การหาภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไกลซีนบีเทนภายใต้ความเครียดจากเกลือโดยไซยาโนแบคทีเรียมชนิดเซลล์เดี่ยว *Synechococcus* sp. MH 393765

Optimization of glycinebetaine production under salt stress by unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. MH 393765

ฤทัยรัตน์ สุทธิสุวรรณ[1*], เพ็ชร สุธิภรณ์[2],
Rutairat Suttisuwan[1*], Petch Suthiporn[2]

[1,2] สาขาวิชาชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ
[1,2] Division of Biology, Department of Science, Faculty of Science and Technology,
Rajamangala University of Technology Krungthep, Bangkok, Thailand
*Corresponding Author. Tel. 09 0983 1026, E-mail: rutairat.s@mail.rmutk.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์และโคลีนที่มีผลต่อการผลิตไกลซีนบีเทนและศึกษากิจกรรมของเอนไซม์บีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส และโคลีนดีไฮโดรจีเนส ในภาวะที่มีความเครียดจากเกลือของเชื้อ *Synechococcus* sp. พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์โคลีนดีไฮโดรจีเนส และกิจกรรมของเอนไซม์บีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส ของเชื้อ *Synechococcus* sp. จะเพิ่มขึ้นเมื่อเติมโคลีนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อเจริญเติบโตครบ 9 วัน อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของโคลีน 50 มิลลิโมลาร์ ไม่สามารถเพิ่มปริมาณไกลซีนบีเทนได้ ปริมาณความเข้มข้นของโคลีนที่เหมาะสมคือ 20 มิลลิโมลาร์ ซึ่งในอาหารที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ และเติมโคลีน ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ จะเป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการสะสมไกลซีนบีเทน ซึ่งได้ปริมาณไกลซีนบีเทน 1,986.786 $\pm$ 187.839 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์โคลีนดีไฮโดรจีเนสสูงสุดที่ 4.65 $\pm$ 0.07 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และมีกิจกรรมของเอนไซม์บีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสสูงสุดที่ 4.99 $\pm$ 0.02 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน จากผลการวิจัยในครั้งนี้บ่งบอกได้ว่าระดับความเข้มข้นที่สูงของเกลือโซเดียม คลอไรด์และโคลีน ไม่สามารถส่งผลต่อการสะสมที่มากขึ้นของไกลซีนบีเทนได้

คำสำคัญ : ภาวะความเครียดเกลือ ไกลซีนบีเทน โคลีน โคลีนดีไฮโดรจีเนส บีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส

ABSTRACT

This research aims to study the level of NaCl and choline on glycinebetain production and the activity of Betaine aldehyde dehydrogenase and choline dehydrogenase on salt stress condition of *Synechococcus* sp. It was found that the activity of choline dehydrogenase and activity of Betaine aldehyde dehydrogenase of *Synechococcus* sp. was enhanced when the

Received 29-04-2021
Revised 08-06-2021
Accepted 10-06-2021

choline was added in medium and cultured growth for 9 days. However, the concentration of choline at 50 mM did not increase the glycinebetain. The optimum concentration of choline was 20 mM of choline using the addition of NaCl_medium for 0.5 M to accumulate amount of glycinebetaine of 1,986.786 ± 187.839 ug/mL. The highest activity of choline dehydrogenase was 4.65 ± 0.07 U/mg protein while the highest activity of betaine aldehyde dehydrogenase was 4.99 ± 0.02 U/mg protein. The results of this study indicated that high level of NaCl and choline was not affect to increase the accumulation of glycinebetaine.

Keyword: Salt stress, Glycinebetain, Choline, Choline dehydrogenase, Betaine aldehyde dehydrogenase

1. บทนำ

ปัจจุบันผู้บริโภคได้มีความสนใจในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นสินค้าอุปโภค หรือบริโภค ที่ผลิตมาจากวัตถุดิบธรรมชาติ (natural product) จึงทำให้ผลิตภัณฑ์ หรือวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตซึ่งได้มาจากธรรมชาติมีราคาสูงขึ้น และถ้าเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความเกี่ยวข้องกับสุขภาพ หรือมีฤทธิ์ทางยา ก็จะยิ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์ให้สูงขึ้นไปอีก งานวิจัยนี้มีความสนใจสารที่เรียกว่าไกลซีนบีเทน (Glycinebetaine) ซึ่งใช้เป็นสารเติมแต่ง (Ingredient) ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น ใช้เป็นสารให้ความชุ่มชื้นในอุตสาหกรรมอาหาร และเครื่องสำอางเป็นที่รู้จักกันดีในทางการค้าซึ่งมีชื่อเรียกว่า ไตรเมทธิลไกลซีน (Trimethylglycine) หรือ TMG นอกจากนี้มีงานวิจัยที่พบว่าไกลซีนบีเทนจะช่วยลดระดับโฮโมซีสทีน (Homocysteine) ในร่างกาย [1,2] ดังนั้นจึงมีความสนใจในการผลิตไกลซีนบีเทนจากไซยาโน-แบคทีเรีย (Cyanobacteria)

ไซยาโนแบคทีเรีย เป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีวิวัฒนาการสามารถสร้างระบบการสังเคราะห์แสงได้ ซึ่งในจุลินทรีย์กลุ่มนี้จะมีการสลายโมเลกุลของน้ำโดยอาศัยพลังงานแสงพื่อนำอิเล็กตรอนไปรีดิวซ์คาร์บอนไดออกไซด์เพื่อสร้างสารประกอบอินทรีย์ ผลจากการสลายน้ำด้วยแสงนี้ ทำให้ได้ก๊าซออกซิเจนเกิดขึ้นมา ซึ่งคล้ายคลึงกับที่พบในสาหร่ายและพืช ซึ่งเป็นข้อดีของการผลิตโดยใช้ไซยาโนแบคทีเรียที่กระบวนการผลิตเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงไม่ต้องอาศัยแหล่งคาร์บอนทำให้ต้นทุนในการเพาะเลี้ยงและผลิตไกลซีนบีเทน ลดต่ำลงกว่าการผลิตจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ [3,4] ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียเพื่อให้ได้สารไกลซีนบีเทน จำเป็นต้องเลี้ยงในอาหารที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ [1] เพื่อทำให้เกิดแรงดันออสโมติกของสารละลายในอาหารที่อยู่ล้อมรอบเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย ทำให้เซลล์อยู่ในภาวะขาดน้ำ ซึ่งจะมีการสะสมสารหรือสร้างเอนไซม์บางชนิดเพื่อปรับความเครียดในเซลล์ รวมถึงรักษาสมดุลของน้ำภายในเซลล์ โดยสารดังกล่าวเรียกว่า ออสโมไลต์ (Osmolyte) หรือ ออสโมโปรเทคแทนต์ (Osmoprotectant) ที่เราต้องการคือ ไกลซีนบีเทน (Glycinebetain) ซึ่งถูกสร้างมาจาก โคลีน (Choline) ผ่านทางวิถีโคลีน-ดีไฮโดรจีเนชัน (Choline-dehydrogenation pathway) เอนไซม์ที่สำคัญในวิถีนี้คือ โคลีนดีไฮโดรจีเนส (Choline dehydrogenase;

CDH) โดยจะทำให้โคลีนเปลี่ยนไปเป็นบีเทนอัลดีไฮด์ หลังจากนั้นเอนไซม์บีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (Betain aldehyde dehydrogenase; BADH) จะเปลี่ยนบีเทนอัลดีไฮด์ไปเป็นไกลซีนบีเทน ซึ่งคาดว่าในภาวะแวดล้อมที่มีความเค็มสูง ถ้าไซยาโนแบคทีเรียสามารถนำโคลีนเข้าสู่เซลล์ได้มากก็จะทำให้มีการสะสมของไกลซีนบีเทน อยู่ในปริมาณสูงเช่นกัน [3]

การศึกษาผลิตไกลซีนบีเทน จากไฟโตแพลงก์ตอนทะเล โดยใช้กระบวนการผลิตแบบแบทช์ ทำการศึกษาการผลิตจากไฟโตแพลงตอนถึง 6 ชนิด ได้แก่ *Amphidinium carterae*, *Chrysochromulina* sp., *Emiliania huxleyi*, *Prorocentrum minimum*, *Skeletonema costatum* และ *Tetraselmis* sp. โดยเลี้ยงใน Chromosil 330 teflon column พบว่า *Chrysochromulina* sp. สามารถผลิตไกลซีนบีเทนได้สูงสุดถึง 7.4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับสารออสโมโพรเทคแทนต์ทั้งหมดที่ไฟโตแพลงก์ตอนผลิตได้ และพบการฟอร์มตัวของไกลซีนบีเทนเมื่อเชื้อเจริญอยู่ในช่วงเอ็กโพเนนเชียล (Exponential phase) [5] แต่ยังไม่มีรายงานการวิจัยที่ศึกษาการผลิตไกลซีนบี เทนจากไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถผลิตสารออสโมโพรเทคแทนต์เหมือนพืชได้ แต่มีข้อดีกว่าพืชคือสามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็วกว่า [1] ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะนำไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะทางกายภาพเป็นเซลล์เดียว ที่แยกได้จากอ่าววงเดือน จังหวัดระยอง ของประเทศไทย มาศึกษาการผลิตไกลซีนบีเทน

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อไซยาโนแบคทีเรีย

การเพาะเลี้ยงเชื้อไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* sp. MH 393765 ที่คัดแยกได้จากอ่าววงเดือน จังหวัดระยองของประเทศไทย ในอาหารสูตรดัดแปลง BG 11 + Turk Island salt solution [6] ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยมีปริมาตรการทำงาน 100 มิลลิลิตร เลี้ยงในภาวะเขย่าตลอดเวลาที่ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมความเข้มแสงที่ 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ให้แสงสว่าง:มืด (12:12 ชั่วโมง) เป็นเวลา 14 วัน เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการศึกษา วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) และ Duncan's new multiple range test (DMRT) ในโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 15.0

2.2 การศึกษาผลของความเข้มข้นเกลือและโคลีน ที่มีต่อการผลิตไกลซีนบีเทน

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0, 0.5, 1.0, 1.5, และ 2.0 โมลาร์ และแต่ละความเข้มข้นเกลือจะทำการเติมโคลีน (Choline) ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0, 10, 20 และ 50 มิลลิโมลาร์ ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใส่อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่หัวเชื้อลงไปในฟลากส์ 1 มิลิลิตร ทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะเขย่าตลอดเวลาที่ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมความเข้มแสงที่ 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ให้แสงสว่าง:มืด (12:12 ชั่วโมง) เป็นเวลา 9 วัน [6] วิเคราะห์ผลการทดลองดังนี้

2.2.1 การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อ

การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อโดยการวัดความขุ่นของเซลล์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร

2.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ

การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ โดยดัดแปลงจากวิธีของ [7] นำตัวอย่างมา 500 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับเมทานอล 500 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง เก็บส่วนใสสีเหลืองไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตรนำค่าที่ได้ไปคำนวณหา ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ

2.2.3 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Bradford

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Bradford [8] โดยใช้ โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน (Bovine serum albumin; BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณไกลซีนบีเทน

การวิเคราะห์ด้วยวิธีของ Grieve และ Grattan [9] โดยการนำเซลล์ไปทำให้แตกโดยการโฮโมจีไนซ์ (Homogenize) แล้วแยกส่วนใสมาวิเคราะห์ผลโดยนำมาปริมาณ 250 ไมโครลิตร เติมสารละลายกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 2 นอร์มอล ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เติมสารละลายโพแทสเซียมไตรไอโอไดด์ที่เย็น นำไปเขย่าในอ่างน้ำแข็งนาน 90 นาที หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนที่เย็น ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และเติม 1,2 –ไดคลอโรมีเทนที่เย็นปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้น นำสารที่อยู่ชั้นล่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร หาความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐาน โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

2.4 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โคลีนดีไฮโดรจีเนส และเอนไซม์บีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส

นำส่วนใสที่ได้หลังจากการทำให้เซลล์แตกมาทำการวิเคราะห์ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ต่าง ๆ ดังนี้

2.4.1 กิจกรรมของเอนไซม์โคลีนดีไฮโดรจีเนส

วิเคราะห์ตามวิธีของ Fan และ Master [10] โดยใช้หลักการของการวัดปฏิกิริยารีดักชันของฟีแนนซีน (Phenanzine) มีไซโตโครม ซี เป็นโคเอนไซม์ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร โดยกำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์ คือปริมาณของโคลีนที่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) ใน 1 นาที

2.4.2 กิจกรรมของเอนไซม์บีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส

วิเคราะห์ตามวิธีของ Pan [11] โดยใช้หลักการของการวัดปฏิกิริยารีดักชันของเอ็นเอดีเอช (นิโคตินาไมด์อะดินีนไดนิวคลีโอไทด์; Nicotinamide adenine dinucleotide; NADH) โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร โดยกำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์ คือปริมาณของการผลิตเอ็นเอดีเอช ที่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) ใน 1 นาที

3. ผลการวิจัยและอภิปรายผล

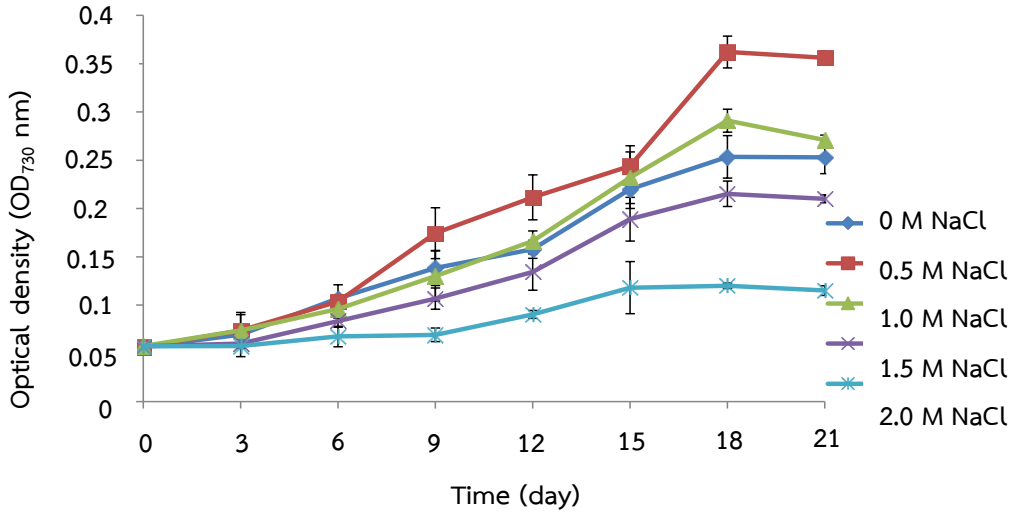
3.1 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Synechococcus* sp. ในภาวะที่มีความเข้มข้นเกลือ

ผลของความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Synechococcus* sp. จึงได้ทำการเลี้ยง *Synechococcus* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลง BG 11 + Turk Island Salt Solution ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 โมลาร์ ทำการตรวจวัดการเจริญเติบโตโดยการวัดความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ดังแสดงในภาพที่ 1 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมทำให้เชื้อ *Synechococcus* sp. มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เพราะถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นของเกลือมากขึ้นจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Synechococcus* sp. ได้ [12]

จากการทดลองพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อทุกสูตรทำให้เชื้อมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ อย่างคงที่จากวันที่ 0 ถึง วันที่ 18 หลังจากนั้นเชื้อจะเข้าสู่การเจริญในระยะ steady state ในการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยเก็บตัวอย่างจนถึงวันที่ 21 และเนื่องจากเชื้อเจริญอยู่ในอาหารที่มีเกลือทำให้เซลล์อยู่ภายใต้ความเครียดจากเกลือ (Salt stress) เป็นผลทำให้เซลล์มีการสะสมสารออสโมโพรเทคแทนต์เพื่อให้เซลล์มีความสามารถในการเจริญเติบโตภายใต้ภาวะที่มีเกลือได้

มีการศึกษาวิจัยการเลี้ยงเชื้อ *Synechococcus* sp. PCC 7942 ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้ในภาวะที่มีความเครียดจากเกลือซึ่งมีความเข้มข้นของเกลือ NaCl ปริมาณ 2 มิลลิโมลาร์ และ 257 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้ยังการศึกษาการทนเค็มของเชื้อไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Synechococcus* sp. PCC 7418 พบว่ามีความสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือ NaCl ปริมาณ 171 มิลลิโมลาร์ และ 462 มิลลิโมลาร์ *Synechococcus* sp. สามารถสะสมสารออสโมไลท์เมื่อเจริญเติบโตอยู่ในระยะ Lag phase ได้ ตัวอย่างสารออสโมไลท์ เช่น ไกลซีนบีเทน [3] นอกจากนี้ในปี 2000 ยังมีงานวิจัยโดยการเลี้ยง *Synechococcus* sp. PCC 7492 ในอาหารสูตร BG-11 ที่เติมเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0.2, 0.375 และ 0.5 โมลาร์ พบว่า ไซยาโนแบคทีเรียก็ยังมีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ [12]

จากผลการทดลองในหัวข้อนี้จึงเลือกทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารไกลซีนบีเทนในวันที่ 9 ในการทดลองในหัวข้อถัดไป เนื่องจากเป็นช่วงวันที่เชื้อมีการผลิตไกลซีนบีเทน และเป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมที่จะทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โคลีนดีไฮโดรจีเนส และเอนไซม์บีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส



ภาพที่ 1 การเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียม *Synechococcus* sp. ในภาวะที่มีความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 โมลาร์

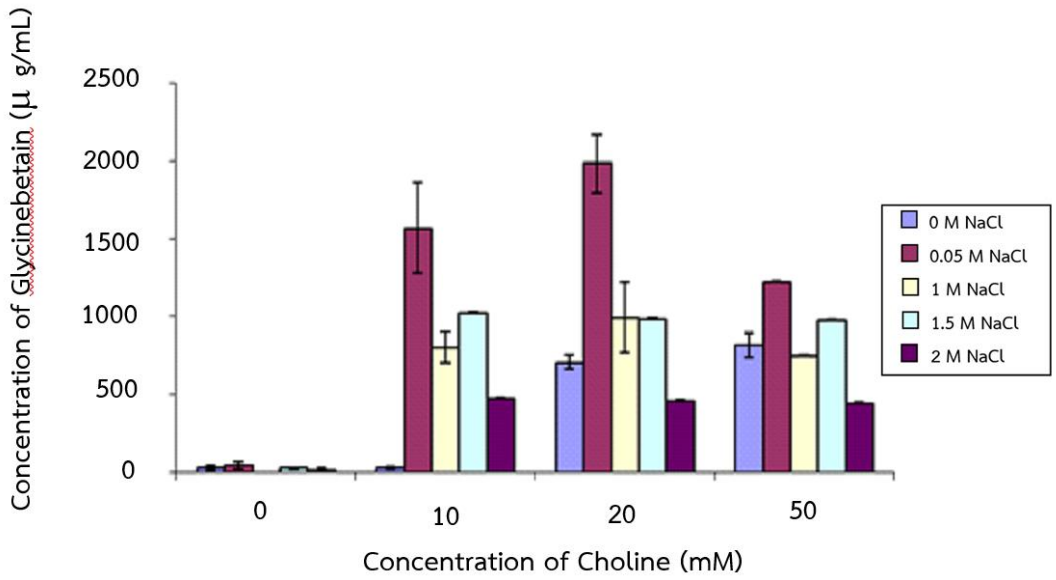
3.2 ความเข้มข้นเกลือและ โคลีน ที่มีต่อการผลิตไกลซีนบีเทน

การศึกษาการผลิตไกลซีนบีเทนโดยทำการเลี้ยง *Synechococcus* sp. ในอาหารสูตร BG-11 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 โมลาร์ และมีปริมาณโคลีนที่ความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 50 มิลลิโมลาร์ ผลการศึกษาพบว่าเมื่อ *Synechococcus* sp. อยู่ในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ และมีปริมาณโคลีน 20 มิลลิโมลาร์ จะมีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอื่น ๆ ทั้งหมด ขณะที่ในอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2.0 โมลาร์ เชื้อจะมีการเจริญเติบโตที่น้อยที่สุด และมีปริมาณคลอโรฟิวส์ เอ ในระดับต่ำที่สุด ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยในปี 2005 ที่ศึกษาการผลิตสารออสโมโพรเทคแทนต์ คือ โพรลีน และไกลซีนบีเทน ในถั่วเขียว พบว่า เมื่อพืชเจริญเติบโตในภาวะที่มีเกลือปริมาณคลอโรฟิวส์ เอ จะลดลง ในขณะที่จะมีการผลิตสารออสโมโพรเทคแทนต์สูงขึ้น [13] ผลการวิจัยในครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อในภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ จากการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ และมีความเข้มข้นโคลีน 10, 20 และ 50 มิลลิโมลาร์ เชื้อ *Synechococcus* sp. ที่เจริญเติบโตได้ 9 วัน จะมีปริมาณโปรตีนสูงสุดซึ่งสอดคล้องกับผลการเจริญเติบโตของเชื้อที่ทำการวัดด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งสอดคล้องกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์โคลีนดีไฮโดรจีเนส และเอนไซม์บีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส ที่จะมีค่าสูงสุดในวันที่ 9 และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2 โมลาร์ จะมีปริมาณโปรตีนต่ำสุด บ่งบอกได้ว่าเชื้อ ไซยาโนแบคทีเรียมมีการเจริญเติบโตที่ไม่ดี ในงานวิจัยนี้ทำการเลือกศึกษาเมื่อเชื้อเจริญได้ 9 วัน เนื่องจาก

ต้องทำการศึกษาตัวอย่างทั้งหมดที่วันเดียวกันแต่ในตัวอย่างที่มีความเข้มข้นเกลือสูง ๆ เมื่อผ่านวันที่ 9 ไปแล้วเชื้อจะเริ่มตายดังนั้นช่วงวันที่ 9 จึงเป็นวันที่เหมาะสมที่สุดในการศึกษา

สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณไกลซีนบีเทน ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 2 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อมีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ และมีปริมาณโคลีนความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ สามารถทำให้ไซยาโนแบคทีเรียมมีการผลิตไกลซีนบีเทนได้สูงสุดปริมาณ 1,986.78 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือ 0.5 โมลาร์ ที่มีปริมาณโคลีน 10 มิลลิโมลาร์ โดยได้ปริมาณไกลซีนบีเทน 1,570.119 มิลลิโมลาร์ ลำดับถัดมาในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ และมีปริมาณโคลีน 20 มิลลิโมลาร์ ทำให้เชื้อสามารถผลิตไกลซีนบีเทนได้ปริมาณ 997.2024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ไซยาโนแบคทีเรียม *Synechocystis* sp. PCC6803 และ *Synechococcus elongatus* PCC7942 จะมีการสร้างสารออสโมโพรเทคแทนต์เมื่ออยู่ในภาวะเครียดเกลือ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์การเจริญเติบโตของเชื้อจะลดลงในวันที่ 8 และเมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโตที่ลดลงสารออสโมโพรเทคแทนต์จะมีปริมาณลดลงเช่นเดียวกัน ไซยาโนแบคทีเรียมที่อยู่ในภาวะเครียดเกลือจะมีการสร้างสารออสโมโพรเทคแทนต์เพื่อให้สามารถเจริญอยู่ในภาวะดังกล่าวได้ และจะใช้โคลีนซึ่งเป็นซับสเตรทในการสร้างไกลซีนบีเทน [1]



ภาพที่ 2 ผลของความเข้มข้นเกลือและโคลีนต่อการผลิตไกลซีนบีเทนของ *Synechococcus* sp. ในวันที่ 9 ของการเจริญเติบโต

เมื่อเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นเกลือและโคลีนต่อการผลิตไกลซีนบีเทนด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าการสะสมไกลซีนบีเทนจะมีมากที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ และมีโคลีนความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ดังแสดงในตารางที่ 1 จึงเป็นการบ่งบอกได้ว่าที่ระดับความเข้มข้นเกลือ 0.5 โมลาร์ มีความเหมาะสมต่อการผลิตไกลซีนบีเทน

ไซยาโนแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว เชื้อไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* sp. PCC 6803, *Synechococcus elongates* PCC 7942 และ *Anabaena* sp. PCC 7120 สามารถสะสมสารออสโมโพรเทคแทนต์ ไว้ภายในเซลล์ได้เมื่อเจริญเติบโตในภาวะที่มีความเครียดเกลือซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้มีการเติมเกลือความเข้มข้น 600 มิลลิโมลาร์ [1] ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยในครั้งนี้ด้วยเช่นกัน

ตารางที่ 1 ปริมาณไกลซีนบีเทนเมื่อเลี้ยง *Synechococcus* sp. ในอาหารที่มีเกลือและโคลีนในปริมาณความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นเกลือ (โมลาร์)	ความเข้มข้นโคลีน (มิลลิโมลาร์)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (เปอร์เซ็นต์/วัน)	ความเข้มข้นไกลซีนบีเทน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
0	0	0.0386	28.7302 ± 18.774^{a}
	10	0.0601	28.5219 ± 6.418^{a}
	20	0.0155	711.8552 ± 42.43^{c}
	50	0	818.6469 ± 77.291^{c}
0.5	0	0.1424	44.8413 ± 27.133^{a}
	10	0.1976	1570.119 ± 289.646^{g}
	20	0.2082	1986.786 ± 187.839^{h}
	50	0.1748	1227.3413 ± 3.871^{f}
1.0	0	0.1342	0.00 ± 0.00^{a}
	10	0.1693	808.0357 ± 98.398^{c}
	20	0.1561	997.2024 ± 225.717^{e}
	50	0.167	751.369 ± 3.155^{c}
1.5	0	0.0688	28.7996 ± 4.09^{a}
	10	0.066	1027.758 ± 6.736^{e}
	20	0.0557	986.3691 ± 2.774^{de}
	50	0.032	979.1469 ± 5.052^{de}

ตารางที่ 1 (ต่อ) ปริมาณไกลซีนบีเทนเมื่อเลี้ยง *Synechococcus* sp. ในอาหารที่มีเกลือและโคลีนในปริมาณความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นเกลือ (โมลาร์)	ความเข้มข้นโคลีน (มิลลิโมลาร์)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (เปอร์เซ็นต์/วัน)	ความเข้มข้นไกลซีนบีเทน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
2.0	0	0	18.4524 ± 10.07^{a}
	10	0	478.8691 ± 2.774^{b}
	20	0	459.9108 ± 4.095^{b}
	50	0	447.4108 ± 6.125^{b}

* a, b, c, e, f, g, h, คือสัญลักษณ์แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

** ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน $\pm$ S.D. (n=3)

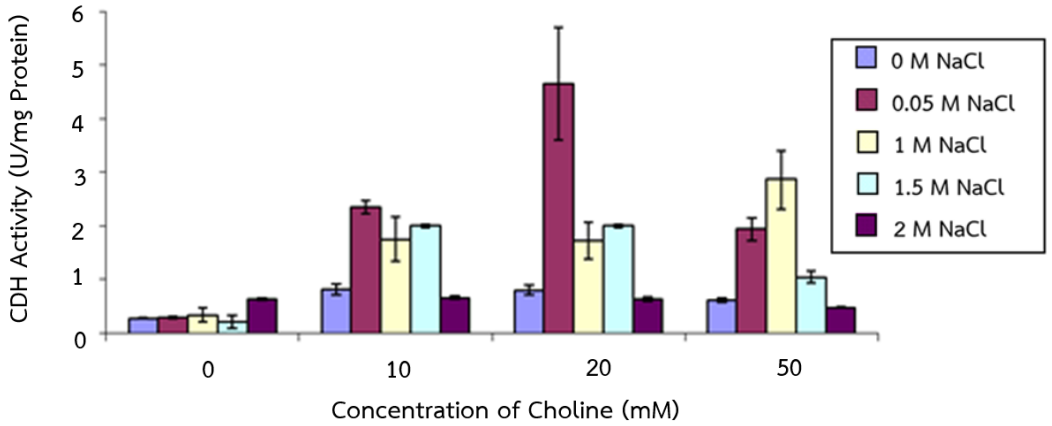
3.3 กิจกรรมของเอนไซม์โคลีนดีไฮโดรจีเนสและเอนไซม์บีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส

กิจกรรมของเอนไซม์โคลีนดีไฮโดรจีเนส (CDH) แสดงในภาพที่ 3 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์โคลีนดีไฮโดรจีเนสจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นในอาหารสูตรที่เติมโคลีนซึ่งแตกต่างจากอาหารสูตรที่ไม่เติมโคลีน อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเกลือความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ และมีโคลีนความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์โคลีนดีไฮโดรจีเนสสูงสุดคือ 4.65 ± 0.07 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน การศึกษาในครั้งนี้สามารถบ่งบอกได้ว่าการเพิ่มปริมาณโคลีนจนถึงความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ จะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์โคลีนดีไฮโดรจีเนสค่อย ๆ เพิ่มขึ้น แต่จะลดลงเมื่อมีโคลีนความเข้มข้นสูงถึง 50 มิลลิโมลาร์ ดังนั้นความเข้มข้นของโคลีนที่เหมาะสมคือความเข้มข้นที่ 20 มิลลิโมลาร์และมีเกลือความเข้มข้น 0.5 โมลาร์

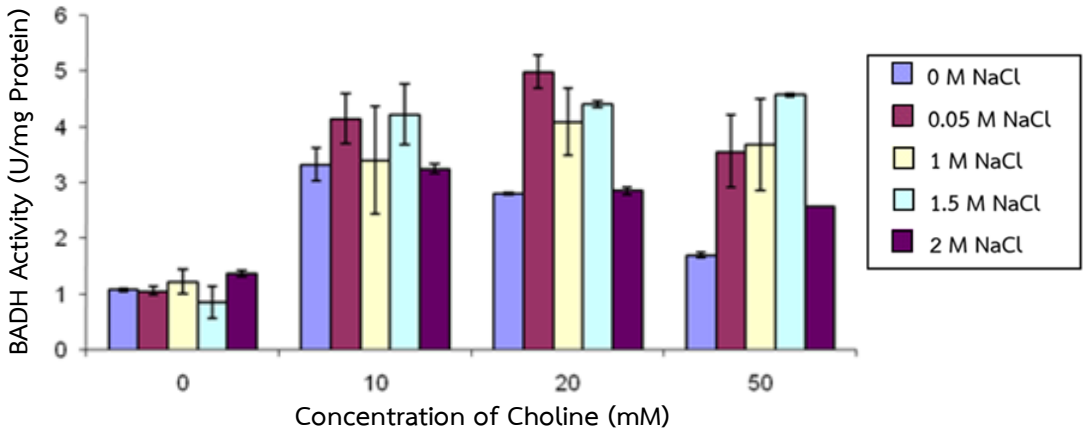
สำหรับกิจกรรมของเอนไซม์บีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (BADH) แสดงในภาพที่ 4 กิจกรรมของเอนไซม์บีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสมีแนวโน้มเหมือนกันกับกิจกรรมของเอนไซม์โคลีนดีไฮโดรจีเนส คือโคลีนมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในอาหารที่มี โคลีนความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์และมีเกลือความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ทำให้มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์บีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสสูงที่สุด คือ 4.99 ± 0.02 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน

ปริมาณการผลิตไกลซีนบีเทนมีความสัมพันธ์กับกิจกรรมของเอนไซม์โคลีนดีไฮโดรจีเนส และเอนไซม์บีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส ในภาวะที่มีความเครียดเกลือไซยาโนแบคทีเรียจะผลิตไกลซีน บีเทนเพื่อมาปกป้องเซลล์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซลล์ ไซยาโนแบคทีเรียเปลี่ยนแปลงให้เซลล์สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ จากการทดลองกล่าวได้ว่าโคลีนเป็นซับสเตรทเพื่อจะถูกนำไปเปลี่ยนให้เป็นไกลซีนบีเทน [14] สมการแสดงความสัมพันธ์ของเอนไซม์ โคลีนดีไฮโดรจีเนส และเอนไซม์บีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส ในการผลิตไกลซีนบีเทน ดังนี้ [15]

โคลีน $\xrightarrow[\text{ดีไฮโดรจีนส}]{\text{โคลีน}}$ บีเทนอัลดีไฮด์ $\xrightarrow[\text{ดีไฮโดรจีเนส}]{\text{บีเทนอัลดีไฮด์}}$ ไกลซีนบีเทน



ภาพที่ 3 ผลของความเข้มข้นเกลือและโคลีนต่อกิจกรรมของเอนไซม์โคลีนดีไฮโดรจีเนสของ *Synechococcus* sp. ในวันที่ 9 ของการเจริญเติบโต



ภาพที่ 4 ผลของความเข้มข้นเกลือและโคลีนต่อกิจกรรมของเอนไซม์บีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสใน *Synechococcus* sp. ในวันที่ 9 ของการเจริญเติบโต

4. สรุปผลการวิจัย

จากงานวิจัยในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* sp. สามารถเจริญเติบโตและผลิตไกลซีนบีเทนได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 ที่ทำการเติมเกลือ NaCl 0.5 โมลาร์และเติมโคลีนความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ โดยการสะสมไกลซีนบีเทนได้เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียจะดูดซึมโคลีนเข้าสู่เซลล์ โดยเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ที่สำคัญสองชนิด คือ โคลีนดีไฮโดรจีเนส (CDH) และเอนไซม์บีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (BADH) ดังนั้นการเพิ่มปริมาณโคลีนเพียงอย่างเดียวไม่สามารถจะเพิ่มการสะสมไกลซีนบีเทนได้อย่างสมบูรณ์แบบยังต้องอาศัยปัจจัยจากเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ด้วย และจากผลการวิจัยในครั้งนี้สามารถนำไปต่อยอดการวิจัยอื่น ๆ ต่อไปได้อีก เช่น การสกัดไกลซีนบีเทนจาก

เซลล์ไซยาโนแบคทีเรียเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมต่าง ๆ ต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้ทำงานวิจัย ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ศรันยา พันธุ์พฤกษ์ จากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อไซยาโนแบคทีเรียม รศ.ดร.อภิชาติ กาญจนทัต จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ชี้แนะให้คำปรึกษาในการทำงานวิจัย และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ ที่สนับสนุนการทำงานวิจัย จากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปี 2563

6. อ้างอิง

[1] Wei D, Feiyan L, Yangkai D, et al. Exploring the photosynthetic production capacity of sucrose by cyanobacteria. Metab Eng. 2013; 19:17-25.

[2] Ivanov A-G, Sane P-V, Simidjiev I, et al. 2012. Restricted capacity for PSI-dependent cyclic electron flow in Δ *petE* mutant compromises the ability for acclimation to iron stress in *Synechococcus* sp. PCC 7942 cells. Biochimica et Biophysica Acta. 2012; 1817:1277-1284.

[3] Sabine F, Jana H, Arne S, et al. Analysis of stress responses in the cyanobacterial strains *Synechococcus* sp. PCC 7942, *Synechocystis* sp. PCC 6803, and *Synechococcus* sp. PCC 7418; Osmolyte accumulation and stress protein synthesis. J Plant Physiol. 1999; 154:240-249.

[4] Zwart F-J, Slow S, Payne R-J, et al. Glycine betaine and glycine betaine analogues in common foods. Food Chem. 2003; 83:197-204.

[5] Keller M-D, Kiene R-P, Matrai P-A et al. Production of glycine betaine and dimethylsulfoniopropionate in marine phytoplankton.I. Batch culture. Mar Biol. 1999; 135:237- 248.

[6] Incharoensakdi A, Karnchanatat A. Salt stress enhances choline uptake in the halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. Biochem Biophys Acta. 2003; 1621:102-109.

[7] Vonshak A, Torzillo G, Tomaseli L. Use of chlorophyll fluorescence to estimate the effect of photoinhibition in outdoor cultures of *Spirulina platensis*. J Phycol. 1994; 6:31-34.

[8] Bradford M-M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1979; 72:248-254.

[9] Grieve C-M, Grattan S-R. Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. Plant Soil. 1983; 70:303-307.

[10] Fan L-L, Masters B-S-S. Properties of purified kidney microsomal NADPH-cytochrome c reductase. Arch Biochem Biophys. 1974; 165:665-671.

[11] Pan S-M, Moreau Y-C, Huang A-H-C. Betaine accumulation and betaine aldehyde dehydrogenase in spinach leaves. Plant Physiol. 1981; 67:1105-1108.

[12] Nobuo K, Takashi H, Yoshito T, et al. Effect of overexpression of *Escherichia coli* kat E and bet genes on the tolerance for salt stress in a fresh water cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. Plant Sci. 2000; 159:281-288.

[13] Neelam M, Ajay K. Effect of salt stress on proline metabolism in two high yielding genotypes of green gram. Plant Sci. 2005; 169:331-339.

[14] Martin H. Molecular biology of cyanobacterial salt acclimation. FEMS Microbiol Rev. 2011; 35:87-123.

[15] Tony C, Norio M. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic enginerring of betaines and other compatible solutes. Curr Opin Plant Biol. 2002; 5(3):250-257