บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

1. การฉายแสงอัลทราไวโอเลต เพื่อชักทำให้เกิดการกลายพันธุ์

วิธีการเดิมที่นิยมใช้ในการฉายแสงอัลทราไวโอเลต เพื่อชักนำเชื้อจุลินทรีย์ ให้เกิดการกลายพันธุ์นิยมเจือจางเซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ในจานแก้ว นำไปฉายแสงแล้วจึงเอาไปเกลี่ยลงบนอาหารแข็งบมในที่มืด [Witkin , 1969 , Gong et al. 1981 ,Maleszka et al., 1983 , Jeffries , 1984 and James et al., 1989] ข้อบกพร่องของวิธีนี้ ก็คือ เซลล์จะไม่ได้รับคลื่นรังสีเท่ากัน เซลล์ที่อยู่บริเวณผิวสารละลายจะถูกรังสีที่มีความเข้มสูงกว่าเซลล์ที่อยู่ลึกจากผิวสารละลายลงไปตามลำดับ เนื่องจากระยะห่างจากหลอดไฟ การดูดกลืนคลื่นแสงของสารละลาย รวมทั้งการบดบังกันของเซลล์ที่อยู่ด้านบน ดังนั้นเซลล์ที่เหลือรอดจึงมักเป็นเซลล์ที่อยู่ด้านล่างเป็นส่วนใหญ่ ส่วนการฉายแสงในหลอดแก้ว ผิวหลอดที่เป็นแก้วก็จะสกัดกั้นลำแสง ทำให้พลังงานลดลงไป แต่วิธีการที่ใช้ สามารถแก้ข้อบกพร่องเหล่านี้ได้ เซลล์ทุกเซลล์ อยู่ในระดับเดียวกันติดตรงผิวอาหาร นั่นหมายถึง เซลล์ที่เหลือรอด น่าจะเป็นเซลล์ที่ถูกรังสีแต่ไม่ตายไปนั่นเอง

ตามปกติ การรอดชีวิตมักใช้ค่าต่ำมาก เช่น ไม่เกิน ร้อยละ 1 [Gong et al.,1981 and Jeffries , 1984.] แต่เนื่องจากความเหมาะสมต่อการทำวิทยานิพนธ์นี้ จึงใช้เวลาการฉายแสงเป็น 33 วินาที ซึ่งจะทำให้เชื้อเหลือรอดอยู่ในช่วงร้อยละ 4.01 ถึง 0.57 คัดเลือกจานแก้วที่ปรากฏโคโลนีเหลือรอดอยู่บริเวณกลางๆ อันจะทำให้สะดวกต่อการนำไปทำ replica plate ต่อไป พบว่าจะได้มีลักษณะดังกล่าว ในอัตราประมาณ 1:3 ถึง 1:7 เมื่อเทียบกับจำนวนจานแก้วที่ทำในแต่ละครั้งทั้งหมด

ตามปกติรังสี UV เป็นรังสีประเภท non-ionizing radiation กล่าวคือมีพลังงานต่ำเมื่อเทียบกับรังสีชนิดอื่นๆ ไม่สามารถทำให้อะตอมของสสาร หลังการถูกรังสีตกกระทบปลดปล่อยอิเลคตรอนออกมาแล้วกลายสภาพไปเป็นอิออนได้ แต่ก็สามารถกระตุ้นให้อิเลคตรอนวงนอกสุดเกิดสภาวะตื่นตัว (excited state) นำไปสู่การเกิด electron shift ของคู่เบส ภายในโครงสร้างของ DNA โดยเฉพาะคู่เบส pyrimidine ได้แก่ Cytosine และ Thymine (Drake and Koch , 1976) ซึ่งผลกระทบที่พบโดยทั่วไปของการชักนำให้เกิดมิวเตชั่นโดยรังสี UV มักเป็นแบบ Thymine dimer [T-dimer] กล่าวคือ 2 โมเลกุลของเบส Thimine ที่อยู่ติดกันในสายเดี่ยวของ DNA มีการสร้างพันธะเชื่อมต่อกันเกิดเป็นวง (cyclobutyl ring) แทนที่จะจับกับเบส Adenine ของสาย polynucleotide ตรงข้ามที่เป็น complementary กันอยู่ อาจพบ dimer ลักษณะนี้ที่เกิดจากการจับ

กันระหว่าง Thymine กับ Cytosine เป็น Thymine-Cytosine dimer ได้เช่นกัน แต่โอกาสเกิดน้อยกว่ามาก และเมื่อ polynucleotide ที่มี T-dimer นี้เกิดการลอกรหัส [transcription] ซึ่งมีเอนไซม์ DNA-polymerase เป็นตัวควบคุม ก็จะไม่สามารถอ่านรหัสตรงนี้ได้ ทำให้สาย polynucleotide ใหม่ที่สร้างเกิดช่องว่าง (gap) ขึ้น เมื่อเป็นเช่นนี้สิ่งมีชีวิตจะมีระบบช่วยตัวเอง 2 แบบ แบบแรก คือ หาเบสตัวใดตัวหนึ่งโดยสุ่ม แทรกเข้าไปแทนในช่องว่างของ polynucleotide ที่กำลังลอกรหัสขึ้นมา หรือแบบที่สองทำการต่อเชื่อม polynucleotide ที่สร้างขึ้นมาใหม่ให้เข้ากับสายของ polynucleotide บริเวณที่เกิดช่องว่างขึ้นนั้น ลักษณะเช่นนี้ทำให้เกิด point mutation ขึ้น โดยถ้าเป็นแบบแรก จะเป็นชนิด transversion หรือ transition แล้วแต่ว่าจะแทนด้วย purine หรือ pyrimidine ตามลำดับ ส่วนแบบที่สอง จะเกิด point mutation ชนิดที่เรียกว่า frameshift mutation [Singleton and Sainsbury , 1988 and Gardner , et al., 1991] กล่าวคือ มีการอ่านรหัสคลาดเคลื่อนผิดไปทั้งสาย

จากเหตุผลดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าผลกระทบจากรังสี UV จะทำให้สารพันธุกรรมเกิดการเปลี่ยนแปลงแบบสุ่ม ที่คาดเดาการแสดงออกแน่นอนไม่ได้ อธิบายได้ดังนี้ คือ

1. ถ้าการเกิด mutation นั้นทำให้ genetic codes บริเวณที่สังเคราะห์โปรตีน ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของเซลล์ไม่ว่าจะเป็นโปรตีนโครงสร้างหรือส่วนประกอบของเอนไซม์ (structural or functional protein) สูญเสียไป จนไม่สามารถสร้างขึ้นได้ หรือ สร้างขึ้นมาแล้วแต่องค์ประกอบเปลี่ยนแปลงไปจนไม่สามารถนำไปใช้เป็นประโยชน์แก่เซลล์อีกต่อไปได้ เซลล์นั้นจะตายไป อันเป็นเหตุผลใช้อธิบาย การตายของเซลล์ (ไม่ปรากฏโคโลนี) หลังการฉายแสง

2. ในทำนองกลับกันถ้า mutation ที่เกิดขึ้นนั้น ไม่ทำให้ genetic codes เปลี่ยนแปลงไป เช่นเกิดการแทนที่ (substitution) ด้วยเบสตัวเดิม หรือเปลี่ยนไปก็จริงแต่อ่านรหัสออกมาเป็นโปรตีนตัวเดิม เนื่องจากรหัสเป็น degeneracy coden ลักษณะเช่นนี้จะพบว่า เซลล์นั้นยังสามารถเจริญได้ตามปกติ แต่คุณสมบัติบางอย่างอาจเปลี่ยนแปลงไป ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณของเอนไซม์ที่ต่างไปจากเดิม จึงมีผลกระทบกับวิถีเมตาบอลิซึมเห็นได้ชัดเจนเมื่อนำเชื้อหลังการฉายแสง ไปเลี้ยงในอาหารที่มีองค์ประกอบแตกต่างกัน

3. โคโลนีที่เกิดขึ้นหลังการฉายแสง UV พบว่าขนาดแตกต่างกันออกไปและส่วนใหญ่เล็กกว่า เมื่อเทียบกับโคโลนี control ซึ่งไม่ถูกฉายแสง สนับสนุนคำอธิบายข้อ 2. กล่าวคือเซลล์หลังถูกฉายแสง UV รหัสพันธุกรรมถูกทำลายแบบสุ่ม ถ้าเป็นรหัสที่สังเคราะห์โปรตีนที่ไม่สำคัญต่อเซลล์นักหรือไม่สำคัญต่อขบวนการแบ่งเซลล์ เซลล์นั้นก็ยังพอมีโอกาสแบ่งเซลล์ได้ในอัตราพอ ๆ กับเซลล์ control โคโลนีพวกนี้จะใหญ่กว่าโคโลนีอื่นๆ ในจานแก้วนั้นๆ ส่วนพวกที่มีโคโลนีขนาดเล็กกว่าปกติ อาจเกิดจากรหัสพันธุกรรมที่สังเคราะห์ส่วนประกอบของเอนไซม์บาง

ตัวถูกทำลายไป หรือเกิดการแทนที่ได้รหัสพันธุกรรมที่สังเคราะห์ส่วนประกอบของเอนไซม์ตัวเดิม แต่มีปริมาณลดลงจาก degeneracy code ดังกล่าวข้างต้นที่มีปริมาณ anticodon ใน t-RNA น้อยกว่าเดิม เป็นผลให้เอนไซม์ที่สร้างขึ้นทำงานได้ไม่เต็มที่หรือพอเพียง [ปริมาณลดลง] เกิดเป็นมิวแทนต์ที่อ่อนแอ (leaky mutants) มีอัตราการแบ่งตัวช้าจึงมีโคโลนีเล็กกว่าโคโลนีอื่น ๆ

4. การเพิ่มเวลาการฉายแสง UV โดยให้ความเข้มแสงและระยะห่างจากต้นกำเนิดเท่าเดิม ย่อมทำให้แสงมีโอกาสตกกระทบโมเลกุลของ DNA เพิ่มมากขึ้น อิเลคตรอนมีเวลามากพอที่จะสะสมพลังงานแสง จนถึงระดับที่จะเกิดสภาวะกระตุ้น อันเป็นผลต่อเนื่องให้เกิดการชิพของอิเลคตรอนในโมเลกุลเบสนำไปสู่บริเวณที่เกิด T-dimer เพิ่มขึ้นส่งผลให้การลอกระหัสยีนผิดพลาดเพิ่มขึ้นเป็นเงาตามตัว เมื่อยีนเสียหายเพิ่มขึ้นอัตราการตายของเซลล์จึงเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มระยะเวลาการฉายแสงนั่นเอง

2. การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ของสายพันธุ์ wild type และมิวแทนต์ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ ซึ่งใช้เป็นตำหนิ [marker] กับความสามารถในการหมักน้ำตาลไซส

อาหารแข็งสูตรYMA ใช้เป็น enrich media เนื่องจากเป็นอาหารหลักที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อหลังการถูกฉายแสง เป็นอาหารที่มีแร่ธาตุและสารอาหารสำคัญครบถ้วน ต่อการเจริญของเชื้อยีสต์และจุลินทรีย์โดยทั่วๆไปอาหารแข็งสูตรไนโตรจีนัสเบสปราศจากกรดอะมิโนเป็น minimal media [YNB] ที่มีแร่ธาตุและสารอาหารเพียงพอ เหมาะกับเซลล์ยีสต์ปกติที่จะสังเคราะห์กรดอะมิโนที่เซลล์ต้องการขึ้นมาได้เอง [ยุวพิน, 2539] ดังนั้นเมื่อทำ replica plate เชื้อ wild type จาก enrich media ลงบนอาหาร YNB พบว่าเชื้อเจริญได้ดีเท่าๆกับในอาหาร enrich media จึงไม่จำเป็นต้องทำ replica plate เชื้อ wild type ลงบนอาหาร YNB เติมกรดอะมิโนเพื่อเปรียบเทียบไว้อีก ส่วนอาหารสูตร YMA ที่เติมยาปฏิชีวนะ nystatin เนื่องจากเซลล์ยีสต์เป็น Eukaryotes ที่มีการสังเคราะห์โปรตีนได้ซับซ้อนกว่า Prokaryotes โดยทั่วๆไป ยาปฏิชีวนะที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่นิยมส่วนมาก อาทิ streptomycin,ampicilin,penicillin หรือ tetracyclin ยาพวกนี้ออกฤทธิ์คล้ายๆกัน คือทำลายโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรีย โดยการเข้าเกาะตำแหน่งต่างๆ ในสาย m-RBA ทำให้ไม่สามารถเกิดการแปลรหัสที่สมบูรณ์ได้ [รุจิรัตน์, 2526, Adelberg et al., 1976 and Bardell et al.,1982] ทำให้แบคทีเรียตายหรือหยุดการแบ่งเซลล์ หรือหยุดกิจกรรมต่างๆ ภายในเซลล์ แต่ยาปฏิชีวนะเหล่านี้มักมีผลต่อเซลล์ยีสต์เพียงเล็กน้อย แม้จะใช้ความเข้มข้นสูงก็ตาม เนื่องจากยีสต์มีผนังเซลล์หนาและเป็นสารประกอบพวก polysaccharides แตกต่างจากผนังเซลล์แบคทีเรีย ที่เป็นสารประกอบ peptidoglycans ที่สังเคราะห์ขึ้นยากกว่าทนต่อสารเคมีได้น้อยกว่า อีกทั้งยีนในจีโนมของยีสต์ซับซ้อนมากกว่าดังกล่าวข้างต้นสามารถสังเคราะห์สารที่จะเข้าจับโมเลกุลของยา

ปฏิชีวนะเหล่านี้ให้เป็นกลางต่อเซลล์ได้ดีกว่าแบคทีเรีย อย่างไรก็ตาม ยังมียาปฏิชีวนะในกลุ่ม polyenes ที่มีฤทธิ์จำเพาะเจาะจงกับยีสต์และเชื้อต่าง ๆ อาทิ nystatin นิยมใช้รักษาโรคที่เกิดจากรา หรือยีสต์โดยเฉพาะพวก *Candida sp.* ในทางเดินอาหารและช่องคลอด กลไกการออกฤทธิ์ของมัน ก็คือ รวมตัวจับกับ sterol ภายในผนังเซลล์ของเชื้อโรคเป็นผลให้ ผนังเซลล์ถูกทำลายหรือสูญเสีย กลไกของมันไป เซลล์จึงไม่สามารถเจริญได้ตามปกติ [Herbert, 1959]

ในการทดลองนี้จึงใช้ nystatin เป็นตำหนิทางการดื้อยาของ *P. tannophilus* ทดสอบความเข้มข้นที่ทำให้เชื้อตายไปมากกว่า 90 % ตามวิธี MIC-test [Minimal Inhibitory Concentration : ดูในภาคผนวก] พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมเป็น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งผลจากการทดลองพบว่าเชื้อมิวแทนต์ 53 สายพันธุ์รวมทั้ง wild type ไม่สามารถเจริญในอาหารผสมยา nystatin นี้ได้เลย มี 2 สายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถเจริญได้คือ สายพันธุ์ที่ 2.4 A กับ 2.5 A ลักษณะโคโลนีของ 2.5 A เหมือนกับ wild type ส่วนของ 2.4A มีขนาดโคโลนีที่เล็กกว่าเล็กน้อย และลักษณะแตกต่างไป อย่างไรก็ตามทั้งคู่เจริญได้ดีในอาหารสูตร YNB แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงในเชิงก้าวหน้าเมื่อเทียบกับ wild type ตรงที่นอกจากจะเจริญในอาหารคัดเลือกได้ดีแล้ว ยังมีคุณสมบัติต้านทานยาปฏิชีวนะ nystatin อีกด้วย แต่คุณสมบัติอันนี้ อาจไม่เหมาะสมต่อ มนุษยชาติ ถ้าสายพันธุ์นั้นก่อให้เกิดโรคในมนุษย์หรือสัตว์เลี้ยง เนื่องจากการหายารักษาได้ยากยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตาม สายพันธุ์ทั้งสองไม่มีความสามารถในการหมักไซโลสได้สูงกว่า wild type จึงไม่ควรเป็นสายพันธุ์ที่จะใช้ศึกษาพัฒนาเพื่อปรับปรุงความสามารถในการหมักน้ำตาลไซโลสต่อไป

การศึกษาฟีโนไทป์ โดยการใช้ความสามารถในการเจริญบน YNB และ YNB เติมกรดอะมิโนเมทไธโอนีนและไลซีนเป็นตำหนิ เหตุผลที่เลือกใช้กรดอะมิโน 2 ตัวนี้ เนื่องจากนิยมใช้ในการศึกษาลักษณะของมิวแทนต์ของยีสต์ อาทิ *Saccharomyces sp.* [ยุวพิน,2529, Lemontt,1977, Lawrence et al., 1985 and Morison et al., 1989] โดยให้เป็นฟีโนไทป์ที่จะใช้เป็นตัวบอกชนิดของเซลล์ร่วมกับ mating type ของมิวแทนต์ที่ได้เพื่อใช้ในการ conjugation ต่อไป เนื่องจาก *Saccharomyces sp.* เป็น heterothallic yeast [Singleton and Sainsbury ,1988. หน้า 420] ใน *P. tannophilus* [Maleszka et al.,1986, Schneider et al., 1989 and James et al.,1989] ใช้เป็นฟีโนไทป์ของมิวแทนต์เช่นกันแต่ต่างกับใน *Saccharomyces sp.* ตรงที่ *P. tannophilus* เป็น homothallic yeast [Singleton and Sainbury, 1988] จึงไม่นำมาใช้ร่วมกับ mating type แต่มักใช้เป็นฟีโนไทป์ร่วมกับลักษณะอื่น ๆ ของมิวแทนต์ที่สร้างขึ้น อาทิ ความสามารถเจริญในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กัน เช่น ไซโลส กลูโคส แมนโนส ไซลิตอล ฯลฯ อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าอะมิโนเหล่านี้ จะไม่สามารถใช้เป็นตำหนิของมิวแทนต์ในการระบุความสามารถในการใช้น้ำตาลไซโลส หรือการผลิตเอทธานอลได้โดยตรง แต่สามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ของมิวแทนต์

