บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

ประวัติความเป็นมาของ *P. tannophilus*

Pachysolen ถูกค้นพบโดย นักวิทยาศาสตร์ชาวฝรั่งเศส 2 ท่าน คือ Jacques Boidin และ Joes Adzet ในปี คศ. 1957 และนำมันเข้าสู่ Agricullural Research Culture Collection ณ สถาบัน Northern Research Center เมือง Peoria มลรัฐ Illinoids สหรัฐอเมริกาโดยแยกได้จากสารละลายแทนนินสกัดมาจากไม้เกาลัด พบว่ามันสามารถเจริญเติบได้ในสารละลายที่ตกตะกอนโปรตีน พร้อมทั้งทำให้แบคทีเรียหยุดการเจริญเติบโต ซึ่งตอนนั้นเขาเรียกมันว่า "สิ่งประหลาด" (Boidin and Adzet ,1957)

ก่อนหน้านี้ Boidin และ Adzet ได้ทำการแยกเชื้อ ยีสต์และราคล้ายยีสต์ ไว้หลายชนิดจากแทนนิน ที่สกัดมาจากไม้ต่างๆ ช่วงสิบปีก่อน ทั้งสองอธิบาย ถึงยีสต์ 1 สกุล 2 สปีชีส์ใหม่ด้วยลักษณะ เฉพาะของมัน ซึ่งได้แก่ *P. tannophilus* และ *P. pelliculatus* ต่อมานักวิทยาศาสตร์ได้รวมยีสต์ทั้งคู่นี้เข้าเป็น specics เดียวกัน ด้วยลักษณะเฉพาะที่เหมือนกัน กล่าวคือ การงอก tube (ascophore ; ก้านชู ascus) จาก vegetative cell โดยผนังของเซลล์และ tube ที่งอกออกมาจากเซลล์ นี้จะหนามาก Kurtzman เรียกมันว่า thick-walled tube เป็นที่มาที่ทำให้ Boidin และ Adzet ตั้งชื่อยีสต์นี้ว่า Pachysolen อันหมายถึง งวงของช้าง นั่นเอง

ปัจจุบัน *P. tannophilus* จัดเป็นยีสต์แท้ ที่มีการจัดจำแนกไว้ดังนี้ (Lodder, 1974)

CLASS ASCOMYCETES
ORDER ENDOMYCETALES
SUBORDER SACCHAROMYCOIDES
FAMILY SACCHAROMYCETACEAE
GENUS PACHYSOLEN
SPECIES *Pachysolen tannophilus*

ลักษณะจากการจัดจำแนกก็คือ ไม่สร้าง mycelium อาจพบ pseudomycelium ได้บ้างเมื่อเลี้ยงในอาหาร สูตรชักนำการสร้างเส้นใย (Wikerham, 1961) สืบพันธุ์ได้ทั้งแบบมีเพศและไม่มี

เพศ (sexual and asexual reproduction แบบมีเพศโดยการสร้าง ascospores 2-4 spores บรรจุอยู่ในascusที่มีก้านชูเป็นแท่งตรงผนังหนาคล้ายงวงช้าง แบบไม่มีเพศโดยการแตกหน่อ (budding) ใช้น้ำตาลได้ทั้ง hexose และ pentose เป็นแหล่งคาร์บอน ใช้ไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน

ขอบผนังที่หนาของ ascophore สามารถหักเหแสงจากกล้องจุลทรรศน์ได้ ทำให้เมื่อส่องดู จะเห็นเป็นสีแดงเรื่อๆ ลักษณะเช่นนี้ สามารถใช้เป็นสิ่งจัดจำแนก *P. tannophilus* ได้เป็นอย่างดี โดยอาศัยช่วงคลื่นแสงที่หักเหออกมา หลังกระทบผนังเซลล์ ส่วนปลายของ tube จะขยายใหญ่ขึ้น เมื่อมันจะ form เป็นถุงผนังบางซึ่งก็คือ ascus ที่ใช้ในการบรรจุ ascospores โดยถุงจะแตกให้สปอร์หลุดออกไปเมื่อสปอร์โตเต็มที่ ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงเรียก tube ของมันนี้ว่า Cylindrical ascophore (ascophore รูปทรงกระบอก) จากการศึกษา tube ผนังหนาหรือ ascophore นี้ เป็นสิ่งที่ทำให้ Wickerham ซึ่งเป็น Culture Collection zygonomist เรียก Pachysolen ว่าเป็น a hitchiker

ปี คศ. 1961 เขาและ Burton กำลังศึกษาถึงวิวัฒนาการของยีสต์ในการสร้างสาร phosphomannan มีลักษณะเป็นยางคล้ายวุ้น (gelatineous gum) ทำให้ผนังมีความหนาผิดปกติ ถูกพบมาตั้งแต่ ปีค.ศ.1958 หลังจากค้นพบ *P. tannophilus* ของ Boidin และ Adzet 1 ปี จากงานวิจัย ของ Culture Collection ในการที่จะหาจุลินทรีย์ ที่สามารถผลิต gum ในระดับอุตสาหกรรม

Wickerham และ Burton มุ่งประเด็นไปยัง gum-producing yeasts ที่เกาะไปกับแมลงเต่าทองเปลือกไม้ (bark beatle) จากคุณสมบัติของการยึดเกาะของ phosphomannan มันจะถูกขับออกมาห่อหุ้มเซลล์ยีสต์ เพื่อยึดเซลล์ติดกับตัวเต่าทองในขณะที่มันขุดโพรงต้นไม้ ก็จะเป็นการนำยีสต์เข้าสู่ substrate sap ของต้นไม้นั้นด้วย มันเป็น symbiosisของสิ่งมีชีวิต 2 อย่าง แบบยั่งยืนและสอดคล้องกัน ยีสต์จะช่วยเก็บอาหารไว้ให้เต่าทองและตัวอ่อนของมันโดยการสร้างผนังไว้รอบ ๆโพรงที่มันเจาะซึ่งช่วยป้องกันการ ไหลท่วมของของเหลว จาก cellsap ของต้นไม้สู่ภายในโพรงที่เจาะไว้ได้อีกด้วย

และจากคุณสมบัติของการหักเหแสงได้ของ tube ชักนำให้ Wickerham คิดว่ามันเป็นสารจำพวกไขมัน ซึ่งมีคุณสมบัติในการกันน้ำ เขาพบว่าสารไขมันของส่วน tube มีสมบัติเป็น strongly hydrophobic surface ซึ่งยึดติดแน่นกับส่วน hydrophobic บนตัวเต่าทองช่วยปกป้องแมลงจากน้ำค้างหรือฝนได้เป็นอย่างดี ในการศึกษาต่อมา ถึงพวกยีสต์ที่ผลิตยางใหม่ (new gum) จาก 20 สปีชีส์ Wickerham สรุปได้ว่า ยีสต์ที่สามารถผลิต phosphomannan จะเป็นพวก primitive ทั้งหมด และจำเป็นต้องอาศัยอยู่บนต้นไม้สำหรับ *P. tannophilus* จะคล้ายกับสปีชีส์ที่เป็นอิสระมากกว่า

จากการศึกษาติดต่อกันถึง 4 ปี หลังจาก *P. tannophilus* ถูกนำเข้าสู่ Yeast Collection Wickerham จึงสรุปคุณสมบัติของมันออกมาได้ดังนี้

1.สามารถที่จะเจริญได้อย่างอิสระในสารละลาย ซึ่งสกัดจากไม้

2.สามารถอยู่ร่วมแบบ symbiosis กับแมลงเต่าทองเปลือกไม้

3.สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส (เหมือนกับยีสต์ทั่วๆไป) หรือน้ำตาล 5 carbons (Pentose) เป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะมีออกซิเจน

4.สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสในสภาวะที่ขาดออกซิเจน (Anaerobic conditions)

5.สามารถสร้าง phosphomannan ทั้งที่มันมีลักษณะแตกต่างจากยีสต์ที่ผลิต phospho-mannan ตามปกติ (คือไม่มีลักษณะที่เป็น primitive)

6.สร้างสปอร์ที่บริเวณส่วนปลายของ ascophore ลักษณะคล้ายงวงช้าง ซึ่งมีผนังหนาจนหักเหแสงจากกล้องจุลทรรศน์ได้ ทำให้ดูขอบมีสีแดงเรื่อ ๆ

ผลการค้นคว้าวิจัยในการใช้ *P. tannophilus* ผลิตเอทธานอลจากน้ำตาลไซโลส

Slininger และคณะ (1982) ทำการเลี้ยง *P. tannophilus* ใน fermenter เพื่อที่จะศึกษาถึงความสามารถ ในการผลิตเอธานอลของมันว่า จะมีศักยภาพเพียงพอในระดับอุตสาหกรรมหรือไม่ ผลจากการวิจัยโดยรวมพบว่า Pachysolen จะเจริญและสร้างเอทธานอลได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส มันต้องการออกซิเจน เพื่อใช้ในการเจริญแต่ไม่ใช่ในการสร้างเอทธานอล โดยการผลิตเอทธานอลนั้นจะเกิดขึ้นขณะเซลล์หยุดการเจริญเติบโต เมื่อเลี้ยง *P. tannophilus* ในสารละลายกรด pH 4.5 เติมแร่ธาตุไนโตรเจน และ 50-250 กรัม ของไซโลสต่อลิตร ผลก็คือ ทั้งการเจริญและการสร้างเอทธานอล มีค่าสูงสุดเมื่อเริ่มต้นด้วย การใช้น้ำตาลไซโลสที่มีความเข้มข้นไม่เกิน 50 กรัมต่อลิตร *P. tannophilus* ดูเหมือนจะถูกยับยั้ง จากความเข้มข้นของเอทธานอลที่มีมากเกินกว่า 20 กรัมต่อลิตรขึ้นไป อีกทั้งผลผลิตเอทธานอลของ *P. tannophilus* เป็นไปอย่างรวดเร็วและได้ปริมาณที่น่าพอใจ เป็นการคัดค้านถึงความเชื่อที่ว่า ยีสต์ไม่สามารถที่จะเปลี่ยนน้ำตาลเพนโตส (5-carbons sugar) ไปเป็นเอทธานอลได้

นั่นหมายถึงว่า 10-20 % ของวัสดุจากการเกษตรและกากของเสียจาก ขบวนการผลิตในโรงงานอุตสาหกรรมที่มีไซโลสเป็นองค์ประกอบอยู่ สามารถที่จะหมักได้โดยตรงเป็นเอทธนอล ซึ่ง *P. tannophilus* สามารถผลิตได้ในอัตรา 4 ถึง 5 แกลลอน ของเอทธานอลจาก 100 ปอนด์ของไซโลสและเอทธานอลที่ผลิตได้นี้ก็จะนำไปเป็นประโยชน์ทดแทนสารเคมีจากผลิตภัณฑ์ปิโตรเคมีต่างๆ ไม่ว่าจะใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรง หรือใช้ในอุตสาหกรรมทางเคมีเช่น ใช้เป็นตัวทำละลายสี ในอุตสาหกรรมผลิตสี ใช้ทำละลายตัวยาหรือเวชภัณฑ์ ในอุตสาหกรรมการผลิตยา ใช้เป็นยาฆ่า

เชื้อโดยตรง ใช้ร่วมในขบวนการเคมีผลิตพลาสติก สารเคลือบเงา ผงซักฟอก เครื่องสำอางค์ สารป้องกันการแข็งตัว (antifreezing) รวมทั้งใช้เป็น สารตั้งต้นในการผลิตสารต่าง ๆ ได้อีกมากมาย

จากรายงานเก่า ๆ พบว่า มี fermenting yeasts หลายชนิดที่เปลี่ยนไซโลสเป็นเอทธานอล ได้ (Gong et al., 1981a and Jeffries, 1981) แต่ในรายงานเหล่านี้ ยังบอกอีกว่า ยีสต์ที่ จะทำเช่นนั้นได้ ก็ต่อเมื่อใส่เอนไซม์ D-xylose isomerase เข้าไปเสียก่อน ต่อมานักวิทยาศาสตร์พบ ยีสต์และ mutants ของมันหลายชนิด ที่สามารถจะผลิตเอทธานอลจากไซโลส โดยตรง เริ่มต้นจาก *Candida tropicalis* รายงาน โดย Jeffries ในปีค.ศ.1981 แต่ผลผลิตที่ได้น้อยกว่า ผลผลิตอื่นๆ ซึ่งอยู่ในรูปของ ไซลิตอล แม้ในรายงานของ Gong และ Tsao ในปีค.ศ.1983 ที่ใช้สายพันธุ์ต่าง ๆ ของ *Candida sp.* มาทำการหมักน้ำตาลไซโลส ก็ได้ผลออก มาในทำนองเดียวกัน กล่าวคือปริมาณ ไซลิตอล จะเกิดขึ้นมากกว่าเอทธานอล เมื่อมีการเปลี่ยนมาใช้ *P. tannophilus* หมักน้ำตาลไซโลสเป็นเอทธานอลแทน กลับได้ผลเป็นที่น่าพอใจ ซึ่งตรงกับรายงาน Slininger (1982) ดังกล่าวข้างต้นดึงดูดให้นักวิทยาศาสตร์สนใจที่จะทำการทดลองเพื่อให้ได้ข้อมูลของยีสต์ตัวนี้มากขึ้น

ในปี 1982 Deverell ค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับ การผลิตเอทธานอลจากทรัพยากรป่าไม้ โดยสนใจในระดับ pilot plant มาไม่ต่ำกว่า 4 ปี หลักการที่ใช้ก็คือ ทำการย่อยสลายไม้เป็นสับสเตรท แล้วนำไปหมักต่อเป็นเอทธานอล กระบวนการย่อยสลายเป็นการใช้กรดซัลฟุริคเจือจางเป็นตัวย่อย สารที่ได้จากการย่อยสลายไม้จะเป็นส่วนผสมระหว่างน้ำตาล hexose กับ pentose แต่เฉพาะน้ำตาล hexose เท่านั้นที่จะถูกเปลี่ยนเป็นเอทธานอลจากการหมักโดยใช้ *Saccharomyces cerevisiae* ในการย่อยสลายไม้เนื้ออ่อนจำพวกสน เช่น *Pinus radiata* จะได้น้ำตาล hexose 87 % pentose 13 % ซึ่งน้ำตาล pentose ส่วนใหญ่จะเป็นไซโลสที่มีปริมาณเฉลี่ย 9 % เมื่อเทียบกับน้ำตาลที่ได้ทั้งหมด ในการย่อยสลายไม้เนื้อแข็ง อาทิ *Poulus tremoloides* จะได้น้ำตาลไซโลส ถึงประมาณ 30% จากปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ดังนั้นการรวมสารละลาย ทั้ง pentose และ hexose อยู่ด้วยกันก็เพื่อที่จะใช้ในการผลิตเป็นเอทธานอลให้ได้ปริมาณมากที่สุด

Deverell ใช้ *P. tannophilus* ผลิตเอทธานอล จาก Wood hydrolysates ผลที่ได้นั้นพบว่า *P. tannophilus* สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ แต่ปริมาณเอทธานอลและอัตราการผลิตของมันกับขึ้นอยู่กับการเพิ่มปริมาณอากาศ โดยมีรายงานก่อนหน้าของ Maleszka และคณะในปีเดียวกันนี้เอง (1982) ไว้ว่า ปริมาณเอทธานอล เพิ่มขึ้นอย่างเป็นปฏิภาคโดยตรงกับปริมาณอากาศที่มันได้รับ แต่ก็ให้อัตราสูงสุดเพียง 0.4 กรัมเอทธานอลต่อกรัมไซโลส รายงานนี้ได้จากการใช้เซลล์แบบ recycle เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลไซโลสอยู่ 2 % ภายใต้สภาวะจำกัดอากาศ จากสภาวะจริงของการทดลองพบว่าต่ำกว่าปริมาณเอทธานอล

จากทางทฤษฎีที่ควรเป็น คือ 0.51 กรัมเอทธานอลต่อกรัมไซโลส เนื่องมาจากการสร้างผลผลิตอื่นๆ อาทิ ไซลิตอล และ กรดอะซิติก ส่วนค่าpH ที่เหมาะสมต่อการหมักของยีสต์นี้จะเป็น 4.5 ตามรายงานของ Slininger และคณะ ในปีค.ศ. 1982

ในการหมักน้ำตาลจากสารละลายไม้ สำหรับน้ำตาลที่ ได้จากการย่อยไม้ *Pinus radiata* ถ้าเริ่มต้นการทดลองใช้ *P. tannophilus* หมักทั้งเฮกโซสและไซโลส จะไม่ทำให้ได้ปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ S. *cerevisiae* ที่เป็นเช่นนี้ เพราะว่าประสิทธิภาพในการใช้น้ำตาล เฮกโซสของ *P. tannophilus* นั้นต่ำกว่า แต่ปริมาณ เอทธานอลจะได้มากที่สุด ถ้าหมักด้วย S. *cerevisiae* และ *P. tannophilus* ในระบบเดียวกัน ขั้นแรกเฮกโซสจะถูกหมักโดย *S. cervisiae* ไปเป็นสารละลายเจือจางของเอทธานอลที่เรียกว่า เบียร์ ซึ่งยังคงมีน้ำตาลไซโลสและกาแลกโตสละลายอยู่ (เนื่องจาก S. *cerevisiae* ใช้น้ำตาลทั้ง 2 ชนิดนี้ไม่ได้) ขั้นต่อมา *P. tannophilus* จะใช้น้ำตาลที่เหลือในสารละลายหมักน้ำตาลต่อไป ทำให้ความเข้มข้นของเอทธานอลเพิ่มสูงขึ้น สำหรับสารละลายที่ได้จากการย่อยสลายไม้เนื้อแข็ง นิยมใช้การหมักแบบ single fermentation ทั้งเฮกโซสและไซโลสโดยใช้ *P. tannophilus* เพียงตัวเดียว

Deverell แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกทำการย่อยสลายไม้ *P. radiata* โดยใช้กรดซัลฟูริคเจือจาง ให้ได้ปริมาณ 220 ลิตร จะได้ ตัวอย่างซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาล 50 กรัมต่อลิตร กรองแล้วต้มที่ 135 องศาเซลเซียส นำมาเติม nutrients แล้วหมักสภาวะไร้อากาศที่ 30 องศาเซลเซียส ด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* 24 ชั่วโมง ปั่นแยกสารละลาย ที่มี 18 กรัมต่อลิตร เอทธานอลและ 8 กรัมต่อลิตร ที่ยังไม่ถูกใช้ ต่อมา inculate เชื้อ *P. tannophilus* เติมอาหารเสริมหมักที่ 35 องศาเซลเซียส 30 ชั่วโมง สภาวะไร้อากาศ

ขั้นตอนที่สอง ใช้สารละลายจากการย่อยสลายไม้ *Populus tremuloides* โดยวิธีเดียวกับขั้นตอนแรก แล้วนำสารละลายที่ได้ไปหมักต่อด้วย *P. tannophilus* เพียงอย่างเดียวที่ 30 องศาเซลเซียส 35 ชั่วโมง สภาวะไร้อากาศ

ผลการทดลองจากขั้นตอนแรกแสดงถึง การใช้น้ำตาลและการสร้างเอทธานอลโดย *P. tannophilus* พบว่า ไซโลสถูกใช้อย่างรวดเร็วถึง 82 % เมื่อเวลาผ่านไปเพียง 11 ชั่วโมง กาแลคโตสถูกใช้อย่างช้า ๆ ส่วนอะราบิโนสไม่ถูกใช้เลย ปริมาณเอทธานอลเพิ่มขึ้น 1.5 กรัมต่อลิตร หลังเวลาผ่านไป 30 ชั่วโมง โดยใช้น้ำตาลไป 4.6 กรัมต่อลิตร หรือเท่ากับอัตราการผลิตเอทธานอลเป็น 0.33 กรัมต่อกรัมน้ำตาล

ถึงแม้ว่า การเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสไปเป็นเอทธานอลโดย *P. tannophilus* จะช้ากว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ สภาวะที่เชื้อได้รับอากาศ แต่การสูญเสียเอทธานอลไปกับชีวมวลของมัน ก็ลดลงเช่นกัน นั่นหมายถึง ในสภาวะมีอากาศเชื้อจะใช้เอทธานอลเป็นแหล่งคาร์บอนอีกแหล่ง ถึงจะมี

น้ำตาลในสารละลายอยู่ด้วยแล้วก็ตาม (Maleszka and Schneider, 1982) ด้วยเหตุนี้ จึงใช้สภาวะจำกัดอากาศในการ ที่จะหมักน้ำตาลให้ได้ปริมาณเอทธานอลมากที่สุด

ปริมาณเอทธานอลที่ได้จากการหมักไซโลสและกาแลคโตสที่ได้จากการย่อยสลายไม้ *P. radiata* น้อยกว่าเพียงเล็กน้อย เมื่อเทียบกับ ปริมาณเอทธานอลที่ได้จาก การหมักอาหารสังเคราะห์ คือได้ 0.4 กรัมต่อกรัมน้ำตาลที่ใช้ และปริมาณเอทธานอลนี้ ยังมากกว่าถึง 9 % เมื่อเทียบกับ ปริมาณที่ได้รับจากการหมักเฮกโซสเพียงอย่างเดียวโดย *S. cerevisiae*

ผลการทดลองจากขั้นตอนที่สอง โดยการใช้สารละลายจากการย่อยสลายไม้ Populus ทั้งกลูโคสและแมนโนสกับอีก 9 % ของไซโลสถูกใช้หมดไปภายใน 35 ชั่วโมง การใช้กลูโคสเป็นไปอย่างรวดเร็วระหว่าง 11 ชั่วโมงแรก ขณะที่ไซโลสถูกใช้ไปเพียง 14 % อย่างไรก็ตาม อัตราการหมักไซโลสเพิ่มขึ้นหลัง 11 ชั่วโมง แม้ว่าปริมาณกลูโคสยังคงมีอยู่มาก แมนโนสถูกใช้ไปในทำนองเดียวกันกับกลูโคสแต่เป็นอัตราที่ช้ากว่า

การสร้างเอทธานอลและผลผลิตอื่นๆ ได้แก่ ไซลิตอล กับกรดอะซิตริก ภายหลัง 35 ชั่วโมง ปริมาณเอทธานอล 7.1 กรัมต่อลิตร ถูกสร้างจากการใช้น้ำตาล 94 % (16.5 กรัมต่อลิตร) เท่ากับ อัตราการผลิตเอทธานอลเป็น 0.34 กรัมต่อกรัมน้ำตาลหรือ 67 % เทียบค่ากับทางทฤษฎี (0.51กรัมเอทธานอลต่อกรัมน้ำตาล)

ในองค์ประกอบของสารละลายที่ได้จากการย่อยไม้ Populus ไม่ปรากฏว่ามีผลกระทบต่อประมาณของเอทธานอล จากการหมักอาหารสังเคราะห์ โดยใช้อัตราส่วนน้ำตาลแบบเดียวกับในสารละลายจากการย่อยไม้ ทำให้ได้ปริมาณเอทธานอลจากการคำนวณประมาณ 7 กรัมต่อลิตร หรือเทียบได้กับ 0.44 กรัมเอทธานอลต่อกรัมกลูโคสและแมนโนส และเท่ากับ 0.34 กรัมเอทธานอลต่อกรัมไซโลส

เช่นเดียวกันกับเอทธานอล ไซลิตอล 0.6 กรัมต่อลิตร และกรดอะซิติก 0.6 กรัมต่อลิตร ถูกสร้างขึ้นในระหว่างการหมัก การสร้าง ผลผลิตอื่นๆ โดยเฉพาะ ไซลิตอล เป็นปัญหาอย่างหนึ่ง ในการที่จะต้องหาทางปรับปรุงคุณสมบัติของเชื้อ *P. tannophilus* ต่อไป เพื่อที่จะเพิ่มอัตราการผลิต เอทธานอลให้มีมากขึ้น

