โชติกา โกศัลวิตร : การปรับแต่งยีสต์ *Pichia pastoris* เพื่อผลิตกรดไขมันดีเอชเอ และความเป็นไปได้ในการใช้ยีสต์น้ำมัน *Rhodotorula paludigena* CM33 สำหรับพลังงานชีวภาพ (MODIFICATION OF *Pichia pastoris* FOR DOCOSAHEXAENOIC ACID (DHA) PRODUCTION AND THE POTENTIAL OF OLEAGINOUS YEAST *Rhodotorula paludigena* CM33 FOR BIOFUEL PRODUCTION) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.มารินา เกตุทัต-คาร์นส์, 72 หน้า

เนื่องจากไขมันและกรดไขมันมีความสำคัญและเกี่ยวข้องกับการดำรงชีวิตของมนุษย์ทั้งในแง่ของอาหารและการดำเนินชีวิตประจำวัน ในวิทยานิพนธ์นี้ ได้ทำการตัดต่อพันธุกรรมยีสต์ *Pichia pastoris* เพื่อให้มีการสะสมของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงชนิดดีเอชเอ (docosahexaenoic acid; DHA) โดยการสกัดยีน Δ2 desaturase (Δ2D) และ Δ6 elongase (Δ6E) จากปลาม้าลาย (*Dario rerio*) และยีน Δ4 desaturase (Δ4D) จากสาหร่ายทะเลขนาดเล็ก (*Isochrysis galbana*) แล้วโคลนเข้าสู่พลาสมิด pGAP และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการวิเคราะห์พบว่ายีนทั้งหมดมีความถูกต้องเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI จากนั้นนำยีนทั้ง 3 มาตัดต่อให้อยู่ภายในพลาสมิดเดียวกัน เกิดเป็นพลาสมิดลูกผสม pGAP-Δ2DΔ6EΔ4D แล้วนำส่งเข้าสู่ยีสต์ *P. pastoris* หลังจากสิ้นสุดการเลี้ยงในสภาวะที่กำหนด พบว่ายีสต์ดังกล่าวมีการสะสมของดีเอชเอสูงถึง 1.67 มิลลิกรัมต่อกรัมยีสต์แห้ง ในขณะที่ไม่พบการสะสมของดีเอชเอในยีสต์ที่ไม่มีพลาสมิดลูกผสมและยีสต์ที่มีพลาสมิดเปล่า จากผลการทดลอง สรุปได้ว่ายีนทั้งหมดสามารถทำงานร่วมกันจนเกิดการสร้างและสะสมดีเอชเอในยีสต์ *P. pastoris*

นอกจากนี้ ยีสต์ในกลุ่มที่มีการสะสมไขมันสูง (oleaginous yeasts) กำลังได้รับความสนใจเพื่อใช้สำหรับผลิตพลังงานชีวภาพ เนื่องจากมีข้อเด่นหลายประการรวมทั้งยังสามารถเจริญได้ในของเสียหรือของเหลือทิ้งจากภาคอุตสาหกรรม จึงได้ทำการคัดเลือกยีสต์น้ำมันจากธรรมชาติโดยใช้เทคนิคการย้อมไขมันด้วย Nile Red (NR) fluorescence dye จากนั้นวัดค่าแสงฟลูออเรสเซนต์โดยใช้เทคนิค flow cytometry พบว่า ยีสต์ CM33 มีค่า relative Mean Fluorescence Intensity (MFI) และการสะสมไขมันสูงสุด จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-5.8S-ITS rDNA พบว่ายีสต์ดังกล่าว คือ *Rhodotorula paludigena* และได้ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีสต์ *R. paludigena* CM33 เป็นที่เรียบร้อยแล้ว โดยสามารถสืบค้นได้ที่ฐานข้อมูล DDBJ/ENA/GenBank ภายใต้ BioProject PRJNA491831 BioSample SAMN10089541 รหัส SWEA00000000.1 Assembled genome sequences รหัส SWEA01000001-SWEA01000078 และ Raw data sequences รหัส SRX6085390 จากนั้นเมื่อทดลองเลี้ยงยีสต์ดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนที่หลากหลาย ได้แก่ กลูโคส กลีเซอรอล ซูโครส และไซโลส พบว่า ยีสต์ CM33 มีการสะสมไขมัน

