การตรวจเอกสาร

เมทิลโลโทรฟิกยีสต์

เมทิลโลโทรฟิกยีสต์ คือ ยีสต์กลุ่มที่สามารถใช้เมทานอลซึ่งเป็นสารประกอบคาร์บอนหนึ่งอะตอมเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้

ปลายปี ค.ศ. 1800 มีรายงานการค้นพบแบคทีเรียบางสายพันธุ์ที่สามารถใช้สารประกอบคาร์บอน 1 อะตอมในเมแทบอลิซึมได้ ต่อมา Ogata *et al.* (1969) แยกยีสต์ *Kloeckera* sp. No. 2201 ได้ (ปัจจุบันจำแนกเป็น *Candida boidinii*) โดยเป็นยีสต์ที่สามารถเจริญโดยใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ถือเป็นการค้นพบเมทิลโลโทรฟิกยีสต์เป็นครั้งแรก หลังจากนั้นมีรายงานว่าราเส้นสายบางชนิดสามารถเจริญในอาหารที่มีเมทานอลได้ด้วย (Goncharova *et al.*, 1977) ปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับเมทิลโลโทรฟิกยีสต์อย่างกว้างขวาง เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ทางด้านต่าง ๆ ในระดับอุตสาหกรรม

การแยกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์

Hazeu *et al.* (1972)ได้ทดสอบความสามารถในการใช้เมทานอลของยีสต์ที่เก็บรวบรวมได้ พบว่า ยีสต์ที่สามารถใช้เมทานอลได้เป็นส่วนใหญ่มักแยกได้จากเปลือกไม้ หรือแมลงที่อาศัยอยู่บนต้นไม้ โดยบริเวณที่มีสารประกอบลิกนินที่อุดมไปด้วยหมู่เมทอกซี (methoxy) อาจช่วยส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ ต่อมา Ogata *et al.* (1975) แยกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์จากแหล่งธรรมชาติโดยวิธี enrichment culture จากอาหารที่ใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน พบว่าไม้และดอกไม้เป็นแหล่งที่ดีสำหรับการแยก (Tani, 1984)

Levine and Cooney (1973) แยกเชื้อ *Hansenula polymorpha* DL-1 โดยวิธี continuous enrichment culture ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสได้ ถือว่าเป็นเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ทนร้อน และเมื่อเลี้ยงยีสต์นี้แบบ chemostat สามารถเจริญได้แม้อุณหภูมิการเลี้ยงที่ 50 องศาเซลเซียส โดยเจริญดีที่ 45 องศาเซลเซียส

van Dijken and Harder (1974) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ คือการใช้เมทานอลความเข้มข้นต่ำในช่วง 0.1-0.5 % (โดยปริมาตร) เพื่อป้องกันการยับยั้งการเจริญโดยเมทานอล การเติมวิตามิน (โดยเฉพาะไบโอตินและไทอามีน) การเติม penicillin G และ D-cyclo-serine อีกทั้งยังปรับค่าพีเอชของอาหารเป็น 4.5 เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่แข่งขันระหว่างขั้นตอนการแยกเชื้อ สำหรับตัวอย่างที่นำมาแยกเชื้อ พบว่าดินที่มีอินทรีย์วัตถุมากเป็นแหล่งที่มีเมทิลโลโทรฟิกยีสต์มากกว่าตัวอย่างชนิดอื่น

Tezuka *et al*. (1975) แยกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์จากแหล่งตัวอย่างธรรมชาติ เช่น ดิน เปลือกไม้ โดยวิธี enrichment culture 4 ครั้ง ในอาหารที่มีส่วนประกอบต่อ 1 ลิตร ดังนี้ เมทานอล 10 กรัม $(NH_4)_2SO_4$ 3 กรัม KH_2PO_4 2 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 0.4 กรัม $FeSO_4.7H_2O$ 0.01 กรัม $CaCl_2.7H_2O$ 0.01 กรัม 50 γ ไบโอติน 500 γ thiamine-HCl ยีสต์สกัด 1 กรัม และ สเตรปโตมัยซิน 0.3 กรัม สามารถแยกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ได้ 32 ไอโซเลท จากตัวอย่างจำนวน 1,500 ตัวอย่าง อีกทั้งยังรายงานว่าหากเริ่มต้นเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีเมทานอล 1 % (โดยปริมาตร) เมทานอลจะระเหยไปมากกว่า 20 % แต่ถ้าลดความเข้มข้นของเมทานอลลงเหลือ 0.5 % (โดยปริมาตร) จะช่วยลดการสูญเสียเมทานอลได้

Minami *et al*. (1978) รายงานถึงวิธีการแยกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ทนร้อนที่มีอัตราการเจริญสูง โดยเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่เขตร้อนซึ่งมีโอกาสพบยีสต์เหล่านี้ได้มาก อีกทั้งยังรายงานว่าการคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์โดยการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราว จะมีโอกาสสูญเสียเชื้อสายพันธุ์ที่มีอัตราการเจริญต่ำ ขณะที่การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องจะทำให้มีโอกาสสูญเสียเชื้อที่มีอัตราการเจริญสูงได้เช่นกัน

Pal and Hamdan (1979) สามารถแยกยีสต์ *H. polymorpha* ซึ่งเป็นยีสต์ทนร้อนและชอบเกลือนำไปผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว เมื่อเลี้ยงให้เจริญในอาหารที่มีเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ที่อุณหภูมิการเพาะเลี้ยง 25-40 องศาเซลเซียส พีเอช 3.5-6.7 และสามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของน้ำทะเลอยู่ 7.5%

Lee and Komagata (1980) ได้ศึกษาอนุกรมวิธานของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ พบว่าเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ส่วนใหญ่ที่นำมาศึกษานั้นมีความสามารถในการใช้เพคติน ซึ่งการสลายสารประกอบชนิดนี้ได้ผลผลิตเป็นเมทานอล แสดงว่ายีสต์ที่ใช้เมทานอลเพื่อการเจริญอาจมีจุดเริ่มต้น

ของวิถีเมแทบอลิซึมของเมทานอลที่เกิดในธรรมชาติจากการย่อยสลายซากพืช ข้อบ่งชี้นี้ยังอาจอธิบายถึงข้อสังเกตที่ว่าซากพืชที่เน่าเปื่อยและดินที่มีอินทรีย์วัตถุอุดมสมบูรณ์เป็นแหล่งที่เหมาะสมสำหรับการแยกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์

เมทิลโลโทรฟิกยีสต์มักแยกได้จากดิน ยางไม้ โดยเฉพาะพืชตระกูลสน แมลง เช่น ด้วงเปลือกไม้ (bark beetle) แมลงหวี่ (*Drosophila* spp.) และแมลงวันผลไม้ (fruit fly) เป็นต้น ส่วนแหล่งอื่น ๆ ที่พบ ได้แก่ ส่วนต่าง ๆ ของพืชที่เน่าเปื่อย น้ำจากการสกัดส่วนต่าง ๆ ของพืช (tanning fluid) น้ำจากแหล่งธรรมชาติ และมูลสัตว์ (Kurtzman and Fell, 1998; Barnett *et al.,* 2000)

อนุกรมวิธานของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์

van Dijken *et al*. (1981) รายงานว่ามียีสต์ประมาณ 50 สายพันธุ์ที่เป็นเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ อยู่ใน 7 สกุล ซึ่งเป็นทั้ง ascomycetous และ asporogenous yeast โดยยีสต์ทั้งหมดนี้สามารถใช้สารประกอบคาร์บอนชนิดอื่น ๆ เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้นอกเหนือจากเมทานอล มีลักษณะเป็น facultative methylotrophs สืบพันธุ์ได้โดยการแตกหน่อแบบ multipolar budding ต้องการไบโอตินและไทอามีนเพื่อการเจริญ

Lee and Komagata (1980) ได้ศึกษาอนุกรมวิธานของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์โดยอาศัยข้อมูลจากค่า G-C content ของดีเอ็นเอ ระบบ ubiquinone และ proton magnetic spectra ของสารแมนแนนในส่วนของผนังเซลล์ และรูปแบบของเอนไซม์ alcohol oxidase บนอิเล็กโตรโฟรีติกเจล มาศึกษาเพิ่มเติมนอกเหนือจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยา แล้วสรุปได้ว่าเมทิลโลโทรฟิกยีสต์มี 4 สกุล คือ *Hansenula*, *Pichia*, *Candida*, *Torulopsis* (Harder and Brooke, 1990) ต่อมาข้อมูลจากหนังสือ The Yeast: A Taxonomic Study 4th edition (Kurtzman and Fell, 1998) และหนังสือ Yeast: Characteristic and Identification 3rd edition (Barnett *et al*., 2000) ได้จัดจำแนกยีสต์ในสกุล *Hansenula* และ *Torulopsis* เป็นสกุลอื่น ๆ เช่น *H. polymorpha* จัดจำแนกใหม่เป็น *P. angusta* จนกระทั่งปี ค.ศ. 2005 มีเมทิลโลโทรฟิกยีสต์กระจายอยู่ใน 3 สกุลคือ *Pichia, Candida* และ *Komagataella* (Kurtzman and Fell, 1998; Barnett *et al*., 2000; Kurtzman, 2005) โดยในประเทศไทยมีรายงานการแยกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์จากตัวอย่างธรรมชาติ และพบว่า

เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ 4 สปีชีส์ ซึ่งมีคุณสมบัติทนอุณหภูมิสูงด้วย คือ *Pichia thermomethanolica, P. siamensis, Candida krabiensis* และ *C. sithepensis* (Limtong *et al*., 2004; Limtong *et al*., 2005)

เมแทบอลิซึมของเมทานอลในเมทิลโลโทรฟิกยีสต์

การใช้เมทานอลเพื่อเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนในเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ เริ่มจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของเมทานอล (CH_3OH) ไปเป็นฟอร์มาลดีไฮด์ (HCOH) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) โดยมีเอนไซม์ alcohol oxidase (AOD; EC 1.1.3.13) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน (Kato *et al.,* 1976; Tani, 1985) ฟอร์มาลดีไฮด์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์นั้นถูกกำจัดโดยเอนไซม์ catalase ให้ผลผลิตคือน้ำและออกซิเจน โดยการออกซิไดซ์เมทานอลไปเป็นฟอร์มาลดีไฮด์นี้เกิดขึ้นภายในเพอร์ออกซิโซม ซึ่งฟอร์มาลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นจัดเป็นสารตัวกลางที่เป็นศูนย์กลางของเมทานอลเมแทบอลิซึม โดยอาจเข้าสู่วิถีดิสสิมิเลชันหรือแอสสิมิเลชันต่อไป

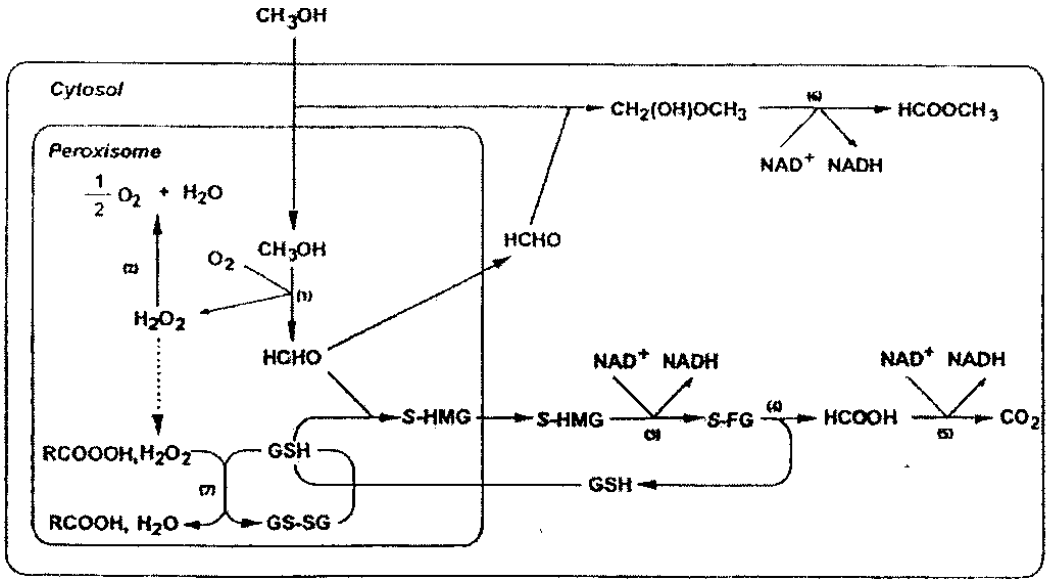
1. **<u>วิถีดิสสิมิเลชัน</u>** เป็นวิถีที่เกี่ยวข้องกับการออกซิไดซ์เมทานอลเป็นคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อผลิต NADH สำหรับสร้างพลังงานในรูป ATP โดยผ่านสารตัวกลางคือ ฟอร์มาลดีไฮด์และฟอร์เมท (ภาพที่ 1)

ในวิถีดิสสิมิเลชันนี้ ฟอร์มาลดีไฮด์จะรวมตัวกับกลูตาไทโอนรูปรีดิวซ์ (GSH) ได้เป็น S-hydroxymethylglutathione (S-HMG; $HOCH_2$-SG) ปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นได้เองโดยไม่ต้องใช้ตัวเร่งและเกิดขึ้นภายในเพอร์ออกซิโซม

$$HCHO + GSH \longrightarrow HOCH_2\text{-}SG$$

ต่อมา S-HMG ถูกส่งไปยังไซโทพลาซึมด้วยกลไกการขนส่งแบบจำเพาะ จากนั้น S-HMG ถูกออกซิไดซ์เป็น S-formylglutathione (S-FG) และ NADH + H^+ โดยมีเอนไซม์ glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase ช่วยเร่งปฏิกิริยา และมี NAD^+ เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (Schutte *et al.,*1976)

$$HOCH_2\text{-}SG + NAD^+ \longrightarrow HCO\text{-}SG + NADH + H^+$$



ภาพที่ 1 วิถีดิสสิมิเลชันของการเปลี่ยนแปลงเมทานอลโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์

เอนไซม์: (1) alcohol oxidase, (2) catalase, (3) glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase, (4) S-formylglutathione hydrolase, (5) formate dehydrogenase, (6) methylformate synthase, (7) Pmp20

คำย่อ: S-HMG, S-hydroxymethylglutathione; S-FG, S-formylglutathione; GSH, รูปรีดิวซ์ของกลูตาไทโอน; GS-SG, รูปออกซิไดซ์ของกลูตาไทโอน

ที่มา: Yurimoto *et al.* (2002)

จากนั้น S-FG ถูกสลายเป็นฟอร์เมท (HCOOH) และ GSH โดยมีเอนไซม์ S-formyl glutathione hydrolase เร่งปฏิกิริยา

$$HCO\text{-}SG + H_2O \longrightarrow HCOOH + GSH$$

GSH ที่เกิดขึ้นสามารถเข้ารวมตัวกับฟอร์มาลดีไฮด์ได้อีก นอกจากนั้นยังพบว่า GSH ทำหน้าที่เป็น reductant สำหรับโปรตีนขนาด 20 กิโลดาลตัน ที่อยู่ระหว่างชั้นของเยื่อหุ้มเพอร์ออกซิโซม (peroxisomal peripheral membrane protein) อีกด้วย

วิถีออกซิเดชันของฟอร์มาลดีไฮด์อาจเกิดโดยไม่เกี่ยวข้องกับ GSH (GSH-independent formaldehyde oxidation pathway) ก็ได้ โดยที่หมู่อัลดีไฮด์ของฟอร์มาลดีไฮด์ทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลของเมทานอลเกิดเป็นเฮมิอะซิทาล [$CH_2(OH)OCH_3$] จากนั้นเปลี่ยนเป็นเมทิลฟอร์เมท โดยมีเอนไซม์ methylformate synthase เร่งปฏิกิริยา และมี NAD^+ เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (Murdanoto *et al.,* 1997; Sakai *et al.,* 1999) ฟอร์เมทที่เกิดขึ้นถูกออกซิไดซ์เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และ $NADH + H^+$ โดยมีเอนไซม์ formate dehydrogenase ช่วยเร่งปฏิกิริยาและมี NAD^+ เป็นตัวรับอิเล็กตรอน

$$HCOOH + NAD^+ \longrightarrow CO_2 + NADH + H^+$$

มีการตรวจพบเมทิลฟอร์เมทปริมาณมากสะสมในระหว่างการเจริญของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์หลายสายพันธุ์ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีเมทานอลเป็นสารอาหารหลัก และเมื่อเติมฟอร์มาลดีไฮด์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะพบว่ามีการสะสมเมทิลฟอร์เมทเพิ่มขึ้น (Sakai *et al.,* 1995) จึงมีการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ methyl formate synthase (MFS) บริสุทธิ์ ของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ *C. boidinii* และ *P. methanolica* พบว่า MFS เป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มของ class 3 alcohol dehydrogenase ซึ่งในหนึ่งหน่วยย่อย (subunit) ของเอนไซม์ประกอบด้วยสังกะสีสองอะตอม และสามารถเร่งปฏิกิริยาที่มีแอลกอฮอล์โครงสร้างเป็นโซ่ยาว เช่น octanol หรือ เฮมิอะซิทาล เป็นสารตั้งต้นได้ดี เอนไซม์ MFS นี้เร่งปฏิกิริยา NAD^+-dependent dehydrogenation ของเฮมิอะซิทาล (ซึ่งเกิดจากการรวมตัวกันของเมทานอลและฟอร์มาลดีไฮด์) ทำให้เกิดเมทิลฟอร์เมทเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา ซึ่งการเกิดเมทิลฟอร์เมทขึ้นนี้แสดงให้เห็นว่า ในเมทิลโลโทรฟิกยีสต์นั้น นอกจากฟอร์มาลดีไฮด์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase แล้ว ฟอร์มาลดีไฮด์ยังอาจถูกออกซิไดซ์โดยการทำงานของเอนไซม์ MFS ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงแบบที่ไม่เกี่ยวข้องกับกลูตาไทโอนได้ด้วย ซึ่งการเปลี่ยนแปลงแบบหลังนี้ทำให้เกิดเมทิลฟอร์เมทขึ้นในกระบวนการเมแทบอลิซึมของเมทานอล (Murdanoto *et al.,* 1997) การที่เมทิลโลโทรฟิกยีสต์มีกระบวนการเปลี่ยนแปลงฟอร์มาลดีไฮด์ได้ถึงสองแบบนี้ อาจช่วยให้เซลล์ยีสต์กลุ่มนี้ทนต่อฟอร์มาลดีไฮด์ได้ดีกว่ายีสต์กลุ่มอื่น เพราะมีการเปลี่ยนแปลงฟอร์มาลดีไฮด์ไปเป็นสารอื่นที่ไม่เป็นพิษได้เร็วกว่ายีสต์ทั่วไป

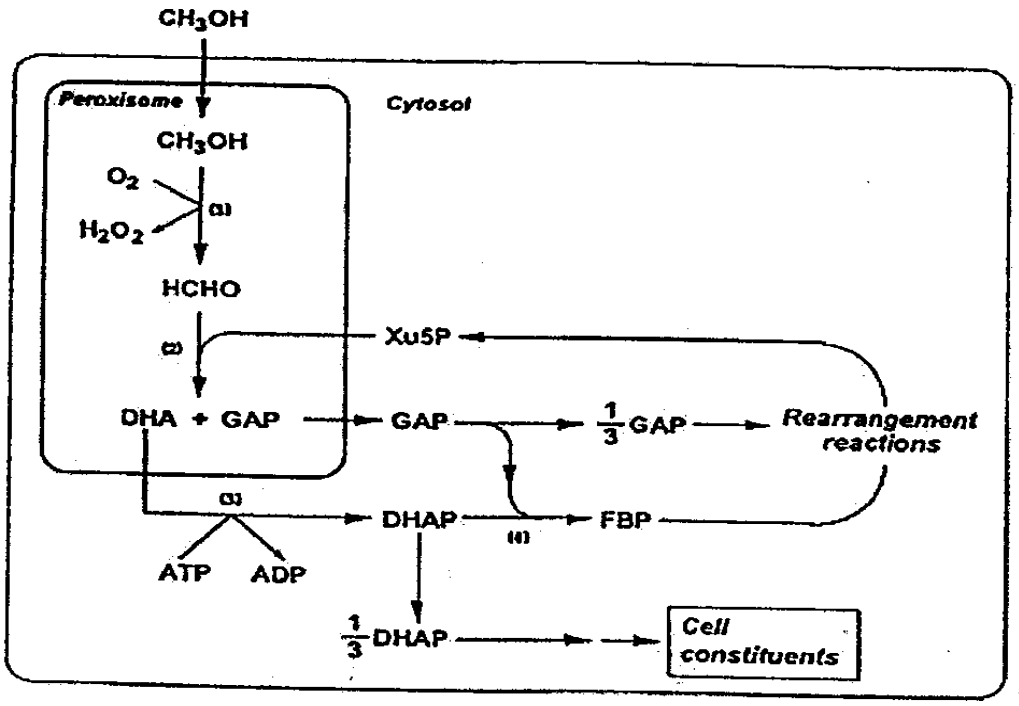
วิถีดิสสิมิเลชันของการเปลี่ยนแปลงเมทานอลโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์นี้ จะให้พลังงานแก่เซลล์ในรูปของ NADH 2 โมเลกุล เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของฟอร์มาลดีไฮด์และฟอร์เมทปฏิกิริยาละ 1 โมเลกุล และ NADH จะถูกนำไปใช้สำหรับการสร้างพลังงานในรูป ATP ต่อไป

2. **<u>วิถีแอสสิมิเลชัน</u>** เป็นวิถีที่เกี่ยวข้องกับการตรึงสารประกอบคาร์บอนหนึ่งอะตอมรวมเข้ากับน้ำตาลคาร์บอนห้าอะตอม เกิดเป็นสารประกอบคาร์บอนสามอะตอมสองโมเลกุล คือ dihydroxyacetone (DHA) และ glyceraldehyde-3-phosphate (GAP) ดังแสดงในภาพที่ 2 เมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่เจริญในสภาวะที่มีเมทานอล ใช้วิถีเมแทบอลิซึมนี้ในการสร้างสารประกอบที่มีพันธะระหว่างคาร์บอนกับคาร์บอนขึ้น เพื่อสังเคราะห์องค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ เนื่องจากเมทานอลเป็นสารประกอบคาร์บอนหนึ่งอะตอมจึงไม่มีพันธะดังกล่าวในโมเลกุล (Anthony,1982; Tani, 1985; Harder and Brooke, 1990; Yurimoto *et al.,* 2002)

ฟอร์มาลดีไฮด์ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของเมทานอลเข้ารวมตัวกับ xylulose-5-phosphate (Xu5P) ภายในเพอร์ออกซิโซม ได้เป็น GAP โดยมีเอนไซม์ dihydroxyacetone synthase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

จากนั้น GAP และ DHA จะผ่านเยื่อหุ้มเพอร์ออกซิโซมออกสู่ไซโทพลาซึม ต่อมามีการเติมหมู่ฟอสเฟตให้แก่ DHA ได้เป็น dihydroxyacetone phosphate (DHAP) โดยมีเอนไซม์ dihydroxyacetone kinase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและมี ATP เป็นตัวให้หมู่ฟอสเฟต จากนั้น DHAP จะเข้ารวมกับ GAP เป็น fructose 1,6-bisphosphate (FBP) โดยมีเอนไซม์ fructose bisphosphatase เร่งปฏิกิริยา

วัฏจักรเพนโทสฟอสเฟตในไซโทพลาซึม ทำให้เกิดการจัดเรียงตัวใหม่ของโมเลกุลของ GAP และ FBP ทำให้ได้ Xu5P ซึ่งสามารถผ่านเยื่อหุ้มเพอร์ออกซิโซมกลับเข้าไปได้ นอกจากนี้พบว่าหนึ่งในสามของโมเลกุลของ DHAP ที่สร้างขึ้นจะถูกนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์กลูโคสของเซลล์ (gluconeogenesis)



ภาพที่ 2 วิถีแอสสิมิเลชันของการเปลี่ยนแปลงเมทานอลโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์
เอนไซม์: (1) alcohol oxidase, (2) dihydroxyacetone synthase,
(3) dihydroxyacetone kinase, (4) fructose bisphosphatase
คำย่อ: DHA, dihydroxyacetone; GAP, glyceraldehyde 3-phosphate;
DHAP, dihydroxyacetone phosphate; Xu5P, xylulose-5-phosphate
ที่มา: Yurimoto *et al.* (2002)

จุลินทรีย์แต่ละประเภทที่เจริญได้ด้วยเมทานอลมีวิถีแอสสิมิเลชันของเมทานอลที่แตกต่างกัน คือ เมทิลโลโทรฟิกยีสต์จะใช้วิถี xylulose monophosphate (XMP) pathway เป็นวิถีหลักของการเปลี่ยนแปลง ขณะที่เมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียและราใช้วิถี ribulose monophosphate (RMP) pathway และวิถี serine pathway

จากภาพที่ 1 และ 2 จะพบว่าฟอร์มาลดีไฮด์เป็นสารตัวกลางหลักซึ่งอยู่ในตำแหน่งศูนย์กลางระหว่างวิถีที่เป็นดิสสิมิเลชันและแอสสิมิเลชันของกระบวนการเปลี่ยนแปลงเมทานอลเพื่อการเจริญ ฟอร์มาลดีไฮด์เป็นสารพิษที่ก่อให้เกิดความผิดปกติที่โปรตีนและดีเอ็นเอของเซลล์ยีสต์ได้ ปริมาณของฟอร์มาลดีไฮด์จึงมีความสำคัญต่อการเจริญและกระบวนการเมแทบอลิซึมของยีสต์

ทั่วไปรวมทั้งเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ โดยพบว่าถ้าเติมเมทานอลปริมาณมาก ๆ ลงในการเลี้ยงเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ในสภาพที่มีเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนแล้ว จะมีการสะสมฟอร์มาลดีไฮด์ ซึ่งในบางกรณีอาจทำให้การเจริญหยุดชะงักลงได้ การเป็นพิษของฟอร์มาลดีไฮด์ต่อการเจริญนี้อาจทำให้เกิดปัญหาในการใช้เมทิลโลโทรฟิกยีสต์เพื่อการผลิตโปรตีนที่เป็นประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากไม่สามารถเลี้ยงให้มีเซลล์ปริมาณมากได้ (Cregg, 1993; Gellissen *et al.,* 1991; Sakai *et al.,* 1996) อย่างไรก็ตามพบว่า เมทิลโลโทรฟิกยีสต์สามารถทนต่อพิษของฟอร์มาลดีไฮด์ได้ดีกว่ายีสต์ทั่ว ๆ ไป โดยสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟอร์มาลดีไฮด์ปริมาณสูงถึง 16 mM (Kato *et al.,* 1982)

การศึกษากระบวนการเปลี่ยนแปลงฟอร์มาลดีไฮด์ในยีสต์ แสดงให้เห็นว่าการที่เมทิลโลโทรฟิกยีสต์สามารถทนต่อความเป็นพิษของฟอร์มาลดีไฮด์ได้นั้น อาจเนื่องมาจากปฏิกิริยาการทำลายความเป็นพิษ (detoxification) ในเซลล์ยีสต์ ที่ทำให้มีการเปลี่ยนฟอร์มาลดีไฮด์ไปเป็นสารที่ไม่มีพิษ โดยอาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์ glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase นอกจากนี้ยังอาจเนื่องมาจากเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดฟอร์มาลดีไฮด์ (คือเอนไซม์ alcohol oxidase) และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายฟอร์มาลดีไฮด์ (คือเอนไซม์ dihydroxyacetone synthase) ซึ่งมีกระบวนการ compartmentalization ภายในเพอร์ออกซิโซมในเซลล์ยีสต์ (Douma *et al.,* 1985; Goodman, 1985; Goodman *et al.,* 1984)

ประโยชน์ของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์

1. การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว

โปรตีนเซลล์เดี่ยว (single cell protein, SCP) เป็นคำที่นิยามขึ้นในปี ค. ศ. 1968 โดยสถาบัน MIT ประเทศสหรัฐอเมริกา หมายถึง เซลล์ของจุลินทรีย์ได้แก่ ยีสต์ แบคทีเรีย สาหร่าย และรา ที่ทำให้แห้ง โดยเพาะเลี้ยงในระบบขนาดใหญ่ สำหรับใช้เป็นแหล่งโปรตีนในมนุษย์และสัตว์ (Kuhad *et al.*, 1997)

เนื่องจากความต้องการโปรตีนสำหรับมนุษย์และสัตว์เพิ่มสูงขึ้น จุลินทรีย์โดยเฉพาะยีสต์จึงเป็นแหล่งโปรตีนที่น่าสนใจ เพราะมีคุณค่าทางโภชนาการ ปลอดภัย และมีความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจ คุณค่าทางอาหารของยีสต์ที่สำคัญนอกจากปริมาณโปรตีนแล้วยังพบส่วนประกอบอื่นๆ

ในเซลล์ยีสต์ที่มีประโยชน์อีกด้วย เช่น คาร์โบไฮเดรต เกลือแร่ ไขมัน กรดนิวคลีอิก ไกลโคเจน และผนังเซลล์ของยีสต์ที่มีกลูแคนและแมนแนนเป็นส่วนประกอบ นอกจากนี้ยังมีโปรตีนและไขมันอยู่ด้วย สำหรับปัญหาในการนำยีสต์มาใช้เป็นแหล่งโปรตีนสำหรับคนและสัตว์ คือ ปริมาณกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ เช่น เมทไธโอนีนมีปริมาณน้อย โดย Boze *et al*. (1992) รายงานว่า ยีสต์มีความบกพร่องของปริมาณเมทไธโอนีนแต่มีสมดุลที่ดีของกรดอะมิโนจำเป็นอื่น ๆ (ไลซีนและทริปโตเฟน) และยังพบว่าผลิตภัณฑ์ยีสต์ที่มีการเติมเมทไธโอนีน 0.1- 0.2 % จะมีคุณค่าทางโภชนาการเท่ากับโปรตีนจากถั่วเหลืองหรือปลาป่น

เพื่อจุดประสงค์สำคัญในการลดต้นทุนการผลิตให้ต่ำลง จึงมีความสนใจนำเมทานอลมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเลี้ยงเซลล์ยีสต์ เนื่องจากเมทานอลมีราคาถูก ละลายน้ำได้ดี มีความบริสุทธิ์สูง สะดวกต่อการเก็บรักษาและจัดการ เมทิลโลโทรฟิกยีสต์จึงถูกนำมาใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว โดยใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานมากกว่าแบคทีเรีย เนื่องจากคุณค่าทางโภชนาการสูงและมีความปลอดภัย โดยปริมาณโปรตีนของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์มีค่าระหว่าง 35-50 % และระดับกรดนิวคลีอิกอยู่ระหว่าง 5-7 % (Cooney and Levine, 1975) นอกจากนี้เซลล์ยีสต์มีขนาดใหญ่ สามารถเก็บเกี่ยวได้ง่ายโดยการกรองหรือหมุนเหวี่ยง ทำให้ต้นทุนการผลิตลดลง และพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงค่อนข้างเป็นกรด (4.0- 4.5) จึงลดการปนเปื้อนจากแบคทีเรียได้

ในช่วงทศวรรษที่ 70 บริษัท Phillips Petroleum ได้พัฒนาการเพาะเลี้ยง *Pichia pastoris* ในเมทานอลโดยการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง พบว่าได้ความเข้มข้นของเซลล์สูง แต่ช่วงเวลานั้นกระบวนการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวไม่สามารถแข่งขันทางเศรษฐกิจได้ เนื่องจากแหล่งโปรตีนจากถั่วเหลืองมีราคาถูกกว่า (Cregg *et al.*, 2000) จนกระทั่งในปี ค. ศ. 1988 บริษัทนี้ได้ประสบความสำเร็จในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ *P. pastoris* โดยใช้เมทานอลเป็นสารตั้งต้น ในถังหมักขนาด 25,000 ลิตร ได้ผลผลิตเป็นเซลล์เข้มข้น 125-150 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร

2. <u>การผลิตกรดอะมิโน</u>

Okumura *et al*. (1970) จดสิทธิบัตรวิธีการผลิตกรดอะมิโนโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ เช่น แอล-อะลานีน (0.3 กรัมต่อลิตร) กรดแอล-กลูทามิก (1.5 กรัมต่อลิตร) แอล-ไลซีน (0.5 กรัมต่อลิตร) แอล-ทรีโอนีน (0.5 กรัมต่อลิตร) และแอล-เวลีน (0.5 กรัมต่อลิตร) สำหรับการผลิต แอล-ทริปโตเฟน มีรายงานในเชื้อสายพันธุ์กลายของ *Hansenula polymorpha* ซึ่งจะต้องเติม แอล-ฟีนิลอะลานีน และ แอล-ไทโรซีน ปริมาณเล็กน้อยในอาหารที่มีเมทานอล 2 % ซึ่งการศึกษาของ Denenu and Demain (1981) พบว่าสายพันธุ์กลายนี้สามารถต้านทานต่อแอนติเมแทบอไลท์ของทริปโตเฟน เช่น 5-fluorotryptophan หรือ anthranilate ได้ โดยสามารถสะสมทริปโตเฟนไว้ภายในเซลล์ นอกจากนี้ยังพบทริปโตเฟนเมแทบอไลท์ (เช่น ทริปโตเฟนอินโดลอะซิติก และ อินโดลอะซิทาลดีไฮด์) อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย

3. <u>การผลิตกรดซิตริก</u>

Sahm (1977) รายงานการผลิตกรดซิตริกโดยยีสต์ *Candida boidinii* ซึ่งสามารถผลิตกรดซิตริกได้ 1 กรัมต่อลิตร เมื่อเติมสาร fluoroacetate ลงในอาหารที่ใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน ต่อมา Tani *et al*. (1984) รายงานเกี่ยวกับสายพันธุ์กลายของ *Candida* ซึ่งสามารถต้านทาน (resistant) ต่อ fluoroacetate ว่าสามารถผลิตกรดซิตริกได้ถึง 5 กรัมต่อลิตร หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลานาน 4 วัน ในอาหารที่มีเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน

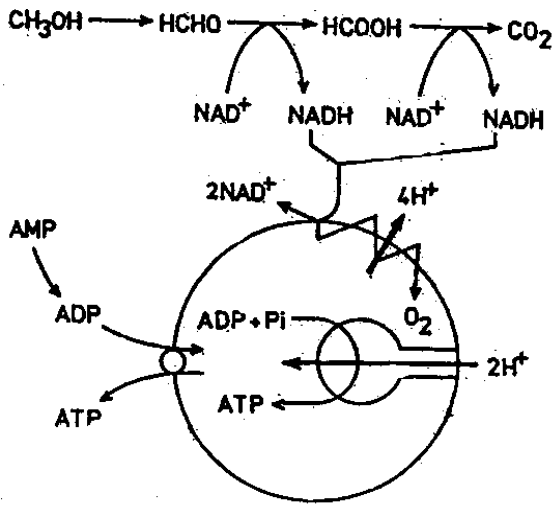
4. <u>การผลิต nucleotide coenzyme</u>

Shimizu *et al*. (1977 b) รายงานถึงการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต flavin adenine dinucleotide (FAD) ในเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ว่า การเติม riboflavin หรือ flavin mononucleotide (FMN) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเมทานอลนั้น ยีสต์จะสามารถเปลี่ยนให้เป็น FAD ได้ วิธีการนี้ให้ผลผลิต FAD สูงถึง 45.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ต่อมา Shimizu *et al*. (1977 a) รายงานการเพาะเลี้ยงเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ในอาหารที่ใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน และเติม flavin 3 ครั้งติดต่อกัน จะส่งผลให้เอนไซม์ FAD

pyrophosphorylase ถูกกดดัน ขณะที่เอนไซม์ FAD-dependent alcohol oxidase จะถูกเหนี่ยวนำโดย flavin ที่เติมในอาหาร ทำให้ riboflavin หรือ flavin mononucleotide (FMN) เปลี่ยนไปเป็น FAD

