บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการกลายพันธุ์ยีสต์ *Candida oleophila* สายพันธุ์ C-73 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาว โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ แล้วตามด้วยการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น ความสำเร็จของการคัดเลือกสายพันธุ์จะขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของการคัดเลือก วิธีการคัดเลือกที่ดีต้องเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว คัดเลือกได้ครั้งละมากๆ และผลที่ได้มีความสอดคล้องกับประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวของสายพันธุ์ จากรายงานของ Nout(1972) ได้ทำการคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตกรดมะนาว โดยเพาะเลี้ยง *Candida* สายพันธุ์ต่างๆ บนอาหารวุ้นที่มีแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 0.5 แล้วทำการละลายกรดมะนาวในอาหารวุ้นด้วยสารละลายกรดซัลฟุริก จากนั้นวิเคราะห์กรดมะนาวด้วยวิธีเพนตะโบรโมอะซิโตน พบว่า วิธีนี้มีความสัมพันธ์กับการผลิตกรดมะนาวในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า งานวิจัยนี้ได้นำเอาวิธีของ Nout มาเป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีการคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์กลายพันธุ์ในขั้นปฐมภูมิ โดยสุ่มสายพันธุ์ใหม่ที่ได้จากการกลายพันธุ์ 50 สายพันธุ์ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสำหรับผลิตกรดมะนาว (production medium) ที่มีกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร และเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 0.3 หาค่า potency index ตามวิธีการทดลองข้อ 6.1 และหาความสัมพันธ์ระหว่างค่า potency index กับปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้ในอาหารเหลวสูตร PM3 ได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.6204 ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ ดังนั้นวิธีที่พัฒนาขึ้นจึงเป็นวิธีที่เหมาะสำหรับที่จะใช้ในการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ อย่างไรก็ตามวิธีการนี้จะต้องอาศัยความแม่นยำ และความชำนาญเพื่อให้ได้ค่าที่ถูกต้อง โดยจะต้อง เทอาหารให้มีความหนา และการกระจายของแคลเซียม-คาร์บอเนตสม่ำเสมอ เขี่ยเชื้อให้มีปริมาณใกล้เคียงกัน ซึ่งการทำหลายๆ ซ้ำจะช่วยให้ค่าที่ได้ถูกต้องแม่นยำขึ้น

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาวในน้ำหมักอาจทำได้โดยใช้วิธีเพนตะโบรโม-อะซิโตน (Ikeno et al.,1975;Wojtatowicz et al.,1991) หรืออาจวิเคราะห์

ด้วย HPLC (Okoshi et al.,1987; Rane and Sims,1993) ในงานวิจัยนี้ได้วิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวในน้ำหมัก 50 ตัวอย่าง ด้วยวิธีวิเคราะห์ทั้งสองวิธี และประเมินความสอดคล้องของผลที่วิเคราะห์ได้ พบว่า ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทั้งสองมีความสอดคล้องกันมาก โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.9948 ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงใช้วิธีวิเคราะห์ด้วยเพนตะโบรโมอะซิโตน สำหรับการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิครั้งที่ 1 เนื่องจากวิธีนี้เหมาะสมกับจำนวนตัวอย่างมาก เพราะทำได้เร็วกว่า และสิ้นเปลืองน้อยกว่าการวิเคราะห์ด้วย HPLC ส่วนการคัดเลือกขั้นสุดท้ายใช้วิธีวิเคราะห์ด้วย HPLC เนื่องจากมีจำนวนตัวอย่างเหลือน้อย และต้องการข้อมูลเกี่ยวกับชนิดและปริมาณกรดอื่นๆ ในน้ำหมักด้วย วิธีวิเคราะห์ด้วย HPLC ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้ปรับปรุงมาจากวิธีของ Bevilacqua และ Califano(1991) โดยสภาวะที่เปลี่ยนไป ได้แก่ ใช้คอลัมน์รีเวอร์สเฟส C18 ที่มีความยาว 25 เซนติเมตร และเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร ใช้สารละลายตัวพาที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 2.00 และไม่เติมอะซิโตไนทริล อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์เป็น 40 องศาเซลเซียส และใช้กรดทาร์ทาริกเป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน

สิ่งก่อการกลายพันธุ์ที่ใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์เพื่อผลิตกรดมะนาว รายงานส่วนใหญ่จะใช้ แสงอุลตราไวโอเลต และสารเคมี NTG จากการทบทวนเอกสารที่มีผู้รายงานไว้(Hamissa et al.,1982;Suzuki et al.,1974;Wojtatowicz et al., 1993;Matsuoka et al.,1980)ไม่สามารถสรุปได้ว่าวิธีการกลายพันธุ์ใดให้ผลดีกว่ากัน ดังนั้นในการกลายพันธุ์ *Candida oleophila* C-73 จึงใช้ แสงอุตราไวโอเลต เปรียบเทียบกับ NTG จากการหาปริมาณ (dose)ของ แสงอุลตราไวโอเลต และ NTG ที่เหมาะสมสำหรับชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ พบว่า ที่เวลาฉายแสงอุลตราไวโอเลตนาน 20,30 และ 40 วินาที ซึ่งได้เปอร์เซนต์รอดเป็น 26.55, 2.20 และ 0.61 ตามลำดับ สายพันธุ์ที่คัดเลือกส่วนใหญ่ผลิตกรดมะนาวได้สูงกว่าสายพันธุ์ C-73 ในการทดลองนี้ได้คัดเลือกสายพันธุ์ U-40 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตกรดมะนาวได้ 111.84 กรัมต่อลิตร สูงกว่า C-73 ร้อยละ 14.30 สำหรับการหาปริมาณ NTG ที่เหมาะสม พบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 0.680 มิลลิโมลาร์ ซึ่งทำให้เกิดเปอร์เซนต์รอดตาย 7.14 จากการทดลองนี้คัดเลือกได้สายพันธุ์ N-57 ที่ผลิตกรดมะนาวได้ 112.06 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่า C-73 ร้อยละ 16.30 ส่วนปริมาณกรดไอโซซิตริกที่ผลิตโดยสายพันธุ์กลายพันธุ์ทุกสายพันธุ์

ใกล้เคียงกับ C-73 เนื่องจากการผลิตกรดมะนาวของสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตรา-ไวโอเลต ซึ่งเดิมได้คัดเลือกไว้ 7 สายพันธุ์ มีแนวโน้มที่จะผลิตกรดมะนาวลดลงถึง 5 สายพันธุ์ หลังจากเพาะเลี้ยง 3 ครั้ง โดยลดลงประมาณ 3-8 กรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลตครั้งนี้มีแนวโน้มการผลิตไม่คงที่ ดังนั้นจึงเลือกใช้สายพันธุ์ N-57 เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นในการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG แทน การเลือกสายพันธุ์ U-40 และใช้ความเข้มข้นของ NTG 0.680 มิลลิโมลาร์ จะเห็นว่า เปอร์เซนต์รอดใกล้เคียงกับของสายพันธุ์ C-73 แต่เปอร์เซนต์ของสายพันธุ์ที่ให้กรดมะนาวสูงขึ้นจะลดลงมาก จากสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ผลิตกรดมะนาวสูงขึ้น คัดเลือกได้สายพันธุ์ NN-1 ซึ่งผลิตกรดมะนาวได้ 121.42 กรัมต่อลิตร สูงกว่าสายพันธุ์ C-73 และ N-57 คิดเป็นร้อยละ 27.21 และ 8.35 ตามลำดับ ส่วนการผลิตกรดไอโซซิตริกของสายพันธุ์ไม่แตกต่างไปจาก C-73 Hamissa และคณะ(1982) และ Wojtatowicz และคณะ (1991) รายงานว่า การกลายพันธุ์ยีสต์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลตสามารถเพิ่มผลผลิตกรดมะนาวได้ดีกว่า NTG และการกลายพันธุ์ครั้งที่ 2 นี้ได้สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ผลิตกรดมะนาวเพิ่มขึ้นน้อยกว่าการกลายพันธุ์ครั้งแรก ดังนั้นจึงทดลองเปลี่ยนชนิดของสารก่อกลายพันธุ์เป็นแสงอุลตราไวโอเลต โดยใช้สายพันธุ์ NN-1 เป็นสายพันธุ์ตั้งต้น หลังจากคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ พบว่า จำนวนสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ผลิตกรดมะนาวเพิ่มขึ้นจะน้อยกว่า จำนวนสายพันธุ์ที่ผลิตกรดมะนาวเพิ่มขึ้น เมื่อชักนำ C-73 ให้กลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต อาจเนื่องจาก NN-1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นมีประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวสูงอยู่แล้ว จึงเพิ่มได้อีกไม่มากเท่ากับ C-73 ซึ่งเริ่มต้นต่ำกว่า ในการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิครั้งที่ 1 สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ผลิตกรดมะนาวได้ใกล้เคียงกัน แต่ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมักลดลงอยู่ในช่วง 3.5-4 ซึ่งบ่งชี้ว่ามีกรดที่ไม่อยู่ในรูปเกลือแคลเซียมอยู่ในน้ำหมัก และยีสต์ใช้น้ำตาลกลูโคสหมด แสดงให้เห็นว่ามีข้อจำกัดของปริมาณน้ำตาลในสูตรอาหาร และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตไม่เพียงพอ ดังนั้นจึงเพิ่มปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต และน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแคลเซียมคาร์บอเนต 120 และน้ำตาลกลูโคส 220 กรัมต่อลิตร การผลิตกรดมะนาวของสายพันธุ์กลายพันธุ์จะแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยสายพันธุ์ NNU-50 และ NNU-62 สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดใกล้เคียงกันเท่ากับ 138.04 และ 138.50 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ C-73 ในสูตรอาหาร PM3 สายพันธุ์ NNU-50 และ NNU-62 สามารถผลิตได้สูงกว่าร้อยละ

38.44 และ 38.90 ตามลำดับ ส่วนน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ และค่าความเป็นกรดด่างสุดท้ายของสายพันธุ์ NNU-62 จะต่ำกว่าสายพันธุ์ NNU-50 เมื่อคิดค่าอัตราส่วนของกรดมะนาวต่อกรดไอโซซิตริกของ NNU-50 และ NNU-62 ได้เท่ากับ 8.70 และ 9.14 ตามลำดับ ดังนั้นจึงคัดเลือกสายพันธุ์ NNU-62 สำหรับการศึกษาต่อไป

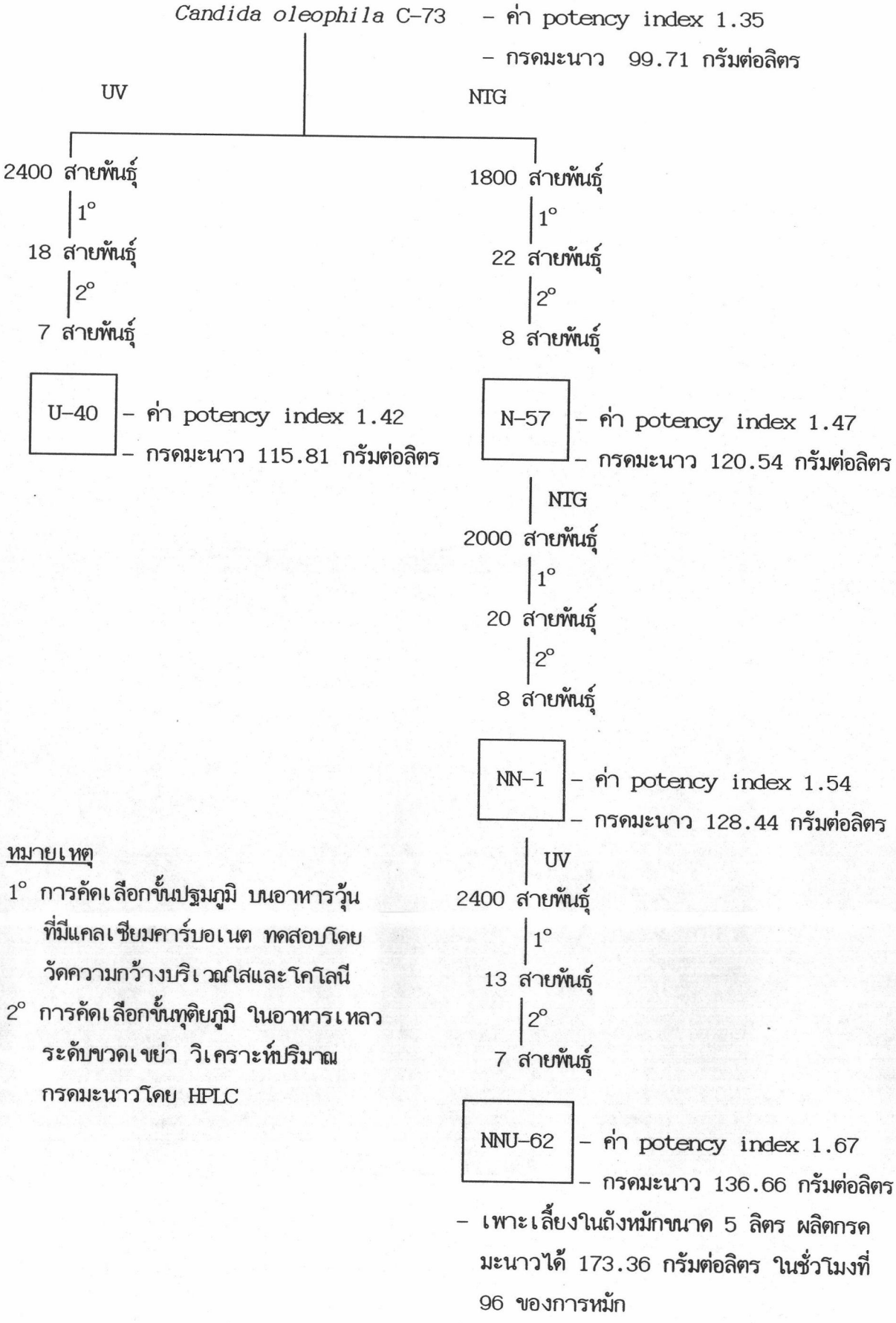
ความเสถียรในการผลิตกรดมะนาว เป็นอีกลักษณะหนึ่งที่ต้องการ จึงทำการทดสอบการผลิตกรดมะนาวของสายพันธุ์ C-73 กับสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ในแต่ละรอบ โดยใช้สูตรอาหาร PM3 เพาะเลี้ยง 5 ครั้ง ในเวลา 75 วัน พบว่า สายพันธุ์ N-57, NN-1, และ NNU-62 มีความเสถียรในระดับที่น่าพอใจ โดยผลิตกรดมะนาวได้ (เฉลี่ยจาก 5 ครั้ง) 120.54±0.86,128.44±1.64 และ 136.66±1.27 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่สายพันธุ์ C-73 ผลิตได้ 99.71±1.53 กรัมต่อลิตร ส่วนการผลิตกรดมะนาวของสายพันธุ์ U-40 จะลดลงครั้งละประมาณ 3 กรัมต่อลิตร จนกระทั่งในครั้งที่ 5 ผลิตกรดมะนาวได้ 111.74 กรัมต่อลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับ C-73 อย่างไรก็ตามความเสถียรยังขึ้นอยู่กับการเก็บรักษา และสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงด้วย (Stanbury and Whitaker, 1984)

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวของ สายพันธุ์ C-73 และ NNU-62 ในระดับขวดเขย่า พบว่า หลังจาก 60 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง การผลิตกรดมะนาวของทั้งสองสายพันธุ์จะแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด โดยสายพันธุ์ NNU-62 มีอัตราการเพิ่มขึ้นของกรดมะนาวเร็วกว่า C-73 หลังจากชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก สายพันธุ์ NNU-62 จะคงที่ เพราะน้ำตาลกลูโคสหมด หรือมีข้อจำกัดอื่นๆ เช่น ความหนืดของอาหารที่เกิดขึ้นเมื่อแคลเซียมซิเตรทเพิ่มขึ้น ทำให้การกวนผสม การถ่ายโอนของสารอาหาร และการละลายของออกซิเจนลดลง เป็นต้น แต่สายพันธุ์ C-73 ยังคงผลิตต่อไปเรื่อยๆ อัตราการผลิตต่ำกว่า แต่ช่วงเวลาการผลิตยาวกว่า อาจเป็นเพราะ น้ำตาลยังเหลือ และความหนืดของอาหารน้อยกว่า

จากการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวในถังหมัก 5 ลิตร โดยใช้อาหารสูตรเดียวกับที่ใช้ในระดับขวดเขย่า พบว่า เชื้อ NNU-62 ผลิตกรดมะนาวได้ถึง 173.36 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก ซึ่งสูงกว่าในระดับขวดเขย่าคิดเป็นร้อยละ 37.06 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการเพาะเลี้ยงในถังหมักมีการกวนผสมอย่างดี ทำให้การถ่ายโอนของสารอาหาร และการละลายของออกซิเจนดีกว่าในขวดเขย่า Okoshi และ

คณะ (1987) และ Rane และ Sims (1994) ได้ศึกษาถึงผลของออกซิเจนต่อการผลิตกรดมะนาว และรายงานไว้ว่า ออกซิเจนมีผลอย่างมากต่อการผลิตกรดมะนาว โดยเมื่อเพิ่มการละลายออกซิเจน จะทำให้การผลิตกรดมะนาวสูงขึ้น และผลิตได้เร็วขึ้น อย่างไรก็ตามสภาวะที่ใช้ในการทดลองนี้ เป็นสภาวะที่ยังมิได้ผ่านการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับสายพันธุ์ใหม่นี้โดยเฉพาะ ดังนั้นจะต้องมีการวิจัยเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับสายพันธุ์ NNU-62 ต่อไป โดยคาดหวังว่าเมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมแล้ว ประสิทธิภาพการผลิตน่าจะดีกว่านี้

จากงานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลและแนวทางในการปรับปรุงสายพันธุ์ *Candida oleophila* เพื่อเพิ่มผลผลิตกรดมะนาวต่อไป การกลายพันธุ์และการคัดเลือกสายพันธุ์เป็นวิธีที่สามารถเพิ่มผลผลิตกรดมะนาวได้ตามวัตถุประสงค์ของงานวิจัย อย่างไรก็ตามการปรับปรุงสายพันธุ์ยังคงต้องทำอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงยิ่งๆขึ้น จากงานวิจัยนี้ สามารถสรุปขั้นตอนการปรับปรุงสายพันธุ์ *Candida oleophila* C-73 ได้แผนภาพดังต่อไปนี้



หมายเหตุ

1° การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ บนอาหารวุ้นที่มีแคลเซียมคาร์บอเนต ทดสอบโดยวัดความกว้างบริเวณใสและโคโลนี

2° การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ ในอาหารเหลว ระดับขวดเขย่า วิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวโดย HPLC