คีรีน โฆ : การผลิตกรดซักซินิกจากแป้งมันสำปะหลังโดยการทำให้เป็นน้ำตาลควบคู่กับกาหมักด้วยเชื้อเอสเชอริเชียโคไลที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรม (SUCCINIC ACID PRODUCTION FROM CASSAVA STARCH BY SIMULTANEOUS SACCHARIFICATION AND FERMENTATION BY METABOLICALLY ENGINEERED *ESCHERICHIA COLI*.) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เขมวิทย์ จันต๊ะมา, 96 หน้า.

แป้งมันสำปะหลังถูกนำมาประเมินการผลิตกรดซักซินิกด้วย การทำให้เป็นน้ำตาลควบคู่กับการหมัก (simultaneous saccharification and fermentation; SSF) ด้วยเชื้อเอสเชอริเชียโคไล สายพันธุ์ KJ122 ที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมแล้ว โดยเชื้ออีโคไลสายพันธุ์ KJ122 ที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อปรับปรุงการผลิตกรดซักซินิกด้วยการกำจัดยีนบางยีนบางยีนออกไป (*ldhA adhE ackA* (*focA-pflB*) *mgsA poxB tdcDE citF aspC sfcA*) เชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวนี้สามารถผลิตกรดซักซินิกในระดับผลผลิตที่ดีเยี่ยม (0.96 กรัมต่อกรัมกลูโคส) ความเข้มข้น และอัตราผลิตผลที่สูงในอาหารเลี้ยงเชื้อเกลือแร่ที่มีกลูโคสภายใต้สภาวะการหมักแบบกะแบบไร้ออกซิเจน อย่างไรก็ตามเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวไม่สามารถใช้แป้งได้อย่างมีประสิทธิภาพได้เนื่องจากการยับยั้งกระบวนการสลาย ด้วยเหตุนี้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสถูกนำมาใช้เพื่อปลดปล่อยน้ำตาลจากแป้งมันสำปะหลัง ผลกระทบของอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง ความเข้มข้นของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น และความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังต่อการผลิตกรดซักซินิกถูกนำมาศึกษา การหมักถูกทดสอบด้วยการทำให้เป็นน้ำตาลควบคู่กับการหมัก (SSF) แบบกะในขวดเลี้ยงเชื้อขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ 350 มิลลิลิตร และดำเนินการที่ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 อุณหภูมิ 37, 39, 41 และ 43 องศาเซลเซียส, ความเข้มข้นของแป้งสำปะหลังที่ 70, 90, 110, 130 และ 150 กรัมต่อลิตร, ความเข้มข้นของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ 300, 500, 700, 900, 1,100 และ 1,300 ยูนิตต่อกรัมแป้งมันสำปะหลัง, ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นถูกทดสอบที่ 0.1, 0.2, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2 และ 1.5 OD_{550}

ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมคือ ค่าความเป็นกรดด่างที่ 6.5 อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 70 กรัมต่อลิตร ปริมาณหัวเชื้อที่ 0.6 OD_{550} และ 500 ยูนิตของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่อกรัมแป้งมันสำปะหลัง กรดซักซินิกที่ความเข้มข้น 70.08±0.12 กรัมต่อลิตรถูกผลิตขึ้นหลังจาก 72 ชั่วโมงของการหมักในกระบวนการทำให้เป็นน้ำตาลควบคู่กับการหมัก (SSF) โดยผลผลิตเท่ากับ 1.01±0.013 กรัมต่อกรัมแป้งมันสำปะหลังที่ถูกใช้ไป ซึ่งเทียบได้เท่ากับ 0.91±0.013 กรัมต่อกรัมกลูโคสที่ถูกใช้ไป และผลิตผลเท่ากับ 0.97±0.001 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ดังนั้นผลผลิตที่ได้เป็นจริงตามผลผลิตทางทฤษฎีซึ่งเท่ากับร้อยละ 81.25 ความเข้มข้นของกรดซัก

ซินิกถูกผลิตขึ้นที่ความเข้มข้นสูงขึ้นที่ 82.46±0.51 กรัมต่อลิตร ผลผลิตที่ 1.03±0.010 กรัมต่อกรัมแป้งมันสำปะหลังที่ถูกใช้ไปซึ่งเทียบได้เท่ากับ 1.00±0.010 กรัมต่อกรัมกลูโคสที่ถูกใช้ไปและผลิตผลที่1.15±0.008 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงถูกผลิตหลังจาก 72 ชั่วโมงในกระบวนการทำให้เป็นน้ำตาลควบคู่กับการหมัก (SSF) แบบกึ่งกะจากผลการทดลองพบว่ากระบวนการทำให้เป็นน้ำตาลควบคู่กับการหมัก (SSF) แบบกึ่งกะสามารถเพิ่มความเข้มข้น ผลผลิต และผลิตผลของกรดซักซินิกได้ถึงร้อยละ 17.67, 2.0 และ 18.56 ภายใต้สภาวะในกระบวนการทำให้เป็นน้ำตาลควบคู่กับการหมัก (SSF) ผลผลิตที่ได้เป็นจริงตามผลผลิตทางทฤษฎีซึ่งเท่ากับร้อยละ 89.3 ตามลำดับ ดังนั้นแป้งมันสำปะหลังจึงเป็นวัตถุดิบทางเลือกสำหรับการผลิตกรดซักซินิกที่มีประสิทธิภาพโดยใช้เชื้ออีโคไลสายพันธุ์ KJ122 ที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมแล้ว

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2557 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

KIRIN KHOR : SUCCINIC ACID PRODUCTION FROM CASSAVA STARCH BY SIMULTANEOUS SACCHARIFICATION AND FERMENTATION BY METABOLICALLY ENGINEERED *ESCHERICHIA COLI.* THESIS ADVISOR: ASST. PROF. KAEMWICH JANTAMA, Ph.D., 96 PP.

SUCCINIC ACID/*E. COLI*/CASSAVA STARCH/SIMULTANEOUS SACCHARIFICATION AND FERMENTATIO

Succinic acid production by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) or cassava starch using engineered *Escherichia coli* KJ122 strain was evaluated. The *E. coli* KJ122 was engineered to improve succinic acid production by elimination of some genes (Δ*ldhA* Δ*adhE* Δ*ackA* Δ*(focA-pflB)* Δ*mgsA* Δ*poxB* Δ*tdcDE* Δ*citF* Δ*aspC* Δ*sfcA*). It produced excellent succinate yield (0.96 g/g glucose), high titer and productivity in mineral salts medium containing glucose under simple-batch anaerobic conditions. However, this strain does not efficiently utilize starch due to catabolic repression, thus glucoamylase was used to release sugar from cassava starch. The effects of temperature, pH, glucoamylase load, inoculum size and cassava starch concentration on succinic acid production were investigated. The fermentation was performed by batch SSF process in a 500 mL vessel with 350 mL working volume. The processes were carried out with pH of the medium adjusted to 5.5, 6.0, 6.5 and 7.0; temperature at 37, 39, 41 and 43^{o}C; different cassava starch concentrations of 70, 90, 110, 130 and 150 g/L; various enzyme loading of 300, 500, 700, 900, 1100 and 1300 U/g-cassava starch. An initial biomass concentration was

provided at the different value of 0.1, 0.2, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2 and 1.5 OD_{550}.

Under the optimum conditions (pH 6.5, 41^{o}C, 70 g/L of cassava starch concentration, 0.6 OD_{550} cell density, and 500 U/g-cassava starch of glucoamylase), 70.08±0.12 g/L of succinic acid was produced after 72 h of fermentation in SSF process, with a yield of 1.01±0.013 g/g cassava starch which was equivalent to 0.91±0.013 g/g glucose consumed and productivity of 0.97±0.001 g/L/h. Therefore, the theoretical yield of 81.25% was achieved. A higher succinic acid concentration of 82.46±0.51 g/L, with a yield of 1.03±0.010 g/g cassava starch which was equivalent to 1.00±0.010 g/g glucose consumed and productivity of 1.15±0.008 g/L/h was produced after 72 h in fed-batch SSF. The result showed that the fed-batch SSF procedure was able to increase succinate concentration, yield and productivity considerably by about 17.67%, 2.00% and 18.56%, respectively. Under fed-batch SSF condition, 89.30% of the theoretical yield was achieved. Therefore, cassava starch would be an alternative raw material for an efficient production of succinic acid by engineered *E. coli* KJ122.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biotechnology

Academic Year 2014

Student's Signature_____

Advisor's Signature_____

Co-advisor's Signature_____