Thesis Title Evaluation of Green Fluorescent Protein Expression in *Pichia pastoris* Cultured in Dried Longan Extract Medium

Author Miss Weeraya Thongkum

Degree Master of Science (Biotechnology)

Thesis Advisor Dr. Ronachai Pratanaphon

ABSTRACT

Longan (*Dimocarpus longan* Lour.) is one of the most economically important fruit crops in Thailand. The main problems of longan production were overproduction which affected its price. Longan was considered to be a potential carbon source for *Pichia pastoris* cultivation since it contained high sugar content. The feasibility of cultivating *P. pastoris* using dried longan extract as a carbon source was investigated. The suitable concentration of dried longan extract for *P. pastoris* cultivation was studied. Media containing 3 concentrations levels of dried longan extract base on total soluble solid (5, 10 and 15 ^{o}Brix) were used to cultivate *P. pastoris*. The highest dry cell weight of 11.68 g L^{-1} was achieved for 5 °Brix dried longan extract medium. Dried longan extract contained three main types of sugar, namely glucose, fructose and sucrose. *P. pastoris* utilized glucose and fructose but not sucrose. In addition, *P. pastoris* could grow in longan juice without additional nitrogen source. *P. pastoris* was later engineered to express green fluorescent protein (GFP) gene as a reporter for expression. Expression of GFP was tested using buffer glycerol-complex medium (BMGY) medium and medium which contained 5 °Brix longan extract. After induction with methanol, yeasts from both media fluoresced under fluorescent microscopy indicating that the GFP was properly folded and expressed.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ทดสอบการแสดงออกของโปรตีนเรืองแสงสีเขียวใน *Pichia pastoris* ที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดจากลำไยอบแห้ง

ผู้เขียน นางสาววีรญา ทองคำ

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร. รณชัย ปรารถนาผล

บทคัดย่อ

ลำไยเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ในแต่ละปีมีผลผลิตออกมาเป็นจำนวนมาก ทำให้เกิดปัญหาลำไยล้นตลาดและราคาตกต่ำ แต่เนื่องจากลำไยเป็นผลไม้ที่มีปริมาณน้ำตาลสูง ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการนำสารสกัดจากลำไยอบแห้งมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง *Pichia pastoris* ในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดลองโดยขั้นแรกหาความเข้มข้นของสารสกัดลำไยอบแห้งที่เหมาะสมในการเตรียมอาหาร โดยใช้ความเข้มข้นของของแข็งละลายน้ำได้ ได้แก่ 5, 10 และ 15 องศาบริกซ์ พบว่า *P. pastoris* สามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อจากสารสกัดลำไยอบแห้งที่ 5 องศาบริกซ์ ได้มวลเซลล์แห้งถึง 11.68 กรัมต่อลิตร และในสารสกัดจากลำไยอบแห้งประกอบด้วยน้ำตาล 3 ชนิด ได้แก่ ซูโครส ฟรุกโตส และกลูโคส พบว่าเชื้อชนิดนี้สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีฟรุกโตส และกลูโคส แต่ในอาหารที่มีซูโครสเจริญได้น้อยมาก นอกจากนี้ยังพบว่า *P. pastoris* ยังสามารถเจริญได้ในอาหารจากสารสกัดลำไยอบแห้งเพียงอย่างเดียว โดยไม่ต้องเติมแหล่งไนโตรเจนใดๆ จากนั้นทำการดัดแปลงพันธุกรรมของ *P. pastoris* เพื่อให้ผลิต green fluorescent protein (GFP) สำหรับใช้ในการติดตามการแสดงออกของยีน แล้วทดสอบการแสดงออกของ GFP ใน *P. pastoris* โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา (buffered glcerol-complex medium; BMGY) และอาหารที่เตรียมจากสารสกัดลำไยอบแห้งที่ 5 องศาบริกซ์ (buffered longan extract-complex medium; BMLEY) แล้วกระตุ้นด้วยเมทานอล จากนั้นนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ พบว่ามีการแสดงออกของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

GFP และเกิด protein folding ที่ถูกต้องทำให้เซลล์ยีสต์มีการเรืองแสงสีเขียวได้ ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดาและอาหารที่เตรียมจากสารสกัดลำไยอบแห้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved