| | |
|---|---|
| ชื่อวิทยานิพนธ์ | การปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็มและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต กรด 5-อะมิโนลีวูลินิก |
| ผู้เขียน | นางสาวปวรายย์ สว่างแสง |
| สาขาวิชา | เทคโนโลยีชีวภาพ |
| ปีการศึกษา | 2547 |

## บทคัดย่อ


แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถสะสมกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์เตตราไพโรลภายใต้สภาวะให้อากาศ-ไร้แสง จากการปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อเพิ่มการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็ม *Rhodobacter capsulatus* SS3 และ สายพันธุ์กลาย 2 สายพันธุ์ของ *Rhodobacter sphaeroides* ES16 (N20, U7) โดยชักนำเชื้อให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้ N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) และรังสียูวีและเลี้ยงเชื้อในอาหารกลูตาเมต-มาเลต (GM) ภายใต้สภาวะมีอากาศ–ไร้แสง พบว่าสายพันธุ์กลาย SN28 จาก *Rhodobacter capsulatus* SS3 สามารถผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกได้สูงกว่าอีก 323 สายพันธุ์ โดยผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก ได้ 64.77 ไมโครโมลาร์ หรือเพิ่มขึ้น 2.9 เท่า โดยเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (22.34 ไมโครโมลาร์) เมื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก ของเชื้อ *Rhodobacter capsulatus* SN28 พบว่าเชื้อผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกได้เพิ่มขึ้น 4.35 เท่า (97.13 ไมโครโมลาร์) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกลูตาเมต-กลูโคส (GG) ความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมในการเติมกรดลีวูลินิกคือเติม 15 มิลลิโมลาร์ที่ชั่วโมงที่ 36 ซึ่งเชื้อสามารถผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกได้เพิ่มขึ้นเป็น 129.37 ไมโครโมลาร์ ส่วนการเติมสารตั้งต้นตามวิถี C5 (กลูตาเมตและกรดมาลิก) ไม่มีผลต่อการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก นอกจากนี้การไม่เติมกลูตาเมตในอาหารกลูตาเมต-กลูโคสที่ดัดแปลง เชื้อสามารถผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกเพิ่มขึ้นเป็น 246.57 ไมโครโมลาร์หรือสูงกว่าชุดควบคุม (64.77 ไมโครโมลาร์) 3.81 เท่า และพบว่าสารตั้งต้นตามวิถี C4 (ซัคซิเนตและไกลซีน)ไม่มีผลต่อการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก เมื่อศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของกรดไขมันระเหย (กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทีริกที่ความเข้มข้น 0.5-3.0 กรัมต่อลิตร) พบว่ากรดบิวทีริกเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร เชื้อผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกสูงสุดเท่ากับ 267.36 ไมโครโมลาร์ และการเติมแมกนีเซียมคลอไรด์ที่ 15 มิลลิโมลาร์ มีผลให้การผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลีนิก เพิ่มขึ้นเป็น 303.13 ไมโครโมลาร์ ส่วนพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมคือ 7.0 และการควบคุมพีเอช (ที่ 7.0)

ระหว่างการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในถังหมักขนาด 5 ลิตรทำให้เชื้อผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกได้สูงสุด การเติมไพริดอกซัลฟอสเฟตไม่มีผลต่อการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก และเมื่อศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ 0-3% พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 2 % โซเดียมคลอไรด์ มีผลให้เชื้อผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกได้ 308.72 ไมโครโมลาร์ เมื่อเปรียบเทียบสูตรอาหารเกรดวิเคราะห์ (สูตร GM, GG และสูตรอาหารที่เหมาะสม) กับสูตรอาหารเกรดทางการค้า; อาหารโมดิฟายด์กลูตาเมต-กลูโคส (MGG), อาหารโมโนโซเดียมกลูตาเมต-กลูโคส (MGS) และอาหารโมโนโซเดียมกลูตาเมต-กลูโคส-เกลือ-ยีสต์สกัด (MGSY) พบว่าการเลี้ยงในสูตรอาหารเกรดวิเคราะห์เชื้อผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก (69.49-310.54 ไมโครโมลาร์) ได้สูงกว่าการเลี้ยงในอาหารเกรดทางการค้า (5.49-88.25 ไมโครโมลาร์) ในบรรดาสูตรอาหารเกรดวิเคราะห์ พบว่าการเลี้ยงในสูตรอาหารที่เหมาะสม *Rhodobacter capsulatus* SN28 ผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก ได้สูงสุด 310.54 ไมโครโมลาร์หรือสูงกว่าชุดควบคุม (64.77 ไมโครโมลาร์) 4.8 เท่า

| | |
|---|---|
| Thesis Title | Strain Improvement of Halotolerant Photosynthetic Bacteria and Optimization for Production of 5-Aminolevulinic Acid |
| Author | Miss Pavara Sawangsaeng |
| Major Program | Biotechnology |
| Academic Year | 2004 |

## Abstract

Photosynthetic bacteria accumulate 5-aminolevulinic acid (ALA), a precursor in tetrapyrrole biosynthesis, under aerobic-dark condition. Strain improvement to increase ALA production from the halotolerant strain *Rhodobacter capsulatus* SS3 and the two mutant strains of *Rhodobacter sphaeroides* ES16 (N20, U7) were conducted using N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) and ultraviolet (UV) and cultivated in glutamate-malate (GM) medium under aerobic-dark condition. Among 323 mutant strains obtained, the isolate SN28 (a mutant from *Rhodobacter capsulatus* SS3) gave the highest value of ALA (64.77 μM) which was 2.9 folds higher than the wild type (22.34 μM). Optimization studies revealed that the ALA production from *R. capsulatus* SN28 increased 4.35 folds (97.13 μM) when cultivated in glutamate-glucose (GG) medium. The optimum concentration of levulinic acid (LA) and time of LA addition for ALA production were 15 mM and at 36 h cultivation, respectively, giving the highest extracellular ALA of 129.37 μM. ALA precursors for C5 pathway (glutamate and malic acid) had no effect on ALA production of this strain. In addition, without glutamate in modified GG medium, the extracellular ALA further increased to 246.57 μM or 3.81 folds higher than the control (64.77 μM). ALA precursors for C4 pathway (succinate and glycine) had no effect on ALA production. For the optimum types and concentrations of volatile fatty acids tested (acetic, propionic and butyric acids at 0.5-3.0 g/l), butyric acid at 0.5 g/l gave the highest ALA production of 267.36 μM. With the addition of 15 mM $MgCl_2$, ALA was further increased to 303.13 μM. The optimum initial pH was 7.0 and pH control (at 7.0) during cultivation in the optimized medium in a 5 L fermentor gave the maximum ALA concentration. Addition of pyridoxal phosphate did not enhance ALA production. For the optimum

concentration of NaCl tested (0-3 %), 2% NaCl gave the highest ALA production of 308.72 μM. ALA production from the mutant strain SN28 using the analytical grade media (GM, GG and optimized medium) and commercial grade media; modified glutamate glucose medium (MGG), monosodium glutamate glucose salt medium (MGS), monosodium glutamate glucose salt yeast extract medium (MGSY) was compared. It was found that the analytical grade media resulted in higher concentration of ALA (69.49-310.54 μM) than the commercial grade media (5.49-88.25 μM). Among varoius media, cultivation of *R. capsulatus* SN28 in optimized medium gave the maximum ALA concentration of 310.54 μM, or increased 4.8 folds compared to the control (64.77 μM).