Abstract

Project Code : IUG5080014

Project Title : Screening of yeast and bacteria capable to produce xylitol from glucose

Investigator : Watanalai Panbangred[a], Piyalak Yaowdam[b], Pronthip Thongkham[b] Takashi Masuda[b]

[a] Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

[b] Ueno Fine Chemicals Industry (Thailand), Ltd., Samutprakan, Thailand

E-mail Address : scwpb@mahidol.ac.th, p_yaowdam@yahoo.com, pt.thongkham@yahoo.com, masuda@ueno-fc.co.th

Project Period : April, 2008 – September, 2010

Abstract

This research project is aimed to screen for yeast and bacteria capable to produce xylitol and/or D-arabitol from glucose. Thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) were used for preliminary screening and determination of sugar alcohol produced by selected microbes.

From TLC screening, 574 and 999 out of 4,671 and 9,664 bacterial and yeast isolates, respectively were putatively xylitol and/or D-arabitol producers. The isolates positive by TLC screening were selected for further analysis of sugar alcohol accumulated in culture broth by HPLC. Eighteen and five out of 187 bacterial isolates produced xylitol and D-arabitol at low yield at 0.006-0.12% and 0.004-0.04%, respectively. Whereas 112, 194 and 64 out of 857 yeast isolates were xylitol, D-arabitol or both sugar alcohol producers, respectively. Xylitol and D-arabitol yield of 0.071-0.344% and 0.542 - 1.464% were produced and accumulated in culture broth, among 50 and 27 selected yeast isolates, respectively. Pentitol dehydrogenase and hexose reductase activities were assayed and their activities did not correlate with sugar alcohol accumulation.

Xylitol production from glucose in 6 selected yeast strains (BK32-10-20, SB27-09-13, SS26-09-08, NR23-09-32, SS26-09-29 and NR20-09-22) were cultured in limited aeration condition at 28, 30 and 32 ^{o}C. It was found that the first 5 isolates produced xylitol at 0.2-0.87% whereas xylitol accumulation was drastically reduced or absent if they were cultured in the medium containing 5% glucose and 5% glycerol. NR20-09-22 produced only D-arabitol at 28 and 30 ^{o}C in medium containing glucose and mixture of glucose and glycerol, respectively. All 6 selected yeast strains efficiently converted 50% xylose in the medium containing 1% glucose to xylitol at the yield of 26.7-47.6% (w/v). Identification of NR20-09-22 and NR20-09-21 which are xylitol and D-arabitol producers, respectively suggested that they were *C. tropicalis*. Another yeast isolate, BK32-10-20 (xylitol producer) was identified as *Kodamaea ohmeri*. From the above study, it is suggested that optimization of culture condition and their substrates might lead to increasing xylitol and/or D-arabitol production from either glucose, xylose and their mixture.

Keywords : xylitol, D-arabitol, yeast, bacteria, glucose

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : IUG5080014

ชื่อโครงการ : การคัดเลือกหาเชื้อยีสต์และเชื้อแบคทีเรียที่ผลิต xylitol จาก glucose

ชื่อนักวิจัยและสถาบัน : วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด[a], ปิยะลักษณ์ เยาดำ[b], พรทิพย์ ทองคำ[b] และ Takashi Masuda[b]

[a] ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร

[b] Ueno Fine Chemicals Industry (Thailand), Ltd., นิคมอุสาหกรรมบางปู สมุทรปราการ

E-mail Address : scwpb@mahidol.ac.th,p_ yaowdam@yahoo.com, pt.thongkham@yahoo.com, masuda@ueno-fc.co.th

Project Period : เมษายน 2551 – กันยายน 2553

บทคัดย่อ

ได้ใช้วิธี Thin layer chromatography (TLC) และ High performance liquid chromatography (HPLC) ในการวิจัยที่มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกหาเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ที่ผลิต sugar alcohol ชนิด xylitol และ D-arabitol จากน้ำตาล glucose โดยที่ TLC ใช้เป็นวิธีการคัดเลือกเบื้องต้นขณะที่วิธี HPLC ใช้ในการหาปริมาณ sugar alcohol ที่เชื้อสร้างขึ้นและสะสมใน culture broth

จากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ 4,671 และ 9,664 สายพันธุ์ พบว่าจำนวน 574 และ 999 สายพันธุ์ตามลำดับให้ผลบวกโดยวิธี TLC จากนั้นได้คัดเลือกเชื้อที่ให้ผลบวกโดย TLC ไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล D-arabitol และ xylitol โดยวิธี HPLC ผลการวิเคราะห์พบว่าเมื่อนำเชื้อแบคทีเรีย 187 สายพันธุ์ไปเลี้ยงในอาหารที่มี glucose 3% พบว่าจำนวน 18 สายพันธุ์ผลิต xylitol อย่างเดียวในระดับต่ำ (0.006-0.12%) และ 5 สายพันธุ์ผลิต D-arabitol ได้เล็กน้อย (0.004-0.047%) ขณะที่เมื่อนำสายพันธุ์ยีสต์ 857 สายพันธุ์มาเลี้ยงในอาหารที่มี glucose 10% พบว่า 112, 194 และ 64 สายพันธุ์ ผลิต xylitol, D-arabitol และน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดตามลำดับ โดยที่ยีสต์ 50 สายพันธุ์ผลิต xylitol จาก glucose (10%) ได้ปริมาณสูงสุดในช่วง 0.071-0.344% และมี 27 สายพันธุ์ที่ผลิต D-arabitol ได้ปริมาณสูงสุดในช่วง 0.542-1.464% ได้เปรียบเทียบการวัดกิจกรรมเอนไซม์ pentitol dehydrogenase และ hexose reductase โดยการวัดค่าความเปลี่ยนแปลงของ NADH เพื่อเปรียบกับปริมาณ xylitol ที่

เชื้อผลิตโดยวิธี HPLC พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่วัดได้และปริมาณน้ำตาลที่เชื้อผลิตไม่มีความสัมพันธ์ต่อกัน

ในการหาสภาะที่เหมาะสมในการผลิต xylitol จาก glucose 10% ในยีสต์ 6 สายพันธุ์ ได้แก่ BK32-10-20, SB27-09-13, SS26-09-08, NR23-09-32, SS26-09-29 และ NR20-09-22 โดยเลี้ยงในสภาวะที่มี limited aeration ที่ 28, 30 และ 32 °C พบว่า 5 สายพันธุ์แรกผลิต xylitol ที่ 0.2-0.87% ขณะที่หากเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์นี้ในอาหารที่มี glucose และ glycerol อย่างละ 5% เชื้อจะผลิต xylitol ได้น้อยลงหรือไม่ผลิตเลย ยีสต์สายพันธุ์ NR20-09-22 จะผลิต D-arabitol ที่ 28 และ 30 °C ในอาหารที่มี glucose หรือ glucose + glycerol เมื่อเลี้ยงยีสต์ทั้ง 6 สายพันธุ์ในอาหารที่มี xylose 50% + glucose 1% พบว่าเชื้อสามารถผลิต xylitol ได้ 26.7-47.6% (w/v) จากการบ่งชี้ชนิดของยีสต์ 3 สายพันธุ์พบว่า NR20-09-22 และ NR20-09-21 ซึ่งผลิต xylitol และ D-arabitol ในปริมาณสูงตามลำดับเป็นเชื้อ *C. tropicalis* ขณะที่ BK32-10-20 ซึ่งผลิต xylitol ปริมาณสูงเป็นเชื้อ *Kodamaea ohmeri* จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าหากมีการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อน่าจะสามารถเพิ่มปริมาณการสร้าง xylitol หรือ D-arabitol จากน้ำตาล glucose, xylose หรือส่วนผสมของน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดได้

Keywords : xylitol, D-arabitol, yeast, bacteria, glucose