Tani *et al.* (1982) ศึกษาการผลิต ATP โดยใช้เซลล์ของ *Kloeckera* sp. No. 2201 (ปัจจุบันจำแนกเป็น *Candida boidinii*) พบว่ายีสต์นี้จะรีดิวซ์ NAD^+ ในกระบวนการออกซิเดชันสารประกอบคาร์บอนหนึ่งอะตอมเพื่อสร้างพลังงาน ซึ่ง NADH ที่ได้จะถูกนำไปใช้ในกระบวนการหายใจเพื่อการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ ADP ได้เป็น ATP นั่นเอง สรุปได้ว่าขั้นตอนจะประกอบด้วยปฏิกิริยา oxidative phosphorylation พร้อมกับการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของเมทานอลหรือฟอร์เมท และยังมีกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับสาร AMP ไปเป็น ADP โดยเอนไซม์ adenylate kinase อีกด้วย ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงดังภาพที่ 3



<u>ภาพที่ 3</u> ลำดับปฏิกิริยาการผลิต ATP ในยีสต์ *Kloeckera* sp. No. 2201
ที่มา: Tani *et al.* (1982)

5. <u>การผลิตสารเมแทบอไลท์ที่เกี่ยวข้องกับวิถีแอสสิมิเลชันของเมทานอล</u>

มีรายงานการผลิตสารเมแทบอไลท์ที่เกี่ยวข้องกับวิถีแอสสิมิเลชันของเมทานอลโดยตรงเพื่อจุดประสงค์ทางการค้า โดย Kato *et al.* (1986) ได้ทำการศึกษาเชื้อสายพันธุ์กลายของ *Hansenula polymorpha* CBS 4732 ที่เจริญในอาหารที่มีเมทานอล พบว่าเชื้อสายพันธุ์นี้สามารถผลิตไดไฮดรอกซีอะซีโตนและกลีเซอรอลจากเมทานอลได้ผลผลิต 18.8 % โดยปริมาณสารทั้งสองชนิดรวมกันเป็น 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

6. <u>การนำไปใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการแสดงออกของยีนจากแหล่งอื่น</u>

ในอดีตมีการศึกษาด้านพันธุศาสตร์และชีวโมเลกุลระดับเซลล์ของ *Saccharomyces cerevisiae* อย่างกว้างขวาง เพื่อการพัฒนาไปใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการแสดงออกของยีนจากแหล่งอื่น (heterologous gene) แต่กลับประสบปัญหาเนื่องจาก *S. cerevisiae* ผลิตโปรตีนที่ถูกกำหนดโดยยีนนั้น (heterologous protein) ได้ในปริมาณที่ไม่สูงนัก นอกจากนี้ยังอาจเกิดความผิดพลาดในกระบวนการ glycosylation ได้ ซึ่งอาจแก้ปัญหาได้โดยใช้เซลล์เนื้อเยื่อสัตว์เป็นเซลล์เจ้าบ้านแทน แต่เป็นวิธีการที่มีค่าใช้จ่ายสูงมาก (Harder and Brooke, 1990) นอกจากนี้การใช้ *S. cerevisiae* เป็นเซลล์เจ้าบ้านยังมีข้อเสียอื่น ๆ อีก คือ ขาดเสถียรภาพหรือความคงตัวทางพันธุกรรรม รวมทั้งการแสดงออกอาจยังไม่ดีพอเนื่องจากขาดการควบคุมการแสดงออกของยีนโดยโปรโมเตอร์ที่มีประสิทธิภาพ

เมื่อเริ่มมีการศึกษาด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ในปี ค. ศ. 1983 จึงพบว่าการผลิตเอนไซม์ alcohol oxidase ของยีสต์กลุ่มนี้สามารถควบคุมให้เกิดการแสดงออกในระดับสูงได้ในอาหารที่มีเมทานอล เมทิลโลโทรฟิกยีสต์จึงถูกนำมาใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการนำยีนจากแหล่งอื่นเข้าสู่โครโมโซมของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ แล้วเกิดการแสดงออกภายใต้การทำงานของโปรโมเตอร์ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ alcohol oxidase เมื่อถูกเหนี่ยวนำโดยเมทานอล (Harder and Brooke, 1990) ปัจจุบันเป็นที่นิยมใช้เมทิลโลโทรฟิกยีสต์เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการทำงานด้านพันธุวิศวกรรม เนื่องจากเป็นเซลล์แบบยูคาริโอต มีกระบวนการปรับแต่งโปรตีนภายหลังการสังเคราะห์ เช่น กระบวนการ glycosylation ได้เช่นเดียวกับสิ่งมีชีวิตชั้นสูง อีกทั้งโปรตีนที่สร้างจากยีนจากแหล่งอื่นจะถูกจัดเก็บไว้ในเพอร์ออกซิโซมของเซลล์ยีสต์ จึงไม่เสี่ยงต่อการถูกทำลายโดยเอนไซม์ protease ในไซโทพลาซึม

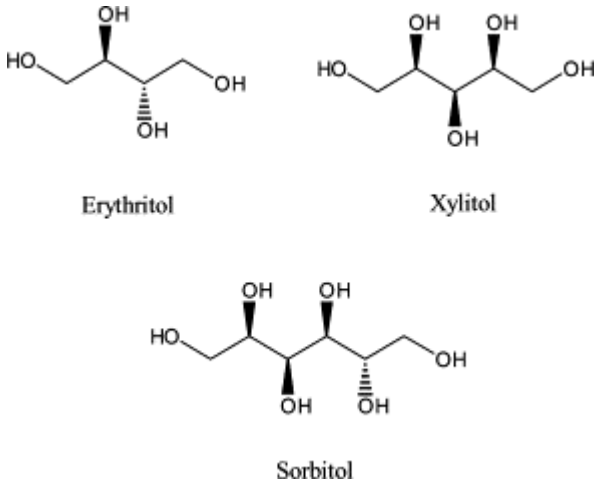
Pichia pastoris ถือเป็นเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิตโปรตีนจากแหล่งอื่น เพราะการแสดงออกของยีนจากแหล่งอื่นนั้นจะถูกควบคุมอย่างดีด้วย alcohol oxidase (AOX 1) promoter ในการผลิตโปรตีนจากแหล่งอื่นนี้ ควรคำนึงถึงความเข้มข้นของเมทานอลในถังหมักด้วย คือ ต้องระมัดระวังมิให้เมทานอลมีความเข้มข้นถึงระดับที่เป็นพิษกับ *P. pastoris* ได้ โดยความเป็นพิษเกิดจากการสะสมฟอร์มาลดีไฮด์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ภายในเซลล์นั่นเอง ดังนั้นการรักษาความเข้มข้นของเมทานอลให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมจึงเป็นสิ่งสำคัญ โดยเมทานอลจะต้องมีความเข้มข้นเพียงพอที่จะกระตุ้นและควบคุมการทำงานของ AOX1 promoter ได้ แต่ต้องไม่สูงจนถึงระดับที่เป็นพิษกับเซลล์ (Lee *et al.*, 2003 b)

ปัจจุบันมีรายงานการผลิตโปรตีนจากแหล่งอื่นหลายชนิดโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ เช่น การผลิตเอนไซม์ แอนติบอดี ไซโตไคน์ และฮอร์โมนต่าง ๆ เป็นต้น (Gellissen, 2000) โดย Stratton *et al.* (1998) ได้รายงานถึงวิธีการผลิตโปรตีนจากแหล่งอื่นให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูง และผลิตโปรตีนจากแหล่งอื่นให้ได้ปริมาณมาก ซึ่งขั้นตอนแรกจะเลี้ยงเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมแล้วด้วยอาหารที่มีเกลือเป็นองค์ประกอบ ใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นแบบ non-fermentable ได้แก่ กลีเซอรอล ส่วนในขั้นตอนที่ 2 เมื่อยีสต์ใช้กลีเซอรอลจนหมดจะเติมกลีเซอรอลลงในถังหมักแบบแบทช์ ซึ่งขั้นตอนนี้ถือว่าสำคัญเพราะผลผลิตพลอยได้ (by-product) เช่น เอทานอลที่เกิดขึ้นในขั้นตอนแรกจะถูกใช้ไปจนหมด โดยขั้นตอนนี้จะได้เซลล์ความเข้มข้นสูง จากนั้นจึงเข้าสู่ขั้นตอนที่ 3 ซึ่งเป็นระยะเหนี่ยวนำ (induction phase) โดยการเติมเมทานอลเพื่อเหนี่ยวนำให้เมทิลโลโทรฟิกยีสต์สร้างโปรตีนจากแหล่งอื่น ซึ่งถ้าความเข้มข้นของเซลล์ภายในถังหมักสูงก็จะสามารถผลิตโปรตีนจากแหล่งอื่นได้ปริมาณมากนั่นเอง

7. <u>การผลิตโพลีออล (polyol)</u>

ยีสต์สร้างโพลีออลหรือน้ำตาลแอลกอฮอล์บางชนิดเพื่อตอบสนองต่อสภาวะที่มีน้ำตาลหรือเกลือความเข้มข้นสูง ซึ่งโพลีออลเหล่านี้ทำหน้าที่เป็น osmoregulator คือทำหน้าที่รักษาหรือควบคุมแรงดันออสโมซีสภายในเซลล์ให้สมดุลกับภายนอกเซลล์ และช่วยป้องกันเอนไซม์ถูกกระตุ้นหรือยับยั้งกิจกรรมเนื่องจากอยู่ในสภาวะที่มี A_w ต่ำ (Brown, 1978; Edgley and Brown, 1983) สารประกอบโพลีออลหลายชนิดเช่น กลีเซอรอล ไซลิทอล ซอร์บิทอล และอีรีทริทอล มีความสำคัญในอุตสาหกรรม โดยทั่วไปการผลิตโพลีออลใช้วิธีการทางเคมี ทำให้ประสบปัญหาในการ

ทำให้บริสุทธิ์ซึ่งมีความซับซ้อนยุ่งยาก ดังนั้นการผลิตสารโพลีออลโดยใช้เซลล์จุลินทรีย์จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ มีการนำเมทิลโลโทรฟิกยีสต์มาศึกษาการผลิตโพลีออลบางชนิดดังนี้



ภาพที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของซอร์บิทอล อีรีทริทอล และไซลิทอล
ที่มา: Talja and Roos (2001)

7.1 การผลิตกลีเซอรอล (glycerol)

กลีเซอรอลเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตยา เครื่องสำอางค์ และยังใช้ผสมในอาหารเพื่อให้เกิดความข้น เป็นสารให้ความคงตัว (stabilizer) ใช้เป็น emulsifier สารหล่อลื่น และสารต้านความเย็น (antifreeze) อีกด้วย

Kato *et al.* (1986) รายงานถึงการผลิตกลีเซอรอลจากเมทานอล โดยเชื้อ *Hansenula polymorpha* CBS 4732 สายพันธุ์กลาย พบว่าสามารถผลิตกลีเซอรอลและไดไฮดรอกซีอะซีโตนได้ผลผลิต 18.8 %

Yamada *et al*. (1993) รายงานว่า *Candida boidinii* UV-16 ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายสามารถผลิตกลีเซอรอลได้ปริมาณสูง โดยการให้เมทานอลและสารอาหารที่เป็นแหล่งไนโตรเจนระหว่างการเลี้ยงเชื้อเพื่อส่งเสริมการผลิตกลีเซอรอล นอกจากนี้ยังพบว่าถ้าไม่มีไบโอตินและ

ไทอามีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่งผลให้การเจริญของเชื้อลดลงแต่สามารถผลิตกลีเซอรอลได้มากขึ้นถึง 2 เท่า โดยวิตามินปริมาณเล็กน้อยที่ติดมากับหัวเชื้อก็ยังจำเป็นสำหรับขั้นตอนการผลิตกลีเซอรอลอยู่ และยังพบว่าการเติม antifoam จะทำให้สามารถผลิตกลีเซอรอลได้ปริมาณสูงขึ้น

7.2 การผลิตซอร์บิทอล (sorbitol)

มีการนำซอร์บิทอลมาใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมอาหารเนื่องจากเป็นสารที่ช่วยรักษาความชื้น (humectant) และให้ความอ่อนนุ่มในผลิตภัณฑ์ที่ต้องป้องกันการสูญเสียความชื้น เช่น อุตสาหกรรมการผลิตเบเกอรี่ การผลิตช็อคโกแลต ซึ่งต้องป้องกันมิให้ผลิตภัณฑ์แห้งและแข็ง ทำให้ผลิตภัณฑ์ดูสดใหม่อยู่เสมอ ซอร์บิทอลเป็นน้ำตาลที่มีความคงตัวทางเคมี แม้อยู่ในที่อุณหภูมิสูงก็ไม่เกิด Maillard reaction หรือ Browning จากคุณสมบัติข้อนี้จึงนำซอร์บิทอลไปใช้ในการผลิตคุกกี้ ทำให้คุกกี้มีสีน่ารับประทาน ไม่มีสีเข้ม นอกจากนี้ยังใช้ซอร์บิทอลเป็นสารให้ความหวานในอาหารจำพวกลูกกวาด หมากฝรั่ง ขนมหวานแช่แข็ง รวมทั้งใช้ในการผลิตยาสีฟันและน้ำยาบ้วนปากด้วย เนื่องจากแบคทีเรียในช่องปากไม่สามารถใช้ซอร์บิทอลในกิจกรรมที่ทำให้เกิดกรดทำลายฟันได้

ประโยชน์ของซอร์บิทอลที่สำคัญอีกประการคือ ใช้เป็นสารให้ความหวานแทนน้ำตาลสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน เนื่องจากมีรสหวาน (มีความหวานเท่ากับ 60 % ของซูโครส) และให้พลังงานต่ำกว่าซูโครส (ซอร์บิทอลให้พลังงาน 2.6 แคลอรีต่อกรัม ขณะที่ซูโครสให้พลังงาน 4 แคลอรีต่อกรัม) จึงสามารถใช้ในการควบคุมน้ำหนักและควบคุมน้ำตาลในเลือดได้ นอกจากนี้ยังใช้ซอร์บิทอลในการผลิตเครื่องสำอางค์และผลิตยาในระดับอุตสาหกรรมอีกด้วย

การนำซอร์บิทอลมาใช้ประโยชน์ดังที่กล่าวมาแล้ว สามารถมั่นใจได้ในความปลอดภัย เนื่องจากซอร์บิทอลได้รับการรับรองจากสถาบันอาหารและยาแห่งประเทศสหรัฐอเมริกาแล้วว่าปลอดภัย นอกจากนี้ยังได้รับการยอมรับอย่างแพร่หลายจากประเทศในกลุ่มยุโรป รวมทั้งประเทศออสเตรเลีย แคนาดา และญี่ปุ่นด้วย ในประเทศสหรัฐอเมริกามีหลายบริษัทที่ผลิตซอร์บิทอลเพื่อการค้า เช่น บริษัท Archer Daniels Midland บริษัท Roquette Americ และบริษัท SPI Polyols เป็นต้น (Calorie Control Council, 2003)

ปัจจุบันอุตสาหกรรมการผลิตซอร์บิทอลมักใช้กระบวนการทางเคมีโดยอาศัยปฏิกิริยาการเติมน้ำ (hydrogenation) เพื่อเปลี่ยนกลูโคสเป็นซอร์บิทอล แต่อย่างไรก็ตามระหว่างกระบวนการเติมน้ำที่อุณหภูมิ 100-140 องศาเซลเซียส และค่าแรงดันไฮโดรเจนที่เปลี่ยนแปลงจะทำให้เกิดสารที่เป็นผลผลิตพลอยได้ขึ้น โดยเฉพาะในสภาวะด่าง กลูโคสจะเกิดปฏิกิริยา isomerization ไปเป็นฟรุกโตสและแมนโนส เป็นผลให้เมื่อเกิดกระบวนการเติมน้ำจะได้ผลผลิตเป็นแมนนิทอล ซึ่งจะเป็นปัญหาในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ ส่งผลให้ต้นทุนการผลิตสูง (van Gorp *et al*., 1999) ดังนั้นการผลิตซอร์บิทอลโดยใช้วิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง

Tani and Vongsuvanlert (1987) รายงานการใช้เมทิลโลโทรฟิกยีสต์ (*Candida boidinii*) ในการผลิตซอร์บิทอลโดยใช้ดี-กลูโคสเป็นสารตั้งต้น โดยคาดว่าการผลิตซอร์บิทอลเกิดจากการเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ xylose isomerase เปลี่ยนดี-กลูโคสเป็นดี-ฟรุกโตส หลังจากนั้นจะเกิดปฏิกิริยารีดักชันเปลี่ยนดี-ฟรุกโตสเป็นซอร์บิทอลด้วยเอนไซม์ sorbitol dehydrogenase (SDH) ซึ่งขั้นตอนนี้จำเป็นต้องใช้ NADH ในปฏิกิริยาด้วย โดย NADH นั้นเกิดจากกระบวนการออกซิเดชันของเมทานอลภายในเซลล์เมทิลโลโทรฟิกยีสต์ (Vongsuvanlert and Tani, 1988 a) ปฏิกิริยาแบบผันกลับได้ที่เกิดจากการเร่งโดยเอนไซม์ sorbitol dehydrogenase แสดงดังสมการ

$$\text{D-fructose} + \text{NADH} + \text{H}^{+} \longleftrightarrow \text{D-sorbitol} + \text{NAD}^{+}$$

ซึ่งผลการทดลองพบว่าเซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยเมทานอลและไซโลสจะสามารถผลิตซอร์บิทอลได้สูง โดยใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยา (reaction mixture) การผลิตซอร์บิทอลที่ประกอบด้วยเมทานอล กลูโคสหรือฟรุกโตส Tris-HCl buffer, Fe^{2+}, PEG-4000 และเซลล์ยีสต์ ซึ่งสามารถให้ปริมาณผลผลิตหรือซอร์บิทอลได้สูงสุดคือ 8.8 กรัมต่อลิตร และ 19.1 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้กลูโคสเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร และฟรุกโตสเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

7.3 การผลิตไอดิทอล (Iditol)

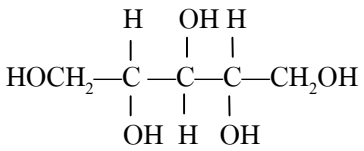
การผลิตไอดิทอลด้วยวิธีการทางเคมีสามารถทำได้โดยใช้ซอร์โบสเป็นสารเริ่มต้น แล้วนำไปผ่านกระบวนการ hydrogenation และ acetylation แต่ไอดิทอลที่ได้จะปนเปื้อนด้วย C-2 epimer และซอร์บิทอล นอกจากนี้ราคาไอดิทอลยังสูง เนื่องจากกระบวนการผลิตเป็นกระบวนการทางเคมีที่ต้องผ่านหลายขั้นตอน ขณะที่ได้ปริมาณผลผลิตเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

Vongsuvanlert and Tani (1988 b) ได้ศึกษาการผลิตไอดิทอลโดยเชื้อ *Candida boidinii* No. 2201 แล้วรายงานว่าการผลิตไอดิทอลจากซอร์โบสนั้นอาศัยเอนไซม์ iditol dehydrogenase ที่ทำงานพร้อมกับการเกิดออกซิเดชันของเมทานอล แล้วได้ NADH ไปใช้ในปฏิกิริยา สำหรับการทดลองสามารถผลิตไอดิทอลได้สูงสุดและมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงสุดเช่นกัน เมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่ประกอบด้วยเมทานอลและซอร์โบส โดยปริมาณไอดิทอลที่สูงที่สุดเท่ากับ 148 กรัมต่อลิตร จากการใช้ซอร์โบส 150 กรัมต่อลิตร และเมทานอลเข้มข้น 0.5 โมลาร์

ไซลิทอล (Xylitol)

1. คุณสมบัติของไซลิทอล

ไซลิทอลเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ของไซโลส มีโมเลกุลเดี่ยว ประกอบด้วยคาร์บอนห้าอะตอม (ภาพที่ 5) สูตรโมเลกุลคือ $C_5H_{12}O_5$ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 152.1 ลักษณะเป็นผงผลึกสีขาว รสชาติหวาน ไม่มีกลิ่น และไม่มีคุณสมบัติเบี่ยงเบนแสง ไซลิทอลจัดเป็นสารมัธยันตร์ในคาร์โบไฮเดรตเมแทบอลิซึมของมนุษย์และสัตว์ สามารถพบไซลิทอลได้ทั่วไปในพืชผักหลายชนิด ซึ่งคุณสมบัติที่สำคัญของไซลิทอลมีดังนี้ (Emodi, 1978)



ภาพที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของไซลิทอล
ที่มา: Emodi (1978)

1.1 จุดเดือดและจุดหลอมเหลว ไซลิทอลมีจุดเดือดที่อุณหภูมิ 216 องศาเซลเซียส และจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 93.4-94.7 องศาเซลเซียส

1.2 การดูดความชื้น ในที่มีความชื้นสูง ไซลิทอลจะดูดความชื้นได้มากกว่าซูโครสแต่น้อยกว่าซอร์บิทอล

1.3 การละลายและความคงตัว ไซลิทอลละลายน้ำได้ดี โดยละลายได้ 64.2 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส สามารถละลายได้รวดเร็วกว่าซอร์บิทอลและสารละลายไซลิทอลมีความคงตัวแม้สัมผัสกับความร้อนหรือเก็บไว้เป็นเวลานาน ไซลิทอลไม่มีหมู่ aldo และ keto ในโครงสร้าง จึงไม่เกิดปฏิกิริยา Maillard browning และ Caramelization จุลินทรีย์โดยส่วนใหญ่ไม่สามารถใช้ไซลิทอลได้ ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากไซลิทอลจึงไม่ถูกจุลินทรีย์ทำลายได้โดยง่าย นอกจากนี้ไซลิทอลสามารถละลายได้ในเอทานอลและเมทานอล โดยละลายได้ 1.2 และ 6.0 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ

1.4 ความเย็น ไซลิทอลมีค่าความร้อนจำเพาะในการละลายเท่ากับ –38.4 แคลอรีต่อกรัม จึงให้ความรู้สึกเย็นคล้ายเมนทอล แต่ไซลิทอลที่อยู่ในรูปอสัณฐานหรือสารละลายจะไม่มีคุณสมบัติที่ให้ความเย็น ดังนั้นหากต้องการความเย็นสำหรับผลิตภัณฑ์อาหารจะต้องใช้ในรูปผลึกเท่านั้น

1.5 ความหวาน ไซลิทอลมีความหวานมากกว่าแมนนิทอล 2.5 เท่า และหวานกว่าซอร์บิทอล 2 เท่า โดยเมื่อเปรียบเทียบกับซูโครสแล้ว ไซลิทอลมีความหวานเท่ากับ 0.85-1.25 เท่า ซึ่งขึ้นอยู่กับค่าพีเอช ความเข้มข้น อุณหภูมิ และความเข้มข้นของเกลือ เป็นต้น โดยไซลิทอลที่มีความเข้มข้น 10% มีความหวานเท่ากับซูโครสเข้มข้น 10% แต่ถ้าความเข้มข้นของไซลิทอลมากกว่า 10% จะมีความหวานมากกว่าซูโครส และไซลิทอลที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า 10% ความหวานจะมีค่าน้อยกว่า โดยหากกำหนดให้ซูโครสมีความหวานเท่ากับ 100 แล้ว ฟรุกโตส ไซลิทอล กลูโคส ไซโลส ซอร์บิทอล และแมนนิทอล มีความหวานเท่ากับ 150, 85-120, 70, 67, 50 และ 40 ตามลำดับ

1.6 พลังงาน ไซลิทอล 1 กรัม ให้พลังงานเท่ากับ 4.06 กิโลแคลอรี ซึ่งมีความใกล้เคียงกับคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่น

1.7 ไม่ทำให้ฟันผุ เนื่องจาก *Streptococcus mutans* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในช่องปาก ไม่สามารถใช้ไซลิทอลในเมแทบอลิซึมได้ จึงไม่เกิดกรดทำลายฟัน ค่าพีเอชที่ผิวฟันจึงไม่ต่ำกว่า 5.7

2. <u>ประโยชน์ของไซลิทอล</u>

น้ำตาลเป็นสิ่งที่ใช้ผสมในขนมหวานและขนมขบเคี้ยว ตลอดจนหมากฝรั่ง เพื่อให้รสชาติหวานอร่อยมาแต่ดั้งเดิม แต่น้ำตาลเป็นอาหารของแบคทีเรียในช่องปาก *Streptocuccus mutans* ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้ฟันผุ ปัจจุบันการผลิตหมากฝรั่งจึงนิยมใช้สารให้ความหวานแทนน้ำตาล เนื่องจากแบคทีเรียในช่องปากไม่สามารถใช้สารให้ความหวานเหล่านี้ได้จึงไม่ทำให้ฟันผุ ซึ่งในบรรดาสารให้ความหวานนั้นไซลิทอลมีความโดดเด่นที่สุด เพราะมีการศึกษาพบว่า การเคี้ยวหมากฝรั่งที่มีส่วนผสมของไซลิทอลช่วยให้การสะสมแร่ธาตุคืนกลับ (remineralization) ของแคลเซียมและฟอสเฟตซึ่งเป็นองค์ประกอบของเนื้อฟันเพิ่มขึ้น ทำให้รอยผุของฟันกลับแข็งแรง นอกจากนี้ไซลิทอลยังกระตุ้นการหลั่งน้ำลาย ช่วยปรับความเป็นกรดด่างในช่องปากให้เป็นกลาง ทำให้อัตราการเกิดฟันผุลดลง

สมาคมทันตแพทย์ชั้นนำในยุโรปกว่า 10 ประเทศ อาทิประเทศฟินแลนด์ อังกฤษ และฝรั่งเศส ฯลฯ ให้การรับรองว่า การเคี้ยวหมากฝรั่งที่มีส่วนผสมของไซลิทอลหลังอาหารทุกมื้อ ครั้งละ 1-2 เม็ด โดยเคี้ยวนาน 3 นาทีขึ้นไปเป็นประจำ สามารถช่วยลดการเกิดฟันผุได้ (Bar, 1988; Makinen, 1992; Gaffar *et al*., 1998)

ปัจจุบันผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพของช่องปาก เช่น น้ำยาบ้วนปาก ก็นิยมใช้ไซลิทอลเป็นส่วนผสมเช่นกัน เนื่องจากช่วยยับยั้งการเกิดคราบจุลินทรีย์ได้ดีกว่าฟลูออไรด์ถึง 5 เท่า และดีกว่าคลอเฮ็กซิดีนซึ่งมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อถึง 3 เท่า นอกจากนี้สามารถใช้ไซลิทอลเป็นส่วนผสมในยาสีฟันเพื่อช่วยรักษาความชุ่มชื้นของผลิตภัณฑ์ได้ (Parajo *et al*., 1998)

นอกเหนือจากที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ไซลิทอลยังนิยมใช้ในอุตสาหกรรมเพื่อเพิ่มความหวานในผลิตภัณฑ์อาหารและยา เช่น วิตามิน เบเกอรี่ ไอศกรีม โยเกิร์ต เยลลี่ และ แยม ซึ่งสามารถเก็บรักษากลิ่น รส และความหนืดได้นานกว่าซูโครส (Emodi, 1978)

นอกจากนี้การเผาผลาญไซลิทอลไม่ขึ้นกับอินซูลิน จึงไม่ก่อให้เกิดสภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (Hyperglycemia) หรือน้ำตาลในเลือดต่ำ (Hypoglycemia) ดังนั้นจึงสามารถใช้ไซลิทอลเป็นสารให้ความหวานสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวานได้อีกด้วย (Makiness, 2000) อย่างไรก็ตามในกรณีที่ร่างกายได้รับไซลิทอลมากเกินไป การดูดซึมอาจเป็นไปได้ไม่สมบูรณ์ เป็นสาเหตุให้เกิดอาการท้องเสียได้ ซึ่ง Culbert *et al*. (1986) รายงานว่า ปริมาณไซลิทอลสูงสุดที่ร่างกายได้รับโดยไม่ส่งผลเสีย คือ 60 กรัมต่อวัน

วิธีการผลิตไซลิทอล

1. การผลิตไซลิทอลโดยการสกัดจากพืช

ไซลิทอลเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่พบในผักผลไม้หลายชนิด แต่ไซลิทอลในพืชเหล่านี้มีปริมาณต่ำมาก ตัวอย่างเช่น ราสเบอร์รี่ สตรอเบอร์รี่ ดอกกะหล่ำ ผักขม และ มะเขือ มีปริมาณไซลิทอลเท่ากับ 268, 362, 300, 107 และ 180 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัม ตามลำดับ (Emodi, 1978) การสกัดไซลิทอลจากพืชเหล่านี้จึงไม่คุ้มค่าทางเศรษฐกิจ

2. การผลิตไซลิทอลโดยกระบวนการทางเคมี

การผลิตไซลิทอลทางอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ใช้กระบวนการทางเคมี เริ่มต้นจากการนำวัตถุดิบทางการเกษตร เช่น ซังข้าวโพด ฟางข้าว เมล็ดฝ้าย หรือชานอ้อย ซึ่งมีไซแลนเป็นองค์ประกอบ มาย่อยสลายด้วยกรด (acid hydrolysis) จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปแยกน้ำตาลชนิดอื่นออกเพื่อให้ได้น้ำตาลไซโลสบริสุทธิ์ แล้วจึงทำการเติมไฮโดรเจนให้แก่โมเลกุลของน้ำตาลไซโลส (hydrogenation) ภายใต้ความดันไฮโดรเจน 50 บรรยากาศ ที่อุณหภูมิ 80-140 องศาเซลเซียส ซึ่งจะได้ไซลิทอลเป็นผลผลิต แต่ต้องนำมาผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์หลายขั้นตอน คือ โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนอิออน การทำให้เข้มข้น การตกผลึก และ การกำจัดสี (Hyvonen and Koivistoinen, 1982) ซึ่งมีการศึกษาพบว่า การผลิตไซลิทอลโดยกระบวนการทางเคมีสามารถให้ผลผลิตไซลิทอลประมาณ 50-60% จากไซโลสเริ่มต้น (Nigam and Singh, 1995)

การผลิตไซลิทอลโดยกระบวนการทางเคมีนั้น มีความยุ่งยากและซับซ้อนในขั้นตอนที่ทำให้ไซลิทอลบริสุทธิ์ ต้นทุนการผลิตจึงสูง ส่งผลให้ไซลิทอลมีราคาแพง ดังนั้นการผลิตไซลิทอลด้วยวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ (Parajo *et al*., 1998)

3. <u>การผลิตไซลิทอลโดยกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ</u>

เป็นกระบวนการที่ใช้จุลินทรีย์หรือเอนไซม์เพื่อการผลิตไซลิทอลจากน้ำตาลดี-ไซโลส (D-xylose)

3.1 การผลิตไซลิทอลโดยแบคทีเรีย

โดยทั่วไปแบคทีเรียสามารถใช้ไซโลสได้โดยอาศัยเอนไซม์ xylose isomerase เพื่อเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลูโลส หลังจากนั้นเอนไซม์ xylulokinase จะทำหน้าที่เปลี่ยนไซลูโลสเป็น xylulose-5-phosphate ซึ่งเป็นสารมัธยันตร์ทั่วไปที่พบในเมแทบอลิซึมของโปรคาริโอตและยูคาริโอต

แบคทีเรียที่สามารถผลิตไซลิทอลจากไซโลสได้นั้นจำเป็นต้องมีเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยารีดักชันไซโลสเพื่อเปลี่ยนเป็นไซลิทอล ก่อนที่ไซลิทอลจะถูกออกซิไดซ์เป็นไซลูโลสต่อไป (Parajo *et al*., 1998) ซึ่งจากรายงานพบว่ามีเพียง *Corynebacterium* sp. (Yoshitake *et al*., 1971) และ *Enterobacter* sp. (Yoshitake *et al*., 1973) ที่สามารถผลิตไซลิทอลจากไซโลสได้

Yoshitake *et al*. (1973) รายงานการผลิตไซลิทอลจาก *Enterobacter* sp. พบว่า ผลิตไซลิทอลได้ 33.3 กรัมต่อลิตร จากไซโลสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร และมีอัตราการผลิตไซลิทอลเท่ากับ 0.35 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *Mycobacterium smegmatis* สามารถใช้ไซลูโลสเป็นสับสเตรตสำหรับการผลิตไซลิทอลได้ (Izumori and Tuzuki, 1988) แต่อย่างไรก็ตามการผลิตไซลิทอลโดยแบคทีเรียเหล่านี้ให้ผลผลิตค่อนข้างต่ำ ดังนั้นจึงไม่เป็นที่สนใจศึกษากันมากนัก

3.2 การผลิตไซลิทอลโดยราเส้นสาย

ราเส้นสายมีวิถีเมแทบอลิซึมของไซโลสเช่นเดียวกับยีสต์ โดยผ่านการทำงานของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันเพื่อเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลูโลส โดยมีไซลิทอลเป็นสารมัธยันตร์ มีรายงานว่าพบการผลิตไซลิทอลโดยราเส้นสายหลายสกุล คือ *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Gliocladium*, *Byssochlamys*, *Myrothecium* และ *Neurospora* spp. แต่ผลิตได้ปริมาณต่ำ (Chiang and Knight, 1960) มีเพียง *Petromyces albertensis* เท่านั้นที่มีรายงานการผลิตไซลิทอลได้สูงถึง 39.8 กรัมต่อลิตร จากไซโลสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 10 วัน (Dahiya, 1991)

3.3 การผลิตไซลิทอลโดยยีสต์

การผลิตไซลิทอลโดยกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพนั้น การผลิตด้วยยีสต์เป็นที่สนใจศึกษากันมากที่สุด เนื่องจากยีสต์หลายสายพันธุ์สามารถผลิตไซลิทอลได้ปริมาณสูง จึงอาจมีประสิทธิภาพที่สามารถทดแทนการผลิตไซลิทอลโดยกระบวนการทางเคมีได้ ซึ่งจะได้กล่าวถึงในรายละเอียดต่อไป

3.4 การผลิตไซลิทอลโดยเอนไซม์

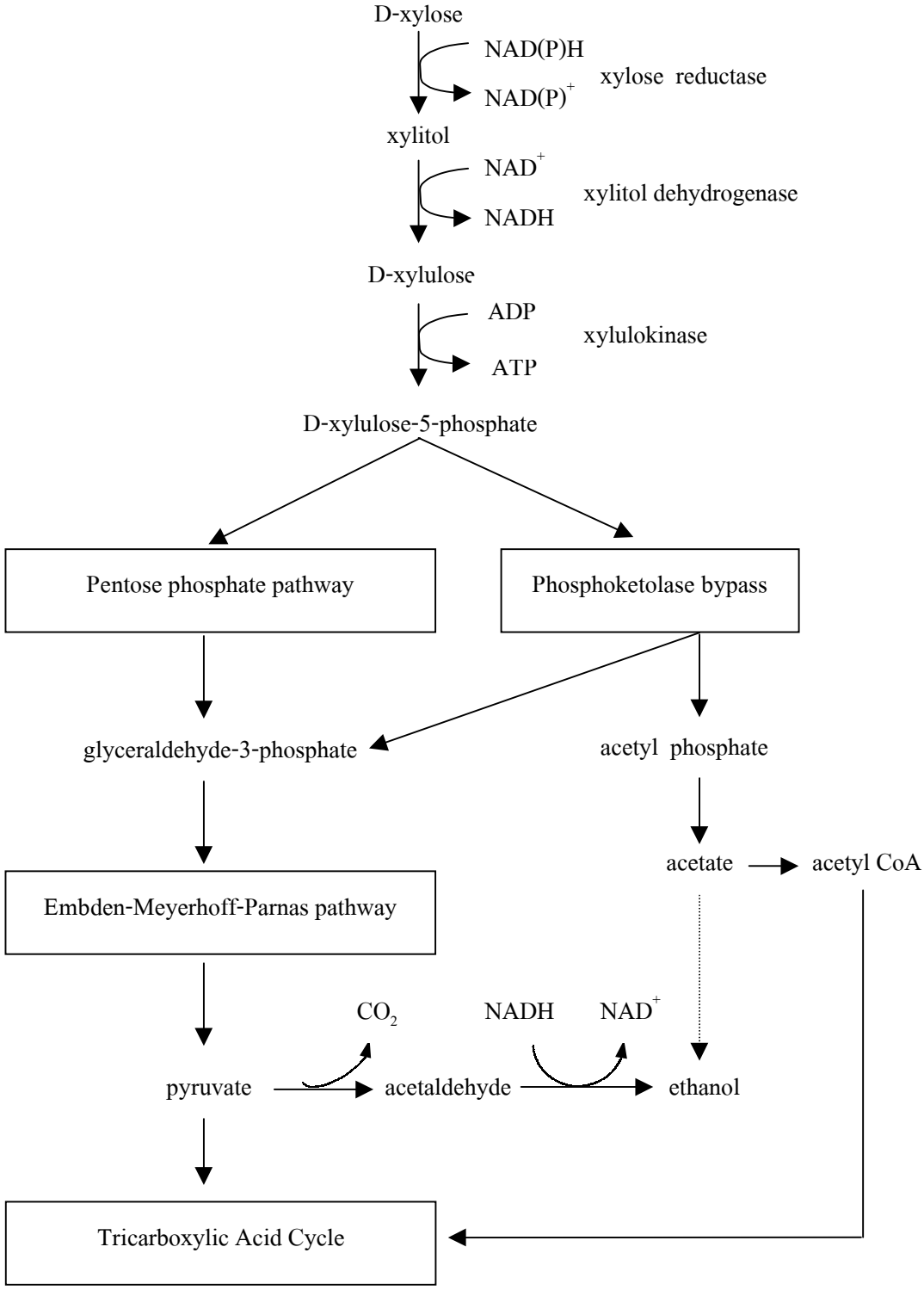
Nidetzky *et al*. (1996) ทดลองผลิตไซลิทอลจากไซโลสโดยใช้เอนไซม์ xylose reductase จากยีสต์ *Candida tenuis* ควบคู่กับการใช้เอนไซม์ glucose dehydrogenase จากแบคทีเรีย *Bacillus cereus* ที่ทำหน้าที่ออกซิไดซ์กลูโคสโดยใช้ NAD^+ เป็นตัวรับอิเล็กตรอน และเกิด NADH ขึ้นในปฏิกิริยา เพื่อนำ NADH ไปใช้ในปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ xylose reductase ต่อไป ผลการทดลองพบว่า มีค่าผลได้ (Yp/s) ของไซลิทอลเท่ากับ 0.96 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส จากไซโลสเริ่มต้น 300 กรัมต่อลิตร และมีอัตราการผลิตไซลิทอลเท่ากับ 3.33 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

การผลิตไซลิทอลโดยยีสต์

เมแทบอลิซึมของน้ำตาลไซโลสในยีสต์

เมแทบอลิซึมของไซโลสในยีสต์นั้นแตกต่างจากกระบวนการที่เกิดขึ้นในแบคทีเรียในขั้นตอนการเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลูโลส โดยแบคทีเรียส่วนใหญ่จะเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลูโลสด้วยปฏิกิริยา isomerization โดยเอนไซม์ xylose isomerase ในขณะที่ยีสต์ใช้ปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชันในการเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลูโลส (Parajo *et al*., 1998)

เมื่อยีสต์นำไซโลสที่อยู่ภายนอกผ่านเข้าไปในเซลล์ ไซโลสจะถูกรีดิวซ์เป็นไซลิทอลโดยเอนไซม์ NADH - และ/หรือ NADPH - linked xylose reductase หลังจากนั้นไซลิทอลอาจถูกขับออกมานอกเซลล์ หรือถูกออกซิไดซ์เป็นไซลูโลสโดยเอนไซม์ NAD^+- linked xylitol dehydrogenase และต่อมาไซลูโลสจะถูกฟอสโฟรีเลทเป็น xylulose-5-phosphate ด้วยปฏิกิริยาฟอสโฟรีเลชันจากการทำงานของเอนไซม์ xylulokinase (Smiley and Bolen, 1982; Rizzi *et al*., 1989) xylulose-5-phosphate ที่เกิดขึ้นจะเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟต (Pentose phosphate pathway) ให้ผลผลิตคือ glyceraldehyde-3-phosphate และ fructose-6-phosphate ซึ่งจะเข้าสู่วิถี EMP (Embden-Meyerhof-Parnas pathway) เพื่อผลิตไพรูเวท โดยไพรูเวทอาจถูกดีคาร์บอกซิเลทและถูกรีดิวซ์โดยปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ pyruvic decarboxylase และ alcohol dehydrogenase ตามลำดับ ได้ผลผลิตเป็นเอทานอล หรือไพรูเวทอาจเข้าสู่วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (TCA cycle) เพื่อสร้างพลังงานและเซลล์ต่อไป นอกจาก xylulose-5-phosphate จะเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟตแล้ว ยังเข้าสู่ phosphoketolase bypass ได้อีกทางหนึ่ง โดยมี glyceraldehyde-3-phosphate และ acetyl phosphate เป็นผลผลิตจากการทำงานของเอนไซม์ xylulose-5-phosphate phosphoketolase ซึ่ง glyceraldehyde-3-phosphate ที่เกิดขึ้นจะเข้าสู่วิถี EMP ขณะที่ acetyl phosphate จะเกิดปฏิกิริยาต่อโดยการทำงานของเอนไซม์ acetate kinase ได้ acetate เป็นผลผลิต ซึ่ง acetate อาจเกิดปฏิกิริยาต่อไปโดยการเร่งของเอนไซม์ acetyl CoA synthase ได้เป็น acetyl CoA ซึ่งจะเข้าสู่ TCA cycle ต่อไป หรือ acetate อาจเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้ (Prior *et al*., 1989; Hahn-Hagerdal *et al*., 1994) ดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 เมแทบอลิซึมของน้ำตาลดี-ไซโลสในยีสต์

ที่มา: ดัดแปลงจาก Winkelhausen and Kuzmanova (1998)

2. ยีสต์สายพันธุ์ที่สามารถผลิตไซลิทอล

ยีสต์หลายสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตไซลิทอลจากไซโลส ซึ่งส่วนใหญ่จัดอยู่ในสกุล *Candida* อาทิเช่น *C. blankii*, *C. boidinii*, *C. guilliermondii*, *C. mogii*, *C. tropicalis* และ *C. utilis* เป็นต้น นอกจากนี้มีรายงานการผลิตไซลิทอลโดยยีสต์สกุลอื่น ๆ เช่น *Pachysolen tannophilus*, *Debaryomyces hansenii* และ *Pichia anomala* เป็นต้น (Kim *et al.*, 1997; Winkelhausen and Kuzmanova, 1998) ซึ่งความสามารถในการผลิตไซลิทอลของยีสต์บางสายพันธุ์ดังที่มีรายงานไว้ได้แก่ *Candida mogii* ATCC 18364 ผลิตไซลิทอลโดยมีค่าผลได้ (Yp/s) ของไซลิทอลเท่ากับ 0.59 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส จากไซโลสเริ่มต้น 93.5 กรัมต่อลิตร (Sirisansaneeyakul *et al*., 1992) *C. boidinii* NRRL Y-17213 มีค่า Yp/s เท่ากับ 0.48 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส จากไซโลสเริ่มต้น 130 กรัมต่อลิตร (Vandeska *et al*., 1995 b) *C. tropicalis* มีค่า Yp/s เท่ากับ 0.56 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส จากไซโลสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร (Kim *et al*., 1997) *C. guilliermondii* IM 50088 มีค่า Yp/s เท่ากับ 0.70 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส จากไซโลสเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร (Aguiar Jr *et al*., 2002) และ *Pachysolen tannophilus* มีค่า Yp/s เท่ากับ 0.14 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส จากไซโลสเริ่มต้น 25 กรัมต่อลิตร (Sanchez *et al*., 2003) เป็นต้น เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบผลผลิตไซลิทอลจากรายงานข้างต้น พบว่า *C. tropicalis* ผลิตไซลิทอลได้ปริมาณมากที่สุด เท่ากับ 84 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ *C. guilliermondii* IM 50088 ผลิตไซลิทอลได้น้อยกว่า โดยผลิตได้เพียง 35 กรัมต่อลิตร แม้จะมีค่า Yp/s ที่สูงกว่าก็ตาม

3. การผลิตไซลิทอลโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์

Vongsuvanlert and Tani (1989) ศึกษาการผลิตไซลิทอลจากไซโลสโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ *Candida boidinii* No. 2201 พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยเมทานอลความเข้มข้น 1% (โดยปริมาตร) ให้ผลผลิตไซลิทอลที่สูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเมทานอล 2.5 เท่า ทั้งนี้เนื่องจากเมทานอลที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อถูกออกซิไดซ์และเกิด NADH ขึ้นในกระบวนการ ซึ่ง NADH มีความจำเป็นสำหรับปฏิกิริยาการเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลิทอลโดยเอนไซม์ NADH-linked xylose reductase (Suryadi *et al*., 2000) นอกจากนี้ระดับ NADH ภายในเซลล์ที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลให้การเกิดปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ NAD^+-linked xylitol dehydrogenase ลดลง การเปลี่ยนไซลิทอลเป็นไซลูโลสจึงลดลง ซึ่งทำให้เกิดการสะสมไซลิทอลมากขึ้น (du Preez *et al*., 1989)

จากการทดลองผลิตไซลิทอลด้วย *Candida boidinii* No. 2201 เมื่อเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารที่มีไซโลสเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร และเมทานอลเข้มข้น 2% (โดยปริมาตร) พบว่า สามารถให้ผลผลิตไซลิทอลเท่ากับ 48.5 กรัมต่อลิตร และให้ไซลูโลสเท่ากับ 3.3 กรัมต่อลิตร (Vongsuvanlert and Tani, 1989)

Suryadi *et al*. (2000) รายงานว่า เมทิลโลโทรฟิกยีสต์ *Hansenula polymorpha*, *H. ofunaensis*, *Candida boidinii* และ *Pichia pinus* ผลิตไซลิทอลจากไซโลสได้ โดย *H. polymorpha* มีปริมาณการผลิตไซลิทอลสูงที่สุด คือ 57 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว basal medium ที่ประกอบด้วยไซโลสเข้มข้น 110 กรัมต่อลิตร เมทานอลเข้มข้น 1% (โดยปริมาตร) ยูเรียเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร และ $MgSO_4 . 7H_2O$ เข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8

4. <u>ปัจจัยบางประการที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไซลิทอลโดยยีสต์</u>

ยีสต์สามารถผลิตไซลิทอลได้มากหรือน้อยแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์และปัจจัยต่าง ๆ เช่น ปริมาณออกซิเจน พีเอช อุณหภูมิ ความเข้มข้นของไซโลส ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น และตัวยับยั้ง เช่น furfuran กรดอะซิติก สารประกอบฟีนอล และอนุมูลโลหะหนัก เป็นต้น (Converti *et al*., 1999; Converti *et al*., 2000)

Horitsu *et al.* (1992) รายงานการผลิตไซลิทอลโดยยีสต์ *Candida tropicalis* IFO 0618 พบว่า ยีสต์สกัดเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อประสิทธิภาพการผลิตไซลิทอล นอกจากนี้ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไซโลสและอัตราการให้อากาศพบว่า การใช้ไซโลสความเข้มข้นสูงแต่อัตราการให้อากาศต่ำ หรือการใช้ไซโลสความเข้มข้นต่ำแต่อัตราการให้อากาศสูง ส่งผลให้การผลิตไซลิทอลไม่มีประสิทธิภาพ แตกต่างจากการใช้ไซโลสความเข้มข้นสูงและอัตราการให้อากาศสูง ซึ่งยีสต์เจริญได้ดี เซลล์มีความเข้มข้นสูง ทำให้ผลิตไซลิทอลได้มาก โดยผลิตไซลิทอลได้สูงสุดเท่ากับ 2.67 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้ไซโลสเข้มข้น 172 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัดเข้มข้น 21 กรัมต่อลิตร และค่า K_La (ประสิทธิภาพการถ่ายโอนออกซิเจน) เท่ากับ 451.50 ต่อชั่วโมง

Sirisansaneeyakul *et al*. (1995) ศึกษาการผลิตไซลิทอลโดยยีสต์ *Candida mogii* ATCC 18364 พบว่า ความเข้มข้นของไซโลส และออกซิเจนเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลสูงต่อการผลิตไซลิทอล

โดยยีสต์สามารถผลิตไซลิทอลได้ดีทั้งในสภาวะที่ให้ออกซิเจนอย่างเพียงพอและสภาวะจำกัดออกซิเจน แต่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนการผลิตไซลิทอลจะต่ำมาก นอกจากนี้เมื่อทดลองเพิ่มความเข้มข้นของไซโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 5.3 เป็น 53 กรัมต่อลิตร พบว่าค่าผลได้ (Yp/s) ของไซลิทอลเพิ่มขึ้นจาก 0 เป็น 0.70 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส ขณะที่การเติมเพปโทนและยีสต์สกัดส่งผลให้ยีสต์มีการเจริญเพิ่มขึ้น แต่ไม่มีผลต่อการผลิตไซลิทอล

Sreenivas Rao *et al*. (2004) ศึกษาอิทธิพลของปัจจัยทางกายภาพ และองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตไซลิทอลจาก *Candida* sp. โดยอาศัยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (QUALITECK 4) เพื่อวิเคราะห์ผลการทดลอง พบว่า อัตราการกวนและอุณหภูมิเป็นปัจจัยทางกายภาพที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไซลิทอลมากที่สุด ส่วนองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอิทธิพลต่อการผลิตคือ ความเข้มข้นของ corn steep liquor ไซโลส และ KH_2PO_4

Sampaio *et al*. (2006) ศึกษาอิทธิพลของค่าพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตไซลิทอลโดยยีสต์ *Debaryomyces hansenii* UFV-170 โดยศึกษาที่พีเอชเริ่มต้นตั้งแต่ 2-8 พบว่า การเพิ่มพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 2 เป็น 4 ส่งผลให้การผลิตไซลิทอลเพิ่มขึ้นจาก 5.39 เป็น 38.9 กรัมต่อลิตร และค่า Yp/s เพิ่มขึ้นจาก 0.22 เป็น 0.70 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส โดยยีสต์สามารถผลิตไซลิทอลได้สูงสุดเท่ากับ 37.5-41.8 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า Yp/s เท่ากับ 0.70-0.76 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าพีเอชเริ่มต้นอยู่ในช่วง 4-8

อุณหภูมิสำหรับการผลิตไซลิทอลโดยยีสต์

การผลิตไซลิทอลโดยยีสต์นั้นมักใช้อุณหภูมิการเพาะเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส เนื่องจากใช้ยีสต์ที่เป็น mesophilic yeasts เช่น *Candida tropicalis* IFO 0618 (Horitsu *et al*., 1992), *C. mogii* ATCC 18364 (Sirisansaneeyakul *et al*., 1995), *C. parapsilosis* KFCC 10875 (Kim *et al*., 1997), *Debaryomyces hansenii* (Girio *et al*., 2000) และ *C. guilliermondii* IM 50088 (Aguiar Jr. *et al*., 2002) เป็นต้น ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอลนั้น แตกต่างกันตามสายพันธุ์ของยีสต์ แต่อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงยีสต์ที่อุณหภูมิสูงเกินไปอาจส่งผลให้การผลิตไซลิทอลลดลงได้ (Slininger *et al*., 1987)

Sanchez *et al*. (2003) รายงานอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการผลิตไซลิทอลโดย *Pachysolen tannophilus* เมื่อเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารที่มีไซโลสเข้มข้น 25 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร พบว่า มีค่า Yp/s สูงสุดเท่ากับ 0.14 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลสเมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิการเพาะเลี้ยงให้สูงขึ้นค่า Yp/s จะลดลง ในขณะที่ยีสต์มีการเจริญดีที่สุดที่อุณหภูมิการเพาะเลี้ยง 33 องศาเซลเซียส โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.25 ต่อชั่วโมง

Sampaio *et al*. (2006) ศึกษาการผลิตไซลิทอลโดย *Debaryomyces hansenii* UFV–170 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ประกอบด้วยไซโลสเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร พบว่า การเพิ่มอุณหภูมิเพาะเลี้ยงจาก 15 เป็น 30 องศาเซลเซียส ส่งผลให้การผลิตไซลิทอลเพิ่มขึ้นจาก 5.15 เป็น 41.6 กรัมต่อลิตร โดยยีสต์มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตอยู่ในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถผลิตไซลิทอลได้สูงสุดเท่ากับ 41-41.6 กรัมต่อลิตร มีค่า Yp/s เท่ากับ 0.74-0.77 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิการเพาะเลี้ยงถึง 40 องศาเซลเซียส จะส่งผลให้การผลิตไซลิทอลลดลงอย่างชัดเจน โดยให้ผลผลิตเท่ากับ 5.83 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า Yp/s เท่ากับ 0.57 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส ในขณะที่การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส ไม่พบการผลิตไซลิทอลเลย

ยีสต์ทนอุณหภูมิสูง

โดยทั่วไปจุลินทรีย์มีความสามารถในการปรับตัวต่อสภาวะภายนอกเพื่อความมีชีวิตแตกต่างกัน อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นเป็นปัจจัยภายนอกที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เพราะมีผลต่อการถูกทำลายและเกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโมเลกุลภายในเซลล์ (Brock, 1986) จุลินทรีย์ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิสูงจำเป็นต้องมีกลไกพิเศษในการช่วยให้มีชีวิตรอด ซึ่งเกี่ยวข้องกับปัจจัยสำคัญ 3 ประการ คือ 1. เสถียรภาพของตัวเซลล์ เนื่องจากปฏิกิริยาของไขมันภายในเซลล์ 2. การสร้างองค์ประกอบของเซลล์ขึ้นใหม่แทนองค์ประกอบที่เสียสภาพเพราะความร้อน 3. การที่จุลินทรีย์ทนต่ออุณหภูมิสูงได้นั้นมีมาแต่เดิมอยู่ก่อนและเกิดวิวัฒนาการอย่างต่อเนื่อง นอกจากนี้ยังพบว่าการปล่อยน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมซึ่งมักมีอุณหภูมิค่อนข้างสูงเป็นการเพิ่มปริมาณของจุลินทรีย์ที่ทนอุณหภูมิสูง โดยเฉพาะในบริเวณที่มีความร้อนเนื่องจากกรรมวิธีแปรรูปผลผลิต (Singleton *et al*., 1973)

อุณหภูมิมีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์จุลินทรีย์ เพราะการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงแบบแผนการสังเคราะห์โปรตีน โดยมีผลให้เกิดการยับยั้งการสร้างโปรตีนบางชนิด และทำให้เกิดการกระตุ้นการสังเคราะห์โปรตีนที่เรียกว่า Heat-Shock Protein (HSPs) เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง นอกจากนี้อุณหภูมิยังมีอิทธิพลต่อการควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์หลายชนิดทั้งที่เป็น intracellular enzyme และ extracellular enzyme (Hereendeen *et al.*, 1979; Yamamori and Yura, 1980)

ยีสต์ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่านั้นพบได้ยาก ซึ่งอุณหภูมิสูงสุดที่ยีสต์เจริญได้มีค่าประมาณ 46-50 องศาเซลเซียส ในขณะที่อุณหภูมิต่ำสุดที่ยีสต์เจริญได้มีค่าประมาณ (-5) - (-7) องศาเซลเซียส (Stokes, 1971; Watson, 1987)

Arthur and Watson (1976) แบ่งกลุ่มยีสต์ตามช่วงอุณหภูมิที่เจริญได้ โดยแบ่งเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้คือ ยีสต์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (psychrophilic yeasts) มีอุณหภูมิที่เจริญได้อยู่ในช่วง (-2) - 20 องศาเซลเซียส ยีสต์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic yeasts) มีอุณหภูมิที่เจริญได้อยู่ในช่วง 5 - 35 องศาเซลเซียส ยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูง (thermotolerant yeasts) มีอุณหภูมิที่เจริญได้อยู่ในช่วง 8 - 42 องศาเซลเซียส และยีสต์ที่ชอบอุณหภูมิสูง (thermophilic yeasts) มีอุณหภูมิที่เจริญได้อยู่ในช่วง 25 หรือ 28-45 องศาเซลเซียส

โดย Arthur and Watson (1976) ศึกษาการเจริญของ *Candida parapsilosis* และ *Saccharomyces telluris* พบว่ายีสต์ทั้งสองสายพันธุ์มีอุณหภูมิที่เจริญได้อยู่ในช่วง 8-42 องศาเซลเซียส โดยมีการเจริญที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ดีกว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงไม่จัดยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์อยู่ในกลุ่มยีสต์ที่ชอบอุณหภูมิสูง แต่จัดอยู่ในกลุ่มยีสต์ทนอุณหภูมิสูง

การใช้ยีสต์ทนอุณหภูมิสูงในการผลิตผลิตภัณฑ์นั้นมีข้อดีหลายประการ เนื่องจากยีสต์เหล่านี้สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง จึงช่วยลดต้นทุนและพลังงานสำหรับหล่อเย็นในระบบถังหมักขนาดใหญ่ สามารถช่วยป้องกันการผลิตหยุดชะงักเมื่อเกิดความร้อนสูงขึ้น นอกจากนี้อุณหภูมิการหมักที่สูงยังช่วยลดโอกาสการปนเปื้อนและเพิ่มอัตราการหมักให้เร็วยิ่งขึ้น ระยะเวลาการหมักจึงลดลง ทำให้มีต้นทุนการผลิตที่ต่ำกว่า (Rossi *et al*., 1989; Kiran Sree *et al*., 2000; Sridhar *et al*., 2002)

โดยส่วนใหญ่มีการนำยีสต์ทนอุณหภูมิสูงมาใช้ประโยชน์ในด้านการผลิตเอทานอล ซึ่งมักเป็นยีสต์ในสกุล *Kluyveromyces*, *Saccharomyces* และ *Candida* (Panchal, 1990) นอกจากนี้มีรายงานการผลิตเอทานอลโดย *Hansenula polymorpha* ซึ่งเป็นเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ทนอุณหภูมิสูงด้วย

สำหรับ *S. cerevisiae* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญอยู่ระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม Kida *et al.* (1992) รายงานว่า *S. cerevisiae* KF-7 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ได้มาจากการปรับปรุงพันธุกรรมโดยวิธี protoplast fusion สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 35 องศาเซลเซียส เป็นยีสต์ทนอุณหภูมิสูง และยังมีสมบัติตกตะกอนได้ง่ายอีกด้วย

Kiran Sree *et al.* (2000) รายงานการแยก *S. cerevisiae* จากดินในประเทศอินเดียได้ 4 สายพันธุ์ ซึ่งมีสมบัติทนอุณหภูมิสูง ทนต่อน้ำตาลความเข้มข้นสูง และสามารถรวมกลุ่มตกตะกอนได้ดี เหมาะสำหรับการผลิตเอทานอล ซึ่งจะช่วยลดค่าใช้จ่ายในการหล่อเย็นได้

Kluyveromyces จัดเป็นยีสต์ทนอุณหภูมิสูงสกุลหนึ่งที่มีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง โดย Hari Krishna *et al.* (2001) ได้เปรียบเทียบการผลิตเอทานอลจากน้ำทิ้งที่มีลิกโน-เซลลูโลสระหว่างยีสต์ทนร้อน *Kluyveromyces fragilis* NCLM 3358 กับ *S. cerevisiae* NRRL-Y-132 พบว่า *K. fragilis* NCLM 3358 สามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณที่สูงกว่า โดยผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 2.5-3.5 % ขณะที่ *S. cerevisiae* NRRL-Y-132 ผลิตได้ 2-2.5 %

Ryabova *et al.* (2003) ใช้ *H. polymorpha* ซึ่งเป็นเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูงสำหรับการผลิตเอทานอล โดยใช้กระบวนการหมักกลูโคส เซลโลไบโอส รวมทั้งไซโลส โดยพบว่ามีชีวกิจกรรมสูงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ขณะที่ *Pichia stipitis* ซึ่งเป็นยีสต์ที่ทราบกันดีว่าสามารถเกิดกระบวนการหมักไซโลสได้นั้น ไม่สามารถเกิดกระบวนการหมักได้ดีที่ 37 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังพบว่า *H. polymorpha* เกิดกระบวนการหมักกลูโคสและไซโลสได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 45 องศาเซลเซียส โดยเชื้อนี้จะเจริญดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีอุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 48 องศาเซลเซียส

นอกจากประโยชน์ด้านการผลิตเอทานอลแล้ว Levine and Cooney (1973) ได้ทดลองผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจาก *H. polymorpha* ในสภาพการเลี้ยงแบบต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

โดยใช้เมทานอลเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน พบว่าได้น้ำหนักแห้งของเซลล์ 0.36 กรัม ต่อการใช้เมทานอล 1 กรัม ปริมาณโปรตีนรวม 40 % และกรดนิวคลีอิก 5-7 %