลล์สัตว์ สติกมาสเตอรอล สโตสเตอรอล แคมแปสเตอรอลในเซลล์พืช และเออร์โกสเตอรอลในฟังไจ โดยมีโครงสร้างของสเตอรอลที่ต่างกันดังรูปที่ 2.1 ดังนั้นสิ่งมีชีวิตที่มีคิงดอมต่างกันจะมีโครงสร้างของสเตอรอลที่แตกต่างกันแต่ฟังก์ชันการทำงานและโครงสร้างระหว่างสปริงโกลิปิดและสเตอรอลจะเหมือนกัน โดยสเตอรอลบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ จะเปลี่ยนรูปโดยกระบวนการเอสเทอร์ฟิเคชันที่บริเวณสายโซ่ยาวของไขมันเป็นสเตียรอยด์เอสเทอร์และเก็บในรูปของหยดไขมัน (lipid droplet) (Koffel และ Schneiter, 2006) โดยการสังเคราะห์, การขนส่งและปฏิกิริยาเอสเทอร์ของสเตอรอลอิสระและการไฮโดรไลซิสของสเตียรอยด์เอสเทอร์เป็นตัวควบคุมภาวะธำรงดุลของสเตอรอล (Sterol homeostasis) เพื่อป้องกันการเป็นพิษเนื่องจากมีปริมาณสเตอรอลอิสระมากเกินไป โดยสเตอรอลอิสระจะส่งไปที่เยื่อหุ้มเซลล์ (Feng และคณะ, 2003) แต่วิถีในการขนส่งยังไม่สามารถอธิบายได้แน่ชัด แต่มีการขนส่งแบบใช้และไม่ใช้เวสิเคิล โดยใช้ ATP (Mesmin และ Maxfield, 2009)

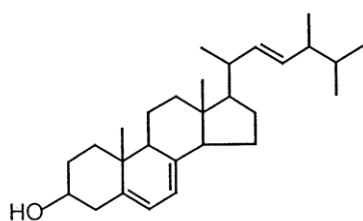
S. cerevisiae เป็นยีสต์ที่ได้รับความนิยมในการศึกษาวิถีการสังเคราะห์สเตอรอลและการนำสเตอรอลเข้าเซลล์ โดยใช้เอนไซม์ ER-localized ในการสังเคราะห์สเตอรอลและส่งไปที่เยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งเยื่อหุ้มเซลล์เป็นบริเวณที่มีเออร์โกสเตอรอลมากที่สุด (Zinser, 1991) และการขนส่งเกิดขึ้นเร็วมาก โดยมีอัตราเร็วในการขนส่งเออร์โกสเตอรอลเข้า-ออกบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ประมาณ 10^5 โมเลกุลต่อวินาที และบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์จะมีการฟอร์มโครงสร้างของ เออร์โกสเตอรอล – ฟอสโฟลิพิด (sterol – sphingolipid complex) (Baumann และคณะ, 2005) ซึ่งโครงสร้างนี้พบได้

จากการศึกษาโดยใช้ fluorescent sterol binding polyene filipin (Jin, Mccaffery และ Grote, 2008)

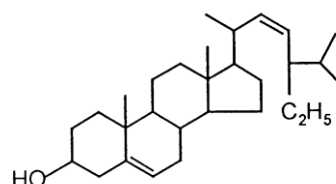
โดยปกติ *S. cerevisiae* ไม่สามารถนำสเตอรอลอิสระจากสิ่งแวดล้อมเข้าเซลล์ได้ในกรณีที่เกิดภาวะที่มีออกซิเจน (Lorenz และคณะ, 1986) แต่ในกระบวนการสังเคราะห์สเตอรอลนั้น จำเป็นต้องใช้ออกซิเจนดังนั้นในสภาวะที่ไม่มีอากาศเซลล์ไม่สามารถสังเคราะห์สเตอรอลได้ ดังนั้นจึงพยายามนำสเตอรอลจากสิ่งแวดล้อมเข้ามาในเซลล์ โดยสเตอรอลจากสิ่งแวดล้อมเข้ามาที่เยื่อหุ้มเซลล์และบางส่วนส่งต่อไปยังเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมโดยวิธีที่ไม่ใช้เวสสิเคิลและเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์และเก็บในรูปแบบของหยดไขมัน (Lorenz และคณะ, 1986)

ในกรณีการนำสเตอรอลเข้าเซลล์ในภาวะมีอากาศ เช่น *Schizosaccharomyces pombe* ซึ่งเป็นยีสต์ ประเภท obligate aerobe สามารถนำสเตอรอลเข้าสู่เซลล์ในภาวะที่มีออกซิเจนได้ โดยการกระตุ้นจาก hypoxic transcription ถูกควบคุมโดยกลุ่มของโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมชื่อว่า sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) (Rawson, 2003) ประกอบไปด้วย 3 รูป คือ SREBP-1a, SREBP-1c และ SREBP-2 โดย SREBPs ทำหน้าที่กระตุ้นการ transcription ของยีนส์มากกว่า 30 ชนิด ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์และการนำเข้าของโคเลสเตอรอล กรดไขมัน ไตรกลีเซอไรด์และ ฟอสโฟลิปิด (Horton, Goldstein และ Brown, 2002) และกิจกรรมของ SREBPs จะหยุดทำงานเมื่อการสะสมของโคเลสเตอรอลในเซลล์มากเกินไป พอล SREBPs ประกอบไปด้วย 2 transmembrane segment อยู่ด้านในของเยื่อหุ้มเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมซึ่งประกอบไปด้วยปลายที่มีคาร์บอนและไนโตรเจนอยู่ที่บริเวณไซโตซอล (รูปที่ 2.2) ในปลายด้าน N ของ SREBP เป็นบริเวณที่เกิด transcription ของ helix-loop-helix/leucine zipper (bHLH-zip) และด้านปลาย C จะเป็นตัวกระตุ้น SREBP cleavage-activating protein (SCAP) (Rawson, 2003) ซึ่ง SCAP คือ โปรตีนของเยื่อหุ้มเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม ประกอบไปด้วย 8 transmembrane segment นอกจากนี้ SREBP จะถูกกระตุ้นด้วย sequential proteolytic cleavage ในกอลจิแอปพาราตัส (Rawson, 2003) และถูกควบคุมโดย Golgi-localized Site-1 และ Site-2 proteases ซึ่ง SREBP homologs เป็นลักษณะพิเศษที่พบอยู่ใน *D. melanogaster* และ *C. elegans* แต่ไม่พบใน *S. cerevisiae* โดยเซลล์ของชนิดนี้ไม่สามารถ

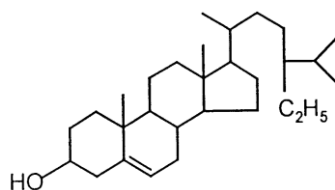
ควบคุมการสังเคราะห์สเตอรอลได้และต้องการนำสเตอรอลจากสิ่งแวดล้อมเข้ามาใช้ (Mckay และคณะ, 2003)



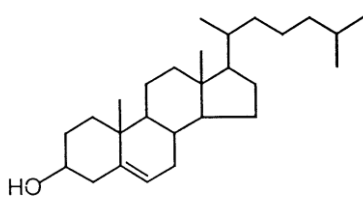
(1)



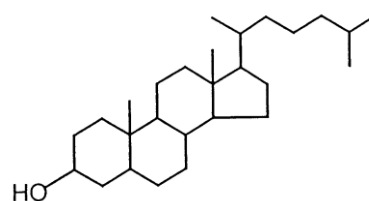
(2)



(3)



(4)



(5)

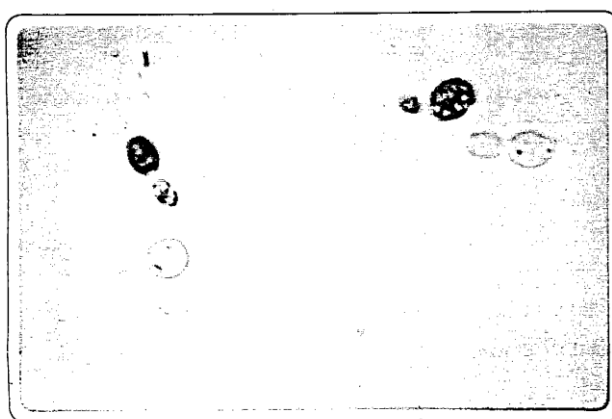
รูปที่ 2.1 โครงสร้างสเตอรอลชนิดต่างๆ (1) เออร์โกสเตอรอล (2) สติกมาสเตอร์รอล

(2) เบต้าซิโตสเตอร์รอล (4) โคลเลสเตอร์รอล (5) โคลเลสตานอล

ที่มา: Rungrach และ Takemoto (1998)

2.3 การนับจำนวนเซลล์มีชีวิตด้วยวิธี Methylene blue staining

ปัจจุบันอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลเป็นอุตสาหกรรมที่ทำอย่างแพร่หลาย และใช้ยีสต์ในระหว่างกระบวนการหมัก โดยประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลจะพิจารณาเซลล์ที่มีชีวิต ดังนั้น การพิจารณาเซลล์มีชีวิตในระหว่างการหมักจึงเป็นสิ่งจำเป็น โดยวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายและเป็นวิธีมาตรฐานคือการนับจำนวนเซลล์ทั้งหมด (Total plate count) แต่เป็นวิธีที่ใช้เวลานานและยุ่งยาก ดังนั้นจึงมีการหาวิธีที่ง่ายและสะดวกสำหรับการแยกเซลล์มีชีวิตออกจากเซลล์ไม่มีชีวิต โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งได้มีการใช้สีย้อมและวิธีการต่างๆ เพื่อหาจำนวนเซลล์มีชีวิต โดยวิธีการต่างๆ จะมีการทดสอบเทียบกับวิธีมาตรฐาน (Total plate count) (Nagodawithana และคณะ, 1974) และสีย้อมที่ใช้ได้แก่ เมทิลีนบลู โดยเมทิลีนบลูใช้ในการแยกระหว่างเซลล์เป็นและเซลล์ตาย เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย สามารถทราบผลได้ทันที และสะดวกเมื่อเทียบกับวิธี plate count agar ดังนั้น จึงเป็นวิธีที่นิยมใช้นับจำนวนเซลล์ยีสต์ในอุตสาหกรรมการหมัก หรือผลิตแอลกอฮอล์ โดยหลักการคือ เซลล์มีชีวิตมีเอนไซม์ที่สำหรับกำจัดสีเมทิลีนบลูได้ แต่เซลล์ที่ตายแล้วไม่มีเอนไซม์นี้ ดังนั้นเซลล์มีชีวิตจะไม่ติดสีของเมทิลีนบลูและเซลล์ตายจะติดสีน้ำเงิน (รูปที่ 2.2) วิธีการคือนำสารละลายเซลล์ผสมกับสารละลายเมทิลีนบลู และนับจำนวนเซลล์บน Heamacytometer เมทิลีนบลูมีความเป็นพิษต่อเซลล์ยีสต์ ดังนั้นต้องเตรียมตัวอย่างและนับจำนวนเซลล์ให้เสร็จภายใน 10 นาที



รูปที่ 2.2 เซลล์ *S. cerevisiae* ที่ติดสีด้วยเมทิลีนบลู ประกอบด้วย

เซลล์มีชีวิต (สีใส) และ เซลล์ตาย (สีน้ำเงิน)

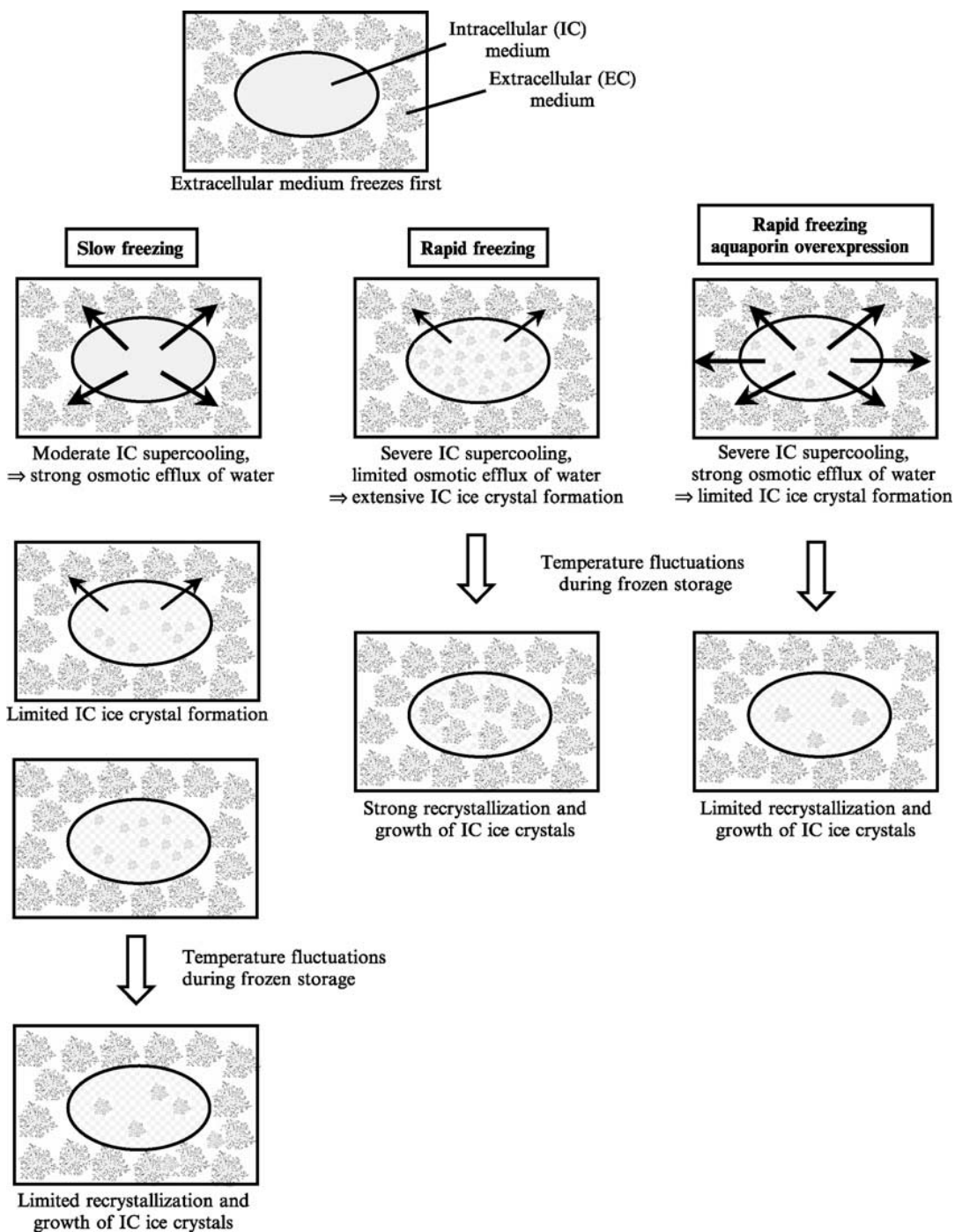
ที่มา: Lee, Robinson และ Wang (1981)

2.4 กระบวนการแช่แข็ง

การแช่แข็งเป็นกระบวนการเก็บรักษาเซลล์ในภาวะที่เซลล์มีชีวิตและไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม นอกจากนี้ยังลดหรือหยุดปฏิกิริยาทางชีวภาพภายในเซลล์ และกระบวนการแช่แข็งเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมในอุตสาหกรรมอาหารและยา (Dumont และคณะ, 2003) โดยระหว่างการแช่แข็งเซลล์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ, ปริมาณและสถานะของน้ำรวมทั้งความเข้มข้นของสารละลาย ซึ่งส่งผลทำให้เซลล์เกิดการบาดเจ็บได้ (Mazur, 1970)

ในกระบวนการแช่แข็งเมื่ออุณหภูมิของสารละลายเซลล์ (cell suspension) ต่ำกว่า $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ พบว่าบริเวณภายในและภายนอกเซลล์ไม่เกิดผลึกน้ำแข็งเนื่องจากภาวะ supercooling และจุดเยือกแข็งที่ต่ำลงของสารละลาย เนื่องจากจุดเยือกแข็งของไซโทพลาสซึมอยู่ที่ $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ และเมื่ออุณหภูมิในการแช่แข็งอยู่ที่ -5 ถึง $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ผลึกน้ำแข็งจะเกิดขึ้นเฉพาะบริเวณด้านนอกเซลล์ เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์ทำหน้าที่ป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งในไซโทพลาสซึม (Mazur, 1965) และที่อุณหภูมิต่ำกว่า $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ภายในเซลล์เกิดผลึกน้ำแข็ง ผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นภายนอกเซลล์จะทำให้เซลล์อยู่ในภาวะไม่สมดุลเนื่องจากเกิดความแตกต่างระหว่างความเข้มข้นของสารละลายภายในและภายนอกเซลล์ โดยที่สารละลายภายในเซลล์มีความเข้มข้นต่ำกว่าภายนอกเซลล์ สำหรับกรณีอัตราเร็วในการแช่แข็งช้า น้ำภายในเซลล์จะออสโมซิสออกมานอกเซลล์เพื่อรักษาสมดุลทางเคมีของภายในและภายนอกเซลล์ ส่งผลให้เซลล์สูญเสียน้ำ (dehydrate) ภายในเซลล์ไม่เหลือน้ำ ทำให้ไม่เกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นในเซลล์ แต่กรณีที่อัตราเร็วในการแช่แข็งเร็ว (รูปที่ 2.3) น้ำไม่สามารถออสโมซิสออกมาได้ทันก่อนเข้าสู่สมดุล จึงทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์ ซึ่งผลึกน้ำแข็งนี้จะส่งผลให้เกิดการบาดเจ็บในเซลล์

ผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นภายในเซลล์เป็นสาเหตุทำให้เซลล์เกิดความเครียดเชิงกล (mechanical stress) โดยเฉพาะบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์และออร์แกเนลล์ต่างๆ โดยพบว่าเมื่ออัตราเร็วในการแช่แข็งเพิ่มขึ้น ความดันออสโมติกระหว่างภายในและภายนอกเซลล์มีความแตกต่างกัน และผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นที่ไซโทพลาสซึมจะเกิดผ่านบริเวณช่องว่างของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งอุณหภูมิและอัตราเร็วในการแช่แข็งมีผลต่อการเกิดผลึกน้ำแข็ง และขนาดของผลึกน้ำแข็งจะแปรผกผันกับอัตราเร็วในการแช่แข็ง (Mazur, 1966)



รูปที่ 2.3 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ระหว่างการแช่แข็ง ที่มา : Mazur (1966)

ตารางที่ 2.3 กลไกการป้องกันการแช่แข็งของจุลินทรีย์

	การป้องกันการแช่แข็ง	กลไกการป้องกัน
กระบวนการเมตาบอลิซึมในการทนต่อความเครียดของเซลล์	trehalose	ป้องกันโปรตีนและเยื่อหุ้มเซลล์ ป้องกันการเสียสภาพของโปรตีน
ลักษณะของเยื่อหุ้มเซลล์	Fluidity Permeability Aquaporins	การรักษาฟังก์ชันของเยื่อหุ้มเซลล์ เพิ่มประสิทธิภาพของการขจัดน้ำภายในเซลล์ เพิ่มสมบัติ Permeability ของเยื่อหุ้มเซลล์
กระบวนการออกซิเดชันและออกซิโมติก	Antioxidant proteins การรวมกันของตัวถูกละลาย Hydrophyllins	การรักษาสมดุลออกซิโมติก
การป้องกันการแช่แข็งแบบจำเพาะ	Antifreeze proteins	การป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 °C

(ที่มา: Tanghe และคณะ, 2002)

ส่งผลให้ degree of under cooling (ความแตกต่างระหว่างอุณหภูมิในไซโทพลาสซึมและจุดเยือกแข็ง) เพิ่มขึ้นโดยพบว่าการเกิดผลึกน้ำแข็งอย่างต่อเนื่องเกี่ยวข้องกับ degree of under cooling ดังนั้นเมื่ออัตราเร็วในการแช่แข็งเพิ่มขึ้น ผลึกน้ำแข็งจะมีขนาดเล็กลง และการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์จะเกิดขึ้นเมื่อขนาดของผลึกน้ำแข็งบริเวณภายนอกเซลล์มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของบริเวณรูของเยื่อหุ้มเซลล์เยื่อหุ้มเซลล์มีบทบาทสำคัญในกระบวนการแช่แข็งเนื่องจากมีสมบัติเป็นเยื่อเลือกผ่าน (semipermeable)

