สิธา จัน : การหาสภาวะที่เหมาะสมและการเพิ่มขนาดกระบวนการผลิต 2,3 บิวเทนไดออล จากมอลโตเดกซ์ทรินด้วย *Klebsiella oxytoca* KMS005 ที่ดัดแปลงวิถีการสร้างและสลาย (OPTIMIZATION AND SCALE-UP PRODUCTION PROCESS OF 2,3-BUTANEDIOL FROM MALTODEXTRIN BY METABOLICALLY ENGINEERED *KLEBSIELLA OXYTOCA* KMS005) อาจารย์ที่ปรึกษาที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี : รองศาสตราจารย์ ดร.เขมวิทย์ จันต๊ะมา, อาจารย์ที่ปรึกษาที่ INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE : PROF. DR. PATRICIA TAILLANDIER, 168 หน้า.

การหาวิธีการที่เหมาะสมด้วยการใช้วัตถุดิบราคาถูกและมีอยู่ล้นเหลือ ได้ถูกพิจารณาให้เป็นหนึ่งในปัจจัยที่มีผลต่อมูลค่าทางการค้าของการผลิต 2,3 บิวเทนไดออล การหาระดับที่เหมาะสม ของค่าความเป็นกรด-ด่าง อัตราการให้อากาศ ความเร็วในการกวน และความเข้มข้นของวัตถุดิบ (มอลโตเดกซ์ทริน) ได้ถูกนำมาหาสภาวะที่เหมาะสมในการหมัก 2,3 บิวเทนไดออล จากมอลโตเดกซ์ทรินด้วย *Klebsiella oxytoca* KMS005 ที่ดัดแปลงวิถีการสร้างและสลาย โดยใช้วิธีการแบบดั้งเดิมและวิธีการพื้นผิวตอบสนอง (RSM) แบบ Box-Behnken จากผลการทดลองพบว่าการใช้ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 อัตราการให้อากาศที่ 0.8 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที การกวนที่ 400 รอบต่อนาที และใช้ความเข้มข้นของมอลโตเดกซ์ทรินที่ 150 กรัมต่อลิตร ตามลำดับเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุด ส่วนผลจาก RSM ชี้ให้เห็นว่า ความเร็วในการกวนเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลมากที่สุดในการผลิต 2,3 บิวเทนไดออล เมื่ออัตราในการกวนและอัตราการให้อากาศเป็นอันตรกิริยาระหว่างกัน หรืออัตราการกวนและความเข้มข้นของวัตถุดิบเป็นอันตรกิริยาระหว่างกัน ทั้งนี้ความเร็ว ในการกวนเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในการผลิต 2,3 บิวเทนไดออล และภายใต้สภาวะการหมักแบบกึ่งกะ ความเข้มข้นของ 2,3 บิวเทนไดออล ค่าผลผลิตและค่าอัตราการผลิต ในระยะเวลา 78 ชั่วโมงของการหมัก มีค่าเท่ากับ 88.1±0.2 กรัมต่อลิตร 0.412±0.001 กรัมของ 2,3 บิวเทนไดออลต่อกรัมของน้ำตาลที่เติมลงไปทั้งหมด และ 1.13±0.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนั้นยังศึกษาอิทธิพลของสภาวะการหมักแบบให้อากาศเล็กน้อยต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการผลิต 2,3 บิวเทนไดออลด้วย โดยการหมักแบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพได้ทำการทดสอบผลของอัตราการไหลอากาศ และอัตราการกวนผ่านการตรวจวัดค่า k_La ซึ่งพบว่าปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์และการผลิต 2,3 บิวเทนไดออล คือ 9.5 กรัม ซึ่งสอดคล้องกับค่า k_La ที่ 25.2 ต่อชั่วโมง ส่วนกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ ได้ทำการทดสอบอัตราการเติมน้ำตาลกลูโคสที่แตกต่างกัน พบว่าการหมักแบบกะที่เริ่มเติมน้ำตาลกลูโคสด้วยอัตรา 2 กรัมต่อชั่วโมง ในช่วงสุดท้ายของการเจริญของจุลินทรีย์ ภายในเวลา 48 ชั่วโมง ตามด้วยการเติม

น้ำตาลกลูโคสในช่วงสุดท้ายของการหมักแบบกะที่ 40 ชั่วโมง ให้ผลเป็นที่น่าพอใจ ส่งผลให้ได้ 2,3 บิวเทนไดออล ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 74.7 กรัมต่อลิตร ให้ค่าอัตราการผลิตเท่ากับ 0.64 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง แต่ได้ผลผลิตพลอยได้เกิดขึ้นเล็กน้อย (ซักซิเนต อะซิเตท และเอทานอล ที่ความเข้มข้นรวมประมาณ 3 กรัมต่อลิตร)

ข้อมูลทั้งหมดที่ได้จากการศึกษาในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร ได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิต 2,3 บิวเทนไดออล ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีขนาดใหญ่ขึ้นเป็นลำดับจาก 10 ลิตร เป็น 90 และ 300 ลิตร โดยที่การทดลองหมักแบบกะจะควบคุมอัตราการให้อากาศไว้ที่ 0.8 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ซึ่งการใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 10 ลิตร ที่ควบคุมอัตราการกวนคงที่ที่ 295 รอบต่อนาที ได้ความเข้มข้นของ 2,3 บิวเทนไดออล และค่าผลผลิตเท่ากับ 53.8 กรัมต่อลิตร และ 0.40 กรัมของ 2,3 บิวเทนไดออลต่อกรัมของน้ำตาลที่เติมลงไปทั้งหมด ตามลำดับ ภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมงของการหมัก ส่วนการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 90 ลิตร ที่ควบคุมอัตราการกวนคงที่ที่ 130 รอบต่อนาที ได้ความเข้มข้นของ 2,3 บิวเทนไดออล เท่ากับ 52.53 กรัมต่อลิตร และได้ค่าผลผลิตที่ 0.43 กรัมของ 2,3 บิวเทนไดออลต่อกรัมของน้ำตาลที่ถูกใช้ไป ภายในเวลา 72 ชั่วโมงของการหมัก ทั้งนี้พบว่าช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเตรียมกล้าเชื้อในระหว่างหมักด้วยถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 90 ลิตร คือบ่มเพาะกล้าเชื้อเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ในช่วงระยะการเจริญ ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสง (OD_{550}) ประมาณ 4 ก่อนที่จะใช้ถ่ายกล้าเชื้อลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ สำหรับการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพระดับโรงงานต้นแบบขนาด 300 ลิตร ที่ควบคุมแรงกวนให้คงที่ที่ 70 รอบต่อนาที สามารถผลิต 2,3 บิวเทนไดออลได้ 45.02 กรัมต่อลิตร และให้ค่าผลผลิตเท่ากับ 0.43 กรัมของ 2,3 บิวเทนไดออลต่อกรัมของน้ำตาลที่ถูกใช้ไป หลังจากการหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2559

ลายมือชื่อนักศึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา (at SUT)_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา (at INPT)_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม (at SUT)_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม (at INPT)_____

SITHA CHAN : OPTIMIZATION AND SCALE-UP PRODUCTION PROCESS OF 2,3-BUTANEDIOL FROM MALTODEXTRIN BY METABOLICALLY ENGINEERED *KLEBSIELLA OXYTOCA* KMS005. THESIS ADVISOR AT SURANAREE UNIVERSITY OF TECHNOLOGY : ASSOC. PROF. KAEMWICH JANTAMA, Ph.D., THESIS ADVISOR AT INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE : PROF. PATRICIA TAILLANDIER, Ph.D., 168 PP.

OPTIMIZATION/SCALE-UP/MALTODEXTRIN/*KLEBSIELLA OXYTOCA* KMS005

An optimization process with a cheap and abundant substrate is considered one of the factors affecting the price of commercial 2,3-Butanediol (2,3-BD) production. The optimized levels of pH, aeration rate, agitation speed, and substrate concentration (maltodextrin) were optimized by a conventional method and Response Surface Methodology (RSM) with Box-Behnken design in which metabolically engineered *Klebsiella oxytoca* KMS005 utilized maltodextrin to produce 2,3-BD. Results revealed that pH, aeration rate, agitation speed, and maltodextrin concentration at levels of 6.0, 0.8 vvm, 400 rpm, and 150 g/L, respectively, were the optimal conditions. RSM indicated that the agitation speed was the most influential parameter when either agitation and aeration interaction or agitation and substrate concentration interaction played important roles for 2,3-BD production. Under interim fed-batch fermentation, 2,3-BD concentration, yield, and productivity were obtained at 88.1±0.2 g/L, 0.412±0.001 g/g sugar supplied, and 1.13±0.01 g/L/h, respectively, within 78 h. The influence of micro-aerobic conditions on microbial growth and 2,3-BD production was also studied. In batch bioreactors, air flow rate and agitation rate characterized through

k_La measurement were tested. The optimal amount of oxygen supply was evaluated at 9.5 g corresponding to a k_La of 25.2 h^{-1} for cell growth and 2,3-BD production. Then, a fed-batch process was investigated by different glucose feeding rate strategies. Fed-batch with a glucose feeding rate of 2 g/h starting at the end of the growth phase during 48 h, followed by a final batch phase of 40 h was found satisfactory. It resulted in a final 2,3-BD concentration of 74.7 g/L with a productivity of 0.64 g/L/h but few by-products formed (about 3 g/L including succinate, acetate and ethanol).

Validated information in the 2 L bioreactor was further applied in a larger scale production of 2,3-BD with series of bioreactors from 10, 90 and 300 L vessels. Batch experiments were conducted based on various agitation speeds with the fixed aeration rate at 0.8 vvm. As a result, 2,3-BD concentration, and yield were achieved at 53.8 g/L, and 0.40 g/g sugar supplied within 48 h, respectively, under the constant tip speed at 295 rpm using a 10 L vessel. Its concentration of 52.53 g/L and yield of 0.43 g/g sugar consumed within 72 h were attained under the condition of the constant tip speed at 130 rpm using a 90 L fermenter. An appropriate seed inoculum condition was found with an optical cell density (OD_{550}) around 4 at the log phase (12 h incubation) prior to transferring of the inoculum into the 90 L fermenter. Under the constant tip speed at 70 rpm, 2,3-BD concentration and yield were obtained at 45.02 g/L and 0.43 g/g sugar consumed in the pilot scale of 300 L bioreactor after 72 h incubation.

School of Biotechnology

Academic Year 2016

Student's Signature_____

Advisor's Signature (at SUT)_____

Advisor's Signature (at INPT)_____

Co-Advisor's Signature (at SUT)_____

Co-Advisor's Signature (at INPT)_____