Thesis Title Molecular Markers and Ethanol Production Potential of Pathumthani1 Rice (*Oryza sativa* L.var. *indica*) Mutants Induced by Low-Energy Ion Beam

Author Miss Kanta Sangwijit

Degree Doctor of Philosophy (Biology)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Somboon Anuntalabhochai Advisor

Assoc. Prof. Dr. LiangDeng Yu Co-advisor

Dr. Ruttaporn Chundet Co-advisor

ABSTRACT

The research involved molecular marker identification of Pathumthani 1 rice mutants induced by low-energy ion beams and investigation of an application of the rice mutant's biomass in ethanol production by developing a plasma-ion-bombardment assisted gene transformation method to favor the biomass fermentation.

Seeds of Thai fragrant rice (*Oryza sativa* L.var. *indica* cv. Pathumthani 1) were bombarded by nitrogen ions at a 60 keV energy level with ion fluences of 6 and 8×10^{16} ions/cm^2 for mutation induction. After the 5th generation, a number of mutants was obtained including EPOS1, EPOS2, EPOS3, TPOS1, TPOS2, EBPOS1 and EBPOS3. These mutants showed several improved characteristics including a tall

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

variety and an early flowering variety. Moreover, the red-brown pigment which could be found in the mutant pericarp was similar to that in husked rice. Consequently, HAT-RAPD (High Annealing Temperature-RAPD) was chosen to investigate their genetic variation. Among the total of 110 arbitrary primers, one of the primers named OPAA14 produced a unique fragment presenting only in the EBPOS3 mutant at a molecular size of 700 bp. This fragment was subcloned and sequenced for identification by Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) marker.

PCR amplification using the SCAR primers provided a 300 bp fragment only in the EBPOS3 mutant. The cDNA-HAT-RAPD technique was selected to analyze genes involved in the rice mutants. Approximately 40 distinct polymorphic band profiles were generated using ten arbitrary primers. After sequencing, none of the sequences were related to their phenotypic changes, and most showed high similarity to hypothetical proteins of rice in Genbank database. Since the EBPOS3 mutant had biomass of the rice straw over 40% percent higher than that of the control because of its height. The rice straw (lignocellulose) of EBPOS3 mutant was chosen for ethanol production. Lignocellulosic biomass composed of complex carbohydrates which could be hydrolyzed by microorganisms into single molecule of sugars before fermentation. In this study, *Bacillus amyoliquefaciens* CX1 which produced extracellular cellulase and xylanase was isolated from horse feces. The cellulase and xylanase were tested and found that they were stable over a wide broad pH from 5-9 and had thermal tolerance between 30-70°C.

In my study, plasma immersion ion implantation (PIII) was demonstrated for gene transfer in to bacterial cell. Both pTZ57R and pBI121 were used to transfer into *E. coli* strain DH5α. Argon and nitrogen species were compared for ion implantation

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

with a bias voltage of 2.5 kV and fluences ranging from $1x10^{12}$ to $1x10^{17}$ ions/cm^2. My result showed that nitrogen ions were more efficient for the gene transfer than argon ions. Therefore, to analyze gene functions, both the cellulase (*BglC*) and xylanase (*XynA*) were cloned into expression vector (pETDuet-1) and transformed into *E. coli* BL21 (DE3) by PIII. The constructed vectors harboring cellulase *(BglC)* and xylanase (*XynA)* were named pETbgl, pETbgl-2, pETxy, pETxy-2, and pETbgl-xy. There, after the constructed vectors were transformed into *E. coli* BL21 (DE3) using nitrogen ions with a bias voltage of 2.5 kV and a fluence of $1x10^{15}$ ions/cm^2.

The transformants obtained from the PIII technique were measured for the hydrolysis activity in comparison with cellulase and xylanse from the wild type. The transformant named pETbgl-xy, which contained both *BglC* and *XynA*, showed the highest hydrolysis activity about 25-fold of cellulase and 50-fold of xylanase greater than enzyme activities of the wild type. Then pETbgl-xy was chosen for ethanol production. In the ethanol production, pretreated rice straw and pretreated corn stover were used as substrates by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) and the pETbgl-xy, *Saccharomyces cerevisiae* V1116 and *Zymomonas* sp. TISTR1102 were used in fermentation. Ethanol produced from pretreated rice straw and pretreated corn stover has yields of 2.79% v/v and 3.29% v/v, respectively.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ เครื่องหมายโมเลกุลและศักยภาพในการผลิตเอทานอลของข้าวปทุมธานี1พันธุ์กลายที่ถูกชักนำด้วยลำไอออนพลังงานต่ำ

ผู้เขียน นางสาวกันตา แสงวิจิตร

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ.ดร. สมบูรณ์ อนันตลาโภชัย	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
รศ.ดร. เหลียงเติ้ง ยู	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ดร. รัฐพร จันทร์เดช	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

วิทยานิพนธ์นี้ประกอบไปด้วยการใช้เครื่องหมายอณูโมเลกุลในการระบุข้าวปทุมธานีพันธุ์กลายที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยลำไอออนพลังงานต่ำและได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการนำชีวมวลของข้าวพันธุ์กลายนี้ไปผลิตเอทานอล ยังได้มีการใช้เทคนิคการระดมยิงด้วยพลาสมาพลังงานต่ำเพื่อส่งถ่ายยีนเข้าข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย เพื่อใช้ในกระบวนการย่อยชีวมวลและนำไปใช้ในกระบวนการผลิตเอทานอลต่อไป

เมล็ดข้าวปทุมธานี 1 ถูกระดมยิงด้วยไอออนไนโตรเจนที่ถูกเร่งที่พลังงาน 60 กิโลโวลท์ และมีปริมาณไอออน 6×10^{16} - 8×10^{16} ไอออนต่อตารางเซนติเมตร เมื่อปลูกจนถึงรุ่นที่ 5 พบข้าวปทุมธานี 1 พันธุ์กลาย จำนวน 7 สายพันธุ์ ได้แก่ EPOS1, EPOS2, EPOS3, TPOS1, TPOS2, EBPOS1 และ EBPOS3 ต้นพันธุ์กลายปรากฏลักษณะ ต้นสูง ออกรวงเร็ว และสีเมล็ดข้าวกล้องแตกต่างจากเมล็ดต้นควบคุมโดยมีลักษณะสีน้ำตาลแดงที่ผิวเมล็ด ทำการตรวจสอบความเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุลของข้าวปทุมธานี 1 พันธุ์กลายด้วยเทคนิค HAT-RAPD (High Annealing Temperature-RAPD) จากไพรเมอร์แบบสุ่มจำนวน 110 ไพรเมอร์ พบว่า ไพรเมอร์ OPAA14 สามารถบ่งบอกความแตกต่างระหว่างต้น พันธุ์กลาย EBPOS3 จากข้าวสายพันธุ์อื่นที่ใช้ในการทดลองได้ โดยพบแถบดีเอ็นเอขนาด 700 คู่เบส จากนั้นได้ทำการหาลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอและพัฒนาเป็นเครื่องหมายอณูโมเลกุล SCAR เมื่อทำการทดสอบไพร์เมอร์ SCAR พบว่าสามารถระบุข้าวพันธุ์กลาย EBPOS3 ได้โดยพบแถบดีเอ็นเอขนาด 300 คู่เบสในต้น EBPOS3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เท่านั้น สำหรับการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะที่เปลี่ยนไปของข้าวพันธุ์กลาย เทียบกับต้นควบคุม โดยใช้เทคนิค cDNA- HAT-RAPD เมื่อใช้ไพร์เมอร์แบบสุ่มจำนวน 10 ไพร์เมอร์ พบแถบดีเอ็นเอที่ต่างไปจากต้นควบคุมจำนวน 40 แถบ เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนกับกรดอะมิโนของยีนในฐานข้อมูล (Genbank) พบว่าแถบ cDNA ส่วนใหญ่มีความเหมือนกับโปรตีนที่ยังไม่มีการระบุหน้าที่ และไม่มีแถบ cDNA ใดเลยที่เกี่ยวข้องกับลักษณะที่เปลี่ยนไปของข้าวพันธุ์กลาย ลักษณะความสูงที่เพิ่มขึ้นของต้นข้าวพันธุ์กลาย EBPOS3 ทำให้มีชีวมวลเพิ่มขึ้นมากกว่าต้นควบคุมถึง 40 % ส่งผลให้มีสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นจึงเลือกต้น EBPOS3ไปใช้ในการผลิตเอทานอลต่อไป ชีวมวลประกอบไปด้วยคาร์โบร์ไฮเดรตสายยาวที่ต้องผ่านกระบวนการย่อยให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวก่อนนำไปผลิตเอทานอล ในการศึกษานี้ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรีย *Bacillus amyoliquefaciens* CX1 ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซเลน-เนสจากมูลของม้า เมื่อทำการทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์พบว่าสามารถทำงานได้ในช่วง ความเป็นกรดเบส (pH) ที่ 5-9 และทนความร้อนได้ในช่วงอุณหภูมิ 30-70 องศาเซลเซียส

ได้ทำการทดลองส่งถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียโดยเทคนิคการระดมยิงด้วยพลาสมาพลังงานต่ำ (PIII) ทำการทดลองใช้ทั้งพลาสมาของไนโตรเจนและอาร์กอนโดยทำการจุ่มเซลล์แบคทีเรียลงในพลาสมาและระดมยิงเซลล์ ด้วยการไบแอสความต่างศักย์ 2.5 กิโลวัตต์ ที่ความหนาแน่นไอออน $1x10^{12}$ ถึง $1x10^{17}$ ไอออนต่อตารางเซนติเมตร และเลือกใช้พลาสมิด pTZ57R และ pBI121 เพื่อใช้ในการส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (*Escherichia coli* strain DH5α) จากการทดลองพบว่าพลาสมาของไนโตรเจนสามารถส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียได้ดีกว่าพลาสมาของอาร์กอน ได้ทำการโคลนยีนเซลลูเลส (*BglC*) และยีนไซเลนเนส (*XynA*) เข้าสู่เวคเตอร์ (pETDuet-1) และตั้งชื่อตามยีนที่อยู่ภายในดังนี้ pETbgl, pETbgl-2, pETxy, pETxy-2, และ pETbgl-xy จากนั้นทำการส่งถ่ายเวค์เตอร์เหล่านี้เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (*E. coli* strain BL21 (DE3)) โดยทำการระดมยิงด้วยไนโตรเจนพลาสมาที่และไบแอสความต่างศักย์ 2.5 กิโลวัตต์ ที่ความหนาแน่นไอออน $1x10^{15}$ ไอออนต่อตารางเซนติเมตร และนำเซลล์ที่ได้รับการส่งถ่ายพลาสมิดมาทดสอบความสามารถในการย่อยสารตั้งต้น ปรากฏว่าเชื้อที่ได้รับการส่งถ่ายพลาสมิด pETbgl-xy ที่มีทั้งยีนเซลลูเลส (*BglC)* และยีนไซเลนเนส (*XynA)* เข้าไปสามารถย่อยสารตั้งต้นได้ดีกว่าเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *B. amyoliquefaciens* CX1 โดยมีแอคทีวิตี้ของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซเลนเนสสูงกว่าเอนไซม์จาก *B. amyoliquefaciens* CX1 ถึง 25 และ 50 เท่าตามลำดับ จึงได้นำเชื้อนี้ไปใช้ในการผลิตเอทานอลต่อไป

ในกระบวนการผลิตเอทานอลจากฟางข้าวและซังข้าวโพดที่ผ่านกระบวนการปรับสภาพโดยกระบวนการหมักอย่างต่อเนื่อง โดยใช้เชื้อแบบผสม (pETbgl-xy, *Saccharomyces cerevisiae*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

V1116 และ *Zymomonas* sp. TISTR1102) ในการหมักและพบว่าปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้เท่ากับ 2.79% (ปริมาตร/ปริมาตร) เมื่อใช้ฟางข้าวเป็นสารตั้งต้นและ 3.29% (ปริมาตร/ปริมาตร) เมื่อใช้ข้าวโพดเป็นสารตั้งต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved