

การเพิ่มความสามารถในการสร้างเอนไซม์กลูโคมีเลสที่อุณหภูมิสูงของเชื้อยีสต์โดยการกลายพันธุ์

Increasing the Glucoamylase Producing Capacity at High Temperature of Yeast by Mutation

สาวตรี ลิ้มทอง และ รัชพร รูปะสุต¹

Savitree Limtong and Touchaporn Rupasut

ABSTRACT

Isolation and selection of amylolytic yeast at 40 °C resulted 3 effective strains, strain SP1, SP2 and SP3, that could produce higher concentration of glucoamylase than the others. The strain SP3 produced maximum glucoamylase as 120.15 units/ml which was the highest among these 3 strains. These 3 selected strains were subjected to mutagenesis using ethylmethanesulfonate with the result that among all mutants obtained, the mutant SP3MO8, a mutant of strain SP3, produced the highest concentration of glucoamylase at 180.72 units/ml. This concentration was 50.14% higher than that produced by the wild type strain SP3. However, the mutant SP2MO7 can increase the glucoamylase production at 61.17% higher than its wild type SP2.

บทคัดย่อ

การแยกและคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่สามารถสร้างเอนไซม์กลูโคมีเลส ที่อุณหภูมิ 40° ซ. ได้เชื้อ 3 สายพันธุ์ คือ SP1 SP2 และ SP3 ซึ่งสร้างเอนไซม์กลูโคมีเลสได้สูงกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ โดยสายพันธุ์ SP3 สร้างเอนไซม์กลูโคมีเลสได้สูงสุดในบรรดา 3 สายพันธุ์ คือมีกิจกรรมสูงสุด 120.15 หน่วย/มล. เมื่อนำเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ มาทำให้กลายพันธุ์โดย ethylmethanesulfonate พบว่าสายพันธุ์กลายของ SP3 คือสาย

พันธุ์ SP3MO8 ให้เอนไซม์กลูโคมีเลสสูงสุดในบรรดาสายพันธุ์กลายทั้งหมดที่แยกได้ โดยมีกิจกรรมสูงสุด 180.72 หน่วย/มล. ซึ่งเท่ากับสร้างเอนไซม์กลูโคมีเลสได้สูงกว่าสายพันธุ์ SP3 50.41% ในขณะที่สายพันธุ์กลายที่สร้างเอนไซม์กลูโคมีเลสเพิ่มขึ้นสูงสุด คือสายพันธุ์กลาย SP2MO7 ซึ่งสร้างเอนไซม์กลูโคมีเลสได้สูงขึ้นจากที่สายพันธุ์ SP2 สร้างได้ 61.17%

¹ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Dept. of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

คำนำ

วัตถุดิบที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับการผลิตเอทานอลและมวลชีวภาพโดยจุลินทรีย์ ในกระบวนการผลิตเอทานอลจากแป้งจำเป็นต้องเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลกลูโคส โดยการใช้กรดหรือเอนไซม์อะไมเลส หรือใช้จุลินทรีย์ที่เหมาะสม หลังจากนั้นจึงนำน้ำตาลกลูโคสมาหมักเป็นเอทานอล เช่นเดียวกับการผลิตมวลชีวภาพ โดยยีสต์บางชนิดต้องอาศัยกระบวนการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลดังกล่าวข้างต้นก่อนที่จะนำน้ำตาลนั้นมาใช้เลี้ยงยีสต์ที่ผลิตมวลชีวภาพ สำหรับเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการย่อยสลายแป้งให้เป็นน้ำตาลกลูโคสคือ แอลฟาอะไมเลสและกลูโคมีเลส ในอุตสาหกรรมการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลทำโดยใช้เอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตขึ้นเป็นการค้าจากพืช แบคทีเรียและรา ส่วนยีสต์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายแป้งมีจำนวนไม่มากนัก โดยยีสต์ที่มีรายงานว่าสามารถสร้างเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และกลูโคสอะไมเลส เช่น *Endomycopsis* spp., *Candida* spp., *Lipomyces* spp., *Schwanniomyces* spp., *Torulopsis* spp., และ *Saccharomyces diastaticus*. (จิราภรณ์, 2518 ; Augustin *et al.*, 1978 ; Clementi *et al.*, 1980 ; Lalue and Mattoon, 1984 ; Lalue *et al.*, 1988 ; Sills *et al.*, 1984a ; Sills *et al.*, 1984b) การที่ยีสต์มีความสามารถในการสร้างทั้งแอลฟาอะไมเลสและกลูโคมีเลส ทำให้ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญในการผลิตเอทานอลและมวลชีวภาพโดยตรงจากแป้ง

เอนไซม์กลูโคมีเลสมีลักษณะเป็น exosplitting enzyme ที่เร่งปฏิกิริยาการปลดปล่อยกลูโคสออกจากปลายด้านที่ไม่รีดิวซ์ของสตาร์ช oligosaccharide และ polysaccharide ยีสต์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์กลูโคมีเลส ที่ได้มีผู้รายงานไว้ส่วน

มากเป็นพวก mesophile ซึ่งเจริญและสร้างอะไมเลสชนิดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 20 – 30 °ซ. (Lalue *et al.*, 1988 ; Sills *et al.*, 1984a ; Sills *et al.*, 1984b) โดยมีเพียงจำนวนน้อยที่รายงานถึงยีสต์ที่สร้างกลูโคมีเลสที่อุณหภูมิสูง (วิชชุพร, 2523) แต่ถ้าพิจารณาถึงการนำเชื้อเหล่านี้ไปใช้อุตสาหกรรมการผลิตผลผลิตจากการหมักของจุลินทรีย์ การใช้เชื้อที่เจริญและสร้างผลผลิตที่อุณหภูมิสูงจะมีข้อได้เปรียบ เนื่องจากในระหว่างการเจริญและสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์อุณหภูมิในถังหมักจะสูงขึ้นมาก ถ้าเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเป็นพวกที่ไม่สามารถเจริญและสร้างผลผลิตที่อุณหภูมิสูงแล้ว เมื่ออุณหภูมิในถังหมักสูงขึ้นเชื้อนั้นจะหยุดการเจริญและสร้างผลผลิตทำให้ได้ผลผลิตต่ำ ดังนั้นในอุตสาหกรรมจึงต้องมีระบบหล่อเย็นเพื่อลดอุณหภูมิในถังหมัก ซึ่งทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น เพื่อลดต้นทุนการผลิตในส่วนนี้ จึงได้มีผู้พยายามที่จะใช้เชื้อที่สามารถเจริญและสร้างผลผลิตที่อุณหภูมิสูง จากเหตุผลข้างต้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ที่เจริญและสร้างเอนไซม์กลูโคมีเลสที่อุณหภูมิสูง 40 °ซ. เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

อาหารเลี้ยงเชื้อและรีเอเจนต์

อาหาร starch agar ประกอบด้วย เปปโตน 0.2% ยีสต์เอกซ์แทรค 0.1% ซอลูเบิลสตาร์ช 1% และวุ้น 1.5%

อาหาร starch broth ประกอบด้วย ยีสต์เอกซ์แทรค 0.5% แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5% แมกนีเซียมซัลเฟต 7 น้ำ 0.05% และโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1% และซอลูเบิลสตาร์ช 4%

อาหาร YPD agar ประกอบด้วย ยีสต์เอกซ์แทรค 0.1% เปปโตน 0.2% กลูโคส 2% และวุ้น 1.5%

สารละลายไอโอดีน ประกอบด้วยไอโอดีน 0.317 กรัม โพตัสเซียมไอโอไดด์ 0.1 กรัม กรดเกลือ 10% ปริมาตร 50 มล. และเติมน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มล.

การแยกเชื้อยีสต์

แยกเชื้อยีสต์ที่สามารถเจริญบนอาหาร starch agar จากตัวอย่างต่าง ๆ คือแป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวเหนียว แป้งมันสำปะหลัง ลูกแป้งข้าวหมาก ลูกแป้งเหล้า เส้น ก๋วยเตี๋ยว ข้าวหมากสำหรับทำขนมจีน แป้งหมักสำหรับทำขนมจีน ข้าวหมาก และขนมที่ทำจากแป้ง โดยการนำตัวอย่างมาทำซัสเพนชัน (suspension) ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85% ให้มีความเจือจางที่เหมาะสมและนำไปเกลี่ยบนผิวหน้าของอาหาร starch agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ. นาน 5 – 7 วัน เก็บเชื้อยีสต์ที่ลักษณะโคโลนีต่าง ๆ กันไว้บน starch agar slant เพื่อศึกษาต่อไป

การเจริญเติบโตและการสร้างเอนไซม์อะไมเลสบนอาหาร starch agar

ศึกษาการเจริญและการสร้างเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อยีสต์ที่แยกได้ โดยการเพาะเชื้อลงบนผิวหน้าอาหารแบบ point inoculation บ่ม 30 °ซ. นาน 7 วัน ตรวจการเจริญโดยสังเกตขนาดของโคโลนี ส่วนการผลิตเอนไซม์อะไมเลสตรวจโดยวัดความสามารถในการย่อยซอลูเบิลสตาร์ชที่เป็นองค์ประกอบในอาหาร starch agar โดยใช้สารละลายไอโอดีนเทปโคโลนีของเชื้อบนอาหาร โคโลนีที่สร้างเอนไซม์อะไมเลสจะให้แถบใส (clear zone) รอบโคโลนี

การสร้างเอนไซม์กลูโคมิเลส

ศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์กลูโคมิเลสของเชื้อยีสต์ โดยเฉพาะเชื้อยีสต์ที่เลี้ยงบน YPD agar 24 ชั่วโมง ลงในอาหาร YPD broth ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที นาน 24

ชั่วโมง เชื้อที่ได้ใช้เป็น inoculum สำหรับการสร้างเอนไซม์ โดยใช้ปริมาตร 2 มล. เพาะลงในอาหาร starch broth ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 300 รอบ/นาที เก็บ culture broth มาวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์กลูโคมิเลส โดยการใช้ refrigerated centrifuge บ่มแยกเซลล์ออกที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาทีที่อุณหภูมิ 4 °ซ. นาน 15 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์กลูโคมิเลสและนำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปวัดการเจริญในรูปของน้ำหนักแห้ง

การสร้างเชื้อสายพันธุ์กลาย

เชื้อสายพันธุ์กลายสร้างโดยใช้วิธีของ Arima and Takano (1979) แต่เปลี่ยนความเข้มข้นของ ethylmethanesulfonate (EMS) เป็น 30 ไมโครลิตร/มล. วิธีทำ คือนำยีสต์ที่เลี้ยงบนอาหาร starch agar ที่ 30° ซ. นาน 24 ชั่วโมง มาเตรียมเป็นซัสเพนชันใน 0.2 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8.0 ให้มีความเข้มข้น 1×10^7 เซลล์/มล. เติมน้ำ EMS 90 ไมโครลิตรลงในซัสเพนชันของเซลล์ที่เตรียมไว้ปริมาตร 3 มล. และบ่มที่ 30° ซ. 120 นาที โดยทุก ๆ 30 นาที ปิเปตส่วนผสม 0.5 มล. ใส่ลงในสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) เข้มข้น 5% ปริมาตร 3 มล. เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ EMS ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต 2 ครั้ง ทำให้เซลล์เจือจางในระดับที่เหมาะสม แล้วนำไปเกลี่ยบน YPD agar บ่มที่ 30° ซ. นาน 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีเพื่อหาอัตราการรอดชีวิต และเชื้อสายพันธุ์กลาย

การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์กลูโคมิเลส

ผสมเอนไซม์ที่เจือจางจนเหมาะสมปริมาตร 1 มล. กับสารละลายซอลูเบิลสตาร์ชที่มีความเข้มข้น 1% ใน 2 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.9 ปริมาตร 1 มล. ซึ่งแต่ละอย่างเขย่าในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ

40 °ซ. มาก่อน นำส่วนผสมที่ได้ไปบ่มที่ 40 °ซ. นาน 20 นาที วัดปริมาณกลูโคสที่สร้างขึ้นโดยวิธี Nelson Somogyi (Nelson, 1944) และคำนวณปริมาณเอนไซม์โดยกำหนดให้ กลูโคมีเลส 1 หน่วยเท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่ต้องการเพื่อสร้างกลูโคส 1 ไมโครกรัมต่อนาที ที่ 40 °ซ.

การหาน้ำหนักแห้ง

ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยน้ำกลั่น บั่นแยกเซลล์โดยใช้ความเร็ว 5,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที และอบแห้งที่ 105 °ซ. นาน 48 ชั่วโมง หรือจนน้ำหนักคงที่

ผลและวิจารณ์

การแยกเชื้อยีสต์ที่สามารถสร้างเอนไซม์มีเลส

จากการแยกเชื้อยีสต์โดยใช้อาหาร starch agar ได้เชื้อจำนวน 16 สายพันธุ์ จากตัวอย่างที่มีแบ่งเป็นองค์ประกอบ 21 ตัวอย่าง เมื่อนำมาศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์มีเลส ที่อุณหภูมิ 30 และ 40 °ซ. โดยสังเกตจากแถบไฮรอปโคโลนีที่เกิดจากการย่อยสลายซอลูบิลิตารซ์ พบว่าเชื้อสายพันธุ์ SP1 SP2 และ SP3 ให้แถบไฮรอปกว้างกว่าสายพันธุ์อื่นทั้ง 2 อุณหภูมิ (Table 1) ดังนั้นน่าจะสร้างเอนไซม์มีเลสได้มากกว่าอีก 13 สายพันธุ์ จึงได้คัดเลือกเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ ไว้ศึกษาต่อไป

การศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์กลูโคมีเลส

นำเชื้อยีสต์ 3 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกไว้ มาศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์กลูโคมีเลส ที่อุณหภูมิ 30 และ 40 °ซ. พบว่าที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เมื่อบ่มเชื้อนาน 12 ชั่วโมง สายพันธุ์ SP1 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดและสูงกว่าสายพันธุ์ SP2 และ SP3 มาก โดย SP1 มีกิจกรรม 204.31 หน่วย/มล. ในขณะที่ SP2 และ SP3 มีกิจกรรมเพียง 27.30 และ 51.32

หน่วย/มล. ตามลำดับ (Figure 1a) แต่กิจกรรมเอนไซม์กลูโคมีเลสของ SP1 ลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากบ่ม 12 ชั่วโมง ส่วนสายพันธุ์ SP2 และ SP3 มีกิจกรรมสูงสุด 55.90 และ 58.30 หน่วย/มล. ที่เวลา 24 ชั่วโมง สำหรับการเจริญที่อุณหภูมิ 30 °ซ. นี้ พบว่าสายพันธุ์ SP3 เจริญเร็วกว่าสายพันธุ์อื่น คือ เมื่อบ่มนาน 36 ชั่วโมง ให้น้ำหนักแห้งของเซลล์สูงสุด 13.80 กรัม/ลิตร ในขณะที่ SP2 เจริญได้น้ำหนักแห้ง 13.96 กรัม/ลิตร ในเวลา 60 ชั่วโมง ส่วน SP1 เจริญช้าและได้น้ำหนักแห้งน้อยที่สุด คือ 9.37 กรัม/ลิตร ในเวลา 60 ชั่วโมง (Figure 1b)

เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 °ซ. พบว่าสายพันธุ์ SP1 สร้างเอนไซม์กลูโคมีเลสได้น้อยลง แต่สายพันธุ์ SP2 และ SP3 สร้างได้เพิ่มขึ้น โดยทั้ง 3 สายพันธุ์สร้างเอนไซม์ได้สูงสุดที่ 36 ชั่วโมง คือ SP1 SP2 และ SP3 มีกิจกรรม 94.20 102.30 และ 120.15 หน่วย/มล. (Figure 2a) ซึ่งแสดงว่าสายพันธุ์ SP3 มีความสามารถสร้างเอนไซม์กลูโคมีเลสได้สูงสุดเมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิสูง 40 °ซ. เมื่อพิจารณาการเจริญพบว่า SP3 เจริญได้สูงที่สุดเช่นกัน โดยเมื่อบ่มนาน 48 ชั่วโมง ได้น้ำหนักแห้ง 10.19 กรัม/ลิตร ในขณะที่ SP1 และ SP2 เจริญสูงสุดได้น้ำหนักแห้ง 9.31 และ 4.85 กรัม/ลิตร เมื่อบ่มนาน 36 ชั่วโมง ตามลำดับ (Figure 2b)

จากการศึกษาโดยทั่วไปพบว่าเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์มีเลสมีน้อยกว่าเชื้อราหรือแบคทีเรีย และปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้น้อยกว่าที่ผลิตโดยเชื้อราและแบคทีเรียด้วย ตัวอย่างเช่น วิษุพร (2523) แยกได้เชื้อ *Endomycopsis fibuligera* CRY 24 ซึ่งสร้างเอนไซม์กลูโคมีเลส 16.5 ไมโครโมลของกลูโคส/นาที/มล. ที่ 40 °ซ. เมื่อใช้มันเส้นเป็นแหล่งคาร์บอน Sills *et al.*, (1984b) รายงานว่าเชื้อ *Schwanniomyces castellii* strain 1402

Table 1 Growth and amylase production on starch agar of isolated yeast strains.

Strain	Growth								Diameter of clear zone							
	2 days		4 days		5 days		7 days		2 days		4 days		5 days		7 days	
	30° C	40° C	30° C	40° C	30° C	40° C	30° C	40° C	30° C	40° C	30° C	40° C	30° C	40° C	30° C	40° C
F01	++	++	+++	++	+++	++	++++	++++	+	+	+	+	+	+	+	+
F02	++	++	+++	++	+++	++	++++	++++	+	+	+	+	+	+	+	+
F03	++	++	+++	++	+++	++	++++	++++	+	+	+	+	+	+	+	+
F04	++	++	+++	++	+++	+	++++	++++	+	+	+	+	+	+	+	+
F05	++	++	+++	++	+++	++	++++	++++	+	+	+	+	+	+	+	+
F06	++	++	++++	++	++++	+	++++	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F07	++	+	+++	++	+++	++	+++	++	-	-	-	+	-	+	+	+
F08	-	+	++	+	+++	++	++	++	-	-	+	+	+	+	-	-
F09	+	+	++	+	+++	++	++	+	-	-	+	+	+	+	-	-
F10	++	++	++	++	+++	++	++++	++++	+	+	+	+	+	+	+	+
F11	++	+	+++	++	+++	++	++++	++++	-	-	-	+	-	-	+	+
SP1	++	+	+++	+	++++	+	++++	+	++	++	+++	++	++++	++	++++	++
SP2	++	++	+++	+	++++	+	++++	+	++	++	+++	++	++++	++	++++	++
SP3	++	++	++++	++	++++	++	++++	++	++	++	+++	++	++++	++	++++	++
F12	++	++	++	++	+++	++	++++	++++	+	+	++	+	+	+	+	+
F13	++	++	+++	++	+++	++	+++	++++	+	+	+	+	+	+	+	+

- = no growth or no clear zone

+, ++, +++, +++++ = growth or diameter of clear zone from the minimum (+) to the maximum (+++++)

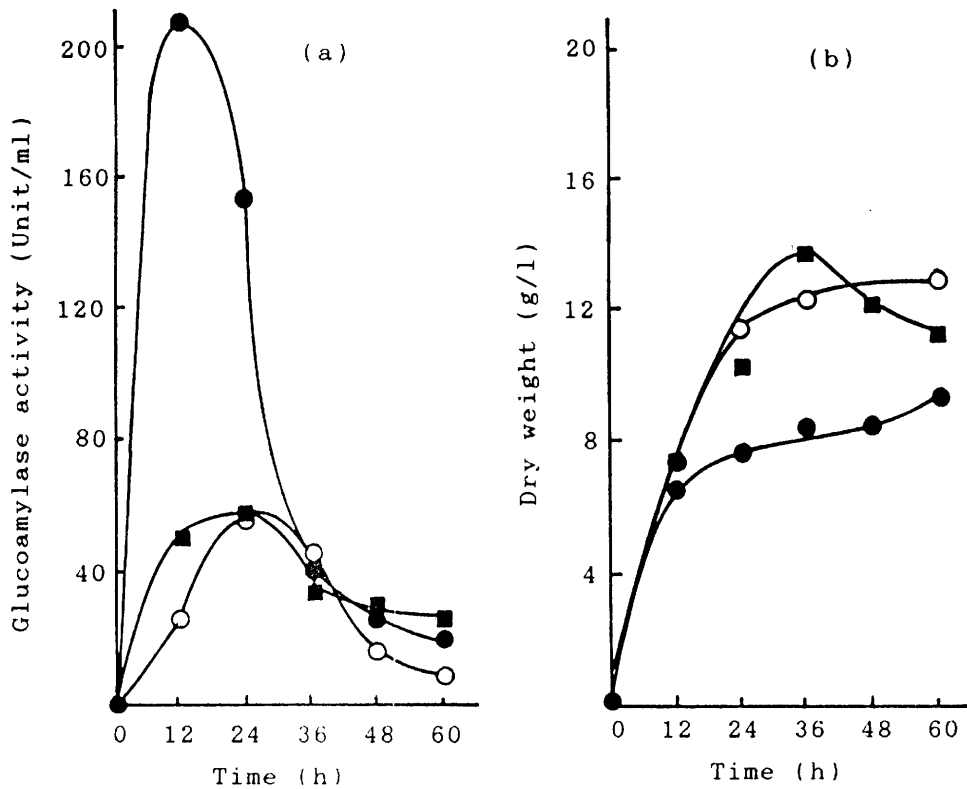


Figure 1. Glucoamylase production (a) and growth (b) by strain SP1 (●), SP2 (○) and SP3 (■), at 30° C.

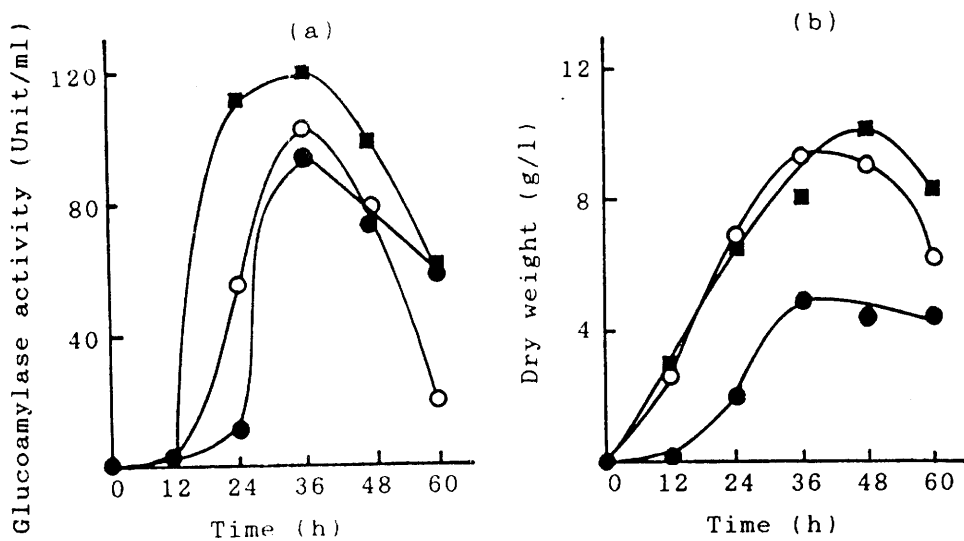


Figure 2. Glucoamylase production (a) and growth (b) by strain SP1 (●), SP2 (○) and SP3 (■), at 40° C.

สร้างเอนไซม์กลูโคมิลเลสสูงสุดได้ 30 ไมโครกรัมกลูโคส/นาที่/มล. เมื่อใช้ซอลูเบิลสตาร์ชเป็นสับสเตรทที่อุณหภูมิ 21 °ซ. และ Ogden and Tubb (1985) รายงานการสร้างเอนไซม์กลูโคมิลเลสโดย *Saccharomyces cerevisiae* 2 สายพันธุ์ ว่าได้กิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 0.0032 ± 0.001 และ 0.012 ± 0.002 ไมโครโมลของกลูโคส/นาที่/มล. ในขณะที่ *Rhizopus oryzae* MB 67 สร้างเอนไซม์ชนิดเดียวกันได้ 22.5 ไมโครโมลของกลูโคส/นาที่/มล. ที่อุณหภูมิ 40 °ซ. เป็นต้น

การสร้างเชื้อสายพันธุ์กลาย

เพื่อเพิ่มความสามารถในการสร้างเอนไซม์กลูโคมิลเลสที่อุณหภูมิสูงของเชื้อยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ จึงได้ทำการกลายพันธุ์เชื้อทั้ง 3 โดยใช้สาร EMS เมื่อศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเชื้อทั้ง 3 หลังจาก treat ด้วย EMS ความเข้มข้น 30 ไมโครลิตร/มล. พบผลดังแสดงใน Figure 3 จึงได้เลือกเวลาสำหรับการ

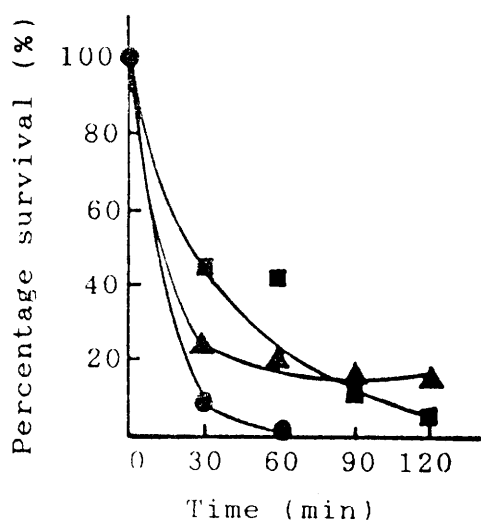


Figure 3. Curves of survivor by strain SP1 (●), SP2 (▲) and SP3 (■) after treatment by EMS.

treat เซลล์ของสายพันธุ์ SP1 เท่ากับ 30 นาที เนื่องจากเชื้อมีอัตราการรอดชีวิต 8.8% ซึ่งอยู่ในช่วงที่เหมาะสมที่จะนำมาหาเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย ส่วนสาย

พันธุ์ SP2 และ SP3 เลือกใช้เวลา treat เซลล์ 90 นาที ซึ่งเชื้อมีอัตราการรอดชีวิต 14.8 และ 11.0% ตามลำดับ โคลนีของเชื้อที่ผ่านการ treat บน YPD agar ถูกเลือกเก็บมาสายพันธุ์ละ 200 โคลนี เพื่อทดสอบความสามารถในการเจริญบนอาหาร starch agar ที่ 40 °ซ. นาน 48 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์กลายของ SP1 จำนวน 200 โคลนี มีเพียง 83 โคลนีที่เจริญได้ ส่วนสายพันธุ์กลายของ SP2 และ SP3 ที่เจริญได้ มี 166 และ 89 โคลนีตามลำดับ ซึ่งแสดงว่ามีสายพันธุ์กลายจำนวนหนึ่งที่สูงยิ่ความสามารถในการสร้างเอนไซม์มิลเลส

ความสามารถในการสร้างเอนไซม์มิลเลสของสายพันธุ์กลาย

นำสายพันธุ์กลายของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ ซึ่งเจริญได้บน starch agar ที่ 40 °ซ. มาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์มิลเลส โดยดูจากแถบสี พบว่ามีสายพันธุ์กลายของ SP1 จำนวน 4 สายพันธุ์ที่ให้แถบสีกว้างกว่า wild type คือ SP1MO1, SP1MO2, SP1MO3 และ SP1MO4 ส่วนสายพันธุ์กลายของ SP2 และ SP3 ที่ให้แถบสีกว้างกว่า wild type คือ SP2MO5, SP2MO7 ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายของ SP2 และ SP3MO8 ที่ได้จากเชื้อสายพันธุ์ SP3 ดังที่แสดงรายละเอียดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแถบสีไว้ใน Table 2 นอกจากนั้นสายพันธุ์กลายทุกตัวดังกล่าวยังเจริญได้ดีกว่า wild type ด้วย จึงได้คัดเลือกไว้ศึกษาต่อไป

การสร้างเอนไซม์กลูโคมิลเลสของสายพันธุ์กลายที่อุณหภูมิสูง

นำสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกไว้ มาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์กลูโคมิลเลส ที่ 40 °ซ. โดยเลี้ยงในอาหารที่มีซอลูเบิลสตาร์ช 4% ผลการทดสอบแสดงว่าในบรรดาสายพันธุ์กลายของ SP1 คือ

Table 2 Growth and amylase production of selected mutants of strain SP1 SP2 and SP3 on starch agar at 40° C for 48 h.

Strain	Growth	Diameter of clear zone (mm)
Wild type SP1	+	16
mutant : SP1MO1	++	17
SP1MO2	++	20
SP1MO3	++	19
SP1MO4	++	22
Wild type SP2	+	20
mutant : SP2MO5	++	21
SP2MO6	++	22
SP2MO7	++	23
Wild type SP3	+	25
mutant : SP3MO8	++	27

+, ++, +++, +++++ = growth from the minimum (+) to the maximum (+++++)

สายพันธุ์กลาย SP1MO4 สร้างเอนไซม์ได้สูงสุด โดยมีกิจกรรม 105.12 หน่วย/มล. เมื่อป้อนเชื้อมานาน 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่า SP1 ที่สร้างได้ 94.20 หน่วย/มล. ที่เวลา 36 ชม. (Figure 4a) นอกจากนั้นสายพันธุ์กลายทั้งหมดยังเจริญได้ดีกว่า wild type (Figure 4b)

สำหรับสายพันธุ์กลายของ SP2 นั้น SP2MO7 สร้างเอนไซม์กลูโคมีเลสได้สูงสุดคือ 164.88 หน่วย/มล. ที่ 48 ชั่วโมง ในขณะที่ wild type สร้างได้ 102.3 หน่วย/มล. ที่ 36 ชั่วโมง (Figure 5a) การเจริญของสายพันธุ์กลาย SP2MO7 ดีกว่า wild type ส่วน SP2MO5 และ SP2MO6 เจริญได้ดีกว่า (Figure 5b)

เมื่อศึกษาการสร้างเอนไซม์กลูโคมีเลสของเชื้อสายพันธุ์กลาย SP3MO8 พบว่าสร้างเอนไซม์ได้สูงกว่าและเร็วกว่า SP3 wild type โดยสายพันธุ์กลาย

มีกิจกรรมสูงสุด 180.72 หน่วย/มล. ที่เวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่ wild type มีกิจกรรม 120.15 หน่วย/มล. ที่เวลา 36 ชม. (Figure 6a) แต่เมื่อพิจารณาการเจริญพบว่าสายพันธุ์กลายเจริญได้ดีกว่า (Figure 6b)

จากการทดลองข้างต้นได้แยกและคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่สามารถสร้างเอนไซม์กลูโคมีเลสได้ดีจำนวน 3 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ SP3 สร้างเอนไซม์ได้สูงสุดในบรรดา 3 สายพันธุ์ที่ 40 °ซ. และเมื่อนำมาทำให้กลายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์กลายของ SP3 คือ SP3MO8 สามารถสร้างเอนไซม์ได้สูงกว่าสายพันธุ์กลายของ SP1 และ SP2 เช่นกัน แต่เมื่อพิจารณาความสามารถในการสร้างเอนไซม์กลูโคมีเลสที่เพิ่มขึ้นพบว่าสายพันธุ์กลาย SP2MO7 ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายของ SP2 สร้างเอนไซม์เพิ่มขึ้น 61.17% ในขณะที่ SP3MO8 และ SP1MO4 ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายของ SP3 และ SP1 สร้างเอนไซม์เพิ่มขึ้น 50.41 และ

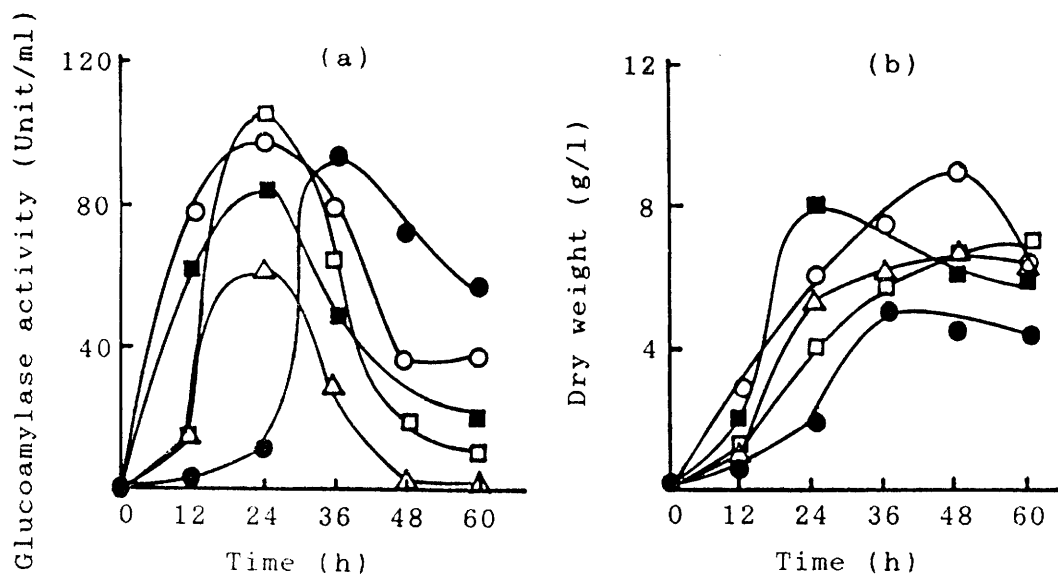


Figure 4. Glucoamylase production (a) and growth (b) by strain SP1 (●), and mutant SP1MO1 (△), SP1MO2 (○) SP1MO3 (■) and SP1MO4 (□), at 40° C.

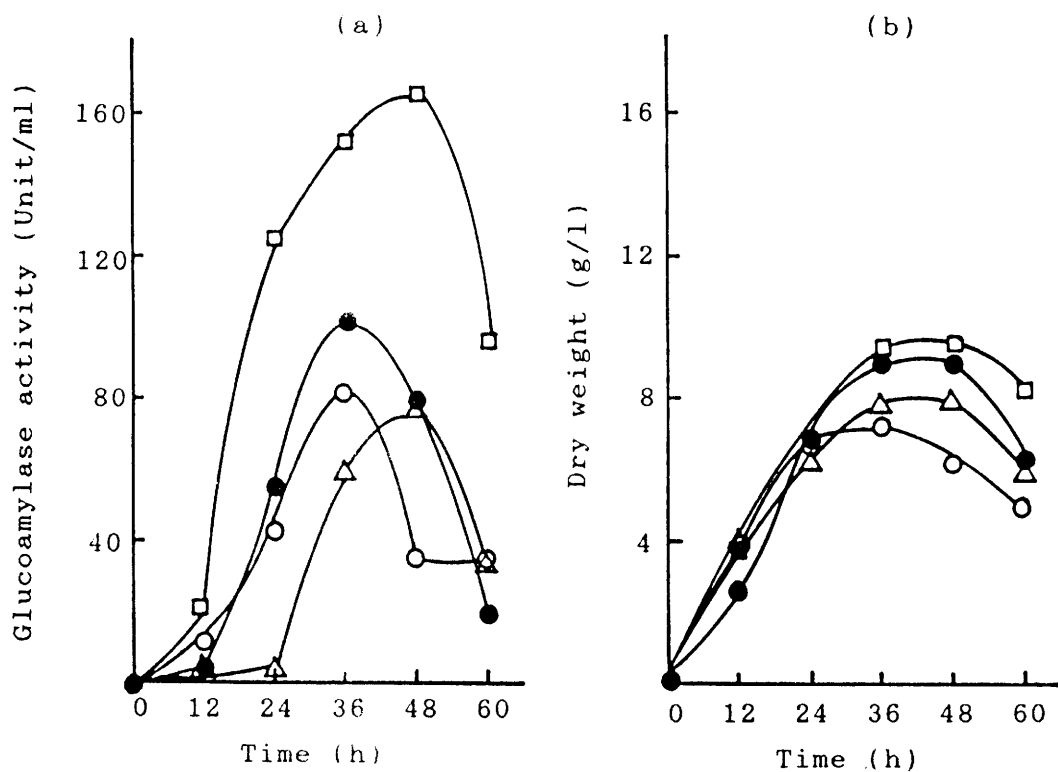


Figure 5. Glucoamylase production (a) and growth (b) by strain SP2 (●), and mutant SP2MO5 (△), SP2MO6 (○) and SP2MO7 (□), at 40° C.

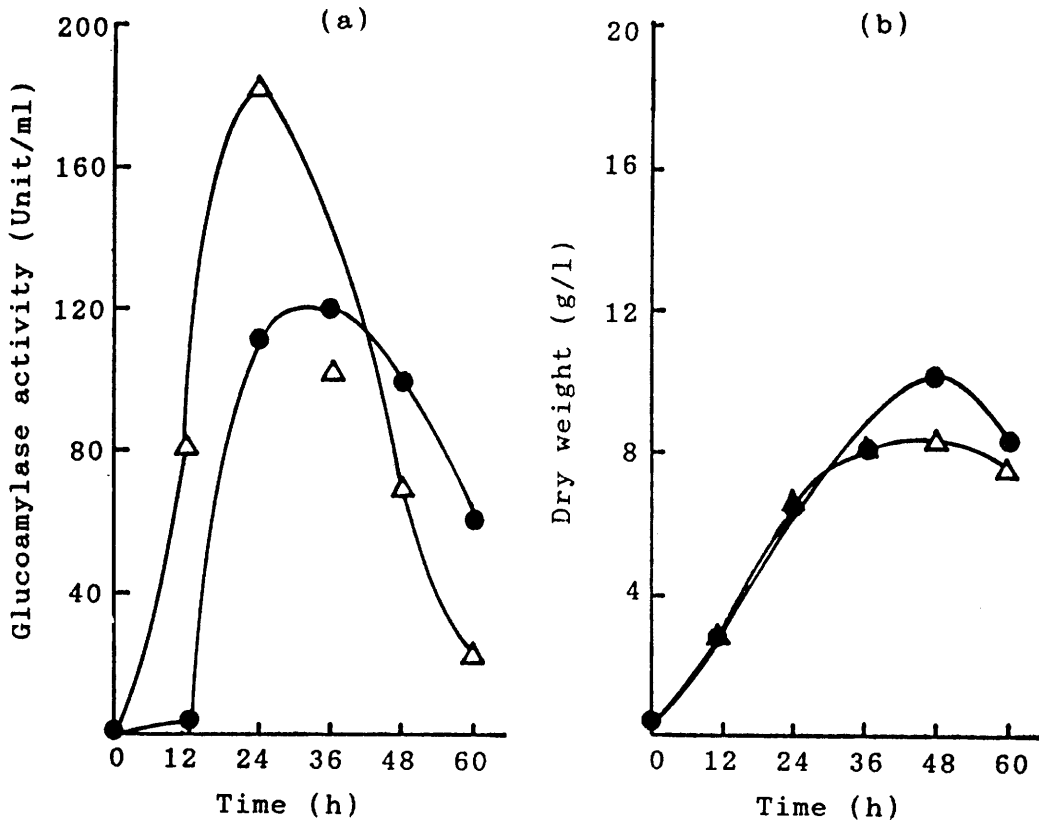


Figure 6. Glucoamylase production (a) and growth (b) by strain SP 3 (●) and mutant SP3MO8 (△) , at 40°C.

11.59% ตามลำดับ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการกลายพันธุ์สามารถใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์กลูโคมิเลสของเชื้อยีสต์ เช่นเดียวกับที่ Sills *et al.* (1984a) ได้เคยรายงานว่าได้สร้างสายพันธุ์กลายที่ทนต่อ 2 - deoxy - glucose ซึ่งมีกิจกรรมของกลูโคมิเลสสูงขึ้นจาก 29 เป็น 45 ไมโครกรัมของกลูโคส/นาทิจ/มล. ซึ่งเท่ากับเพิ่มขึ้น 55.17% ถึงแม้ว่าการสร้างเอนไซม์กลูโคมิเลสของเชื้อยีสต์จะต่ำกว่าเชื้อราโดยทั่วไป แต่เมื่อคำนึงถึงการที่จะลดขั้นตอนในการผลิตเอธานอลหรือโปรตีนเซลล์เดียวให้เหลือเพียงขั้นตอนเดียว โดยการสร้างสายพันธุ์ที่สามารถหมักเอธานอลหรือเจริญได้สูง โดยใช้แป้งเป็นวัตถุดิบโดยตรงแล้ว

การใช้เชื้อยีสต์ที่สร้างเอนไซม์กลูโคมิเลสได้สูง ผสมพันธุ์กับยีสต์ที่หมักเอธานอลได้สูง หรือเจริญดีเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยวิธีต่าง ๆ เช่น mating หรือ protoplast fusion น่าจะเป็นวิธีการที่เหมาะสมและง่ายกว่า เนื่องจากการผสมพันธุ์เชื้อชนิดเดียวกัน

สรุป

1. จากการแยกและคัดเลือดยีสต์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์กลูโคมิเลสที่อุณหภูมิ 40 °ซ. ได้สูง ได้เชื้อจำนวน 3 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ SP3 สร้างเอนไซม์ได้สูงสุด คือมีกิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 120.15 หน่วย/มล. ส่วนสายพันธุ์ SP1 และ SP3 มี

กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 94.20 และ 102.30 หน่วย/มล. ตามลำดับ

2. ทำการปรับปรุงพันธุ์เชื้อทั้ง 3 เพื่อให้สามารถสร้างเอนไซม์กลูโคมิเลสได้สูงขึ้นโดยทำให้กลายพันธุ์ด้วย ethylmethanesulfonate พบว่าสายพันธุ์กลายของ SP1 ที่สร้างเอนไซม์กลูโคมิเลสสูงสุดคือ SP1 MO4 ซึ่งมีกิจกรรมสูงสุด 105.12 หน่วย/มล. ส่วนสายพันธุ์กลายของ SP2 และ SP3 ที่สร้างเอนไซม์สูงสุดคือ สายพันธุ์กลาย SP2MO7 และ SP3MO8 ซึ่งสร้างเอนไซม์ 164.88 และ 180.72 หน่วย/มล. ตามลำดับ

คำขอบคุณ

การวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ คณะผู้รายงานใคร่ขอขอบคุณไว้ ณ โอกาสนี้

เอกสารอ้างอิง

- จิราภรณ์ สุขมาวาลี. 2518. การศึกษาทางชีววิทยาของลูกแป้งข้าวหมาก. รายงานการประชุมทางวิชาการเกษตรศาสตร์และชีววิทยา ครั้งที่ 14 สาขาพืช กรุงเทพฯ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- วิษุพร ว่องสุวรรณเลิศ. 2523. จุลินทรีย์โปรตีนจากมันสำปะหลัง โดย *Rhizopus* และยีสต์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 150 หน้า.
- Arima, K. and I. Takano. 1979. Evidence for co-dominance of the homothallic genes, HM/hm and HMa/hma, in *Saccharomyces* yeast. Genetics 93 : 1-2.
- Augustin, J., J. Zemek, A.K. Kratochvilova and L. Koniak, 1978. Production of alpha-amylase by yeasts and yeast-like organisms. Folia Microbiol. 23 : 353 - 361.
- Clementi, F., J. Rossi, L. Costamagna and J. Rosi. 1980. Production of amylase (s) by *Schwanniomyces castellii* and *Endomycopsis fibuligera*. Antonie van Leeuwenhock. 46 : 399 - 405.
- Laluce, C. and J.R. Matton. 1984. Development of rapidly fermenting strains of *Saccharomyces diastaticus* for direct conversion of starch and dextrins to ethanol. Appl. Environ. Microbiol. 48 (1) : 17 - 25.
- Laluce, C., M.C. Bertolini, J.R. Ernandes, A.V. Martini and A. Martini. 1988. New amylolytic yeast strains for starch and dextrin fermentation. Appl. Environ. Microbiol. 54 (10) : 2447 - 2451.
- Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 154 : 375 - 380.
- Ogden, K. and R.S. Tubb. 1985. A strain of *Saccharomyces cerevisiae* which grows efficiently on starch. Enzyme Microb - Technol. 7 May : 220 - 224.
- Sills, A.M., P.S. Zygora and G.G. Stewart. 1984a. Characterization of *Schwanniomyces castellii* mutants with increased productivity of amylase. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20 : 124 - 128.
- Sills, A.M., M.E. Sauder and G.G. Stewart. 1984b. Isolation and characterization of the amylolytic system of *Schwanniomyces castellii*. J. Inst. Brew. 90 : 311 - 314.