

โชติกา โกศลวิตร : การสร้าง *Pichia pastoris* ให้ผลิตกรดไขมันที่มีความไม่อิ่ม ตัวสูง  
(THE CONSTRUCTION OF *PICHLA PASTORIS* TO PRODUCE  
POLYUNSATURATED FATTY ACIDS (PUFAs) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์  
ดร.มารินา เกตุทัต-การ์นส์, 79 หน้า

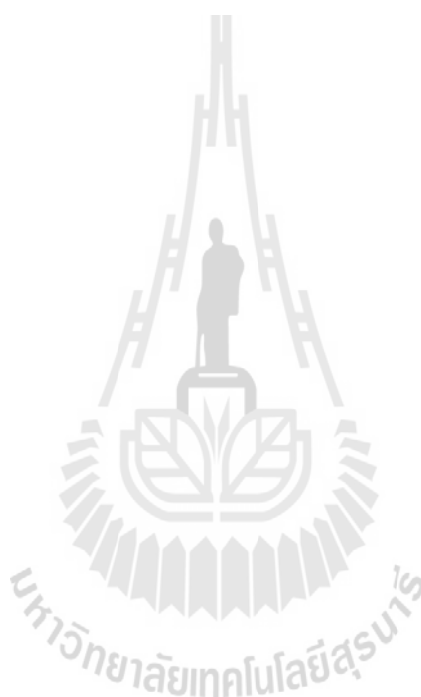
กรดไขมันที่มีความไม่อิ่มตัวสูง (polyunsaturated fatty acids; PUFAs) ถูกสร้างขึ้นโดย  
ออคซีเอนไซม์ desaturase และ elongase หลายชนิด เช่น  $\Delta 5$  desaturase ( $\Delta 5$ )  $\Delta 6$  desaturase ( $\Delta 6$ )  
 $\Delta 5$  elongase (E5) และ  $\Delta 6$  elongase (E6) เอนไซม์ทั้งสองกลุ่มนี้ พบได้ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง  
ทั่วไปรวมถึงปลาด้วย ในการศึกษานี้ได้ทำการสกัดยีน  $\Delta 6$  จากปลาชนิด และยีน  $\Delta 6\&\Delta 5$  E5 และ E6  
จากปลาหลายแล้วนำเข้าสู่พลาสมิด pGAPZ เพื่อสร้างพลาสมิดลูกผสม (pGAPZ: $\Delta 6$  pGAPZ:  
 $\Delta 6\&\Delta 5$  pGAPZ:E5 และ pGAPZ:E6) นอกจากนี้ยังได้สร้างพลาสมิดลูกผสมที่มีการแสดงออก  
ของสองยีน คือ  $\Delta 6\&\Delta 5$  และ E6 (pGAPZ: $\Delta 6\&\Delta 5$ :E6) พลาสมิดลูกผสมทั้งหมดถูกถ่ายโอนเข้าสู่  
เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* แล้วสกัดออกมาเพื่อทำการบ่งชี้ลักษณะที่สำคัญของเอนไซม์ใน  
กลุ่ม desaturase และ elongase จากผลการวิเคราะห์พบบริเวณสำคัญที่ต้องตรงตามกลุ่มของ  
เอนไซม์ desaturase และ elongase หลังจากนั้นจึงถ่ายโอน พลาสมิดลูกผสมทั้งหมดเข้าสู่เซลล์ยีสต์  
*Pichia pastoris* เพื่อศึกษาการสะสมของกรดไขมันที่มีความไม่อิ่มตัวสูง โดยทำการเพาะเลี้ยง *P.*  
*pastoris* ลูกผสมเหล่านั้น สกัดกรดไขมัน เปลี่ยนกรดไขมันให้อยู่ในรูปเอสเทอร์ของกรดไขมัน  
(fatty acid methyl esters; FAMES) และวิเคราะห์ FAMES ที่ได้ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี  
ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า *P. pastoris* ลูกผสมที่มี pGAPZ: $\Delta 6$  และ pGAPZ: $\Delta 6\&\Delta 5$  มีการสะสม  
gamma-linolenic acid (GLA, C18:3n-6) ซึ่งไม่พบในกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่า *P. pastoris*  
ลูกผสมที่มี pGAPZ: $\Delta 6\&\Delta 5$ :E6 มีการสะสมของ EPA และ ARA ด้วย

CHOTIKA GOSALAWIT : THE CONSTRUCTION OF *PICHLIA PASTORIS*  
TO PRODUCE POLYUNSATURATED FATTY ACIDS (PUFAs). THESIS  
ADVISOR : ASSOC. PROF. MARIENA KETUDAT-CAIRNS, Ph.D.,  
79 PP.

PUFAs/DESATURASE/ELONGASE/*PICHLIA PASTORIS*/pGAPZ plasmid

Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are generated by desaturase and elongase enzymes for example,  $\Delta 5$  desaturase ( $\Delta 5$ ),  $\Delta 6$  desaturase ( $\Delta 6$ ),  $\Delta 5$  elongase (E5), and  $\Delta 6$  elongase (E6). These enzymes can be found in all vertebrates including fish. In this study, cDNAs of  $\Delta 6$  from Nile tilapia and  $\Delta 6$ & $\Delta 5$  bifunctional, E5, and E6 from zebrafish were amplified and cloned into pGAPZ to generate recombinant expression plasmids (pGAPZ: $\Delta 6$ , pGAPZ: $\Delta 6$ & $\Delta 5$ , pGAPZ:E5, and pGAPZ:E6). Moreover, a co-express recombinant plasmid of  $\Delta 6$ & $\Delta 5$  and E6 (pGAPZ: $\Delta 6$ & $\Delta 5$ :E6) was constructed. All recombinant plasmids were transformed into *Escherichia coli*, and then extracted to identify the important characteristics of the desaturase and elongase enzyme families. The results indicated that the desaturases and elongases cloned contained important regions of their enzyme families. Thereafter, the recombinant plasmids were transformed into *Pichia pastoris*. To study the PUFAs accumulation, the recombinant *P. pastoris* were cultured, and fatty acids were extracted and methylated to form fatty acid methyl esters (FAMES), which were determined by gas chromatography. The results indicated that recombinant *P. pastoris* containing pGAPZ: $\Delta 6$  and pGAPZ: $\Delta 6$ & $\Delta 5$  accumulate gamma-linoleic acid (GLA, C18:3n-6) which is a fatty acid that is not present in the *P. pastoris* containing empty pGAPZ

plasmid. In addition, the EPA and ARA accumulation were detected in recombinant *P. pastoris* containing pGAPZ: $\Delta$ 6& $\Delta$ 5:E6



School of Biotechnology

Academic Year 2013

Student's Signature \_\_\_\_\_

Advisor's Signature \_\_\_\_\_