พรรวณา ขุนโนนเขวา : วิศวกรรมของ *Escherichia coli* เพื่อผลิตซักซิเนตจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลไซโลสและการทำบริสุทธิ์ด้วยกระบวนการกรองชนิดนาโน (REENGINEERING OF *ESCHERICHIA COLI* TO PRODUCE SUCCINATE FROM XYLOSE-CONTAINING MEDIUM AND ITS PURIFICATION BY NANOFILTRATION) อาจารย์ที่ปรึกษาที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี : รองศาสตราจารย์ ดร.เขมวิทย์ จันต๊ะมา, อาจารย์ที่ปรึกษาที่ UNIVERSITÉ PAUL SABATIER : DR. HÉLÈNE ROUX-DE BALMANN, 236 หน้า.

Escherichia coli สายพันธุ์ KJ122 ได้ถูกดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อให้สามารถผลิตซักซิเนตในระดับความเข้มข้น และผลผลิตที่สูงในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่ายที่มีกลูโคส ด้วยการหมักอย่างง่ายภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน อย่างไรก็ตามสายพันธุ์นี้ไม่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสอย่างมีประสิทธิภาพเนื่องจากการยับยั้งกระบวนการสลาย ดังนั้นเพื่อที่จะเพิ่มประสิทธิภาพการนำเข้าและใช้น้ำตาลไซโลสของ *E. coli* สายพันธุ์ KJ122 ยีนที่ควบคุมการขนส่งน้ำตาลไซโลสเข้าสู่เซลล์ (*xylFGH*) ถูกยับยั้งด้วยเทคนิคการตัดสายพันธุกรรมทิ้ง ได้สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีชื่อว่า KJ12201 (*E. coli* สายพันธุ์ KJ122 ที่ถูกตัดยีน *xylFGH*) แสดงความสามารถในการเจริญ การใช้น้ำตาลไซโลสและการผลิตซักซิเนตที่สูงมากเมื่อเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ หลังจากการวิวัฒนาการของกระบวนการสร้างและสลาย พบว่าอีโคไลสายพันธุ์ KJ12201-14T สามารถใช้น้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์อย่างมีประสิทธิภาพในการผลิตซักซิเนตที่มีความเข้มข้นสูงถึง 84 กรัมต่อลิตร โดยมีการสะสมของอะซิเตทที่ความเข้มข้น 11 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่าย (AM1) ภายใต้สภาวะการหมักแบบไร้ออกซิเจนแบบกะ ในระหว่างกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ พบว่า *E. coli* สายพันธุ์ KJ12201-14T ผลิตซักซิเนตที่ความเข้มข้น 84 กรัมต่อลิตร โดยมีผลผลิตอยู่ที่ 0.85 กรัมของซักซิเนตต่อกรัมของน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ไป และอัตราการผลิตที่ 1.0 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า *E.coli* สายพันธุ์ KJ12201 น่าจะเป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการผลิตซักซิเนตจากน้ำตาลไซโลสและไฮโดรไลเสตที่มีน้ำตไซโลสซึ่งได้จากวัสดุลิกโนเซลลูโลสที่คุ้มค่าทางเศรษฐกิจ

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการทำบริสุทธิ์ของซักซิเนตจากน้ำหมักด้วยกระบวนการกรองชนิดนาโน การทดลองครั้งนี้ได้ทำการทดลองกับแผ่นเยื่อ NF45 และน้ำหมักสังเคราะห์ที่มีซักซิเนตและสิ่งเจือปนต่างๆ เช่น เกลืออนินทรีย์ กลูโคส และเกลือของกรดอินทรีย์รวมไปถึงอะซิเตท ทั้งนี้ได้ทำการศึกษาผลกระทบของสภาวะการดำเนินการ เช่น ค่าความเป็นกรดด่าง ความดัน ตลอดจนองค์ประกอบของน้ำหมักต่อประสิทธิภาพของกระบวนการกรองชนิดนาโน

ทั้งนี้กลไกการถ่ายเทมวลสารของตัวถูกละลายผ่านแผ่นเยื่อถูกศึกษาเพื่ออธิบายค่ารีเทนชั่นของตัวถูกละลายต่างชนิดกันซึ่งเป็นองค์ประกอบของน้ำหมัก จากการทดลองพบว่าในสารละลายที่มีตัวถูกละลายหนึ่งชนิด ค่ารีเทนชั่นเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความดันและค่าความเป็นกรดด่างของสารป้อน และลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารป้อนสูงขึ้น ตัวอย่างเช่น ค่ารีเทนชั่นของซักซิเนต และอะซิเตทในสารละลายผสมไม่แตกต่างจากค่าที่วัดได้ในสารละลายที่มีตัวถูกละลายหนึ่งชนิดที่ความเข้มข้นของเกลือต่ำประมาณ 0.1 โมลาร์ ดังนั้นสามารถทำบริสุทธิ์ของซักซิเนตได้ดี ในทางตรงกันข้ามค่ารีเทนชั่นลดลงเนื่องจากผลกระทบจากการคัดเลือกเมื่อความเข้มข้นของซักซิเนตสูงขึ้น ดังนั้นค่ารีเทนชั่นของซักซิเนต และอะซิเตทมีค่าใกล้เคียงกันเกินไปที่จะทำให้เกิดการแยก จากผลการศึกษากลไกการเทมวลสารข้างต้นได้ถูกนำมาใช้เพื่อหาวิธีการในการทำบริสุทธิ์ของซักซิเนตจากน้ำหมัก การแยกซักซิเนตออกจากอะซิเตทถูกดำเนินการในสองขั้นตอน โดยการทำไดอะฟิลเตรชันของน้ำหมักที่ทำการเจือจางจะดำเนินการในขั้นตอนแรก และการทำให้เข้มข้นจะถูกดำเนินการในขั้นตอนต่อมา ซึ่งการแยกด้วยกระบวนการนี้ทำให้ค่าบริสุทธิ์ของซักซิเนตเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 85 เป็นมากกว่าร้อยละ 99.5 ในขณะที่สามารถรักษาผลผลิตมากกว่าร้อยละ 92 จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่ากระบวนการกรองชนิดนาโนสามารถนำมาใช้ในการทำบริสุทธิ์ซักซิเนตจากน้ำหมักได้อย่างมีประสิทธิภาพ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2559

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

PANWANA KHUNNONKWAO : REENGINEERING OF *ESCHERICHIA COLI* TO PRODUCE SUCCINATE FROM XYLOSE-CONTAINING MEDIUM AND ITS PURIFICATION BY NANOFILTRATION. THESIS ADVISOR AT SURANAREE UNIVERSITY OF TECHNOLOGY : ASSOC. PROF. KAEMWICH JANTAMA, Ph.D., THESIS ADVISOR AT UNIVERSITÉ PAUL SABATIER : HÉLÈNE ROUX-DE BALMANN, Ph.D., 236 PP.

SUCCINATE/FERMENTATION/*ESCHERICHIA COLI*/METABOLIC ENGINEERING/XYLOSE/NANOFILTRATION

Escherichia coli KJ122 strain was previously engineered to produce high titers and yields of succinate in mineral salts medium containing glucose under simple-batch anaerobic conditions. However, this strain does not efficiently utilize xylose due to catabolic repression. To improve the xylose uptake and its utilization of *E. coli* KJ122, *xylFGH* genes were inactivated by the gene deletion technique. The mutant strain named KJ12201 (*E. coli* KJ122 Δ*xylFGH*) exhibited high abilities in fast growth, xylose consumption and succinate production compared to those of the parental strains. After performing metabolic evolution, *E. coli* KJ12201-14T efficiently consumed 10% xylose to produce a high succinate concentration at 84 g/L with an accumulated acetate concentration at 11 g/L in mineral salts medium (AM1) under batch fermentation. During fed-batch fermentation, *E. coli* KJ12201-14T produced succinate at a concentration, yield, and overall productivity of 84 g/L, 0.85 g/g, and 1.0 g/L/h, respectively. These results demonstrated that *E. coli* KJ12201 would be a potential strain for the economic bio-based succinate production from xylose and other xylose-rich hydrolysates derived from lignocellulosic materials.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

The succinate purification from fermentation broth by nanofiltration (NF) was also investigated. The experiment was carried out with a NF45 membrane and various synthetic fermentation broths containing succinate salt and different impurities such as inorganic salts, glucose, and other organic acid salts including acetate. The influence of the operating conditions (pH, pressure) as well as the broth composition on the NF performances was evaluated. The mechanisms governing the transfer of the solutes through the membrane were studied in order to explain the different solute retentions observed according to the fermentation broth composition. In single-solute solutions, the succinate retention increases with increasing pressure and feed pH and decreases with increasing feed concentration. For instance, at a low salts concentration at 0.1 M, it was observed that the retentions of succinate and acetate in the mixture are identical to those in single solutions. Thus, a good purification of succinate can be obtained. On the contrary, with higher succinate concentrations, the retention was decreased due to the screening effect. Retentions of those solutes were then too close to achieve a separation. Based on abovementioned mechanisms observed, a methodology was proposed to perform the succinate purification from fermentation broth. The succinate/acetate separation was carried out in two steps. A diafiltration of the diluted fermentation broth was initially performed, and the concentration step followed. With this process, it was possible to increase the succinate purity from 85% to more than 99.5% while maintaining a total yield higher than 92%. From this work, it was shown that NF could be effectively used for the succinate purification from fermentation broth.

School of Biotechnology

Academic Year 2016

Student's Signature panwana khunnonkwao

Advisor's Signature (at SUT) N. Pintama

Advisor's Signature (at UPS)

Co-Advisor's Signature (at SUT)

Co-Advisor's Signature (at UPS)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี