รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์
ทุนอุดหนุนวิจัย มก.ปีงบประมาณ 2554

รหัสโครงการวิจัย ว-ท(ด)166.54

การปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลในสภาวะที่มีแรงดันออสโมซิสและความเข้มข้นของเอทานอลสูง

Strain improvement of ethanol fermenting yeast for high ethanol production in osmotic and ethanol stresses

หัวหน้าโครงการ ผศ.สุทธิชา ณ ระนอง ธรรมสิทธิรงค์
หน่วยงานต้นสังกัด โครงการจัดตั้งสายวิชาจุลชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ กำแพงแสน
หน่วยงานหลัก ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ กำแพงแสน

แหล่งทุน : ทุนอุดหนุนวิจัย มก.
สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยรหัส ว-ท(ด)166.54 “การปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลในสภาวะที่มีแรงดันออสโมซิสและความเข้มข้นของเอทานอลสูง” สำเร็จได้เนื่องจากบุคคลหลายท่าน ผู้วิจัยขอขอบพระคุณนักวิจัยที่ปรึกษาโครงการ รศ.ดร. กล้าณรงค์ ศรีรอต และผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่าน ที่ได้ช่วยตรวจสอบ ให้ข้อคิด ข้อแก้ไข ตลอดจนคำแนะนำต่างๆ ที่เป็นประโยชน์จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย

สุทธิชา ณ ระนอง ธรรมสิทธิรงค์

โครงการวิจัยรหัส ว-ท(ด)166.54

(การปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลในสภาวะที่มีแรงดันออสโมซิสและความเข้มข้นของเอทานอลสูง)

(Strain improvement of ethanol fermenting yeast for high ethanol production in osmotic and ethanol stresses)

(สุทธิชา ณ ระนอง ธรรมสิทธิรงค์[1] มาลี ศรีสดสุข[1])

(Sutticha Na-Ranong Thammasittirong[1] Malee Srisodsuk[1])

บทคัดย่อ

การผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมต้องการผลิตเอทานอลให้ได้ผลผลิตสูงโดยใช้ต้นทุนต่ำ ยีสต์ที่มีคุณสมบัติทนแรงดันออสโมติก ทนเอทานอลและผลิตเอทานอลในสภาวะที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูงนับเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สามารถช่วยเพิ่มผลผลิตเอทานอลได้ ในการศึกษานี้ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ที่แยกและคัดเลือกได้จากธรรมชาติให้มีคุณสมบัติในการทนแรงดันออสโมติกและทนเอทานอลโดยใช้การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยรังสีอุลตราไวโอเลตและสารเคมี ethyl methane sulfonate (EMS) งานวิจัยนี้สามารถแยกยีสต์ทนแรงดันออสโมติกและทนเอทานอลได้ทั้งหมด 114 ไอโซเลท โดยพบว่าในสภาวะที่มีน้ำตาลความเข้มข้น 25% (w/v) และเอทานอลความเข้มข้น 15% (v/v) ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* OA33 สามารถเจริญได้ดีกว่ายีสต์สายพันธุ์อื่นที่แยกได้ และเมื่อทำการหมักเอทานอล ณ สภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 25% (w/v) ที่อุณหภูมิ 37 °C พบว่าสามารถผลิตเอทานอลได้สูง 12.3% (v/v) จึงได้นำ *S. cerevisiae* OA33 มาใช้เป็นสายพันธุ์พ่อแม่ในการทำการกลายพันธุ์โดยรังสีอุลตราไวโอเลตและนำยีสต์สายพันธุ์กลายที่ได้ไปทำการกลายพันธุ์ต่อด้วยสารเคมี EMS พบว่ายีสต์สายพันธุ์กลาย *S. cerevisiae* M43OA33 สามารถทนต่อสภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 25% (w/v) และเอทานอลความเข้มข้น 15% (v/v) ได้สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม และสามารถผลิตเอทานอล ณ สภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 30% (w/v) ที่อุณหภูมิ 37 °C ได้ความเข้มข้นเอทานอลและค่าผลผลิตทางทฤษฎีสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม 8.6% และ 8.4% ตามลำดับ

คำสำคัญ: การทำการกลายพันธุ์โดยรังสีอุลตาไวโอเลต การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยสาร ethyl methane sulfonate ยีสต์ทนแรงดันออสโมติก ยีสต์ทนเอทานอล การผลิตเอทานอล

[1] โครงการจัดตั้งสายวิชาจุลชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ประเทศไทย [1]Department Founding Project of Microbiology, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Kamphaeng Sean Campus, Nakorn Pathom, Thailand

ABSTRACT

The major requirements of industrial fuel ethanol production are high ethanol yield and low-cost production. The ability to tolerate osmotic stress and ethanol stress is considering to be a key factor in achieving high ethanol concentration. In this study, UV-mutagenesis and ethyl methane sulfonate (EMS)-induced mutagenesis were performed to improve osmotolerance, ethanol tolerance and ethanol production from high concentration of sugar. Among 114 osmotolerant and ethanol-tolerant yeasts, *Saccharomyces cerevisiae* OA33 showed the best ability to grow in the presence of 25% (w/v) glucose and 15% (v/v) ethanol and produced high concentration of ethanol (12.3% v/v) at 37 °C from 25% (w/v) glucose. This osmotolerant and ethanol-tolerant yeast was subjected to UV-mutagenesis and the selected mutants were then treated with EMS. One mutant, M43OA33, displayed a significantly improved growth tolerance in the presence of 25% (w/v) glucose and 15% (v/v) ethanol comparing to the wild-type. The maximum ethanol concentration and theoretical yield by *S. cerevisiae* M43OA33 mutant from 30% (w/v) glucose at 37 °C was 8.6% and 8.4% higher than the wild-type, respectively.

Key words: UV-mutagenesis, ethyl methane sulfonate-induced mutagenesis, osmotolerant yeast, ethanol-tolerant yeast, ethanol production

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	I
บทคัดย่อ	II
Abstract	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	V
สารบัญภาพ	VI
ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
ขอบเขตของโครงการวิจัย	3
การตรวจเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
วิธีวิจัย	8
ผลและวิจารณ์	12
สรุปและข้อเสนอแนะ	29
เอกสารอ้างอิง	30

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงความสามารถในการหมักเอทานอลของยีสต์ 79 ไอโซเลท ในอาหารเหลว YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 22% (w/v) และเอทานอลความเข้มข้น 12% (v/v) และมีหลอดดักแก๊ส ที่อุณหภูมิ 30°C เมื่อบ่มนาน 24 ชั่วโมง 48 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง	13
2	ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ D1/D2 domain ของหน่วยย่อยขนาดใหญ่ของ ribosomal DNA ของยีสต์ OA10, OA33, OA52, OA89 และ OA106 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ D1/D2 domain จากฐานข้อมูล GenBank	19
3	แสดงความสามารถในการหมักเอทานอลจากน้ำตาลชนิดต่างๆ ของยีสต์ทนแรงดันออสโมติกและทนเอทานอลสูง	20
4	ผลการหมักเอทานอลโดยยีสต์ทนแรงดันออสโมติกสูงและทนเอทานอลสูงจำนวน 5 สายพันธุ์ ณ สภาวะการหมักที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 25% (w/v) ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 48 ชั่วโมง	21
5	แสดงความสามารถในการหมักเอทานอลของยีสต์สายพันธุ์กลาย 70 ไอโซเลท ในอาหารเหลว YPD ที่มีหลอดดักแก๊ส โดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 25% (w/v) และเอทานอลความเข้มข้น 15% (v/v) ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	23
6	จำนวนยีสต์ที่มีชีวิตจากการเลี้ยงในสภาวะที่มีน้ำตาลความเข้มข้น 25% (w/v) และเอทานอลความเข้มข้น 15% (v/v) ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 30 ชั่วโมง	27
7	ผลการหมักเอทานอลโดยยีสต์สายพันธุ์กลาย M43OA33 และยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม OA33 ณ สภาวะการหมักที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 30% (w/v) ที่อุณหภูมิ 37°C	28

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	จำนวนยีสต์ที่มีชีวิต (CFU/ml) ของยีสต์ 5 ไอโซเลท คือ OA10, OA33, OA52, OA89 และ OA106 เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีน้ำตาลความเข้มข้น 25% (w/v) และ เอทานอลความเข้มข้น 15% (v/v) ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 30 ชั่วโมง	17
2	PCR product ของบริเวณ D1/D2 domain ของหน่วยย่อยขนาดใหญ่ของไรโบโซมดีเอ็นเอของยีสต์ 5 ไอโซเลท คือ OA10, OA33, OA52, OA89 และ OA106 เลนส์ M: M11 DNA ladder marker, เลนส์ 1-5: PCR product ของยีสต์สายพันธุ์ OA10, OA33, OA52, OA89 และ OA106 ตามลำดับ	18
3	แสดงลักษณะโคโลนีของยีสต์ที่เจริญบนอาหารแข็ง YPD gradient plate ที่มีความเข้มข้น ของเอทานอล 15% (v/v)	22

ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศที่มีแหล่งทรัพยากรธรรมชาติด้านพลังงานอยู่น้อย อีกทั้งการขยายตัวภาคอุตสาหกรรมและคมนาคมของประเทศที่สูงขึ้นมากส่งผลให้ประเทศไทยต้องเพิ่มการนำเข้าน้ำมันเชื้อเพลิงและพลังงานจากต่างประเทศ ในปัจจุบันกำลังเกิดวิกฤตการณ์ทางด้านราคาน้ำมันที่สูงขึ้นทั่วโลก เนื่องจากความต้องการใช้พลังงานมีสูงขึ้นแต่อัตราการผลิตไม่เพิ่มขึ้นมากนักทำให้ราคาน้ำมันสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องจึงส่งผลกระทบต่อระบบเศรษฐกิจทั่วโลกรวมถึงประเทศไทยด้วย เพื่อบรรเทาปัญหาดังกล่าวจึงจำเป็นต้องหาพลังงานทดแทนจากแหล่งอื่นๆ มาทดแทนน้ำมันปิโตรเลียมซึ่งเป็นแหล่งเชื้อเพลิงและพลังงานหลักที่ใช้ในปัจจุบัน แหล่งพลังงานจากเชื้อเพลิงชีวภาพ เช่น การผลิตเอทานอลจากผลิตผลทางการเกษตร เช่น อ้อย มันสำปะหลัง กากน้ำตาล ข้าวฟ่างหวาน รวมถึงวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรนับเป็นพลังงานทดแทนอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจที่จะช่วยลดภาระการสั่งซื้อพลังงานจากต่างชาติได้

การปรับปรุงการผลิตเอทานอลจากผลิตผลทางการเกษตรเพื่อให้ได้เอทานอลในปริมาณมากขึ้นและมีต้นทุนการผลิตถูกลง นอกจากจะต้องคำนึงถึงวัตถุดิบ ปัจจัยแวดล้อมในถังหมักแล้ว การใช้ยีสต์สายพันธุ์ที่ผลิตเอทานอลได้สูงและทนต่อสภาวะความเครียดต่าง ๆ ในการหมักนับเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งเสริมให้การผลิตเอทานอลมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น [1] การใช้ยีสต์ที่สามารถเจริญและมีอัตราการหมักเอทานอลจากวัตถุดิบที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงนั้นมีประโยชน์ในอุตสาหกรรมเอทานอลมาก เนื่องจากทำให้เอทานอลที่ผลิตได้มีความเข้มข้นสูงจึงช่วยลดเวลาในการผลิตเอทานอล ลดค่าใช้ในการกลั่นเอทานอล และยังช่วยลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นได้อีกด้วย แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าแรงดันออสโมติกและความเข้มข้นของเอทานอลเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดในการยับยั้งการเจริญ การมีชีวิตรอด และการผลิตเอทานอลของยีสต์ [2] เนื่องจากแรงดันออสโมติกจากการใช้วัตถุดิบที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูงจะเหนี่ยวนำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของยีสต์มีลักษณะแข็ง (rigid) ทำให้การนำสารอาหารผ่านเข้าออกจากเซลล์ผิดปกติ ยีสต์จึงขาดสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญและเอทานอลที่เซลล์ผลิตได้ไม่สามารถแพร่ออกจากเซลล์ได้จึงเกิดการสะสมเอทานอลภายในเซลล์และส่งผลกระทบต่อเซลล์ยีสต์ [3] นอกจากนี้เซลล์ยีสต์ยังสูญเสียความสามารถในการขนส่งน้ำตาลถ้าถูกเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นสูง [4] สำหรับผลของเอทานอลต่อเซลล์ยีสต์มีรายงานว่าเอทานอลความเข้มข้น 1-2% โดยน้ำหนัก ทำให้การเจริญของยีสต์ลดลงและเอทานอลที่ความเข้มข้น 4.7-7.8% โดยน้ำหนักจะทำให้การเจริญของยีสต์หยุดลง [3] มีการตั้งสมมุติฐานว่าเอทานอลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียหายหรือมีสมบัติเปลี่ยนแปลงไป และเอทานอลส่งผลต่อ proton motive force จึงทำให้มีการยับยั้งการขนส่งกลูโคส มอลโทส แอมโมเนีย กรดอะมิโน และสารละลายต่าง ๆ ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ [5] อีกทั้งเอทานอลยังส่งผลยับยั้งกระบวนการ endocytosis และลดกิจกรรมของเอนไซม์ที่สำคัญหลายชนิด เช่น protein kinase A และ alcohol dehydrogenase (ADH) [6]

เนื่องจากผลของแรงดันออสโมติกและความเข้มข้นเอทานอลในถังหมักมีความสัมพันธ์กันในการยับยั้งการเจริญ การมีชีวิตรอดของยีสต์ และการผลิตเอทานอลของยีสต์ ดังนั้นการใช้ยีสต์สายพันธุ์ที่ทนต่อสภาวะความเครียดดังกล่าวได้จะช่วยเพิ่มผลผลิตการหมัก (fermentation yield) เพิ่มความสามารถในการหมัก (productivity) และช่วยลดต้นทุนการผลิตเอทานอลได้ มีรายงานว่าความสามารถในการทนต่อสภาวะความเครียดของยีสต์ถูกแสดงออกภายใต้การทำงานของยีนหลายยีนร่วมกันในหลายตำแหน่งบนโครโมโซมของจีโนม (genome) ของยีสต์ เนื่องจากความรู้ความเข้าใจในการทำงานร่วมกันของยีนเหล่านี้ในเซลล์ยีสต์ต่อการทนสภาวะความเครียดยังมีอยู่อย่างจำกัด [7, 8] จึงทำให้การปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ให้ผลิตเอทานอลได้สูงพร้อมทั้งทนต่อสภาวะความเครียดต่างๆ โดยใช้เทคนิควิศวกรรมกระบวนการสร้างและการสลาย (metabolic engineering) ร่วมกับเทคนิคพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) ทำได้ค่อนข้างยาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งแยกและคัดเลือกยีสต์ผลิตเอทานอลที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลและทนต่อแรงดันออสโมติกและเอทานอลความเข้มข้นสูง และนำมาปรับปรุงสายพันธุ์โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (induce mutation) โดยรังสีอุลตราไวโอเลตและสิ่งก่อการกลายเคมี (chemical mutagen) เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ให้สามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้สูงขึ้นในสภาวะการเลี้ยงที่มีแรงดันออสโมติกสูงและสามารถทนต่อความเข้มข้นเอทานอลได้สูงเพื่อป้องกันการยับยั้งการเจริญและเพิ่มการรอดชีวิตของยีสต์จากเอทานอลที่ยีสต์ผลิตสะสมในถังหมัก โดยคาดว่ายีสต์สายพันธุ์กลายที่ได้จากงานวิจัยนี้จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมผลิตเอทานอลได้ นอกจากนี้ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมที่คัดเลือกได้และสายพันธุ์กลายที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ยังสามารถใช้เป็นเครื่องมือชีวภาพในการศึกษาคุณลักษณะทางอณูชีววิทยาและชีวเคมีของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการผลิตเอทานอล รวมถึงยีนที่เกี่ยวข้องกับการทนต่อสภาวะกดดัน (stress tolerance) ของยีสต์ ซึ่งความรู้ที่ได้นี้สามารถนำไปใช้ร่วมกับเทคนิคพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) และวิศวกรรมกระบวนการสร้างและการสลาย (metabolic engineering) เพื่อพัฒนาและปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ให้มีศักยภาพสูงในการผลิตเอทานอลต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อแยกและคัดเลือกยีสต์ผลิตเอทานอลที่สามารถทนต่อแรงดันออสโมติกสูงและเอทานอลความเข้มข้นสูง
2. เพื่อปรับปรุงความสามารถของยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ให้ทนต่อแรงดันออสโมติกและเอทานอลความเข้มข้นสูงและมีความสามารถในการผลิตเอทานอลสูงในสภาวะการเลี้ยงที่มีแรงดันออสโมติกสูง

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. แยกและคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตเอทานอลจากแหล่งธรรมชาติที่สามารถทนต่อแรงดันออสโมติกสูงและเอทานอลความเข้มข้นสูง
2. จัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์ที่คัดเลือกได้
3. ปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (induce mutation) โดยรังสีอุลตราไวโอเลตและสิ่งก่อการกลายเคมี (chemical mutagen)

การตรวจเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอทานอลเป็นเชื้อเพลิงที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีและการหมักวัตถุดิบที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบโดยจุลินทรีย์ สำหรับการผลิตเอทานอลโดยวิธีการหมักนั้นอาศัยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ในการเปลี่ยนวัตถุดิบที่มีน้ำตาลให้เป็นเอทานอลและแก๊ส CO_2 โดยค่าผลผลิตทางทฤษฎี (theoretical yield หรือ Gay-Lussac yield) ของเอทานอลจากกลูโคส 1 กรัม คือให้เอทานอล 0.511 กรัม และแก๊ส CO_2 0.489 กรัม คิดเป็นการผลิตเอทานอลเท่ากับ 51.1% แต่ในทางปฏิบัติจริงในระดับอุตสาหกรรมเอทานอลที่ได้จะมีค่าเพียง 80-90% ของค่าผลผลิตทางทฤษฎี [3]

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญในกระบวนการหมักเอทานอล มียีสต์หลายสายพันธุ์ที่สามารถหมักเอทานอลได้ เช่น *Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces uvarum, Kluyverromyces fragilis, Kluyverromyces marxianas* เป็นต้น [3, 9] โดยเฉพาะ *S. cerevisiae* ที่มีการนำไปใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมผลิตเอทานอล อย่างไรก็ตาม *S. cerevisiae* มีข้อจำกัดในการหมักเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสซึ่งมีน้ำตาลไซโลสเป็นองค์ประกอบและการทนสภาวะกดดันในถังหมักเอทานอล

คุณสมบัติของยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล

สายพันธุ์ของยีสต์ที่ใช้ในการหมักเอทานอลนับว่ามีความสำคัญต่อผลผลิตเอทานอลและต้นทุนในการผลิต โดยยีสต์ที่ดีและมีความเหมาะสมในการผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงควรมีลักษณะดังนี้ [3, 10]

1. ให้ผลผลิตเอทานอลสูงและมีอัตราการหมักเอทานอลเร็ว
2. ทนต่อเอทานอล (etanol tolerance)
3. ทนต่อแรงดันออสโมติก (osmotolerance) เช่น ความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูง
4. ทนต่อพีเอชต่ำ (acid tolerance) ในระหว่างกระบวนการหมักยีสต์จะมีการผลิตผลผลิตพลอยได้ประเภทกรดออกมา เช่น acetic acid, lactic acid และ succinic acid นอกจากอาจมีการตกค้างของกรดที่ใช้ล้างทำความสะอาดถังหมัก ส่งผลให้มีการยับยั้งการเจริญของยีสต์
5. ทนอุณหภูมิสูง (thermotolerance)
6. เพิ่มจำนวน (propagation) ได้ง่าย
7. สามารถตกตะกอนได้ ยีสต์ที่ตกตะกอนได้ดีจะทำให้ง่ายในการเก็บเกี่ยวและการหมุนเวียนเซลล์ยีสต์กลับไปใช้อีก
8. มีพันธุกรรมที่ไม่เปลี่ยนแปลงได้ง่าย
9. สามารถใช้ substrate ได้หลากหลาย
10. มีความทนต่อสารพิษต่างๆ

ยีสต์ทนเอทานอล

เอทานอลเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ [11, 12] ทั้งนี้สามารถจัดกลุ่มผลกระทบของเอทานอลต่อยีสต์ได้ 3 กลุ่ม คือ 1). เอทานอลส่งผลต่อการเจริญและการมีชีวิตรอดของยีสต์ โดยเอทานอลจะส่งผลยับยั้งการแบ่งเซลล์ ยับยั้งการเจริญ และเอทานอลยังทำให้ความสามารถในการทนความร้อนของยีสต์ลดลง [10, 13, 14] 2). เอทานอลส่งผลต่อ intermediate metabolism และการสังเคราะห์สารชีวโมเลกุลของยีสต์ เช่น เอทานอลทำให้ยีสต์มีอัตราการสังเคราะห์โปรตีนและอาร์เอ็นเอลดลง [15] ลดกิจกรรมของ glycolytic enzymes เพิ่ม oxygen free radicals [10, 16] 3). เอทานอลส่งผลต่อโครงสร้างและหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยโครงสร้างเซลล์ที่เป็นเป้าหมายหลักต่อการส่งผลของเอทานอล คือ plasma membrane เอทานอลจะละลาย phospholipid ที่เยื่อหุ้มเซลล์จึงทำให้การไหลของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane fluidity) เพิ่มขึ้น และ membrane integrity ลดลง ส่งผลให้การคัดเลือกสารผ่านเข้าออกของเยื่อหุ้มเซลล์ผิดปกติทำให้สารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กและอิออนต่างๆ ผ่านเข้าเซลล์ได้มากขึ้นก่อให้เกิดความต่างของระดับโปรตอน (proton gradient) จึงส่งผลยับยั้งการขนส่งสารต่าง ๆ ภายในเซลล์ยีสต์ [17, 18] นอกจากนี้ยังมีส่วนประกอบอื่น ๆ ในเซลล์ที่ได้รับผลกระทบจากเอทานอล เช่น hydrophobic proteins, mitochondrial membranes, nuclear membrane, vascular membrane, endoplasmic reticulum และ hydrophilic proteins ของ cytoplasm [10]

โดยทั่วไปความเข้มข้นเอทานอล 1-2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ทำให้การเจริญของยีสต์ลดลงและการเจริญของยีสต์โดยทั่วไปจะหยุดเมื่อมีเอทานอล 4.7-7.8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก [3] แต่อย่างไรก็ตามมียีสต์บางสายพันธุ์ที่สามารถทนและเจริญในสภาวะเอทานอลความเข้มข้นสูงได้ เช่น ยีสต์ *S. cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ที่ทนเอทานอลได้สูงกว่าแบคทีเรียที่ผลิตเอทานอลและยีสต์กลุ่ม non-*Saccharomyces* [19] ได้มีการศึกษาถึงสรีระวิทยาของยีสต์ทนเอทานอลพบว่ายีสต์สายพันธุ์ที่ทนเอทานอลจะมีปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในเยื่อหุ้มเซลล์สูงจึงทำให้เยื่อหุ้มเซลล์อยู่ในสภาพของไหล (fluidity) จึงสามารถขับเอทานอลจากเซลล์ได้ดีทำให้ปริมาณเอทานอลที่จะเป็นพิษภายในเซลล์ลดลง ในขณะที่ถ้ากรดไขมันไม่อิ่มตัวลดลงจะทำให้ความทนต่อเอทานอลลดลงด้วยและทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความแข็งแกร่ง (rigid) ความสามารถในการขับเอทานอลออกจากเซลล์ก็ลดลงทำให้มีปริมาณเอทานอลที่จะเป็นพิษภายในเซลล์เพิ่มขึ้น [3] นอกจากนี้ปริมาณของน้ำตาล trehalose ในเซลล์ของยีสต์ทนเอทานอลจะสูงกว่าสายพันธุ์ที่ไม่ทนเอทานอล และยีสต์จะมีการเพิ่มกิจกรรมของ superoxide dismutase ในไมโตรคอนเดรีย และเพิ่มการสังเคราะห์ cytochrome P450 [3]

ยีสต์ทนแรงดันออสโมติก

สภาวะกดดันจากแรงดันออสโมติก (osmotic stress) มีความสัมพันธ์กับสภาวะกดดันจากน้ำ (water stress) โดยความเข้มข้นของน้ำตาลหรือเกลือที่สูงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้ค่า water potential ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำส่งผลให้น้ำในเซลล์ยีสต์แพร่ออกมาสู่สิ่งแวดล้อม เซลล์จึงเหี่ยว เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า hyperosmotic shock จะเห็นว่าความเข้มข้นน้ำตาลมีผลต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ นอกจากนี้ความเข้มข้นน้ำตาลที่สูงแต่ยังไม่สูงพอที่จะทำให้เกิด hyperosmotic shock จะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีสภาพแข็งแกร่งมากขึ้นทำให้การผ่านเข้าออกของสารเข้าเซลล์ผิดปกติไปยีสต์จึงขาดสารอาหารในการเจริญและการรักษาเซลล์ และความเข้มข้นของน้ำตาลสูงยังทำให้มีการเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลภายในเซลล์ซึ่งส่งผลต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลดังได้กล่าวแล้วข้างต้นในหัวข้อยีสต์ทนเอทานอล นอกจากนี้ผลการยับยั้งของน้ำตาลและเอทานอลต่อเซลล์ยีสต์นั้นส่งเสริมกัน Panchal และคณะ (1990) [3] ได้ศึกษาผลของแรงดันออสโมติกต่อการเจริญและการหมักเอทานอลของยีสต์โดยพบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลตั้งแต่ 20% (w/v) จะทำให้อัตราการเจริญและผลผลิตเอทานอลทางทฤษฎีลดลง ดังนั้นการผลิตเอทานอลจึงใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นต่ำกว่า 20% (w/v) ในการหมักเพื่อลดผลกระทบของสภาวะกดดันดังกล่าว [20]

ยีสต์ทนแรงดันออสโมติกและทนเอทานอลมีประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล เพราะสามารถเจริญและหมักเอทานอลในสภาวะที่มีน้ำตาลสูง ทำให้ได้ผลผลิตเอทานอลสูงในเวลาสั้นกว่า จึงช่วยลดค่าใช้จ่ายในการกลั่น นอกจากนี้ยังช่วยลดการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นระหว่างการหมักได้อีกด้วย โดยยีสต์ทนแรงดันออสโมติกจะสามารถเจริญและมีชีวิตรอด ณ ความเข้มข้นของน้ำตาลเท่าใดนั้นขึ้นกับสายพันธุ์ของยีสต์

การปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย รังสีอุลตราไวโอเลตและสารเคมี ethyl methane sulfonate (EMS)

รังสี UV เป็นรังสีประเภทไม่แตกตัวเป็นอิออน (non-ionizing radiation) สามารถใช้เป็นสิ่งก่อการกลายกายภาพ (physical mutagen) ในการเหนี่ยวนำให้จุลินทรีย์เกิดการกลายพันธุ์ได้ รังสี UV สามารถแบ่งได้ 3 ชนิด ตามความยาวคลื่น คือ รังสี UV A (320-400 nm) รังสี UV B (290-320 nm) และรังสี UV C (180-290 nm) โดยความยาวคลื่นของรังสี UV ที่ DNA สามารถดูดซับได้ดีที่สุดคือ 254 nm จึงทำให้ที่ความยาวคลื่น 254 nm เป็นความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยรังสี UV จะทำให้เกิด pyrimidine dimer ซึ่ง pyrimidine dimer จะไปรบกวนโครงสร้างของ DNA และรบกวนการจำลองตัวเองของ DNA ส่งผลให้ DNA มีการจำลองตัวเองผิดไปจากเดิม นอกจากนี้ pyrimidine dimer ยังมีผลให้เกิดความผิดพลาดของ DNA ขณะที่เซลล์มีการซ่อมแซม DNA ได้อีกด้วย รังสี UV สามารถเหนี่ยวนำการกลายพันธุ์ได้เกือบทุกชนิด เช่น frameshift mutation, substitution และ deletion นอกจากนี้รังสี UV

สามารถนำไปใช้ได้ง่าย ไม่อันตรายต่อผู้ปฏิบัติมากนัก ดังนั้นรังสี UV จึงได้รับความนิยมในการนำไปเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในจุลินทรีย์

มีการศึกษาจำนวนมากที่รายงานถึงประสิทธิภาพของรังสี UV ในการปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ให้มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล เช่น Sridhar และคณะ (2002) [21] ได้นำยีสต์ทนอุณหภูมิสูง S. *cerevisiae* VS1 และ *S. cerevisiae* VS3 มาปรับปรุงสายพันธุ์โดยการฉายรังสี UV พบว่าได้ยีสต์สายพันธุ์กลายที่สามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมในสภาวะการหมักที่อุณหภูมิสูง 42°C และแรงดันออสโมซิสสูง มีรายงานว่ามีการใช้แสง UV ทำให้สายพันธุ์ยีสต์ที่แยกได้จากองุ่นสามารถทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลได้สูงถึง 12% (v/v) [22] Uma และคณะ (1990) [23] ได้ใช้แสงUV ในการปรับปรุงให้ *S. cerevisiae* มีชีวมวลและผลผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น Watanabe และคณะ (2011) [24] รายงานว่า สามารถสร้างยีสต์สายพันธุ์กลาย *P. stipitis* PXF58 จากการฉายรังสี UV โดยยีสต์ดังกล่าวสามารถหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสได้มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม 1.4 เท่า และยีสต์สายพันธุ์กลาย PET41 ที่สามารถทนเอทานอลและหมักเอทานอลจากน้ำตาลไซโลสได้สูง นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงการปรับปรุงพันธุ์โดยรังสี UV ของ *C. tropicalis* พบว่ายีสต์สายพันธุ์กลาย *C. tropicalis* ผลิต xylitol ได้มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม 5% [25]

สารเคมี Ethyl Methane Sulfonate (EMS) เป็นสารก่อการกลายเคมี (chemical mutagen) ที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่ม สารเคมี EMS เป็นสารก่อการกลายเคมีประเภทสารอัลคิเลติง (alkylating agent) ทำหน้าที่เติมหมู่ ethyl ที่เบส guanine ที่ตำแหน่ง O^6 ของเบส guanine ทำให้เกิดการทรานซิชันของ G:C ไปเป็น A:T สารเคมี EMS สามารถเหนี่ยวนำให้เกิด point mutation ในอัตราส่วน 5×10^{-4}- 5×10^{-2} ต่อยีน สารเคมี EMS นิยมใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของจุลินทรีย์ พืชและสัตว์เ ประสิทธิภาพในการก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ แต่การใช้ต้องมีความระมัดระวังเพราะเป็นสารก่อมะเร็ง มีรายงานถึงประสิทธิภาพของสารเคมี EMS ในการปรับปรุงพันธุ์ยีสต์ เช่น Dehkodi และคณะ (2008) [26] ได้เหนี่ยวนำให้ *S. cerevisiae* เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี EMS พบว่ายีสต์สายพันธุ์กลายสามารถผลิตเอทานอลได้สูงขึ้น 17.3% เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม นอกจากนี้ได้มีการใช้สารเคมี EMS สร้างยีสต์สายพันธุ์กลายและนำยีสต์สายพันธุ์กลายที่ได้ไปทำการกลายพันธุ์ด้วยวิธีอื่น เช่น การใช้เทคนิค genome shuffling เทคนิค recombinant DNA หรือมีการใช้สารเคมี EMS ร่วมกับการใช้รังสี UV ในการปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ [27-30]

วิธีวิจัย

1. การแยกยีสต์สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการทนแรงดันออสโมติกและทนเอทานอล

ทำการเก็บตัวอย่างจากแหล่งธรรมชาติเพื่อแยกยีสต์ที่สามารถเจริญในอาหารเหลวและอาหารแข็ง YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 20% (w/v) (1% yeast extract, 2% peptone, 20% D-glucose) และมีเอทานอลความเข้มข้น 10% (v/v) โดยบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง ทำการเจือจางตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} ปิเปตมา 1 ml และนำมาเพาะเชื้อบนอาหารแข็ง YPD มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 20% (w/v) และมีเอทานอลความเข้มข้น 10% (v/v) โดยเทคนิค spread plate ทำเช่นนี้ทุกระดับความเจือจาง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง

นำเชื้อที่เจริญมา streak บนอาหารแข็ง YPD เพื่อแยกเชื้อยีสต์บริสุทธิ์ โดยทำซ้ำ 3-5 ครั้ง หรือจนกว่าจะได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ในอาหารแข็ง YPD วุ้นเอียง

2. การคัดเลือกยีสต์ที่ทนแรงดันออสโมติกและทนเอทานอลที่สามารถหมักเอทานอลได้

นำยีสต์บริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหารแข็ง YPD อายุ 12-16 ชั่วโมง มา 1 loop และเพาะในอาหารเหลว YPD มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 20% (w/v) และมีเอทานอลความเข้มข้น 10% (v/v) และมีหลอดดักแก๊ส บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตรวจความสามารถในการสร้างแก๊สทุก 24 ชั่วโมง นำยีสต์ที่สร้างแก๊ส ณ สภาวะดังกล่าวไปคัดเลือกหายีสต์ที่มีความสามารถในการหมักเอทานอลในอาหารเหลว YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 12% (w/v) และมีเอทานอลความเข้มข้น 20% (v/v) และมีหลอดดักแก๊ส โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตรวจความสามารถในการสร้างแก๊สทุก 24 ชั่วโมง

3. การศึกษาการเจริญของยีสต์ที่คัดเลือกได้ในสภาวะที่มีแรงดันออสโมติกและความเข้มข้นเอทานอลสูง

เพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ในอาหารเหลว YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 25% (w/v) และเอทานอลความเข้มข้น 15% (v/v) โดยใช้ความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เริ่มต้น 1×10^{7} cells/ml บ่มที่อุณหภูมิ 30°C แบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 rpm เป็นเวลา 30 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างมาทำการเจือจางที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} และไม่ทำการเจือจาง ปิเปตมา 1 ml และนำมาการเพาะเชื้อบนอาหารแข็ง YPD โดยเทคนิค spread plate ทำเช่นนี้ทุกระดับความเจือจาง บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 36-72 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง (CFU/ml)

4. การศึกษาความสามารถในการหมักเอทานอลในสภาวะที่มีแรงดันออสโมติกสูง

นำยีสต์ที่คัดเลือกได้มาทดสอบความสามารถในการหมักเอทานอลในอาหารเหลว Fermentative (FM) medium ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 25% (w/v) และ 30% (w/v) (1% yeast extract, 2% peptone, 25-30% D-glucose, 0.6% $(NH_4)_2SO_4$, 0.15% KH_2PO_4, pH 5.5) (Shi, 2009 #105) โดยเพาะเชื้อที่มีความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น 1×10^5 cells/ml นำมาเลี้ยงแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 rpm ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างและนำมาวิเคราะห์ความเข้มข้นของเอทานอลด้วยเครื่อง Gas Chromatography

5. การจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์

นำยีสต์ทนแรงดันออสโมติกและทนเอทานอลที่คัดเลือกได้มาทำการจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธีการระดับโมเลกุลโดยวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 domain ของหน่วยย่อยขนาดใหญ่ของ ribosomal DNA

5.1 การสกัด genomic DNA (ดัดแปลงจากวิธีของ Suh) [31]

นำยีสต์ที่เจริญบนอาหารแข็ง YPD อายุ 12-24 ชั่วโมง มาเตรียมซัสเพนชันในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 50 µl นำไปแช่น้ำแข็งนาน 5 นาที และนำไปใส่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 100°C นาน 5-10 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm นาน 1-2 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปใช้เป็น DNA template สำหรับการเพิ่มจำนวนนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 domain

5.2 การเพิ่มจำนวนนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 domain ของหน่วยย่อยขนาดใหญ่ของ ribosomal DNA ของยีสต์ที่คัดเลือกได้

การเพิ่มจำนวนนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 domain ของหน่วยย่อยขนาดใหญ่ของ ribosomal DNA ของยีสต์ที่คัดเลือกได้ใช้เทคนิค Polymerase chain reaction [32] โดยใช้ primer NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') เป็น forward primer และ NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') เป็น reverse primer สภาวะในการทำ PCR ปริมาตร 50 µl ประกอบด้วย 2.5 mM dNTPs, 1× PCR buffer, 20 pmol ของ forward primer, 20 pmol ของ reverse primer, 2 mM $MgCl_2$, 1 Units ของ *Taq* DNA polymerase และ 5-10 µl ของ DNA template ที่ได้จากข้อ 4.1 สำหรับอุณหภูมิที่ใช้ในการทำ PCR คือ 94°C นาน 3 นาที (1 cycle) และ 94°C นาน 40 วินาที, 55°C นาน 40 วินาที, 72°C นาน 2 นาที (30 cycles) โดย PCR product ที่ได้จะนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย Nucleospin® ExtractII kit (Macherey-Nagel, Germany) จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 domain ของหน่วยย่อยขนาดใหญ่ของ ribosomal DNA ของยีสต์ที่อยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn (NCBI, USA) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

6. การศึกษาความสามารถในการหมักเอทานอลจากน้ำตาลชนิดต่าง ๆ

การทดสอบความสามารถในการหมักเอทานอลจากน้ำตาลชนิดต่างๆ และแป้งที่ละลายน้ำได้ ทำโดยเพาะยีสต์ที่เจริญบนอาหารแข็ง YPD อายุ 12-24 ชั่วโมง 1 loop ลงในหลอดทดสอบที่บรรจุอาหารเหลวที่มีน้ำตาลที่ต้องการทดสอบ คือ glucose, lactose, maltose, xylose, mannose, sucrose, fructose และ galactose และ soluble strach และมีหลอดดักแก๊ส นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 15 วัน ตรวจสอบความสามารถในการหมักเอทานอลโดยบันทึกปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นในหลอดดักแก๊ส

7. การปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์

7.1 การปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ด้วยรังสีอุลตราไวโอเลต

เพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ที่ต้องการปรับปรุงสายพันธุ์ในอาหารเหลว YPD บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง และทำการเพาะเชื้อยีสต์ด้วยเทคนิค spread plate บนจานอาหารแข็ง YPD gradient plate ที่มีความเข้มข้นของเอทานอล 15% (v/v) โดยใช้ความเข้มข้นเซลล์ 1×10^{7} cells/ml และนำไปฉายรังสีอุลตราไวโอเลตชนิด C เป็นเวลา 0 และ 15 วินาที จากนั้นบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง บันทึกลักษณะโคโลนีที่เจริญ และคัดเลือกยีสต์ที่เจริญบนอาหารบริเวณที่มีเอทานอลความเข้มข้นสูงไปทำการศึกษาต่อไป

7.2 การปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ด้วย Ethyl Methane Sulfonate (EMS)

นำยีสต์ที่เจริญบนอาหาร gradient plate บริเวณที่มีเอทานอลสูงที่ได้จากข้อ 7.1 มาทำการปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้สารเคมี EMS โดยเลี้ยงเซลล์ยีสต์ในอาหารเหลว YPD 12-24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยง เทส่วนใสทิ้งเติม 0.1 M potassium phosphate buffer ผสมให้เข้ากันด้วย votex และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วย microcentrifuge เทส่วนใสทิ้ง ทำการล้างเซลล์เช่นนี้สองครั้ง จากนั้นเติม 0.1 M potassium phosphate buffer ผสมให้เข้ากันแล้วเติม EMS (3% v/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 15, 30, 45 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดแล้วเติม 5% sodiumthiosulphate จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm นาน 3 นาที และเทส่วนใสทิ้ง เติมน้ำกลั่นและทำการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยเทคนิค spread plate บน gradient plate ที่มีเอทานอล 15% (v/v) นำไปบ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

8. การวิเคราะห์ความเข้มข้นเอทานอล

ความเข้มข้นเอทานอลได้วิเคราะห์โดยเครื่อง Gas Chromatography (GC) (Chrompack CP9001, Chrompack, The Netherlands) ใช้คอลัมน์ชนิด CP WAX 52 CB (Chrompack, The Netherlands) อุณหภูมิของคอลัมน์ 250°C อุณหภูมิของ detector 250°C อุณหภูมิของ injection 250°C ใช้แก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพาโดยใช้อัตราการไหล 1 ml/min ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ความเข้มข้นเอทานอลจะนำมาเจือจางด้วย n-propanol และใช้ปริมาตร 1 μl ฉีดเข้าเครื่อง GC

9. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Dinitrosalicylic Acid Method (DNS)

ดูดตัวอย่างที่ตองการวิเคราะหปริมาตร 1 ml ใสในหลอดทดลองและเติมสารละลาย DNS 1 ml ผสมใหเขากัน นำฟรอยดมาปดปากหลอดเพื่อปองกันการระเหยของน้ำ นำไปตมในน้ำเดือดเปนเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาการเกิดสีดวยการแชในน้ำเย็นทันทีเปนเวลา 5 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่น 10 ml ผสมใหเขากัน นำไปวัดคาการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm ดวยเครื่อง spectrophotometer นำคา OD ที่ได เทียบหาคาปริมาณน้ำตาลรีดิวซกับกราฟมาตราฐานน้ำตาลกลูโคส

ผลและวิจารณ์

1. การแยกยีสต์สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการแรงดันออสโมติกและทนเอทานอล

เนื่องจากผลการยับยั้งของน้ำตาลและเอทานอลต่อเซลล์ยีสต์มีความสัมพันธ์กัน งานวิจัยนี้จึงต้องการแยกยีสต์ที่สามารถทนแรงดันออสโมติกและทนเอทานอลได้ โดยได้นำตัวอย่างธรรมชาติมาแยกยีสต์โดยเทคนิค enrichment (enrichment technique) เนื่องจากการหมักเอทานอลในอุตสาหกรรมใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นอยู่ในช่วง 18-20% จึงได้เลือกความเข้มข้นน้ำตาล 20% (w/v) เป็นสภาวะในการแยกเชื้อยีสต์ร่วมกับสภาวะที่มีเอทานอล 10% (v/v) จากการทดลองสามารถแยกยีสต์จากแหล่งธรรมชาติที่สามารถเจริญในอาหารเหลว YPD ณ สภาวะกดดันดังกล่าวได้ทั้งหมด 114 ไอโซเลท โดยการคัดเลือกยีสต์ได้คัดเลือกจากลักษณะโคโลนีของยีสต์ เช่น ขนาดโคโลนี ขอบโคโลนี สี ความโปร่งแสง ทึบแสง เป็นต้น

2. การคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่ทนแรงดันออสโมติกและทนเอทานอลที่สามารถหมักเอทานอล

นำเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างธรรมชาติทั้ง 114 ไอโซเลท มาทดสอบการเจริญและการหมักเอทานอลในอาหารเหลว YPD ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลและเอทานอลเช่นเดียวกับสภาวะที่ใช้แยกยีสต์ คือ น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 20% (w/v) และความเข้มข้นของเอทานอล 10% (v/v) และมีหลอดดักแก๊ส ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ความสามารถในการหมักเอทานอลของยีสต์สังเกตจากแก๊สที่เกิดขึ้นภายในหลอดดักแก๊ส เมื่อยีสต์ใช้น้ำตาลกลูโคสใน fermentative metabolism จะให้เอทานอลและแก๊ส CO_2 จึงได้ใช้แก๊ส CO_2 ที่ยีสต์ผลิตเป็นตัวบ่งชี้ในเบื้องต้นถึงการหมักเอทานอลของยีสต์ จากการศึกษาพบว่ามียีสต์ 79 ไอโซเลท ที่สามารถเจริญและสร้างแก๊สได้ เมื่อนำยีสต์ทั้ง 79 ไอโซเลท ไปศึกษาการสร้างแก๊สในอาหารเหลว YPD ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลและเอทานอลสูงขึ้น คือ น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 22% (w/v) และเอทานอลความเข้มข้น 12% (v/v) พบว่ามียีสต์ 37 ไอโซเลท ที่สามารถเจริญและสร้างแก๊สในอาหารเหลว YPD ดังกล่าว โดยสามารถสร้างแก๊สได้เต็มหลอดดักแก๊สภายใน 48-72 ชั่วโมง ดังแสดงผลในตารางที่ 1 จึงได้นำยีสต์ทั้ง 37 ไอโซเลท ไปศึกษาการเจริญในสภาวะที่มีแรงดันออสโมติกสูงและความเข้มข้นเอทานอลสูงและต่อไป

ตารางที่ 1 แสดงความสามารถในการหมักเอทานอลของยีสต์ 79 ไอโซเลท ในอาหารเหลว YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 22% (w/v) และเอทานอลความเข้มข้น 12% (v/v) และมีหลอดดักแก๊ส ที่อุณหภูมิ 30°C เมื่อบ่มนาน 24 ชั่วโมง 48 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง

รหัสเชื้อ	ความสามารถในการสร้างแก๊ส ณ สภาวะอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 22% (w/v) และเอทานอลความเข้มข้น 12% (v/v)		
	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.
OA1	-	-	-
OA2	-	-	-
OA3	-	+	+
OA4	+	+++	+++
OA5	-	-	-
OA6	-	-	-
OA7	-	+++	+++
OA8	++	++	+++
OA10	++	+++	+++
OA12	+	+++	+++
OA14	-	+	+
OA15	-	-	+
OA16	+	+++	+++
OA17	+	+++	+++
OA20	-	+++	+++
OA21	-	-	-
OA22	-	-	-
OA23	-	-	-
OA25	-	-	-
OA30	-	-	+
OA31	++	++	+++
OA32	-	+++	+++
OA33	++	+++	+++

ตารางที่ 1 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ความสามารถในการสร้างแก๊ส ณ สภาวะอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 22% (w/v) และเอทานอลความเข้มข้น 12% (v/v)		
	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.
OA34	-	-	-
OA35	+	+++	+++
OA38	-	-	-
OA39	++	++	+++
OA43	-	+	+
OA44	++	+++	+++
OA45	-	-	-
OA46	-	-	-
OA48	+	+++	+++
OA50	++	+++	+++
OA51	+	+++	+++
OA52	++	++	+++
OA53	-	+	+
OA54	-	-	+
OA59	-	-	+
OA61	++	+++	+++
OA62	+	+++	+++
OA63			
OA64	-	-	-
OA65			
OA66	+	+++	+++
OA67	-	-	+
OA68	-	-	-
OA69	-	-	-
OA70	+	+++	+++
OA75	-	-	+
OA77	+	+++	+++

ตารางที่ 1 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ความสามารถในการสร้างแก๊ส ณ สภาวะอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 22% (w/v) และเอทานอลความเข้มข้น 12% (v/v)		
	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.
OA80	++	++	+++
OA83	-	+++	+++
OA84	-	-	-
OA85	-	-	-
OA87	-	-	-
OA88	-	-	+
OA89	++	+++	+++
OA90	++	++	+++
OA95	++	+++	+++
OA96	-	+++	+++
OA97	++	+++	+++
OA98	-	-	+
OA99	++	+++	+++
OA100	-	+	+
OA101	+	+++	+++
OA102	-	-	-
OA103	-	-	-
OA104	-	-	-
OA105	+	+++	+++
OA106	++	+++	+++
OA107	-	+++	+++
OA108	-	-	+
OA109	++	+++	+++
OA110	-	-	+
OA111	+	+++	+++
OA112	-	-	-
OA114	-	-	-

หมายเหตุ +++ มีแก๊สเต็มหลอดดักแก๊ส

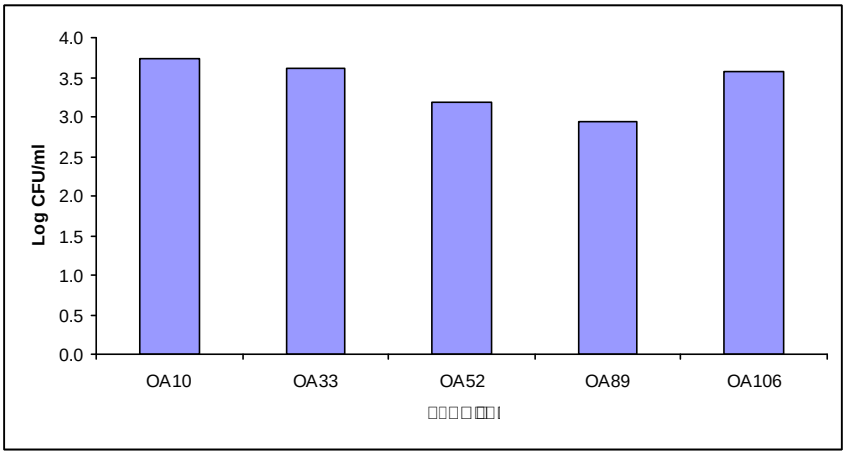
++ มีแก๊สมากกว่าครึ่งหลอดดักแก๊ส

\+ มีแก๊สน้อยกว่าครึ่งหลอดดักแก๊ส

\- ไม่มีแก๊สเกิดขึ้น

3. การศึกษาการเจริญของยีสต์ที่คัดเลือกได้ในสภาวะที่มีแรงดันออสโมติกสูงและความเข้มข้นเอทานอลสูง

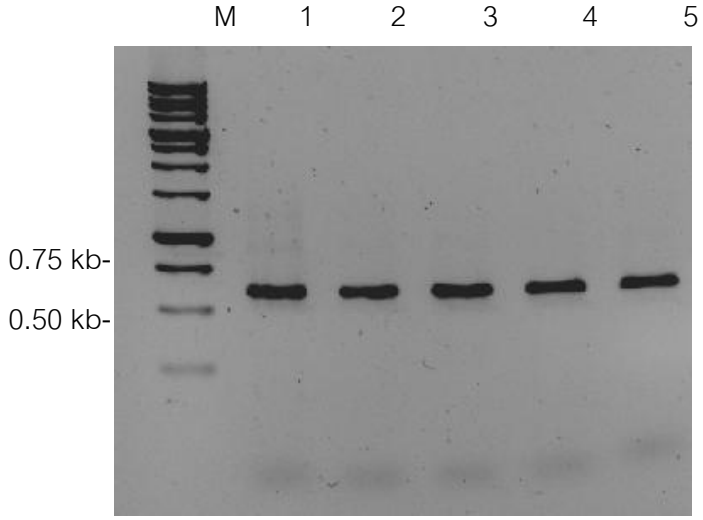
การทนต่อแรงดันออสโมติกเป็นคุณสมบัติเฉพาะของยีสต์แต่ละสายพันธุ์ Panchal และคณะ (1990) [3] ได้ศึกษาผลของแรงดันออสโมติกต่อการเจริญและการหมักเอทานอลของยีสต์โดยพบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลตั้งแต่ 20% (w/v) จะทำให้อัตราการเจริญและผลผลิตเอทานอลทางทฤษฎีลดลง Limtong และคณะ (2007) [9] ได้รายงานว่าความเข้มข้นของน้ำตาลมากกว่า 22% (w/v) จะทำให้ยีสต์ผลิตเอทานอลได้ลดลง สำหรับความเข้มข้นเอทานอลที่ได้จากการหมักในระดับอุตสาหกรรมจะอยู่ในช่วง 12-15% ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้เลือกศึกษาการเจริญของยีสต์ในสภาวะที่มีน้ำตาลความเข้มข้น 25% (w/v) และ เอทานอลความเข้มข้น 15% (v/v) ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 30 ชั่วโมง เมื่อนำยีสต์ที่เลี้ยงในสภาวะดังกล่าวไปเพาะเชื้อบนอาหารแข็ง YPD พบว่าสามารถคัดเลือกยีสต์ 5 ไอโซเลท คือ OA10, OA33, OA52, OA89 และ OA106 ที่สามารถเจริญได้ดีในสภาวะกดดันดังกล่าว โดยมีจำนวนยีสต์ที่มีชีวิตสูงอยู่ในช่วง 8.8×10^{2}-5.5×10^{3} CFU/ml โดยยีสต์ไอโซเลท OA33 มีจำนวนยีสต์ที่มีชีวิตสูงสุดคือ 5.5×10^{3} CFU/ml แสดงถึงความสามารถในการทนต่อสภาวะที่มีความเข้มข้นน้ำตาลและความเข้มข้นเอทานอลสูงได้ดีที่สุด



ภาพที่ 1 จำนวนยีสต์ที่มีชีวิต (CFU/ml) ของยีสต์ 5 ไอโซเลท คือ OA10, OA33, OA52, OA89 และ OA106 เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีน้ำตาลความเข้มข้น 25% (w/v) และ เอทานอลความเข้มข้น 15% (v/v) ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 30 ชั่วโมง

4. การจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์

นำยีสต์สายพันธุ์ที่หมักเอทานอลและมีคุณสมบัติทนแรงดันออสโมติกและทนเอทานอลที่คัดเลือกได้ 5 ไอโซเลท คือ OA10, OA33, OA52, OA89 และ OA106 มาสกัด DNA และทำการเพิ่มจำนวนนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 domain ของหน่วยย่อยขนาดใหญ่ของไรโบโซมดีเอ็นเอของยีสต์โดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction [32] ด้วย primer NL1 และ NL4 โดยปกติบริเวณ D1/D2 domain ของหน่วยย่อยขนาดใหญ่ของไรโบโซมดีเอ็นเอของยีสต์มีขนาดประมาณ 0.6-0.7 kb ซึ่ง PCR product ที่ได้จากการศึกษานี้มีขนาดประมาณ 0.6 kb ซึ่งตรงตามที่คาดไว้ ดังภาพที่ 2 เมื่อนำ PCR products ที่ได้ไปทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์และนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีสต์ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อ GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) โดยใช้โปรแกรม Blastn พบว่ายีสต์ที่แยกและคัดเลือกได้ทั้ง 5 ไอโซเลท เป็นยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ดังแสดงในตารางที่ 2



ภาพที่ 2 PCR product ของบริเวณ D1/D2 domain ของหน่วยย่อยขนาดใหญ่ของไรโบโซมดีเอ็นเอของยีสต์ 5 ไอโซเลท คือ OA10, OA33, OA52, OA89 และ OA106 เลนส์ M: M11 DNA ladder marker, เลนส์ 1-5: PCR product ของยีสต์สายพันธุ์ OA10, OA33, OA52, OA89 และ OA106 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ D1/D2 domain ของหน่วยย่อยขนาดใหญ่ของ ribosomal DNA ของยีสต์ OA10, OA33, OA52, OA89 และ OA106 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ D1/D2 domain จากฐานข้อมูล GenBank

สายพันธุ์	สายพันธ์ยีสต์ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม	หมายเลขของลำดับ D1/D2 ใน GenBank[a]	ค่าความเหมือน(%)[b]
OA10	*Saccharomyces cerevisiae*	JQ219350	100
OA33	*Saccharomyces cerevisiae*	HQ262379	100
OA52	*Saccharomyces cerevisiae*	HQ262387	100
OA89	*Saccharomyces cerevisiae*	JN938921	100
OA106	*Saccharomyces cerevisiae*	HM988705	100

[a]Acession numbers ของลำดับนิวคลีโอไทด์ D1/ D2 ของ LSU rRNA gene ที่อยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI.

[b]ค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ D1/D2 ของยีสต์ที่แยกได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GenBank

5. การศึกษาความสามารถในการหมักเอทานอลจากน้ำตาลชนิดต่าง ๆ

เมื่อนำยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ทนแรงดันออสโมติกและทนเอทานอลสูงทั้ง 5 สายพันธุ์ คือ OA10, OA33, OA52, OA89 และ OA106 มาทดสอบความสามารถในการหมักเอทานอลจากน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ทั้งน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่มีคาร์บอน 6 อะตอม (hexose) น้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharide) น้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม (pentose) และแป้งที่ละลายน้ำได้ พบว่ายีสต์ *S. cerevisiae* ทั้ง 5 สายพันธุ์ สามารถหมักเอทานอลจากน้ำตาล glucose galactose fructose mannose และ sucrose ได้ (ตารางที่ 3) จากการที่ยีสต์ *S. cerevisiae* ทั้ง 5 สายพันธุ์ สามารถหมักเอทานอลจากน้ำตาล glucose, fructose และ sucrose ได้ นับว่ามีประโยชน์ในการนำไปใช้ในการหมักเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทกากน้ำตาล น้ำอ้อย ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่ประกอบไปด้วยน้ำตาลหลายชนิดโดยมีน้ำตาล sucrose fructose และ glucose เป็นองค์ประกอบหลัก

ตารางที่ 3 แสดงความสามารถในการหมักเอทานอลจากน้ำตาลชนิดต่างๆ ของยีสต์ทนแรงดันออสโมติกและทนเอทานอลสูง

น้ำตาล	สายพันธุ์				
	OA10	OA33	OA33	OA89	OA106
Glucose	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+
Maltose	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Sucrose	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-
Mannose	+	+	+	+	+
Xylose	-	-	-	-	-
Soluble starch	-	-	-	-	-

หมายเหตุ

+ คือ มีการหมักเอทานอล - คือ ไม่มีการหมักเอทานอล +/- คือ ความสามารถในการหมักเอทานอลไม่คงที่

6. การศึกษาความสามารถในการหมักเอทานอลในสภาวะที่มีแรงดันออสโมติกสูงของยีสต์ที่คัดเลือกได้

เมื่อนำยีสต์ *S. cerevisiae* 5 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกได้มาศึกษาความสามารถในการหมักเอทานอลในอาหารเหลว FM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 25% (w/v) โดยเลี้ยงแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 rpm นาน 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C พบว่ายีสต์ไอโซเลท OA33 ผลิตเอทานอลได้ความเข้มข้นสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญโดยผลิตได้ 12.33% (v/v) และให้ค่าผลผลิตทางทฤษฎี 77.23% ยีสต์ *S. cerevisiae* OA10 และ OA106 ผลิตเอานอลได้ความเข้มข้นสูงรองลงมา โดยผลิตได้ 12.08-12.12% (v/v) และให้ค่าผลผลิตทางทฤษฎี 75.64-75.91% สำหรับยีสต์ OA52 และ OA89 ผลิตเอทานอลอยู่ในช่วง 11.70-11.85% (w/v) และให้ค่าผลผลิตทางทฤษฎีอยู่ในช่วง 73.35-74.23% (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลการหมักเอทานอลโดยยีสต์ทนแรงดันออสโมติกสูงและทนเอทานอลสูงจำนวน 5 สายพันธุ์ ณ สภาวะการหมักที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 25% (w/v) ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 48 ชั่วโมง

สายพันธุ์	Ethanol % (v/v)	Theoretical Yield (%)
OA10	12.12±0.35[b]	75.91
OA33	12.33±0.21[a]	77.23
OA52	11.70±0.18[d]	73.35
OA89	11.85±0.11[c]	74.23
OA106	12.08±0.07[b]	75.64

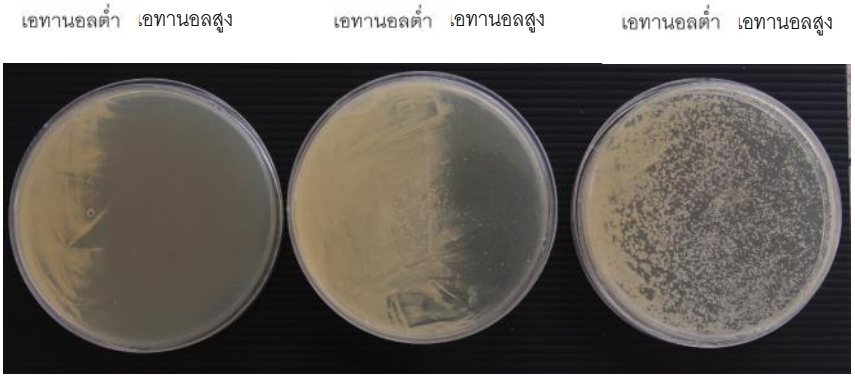
ตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ ($p<0.05$)

7. การกลายพันธุ์ยีสต์โดยการฉายด้วยรังสีอุลตราไวโอเลตและสารเคมี EMS

การศึกษาครั้งนี้ได้นำเชื้อ *S. cerevesiae* OA33 ที่สามารถทนต่อแรงดันออสโมติกและความเข้มข้นเอทานอลได้ดีที่สุดโดยสามารถเจริญและให้จำนวนยีสต์ที่มีชีวิตสูงสุด และยังสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดมาทำการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอุลตราไวโอเลตชนิด C ในงานวิจัยนี้ได้ใช้ความเข้มข้นเอทานอลเป็นตัวคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์กลายโดยทำการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวของยีสต์ที่สามารถเจริญได้บนจานอาหารแข็ง YPD gradient plate ที่มีความเข้มข้นของเอทานอล 15% (v/v) โดยการคัดเลือกจะเลือกโคโลนีขนาดใหญ่ที่สามารถเจริญบนอาหารบริเวณที่มีความเข้มข้นเอทานอลสูง ขณะที่ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมไม่สามารถเจริญบนอาหารบริเวณดังกล่าวได้

จากผลการทดลองของจานอาหารที่ไม่ผ่านการฉายรังสีอุลตราไวโอเลตพบว่าเชื้อ *S. cerevisiae* OA33 เจริญได้บริเวณที่มีเอทานอลความเข้มข้นต่ำ (ภาพที่ 3ก) สำหรับจานอาหารที่ผ่านการฉายรังสีอุลตราไวโอเลตเป็นเวลา 15 วินาที พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้บนอาหารบริเวณที่มีความเข้มข้นของเอทานอลสูง (ภาพที่ 3ข) จึงได้นำยีสต์ที่เจริญบนอาหารแข็งบริเวณที่มีเอทานอลความเข้มข้นสูงไปทำการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี EMS ต่อไป

จากผลการทดลองของการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี EMS พบว่าเชื้อยีสต์ที่ผ่านการกลายพันธุ์โดยสารเคมี EMS สามารถเจริญบนจานอาหารแข็ง YPD gradient plate ที่มีความความเข้มข้นเอทานอล 15% (v/v) ในบริเวณที่มีความเข้มข้นเอทานอลได้สูงกว่ายีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม OA33 และยีสต์ที่ผ่านการกลายพันธุ์โดยรังสีอุลตราไวโอเลต (ภาพที่ 3ค)



ก ข ค

ภาพที่ 3 แสดงลักษณะโคโลนีของยีสต์ที่เจริญบนอาหารแข็ง YPD gradient plate ที่มีความเข้มข้นของเอทานอล 15% (v/v)

ก. แสดงลักษณะโคโลนีของยีสต์ที่ไม่ผ่านการฉายรังสีอุลตราไวโอเลต

ข. แสดงลักษณะโคโลนีของยีสต์ที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์โดยรังสีอุลตราไวโอเลต

ค. แสดงลักษณะโคโลนีของยีสต์ที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์โดยสารเคมี EMS

8. การทดสอบคุณสมบัติในการหมักเอทานอลของยีสต์สายพันธุ์กลาย

เนื่องจากการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอุลตราไวโอเลตและสารเคมี EMS เป็นการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่มอาจทำให้ยีสต์มีคุณสมบัติในการทนแรงดันออสโมติกและทนเอทานอลได้ดีกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมแต่อาจทำให้คุณสมบัติในการหมักเอทานอลเสียไป ดังนั้นจึงได้ทำการทดสอบความสามารถในการหมักเอทานอลโดยนำยีสต์สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้จำนวน 70 ไอโซเลท มาทดสอบการหมักเอทานอลในอาหารเหลว YPD ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 25% (w/v) และเอทานอลความเข้มข้น 15% (v/v) และมีหลอดดักแก๊ส ที่อุณหภูมิ 30 °C ซึ่งเป็นสภาวะที่ได้ใช้ในการศึกษาการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมในสภาวะที่มีแรงดันออสโมติกและเอทานอลความเข้มข้นสูง

จากผลการทดสอบคุณสมบัติในการหมักเอทานอลของยีสต์สายพันธุ์กลายเปรียบเทียบกับยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม *S. cereviciae* OA33 (ตารางที่ 5) พบว่ามียีสต์สายพันธุ์กลายจำนวน 9 ไอโซเลท ที่ไม่สร้างแก๊ส แสดงว่ายีสต์สายพันธุ์กลายดังกล่าวมีคุณสมบัติทนเอทานอลได้เพิ่มขึ้นแต่สูญเสียความสามารถในการหมักเอทานอล มียีสต์สายพันธุ์กลายจำนวน 33 ไอโซเลท ที่มีคุณสมบัติทนเอทานอลได้เพิ่มขึ้นแต่มีความสามารถในการหมักเอทานอลได้ลดลง สำหรับยีสต์สายพันธุ์กลายอีก 28 ไอโซเลท มีความสามารถในการทนเอทานอลได้เพิ่มขึ้นและยังคงความสามารถในการหมักเอทานอลโดยสามารถผลิตแก๊สได้เต็มหลอดดักแก๊สได้ภายใน 24-48 ชั่วโมง เมื่อนำยีสต์สายพันธุ์กลาย 28 ไอโซเลท ดังกล่าวมาทำการเพาะเชื้อบนอาหารแข็ง YPD จำนวน 10 รอบ และนำมาทดสอบการเจริญและการสร้างแก๊ส ณ สภาวะกดดันข้างต้น

พบว่ามียีสต์สายพันธุ์กลาย 21 ไอโซเลท ที่ยังสามารถเจริญและสร้างแก๊สได้ในอาหารเหลว YPD ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 25% (w/v) และเอทานอลความเข้มข้น 15% (v/v) แสดงว่ายีสต์สายพันธุ์กลายทั้ง 21 ไอโซเลท มีพันธุกรรมคงที่

ตารางที่ 5 แสดงความสามารถในการหมักเอทานอลของยีสต์สายพันธุ์กลาย 70 ไอโซเลท ในอาหารเหลว YPD ที่มีหลอดดักแก๊ส โดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 25% (w/v) และเอทานอลความเข้มข้น 15% (v/v) ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

รหัสเชื้อ	ความสามารถในการสร้างแก๊สของยีสต์สายพันธุ์กลาย		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
OA33	++	+++	+++
M1OA33*	++	+++	+++
M2OA33*	+++	+++	+++
M3OA33*	+++	+++	+++
M4OA33	-	-	-
M5OA33	+	+	++
M6OA33*	+++	+++	+++
M7OA33	-	+	++
M8OA33*	+++	+++	+++
M9OA33*	+++	+++	+++
M10OA33	-	-	+
M11OA33*	+++	+++	+++
M12OA33	+	+	++
M13OA33	-	-	-
M14OA33*	+++	+++	+++
M15OA33*	+++	+++	+++
M16OA33	-	-	-
M17OA33*	+	++	+++
M18OA33	+++	+++	+++
M19OA33	+	+	++
M20OA33*	+++	+++	+++

ตารางที่ 5 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ความสามารถในการสร้างแก๊สของยีสต์สายพันธุ์กลาย		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
M21OA33	+	+	+
M22OA33	+++	+++	+++
M23OA33*	+++	+++	+++
M24OA33	+++	+++	+++
M25OA33	+	+	+++
M26OA33	++	+++	+++
M27OA33	-	++	+++
M28OA33	+++	+++	+++
M29OA33*	+++	+++	+++
M30OA33	-	-	-
M31OA33	+++	+++	+++
M32OA33	++	++	++
M33OA33	+++	+++	+++
M34OA33*	+++	+++	+++
M35OA33	-	-	+
M36OA33*	+++	+++	+++
M37OA33	-	-	-
M38OA33*	+++	+++	+++
M39OA33*	+++	+++	+++
M40OA33	-	-	+
M41OA33	-	-	+
M42OA33*	+++	+++	+++

ตารางที่ 5 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ความสามารถในการสร้างแก๊สของยีสต์สายพันธุ์กลาย		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
M43OA33*	+++	+++	+++
M44OA33*	+	++	+++
M45OA33	+	++	++
M46OA33	-	-	+
M47OA33	-	-	-
M48OA33	++	++	++
M49OA33	+	++	++
M50OA33	+	+	+
M51OA33	+	+	++
M52OA33*	+++	+++	+++
M53OA33	-	-	-
M54OA33	+	++	++
M55OA33	+++	+++	+++
M56OA33	-	-	-
M57OA33	+++	+++	+++
M58OA33	+	+	++
M59OA33	+	++	++
M60OA33	+	++	++
M61OA33	++	++	++
M62OA33	+	++	++
M63OA33	+++	+++	+++
M64 OA33	-	-	-
M65 OA33	+	++	++

ตารางที่ 5 **(ต่อ)**

รหัสเชื้อ	ความสามารถในการสร้างแก๊สของยีสต์สายพันธุ์กลาย		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
M66OA33	++	++	++
M67OA33	+	+	++
M68OA33	+	++	++
M69OA33	-	-	+
M70OA33	-	+	+

หมายเหตุ +++ แก๊สเต็มหลอด

++ มีแก๊สมากกว่าครึ่งหลอด

+ มีแก๊สน้อยกว่าครึ่งหลอด

- ไม่มีแก๊สเกิดขึ้น

* ยีสต์ที่มีพันธุกรรมไม่คงที่

9. การศึกษาการเจริญของยีสต์สายพันธุ์กลายในสภาวะที่มีแรงดันออสโมติกและความเข้มข้นเอทานอลสูง

นำยีสต์สายพันธุ์กลายที่มีพันธุกรรมคงที่จำนวน 21 ไอโซเลท มาศึกษาการเจริญในสภาวะที่มีแรงดันออสโมติกและความเข้มข้นเอทานอลสูงเปรียบเทียบกับยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม *S. cerevisiae* OA33 โดยการทดลองได้ใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 25% (w/v) และเอทานอลความเข้มข้น 15% (v/v) เช่นเดียวกับการศึกษาการเจริญของยีสต์ที่คัดแยกได้จากธรรมชาติในข้อ 3 จากการทดลองพบว่ายีสต์สายพันธุ์กลายทุกไอโซเลทสามารถทนต่อสภาวะกดดันดังกล่าวได้ดีกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยมีจำนวนยีสต์ที่รอดชีวิตสูงกว่ายีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม *S. cerevisiae* OA33 (ตารางที่ 6) โดยเฉพาะยีสต์สายพันธุ์กลาย *S. cerevisiae* M43OA33 ที่มีจำนวนยีสต์ที่รอดชีวิตสูง 1.5×10^{5} CFU/ml โดยสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม 37 เท่า จึงได้เลือกยีสต์สายพันธุ์กลาย *S. cerevisiae* M43OA33 มาศึกษาการหมักเอทานอลในสภาวะที่มีแรงดันออสโมติกสูงต่อไป

จากการทดลองพบว่าการปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์โดยใช้รังสีอุลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี EMS สามารถสร้างยีสต์สายพันธุ์กลายที่สามารถทนและเจริญในสภาวะที่มีแรงดันออสโมติกและความเข้มข้นเอทานอลสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม *S. cerevisiae* OA33 โดยยีสต์ที่ทนต่อสภาวะแรงดันออสโมติกสูงและเอทานอลความเข้มข้นสูงจะช่วยเพิ่มผลผลิตการหมัก (fermentation yield) ลดระยะเวลาการหมัก และช่วยลดต้นทุนการผลิตเอทานอลได้

ตารางที่ 6 จำนวนยีสต์ที่มีชีวิตจากการเลี้ยงในสภาวะที่มีน้ำตาลความเข้มข้น 25% (w/v) และเอทานอลความเข้มข้น 15% (v/v) ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 30 ชั่วโมง

ยีสต์สายพันธุ์กลาย	จำนวนยีสต์ที่มีชีวิต (CFU/ml)
OA33	4.0×10^{3}
M1OA33	7.5×10^{3}
M2OA33	7.0×10^{4}
M3OA33	2.8×10^{4}
M6OA33	4.9×10^{3}
M8OA33	9.5×10^{4}
M9OA33	5.6×10^{4}
M11OA33	7.2×10^{3}
M14OA33	2.5×10^{4}
M15OA33	7.0×10^{3}
M17OA33	8.4×10^{4}
M20OA33	1.8×10^{4}
M23OA33	1.2×10^{4}
M29OA33	2.7×10^{4}
M34OA33	4.4×10^{4}
M36OA33	8.5×10^{4}
M38OA33	3.2×10^{4}
M39OA33	7.7×10^{3}
M42OA33	8.2×10^{3}
M43OA33	1.5×10^{5}
M44OA33	3.2×10^{4}
M52OA33	3.0×10^{4}

10. การศึกษาความสามารถในการหมักเอทานอลในสภาวะที่มีแรงดันออสโมติกสูงโดยยีสต์สายพันธุ์กลาย

เมื่อนำยีสต์สายพันธุ์กลาย *S. cerevisiae* M43OA33 มาศึกษาความสามารถในการหมักเอทานอลในอาหารเหลว FM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 25% (w/v) โดยเลี้ยงแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 72 ชั่วโมง และทำการเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ทุก 12 ชั่วโมง จากการศึกษาพบว่ายีสต์สายพันธุ์กลาย *S. cerevisiae* M43OA33 ผลิตเอทานอลได้ความเข้มข้นสูงกว่ายีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญโดยผลิตได้ 14.60% (v/v) ค่า productivity 1.95 g/l/h และค่าผลผลิตทางทฤษฎี 76.21% ขณะที่ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม *S. cerevisiae* OA33 ผลิตเอทานอลได้ 13.45% ค่า productivity 1.49 g/l/h และค่าผลผลิตทางทฤษฎี 70.29% (ตารางที่ 7)

ผลจากงานวิจัยนี้สามารถสร้างยีสต์สายพันธุ์กลายที่สามารถทนแรงดันออสโมติกและเอทานอลได้สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม และสามารถผลิตเอทานอลได้สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม 8.6% มีรายงานว่าความเข้มข้นของไนโตรเจนและวิตามินมีผลต่อการหมักเอทานอลในสภาวะที่มีน้ำตาลความเข้ สูง [33] งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการหมักเอทานอลแบบ batch จึงทำให้เมื่อเวลาในการหมักเพิ่มขึ้นปริมาณไนโตรเจนอาจไม่เหมาะสมในการหมักเอทานอลส่งผลให้ความเข้มข้นเอทานอลและค่าผลผลิตทางทฤษฎีที่ได้ไม่สูงมากนัก

ตารางที่ 7 ผลการหมักเอทานอลโดยยีสต์สายพันธุ์กลาย M43OA33 และยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม OA33 ณ สภาวะการหมักที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 30% (w/v) ที่อุณหภูมิ 37°C

สายพันธุ์	Ethanol % (v/v)	Productivity (g/l/h)	Theoretical Yield (%)
OA33	13.45±0.16[a] (72 h)	1.49±0.02[a]	70.29
M43OA33	14.60±0.21[b] (60 h)	1.95±0.04[b]	76.21

ตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ ($p<0.05$)

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

สรุปผล

การศึกษานี้สามารถแยกและคัดเลือกยีสต์ทนแรงดันออสโมติกและทนเอทานอลได้ 5 สายพันธุ์ ที่สามารถเจริญและมีจำนวนยีสต์ที่รอดชีวิตในสภาวะการเลี้ยงที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 25% (w/v) และมีเอทานอลความเข้มข้น 15% (v/v) สูงสุด เมื่อนำมาทำการจัดจำแนกสายพันธุ์โดยวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 domain ของหน่วยย่อยขนาดใหญ่ของ ribosomal DNA พบว่ายีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ คือ *S. cerevisiae* โดยยีสต์ *S. cerevisiae* OA33 เป็นสายพันธุ์ที่ทนแรงดันออสโมติกและทนเอทานอลได้สูงสุด และสามารถผลิตเอทานอลได้สูง ณ สภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 25% (w/v) ที่อุณหภูมิ 37°C โดยผลิตเอทานอลได้ 12.33% (v/v) จึงได้นำ *S. cerevisiae* OA33 มาเป็นสายพันธุ์พ่อแม่ในการทำการกลายพันธุ์โดยรังสีอุลตราไวโอเลตและสารเคมี ethyl methane sulfonate (EMS)

เมื่อทำการคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์กลายที่มีขนาดโคโลนีใหญ่ที่เจริญบนอาหารที่มีเอทานอลความเข้มข้น 15% (w/v) ที่เตรียมแบบไล่ระดับความเข้มข้น พบว่ายีสต์สายพันธุ์กลาย *S. cerevisiae* M43OA33 สามารถทนต่อสภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 25% (w/v) และเอทานอลความเข้มข้น 15% (v/v) ได้สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม และสามารถผลิตเอทานอล ณ สภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 30% (w/v) ที่อุณหภูมิ 37°C ได้ความเข้มข้นเอทานอลและค่าผลผลิตทางทฤษฎีสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม 8.6% และ 8.4% ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

ควรทำการศึกษาการหมักเอทานอลของยีสต์สายพันธุ์กลาย *S. cerevisiae* M43OA33 แบบ fed-batch หรือ แบบ continuous และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากสภาวะที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง เช่น ปริมาณของแหล่งไนโตรเจน วิตามิน อุณหภูมิ เป็นต้น และควรทำการศึกษาการรอดชีวิต ณ สภาวะการหมักตามช่วงระยะเวลาที่หมัก เช่น ที่ 12 24 36 48 60 72 ชั่วโมง

เอกสารอ้างอิง

1. Rocher, M., *The Biology of Ethanol:Classical and Future Applications* 2001, Toronto: Wiley VCH. 214-234.
2. Querol, A., Fernandez-Espinar, M.T., Olmo, M. and Barrio, M., *Adaptive evolution of wine yeast.* Int. J. Food Microbiology, 2003. 86: p. 3-10.
3. Panchal, C.J., and Tavares, F.C.A., *Yeast strain selection*. Yeast strain selection for ethanol production 1990, New York: Marcel Dekker. 255-243.
4. Salmon, J.M., and Maurioco, J.C., *Relationship between sugar uptake kinetics and total sugar consumption in different industrial Saccharomyces cerevisiae strains during alcohol fermentation.* Biotechnol. Lett., 1994. 16: p. 89-94.
5. Osho, A., *Ethanol and sugar tolerance of wine yeasts isolated from fermentating cashew apple juice.* Afr. J. Biotechnol.,, 2005. 4: p. 660-662.
6. Lucero, P., Penalver, E., Moreno, E., and Lagunas, R., *Internal trehalose protects endocytosis from inhibition by ethanol in Saccharomyces cerevisiae.* Apply Environment. Microbiol., 2000. 2000: p. 4456-4461.
7. Alexandre, H., Ansanay-Galeote, V., Dequin, S., and Blondin, B. , *Global gene expression during short-term ethanol stress in Saccharomyces cerevisiae.* FEMS. Lett., 2001. 498: p. 98–103.
8. Ando, A., Tanaka, F., Murata, Y., Takagi, H and Shima. J. , *Identification and classification of genes required for tolerance to high-sucrose stress revealed by genome-wide screening of Saccharomyces cerevisiae.* FEMS. Yeast Res., 2006. 6: p. 249–267.
9. Limtong, S., Sringiew, C. and Yongmanitchai, W., *Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolate Kluyveromyces marxianus* Biorecource Technol., 2007. 98: p. 3367-3374.
10. Walker, G.M., *Yeast physiology and biotechnology.* 1998, John Wiley&Son Ltd. England.
11. Ingram, L.O. and T.M. Buttke, *Effects of alcohols on micro-organisms.* Adv. Microb. Physiol., 1984. 25: p. 253-300.
12. Querol, A., et al., *Adaptive evolution of wine yeast.* Int. J. Food Microbiol., 2003. 86(1-2): p. 3-10.

13. Casey, G.P. and W.M. Ingledew, *Re-evaluation of alcohol synthesis and tolerance in brewers yeast.* J. AM. Soc. Brew. Chem.,1985. 43: p. 75-83.

14. Edgardo, A., Carolina, P., Manuela, R., Juanitaa, F. and Jaimea, B., *Selection of thermotolerant yeast strains Saccharomyces cerevisiae for bioethanol production.* Enzyme Microb. Tech. 2008. 43: p. 120–123.

15. Hu, X.H., *Genetic dissection of ethanol tolerance in the budding yeast Saccharomyces cerevisiae.* Genetics, 2007. 175(3): p. 1479-87.

16. Hallsworth, J.E., *Ethanol-induced water stress in yeast.* J. Ferment. Bioeng. , 1998. 85(2): p. 125-137.

17. Lloyd, D., et al., *Effects of growth with ethanol on fermentation and membrane fluidity of Saccharomyces cerevisiae.* Yeast, 1993. 9(8): p. 825-33.

18. Walker, G.M., *Magnesium as a stress-protectant for industrial strains of Saccharomyces cerevisiae* J. AM. Soc. Brew. Chem. , 1998. 56: p. 109-113.

19. Cadete, R.M., et al., *Spathaspora arborariae sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil.* FEMS Yeast Res., 2009. 9(8): p. 1338-42.

20. Sree, N.K., et al., *High alcohol production by repeated batch fermentation using an immobilized osmotoleran ;Saccharomyces cerevisiae.* J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 2000. 24(3): p. 222-226.

21. Sridhar, M., Kirin Sree, N. and Venkatesmar Rao, L., *Effect of UV radiation on thermotolerance, ethanol tolerence and osmotolerence Saccharomyces cerevisiae VS*1 *and VS*3 *strains.* Biorecource Technol., 2002. 83: p. 199-202.

22. Unaldi, N.M., B. Arikan, and G. Coral, *Isolation of alcohol tolerant, osmotolerant and thermotolerant yeast strains and improvement of thier alcohol tolerance by UV mutagenesis.* Acta Microbiologica Polonica, 2002. 51: p. 115-120.

23. Uma, V. and H. Polasa, *Enhanced ethanol production by using mutagens.* Microbiol. Biotechnol., 1990. 5: p. 1-4.

24. Watanabe, T., et al., *A UV-induced mutant of Pichia stipitis with increased ethanol production from xylose and selection of a spontaneous mutant with increased ethanol tolerance.* Bioresoure Technol, 2011. 102(2): p. 1844-8.

25. Rao, R.S., et al., *Strain improvement of Candida tropicalis for the production of xylitol: biochemical and physiological characterization of wild-type and mutant strain CT-OMV*5. J Microbiol., 2006. 44(1): p. 113-20.

26. Dehkordi, M.M., Nahvi, I., Esfahani, Z.H., Ghaedi, K.,Tavassoli, M. and Akada, R., *Isolation of a Novel Mutant Strain of Saccharomyces cerevisiae by an Ethyl Methane Sulfonate-Induced Mutagenesis Approach as a High Producer of Bioethanol* J. Biosci. Bioeng, 2008. 105: p. 403-408.

27. Hou, L., *Novel methods of genome shuffling in Saccharomyces cerevisiae.* Biotechnol Lett., 2009. 31(5): p. 671-7.

28. Hou, L., *Improved production of ethanol by novel genome shuffling in Saccharomyces cerevisiae.* Appl. Biochem. Biotechnol., 2010. 160(4): p. 1084-93.

29. Wahlbom, F.C., Zyl, H.W., Jonsson, J.L., Hahn-Hagerdal, B. and Otero, R.C., *Generation of the improved recombinant xylose-utilizing Saccharomyces cerevisiae TMB* 3400 *by random mutagenesis and physiological comparison with Pichia stipitis CBS* 6054. FEMS Yeast Res., 2003. 3: p. 319-326.

30. Shi, D.J., C.L. Wang, and K.M. Wang, *Genome shuffling to improve thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol productivity of Saccharomyces cerevisiae.* J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 2009. 36(1): p. 139-47.

31. Suh, S.O. and M. Blackwell, *Four new yeasts in the Candida mesenterica clade associated with basidiocarp-feeding beetles.* Mycologia, 2005. 97(1): p. 167-77.

32. Kidson, C., et al., *Selecting candidate antigens for malaria vaccines.* Asian Pac. J. Allergy Immunol., 1984. 2(2): p. 325-8.

33. Breisha, G.Z., *Production of* 16% *ethanol from* 35% *sucrose.* Biomass and Bioenergy, 2010. 34(8): p. 1243-1249.