

บทคัดย่อ

สภาวะโลกร้อนและปริมาณความต้องการของเชื้อเพลิงที่มากกว่ากำลังผลิต ทำให้หลายฝ่ายต่างให้ความสนใจในเชื้อเพลิงทดแทน ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาการใช้ระบบจุลินทรีย์เพื่อผลิตเชื้อเพลิงพลังงานสูงผ่านกระบวนการทางชีวภาพได้กลายเป็นทางเลือกหนึ่ง ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและสามารถใช้งานได้จริงในระดับอุตสาหกรรม งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายในการปรับปรุงพันธุกรรมของยีสต์ *Pichia pastoris* เพื่อให้ได้เซลล์ยีสต์ลูกผสม *P. pastoris* สำหรับการผลิตพลังงานทดแทน ไอโซบิวทานอล และ สารหอมระเหย ไอโซบิวทิลอะซิเตท โดยอาศัยการหมักแบบขั้นตอนเดียวจากน้ำตาลกลูโคส โดยยีสต์ลูกผสมดังกล่าวถูกปรับปรุงพันธุกรรม ให้มีลักษณะดังนี้ คือ มีการแสดงออกของเอนไซม์ทั้งหมด 5 เอนไซม์ โดยประกอบด้วย ยีนที่ประมวลรหัสเป็นเอนไซม์อะซีโตแลคเตทซินเตส, เอนไซม์อะซีโตไฮดรอกซีแอซิด รีดักโตไอโซเมอเรส และเอนไซม์ไดไฮดรอกซีแอซิด ดีไฮเดราเตส ที่ได้จากเชื้อ *P. pastoris* ยีนที่ประมวลรหัสเป็นเอนไซม์คีโตแอซิด ดีคาร์บอกซิเลส ที่ได้จากเชื้อ *Lactococcus lactis* ยีนที่ประมวลรหัสเป็นเอนไซม์แอลกอฮอล์-โอ-เอซิลทรานเฟอเรส จากวิถีชีวสังเคราะห์ของเอสเทอร์

ยีสต์ลูกผสมที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมดังกล่าวสามารถผลิตไอโซบิวทานอลในปริมาณที่สูงถึง 2.22 กรัมต่อลิตร ซึ่งเพิ่มขึ้น 43 เท่าจากระดับที่สายพันธุ์ดั้งเดิมสามารถผลิตได้ และ เป็นปริมาณการผลิตไอโซบิวทานอลในยีสต์ที่สูงที่สุดเท่าที่เคยมีการแสดงผลมา นอกจากนี้สายพันธุ์ที่เราออกแบบให้ผลิตไอโซบิวทิลอะซิเตทยังสามารถผลิตสารดังกล่าวได้ที่ระดับ 51 มิลลิกรัมต่อลิตร งานวิจัยของเราแสดงให้เห็นว่ายีสต์ลูกผสม *Pichia pastoris* มีศักยภาพในการผลิตพลังงานทดแทน ไอโซบิวทานอล และ สารหอมระเหย ไอโซบิวทิลอะซิเตทจากแหล่งคาร์บอนที่หาได้ง่าย เราเชื่อมั่นว่างานวิจัยของเราเหมาะที่นำไปขยายขนาด และ พัฒนาเป็นกระบวนการผลิตสารมีค่าเหล่านี้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

Abstract

Background

Interests in renewable fuels have exploded in recent years as the serious effects of global climate change become apparent. Microbial production of high-energy fuels by economically efficient bioprocesses has emerged as an attractive alternative to the traditional production of transportation fuels. Here, we engineered *Pichia pastoris*, an industrial workhorse in heterologous enzyme production, to produce the biofuel isobutanol from two renewable carbon sources, glucose and glycerol. Our strategy exploited the yeast's amino acid biosynthetic pathway and diverted the amino acid intermediates to the 2-keto acid degradation pathway for higher alcohol production. To further demonstrate the versatility of our yeast platform, we incorporated a broad-substrate-range alcohol-O-acyltransferase to generate a variety of volatile esters, including isobutyl acetate ester and isopentyl acetate ester.

Results

The engineered strain overexpressing the keto-acid degradation pathway was able to produce 284 mg/L of isobutanol when supplemented with 2-ketoisovalerate. To improve the production of isobutanol and eliminate the need to supplement the production media with the expensive 2-ketoisovalerate intermediate, we overexpressed a portion of the amino acid L-valine biosynthetic pathway in the engineered strain. While heterologous expression of the pathway genes from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* did not lead to improvement in isobutanol production in the engineered *P. pastoris*, overexpression of the endogenous L-valine biosynthetic pathway genes led to a strain that is able to produce 0.89 g/L of isobutanol. Fine-tuning the expression of bottleneck enzymes by employing an episomal plasmid-based expression system further improved the production titer of isobutanol to 2.22 g/L, a 43-fold improvement from the levels observed in the original strain. Finally, heterologous expression of a broad-substrate-range alcohol-O-acyltransferase led to the production of isobutyl acetate ester and isopentyl acetate ester at 51 mg/L and 24 mg/L, respectively.

Conclusions

In this study, we engineered high-level production of the biofuel isobutanol and the corresponding acetate ester by *P. pastoris* from readily available carbon sources. We envision that our work will provide an economic route to this important class of