รหัสโครงการ SUT3-304-61-12-07

รายงานการวิจัย

วิศวกรรมของเชื้ออีโคไลสายพันธุ์ KJ122 เพื่อผลิตกรดซักซินิกจากไซโลส

(Engineering of *Escherichia coli* KJ122 for succinate production from xylose)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-304-61-12-07

รายงานการวิจัย

วิศวกรรมของเชื้ออีโคไลสายพันธุ์ KJ122 เพื่อผลิตกรดซักซินิกจากไซโลส

(Engineering of *Escherichia coli* KJ122 for succinate production from xylose)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.เขมวิทย์ จันต๊ะมา

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ดร.พรรวณา ขุนโนนเขวา

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2561

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

เมษายน 2563

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่งสำหรับมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2561 จนทำให้สามารถดำเนินงานวิจัยได้แล้วเสร็จสมบูรณ์ด้วยความเรียบร้อย รวมทั้งขอขอบคุณ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ได้อนุญาตให้ใช้สถานที่ ตลอดถึงความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือต่าง ๆ ในการทำวิจัย ท้ายที่สุดขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาทุกคนที่ได้มีส่วนช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คณะผู้วิจัย

กันยายน 2561

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วิศวกรรมของเชื้ออีโคไลสายพันธุ์ KJ122 เพื่อผลิตกรดซักซินิกจากไซโลส

พรรวณา ขุนโนนเขวา และเขมวิทย์ จันต๊ะมา
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

E. coli KJ122 ได้ถูกดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อให้สามารถผลิตซักซิเนตในระดับความเข้มข้น และผลผลิตที่สูงในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่ายที่มีกลูโคส ด้วยการหมักอย่างง่ายภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์สายพันธุ์นี้ไม่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสอย่างมีประสิทธิภาพเนื่องจากการยับยั้งกระบวนการสลายของน้ำตาลไซโลสเนื่องด้วยกลูโคส (catabolic repression) ดังนั้นเพื่อที่จะเพิ่มประสิทธิภาพการนำเข้าและใช้น้ำตาลไซโลสของเชื้อ *E. coli* KJ122 ยีนที่ควบคุมการขนส่งน้ำตาลไซโลสเข้าสู่เซลล์ (*xylFGH*) ได้ถูกยับยั้งด้วยเทคนิคการตัดสายพันธุกรรมทิ้ง ได้สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีชื่อว่า *E. coli* KJ12201 (*E. coli* KJ122 ที่ถูกตัดยีน *xylFGH*) ที่มีความสามารถในการเจริญ การใช้น้ำตาลไซโลสและการผลิตซักซิเนตที่สูงมากเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น หลังจากการวิวัฒนาการของกระบวนการสร้างและสลาย พบว่า *E. coli* KJ12201-14T สามารถใช้น้ำตาลไซโลสความเข้มข้นร้อยละ 10 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) อย่างมีประสิทธิภาพในการผลิตซักซิเนตที่ความเข้มข้นสูงถึง 84 กรัมต่อลิตร โดยมีการสะสมของอะซิเตทที่ความเข้มข้น 11 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่าย (AM1) ภายใต้สภาวะการหมักแบบไร้ออกซิเจนแบบกะ อีกทั้งในระหว่างกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ พบว่า *E. coli* KJ12201-14T สามารถผลิตซักซิเนตที่ความเข้มข้น 84 กรัมต่อลิตร โดยมีผลผลิตอยู่ที่ 0.85 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า *E. coli* KJ12201-14T น่าจะเป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการผลิตซักซิเนตจากน้ำตาลไซโลส และไฮโดรไลสตที่มีน้ำตาลไซโลสซึ่งได้จากวัสดุลิกโนเซลลูโลสที่คุ้มค่าทางเศรษฐกิจ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Engineering of *Escherichia coli* KJ122 for succinate production from xylose

Panwana Khunnonkwao and Kaemwich Jantama
School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology
Suranaree University of Technology

Escherichia coli KJ122 strain was previously engineered to produce high titers and yields of succinate in mineral salts medium containing glucose under simple batch anaerobic conditions. However, this strain does not efficiently utilize xylose due to catabolic repression. To improve the xylose uptake and its utilization of *E. coli* KJ122, genes *xylFGH* were inactivated by gene deletion techniques. The mutant strain named *E. coli* KJ12201 (*E. coli* KJ122 Δ*xylFGH*) exhibited high abilities in fast growth, xylose consumption and succinate production compared to those of the parental strains. After performing metabolic evolution, *E. coli* KJ12201-14T efficiently consumed 10% (w/v) xylose to produce a high succinate concentration at 84 g/L with an accumulated acetate concentration at 11 g/L in mineral salts medium (AM1) under batch fermentation. During fed-batch fermentation, *E. coli* KJ12201-14T produced succinate at a concentration, yield, and overall productivity of 84 g/L, 0.85 g/g, and 1.0 g/L/h, respectively. These results demonstrated that *E. coli* KJ12201-14T would be a potential strain for the economic bio-based succinate production from xylose and other-rich hydrolysates derived from lignocellulosic materials.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญเรื่อง

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ..... ก
บทคัดย่อภาษาไทย ..... ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค
สารบัญเรื่อง ..... ง
สารบัญตาราง ..... ฉ
สารบัญรูปภาพ ..... ช
คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย ..... ซ
บทที่ 1 บทนำ 1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย 2
ขอบเขตของการวิจัย 3
ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของการวิจัย 3
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง 4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย 10
แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย 11
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย 13
เชื้อจุลินทรีย์ ไพร์เมอร์ และอาหารเลี้ยงเชื้อ 13
สภาวะในการเลี้ยงและการเตรียมกล้าเชื้อ 15
การดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการลำเลียงน้ำตาลไซโลสของเชื้อ *E. coli* KJ122 ในการผลิตกรดซักซินิก 16
การประยุกต์ใช้วิวัฒนาการเมทาบอลิกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้น 17
การหมักแบบกะภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน 18
การหมักแบบกึ่งกะภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน 19
การหาความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรีย 20
การวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมัก 20
การวิเคราะห์ทางจลนศาสตร์ 20
สถานที่ทำการทดลอง 20
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง 21
ผลของการผลิตซักซิเนตจากน้ำตาลไซโลสจากเชื้อ *E. coli* KJ122 21

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

หน้า

ผลของการตัดยีน *xylFGH* และ *xylE* ต่อการผลิตซักซิเนตจากน้ำตาลไซโลส
จากเชื้อ *E. coli* KJ122 23
การทำวิวัฒนาการทางเมทาบอลิกของเชื้อ *E. coli* KJ12201..... 27
การผลิตซักซิเนตจากน้ำตาลไซโลสของเชื้อ *E. coli* KJ12201 และ
E. coli KJ12201-14T ภายใต้กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ 30
บทที่ 4 บทสรุป..... 34
สรุปผลการวิจัย 34
ข้อเสนอแนะ..... 34
บรรณานุกรม..... 35
ประวัติผู้วิจัย..... 39

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1.1 แสดงแบคทีเรียที่ผลิตกรดซักซินิกได้เองตามธรรมชาติที่นำมาผลิตกรดซักซินิกในระดับอุตสาหกรรม 6
ตารางที่ 1.2 แสดงแบคทีเรีย *E. coli* ที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อใช้ผลิตกรดซักซินิก 7
ตารางที่ 2.1 ลักษณะ แหล่งที่มาของสายพันธุ์แบคทีเรีย พลาสมิด และไพรเมอร์ 14
ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ AM1 15
ตารางที่ 3.1 ค่าต่างๆ ที่ได้จากการหมักน้ำตาลไซโลสของเชื้อ *E. coli* KJ122 และอนุพันธุ์ 27
ตารางที่ 3.2 ค่าต่างๆ ที่ได้จากการหมักน้ำตาลไซโลสของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ต่างๆ ที่ได้จากการทำวิวัฒนาการทางเมทาบอลิกของเชื้อ *E. coli* KJ12201 30
ตารางที่ 3.3 เปรียบเทียบการผลิตซักซิเนตจากแหล่งเซลลูโลสชนิดต่างๆ ด้วยเชื้อ *E.coli* สายพันธุ์ต่างๆ 33

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1.1 การใช้กรดซักซินิกเป็นหน่วยการสร้างสำหรับสังเคราะห์สารเคมีชนิดต่างๆ 4
รูปที่ 1.2 การตัดแต่งพันธุกรรมของ *E. coli* ATCC 8739 สายพันธุ์ตั้งต้นเพื่อ
สร้างสายพันธุ์ KJ122 9
รูปที่ 2.1 แสดงขวดทดลองขนาด 500 mL ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่เชื่อมต่อด้วยระบบ
ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในระหว่างการหมักอย่างอัตโนมัติ 16
รูปที่ 2.2 วิวัฒนาการทางเมทาบอลิกของเชื้อ *E. coli*
KJ12201 ในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่ายที่มีน้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้น
100 กรัมต่อลิตร 18
รูปที่ 2.3 แสดงชุดถุงหมักขนาด 2 ลิตรที่เชื่อมต่อกับอ่างควบคุมอุณหภูมิและระบบ
ควบคุมความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในระหว่างการหมักอย่างอัตโนมัติ..... 19
รูปที่ 3.1 ระยะเวลาในการเจริญและการผลิตซักซิเนตจากน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่ง
คาร์บอนของเชื้อ *E. coli* KJ122 ที่หมักด้วยขวดปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดเล็ก
(500 มิลลิลิตร) และใช้อาหาร AM1 22
รูปที่ 3.2 ระยะเวลาในการเจริญและการผลิตซักซิเนตจากน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่ง
คาร์บอนของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ต่างๆ ที่หมักด้วยขวดปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดเล็ก
(500 มิลลิลิตร)..... 25
รูปที่ 3.3 กลไกการนำเข้าน้ำตาลไซโลสและผลิตซักซิเนตของเชื้อ *E. coli* KJ12201 26
รูปที่ 3.4 การทำวิวัฒนาการเมทาบอลิกของเชื้อ *E. coli* KJ12201 ที่มีน้ำตาลไซโลส
100 กรัมต่อลิตร 29
รูปที่ 3.5 การผลิตซักซิเนตระหว่างการหมักแบบกึ่งกะด้วยน้ำตาลไซโลสภายใต้สภาวะไร้
ออกซิเจนของเชื้อ *E. coli* KJ12201 และ KJ12201-14T..... 32

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย

AM1	=	Alfredo Mertinez medium version 1
ANOVA	=	Analysis of variance
atm	=	Atmosphere
ATP	=	Adenosine 5'-tri-phosphate
ADP	=	Adenosine diphosphate
°C	=	Degree Celsius
cAMP	=	cyclic adenosine 3′, 5′-monophosphate
CCR	=	Carbon catabolite repression
CDW	=	Dry cell weight
CSL	=	Corn steep liguor
g	=	Gram (s)
g/g	=	Gram (s) per gram
g/L	=	Gram (s) per liter
g/L/h	=	Gram (s) per liter per hour
h	=	Hour (s)
HPLC	=	High performance liquid chromatography
IPTG	=	Isopropyl-β-D-thiogalactoside
IU/g	=	International unit (s) per gram
Kg	=	Kilogram (s)
kPa	=	Kilopascal
M	=	Molar
mM	=	Millimolar
mg	=	Milligram (s)
mg/L	=	Milligram (s) per liter
min	=	Minute (s)
mL	=	Milliliter (s)
mm	=	Millimeter (s)
N	=	Normality
NAD	=	Nicotinamide adenine dinucleotide (Oxidized form)
NADH	=	Reduced form of Nicotinamide adenine dinucleotide
NADP	=	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (Oxidized form)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย (ต่อ)

NADPH	=	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (Reduced form)
OD_{550}	=	Optical density at 550 nm
ppm	=	Part per million
% (w/v)	=	Percentage weight by volume
rpm	=	Revolutions per minute
μL	=	Microliter (s)
μM	=	Micro molar (s)
YE	=	Yeast extract

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ไบโอซักซินิก หรือ กรดซักซินิกจากชีวมวล เป็นเคมีชีวภาพตัวหนึ่งที่มีประโยชน์กว้างขวางไม่เฉพาะสำหรับอุตสหกรรมเคมีเท่านั้น แต่ยังรวมถึงอุตสาหกรรมการแพทย์ เภสัชกรรม และอาหาร นอกจากนี้กรดซักซินิกยังสามารถนำไปใช้สังเคราะห์พอลิบิวทิลินซักซิเนต (Polybutylene succinate) หรือ PBS ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายทางชีวภาพได้ (Biodegradable polymer) และนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน โดยเฉพาะด้านวัสดุทางการแพทย์และพลาสติกชีวภาพ โดยทั่วไปการผลิตกรดซักซินิกได้จากกระบวนการเติมไฮโดรเจนให้กับสารประกอบ maleic anhydride ซึ่งได้จากผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม และด้วยต้นทุนการผลิตที่สูงจึงทำให้การผลิตกรดซักซินิกโดยการสังเคราะห์ทางเคมีไม่เป็นที่นิยมในปัจจุบัน ดังนั้นนักวิจัยหลายกลุ่มให้ความสนใจการผลิตกรดซักซินิกจากกระบวนการหมักโดยใช้เชื้อแบคทีเรียที่พบในกระเพาะย่อยอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้องซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สร้างกรดซักซินิกเป็นหลัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรีย *Actinobacillus succinogenes*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens* และ *Mannheimia succinoproducens* โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถผลิตกรดซักซินิกได้ในปริมาณที่สูงจากการหมักกลูโคสภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน แต่อย่างไรก็ตามเชื้อแบคทีเรียข้างต้นต้องการอาหารที่มีความอุดมสมบูรณ์มากในการเจริญเติบโต และต้องมีการให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ระหว่างการหมักด้วย ซึ่งทำให้ต้นทุนในการผลิตสูง นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียดังกล่าวยังมีข้อจำกัดหากนำมาประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมเนื่องจากมีการผลิตกรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และกรดแลคติก เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ เป็นผลให้ต้องเสียค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงในการทำบริสุทธิ์กรดซักซินิก

ดังนั้นการใช้จุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ดีในสภาวะแบบกึ่งไร้ออกซิเจน และสามารถสร้างกรดซักซินิกได้เหมือนกันในสภาวะแบบกึ่งไร้ออกซิเจน เช่น *Escherichia coli* ซึ่งได้รับความสนใจอย่างมาก และมากกว่าการผลิตด้วยเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ซึ่งภายในสิบปีที่ผ่านมามีการพัฒนาสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์นี้อย่างต่อเนื่องเพื่อให้สามารถผลิตกรดซักซินิกได้ปริมาณสูงมากขึ้นประมาณ 700 มิลลิโมลาร์จากอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่ายที่มีกูลโคสและซูโครสเป็นแหล่งสารอาหารคาร์บอนเพียงอย่างเดียว ภายใต้สภาวะแบบกึ่งไร้ออกซิเจน ซึ่งสายพันธุ์ของเชื้อ *E. coli* ดังกล่าวมีชื่อว่า KJ122 (Jantama et al., 2008a, b; Chan et al., 2012) นอกจากนี้ *E. coli* KJ122 สามารถผลิตกรดซักซินิกในปริมาณที่สูงจากการหมักแป้งมันสำปะหลังและกากมันสำปะหลัง (Sawisit et al., 2015a; Khor et al., 2016) ถึงแม้ว่าการผลิตกรดซักซินิกจาก *E. coli* KJ122 ที่ได้จะเป็นที่น่าพึงพอใจ แต่อย่างไรก็ตามการใช้น้ำตาลไซโลสซึ่งถือว่าเป็นน้ำตาลส่วนใหญ่ที่มาจากเฮมิเซลลูโลสของเชื้อ *E. coli* KJ122 เพื่อนำไปผลิตกรดซักซินิกเป็นไปได้อย่างไม่มีประสิทธิภาพ เนื่องจากกระบวนการลำเลียงน้ำตาลไซโลสเพื่อกิจกรรมของเซลล์ในระดับโมเลกุลถูกควบคุมอย่างเข้มข้น ดังนั้นเพื่อให้เกิดการลดต้นทุนการผลิตกรดซักซินิกอันเนื่องมาจากการใช้สารอาหารคาร์บอนราคาถูกและมีอย่างมากมายในประเทศไทย จึงมีความจำเป็นอย่างมากในการพัฒนาเชื้อสายพันธุ์ *E. coli* KJ122 อย่างต่อเนื่องเพื่อให้กระบวนการลำเลียงน้ำตาลไซโลสเข้าสู่เซลล์เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ ยังผลให้การผลิตกรดซักซินิกจาก

วัตถุดิบเฮมิเซลลูโลส เช่นสารย่อยของฟางข้าว ชานอ้อย รวมถึงลำต้นปาล์มน้ำมันมีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น เป็นการสร้างความเป็นไปได้ในการผลิตสารเคมีชีวภาพจาก second generation biomass อย่างยั่งยืน และในทางอุตสาหกรรมด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

การพัฒนากระบวนการผลิตไบโอซักซินิกจากเฮมิเซลลูโลสแทนการใช้แป้งและน้ำตาล เนื่องจากแป้งและน้ำตาลมีความสำคัญต่อห่วงโซ่อาหาร ซึ่งหากมีการนำแป้งและน้ำตาลมาใช้ในการผลิตสารเคมี และเชื้อเพลิงมากเกินไป จะเป็นการรบกวนความมั่นคงทางอาหารได้ ประเทศไทยจัดเป็นประเทศเกษตรกรรมทำให้มีทรัพยากรทางการเกษตรจำนวนมาก โดยมีการผลิตพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ ได้แก่ ข้าว อ้อย ข้าวโพด และมันสำปะหลัง เป็นต้น ซึ่งทั้งหมดสามารถใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการหมักไบโอซักซินิก ฉะนั้นการลงทุนผลิตไบโอซักซินิกจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรในประเทศไทยจึงมีความได้เปรียบ โดยเฉพาะด้านต้นทุนวัตถุดิบ โลจิสติกส์ และมีความต่อเนื่องของสายอุปทานชีวมวลที่จะป้อนให้กับระบบการผลิต และที่สำคัญกว่านั้นคือ โอกาสของเกษตรกรไทยที่จะได้รับประโยชน์จากตลาดใหม่สำหรับพืชผลทางการเกษตร เพราะการพัฒนาอุตสาหกรรมไบโอซักซินิกในประเทศจะเป็นการเปิดตลาดใหม่ให้แก่พืชผลทางการเกษตรอีกทางหนึ่งด้วย

ดังนั้นวัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัยนี้เพื่อต้องการปรับปรุงประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลไซโลสของเชื้อจุลินทรีย์ *E. coli* KJ122 เพื่อการผลิตกรดซักซินิกให้มีอัตราการผลิตสูง ผลผลิต และผลิตผลมากเพื่อจะได้นำเอาเชื้อที่พัฒนาปรับปรุงได้ไปใช้ในการผลิตกรดซักซินิกจากสารประกอบเฮมิเซลลูโลสที่ได้จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่นฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพดรวมถึงลำต้นปาล์ม เป็นต้น ยังผลให้เกิดการผลิตสารเคมีชีวภาพอย่างยั่งยืน และมีต้นทุนการผลิตต่ำ มีปริมาณเพียงพอกับความต้องการของตลาดภายในประเทศและสามารถที่จะนำไปต่อยอดในการผลิตกรดซักซินิกในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่เพื่อส่งออกขายในตลาดต่างประเทศต่อไป แผนงานวิจัยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. ทำการดัดแปลงวิถีเมทาบอลิซึ่มของการลำเลียงน้ำตาลไซโลสเข้าสู่เซลล์ *E. coli* KJ122 ด้วยวิธีการตัดสายพันธุกรรมของยีนที่เกี่ยวข้องกับการลำเลียงน้ำตาลไซโลสเข้าสู่เซลล์ เช่นยีน *xylE* และ *xylFGH* รวมถึงการใช้เทคนิควิวัฒนาการเมทาบอลิก (Metabolic evolution) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการลำเลียงน้ำตาลไซโลสเข้าสู่เซลล์ให้ดีขึ้นเพื่อการผลิตกรดซักซินิกได้ในประสิทธิภาพที่ดียิ่งขึ้นด้วย

2. ทำการทดสอบการผลิตกรดซักซินิกจากเชื้อ *E. coli* KJ122 (Δ*xylE* และ Δ*xylFGH*) ที่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรมแล้วในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่าย (Minimal Salts Media) โดยมีน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนเพียงอย่างเดียว

3. ทำการศึกษาการผลิตกรดซักซินิกจากเชื้อ *E. coli* KJ122 (Δ*xylE* และ Δ*xylFGH*) ในถังหมักแบบกะ (Batch fermentation) และแบบกึ่งกะ (fed-batch fermentation) เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่ให้อัตราการผลิต ผลผลิต และผลิตผลที่ดีในกระบวนการหมักด้วยน้ำตาลไซโลส เมื่อได้ข้อมูลพื้นฐานเป็นที่เรียบร้อยแล้วเราสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปประยุกต์ใช้เพื่อการผลิตกรดซักซินิกในอุตสาหกรรมที่มีการหมักในถังหมักขนาดใหญ่และต่อเนื่องต่อไป

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการพัฒนาเชื้อ *E. coli* KJ122 เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลไซโลสในการผลิตกรดซักซินิกให้มีอัตราการผลิตสูง ผลผลิต และผลิตผลมากเพื่อจะได้นำเอาเชื้อที่พัฒนาปรับปรุงได้ไปใช้ในการผลิตกรดซักซินิกจากสารประกอบเฮมิเซลลูโลสที่ได้จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่นฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด รวมถึงลำต้นปาล์ม เป็นต้น ยังผลให้เกิดการผลิตสารเคมีชีวภาพอย่างยั่งยืน และมีต้นทุนการผลิตต่ำ มีปริมาณเพียงพอกับความต้องการของตลาดภายในประเทศ และสามารถที่จะนำไปต่อยอด ในการผลิตกรดซักซินิกในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่เพื่อส่งออกขายในตลาดต่างประเทศต่อไป โดยใช้เทคนิคการตัดสายพันธุกรรมของ *xylE* และ *xylFGH* ร่วมกับการใช้เทคนิควิวัฒนาการเมทาบอลิก (Metabolic evolution) หลังจากนั้นจะทำศึกษาการผลิตกรดซักซินิกโดยใช้แบคทีเรีย *E. coli* KJ122 (Δ*xylE* และ Δ*xylFGH*) ที่ได้มาจากกระบวนการข้างต้นโดยใช้น้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งของสารอาหารคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อเกลือแร่ด้วยกระบวนการหมักแบบกะและแบบกึ่งกะเพื่อหวังให้ได้การผลิตกรดซักซินิกจากเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวอย่างมีประสิทธิภาพ

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

น้ำมันดิบนับเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจมหาศาล เพราะนอกจากจใช้เป็นต้นกำเนิดเชื้อเพลิงเหลวสำหรับการขับยานยนต์และเครื่องจักรกลต่าง ๆ แล้ว ยังเป็นแหล่งกำเนิดปิโตรเคมีหลากชนิดที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย เนื่องจากน้ำมันดิบเป็นทัพยากรสิ้นเปลือง (non-renewable resource) ที่นับวันจะยิ่งหายากและราคาสูงขึ้น ดังนั้นเพื่อทดแทนการนำเข้าน้ำมันดิบราคาสูงจากต่างประเทศและลดความวิตกกังวลในการขาดแคลนแหล่งน้ำมันดิบสำรองของโลก การแสวงหาแหล่งพลังงานวัสดุ และเคมีภัณฑ์แหล่งใหม่ทดแทนน้ำมันดิบจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในปัจจุบัน

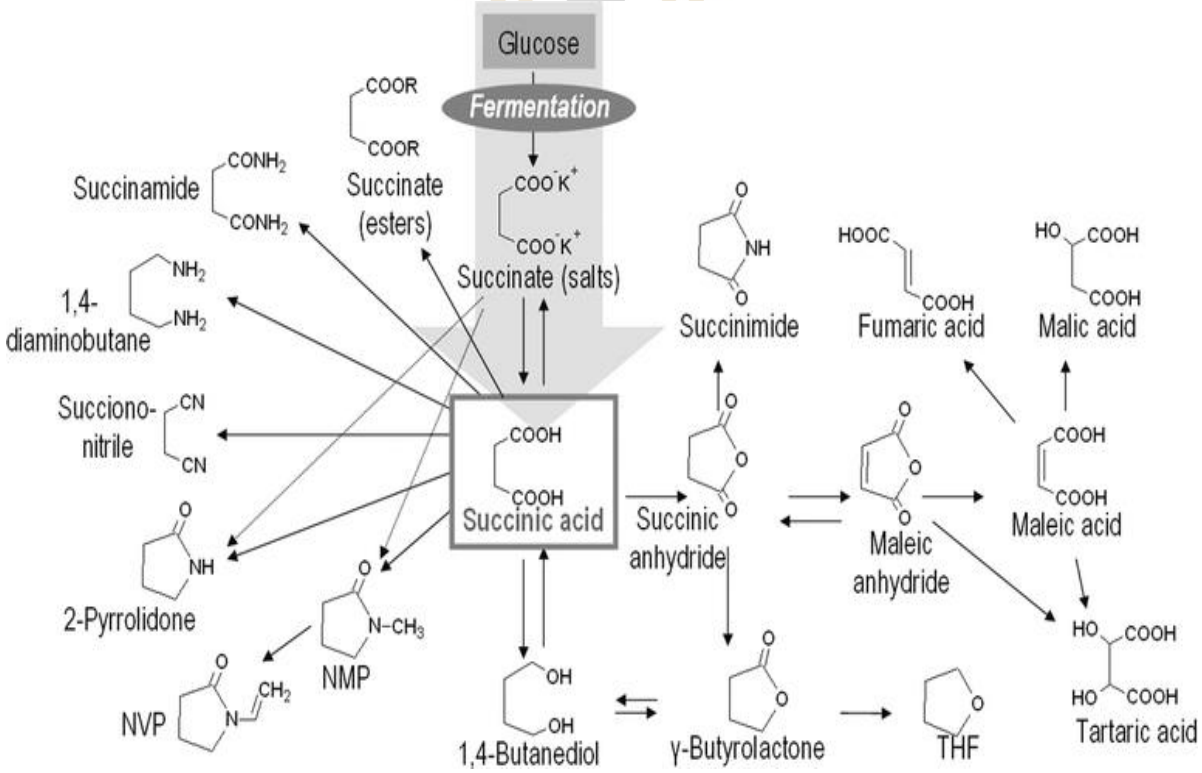
เป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่าประเทศไทยเราเป็นประเทศเกษตรกรรม ผลผลิตการเกษตรที่สำคัญส่วนใหญ่เป็นผลิตภัณฑ์แป้งที่ได้จากการปลูกมันสำปะหลังซึ่งเป็นแหล่งชีวมวล (biomass) ที่สำคัญ และมีปริมาณมากจนเกินกว่าความต้องการบริโภคภายในประเทศ และเกินกว่าที่จะส่งออกขายภายนอกประเทศ ทำให้ราคาสินค้าทางการเกษตรพวกแป้ง และน้ำตาลในประเทศมีราคาตกต่ำ นอกจากนั้นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว แกลบ กากอ้อย กากใย และลำต้นปาล์ม ที่มีมากมายมหาศาลยังมีศักยภาพในการเป็นชีวมวล โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่มีการปลูกพืชดังกล่าวกันอย่างแพร่หลายหลังจากการเพาะปลูกวัสดุดังกล่าวเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรซึ่งประกอบไปด้วยเส้นใยเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสเป็นส่วนใหญ่เมื่อทำการย่อยด้วยเอนไซม์ ร่วมกับกรดหรือด่างแล้วจะได้สารย่อยที่มีน้ำตาลไซโลสและกลูโคสเป็นส่วนประกอบหลัก งานวิจัยนี้จึงเป็นจุดเริ่มต้นที่ดีที่จะนำเอาชีวมวลที่ได้จากผลิตผลทางการเกษตร และวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นส่วนประกอบหลักมาทำเป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิตสารเคมีสำคัญ รวมถึงกรดซักซินิกโดยใช้ เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* KJ122 ที่ผ่านการดัดแปลงวิถีเมทาบอลิก เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพเพื่อรองรับความต้องการที่จะใช้กรดซักซินิกที่เพิ่มขึ้น และเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจของวัสดุทางการเกษตร

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเพื่อพัฒนากระบวนการหมักเพื่อการผลิตกรดซักซินิกจากเชื้อจุลินทรีย์ *E. coli* KJ122 ที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อเกลือแร่ (Mineral salts media) โดยไม่ต้องการ

การเสริมสร้างสารอาหารเชิงซับซ้อนที่มีราคาสูง โดยงานวิจัยนี้จะนำเชื้อสายพันธุ์ *E. coli* KJ122 ที่ผ่านการดัดแปลงเมทาบอลิกของเชื้อเพื่อให้เชื้อสายพันธุ์นี้ผลิตกรดซักซินิกเป็นหลักในกระบวนการหมักแบบกะภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน โดยทำการทดสอบการผลิตกรดซักซินิกจากแหล่งสารอาหารคาร์บอนคือน้ำตาลไซโลสด้วยกระบวนการหมักแบบกะ และกึ่งกะ เพื่อเป็นการพัฒนากระบวนการผลิตกรดซักซินิกด้วยเทคโนโลยีการหมักที่เหมาะสมมีประสิทธิภาพเพื่อใช้ต่อยอดในการผลิตในระดับที่ใหญ่ขึ้น จนถึงขั้นในระดับอุตสาหกรรม

1.5 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

กรดซักซินิก ($C_4H_6O_6$) เป็นกรดอินทรีย์ประเภทไดคาร์บอกซิลิก (มีหมู่คาร์บอกซิลิก 2 หมู่) ประกอบด้วยธาตุคาร์บอนรวม 4 อะตอม กรดซักซินิกมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมการผลิตยา วิตามิน และเครื่องสำอาง รวมถึงอุตสาหกรรมเคมีภัณฑ์อื่นๆ เช่น สารเคมีในบ้านเรือน และสีทาบ้าน รวมถึงนำมาใช้ในการผลิตพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ง่ายทางชีวภาพ ทำให้ความต้องการกรดซักซินิกเพิ่มสูงขึ้นทุกๆ ปี การมีขนาดโมเลกุลที่เล็กทำให้กรดซักซินิกสามารถใช้แทนสารเคมีอื่นๆ ที่ผลิตจากปิโตรเลียม ดังแสดงในภาพที่ 1.1 ทำให้เกิดการลดมลภาวะที่เกิดจากอุตสาหกรรมที่มีการใช้สารเคมีที่สังเคราะห์มาจากอนุพันธ์ของเบนซีนมากกว่า 250 ชนิด (Sauer et al, 2008)



ภาพที่ 1.1 การใช้กรดซักซินิกเป็นหน่วยการสร้างสำหรับสังเคราะห์สารเคมีชนิดต่างๆ (Kamm and Kamm, 2007)

ถึงแม้กรดซักซินิกจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง และมีความต้องการของตลาดสูงถึงประมาณ 20,000 ถึง 30,000 ตันต่อปี โดยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นสูงขึ้นเรื่อยๆ คิดเป็นร้อยละ 10 ต่อปี (Kidwell et al., 2008) แต่การผลิตกรดซักซินิกก็ยังไม่เพียงพอ เนื่องจากการผลิตกรดซักซินิกในภาคอุตสาหกรรมได้จากการสังเคราะห์ปิโตรเคมีที่ต้องใช้ต้นทุนการผลิตสูง โดยราคาของกรดซักซินิกในตลาดจะอยู่ที่ 5.9 ถึง 8.8 เหรียญสหรัฐต่อกิโลกรัม ขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์ จึงเป็นปัจจัยสำคัญที่จำกัดกำลังการผลิตกรดซักซินิกในภาคอุตสาหกรรม ด้วยประโยชน์ที่หลากหลายของกรดซักซินิกจึงมีการคิดค้นวิธีการผลิตกรดซักซินิกให้ได้ปริมาณมากด้วยต้นทุนที่ต่ำกว่าการผลิตโดยวิธีสังเคราะห์จากปิโตรเคมี การผลิตกรดซักซินิกจากเชื้อจุลินทรีย์ด้วยกระบวนการหมักสามารถทดแทน และลดการใช้สารปิโตรเลียมเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิตกรดซักซินิก และอนุพันธ์ของกรดซักซินิก โดยสามารถผลิตกรดซักซินิกที่มีราคาจำหน่าย 2.2 เหรียญสหรัฐต่อกิโลกรัม ที่มีกำลังการผลิต 5,000 ตันต่อปี และถ้าเพิ่มกำลังผลิตเป็น 75,000 ตันต่อปีขึ้นไป จะทำให้ได้กรดซักซินิกที่มีราคาจำหน่าย 0.55 เหรียญสหรัฐต่อกิโลกรัม ซึ่งถูกกว่ากรดซักซินิกที่ผลิตจากปิโตเลียม และเป็นผลดีต่อประเทศในด้านการลดการนำเข้าน้ำมันดิบที่มีราคาสูงขึ้นอย่างมาก (Nordhoff et al., 2007) อีกยังผลกระทบทางด้านความเป็นพิษจากสารที่ได้ระหว่างกระบวนการสังเคราะห์กรดซักซินิกโดยใช้ปฏิกิริยาเคมี (Hatti-Kaul et al., 2007; Sauer et al., 2008)

มีนักวิจัยหลายกลุ่มทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สร้างกรดซักซินิกจากของเหลวในกระเพาะอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น วัว และควาย ยกตัวอย่างเช่น *Ruminococcus flavefaciens*, *A. succinogens*, *A. succiniciproducens*, *A. succiniciproducens* และ *M. succinoproducens* (Bryant and Small, 1956; Guettler et al., 1996; Guettler et al., 1998; Song et al., 2007) โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถสร้างกรดซักซินิกได้ในปริมาณสูงจากการหมักน้ำตาลกลูโคส (ตารางที่ 1.1) อย่างไรก็ตามการผลิตกรดซักซินิกในเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มนี้จำเป็นต้องอาศัยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารเชิงซับซ้อน และธาตุอาหารพิเศษบางชนิดเพื่อความต้องการในการเจริญเติบโต สังเคราะห์กรดอะมิโนจำเป็น และวิตามินต่าง ๆ รวมถึงการสร้างกรดซักซินิกในปริมาณสูงต้องอยู่ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนแบบยิ่งยวด เมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้มาทำการผลิตกรดซักซินิกในระดับอุตสาหกรรมทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้นที่เกิดจากราคาอาหารเลี้ยงเชื้อ และราคาก๊าซอื่นๆ ที่ใช้ในการทำให้เกิดสภาวะไร้ออกซิเจนแบบยิ่งยวด และเพิ่มมวลชีวภาพ

การผลิตกรดซักซินิกจากการหมักน้ำตาลกลูโคสภายใต้สภาวะแบบกึ่งไร้ออกซิเจนโดยใช้แบคทีเรีย *E. coli* ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน และมีการพัฒนาสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์นี้อย่างต่อเนื่องในระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมา พบว่า *E. coli* AFP111 ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธีการตัดยีน *ldhA* และ *pflB* ทิ้ง สามารถผลิตกรดซักซินิกจากน้ำตาลกลูโคสได้ที่ความเข้มข้น 75 มิลลิโมลาร์ (ตารางที่ 1.2) (Chatterjee et al., 2001) นอกเหนือจากนี้ยังพบว่า การตัดยีน *ptsG* ช่วยเพิ่มผลผลิตของกรดซักซินิกใน *E. coli* AFP184 อีกด้วย (Andersson et al., 2007) อย่างไรก็ตาม *E. coli* AFP111 และ AFP184 ยังมีอัตราการผลิตกรดซักซินิกในปริมาณที่ต่ำ ดังนั้น *E. coli* KJ122 จึงถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อเพิ่มผลผลิตของกรดซักซินิกด้วยวิธีการตัดสายพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง กรดแลคติก กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และเอทานอล ร่วมกับการทำวิวัฒนาการทางเมทาบอลิก พบว่า *E. coli* KJ122 สามารถผลิต

กรดซักซินิกจากน้ำตาลกลูโคส จากอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่ายที่ไม่มีการเสริมสารอาหารเชิงซับซ้อน (Jantama et al., 2008b) ได้ในปริมาณที่สูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *E. coli* AFP111 และ AFP184 (ตารางที่ 1.2)

ตารางที่ 1.1 แสดงแบคทีเรียที่ผลิตกรดซักซินิกได้เองตามธรรมชาติที่นำมาผลิตกรดซักซินิกในระดับอุตสาหกรรม

Organism	Medium/Condition[a]	Succinate Titer (mM)[b]	Reference
A. succinogenes FZ53	130 g/l glucose supplemented with 15 g/l CSL and 5 g/l YE, 80 g/l $MgCO_3$, anaerobic batch fermentation, 78 h incubation	898 [1.36]	Guettler et al., 1996
A. succiniciproducens ATCC 53488	50 g/l glucose, 2% CSL, and 25 ppm tryptophan, neutralized with 5.5 M $NaCO_3$, saturated medium of 0.3 atm partial pressure of CO_2, 29.5 h incubation	289 [1.16]	Guettler et al., 1998
A. succiniciproducens ATCC 53488	120 g/l glucose in peptone/YE based medium, integrated membrane-bioreactor-electrodialysis with CO_2 sparging, 150 h incubation	703 [0.55]	Meynial-Salles et al., 2008
M. succiniciproducens MBEL55E KCTC 0769BP	18 g/L glucose in MH4 (YE based medium) supplemented with 119 mM $NaHCO_3$, a continuous-cell-recycle membrane reactor with the CO_2 partial pressure of 101.3 kPa gas (100% CO_2), 6 h incubation	144 [2.83]	Song et al., 2007

[a] Abbreviations: CSL, corn steep liquor; YE, yeast extract.

[b] Average volumetric productivity is shown in brackets [g/l.h] beneath succinate titer.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 1.2 แสดงแบคทีเรีย *E. coli* ที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อใช้ผลิตกรดซักซินิก

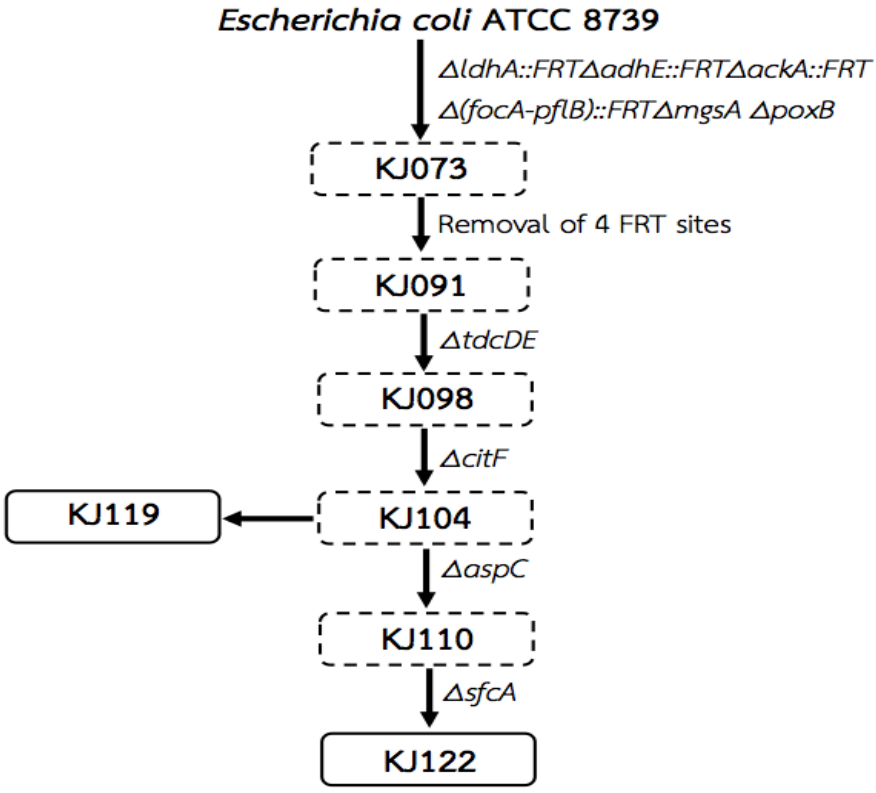
Organism	Medium/Condition[a]	Succinate Titer (mM)[b]	Reference
E. coli AFP111 (Δ*ldhA*, Δ*pflB, ptsG**)	9 g/l glucose in LB medium supplemented with 50 g/l $MgCO_3$, simple batch fermentation, 20 h incubation	75 [0.88]	Chatterjee et al., 2001
E. coli AFP184 (Δ*ldhA*, Δ*pflB,* Δ*ptsG*)	100 g/l glucose in minimal medium supplemented with 0.4 g/l CSL, dual phase- batch fermentation, 32 h incubation, pH maintained with NH4OH (15% NH_3 solution)	340 [0.50]	Andersson et al., 2007
E. coli KJ122 (Δ*ldhA,* Δ*adhE,* Δ*ackA,* Δ(*focA-pflB*), Δ*mgsA,* Δ*poxB,* Δ*tdcDE,* Δ*citF*, Δ*aspC,* Δ*sfcA*, Δ*pta-ackA*, *pck*, ptsI**)	100 g/l glucose in AM1 medium supplemented with 10 g/l $KHCO_3$, simple batch fermentation, 120 h incubation, pH maintained with 6:1 mixture of 6M KOH+3M K_2CO_3	700 [0.75]	Jantama et al., 2008b
	100 g/L cassava pulp in AM1 medium supplemented with 10 g/L $KHCO_3$, 2 L bioreactor batch SSF, 96 h incubation, pH maintained with 1:1 mixture of 6 M KOH + 3 M K_2CO_3	698 [0.70]	Sawisit et al., 2015a
	70 g/L cassava starch in AM1 medium supplemented with 10 g/L $KHCO_3$, 2 L bioreactor batch SSF, 72 h incubation, pH maintained with 1:1 mixture of 6 M KOH + 3 M K_2CO_3	593 [1.00]	Khor et al., 2016
E. coli KJ122-pKJSUC-24T (*cscKB* and *cscA* from *E. coli* B)	150 g/L sugarcane molasses in AM1 medium supplemented with 10 g/L $KHCO_3$, 10 L bioreactor simple batch fermentation, 96 h incubation, pH maintained with 1:1 mixture of 6 M KOH + 3 M K_2CO_3	560 [0.77]	Chan et al., 2012
E. coli KJ122-pKJSUC-24T (*cscKB* and *cscA* from *E. coli* B)	70 g/L sucrose in AM1 medium supplemented with 10 g/L $KHCO_3$, 10 L bioreactor with simple batch fermentation, 72 h incubation, pH maintained with 1:1 mixture of 6 M KOH + 3 M K_2CO_3	453 [0.74]	Chan et al., 2012

[a] Abbreviations: CSL, corn steep liquor; YE, yeast extract; SSF, simultaneous saccharification and fermentation.

[b] Average volumetric productivity is shown in brackets [g/l-h] beneath succinate titer.

E. coli KJ122 ถูกตัดแต่งดัดแปลงพันธุกรรมให้สามารถผลิตกรดซักซินิกได้ในปริมาณที่สูงในระดับห้องปฏิบัติการโดยมีอัตราการเจริญที่สูงรวดเร็วในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่ไม่มีการเสริมสารอาหารเชิงซับซ้อน และสามารถทำการผลิตกรดซักซินิกได้ในกระบวนการหมักแบบกะภายใต้สภาวะกึ่งไร้ออกซิเจนที่ความดันและอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดย *E. coli* KJ122 นั้นถูกดัดแปลงกระบวนการสร้างและสลายมาจากเชื้อ *E. coli* KJ073 อีกต่อหนึ่งโดยที่สายพันธุ์นี้ถูกตัดแต่งพันธุกรรมมาจาก *E. coli* ATCC 8739 สายพันธุ์ตั้งต้นด้วยการดัดแปลงและการทำวิวัฒนาการวิถีกระบวนการสร้างและสลาย (metabolic engineering and metabolic evolution) ซึ่ง สายพันธุ์ *E. coli* KJ073 ถูกตัดยีน *ldhA, adhE, ackA, (focA-pflB), mgsA* และ *poxB* ซึ่งยีนดังกล่าวเกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ lactate dehydrogenase, alcohol dehydrogenase, acetate kinase, pyruvate formate lyase, methyl glyoxylase และ pyruvate oxidase ตามลำดับ ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้เกี่ยวข้องกับการสร้างกรดอินทรีย์ต่างๆ ที่ไม่ใช่กรดซักซินิก ระหว่างกระบวนการหมักน้ำตาลภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน เป็นผลให้สายพันธุ์ดังกล่าวสามารถผลิตกรดซักซินิกได้มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น (ATCC 8739) และได้ผลผลิต (yield) เท่ากับ 1.2 โมลของซักซิเนตต่อโมลของน้ำตาลกลูโตสที่ถูกใช้ไป หลังจากนั้นสายพันธ์ KJ073 ถูกนำไปพัฒนาต่อเพื่อให้สามารถสร้างกรดซักซินิกในปริมาณสูงขึ้นอีกโดยการตัดยีน *tdcDE , citF, aspC* และ *sfcA* ทำให้ได้สายพันธุ์ KJ122 (รูปที่ 1.2) โดยยีนดังกล่าวเกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ threonine decarboxylase, citrate lyase, aspartate synthase และ malate dehydrogenase ตามลำดับ ซึ่งสายพันธุ์ KJ122 สามารถผลิตกรดซักซินิกความเข้มข้น 83 กรัมต่อลิตร มีค่าผลผลิตได้ (yield) เท่ากับ 1.46 โมลของซักซิเนตต่อโมลของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไป และผลิตผลเฉลี่ย (average productivity) ที่เวลา 120 ชั่วโมง เท่ากับ 0.9 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง นอกจากนี้ *E. coli KJ122* สามารถใช้แป้งมันสำปะหลังและกากมันสำปะหลังในการผลิตกรดซักซินิกได้ในความเข้มข้นที่สูงถึง 593 และ 700 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (ตารางที่ 1.2)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 1.2 การตัดแต่งพันธุกรรมของ *E. coli* ATCC 8739 สายพันธุ์ตั้งต้นเพื่อสร้างสายพันธุ์ KJ122 (Jantama *et al*., 2008b)

เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ KJ122 ได้ถูกดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อให้สามารถผลิตซักซิเนตในระดับความเข้มข้นและผลได้ที่สูงในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำที่มีกลูโคส ภายใต้สภาวะการหมักแบบไร้ออกซิเจนอย่างง่าย อย่างไรก็ตามสายพันธุ์นี้ไม่สามารถใช้น้ำตาลซูโครสอย่างมีประสิทธิภาพเนื่องจากการยับยั้งกระบวนการสลาย (catabolite repression) ดังนั้น Chan et al. (2012) ได้เพิ่มประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลซูโครสของสายพันธุ์ *E. coli* KJ122 ด้วยยีนที่สร้างเอนไซม์สลายซูโครส (*cscA* and *cscKB*) ที่มีส่วนของโปรโมเตอร์ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ B ซึ่งมีความสามารถในการใช้น้ำตาลซูโครสได้ตามธรรมชาติถูกโคลนและแสดงออกใน *E. coli* KJ122 โดยที่สายพันธุ์ *E. coli* KJ122 ที่มีพลาสมิดลูกผสมที่ชื่อว่า pKJSUC อยู่ได้ถูกคัดเลือกการใช้น้ำตาลซูโครสอย่างมีประสิทธิภาพในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Phenol Red ที่มีน้ำตาลซูโครสผสมอยู่ทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว และอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้น โคลนที่ได้สามารถแสดงอาณาเขตโคโลนีสีเหลืองใสที่ใหญ่กว่าเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ *E. coli* KJ122 ที่ไม่มีพลาสมิดลูกผสมอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้น และยังแสดงความสามารถในการเจริญ และการสร้างกรดอย่างรวดเร็วในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว

หลังจากการทำวิวัฒนาการของกระบวนการสร้างและสลาย *E. coli* สายพันธุ์ KJ122-pKJSUC สามารถใช้น้ำตาลซูโครสอย่างมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดซักซินิกที่มีความเข้มข้นสูงโดยมีการสะสมของผลิตภัณฑ์อันไม่พึงประสงค์ในระดับต่ำในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ AM1 อาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวชนิดที่มีความเข้มข้นเหมาะสมที่ 70 กรัมต่อลิตรของน้ำตาลซูโครสให้กรดซักซินิกที่ความเข้มข้น 453 มิลลิโมลาร์ (ผลิตผล 0.74 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 10 ลิตร ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่ 72 ชั่วโมง

อย่างไรก็ตามพบว่า ยาปฏิชีวนะไม่มีผลกระทบต่อการผลิตกรดซักซินิกจากเชื้อสายพันธุ์ *E. coli* KJ122-pKJSUC ภายใต้สภาวะการหมักแบบกะ นอกจากนั้นกรดซักซินิกถูกผลิตที่ความเข้มข้น 560 มิลลิโมลาร์ (ผลิตผล 0.77 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) จากกากน้ำตาลอ้อย 150 กรัมต่อลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 10 ลิตร ภายในเวลา 96 ชั่วโมง ซึ่งสามารถสรุปผลการทดลองได้ตารางที่ 1.2 จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *E. coli* KJ122-pKJSUC น่าจะเป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการผลิตกรดซักซินิกจากน้ำตาลซูโครส และกากน้ำตาลอ้อยที่มีความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจ

อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าจากการศึกษาการผลิตกรดซักซินิกจากน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส แป้งมันสำปะหลัง และกากมันสำปะหลังด้วย *E. coli* KJ122 ที่ได้จะเป็นที่น่าพึงพอใจแต่ยังไม่มีงานวิจัยที่การนำเอาสารอาหารคาร์บอนที่ได้จากเฮมิเซลลูโลสที่มาจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาใช้ในการผลิตกรดซักซินิก ดังนั้นจึงมีความน่าสนใจเป็นอย่างมากในการที่จะนำเอาน้ำตาลที่จได้จากการย่อยเฮมิเซลลูโลสมาใช้ในการผลิตกรดซักซินิกเพื่อทำให้เกิดมูลค่าเพิ่มของวัตถุดิบดังกล่าวเป็นกรดซักซินิกที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจมากขึ้น

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น ด้านวิชาการ ด้านนโยบาย ด้านเศรษฐกิจ/พาณิชย์ ด้านสังคมและชุมชน รวมถึงการเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ และหน่วยงานที่ใช้ประโยชน์จากผลการวิจัย

ประเทศไทยมีศักยภาพอย่างมากที่จะทำการผลิตกรดซักซินิกโดยเทคนิคด้านเทคโนโลยีชีวภาพจากกระบวนการหมักเนื่องจากความพร้อมทางด้านวัตถุดิบ และความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถใช้ในการผลิตกรดซักซินิก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงถูกเสนอขึ้นภายใต้กรอบแนวคิดที่จะนำเอาประโยชน์ที่ได้จากการดัดแปลงพันธุกรรมของเชื้อ *E. coli* KJ122 ที่สามารถผลิตกรดซักซินิกจากสารอาหารคาร์บอนได้หลากหลายและอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ (mineral salts medium) และมีราคาถูก ไม่ต้องการสารอาหารที่ซับซ้อนที่มีราคาแพงเช่น yeast extract หรือ peptone เป็นต้น การผลิตยังสามารถทำได้ที่สภาวะกึ่งมีออกซิเจน (facultative anaerobic conditions) และมีการควบคุมสภาวะกระบวนการหมักอย่างง่ายๆ ทั้งนี้กระบวนการผลิตของเชื้อ *E. coli* KJ122 สามารถลดข้อบกพร่องของการผลิตกรดซักซินิกแบบดั้งเดิมด้วยเชื้อแบคทีเรียที่สร้างกรดซักซินิกเป็นหลักตามธรรมชาติ (succinate-producing bacteria) กล่าวคือในกรณีของเชื้อแบคที่เรียที่สร้างกรดซักซินิกเป็นหลักที่คัดแยกได้จากธรรมชาติส่วนมากมักจะมีอัตราการผลิตกรดซักซินิกสูงในสภาวะไร้ออกซิเจนอย่างยิ่งยวด (strictly anaerobic conditions) ซึ่งยากต่อการควบคุมและมีความสิ้นเปลืองจากการเพิ่มก๊าซต่างๆ เข้าสู่กระบวนการผลิต เพื่อให้เกิดสภาวะไร้ออกซิเจนแบบยิ่งยวดและเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้ต้องการธาตุอาหารเสริมบางชนิดที่จำเพาะและมีราคาแพงที่ทำให้ราคาต้นทุนการผลิตเพิ่มสูงขึ้น ในทางตรงกันข้ามการใช้ *E. coli* KJ122 ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อการผลิตกรดซักซินิกซึ่งสามารถทำได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำราคาถูก และใช้สภาวะกึ่งไร้ออกซิเจนธรรมดาที่ไม่ต้องการเพิ่มก๊าซใดๆ ในกระบวนการผลิต อย่างไรก็ตามการผลิตกรดซักซินิกจากเชื้อ *E. coli* KJ122 ยังต้องได้รับการพัฒนาปรับปรุงกระบวนการหมักเพื่อให้เหมาะสมต่อวัตถุดิบแต่ละชนิด เช่นน้ำตาลไซโลสที่ได้จากการย่อยเฮมิเซลลูโลสด้วยงานวิจัยที่ต่อยอดเพื่อนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

งานวิจัยนี้จะเป็นส่วนหนึ่งของโครงการการเรียนการสอนระดับบัณฑิตศึกษาดังนั้นความรู้และเทคนิคต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จะถูกถ่ายทอดโดยตรงกับนักศึกษาบัณฑิตศึกษาที่กำลังอยู่ในระหว่าง

การทำวิทยานิพนธ์ นอกเหนือจากนั้นงานวิจัยนี้เป็นการใช้องค์ความรู้เฉพาะทางที่มีจุดมุ่งหมายระยะยาวในการถ่ายทอดเทคนิควิธีการจากมหาวิทยาลัยไปสู่ทั้งภาคเกษตรและภาคอุตสาหกรรมเพื่อพัฒนากระบวนการผลิตกรดซักซินิกจากกระบวนการหมักโดยเชื้อแบคทีเรียให้มีฐานการผลิตขนาดใหญ่ ที่จะเป็นเป้าหมายในการผลิตเพื่อการค้าในอนาคต

เนื่องด้วยหัวหน้าโครงการวิจัย มีประสบการณ์หลังจบการศึกษาในระดับปริญญาเอกภายในระยะเวลาน้อยกว่า 10 ปี ทำให้เป็นโอกาสอันดีที่แผนงานวิจัยนี้จะมีส่วนช่วยให้หัวหน้าโครงการวิจัย มีแหล่งเงินทุนสนับสนุนการวิจัยเพื่อพัฒนาขีดความสามารถในการทำวิจัย รวมถึงการผลิตผลงานทางวิชาการในรูปแบบต่าง ๆ เช่นบทความทางวิชาการ ยังผลให้เป็นนักวิจัยรุ่นใหม่อย่างมีคุณภาพต่อไป

นอกจากนั้นงานวิจัยนี้ทั้งหัวหน้าโครงการวิจัยและผู้ร่วมงานวิจัยยังมีโอกาสในการถ่ายทอดความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์ที่ตนเองถนัดไปยังนักศึกษาระดับปริญญาตรี และปริญญาโทที่สนใจเข้ามามีส่วนร่วมในการทำงานวิจัยที่เสนอในแผนงานวิจัยนี้ ทั้งนี้นักศึกษาระดับปริญญาตรี และปริญญาโทจะมีโอกาสได้เรียนรู้การปฏิบัติงานทางด้านวิทยาศาสตร์อย่างมีระบบ และเป็นแบบแผนซึ่งจะเป็นพื้นฐานการสร้างบุคลากรทางวิทยาศาสตร์ที่มีความสามารถต่อไปในอนาคต

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้จากการวิจัยนี้คือการตีพิมพ์ลงในวารสารทางวิทยาศาสตร์ในระดับนานาชาติ เช่น applied microbiology and biotechnology เป็นต้น ซึ่งสามารถเสนอผลงานวิจัยในแง่การพัฒนากระบวนการผลิตกรดซักซินิกจากเชื้อ *E. coli* KJ122 ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมจากน้ำตาลไซโลสที่ได้จากการย่อยเฮมิเซลลูโลส นำไปสู่การถ่ายทอดเทคโนโลยีจากภาคการศึกษาสู่ภาคการผลิตขนาดอุตสาหกรรมซึ่งจะเป็นการแก้ปัญหาราคาตกต่ำของปริมาณวัตถุดิบทางการเกษตรของกลุ่มพืชพลังงานที่ล้นตลาดเช่น อ้อย และมันสำปะหลัง เป็นต้น ให้มาเป็นกรดซักซินิกที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูงต่อไปได้

1.7 แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

งานวิจัยนี้สามารถทำการผลิตกรดซักซินิกจากการเปลี่ยนมวลชีวภาพ ซึ่งรวมถึงสารคาร์บอนราคาถูกที่ได้จากกลุ่มพืชพลังงาน ที่มีราคาถูกไปเป็นกรดซักซินิกที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจอยู่สูง เพื่อรองรับกับความต้องการกรดซักซินิกไว้ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารเคมีอื่น ๆ ที่สำคัญ รวมถึงพลาสติกชีวภาพต่อไป ดังนั้นเทคโนโลยีที่ได้จากงานวิจัยนี้เมื่อสำเร็จทำให้ประเทศไทยเรามีสายพันธุ์แบคทีเรีย KJ122 ที่สร้าง กรดซักซินิก รวมถึงได้องค์ความรู้ด้านเทคโนโลยีการหมักที่เหมาะสมในการนำเอาเชื้อ KJ122 จากน้ำตาลไซโลสเอาไว้ใช้ในการผลิตกรดซักซินิกเองภายในประเทศโดยไม่ต้องพึ่งกระบวนการผลิต กรดซักซินิกจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกหรือพัฒนากระบวนการผลิตมาจากแหล่งอื่นซึ่งสามารถลดต้นทุนการผลิตจากการจ่ายเงินเพื่อซื้อสิทธิบัตรการผลิตจากต่างประเทศ

ดังนั้นเทคโนโลยีที่พัฒนาได้จากงานวิจัยชิ้นนี้สามารถถูกนำไปถ่ายทอดเพื่อการกรดซักซินิกในระดับโรงงานอุตสาหกรรมที่มีการขยายขนาดกำลังการผลิตจากการหมักแบบกะ เป็นการหมักแบบต่อเนื่องในถังหมักปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดใหญ่ซึ่งทำให้เกิดการนำเอาองค์ความรู้ที่ถูกคิด และพัฒนาจากสถาบันการศึกษาในระดับมหาวิทยาลัยไปสู่ภาคเอกชนที่มีศักยภาพในการลงทุนการผลิตกรดซักซินิกในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่เพื่อการค้าต่อไป ตัวอย่างโรงงานอุตสาหกรรมที่น่าจะนำเอาเทคโนโลยีการผลิต กรดซักซินิกที่พัฒนาจากงานวิจัย

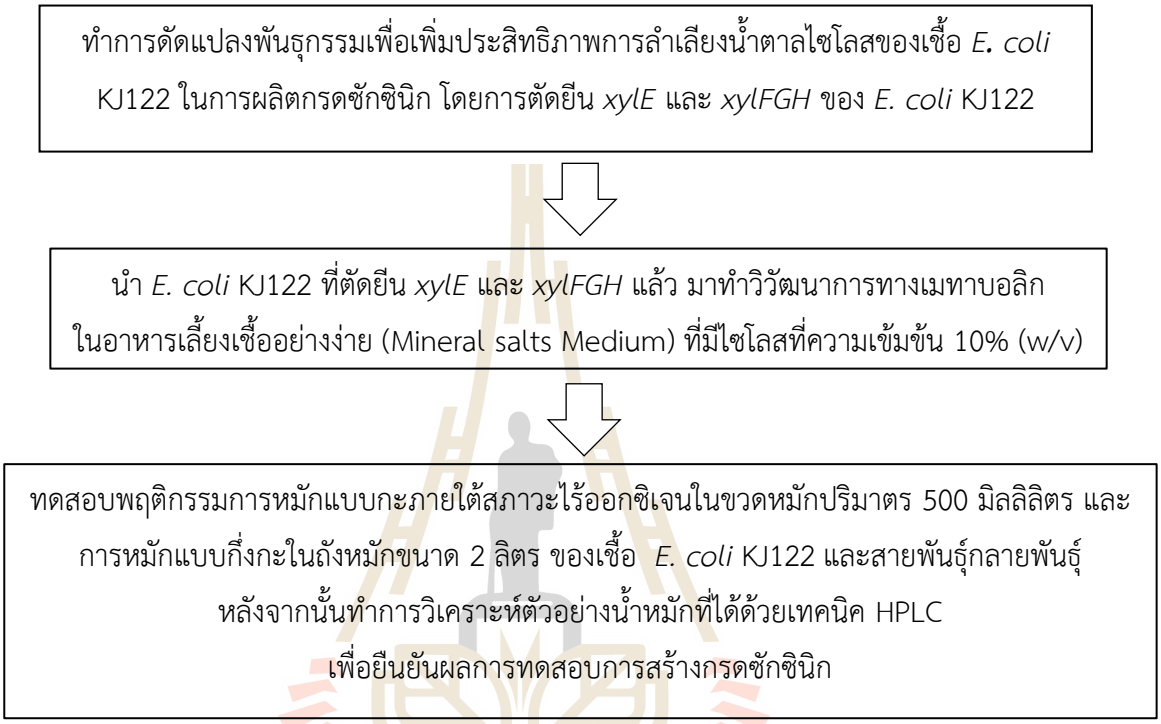
นี้ไปใช้ได้แก่โรงงานอุตสาหกรรมที่มีการแปรรูปสินค้าทางการเกษตร เช่นน้ำตาล และแป้งมัน โดยที่โรงงานเหล่านี้สามารถนำเอาน้ำตาล แป้งมัน หรือวัสดุเหลือใช้จากกระบวนการผลิต เช่น ชานอ้อย กากน้ำตาล กากมันสำปะหลัง ที่ทางโรงงานผลิตได้เองมาเป็นวัตถุดิบการผลิตกรดซักซินิก อย่างครบวงจร ซึ่งมีตัวอย่างที่คล้ายคลึงให้เห็นเช่นการผลิตไบโอเอทานอลของโรงงานผลิตน้ำตาลจากกากน้ำตาลอ้อยหลายแห่งในประเทศ ทั้งนี้การถ่ายทอดเทคโนโลยีดังกล่าวสามารถทำได้ภายหลังจากการสิ้นสุดการดำเนินงานวิจัย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

ในการวิจัยนี้จะทำการทดลองตามวิธีการวิจัยตามแผนภูมิด้านล่าง

<u>แผนภูมิการดำเนินการวิจัย</u>



2.1 เชื้อจุลินทรีย์ ไพร์เมอร์ และอาหารเลี้ยงเชื้อ

เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* KJ122 ถูกใช้เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นในการพัฒนาสายพันธุ์มิวแตนท์ที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสด้วยวิธีการตัดสายพันธุกรรมทิ้ง นอกจากนั้นแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ รวมถึงพลาสมิด และไพร์เมอร์ที่ใช้ในการทำโคลนนิ่งที่เกี่ยวข้องกับการวิจัยนี้ถูกสรุปไว้ในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ลักษณะ แหล่งที่มาของสายพันธุ์แบคทีเรีย พลาสมิด และไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

	ลักษณะ	แหล่งที่มา
	สายพันธุ์	
E. coli KJ122	*E. coli* ATCC 8739 (Δ*ldhA*, Δ*adhE*, Δ*ackA*, Δ *(focA-pflB)*, Δ*mgsA*, Δ*poxB*, Δ*tdcDE*, Δ*citF*, Δ*aspC*, Δ*sfcA*, *pck**, *ptsI**)	Jantama *et al*., 2008a, b
E. coli KJ12201	*E. coli* KJ122 (Δ*xylFGH*)	งานวิจัยนี้
E. coli KJ12202	*E. coli* KJ122 (Δ*xylE*)	งานวิจัยนี้
E. coli KJ12203	*E. coli* KJ122 (Δ*xylFGH*, Δ*xylE*)	งานวิจัยนี้
E. coli KJ12201-14T	*E. coli* KJ12201 ที่ผ่านการทำวิวัฒนาการทางเมทาบอลิซึมในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่าย AM1 ที่มีน้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร	งานวิจัยนี้
	พลาสมิด	
pKD4	*bla* FRT-*kan*-FRT	Datsenko and Wanner, 2000
pKD46	*bla γ β exo* (Red recombinase), temperature-conditional replicon	Datsenko and Wanner, 2000
pFT-A	*bla flp* temperature-conditional replicon and FLP recombinase	Posfai, 1997
	ไพรเมอร์	
XylFGH-Forward	5’ATGAAAATAAAGAACATTCTACTCACCCTTTGCACCTCACTCCTGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC 3’	งานวิจัยนี้
XylFGH-Reverse	5’TCAAGAACGGCGTTTGGTTGCGGAGTCCATCCATACTGCCAGCAACATATGAATATCCTCCTTAG 3’	งานวิจัยนี้
XylE-Forward	5'ATGAATACCCAGTATAATTCCAGTTATATATTTTCGATTACCTTAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC 3'	งานวิจัยนี้
XylE-Reverse	5’TTGCAGCGTACCAGTTTGTTGTGTTTTCTTCGTTTCCGGTTCCCACATATGAATAT CCTCCTTAG 3’	งานวิจัยนี้

- 20 bp underlined is corresponded to antibiotic-resistant kanamycin gene (*kan* cassette)

สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* KJ122 เพื่อจะทำการผลิตกรดซักซินิกนั้นจะใช้อาหาร AM1 ตามรายงานของ Martinez et al. (2007) ซึ่งมีองค์ประกอบตามตารางที่ 2.2 โดยจะมีการเติมน้ำตาลไซโลสเพื่อใช้เป็นสารอาหารคาร์บอนตั้งต้นเพื่อการผลิตกรดซักซินิก

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่าย AM1 (Martinez et al., 2007)

องค์ประกอบหลัก	**ความเข้มข้น (มิลลิโมลต่อลิตร)**
$(NH_4)_2HPO_4$	19.92
$NH_4H_2PO_4$	7.56
Total PO_4	27.48
Total N	47.93
[a]Total K	1.00
$MgSO_4.7H_2O$	1.50
Betaine-HCl	1.00
องค์ประกอบธาตุโลหะ	**(ไมโครโมลต่อลิตร)[b]**
$FeCl_3.6H_2O$	8.88
$CoCl_2.6H_2O$	1.26
$CuCl_2.2H_2O$	0.88
$ZnCl_2$	2.20
$Na_2MoO_4.2H_2O$	1.24
H_3BO_3	1.21
$MnCl_2.4H_2O$	2.50
ความเข้มข้นเกลือรวม	**4.1 กรัมต่อลิตร**

[a] KOH is used to neutralize betaine-HCl stock.

[b] Trace metal stock (1000X) was prepared in 120 mM HCl.

2.2 สภาวะในการเลี้ยงและการเตรียมกล้าเชื้อ

กล้าเชื้อ (Inoculums) จะเตรียมโดยการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ *E. coli* KJ122 และสายพันธุ์ที่ได้ดัดแปลงพันธุกรรมในขวด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ LB 100 มิลลิลิตร บ่มในอ่างน้ำวนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่ใช้แรงกวน 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 16 ชั่วโมง สำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดซักซินิกจะเลี้ยงในขวดทดลองขนาด 500 มิลลิลิตร (รูปที่ 2.1) โดยใช้ปริมาตรน้ำหมัก (Working volume) 350 มิลลิลิตร และใส่กล้าเชื้อที่เตรียมได้ข้างต้นความเข้มข้นของค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร (OD_{550}) เท่ากับ 0.1 (33.3 มิลลิกรัม น้ำหนักแห้งของเซลล์ของเซลล์ (CDW; g/L) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใช้แรงกวน 200 รอบต่อ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

นาทีเป็นเวลา 120 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง ในระหว่างการหมักจะควบคุมค่า ความเป็นกรด-ด่าง อัตโนมัติด้วยการเติมสารละลายผสมของโพแทสเซียมคาร์บอเนตที่ความเข้มข้น 3 โมลาร์ และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 6 โมลาร์ ในอัตราส่วน 1:1 ทั้งนี้สภาวะไร้ออกซิเจนในกระบวนการหมักจะเกิดขึ้นทันทีที่แบคทีเรียเริ่มมีการเจริญและผลิตกรดอินทรีย์ขึ้น โดยกรดอินทรีย์ที่ผลิตขึ้นจะไปทำปฏิกิริยากับไบคาร์บอเนตในน้ำหมักแล้วปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาแทนที่ออกซิเจนในน้ำหมักทำให้เกิดสภาวะไร้ออกซิเจนขึ้น

รูปที่ 2.1 แสดงขวดทดลองขนาด 500 mL ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่เชื่อมต่อด้วยระบบควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในระหว่างการหมักอย่างอัตโนมัติ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2.3 การดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการลำเลียงน้ำตาลไซโลสของเชื้อ *E. coli* KJ122 ในการผลิตกรดซักซินิก

E. coli KJ122 จะถูกใช้เป็นจุลินทรีย์ตั้งต้นในการดัดแปลงเมทาบอลิซึมเพื่อทำให้เกิดการสร้างกรดซัคซินิกจากน้ำตาลไซโลส เป็นผลิตภัณฑ์หลักระหว่างการทำการหมักในสภาวะไร้อากาศ สายพันธุกรรมหรือยีน (gene) ที่เกี่ยวข้องในการลำเลียงน้ำตาลไซโลสของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้จะถูกตัดออกจากจีโนมโดยใช้เทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรมศาสตร์แบบตัดสายพันธุกรรมทิ้ง (gene deletion) รายชื่อของสายพันธุกรรมที่จะทำการตัดทิ้งออกจากจีโนมของเชื้อตั้งต้นได้แก่ *xylE* (xylose:proton transporter) และ *xylFGH* (xylose ABC transporter) วิธีการตัดสายพันธุกรรมถูกพัฒนามาจากวิธีของ Thomason et al. (2005) ซึ่งใช้เทคนิคการรีคอมบิเนชั่นแบบคู่เพื่อทำการตัดสายพันธุกรรมทิ้ง วิธีการนี้จะไม่เหลือสายพันธุกรรมที่แสดงฤทธิ์ต้านยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์บนจีโนมของ *E. coli* KJ122 ภายหลังการตัดสายพันธุกรรมทิ้งสิ้นสุดลง วิธีการอย่างย่อ ๆ คือชิ้นส่วนดีเอนเอที่จะถูกตัดทิ้งจะถูกแทนที่โดยสายดีเอนเอที่ประกอบด้วยสายพันธุกรรมที่ถูกสร้างมาจากชุด primers

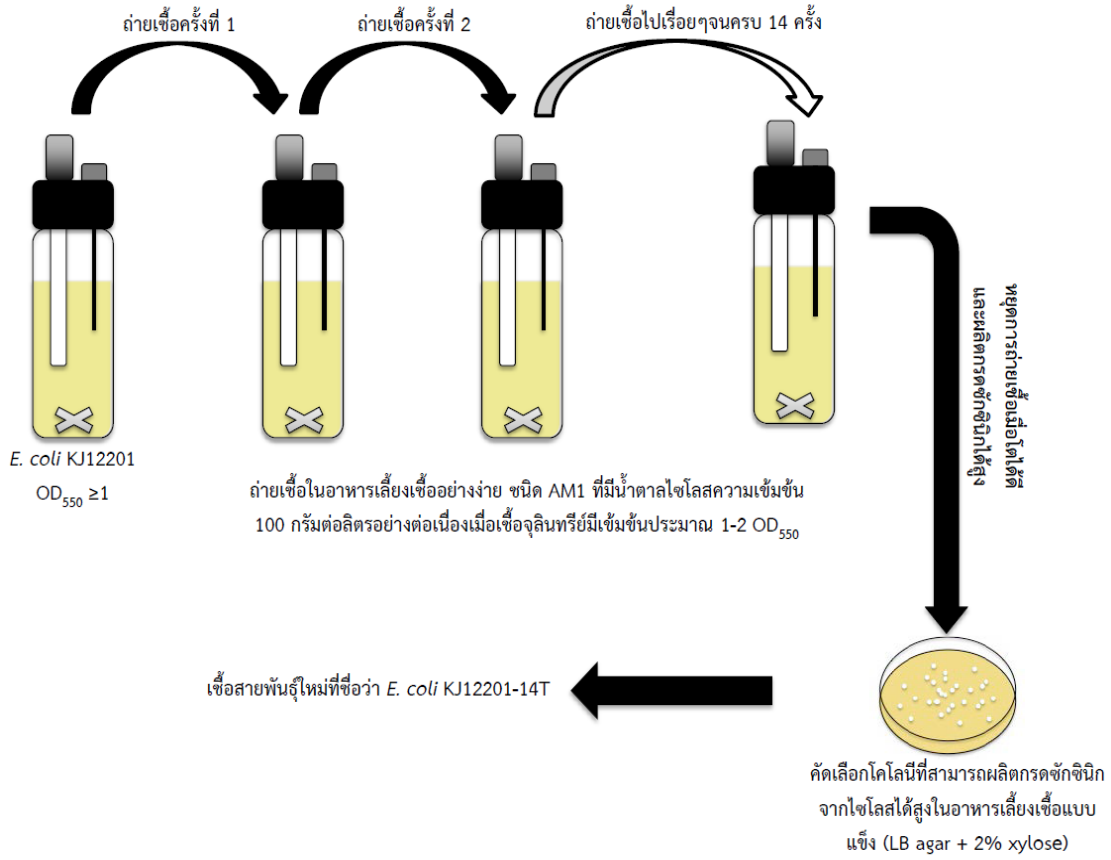
xylFGH-forward/reverse หรือ xylE-forward/reverse ที่สามารถลอกแบบยีนที่แสดงฤทธิ์ต้านยาปฏิชีวนะในที่นี้คือ kanamycin ที่ลอกมาจากพลาสมิด pKD4 (Datsenko and Wanner, 2002) หลังจากนั้นสายดีเอนเอดังกล่าวจะถูกส่งผ่านเข้าสู่เซลล์ KJ122 ที่แสดงออกยีน red recombinase ที่มาจากพลาสมิด pKD46 เพื่อให้เกิดการแทรกของชิ้นส่วนดีเอนเอนี้ ณ ตำแหน่งยีนที่ต้องตัดทิ้ง เซลล์ที่มีการแทรกยีนของสายดีเอนเอนี้จะถูกคัดแยกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-kanamycin agar และเซลล์จะถูกนำไปวิเคราะห์การถูกต้องของการแทรกยีน ณ ตำแหน่งจำเพาะของยีนที่ถูกตัดทิ้งด้วยเทคนิค PCR ต่อไป

2.4 การประยุกต์ใช้วิวัฒนาการเมทาบอลิก (Metabolic evolution) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้นสูง

นำเชื้อสายพันธุ์ *E. coli* KJ12201 มาทำวิวัฒนาการทางเมทาบอลิซึมเพื่อให้เชื้อสามารถเจริญ และผลิตกรดซักซินิกจากอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่าย (Mineral salts medium) (รูปที่ 2.2) โดยเริ่มต้นจากทำการเลี้ยงเชื้อ *E. coli* KJ12201 ในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่าย (Mineral Salts Medium) ที่มีน้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร จนได้ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 1-2 OD_{550} หลังจากนั้นทำการถ่ายเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อเดิมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดิมข้างต้นที่เตรียมขึ้นใหม่โดยให้มีความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นประมาณ 0.1 OD_{550} และบ่มเชื้อจนกระทั่งเชื้อเจริญอยู่ในช่วงกลางของ exponential phase จึงทำการถ่ายเชื้อใหม่อีกครั้ง เมื่อเชื้อสามารถเจริญได้ดีหรือเจริญเลยช่วง exponential phase ภายในเวลา 24 ชั่วโมงจะทำการถ่ายเชื้อใหม่อีกครั้งทุก ๆ 24 ชั่วโมงที่ความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นประมาณ 0.1 OD_{550} ทำอย่างนี้ซ้ำ ๆ จนกว่าเชื้อจะเจริญได้ดีและสามารถผลิตกรดซักซินิกได้เร็วขึ้น เมื่อเชื้อเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่ายที่มีไซโลสที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร

2.5 การหมักแบบกะ (Batch Fermentation) ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน

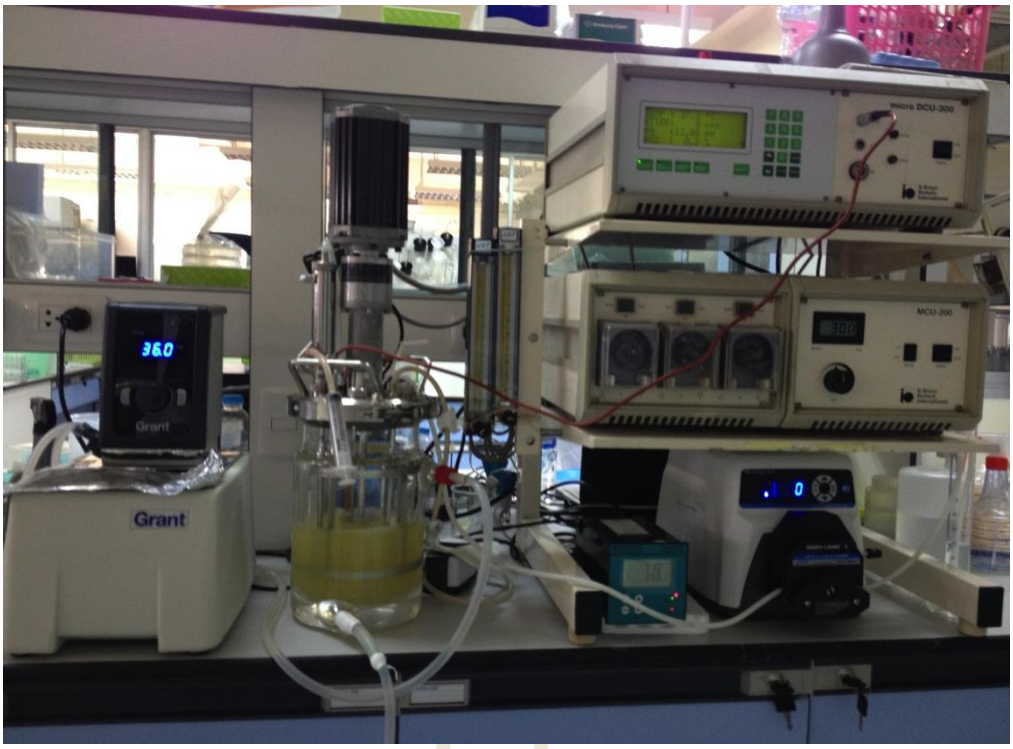
นำเชื้อสายพันธุ์ *E. coli* KJ12201 ที่ผ่านการทำวิวัฒนาการทางเมทาบอลิซึม ที่ผ่านการดัดแปลงกระบวนการสร้างและสลายจะถูกนำมาทดสอบ การสร้างกรดซักซินิกจากไซโลสด้วยกระบวนหมักแบบกะในสภาวะไร้ออกซิเจน ในภาชนะหมักขนาดบรรจุ 500 มิลลิลูกบาศก์เมตร (รูปที่ 2.1) โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่หลากหลายในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่ายชนิด AM1 (Martinez et al., 2007) ที่มีปริมาตร 350 มิลลิลูกบาศก์เมตร อุณหภูมิของน้ำหมักจะถูกควบคุมด้วยอ่างน้ำวน และความเร็วในการกวนจะถูกควบคุมด้วยเครื่องควบคุมการกวนอัตโนมัติ การหมักจะถูกควบคุมความเป็นกรดและด่างอย่างอัตโนมัติโดยสารละลายด่างจะถูกจ่ายเข้าภาชนะหมักอย่างอัตโนมัติเมื่อความเป็นกรดเพิ่มขึ้นเนื่องจากจุลินทรีย์มีการผลิตกรดอินทรีย์มากขึ้นระหว่างกระบวนการหมัก หลังจากนั้นนำน้ำหมักออกจากขวดหมักด้วยเข็มฉีดยาที่ต่อเข้ากับขวดหมักเพื่อทำการตรวจสอบการเจริญของเชื้อและวิเคราะห์ปริมาณกรดซักซินิก และน้ำตาลไซโลสที่อยู่ในน้ำหมักด้วยวิธี HPLC (High performance liquid chromatography) สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซักซินิกจะถูกศึกษา หลังจากนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซักซินิกจะถูกนำมาทดสอบในถังหมักขนาด 2 ลิตร ต่อไป



รูปที่ 2.2 วิวัฒนาการทางเมทาบอลิกของเชื้อสายพันธุ์ *E. coli* KJ12201 ในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่ายที่มีน้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร

2.6 การหมักแบบกึ่งกะ (Fed-batch Fermentation) ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน

กระบวนการผลิตกรดซักซินิกด้วยวิธีการการหมักแบบกึ่งกะ คือการประยุกต์จากการหมักแบบกะให้มีการเติมสารอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่เข้าไปอย่างต่อเนื่อง แต่จะไม่มีการถ่ายออกของน้ำหมัก ซึ่งวิธีดังกล่าวมีจุดประสงค์ที่จะหลีกเลี่ยงสภาวะยับยั้งที่เกิดจากความเข้มข้นของสารอาหารมากไปแต่การเติมสารอาหารด้วยวิธีการหมักแบบกึ่งกะสามารถที่จะเพิ่มประสิทธิภาพในการหมักได้ โดยจะให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จะทำการทดสอบการผลิตกรดซักซินิก โดยกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ (Fed-batch fermentation) ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนในภาชนะหมักขนาดบรรจุ 2 ลิตร (รูปที่ 2.3) โดยใช้ความเข้มข้นของไซโลสเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตกรดซักซินิกที่ดีที่สุดที่ได้จากการศึกษาการหมักแบบกะ ซึ่งการศึกษาการผลิตกรดซักซินิกด้วยกระบวนการหมักแบบกึ่งกะจะศึกษาอิทธิผลของความเข้มข้นของสารอาหารเลี้ยงเชื้อที่จะเติมเข้าไปในถังหมักในระหว่างการหมักที่มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตของกรดซักซินิกโดยจะทำการป้อนสารละลายเข้มข้นของไซโลสแบบการป้อนเป็นระยะ (interim feeding) ซึ่งสารละลายเข้มข้นไซโลสจะถูกป้อนเข้าถังหมักที่เวลาต่างกันเมื่อความเข้มข้นของไซโลสในน้ำหมักลดลงต่ำกว่า 5 กรัมต่อลิตร และรักษาระดับความเข้มข้นของไซโลสในน้ำหมักอยู่ระหว่าง 5 ถึง 30 กรัมต่อลิตร หลังจากระยะการเจริญของเซลล์ (growth phase) เพื่อศึกษาจลศาสตร์การผลิตกรดซักซินิกด้วยเชื้อ *E. coli* KJ12201 และ KJ12201-14T ในระบบการหมักแบบกึ่งกะ



รูปที่ 2.3 แสดงชุดถังหมักขนาด 2 ลิตรที่เชื่อมต่อกับอ่างควบคุมอุณหภูมิ และระบบควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในระหว่างการหมักอย่างอัตโนมัติ

2.7 การหาความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรีย

ความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียในระหว่างกระบวนการหมัก โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของน้ำหมักที่มีน้ำตาลไซโลส ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer (SPEKOL 1500, Analytik Jena, Germany) จากนั้นจะเปลี่ยนค่า OD_{550} ให้เป็นค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (dry cell weight) (1.0 OD_{550} จะเท่ากับ 0.33 มิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้งต่อมิลลิลิตรของน้ำหมักโดยประมาณ)

2.8 การวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมัก

การหาปริมาณความเข้มของน้ำตาลไซโลสและกรดอินทรีย์ (กรดซักซินิกและกรดแอซิติก) จะวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (High performance liquid chromatography) (Model 1200 series, Agilent technology, Germany) โดยใช้ Detector ชนิด RI (refractive index) ซึ่งน้ำตาลและกรดอินทรีย์จะถูกแยกโดยใช้คอลัมน์ชนิด anion exclusion (BIORAD, Aminex, HPX-87H, USA) ที่ตั้งอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 45 องศาเซลเซียส และใช้กรดซัลฟูริกความเข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์ เป็น mobile phase โดยใช้อัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที ฉีดตัวอย่างครั้งละ 10 ไมโครลิตร

2.9 การวิเคราะห์ทางจลนศาสตร์

ค่าอัตราการผลิตกรดซักซินิกในกระบวนการหมักแบบกะหรือกึ่งกะ (productivity; g/L/h) จะคำนวณโดยใช้ผลรวมของความเข้มข้นของซักซินิกหารด้วยเวลาในการหมักที่ทำให้ได้ปริมาณกรดซักซินิกสูงสุด ส่วนค่าผลผลิตที่ได้ (yield; g product/g sugar consumed) ของกรดซักซินิกนั้น จะคำนวณจากปริมาณความเข้มข้นของกรดซักซินิกหารด้วยปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ถูกใช้ไปเพื่อผลิตกรดซักซินิก

2.10 สถานที่ทำการทดลอง

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

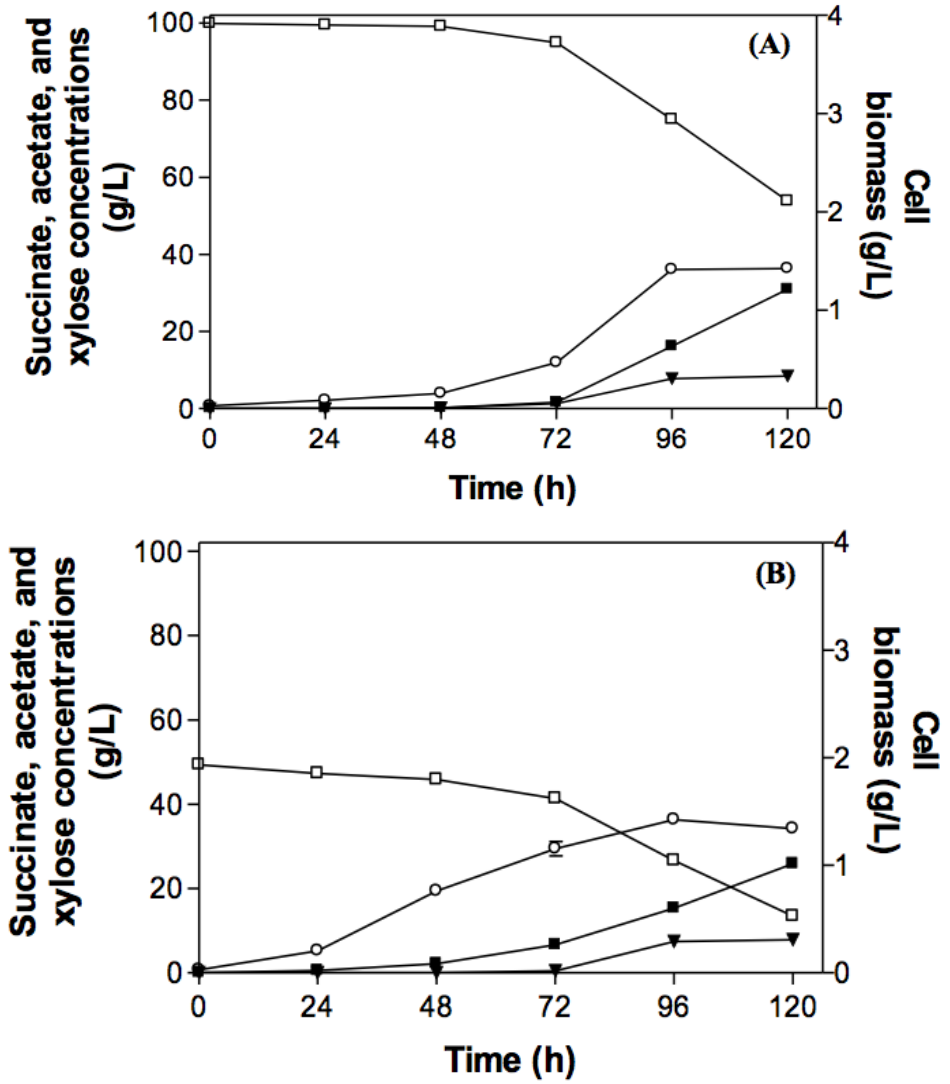
3.1 ผลของการผลิตซักซิเนตจากน้ำตาลไซโลสจากเชื้อ *E. coli* KJ122

E. coli KJ122 ได้รับการพัฒนาให้สามารถผลิตซักซิเนตได้ในปริมาณที่สูงจากกลูโคสภายใต้สภาวะการหมักแบบไร้ออกซิเจน ด้วยวิธีการตัดสายพันธุกรรมทิ้งร่วมกับการทำวิวัฒนาการทางเมทาบอลิซึม (Jantama et al., 2008a, b) อย่างไรก็ตามสายพันธุ์นี้ไม่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสที่ได้อย่างมีประสิทธิภาพเนื่องจากความเป็นพิษของ furfural และ การยับยั้งกระบวนการสลาย (catabolite repression) ที่เกิดจากกลูโคสในไฮโดรไลเสตของกากชานอ้อย (hydrolysate) (Wang et al., 2013)

ดังนั้นการศึกษานี้ ได้ทดสอบความสามารถของเชื้อ *E. coli* KJ122 ในการผลิตซักซิเนตจากน้ำตาลไซโลสก่อนที่ทำการปรับปรุงพันธุกรรมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการใช้น้ำตาลไซโลส จากการทดลองพบว่า *E. coli* KJ122 เริ่มเจริญและผลิตซักซิเนตหลังจากการหมักผ่านไปแล้ว 48 ชั่วโมง เมื่อทำการหมักเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ AM1 ที่มีน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก เชื้อ *E. coli* KJ122 สามารถผลิตซักซิเนต ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 31.0±0.5 กรัมต่อลิตร ให้ค่าผลผลิตได้เท่ากับ 0.67±0.02 กรัมต่อกรัมของน้ำตาลไซโลสที่ใช้ไป และค่าอัตราการผลิต (productivity) 0.26±0.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบน้ำตาลไซโลส 47.72±0.02 กรัมต่อลิตร เหลืออยู่ในน้ำหมัก (รูปที่ 3.1A) จากผลการทดลองดังกล่าวเราจึงทำทดสอบเชื้อ *E. coli* KJ122 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลไซโลสความเข้มข้นเพียง 50 กรัมต่อลิตร พบว่าระยะพักตัว (lag phase) ของเชื้อจุลินทรีย์ลดลงเหลือเพียง 24 ชั่วโมง และสามารถผลิตซักซิเนตได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 120 ของการหมักที่ความเข้มข้นเท่ากับ 25.9±0.9 กรัมต่อลิตร และมีค่าผลผลิตได้เท่ากับ 0.72±0.26 กรัมต่อกรัมของน้ำตาลไซโลสที่ใช้ไป (รูปที่ 3.1B) อย่างไรก็ตามอัตราการใช้น้ำตาลไซโลสของเชื้อ *E. coli* KJ122 ต่ำกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคส ผลการทดลองดังกล่าวนี้เหมือนกับที่พบในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ AFP184 ที่มีการเจริญในน้ำตาลไซโลสในช่วงแรกของการหมักที่ต่ำมากต่างกับการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่พบว่าเชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญที่เร็วมากตั้งแต่เริ่มต้นกระบวนการหมัก (exponential growth) (Andersson et al., 2007)

การนำเข้าน้ำตาลไซโลสเข้าสู่เซลล์ของ *E. coli* จะเกิดขึ้นผ่าน 2 ระบบที่แตกต่างกัน ระบบแรกคือระบบที่ประกอบไปด้วยกลุ่มของโปรตีนที่เรียกว่า ABC transporter เป็นระบบที่ต้องการพลังงานจากการสลาย ATP และโปรตีนในกลุ่มนี้จะมี ATP-binding cassette (บริเวณจำเพาะสำหรับให้ ATP มาจับ) ซึ่งจะถูกตั้งรหัสยีนเป็น *xylF*, *xylG* และ *xylH* ทั้งนี้ยีน *xylFGH* จะมีความสามารถในการจับกับสารตั้งต้น (affinity) สูง โดยมีค่า K_m ระหว่าง 0.2 และ 4 μM ส่วนระบบขนส่งน้ำตาลไซโลสระบบที่สอง คือ ระบบที่อาศัยการทำงานของโปรตรอน (proton/xylose symporter) ที่ตั้งรหัสยีนว่า *xylE* ระบบนี้จะอาศัยพลังงานจากแรงขับเคลื่อนโปรตอนที่เกิดจากความแตกต่างของความเข้มข้นของโปรตอนของทั้ง 2 ฝั่งของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยระบบ proton/xylose symporter จะมีความสามารถในการจับกับสารที่ค่อนข้างต่ำโดยมีค่า K_m ระหว่าง 63 และ 169 μM (Sumiya et al., 1995; Gonzalez et al., 2002) โดยทั่วไปแล้วน้ำตาลไซโลสจะถูกนำเข้าสู่เซลล์ของ

E. coli ผ่านยีน *xylFGH* ทั้งนี้การนำเข้าน้ำตาลไซโลสด้วยระบบนี้ จะต้องการพลังงานในรูป ATP จำนวน 2 โมล ในการขนส่งน้ำตาลไซโลส และสำหรับกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) (Andersson et al., 2007; Hasona et al., 2004) ในขณะที่เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ตั้งต้น (wildtype strain) สามารถสร้าง ATP ได้เพียง 1.67 โมล จากการผลิตซักซิเนตจากน้ำตาลไซโลส 1 โมล ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน (Andersson et al., 2007; Liu et al., 2012) ดังนั้นประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลไซโลสและการเจริญของเชื้อ *E. coli* จะต่ำกว่าเกณฑ์ปรกติ เนื่องจากอยู่ภายใต้สภาวะที่ ATP ถูกจำกัดนั่นเอง



รูปที่ 3.1 ระยะเวลาในการเจริญและการผลิตซักซิเนตจากน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อ *E. coli* KJ122 ที่หมักด้วยขวดปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดเล็ก (500 มิลลิลิตร) และใช้อาหาร AM1; Symbols for all: xylose (open square), succinate (filled square), acetate (filled triangle), biomass (open circle)

(A) ใช้น้ำตาลไซโลสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร

(B) ใช้น้ำตาลไซโลสเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร

3.2 ผลของการตัดยีน *xylFGH* และ *xylE* ต่อการผลิตซักซิเนตจากน้ำตาลไซโลสของเชื้อ *E. coli* KJ122

การขนส่งน้ำตาลไซโลสเข้าสู่เซลล์ของเชื้อ *E. coli* KJ122 ถูกจำกัดด้วยระดับ ATP ภายในเซลล์ส่งผลให้เชื้อจุลินทรีย์ไม่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงทำการปรับปรุงพันธุกรรมของเชื้อ *E. coli* KJ122 โดยการตัดยีน *xylFGH* เพื่อรักษาสมดุลของ ATP ภายในเซลล์สำหรับใช้ในกระบวนการขนส่งและสลายน้ำตาลไซโลสเพื่อการสร้างซักซิเนต จากผลการทดลอง พบว่า เชื้อ *E. coli* KJ12201 (*E. coli* KJ122 ที่ถูกตัดยีน *xylFGH*) สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้ดีกว่าเชื้อ *E. coli* KJ122 เมื่อทำการหมักเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ AM1 ที่มีน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร เชื้อดังกล่าวสามารถผลิตซักซิเนตที่ความเข้มข้น 70.8±3.4 กรัมต่อลิตร ให้ค่าผลผลิตและอัตราการผลิตได้เท่ากับ 0.87±0.03 กรัมต่อกรัมน้ำตาลไซโลสที่ใช้ไป และ 0.58±0.02 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ 120 ชั่วโมง (รูปที่ 3.2A) อย่างไรก็ตามยังคงพบน้ำตาลไซโลสปริมาณ 19.5 กรัมต่อลิตร เหลืออยู่ในน้ำหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *E. coli* KJ12201 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ AM1 ที่มีน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร พบว่า เชื้อดังกล่าวสามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้หมดภายใน 72 ชั่วโมง เมื่อกระบวนการหมักเสร็จสิ้นลงสามารถผลิตซักซิเนตที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 37.4±0.7 กรัมต่อลิตร ให้ค่าผลผลิตและอัตราผลผลิตได้เท่ากับ 0.77±0.02 กรัมต่อกรัมน้ำตาลไซโลสที่ใช้ไป และ 0.31±0.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (รูปที่ 3.2B) นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการใช้น้ำตาลไซโลสและการสร้างมวลเซลล์ของเชื้อ *E. coli* KJ12201 เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับเชื้อ *E. coli* KJ122 (ตารางที่ 3.1) ซึ่งคล้ายกับผลการทดลองของ Utrilla *et al.* (2012)

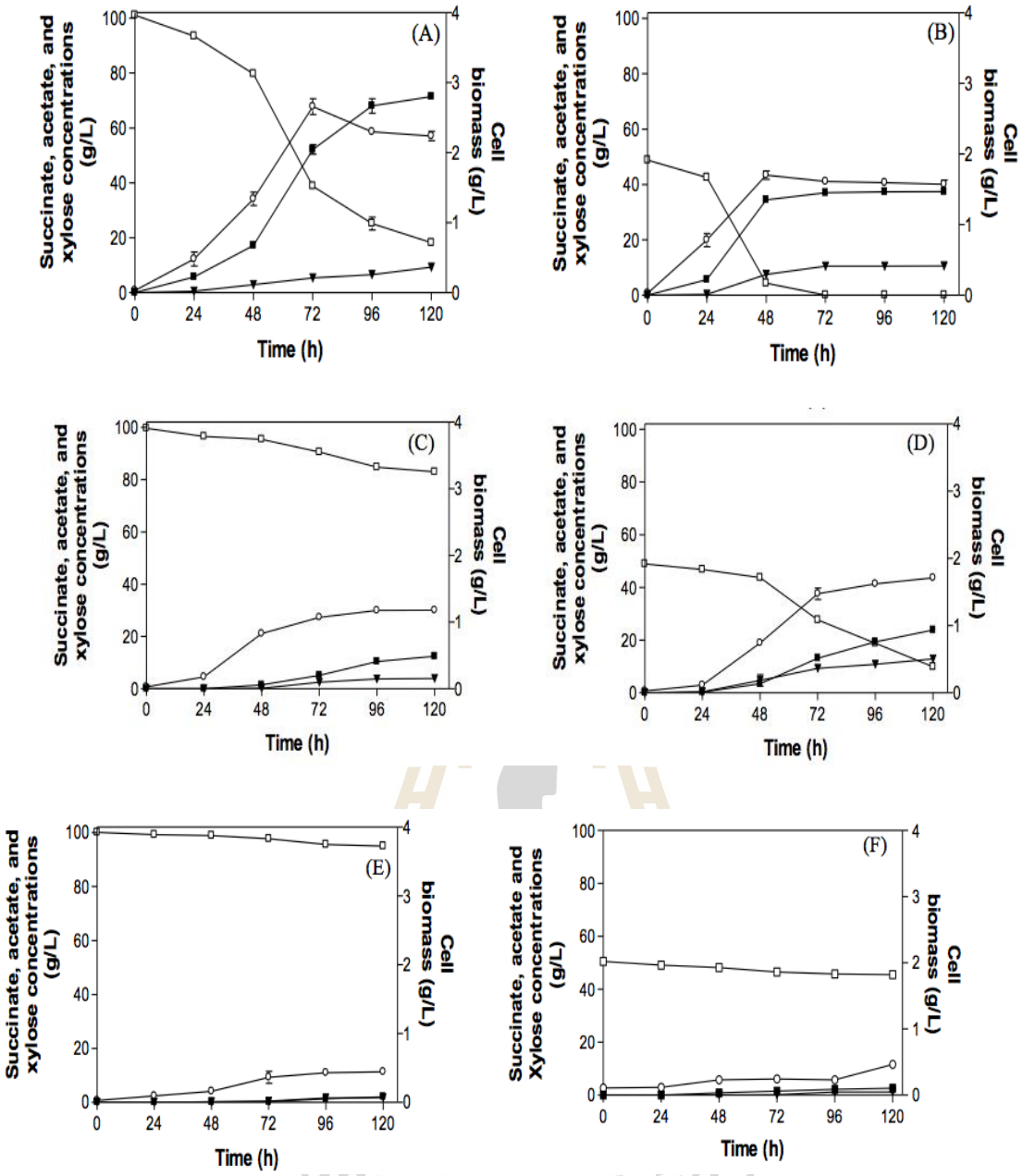
จากผลการทดลองข้างต้นสามารถอธิบายได้ว่าการตัดยีน *xylFGH* ออกจากจีโนมของเชื้อ *E. coli* KJ122 มีผลต่อการรักษาระดับ ATP ภายในเซลล์ เนื่องจากน้ำตาลไซโลสถูกนำเข้าสู่เซลล์ผ่านระบบ proton/xylose symporter (*xylE*) ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ใช้ ATP เพียง 1 โมลเท่านั้น (รูปที่ 3.3) ในการนำเข้าน้ำตาลไซโลส และกระบวนการ phosphorylation ดังนั้น ATP จึงมีเพียงพอต่อการเจริญและผลิตซักซิเนต ส่งผลให้เชื้อ *E .coli* KJ12201 สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลไซโลส และผลิตซักซิเนตได้ดีกว่า *E .coli* KJ122 ซึ่งสามารถยืนยันได้ว่าการตัดยีน *xylFGH* ทิ้งประสบความสำเร็จในการเพิ่มประสิทธิภาพในการใช้น้ำตาลไซโลสของเชื้อ *E. coli* KJ122 ได้

