บทที่ 1

บทนำ

Hemicellulose เป็นหนึ่งขององค์ประกอบหลัก ที่มีอยู่ในผนังเซลล์ของพืชโดยมีประมาณถึง 40 %ของ ชีวมวลพืช (Plant biomass) ที่ได้จากวัสดุการเกษตรและไม้เนื้อแข็ง (Freitas et al., 1977 and Goldstein, 1981) ซึ่งเมื่อนำมาย่อยสลายแล้วจะได้ของผสมคาร์โบไฮเดรต มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลกลูโคสกับไซโลสในอัตราส่วนประมาณ 2:1 (ตารางที่ 1) จุลินทรีย์ส่วนใหญ่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสเพื่อการเจริญเติบโตและสร้างผลผลิต (products) ต่าง ๆ ซึ่งก็มีการผลิตสารเคมีจากการย่อยสลายชีวมวลพืช เป็นน้ำตาลเชิงอุตสาหรรม โดยจุลินทรีย์เหล่านี้มาช้านาน ที่รู้จักดีที่สุดก็คือ อุตสาหกรรมการหมัก เหล้า เบียร์ โดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* แต่ยีสต์ตัวนี้มีความสามารถผลิตเอทธานอล ได้จากกลูโคส เท่านั้น (Schneider et al., 1981) ดังนั้นสิ่งที่นักวิทยาศาสตร์ เริ่มให้ความสนใจก็คือการผลิตสารเคมี โดยใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถ ในการใช้น้ำตาลไซโลส (D-xylose) ซึ่งนับว่ามีปริมาณมหาศาลรองจากกลูโคสดังกล่าวข้างต้น แม้ว่าแบคทีเรียและราหลายชนิด สามารถที่จะเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสไปเป็นสารต่าง ๆได้ อย่างไรก็ตาม ปริมาณสารที่ได้เหล่านี้ โดยเฉพาะเอทธานอลนั้นค่อนข้างต่ำ จากความพยายามแยกสายพันธุ์ของยีสต์ที่หมักไซโลสออกมากว่าครึ่งจากยีสต์ 434 สายพันธุ์ (Barnett et al., 1979) ส่วนใหญ่สามารถหมักน้ำตาลไซโลส ในสภาวะ aerobic conditions แล้วได้ผลผลิตเป็น ไซลิตอล ออกมามากกว่าเอทธานอล

ตามปกติยีสต์โดยทั่วไปสามารถที่จะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคส1 โมเลกุลไปเป็น 2 โมเลกุลของคาร์บอนไดออกไซด์กับ 2 โมเลกุลของเอทธานอล โดยมีด้วยจำนวนอะตอม 6 คาร์บอน 16 ไฮโดรเจน และ 6 ออกซิเจน เท่ากันทั้ง 2 ข้าง สมการดังนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

$$1\ C_6H_{12}O_6 \text{--------} > 2\ CO_2 + 2\ C_2H_5OH$$

แต่น้ำตาลไซโลส มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_5H_{12}O_5$ จะไม่สามารถเปลี่ยนแปลงไปตามสมการนี้ได้ (Kurtzman, 1982) Slininger กล่าวถึงยีสต์ที่จะเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสไปเป็นเอทธานอลว่า โมเลกุลของไซโลส จะต้องถูกเปลี่ยนเป็น 1.6666 โมเลกุลของ CO_2 กับ เอทธานอล อธิบายดังสมการข้างล่างนี้

NEUTRAL CARBOHYDRATE OF AGRICULTURAL RESIDUE AND WOOD

MATERIAL	PERCENT (%, W/V)		
	GLUCOSE	XYLOSE	OTHERS
AGRICULTURL RESIDUES			
CORN			
Leaves	58	35	7
Stalks	61	32	7
Husks	54	36	10
Cobs	54	40	6
Fibers	67	29	4
SUGARCANE BAGASSE	60	32	8
SUN FLOWER STALKS	70	26	4
WHEAT STRAW	60	32	8
HARD WOOD			
Alder *(A. incana)*	67	27	6
Ash *(F. excelsior)*	60	32	8
Beech *(F. silvatica)*	65	28	7
Birch *(B. verricosa)*	58.5	39	2.5
Elm *(U. scraba)*	67.5	27	5.5
Linden (T. cordata)	58.5	34.5	7
Maple *(A. platanoides)*	60.5	32.5	7
Oak *(O. excelsior)*	68.5	26	5.5
Popular *(P. tremular)*	64.5	30	5.5
Willow *(S. alba)*	67.5	26	6.5
SOFTWOOD			
Larch *(L. sibirica)*	63	9	28
Spruce *(P. excelsa)*	65.5	9	25.5
White Pine *(P. silvestris)*	65	13	21.5

