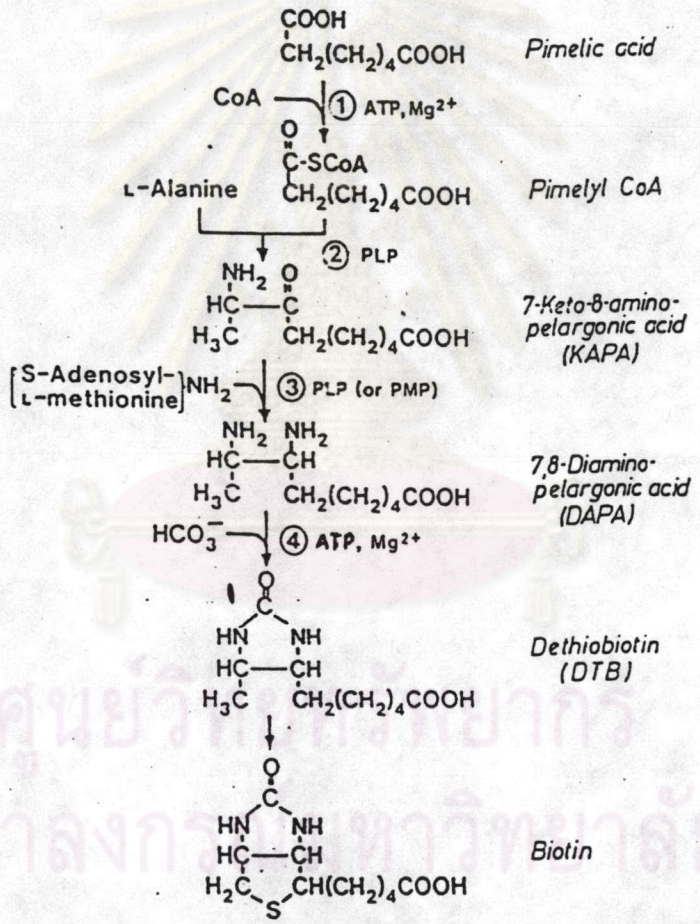
บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

2.1 ผลของกรดพิมีลิคต่อการศึกษาการสังเคราะห์ไบโอตินในจุลินทรีย์



รูปที่ 3 ขั้นตอนการสังเคราะห์ไบโอตินในจุลินทรีย์ 1.Pimelyl-CoA synthetase; 2. KAPA synthetase; 3. DAPA aminotransferase; 4. DTB synthetase (Izumi, et al., 1980)

รูปที่ 3 แสดงขั้นตอนการสังเคราะห์ไบโอตินในจุลินทรีย์ จากการตรวจเอกสารพบว่าในจุลินทรีย์เช่น แบคทีเรียและรา มีผู้ทดลองศึกษาผลของไบโอตินไวตาเมอร์คือ สารที่อยู่ในวิถีการสังเคราะห์ไบโอติน เช่น ดีไทโอไบโอติน (dethiobiotin)และกรดพิมีลิค (pimelic acid) ต่อการสังเคราะห์ไบโอติน แต่ยังมีการทดลองน้อยมากเกี่ยวกับผลของไบโอตินไวตาเมอร์ต่อการสังเคราะห์ไบโอตินในยีสต์ดังปรากฏในตัวอย่างเอกสาร เช่น Eisenberg(1963) ศึกษาการสังเคราะห์ไบโอตินในรา *Phycomyces blakesleeanus* โดยเติมกรดพิมีลิคความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร และให้อากาศโดยเขย่าขวดเลี้ยงเชื้อที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที บ่มเชื้อที่ 30°ซ เป็นเวลา 7 วัน ปริมาณไบโอตินที่สังเคราะห์ได้เพิ่มขึ้น 10-12 เท่า ปริมาณไบโอตินที่สังเคราะห์ได้อยู่ในปริมาณ 20-25 ไมโครกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร และเมื่อบ่มเชื้อ 10-14 วันปริมาณไบโอตินที่สังเคราะห์อยู่ในช่วงระหว่าง 35 ถึง 60 ไมโครกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร การทดสอบแหล่งคาร์บอนที่ใช้ได้แก่ซูโครส มอลโตสและกลูโคส สามารถเพิ่มการเจริญของเชื้อได้ แต่ไม่สามารถเพิ่มการสังเคราะห์ไบโอติน การทดสอบแหล่งไนโตรเจนพบว่ากรดกลูตามิค กรดแอสพาติก อลานีน และไกลซีนเพิ่มการเจริญของเชื้อได้ ผลการทดสอบแร่ธาตุบางชนิดพบว่าถ้าไม่เติม คอปเปอร์ แมกนีเซียม โมลิบดีนัม และโบรอน ไม่มีผลหรือมีผลเพียงเล็กน้อยต่อการสังเคราะห์ไบโอติน แต่ถ้าไม่เติมธาตุสังกะสีมีผลไปลดการเจริญของเชื้อลงครึ่งหนึ่ง และปริมาณการสังเคราะห์ไบโอตินลดลง 80% และถ้าไม่เติมธาตุเหล็กมีผลให้การเจริญลดลงเล็กน้อย และการสังเคราะห์ไบโอตินลดลง 44%

การสังเคราะห์ไบโอตินใน *Escherichia coli* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมไบโอตินที่ความเข้มข้นต่างๆกัน พบว่าปริมาณไบโอตินที่สร้างขึ้นมีปริมาณลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับที่ไม่ได้เติมไบโอตินลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงว่ามีการยับยั้งการสังเคราะห์ไบโอตินเนื่องมาจากปริมาณไบโอตินที่เติมลงไป พบว่าการยับยั้งการสังเคราะห์ไบโอตินไม่ใช่เป็นแบบ feed back inhibition แต่เป็นแบบ repression และการศึกษาในแบคทีเรียหลายชนิดพบว่าการสะสมไบโอตินจะถูกยับยั้งโดยไบโอตินในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในเชื้อ *Bacillus sphaericus* ซึ่งสามารถสังเคราะห์ดีไทโอไบโอตินในปริมาณสูง ได้ถูกนำมาศึกษาการสังเคราะห์ดีไทโอไบโอ

ตินจากกรดพิมีลิคโดยไม่มีการเติมไบโอตินลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าสามารถสังเคราะห์ดีไทโอไบโอตินได้ แต่ถ้าเติมไบโอตินลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้ความสามารถในการสังเคราะห์ดีไทโอไบโอตินลดลง แสดงว่าการยับยั้งการสังเคราะห์ไบโอตินเป็นแบบ repression (Izumi,1980)

Niimura และคณะ (1964) ศึกษาการสร้างไบโอตินโดยเติมดีไทโอไบโอตินและซัลเฟตลงในอาหารเลี้ยงยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7752 ผลการทดลอง พบว่าสภาวะที่ดีที่สุดสำหรับการสังเคราะห์ไบโอตินจากดีไทโอไบโอตินโดยเซลของ *S. cerevisiae* ได้แก่การเลี้ยงเซลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีดีไทโอไบโอติน 20 นาโนกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1-3 วัน ที่ 37°ซ โดยไม่มีการเขย่า เก็บเซลและล้างเซล 3 ครั้ง ด้วยน้ำเกลือที่ฆ่าเชื้อแล้ว เติมน้ำเกลือในเซลที่ล้างแล้วให้ได้ปริมาณเซล 10 มิลลิกรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร เลี้ยงเซลในฟลาสต์ที่มีความจุ 125 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีดีไทโอไบโอติน 2×10^{-7} โมลาร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ 37°ซ โดยไม่มีการเขย่า ปริมาณไบโอตินที่ผลิตได้มากที่สุดคือ 4.3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ผลการทดลองพบว่าปริมาณชาตุกำมะถันที่พบภายในเซลเพียงพอสำหรับการสังเคราะห์ไบโอตินในปริมาณสูง

