

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

บทบาทของลิพิดต่อการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสงของ

สาหร่ายสีไปรูลินา

Role of lipids on the electron transport in photosynthesis of *Spirulina platensis*

ผู้จัดทำ

นางสาว มารศรี เรืองจิตซ์ชาลย์

นางสาว ทิพวรรณ มาไพศาลทรัพย์

นางสาว พีรดา พรหมมีเนตร

สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน

ปีงบประมาณ 2553

บทคัดย่อ

สไปรูลินา (*Spirulina platensis*) เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ โดยกิจกรรมการสังเคราะห์แสงจะเกิดที่ thylakoid membrane ภายในเซลล์ องค์ประกอบหลักภายใน membrane ประกอบด้วย glycerolipid (DGDG, MGDG, SQDG และ PG) และโปรตีน ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนภายใน membrane การทดลองที่ผ่านมาพบว่า *S. platensis* สายพันธุ์กลาย I22 มีกิจกรรมการสังเคราะห์แสงและการหายใจต่ำกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยเมื่อพิจารณาถึงกิจกรรมการสังเคราะห์แสงของระบบ PSI พบว่าต่ำกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมร้อยละ 70 ขณะที่กิจกรรมการสังเคราะห์แสงของระบบ PSII สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมร้อยละ 30 นอกจากนี้สายพันธุ์กลายยังมีความบกพร่องในการผลิตกรดแกมมา-ลิโนเลนิก (γ -linolenic acid, C18:3 ^{$\Delta_{6,9,12}$} หรือ GLA) ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญต่อชนิดลิปิดภายในเซลล์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาถึงผลการเปลี่ยนแปลงของกรดไขมัน (GLA) ที่มีต่อชนิดและปริมาณของลิปิดต่อกิจกรรมการสังเคราะห์แสงของพันธุ์กลาย I22

ผลการศึกษาถึงชนิดและปริมาณของลิปิดภายในเซลล์ *Spirulina* ของ crude lipids แสดงให้เห็นว่าปริมาณ MGDG ของสายพันธุ์กลาย I22 สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมร้อยละ 33 ขณะที่ปริมาณลิปิด DGDG, SQDG และ PG ต่ำกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมร้อยละ 37, 42 และ 47 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ถึงองค์ประกอบของกรดไขมัน พบว่าสัดส่วนของ C18:3 ของลิปิดแต่ละชนิดมีปริมาณต่ำกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม การศึกษาใน plasma และ thylakoid membrane พบว่าสัดส่วนองค์ประกอบของ C18:3 โดยรวมมีปริมาณต่ำกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม ประมาณร้อยละ 70 และ 30 ตามลำดับ ในการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงกรดไขมันของ glycerolipid ใน plasma membrane พบว่า C18:3 ในชั้น MGDG, DGDG และ PG ของสายพันธุ์กลาย I22 สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม ร้อยละ 50, 50 และ 70 ตามลำดับ แต่การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงกรดไขมันของ glycerolipid ใน thylakoid membrane พบว่า C18:3 ในชั้น MGDG และ PG มีสัดส่วนของกรดไขมันต่ำกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม ร้อยละ 37 และ 61 ตามลำดับ

ผลการศึกษาที่ได้แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของกรดไขมันภายในเซลล์แปรผันตามการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของกรดไขมันใน thylakoid membrane เนื่องจากองค์ประกอบร้อยละ 90 ของลิปิดอยู่ใน thylakoid membrane และทำให้องค์ประกอบของลิปิดภายในเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง จึงเป็นไปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงทั้งปริมาณลิปิดและกรดไขมันภายในเซลล์จะส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการทำงานของโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการส่งถ่ายอิเล็กตรอนภายใน membrane โดยเฉพาะกับ thylakoid membrane ซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดกิจกรรมการสังเคราะห์แสงภายในของเซลล์

คำสำคัญ *Spirulina platensis*, กลีเซอโรลิปิด, plasma membrane, thylakoid membrane

Abstract

S. platensis is a photosynthetic cyanobacterium performing photosynthetic activity at the thylakoid membrane. The major components of thylakoid membrane are glycerolipids (MGDG, DGDG, SQDG and PG) and proteins which involved in structure, activity and conformation of protein complexes in the membrane. The mutant, *S. platensis* I22 has been reported for defective in both GLA (C18:3) production and photosynthetic activity when compare with the wild type (WT). Therefore, this mutant has been subjected to further study on lipid composition and effect on composition change in *S. platensis* cells.

Lipid composition analysis revealed that MGDG in crude lipids of *S. platensis* I22 was increased 33% while DGDG, SQDG and PG in the mutant was 37, 42 and 47% lower than WT, respectively. Fatty acid analysis also revealed lowered level of C18:3 in the mutant than WT cells. Further analysis of plasma and thylakoid membrane also supported the lower level of C18:3 for 70% and 30%, respectively. Analysis of glycerolipid classes in both plasma membrane and thylakoid membrane confirmed the effect of C18:3 level in all lipid classes (MGDG, DGDG, SQDG and PG). The result revealed the similar trends of lipid class profile between thylakoid membrane and cells lipid composition as more than 90% of membrane lipid is located in thylakoid membrane. The change in both lipid and fatty acid composition in cells has confirmed effect on electron transport between photosynthetic protein complexes in the thylakoid membrane.

Keywords: *Spirulina platensis*, glycerolipid, plasma membrane, thylakoid membrane

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	1
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	2
สารบัญ	3
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	5
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	6
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	6
1.4 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
1.5 การทบทวนวรรณกรรม / สารสนเทศ	7
บทที่ 2 วิธีการดำเนินการวิจัย	
2.1 จุลินทรีย์และสภาวะการเลี้ยง	17
2.2 สภาวะที่ใช้เลี้ยงเซลล์เริ่มต้น	17
2.3 การเลี้ยงเซลล์เพื่อการวิเคราะห์	17
2.4 กิจกรรมการสังเคราะห์แสง	17
2.5 การแยกเมมเบรน (membranes)	18
2.6 การสกัดลิปิด	18
2.7 การแยกชนิดลิปิด	18
2.8 การวิเคราะห์กรดไขมัน	19
บทที่ 3 ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการทดลอง	
3.1 การศึกษาความคงตัวของคุณลักษณะด้านการสังเคราะห์แสงของ <i>S. platensis</i> พันธุ์กลาย สายพันธุ์ I22	20
3.2 การศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันใน <i>S. platensis</i> สายพันธุ์กลาย I22 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม	21
3.3 การศึกษาองค์ประกอบของ glycerolipid ชนิดต่างๆใน <i>S. platensis</i> สายพันธุ์กลาย I22 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม	22
3.4 การศึกษาการกระจายตัวของกรดไขมันแต่ละชนิดใน glycerolipid ของ <i>S. platensis</i> พันธุ์กลาย I22 และ สายพันธุ์ดั้งเดิม (WT)	24
3.5 การศึกษาชนิดและปริมาณของกรดไขมันองค์ประกอบใน plasma และ thylakoid membrane	26

3.6 การศึกษาการกระจายตัวของกรดไขมันใน glycerolipid แต่ละชนิดภายใน plasma membrane ของ <i>S. platensis</i> พันธุ์กลาย I22 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (WT)	27
3.7 การศึกษาการกระจายตัวของกรดไขมันใน glycerolipid แต่ละชนิดของ thylakoid membrane ใน <i>S. platensis</i> สายพันธุ์กลาย I22 และ สายพันธุ์ดั้งเดิม (WT)	29
บทที่ 4 สรุปและข้อเสนอแนะ	
4.1 สรุปผลการทดลอง	31
4.2 ข้อเสนอแนะ	32
เอกสารอ้างอิง	33
ภาคผนวก	37

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

สไปรูลินา (*Spirulina* sp.) เป็นไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacterium) ที่เป็นแหล่งของโปรตีน และ สารเคมีมูลค่าสูง (1) โดยเฉพาะกรดแกมมา-ลิโนลินิก (γ -linolenic acid หรือ GLA, $18:3\Delta^{6,9,12}$) ซึ่งมีประมาณ ร้อยละ 20-30 ของกรดไขมันทั้งหมด หรือประมาณร้อยละ 1-1.3 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (2) GLA มีความสำคัญ เนื่องจากเป็นสารตั้งต้นชนิดหนึ่งในการสร้างสารคล้ายฮอร์โมนพรอสตาแกลนดินส์ (prostaglandins) ที่ เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) ที่สำคัญต่างๆ รวมทั้งระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายมนุษย์ (3) แต่แหล่งที่ใช้ในการผลิต GLA มีจำกัดทำให้ GLA มีราคาสูง สไปรูลินา จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีศักยภาพ สามารถนำมาเป็นแหล่งผลิต GLA ในระดับอุตสาหกรรม

กลุ่มวิจัยในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (มจธ.) มีการศึกษาโดยใช้สารปราบวัชพืชกลุ่ม pyridazinone ในการคัดเลือกสายพันธุ์ของสไปรูลินา พบว่าได้สายพันธุ์ *S. platensis* Z19/2 ซึ่งสามารถต้านต่อ SAN 9785 ที่ระดับความเข้มข้น 1.2 มิลลิโมลาร์ สามารถผลิต GLA ได้สูงถึงร้อยละ 1.7 ของน้ำหนักแห้งเมื่อ เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (2, 3) ขณะที่การใช้สารเคมี ethylmethanesulfonate (EMS) เพื่อให้ *S. platensis* C1 เกิด การกลายพันธุ์ พบว่าได้ *S. platensis* I22 (4) ที่มีความผิดปกติในการผลิต GLA กล่าวคือ เมื่อเปรียบเทียบกับสาย พันธุ์ดั้งเดิม (*S. platensis* C1) ที่อุณหภูมิปกติ (35°C) สายพันธุ์กลาย I22 สามารถผลิต GLA ได้เพียงร้อยละ 50 แต่มีอัตราการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ยังพบว่าสายพันธุ์กลาย I22 มีกิจกรรมการสังเคราะห์แสงและ อัตราการหายใจเพียงร้อยละ 50 โดยเฉพาะกิจกรรมในส่วน of photosystem I (PS I) พบว่าต่ำกว่าสายพันธุ์ ดั้งเดิมถึงร้อยละ 70 (5) เมื่อศึกษาตัวกลางในการรับ-ส่งอิเล็กตรอนแต่ละตัว กิจกรรมของ cytochrome *b_f* (cyt *b_f*) และ plastocyanin (PC) มีกิจกรรมใกล้เคียงกับสายพันธุ์ดั้งเดิม แต่กิจกรรม re-reduction ของ cytochrome *f* (cyt *f*) ในสายพันธุ์กลาย I22 ใช้เวลาในการรับอิเล็กตรอนช้ากว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (6) เมื่อศึกษาในระดับยีน โครงสร้างและการแสดงออกของยีนในระดับ transcription ของ cyt *b_f* ซึ่งประกอบด้วย 4 subunits หลักคือ cyt *f*, โปรตีน Rieske Fe-S, cytochrome *b_h* (cyt *b_h*) และ subunit IV พบว่าลำดับเบสของยีนโครงสร้างทั้ง 4 subunits ไม่แตกต่างจากสายพันธุ์ดั้งเดิมส่วนการแสดงออกของยีนในระดับ transcription ทั้ง 4 subunits มีการแสดงออก ของยีนต่ำกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม แสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนมีความผิดปกติใน ระดับการแสดงออก ทำให้การถ่ายทอดอิเล็กตรอนของการสังเคราะห์แสงและการหายใจเกิดช้ากว่าสายพันธุ์ ดั้งเดิม ในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำ (20°C) สายพันธุ์กลาย I22 มีอัตราการเจริญเติบโตลดลงจากอุณหภูมิปกติและต่ำ กว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมร้อยละ 50 ส่วนกิจกรรมการสังเคราะห์แสงต่ำกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมมากยิ่งขึ้น แต่มีการผลิต GLA ได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ดั้งเดิม ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงศึกษาถึงผลของชนิดและปริมาณของ

ลิปิดและองค์ประกอบของกรดไขมันแต่ละชั้นของสายพันธุ์กลาย I22 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม เพื่อศึกษาถึงผลกระทบจากการสร้าง GLA ที่ผิดปกติในสถานะอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ว่ามีผลต่อชนิดและปริมาณของลิปิดภายในเซลล์อย่างไร และมีผลต่อเนื่องถึง การถ่ายทอดอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสงของสายพันธุ์กลายหรือไม่

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณของลิปิดที่มีผลกระทบต่อกิจกรรมการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสงของ *S. platensis* สายพันธุ์กลาย I22 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (*S. platensis* C1)

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาชนิดและปริมาณของลิปิดและกรดไขมันใน thylakoid membrane ที่อุณหภูมิปกติ (35°C) และการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสงของ *S. platensis* สายพันธุ์กลาย I22 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

1.4 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การจัดเรียงตัวของ membrane และองค์ประกอบของ membrane ในไซยาโนแบคทีเรียจะเหมือนกับในคลอโรพลาสต์ของพืชชั้นสูง โดยประกอบด้วย membrane 3 ชนิด คือ outer membrane, plasma membrane และ thylakoid membrane ใน thylakoid membrane เป็นแหล่งที่เกิดกระบวนการสังเคราะห์แสง การส่งถ่ายอิเล็กตรอน และ photophosphorylation ของไซยาโนแบคทีเรียและ chloroplast ของพืชชั้นสูง ยังมีโปรตีนเชิงซ้อนทำหน้าที่ในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในระบบการสังเคราะห์แสงและปั๊มโปรตอน และลิปิดในกลุ่มกลีเซอโรลิปิด เป็นองค์ประกอบ thylakoid membrane จะมีลักษณะเป็น fluidity (กึ่งแข็งกึ่งเหลว) ซึ่งการรักษาสภาพความเป็น fluidity ของ thylakoid membrane ของไซยาโนแบคทีเรียและสิ่งมีชีวิตอื่นๆ จะเป็นการกำหนดลักษณะทางชีวเคมีและกายภาพของเมมเบรนในสิ่งมีชีวิต (7)

จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า *S. platensis* สายพันธุ์กลาย I22 มีกิจกรรมการสังเคราะห์แสงและการหายใจเพียงร้อยละ 50 เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม นอกจากนี้ยังพบว่าสายพันธุ์กลาย I22 ยังมีความผิดปกติในการสร้าง GLA โดยสังเคราะห์ได้เพียงร้อยละ 50 ของกรดไขมันทั้งหมดเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม การศึกษาในเรื่องการส่งถ่ายอิเล็กตรอนของสายพันธุ์กลาย I22 พบว่ามีความบกพร่องที่การทำงานของตัวกลางในการรับ-ส่งอิเล็กตรอนของ cyt *b_f* complex ซึ่งเป็นโปรตีนที่ใช้ในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนระหว่าง PSII และ PSI ในกระบวนการสังเคราะห์แสง เมื่อศึกษาในระดับการแสดงออกของ cyt *b_f* พบว่า ในสายพันธุ์กลาย I22 มีการแสดงออกของ cyt *b_f* ในระดับ transcription ที่ต่ำกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้กิจกรรมการสังเคราะห์แสงและการหายใจของสายพันธุ์กลาย I22 ต่ำกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม

ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจว่า *S. platensis* สายพันธุ์กลาย I22 ซึ่งมีความบกพร่องในการทำงานของ cyt *b_f* complex ในระบบการสังเคราะห์แสงและความสามารถในการสร้างกรดไขมัน GLA ที่แตกต่างไปจากสายพันธุ์ดั้งเดิม จะสามารถนำมาใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างชนิดและปริมาณของลิปิดและกรดไขมัน กับการ

สังเคราะห์แสงในไซยาโนแบคทีเรีย เนื่องจากการถ่ายทอดอิเล็กตรอนของกระบวนการสังเคราะห์แสงใน thylakoid membrane ไม่ได้ขึ้นกับโปรตีนที่ใช้ในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนเพียงอย่างเดียว โครงสร้างและองค์ประกอบของ thylakoid membrane ซึ่งเป็นที่อยู่ของโปรตีนที่ใช้ในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนก็มีความสำคัญต่อการเกิดการถ่ายทอดอิเล็กตรอนด้วยเช่นกัน ดังนั้นการเกิดความผิดปกติขององค์ประกอบอื่น เช่น การเปลี่ยนแปลงของชนิดของลิพิดและกรดไขมันของ thylakoid membrane ในสายพันธุ์กลาย I22 อาจจะส่งผลถึงโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนใน thylakoid membrane ด้วยเช่นกัน

1.5 การทบทวนวรรณกรรม /สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

1. สไปรูลินา (*Spirulina* sp.)

เป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน หรือไซยาโนแบคทีเรียชนิดหนึ่ง ประกอบด้วยเซลล์เดี่ยว ลักษณะทรงกระบอกเรียงต่อกันเป็นสาย (filament) และบิดเป็นเกลียว ไม่มี heterocysts และกิ่งก้าน มักพบอยู่บริเวณแหล่งน้ำที่มีความเป็นด่างสูง (pH 8.5-11) (8) เป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ (autotrophic organisms) โดยเปลี่ยนพลังงานแสงเป็นพลังงานเคมีในรูปคาร์โบไฮเดรต (9)

2. การสังเคราะห์แสงในไซยาโนแบคทีเรีย

เป็นการทำงานร่วมกันของปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องของ 2 ปฏิกิริยาใน thylakoid membrane คือ

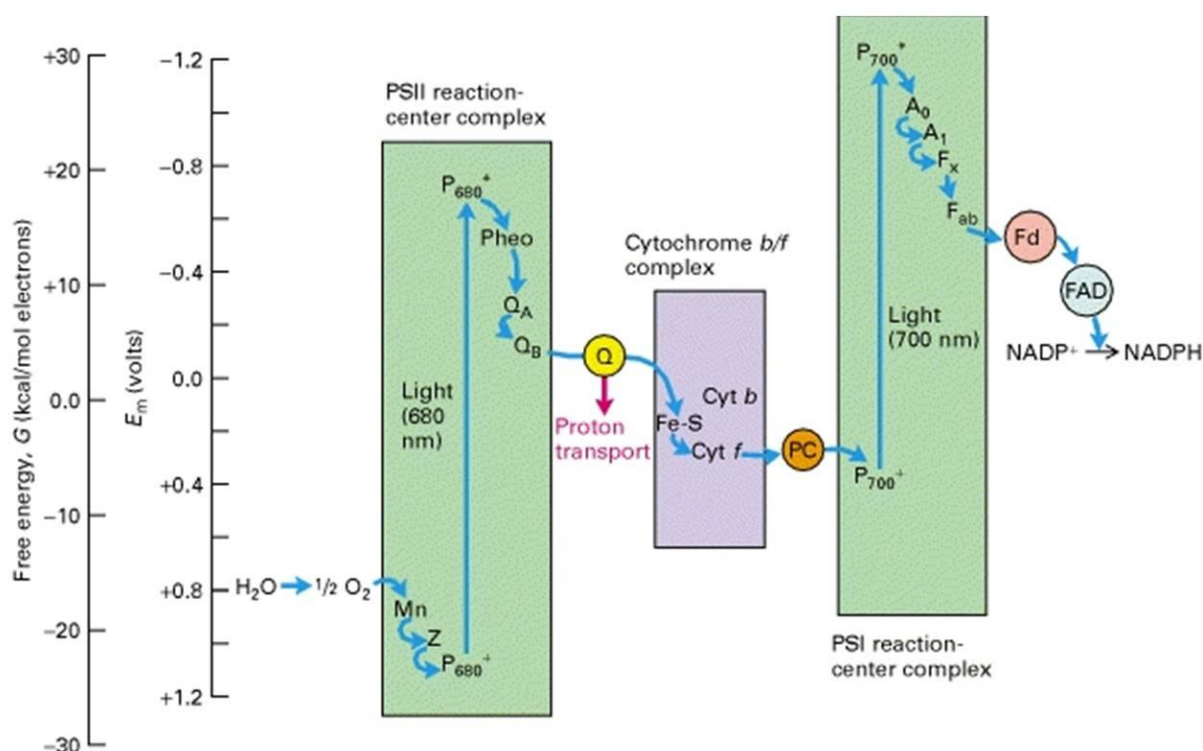
2.1 ปฏิกิริยาการใช้แสง

เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นใน thylakoid membrane ซึ่งปฏิกิริยานี้เกี่ยวข้องกับการสร้าง ATP, NADPH และออกซิเจน โดยการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสงมีรงควัตถุช่วยดักจับพลังงานแสง ได้แก่ chlorophyll, β -carotene และ phycobilins โดย phycobiliproteins จาก phycobilisomes มีหน้าที่เหมือน light-harvesting complex ของ PSII โดยเชื่อมกับผิวนอกของ thylakoid membrane (7) และมีโปรตีนหลายชนิดช่วยในการถ่ายทอดอิเล็กตรอน (10) โดยการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจะเกิดขึ้น 2 แบบ คือ

2.1.1 การถ่ายทอดอิเล็กตรอนแบบไม่เป็นวัฏจักร (non-cyclic electron transfer)

เป็นการถ่ายทอดอิเล็กตรอนที่เกิดจากการทำงานร่วมกันระหว่างระบบแสง สองระบบ คือ ระบบแสงที่ II (PSII) ประกอบด้วยหน่วยสังเคราะห์แสงที่มีศูนย์กลางปฏิกิริยาที่สามารถรับพลังงานในช่วงคลื่นที่มีความยาวคลื่นต่ำกว่า 680 นาโนเมตร (P680) และ ระบบแสงที่ I (PSI) ประกอบด้วยหน่วยสังเคราะห์แสงที่มีศูนย์กลางปฏิกิริยาที่สามารถรับพลังงานในช่วงคลื่นที่มีความยาวคลื่นต่ำกว่า 700 นาโนเมตร (P700) ซึ่งระบบแสง (photosystem) ทั้ง 2 เป็น protein complex ที่ฝังตัวอยู่ใน thylakoid membrane แต่ละระบบแสงประกอบด้วยศูนย์กลางปฏิกิริยา (reaction center) ที่มีคลอโรฟิลล์จำเพาะเมื่อ PS II ดูดจับพลังงานแสง อิเล็กตรอนจึงถูกกระตุ้น ทำให้มีพลังงานภายในโมเลกุลสูงขึ้นและมีผลให้เกิดการสูญเสียอิเล็กตรอนให้แก่

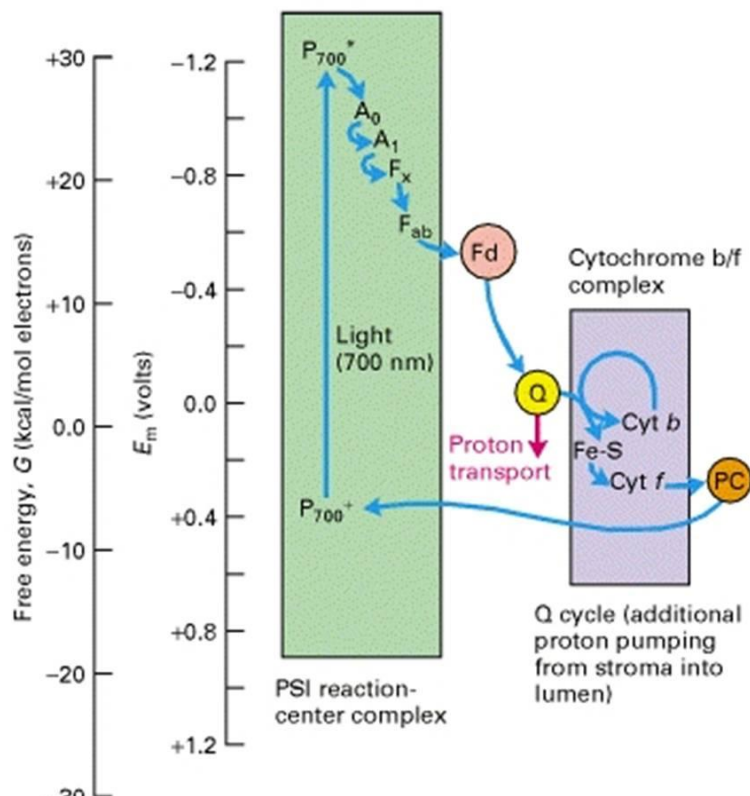
ตัวรับอิเล็กตรอนตัวถัดไป โดยอิเล็กตรอนถูกเคลื่อนไป ยังตัวรับอิเล็กตรอนตัวแรกคือ ฟิโอฟิติน และส่งต่อไปยัง Plastoquinone (PQ), cytochrome *b/f* complex, Plastocyanin(PC) PSI และ NADP^+ ตามลำดับ ดังรูปที่ 2.1 การถ่ายทอดอิเล็กตรอนแบบไม่เป็นวัฏจักรนี้จะได้ ATP และ NADPH_2 ซึ่งพลังงานที่ได้จะถูกนำไปใช้ในปฏิกิริยาไมใช้แสงต่อไป (11)



รูปที่ 2.1 การถ่ายทอดอิเล็กตรอนในปฏิกิริยาใช้แสงแบบไม่เป็นวัฏจักร

2.1.2 การถ่ายทอดอิเล็กตรอนแบบเป็นวัฏจักร (cyclic electron transfer)

เป็นการถ่ายทอดอิเล็กตรอนที่เกิดเฉพาะ PSI เมื่อ PSI ได้รับพลังงานจากแสงจะถูกออกซิไดซ์ กลายเป็น P700^+ ซึ่งอิเล็กตรอนที่หลุดออกมาจะไปรีดิวซ์ เฟอร์รีดอกซินแล้วถ่ายทอดอิเล็กตรอนไปยัง PQ cytb_f และ PC ตามลำดับ การถ่ายทอดอิเล็กตรอนแบบนี้ไม่มีการสร้าง NADPH_2 แต่สร้างพลังงานในรูป ATP ดังรูปที่ 2.2 (11)



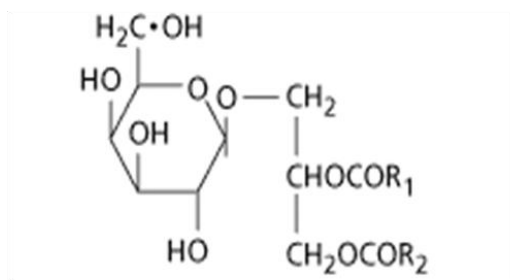
รูปที่ 2.2 การถ่ายทอดอิเล็กตรอนในปฏิกิริยาใช้แสงแบบเป็นวัฏจักร

2.2 ปฏิกิริยาไม่ใช้แสง เป็นปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรตจากคาร์บอนไดออกไซด์ ปฏิกิริยานี้ไม่ใช้แสงโดยตรง แต่ใช้พลังงานเคมีที่ได้จากปฏิกิริยาใช้แสง คือ ATP และ NADPH มารีดิวซ์คาร์บอนไดออกไซด์ให้เป็นคาร์โบไฮเดรต เรียกปฏิกิริยานี้ว่า วัฏจักรคาลวิน (10)

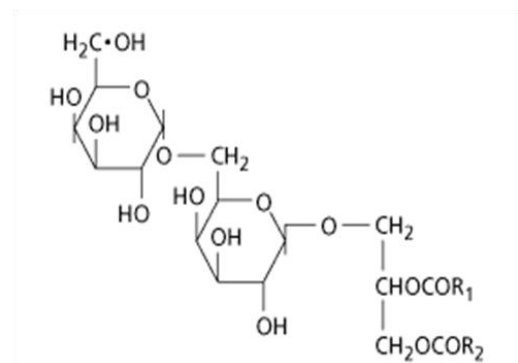
3. ชนิดของลิปิด และความเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงในไซยาโนแบคทีเรีย

เมมเบรนของไซยาโนแบคทีเรียประกอบด้วย outer membrane, inner membrane (cytoplasmic หรือ plasma membrane) และ intracellular membrane (thylakoid membrane) ระหว่าง outer membrane และ inner membrane มี peptidoglycan ชั้นอยู่ระหว่างกลางเมมเบรนทั้ง 2 เมมเบรนแต่ละชนิดมีหน้าที่แตกต่างกัน เช่นใน plasma membrane ทำหน้าที่เป็นเชื้อเลือกผ่านโดยควบคุมการแลกเปลี่ยนไอออนและสารอาหารระหว่างภายนอกและภายในเซลล์ และเกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจ มี Xanthophyll เป็นรงควัตถุหลัก ส่วน chlorophyll a และ β -carotene พบเพียงเล็กน้อยหรือไม่มีเลย (7, 12) ขณะที่ thylakoid membrane ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงและการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจ มี โปรตีนเชิงซ้อน ได้แก่ PSII, cyt *b₆f* complex, PSI และ ATP synthase ช่วยในการส่งถ่ายอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสง นอกจากนี้ยังมีรงควัตถุช่วยดูดซับพลังงานแสง ได้แก่ chlorophyll a, β -carotene และ phycobilins (7)

