มลฤดี เชาวรัตน์ 2549. **การเจริญเติบโตและอัตราการผลิตไซลิทอล จากสารสกัดชานอ้อย โดยยีสต์ที่สามารถผลิตไซลิทอลที่ได้รับการตกแต่งยีน.** วิทยานิพนธ์ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัย ขอนแก่น. [ISBN 974-626-609-8]

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: อาจารย์ ดร.ไพบูลย์ ด่านวิรุทัย,
ศาสตรจารย์ เอียน แฟรงค์ คอนเนอร์ตัน,
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิชัย ลีลาวัชรมาศ

บทคัดย่อ

ทำการย่อยสลายชานอ้อยในสารละลายกรดซัลฟูริค ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ภายใต้สภาวะหม้อนึ่งความดันไอที่แรงดัน 1.5 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร (126.7 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 60 นาที ภายหลังการทำสารสกัดที่ได้ให้เข้มข้นขึ้น เติมผงถ่านกัมมันต์ ปริมาณ 2.4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ลงในสารสกัดเพื่อกำจัดสารพิษที่ขัดขวางการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ สารสกัดจากชานอ้อยที่ได้กำจัดสารพิษบางส่วนนี้นำมาใช้เป็นอาหารในการเลี้ยงยีสต์ ทำการคัดเลือกยีสต์ที่หมักน้ำตาลไซโลส และมีความสามารถสูงในการผลิตไซลิทอลจากสารสกัดที่ได้จากชานอ้อย ที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Candida guilliermondii* 5068, *Kluyveromyces marxianus* 5057 และ *Hansenula anomala* 5302

ทำการแยกยีนไซโลสรีดักเตส จาก *K. marxianus* 5057 เพื่อทำการศึกษา และตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของยีน พบว่าชิ้นส่วนของ DNA ที่มียีนไซโลสรีดักเตสมีขนาด 4.5 kb ทำการส่งถ่ายชิ้นส่วนของยีนไซโลสรีดักเตสของ *K. marxianus* 5057 ขนาด 4.5 kb กลับเข้าไปใน *K. marxianus* 5057 สายพันธุ์ดั้งเดิม คัดเลือกเชื้อ *K.marxianus* 5057 ที่ทำการตกแต่งยีนนี้ จำนวน 6 โคลน ได้แก่ rKm1, rKm2, rKm3, rKm4, rKm5 และ rKm6 เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโต และความสามารถในการผลิตไซลิทอลในอาหารที่ได้จากสารสกัดจากชานอ้อย ขณะเดียวกันทำการศึกษาการแสดงออกของยีน และตรวจวิเคราะห์หาลำดับของกรดอะมิโน ใน *Pichia pastoris* ผลการวิเคราะห์พบว่าไซโลสรีดักเตส มีน้ำหนักโปรตีนเท่ากับ 37.5 kDa และมีสายยาวของโพลีเปปไทด์ที่ประกอบด้วย 329 กรดอะมิโน

จากการเปรียบเทียบการเจริญเติบโต และการผลิตไซลิทอลในสารสกัดจากชานอ้อยของเชื้อดั้งเดิม ได้แก่ *C. guilliermondii* 5068, *K. marxianus* 5057 และ *H. anomala* 5302 และเชื้อที่ทำการตกแต่งยีน จำนวน 6 โคลน ได้แก่ rKm1, rKm2, rKm3, rKm4, rKm5 และ rKm6 ในฟาสก์ที่มีการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่า rKm6 มีการผลิตไซลิทอลปริมาณสูงที่สุด คือ 15.64 กรัมต่อลิตร มีอัตราการผลิตเป็น 0.13 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ปริมาณเซลล์สูงสุดเป็น 5.30 กรัมต่อลิตร

