

การแยกเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ที่สามารถใช้เมทานอลเพื่อการเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสจาก ตัวอย่างจากแหล่งธรรมชาติจำนวน 71 ตัวอย่าง ได้เมทิลโลโทรฟิเคียสต์จำนวน 38 ไอโซเลท โดยในจำนวนนี้มี 24 ไอโซเลท ที่เจริญได้ในอาหารเหลว 1% methanol ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการผลิตไซลิทอลที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส โดยทดสอบร่วมกับเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ที่ได้คัดเลือกไว้ก่อนหน้านี้นี้แล้วว่าสามารถเจริญได้ในอาหารเหลว 1% methanol ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเช่นกัน จำนวน 39 ไอโซเลท (รวมเป็น 63 ไอโซเลท) พบว่ามียีสต์จำนวน 7 ไอโซเลท ที่ผลิตไซลิทอลได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีเพียง 5 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตไซลิทอลได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสด้วย

นำเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ทั้ง 5 ไอโซเลทมาศึกษาการผลิตไซลิทอล พบว่ายีสต์รหัส N22 สามารถผลิตไซลิทอลได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส โดยมีปริมาณการผลิตไซลิทอลเท่ากับ 4.7 และ 4.1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ยีสต์รหัส FS96 ผลิตไซลิทอลได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แต่ผลิตไซลิทอลที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ได้ต่ำกว่ายีสต์รหัส N22 ดังนั้นจึงคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิเคียสต์รหัส N22 ไว้สำหรับศึกษาการผลิตไซลิทอลต่อไป ซึ่งจากการศึกษาอัตราการเจริญจำเพาะที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่าเมทิลโลโทรฟิเคียสต์รหัส N22 เป็นเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ทนอุณหภูมิสูง

สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอลโดยเมทิลโลโทรฟิเคียสต์รหัส N22 เมื่อเพาะเลี้ยงในฟลาสก์บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คือเลี้ยงในอาหารเหลว basal medium ที่ประกอบด้วยเมทานอล 1.5% (โดยปริมาตร) โซโลส 100 กรัมต่อลิตร casamino acids 5 กรัมต่อลิตร และ  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 ซึ่งยีสต์ผลิตไซลิทอลได้เท่ากับ 52.3 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง คิดเป็นค่าผลได้ของไซลิทอลเท่ากับ 0.54 กรัมไซลิทอลต่อกรัมโซโลส และเมื่อนำสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวมาศึกษาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอลในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร โดยใช้อาหารเหลว basal medium ปริมาตร 1 ลิตร พบว่ายีสต์รหัส N22 ผลิตไซลิทอลสูงที่สุดเท่ากับ 82.8 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยงเมื่อให้อากาศในอัตรา 1.75 vvm ซึ่งคิดเป็นค่าผลได้ของไซลิทอลเท่ากับ 0.83 กรัมไซลิทอลต่อกรัมโซโลส แสดงว่าเมทิลโลโทรฟิเคียสต์รหัส N22 ผลิตไซลิทอลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ได้เพิ่มขึ้น 16.6 เท่าจากเดิม และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิการผลิตไซลิทอลในถังหมักเป็น 40 องศาเซลเซียส โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าเมทิลโลโทรฟิเคียสต์รหัส N22 ผลิตไซลิทอลได้เท่ากับ 80.8 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง คิดเป็นค่าผลได้ของไซลิทอลเท่ากับ 0.81 กรัมไซลิทอลต่อกรัมโซโลส

Thirty-eight isolates of methylotrophic yeasts capable to use methanol for growth at 37°C were isolated from 71 natural samples. Among these, 24 isolates showed good growth when cultivated in 1% (v/v) methanol broth at 37°C. These 24 isolates as well as 39 isolates obtained from the previous screening for methylotrophic growth at 37°C were screened for xylitol production at 37°C and 40°C. Seven isolates showed the ability to produce xylitol at 37°C and five of them also produced xylitol at 40°C.

Xylitol production of those five methylotrophic yeasts was studied. Results indicated that the isolate N22 was the best producer of 4.7 and 4.1 gram xylitol per liter when cultivated at 37°C and 40°C, respectively. The isolate FS96 also showed good yield of xylitol produced at 37°C. However, lower yield of xylitol was found when cultivated this isolate at 40°C. The isolate N22 was therefore selected for the optimization of xylitol production. In addition, this isolate was identified as thermotolerant methylotrophic yeast based on its higher maximum specific growth rate observed at 30°C compared to those observed at 37°C and 40°C.

The highest xylitol productivity was observed in shake-flask culture using the optimized medium containing 1.5% (v/v) methanol, 100 gram per liter of xylose, 5 gram per liter of casamino acids, 0.5 gram per liter of MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O and adjusted the pH to 7. Using this medium, the isolate N22 produced 52.3 gram xylitol per liter (0.54 gram xylitol per gram xylose) after 12 days of cultivation at 37°C. To optimize the aeration rate, 1 liter of the optimized medium was used for xylitol production in 2.5 liter fermenter. Results showed that the aeration rate of 1.75 vvm gave the highest xylitol production, i.e., 82.8 gram xylitol per liter (0.83 gram xylitol per gram xylose) after 11 days of cultivation at 37°C. This indicated that xylitol production by the isolate N22 increased by 16.6 folds compared to the results obtained prior to the optimization. Xylitol production of this yeast under the optimized conditions but incubated at 40°C was appeared to be not much lower than that was observed at 37°C after 11 days of cultivation (80.8 gram xylitol per liter equivalent to 0.81 gram xylitol per gram xylose).