ประศมา บุญญานันท์ : กระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำและการเลี้ยงเซลล์พืชในอาหารเหลวเพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. มารินา เกตุทัต-คาร์นส์, 76 หน้า

เมล็ดต้นสบู่ดำสามารถนำมาสกัดเพื่อใช้ผลิตน้ำมันไบโอดีเซล โดยที่การตัดต่อพันธุกรรมเป็นทางเลือกหนึ่งในการพัฒนาและปรับปรุงสายพันธุ์ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นส่วนหนึ่งของกระบวนตัดต่อพันธุกรรม การล้างชิ้นส่วนใบของต้นสบู่ดำด้วยสารเคมีที่ปลอดภัยต่อผู้ใช้งานและสิ่งแวดล้อมจึงถูกศึกษาโดยเปรียบเทียบการใช้โซเดียมไฮโปคลอไรด์และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 0-10% พบว่าการใช้ 5% ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์สามารถทำให้ชิ้นส่วนพืชปราศจากเชื้อปนเปื้อนได้ 47% จากนั้นได้ทำการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมโดยการเปรียบเทียบการใช้ฮอร์โมนพืช BA และ IBA พบว่าอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA และ IBA ร่วมกัน สามารถกระตุ้นการเกิดชิ้นแคลลัสได้มากถึง 90.5% จากนั้นชิ้นแคลลัสถูกกระตุ้นให้เกิดยอดพบว่าอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถกระตุ้นให้เกิดยอดได้ 43.7% โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 2 ยอดต่อชิ้นแคลลัส ยอดสมบูรณ์ถูกนำมากระตุ้นบนอาหารแข็งสูตร1/2 MS ที่เติม IBA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ phloroglucinol 100 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อชักนำให้เกิดรากและจึงเกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์ในที่สุด

การผลิตโปรตีนมูลค่าสูงสามารถผลิตจากเซลล์พืช ซึ่งมีความปลอดภัยต่อผู้ใช้งาน ต้นทุนการผลิตต่ำและใช้พื้นที่น้อยในการผลิต การทดลองนี้ได้ทำการผลิตโปรตีนเรืองแสงในเซลล์ *Arabidopsis thaliana* เพื่อใช้ทดสอบประสิทธิภาพการบ่งชี้ของเพปไทด์ส่งสัญญาณเพื่อส่งออกนอกเซลล์โดยศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอล นอกจากนั้นการเปรียบเทียบผลผลิตโปรตีนเรืองแสงเมื่อใช้โปรโมเตอร์ 35S และโปรโมเตอร์ Rd29a พบว่า โปรโมเตอร์ Rd29a สามารถควบคุมให้มีการผลิตโปรตีนเรืองแสงได้มากกว่าการใช้โปรโมเตอร์ 35S การใช้โปรโมเตอร์ Rd29a ที่มีเพปไทด์ส่งสัญญาณจะให้ผลผลิตสูงในเซลล์แขวนลอยตั้งแต่วันที่ 12 เป็นต้นไป การศึกษาดังกล่าวสามารถทำให้การเก็บเกี่ยวผลผลิตจากอาหารเหลวทำได้ง่ายขึ้น ลดขั้นตอนและสารเคมีจากการสกัดโปรตีนจากเซลล์พืช จากการใช้โปรตีนเรืองแสงเป็นต้นแบบทำให้ทราบว่าอนาคตโปรตีนที่มูลค่าสูงก็จะสามารถนำมาผลิตในเซลล์แขวนลอยของ *Arabidopsis* ได้

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา ประศมา บุญญานันท์

ปีการศึกษา 2562 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

PASAMA BOONYANAN : TISSUE CULTURE FOR JATROPHA REGENERATION AND PLANT CELL SUSPENSION CULTURE FOR RECOMBINENT PROTEIN PRODUCTION. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. MARIENA KETUDAT-CAIRNS, Ph.D., 76 PP.

TISSUE CULTURE/STERILIZATION/SUSPENSION CULTURE/GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP)/SIGNAL PEPTIDE

Jatropha seeds can be used for biodiesel production. Genetic modification is one of the ways to develop and improve Jatropha characteristics. Tissue culture is a part of the genetic modification process. Sterilization of Jatropha leaves explants with chemicals that are safe for users and the environment was studied. The use of sodium hypochlorite (NaOCl) and hydrogen peroxide (H_2O_2) were compared. The results indicated that using 5% H_2O_2 can give 47% green explant without contamination. In addition, combination of 6-benzylaminopurine (BA) and Indole-3-butyric acid (IBA) in the medium can induce up to 90.5% calli. The calli transferred to MS medium supplemented with 2 mg/L BA were able to stimulate 43.7% shoot regeneration with an average of 2 shoots/callus. The shoots were transferred to half MS medium supplemented with 0.5 mg/L IBA and 100 mg/L phloroglucinol to promote regeneration of roots and finally whole plants.

The production of high-value proteins can be made from plant cells. The production of Green Fluorescent Protein (GFP) as a model protein was produced in *Arabidopsis thaliana* suspension cell culture. The *GFP* expression was compared between using CaMV 35S promoters and Rd29a promoters. Confocal microscope

showed that GFP can be exported outside the cell by the rice 33 KD protein signal peptide (SS). When compared the production of GFP by each promoter, it was found that the Rd29a promoter can drive GFP production more than using the 35S promoter. Moreover, the GFP production and secretion were the highest at day 12. This result demonstrated that recombinant protein can be produced and secreted outside the cell in suspension culture. Production of other high value recombinant proteins, for example growth factors, can be produced under this system.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biotechnology

Academic Year 2019

Student's Signature ประสมา บุญสูงเนิน

Advisor's Signature