อภิชัย สาวิสิทธิ์ : การผลิตซักซิเนตจากกากมันและชานอ้อยด้วยเชื้อที่ผ่านวิศวกรรมเมแทบอลิซึมสายพันธุ์เอสเชอริเชีย โคไล KJ122 และเชื้ออนุพันธ์ (SUCCINATE PRODUCTION FROM CASSAVA PULP AND SUGARCANE BAGASSE BY METABOLICALLY ENGINEERED *ESCHERICHIA COLI* KJ122 AND ITS DERIVATIVES) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เขมวิทย์ จันต๊ะมา, 239 หน้า

เชื้อเอสเชอริเชีย โคไล KJ122 ถูกใช้สำหรับการผลิตซักซิเนตจากกากมันสำปะหลังและชานอ้อย เมื่อใช้กากมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ เชื้ออีโคไลสายพันธุ์ KJ122 สามารถใช้กากมันสำปะหลังได้อย่างมีประสิทธิภาพ และผลิตซักซิเนตความเข้มข้น 41.46±0.05 กรัมต่อลิตร ในระหว่างกระบวนการหมักที่การย่อยเป็นน้ำตาลและการหมักแยกจากกัน (SHF) ส่วนกระบวนการหมักแบบกะที่มีการย่อยเป็นน้ำตาลพร้อมกันกับการหมัก (SSF) ที่สภาวะเหมาะสมของการใช้กากมันสำปะหลังความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ (ร้อยละน้ำหนักต่อน้ำหนัก) ย่อยด้วยเอนไซม์ผสมระหว่างอะไมโลกลูโคซิเดส 2 เปอร์เซ็นต์ และเซลลูเลสเชิงซ้อน 3 เปอร์เซ็นต์ (ร้อยละปริมาตรต่อน้ำหนัก) ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.5 และอุณหภูมิที่ 39 องศาเซลเซียส สามารถผลิตซักซิเนตได้ 82.33±0.14 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้กระบวนการหมักแบบกึ่งกะโดยใช้กระบวนการหมักที่มีการย่อยเป็นน้ำตาลพร้อมกันกับการหมัก ผลิตซักซิเนตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเป็น 98.63±0.12 กรัมต่อลิตร

เชื้อกลายพันธุ์ได้ถูกคัดเลือกโดยการถ่ายเชื้ออย่างต่อเนื่องในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่าย AM1 ที่มีน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ร้อยละปริมาตรต่อน้ำหนัก) หลังจากถ่ายเชื้อ 16 ครั้งในอาหารที่มีน้ำตาลไซโลส เชื้อที่เกิดการปรับตัวให้สามารถใช้ไซโลสได้ดีที่สุดจะถูกคัดแยกแล้วตั้งชื่อเป็นอีโคไลสายพันธุ์ AS1600a ซึ่งเชื้ออีโคไลสายพันธุ์ AS1600a สามารถผลิตซักซิเนตจากน้ำตาลไซโลสได้ 84.26±1.37 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้เชื้อสายพันธุ์ AS1600a ยังให้ค่าอัตราการผลิต (0.96 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) ที่ได้จากการหมักน้ำตาลไซโลส 10 เปอร์เซ็นต์ (ร้อยละน้ำหนักต่อปริมาตร) ปรับปรุงจากเชื้อสายพันธุ์ KJ122 (0.31 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) ถึง 3 เท่า จากนั้นเชื้อสายพันธุ์ AS1600a ได้ถูกนำไปตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และพบว่าเชื้อดังกล่าวมีการกลายพันธุ์ในระบบนำเข้าน้ำตาลของโปรตีนกาแล็กโทสเพอมิเอส (GalP, G236D) ซึ่งการกลายพันธุ์ใน GalP นี้ ได้พิสูจน์แล้วว่าเกี่ยวข้องกับการปรับปรุงฟีโนไทป์ในการใช้น้ำตาลไซโลสของเชื้อกลายพันธุ์สายพันธุ์ AS1600a ทั้งนี้ยังพบว่ายีนทนต่อเฟอฟูรอล เช่น ยีนกลายพันธุ์ของ *fucO* (*fucO**) และ *puuP* เป็นประโยชน์ในการเพิ่มความสามารถในการทนต่อเฟอฟูรอลในเชื้ออีโคไลสายพันธุ์ AS1600a ซึ่งเชื้อที่มียีน *fucO** และ *puuP* ยีนใดยีนหนึ่ง สามารถสันดาปเฟอฟูรอลความเข้มข้น 20

มิลลิโมลาร์ ได้อย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 72 และ 96 ชั่วโมง และผลิตซักซิเนต 70.21±0.93 และ 67.18±2.13 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้นเชื้อดังกล่าวยังสามารถใช้น้ำตาลที่มีในไฮโดรไลเสตจากชานอ้อย (ปรับสภาพด้วยการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 9.0 และเติมเกลือไบซัลไฟต์) เพื่อผลิตซักซิเนตได้สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่ไม่มียีนทนต่อเฟอฟูรอลถึง 37 เปอร์เซ็นต์ (72.76±0.98 เทียบกับ 46.05±1.34 กรัมต่อลิตร) หลังจากนั้นเชื้ออนุพันธ์ของอีโคไล AS1600a ที่ทนต่อสารที่ไม่ใช่เฟอฟูรอล ได้ถูกคัดเลือกโดยการถ่ายเชื้ออย่างต่อเนื่องในไฮโดรไลเสตจากชานอ้อยที่ปรับสภาพด้วยการปรับค่ากรด-ด่างให้ได้ 6.3 ร่วมกับการใช้การระเหยสุญญากาศและการเติมเกลือไบซัลไฟต์ แล้วเสริมด้วยน้ำตาลไซโลส 5 เปอร์เซ็นต์ (ร้อยละน้ำหนักต่อปริมาตร) หลังจากการถ่ายเชื้อ 145 ครั้ง ก็ทำการคัดเลือกโคโลนีจากประชากรเชื้อระหว่างการถ่ายเชื้อ หนึ่งในโคโลนีเหล่านั้นเชื้อสายพันธุ์ AS2003 สามารถเจริญในอาหารที่มีไฮโดรไลเสตจากชานอ้อย 70 เปอร์เซ็นต์ (ร้อยละปริมาตรต่อปริมาตร) (METSO; 185 องศาเซลเซียส; 7.5 นาที) ที่ปรับสภาพโดยการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 6.3 ร่วมกับการระเหยในสภาวะสุญญากาศและการเติมเกลือไบซัลไฟต์ และในกระบวนการหมักที่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง เชื้อสายพันธุ์ AS2003 สามารถผลิตซักซิเนตได้สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น (AS1600a) ราวๆ 15 เปอร์เซ็นต์ (85.46±1.69 ต่อ 72.66±0.59 กรัมต่อลิตร) จากการใช้ไฮโดรไลเสตจากชานอ้อย 50 เปอร์เซ็นต์ (ร้อยละปริมาตรต่อปริมาตร) ที่ปรับสภาพโดยการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 9.0 ร่วมกับการระเหยสุญญากาศและการเติมเกลือไบซัลไฟต์ นอกจากนี้เชื้อสายพันธุ์ AS2003 ที่มียีน *fucO** สามารถใช้ไฮโดรไลเสตที่ไม่ผ่านการปรับสภาพเลย ผลิตซักซิเนตได้มากกว่า 80 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นเชื้อสายพันธุ์ AS2003 ถูกนำไปตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งพบว่ามียีนกลายพันธุ์ถึง 8 ยีนเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อตั้งต้นสายพันธุ์ AS1600a

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2558 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

APICHAI SAWISIT : SUCCINATE PRODUCTION FROM CASSAVA PULP AND SUGARCANE BAGASSE BY METABOLICALLY ENGINEERED *ESCHERICHIA COLI* KJ122 AND ITS DERIVATIVES. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. DR. KAEMWICH JANTAMA, Ph.D., 239 PP.

SUCCINATE PRODUCTION/*ESCHERICHIA COLI*/CASSAVA PULP/ SUGARCANE BAGASSE/METABOLIC EVOLUTION

Escherichia coli KJ122 was utilized for succinate production from cassava pulp and sugarcane bagasse. With cassava pulp as the substrate, the *E. coli* KJ122 efficiently utilized cassava pulp and produced succinate at a concentration of 41.46±0.05 g/L during separate hydrolysis and fermentation (SHF). In batch simultaneous saccharification and fermentation (SSF), the optimization of 12% (w/w) cassava pulp with an enzyme loading of 2% amyloglucosidase + 3% cellulase complex (v/w) at pH 6.5 at 39°C provided the succinate concentration of 80.86±0.49 g/L. Fed-batch SSF significantly enhanced succinate concentration to 98.63±0.12 g/L.

Mutants were also selected by serial transfers in AM1 medium with 10% (w/v) xylose. After 16 serial transfers in xylose containing medium, the xylose-evolved strain was isolated and assigned as the *E. coli* AS1600a strain. The AS1600a strain produced 84.26±1.37 g/L succinate from xylose. The *E. coli* AS1600a strain also exhibited a 3-fold improvement in productivity with 10% (w/v) xylose (0.96 g/L/h) as compared with KJ122 strain (0.31 g/L/h). The *E. coli* AS1600a strain was sequenced and found to contain a mutation in galactose permease (GalP, G236D). This mutation in GalP was proved to be responsible for improvement in xylose

utilization in the *E. coli* AS1600a strain. Additionally, furfural resistant genes such as a mutated *fucO* (*fucO**), and *puuP* beneficially improved the furfural tolerance in the *E. coli* AS1600a strain. The strain individually harboring the *fucO** and *puuP* gene entirely metabolized 20 mM furfural within 72 and 96 h, and produced 70.21±0.93 and 67.18±2.13 g/L succinate, respectively. These strains could consume all sugars contained in sugarcane bagasse hydrolysate (pH 9.0 treatment + bisulfite addition) to produce about 37% succinate concentration higher than that of the strain harboring the empty vector control (72.76±0.98 versus 46.05±1.34 g/L). Further, non-furfural hydrolysate resistant derivatives of the *E. coli* AS1600a were also selected by serial transfers in the vacuum bisulfite-treated hydrolysate supplemented with 5% (w/v) xylose medium. After 145 serial transfers, clones from this population were isolated. One of these, the *E. coli* AS2003 strain, grew on 70% (v/v) of the pH 6.3 vacuum bisulfite-treated hydrolysate (METSO, 185ºC, 7.5 min). In pH-controlled fermentation, the AS2003 strain was able to produce about 15% higher succinate (85.46±1.69 g/L) when compared with the parental strain (AS1600a) from the use of the 50% (v/v) vacuum bisulfite-treated hydrolysate (pH 9.0 treated). Moreover, the *E. coli* AS2003 strain harboring a *fucO** gene could utilize non-detoxified sugarcane bagasse hydrolysate to produce succinate up to 80 g/L. The AS2003 strain was sequenced and found to contain 8 mutations when compared with the parental strain, AS1600a.

School of Biotechnology

Academic Year 2015

Student's Signature_____

Advisor's Signature_____

Co-Advisor's Signature_____

Co-Advisor's Signature_____