ยีสต์ที่ผลิตเอทธานอลจากน้ำตาลไซโลส ที่ถูกคัดแยกได้มาตามปกติใช้ออกซิเจนเป็นตัวกระตุ้น การเพิ่มปริมาณผลผลิตเกือบทั้งหมด อย่างไรก็ตาม *P. tannophilus* แตกต่างออกไป เนื่องจากสามารถผลิตเอทธานอลได้ในภาชนะปิดผนึกโดยให้ปริมาณที่น่าเอาใจ ถึงแม้ว่าจะไม่สามารถเติบโตได้ในสภาวะที่ขาดออกซิเจนก็ตาม จากความพยายามภายใต้แนวทางการพัฒนาขบวนการด้านเศรษฐศาสตร์ เพื่อที่จะใช้ Single yeast ในการผลิตเอทธานอล จากทั้งน้ำตาล

เฮกโซส และ ไซโลส ที่ได้จากการย่อยสลายชีวมวลของพืช ทำให้เกิดความคิดที่จะปรับปรุงพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ

เหตุผลสำคัญที่เป็นองค์ประกอบที่นักวิทยาศาสตร์เลือก *P. tannophilus* ในการหมักเอทธานอลจากน้ำตาลไซโลส [Schneider, 1983] **ก็คือ**

1. บางองค์ประกอบที่จำกัดปริมาณเอทธานอล ที่สร้างจาก *P. tannophilus* นั้นไม่แตกต่างจากองค์ประกอบสามัญของยีสต์ที่หมักน้ำตาลไซโลสโดยทั่วไป

2. *P. tannophilus* เป็นหนึ่งในจำนวนจุลินทรีย์ ที่มีประสิทธิภาพสูงต่อการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลส ได้ปริมาณมากถึง 60-70 % เทียบค่าทางทฤษฎี จากการหมักภายใน 24 ชั่วโมง โดยใช้น้ำตาลไซโลส เพียง 2 % [Maleszka et al., 1982]

3. สามารถสร้างเอทธานอลได้ในภาชนะปิดผนึก

4. มีความเหมาะสมต่อวิธีการปรับปรุงสายพันธุ์ทางพันธุศาสตร์

Schneider (1983) ได้ทำการทดลองเพื่อหาศักยภาพการเปลี่ยนน้ำตาลเฮกโซสและไซโลส ไปเป็นเอทธานอลโดยใช้ *P. tannophilus* เปรียบเทียบกับมิวแทนต์ของมัน และเพื่อที่จะศึกษาลักษณะอันไม่พึงปรารถนาบางประการ Schneider เลี้ยง *P. tannophilus* ในส่วนผสมของน้ำตาลที่เลียนแบบ สารละลายไม้โดยใช้กรดซัลฟูริค ซึ่งแปรตามชนิดของเนื้อไม้ ถ้าได้จากไม้เนื้อแข็งจะมีไซโลสอยู่ประมาณ 60 % ถ้าได้จากไม้เนื้ออ่อนก็จะมีอยู่ประมาณ 20 % ในส่วนผสมทั้ง 2 แบบ ก็จะมีน้ำตาลชนิดต่าง ๆ อยู่ด้วย เช่น กลูโคส กาแลคโตส และอะราบิโนส เป็นต้น

ถึงแม้ว่าตามปกติ *P. tannophilus* จะเจริญได้ในกาแลคโตสและสามารถเปลี่ยนไปเป็นเอทธานอล แต่กาแลคโตสในส่วนผสม กลับถูกใช้ไปอย่างช้า ๆ เมื่อเทียบกับน้ำตาลเฮกโซสอื่น ๆ อัตราของการใช้น้ำตาลของมิวแทนต์ที่ถูกพัฒนาขึ้นมา จากสายพันธุ์เดิมนั้นรวดเร็วกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ wild type

ข้อมูลของปริมาณเอทธานอล จากส่วนผสมเลียนแบบสารละลายไม้โดยใช้กรดซัลฟูริค เปรียบเทียบกันระหว่างมิวแทนต์กับ wild type เก็บข้อมูลการทดลองแบบ recycle ทุกๆ 24 ชั่วโมง มิวแทนต์สามารถใช้น้ำตาล ได้ทั้ง กลูโคส, ไซโลส, แมนโนส และกาแลคโตส อย่างสมบูรณ์ ภายใน 20 ชั่วโมง ปริมาณเอทธานอลจากมิวแทนต์สูงกว่าที่ได้จาก wild type โดยได้ปริมาณมากถึง 90 % เทียบกับค่าทางทฤษฎี สำหรับส่วนผสมที่ได้จากไม้เนื้ออ่อนและ 83 % สำหรับที่ได้จากไม้เนื้อแข็งค่าที่แสดง ได้จากสภาวะที่มีออกซิเจนเข้าสู่media ปัจจัยสำคัญที่ชี้ให้เห็นถึงผลลัพท์ที่ได้ในระหว่าง cycle เมื่อภาชนะถูกปิดผนึกกันมิให้ออกซิเจนเข้าถึง เป็นส่วนหนึ่งของเหตุผล ที่ปริมาณผลผลิตไม่เพิ่มสูงขึ้นกว่านี้ เนื่องจากการสร้างผลผลิตอื่นๆ อาทิ กรดอะซิติก

ไซลิตอล และ อะราบินิตอล นั้นสูงกว่าและมากกว่า ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลอะราบิโนส อย่างไรก็ตาม อะราบินิตอล สามารถถูกสร้างเป็นผลผลิตอื่นๆ ถึงแม้มีเพียงน้ำตาลไซโลส อย่างเดียวใน media แต่เกิดในอัตราที่ต่ำ ถ้าถือว่าการสร้างกรดอะซิติก มีค่าเท่ากับจำนวนโมลของปริมาณเอทธานอลที่สูญเสียไปและการสร้าง ไซลิตอล มีค่าเท่ากับจำนวนโมลของน้ำตาลไซโลสที่สูญเสียไปจากการเปลี่ยนเป็นเอทธานอล ดังนั้นปริมาณของการสูญเสียจะมีค่าเป็น 8 % (หรือน้อยกว่า)

ผลจากการทดลอง ในส่วนผสมที่สร้างขึ้นนี้ ชี้ให้เห็นว่า *P. tannophilus* มีศักยภาพสูง มันสามารถผลิตเอทธานอลได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากส่วนผสมของน้ำตาล 4 ตัว คือ กลูโคส, ไซโลส , แมนโนสและกาแลคโตส ซึ่งมีอยู่ไม่ต่ำกว่า 90 % ของเนื้อไม้ของพืชที่มีอยู่ตามธรรมชาติ

ปัญหาบางประการในการใช้ *P. tannophilus* ในการผลิตเอทธานอลจากน้ำตาลไซโลส

ถึงแม้ว่าจะมีประสิทธภาพสูง ในการผลิตเอทธานอล จากน้ำตาลไซโลส แต่เชื้อ *P. tannophilus* ก็มีข้อเสียบางอย่าง ซึ่งแยกได้ดังนี้คือ

1. อัตราการเจริญ

ในกระบวนการผลิตทางการค้าต้องการให้จุลินทรีย์ที่ใช้นั้นเติบโตรวดเร็วกว่าจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในขบวนการแบบ recycle หรือแบบต่อเนื่อง อย่างไรก็ตาม *P. tannophilus* นั้นโตได้อย่างช้า ๆ บนอาหารผสมไซโลส และอัตราการเจริญขึ้นอยู่กับ ความเข้มข้นของน้ำตาลที่ให้ ตัวอย่างเช่นภายใต้สภาวะไร้อากาศระยะเวลาของการแบ่งตัวเป็น 4 ชั่วโมง ใน 1.6 % ไซโลส , 4.6 ชั่วโมง ใน 4 % ไซโลส และ 6.2 ชั่วโมงใน 7 % ไซโลส ตามลำดับ (Schneider et al, 1981) อย่างไรก็ตาม การเจริญดูเหมือนว่าจะช้ากว่า ภายใต้สภาวะ recycle ซึ่งให้ปริมาณของเอทธานอลสูงกว่า (Maleszka et al, 1981)

อัตราการเจริญระหว่าง recycle นั้น ยากต่อการวัด แต่คำนวณได้ว่าคงไม่น้อยกว่า 6 ชั่วโมง ของเวลาที่ใช้ในการแบ่งตัว การเจริญในภาวะเช่นนี้ บนอาหารผสมน้ำตาลไซโลส จะช้าเพราะถูกจำกัดปริมาณออกซิเจน อีกทั้ง การเพิ่มปริมาณชีวมวล ระหว่าง recycle นั้น ก็เป็นตัวจำกัดต่อการป้อนออกซิเจน ให้แก่เซลล์ด้วย

2. การใช้เอทธานอลเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมไปกับการใช้น้ำตาล

ถึงแม้ว่าอัตราการเจริญ จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ถ้าเพิ่มปริมาณอากาศ แต่ขณะเดียวกันปริมาณเอทธานอลก็จะผลิตลดลงด้วย ลักษณะเช่นนี้ เป็นเหมือนยีสต์อื่น ๆ ทั่วไป ในส่วนของ

P. tannophilus มันจะใช้เอทธานอลเป็นแหล่งผลิตคาร์บอน เพื่อสร้างชีวมวลของเซลล์ ถึงแม้ว่าจะให้น้ำตาลในอาหารแล้วก็ตาม (Maleszka et al., 1982)

ตัวอย่างเช่น กับ 2 %ไซโลส ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนภายใต้สภาวะมีอากาศที่ให้การเจริญและการสร้างเอทธานอลเกิดได้ในขณะเดียวกัน 9.8 % ของเอทธานอลที่ถูกสร้างขึ้นนำไปคำนวนประกอบเข้าด้วยกันในระดับ macromolecule อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะมีการผลิตเอทธานอลเป็นปริมาณมาก แต่ก็ดูเหมือนจะไม่ปรากฏอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ นั่นแสดงว่าเอทธานอลถูกออกซิไดซ์ ไปเป็น น้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ ขบวนการการใช้เอทาธานอลนี้เกี่ยวข้องโดยตรงกับปริมาณอากาศ อัตราของมันจะเพิ่มขึ้นถ้าเราให้ปริมาณอากาศเพิ่ม การใช้เอทธานอลจะถูกยับยั้งโดยชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลที่เติมลงไป

สำหรับอัตราการเจริญของยีสต์อื่น ๆ ซึ่งเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสไปเป็นเอทธานอล ขึ้นอยู่กับปริมาณออกซิเจน อาทิ *Candida tropicalis* (Jeffries, 1981) ปริมาณออกซิเจนที่เกี่ยวข้องกับการใช้เอทธานอล ขณะที่ใช้น้ำตาลไซโลสนั้นพบว่าพอ ๆ กับ *Candida sp.* อื่น ๆ และยีสต์อีกหลายชนิด

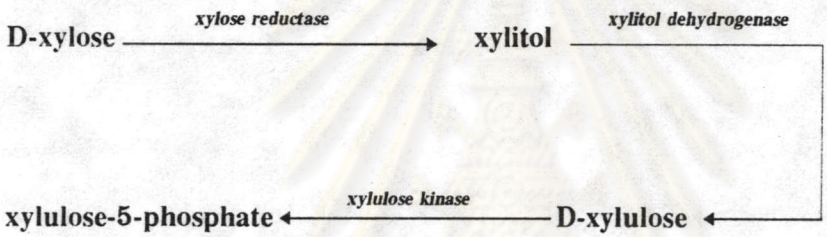
3. การสร้างผลผลิตอื่นๆ (by-products)

เมื่อปริมาณไซโลส เข้มข้นมากกว่า 2 % จะเกิดการเพิ่มอัตราส่วนของผลผลิตอื่นๆ ที่ถูกสร้างขึ้นรวมทั้งการลดลงของปริมาณเอทธานอล ผลผลิตอื่นๆสำคัญที่มีปริมาณสูงก็คือไซลิตอล ใน 4 %ไซโลส ระดับ ไซลิตอล จะมีประมาณ 6 % ที่ตรวจพบ ถึงแม้ว่า ไซลิตอล จะนำไปใช้ประโยชน์ได้ก็ตาม แต่มันก็ไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ใน อาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีเอทธานอลสำหรับผลผลิตอื่นๆ ที่มักพบอยู่ด้วย เช่น ไรบิตอล, อะราบิตอล, อะเซทาลดีไฮด์ และ กรดอะซิติก เป็นต้น การสร้างสาร เหล่านี้ จะเกิดขึ้นร่วมอยู่กับเอทธานอลในถังหมัก ปริมาณของผลผลิตอื่นๆ จะแปรผันตามสภาวะที่ใช้ในการทดลอง สำหรับ อะเซทาลดีไฮด์ จะมีระดับเพิ่มขึ้นเมื่อเชื้อถูกจำกัดปริมาณออกซิเจนให้น้อยลง

ลักษณะที่เพิ่มขึ้นมาอย่างหนึ่งของ *P. tannophilus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ปริมาณไซโลส สูง ๆ คือการจำกัดของปริมาณเอทธานอล ตัวอย่างเช่น ใน 500 มิลลิโมลของไซโลส (7.5 %) ความเข้มข้นสูงสุดของเอทธานอลที่สร้างขึ้นเป็น 293 มิลลิโมล (1.35 %) นับเป็นปริมาณที่ต่ำ เมื่อเทียบค่าตามทฤษฎี (3.38 %) ที่เป็นเช่นนี้สามารถอธิบายได้เพียงว่าเกิดจากการสร้างผลผลิตอื่นๆ ดังแสดงไว้ในปริมาณที่ต่ำนี้เกี่ยวข้องกับการเจริญบนอาหารผสมไซโลสไม่ใช่กลูโคส เพราะในอาหารผสมกลูโคส 10 % ค่าของเอทธานอลเพิ่มขึ้นเป็น 4.3 % ซึ่งเป็นค่าที่มากกว่าคือประมาณ 84 % เมื่อเทียบค่าตามทฤษฎี

การสร้าง ไซลิตอล ก็เป็นปัญหาสำคัญของยีสต์อื่น ๆ เช่นกัน (Gong and Tsao, 1983) นอกจากนั้นแล้วขณะที่ยีสต์อื่น ๆ สร้างเอทธานอล จาก ไซโลส และ ไซลูโลส มันก็ยังสร้าง ไซลิตอล ในระดับต่ำ ถึงแม้ว่าน้ำตาลทั้ง 2 ตัวสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับการเจริญแล้วก็ตาม ยังไม่มีใครอธิบายเหตุผลที่น่าสงสัยอันนี้ได้อย่างกระจ่างนัก

ในส่วนของความพยายาม ที่จะหาเหตุผลของ การสร้าง ไซล์ตอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการผลิตเอทธานอล จากการศึกษาทางพันธุศาสตร์ของวิถีกะตาบอลิซึม ในการใช้ไซโลส ถูกนำมาพิจารณา โดยถ้าให้ ไซลิตอล ถูกใช้เป็นอินเตอร์มีเดียทในวิถี ดังนั้น ขั้นตอนเริ่มต้นตามปกติควรเป็นดัง แผนภาพข้างล่าง



มิวแทนต์ 2 ตัว ถูกสร้างขึ้นเพื่อค้นหา xylitol dehydrogenase มันมีคุณสมบัติเฉพาะในด้านนี้ มิวแทนต์จะสะสมไซโลส แล้วเปลี่ยนเป็น ไซลิตอล อย่างไรก็ตาม มันไม่เจริญทั้งในไซโลส และ ไซลิตอล ขณะที่มันเจริญในไซลูโลส แล้วสร้างเอทธานอล เป็นเครื่องชี้ให้เห็นในทางพันธุศาสตร์ว่า ไซลิตอล นี้เป็นอินเตอร์มีเดียทของ ไซโลส catabolism นำไปสู่เหตุผลที่ไม่สามารถใช้มันไปในทางการหมัก เพื่ออธิบายข้อสงสัยข้างต้น

ถึงแม้ว่าเซลล์ที่สกัดจาก 1 ใน 2 ของมิวแทนต์ยังไม่ถูกตรวจสอบระดับของ xylitol dehydrogenase บางส่วนของ ไซลิตอล ถูกพบในในอาหารเลี้ยงเชื้อ ขณะที่ใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน การอธิบายสาเหตุเช่นนี้ อย่างหนึ่งก็คือ *P. tannophilus* สามารถสร้าง ไซลิตอล ขึ้นเองได้ในปฏิกริยาซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับไซโลส หรือไซลูโลส

Debus (1982) และคณะ ได้ทำการทดลองและพยายามอธิบายถึงการเกิด ไซลิตอล จากการหมักไซโลส ด้วย *P. tannophilus* สายพันธุ์ IFGB 0101 โดยกล่าวว่า ในสภาวะไร้อากาศ (ใช้กาซไนโตรเจนลงไปไล่อากาศออกจนหมด) ไซโลสจะถูกเปลี่ยนไปเป็น ไซลิตอล เอทธานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ ตามสมการ

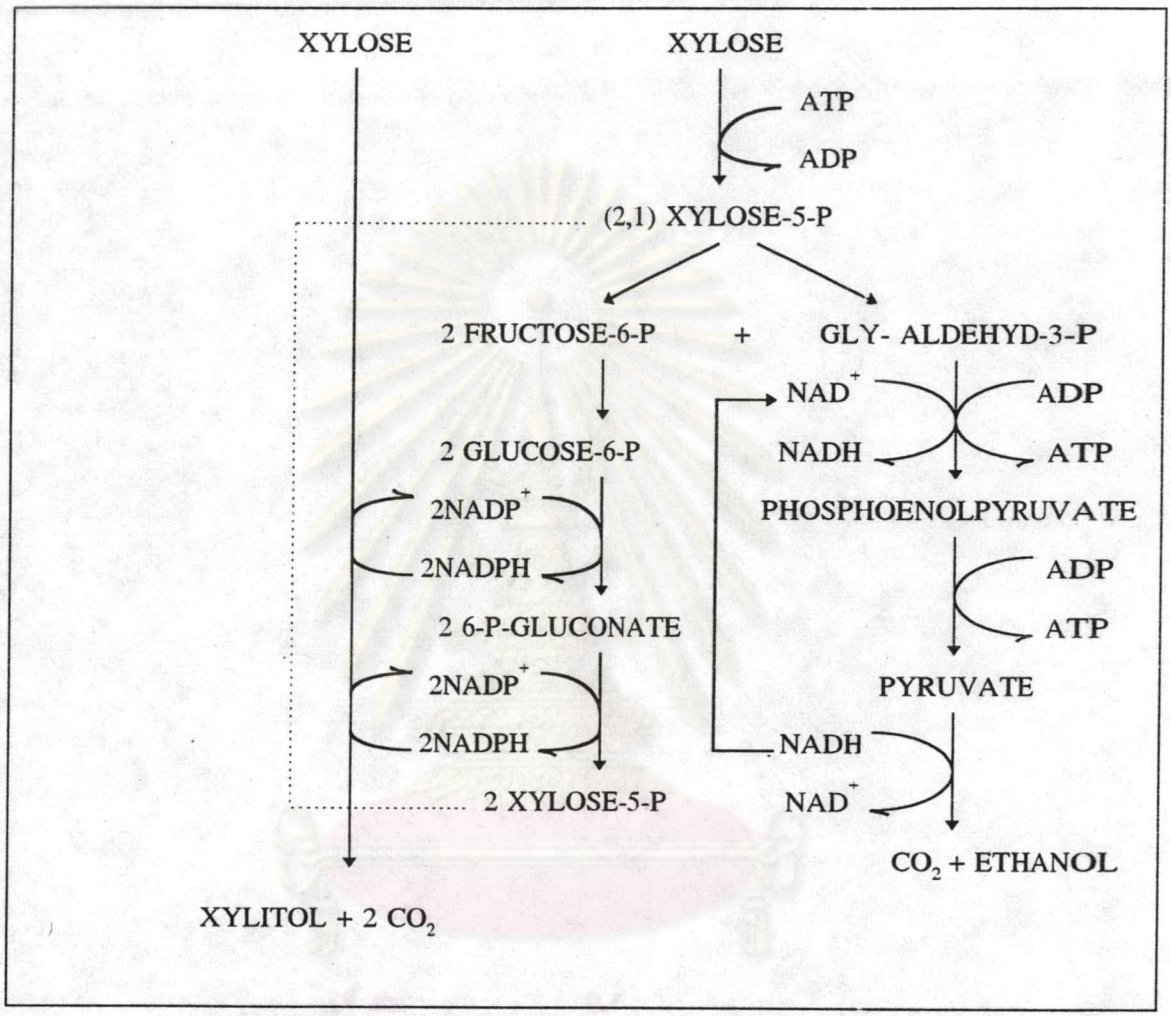
5 xylose + 2 H_2O ----------> 4 xyliyol + 1 Ethanol +1 CO_2

สำหรับไซโลสเมตาบอลิซึม อธิบายโดยใช้แผนภาพวิถีเพ็นโตสและฟอสโฟกลูโคเนตชั้นท์ (รูปที่ 2.1) จากแผนภาพไซโลสจะถูกไอโซเมอไรซ์และ ฟอสโฟรีเลท ไปเป็น xylose-5-P ซึ่งสามารถเปลี่ยนรูปต่อไปเป็น hexose-6-P และ glyceraldehyde-3-P ต่อเข้าสู่วิถีไกลโคไลซีส เปลี่ยนไปเป็นเอทธานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ hexose-6-P สองตัวถูกเปลี่ยนไปเป็น 6-P-gluconate ซึ่งจะถูกแยกเป็นสองคาร์บอนไดออกไซด์และสอง xylulose-5-P นำกลับไปใช้ในวิถีเพ็นโตสใหม่

เอนไซม์ glucose-6-P dehydrogenase และ 6-P-gluconate dehydrogenase ขึ้นอยู่กับ $NADP^+$ ของเซลล์และอิเลคตรอนจาก NADPH ถูกถ่ายทอดไปยังไซโลสเพื่อสร้าง ไซลิตอล ในฟอสโฟกลูโคเนตชั้นท์ จึงไม่สามารถสร้าง ATP ส่วนในวิถีไกลโคไลซิสดูเหมือนว่าจะได้ 1 ATP ต่อ 5 โมเลกุลไซโลส อาจเป็นเหตุผลนี้ที่เกี่ยวข้องการการเจริญเติบโตได้ช้าของ *P. tannophilus* ภายใต้สภาวะไร้อากาศ (0.002 V.V.M.) ปริมาณเอทธานอลที่ได้จากการหมักดูเหมือนจะเพิ่มมากขึ้น โดยเปลี่ยนมาจาก ไซลิตอล สามารถคำนวณออกมาได้ว่า ภายใต้สภาวะจำกัดอากาศปริมาณ 70 % ของไซโลส ถูกเมตาบอไรซ์ไปตามแผนภาพที่ 2.1 อีก 30 % ที่เหลือใช้ไปในไกลโคไลซีสและการหายใจ อาจสรุปได้ว่าปริมาณ ไซลิตอล ที่ปรากฏขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะไร้อากาศไม่ได้เป็นสารหลักของการเมตาบอไรซ์ขั้นต้น จากไซโลสไปเป็น xyulose-5-P เหมือนในแผนภาพที่แสดงถึงการแยกอิเลคตรอนเข้าสู่วิถีฟอสโฟกลูโคเนท ออกไปเป็นส่วนเฉพาะจากวิถีไกลโคไลซีส

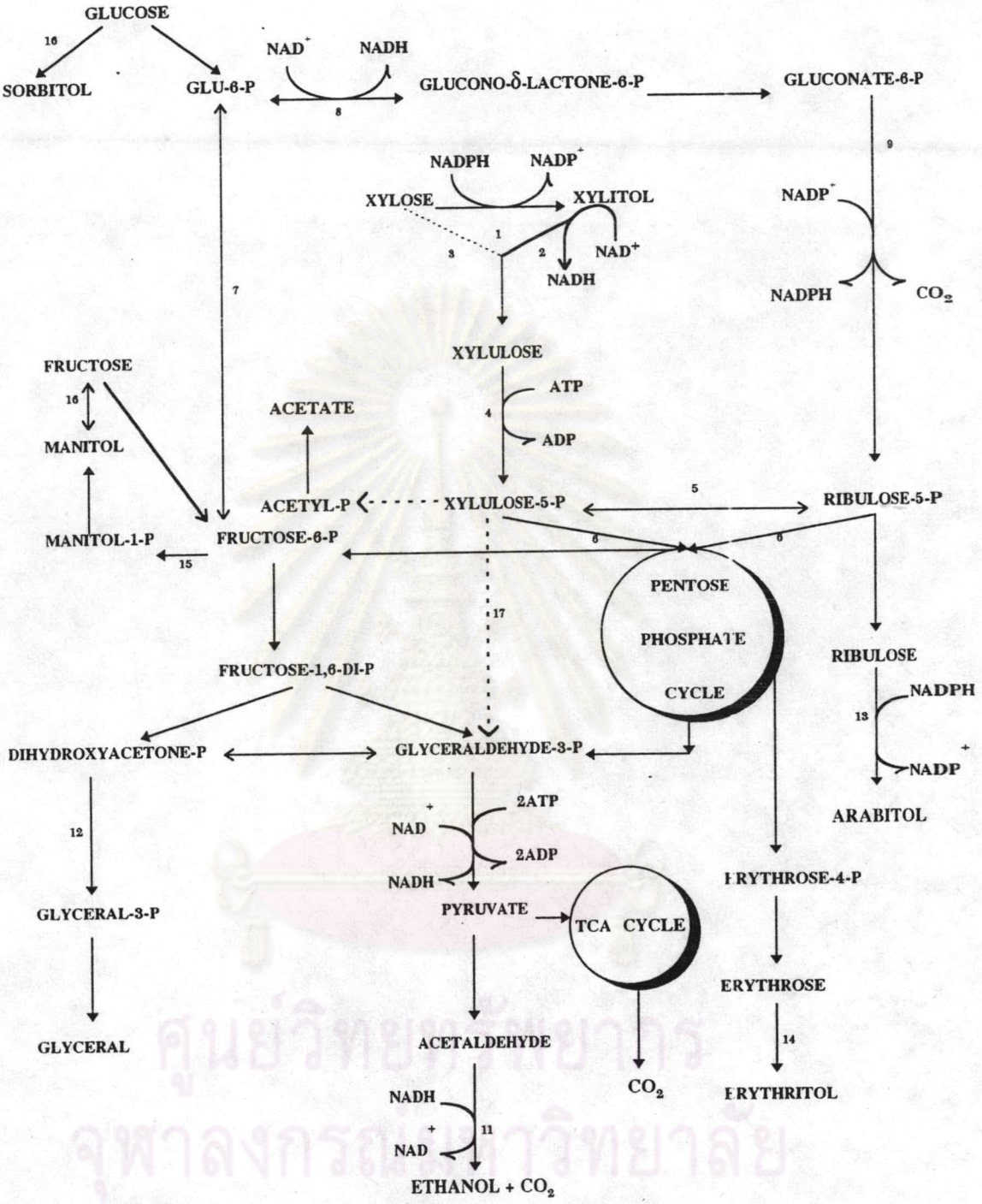
ปริมาณเอทธานอลทางทฤษฎี

ในยีสต์ การรีดิวซ์ไซโลส ไปเป็น ไซลิตอล นั้นถูกคะตะไลซ์ด้วย NADPH ซึ่งขึ้นอยู่กับการทำงานของเอนไซม์ xylose reductase ที่เชื่อกันว่าเกี่ยวเนื่องในขั้นตอนเมตาบอริซึมของไซโลส ด้วยวิธีนี้ ไซลิตอล ถูกสร้างขึ้นจากการออกซิไดซ์ไซโลส ไปเป็น xylulose-5-p อันเป็นอินเตอร์มีเดียทตัวสำคัญ ซึ่งอธิบายกลไกของมันจากแผนภาพในรูปที่ 2.2 (Gong and Tsao, 1983) $NADP^+$ ที่ได้จากการรีดิวซ์ไซโลส สามารถที่จะส่งต่อไปออกซิไดซ์ glucose-6-P เป็น ribulose-5-P สองโมลของ NADPH และ หนึ่งโมลของคาร์บอนไดออกไซด์จะถูกสร้างขึ้นด้วยวิธีนี้ สำหรับทุกโมลของไซโลส ที่ถูกเมตาบอไรซ์ผ่านวิถีเพ็นโตสและการออกซิไดซ์ย่อยลำดับขั้นของเฮกโซสฟอสเฟตก็จะเกิด $NADP^+$ ซึ่งจะถูกเปลี่ยนไปเป็น NADPH ในการรีดิวซ์ 10 โมลของไซโลสไปเป็น ไซลิตอล ตามรูปที่ 2.2 และจากวิถีเมตาบอลิซึม ประมาณ 91 % ของปริมาณเอทธานอล ตามทฤษฎีที่คาดหวังได้เมื่อเปรียบเทียบกับเอทธานอล ที่จะได้จาก glucose หรือ xylulose ตามสมการ



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2.1 เมตาบอลิซึมไซโลสของ *P. tannophilus* เสนอโดย Dieter Debus และคณะ [1983]



1. xylose reductase 2. xylitol dehydrogenase 3.xylose isomerase 4.xylulosekinase 5 .phosphoketopento-pimerase 6. transaldolase and transketolase 7.phosphohexoisomerase 8.glucose-6-phosphatedehydro-genase phosphogluconate dehydrogenase 10. aldolase11. alcoholdehydrogenase12.glycerol-6-phosphate dehydrogenase 13. arabitol dehydrogenase 14.erythritol dehydrogenase 15. mannito-1-phosphate oxidoreductase 16. polyol dehydrogenase 17. xylulose-5-phosephate phosphoketolase .

รูปที่ 2.2 เมตาบอลิซึมไซโลสของ *P. tannophilus* เสนอโดย Gong และ Tsao [1983]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1 glucose ----------> 2 ethanol + 2 CO_2

3 xylulose ----------> 5 ethanol + 5 CO_2

ซึ่งเมื่อคำนวณจะได้ค่าประมาณ 0.51 กรัมเอทธานอลต่อกรัมไซโลส

ผลงานการปรับปรุงสายพันธุ์ของ *P. tannophilus* โดยใช้แสงอัลทราไวโอเลต

ตั้งแต่การใช้เอนไซม์ไซโลสไอไซเมอเรส เพื่อใช้ในการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสจากชีวมวลไปเป็นเอทธานอลในการหมักแบบ isomerization มีราคาแพงมากขึ้นอีกทั้ง การหมักแบบนี้ก็ได้ผลไม่ดีนัก ดังนั้น การเลือกใช้ยีสต์หรือมิวแทนต์ของมัน มาใช้ในการเปลี่ยนไซโลสเป็นเอทธานอลโดยตรงจึงมีบทบาทมากขึ้นทำให้ลดต้นทุนลง การปรับปรุงสายพันธุ์โดยการสร้างมิวแตนท์ของเชื้อให้มีคุณสมบัติดีขึ้น อาทิ การทนต่อเอทธานอล การไม่สร้างผลผลิตอื่นๆ เช่น ไซลิตอล ความสามารถที่จะใช้น้ำตาลต่างๆ ที่มีอยู่ในสารละลายของการย่อยสลายไม้ได้ดีขึ้นเป็นต้น มักนิยมใช้แสง UV ในการปรับปรุงสายพันธุ์ เนื่องจากรวดเร็วและประหยัดค่าใช้จ่ายมากกว่าวิธีอื่น ๆ

Mc Cracken และ Gong (1983) ทำการสร้างมิวแทนต์ของยีสต์ *Candida sp.* จากการชักนำด้วยแสง UV แล้วก็นำไปเลี้ยงในอาหารซึ่งมีไซโลส และ ไซลิตอล คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติในการหมักไซโลสได้สูงขึ้น ซึ่งพบว่าสายพันธุ์ของมิวแทนต์ที่มีลักษณะเช่นนี้ จะมีระดับของเอนไซม์ xylitol dehydrogenase และ xylulose kinase สูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่

Jeffries (1989) สร้างมิวแทนต์ของ *P. tannophilus* สายพันธุ์ NRRL Y-2460 โดยใช้แสงอัลทราไวโอเลตในสภาวะที่ทำให้เชื้อมีชีวิตเหลือรอดอยู่เพียง 1 % นำไปเลี้ยง ในอาหารเหลวซึ่งมีส่วนผสมของยูเรียและไนเตรต แล้วนำแต่ละ culture มาถ่ายเลี้ยงให้วุ้นอาหารซึ่งผสมยูเรียและไนเตรตเช่นกัน ทำให้เกิดความแตกต่างของมิวแตนท์ขึ้น 4 ชนิด แล้วนำมิวแตนท์เหล่านี้มาเลี้ยงในวุ้นอาหารผสม ไซลิตอล ทำการวัดขนาดและอัตราเร็วในการเจริญของโคโลนีที่เกิดขึ้นซึ่งคัดแยกได้ 24 สายพันธุ์ไปทำการหมักหมักไซโลสและกลูโคส ในสภาวะมีอากาศหรือไร้อากาศ พบว่า 2 สายพันธุ์ ที่เจริญได้ช้าที่สุดในวุ้นอาหารผสมยูเรียก็จะสร้างเอทธานอลจากไซโลส ได้ช้าที่สุดเช่นกันแต่ 7 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงในอาหารเหลวและวุ้นอาหารที่ผสมไนเตรตที่เจริญเร็วที่สุด กลับไม่สร้างเอทธานอลได้เร็วที่สุดด้วย 6 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหารวุ้นอาหารผสมไนเตรตที่เหลือมีเพียง 3 สายพันธุ์ ให้อัตราการหมักกลูโคสสูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ 6 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวผสมไนเตรตและวุ้นอาหารผสมยูเรียให้อัตราการหมักกลูโคสและไซโลสสูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ แต่มีการเจริญเติบโตช้ากว่า ส่วนอีก 6 สายพันธุ์ที่เหลือซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลว ผสมยูเรียและวุ้น

อาหารผสมไนเตรตนั้นเจริญได้เร็วกว่าสายพันธุ์เดิมและมีอัตราการสร้างเอทธานอลจากไซโลสในสภาวะมีอากาศได้สูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่แต่อัตราการสร้างเอทธานอลในสภาวะไร้อากาศกลับต่ำกว่า

ในปีค.ศ.1989 du Preez และคณะ ได้สร้าง D-xylose mutants ของ *P. tannophilus* NRRL Y-2460 จากการชักนำด้วยแสงอัลทราไวโอเลตเช่นกัน ทำการคัดแยกโดยดูจากเชื้อที่เจริญได้ไม่ดีในอาหารผสมไซโลส (xylose negative mutants) แต่เจริญได้ดีในอาหารผสม ไซลิตอล และกลูโคส นำเซลล์มาตรวจสอบพบว่าเป็นมิวแทนต์ที่มี activity ของ xylose reductase ต่ำลงเนื่องจากใช้ $NADP^+$ เป็นโคแฟกเตอร์ แต่ไม่ได้ใช้ร่วมกับ NAD^+ ขณะที่สายพันธุ์พ่อแม่จะใช้โคแฟคเตอร์ NAD^+ และ $NADP^+$ ร่วมกันเป็นตัวรับอิเลคตรอนคนละคู่จาก xylose reductase โดย $NADP^+$ จะส่งอิเลคตรอน เข้าสู่วิถีเพนโตสส่วน NAD^+ จะส่งอิเลคตรอนเข้าสู่ลูกโซ่การหายใจ และเปลี่ยน ไซลิตอล ไปเป็น xylulose มิวแทนต์ที่คัดเลือก จะมียีนควบคุมการทำงานของโคแฟคเตอร์ $NADP^+$ เสียไป ทำให้ D-xylose ส่งอิเลคตรอนไปยัง NAD^+ ได้อย่างเดียวมันจึงเจริญในไซโลสไม่ดีแต่เจริญใน ไซลิตอล ได้ดีและเนื่องจาก NAD^+ ส่งอิเลคตรอนไปให้ออกซิเจนในลูกโซ่การหายใจ ดังนั้น มิวแทนท์จึงมีการตอบสนองต่อการเปลี่ยนสภาวะการให้ออกซิเจนน้อยกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ อย่างไรก็ตาม น้ำตาลไซโลส ถูกใช้โดยมิวแทนต์อย่างมีประสิทธิภาพ ขณะที่สร้างผลผลิตอื่นๆ ออกมาน้อยกว่า ไซลิตอล ยังคงถูกสร้างขึ้นบ้างเมื่อสภาวะการให้อากาศลดลง แต่อย่างไรก็ดี มันสร้าง เอทธานอลขึ้นในปริมาณที่สูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ แต่ข้อเสียก็คือมันเจริญได้อย่างช้า ๆ ขณะเลี้ยงในอาหารที่ใช้น้ำตาลไซโลส เป็นแหล่งคาร์บอน

James และคณะ (1989) รายงานเกี่ยวกับมิวแทนต์ที่บกพร่องในการเจริญในอาหารผสมไซโลส แต่เจริญได้ดีในอาหารผสมกลูโคสโดยไม่มีความสามารถต่อการเปลี่ยนไซโลสเป็นเอทธานอล ชักนำด้วยแสงอัลทราไวโอเลต 14 สายพันธุ์ ถูกคัดเลือกออกมาพบว่าขาดยีนที่สำคัญไป 9 ตำแหน่ง ข้อมูลยังชี้ให้เห็นอีกว่าตำแหน่งอื่น ๆ ยังคงสมบูรณ์ มิวแทนต์ทั้งหมด แสดงผลในแง่การตอบสนองต่อสภาวะสารอาหาร โดยมีการกำหนดทางสายพันธุ์เป็นพื้นฐาน มิวแทนต์หลายตัว ที่เจริญได้ไม่ดีนัก พบว่าจะขาดอินเตอร์มิเดียทอย่างน้อย 1 ตัว ในวัฏจักรของเครบส์ อาทิ succiante , alfa-ketoglutarate หรือสารบางตัว ที่ได้จากเมตาบอไรท์ของวัฏจักร อาทิ เอทธานอล หรือกลีเซอรอล เมื่อนำมาวิเคราะห์ทางชีวเคมีพบว่า เอนไซม์ xylose reductase , xylitol dehydrogenase และ xylulose kinase แสดง activity หนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งตัวใน 12 มิวแทนต์ อย่างไรก็ตาม อาศัยการรีดิวซ์ที่รุนแรง ของ activity จากแต่ละเอนไซม์ พบว่า xylitol dehydrogenase จากมิวแทนต์ มีตำแหน่งการทำงานของยีนอยู่ 3 ตำแหน่ง ขณะที่ D-xylose reductase จะมี ตำแหน่งที่แตกต่างออกไปซึ่งทุกตำแหน่งไม่เกี่ยวข้องกับ xylose reductase เลย

Mc Cracken และ Bothast (1989) พบว่า xylose reductase ที่สกัดได้จากอาหารที่ใช้เลี้ยง *P. tannophilus* ในสภาวะไร้อากาศ จะมี 2 รูปแบบจริง ๆ คือรูปแบบที่ใช้โคแฟคเตอร์ทั้ง NAD^+ และ $NADP^+$ จะมี isoelectric point 5.1 (P.I. 5.1) ส่วนรูปแบบที่ใช้โคแฟคเตอร์ $NADP^+$ อย่างเดียว จะมี P.I. 6.4 ทั้ง 2 รูปแบบ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 36,000 ดาลตัน

P. tannophilus เป็นตัวยีสต์ตัวใหม่ที่มีบทบาทสำคัญต่อการนำมาใช้หมักน้ำตาลไซโลส ที่มีคุณสมบัติ เหนือกว่ายีสต์หมักน้ำตาลไซโลสตัวอื่น ๆ แต่ข้อบกพร่องบางอย่างที่กล่าวไว้แล้วนั้น อาทิ การสร้างเอทธานอลในอัตราที่ต่ำกว่า เมื่อเทียบกับ*S. cerevisiae* การสร้างผลผลิตอื่นๆ รวมทั้ง การสร้างเอทธานอลอย่างมีขีดจำกัดตามสภาวะอากาศที่ให้ เป็นสิ่งท้าทายทางด้านวิทยาศาสตร์ ต่อ การแก้ปัญหา การสร้างสมมุติฐาน การทดลองและนำไปประยุกต์ใช้เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่ดีที่สุดต่อการนำมาใช้ในวงการอุตสาหกรรม การผลิตเอทธานอล ต่อไป.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย