รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1.**ชุดโครงการวิจัย** : ศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

2.**โครงการวิจัย** : การผลิตไบโอเอทานอลจากชีวมวลโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ

กิจกรรม : การศึกษา พัฒนาสายพันธุ์จุลินทรีย์ และการผลิตเอนไซม์เพื่อผลิตไบโอเอทานอลจากชีวมวล

3.ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การรวบรวมและพัฒนาสายพันธุ์ยีสต์สำหรับผลิตไบโอเอทานอล

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : ระบุชื่อการทดลองตามแบบ ว1-ก ที่ผ่านการอนุมัติ

4.คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

5.บทคัดย่อ : ผลการแยกเชื้อยีสต์จากตัวอย่าง จากองุ่น สับปรด ไม้ที่กำลังถูกย่อยสลาย กากอ้อย กากน้ำตาล และลูกแป้ง ที่ใช้สำหรับผลิตเหล้าขาว สามารถแยกเชื้อยีสต์ที่แตกต่างกันได้ 50 ไอโซเลต และเมื่อนำมาจำแนกชนิดของเชื้อยีสต์ โดยการวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมไรโบโซมอลดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ NL-1 และ NL- 4 ได้ยีสต์จำนวน 10 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ของยีสต์ที่ดี

ผลการโคลนยีน Xylose reductase สามารถโคลนยีน Xylose reductase ได้จากเชื้อรา *Neurospora sp.* ยีน *endo Xylanase* ได้จากเชื้อรา *Aspergillus niger* และยีน *Xylital dehydrogenase* ได้จากเชื้อรา *Trichoderma sp.* แล้วส่งถ่ายเข้า เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่ายีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) ที่ได้รับการถ่ายฝาก ยีน Xylose reductase มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสและลิตเอทานอลได้สูงกว่า ที่ยีสต์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนถึง 11.35 %

6.คำนำ

ปัจจุบันการผลิตเอทานอลส่วนใหญ่ของโลกใช้วัตถุดิบหลัก 2 ประเภท คือ น้ำตาล เช่น อ้อย และกากน้ำตาล และแป้ง เช่น มันสำปะหลัง ข้าว และข้าวโพด อย่างไรก็ตาม เริ่มมีความกังวลว่าวัตถุดิบดังกล่าวอาจไม่เพียงพอต่อการผลิตเอทานอลในระยะข้างหน้า และเป็นการนำพืชอาหารมาใช้ผลิตเอทานอลซึ่งในบางประเทศ เช่น สหรัฐฯ และจีน ที่นำข้าวโพดมาใช้ผลิตเอทานอล ส่งผลให้ราคาสินค้าอาหารภายในประเทศปรับ

สูงขึ้น ดังนั้น ปัจจุบันการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตเอทานอลในหลายประเทศจึงมุ่งเน้นไปที่วัตถุดิบประเภทอื่น คือ เซลลูโลส ซึ่งเป็นเศษเหลือใช้ที่ได้จากพืช

เซลลูโลส คือเส้นใยของพอลิเมอร์แซคคาไรด์ที่เป็นส่วนประกอบหลักในผนังเซลล์ของพืชและเป็นสารอินทรีย์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติมากที่สุด เซลลูโลสเป็นส่วนประกอบหลักในใบไม้ ปอ และฟาง คุณสมบัติทางเคมีที่สาคัญของเซลลูโลสคือเป็นตัวที่ไม่ทาปฏิกิริยาโดยเฉพาะไฮโดรไลซีส (Hydrolysis) ขั้นตอนการเปลี่ยนสารเซลลูโลสให้เป็นเอทานอลได้ ในขั้นตอนแรกจะนำเซลลูโลสมาเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสด้วยกระบวนการย่อยด้วยกรดหรือกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์จากนั้นนำน้ำตาลที่ได้มาผ่านกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์ เช่น *Saccharomyces cerevisiae, Escherichia coli, Zymomonas mobilis* เพื่อให้ได้เอทานอล ซึ่งในประเทศไทยมีศักยภาพในการผลิตเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจำนวนมากมาย จึงมีความเหมาะสมที่จะสามารถผลิตเอทานอลได้เป็นอย่างดี อีกทั้งยังสอดคล้องกับนโนบายของรัฐบาลในการเพิ่มกำลังการผลิตเอทานอลให้มากขึ้น ดังนั้นการผลิตเอทานอลในประเทศไทยจากเซลลูโลสจึงเป็นที่น่าสนใจและควรได้รับการสนับสนุนสู่อุตสาหกรรมขนาดใหญ่

เอทานอลจากกระบวนการหมักเป็นการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลด้วยเชื้อเชื้อจุลินทรีย์ (ยีสต์) ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรก ยีสต์จะใช้น้ำตาลเชิงเดี่ยว (Monosaccharide) เป็นอาหาร และเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลโดยกระบวนการไกลโคไลซิส (Glycolysis) ในสภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจน ในปัจจุบันจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องและรู้จักกันดีในการหมักเพื่อผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมคือ ยีสต์พวก *Saccharomyces sp.* เช่น *S. cerevisiae, S. ellipsoideus, S. uvarum* ยีสต์เหล่านี้มีความสามารถในการหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ แต่เนื่องจาก *S. cerevisiae* เป็นยีสต์ที่ทนต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆ ที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่ายีสต์ชนิดอื่น จึงเป็นยีสต์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมการหมักน้ำตาลกลูโคส Saccharomyces เป็นสายพันธุ์ที่ได้รับการคัดเลือกจนเป็นที่ยอมรับในอุตสาหกรรมการหมัก สามารถเจริญได้ดีในสภาพแวดล้อมที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสสูง มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลได้ดี

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ การรวบรวมและพัฒนาสายพันธุ์ยีสต์สำหรับผลิตไบโอเอทานอล โดยพัฒนาสายพันธุ์ยีสต์ ให้มีการควบคุมการแสดงออกของยีนที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้หรือ สังเคราะห์ยีนโดยตรง ถ่ายฝากลงในยีสต์ *S.cerevisiae* สำหรับเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการหมักเอทานอล

7.อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

วิธีการดำเนินการวิจัย

1.เก็บตัวอย่าง จากองุ่น สับปรด ไม้ที่กำลังถูกย่อยสลาย กากอ้อย กากน้ำตาล และลูกแป้ง ที่ใช้สำหรับผลิตเหล้าขาว สุ่ม อย่างละ 20 กรัม มาบด ทำให้เจือจางด้วยน้ำเกลือ (Normal saline) แล้วเลี้ยงบน Malt Extract Agar (MEA) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง

2. ย้ายโคโลนีของยีสต์ เลี้ยงบน Yeast Extract Peptone Dextrose Medium (YPD) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง สามารถคัดแยกเชื้อยีสต์ที่เจริญได้ดีได้ เก็บเชื้อนี้ไว้ เพื่อใช้ทดลองและทดสอบต่อไป

3. การทดสอบความสามารถในการหมักแอลกอฮอล์ของยีสต์

3.1 เลี้ยงกล้าเชื้อยีสต์ลงบนอาหาร YPD agar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ย้ายลงในฟลาสที่บรรจุอาหาร YPDเหลว ปริมาตร 30 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 190 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่ 30 องศาเซลเซียส

3.2. วัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density: OD) ที่ 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer เพื่อเตรียมคำนวณกล้าเชื้อให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากัน

3.3 ปิเปต กล้าเชื้อเท่ากับปริมาตรที่คำนวณได้ ลงในฟลาสที่บรรจุอาหารเหลว YPD18 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 190 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.4. เก็บตัวอย่างที่ 0 และ 48 ชั่วโมง มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และสำหรับคำนวณเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ที่ยีสต์หมักได้ ที่เวลา 48 ชั่วโมง วัดได้โดยใช้เครื่องอิบูลลิโอมิเตอร์

4. การจำแนกเชื้อยีสต์

4.1 เลี้ยงเซลล์ยีสต์ ที่คัดเลือก ได้ทั้ง 10 ไอโซเลต ลงในอาหารเหลว YPD 20 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 190 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตกตะกอนเซลยีสต์

4.2. นำเซลตะกอนยีสต์มาสกัดดีเอ็นเอด้วยด้วยชุดสกัด MasterPureTM Yeast DNA Purification Kit (Epicentre® an Illumina company, USA)

4.3. เพิ่มปริมาณไรโบโซมอลดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ด้วย ไพรเมอร์ NL-1 และNL- 4

Forward primer NL-1 5’-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3’

Reverse primer NL- 4 5’-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G- 3’

4.4 ทำผลผลิต PCR บริสุทธิ์โดยใช้ชุด QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen,Hilden,Germany) และนำไปอ่านลำดับพันธุกรรม

4.5 วิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม เพื่อระบุ สปีชีส์ของยีสต์ โดยเข้าไปที่เว็ปไซต์ ของ NCBI (National Center for Biotechnology Information) ที่ http://www.ncbi.nlm.nih.gov โดยใช้โปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

5 . การโคลนยีน

5.1 การโคลนยีน Xylose reductase รวบรวมเชื้อ *Aspergillus niger* และ *Neurospora* มาทำการสกัด DNA และ RNA

5.2 ค้นหาลำดับพันธุกรรมของ ยีน Xylose reductase จาก GenBank ทำ multiple alignment ออกแบบ primer

5.3 โคลนยีนโดยเทคนิค RT-PCR จากนั้นตรวจสอบลำดับพันธุกรรมเพื่อยืนยันว่าเป็น ยีน Xylose reductase

5.4 ตัดต่อยีน Xylose reductase เข้ากับ vector pYES2.1 ซึ่งมี GAL1 และ CYC1 เป็น โปรโมเตอร์ และ เทอร์มิเนเตอร์ ตามลำดับ plasmid นี้ พร้อมส่งถ่ายเข้าไปใน เซลล์ยีสต์ สำหรับยีน Xylital dehydrogenase และ Xylanase ก็ดำเนินการโคลนเช่นเดียวกันกับข้อ5.1-5.4

6. นำเชื้อยีสต์ที่ได้รับการถ่ายฝากยีน Xylose reductase(XR), Xylital dehydrogenase (XDH) และ Xylanase ทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอนคือ Xylose และ Xylan ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

7.ทำการถ่ายฝากยีน Xylose reductase ให้กับยีสต์ *Candida tropicalis* LPY1,

และ *Candida lusitaniae* ที่สามารถ ย่อยใช้น้ำตาล Xylose ได้ดี เพื่อศึกษาความสามารถของเชื้อหลังได้รับการถ่ายฝากว่ามีประสิทธิภาพสูงขึ้นหรือไม่

เวลาและสถานที่ - ปี 2556 – ปี 2558

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

8.ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการแยกเชื้อยีสต์จากตัวอย่าง จากองุ่น สับปรด ไม้ที่กำลังถูกย่อยสลาย กากอ้อย กากน้ำตาล และลูกแป้ง ที่ใช้สำหรับผลิตเหล้าขาว สุ่ม อย่างละ 20 กรัม มาบด ทำให้เจือจางด้วยน้ำเกลือ (Normal saline) แล้วเลี้ยงบน Malt Extract Agar (MEA) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง สามารถแยกเชื้อยีสต์ที่แตกต่างกันได้ 50 ไอโซเลต จากนั้นย้ายโคโลนีของยีสต์ 50 ไอโซเลต เลี้ยงบน Yeast Extract Peptone Dextrose Medium (YPD) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง สามารถคัดแยกเชื้อยีสต์ที่เจริญได้ดีได้ 25 ไอโซเลต

ผลการทดสอบความสามารถในการหมักแอลกอฮอล์ของยีสต์

ตารางที่ 1 แสดงผลการหมักทดสอบความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ของยีสต์

ไอโซเลท	ไอโซเลต No.	จุดเดือด	% แอลกอฮอล์	ความสามารถในการตกตะกอน	ความสามารถในการเกิดฟอง
1	BO-Y4	93.45	8.07	ดีมาก	ฟองเยอะมาก
2	LP-Y1	92.65	9.53	ดีมาก	ฟองเยอะมาก
3	LP-Y2	96.53	3.44	ไม่ตะกอน	ไม่มีฟอง
4	LP-Y1F	92.63	9.43	ปานกลาง	ไม่มีฟอง
5	WM-Y1	92.93	8.93	ดีมาก	ฟองมาก
6	PD-Y1	93.05	8.69	ดีมาก	ฟองมาก
7	PD-Y3	93.15	8.56	ปานกลาง	ฟองปานกลาง
8	SH-Y1	93.38	8.15	ดีมาก	ฟองปานกลาง
9	PA-y1	93.25	8.40	ปานกลาง	ฟองเยอะมาก
10	PA-Y2	93.15	8.57	ปานกลาง	ฟองมาก

หมายเหตุ: คัดเลือกจากเชื้อทั้งหมด 25 ไอโซเลต ทำทดสอบจากการหมักแอลกอฮอล์ของยีสต์ ค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ

ผลการจำแนกเชื้อยีสต์ด้วยเทคนิคลำดับนิวคลีโอไทด์

ตาราง 2 แสดงการจำแนกชนิดของเชื้อยีสต์ โดยการวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมไรโบโซมอลดีเอ็นเอ ด้วยไพรเมอร์ NL-1 และ NL- 4

Isolate no.	Isolate code	name	Accession No.	Identity (%)
1	BO-Y4	*Candida tropicalis*	JQ686911.1	99%
2	LP-Y1	*Candida tropicalis*	EU543684.1	100%
3	LP-Y2	*Pichia guilliermondii*	EU182216.1	99%
4	LP-Y1F	*Hanseniaspora*	FJ196743.1	99%
5	WM-Y1	*Candida tropicalis*	KC544468.1	99%
6	PD-Y1	*Pichia kudriavzevii*	JQ231077.1	100%
7	PD-Y3	*Candida tropicalis*	JQ686912.1	99%
8	SH-Y1	*Zygosaccharomyces bailii*	JX458116.1	99%
9	PA-y1	*Candida tropicalis*	JQ686913.1	99%
10	PA-Y2	*Clavispora lusitaniae*	KC616317.1	97%

ผลการโคลนยีน Xylose reductase สามารถโคลนยีน

- Xylose reductase ได้จาก**เชื้อรา** *Neurospora sp*
- *endo Xylanase* ได้จาก**เชื้อรา** *Aspergillus niger*

-.*Xylital dehydrogenase* ได้จาก**เชื้อรา** *Trichoderma sp.*

แล้วทำการตรวจสอบลำดับพันธุกรรมของ ยีน ทั้ง 3 พบว่าถูกต้อง เมื่อนำมาตัดต่อยีน Xylose reductase เข้ากับ vector pYES2.1 ซึ่งมี GAL1 และ CYC1 เป็น โปรโมเตอร์ และ เทอร์มิเนเตอร์ ตามลำดับ subclone plasmid ที่มียีนแทรกอยู่โดยการถ่ายฝาก ใน *E.coli* เพื่อขยาย plasmid ที่มียีนแทรกอยู่ แล้วสกัดแยก plasmid ที่มียีนแทรกอยู่ จาก เซลล์ *E.coli* แล้วส่งถ่ายเข้า เชื้อยีสต์(*Saccharomyces cerevisiae*) ที่ได้รับการถ่ายฝากในอาหารที่ขาด URA3

นำเชื้อยีสต์ที่ได้รับการถ่ายฝากยีน Xylose reductase(XR), Xylital dehydrogenase (XDH) และXylanase ทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอนคือ Xylose และ Xylan ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า

ยีสต์ที่ได้รับการถ่ายฝากยีน Xylose reductase(XR) มีการแสดงออกของยีน Xylose reductase สำหรับยีนอื่นไม่มีการแสดงออก

ยีสต์(*Saccharomyces cerevisiae*) ที่ได้รับการถ่ายฝาก ยีน Xylose reductase เจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มี Xylose เป็นแหล่งคาร์บอนขณะที่ ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) ที่ได้ไม่รับการถ่ายฝาก ยีน Xylose reductase ไม่สามารถเจริญเติบโต ในอาหารนี้

ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) ที่ได้รับการถ่ายฝาก ยีน Xylose reductase, มีประสิทธิภาพสูงกว่า ที่ไม่ถ่ายยีนถึง 11.35 %

9.สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ผลการแยกเชื้อยีสต์จากตัวอย่าง จากองุ่น สับปรด ไม้ที่กำลังถูกย่อยสลาย กากอ้อย กากน้ำตาล และลูกแป้ง ที่ใช้สำหรับผลิตเหล้าขาว สามารถแยกเชื้อยีสต์ที่แตกต่างกันได้ 50 ไอโซเลต และเมื่อนำมาจำแนกชนิดของเชื้อยีสต์ โดยการวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมไรโบโซมอลดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ NL-1 และ NL- 4 ได้ยีสต์จำนวน 10 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ของยีสต์ที่ดี

ผลการโคลนยีน Xylose reductase สามารถโคลนยีน Xylose reductase ได้จากเชื้อรา *Neurospora sp.* ยีน *endo Xylanase* ได้จากเชื้อรา *Aspergillus niger* และยีน *Xylital dehydrogenase* ได้จากเชื้อรา *Trichoderma sp.* แล้วส่งถ่ายเข้า เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่ายีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) ที่ได้รับการถ่ายฝาก ยีน Xylose reductase มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสและลิตเอทานอลได้สูงกว่า ที่ยีสต์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนถึง 11.35 %

10.การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ นำยีสต์ไปใช้ในการวิจัยและใช้ในการหมักเอทานอลระดับอุตสาหกรรมต่อไป

11.คำขอบคุณ (ถ้ามี)

12.เอกสารอ้างอิง

13.ภาคผนวก