สูงสุดถึง 23.9% จากการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนระยะเวลา 4 วัน โดยมีกรดไขมันในกลุ่ม C16 และ C18 เป็นส่วนประกอบหลัก และเมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า สามารถผลิตชีวมวลและไขมันสูงขึ้นถึง 16.5 และ 6.1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้จากการวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้ยีสต์ *R. paludigena* สำหรับสร้างและสะสมไขมันและกรดไขมันจากการใช้ของเหลือทิ้งที่มีราคาถูกเป็นแหล่งคาร์บอน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ปีการศึกษา 2562 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

CHOTIKA GOSALAWIT : MODIFICATION OF *Pichia pastoris* FOR DOCOSAHEXAENOIC ACID (DHA) PRODUCTION AND THE POTENTIAL OF OLEAGINOUS YEAST *Rhodotorula paludigena* CM33 FOR BIOFUEL PRODUCTION. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. MARIENA KETUDAT-CAIRNS, Ph.D., 72 PP.

DHA/OLEAGINOUS YEAST/FATTY ACID BIOSYNTHESIS/BIOFUELS

Lipid and fatty acids are known to be important molecules for human daily life both as food and fuel. In this thesis, docosahexaenoic acid (DHA) which is important for human health was produced by co-expression of desaturase and elongase genes. The Δ2 desaturase (Δ2D) and Δ6 elongase (Δ6E) genes from zebrafish (*Dario rerio*) and Δ4 desaturase (Δ4D) gene from marine microalgae (*Isochrysis galbana*) were cloned into plasmid under the constitutive GAP promoter. Sequences of the deduced amino acids of all 3 genes showed that they contained conserved regions important for their activities. The co-expression of these 3 genes using *Pichia pastoris* as expression host showed that DHA was produced in recombinant yeast but was not detected in non-transformed *Pichia* and *Pichia* transformed with empty plasmid. Cultivation under certain conditions led to maximum DHA production of 1.67 mg/g DCW. The accumulation of DHA indicated the successful co-expression of Δ2D, Δ6E and Δ4D genes in *P. pastoris*.

Moreover, oleaginous yeasts are the future of biofuel production due to their numerous advantages. They not only require a short time, are easy to manipulate, and can cultivate to high cell density, but they also are able to grow in various carbon sources and waste materials. Therefore, oleaginous yeasts were screened using Nile Red (NR) fluorescence dye staining coupled with flow cytometry techniques. Strain CM33 showed the highest relative Mean Fluorescence Intensity (MFI) value, which correlated with the maximum lipid content when

compared with other yeasts. CM33 was identified as *Rhodotorula paludigena* by sequencing the ITS-5.8S-ITS rDNA region. After that, *de novo* sequencing of *R. paludigena* CM33 was performed and the whole genome sequence was deposited in DDBJ/ENA/GenBank under the BioProject PRJNA491831, BioSample SAMN10089541, accession number SWEA00000000.1. Assembled genome sequences are provided via GenBank accession numbers SWEA01000001-SWEA01000078. Raw data sequences have been deposited in the SRA database under accession number SRX6085390. The potential to assimilate various carbon sources of CM33 was performed through glucose-, glycerol-, sucrose- or xylose-based minimal media. Glucose-based medium showed the highest lipid content of 23.9% DCW after 4 days of cultured. The major fatty acids of the total lipids were C16:0 and C18:1. Molasses-based medium, biomass, lipid content and lipid yield increased to about 16.5 g/L, 37.1% DCW and 6.1 g/L, respectively. These results suggested that *R. paludigena* CM33 is a potential candidate for the maintenance of the carbon value chain by converting renewable waste material for biolipid production.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biotechnology

Academic Year 2019

Student's Signature CHOTIKA GOSALAWIT.

Advisor's Signature