การเจริญและการแสดงออกของยีนที่สัมพันธ์กับพีเอชเอของสไปรูไลนา พลาเทนซิสที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่ขาดไนเทรตและอาหารเลี้ยงที่เสริมแอซิเทต

ฉันท์ชนก ดวงศรี และวุฒินันท์ รักษาจิตร์*

สาขาวิชาเทคโนโลยีสุขภาพสัตว์ คณะเทคนิคการสัตวแพทย์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900
*E-mail: cvtwnr@ku.ac.th

รับบทความ: 9 พฤษภาคม 2560 ยอมรับตีพิมพ์: 22 กันยายน 2560

บทคัดย่อ

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (พีเอชเอ) เป็นพอลิเอสเทอร์แบบเส้นตรงซึ่งสามารถผลิตและสะสมได้โดยสไปรูไลนา พลาเทนซิส พีเอชเอเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากเอนไซม์ PHA synthase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ถูกแปลรหัสจากยีน *phaC* พีเอชเอที่ผลิตขึ้นจากสไปรูไลนา พลาเทนซิส เป็นพอลิเมอร์ที่สามารถเข้ากันได้กับเซลล์และเนื้อเยื่อสัตว์ ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการขาดไนเทรตและการเติมแอซิเทตต่อการเจริญและการแสดงออกของยีน *phaC* ของสไปรูไลนา พลาเทนซิส ผลการวิจัยพบว่า การเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงที่ขาดไนเทรตส่งผลให้การเจริญของสไปรูไลนา พลาเทนซิสลดลง มีการเปลี่ยน แปลงสีของเซลล์จากสีเขียวเป็นสีเหลืองในช่วงระยะเวลา 3 วัน การเติมแอซิเทต 0.25 – 0.50%(w/v) ลงในอาหารเลี้ยงที่ขาดไนเทรตมีส่วนช่วยบรรเทาผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของสไปรูไลนา พลาเทนซิส จากผลของ RT-PCR แสดงให้เห็นว่าอาหารเลี้ยงที่ขาดไนเทรตและมีการเติมแอซิเทต 0.50%(w/v) เหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน *phaC* สูงที่สุด ($p < 0.05$) ที่เวลา 6 ชั่วโมงของการปรับตัว

คำสำคัญ: พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต สไปรูไลนา พลาเทนซิส ยีน *phaC* ไนเทรต แอซิเทต

Growth and PHAs-Related Gene Expression of *Spirulina platensis* Grown on Nitrate-Deprived and Acetate-Supplemented Medium

Chanchanok Duangsri and Wuttinun Raksajit*

Program of Animal Health Technology, Faculty of Veterinary Technology,
Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand
*E-mail: cvtwnr@ku.ac.th

Received: 9 May 2017 Accepted: 22 September 2017

Abstract

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are linear polyhydroxyesters that can be produced and accumulated by *Spirulina platensis*. The PHAs are biodegradable polymer generated by PHA synthase which is encoded by *phaC*. PHAs generated from *S. platensis* are biocompatible polymers with animal cells and tissues. In the present study, the influences of nitrate deprivation and acetate supplementation on growth and expression of the *phaC* gene of *S. platensis* were investigated. In the absence of nitrate, *S. platensis* growth was reduced. The cells changed from green to yellow within 3 days. The addition of 0.25 – 0.50% (w/v) acetate to cultures could alleviate the effects of nitrate deprivation on growth of *S. platensis*. RT-PCR clearly showed that nitrate-deprived culture containing 0.50% (w/v) acetate induces the expression of this *phaC* gene ($p < 0.05$) at 6-hour adaptation.

Keywords: Polyhydroxyalkanoates, *Spirulina platensis*, *phaC* gene, Nitrate, Acetate

บทนำ

พลาสติกชีวภาพ (bioplastic) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ผลิตขึ้นจากวัสดุธรรมชาติ เช่น พืช สาหร่าย ไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งสามารถย่อยสลายได้ (biodegradable) ด้วยจุลินทรีย์ ปฏิกิริยาเคมีหรือความร้อน และให้ผลผลิตสุดท้ายคือ น้ำและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์จึงไม่สะสมและไม่ก่อให้เกิดมลพิษหลังการเผา รวมถึงไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม พลาสติกชีวภาพมีระยะเวลาในการย่อยสลายประมาณ 14 – 280 วัน ขึ้นอยู่กับชนิดของพลาสติกชีวภาพ (Emadian et al., 2017) ตัวอย่างชนิดของพลาสติกชีวภาพ เช่น พอลิแลกติกแอซิด (polylactic acid) พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoates) (Drosg et al., 2015) ด้วยคุณภาพของพลาสติกชีวภาพที่มีความยืดหยุ่นและมีคุณสมบัติเข้ากันทางชีวภาพกับเซลล์สัตว์ (biocompatibility) (López et al., 2015) ในปัจจุบันจึงมีการประยุกต์ใช้พลาสติกชีวภาพในการผลิต

อุปกรณ์ทางการพยาบาลสัตว์ เช่น การผลิตไหมเทียม อุปกรณ์ในการศัลยกรรมกระดูก กระดูกเทียม วัสดุค้ำจุน อุปกรณ์นำส่งยา (Duangsri and Raksajit, 2016)

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxy alkanoates, PHAs, พีเอชเอ) เป็นพอลิเอสเทอร์ของไฮดรอกซีอัลคาโนเอต มีคุณสมบัติคล้ายกับพลาสติกที่ได้จากปิโตรเลียม มีจุดหลอมเหลวต่ำและมีความยืดหยุ่นสูง (Wang et al., 2014) พีเอชเอสังเคราะห์และสะสมภายในเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย (Mendhulkar and Shetye, 2017; Drosg et al., 2015) ภายใต้สภาวะที่ขาดแหล่งอาหาร เช่น แหล่งไนโตรเจน ฟอสฟอรัส หรือสภาวะที่มีแหล่งอาหารคาร์บอนมากเกินพอ (Nishioka et al., 2001) การสังเคราะห์พีเอชเอในไซยาโนแบคทีเรียควบคุมด้วยการทำงานของกลุ่มยีน *pha* ซึ่งประกอบด้วยยีน *phaA* ซึ่งแปลรหัสเป็น เอนไซม์ β-ketothiolase กระตุ้นการเปลี่ยน acetyl-CoA ที่มากพอจำนวน 2 โมเลกุลไปเป็น acetoacetyl-CoA จำนวน 1 โมเลกุล จากนั้น acetoacetyl-CoA จะเปลี่ยนแปลงไปเป็น 3-hydroxybutyl-CoA โดยการทำงานของเอนไซม์ acetoacetyl-CoA reductase ซึ่งแปลรหัสจากยีน *phaB* และขั้นตอนสุดท้าย 3-hydroxybutyl-CoA จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นพีเอชเอ โดยการทำงานของเอนไซม์ PHA synthase ซึ่งแปลรหัสจากยีน *phaC* (Keshavarz and Roy, 2010; Duangsri and Raksajit, 2016)

สไปรูไลนา พลาเทนซิส (*Spirulina platensis*) เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะเบส (pH 8.5 – 11) โครงสร้างภายในเซลล์ประกอบด้วยไทรโคม (trichome) หลายอันเรียงติดต่อกัน เซลล์มีรูปร่างเป็นเกลียวเวียนซ้าย ภายในบรรจุโปรตีนไฟโคบิลิน (phycobilins) ที่มีสีฟ้า คลอโรฟิลล์ *เอ* แคโรทีนอยด์ และแซนโทฟิลล์ (Sharma et al., 2014) นอกจากนี้ชีวมวล (biomass) ของสไปรูไลนา พลาเทนซิสยังเป็นแหล่งสารอาหาร อาทิ วิตามิน แร่ธาตุ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และลิพิด และมีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาที่ประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ที่มีคุณสมบัติปรับภูมิต้านทาน (immunomodulatory) ออกฤทธิ์ต้านอักเสบ (anti-inflammation) ต้านมะเร็ง (anti-cancer) และต้านการสร้างหลอดเลือดใหม่ (anti-angiogenic) สไปรูไลน่า พลาเทนซิสเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์และสะสมพีเอชเอได้ อีกทั้งไม่ผลิตสารกลุ่ม microcystin หรือ cyanobacterin ซึ่งมีความเป็นพิษสูงต่อสิ่งมีชีวิต จากข้อมูลวิจัยในปัจจุบันการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงง่าย เจริญเร็ว และมีความสามารถในการผลิตพลาสติกชีวภาพได้จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่น่าสนใจที่จะนำมาใช้เป็นต้นแบบในการผลิตพีเอชเอในระดับอุตสาหกรรมต่อไป ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งหมายที่ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพีเอชเอ (PHAs) ของสไปรูไลนา พลาเทนซิส โดยติดตามการเจริญของเซลล์และการแสดงออกของยีน *phaC* ภายใต้สภาวะที่อาหารเลี้ยงปกติ อาหารเลี้ยงที่ขาดไนเทรต และอาหารเลี้ยงที่ขาดไนเทรตและเติมแอซิเทตที่มีความเข้มข้น 0.25%(w/v) 0.5%(w/v) และ 0.75% (w/v)

วิธีดำเนินการวิจัย

การเพาะเลี้ยงสไปรูไลนา พลาเทนซิส

เพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลว Zarrrouk (pH 9.0) (Zarrouk, 1966) ปริมาตร 250 mL ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 mL ภายใต้แสงที่มีความเข้ม 40 μmolE/m^2/s และเขย่าตลอดเวลาด้วยความเร็วรอบ 120 rpm ที่อุณหภูมิ 32°C และวัดการ

เจริญของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 730 nm ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Genesys 20 ยี่ห้อ Thermo Scientific

การศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงสไปรูไลนาต่อการสะสมพีเอชเอ

นำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Zarrouk (pH 9.0) เป็นเวลา 7 วัน (OD~1.0) ไปเพาะเลี้ยงในอาหาร Zarrouk (pH9.0) ที่ขาดไนเทรต (ZN_o) และอาหารเลี้ยง ZN_o ที่มีการเติมแอซิเทต (ZN_oA) ที่ความเข้มข้น 0.25%(w/v) 0.5%(w/v) และ 0.75%(w/v) และเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 5 วัน จากนั้นเก็บเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 0, 3 และ 5 วัน เพื่อนำมาวิเคราะห์การสะสมพีเอชเอ

การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ

นำเซลล์มาเติม 90%(v/v) เมทานอล อัตราส่วน 1:9 โดยปริมาตรและบ่มในที่ไม่มีแสงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 nm ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Genesys 20 ยี่ห้อThermo Scientific และคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ *เอ* ในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (µg/mL) จากการนำค่าการดูดกลืนแสงคูณด้วย 12.7 (Meeks and Castenholz, 1971)

เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

PCR mixture ประกอบด้วย 1× buffer ปริมาตร 2 µL 2mM $MgCl_2$ ปริมาตร 0.8 µL 0.2 mM dNTPs ปริมาตร 0.4 µL 0.1 µM F-primer ปริมาตร 0.2 µL 0.1 µM R-primer ปริมาตร 0.2 µL Taq DNA polymerase (5 U/µL) ปริมาตร 0.4 µL ส่วนใสที่สกัดได้ปริมาตร 2 µL และน้ำ Milli Q บริสุทธิ์ปริมาตร 14 µL ผสมกันให้ได้ปริมาตรสุทธิเป็น 20 µL สภาวะในการทำ PCR ประกอบด้วย pre-denaturation อุณหภูมิ 94ºC 10 นาที จำนวน 1 รอบ denaturation อุณหภูมิ 94ºC 45 s annealing อุณหภูมิ 53–56ºC 30 s และextension อุณหภูมิ 72ºC 45 s จำนวน 33 รอบ และpost-extension อุณหภูมิ 72ºC 10 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย 1.0%(w/v) อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส สีย้อม SYBR safe และ 0.5%(w/v) TAE buffer

การสกัดดีเอ็นเอจากสไปรูไลนา พลาเทนซิส

นำเซลล์ปริมาตร 500 µL มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000×*g* เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำเซลล์มาล้างด้วย TE buffer (pH 8.0) ปริมาตร 200 µL และเก็บเซลล์มาเติม dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 20 µL ผสมให้เข้ากัน และเติม TE buffer (pH 8.0) ปริมาตร 90 µL นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 18000×*g* เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสด้านบนที่มีดีเอ็นเอมาใช้ในการทำ PCR

การสกัดอาร์เอ็นเอจากสไปรูไลนา พลาเทนซิส

นำเซลล์ปริมาตร 2 µL มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000×*g* เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นล้างเซลล์ด้วยน้ำ Milli Q บริสุทธิ์ เติม Trizol reagent ปริมาตร 100 µL และคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 200 µL และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000×*g* เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสมาเติมไอโซโพรพานอล 200 µL และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000×*g* เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำตะกอนอาร์เอ็นเอมาเติม 75% (v/v) เอทานอลเย็นปริมาตร 500 µL ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000×*g* เป็นเวลา 5 นาที ทำให้แห้งและละลายอาร์เอ็นเอด้วยน้ำ Milli Q บริสุทธิ์ ปริมาตร 20 µL

การทำให้อาร์เอ็นเอบริสุทธิ์

นำอาร์เอ็นเอปริมาตร 20 µL เติม Rnase-free Dnase 10×Reaction buffer ปริมาตร 5 µL และเติม Rnase-free Dnase (2 unit/µg) ปริมาตร 2 µL จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 30 นาที และเติม Dnase stop solution ปริมาตร 1 µL และบ่มที่อุณหภูมิ 65ºC เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นสกัดอาร์เอ็นเอด้วยคลอโรฟอร์ม ไอโซโพรพานอล และ 75%(v/v) เอทานอลเย็น ตามลำดับ สุดท้ายละลายอาร์เอ็นเอด้วยน้ำ Milli Q บริสุทธิ์ 20 µL

การสังเคราะห์ cDNA

นำอาร์เอ็นเอ 50 ng ปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli Q บริสุทธิ์ให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 11 µL หลังจากนั้นเติมไพรเมอร์จำเพาะ (F-primer) 1 µL (ตาราง 1) บ่มที่อุณหภูมิ 65ºC เป็นเวลา 5 นาที โดยใช้เครื่อง Thermocycler รุ่น Geneamp pcr system 9700 ยี่ห้อ Applied biosystems และเติม 5×Reaction Buffer ปริมาตร 4 µL RiboLock RNase Inhibitor (20 unit/µg) ปริมาตร 1 µL 10 mM dNTP ปริมาตร 2 µL และเติม RevertAid Reverse Transcriptase (20 unit/µg) ปริมาตร 1 µL ปริมาตรสุทธิเป็น 20 µL และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 25ºC เป็นเวลา 5 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 42ºC เป็นเวลา 60 นาที และสุดท้ายบ่มที่อุณหภูมิ 72ºC เป็นเวลา 5 นาที โดยใช้เครื่อง Thermo cycler รุ่น Geneamp pcr system 9700 ยี่ห้อ Applied biosystems

ตาราง 1 ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนที่มีความสัมพันธ์กับพีเอชเอ

ยีน		ลำดับไพรเมอร์	ขนาดของผลิตภัณฑ์ (bp)
pha C	F-primer	5′-CTTTTTCGGCGTAGAGGTTG-3′	340
	R-primer	3′-CCCGAAGCCGTAGATATTGA-5′	
16s rDNA	F-primer	5′-GTTTACGGGATTGGCTCAGA-3′	284
	R-primer	3′-TCTTGGTGAAAGCCGAGAGT-5′	

เทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

PCR mixture ประกอบด้วย 1×buffer ปริมาตร 2 µL 2mM $MgCl_2$ ปริมาตร 0.8 µL 0.2 mM dNTPs ปริมาตร 0.4 µL 0.1 µM F-primer ปริมาตร 0.2 µL 0.1 µM R-primer ปริมาตร 0.2 µL Taq DNA polymerase (5 U/µL) ปริมาตร 0.4 µL ส่วนใสที่สกัดได้ปริมาตร 2 µL และน้ำ Milli Q บริสุทธิ์ปริมาตร 14 µL ผสมกันให้ได้ปริมาตรสุทธิเป็น 20 µL สภาวะในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *phaC* ประกอบด้วย pre-denaturation อุณหภูมิ 94ºC 10 นาที จำนวน 1 รอบ denaturation อุณหภูมิ 94ºC 45 s annealing อุณหภูมิ 53 – 56ºC 30 s และ extension อุณหภูมิ 72ºC 45 s จำนวน 33 รอบ และpost-extension อุณหภูมิ 72ºC 10 นาที จำนวน 1 รอบ สำหรับการตรวจสอบยีนควบคุม (*16s rDNA*) ใช้สภาวะเดียวกัน แต่จำนวนรอบใช้เพียง 25 รอบ จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย 1.0%(w/v) อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส สีย้อม SYBR safe และ 0.5% (w/v) TAE buffer

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

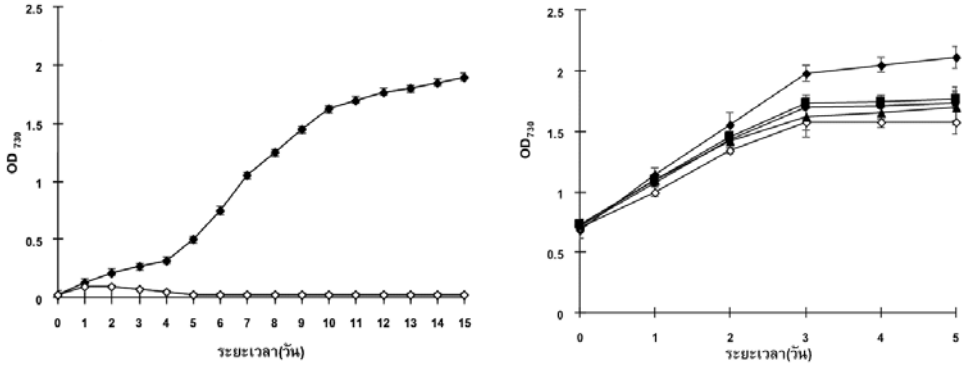
เปรียบเทียบผลการเจริญและการแสดง

ออกของยีน *phaC* โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ($n = 3$) คำนวณค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p = 0.05$)

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การเจริญเติบโตและการสะสมคลอโรฟิลล์ เอ ของสไปรูไลนา พลาเทนซิส

ผลการทดลอง พบว่า เซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยง Zarrouk ที่มีไนเทรตเป็นแหล่งไนโตรเจน มีอัตราการเจริญสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วง 1 – 15 วันซึ่งสังเกตได้จากค่า OD_{730} ที่มีค่าสูงขึ้น หลังจาก 15 วัน เซลล์มีอัตราการเจริญช้าลง คงที่ และลดลงตามลำดับ อย่างไรก็ตามเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยง Zarrouk ที่ขาดไนเทรต (ZN_o) มีอัตราการเจริญช้ากว่าเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร Zarrouk ที่มีไนเทรต ในช่วง 1 – 15 วัน แสดงให้เห็นว่า ไนเทรตมีความจำเป็นต่อการเจริญของสไปรูไลนา พลาเทนซิส เนื่องจากไนเทรตเป็นแหล่งอาหารไนโตรเจนที่สำคัญในการเจริญของเซลล์ โดยเป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโนและนิวคลีโอไทด์ ดังนั้นในสภาวะที่ขาดไนเทรตจะส่งผลกระทบต่อการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ อีกทั้งเมื่อขาดไนโตรเจนเป็นระยะเวลานาน ๆ เซลล์จะย่อยสลายกรดอะมิโนเพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทนไนเทรตในการดำรงชีวิต จึงทำให้สไปรูไลนา พลาเทนซิสมีการเจริญลดลงในสภาวะที่ขาดไนเทรต (ภาพที่ 1ก) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Jau et al. (2005) และ Khetkorn et al. (2016) หลังจากที่เก็บเซลล์ที่มีอายุ 7 วัน (ค่า OD_{730}~1) (ภาพที่ 1ข) มาเลี้ยงในสภาวะที่อาหารเลี้ยงขาดไนเทรตและสภาวะที่อาหารเลี้ยงขาดไนเทรตและเติมแอซิเทต (ZN_oA) พบว่า การเติมแอซิเทตลงไปในอาหารเลี้ยง Zarrouk ที่ขาดไนเทรต (ZN_oA) มีส่วนช่วยสนับสนุนการเจริญของเซลล์ โดยเมื่อเติมแอซิเทตที่มีความเข้มข้น 0.25%(w/v) 0.5%



(ก) (ข)

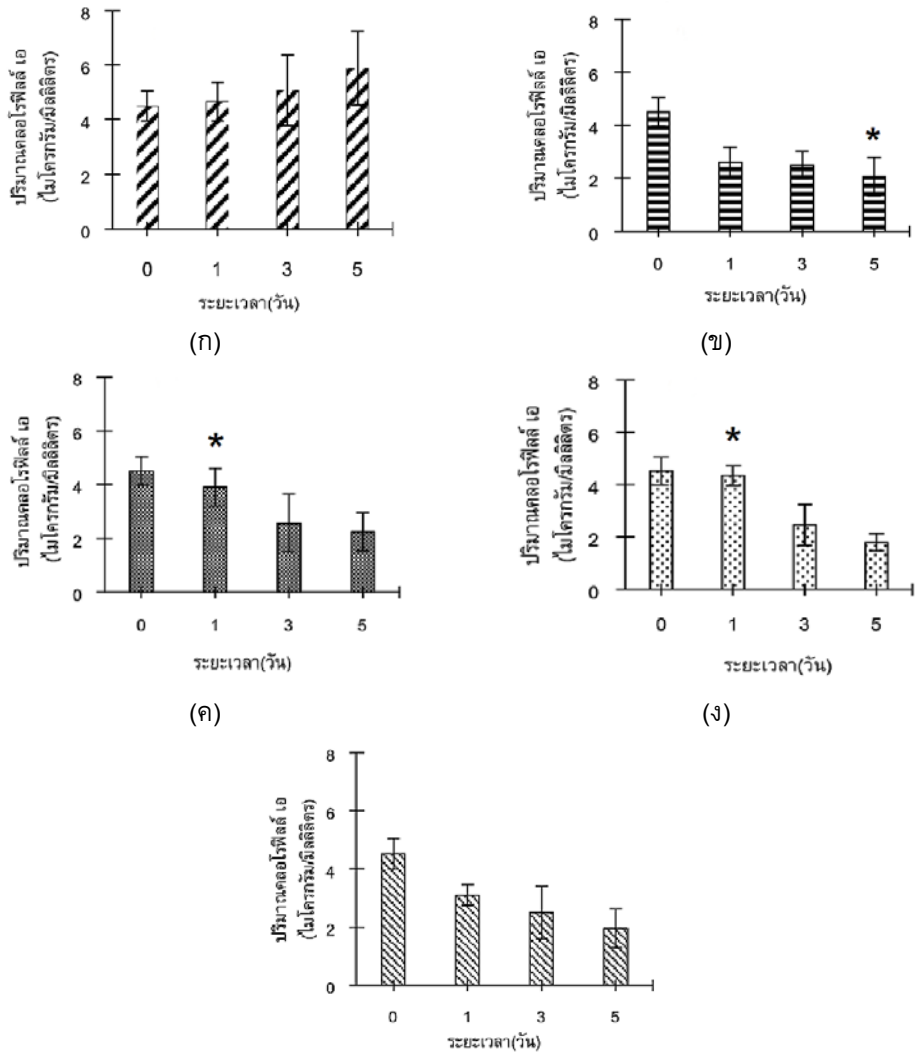
ภาพที่ 1 การเจริญของสไปรูไลนา พลาเทนซิส (ก) เซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 15 วัน ในอาหารเลี้ยง Zarrouk [◆] และอาหารเลี้ยง Zarrouk ที่ขาดไนเทรต (ZN_o) [◇] (n=3) (ข) เซลล์สไปรูไลนา พลาเทนซิสซึ่งมีอายุ 7 วัน (OD~1.0) เพาะเลี้ยงต่อในอาหารเหลวชนิดต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 5 วัน ได้แก่ อาหารเลี้ยง Zarrouk [◆] อาหารเลี้ยง Zarrouk ที่ขาดไนเทรต (ZN_o) [◇] อาหารเลี้ยง ZN_o ที่เติมแอซิเทตความเข้มข้น 0.25%(w/v) [●] 0.5%(w/v) [■] และ 0.75%(w/v) [▲] (n=3)

(w/v) และ0.75%(w/v) ลงในอาหารเลี้ยง Zarrouk ที่ขาดไนเทรต เซลล์จะเจริญดีกว่าในสภาวะที่ขาดไนเทรต (ZN_o) โดยการเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้นในช่วง 1 – 5 วัน และเริ่มคงที่หลังจาก 5 วัน แต่การเจริญยังไม่ดีเท่ากับเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยง Zarrouk ที่เติมไนเทรต การเพิ่มความเข้มข้นของแอซิเทตลงในอาหารเลี้ยง ZN_o ไม่มีผลกระตุ้นการเจริญของเซลล์ในช่วง 3 วันแรก มีรายงานว่า ไซยาโนแบคทีเรียสามารถสังเคราะห์ acetyl-CoA จากแอซิเทต ได้ด้วยเอนไซม์ acetyl-CoA synthetase หรืออาจสังเคราะห์จากเอนไซม์ acetate kinase และ phosphotransacetylase (Summers et al., 1999) ซึ่งacetyl-CoA สามารถใช้เป็นส่วนประกอบในการสังเคราะห์พอลิเพปไทด์จากสารตัวกลาง α-ketoglutarate และ acetyl-CoA ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ลิพิด (lipid biosynthesis) นอกจากนี้พบว่า acetyl-CoA ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ เช่น terpenoids flavonoids polyketides ในไซยาโนแบคทีเรียด้วย (Ihlenfeldt and Gibson, 1977)

ผลของการเจริญสอดคล้องกับปริมาณคลอโรฟิลล์ *เอ* ในสไปรูไลนา พลาเทนซิส โดยพบว่า เซลล์ที่เลี้ยงอาหาร Zarrouk ที่มีไนเทรตมีการเพิ่มปริมาณคลอโรฟิลล์เอในช่วง 5 วันแรก (ภาพที่ 2ก) ซึ่งเซลล์มีสีน้ำเงิน-เขียวปกติ ขณะที่เซลล์ที่เลี้ยงอาหารที่ขาดไนเทรต เซลล์จะมีสีเหลือง-เขียว (ตาราง 2) เนื่องจากการลดลงของคลอโรฟิลล์ *เอ* โดยเฉพาะในวันที่ 5 ปริมาณคลอโรฟิลล์ *เอ* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับวันที่ 0 (ภาพที่ 2ข) เนื่องจากไนเทรตเป็นแหล่งอาหารไนโตรเจนและเป็นแหล่งอาหารสำคัญต่อการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ *เอ* ดังนั้นเมื่อขาดไนเทรตจึงส่งผลต่อสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ *เอ* ลดลง ทำให้สีของเซลล์ที่เปลี่ยนจากน้ำเงิน-เขียวเป็นสีเหลือง-เขียว เรียกว่า เกิดสภาวะ chlorosis เนื่องจากเซลล์จำเป็นต้องย่อยสลายพอลิเพปไทด์และกรดอะมิโนเพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารทดแทนในการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะเครียด อีกทั้งการขาดไนเทรตทำให้เกิดการสลายตัวของ phycobiliprotein ซึ่งมีสีฟ้าอมเขียว ทำให้สีของเซลล์เปลี่ยนแปลงเป็นสีเหลือง-เขียวเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Jau et al. (2005) และ Khetkorn et al. (2016) การเติมแอซิเทต (0.25 – 0.5% (w/v)) ลงในอาหารเลี้ยงได้มีส่วนช่วยเพิ่มปริมาณคลอโรฟิลล์ *เอ* ในวันที่ 1 ของการเลี้ยงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 2ค และ 2ง) อย่างไรก็ตามการเติมแอซิเทตมากเกินพอไม่ได้ช่วยการเพิ่มปริมาณคลอโรฟิลล์ *เอ* (ภาพที่ 2จ) เนื่องจากเซลล์จำเป็นต้องใช้แอซิเทตเป็นสารตัวกลางในเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับการรักษาสภาพของเซลล์เพื่อให้ทนต่อสภาวะเครียดจากการขาดไนเทรตได้

การแสดงออกของยีน phaC ของสไปรูไลนา พลาเทนซิส

จากการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *phaC* จากดีเอ็นเอของสไปรูไลนา พลาเทนซิสโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะด้วยเทคนิค Colony PCR พบผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 340 bp (ภาพที่ 3) และเมื่อนำผลิตภัณฑ์ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า มีลักษณะตรงกับชิ้นส่วนของยีน *phaC* ของสไปรูไลนา พลาเทนซิส (data not shown) และมีความคล้ายคลึงกับยีน *phaC* ในไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น (Drosg et al. 2015; Lane and Benton, 2015) จากการเลือกอุณหภูมิ 55°C สำหรับใช้ในขั้นตอน Annealing ของการทำ RT-

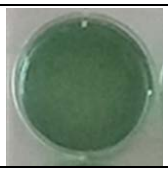
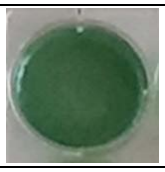
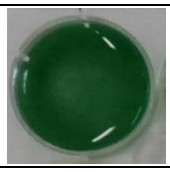
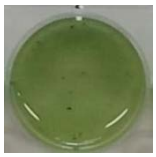
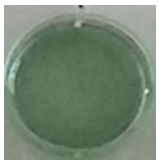
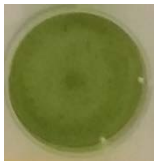
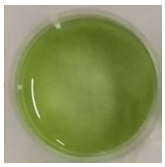
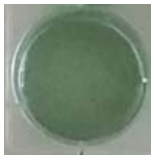
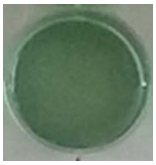
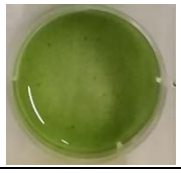


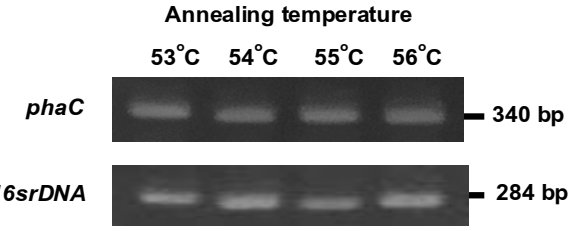
ภาพที่ 2 ปริมาณคลอโรฟิลล์ *เอ* ของสไปรูไลนา พลาเทนซิสซึ่งมีอายุ 7 วัน (OD~1.0) เพาะเลี้ยงต่อในอาหารเหลวชนิดต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 5 วัน ได้แก่ (ก) อาหารเลี้ยง Zarrouk (ข) อาหารเลี้ยง Zarrouk ที่ขาดไนเทรต (ZN_o) (ค) อาหารเลี้ยง ZN_o ที่เติมแอซิเทต ความเข้มข้น 0.25% (w/v) (ง) 0.5%(w/v) และ (จ) 0.75%(w/v) เครื่องหมายดอกจัน (*) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (n=3)

PCR เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *phaC* ของสไปรูไลนา พลาเทนซิส ในสภาวะที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงชนิดต่าง ๆ ได้แก่ อาหารเลี้ยง Zarrouk อาหารเลี้ยง Zarrouk ที่ขาดไนเทรต (ZN_o) และอาหารเลี้ยง ZN_o ที่เติมแอซิเทตที่ความเข้มข้น 0.25%(w/v) 0.5%(w/v) และ 0.75%(w/v) จาก

ผลการทดลองไม่พบการแสดงออกของยีน *phaC* ในอาหารเลี้ยง Zarrouk แต่พบการแสดงออกของยีน *phaC* ในอาหารเลี้ยง ZN_o และอาหารเลี้ยง ZN_o ที่เติมแอซิเทต โดยพบว่าในอาหารเลี้ยง ZN_o ที่เติมแอซิเทต 0.5%(w/v) เซลล์มีการแสดงออกของยีน *phaC* มากที่สุด (ภาพที่ 4ก) และการแสดงออกเพิ่มขึ้น 5 เท่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ที่เวลา 6 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์

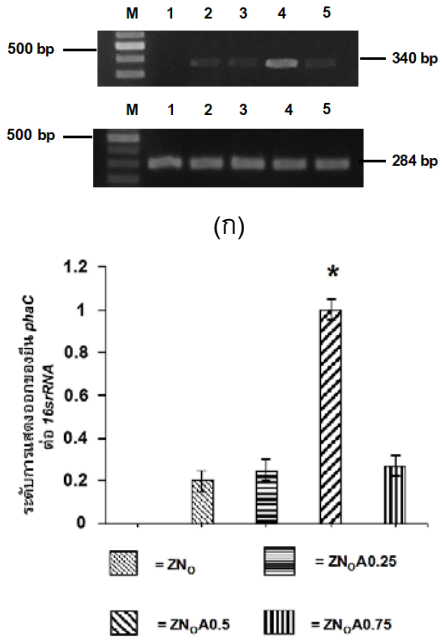
ตาราง 2 การเปลี่ยนแปลงสีของของสไปรูไลนา พลาเทนซิสที่เลี้ยงในอาหารเหลวชนิดต่าง ๆ

สภาวะในการเลี้ยง	ระยะเวลา(วัน)		
	1	3	5
อาหารเลี้ยง Zarrouk			
อาหารเลี้ยง Zarrouk ที่ขาดไนเทรต (ZN_o)			
อาหารเลี้ยง ZN_o ที่เติมแอซิเทต ความเข้มข้น 0.25%(w/v)			
อาหารเลี้ยง ZN_o ที่เติมแอซิเทต ความเข้มข้น 0.5%(w/v)			
อาหารเลี้ยง ZN_o ที่เติมแอซิเทต ความเข้มข้น 0.75%(w/v)			



ภาพที่ 3 การตรวจสอบยีน *phaC* ของสไปรูไลนา พลาเทนซิสด้วยเทคนิค Colony PCR โดยใช้ Annealing temperature ตั้งแต่ 53-56°C (n=3)

ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยง ZN_o ที่ไม่เติมแอซิเทต (ภาพที่ 4ข) แสดงให้เห็นว่า การขาดไนเทรตกระตุ้นให้เซลล์เพิ่มการแสดงออกของยีน *phaC* และการเพิ่มแอซิเทตเป็นการเพิ่มสารตัวกลาง เช่น acetyl-CoA ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์พีเอชเอและลิพิดชนิดอื่น (Rehm, 2007) มีรายงานก่อนหน้านี้พบว่าการเติมแอซิเทตไปสนับสนุนวัฏจักรเครบส์และกระบวนการสังเคราะห์ไกลโคเจน Khetkorn et al. (2016) ยืนยันผลโดยติดตามการแสดงออกของยีน *glgX* ซึ่งแปลรหัสให้ glycogen debranching enzyme พบว่า มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นจริงในสภาวะที่ขาดไนเทรตและมีการเติมแอซิเทตลงในอาหารเลี้ยง นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า เซลล์ *Nostoc muscorum* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่ขาดฟอสฟอรัสและมีการเติม 0.2% แอซิเทต ภายใต้สภาวะไม่มีแสงสว่างสามารถผลิต PHB สูงขึ้นถึง 35% (Sharma and Mallick, 2005) เมื่อผู้วิจัยติดตามการแสดงออกของยีน *accA* ซึ่งแปลรหัสให้เอนไซม์ acetyl-coA carboxylase carboxyl transferase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์และสะสมลิพิดโดยการสร้าง malonyl-CoA เป็นสารตั้งต้น ผลการทดลองพบว่า มีการแสดงออกของยีน *accA* เพิ่มขึ้นเช่นกันในสภาวะที่ขาดไนเทรตและมีการเพิ่มแอซิเทตลงในอาหารเลี้ยง (data not shown) แสดงให้เห็นว่า ในสภาวะที่ขาดไนเทรตและมีการเติมแอซิเทต เซลล์จะมีการแสดงออกของยีน *phaC* และยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์พีเอชเอและลิพิด อย่างไรก็ตามการตรวจวัดปริมาณพีเอชเอที่สะสมภายในเซลล์และการตรวจวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ PHA synthase ร่วมกับการแสดงออกของยีนเป็นเรื่องสำคัญที่ช่วยอธิบายกลไกการทำงานได้ครบถ้วนมากขึ้น



ภาพที่ 4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *phaC* ของสไปรูไลนา พลาเทนซิสที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่แตกต่างกันที่เวลา 6 ชั่วโมงด้วยเทคนิค RT-PCR (n=3) (ก) การแสดงออกของยีน *phaC* ขนาด 340 bp และ 16S rRNA ขนาด 284 bp บน 1.2%(w/v) อะกาโรสเจล ตัวอักษร M แสดงแถบ DNA มาตรฐาน (GeneRuler 100 bp plus DNA ladder, invitrogen) หมายเลข 1 – 5 แสดงการแสดงออกของยีนในอาหารเลี้ยงที่แตกต่างกัน หมายเลข 1 อาหารเลี้ยง Zarrouk หมายเลข 2 อาหารเลี้ยง Zarrouk ที่ขาดไนเทรต (ZN_o) หมายเลข 3 อาหารลี้ยง ZN_o ที่เติมแอซิเทต 0.25%(w/v) หมายเลข 4 อาหารเลี้ยง ZN_o ที่เติมแอซิเทต 0.5%(w/v) และหมายเลข 5 อาหารเลี้ยง ZN_o ที่เติมแอซิเทต 0.75% (w/v) (ข) การแสดงออกของยีน *phaC* ต่อ 16S rRNA (Re) เครื่องหมายดอกจัน (*) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

การผลิตพลาสติกชีวภาพพีเอชเอจากการคัดกรองจุลินทรีย์หรือสร้างจุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่ที่มีศักยภาพและสามารถเจริญได้ดีในอาหารเพาะเลี้ยงที่หลากหลายและมีราคาถูกเป็นการลดต้นทุน โดยพีเอชเอที่สังเคราะห์ขึ้นต้องไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สัตว์ รวมถึงมีสมบัติและโครงสร้างของพลาสติกชีวภาพที่ใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์ทางเคมี

สรุปผล

1. ไนเทรตมีผลต่อการเจริญและปริมาณคลอโรฟิลล์ *เอ* ในสไปรูไลนา พลาเทนซิส ซึ่งพบว่าการขาดไนเทรตมีผลทำให้การเจริญและปริมาณคลอโรฟิลล์เอลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

2. การเติมแอซิเทตเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนให้เซลล์ ในสภาวะขาดไนเทรตช่วยบรรเทาผลกระทบและมีส่วนสนับสนุนการเจริญและปริมาณคลอโรฟิลล์ *เอ*

3. ในสภาวะขาดไนเทรตและเติม 0.5% (w/v) แอซิเทต พบว่า เซลล์มีการแสดงออกของยีน *phaC* สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ที่เวลา 6 ชั่วโมงของการปรับตัว

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณคณะเทคนิคการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (KURDI. M-W9.53) ที่สนับสนุนเงินทุนและสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Drosg, B., Fritz, I., Gattermayr, F., and Silvestrini, L. (2015). Photo-autotrophic production of poly(hydroxyalkanoates) in cyano bacteria. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly** 29(2): 145–156.

Duangsri, C., and Raksajit, W. (2016). Polyhydroxyalkanoates: An alternative biomaterial for renewable plastic. **Journal of Research Unit on Science, Technology and Environment for Learning** 7(2): 414–423.

Emadian, S. M., Onay, T. T., and Demirel, B. (2017). Biodegradation of bioplastics in natural environments. **Waste Management** 59: 526–536.

Ihlenfeldt, M. J., and Gibson, J. (1977). Acetate uptake by the unicellular cyanobacteria *Synechococcus* and *Aphanocapsa*. **Archive Microbiology** 113(3): 231–241.

Jau, M.-H., Yew, S.-P., Toh, P. S. Y., Chong, A. S. C., Chu, W.-L., Phang, S.-M., Najimudin, N., and Sudesh, K. (2005). Biosynthesis and mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] by *Spirulina platensis*. **International Journal of Biological Macromolecules** 36(3): 144–151.

Keshavarz, T., and Roy, I. (2010). Polyhydroxy alkanoates: Bioplastics with a green agenda. **Current Opinion in Microbiology** 13(3): 321–326.

Khetkorn, W., Incharoensakdi, A., Lindblad, P., and Jantaro, S. (2016). Enhancement of poly-3-hydroxybutyrate production in *Synechocystis* sp. PCC 6803 by overexpression of its native biosynthetic genes. **Bioresource Technology** 214: 761–768.

Lane, C. E., and Benton, M. G. (2015). Detection of the enzymatically-active poly hydroxyalkanoate synthase subunit gene, *phaC*, in cyanobacteria via colony PCR. **Molecular and Cellular Probes** 29(6): 454–460.

López, N. I., Pettinari, M. J., Nikel, P. I., and Méndez, B. S. (2015). Polyhydroxyalka noates: Much more than biodegradable plastics. **Advances in Applied Microbiology** 93: 73–106.

Meeks, J. C., and Castenholz, R. W. (1971). Growth and photosynthesis in an extreme thermophile, *Synechococcus lividus* (Cyanophyta). **Archivfür Mikrobiologie** 78(1): 25–41.

Mendhulkar, V. D., and Shetye, L. A. (2017). Synthesis of biodegradable polymer poly hydroxyalkanoate (PHA) in cyanobacteria *Synechococcus elongates* under mixotrophic nitrogen- and phosphate-mediated stress conditions. **Industrial Biotechnology** 13(2): 85–93.

Ng, L.-M., and Sudesh, K. (2016). Identification of a new polyhydroxyalkanoate (PHA) producer *Aquitalea* sp. USM4 (JCM 19919) and characterization of its PHA synthase. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 122(5): 550–557.

Nishioka, M., Nakai, K., Miyake, M., Asada, Y., and Taya, M. (2001). Production of poly-β-hydroxybutyrate by thermophilic cyano bacterium, *Synechococcus* sp. MA19, under phosphate-limited conditions. **Biotechnology Letters** 23(14): 1095–1099.

Rehm, B. H. A. (2007). Biogenesis of microbial polyhydroxyalkanoate granules: A platform technology for the production of tailor-made bioparticles. **Current Issues in Molecular Biology** 9(1): 41–62.

Sharma, G., Kumar, M., Ali, M. I., and Jasuja, N. D. (2014). Effect of carbon content, salinity and pH on *Spirulina platensis* for phycocyanin, allophycocyanin and phyco erythrin accumulation. **Journal of Microbial and Biochemical Technology** 6(4): 202–206.

Sharma, L. and Mallick, N. (2005). Accumulation of poly-b-hydroxybutyrate in *Nostoc muscorum*: regulation by pH, light-dark cycles, N and P status and carbon sources. **Bioresource Technology** 96: 1304–1310.

Summers, M. L., Denton M. C., and McDermott, T. R. (1999). Genes coding for phosphotransacetylase and acetate kinase in *Sinorhizobium meliloti* are in an operon that is inducible by phosphate stress and controlled by *phoB*. **Journal of Bacteriology** 181(7): 2217–2224.

Wang, Y., Yin, J., and Chen, G.-Q. (2014). Polyhydroxyalkanoates, challenges and opportunities. **Current Opinion in Biotechnology** 30: 59–65.

Zarrouk, C. (1966). Contribution al'etuded'une

cyanophycee. Influence de Divers Facteurs Physiques Et chimiquessur la croissanceet Photosynthese de *Spirulina maxima*, (Setch et Gardner) Geitler. Ph.D. Thesis. Paris: University of Paris.