โสะเจียตา จู: การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกชนิด D(-) จากจุกสับปะรดด้วยเชื้อที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรม *Klebsiella oxytoca* KIS004-91T (OPTIMIZATION OF D-(-)-LACTIC ACID PRODUCTION FROM PINEAPPLE CROWN USING METABOLICALLY ENGINEERED *KLEBSIELLA OXYTOCA* KIS004-91T)
อาจารย์ที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์ ดร. เขมวิทย์ จันต๊ะมา, 82 หน้า

คำสำคัญ: จุกสับปะรด/กรดแลคติก/การปรับสภาพด้วยเบส/การย่อยสลายและหมักแยกกัน/การย่อยสลายและหมักพร้อมกัน

จุกสับปะรดเป็นของเหลือจากกระบวนการแปรรูปสับปะรดในภาคอุตสาหกรรมซึ่งประกอบด้วยลิกโนเซลลูโลส และมีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นวัสดุตั้งต้นสำหรับการผลิตสารชีวเคมีโดยจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตาม งานวิจัยเกี่ยวกับการเพิ่มมูลค่าของจุกสับปะรดเพื่อวัตถุประสงค์ดังกล่าวค่อนข้างจำกัด งานวิจัยนี้จึงได้มีการพัฒนาแพลตฟอร์มเทคโนโลยีสำหรับการผลิตกรดดี-(-)-แลกติกเพื่อให้ได้ค่าผลผลิต และอัตราการผลิตที่สูงโดยทำการปรับสภาพจุกสับปะรดเป็นแหล่งคาร์บอนในการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ *Klebsiella oxytoca* KIS004-91T โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.75 N ซึ่งให้น้ำหนักจุกสับปะรดที่ปรับสภาพแล้ว ร้อยละ 37.8±4.0 ของน้ำหนักต่อน้ำหนักจุกสับปะรดเริ่มต้น น้ำตาลสำหรับใช้หมักได้ร้อยละ 62.5±0.ของน้ำหนักต่อน้ำหนักจุกสับปะรดที่ผ่านการปรับสภาพ สภาวะการย่อยสลายจุกสับปะรถด้วยเอนไซม์ที่ให้ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดสูงสุดที่ 13.69±0.36 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลที่ได้จากเซลลูโลสร้อยละ 89.77±1.4 ของเซลลูโลสในจุกสับปะรด คือจุกสับปะรดที่ผ่านการปรับสภาพ 20 กรัมต่อลิตร ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 60 พีซียูต่อกรัม ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

จากนั้นจุกสับปะรดที่ผ่านการปรับสภาพที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ถูกนำไปหมักภายใต้กระบวนการย่อยและหมักแยกกัน (Separate hydrolysis and fermentation) โดยให้กรดดี-(-)-แลคติก 45.69±1.16 กรัมต่อลิตร มีอัตราการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ 0.81±0.02 กรัมต่อกรัม และอัตราการผลิต 1.92±0.35 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ส่วนจุกสับปะรดที่ผ่านการปรับสภาพ 75 กรัมต่อลิตรเพื่อนำไปหมักภายใต้กระบวนการย่อยสลายและหมักพร้อมกัน (Simultaneous saccharification and fermentation) ด้วย ให้ผลผลิตกรดดี-(-)-แลกติก 31.50±1.97 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ 0.70±0.03 กรัมต่อกรัม และอัตราการผลิต 1.07±0.03 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง การเพิ่มประสิทธิภาพด้วยการหมักแบบกึ่งกะด้วยสภาวะกระบวนการย่อยและหมักแยกกัน

(fed-batch SHF) สามารถเพิ่มผลผลิตกรดดี-(-)-แลกติกได้ถึง 62.87±0.42 กรัมต่อลิตร โดยมีอัตราการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ 0.96±0.07 กรัมต่อกรัม และอัตราการผลิต 1.31±0.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยกระบวนการหมักทั้งหมดดำเนินการด้วยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเกลือแร่ ให้ผลผลิตกรดดี-(-)-แลกติกที่มีความบริสุทธิ์สูง พร้อมด้วยผลพลอยได้ ได้แก่ 2,3-บิวทานีไดออล และกรดอะซิติก (ประมาณ 3.5 กรัมต่อลิตร) ในระดับต่ำ ผลการวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าจุกสับปะรดเป็นวัสดุชีวมวลที่มีศักยภาพสำหรับการผลิตกรดดี-(-)-แลกติก ซึ่งสามารถลดต้นทุน เพิ่มมูลค่าของเสีย และส่งเสริมแนวคิดอุตสาหกรรมชีวภาพแบบไร้ของเสียในอนาคต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ปีการศึกษา 2567 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

SOCHEATA CHOU: OPTIMIZATION OF D-(-)-LACTIC ACID PRODUCTION FROM PINEAPPLE CROWN USING METABOLICALLY ENGINEERED *KLEBSIELLA OXYTOCA* KIS004-91T. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. KAEMWICH JANTAMA, Ph.D, 82 PP.

Keyword: Pineapple crown/Lactic acid/Alkaline pretreatment/Separate hydrolysis and fermentation/Simultaneous saccharification and fermentation

Pineapple crowns (PIC) represent a lignocellulosic and industrial waste byproduct from pineapple processing industries, with promising potential as a feedstock for microbial biochemical production. However, limited research has been conducted on the valorization of PIC for this purpose. In this study, a technological platform was developed for high-yield, high-productivity production of D-(-)-lactic acid from PIC using an engineered strain of *Klebsiella oxytoca* KIS004-91T. Pretreatment of PIC was performed using 0.75 N NaOH, resulting in a recovery yield of 37.8±4.0% (w/w) pretreated PIC containing 62.5±0.1% (w/w) fermentable sugars. Enzymatic hydrolysis of 20 g/L of pretreated PIC using an optimal crude cellulase loading of 60 PCU/g at 50°C achieved a maximum total reducing sugar concentration of 13.69±0.36 g/L and a cellulose saccharification efficiency of 89.77±1.41% (w/w). Subsequent fermentation under separate hydrolysis and fermentation (SHF) conditions using 100 g/L of NaOH-pretreated PIC yielded 45.69±1.16 g/L D-(-)-lactic acid, with a conversion yield of 0.81±0.02 g/g and a productivity of 1.92±0.35 g/L/h. Under simultaneous saccharification and fermentation (SSF) using 75 g/L of pretreated PIC, 31.50±1.97 g/L of D-(-)-lactic acid was produced, with a yield of 0.70±0.03 g/g and a productivity of 1.07±0.03 g/L/h. Further optimization using a fed-batch SHF strategy significantly enhanced D-(-)-lactic acid production to 62.87±0.42 g/L, achieving a yield of 0.96±0.07 g/g and a productivity of 1.31±0.01 g/L/h. The fermentation process was carried out in a low-salt medium, producing high-purity D-(-)-lactic acid with minimal by-product formation, including 2,3-butanediol and acetic acid (~3.5 g/L). These findings highlight PIC as a viable alternative biomass for sustainable D-lactic acid production, offering

potential for cost reduction, waste valorization, and advancement toward a zero-waste biorefinery approach.

School of Biotechnology
Academic Year 2024

Student's Signature .....
Advisor's Signature .....