

บทสรุปย่อสำหรับผู้บริหาร

ทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภททุนอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ 2556

1. ชื่อโครงการ

(ภาษาไทย) การศึกษาเอนไซม์ PLP synthase ในเชื้อชอบร้อนเพื่อใช้ประโยชน์ในการผลิตวิตามินบีหกทางเทคโนโลยีชีวภาพ

(ภาษาอังกฤษ) Study on PLP synthase in thermophilic bacterium for vitamin B6 production by biotechnology

2. ประเภทโครงการ โครงการเดี่ยว ต่อเนื่อง ระยะเวลา 2 ปี (2556-2557)

3. ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานที่สังกัด

หัวหน้าโครงการ : รศ.ดร.ยานี ตรองพาณิชย์

หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

4. ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

วิตามินบีหกเป็นวิตามินที่ละลายน้ำ ที่จำเป็นต่อร่างกายของคนและสัตว์ เนื่องจากไม่สามารถสังเคราะห์ได้เอง ประกอบด้วย 6 รูป ได้แก่ Pyridoxine (PN), Pyridoxal (PL), Pyridoxamine (PM) และอีก 3 รูปที่รวมอยู่กับฟอสเฟตในรูปของฟอสเฟตเอสเทอร์ ได้แก่ Pyridoxine 5'-phosphate (PNP), Pyridoxal 5'-phosphate (PLP), Pyridoxamine 5'-phosphate (PMP)

วิตามินบีหกในรูปของ PLP เป็นโคแฟกเตอร์ที่จำเป็นในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด และเกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์มากกว่า 140 ปฏิกิริยา ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้ PLP เป็นโคแฟกเตอร์ มีจำนวน 5 กลุ่ม จากเอนไซม์ทั้งหมด 6 กลุ่ม ตามการแบ่งกลุ่มของเอนไซม์ (enzyme class) ได้แก่ EC 1 oxidoreductase, EC 2 transferase, EC 3 hydrolase, EC 4 lyase และ EC 5 isomerase จากการเป็นโคแฟกเตอร์ที่จำเป็นของเอนไซม์หลายกลุ่ม แสดงให้เห็นถึงหน้าที่ความสำคัญของ PLP ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ยกตัวอย่างเช่น ปฏิกิริยาในการเปลี่ยนรูปของกรดอะมิโนจาก L-form เป็น D-form หรือ การสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว (polyunsaturated fatty acid) รวมถึงการสังเคราะห์ DNA และการสังเคราะห์สารสื่อประสาท และยาปฏิชีวนะหลายชนิด (Mooney et al., 2009; Wallner et al., 2009)

การผลิตวิตามินบีหกทางอุตสาหกรรมในปัจจุบัน ใช้วิธีการสังเคราะห์ทางเคมี (Chemical synthesis) (Lin, 2003) ซึ่งมีการใช้สารเคมีและสูญเสียพลังงานมากขึ้น ส่งผลเสียต่อสภาวะแวดล้อม เพื่อ

ลดผลเหล่านี้ จึงมีการพัฒนาโดยใช้ทรัพยากรทางชีวภาพ เช่น การผลิตวิตามินบีหกโดยใช้แบคทีเรีย (Hoshino et al., 2008) มาแทนที่เช่นเดียวกับการผลิตวิตามินบีสองและบีสิบสอง รวมถึงการผลิตวิตามินบีหกโดยการเปลี่ยนรูปของวิตามินบีหกให้อยู่ในรูปที่มีมูลค่าสูง โดยใช้เอนไซม์ (Schell et al., 2009) การพัฒนาทั้งหมดนี้ ช่วยลดต้นทุนการผลิต ลดการใช้สารเคมีและพลังงานลง และทำให้สิ่งแวดล้อมดีขึ้นอีกด้วย

ในประเทศไทย ไม่สามารถผลิตวิตามินบีหกได้เอง จำเป็นต้องนำเข้าจากต่างประเทศ จากสถิติการนำเข้าที่ผ่านมาในปี 2549 มีการนำเข้าวิตามินบีหกเป็นมูลค่า 120,474,343 บาท (กรมศุลกากร, 2553) การใช้วิตามินบีหกในปัจจุบัน นำมาใช้เป็นยา อาหารเสริมสุขภาพและเป็นส่วนประกอบในอาหารสัตว์ และเครื่องสำอาง รวมถึงในผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น เครื่องดื่มต่าง ๆ ที่ปรากฏในท้องตลาด และมีสถิติการส่งออกไปยังประเทศเพื่อนบ้าน ได้แก่ พม่า มาเลเซีย และลาว ซึ่งปริมาณการส่งออกคาดว่าจะขึ้นกับปริมาณที่เหลือใช้ภายในประเทศ

จากงานวิจัยที่ได้ทำก่อนหน้านี้ พบเชื้อแบคทีเรียชอบร้อน *Geobacillus* sp. H6a ซึ่งคัดแยกจากบ่อน้ำพุร้อน สามารถผลิตวิตามินบีหกออกภายนอกเซลล์ ได้สูงสุด 419.2 $\mu\text{g/L}$ เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน ในรูปของ PMP และ PM (Anutrakunchai et al., 2010a) และพบยีนที่แปลรหัสเป็นเอนไซม์ PLP synthase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ PLP ในเชื้อ *Geobacillus* sp. H6a (Anutrakunchai et al., 2010b) เอนไซม์ที่ได้จากแบคทีเรียชอบร้อน มีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในอุตสาหกรรม เนื่องจากมีความทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดี ทำให้ลดค่าใช้จ่ายในการควบคุมอุณหภูมิ (McMullan et al., 2004)

การศึกษาเอนไซม์ PLP synthase ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์วิตามินบีหกขึ้นมาใหม่ในแบคทีเรียชนิดนี้ เป็นสิ่งจำเป็น เพราะนอกจากจะทำให้เข้าใจเกี่ยวกับวิธีการผลิตวิตามินบีหกในแบคทีเรียชนิดนี้แล้ว ความรู้ที่ได้รับ อาจสามารถนำเอนไซม์ในวิธีการผลิตวิตามินบีหกมาใช้ให้เกิดประโยชน์ในอุตสาหกรรม เช่น การผลิตวิตามินบีหกในรูปของ PLP จากเอนไซม์โดยตรง หรือดัดแปลงแบคทีเรียชนิดนี้ ให้มีการผลิตวิตามินบีหกได้สูงขึ้น ซึ่งเหมาะต่อการนำไปใช้ในอุตสาหกรรม นอกจากนั้น ข้อมูลที่ได้รับยังสามารถใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงให้กับเชื้อชอบร้อนอื่น ๆ ในกลุ่มเดียวกันได้

5. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ PLP synthase ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์วิตามินบีหกขึ้นมาใหม่ ในเชื้อชอบร้อน *Geobacillus* sp. H6a

6. ขอบเขตของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้ เป็นการศึกษาเอนไซม์ PLP synthase ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์วิตามินบีหกขึ้นมาใหม่ ในเชื้อชอบร็อน *Geobacillus* sp. H6a

7. วิธีการดำเนินการวิจัย (โดยย่อ)

ปีที่ 1 (2556)

- 14.1 เพิ่มปริมาณยีน *pdx1* และ *pdx2* ของเอนไซม์ PLP synthase โดยการทำให้ PCR
- 14.2 ทำ cloning ยีนใน expression vector ใส่ในเชื้อเจ้าบ้าน เช่น *E.coli*
- 14.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของโปรตีน ได้แก่ อุณหภูมิที่เหมาะสม ตัวเหนี่ยวนำที่เหมาะสม

ปีที่ 2 (2557)

- 14.4 ทำการ purify โปรตีน และศึกษา activity และ stability ของเอนไซม์
- 14.5 ศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ ได้แก่ optimum pH, pH stability, optimum temperature, temperature stability, kinetic constance, substrate specificity.

8. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

- 8.1 ได้ข้อมูลเอนไซม์ PLP synthase จากเชื้อชอบร็อน *Geobacillus* sp. H6a เพื่อเป็น แนวทางนำไปสู่การพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์
- 8.2 ได้ข้อมูลสำหรับใช้เขียนบทความตีพิมพ์ในวารสารทั้งในและต่างประเทศตามเกณฑ์ของ ก.พ.ร.
- 8.3 สร้างบัณฑิตในระดับ ตรี/โท/เอก ให้มีประสบการณ์ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพให้กับประเทศเพิ่มขึ้น

9. ผลที่ได้รับ

- 9.1 ยีน *GhpdxS* และ *GhpdxT* จากเชื้อชอบร็อน *Geobacillus* sp. H6a มีขนาด 885 bp และ 591 bp ตามลำดับ ได้รับจากการทำ touchdown PCR โดย primers ที่ออกแบบจากข้อมูลของ GenBank database และ Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database ตรวจสอบความถูกต้องของ PCR product โดยหาลำดับดีเอ็นเอโดยวิธี DNA sequencing พบเป็น open reading frame ที่มี start และ stop codon ลำดับดีเอ็นเอที่ได้รับ ได้ส่งไปเก็บในข้อมูลของ GenBank database โดยได้รหัสเป็น FJ497249 (ยีน *GhpdxS*) และ FJ497250 (ยีน *GhpdxT*)
- 9.2 ข้อมูลจากลำดับดีเอ็นเอจากยีน *GhpdxS* (885 bp) ที่ถอดรหัสได้ 294 กรดอะมิโน และยีน *GhpdxT* (591 bp) ที่ถอดรหัสได้ 196 กรดอะมิโน ถูกนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีอยู่ใน GenBank database และวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดย bioinformatic analysis พบว่าโปรตีน GhPDXS และ GhPDXT จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับโปรตีน PDXS และ PDXT ที่ได้จากเชื้อ *Geobacillus* sp. อื่น ๆ

และ มีลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกันในส่วน motif ของโปรตีนในกลุ่ม PDXS และ PDXT รวมถึงโครงสร้างในระดับทุติยภูมิและตติยภูมิ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ยีนที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดยวิธี touchdown PCR น่าจะเป็นยีนที่ถอดรหัสให้โปรตีน PDXS และ PDXT ที่รวมกันเป็นเอนไซม์ PLP synthase จริง

9.3 ยีน *GhpdxS* และ *GhpdxT* ถูก ligated เข้า pET-28a expression vector และ transform เข้าสู่ *E.coli* BL21 (DE3) เมื่อ induced ด้วย IPTG พบการ expression ของโปรตีนที่มีขนาด 39 kD และ 28 kD ตามลำดับ ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็น โปรตีน recombinant ที่มีส่วนของโปรตีน GhPDXS และ GhPDXT และส่วนของ His₆-tagged และ thrombin cleavage site มีขนาด 7 kD

9.4 ตรวจสอบหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการ expression ของโปรตีน GhPDXS และ GhPDXT โดยการ vary อุณหภูมิที่ใช้ในการ induced (25-30-37°C) ด้วย 1 mM IPTG ในช่วงเวลา 0, 1, 3, และ 6 ชั่วโมง พบว่า ทั้งโปรตีน His₆-tagged GhPDXS และ GhPDXT มีการเพิ่มปริมาณขึ้นตามเวลาของการเหนี่ยวนำ และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของ recombinant His₆-tagged GhPDXS และ GhPDXT ได้แก่ 30°C เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่ได้โปรตีนอยู่ในรูป soluble ที่มีการแสดงออกมากที่สุด เพื่อนำมาศึกษา activity ของเอนไซม์ต่อไป

10. การเผยแพร่ผลงาน

1. ส่วนหนึ่งในงานวิจัยนี้ถูกนำไปเผยแพร่แบบ poster ในงานประชุมวิชาการ Innovative biotechnology for a green world and beyond ในหัวข้อเรื่อง “Cloning and expression of genes in vitamin B-6 biosynthesis pathways from *Geobacillus* sp. H6a” ณ EXCO เมือง Daegu ประเทศเกาหลีใต้ วันที่ 16-21 กันยายน 2555
2. ส่วนหนึ่งในงานวิจัยนี้จะถูกนำไปเผยแพร่แบบ proceeding ในงานประชุม International conference on microbial taxonomy, basic and applied microbiology ในหัวข้อเรื่อง “Cloning and Expression of *pdxS* and *pdxT* genes from from *Geobacillus* sp. H6a” ณ โรงแรมโซะยะ จังหวัดขอนแก่น วันที่ 4-6 ตุลาคม 2555
3. และเนื่องจากงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ คลัสเตอร์สหสาขาบูรณาการ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปี 2555 จึงคาดว่างานวิจัยนี้ จะสามารถตีพิมพ์เป็นผลงานระดับนานาชาติได้อย่างแน่นอน
