รัติกาล ทองสำฤทธิ์ : การแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสจากต่างสายพันธุ์เพื่อผลิตเอทานอลใน *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* (HETEROLOGOUS EXPRESSION OF α-AMYLASE AND GLUCOAMYLASE GENES TO PRODUCE ETHANOL IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*) อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์ ดร.พงษ์ฤทธิ์ ครบปรัชญา, 136 หน้า.

ในปัจจุบันเอทานอลได้กลายเป็นแหล่งพลังงานทางเลือกที่สำคัญ เนื่องจากการลดลงอย่างต่อเนื่องของเชื้อเพลิงจำพวกฟอสซิลที่มีอย่างจำกัด เอทานอลที่ผลิตด้วยกระบวนการหมักเรียกกันโดยทั่วไปว่าไบโอเอทานอล หรือเอทานอลชีวภาพ ซึ่งถือว่าเป็นวิธีการแก้ปัญหาบางส่วนสำหรับวิกฤตพลังงานทั่วโลก ประเทศไทยถือว่าเป็นผู้ผลิตมันสำปะหลังที่ใหญ่ที่สุดเป็นอันดับสามของโลก ซึ่งมันสำปะหลังเป็นพืชที่มีคาร์โบไฮเดรตสูงและเป็นสารตั้งต้นที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลในราคาที่ต่ำลงได้ กระบวนการหมักเอทานอลในอุตสาหกรรมโดยทั่วไปประกอบด้วยสองขั้นตอนหลักคือการย่อยสลายแป้งและการหมัก แต่เนื่องจากจุลินทรีย์ที่สำคัญ เช่น เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ขาดกิจกรรมของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายแป้ง (Amylolytic enzyme) จึงไม่สามารถใช้ประโยชน์จากแป้งโดยตรงสำหรับการเจริญเติบโตและการหมักได้ ดังนั้นกระบวนการหมักจึงต้องใช้พลังงานและเอนไซม์ย่อยสลายแป้งจำนวนมากเพื่อเปลี่ยนแป้งไปเป็นเจล จากนั้นทำให้เป็นของเหลวแล้วเปลี่ยนเป็นเดกซ์ทรินก่อนการหมักของแป้งดิบเพื่อผลิตเอทานอล

ด้วยสาเหตุดังกล่าวนี้ได้มีการแนะนำว่าการใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมให้มีการแสดงออกของเอนไซม์ย่อยสลายแป้ง ซึ่งอาจจะสามารถย่อยสลายแป้งและเข้าสู่ขั้นตอนการหมักได้ในขั้นตอนเดียว ซึ่งการปรับปรุงสายพันธุ์นี้จะสามารถลดต้นทุนและค่าใช้จ่ายด้านพลังงานให้กับโรงงานผลิตเอทานอลในปัจจุบันได้ และทำให้สามารถผลิตเอทานอลเชิงการค้าได้มากขึ้น ในโครงการนี้ การเปลี่ยนแปลงแป้งมันสำปะหลังโดยกระบวนการทางชีวภาพให้เป็นน้ำตาลเพื่อการหมักทดสอบโดยการใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* 2 สายพันธุ์ใหม่ที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมได้แก่ *S. cerevisiae* TISTR 5596/pSWA2 (ผลิตแอลฟาอะไมเลส) และ *S. cerevisiae* TISTR 5596/pGAM1 (ผลิตกลูโคอะไมเลส) ซึ่ง ยีน *SWA2* และยีน *GAM1* แต่ละยีนถูกตัดต่อเข้าพลาสมิดสำหรับแสดงออกภายใต้การควบคุมการทำงานของ GAP โปรโมเตอร์เพื่อสร้างพลาสมิด pSWA2 และ pGAM1 ตามลำดับ โดยพลาสมิด pSWA2 และ pGAM1 นี้ถูกถ่ายเข้าสู่โครโมโซมยีสต์ ยีสต์

แต่ละสายพันธุ์ที่รับเอาพลาสมิด pSWA2 หรือ pGAM1เข้าไปนั้นจากการตรวจ พบกิจกรรมของการแสดงออกของเอนไซม์ย่อยสลายแป้งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบ ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นว่าสายพันธุ์ยีสต์ที่ถูกดัดแปลงนี้มีการแสดงออกของ SWA2 และ GAM1 ที่สามารถผลิตและหลั่งเอนไซม์ของแอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสที่ทำงานได้ ตามลำดับ ในชุดการหมักของการศึกษานี้ได้ใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว ความสามารถของ *S. cerevisiae* TISTR5596/pSWA2 *S. cerevisiae* TISTR5596/pGAM1 และการเลี้ยงร่วมกันของทั้งสองสายพันธุ์คือ *S. cerevisiae* TISTR5596/pSWA2 กับ *S. cerevisiae* TISTR5596/pGAM1 โดยใช้แป้งมันสำปะหลังและการผลิตเอทานอล พบว่าแต่ละสายพันธุ์ในชุดการหมักนี้สามารถที่จะย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังภายใต้เงื่อนไขการหมักเอทานอลได้ และพบว่าผลผลิตของเอทานอลสูงสุดที่ได้รับเท่ากับ 0.465 ± 0.012 0.489 ± 0.010 และ 0.516 ± 0.021 กรัมเอทานอล ต่อ กรัมของสารตั้งต้นที่ใช้ ที่ 12 วัน เรียงตามลำดับของแต่ละสายพันธุ์ และได้ปริมาณเอทานอลมากสุดเท่ากับ 1.478 ± 0.267 1.992 ± 0.248 และ 2.977 ± 0.020 กรัมต่อลิตรที่ 25 วัน เรียงตามลำดับของแต่ละสายพันธุ์ โดยที่การเลี้ยงร่วมกันของทั้งสองสายพันธุ์คือ *S. cerevisiae* TISTR5596/pSWA2 กับ *S. cerevisiae* TISTR5596/pGAM1 ได้ผลผลิตเอทานอลที่สูงและอัตราการผลิตมากกว่าการเลี้ยงเพียงสายพันธุ์เดียว ดังนั้นยีสต์ลูกผสมสามารถเปลี่ยนแป้งเป็นเอทานอลด้วยกระบวนการตัดต่อพันธุกรรมได้สำเร็จ ยีนที่ถูกถ่ายโอนครั้งนี้สามารถแสดงออกในสายพันธุ์เจ้าบ้านได้ ซึ่งถือได้ว่าเป็นจุดเริ่มต้นในการพัฒนาสายพันธุ์ยีสต์ที่ผลิตเอทานอลในอนาคตต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาชีววิทยา ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2555 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

RUTTIKAN TONGSUMRIT : HETEROLOGOUS EXPRESSION OF α-AMYLASE AND GLUCOAMYLASE GENES TO PRODUCE ETHANOL IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. THESIS ADVISOR : PONGRIT KRUBPHACHAYA, Ph.D. 136 PP.

α-AMYLASE/ GLUCOAMYLASE/ RECOMBINANT *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*/ CASSAVA STARCH/ ETHANOL PRODUCTION

Ethanol has recently become an alternative energy because of the continuous reduction of limited fossil fuel stock. Ethanol produced by a fermentation process, generally referred as bioethanol, is considered to be a partial solution to the worldwide energy crisis. Thailand is the world's third largest producer for cassava. Cassava is an efficient carbohydrate crop and cheap substrate for conversion to ethanol. Traditionally, industrial bioethanol fermentation involves two major steps: cassava starch hydrolysis and fermentation. *Saccharomyces cerevisiae* lacks of amylolytic activity and is unable to directly utilize starch for growth and fermentation. It requires intensive amount of energy and starch hydrolysis enzyme to gelatinize, liquefied and dextrinize the raw starch before fermentation to produce ethanol.

It has been suggested that genetically engineered yeast which expresses amylolytic enzymes, simultaneous starch hydrolysis and fermentation. This improvement could greatly reduce the capital and energy cost in current bioethanol producing plants and make bioethanol production more economic. In this project, bioconversion of cassava starch to fermentation sugar was investigated using two genetically modified *S. cerevisiae* strains, *S. cerevisiae* TISTR 5596/pSWA2

(expressing α-amylase) and *S. cerevisiae* TISTR 5596/pGAM1 (expressing glucoamylase). Each of *SWA2*gene and *GAM1* gene was cloned downstream of a constitutive promoter, GAP, to obtain yeast expression plasmid named pGAM1 and pSWA2, respectively. These plasmids were introduced into the *S. cerevisiae* chromosome. Each of the pSWA2 and pGAM1 harboring yeast showed detectable amylolytic activity in the culture supernatant. This indicates that the pGAM1 and pS2 harboring yeast secreted biologically active glucoamylase and α-amylase, respectively. In batch fermentation, the ability of *S. cerevisiae* TISTR5596/pGAM1 and *S. cerevisiae* TISTR5596/pSWA2 and the co-cultured of *S. cerevisiae* TISTR5596/pGAM1 and *S. cerevisiae* TISTR5596/pSWA2 on cassava starch utilization and ethanol production were evaluated. The maximum ethanol yield was obtained at the level of 0.465 ± 0.012, 0.489 ± 0.010, and 0.516 ± 0.021 g ethanol/g substrate consumed at 12 days. The maximum ethanol concentration was obtained at the level of 1.478 ± 0.267, 1.992 ± 0.248, and 2.977 ± 0.020 g/l at 25 days. The co-cultured of *S. cerevisiae* TISTR5596/pSWA2 and *S. cerevisiae* TISTR5596/pGAM1 produce ethanol with higher liters and yield than those of single culture. The recombinant yeast converts starch into ethanol was successfully engineered. The transgene was expressed in host strain. The study is the promising start for future ethanol producing yeast development.

School of Biology Student's Signature_____

Academic Year 2012 Advisor's Signature_____