โสคา โคริ่ : การผลิตกรดแลคติกชนิดดี (-) ที่มีประสิทธิภาพจากชานอ้อยในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่ายด้วยเชื้อ KLEBSIELLA OXYTOCA KIS004-91T (EFFICIENT PRODUCTION OF D-(-)-LACTIC ACID FROM SUGARCANE BAGASSE IN MINERAL SALTS MEDIUM BY METABOLICALLY ENGINEERED KLEBSIELLA OXYTOCA KIS004-91T) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. เขมวิทย์ จันต๊ะมา, 120 หน้า.

งานวิจัยนี้ศึกษาการผลิตกรดแลคติกชนิดดี (-) ที่มีประสิทธิภาพจากชานอ้อย ในขั้นตอนการปรับสภาพนั้นสารละลายเจือจางโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ความเข้มข้น 3%, อัตราส่วนของแข็งต่อของเหลวคือ 1 ต่อ 9.1 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง) ถูกใช้เพื่อปรับเปลี่ยนโครงสร้างแบบเมทริกซ์ของชานอ้อย ซึ่งประสิทธิภาพของขั้นตอนนี้แสดงได้จากการแสดงถึงการเอากลับคืนของของแข็งที่ต่ำของชานอ้อย และการเข้าถึงเซลลูโลสในกากชานอ้อยที่สูงขึ้น ของเอนไซม์เซลลูเลสคอมเพล็กซ์ปริมาณเซลลูเลสคอมเพล็กซ์อยู่ในช่วง 5 ถึง 30 ยูนิต ต่อกรัมของชานอ้อยที่ถูกปรับสภาพแล้ว โดยการย่อยนี้ทำในขวดรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตร ที่ 50 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที จากผลการทดลอง พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ที่ 25 ยูนิตต่อกรัมชานอ้อยส่งผลให้ได้ปริมาณน้ำตาลสูงกว่าการใช้เอนไซม์ที่ต่ำกว่า 25 ยูนิต ในอัตราที่ใกล้เคียงกัน โดยที่ปริมาณเอนไซน์นี้ค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาก่อนหน้านี้

นอกจากนี้เชื้อ *Klebsiella oxytoca* KIS004-91T ถูกนำมาใช้เพื่อเปลี่ยนน้ำตาลที่ย่อยได้เป็นกรดแลคติกชนิดดี (-) โดยกระบวนการการหมักหลังการย่อย (SHF) และกระบวนการหมักระหว่างการย่อย (SSF) ถูกดำเนินการในถังหมักขนาด 5 ลิตร กรดแลคติกชนิดดี (-) ที่ความเข้มข้น 53.5±3.0 กรัมต่อลิตร ถูกผลิตในระหว่างกระบวนการ SHF แบบกะ สำหรับการใช้ชานอ้อยที่ปรับสภาพแล้วด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ประมาณ 150 กรัมต่อลิตร โดยมีผลผลิตของการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดแลคติก ชนิดดี (-) คิดเป็นร้อยละ 95 และ 36 ซึ่งคำนวณจากน้ำตาลที่ถูกใช้ และปริมาณของชานอ้อยที่ปรับสภาพแล้ว ตามลำดับ อย่างไรก็ตามกระบวนการ SSF แบบกะไม่ได้ช่วยปรับปรุงการผลิตกรดแลคติกชนิดดี (-) ของเชื้อสายพันธุ์นี้ ดังนั้นกระบวนการ SHF แบบกึ่งกะถูกนำมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดแลคติกชนิดดี (-) จากการใช้ชานอ้อยที่ถูกปรับสภาพแล้วในปริมาณที่สูงขึ้น ส่งผลให้ได้กรดแลคติกชนิดดี (-) ที่ความเข้มข้น 101.0±0.9 กรัมต่อลิตร จากการใช้ชานอ้อยที่ปรับสภาพแล้วในปริมาณรวม 250 กรัมต่อลิตร นอกเหนือจากนี้พบว่าผลผลิตของกรดแลคติกชนิดดี (-) มีค่าเพิ่มสูงขึ้นเป็นร้อยละ 99 และ 40.4 เทียบกับน้ำตาลที่ถูกใช้และปริมาณของชานอ้อยที่ปรับสภาพแล้ว ตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้นต้นทุนการผลิตของ

กรดแลคติกชนิดดี (-)โดยประมาณยังต่ำกว่าเมื่อเทียบกับการใช้น้ำตาลคุณภาพสูงเป็นแหล่งคาร์บอน จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มที่เป็นได้ในการผลิตกรดแลคติกชนิดดี (-) โดยใช้เชื้อ *K. oxytoca* KIS004-91T จากชานอ้อยที่ปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งเป็นหนึ่งในชีวมวลลิกโนเซลลูโลสที่ยั่งยืน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2562 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

SOKHA KORY : EFFICIENT PRODUCTION OF D-(-)-LACTIC ACID FROM SUGARCANE BAGASSE IN MINERAL SALTS MEDIUM BY METABOLICALLY ENGINEERED KLEBSIELLA OXYTOCA KIS004-91T. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. KAEMWICH JANTAMA, Ph.D., 120 PP.

D-(-)-LACTIC ACID/SUGARCANE BAGASSE/NaOH PRETREATMENT/ KLEBSIELLA OXYTOCA KIS004-91T

The efficient production of D-(-)-lactic acid from sugarcane bagasse (SCB) was investigated in this research. In the pretreatment step, a dilute NaOH solution (3% NaOH with a solid:liquid ratio at 1:9.1, incubated at 50°C for 4 h) was used to alter the matrix structure of SCB. The effectiveness of this step was indicated through the low recovery of SCB solid fraction and high accessibility of cellulase complex to the pretreated cellulose residues. Cellulase complex loading in the range of 5 to 30 U/g SCB for enzymatic digestion of the NaOH pretreated SCB was evaluated in 250 mL shaking flask at 50°C and 200 rpm. The result showed that 25 U/g SCB enzyme loading liberated higher sugars levels than those of lower enzymatic loadings with a comparable conversion rate. This loading quantity was quite low compared to those of previous studies.

Further, the mutant *Klebsiella oxytoca* KIS004-91T was used to convert liberated sugars to D-(-)-lactic acid. Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF) and Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) processes were subsequently performed in 5 L bioreactor. For 150 g/L of the pretreated SCB, D-(-)-lactic acid at the

concentration of 53.5±3.0 g/L was obtained during a batch SHF with the conversion yields of 95% and 36% calculated based on liberated sugars consumed and the NaOH pretreated SCB provided, respectively. However, the batch SSF process did not improve D-(-)-lactic acid production by the strain. Therefore, a fed-batch SHF was further investigated to gain more efficiency of D-(-)-lactic acid production from higher solid loading of the NaOH pretreated SCB. As a result, D-(-)-lactic acid at the level of 101.0±0.9 g/L was obtained from 250 g/L of the NaOH pretreated SCB loading. Additionally, D-(-)-lactic acid yields of up to 99% and 40.4% based on liberated sugars consumed and the NaOH pretreated SCB provided were improved. Also, the D-(-)-lactic acid's estimated production cost is lower compared to those produced by high grade sugars as a sole carbon source. These results illustrated a feasible promising of D-(-)-lactic acid production by *K. oxytoca* KIS004-91T from the NaOH pretreated SCB, which is one of the sustainable lignocellulosic biomasses.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biotechnology

Academic Year 2019

Student's Signature _____

Advisor's Signature _____