สุกรา อิน : วิศวกรรมอีกครั้งของเชื้อ *Klebsiella oxytoca* KMS004 เพื่อเพิ่มผลผลิตแลคเตทชนิด D-(-) (RE-ENGINEERING *KLEBSIELLA OXYTOCA* KMS004 TO IMPROVE D-(-) LACTATE PRODUCTION YIELD) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.เขมวิทย์ จันต๊ะมา, 94 หน้า.

Klebsiella oxytoca M5a1 สายพันธุ์ตั้งต้นได้ถูกดัดแปลงพันธุกรรมมาก่อนหน้านี้เพื่อให้สามารถผลิตแลคเตทชนิดดี (-) จากน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่าย ยีน alcohol dehydrogenase (*adhE*) และ phospho transacetylase-acetate kinase (*pta-ackA*) ถูกตัดออกจากเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้นเพื่อสร้างเชื้อสายพันธุ์ *K. oxytoca* KMS004 เชื้อสายพันธุ์ KMS004 สามารถผลิตแลคเตทชนิดดี (-) ในระดับความเข้มข้นที่สูงเมื่อเทียบกับเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น อย่างไรก็ตาม ผลผลิตอื่นๆ / ผลิตภัณฑ์อื่นๆ ยังคงเป็นปัญหาในการผลิตแลคเตท นอกจากนี้ เชื้อสายพันธุ์ KMS004 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้เพียง 50 กรัมต่อลิตร เพื่อการผลิตแลคเตทชนิดดี (-) ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้ ยีน fumarate reductase ABCD (*frdABCD*) และ pyruvate formate lyase B (*pflB*) จึงถูกตัดออกเพื่อเพิ่มการผลิตแลคเตท โดยยีนทั้งสองนี้เป็นวิถีหลักในการสร้าง NAD^+ วิวัฒนาการของกระบวนการสร้างและสลายถูกนำมาใช้ โดยทำการถ่ายเชื้อสายพันธุ์ใหม่ *K. oxytoca* KIS004 ในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่ายชนิด AM1 ที่มีน้ำตาลกูลโคส 50 และ 100 กรัมต่อลิตร เพื่อเพิ่มการผลิตแลคเตทชนิดดี (-) สายพันธุ์ KIS004 ถูกนำมาทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่ายชนิด AM1 ที่มีน้ำตาลกลูโคส 50 และ 100 กรัมต่อลิตร เพื่อการผลิต แลคเตทชนิดดี (-) ภายใต้ทั้งกระบวนการหมักแบบกะ และแบบกึ่งกะ ในสภาวะไร้ออกซิเจนที่มีการควบคุมความเป็นกรดด่าง ผลการศึกษาพบว่า ในระดับน้ำตาลกูลโคส 50 กรัมต่อลิตร สายพันธุ์ KIS004 ผลิตแลคเตทชนิดดี (-) ที่ความเข้มข้น 45.2±0.02 กรัมต่อลิตร โดยมีผลผลิตอยู่ที่ 0.96±0.05 กรัมต่อกรัม และอัตราการผลิตที่ 0.47±0.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง หลังจากการทำวิวัฒนาการของกระบวนการสร้างและสลาย พบว่าสายพันธุ์ KIS004-91T ผลิตแลคเตทชนิดดี (-) ที่ความเข้มข้น 95.9±0.2 กรัมต่อลิตร มีค่าผลผลิต 0.95±0.01 กรัมต่อกรัม และอัตราการผลิต 1.00±0.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากน้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร ในขวดทดลองขนาด 500 มิลลิลิตร โดยใช้ปริมาตรน้ำหมัก 350 มิลลิลิตร เพื่อเพิ่มการผลิตแลคเตทชนิดดี (-) เชื้อสายพันธุ์ KIS004-91T ถูกนำมาทดสอบในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ในกระบวนการหมักแบบกะ พบว่าแลคเตทชนิดดี (-) ถูกผลิตที่ความเข้มข้น 100±0.2 กรัมต่อลิตร มีค่าผลผลิต 0.96±0.02 กรัมต่อกรัม และอัตราการผลิต 2.01±0.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในกระบวน การหมักแบบกึ่งกะ แลคเตทชนิดดี (-) ถูกผลิตขึ้นที่ความเข้มข้น 129±0.12 กรัมต่อลิตร มีค่าผลผลิต 0.95±0.12 กรัมต่อกรัม และอัตราการผลิต 1.9±0.02 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง นอกเหนือจากนี้

กระบวนการหมักที่ทำควบคู่กับการย่อย (SHF) ถูกนำมาทดสอบใช้กับแป้งมันสำปะหลังที่เป็นสารตั้งต้น จากผลการศึกษาพบว่า แลคเตทชนิดดี (-) ถูกผลิตขึ้นที่ความเข้มข้น 98±0.8 กรัมต่อลิตร มีค่าผลผลิต 0.93±0.01 กรัมต่อกรัม และอัตราการผลิต 1.43±0.02 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสายพันธุ์ KIS004-91T เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถต่อการผลิตแลคเตทชนิดดี (-) ได้สูง ยิ่งกว่าไปนั้น สายพันธุ์ KIS004-91T สามารถเป็นอีกหนึ่งทางเลือกสำหรับการผลิตแลคเตทชนิดดี (-) ในภาคอุตสาหกรรม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2562 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

SOKRA IN : RE-ENGINEERING *KLEBSIELLA OXYTOCA* KMS004 TO IMPROVE D-(-) LACTATE PRODUCTION YIELD. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. KAEMWICH JANTAMA, Ph.D., 94 PP.

RE-ENGINEERING/*KLEBSIELLA OXYTOCA* KMS004/D- (-) LACTATE

Klebsiella oxytoca M5a1 wild type strain was previously engineered to produce D-(-) lactate in the mineral salts medium containing glucose. Gene encoding, alcohol dehydrogenase (*adhE*) and phospho transacetylase- acetate kinase (*pta-ackA*) were removed from the wild type strain to construct *K. oxytoca* KMS004. KMS004 strain produced a high titer of D-(-) lactate compared to the *K. oxytoca* wild-type. However, other by-products are still a concern in the production of D-(-) lactate. Additionally, glucose at the concentration of 50 g/L could be only utilized in the experiment to produce D-lactate by KMS004. In this work, the fumarate reductase ABCD gene (*frdABCD*) and pyruvate formate lyase B (*pflB*) were removed to offer D-(-) lactate production as the key pathway to regenerate NAD^+. Metabolic evolution was also applied by repeatedly transferring the newly constructed strain, *K. oxytoca* KIS004 in the AM1 medium containing 50 and 100 g/L glucose to improve D-(-) lactate production. The KIS004 strain was tested in the mineral salt medium (AM1) containing 50 and 100 g/L glucose for D-(-) lactate production with both batch and fed-batch under anaerobic conditions with a pH control. The results indicated that in 50 g/L glucose, KIS004 produced D-(-) lactate at a concentration of 45.2±0.02 g/L, with a yield of 0.96±0.05 g/g and productivity of 0.47±0.01 g/L/h. After metabolic evolution, the evolved strain KIS004-91T produced D-(-) lactate at a concentration of 95.9±0.2 g/L, with a yield of 0.95±0.01 g/g and productivity of 1.00±0.01 g/L/h from 100 g/L glucose in 500 mL vessels with the working volume 350 mL. To improve D-(-) lactate production, KIS004-91T was applied in the 5 L bioreactor. In the batch process, the results showed that D-(-) lactate was

produced at a concentration of 100±0.2 g/L, with a yield of 0.96±0.02 g/g and productivity of 2.1±0.01 g/L/h. In the fed-batch process, D-(-) lactate at a concentration of 129±0.2 g/L, with a yield of 0.95±0.12 g/g and productivity of 1.9±0.02 g/L/h was produced. In addition, simultaneous hydrolysis and fermentation (SHF) was further performed using cassava starch as a substrate. The result revealed that a concentration of D-(-) lactate at 98.4±0.8 g/L, with a yield of 0.93±0.01 g/g and productivity of 1.43±0.02 g/L/h was produced. In conclusion, KIS004-91T is a high-capacity strain, which is able to produce high D-(-) lactate. Exclusively, KIS004-91T would be one of the feasible choices for D-(-) lactate production in industry.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biotechnology Student's Signature _____

Academic Year 2019 Advisor's Signature _____