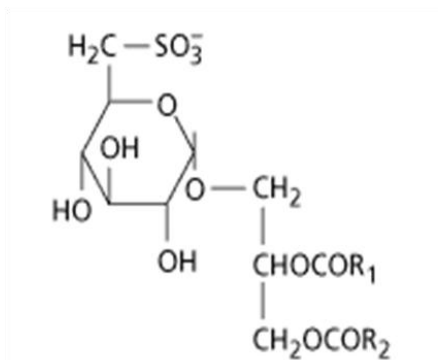
ใน plasma และ thylakoid membrane มี glycerolipids และโปรตีนเป็นองค์ประกอบ ลิพิดที่พบจะเป็น ลิพิดในกลุ่ม glyceroglycolipid และ phosphatidyl glycerol ประกอบด้วย monogalactosyl diacylglycerol (MGDG), digalactosyl diacylglycerol (DGDG), sulfoquinovosyl diacylglycerol (SQDG) และ phosphatidylglycerol (PG) แสดงดังรูปที่ 2.3 และอาจมี monoglucosyl diacylglycerol (GlcDG) อยู่เล็กน้อยโดย สัดส่วนของ MGDG และ DGDG มีประมาณร้อยละ 50 และ 30 ตามลำดับของกลีเซอโรลิพิดทั้งหมด ส่วนที่เหลือเป็น SQDG และ PG มีประมาณร้อยละ 5-12 ของกลีเซอโรลิพิดทั้งหมด (13) ซึ่งจะมีปริมาณแตกต่างกันไป ขึ้นกับสายพันธุ์และสภาวะที่ใช้ในการเจริญเติบโต โดยมี GlcDG อยู่ไม่เกินร้อยละ 1 แสดงดังตารางที่ 2.1 (14)



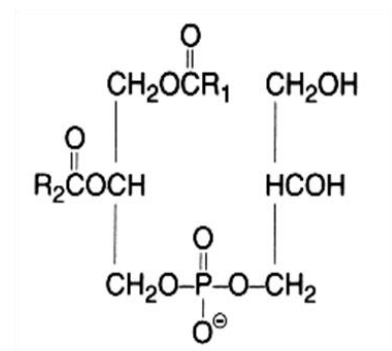
Monogalactosyl diacylglycerol (MGDG)



Digalactosyl diacylglycerol (DGDG)



Sulfoquinovosyl diacylglycerol (SQDG)



Phosphatidylglycerol (PG)

รูปที่ 2.3 โครงสร้างโมเลกุลของกลีเซอโรลิพิด (14)

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของลิปิดในไซยาโนแบคทีเรีย (14)

สายพันธุ์	อุณหภูมิ (°C)	ลิปิด (mol %)				
		GlcDG	MGDG	DGDG	SQDG	PG
<i>Anabaena variabilis</i>	22	1	54	17	11	17
<i>Mastigocladus laminosus</i>	34		51	14	15	20
<i>Synechococcus</i> PCC7002	34		58	12	19	13
	22		57	9	11	23
<i>Spirulina platensis</i>	32		47	16	17	22
<i>Synechococcus</i> PCC6803	34		59	17	16	8
	22		54	18	15	13

Glycerolipids มีความสำคัญต่อการรักษาโครงสร้างของเมมเบรน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของ glycerolipids แต่ละชนิดจะขึ้นกับระดับความไม่อิ่มตัวของกรดไขมันที่ esterify กับกลีเซอรอลด้วยพันธะเอสเทอร์ (15) และส่งผลกระทบต่อคุณลักษณะต่างๆของเซลล์ได้ เช่น การรักษาสภาพของระบบการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสงและการผ่านเข้าออกของสาร metabolites เป็นต้น (16) การศึกษาโปรตีนเชิงซ้อนที่แทรกอยู่ในโมเลกุลของลิปิด ในไซยาโนแบคทีเรีย *Thermosynechococcus elongates* โดยเทคนิค X-ray crystallography พบว่าในโครงสร้างของ PSI complex จะมี MGDG อยู่ 1 โมเลกุลและมี PG อยู่ 3 โมเลกุล โดย PG จะอยู่ระหว่าง PsaB และ PsaX subunits ของ PSI (17) ส่วนโครงสร้างของ PSII complex จะมี MGDG อยู่ 6 โมเลกุล DGDG 4 โมเลกุล SQDG 3 โมเลกุล และ PG 1 โมเลกุล ในสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* พบโครงสร้าง cyt *b₆* อยู่กับ 1 โมเลกุลของ SQDG และ 2 โมเลกุลของลิปิดชนิดอื่นๆ แต่ไม่ใช่ PG (18) ใน thylakoid membrane ของสิ่งมีชีวิตอื่น พบว่า โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง มีโครงสร้างอยู่ร่วมกับลิปิดชนิดอื่นๆเช่นกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 จำนวนของโมเลกุลของลิปิดในโปรตีนเชิงซ้อนจาก thylakoid membrane โดยการวิเคราะห์จาก X-ray crystallographic analysis

โปรตีนเชิงซ้อน	สิ่งมีชีวิต	ชนิดของลิปิด	จำนวนของโมเลกุลลิปิด
PSI	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	PG	3
		MGDG	1
PSII	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	PG	1
		MGDG	6
		DGDG	4
		SQDG	3
LCHII	<i>Spinacia oleracea</i>	PG	1
		DGDG	1
		PC	2
Cyt <i>b_f</i>	<i>Mastigocladus laminosus</i>	PC	2
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	SQDG	1
		MGDG	2

การศึกษาใน *Arabidopsis thaliana* พันธุ์กลาย สายพันธุ์ *dgd1* มีความผิดปกติในการสังเคราะห์ DGDG โดยมีการสังเคราะห์ DGDG ต่ำกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมร้อยละ 90 การศึกษากระบวนการสังเคราะห์แสง พบว่า อัตราส่วนของกิจกรรม PSII/PSI ในสายพันธุ์กลายลดลง แต่ขนาดของหน่วยรับแสง PSII เพิ่มขึ้น (19) นอกจากนี้ยังพบว่า DGDG มีความสำคัญต่อโครงสร้างและหน้าที่ของหน่วยการสังเคราะห์แสง PSI ใน *A. thaliana* (20)

ใน *C. reinhardtii* พันธุ์กลาย สายพันธุ์ *hf-9* เป็นสายพันธุ์ที่มีความผิดปกติในการเติมพันธะคู่ของกรดไขมันที่ตำแหน่ง ω -6 ซึ่งพบมากใน MGDG และ DGDG พบว่า มีอัตราการเจริญเติบโตต่ำกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม อีกทั้งอัตราการสังเคราะห์แสงและการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ก็ลดลง นอกจากนี้กิจกรรมของ PSI ต่ำกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม ร้อยละ 37 ส่วนกิจกรรมของ PSII ต่ำกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมร้อยละ 81 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าชนิดของกรดไขมันไม่อมตัวและชนิดของลิปิดมีผลต่อกิจกรรมของ PSI และ PSII (21) ส่วนในพันธุ์กลาย *hf-2* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีความผิดปกติในการสังเคราะห์ SQDG พบว่ามีการเจริญเติบโตช้า มีประสิทธิภาพการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจากน้ำไปยัง Tyrosine Z ลดลง และ กิจกรรมของ PSII ลดลงร้อยละ 40 แต่ไม่มีผลกระทบต่อ การถ่ายทอดอิเล็กตรอนจาก Q_A ไปยัง Q_B เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม ส่วนกิจกรรมของ PSI ลดลงเล็กน้อย (22, 23) เมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมของ PSII ระหว่างสายพันธุ์กลายสายพันธุ์ *hf-9* และ *hf-2* พบว่ากิจกรรมของ

PSII ในพันธุ์กลาย *hf-9* ต่ำกว่า *hf-2* อาจเนื่องมาจากพันธุ์กลาย *hf-9* มีความผิดปกติในการสร้าง MGDG และ DGDG ซึ่งเป็น glycerolipid หลักที่มีปริมาณร้อยละ 50-80 ของลิพิดทั้งหมด ส่วนสายพันธุ์ *hf-2* มีความผิดปกติในการสร้าง SQDG ซึ่งเป็น glycerolipid ที่มีปริมาณร้อยละ 20 ของลิพิดทั้งหมด ถ้า MGDG และ DGDG ซึ่งเป็นลิพิดหลักถูกทำลายหรือมีปริมาณลดลงน่าจะส่งผลกระทบต่อกิจกรรมของ PSI และ PSII มากกว่าการลดลงของ SQDG (24)

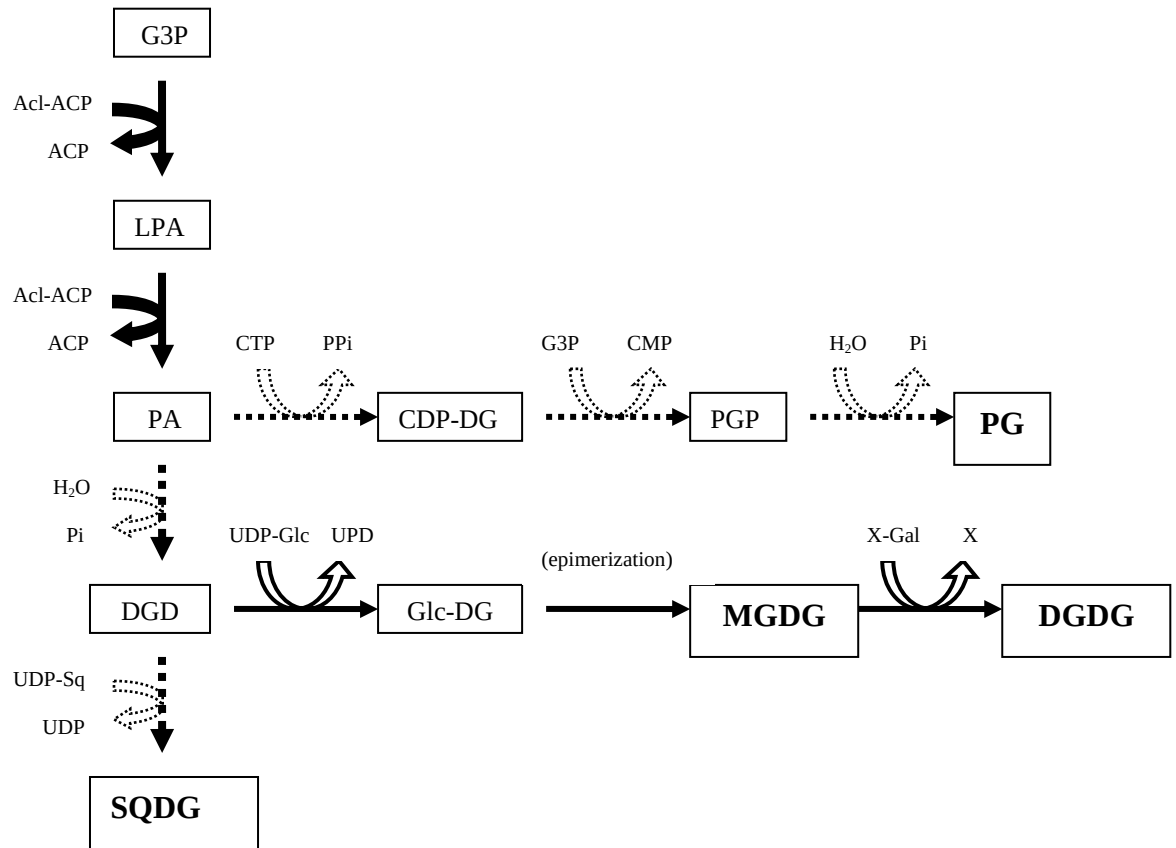
อย่างไรก็ตามพบว่าบทบาทของ SQDG ต่อการสังเคราะห์แสงในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด อาจมีความแตกต่างกัน เช่น ในไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC6803 สายพันธุ์ SD1 เป็นพันธุ์กลายที่ไม่สามารถสังเคราะห์ SQDG พบว่ากิจกรรมการสังเคราะห์แสงและกิจกรรมของ PSII ลดลงแต่ใน *Synechococcus* sp. PCC7942 สายพันธุ์ที่ไม่สังเคราะห์ SQDG พบว่ากิจกรรมของ PSII สามารถทำงานได้ปกติ (25)

PG เป็น phospholipid ที่มีความสัมพันธ์กับโครงสร้างของ Light Harvesting Complex II (LHCII) ซึ่งทำหน้าที่ดักจับพลังงานแสงและถ่ายทอดไปยังศูนย์กลางปฏิกิริยาของ PSII บน thylakoid membrane การศึกษาหน้าที่ของ PG ใน *Synechocystis* sp. PCC6803 พันธุ์กลาย สายพันธุ์ *pgsA* ซึ่งมีความผิดปกติในการสังเคราะห์ PG พบว่ามีการเจริญเติบโตช้าและมีกิจกรรมของ oxygen evolution ลดลงร้อยละ 50 ขณะที่กิจกรรมของ PSI ลดลงร้อยละ 60 เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ปกติ (26) ส่วนการศึกษาสภาวะการขาดฟอสเฟตในใบแดงกวาพบว่าปริมาณ PG ใน thylakoid membrane ลดลงแต่ DGDG และ SQDG เพิ่มขึ้น เมื่อศึกษาประสิทธิภาพของคลอโรฟิลล์ฟลูออเรสเซนซ์และกิจกรรมของ PSII ระหว่างสภาวะปกติและสภาวะการขาดฟอสเฟตพบว่ากิจกรรมของ PSII ไม่แตกต่างกัน อาจเป็นไปได้ว่าใน thylakoid membrane มี PG 2 ชนิด โดย PG บางชนิดมีบทบาทต่อการรักษาโครงสร้างของ thylakoid membrane ส่วนลิพิดชนิดอื่น เช่น SQDG ซึ่งเป็น anionic lipid เหมือน PG จึงทำหน้าที่แทน PG ในสภาวะที่ขาดฟอสเฟต โดย PG ที่พบบริเวณ PSII (LHCII) อาจมีบทบาทสำคัญต่อการรักษาโครงสร้างและหน้าที่ของ PSII ซึ่งลิพิดชนิดอื่นไม่สามารถทำหน้าที่แทนได้ (27) ใน *A. thaliana* พันธุ์กลาย สายพันธุ์ *PGP1* เป็นสายพันธุ์ที่มีความผิดปกติในการสร้าง PGP synthase พบว่าระดับ PG ในใบต่ำกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม ร้อยละ 25 มีการสังเคราะห์แสงลดลงซึ่งทำให้ใบซีด ดังนั้น PG อาจมีบทบาทสำคัญในการพัฒนาคลอโรพลาสต์และกลไกการสังเคราะห์แสงเช่นกัน (28)

