ผลและวิจารณ์

1. การแยกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่สามารถใช้เมทานอลเพื่อการเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

การแยกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ในการทดลองนี้ใช้ความสามารถในการเจริญบนอาหารแข็ง 0.5% methanol ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นข้อจำกัดในขั้นตอนสุดท้ายของการแยกเชื้อ ทั้งนี้เพื่อคัดเลือกให้ได้เฉพาะเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงเท่านั้น โดยสามารถแยกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ได้จำนวน 38 ไอโซเลท จากตัวอย่างที่เก็บจากธรรมชาติจำนวนทั้งสิ้น 71 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การแยกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่สามารถใช้เมทานอลเพื่อการเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนอาหารแข็ง 0.5% methanol เมื่อบ่มนาน 5 วัน

ตัวอย่างที่	ชนิดของตัวอย่าง	จังหวัดที่เก็บตัวอย่าง	รหัสเชื้อที่แยกได้
1	ดอกกล้วยไม้	กาญจนบุรี	B1, B2, B3
2	ดอกกล้วยไม้	พิษณุโลก	-
3	ดอกกล้วยไม้	เพชรบุรี	-
4	ดอกกล้วยไม้	อยุธยา	-
5	ดอกกุหลาบ	นครปฐม	-
6	ดอกกุหลาบ	พิษณุโลก	-
7	ดอกกุหลาบ	ร้อยเอ็ด	-
8	ดอกเข็ม	กรุงเทพมหานคร	A1, A2, A3
9	ดอกเข็ม	พิษณุโลก	-
10	ดอกเข็ม	ร้อยเอ็ด	-
11	ดอกเข็ม	อยุธยา	-
12	ดอกจำปา	สุโขทัย	-
13	ดอกจำปี	สุโขทัย	-
14	ดอกดาวเรือง	นครปฐม	-
15	ดอกดาวเรือง	ราชบุรี	-
16	ดอกบานชื่น	ราชบุรี	-

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ชนิดของตัวอย่าง	จังหวัดที่เก็บตัวอย่าง	รหัสเชื้อที่แยกได้
17	ดอกผกากรอง	ราชบุรี	-
18	ดอกผกากรอง	อยุธยา	-
19	ดอกพิกุล	กาญจนบุรี	B4
20	ดอกพิกุล	ราชบุรี	-
21	ดอกพุดซ้อน	ราชบุรี	-
22	ดอกมะลิ	นนทบุรี	A4, A5, A6, A7
23	ดอกมะลิ	ราชบุรี	-
24	ดอกโมก	นครปฐม	-
25	ดอกไม้	ภูเก็ต	-
26	ดอกรัก	กาญจนบุรี	-
27	ดอกรัก	ร้อยเอ็ด	-
28	ดิน	นครปฐม	-
29	ดิน	สุโขทัย	T2
30	ดินเขื่อน	ภูเก็ต	-
31	ดินนา	นนทบุรี	-
32	ดินนา	บุรีรัมย์	-
33	ดินนา	พิษณุโลก	-
34	ดินนา	เพชรบุรี	-
35	ดินนา	ร้อยเอ็ด	-
36	ดินนา	สุราษฎร์ธานี	-
37	ดินน้ำตก	พิษณุโลก	-
38	ดินป่า	กาญจนบุรี	-
39	ดินริมน้ำ	พิษณุโลก	-
40	ดินสวน	กาญจนบุรี	-
41	ดินสวน	นนทบุรี	-
42	ดินสวน	เพชรบุรี	-

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ชนิดของตัวอย่าง	จังหวัดที่เก็บตัวอย่าง	รหัสเชื้อที่แยกได้
43	ดินสวน	ราชบุรี	T1
44	ดินสวนปาล์ม	กระบี่	-
45	ดินสวนผลไม้	กระบี่	-
46	ดินสวนผลไม้	สุราษฎร์ธานี	-
47	ดินสวนยางพารา	กระบี่	-
48	ดินสวนยางพารา	สุราษฎร์ธานี	-
49	เปลือกต้นกระถิน	พิษณุโลก	T3
50	เปลือกต้นฉำฉา	พิษณุโลก	T4
51	เปลือกต้นประดู่	ภูเก็ต	V1
52	เปลือกต้นมะขาม	นนทบุรี	P1
53	เปลือกต้นมะขาม	อยุธยา	-
54	เปลือกต้นมะม่วง	ภูเก็ต	V3
55	เปลือกต้นมะรุม	ภูเก็ต	V2
56	เปลือกต้นยาง	กระบี่	P2, P3
57	เปลือกผลไม้	สุโขทัย	-
58	เปลือกมังคุด	นนทบุรี	K50
59	เปลือกไม้	นครปฐม	-
60	เปลือกไม้	นนทบุรี	-
61	เปลือกไม้	เพชรบุรี	-
62	เปลือกไม้	ภูเก็ต	-
63	เปลือกไม้	ร้อยเอ็ด	-
64	เปลือกไม้	สุโขทัย	-
65	เปลือกละมุด	นนทบุรี	K16, K17
66	ยางไม้	กระบี่	P4
67	ยางไม้	นครราชสีมา	N20, N21, N22

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ชนิดของตัวอย่าง	จังหวัดที่เก็บตัวอย่าง	รหัสเชื้อที่แยกได้
68	ยางไม้	พิษณุโลก	N13, N18
69	ยางไม้	ภูเก็ต	V4, V5, V6
70	ยางไม้	สุโขทัย	-
71	ยางไม้	อยุธยา	C1, C2, C3, C4, C5

จากผลการทดลองที่แยกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ได้จำนวนน้อย อาจเนื่องมาจากอุณหภูมิการบ่มเชื้อในขั้นตอนสุดท้ายของการแยกเชื้อที่สูงถึง 37 องศาเซลเซียส ซึ่งยีสต์ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสพบได้น้อยในธรรมชาติ (Stokes, 1971) โดย van Dijken and Harder (1974) รายงานว่า การแยกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำให้แยกเชื้อได้น้อยกว่าเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส แต่เนื่องจากการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่สามารถใช้เมทานอลเพื่อการเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง ดังนั้นในขั้นตอนสุดท้ายของการแยกเชื้อจึงต้องบ่มที่อุณหภูมิสูงถึง 37 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ Levine and Cooney (1973) ใช้ในการแยกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ทนอุณหภูมิสูงจากแหล่งธรรมชาติ

Kiran Sree *et al.* (2000) รายงานว่าสามารถแยกยีสต์ทนอุณหภูมิสูงได้หลายสายพันธุ์จากดินในประเทศอินเดีย ซึ่งเป็นประเทศในเขตร้อนและมีอุณหภูมิในฤดูร้อนที่สูงมาก ซึ่งหากการทดลองนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อแยกเชื้อในฤดูร้อนอาจช่วยเพิ่มโอกาสที่จะแยกได้ยีสต์ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสมากขึ้นก็ได้

อย่างไรก็ตามการคัดเลือกเชื้อโดยใช้อาหารแข็ง 0.5% methanol เป็นเพียงการคัดเลือกเบื้องต้นเท่านั้น เนื่องจากเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่จะนำไปใช้ในการผลิตไซลิทอลจะต้องเจริญได้ในอาหารเหลว ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาการเจริญในอาหารเหลวด้วย ดังการทดลองต่อไป

2. <u>การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ซึ่งเจริญได้ในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส</u>

การทดลองในส่วนนี้เป็นการพิจารณาความสามารถในการเจริญของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่แยกได้จากข้อ 1 โดยการเก็บตัวอย่างเพียงครั้งเดียวจากการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ ซึ่งยีสต์ที่ผ่านการคัดเลือกจากการทดลองนี้จะถูกนำไปเพาะเลี้ยงแบบแบทช์อีกครั้งหนึ่ง (ข้อ 3) เพื่อศึกษารูปแบบการเจริญและคำนวณค่าอัตราการเจริญจำเพาะจากการเจริญช่วง exponential phase ซึ่งอาหารเหลวที่ใช้ในการทดลองดังกล่าวจะมีเมทานอล 1% (โดยปริมาตร) เพื่อที่ยีสต์สามารถเจริญได้ยาวนานขึ้นและทำให้พิจารณาค่าการเจริญได้ชัดเจนขึ้นกว่าการใช้เมทานอล 0.5% (โดยปริมาตร) เช่นที่ใช้ในอาหารแข็ง ดังนั้นในการทดลองนี้จึงคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ซึ่งเจริญได้ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1% (โดยปริมาตร) เป็นองค์ประกอบ

เมื่อนำเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ทั้งหมดที่แยกได้จากข้อ 1 จำนวน 38 ไอโซเลท มาทดสอบการเจริญในอาหารเหลว 1% methanol ที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส โดยการเลี้ยงในฟลาสก์แบบเขย่า พบว่า มียีสต์จำนวน 24 ไอโซเลทที่สามารถเจริญได้ที่ 37 องศาเซลเซียส และเมื่อนำยีสต์ทั้ง 24 ไอโซเลทมาทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่ามีเพียง 10 ไอโซเลทเท่านั้นที่สามารถเจริญได้ ดังตารางที่ 2

<u>ตารางที่ 2</u> การเจริญของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว 1% methanol ปริมาตร 50 มล. ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน

รหัสเชื้อ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	
	37	40
N13	+	+
N18	+	+
K50	+	-
K16	-	ND
K17	-	ND
N20	+	+
N21	+	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	
	37	40
N22	+	+
A1	+	-
A2	+	-
A3	+	-
A4	+	-
A5	+	-
A6	+	-
A7	+	-
B1	+	-
B2	+	-
B3	+	-
B4	+	-
C1	+	+
C2	+	+
C3	+	+
C4	+	+
C5	+	+
V1	-	ND
V2	-	ND
V3	-	ND
V4	-	ND
V5	-	ND
V6	-	ND
P1	-	ND
P2	+	-
P3	+	+

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	
	37	40
P4	-	ND
T1	-	ND
T2	-	ND
T3	-	ND
T4	-	ND

หมายเหตุ + หมายถึง เจริญ
- หมายถึง ไม่เจริญ
ND หมายถึง ไม่ได้ทำการทดลอง

เมื่อพิจารณาผลการทดลองพบว่า เมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่สามารถเจริญได้บนอาหารแข็ง 0.5% methanol ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทั้ง 38 ไอโซเลท มีเพียง 24 ไอโซเลทที่สามารถเจริญในอาหารเหลว 1% methanol ที่อุณหภูมิเดียวกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณออกซิเจนที่จำกัดต่อการเจริญของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์บางไอโซเลทเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว โดยออกซิเจนมีความจำเป็นในปฏิกิริยาแรกของกระบวนการออกซิเดชันของเมทานอล ในกรณีของ *Pichia pastoris* ซึ่งเป็นเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่นิยมใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการแสดงออกของยีนจากแหล่งอื่น มีรายงานว่าการเพาะเลี้ยงในถังหมักควรควบคุมอัตราการให้อากาศให้อยู่ในช่วง 0.1 – 1.0 vvm (ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารในถังหมักต่อนาที) อัตราการกวน 500 – 1500 รอบต่อนาที โดยรักษาระดับความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในอาหารเหลวให้สูงกว่า 20% ซึ่งอัตราการใช้ออกซิเจนนั้นจะขึ้นกับความเข้มข้นของเมทานอล (Invitrogen corporation, 2002) ทั้งนี้ Lee *et al.* (2003 a) รายงานว่า หากเพิ่มปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ จะส่งผลให้เมทิลโลโทรฟิกยีสต์มีอัตราการใช้เมทานอลสูงขึ้น และมีการแสดงออกของยีนจากแหล่งอื่นได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น มีรายงานการเพาะเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์บนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็วสูง เช่น 330 รอบต่อนาที (Rahbarizadeh *et al*., 2005) หรือใช้ฟลาสก์ลักษณะพิเศษ คือ baffled flask ที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที (Choi *et al.*, 2002) เพื่อวัตถุประสงค์ในการเพิ่มปริมาณออกซิเจนในระบบ ในขณะที่การทดลองนี้ใช้ฟลาสก์ลักษณะปกติและใช้ความเร็วรอบของการเขย่าเพียง 170 รอบนาที ซึ่งเป็น

สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อทั่วไป จึงอาจส่งผลให้เมทิลโลโทรฟิกยีสต์บางไอโซเลทได้รับออกซิเจนไม่เพียงพอต่อการเจริญได้

การที่เมทิลโลโทรฟิกยีสต์บางไอโซเลทไม่สามารถเจริญได้ในอาหารเหลว 1% methanol แต่เจริญได้บนอาหารแข็ง 0.5% methanol ที่ใช้ในการทดลองก่อนหน้านี้ อาจเนื่องจากเมทานอลความเข้มข้น 1% (โดยปริมาตร) ยับยั้งการเจริญของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์บางไอโซเลท ตามที่ van Dijken and Harder (1974) รายงานว่าเมทานอลความเข้มข้นสูงกว่า 0.5% (โดยปริมาตร) อาจยับยั้งการเจริญของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์บางสปีชีส์ได้ ซึ่งประเสริฐ (2546) รายงานการเพาะเลี้ยงเมทิล-โลโทรฟิกยีสต์ FS96 ที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่ามีการเจริญดีที่สุดเมื่อใช้เมทานอลเข้มข้น 0.25-0.75 % (โดยปริมาตร) และหากเพิ่มความเข้มข้นของเมทานอลเป็น 1% (โดยปริมาตร) การเจริญของ FS96 จะลดลง แต่อย่างไรก็ตาม มีรายงานการใช้เมทานอลความเข้มข้น 1% หรือมากกว่านั้นเพื่อเพาะเลี้ยงเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ เช่น การเพาะเลี้ยง *Pichia pastoris* ในอาหารที่มีเมทานอลความเข้มข้น 1% (โดยปริมาตร) (Rahbarizadeh *et al.,* 2005) การเพาะเลี้ยง *Hansenula polymorpha* ในอาหารที่มีเมทานอล 1 – 2 % (โดยปริมาตร) (Sanchez and Demain, 1978; Laoteng *et al.,* 2005) และการเพาะเลี้ยง *Candida boidinii* ในอาหารที่มีเมทานอล 1.5 – 2% (โดยปริมาตร) (Tani and Vongsuvanlert, 1987; Yurimoto *et al.,* 2000) เป็นต้น

3. <u>การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ทนอุณหภูมิสูง</u>

เมื่อนำเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่สามารถเจริญได้ในอาหารเหลว 1% methanol ที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส จากตารางที่ 2 มาเลี้ยงซ้ำอีกครั้งหนึ่งในอาหารเหลว 1% methanol ที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาการเจริญที่ระยะเวลาต่าง ๆ (ภาคผนวก ง ตาราง ผนวกที่ ง1-5) และเพื่อคำนวณค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ค่าความขุ่นสูงสุดของเซลล์แขวนลอย (OD_{610}max) และอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μmax) ของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว 1% methanol ปริมาตร 50 มล. ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส

รหัส	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)					
	30		37		40	
	OD_{610}max[a]	μmax[b]	OD_{610}max[a]	μmax[b]	OD_{610}max[a]	μmax[b]
N13	7.080 (75)	0.288	7.070 (65)	0.141	6.000 (75)	0.112
N18	7.520 (75)	0.116	7.260 (65)	0.131	5.600 (75)	0.148
N20	6.880 (98)	0.122	5.880 (75)	0.146	6.240 (75)	0.096
N22	6.920 (98)	0.145	5.500 (75)	0.144	5.780 (75)	0.115
C1	ND	ND	3.700 (60)	0.095	0.472 (86)	0.080
C2	ND	ND	3.660 (46)	0.078	0.291 (86)	0.026
C3	ND	ND	3.960 (46)	0.076	0.374 (86)	0.024
C4	ND	ND	4.390 (60)	0.074	0.392 (86)	0.034
C5	ND	ND	3.290 (60)	0.097	0.253 (86)	0.025
P3	ND	ND	3.630 (86)	0.077	0.193 (86)	0.013

หมายเหตุ ND หมายถึง ไม่ได้ทำการทดลอง

ตัวเลขในวงเล็บ คือ ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ (ชั่วโมง) ที่ให้ค่าความขุ่นสูงสุด (OD_{610}max)

[a] หน่วยคือ OD_{610} unit

[b] หน่วยคือ ต่อชั่วโมง

เมื่อพิจารณาเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ทั้ง 10 ไอโซเลท ที่สามารถเจริญได้ทั้งที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส คือ N13, N18, N20, N22, C1, C2, C3, C4, C5 และ P3 (ตารางที่ 3) พบว่า C1, C2, C3, C4, C5 และ P3 มีค่าความขุ่นสูงสุด (OD_{610}max) และอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μmax) ที่ต่ำมากเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยมีค่าความขุ่นสูงสุดอยู่ระหว่าง 0.193 – 0.472 และค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดอยู่ระหว่าง 0.013 – 0.080 ต่อชั่วโมง ดังนั้นมี

เมทิลโลโทรฟิกยีสต์เพียง 4 ไอโซเลทเท่านั้น ที่สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส คือ เมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N13, N18, N20 และ N22 จึงนำยีสต์ทั้ง 4 ไอโซเลทนี้ไปเลี้ยงในอาหารเหลว 1% methanol ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาการเจริญและคำนวณค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ซึ่งผลการทดลองจากตารางที่ 3 แสดงว่ายีสต์รหัส N18 น่าจะเป็นเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ชอบอุณหภูมิสูง (thermophile) เนื่องจากเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส รองลงมาคือ 37 และ 30 องศาเซลเซียสตามลำดับ โดยพิจารณาจากค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดที่คำนวณได้ที่อุณหภูมิดังกล่าว ส่วนยีสต์รหัส N20 ก็น่าจะเป็นเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ชอบอุณหภูมิสูงเช่นกัน เนื่องจากมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สูงกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สำหรับยีสต์รหัส N13 และ N22 นั้น สรุปได้ว่าเป็นเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ทนอุณหภูมิสูง (thermotolerant) เนื่องจากมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดที่อุณหภูมิการเพาะเลี้ยงต่ำมากกว่าที่อุณหภูมิการเพาะเลี้ยงสูง นอกจากนี้เมื่อนำไปทดสอบการเจริญบนอาหารแข็ง YPD ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส พบว่า เมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N13 และ N22 สามารถเจริญได้ สอดคล้องกับ Arthur and Watson (1976) ที่รายงานว่า ยีสต์ทนอุณหภูมิสูงมีอุณหภูมิที่เจริญได้อยู่ในช่วง 8-42 องศาเซลเซียส

เมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนั้นถือว่าพบได้ยาก (Harder and Brooke, 1990) โดย Ogata *et al*. (1975) รายงานว่า พบเมทิลโลโทรฟิกยีสต์จำนวน 7 ไอโซเลทจากจำนวน 55 ไอโซเลท ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมีเพียงสายพันธุ์ของ *Hansenula polymorpha* เท่านั้นที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งจัดเป็นเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ทนอุณหภูมิสูง

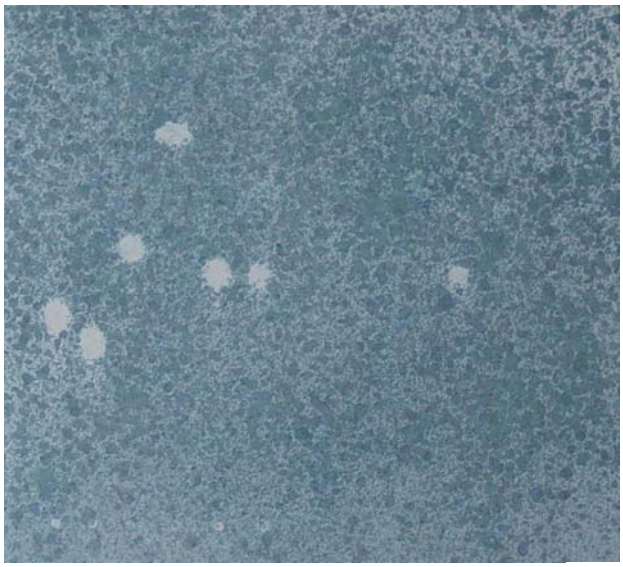
ปัจจุบันมักมีการใช้ประโยชน์จากยีสต์ทนอุณหภูมิสูงในการผลิตเอทานอล ซึ่งอาจพบว่าอุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นจากเดิมถึง 11 องศาเซลเซียส หากไม่ได้ควบคุมอุณหภูมิการผลิต (Burrows, 1970) โดยเฉพาะในประเทศเขตร้อนซึ่งอุณหภูมิที่สูงขึ้นในกระบวนการหมักอาจสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส มีการศึกษาวิจัยเพื่อคัดเลือกยีสต์ทนอุณหภูมิสูงโดย Szczdodrak and Targonski (1988) ซึ่งทดสอบยีสต์ 58 สายพันธุ์ที่จัดอยู่ใน 12 สกุล พบว่ายีสต์หลายสายพันธุ์ในสกุล *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* และ *Fabospora* มีความสามารถในการผลิตเอทานอลจากกลูโคส กาแลกโตส และแมนโนส ที่อุณหภูมิ 40, 43 และ 46 องศาเซลเซียสตามลำดับ นอกจากนี้ Kiran Sree *et al*. (2000) สามารถแยก *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ทนอุณหภูมิสูงจากดินในประเทศอินเดีย ซึ่งเจริญและผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 44 องศาเซลเซียส และนอกจากประโยชน์ในการผลิต

เอทานอลแล้ว ยังมีรายงานการใช้ *Kluyveromyces marxianus* เพื่อกำจัดสีย้อมผ้าซึ่งเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Banat *et al*., 2000)

Pichia pastoris และ *Hansenula polymorpha* เป็นเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่ถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางเพื่อเป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับผลิตโปรตีนจากแหล่งอื่น เช่น การผลิตเอนไซม์ไลเปส และ อะไมเลส โดย *P. pastoris* (Minning *et al*., 2001; Choi and Park, 2005) และการผลิต Interferon α - 2a โดย *H. polymorpha* (Muller *et al*., 2002) เป็นต้น โดย *P. pastoris* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส หากอุณหภูมิสูงกว่า 32 องศาเซลเซียส จะส่งผลเสียต่อการแสดงออกของยีน (Invitrogen corporation, 2002) ขณะที่ *H. polymorpha* เป็นเมทิลโลโทรฟิกยีสต์เพียงชนิดเดียวที่จัดเป็นยีสต์ทนอุณหภูมิสูง ที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 37-43 องศาเซลเซียส สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงสุดคือ 48 องศาเซลเซียส (van Dijken *et al*., 2000) นอกจากนี้ Ryabova *et al*. (2003) รายงานว่า *H. polymorpha* สามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทั้งยังมีรายงานการนำไปใช้เพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวได้อีกด้วย (Pal and Hamdan, 1979)

4. <u>การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่สามารถผลิตไซลิทอลได้ที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส</u>

เนื่องจากผลการทดลองในข้อ 3 สรุปได้ว่ามีเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ทนอุณหภูมิสูงจำนวนน้อยเพียง 2 ไอโซเลทเท่านั้น ดังนั้นการคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่สามารถผลิตไซลิทอลได้ที่อุณหภูมิสูงจึงนำเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ทั้งหมดที่สามารถเจริญได้ในอาหารเหลว 1% methanol ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้เองจำนวน 24 ไอโซเลท และได้รับจาก รศ.ดร.สาวิตรี ลิ่มทอง จำนวน 39 ไอโซเลท รวมเป็น 63 ไอโซเลท มาใช้ในการคัดเลือกด้วย โดยนำมาทดสอบความสามารถในการผลิตไซลิทอลจากไซโลสที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้วิธี Thin - Layer Chromatography (TLC) ดังตัวอย่างแสดงในภาพที่ 7 และนำไอโซเลทที่สามารถผลิตไซลิทอลได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ไปทดสอบการผลิตไซลิทอลที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสด้วย ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4



แถวที่ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 การเคลื่อนที่ของตัวอย่าง

ภาพที่ 7 โครมาโตแกรมแสดงผลการตรวจสอบการผลิตไซลิทอลของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้วิธี two-step development โดยใช้แผ่น TLC แบบ Silica gel 60 plate ขนาด 20 x 20 ซม. (Merck, Germany) และใช้ n-butanol- acetone-water อัตราส่วน 40: 50: 10 (โดยปริมาตร) เป็นตัวทำละลาย แล้วสเปรย์ด้วยน้ำยาตรวจสอบสารประกอบโพลีออล (ภาคผนวก ข ข้อ 1)

เมื่อแถวที่ 1 คือ แมนนิทอลมาตรฐาน 0.2%
2 คือ ซอร์บิทอลมาตรฐาน 0.2%
3 คือ อะราบิทอลมาตรฐาน 0.2%
4 คือ กลีเซอรอลมาตรฐาน 0.2%
5 คือ ไซลิทอลมาตรฐาน 0.2%
6 คือ น้ำหมักโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22
7 คือ น้ำหมักโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส K50
8 คือ น้ำหมักโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N21
9 คือ น้ำหมักโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส FS96
10 คือ น้ำหมักโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส A1

ตารางที่ 4 ความสามารถในการผลิตไซลิทอลของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว basal medium ปริมาตร 5 มล. ที่มีไซโลส 30 กรัมต่อลิตร และเมทานอล 2% (โดยปริมาตร) ในหลอดทดลองขนาด 16.5 x 165 มม. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบรีซิโพรคาล (reciprocal) ที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที ระยะเวลา 3 วัน

รหัสเชื้อ	การผลิตไซลิทอลที่อุณหภูมิต่าง ๆ		รหัสเชื้อ	การผลิตไซลิทอลที่อุณหภูมิต่าง ๆ	
	37 องศาเซลเซียส	40 องศาเซลเซียส		37 องศาเซลเซียส	40 องศาเซลเซียส
N13	+	+	FS28	-	ND
N18	+	+	FS29	-	ND
K50	-	ND	FS30	-	ND
N20	+	+	FS56	-	ND
N21	-	ND	FS58	-	ND
N22	+	+	FS66	+	-
FS95	-	ND	FS77	-	ND
FS96	+	+	FS79	-	ND
A1	-	ND	FS100	-	ND
A2	-	ND	N002	-	ND
A3	-	ND	N003	-	ND
A4	-	ND	N016	-	ND
A5	-	ND	N017	-	ND
A6	-	ND	N051	-	ND
A7	-	ND	N065	-	ND
B1	-	ND	N066	-	ND
B2	-	ND	N067	-	ND
B3	-	ND	N068	-	ND
B4	-	ND	N069	-	ND
C1	-	ND	N072	-	ND
C2	+	-	PT09	-	ND
C3	-	ND	PT22	-	ND

ตารางที่ 4 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	การผลิตไซลิทอลที่อุณหภูมิต่าง ๆ		รหัสเชื้อ	การผลิตไซลิทอลที่อุณหภูมิต่าง ๆ	
	37 องศาเซลเซียส	40 องศาเซลเซียส		37 องศาเซลเซียส	40 องศาเซลเซียส
C4	-	ND	PT23	-	ND
C5	-	ND	PT26	-	ND
P2	-	ND	PT27	-	ND
P3	-	ND	PT30	-	ND
S023	-	ND	PT31	-	ND
M02	-	ND	PT34	-	ND
S027	-	ND	PT44	-	ND
S051	-	ND	PT48	-	ND
FS26	-	ND	PT50	-	ND
FS27	-	ND			

หมายเหตุ + หมายถึง ตรวจพบไซลิทอล
- หมายถึง ตรวจไม่พบไซลิทอล
ND หมายถึง ไม่ได้ทำการทดลอง

จากผลการทดลองพบว่า มีเมทิลโลโทรฟิกยีสต์จำนวน 7 ไอโซเลท จากจำนวน 63 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตไซลิทอลจากไซโลสได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คือ N13, N18, N20, N22, C2, FS 66 และ FS 96 และเมื่อนำทั้ง 7 ไอโซเลทไปทดสอบการผลิตไซลิทอลที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่า มีเมทิลโลโทรฟิกยีสต์เพียง 5 ไอโซเลท คือ N13, N18, N20, N22 และ FS96 ที่สามารถผลิตไซลิทอลได้ ดังนั้นจึงเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ทั้ง 5 ไอโซเลทไว้เพื่อคัดเลือกไอโซเลทที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอลต่อไป

จากผลการทดลองในข้อ 3 และผลการทดลองของประเสริฐ (2546) พบว่า เมทิลโลโทร-ฟิกยีสต์ที่สามารถผลิตไซลิทอลได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทั้ง 5 ไอโซเลท คือ N13, N18, N20, N22 และ FS96 นั้น ล้วนสามารถเจริญได้ในอาหารเหลว 1% methanol ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสทั้งสิ้น ในขณะที่เมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส C2 พบการเจริญน้อยมาก จึงอาจกล่าวได้

ว่าการที่เมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส C2 ไม่สามารถผลิตไซลิทอลที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เนื่องจากข้อจำกัดด้านการเจริญในอาหารเหลวที่อุณหภูมิสูงนั่นเอง แต่สำหรับเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส FS66 นั้น ไม่มีรายงานการศึกษาการเจริญในอาหารเหลว 1% methanol ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ยีสต์ที่ใช้ไซโลสเพื่อการเจริญสามารถนำมาใช้ประโยชน์ด้านการผลิตเอทานอลและไซลิทอลจากไซโลส ซึ่งมีรายงานการผลิตไซลิทอลจากยีสต์หลายสกุล เช่น *Candida* sp. (Barbosa *et al*., 1988; Vandeska *et al*., 1995 a), *Debaryomyces hansenii* (Roseiro *et al*., 1991) และ *Pachysolen tannophilus* (Slininger *et al*., 1987) เป็นต้น ซึ่งยีสต์ที่สามารถใช้ไซโลสเพื่อผลิตไซลิทอลพบได้ไม่ยากนัก แต่อย่างไรก็ตามวัตถุประสงค์ของการทดลองนี้คือการคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่สามารถผลิตไซลิทอลได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 37 และ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งด้วยข้อจำกัดของการใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน รวมทั้งอุณหภูมิสูงของการผลิตไซลิทอล ทำให้คัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่มีคุณสมบัติดังกล่าวได้เพียง 5 ไอโซเลทเท่านั้น

Suryadi *et al.* (2000) คัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตไซลิทอลโดยใช้อาหารเหลว basal medium ปริมาตร 5 มล. ที่ประกอบด้วยไซโลสเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร และเมทานอลเข้มข้น 2% (โดยปริมาตร) ในหลอดทดลองขนาด 16.5 x 165 มม. บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบเมทิลโลโทรฟิกยีสต์หลายสายพันธุ์ที่สามารถผลิตไซลิทอลจากไซโลสได้ คือ *Candida boidinii*, *Hansenula polymorpha, H. ofunaensis* และ *Pichia pinus*

การทดลองนี้คัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตไซลิทอล โดยวิธีการของ Suryadi *et al*. (2000) แต่ทำการผลิตหรือบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าแบบรีซิโพรคาลที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที ใช้อาหารสำหรับกล้าเชื้อที่มีเมทานอลเข้มข้น 1% (โดยปริมาตร) เป็นส่วนประกอบ ซึ่งเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ทั้ง 63 ไอไซเลทสามารถเจริญได้ดีในอาหารนี้ แต่อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตไซลิทอลมีเมทานอลเข้มข้น 2% (โดยปริมาตร) เป็นส่วนประกอบ ซึ่งเมทานอลความเข้มข้น 2% (โดยปริมาตร) นี้ อาจส่งผลเสียต่อการเจริญรวมถึงการผลิตไซลิทอลของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์บางไอโซเลทได้ จึงอาจเป็นสาเหตุให้ตรวจพบเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตไซลิทอลจำนวนน้อย แต่อย่างไรก็ตาม Vongsuvanlert

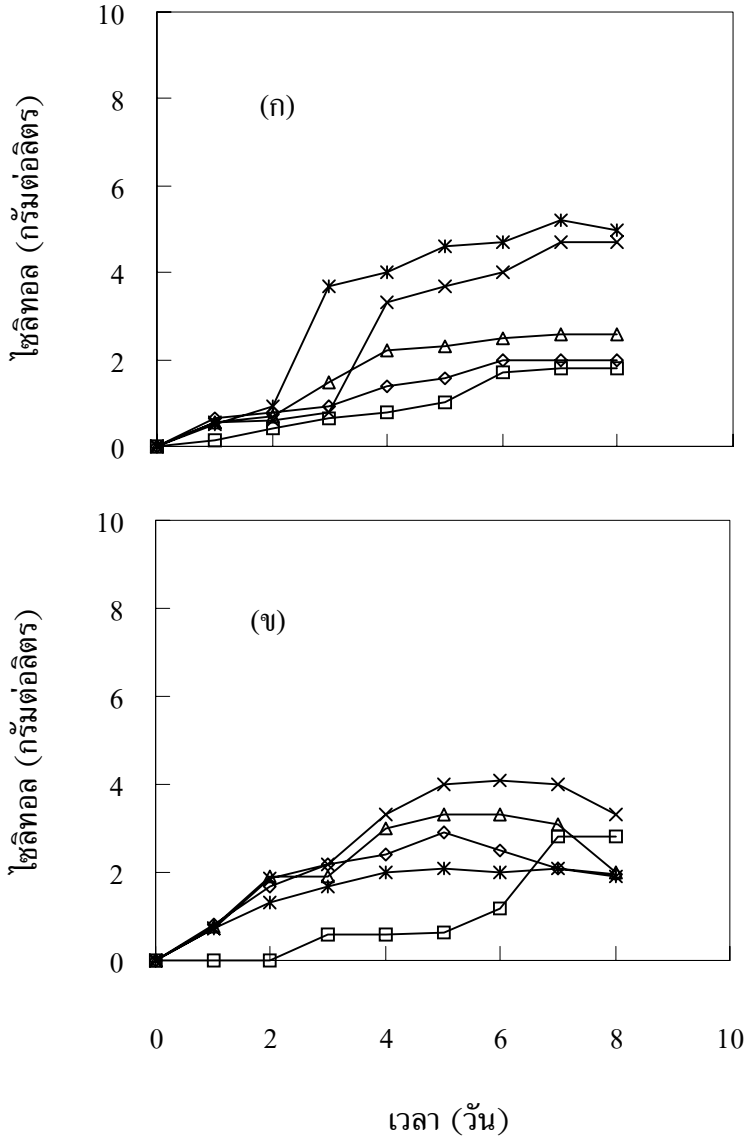
and Tani (1989) และ Suryadi *et al*. (2000) รายงานการผลิตไซลิทอลโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเมทานอลความเข้มข้น 2% (โดยปริมาตร) เช่นเดียวกัน

ตามที่ Ikeuchi *et al.* (1999) และ Suryadi *et al.* (2000) รายงานการคัดเลือกยีสต์สำหรับผลิตไซลิทอล โดยใช้เวลาการเพาะเลี้ยงนาน 3 วัน และสามารถคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตไซลิทอลได้หลายสายพันธุ์นั้น จึงได้เลือกใช้ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงนาน 3 วันในขั้นตอนการทดสอบความสามารถในการผลิตไซลิทอลของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ทั้ง 63 ไอโซเลท อย่างไรก็ตามระยะเวลา 3 วัน ที่ใช้บ่มเชื้อเพื่อผลิตไซลิทอลสำหรับการทดลองนี้อาจสั้นเกินไปสำหรับเมทิลโลโทรฟิกยีสต์บางไอโซเลทที่อาจพบการผลิตไซลิทอลหลังจากวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงก็ได้ ขึ้นอยู่กับอัตราการเจริญและการใช้วัตถุดิบตั้งต้นของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์แต่ละไอโซเลท ทำให้ไม่สามารถตรวจพบการผลิตไซลิทอลในระยะเวลา 3 วัน

5. <u>การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่สามารถผลิตไซลิทอลได้ดีที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส</u>

นำเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่สามารถผลิตไซลิทอลได้ที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส จากข้อ 4 ทั้ง 5 ไอโซเลท คือ N13, N18, N20, N22 และ FS 96 มาตรวจสอบปริมาณการผลิตไซลิทอลที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส โดยเพาะเชื้อเท่ากันทุกไอโซเลทลงในอาหารเหลว basal medium ที่ประกอบด้วยไซโลสเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร และเมทานอลเข้มข้น 1% (โดยปริมาตร) (Suryadi *et al*., 2000) บ่มที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส โดยเก็บตัวอย่างทุกวันและวิเคราะห์ปริมาณไซลิทอลด้วยเครื่อง HPLC เพื่อคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่สามารถผลิตไซลิทอลได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 8 และภาคผนวก ง ตารางผนวกที่ ง6

ผลการเพาะเลี้ยงเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ในอาหารเหลว basal medium ที่มีไซโลสเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร และเมทานอลเข้มข้น 1% (โดยปริมาตร) พบว่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ยีสต์รหัส FS96 สามารถผลิตไซลิทอลได้ปริมาณสูงที่สุด คือ 5.2 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง รองลงมาคือยีสต์รหัส N22 ที่ผลิตได้ 4.7 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 เช่นเดียวกันซึ่งถือว่าเมทิล-โลโทรฟิกยีสต์รหัส FS96 และ N22 สามารถผลิตไซลิทอลได้ในปริมาณที่ไม่แตกต่างกันมากนัก ในขณะที่ยีสต์รหัส N13, N18 และ N20 ผลิตไซลิทอลได้ต่ำกว่า โดย N13 ผลิตได้ 2.0 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 และยีสต์รหัส N18 และ N20 ผลิตได้ 1.8 และ 2.6 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ตามลำดับ



ภาพที่ 8 การผลิตไซลิทอลโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (ก) และ 40 องศาเซลเซียส (ข) ในอาหารเหลว basal medium ปริมาตร 50 มล. ที่มีไซโลส 100 กรัมต่อลิตร และเมทานอล 1% (โดยปริมาตร) ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที

เมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส: N13 (◊) N18 (□) N20 (△) N22 (×) FS96 (✳)

และเมื่อนำเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ทั้ง 5 ไอโซเลท มาทดสอบการผลิตไซลิทอลที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่า ยีสต์รหัส N22 สามารถผลิตไซลิทอลได้ปริมาณสูงที่สุด คือ 4.1 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ขณะที่ยีสต์รหัส FS96 ผลิตได้เพียง 2.1 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 เช่นเดียวกัน ส่วนยีสต์รหัส N13 และ N20 ตรวจพบการผลิตไซลิทอลเท่ากับ 2.9 และ 3.3 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 ตามลำดับ และยีสต์รหัส N18 ผลิตไซลิทอลได้เท่ากับ 2.8 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งพบว่ายีสต์รหัส N13 N18 และ N20 สามารถผลิตไซลิทอลได้ปริมาณสูงขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิการเพาะเลี้ยงจาก 37 เป็น 40 องศาเซลเซียส แต่อย่างไรก็ตามยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลท ยังคงผลิตไซลิทอลได้ต่ำกว่าเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 ซึ่งจากผลการทดลองข้อ 3 ได้แสดงว่าเป็นยีสต์ทนอุณหภูมิสูง และผลการทดลองนี้ก็แสดงว่าเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 สามารถผลิตไซลิทอลได้ดีทั้งที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 ไว้สำหรับศึกษาการผลิตไซลิทอลจากไซโลส

ความสามารถในการผลิตไซลิทอลได้สูงหรือต่ำนั้น ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ โดย Sirisansaneeyakul *et al*. (1995) ทำการคัดเลือกยีสต์สำหรับผลิตไซลิทอลจากยีสต์จำนวน 11 สายพันธุ์ โดยใช้อาหารที่มีน้ำตาลไซโลสเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร พบว่า *Candida mogii* ATCC 18364 สามารถผลิตไซลิทอลได้สูงที่สุด มีค่าผลได้ (Yp/s) ของไซลิทอลเท่ากับ 0.62 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส ในขณะที่ *Saccharomyces* sp. และ *Pichia stipitis* ATCC 7124 ไม่พบการผลิตไซลิทอล นอกจากนี้ Suryadi *et al*. (2000) รายงานว่า *Hansenula polymorpha* สามารถผลิตไซลิทอลได้ปริมาณสูงกว่า *Candida boidinii* ในขณะที่ผลการทดลองของ Vandeska *et al*. (1995 a) พบว่า *C. boidinii* สามารถผลิตไซลิทอลได้สูงกว่า *H. anomala*

กระบวนการหมักโดยทั่วไปมีความร้อนเกิดขึ้นในระบบ จึงจำเป็นต้องติดตั้งระบบหล่อเย็นเพื่อควบคุมอุณหภูมิไม่ให้สูงจนส่งผลกระทบต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการผลิตผลิตภัณฑ์ ซึ่งการที่ยีสต์สามารถผลิตไซลิทอลได้ที่อุณหภูมิสูง ถือเป็นข้อได้เปรียบ เนื่องจากช่วยลดค่าใช้จ่ายเพื่อการหล่อเย็นได้ ต้นทุนการผลิตจึงลดลง นอกจากนี้ยังช่วยป้องกันการผลิตหยุดชะงักเมื่อเกิดความร้อนสูงขึ้น และอุณหภูมิการหมักที่สูงยังช่วยลดโอกาสการปนเปื้อนได้อีกด้วย (Kiran Sree *et al*., 2000; Sridhar *et al*., 2002) ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงศึกษาการผลิตไซลิทอลโดยการเพาะเลี้ยงยีสต์ที่อุณหภูมิสูงถึง 37 และ 40 องศาเซลเซียส แตกต่างจากการผลิตไซลิทอลทั่วไปที่ใช้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Sirisansaneeyakul *et al*., 1995; Winkelhausen and Kuzmanova, 1998; Ikeuchi *et al*., 1999; Aguiar Jr. *et al*., 2002)

เมื่อพิจารณาการผลิตไซลิทอลโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 ที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่า มีปริมาณการผลิตค่อนข้างต่ำ คือ 4.7 และ 4.1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ Suryadi *et al*. (2000) รายงานว่า *Hansenula polymorpha* และ *Candida boidinii* สามารถผลิตไซลิทอลได้ 43.2 และ 30 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงหรือใช้อุณหภูมิการผลิตที่ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อ basal medium ที่มีไซโลสเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร และเมทานอลเข้มข้น 1% (โดยปริมาตร) เช่นเดียวกับการทดลองนี้ ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวจึงจำเป็นต้องศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไซลิทอลโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตต่อไป

6. <u>การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสของเมทิลโล-โทรฟิกยีสต์ทนอุณหภูมิสูงที่คัดเลือกได้</u>

6.1 ความเข้มข้นของเมทานอล

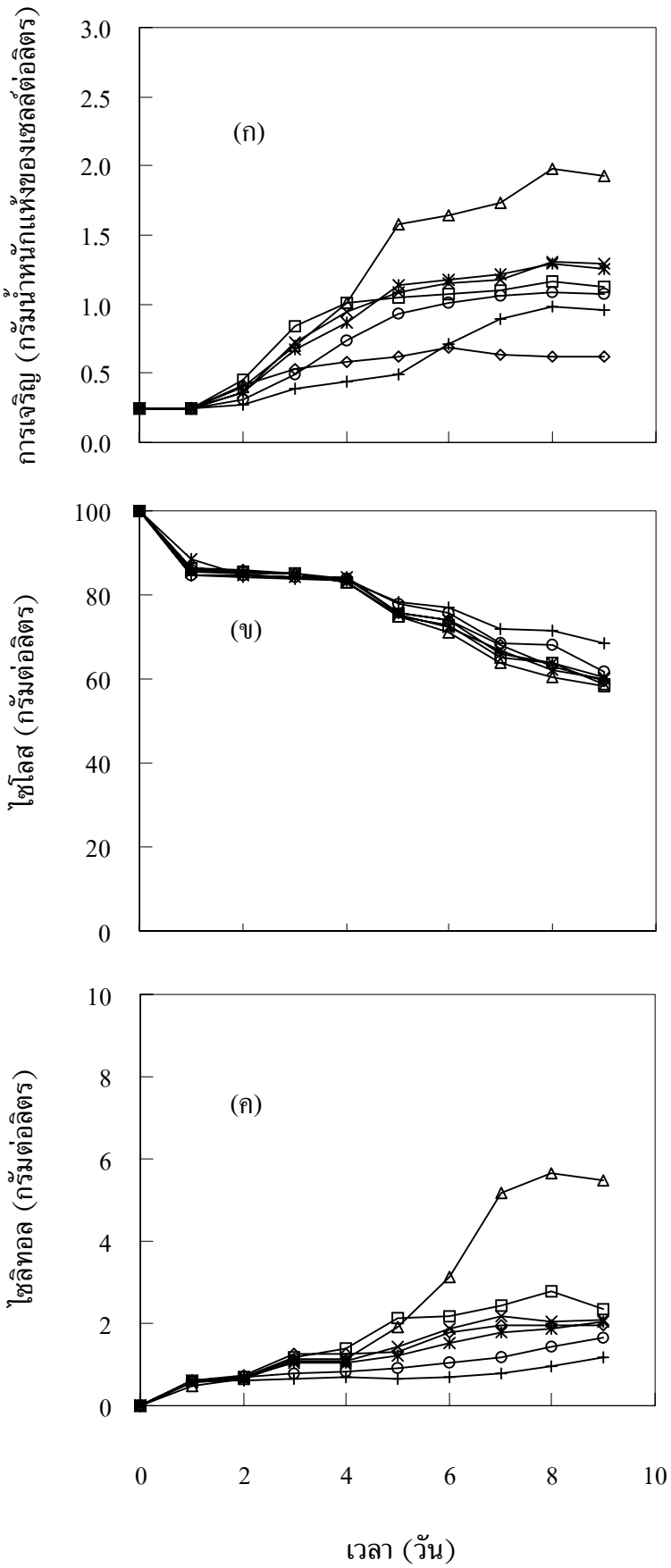
ยีสต์สามารถผลิตไซลิทอลได้จากไซโลสโดยเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา 2 ขั้นตอน คือ ปฏิกิริยารีดักชันของไซโลสไปเป็นไซลิทอลโดยเอนไซม์ xylose reductase ที่ต้องการ NADH และ/หรือ NADPH ในปฏิกิริยา โดยไซลิทอลที่เกิดขึ้นอาจถูกขับออกมานอกเซลล์หรืออาจถูกออกซิไดซ์เปลี่ยนเป็นไซลูโลสโดยปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ xylitol dehydrogenase ที่มี NAD^+ เป็นโคเอนไซม์ (Smiley and Bolen, 1982; Rizzi *et al*., 1989) สำหรับการทดลองนี้เมทานอลที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะถูกออกซิไดซ์โดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์และสร้าง NADH ในกระบวนการ ซึ่ง NADH จำเป็นสำหรับปฏิกิริยาการเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลิทอลโดยเอนไซม์ NADH - linked xylose reductase (Suryadi *et al.,* 2000) นอกจากนี้การที่ภายในเซลล์มีระดับ NADH ที่เพิ่มขึ้น จะส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไซลิทอลโดยเอนไซม์ NAD^+ - linked xylitol dehydrogenase ลดลง การเปลี่ยนไซลิทอลเป็นไซลูโลสจึงลดลง ดังนั้นจึงเกิดการสะสมไซลิทอลได้เพิ่มขึ้นขึ้นนั่นเอง (du Preez *et al*., 1989)

การทดลองเลี้ยงเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว basal medium ที่มีไซโลสเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร และเมทานอลความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3% และ 4% (โดยปริมาตร) เป็นระยะเวลา 9 วัน พบว่าเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีเมทานอลเข้มข้น 1.5% (โดยปริมาตร) ยีสต์ผลิตไซลิทอลได้มากที่สุด เท่ากับ 5.6 กรัมต่อ

ลิตร คิดเป็นค่าผลได้ (Yp/s) ของไซลิทอลเท่ากับ 0.14 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส ในวันที่ 8 ของการเลี้ยงเชื้อ รองลงมาคือสภาวะที่มีเมทานอลเข้มข้น 1%, 2%, 2.5%, 0.5%, 3% และ 4% (โดยปริมาตร) ซึ่งผลิตไซลิทอลได้มากที่สุดเท่ากับ 2.8, 2.2, 2.0, 1.9, 1.7 และ 1.2 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า Yp/s เท่ากับ 0.08, 0.07, 0.05, 0.05, 0.04 และ 0.04 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส ตามลำดับ (ภาพที่ 9 และภาคผนวก ง ตารางผนวกที่ ง7)

เมื่อพิจารณาการใช้ไซโลส (ภาพที่ 9 (ข)) ซึ่งการทดลองนี้ใช้ไซโลสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร พบว่า เมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 มีการใช้ไซโลสที่ใกล้เคียงกัน โดยใช้น้ำตาลได้ในช่วง 39.4 - 41.5 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเมทานอลความเข้มข้น 0.5 – 3% (โดยปริมาตร) แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเมทานอลเป็น 4% (โดยปริมาตร) ความสามารถในการใช้ไซโลสจะลดลงเล็กน้อยโดยใช้ไป 31.7 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 ซึ่งพบว่ายังมีไซโลสเหลืออยู่ปริมาณมาก การที่ยีสต์ใช้ไซโลสต่ำ จึงส่งผลให้มีการผลิตไซลิทอลได้ในปริมาณน้อยตามไปด้วย

เมื่อเลี้ยงเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 ในอาหารที่มีเมทานอลความเข้มข้นต่ำที่สุดสำหรับการทดลองนี้ คือ 0.5% (โดยปริมาตร) ยีสต์มีการเจริญต่ำที่สุด โดยคิดเป็นน้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.68 กรัมต่อลิตร จากเซลล์เริ่มต้นซึ่งคิดเป็นน้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.24 กรัมต่อลิตร และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเมทานอลจะส่งผลให้การเจริญของยีสต์เพิ่มขึ้น โดยที่ความเข้มข้นของเมทานอลเท่ากับ 1.5% (โดยปริมาตร) ยีสต์สามารถเจริญได้ดีที่สุด คิดเป็นน้ำหนักแห้ง 1.97 กรัมต่อลิตร ซึ่งที่เมทานอลความเข้มข้นนี้ยีสต์สามารถผลิตไซลิทอลได้ปริมาณสูงที่สุดด้วย แต่หากเพิ่มความเข้มข้นของเมทานอลขึ้นเป็น 2% (โดยปริมาตร) หรือมากกว่า จะส่งผลให้การเจริญของยีสต์ลดลงอย่างชัดเจน ดังภาพที่ 9 (ก) สอดคล้องกับรายงานของ Hansen and Hollenberg (1994) ที่พบว่า ความเข้มข้นของเมทานอลที่สูงกว่า 2% (โดยปริมาตร) ส่งผลให้การเจริญของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ


การเจริญ (กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
(ก)
ไซโลส (กรัมต่อลิตร)
100
80
60
40
20
0
(ข)
ไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)
10
8
6
4
2
0
(ค)
0
2
4
6
8
10
เวลา (วัน)

มีการศึกษาเปรียบเทียบผลของการเติมและไม่เติมเมทานอลต่อการผลิตไซลิทอลของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ โดยเติมเมทานอลความเข้มข้น 1% (โดยปริมาตร) ในอาหารเหลว basal medium ที่มีไซโลสเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่า การเติมเมทานอลสามารถทำให้ *Candida boidinii* ผลิตไซลิทอลเพิ่มขึ้นจาก 21 กรัมต่อลิตร เป็น 30 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า Yp/s เพิ่มขึ้นจาก 0.60 เป็น 0.79 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส เช่นเดียวกับ *Hansenula polymorpha* ที่ผลผลิตไซลิทอลเพิ่มขึ้นจาก 38 กรัมต่อลิตร เป็น 43 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า Yp/s เพิ่มขึ้นจาก 0.51 เป็น 0.81 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส (Suryadi *et al*., 2000)

อย่างไรก็ตามแม้ว่าเมทานอลจะส่งผลให้เมทิลโลโทรฟิกยีสต์สามารถผลิตไซลิทอลได้เพิ่มขึ้น แต่ต้องใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมซึ่งแตกต่างกันไปในแต่ละเชื้อ โดย Vongsuvanlert and Tani (1989) ผลิตไซลิทอลจาก *Candida boidinii* No. 2201 โดยใช้เมทานอลความเข้มข้น 2% (โดยปริมาตร) ขณะที่ Suryadi *et al*. (2000) ใช้เมทานอลความเข้มข้น 1% (โดยปริมาตร) ในการผลิตไซลิทอลจาก *Hansenula polymorpha*

ความเข้มข้นของเมทานอลมีความสำคัญต่อการเจริญของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ ซึ่งส่งผลต่อการผลิตผลิตภัณฑ์ โดยความเข้มข้นของเมทานอลที่ขาดแคลนหรือต่ำเกินไปจะส่งผลให้เชื้อมีอัตราการเจริญต่ำ ในขณะที่เมทานอลความเข้มข้นสูงอาจมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ และทำให้อัตราการใช้น้ำตาลไซโลสลดลง ทั้งนี้เนื่องจากความเป็นพิษของเมทานอลต่อการถ่ายแบบดีเอ็นเอ (DNA replication) และการสังเคราะห์เมมเบรน แต่อย่างไรก็ตามการสังเคราะห์โปรตีนและเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ไม่ได้ถูกยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญ มีรายงานการเพาะเลี้ยง *Pichia pastoris* ที่พบว่า อัตราการเจริญจำเพาะจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของเมทานอลเพิ่มสูงถึง 17 กรัมต่อลิตร และจะลดลงอย่างเด่นชัดเมื่อความเข้มข้นของเมทานอลสูงถึง 31 กรัมต่อลิตร (Katakura *et al*., 1998) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ที่ความเข้มข้นของเมทานอล 1 – 2% (โดยปริมาตร) อาจเป็นพิษต่อเซลล์ได้ (Invitrogen corporation, 2002) ดังนั้นการควบคุมความเข้มข้นของเมทานอลในการเพาะเลี้ยงเมทิลโลโทรฟิกยีสต์จึงมีความสำคัญอย่างมาก โดย Lee *et al*. (2003 b) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงเมทิล-โลโทรฟิกยีสต์ในระบบการหมักแบบเฟด-แบทช์ โดยใช้ค่าการละลายของออกซิเจนในถังหมักเพื่อบ่งชี้ถึงสภาวะที่มีหรือขาดแคลนเมทานอล และเชื่อมโยงสู่การควบคุมความเข้มข้นของเมทานอลในที่สุด ซึ่งวิธีนี้สามารถรักษาระดับความเข้มข้นของเมทานอลในถังหมักไม่ให้สูงหรือต่ำเกินไปได้

ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า นอกจากเมทานอลจะมีอิทธิพลต่อการเจริญของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 แล้ว เมทานอลยังส่งผลให้การผลิตไซลิทอลเพิ่มสูงขึ้น โดยการเพิ่มความเข้มข้นของเมทานอลในอาหารเหลว basal medium จะทำให้ปริมาณการผลิตไซลิทอลสูงขึ้น ซึ่งที่ความเข้มข้นของเมทานอลเท่ากับ 1.5% (โดยปริมาตร) ยีสต์สามารถผลิตไซลิทอลได้ดีที่สุด แต่หากเพิ่มความเข้มข้นของเมทานอลให้สูงกว่าหรือเท่ากับ 2% (โดยปริมาตร) จะส่งผลให้การผลิตไซลิทอลลดลงอย่างชัดเจนเช่นเดียวกับการเจริญ (ภาพที่ 9 (ค)) ดังนั้นจึงเลือกใช้เมทานอลความเข้มข้น 1.5% (โดยปริมาตร) สำหรับการผลิตไซลิทอลโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22

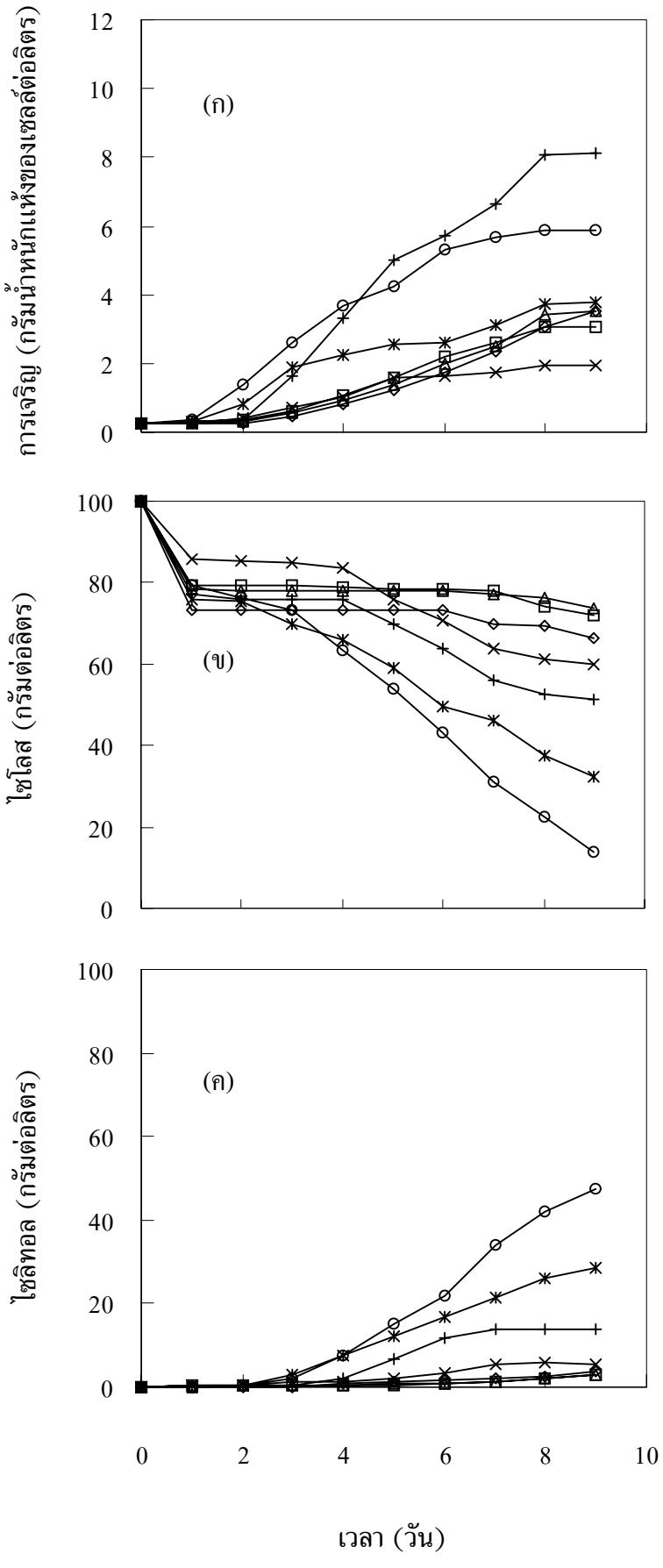
6.2 ชนิดของแหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับผลิตไซลิทอลนั้นแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิต เช่น Nahlik *et al*. (2003) ศึกษาการผลิตไซลิทอลโดย *Debaryomyces hansenii* โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ขณะที่วรสิทธิ์ (2541) ใช้แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตในการผลิตไซลิทอลโดย *Candida mogii* อย่างไรก็ตามมีรายงานการผลิตไซลิทอลโดยใช้แหล่งไนโตรเจนหลายชนิด เช่น ยูเรียและ casamino acids สำหรับการผลิตไซลิทอลโดย *Candida boidinii* (Vandeska *et al*., 1995 b) และการใช้ยีสต์สกัดและแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตในการผลิตไซลิทอลโดย *Candida tropicalis* IFO 0618 (Yahashi *et al*., 1996)

เมื่อนำเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 มาทดลองเลี้ยงในอาหารเหลว basal medium ที่มีไซโลสเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร และเมทานอลเข้มข้น 1.5% (โดยปริมาตร) ซึ่งคัดเลือกแล้วว่าเป็นความเข้มข้นของเมทานอลที่เหมาะสมที่สุดสำหรับยีสต์นี้ในการผลิตไซลิทอล และใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ยูเรีย, แอมโมเนียมซัลเฟต, แอมโมเนียมไนเตรต, แอมโมเนียมคลอไรด์, ยีสต์สกัด, casamino acids และ yeast nitrogen base (with amino acid) ซึ่งคำนวณให้มีธาตุไนโตรเจนเท่ากับยูเรียเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร (Suryadi *et al*., 2000) ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 9 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่า เมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 สามารถเจริญเติบโตได้ดีเมื่อใช้ casamino acids, yeast nitrogen base และยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยคิดเป็นน้ำหนักแห้งสูงสุดได้เท่ากับ 5.87, 8.14 และ 3.75 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 9 วัน ซึ่งการใช้ yeast nitrogen base เป็นแหล่งไนโตรเจน แม้ส่งผลให้ยีสต์มีการเจริญสูงที่สุด แต่กลับมีการใช้ไซโลสและการผลิตไซลิทอลที่ต่ำกว่าการใช้ casamino acids และยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน อย่างไรก็ตามมีแนวโน้มว่าการเจริญเติบโตที่ดีจะส่งผลให้การผลิตไซลิทอลสูง

ตามไปด้วย และในส่วนของการใช้ไซโลสนั้น พบว่า ยีสต์สามารถใช้ไซโลสได้มากที่สุดเมื่อใช้ casamino acids เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยสามารถใช้น้ำตาลไป 86.0 กรัมต่อลิตร จากไซโลสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือยีสต์สกัด และ yeast nitrogen base ซึ่งใช้ไซโลสได้ 67.8 และ 48.7 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในวันที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ การผลิตไซลิทอลนั้นมีความสัมพันธ์กับการใช้ไซโลส โดยยีสต์มีการใช้ไซโลสสูงที่สุดและผลิตไซลิทอลได้ปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 47.4 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ casamino acids เป็นแหล่งไนโตรเจน คิดเป็นค่า Yp/s เท่ากับ 0.55 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส แหล่งไนโตรเจนที่ให้ผลผลิตไซลิทอลรองลงมาคือยีสต์สกัด และ yeast nitrogen base ซึ่งทำให้ยีสต์ผลิตไซลิทอลได้ 28.5 กรัมต่อลิตร และ 14.0 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า Yp/s เท่ากับ 0.42 และ 0.30 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส ตามลำดับ ในขณะที่การใช้ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรต และแอมโมเนียมคลอไรด์ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้ผลผลิตไซลิทอลต่ำมาก คือ 3.7, 2.8, 3.0 และ 5.7 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า Yp/s เท่ากับ 0.11, 0.10, 0.11 และ 0.14 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 10 และภาคผนวก ง ตารางผนวกที่ ง8

จากผลการทดลองแสดงว่า ชนิดของแหล่งไนโตรเจนมีอิทธิพลอย่างมากต่อการเจริญเติบโต การใช้ไซโลส และการผลิตไซลิทอล ของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 โดยการใช้ casamino acids, yeast nitrogen base และ ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน ส่งผลให้ยีสต์สามารถเจริญได้ดี มีการใช้ไซโลสในระดับสูง และสามารถผลิตไซลิทอลได้ปริมาณมาก ขณะที่การใช้ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรต และแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจนนั้น ทำให้ยีสต์มีการเจริญไม่ดีนัก โดยคิดเป็นน้ำหนักแห้งอยู่ในช่วง 1.96 - 3.53 กรัมต่อลิตร และยีสต์ใช้ไซโลสได้น้อย คือใช้น้ำตาลไป 26.4 - 40.0 กรัมต่อลิตร จากไซโลสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังส่งผลให้ยีสต์ผลิตไซลิทอลได้น้อยด้วย โดยมีค่าระหว่าง 2.8 - 5.7 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 9 วัน ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 10 จากผลการทดลองดังกล่าวจึงได้เลือก casamino acids เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไซลิทอลโดยเมทิลโลโทร-ฟิกยีสต์รหัส N22


การเจริญ (กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร)
(ก)
ไซโลส (กรัมต่อลิตร)
(ข)
ไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)
(ค)
เวลา (วัน)

ผลการทดลองที่ได้แตกต่างจากรายงานของ Suryadi *et al*. (2000) ซึ่งพบว่า *Hansenula polymorpha* สามารถผลิตไซลิทอลได้ปริมาณมาก โดยมีค่า Yp/s เท่ากับ 0.55 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส จากไซโลสเข้มข้น 90 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยการใช้ยูเรียนั้น ยีสต์ใช้ไซโลสได้หมดในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ และสามารถเจริญและผลิตไซลิทอลได้มากที่สุดด้วย ในขณะที่การใช้ยีสต์สกัด, casamino acids และ yeast nitrogen base เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้ผลผลิตไซลิทอลที่ต่ำกว่า นอกจากนี้ Barbosa *et al*. (1988) ศึกษาการผลิตไซลิทอลโดย *Candida guilliermondii* FTI 20037 พบว่ายูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้ประสิทธิภาพการผลิตไซลิทอลสูงกว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งกัญญา (2537) ได้อธิบายว่า อนุมูล NH_4^+ จากแอมโมเนียมซัลเฟตถูกนำไปใช้เพื่อการเจริญ จึงทำให้เหลือ SO_4^{2-} ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำจะเกิดกรดขึ้น ทำให้ค่าพีเอชลดต่ำลง จึงมีผลต่อการเจริญและการผลิตไซลิทอลลดต่ำลงไปด้วย ในขณะที่เมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ยูเรียจะถูกสลายและปลดปล่อย NH_3 ออกมา ทำให้ค่าพีเอชสูงขึ้น และพีเอชจะค่อย ๆ ลดลงเมื่ออนุมูล NH_3 ถูกใช้ไป

สำหรับการทดลองนี้ การใช้ casamino acids และยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถให้ผลผลิตไซลิทอลสูง ทั้งนี้เนื่องจาก casamino acids และยีสต์สกัดเป็นสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนที่ประกอบด้วยวิตามินและ growth factors หลายชนิด เช่น แร่ธาตุ กรดอะมิโน ไบโอติน ไทอามิน Mg^{2+} และ Zn^{2+} เป็นต้น (du Preez *et al*., 1985; Xia *et al*., 1995)

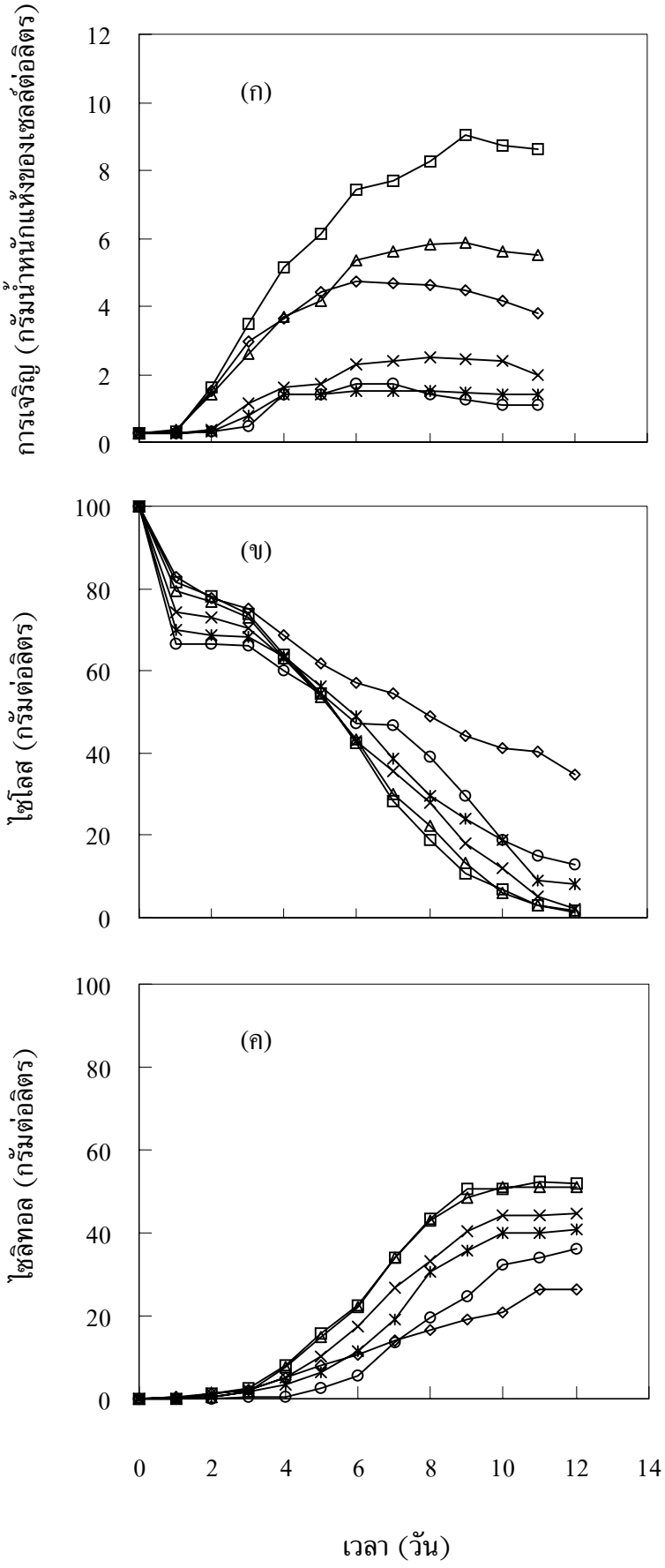
Ikeuchi *et al*. (1999) รายงานการผลิตไซลิทอลโดย *Candida* sp. 559-9 โดยใช้แหล่งไนโตรเจน 3 ชนิด คือ ยีสต์สกัด, เพปโทน และ แอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าสารอินทรีย์ในยีสต์สกัดและเพปโทนจำเป็นสำหรับการผลิตไซลิทอล โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ ยีสต์สกัด 3 กรัมต่อลิตร และเพปโทน 2 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามยีสต์สกัดที่มีความเข้มข้นสูงถึง 10 กรัมต่อลิตรจะส่งผลให้การผลิตไซลิทอลลดลงได้

นอกจากนี้มีการศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนต่อระดับของเอนไซม์ xylose reductase และ xylitol dehydrogenase ใน *Candida tenuis* พบว่า ยีสต์สกัด และแอมโมเนียมไนเตรต มีความสำคัญต่อการเจริญของยีสต์และการผลิตเอนไซม์ xylose reductase และ xylitol dehydrogenase ในขณะที่แอมโมเนียมคลอไรด์มีผลกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ทั้งสองชนิดเช่นเดียวกัน แต่การเจริญของยีสต์จะลดลงหากความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์สูงถึง 100 มิลลิโมลาร์ (Kern *et al*., 1998)

6.3 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

การทดลองเพาะเลี้ยงเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 ในอาหารเหลว basal medium ที่มีไซโลสเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร เมทานอลเข้มข้น 1.5% (โดยปริมาตร) โดยใช้ casamino acids เป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ 1, 5, 11.6, 24.4, 36.1 และ 50 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน พบว่า ยีสต์สามารถผลิตไซลิทอลได้มากที่สุดเมื่อใช้ casamino acids ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร โดยผลิตไซลิทอลได้เท่ากับ 52.2 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง โดยคิดเป็นค่า Yp/s เท่ากับ 0.54 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส และที่พบว่ายีสต์ผลิตไซลิทอลได้ดีรองลงมา เมื่อใช้ความเข้มข้นของ casamino acids เท่ากับ 11.6, 24.4, 36.1, 50 และ 1 กรัมต่อลิตร ซึ่งผลิตไซลิทอลได้เท่ากับ 51.1, 44.7, 41.0, 36.2 และ 26.4 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า Yp/s เท่ากับ 0.52, 0.46, 0.45, 0.42 และ 0.40 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส ตามลำดับ (ภาพที่ 11 และภาคผนวก ง ตารางผนวกที่ ง9)

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ casamino acids จาก 1 เป็น 5 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้การเจริญของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 เพิ่มสูงขึ้น โดยเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี casamino acids ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ยีสต์สามารถเจริญได้ดีที่สุด คิดเป็นน้ำหนักแห้งเท่ากับ 9.02 กรัมต่อลิตร จากเซลล์เริ่มต้นที่คิดเป็นน้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.24 กรัมต่อลิตร ซึ่งยีสต์สามารถผลิตไซลิทอลได้มากที่สุด และพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ casamino acids เป็น 11.6 กรัมต่อลิตร หรือสูงกว่าจะส่งผลให้การเจริญของยีสต์ลดลงตามความเข้มข้นของ casamino acids ที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่การใช้ casamino acids ที่ความเข้มข้นต่ำคือ 1 กรัมต่อลิตรนั้น ยีสต์สามารถเจริญได้ดีกว่า แต่ก็พบว่าผลิตไซลิทอลได้ต่ำกว่าการใช้ casamino acids ที่มีความเข้มข้นสูง 24.4 - 50 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 11)


(ก)
(ข)
(ค)
การเจริญ (กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร)
ไซโลส (กรัมต่อลิตร)
ไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)
เวลา (วัน)
0
2
4
6
8
10
12
14
20
40
60
80
100

จากผลการทดลองพบว่า ยีสต์สามารถใช้ไซโลสได้สูงสุดเมื่อใช้ casamino acids ที่ความเข้มข้น 5 และ 11.6 กรัมต่อลิตร โดยใช้ไป 98.4 และ 98.5 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยงซึ่งมีการผลิตไซลิทอลสูงสุดด้วย โดยมีค่าระหว่าง 51.1 - 52.2 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ casamino acids ให้สูงขึ้นเป็น 24.4 - 50 กรัมต่อลิตร พบว่า การใช้ไซโลสลดลงเล็กน้อยและการผลิตไซลิทอลก็ลดลงด้วยเช่นกัน ในขณะที่เมื่อใช้ casamino acids ความเข้มข้นต่ำเท่ากับ 1 กรัมต่อลิตรนั้น ยีสต์ใช้ไซโลสได้ต่ำที่สุด โดยมีค่าเพียง 65.3 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 12 ซึ่งพบการผลิตไซลิทอลต่ำที่สุดด้วย

เนื่องจากการเพาะเลี้ยงยีสต์ในสภาวะที่มี casamino acids เข้มข้น 11.6 กรัมต่อลิตรนั้น ยีสต์ใช้ไซโลสและผลิตไซลิทอลได้ไม่แตกต่างจากเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี casamino acids เข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงเลือกใช้ casamino acids ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการผลิตไซลิทอลโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22

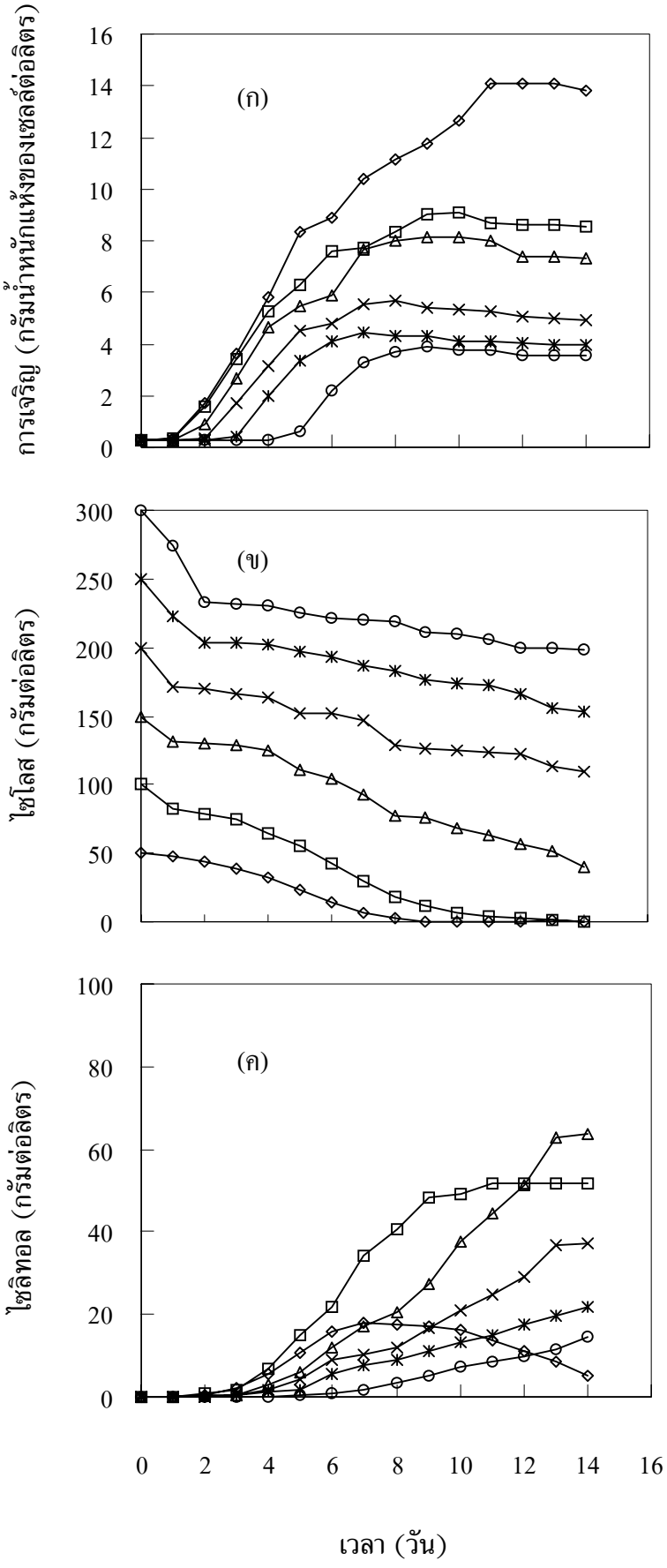
ความเข้มข้นของ casamino acids มีความสำคัญต่อการผลิตไซลิทอลโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 เนื่องจากการใช้ casamino acids ที่ความเข้มข้นสูงเกินไป พบว่ามีผลให้การเจริญของยีสต์ลดลง (ภาพที่ 11 (ก)) ในขณะที่การใช้ casamino acids ความเข้มข้นต่ำ ผลผลิตไซลิทอลจะมีปริมาณน้อย (ภาพที่ 11 (ข)) อย่างไรก็ตาม casamino acids เป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาสูง หากนำมาใช้เพื่อการผลิตไซลิทอลในระดับอุตสาหกรรมต้องใช้ต้นทุนมาก ดังนั้นหากใช้ casamino acids ร่วมกับแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นที่มีราคาถูก อาจช่วยลดต้นทุนได้ ซึ่งมีรายงานการใช้ casamino acids ร่วมกับแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นในการผลิตไซลิทอลด้วย เช่น Vandeska *et al.* (1995 b) ผลิตไซลิทอลโดย *Candida boidinii* ในอาหารที่มีไซโลสเข้มข้น 130 กรัมต่อลิตร มียูเรียเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร และ casamino acids เข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าสามารถผลิตไซลิทอลคิดเป็นค่า Yp/s เท่ากับ 0.48 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส นอกจากนี้ กัญญา (2537) รายงานว่า การเติม casamino acids ที่มีความเข้มข้น 1 และ 5 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่มียูเรียเข้มข้น 2.27 กรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไซลิทอลโดย *Candida* sp. WT 52 ได้เล็กน้อย

6.4 ความเข้มข้นของไซโลส

นำเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว basal medium ที่มีเมทานอลเข้มข้น 1.5% (โดยปริมาตร) และ casamino acids เข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร โดยใช้ไซโลสความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 กรัมต่อลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 12 และ ตารางที่ 5

ผลการทดลอง แสดงว่า เมื่อใช้ไซโลสเริ่มต้นความเข้มข้นต่ำสุด คือ 50 กรัมต่อลิตร ยีสต์ใช้ไซโลสได้ดีและมีการเจริญอย่างรวดเร็ว คิดเป็นน้ำหนักแห้ง เท่ากับ 10.41 กรัมต่อลิตร โดยใช้ไซโลสได้ถึง 86.20% (โดยน้ำหนัก) ในเวลาเพียง 7 วัน แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไซโลสเริ่มต้น ความสามารถในการใช้ไซโลสและการเจริญของยีสต์มีแนวโน้มลดลง ซึ่งส่งผลให้ระยะเวลาที่ใช้ในการหมักไซโลสนานขึ้น (ตารางที่ 5) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเจริญของยีสต์ถูกยับยั้งโดยแรงดันออสโมติกในสภาวะที่มีไซโลสความเข้มข้นสูง (กัญญา, 2537) เช่นเดียวกับเมื่อใช้ไซโลสเริ่มต้นที่ความเข้มข้นสูงถึง 300 กรัมต่อลิตร พบว่ายีสต์มีการเจริญน้อยที่สุด โดยคิดเป็นน้ำหนักแห้งเท่ากับ 3.56 กรัมต่อลิตร และใช้ไซโลสได้เพียง 33.73% (โดยน้ำหนัก) แม้จะใช้ระยะเวลาการหมักนานถึง 14 วันแล้วก็ตาม (ภาคผนวก ง ตารางผนวกที่ ง10)

สำหรับการผลิตไซลิทอล พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไซโลสเริ่มต้น (50-150 กรัมต่อลิตร) มีผลให้การผลิตไซลิทอลและค่า Yp/s มีค่าเพิ่มขึ้น สำหรับการทดลองนี้พบว่าความเข้มข้นของไซโลสเริ่มต้นที่ 150 กรัมต่อลิตร ทำให้ยีสต์สามารถผลิตไซลิทอลดีที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 63.7 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า Yp/s เท่ากับ 0.58 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส ในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเมื่อใช้ไซโลสที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร พบว่ามีการผลิตไซลิทอลและค่า Yp/s ต่ำกว่าไม่มากนัก โดยผลิตไซลิทอลได้ 51.8 กรัมต่อลิตร มีค่า Yp/s เท่ากับ 0.53 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไซโลสเริ่มต้นให้สูง 200-300 กรัมต่อลิตร ปริมาณการผลิตไซลิทอลและค่า Yp/s จะลดลงอย่างชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 12 (ค)


การเจริญ (กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร)
(ก)
ไซโลส (กรัมต่อลิตร)
(ข)
ไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)
(ค)
เวลา (วัน)

ตารางที่ 5 การเจริญ การใช้ไซโลส การผลิตไซลิทอล และค่าผลได้ของไซลิทอล โดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 ในอาหารเหลว basal medium ปริมาตร 100 มล. ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ที่มีเมทานอล 1.5% (โดยปริมาตร) casamino acids 5 กรัมต่อลิตร และไซโลสความเข้มข้นต่าง ๆ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที

ไซโลสเริ่มต้น (กรัม/ลิตร)	เวลา (วัน)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ไซโลสที่ถูกใช้ (เปอร์เซ็นต์)	ไซลิทอล (กรัม/ลิตร)	Yp/s (กรัม/กรัม)
50	7	10.41	86.20	18.0	0.42
100	12	8.63	98.00	51.8	0.53
150	14	7.31	73.30	63.7	0.58
200	14	4.95	45.15	37.0	0.41
250	14	3.97	38.68	22.0	0.23
300	14	3.56	33.73	14.6	0.14

การเลี้ยงยีสต์ในสภาวะที่มีไซโลสความเข้มข้นสูง สามารถเหนี่ยวนำให้ยีสต์มีการผลิตไซลิทอลได้ เนื่องจากความเข้มข้นของไซโลสที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้อัตราการใช้ไซโลสและอัตราการเกิดปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ xylose reductase เพิ่มขึ้น นั่นคือไซโลสถูกเปลี่ยนเป็นไซลิทอลได้มาก แต่ไซโลสที่ความเข้มข้นสูงนั้นไม่มีผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ xylitol dehydrogenase ดังนั้นไซลิทอลที่เกิดขึ้นจึงเปลี่ยนเป็นไซลูโลสได้อย่างจำกัด ทำให้ไซลิทอลถูกขับออกนอกเซลล์ปริมาณมาก ขณะที่ไซลูโลสที่เกิดขึ้นนั้นจะเข้าสู่วิถีเมแทบอลิซึมต่อไป ได้ผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เป็นผลผลิต เช่น เอทานอล กรดอะซิติก และ โพลีแซคคาไรด์ เป็นต้น (Sirisansaneeyakul *et al.,* 1995; Winkelhausen and Kuzmanova, 1998) นอกจากนี้มีรายงานว่า การใช้ไซโลสความเข้มข้นสูงส่งผลให้ยีสต์มีการผลิตไซลิทอลมากกว่าผลิตเอทานอล อัตราการผลิตไซลิทอลต่อเอทานอลจึงมีค่าเพิ่มขึ้น ผลได้ของเอทานอลจึงลดลง ขณะที่ผลได้ของไซลิทอลมีค่าเพิ่มขึ้น (Roseiro *et al*., 1991; Vandeska *et al*., 1995 a) อย่างไรก็ตาม ไซโลสความเข้มข้นสูงจะมีผลยับยั้งการเจริญของยีสต์ ซึ่งเมื่อยีสต์มีการเจริญต่ำมาก ผลผลิตไซลิทอลย่อมมีปริมาณน้อยตามไปด้วย ดังเช่นผลการทดลองนี้ที่พบว่า การใช้ไซโลสเริ่มต้นที่มีความเข้มข้นสูงตั้งแต่ 200 กรัมต่อลิตรขึ้นไปทำให้การเจริญของเชื้อลดลงมาก ซึ่งส่งผลให้ปริมาณการผลิตไซลิทอลและค่า Yp/s ลดต่ำลงเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 12)

แม้พบว่าความเข้มข้นของไซโลสเริ่มต้นที่ 150 กรัมต่อลิตร ทำให้ยีสต์ผลิตไซลิทอล และมีค่า Yp/s ที่สูงกว่าการใช้ไซโลสเริ่มต้นที่ 100 กรัมต่อลิตร แต่ก็มากกว่าเพียงเล็กน้อย ซึ่งการผลิตไซลิทอลโดยใช้ไซโลสเพิ่มขึ้นต้องใช้ต้นทุนเพิ่มขึ้น นอกจากนี้การใช้ไซโลสความเข้มข้นสูงต้องใช้ระยะเวลาการหมักที่นานกว่า ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงเลือกใช้ไซโลสความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร เพื่อศึกษาการผลิตไซลิทอลโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 ต่อไป

ความเข้มข้นของไซโลสเริ่มต้นที่ให้ค่าผลได้ (Yp/s) ของไซลิทอลสูงสุด มักอยู่ในช่วง 100-200 กรัมต่อลิตร (Winkelhausen and Kuzmanova, 1998) เช่น *Candida boidinii* NRRL Y-17213 ใช้ไซโลสความเข้มข้น 130 กรัมต่อลิตร (Vandeska *et al*., 1995 b) และ *Hansenula polymorpha* ใช้ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร (Suryadi *et al*., 2000) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ได้มีการศึกษาเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ของยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตไซลิทอลจากไซโลสที่มีความเข้มข้นสูงมาก เพื่อให้ได้ผลผลิตที่สูงขึ้น โดย Ikeuchi *et al*. (1999) ทำการแยก *Candida* sp. 559-9 จากดิน ซึ่งสามารถผลิตไซลิทอลได้ 173 กรัมต่อลิตร จากไซโลสความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ Meyrial *et al*. (1991) รายงานการผลิตไซลิทอลจาก *Candida guilliermondii* NRC 5578 โดยใช้ไซโลสความเข้มข้นสูงถึง 300 กรัมต่อลิตร พบว่าผลิตไซลิทอลได้ 221 กรัมต่อลิตร โดยใช้ระยะเวลานานถึง 406 ชั่วโมง

Ikeuchi *et al*. (1999) รายงานการผลิตไซลิทอลแบบเฟด-แบทช์ ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถรักษาความเข้มข้นของไซโลสและอัตราการเจริญให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม และสามารถผลิตไซลิทอลได้ดี โดยใช้ยีสต์ *Candida* sp. 559-9 ที่เลี้ยงโดยการเติมไซโลส 2 กรัม ในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 10 มล. ที่มีไซโลสอยู่แล้ว 2 กรัม พบว่าได้ผลผลิตไซลิทอล 2.9 กรัม จากไซโลส 4 กรัม คิดเป็นความเข้มข้นของไซลิทอลเท่ากับ 256 กรัมต่อลิตร และค่า Yp/s เท่ากับ 0.85 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส ภายหลังการเลี้ยงเชื้อ 11.5 วัน นอกจากนี้ Kim *et al*. (1997) ได้ผลิตไซลิทอลจากยีสต์ *Candida parapsilosis* โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตรเริ่มต้น 2 ลิตร ที่มีไซโลสเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร และเติมไซโลสความเข้มข้น 600 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 500 มล. 2 ครั้ง สามารถผลิตไซลิทอลได้ 210 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า Yp/s เท่ากับ 0.70 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส ในระยะเวลา 66 ชั่วโมง

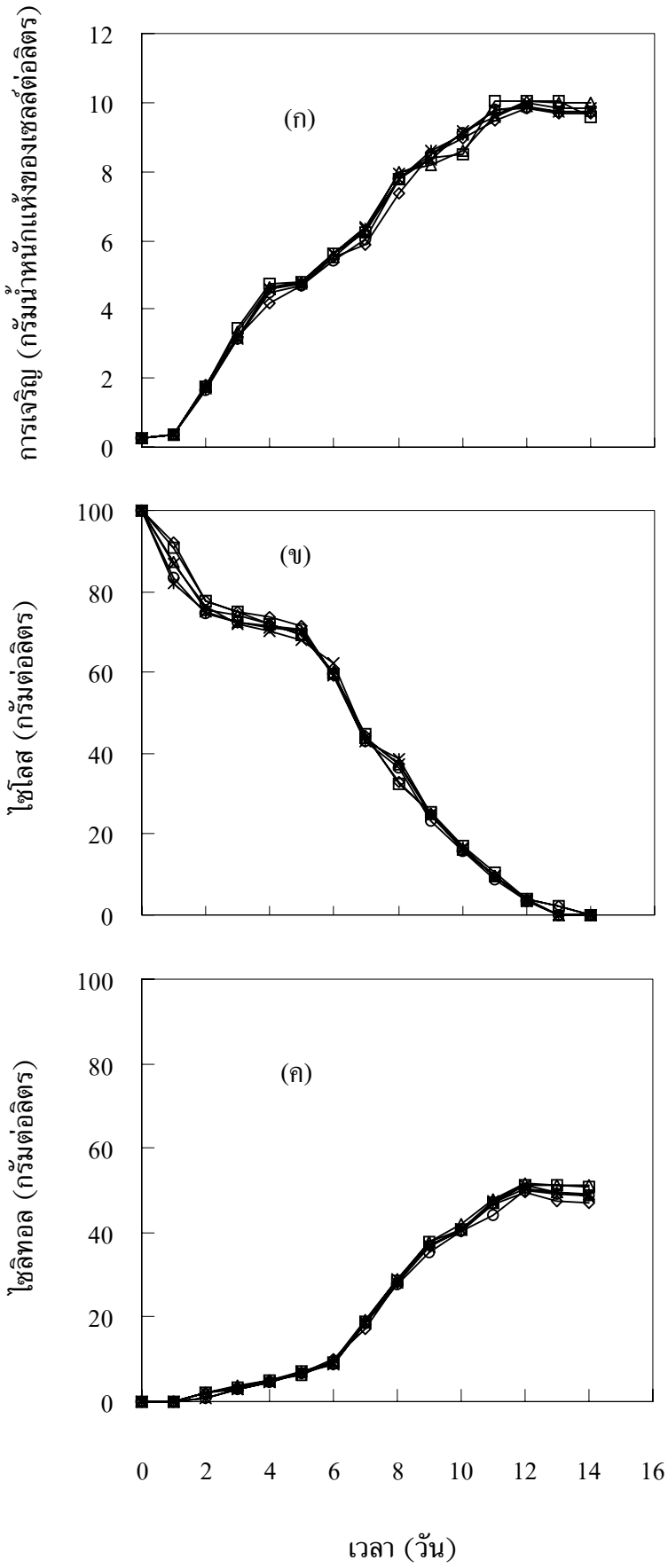
6.5 ความเข้มข้นของ $MgSO_4. 7H_2O$

ความเข้มข้นของ $MgSO_4. 7H_2O$ ที่ใช้สำหรับผลิตไซลิทอลตามที่มีในรายงานนั้น แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของยีสต์ ตัวอย่างเช่น การผลิตไซลิทอลโดย *Candida parapsilosis* ใช้ $MgSO_4. 7H_2O$ ความเข้มข้น 0.4 กรัมต่อลิตร (Kim *et al*., 1997) ขณะที่ *Debaryomyces hansenii* (Nahlik *et at*., 2003) และ *Candida tropicalis* (Yahashi *et al*., 1996) ใช้ $MgSO_4. 7H_2O$ ความเข้มข้น 0.5 และ 1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เมื่อนำเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว basal medium ที่มีเมทานอลเข้มข้น 1.5% (โดยปริมาตร) ไซโลสเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร casamino acids เข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $MgSO_4. 7H_2O$ ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5 กรัมต่อลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน แล้ววิเคราะห์การเจริญ การใช้ไซโลสและการผลิตไซลิทอล ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 13 และภาคผนวก ง ตารางผนวกที่ ง11

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของ $MgSO_4. 7H_2O$ มีผลต่อการเจริญของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 น้อยมาก โดยยีสต์ใช้ไซโลสและมีการเจริญที่ใกล้เคียงกันในทุกความเข้มข้นของ $MgSO_4. 7H_2O$ ที่ทดลอง โดยเจริญสูงสุดในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง คิดเป็นน้ำหนักแห้ง 9.82-10.02 กรัมต่อลิตร ซึ่งการใช้ $MgSO_4. 7H_2O$ ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 กรัมต่อลิตร ยีสต์สามารถเจริญได้ดีที่สุด คิดเป็นน้ำหนักแห้งเท่ากับ 10.02 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 13 (ก))

สำหรับการผลิตไซลิทอล พบว่า เมื่อใช้ $MgSO_4. 7H_2O$ ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5 กรัมต่อลิตร เมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 สามารถผลิตไซลิทอลได้เท่ากับ 49.6, 51.3, 51.7, 51.2, 50.5 และ 50.1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง คิดเป็นค่า Yp/s เท่ากับ 0.52, 0.53, 0.54, 0.53, 0.53 และ 0.52 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่า ยีสต์ผลิตไซลิทอลได้ใกล้เคียงกันที่ทุกความเข้มข้นของ $MgSO_4. 7H_2O$ ที่ใช้ อย่างไรก็ตามการใช้ $MgSO_4. 7H_2O$ ที่มีความเข้มข้นต่ำที่สุดในการทดลองคือ 0.25 กรัมต่อลิตร ปริมาณไซลิทอลและค่า Yp/s จะมีค่าต่ำที่สุด นอกจากนี้เมื่อพิจารณาผลการทดลองจะพบว่าการใช้ $MgSO_4. 7H_2O$ ที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ยีสต์สามารถผลิตไซลิทอลได้มากที่สุด เท่ากับ 51.7 กรัมต่อลิตร มีค่า Yp/s เท่ากับ 0.54 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส รองลงมาคือ


การเจริญ (กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร)
12
10
8
6
4
2
0
(ก)
ไซโลส (กรัมต่อลิตร)
100
80
60
40
20
0
(ข)
ไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)
100
80
60
40
20
0
(ค)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
เวลา (วัน)

$MgSO_4$. $7H_2O$ ที่มีความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งผลิตไซลิทอลได้ 51.3 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า Yp/s เท่ากับ 0.53 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส ซึ่งผลการผลิตไซลิทอลที่ได้จาก $MgSO_4$. $7H_2O$ ทั้ง 2 ความเข้มข้นนั้น ไม่มีความแตกต่างกัน ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของ $MgSO_4$. $7H_2O$ 0.5 กรัมต่อลิตร ดังที่เคยใช้ในการทดลองก่อนหน้านี้ สำหรับการผลิตไซลิทอลโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 ต่อไป

Suryadi *et al*. (2000) รายงานเกี่ยวกับอิทธิพลของ Mg^{2+} ต่อการผลิตไซลิทอลของ *Hansenula polymorpha* ซึ่งทำการทดลองโดยใช้ $MgSO_4$. $7H_2O$ ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ในช่วง 0.25-10 กรัมต่อลิตร พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ Mg^{2+} ส่งผลให้การผลิตไซลิทอลเพิ่มขึ้นโดยความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตคือ 1 กรัมต่อลิตร และหากใช้ความเข้มข้นที่สูงกว่านี้ ไซโลสจะถูกนำไปใช้เพื่อการเจริญมากขึ้น สอดคล้องกับรายงานของ Walker (1994) ที่พบว่า Mg^{2+} สามารถกระตุ้นการเจริญของ *Candida tenuis* และยีสต์อีกหลายสายพันธุ์ได้ นอกจากนี้ Mahler and Guebel (1994) ยังพบว่า เมื่อใช้ Mg^{2+} ที่มีความเข้มข้นต่ำเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ทำให้ยีสต์ *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 สามารถผลิตไซลิทอลได้ดีกว่าเอทานอล

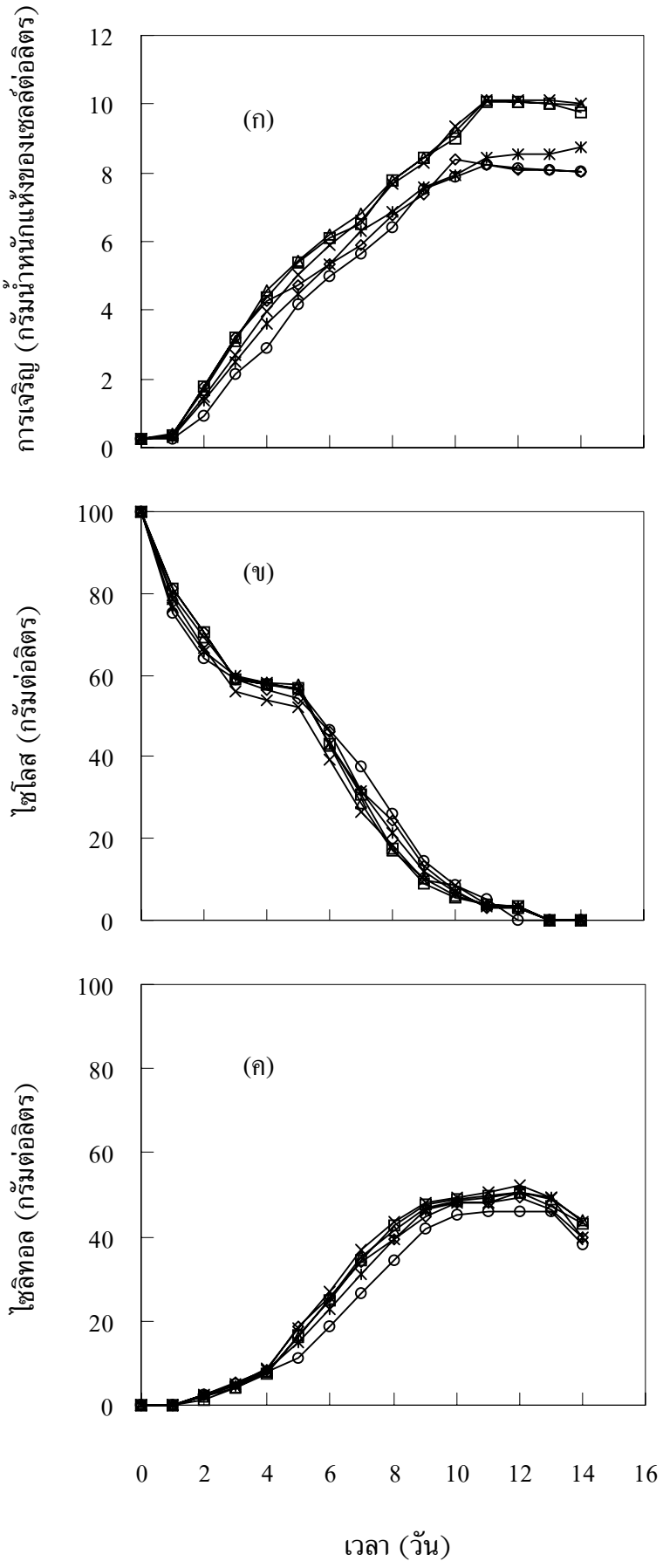
6.6 พีเอชเริ่มต้น

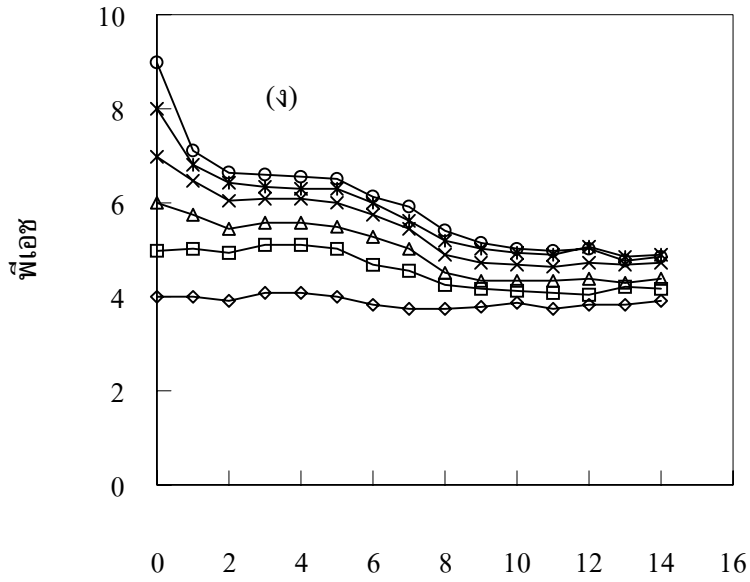
การศึกษาอิทธิพลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตไซลิทอลของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว basal medium ที่มีเมทานอลเข้มข้น 1.5% (โดยปริมาตร) ไซโลสเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร casamino acids เข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร และ $MgSO_4$. $7H_2O$ เข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร โดยปรับค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ผลการทดลองพบว่า เมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 สามารถผลิตไซลิทอลได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 โดยผลิตไซลิทอลได้ 52.3 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง คิดเป็นค่า Yp/s เท่ากับ 0.54 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส ในขณะที่เมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4, 5, 6, 8 และ 9 สามารถผลิตไซลิทอลได้เท่ากับ 49.2, 50.5, 50.5, 50.8 และ 46.2 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง คิดเป็นค่า Yp/s เท่ากับ 0.51, 0.52, 0.52, 0.53 และ 0.46 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 14 ซึ่งพบว่าเมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นในช่วง 4-8 ยีสต์สามารถผลิตไซลิทอลได้ใกล้เคียงกัน โดยมีค่าความเข้มข้นของไซลิทอลอยู่ระหว่าง 49.2-52.3 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง และมีค่า Yp/s อยู่ในช่วง 0.51-0.54 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส แต่เมื่อใช้พีเอชเริ่มต้นที่สูงขึ้น

เท่ากับ 9 การผลิตไซลิทอลจะลดลงเล็กน้อย คือมีค่าเท่ากับ 46.2 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า Yp/s เท่ากับ 0.46 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส (ภาพที่ 14 (ค) และภาคผนวก ง ตารางผนวกที่ ง12)

เมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 เจริญได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นอยู่ในช่วง 5-7 โดยคิดเป็นน้ำหนักแห้งเท่ากับ 10.06-10.10 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง และหากใช้อาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นที่สูงหรือต่ำกว่า 5-7 พบว่าการเจริญของยีสต์จะลดลง สังเกตได้จากเมื่อใช้ค่าพีเอชเริ่มต้นที่ 4, 8 และ 9 การเจริญจะลดลงอย่างชัดเจน คิดเป็นน้ำหนักแห้งเท่ากับ 8.09, 8.55 และ 8.11 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ (ภาพที่ 14 (ก)) และเมื่อพิจารณาการใช้ไซโลส (ภาพที่ 14 (ข)) พบว่ามีความใกล้เคียงกันทุกพีเอชเริ่มต้นที่ใช้ทดลอง โดยยีสต์สามารถใช้ไซโลสได้หมดในวันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยง และเมื่อน้ำตาลหมด ยีสต์จะนำไซลิทอลมาใช้โดยเปลี่ยนเป็นไซลูโลสและเข้าสู่วิถีเมแทบอลิซึมต่อไป ส่งผลให้ไซลิทอลมีปริมาณลดลง (Ikeuchi *et al*., 1999)

แม้พบว่าเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 สามารถเจริญและผลิตไซลิทอลได้ดีในช่วงพีเอชที่กว้าง แต่เมื่อใช้พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 ยีสต์สามารถผลิตไซลิทอลและมีการเจริญที่คิดเป็นน้ำหนักแห้งสูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 เป็นค่าที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตไซลิทอลโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 ซึ่งสอดคล้องกับการผลิตไซลิทอลโดย *Candida boidinii* No. 2201 ที่พบว่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิต คือ 7 โดยเชื้อมีการเจริญดีที่สุดที่พีเอช 6.5 (Vongsuvanlert and Tani, 1989) ในขณะที่ Suryadi *et al*. (2000) ได้รายงานถึงอิทธิพลของค่าพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตไซลิทอลโดย *Hansenula polymorpha* ว่า เมื่อใช้ค่าพีเอชเริ่มต้นที่สูงขึ้น (4.5-8) การผลิตไซลิทอลจะเพิ่มขึ้น โดยพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8 เหมาะสมสำหรับการผลิตมากที่สุด นอกจากนี้ยังแสดงว่าการเปลี่ยนแปลงพีเอชเริ่มต้นไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ


การเจริญ (กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร)
12
10
8
6
4
2
0
(ก)
ไซโลส (กรัมต่อลิตร)
100
80
60
40
20
0
(ข)
ไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)
100
80
60
40
20
0
(ค)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
เวลา (วัน)



พีเอชเริ่มต้น: 4 (◊) 5 (□) 6 (△) 7 (×) 8 (✳) 9 (○)

ภาพที่ 14 (ต่อ)

พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และการเกิดผลิตภัณฑ์ โดยค่าพีเอชระหว่างกระบวนการหมักมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้อาจเป็นสาเหตุให้สารอาหารบางชนิดเกิดการตกตะกอนไม่สามารถดูดซึมเข้าสู่เซลล์ได้ (Sanchez *et al*., 1997) สำหรับการทดลองนี้ พบว่า การใช้พีเอชเริ่มต้นในช่วง 5-9 ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีแนวโน้มลดลงและเริ่มคงที่ในวันที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งค่าพีเอชที่ลดลงนี้อาจเนื่องมาจากการผลิตกรดอินทรีย์ในระหว่างกระบวนการหมัก ในขณะที่การปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4 ระหว่างการหมักไม่พบการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารมากนัก ดังภาพที่ 14 (ง) และเมื่อพิจารณาจากรายงานอื่น ๆ พบว่า ระบบการหมักที่ไม่มีการควบคุมพีเอช ดังเช่นการทดลองนี้ ค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตจะมีค่าสูงกว่าในระบบที่ควบคุมพีเอชได้ ตัวอย่างเช่น การผลิตไซลิทอลโดย *Candida boidinii* ในระบบที่ไม่มีการควบคุมพีเอช ค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสม คือ 7 (Vongsuvanlert and Tani, 1989) แต่ในระบบที่ควบคุมพีเอช ค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไซลิทอล คือ 5.5 (Vandeska *et al.,* 1995 b)

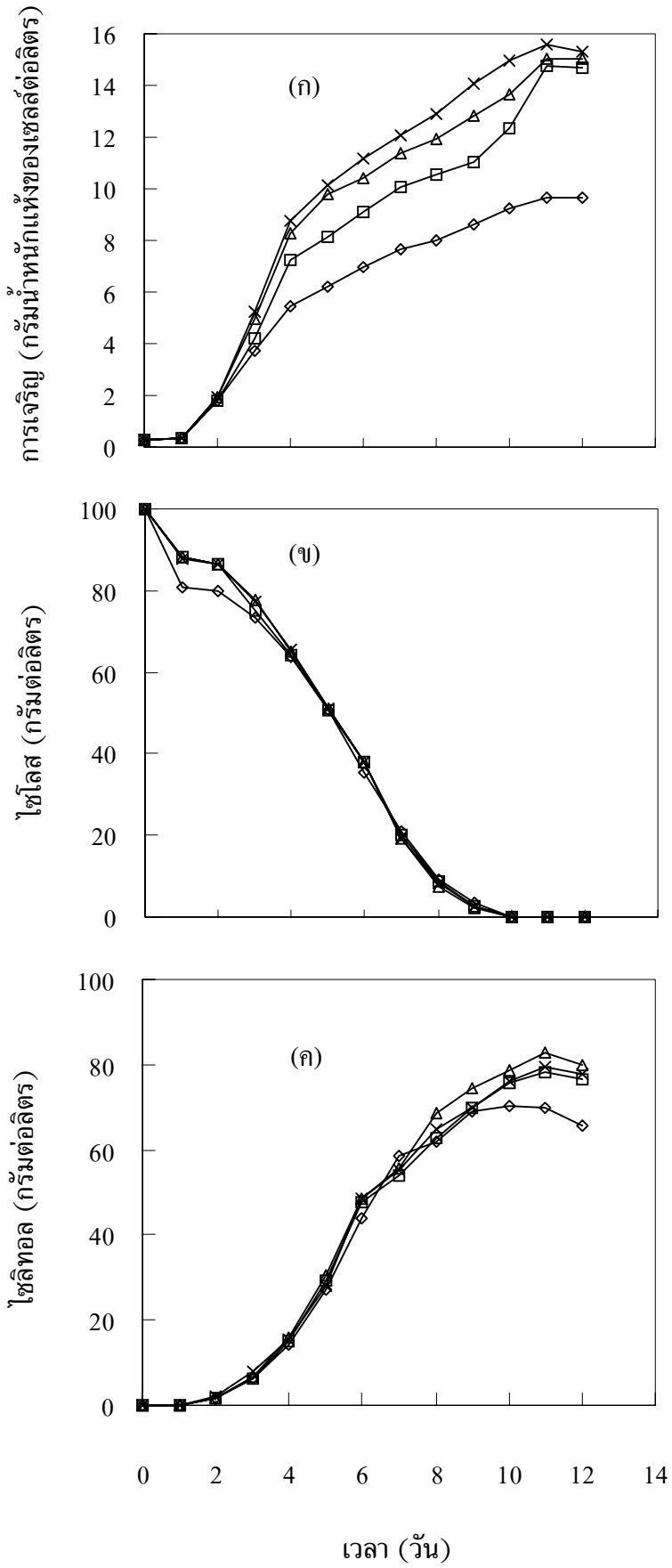
6.7 อัตราการให้อากาศ

เนื่องจากการทดลองเลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลวที่ผ่านมาทั้งหมดเป็นการทดลองในฟลาสก์ ซึ่งไม่สามารถผันแปรค่าอัตราการให้อากาศได้ ในการทดลองนี้จึงจำเป็นต้องใช้ถังหมักเพื่อการเลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลว โดยเพาะเลี้ยงเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 ในถังหมัก (Biostat B) ขนาด 2.5 ลิตร (ภาพที่ 15) ที่มีอาหารเหลว basal medium ปริมาตร 1 ลิตร ซึ่งส่วนประกอบของอาหารและพีเอชเริ่มต้นเป็นไปตามสภาวะที่คัดเลือกแล้วว่าเหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอลโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 เมื่อเลี้ยงในฟลาสก์จากการทดลองข้างต้น (ข้อ 6.1-6.6) คือ เมทานอลเข้มข้น 1.5% (โดยปริมาตร) ไซโลสเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร casamino acids เข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร $MgSO_4.7H_2O$ เข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 และให้อัตราการให้อากาศที่แตกต่างกัน คือ 0.75, 1.5, 1.75 และ 2 vvm (ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารในถังหมักต่อนาที) ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และอัตราการกวนที่ 150 รอบต่อนาที ตลอดระยะเวลาการหมัก ผลการทดลองแสดงว่าเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 สามารถผลิตไซลิทอลได้ปริมาณสูงที่สุดเมื่อให้อากาศ 1.75 vvm โดยสามารถผลิตไซลิทอลได้เท่ากับ 82.8 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง คิดเป็นค่า Yp/s เท่ากับ 0.83 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส รองลงมาคือการผลิตเมื่อให้อากาศ 2, 1.5 และ 0.75 vvm ซึ่งผลิตไซลิทอลได้ 79.4, 78.2 และ 69.7 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า Yp/s เท่ากับ 0.79, 0.78 และ 0.70 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 16 และภาคผนวก ง ตารางผนวกที่ ง13

เมื่อพิจารณาการเจริญของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศ ส่งผลให้การเจริญของยีสต์เพิ่มขึ้น โดยการให้อากาศในอัตราที่สูงที่สุดคือ 2 vvm ทำให้ยีสต์เจริญได้ดีที่สุด คิดเป็นน้ำหนักแห้งเท่ากับ 15.59 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือเมื่อให้อากาศ 1.75, 1.5 และ 0.75 vvm ซึ่งยีสต์เจริญคิดเป็นน้ำหนักแห้งเท่ากับ 15.01, 14.72 และ 9.68 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่า ยีสต์ใช้ไซโลสได้ใกล้เคียงกันในทุกการทดลองที่ผันแปรการให้อากาศและสามารถใช้ไซโลสหมดในวันที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อ

อากาศหรือออกซิเจนมีความสำคัญต่อการเจริญของยีสต์ โดยการให้อากาศหรือออกซิเจนในอัตราสูง เป็นผลให้กรดไพรูวิกเบี่ยงเบนเข้าสู่วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (Tricarboxylic acid cycle) จำนวนเซลล์จึงเพิ่มขึ้น (Winkelhausen and Kuzmanova, 1998) ดังเช่นผลการทดลองนี้ที่พบว่าอัตราการให้อากาศที่สูงขึ้นส่งผลให้ยีสต์มีการเจริญดี และทำให้การผลิต

ภาพที่ 15 Biostat B fermenter (Braun Biotech International, Germany) ที่ใช้ทดลองผลิตไซลิทอลจากไซโลส


การเจริญ (กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อลิตร)
16
14
12
10
8
6
4
2
0
(ก)
ไซโลส (กรัมต่อลิตร)
100
80
60
40
20
0
(ข)
ไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)
100
80
60
40
20
0
(ค)
0
2
4
6
8
10
12
14
เวลา (วัน)

ไซลิทอลสูงตามไปด้วย โดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 สามารถเจริญและผลิตไซลิทอลได้ดีเมื่อให้อากาศในอัตรา 1.5-2 vvm แต่เมื่อใช้อัตราการให้อากาศในระดับต่ำที่สุด คือ 0.75 vvm ยีสต์มีการเจริญและการผลิตไซลิทอลต่ำที่สุด สอดคล้องกับรายงานของ Kim *et al*. (1997) ที่พบว่า การเจริญของ *Candida parapsilosis* จะลดลง และการผลิตไซลิทอลจะลดลงในสภาวะที่มีออกซิเจนน้อย

แม้ว่าการเพิ่มอัตราการให้อากาศจะช่วยส่งเสริมการเจริญของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 แต่การผลิตไซลิทอลที่อัตราการให้อากาศ 1.75 vvm มีปริมาณสูงกว่าที่ 2 vvm เล็กน้อย ดังนั้นจึงเลือกอัตราการให้อากาศที่ 1.75 vvm สำหรับการผลิตไซลิทอลโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 ต่อไป

นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงว่า การผลิตไซลิทอลโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 ในถังหมัก ให้ผลผลิตได้สูงกว่าเมื่อผลิตในฟลาสก์ ซึ่งอาจเกิดจากการให้อากาศแก่ระบบเพาะเลี้ยงในถังหมักดีกว่า โดยการให้อากาศในอัตราต่ำสุดของการทดลองในถังหมักคือ 0.75 vvm มีผลผลิตไซลิทอลเท่ากับ 69.7 กรัมต่อลิตร ซึ่งก็ยังสูงกว่าผลผลิตสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ (52.3 กรัมต่อลิตร จากการทดลองในข้อ 6.6)

การวิเคราะห์ระดับของอากาศหรือออกซิเจนนั้น อาจทำได้หลายรูปแบบ เช่น ในรูปของอัตราการให้อากาศ (Fulan *et al*., 1991) ค่า K_La (ประสิทธิภาพการถ่ายโอนออกซิเจน) (Aguiar Jr. *et al*., 2002) และค่า OTR (Oxygen Transfer Rate) หรืออัตราการถ่ายโอนออกซิเจน (Vandeska *et al*., 1995 b) เป็นต้น

การให้อากาศมีอิทธิพลต่อการเจริญ การใช้ไซโลส และการผลิตไซลิทอล ซึ่งขึ้นกับสายพันธุ์ของยีสต์ โดยส่วนใหญ่พบว่า เมื่อให้อากาศในระดับปานกลางจะมีผลได้ (Yp/s) ของไซลิทอลสูงสุด (Parajo *et al*., 1998) ซึ่ง Vandeska *et al*. (1995 b) ได้ศึกษาการผลิตไซลิทอลโดย *Candida boidinii* พบว่าเมื่อค่า OTR เท่ากับ 14 หรือ 18 มิลลิโมลต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งเป็นสภาวะจำกัดออกซิเจน จะได้ค่า Yp/s สูงสุด แต่เมื่อเพิ่มค่า OTR ถึง 30 มิลลิโมลต่อลิตรต่อชั่วโมง จะส่งผลให้การเจริญของยีสต์เพิ่มขึ้น แต่การผลิตไซลิทอลจะลดลง โดย du Preez *et al.* (1994) อธิบายว่า การให้อากาศหรือออกซิเจนนั้นทำให้เกิดการออกซิไดซ์ NADH เป็น NAD^+ จากการทำงานของลูกโซ่อิเล็กตรอน ดังนั้นปฏิกิริยาการเปลี่ยนไซลิทอลเป็นไซลูโลสโดยเอนไซม์ xylitol

dehydrogenase ที่ต้องการ NAD^+ เป็นโคเอนไซม์ สามารถดำเนินไปได้อย่างดี ส่งผลให้เกิดการใช้ไซโลสเพื่อการเจริญ แต่ทำให้การผลิตไซลิทอลลดลง

ส่วนกรณีของการผลิตไซลิทอลโดย *Candida mogii* ATCC 18364 พบว่า ยีสต์มีการผลิตไซลิทอลที่ไม่แตกต่างกัน ทั้งในสภาวะที่ให้ออกซิเจนอย่างเพียงพอและสภาวะจำกัดออกซิเจน (Sirisansaneeyakul *et al*., 1995) ในขณะที่ *Pichia tannophilus* ผลิตไซลิทอลได้ดีในสภาวะจำกัดออกซิเจนหรือไม่มีออกซิเจนเลย (Ligthelm *et al*., 1988)

การให้อากาศและความเข้มข้นของไซโลสเป็นปัจจัยสำคัญในการผลิตไซลิทอล (Winkelhausen and Kuzmanova, 1998) ซึ่ง Horitsu *et al*. (1992) ได้ทำการศึกษาการผลิตไซลิทอลใน *Candida tropicalis* IFO 0618 พบว่า อัตราการให้อากาศและความเข้มข้นของไซโลสมีความเกี่ยวข้องกับความเข้มข้นของเซลล์ โดยการให้อากาศน้อยและความเข้มข้นของไซโลสในระดับต่ำส่งผลให้ยีสต์มีการเจริญหรือความเข้มข้นของเซลล์ในระดับต่ำ และพบการผลิตไซลิทอลในระยะแรกของการเลี้ยงเชื้อ ในขณะที่การให้อากาศเพิ่มขึ้นและใช้ไซโลสความเข้มข้นสูง พบว่ายีสต์สามารถเจริญได้ดี เซลล์มีความเข้มข้นสูง ส่งผลให้การผลิตไซลิทอลเพิ่มสูงขึ้นด้วย โดยมีอัตราการผลิตไซลิทอลสูงสุดเท่ากับ 2.67 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อไซโลสเริ่มต้นมีความเข้มข้นเท่ากับ 172 กรัมต่อลิตร และมีการให้อากาศในรูปของ K_La มีค่าเท่ากับ 451.5 ต่อชั่วโมง

นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงความสัมพันธ์ของการให้อากาศและขนาดของหัวเชื้อต่อการผลิตไซลิทอลด้วย *Candida guilliermondii* IM 50088 ซึ่งพบว่า การผลิตไซลิทอลโดยใช้เซลล์เริ่มต้นความเข้มข้นต่ำ (1 กรัมต่อลิตร) ไม่ควรให้อากาศมาก แต่เมื่อใช้เซลล์เริ่มต้นความเข้มข้นสูง (4 กรัมต่อลิตร) การผลิตไซลิทอลจะมีปริมาณมากเมื่อให้อากาศมากด้วย โดยอัตราการผลิตไซลิทอลมีค่าสูงสุดเท่ากับ 1.52 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้เซลล์เริ่มต้นที่มีความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร และค่า K_La เท่ากับ 100 ต่อชั่วโมง (Aguiar Jr. *et al*., 2002)

การทดลองที่ผ่านมาได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอลโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 เมื่อใช้อุณหภูมิการเพาะเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส สรุปผลการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอลแสดงดังตารางที่ 6

จากผลการทดลองในตารางที่ 6 พบว่า เมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 ผลิตไซลิทอล และมีค่า Yp/s ที่เพิ่มขึ้นมาก เมื่อใช้ casamino acids เป็นแหล่งไนโตรเจน หลังจากนั้นแม้ใช้สภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยอื่น ๆ ก็ไม่ได้ส่งผลให้การผลิตไซลิทอลและค่า Yp/s เปลี่ยนแปลงมากนัก อย่างไรก็ตามเมื่อทำการศึกษาอัตราการให้อากาศได้เพาะเลี้ยงยีสต์ในถังหมักแทนฟลาสก์ ซึ่งพบว่ายีสต์มีการผลิตไซลิทอลเพิ่มขึ้นมาก ดังตารางที่ 6 โดยเมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตครบทุกปัจจัยที่ศึกษา พบว่าเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 สามารถผลิตไซลิทอลได้มากถึง 82.8 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง คิดเป็นค่า Yp/s เท่ากับ 0.83 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส

Suryadi *et al*. (2000) รายงานการผลิตไซลิทอลโดย *Hansenula polymorpha* พบว่ายีสต์ผลิตไซลิทอลได้เท่ากับ 57 กรัมต่อลิตร มีค่า Yp/s เท่ากับ 0.52 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส ในวันที่ 3 ของการผลิต เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว basal medium ที่มีเมทานอลเข้มข้น 1 % (โดยปริมาตร) ไซโลสเข้มข้น 110 กรัมต่อลิตร ยูเรียเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร $MgSO_4.7H_2O$ เข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8 โดยผลิตในฟลาสก์ขนาด 500 มล. ที่มีอาหารเหลวปริมาตร 200 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่อัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

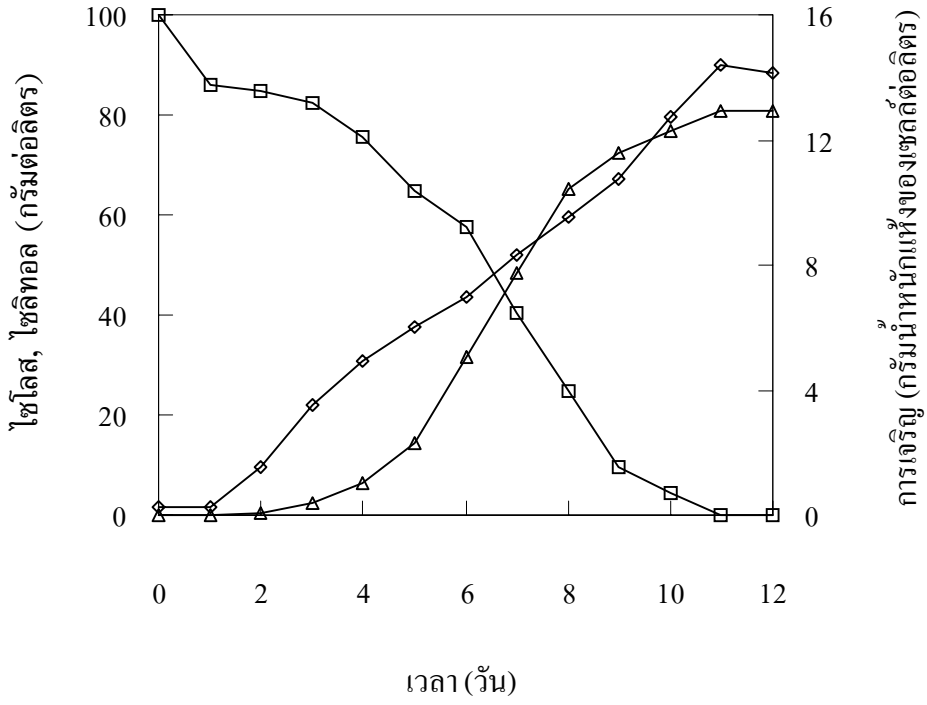
เมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 สามารถผลิตไซลิทอลได้มากกว่า *Hansenula polymorpha* แต่ต้องใช้ระยะเวลาการผลิตที่ยาวนานกว่า ซึ่งเมื่อพิจารณาจากผลการทดลอง พบว่า เมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 ต้องใช้ระยะเวลาการผลิต 6-7 วัน จึงสามารถผลิตไซลิทอลได้ปริมาณเทียบเท่ากับ *H. polymorpha* ที่ใช้เวลาเพียง 3 วัน ซึ่งระยะเวลาการผลิตที่ยาวนานอาจเนื่องจากการใช้เซลล์เริ่มต้นที่มีความเข้มข้นต่ำเพียง 0.24 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การผลิตไซลิทอลโดย *H. polymorpha* ใช้เซลล์เริ่มต้นที่มีความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ซึ่งหากต้องการลดระยะเวลาการผลิตอาจทำได้โดยเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น ดังเช่นรายงานของ Cao *et al*. (1994) ที่พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นสามารถช่วยลดระยะเวลาการผลิตไซลิทอลโดย *Candida* sp. B-22 ได้ นอกจากนี้ยังส่งผลให้ *Candida boidinii* NRRL Y-17231 มีค่า Yp/s เพิ่มขึ้นจาก 0.1 เป็น 0.2 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นจาก 1.3 เป็น 5.1 กรัมต่อลิตร (Vandeska *et al*., 1995 a)

7. <u>การผลิตไซลิทอลโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ทนอุณหภูมิสูงที่คัดเลือกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส</u>

จากผลการทดลองในข้อที่ 3 และ 5 แสดงว่าเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 สามารถเจริญและผลิตไซลิทอลได้ที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส การทดลองนี้จึงนำเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 มาศึกษาการผลิตไซลิทอลที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เมื่อใช้สภาวะการผลิตที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คือ อาหารเหลว basal medium ที่มีเมทานอลเข้มข้น 1.5% (โดยปริมาตร) ไซโลสเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร casamino acids เข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร และ $MgSO_4 . 7H_2O$ เข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 โดยทำการผลิตในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร (Biostat B) ที่มีอาหารเหลวปริมาตร 1 ลิตร ควบคุมอัตราการให้อากาศที่ 1.75 vvm อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที แต่เพาะเลี้ยงให้ผลิตไซลิทอลที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 17 และภาคผนวก ง ตารางผนวกที่ ง14

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถวัดการเจริญคิดเป็นน้ำหนักแห้งได้เท่ากับ 15.01 กรัมต่อลิตร กับเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่ามีการเจริญคิดเป็นน้ำหนักแห้งเท่ากับ 14.42 กรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นจาก 37 เป็น 40 องศาเซลเซียส ส่งผลให้การเจริญของยีสต์ลดลงเล็กน้อย นอกจากนี้ยังพบว่า ยีสต์มีการใช้ไซโลสที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ล่าช้ากว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเล็กน้อย โดยยีสต์ใช้ไซโลสได้หมดในวันที่ 10 เมื่อเพาะเลี้ยงให้ผลิตไซลิทอลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แต่เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ยีสต์ใช้ไซโลสหมดในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง

ผลการทดลอง พบว่า ยีสต์ผลิตไซลิทอลที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสได้ต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเล็กน้อย โดยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีการผลิตไซลิทอลเท่ากับ 80.8 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง คิดเป็นค่า Yp/s เท่ากับ 0.81 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส ในขณะที่การผลิตไซลิทอลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส วัดปริมาณไซลิทอลได้เท่ากับ 82.8 กรัมต่อลิตร และคิดเป็นค่า Yp/s เท่ากับ 0.83 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส ในวันที่ 11 เช่นเดียวกัน



ภาพที่ 17 การเจริญ ปริมาณไซโลส และปริมาณไซลิทอล ของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว basal medium ปริมาตร 1 ลิตร ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร (Biostat B) ที่มีเมทานอล 1.5% (โดยปริมาตร) ไซโลส 100 กรัมต่อลิตร casamino acids 5 กรัมต่อลิตร และ $MgSO_4$. $7H_2O$ 0.5 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 ควบคุมอัตราการให้อากาศที่ 1.75 vvm อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

การเจริญ (◊) ไซโลส (□) ไซลิทอล (△)

มีรายงานว่า อุณหภูมิที่สูงเกินไปส่งผลให้การผลิตไซลิทอลลดลง โดย Slininger *et al.* (1987) อธิบายว่า อาจเกิดจากการที่เอนไซม์ xylose reductase สูญเสียกิจกรรมที่อุณหภูมิสูง ซึ่งอุณหภูมิที่ส่งผลกระทบต่อการผลิตนี้มีค่าแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์ โดย Barbosa *et al.* (1988) รายงานว่า การผลิตไซลิทอลโดย *Candida guilliermondii* FTI 20037 จะลดลงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ de Silva and Afschar (1994) พบว่า ค่าผลได้ (Yp/s) ของไซลิทอล

โดย *Candida tropicalis* DSM 7524 มีค่าลดลงอย่างชัดเจน เมื่อใช้อุณหภูมิที่สูงกว่า 37 องศาเซลเซียส ในขณะที่การใช้อุณหภูมิที่อยู่ในช่วง 30-37 องศาเซลเซียส ไม่ส่งผลกระทบต่อการผลิต

จากผลการทดลองพบว่า เมทิลโลโทรฟิกยีสต์รหัส N22 เป็นยีสต์ทนอุณหภูมิสูงที่สามารถผลิตไซลิทอลได้ดีที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งคุณสมบัติที่สามารถผลิตไซลิทอลได้ที่อุณหภูมิสูงนั้นถือเป็นผลดีต่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากไม่จำเป็นต้องใช้ระบบหล่อเย็นที่มีประสิทธิภาพมากนัก จึงช่วยลดต้นทุนการผลิตได้ อีกทั้งยังช่วยป้องกันการผลิตหยุดชะงักเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น นอกจากนี้การผลิตไซลิทอลโดยเพาะเลี้ยงยีสต์ที่อุณหภูมิสูงอาจช่วยลดโอกาสการปนเปื้อนได้อีกด้วย