บทคัดย่อ

กรดแลกติกมีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวางรวมถึงความเป็นไปได้ในการใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ โดยกระบวนการผลิตกรดแลกติกบริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพมีความสำคัญอย่างยิ่งสำหรับการนำไปใช้เพื่อการสร้างสายพอลิเมอร์ เมื่อการตัดต่อยีน *ldhA*จาก *Rhizopus oryzae* เข้าสู่พลาสมิด แล้วนำเข้าสู่ *Esherichia coli* ที่ยีน *ldhA*บนดีเอ็นเอถูกทำลายเกิดเป็น *E. coli* สายพันธุ์ RB24 พบว่ายีน *ldhA*ของ *R. oryzae* บนพลาสมิดสามารถแสดงออกได้ โดยเมื่อทำการหมักในอาหารที่มีกลูโคสเริ่มต้น 100 g/L ในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนและไม่เติม Ampicilin พบว่า *E. coli* สายพันธุ์นี้สามารถผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ได้มากที่สุด แต่เนื่องจากปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้ยังมีปริมาณน้อยซึ่งอาจเป็นผลมาจากกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณมากทำให้ไปยับยั้งการผลิตกรดแลกติกและการสูญเสียพลาสมิดได้ง่ายเมื่อไม่เติม Ampicilin จึงได้ทำการหาภาวะที่เหมาะสมในการหมัก *E. coli* สายพันธุ์ RB24 คือในขั้น Pre-culture ใช้ภาวะที่มีออกซิเจนเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ แล้วจึงทำการหมักในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนโดยใช้กลูโคสเริ่มต้น 20 g/L และเติม Ampicilin ทำให้ได้ปริมาณกรดแลกติกที่คงที่มากขึ้นเมื่อทำการศึกษาการใช้เทคนิค error-prone PCR เพื่อทำให้บริเวณยีน *ldhA*จาก *R. oryzae* บนพลาสมิดเกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่ม พบว่าสามารถคัดเลือก *E. coli* สายพันธุ์ที่ผลิตกรดแลกติกได้ดีขึ้นกว่า *E. coli* สายพันธุ์ RB24 ประมาณ 7 เท่า โดยพบการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 94 และ 204 หลัง Stop codon จาก G เป็น T ทั้งสองตำแหน่งในสายพันธุ์ที่ตั้งชื่อว่าสายพันธุ์ TW4 นอกจากนี้ยังพบว่า *E. coli* สายพันธุ์ TW4 สามารถผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ได้ดีที่สุดในอาหารหมักที่มีกลูโคสเริ่มต้น 20 g/L

คำสำคัญ**:** กรดแลกติก, *Rhizopus oryzae*, *Escherichia coli*, error-prone PCR

ABSTRACT

Lactic acid is widely applied in various industries including the use as a potential precursor for biodegradable plastics. The effective process to produce optically pure monomers of lactic acid is essential for further polymer synthesis. When plasmid with *ldhA* from *Rhizopus oryzae* was transformed into *E. coli*of which chromosomal *ldhA* was knocked out, generating the strain called RB24, *R. oryzae ldhA* gene on the plasmid could be expressed. TheRB24 produced L-lactic acid with the highest yield when fermented with fermentation broth containing 100 g/L intial glucose without Ampicillin under anaerobic condition. However, the lactic acid yield obtained from this strain was still low that may result from the inhibition of the lactic acid production by high amount of residual glucose in the culture and the easy loss of plasmid when Ampicillin was not added. To solve this problem, the suitable condition for fermenting *E. coli* strain RB24 was optimized and found that L-lactic acid production was more stable when the strain was pre-cultured under aerobic condition to increase cell density for the inoculum and further fermented with fermentation broth containing 20 g/L intial glucose with Ampicillin addition under anaerobic condition. When error-prone PCR was applied to generate random mutations on *R. oryzae ldhA* gene region, which further inserted on plasmid and transformed into *E. coli*, the selected clone could produce L-lactic acid approximately 7 times more than RB24 strain. DNA sequencing suggested that, in the strain named TW4, there were 2 point mutations from G to T at both of 94^{th} and 204^{th} positions which were located downstream the stop codon. Furthermore, the strain TW4 could produce L-lactic acid with the highest yield by using fermentation broth with 20 g/L initial glucose.

Keywords: Lactic acid, *Rhizopus oryzae*, *Escherichia coli*, error-prone PCR