ได้ อาทิ การทำ conjugate ข้ามสายพันธุ์ หรือการเติมกรดอะมิโนตัวที่ขาดไปในอาหารที่มิวแทนต์ต้องการ ดังเช่น รายงานของ James และคณะ [1989] ในการสร้างมิวแทนต์ที่เจริญได้ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลไซโลสได้ไม่ดี และเป็น met^- กล่าวคือ ไม่สามารถเจริญในอาหาร YNB [Yeast Nitrogenous Base:YNB] ยกเว้นเมื่อเติมกรดอะมิโนเมทไธโอนีน เมื่อนำสายพันธุ์นี้ไปหมักไซโลส พบว่า activity การผลิตเอทธานอลจะเพิ่มขึ้น เมื่อเติมเมทไธโอนีนลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ นั่นหมายถึง ฟีโนไทป์ที่ได้จากการคัดเลือก โดยใช้กรดอะมิโนทั้งสองตัวนี้จะเป็นประโยชน์ในการใช้ปรับปรุงสายพันธุ์มิวแทนต์ที่มี activity ต่ำในการผลิตเอทธานอลต่อไปได้ ตัวอย่างสายพันธุ์เหล่านี้ ได้แก่ สายพันธุ์ที่ 2.1A,2.2A,2.6A และ 3.4B

จากฟีโนไทป์และลักษณะของโคโลนี กับความสามารถในการหมักไซโลส สายพันธุ์ที่มี activity ในการหมักไซโลสได้สูง [มีความยาวฟองกาซในหลอดเก็บกาซสูงกว่า 90 % เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ wild type] ได้แก่ 2.3B, 2.5B, 2.6B, 3.1D, 4.2A, 4.2B, 5.1A, 5.2B, 5.3A และ 5.3D ทั้งหมด 11 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 20 เมื่อเทียบกับสายพันธุ์มิวแทนต์ที่สร้างขึ้นทั้งหมด 55 สายพันธุ์ พบว่าสิ่งที่เหมือนกันมิวแทนต์เหล่านี้คือ สามารถเจริญได้ใน YNB ได้ทั้งหมดแต่ไม่สามารถเจริญในอาหารผสมยาปฏิชีวนะ nystatin ได้เลย สรุปว่ามิวแทนต์เหล่านี้ มีฟีโนไทป์ met^+ lys^+ nys^- เหมือนกันหมด อย่างไรก็ตาม ความสามารถในการเจริญบนอาหาร YNB และอาหาร YNB ที่เติมกรดอะมิโนดังกล่าวอาจแตกต่างกันเล็กน้อยในด้านลักษณะของโคโลนี พบว่า มี 7 สายพันธุ์จากมิวแทนต์เหล่านี้มีลักษณะโคโลนีเหมือนกับ wild type ทั้งหมด คือ กลม ขอบโคโลนีเรียบ ผิวมันและมีสีขาวครีมคล้ายเนยเหลว [Wickerham, 1961] ได้แก่สายพันธุ์ 2.3B, 2.5B, 2.6B, 3.1D, 4.2A, 4.2B และ 5.3A คิดเป็นร้อยละ 12.7 เมื่อเทียบกับสายพันธุ์มิวแทนต์ที่สร้างขึ้นทั้งหมด ส่วนสายพันธุ์ที่เหลืออีก 4 สายพันธุ์คือ 3.1B, 5.1A, 5.2B, และ 5.3D โคโลนีมีลักษณะต่างจาก wild type เล็กน้อย ได้แก่ 3.1B และ 5.1A กล่าวคือ รีไม่กลมเท่า wild type นอกจากนั้นเหมือนกับ wild type คิดเป็นร้อยละ 3.6 ที่เป็นเช่นนี้ อาจเกิดจากสาเหตุ 2 ประการ ประการแรก โคโลนีเกิดจากเซลล์อย่างน้อย 2 เซลล์ที่อยู่ใกล้กัน ประการที่สอง โคโลนีเกิดจากเซลล์เดียว แต่ค่อนข้างไวต่อความหนืดหรือสารอาหารใน Plate ที่อาจมีความหนืดหรือเข้มข้นต่างกันอยู่บ้าง บริเวณที่มีความหนืดน้อยหรือมีความเข้มข้นอาหารอยู่ต่ำ เซลล์จะแบ่งตัวในทิศทางนั้นช้ากว่าบริเวณที่มีความหนืดต่ำหรือมีความเข้มข้นสารอาหารที่มันต้องการมากกว่า ส่วนอีก 2 สายพันธุ์ คือ 5.2B และ 5.3B มีโคโลนีที่แตกต่างจากโคโลนี wild type ค่อนข้างมากกว่ามิวแทนต์อื่นๆข้างต้น กล่าวคือ ค่อนข้างกลม ผิวด้าน สีครีม อันเป็นสีเข้มกว่าเล็กน้อย คือ ออกเหลืองอ่อน ขณะที่ wild type จะมีสีขาวอมเหลืองอ่อน ลักษณะที่โคโลนีไม่กลมเท่ากับ wild type อธิบายด้วยเหตุผลเดียวกันกับในสายพันธุ์ 3.1B และ 5.1A ส่วนลักษณะผิวด้านอาจเกิดจากองค์ประกอบของผนังเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปจาก

เดิม ทำให้หักเหแสงได้น้อยลงเป็นผลให้ความมันวาวลดลงด้วย ส่วนการที่สีเข้มกว่าเล็กน้อยอาจเป็นสาเหตุเดียวกันกับความมันวาวที่ลดลงจนเห็นผิวด้านนั่นเอง คือเมื่อความมันวาวน้อย แสงหักเหยาก ทำให้ดูโคโลนีทึบหนาจนเหมือนมีสีเข้มขึ้นนั่นเอง สังเกตได้จากสายพันธุ์มิวแทนต์อื่นๆ ที่มีผิวโคโลนีด้านจะมีสีโคโลนีเป็นสีครีมทั้งสิ้น ยกเว้นสายพันธุ์ 2.4A สายพันธุ์เดียว ที่มีโคโลนีสีขาวทั้งนี้นอกจาก องค์ประกอบผนังเซลล์ที่หักเหแสงได้น้อยกว่าแล้วอาจเกิดจากองค์ประกอบต่างๆภายในเซลล์ ที่มีความทึบแสงน้อยลง คิดเป็นร้อยละ 1.8 เท่านั้นเมื่อเทียบกับมิวแทนต์ทุกสายพันธุ์ที่พบโคโลนีลักษณะเช่นนี้ อย่างไรก็ตาม สายพันธุ์ 2.6B กับ 5.3D ก็เป็นสายพันธุ์ที่มี activity สูงกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ ในการหมักน้ำตาลไซโลส

สำหรับสายพันธุ์ที่มี activityในการหมักไซโลสได้ต่ำกว่า wild type ไม่น้อยกว่า 50 % คัดเลือกได้ 7 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 12.7 ได้แก่ 1A, 2.4C, 3.1A, 3.2C, 3.3B และ 4.1C ลักษณะทางฟีโนไทป์โดยรวมคล้ายสายพันธุ์ที่มี activity สูง ตรงที่ทั้งหมดสามารถเจริญได้ในอาหาร YNB อย่างไรก็ตามมันมีความแตกต่างกันมากกว่า อาทิ สายพันธุ์ 1A กับ 2.6C มีความสามารถในการเจริญเทียบเท่ากับ wild type, สายพันธุ์ 2.4B กับ 3.2C มีความสามารถในการเจริญพอ ๆ กัน, สายพันธุ์ 3.3B กับ 4.1C มีความสามารถในการเจริญพอๆกันและน้อยกว่าสายพันธุ์ 1A และ 2.6C เพียงเล็กน้อย ส่วนความสามารถในการตอบสนองต่อกรดอะมิโน พบว่า สายพันธุ์ 2.4B และ 3.2C ตอบสนองการเจริญเมื่อเติมกรดอะมิโนไลนีนได้ดีกว่าเมทไธโอนีน สายพันธุ์ 3.1A และ 4.1C ตอบสนองต่อกรดอะมิโนทั้งสองพอๆกัน ส่วนสายพันธุ์ที่ 3.3B การเจริญบนอาหารเติมกรดอะมิโนทั้งสองตัวไม่แตกต่างไปจาก การเจริญบนอาหาร YNB ที่ไม่ได้เติมกรดอะมิโนทั้งสอง หมายถึงไม่มีการตอบสนองต่อกรดอะมิโนทั้งสองตัวนี้ในด้านความสามารถในการเจริญบน enrich media ที่เติมยาปฏิชีวนะ nystatin พบว่าทุกสายพันธุ์ ไม่สามารถเจริญขึ้นได้เลย อย่างไรก็ตาม การให้ตำหนิทางฟีโนไทป์ คงเหมือนกับ 11 สายพันธุ์ที่มี activity สูง คือเป็น met^{+} lys^{+} nys^{-} เช่นกัน

ในด้านลักษณะของโคโลนีเหมือน wild type อยู่ 3 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 5.5 เมื่อเทียบกับมิวแทนต์ทั้งหมดและเป็นร้อยละ 42.9 เมื่อเทียบกับมิวแทนต์ activity ต่ำ 7 สายพันธุ์ซึ่งได้แก่ 1A, 2.6C และ 3.3B อาจเกิดจากยีนที่ควบคุมลักษณะและองค์ประกอบของผนังเซลล์ ไม่ถูกทำลายหรือเกิดการผกผันกลับ [reversible] คาดว่าเป็นไปได้ 2 กรณี คือ เกิด back mutation ในตำแหน่งเดิมของยีนที่เปลี่ยนแปลงไป มิวแทนต์พวกนี้จะมีคุณสมบัติเหมือน wild type มากกว่า การผกผันกลับอีกแบบหนึ่ง สายพันธุ์ที่น่าจะมี revesible แบบนี้ คือ 1A และ 2.6C สังเกตได้จากขนาดของโคโลนีที่อยู่ในช่วงเดียวกับ wild type ซึ่งสามารถใช้อธิบายคุณสมบัติในการเจริญบนอาหารทุกสูตรได้ดีเท่ากับ wild type ในแบบเดียวกัน ส่วนอีกกรณีหนึ่งเกิด reversible ในตำแหน่งใหม่แต่ถอดรหัสออกมาได้เหมือนเดิมเรียกตำแหน่งที่เกิดการผกผันกลับแบบนี้ว่า "Secondary Site

Mutation" ผลก็คือได้ Pseudoprotein ที่ทำให้มีลักษณะคล้ายกับ wild type แต่อาจมีส่วนแตกต่างออกไปในทางด้อยกว่า [leaky mutant] พบได้ในสายพันธุ์ 3.3B ซึ่งมีขนาดโคโลนีเล็กกว่าโคโลนีที่เล็กที่สุดเท่าที่พบใน wild type รวมทั้งใช้อธิบายการเจริญในอาหารทุกสูตรได้เหมือนกัน แต่ไม่ดีเท่ากับ wild type และสายพันธุ์ทั้งสองข้างต้น [Gardner et al., 1991]

สำหรับสายพันธุ์ที่เหลืออีก 4 สายพันธุ์ มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างไปจาก wild type อาทิ รี ขอบไม่เรียบ ผิวด้าน สีขาวหรือครีม อธิบายได้ในแบบเดียวกันกับความผิดปกติ ของโคโลนีสายพันธุ์ 5.2B และ 5.3D

สรุปการศึกษาฟีโนไทป์ทั้งหมดของมิวแทนต์ 55 สายพันธุ์ ที่สร้างขึ้นได้ดังนี้

1. ตำหนิที่ได้จากการเจริญบนอาหารสูตรต่างๆกับความสามารถในการหมักไซโลสไม่มีความสัมพันธุ์ต่อกัน อาจเป็นเพราะยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์กรดอะมิโน เมทไธโอนีนและไลซีนไม่เกี่ยวข้องหรือมีผลกระทบน้อยต่อยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ในวิถีเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับการใช้น้ำตาลไซโลส

2. แสงอัลทราไวโอเลต มีผลกระทบต่อยีนควบคุมลักษณะและองค์ประกอบของผนังเซลล์ รวมทั้งอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ พิจารณาจากความแตกต่างของลักษณะและขนาดของโคโลนีมิวแทนต์ที่แตกต่างไปจาก wild type ซึ่งพบทั้งหมด 35 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 63.6

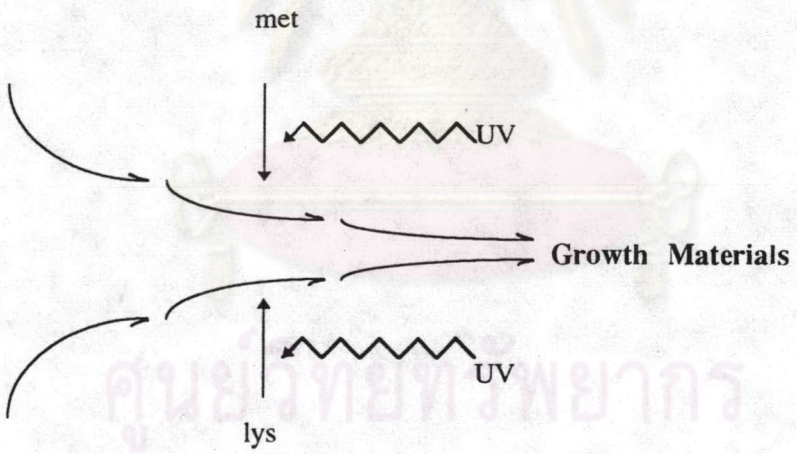
3. จากความสามารถในการเจริญบนอาหารคัดเลือกสูตรต่างๆ พอสรุปชนิดของมิวแทนต์ได้ 4 ชนิดคือ

ก. พวกที่เจริญในอาหารได้เหมือน wild type ทุกประการ พบ 9 สายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์ 1A, 2.2B, 2.3B, 2.6B, 2.6C, 3.1B, 3.1C, 3.1D และ 3.1E คิดเป็นร้อยละ 16.4 อธิบายสาเหตุแบบเดียวกันกับการเกิดโคโลนีเหมือน wild type ในสายพันธุ์ 1A และ 2.6C

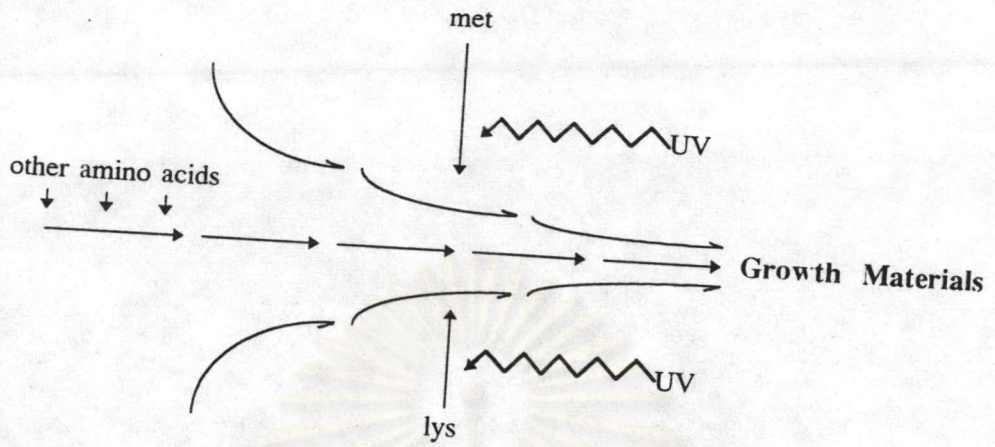
ข. พวกที่เจริญในอาหารสูตร YNB และอาหารสูตร YNB เติมกรดอะมิโนทั้ง 2 ตัวได้ดีพอๆกันแต่น้อยกว่า wild type หมายถึงพวกที่ไม่มีการตอบสนองต่อการเติมกรดอะมิโนทั้ง 2 ชนิดในอาหาร YNB พบทั้งหมด 16 สายพันธุ์ ได้แก่ 2.2D, 2.4A, 2.5A, 2.5B, 3.2B, 3.3A, 3.3B, 4.1D, 4.1E, 4.2A, 4.2B, 5.1B, 5.1C, 5.2A, 5,3B และ 5.3C คิดเป็ร้อยละ 29.1 พวกนี้แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของยีน ในลักษณะที่เรียกว่า back mutation แบบ Secondary Site mutation เป็น Pseudowildtype คือเจริญในอาหารสูตรต่างๆได้ดีแต่ยังด้อยกว่า wild type อธิบายในแบบเดียวกันกับลักษณะโคโลนีที่พบในสายพันธุ์ 3.3B

ค. พวกที่เจริญในอาหาร YNB ไม่ได้หรือไม่ดีเท่ากับในอาหาร YNB ที่เติมกรดอะมิโนเมทไธโอนีนหรือไลซีน กล่าวคือมีการตอบสนองต่อกรดอะมิโนทั้งสองตัวนี้ แยกได้เป็นพวกที่ตอบสนองเฉพาะอาหารที่เติมกรดอะมิโนเมทไธโอนีนมี 5 สายพันธุ์คือ 2.1B, 2.5C, 3.3C, 3.4B

และ 3.4C คิดเป็นร้อยละ 9.1 พวกที่ตอบสนองเฉพาะอาหารที่เติมกรดอะมิโนไลซีนมี 13 สายพันธุ์ คือ 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 2.2A, 2.3A, 2.4B, 3.2C, 4.1A, 5.1A, 5.3A, และ 5.3D คิดเป็นร้อยละ 23.6 พวกที่ตอบสนองต่อกรดอะมิโนทั้ง 2 ตัว มี 12 สายพันธุ์ คือ 2.1A, 2.1C, 2.2C, 2.6A, 3.1A, 3.2A, 3.2D, 3.4A, 4.1B, 4.1C, 5.2B, และ 5.2C คิดเป็นร้อยละ 21.8 เมื่อเทียบกับสายพันธุ์มิวแทนต์ทั้งหมดที่สร้างขึ้น 55 สายพันธุ์ มิวแทนต์เหล่านี้จัดเป็น Nutritional Visible Mutants กล่าวคือ ความสามารถในการสังเคราะห์กรดอะมิโน โดยเฉพาะเมทไธโอนีนกับไลซีนสูญเสียไป ซึ่งอาจเรียกได้อีกอย่างว่าเป็นพวก auxotrophs [James et al., 1989] ได้แก่มิวแทนต์ที่เจริญในอาหาร YNBไม่ได้เลย 4 สายพันธุ์ ดังกล่าวไว้แล้วในช่วงต้นของการอภิปราย คือ สายพันธุ์ 2.1A, 2.2A, 2.6A และ 3.4B แต่จะเจริญหรือตอบสนองเมื่อเติมกรดอะมิโนทั้ง 2 ตัว แสดงว่ารังสี UV ทำลายยีนที่ใช้ในการสังเคราะห์กรดอะมิโนทั้ง 2 ตัวนี้ทั้งหมด หรือกรดอะมิโนทั้ง 2 ตัวนี้เกี่ยวข้องในวิถีเมตาบอลิซึมของสารที่ใช้ในการเจริญเติบโต [Growth Materials] เมื่อมันสังเคราะห์ขึ้นไม่ได้ เชื้อก็ไม่สามารถแบ่งตัวหรือเจริญได้ต่อไป แต่เมื่อเติมกรดอะมิโนตัวใดตัวหนึ่งลงไปก็สามารถเจริญต่อไปได้ ดังแผนภาพข้างล่าง



สำหรับพวกที่เจริญในอาหาร YNB ได้ และจะเจริญได้ดีขึ้น หรือมีการตอบสนองเมื่อเติมกรดอะมิโนตัวใดตัวหนึ่งลงไปอธิบายคล้ายแผนภาพข้างต้น เพียงแต่มิวแทนต์พวกนี้ยีนไม่ถูกทำลายไปมากเหมือน 4 สายพันธุ์ดังกล่าว กล่าวคือ มีวิถีเมตาบอลิซึมที่ใช้กรดอะมิโนตัวอื่นเป็นหลักในการสังเคราะห์ Growth Materials ข้างต้น โดยยีนสังเคราะห์กรดอะมิโนเหล่านี้ไม่ถูกทำลายไป อย่างไรก็ตาม ยีนสังเคราะห์กรดอะมิโนเมทไธโอนีนหรือไลซีน ถูกทำลายไปทั้งหมดหรือเพียงบางส่วนปริมาณ Growrt Materials ย่อมลดลงไปด้วย เป็นผลให้การเจริญในอาหาร YNB ได้ไม่ดีเท่ากับ wild type หรือ ในอาหารที่เติมกรดอะมิโนที่มันขาดลงไป อธิบายตามแผนภาพข้างล่าง



พวกสุดท้าย สามารถเจริญได้ในอาหาร YNB แต่จะเจริญได้ดีขึ้นไม่ว่าจะเติมกรดอะมิโนเมทไธโอนีนหรือไลซีน คือตอบสนองต่อกรดอะมิโนทั้งสองได้พอๆกัน อธิบายโดยใช้แผนภาพเดียวกันกับพวกที่เจริญได้ในอาหาร YNB และเจริญได้ดีขึ้น เมื่อเติมกรดอะมิโนตัวใดตัวหนึ่งลงไป ข้อแตกต่างของมิวแทนต์ที่ตอบสนองต่ออะมิโนตัวเดียว เนื่องจากยีนที่สังเคราะห์เมทไธโอนีนหรือไลซีนสูญเสียไปเพียงตัวเดียว แต่มิวแทนต์ที่ตอบสนองต่อกรดอะมิโนทั้งสอง ยีนที่สังเคราะห์เมทไธโอนีนหรือไลซีนสูญเสียคุณสมบัติจากรังสี UV ทั้งสองตัว เมื่อเติมกรดอะมิโนตัวใดตัวหนึ่งลงไป จึงสามารถเจริญได้ดีพอ ๆ กัน

ง. พวกที่สามารถเจริญได้ใน enrich media ผสมยาปฏิชีวนะ nystatin พบเพียง 2 สายพันธุ์ คือ 2.4A และ 2.5A คิดเป็นร้อยละ 3.6 ดังกล่าวไว้แล้วข้างต้น ทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ยังจัดอยู่ในพวกที่ไม่ตอบสนองต่อกรดอะมิโนทั้งสองตัว อย่างไรก็ตามทั้งคู่ยังมีข้อแตกต่างทางลักษณะของโคโลนีอยู่บ้างกล่าวคือ 2.5A มีลักษณะเหมือน wild type ส่วน 2.4A ขอบโคโลนีไม่เรียบ ผิวด้านลักษณะที่มิวแทนต์แตกต่างไปจาก wild type [ในด้านการดื้อยา]โดยสิ้นเชิงนี้ เรียกว่า " Forward Mutation" การที่เชื้อมีสมบัติต้านทานยา nystatin ได้นี้ อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ DNA จากสายผิดปกติที่ replicate ขึ้นจากบริเวณที่เกิด T-dimer ผลจากลำแสง UV ดังอธิบายไว้ในตอนต้นของการอภิปราย DNA ที่ผิดปกตินี้อาจบังเอิญถอดรหัสโปรตีนที่เข้าจับกับโมเลกุลของ nystatin แล้วทำให้โมเลกุลของมันเสียคุณสมบัติไปจากเดิม กล่าวคือเป็นกลางและไม่สามารถทำอันตรายต่อเซลล์ได้อีกต่อไป หรืออาจจะมีกลไกแบบอื่นๆ ซึ่งคล้ายกับกลไกการดื้อยาในจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคโดยทั่วๆไป [รุจิรัตน์, 2526 และ Tortora et al., 1982]

3. ความสามารถในการหมักน้ำตาลไซโลสกับการผลิตเอทธานอล

เวลาในการหมักเพื่อหาปริมาณฟองกาซใช้เวลาในการหมักถึง 5 วันเนื่องจากความสามารถในการหมักน้ำตาลไซโลสจะช้ากว่ามากเมื่อเทียบกับน้ำตาลกลูโคส ซึ่งสามารถให้ฟองกาซไม่ต่ำกว่าครึ่ง [2.5 ซ.ม.] เมื่อบ่มด้วยจุลินทรีย์ทั่วไป ที่อุณหภูมิห้องเพียง 2 วัน เท่านั้น [ศิริพงษ์, 2534] ถึงแม้ว่าทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบความสามารถจะเหนี่ยวนำให้เกิดเอนไซม์ในการหมักน้ำตาลไซโลสโดยการเลี้ยงด้วยอาหารที่มีแต่ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนแล้วก็ตาม

ผลความยาวฟองกาซ การคัดเลือกครั้งที่ 2 แตกต่างจากการคัดเลือกครั้งที่ 1 อาจเกิดจากเหตุผล 2 ประการ ประการแรกจากการเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร YMB ที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนถึง 2 ชั่วอายุ ในการคัดเลือกครั้งที่สอง ซึ่งแตกต่างไปจากครั้งแรกที่ถ่ายเชื้อจากอาหารวุ้นเอียงสูตร YMA ที่มีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยตรงดังนั้น activity ของเอนไซม์ต่อการหมักไซโลสในครั้งที่สองจึงดีกว่าครั้งแรก อีกประการหนึ่งเชื้อที่ดูดจากอาหารเหลวอาจมีปริมาณสูงกว่าการถ่ายเชื้อด้วยลูปจากอาหารวุ้นเอียงสูตร YMA โดยตรง อย่างไรก็ตาม ผลที่ได้ยังสอดคล้องกันทั้งสองครั้งรวมทั้งส่วนเบี่ยงเบนในครั้งที่สองมีค่าน้อยกว่าในครั้งแรก เนื่องจากการถ่ายเชื้อของเซลล์ในอาหารเหลว ย่อมมีปริมาณเซลล์ใกล้เคียงกันมากกว่าลูปจากอาหารวุ้นเอียงสูตร YMA [สุพจน์, 2530]

การหมักหมายถึง กระบวนการเมตาบอลิซึมที่ได้พลังงานจากการใช้สารประกอบอินทรีย์ทำหน้าที่เป็นทั้งตัวให้และตัวรับอิเลคตรอนขั้นสุดท้าย เช่น การหมักน้ำตาลไซโลสจะหมายถึงกระบวนการเมตาบอลิซึมที่ได้พลังงาน จากการใช้น้ำตาลไซโลสเป็นตัวให้อิเลคตรอนในขั้นต้นและใช้ไพรูเวต [Debus et al., 1983] หรือ อะเซทตาลดีไฮด์ [Gong and Tsao, 1983] เป็นตัวรับอิเลคตรอนขั้นสุดท้ายก่อนจะเปลี่ยนเป็นเอทธานอล แล้วแต่ว่าอยู่ในสภาวะ ไร้อากาศ หรือ มีอากาศตามลำดับ

ในการทดลองเพิ่มเวลาในการหมักเป็น 7 วัน เพื่อให้ความยาวฟองกาซมีมากขึ้นสังเกตความแตกต่างของแต่ละสายพันธุ์ ในการคัดเลือกครั้งที่ 3 นี้ ได้ละเอียดยิ่งขึ้นกว่าสองครั้งแรก พบว่าสายพันธุ์ 5.3D มีความยาวสูงสุด ให้ค่าเฉลี่ยสูงกว่า wild type ถึง 2.38 เท่า ขณะที่ NO_3-NO_3 mutant และ 2.6B เป็น 2 สายพันธุ์ที่มีความยาวฟองกาซเฉลี่ยรองลงมาโดยมีค่าเท่ากันและสูงกว่า wild type 2.13 เท่า จึงคัดเลือกเฉพาะมิวแทนต์ 3 สายพันธุ์นี้รวมทั้ง wild type ไปทำการหมักเอทธานอลจากน้ำตาลไซโลสต่อในขั้นตอนที่ 4.4 โดยเลือกสภาวะที่ให้ผลผลิตสูงสุดแก่เชื้อ wild type [Slininger, 1982 and Schneider, 1983] กล่าวคือ สภาวะจำกัดอากาศ อุณหภูมิ 32 ^{o}c

ในการหมักเอทธานอลนี้ ใช้อาหารเหลวสูตร YMB ที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนอยู่ 0.5 % W/V เลี้ยงในสภาวะมีอากาศโดยการจุกด้วยสำลีที่อากาศผ่านเข้าออกได้สะดวกนาน3วัน

เพื่อให้เชื้อเจริญได้เต็มที่ก่อนแล้วจึงเติมน้ำตาลไซโลสเพิ่มขึ้นไปอีกฟลาสก์ละ 2 % W/V เลี้ยงต่อในสภาวะจำกัดอากาศ โดยการเอาจุกสำลีออกแล้วปิดด้วยแผ่นพลาสติก 2 ชั้น รัดปากให้แน่น เพื่อป้องกันอากาศถ่ายเทเมื่อครบ 24 ชั่วโมงในแต่ละวัน จึงเปิดปากฟลาสก์ ดูดตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณเอทธานอลและปริมาณน้ำตาลคงเหลือ ดังนั้นใน 24 ชั่วโมงเชื้อจะมีปริมาณอากาศให้ใช้ได้เฉพาะในฟลาสก์พบว่า ในวันแรกอัตราการผลิตเอทธานอลของทุกสายพันธุ์จะต่ำที่สุด เมื่อเทียบกับวันอื่น ๆ สาเหตุจากเชื้ออยู่ในช่วงที่เริ่มเปลี่ยนสภาวะจากไม่จำกัดอากาศซึ่งตามปกติจะผลิตเอทธานอลได้น้อย มาเป็นสภาวะจำกัดอากาศที่ผลิตเอทธานอลได้มากกว่า ตรงกันข้ามกับในวันสุดท้ายคือวันที่ 10 อัตราการผลิตเอทธานอลของทุกสายพันธุ์กลับสูงที่สุด สาเหตุเนื่องจาก 5 วันสุดท้าย เชื้อถูกปล่อยให้อยู่ในสภาวะจำกัดอากาศติดต่อกัน ต่างจาก 5 วันแรกที่เชื้อทุกสายพันธุ์จะเปิดปากฟลาสก์ดูดตัวอย่างไปทดสอบดังกล่าว จึงมีโอกาสให้เกิดการถ่ายเทอากาศใหม่ทุกๆ 24 ชั่วโมง ลักษณะเช่นนี้ตรงกับการทดลองที่รายงานจากนักวิทยาศาสตร์ ที่ใช้ยีสต์ตัวนี้หมักเอทธานอลจากน้ำตาลไซโลส [Jeffries, 1982, Slininger et al., 1982, Maleszka and Schneider, 1982, Gong and Tsao, 1983, Schvester et al., 1983, Neirinck et al., 1984, duPreez et al., 1984, Bolen and Detroy , 1985]ข้อจำกัดของสภาวะอากาศกับการผลิตเอทธานอลของ *P. tannophilus* ก็คือ ในสภาวะไม่จำกัดอากาศ มันจะผลิตเอทธานอลได้ดีที่สุดขณะเดียวกันมันก็จะใช้เอทธานอลเป็นแหล่งคาร์บอนอีกแหล่งไปพร้อมๆกัน เอทธานอลสุทธิที่ตรวจพบในสภาวะนี้จึงต่ำกว่าสภาวะอื่นๆ ดังนั้น จากเหตุผลเดียวกันทุกรายงานจากนักวิทยาศาสตร์เหล่านี้ จึงระบุถึงสภาวะจำกัดอากาศ เป็นสภาวะเหมาะสมที่สุดต่อการใช้ *P. tannophilus* หมักเอทธานอลจากน้ำตาลไซโลส

จากการทดลองพบว่า NO_3-NO_3 mutant [N] มีอัตราการผลิตเอทธานอลสูงกว่าทุกสายพันธุ์ในทุกวัน รวมทั้งอัตราการใช้น้ำตาลไซโลสที่เป็นไปอย่างรวดเร็ว ส่วนสายพันธุ์ 5.3D มีอัตราการผลิต 2 วันแรกน้อยกว่า wild type [W] แล้วมีอัตราการผลิตเพิ่มสูงกว่า W ในวันที่ 3 และเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงวันที่ 10 มีค่าสูงกว่า W และ 2.6B ซึ่งมีค่าสูงกว่า W ไม่มากนัก ขัดแย้งกับค่าที่ได้ จากการคัดเลือกความสามารถในการหมักน้ำตาลไซโลสในการทดลองขั้นตอน 4.3 โดยความยาวฟองกาซเรียงตามลำดับจากน้อยไปหามากทั้ง 4 สายพันธุ์เป็น W, 2.6B, N และ 5.3D แต่เมื่อนำมาทำการหมักจริงอัตราการผลิตเอทธานอลจากน้อยไปหามากกลับเป็น W, 2.6B, 5.3D และ N ทั้งที่ในการคัดเลือกครั้งที่ 3 ในตารางที่ 4.3.3 สายพันธุ์ 2.6B กับ N มีค่าเฉลี่ยความยาวฟองกาซพร้อมกับส่วนเบี่ยงเบนเท่ากันกับ N โดยน้อยกว่า 5.3D อยู่ 11.8 % ซึ่งในการทดลองที่ 4.4 N กลับมีอัตราการผลิตสูงสุด มากกว่า 5.3D, 2.6B และ W เป็น 13.1 %, 32.3 %, และ 40.2 % ตามลำดับ อธิบายผลการทดลองที่ขัดแย้งกันนี้ได้ 2 ประการคือ

1.ตามปกติกาซที่เกิดขึ้นในการหมักเอทธานอลจากน้ำตาลไซโลสก็คือกาซคาร์บอนไดออกไซด์ [CO_2] กาซนี้จะได้ออกมาในขั้นตอนเปลี่ยนโมเลกุลสารอินทรีย์ ที่มีขนาดใหญ่ให้เป็นโมเลกุลเล็กลง อาทิ เปลี่ยน 1 โมเลกุลของ pyruvate (3C) เป็น 1 โมเลกุลของ ethanol (2C) จะได้ CO_2 ออกมา 1 โมเลกุล อย่างไรก็ตามการสร้างผลผลิตอื่นๆ ก็ได้ CO_2 ออกมาเช่นกัน ตัวอย่างในวิถีเมตาบอลิซึม ที่เสนอโดย Gong และ Tsao ในปี 1983 และ Debus ในปีเดียวกัน นั่นหมายถึงฟองกาซที่เกิดขึ้นไม่จำเป็นต้องได้จากการสร้างเอทธานอลเสมอไป แต่อาจได้จากการสร้างผลผลิตอื่นๆ โดยเฉพาะ ไซลิตอล เป็นไปได้ว่า สายพันธุ์ที่ 5.3D สร้าง ไซลิตอล ออกมากกว่า N จึงมีความยาวฟองกาซเฉลี่ยสูงกว่า แต่เมื่อทำการหมักจริงจึงตรวจพบเอทธานอลต่ำกว่า อย่างไรก็ตามการสร้าง CO_2 ออกมามากกว่า ย่อมหมายถึงการมี activity ต่อไซโลสสูงกว่านั่นเอง

2. ดังกล่าวไว้แล้วว่า *P. tannophilus* จะใช้เอทธานอลเป็นแหล่งคาร์บอนอีกแหล่งร่วมไปกับไซโลส เป็นเหตุผลอีกประการที่ใช้อธบายความขัดแย้งของผลการทดลองที่อาจเป็นไปได้โดยสายพันธุ์ 5.3D สร้าง CO_2 ออกมามากพร้อมกันด้วยโดยเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซีติกหรืออะเซ็ทตาลดีไฮด์ในสภาวะมีออกซิเจน จึงเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่สามารถใช้อธิบายผลของการหมักเอทธานอลในวันที่ 10 ที่สายพันธุ์ 5.3D มีอัตราการผลิตสูงจนเกือบเท่า N เนื่องจากออกซิเจนมีปริมาณน้อยลง

NO_3-NO_3 mutant เป็นสายพันธุ์ที่สร้างโดย Jeffries ในปี 1984 จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสง UV กับสายพันธุ์ NRRL Y-2460 เหมือนกัน แต่คัดเลือกมิวแทนต์ที่สามารถเจริญได้ดีทั้งในอาหารที่มี Nitrate หรือ Urea เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งตามปกติ wild type จะสามารถใช้ Nitrate เป็น N-Source ได้เท่านั้น Jeffries ให้เหตุผลว่ามิวแทนต์ที่สามารถใช้ Urea เป็น N-Source ได้ด้วยกันนี้ จะมี activity ของ ethanol dehydrogenase ต่ำ จึงทำให้มีอัตราการใช้เอทธานอลต่ำลงตามไปด้วย เอทธานอลที่เชื้อผลิตออกมาจึงไม่ถูกนำไปใช้ ยังผลให้ตรวจพบได้มากกว่าสายพันธุ์อื่น สำหรับอัตราการผลิตเอทธานอลสูงสุดที่ตรวจพบในวันที่ 10 ทั้ง 4 สายพันธุ์ เนื่องมาจากการที่ 5 วันสุดท้ายเชื้อถูกทิ้งให้อยู่ในสภาวะจำกัดอากาศดังกล่าวข้างต้น เรียงตามลำดับคือ N, 5.3D, 2.6B และ W เป็น 0.467, 0.413, 0.353 และ 0.333 ก./ก. สำหรับ W ได้ค่าตรงกับรายงานที่มีผู้เคยทำไว้แล้วในสภาวะจำกัดอากาศ คือประมาณ 0.33-0.36 ก./ก. ส่วน N ก็ได้ค่าใกล้เคียงกับรายงานของ Jeffries กล่าวคือมีอัตราการผลิตสูงกว่า W ประมาณ 30-40 % ซึ่งเป็นค่าสูงสุดของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอทธานอลจากน้ำตาลไซโลสในปัจจุบัน 2.6B มีอัตราการผลิตไม่สูงกว่า W มากนักขณะที่ 5.3D มีอัตราการผลิตสูงกว่า W ถึง 24 % แม้จะไม่เทียบเท่ากับ N แต่ก็ยังมีข้อดีตรงที่อัตราการผลิตของมันจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ขณะที่อัตราการใช้น้ำตาลไซโลสมีน้อยกว่า

N สามารถนำไปใช้ปรับปรุงสายพันธ์ให้ดีขึ้นได้อีก หรืออาจนำไปใช้ในการหมักแบบ recycle ที่มีสภาวะ O_2 ต่ำมีการใช้เชื้อหมักซ้ำนานติดต่อกัน อันจะเป็นผลให้มีการผลิตเอทธานอลได้เพิ่มขึ้น

4. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสายพันธุ์ที่มี activity ในการหมักไซโลสได้สูงและต่ำเปรียบเทียบกับ wild type

สำหรับสายพันธุ์ activity ต่ำ คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความยาวฟองกาซในหลอดเก็บกาซต่ำกว่า wild type [W] ไม่ถึง 50 % ได้ 7 สายพันธุ์ คือ 1A, 2.4B, 2.6C,3.1A, 3.2C, 3.3B, และ 4.1C ส่วนสายพันธุ์ activity สูง 3 สายพันธุ์ ก็คือ N, 5.3D และ 2.6B ดังกล่าวไว้ในหัวข้อการอภิปรายข้างต้น

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบ 2 ตา 50 microscopic fields (50 m.f.) กับเซลล์ที่เลี้ยงใน YMB เป็นเวลา 1 เดือน โดยเริ่มจาก W พบการสร้างแอสคัส โดยดูจากลักษณะของแอสโคฟอร์ ที่ตรวจพบเนื่องจากมีขนาดใหญ่ เห็นชัดเจนซึ่งอาจมีแอสคัสติดอยู่หรือแตกออกแล้วก็ได้ 58 แห่ง จาก 50 m.f. คิดเป็น 1.16 แห่งต่อ filed เทียบกับจำนวนเซลล์ 763 เซลล์ เท่ากับ 13.16 เซลล์ต่อแห่ง Wickerham (1961) ใช้ลักษณะของแอสโคฟอร์เป็นหลักในการ จัดจำแนก *P. tannophilus* ดังนั้นการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาในทุก m.f. จะยึดหลักการตรวจพบแอสโคฟอร์เป็นสำคัญ ซึ่ง Wickerham ได้ให้หลักการพิจารณาสิ่งที่ตรวจพบว่าเป็นแอสโคฟอร์หรือไม่ พอสรุปได้ 3 ประการคือ

1. มีส่วนหัวอันเป็น vegetative cell ที่สร้างแอสโคฟอร์ ซึ่งตามปกติจะเห็นเป็นส่วนแหลมต่อกับส่วนหลอดรูปทรงกระบอกยาวซึ่งรวมกันเป็นก้านชูแอสคัส

2. ทั้งส่วนหัวและส่วนหลอด จะมีผนังหนามากจนเมื่อดูในกล้องจุลทรรศน์จะมีลักษณะทึบแสงต่างจากเซลล์ปกติที่แสงส่องผ่านทะลุได้

3. ตรงปลายหลอดอีกด้านหนึ่ง จะโป่งออกเป็นกระเบาะผนังบางใส ภายในมีแอสโคสปอร์ 1 ถึง 4 อัน ซึ่งสังเกตเห็นได้จากกล้องจุลทรรศน์ ถ้าแอสคัสนี้แตกออก ส่วนปลายแอสโคฟอร์หรือปลายหลอดตรงด้านนี้ จะมีลักษณะเป็นรูปตัวยูหรือวี

ลักษณะของแอสโคฟอร์ที่พบใน W เป็นแท่งตรงยาว 8-32 u อาจพบแท่งโค้งงอบ้างแต่อาจเกิดจากการกดทับหรือรีดแผ่น cover slip ลงไปโดนแอสโคฟอร์ที่ยาว ๆ อย่างไรก็ตามไม่พบแอสโคฟอร์ที่ผิดปกติ อาทิ แอสโคฟอร์ที่แตกสาขาหรือติดกันเป็นกระจุกแต่ประการใด ส่วนในด้านของเซลล์ ส่วนใหญ่มักเป็นรูปร่างกลมหรือรี อาจพบเป็นรูปร่างเหลี่ยมบ้างแต่ไม่มากนัก พบเซลล์ที่มีหน่อเซลล์เล็ก ๆ ติดอยู่ ประมาณ 1 ถึง 3 เซลล์ สายพันธุ์ Y-2460นี้ เป็นพวก diploid strain กล่าวคือจะพบ diploid cells เป็นส่วนใหญ่ [Lodder, 1974] เซลล์มีขนาดใหญ่วัดได้กว้าง 3-

6 u ยาว 4-7 u ส่วนเซลล์ขนาดเล็กจะเป็น haploid cells วัดได้กว้างและยาวพอ ๆ กันคือ 1-3 u เซลล์ที่สร้างแอสคัสจะเป็น diploid cells ขนาดใหญ่ประมาณ 3 x 4 ถึง 4 x 4u เป็นต้นไป ไม่พบการสร้างเส้นใยแบบใด ๆ ทั้งสิ้น ซึ่ง Wickerham กล่าวว่า *P. tannophilus* เป็นสายพันธุ์ที่พัฒนามามากกว่ายีสต์ที่สร้าง phosphomannan อื่น ๆ ตรงที่มันไม่สร้างเส้นใย นอกจากจะเลี้ยงในอาหารที่ชักนำให้สร้างเส้นใยโดยเฉพาะ โดยมีลักษณะเป็นสาย 6 ถึง 7 เซลล์รูปทรงกระบอก วัดได้ตั้งแต่ 10-100 u และอาจมีการแตกแขนงแบบ pseudohyphae กล่าวคือ เป็นสายยาวของ budding cells ที่เกาะติดกันอยู่ อย่างไรก็ตามในการเลี้ยงใน YMB และใน YMA-slant ไม่พบลักษณะทั้ง mycelium หรือ pseudomycelium ใด ๆ ดังกล่าว

แต่ในมิวแทนต์หลายสายพันธุ์ กลับมีลักษณะแตกต่างไปจาก W ในสายพันธุ์ N, 1A, 2.6C และ 4.1C ลักษณะเป็นสายยาวผนังบางใสเป็นข้อ ๆ บางครั้งแตกแขนง ความยาวไม่แน่นอน ตั้งแต่ 10 ถึง 53 u ลักษณะนี้เหมือนกับ pseudomycelium ที่สร้างในพวกยีสต์จีนัสอื่นที่ primitive กว่า โดยเฉพาะพวก phosphomannan producers ด้วยกันเอง แสดงถึงแนวโน้มของยีนทางด้านสัณฐานวิทยาของสายพันธุ์มิวแทนต์เหล่านี้ที่ต่างไปจาก wild type ซึ่งไม่สร้างเส้นใยในอาหารปกติ

ลักษณะแตกต่างจาก W ที่ตรวจพบอีกอย่างหนึ่งก็คือ การสร้างแอสโคฟอร์แตกสาขาหรือแอสโคฟอร์ติดกันเป็นกระจุก จะพบร่วมกันเสมอและไม่พบใน W ซึ่งจะพบแยกกันเดี่ยว ๆ เป็นอัน ๆ ไป Lodder (1974) กล่าวถึงลักษณะนี้ไว้ว่า ในสายพันธุ์ NRRL Y-2461, 2462 และ 2463 พวกนี้ส่วนใหญ่เป็น haploid strains ซึ่งเห็นได้จาก conjugated asci สร้างมาจากเซลล์ที่ได้จาก conjugation tube บางครั้งแตกแขนงหลายจุดขึ้นอยู่กับความยาวของเซลล์ที่สร้างมันขึ้นมา บ่อยครั้งแอสโคฟอร์เหล่านี้จะติดกันเป็นกระจุก conjugant เล็ก ๆ ของ conjugate asci โดยทั่วไปจะเรียวเล็กและติดกันหรืออยู่ใกล้กันกับกระเปาะเซลล์ [bulbous cell] ที่สร้างมันขึ้นมา conjugant จะหนาขึ้นเรื่อยๆ ตลอดความยาวจนถึงแอสคัสตรงปลายแอสโคฟอร์ที่ยังคงมีผนังบางอยู่ นั่นหมายถึงสายพันธุ์มิวแทนต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ที่สร้างเส้นใยข้างต้นนี้มีแนวโน้มของการเปลี่ยนแปลง dominant life cycle จากเดิมที่เป็น diploid strain ไปเป็นแบบ haploid strain มากกว่า แสดงให้เห็นถึงผลกระทบของรังสี UV ที่มีต่อยีนที่ควบคุมกลไกของ life cycle ของเซลล์ ซึ่งอาจมีผลกระทบต่อการหมักไซโลสที่น่าจะเป็นไปในทางที่เลวลงเนื่องจาก haploid strains ของ *P. tannophilus* ทั้งหมด 3 สายพันธุ์ ดังกล่าวคือ Y-2461 ถึง 2463 นั้น จะมี activity การหมักไซโลส ต่ำกว่า Y-2460 ที่ใช้เป็น wild type ในการทดลองนี้ทั้งสิ้น

อย่างไรก็ตาม สายพันธุ์ NO_3-NO_3 mutant (N) สร้าง pseudomycelium เช่นกัน แต่กลับมี activity การหมักสูงสุด สิ่งที่พบในกล้องจุลทรรศน์ของสายพันธุ์นี้ที่แตกต่างจากสายพันธุ์อื่น ๆ ทั้งหมด ก็คือ "กระจุกเซลล์" ซึ่งอาจเป็นกุญแจสำคัญที่ทำให้ N มี activity สูงกว่าสายพันธุ์อื่นก็ได้

กระจุกเซลล์นี้แตกต่างไปจากกลุ่มก้อนเซลล์ที่เหนียวติดกันตามปกติ กล่าวคือยึดติดกันแน่นกว่า แม้จะปั่นกระจายเซลล์เป็นเวลานาน ซึ่งถ้าเป็นกลุ่มเซลล์ที่เขี่ยจากอาหารเอียงตามปกติลงในสารละลายแล้วปั่น เซลล์จะกระจายตัวจากกัน อีกทั้งเมื่อหยดสารแขวนลอยของเซลล์ N บนสไลด์แล้วเคาะหรือรีดด้วย cover slip ขณะตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เซลล์ยังยากที่จะหลุดออกจากกัน ยังยึดติดกันเป็นก้อนทรงกลมทุกครั้งเมื่อปล่อย cover slip ซึ่งถ้าเป็นกลุ่มเซลล์ตามปกติเมื่อเคาะหรือรีด cover slip เซลล์จะแผ่แบนออกจากกันอีกทั้งมันยังต่างจาก budding cells ทั่วๆไป กล่าวคือ budding cells ทั่ว ๆ ไป จะมีขนาดเล็กกว่า mother cell ที่สร้างมันขึ้นมา แต่กระจุกเซลล์ประกอบด้วยเซลล์ขนาดเล็กพอ ๆ กันตั้งแต่ 1 x 1 ถึง 2 x 2 u ซึ่งไม่ควรเป็นขนาดของ mother cell ตามปกติที่มีขนาดประมาณ 3 x 3 ขึ้นไป ยังไม่ทราบกลไกแน่นอนของการเกิด แต่อธิบายโดยการเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งที่มีความปกติทางพันธุกรรมแล้วทำให้เซลล์เกิดมิวเตชั่นเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและหน้าที่มักแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วทั้ง ๆ ที่เซลล์ยังไม่เจริญเต็มที่เซลล์พวกนี้จะมี activity สูงมากกว่าปกติ อาจขับสารหรือเอนไซม์ที่ผิดปกติหรือมีปริมาณสูงกว่าเดิม เป็นไปได้ที่กระจุกเซลล์เหล่านี้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมจากผลของรังสี UV และการชักนำในสารอาหารบางอย่าง ทำให้มีการเพิ่มจำนวนจากเซลล์ที่ยังไม่เจริญเต็มที่แบบเดียวกับเซลล์มะเร็ง มีการสร้างสารบางอย่างซึ่งอาจสำคัญต่อการผลิตเอทธานอล จึงพบว่าสายพันธุ์นี้สามารถผลิตเอทธานอลจากไซโลสได้สูงที่สุด เมื่อเทียบกับ wild type หรือมิวแทนต์ของจุลินทรีย์ที่ใช้หมักไซโลสในปัจจุบัน

สรุปผลการทดลอง

1. เวลาที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตกับ *P. tannophilus* NRRL Y-2460 จากหลอด 15 วัตต์ ให้พลังงาน 8400 mW ที่ช่วงคลื่น 253.7 นาโนเมตร 2 หลอด ที่ระยะห่าง 45 ซม. คือ 33 วินาที

2. จากสายพันธุ์มิวแทนต์ที่สร้างขึ้น 55 สายพันธุ์ มีขนาดและลักษณะของโคโลนีแตกต่างจาก wild type [กลม, ขอบเรียบ, ผิวมัน, ขาวครีม, ขนาด 2.5-4.5 ม.ม.] ทั้งหมด 35 สายพันธุ์ (63.6 %)

3. ตำหนิทางฟีโนไทป์ที่ได้จากความสามารถในการเจริญบนอาหารคัดเลือกสูตรต่างๆของมิวแทนต์ ไม่มีความสัมพันธุ์กันกับความสามารถในการหมักน้ำตาลไซโลส แต่อาจใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงสายพันธุ์ต่อไปได้

4. จากความสามารถในการเจริญบนอาหารคัดเลือกสูตรต่าง ๆ สามารถจำแนกมิวแทนต์ได้ 4 ชนิด คือ

ก. พวกที่มีความสามารถในการเจริญเหมือน wild type 9 สายพันธุ์ (16.4%)

ข. พวกที่ไม่มีการตอบสนองต่อกรดอะมิโนไลซีนและเมทไธโอนีน 16 สายพันธุ์ (29.1%)

ค. พวกที่มีการตอบสนองต่อกรดอะมิโน รวม 30 สายพันธุ์ (54.5%) แยกเป็น 3 แบบ คือ

1. พวกที่ตอบสนองเฉพาะกรดอะมิโนเมทไธโอนีน 5 สายพันธุ์ (9.1%)

2. พวกที่ตอบสนองเฉพาะกรดอะมิโนไลซีน 13 สายพันธุ์ (23.6%)

3. พวกที่ตอบสนองทั้งเมทไธโอนีนและไลซีน 12 สายพันธุ์ (21.8%)

จ. พวกที่มีสมบัติในการดื้อยาปฏิชีวนะไนสเตติน 2 สายพันธุ์ (3.6%)

5. จากการคัดเลือกความสามารถในการหมักน้ำตาลไซโลสโดยอาศัยความยาวฟองกาซที่เชื้อสร้างขึ้นในหลอดเก็บกาซ สายพันธุ์ที่มีค่าสูงกว่า wild type ไม่ต่ำกว่า 50 % ในการคัดเลือกครั้งแรกได้ 11 สายพันธุ์ (20 %) สายที่มีค่าสูงกว่า wild type และใกล้เคียงกับ NO_3-NO_3 mutant ในการคัดเลือกครั้งที่ 2 ได้ 4 สายพันธุ์ (7.27 %) สายพันธุ์ที่มีค่าสูงกว่า wild type และมีค่าเท่ากันหรือมากกว่า NO_3-NO_3 mutant ในการคัดเลือกครั้งที่ 3ได้ 2 สายพันธุ์ (3.6 %) ได้แก่สายพันธุ์ 2.6B และ 5.3D

6.ความสามารถในการผลิตเอทธานอลจากการหมักน้ำตาลไซโลสในสภาวะจำกัดอากาศของ 4 สายพันธุ์เรียงตามลำดับจากน้อยไปหามากคือ wild type, 2.6B, 5.3D และ NO_3-NO_3 mutant โดยให้อัตราการผลิตสูงสุดเป็น 0.333, 0.353, 0.413 และ 0.467 ก./ก. ซึ่งเมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี [0.51 ก./ก.] จะได้ 65.29%, 69.22%, 80.98% และ 91.57% ตามลำดับ

7. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสายพันธุ์ที่มี activity ต่อการหมักไซโลสได้ต่ำกว่า wild type โดยไม่ถึง 50 % เมื่อเทียบโดยใช้ความยาวฟองกาซในหลอดเก็บกาซ พบว่ามีแนวโน้มไปเป็นแบบ haploid strains มากกว่าสายพันธุ์ wild type ซึ่งเป็น diploid strain อาทิ การสร้างแอสโคฟอร์แตกสาขาหรือติดกันเป็นกระจุก ส่วนสายพันธุ์ activity สูง ได้แก่ 2.6B และ 5.3D ไม่พบสิ่งที่แตกต่างไปจาก wild type เดิม ในสายพันธุ์ activity สูงสุดได้แก่ NO_3-NO_3 mutant พบการสร้างเส้นใยเทียม และกระจุกเซลล์ที่อาจเป็นตัวทำให้สายพันธุ์นี้มี activity สูงกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ

จากการทดลองทั้งหมดนี้ สรุปได้ว่า แสงอัลทราไวโอเลต มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์ของ *P. tannophilus* NRRL Y-2460 ได้ทั้งในแง่บวกและลบ โดยเฉพาะในแง่บวกสามารถสร้างสายพันธุ์ที่ผลิตเอทธานอลได้สูงกว่า wild type ถึง 24% ได้แก่ สายพันธุ์ 5.3D ในอัตราส่วน 1 ต่อ 55 สายพันธุ์ของมิวแทนต์ทั้งหมดที่สร้างขึ้น ชี้ให้เห็นถึงคุณสมบัติของแสดง UV ที่มีผลต่อการปรับปรุงสายพันธุ์ของยีสต์นี้ ด้วยวิธีการที่ง่ายและประหยัดค่าใช้จ่ายอันจะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาการปรับปรุงพันธุ์ด้วยแสง UV และการหมักเอทธานอลจากน้ำตาลไซโลสได้ต่อไป