บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) หรือที่รู้จักกันดีในชื่อของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae) เป็นแบคทีเรียที่สังเคราะห์แสงได้ โดยใช้โปรตีนไฟโคบิลิน (phycobilin) ที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในของไทลาคอยด์ (thylakoid) ทำงานร่วมกับคลอโมฟลอร์ (chromophore) โปรตีนไฟโคบิลินนี้นับว่าเป็นรงควัตถุที่สำคัญต่อการสังเคราะห์แสงซึ่งพบได้มากถึง 40-60 เปอร์เซ็นต์ ของโปรตีนที่สามารถละลายน้ำได้ภายในเซลล์ โปรตีนไฟโคบิลินจะรวมตัวเพื่อสร้างเป็นกลุ่มของโปรตีนเรียกว่า ไฟโคบิลิโซม (phycobilisome) ซึ่งเป็นกลุ่มย่อยของการรวมกันระหว่างโปรตีนและกลุ่มธาตุที่ทำให้เกิดสีในสารประกอบ (chromoprotein) ทำหน้าที่สำคัญในการเป็นตำแหน่งของการสังเคราะห์แสง ในธรรมชาติโปรตีนไฟโคบิลินจำแนกได้เป็น 3 กลุ่มตามคุณสมบัติในการเกิดสี ได้แก่ ไฟโคอิลิทริน (phycoerythrin) ให้สีได้ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ไฟโคไซยานิน (phycocyanin) ให้สีได้ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และอัลโลไฟโคไซยานิน (allophycocyanin) ให้สีได้ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ซึ่งโปรตีนไฟโคบิลินแต่ละชนิดประกอบไปด้วยสายแอลฟา 1 สาย และสายบีตา 1 สาย ในสิ่งมีชีวิตโปรตีนไฟโคบิลินทำหน้าที่ในการดักจับพลังงานแสงตั้งแต่ความยาวคลื่น 500 ถึง 650 นาโนเมตร และทำการส่งต่อพลังงานแสงไปสู่คลอโรฟิลล์เอ โดยการส่งถ่ายพลังงานนั้นเริ่มจากการรับแสงของไฟโคอิลิทริน จากนั้นส่งต่อไปที่ไฟโคไซยานิน แล้วส่งต่อไปให้กับอัลโลไฟโคไซยานิน และสุดท้ายส่งให้กับคลอโรฟิลล์เอ การส่งถ่ายพลังงานภายในโปรตีนไฟโคบิลินจะส่งจากสายบีตาไปให้กับสายแอลฟา

ไฟโคไซยานินนอกจากเป็นรงควัตถุที่สำคัญต่อการสังเคราะห์แสงแล้ว ไฟโคไซยานินยังมีคุณสมบัติหลากหลายทั้งเรื่องของการต้านอนุมูลอิสระ การต้านการอักเสบ และการเป็นสารเรืองแสง โดยไฟโคไซยานินอะโปโปรตีนมี คุณสมบัติ ในการต้านอนุมูลอิสระและต้านการบวม ส่วนไฟโคไซยานินโฮโล

โปรตีนที่เกิดจากการรวมตัวของไฟโคไซยานินอะโปโปรตีนกับคลอโมฟลอร์ด้วยพันธะไทโออีเทอร์ตรงบริเวณซิสทีอินจะเป็นสารประกอบฟลูออเรสเซนต์สีน้ำเงิน

โครงการวิจัยนี้ได้ทำการศึกษา บีตา และ แอลฟาไฟโคไซยานิน โอเปอร์รอนจาก *Anabaena siamensis* TISTR 8012 โดย โคลน ผลิต และการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ แล้วทำการทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 โคลนยีนที่มีการแสดงออกของโปรตีนไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรีย

1.2.2 ชักนำให้เกิดการการแสดงออกของโปรตีนไฟโคไซยานินใน *Escherichia coli* เพื่อเป็นการยืนยันว่ารีคอมบิแนนพลาสมิดซึ่งมียีนไฟโคไซยานินแทรกอยู่ เมื่อถ่ายเข้าสู่ *E. coli* ซึ่งเป็นเซลล์เจ้าบ้าน เพื่อเป็นการตรวจสอบว่าโปรโมเตอร์สามารถถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนโปรตีนไฟโคไซยานินที่มาจากไซยาโนแบคทีเรีย

1.2.3 ทำการแยกโปรตีนไฟโคไซยานินที่ผลิตได้ และทำให้โปรตีนบริสุทธิ์

1.2.4 ทำการทดสอบคุณสมบัติของการต้านสารอนุมูลอิสระของรีคอมบิแนนโปรตีนที่ได้ เพื่อยืนยันว่ารีคอมบิแนนโปรตีนไฟโคไซยานินที่ผลิตได้นั้นสามารถทำงานได้จริง

1.3 ข้อตกลงเบื้องต้น

เนื่องจากยังไม่มีรายงานการโคลน การผลิต และการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์แก่ บีตา และแอลฟา โอเปอร์รอนจาก *Anabaena siamensis* และไฟโคไซยานินโฮโลโปรตีนเป็นโปรตีนที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยผู้วิจัยทำการศึกษา และสร้างองค์ความรู้ในการผลิต และทำให้บริสุทธิ์ กระทั่งทดสอบคุณสมบัติของโปรตีนที่ผลิตได้ในห้องปฏิบัติการ

1.4 การทบทวนวรรณกรรม (reviewed literature) / สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

ไซยาโนแบคทีเรีย เป็นสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในกลุ่มของโปรคาริโอตที่มีชีวิตมาตั้งแต่ก่อนสมัยจะก่อกำเนิดสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในโลก และเป็นสิ่งมีชีวิตที่ก่อให้เกิดการมีก๊าซออกซิเจนขึ้นในชั้นบรรยากาศของโลก ไซยาโนแบคทีเรียสามารถอาศัยในสภาวะที่หลากหลาย เช่น อุณหภูมิอบอุ่น บริเวณที่มีแสงสว่างมาก และบริเวณที่มีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำ จึงทำให้ไซยาโนแบคทีเรียสามารถมีชีวิตได้ในสภาวะที่หลากหลาย เช่น อากาศร้อนในฤดูใบไม้ผลิ ทะเลสาบที่มีอุณหภูมิต่ำ และในดิน มีเพียงไม่กี่สายพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรียเท่านั้นที่มีชีวิตอยู่บริเวณมหาสมุทรเปิด โคลนบริเวณปากอ่าว บริเวณน้ำตื้น ทะเลสาบ และแม่น้ำ เรามักจะรู้จักไซยาโนแบคทีเรียในชื่อของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ในการศึกษาเรื่องของส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียทำให้ทราบว่า ไซยาโน-แบคทีเรียเป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมลบ ประกอบด้วย เยื่อหุ้มเซลล์ 3 ชั้นด้วยกัน ได้แก่ เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) ชั้นเพปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) ซึ่งค่อนข้างหนาจึงใช้ส่วนนี้ในการจำแนกไซยาโนแบคทีเรียออกจากแบคทีเรียแกรมลบทั่วไป และชั้นสุดท้ายคือเยื่อหุ้มพลาสมา (plasma membrane) (Christa และคณะ 2005) ในปี ค.ศ.1979 Rippka และผู้ร่วมวิจัยได้ทำการจำแนกไซยาโนแบคทีเรียตามลักษณะออกเป็น 5 กลุ่มดังนี้ (Rippka และคณะ 1979)

กลุ่มที่ 1 ไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียวมีการแพร่พันธุ์แบบการแบ่งตัวจาก 1 เป็น 2 เซลล์ หรือการแตกหน่อ ได้แก่ *Synechococcus* Type I II III, *Glloeothce*, *Gloeocapsa, Gloeobacter, Chanaesiphon* และ *Synechocystis* Type I II

กลุ่มที่ 2 ไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียวมีการแพร่พันธุ์แบบการแบ่งตัวมากกว่าครั้งละ 2 เซลล์ได้แก่ *Dermocarsa, Xenococcus, Dermocarpella, Chroococcidiopsis, Pleurocapsa* group Type I II และ *Myxosarcina*

กลุ่มที่ 3 ไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเส้นใย ไม่มีเซลล์เฮทเทอโรซิส และมีการแพร่พันธุ์โดยแบ่งตัวเป็นระนาบได้เพียงครั้งละ 1 ระนาบ ได้แก่ *Spirulina, Arthrospira, Oscillatoria, Pseudonabaena,* and LPP group A B และ *Plectonema baryanum* type

กลุ่มที่ 4 ไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเส้นใย มีเซลล์เฮทเทอโรซิสมี และมีการแพร่พันธุ์โดยแบ่งตัวเป็นระนาบได้เพียงครั้งละ 1 ระนาบ ได้แก่ *Anabaena, Nodularia, Cylindrospermum, Nostoc, Scytonema*, *Calothrix* และ *Tolypothrix tenuis* type

กลุ่มที่ 5 ไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเส้นใย มีเซลล์เฮทเทอโรซิส และมีการแพร่พันธุ์โดยแบ่งตัวเป็นระนาบได้มากกว่าครั้งละ 1 ระนาบ ได้แก่ *Chlorogloeopsis fritschii* และ *Fischerella*

ในการทำวิจัยในครั้งนี้ได้เลือกไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเส้นใย มีเซลล์เฮทเทอโรซิส และมีการแพร่พันธุ์โดยแบ่งตัวเป็นระนาบได้เพียงครั้งละ 1 ระนาบ เนื่องจากมีการแบ่งตัวที่รวดเร็ว และโตง่ายทำให้สามารถเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียเพียงระยะเวลาอันสั้นแต่ได้จำนวนเซลล์มากมาย *Anabaena siamensis* TISTR 8012 เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นใย และมีการสร้างเซลล์เฮทเทอโรซิส ซึ่งเซลล์เฮทเทอโรซิสนี้เป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดการตรึงก๊าซไนโตรเจน ภายใต้สภาวะการขาดแหล่งไนโตรเจนเซลล์ปกติจะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์เฮทเทอโรซิส เพื่อทำการตรึงก๊าซไนโตรเจนให้ไซยาโนแบคทีเรียสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ (Kaneko และคณะ 2001) โดย *A. siamensis* ค้นพบครั้งแรกในนาข้าวของประเทศไทย ซึ่งในปัจจุบันสายพันธุ์นี้นิยมนำมาใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพสำหรับใช้ในนาข้าว ซึ่งสามารถให้ผลผลิตที่ใกล้เคียงกับการใช้ปุ๋ยเคมี อีกทั้งไม่ทำลายสิ่งแวดล้อมอีกด้วย (Phunprunch และคณะ 2006)

ในส่วนต่อไปจะได้กล่าวถึงส่วนประกอบของโปรตีนไฟโคบิลิน (phycobiliproteins) ซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง จะพบได้ในเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในของไทลาคอยด์ (thylakoid) (Yu และคณะ 1981) โดยโปรตีนไฟโคบิลิน คือ โปรตีนที่ทำงานร่วมกับคลอโมฟลอร์ (chromophore) โดยส่วนมากพบในชั้นไทลาคอยด์ โปรตีนไฟโคบิลินนี้นับว่าเป็นรงควัตถุที่สำคัญต่อการสังเคราะห์แสงซึ่งพบ

ได้มากถึง 40-60 เปอร์เซ็นต์ ของโปรตีนที่สามารถละลายน้ำได้ภายในเซลล์ (Pilot และ Fox 1984) โปรตีนไฟโคบิลินจะรวมตัวเพื่อสร้างเป็นกลุ่มของโปรตีนเรียกว่า ไฟโคบิลิโซม (phycobilisome) ซึ่งเป็นกลุ่มย่อยของการรวมกันระหว่างโปรตีนและกลุ่มธาตุที่ทำให้เกิดสีในสารประกอบ (chromoprotein) (Lorimier และคณะ 1984) ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการเป็นตำแหน่งของการสังเคราะห์แสง ในธรรมชาติโปรตีนไฟโคบิลินจำแนกได้เป็น 3 กลุ่มตามคุณสมบัติในการเกิดสี ได้แก่ ไฟโคอิลิทริน (phycoerythrin) สามารถให้สีได้ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ไฟโคไซยานิน (phycocyanin) สามารถให้สีได้ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และอัลโลไฟโคไซยานิน (allophycocyanin) สามารถให้สีได้ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ซึ่งโปรตีนไฟโคบิลินแต่ละชนิดประกอบไปด้วย สายแอลฟา 1 สาย และสายบีตา 1 สาย ในสิ่งมีชีวิตโปรตีนไฟโคบิลิน ทำหน้าที่ในการดักจับพลังงานแสงตั้งแต่ความยาวคลื่น 500 ถึง 650 นาโนเมตร และทำการส่งต่อพลังงานแสงไปสู่คลอโรฟิลล์เอ (Liu และคณะ 2005) โดยการส่งถ่ายพลังงานนั้นเริ่มจาก การรับแสงของไฟโคอิลิทริน จากนั้นส่งต่อไปที่ไฟโคไซยานิน จากนั้นส่งต่อไปให้กับอัลโลไฟโคไซยานิน และสุดท้ายส่งให้กับคลอโรฟิลล์เอ การส่งถ่ายพลังงานภายในโปรตีนไฟโคบิลินจะส่งจาก สายบีตาไปให้กับสายแอลฟา (Romay และคณะ 2003) ในงานวิจัยครั้งนี้จะให้ความสำคัญไปที่ไฟโคไซยานิน เนื่องจากมีคุณสมบัติหลากหลายทั้งเรื่องของการต้านอนุมูลอิสระ การต้านการอักเสบ และการเรืองแสง

1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

สามารถเริ่มต้นการเป็นส่วนหนึ่งของ การสร้างระบบเทคโนโลยีการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และการศึกษาหน้าที่ของโปรตีนไฟโคไซยานิน นอกจากนี้ โปรตีนไฟโคไซยานินที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วได้ถูกนำมาศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้น จึงเป็นการเพิ่มความรู้เกี่ยวกับการศึกษาการต้านอนุมูลอิสระ

งานวิจัยนี้ได้เป็นส่วนหนึ่งในการผลิตนักศึกษาปริญญาโท 1 คน บางส่วนของงานวิจัยนี้ได้นำเสนอในการประชุมวิชาการระดับ ชาติ และนานาชาติ เพื่อให้เกิดองค์ความรู้แก่ ประชาชน นักเรียน นักศึกษา ครู อาจารย์ นักวิชาการได้ศึกษาเพื่อเป็นความรู้พื้นฐานหรือนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยอื่น ๆ ต่อไป

Suphap, W., and Ketudat-Cairns, M. (2009) Phycocyanin alpha and Beta subunits of *Anabaena siamensis* TISTR8012 Proceeding of the The 2nd SUT Graduate Conference 2009 , Nakhon Ratchasima Thailand, January 21-22, 2009

Suphap, W., Charoenrat, T. and Ketudat-Cairns, M. (poster presentation) Cloning and expression of Phycocyanin from Cyanobacteria Proceeding of the 20th Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology "Biotechnology for Global Care" Taksila Hotel, Maha Sarakham, Thailand October 14-17, 2008. *** **Poster award*****

จากการโคลนยีนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จึงได้ส่งลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าตีพิมพ์ยังฐานข้อมูล NCBI 2 ข้อมูลดังนี้

- Anabaena siamensis TISTR 8012 phycocyanin beta subunit gene, complete cds 519 bp linear DNA Accession:EU815328.1 GI:194271298
- Anabaena siamensis TISTR 8012 phycocyanin alpha subunit gene, complete cds 492 bp linear DNA Accession:EU815327.1 GI:194271296