โดยระหว่างการแช่แข็ง น้ำจะมีการแพร่เข้าและออกเซลล์แบบ passive transport เมื่อเซลล์ถูกล้อมรอบด้วยผลึกน้ำแข็ง น้ำที่แพร่ออกนอกเซลล์และผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นในเซลล์จะส่งผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ เนื่องจากเซลล์มีลักษณะยึดหยุ่นที่จำกัด (Wolfe, 1985) เมื่อเซลล์เกิดการหดตัว องค์ประกอบต่างๆบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์จะถูกปลดปล่อยออกมาและผนังเซลล์มีความหนาแน่นเพิ่มขึ้น และจากการศึกษาพบว่าบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์เกิดความเสียหายจากการแช่แข็งมากกว่าผนังเซลล์ (Morris, Coulson และ Clarke, 1998) นอกจากความเสียหายที่เกิดขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์ ยังมีความเสียหายที่เกิดภายในเซลล์ เช่น ความเสียหายของไลโซโซม (Mcgrath, Cravalho และ Huggins, 1975), แวกคิวโกล และการรั่วของ cytochrome C บริเวณไมโทคอนเดรีย (Morris และคณะ, 1998) แต่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์เป็นที่นิยมใช้ศึกษาการบาดเจ็บเนื่องจากการแช่แข็ง

นอกจากนี้ยังมีอีกหลายปัจจัยที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการป้องกันการบาดเจ็บ (ตารางที่ 2.4) เช่น ปริมาณของทีรีฮาโลส การสังเคราะห์ chaperone องค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์และการสังเคราะห์ของโปรตีนที่ต้านอนุมูลอิสระ (Tanghe และคณะ, 2002)

แต่พบว่ายังมีหลายปัจจัยที่ช่วยป้องกันการบาดเจ็บของเซลล์และเพิ่มอัตราการอยู่รอดระหว่างการแช่แข็งได้แก่ กระบวนการเมตาบอลิซึมในการทนต่อความเครียดของเซลล์ ลักษณะของเยื่อหุ้มเซลล์ กระบวนการออกซิเดชันและออกซิโมติก การป้องกันการแช่แข็งแบบจำเพาะและอัตราเร็วในการแช่แข็ง (ตารางที่ 2.3)

2.4.1 ผลของสเตอรอลต่อการอยู่รอดของเซลล์ระหว่างการแช่แข็ง

เยื่อหุ้มเซลล์มีบทบาทสำคัญในการป้องกันการบาดเจ็บของเซลล์ระหว่างการแช่แข็ง โดย Murakami และ Yokoigawa (1995) ศึกษา องค์ประกอบไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ของ *Torulasporea delbrueckii* D2-4 (freeze tolerant) กับ *T. delbrueckii* 60B3 (freeze-sensitive) พบว่า D2-4 สามารถทนต่อการแช่แข็งดีกว่า 60B3 เนื่องจากความแตกต่างระหว่างองค์ประกอบไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ของยีสต์สองชนิด โดยพบว่าปริมาณไขมันรวมและสเตอรอลใกล้เคียงกัน แต่ปริมาณ

ฟอสโฟลิปิด, นิวทรัลลิพิด และอัตราส่วนระหว่างสเตอรอลและฟอสโฟลิพิดมีความแตกต่างกัน โดยสเตอรอลจะลดคุณสมบัติ fluidity ที่เยื่อหุ้มเซลล์ ดังนั้นอัตราส่วนโดยโมลระหว่างสเตอรอลต่อฟอสโฟลิพิดที่เยื่อหุ้มเซลล์ เป็นปัจจัยสำคัญในการพิจารณาคุณสมบัติ fluidity โดยพบว่าอัตราส่วนโดยโมลระหว่างสเตอรอลต่อฟอสโฟลิพิดที่เยื่อหุ้มเซลล์เพิ่มขึ้นทำให้คุณสมบัติ fluidity ที่เยื่อหุ้มเซลล์ลดลง จากการศึกษาพบว่า D2-4 มีอัตราส่วนโดยโมลระหว่างสเตอรอลต่อฟอสโฟลิพิดที่เยื่อหุ้มเซลล์ มากกว่า 1.7 เท่าของ 60B3 ทำให้ D2-4 ทนการแช่แข็งดีกว่า ดังนั้นปริมาณสเตอรอลที่เพิ่มทำให้อัตราส่วนโดยโมลระหว่างสเตอรอลต่อฟอสโฟลิพิดที่เยื่อหุ้มเซลล์เพิ่มขึ้น และคุณสมบัติ fluidity ที่เยื่อหุ้มเซลล์ลดลง

Calcott และ Antohony (1982) ศึกษาการอัตราการอยู่รอดหลังการแช่แข็งของ *S. cerevisiae* โดยเติมแคมเปสเตรอล, โคเลสเตอรอล, เออร์โกสเตอรอลและสตีกลมาสเตรอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำไปแช่แข็งพบว่า ยีสต์ที่เติมสตีกลมาสเตรอลมีอัตราการอยู่รอดหลังการแช่แข็งสูงสุด และรองลงมาได้แก่ เออร์โกสเตอรอล, แคมเปสเตรอลและโคเลสเตอรอลตามลำดับ โดยพบปฏิสัมพันธ์ระหว่างไขมันไม่อิ่มตัวบริเวณสายโซ่ข้างของสเตอรอลกับเมทิลีนกรุปบริเวณฟอสโฟลิปิดทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความแน่นขึ้นและช่วยป้องกันการบาดเจ็บระหว่างการแช่แข็งได้ และพบว่าบริเวณสายโซ่ข้างของสตีกลมาสเตรอลมีหมู่เอทิล ซึ่งมีขนาดใหญ่ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความแน่นมากกว่าสายโซ่ข้างที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นเมทิล (เออร์โกสเตอรอล) และไม่มีหมู่ฟังก์ชันที่สายโซ่ข้าง (โคเลสเตอรอล, แคมเปสเตรอล)

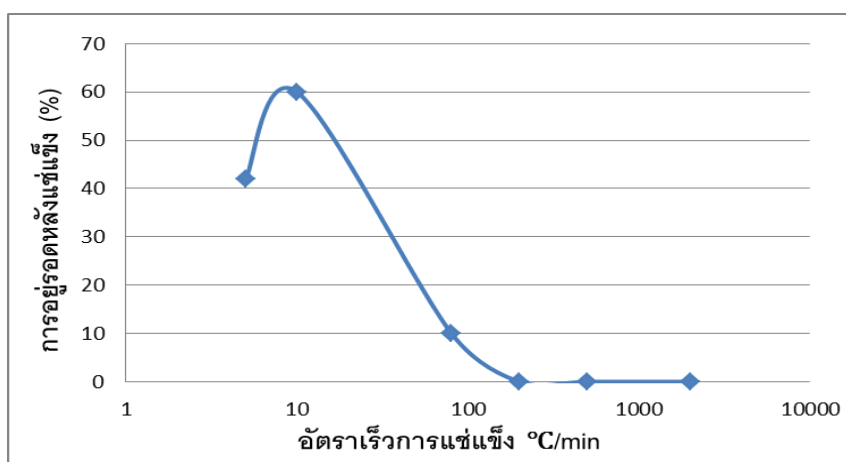
นอกจากนี้ Bostian และ Gilliland (1981) ศึกษาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ *K. fragilis* หลังแช่แข็งที่อุณหภูมิ -19°C กับองค์ประกอบของกรดไขมันของเซลล์ โดยศึกษาองค์ประกอบไขมันของ *K. fragilis* 8 สายพันธุ์กับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็ง พบว่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังแช่แข็งแปรผันตามปริมาณกรดไขมันโคเลสเตอรอลในอีกที่เยื่อหุ้มเซลล์

2.4.2 ผลของอัตราเร็วในการแช่แข็งต่อการอยู่รอดของเซลล์

อัตราเร็วในการแช่แข็งจัดเป็นอีกปัจจัยที่ใช้พิจารณาอัตราการอยู่รอดของเซลล์ซึ่งอัตราเร็วในการแช่แข็งที่ต่ำและสูงเกินไปทำให้เซลล์เกิดการบาดเจ็บได้ โดย Mazur (1977) ศึกษาอัตราเร็วในการแช่แข็งต่อเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ไซกระดุกหนู, ยีสต์และเซลล์เม็ดเลือดแดงมนุษย์

พบว่ากราฟที่ได้มีลักษณะเป็นกราฟรูปตัวยูคว่ำ โดยอัตราเร็วที่ทำให้เซลล์ในกระดุกหนู, ยีสต์และเซลล์เม็ดเลือดแดงมนุษย์ มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงสุดอยู่ที่ 1.6, 7 และ 200 °C/min ตามลำดับ

นอกจากนี้ Mcgrath, Cravalho และ Huggins (1975) ศึกษาอัตราเร็วในการแช่แข็งต่อร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ *S. cerevisiae* พบว่ามีอัตราการรอดสูงสุดเมื่อแช่แข็งด้วยอัตราเร็ว 7 °C/min และที่อัตราเร็วที่ต่ำและสูงกว่า 7 °C/min มีอัตราการอยู่รอดของเซลล์ลดลง (รูปที่ 2.4) ขณะแช่แข็ง ผลึกน้ำแข็งจะเริ่มเกิดด้านนอกของเซลล์ โดยที่ภายในเซลล์ยังไม่มีผลึกน้ำแข็ง เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์ทำหน้าที่ป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเยื่อหุ้มเซลล์ (Mazur, 1965) กรณีอัตราเร็วในการแช่แข็งช้ากว่าที่อยู่ที่อยู่ในเซลล์จะแพร่ออกนอกเซลล์ เนื่องจากความแตกต่างของความเข้มข้นภายในและภายนอกเซลล์ เพื่อรักษาศักย์สมดุลเคมีของเซลล์ ผลที่เกิดขึ้นคือเซลล์จะสูญเสียน้ำและไม่เกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ แต่กรณีอัตราเร็วการแช่แข็งของเซลล์เร็ว น้ำภายในเซลล์ไม่สามารถแพร่ออกมาได้ทัน ทำให้เซลล์เกิดการเย็นตัวอย่างยิ่งยวดและเกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์(รูปที่ 2.4)

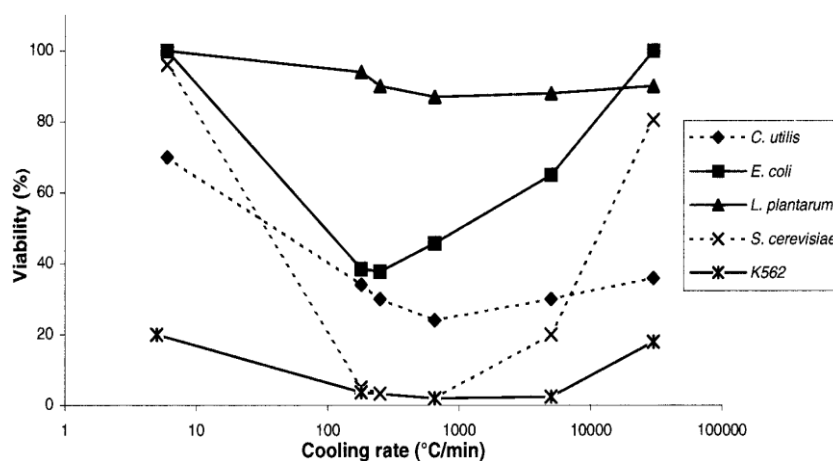


รูปที่ 2.4 อัตราเร็วในการแช่แข็งต่อเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของ *S. cerevisiae* (ที่มาจาก Mazur, 1965)

Dumont และ คณะ (2003) ศึกษาปัจจัยในการรอดชีวิตของเซลล์หลังแช่แข็งที่อัตราเร็วแช่แข็งต่างๆ โดย ศึกษาที่เซลล์ 5 ชนิด ได้แก่ *S. cerevisiae*, *Candida utilis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* และ เซลล์ลูคีเมียของมนุษย์ โดยแปรอัตราเร็วในการแช่แข็ง 5 ระดับ ได้แก่ 5, 180, 250, 5,000 และ 30,000 °C/min พบว่าเซลล์ที่แช่แข็งที่อัตราเร็ว 5 °C/min มี

เปอร์เซ็นต์อยู่รอดหลังการแช่แข็งสูงกว่าที่ 180, 250 °C/min แต่ที่อัตราเร็วในการแช่แข็ง 5,000 และ 30,000 °C/min เซลล์จะมีเปอร์เซ็นต์อยู่รอดที่กลับมาสูงขึ้น ยกเว้นกรณีของ *L. plantarum* ที่มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็งที่สูงในทุกอัตราเร็วการแช่แข็ง (รูปที่ 2.5)

เนื่องจากถ้าอัตราการเคลื่อนที่ของน้ำที่ออกจากเซลล์เร็วกว่าการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิจะไม่เกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์ทำให้เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์สูง แต่ถ้าการเคลื่อนที่ของน้ำเท่ากับการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ อัตราเร็วในการแช่แข็งจะส่งผลให้น้ำที่อยู่ในเซลล์เกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นส่งผลทำให้เซลล์เกิดการบาดเจ็บและตายได้ แต่ที่อัตราเร็วในการแช่แข็งเร็วมาก (5,000 และ 30,000 °C/min) (รูปที่ 2.5) (Dumon และคณะ, 2003) เซลล์มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังการแช่แข็งสูงเพราะว่า การเกิดผลึกน้ำแข็งขนาดเล็กจะไม่เป็นอันตรายกับเซลล์ (Mazur, 1966) นอกจากนี้ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการรอดชีวิตของเซลล์หลังการแช่แข็งคือ อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวต่อปริมาตรเซลล์ (SV) ดังนั้นถ้าเซลล์มีขนาดใหญ่รัศมีของเซลล์มาก SV จะต่ำ และพบว่าถ้า SV สูง การถ่ายเทความร้อนและน้ำจะดีกว่าเซลล์ที่มี SV ต่ำ ค่า SV ของ *S. cerevisiae*, *Candida utilis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* และ เซลล์ลูคีเมียของมนุษย์ เท่ากับ 0.7, 0.75, 3.3, 3.7 และ 0.6 จึงเห็นได้ว่า *L. plantarum* มีร้อยละการอยู่รอดหลังการแช่แข็งที่สูง ในขณะที่ เซลล์ลูคีเมียมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดที่ต่ำ (Dumont และคณะ, 2003)



รูปที่ 2.5 ร้อยละของการอยู่รอดของเซลล์ที่อัตราเร็วในการแช่แข็งต่างๆ ◆ , *C. utilis* ; * , K562;

x, *S. cerevisiae*; , ▲ , *L. plantarum* ; ■ , *E. coli* ที่มา : (Dumon และคณะ, 2003)

2.5 การเก็บรักษายีสต์ด้วยวิธีแช่แข็ง

วัตถุประสงค์ในการเก็บรักษายีสต์เพื่อเก็บไว้สำหรับศึกษาหรือใช้เป็นกล้าเชื้อในอุตสาหกรรม และในการเก็บรักษายีสต์นั้นเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญเนื่องจากเซลล์จะตายหรือสูญเสียลักษณะบางประการเมื่อเก็บไว้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม โดยเป้าหมายที่สำคัญในการเก็บรักษาสเซลล์คือให้เซลล์มีชีวิตนานที่สุดและการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ชีวภาพและพันธุกรรม น้อยที่สุด ซึ่งวิธีที่ง่ายและนิยมทำคือการถ่ายเชื้อ (subculturing) จากอาหารเลี้ยงเชื้อหนึ่งไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ แต่ข้อเสียของวิธีนี้คือ เมื่อเก็บไว้ในระยะเวลาอันยาวนาน อาหารเลี้ยงเชื้อจะแห้งและหมดไป และอาจเกิดการผันแปรของเชื้อเมื่อมีการถ่ายเชื้อไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ (วันเจริญ และคณะ, 2540) ดังนั้นมีผู้ปรับปรุงวิธีการหรือคิดค้นวิธีการอื่นๆ เพื่อให้เก็บเชื้อได้นานขึ้น มีความสมบูรณ์และเกิดการเปลี่ยนแปลงน้อย ซึ่งวิธีการเก็บเชื่อนั้นมีอยู่หลายวิธีขึ้นกับวัตถุประสงค์และความจำเป็นของสถานการณ์ ซึ่งวิธีการเก็บแช่แข็ง (freezing) เป็นวิธีหนึ่งที่ทำให้เชื้อที่เก็บไว้มีความคงตัวสูงและจำนวนเซลล์มีชีวิตอยู่รอดมาก

การเก็บเซลล์ด้วยวิธีแช่แข็งเป็นวิธีที่ทำให้เซลล์หยุดกิจกรรมต่างๆ เนื่องจากน้ำภายในและภายนอกเซลล์กลายเป็นน้ำแข็ง ทำให้เซลล์รอดชีวิตอยู่ได้นานและไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ซึ่งในระหว่างการเก็บแช่แข็งเซลล์บางส่วนจะเกิดการบาดเจ็บเนื่องจากการเกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นในเซลล์ หรือการเกิดแรงดันออสโมซิสระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ การป้องกันเพื่อลดการบาดเจ็บของเซลล์สามารถทำได้โดย การใช้สารป้องกันความเย็น เช่น กลีเซอรอล, การใช้ยีสต์ที่มีอายุเหมาะสม, การควบคุมอัตราเร็วในการแช่แข็งและอัตราการละลายน้ำแข็งระหว่างการนำเซลล์กลับมาใช้งาน โดยพบว่า การเก็บยีสต์ที่อุณหภูมิ -196°C ยีสต์มีการรอดชีวิตที่สูง (Abadias และคณะ, 2001) และพบว่า การเก็บแช่แข็งยีสต์ที่อุณหภูมิสูงกว่า -70°C ไม่เหมาะสมในการเก็บรักษาสเซลล์ เนื่องจากมี free water ในเซลล์ และ free water มีกิจกรรมทางกายภาพและเคมีอยู่ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้ DNA ของเซลล์เสียหายและ การรอดชีวิตระหว่างการแช่แข็งลดลงอย่างรวดเร็ว โดยการเก็บแช่แข็งเซลล์ที่อุณหภูมิ -80°C เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเก็บแช่แข็งเซลล์ (Spring, 2006)

สำหรับอายุของการเก็บด้วยวิธีแช่แข็งไม่มีการระบุอย่างแน่ชัด โดยที่ NCYC ประเทศอังกฤษ พบว่าความมีชีวิตไม่ลดลงเมื่อเก็บนาน 26 เดือน และในบางสายพันธุ์เก็บได้นานถึง 4 ปี โดยพบว่าวิธีนี้ใช้ได้กับยีสต์เกือบทุกสกุลและมีระดับการรอดชีวิตโดยเฉลี่ยทันทีหลังการแช่แข็งสูงกว่า 60% เช่น *Saccharomyces* ประมาณ 65% และสำหรับ *Candida* ประมาณ 73% (Henry และ Kirsop, 1989)

สำหรับการเก็บแช่แข็งสารที่นิยมใช้เป็นสารป้องกันความเย็น เช่น กลีเซอรอล (5, 10 และ 20 %) ไดมethylซัลฟอกไซด์ (DMSO) (10%) เอทิลแอลกอฮอล์และ YM broth เช่น Henry และ Kirsop (1989) ศึกษาการเก็บแช่แข็งยีสต์ในหลอดโพลีโพรพีลีนโดยใช้กลีเซอรอล 10% เป็นสารป้องกันความเย็น นอกจากนี้ Morris, Coulson และ Clake (1988) ศึกษาผลการอยู่รอดของ *S. cerevisiae* ที่แช่แข็งในสารละลาย NaCl ที่ความเข้มข้นต่างกัน พบว่า เมื่อแช่แข็งเซลล์ที่อุณหภูมิ -15 °C ในสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.1, 0.3 และ 0.5 M มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็ง 78, 61 และ 68% ตามลำดับ

นอกจากการเก็บรักษารักชายีสต์ด้วยวิธีแช่แข็งในรูปของหัวเชื้อ ยังมีการเก็บแช่แข็งยีสต์ที่อยู่ในผลิตภัณฑ์ เช่น Meziani และคณะ (2012) ศึกษาผลของการแช่แข็งต่อความสามารถในการหมักของ *S. cerevisiae* ในโดเมือเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิต่าง

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

ในงานวิจัยนี้มีอุปกรณ์, สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง และวิธีการทดลองดังนี้

3.1 อุปกรณ์

- 3.1.1 กล้องจุลทรรศน์ (Trinocular phase contrast microscope) บริษัท Olympus ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.2 เครื่องเขย่า (shaker) บริษัท New Brunswick Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.3 เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น 2000 บริษัท New Brunswick Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.4 เครื่องวัดความเป็นกรด – เบส (pH meter) รุ่น 1000 บริษัท Cyberscan ประเทศสิงคโปร์
- 3.1.5 เครื่องชั่งแบบละเอียด (electronic balance) รุ่น ML204 บริษัท Mettler Toledo ประเทศไทย
- 3.1.6 เครื่องชั่งแบบหยาบ (electronic balance) รุ่น ML1602 บริษัท Mettler Toledo ประเทศไทย
- 3.1.7 เครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) รุ่น Diamond บริษัท Perkin Elmer ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.8 เครื่องทำความเย็น (cooling bath) รุ่น HMT 200 บริษัท Heto ประเทศญี่ปุ่น
- 3.1.9 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น 5310 บริษัท Kubota ประเทศญี่ปุ่น
- 3.1.10 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น 22R บริษัท Hettich zentrifugen
- 3.1.11 ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (incubator) บริษัท WTB binder ประเทศเยอรมัน
- 3.1.12 ตู้แช่เย็น -10 °C (refrigerator) บริษัท Sanyo ประเทศญี่ปุ่น
- 3.1.13 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 °C (temperature freezer) บริษัท Toshiba ประเทศญี่ปุ่น

- 3.1.14 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -30 °C (temperature freezer) บริษัท Toshiba ประเทศญี่ปุ่น
- 3.1.15 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -40 °C (ultra low temperature freezer) บริษัท New Brunswick Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.16 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -60 °C (ultra low temperature freezer) บริษัท New Brunswick Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.17 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -80 °C (ultra low temperature freezer) บริษัท New Brunswick Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.18 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) รุ่น 1100 series บริษัท Agilent ประเทศอังกฤษ
- 3.1.19 หม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave) รุ่น sx-700 บริษัท Meditop ประเทศไทย
- 3.1.20 เครื่องเขย่าสาร (vortex mixer) รุ่น genie2 บริษัท Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.20 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) บริษัท Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- 3.2.1 สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
- 3.2.2 สเตกมาสเตอร์อล (Stigmasterol) บริษัท Sigma ประเทศมาเลเซีย
- 3.2.3 น้ำตาลเดกโตส (Dextrose) บริษัท Britania ประเทศอาร์เจนตินา
- 3.2.4 น้ำตาลแลคโตส (Dextrose) บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
- 3.2.5 เปปโตน (Peptone) บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
- 3.2.6 สารสกัดมอลต์ (Malt extract) บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
- 3.2.7 เอทานอล (Ethanol) บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

- 3.2.8 เมทานอล (Methanol) บริษัท fisher scientific ประเทศฟินแลนด์
- 3.2.9 Ortho-Nitrophenyl- β -galactosidase (ONPG) บริษัท Sigma ประเทศมาเลเซีย
- 3.2.10 คลอโรฟอร์ม (Chloroform) บริษัท Analar ประเทศอังกฤษ
- 3.2.11 Sodium dodecyl sulfate (SDS) บริษัท Ajax finechem ประเทศออสเตรเลีย
- 3.2.12 Na_2HPO_4 บริษัท Ajax finechem ประเทศออสเตรเลีย
- 3.2.13 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ บริษัท Ajax finechem ประเทศออสเตรเลีย
- 3.2.14 KCl บริษัท Ajax finechem ประเทศออสเตรเลีย
- 3.2.15 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ บริษัท Ajax finechem ประเทศออสเตรเลีย
- 3.2.16 β -mercaptoethanol บริษัท Sigma ประเทศมาเลเซีย
- 3.2.17 Na_2CO_3 บริษัท Ajax finechem ประเทศออสเตรเลีย

3.3 เชื้อจุลินทรีย์ การเก็บรักษาและการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

3.3.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อที่ใช้ในการทดลองคือเชื้อยีสต์ *Kluyveromyces marxianus* UBU 1-11 ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร. ชริดา ปุกนุด จากภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

3.3.2 การเก็บรักษาเชื้อยีสต์

ถ่าย (transfer) *K. marxianus* ที่ใช้ในการทดลองโดยใช้เข็มเย็บเชื้อ (loop) ลาก (streak) ลงบนอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) ลาดเฉียง (agar slant) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และต่อเชื้อทุก 10 วัน

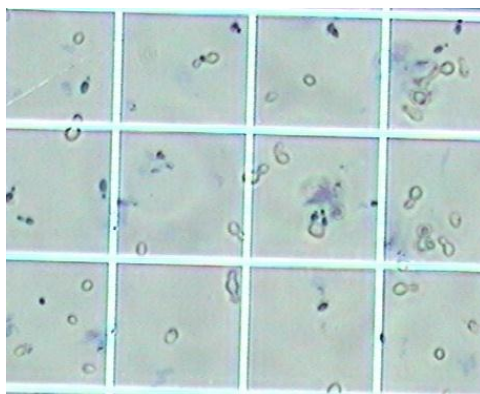
3.3.3 การเตรียม active yeast culture

เชื้อเชื้อจากอาหารแข็ง PDA ลาดเฉียง 1 loop ใส่ลงในอาหารเหลว Yeast Malt extract broth (YM broth) นำไปบ่มบนเครื่องเขย่า (shaker) เขย่าด้วยความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 22 ชั่วโมง

3.4 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.4.1 การตรวจสอบความถูกต้อง (Validation) การนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี Methylene blue staining เทียบกับวิธี total plate count

เตรียมสารละลายยีสต์ให้มีจำนวนเซลล์ 10^6 , 10^7 และ 10^8 cells/mL โดย ปิเปต active yeast culture จากข้อ 3.3.3 ร้อยละ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลว YM broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 22 ชั่วโมง จะได้จำนวนเซลล์อยู่ในช่วง 10^6 cells/mL และ เจือจาง (dilute) ด้วย 0.85% NaCl จะได้จำนวนเซลล์ 10^6 , 10^7 cells/mL จากนั้นนับจำนวนเซลล์มีชีวิตด้วยวิธีนับจำนวนเซลล์ทั้งหมด (Total plate count) เทียบกับวิธี Methylene Blue Staining (MBS) โดยเตรียมร้อยละ 0.025 เมทิลีนบลูในสารละลายริงเจอร์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นปิเปตตัวอย่างเซลล์ปริมาตร 900 ไมโครลิตรและเติม methylene blue ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นหยดลง haemocytometer ที่สะอาด วาง cover slip โดยไม่ให้มีฟองอากาศ นำไปนับจำนวนเซลล์ยีสต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 20 เท่า ปรับโฟกัสให้เห็นตารางทั้งหมด 25 ช่อง ซึ่งใน 1 ช่องจะมีตารางเล็ก 16 ช่อง และนับจำนวนเซลล์ 5 ช่องจากทั้งหมด 25 ช่อง โดยนับบริเวณมุมทั้ง 4 ด้านและตรงกลางอีก 1 ช่อง ถ้าหากมีเซลล์ยีสต์อยู่ทับเส้นระหว่างช่องให้นับเซลล์ทุกเซลล์ที่ทับอยู่บนเส้นด้านซ้ายและด้านบน และไม่นับเซลล์ยีสต์ที่ทับเส้นด้านขวาและด้านล่างของสี่เหลี่ยม และนับจำนวนเซลล์ยีสต์สี่ซึ่งหมายถึงเซลล์ที่มีชีวิต และไม่นับเซลล์ที่ติดสีฟ้าหมายถึงเซลล์ตาย (รูปที่ 3.1) และคำนวณจำนวนเซลล์มีชีวิตในหน่วย cells/mL ด้วยสูตร $A \times 5 \times 10^4 \times \text{dilution factor}$ โดย A คือจำนวนเซลล์ที่นับได้ใน 5 ช่อง และวิเคราะห์ความแตกต่างของสองวิธีด้วย t-test จำนวน 3 ซ้ำ



รูปที่ 3.1 เซลล์ *K. marxianus* ที่ผ่านการติดสีด้วยเมทิลีนบลู ประกอบด้วย เซลล์มีชีวิต (สีใส) และ เซลล์ตาย (สีฟ้า)

3.4.2 การศึกษาผลของสติกมาสเตอร์ลดต่อการเจริญและการนำเข้าสู่เซลล์ของ

K. marxianus

3.4.2.1 ศึกษาผลของปริมาณสติกมาสเตอร์ลดในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญ

ของ *K. marxianus*

เปิด active yeast culture จากข้อ 3.3.3 ร้อยละ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลว YM broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และเติมสติกมาสเตอร์ลดปริมาณ 0, 1, 3, 5, 7 และ 9 mg/L นำไปปั่นบนเครื่องเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 22 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนเซลล์มีชีวิตด้วยวิธี Methylene Blue Staining (MBS) ตามวิธีวิเคราะห์ 3.4.1 โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ

3.4.2.2 ศึกษาผลของสติกมาสเตอร์ลดในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเข้าสู่เซลล์

K. marxianus

เตรียมตัวอย่างเชื้อตามข้อ 3.4.2.1 จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณสติกมาสเตอร์ลดโดยดัดแปลงวิธีของ Letter (1966) โดยปั่นเก็บเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วรอบ 8,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ 2 ครั้ง ทำให้เซลล์แตกโดยใช้เม็ดแก้วขนาด 0.45 มิลลิเมตรจำนวน 10 กรัมใส่ลงในสารละลายยีสต์ที่เติมน้ำ 10 มิลลิลิตรในหลอดขนาด 50 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นแช่ในน้ำแข็ง 15 วินาที ทำ 2 ครั้ง

และทำเช่นเดียวกันแต่เพิ่มเวลาเป็น 30 วินาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นปั่นเก็บเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง สกัดสเตรอลตามวิธีของ Bligh และ Dryer (1959) โดยเติมคลอโรฟอร์ม : เมทานอล ปริมาตร 1 : 2 เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติมคลอโรฟอร์ม เขย่า 1 ส่วน ผสมให้เข้ากันและเติมน้ำ 1 ส่วน นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 1,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ดูดชั้นล่างซึ่งเป็นชั้นของคลอโรฟอร์ม นำมาวิเคราะห์หาปริมาณสเตกมาสเตรอลด้วย HPLC (Saynajoki และคณะ, 2003) วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ HPLC

ชนิดคอลัมน์	Eclipse C-8 5 ไมโครเมตร
Mobile phase	เมทานอล : น้ำ (95:5)
Flow rate	10 mL/min
Detector	DAD ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร

3.4.3 การศึกษาผลของปริมาณสเตกมาสเตรอลและอุณหภูมิแช่แข็งต่อเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของ *K. marxianus* (Dumont, 2003)

เตรียมตัวอย่างเชื้อตามข้อ 3.4.2.1 โดยแปรปริมาณสเตกมาสเตรอลใน YM broth เท่ากับ 0, 5, 7, และ 9 mg/L และสำหรับเซลล์ที่มีสเตกมาสเตรอล 0.04 mg/g cell เตรียมได้จากปิเปต active yeast culture จากข้อ 3.3.3 ร้อยละ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในขวดรูปชมพู่ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลว YM broth ปริมาตร 100 mL นำไปปั่นบนเครื่องเขย่า (shaker) ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นเติมสเตกมาสเตรอลปลอดเชื้อ 5 mg/L แล้วนำไปปั่นต่อให้ครบ 22 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดปั่นเก็บเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ความเร็วรอบ 8,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วย 0.85 % NaCl 2 ครั้ง จากนั้นเติม 0.85 % NaCl ให้มีปริมาตรเท่าเดิม เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นแช่แข็งด้วยเครื่องทำความเย็น (cooling bath) โดยใช้เอทานอลเป็นสารทำความเย็น โดยแช่สารแขวนลอยเซลล์ที่อุณหภูมิ -10, -20 และ -30 °C จนสารแขวนลอยเซลล์มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิที่กำหนด

จากนั้นละลายน้ำแข็งด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 37 °C และนำมาหาผลต่างระหว่างจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตก่อนและหลังการแช่แข็งด้วยวิธี Methylene Blue Staining (MBS) ตามข้อ 3.4.1 โดยวางแผนการทดลองแบบ 3 x 5 Factorial in Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ

3.4.4 การศึกษาผลของอัตราเร็วในการแช่แข็งต่อเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของ

K. marxianus ที่มีและไม่มีสติกมาสเตอรอล

เตรียมตัวอย่างเซลล์ที่ไม่เติมสติกมาสเตอรอลและเติมสติกมาสเตอรอล 5 mg/L ใน YM broth ตามข้อ 3.4.2. และปั่นเก็บเซลล์ตามข้อ 3.4.3 จากนั้นปิเปตสารละลายยีสต์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมนิมัมแพน ซีลปิดและนำไปแช่แข็งด้วยเครื่อง DSC โดยตั้งอุณหภูมิเริ่มต้น 30 °C แช่แข็งจนมีอุณหภูมิต่ำสุดทำเป็น -20 °C โดยแปรอัตราเร็วเป็น 1, 7, 10, 20 และ 40 °C/min และละลายน้ำแข็งด้วยอัตราเร็ว 7 °C/min จากนั้นหาผลต่างระหว่างจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตก่อนและหลังการแช่แข็งด้วยวิธี Methylene Blue Staining (MBS) ตามข้อ 3.4.1 โดยวางแผนการทดลองแบบ 2 x 5 Factorial in Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ

3.4.5 การศึกษาผลของอุณหภูมิของการเก็บแช่แข็งต่อ *K. marxianus* ที่มีและไม่มีสติกมาสเตอรอล

เตรียมตัวอย่างเซลล์ที่ไม่เติมสติกมาสเตอรอลและเติมสติกมาสเตอรอล ตามข้อ 3.4.4 ปิเปตสารละลายยีสต์ปริมาตร 1.5 mL ลงในหลอด Eppendorf ขนาด 2 mL จากนั้นแช่แข็งด้วยเครื่องทำความเย็น (cooling bath) ที่ -30 °C จนสารแขวนลอยเซลล์มีอุณหภูมิที่กำหนด จากนั้นนำไปเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -10, -20, -30, -40, -60 และ -80 °C จำนวน 6 สัปดาห์และหาผลต่างระหว่างจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตก่อนและหลังการแช่แข็งด้วยวิธี Methylene Blue Staining (MBS) ตามข้อ 3.4.1 โดยนับจำนวนเซลล์สัปดาห์ที่ 1-2 สัปดาห์ละ 2 ครั้งและตั้งแต่วันที่ 3-6 นับจำนวนเซลล์อาทิตย์ละ 1 ครั้ง โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ

3.4.6 การศึกษาผลของสติกมาสเตอร์อลและการแช่แข็งต่อกิจกรรมของเอนไซม์เบตาคาแลคโตซิเดสของ *K. marxianus*

เตรียมตัวอย่างตามข้อ 3.4.4 โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อจาก YM broth เป็น สารสกัดยีสต์และน้ำตาลแลคโตส จากนั้นเก็บเซลล์และแช่แข็งที่ $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ตามข้อ 3.4.3 และหากิจกรรมของเอนไซม์เบตาคาแลคโตซิเดสของ *K. marxianus* ที่ไม่มีและมีสติกมาสเตอร์อล ของตัวอย่างก่อนและหลังการแช่แข็ง และตัวอย่างหลังการแช่แข็งที่นำไปเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ 22 ชั่วโมง ตามวิธีของ Miller (1972) โดยปิเปตสารละลายเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิตรลงในหลอด Eppendorf นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 14,000 rpm อุณหภูมิ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 วินาที เทส่วนใสทิ้ง เติมน้ำ Z-buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติม 0.1% SDS 50 ไมโครลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่า 15 วินาที ตามด้วยคลอโรฟอร์ม 50 ไมโครลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 15 วินาที เติมน้ำ Ortho-Nitrophenyl- β -galactosidase (ONPG) (4mg/mL) ที่ทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วย 1 M ของ Na_2CO_3 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ ความเร็วรอบ 14,000 rpm อุณหภูมิ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 30 วินาที นำส่วนใสไปวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร และวัดค่า OD ของเซลล์ยีสต์ที่ใช้ในการหากิจกรรมของเบตาคาแลคโตซิเดส ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (Miller, 1972) จากนั้นคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์จากสูตร

$$\text{Unit ของ เบตาคาแลคโตซิเดส} = \frac{1000 \times OD_{420}}{V \times t \times OD_{600}}$$

V คือ ปริมาตรของเซลล์ (mL)

t คือ เวลาที่ใช้ในการบ่ม (นาที)

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

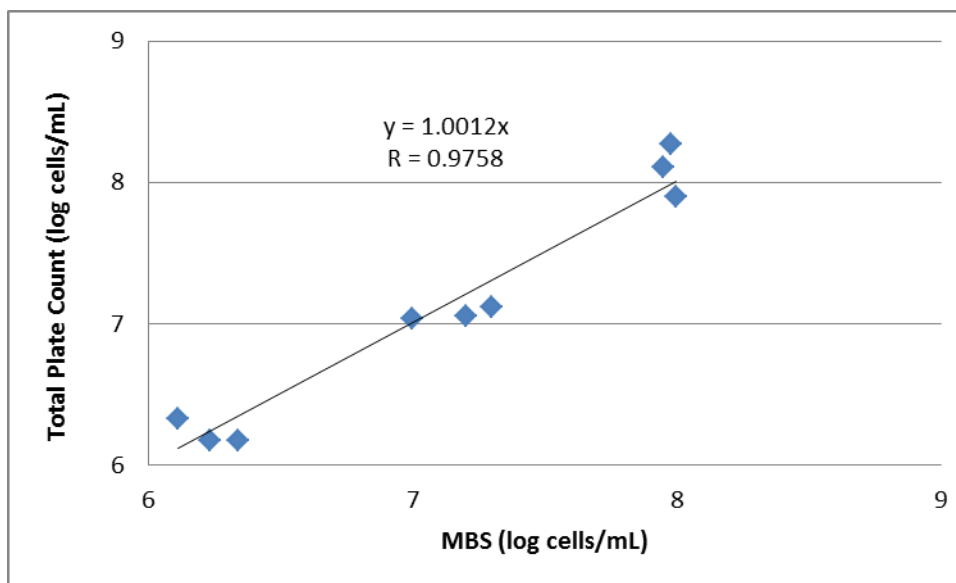
4.1 การตรวจสอบความถูกต้อง (Validation) การนับจำนวนเซลล์ วิธี Methylene Blue

Staining เทียบกับวิธี Total plate count

จากการทดลองพบว่าเมื่อแปรปริมาณเซลล์ในระดับ 6-8 \log_{10} cells/mL แล้วนำไปนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี Methylene blue staining (MBS) เทียบกับวิธี total plate count (TPC) พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) (ตารางที่ 4.1) และเมื่อเขียนกราฟระหว่างจำนวนเซลล์เมื่อนับด้วยวิธี MBS เทียบกับวิธี TPC พบว่ามีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง โดยมีค่า r เท่ากับ 0.9758 ซึ่งค่า r มีค่าเป็นบวกแสดงว่าถ้าจำนวนเซลล์ที่นับด้วยวิธี MBS เพิ่ม จำนวนเซลล์ที่นับด้วยวิธี TPC เพิ่มตาม และถ้าจำนวนเซลล์ที่นับด้วยวิธี MBS ลด จำนวนเซลล์ที่นับด้วยวิธี TPC ลดลงด้วย (รูปที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 จำนวนเซลล์ *K. marxianus* ระดับต่างๆ เมื่อนับเซลล์ด้วยวิธี Total plate count agar (TPC) เทียบกับวิธี Methylene blue staining (MBS)

จำนวนเซลล์ (cell/mL)	วิธี	จำนวนเซลล์ที่นับได้ (\log_{10} cell/mL)		
		วิธี MBS	วิธี TPC	ค่า r
10^6	MBS	6.11	6.23	6.34
	TPC	6.33	6.17	6.17
10^7	MBS	7.30	7.00	7.20
	TPC	7.12	7.04	7.05
10^8	MBS	7.95	7.98	8.00
	TPC	8.11	8.27	7.90



รูปที่ 4.1 เปรียบเทียบการนับจำนวนเซลล์ *K. marxianus* (\log_{10} cells/mL) ระหว่าง วิธี TPC และวิธี MBS

ซึ่งสอดคล้องกับ Lee, Robinson และ Wang (1981) ศึกษาวิธีการหาจำนวนเซลล์ *S. cerevisiae* ที่มีชีวิตโดยใช้วิธี MBS และวิธี McDonald's (สำหรับวิธีของ McDonald's คือการเปลี่ยนสารละลายที่ใช้ในวิธี MBS จากเมทิลีนบลูเป็น Wolford stain โดยใช้สารละลาย A (น้ำมันอะนิลีน 3 mL + เอทานอล 95% 10 mL + HCl 1.5 mL + เมทิลีนบลูที่ละลายในแอลกอฮอล์ 30 mL + น้ำกลั่น 55.5 mL) 10 mL ผสมกับสารละลาย B (fushin 1 g + เอทานอล 95% 100 mL) 2 mL และเติมน้ำกลั่น 55.5 mL) เทียบกับ วิธี viable cell count และนับจำนวนเซลล์ในช่วง $1 \times 10^5 - 8 \times 10^8$ cells/mL พบว่าจำนวนเซลล์ที่ได้มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงและวิธี MBS สามารถใช้ในการนับจำนวนเซลล์ยีสต์ได้ในระยะเวลาสั้น ดังนั้นในการทดลองจะใช้วิธี MBS ในการนับจำนวนเซลล์มีชีวิตเนื่องจาก เมื่อคำนวณทางสถิติแล้วไม่มีความแตกต่างเมื่อเทียบกับวิธี TPC ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน นอกจากนี้วิธี MBS เป็นวิธีที่ใช้ับจำนวนเซลล์ได้ง่ายสะดวกและรวดเร็วกว่า วิธี TPC รวมถึงงานวิจัยนี้มีการวิเคราะห์ผลโดยการนับจำนวนเซลล์เป็นวิธีวิเคราะห์หลักในการทดลอง แทนการใช้วิธี TPC ที่ใช้เวลานานและค่าใช้จ่ายสูง

4.2 ผลของสติกมาสเตอร์ลดต่อการเจริญและการนำเข้าสู่เซลล์ของ *K. Marxianus*

จากการศึกษาผลของปริมาณสติกมาสเตอร์ลดที่เติมลงใน YM broth 1-9 mg/L ต่อจำนวนเซลล์ *K. marxianus* ในช่วง stationary phase (\log_{10} cells/mL) เมื่อนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี MBS (ตารางที่ 4.2) พบว่า *K. marxianus* ที่เจริญที่อุณหภูมิห้องใน YM broth และ *K. marxianus* ที่เจริญที่อุณหภูมิห้องใน YM broth ที่เติมสติกมาสเตอร์ลด ปริมาณ 1-9 mg/L ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังนั้นสติกมาสเตอร์ลดจึงไม่มีผลต่อการเจริญของ *K. marxianus*

จากรายงานก่อนหน้าพบว่าสเตอร์ลดใน *K. marxianus* มีเพียงชนิดเดียว คือ เออร์โกสเตอร์ลด ซึ่งพบที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์และเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (Molnár และคณะ, 1996) โดยพบว่าการเพิ่มเออร์โกสเตอร์ลดในอาหารเลี้ยงเชื้อช่วยเพิ่มจำนวนเซลล์ในช่วง stationary phase (Martin, 1968) และเมื่อพิจารณาโครงสร้างของเออร์โกสเตอร์ลดกับสติกมาสเตอร์ลดพบที่มีความแตกต่างกันที่บริเวณสายโซ่ข้างของสเตอร์ลด โดยเออร์โกสเตอร์ลดมีหมู่เมทิลแต่สติกมาสเตอร์ลดมีหมู่เอทิล (รูปที่ 2.2) ดังนั้นเนื่องจากโครงสร้างที่แตกต่างกันและสติกมาสเตอร์ลดไม่ใช่สเตอร์ลดที่จำเป็นของยีสต์ทำให้สติกมาสเตอร์ลดไม่มีผลในการเพิ่มจำนวนเซลล์

ตารางที่ 4.2 จำนวนเซลล์ *K. marxianus* ในช่วง stationary phase (\log_{10} cells/mL) และปริมาณ สติกมาสเตอรอลในเซลล์ (mg/g dry weight cells) ที่เติมสติกมาสเตอรอลใน YM broth ระดับต่างๆ

ปริมาณสติกมาสเตอรอล ที่เติมใน YM broth (mg/L)	จำนวนเซลล์ช่วง stationary phase ^{ns} (\log_{10} cells/mL)	ปริมาณสติกมาสเตอรอล ในเซลล์ (mg/g dry weight cells)
0	8.26±0.10	0.00±0.00
1	8.28±0.11	0.00±0.00
3	8.19±0.09	0.00±0.00
5	8.16±0.18	0.15 ^b ±0.01
7	8.17±0.21	0.32 ^a ±0.06
9	8.24±0.11	0.37 ^a ±0.08

ns คือ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$); ($r = 3$)

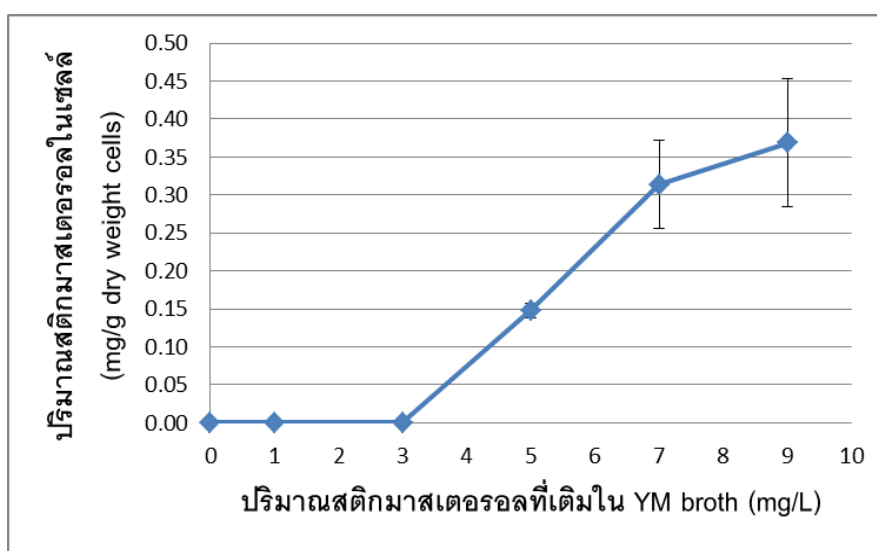
a,b คือ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$); ($r = 3$)

Martin (1968) ศึกษาผลของชนิดสเตอรอลต่อการเจริญของ *S. cerevisiae* ที่เลี้ยงใน ภาวะไม่มีอากาศ โดยแปรชนิดและปริมาณของสเตอรอล พบว่าสเตอรอลบางชนิดไม่มีผลในการ เพิ่มจำนวนเซลล์ในช่วง stationary phase แต่สเตอรอลบางชนิด มีผลในการเพิ่มจำนวนเซลล์ ในช่วง stationary phase ได้ 2-3 เท่า ซึ่งสามารถอธิบายได้จากทฤษฎี All or None (Martin, 1968) คือสเตอรอลบางชนิดแม้เติมในปริมาณน้อยก็มีส่วนช่วยเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ แต่ สเตอรอลบางชนิดแม้เติมในปริมาณมากก็ไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ ตัวอย่างของสเตอรอลที่ สามารถช่วยเพิ่มจำนวนเซลล์ เช่น เออร์โกสเตอรอล, 5 α - cholestane-3 α -ol และสเตอรอลที่ไม่ ช่วย เช่น 5 α -cholestane, Lupeol และ 4-Cholesten-3-one

Rodriguez และ Parks (1982) ได้ศึกษาผลของการเติมโคเลสเตอรอลลงในอาหารเลี้ยง เชื้อเพียงชนิดเดียวไม่มีผลต่อการเจริญของ *S. cerevisiae* แต่เมื่อมีการเติมเออร์โกสเตอรอล

โคเลสเตอรอล สติกมาสเตอรอลหรือเบต้าสโตสเตอรอล ปริมาณ 10 ng/mL ลงไปกับ โคเลสเตอรอล 5 $\mu\text{g/mL}$ พบว่ามีส่วนช่วยเพิ่มการเจริญของเซลล์ได้

เมื่อแปรปริมาณสติกมาสเตอรอลใน YM broth 1-9 mg/L ต่อปริมาณสติกมาสเตอรอลในเซลล์ ไม่พบปริมาณสติกมาสเตอรอลในเซลล์ *K. marxianus* เมื่อเติมสติกมาสเตอรอลใน YM broth 1 และ 3 mg/L และพบปริมาณสติกมาสเตอรอลในเซลล์เมื่อเติมสติกมาสเตอรอลใน YM broth ตั้งแต่ 5 mg/L (ตารางที่ 4.2) และปริมาณสเตอรอลในเซลล์แปรผันตามปริมาณสติกมาสเตอรอลที่เติมใน YM broth (รูปที่ 4.3)



รูปที่ 4.2 ผลของปริมาณสติกมาสเตอรอลที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (mg/L) ต่อการนำเข้าสู่เซลล์ (mg/g dry weight cells)

เมื่อเติมสติกมาสเตอรอลใน YM broth 5 mg/L พบว่าปริมาณสติกมาสเตอรอลในเซลล์แตกต่างจากการเติมสติกมาสเตอรอลใน YM broth 7 และ 9 mg/L และการเติมสติกมาสเตอรอลใน YM broth 7 และ 9 mg/L ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 4.2) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าสติกมาสเตอรอลสามารถเข้าสู่เซลล์ได้ในปริมาณที่จำกัด (รูปที่ 4.2)

สันนิษฐานว่าปริมาณสติกมาสเตอรอลที่พบนั่นอาจจะอยู่ที่ผนังเซลล์หรือเยื่อหุ้มเซลล์ เนื่องจากการสังเคราะห์สเตอรอลในเซลล์และการนำสเตอรอลจากสิ่งแวดล้อมเข้าสู่เซลล์มีการสังเคราะห์สเตอรอลไปที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ยีสต์ (Lorenz และคณะ, 1986; Zinser, 1991)

เนื่องจากในขั้นตอนการสกัดสติกมาสเตอรอลเพื่อนำไปวิเคราะห์ได้ทำให้เซลล์แตก ซึ่งเป็นการทำเซลล์แตกทางกายภาพโดยการเขย่าด้วย glass bead เป็นเวลา 90 วินาที (Hazen และ Cutler, 1982) เมื่อบั่นเหวี่ยงเก็บตะกอนเซลล์ส่วนที่เป็นของแข็งคือผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ที่นำมาวิเคราะห์สติกมาสเตอรอลและเมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์จะทำให้ไขมันที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ออกมา (Nguyen, Fleet และ Rogers, 1998)

โดยยีสต์ที่ต้องใช้อากาศในการเจริญที่เหมือนกับ *K. marxianus* เช่น *Schizosaccharomyces pombe* สามารถนำสเตอรอลเข้าเซลล์ในภาวะมีออกซิเจนได้ โดยพบว่ามีการนำสเตอรอลเข้าเซลล์คล้ายกับการนำสเตอรอลเข้าเซลล์ของมนุษย์ เนื่องจากการสังเคราะห์โคเลสเตอรอลและกรดไขมันของมนุษย์ถูกควบคุมโดยกลุ่มของโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์บริเวณเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมซึ่งได้แก่ regulatory element binding proteins (SREBPs) (Rawson, 2003) ประกอบไปด้วย 3 รูป คือ SREBP-1a, SREBP-1c และ SREBP-2 และ SREBPs เป็นตัวกระตุ้นการ transcription ของยีนส์ที่มากกว่า 30 ชนิด ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โคเลสเตอรอล, กรดไขมัน, ไตรกลีเซอไรด์และฟอสโฟลิปิด (Horton และคณะ, 2002) ซึ่งสเตอรอลที่นำเข้ามาจากภายนอกบางส่วนอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์และบางส่วนอยู่ที่เอนโดพลาสมิกเรติคูลัมและเอสเทอร์ฟายเก็บในรูปของหยดไขมัน (Lange และ Steck, 2004)

4.3 ผลของปริมาณสติกมาสเตอรอลและอุณหภูมิแช่แข็งต่อการอยู่รอดของ *K. marxianus*

จากการทดลองที่ 4.2 เซลล์ที่เจริญใน YM broth ที่มีสติกมาสเตอรอล 1 และ 3 mg/L ไม่พบปริมาณสติกมาสเตอรอลในเซลล์จึงแปรปริมาณสติกมาสเตอรอลที่ต่ำลงโดยการเติมสติกมาสเตอรอลตลอดเชื้อ 5 mg/L ใน *K. marxianus* ที่เจริญใน YM broth เมื่อผ่านการบ่มเป็นเวลา 18 ชั่วโมง และนำไปบ่มต่อจนครบ 22 ชั่วโมง โดยพบว่าปริมาณสติกมาสเตอรอลในเซลล์เท่ากับ 0.04 mg/g dry weight cells

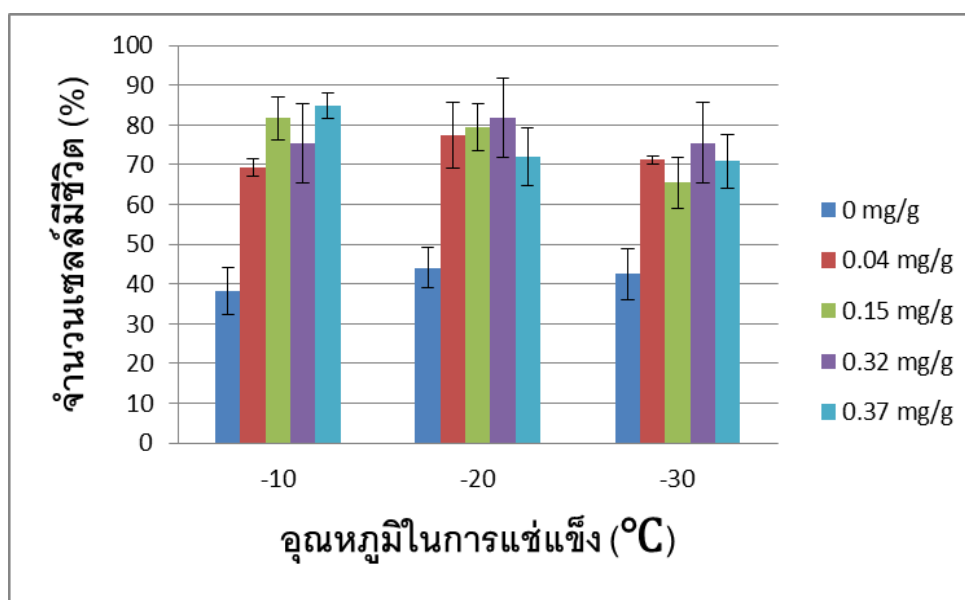
เมื่อแปรระดับสติกมาสเตอรอลในเซลล์ 0-0.37 mg/g dry weight cells และแช่แข็งที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่า *K. marxianus* ที่มีสติกมาสเตอรอลมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์หลังการแช่แข็งที่สูงกว่า *K. marxianus* ที่ไม่มีสติกมาสเตอรอล (รูปที่ 4.3) โดย *K. marxianus* ที่ไม่มีสติกมาสเตอรอลเมื่อแช่แข็งที่อุณหภูมิต่างๆ มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังแช่แข็งไม่แตกต่างกัน แต่ใน *K. marxianus* ที่มีสติกมาสเตอรอลพบว่า *K. marxianus* ที่มีสติกมาสเตอรอล 0.37 mg/g dry weight cells และแช่แข็งที่ -10 °C มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็งสูงสุด และ

K. marxianus ที่มีสติกมาสเตอรอล 0.15 mg/g dry weight cells แช่แข็งที่ -10 และ -20 °C มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็งรองลงมา (ตารางภาคผนวกที่ ค1)

เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์เป็นปัจจัยหนึ่งในการพิจารณาการอยู่รอดของเซลล์ระหว่างการแช่แข็งซึ่งไขมันไม่อิ่มตัวและสเตอรอลที่เยื่อหุ้มเซลล์ยีสต์และแบคทีเรียมีผลต่อการอยู่รอดของเซลล์ระหว่างการแช่แข็ง (Calcott และ Anthony, 1982) ซึ่ง Murakami และ Yokoigawa (1995) ศึกษาองค์ประกอบไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ของ *Torulasporea delbrueckii* D2-4 (freeze tolerant) กับ *T. delbrueckii* 60B3 (freeze-sensitive) พบว่า D2-4 สามารถทนต่อการแช่แข็งดีกว่า 60B3 เนื่องจากความแตกต่างระหว่างองค์ประกอบไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ของยีสต์สองชนิดโดยมีอัตราส่วนโดยโมลระหว่างสเตอรอลและฟอสโฟลิพิดแตกต่างกัน และพบว่า D2-4 มีอัตราส่วนโดยโมลระหว่างสเตอรอลต่อฟอสโฟลิพิดที่เยื่อหุ้มเซลล์ มากกว่า 1.7 เท่าของ 60B3 ทำให้ D2-4 ทนการแช่แข็งดีกว่า 60B3 ดังนั้นปริมาณสเตอรอลที่เพิ่มขึ้นทำให้อัตราส่วนโดยโมลระหว่างสเตอรอลต่อฟอสโฟลิพิดที่เยื่อหุ้มเซลล์เพิ่มขึ้นและคุณสมบัติ fluidity ที่เยื่อหุ้มเซลล์ลดลง

แม้ว่า *K. marxianus* ที่มีสติกมาสเตอรอล 0.37 mg/g dry weight cells มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็งสูงสุด แต่เลือก *K. marxianus* ที่มีสติกมาสเตอรอล 0.15 mg/g dry weight cells เป็นตัวแทนของ *K. marxianus* ที่มีสติกมาสเตอรอลใช้ในการทดลองต่อไปเพื่อศึกษาผลของสติกมาสเตอรอลต่ออัตราเร็วการแช่แข็งและสาเหตุที่เลือกเนื่องจากใช้ปริมาณสติกมาสเตอรอลที่น้อยกว่า *K. marxianus* ที่มีสติกมาสเตอรอลในเซลล์ 0.37 mg/g dry weight cells ถึง 1.8 เท่า แต่เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็งมีค่าใกล้เคียงกันและสติกมาสเตอรอลมีราคาแพง

จากสถานะที่ทำการทดลองแช่เยือกแข็งเมื่อคำนวณอัตราเร็วในการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -10, -20 และ -30 °C เท่ากับ 1.55, 3.48 และ 5.70 °C/min (รูปภาคผนวกที่ ค2, ค3 และ ค4) และอัตราเร็วเป็นปัจจัยหนึ่งในการพิจารณาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็งของเซลล์ (Mazur, 1977) แต่ในการทดลองนี้มีข้อจำกัดในเรื่องของการควบคุมอัตราเร็วในการแช่แข็งเนื่องจากเครื่อง cooling bath ที่ใช้แช่แข็งสารแขวนลอยเซลล์ไม่สามารถควบคุมอัตราเร็วที่ต้องการได้ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้เครื่อง DSC เป็นเครื่องมือในการแช่แข็งเพื่อสามารถเพิ่มอัตราเร็วในการแช่แข็ง



รูปที่ 4.3 เปอร์เซนต์การอยู่รอดของ *K. marxianus* ที่มีปริมาณสติกมาสเตอร์อลที่ต่างกันหลังการแช่แข็งที่อุณหภูมิต่างๆ ด้วยเครื่อง cooling bath

4.4 ผลของสติกมาสเตอร์อลและอัตราเร็วในการแช่แข็งต่อการอยู่รอดของ *K. marxianus*

เมื่อแปรอัตราเร็วในการแช่แข็งต่อเปอร์เซนต์การอยู่รอดของ *K. marxianus* หลังการแช่แข็งที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าที่อัตราเร็วแช่แข็ง 1 และ 7 °C/min *K. marxianus* ที่ไม่มีและมีสติกมาสเตอร์อลมีเปอร์เซนต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็งใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4.4) และเมื่อแปรอัตราเร็วในการแช่แข็งที่ 20 และ 40 °C/min พบว่าเปอร์เซนต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็งคงที่ทั้งเซลล์ที่ไม่มีและมีสติกมาสเตอร์อล และที่อัตราเร็วในการแช่แข็ง 10 °C/min *K. marxianus* มีเปอร์เซนต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็งสูงสุด (รูปที่ 4.4) โดยเมื่อพิจารณาอัตราเร็วในการแช่แข็งที่ระดับต่างๆ พบว่าอัตราเร็วในการแช่แข็ง 1 และ 7 °C/min มีเปอร์เซนต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็งที่สูงกว่า 20 และ 40 °C/min (รูปที่ 4.4)

เนื่องจากอัตราเร็วในการแช่แข็งเป็นปัจจัยหนึ่งสำหรับพิจารณาความสามารถของการอยู่รอดของเซลล์หลังแช่แข็ง และพบว่าอัตราเร็วในการแช่แข็งที่ช้าหรือเร็วเกินไปทำให้เซลล์เกิดความเสียหายได้ (Mazur, 1977) ซึ่ง Mazur (1977) ศึกษาอัตราเร็วในการแช่แข็งต่อเปอร์เซนต์การอยู่รอดของเซลล์ไขกระดูกหนู, ยีสต์และเซลล์เม็ดเลือดแดงมนุษย์ พบว่ากราฟที่ได้มีลักษณะเป็นกราฟรูปตัวยูคว่ำ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองนี้ (รูปที่ 4.4) โดยอัตราเร็วที่ทำให้เซลล์ไขกระดูกหนู,

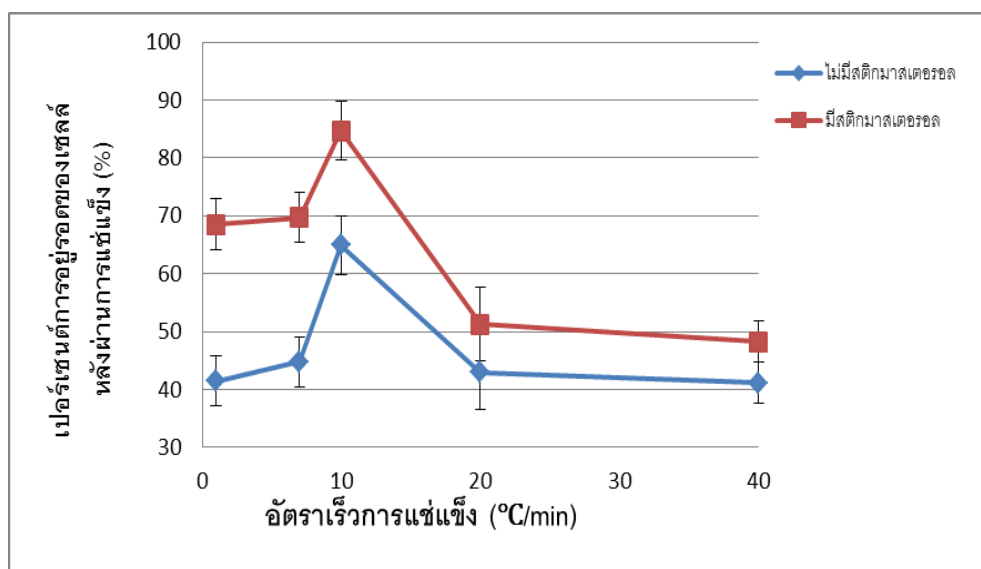
ยีสต์และเซลล์เม็ดเลือดแดงมนุษย์ มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงสุดอยู่ที่ 1.6, 7 และ 200 °C/min ตามลำดับ

เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็งของเซลล์สูงสุดคือจุดที่อัตราเร็วเหมาะสมในการแช่แข็ง (optimum rate) และเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดที่ต่ำลงทั้งสองด้านของกราฟประกอบไปด้วย suboptimum rate และ supraoptimum rate โดยในช่วง suboptimum rate เซลล์จะรักษาสมดุลโดยน้ำที่อยู่ภายในเซลล์จะเคลื่อนที่ออกนอกเซลล์ทำให้เซลล์เกิดการสูญเสียน้ำและไม่เกิดน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์ แต่ถ้าน้ำออกจากเซลล์มากเกินไปจะส่งผลให้เซลล์เกิดการบาดเจ็บทำให้เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็งต่ำ แต่ในช่วง supraoptimum rate น้ำที่อยู่ภายในเซลล์ไม่สามารถออกจากเซลล์ได้ทันทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นในเซลล์และผลึกน้ำแข็งนี้เป็นสาเหตุที่ทำให้เซลล์เกิดการบาดเจ็บ และการบาดเจ็บของเซลล์ที่เกิดจากผลึกน้ำแข็งส่งผลให้เซลล์มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็งต่ำกว่าเซลล์ที่เกิดการสูญเสียน้ำ และค่าอัตราเร็วที่ทำให้เซลล์มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดมากที่สุดคือ ไม่ทำให้เซลล์เกิดการสูญเสียน้ำมากไปและไม่เกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์ (Mazur, 1977) ดังนั้นที่อัตราเร็ว 10 °C/min คืออัตราเร็วที่เหมาะสมในการแช่แข็งที่ทำให้เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็งสูงสุด และในงานวิจัยนี้พบว่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็งของ *K. marxianus* ที่อัตราเร็วในการแช่แข็ง 1 °C/min จะมากกว่าที่อัตราเร็วในการแช่แข็ง 40 °C/min (รูปที่ 4.4)

นอกจากนี้ Dumont, Pieere-Andre และ Patrick (2003) ศึกษาปัจจัยในการรอดชีวิตของเซลล์หลังแช่แข็งที่อัตราเร็วแช่แข็งต่างๆ พบว่าอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวต่อปริมาตรเซลล์ (S/V) มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์หลังการแช่แข็ง โดยพบว่าถ้า S/V สูง การถ่ายเทความร้อนและน้ำจะดีกว่าเซลล์ที่มี S/V ต่ำ และอัตราเร็วแช่แข็งที่ทำให้เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็งสูงสุดของ

S. cerevisiae เท่ากับ 7 °C/min (Mazur, 1968) และ 5 °C/min (Dumont และคณะ, 2003) ซึ่งการทดลองนี้พบว่า *K. marxianus* อยู่ที่ 10 °C/min ซึ่งมีค่าที่ใกล้เคียงกับ *S. cerevisiae* สาเหตุอาจมาจากขนาดของเซลล์ที่ใกล้เคียงกับ *S. cerevisiae* โดย *S. cerevisiae* มีขนาด (1-7) x (5-10) μm และ *K. marxianus* มีขนาด (2-6) x (3-10) μm และมีรูปร่างเซลล์เป็นแบบ

Ellipsoidal เหมือนกัน (Kurtzman และ Fell, 1998). ดังนั้นขนาดและรูปร่างของเซลล์ที่คล้ายกัน ทำให้ค่า S/V มีค่าใกล้เคียงกันทำให้อัตราเร็วที่เหมาะสมในการแช่แข็งมีค่าใกล้เคียงกัน



รูปที่ 4.4 เปอร์เซนต์การอยู่รอดของ *K. marxianus* ที่ไม่มีและมีสติกมาสเตอร์อล

ในเซลล์เมื่อแปรอัตราเร็วในการแช่แข็ง ที่อุณหภูมิ $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ เมื่อแช่แข็ง

ด้วยเครื่อง DSC

เมื่อพิจารณาผลของปริมาณสติกมาสเตอร์อลพบว่า *K. marxianus* ที่มีสติกมาสเตอร์อล มีเปอร์เซนต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็งเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับ *K. marxianus* ที่ไม่มีสติกมาสเตอร์อล ในทุกอัตราเร็วการแช่แข็ง โดยพบว่าที่อัตราเร็วแช่แข็ง 1 และ 7 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ สติกมาสเตอร์อลมีผลทำให้เปอร์เซนต์การอยู่รอดหลังแช่แข็งเพิ่มขึ้นประมาณ 30% ในขณะที่อัตราเร็วแช่แข็ง 20 และ 40 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ สติกมาสเตอร์อลทำให้เปอร์เซนต์การอยู่รอดหลังแช่แข็งเพิ่มขึ้นประมาณ 10% และที่อัตราเร็วแช่แข็ง 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ของ *K. marxianus* ที่มีและไม่มีสติกมาสเตอร์อลพบว่า มีเปอร์เซนต์การอยู่รอดหลังแช่แข็งสูงสุดเหมือนกัน ดังนั้นสติกมาสเตอร์อลมีผลทำให้เปอร์เซนต์การอยู่รอดเพิ่มขึ้นและไม่มีผลทำให้อัตราเร็วแช่แข็งที่ทำให้เซลล์มีเปอร์เซนต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็งสูงสุดเปลี่ยนแปลง

เมื่อเปรียบเทียบการทดลองที่ 4.3 และ 4.4 ในช่วงอัตราเร็ว 1.55 – 5.70 °C/min ในการทดลองที่ 4.3 กับ อัตราเร็วในช่วง 1-7 °C/min ในการทดลองที่ 4.4 พบว่า *K. marxianus* ที่ไม่มีสติกมาสเตอร์อลเมื่ออัตราเร็วเพิ่มขึ้น เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังแช่แข็งเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ *K. marxianus* ที่มีสติกมาสเตอร์อลมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังแช่แข็งค่อนข้างคงที่ (รูปที่ 4.3 และ 4.4) และเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็งของการทดลองที่ 4.3 และ 4.4 มีค่าใกล้เคียงกัน ดังนั้นปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดหลังการแช่แข็งมาจากอัตราเร็วในการแช่แข็งมากกว่าอุณหภูมิที่แช่แข็งและสรุปได้ว่า สติกมาสเตอร์อลทำให้เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังแช่แข็งของเซลล์เพิ่มขึ้น และอัตราเร็วแช่แข็งมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์หลังการแช่แข็ง โดยพบว่าอัตราเร็วแช่แข็ง 10 °C/min ทำให้เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็งสูงสุด

4.5 ผลของสติกมาสเตอร์อลต่อการอยู่รอดของ *K. marxianus* ในระหว่างการเก็บรักษาแบบแช่เยือกแข็ง

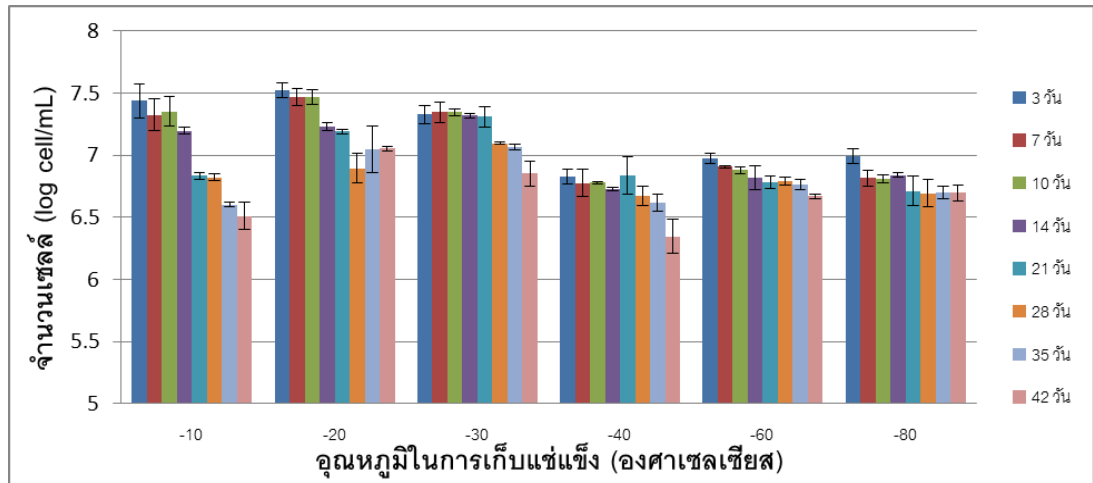
ก่อนเก็บสารละลายเซลล์แช่แข็งที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แช่แข็งสารละลายเซลล์ที่อุณหภูมิ -30 °C เป็นเวลา 15 นาที ในหลอด Eppendoff ขนาด 2 mL ซึ่งมีอัตราเร็วการแช่แข็ง 13.75 °C/min (รูปภาคผนวกที่ ค6) และพบว่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็งของ *K. marxianus* ที่ไม่มีสติกมาสเตอร์อลเท่ากับ 56.19±4.14 % และมีสติกมาสเตอร์อลเท่ากับ 84.84±0.42 % ซึ่งมีค่าสอดคล้องกับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็งของ *K. marxianus* ที่อัตราเร็ว 10 °C/min ในการทดลองที่ 4.5 ซึ่งเป็นอัตราเร็วที่ทำให้เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็งสูงสุด (รูปที่ 4.4)

จากการศึกษาจำนวนเซลล์มีชีวิตของ *K. marxianus* ที่ไม่มีสติกมาสเตอร์อลเมื่อแช่แข็งที่ -30 °C เท่ากับ 8.04±0.06 log₁₀ cells/mL และเมื่อเก็บเซลล์เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ -10, -20, -30, -40, -60 และ -80 °C มีจำนวนเซลล์มีชีวิต 7.44±0.14, 7.52±0.06, 7.33 ±0.07, 6.83±0.06, 6.98±0.04 และ 7.00±0.06 log₁₀ cells/mL ตามลำดับ และเมื่อเก็บเซลล์เป็นเวลา 42 วัน มีจำนวนเซลล์มีชีวิต 6.51±0.11, 7.05±0.02, 6.85±0.10, 6.35±0.10, 6.67±0.02 และ 6.69 ±0.06 log₁₀ cells/mL ตามลำดับ (ตารางภาคผนวกที่ ค3) เมื่อคำนวณผลต่างระหว่างจำนวนเซลล์มีชีวิตเมื่อเก็บเซลล์เป็นเวลา 42 วัน และ 3 วัน และเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -10 ถึง -80 °C มีค่า 0.93,

0.47, 0.48, 0.48, 0.31 และ 0.31 \log_{10} cells/mL ตามลำดับ แสดงว่าที่อุณหภูมิ -10°C จำนวนเซลล์มีชีวิตลดลงมากที่สุด และที่อุณหภูมิ -20 , -30 และ -40°C จำนวนเซลล์มีชีวิตลดลงมีค่าใกล้เคียงกัน และที่อุณหภูมิในการเก็บ -60 และ -80°C จำนวนเซลล์มีชีวิตลดลงน้อยที่สุด สำหรับจำนวนเซลล์มีชีวิตของ *K. marxianus* ที่มีสติกมาสเตอร์เซลล์เมื่อแช่แข็งที่ -30°C เท่ากับ $8.07 \pm 0.02 \log_{10}$ cells/mL และเมื่อเก็บเซลล์เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ -10 , -20 , -30 , -40 , -60 และ -80°C มีจำนวนเซลล์มีชีวิต 7.44 ± 0.13 , 7.31 ± 0.05 , 7.28 ± 0.01 , 7.07 ± 0.02 , 7.09 ± 0.01 และ $7.17 \pm 0.16 \log_{10}$ cells/mL ตามลำดับ และเมื่อเก็บเซลล์เป็นเวลา 42 วัน มีจำนวนเซลล์มีชีวิต 7.03 ± 0.04 , 7.11 ± 0.01 , 7.03 ± 0.02 , 6.90 ± 0.05 , 6.90 ± 0.03 และ $7.02 \pm 0.07 \log_{10}$ cells/mL ตามลำดับ (ตารางภาคผนวกที่ ค4) เมื่อคำนวณผลต่างระหว่างจำนวนเซลล์มีชีวิตเมื่อเก็บเซลล์เป็นเวลา 42 วัน และ 3 วัน และเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -10 ถึง -80°C มีค่า 0.41, 0.20, 0.25, 0.17, 0.19 และ 0.15 \log_{10} cells/mL ตามลำดับ แสดงว่าที่อุณหภูมิ -10°C จำนวนเซลล์มีชีวิตลดลงมากที่สุด และที่อุณหภูมิ -20 และ -30°C จำนวนเซลล์มีชีวิตที่ลดลงมีค่าใกล้เคียงกัน และที่อุณหภูมิในการเก็บ -40 , -60 และ -80°C จำนวนเซลล์มีชีวิตที่ลดลงน้อยที่สุด ดังนั้นการเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำจะทำให้การลดลงของจำนวนเซลล์มีชีวิตในระหว่างเก็บแช่แข็งน้อยกว่าการเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิสูงกว่า และเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง *K. marxianus* ที่ไม่มีสติกมาสเตอร์เซลล์และมีสติกมาสเตอร์เซลล์ พบว่า *K. marxianus* ที่มีสติกมาสเตอร์เซลล์มีการลดลงของจำนวนเซลล์มีชีวิตในระหว่างเก็บแช่แข็งน้อยกว่า *K. marxianus* ที่ไม่มีสติกมาสเตอร์เซลล์ในทุกอุณหภูมิการเก็บแช่แข็ง (รูปที่ 4.5 และ 4.6)

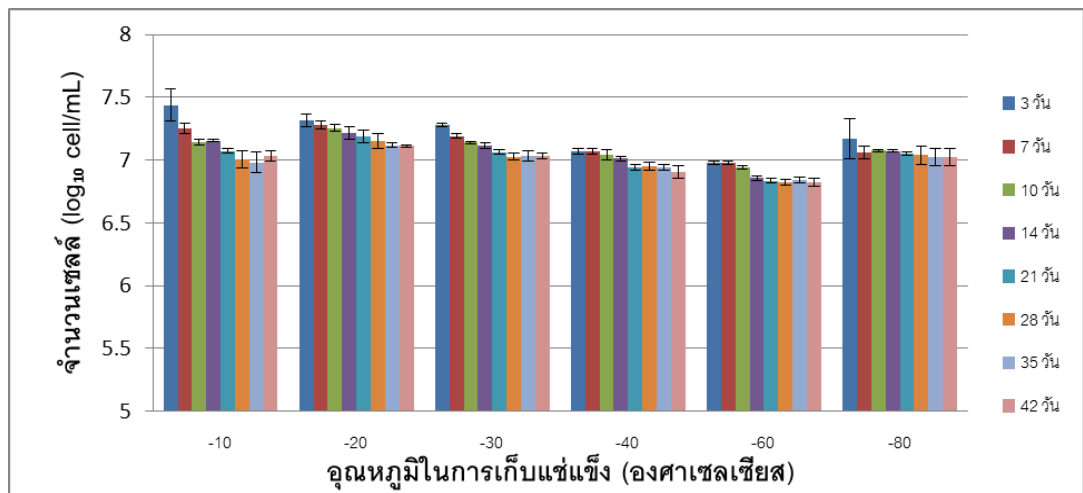
สอดคล้องกับทดลองของ Bostian และ Gilliland (1979) ศึกษาจำนวนเซลล์รอดชีวิตหลังการเก็บแช่แข็งของ *K. fragillis* เมื่อเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -19°C และ -196°C เป็นเวลาทั้งหมด 21 วัน พบว่า *K. fragillis* ที่เก็บแช่แข็งที่ -19°C เมื่อเวลาในการเก็บเซลล์นานขึ้น จำนวนเซลล์มีชีวิตมีค่าลดลง ในขณะที่อุณหภูมิเก็บแช่แข็งที่ -196°C จำนวนเซลล์มีค่าเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย เนื่องจากที่อุณหภูมิเก็บแช่แข็ง -19°C ยังมีน้ำบางส่วนอยู่ในเซลล์เมื่อเวลาในการเก็บแช่แข็งเซลล์นานขึ้น น้ำกลายเป็นผลึกน้ำแข็งทำให้เซลล์เกิดการบาดเจ็บได้ส่งผลให้จำนวนเซลล์มีชีวิตลดลง แต่ที่อุณหภูมิในการเก็บแช่แข็ง -196°C ภายในเซลล์ไม่เหลือน้ำอยู่เลย ดังนั้นเมื่อจำนวนวันในการเก็บแช่แข็งนานขึ้น จำนวนเซลล์มีชีวิตก็จะเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย ซึ่งจาก

การทดลองนี้พบว่าที่อุณหภูมิ -60 และ -80 °C ทำให้จำนวนเซลล์มีชีวิตเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับที่อุณหภูมิต่างๆเมื่อเวลาในการเก็บแช่แข็งนานขึ้น



รูปที่ 4.5 ผลของสติกมาสเตอร์เซลล์ต่อจำนวนเซลล์มีชีวิต (\log_{10} cells/mL) ที่เก็บไว้ที่

อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ของ *K. marxianus* ที่ไม่มีสติกมาสเตอร์เซลล์ที่เยื่อหุ้มเซลล์



รูปที่ 4.6 ผลของสติกมาสเตอร์เซลล์ต่อจำนวนเซลล์มีชีวิต (\log_{10} cells/mL) ที่เก็บไว้ที่

อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา 6 สัปดาห์ของ *K. marxianus* ที่มีสติกมาสเตอร์เซลล์ที่เยื่อหุ้มเซลล์

และเมื่อพลอตกราฟระหว่าง เวลาในการเก็บแช่แข็ง (วัน) กับ $\ln(N/N_0)$ (รูปที่ 4.7 และ 4.8) ตามสมการจลนพลศาสตร์ปฏิกิริยาอันดับ 1 ดังสมการ

$$\ln \frac{N}{N_0} = -kt$$

N_0 = จำนวนเซลล์เริ่มต้น (cells/mL)

N = จำนวนเซลล์เริ่มต้น ณ เวลาใดๆ (cells/mL)

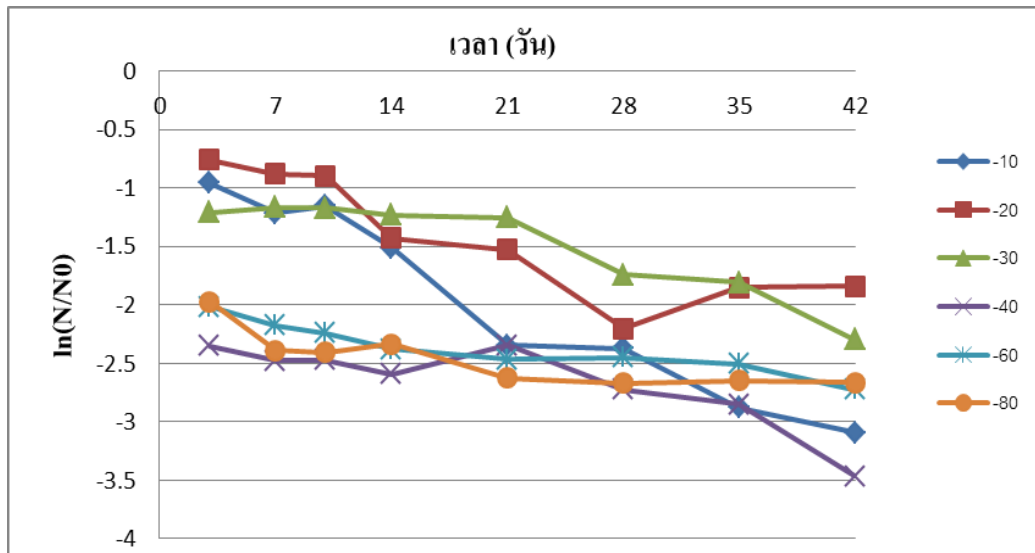
t = เวลา (วัน)

k = ความชันของกราฟ

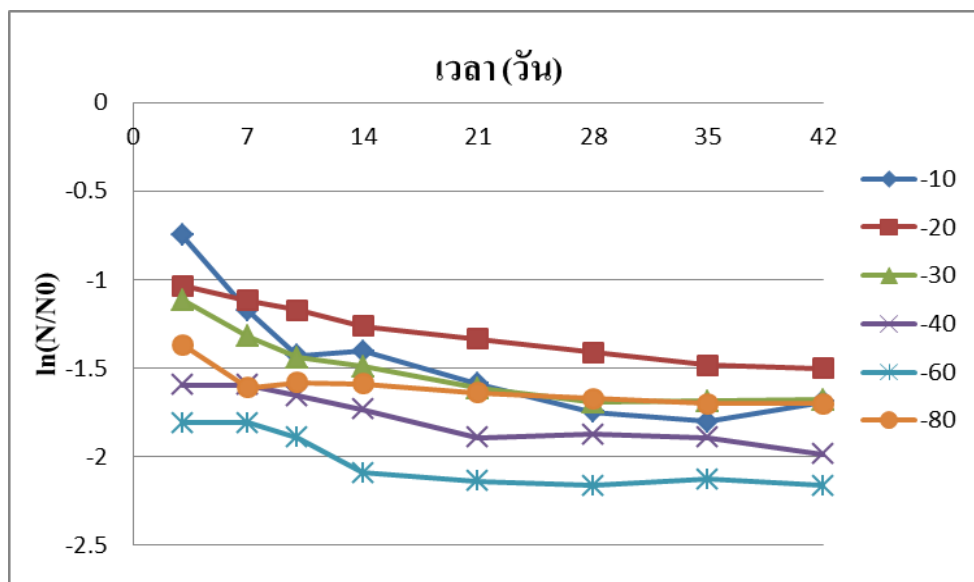
และหาค่าความชัน (k) จากกราฟ ผลแสดงตามตารางที่ 4.3 พบว่าเมื่อเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -10 ถึง -80 °C พบว่า *K. marxianus* ที่ไม่มีสติกมาสเตอร์อลมีค่าความชันของกราฟอยู่ที่ 0.0144 – 0.0584 และ *K. marxianus* ที่มีสติกมาสเตอร์อลมีค่าความชันของกราฟอยู่ที่ 0.0062 – 0.0212 และเมื่อเปรียบเทียบค่าความชันของกราฟในการเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิเดียวกันพบว่า

K. marxianus ที่ไม่มีสติกมาสเตอร์อลมีกราฟที่มีความชันมากกว่า *K. marxianus* ที่มีสติกมาสเตอร์อล จากกราฟถ้าค่าความชันมากบ่งบอกถึงการลดลงของจำนวนเซลล์มีชีวิตมาก และถ้าค่าความชันน้อยบ่งบอกถึงการลดลงของจำนวนเซลล์มีชีวิตน้อย ดังนั้นเมื่อเวลาเก็บแช่แข็งนานขึ้น *K. marxianus* ที่มีสติกมาสเตอร์อลจะมีการลดลงของจำนวนเซลล์มีชีวิตน้อยกว่า *K. marxianus* ที่ไม่มีสติกมาสเตอร์อล

เมื่อพลอตกราฟระหว่างค่าความชันของกราฟ (k) ที่ได้จากการพลอตกราฟของสมการจลนพลศาสตร์ปฏิกิริยาอันดับ 1 กับอุณหภูมิในการเก็บแช่แข็ง (°C) ของ *K. marxianus* ที่ไม่มีและมีส่วนสติกมาสเตอร์อล และพิจารณาจากรูปที่ 4.9 ที่อุณหภูมิในการเก็บแช่แข็งที่ -80 ถึง -60 °C พบว่ามีค่า k ใกล้เคียงกันทั้ง *K. marxianus* ที่ไม่มีและมีส่วนสติกมาสเตอร์อล และที่อุณหภูมิในการเก็บแช่แข็งที่ -60 ถึง -40 °C พบว่า *K. marxianus* ที่ไม่มีสติกมาสเตอร์อลมีค่า k ที่เพิ่มขึ้น แต่ *K. marxianus* ที่มีสติกมาสเตอร์อล มีค่า k เพิ่มขึ้นเล็กน้อย



รูปที่ 4.7 เวลาในการแช่แข็ง (วัน) กับค่า $\ln(N/N_0)$ ของ *K. marxianus* ที่ไม่มีสติกมาสเตอร์วอล เมื่อเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -10, -20, -30, -40, -60 และ -80 °C



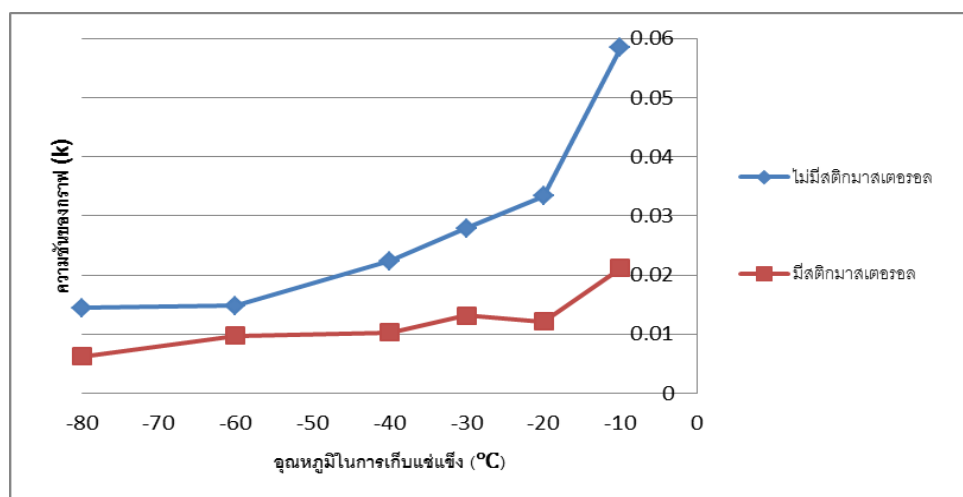
รูปที่ 4.8 เวลาในการแช่แข็ง (วัน) กับค่า $\ln(N/N_0)$ ของ *K. marxianus* ที่มีสติกมาสเตอร์วอล เมื่อเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -10, -20, -30, -40, -60 และ -80 °C

ตารางที่ 4.3 สมการจลนพลศาสตร์ปฏิกิริยาอันดับหนึ่งเมื่อเก็บเซลล์ *K. marxianus* ที่ไม่มีและมี
 สติกมาสเตอรอลในเซลล์ ณ อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ โดยพลอตกราฟ
 ระหว่าง เวลา (วัน) (แกน x) กับ $\ln(N/N_0)$ (แกน y)

อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	สมการจลนพลศาสตร์ปฏิกิริยาอันดับหนึ่งของ <i>K. marxianus</i>	
	ไม่มีสติกมาสเตอรอล	มีสติกมาสเตอรอล
-10	$y = -0.0584x - 0.7731$ $R^2 = 0.9607$	$y = -0.0212x - 1.0244$ $R^2 = 0.7181$
-20	$y = -0.0333x - 0.756$ $R^2 = 0.7609$	$y = -0.0121x - 1.0483$ $R^2 = 0.9554$
-30	$y = -0.0279x - 0.9263$ $R^2 = 0.8631$	$y = -0.0131x - 1.2424$ $R^2 = 0.7824$
-40	$y = -0.0224x - 2.2115$ $R^2 = 0.7174$	$y = -0.0103x - 1.5732$ $R^2 = 0.9015$
-60	$y = -0.0148x - 2.0727$ $R^2 = 0.8906$	$y = -0.0084x - 1.565$ $R^2 = 0.9805$
-80	$y = -0.0144x - 2.1766$ $R^2 = 0.6868$	$y = -0.0062x - 1.485$ $R^2 = 0.6372$

ที่อุณหภูมิในการเก็บแช่แข็งที่ -40 ถึง -20 °C *K. marxianus* ที่ไม่มีสติกมาสเตอร์อลมีค่า k ที่เพิ่มขึ้นมากกว่าที่มีสติกมาสเตอร์อล และที่อุณหภูมิในการเก็บแช่แข็งที่ -20 ถึง -10 °C มากกว่าที่มีสติกมาสเตอร์อลอย่างมาก และ *K. marxianus* ที่มีสติกมาสเตอร์อลมีค่า k ที่มากกว่าที่ไม่มีสติกมาสเตอร์อลในทุกอุณหภูมิเก็บแช่แข็ง และอุณหภูมิในการเก็บแช่แข็งที่นิยมใช้ในการเก็บอาหารและจุลินทรีย์คือ -20 และ -40 °C เนื่องจากเป็นอุณหภูมิของตู้แช่แข็งที่ใช้งานในห้องวิจัยและอุตสาหกรรม จากรูปที่ 4.9 จะเห็นว่า *K. marxianus* ที่มีสติกมาสเตอร์อลมีค่า k ที่ต่ำกว่าที่ไม่มีสติกมาสเตอร์อล ซึ่งค่า k ที่น้อยบ่งบอกว่าการลดลงของจำนวนเซลล์มีชีวิตที่น้อยกว่าที่ไม่มีสติกมาสเตอร์อลจึงสามารถเก็บได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่าและมีจำนวนเซลล์มีชีวิตมากกว่า *K. marxianus* ที่ไม่มีสติกมาสเตอร์อล

สรุปได้ว่าอุณหภูมิในการเก็บแช่แข็งต่ำทำให้การลดลงของจำนวนเซลล์มีชีวิตที่น้อยกว่าการเก็บแช่แข็งในอุณหภูมิที่สูงกว่าและ *K. marxianus* ที่มีสติกมาสเตอร์อลมีการลดลงของจำนวนเซลล์มีชีวิตที่น้อยกว่า *K. marxianus* ที่ไม่มีสติกมาสเตอร์อล



รูปที่ 4.9 อุณหภูมิในการเก็บแช่แข็งต่อความชันของกราฟจลนพลศาสตร์ปฏิกิริยาอันดับ 1 ของเซลล์ที่ไม่มีและมีสติกมาสเตอร์อล

4.6 ผลของสติกมาสเตอร์และ การแช่แข็งต่อกิจกรรมเบตาไกลูโคซิลเดสของ

K. marxianus

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการศึกษาว่าสติกมาสเตอร์ในเซลล์และการแช่แข็งมีผลต่อ *K. marxianus* หรือไม่ โดยเลือกกิจกรรมเบตาไกลูโคซิลเดสของ *K. marxianus* มาเป็นตัวแทน โดยเฉพาะเลี้ยง *K. marxianus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งของคาร์บอนเพียงอย่างเดียว ทั้งแบบไม่เติมและเติมสติกมาสเตอร์พบว่า เมื่อวัดค่า OD ที่ 600 nm ของ *K. marxianus* ที่ไม่มีและมีสติกมาสเตอร์มีค่าไม่แตกต่างกันอยู่ในช่วง 1.30-1.50 แสดงว่าเซลล์ที่มีและไม่มีสติกมาสเตอร์สามารถเจริญได้ ดังนั้นจึงสามารถสร้างเอนไซม์เบตาไกลูโคซิลเดสเพื่อมาย่อยน้ำตาลแลคโตสที่เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในอาหารเลี้ยงเชื้อและเมื่อวัดกิจกรรมของเบตาไกลูโคซิลเดสพบว่า *K. marxianus* ที่ไม่มีสติกมาสเตอร์มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่มากกว่า *K. marxianus* ที่มีสติกมาสเตอร์ (ตารางที่ 4.4) โดยมีค่ามากกว่าถึง 57 เท่า เนื่องจากเบตาไกลูโคซิลเดส เป็น intracellular enzyme ดังนั้นในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ ต้องทำให้ผนังเซลล์เสีย permeability ซึ่งเป็นไปได้ว่าสติกมาสเตอร์ที่เยื่อหุ้มเซลล์มีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์แข็งแรง ผนังเซลล์ไม่เสีย permeability จึงไม่สามารถ permeate เซลล์ด้วย SDS และคลอโรฟอร์มตามวิธีของ Miller (1972) ได้ ทำให้ไม่สามารถเปลี่ยน Ortho-Nitrophenyl- β -Galactoside (ONPG) ซึ่งเป็นสับสเตรตอยู่ในสารละลายภายนอกเซลล์ ให้เป็น Ortho-Nitrophenol (ONP) และกาแลคโตสได้ ซึ่ง ONP เป็นสารที่มีสีเหลืองวัดค่า OD ได้ที่ 420 nm แต่เมื่อนำ *K. marxianus* ที่มีและไม่มีสติกมาสเตอร์ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์เบตาไกลูโคซิลเดสไม่แตกต่างจาก *K. marxianus* ก่อนแช่แข็ง (ตารางที่ 4.4) เนื่องจากการแช่แข็งเป็นกระบวนการเก็บรักษาเซลล์ในภาวะที่เซลล์มีชีวิตและไม่มี การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (Dumont, Pieere-Andre และ Patrick, 2003) และเมื่อนำ *K. marxianus* ที่ไม่มีและมีสติกมาสเตอร์ที่ผ่านการแช่แข็งที่ -20°C ไปเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลแลคโตสและเขย่า 160 rpm เป็นเวลา 22 ชั่วโมงและนำมาหา กิจกรรมของเอนไซม์เบตาไกลูโคซิลเดส พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์มีค่า 42.67 ± 4.46 และ 43.21 ± 2.23 ซึ่งไม่ต่างจาก *K. marxianus* ที่ไม่มีสติกมาสเตอร์ก่อนแช่แข็ง (ตารางที่ 4.4) ดังนั้น สติกมาสเตอร์และการแช่แข็งไม่มีผลต่อกิจกรรมของเบตาไกลูโคซิลเดสและก่อนนำ

K. marxianus ที่มีสติกมาสเตอร์และเก็บแช่แข็งมาใช้งาน จะต้องนำไป subculture ก่อน เพื่อให้กิจกรรมต่างๆภายในเซลล์กลับมาใช้งานได้เหมือนเดิม

ตารางที่ 4.4 กิจกรรมของเอนไซม์เบตาไกลูโคซิเดส (unit) ของ *K. marxianus* ที่ไม่มีและ
มีสติกมาสเตอร์ในสภาวะต่างๆ

	กิจกรรมเอนไซม์เบตาไกลูโคซิเดส ของ <i>K. marxianus</i> (unit)	
	ไม่มีสติกมาสเตอร์	มีสติกมาสเตอร์
	ก่อนแช่แข็ง	43.77 ^a ±3.30
หลังแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °C	45.52 ^a ±3.75	0.84 ^b ±0.12

a และ b คือ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ($r = 3$)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาผลของสติกมาสเตอร์ลดต่อการทนการแช่แข็งของ *K. marxianus* พบว่าการมีสติกมาสเตอร์ลดไม่มีผลต่อการเจริญของ *K. marxianus* และปริมาณสติกมาสเตอร์ลดที่สามารถเข้าเซลล์ได้คือเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 5 mg/L และเมื่อแปรปริมาณสติกมาสเตอร์ลดและอุณหภูมิแช่แข็งต่อเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังแช่แข็งของเซลล์ พบว่า *K. marxianus* ที่ไม่มีสติกมาสเตอร์ลดมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังแช่แข็ง 38.12 – 44.10% และ *K. marxianus* ที่มีสติกมาสเตอร์ลดมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังแช่แข็ง 65.54 – 84.90% ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสติกมาสเตอร์ลดทำให้การอยู่รอดของเซลล์หลังการแช่แข็งเพิ่มขึ้นประมาณ 20-40% เมื่อเลือกใช้ *K. marxianus* ที่มีสติกมาสเตอร์ลด 0.15 mg/g dry weight cells เป็นตัวแทนของ *K. marxianus* ที่มีสติกมาสเตอร์ลดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไปพบว่า *K. marxianus* ที่มีและไม่มีสติกมาสเตอร์ลดมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็งสูงสุดที่อัตราเร็วแช่แข็ง 10 °C/min โดยพบว่าสติกมาสเตอร์ลดมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็งเพิ่มขึ้นในทุกอัตราเร็ว และเมื่อเก็บแช่แข็ง *K. marxianus* เป็นเวลา 6 สัปดาห์พบว่า การลดลงของจำนวนเซลล์มีชีวิตเมื่อเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำน้อยกว่าเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิสูง และ *K. marxianus* ที่มีสติกมาสเตอร์ลดมีการลดลงของจำนวนเซลล์มีชีวิตระหว่างการเก็บแช่แข็งน้อยกว่า *K. marxianus* ที่ไม่มีสติกมาสเตอร์ลดในทุกสภาวะอุณหภูมิเก็บแช่แข็ง นอกจากนี้การศึกษาผลของสติกมาสเตอร์ลดและการแช่แข็งต่อเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็งได้ศึกษาแอดติวิตีของเซลล์โดยเลือกกิจกรรมของเบตาไกลูโคสิดีไฮเดส ของ *K. marxianus* เป็นตัวแทน พบว่า สติกมาสเตอร์ลดและการแช่แข็งไม่มีผลต่อกิจกรรมของเซลล์

5.2 ข้อเสนอแนะ

ศึกษาผลของสติกมาสเตอร์ลดหรือไขมันชนิดอื่นและปัจจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้องต่อการทนการแช่แข็งของ *K.marxianus*

เอกสารอ้างอิง

- วันเชิญ โปธาเจริญ, ไพพรรณ นุตกะ, บัณฑิต ผึ้งสินธุ์, ขวัญจิต ควรดี และ ลาวัลย์ ชตานนท์.
2540. การใช้เทคนิคอย่างง่ายในการเก็บรักษาจุลินทรีย์. รายงานการประชุมวิชาการของ
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35. วันที่ 3-5 กุมภาพันธ์ 2540. กรุงเทพฯ.
สาวิตรี ลิ้มทอง, 2549. ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ:
สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 221-224.
- Abadias, M., Benabarre, A., Teixido, N., Usall, J. and Vinas, I. 2001. Effect of freeze
drying and protectant on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. **Journal
of Food Microbiology** 65: 173-182.
- Adam, L., Bridget, L. and Peter, J. 2005. SREBP Pathway responds to sterols and
functions as an oxygen sensor in fission yeast. 2005. **Cell Biology** 120: 831-842.
- Ajoka, M.I., Khan, S. and Shahid, R. 2003. Kinetics and regulation studies of the
production of b-galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* grown on different
substrates. **Food Technology Biotechnology** 41: 315-320.
- Albrecht, R. M., Orndorff, G. R. and MacKenzie, A. P. 1973. Survival of certain
microorganisms subjected to rapid and very rapid freezing on membrane
filters. **Cryobiology** 10: 233-239.
- Anderson, P.J., McNeil, K. and Watson, K. 1986. High-efficiency carbohydrate
fermentation to ethanol at temperatures above 40°C by *Kluyveromyces
marxianus* var. *marxianus* isolated from sugar mills. **Microbiology Biotechnology**
13: 509-521.
- Ballesteros, I., Ballesteros, M., Cabanas, A., Carrasco, J., Martin, C., Negro, M.J., Saez,
F. and Saez, R. 1991. Selection of thermotolerant yeasts for simultaneous
saccharification and fermentation (SSF) of cellulose to ethanol. **Applied
Biochemical and Biotechnology** 28: 307-315.

- Banat, I.M., Nigam, P., Singh, D., Marchant, R. and McHale, A.P. 1998. Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I - Yeasts in general. **World Journal Microbiology Biotechnology** 14: 809–821.
- Barron, N., Marchant, R., McHale, L. and McHale, A.P. 1995. Partial characterization of β -glucosidase activity produced by *Kluyveromyces marxianus* IMB3 during growth on cellobiose containing media at 45°C. **Biotechnology Letters** 17: 1047–1050.
- Baumann, N.A., Sullivan, D.P., Ohvo-Rekila, H., Simonot, C., Pottekat, A., Klaassen, Z., Beh, C.T. and Menon, A.K. 2005. Transport of newly synthesized sterol to the sterol-enriched plasma membrane occurs via nonvesicular equilibration, **Biochemistry** 44(15): 5816–5826.
- Bellaver, L.H., Carvalho, N.M.B., Abrahão-Neto, J. and Gombert, A.K. 2004. Ethanol formation and enzyme activities around glucose- 6-phosphate in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 exposed to glucose or lactose excess. **FEMS Yeast Research** 4: 691–698.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification of total lipid from animal tissues. **Journal of Physiology and Biochemistry** 226: 497-509.
- Bostian, M. and Gilliland, S.E. 1979. Frozen concentrated cultures of *Kluyveromyces fragilis*. **Journal of food science** 46: 696-699.
- Bostian, M. and Gilliland, S.E. 1981. Relationship of survival of *Kluyveromyces fragilis* at -19 °C to cellular fatty acid composition. **Journal of food science** 46: 964-965.
- Braga, A. R. C., Manera, A. P., Ore, J. C., Sala, L., Maugeri, F. and Kalil, S. J. 2012. Kinetics and Thermal Properties of Crude and Purified β -Galactosidase with Potential for the Production of Galactooligosaccharides. **Food Technology and Biotechnology** 5(1): 45-52.

- Calcott, P.H. and Anthony, H.R. 1982. Freeze-Thaw and cold-shock resistance of *Saccharomyces cerevisiae* as affected by plasma membrane lipid composition. **Journal of General Microbiology** 128: 549-555.
- Chang, T.Y., Chang, C.C., Ohgami, N. and Yamauchi, Y. 2006. Cholesterol sensing, trafficking, and esterification. **Annual Review of Cell and Developmental Biology** 22: 129–157.
- Chassang-Douillet, A., Ladet, J., Boze, H. and Galzy, P. 1973. Respiratory metabolism of *Kluyveromyces fragilis* van der Walt. **Zeitschrift Allgemeine Mikrobiologie** 13:193–199.
- Cruz-Guerrero, A., García-Peña. I., Bárzana. E., García-Garibay. M. and Gómez-Ruiz, L. 1995. *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278: a wild inulinase hyperproducing strain. **Journal of Fermentation and Bioengineering** 80:159–163.
- De Sánchez, S.B. and Castillo, F.J. 1980. Effect of pH on the growth of *Kluyveromyces fragilis* on deproteinized whey. **Acta Científica Venezolana** 31: 24–26.
- Dumont, F., Pierre-André, M. and Patrick, G. 2003. Influence of cooling rate on *Saccharomyces cerevisiae* destruction during freezing: unexpected viability at ultra-rapid cooling rates. **Cryobiology** 46: 33-42.
- Dumont, F., Pierre-André, M. and Patrick, G. 2004. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates. **Applied and environmental microbiology** 70(1): 268-272.
- Feng, B., Yao, P.M., Li, Y., Devlin, C.M. D., Zhang, H.P., Harding, M., Sweeney, J.X., Rong, G., Kuriakose, E.A., Fisher, A.R. Marks, D. and Ron, I. 2003. The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages, **Nature Cell Biology** 5 (9):781–792.
- Fonseca, G.G., Heinzle, E., Wittmann, C. and Gombert, A.K. 2008. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology** 79: 339-354.

- Haines, T.H. 2001. Do sterols reduce proton and sodium leaks through lipid bilayers?
Progress in Lipid Research 40: 299-324.
- Han, J.H., Yang, Y.X. and Feng, M.Y. 2008. Contents of phytosterols in vegetables and fruits commonly consumed in China. **Biomedical and Environmental Science** 21: 449–453.
- Harrison, R. and Lunt, G. G. 1980. **Biological Membranes**, 2nd edn. Glasgow: Blackie.
- Hazen, K.C. and Cutler, J.E. 1982. Optimal conditions for breaking medically important yeasts by an inexpensive and simple method. **Mycopathologia** 80: 113-116.
- Henry, J. and Kirsop, B. 1989. Cryopreservation of yeast in polypropylene straws. **World Federal for Culture Collections-Technical information Sheet No. 3**.
- Hensing, M.C., Rouwenhorst, R.J., Heijnen, J.J., van Dijken, J.P. and Pronk, J.T. 1995. Physiological and technological aspects of large-scale heterologous- protein production with yeasts. **Antonie van Leeuwenhoek** 67: 261–279.
- Horton, J.D., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. **Journal of Clinical Microbiology** 109: 1125–1131.
- Hughes, D.B., Tudrosaen, N.J. and Moya, C.J. 1984. The effect of temperature on the kinetics of ethanol production by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology Letters** 6: 1–6.
- Jin, H. McCaffery, J.M. and Grote, E. 2008. Ergosterol promotes pheromone signaling And plasma membrane fusion in mating yeast. **The Journal of Cell Biology** 180(4) 813–826.
- Kametani, T. and Furuyama, H. 1987. Synthesis of vitamin D3 and related compounds. **Medicinal Research Review** 7: 147–171.

- Karina, T.M.G., Ana, K. R., Ivani, M.G., Ivaldesa, G., Andréia, P. and Rosane, F. S. 2013. Ethanol production from deproteinized cheese whey fermentations by co-cultures of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. **African Journal of Microbiology Research** 7(13): 1121-1127.
- Koffel, R. and Schneiter, R. 2006. constitutes the major sterol ester hydrolase under heme-deficient conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryotic Cell** 5 (7): 1018–1025.
- Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. 1998. **The yeasts**. A taxonomic study, 4th edn. Elsevier, Amsterdam.
- Lange, Y., Ye, J. and Steck, T.L. 2004. How cholesterol homeostasis is regulated by plasma membrane cholesterol in excess of phospholipids. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America** 101 (32):11664–11667.
- Lee, S.S., Robinson, F.M. and Wang, H.Y. 1982. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**. 641-649.
- Letter, R. 1966. Phospholipid of yeast extraction, isolation and characterization of yeast phospholipids. **Biochimica et biophysica acta** 116: 489-499.
- Lodder, J and Kreger-van Rij, N.J.W. 1952. **The yeasts**. A taxonomic study. NHPG. Amsterdam.
- Lorenz, R.T., Rodriguez, R.J., Lewis, T.A. and Parks, L.W. 1986. Characteristics of sterol uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology** 167: 981–985.
- Mahoney, R.R., Nickerson, T.A. and Whitaker, J.R. 1975. Selection of strain growth conditions and extraction procedures for optimum production of lactase from *Kluyveromyces fragilis*. **Journal of Dairy Science** 58:1620–1629
- Margaritis, A. and Bajpai, P. 1983. Effect of sugar concentration in Jerusalem artichoke extract on *Kluyveromyces marxianus* growth and ethanol production. **Applied and Environmental Microbiology** 45: 723–725.

- Martin, W. 1968. Role of sterols in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta* 152: 431-434.
- Mazur, P. 1965. The role of cell membranes in the freezing of yeast and other single cells. *Annual of the New York Academy of Science* 125: 658-676.
- Mazur, P. 1966. Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells. *Cryobiology* 2:181–192.
- Mazur, P. 1970. The freezing of biological systems. *Cryobiology* 168: 939–949.
- Mazur, P. 1977. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology* 14: 251-272.
- Mcgrath, J.J., Cravalho, E.G., and Huggins, C.E. 1975. An experimental comparison of intra- cellular ice formation and freeze-thaw survival of HeLa S-3 cells. *Cryobiology* 12: 540-550.
- McKay, R.M., McKay, J.P., Avery, L., and Graff, J.M. 2003. *gans*: a model for exploring the genetics of fat storage. *Developmental Cell* 4: 131–142.
- Mesmin, B. and Maxfield, F.R. 2009. Intracellular sterol dynamics, *Biochimica et biophysica acta* 1791 (7) : 636–645.
- Meziani, S., Ioannou, I., Jasniewski, J., Belhaj, N., Muller, J.M. and Desobry, S. 2012. Effects of freezing treatments on the fermentative activity and gluten network integrity of sweet dough. *Food science and Technology* 46: 118-126.
- Miller, J. 1972. Experimental in molecular genetics. *Cold Harbor Laboratory*: 352-355.
- Molnár, O., Prillinge, R. H., Lopandic, K., Weigang, F. and Staudacher, E. 1996. Analysis of coenzyme Q systems, monosaccharide patterns of purified cell walls, and RAPD-PCR patterns in the genus *Kluyveromyces*. *Antonie van Leeuwenhoek* 70:67–78
- Morris, G.J., Coulson, G.E. and Clarke, K.J. 1988. Freezing injury in *Saccharomyces cerevisiae*: the effect of growth conditions. *Cryobiology* 25: 471–482.

- Murakami, Y. and Yokoigawa, K. 1995. Lipid composition of a freeze-tolerant yeast, *Torulasporea delbureckii*, and its freeze-sensitive mutant. **Applied Microbiology and Biotechnology** 44: 167-171.
- Nagodawithana, T.W., Stienkraus, K.H. and Castellano, C. 1974. **Applied Environmental Microbiology** 28: 383.
- Nguyen, T.H., Fleet, G.H., Rogers, P.L. 1998. Composition of the cell walls of several yeast species. **Applied Microbiology Biotechnology** 50: 206–212.
- Nunes, M.F.A., Massaguer, S. and Alegre, R.M. 1993. Produção e propriedades de β -galactosidase *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-2415. **Reviews Farmaceutical Biochemical University Saint Paulo** 29 :25–30.
- Parks, L.W. and Casey, W.M. 1995. Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. **Annual Review of Microbiology** 49: 95-116.
- Pessoa, Jr. A. and Vitolo, M. 1999. Inulinase from *Kluyveromyces marxianus* culture medium composition and enzyme extraction. **Brazilian Journal of Chemical Engineering** 16:237–245.
- Pukahuta, C., Nonklang S., Suwannarit, P., Hoshida H. and Akada, R. 2008. Method for screening of thermotolerant yeast. **The 1st Joint Seminar on Asian Core Programme**. March 20-21, Kasetsart University, Bangkok, Thailand.
- Rajoka, M.I., Khan, S. and Shahid, R. 2003. Kinetics and regulation studies of the production of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* grown on different substrates. **Food Technology Biotechnology** 41: 315–320.
- Rawson, R.B. 2003. The SREBP pathway—insights from fungi and insects. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 4: 631–640.
- Raychaudhuri, S. and Prinz, W.A. 2006. Uptake and trafficking of exogenous sterols in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical Society Transactions** 34: 359–362.

- Rech, R., Cassini, C.F. and Secchi, A.R. 1999. Utilization of proteinhydrolyzed chesse whey for the production of b-galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** 23:91–96.
- Rodriguez, R.J. and Parks, L.W. 1982. A requirement for ergosterol to permit growth of yeast sterol auxotrophs on cholestanol. **Biochemical and Biophysical Research Communication** 106: 435-441.
- Rosa, F.M. and Sa-Correia, I.1992. Ethanol tolerance and activity of plasma membrane ATPase in *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme Microbiology Technology** 14, 23–27.
- Rose, A. H. 1977. Dialling the composition of the yeast plasma membrane. **Alcohol Industry and Research**, 179-189.
- Rouwenhorst, R.J., Visser, L.E., Van der Baan, A.A., Scheffers, W.A. and van Dijken, J.P. 1988. Production, distribution, and kinetic properties of inulinase in continuous culture of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. **Applied and Environmental Microbiology** 54: 1131–1137.
- Rungrach, W. and Takemoto, Y. 1998. Role of ergosterol in growth inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* by syringomycin E. **FEMS Microbiology Letters** 167: 215-220.
- Saynajoki, S., Sundberg, S., Soupas, L., Lampi, A.M. and Piironen, V. 2003. Determination of stigmasterol primary oxidation products by high-performance liquid chromatography. **Food chemistry** 80: 415-421.
- Schaffrath, R. and Breunig, K.D. 2000. Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*. **Fungal genetic and biology** 30:173–190.
- Sonawat, H.M., Agrawal, A. and Dutta, S.M. 1981. Production of bgalactosidase from *Kluyveromyces fragilis* grown on whey. **Folia Microbiologica** 26:370–376.
- Spring, S. 2006. 15 preservation of thermophilic microorganisms. **Methods in Microbiology** 35: 349-368.

- Steensma, H.Y., de Jongh, F.C.M. and Linnekamp, M. 1988. The use of electrophoretic karyotypes in the classification of yeasts: *Kluyveromyces marxianus* and *K. lactis*. **Current Genetics journal** 14: 311–317.
- Tanghe, A., Van Dijck, P., Dumortier, F., Teunissen, A., Hohman, S., and Thevelein, J. M. 2002. Aquaporin expression correlates with freeze tolerance in yeast and overexpression improves freeze tolerance in industrial yeast. **Applied Environmental Microbiology** 68: 5981–5989.
- U.S. Food and Drug Administration. 2001. **Bacteriological Analytical Manual**, 8th Ed., Rev. A, AOAC INTERNATIONAL, Bethesda, MD.
- Van der Walt, J.P. 1970. *Kluyveromyces van der Walt* emend. van der Walt. In: Lodder J **The yeasts a taxonomic study**, 2nd edn. NHPG, Amsterdam, 316–378.
- Van Dijken, J.P., Weusthuis, R.A. and Pronk, J.T. 1993. Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts. **Antonie van Leeuwenhoek** 63: 343– 352.
- Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W.A. and van Dijken, J.P. 1992. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. **Journal of Yeast and fungal research** 8: 501–517.
- Welsh, F.W., Murray, W.D. and Williams, R.E. 1989 Microbiological and enzymatic production of flavor and fragrance chemicals. **Critical Reviews in Biotechnology** 9: 105–169.
- Wolfe, J., Dowgert, M. F., and Steponkus, P. L. 1985. Dynamics of membrane exchange of the plasma membrane and the lysis of isolated protoplasts during rapid expansion in area. **Journal of Membrane Biology** 86: 127-138.
- Workman, W.E. and Day, D.F. 1984. The cell wall-associated inulinase of *Kluyveromyces fragilis*. **Antonie van Leeuwenhoek** 50: 349–353.

- Yarrow, D. 1998. Methods for isolation, maintenance and identification of yeast. 75-76. In C.P. Kurtzman and Fell, J.W. (eds). **The yeasts**, A Taxonomic Study, Elsevier, Amsterdam.
- Zinser, E. 1991. Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes In the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*, **Journal of Bacteriology**. 173 (6): 2026–2034.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth (Yeast extract malt extract)

Peptone bacteriological	6	g
Yeast extract	3	g
Malt extract	3	g
Dextrose	10	g

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เป็นเนื้อเดียวกัน ถ่ายอาหารลงในขวดรูปชมพู่ที่ปิดด้วยจุกสำลี และฟอยล์ นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัตโนมัติที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

2. การเติมสตริกมาสเตอร์ลงใน YM broth

ชั่งสตริกมาสเตอร์จำนวน 1, 3, 5, 7 และ 9 mg เติมเอทานอล 20 mL คนจน สตริกมาสเตอร์ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 1 ลิตร จากนั้นเทลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลีและฟอยล์ นำไปฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

การเตรียมสารเคมี

สารละลาย Z-buffer

Na_2HPO_4	4.27	g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$	2.75	g
KCl	0.375	g
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.125	g

ปรับ pH ให้เท่ากับ 7 จากนั้นเติมน้ำจนมีปริมาตร 500 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้ในแต่ละวันต้องเติม β -mercaptoethanol 0.14 มิลลิลิตร ต่อ Z-buffer 50 มิลลิลิตร

สับสเตรต ONPG (O-nitrophenyl- β -D-galactoside)

ONPG	80	mg
น้ำกลั่น	20	mg

จะได้ความเข้มข้น 4 mg/mL เมื่อจะใช้ในแต่ละครั้งให้เติม β -mercaptoethanol 0.14 มิลลิลิตร

การเตรียม Na_2CO_3 1 M

Na_2CO_3	5.3	g
น้ำกลั่น	50	mL

การเตรียม Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 0.1%

ชั่ง SDS 0.1 g เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 mL

ภาคผนวก ข.

วิธีวิเคราะห์

การวิเคราะห์จำนวนยีสต์และรา (BAM, 2001)

สารเคมี

1. Yeast malt agar (YM agar)
2. สารละลาย 0.85 % normal saline

วิธีทดลอง

1. ปิเปตตัวอย่างสารละลายยีสต์ 1 mL ลงในสารละลาย 0.85 % normal saline ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 9 mL
2. เขย่าให้เข้ากันจะได้สารละลายที่มีระดับความเจือจาง 1:10
3. เจือจางสารละลายตัวอย่างให้มีระดับความเจือจาง 1:100 ถึง $1:10^6$ ด้วยสารละลาย 0.85 % normal saline ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 9 mL
4. ปิเปตตัวอย่างแขวนลอย 0.1 mL จากระดับการเจือจางต่อเนื่อง 3 ระดับลงในจานเพาะเชื้อที่มี YM agar และใช้แท่งแก้วฆ่าเชื้อเกลี่ยลงบนผิวหน้าอาหารจนแห้ง
5. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
6. อ่านผลโดยนับจำนวนโคโลนีทั้งหมดในช่วง 25 – 250 โคโลนีบนจานอาหารเพาะเชื้อและคำนวณในหน่วยของ cells/mL

การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับการหาปริมาณสติกมาสเตอรอลด้วยวิธี HPLC

สารเคมี

1. สติกมาสเตอรอล
2. Absolute ethanol

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสารละลายสติกมาสเตอรอลที่ความเข้มข้น 10 mg/L โดยชั่งสติกมาสเตอรอล ปริมาณ 0.001 กรัม ละลายใน Absolute ethanol และปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ด้วย Absolute ethanol
2. เตรียมสารละลายสติกมาสเตอรอลที่ความเข้มข้น 2, 4, 6 และ 8 mg/L โดยปิเปต 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 mL ของสารละลายสติกมาสเตอรอลที่ความเข้มข้น 10 mg/L ปรับ ปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ด้วย Absolute ethanol

การคำนวณปริมาณสติกมาสเตอรอลในเซลล์

1. ชั่งปริมาณเซลล์ที่นำไปสกัด
2. คำนวณน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยแบ่งเซลล์ที่จะนำไปสกัดบางส่วนใส่ในถ้วยอลูมิเนียมซึ่ง บันทึกรน้ำหนักและใส่ในเดซิเคเตอร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นชั่งน้ำหนักอีกครั้ง เพื่อ คำนวณน้ำหนักเซลล์แห้ง
3. คำนวณน้ำหนักแห้งของเซลล์จาก

$$\text{เปอร์เซ็นต์น้ำในเซลล์} = \frac{\text{น้ำหนักเซลล์เริ่มต้น} - \text{น้ำหนักเซลล์แห้ง}}{\text{น้ำหนักเซลล์เริ่มต้น}} \times 100$$

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (g dry weight cell)} = (100 - \text{เปอร์เซ็นต์น้ำในเซลล์}) \times \text{น้ำหนักเซลล์เริ่มต้น}$$

$$\text{ปริมาณสติกมาสเตอรอลในเซลล์ (mg/g dry weight cell)} = \frac{A \times 2 \times 10^{-3}}{\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง}}$$

A คือ ปริมาณสติกมาสเตอร์ที่อ่านได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC (mg/L)

2×10^{-3} คือ ปริมาณคลอโรฟอร์มที่ใช้ในการสกัด (L)

การวัดอัตราเร็วการแช่แข็ง

- ใช้เทอร์โมคอปเปอร์จุ่มในสารละลายเซลล์ที่บริเวณกึ่งกลางจับเวลาและบันทึกอุณหภูมิทุก 30 วินาที กรณีหลอดขนาด 15 มิลลิลิตรและ ทุก 10 วินาทีสำหรับหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร โดยวัดจนถึงอุณหภูมิสุดท้ายที่ตั้งไว้
- คำนวณอัตราเร็วในการแช่แข็ง

$$\text{อัตราเร็วในการแช่แข็ง (}^{\circ}\text{C/min)} = \frac{\text{อุณหภูมิสุดท้าย} - \text{อุณหภูมิเริ่มต้น}}{\text{เวลาสุดท้าย} - \text{เวลาเริ่มต้น}}$$

การนับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์

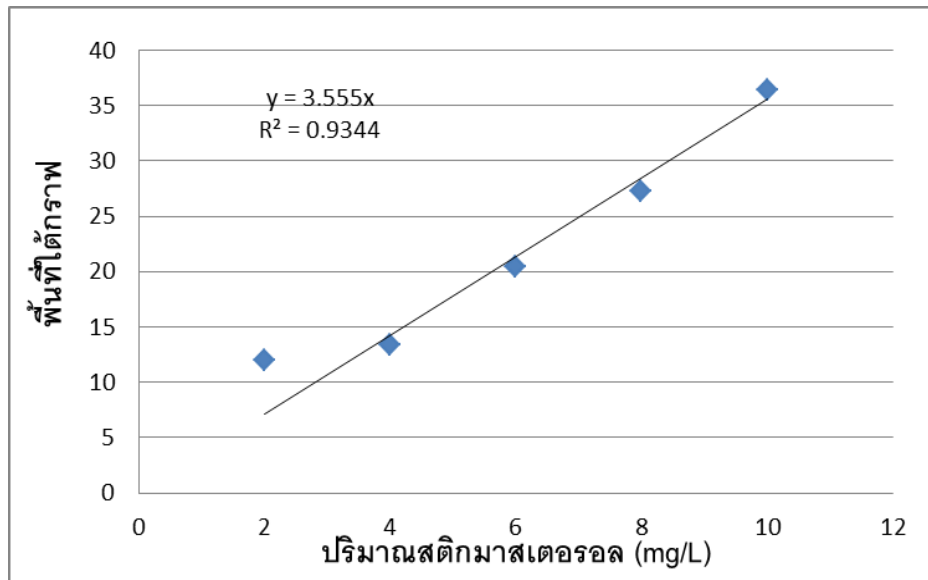
นับจำนวนเซลล์มีชีวิตก่อนแช่แข็งและหลังการแช่แข็งด้วยวิธี MBS และคำนวณจาก

$$\text{เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังแช่แข็ง(\%)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์มีชีวิตหลังแช่แข็ง}}{\text{จำนวนเซลล์ก่อนการแช่แข็ง}} \times 100$$

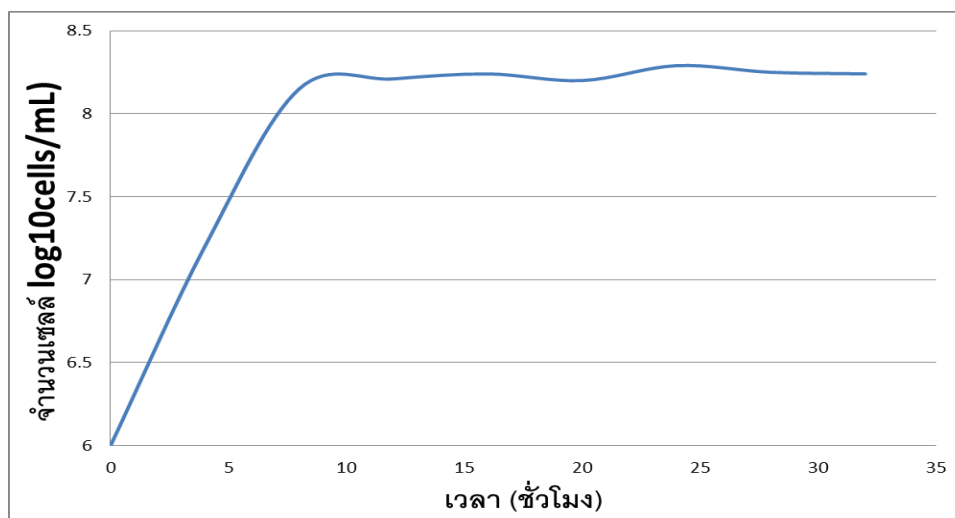
ภาคผนวก ค.

กราฟมาตรฐานและกราฟต่างๆ

กราฟมาตรฐานสติกมาสเตอรอล

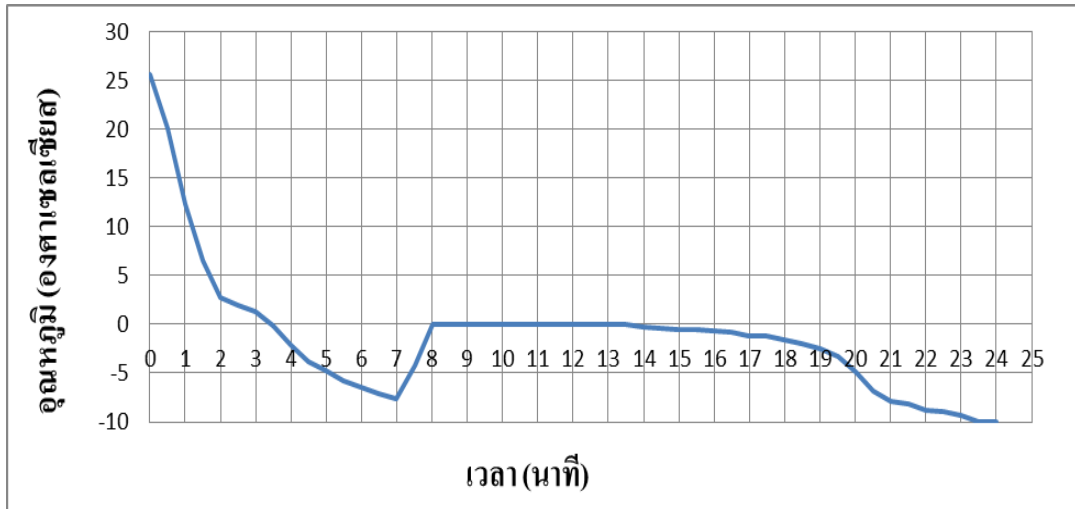


รูปที่ ค1 กราฟมาตรฐานของปริมาณสติกมาสเตอรอล (mg/L) ต่อพื้นที่ใต้กราฟเมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC

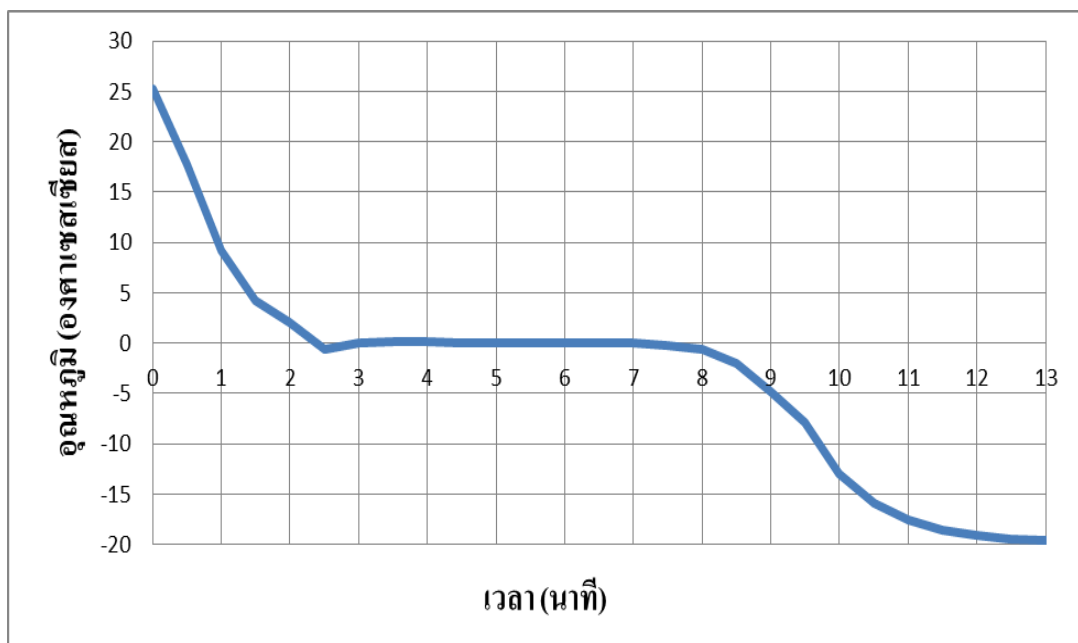


รูปที่ ค2 กราฟการเจริญ (log₁₀ cells/mL) ของ *K. marxianus* UBU1-11

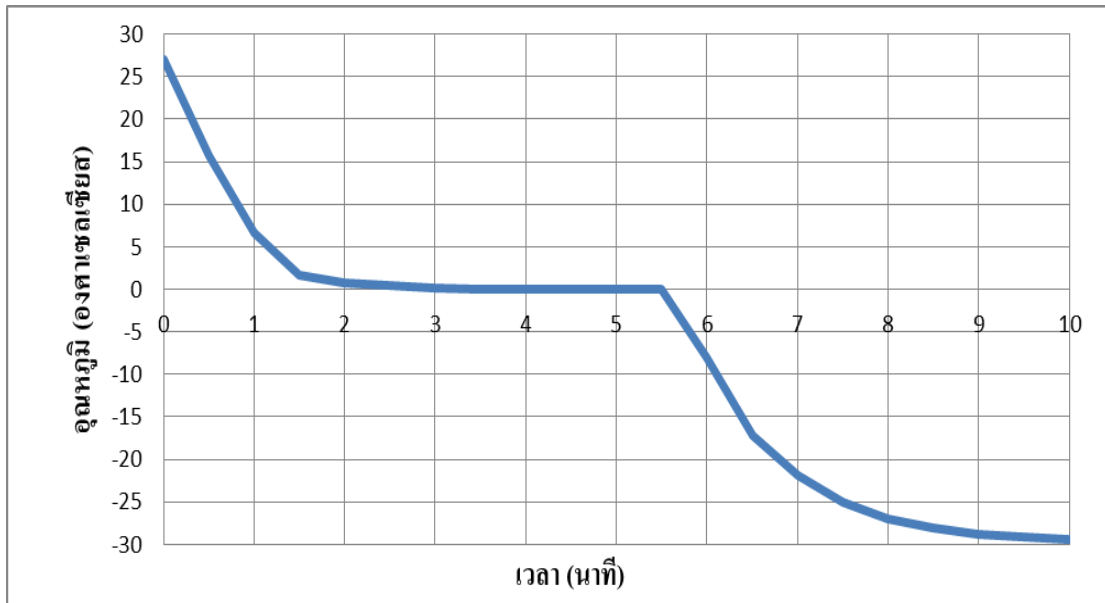
กราฟอัตราเร็วในการแช่แข็ง *K. marxianus*



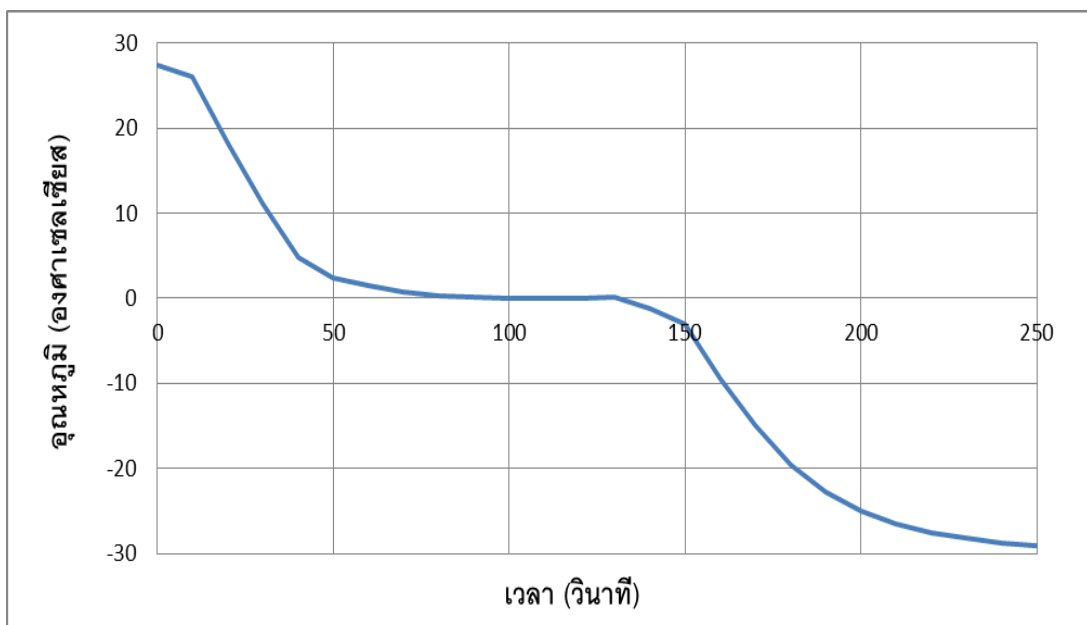
รูปที่ ค3 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของสารละลายเซลล์ในหลอดปั่นเหวี่ยงปริมาตร 15 มิลลิลิตร
ที่อุณหภูมิแช่แข็ง -10°C



รูปที่ ค4 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของสารละลายเซลล์ในหลอดปั่นเหวี่ยงปริมาตร 15 มิลลิลิตร
ที่อุณหภูมิแช่แข็ง -20°C



รูปที่ ค5 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของสารละลายเซลล์ในหลอดปั่นเหวี่ยงปริมาตร 15 มิลลิลิตร
ที่อุณหภูมิแช่แข็ง -30°C



รูปที่ ค6 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของสารละลายเซลล์ในหลอด eppendorf ปริมาตร 2 มิลลิลิตร
ที่อุณหภูมิแช่แข็ง -30°C

ตารางที่ ค1 ปริมาณสติกมาสเตอรอลที่เยื่อหุ้มเซลล์ต่อเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของ *K. marxianus* หลังการแช่แข็งที่อุณหภูมิต่างๆ

ปริมาณสติกมาสเตอรอล ในเซลล์ (mg/g dry weight cells)	จำนวนเซลล์ <i>K. marxianus</i> ที่มีชีวิต (%)			
	หลังการแช่แข็งที่อุณหภูมิ			ค่าเฉลี่ย
	-10 °C	-20 °C	-30 °C	
0	38.12 ^f ±5.97	44.10 ^f ±4.99	42.55 ^f ±6.41	41.59 ^B ±3.10
0.04	69.25 ^{de} ±2.11	77.34 ^{bcd} ±8.37	71.30 ^{cde} ±0.99	72.63 ^A ±4.20
0.15	81.68 ^{ab} ±5.36	79.47 ^{abc} ±5.84	65.54 ^e ±6.46	75.56 ^A ±8.75
0.32	75.35 ^{cd} ±7.62	81.93 ^{ab} ±2.84	75.53 ^{bcd} ±5.07	77.60 ^A ±3.75
0.37	84.90 ^a ±3.13	73.63 ^{cde} ±7.17	70.90 ^{cde} ±6.69	76.48 ^A ±7.42
ค่าเฉลี่ย	69.86 ² ±18.73	70.98 ² ±15.46	65.16 ¹ ±13.13	

A,B คือ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับในแนวนอนเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

(r = 3)

1,2 คือ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับในแนวตั้งเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

(r = 3)

a, b, c, d, e และ f คือ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

(r = 3)

ตารางที่ ค2 อัตราเร็วในการแช่แข็ง *K. marxianus* ที่อุณหภูมิ -20 °C ต่อเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด
ของ *K. marxianus* ที่ไม่มีและมีสติกมาสเตอร์เซลล์ที่เยื่อหุ้มเซลล์

อัตราเร็วการแช่แข็ง (°C/min)	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์หลังผ่านการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °C เมื่อ		
	ไม่มีสติกมาสเตอร์เซลล์	มีสติกมาสเตอร์เซลล์	ค่าเฉลี่ย
1	41.49 ^d ± 5.44	68.51 ^b ± 4.36	55.00 ^B ± 19.11
7	44.74 ^{cd} ± 4.57	69.67 ^b ± 4.31	57.20 ^B ± 17.62
10	64.94 ^b ± 5.66	84.67 ^a ± 5.04	74.81 ^A ± 13.95
20	42.99 ^{de} ± 2.55	51.26 ^c ± 6.41	47.13 ^C ± 5.85
40	41.09 ^d ± 2.50	48.23 ^{cd} ± 3.57	44.66 ^C ± 5.05
ค่าเฉลี่ย	47.05 ² ± 10.10	60.47 ¹ ± 14.36	

A, B, C, D และ E คือค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวนอนเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ($r = 3$)

1,2 คือ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับในแนวตั้งเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ($r = 3$)

a,b,c,d,e และ f คือ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ($r = 3$)

ตารางที่ ค3 จำนวนเซลล์ *K. marxianus* ที่ไม่มีสติกมาสเตอรอล (log cells/mL) ที่เก็บไว้ที่
อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา 6 สัปดาห์

วันที่	จำนวนเซลล์มีชีวิต (log cells/mL) ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ					
	-10 °C	-20 °C	-30 °C	-40 °C	-60 °C	-80 °C
3	7.44±0.14	7.52±0.06	7.33±0.07	6.83±0.06	6.98±0.04	7.00±0.06
7	7.32±0.13	7.47±0.07	7.35±0.08	6.78±0.11	6.91±0.01	6.81 ±0.06
10	7.35±0.12	7.46±0.06	7.34±0.03	6.78±0.01	6.88±0.03	6.81 ±0.03
14	7.20±0.03	7.23±0.03	7.32±0.02	6.73±0.01	6.82±0.10	6.84 ±0.02
21	6.83±0.03	7.19±0.02	7.31±0.08	6.83±0.15	6.78±0.05	6.71 ±0.12
28	6.82±0.03	6.90±0.12	7.10±0.01	6.67±0.08	6.79±0.03	6.69 ±0.11
35	6.60±0.02	7.05±0.19	7.07±0.02	6.61±0.07	6.76±0.04	6.70 ±0.05
42	6.51±0.11	7.05±0.02	6.85±0.10	6.35±0.14	6.67±0.02	6.69 ±0.06

ตารางที่ ค4 จำนวนเซลล์ *K. marxianus* ที่มีสติกมาสเตอรอลที่เยื่อหุ้มเซลล์ (log cells/mL) ที่เก็บ
ไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์

วันที่	จำนวนเซลล์มีชีวิต (log cells/mL) ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ					
	-10 °C	-20 °C	-30 °C	-40 °C	-60 °C	-80 °C
3	7.44±0.13	7.31±0.05	7.28±0.01	7.07±0.02	7.09±0.01	7.17±0.16
7	7.25±0.04	7.28±0.03	7.19±0.02	7.07±0.02	7.06±0.01	7.06±0.05
10	7.14±0.02	7.25±0.03	7.14±0.01	7.04±0.04	7.04±0.01	7.08±0.01
14	7.15±0.01	7.22±0.05	7.12±0.02	7.01±0.02	7.02±0.02	7.07±0.01
21	7.07±0.02	7.18±0.05	7.06±0.03	6.94±0.01	7.01±0.02	7.05±0.02
28	7.00±0.07	7.15±0.06	7.03±0.03	6.95±0.03	6.98±0.02	7.04±0.07
35	6.98±0.08	7.12±0.02	7.03±0.04	6.94±0.02	6.94±0.02	7.02±0.07
42	7.03±0.04	7.11±0.01	7.03±0.02	6.90±0.05	6.90±0.03	7.02±0.07

ภาคผนวก ง.
การคำนวณทางสถิติ

ตารางที่ ง1 การวิเคราะห์ทางสถิติ t-test ของจำนวนเซลล์ *K. marxianus* (log cells/mL) เมื่อนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี total plate count เทียบกับวิธี Methylene blue ที่แปรจำนวนเซลล์ 10^6 cells/mL (A), 10^7 cells/mL (B) และ 10^8 cells/mL (C)

Source	Levene's test for equality of variances		t-test for equality of means		
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)
A	0.026	0.879	0.039	4	0.971
B	3.595	0.131	1.054	4	0.351
C	3.828	0.122	-1.079	4	0.341

ตารางที่ ง2 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของจำนวนเซลล์ *K. marxianus* (log cells/mL) เมื่อแปรปริมาณสติกมาสเตอร์ลดระดับต่างๆ (A) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

Source	Sum of Squares	df	Mean square	F	Sig
A	0.045	5	0.009	0.486	0.780
Error	0.220	12	0.018		
Total	0.264	17			

ตารางที่ ง3 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของปริมาณสติกมาสเตอร์ลดในเซลล์ *K.marxianus* (mg/g dry weight cell) เมื่อแปรปริมาณสติกมาสเตอร์ลดใน YM broth ระดับต่างๆ (A) ที่ระดับ ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

Source	Sum of Squares	df	Mean square	F	Sig
A	0.419	5	0.084	68.140	0.000
Error	0.015	12	0.001		
Total	0.434	17			

ตารางที่ 4 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็งของ *K. marxianus* เมื่อแปรอุณหภูมิในการแช่แข็ง (A) และปริมาณสติกมาสเตอร์รอลในเซลล์ (B) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

Source	Sum of Squares	df	Mean square	F	Sig
Model	9349.093	14	673.864	21.086	0.000
A	285.874	2	142.937	4.473	0.020
B	8363.589	4	2090.897	65.428	0.000
AB	784.630	8	98.079	3.069	0.012
Error	958.717	30	31.957		
Total	10392.811	44			

ตารางที่ 5 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็ง *K. marxianus* ที่มีปริมาณสติกมาสเตอร์รอลและแปรอุณหภูมิในการแช่แข็ง (A) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

Source	Sum of Squares	df	Mean square	F	Sig
A	7589.902	4	1897.476	24.119	0.000
Error	3146.919	40	78.673		
Total	10736.822	44			

ตารางที่ 6 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็ง *K. marxianus* ที่ไม่มีสติกมาสเตอร์รอลเมื่อแปรอัตราเร็วในการแช่แข็ง (A) และปริมาณสติกมาสเตอร์รอล (B) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

Source	Sum of Squares	df	Mean square	F	Sig
Model	683.955	9	683.955	32.569	0.000
A	844.874	4	844.874	40.232	0.000
B	2266.004	1	2266.004	107.904	0.000
AB	127.524	4	127.524	6.072	0.002
Error	21.000	20	21.000		
Total		29			

ตารางที่ 7 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังการแช่แข็ง *K. marxianus* ที่ไม่มีและมีสติกมาสเตอร์ลดเมื่อแปรอัตราเร็วในการแช่แข็ง (A) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

Source	Sum of Squares	df	Mean square	F	Sig
A	6107.319	9	678.591	28.982	0.000
Error	468.282	20	23.414		
Total	6575.601	29			

ตารางที่ 8 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของกิจกรรมของเอนไซม์ เบตาไกลูคอสิดาซีเอสของ *K. marxianus* (A) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

Source	Sum of Squares	df	Mean square	F	Sig
A	5773.494	3	1924.498	308.093	0.000
Error	49.972	8	6.246		
Total	5823.466	11			

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวอภิญญา แซ่ใจ้ว เกิดเมื่อวันที่ 20 ตุลาคม 2531 ที่กรุงเทพมหานคร สำเร็จ
การศึกษาคณะวิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ 2) สาขาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะ
วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2552 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรปริญญา
มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา
2553

การนำเสนอผลงานทางวิชาการ

อภิญญา แซ่ใจ้ว, ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา, วรภา คงเป็นสุข และสุเมธ ตันตระเชียร. 2555.
ผลของสติกมาสเตอร์ลดต่อการทนอุณหภูมิต่ำของยีสต์พันธุ์ *Kluyveromyces marxianus*. ใน
การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 51 (ภาคบรรยาย) วันที่ 5-7 กุมภาพันธ์
2555 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร.