ภัทรเศรษฐ์ พลเยี่ยม : การปรับเปลี่ยนวิถีการสร้าง และสลายอีกครั้งของเชื้อ *Klebsiella oxytoca* เพื่อการผลิต 2,3-บิวเทนไดออล (RE-ENGINEERING OF METABOLIC PATHWAY OF *KLEBSIELLA OXYTOCA* FOR 2,3-BUTANEDIOL PRODUCTION) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เขมวิทย์ จันต๊ะมา, 139 หน้า.

เชื้อสายพันธุ์ *Klebsiella oxytoca* ที่ได้ผ่านการปรับเปลี่ยนวิถีการสร้าง และสลายสำหรับการผลิต 2,3-บิวเทนไดออลในอาหารลี้ยงเชื้ออย่างง่ายภายใต้สภาวะที่มีอากาศน้อย (microaerobic conditions) จากเชื้อตั้งต้น *K. oxytoca* สายพันธุ์ KMS004 (Δ*adhE* Δ*pta-ackA*) เป็นสายพันธุ์ดั้งเดิมซึ่งผลิตกรดแลกติคชนิดดี (-) เป็นผลิตภัณฑ์หลัก ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการตัดยีน *ldhA* ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์แลกเตต ดีไฮโดรจิเนส จากจีโนมของเชื้อสายพันธุ์ KMS004 ทำให้ได้เชื้อสายพันธุ์ใหม่ KMS005-76T (Δ*adhE* Δ*pta-ackA* Δ*ldhA'-cat-sacB-ldhA"*) ทั้งนี้เชื้อสายพันธุ์ KMS005-76T ได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีการสร้าง 2,3-บิวเทนไดออลที่สูงขึ้น หลังจากการทำวิวัฒนาการของวิถีการสร้าง และสลายแล้ว (metabolic evolution) พบว่าเชื้อสายพันธุ์ KMS005-76T ดังกล่าวมีอัตราการเจริญ การใช้น้ำตาล ตลอดจนการสร้าง 2,3-บิวเทนไดออลที่ดีขึ้น ทั้งนี้ในระหว่างกระบวนการหมักที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง 2,3-บิวเทนไดออล พบว่าเชื้อสายพันธุ์ KMS-005-76T มีค่าการทำงานของเอนไซม์ เช่น แลกเตต ดีไฮโดรจิเนส (LDHA) แอลกอฮอล์ ดีไฮโดร-จิเนส (ADHE) และมาเลตดีไฮโดรจิเนส (MDH) ลดลง แต่พบว่ามีระดับการทำงานของเอนไซม์ 2,3-บิวเทนไดออลดีไฮโรจิเนส (BUDC) เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับระดับของเอนไซม์ในกลุ่มที่กล่าวมา โดยที่เชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวมีการสร้าง 2,3-บิวเทนไดออลที่ความเข้มข้น 23 กรัมต่อลิตร ได้ผล-ผลิต 0.46 กรัม ของ 2,3-บิวเทนไดออลต่อกรัม ของน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่าย ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ในขวดรูปชมพู่ เมื่อเทียบกับผลผลิตทางทฤษฎีของ 2,3-บิวเทนไดออล 0.50 กรัมต่อกรัม สำหรับการผลิต 2,3-บิวเทนไดออลโดยใช้กากน้ำตาล-อ้อยนั้นได้ความเข้มข้นที่ 19 กรัมต่อลิตร เทียบเป็นผลได้ 0.42 กรัม ของ 2,3-บิวเทนไดออลต่อกรัม ของน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ ยิ่งไปกว่านั้นเชื้อสายพันธุ์ KMS005-76T ยังสามารถผลิต 2,3-บิวเทนไดออล จากไฮโดรไลซ์แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 19 กรัมต่อลิตร เทียบเป็นผลได้ 0.39 กรัม ของ 2,3-บิวเทนไดออลต่อกรัม ของน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ นอกจากนี้เชื้อดังกล่าวยังสามารถผลิต 2,3-บิวเทนไดออลจากมอลโตเดกซ์ทริน ที่ความเข้มข้น 9 กรัมต่อลิตร เทียบเป็นผลผลิตได้ 0.40 กรัม ของ2,3-บิวเทนไดออลต่อกรัม ของน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับผลของอัตราการให้อากาศต่อการผลิต 2,3-บิวเทนไดออลในถังหมักขนาด 2 ลิตร พบว่าเชื้อสายพันธุ์ KMS005-76T สามารถผลิต 2,3-บิวเทนไดออลที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เทียบเป็น

อัตราผลผลิตสูงสุดที่ 0.67 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะที่ให้อากาศในอัตรา 1.0 ของปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที (vvm) ในระหว่างกระบวนการหมักแบบกึ่งกะต่อเนื่อง เชื้อสายพันธุ์ KMS005-76T สามารถผลิต 2,3-บิวเทนไดออลที่ความเข้มข้น 117 กรัมต่อลิตร เทียบเป็นอัตราการผลิตได้ 1.20 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากน้ำตาลกลูโคส และผลิต 2,3-บิวเทนไดออลที่ความเข้มข้น 93 กรัมต่อลิตร เทียบเป็นอัตราการผลิต 0.95 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากมอลโตเดกซ์-ทรินตามลำดับ ดังนั้นจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อสายพันธุ์ KMS005-76T เป็นเชื้อที่มีศักยภาพสูงสำหรับการผลิต 2,3-บิวเทนไดออล จากแหล่งอาหารที่ไม่มีวันหมด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

| | |
|---|---|
| สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ | ลายมือชื่อนักศึกษา ____________________ |
| ปีการศึกษา 2556 | ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ______________ |
| | ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ____________ |

PATTHARASEDTHI PHOLYIAM : RE-ENGINEERING OF METABOLIC PATHWAY OF *KLEBSIELLA OXYTOCA* FOR 2,3-BUTANEDIOL PRODUCTION. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. KAEMWICH JANTAMA, Ph.D. 139 PP.

2,3-BUTANEDIOL/*KLEBSIELLA OXYTOCA*/MICROAEROBIC CONDITIONS/ METABOLIC ENGINEERING

A metabolically engineered *Klebsiella oxytoca* was constructed for the production of 2,3-butanediol (2,3-BD) in mineral salts medium under microaerobic conditions. *K. oxytoca* KMS004 (Δ*adhE* Δ*pta-ackA*) parental strain exhibited D-(-)-lactic acid production as a major metabolite. In this study, lactate dehydrogenase (*ldhA*) gene was deleted from genomic DNA of the *K. oxytoca* KMS004. The mutant strain, KMS005 (Δ*adhE* Δ*pta-ackA* Δ*ldhA'-cat-sacB-ldhA"*) was constructed to improve 2,3-BD production yield. After metabolic evolution performance, KMS005-76T strain showed improvement in growth and sugar consumption rates with simultaneous production of 2,3-BD. During the fermentation process to produce 2,3-BD, KMS005-76T possessed lower specific enzymatic activities of lactate dehydrogenase (LDHA), alcohol dehydrogenase (ADHE) and malate dehydrogenase (MDH) but higher in the specific enzymatic activity of 2,3-butandiol dehydrogenase (BUDC) than those of the parental strain (KMS004). The mutant strain produced 2,3-BD at the concentration of 23 g/L with the yield of 0.46 g/g in the medium containing 50 g/L glucose in shake flask close to the theoretical 2,3-BD yield of 0.50 g/g. For sugarcane molasses, KMS005-76T produced 2,3-BD at the concentration of

19 g/L with the yield of 0.42 g/g total sugars consumed. Moreover, KMS005-76T showed high ability to produce 2,3-BD from hydrolyzed cassava starch at 19 g/L with the yield of 0.39 g/g total sugars consumed. This strain was also able to utilize maltodextrin and produced 2,3-BD at the concentration around 9 g/L with the yield of 0.40 g/g total sugars consumed. To study an effect of the aeration rate, 2,3-BD production was performed in a 2 L bioreactor. It was found that KMS005-76T could produce 2,3-BD concentration at 20 g/L with the highest productivity of 0.67 g/L.h from 50 g/L glucose under the aeration rate of 1.0 vvm. During the fed-batch fermentation, KMS005-76T could produce 2,3-BD at the concentration of 117 g/L with the productivity of 1.20 g/L.h from glucose and produce 2,3-BD at the concentration of 93 g/L with the productivity of 0.95 g/L.h from maltodextrin respectively. The results demonstrated that KMS005-76T would be a potential strain for economic bio-based 2,3-BD production from renewable substrates.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biotechnology — Student's Signature ____________________

Academic Year 2013 — Advisor's Signature ____________________

Co-Advisor's Signature ________________