ชัชวาลย์ โพธิ์ศรีราน: วิศวกรรมอีกครั้งของ *Klebsiella oxytoca* KMS006 เพื่อการผลิตกรดซักซินิกในอาหารเลี้ยงเชื้อเกลือแร่ (RE-ENGINEERING OF *KLEBSIELLA OXYTOCA* KMS006 TO PRODUCE SUCCINIC ACID IN MINERAL SALTS MEDIUM)
อาจารย์ที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์ ดร.เขมวิทย์ จันต๊ะมา, 127 หน้า.

คำสำคัญ: *Klebsiella oxytoca* KMS006/การดัดแปลงพันธุกรรม/การปรับตัวเชิงวิวัฒนาการ/กรดซักซินิก

สายพันธุ์ *Klebsiella oxytoca* KMS006 (Δ*adhE*Δ*pta-ackA*Δ*ldhA*) ถูกตัดต่อพันธุกรรมอีกครั้ง เพื่อเพิ่มคาร์บอนฟลักซ์ไหลไปสู่วิถีการสร้างซักซิเนต สายพันธุ์ที่ได้หลังการตัดต่อพันธุกรรม *K. oxytoca* KC004 (Δ*adhE*Δ*pta-ackA*Δ*ldhA*Δ*budAB*Δ*pflB*) แสดงการเจริญที่ไม่ดีและอัตราการใช้กลูโคสต่ำในอาหารเลี้ยงเชื้อเกลือแร่ (AM1) โดยที่ไม่มีการผลิตซักซิเนต เนื่องจากสายพันธุ์ดังกล่าวบกพร่องในการผลิต ATP และการรีออกซิเดชั่นของ NADH ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวได้มีการใช้วิธีการปรับตัวเชิงวิวัฒนาการมาจัดการกับสายพันธุ์นี้ หลังการทำวิธีการปรับตัวเชิงวิวัฒนาการพบว่า การใช้กลูโคสและการผลิตซักซิเนตของสายพันธุ์ที่ผ่านการปรับตัวเชิงวิวัฒนาการ (*K. oxytoca* KC004-TF160) ถูกปรับปรุงอย่างมีนัยสำคัญในอาหารเลี้ยงเชื้อ AM1 ที่มี 100 กรัมต่อลิตรกลูโคสพบว่า สายพันธุ์ KC004-TF160 ผลิตซักซิเนตที่ความเข้มข้น 84 กรัมต่อลิตร โดยให้ผลผลิตและผลิตผลสูงสุด 0.84 กรัมต่อกรัม และ 0.87 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ และผลิตอะซิเตทที่ 14 กรัมต่อลิตร แต่ไม่พบผลิตภัณฑ์พลอยได้อื่น ๆ นอกเหนือจากนี้ พบว่าสายพันธุ์ KC004-TF160 มีความสารถผลิตซักซิเนตที่ได้ผลผลิตสูง 0.41 ถึง 0.87 กรัมต่อกรัม จากการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆและกากน้ำตาลที่มีต้นทุนการผลิตที่ต่ำและเป็นแหล่งสารอาหารทางเลือกที่มีศักยภาพต่อการผลิตที่จะพัฒนาต่อไปได้ ในขณะที่การพัฒนาเพิ่มเติมของสายพันธุ์ KC004-TF160 เพื่อลดการผลิตอะซิเตทนั้นสามารถเพิ่มผลผลิตเพิ่มขึ้นเท่ากับ 0.88 กรัมต่อกรัม จากสายพันธุ์ *K. oxytoca* KP001-TF60 (Δ*adhE*Δ*pta-ackA*Δ*ldhA*Δ*budAB*Δ*pflB*Δ*tdcD*Δ*pmd*) และยังพบอะซิเตทที่ต่ำกว่า 1 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามสายพันธุ์นี้สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้เพียงประมาณ 60 กรัมต่อลิตร และยังต้องการสารสกัดยีสต์เพื่อการเจริญของเซลล์ ถึงอย่างไรก็ตามทั้งสายพันธุ์ KC004-TF160 และ KP001-TF60 สามารถผลิตซักซิเนตเทียบเท่ากับสายพันธุ์ผู้ผลิตดั้งเดิมและสายพันธุ์พัฒนา *Escherichia coli* และเมื่อวิเคราะห์การเมตาบอลิซึมภายในพบว่ากิจกรรมของยีน *pck* ถูกเพิ่มขึ้นเพื่อตอบสนองการเพิ่มขึ้นของผลผลิตซักซิเนตและการผลิตพลังงาน ขณะที่กิจกรรมของยีน *pdh*, *tdcE* และ *tdcD* ตอบสนองการผลิตอะซิติลโคเอและอะซิเตทที่เป็นกระบวนการหลักสำหรับเป็นแหล่งพลังงานและความสมดุลของกระบวนการรีดอกซ์ และกิจกรรมของยีน *pck* ที่เพิ่มขึ้นอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ในยีน *cyaA*, *ptsG*, *agaC*, และ *csrB* ซึ่งจาก

ผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า สายพันธุ์ KC004-TF160 ที่พัฒนาขึ้นใหม่อาจมีประโยชน์ในฐานะหนึ่งในแพลตฟอร์มจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพสำหรับการผลิตซักซิเนตในเชิงพาณิชย์ ขณะที่สายพันธุ์ KP001-TF60 สามารถใช้เพื่อพัฒนาเป็นผู้ผลิตซักซิเนตต่อไปในอนาคต

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biotechnology
Academic Year 2022

Student's Signature ชัชกลย์ โพธิ์ชัยราน
Advisor's Signature N. Somtana

CHUTCHAWAN PHOSRIRAN: RE-ENGINEERING OF *KLEBSIELLA OXYTOCA* KMS006 TO PRODUCE SUCCINIC ACID IN MINERAL SALTS MEDIUM. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. KAEMWICH JANTAMA, Ph.D., 127 PP.

Keyword: *Klebsiella oxytoca* KMS006/Metabolic engineering/Evolutionary adaptation/ Succinic acid

Klebsiella oxytoca KMS006 (Δ*adhE*Δ*pta-ack*AΔ*ldhA*) was re-engineered to enhance the carbon flux through the succinate-producing pathway. The resulting strain, KC004 (Δ*adhE*Δ*pta-ack*AΔ*ldhA*Δ*budAB*Δ*pflB*), exhibited a poor growth and low-glucose consumption rate in the mineral salts (AM1) medium without the succinate production due to its deficiencies in ATP production and NADH reoxidation under anaerobic conditions. To overcome these circumstances, evolutionary adaptation was conducted, resulting in spontaneous mutation in the developed strain named KC004-TF160. In the 100 g/L AM1 medium, KC004-TF160 produced succinate at a concentration of 84 g/L with a yield and productivity of 0.84 g/g and 0.87 g/L/h, respectively. Acetate was detected at 14 g/L, but no other byproducts were found. Additionally, KC004-TF160 was able to produce succinate at a yield of 0.41-0.87 g/g using a variety of sugars and sugarcane molasse for a potential low cost and alternative carbon sources. KC004-TF160 was further improved to the reduce acetate formation which resulted in enhancing the succinate yield up to 0.88 g/g by *K. oxytoca* KP001-TF60 (Δ*adhE*Δ*pta-ack*AΔ*ldhA*Δ*budAB*Δ*pflB*Δ*tdcD*Δ*pmd*). An acetate level of less than 1 g/L was detected. Unfortunately, this strain could consume 60 g/L of glucose and requires yeast extract for cell growth. Even though KC004-TF160 and KP001-TF60 can produce succinate as efficiently as previous native producers and developed *Escherichia coli* strains. Further analysis of internal metabolic revealed that the increased enzymatic activity of the *pck* gene was responsible for the increased succinate yield and ATP production, whereas the activities of *pdh*, *tdcE* and *tdcD* genes were responsible for acetyl-CoA and acetate formation which is the primary mechanism for energy sources and redox balance. An increased *pck* activity may cause nucleotide variations in genes *cyaA*, *ptsG*, *agaC*, and *csrB*. All results demonstrate that

the newly developed KC004-TF160 may be useful as one of the potential microbial platforms for the commercial production of succinate.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biotechnology
Academic Year 2022

Student's Signature ชัชวาลย์ โพธิ์ศรีทน
Advisor's Signature