นนทพร หว่อง : วิศวกรรมเมทาบอลิกของเชื้อเอสเชอริเชีย คอไล เพื่อการผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยไม่ใช้ระบบการแสดงออกของยีนด้วยพลาสมิด (METABOLIC ENGINEERING OF *Escherichia coli* TO PRODUCE 1,3-PROPANEDIOL DEVOID OF A PLASMID EXPRESSION SYSTEM) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.เขมวิทย์ ขันคะมา, 138 หน้า

ไอเปอรออนกลีเซอรอล ดีไฮดราเทส (*gdrAB-dhaB123*) จากเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* และยีน 1,3-โพรเพนไดออล ออกซิโดรีดักเทส (*yqhD*) ที่ขึ้นกับ NADPH จาก *Escherichia coli* ถูกแทรกบนโครโมโซมตีเอ็นเอของ *E. coli* และถูกแสดงออกภายใต้โปรโมเตอร์ *ldhA* และ *pflB* ของ *E. coli* ตามลำดับ โดยเชื้อ *E. coli* NSK015 (Δ*ldhA*::*gdrAB-dhaB123* Δ*ackA*::FRT Δ*pflB*::*yqhD* Δ*frdABCD*::*cat-sacB*) ที่ถูกพัฒนาขึ้นผลิต 1,3-โพรเพนไดออล (1,3-PDO) ได้ที่ความเข้มข้น 36.8 กรัมต่อลิตร และมีผลผลิตที่ 0.99 โมลต่อโมลของกลีเซอรอล การทดสอบผลการผลิตโดยใช้สารตั้งต้นร่วมกันระหว่างกลีเซอรอลและแป้งมันสำปะหลังเพื่อผลิตสาร1,3-โพรเพนไดออล พบว่าเชื้อนี้สามารถผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล ได้ที่ความเข้มข้น 31.9 กรัมต่อลิตรและ มีผลการผลิตที่ 0.84 โมลต่อโมลของกลีเซอรอลตามลำดับ งานวิทยานิพนธ์นี้เป็นงานบุกเบิกที่แสดงการผลิต 1,3-โพรเพนไดออล อย่างมีประสิทธิภาพโดยทำให้เกิดการแสดงออกของยีนจากสิ่งมีชีวิตอื่นบนจีโนมของ *E. coli* โดยที่ไม่ได้ใช้ระบบพลาสมิดในการแสดงออกของยีน พลาสมิด ยาปฏิชีวนะ IPTG และสารอาหารที่ครบถ้วนไม่ถูกนำมาใช้ในการผลิต 1,3-โพรเพนไดออล

เพื่อเพิ่มอัตราการผลิต การผลิต 1,3-โพรเพนไดออลภายใต้สภาวะที่เหมาะสมถูกศึกษาใน *E. coli* NSK015 ซึ่งพบว่าสภาวะที่ดีที่สุดคือความเร็วในการกวน 300 รอบต่อนาทีและความเข้มข้นต่ำของโคเอนไซม์บี 12 ที่ 7.5 ไมโครโมลาร์ โดยที่อัตราการผลิตเพิ่มขึ้นจาก 0.34 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เป็นที่ 0.79 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ต่อมาเพื่อที่จะปรับปรุงความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลให้สูงขึ้นจึงได้ทำการหมักแบบกึ่งกะโดยที่มีการปรับเปลี่ยนรูปแบบการป้อนสารตั้งต้นร่วมของกลูโคสและกลีเซอรอล ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้รูปแบบการให้แบบแบ่งเป็นจังหวะอย่างต่อเนื่องมีประสิทธิภาพอย่างมากในการผลิต 1,3-โพรเพนไดออล ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลเพิ่มขึ้นถึง 132.63 % จาก 38.1 กรัมต่อลิตร เป็น 88.6 กรัมต่อลิตรภายในเวลา 144 ชั่วโมง ด้วยอัตราการผลิตในการหมักแบบกึ่งกะที่อัตราการผลิต 0.62 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา นนทพร หว่อง

ปีการศึกษา 2563 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

NONTHAPORN WONG : METABOLIC ENGINEERING OF *Escherichia coli* TO PRODUCE 1,3-PROPANEDIOL DEVOID OF A PLASMID EXPRESSION SYSTEM. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. KAEMWICH JANTAMA, Ph.D., 138 PP.

1,3-PROPANEDIOL/*E. COLI*/ *K. PNEUMONIAE*/GLYCEROL/CASSAVA

Glycerol dehydratase (*gdrAB-dhaB123*) operon from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* NADPH-dependent 1,3-propanediol oxidoreductase (*yqhD*) were stably integrated on the chromosomal DNA of *E. coli* and their overexpression was under the control of the native-host *ldhA* and *pflB* promoters, respectively. A developed *E. coli* NSK015 (Δ*ldhA*::*gdrAB-dhaB123* Δ*ackA*::FRT Δ*pflB*::*yqhD* Δ*frdABCD*::*cat-sacB*) produced 1,3-propanediol (1,3-PDO) at the level of 36.8 g/L with a yield of 0.99 mol/mol glycerol. Co-substrate of glycerol and cassava starch was also utilized for 1,3-PDO production with the obtained concentration and yield of 31.9 g/L and 0.84 mol/mol glycerol respectively. This represents a pioneer work for efficient 1,3-PDO production in which the overexpression of heterologous genes on the *E. coli* host genome devoid of plasmid expression systems. Plasmids, antibiotics, IPTG, and rich nutrients were omitted during 1,3-PDO production.

To improve productivity, 1,3-PDO production by *E. coli* NSK015 was optimized. After performing optimization, the best condition for 1,3-PDO production was obtained at 300 rpm agitation with a low concentration of coenzyme B12 of 7.5 μM. The 1,3-PDO productivity was enhanced from 0.34 g/L/h up to 0.79 g/L/h. To further improve 1,3-PDO production, the fed-batch fermentation mode was carried out

by varying different feeding modes of the co-substrate of glucose and glycerol. The results showed that the use of the continuous-pulsed mode was more powerful to produce 1,3-PDO. After 144 h incubation, 1,3-PDO concentration was improved from 38.1 g/L to 88.6 g/L, which is an 132.6 % with the 1,3-PDO productivity at 0.62 g/L/h.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biotechnology

Academic Year 2020

Student's Signature _____

Advisor's Signature _____