

การผลิตพลาสติกชีวภาพชนิด Polyhydroxyalkanoate จากกลีเซอรอล โดย *Escherichia coli* ดัดแปลง

BIOSYNTHESIS OF POLYHYDROXYALKANOATE BIOPLASTIC FROM GLYCEROL BY ENGINEERED *ESCHERICHIA COLI*

จิตวดี พิทักษ์โรจนกุล 5137026 MBMG/D

ปร.ด. (อนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: กุศล ภูวนิจ, Ph.D., สุทิพา ธนพงศ์พิพัฒน์, Ph.D.,
วิระวัฒน์ แซ่มปรีดา, Ph.D., วิภา จิงจุพรชัย, Ph.D., อภินันท์ อุดมกิจ, Ph.D.

บทคัดย่อ

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) มีศักยภาพที่จะใช้เป็นพลาสติกชีวภาพ อย่างไรก็ตามตลาดการใช้งานของ PHAs ยังถูกจำกัดด้วยราคาที่สูง กลีเซอรอลดิบคือแหล่งคาร์บอนทางเลือกสำหรับการผลิต PHAs *Escherichia coli* ดัดแปลงหลายสายพันธุ์จึงถูกสร้างขึ้นเพื่อศึกษาความสามารถในการผลิต poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] และ Short-Chain-Length-co-Medium-Chain-Length PHAs (SCL-MCL-PHAs) จากกลีเซอรอลบริสุทธิ์และกลีเซอรอลดิบ โดยขึ้นที่เกี่ยวกับการผลิต PHA ได้แก่ β -ketothiolase (*phaA*) acetoacetyl-CoA reductase (*phaB*) และ PHA synthase (*phaC*) ถูกโคลนเข้า pETDuet-ABCs และถูกเหนี่ยวนำให้แสดงออกพร้อมกันใน *E. coli* เพื่อผลิต P(3HB) โดยที่ขึ้น *phaA* และ *phaB* มาจาก *Ralstonia eutropha* ในขณะที่ *phaCs* 3 ชนิด มาจากแบคทีเรีย 3 ชนิดคือ *Aeromonas hydrophila* *R. eutropha* และ *Pseudomonas putida* ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าชนิดของ *phaCs* ส่งผลต่อปริมาณของ P(3HB) ที่ผลิตได้ (30% 24% และ 2% ของน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ) ระยะของเซลล์และสัดส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงมีผลต่อปริมาณ P(3HB) เช่นกัน และเพื่อที่จะผลิต SCL-MCL-PHAs จึงโคลนยีน (*R*)-specific enoyl-CoA hydratase 3 ชนิด จาก *P. putida* (*phaJ1_{pp}* and *phaJ4_{pp}*) และ *A. hydrophila* (*phaJ_{Ah}*) เข้า pCDFDuet-Js และส่งถ่ายพร้อมกับ pETDuet-ABCs พบว่าการแสดงออกพร้อมกันของ PhaAB กับแต่ละชนิดของ PhaCs และ PhaJs ทำให้ *E. coli* ผลิต SCL-MCL-PHAs ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 4 ถึง 10 อะตอมจากการใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ร่วมกับโคเดคาร์โนเอต และสัดส่วนของโมโนเมอร์สัมพันธ์กับความเข้มข้นของโคเดคาร์โนเอต นอกจากนี้เมื่อกลีเซอรอลดิบถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *E. coli*-ABC_{Ah} ผลิต P(3HB) ได้ 14% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ในขณะที่ *E. coli*-ABC_{Ah}J_{Ah} ผลิต P(3HB-1 mol% 3HHx) ได้ 3% ของน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อมีการเติมโคเดคาร์โนเอตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ น้ำหนักโมเลกุลของ PHAs ที่ได้อยู่ในช่วง 110 ถึง 260 กิโลดาร์ตัน และ P(3HB-co-3HHx) แสดงคุณสมบัติด้านความร้อนที่ดีกว่า P(3HB)