

บทคัดย่อ

เนื่องจากจุลสาหร่ายผลิตลิพิด (lipid) และมีชีวมวล (biomass) สูงกว่าพืชบก จึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้จุลสาหร่ายเป็นแหล่งลิพิดไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol, TAG) สำหรับผลิตไบโอดีเซล ปัจจุบันการผลิตไบโอดีเซลจากจุลสาหร่ายนั้นมีความเป็นไปได้ในทางเทคนิค แต่ยังไม่คุ้มทุนในเชิงพาณิชย์ การเพิ่มปริมาณ TAG ในจุลสาหร่ายด้วยวิธีทางพันธุวิศวกรรม จะนำไปสู่การพัฒนาการผลิตไบโอดีเซลอย่างมีประสิทธิภาพ วิธีการสังเคราะห์ (biosynthesis pathway) TAG ประกอบด้วยเอนไซม์สำคัญต่าง ๆ เช่น lysophosphatidic acid acyltransferase (LPAAT) และ diacylglycerol acyltransferase (DGAT) จุลสาหร่าย *Neochloris oleoabundans* สามารถสะสมลิพิด 36-54% ของน้ำหนักแห้ง และอาจมี 80% ของลิพิดทั้งหมดเป็น TAG ที่ส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid) ที่มีคาร์บอนประมาณ 16-20 อะตอมซึ่งเหมาะสำหรับการผลิตไบโอดีเซล

คณะวิจัยมีเป้าหมายเพิ่มการสะสมลิพิดใน *N. oleoabundans* ด้วยวิธีทางพันธุวิศวกรรม เพื่อบรรลุเป้าหมายดังกล่าว คณะวิจัยจึงได้พัฒนาระบบการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ *N. oleoabundans* พร้อมทั้งได้โคลน (clone) และศึกษาคุณลักษณะของ cDNA ที่สร้างเอนไซม์สำคัญ LPAAT (*NeoLPAAT*) และ DGAT (*NeoDGAT2*) จาก *N. oleoabundans* คณะวิจัยได้ประสบความสำเร็จในการถ่ายโอน *NeoDGAT2* cDNA เข้าสู่นิวเคลียสจีโนมของ *N. oleoabundans* ทรานส์ฟอर्मานต์ (transformant) ที่ได้มีการสะสมลิพิดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ลักษณะปกติ (wild type) อย่างไรก็ตาม ความรู้เกี่ยวกับการควบคุมการแสดงออกของยีน *NeoLPAAT* และ *NeoDGAT2* จะมีความสำคัญต่อการเพิ่มการสะสม TAG

โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์คือ เพื่อโคลนและศึกษาคุณลักษณะของลำดับดีเอ็นเอที่ควบคุมการแสดงออกของยีน *NeoLPAAT* และ *NeoDGAT2* เพื่อเพิ่มปริมาณ TAG โดยวิธีเพิ่มการแสดงออกของ *NeoLPAAT* cDNA และวิธีเพิ่มการแสดงออกร่วมกันของ cDNA *NeoLPAAT* และ *NeoDGAT2* ใน *N. oleoabundans* ผลการทดลองพบว่า (i) มีส่วนที่คาดว่าเป็น cis-regulatory elements หลายแห่งในส่วน upstream sequences ของยีน *NeoLPAAT* และ *NeoDGAT2* (ii) regulatory sequences ของยีน *NeoLPAAT* และ *NeoDGAT2* ถูกเหนี่ยวนำในสภาวะขาดแคลนไนโตรเจน (iii) การเพิ่มการแสดงออกของ *NeoLPAAT* cDNA ใน *N. oleoabundans* ผลการทดลองพบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ลักษณะปกติ ทรานส์ฟอर्मานต์ B2-LP สามารถเร่งสะสมนิวทรัลลิพิดสูงกว่าถึง 2.5 เท่า มี *NeoLPAAT* transcript สูงกว่า 1.9 เท่า มีปริมาณลิพิดทั้งหมดสูงขึ้น 1.9 เท่า มีปริมาณ TAG เพิ่มขึ้น 2.1 เท่า นอกจากนี้ องค์ประกอบของกรดไขมันในทรานส์ฟอर्मานต์มีการเปลี่ยนแปลง โดย C18:2 เพิ่มขึ้น 1.8 เท่า (iv) การเพิ่มการแสดงออกร่วมกันของ cDNA *NeoLPAAT* และ *NeoDGAT2* ใน *N. oleoabundans* พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ลักษณะปกติ ทรานส์ฟอर्मานต์ AR-LD เพิ่มการสะสมนิวทรัลลิพิด มีปริมาณลิพิดทั้งหมดสูงขึ้น 1.6 เท่า มีปริมาณ TAG เพิ่มขึ้น 2.1 เท่า และองค์ประกอบของกรดไขมันในทรานส์ฟอर्मานต์มีการเปลี่ยนแปลง โดยมี C16:0 เพิ่มขึ้น และ C18:0 ลดลง ดังนั้นปริมาณ TAG ที่เพิ่มขึ้นอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกับทรานส์ฟอर्मานต์ B2-LP

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า regulatory sequences ของยีน *NeoLPAAT* และ *NeoDGAT2* ถูกเหนี่ยวนำในสภาวะขาดแคลนไนโตรเจน การเพิ่มปริมาณและการผลิต TAG ใน *N. oleoabundans* โดยเพิ่มการแสดงออกของ *NeoLPAAT* และการเพิ่มการแสดงออกร่วมกันของ *NeoLPAAT* และ *NeoDGAT2* ซึ่งจะเป็นก้าวแรกที่จะนำไปสู่การทำให้จุลสาหร่ายเป็นแหล่งผลิตไบโอดีเซลในเชิงพาณิชย์

Abstract

Because microalgae have much higher lipid and biomass productivity compared to terrestrial plants, they are promising sources of lipid triacylglycerol (TAG) for biodiesel production. Currently, biodiesel production from microalgae is technically feasible, but not yet economically viable. Increasing microalgal TAG content via genetic engineering could be a potential approach to improve the efficiency of biodiesel production. The TAG biosynthesis pathway includes key enzymes, lysophosphatidic acid acyltransferase (LPAAT) and diacylglycerol acyltransferase (DGAT). The microalga, *Neochloris oleoabundans*, has been shown to accumulate 36-54% lipids of its cell dry weight. Up to 80% of the total lipids are TAG mainly comprised of the saturated fatty acids containing carbon around 16-20 atoms ideal for biodiesel production.

Our research is aimed to increase the accumulation of lipids in *N. oleoabundans* via genetic engineering. To achieve our goal, the stable gene transfer system of *N. oleoabundans* was developed in our laboratory. The cDNA encoding key enzymes LPAAT (*NeoLPAAT*) and DGAT (*NeoDGAT2*) of *N. oleoabundans* were cloned and characterized. We successfully transferred the *NeoDGAT2* cDNA into the nuclear genome of *N. oleoabundans*. The lipid accumulation of the resulting transformants is significantly higher than that of wild type. How the *NeoLPAAT* and *NeoDGAT2* gene are regulated would be important for increasing TAG accumulation. This study is aimed: to clone and characterize the regulatory sequences of *NeoLPAAT* and *NeoDGAT2* gene; to overexpress the *NeoLPAAT* cDNA; and to co-overexpress the *NeoLPAAT* and *NeoDGAT2* cDNA in *N. oleoabundans*. Results indicated that: (i) there are several predicted *cis*-regulatory elements of the upstream sequences of *NeoLPAAT* and *NeoDGAT2* gene; (ii) the regulatory sequences of *NeoLPAAT* and *NeoDGAT2* gene were induced under N-starvation condition; (iii) overexpression of *NeoLPAAT* cDNA in *N. oleoabundans* transformant B2-LP accelerated neutral lipid accumulation about 2.5-fold higher than in wild type. The *NeoLPAAT* transcript in transformant B2-LP was 2-fold higher than in wild type; total lipid content increased 1.9-fold; TAG content increased 2.1-fold when compared to wild type. The fatty acid composition of the transformant was altered when compared to that of wild type: C18:2 was increased 1.8-fold; (iv) Co-overexpression of *NeoLPAAT* and *NeoDGAT2* cDNA in *N. oleoabundans* transformant AR-LD increased neutral lipid accumulation, total lipid content of transformant AR-LD increased 1.6-fold; TAG content increased 2.1-fold when compared to wild type. The fatty acid composition of transformant AR-LD was altered when compared to that of wild type: C16:0 increased and C18:0 decreased. Thus, the level of increased TAG content in transformant AR-LD is similar to that in transformant B2-LP.

Our results demonstrate that the regulatory sequences of *NeoLPAAT* and *NeoDGAT2* gene were induced under N-starvation condition. The increased TAG content and productivity in *N. oleoabundans* by overexpression of *NeoLPAAT* and co-overexpression of *NeoLPAAT* and *NeoDGAT2* may offer the first step towards making microalgae an economically feasible source for biodiesel.

Key words: Biodiesel, Microalgae, Lysophosphatidic acid acyltransferase (LPAAT), Diacylglycerol acyltransferase (DGAT), Triacylglycerol, Lipids