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของน้ำตาลในเนื้อไม้และวัสดุการเกษตรบางชนิด (Gong and Tsao, 1983)

จาก $C_5H_{12}O_5$ -------> X CO_2 + 2X C_2H_5OH

เปรียบเทียบสมการกับปริมาณคาร์บอน ;

5C = XC + 2XC = 3XC

เพราะฉะนั้น X = 5/3 = 1.6666

หรืออาจกล่าวอีกอย่างว่ายีสต์นั้นจะต้องสามารถเปลี่ยนน้ำตาลไซโลส ทุก ๆ 3 โมเลกุล ไปเป็น 5 โมเลกุล ของ คาร์บอนไดออกไซด์ กับ เอทธานอล ดังนี้

3 $C_5H_{12}O_5$ --------> 5 CO_2 + 5 C_2H_5OH

จากการค้นคว้าวิจัยของ Schneider ในปี 1980 ก็ค้นพบยีสต์ตัวสำคัญ คือ *Pachysolen tannophilus* ซึ่งเป็นยีสต์หมักไซโลส (xylose-fermenting yeast) ที่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสเป็นเอทธานอล ได้ในประมาณสูงและรวดเร็ว จนทำให้นักวิทยาศาสตร์มุ่งความสนใจเกี่ยวกับยีสต์ตัวนี้กันมากขึ้นในปัจจุบัน อย่างไรก็ตาม ปริมาณเอทธานอลที่ได้นี้เมื่อเทียบกับ ปริมาณเอทธานอลที่ได้จากการหมักน้ำตาลกลูโคสโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* ยังห่างไกลกันอยู่มาก เนื่องจากปัญหาการสร้าง by-produts บางอย่าง อาทิ ไซลิตอล และ กรดอะซิติก นักวิทยาศาสตร์เชื่อว่า น่าจะมีวิธีการปรับปรุงสายพันธุ์ ของยีสต์สายพันธุ์นี้ เพื่อที่จะหามิวแทนต์ ที่สามารถให้ผลผลิตเอทธานอลจากการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสได้ เท่าหรือใกล้เคียงกับปริมาณเอทธานอล ที่ได้จากการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคส โดยใช้ยีสต์หมักน้ำตาลกลูโคส (glucose fermenting yeasts) สำหรับวิทยานิพนธ์นี้เป็นการสร้างมิวแทนต์จาก *P. tannophilus* สายพันธุ์ NRRL Y-2460 ที่ใช้เป็นสายพันธุ์ wild type โดยการชักนำด้วยแสงอัลทราไวโอเลต เก็บรวบรวมลักษณะทางฟี-โนไทป์ของมิวแทนต์ซึ่งพิจารณาจากความสามารถ ในการเจริญบนอาหารคัดเลือก (Selective media) ที่ใช้เป็นตำหนิ (marker) รวมทั้งลักษณะและขนาดของโคโลนี คัดเลือกเชื้อที่มีความ สามารถในการหมักน้ำตาลไซโลส เปรียบเทียบกับ wild type แล้วนำไปทำการหมักในสภาวะจำกัดอากาศเพื่อที่อาจจะได้สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิต เอธานอลได้สูงกว่าสายพันธุ์ wild type เดิม อันจะนำไปใช้เป็นประโยชน์ต่อการหมักน้ำตาลไซโลสในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาสายพันธุ์ของยีสต์ *Pachysolen tannophius* ที่มีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปจากสายพันธุ์เดิม โดยการฉายแสงอัลทราไวโอเลต

2. เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์มิวแทนต์ที่มีความสามารถ ในการหมักน้ำตาลไซโลส ไปเป็นเอทธานอล เปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เป็นการสร้างมิวแทนต์ ที่อาจได้สายพันธุ์ใหม่ที่มีความสามารถในการใช้น้ำตาลไซโลสเปลี่ยนไปจากสายพันธุ์เดิมซึ่ง ถ้าสูงขึ้นก็จะเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการหมักน้ำตาลไซโลสเป็นเอทธานอลต่อไป

ขอบเขตของการศึกษา

งานวิจัยนี้ จะทำการศึกษาวิธีการสร้างมิวแทนต์ของยีสต์ *P. tannophilus* โดยการใช้แสงอัลทราไวโอเลต แล้วทำการคัดเลือก โดยอาศัยคุณสมบัติของความต้านทานยาปฏิชีวนะ และความสามารถในการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่จำเป็น เป็นตำหนิ ศึกษาการเจริญเติบโต ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ และการผลิตเอทธานอลจากน้ำตาลไซโลสในสภาวะจำกัดอากาศ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย