บทคัดย่อ

การผลิตกรดออกซาโลอะซิติกจากยีสต์ทนร้อน *Issatchanchia* sp. S1

ยีสต์ทนร้อน การหมัก กรดออกซาโลอะซิติก

ในปัจจุบันกรดออกซาโลอะซิติกมีบทบาททางด้านการศึกษาทางวิทยาศาสตร์ที่หลากหลาย และมีราคาที่ค่อนข้างสูง การศึกษาเกี่ยวกับการผลิตกรดออกซาโลอะซิติกและการนำไปประยุกต์ใช้มีน้อยมาก ดังนั้นการศึกษาการผลิตกรดออกซาโลอะซิติกจากเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. สายพันธุ์ S1 จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ และนำไปสู่กระบวนการผลิตกรดออกซาโลอะซิติก โดยในการทดลองนี้มุ่งเน้นที่จะหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดออกซาโลอะซิติก โดยยีสต์ *Issatchenkia* sp. สายพันธุ์ S1 ที่ใช้ในการทดลองนี้ สามารถคัดแยกได้จากหญ้าหมัก เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สมบัติทางชีวเคมี และการวิเคราะห์ 18S rDNA พบว่ายีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ S1 มีความใกล้เคียงกับ *I. orientalis* 99 % จากการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร enrich medium ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งทำการเปรียบเทียบชนิดของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM พบว่า *Issatchenkia* sp. S1 เจริญได้น้อยในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี ซูโครส แลคโตส กลีเซอรอล แมนนิทอล มอลโตส แป้งมันสำปะหลังและแป้งมันฝรั่ง เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน พบว่าอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสหรือฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ยีสต์สามารถเจริญได้ดี เมื่อทำการทดสอบการผลิตกรดออกซาโลอะซิติกเบื้องต้นของเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ในอาหาร YM ที่มีองค์ประกอบของ น้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร สารสกัดยีสต์ 3 กรัมต่อลิตร สารสกัดมอลต์ 3 กรัมต่อลิตร เปปโตน 5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร ทำการเลี้ยงที่อุณภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการกวนที่ 200 รอบต่อนาที ในสภาวะที่ไม่ให้อากาศ พบว่า การเจริญสูงสุดอยู่ที่ 0.297 ± 0.001 ต่อชั่วโมง และสามารถผลิตกรดออกซาโลอะซิติกได้ 3.02 กรัมต่อลิตร หลังจากทำการหมักไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม หลังจาก 24 ชั่วโมง ปริมาณของกรดออกซาโลอะซิติกที่อยู่ในอาหารเหลวจะลดลง

จากนั้น ได้ทดสอบหาแหล่งอาหารคาร์บอนชนิดต่างๆ ต่อการเจริญโดยนำแหล่งอาหารคาร์บอน ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลซูโครสที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อินเวอร์เทส และแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (AMG 300L) และเอนไซม์เทอร์มามิว (Thermamyl® SC) ที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร มาเตรียมเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนที่ใช้สำหรับการหมัก โดยใช้อาหาร YM ทำการหมักในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเติมอาหาร

100 มิลลิลิตร ทำการเติมหัวเชื้อที่ 5% โดยปริมาตร ทำการบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน พบว่า อัตราการเจริญของเชื้อ *Issatchenkia* sp. S1 สูงสุดที่ 0.295±0.025 ต่อชั่วโมง ในอาหารที่ใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสและเอนไซม์เทอร์มามิวเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน แต่กลับไม่พบการผลิตของกรดออกซาโลอะซิติกในตัวอย่างที่ทำการทดลอง

เนื่องจากได้มีการย้ายห้องปฏิบัติการไปยังอาคารใหม่ในระหว่างดำเนินโครงการ แต่จากความผิดพลาดในขนย้าย และกระแสไฟฟ้าไม่เสถียร มีผลทำให้ตู้แช่ -70 องศาเซลเซียส ไม่สามารถควบคุมอุณภูมิได้ เชื้อที่ทำการเก็บไว้เกิดความเสียหายและมีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย หลังจากนั้นได้มีการคัดแยกเชื้อจากหลอดเก็บเชื้อดังกล่าว และทำการตรวจสอบ พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ดีในอาหาร YM ที่มีน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตส รวมทั้งใช้เกลืออะซิเตตในความเข้มข้นต่ำเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน สามารถทนอุณหภูมิ และผลิตเอทานอลได้ที่สภาวะเดิมที่ใช้ในการทดลอง และมีลักษณะทางกายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์เช่น ลักษณะของเซลล์ การเกิด pseudomycelium ความสามารถในการใช้น้ำตาล และความสามารถในการทนอุณหภูมิสูง ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับ *Issatchenkia* sp. S1 แต่ไม่พบการผลิตกรดออกซาโลอะซิกจากโคโลนีที่ทำการแยกได้ ด้วยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟฟีของเหลวสมรรถณะสูง (HPLC)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ABSTRACT

Oxaloacetic Acid Production by Thermotolerant *Issatchenkia* sp. S1

Thermotolerant yeast, Fermentation, Oxaloacetic acid

Nowadays, oxaloactic acid has been an important chemical in life science research and its price is very expensive. Moreover, the research in oxaloactic acid production and their application are not so much. Therefore, the production of oxaloacetic acid by thermotolerant yeast *Issatchenkia* sp. S1 is very impressive topic. Therefore, this study focuses on the optimization condition of oxaloactic acid production by thermotolerant yeast *Issatchenkia* sp. S1. Thermotolerant yeast strain *I. orientalis* S1 was isolated from silage sample. According to the morphological, biochemical characterization and 18S rDNA analysis, the results showed the S1 strain has 99% similarity to *I. orientalis*. The optimum conditions for growth of thermotolerant *I. orientalis* S1 was determined in enrich medium at 40^{o}C. The utilization of carbon sources by *Issatchenkia* sp. S1 was varied with sort of carbons supplemented in YM medium. *Issatchenkia* sp. S1 showed weakly grown in YM medium with sucrose, lactose, glycerol, manitol, maltose, cassava starch or potato starch as carbon sources. When either glucose or fructose was used as carbon source in YM medium, the better growth of *Issatchenkia* sp. S1 was performed. In 2 L fermenter experiment, The agitation speed at 200 rpm with no aeration in YM medium with 100 g/L and 2 g/L $(NH_4)_2SO_4$ at 40^{o}C showed the highest of growth rate (0.297 ± 0.001 h^{-1}). The highest concentration of oxaloacetic acid production was 3.02 g/L at 24 h after fermentation. However, oxaloacetic acid concentration in fermented broth was decreased after 24 h of fermentation time.

Additionally, effect of carbon sources on growth were analyzed in YM medium which replaced the carbon source at 100 g/L of glucose, fructose, hydrolyzed sucrose (treated with invertase) or hydrolyzed cassava starch (treated with AMG 300L and Termamyl® SC). The cultures were fermented in 250-mL Erlenmeyer flasks with 100 mL of reaction volume with 5% v/v of inoculum and incubated at 40^{o}C with 200 rpm for 2 days. The highest growth rate was obtained at

0.295±0.025 h^{-1} when cultured in hydrolyzed cassava starch but could not detect oxaloacetic acid production in fermented broth.

By transferring laboratory to the new building, the fault in transport was occurred. The deep freezer (-70 ^{o}C) could not controlled the temperature in fluctuated electricity. It was made damage and bacterial contamination in stock tube of thermotolerant yeast *Issatchenkia* sp. S1. Then, the contaminated stock tube was isolated. The all isolates were the great growth rate in YM medium with glucose and fructose including acetate salt, as carbon source, could tolerated temperature and produced the ethanol at the same condition of thermotolerant yeast *Issatchenkia* sp. S1. Moreover, the cell morphology under light microscope was not different the thermotolerant yeast *Issatchenkia* sp. S1 but not found the oxaloacetic acid from all isolated colony using high performant liquid chromatography (HPLC) analysis.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี