MAYTAWADEE SANGPROO : PRODUCTION OF D-(-)-LACTIC ACID BY METABOLICALLY ENGINEERED *KLEBSIELLA OXYTOCA* M5a1 IN MINIMAL SALTS MEDIUM. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. KAEMWICH JANTAMA, Ph.D., 122 PP.

D-(-)-LACTIC ACID/*KLEBSIELLA OXYTOCA* M5a1/ANAEROBIC CONDITION/ METABOLIC ENGINEERING

Klebsiella oxytoca M5a1 wild type strain was constructed to produce optically pure D-(-)-lactic acid by applying pH-controlled batch fermentation in mineral salts medium. The alcohol dehydrogenase gene, *adhE* and phospho transacetylase-acetate kinase A gene, *pta-ackA* were deleted from the wild type. The mutant strains were named as KMS002 (Δ*adhE*) and KMS004 (Δ*adhE* Δ*pta-ackA*), respectively. They exhibited D-(-)-lactic acid production as a primary pathway for the regeneration of NADH. Both strains produced D-(-)-lactic acid at concentrations of 11-13 g/L in the medium containing 20 g/L glucose with yields of 0.64-0.71 g/g glucose used. In sugarcane molasses, KMS002 and KMS004 produced D-(-)-lactic acid at concentrations of 22-24 g/L with yields of 0.80-0.87 g/g total sugars utilized. Both strains also utilized maltodextrin derived from cassava starch and produced D-(-)-lactic acid at concentrations of 33-34 g/L with yields of 0.91-0.92 g/g maltodextrin utilized. The optimal temperature at 40°C could produce D-(-)-lactic acid at concentrations of 36.28 ± 0.22 g/L with productivity of 0.38 g/L/h in 500 ml small anaerobic bottle within 72 h. For the effect of pH during fermentation, it was found that the highest D-(-)-lactic acid production was obtained with controlled pH at 6.5. In addition, the optimal initial cell concentration at OD_{550} on D-(-)-lactic

เมธาวดี แสงพรู : การผลิตกรดแลคติกชนิดดี(-) โดยเชื้อ *KLEBSIELLA OXYTOCA* M5a1 ที่ได้ผ่านการดัดแปลงวิถีการสล้างและสลายในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่าย (PRODUCTION OF D-(-)-LACTIC ACID BY METABOLICALLY ENGINEERED *KLEBSIELLA OXYTOCA* M5a1 IN MINIMAL SALTS MEDIUM) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เขมวิทย์ จันต๊ะมา, 122 หน้า.

เชื้อสายพันธุ์ *Klebsiella oxytoca* M5a1 ถูกนำมาใช้เป็นสายพันธุ์ตั้งต้น เพื่อผลิตกรดแลคติกชนิดดี(-) ในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่ายจากการหมักแบบกะ และควบคุมความเป็นกรดด่าง ยีน alcohol dehydrogenase (*adhE*) และ phospho transacetylase-acetate kinase A (*pta-ackA*) ถูกตัดออกจากเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น มิวแตนท์ที่ได้ถูกตั้งชื่อว่า KMS002 (Δ*adhE*) และ KMS004 (Δ*adhE* Δ*pta-ackA*) โดยพบว่าเชื้อสองสายพันธุ์มีการสร้างกรดแลคติกชนิดดี(-) เป็นวิถีหลักเพื่อรีเจนเนอเรชั่น NADH เชื้อมิวแตนท์ทั้งสองสายพันธุ์สามารถผลิตกรดดีแลคติกชนิดดี(-) ประมาณ 11-13 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เทียบเป็นผลได้ประมาณ 0.64-0.71 กรัมของกรดแลคติกชนิดดี(-) ต่อกรัมของกลูโคสที่ถูกใช้ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากน้ำตาลอ้อยเชื้อสายพันธุ์ KMS002 และ KMS004 สามารถผลิตกรดแลคติกชนิดดี(-) ได้ 22-24 กรัมต่อลิตรเทียบเป็นผลได้ประมาณ 0.80-0.87 กรัมของกรดแลคติกชนิดดี(-) ต่อกรัมของกากน้ำตาลอ้อยที่ถูกใช้ นอกจากนี้เชื้อทั้งสองสายพันธุ์ยังสามารถใช้มอลโตเด็กซ์ตริน ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง และผลิตกรดแลคติกชนิดดี(-) ได้ 33-34 กรัมต่อลิตร เทียบเป็นผลได้ประมาณ 0.91-0.92 กรัมของกรดแลคติกชนิดดี(-) ต่อกรัมของน้ำตาลมอลโทสที่ถูกใช้โดยเซลล์ อุณภูมิที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกชนิดดี(-) คือ 40 องศาเซลเซียส สามารถผลิตกรดแลคติกชนิดดี(-) ได้ 37.28 ± 0.22 กรัมต่อลิตร เทียบเป็นอัตราผลผลิตสูงสุดประมาณ 0.38 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนในขวดหมักขนาดปริมาตร 500 มิลลิลิตร ภายในเวลา 72 ชั่วโมง สำหรับผลกระทบของค่าความเป็นกรดด่างระหว่างการหมักพบว่า กรดแลคติกชนิดดี(-) สามารถผลิตได้สูงที่สุดเมื่อควบคุมค่าความเป็นกรดด่างที่ 6.5 นอกจากนี้ยังพบว่าค่าความขุ่นของเชื้อวัดที่ความยาวคลื่นแสง 550 นาโนเมตรเท่ากับ 0.5 มีความเหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกชนิดดี(-) และมีอัตราผลผลิตประมาณ 0.50 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากผลที่กล่าวมาข้างต้น เชื้อสายพันธุ์ KMS002 และ KMS004 จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่มีความเป็นไปได้ในการนำไปใช้ผลิตกรดแลคติกชนิดดี(-) ในระดับอุตสาหกรรม

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2555 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

production was found to be suitable at 0.5, of which productivity of 0.50 g/L/h was obtained. These results demonstrated that KMS002 and KMS004 would be another feasible choice for D-(-)-lactic acid production in an industrial scale.

School of Biotechnology Student's Signature_____

Academic Year 2012 Advisor's Signature_____