

บทคัดย่อ

สภาวะโลกร้อนและปริมาณความต้องการของเชื้อเพลิงที่มากกว่ากำลังผลิต ทำให้หลายฝ่ายต่างให้ความสนใจในเชื้อเพลิงทดแทน โดยเฉพาะเชื้อเพลิงชีวภาพ ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาการใช้ระบบจุลินทรีย์เพื่อผลิตเชื้อเพลิงพลังงานสูงผ่านกระบวนการทางชีวภาพ ได้กลายเป็นทางเลือกหนึ่งที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและสามารถใช้งานได้จริงในระดับอุตสาหกรรม ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นจุลินทรีย์ที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมากในการพัฒนาและดัดแปลงเพื่อผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพที่หลากหลาย อย่างไรก็ตามข้อจำกัดที่สำคัญอย่างหนึ่งของ *S. cerevisiae* คือไม่สามารถใช้ชีโอสซึ่งเป็นน้ำตาลที่มีปริมาณมากที่สุดเป็นอันดับสองในชีวมวลลิกโนเซลลูโลส (lignocellulosic biomass) สำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตสารเคมีได้ ดังนั้นการพัฒนาสายพันธุ์ *S. cerevisiae* ให้สามารถใช้ชีโอสได้อย่างมีประสิทธิภาพจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง

งานวิจัยนี้มุ่งพัฒนาเชื้อ *S. cerevisiae* ให้สามารถใช้ชีโอสเป็นแหล่งคาร์บอนได้อย่างมีประสิทธิภาพ ด้วยกระบวนการทางชีววิทยาศาสตร์สังเคราะห์ (synthetic biology) เราคัดกรองเอนไซม์ไซโลสรีดักเตส (xylose reductase, XR) และไซลิตอลดีไฮโดรจีเนส (xylitol dehydrogenase, XDH) จากยีสต์หลายสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายชีโอสได้เองในธรรมชาติ เพื่อหาคู่เอนไซม์ XR-XDH ที่เหมาะสมและมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่สูงที่สุดในยีสต์ *S. cerevisiae* เมื่อคัดกรองได้ดังกล่าว เราแสดงออกเอนไซม์ทั้งสองในยีสต์ *S. cerevisiae* ร่วมกับเอนไซม์ไซลูลโคเนส (xylulokinase, XK) และเอนไซม์ทั้ง 5 เอนไซม์ในวิถีเมตาบอลิซึมของไอโซบิวทานอล อีกทั้งยังลดการแสดงออกของเอนไซม์ PHO13 และ GRE3 สายพันธุ์ดังกล่าว (เรียกว่า PWY2353) สามารถผลิตไอโซบิวทานอลได้ 48.4 ± 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อมาเราใช้เทคนิค adaptive laboratory evolution เพื่อให้ได้เชื้อกลายพันธุ์ (evolved mutant) ของเชื้อ PWY2353 ที่มีประสิทธิภาพในการใช้ชีโอสดีขึ้น อีกทั้งยังมีอัตราการเติบโตที่สูงขึ้นกว่าเดิมด้วย จากการถอดรหัสพันธุกรรมในระดับจีโนมของเชื้อกลายพันธุ์ทำให้เราค้นพบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในยีน 2 ยีนได้แก่ *CCR4* และ *TIF1* ที่ช่วยเพิ่มอัตราการเติบโตเฉพาะ (specific growth rate) ของยีสต์ 23% และ 14% ตามลำดับ นับว่าเป็นการค้นพบบทบาทหรือความเกี่ยวข้องของยีน *CCR4* และ *TIF1* ต่อความสามารถในการใช้ชีโอสของยีสต์ที่ไม่เคยมีการรายงานมาก่อน สุดท้ายเราทำการปรับระดับการแสดงออกของเอนไซม์คอขวด (fine-tuning bottle-neck enzyme) ในวิถีเมตาบอลิซึมของไอโซบิวทานอล เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิต ไอโซบิวทานอล โดยสายพันธุ์ที่ดีที่สุดของเรา (PWY2353ev34b) สามารถผลิตไอโซบิวทานอลได้ 92.9 ± 4.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าปริมาณการผลิตของสายพันธุ์ที่มีการรายงานก่อนหน้านี้ถึง 68 เท่า (สายพันธุ์ Isoy16, 1.36 มิลลิกรัมต่อลิตร) เราหวังว่างานวิจัยของเราจะสามารถนำไปขยายขนาดและพัฒนาเป็นเป็นกระบวนการ ผลิตไอโซบิวทานอลและสารมีค่าอื่นๆจากชีโอสในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

Abstract

As the importance of reducing carbon emissions as a means to limit the serious effects of global climate change becomes apparent, synthetic biologists and metabolic engineers are looking to develop renewable sources for transportation fuels and petroleum-derived chemicals. In recent years, microbial production of high-energy fuels has emerged as an attractive alternative to the traditional production of transportation fuels. In particular, the Baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*, a highly versatile microbial chassis, has been engineered to produce a wide array of biofuels. Nevertheless, a key limitation of *S. cerevisiae* is its inability to utilize xylose, the second most abundant sugar in lignocellulosic biomass, for both growth and chemical production. Therefore, the development of a robust *S. cerevisiae* strain that is able to use xylose is of great importance.

Here, we engineered *S. cerevisiae* to efficiently utilize xylose as a carbon source and produce the advanced biofuel isobutanol. Specifically, we screened xylose reductase (XR) and xylose dehydrogenase (XDH) variants from different xylose-metabolizing yeast strains to identify the XR-XDH combination with the highest activity. Overexpression of the selected XR-XDH variants, a xylose-specific sugar transporter, xylulokinase, and isobutanol pathway enzymes in conjunction with the deletions of *PHO13* and *GRE3* resulted in an engineered strain (PWY2353) that is capable of producing isobutanol at a titer of 48.4 ± 2.0 mg/L. Next, we subjected PWY2353 to adaptive laboratory evolution to further improve the strain's ability to utilize xylose. Whole genome resequencing of several evolved strains followed by reverse engineering identified two single nucleotide mutations, one in *CCR4* and another in *TIF1*, that improved the yeast's specific growth rate by 23% and 14%, respectively. Neither one of these genes has previously been implicated to play a role in utilization of D-xylose. Finally, we fine-tuned the expression levels of the bottleneck enzymes in the isobutanol pathway to improve the evolved strain's isobutanol titer to 92.9 ± 4.4 mg/L (specific isobutanol production of 50.2 ± 2.6 mg/g CDW), a 90% improvement in titer and a 110% improvement in specific production over the non-evolved strain. We hope that our work will set the stage for an economic route to the advanced biofuel isobutanol and enable efficient utilization of xylose-containing biomass.