สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature review)

ทบทวนวรรณกรรม

นฤมล และคณะ (2550) แยกยีสต์ทนร้อนจากผลไม้ ดอกไม้ ใบไม้ ดิน และผลปาล์มจำนวน 145 ตัวอย่าง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสสามารถแยกยีสต์ทนร้อนได้ 70 ไอโซเลท มี 6ไอโซเลทที่เจริญญได้ดีในอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบการหมักน้ำตาลกลูโคสและซูโครสพบยีสต์ 3 ไอโซเลท (MIY1 MIY48 และ MIY57) หมักน้ำตาลทั้งสองชนิดได้เอทานอลภายใน 24 ชั่งโมง เจริญได้ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส แต่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เมื่อคัดเลือกจากความสามารถในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสจากอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 15% ไฮโซเลท MIY57 ผลิตเอทานอลได้ 4.6% (v/v)นำยีสต์ MIY57 มาเลี้ยงเพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอทานอล พบว่ายีสต์ MIY57 ผลิตเอทานอลได้ดีที่สุด 5.0 % (v/v) เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 5% ในอาหารที่มีกลูโคส 15% ม yeast extract 1%, pH เริ่มต้น 4.5 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งสูงกว่า *Saccharomyces cerevisiae* TISIR 5048 ที่ใช้เปรียบเทียบ 3.7 % (v/v) และได้ปริมาณเซลล์สูงสุด 7.2 กรัม/ลิตร ที่เวลา 18 ชั่วโมง ในขณะที่ *Saccharomyces cerevisiae* TISIR 5048 ได้ 4.1 กรัม/ลิตร เมื่อจัดจำแนกยีสต์ MIY57 โดยใช้ลักษณะสัณานวิทยา สรีรวิทยา และลักษณะทางอนูชีววิทยา บ่งชี้ว่าเป็น *Saccharomyces cerevisiae*

สาวิตรี ลิ่มทอง(2549)ศึกษาความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพยีสต์การจัดจำแนกและวิธีการจัดจำแนกยีสต์ อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม อนุกรมวิธานระดับโมเลกุลของยีสต์และไฟโลจีนีนิเวศวิทยาและความหลากหลายของยีสต์และหลักการวิธีการเก็บรักษายัสต์ส่วนเรื่องที่เกี่ยวกับเทคโนโลยีชีวภาพของยีสต์ เป็นหลักการสำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์ การปรับปรุงพันธุกรรมของยีสต์อุตสาหกรรมให้มีประสิทธิภาพในการผลิตผลิตภัณฑ์มีลักษณะที่เหมาะสมและดีในการใช้ในระดับอุตสาหกรรม ด้วยวิธีการกลายพันธุ์ โปรพลาสฟิวชันและรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเทคโนโลยี

Alegre *et al.* (2003) ได้ศึกษาการผลิตอแลกอฮอล์ที่ได้จากกระบวนการหมักแบบกะและแบบต่อเนื่อง โดยการตรึงเซลล์ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* บน chrysotile ใช้ sugar cane malasses เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า ในกรณีการหมักแบบกะอัตราการเกิดคาร์บอนไดออกไซด์จะเพิ่มสูงขึ้นประมาณ 27 % ในช่วง 30 นาทีแรกของการหมักเมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการหมักที่ไม่มีการตรึงเซลล์ยีสต์ส่วนการหมักแบบต่อเนื่องปริมาณเอทานอลจะสูงขึ้นตามปริมาณการเจือจางที่เพิ่มขึ้น และปริมาณเอทานอลที่ได้จะมีค่าสูงกว่ากระบวนการหมักที่ไม่มีการตรึงเซลล์ยีสต์ ซึ่ง

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 02 ต.ค. 2555
เลขทะเบียน 249885
เลขเรียกหนังสือ

แสดงให้เห็นว่ากระบวนการตรึงเซลล์ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae*บน chrysotile จะสามารถเพิ่มความเสถียรให้กับยีสต์และเพิ่มปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ให้มีปริมาณสูงขึ้น

Kurtzman and Robnett (1998) ทดสอบไฟโลจนีโดยอาศัยบริเวณ D1/D2 ของ 26S rRNA ยีน เป็นไปในทางเดียวกันกับต้นไม้วิวัฒนาการที่ได้จาก 18S rRNA ยีน จากการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าลำดับเบสบริเวณ D1/D2 สามารถแยกวิวัฒนาการได้ดีกว่า 18S rRNA ยีน แต่ความสัมพันธุ์ของชนิดเมื่อใช้สองโมเลกุลค่อน้างเหมือนกัน เมื่อแขนงมีค่า boostrap สูง ข้อยกเว้นที่สำคัญคือ *Zygosaccharomyces mrakii* ซึ่งใกล้ *Zygosaccharomyces florentinus* ในต้นไม้ที่ได้จากบริเวณ D1/D2 ของ 26S rRNA ยีน แต่อยู่ในกลุ่มของ *Torulaspora clade* ในต้นไม่จาก 18S rRNA ยีน

Kurtzman *et al.* (1998) เป็นการศึกษาและวิธีการจัดจำแนกยีสต์ซึ่งเป็นหนังสือมาตราฐานสำหรับอนุกรมวิธารสำหรับยีสต์ที่มีประโยชน์ในการจัดจำแนกยีสต์ ยีสต์ถูกจำแนกประเภทโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี รวมทั้งเกณฑ์อนุกรมวิธานเคมีและอนุกรมวิธารระดับโมเลกุล

Limtong *et al.* (1986) แยกยีสต์ทนเค็มจากตัวอย่างหลายประเภทในประเทศไทย เช่น อาหารหมักที่มีเกลือ เนื้อเค็นตากแห้ง และกากน้ำตาลโดยใช้เทคนิคการเพิ่มจำนวน (enrichment technique) ด้วยอาหารกากน้ำตาลที่มีโซเดียมคลอไรด์ 5 และ 17 เปอร์เซ็น บ่มที่ 37 และ 40 องศาเซลเซียส ได้ยีสต์ทนเค็มทั้งหมด 413 ไอโซเลท และเมื่อศึกษาการทนเกลือของยีสต์ทนเค็มที่แยกได้ พบว่ามีบางไอโซเลทที่สามารถเจริญได้ในที่มีโซเดียมคลอไรด์ 23-24 เปอร์เซ็น (4.0 โมลาร์) ปัจจุบันการประยุกต์ใช้ยีสต์ทนเค็มส่วนใหญ่เป็นการใช้ในอุตสาหกรรมอาหารหมักเนื่องจากยีสต์ทนเค็มสามรถเจริญได้ในที่มี A_w ต่ำ

Limtong *et al.* (1986 และ 1987) การจัดจำแนกยีสต์ทนเค็ม จำนวน 137 ไอโซเลท แยกและรวบรวมไว้ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี โดยเทียบกับ key ในหนังสือ The Yeasts, A Taxonomic Study, 4h edition (Kurtzman และ Fell, 1998) พบว่ายีสต์เหล่านี้อยู่ใน Phylum Ascomycota, Class Hemiascomycetes, Order Saccharomycetales, Family Saccharomycetaceae โดยแบ่งออกเป็น 7 จีนัส 34 สปีชีส์ คือ Candida anatomiae 4 ไอโซเลท C. apicola 2 ไอโซเลท C. chiropterorum 1 ไอโซเลท, C. entomophila 1 ไอโซเลท, C. glabrata 8 ไอโซเลท, C. glucosophila 2 ไอโซเลท, C. gropengiesseri 1 ไอโซเลท, C. incommunis 2 ไอโซเลท, C. ishiwadae 7 ไอโซเลท, C. maltosa 1 ไอโซเลท, C. maris 1 ไอโซเลท, C. maritima 2 ไอโซเลท, C. melibiosica 1 ไอโซเลท, C. membranifaciens 3 ไอโซเลท, C. parapsilosis 10 ไอโซเลท, C. quercitrusa 1 ไอโซเลท, C. spandovensis 1 ไอโซเลท, C. tenuis 1 ไอโซเลท, C. valdiviana 3 ไอโซเลท, C. versatilis 2 ไอโซ

เลท, Candida spp. 5 ไอโซเลท, Citeromyces spp. 2 ไอโซเลท, Debaryomyces occidentalis 1 ไอโซเลท, Debaryomyces sp. 1 ไอโซเลท, issatchenkia orientalis 37 ไอโซเลท, Pichia anomala 2 ไอโซเลท, Saccharomyces byanus 2 ไอโซเลท, S. castellii 1 ไอโซเลท, S. cerevisiae 12 ไอโซเลท, S. exiguus 1 ไอโซเลท, S. kluyveri 1 ไอโซเลท, S. paradoxus 1 ไอโซเลท, S. pastorianus 5 ไอโซเลท , S. spencerorum 2 ไอโซเลท, Saccharomyces spp. 6 ไอโซเลท, Zygosaccharomyces bisporus 3 ไอโซเลท และ Z. rouxii 1 ไอโซเลท

Tofalo *et al.* (2009) ศึกษา Vino cotto ที่เป็นผลิตภัณฑ์ไวน์ที่ทำมาจากองุ่นขาวของ Trebbiano, Passerina หรือ Moscato ผลิตที่ Marche และ Abruzzo ที่อิตาลี โดยงานวิจัยนี้เกี่ยวกับเทคโนลียีการทำไวน์ ซึ่งจะมุ่งเน้นการศึกษาไปที่ *Saccharomyces* และ non-*Saccharomyces* yeast ในระหว่างการผลิต vino cotto และศึกษาลักษณะของยีสต์ที่ทนต่อ osmotic stress และ ethanol โดยขั้นแรกจะเป็การวิเคราะห์ทางด้านเคมีของผลิตภัณฑ์ไวน์ จากนั้นศึกษาประชากรยีสต์จาก ตัวอย่าง fresh Trebbiano must (FTM) , vino cotto must (VCM) ,VCM ในระหว่างการหมักและ vino cotto ใน Wallerstein Laboratory Nutrient (WLN), Lysine medium (LM) และ Yeast Peptone Dextrose agar (YPD) โดยจำนวนจุลินทรีย์ บน YPD 6.30 log CFU/ml และสูงสุด 8.2 log CFU/ml ในช่วงท้ายการหมักเหลือ 5.15 log CFU/ml ใน WLN และ LM มีแนวโน้มเหมือนกัน ในการจัดจำแนกระดับ Molecular ของ isolates ที่แยกได้จากกระบวนการผลิต Vino cotto โดยใช้วิธี PCR-RFLP บริเวณ 5.8s ITS rRNA แบ่งได้เป็น 4 กล่ม คือกลุ่ม I สัมพันธ์กับ *Saccharomyces cerevisiae* กลุ่ม II สัมพันธ์กับ *Candida apicola* กลุ่ม III สัมพันธ์กับ *Candida zemplinina* และกลุ่ม IV สัมพันธ์คกับ *Zygosaccharomyces bailii* และมีการยืนยันโดยทำ gene sequiencing บริเวณ D1/D2 ของ 26s rRNA gene เมื่อเปรียบเทียบฐานข้อมูลใน GenBank โดยความเหมือนที่ได้อยู่ในช่วง 99-100% ซึ่งยืนยันได้ว่ากลุ่ม I, II, III, IV เป็นไปตามที่รายงาน นอกจากนี้แล้วยังมีการศึกษาการเจริญที่ความเข้มข้นของกลูโคสต่าง(2, 20, 40 และ 60% w/v) และ ethanol (0, 8, 14 และ 20% v/v) โดยผลที่ได้มี 3 species ที่เป็น osmotolerant คือ *Candida zemplinina* , *Candida apicola* และ *Zygosaccharomyces bailii* เจริญได้เร็วที่ 20% glucose และเจริญได้ที่ 40% glucose ส่วนที่ 60% glucose มีแค่ *Candida zemplinina* และ *Candida apicola* เท่านั้นที่เจริญ และ *Saccharomyces cerevisiae* มีการเจริญ 3 รูปแบบ คือ type A, B และ C และดังที่คาดหมายไว้ *Saccharomyces cerevisiae* ทนต่อ ethanol ที่ 8% ethanol

Solieri *et al.* (2005)จัดจำแนกประชากรยีสต์ในกระบวนการหมักน้ำส้มสายชู(Traditional balsamic vinegar(TBV)การทดลองมีการวิเคราะห์บริเวณ ribosomal5.8S(5.8S rRNA)และบริเวณ Internal transcribed spacers 1และ 2 สามารถแยกได้ 133 สายพันธุ์ จากตัวอย่างองุ่นที่ผ่านการต้ม 17 ตัวอย่าง มียีสต์ต่างกัน 10 ชนิด 4 genera นอกจากนั้นยังยืนยันผลโดยการวิเคราะห์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rRNA ซึ่งส่วนมากเป็น genus *Zygosaccharomyces* พบ*Zygosaccharomyces bailii*41%ของตัวอย่างทั้งหมดตามด้วย *Saccharomyces cerevisiae, Zygosaccharomyces pseudorouxii* และ *Candida stellata* และมีบางสายพันธุ์อยู่ในกลุ่ม *Zygosaccharomyces mellis, Zygosaccharomyces bisporus, Zygosaccharomyces rouxii, Hanseniaspora valbyensis, Hanseniaspora osmophila* และ *Candida lactis-condens*

Stringini *et al.* (2009) ศึกษาประชากรยีสต์ประจำถิ่นระหว่างการ tapping และกระบวนการหมักไวน์ปาล์มจาก Cameroon การวิเคราะห์ความหลากหลายของยีสต์จะใช้วิธีที่ขึ้นกับสภาวะการเลี้ยงและไม่ขึ้นอยู่กับสภาวะการเลี้ยง ส่วนมากแยกลักษณะเด่นของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยใช้ primer ที่จำเพาะสำหรับ δ sequence และ minisatellites ของยีนที่ encod ผนังเซลล์ สามารถยืนยันโดยการที่พบปริมาณมากของยีสต์, Lactic acid bacteria และ acetic acis bacteria ระหว่างกระบวนการทำไวน์ปาล์ม ชนิดที่พบมากที่สุดคือ *Saccharomyces cerevisiae* ในระหว่างกระบวนการ tapping ไวน์ปาล์ม จะพบชนิดอื่น เช่น *Saccharomycodes ludwigii* และ *Zygosaccharomyces bailii* นอกจากนี้ยังวิเคราะห์โดย denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) พบ *Hanseniaspora uvarum, Candida parapsilopsis, Candida fermentati* และ *Pichia fermantans* ในการเปรียบเทียบหาความหลากหลายของยีสต์จะเปรียบลักษณะทาง Molecular ของ *S. Cereviae* ที่มีความใกล้ชิดในระหว่างความแตกต่างของการ tapping ได้ 15 biotype ที่แตกต่างกัน

Eliasson *et al.* (2001) ได้วิเคราะห์การทำให้อัตราส่วนของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเมทาบอลิซึมไซโลส ทั้ง 3 เหมาะสมจะช่วยให้ผลผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นหรือไม่ โดยการสร้างสายพันธุ์ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสต่อไซลิทอลดีไฮโดรจีเนสต่อไซลูโลสไคเนสในอัตราส่วนที่ต่างกัน 3 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ TMB 3002 ที่มีกิจกรรมไซลูโลสไคเนสตามธรรมชาติกัมีกิจกรรมของไซโลสรีดักเทสต่ำและไซลิทอลดีไฮโดรจีเนสสูงที่ได้จาการทรานสฟอร์เมชันของ *S. cerevisiae*

GPY55-15α ด้วนพลาดมิด pY7 สายพันธุ์ TMB 3003 ได้จากทรานสฟอร์เมชัน *S. cerevisiae* GPY55-15α ด้วนพลาดมิด pXDH ซึ่งเป็นพาหะชนิดที่มีเซนโทรเมียร์ (centromeric vector) ที่มี *XYL2* ไซลิทอลดีไฮโดรจิเนสจาก *P. stipitis* และพลาดมิด pXK ที่มียีน XKSI ที่กำหนดการสร้างไซลูโลสไคเนสจาก *S. cerevisiae* โดยสายพันธุ์ TMB 3003 นี้มีกิจกรรมของไซโลรีดักเทสสูง ไซลิทอลดีไฮโดรจิเนสต่ำ และมีกิจกรรมของไซลูโลสไคเนสเพิ่มจากธรรมชาตุและสายพันธุ์สุดท้ายคือ TMB 3004 ที่ได้จาการทรานสฟอร์เมชันของ *S. cerevisiae* GPY55-15α ด้วนพลาดมิด pY7 ซึ่งมีทั้งยีน *XYL1* ที่กำหนดการสร้างไซโลรีดักเทส ยีน *XYL2* และพลาดมิด pXK ทำให้สายพันธุ์ TMB 3004 มีกิจกรรมของไซลูโลสไคเนสเพิ่มขึ้น สำหรับยีน *XKSI* ที่กำหนดการสร้างไซลูโลสไคเนสแสดงออกภายใต้การควบคุมโพรโตเมอร์ *PGK1* ในทุกๆกรณี ในขณะที่ *XYL1* และ *XYL2* แสดงออกภายใต้โพรโตเมอร์ *ADH1* เมื่อต้องการให้มีการแสดงออกในระดับต่ำและภายใต้โพรโตเมอร์ *PGK1* ที่ต้องการแสดงออกในระดับสูง ในการศึกษเพื่อหาอัตราส่วนของเอนไซม์ ทั้ง 3 ชนิดที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการหมักเอทานอลจากไซโลสนั้นใช้ high-performance bioreactor ใช้กลูดคสสำหรับการผลิตชีวมวล และระหว่างระยะที่สองของการหมักซึ่งเป็นช่วงของการคำนวณใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ด้วยวิธีนี้หลักเลี่ยงอิทธิพลของออกซิเจน กลโคส และการสร้างชีวมวล จากการทำ simulation โดยข้อมูลอาศัยแบบจำลองจลน์ (Kinetic model) ชี้ว่าภายใต้สภาวะการจำลองง่ายๆความสัมพันธ์ของไซโลรีดักเทสต่อไซลิทอลดีไฮโดรจิเนสต่อไซลูโลสไคเนส ในอัตราส่วน 1:≥10:≥4 เหมาะสมที่สุดในการทำให้สร้างไซลิทอลระหว่างการใช้ไซโลสน้อยที่สุด

Pachal and Tavares (1990) ยีสต์ทนแรงดันออสโมซิสมีประโยชน์ในอุตสาหกรรมการหมักเอทานอลเพราะสามารถเจริญและหมักเอทานอลในน้ำตาลความเข้มข้นสูงๆ ซึ่งไม่เพียงแต่การลดการปนเปื้อนของเชื้ออื่นแต่ยังให้เอทานอลความเข้มข้นสูงซึ่งช่วยลดค่าใช้จ่ายในการกลั่น การปรับปรุงการหมักเอทานอลภายใต้แรงดันออสโมซิสทำโดยค่อยๆเติมสับสเทรตเป็นระยะๆเพื่อลดแรงดันออสโมซิสและทำให้ความมีชีวิตของเซลล์สูงขึ้น เช่น กรณีการทำ เฟด-แบตช์

Seki *et al.* (1983) การหมักเอทานอลมีอัตราการหมักสูงจะมีความร้อนเกิดขึ้นในอัตราที่สูง การหมักด้วยยีสต์ที่ใช้ทั่วไปซึ่งมักเป็นยีสต์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นความสามารถในการหมักเอทานอลจะลดลงอย่างมากเนื่องจากผลการยับยั้งของเอทานอลที่มากขึ้น

แนวทางการแก้ไขปัญหานี้อย่างหนึ่งคือการใช้ยีสต์ทนอุณหภูมิสูงที่เจริญและหมักเอทานอลได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ แต่ยังคงเจริญและหมักเอทานอลได้ถึงมีอุณหภูมิสูงขึ้น ประโยชน์ของการใช้ยีสต์ทนอุณหภูมิสูงสำหรับการผลิตเอทานอลในอุตสาหกรรมคือลดการใช้ระบบหล่อเย็นทำให้ค่าใช้จ่ายในส่วนนี้ลดลงเป็นผลให้ต้นทุนการผลิตลดลง นอกจากนั้นการหมักที่อุณหภูมิสูงยีสต์มักมีอัตราการหมักสูงทำให้สามารถผลิตเอทานอลได้เร็ว และยังช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนของเชื้ออื่นได้อีกด้วย

Van der Au Kuhle *et al.* (2001) รายงานยีสต์ที่ได้จากเบียร์ที่ผลิตจากข้าวฟ่างในอัฟริกาตะวันตก ซึ่งมีจำนวนมากกว่า 50 % มีลักษณะสรีรวิทยาต่างกับ *Saccharomyces cerevisiae* หรือสมาชิกอื่นในกลุ่ม sensus stricto เนื่องจากแอสซิมิเลทเฉพาะกลูโคส มอลโทส และเอทานอล แต่จากผลของ ITS-PCR, RFLP และ PFGE รวมทั้งลำดับเบสบริเวณ D1/D2 ของ 26s rDNA ชี้ชัดว่าโซเลทเหล่านั้นสัมพันธ์กับ *S. cerevisiae* โดยพบว่าไอโซเลทที่ตรวจสอบแสดงแบบรูปของโครโมโซมจาก PFGE มีลักษณะของ *S. cerevisiae* และมีขนาดของโครโมโซม 200-1,900 kb ไม่ว่าสายพันธุ์เหล่านั้นสามารถแอสซิมิเลทสารประกอบคาร์บอนได้มากหรือน้อยชนิด นอกจากนั้นพบ chromosome length polymophism ทั้งขนาดและจำนานแถบ โดยทุกไอโซเลทมีรูปแบบโครโมโซมที่แตกต่างกันแม้ว่าจะมีบางไอโซเลทที่ใกล้เคียงกัน