4. การสังเคราะห์ลิพิดในไซยาโนแบคทีเรีย

สารตั้งต้นของการสังเคราะห์ลิพิดในไซยาโนแบคทีเรีย คือ phosphatidic acid (PA) โดยเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ phosphatidylglycerol (PG) และ 1,2-diacylglycerol (DAG) โดยที่ DAG เปลี่ยนไปเป็น sulfolipid และ GlcDG ต่อไป Feige และคณะ (29) ได้ศึกษาการสังเคราะห์ลิพิดใน *A. variabilis* พบว่า GlcDG เป็นสารตั้งต้นของ MGDG เช่นเดียวกับการศึกษาของ Sato และ Murata (30) ซึ่งพบว่า GlcDG เปลี่ยนไปเป็น MGDG ได้โดยการเกิด epimerization ของ กลูโคสไปเป็นกาแลกโตส ในขณะที่ DGDG ถูกสร้างขึ้นโดยการเติมกาแลกโตสที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นใหม่ใน MGDG ส่วน SQDG และ PG ถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยตรงจาก PA (รูปที่ 2.4) โดยเอนไซม์ในการสังเคราะห์ glycolipid ในขั้นตอนแรกคือ เอนไซม์ glycerol-3-phosphate acyltransferase

และ 1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase โดยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดใช้ acyl-[acyl carrier protein] (acyl-ACP) เป็นสารตั้งต้น (31)



รูปที่ 2.4 วิธีการสังเคราะห์กลีเซอรอลิพิดในไซยาโนแบคทีเรีย [32]

G3P	= Glycerol-3-phosphate	LPA	= 1-acylglycerol-3-phosphate
PA	= phosphatidic acid	DGD	= 1, 2-diacylglycerol
CDP-DG	= cytidine diphosphate diacylglycerol	PGP	= phosphatidylglycerolphosphate
Acyl	= fatty acid	Sq	= sulfoquinovose
Glc	= glucose	Gal	= galactose
X	= unidentified galactose carrier		

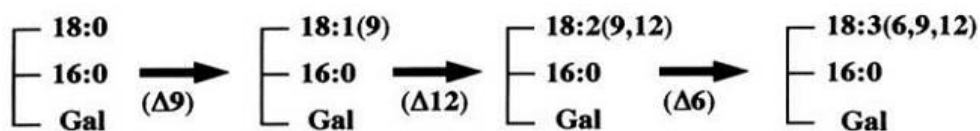
ส่วนการเติมพันธะคู่ใน DGDG จะไม่เกิดขึ้นโดยตรง แต่เกิดขึ้นจากการเติมน้ำตาลกาแลคโตสเข้าไปที่ ลิพิด MGDG ด้วยปฏิกิริยา galactosylation ในการเติมพันธะคู่ของกรดไขมันในแต่ละชั้นลิพิดเกิดขึ้นโดยการทำงานของเอนไซม์ desaturase ชนิดต่างๆ โดยใน MGDG มีเอนไซม์ Δ^{12} , Δ^9 และ Δ^6 -desaturase เติมพันธะคู่ให้กับกรดไขมันที่ตำแหน่งจำเพาะ คือ ตำแหน่ง 12, 9 และ 6 ตามลำดับ ในขณะที่ SQDG และ PG มีเอนไซม์ Δ^{12} และ Δ^9 -desaturase เติมพันธะคู่ให้กับกรดไขมันที่ตำแหน่งจำเพาะ คือ ตำแหน่ง 12 และ 9

ตามลำดับเช่นกัน เอนไซม์ desaturase ที่ทำหน้าที่ในการเติมพันธะคู่ใน *S. platensis* คือ Δ^6 , Δ^9 , และ Δ^{12} -desaturase ซึ่งถอดรหัสมาจากยีน *desC*, *desD*, และ *desA* ตามลำดับ (32)

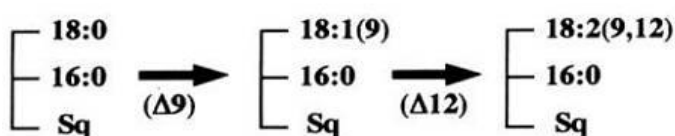
5. กรดไขมันกับชนิดของลิพิดในไซยาโนแบคทีเรีย

ในไซยาโนแบคทีเรีย การสังเคราะห์กรดไขมันเกิดขึ้นในไซโตพลาสซึม มี 2 ขั้นตอน คือ การสังเคราะห์กรดไขมันอิ่มตัว และการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัว โดยกรดไขมันอิ่มตัวถูกสังเคราะห์ขึ้นอยู่ในรูป acyl-acyl carrier protein (acyl-ACP) เกิดร่วมกับปฏิกิริยา elongation ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการเติมคาร์บอน 2 อะตอมเข้าไปในโมเลกุลที่ปลายคาร์บอกซิลของกรดไขมันอิ่มตัว โดยในปฏิกิริยาต้องการ NADPH และ NADH เป็น coenzyme (32) โดยมีการทำงานของเอนไซม์ acetyl-CoA carboxylase ร่วมกับ fatty acid synthase ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือ palmitoyl-ACP (C16:0-ACP) และ steroyl-ACP (C18:0-ACP) กระบวนการเติมพันธะคู่ของกรดไขมันในกลุ่ม C18 เกิดที่ตำแหน่ง sn-1 ของกลีเซอโรลิพิด โดยมี sn-1-18:0/sn-2-16:0 species เป็นสารตั้งต้นหลักในการเติมพันธะคู่ของ molecular species ของ MGDG, SQDG, และ PG (รูปที่ 2.5) ในแต่ละเมมเบรนของไซยาโนแบคทีเรียมีองค์ประกอบของกรดไขมันใน glycerolipid แตกต่างกัน เช่นใน *Synechocystis* sp. PCC 6803 มีองค์ประกอบของกรดไขมันในชั้น MGDG คล้ายกับชั้น DGDG ส่วนชั้น SQDG คล้ายกับชั้น PG ดังตารางที่ 2.3 (33)

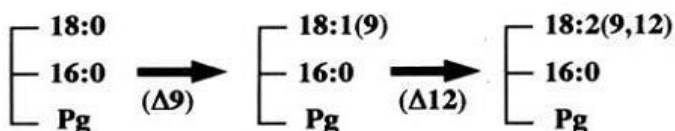
MGDG



SQDG



PG



รูปที่ 2.5 กระบวนการเติมพันธะคู่ของกรดไขมันใน *S. platensis* (32)

Gal = Galactose

Sq = Sulfoquinovosone

Pg = Glycerophosphate

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบของกรดไขมันในแต่ละชั้นของลิพิดจาก plasma และ thylakoid membrane ของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 เจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 34°C

ชนิดเมมเบรน	ชนิดลิพิด	องค์ประกอบของกรดไขมัน (%mol)					
		16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3
Plasma membrane	MGDG	61	3	2	11	12	11
	DGDG	57	4	1	6	13	20
	SQDG	82	1	4	10	3	0
	PG	64	5	8	12	9	1
Thylakoid membrane	MGDG	55	4	t	9	15	17
	DGDG	57	4	1	6	13	20
	SQDG	74	4	2	13	7	t
	PG	63	2	3	12	17	2

บทที่ 2

วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1 จุลินทรีย์และสภาวะการเลี้ยง

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองคือ *Spirulina platensis* สายพันธุ์ Italy หรือ *S. platensis* C1 เป็นสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type, WT) และ *S. platensis* พันธุ์กลาย สายพันธุ์ I22 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ได้จากการทำการกลายพันธุ์ *S. platensis* C1 ด้วยสารเคมี EMS (34) โดยเก็บรักษาเซลล์ในอาหารแข็งสูตรของ Zarrouk (ภาคผนวก ก.) ภายใต้ความเข้มแสง $20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ที่อุณหภูมิ 30°C

2.2 สภาวะที่ใช้เลี้ยงเซลล์เริ่มต้น

การเลี้ยงเซลล์เริ่มจากการเปียเซลล์จากอาหารแข็ง (slant) มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Zarrouk 50 ml ในขวดทดลอง ขนาด 125 ml โดยเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 130 รอบต่อนาที โดยให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ (osram ขนาด 30 วัตต์) ตลอดเวลาที่ความเข้มแสง $50 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นจึงทำการขยายปริมาตรโดยถ่ายเซลล์มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดิมปริมาตร 100 ml ในขวดทดลอง ขนาด 250 ml ที่อุณหภูมิ 35°C และเขย่าด้วยความเร็ว 130 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน ซึ่งเซลล์ *S. platensis* มีการเจริญเติบโตอยู่ในระยะ exponential phase

2.3 การเลี้ยงเซลล์เพื่อการวิเคราะห์

นำเซลล์ที่มีอายุ 4 วัน มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Zarrouk ปริมาตร 1400 ml ในขวดทดลองขนาด 2000 ml บ่มในอ่างน้ำมีการให้แสงโดยหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสง $80 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ 35°C เป็นเวลา 4 วัน

2.4 กิจกรรมการสังเคราะห์แสง

เตรียมเซลล์ที่มีค่าความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์เท่ากับ 2.5 mg Chl/l ปริมาตร 4 มล. ใส่ในอุปกรณ์ท่อแก้ว 2 ชั้นที่ควบคุมอุณหภูมิ (double jacket thermoregulated glass vessel) คงที่ 35°C และทำการวัดกิจกรรมการสังเคราะห์แสงด้วย Clark-type O_2 -electrode โดยให้แสงที่มีความเข้ม $160 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ ด้วย slide projector lamp นำสัญญาณที่อ่านได้จากเครื่องบันทึกมาคำนวณตามสูตร

$$\begin{aligned} \text{O}_2 \text{ evolution} &= \frac{\text{slope} \times A \times 60 \times 1000}{B \times 32 \times C} \\ (\mu\text{molO}_2 \cdot \text{mgChl}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}) & \end{aligned}$$

โดย

slope = slope ของสัญญาณที่อ่านได้จากเครื่องบันทึก (unit/min)

A = ค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำที่อุณหภูมิ 35°C (7.02 mg/l)

B = ค่าความแตกต่างระหว่างค่าความอิ่มตัวของไนโตรเจนและอากาศ (unit)

C = ค่าความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ (mg/l)

2.5 การแยกเมมเบรน (membranes)

ในการวิเคราะห์จะทำการแยกเมมเบรนสองชนิด คือ plasma membrane (PM) และ thylakoid membrane (TM) ออกจากกันโดยใช้วิธี sucrose gradient ที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Murata และ Omata (35)

2.6 การสกัดลิปิด

การสกัดลิปิดจากเซลล์แห้ง, plasma และ thylakoid membrane ตามวิธีของ Sato และ Murata (36) โดยนำตัวอย่างใส่ในหลอดทดลอง เดิมสารละลายคลอโรฟอร์ม/เมทานอล (1:2, ปริมาตร/ปริมาตร) 3.25 μ l และ น้ำกลั่น ปริมาตร 1.25 μ l เขย่าให้เข้ากันแล้ววางตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปเติมคลอโรฟอร์มและน้ำ อย่างละ 227 μ l เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงแยกชั้นที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสซึ่งอยู่ชั้นบนออก นำชั้นล่างมาเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม /น้ำ (1:1, ปริมาตร/ปริมาตร) 454 μ l เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงแยกชั้นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำชั้นล่างสุดมาใส่ในขวด vial ใหม่ แล้วทำให้แห้งภายใต้บรรยากาศก๊าซไนโตรเจน

2.7 การแยกชนิดลิปิด

ในการทดลองจะทำการแยกชนิดลิปิดจาก PM, TM และเซลล์ทั้งหมด โดยใช้ดินสอลากเส้นเบาๆ บนแผ่น silica gel (Merck No. 1.05553 TLC aluminium sheets silica gel 60 without fluorescent, 20x20 ซม.) ให้มีระยะสูงขึ้นมาจากขอบ plate 2 ซม. หยดลิปิดที่สกัดได้จาก 2.4.2. ซึ่งละลายด้วยคลอโรฟอร์ม/เมทานอล (อัตราส่วน 2:1 ปริมาตร/ปริมาตร) ให้เป็นแนวเส้นตรงประมาณ 1 mg ด้วย microsyringe ลงบนรอยดินสอที่ลากไว้ เป่าไล่ความชื้นบนแผ่น silica gel plate แล้วนำไปใส่ในโถ (chamber) ซึ่งมีระบบตัวทำละลายของคลอโรฟอร์ม / เมทานอล / แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (28%) ในอัตราส่วน 13:7:1 (โดยปริมาตร) 100 มล. ทิ้งไว้จนกระทั่งลิปิดบนแผ่น silica gel ถูกตัวทำละลายพาเคลื่อนที่ไปได้เป็นระยะทาง ประมาณ 15 ซม. (ประมาณ 1 ชั่วโมงครึ่ง) จากนั้นนำแผ่น silica gel ออกมาวางทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 30 นาที แล้วสเปรย์ด้วย 0.01% primuline ในอะซิโตน/น้ำ (อัตราส่วน 4:1 ปริมาตร/ปริมาตร) ทิ้งให้แห้งเป็นเวลาประมาณ 20 นาที จากนั้นจึงนำไปตรวจสอบชนิดลิปิดภายใต้แสง UV (312 nm ultraviolet; T350 spectroline Model TVC-312A) โดยใช้ดินสอทำตำแหน่งของลิปิดแต่ละชนิดเอาไว้ นำลิปิดแต่ละชนิดมาสกัด หาปริมาณของลิปิดแต่ละชนิดและวิเคราะห์กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของลิปิดแต่ละชนิด

2.8 การวิเคราะห์กรดไขมัน

ในการทดลองจะทำการวิเคราะห์โดยวิธี direct transmethylation ที่ดัดแปลงจาก Lepage และ Roy (34) โดยนำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ใส่ลงในขวด vial และเติม C17:0 (Heptadecanoic acid : $C_{17}H_{33}COOH$; Sigma Chemical Co.) เพื่อเป็นสารมาตรฐานควบคุมภายใน (internal standard) ในปริมาณร้อยละ 1 (โดยน้ำหนักแห้งของตัวอย่างที่ใช้) เติม 5% HCl ในเมทานอล ปริมาตร 2 มล. บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ $85^{\circ}C$ พร้อมกับกวนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงเจือจางด้วยน้ำ และสกัดกรดไขมันที่อยู่ในรูปของเอสเทอร์ด้วยเฮกเซน (Hexane) ที่มีสาร antioxidant BHT (butylated hydroxytoluene) ร้อยละ 1 (ปริมาตร/ปริมาตร) อย่างละ 1 มล. เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นแยกชั้นเฮกเซนที่อยู่บนสุดกรองผ่านโซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) เพื่อดูดซับน้ำที่ปนเปื้อน และวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันโดยก๊าซโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography, GC) ด้วยเครื่อง GC17A (Shimadzu) ที่มีเครื่องตรวจวัด (detector) แบบ Flame Ionization Detector (FID) ด้วย OmegawaxTM 250 (Supelco, Inc.) ซึ่งเป็นคอลัมน์แบบ fused silica capillary ขนาดยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลางด้านใน (ID) 0.25 มิลลิเมตร และมีความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร โดยใช้อุณหภูมิ คอลัมน์ที่ $205^{\circ}C$ อุณหภูมิ injector ที่ $250^{\circ}C$ และอุณหภูมิเครื่องตรวจวัดที่ $220^{\circ}C$ และอัตราการไหลผ่านคอลัมน์ของก๊าซไนโตรเจนที่ 2 มิลลิลิตรต่อนาที ด้วย split ratio 1:100

บทที่ 3

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 การศึกษาความคงตัวของคุณลักษณะด้านการสังเคราะห์แสงของ *S. platensis* สายพันธุ์กลาย I22 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

S. platensis สายพันธุ์ I22 ถูกทำให้กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี EMS การตรวจสอบถึงความคงตัวของคุณสมบัติเบื้องต้นในด้านการสังเคราะห์แสง พบว่ากิจกรรมการสังเคราะห์แสงของสายพันธุ์กลาย I22 ต่ำกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) ร้อยละ 50 เมื่อพิจารณาถึงกิจกรรมของระบบการสังเคราะห์แสง PSI และ PSII ซึ่งเป็น supramolecular complexes ทำหน้าที่ในการส่งถ่ายอิเล็กตรอนของกระบวนการสังเคราะห์แสง พบว่า กิจกรรมของระบบการสังเคราะห์แสง PSI ของสายพันธุ์กลาย I22 ต่ำกว่า WT ร้อยละ 70 ขณะที่กิจกรรมของระบบการสังเคราะห์แสง PSII สูงกว่า WT ร้อยละ 30 นอกจากนี้ยังมีอัตราการหายใจต่ำกว่า WT ร้อยละ 46 ดังตารางที่ 3.1 แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์กลาย I22 ยังมีความคงตัวในคุณลักษณะด้านการสังเคราะห์แสง และการหายใจ

ตารางที่ 3.1 แสดงคุณสมบัติด้านการสังเคราะห์แสงของ *S. platensis* สายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) และ สายพันธุ์กลาย I22 เมื่อเซลล์เจริญภายใต้ความเข้มแสง $80 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ที่อุณหภูมิ 35°C

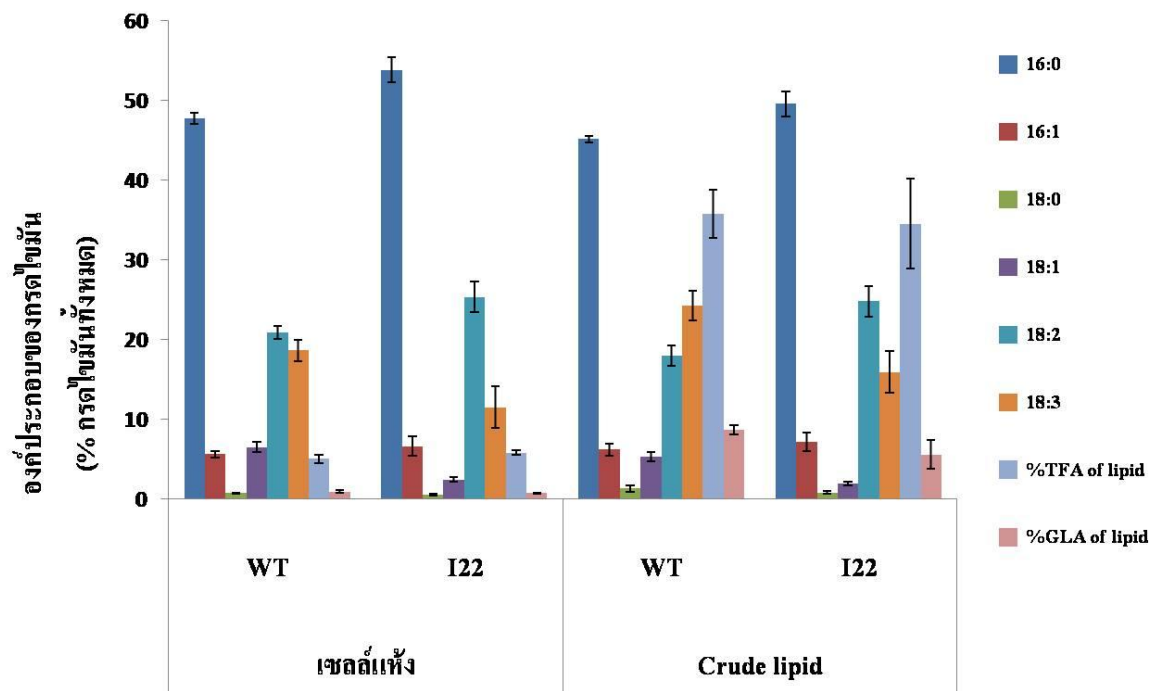
คุณสมบัติของเซลล์	WT	I22
O_2 evolution ($\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mgChl}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$)	580 ± 11	240 ± 8
กิจกรรมของระบบการสังเคราะห์แสงที่ 2 (PSII) ($\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mgChl}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$)	176 ± 3	246 ± 6
กิจกรรมของระบบการสังเคราะห์แสงที่ 1 (PSI) ($\mu\text{mol O}_2 \text{ uptake} \cdot \text{mgChl}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$)	174 ± 3	69 ± 5
Respiration ($\mu\text{mol O}_2 \text{ uptake} \cdot \text{mgChl}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$)	47 ± 4	25 ± 0.6

3.2 การศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันใน *S. platensis* สายพันธุ์กลาย I22 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

กรดไขมันเป็นองค์ประกอบของลิพิด ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า เมื่อองค์ประกอบของลิพิดภายใน membrane มีการเปลี่ยนแปลง จะส่งผลกระทบต่อการทำงานของโปรตีนที่แทรกอยู่ในชั้น membrane ทำให้ประสิทธิภาพการส่งถ่ายอิเล็กตรอนของโปรตีนในกระบวนการสังเคราะห์แสงมีความบกพร่อง จากการศึกษาปริมาณกรดไขมันโดยรวม พบว่า Total Fatty Acids (TFA) ของลิพิดในเซลล์แห้งของสายพันธุ์กลาย I22 สูงกว่า WT ร้อยละ 16 ขณะที่ crude lipids มีปริมาณใกล้เคียงกับสายพันธุ์ดั้งเดิม เมื่อพิจารณาถึงองค์ประกอบของกรดไขมันแต่ละชนิด พบว่าสายพันธุ์กลาย I22 มีสัดส่วนของ C18:2 มากกว่า WT ร้อยละ 20-30 ขณะที่สัดส่วนของ C18:3 ของสายพันธุ์กลาย มีปริมาณต่ำกว่า WT ร้อยละ 40 ดังตารางที่ 3.2 และรูปที่ 3.1 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเติมพันธะคู่ของกรดไขมันที่ตำแหน่ง $\Delta 6$ ของ C18:2 ใน *S. platensis* สายพันธุ์กลาย I22 มีความบกพร่อง ซึ่งส่งผลกระทบต่อองค์ประกอบกรดไขมันภายในเซลล์ แต่รายงานก่อนหน้านี้พบว่ายีนโครงสร้างของยีน *desD* ซึ่ง encode ได้เอนไซม์ $\Delta 6$ -desaturase และระดับการแสดงออกของยีน *desD* คล้ายกับ WT แต่มีอัตราการทำลายของ mRNA ช้ากว่า WT ร้อยละ 2.5 เท่า การที่ระดับการแสดงออกของยีน *desD* ไม่สอดคล้องกับสัดส่วนของ GLA นั้นอาจเป็นไปได้ว่าเกิดความผิดปกติที่ระดับ post-transcription และ/หรือระดับ transcription (37)

ตารางที่ 3.2 องค์ประกอบของกรดไขมันใน *S. platensis* เซลล์แห้งและ crude lipids โดยเปรียบเทียบปริมาณกรดไขมันของ *S. platensis* สายพันธุ์กลาย I22 และ สายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) เมื่อเซลล์มีการเจริญภายใต้ความเข้มแสง $80 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ที่อุณหภูมิ 35°C

องค์ประกอบของกรดไขมัน	เซลล์แห้ง		Crude lipids	
	WT	I22	WT	I22
C16:0	47.7 ± 0.7	53.8 ± 1.6	45.1 ± 0.4	49.5 ± 0.4
C16:1	5.6 ± 0.4	6.6 ± 1.2	6.2 ± 0.8	7.1 ± 0.4
C18:0	0.7 ± 0.03	0.5 ± 0.1	1.3 ± 0.4	0.8 ± 0.06
C18:1	6.5 ± 0.6	2.4 ± 0.3	5.3 ± 0.5	1.9 ± 0.2
C18:2	20.9 ± 0.8	25.3 ± 1.9	18.0 ± 1.2	24.8 ± 1.7
C18:3	18.6 ± 1.3	11.5 ± 2.6	24.2 ± 1.9	15.9 ± 1.1
%TFA of lipid	5.0 ± 0.5	5.8 ± 0.3	35.76 ± 3.0	34.5 ± 5.6
%GLA of lipid	0.9 ± 0.2	0.7 ± 0.07	8.6 ± 0.6	5.6 ± 1.8



รูปที่ 3.1 กราฟแท่งแสดงองค์ประกอบของกรดไขมันแต่ละชนิดใน *S. platensis* สายพันธุ์กลาย I22 และ สายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) ที่พบในเซลล์แห้งและ crude lipid

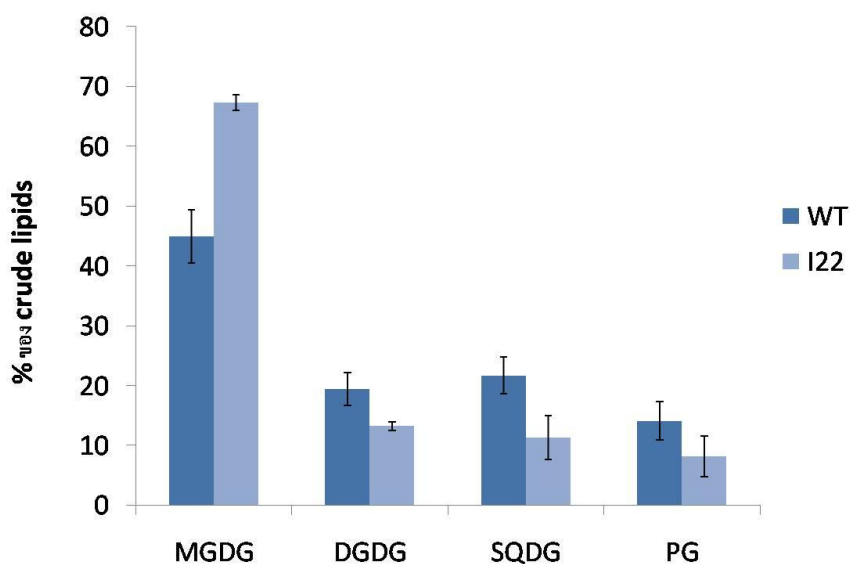
3.3 การศึกษาองค์ประกอบของ glycerolipid ชนิดต่างๆใน *S. platensis* สายพันธุ์กลาย I22 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

การศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในเซลล์ของ *S. platensis* พบว่า จะอยู่ในรูปของ glycerolipids ซึ่งประกอบด้วยลิพิด 4 ชนิดได้แก่ MGDG, DGDG, SQDG และ PG ในการทดลองครั้งนี้พบว่า % mol ของ MGDG ใน *S. platensis* สายพันธุ์กลาย I22 มีปริมาณสูงกว่า WT ร้อยละ 33 ขณะที่ DGDG, SQDG และ PG พบว่า ในสายพันธุ์กลาย มีปริมาณต่ำกว่า WT ร้อยละ 37 47 และ 42 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3.3 และรูปที่ 3.2 อาจเป็นไปได้ว่าปฏิกิริยา galactosylation ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เติมหมู่ น้ำตาล galactose เข้าไปที่ MGDG เพื่อเปลี่ยนเป็น DGDG (32) ในเซลล์ *S. platensis* สายพันธุ์กลาย I22 เกิดความบกพร่อง จึงทำให้ไม่มีการเติมหมู่ น้ำตาลใน MGDG ในทางตรงกันข้าม การที่สายพันธุ์กลาย I22 มีการสะสมของ MGDG เพิ่มขึ้นอาจช่วยส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ ATP synthase เนื่องจาก MGDG เป็นลิพิดที่ช่วยในการสนับสนุนโครงสร้างของ ATP synthase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในสร้างพลังงาน ATP ที่อยู่ในไทลาคอยด์เมมเบรน (38) เพื่อทดแทนพลังงานที่ได้จากการสังเคราะห์แสงที่ไม่เพียงพอต่อความต้องการใช้พลังงานภายในเซลล์ นอกจากนี้ MGDG ยังมีความสำคัญต่อกิจกรรมการทำงานของ PSII เนื่องจากช่วยส่งเสริมการทำงานของ light-harvesting complex II (LHCII) ของ PSII (39) ซึ่งสอดคล้องกับกิจกรรมของ PSII ในสายพันธุ์กลาย I22 ที่มีค่าการเกิดกิจกรรมสูงขึ้น (ตารางที่ 3.1)

จากรายงานก่อนหน้านี้พบว่า *Arabidopsis thaliana* สายพันธุ์กลาย สายพันธุ์ *dgd1* ซึ่งมีการสร้าง DGDG น้อยกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมร้อยละ 90 มีผลทำให้โครงสร้างของ thylakoid membrane ในคลอโรพลาสต์ ยาวขึ้น นอกจากนี้ยังมีผลต่อโครงสร้างของ PSI มากกว่า PSII โดยพบว่า protein ของ Reaction center ใน PSI (PsaA และ PsaB) มีปริมาณลดลงประมาณร้อยละ 50 ขณะที่ protein ของ Reaction center ใน PSII (PsbA) และ light-harvesting proteins ของ PSII มีปริมาณไม่แตกต่างจาก WT (40) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าโครงสร้างของ PSI ในสายพันธุ์กลาย I22 มีความไม่เสถียร จึงส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการส่งถ่ายอิเล็กตรอนใน PSI

ตารางที่ 3.3 องค์ประกอบของ glycerolipid ชนิดต่างๆ ใน *S. platensis* สายพันธุ์กลาย I22 และสายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) เมื่อเซลล์เจริญภายใต้ความเข้มแสง $80 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ที่อุณหภูมิ 35°C

ชนิดของลิปิด	% mol	
	WT	I22
MGDG	44.9 ± 4.4	67.3 ± 1.3
DGDG	19.4 ± 2.8	13.2 ± 0.6
SQDG	21.6 ± 3.0	11.1 ± 3.6
PG	14.1 ± 3.2	8.2 ± 3.4



รูปที่ 3.2 กราฟแท่งแสดงองค์ประกอบของ glycerolipid ชนิดต่างๆ ใน *S. platensis* สายพันธุ์กลาย I22 และสายพันธุ์ดั้งเดิม (WT)

3.4 การศึกษาการกระจายตัวของกรดไขมันแต่ละชนิดใน glycerolipid ของ *S. platensis* พันธุ์กลาย I22 และ สายพันธุ์ดั้งเดิม (WT)

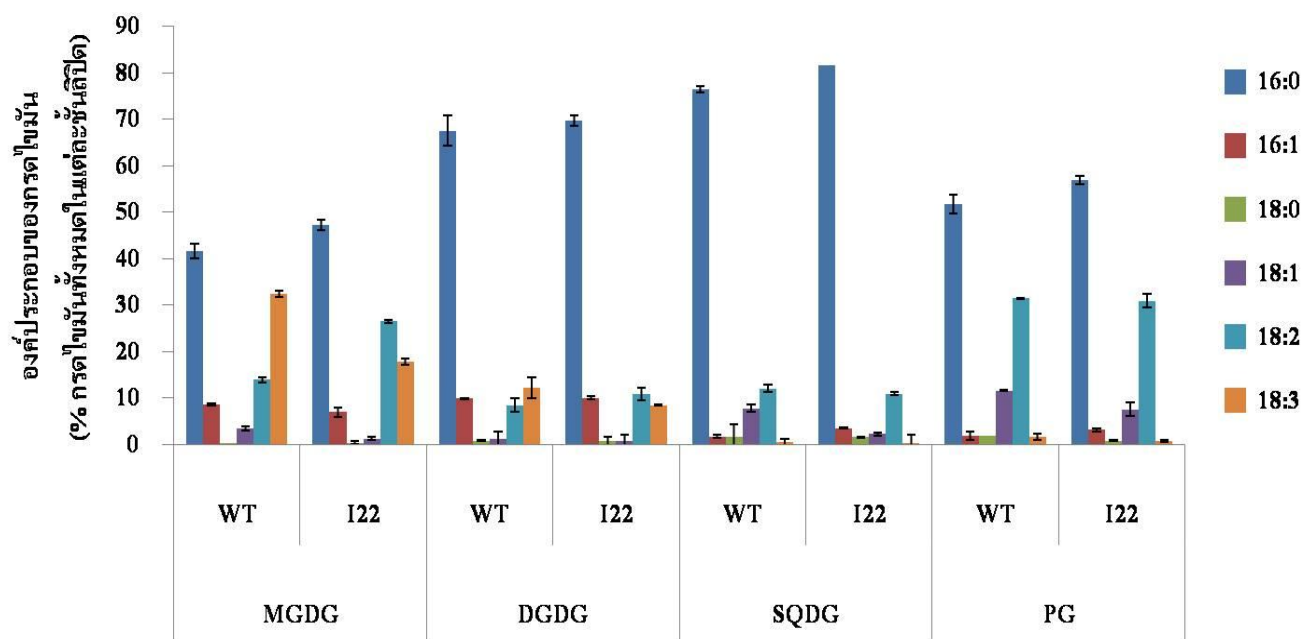
องค์ประกอบของลิพิดแต่ละชนิดในไซยาโนแบคทีเรีย *S. platensis* C1 จะมีกรดไขมันเป็นองค์ประกอบ โดยเฉพาะ MGDG และ DGDG พบว่า มีสัดส่วนของกรดไขมัน C18:3 หรือ GLA เป็นองค์ประกอบหลัก (41) จากการศึกษาชนิดและปริมาณของกรดไขมันใน *S. platensis* C1 พบว่าสายพันธุ์กลาย I22 และ WT มีกรดไขมัน C16:0 เป็นองค์ประกอบหลักของทุกชนิดของลิพิด ในขณะที่กรดไขมัน C18:3 จะพบมากในลิพิดชนิด MGDG และ DGDG ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณของกรดไขมันทั้งหมดภายในเซลล์คือกรดไขมัน C18:3 ของสายพันธุ์กลาย I22 จะต่ำกว่า WT เมื่อพิจารณาถึงสัดส่วนของ C18:3 ในชั้น MGDG และ DGDG พบว่า ในสายพันธุ์กลาย จะมีสัดส่วนที่ต่ำกว่า WT ประมาณร้อยละ 45 และ 30 ตามลำดับ ส่วนในลิพิดชนิด SQDG และ PG ของทั้งสายพันธุ์กลาย I22 และ WT พบว่ามี C18:3 ในสัดส่วนที่ต่ำกว่าชั้น MGDG และ DGDG ในขณะที่กรดไขมัน C18:2 ส่วนใหญ่สะสมในลิพิด SQDG และ PG ซึ่งทั้งสายพันธุ์กลาย I22 และ WT พบว่ามีสัดส่วนปริมาณของกรดไขมัน C18:2 ใกล้เคียงกัน คือประมาณร้อยละ 10-30 ดังแสดงในตารางที่ 3.4 และรูปที่ 3.3

จะเห็นได้ว่า ในขณะที่กรดไขมัน C18:3 มีสัดส่วนที่ลดลงในพันธุ์กลาย I22 แต่เมื่อพิจารณาถึง % mol ของลิพิด MGDG พบว่า มีสัดส่วนที่สูงกว่าปริมาณลิพิดที่พบใน WT ดังนั้น การศึกษาในขั้นต่อไป จะพิจารณาถึงองค์ประกอบของกรดไขมันในแต่ละชั้นของเมมเบรน เนื่องจาก Membrane แต่ละชนิดมีองค์ประกอบของลิพิด ในสัดส่วนที่แตกต่างกัน เช่น *Anacystis nidulans* มีลิพิดเป็นองค์ประกอบใน plasma และ thylakoid membrane ร้อยละ 57 และ 15 ของน้ำหนักแห้งของ membrane ตามลำดับ (16) ดังนั้น ถ้าสัดส่วนของกรดไขมันเปลี่ยนแปลงอาจส่งผลถึงการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณของลิพิด ซึ่งส่งผลต่อเนื่องถึงโครงสร้างของภายในของ membrane แต่ละชนิดได้

ตารางที่ 3.4 ปริมาณของกรดไขมันองค์ประกอบใน glycerolipid แต่ละชนิดของ *S. platensis* สายพันธุ์กลาย I22 และ สายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) เมื่อเซลล์เจริญภายใต้ความเข้มแสง $80 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ที่อุณหภูมิ 35°C

ชนิดของกรดไขมัน องค์ประกอบในลิพิด แต่ละชนิด	MGDG		DGDG		SQDG		PG	
	WT	I22	WT	I22	WT	I22	WT	I22
C16:0	41.6	47.3	67.5	69.7	76.4	81.6	51.7	56.9
C16:1	8.6	6.9	9.8	10.0	1.7	3.5	1.9	3.1
C18:0	0.2	0.3	0.8	0.7	1.7	1.5	1.8	0.8
C18:1	3.4	1.2	1.3	0.6	7.7	2.2	11.6	7.5
C18:2	13.9	26.5	8.4	10.8	12.0	10.9	31.4	30.9
C18:3	32.4	17.8	12.1	8.4	0.4	0.28	1.6	0.7

*ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน $\pm 5\%$



รูปที่ 3.3 กราฟแท่งแสดงชนิดและปริมาณของกรดไขมันองค์ประกอบใน glycerolipid แต่ละชนิดของ *S. platensis* สายพันธุ์กลาย I22 และ สายพันธุ์ดั้งเดิม (WT)

3.5 การศึกษาชนิดและปริมาณของกรดไขมันองค์ประกอบใน plasma และ thylakoid membrane

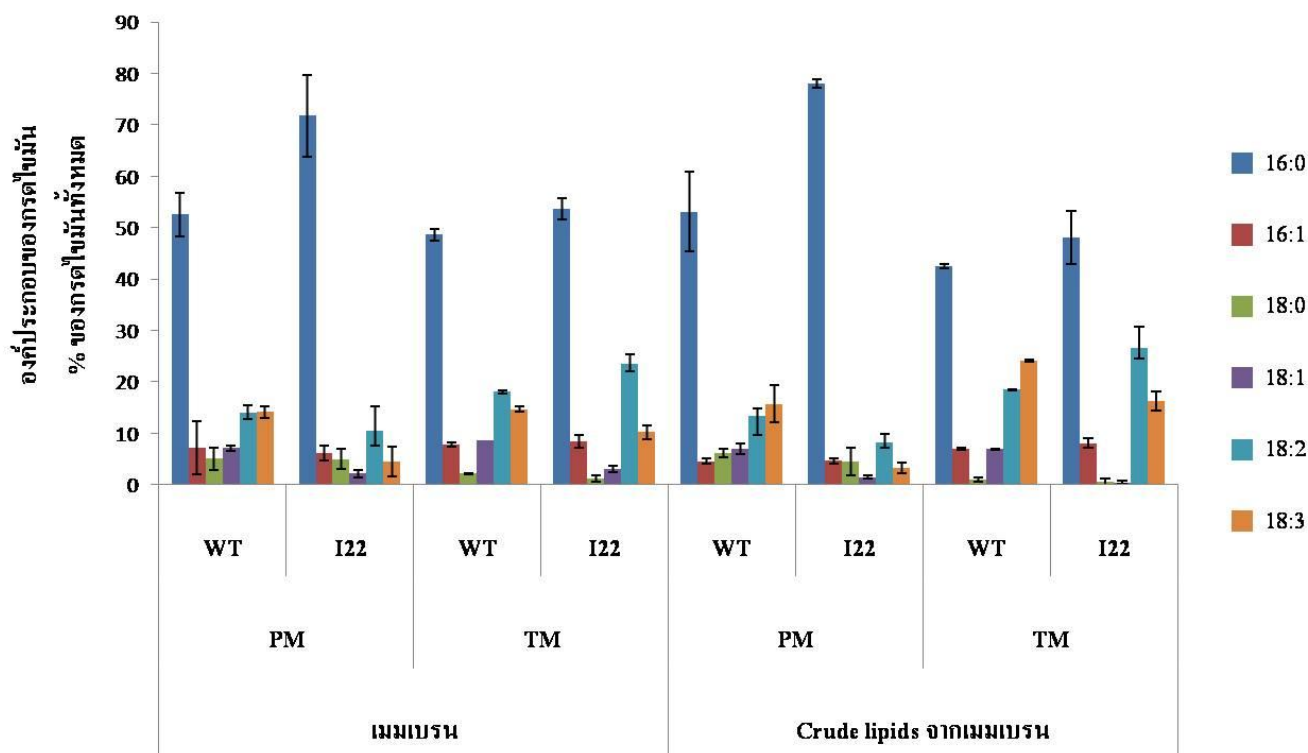
จากการศึกษากรดไขมันองค์ประกอบของ membrane ทั้งสองชนิดใน *S. platensis* C1 พบว่าทั้งใน plasma และ thylakoid membrane ของสายพันธุ์กลาย I22 มีสัดส่วนของกรดไขมัน C16:0 ซึ่งเป็นองค์ประกอบของกรดไขมันส่วนใหญ่สูงกว่า WT ประมาณร้อยละ 30 และ 10 ตามลำดับ ขณะที่กรดไขมัน C16:1 มีสัดส่วนที่ใกล้เคียงกัน สัดส่วนของกรดไขมันในกลุ่ม C18 ใน plasma membrane พบว่า มีสัดส่วนของกรดไขมัน C18:2 และกรดไขมัน C18:3 ต่ำกว่า WT ประมาณร้อยละ 25-35 และร้อยละ 70-80 ตามลำดับ ส่วนใน thylakoid membrane พบว่า กรดไขมัน C18:2 ในสายพันธุ์กลาย I22 มีสัดส่วนสูงกว่า WT ประมาณร้อยละ 25-30 แต่กรดไขมัน C18:3 มีสัดส่วนที่ต่ำกว่า WT ประมาณร้อยละ 30

จากการเปรียบเทียบสัดส่วนของกรดไขมัน ระหว่าง plasma และ thylakoid membrane พบว่าการเปลี่ยนแปลงกรดไขมันองค์ประกอบใน thylakoid membrane สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของกรดไขมันองค์ประกอบของจากเซลล์แห้งและ crude lipids แสดงให้เห็นว่า สัดส่วนและปริมาณของกรดไขมันใน thylakoid membrane ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสัดส่วนและปริมาณของกรดไขมันทั้งเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานไว้ใน thylakoid membrane ของไซยาโนแบคทีเรียมีลิดเป็นองค์ประกอบอยู่ประมาณร้อยละ 90 ของลิดทั้งหมด (16) ดังแสดงในตารางที่ 3.5 และรูปที่ 3.4 ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนและปริมาณของกรดไขมันที่เกิดขึ้น จึงส่งผลกระทบต่อโดยตรงต่อชนิดและปริมาณของลิดใน thylakoid membrane ซึ่งมีผลต่อเนื่องถึงหน้าที่ของโปรตีนใน thylakoid membrane

ตารางที่ 3.5 กรดไขมันองค์ประกอบของลิดแต่ละชนิดใน plasma membrane (PM) และ thylakoid membrane (TM) จากเมมเบรนและ crude lipids ของเมมเบรนใน *S. platensis* สายพันธุ์กลาย I22 และ สายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) เมื่อเซลล์เจริญภายใต้ความเข้มแสง $80 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ที่อุณหภูมิ 35°C

กรดไขมัน องค์ประกอบ (% กรดไขมัน ทั้งหมด)	เมมเบรน				Crude lipids			
	Plasma membrane		Thylakoid membrane		Plasma membrane		Thylakoid membrane	
	WT	I22	WT	I22	WT	I22	WT	I22
16:0	52.5	71.8	48.7	53.6	53.1	78.0	42.6	48.1
16:1	7.2	6.1	7.7	8.4	4.5	4.7	7.0	8.1
18:0	5.1	5.0	2.2	1.3	6.2	4.5	1.0	0.6
18:1	7.1	2.2	8.6	3.0	7.0	1.4	6.9	0.4
18:2	14.0	10.4	18.2	23.5	13.5	8.2	18.5	26.5
18:3	14.1	4.6	14.6	10.2	15.8	3.3	24.1	16.3

*ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน $\pm 10\%$



รูปที่ 3.4 กราฟแท่งแสดงกรดไขมันองค์ประกอบใน plasma และ thylakoid membrane จากเมมเบรน และ crude lipids ของเมมเบรนใน *S. platensis* สายพันธุ์กลาย I22 และ สายพันธุ์ดั้งเดิม (WT)

3.6 การศึกษาการกระจายตัวของกรดไขมันใน glycerolipid แต่ละชนิดภายใน plasma membrane ของ *S. platensis* พันธุ์กลาย I22 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (WT)

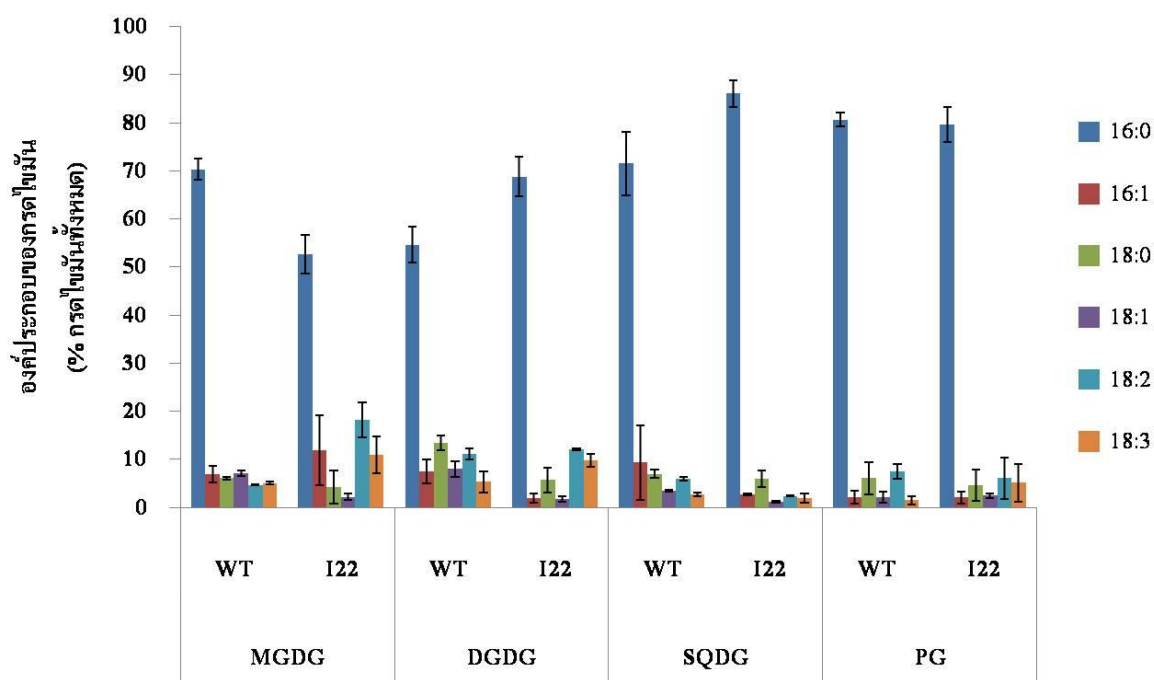
จากการศึกษาการกระจายตัวของกรดไขมันใน glycerolipid แต่ละชนิดภายใน plasma membrane ของ *S. platensis* C1 แม้ว่าการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณของกรดไขมันจะไม่เป็นแบบเดียวกับการเปลี่ยนแปลงใน thylakoid membrane ของเซลล์ แต่การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น พบว่าในชั้น MGDG ของสายพันธุ์กลาย I22 มีสัดส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงกว่า WT (C16:1, C18:2 และ C18:3) ร้อยละ 50, 75 และ 50 ตามลำดับ ในขณะที่สัดส่วนของกรดไขมันอิ่มตัว (C16:0 และ C18:0) มีปริมาณต่ำกว่า WT ร้อยละ 25 และ 30 ตามลำดับ ในชั้นลิพิด DGDG และ PG มีสัดส่วนของ C18:3 สูงกว่า WT ร้อยละ 50 และ 70 ตามลำดับ แต่มีสัดส่วนของ C18:2 ใกล้เคียงกัน เมื่อพิจารณาที่ชั้น SQDG พบว่า กลุ่มของกรดไขมัน C18 ในสายพันธุ์กลาย I22 มีปริมาณที่ต่ำกว่า WT ทั้งกลุ่ม แต่มีกรดไขมัน C16:0 มากกว่า WT ร้อยละ 17 ดังแสดงในตารางที่ 3.6 และรูปที่ 3.5 จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าโปรตีนองค์ประกอบในระบบการสังเคราะห์แสงที่ 2 และ ระบบการสังเคราะห์แสงที่ 1 (PSII และ PSI) ของ thylakoid membrane เช่น โปรตีน D1, D2, PsaA, PsaB และ MSP สามารถพบใน plasma membrane (42) ซึ่งโปรตีนหน่วยย่อยเหล่านี้ จะช่วยส่งเสริมการทำงานของ PSII และ PSI ใน thylakoid membrane นอกจากนี้ใน plasma membrane ยังมีโปรตีนชนิดอื่นๆ เช่น Nitrate-binding protein (NrtA) เป็น

โปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งในเตรทหรือในไตรท์ระหว่างเซลล์ ซึ่งจะเชื่อมกับ lipoprotein ของ membrane และ CtpA เป็นเอนไซม์ที่ช่วยหลีกเลี่ยงการเกิด water-oxidizing ใน PSII เป็นต้น แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของกรดไขมันในแต่ละชนิดของลิพิดใน plasma membrane ในสายพันธุ์กลาย I22 อาจส่งผลกระทบต่อกิจกรรมต่างๆและปฏิกิริยาการสังเคราะห์แสงภายในเซลล์ (43) ด้วยเช่นกัน

ตารางที่ 3.6 กรดไขมันองค์ประกอบใน glycerolipids ของ plasma membrane (PM) ใน *S. platensis* สายพันธุ์กลาย I22 และ สายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) เมื่อเซลล์เจริญภายใต้ความเข้มแสง $80 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ที่อุณหภูมิ 35°C

องค์ประกอบของ กรดไขมัน (%กรดไขมันทั้งหมด)	ชนิดของลิพิดใน plasma membrane							
	MGDG		DGDG		SQDG		PG	
	WT	I22	WT	I22	WT	I22	WT	I22
16:0	70.31	52.67	54.65	68.77	71.56	86.07	80.68	79.67
16:1	6.94	11.89	7.54	1.91	9.32	2.62	2.11	2.05
18:0	6.05	4.20	13.42	5.70	6.95	5.93	6.11	4.60
18:1	7.07	2.19	7.97	1.69	3.48	1.15	2.09	2.46
18:2	4.63	18.16	11.11	12.09	5.97	2.37	7.50	6.08
18:3	5.00	10.90	5.30	9.84	2.72	1.86	1.52	5.13

*ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน $\pm 5\%$



รูปที่ 3.5 กราฟแท่งแสดงกรดไขมันองค์ประกอบใน glycerolipid แต่ละชนิดของ plasma membrane ใน *S. platensis* สายพันธุ์กลาย I22 และ สายพันธุ์ดั้งเดิม (WT)

3.7 การศึกษาการกระจายตัวของกรดไขมันใน glycerolipid แต่ละชนิดของ thylakoid membrane ใน *S.*

platensis สายพันธุ์กลาย I22 และ สายพันธุ์ดั้งเดิม (WT)

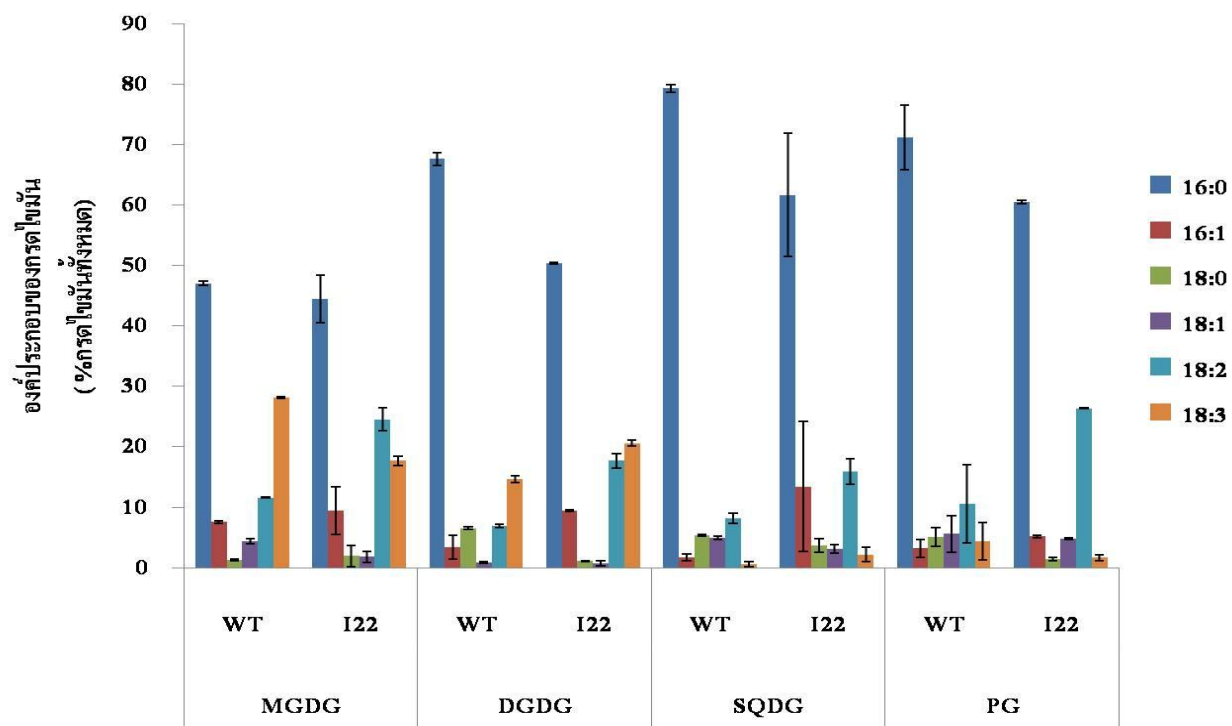
Thylakoid membrane ของไซยาโนแบคทีเรียทำหน้าที่เป็นแหล่งกำเนิดปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แสงและการส่งถ่ายอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจ ซึ่งในสภาวะปกติสัดส่วนขององค์ประกอบของกรดไขมันในชั้น MGDG จะคล้ายกับ DGDG และ SQDG จะคล้ายกับ PG ทั้งใน plasma และ thylakoid membrane (33) จากการศึกษาการกระจายตัวของกรดไขมันใน glycerolipid แต่ละชนิดใน thylakoid membrane ของ *S. platensis* C1 สายพันธุ์กลาย I22 พบว่าสัดส่วนของกรดไขมัน C16:0 ในทุกชนิดของลิพิด มีปริมาณต่ำกว่า WT และ สัดส่วนของกรดไขมัน C18:3 ในชั้น MGDG และ PG ต่ำกว่า WT ร้อยละ 37 และ 61 ตามลำดับ

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสัดส่วนของกรดไขมัน C18:3 จากเซลล์แห้ง, crude lipids และจากเมมเบรนแปรผันตามสัดส่วนของกรดไขมัน C18:3 จากชั้น MGDG ภายใน thylakoid membrane ดังแสดงในตารางที่ 3.7 และรูปที่ 3.6 เนื่องจาก MGDG เป็น glycerolipid ที่พบมากที่สุดภายใน thylakoid membrane (14) ในขณะที่ปริมาณของกรดไขมัน C18:3 ในชั้น DGDG และ SQDG ของสายพันธุ์กลาย I22 พบว่า มีปริมาณสูงกว่า WT ร้อยละ 28 และ 72 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาถึงสัดส่วนของกรดไขมัน C18:2 พบว่า ในลิพิดทุกชนิดของสายพันธุ์กลาย I22 จะมีสัดส่วนที่สูงกว่า WT ประมาณร้อยละ 50-60 การเพิ่มขึ้นของกรดไขมัน C18:2 และการลดลงของกรดไขมัน C18:3 ในสายพันธุ์กลาย I22 จะมีผลต่อ fluidity ใน thylakoid membrane ซึ่งจะส่งผลต่อการส่งถ่ายอิเล็กตรอนจาก PSII ยัง PSI (44) นอกจากนี้การลดลงของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในชั้น MGDG ยังส่งผลกระทบต่อ การรับส่งอิเล็กตรอนของ plastoquinone ในระบบการสังเคราะห์แสงด้วย (45)

ตารางที่ 3.7 องค์ประกอบของกรดไขมันใน glycerolipids ของ thylakoid membrane (TM) ใน *S. platensis* พันธุ์กลาย I22 และ สายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) เมื่อเซลล์เจริญภายใต้ความเข้มแสง $80 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ที่อุณหภูมิ 35°C

กรดไขมัน องค์ประกอบในลิพิด แต่ละชนิด (% กรดไขมันทั้งหมด)	ชนิดของลิพิดใน thylakoid membrane							
	MGDG		DGDG		SQDG		PG	
	WT	I22	WT	I22	WT	I22	WT	I22
16:0	47.0	44.5	67.6	50.4	79.3	61.7	71.2	60.6
16:1	7.6	9.5	3.3	9.5	1.7	13.5	3.2	5.2
18:0	1.2	2.0	6.5	1.1	5.4	3.7	5.1	1.4
18:1	4.3	1.8	0.9	0.7	4.9	3.1	5.6	4.8
18:2	11.6	24.5	7.0	17.7	8.2	15.9	10.6	26.4
18:3	28.2	17.7	14.7	20.6	0.6	2.2	4.4	1.7

*ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน $\pm 5\%$



รูปที่ 3.6 กราฟแท่งแสดงกรดไขมันองค์ประกอบใน glycerolipid แต่ละชนิดของ thylakoid membrane ใน *S. platensis* สายพันธุ์กลาย I22 และ สายพันธุ์ดั้งเดิม (WT)

บทที่ 4

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

4.1 สรุปผลการทดลอง

การศึกษากิจกรรมการสังเคราะห์แสงและอัตราการหายใจของ *S. platensis* สายพันธุ์กลาย I22 พบว่า มีกิจกรรมเกิดขึ้นต่ำกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมร้อยละ 50 และมีความผิดปกติในการผลิต γ -linolenic acid การศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณของลิพิดและกรดไขมันองค์ประกอบในลิพิดแต่ละชนิด ทั้งใน intact cell และในแต่ละเมมเบรน แสดงให้เห็นว่า

1. กรดไขมันทั้งหมดในเซลล์แห้งและ crude lipid ของ *S. platensis* สายพันธุ์กลาย I22 มีสัดส่วนใกล้เคียงกัน ขณะที่กรดไขมันองค์ประกอบโดยเฉพาะกรดไขมัน C18:3 ในสายพันธุ์กลายมีปริมาณต่ำกว่า WT ร้อยละ 50
2. % mol ของ MGDG ในสายพันธุ์กลาย I22 สูงกว่า WT ร้อยละ 33 ขณะที่ DGDG, SQDG และ PG ต่ำกว่า WT ร้อยละ 37 47 และ 42 ตามลำดับ
3. กรดไขมันองค์ประกอบในลิพิดชนิด MGDG และ DGDG มีสัดส่วนที่คล้ายกับกรดไขมันองค์ประกอบของทั้งเซลล์ โดยใน *S. platensis* สายพันธุ์กลาย I22 ลิพิดชนิด MGDG และ DGDG มีสัดส่วนของกรดไขมัน C18:3 ต่ำกว่า WT ประมาณร้อยละ 45 และ 30 ตามลำดับ ในขณะที่กรดไขมัน C18:2 ส่วนใหญ่มีการสะสมในชั้น SQDG และ PG ซึ่งทั้งในสายพันธุ์กลาย I22 และ WT มีสัดส่วนของกรดไขมัน C18:2 ที่ใกล้เคียงกัน คือประมาณร้อยละ 10-30 (ตารางที่ 3.4)
4. ใน plasma membrane มีกรดไขมัน C18:2 ต่ำกว่า WT ประมาณร้อยละ 25-35 และกรดไขมัน C18:3 ต่ำกว่า WT ประมาณร้อยละ 70-80 ส่วนใน thylakoid membrane พบสัดส่วนของกรดไขมัน C18:2 สูงกว่า WT ประมาณร้อยละ 25-30 แต่กรดไขมัน C18:3 มีสัดส่วนต่ำกว่า WT ประมาณร้อยละ 30 (ตารางที่ 3.5)
5. การกระจายตัวของกรดไขมันองค์ประกอบใน glycerolipids แต่ละชนิดใน plasma membrane ของสายพันธุ์กลาย I22 ในชั้น MGDG, DGDG และ PG พบว่ามีสัดส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัวโดยเฉพาะ C18:3 สูงกว่า WT ร้อยละ 50, 50 และ 70 ตามลำดับ ขณะที่ชั้น SQDG มีสัดส่วนของกรดไขมัน C18:3 ต่ำกว่า WT ร้อยละ 30 (ตารางที่ 3.6)
6. การกระจายตัวของกรดไขมันองค์ประกอบใน glycerolipids แต่ละชนิดใน thylakoid membrane ของสายพันธุ์กลาย I22 มีสัดส่วนของกรดไขมัน C18:3 ในลิพิดชนิด MGDG และ PG ต่ำกว่า WT ร้อยละ 37

และ 61 ตามลำดับ ขณะที่ลิพิดชนิด DGDG และ SQDG พบว่า ปริมาณกรดไขมัน C18:3 มีสัดส่วนสูงกว่า WT ร้อยละ 28 และ 72 ตามลำดับ (ตารางที่ 3.6)

4.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า มีการเปลี่ยนแปลงทั้งชนิดของลิพิดและกรดไขมัน ซึ่งเป็น องค์ประกอบของลิพิดใน membrane แต่ละชนิดใน *S. platensis* สายพันธุ์กลาย I22 โดยเฉพาะใน thylakoid membrane ซึ่งมี MGDG เป็น glycerolipid หลัก ถึงแม้ว่า การสร้าง MGDG ใน thylakoid membrane ของสายพันธุ์กลาย จะมากขึ้นแต่สัดส่วนของกรดไขมัน โดยเฉพาะ C18:3 ที่พบมากในชั้น MGDG กลับสร้างได้ต่ำกว่า WT ทำให้มีผลต่อ fluidity ของเมมเบรน ซึ่งเป็นไปได้ว่า จะส่งผลกระทบต่อเนื่องถึงการรับ-ส่งอิเล็กตรอนของโปรตีนในกระบวนการสังเคราะห์แสงที่แทรกอยู่ภายในเมมเบรน ถ้าเราทราบถึง การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ลิพิด อาจทำให้เข้าใจถึงกลไกการสร้างลิพิดในพันธุ์กลาย I22 ได้ดียิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. Cohen, Z. (1997) The chemicals of *Spirulina*, in *Spirulina platensis (Arthrospira)*, *Physiology, Cell Biology and Biotechnology* (A. V., Ed.), pp 175-203., Taylor & Francis Ltd, Great Britain.
2. Tanticharoen, M., Reungjitchachawali, M., Boonag, B., Vonktaveesuk, P., Vonshak, A., and Cohen, Z. (1994) Optimization of γ -linolenic acid (GLA) production in *Spirulina platensis*, *Journal of Applied Phycology* 6, 295-300.
3. Cohen, Z., Tanticharoen, M., Reungjitchachawali, M., Siangdung, W., and Heimer, Y. M. (1993) Herbicide - resistant lines of microalgae growth and fatty acid composition, *Phytochemistry*, 34, 973-978.
4. รัตนา ชัยกล้าหาญ , (2541) การกลายพันธุ์และคัดเลือกสายกร่ายเกลียวทอง (*Spirulina platensis*), สายเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, หน้า 125
5. Ruengjitchatchawalya, M., Chirasuwan, N., Chaiklahan, R., and Bunnag, B. (2002) Photosynthetic characterization of a mutant of *Spirulina platensis*, *Journal of Applied Phycology*, 14, 71-76.
6. Ruengjitchatchawalya, M., Kovacs, L., Mapaisansup, T., and Gombos, Z. (2005) Higher plant-like fluorescence induction and thermoluminescence characteristics in cyanobacterium, *Spirulina* mutant defective in PQH₂ oxidation by cyt *b₆f* complex, *Journal of plant physiology*, 162, 1123-1132.
7. Gantt, E. (1994) Supramolecular membrane organization, in *The Molecular Biology of Cyanobacteria* (Bryant, D. A., Ed.), pp 119-138 Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
8. Trainor, F. R. (1978) Cyanophyceae: Blue-green algae, in *In Introductory Phycology* (Trainor, F. R., Ed.), pp 9-15 John Wiley & Sons, New York.
9. Govindjee. (1982) Photosynthesis, in *In energy conversion by plants and bacteria* (Govindjee, Ed.), p 139, Academic Press, New York.
10. Boweyer, J. R., and Leegood, R. C. (1997) Photosynthesis, in *In Plant Biochemistry* (Dey, P. M., and Harborne, J. B., Eds.), pp 49-80, Academic Press, San Diego.
11. Mohanty, P., Srivastava, M., and Krishina, K. B. (1997) The photosynthetic apparatus of *Spirulina*: electron transport and energy transfer, in *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-biology and Biotechnology* (A. Vonshak, Ed.), pp 17-42, Taylor and Francis, London.

12. Waditee, R., Hossain, G. S., and Tanaka, Y. (2004) Isolation and Functional Characterization of $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ Antiporters from Cyanobacteria, *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 4330-4338.
13. Douce, R., and Joyard, J. (1996) Biosynthesis of thylakoid membrane lipids, in *Advances in photosynthesis/ oxygenic photosynthesis: the light reactions* (Ort, D. R., and Yocum, C. F., Eds.), Kluwer Academic, Dordrecht.
14. Murata, N., and Nishida, I. (1987) Lipids of blue-green algae (cyanobacteria), in *The biochemistry of plants* (Stumpf, P., Ed.), pp 315-347, Academic press, San diego.
15. Wada, H., Gombos, Z., and Murata, N. (1994) Contribution of membrane-lipids to the ability of the photosynthetic machinery to tolerate temperature stress, *Proceeding of the National Academy of Science*, 91, 4273-4277.
16. Murata, N., Sato, N., Omata, T., and Kuwabara, T. (1981) Separation and characterization of thylakoid and cell envelope of the blue-green alga (cyanobacterium) *Anacystis nidulans*, *Plant Cell Physiology*, 22, 855-866.
17. Jordan, P., Fromme, P., Witt, H. T., Klukas, O., Saenger, W., and Krauss, N. (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution, *Nature*, 411, 909-917.
18. Stroebel, D., Choquet, Y., Popot, J. L., and Picot, D. (Nature) An atypical haem in the cytochrome *b₆f* complex, *Nature*, 426, 413-418.
19. Hartel, H., Lokstein, H., Dormann, P., Crimm, B., and Benning, C. (1997) Changes in the composition of the photosynthetic apparatus in the galactolipid-deficient *dgd1*- mutant of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiology*, 115, 1175-1184.
20. Guo, J., Zhang, Z., Bi, Y., and Yanga, W. (2005) Decreased stability of photosystem I in *dgd1* mutant of *Arabidopsis thaliana*, *FEBS Letters*, 579, 3619-3624.
21. Sato, N., Sonoike, K., Tsuzuki, M., and Kawaguchi, A. (1996) Photosynthetic characteristics of a mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* impaired in fatty acid desaturation in chloroplasts, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1274, 112-118.
22. Minoda, A., Sato, N., Nozaki, H., Okada, K., Takahashi, H., Sonoike, K., and Tsuzuki, M. (2002) Role of sulfoquinovosyl diacylglycerol for the maintenance of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*, *European Journal of Biochemistry*, 269, 2353-2358.
23. Minoda, A., Sonoike, K., Okada, K., Sato, N., and Tsuzuki, M. (2003) Decrease in the efficiency of the electron donation to tyrosine Z of photosystem II in an SQDG-deficient mutant of *Chlamydomonas*, *FEBS Letters*, 553, 109-112.

24. Sato, N., Sonoike, K., Tsuzuki, M., and Kawaguchi, A. (1995) Impaired photosystem II in a mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* defective in sulfoquinovosyl diacylglycerol, *European Journal of Biochemistry*, *234*, 16-23.
25. Aoki, M., Sato, N., Meguro, A., and Tsuzuki, M. (2004) Differing involvement of sulfoquinovosyl diacylglycerol in photosystem II in two species of unicellular cyanobacteria, *European Journal of Biochemistry*, *271*, 685–693.
26. Domonkos, I., Malec, P., Sallai, A., Kovács, L., and Itoh, K. (2004) Phosphatidylglycerol is essential for oligomerization of photosystem I reaction center, *Plant Physiology*, *134*, 1471-1478.
27. Yang, W., Liu, S., Feng, F., Hou, H., Jiang, G., Xu, Y., and Kuang, T. (2004) Effects of phosphate deficiency on the lipid composition in cucumber thylakoid membranes and PSII particles., *Plant Science*, *166*, 1575-1579.
28. Xu, C., Hartel, H., Wada, H., Hagio, M., Yu, B., Eakin, C., and Benning, C. (2002) The *pgp1* mutant locus of *Arabidopsis* encodes a phosphatidylglycerolphosphate synthase with impaired activity, *Plant Physiology*, *129*, 594-604.
29. Feige, G. B., Heinz, E., Wrage, K., Cochems, N., and Ponzelar, E. (1980) Biogenesis and function of plant lipids, pp 135-140, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
30. Sato, N., and Murata, N. (1982) Lipid biosynthesis in the blue-green alga (cyanobacterium) *Anabaena variabilis*, UDP glucose : diacylglycerol glucotransferase activity in vitro, *Plant and Cell Physiology*, *23*, 1115-1120.
31. Omata, T., and Murata, N. (1986) Glucolipid synthesis activity in cytoplasmic and thylakoid membrane from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*, *Plant Cell Physiology*, *27*, 485-490.
32. Murata, N., Deshnum, P., and Tasaka, Y. (1996) Biosynthesis of γ -linolenic acid in the cyanobacterium *Spirulina platensis*, in *γ -Linolenic Acid: Metabolism and its Roles in Nutrition and Medicine* (Huang, Y. S. a. M., D.E., Ed.), pp 22-32, AOCS Press, Illinois.
33. Gombos, Z., Wada, H., Varkonyi, Z., Los, D. A., and Murata, N. (1996) Characterization of the *Fad12* mutant of *Synechocystis* that is defective in Δ^{12} acyl-lipid desaturase activity., *Biochimica et Biophysica Acta*, *1299* 117-123.
34. Lepage, G., and Roy, C. C. (1984) Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification, *Journal of Lipid Research*, *25*, 1391-1396.
35. Wada, H., and Murata, N. (1990) Temperature-induced changes in the fatty acid composition of the cyanobacterium, *Synechocystis* PCC6803, *Plant Physiology*, *4*, 1062-1069.

36. Murata, N., and Omata, T. (1988) Isolation of cyanobacterial plasma membranes, in *Methods in Enzymology* (Packer, L., and Glazer, A. N., Eds.), pp 245-251, Academic Press, San Diego.
37. สิริภัทร, ชัมพพงษ์. (2543) การศึกษาคุณลักษณะระดับโมเลกุลของยีน *desD* ใน *Spirulina platensis* สายพันธุ์กลายที่มีความผิดปกติในการผลิตกรดแกมมา-ลิโนลิโนอิก, สายเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, หน้า 59.
38. Pick, U., Weiss, M., Gounaris, K., and Barber, J. (1987) The role of different thylakoid glycolipids in the function of reconstituted chloroplast ATP synthase, *Biochimica et Biophysica Acta*, 891, 28-39.
39. Zhou, F., Liu, S., and Hu, Z. (2009) Effect of monogalactosyldiacylglycerol on the interaction between photosystemII core complex and its antenna complexes in liposomes of thylakoid lipids, *Photosynthesis Research*, 99, 185-193.
40. Ivanov, A. G., Hendrickson, L., Krol, M., and Selstam, E. (2006) Digalactosyl-diacylglycerol deficiency impairs the capacity for photosynthetic intersystem electron transport and state transitions in *Arabidopsis thaliana* due to photosystem I acceptor-side limitations, *Plant and Cell Physiology*, 47, 1146-1157.
41. Murata, N., Wada, H., and Gombos, Z. (1992) Modes of fatty-acid desaturation in cyanobacteria, *Plant and Cell Physiology*, 33, 933-941.
42. Zak, E., Norling, B., Maitra, R., Huang, F., Andersson, B., and Pakrasi, H. B. (2001) The initial steps of biogenesis of cyanobacterial photosystems occur in plasma membranes, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 13443-13448.
43. Norling, B., Zak, E., Andersson, B., and Pakrasi, H. (1998) 2D-isolation of pure plasma and thylakoid membranes from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *FEBS Letters*, 436, 189-192.
44. Yamamoto, Y., Ford, R. C., and Barber, J. (1981) Relationship between thylakoid membrane fluidity and the functioning of pea chloroplasts, *Plant Physiology* 67, 1069-1072.
45. Oquist, G. (1982) Seasonally induced changes in acyl lipids and fatty acids of chloroplast thylakoids of *Pinus silvestris*, *Plant Physiology*, 69, 869-875.

ภาคผนวก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Zarrouk

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น (g/l)
NaHCO_3	16.8
NaCl	1
NaNO_3	2.5
K_2HPO_4	0.5
K_2SO_4	1
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01
EDTA-Na_2	0.08
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.5
A-5 solution	1ml/l
B-6 solution	1ml/l

A-5 solution

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น (mg/l)
H_3BO_3	2.86
$\text{MnC}_{12} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.8
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.22
MoO_3	0.01
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.08

B-6 solution

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น (mg/l)
NH_4VO_3	22.9
$\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	47.8
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	17.9
$\text{Ti}(\text{SO}_4)$	40
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	4.4
$\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	120