Ogata และคณะ (1965) ศึกษาการสังเคราะห์ไบโอตินในอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 มิลลิลิตร ที่เติมกรดพิมีลิค 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร(0.00005%) โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์เช่น *Mucor* 83 สายพันธุ์ *Rhizopus* 75 สายพันธุ์ *Streptomyces* 90 สายพันธุ์ และ *Bacillus sphaericus* 1 สายพันธุ์ ผลการทดลองพบว่า *Mucor* spp. และ *Rhizopus* spp. สังเคราะห์ไบโอตินได้ระหว่าง 0.01 ถึง 0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน *Streptomyces* spp. สังเคราะห์ไบโอตินได้ระหว่าง 0.01 ถึง 0.20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใน *Bacillus sphaericus* สังเคราะห์ไบโอตินไวตาเมอร์ได้ 20 ถึง 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของกรดพิมีลิคที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์ไบโอติน-ไวตาเมอร์ในเชื้อราเช่น *Mucor* spp. และในเชื้อแบคทีเรียเช่น *Bacillus* spp. อยู่ระหว่าง 100-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร(0.00001-0.0001%) เมื่อความเข้มข้นของกรดพิมีลิคมากกว่า 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร(0.005%) พบว่าปริมาณการสังเคราะห์ไบโอตินไวตาเมอร์ลดลง

Iwahara และคณะ (1966) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการสังเคราะห์ไบโอตินและดีไทโอไบโอติน และการสังเคราะห์ไบโอตินจากดีไทโอไบโอตินในแบคทีเรีย รา และยีสต์ และจำแนกจุลินทรีย์ที่สังเคราะห์ดีไทโอไบโอตินและไบโอตินจากกรดพิมีลิค และสังเคราะห์ไบโอตินจากดีไทโอไบโอติน

1. จุลินทรีย์ที่สังเคราะห์ดีไทโอไบโอติน และไบโอตินในปริมาณมาก โดยไม่เติมกรดพิมีลิคลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยจุลินทรีย์เหล่านี้อาจสังเคราะห์กรดพิมีลิคเพียงพอต่อการสังเคราะห์ดีไทโอไบโอตินและไบโอติน(Ogata et al.,1965) จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ได้แก่ เชื้อราต่างๆเช่น *Mucor* spp.และ *Rhizopus* spp. ดังแสดงในตารางที่ 2

2. จุลินทรีย์ที่สังเคราะห์ไบโอตินในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดพิมีลิค หรือดีไทโอไบโอติน แต่สามารถสังเคราะห์ไบโอตินในปริมาณน้อยเมื่อไม่เติมกรดพิมีลิคหรือดีไทโอไบโอตินในอาหารเลี้ยงเชื้อ และพบว่าเมื่อจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้สังเคราะห์ดีไทโอไบโอตินในปริมาณสูงในสภาวะที่เติมกรดพิมีลิค มักจะสังเคราะห์ไบโอตินในปริมาณสูงเช่นกัน แสดงว่าดีไทโอไบโอตินที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากกรดพิมีลิคถูกเปลี่ยนเป็นไบโอติน จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ได้แก่ *Mucor* spp., *Rhizopus* spp. และ *Streptomyces* spp. ดังแสดงในตารางที่ 2

3. จุลินทรีย์ที่สังเคราะห์ดีไทโอไบโอติน และไบโอตินได้ในปริมาณน้อย แม้ว่ามีการเติมกรดพิมีลิคลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่สามารถสังเคราะห์ไบโอตินได้สูงเมื่อเติมดีไทโอไบโอตินลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ดีไทโอไบโอตินต่ำ ได้แก่ เชื้อรา *Aspergillus* spp., *Neurospora crassa*, *Fusarium bulbigenum* ดังแสดงในตารางที่ 2

4. จุลินทรีย์ที่สังเคราะห์ดีไทโอไบโอตินจากกรดพิมีลิคได้ในปริมาณสูง แต่สังเคราะห์ไบโอตินได้ในปริมาณต่ำ จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ไบโอตินจากดีไทโอไบโอตินต่ำ จุลินทรีย์กลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียและเชื้อราบางชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การสังเคราะห์ดีไทโอไบโอตินและไบโอตินจากกรดพิมีลิคและการสังเคราะห์ไบโอติน จากดีไทโอไบโอตินในแบคทีเรีย รา และยีสต์ (Iwahara, et al.,1966)

จุลินทรีย์	ปริมาณไบโอติน-ไวตาเมอร์(นก.มล.$^{-1}$)				
	total biotin*		true biotin		
	a**	b**	a**	b**	c**
กลุ่มที่ 1					
Mucor ambigus	300	700	180	160	200
Mucor javanicus	1000	8000	100	100	160
Rhizopus oryzae	1500	4000	400	500	500
Rhizopus tonkinensis	1000	3000	225	300	350
Rhizopus nigricans	1000	2000	225	350	500
H-96 (*Rhizopus* sp. และ *Mucor* sp. คัดเลือกจากดิน)	1200	3400	270	270	300
H-36	500	1000	330	450	345
H-49-S-5	1000	1000	120	130	150
H-48-S-3	1500	1500	190	220	250
H-38-S-2	680	1800	230	240	340
Fusarium oxysporum	600	600	230	200	340
กลุ่มที่ 2					
Rhizopus japonicus	200	600	75	150	250
Rhizopus nodosus	200	5000	70	135	500
Rhizopus delemar	400	5000	50	270	300
Aspergillus flavus	trace	1300	trace	100	205
A-1031-7 *Streptomyces* sp.	trace	500	26	70	130
A-1030-3 คัดเลือกจากดิน)	trace	450	40	145	130
A-1001-15	50	1000	40	140	300

(ยังมีต่อ)

ตารางที่ 2 การสังเคราะห์ดีไทโอไบโอตินและไบโอตินจากกรดพิมีลิคและการสังเคราะห์ไบโอติน จากดีไทโอไบโอตินในแบคทีเรีย รา และยีสต์ (ต่อ)

จุลินทรีย์	ปริมาณไบโอติน-ไวตาเมอร์(นก.มล.$^{-1}$)				
	total biotin*		true biotin		
	a**	b**	a**	b**	c**
กลุ่มที่ 3					
Aspergillus oryzae(M-61)	trace	trace	30	50	180
Aspergillus tamarii(M-68)	70	70	50	65	345
Aspergillus tamarii(M-69)	50	50	35	25	300
Aspergillus sojae	45	50	20	10	400
Neurospora crassa(M-122)	trace	trace	trace	trace	200
Neurospora crassa(M-124)	trace	trace	trace	trace	380
กลุ่มที่ 4					
Mucor javanicus	250	4500	40	50	60
Aspergillus cellulosae	400	800	50	60	80
Bacillus Sphaericus	50	20000-200000	trace	trace	trace
Pseudomonas fluorescens	trace	2000	trace	trace	trace
Pseudomonas aeruginosa	trace	2000	trace	trace	trace
Bacillus megaterium	trace	1000	trace	trace	trace
BC-80 (*Bacillus* sp.	trace	3150	trace	trace	trace
BC-44 คัดเลือกจากดิน	trace	3000	trace	trace	trace
K-597-1-13	trace	3100	trace	trace	trace
K-681-5-2	80	3600	trace	trace	trace

* : ดีไทโอไบโอติน เป็นส่วนประกอบหลักใน total biotin

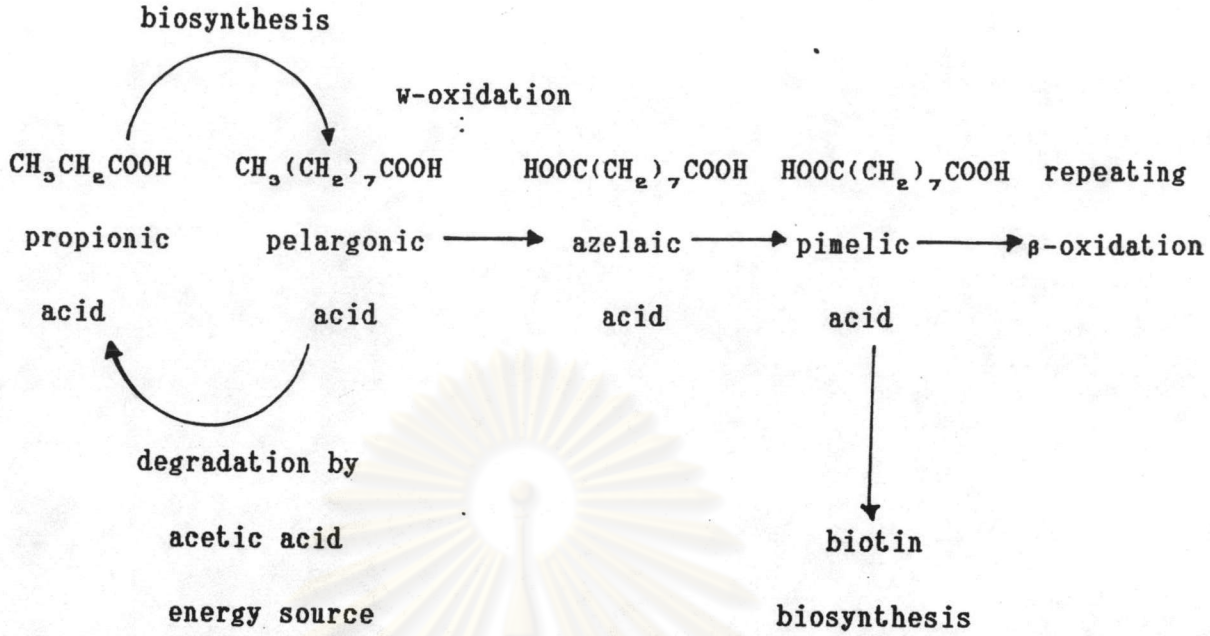
** a : ไม่เติมกรดพิมิลิค และดีไทโอไบโอตินลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

b : เติมกรดพิมิลิค 50 มก.มล.$^{-1}$(0.00005%) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

c : เติมดีไทโอไบโอติน 50 มก.มล.$^{-1}$ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

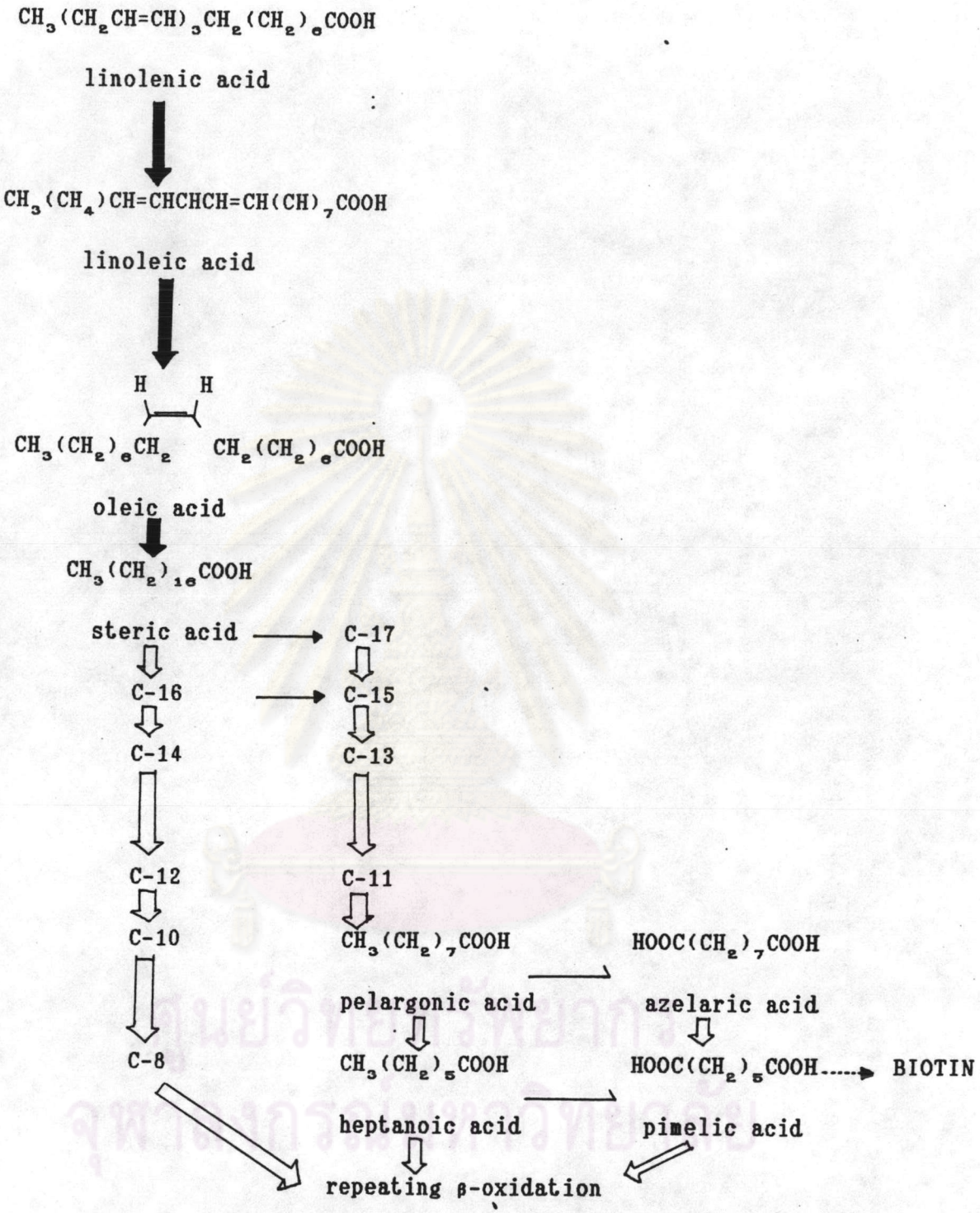
2.2 การสังเคราะห์ไบโอตินจากกรดไขมันสายยาว

Ohsugi และคณะ(1972) ศึกษาการสังเคราะห์ดีไทโอไบโอตินจากกรดโอลีอิค (oleic acid)ใน *Brevibacterium* สามารถสังเคราะห์ดีไทโอไบโอตินได้ 5.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อมาในปี 1975 Ohsugi และคณะ ศึกษาการสังเคราะห์ไบโอตินจากกรดโอลีอิคใน *Cryptococcus neoforman* โดยเติมกรดโอลีอิคเข้มข้น 0.1% ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เลี้ยงเชื้อที่ 28°ซ นาน 3 วัน สามารถสังเคราะห์ไบโอตินได้ 2.40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ไม่เติมกรดโอลีอิคในอาหารเลี้ยงเชื้อจะสังเคราะห์ไบโอตินได้ 0.74 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และการใช้ ^{14}C ติดฉลากที่กรดโอลีอิคเพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงพบว่า 7-keto-8 aminopelargonic acid , ดีไทโอไบโอติน และ ไบโอติน มี ^{14}C อยู่ในโมเลกุล แสดงว่ามีการเปลี่ยนแปลงในโมเลกุลของกรดโอลีอิคเปลี่ยนไปเป็นไบโอตินได้ ต่อมาในปี 1981 Ohsugi และคณะ ศึกษาการใช้กรดโอลีอิคในการสังเคราะห์ไบโอตินใน *Micrococcus sp.* โดยศึกษาการเติมกรดพิมีลิค , กรดอะซิลาอิค(azelaic acid) สารที่อยู่ในวิถีการสังเคราะห์ไบโอติน และไบโอติน โดยกรดโอลีอิคเปลี่ยนเป็นกรดพิมีลิค 1.1 % และกรดอะซิลาอิค 2.8 % และปริมาณไบโอติน 1.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อมาในปี 1982 Ohsugi และคณะ ศึกษาการสังเคราะห์ไบโอตินจากกรดพีลาร์โกนิค(pelargonic acid)ใน *Pseudomonas sp.* ผลผลิตที่ได้ส่วนใหญ่จะเป็นดีไทโอไบโอติน และการเติมสเตรปโตมัยซิน (streptomycin) หรืออะลานีน (L-alanine) จะเพิ่มปริมาณการสะสมดีไทโอไบโอติน สารที่ได้จากการเปลี่ยนกรดพีลาร์โกนิคโดยแบคทีเรียนี้จะได้กรดโพรพิโอนิค (propionic acid) , กรดพิมีลิค และกรดอะซิลาอิค ซึ่งเมื่อใช้กรดโพรพิโอนิคในการเลี้ยงเชื้อ ผลผลิตเป็นกรดพิมีลิคและกรดอะซิลาอิค จะได้วิถีการเปลี่ยนแปลงดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 ขั้นตอนการเปลี่ยนกรดพีลาร์โกนิคในวิถีการสังเคราะห์ไบโอตินโดย *Pseudomonas sp.* 393

การศึกษาการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว เพื่อศึกษาวิถีการสังเคราะห์ไบโอตินจากสารตั้งต้นก่อนที่จะถูกเปลี่ยนเป็นกรดพิมิลิค จะประกอบไปด้วยปฏิกิริยาหลายปฏิกิริยา เริ่มจากปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชั่น (dehydrogenation) ในการเปลี่ยนกรดลิโนเลนิค (linolenic acid) เป็นกรดสเตียริค (steric acid) โดยมีกรดลิโนลีอิค (linoleic acid) และกรดโอลีอิค (oleic acid) เป็นสารที่อยู่ในปฏิกิริยาตามลำดับ และต่อด้วยปฏิกิริยาอัลฟาออกซิเดชัน (α-oxidation) โดยเปลี่ยนโครงสร้างของกรดสเตียริคซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวให้มีโครงสร้างเป็นกรดไขมันอิ่มตัว ต่อมาเป็นปฏิกิริยาเบตาออกซิเดชัน (β-oxidation) เปลี่ยนโครงสร้างของกรดไขมันอิ่มตัวที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอม 17 ตัวเป็นกรดพีลาร์โกนิคและกรดเฮปตาโนอิค (heptanoic acid) และต่อมาเป็นปฏิกิริยาโอเมกาออกซิเดชัน (w-oxidation) ที่จะเปลี่ยนกรดพิลาร์โกนิค และกรดเฮปตาโนอิคไปเป็นกรดพิมีลิค และสุดท้ายเป็นปฏิกิริยาเบตาออกซิเดชัน เปลี่ยนกรดอะซิลาอิคเป็นกรดพิมีลิคซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ไบโอติน (Ohsugi, 1985) ดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 วิถีการสังเคราะห์ไบโอตินจากกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวโดยแบคทีเรีย(Ohsugi, 1985)

(➡) ปฏิกิริยา hydrogenation, (⟶) ปฏิกิริยา α-oxidation

(⇨) ปฏิกิริยา β-oxidation, (⇢) ปฏิกิริยา ω-oxidation

2.3 การสังเคราะห์ไบโอตินโดยยีสต์

ในปี ค.ศ. 1986 Pearson และคณะ ศึกษาการผลิตไบโอตินโดยยีสต์ 129 สายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีไบโอติน ผลการทดลองพบว่า *Rhodotorula glutinis* NCYC 377 และ *Sporobolomyces pararoseus* NCYC 1443 ผลิตไบโอตินได้สูงสุดในช่วง 10.4-10.6 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้เมื่อเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดพิมีลิคซึ่งเป็นไบโอตินไวตาเมอร์ตัวหนึ่ง ในขั้นตอนการสังเคราะห์ไบโอตินดังแสดงในรูปที่ 1 ผลการทดลองพบว่ากรดพิมีลิคเพิ่มปริมาณการผลิตไบโอตินในยีสต์บางสายพันธุ์ และลดการผลิตไบโอตินโดยยีสต์บางสายพันธุ์ ตัวอย่างเช่นผลการทดลองพบว่า *Rhodotorula glutinis* NCYC 377 เพิ่มการผลิตไบโอตินขึ้นเป็น 27.6 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ *Sporobolomyces pararoseus* NCYC 1443 ผลิตไบโอตินเพียง 8.7 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จึงเป็นที่น่าสนใจว่ากรดพิมีลิคมีผลอย่างไรต่อการผลิตไบโอตินโดยยีสต์สายพันธุ์ต่าง ๆ เหตุใดยีสต์บางสายพันธุ์จึงผลิตไบโอตินในปริมาณสูงขึ้นเมื่อเติมกรดพิมีลิคในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในขณะที่ยีสต์บางสายพันธุ์ผลิตไบโอตินในปริมาณเท่าเดิมหรือลดลง ข้อมูลเรื่องผลของกรดพิมีลิคต่อการสังเคราะห์ไบโอตินในยีสต์สายพันธุ์ต่างๆจะเป็นข้อมูลพื้นฐานประกอบการวิจัยต่อไป เรื่องการเปรียบเทียบแอคติวิตี้ของเอ็นไซม์ในวิถีการสังเคราะห์ไบโอตินระหว่างยีสต์สายพันธุ์ที่สังเคราะห์ไบโอตินเพิ่มขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อมีกรดพิมีลิค และยีสต์สายพันธุ์ที่สังเคราะห์ไบโอตินน้อยลงเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีกรดพิมีลิค เป็นต้น ข้อมูลเหล่านี้อาจนำไปสู่ความเข้าใจกลไกควบคุมการสังเคราะห์ไบโอติน ซึ่งจะนำไปสู่การใช้พันธุวิศวกรรมศาสตร์ปรับปรุงเปลี่ยนแปลงยีนส์ของยีสต์ที่มีความสำคัญด้านอุตสาหกรรม เพื่อใช้ยีสต์ผลิตไบโอตินเชิงพาณิชย์และ/หรือเพื่อใช้ยีสต์ผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ โดยยีสต์สามารถผลิตไบโอตินขึ้นใช้เองได้ในปริมาณสูงไม่ต้องมีการเติมไบโอตินลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ อันเป็นการลดต้นทุนการผลิต อนึ่งในการวิจัยใช้จุลินทรีย์ผลิตผลิตภัณฑ์ในถังหมัก มักมีการทดลองในระดับขวดเขย่าก่อนแล้วใช้ผลการทดลองในการออกแบบสภาวะการทดลองเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ในถังหมัก (Moo-Young & Blanch, 1987) ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงจำเป็นต้องมีการวิจัยใช้ยีสต์ผลิตไบโอตินในระดับขวดเขย่าก่อนจะทำการทดลองใช้ยีสต์ผลิตไบโอตินในถังหมักขนาด 10 ลิตร

2.4 การศึกษาอนุกรมวิธานของยีสต์

ในการจำแนกยีสต์ทางอนุกรมวิธาน จำเป็นต้องศึกษาลักษณะรูปร่างภายนอก ลักษณะการเจริญ การสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ และลักษณะทางสรีระวิทยาของยีสต์ชนิดนั้นภายใต้สภาวะเดียวกัน Kreger-van Rij(1984) แบ่งยีสต์ออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

2.4.1. ยีสต์ในกลุ่ม Ascosporogenous yeasts เป็นกลุ่มยีสต์ที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยการสร้างสปอร์ที่เรียกว่าแอสโคสปอร์(ascospores) ยีสต์ในกลุ่มนี้ประกอบด้วย 2 กลุ่ม ที่มีลักษณะดังนี้คือ

2.4.1.1 แฟมิลี Spermophthoraceae เซลปกติอยู่ในสภาวะแฮบพลอยด์(haploid)สร้างเส้นใยชนิดไม่มีผนังกั้นสร้างเส้นใยแท้หรือเส้นใยเทียม สปอร์ของยีสต์สามารถผสมกันเองเกิดเป็นเส้นใยที่เป็นดิบพลอยด์(diploid) โดยเส้นที่เกิดขึ้นมีนิวเคลียสเพียง 1 อัน และสามารถสร้างสปอร์ลักษณะรูปเข็มได้ 8-12 สปอร์ มี 3 จีนัส ได้แก่จีนัส *Coccidiascus*, *Metschnikowia* และ *Nematospora*

2.4.1.2 แฟมิลี Saccharomycetaceae สร้างเส้นใยชนิดเส้นใยเทียม สร้างอาร์โทร์สปอร์(arthrospores) เซลปกติสามารถสืบพันธุ์โดยการแตกหน่อหรือแบ่งตัว แอสโคสปอร์ที่เกิดขึ้นมีรูปร่างหลายแบบ ยกเว้นแอสโคสปอร์รูปเข็ม ยีสต์ในกลุ่มนี้สามารถดำรงชีวิตได้ทั้งในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน มี 30 จีนัส เช่นจีนัส *Citeromyces*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces* เป็นต้น

2.4.2. ยีสต์ในกลุ่ม Basidiosporogenous yeasts เป็นกลุ่มยีสต์ที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างสปอร์ที่เรียกว่าเบสิดิโอสปอร์(basidiospores)ยีสต์ในกลุ่มนี้ประกอบด้วย 4 กลุ่ม ที่มีลักษณะดังนี้คือ

2.4.2.1 แฟมิลี Filobasidiaceae สร้างสปอร์จากกลุ่มของเส้นใยที่มีโครงสร้าง clampconnections ที่อยู่กันอย่างหนาแน่นหรือหลวมๆ สปอร์มีรูปร่างเรียวยาว ไม่มีผนังกั้น ไม่มีก้านชูสปอร์ และสร้างบลาสโตสปอร์(blastospores) มี 3 จีนัส ได้แก่จีนัส *Chionosphaera*, *Filobasidiella*, *filobasidium*

2.4.2.2 ยีสต์ในกลุ่ม Teliospore-forming yeasts เซลปกติสืบพันธุ์โดยอาศัยการแตกหน่อ สร้างเส้นใยชนิดเส้นใยแท้และเส้นใยเทียม อาจสร้างหรือไม่สร้าง clamp connection สร้างสปอร์ที่เรียกว่าเทลิโอสปอร์(teliospores) มี 3 จีนัส ได้แก่จีนัส *Leucosporidium, Rhodosporidium, Sporidiobolus*

2.4.2.3/4 แฟมิลี Sirobasidiaceae และ Tremellaceae เซลปกติอยู่ในสภาวะแฮบพลอยด์ เส้นใยจะถูกสร้างจากเซลที่ผสมกันโดยอาศัย conjugation tube ซึ่งเปลี่ยนแปลงโครงสร้างต่อไปเป็น dikaryotic mycelium เส้นใยนี้สามารถสร้าง conidia หรือบางสภาวะจะสร้างเซลแฮบพลอยด์ และถ้าสภาวะเหมาะสมเส้นใยนี้จะสร้าง basidicarp, basidia และ basidiosopre ในแฟมิลี Sirobasidiaceae สร้างสปอร์สืบพันธุ์เรียกว่า basidiospore มี 2 จีนัส ได้แก่จีนัส *Fibulobasidium* และจีนัส *Sirobasidium* ในแฟมิลี Tremellaceae เรียกว่า ballistospore มี 2 จีนัส ได้แก่ จีนัส *Holtermannia* และจีนัส *Tremella*

2.4.3. ยีสต์ในกลุ่ม Imperfect yeasts เป็นกลุ่มยีสต์ที่มีไม่พบการการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะสร้างสปอร์เช่น อาร์โทรสปอร์ บอลลิสโตสปอร์ (ballistospores) คลามัยโดสปอร์(chlamydospores) ถ้าเมื่อไรที่ศึกษาพบว่ายีสต์เหล่านี้มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศก็ถูกจัดตามชนิดของสปอร์แบบอาศัยเพศ ยีสต์ในกลุ่มนี้ประกอบด้วย 2 กลุ่ม ที่มีลักษณะดังนี้คือ

2.4.3.1 แฟมิลี Cryptococaceae เซลปกติสืบพันธุ์โดยอาศัยการแตกหน่อ สร้างเส้นใยชนิดเส้นใยแท้และเส้นใยเทียม อาจพบการสร้างอาร์โทรสปอร์ เซลปกติมีสีแตกต่างกันไปตามชนิดของรงควัตถุคาโรทีนอยด์(carotenoid) เช่นสีแดง เหลือง ส้ม หรือไม่มีสี สามารถดำรงชีพได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนหรือไม่มีออกซิเจน มี 17 จีนัสเช่นจีนัส *Candida Cryptococcus, Kloeckera, Rhodotorula, Trichosporon* เป็นต้น

2.4.3.2 แฟมิลี Sporobolomycetaceae เซลปกติสืบพันธุ์โดยการแตกหน่อหรือการแบ่งตัว สร้างเส้นใยชนิดเส้นใยเทียม สร้างสปอร์บนก้านชูสอร์ 1-2 อัน สปอร์มีผิวเรียบและใส เมื่อสปอร์แก่ จะถูกแรงดึงดูดของโลกดึงหลุดลงมา เรียกสปอร์นี้ว่าบอลลิสโตสปอร์

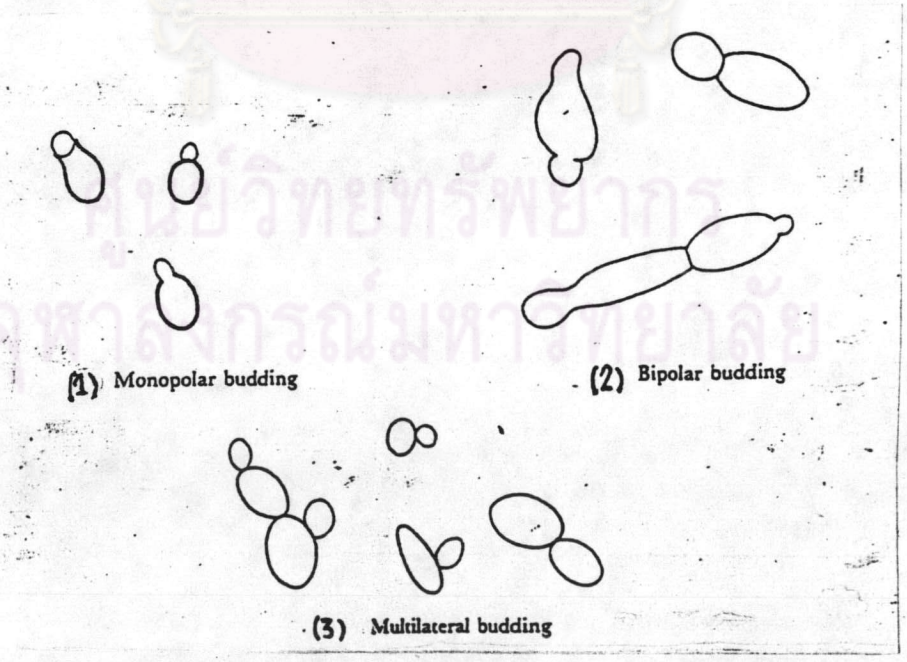
สามารถดำรงชีพได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนเท่านั้น มี 2 จีนัสได้แก่จีนัส *Bullera* และจีนัส *Sporobolomyces*

2.5 การจำแนกยีสต์ทางอนุกรมวิธาน

จำแนกยีสต์ทางอนุกรมวิธานโดยศึกษาลักษณะต่างๆต่อไปนี้

2.5.1. การศึกษาลักษณะการแตกหน่อ(Kreger Van Rij,1984)

ยีสต์สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ(budding), การแบ่งตัว(fission), หรือพบการสืบพันธุ์ทั้งสองแบบ การแตกหน่อของยีสต์เกิดได้ทั้งในเซลปกติหรือในเส้นใย (hyphae) การแบ่งชนิดการแตกหน่ออาศัยลักษณะการแตกหน่อบนตำแหน่งต่างๆของเซล ถ้าการแตกหน่อเกิดเฉพาะที่ขั้วใดขั้วหนึ่งของเซลแม่ เรียกการแตกหน่อนั้นว่า monopolar budding ถ้าการแตกหน่อเกิดที่ขั้วทั้งสองด้านของเซล เรียกการแตกหน่อนั้นว่า bipolar budding ถ้าการแตกหน่อเกิดเป็นลักษณะของผนังกั้นระหว่างเซลทั้งสอง เรียกการแตกหน่อนั้นว่า budding on broad base หรือ bud fission ถ้าการแตกหน่อเกิดบนตำแหน่งต่างๆของเซลแม่ เรียกการแตกหน่อนั้นว่า multilateral budding



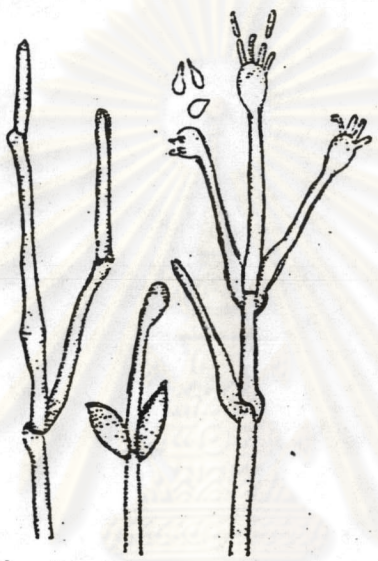
รูปที่ 6 ลักษณะการแตกหน่อชนิดต่างๆของยีสต์ 1.monopolar budding 2.bipolar budding 3.multilateral budding

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.5.2. <u>การสร้างเส้นใยชนิดเส้นใยแท้(true mycelium) และเส้นใยเทียม (pseudomycelium)</u>

ในยีสต์ที่มีการสืบพันธุ์โดยการแตกหน่อเพียงอย่างเดียว หน่อที่เจริญเต็มที่แล้วอาจจะหลุดออกจากเซลแม่ทันที หรือยังคงติดอยู่กับเซลแม่เป็นกลุ่มก้อนหรือเจริญต่อกันเป็นสายยาว ยีสต์บางชนิดจะมีการสร้างเซลต่อกันเป็นสายยาวเกิดเป็นลักษณะของเส้นใยเทียม ซึ่งมีโครงสร้างของเซลยืดยาว ภายในเส้นใยประกอบด้วยเซลที่มีขนาดใกล้เคียงกัน เซลแต่ละเซลสร้างสปอร์ที่เรียกว่าบลาสโตสปอร์ (blastospores) ลักษณะรูปร่างและการเรียงตัวของบลาสโตสปอร์มีความแตกต่างกันในยีสต์แต่ละสายพันธุ์ ในปี ค.ศ.1932 Langeron และ Talice(Lodder,1974)จำแนกลักษณะของเส้นใย5แบบ ดังแสดงในรูปที่ 8 ได้แก่ 1.แบบมัยโคโทรูลา(mycotorula type) การเจริญของเส้นใยหนาแน่น บลาสโตสปอร์เกิดที่รอยต่อของเซลมีปริมาณไม่มากเซลมีการเจริญยืดยาวออกไป 2. แบบมัยโคโทรูลอยดีส (mycotoruloides type)บลาสโตสปอร์ที่เจริญที่รอยต่อระหว่างเซลเจริญแตกกิ่งออกไป 3. แบบแคนดิดา(candida type) บลาสโตสปอร์มีการเรียงตัวแตกกิ่งออกไปที่รอยต่อระหว่างเซล 4.แบบมัยโคแคนดิดา(mycocandida type)เส้นใยมีการเจริญแตกกิ่งก้านออกไปที่รอยต่อระหว่างเซล 1 ถึง 2 กิ่ง และมีบลาสโตสปอร์ที่รอยต่อของเส้นใยยีสต์ที่มีการแตกหน่อ 5.แบบบลาสโตเดนเดรียน (blastodendrion) บลาสโตสปอร์มีการเรียงตัวรูปหยดน้ำคล้าย *Pennicilium* ยีสต์บางชนิดภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจะสร้างเส้นใยที่มีผนังกั้น เส้นใยนี้เป็นเส้นใยแท้ โดยเกิดจากการเจริญอย่างต่อเนื่องของเซลที่อยู่ปลายเส้นใย และมีการสร้างผนังกั้นเซลขึ้นมาภายหลัง ทำให้พบว่าเซลที่อยู่ปลายสุดของเส้นใยยาวกว่าเซลที่อยู่ถัดภายในเข้ามา ในปี ค.ศ. 1951 Wickerham(Lodder, 1974) จำแนกลักษณะของเส้นใยแท้ 3 แบบ ดังนี้(ดังแสดงในรูปที่ 7) 1.เส้นใยแท้จะมีการหักเหแสงที่ผนังกั้นของเส้นใย เนื่องจากเส้นใยแท้มีผนังกั้นเซลตรงและหนาเห็นได้ชัดเจนแตกต่างจาก vacuole ภายใน เส้นใยเทียมไม่มีผนังกั้นเส้นใยจึงไม่เกิดการหักเหของแสงที่บริเวณนี้ เนื่องจากบริเวณปลายทั้งสองด้านของแต่ละเซล มีลักษณะโค้ง ไม่เกิดการหักเหแสง ในเส้นใยแบบผสมจะพบผนังกั้นเส้นใยน้อย 2.ในเส้นใยแท้จะพบว่าเซลที่อยู่ปลายสุดของเส้นใยมีความยาวกว่าเซลที่อยู่ถัดเข้ามาภายใน ในขณะที่

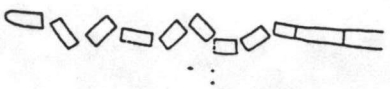
เส้นใยเทียมพบว่าเซลที่อยู่ปลายสุดของเส้นใยสั้นกว่าหรือยาวเท่ากับเซลที่อยู่ถัดเข้ามาภายในในเส้นใยแบบผสมพบเซลที่อยู่ปลายสุดของเส้นใยยาวกว่าเซลที่อยู่ถัดเข้ามาภายในมีปริมาณน้อย 3. เส้นใยแท้จะไม่พบหรืออาจจะพบรอยคอดเว้าที่ผนังกั้นของเส้นใย ในเส้นใยเทียมพบรอยคอดเว้าที่รอยต่อระหว่างเซล



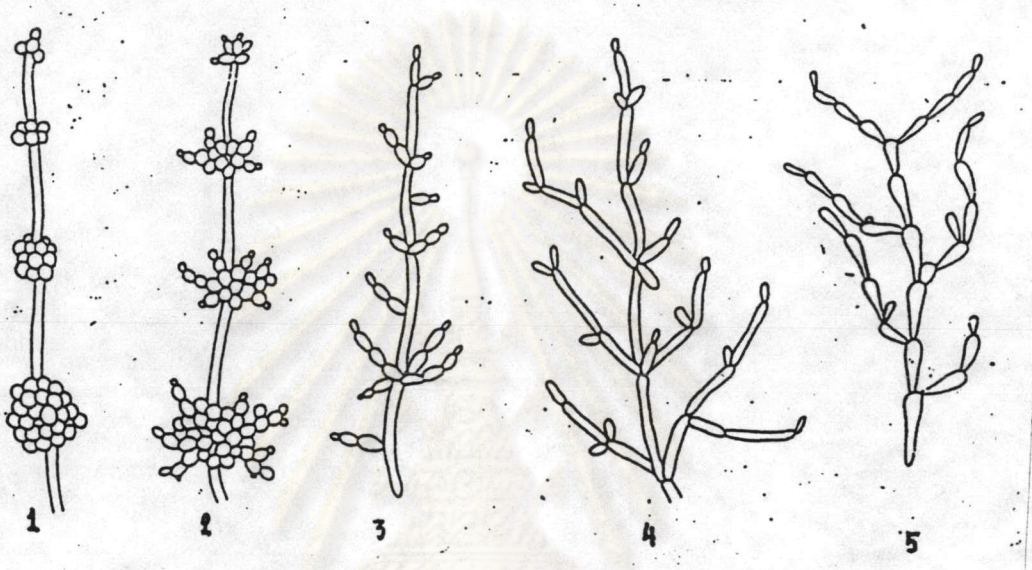
รูปที่ 7 ลักษณะเส้นในแท้ใน *Filobasidiell* sp.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ยีสต์ที่มีการสืบพันธุ์โดยการแบ่งตัวและมีการเจริญเป็นเส้นใย เส้นใยที่เกิดขึ้นเป็นเส้นใยแท้ และเกิดการเจริญอย่างต่อเนื่องของเซลที่อยู่ปลายสุดของเส้นใย โดยที่เซลที่เกิดใหม่มีความยาวกว่าเซลเดิมซึ่งภายหลังจะเกิดผนังกั้นขึ้นระหว่างเซล ถ้าเส้นใยเกิดการแตกหักที่ผนังกั้นของเส้นใย เรียกเซลที่แตกหักออกไปว่าอาร์โทรสปอร์(arthrospores) การแตกหักของเส้นใยเป็นลักษณะซิกแซก(zig zag)



รูปที่ 8 ลักษณะของอาร์โทรสปอร์ใน *Trichosporon* sp.



รูปที่ 9 ลักษณะของเส้นใยเทียมทั้ง 5 แบบ 1.mycotorula 2.mycotoruloides 3.candida 4.mycocandida 5.blastodendrion(Kreger-Van Rij,1984)

2.5.3. <u>การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง</u>

การเจริญของยีสต์บนอาหารแข็ง มีลักษณะแตกต่างกันหลายแบบเช่น เป็นเมือก, ลักษณะเหนียว, ผิวด้าน ยีสต์ที่มีการเจริญเป็นเมือกมักจะเกี่ยวข้องกับการสร้างแคปซูลเนื่องมาจากการสร้างน้ำตาลสายยาวภายนอกเซล การตรวจสอบลักษณะการเจริญของยีสต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ต้องตรวจลักษณะต่างๆดังนี้ เนื้อมีลักษณะต่างๆ เช่น เมือก, เหนียวเป็นยาง, เนื้อร่วน สีของโคโลนีมีสีต่างกันไปเช่น สีเหลือง ส้ม หรือแดง ในบางสายพันธุ์มีการสร้างเม็ดสี (pigment) เช่นยีสต์ในจีนัส *Rhorotorula, Sporobolomyces, Rhodosporidium, Phaffia, Sporidiobolus* มีการสร้างสารคาโรทีนอย์(carotenoid pigment) ในยีสต์ส่วนใหญ่โคโลนีมักมีสีขาวจนถึงสีครีมหรือถึงสีน้ำตาล ขอบโคโลนีมีลักษณะผิวเรียบ ถึงขรุขระ

2.5.4. การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

ยีสต์ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมีลักษณะแตกต่างกันไปเช่น มีการรวมตัวอัดกันแน่น, เกาะเป็นก้อน, ตกตะกอน, เป็นตะกอนเหนียว, เจริญเป็นวงแหวน(พบการเจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อเจริญที่ขอบสัมผัสกับหลอดทดลองเท่านั้น) หรือเจริญเป็นเยื่อบางๆ เป็นผิวย่นหรือเจริญขึ้นไปตามผนังด้านข้าง ซึ่งถ้าเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานจะมีลักษณะเงาและมีหยดน้ำซึ่งเป็นลักษณะของเส้นใยแท้ โดยที่เยื่อที่เจริญบนผิวหน้ามีความหนาและเหนียว เนื่องจากมีการสร้างสารที่มีลักษณะเป็นเมือกออกมาโดยมากมักจะมีกลิ่น

2.5.5. การสร้างบอลลิสโตสปอร์

บอลลิสโตสปอร์เป็นสปอร์สืบพันธุ์ชนิดไม่อาศัยเพศ พบการสร้างสปอร์ชนิดนี้ในยีสต์กลุ่ม Basidiomycetous yeast จีนัส *Sporobolomyces* บอลลิสโตสปอร์ถูกสร้างบนก้านชู ซึ่งยื่นออกมาจากเซลแม่ เมื่อสปอร์แก่จะหลุดออกโดยแรงโน้มถ่วง(drop mechanism) รูปร่างของบอลลิสโตสปอร์มี 2 แบบ แบบแรกคือ rotational มีลักษณะกลมป้าน ทรงไข่ แบบที่สองคือ bilateral มีลักษณะคล้ายไต หรือคล้ายถั่ว การศึกษาลักษณะของบอลลิสโตสปอร์โดยตรวจสอบสปอร์ที่ตกลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ด้านล่างรองรับสปอร์ที่ตกลงมาจากยีสต์ที่เจริญอยู่บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบนที่วางคว่ำลง ในลักษณะของปรากฏการณ์กระจกเงา (mirror image)

2.5.6. การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศพบในยีสต์ส่วนใหญ่ ซึ่งมีลักษณะแตกต่างกันไปในยีสต์แต่ละสายพันธุ์ ยีสต์ในกลุ่ม Ascogenous yeast พบการแบ่งเซลแบบไมโอซิส(meiosis) ภายในถุงหุ้มสปอร์(ascus) ภายในบรรจุแอสโคสปอร์ โดยกระบวนการที่ไซโตพลาสซึม(cytoplasm) ที่อยู่ล้อมรอบนิวเคลียส(nucleus)ที่เกิดจากการแบ่งเซลแบบไมโอซิสเปลี่ยนแปลง เป็นผนังหุ้มสปอร์ และยีสต์ในกลุ่ม Basidiomycetous yeast มีการแบ่งเซลเกิดขึ้นภายในเบสิเดียม (basidium) ภายในบรรจุเบสิดิโอสปอร์

2.5.6.1 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของยีสต์กลุ่ม Ascomycetous yeasts

ในยีสต์กลุ่มโฮโมแทลลิค(homothallic yeasts) ซึ่งเซลปกติอยู่ในสภาวะแฮบพลอยด์(haploid) หลังการมีการแบ่งตัวแบบไมโตซิส(mitosis) และสร้างเซลหน่อขึ้นมาซึ่งยังคงเชื่อมติดอยู่กับเซลแม่ ต่อมามีการรวมนิวเคลียส 2 นิวเคลียส ระหว่างเซลแม่กับเซลลูก โดยที่เซลแม่เปลี่ยนโครงสร้างเป็นถุงหุ้มสปอร์ ภายในบรรจุแอสโคสปอร์ 1-4 สปอร์ เกิดขึ้นในยีสต์จีนัส *Schwanniomyces, Torulaspora, Debaryomyces, Wingea, Pichia* และ *Hansenula* หรืออาจเกิดจากเซลปกติในสภาพแฮบพลอยด์ 2 เซล โดยที่แต่ละเซลเปลี่ยนแปลงสภาพเซลเป็นอมีบอยด์(amoeboid) เกิดขึ้นในยีสต์จีนัส *Schizosaccharomyces* หรือการที่เซลปกติสร้างโครงสร้างที่ยื่นยาวออกมา เข้ามาเชื่อมเข้าด้วยกัน ในกระบวนการนี้จะได้แอสคัสรูปคล้ายดัมเบลล์(dumbbell) เกิดขึ้นในยีสต์จีนัส *Debaryomyces, Wingea* และ *Zygosaccharomyces* ในบางครั้งการเข้าเชื่อมเข้าด้วยกันไม่สามารถเกิดขึ้นได้ เนื่องจากโครงสร้างที่ยื่นยาวออกมา มีความไม่สมบูรณ์ (abortive conjugation tubes) แต่ละเซลล์คงยังแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส ภายในถุงหุ้มสปอร์จะบรรจุแอสโคสปอร์ 1-2 สปอร์ เกิดขึ้นในยีสต์จีนัส *Debaryomyces, Torulaspora* และ *Wingea*

ในยีสต์กลุ่มโฮโมแทลลิคเซลปกติในสภาวะดิบพลอยด์เซลปกติสามารถแบ่งเซลแบบไมโตซิสภายในเซล และเปลี่ยนโครงสร้างเซลเป็นถุงหุ้มสปอร์ โดยไม่ต้องอาศัยการเข้าเชื่อมจากเซลอื่น เกิดขึ้นในยีสต์จีนัส *Saccharomyces*

ในยีสต์กลุ่มเฮทเทอโรแทลลิค(heterothallic yeasts) ในสภาวะdiplophase แต่ละแอสคัสจะไม่เข้ามาเชื่อมติดกัน ทำให้เกิดแอสโคสปอร์แบบ unisexual haploid ของแต่ละ mating type และแอสโคสปอร์ที่มี mating type ตรงกันข้าม สามารถเชื่อมเข้าด้วยกันภายในแอสคัส และเข้าสู่ระยะ diplophase เช่น ในยีสต์จีนัส *Saccharomycodes* หรือ แอสโคสปอร์ที่อยู่ในสภาวะแฮบพลอยด์สามารถงอกออกจากแอสคัส เจริญเป็นเซลปกติที่มี mating type ตรงกันข้าม

ในยีสต์กลุ่ม filamentous yeast ในขณะที่เส้นใยอยู่ในสภาวะแฮพลอยด์ 2 เส้นใย ที่มี mating type ตรงกันข้ามสามารถที่จะเชื่อมเข้าด้วยกันเกิดเป็นถุงหุ้มสปอร์ขึ้นได้ ถ้าเส้นใยอยู่ในสภาวะ diploid แต่ละสปอร์ในเส้นใยนั้นอาจเกิดเป็น ascus ภายในเส้นใยหรือที่บริเวณปลายสุดของเส้นใย

การเกิดแอสโคสปอร์ถูกกระตุ้นโดยปัจจัยที่จำเพาะหลายชนิด เช่น สภาวะสารอาหารภายในเซลแม่ ส่วนประกอบและความเป็นกรด-ด่างของอาหารเพื่อเตรียมการสร้างสปอร์ ซึ่งโดยส่วนมากมักใช้ YM หรือ malt extract agar ส่วนอาหารสำหรับการสร้างสปอร์ประกอบด้วยสูตรอาหารหลายชนิด เช่น Gorodkowa agar, V8 agar, acetate agar, malt extract agar และ YM agar ซึ่งสูตรอาหารเหล่านี้จะจำกัดแหล่งธาตุคาร์บอน เพื่อลดการเจริญเติบโต แต่กระตุ้นให้เซลมีการสืบพันธุ์ อุณหภูมิระหว่างการสร้างสปอร์ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 20-25°ซ

แอสโคสปอร์ที่เกิดขึ้นแตกต่างกันไปตามรูปร่าง สี ขนาด และการเรียงตัว และจำนวนแอสโคสปอร์ที่สร้างขึ้นในยีสต์แต่ละสายพันธุ์ การตรวจสอบลักษณะของแอสโคสปอร์ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดาหรือกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

2.5.6.2 <u>การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของยีสต์กลุ่ม Basidiomycetous yeasts</u>

ยีสต์ในกลุ่ม basidiomycetous yeasts สามารถสืบพันธุ์โดยการแตกหน่อได้ในเซลปกติที่เป็นแฮปพลอยด์หรือเส้นใยที่เป็นดิปพลอยด์ หรือสร้างสืบพันธุ์โดยการสร้างสปอร์ในเส้นใยที่เป็นดิปพลอยด์ ถึงแม้ว่าลักษณะที่เส้นใยเป็นดิปพลอยด์มีการสร้าง clamp connection เป็นลักษณะที่สำคัญของการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของยีสต์ในกลุ่มนี้ แต่มักจะไม่จำเป็นเสมอไป การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของยีสต์ในกลุ่มนี้ เกิดได้ทั้งแบบ heterothallic หรือ homothallic

ในยีสต์กลุ่มเฮทเทอโรแทลลิค หลังจากที่เซล 2 เซลที่มี mating type ตรงกันข้ามเข้ามาผสมเข้าด้วยกัน จะเกิดเป็น dikaryotic mycelium ขึ้นมา เส้นใยที่เกิดขึ้นมา ต่อมาจะมีขนาดใหญ่ขึ้น มีส่วนประกอบของไขมันอยู่จำนวนมาก และนิวเคลียสของทั้ง 2 เซลรวมเข้าด้วยกัน เซลในระยะนี้เรียกว่าโปรเบสิเดีย(probasidia) โปรเบสิเดียจะเกิดที่ภายในของ

เส้นใย หรือที่บริเวณปลายหรือปลายสุดของเส้นใย

ในยีสต์กลุ่มโฮโมแทลลิคเป็นกลุ่มที่สืบพันธุ์ด้วยตัวเอง ในยีสต์กลุ่มนี้มีเส้นใย 2 ชนิดด้วยกันคือ เส้นใยปฐมภูมิ(primary homothallism)เป็นเส้นใยที่มีนิวเคลียสเพียงอันเดียว และไม่มีการสร้าง clamp connection และเส้นใยทุติยภูมิ(secondary homothallism) เป็นเส้นใยที่มีนิวเคลียส 2 อัน และมีการสร้าง clamp connection

อย่างไรก็ตามแม้ว่าต่อมาโครงสร้างที่อุดมไปด้วยไขมันของโปรเบสิเดียจะเปลี่ยนแปลงเป็นเบสิเดีย แต่ก็จะมีชื่อเรียกที่แตกต่างกันออกไปในยีสต์แต่ละจำพวก ขึ้นกับหน้าที่และโครงสร้างของสปอร์ที่เปลี่ยนแปลงไป

2.5.7. <u>การศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยา</u>

ลักษณะทางสรีระวิทยาใช้อธิบายความแตกต่างของยีสต์แต่ละสายพันธุ์ จำเป็นต่อการใช้จำแนกสายพันธุ์ยีสต์โดยวิธีต่างๆเช่น การใช้แหล่งธาตุคาร์บอน หรือธาตุไนโตรเจน การใช้สารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญ ความสามารถเจริญในสภาวะต่างๆเช่น อุณหภูมิที่สูง-ต่ำมาก ความเป็นกรด-ด่างสูง

2.5.7.1 <u>การใช้แหล่งคาร์บอนในกระบวนการหมัก</u>

ยีสต์แต่ละชนิดมีความสามารถใช้แหล่งน้ำตาลชนิดต่างๆในกระบวนการหมักต่างกัน การตรวจสอบกระบวนการหมัก ตรวจสอบจากการเกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากแหล่งคาร์โบไฮเดรตภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน การเกิดกระบวนการหมักต้องใช้เชื้อตั้งต้นปริมาณมากภายใต้ระบบปิดที่จำกัดปริมาณออกซิเจน ทำให้จำกัดการเพิ่มจำนวนเซลซึ่งไปกระตุ้นกระบวนการของเอ็นไซม์ภายในเซล ในการทดลองมักใช้หลอด Durham tube ที่บรรจุสารละลายน้ำตาลความเข้มข้น 2%(w/v) โดยในสารละลายอาหารที่ใช้ตรวจสอบมีแหล่งไนโตรเจนและธาตุอาหารอื่นเช่น วิตะมิน เกลือแร่ ในปริมาณที่จำเป็นต่อการเจริญและจำเป็นต่อสภาวะการทำงานของเอ็นไซม์ โดยปราศจากแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ในการทดลองจะตรวจสอบการใช้น้ำตาล กลูโคส กาแลคโตส ซูโครส มอลโตส แลคโตส และแรฟฟิโนส เป็นต้น ถ้าพบการใช้น้ำตาลกลูโคสในกระบวนการหมักจะสัมพันธ์กับการใช้น้ำตาลฟรุคโตสและแมนโนส โดยอาศัยการทำงานของเอ็นไซม์ hexokinase ความสามารถของยีสต์ในกระบวนการหมักอาจเปลี่ยนแปลงเนื่องจาก

พันธุกรรม เนื่องจากการเก็บรักษาเชื้อเป็นเวลานาน ควรเก็บรักษาเชื้อบน malt agar หรือแหล่งคาร์บอนอื่นที่จำเพาะ

2.5.7.2 การใช้แหล่งคาร์บอนในกระบวนการหายใจ

ความสามารถในการใช้น้ำตาลแต่ละชนิดของยีสต์ ตรวจสอบได้จากการเจริญที่ตอบสนองต่อแหล่งคาร์บอนชนิดนั้นๆ ซึ่งโดยทั่วไปมีวิธีตรวจสอบได้ 3 วิธีได้แก่

1. การตรวจสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนที่ต้องการตรวจสอบละลายอยู่ด้วย การตรวจสอบการเจริญจะใช้เวลานานหลายสัปดาห์ และจะทำควบคู่กับตัวคอนโทรลที่เพาะเชื้อลงไป การเขย่าและการให้อากาศจะสามารถเร่งการเจริญได้ดีขึ้น

2. การตรวจสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีส่วนประกอบของแหล่งคาร์บอนที่ต้องการทดสอบผสมอยู่ เพาะเชื้อโดยการขีดลาก หรือจุดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง โดยวุ้นต้องบริสุทธิ์ปราศจากแหล่งคาร์บอน และทำการทดลองควบคู่กับเชื้อคอนโทรล

3. การตรวจสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีส่วนประกอบของแหล่งคาร์บอนที่ต้องการทดสอบผสมอยู่ เพาะเชื้อโดยเทคนิค pour plate โดยยีสต์เจริญอยู่ภายในอาหารวุ้น วิธีนี้จะให้ผลการทดลองภายใน 2-4 วัน และต้องระวังอาหารวุ้นแห้งเนื่องจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน และวิธีนี้ไม่เหมาะสมกับยีสต์ที่เจริญช้า

2.5.7.3 การใช้แหล่งไนโตรเจน

ยีสต์มีความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนได้หลายชนิด แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการจัดจำแนกชนิดของยีสต์ได้แก่ ไนเตรต ไนไตรต์ เอทิลลามีนไฮโดรคลอไรด์ แอล-ไลซีน เป็นต้น แต่หลักเกณฑ์ที่ใช้ในการจัดจำแนกยีสต์ใช้การศึกษาการใช้ไนเตรต-ไนโตรเจน ยีสต์ที่ไม่สามารถใช้แหล่งไนเตรตได้แก่ *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia* และ *Debaryomyces* และยีสต์ที่สามารถใช้แหล่งไนเตรตได้แก่ *Hansenula*, *Pachysolon*, *Citeromyces* และ *Wickerhamiella* และจีนัสที่สามารถใช้แหล่งไนเตรตและไม่ใช้แหล่งไนเตรตได้แก่ *Candida* และ *Trichosporon* เป็นต้น ซึ่งยีสต์ที่สามารถใช้แหล่งไนเตรตได้ก็สามารถใช้แหล่งไนไตรต์ได้ด้วยเช่นกัน แต่ในทางตรงกันข้ามยีสต์ที่ใช้แหล่งไนไตรต์ได้ไม่จำเป็นต้องใช้ไนเตรตได้เสมอไป ในการทดสอบไนไตรต์ต้องระวังการเกิดกรดไนตรัสใน

สภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 6.0 ในการทดสอบการใช้แหล่งไนเตรต สามารถตรวจสอบได้จากการเจริญของเชื้อทั้งบนอาหารแข็งหรือในอาหารเหลว แต่การตรวจสอบบนอาหารแข็งต้องระวังอาหารเกิดการแห้งแข็ง และเชื้อที่เจริญช้าไม่เหมาะสมที่ใช้การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย