บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5380156

ชื่อโครงการ: การตัดต่อทางพันธุกรรมของ *Escherichia coli* เพื่อผลิตกรดแลกติก

ชื่อนักวิจัย: อาจารย์ ดร. ฤทัยรัตน์ บุญสมบัติ

E-mail Address: Ruethairat.B@chula.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 15 มิถุนายน พ.ศ. 2553 - 14 มิถุนายน พ.ศ. 2556

กรดแลกติกมีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวางรวมถึงความเป็นไปได้ในการใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ โดยกระบวนการผลิตกรดแลกติกบริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพมีความสำคัญอย่างยิ่ง เมื่อการตัดต่อยีน *ldhA* จาก *Rhizopus oryzae* เข้าสู่พลาสมิดแล้วนำเข้าสู่ *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 แต่เนื่องจากปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้ยังมีปริมาณน้อยซึ่งอาจเป็นผลมาจากกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณมากทำให้ไปยับยั้งการผลิตกรดแลกติก และการสูญเสียพลาสมิดได้ง่ายเมื่อไม่เติม Ampicilin จึงได้ทำการหาภาวะที่เหมาะสมในการหมัก *E. coli* สายพันธุ์ RB24 คือในขั้น Pre-culture ใช้ภาวะที่มีออกซิเจนเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ แล้วจึงทำการหมักในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนโดยใช้กลูโคสเริ่มต้น 20 g/L และเติม Ampicilin ทำให้ได้ปริมาณกรดแลกติกที่คงที่มากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อตัดต่อยีน *ldhA* จาก *R. oryzae* ลงบนพลาสมิด pUC19 สามารถผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ได้ดีกว่าการใช้พลาสมิด pBluescript II KS(+) ซึ่งอาจเป็นเพราะขนาดของพลาสมิดที่แตกต่างกัน เมื่อทำการศึกษาการใช้เทคนิค error-prone PCR เพื่อทำให้บริเวณยีน *ldhA* จาก *R. oryzae* บนพลาสมิดเกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่ม พบว่าสามารถคัดเลือก *E. coli* สายพันธุ์ที่ผลิตกรดแลกติกได้ดีขึ้นกว่า *E. coli* สายพันธุ์ RB24 ประมาณ 6-8 เท่า โดยพบการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 554 จาก C เป็น T ในสายพันธุ์ TW10 และการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 524 เหนือ Start codon จาก A เป็น G ในสายพันธุ์ TW11 นอกจากนี้ยังพบว่า *E. coli* สายพันธุ์ที่ปรับปรุงด้วยด้วยเทคนิค error-prone PCR สามารถผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ได้ดีที่สุดในอาหารหมักที่มีกลูโคสเริ่มต้น 20 g/L

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

Abstract

Project Code: MRG5380156

Project Title: Genetic modification of *Escherichia coli* for lactic acid production

Investigator: Dr. Ruethairat Boonsombat

Institute of Biotechnology and Genetic Engineering, Chulalongkorn University

E-mail Address: Ruethairat.B@chula.ac.th

Project Period: 15th June 2010 - 14th June 2013

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. When plasmid with *ldhA* from *Rhizopus oryzae* was transformed into *E. coli* which chromosomal *ldhA* was knocked out, generating the strain called RB24, *R. oryzae ldhA* gene on the plasmid could be expressed. The RB24 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. Morover, due to the difference in size, it was suggested that *ldhA* from *R. oryzae* on pUC19 plasmid produced more L-lactic acid than on pBluescript II KS(+). 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*, clones that could produce L-lactic acid approximately 6-8 times more than RB24 strain were selected. DNA sequencing suggested there was a mutation for the strain TW10 at nucleotide 554 from C to T and for the strain TW11 at 524 base pair upstream the start codon from A to G. Furthermore, the modified strains by error-prone PCR could produce L-lactic acid with the highest yield by using fermentation broth with 20 g/L initial glucose.

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