ท้ายที่สุดเชื้อ *K. marxianus* 5057 ที่ทำการตกแต่งยีน คือ rKm6 โดยมียีนไซโลสรีดักเตส จาก *K. marxianus* 5057 สายพันธุ์ดั้งเดิม ถูกคัดเลือกเพื่อนำมาพัฒนาในการเพิ่มผลผลิตไซลิทอล โดยใช้สารสกัดจากชานอ้อย ซึ่งทำการศึกษาในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร ที่บรรจุอาหารสารสกัดจากชานอ้อย ปริมาตร 1.2 ลิตร ผลการศึกษาพบว่าเชื้อที่เลี้ยงในสภาวะการให้อากาศ 1.5 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที (vvm) และมีการกวนใน

อัตรา 200 รอบต่อนาที ให้ผลผลิตไซลิทอลสูงสุด เท่ากับ 45.38 กรัมต่อลิตร หรืออัตราการผลิตเป็น 0.27 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง หลังการเลี้ยงนาน 168 ชั่วโมง ซึ่งให้อัตราการผลิตมากกว่าการเลี้ยงในฟาสก์ที่มีการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที

Monrodee Chaowarat. 2006. **Growth and Xylitol Productivity from Treated Sugarcane Bagasse by Recombinant Xylitol Producing Yeast.** Doctor of Philosophy Thesis in Biotechnology, Graduate School, Khon Kaen University. [ISBN 974-626-609-8]

Thesis Advisors: Dr. Paiboon Danvirutai,
Prof. Ian. F. Connerton,
Asst. Prof. Dr. Vichai Leelavatcharamas

ABSTRACT

The sugarcane bagasse was hydrolysed by 3% (w/v) H_2SO_4 solution in an autoclave at 1.5 kg/cm^2 pressure gauge (126.7°C) for 60 min reaction time. After concentration of hydrolysate, 2.4% (w/v) of activated charcoal pellet was added to remove inhibitors. The detoxified hydrolysate from sugarcane bagasse was then used as the fermentation medium for the tested yeasts. The xylose–fermenting yeasts namely; *C. guilliermondii* 5068, *Kluyveromyces marxianus* 5057 and *Hansenula anomala* 5302 were employed for this experiment based on the previously reported for efficient xylitol production in sugarcane bagasse hydrolysate.

Isolation of xylose reductase (XR) gene from *K. marxianus* 5057 was conducted and determined for gene expression. The 4.5 kb XR fragment was characterised. The XR gene of *K. marxianus* 5057 at 4.5 kb was then transformed into the wild type of *K. marxianus* 5057. The 6 favoured recombinants of *K. marxianus* 5057 (rKm1, rKm2, rKm3, rKm4, rKm5, rKm6) were chosen and used to compare the growth and their ability of maximal xylitol production in sugarcane bagasse hydrolysate. Meanwhile, the gene fragment was expressed in *Pichia pastoris* and sequenced for nucleotide characteristics. The apparent molecular weight of XR protein was 37.5 kDa and capable for encoding a polypeptide of 329 amino acids.

Comparisons of growth and xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate by both wild types (*C. guilliermondii* 5068, *K. marxianus* 5057) and recombinant cultures (rKm1, rKm2, rKm3, rKm4, rKm5, rKm6) were investigated in

shake-flask cultivation at 30°C and 200 rpm for 120 h. The highest yield of xylitol (15.64 g/l) and 0.13 g/l/h productivity was obtained in the batch of rKm6 tested culture, resulting in the biomass concentration of 5.30 g/l.

Finally, fermentation characteristics of recombinant *K. marxianus* 5057 (rKm6) containing the XR gene from *K. marxianus* 5057 were investigated in an attempt to improve the maximum xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate. The batch processes were carried out in the 2.5 l stirred tank reactor with 1.2 l working volume. Xylitol was produced in bagasse hydrolysate medium under aeration rate of 1.5 vvm and agitation rate of 200 rpm after168 h fermentation with a maximum yield of 45.38 g/l or 0.27 g/l/h productivity, which is about two times that of shake flask culture.