

## สรุป

การแยกเมทิลโลโทรฟิเคียส์ที่สามารถใช้เมทานอลเพื่อการเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากตัวอย่างที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติจำนวน 71 ตัวอย่าง ได้เมทิลโลโทรฟิเคียส์จำนวน 38 ไอโซเลท โดยมียีสต์จำนวน 24 ไอโซเลทที่เจริญได้ในอาหารเหลว 1% methanol ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (คือ เมทิลโลโทรฟิเคียส์รหัส N13, N18, K50, N20, N21, N22, A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, B1, B2, B3, B4, C1, C2, C3, C4, C5, P2 และ P3) ซึ่งเมื่อนำยีสต์ทั้ง 24 ไอโซเลทมาทดสอบการเจริญในอาหารเหลว 1% methanol ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่ายีสต์จำนวน 10 ไอโซเลทสามารถเจริญได้ คือยีสต์รหัส N13, N18, N20, N22, C1, C2, C3, C4, C5 และ P3 และในจำนวนนี้มีเพียงยีสต์รหัส N13, N18, N20 และ N22 เท่านั้นที่เจริญได้ดี โดยเมื่อศึกษาการเจริญที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่ายีสต์รหัส N13 และ N22 จัดเป็นเมทิลโลโทรฟิเคียส์ทนอุณหภูมิสูง ขณะที่ N18 และ N20 เป็นเมทิลโลโทรฟิเคียส์ชอบอุณหภูมิต่ำ

นำเมทิลโลโทรฟิเคียส์ที่สามารถเจริญได้ในอาหารเหลว 1% methanol ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งแยกจากธรรมชาติจำนวน 24 ไอโซเลท และได้รับจาก รศ.ดร.สาวิตรี ลิ้มทองจำนวน 39 ไอโซเลท รวมเป็น 63 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการผลิตไซลิทอลจากไซโลส โดยเฉพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลว basal medium ปริมาตร 5 มล. ที่มีไซโลสเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร และเมทานอลเข้มข้น 2% (โดยปริมาตร) ในหลอดทดลองขนาด 16.5 x 165 มม. ปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นคิดเป็นน้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.24 กรัมต่อลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบรีซิโพรคัลที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน แล้วตรวจสอบการผลิตไซลิทอล พบว่ามีเมทิลโลโทรฟิเคียส์จำนวน 7 ไอโซเลทที่สามารถผลิตไซลิทอลได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คือยีสต์รหัส N13, N18, N20, N22, FS96, C2 และ FS66 และมียีสต์จำนวน 5 ไอโซเลทเท่านั้น คือยีสต์รหัส N13, N18, N20, N22 และ FS96 ที่สามารถผลิตไซลิทอลได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิเคียส์ที่สามารถผลิตไซลิทอลได้ดีที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส ได้ทำการเพาะเลี้ยงเมทิลโลโทรฟิเคียส์รหัส N13, N18, N20, N22 และ FS96 ในอาหารเหลว basal medium ปริมาตร 50 มล. ในฟลาस्कขนาด 250 มล. ที่มีไซโลสเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร และเมทานอลเข้มข้น 1% (โดยปริมาตร) ให้มีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นคิดเป็น

น้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.24 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที แล้ววิเคราะห์ปริมาณไซลิทอลทุกวันเป็นระยะเวลา 8 วัน พบว่าเมทิลโลโทรฟิเคียสตร์รหัส N22 และ FS96 ผลิตไซลิทอลได้ดี มีปริมาณการผลิตที่ใกล้เคียงกัน คือ 4.7 และ 5.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แต่ยีสต์รหัส N22 ผลิตไซลิทอลได้มากกว่ายีสต์รหัส FS96 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยผลิตไซลิทอลได้เท่ากับ 4.1 และ 2.1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังนั้นจึงได้เลือกเมทิลโลโทรฟิเคียสตร์รหัส N22 ไว้ศึกษาการผลิตไซลิทอลต่อไป

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอลโดยเมทิลโลโทรฟิเคียสตร์รหัส N22 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเฉพาะเชื้อลงในอาหารเหลว basal medium ปริมาตร 100 มล. ในพลาสติกขนาด 250 มล. ให้มีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นคิดเป็นน้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.24 กรัมต่อลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไซลิทอล คือ อาหารเหลว basal medium ที่มีเมทานอล 1.5% (โดยปริมาตร) ไชโลส 100 กรัมต่อลิตร casamino acids 5 กรัมต่อลิตร และ  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 กรัมต่อลิตร ที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 โดยสภาวะดังกล่าวเมทิลโลโทรฟิเคียสตร์รหัส N22 สามารถผลิตไซลิทอลได้เท่ากับ 52.3 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง คิดเป็นค่า Yp/s หรือผลได้ของไซลิทอลเท่ากับ 0.54 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไชโลส ส่วนการศึกษาอิทธิพลของอัตราการให้อากาศต่อผลผลิตไซลิทอล ได้ทำการศึกษาโดยใช้ถังหมัก Biostat B ขนาด 2.5 ลิตร ที่มีอาหารเหลว basal medium ปริมาตร 1 ลิตร โดยส่วนประกอบของอาหารและพีเอชเริ่มต้นเป็นไปตามสภาวะที่เหมาะสมจากการผลิตในพลาสติก พบว่า อัตราการให้อากาศที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตไซลิทอลคือ 1.75 vvm (ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารในถังหมักต่อนาที) โดยผลิตไซลิทอลได้มากที่สุดเท่ากับ 82.8 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง คิดเป็นค่า Yp/s หรือผลได้ของไซลิทอลเท่ากับ 0.83 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไชโลส แสดงว่า เมทิลโลโทรฟิเคียสตร์รหัส N22 ผลิตไซลิทอลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ได้เพิ่มขึ้น 16.6 เท่า เมื่อเทียบกับการผลิตก่อนใช้สภาวะการผลิตที่เหมาะสม เมื่อเพิ่มอุณหภูมิการเพาะเลี้ยงเป็น 40 องศาเซลเซียส โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่า เมทิลโลโทรฟิเคียสตร์รหัส N22 สามารถผลิตไซลิทอลที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสได้ต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเพียงเล็กน้อย โดยผลิตไซลิทอลได้เท่ากับ 80.8 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยงคิดเป็นค่า Yp/s หรือผลได้ของไซลิทอลเท่ากับ 0.81 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไชโลส