

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5380004

ชื่อโครงการ: การผลิตกรดซักซินิกจากน้ำตาลซูโครส และกากน้ำตาลอ้อย

ชื่อนักวิจัย: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เขมวิทย์ จันทะมา

หน่วยวิจัยวิศวกรรมเมทาบอลิก สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

อีเมล: kaemwich@sut.ac.th

ระยะเวลา: 2 ปี (15 มิถุนายน 2553 to 14 มิถุนายน 2555)

เชื้อเอสเชอริเชีย โคไล สายพันธุ์ KJ122 ได้ถูกดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อให้สามารถผลิตซักซินิกใน ระดับความเข้มข้น และผลได้ที่สูงในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่ายที่มีกลูโคส ภายใต้สภาวะการหมักแบบไร้ออกซิเจนอย่างง่าย อย่างไรก็ตามสายพันธุ์นี้ไม่สามารถใช้น้ำตาลซูโครสอย่างมีประสิทธิภาพเนื่องจากการยับยั้งกระบวนการสลาย ดังนั้นเพื่อที่จะเพิ่มประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลซูโครสของสายพันธุ์ KJ122 ยีนที่สร้างเอนไซม์สลายซูโครส (*cscA* and *cscKB*) ที่มีส่วนของโปรโมเตอร์ของเชื้ออีโคไลสายพันธุ์ B ซึ่งความสามารถในการใช้น้ำตาลซูโครสได้ตามธรรมชาติถูกโคลนและแสดงออกในอีโคไลสายพันธุ์ KJ122 โดยที่สายพันธุ์ KJ122 ที่มีพลาสมิดลูกผสมที่ชื่อว่า pKJSUC อยู่จะถูกคัดเลือกการใช้น้ำตาลซูโครสอย่างมีประสิทธิภาพในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Phenol Red ที่มีน้ำตาลซูโครสผสมอยู่ทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว และอาหารเลี้ยงเชื้อแบบอาหารวุ้น โคลนที่ได้สามารถแสดงอาณาเขตโคโลนีสีเหลืองใสที่ใหญ่กว่าเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ KJ122 ที่ไม่มีพลาสมิดลูกผสมอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้น และยังสามารถแสดงความสามารถในการเจริญ และการสร้างกรดอย่างรวดเร็วในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว

หลังจากการทำวิวัฒนาการของกระบวนการสร้างและสลาย สายพันธุ์ KJ122-pKJSUC สามารถใช้น้ำตาลซูโครสอย่างมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดซักซินิกที่มีความเข้มข้นสูงโดยมีการสะสมของผลิตภัณฑ์อันไม่พึงประสงค์ในระดับต่ำในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ AM1 อาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวชนิดที่มีความเข้มข้นเหมาะสมที่ 70 กรัมต่อลิตรของน้ำตาลซูโครสให้กรดซักซินิกที่มีความเข้มข้น 50.52 ± 1.8 กรัมต่อลิตร (ผลิตผล 1.05 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) ในขวดเลี้ยงเชื้อขนาด 500 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน และที่ความเข้มข้น 46.59 ± 1.23 กรัมต่อลิตร (ผลิตผล 0.97 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 10 ลิตร ภายในเวลา 48 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามพบว่ายาปฏิชีวนะไม่มีผลกระทบต่อการผลิตกรดซักซินิกจากเชื้อสายพันธุ์ KJ122-pKJSUC ภายใต้สภาวะการหมักแบบกะ นอกจากนั้นกรดซักซินิกถูกผลิตที่ความเข้มข้น 47.69 ± 3.94 กรัมต่อลิตร (ผลิตผล 0.99 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) จากกากน้ำตาลอ้อย 150 กรัมต่อลิตร ในขวดเลี้ยงเชื้อขนาดเล็กภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนในเวลา 48 ชั่วโมง จากการเพิ่มขนาดการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 10 ลิตรพบว่ากรดซักซินิกถูกผลิตขึ้นที่ความเข้มข้น 35.14 ± 7.53 กรัมต่อลิตร และ 65.01 ± 0.64 กรัมต่อลิตร ภายในเวลา 48 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเชื้ออีโคไล KJ122-pKJSUC น่าจะเป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการผลิตกรดซักซินิกจากน้ำตาลซูโครส และกากน้ำตาลอ้อยที่มีความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจ

คำสำคัญ: กรดซักซินิก, *E. coli*, น้ำตาลซูโครส, สภาวะไร้ออกซิเจน, กากน้ำตาลอ้อย

ABSTRACT

Project Code: MRG5380004

Project Title: Production of Succinic Acid from Sucrose and Cane Molasses

Investigator: Assistant Professor Dr. Kaemwich Jantama

Metabolic Engineering Research Unit, School of Biotechnology,

Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology

E-mail Address: kaemwich@sut.ac.th

Project Period: 2 years (15 June 2010 to 14 June 2012)

Escherichia coli KJ122 was engineered to produce high titer and yield of succinate in mineral salt medium containing glucose under simple-batch anaerobic conditions. However, this strain does not efficiently utilize sucrose due to catabolic repression. To enhance the sucrose utilization of KJ122, sucrose utilizing genes (*cscA* and *cscKB*) containing their native promoters from *E. coli* B, which is able to naturally utilize sucrose, were cloned and functionally expressed in KJ122. The transformants harboring a recombinant plasmid named pKJSUC were selected for the efficient sucrose utilization on the phenol red agar and broth supplemented with sucrose. The clones exhibited a larger clear yellow zone on the agar compared to KJ122 without the plasmid, and showed a high ability in fast growth and acid production in cultivation broth. After performing metabolic evolution, KJ122-pKJSUC efficiently consumed sucrose to produce high succinate concentration with less accumulation of by-products in AM1 medium. The optimal concentration of sucrose at 70 g/L could produce succinate at 50.52 ± 1.80 g/L (productivity at 1.05 g/L/h) in 500 mL small anaerobic bottles and at 46.59 ± 1.23 g/L (productivity at 0.97 g/L/h) in 10 L bioreactor within 48 hours. In addition, it was found that antibiotics had no effects on succinate production by KJ122-pKJSUC under batch conditions. Succinate at concentration of 47.69 ± 3.94 g/L (productivity at 0.99 g/L/h) was produced from 150 g/L molasses in a small anaerobic bottle after 48 hours. Scaling up to 10 L bioreactor, succinate at concentration of 35.14 ± 7.53 g/L (0.73 g/L/h) and 65.01 ± 0.64 g/L (0.67 g/L/h) was produced within 48 hours and 96 hours, respectively. These results demonstrated that KJ122-pKJSUC would be a potential strain for the economic bio-based succinate production from sucrose and sugar cane molasses.

Key Word: Succinate, *E. coli*, Anaerobic conditions, Sucrose, Sugarcane molasses