ชื่อวิทยานิพนธ์	สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต 5-อะมิโนลีวูลินิกแอซิดจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็ม *Rhodobacter capsulatus* SS3
ผู้เขียน	นางสาวศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2545

บทคัดย่อ

จากการคัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็ม จำนวน 5 สายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ SS3 สามารถผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกได้สูงสุด (26 ไมโครโมลาร์) และจำแนกเชื้อได้เป็น *Rhodobacter capsulatus* เมื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกของเชื้อ โดยเลี้ยงในอาหารกลูตาเมต-มาเลตที่มีเกลือ 3% ภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง (3,000 ลักซ์) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าความเข้มข้นของกรดลีวูลินิกที่เหมาะสมคือ 15 มิลลิโมลาร์ และการเติมกรดลีวูลินิก 2 ครั้ง (ครั้งละ 15 มิลลิโมลาร์) เชื้อผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกได้เพิ่มขึ้นเป็น 74 ไมโครโมลาร์ ในขณะที่การเจริญลดลง สำหรับผลของสารตั้งต้นของวิถี C_5 พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของกลูตาเมต และกรดมาลิก คือ 30 และ 7.5 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ ซึ่งให้กรด 5 อะมิโนลีวูลินิกเพิ่มขึ้นเป็น 110 ไมโครโมลาร์ สำหรับสารตั้งต้นของวิถี C_4 พบว่าการเติมไกลซีน 10 มิลลิโมลาร์และซัคซิเนต 40 มิลลิโมลาร์ เชื้อผลิตกรด 5- อะมิโนลีวูลินิกเพิ่มขึ้นเป็น 348 ไมโครโมลาร์ สำหรับชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของกรด ไขมันระเหย (กรดอะซิติก โพรพิโอนิก และบิวทิริก ที่ความเข้มข้น 0.5-3.0 กรัมต่อลิตร) คือ กรดโพรพิโอนิกที่ 0.5 กรัมต่อลิตร เชื้อผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกได้สูงสุดเท่ากับ 514 ไมโครโมลาร์ การเติมแมกนีเซียมคลอไรด์ที่ 15 มิลลิโมลาร์ และไพริดอกซัลฟอสเฟตที่ 10 ไมโครโมลาร์ มีผลให้การผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกเพิ่มขึ้นเป็น 615 และ 692 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ และผลผลิตของเซลล์เท่ากับ 1.5 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมคือ 6.5 ได้กรด 5-อะมิโนลีวูลินิกสูงสุด 976 ไมโครโมลาร์ แต่การควบคุมพีเอชที่ 6.5 เชื้อผลิตผลิตภัณฑ์ได้ต่ำกว่าการเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะที่ไม่มีการควบคุมพีเอช

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Rhodobacter capsulatus* SS3 ในอาหารสูตรดั้งเดิม (อาหารกลูตาเมต-มาเลตที่มีเกลือ 3%) เปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม พบว่าได้ปริมาณกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกภายนอกเซลล์เท่ากับ 26 และ 750 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ และมีการสะสมของกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกภายในเซลล์เท่ากับ 3.25 และ 19.20 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ ดังนั้นการศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในถังหมักจึงมีผลให้เชื้อสามารถผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกภายนอกเซลล์เพิ่มขึ้น 29 เท่าและเกิดการสะสมของกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกภายในเซลล์เพิ่มขึ้น 5.9 เท่า

Thesis Title	Optimization for Production of 5-Aminolevulinic Acid from Halotolerant Photosynthetic Bacteria *Rhodobacter capsulatus* SS3
Author	Miss Supalak Sattayasmithstid
Major Program	Biotechnology
Acedemic Year	2002

Abstract

Screening on five halotolerant photosynthetic bacterial isolates revealed that the isolate SS3 produced the highest amount of 5-aminolevulinic acid (ALA) (26 μM)and was identified to be *Rhodobacter capsulatus*. Studies on factors affecting the growth and ALA production from *R. capsulatus* SS3 was carried out in glutamate-malate (GM) medium with 3% NaCl under microaerobic-light (3,000 lux) condition at 37°C. The optimum concentration of levulinic acid (LA) for ALA production was 15 mM. Furthermore addition of LA two times (15 mM each) could increase the ALA production to 74 μM although growth was retarded. The effect of ALA precursors for C_5 pathway revealed that the optimum concentrations of glutamate and malic acids were 30 and 7.5 μM respectively, which enhanced the ALA production to 110 μM. For C_4 pathway, addition of 10 mM glycine and 40 mM succinate had a pronounce effect on ALA production in which the concentration further increased to 348 μM. For the optimum type and concentration of volatile fatty acids (acetic, propionic and butyric acids at 0.5-3.0 g/l), 0.5 g/l propionic acid gave the highest ALA production of 514 μM. Addition of 15 mM $MgCl_2$ and 10 μM pyridoxal phosphate enhanced ALA production to 615 and 692 μM, respectively with the cell yield of 1.5 g/l. The optimum initial pH was 6.5 which

gave the maximum ALA concentration of 976 μM. But controlling pH at 6.5 gave lower product yield than that under uncontrol pH. Cultivation of *Rhodobacter capsulatus* SS3 in the original medium (glutamate-malate medium with 3% NaCl) compared with the optimized medium gave the extracellular ALA concentration of 26 and 750 μM, repectively while the intracellular ALA concentration were 3.25 and 19.20 μM, respectively. Therefore, the optimization studies resulted in the 29 folds increase of the extracellular ALA and 5.9 folds increase of the intracellular ALA.