ในทางตรงกันข้ามเมื่อตัดยีน *xylE* ออกจากจีโนมของเชื้อ *E. coli* KJ122 พบว่าเชื้อ *E. coli* KJ12202 (*E. coli* KJ122 ที่ถูกตัดยีน *xylE*) มีอัตราการเจริญ และการผลิตซักซิเนตที่ต่ำเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 50 และ 100 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 3.2C และ 3.2D) เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก (120 ชั่วโมง) เชื้อ *E. coli* KJ12202 สามารถผลิตซักซิเนตได้ความเข้มข้นเท่ากับ 23.8±0.6 กรัมต่อลิตร และ 17.5±0.2 กรัมต่อลิตร จากน้ำตาลไซโลส 50 และ 100 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีค่าผลผลิตและอัตราการผลิตได้เท่ากับ 0.61±0.01 กรัมต่อกรัมน้ำตาลไซโลสที่ใช้ไป และ 0.20±0.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากน้ำตาลไซโลส 50 กรัมต่อลิตร และ 0.75±0.02 กรัมต่อกรัมน้ำตาลไซโลสที่ใช้ไป และ 0.10±0.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากน้ำตาลไซโลส 100 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3.1) จากน้ำตาลไซโลส 100 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3.1) นอกจากนี้ยัง พบว่า อัตราการใช้น้ำตาลไซโลสของเชื้อ *E. coli* KJ12202 ลดลงร้อยละ 64 และ 80 เมื่อเทียบกับเชื้อ *E. coli* KJ122 และ *E. coli* KJ12201 ตามลำดับ

ดังนั้นผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าเมื่อเชื้อจุลินทรีย์ขาดยีน *xylE* น้ำตาลไซโลสจะเข้าสู่เซลล์ผ่านการทำงานของยีน *xylFGH* ซึ่งต้องอาศัยพลังงาน ATP 2 โมล ต่อการขนส่งและการ phosphorylation ของน้ำตาลไซโลส 1 โมล (รูปที่ 3.3) ทำให้ ATP มีไม่เพียงพอต่อการเจริญและสร้างซักซิเนต ส่งผลให้ความสามารถในการใช้น้ำตาลไซโลสของเชื้อ *E. coli* KJ12202 ลดลง

การทดลองต่อมาผู้วิจัยทำการตัดยีน *xylFGH* และ *xylE* ออกจากจีโนมของเชื้อ *E. coli* KJ122 พร้อมกัน ซึ่งพบว่า เชื้อ *E. coli* KJ12203 (*E. coli* KJ122 ที่ถูกตัดยีน *xylFGH* และ *xylE*) มีการเจริญที่ต่ำมากเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 50 และ 100 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้เพียง 5 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 120 ชั่วโมง (รูปที่ 3.2E และF) นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อ *E. coli* KJ12203 มีการสร้างมวลเซลล์ และซักซิเนตได้ต่ำมากเมื่อเทียบกับเชื้อ *E. coli* KJ122, KJ12201 และ KJ12202 เนื่องจากเชื้อดังกล่าวไม่มียีนที่ทำหน้าที่ขนส่งน้ำตาลไซโลสเข้าสู่เซลล์ จากผลการทดลองดังกล่าว สามารถสรุปได้ว่าเชื้อ *E. coli* KJ122 และเชื้ออนุพันธุ์อาศัยยีน *xylFGH* และ *xylE* ในการขนส่งน้ำตาลไซโลสเข้าสู่เซลล์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 3.2 ระยะเวลาในการเจริญและการผลิตซักซิเนตจากน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ต่างๆ ที่หมักด้วยขวดปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดเล็ก (500 มิลลิลิตร)

(A) เชื้อ *E. coli* KJ12201 เลี้ยงในอาหาร AM1 ทีมีน้ำตาลเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร

(B) เชื้อ *E. coli* KJ12201 เลี้ยงในอาหาร AM1 ที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร

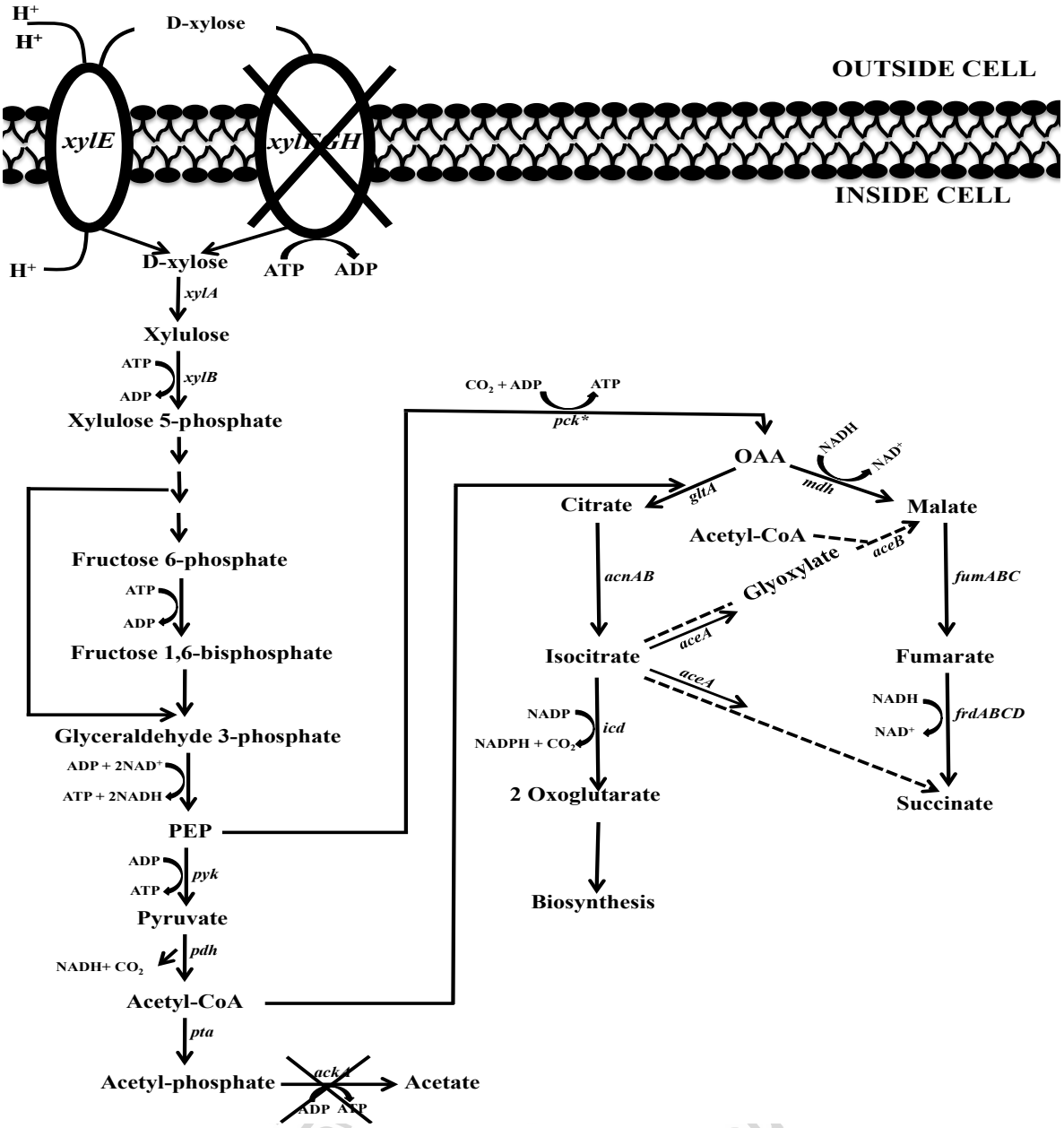
(C) เชื้อ *E. coli* KJ12202 เลี้ยงในอาหาร AM1 ที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร

(D) เชื้อ *E. coli* KJ12202 เลี้ยงในอาหาร AM1 ที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร

(E) เชื้อ *E. coli* KJ12203 เลี้ยงในอาหาร AM1 ที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร

(F) เชื้อ *E. coli* KJ12203 เลี้ยงในอาหาร AM1 ที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร

Symbols for all: xylose (open square), succinate (filled square), acetate (filled triangle), biomass (open circle)



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุร

รูปที่ 3.3 กลไกการนำเข้าน้ำตาลไซโลสและผลิตซักซิเนตของเชื้อ *E. coli* KJ12201.

ยีนและเอนไซม์: *galP*, galactose permease; *xylE*, D-xylose::H^+ transportor; *xylFGH*, ATP-dependent xylose transportor; *xylA*, xylose isomerase; *xylB*, xylulokinase; *pyk*, pyruvate kinase; *pta*, phosphate acetyltransferase; *ackA*, acetate kinase; *gltA,* citrate synthase; *mdh,* malate dehydrogenase; *fumABC,* fumarase; *frdABCD,* fumarate reductase; *aceA*, isocitrate lyase; *aceB*, malate synthase A; *acnAB*, aconitase; and *icd*, isocitrate dehydrogenase; *pck*,* mutated PEP carboxykinase; *pdh,* mutataed pyruvate dehydrogenase (adapted from Zhang et al., 2009). Crossed signs represent deletion of genes in *E. coli* KJ122 strain

ตารางที่ 3.1 ค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากการหมักน้ำตาลไซโลสของเชื้อ *E. coli* KJ122 และเชื้ออนุพันธุ์

Strains	Xylose (g/L)	KJ122	KJ12201	KJ12202	KJ12203
Maximum CDW (g/L)	50	1.43±0.03$^{d,\alpha}$	1.61±0.08$^{\beta}$	1.71±0.01$^{\gamma}$	0.93±0.02$^{\delta}$
	100	1.42±0.01$^{\alpha}$	2.66±0.19$^{\beta}$	1.18±0.01$^{\gamma}$	0.44±0.05$^{\delta}$
Xylose consumption (g/L)	50	35.89±0.31$^{\alpha}$	48.82±0.96$^{\beta}$	39.02±0.07$^{\gamma}$	4.93±0.70$^{\delta}$
	100	46.00±0.38$^{\alpha}$	81.51±0.81$^{\beta}$	16.62±0.38$^{\gamma}$	5.03±0.63$^{\delta}$
Succinate (g/L)	50	25.89±0.89$^{\alpha}$	37.43±0.67$^{\beta}$	23.80±0.59$^{\gamma}$	2.66±0.78$^{\delta}$
	100	30.99±0.52$^{\alpha}$	70.76±3.39$^{\beta}$	11.46±0.17$^{\gamma}$	2.06±0.10$^{\delta}$
Succinate yield[a] (g/g)	50	0.72±0.26$^{\alpha}$	0.77±0.02$^{\alpha}$	0.61±0.01$^{\gamma}$	0.54±0.01$^{\gamma}$
	100	0.67±0.02$^{\alpha}$	0.87±0.03$^{\beta}$	0.71±0.02$^{\gamma}$	0.41±0.05$^{\delta}$
Succinate productivity[b] (g/L.h)	50	0.21±0.01$^{\alpha}$	0.31±0.01$^{\beta}$	0.20±0.01$^{\gamma}$	0.02±0.00$^{\delta}$
	100	0.26±0.01$^{\alpha}$	0.58±0.02$^{\beta}$	0.10±0.01$^{\gamma}$	0.017±0.00$^{\delta}$
Specific succinate productivity[c] (g/g.h)	50	0.16±0.00$^{\alpha}$	0.20±0.12$^{\beta}$	0.11±0.00$^{\gamma}$	0.02±0.07$^{\delta}$
	100	0.18±0.00$^{\alpha}$	0.19±0.01$^{\beta}$	0.09±0.00$^{\gamma}$	0.04±0.01$^{\delta}$
Acetate (g/L)	50	10.57±0.42$^{\alpha}$	10.57±0.42$^{\beta}$	12.84±1.06$^{\gamma}$	1.23±0.05$^{\delta}$
	100	8.39±0.51$^{\alpha}$	9.34±0.74$^{\beta}$	3.97±0.12$^{\gamma}$	1.77±0.22$^{\delta}$

[a]The succinate yield was calculated as gram(s) of succinate produced divided by gram(s) of xylose consumed.

[b]The succinate productivity was calculated as succinate concentration produced divided by overall incubation time.

[c]The succinate specific productivity was calculated as succinate productivity divided by cell dry weight.

[d]Values bearing different Greek symbols are significantly different (P<0.05) among strains between column.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.3 การทำวิวัฒนาการทางเมทาบอลิก (Metabolic Evolution) ของเชื้อ *E. coli* KJ12201

การทำวิวัฒนาการทางเมทาบอลิกเป็นกระบวนการพัฒนาและคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่จะนำเอามาเพื่อใช้ประโยชน์ในการผลิตสารเคมีสำคัญต่างๆ อาทิเช่น เอทานอล (Yomano et al. 2008) 2,3 บิวเทนไดออล (Jantama et al. 2015) กรดแลคติกชนิด D-(-) (Utrilla et al. 2012; Zhou et al. 2003) และกรดซักซินิก (Jantama et al. 2008a, b; Sawisit et al. 2015b) ในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งวิธีการนี้เป็นวิธีการที่มีการยอมรับในแวดวงวิชาการอย่างกว้างขวางทางด้านวิศวกรรมเมทาบอลิกในระยะเวลาหลายปีที่ผ่านมา จากผลการทดลองเบื้องต้นพบว่า เชื้อ *E. coli* KJ12201 สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่ายที่มีน้ำตาลไซโลส และผลิตซักซิเนตได้ดีกว่าเชื้อ *E. coli* KJ122 อย่างไรก็ตามเมื่อทำการหมักเชื้อดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่ายชนิด AM1 ที่มีน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร

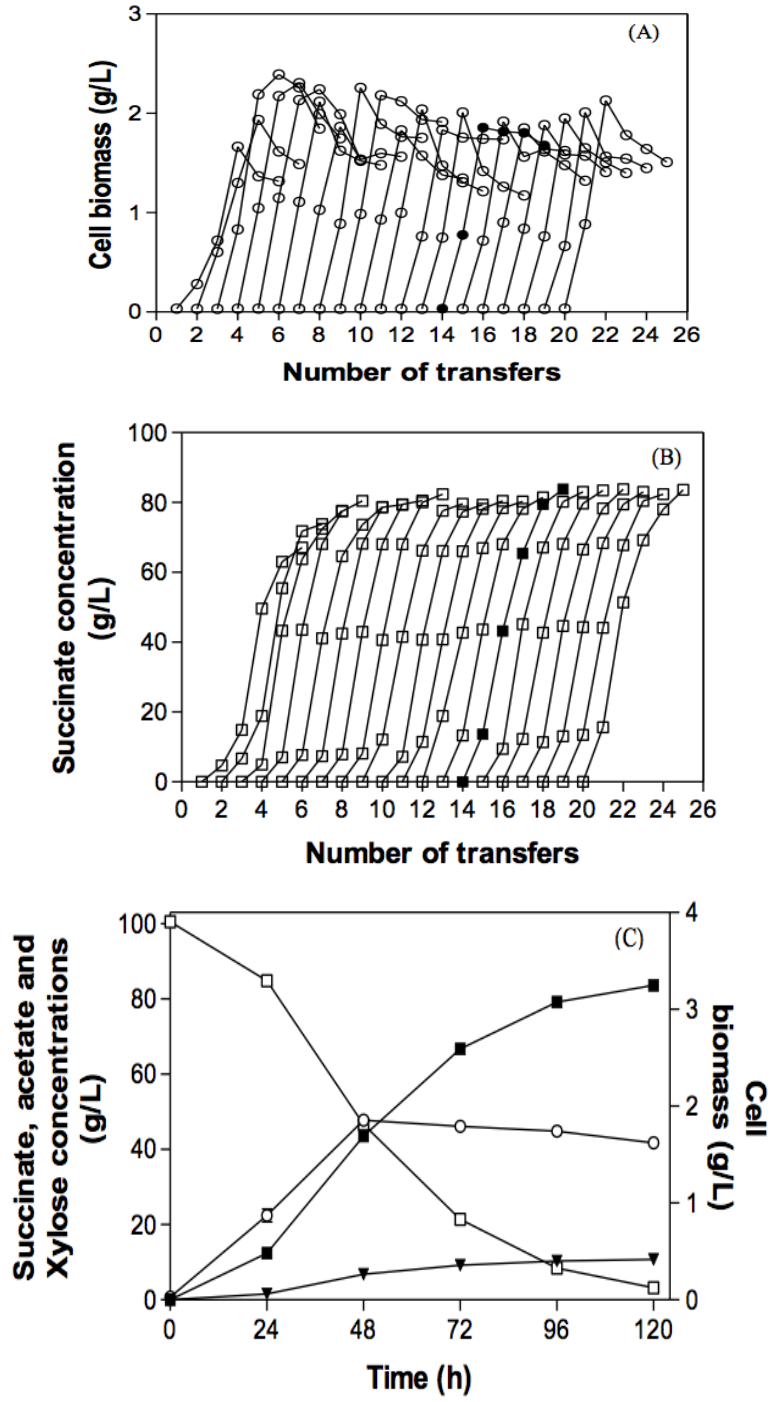
เมื่อกระบวนการหมักสิ้นสุดที่เวลา 120 ชั่วโมง พบว่าเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้เพียง 80 กรัมต่อลิตร และผลิตซักซิเนตเพียง 70 กรัมต่อลิตร ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงนำเทคนิคการทำวิวัฒนาการทางเมทาบอลิกมาประยุกต์ใช้กับเชื้อ *E. coli* KJ12201 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลไซโลสให้เชื้อดังกล่าว

เชื้อ *E. coli* KJ12201 ถูกนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่ายชนิด AM1 ที่มีน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร และทำการถ่ายเชื้ออีกครั้งทุกๆ 24 ชั่วโมง จนครบ 20 ครั้ง พบว่าเชื้อ *E. coli* KJ12201 มีอัตราการเจริญที่ดีขึ้น ส่งผลให้มีการผลิตซักซิเนตจากน้ำตาลไซโลสได้ในอัตราที่ดีขึ้นตามไปด้วย (รูปที่ 3.4A และ B) จากรูปที่ 3.4A จะสังเกตเห็นว่าเชื้อ *E. coli* KJ12201 มีการเจริญและผลิตซักซิเนตที่ต่ำในช่วงแรกของการทำวิวัฒนาการทางเมทาบอลิก แต่เมื่อทำการถ่ายเชื้อไปเรื่อยๆ พบว่า เชื้อที่ได้จากการถ่ายเชื้อครั้งที่ 14 มีอัตราการใช้น้ำตาลไซโลสสูงกว่าเชื้อที่ได้จากการถ่ายเชื้อครั้งที่ 8 ถึง 12 (ตารางที่ 3.2)

นอกจากนี้ยังพบว่า อัตราการใช้น้ำตาลไซโลสประมาณ 98 กรัมต่อลิตร และค่าอัตราการผลิตซักซิเนตประมาณ 0.70 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ของเชื้อที่ได้จากการถ่ายเชื้อครั้งที่ 12 ถึง 20 ไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามอัตราการผลิตซักซิเนตจำเพาะ (specific succinate productivity) ของเชื้อค่อยๆ ลดลงหลังจากการถ่ายเชื้อครั้งที่ 14 ในขณะที่เชื้อมีการผลิตอะซิเตทเพิ่มสูงขึ้นระหว่างการทำวิวัฒนาการทางเมทาบอลิก โดยเฉพาะในช่วงการถ่ายเชื้อครั้งที่ 16 ถึง 20 (ตารางที่ 3.2) ด้วยเหตุผลนี้ เชื้อที่ได้จากการถ่ายเชื้อครั้งที่ 14 จึงถูกนำมาใช้ในการผลิตซักซิเนตจากน้ำตาลไซโลส โดยเชื้อสายพันธุ์ใหม่มีชื่อว่า *E. coli* KJ12201-14T สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้ถึง 97.4±1.3 กรัมต่อลิตร ในน้ำหมักอีกด้วย (รูปที่ 3.4C) ซึ่งค่าผลผลิตของซักซิเนตที่ผลิตได้เท่ากับ 0.86±0.01 กรัมต่อกรัมน้ำตาลไซโลสที่ใช้ไป คิดเป็นร้อยละ 92 ของค่าผลผลิตตามทฤษฎีโดยค่าผลผลิตตามทฤษฎี ที่คำนวณจากสมการที่ 3.1 คือ 1.12 กรัมต่อกรัมน้ำตาลไซโลสที่ใช้ไป

$$7\ C_5H_{10}O_5 + 5\ CO_2 \longrightarrow 10\ C_4H_6O_4 + 5\ H_2O \qquad \textbf{(สมการ 3.1)}$$

เชื้อ *E. coli* KJ12201-14T มีอัตราการใช้น้ำตาลไซโลส และผลิตซักซิเนตสูงกว่าร้อยละ 20 และ 18 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *E. coli* KJ12201 นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อ *E. coli* KJ12201-14T มีค่าอัตราการผลิตซักซิเนตสูงกว่าเชื้อ *E. coli* KJ122 และ KJ12201 คิดเป็นร้อยละ 61 และ 17 ตามลำดับ เหตุผลเนื่องมาจากสารพันธุกรรมภายในเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงระหว่างการทำวิวัฒนาการทางเมทาบอลิก หรือที่เรียกว่า การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (spontaneous mutations) จึงทำให้เชื้อ *E .coli* KJ12201-14T สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน จากการทดลองนี้สามารถยืนยันได้ว่าการทำวิศวกรรมการสร้างและสลายร่วมกับการทำวิวัฒนาการทางเมทาบอลิกสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลไซโลสและการผลิตซักซิเนตของเชื้อ *E .coli* KJ12201-14T ได้



รูปที่ 3.4 การทำวิวัฒนาการเมทาบอลิกของเชื้อ *E. coli* KJ12201 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ AM1 ที่มีน้ำตาลไซโลส 100 กรัมต่อลิตร

(A) การผลิตชีวมวล

(B) การผลิตซักซิเนต

(C) ระยะเวลาในการเจริญเติบโตและการผลิตกรดซักซินิกจากน้ำตาลไซโลสของเชื้อ *E. coli* KJ12201-14T

Symbols for all: xylose (open square), succinate (filled square), acetate (filled triangle), biomass (open circle)

ตารางที่ 3.2 ค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากการหมักน้ำตาลไซโลสของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ต่างๆ ที่ได้จากการทำวิวัฒนาการทางเมทาบอลิกของเชื้อ *E. coli* KJ12201

Number of transfers	Xylose consumption (g/L)	Productivity (g/L/h)	Specific productivity (g/gCDW/h)	Acetate (g/L)
KJ122	46	0.26	0.18	8.4
		KJ12201		
Transfer 1	82	0.58	0.19	9.1
.....	.....	.....	.....	.....
Transfer 8	94	0.68	0.30	11.0
Transfer 10	93	0.66	0.33	11.7
Transfer 12	93	0.67	0.37	10.8
Transfer 14	**98**	**0.70**	**0.38**	**10.7**
Transfer 16	98	0.69	0.37	12.1
Transfer 18	97	0.69	0.32	12.5
Transfer 20	97	0.70	0.33	11.8

3.4 การผลิตซักซิเนตจากน้ำตาลไซโลสของเชื้อ *E. coli* KJ12201 และ KJ12201-14T ภายใต้กระบวนการการหมักแบบกึ่งกะ (fed-batch fermentation)

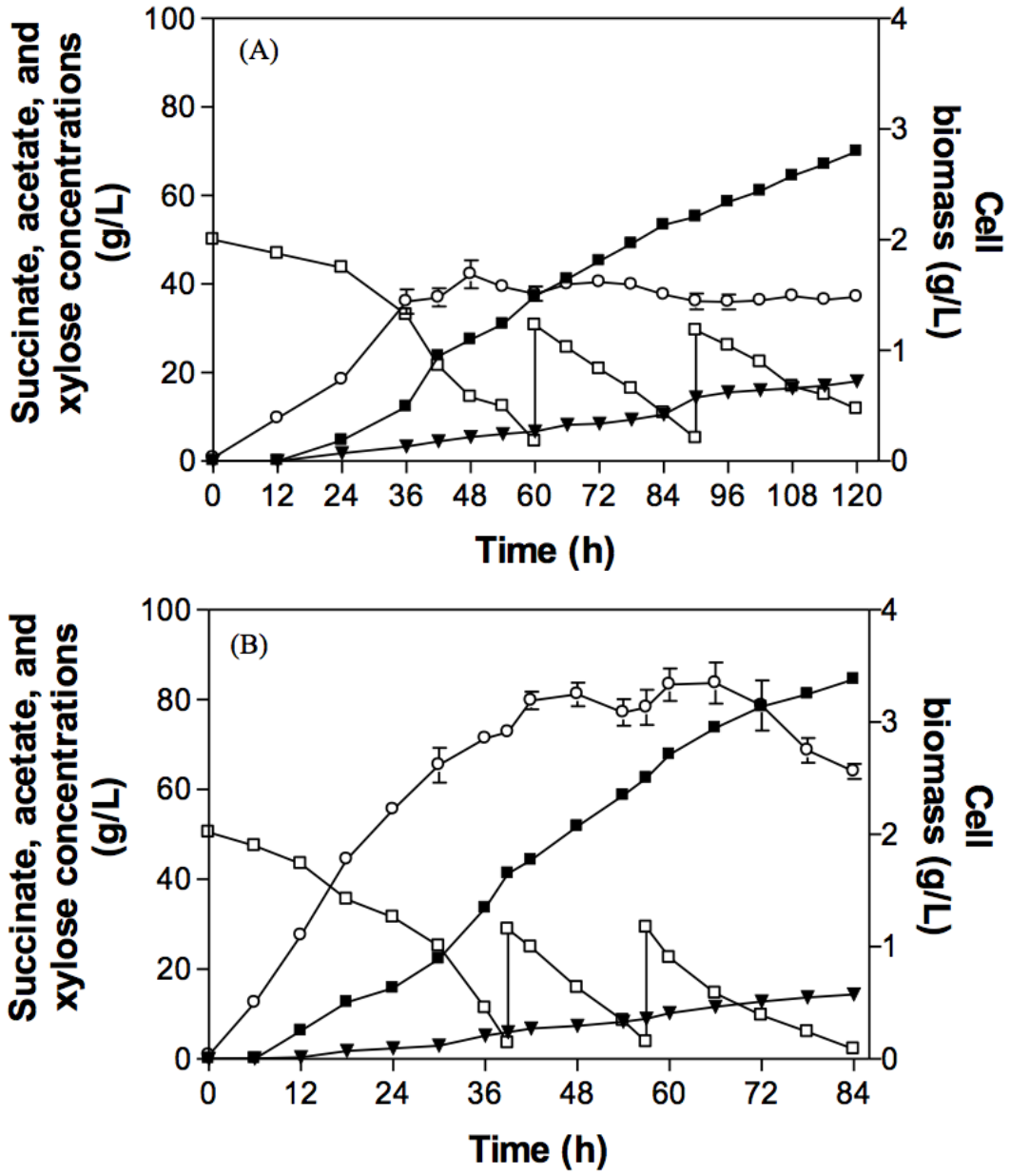
การศึกษาผลิตซักซิเนตจากน้ำตาลไซโลสภายใต้กระบวนการหมักแบบกะ (batch fermentation) พบว่าเชื้อ *E. coli* KJ12201 และ KJ12201-14T และสามารถผลิตซักซิเนตในอัตราการผลิตที่ 0.58 และ 0.7 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 3.2A และ 3.4C) ซึ่งถือว่าอัตราการผลิตดังกล่าวน่าจะสามารถทำให้สูงขึ้นได้อีก ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการศึกษาการผลิตซักซิเนตจากน้ำตาลไซโลสของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ในระบบการหมักแบบกึ่งกะโดยมีการป้อนสารอาหารคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลไซโลสที่แบบ interim feeding เพื่อหวังให้อัตราการผลิตซักซิเนตสูงขึ้น เนื่องจากสามารถลดผลการยับยั้งของสารอาหารคาร์บอนที่ความเข้มข้นสูง (substrate inhibition)

กระบวนการหมักด้วยแบบกึ่งกะของเชื้อทั้งสองสานพันธุ์จะทำการทดลองในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร โดยใช้ปริมาตรเริ่มต้น (initial volume) 1 ลิตร ที่มีน้ำตาลไซโลสความเข้มข้นเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองผลิตซักซิเนตภายใต้กระบวนการหมักแบบกึ่งกะของเชื้อ *E.coli* KJ12201 พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสในน้ำหมักลดลงเหลือ 5 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 60 (รูปที่ 3.5A) และในระหว่างการหมักสารละลายเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสถูกป้อนเข้าถังหมักในชั่วโมงที่ 60 และ 90 เพื่อรักษาระดับความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสให้อยู่ระหว่าง 5 ถึง 30 กรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักที่ 120 ชั่วโมง

พบซักซิเนตที่ ความเข้มข้นเท่ากับ 69.9±0.6 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 3.5A) มีค่าผลผลิตเท่ากับ 0.79±0.01 กรัมต่อกรัมน้ำตาลไซโลสที่ใช้ไป และค่าอัตราการผลิตเท่ากับ 0.58±0.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ตารางที่ 3.3) อย่างไรก็ตามอัตราการผลิตซักซิเนตที่ได้จากกระบวนการหมักแบบกะ และแบบกึ่งกะมีค่าไม่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่ากระบวนการหมักแบบกึ่งกะไม่สามารถเพิ่มอัตราการผลิตซักซิเนตของเชื้อ *E. coli* KJ12201 ได้

ต่อมาผู้วิจัยได้ทำการทดลองการผลิตซักซิเนตจากเชื้อ *E. coli* KJ12201-14T ภายใต้กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ พบว่าน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 98.9±0.6 กรัมต่อลิตร ถูกใช้หมดอย่างรวดเร็วในเวลา 84 ชั่วโมง และเชื้อสายพันธุ์นี้มีอัตราการเจริญที่สูงมากเมื่อเทียบกับเชื้อ *E. coli* KJ12201 โดยมีการสร้างมวลเซลล์ในระดับสูงสุดที่ความเข้มข้นประมาณ 3.35±0.32 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 3.5B) และผลิตซักซิเนตได้สูงถึง 84.6±0.7 กรัมต่อลิตร ในขณะที่เชื้อ *E. coli* KJ12201 ผลิตได้เพียง 69.9±0.6 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3.3) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *E. coli* KJ12201-14T มีค่าผลผลิตเท่ากับ 0.86±0.01 กรัมต่อกรัมน้ำตาลไซโลสที่ใช้ไป และอัตราการผลิตเท่ากับ 1.01±0.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งมากกว่าเชื้อ *E. coli* KJ12201 (ตารางที่ 3.3) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่ากระบวนการหมักแบบกึ่งกะสามารถเพิ่มอัตราการเจริญและการผลิตซักซิเนตจากน้ำตาลไซโลสของเชื้อ *E. coli* KJ12201-14T ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ดังนั้นกระบวนการหมักแบบกึ่งกะจึงสามารถนำไปใช้ในการเพิ่มอัตราการผลิตซักซิเนตในระดับอุตสาหกรรมได้ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการผลิตสารเคมีชีวภาพตัวอื่นได้ด้วย นอกจากนี้เชื้อ *E. coli* KJ12201-14T ยังเป็นเชื้อสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการผลิตซักซิเนตจากน้ำตาลไซโลส และไฮโดรไลเสตที่มีน้ำตาลไซโลสซึ่งได้จากวัสดุลิกโนเซลลูโลสได้เป็นอย่างดี เนื่องจากสามารถผลิตซักซิเนตได้ที่ความเข้มข้น ผลผลิต และอัตราการผลิตสูงกว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นๆ ที่ได้มีการรายงานมาก่อนหน้านี้แล้วซึ่งจะทำให้ต้นทุนการผลิตซักซิเนตคุ้มค่าเป็นอย่างมาก (ตารางที่ 3.3)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 3.5 การผลิตซักซิเนตระหว่างการหมักแบบกึ่งกะด้วยน้ำตาลไซโลสภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนของเชื้อ *E. coli* KJ12201 และ *E. coli* KJ12201-14T

(A) เชื้อ *E. coli* KJ12201

(B) เชื้อ *E. coli* KJ12201-14T

ตารางที่ 3.3 เปรียบเทียบการผลิตซักซิเนตจากแหล่งน้ำตาลชนิดต่างๆ ด้วยเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ต่างๆ

Strains	Media/Mode of process	Succinate			References
		Concentration (g/L)	Yield (g/g)	Overall productivity (g/L/h)	
E. coli KJ12201 (KJ122, Δ*xylFGH*)	100 g/L xylose/AM1/batch fermentation	$70.8 \pm 3.4^{\alpha}$	$0.87 \pm 0.03^{\alpha}$	$0.58 \pm 0.01^{\alpha}$	งานวิจัยนี้
	100 g/L xylose/AM1/fed-batch fermentation	$69.9 \pm 0.6^{\alpha}$	$0.79 \pm 0.01^{\beta}$	$0.58 \pm 0.00^{\alpha}$	
E. coli KJ12201-14T (KJ122, Δ*xylFGH*), serials transfer in 10% xylose	100 g/L xylose/AM1/batch fermentation	$83.7 \pm 0.2^{\beta}$	$0.86 \pm 0.01^{\alpha}$	$0.70 \pm 0.01^{\beta}$	งานวิจัยนี้
	100 g/L xylose/AM1/fed-batch fermentation	$84.6 \pm 0.7^{\beta}$	$0.86 \pm 0.01^{\alpha}$	$1.01 \pm 0.01^{\gamma}$	
E. coli YL104H (Δ*ptsG*Δ*poxB*Δ*pta*Δ*iclR* Δ*sdhA*Δ*arcA*Δ*ldhA*Δ*adhE::trc-rbs-glf*$_{zm}$,Δ*ptsH)*	40 g/L xylose/AM1 medium/dual-phase fermentation	14.8	0.61	0.21	Zhang et al. (2016)
E. coli TXXP/pTrc99A-*pck* (Δ*ptsG*Δ*glk* Δ*manZ*Δ*crr*Δ*pflB* Δ*ldhA*Δ*ppc::FRT-Kan*) and over-expressed ATP-forming PCK	45 g/L xylose/basal medium supplemented with yeast extract/fed-batch fermentation	32	0.86	0.60	Xia et al. (2015)
E. coli DC115 (Δ*ldhA*Δ*pflB*Δ*ptsG*) selected by the atmospheric and room-temperature plasma mutation system	20 g/L xylose/LB medium supplemented with chemically defined medium/simple bath fermentation	12.1	0.67	0.16	Jiang et al. (2014)
E. coli BA305 (Δ*ldhA*Δ*pflB*Δ*ppc*Δ*ptsG*) and over-expressed ATP-forming PCK	35 g/L xylose /LB medium supplemented with chemically defined medium/repetitive fermentation in the final round	24.0	0.68	2.00	Liang et al. (2013)

Values bearing different Greek symbols are significantly different (P<0.05) among strains between column.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
บทสรุป

4.1 สรุปผลการวิจัย

เชื้อ *E. coli* KJ122 มีอัตราการเจริญที่ต่ำมากเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่ายชนิด AM1 ที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนเนื่องจากการยับยั้งกระบวนการสลาย (catabolite repression) ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการปรับปรุงเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการใช้น้ำตาลไซโลสโดยการทำวิศวกรรมกระบวนการสร้างและสลายร่วมกับการทำวิวัฒนาการทางเมทาบอลิก จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า การตัดยีน *xylFGH* จากจีโนมของเชื้อ *E. coli* KJ122 ทำให้เชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่มีชื่อว่า *E. coli* KJ12201 สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลไซโลสได้ดีกว่าเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น อย่างไรก็ตามอัตราการใช้น้ำตาลไซโลส และผลิตซักซิเนตของเชื้อสายพันธุ์นี้ยังไม่เป็นที่น่าพอใจนัก เนื่องจากสามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้เพียง 80 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ดังนั้นเชื้อสายพันธุ์นี้ถูกพัฒนาต่อด้วยการทำวิวัฒนาการเมทาบอลิก โดยเชื้อกลายพันธุ์ถูกคัดเลือกด้วยการถ่ายเชื้ออย่างต่อเนื่อง 20 ครั้ง ในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่ายชนิด AM1 ที่มีน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร พบว่า เชื้อมีการปรับตัวให้สามารถใช้ไซโลสได้ดีที่สุดหลังจากถ่ายเชื้อ 14 ครั้ง ทำให้ได้เชื้อสายพันธุ์ใหม่ *E. coli* KJ12201-14T ซึ่งเชื้อสายพันธุ์นี้สามารถผลิตซักซิเนตจากน้ำตาลไซโ ลสได้สูงถึง 84 กรัมต่อลิตร จากการหมักน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้เชื้อ *E. coli* KJ12201-14T ยังให้ค่าผลผลิต 0.86 กรัมต่อกรัมน้ำตาลไซโลสที่ใช้ไป และอัตราการผลิตซักซิเนต 0.7 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่สูงกว่าเชื้อ *E. coli* KJ122 อีกด้วย ยิ่งไปกว่านั้นเชื้อ *E. coli* KJ12201-14T ยังให้ค่าอัตราการผลิตซักซิเนตที่สูงถึง 1.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากการหมักน้ำตาลไซโลสแบบกึ่งกะ ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าเชื้อ *E. coli* KJ12201-14T เป็นเชื้อจุลินทรีย์อีกหนึ่งสายพันธุ์ที่สามารถช่วยลดต้นทุนการผลิตซักซิเนตได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อใช้น้ำตาลไซโลส และไฮโดรไลสตที่มีน้ำตาลไซโลสซึ่งได้จากวัสดุลิกโนเซลลูโลส เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย หรือกากมันสำปะหลัง เป็นวัตถุดิบหลัก

4.2 ข้อเสนอแนะ

เป็นที่ทราบกันดีว่าการทำวิวัฒนาการเมทาบอลิกจะทำให้เชื้อจุลินทรีย์เกิดการกลายพันธุ์เนื่องจากสารพันธุกรรมในเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมอย่างไรก็ตามเราไม่สามารถระบุได้ว่ามีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งบนจีโนมของเชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงควรมีการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *E. coli* KJ12201-14T เพื่อพิสูจน์การกลายพันธุ์ของเชื้อสายพันธุ์นี้ เนื่องจากไฮโดรไลเสตที่ได้จากย่อยวัสดุลิกโนเซลลูโลสเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย เป็นต้น มีองค์ประกอบหลายอย่าง เช่น เฟอฟรูรอล (furfural) 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอฟรูรอล (5-hydroxymethylfurfural) กรดฟอร์มิก และกรดอะซิติก เป็นต้น ที่อาจส่งผลต่อการเจริญและการผลิตซักซิเนตจากน้ำตาลไซโลส ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาพฤติกรรมการหมักของเชื้อ *E. coli* KJ12201-14T ในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่ายที่มีไฮโดรไลเสตเป็นแหล่งคาร์บอน

บรรณานุกรม

Andersson C, Hodge D, Berglund KA, Rova U. 2007. Effect of different carbon sources on the production of succinic acid using metabolically engineered *Escherichia coli*. Biotechnology Progress. 23: 381-388.

Bryant MP, Small N. 1956. Characteristics of two new genera of anaerobic curved rods isolated from the rumen of cattle. Journal of Bacteriology. 72:22-26.

Chatterjee R, Millard CS, Champion K, Clark DP, Donnelly MI. 2001. Mutation of the *ptsG* gene results in increased production of succinate in fermentation of glucose by *Escherichia coli.* Applied and Environmental Microbiology. 67: 148-154

Datsenko KA, Wanner BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 97: 6640-6645.

Chan S, Kanchanatawee S, Jantama K. 2012. Production of Succinate from sucrose and sugarcane molasses by metabolically engineered *E. coli*. Bioresource Technology. 103:329-336.

Hatti-Kaul R, Tornvall U, Gustafsson L, Borjesson P. 2007. Industrial biotechnology for the production of bio- based chemicals- a cradle- to- grave perspective. Trends in Biotechnology 25(3):119-124.

Guettler MV, Jain MK, Rumler D. 1996. Method for making succinic acid, bacterial variants for use in the process, and methods for obtaining the variants. US Patent 5573931.

Guettler MV, Jain MK, Soni BK. 1998. Process for making succinic acid, microorganisms for use in the process and methods of obtaining the microorganisms. US Patent 5723322.

Jantama K, Haupt MJ, Svoronos SA, Zhang X, Moore JC, Shanmugam KT, Ingram LO. 2008a. Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop nonrecombinant strains of *Escherichia coli* C that produce succinate and malate. Biotechnology and Bioengineering 99(5): 1140-1153.

Jantama K, Zhang X, Moore JC, Svoronos SA, Shanmugam KT, Ingram LO. 2008b. Eliminating side products and increasing succinate yields in engineered strains of *Escherichia coli* C**.** Biotechnology and Bioengineering. 101(5): 881-893.

Jantama K, Polyiam P, Khunnonkwao P, Chan S, Sangproo M, Khor K, Jantama SS, Kanchanatawee S. 2015. Efficient reduction of the formation of by-products and improvement of production yield of 2,3-butanediol by a combined deletion of alcohol

dehydrogenase, acetate kinase-phosphotransacetylase, and lactate dehydrogenase genes in metabolically engineered *Klebsiella oxytoca* in mineral salts medium. Metabolic Engineering. 30: 16-26.

Jiang M, Wan Q, Liu R, Liang L, Chen X, Wu M, Zhang H, Chen K, Ma J, Wei P, Ouyang P. 2014 Succinic acid production from corn stalk hydrolysate in an *Escherichia coli* mutant generated by atmospheric and room temperature plasmas and metabolic evolution strategies. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 41: 115-123.

Khor K, Sawisit A, Chan S, Kanchanatawee S, Jantama SS, Jantama K. 2016. High production yield and specific productivity of succinate from cassava starch by metabolically-engineered *Escherichia coli* KJ122. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 91: 2834-2841.

Liang L, Liu R, Li F, Wu M, Chen K, Ma J, Jiang M, Wei P, Ouyang P. 2013. Repetitive succinic acid production from lignocellulose hydrolysates by enhancement of ATP supply in metabolically engineered *Escherichia coli*. Bioresource Technology. 143: 405-412.

Liu R, Liang L, Chen K, Ma J, Jiang M, Wei P, Ouyang P. 2012. Fermentation of xylose to succinate by enhancement of ATP supply in metabolically engineered *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology. 94: 959-968.

Meynial-Salles I, Dorotyn S, Soucaille P. 2008. A new process for the continuous production of succinic acid from glucose at high yield, titer, and productivity. Biotechnology and bioengineering. 99(1): 129-135.

Nordhoff S, Hocker H, Gebhardt H. 2007. Renewable resources in the chemical industry-Breaking away from oil? Biotechnology. 2:1505-1513.

Posfai G, Koob MD, Kirkpatrick HA, Blattner FR. 1997. Versatile insertion plasmids for targeted genome manipulations in bacteria: Isolation, deletion, and rescue of the pathogenicity island LEE of the *Escherichia coli* O157:H7 genome. Bacteriology. 179: 4426-4428.

Martinez A, Grabar TB, Shanmugam KT, Yomano LP, York SW, Ingram LO. 2007. Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant *Escherichia coli* B. Biotechnology Letters. 29: 397-404.

Hasona A, Kim Y, Healy F, Shanmugam KT, Ingram LO. 2004. Pyruvate formate lyase and acetate kinase are essential for anaerobic growth of *Escherichia coli* on xylose. Bacteriology. 186: 7593-7600.

Sawisit A., Kanchanatawee S., Jantama SS., Jantama K. 2015a. Efficient utilization of

cassava pulp for succinate production by metabolically engineered *Escherichia coli* KJ122. Bioprocess and Biosystems Engineering. 38(1): 175-187.

Sawisit A, Jantama K, Zheng H, Yomano LP, York S, Shanmugam KT, Ingram LO. 2015b. Mutation in g*alP* improved fermentation of mixed sugars to succinate using engineered *Escherichia coli* AS1600a and AM1 mineral salts medium. Bioresource Technology. 193: 433-441.

Kamm B, Kamm M. 2007. Advances in biochemical engineering/biotechnology. White Biotechnology, ed. R. Ulber and D. Sell. Springer. Heidelberg.

Sauer M, Porro D, Mattanovich D, Branduardi P. 2008. Microbial production of organic acids: expanding the markets. Trends in Biotechnology. 26(2):100-108.

Song H, Huh, YS, Lee, SY, Hong, WH, Hong YK. 2007. Recovery of succinic acid produced by fermentation of a metabolically engineered *Mannheimia succiniciproducens* strain. Biotechnology. 132: 445-452.

Utrilla J, Licona-Cassani C, Marcellin E, Gosset G, Nielsen LK, Martinez A. 2012. Engineering and adaptive evolution of *Escherichia coli* for D-lactate fermentation reveals GatC as a xylose transporter. Metabolic Engineering. 14: 469-476.

Wang X, Yomano LP, Lee JY, York SW, Zheng H, Mullinnix MT, Shanmugam KT, Ingram LO. 2013. Engineering furfural tolerance in *Escherichia coli* improves the fermentation of lignocellulosic sugars into renewable chemicals. Proceedings of the National Academy of Sciences. 110: 4021-4026.

Xia T, Altman E, Eiteman MA. 2015. Succinate production from xylose-glucose mixtures using a consortium of engineered *Escherichia coli*. Engineering Life Science. 15: 65-72.

Yomano LP, York SW, Zhou S, Shanmugam KT, Ingram LO. 2008. Re-engineering *Escherichia coli* for ethanol production. Biotechnology Letters 30: 2097-2103.

Zhang F, Li J, Liu H, Liang Q, Qi Q. 2016. ATP-based ratio regulation of glucose and xylose improved succinate production. PlosOne 11:e0157775.doi:10.1371/journal. pone.0157775.

Zhang X, Jantama K, Shanmugam KT, Ingram LO. 2009. Reengineering *Escherichia coli* for succinate production in mineral salts medium. Applied and Environmental Microbiology. 75: 7807-7813.

Zhou S, Causey TB, Hasona A, Shanmugam KT, Ingram LO. 2003. Production of optically pure D-lactic acid in mineral salts medium by metabolically engineered *Escherichia coli* W3110. Applied and Environmental Microbiology. 69: 399-407.

ประวัติผู้วิจัย

ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

1. **ชื่อ (ภาษาไทย)** นายเขมวิทย์ จันต๊ะมา

   (ภาษาอังกฤษ) Mr. KAEMWICH JANTAMA

2. **ตำแหน่งปัจจุบัน**

   รองศาสตราจารย์ประจำสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ

   สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3. **หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail**

   สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

   111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000

   โทรศัพท์ 044-22 4562; โทรสาร 044-22 4154 E-mail: kaemwich@sut.ac.th

4. **ประวัติการศึกษา**

ระดับการศึกษา	ปีที่สำเร็จการศึกษา	สถานศึกษา	วิชาเอก
ปริญญาตรี	2541	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (Chiang Mai University)	วิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีอาหาร (เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง) B.Sc. (Food Science and Technology)
ปริญญาโท	2544	มหาวิทยาลัยมหิดล (Mahidol University)	อณูพันธุศาสตร์ และพันธุวิศวกรรมศาสตร์ M.Sc. (Molecular Genetics and Genetic Engineering)
ปริญญาโท	2547	University of Florida, USA	วิศวกรรมเคมี M.E. (Chemical Engineering)
ปริญญาเอก	2551	University of Florida, USA	วิศวกรรมเคมี Ph.D. (Chemical Engineering)

5. **สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ**

   Metabolic Engineering and Evolution, Fermentation Technology, Molecular Genetics and Genetic Engineering, and Protein Expression

6. **ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ : ระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอโครงการวิจัย เป็นต้น**

   - **ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย** : ชื่อแผนงานวิจัย
     - การขยายขนาดการผลิตของ 2,3-บิวเทนไดออล และการแยกบริสุทธิ์ (วช. ปี 2555)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

- **หัวหน้าโครงการวิจัย** :
  - วิศวกรรมกระบวนการสร้างและสลายของเชื้อจุลินทรีย์ *Klebsiella oxytoca* เพื่อผลิตกรดซักซินิกบริสุทธิ์ (มทส. ปี 2552-2553)
  - Production of Lactic Acid by Metabolic Engineered *Klebsiella oxytoca* in Mineral Salts Media (มทส. ปี 2552)
  - การดัดแปลงเมตาบอลิกของ *Klebsiella oxytoca* เพื่อนำไปสู่การผลิตกรดซักซินิกที่มีอัตราการผลิต และผลผลิตสูงในอาหารเลี้ยงเชื้อราคาถูก (วช. ปี 2552)
  - การผลิตกรดซักซินิกจากน้ำตาลซูโครส และกากน้ำตาลอ้อย (สกว. ปี 2553-2554)
  - Production of Succinic Acid by Metabolic Engineered *E. coli* from Sucrose and Cane Molasses (International Foundation of Science ปี 2553)
  - การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สร้างกรดซักซินิกจากกระเพาะอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง (วช. ปี 2553)
  - การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซักซินิกจากกระบวนการหมักแบบกะจากเชื้อ *Actinobacillus succinogenes* (สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ ปี 2554)
  - การผลิตกรดแลคติคชนิด D-(-) จากแหล่งน้ำตาลอ้อยเข้มข้นกากน้ำตาล และแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดแล้ว โดยใช้ *Klebsiella oxytoca* ที่ผ่านการดัดแปลงวิถีกระบวนการสร้างและสลาย (สวทช. ปี 2554)
  - การผลิต 2,3-บิวเทนไดออล จากมอลโตเด็กซ์ทรินโดยเชื้อแบคทีเรีย *Klebsiella oxytoca* KMS005 ที่ผ่านการดัดแปลงวิถีกระบวนการสร้างและสลาย ด้วยระบบการหมักแบบกะและกึ่งกะ (วช. ปี 2555)
  - การขยายขนาดการผลิตของ 2,3-บิวเทนไดออล จากมอลโตเดรกซ์ตรินโดยเชื้อ *Klebsiella oxytoca* ที่ผ่านการดัดแปลงวิถีกระบวนการสร้างและสลาย (วช. ปี 2555)
  - Fermentative Production of Succinate from Renewable Agricultural Products and Its Purification by Nano-Filtration Technology (รัฐบาลฝรั่งเศส-สกอ. ปี 2556-2557)
  - การผลิตกรดซักซินิกจากแป้งมันและกากมันสำปะหลังด้วยเชื้ออีโคไลที่ผ่านการดัดแปลงกระบวนการสร้างและสลายสายพันธุ์ KJ122 (วช. ปี 2557-2558)
  - Optimization of 2,3-butanediol production from maltodextrin by metabolically engineered *Klebsiella oxytoca* KMS005 (รัฐบาลฝรั่งเศส-สกอ. ปี 2558-2559)
  - การประยุกต์ใช้เทคนิควิวัฒนาการเมทาบอลิกในเชื้อ *Escherichia coli* ที่ผ่านการดัดแปลงวิถีเมทาบอลิกสายพันธุ์ KJ122 เพื่อความทนทานต่อสารพิษในสารย่อยชานอ้อยและการผลิตกรดซักซินิกจากสารย่อยชานอ้อย (วช. ปี 2558-2559)

- การผลิต 2,3 บิวเทนไดออล (2,3-BD) จากไซโลสโดยเชื้อ *Klebsiella oxytoca* KMS006 ที่ผ่านวิศวกรรมเมทาบอลิก (บ.พีทีที โกลบอล เคมิคอล จำกัด ปี 2559-2560)
- การผลิตกรดซักซินิกจากฟางข้าวด้วยเชื้ออีโคไลที่ผ่านการดัดแปลงกระบวนการสร้างและสลายสายพันธุ์ AS1600a (วช. ปี 2560-2561)
- การศึกษาความคงตัวของแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์ในน้ำผักและผลไม้ (วช. ปี 2560)
- การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ *Bifidobacterium* spp. เพื่อใช้ในเป็นกล้าเชื้อในอุตสาหกรรมนมหมัก (วช. ปี 2556-2557)
- การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ *Lactobacullus* spp. เพื่อใช้ในเป็นกล้าเชื้อในอุตสาหกรรมนมหมัก (วช. ปี 2556-2557)
- วิศวกรรมเมทาบอลิกของเชื้อ *Escherichia coli* KJ122 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลไซโลสในการผลิตกรดซักซินิก (วช. ปี 2561)
- การเพิ่มมูลค่าของแป้งมันและกากมันสำปะหลังด้วยการผลิต 2,3-บิวเทนไดออลด้วย *Klebsiella oxytoca* KMS005 (วช. ปี 2562)
- การพัฒนากล้าเชื้อโปรไบโอติกสำหรับ *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. ที่มีศักยภาพในการใช้ในอุตสาหกรรมอาหารนมหมัก (คปก. ปี 2553-2557)
- การหาสภาวะที่เหมาะสมของการระเบิดด้วยไอน้ำร่วมกับการใช้เอนไซม์ย่อยของกากชานอ้อยเพื่อการผลิตกรดซักซินิก (คปก. ปี 2554-2556)
- วิศวกรรมเมทาบอลิกของ *Escherichia coli* เพื่อการผลิต 3-HPA (คปก. ปี 2557-2561)
- วิศวกรรมเมทาบอลิกของ *Escherichia coli* เพื่อการผลิตกรดอิทาโคนิก (คปก. ปี 2560-2564)
- วิศวกรรมเมทาบอลิกของ *Klebsiella oxytoca* เพื่อการผลิตกรดซักซินิก (คปก. ปี 2561-2565)

○ **ผู้ร่วมโครงการวิจัย** :

- การแยก และทำให้บริสุทธิ์กรดซักซินิกจากน้ำหมักโดยวิธีการสกัดแบบมีปฏิกิริยา (วช. ปี 2553)
- การแยกและทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิกจากน้ำหมักโดยกระบวนการนาโนฟิวเตรชัน (วช. ปี 2553-2554)
- การแยกสาร 2,3-บิวเทนไดออลจากน้ำหมักโดยการสกัดด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค (วช. ปี 2555)

○ **งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :**

- วิศวกรรมกระบวนการสร้างและสลายของเชื้อจุลินทรีย์ *Klebsiella oxytoca* เพื่อผลิตกรดซักซินิกบริสุทธิ์ (มทส. ปี 2552-2553)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

- Production of Lactic Acid by Metabolic Engineered *Klebsiella oxytoca* in Mineral Salts Media (มทส. ปี 2552)
- การดัดแปลงเมตาบอลิกของ *Klebsiella oxytoca* เพื่อนำไปสู่การผลิตกรดซักซินิกที่มีอัตราการผลิต และผลผลิตสูงในอาหารเลี้ยงเชื้อราคาถูก (วช. ปี 2552)
- การผลิตกรดซักซินิกจากน้ำตาลซูโครส และกากน้ำตาลอ้อย (สกว. ปี 2553-2554)
- Production of Succinic Acid by Metabolic Engineered *E. coli* from Sucrose and Cane Molasses (International Foundation of Science ปี 2553)
- การแยก และทำให้บริสุทธิ์กรดซักซินิกจากน้ำหมักโดยวิธีการสกัดแบบมีปฏิกิริยา (วช. ปี 2553)
- การแยกสาร 2,3-บิวเทนไดออลจากน้ำหมักโดยการสกัดด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค (วช. ปี 2555)
- การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สร้างกรดซักซินิกจากกระเพาะอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง (วช. ปี 2553)
- การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซักซินิกจากกระบวนการหมักแบบกะจากเชื้อ *Actinobacillus succinogenes* (สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ ปี 2554)
- การแยกและทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิกจากน้ำหมักโดยกระบวนการนาโนฟิวเตรชัน (วช. ปี 2553-2554)
- การผลิตกรดแลคติคชนิด D-(-) จากแหล่งน้ำตาลอ้อยเข้มข้นกากน้ำตาล และแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดแล้ว โดยใช้ *Klebsiella oxytoca* ที่ผ่านการดัดแปลงวิถีกระบวนการสร้างและสลาย (สวทช. ปี 2554)
- การผลิต 2,3-บิวเทนไดออล จากมอลโตเด็กซ์ทรินโดยเชื้อแบคทีเรีย *Klebsiella oxytoca* KMS005 ที่ผ่านการดัดแปลงวิถีกระบวนการสร้างและสลาย ด้วยระบบการหมักแบบกะและกึ่งกะ (วช. ปี 2555)
- การขยายขนาดการผลิตของ 2,3-บิวเทนไดออล จากมอลโตเดรกซ์ตรินโดยเชื้อ *Klebsiella oxytoca* ที่ผ่านการดัดแปลงวิถีกระบวนการสร้างและสลาย (วช. ปี 2555)
- Fermentative Production of Succinate from Renewable Agricultural Products and Its Purification by Nano-Filtration Technology (รัฐบาลฝรั่งเศส-สกอ. ปี 2556-2557)
- การผลิตกรดซักซินิกจากแป้งมันและกากมันสำปะหลังด้วยเชื้ออีโคไลที่ผ่านการดัดแปลงกระบวนการสร้างและสลายสายพันธุ์ KJ122 (วช. ปี 2557-2558)
- Optimization of 2,3-butanediol production from maltodextrin by metabolically engineered *Klebsiella oxytoca* KMS005 (รัฐบาลฝรั่งเศส-สกอ. ปี 2558-2559)

- การประยุกต์ใช้เทคนิควิวัฒนาการเมทาบอลิกในเชื้อ *Escherichia coli* ที่ผ่านการดัดแปลงวิถีเมทาบอลิกสายพันธุ์ KJ122 เพื่อความทนทานต่อสารพิษในสารย่อยชานอ้อยและการผลิตกรดซักซินิกจากสารย่อยชานอ้อย (วช. ปี 2558-2559)
- การผลิต 2,3 บิวเทนไดออล (2,3-BD) จากไซโลสโดยเชื้อ *Klebsiella oxytoca* KMS006 ที่ผ่านวิศวกรรมเมทาบอลิก (บ.พีทีที โกลบอล เคมิคอล จำกัด ปี 2559-2560)
- การศึกษาความคงตัวของแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์ในน้ำผักและผลไม้ (วช. ปี 2560)
- การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ *Bifidobacterium* spp. เพื่อใช้ในเป็นกล้าเชื้อในอุตสาหกรรมนมหมัก (วช. ปี 2556-2557)
- การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ *Lactobacullus* spp. เพื่อใช้ในเป็นกล้าเชื้อในอุตสาหกรรมนมหมัก (วช. ปี 2556-2557)
- การพัฒนากล้าเชื้อโปรไบโอติกสำหรับ *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. ที่มีศักยภาพในการใช้ในอุตสาหกรรมอาหารนมหมัก (คปก. ปี 2553-2557)
- การหาสภาวะที่เหมาะสมของการระเบิดด้วยไอน้ำร่วมกับการใช้เอนไซม์ย่อยของกากชานอ้อยเพื่อการผลิตกรดซักซินิก (คปก. ปี 2554-2556)
- วิศวกรรมของเชื้ออีโคไลสายพันธุ์ KJ122 เพื่อผลิตกรดซักซินิกจากไซโลส (วช. ปี 2561)

<u>ประวัติผู้ร่วมวิจัย</u>

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาวพรรวณา ขุนโนนเขวา

(ภาษาอังกฤษ) MISS PANWANA KHUNNONKWAO

2. ตำแหน่งปัจจุบัน

นักวิจัย สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000

โทรศัพท์ 044-22 3357; โทรสาร 044-22 4154 E-mail: panwana.k@sut.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

ระดับการศึกษา	ปีที่สำเร็จการศึกษา	สถานศึกษา	วิชาเอก
ปริญญาตรี	2551	มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี (Ubon Ratchathani University)	เทคโนโลยีอาหาร (เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง)

			B.Sc. (Food Science and Technology)
ปริญญาโท	2553	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (Suranaree University of Technology)	เทคโนโลยีชีวภาพ M.Sc. (Biotechnology)
ปริญญาเอก	2557	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (Suranaree University of Technology) Université Toulouse III - Paul Sabatier	เทคโนโลยีชีวภาพ Ph.D. (Biotechnology) วิศวกรรมเคมี Ph.D. (Chemical Engineering)

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

Metabolic Engineering and Evolution, Fermentation Technology, Separation and Purification Technology

6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ : ระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอโครงการวิจัย เป็นต้น

- **ผลงานที่ตีพิมพ์ในวารสาร**

Khunnonkwao P, Jantama K., Kanchanatawee S, Galier S, and Roux-de Balmann H. 2018. A two steps membrane process for the recovery of succinic acid from fermentation broth. Separation and Purification Technology. 207: 451-460.

Khunnonkwao P, Jantama S S, Kanchanatawee S, Jantama K. 2018. Re-engineering Escherichia coli KJ122 to enhance the utilization of xylose and xylose/glucose mixture for efficient succinate production in mineral salts medium. Applied Microbiology and Biotechnology. 102: 127-141.

Khunnonkwao P, Jantama K., Kanchanatawee S, Galier S, and Roux-de Balmann H. 2016. Integration of nanofiltration in the production of succinic acid from fermentation of lignocellulosic material. 5th International Congress on Green Process Engineering (GPE 2016), June 19 - 24, Mont Tremblant, Quebec, Canada.

Jantama K, Polyiam P, Khunnonkwao P, Chan S, Sangproo M, Khor K, Kanchanatawee S, Jantama S S, Jantama K. 2015. Efficient reduction of the formation of by-products and improvement of production yield of 2,3-butanediol by a combined deletion of

alcohol dehydrogenase, acetate kinase-phosphotransacetylase, and lactate dehydrogenase genes in metabolically engineered Klebsiella oxytoca in mineral salts medium. Metabolic Engineering, 30: 16-26.

Khunnonkwao P, Boontawan P, Haltrich D, Maischberger T, Boontawan A. 2012. Purification of L-(+)-lactic acid from pre-treated fermentation broth using vapor permeation-assisted esterification. Process Biochemistry 47: 1948-1956.

Khunnonkwao P, Ariyawong C, Lertsiriyothin W, Boontawan A. 2012. Purification of D-(-)-Lactic Acid from Fermentation Broth Using Nanofiltration, Esterification, Distillation, and Hydrolysis Technique. Advanced Materials Research 550-553: 2945-2952.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี