



โซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่าย :  
พันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลและเทคโนโลยีชีวภาพ



รศ. ดร.วิภา จิงจตุพรชัย  
สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล  
มหาวิทยาลัยมหิดล





โซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่าย :  
พันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลและเทคโนโลยีชีวภาพ

รศ. ดร.วิภา จິงจตุพรชัย  
สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล  
มหาวิทยาลัยมหิดล

# ไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่าย : พันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลและเทคโนโลยีชีวภาพ

**ผู้จัดพิมพ์** รศ. ดร.วิภา จິงจตุพรชัย  
สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล  
25/25 ถนนพุทธมณฑลสาย 4 ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมณฑล  
จังหวัดนครปฐม 73170

**พิมพ์ครั้งแรก** กุมภาพันธ์ 2561

**จำนวน** 300 เล่ม

## ข้อมูลทางบรรณานุกรมของสำนักหอสมุดแห่งชาติ

วิภา จິงจตุพรชัย.

ไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่าย : พันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลและเทคโนโลยีชีวภาพ.

-- กรุงเทพฯ : อมรินทร์, 2561.

160 หน้า.

1. ไซยาโนแบคทีเรีย. 2. สาหร่ายขนาดเล็ก. I. ชื่อเรื่อง.

579.3

ISBN 978-616-455-602-7

**พิมพ์ที่** บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน)  
376 ถนนชัยพฤกษ์ แขวงตลิ่งชัน เขตตลิ่งชัน กรุงเทพฯ 10170  
โทรศัพท์ 0-2422-9000, 0-2882-1010 โทรสาร 0-2433-2742, 0-2434-1385  
E-mail : [aprint@amarin.co.th](mailto:aprint@amarin.co.th) Homepage : <http://www.amarin.com>

## คำนำ

มีความสนใจเป็นอันมากในการนำไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) หรือสาหร่ายสีเขียวกามน้ำเงิน (blue green algae) และจุลสาหร่าย (microalgae) มาใช้ประโยชน์ต่าง ๆ เช่น เป็นอาหารของคน อาหารเสริมของสัตว์ ปุ๋ยชีวภาพ ผลิตภัณฑ์มูลค่าสูง และเชื้อเพลิงชีวภาพ เป็นต้น เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายสร้างอาหารได้เองจากการสังเคราะห์แสง จึงต้องการเพียงแสง คาร์บอนไดออกไซด์ และแร่ธาตุเพียงเล็กน้อย (trace elements) ที่ไม่ต้องใช้ที่ดินในการเพาะเลี้ยง ให้ผลผลิตชีวมวลสูง และที่สำคัญคือเป็นแหล่งของสารเคมีหลากหลาย แม้ไซยาโนแบคทีเรียเป็นโพรแคริโอต (prokaryote) และจุลสาหร่ายเป็นยูแคริโอต (eukaryote) แต่ทั้งคู่มักเจริญเติบโตผสมปนกันในธรรมชาติ นอกจากนี้ วิธีการเพาะเลี้ยงและการนำไปใช้ประโยชน์ก็คล้ายกัน ปัจจุบันจึงมักรวมการศึกษาไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายเข้าด้วยกัน อย่างไรก็ตาม อย่างไรก็ดี สายพันธุ์ที่ใช้ศึกษาวิจัยมีน้อยมาก มักใช้สายพันธุ์ต้นแบบ (model) จึงทำให้ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายมีอย่างจำกัด ในช่วงสิบปีที่ผ่านมา ทั่วโลกมีการวิจัยอย่างมากเกี่ยวกับการใช้ไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายสำหรับผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ (biofuel) ส่งผลให้เกิดการตื่นตัวในการพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพของไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่าย ความก้าวหน้าด้านเทคโนโลยีที่ให้ข้อมูลสูง (high-throughput data) และชีวสารสนเทศ (bioinformatics) ช่วยวิเคราะห์ข้อมูลจำนวนมากได้ในเวลาอันรวดเร็วอย่างไม่เคยปรากฏมาก่อน ทำให้เกิดศาสตร์โอมิกส์ (omics) ซึ่งนำไปสู่ความรู้ความเข้าใจในกระบวนการสังเคราะห์สารชีวโมเลกุล (biomolecules) ในไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่าย ทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะปรับปรุงพันธุ์ให้ไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายเป็น “โรงงาน” สำหรับผลิตสารธรรมชาติใหม่ ๆ ในเชิงพาณิชย์มากขึ้น จึงเป็นเวลาอันเหมาะสมในการเขียนหนังสือ “ไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่าย : พันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลและเทคโนโลยีชีวภาพ”

หนังสือเล่มนี้ ผู้เขียนได้รวบรวมเนื้อหาเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้ไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายด้านเทคโนโลยีชีวภาพที่ใช้องค์ความรู้พันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล ผู้เขียนได้แสดงให้เห็นถึงแนวคิดและความหลากหลายของเทคโนโลยีที่มีการรายงานในปัจจุบัน รวมทั้งชี้ให้เห็นถึงการพัฒนาที่เป็นไปได้ในอนาคต หนังสือเล่มนี้แบ่งเป็นหกบท บทที่หนึ่งกล่าวถึงข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่าย การจำแนก การเพาะเลี้ยง และการประยุกต์ใช้ทางเทคโนโลยีชีวภาพ บทที่สองกล่าวถึงโอมิกส์ (omics) ของไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายสำหรับเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น จีโนมิกส์ (genomics) ทรานสคริปโตมิกส์ (transcriptomics) โปรตีโอมิกส์ (proteomics) และเมแทบอลอมีิกส์ (metabolomics) เป็นต้น การปรับปรุงพันธุ์ด้วยโอมิกส์และวิศวกรรมเมแทบอลิก (metabolic engineering) ที่นำไปสู่การค้นพบผลิตภัณฑ์ธรรมชาติใหม่ ๆ เพื่อประยุกต์ใช้ทางเทคโนโลยีชีวภาพ เนื่องจากการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิศวกรรมเมแทบอลิก จำเป็นต้องใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) เข้าร่วมด้วยในบทที่สามจึงได้กล่าวถึงพันธุวิศวกรรมในไซยาโนแบคทีเรีย ชีววิทยาสังเคราะห์ การควบคุมการแสดงออกของยีน องค์ประกอบของพันธุวิศวกรรมในไซยาโนแบคทีเรีย และการประยุกต์ใช้ไซยาโนแบคทีเรียตัดแปรพันธุกรรม บทที่สี่กล่าวถึงพันธุวิศวกรรมในจุลสาหร่าย การควบคุมการแสดงออกของยีน องค์ประกอบของพันธุวิศวกรรมทั้งในนิวเคลียสและคลอโรพลาสต์ของจุลสาหร่าย และการประยุกต์ใช้จุลสาหร่ายตัดแปรพันธุกรรม บทที่ห้ากล่าวถึงเชื้อเพลิงชีวภาพ (biofuel) จากไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่าย การใช้พันธุวิศวกรรมในวิถีเมแทบอลิกของไซยาโนแบคทีเรียหรือจุลสาหร่ายเพื่อผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพต่าง ๆ เช่น ไฮโดรเจน (hydrogen) เอทานอล (ethanol) แอลเคน (alkane) และ ไบโอดีเซล (biodiesel) เป็นต้น และบทที่หกกล่าวถึงแนวโน้มในอนาคต การวิจัยและพัฒนาไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่าย เพื่อให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้สามารถแข่งขันในเชิงพาณิชย์ การคัดเลือกและการปรับปรุงสายพันธุ์ การเพาะเลี้ยงและการเก็บเกี่ยวชีวมวล และการผลิตสารต่าง ๆ จากชีวมวลด้วยระบบโรงกลั่นชีวภาพ (biorefinery) นอกจากนี้ ยังมีข้อมูลผลงานวิจัยของผู้เขียน แทรกอยู่ในเนื้อหาส่วนต่าง ๆ รวมทั้งใช้เป็นกรณีศึกษาในบทที่สาม สี่ และห้า

ผู้เขียนขอแสดงความกตัญญูต่อบุพการีและครูอาจารย์ทุกท่าน ผู้สนับสนุนให้ใฝ่รู้จนเกิดความงอกงามทางปัญญา ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.มรกต ตันติเจริญ ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการปรับปรุงเพิ่มเติมจนทำให้หนังสือเล่มนี้เสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.วรภารณ์ อัครปทุมวงศ์ ที่ให้กำลังใจและสละเวลาช่วยอ่านและแก้ไขเพิ่มเติม ขอขอบคุณนักศึกษา ผู้ช่วยวิจัย ผู้ร่วมงาน และอาจารย์ทุกท่าน ที่มีส่วนสำคัญในการขับเคลื่อนงานวิจัยของผู้เขียนให้มีความก้าวหน้า จนทำให้ค้นพบองค์ความรู้และประมวลมาถ่ายทอดเป็นหนังสือเล่มนี้

คำศัพท์วิทยาศาสตร์ภาษาไทยในหนังสือนี้ ผู้เขียนได้ตรวจสอบให้ถูกต้องตามพจนานุกรมฉบับราชบัณฑิตยสถาน สำหรับคำที่มีได้บัญญัติไว้ ผู้เขียนได้พยายามแปลโดยอ้างอิงตามหลักพจนานุกรมฉบับราชบัณฑิตยสถาน

สุดท้ายนี้ ผู้เขียนหวังเป็นอย่างยิ่งว่า หนังสือเล่มนี้จะเป็นประโยชน์ต่อนักศึกษา นักวิจัย และนักวิทยาศาสตร์ ช่วยกระตุ้นให้เกิดแนวคิดและการสร้างสรรค์ใหม่ในการวิจัยและพัฒนาการประยุกต์ใช้ไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายทางเทคโนโลยีชีวภาพในประเทศไทยต่อไป

วิภา จິงจตุพรชัย  
สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล  
มหาวิทยาลัยมหิดล

# สารบัญ

คำนำ	ก
บทที่	
1 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่าย	1
บทนำ	1
การจำแนกไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่าย	5
การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่าย	9
การประยุกต์ไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่าย	10
บทสรุป	14
2 โอมิกส์ของไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายสำหรับเทคโนโลยีชีวภาพ	17
บทนำ	17
จีโนมิกส์	18
ทรานสคริปโตมิกส์	27
โปรตีโอมิกส์	28
เมแทบอลิโอมิกส์	29
โอมิกส์อื่น ๆ	30
วิศวกรรมเมแทบอลิก	31
กรณีศึกษา	32
บทสรุป	36



<b>3 พันธุวิศวกรรมในไฮยาโนแบคทีเรีย</b>	<b>43</b>
บทนำ	43
ชีววิทยาสังเคราะห์ในไฮยาโนแบคทีเรีย	44
การควบคุมการแสดงออกของยีนในไฮยาโนแบคทีเรีย	45
พันธุวิศวกรรมในไฮยาโนแบคทีเรีย	50
กรณีศึกษา	63
การประยุกต์ไฮยาโนแบคทีเรียดัดแปรพันธุกรรม	66
บทสรุป	71
<b>4 พันธุวิศวกรรมในจุลสาหร่าย</b>	<b>77</b>
บทนำ	77
การควบคุมการแสดงออกของยีนในจุลสาหร่าย	78
พันธุวิศวกรรมในจุลสาหร่าย	81
กรณีศึกษา	98
การประยุกต์จุลสาหร่ายดัดแปรพันธุกรรม	102
บทสรุป	107
<b>5 เชื้อเพลิงชีวภาพจากไฮยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่าย</b>	<b>115</b>
บทนำ	115
เชื้อเพลิงชีวภาพจากไฮยาโนแบคทีเรีย	116
เชื้อเพลิงชีวภาพจากจุลสาหร่าย	123
กรณีศึกษา	126
บทสรุป	129
<b>6 แนวโน้มในอนาคต</b>	<b>135</b>
บทนำ	135
การคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์	135
การเพาะเลี้ยงและการเก็บเกี่ยวชีวมวล	136
การผลิตสารต่าง ๆ จากชีวมวลด้วยระบบโรงกลั่นชีวภาพ	137
บทสรุป	138
<b>ดัชนี</b>	<b>139</b>
Gene Index	142
Species Index	144
Subject Index	147
<b>ประวัติผู้เขียน</b>	<b>151</b>



# บทที่ 1

## ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับไซยาโนแบคทีเรีย และจุลสาหร่าย

### 1.1 บทนำ

สาหร่าย (algae) มีการนำมาใช้ประโยชน์ด้านต่าง ๆ เช่น เป็นอาหารคน อาหารสัตว์ การบำบัดน้ำเสีย ปุ๋ยชีวภาพ และสารสี (pigment) เป็นต้น ทั้งนี้เพราะสาหร่ายสร้างอาหารได้เองจากการสังเคราะห์แสงโดยใช้คลอโรฟิลล์เอ (chlorophyll a) แล้วคายออกซิเจน (oxygen evolved photosynthesis) จึงต้องการเพียงแสง คาร์บอนไดออกไซด์ และแร่ธาตุเพียงเล็กน้อย (trace elements) ที่ไม่ต้องใช้ที่ดินในการเพาะเลี้ยง สาหร่ายแบ่งเป็น 2 พวกใหญ่ ๆ คือ พวกโพรแคริโอต (prokaryote) ได้แก่ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue green algae) หรือไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) และพวกยูแคริโอต (eukaryote) ที่มีทั้งมหสาหร่าย (macroalgae) ซึ่งมีขนาดใหญ่ และจุลสาหร่าย (microalgae) ซึ่งมีขนาดเล็กมองไม่เห็นด้วยตาเปล่า (microscopic algae) ในหนังสือเล่มนี้จะกล่าวเฉพาะสาหร่ายในกลุ่มไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายเท่านั้น

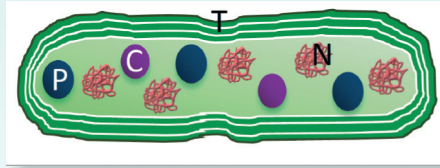
ไซยาโนแบคทีเรียมีลักษณะที่แตกต่างกันได้แก่ พวกที่เป็นเซลล์เดี่ยว เช่น *Synechocystis* sp. และ *Synechococcus* sp. (ดังแสดงในรูปที่ 1-1) พวกที่อยู่เป็นกลุ่ม เช่น *Xenococcus* sp. พวกที่เป็นเส้นสาย เช่น *Spirulina* sp. และ *Arthrospira* sp. พวกที่เป็นเส้นสายบางสปีชีส์ (species) เช่น *Calothrix* sp. และ *Nostoc* sp. ยังมีเซลล์หลายรูปแบบเพื่อตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อม ได้แก่ เซลล์อะคิเน็ต (akinetete) ซึ่งเป็นสปอร์ (spore) ที่ทนต่อสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม และเซลล์เฮเทอโรซิสต์ (heterocyst) สำหรับตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixation) เป็นต้น [1] (ดูตารางที่ 1-1)

จุลสาหร่ายเป็นยูแคริโอตเซลล์เดียว บางชนิดมีสีเขียว (Chlorophyta) สีแดง (Rhodophyta) หรือสีน้ำตาล (Cryptophyta) บางชนิดมีแฟลเจลลา (flagella) เซลล์อยู่กันหลายลักษณะ พวกที่เป็นเซลล์เดี่ยว เช่น *Chlamydomonas* sp. และ *Neochloris* sp. (ตั้งแสดงในรูปที่ 1-2) พวกที่เป็นเส้นสาย เช่น *Chaetophora* sp. และ *Oedogonium* sp. พวกที่รวมกลุ่ม เช่น *Volvox* sp. และ *Botryococcus* sp. เป็นต้น นอกจากนี้ยังรวมถึงพวกที่คล้ายเซลล์พืชและสัตว์ (Euglenophyta) และพวกไดอะตอม (diatom) [2] (ดูตารางที่ 1-2)

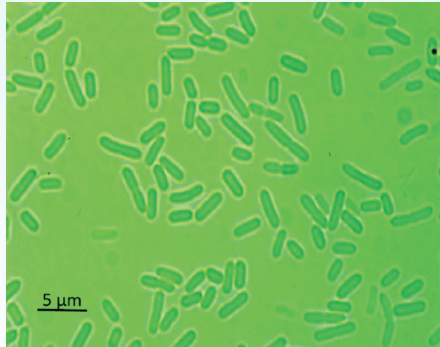
ไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายมีบทบาทช่วยลดคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของภาวะโลกร้อน (global warming) เนื่องจากพืโกไซยาโนแบคทีเรียทะเล (marine picocyanobacteria) ได้แก่ *Synechococcus* sp. และ *Prochlorococcus* sp. ตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ส่วนใหญ่ของมหาสมุทร เพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง แล้วคายออกซิเจนให้โลก [3] นอกจากนี้ไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายสามารถกักเก็บ (sequestration) คาร์บอนไดออกไซด์จากโรงงานอุตสาหกรรม แล้วให้ผลผลิต เช่น เชื้อเพลิงชีวภาพ (biofuel) และเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) อื่น ๆ ที่น่าสนใจ เป็นต้น [4]

ไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายมักเจริญเติบโตผสมปนกันในธรรมชาติ พบได้ในแทบทุกสภาพแวดล้อม เช่น ในดิน น้ำจืด น้ำกร่อย น้ำเค็ม น้ำพุร้อน และหิมะ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีวิธีการเพาะเลี้ยงและการนำไปใช้ประโยชน์ที่คล้ายกัน การศึกษาจุลสาหร่ายในปัจจุบัน จึงรวมไซยาโนแบคทีเรียเข้าไปด้วย ไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายมีความหลากหลาย (biodiversity) มาก ไซยาโนแบคทีเรียที่ค้นพบแล้วมีประมาณ 2,000 สปีชีส์และแบ่งเป็น 150 เจเนอรา (genera) ส่วนจุลสาหร่ายนั้นคาดว่ามีความประมาณ 200,000 ถึงหลายล้านสปีชีส์ [5] ดังนั้น ไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายจึงมีองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ที่หลากหลายด้วย เป็นจุลชีพที่เป็นไปได้มากที่สุดกลุ่มหนึ่งที่จะเป็นแหล่งของสารเคมีมูลค่าสูง ผลิตภัณฑ์ใหม่ ๆ และการประยุกต์ทางเทคโนโลยีชีวภาพ [2, 5] การใช้ทางเทคโนโลยีชีวภาพให้ประสบความสำเร็จนั้น ปัจจัยสำคัญอยู่ที่การเลือกใช้สายพันธุ์ ไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่าย ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อสภาวะที่ใช้เพาะเลี้ยงและให้ผลผลิตตามต้องการ อย่างไรก็ตาม ไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายจำนวนมากที่ได้สำรวจและศึกษาในบทนี้จะขอกกล่าวถึงไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่าย ในแง่ของการจำแนก การเพาะเลี้ยง และการประยุกต์ใช้ทางเทคโนโลยีชีวภาพ

(ก)



(ข)



(ค)



รูปที่ 1-1 ไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus elongatus* PCC 7942

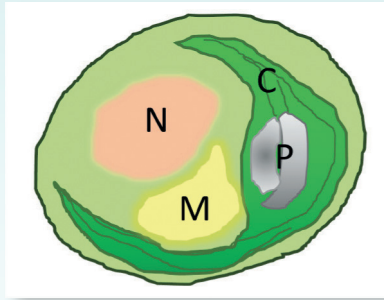
(ก) โครงสร้างของเซลล์ T: thylakoid membrane; P: polyphosphate granule; C: carboxysome shell; N: nucleoid ข้อมูลจาก [6, 7]

(ข) เซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

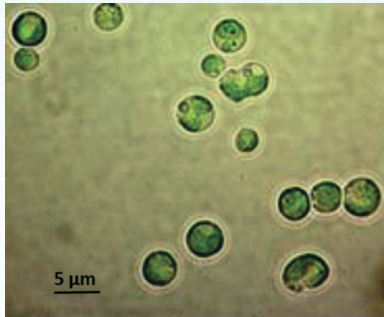
(ค) เซลล์เจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวและแข็ง สามารถแยกเป็นโคโลนี (colony) เต็มบนอาหารแข็ง

ที่มา: ภาพโดย วิภา จิงจตุพรชัย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

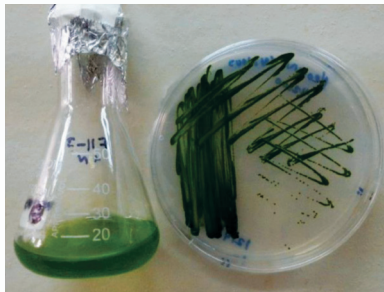
(ก)



(ข)



(ค)



รูปที่ 1-2 จุลสาหร่าย *Neochloris oleoabundans*

(ก) โครงสร้างของเซลล์ C: chloroplast; P: pyrenoid; M: mitochondrion; N: nucleus ข้อมูลจาก [8]

(ข) เซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

(ค) เซลล์เจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวและแข็ง สามารถแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวบนอาหารแข็ง  
ที่มา: ภาพโดย วิภา จิงจตุพรชัย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

## 1.2 การจำแนกไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่าย

ไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายมีความหลากหลายมาก ซึ่งอาจมากกว่าพืชชั้นสูงหรือสัตว์ [2] และยังมีอีกมากที่ยังไม่ได้สำรวจ อนุกรมวิธาน (taxonomy) ของไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายมีการจำแนกไว้แตกต่างกันหลายแบบโดยใช้ฟีโนไทป์ (phenotype) ปัจจุบันใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล เช่น การใช้ลำดับของยีนสร้าง 16S rRNA (สำหรับไซยาโนแบคทีเรีย) 18S rRNA และ 28S rRNA (สำหรับจุลสาหร่าย) เพื่อจัดทำแผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ (phylogenetic tree) ทำให้มีการปรับเปลี่ยนอนุกรมวิธานของไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายอยู่บ่อย ๆ และยังมีประเด็นที่เป็นปัญหาไม่เห็นพ้องกัน [2, 9-12] จึงอาจทำให้เกิดความสับสนได้ในที่นี้จะเสนอการจำแนกไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่าย (ยกเว้นมหสาหร่าย) โดยใช้ฟีโนไทป์พอสังเขป (ตารางที่ 1-1 และ 1-2) ส่วน Prochlorophyta (ในตารางที่ 1-1) เป็นโพรแคโรอิต แต่แตกต่างจากไซยาโนแบคทีเรียตรงที่มีคลอโรฟิลล์เอและบี (chlorophyll a, b) เช่นเดียวกับจุลสาหร่ายยูแคริโอตและพืชชั้นสูง ดำรงชีวิตลอยอยู่ในมวลน้ำเป็นแพลงก์ตอน (plankton) เช่น *Prochlorothrix* sp. และ *Prochlorococcus* sp. เป็นต้น [13]

**ตารางที่ 1-1** การจำแนกไซยาโนแบคทีเรียและตัวอย่างสายพันธุ์สำหรับเทคโนโลยีชีวภาพ  
ที่มา: ตารางโดย วิภา จิงจตุพรชัย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

Division	Major group	e.g. genera/used for biotechnology
Cyanobacteria <sup>a</sup> (Cyanophyta, blue-green algae)	• <b>Chroococcales</b> (unicellular)	• <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942 <sup>c</sup> and <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 used as model system
	• <b>Pleurocapsales</b> (unicellular and aggregate-forming)	• <i>Xenococcus</i> sp.; none exploited for biotechnology
	• <b>Oscillatoriales</b> (filamentous; no specialized cells)	• <i>Spirulina</i> sp. and <i>Arthrospira</i> sp. <sup>d</sup> rich in $\gamma$ -linolenic acid and protein used as food and animal feed

Division	Major group	e.g. genera/used for biotechnology
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Nostocales</b> (filamentous; specialized cells: heterocysts, akinetes)</li> <li>• <b>Stigonematales</b> (filamentous; branched; specialized cells: heterocysts, akinetes and motile, gliding hormonogia)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Anabaena</i> sp., <i>Calothrix</i> sp. and <i>Nostoc</i> sp. used as biofertilizer [2]; <i>Nostoc muscorum</i> and <i>Aulosira fertilissima</i> used for poly-3-hydroxybutyrate production [14, 15]</li> <li>• <i>Fischerella</i> sp.; none exploited for biotechnology</li> </ul>
Prochlorophyta <sup>b</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Prochlorales</b> (artificial group; coccoid and filamentous; free-living chloroplast)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Prochlorothrix</i> sp. and <i>Prochlorococcus</i> sp.; none exploited for biotechnology</li> </ul>

<sup>a</sup>: ข้อมูลจาก [1, 16]

<sup>b</sup>: ข้อมูลจาก [13]

<sup>c</sup>: ชื่อเดิม *Anacystis nidulans* R2 ต่อมาเปลี่ยนเป็น *Synechococcus* sp. PCC 7942 ปัจจุบันเปลี่ยนเป็น *Synechococcus elongatus* PCC 7942

<sup>d</sup>: *Spirulina platensis* และ *Spirulina maxima* ได้เปลี่ยนชื่อเป็น *Arthrospira platensis* และ *Arthrospira maxima* ตามลำดับ ในหนังสือเล่มนี้จึงขอใช้ *Arthrospira* sp. แทน *Spirulina* sp. ที่เป็นอาหาร



## ตารางที่ 1-2 การจำแนกจุลสาหร่ายและสายพันธุ์ที่สำคัญสำหรับเทคโนโลยีชีวภาพ

ที่มา: ตารางโดย วิภา จิงจตุพรชัย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

Division <sup>a</sup>	Major group <sup>a</sup>	Important genera for biotechnology <sup>b</sup>
Chlorophyta (green algae)	• <b>Prasinophyceae</b> (flagellated unicells)	• <i>Tetraselmis</i> sp., <i>Pyramimonas</i> sp. and <i>Micromonas</i> sp. used as feed for mollusk larvae
	• <b>Chlorophyceae</b> (unicells or filamentous microalgae)	• <i>Dunaliella salina</i> used for $\beta$ -carotene production; <i>Haematococcus pluvialis</i> used for astaxanthin production; <i>Chlamydomonas</i> sp., <i>Chlorella</i> sp., <i>Scenedesmus</i> sp. and <i>Nannochloris</i> sp. used commercially in aquaculture; <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> used as a model system; <i>Neochloris oleoabundans</i> used as feedstock for biodiesel
	• <b>Ulvophyceae</b> (filamentous microalgae)	• None exploited for biotechnology
	• <b>Charophyceae</b> (filamentous microalgae)	• None exploited for biotechnology
Rhodophyta (red algae)	• <b>Bangiophycidae</b> (microalgae)	• <i>Porphyridium</i> sp. used for the production of arachidonic acid, pigments (phycocyanin and phycoerythrin), and extracellular polysaccharides

Division <sup>a</sup>	Major group <sup>a</sup>	Important genera for biotechnology <sup>b</sup>
<b>Glaucophyta</b>	• (flagellated unicells)	• None exploited for biotechnology
<b>Euglenophyta</b>	• plant-like and animal-like characteristics (flagellated unicells)	• None exploited for biotechnology
<b>Cryptophyta</b> (reddish brown algae)	• (unicells)	• None exploited for biotechnology
<b>Pyrrophyta</b> (dinoflagellata)	• (flagellated unicells)	• <i>Gymnodinium</i> sp. containing high concentration of docosahexaenoic acid (DHA) used as feed in aquaculture
<b>Chromophyta</b> (heterokont algae)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Prymnesiophyceae</b> or Haptophytes (yellow-green to brownish algae, flagellated or coccoid unicells)</li> <li>• <b>Xanthophyceae</b> (yellow-green algae, unicells or filamentous cells)</li> <li>• <b>Chrysophyceae</b> (golden-brown algae, flagellated unicells)</li> <li>• <b>Eustigmatophyceae</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• None exploited for biotechnology</li> <li>• None exploited for biotechnology</li> <li>• None exploited for biotechnology</li> <li>• <i>Nannochloropsis</i> sp. containing high concentration of eicosapentaenoic acid (EPA) used as feed in aquaculture</li> </ul>

(ต่อ)

Division <sup>a</sup>	Major group <sup>a</sup>	Important genera for biotechnology <sup>b</sup>
	• <b>Bacillariophyceae</b> (diatoms)	• <i>Phaeodactylum</i> sp., <i>Nitzschia</i> sp. and <i>Thalassiosira</i> sp. containing high concentration of EPA used as feed in aquaculture

<sup>a</sup>: แสดงเฉพาะที่เป็นจุลสาหร่ายเท่านั้น ข้อมูลจาก [2]

<sup>b</sup>: ข้อมูลจาก [11]

### 1.3 การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่าย

เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายใช้พลังงานแสงในกระบวนการสังเคราะห์แสงอย่างมีประสิทธิภาพ จึงมีผลผลิตชีวมวลต่อหน่วยพื้นที่สูงกว่าการปลูกพืชบกทั่วไป ในธรรมชาติมักพบไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายหลากหลายชนิดเจริญเติบโตผสมปนกัน จึงจำเป็นต้องแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) ก่อนนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อการศึกษา เช่น สันฐานวิทยา สรีรวิทยา การเจริญ และชีวเคมี เป็นต้น การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายมีปัจจัยที่ควรคำนึง ได้แก่ แสง อุณหภูมิ คาร์บอนไดออกไซด์ อาหาร และน้ำ ซึ่งมีแหล่งที่มาหลากหลายดังแสดงในรูปที่ 1-3 ส่วนสูตรอาหารที่ใช้สารเคมีเพื่อเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายจะไม่กล่าวถึงในที่นี้ แต่สามารถดูรายละเอียดได้ใน Becker 1994 [17] การเพาะเลี้ยงทำได้ตั้งแต่ขนาดเล็กในห้องปฏิบัติการจนถึงขนาดใหญ่ระดับอุตสาหกรรม การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายในระดับอุตสาหกรรมให้ประสบความสำเร็จนั้น ต้องใช้เทคโนโลยีระดับสูงที่ผสมผสานระหว่างเทคโนโลยีการเกษตรและเทคโนโลยีการหมัก (fermentation technology) [17] ซึ่งโดยพื้นฐานแล้ววิธีเพาะเลี้ยงแบ่งได้ 2 แบบ ได้แก่ ระบบปิดและระบบเปิด การเพาะเลี้ยงระบบปิด เช่น เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบให้แสง (photobioreactor) ซึ่งเป็นถังหมัก (fermentor) ที่มีแสงและระบบควบคุมต่าง ๆ ที่ซับซ้อน ปิดกั้นจากสิ่งแวดล้อมภายนอก เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากสารเคมีหรือสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ และป้องกันไม่ให้ไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายที่ปนเปื้อนมาเจริญเติบโตแข่งกับชนิดที่เพาะเลี้ยงซึ่งมักไม่สามารถแข่งขันได้ ระบบปิดนี้มักใช้เพาะเลี้ยงเพื่อทำผลิตภัณฑ์มีมูลค่าสูง เช่น ไฟโคบิลินเกรดรีเอเจนต์ (reagent-grade phycobilin) หรือสารประกอบติดตามไอโซโทปที่ใช้ในงานวิจัย (isotopically-labeled research compounds) [2] เป็นต้น ส่วนการเพาะเลี้ยงระบบเปิด เช่น บ่อน้ำวน (raceway pond) ขนาดใหญ่ เป็นบ่อเปิดที่สัมผัสกับอากาศโดยตรง

มักใช้ระบบนี้เพื่อเพาะเลี้ยงสำหรับใช้ทำผลิตภัณฑ์อาหารเสริมในคน เป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ หรือใช้ในการบำบัดน้ำเสีย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวิธีการออกแบบทางวิศวกรรมของบ่อ นอกจากนี้ วิธีเพาะเลี้ยงยังแบ่งตามวัตถุดิบที่ใช้และการใช้ประโยชน์จากชีวมวลได้ 2 ระบบ ดังนี้

1) ระบบที่ใช้กระบวนการสะอาด ใช้เลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ของสายพันธุ์ที่คัดเลือกด้วยน้ำสะอาด เติมแร่ธาตุอาหารและแหล่งคาร์บอน (carbon source) ไซยาโนแบคทีเรียหรือจุลสาหร่ายที่ได้มักนำไปใช้เป็นอาหารเสริมในคน เช่น *Arthrospira* sp., *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Uronema* sp., *Coelastrum* sp., *Dunaliella* sp. และ *Porphyridium* sp. เป็นต้น [17]

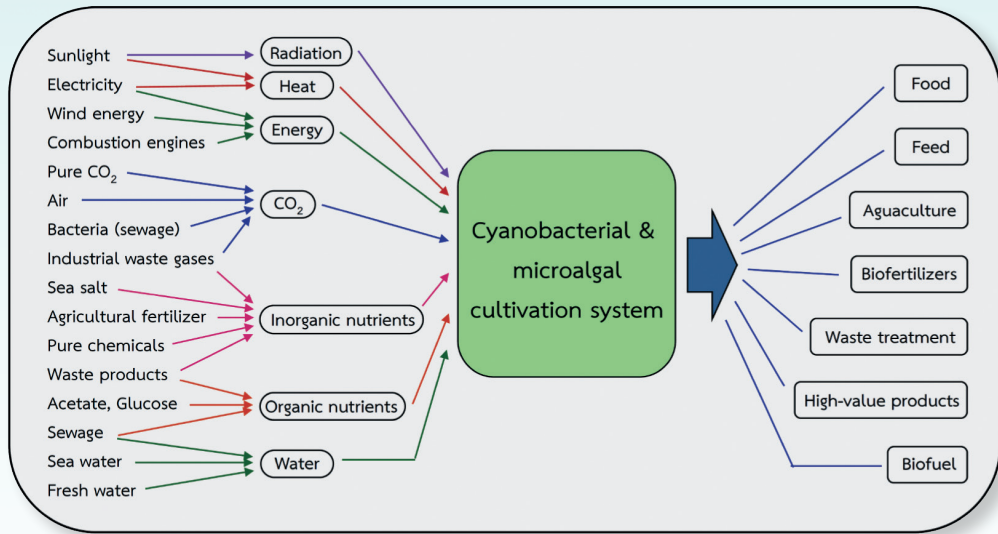
2) ระบบที่ใช้น้ำทิ้งหรือน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม โดยมีได้เติมแร่ธาตุอาหารหรือแหล่งคาร์บอน เป็นการบำบัดน้ำเสีย ชีวมวลของไซยาโนแบคทีเรียหรือจุลสาหร่ายที่ได้มักจะผสมปนกันหลากหลาย มีแบคทีเรียปริมาณสูงและมักมีแพลงก์ตอนสัตว์ (zooplankton) ปนอยู่ด้วย สายพันธุ์ที่ใช้เลี้ยงในระบบนี้ เช่น *Oscillatoria* sp., *Micractinium* sp., *Oocystis* sp., *Chlamydomonas* sp., *Euglena* sp. และ *Ankistrodesmus* sp. เป็นต้น [17]

## 1.4 การประยุกต์ไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่าย

เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายมีความหลากหลาย แม้ส่วนใหญ่ยังไม่ได้สำรวจเพื่อใช้ประโยชน์ (ดังแสดงในตารางที่ 1-1 และ 1-2) แต่ก็มี การนำบางสายพันธุ์มาประยุกต์ใช้ทางเทคโนโลยีชีวภาพ (รูปที่ 1-3) ได้แก่

### 1.4.1 อาหารของคน

ปัจจุบันมีไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายเพียงไม่กี่สายพันธุ์ที่นำชีวมวลมาใช้เป็นอาหารหรือเป็นอาหารเสริมสุขภาพ เช่น ไซยาโนแบคทีเรีย *Arthrospira* sp. และ *Nostoc* sp. จุลสาหร่าย *Chlorella* sp. และ *Dunaliella* sp. และไดอะตอมทะเล *Odontella aurita* เป็นต้น แต่ที่โดดเด่นและแพร่หลายได้แก่ *Arthrospira* sp. ซึ่งมีโปรตีนที่มีประโยชน์ดีเทียบเท่าเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์นม และดีกว่าผลิตภัณฑ์จากพืช มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว  $\gamma$ -linolenic acid (GLA) ทั้งยังมีวิตามิน A และ B12 สูง [2] นอกจากนี้ *Arthrospira* sp. ยังช่วยการทำงานของระบบย่อยอาหาร โดยช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Lactobacillus acidophilus* ดังนั้น ในบางประเทศ เช่น เยอรมันมีการเติมชีวมวลหรือสารสกัดจาก *Arthrospira* sp. ในอาหาร เช่น พาสต้า (pasta) ขนมปังและเครื่องดื่ม [5] ส่วนประเทศไทยมีการเติมชีวมวล *Arthrospira* sp. ในอาหารและเครื่องดื่ม (บริษัทเอ็นเนอร์โกอา <http://energaia.com/>) หรือใช้เป็นอาหารเสริม (บุญสมฟาร์มสาหร่ายเกลียวทอง <http://www.boonsomfarm.com/>) เป็นต้น



รูปที่ 1-3 ปัจจัยสำหรับการเพาะเลี้ยง และการประยุกต์ไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่าย  
ข้อมูลจาก [5, 17]

ที่มา: แผนภาพโดย วิภา จิงจตุพรชัย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

### 1.4.2 อาหารเสริมของสัตว์

เนื่องจากความต้องการหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีโดยเฉพาะยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงสัตว์ จึงใช้ไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายผสมในอาหารสัตว์เพื่อส่งเสริมให้สัตว์มีสุขภาพดี อย่างไรก็ตาม การใช้มักจำกัดอยู่เพียงสายพันธุ์ *Arthrospira* sp., *Chlorella* sp. และ *Scenedesmus* sp. ซึ่งช่วยเสริมภูมิคุ้มกันในตัวที่เลี้ยงเพื่อเป็นอาหาร เช่น สัตว์ปีก สุกร และกระต่าย เป็นต้น [5]

### 1.4.3 การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

จุลสาหร่ายมีความสำคัญอย่างยิ่งต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์ทะเล ที่ใช้เป็นอาหารคน เนื่องจากอาหารสูตรสำเร็จที่ใช้ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงมักไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของสัตว์ทะเล จึงต้องใส่จุลสาหร่ายเป็นอาหารเสริม เช่น จุลสาหร่ายที่ให้กรดอะมิโนที่สำคัญ กรดไขมัน หรือให้แคโรทีนอยด์ (carotenoid) สำหรับการเพิ่มสีในผลิตภัณฑ์สุดท้าย เป็นต้น จุลสาหร่ายที่นิยมใช้เลี้ยงหอย กุ้ง และปู เช่น *Chaetoceros calcitrans*, *Skeletonema costatum* และ *Thalassiosira pseudonana* ส่วน *Nannochloropsis* sp. นิยมใช้เลี้ยงโรติเฟอร์ (rotifer) เพื่อนำมาเลี้ยงกุ้งและปลา [18] เป็นต้น นอกจากนี้ยังใช้ไซยาโนแบคทีเรีย *Arthrospira* sp. ผสมกับอาหารปลา เพื่อเร่งสีในปลาสวยงามบางชนิด

#### 1.4.4 ปุ๋ยชีวภาพ

ไซยาโนแบคทีเรียหลายชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศมาใช้ในกระบวนการชีวเคมีภายในเซลล์ จึงช่วยเพิ่มปุ๋ยไนโตรเจนให้แก่ดินในอย่างต่อเนื่องและช่วยเพิ่มผลผลิตข้าว ไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ (biofertilizer) เช่น *Anabaena* sp., *Nostoc* sp., *Calothrix* sp., *Aulosira* sp., *Tolypothrix* sp. และ *Scytonema* sp. [2] เป็นต้น ประเทศไทยมีปุ๋ยอัลจินัว (Alginure) ที่ประกอบด้วย *Anabaena* sp., *Calothrix* sp. และ *Nostoc* sp. สำหรับนาข้าว (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย)

#### 1.4.5 การบำบัดน้ำเสีย

เนื่องจากออกซิเจนที่ได้จากการสังเคราะห์แสงของจุลสาหร่ายสามารถบำบัดน้ำเสีย จุลสาหร่ายจึงเป็นส่วนสำคัญของระบบบำบัดต่าง ๆ ที่ใช้บำบัดน้ำเสียจากครัวเรือนหรือโรงงานอุตสาหกรรม กลุ่มที่พบโดดเด่นในบ่อบำบัดมักเป็นจุลสาหร่ายสีเขียว (Chlorophyta) เช่น *Ankistrodesmus* sp., *Chlorella* sp. และ *Scenedesmus* sp. [2] เป็นต้น พวกจุลสาหร่ายแพลงก์ตอนช่วยดูดซับและแยกโลหะหนักที่ปนอยู่ในน้ำเสีย ช่วยบำบัดน้ำให้สะอาดนำกลับไปใช้ได้ใหม่ [17] การเลี้ยงจุลสาหร่ายโดยใช้ความร้อนหรือคาร์บอนไดออกไซด์จากโรงงานอุตสาหกรรม [5] ช่วยลดการปล่อยก๊าซเรือนกระจกที่มีผลกระทบต่อทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ นอกจากนี้ชีวมวลของไซยาโนแบคทีเรีย เช่น *Arthrospira* sp. ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยน้ำเสียจากฟาร์มหมูสามารถใช้เป็นอาหารสัตว์ [19]

#### 1.4.6 ผลิตภัณฑ์มูลค่าสูง

ผลิตภัณฑ์มูลค่าสูงจากไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายมีอยู่เป็นจำนวนมาก ที่มีได้กล่าวในที่นี้ เช่น การใช้เป็นส่วนประกอบของเครื่องเวชสำอาง (cosmeceuticals) และการใช้บำบัดโรค (therapeutic) เป็นต้น ขอยกตัวอย่างผลิตภัณฑ์ดังนี้

##### 1) แครโรทีนอยด์

แครโรทีนอยด์ธรรมชาติที่ได้จากจุลสาหร่ายส่วนใหญ่ประกอบด้วยบีตาแครโรทีน ( $\beta$ -carotene) และแอสตาแซนทีน (astaxanthin) บีตาแครโรทีนเป็นผลิตภัณฑ์เชิงพาณิชย์ตัวแรก ที่ผลิตจากจุลสาหร่าย โดยผลิตจากจุลสาหร่ายน้ำเค็มสีเขียวเซลล์เดี่ยว *Dunaliella bardawil* ซึ่งประกอบด้วยสองไอโซเมอร์ (isomer) ได้แก่ all-trans และ 9-cis ส่วนบีตาแครโรทีนสังเคราะห์ มีไอโซเมอร์ all-trans อย่างเดียว [20] บีตาแครโรทีนจาก *D. bardawil* มีมูลค่าสูงกว่าชนิดสังเคราะห์ นำมาใช้เป็นอาหารเสริมและเป็นสารตั้งต้นวิตามินเอ (vitamin A precursor) [21]

แอสตาแซนทีนที่ผลิตจากจุลสาหร่ายน้ำจืดสีเขียว *Haematococcus pluvialis* มีเพียงสเตอริโอไอโซเมอร์ (stereoisomer) เดียวคือ (3S, 3'S) แต่แอสตาแซนทีนสังเคราะห์ประกอบด้วยสามสเตอริโอไอโซเมอร์ ได้แก่ (3R, 3'R), (3R, 3'S) (meso) และ (3S, 3'S) [22] ปัจจุบันแอสตาแซนทีนจาก *H. pluvialis* มีมูลค่าสูง ใช้เป็นโภชนเภสัช (nutraceutical) และสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) [21]

## 2) ไฟโคบิลิน

ไฟโคบิลิน (phycobilin) เป็นสารสี (pigment) ได้แก่ ไฟโคไซยานิน (phycocyanin) ไฟโคอีริทริน (phycoerythrin) และแอลโลไฟโคไซยานิน (allophycocyanin) ซึ่งพบในจุลสาหร่ายที่อยู่ในกลุ่ม Rhodophyta เช่น *Porphyridium* sp., *Rhodella* sp. และ *Galdieria* sp. รวมทั้งกลุ่ม Cryptophyta และ Glaucophyta ที่พบในไซยาโนแบคทีเรีย เช่น *Arthrospira* sp. เป็นต้น โดยเฉพาะซี-ไฟโคไซยานิน (C-phycocyanin) จาก *Arthrospira* sp. ได้ผลิตในเชิงพาณิชย์มานานแล้ว สารสีซึ่งละลายน้ำได้เหล่านี้ นำไปประยุกต์ได้หลายอย่าง เช่น เป็นสารติดฉลากเรืองแสง (fluorescent tags) สำหรับโฟลว์ไซโตเมตรี (flow cytometry) และการศึกษาด้านภูมิคุ้มกัน (immunology) [23] การใช้เพิ่มสีและเป็นตัวต้านอนุมูลอิสระในอาหารและเครื่องสำอาง เป็นต้น [21]

## 3) กรดไขมันไม่อิ่มตัว

จุลสาหร่ายเป็นแหล่งกรดไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acids หรือ PUFA) โดยเฉพาะชนิดสายยาว (Long-chain PUFA) เช่น  $\gamma$ -linolenic acid (GLA), eicosapentaenoic acid (EPA) และ docosahexaenoic acid (DHA) เป็นต้น ที่ผลิตในเชิงพาณิชย์แล้ว ได้แก่ DHA และ EPA จาก *Schizochytrium* sp. หรือ EPA จาก *Nannochloropsis* sp. ลิพิด (lipid) จากจุลสาหร่ายเป็นแหล่งของ DHA และ EPA ที่นำมาใช้เป็นอาหารเสริมในการอุตสาหกรรมเลี้ยงปลาแซลมอน (salmon) แหล่งที่ดีที่สุดสำหรับ GLA คือไซยาโนแบคทีเรีย *Arthrospira* sp. [24] แต่เนื่องจาก *Arthrospira* sp. มีปริมาณน้ำมันต่ำจึงทำให้ผลิตผล GLA ต่ำไปด้วย

## 4) พลาสติกชีวภาพ

พลาสติกชีวภาพ (bioplastic) เช่น พอลิ-3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต (poly-3-hydroxybutyrate หรือ PHB) ซึ่งย่อยสลายได้ ผลิตจากไซยาโนแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ เช่น *Arthrospira platensis* และ *Synechocystis* sp. ที่เลี้ยงในสภาวะมิกโซโทรฟิก (mixotrophic สร้างอาหารเองโดยการสังเคราะห์แสง พร้อมทั้งใช้สารอินทรีย์คาร์บอนที่ให้เพิ่ม) สามารถสะสม PHB ได้ 14% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (dry cell weight) [15] *Calothrix scytonemicola* ที่เลี้ยงในสภาวะขาดแคลน

ไนโตรเจน พบว่าสะสม PHB ได้ถึง 25% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง [25] ส่วน *Aulosira fertilissima* ที่เลี้ยงในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิกสะสม PHB ได้ถึง 85% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง [15] ดังนั้น ไซยาโนแบคทีเรียจึงเป็นแหล่งที่น่าสนใจสำหรับผลิตพลาสติกชีวภาพ

#### 1.4.7 เชื้อเพลิงชีวภาพ

เชื้อเพลิงชีวภาพ (biofuel) เช่น ไฮโดรเจน (hydrogen) และ ไบโอดีเซล (biodiesel) เป็นต้น เป็นพลังงานสะอาด เนื่องจากการเผาไหม้ที่มีประสิทธิภาพ ไม่ปลดปล่อยแก๊สที่เป็นมลพิษ เป็นการรักษาสีเขียวสิ่งแวดล้อม ไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตไฮโดรเจน เช่น *Oscillatoria* sp., *Gloeocapsa alpicola*, *Arthrospira platensis*, *Anabaena cylindrical* และ *Nostoc punctiforme* [26] เป็นต้น ในสภาวะที่ขาดแคลนไนโตรเจน จุลสาหร่ายบางชนิดสะสมลิพิด ซึ่งสามารถใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตไบโอดีเซลได้มากกว่า 50% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง จุลสาหร่ายที่ใช้เป็นแหล่งผลิตไบโอดีเซล เช่น *Neochloris oleoabundans*, *Botryococcus braunii* และ *Chlorella* sp. [27] เป็นต้น (ดูรายละเอียดในบทที่ 5)

### 1.5 บทสรุป

ไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายสร้างอาหารได้เองจากการสังเคราะห์แสง ต้องการเพียงแสง คาร์บอนไดออกไซด์ และแร่ธาตุเพียงเล็กน้อย ทั้งไม่ต้องใช้ที่ดินในการเพาะเลี้ยง ให้ผลผลิตชีวมวลสูงกว่าพืช การเพาะเลี้ยงมีทั้งระบบเปิดและระบบปิด ซึ่งในระดับอุตสาหกรรมต้องใช้เทคโนโลยีระดับสูงที่ผสมผสานระหว่างเทคโนโลยีการเกษตรและเทคโนโลยีการหมัก ไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายเป็นแหล่งของสารเคมีหลากหลาย จึงมีการใช้ประโยชน์ด้านเทคโนโลยีชีวภาพมากขึ้นเรื่อยๆ เช่น เป็นอาหารของคน อาหารเสริมของสัตว์ การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ปุ๋ยชีวภาพ การบำบัดน้ำเสีย ผลิตภัณฑ์มูลค่าสูง และเชื้อเพลิงชีวภาพ เป็นต้น อย่างไรก็ตาม มีไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายน้อยมากที่นำมาใช้ประโยชน์ ยังมีอีกมากที่ยังไม่ได้ทำการสำรวจและศึกษา ซึ่งจะเป็นแหล่งความหลากหลายอย่างมหาศาลของสารเคมีใหม่ ๆ ความก้าวหน้าอย่างรวดเร็วทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล พันธุวิศวกรรม และเทคโนโลยีชีวสารสนเทศ (bioinformatics) จะนำไปสู่ความรู้ความเข้าใจในกระบวนการสังเคราะห์สารชีวโมเลกุล (biomolecules) ในไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่าย ทำให้เป็นไปได้ที่จะมีผลิตภัณฑ์ใหม่ ๆ ในเชิงพาณิชย์มากขึ้น



## เอกสารอ้างอิง

1. Rippka R. Recognition and identification of cyanobacteria. *Methods Enzymol.* 1988; 167: 28-67.
2. Metting Jr F. Biodiversity and application of microalgae. *J Ind Microbiol.* 1996; 17: 477-489.
3. Scanlan DJ. Marine picocyanobacteria. *Ecology of Cyanobacteria II*: Springer; 2012. p. 503-533.
4. Kumar K, Dasgupta CN, Nayak B, Lindblad P, Das D. Development of suitable photobioreactors for CO<sub>2</sub> sequestration addressing global warming using green algae and cyanobacteria. *Bioresour Technol.* 2011; 102: 4945-4953.
5. Pulz O, Gross W. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004; 65: 635-648.
6. Sherman DM, Troyan TA, Sherman LA. Localization of membrane proteins in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942 (radial asymmetry in the photosynthetic complexes). *Plant Physiol.* 1994; 106: 251-262.
7. Ducat DC, Way JC, Silver PA. Engineering cyanobacteria to generate high-value products. *Trends Biotechnol.* 2011; 29: 95-103.
8. Giovanardi M, Ferroni L, Baldisserotto C, Tedeschi P, Maietti A, Pantaleoni L, Pancaldi S. Morphophysiological analyses of *Neochloris oleoabundans* (Chlorophyta) grown mixotrophically in a carbon-rich waste product. *Protoplasma.* 2013; 250: 161-174.
9. Palinska KA, Surosz W. Taxonomy of cyanobacteria: a contribution to consensus approach. *Hydrobiologia.* 2014; 740: 1-11.
10. Komárek J. Recent changes (2008) in cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept). *Hydrobiologia.* 2010; 639: 245-259.
11. Pulz O, Scheibenbogen K, Groß W. Biotechnology with cyanobacteria and microalgae. In: Rehm HJ, Reed G, eds. *Biotechnology Set*, 2<sup>nd</sup> ed. Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2001. doi: 10.1002/9783527620999.ch5k.
12. Hoek C, Mann D, Jahns HM. *Algae: An introduction to phycology*. Cambridge University Press; 1995. p. 1-41.
13. Lewin R, Staley J, Bryant M, Pfennig N, Holt J. Oxygenic photosynthetic bacteria, group II. Order Prochlorales. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins; 1989. p. 1799-1806.
14. Haase SM, Huchzermeyer B, Rath T. PHB accumulation in *Nostoc muscorum* under different carbon stress situations. *J Appl Phycol.* 2012; 24: 157-162.
15. Samantaray S, Bhati R, Mallick N. Cyanobacterial polyhydroxyalkanoates: an alternative source for plastics. *Cyanobacteria: An Economic Perspective.* 2013; 227-244.

16. Castenholz R, Waterbury J. Oxygenic photosynthetic bacteria. Group I. Cyanobacteria. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore: Williams and Wilkins; 1989. p. 1710-1789.
17. Becker EW. Microalgae: biotechnology and microbiology. Cambridge University Press; 1994. p. 5-8.
18. Borowitzka MA. Microalgae for aquaculture: opportunities and constraints. J Appl Phycol. 1997; 9: 393-401.
19. Cheunbarn S, Peerapornpisal Y. Cultivation of *Spirulina platensis* using anaerobically swine wastewater treatment effluent. Int J Agric Biol. 2010; 12: 586-590.
20. Ben-Amotz A, Lers A, Avron M. Stereoisomers of  $\beta$ -carotene and phytoene in the alga *Dunaliella bardawil*. Plant Physiol. 1988; 86: 1286-1291.
21. Borowitzka MA. High-value products from microalgae—their development and commercialisation. J Appl Phycol. 2013; 25: 743-756.
22. Grung M, D'Souza FM, Borowitzka M, Liaaen-Jensen S. Algal carotenoids 51. Secondary carotenoids 2. *Haematococcus pluvialis* aplanospores as a source of (3S, 3'S)-astaxanthin esters. J Appl Phycol. 1992; 4: 165-171.
23. Glazer AN. Phycobiliproteins—a family of valuable, widely used fluorophores. J Appl Phycol. 1994; 6: 105-112.
24. Tanticharoen M, Reungjitchachawali M, Boonag B, Vonktaveesuk P, Vonshak A, Cohen Z. Optimization of  $\gamma$ -linolenic acid (GLA) production in *Spirulina platensis*. J Appl Phycol. 1994; 6: 295-300.
25. Kaewbai-ngam A, Incharoensakdi A, Monshupanee T. Increased accumulation of polyhydroxybutyrate in divergent cyanobacteria under nutrient-deprived photoautotrophy: An efficient conversion of solar energy and carbon dioxide to polyhydroxybutyrate by *Calothrix scytonemicola* TISTR 8095. Bioresour Technol. 2016; 212: 342-347.
26. Sharma NK, Stal LJ. The economics of cyanobacteria-based biofuel production: challenges and opportunities. In: Sharma NK, Rai AK, Stal LJ. eds. Cyanobacteria: an economic perspective. UK: John Wiley & Sons; 2013. p. 167-180.
27. Mata TM, Martins AA, Caetano NS. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. Renew Sustainable Energy Rev. 2010; 14: 217-232.

# โอมิกส์ของไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่าย สำหรับเทคโนโลยีชีวภาพ

## 2.1 บทนำ

การศึกษาโครงสร้าง บทบาท และหน้าที่ของยีนในสิ่งมีชีวิตแต่เดิมมักศึกษาคร่าวละยีนหรือยีนจำนวนไม่มากเนื่องจากข้อจำกัดทางเทคโนโลยี ต่อมามีการพัฒนาเทคโนโลยีการหาลำดับดีเอ็นเอ ทำให้ประสบความสำเร็จในการหาลำดับดีเอ็นเอในจีโนม (genome) ของไวรัส bacteriophage  $\phi$ X174 ในปี พ.ศ. 2520 [1] และไมโทคอนเดรียจีโนม (mitochondrial genome) ของมนุษย์ในปี พ.ศ. 2524 [2] รวมทั้งการวิเคราะห์ข้อมูลและทำแผนที่จีโนมซึ่งเป็นดีเอ็นเอทั้งหมดของออร์แกเนลล์ (organelle) หนึ่งหรือเซลล์ ๆ หนึ่งของสิ่งมีชีวิตหนึ่ง จึงเป็นจุดเริ่มต้นของการศึกษาจีโนมที่เรียกว่าจีโนมิกส์ (genomics) ทำให้เกิดวิทยาการแขนงต่อมา เช่น ทรานสคริปโตมิกส์ (transcriptomics) เป็นการศึกษาทรานสคริปโตม (transcriptome) ซึ่งเป็นชุดเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ทั้งหมดที่แสดงออกทั้งจีโนมในระดับการถอดรหัส (transcription) โปรตีโอมิกส์ (proteomics) เป็นการศึกษาโปรตีโอม (proteome) ซึ่งเป็นชุดโปรตีนทั้งหมดที่แสดงออกทั้งจีโนมในระดับการแปลรหัส (translation) และเมแทบอลอเมติกส์ (metabolomics) เป็นการศึกษาเมแทบอลอม (metabolome) ซึ่งเป็นชุดเมแทบอลไลต์ (metabolite) ทั้งหมดจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) เป็นต้น ดังนั้น ศาสตร์ที่ลงท้ายด้วยโอมิกส์ (omics) จึงเป็นศาสตร์ที่มุ่งเน้นปริมาณโดยรวมของสารชีวโมเลกุล (biological molecules) และคุณลักษณะโดยรวม (collective characterization) ซึ่งถอดความหมายไปสู่โครงสร้าง หน้าที่ และพลวัต (dynamic) ของสิ่งมีชีวิต ข้อมูลมากมายเหล่านี้เกิดขึ้นได้ เพราะความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีที่ให้ข้อมูลสูง (high-throughput data) และชีวสารสนเทศ (bioinformatics) ทำให้วิเคราะห์ข้อมูล

จำนวนมากได้ในเวลาอันรวดเร็ว บูรณาการโอมิกส์ก่อให้เกิดความรู้ด้านชีววิทยาเชิงระบบ (systems biology) นำไปสู่การค้นพบผลิตภัณฑ์ธรรมชาติใหม่ ๆ และการประยุกต์ทางเทคโนโลยีชีวภาพ [3, 4] ดังได้แสดงในรูปที่ 2-1

ไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายมีองค์ประกอบทางเคมีหลากหลายมาก จึงเป็นแหล่งของสารธรรมชาติใหม่ ๆ ที่น่าสนใจสำหรับเทคโนโลยีชีวภาพ (ดูบทที่ 1) อย่างไรก็ตาม ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีความสำคัญในเชิงพาณิชย์นั้น มักเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ซับซ้อนมีโครงสร้างและสเตอริโอเคมี (stereochemistry) ที่จำเพาะ ไม่สามารถสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ หรือแพงเกินกว่าที่จะสังเคราะห์ขึ้น หรือเป็นสารที่สร้างในปริมาณน้อยมากไม่เหมาะที่จะผลิตในระดับอุตสาหกรรม [5] ดังนั้น การใช้ไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายเป็น “โรงงาน” สำหรับผลิตสารธรรมชาติปริมาณมาก จึงจำเป็นต้องปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งทำได้โดยอาศัยศาสตร์โอมิกส์ แม้โอมิกส์ในไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายจะมีอย่างจำกัดและเพิ่งเริ่มต้น แต่ก็เติบโตอย่างรวดเร็ว ในบทนี้จะขอกกล่าวถึงโอมิกส์ต่าง ๆ ในไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่าย การปรับปรุงพันธุ์ด้วยโอมิกส์และวิศวกรรมเมแทบอลิกเพื่อประยุกต์ทางเทคโนโลยีชีวภาพ รวมทั้งกรณีศึกษา

## 2.2 จีโนมิกส์

จีโนมิกส์เป็นการศึกษาทั้งจีโนมซึ่งเป็นดีเอ็นเอทั้งหมดของออร์แกเนลล์หนึ่งหรือเซลล์ ๆ หนึ่งของสิ่งมีชีวิตหนึ่ง โดยศึกษาวิธียาลำดับดีเอ็นเอร่วมกับการใช้ชีวสารสนเทศในการประมวลผล วิเคราะห์โครงสร้างและหน้าที่ของจีโนม นำไปสู่ความเข้าใจในความเกี่ยวข้องที่ซับซ้อนระหว่างพันธุกรรม สรีรวิทยา และชีวเคมีในเซลล์ [6] ดังได้แสดงเทคโนโลยีที่ใช้และข้อมูลที่ได้ในรูปที่ 2-1 โดยทั่วไปโครงการจีโนมประกอบด้วย 3 ส่วน ได้แก่

### 1) การหาลำดับดีเอ็นเอ

เทคโนโลยีการหาลำดับดีเอ็นเอที่เป็นเน็กซ์เจเนอเรชันซีควนซิง (next-generation sequencing หรือ NGS) มีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว เป็นเทคโนโลยีที่ให้ข้อมูลสูงและวิเคราะห์แบบอัตโนมัติ รวดเร็วขึ้นและเสียค่าใช้จ่ายน้อยกว่าเดิมมาก ทำให้มีข้อมูลจีโนมของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ รวมทั้งไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จากเดิมที่มักศึกษาแต่ในเซลล์ต้นแบบ (model) เช่น ไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 6803 และจุลสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* เป็นต้น

## 2) การประกอบลำดับดีเอ็นเอให้ได้จีโนมต้นฉบับ

เพื่อให้ได้จีโนมต้นฉบับ (original genome) ลำดับดีเอ็นเอแต่ละชิ้นจะประกอบ (assembly) เข้าด้วยกัน โดยใช้บริเวณที่มีลำดับดีเอ็นเอทับซ้อนเป็นตัวช่วย หากข้อมูลดีเอ็นเอไม่คล้ายคลึงกับที่เคยมี จะเป็นการประกอบใหม่ (de novo assembly) หากมีข้อมูลดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตอื่นที่เป็นญาติใกล้ชิด (closely related organism) และสามารถใช้อ้างอิงได้ จะเป็นการประกอบขึ้นดีเอ็นเอโดยการเปรียบเทียบ (comparative assembly) องค์กรที่ดี จีโนมที่ได้ อาจเสร็จสมบูรณ์ (completed) หรือไม่ก็ได้ กรณีที่ไม่เสร็จสมบูรณ์ (incompleted) อาจเป็นเพราะข้อมูลมีเพียงลำดับดีเอ็นเอชิ้นต่าง ๆ (contigs) เท่านั้น หรือมีการประกอบลำดับดีเอ็นเอชิ้นต่าง ๆ เป็นโครงร่าง (scaffold) แล้ว หรือเป็นโครงร่างระดับโครโมโซมที่เกือบสมบูรณ์ แต่ยังมีช่องว่าง (gap) อยู่บ้าง

## 3) การวิเคราะห์และการแสดงข้อมูลประกอบจีโนม

การประกอบลำดับดีเอ็นเอเข้าด้วยกันโดยปราศจากการแสดงข้อมูลประกอบจีโนม (genome annotation) นั้นมีประโยชน์ไม่มากนัก จึงจำเป็นต้องมีการแสดงข้อมูลประกอบจีโนม ซึ่งเป็นกระบวนการวิเคราะห์และแนบข้อมูลทางชีววิทยาให้กับลำดับดีเอ็นเอในจีโนม โดยมี 3 ขั้นตอน ได้แก่ การระบุส่วนของจีโนมที่ไม่แปลรหัสเป็นโปรตีน การระบุส่วนที่ทำนายได้ว่าเป็นยีน เช่น ขอบข่ายการอ่านรหัส (open reading frame หรือ ORF) และการแนบข้อมูลเข้ากับส่วนต่าง ๆ ดังกล่าว

### 2.2.1 จีโนมิกส์ของไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรียเป็นโพรแคริโอต (prokaryote) (ดูบทที่ 1) ส่วนใหญ่มีโครโมโซม (chromosome) เป็นวงกลม (circular) และมักมีพลาสมิด (plasmid) ด้วย โดยมีจำนวนโครโมโซมที่แตกต่างกันมาก พวกพิกไซยาโนแบคทีเรียทะเล (marine picocyanobacteria) เช่น *Prochlorococcus* sp. มักเป็นโมนอพลอยด์ (monoploid) หรือดิพลอยด์ (diploid) แต่ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Synechococcus elongatus* PCC 7942 เป็นโอลิโกพลอยด์ (oligoploid) มีโครโมโซม 3-10 สำเนา (copy) ต่อเซลล์และ *Synechocystis* sp. PCC 6803 เป็นพอลิพลอยด์ (polyploid) มีโครโมโซมสูงสุดได้ถึง 218 สำเนาต่อเซลล์ [7, 8]

ปัจจุบันข้อมูลจีโนมของไซยาโนแบคทีเรียมี 365 จีโนม แต่ที่เป็นข้อมูลสมบูรณ์มี 84 จีโนม ส่วนที่เหลือก็มีความก้าวหน้าในระดับต่าง ๆ กัน คาดว่าจะมีข้อมูลจีโนมเพิ่มขึ้นอีกมาก รวมทั้งข้อมูลเมตาจีโนม (metagenome) จากไซยาโนแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้

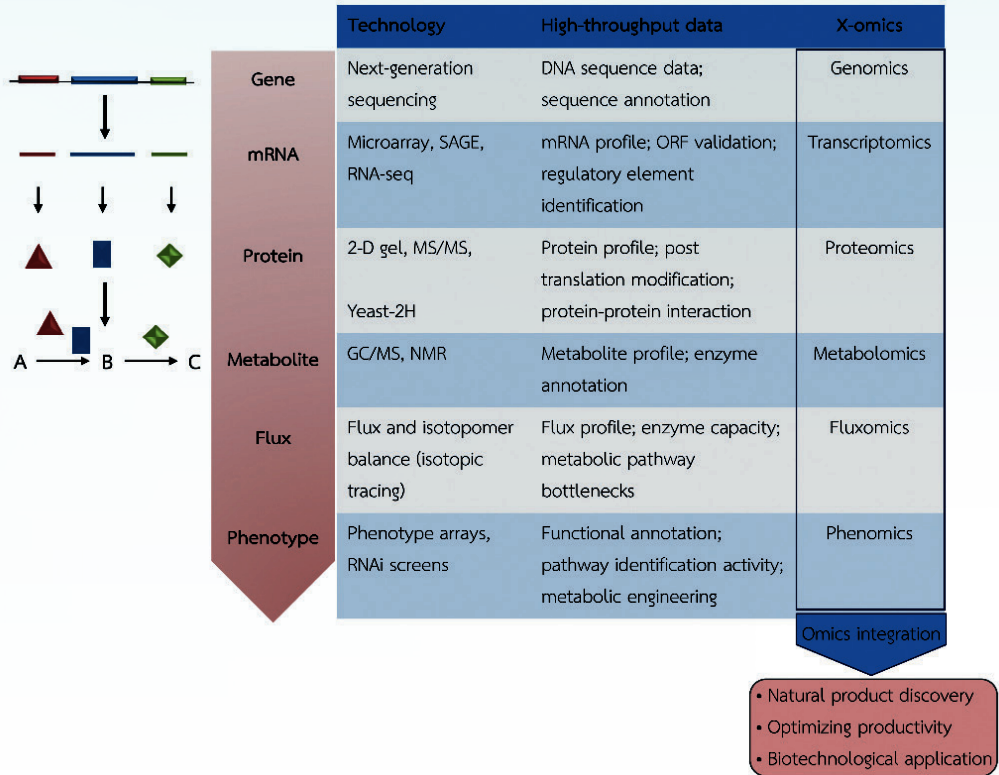
ทั้งนี้เมตาจีโนมเป็นจีโนมของกลุ่มจุลินทรีย์ที่อยู่ในตัวอย่างธรรมชาติเดียวกัน เป็นการหาลำดับดีเอ็นเอโดยตรง ไม่ต้องทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ จึงครอบคลุมไปถึงจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ ได้แสดงตัวอย่างจีโนมของไซยาโนแบคทีเรียไว้ในตารางที่ 2-1 โดยติดตามความก้าวหน้าข้อมูลจีโนมได้จากฐานข้อมูล NCBI (The National Center for Biotechnological Information database; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/>)

การใช้ข้อมูลจีโนมส่งผลกระทบต่ออนุกรมวิธาน (taxonomy) ของไซยาโนแบคทีเรียเป็นอันมาก โดยทั่วไปมักใช้ลำดับของยีนสร้าง 16S rRNA ในการสร้างแผนภูมิตวิวัฒนาการชาติพันธุ์ (phylogenetic tree) ของไซยาโนแบคทีเรีย แต่วิธีนี้มีข้อจำกัด เนื่องจากยีนสร้าง 16S rRNA มีบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) สูงมากจนไม่สามารถใช้แยกแยะสายพันธุ์ (strain) ที่อยู่ในสปีชีส์ (species) เดียวกัน การใช้โฮโมโลกัสโปรตีน (orthologous protein) ที่ได้จากข้อมูลจีโนมช่วยให้อ่านข้ามข้อจำกัดนี้ ทำให้เห็นความผันแปร (variation) ของจีโนมในสปีชีส์นั้น ๆ เช่น สามารถแยกแยะสายพันธุ์ใน *Arthrospira* (*Spirulina*) sp. และ *S. elongatus* [9] เป็นต้น (ดูรูปที่ 2-2) เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลจีโนมของ *S. elongatus* PCC 7942 กับ *S. elongatus* PCC 6301 พบว่าการจัดตำแหน่งของยีนและลำดับดีเอ็นเอเหมือนกันเกือบทั้งหมด ยกเว้นมีส่วนที่กลับทิศ (inversion) ประมาณ 188.6 kb [10] การวิเคราะห์ข้อมูลจีโนมของ *Arthrospira platensis* สายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า *A. platensis* C1 มีสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ *A. maxima* CS-328 มากกว่า *Arthrospira* sp. PCC 8005, *A. platensis* NIES-39 และ *A. platensis* Paraca [9, 11-13] (รูปที่ 2-2) รวมทั้งพบการเรียงตัวใหม่ (rearrangement) ของดีเอ็นเอโดยเฉพาะในลักษณะกลับทิศ *Arthrospira* sp. มีลำดับดีเอ็นเอซ้ำ ๆ (repetitive sequence) สูงสุดในกลุ่ม Oscillatoriales [14] ลำดับดีเอ็นเอซ้ำ ๆ กระจายทั่วจีโนมนี้เป็นอุปสรรคสำคัญในการประกอบลำดับดีเอ็นเอให้ได้จีโนมต้นฉบับที่สมบูรณ์ อาจทำได้เพียงระดับโครงร่างโครโมโซมเท่านั้น รายงานข้อมูลจีโนมต่าง ๆ ของ *Arthrospira* sp. ที่ปรากฏในปัจจุบันจึงเป็นข้อมูลจีโนมที่เกือบจะสมบูรณ์ แต่เนื่องจากเทคโนโลยีการหาลำดับดีเอ็นเอมีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว สามารถหาลำดับดีเอ็นเอได้ยาวขึ้น จะช่วยแก้ปัญหาลำดับดีเอ็นเอซ้ำ ๆ ดังกล่าวได้ การสร้างแผนภูมิตวิวัฒนาการชาติพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรียจากข้อมูลจีโนมเพิ่งเริ่มต้น เนื่องจากยังมีข้อมูลจีโนมจำกัด ข้อมูลส่วนใหญ่มักเป็นพวกพื้ไซยาโนแบคทีเรียทะเล โดยเฉพาะ *Synechococcus* sp. และ *Prochlorococcus* sp. [15] ยิ่งขาดข้อมูลจีโนมจากไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ อีกมาก อย่างไรก็ตาม มีความพยายามใช้ข้อมูลจีโนมในการสร้างแผนภูมิตวิวัฒนาการชาติพันธุ์มากขึ้นเรื่อย ๆ [9, 16] เกิดการเสนอปรับเปลี่ยนแผนภูมิบ่อย ๆ และยังมีประเด็นที่เป็นปัญหาไม่เห็นพ้องกันอยู่มาก จึงอาจต้องใช้เวลาที่จะได้อนุกรมวิธานของไซยาโนแบคทีเรียที่ถูกต้องและสมบูรณ์

จากการวิเคราะห์ข้อมูลจีโนมบ่งชี้ว่า *Prochlorococcus* sp. มีจีโนมมิกอไอส์แลนด์ (genomic island) ที่กำเนิดจากการถ่ายทอดในแนวนอน (horizontal origins) เป็นบริเวณที่มี ดีเอ็นเอแปรผันสูง (hypervariable) และเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสในธรรมชาติ หากเกิดการกลาย (mutation) ในบริเวณดังกล่าว จะส่งผลกระทบต่อให้ไวรัสไม่สามารถจับบนผิวเซลล์ ทำให้เจ้าบ้านไม่ติดเชื้อไวรัสจึงสมบูรณ์แข็งแรง ดังนั้น ไวรัสจึงเป็นตัวเลือกกดดัน (selective pressure) ที่ส่งเสริมให้เกิดความหลากหลายในจีโนมมิกอไอส์แลนด์ คาดว่าเป็นกลไกของจีโนมในการควบคุมขนาดประชากรด้วยไวรัส ทำให้ไวรัสและเจ้าบ้านไซยาโนแบคทีเรียสามารถอยู่ร่วมกันได้ในระยะยาวในธรรมชาติ [17] ทั้งนี้ส่งผลให้เกิดความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียในระบบนิเวศด้วย

จีโนมของไซยาโนแบคทีเรียเป็นแหล่งยีนสำหรับการปรับปรุงสายพันธุ์พืช เช่น ให้มีคุณสมบัติใหม่ หรือเพิ่มประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสง พืชส่วนใหญ่รวมทั้งพืชที่ใช้เป็นอาหาร เช่น ข้าว ข้าวสาลี และถั่วเหลืองเป็นพืช C3 พืชอาหารเหล่านี้มีผลผลิตลดลง มักมีสาเหตุจากการหายใจแสง (photorespiration) ซึ่งเกิดจากเอนไซม์ไรบูโลส-1,5-บิสฟอสเฟตคาร์บอกซิเลส/ออกซิจีเนส (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase หรือ Rubisco) ที่ปกติทำหน้าที่ตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ ( $\text{CO}_2$ ) ในอากาศมาสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรต แต่ในสถานะที่มี  $\text{CO}_2$  ต่ำ Rubisco จะจับออกซิเจน ( $\text{O}_2$ ) แทนที่จะจับ  $\text{CO}_2$  และใช้คาร์บอนที่ตรึงได้ทั้งหมดเป็นการสิ้นเปลืองพลังงาน ไซยาโนแบคทีเรียและพืช C4 มีกลไกทำ  $\text{CO}_2$  เข้มข้น ( $\text{CO}_2$ -concentrating mechanisms หรือ CCM) และใช้ Rubisco ที่มีประสิทธิภาพสูง จึงช่วยเพิ่มการตรึง  $\text{CO}_2$  และยับยั้งการหายใจแสง ในขณะที่พืช C3 ไม่มี CCM และถูกจำกัดให้ใช้ Rubisco ที่มีประสิทธิภาพต่ำ ดังนั้น จึงมีความพยายามปรับปรุงพืช C3 ให้เพิ่มผลผลิตโดยเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้อง Rubisco หรือ CCM เช่น นำยีน *ictB* ที่สร้างโปรตีนขนย้ายคาร์บอนอนินทรีย์ (inorganic carbon transporter) จาก *S. elongatus* PCC 7942 มาแสดงออกในต้นยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) และ *Arabidopsis thaliana* เพื่อให้ความเข้มข้นของ  $\text{CO}_2$  ในเซลล์สูงขึ้น ทำให้พืชดัดแปรพันธุกรรมดังกล่าวทนต่อ  $\text{CO}_2$  ที่สูงขึ้น ทำให้มีการสังเคราะห์แสงและการเจริญเติบโตสูงขึ้นกว่าสายพันธุ์ลักษณะปกติ (wild type) [18] ในกรณีของ Rubisco มีการนำยีน *RbcL* และ *RbcS* (ที่สร้าง Rubisco large subunit และ small subunit ตามลำดับ) พร้อมทั้งยีนสร้างโปรตีนแชเพอโรน (chaperone เพื่อช่วยการพับตัวของ Rubisco) จาก *S. elongatus* PCC 7942 เข้าแทนที่ยีน *RbcL* ที่ถูกน็อกเอาต์ (knockout) ในคลอโรพลาสต์ของต้นยาสูบ ส่งผลให้ต้นยาสูบดัดแปรพันธุกรรมมีการสังเคราะห์แสงเพิ่มขึ้น [19] จึงมีความเป็นไปได้ที่จะทำให้พืช C3 เพิ่มผลผลิตด้วยการยับยั้งการหายใจแสง และเพิ่มการสังเคราะห์แสงโดยใช้ยีนจากไซยาโนแบคทีเรีย นอกจากนี้ยีนจากไซยาโนแบคทีเรียยังใช้ปรับปรุงพืชให้มีคุณสมบัติใหม่ เช่น การนำยีน *crtO* ที่สร้างเอนไซม์บีตาแคโรทีนคีโทเลส

( $\beta$ -carotene ketolase) จาก *Synechocystis* sp. PCC 6803 มาแสดงออกในหัวมันฝรั่ง ช่วยเพิ่มการสะสมแอสตาแซนทีน (astaxanthin) โดยไม่มีผลกระทบต่อการใช้แสง [20] หรือการนำยีน *stmA* ที่สร้างโปรตีนเมทัลโลไทโอนีน (metallothionein) จาก *S. elongatus* PCC 7942 มาแสดงออกใน *A. thaliana* ส่งผลให้พืชตัดแปรพันธุกรรมดังกล่าวทนต่อธาตุสังกะสี (zinc) [21] เป็นต้น



**รูปที่ 2-1** กระบวนการโอมิกส์และบูรณาการโอมิกส์

เทคโนโลยีที่ให้ข้อมูลสูงจากองค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์นำไปสู่โอมิกส์ต่าง ๆ บูรณาการโอมิกส์ทำให้ค้นพบผลิตภัณฑ์ธรรมชาติใหม่ ๆ สภาวะที่ดีที่สุดในการผลิตและการประยุกต์ใช้ทางเทคโนโลยีชีวภาพ SAGE: serial analysis of gene expression; RNA-seq: high-throughput RNA sequencing; ORF: open reading frame; 2D-gel: two dimensional gel; MS/MS: tandem mass spectrometry; Yeast-2H: yeast-two hybrid system; GC/MS: gas chromatography/mass spectrometry; NMR: nuclear magnetic resonance; RNAi: RNA interference ข้อมูลจาก [3, 4]

ที่มา: แผนภาพโดย วิภา จึงจตุพรชัย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล



ตารางที่ 2-1 ตัวอย่างจีโนมของไซยาโนแบคทีเรีย

ข้อมูลจาก NCBI

ที่มา: ตารางโดย วิภา จิงจตุพรชัย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

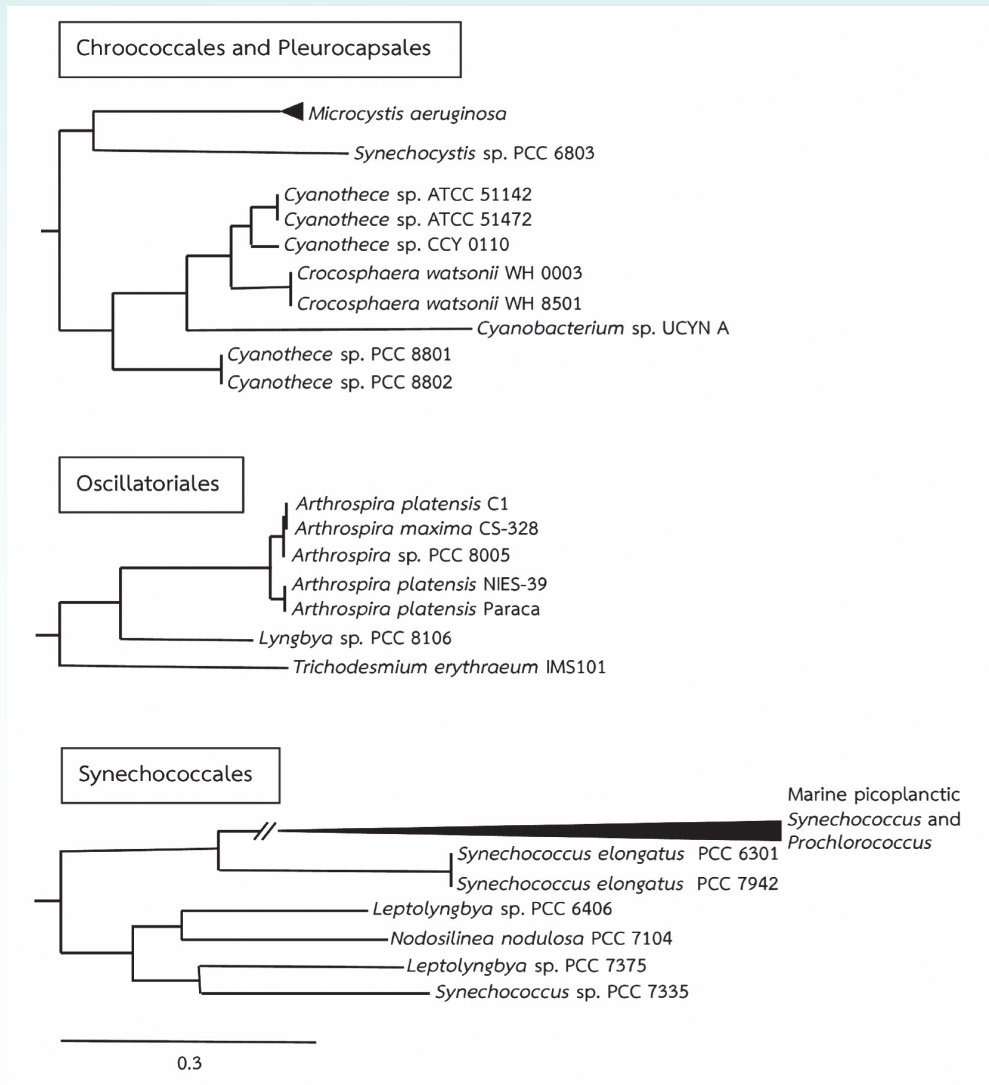
Cyanobacteria	Status <sup>a</sup>	Size (Mb)	GC (%)	Gene
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	cmpl.	7.11	41.39	5808
<i>Arthrospira platensis</i> C1 <sup>b</sup>	inc.	6.09	44.80	5225
<i>Calothrix</i> sp. PCC 6303	cmpl.	6.96	39.80	5635
<i>Cyanothece</i> sp. PCC 7822	cmpl.	7.84	39.87	6842
<i>Fischerella</i> sp. PCC 9339	inc.	8.01	40.20	6515
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 <sup>c</sup>	cmpl.	7.21	41.22	6051
<i>Oscillatoria acuminata</i> PCC 6304	cmpl.	7.80	47.61	6037
<i>Prochlorococcus</i> sp. MIT 0604	cmpl.	1.78	31.20	1941
<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942 <sup>d</sup>	cmpl.	2.74	55.46	2713
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	cmpl.	3.95	47.35	3673
<i>Xenococcus</i> sp. PCC 7305	inc.	5.93	39.70	5199

<sup>a</sup>: cmpl, เสร็จสมบูรณ์ (completed); inc, ไม่สมบูรณ์ (incompleted)

<sup>b</sup>: ชื่อเดิม *Spirulina platensis* C1

<sup>c</sup>: ชื่อเดิม *Anabaena* sp. PCC 7120

<sup>d</sup>: ชื่อเดิม *Anacystis nidulans* R2 ต่อมาเปลี่ยนเป็น *Synechococcus* sp. PCC 7942 ปัจจุบันเป็น *Synechococcus elongatus* PCC 7942



รูปที่ 2-2 แผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ข้อมูลจีโนม สร้างแผนภูมิโดยใช้ออร์โทล็อกส์โปรตีนที่ต่อเนื่องกัน 69 ตำแหน่ง (concatenated orthologous protein coding loci) และได้แสดงตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียในออร์เดอร์ (order) ตามที่ระบุไว้ ข้อมูลจาก [9, 22] ที่มา: แผนภาพโดย วิภา จึงจตุพรชัย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

## 2.2.2 จีโนมิกส์ของจุลสาราย

จุลสารายเป็นยูแคริโอต (eukaryote) (ดูบทที่ 1) ภายในเซลล์ประกอบด้วยออร์แกเนลล์ที่มีจีโนม ได้แก่ นิวเคลียร์จีโนม (nuclear genome) ไมโทคอนเดรียจีโนม และคลอโรพลาสต์จีโนม (chloroplast genome) มีข้อมูลจีโนมของจุลสารายเพียงเล็กน้อย คาดว่าจะมีเพิ่มขึ้นอีกมาก สามารถติดตามความก้าวหน้าของข้อมูลจีโนมจุลสารายได้จากฐานข้อมูล NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/>) ในที่นี้จะกล่าวเฉพาะนิวเคลียร์จีโนมและคลอโรพลาสต์จีโนม ซึ่งมีการประยุกต์ทางเทคโนโลยีชีวภาพ

### 1) นิวเคลียร์จีโนมของจุลสาราย

ปัจจุบันจุลสารายที่จำแนกแล้วมีมากกว่า 40,000 สปีชีส์ แต่มีข้อมูลจีโนมของจุลสารายเพียงเล็กน้อย มีข้อมูลนิวเคลียร์จีโนม 36 จีโนม แต่ที่เป็นข้อมูลสมบูรณ์มีเพียง 3 จีโนม (ดูตัวอย่างในตารางที่ 2-2) นิวเคลียร์จีโนมของ *C. reinhardtii* มีขนาดประมาณ 120 Mb และประกอบด้วยยีนประมาณ 15,000 ยีน (ดูตารางที่ 2-2) แม้ *C. reinhardtii* จะเป็นสายพันธุ์อ้างอิงสำหรับการแสดงข้อมูลประกอบจีโนม แต่จากฐานข้อมูล Unipro (<http://www.uniprot.org>) ระบุว่ามิโปรตีนจาก *C. reinhardtii* เพียง 50 ชนิดเท่านั้น ที่มีการทดสอบหน้าที่ด้วยการทดลองจริงในห้องปฏิบัติการ เปรียบเทียบกับการทดสอบโปรตีนถึง 6,800 ชนิดจากพืชต้นแบบ *A. thaliana* ดังนั้น การแสดงข้อมูลประกอบของยีนส่วนใหญ่จาก *C. reinhardtii* จึงได้จากการใช้คอมพิวเตอร์วิเคราะห์โดยอ้างอิงภาวะต้นกำเนิดเดียวกัน (homology) กับ *A. thaliana* รวมทั้งพืชอื่น ๆ และจุลชีพ ส่งผลให้ความถูกต้องของการจำแนกและการแสดงข้อมูลประกอบหน้าที่ของจีโนมเป็นไปอย่างจำกัด และเป็นปัญหามากขึ้นเมื่อนำการแสดงข้อมูลประกอบหน้าที่ของ *C. reinhardtii* ที่ได้จากการจำลองบนเครื่องคอมพิวเตอร์ (*in silico*) มาใช้กับจุลสารายสปีชีส์อื่น ๆ เนื่องจากขาดบรรพบุรุษร่วมกัน จุลสารายสองสปีชีส์อาจจะมีความหลากหลายมากกว่าพืชสองสปีชีส์ [23] ดังนั้น เทคโนโลยีที่ให้ข้อมูลสูงดังกล่าว จึงไม่เหมาะที่จะใช้แสดงข้อมูลประกอบหน้าที่จีโนมของจุลสารายอย่างถูกต้อง เพื่อก้าวข้ามอุปสรรคดังกล่าว จึงควรใช้วิธีต่าง ๆ กัน ร่วมกับแหล่งข้อมูลต่าง ๆ ในการทำการแสดงข้อมูลประกอบหน้าที่จีโนม

### 2) คลอโรพลาสต์จีโนมของจุลสาราย

คลอโรพลาสต์จีโนมของจุลสารายและพืชชั้นสูง มีคุณลักษณะคล้ายกับยูแบคทีเรีย (eubacteria) คือมีหลายสำเนา มักมีลักษณะเป็นวงกลมขนาดประมาณ 200 kb ประกอบด้วยลำดับดีเอ็นเอซ้ำกลับทิศ (inverted repeat หรือ IR) ขนาดใหญ่สองแห่งทำให้แบ่งวงกลมออกเป็น

ส่วนใหญ่และส่วนเล็ก ส่วนของ IR ประกอบด้วยยีนสร้าง rRNA และยีนอื่น ๆ ยีนสร้าง 16S, 23S และ 5S rRNA และยีนสร้างโปรตีนไรโบโซม (ribosomal protein) มักเรียงลำดับคล้ายคลึงกับโอเพอโรนของไรโบโซม (ribosomal operon) ในไซยาโนแบคทีเรีย คาดว่าคลอโรพลาสต์วิวัฒนาการมาจากไซยาโนแบคทีเรีย ที่อยู่ร่วมภายในกับเซลล์ (endosymbiosis) [24, 25] นอกจากนี้คลอโรพลาสต์จีโนมยังคงรักษายีนชุดสำคัญจากบรรพบุรุษไซยาโนแบคทีเรีย ได้แก่ ยีนที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาแสง (light reaction) ในการสังเคราะห์แสง การถอดรหัส (transcription) และการแปลรหัส (translation) ระหว่างวิวัฒนาการ ยีนของไซยาโนแบคทีเรียจำนวนมากได้ถ่ายเทไปยังนิวเคลียสของเจ้าบ้านและผลผลิตจากยีนเหล่านี้ถูกส่งมุงเป่ากลับมาที่คลอโรพลาสต์ แต่มียีนอื่น ๆ อีกมากที่สูญหายเนื่องจากผลผลิตจากยีนนั้นไม่มีความจำเป็นอีกต่อไป ยีนในคลอโรพลาสต์จีโนมจึงลดลงเหลือเพียง 2-5% ของบรรพบุรุษไซยาโนแบคทีเรีย คาดว่าในนิวเคลียสของ *A. thaliana* มีอย่างน้อย 2,000 ยีนที่มีกำเนิดมาจากไซยาโนแบคทีเรีย ในกรณีของจุลสาหร่าย เช่น *C. reinhardtii* ซึ่งมีเพียงคลอโรพลาสต์เดี่ยวต่อเซลล์ จึงมีความถี่ของการถ่ายเทดีเอ็นเอไปยังนิวเคลียสน้อยกว่า [25, 26] ข้อมูลคลอโรพลาสต์จีโนมของจุลสาหร่ายมีประมาณ 100 จีโนม โดย 85 จีโนมเป็นของจุลสาหร่ายสีเขียว (Chlorophytes) (ดูตัวอย่างในตารางที่ 2-3)

## ตารางที่ 2-2 ตัวอย่างนิวเคลียร์จีโนมของจุลสาหร่าย

ข้อมูลจาก NCBI

ที่มา: ตารางโดย วิชา จิ้งจตุพรชัย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

Microalgae	Status <sup>a</sup>	Size (Mb)	GC (%)	Gene
<b>Nuclear genomes</b>				
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> cc-503	inc.	120.41	61.95	14,488
<i>Chlorella vulgaris</i>	inc.	46.16	65.50	9,780
<i>Cyanidioschyzon merolae</i> strain 10D	cmpl.	16.55	55.02	6,170
<i>Micromonas</i> sp. RCC 299	cmpl.	21.11	63.82	10,127
<i>Nannochloropsis gaditana</i> CCMP 526	inc.	33.99	53.60	3,557
<i>Ostreococcus lucimarinus</i> CCE 9901	cmpl.	13.20	60.44	7,640
<i>Thalassiosira pseudonana</i> CCMP 1335	inc.	32.44	46.91	11,771
<i>Volvox carteri</i> f. <i>nagariensis</i>	inc.	137.68	55.30	14,437

<sup>a</sup>: cmpl, เสร็จสมบูรณ์ (completed); inc, ไม่สมบูรณ์ (incompleted)

## ตารางที่ 2-3 ตัวอย่างคลอโรพลาสต์จีโนมของจุลสาหร่าย

ข้อมูลจาก NCBI

ที่มา: ตารางโดย วิชา จิงจตุพรชัย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

Microalgae	Status <sup>a</sup>	Size (Kb)	GC (%)	Gene
<b><u>Chloroplast genomes</u></b>				
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	cmpl.	203.83	34.45	109
<i>Chlorella vulgaris</i>	cmpl.	150.61	31.56	210
<i>Micromonas</i> sp. RCC 299	cmpl.	72.59	38.85	32
<i>Nannochloropsis granulata</i>	cmpl.	117.67	33.33	159
<i>Ostreococcus tauri</i> OTTH 0595	cmpl.	71.67	39.89	94
<i>Dunaliella salina</i> CCAP 19/18	cmpl.	269.04	32.08	122
<i>Botryococcus braunii</i>	cmpl.	172.83	42.45	114

<sup>a</sup>: cmpl, เสร็จสมบูรณ์ (completed); inc, ไม่สมบูรณ์ (incompleted)

## 2.3 กรานสคริปโตมิกส์

ทรานสคริปโตมิกส์เป็นการศึกษาเกี่ยวกับทรานสคริปโตมซึ่งเป็นชุดของเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ทั้งหมดของเซลล์ เป็นการแสดงออกของยีนทั้งจีโนมในระดับการถอดรหัส ซึ่งแปรเปลี่ยนไปตามสภาวะสิ่งแวดล้อม เช่น ในสภาวะที่ซัลเฟอร์ (sulfur) ฟอสเฟต (phosphate) และไนโตรเจน (nitrogen) สำหรับการเจริญเติบโตอย่างจำกัด เป็นต้น ทรานสคริปโตมิกส์นำไปสู่ความเข้าใจในวิถีเมแทบอลิก (metabolic pathway)

เพื่อให้ได้ข้อมูลทรานสคริปโตม ในกรณีที่มีข้อมูลจีโนมที่สมบูรณ์อาจใช้เทคโนโลยีไมโครอาร์เรย์ (microarray) ส่วนในกรณีที่ไม่มีข้อมูลจีโนมอาจใช้เทคโนโลยีหาลำดับอาร์เอ็นเอที่ให้ข้อมูลสูง (high-throughput RNA sequencing หรือ RNA-seq) (รูปที่ 2-1) แล้วประกอบขึ้นอาร์เอ็นเอสั้น ๆ ที่ทำได้โดยใช้ซอฟต์แวร์ (software) ให้เป็นข้อมูลทรานสคริปโตมโดยตรง [3, 27] ปัจจุบันมีชุดข้อมูลทรานสคริปโตมของไซยาโนแบคทีเรียอยู่มากกว่า 2,000 ชุด และของจุลสาหร่ายอยู่มากกว่า 2,800 ชุด คาดว่าจะมีข้อมูลเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว สามารถติดตามความก้าวหน้าข้อมูลทรานสคริปโตมได้จากฐานข้อมูล Gene Expression Omnibus database (GEO; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) ข้อมูลทรานสคริปโตมของไซยาโนแบคทีเรีย *Prochlorococcus* sp.

บ่งชี้ว่ามีอาร์เอ็นเอชนิดไม่กำหนดรหัส (noncoding RNA หรือ ncRNA) จำนวนมาก จนเป็นส่วนใหญ่ของทรานสคริปโตม และมีมากกว่าในแบคทีเรียชนิดอื่น และสามในสี่ส่วนของยีนมีแอนติเซนส์อาร์เอ็นเอ (antisense RNA) อย่างไรก็ตาม ยังไม่ทราบหน้าที่ของ ncRNA ส่วนใหญ่ [28, 29] เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทรานสคริปโตมของจุลสาหร่าย *Neochloris oleoabundans* ภายใต้สภาวะขาดแคลนไนโตรเจน พบการเพิ่มการแสดงออกของกรดไขมัน (fatty acid) และองค์ประกอบของการสังเคราะห์ไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol biosynthesis components) พร้อมทั้งพบการยับยั้ง (repression) การเสื่อมสลายของกรดไขมันในวิถีบีตาออกซิเดชัน (beta-oxidation pathway) [30] ส่วนข้อมูลทรานสคริปโตมของ *C. reinhardtii* สามารถบ่งชี้แฟกเตอร์ถอดรหัส (transcription factor) ต่าง ๆ 41 ชนิดที่ถูกควบคุมภายใต้สภาวะขาดแคลนไนโตรเจน [31]

## 2.4 โปรตีโอมิกส์

โปรตีโอมิกส์เป็นการศึกษาโปรตีโอมซึ่งเป็นชุดโปรตีนทั้งหมดที่แสดงออกจากจีโนมของเซลล์ในระดบการแปลรหัส ซึ่งแปรเปลี่ยนไปตามสภาวะสิ่งแวดล้อม เป็นการศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีน การปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน (protein-protein interaction) โดยใช้เทคโนโลยีต่าง ๆ ดังแสดงในรูปที่ 2-1 ข้อมูลโปรตีโอมนั้นใหญ่กว่าข้อมูลจีโนมโดยเฉพาะในยูแคริโอต เพราะมีการตัดเชื่อมเอ็มอาร์เอ็นเอ (RNA splicing) ได้หลายแบบ และมีการดัดแปรภายหลังแปลรหัส (post translation) เช่น กลัยโคซิเลชัน (glycosylation) หรือฟอสฟอริเลชัน (phosphorylation) เป็นต้น จึงทำให้มีจำนวนโปรตีนมากกว่ายีน

โปรตีโอมิกส์ในห้องปฏิบัติการทดลองจริง (รูปที่ 2-1) มักเริ่มด้วยการแยกโปรตีนบนเจลสองมิติด้วยกระแสไฟฟ้า (two dimensional gel electrophoresis หรือ 2-DE) แล้วนำมาแยกแยะชนิดของโปรตีนด้วยแทนเด็มแมสสเปกโตรเมตรี (tandem mass spectrometry หรือ MS/MS) โดยอ้างอิงฐานข้อมูล เช่น open proteomics database (OPD) นอกจากนี้ยังศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนโดยใช้เทคโนโลยีข้อมูลสูง เช่น ระบบยีสต์ทูไฮบริด (yeast two-hybrid system) ซึ่งช่วยบ่งชี้บทบาทของโปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่ โดยอ้างอิงจากการปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนที่ทราบหน้าที่แล้ว ปัจจุบันมีฐานข้อมูลเครือข่ายการปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนหลายแห่ง เช่น STRING สำหรับสิ่งมีชีวิตทั่วไป SynechoNET และ IntroPORC สำหรับไซยาโนแบคทีเรียโดยเฉพาะ *Synechocystis* sp. PCC 6803 [27] และ SpirPro สำหรับ *A. platensis* C1 [32] เป็นต้น ส่วนข้อมูลสำหรับจุลสาหร่ายยังมีไม่มากนักและส่วนใหญ่เป็นของ *C. reinhardtii* เช่น ฐานข้อมูลเปปไทด์ (peptide) ProMEX [33] เป็นต้น

## 2.5 เมแทบอลิโอมิกส์

เมแทบอลิโอมิกส์เป็นการศึกษาเมแทบอลิโอม ซึ่งเป็นชุดเมแทบอลิโอมทั้งหมดของเซลล์ เมแทบอลิโอมเป็นสารเคมีที่เกิดระหว่างกระบวนการสร้างและสลายสารอาหารในเซลล์หรือกระบวนการเมแทบอลิซึม เมแทบอลิโอมมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา เมแทบอลิโอมิกส์นำไปสู่ความเข้าใจในวิถี (pathway) และเครือข่าย (network) ของเมแทบอลิซึม

การศึกษาเมแทบอลิโอมในห้องปฏิบัติการทดลองจริงมีหลายวิธี เช่น แยกวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของเมแทบอลิโอมโดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโตรเมตรี (gas chromatography/mass spectrometry หรือ GC/MS) หรือหาโครงสร้างของเมแทบอลิโอมด้วยนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (nuclear magnetic resonance หรือ NMR) เป็นต้น (รูปที่ 2-1) เนื่องจากมียีนจำนวนมากสำหรับเมแทบอลิโอมในไซม์ ประกอบกับความซับซ้อนของเมแทบอลิซึมในเซลล์ ดังนั้น การประเมินประสิทธิภาพจึงไม่ได้ตรงไปตรงมา ข้อจำกัดดังกล่าวนำไปสู่การสร้างแบบจำลองเมแทบอลิโอม (metabolic model) ด้วยคอมพิวเตอร์ให้ข้อมูลสูง ซึ่งเสนอภาพรวมของเมแทบอลิซึมของสิ่งมีชีวิตในรูปแบบเครือข่าย โดยทั่วไปเมแทบอลิโอมิกส์จะต้องการข้อมูลจีโนมที่สมบูรณ์ อย่างไรก็ตาม เมื่อเทียบกับจำนวนจีโนมที่มีอยู่ก็พบว่ามีเมแทบอลิโอมิกส์น้อยมาก (น้อยกว่า 3%) เพราะขาดเครื่องมือแบบจำลองอัตโนมัติ (automatic modeling tools) [27] ปัจจุบันแบบจำลองเมแทบอลิโอมระดับจีโนม (genome-scale metabolic model) สร้างจากข้อมูลจีโนมและทรานสคริปโตม [23] แล้วนำไปวิเคราะห์เครือข่ายเมแทบอลิโอมด้วยคณิตศาสตร์ เพื่อทำนายพฤติกรรมทางเมแทบอลิโอม (metabolic behavior) มีการค้นพบเมแทบอลิโอมต่าง ๆ โดยไม่ทราบกลุ่มยีน (gene clusters) ที่ใช้ในการสังเคราะห์ ดังนั้น เครือข่ายเมแทบอลิโอมจะเป็นกุญแจสำคัญที่นำไปสู่การระบุยีนของเมแทบอลิโอม นอกจากนี้ยังนำไปสู่การออกแบบสายพันธุ์ที่เหมาะสมแก่การผลิตสารที่ต้องการจำนวนมาก และช่วยกำหนดสภาวะที่ดีที่สุดต่อการเจริญเติบโตของเซลล์

แบบจำลองเมแทบอลิโอมของไซยาโนแบคทีเรียมีหลายแบบโดยเฉพาะในสายพันธุ์ต้นแบบ *Synechocystis* sp. PCC 6803 เช่น แบบจำลองทำนายการเจริญเติบโตในสภาวะโฟโตออโตโทรฟิก (photoautotrophic) เฮเทอโรโทรฟิก (heterotrophic) และมิคโซโทรฟิก (mixotrophic) นอกจากนี้ยังมีแบบจำลองเมแทบอลิโอมในสายพันธุ์ที่ตรึงไนโตรเจน *Cyanothece* sp. ATCC 51142 [27] และแบบจำลองเมแทบอลิโอมในสายพันธุ์ที่ใช้ในอุตสาหกรรม *A. platensis* [34] เป็นต้น ส่วนในจุลสาหร่ายมีรายงานแบบจำลองเมแทบอลิโอมในคลอโรพลาสต์และไซโทซอล (cytosol) ของสายพันธุ์ต้นแบบ *C. reinhardtii* [35] เช่น แบบจำลองเมแทบอลิโอม iRC1080 [36]

และ Alga-GEM [37] เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานในสายพันธุ์อื่น ๆ บาง ได้แก่ *Ostreococcus tauri*, *Ostreococcus lucimarinus* และ *Thalassiosira pseudonana* [23] อย่างไรก็ตามก็มีความเข้าใจน้อยมากเกี่ยวกับเมแทบอลิซึมในจุลสาหร่ายสายพันธุ์อื่น ๆ

## 2.6 โอมิกส์อื่น ๆ

นอกจากโอมิกส์ต่าง ๆ ที่ได้กล่าวแล้วในข้างต้น ยังมีฟลักซ์โอมิกส์ (fluxomics) และ ฟีนโอมิกส์ (phenomics) (รูปที่ 2-1) ซึ่งเป็นศาสตร์ที่อยู่ในระยะเริ่มต้นและมีข้อมูลน้อย

### 2.6.1 ฟลักซ์โอมิกส์

ฟลักซ์โอมิกส์เป็นการศึกษาฟลักซ์โอม (fluxome) ซึ่งเป็นฟลักซ์ (flux) หรืออัตราที่เมแทบอลิต์ไหลผ่านในวิถีเมแทบอลิกหนึ่ง ฟลักซ์โอมิกส์เกี่ยวข้องกับการจำลองการทำงาน (simulation) ของเมแทบอลิกฟลักซ์ด้วยคอมพิวเตอร์ควบคู่กับการทดสอบแบบจำลองนั้นด้วยการทดลองในห้องปฏิบัติการ เพื่อทำนายปฏิกิริยาเมแทบอลิกในระบบชีววิทยา แบบจำลองเมแทบอลิกระดับจีโนมด้วยคอมพิวเตอร์ เช่น การวิเคราะห์ฟลักซ์บาลานซ์ (flux balance analysis หรือ FBA) ใช้ทำนายสถานะที่ดีที่สุด ที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์ชีวมวลหรือผลิตภัณฑ์เป้าหมายในระดับสูงสุด [23, 27] ส่วนการทดสอบแบบจำลองด้วยการทดลองในห้องปฏิบัติการนั้น มักตรวจวัดฟลักซ์โดย ป้อนเซลล์และติดตามด้วยสารติดตามกัมมันตภาพรังสี (isotopic tracing) คาร์บอน 13 อะตอม ( $^{13}\text{C}$ ) ดังนั้น สารเมแทบอลิต์สุดท้ายของวิถีเมแทบอลิกจะถูกติดตามด้วย  $^{13}\text{C}$  เข้าไปด้วย ซึ่งแบบแผนของการติดตามนี้สามารถนำมาวิเคราะห์หาปฏิกิริยาฟลักซ์

การสร้างแบบจำลองเมแทบอลิกระดับจีโนมสำหรับไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่าย ยังอยู่ในระยะเริ่มต้นและไม่ครอบคลุม แบบจำลองที่ใช้เครือข่ายเมแทบอลิกที่คลุมเครือ เช่น ใน *Synechocystis* sp. PCC 6803 ทำให้ผลของเมแทบอลิกฟลักซ์แตกต่างจากผลการทดลองจริงในห้องปฏิบัติการ [38] การศึกษาวิถีเมแทบอลิกของคาร์บอนในไซยาโนแบคทีเรีย *Cyanotheca* ATCC 51142 พบว่าการทดลองจริงในห้องปฏิบัติการมีความสอดคล้องกับ FBA [39] ส่วนในจุลสาหร่าย เช่น *C. reinhardtii* มีการใช้ FBA ศึกษาเมแทบอลิกฟลักซ์ของเซลล์ที่เจริญเติบโตภายใต้สภาวะแบบโฟโตออโตโทรฟิก เฮเทอโรโทรฟิก และมิโครโทรฟิก เพื่อดูผลกระทบต่อชีวมวล [40] เป็นต้น



## 2.6.2 ฟีนอมิกส์

ฟีนอมิกส์เป็นการศึกษาฟีนอม ซึ่งเกี่ยวข้องกับลักษณะกายภาพและชีวเคมีของสายพันธุ์ (trait) ของสิ่งมีชีวิตที่เปลี่ยนแปลงโดยตอบสนองต่อการกลายพันธุ์และอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อม การศึกษาฟีนอมิกส์มีหลายวิธี เช่น ฟีนไทป์งไมโครอาร์เรย์ (phenotyping microarray) ใช้ประเมินความสามารถในการเจริญเติบโตของจุลชีพที่เป็นสายพันธุ์ลักษณะปรกติและสายพันธุ์กลาย (mutant strain) การคัดกรองด้วยการรบกวนอาร์เอ็นเอ (RNA interference หรือ RNAi) เพื่อประเมินความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ (genotype) และฟีนไทป์ (phenotype) ซึ่งมีการใช้อย่างกว้างขวางในยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) แมลงหวี่ (*Drosophila melanogaster*) และ หนอนตัวกลม (*Caenorhabditis elegans*) [3] แต่ยังไม่พบรายงานฟีนอมิกส์ในไซยาโนแบคทีเรีย และจุลสาหร่าย

## 2.7 วิศวกรรมเมแทบอลิก

วิศวกรรมเมแทบอลิก (metabolic engineering) เป็นการวิเคราะห์วิถีเมแทบอลิก เพื่อหาข้อจำกัดและผลกระทบต่อการผลิตสารเป้าหมาย แล้วลดข้อจำกัดดังกล่าวโดยใช้พันธุวิศวกรรม (genetic engineering) มาแก้ไขวิถีเมแทบอลิก แล้วนำที่แก้ไขนี้มาทำแบบจำลองอีกครั้งหนึ่ง เพื่อคำนวณหาผลผลิตใหม่ของสารเป้าหมาย จุดมุ่งหมายของวิศวกรรมเมแทบอลิกคือการทำให้สิ่งมีชีวิตผลิตสารที่มีมูลค่าจำนวนมากในระดับอุตสาหกรรมอย่างคุ้มทุน แม้มีการคาดหวังว่าบูรณาการไอมิกส์ (ดังแสดงในรูปที่ 2-1) จะนำไปสู่การประยุกต์ทางเทคโนโลยีชีวภาพ แต่เนื่องจากปัจจุบันบูรณาการไอมิกส์ทั้งหมดยังห่างไกลความเป็นจริงอยู่มาก จึงได้มุ่งสู่วิศวกรรมเมแทบอลิก

กระบวนการวิศวกรรมเมแทบอลิกมีดังนี้ ใช้คอมพิวเตอร์ที่ให้ข้อมูลสูงสร้างแบบจำลองเครือข่ายเมแทบอลิกจากข้อมูลจีโนมและ/หรือทรานสคริปโตม แล้วใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์คำนวณหาผลผลิตทางทฤษฎีของสารเป้าหมาย หรือหาปฏิกิริยาฟลักซ์ (flux reaction) ภายในเซลล์ ซึ่งทำให้ทราบว่าควรจะต้องเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาใดและจัดการกับยีนใด จึงจะเพิ่มผลผลิตของสารเป้าหมาย โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมช่วยจัดการให้ยีนแสดงออกมากขึ้นหรือน้อยลงด้วยยีนนอกเอาต์ ขึ้นอยู่กับผลกระทบที่มีต่อวิถีเมแทบอลิกและเป้าหมายสุดท้าย เช่น หากปฏิกิริยานั้นมีฟลักซ์ต่ำและจำกัดปริมาณของผลผลิต ก็ควรเพิ่มปฏิกิริยาฟลักซ์โดยเพิ่มการแสดงออกของยีนที่สร้างเอนไซม์ในปฏิกิริยาดังกล่าว เป็นต้น เนื่องจากเซลล์ใช้เครือข่ายเมแทบอลิกเพื่อมีชีวิตรอด การเปลี่ยนแปลงเครือข่ายอาจส่งผลกระทบต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ จึงเกิดการได้อย่างเสียอย่างขึ้น ระหว่างการที่เซลล์ผลิตสารที่ต้องการมากขึ้นกับความจำเป็นตามธรรมชาติ

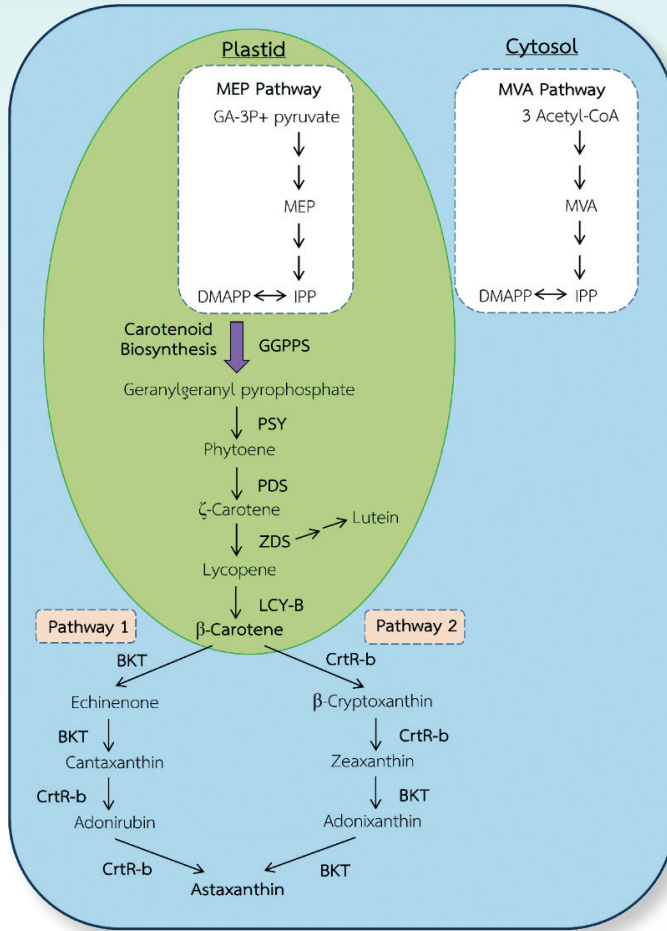
ที่จะมีชีวิตรอด ดังนั้น แทนที่จะจัดการให้ยีนที่สร้างเมแทบอลิซึมมีการแสดงออกมากขึ้น หรือน้อยลงด้วยการเอาเยีนออกไป วิศวกรรมเมแทบอลิกในปัจจุบันจึงเริ่มมุ่งความสนใจไปในด้านการควบคุมการทำงานของเครือข่ายเมแทบอลิกเพื่อเกิดประสิทธิภาพยิ่งขึ้น เช่น จากการวิเคราะห์ข้อมูลทรานสคริปโตมร่วมกับยีนไซเลนซิง (gene silencing) และการเพิ่มการแสดงออกของยีนใน *C. reinhardtii* ช่วยบ่งชี้แพกเตอร์ถอดรหัสที่ตอบสนองต่อไนโตรเจนได้ 2 ตัว ตัวแรกสำหรับการสะสมฟอสโฟลิพิด (phospholipid) ในสภาวะอาหารไม่ขาดแคลน [41, 42] ส่วนตัวที่สองจำเป็นสำหรับการสะสมลิพิดภายใต้สภาวะที่ขาดแคลนไนโตรเจน [43] การค้นพบนี้เป็นการเน้นย้ำถึงสมรรถนะการวิเคราะห์โอมิกส์ของจุลสาหร่ายในการระบุเป้าหมาย ซึ่งอาจนำไปสู่การทำวิศวกรรมที่ตัวควบคุมการทำงาน เช่น แพกเตอร์ถอดรหัส เป็นต้น อาจเป็นหนทางนำไปสู่การแยกออกจากกัน ระหว่างการควบคุมวงจรชีวิตของเซลล์ (cell-cycle regulation) และการสะสมลิพิด อาจทำให้เพิ่มการสร้างลิพิดในช่วงที่เซลล์เจริญอย่างว่องไว (active growth) ได้ [41]

## 2.8 กรณศึกษา: โอมิกส์และวิศวกรรมเมแทบอลิกเพื่อผลิตแคโรทีนอยด์จากจุลสาหร่าย

แคโรทีนอยด์ (carotenoid) เป็นสารสี (pigment) เกี่ยวข้องกับการรับและการป้องกันแสง (photoprotection) แคโรทีนอยด์สำคัญที่พบในจุลสาหร่าย เช่น บีตาแคโรทีน ( $\beta$ -carotene) และแอสตาแซนทีน (astaxanthin) เป็นต้น บีตาแคโรทีนมักพบสะสมเป็นก้อนลิพิด (lipid globule) อยู่ภายในพลาสติด (plastid) ส่วนแอสตาแซนทีนมักพบเป็นหยดลิพิด (lipid droplet) อยู่ในไซโทพลาซึม (cytoplasm) บีตาแคโรทีนธรรมชาติที่ผลิตจากจุลสาหร่าย *Dunaliella bardawil* ประกอบด้วยสองไอโซเมอร์ (isomer) ได้แก่ all-trans และ 9-cis ส่วนชนิดสังเคราะห์มีไอโซเมอร์ all-trans อย่างเดียว [46] บีตาแคโรทีนจากธรรมชาติมีมูลค่าสูงกว่าชนิดสังเคราะห์ สามารถนำมาใช้เป็นอาหารเสริม และเป็นสารตั้งต้นวิตามินเอ [47] เป็นต้น ส่วนแอสตาแซนทีนธรรมชาติที่ผลิตจากจุลสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* มีเพียงสเตอริโอไอโซเมอร์ (stereoisomer) เดียว (3S, 3'S) แต่ชนิดสังเคราะห์ประกอบด้วย 3 สเตอริโอไอโซเมอร์ (3R, 3'R), (3R, 3'S) (meso) และ (3S, 3'S) ในอัตราส่วน 1:2:1 [48] แอสตาแซนทีนธรรมชาติมีมูลค่าสูง ใช้เป็นโภชนเภสัช (nutraceutical) และสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) [47] เป็นต้น

### 2.8.1 การสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในจุลสาหร่าย

การสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ใช้สารตั้งต้น ไดเมทิลแอลลิลไดฟอสเฟต (dimethylallyl diphosphate หรือ DMAPP) และไอโซเพนทีนิลไพโรฟอสเฟต (isopentenyl pyrophosphate



รูปที่ 2-3 วิธีสังเคราะห์บีตาแคโรทีนและแอสตาแซนทีนในจุลสาหร่าย

การสังเคราะห์ DMAPP และ IPP ในจุลสาหร่ายสีเขียว (Chlorophytes) มีวิถี MEP อย่างเดียว ในขณะที่สาหร่ายชนิดอื่นและพืชชั้นสูงมักมีทั้งวิถี MEP และ MVA การสังเคราะห์บีตาแคโรทีนในจุลสาหร่ายสีเขียวเกิดขึ้นในคลอโรพลาสต์ ส่วนขั้นตอนต่อมาเกิดขึ้นได้ทั้งในคลอโรพลาสต์และไนโซโทพลาซึม การสังเคราะห์แอสตาแซนทีนใน *Haematococcus pluvialis* ใช้วิถีที่ 1 ส่วนใน *Chlorella zofingiensis* ใช้วิถีที่ 2 ในภาพนี้ได้แสดงอินเทอร์มีเดียตส์ (intermediates) ทั้งหมด

MEP: methylerythritol phosphate; MVA: mevalonate; DMAPP: dimethylallyl diphosphate; IPP: Isopentenyl pyrophosphate; GGPPS: geranylgeranyl pyrophosphate synthase; PSY: phytoene synthase; PDS: phytoene desaturase; ZDS: ζ-carotene desaturase; LYC-B: lycopene β-cyclase; BKT: β-carotene ketolase; CrtR-b: β-carotene hydroxylase  
 ข้อมูลจาก [41, 44, 45]

ที่มา: แผนภาพโดย วิภา จิงจตุพรชัย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

หรือ IPP) ซึ่งได้จากการสังเคราะห์ด้วยวิถีเมแทบอลิกที่แตกต่างและเป็นอิสระต่อกัน 2 วิธี (รูปที่ 2-3) ได้แก่ วิถีเมทิลอิริทริทอลฟอสเฟต (methylerythritol phosphate หรือ MEP) ซึ่งเริ่มด้วย ไพรูเวต (pyruvate) ในพลาสติดและวิถีเมวาโลเนต (mevalonate หรือ MVA) ซึ่งเริ่มด้วย แอซีทิลโคเอ (Acetyl-CoA) ในไซโทพลาซึม [41, 49] จากการเปรียบเทียบจีโนมิกส์ของสาหร่ายหลายสปีชีส์ พบว่าวิถี MVA ได้สูญหายไปจากจุลสาหร่ายสีเขียว จึงใช้เฉพาะวิถี MEP อย่างเดียว ในขณะที่สาหร่ายสีแดงบางชนิดใช้ทั้งสองวิถี [50]

## 2.8.2 โอมิกส์เพื่อระบุยีนและวิถีเมแทบอลิกของบีตาแคโรทีน [51]

จุลสาหร่าย *Trentepohlia jolithus* ซึ่งอยู่ใน class Ulvophyceae สามารถสังเคราะห์ บีตาแคโรทีนในปริมาณมาก แต่แทบไม่มีข้อมูลทางชีววิทยาระดับโมเลกุล เพื่อค้นหาสิ่งที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์บีตาแคโรทีน จึงสร้างข้อมูลทรานสคริปโตมโดยหาลำดับอาร์เอ็นเอด้วยเทคโนโลยีที่ให้ข้อมูลสูง RNA-seq แล้ววิเคราะห์ข้อมูลโดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลต่าง ๆ เช่น the NCBI non-redundant protein database (NR), Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG), Swiss-Prot และ Clusters of orthologous groups (COG) เป็นต้น ทำให้สามารถระบุยีนทั้งหมดที่สร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับวิถี MEP และพบว่า *T. jolithus* ไม่มีวิถี MVA แต่ใช้วิถี MEP อย่างเดียว เช่นเดียวกับในจุลสาหร่ายสีเขียว ส่วนวิถีการสังเคราะห์บีตาแคโรทีนนั้นแม้จะคล้ายกับที่แสดงในรูปที่ 2-3 แต่มีความต่างหลายแห่ง ที่สำคัญคือการค้นพบยีนที่สร้างเอนไซม์ซีตาแคโรทีน ไอโซเมอเรส (Zeta-carotene isomerase) ซึ่งคาดว่าจะเป็ยีนที่พบเฉพาะใน *T. jolithus* นอกจากนี้ยังไม่พบยีนสร้างเอนไซม์บีตาแคโรทีนคีโทเลส ( $\beta$ -carotene ketolase) ถ้าหากไม่มียีนดังกล่าวในจีโนมจริง คงหมดโอกาสที่จะสร้างแอสตาแซนทีนโดยธรรมชาติใน *T. jolithus*

## 2.8.3 โอมิกส์สำหรับวิถีเมแทบอลิกของแอสตาแซนทีน

จุลสาหร่าย *H. pluvialis* สะสมแอสตาแซนทีนปริมาณมาก จึงเป็นสายพันธุ์ที่มีความเป็นไปได้มากที่สุดที่จะใช้ผลิตแอสตาแซนทีนธรรมชาติ เมื่อใช้ไมโครอาร์เรย์ตรวจสอบการสร้างเอ็มอาร์เอ็นเอของ *H. pluvialis* ที่อยู่ในสภาวะเหนียวนำไปสร้างแอสตาแซนทีน เช่น สภาวะที่มีความเข้มแสงสูง และสภาวะขาดสารอาหาร พบว่าเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงลดลง ในขณะที่เอ็มอาร์เอ็นเอของยีนที่เกี่ยวข้องกับความเครียด (stress) และการส่งทอดสัญญาณ (signal transduction) เพิ่มขึ้น [52] ซึ่งผลที่ได้นี้คล้ายคลึงกับที่ได้จากทรานสคริปโตมิกส์ของ *Dunaliella salina* ซึ่งพบว่าเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนที่สร้างเอนไซม์ 4-ไฮดรอกซี-3-เมทิลบูต-2-อินัล ไดฟอสเฟตรีดักเทส (4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl

diphosphate reductase) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในวิถี MEP มีระดับสูงขึ้นภายใต้สภาวะความเครียด เช่น สภาวะขาดสารอาหาร ความเค็มสูง และความเข้มแสงสูง [53] จากโปรตีนโอบิสังของ *H. pluvialis* พบว่าเอนไซม์ที่ต้านออกซิเดชัน (antioxidative enzyme) จะมีระดับสูงขึ้นชั่วคราว แล้วกลับสู่ระดับปกติหรือต่ำกว่าปกติ เอนไซม์เป็นระบบป้องกันเบื้องต้นของกลไกตอบสนองต่อความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) และหากมีความเครียดต่อเนื่อง เซลล์จะสร้างและสะสมแอสตาแซนทีนเพื่อเป็นกลไกในการป้องกันตัวในระยะยาว [54]

วิธีการสังเคราะห์แอสตาแซนทีนในจุลสาหร่ายมีปฏิสัมพันธ์กับวิถีเมแทบอลิกอื่น ๆ เช่น การถ่ายทอดอิเล็กตรอนในการสังเคราะห์แสง และการสังเคราะห์กรดไขมัน [55] เป็นต้น เมื่อเร็ว ๆ นี้มีความสนใจที่จะใช้จุลสาหร่าย *Chlorella zofingiensis* เป็นทางเลือกในการผลิตแอสตาแซนทีน เนื่องจากมีความสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว วิธีการสังเคราะห์บีตาแคโรทีนใน *C. zofingiensis* เหมือนกับใน *H. pluvialis* คือใช้วิถี MEP แต่วิธีการสังเคราะห์แอสตาแซนทีนนั้นต่างกัน ใน *H. pluvialis* ใช้วิถีที่ 1 ส่วนใน *C. zofingiensis* ใช้วิถีที่ 2 [55] (ดูรูปที่ 2-3)

#### 2.8.4 วิศวกรรมเมแทบอลิกของแคโรทีนอยด์

แม้แคโรทีนอยด์จะมีมูลค่าสูงและมีความได้เปรียบที่จะผลิตโดยใช้จุลสาหร่าย แต่มีรายงานน้อยมากเกี่ยวกับการใช้วิศวกรรมเมแทบอลิกในจุลสาหร่ายเพื่อปรับสภาวะที่ดีที่สุดในการผลิตแคโรทีนอยด์ เนื่องจากการสังเคราะห์บีตาแคโรทีนในจุลสาหร่ายสี่ชนิดเกิดขึ้นในคลอโรพลาสต์ ส่วนขั้นตอนต่อมา (รูปที่ 2-3) สามารถเกิดขึ้นได้ทั้งในคลอโรพลาสต์และในไซโทพลาซึม [49] ดังนั้น วิศวกรรมเมแทบอลิกของแคโรทีนอยด์ในจุลสาหร่ายน่าจะประสบความสำเร็จได้โดยพันธุวิศวกรรมด้วยการถ่ายโอนยีน (gene transformation) ที่นิวเคลียสหรือคลอโรพลาสต์ อย่างไรก็ตาม หรือทั้งสองอย่าง ตัวอย่างของวิศวกรรมเมแทบอลิกของแคโรทีนอยด์ในจุลสาหร่ายที่ประสบความสำเร็จ เช่น เมื่อนำยีนสร้างเอนไซม์ไฟโทอินซินเทส (phytoene synthase หรือ PSY) จาก *D. salina* หรือจาก *C. zofingiensis* มาเพิ่มการแสดงออกในนิวเคลียสของ *C. reinhardtii* พบว่ามีการผลิตลูทีน (lutein) เพิ่มขึ้น 2.6 เท่า และ 2.2 เท่าตามลำดับ [56, 57] เมื่อนำยีนเอนโดจีนัส (endogenous) ที่สร้างเอนไซม์ไฟโทอินดีแซตเจอเรส (phytoene desaturase หรือ PDS) มาแสดงออกเพิ่มขึ้นในนิวเคลียสของ *H. pluvialis* และ *C. zofingiensis* ทำให้มีการสังเคราะห์แอสตาแซนทีนเพิ่มขึ้น 26% และ 54.1% ตามลำดับ [58, 59] แนวโน้มในอนาคตสำหรับวิศวกรรมเมแทบอลิกของแคโรทีนอยด์ เช่น อาจมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นของโปรตีนพร้อมกันที่เดียวหลาย ๆ ตัว เพื่อให้การไหลของเมแทบอลิกเข้มแข็งขึ้น หรืออาจทำวิศวกรรมที่ตัวควบคุมการทำงานแพกเตอร์ถอดรหัส เป็นต้น

## 2.9 บทสรุป

โอมิกส์เกิดขึ้นได้ เพราะความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีที่ให้ข้อมูลสูงและชีวสารสนเทศ ทำให้วิเคราะห์ข้อมูลจำนวนมากได้ในเวลาอันรวดเร็ว ปัจจุบันโอมิกส์ของไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายเพิ่งเริ่มต้นและมีข้อมูลน้อย ทำให้บูรณาการโอมิกส์ยังห่างไกลความเป็นจริงอยู่มาก จึงมุ่งสู่วิศวกรรมเมแทบอลิกและใช้พันธุวิศวกรรมมาแก้ไขวิถีเมแทบอลิกให้ผลิตสารตามต้องการอย่างไรก็ดี คาดว่าจะมีโอมิกส์ของไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายเพิ่มขึ้นอีกมากอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้ใช้โอมิกส์ได้อย่างเต็มศักยภาพ และนำไปสู่บูรณาการโอมิกส์ ซึ่งมีความเป็นไปได้สูงที่จะประสบความสำเร็จ ในการปรับปรุงพันธุ์ไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายให้เป็น “โรงงาน” ผลิตสารธรรมชาติที่มีมูลค่าสูง ปริมาณมากในระดับอุตสาหกรรมอย่างคุ้มค่า

## เอกสารอ้างอิง

1. Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes JC, Hutchison C, Slocombe PM, Smith M. Nucleotide sequence of bacteriophage  $\phi$ X174 DNA. *Nature*. 1977; 265: 687-695.
2. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, De Bruijn M, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981; 290: 457-465.
3. Joyce AR, Palsson BØ. The model organism as a system: integrating omics' data sets. *Nature Rev Mol Cell Biol*. 2006; 7: 198-210.
4. Lee SY, Lee D-Y, Kim TY. Systems biotechnology for strain improvement. *Trends Biotechnol*. 2005; 23: 349-358.
5. Burja AM, Dhamwichukorn S, Wright PC. Cyanobacterial postgenomic research and systems biology. *Trends Biotechnol*. 2003; 21: 504-511.
6. Morozova O, Marra MA. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics*. 2008; 92: 255-264.
7. Griese M, Lange C, Soppa J. Ploidy in cyanobacteria. *FEMS Microbiol Lett*. 2011; 323: 124-131.
8. Hess WR. Cyanobacterial genomics for ecology and biotechnology. *Curr Opin Microbiol*. 2011; 14: 608-614.
9. Dvořák P, Casamatta DA, Hašler P, Jahodářová E, Norwich AR, Pouličková A. Diversity of the cyanobacteria. In: Hallenbeck P, ed. *Modern topics in the phototrophic prokaryotes*. Springer; 2017. p. 3-46.
10. Sugita C, Ogata K, Shikata M, Jikuya H, Takano J, Furumichi M, Kanehisa M, Omata T, Sugiura M, Sugita M. Complete nucleotide sequence of the freshwater unicellular cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 6301 chromosome: gene content and organization. *Photosynth Res*. 2007; 93: 55-67.
11. Cheevadhanarak S, Paithoonrangsarid K, Prommeenate P, Kaewngam W, Musigkain A, Tragoonrung S, Tabata S, Kaneko T, Chajjaruwanich J, Sangsrakru D. Draft genome sequence of *Arthrospira platensis* C1 (PCC 9438). *Stand Genomic Sci*. 2012; 6: 43.
12. Janssen P, Morin N, Mergeay M, Leroy B, Wattiez R, Vallaeys T, Waleron K, Waleron M, Wilmotte A, Quillardet P. Genome sequence of the edible cyanobacterium *Arthrospira* sp. PCC 8005. *J Bacteriol*. 2010; 192: 2465-2466.
13. Fujisawa T, Narikawa R, Okamoto S, Ehira S, Yoshimura H, Suzuki I, Masuda T, Mochimaru M, Takaichi S, Awai K. Genomic structure of an economically important cyanobacterium, *Arthrospira (Spirulina) platensis* NIES-39. *DNA Res*. 2010; 17: 85-103.

14. Xu T, Qin S, Hu Y, Song Z, Ying J, Li P, Dong W, Zhao F, Yang H, Bao Q. Whole genomic DNA sequencing and comparative genomic analysis of *Arthrospira platensis*: high genome plasticity and genetic diversity. DNA Res. 2016; 23: 325-338.
15. Larsson J, Nylander JA, Bergman B. Genome fluctuations in cyanobacteria reflect evolutionary, developmental and adaptive traits. BMC Evol Biol. 2011; 11: 187.
16. Shih PM, Wu D, Latifi A, Axen SD, Fewer DP, Talla E, Calteau A, Cai F, De Marsac NT, Rippka R. Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. Proc Natl Acad Sci. 2013; 110: 1053-1058.
17. Avrani S, Wurtzel O, Sharon I, Sorek R, Lindell D. Genomic island variability facilitates *Prochlorococcus*-virus coexistence. Nature. 2011; 474: 604-608.
18. Lieman-Hurwitz J, Rachmilevitch S, Mittler R, Marcus Y, Kaplan A. Enhanced photosynthesis and growth of transgenic plants that express *ictB*, a gene involved in  $\text{HCO}_3^-$  accumulation in cyanobacteria. Plant Biotechnol J. 2003; 1: 43-50.
19. Lin MT, Occhialini A, Andralojc PJ, Parry MA, Hanson MR. A faster Rubisco with potential to increase photosynthesis in crops. Nature. 2014; 513: 547.
20. Gerjets T, Sandmann G. Ketocarotenoid formation in transgenic potato. J Exp Bot. 2006; 57: 3639-3645.
21. Xu J, Tian Y-S, Peng R-H, Xiong A-S, Zhu B, Hou X-L, Yao Q-H. Cyanobacteria MT gene *SmtA* enhance zinc tolerance in *Arabidopsis*. Mol Biol Rep. 2010; 37: 1105.
22. Komárek J. Recent changes (2008) in cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept). Hydrobiologia. 2010; 639: 245-259.
23. Reijnders MJ, van Heck RG, Lam CM, Scaife MA, dos Santos VAM, Smith AG, Schaap PJ. Green genes: bioinformatics and systems-biology innovations drive algal biotechnology. Trends Biotechnol. 2014; 32: 617-626.
24. De Alda JAO, Esteban R, Diago ML, Houmard J. The plastid ancestor originated among one of the major cyanobacterial lineages. Nature Commun. 2014; 5: 4937.
25. Green BR. Chloroplast genomes of photosynthetic eukaryotes. Plant J. 2011; 66: 34-44.
26. Löffelhardt W. The single primary endosymbiotic event. In: Endosymbiosis. Vienna: Springer; 2014. p. 39-52.
27. Hernández-Prieto MA, Semeniuk TA, Futschik ME. Toward a systems-level understanding of gene regulatory, protein interaction, and metabolic networks in cyanobacteria. Front Genet. 2014; 5: 10.3389.
28. Voigt K, Sharma CM, Mitschke J, Lambrecht SJ, Voß B, Hess WR, Steglich C. Comparative transcriptomics of two environmentally relevant cyanobacteria reveals unexpected transcriptome diversity. ISME J. 2014; 8: 2056.



29. Waldbauer JR, Rodrigue S, Coleman ML, Chisholm SW. Transcriptome and proteome dynamics of a light-dark synchronized bacterial cell cycle. *PloS one*. 2012; 7: e43432.
30. Rismani-Yazdi H, Haznedaroglu B, Hsin C, Peccia J. Transcriptomic analysis of the oleaginous microalga *Neochloris oleoabundans* reveals metabolic insights into triacylglyceride accumulation. *Biotechnol Biofuels*. 2012; 5: 74.
31. Lv H, Qu G, Qi X, Lu L, Tian C, Ma Y. Transcriptome analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* during the process of lipid accumulation. *Genomics*. 2013; 101: 229-237.
32. Senachak J, Cheevadhanarak S, Hongsthong A. SpirPro: A *Spirulina* proteome database and web-based tools for the analysis of protein-protein interactions at the metabolic level in *Spirulina (Arthrospira) platensis* C1. *BMC Bioinformatics*. 2015; 16: 233.
33. Wienkoop S, Staudinger C, Hoehenwarter W, Weckwerth W, Egelhofer V. ProMEX – a mass spectral reference database for plant proteomics. *Front Plant Sci*. 2012; 3: 125.
34. Klanchui A, Khannapho C, Phodee A, Cheevadhanarak S, Meechai A. i AK692: A genome-scale metabolic model of *Spirulina platensis* C1. *BMC Syst Biol*. 2012; 6: 1.
35. Lü J, Sheahan C, Fu P. Metabolic engineering of algae for fourth generation biofuels production. *Energy Environ Sci*. 2011; 4: 2451-2466.
36. Chang RL, Ghamsari L, Manichaikul A, Hom EF, Balaji S, Fu W, Shen Y, Hao T, Palsson BØ, Salehi-Ashtiani K. Metabolic network reconstruction of *Chlamydomonas* offers insight into light-driven algal metabolism. *Mol Syst Biol*. 2011; 7: 518.
37. de Oliveira Dal’Molin CG, Quek L-E, Palfreyman RW, Nielsen LK. AlgaGEM – a genome-scale metabolic reconstruction of algae based on the *Chlamydomonas reinhardtii* genome. *BMC Genomics*. 2011; 12: S5.
38. Yoshikawa K, Kojima Y, Nakajima T, Furusawa C, Hirasawa T, Shimizu H. Reconstruction and verification of a genome-scale metabolic model for *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011; 92: 347-358.
39. Alagesan S, Gaudana SB, Sinha A, Wangikar PP. Metabolic flux analysis of *Cyanotheca* sp. ATCC 51142 under mixotrophic conditions. *Photosynth Res*. 2013; 118: 191-198.
40. Boyle NR, Morgan JA. Flux balance analysis of primary metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *BMC Syst Biol*. 2009; 3: 1.
41. Guarneri MT, Pienkos PT. Algal omics: unlocking bioproduct diversity in algae cell factories. *Photosynth Res*. 2015; 123: 255-263.
42. Yohn C, Mendez M, Behnke C, Brand A. Stress-Induced Lipid. Trigger. Patent No. WO/2011/097261, 11 August 2011. [Google Scholar]; 2011.
43. Boyle NR, Page MD, Liu B, Blaby IK, Casero D, Kropat J, Cokus SJ, Hong-Hermesdorf A, Shaw J, Karpowicz SJ, Gallaher SD, Johnson S, Benning C, Pellegrini M, Grossman A, Merchant SS. Three acyltransferases and nitrogen-responsive regulator are implicated in nitrogen

- starvation-induced triacylglycerol accumulation in *Chlamydomonas*. *J Biol Chem*. 2012; 287: 15811-15825.
44. Grünewald K, Hirschberg J, Hagen C. Ketocarotenoid biosynthesis outside of plastids in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. *J Biol Chem*. 2001; 276: 6023-6029.
45. Ye Z-W, Jiang J-G, Wu G-H. Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: progresses and prospects. *Biotechnol Adv*. 2008; 26: 352-360.
46. Ben-Amotz A, Lers A, Avron M. Stereoisomers of  $\beta$ -carotene and phytoene in the alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol*. 1988; 86: 1286-1291.
47. Borowitzka MA. High-value products from microalgae—their development and commercialisation. *J Appl Phycol*. 2013; 25: 743-756.
48. Grung M, D'Souza FM, Borowitzka M, Liaaen-Jensen S. Algal carotenoids 51. Secondary carotenoids 2. *Haematococcus pluvialis* aplanospores as a source of (3S, 3'S)-astaxanthin esters. *J Appl Phycol*. 1992; 4: 165-171.
49. Gimpel JA, Henríquez V, Mayfield SP. In: Metabolic engineering of eukaryotic microalgae: potential and challenges come with great diversity. *Front Microbiol*. 2015; 6.
50. Lohr M, Schwender J, Polle JE. Isoprenoid biosynthesis in eukaryotic phototrophs: a spotlight on algae. *Plant Sci*. 2012; 185: 9-22.
51. Li Q, Liu J, Zhang L, Liu Q. De novo transcriptome analysis of an aerial microalga *Trentepohlia jolithus*: pathway description and gene discovery for carbon fixation and carotenoid biosynthesis. *PloS one*. 2014; 9: e108488.
52. Eom H, Lee C-G, Jin E. Gene expression profile analysis in astaxanthin-induced *Haematococcus pluvialis* using a cDNA microarray. *Planta*. 2006; 223: 1231-1242.
53. Ramos AA, Marques AR, Rodrigues M, Henriques N, Baumgartner A, Castilho R, Brenig B, Varela JC. Molecular and functional characterization of a cDNA encoding 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase from *Dunaliella salina*. *J Plant Physiol*. 2009; 166: 968-977.
54. Wang S-B, Chen F, Sommerfeld M, Hu Q. Proteomic analysis of molecular response to oxidative stress by the green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Planta*. 2004; 220: 17-29.
55. Han D, Li Y, Hu Q. Astaxanthin in microalgae: pathways, functions and biotechnological implications. *Algae*. 2013; 28: 131.
56. Cordero BF, Couso I, León R, Rodríguez H, Vargas MÁ. Enhancement of carotenoids biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* by nuclear transformation using a phytoene synthase gene isolated from *Chlorella zofingiensis*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011; 91: 341-351.

57. Couso I, Vila M, Rodriguez H, Vargas M, Leon R. Overexpression of an exogenous phytoene synthase gene in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii* leads to an increase in the content of carotenoids. *Biotechnol Prog.* 2011; 27: 54-60.
58. Steinbrenner J, Sandmann G. Transformation of the green alga *Haematococcus pluvialis* with a phytoene desaturase for accelerated astaxanthin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72: 7477-7484.
59. Liu J, Sun Z, Gerken H, Huang J, Jiang Y, Chen F. Genetic engineering of the green alga *Chlorella zofingiensis*: a modified norflurazon-resistant phytoene desaturase gene as a dominant selectable marker. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014; 98: 5069-5079.



## พันธุวิศวกรรมในไซยาโนแบคทีเรีย

### 3.1 บทนำ

พันธุวิศวกรรม (genetic engineering) เป็นกระบวนการดัดแปลงหรือเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต โดยใช้เทคนิครีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ (recombinant DNA) ในการตัดต่อยีนจากสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งแล้วถ่ายโอน (transform) เข้าสู่สิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง เพื่อสร้างสิ่งมีชีวิตดัดแปรพันธุกรรมที่มีคุณสมบัติใหม่ตามต้องการ ปัจจุบันการใช้พันธุวิศวกรรมไปไกลกว่าเดิมอีกชั้นหนึ่ง โดยใช้กับแขนงวิชาที่เกิดขึ้นใหม่ เช่น ชีววิทยาสังเคราะห์ (synthetic biology) และวิศวกรรมเมแทบอลิก (metabolic engineering) ในกระบวนการวิศวกรรมเมแทบอลิก จะใช้ปฏิกิริยาฟลักซ์ (flux reaction) ในการบ่งชี้ว่าควรเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาใด และจัดการกับยีนใดในวิถีเมแทบอลิก (metabolic pathway) แล้วใช้พันธุวิศวกรรมในการแก้ไขวิถีเมแทบอลิก จัดการให้ยีนนั้นแสดงออกให้เหมาะแก่การสังเคราะห์สารเป้าหมายจำนวนมาก ในระดับอุตสาหกรรมอย่างคุ้มทุน (ดูรายละเอียดในบทที่ 2) ส่วนการใช้พันธุวิศวกรรมในชีววิทยาสังเคราะห์นั้นเป็นการประกอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาตรฐานชนิดต่าง ๆ เข้าด้วยกัน แล้วถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์เพื่อให้เกิดคุณสมบัติใหม่ตามต้องการ

ไซยาโนแบคทีเรียเป็นโพรแคริโอต (prokaryote) ที่มีองค์ประกอบทางเคมีหลากหลาย เป็นแหล่งของสารธรรมชาติใหม่ ๆ ที่น่าสนใจสำหรับเทคโนโลยีชีวภาพ (ดูบทที่ 1) เพื่อใช้ไซยาโนแบคทีเรียสำหรับผลิตสารธรรมชาติปริมาณมาก จึงจำเป็นต้องปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งทำได้โดยใช้ชีววิทยาสังเคราะห์และวิศวกรรมเมแทบอลิก ซึ่งล้วนแต่ต้องใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเข้าร่วมด้วยการทำพันธุวิศวกรรมในไซยาโนแบคทีเรียให้ประสบความสำเร็จนั้น ต้องใช้ความรู้ด้านพันธุศาสตร์

ระดับโมเลกุล (molecular genetics) เช่น การควบคุมการแสดงออกของยีน และเทคโนโลยีการถ่ายโอนดีเอ็นเอ (DNA transformation) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ความสำเร็จดังกล่าวในไซยาโนแบคทีเรียมีอยู่อย่างจำกัด การศึกษามักทำในสายพันธุ์ต้นแบบ (model) มีสายพันธุ์ที่ใช้ทำพันธุวิศวกรรมน้อยมาก ในบทนี้จะกล่าวถึงชีววิทยาสังเคราะห์ การควบคุมการแสดงออกของยีน องค์ประกอบของพันธุวิศวกรรมในไซยาโนแบคทีเรียรวมทั้งกรณีศึกษา และการประยุกต์ไซยาโนแบคทีเรียดัดแปรพันธุกรรม

### 3.2 ชีววิทยาสังเคราะห์ในไซยาโนแบคทีเรีย

ชีววิทยาสังเคราะห์เป็นการนำหลักทางวิศวกรรมมาใช้กับชีววิทยา ในทางวิศวกรรมหากประกอบชิ้นส่วนมาตรฐานชนิดต่าง ๆ เข้าด้วยกันตามแบบที่กำหนด จะได้เครื่องจักรที่ทำงานอย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถเปลี่ยนหรือเพิ่มเติมชิ้นส่วนในเครื่องจักรได้ โดยเลือกชิ้นส่วนมาตรฐานจากบัญชีรายชื่อ แนวคิดดังกล่าวได้นำมาใช้ในชีววิทยา เพื่อช่วยให้กระบวนการพันธุกรรมทำได้ง่ายขึ้น ชีววิทยาสังเคราะห์จึงเป็นการประกอบชิ้นส่วนมาตรฐานที่สังเคราะห์ขึ้น โดยอาศัยความรู้ด้านชีววิทยาเชิงระบบ (systems biology) และแบบจำลองการทำงาน (simulation) เพื่อปรับเปลี่ยนการทำหน้าที่ทางชีววิทยาของสิ่งมีชีวิตอย่างมีประสิทธิภาพ เกิดคุณสมบัติใหม่ที่ไม่พบในธรรมชาติ เป็นสิ่งมีชีวิตที่สังเคราะห์ขึ้น ชิ้นส่วนมาตรฐานในชีววิทยาสังเคราะห์ ได้แก่ กรดอะมิโน โปรตีน และยีน เป็นต้น ชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาตรฐานชนิดต่าง ๆ ซึ่งมีหน้าที่เฉพาะหรือไบโอบริคส์ (BioBricks) ที่จัดทะเบียนแล้ว ดูได้จากฐานข้อมูลที่ MIT ([http://parts.igem.org/Main\\_Page](http://parts.igem.org/Main_Page))

ชีววิทยาสังเคราะห์โดยไซยาโนแบคทีเรียเป็นเจ้าบ้านนั้นเพิ่งเริ่มต้น โดยใช้สายพันธุ์ต้นแบบ ได้แก่ *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus elongatus* PCC 7942, *Synechococcus* sp. PCC 7002, *Nostoc (Anabaena)* sp. PCC 7120 และ *Leptolyngbya* sp. strain BL0902 [1, 2] มีการจดทะเบียนชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทำงานได้ในไซยาโนแบคทีเรียบ้างแล้ว เช่น โพรโมเตอร์ (promoter) ชนิดต่าง ๆ ตำแหน่งจับของไรโบโซม (ribosome binding site) และยีนรายงาน (reporter gene) เป็นต้น โดยใช้กระบวนการพันธุวิศวกรรมในการประกอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาตรฐานชนิดต่าง ๆ เข้าด้วยกันให้อยู่ในรูปของพลาสมิด (plasmid) หรือดีเอ็นเอเส้นสาย (linear) แล้วถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย

### 3.3 การควบคุมการแสดงออกของยีนในไซยาโนแบคทีเรีย

การทำพันธุวิศวกรรมในไซยาโนแบคทีเรียเพื่อให้มีคุณสมบัติใหม่ตามต้องการนั้น จำเป็นต้องใช้ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับการควบคุมการแสดงออกของยีนในไซยาโนแบคทีเรีย เช่น การควบคุมระดับถอดรหัส (transcription) และระดับแปลรหัส (translation) เป็นต้น

#### 3.3.1 การควบคุมระดับถอดรหัส

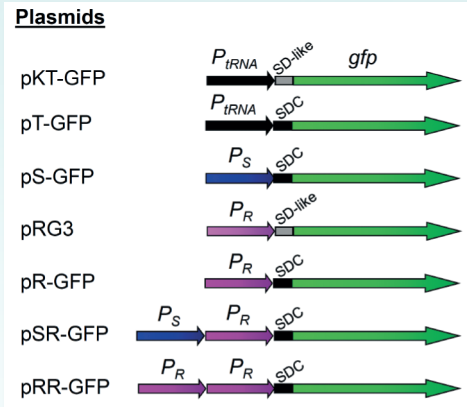
การควบคุมการแสดงออกของยีนในระดับถอดรหัสมีองค์ประกอบสำคัญ ได้แก่ โพรโมเตอร์ แฟกเตอร์ถอดรหัส (transcription factor) และเทอร์มิเนเตอร์ถอดรหัส (transcription terminator) กระบวนการถอดรหัสจะขับเคลื่อนด้วยฮอโลเอนไซม์อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรส (holoenzyme RNA polymerase หรือ RNAP) ซึ่งประกอบด้วยซิกมาแฟกเตอร์ (sigma factor หรือ  $\sigma$ ) และเอนไซม์แกน (core enzyme) ในการตั้งต้นถอดรหัสซิกมาแฟกเตอร์จะจดจำและจำแนกได้ว่าลำดับดีเอ็นเอใดเป็นโพรโมเตอร์ โดยซิกมาแฟกเตอร์แต่ละชนิดจะจดจำอย่างจำเพาะกับโพรโมเตอร์ชนิดนั้น ๆ เอนไซม์แกนจะรวมกับซิกมาแฟกเตอร์ชนิดใด ขึ้นอยู่กับสภาพของสิ่งแวดล้อมหรือสภาพภายในเซลล์ ซึ่งเป็นกลไกในการควบคุมการถอดรหัสของยีน

แม้ไซยาโนแบคทีเรียจะเป็นยูแบคทีเรีย (eubacteria) แต่มี RNAP ที่แตกต่างจาก *Escherichia coli* เพราะมีหน่วยย่อยแกมมา ( $\gamma$  subunit) นั่นคือประกอบด้วย  $\alpha_2\beta\beta'\gamma\sigma$  ในขณะที่ของ *E. coli* ประกอบด้วย  $\alpha_2\beta\beta'\sigma$  ซิกมาแฟกเตอร์ที่พบในไซยาโนแบคทีเรียจะอยู่ในตระกูล  $\sigma^{70}$  ในขณะที่ตระกูล  $\sigma^{54}$  ที่พบในแบคทีเรียส่วนใหญ่กลับไม่พบในไซยาโนแบคทีเรีย [3]  $\sigma^{70}$  ของไซยาโนแบคทีเรียแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มตามลักษณะของโพรโมเตอร์ ได้แก่ กลุ่มที่ 1 มีลำดับเบสพ้อง  $\sigma^{70}$  (consensus- $\sigma^{70}$ ) จดจำโพรโมเตอร์ที่มีลำดับบริเวณ -35 (TTGACA) และ -10 (TATAAT) เหมือนกับที่พบใน *E. coli* เป็น  $\sigma^{70}$  ที่รับผิดชอบต่อการแสดงออกของยีนทั่วไปที่มีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิต (housekeeping genes) จึงเป็นกลุ่มที่เซลล์ขาดไม่ได้ กลุ่มที่ 2 และ 3 เป็น  $\sigma^{70}$  ที่ตอบสนองต่อภาวะความเครียดทางสิ่งแวดล้อม เช่น ความร้อน ความเค็ม หรือสารอาหารจำกัด เป็นต้น โพรโมเตอร์ในกลุ่มที่ 2 จะมีเพียงลำดับบริเวณ -10 หรือโมทีฟตัวส่งเสริม (enhancer motif) ที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนที่กระตุ้นการถอดรหัส ส่วนโพรโมเตอร์ในกลุ่มที่ 3 นั้นแตกต่างจากกลุ่มที่ 1 และ 2 แต่ยังมีรูปร่างน้อยมากเกี่ยวกับความจำเพาะและการปฏิสัมพันธ์กับซิกมาแฟกเตอร์ [2]

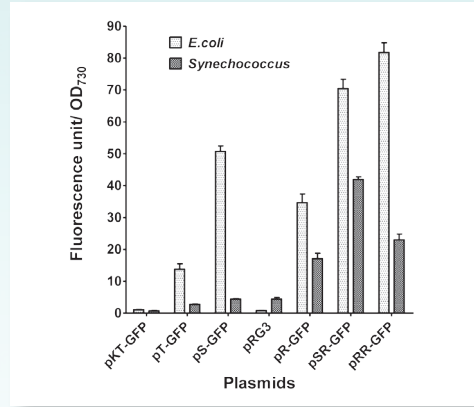
เนื่องจากการถอดรหัสของไซยาโนแบคทีเรียมีความแตกต่างจาก *E. coli* ดังที่กล่าวมาข้างต้น จึงมีความเป็นไปได้ที่โปรโมเตอร์ที่ใช้ใน *E. coli* อาจทำงานต่างออกไปเมื่อนำมาใช้ในไซยาโนแบคทีเรีย โดยพบว่าโปรโมเตอร์ที่ทำงานระดับสูงใน *E. coli* เช่น  $P_{trc}$ ,  $P_{lac}$  และ  $\lambda P_R$  กลับแทบไม่ทำงานใน *Synechocystis* sp. PCC 6803 [4] วิชา จึงจตุพรชัย และคณะ ได้ตรวจสอบการทำงานของโปรโมเตอร์  $P_S$  ซึ่งมีลำดับเบสพ้อง  $\sigma^{70}$  ของ *E. coli* โดยใช้ยีนรายงาน *gfp* ที่สร้างโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (green fluorescent protein หรือ GFP) พบว่าโปรโมเตอร์  $P_S$  ทำงานระดับสูงใน *E. coli* แต่ทำงานระดับน้อยมากใน *S. elongatus* PCC 7942 ในขณะที่โปรโมเตอร์  $P_R$  จาก *rna* ของ *S. elongatus* PCC 7942 ทำงานได้ดีทั้งใน *E. coli* และ *S. elongatus* PCC 7942 และเมื่อใช้ทั้ง  $P_S$  และ  $P_R$  ร่วมกัน พบว่ามีการเสริมกันให้ทำงานระดับสูงขึ้นมากใน *S. elongatus* PCC 7942 จนสามารถตรวจพบโปรตีนรายงาน GFP ด้วยวิธี SDS-PAGE ย้อมด้วยสีคัมเมสซีบลู (Coomassie blue) [5] (รูปที่ 3-1) ตัวอย่างของโปรโมเตอร์ต่าง ๆ สำหรับพันธุวิศวกรรมในไซยาโนแบคทีเรียในตารางที่ 3-1

นอกจากโปรโมเตอร์แล้ว แฟกเตอร์ถอดรหัสก็เป็นองค์ประกอบสำคัญในการควบคุมการถอดรหัสสำหรับการแสดงออกของยีน จากการสำรวจจีโนมของไซยาโนแบคทีเรียจำนวน 21 จีโนม พบว่ามี 1,288 ยีนที่สันนิษฐานได้ว่าสร้างแฟกเตอร์ถอดรหัส (putative transcription factor) [6] ส่วนเทอร์มิเนเตอร์ถอดรหัสนั้นยังไม่มี การสำรวจในไซยาโนแบคทีเรีย แต่ที่นำมาใช้ในไซยาโนแบคทีเรีย เช่น เทอร์มิเนเตอร์ถอดรหัสจาก bacteriophage T4 [7] เทอร์มิเนเตอร์ถอดรหัสของยีน *rmB* จาก *E. coli* [8] และเทอร์มิเนเตอร์ถอดรหัสของยีนสร้างโนพาลีนซินเทส (*nopaline synthase*) จากพืช [5] เป็นต้น

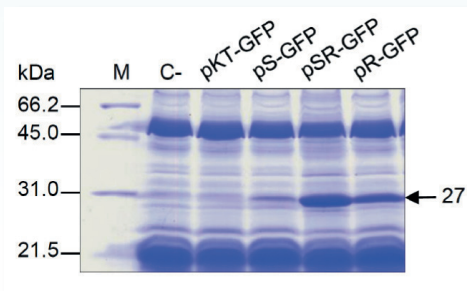




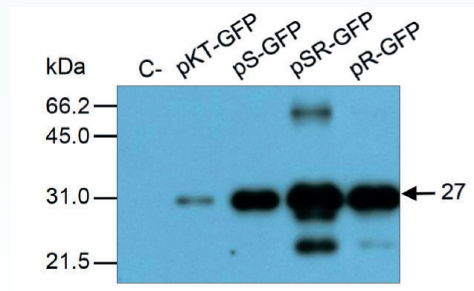
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

รูปที่ 3-1 การทำงานของโพรโมเตอร์และตำแหน่งจับของไรโบโซมใน *Synechococcus elongatus* PCC 7942

(ก) พลาสมิดที่ใช้ศึกษา  $P_{tRNA}$ : โพรโมเตอร์ของยีน  $tRNA^{pro}$  จาก *S. elongatus* PCC 7942;  $P_S$ : โพรโมเตอร์ consensus- $\sigma^{70}$  จาก *E. coli*;  $P_R$ : โพรโมเตอร์ของ *rna* operon จาก *S. elongatus* PCC 7942; SDC: consensus Shine-Dalgarno (SD) sequence AAGGAGGT; SD-like: GGTGGT; *gfp*: ยีนสร้างโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (green fluorescent protein หรือ GFP)

(ข) ระดับฟลูออเรสเซนซ์จากโปรตีนรายงาน GFP

(ค) ผลการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และย้อมด้วยสีคูแมสซีบลู

(ง) ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอต (western blot) โดยใช้โปรตีนสกัดจาก *S. elongatus* PCC 7942 ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีโคลนเดี่ยว (monoclonal antibody) ต่อ GFP  
 M: โปรตีนมาตรฐาน; C-: โปรตีนจากเซลล์ที่ไม่มียีน *gfp*

ที่มา: ดัดแปลงจาก Chungjatupornchai and Fa-aoonsawat, 2014 [5]

**ตารางที่ 3-1** ตัวอย่างโปรโมเตอร์สำหรับพันธุวิศวกรรมในไซยาโนแบคทีเรีย  
ที่มา: ตาราจันเดย์ วิกา จิงจตุพรชัย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

Promoter	Host strain	Comments	Ref
<i>Native</i>			
<i>tRNA<sup>Pro</sup></i>	<i>S. elongatus</i> PCC 7942	Constitutive promoter	[5, 7]
<i>rrnA</i>	<i>S. elongatus</i> PCC 7942	Constitutive promoter	[5]
<i>psbA2</i>	<i>S. elongatus</i> PCC 7942	Active in light; but not in darkness	[9]
<i>psbA2</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Active in light; but not in darkness	[10]
<i>nirA</i>	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	Active if sufficient nitrate is present	[11]
<i>Orthogonal</i>			
$\lambda P_R$	<i>S. elongatus</i> PCC 7942	Heat inducible promoter	[12]
<i>CaMV35S</i>	<i>S. elongatus</i> PCC 7942	Constitutive promoter	[12]
<i>tac</i>	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	Repressed by LacI, induced by IPTG	[13]
<i>trc</i>	<i>S. elongatus</i> PCC 7942	Repressed by LacI, induced by IPTG	[14]
<i>trc</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Repressed by LacI, induced by IPTG	[4]
<i>trc</i>	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	LacI repression/IPTG induction has not been tested	[4]

### 3.3.2 การควบคุมระดับแปลรหัส

องค์ประกอบสำคัญสำหรับการควบคุมการแสดงออกของยีนในระดับการแปลรหัส ได้แก่ ตำแหน่งจับของไรโบโซม (ribosome binding site หรือ RBS), แอนติเซนส์อาร์เอ็นเอ (antisense RNA) และการใช้โคดอน (codon usage) การแปลรหัสในโพรแคริโอตโดยทั่วไปเริ่มต้นด้วยไรโบโซมจับกับเอ็มอาร์เอ็นเอที่ RBS ที่มีลำดับเบสพ้อง (consensus) ไชน์-ดัลการ์โน (Shine-Dalgarno หรือ SD, GGAGG) [15] ประสิทธิภาพของลำดับ SD ขึ้นกับ 1) ความสามารถในการจับคู่กับลำดับ anti-SD ซึ่งเป็น 3' end ของลำดับ 16S rRNA และ 2) ระยะห่างระหว่างลำดับ SD และโคดอนเริ่มต้น (start codon) อย่างไรก็ดี ในไซยาโนแบคทีเรียมียีนจำนวนน้อยที่ RBS มีลำดับเบสพ้อง SD จากการวิเคราะห์ลำดับ RBS ของยีนทั้งหมดใน *Synechocystis* sp. PCC 6803 พบว่ามีเพียง 26% ของยีนที่มีลำดับเบสพ้อง SD ในขณะที่ *E. coli* มีถึง 57% [8] วิชา จึงจตุพรชัย และคณะ ได้เปรียบเทียบการทำงานของลำดับเบสพ้อง SD (AAGGAGGT) และลำดับเบสคล้าย SD (SD-like, GGTGGT) ใน *S. elongatus* PCC 7942 (รูปที่ 3-1) พบว่าลำดับเบสพ้อง SD ทำงานได้ดีกว่าลำดับเบสคล้าย SD ทั้งนี้อาจเป็นเพราะลำดับ anti-SD ที่ด้าน 3' ของ 16S rRNA จาก *S. elongatus* PCC 7942 และ *E. coli* มีโฮโมโลกัส (homologous) สูงมาก [5]

แอนติเซนส์อาร์เอ็นเอ นั้น เป็นที่ทราบกันว่ามีความสำคัญในการควบคุมการทำงานของยีนในไซยาโนแบคทีเรีย เช่น ไปจับกับบริเวณเอยูริชบ็อกซ์ (AU-rich box) ของ RBS เพื่อป้องกันการย่อยสลายที่เกิดจากอาร์เอ็นเอสอี (RNAase E) [16] เมื่อตรวจหาจุดเริ่มต้นถอดรหัส (transcriptional start site) จำนวน 3,527 ตำแหน่ง ใน *Synechocystis* sp. PCC 6803 พบว่าหนึ่งในสามของจุดเริ่มต้นถอดรหัสทั้งหมดอยู่ในตำแหน่งย้อนกลับของสายคู่สม (reverse complementary strand) ของ 866 ยีน แสดงให้เห็นว่ามีการถอดรหัสแบบแอนติเซนส์สูงมาก [17]

การใช้โคดอนของไซยาโนแบคทีเรียนั้นโดยทั่วไปมักคล้ายกับแบคทีเรียอื่น ๆ เช่น *E. coli* เป็นต้น อย่างไรก็ดี ในกลุ่มไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้เป็นต้นแบบ สายพันธุ์ที่เป็นเซลล์เดี่ยวมีแนวโน้มที่จะมีจำนวนโคดอนที่ถูกใช้ด้วยความถี่ต่ำกว่า 10% มากกว่าสายพันธุ์ที่เป็นสาย โดยเฉพาะ *Synechococcus* sp. มีหลายโคดอนที่ถูกใช้ด้วยความถี่ต่ำมาก [8] ดังนั้น การปรับปรุงการแสดงออกของยีน อาจทำได้ด้วยการปรับการใช้โคดอนให้เหมาะสมกับสายพันธุ์ที่จะใช้เป็นเจ้าบ้าน เช่น เมื่อปรับโคดอนของยีนสร้างเอนไซม์ไอโซพรีนซินเทส (isoprene synthase) จากพืชให้เหมาะกับเจ้าบ้าน *Synechocystis* sp. PCC 6803 ส่งผลให้สร้างเอนไซม์ดังกล่าวเพิ่มขึ้น 10 เท่า [10] เป็นต้น

### 3.3.3 ยีนรายงาน

การแสดงออกของยีนจำนวนมากในไซยาโนแบคทีเรียอยู่ภายใต้การควบคุมของสิ่งแวดล้อม วิธีที่ง่ายที่สุดในศึกษาการแสดงออกของยีนเหล่านี้คือการใช้ยีนรายงาน โดยให้ยีนรายงานอยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ของยีนที่ต้องการศึกษา เช่น วิเคราะห์ระดับและสภาวะการทำงานของโปรโมเตอร์ เป็นต้น นอกจากนี้โปรตีนจากยีนรายงานยังใช้เป็นตัวระบุตำแหน่ง (localization) ภายในเซลล์ได้ด้วย ยีนรายงานที่ใช้ในไซยาโนแบคทีเรีย เช่น *lacZ* ( $\beta$ -galactosidase), *gus* ( $\beta$ -glucuronidase), *luxAB* (luciferase) และ *gfp* เป็นต้น วิชา จึงจุดพรชัย และคณะ ได้ใช้ *gus* เป็นตัวรายงาน เพื่อตรวจสอบการทำหน้าที่โปรโมเตอร์ของซันตีเอ็นเอจาก *S. elongatus* PCC 7942 [7, 12] และการทำงานของโปรโมเตอร์ที่เหนี่ยวนำด้วยความเข้มแสง [18] นอกจากนี้ได้ใช้โปรตีนรายงาน GFP เพื่อระบุตำแหน่งภายในเซลล์ (subcellular localization) ว่าอยู่ในไซโทพลาซึม (cytoplasm) ในช่องว่างเพอริพลาซึม (periplasmic space) หรือส่งโปรตีนออกไปแสดงภายนอกเซลล์ (surface display) ของ *S. elongatus* PCC 7942 [19]

## 3.4 พันธุวิศวกรรมในไซยาโนแบคทีเรีย

พันธุวิศวกรรมในไซยาโนแบคทีเรียมีองค์ประกอบ ได้แก่ รีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอในรูปของพลาสมิดเป็นวง (circular) หรือเป็นเส้นสาย และการถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ ซึ่งมี 3 วิธี ได้แก่ ทรานสเฟอร์เมชันโดยธรรมชาติ (natural transformation) อิเล็กโทรพอเรชัน (electroporation) และคอนจูเกชัน (conjugation) เมื่อรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์แล้ว อาจคงอยู่ในรูปพลาสมิด หรืออาจรวมเข้ากับโครโมโซม (chromosome) ของเจ้าบ้าน ขึ้นอยู่กับชนิดของพลาสมิดที่ใช้

### 3.4.1 เวกเตอร์

เวกเตอร์ (vector) หรือพลาสมิดพาหะมีส่วนประกอบที่สำคัญ ได้แก่ ยีนเป้าหมาย จุดเริ่มการถ่ายแบบซ้ำ (origin of replication) ของพลาสมิด และยีนที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะใช้สำหรับการคัดกรอง เป็นต้น เวกเตอร์เป็นสิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงสำหรับพันธุวิศวกรรมในไซยาโนแบคทีเรีย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับเป้าหมายการใช้งาน โดยแบ่งออกเป็นพลาสมิดชนิดถ่ายแบบซ้ำ (replicative plasmid) และพลาสมิดชนิดรวมเข้ากับโครโมโซม (integrative plasmid) ของเจ้าบ้าน (ดูรูปที่ 3-2) การใช้พลาสมิดชนิดที่รวมเข้ากับโครโมโซมของไซยาโนแบคทีเรียเจ้าบ้าน จะใช้เมื่อต้องการให้ยีนที่

ถ่ายโอนมีความเสถียรสูง มีการถ่ายทอดทางกรรมพันธุ์ในระยะยาว หรือต้องการเปลี่ยนแปลงโครโมโซมของเจ้าบ้าน การรวมตัวของพลาสมิดเข้ากับโครโมโซมไม่จำเป็นเสมอไปที่จะนำไปสู่จำนวนยีนซ้ำ (gene dosage) ต่ำ เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียมักมีโครโมโซมหลายสำเนา (oligoploid) เช่น *Synechocystis* sp. PCC 6803 และ *S. elongatus* PCC 7942 มีโครโมโซมประมาณ 10 สำเนา (copy) ต่อเซลล์ [20, 21] จึงจำเป็นต้องทำการแยก (segregation) เซลล์จนรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอที่ถ่ายโอนเข้าไปปรากฏอยู่ในโครโมโซมทุกสำเนา ซึ่งเป็นเรื่องใช้เวลานาน ดังนั้น บ่อยครั้งหากใช้พลาสมิดชนิดถ่ายแบบซ้ำได้ ก็อาจจะง่ายกว่าการใช้พลาสมิดชนิดรวมเข้ากับโครโมโซม อย่างไรก็ตาม การใช้พลาสมิดชนิดถ่ายแบบซ้ำอาจเกิดปัญหาพลาสมิดกระจายไปสู่สายพันธุ์อื่น ๆ

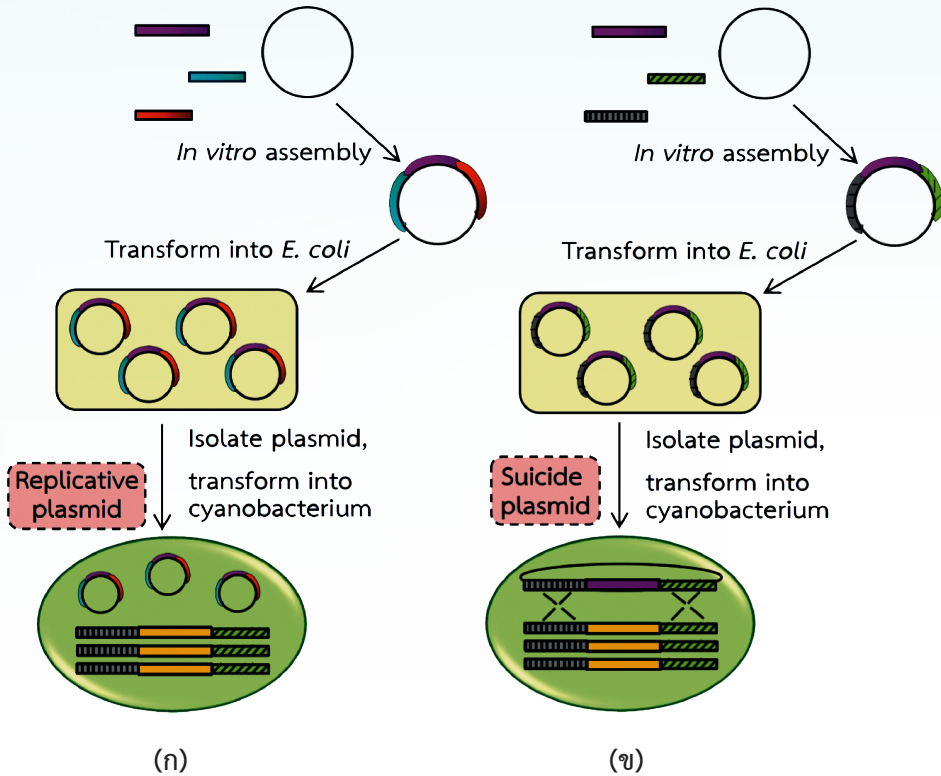
### 1) พลาสมิดชนิดถ่ายแบบซ้ำ

การโคลน (cloning) โดยทั่วไปมักทำใน *E. coli* ดังนั้น จึงจำเป็นต้องใช้ตัวพาร่วม (shuttle vector) ซึ่งเป็นพลาสมิดชนิดถ่ายแบบซ้ำได้ทั้งใน *E. coli* และไซยาโนแบคทีเรีย (รูปที่ 3-2 ก) ตัวพาร่วมที่ใช้ในไซยาโนแบคทีเรียมี 2 แบบ แบบแรกเป็นตัวพาร่วมที่มีเรพลิคอน (replicon) ทั้งของ *E. coli* และไซยาโนแบคทีเรียจำเพาะสายพันธุ์ เช่น พลาสมิด pKGT ซึ่งมีเรพลิคอนของ p15A จาก *E. coli* และ pUH24 จาก *S. elongatus* PCC 7942 [7, 22] และแบบที่สองเป็นตัวพาร่วมที่มีเรพลิคอนชนิดช่วงเจ้าบ้านกว้าง (broad host range) อาจเป็นเพราะการเริ่มถ่ายแบบซ้ำนั้นไม่ขึ้นกับชนิดของเจ้าบ้าน จึงทำหน้าที่ได้ในแบคทีเรียหลายชนิดรวมทั้งใน *E. coli* และไซยาโนแบคทีเรีย ได้แก่ พลาสมิดในกลุ่ม Incompatibility group Q (IncQ) เช่น RSF1010 [4] การใช้พลาสมิดชนิดช่วงเจ้าบ้านกว้าง ทำให้รีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอสามารถย้ายไปมาระหว่าง *E. coli* และไซยาโนแบคทีเรียเป้าหมาย (ดูตัวอย่างพลาสมิดชนิดถ่ายแบบซ้ำ ในตารางที่ 3-2)

### 2) พลาสมิดชนิดรวมเข้ากับโครโมโซม

พลาสมิดชนิดนี้ไม่สามารถถ่ายแบบซ้ำในเจ้าบ้านเป้าหมาย แต่จะรวมเข้ากับโครโมโซมหรือไม่ก็หายไปเมื่อเซลล์แบ่งตัว จึงมักเรียกว่าพลาสมิดชนิดฆ่าตัวตาย (suicide plasmid) (ดูรูปที่ 3-2 ข และตัวอย่างของพลาสมิดในตารางที่ 3-3) พลาสมิดนี้อาจรวมเข้ากับโครโมโซมของไซยาโนแบคทีเรียที่ตำแหน่งเฉพาะเจาะจง แบบโฮโมโลกัสรีคอมบิเนชันสองตำแหน่ง (double homologous recombination) ทำให้ส่วนของโครโมโซมถูกแทนที่ด้วยดีเอ็นเอเป้าหมาย หรือแบบโฮโมโลกัสรีคอมบิเนชันตำแหน่งเดียว (single homologous recombination) ทำให้พลาสมิดทั้งอันแทรกตัวรวมเข้ากับโครโมโซม (รูปที่ 3-3) ซีนติเอ็นเอที่อยู่ขนานข้าง (franking sequence) ดีเอ็นเอเป้าหมายนั้น ใช้ความยาวที่แตกต่างกันในไซยาโนแบคทีเรียแต่ละชนิด

เช่น ใน *Synechocystis* sp. PCC 6803 และ *S. elongatus* PCC 7942 ต้องใช้อย่างน้อยประมาณ 300 bp และใน *Nostoc* sp. PCC 7120 ประมาณ 400 bp [8] เป็นต้น โดยทั่วไปนั้นความยาวของชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่บนขาข้างเพิ่มขึ้น มีแนวโน้มที่จะเพิ่มประสิทธิภาพในการรีคอมบิเนชัน ในกรณีการเกิดโฮโมโลกัสรีคอมบิเนชันสองตำแหน่งกับโครโมโซมของไซยาโนแบคทีเรีย รีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอที่ใช้อาจอยู่ในรูปพลาสมิดหรือชิ้นดีเอ็นเอเส้นสายที่สร้างขึ้นด้วยวิธี PCR



### รูปที่ 3-2 การสร้างไซยาโนแบคทีเรียพันธุกรรม

รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สร้างแบบนอกกาย (*in vitro*) ถ่ายโอนเข้า *E. coli* เพื่อเพิ่มจำนวน จากนั้นจึงถ่ายโอนเข้าไซยาโนแบคทีเรีย

(ก) พลาสมิดชนิดถ่ายแบบซ้ำ เพิ่มจำนวนในเซลล์

(ข) พลาสมิดชนิดรวมเข้ากับโครโมโซม หรือพลาสมิดชนิดฆ่าตัวตาย

ที่มา: แผนภาพโดย วิภา จึงจตุพรชัย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

**ตารางที่ 3-2** ตัวอย่างพลาสมิดชนิดถ่ายแบบซ้ำ สำหรับพันธู์วิศวกรรมไบโไซยาโนแบคทีเรีย  
ที่มา: ตารางโดย วิภา จึงจตุพรชัย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

Replicative plasmid	Replicon	Selectable marker	Host strain	Ref
pUC303	pUH24	Cm, Str	<i>E. coli</i> , <i>S. elongatus</i> PCC 7942	[22]
pKGT	pUH24	Amp, Km	<i>E. coli</i> , <i>S. elongatus</i> PCC 7942	[7]
pSG111M	pMB1	Cm, Amp	<i>E. coli</i> , <i>S. elongatus</i> PCC 7942	[23]
pSUN119/202	pUH24	Km and Nm, Amp	<i>E. coli</i> , <i>Nostoc punctiforme</i>	[24]
pFC1	pMB1, pDC1	Str, Cm	Broad-host-range	[25]
pPMQAK1	RSF1010	Km and Nm, Amp	Broad-host-range	[4]
pKT210	RSF1010	Cm, Str	Broad-host-range	[26]

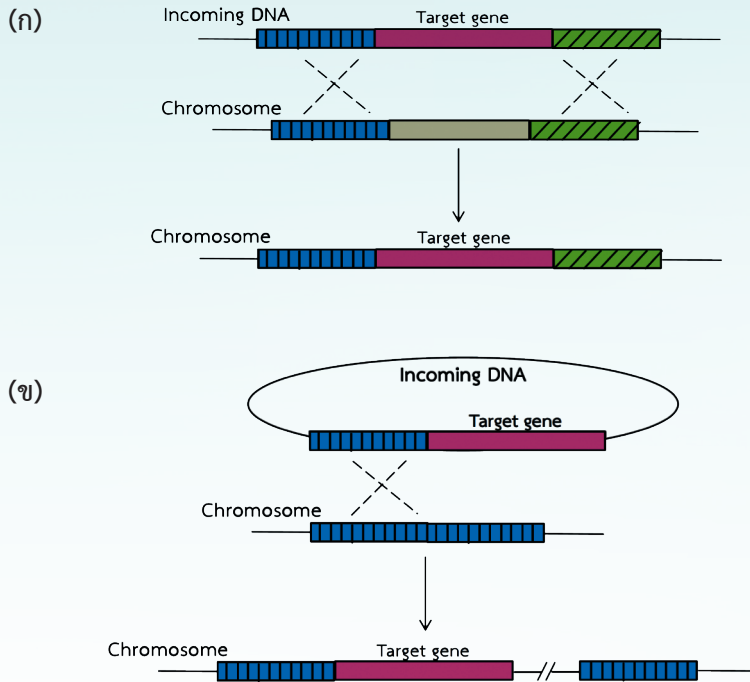
Amp, ampicillin; Cm, chloramphenicol; Km, kanamycin; Nm, neomycin; Str, streptomycin

**ตารางที่ 3-3** ตัวอย่างพลาสมิดชนิดรวมเข้ากับโครโมโซม สำหรับพันธุวิศวกรรมในไซยาโนแบคทีเรีย  
ที่มา: ตาราจันเดย์ วิภา จิงจตุพรชัย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

Integrative plasmid	Integron	Selectable marker	Host strain	Ref
pRL1063	Tn-1063	Bm, Nm, Str	<i>E. coli</i> , <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	[27]
pAM1303	Recombination	Spc	<i>E. coli</i> , <i>S. elongatus</i> PCC 7942	[28]
pAM1573	Recombination	Amp, Cm	<i>E. coli</i> , <i>S. elongatus</i> PCC 7942	[28]
pSCR104	Recombination	Nm	<i>E. coli</i> , <i>Nostoc punctiforme</i>	[29]

Amp, ampicillin; Bm, bleomycin; Cm, chloramphenicol; Nm, neomycin; Spc, spectinomycin; Str, streptomycin





รูปที่ 3-3 การรวมดีเอ็นเอเป้าหมายเข้ากับโครโมโซมของไซยาโนแบคทีเรีย

(ก) โฮโมโลกัสรีคอมบิเนชันสองตำแหน่ง ระหว่างดีเอ็นเอที่เป็นพลาสมิดหรือเป็นเส้นสายกับโครโมโซมของไซยาโนแบคทีเรีย ทำให้เกิดการแทนที่ส่วนของโครโมโซมด้วยดีเอ็นเอเป้าหมาย

(ข) โฮโมโลกัสรีคอมบิเนชันหนึ่งตำแหน่ง ระหว่างพลาสมิดกับโครโมโซมของไซยาโนแบคทีเรีย ทำให้เกิดดิพลอยด์บางส่วน (partial diploid)

ยีนเป้าหมายอาจประกอบด้วยยีนที่มีโปรโมเตอร์เพื่อการแสดงออกที่เหมาะสมและยีนที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะเพื่อใช้สำหรับการคัดกรอง

ที่มา: แผนภาพโดย วิภา จิงจตุพรชัย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

### 3.4.2 การถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

ไซยาโนแบคทีเรียที่นำมาพัฒนาระบบถ่ายโอนยีนจนประสบความสำเร็จมีน้อยมาก ปัจจัยหนึ่งที่เป็นอุปสรรคคือไซยาโนแบคทีเรียมักสร้างเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอส (endonuclease) หลายชนิดรวมกัน เช่น *Anabaena variabilis* สร้างเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) สามชนิด ได้แก่ Aval, Avall และ Avalll ส่วน *Arthrospira (Spirulina) platensis* สร้าง Spl, Spll และ Splll เป็นต้น นอกจากนี้เอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิดเป็นไอโซไซโซเมอร์ (isoschizomer) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สร้างโดยสายพันธุ์ที่มีได้เป็นญาติกัน แต่จดจำและตัดลำดับดีเอ็นเอเดียวกัน [30]

การถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่ไซยาโนแบคทีเรียนั้น มีการค้นพบที่เป็นประวัติศาสตร์สำคัญอยู่ 2 วิธี ได้แก่ วิธีทรานส์ฟอร์มเมชันโดยธรรมชาติ (natural transformation) ใน *S. elongatus* PCC 7942 (ชื่อเดิม *Anacystis nidulans* R2) [31] และวิธีคอนจูเกชัน (conjugation) จาก *E. coli* เข้าสู่ *Nostoc (Anabaena) sp.* [32] การค้นพบเหล่านี้มีประเด็นสำคัญคือ ดีเอ็นเอที่ถ่ายโอนเข้าไป เกิดรีคอมบิเนชันกับโครโมโซม [31] หรือพลาสมิดนั้นถ่ายแบบซ้ำได้ในไซยาโนแบคทีเรียผู้รับ [32] ซึ่งเป็นพื้นฐานสำหรับการพัฒนาวิธีต่าง ๆ ในการถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่ไซยาโนแบคทีเรียในเวลาต่อมา ในที่นี้จะกล่าวถึงการถ่ายโอนดีเอ็นเอ 3 วิธี ได้แก่ ทรานส์ฟอร์มเมชันโดยธรรมชาติ คอนจูเกชัน และอิเล็กโทรพอเรชัน (ดูตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียและวิธีการถ่ายโอนดีเอ็นเอในตารางที่ 3-4)

#### 1) ทรานส์ฟอร์มเมชันโดยธรรมชาติ

การถ่ายโอนดีเอ็นเอด้วยวิธีทรานส์ฟอร์มเมชันโดยธรรมชาตินั้นเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว โดยอาศัยคุณสมบัติทางธรรมชาติของเซลล์ที่รีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอในรูปพลาสมิดหรือดีเอ็นเอเส้นสายที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าสู่เซลล์ เมื่อทำทรานส์ฟอร์มเมชันใน *S. elongatus* PCC 7942 โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากเซลล์ที่ติดต่อยาปฏิชีวนะของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกัน พบว่ามีความถี่ของทรานส์ฟอร์มเมชัน (transformation frequency) สูงมากประมาณ  $2 \times 10^{-3}$ /colony-forming unit (CFU) [31] แต่เมื่อใช้ตัวพาร่วมที่ถ่ายแบบซ้ำได้ทั้งใน *E. coli* และ *S. elongatus* PCC 7942 กลับมีความถี่ของทรานส์ฟอร์มเมชันที่ต่ำลงเป็น  $5 \times 10^{-5}$ /CFU [33] อย่างไรก็ตาม หากใช้พลาสมิดชนิดฆ่าตัวตายจะได้ความถี่ของทรานส์ฟอร์มเมชันสูงขึ้นเป็น  $5 \times 10^{-3}$ /CFU [34] ระยะการเจริญเติบโต (growth phase) ของเซลล์มีความสำคัญต่อประสิทธิภาพของทรานส์ฟอร์มเมชัน เซลล์ที่อยู่ในระยะแบ่งตัวทวีคูณ (exponential phase) จะมีประสิทธิภาพสูงสุด และจะลดลงอย่างมากเมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงจำนวน (stationary phase) กลไกของการเกิดทรานส์ฟอร์มเมชันโดยธรรมชาตินี้ยังเข้าใจน้อยมาก คาดว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับการแตกหัก (breakage) ของดีเอ็นเอที่เข้าสู่เซลล์ [35] นอกจากนี้ยังมีโปรตีนที่มีความจำเป็นต่อทรานส์ฟอร์มเมชันใน *Synechocystis sp.*

PCC 6803 เช่น โปรตีน Pil ที่สร้างพิไลชนิดที่สี่ (type IV pili) โปรตีน ComA ที่มีโดเมน (domain) สำหรับจับดีเอ็นเอและเอนโดนิวคลีเอส (endonuclease) และ โปรตีน ComF ที่มีโดเมนฟอสโฟไรโบซิลทรานสเฟอเรส (phosphoribosyltransferase domain) [36-38] วิธีทรานส์ฟอร์มชันโดยธรรมชาตินี้ นอกจากจะใช้ได้กับไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่กล่าวแล้วข้างต้น ยังใช้ได้กับสายพันธุ์อื่นที่เป็นเซลล์เดี่ยว เช่น *Synechococcus* sp. PCC 7002 และ *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 เป็นต้น (ตารางที่ 3-4) แต่ยังไม่พบว่าใช้ได้กับไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นสาย วิธีนี้ใช้ได้กับพลาสมิทชนิดถ่ายแบบซ้ำ พลาสมิทชนิดฆ่าตัวตายและดีเอ็นเอเส้นสาย ซึ่งในกรณีที่ใช้พลาสมิทชนิดฆ่าตัวตาย โอกาสเกิดโฮโมโลกัสรีคอมบิเนชันสองตำแหน่ง (ทำให้เกิดการแทนที่ส่วนของโครโมโซมด้วยรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ) มีมากกว่าโฮโมโลกัสรีคอมบิเนชันหนึ่งตำแหน่ง (ทำให้พลาสมิททั้งอันแทรกตัวรวมเข้ากับโครโมโซม) (รูปที่ 3-3) ในกรณีที่ใช้ดีเอ็นเอเส้นสายต้องออกแบบให้เกิดโฮโมโลกัสรีคอมบิเนชันสองตำแหน่งเท่านั้น เพราะหากเกิดโฮโมโลกัสรีคอมบิเนชันหนึ่งตำแหน่ง จะเกิดการเปิดของโครโมโซมซึ่งทำให้ไซยาโนแบคทีเรียตาย

## 2) คอนจูเกชัน

คอนจูเกชันเป็นการถ่ายโอนดีเอ็นเอโดยเซลล์สัมผัสกัน โดยเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอจากแบคทีเรียชนิดหนึ่ง (มักเป็น *E. coli*) ไปสู่อีกชนิดหนึ่งโดยใช้คอนจูเกทิฟพลาสมิทชนิดช่วงเจ้าบ้านกว้าง (broad-host-range conjugative plasmid) เมื่อผสมไซยาโนแบคทีเรียกับ *E. coli* เข้าด้วยกัน ไซยาโนแบคทีเรียจะรับพลาสมิทจาก *E. coli* [23] ตัวอย่าง เช่น ใน *Nostoc* sp. PCC 7120 จะได้ความถี่ของคอนจูเกชัน (conjugation frequency) ประมาณ 10% ของเซลล์ตัวรับ (recipient cells) วิธีคอนจูเกชันด้วย *E. coli* นี้สามารถใช้ถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่ไซยาโนแบคทีเรียอื่น ๆ หลายสายพันธุ์ สายพันธุ์ที่เป็นเซลล์เดี่ยว เช่น *Synechocystis* sp. PCC 6803, *S. elongatus* PCC 7942 และ *S. elongatus* PCC 6301 ส่วนสายพันธุ์ที่เป็นสาย เช่น *Nostoc punctiforme* ATCC 29133, *Fremyella diplosiphon* PCC 7601 และ *Anabaena variabilis* ATCC 29413 เป็นต้น (ตารางที่ 3-4)

วิธีโทรพาเรนต์ลคอนจูเกชัน (triparental conjugation) (รูปที่ 3-4) เริ่มด้วยการผสมเซลล์ 3 ชนิดเข้าด้วยกัน ได้แก่ *E. coli* ผู้ให้ (donor) 1, *E. coli* ผู้ให้ 2 และไซยาโนแบคทีเรียผู้รับ แล้วนำไปกระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ซึ่งเป็นที่เกิดคอนจูเกชันและโคลิไนทรานส์ฟอร์มเมนต์ (transformant) เจริญเติบโต มีรายละเอียดของพลาสมิทดังนี้

*E. coli* ผู้ให้ 1 มีคอนจูเกทิฟพลาสมิท (conjugative plasmid) RP4 ซึ่งมีขนาดใหญ่ประมาณ 60 kb อยู่ใน Incompatibility group P (IncP) เนื่องจากพลาสมิท RP4 มียีน *tra*

สำหรับสร้างพิลัส (pilus) ทำให้สามารถเคลื่อนย้ายตัวเองและพลาสมิดอื่น ๆ ได้โดยผ่านพิลัส และมียีน *mob* ที่สร้างโปรตีนที่จัดจำและนิค (nick) เฉพาะบริเวณ *oriT* ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นการถ่ายโอน (origin of transfer) ทั้งยังมี *oriV* ที่เป็นจุดเริ่มการถ่ายแบบซ้ำของ *E. coli* พลาสมิดต่าง ๆ ที่อยู่ได้ภายในเซลล์เดียวกันจำเป็นต้องมี *oriV* ที่แตกต่างกัน นอกจากนี้คอนจูเกทิฟพลาสมิดยังสร้างโปรตีนอื่น ๆ ที่จำเป็นต่อการเคลื่อนย้ายตัวเองและพลาสมิดขนาดเล็กกว่าไปสู่เจ้าบ้านอื่น ๆ โดยพลาสมิดขนาดเล็กดังกล่าวจะต้องมี *oriT* และยีน *mob* หรือโปรตีนที่ทำหน้าที่นิกที่บริเวณ *oriT*

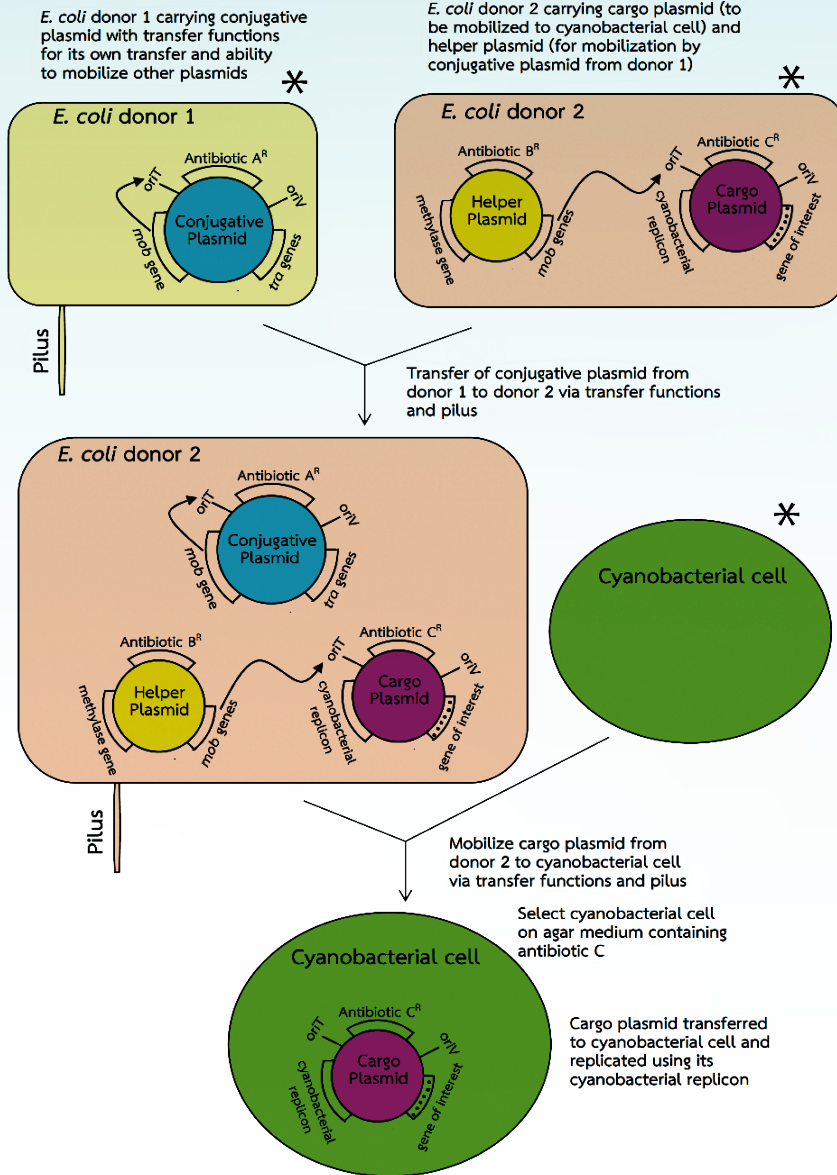
*E. coli* ผู้ให้ 2 มีพลาสมิดผู้ช่วย (helper plasmid) ซึ่งมียีนสร้างเอนไซม์เมทิลเลส (methylase) จำเพาะ เพื่อปกป้องดีเอ็นเอสำหรับไซยาโนแบคทีเรียเจ้าบ้านบางสายพันธุ์ที่มีเอนไซม์ตัดจำเพาะ และเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ นอกจากนี้ยังมีคาร์โกพลาสมิด (cargo plasmid) สร้างจากพลาสมิดชนิดช่วงเจ้าบ้านกว้าง RSF 1010 การถ่ายโอนคาร์โกพลาสมิดซึ่งมีเป้าหมายนี้อาศัยการทำงานของคอนจูเกทิฟพลาสมิด [23, 26] (ดูรูปที่ 3-4)

### 3) อิเล็กโทรพอเรชัน

การถ่ายโอนดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน เป็นการผ่านกระแสไฟฟ้าด้วยขนาดและเวลาที่เหมาะสมไปยังเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย เพื่อให้ผนังเซลล์เกิดรูที่พอเหมาะกับการรับพลาสมิด หากใช้กระแสไฟฟ้าสูงหรือเวลานานเกินไปเซลล์อาจตาย มักใช้กับพลาสมิดที่พัฒนาเพื่อใช้ในคอนจูเกชัน เป็นวิธีที่มีข้อดีเมื่อเทียบกับวิธีคอนจูเกชันคือไม่มี *E. coli* ปนเปื้อนกับโคโลนิทรานสฟอร์มแมนต์ และเป็นวิธีที่ง่าย ใช้เพียงดีเอ็นเอกับเซลล์ที่ล้างแล้ว สายพันธุ์ที่สามารถถ่ายโอนพลาสมิดด้วยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน เช่น *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. PCC 7120 และ *N. punctiforme* ATCC 29133 เป็นต้น (ตารางที่ 3-4)

### 3.4.3 เครื่องหมายคัดเลือก

การคัดเลือกทรานส์ฟอร์มแมนต์ทำได้โดยใช้เครื่องหมายคัดเลือก (selectable marker) เช่น ใส่ยีนดื้อต่อยาปฏิชีวนะไปด้วย แล้วคัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะนั้น ชนิดและความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ใช้จะแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรีย เช่น แอมพิซิลลิน (ampicillin) ซึ่งใช้ทั่วไปในการทำโคลนนิ่งใน *E. coli* มักไม่ค่อยมีประโยชน์ในไซยาโนแบคทีเรีย เพราะมีความเสถียรต่ำ ประกอบกับไซยาโนแบคทีเรียใช้เวลาเจริญเติบโตนานกว่า ยาปฏิชีวนะที่ไวต่อแสง เช่น เททระไซคลิน (tetracycline) และไรแฟมพิซิน (rifampicin) ไม่ค่อยมีประโยชน์ในไซยาโนแบคทีเรีย เพราะการเจริญเติบโตในสภาวะปกติต้องใช้แสง ยาปฏิชีวนะที่มักใช้ในไซยาโนแบคทีเรีย เช่น กานามัยซิน (kanamycin) สเปกตินอมัยซิน (spectinomycin) และคลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol) เป็นต้น นอกจากนี้อาจใช้ยีนที่ดื้อต่อยาฆ่าวัชพืช (herbicide) เช่น ยีน *bar* เป็นเครื่องหมายคัดเลือกในไซยาโนแบคทีเรีย [48]



รูปที่ 3-4 วิธีโทรพารেন্টคอนจูเกชันใช้ถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่ไซยาโนแบคทีเรีย

คอนจูเกทีฟพลาสมิดในผู้ให้ 1 เป็นชนิด RP4 ซึ่งมียีน *tra* สร้างพิลัส เคลื่อนย้ายตัวเองไปสู่ผู้ให้ 2 และช่วยเคลื่อนย้ายคาร์ิโอพลาสมิด ยีน *mob* สร้างโปรตีนเพื่อนิกที่ *oriT* ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นการถ่ายโอน ส่วน *oriV* เป็นจุดเริ่มต้นการถ่ายแบบซ้ำของ *E. coli* ในพลาสมิดผู้ช่วยมียีนสร้างเอนไซม์เมทิลเลสที่แสดงออกใน *E. coli* ซึ่งจะเติมหมู่เมทิล (methyl) ที่ตำแหน่งตัดจำเพาะในคาร์ิโอพลาสมิด ดอกจันแสดงถึงเซลล์ทั้งสามชนิดที่ใช้ตั้งต้นในการทำคอนจูเกชัน ข้อมูลจาก [23, 26]

ที่มา: แผนภาพโดย วิภา จิงจตุพรชัย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

### ตารางที่ 3-4 ตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียและวิธีการถ่ายโอนดีเอ็นเอ

ที่มา: ตารางโดย วิภา จิงจตุพรชัย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

Cyanobacterial strain	Transformation method	Ref
<u>Unicellular strain</u>		
<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942 <sup>a</sup>	Transformation/conjugation	[21, 22, 34]
<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 6301	Conjugation	[25, 34]
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002 <sup>b</sup>	Transformation	[39]
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Transformation/conjugation/ electroporation	[8, 25, 40]
<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1	Transformation	[41, 42]
<u>Filamentous strain</u>		
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	Conjugation	[43]
<i>Arthrospira platensis</i> C1 <sup>c</sup>	Electroporation	[44]
<i>Fremyella diplosiphon</i> PCC 7601 <sup>d</sup>	Conjugation/electroporation	[45, 46]
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 <sup>e</sup>	Electroporation	[32]
<i>Nostoc punctiforme</i> ATCC 29133	Conjugation/electroporation	[29, 47]

<sup>a</sup>: ชื่อเต็ม *Anacystis nidulans* R2 และ *Synechococcus* sp. PCC 7942

<sup>b</sup>: ชื่อเต็ม *Agmenellum quadruplicatum*

<sup>c</sup>: ชื่อเต็ม *Spirulina platensis* C1

<sup>d</sup>: ชื่อเต็ม *Tolypothrix* sp. PCC 7601

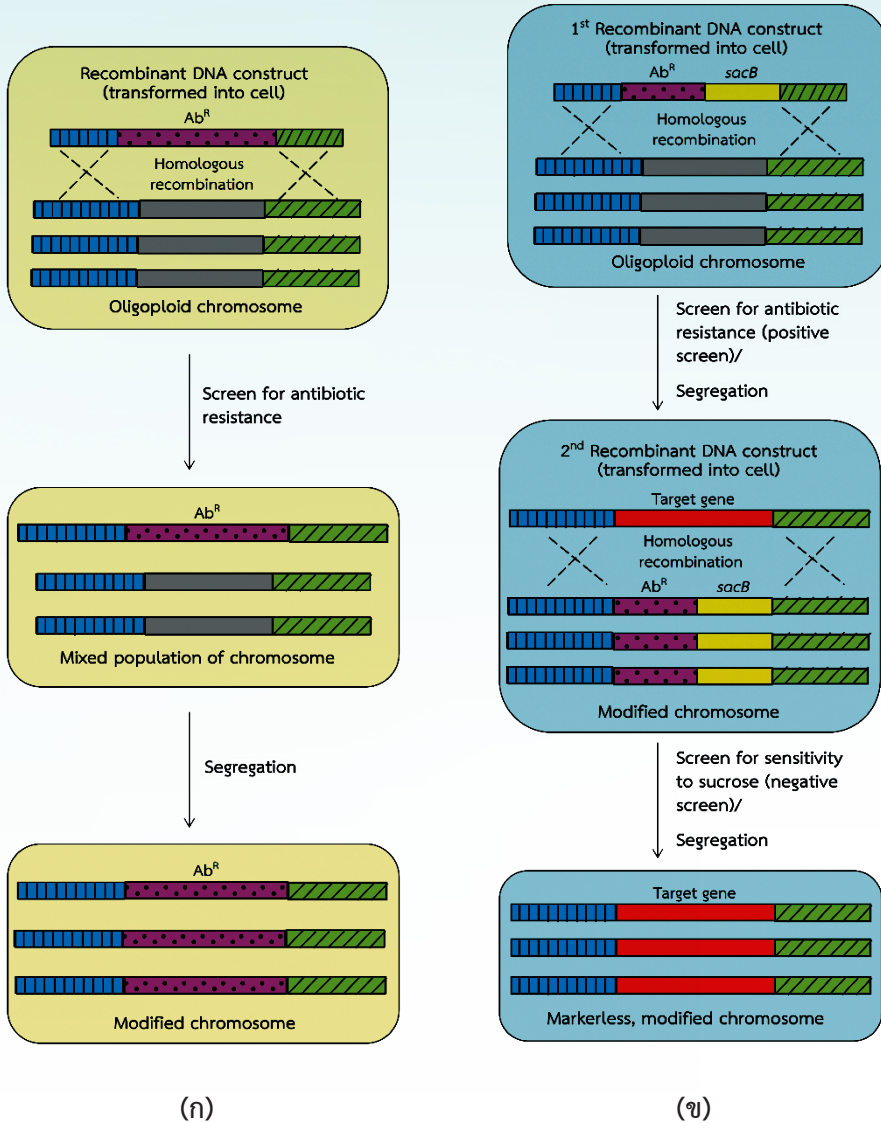
<sup>e</sup>: ชื่อเต็ม *Anabaena* sp. PCC 7120

### 3.4.4 การแยกโฮโมไซกัส

เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้เป็นต้นแบบ เช่น *S. elongatus* PCC 7942 เป็นโอลิโกพลอยด์ (oligoploid) มีโครโมโซมประมาณ 10 สำเนา (copy) ต่อเซลล์ และ *Synechocystis* sp. PCC 6803 เป็นพอลิพลอยด์ (polyploid) มีโครโมโซมสูงสุดได้ถึง 218 สำเนาต่อเซลล์ [49, 50] เมื่อรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอรวมเข้ากับโครโมโซมของไซยาโนแบคทีเรียโดยโฮโมโลกัสรีคอมบิเนชัน ในเบื้องต้นจะเกิดเซลล์ที่เป็นเฮเทอโรไซกัส (heterozygous) นั่นคือมีทั้งโครโมโซมพันธุ์กลาย (mutant) และโครโมโซมลักษณะปรกติ (wild type) ปะปนกันภายในเซลล์ จึงจำเป็นต้องแยก (segregation) โครโมโซมพันธุ์กลายดังกล่าวออกจากโครโมโซมลักษณะปรกติ จนกว่าจะได้โฮโมไซกัส (homozygous) ของโครโมโซมพันธุ์กลาย (รูปที่ 3-5 ก) อย่างไรก็ตาม หากตำแหน่งที่เกิดการกลาย (mutation) ในโครโมโซมมีผลกระทบต่อการมีชีวิตรอดของไซยาโนแบคทีเรีย อาจเป็นไปได้ที่จะประสบความสำเร็จในการแยกจนได้โฮโมไซกัสอย่างสมบูรณ์

### 3.4.5 การสร้างเซลล์พันธุ์กลายที่ปราศจากเครื่องหมาย

ไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้เพื่อการผลิตทางอุตสาหกรรมนั้นนิยมใช้สายพันธุ์ที่มีโครโมโซมแบบปราศจากเครื่องหมาย (markerless) มีการพัฒนาระบบปราศจากเครื่องหมายในไซยาโนแบคทีเรียโดยใช้ยีน *sacB* ที่สร้างลิแวนซูโครส (levansucrase) ร่วมกับยีนดื้อต่อยาปฏิชีวนะ ซึ่งจะแทรกรวมเข้ากับโครโมโซมทำให้สามารถคัดกรองได้ด้วยยาปฏิชีวนะ เป็นการคัดเลือกเชิงบวก (positive selection) และเมื่อใส่ยีนเป้าหมายเข้าไปแทนที่ยีน *sacB* และยีนดื้อต่อยาปฏิชีวนะ พร้อมทั้งเติมซูโครส (sucrose) เพื่อใช้เป็นการคัดเลือกเชิงลบ (negative selection) (รูปที่ 3-5 ข) เนื่องจากเซลล์ที่มียีน *sacB* จะเปลี่ยนซูโครสเป็นลิแวนส์ (levans) ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้น เฉพาะเซลล์ที่ปราศจากเครื่องหมายคือไม่มียีน *sacB* และไม่มียีนดื้อต่อยาปฏิชีวนะเท่านั้น ที่จะมีชีวิตรอดในสภาวะที่มีซูโครส [51, 52]



รูปที่ 3-5 การสร้างไซยาโนแบคทีเรียพันธุ้กลายด้วยโฮโมโลกัสรีคอมบิเนชันสองตำแหน่ง

(ก) การคัดเลือกเซลล์พันธุ้กลายโดยใช้ยีนดื้อต่อยาปฏิชีวนะ

(ข) การสร้างเซลล์พันธุ้กลายที่ปราศจากเครื่องหมาย โดยอาจเลือกใช้ยีนอื่น ๆ แทนยีน *sacB* รีคอมบิเนนท์ที่เอ็นเออาจอยู่ในรูปเส้นสาย หรือพลาสมิดชนิดฆ่าตัวตายซึ่งไม่ถ่ายแบบซ้ำในเจ้าบ้าน เป้าหมาย *sacB*: ยีนสร้างลิแวนซูเครส (levansucrase);  $Ab^R$ : ยีนดื้อต่อยาปฏิชีวนะ ข้อมูลจาก [1, 51]

ที่มา: แผนภาพโดย วิภา จิงจตุพรชัย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล



### 3.5 กรณีศึกษา: กลยุทธ์การยับยั้งอาร์อาร์เอ็นเอ (rRNA) ในโครโมโซมของไซยาโนแบคทีเรียและแทนที่ด้วยอาร์อาร์เอ็นเอจากพลาสมิด [21]

เนื่องจาก *S. elongatus* PCC 7942 มีโครโมโซมประมาณ 10 ล้านเบสต่อเซลล์ แต่ละสำเนา มีอาร์อาร์เอ็นเอ (rRNA) สองโอเพอโรน (operon) ได้แก่ *rrnA* และ *rrnB* ซึ่งมีลำดับกำหนดรหัส (coding sequence) เหมือนกัน 100% แต่แตกต่างกันที่ลำดับควบคุม (regulatory sequence) ทำให้เป็นอุปสรรคต่อการศึกษาหน้าที่ของอาร์อาร์เอ็นเอพันธุกลาย (mutated rRNA) คณะวิจัยของวิชา จึงจัดทุพรชัย จึงได้พัฒนาระบบที่ยับยั้ง (inactivate) โอเพอโรนของ rRNA ในโครโมโซมทั้งหมดและให้สร้างอาร์อาร์เอ็นเอพันธุกลายจากพลาสมิด ทำให้สามารถศึกษาหน้าที่ของอาร์อาร์เอ็นเอพันธุกลายได้ (ดูรูปที่ 3-6) โดยมีรายละเอียดดังนี้

#### 1) การยับยั้ง *rrnA* ในโครโมโซม

ใช้ชิ้นดีเอ็นเอซึ่งมียีน *Spc<sup>R</sup>* ที่ติดต่อสเปกติโนมายซินและมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *rrnA* ประกอบ ทั้งสองข้าง นำถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ *S. elongatus* PCC 7942 ด้วยวิธีทรานส์ฟอร์เมชันโดยธรรมชาติ แล้วคัดเลือกทรานส์ฟอร์มแมนต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสเปกติโนมายซิน ยีน *Spc<sup>R</sup>* จะเข้าแทนที่ *rrnA* ในบางโครโมโซมโดยโฮโมโลกัสรีคอมบิเนชันสองตำแหน่ง (ทำนองเดียวกับที่แสดงในรูปที่ 3-5 ก) ทำให้มีทั้งโครโมโซมพันธุกลายและโครโมโซมลักษณะปกติปนกันอยู่ในเซลล์ จึงนำมาแยกให้ได้ โฮโมไซกัสของโครโมโซมพันธุกลาย ได้เซลล์ A1 (Wt  $\Delta rrnA::Spc^R$ )

#### 2) การทดแทน *rrnA* ในโครโมโซมที่ถูกยับยั้งด้วยพลาสมิด pRN-B

นำพลาสมิด pRN-B ซึ่งได้จากการแทรก *rrnB* เข้าใน pKGT (ดูตารางที่ 3-2) และมียีน *Km<sup>R</sup>* ที่ติดต่อกานามัยซิน นำมาถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ A1 ด้วยวิธีทรานส์ฟอร์เมชันโดยธรรมชาติ และคัดเลือกทรานส์ฟอร์มแมนต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกานามัยซิน จะได้เซลล์ A3 (Wt  $\Delta rrnA::Spc^R$ /pRN-B)

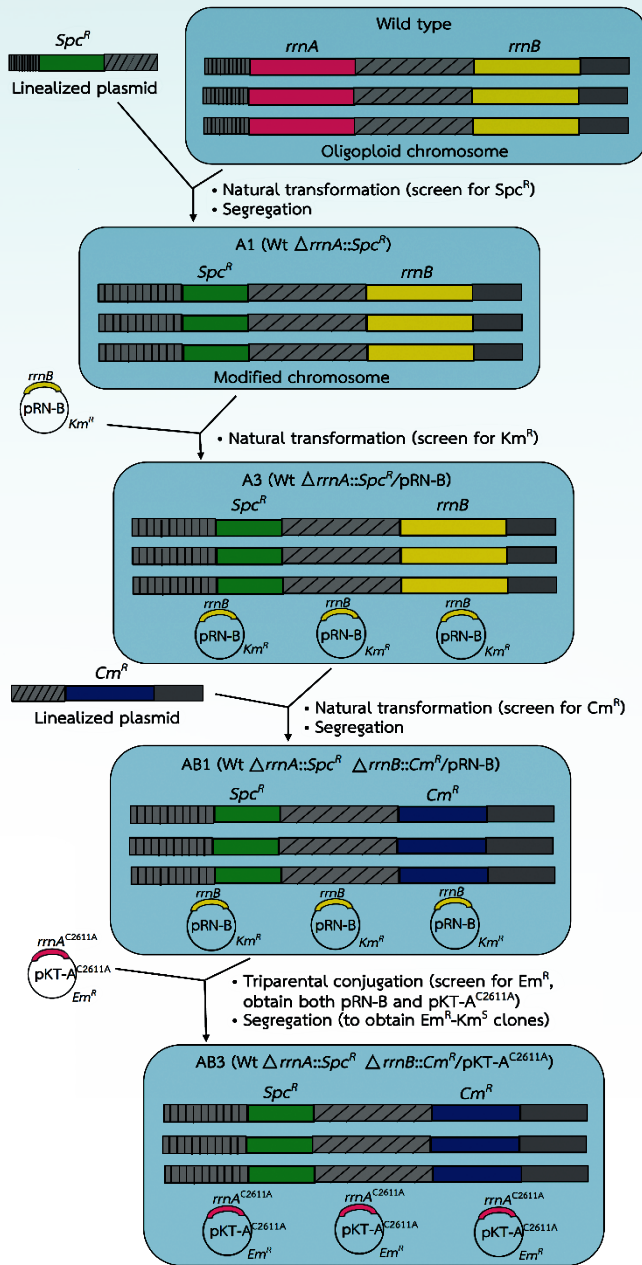
#### 3) การยับยั้ง *rrnB* ในโครโมโซม

ใช้ยีน *Cm<sup>R</sup>* ที่ติดต่อยาคลอแรมเฟนิคอลและมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *rrnB* ประกอบทั้งสองข้าง นำมาถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ A3 ด้วยวิธีทรานส์ฟอร์เมชันโดยธรรมชาติ คัดเลือก ทรานส์ฟอร์มแมนต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีคลอแรมเฟนิคอล ยีน *Cm<sup>R</sup>* จะเข้าแทนที่ *rrnB* ในบางโครโมโซมโดย โฮโมโลกัสรีคอมบิเนชันสองตำแหน่ง นำเซลล์มาแยกให้ได้โฮโมไซกัสจนได้เซลล์ AB1 (Wt  $\Delta rrnA::Spc^R \Delta rrnB::Cm^R$ / pRN-B) ซึ่งใช้เป็นเซลล์ตั้งต้นสำหรับการสลับเปลี่ยนพลาสมิดได้ตามต้องการ

#### 4) การวิเคราะห์หน้าที่ของอาร์อาร์เอ็นเอพันธู์กลาย

นำคาร์ิโอพลาสมีด pKT-A<sup>C2611A</sup> ซึ่งยีนสร้าง 23S rRNA มีการกลายที่ตำแหน่ง C2611A และมียีน *Em<sup>R</sup>* ที่ต่อต้านอิริโทรมัยซิน (erythromycin) มาถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ AB1 ด้วยวิธีโทรพาเรนทอลคอนจูเกชัน แล้วคัดเลือกทรานส์ฟอร์มแมนต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอิริโทรมัยซิน จะได้ทั้งพลาสมีด pKT-A<sup>C2611A</sup> และ pRN-B อยู่ด้วยกันภายในเซลล์ ทำการแยกเซลล์จนได้โคลนที่ไวต่อกานามัยซิน แต่ต่อต้านอิริโทรมัยซิน นั่นคือมีแต่ pKT-A<sup>C2611A</sup> ผลที่ได้คือเซลล์ AB3 (Wt  $\Delta$ *rrnA::Sp<sup>R</sup>*  $\Delta$ *rrnB::Cm<sup>R</sup>*/pKT-A<sup>C2611A</sup>) ทำให้สามารถศึกษาผลกระทบของ *rrn* พันธู์กลายที่ได้จากพลาสมีด พบว่าการกลายเพียงนิวคลีโอไทด์เดียว AC2611A ในยีนสร้าง 23S rRNA ส่งผลให้มีระยะเวลาเจริญล่าช้า (lag time) ทำให้การปรับตัวจากการเจริญเติบโตในที่มีดิสก์ที่มีแสงต้องใช้เวลาเพิ่มขึ้น 50% และมีความไว (sensitive) ต่ออุณหภูมิที่ 16°C และ 45°C

กลยุทธ์การยับยั้ง rRNA ในโครโมโซมทั้งหมดของไซยาโนแบคทีเรียแล้วทดแทนด้วย rRNA จากพลาสมีด อาจนำไปประยุกต์เพื่อศึกษาผลกระทบของยีนพันธู์กลายอื่น ๆ ที่มีความจำเป็นต่อชีวิต เช่น ยีนเกี่ยวกับการสังเคราะห์แสงที่ทำให้ไซยาโนแบคทีเรียแข็งแรงขึ้น เหมาะแก่การนำไปใช้ในอุตสาหกรรม เป็นต้น การที่พลาสมีดถ่ายแบบซ้ำสองชนิดสามารถอยู่ร่วมกันในไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียวกัน อาจนำไปใช้เพื่อการแสดงออกของยีนสองชนิดที่อยู่คนละพลาสมีดและการประยุกต์ใช้ทางเทคโนโลยีชีวภาพ



รูปที่ 3-6 การยั่วยักรอาร์เอ็นเอในโครโมโซมและแทนที่ด้วยอาร์เอ็นเอจากพลาสมิด *Synechococcus elongatus* PCC 7942 มีอาร์เอ็นเอโอเพอโรน *rrnA* และ *rrnB* *Spc<sup>R</sup>*: spectinomycin resistance; *Cm<sup>R</sup>*: chloramphenicol resistance; *Km<sup>R</sup>*: kanamycin resistance; *Em<sup>R</sup>*: erythromycin resistance ข้อมูลจาก [21]

ที่มา: แผนภาพโดย วิภา จิงจตุพรชัย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

## 3.6 การประยุกต์ไซยาโนแบคทีเรียดัดแปรพันธุกรรม

พันธุวิศวกรรมในไซยาโนแบคทีเรียเพื่อประยุกต์ทางเทคโนโลยีชีวภาพยังมีการพัฒนาน้อยมาก มีผลิตภัณฑ์จากไซยาโนแบคทีเรียดัดแปรพันธุกรรม ได้แก่ ผลิตภัณฑ์โปรตีน ผลิตภัณฑ์เคมี วัสดุพิเศษสำหรับพลังงานชีวภาพ นอกจากนี้ยังมีการดัดแปรพันธุกรรมเพื่อให้ได้เซลล์ไซยาโนแบคทีเรียที่แข็งแรง มีความเหมาะสมในการใช้ระดับอุตสาหกรรม

### 3.6.1 ผลิตภัณฑ์โปรตีน

การผลิตโปรตีนโดยใช้เฮเทอโรโทรฟิกแบคทีเรีย (heterotrophic bacteria) เช่น *E. coli* สามารถผลิตในระดับสูงได้ง่าย แต่แบคทีเรียเหล่านี้ต้องใช้คาร์บอนอินทรีย์ (organic carbon) ในขณะที่ไซยาโนแบคทีเรียดัดแปรพันธุกรรมผลิตโปรตีนโดยโฟโตออโตโทรฟิก (photoautotrophic) จึงต้องการเพียงแสง คาร์บอนไดออกไซด์ และแร่ธาตุเพียงเล็กน้อย (trace elements) ทั้งไม่ต้องใช้ที่ดินในการเพาะเลี้ยง เนื่องจากวัสดุคาร์บอนมีจำกัด และความห่วงใยด้านสิ่งแวดล้อมเพิ่มขึ้น การใช้ไซยาโนแบคทีเรียดัดแปรพันธุกรรมจึงมีความสำคัญมากขึ้นเรื่อย ๆ ดังตัวอย่างที่จะกล่าวต่อไป ดังนี้

#### 1) ไฟโคบิลิโปรตีน

ไฟโคบิลิโปรตีน (phycobiliprotein) เป็นสารสี (pigment) ที่ไซยาโนแบคทีเรียสร้างขึ้น เพื่อรับแสงสำหรับการสังเคราะห์แสง โดยธรรมชาติไฟโคบิลิโปรตีนเป็นโมเลกุลที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescent) จึงใช้เป็นตัวติดฉลากฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescent tag) สำหรับการคัดแยกเซลล์ (cell sorting) การทำภาพเนื้อเยื่อ (histological imaging) และการประยุกต์ทางเทคโนโลยีอาร์เรย์ (array technology) เป็นต้น เมื่อเพิ่มไบนด์ดิ้งแท็ก (binding tag) ให้ไฟโคบิลิโปรตีน ชนิดซี-ไฟโคไซยานิน (C-phycocyanin) ด้วยวิธีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ ทำให้ไฟโคบิลิโปรตีนที่ดัดแปลงนี้มีแอฟฟินิตีแท็ก (affinity tag) ที่ใช้สำหรับการทำให้บริสุทธิ์ (purification) ช่วยให้ง่ายไม่ต้องดัดแปลงเพิ่มเติมด้วยสารเคมี [53] เนื่องจากไฟโคบิลิโปรตีนเป็นผลิตภัณฑ์โดยธรรมชาติของไซยาโนแบคทีเรีย ดังนั้น ไซยาโนแบคทีเรียจึงน่าจะเป็นเจ้าบ้านที่ดีที่สุดสำหรับผลิตภัณฑ์รีคอมบิแนนท์ไฟโคบิลิโปรตีน

#### 2) โปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง

เป็นที่ทราบกันดีว่ายุงเป็นพาหะนำโรคหลายชนิด จึงมีการควบคุมประชากรยุงด้วยวิธีต่าง ๆ วิธีหนึ่งคือใช้แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) ซึ่งสร้าง

โปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง แต่เนื่องจาก *Bti* ลอยอยู่บนผิวน้ำไม่นานมักจมลงใต้น้ำซึ่งไม่ใช่บริเวณที่ลูกน้ำยุงอยู่ ไซยาโนแบคทีเรียมักลอยอยู่ผิวน้ำเนื่องจากต้องรับแสงสำหรับการสังเคราะห์แสง จึงมีแนวคิดใช้ไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ เป็นเจ้าบ้านในการสร้างโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงจาก *Bti* เช่น *Synechocystis* sp. PCC 6803, *S. elongatus* PCC 7942, *Synechococcus* sp. PCC 7002, *Nostoc* sp. PCC 7120 [48, 52] เป็นต้น

### 3) ฮอโมนการเจริญเติบโตในปลา

ปลาแซลมอน (salmon) เป็นปลาเศรษฐกิจ เพื่อเร่งการเจริญเติบโตของปลา จึงทำพันธุวิศวกรรมในไซยาโนแบคทีเรียให้สร้างฮอโมนการเจริญเติบโต (growth hormone) จากปลาแซลมอน ไซยาโนแบคทีเรียตัดแปรพันธุกรรมนี้สามารถสร้างฮอโมนและนำไปเลี้ยงปลาโดยตรงได้ [54]

### 4) เอนไซม์ย่อยสลายยาฆ่าแมลง

ออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate หรือ OP) เป็นยาฆ่าแมลงศัตรูพืชที่ใช้กันแพร่หลาย เมื่อฝนตกเกิดการชะล้างทำให้มี OP ปนเปื้อนลงไปในแหล่งน้ำต่าง ๆ เอนไซม์ออร์กาโนฟอสฟอรัสไฮโดรเลส (organophosphorus hydrolase หรือ OPH) จากแบคทีเรีย *Flavobacterium* sp. ย่อยสลาย OP ได้ หากไซยาโนแบคทีเรียซึ่งอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำสร้าง OPH จะช่วยย่อยสลาย OP ที่ปนเปื้อนได้ วิชา จึงจัดพรชัย และคณะ จึงได้ทำพันธุวิศวกรรมใน *S. elongatus* PCC 7942 ให้สร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน OPH โดยให้สร้างอยู่ภายในเซลล์หรือแสดงออกที่ผิวเซลล์ (surface display) ทำให้ไซยาโนแบคทีเรียสามารถย่อยสลาย OP ได้ ในขณะที่เซลล์ยังมีชีวิตอยู่ [55, 56]

### 5) การบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ

มลพิษที่เกิดจากกิจกรรมของมนุษย์ซึ่งรวมถึงโลหะหนักต่าง ๆ ก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม จึงจำเป็นต้องพัฒนาเครื่องมือบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ (bioremediation) เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียเจริญเติบโตในแหล่งน้ำและต้องการอาหารเป็นแร่ธาตุเพียงเล็กน้อย จึงเป็นตัวเลือกที่เหมาะสมในการบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ เช่น มีการใช้ไซยาโนแบคทีเรีย *Nostoc* sp. PCC 7120 ที่ตัดแปรพันธุกรรมเพื่อย่อยสลายมลพิษอินทรีย์ลินเดน (lindane) และ 4-คลอโรเบนโซเอต (4-chloro-benzoate) รวมทั้งกำจัดโลหะหนัก เช่น แคดเมียม (cadmium) และซิงค์ (zinc) ในน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม [52, 57] เป็นต้น

## 6) ไบโอสเซนเซอร์

ไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นพืช เมื่อเบ่งบาน (bloom) จะเป็นอันตรายต่อสุขภาพของคน และมีผลกระทบต่อสภาวะแวดล้อมทางน้ำ การเบ่งบานนี้เกิดจากการชักนำของสารอาหารที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น เช่น เหล็ก (iron) ฟอสฟอรัส (phosphorus) และไนเตรต (nitrate) เป็นต้น จึงจำเป็นต้องมีเซนเซอร์ (sensor) สำหรับตรวจวัดสารอาหารเหล่านี้ เพื่อจำกัดสารอาหารและทำนายการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นพืช ไซยาโนแบคทีเรียตัดแปรพันธุกรรมเป็นตัวเลือกสำหรับไบโอสเซนเซอร์ (biosensor) ดังกล่าวเนื่องจากเจริญเติบโตในแหล่งน้ำ จึงเป็นการวัดในแหล่งกำเนิด (*in situ*) มีการพัฒนาไซยาโนแบคทีเรียเรืองแสง (luminescent) โดยให้ยีนรายงานที่สร้างโปรตีนลูซิเฟอเรส (luciferase) อยู่ภายใต้การควบคุมของโพรโมเตอร์ที่ตอบสนองต่อเหล็ก ฟอสฟอรัส หรือไนเตรต ทำให้สามารถวัดความเข้มข้นของสารอาหารในแหล่งน้ำต่าง ๆ ทั้งแหล่งน้ำจืดและทะเล ขึ้นอยู่กับชนิดของไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้เป็นเจ้าบ้าน [52]

### 3.6.2 ผลิตภัณฑ์สารเคมี

พันธุวิศวกรรมในไซยาโนแบคทีเรียเพื่อให้ผลิตสารเคมีนั้น ต้องคำนึงถึงธรรมชาติของเมแทบอลิกฟลักซ์ (metabolic flux) วิถีเมแทบอลิก ระบบการควบคุมที่ใช้ในไซยาโนแบคทีเรียเจ้าบ้าน และเมแทบอลิต์ (metabolite) ตัวตั้งต้นที่จะส่งผลถึงสารเคมีที่เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย แม้เมแทบอลิซึม (metabolism) ของไซยาโนแบคทีเรียจะไม่เป็นที่เข้าใจดีเท่ากับของ *E. coli* แต่ก็มี การสร้างไซยาโนแบคทีเรียตัดแปรพันธุกรรมที่ประสบความสำเร็จในการสร้างสารเคมีหลายชนิด ได้แก่

#### 1) ไอโซพรีน

ไอโซพรีน (isoprene) เป็นวัตถุดิบที่สำคัญในเคมีสังเคราะห์ พืชหลายชนิดสังเคราะห์และปล่อยไอโซพรีนเพื่อจัดการกับความร้อน เพื่อให้ไซยาโนแบคทีเรียสังเคราะห์ไอโซพรีน จึงถ่ายโอนยีน *IspS* ที่สร้างเอนไซม์ไอโซพรีนซินเทส (isoprene synthase) จาก *Pueraria montana* เข้าสู่จีโนมของ *Synechocystis* sp. พบว่าการใช้โคดอนมีความสำคัญต่อการแสดงออกของยีน *IspS* ภายหลังเมื่อปรับการใช้โคดอนแล้ว การแสดงออกของยีน *IspS* ในไซยาโนแบคทีเรียตัดแปรพันธุกรรมเพิ่มขึ้นเป็น 10 เท่า และสามารถผลิตไอโซพรีนในอัตราประมาณ 50 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้งต่อวัน [10]

## 2) แอซีโตน

แอซีโตน (acetone) เป็นคีโตน (ketone) ที่ใช้เป็นตัวทำละลาย (solvent) และสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมเคมี แอซีโตนที่ผลิตจากการหมัก (fermentation) โดยแบคทีเรีย *Clostridia* และ *E. coli* ดัดแปรพันธุกรรม ซึ่งเมื่อใช้น้ำตาลเฮกโซส (hexose) เป็นแหล่งคาร์บอนจะได้ผลสูงสุดเพียง 50% อีกครั้งหนึ่งถูกปล่อยเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ มีการสร้างไซยาโนแบคทีเรียดัดแปรพันธุกรรม *Synechocystis* sp. PCC 6803 ให้สังเคราะห์แอซีโตนโดยกำจัด (delete) ยีน *PhaEC* ที่สร้างพอลิไฮดรอกซีพอลิเมอร์ (PHB polymerase) แล้วให้ยีน *adc* ที่สร้างแอซีโตนแอซีเทต ดีคาร์บอกซิเลส (acetoacetate decarboxylase) แสดงออกพร้อมกับยีน *ctfAB* ที่สร้างโคเอนไซม์ เอทรานส์เฟอเรส (coenzyme A transferase) พบว่าได้ผลผลิตค่อนข้างต่ำ แต่เมื่อกำจัดยีน *pta* ที่สร้างฟอสฟอทรานส์แอซีทิลเลส (phosphotransacetylase) ซึ่งเป็นคู่แข่งของการผลิตแอซีโตนออกไปด้วย ส่งผลให้ผลิตแอซีโตนเพิ่มขึ้นมากถึง 7 เท่า (36 มิลลิกรัมต่อลิตร) [58]

## 3) พลาสติกชีวภาพ

ไซยาโนแบคทีเรียโดยธรรมชาติผลิตพลาสติกชีวภาพ (bioplastic) พอลิ-3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (poly-3-hydroxybutyrate หรือ PHB) ซึ่งเป็นพอลิไฮดรอกซีแอลคานอยด์ (poly-hydroxyalkanoate หรือ PHA) ชนิดหนึ่งที่สามารถย่อยสลายได้ อย่างไรก็ตาม วัฏจักรการผลิตค่อนข้างต่ำ จึงมีการนำยีนการสังเคราะห์ PHB จาก *Ralstonia eutropha* มาถ่ายโอนเข้า *S. elongatus* PCC 7942 เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่ขาดแคลนไนโตรเจนพร้อมทั้งเติมแอซีเทต (acetate) ทำให้ไซยาโนแบคทีเรียดัดแปรพันธุกรรมเพิ่มการสังเคราะห์ PHB ได้สูงสุด 25.6% ของเซลล์น้ำหนักแห้ง แต่เนื่องจาก PHB ไม่สามารถหลั่งออกนอกเซลล์ จึงต้องใช้กระบวนการสกัดซึ่งยังคงเป็นอุปสรรคหนึ่งของการนำไปใช้เชิงพาณิชย์ มีรายงานการสร้าง *E. coli* ดัดแปรพันธุกรรมที่สังเคราะห์ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (3-hydroxybutyrate หรือ 3HB) ซึ่งเป็นโมโนเมอร์ (monomer) ของ PHB และสามารถหลั่งออกนอกเซลล์ได้สำเร็จ ดังนั้น การสร้างไซยาโนแบคทีเรียดัดแปรพันธุกรรมให้สังเคราะห์ 3HB อาจแก้ปัญหาทำให้หลังพลาสติกชีวภาพออกนอกเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียได้ [59]

## 4) กรดแลกติก

กรดแลกติก (lactic acid) เป็นสารเคมีที่เป็นหน่วยโครงสร้าง (building block) ใช้สังเคราะห์พอลิเอสเทอร์ (polyester) ที่ย่อยสลายได้เป็นคุณสมบัติที่มีประโยชน์ทางการแพทย์ นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารกันเสียในอุตสาหกรรมอาหาร โดยปกติกรดแลกติกมักผลิตจากการหมักจุลินทรีย์ด้วยน้ำตาล เพื่อให้มีการผลิตกรดแลกติกจากไซยาโนแบคทีเรีย จึงถ่ายโอนยีน 3 ชนิด ได้แก่

*ldhA*, *lldP* และ *udhA* ให้แสดงออกร่วมกันใน *S. elongatus* PCC 7942 พบว่าภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิกสามารถผลิตกรดแลกติกได้ประมาณ 56 มิลลิกรัมต่อลิตร [60]

### 3.6.3 เชื้อเพลิงชีวภาพ

เพื่อพัฒนาให้ไซยาโนแบคทีเรียเป็นวัตถุดิบสำหรับพลังงานทางเลือก จึงสร้างไซยาโนแบคทีเรียดัดแปรพันธุกรรมที่ผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ (biofuel) ต่าง ๆ เช่น เอทานอล (ethanol) ไฮโดรเจน (hydrogen) กรดไขมันอิสระ (free fatty acid) ไอโซบิวทานอล (isobutanol) และแอลเคน (alkane) เป็นต้น (ดูรายละเอียดในบทที่ 5 เชื้อเพลิงชีวภาพจากไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่าย)

### 3.6.4 การดัดแปรพันธุกรรมให้เซลล์แข็งแรง

ความแข็งแรงและอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการผลิตโปรตีน สารเคมี และเชื้อเพลิงในระดับอุตสาหกรรม การเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรานั้นไม่เหมือนกับจุลชีพกลุ่มเฮเทอโรโทรฟิก เช่น *E. coli* เนื่องจากขึ้นอยู่กับอัตราการสังเคราะห์แสงเพื่อให้ได้มาซึ่งคาร์บอนและพลังงาน ดังนั้น การปรับปรุงการสังเคราะห์แสงจึงน่าจะช่วยให้ไซยาโนแบคทีเรียแข็งแรงขึ้น คาดกันว่าระดับการทำงานของเอนไซม์ Rubisco ที่ตรึงคาร์บอนไดออกไซด์เป็นขั้นตอนที่จำกัดการทำงาน อย่างไรก็ตาม เมื่อเพิ่มการแสดงออก (overexpression) ของ Rubisco ใน *S. elongatus* PCC 7942 กลับไม่พบผลกระทบที่มีต่อการสังเคราะห์แสง นอกจากนี้การรับแสงก็อาจเป็นขั้นตอนที่จำกัดการสังเคราะห์แสง โดยเฉพาะในการเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในระบบเปิดขนาดใหญ่มีเซลล์หนาแน่นสูงและความลึกของระบบที่เลี้ยงทำให้จำกัดการผ่านของแสง การเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในอาหารเหลวจะเกิดการดูดกลืนแสงอาทิตย์มากเกินไป มีผลให้ลดแสงที่ผ่านลงไปเช่นกัน ก่อให้เกิดสภาวะการยับยั้งโดยแสง (photoinhibition) ในบริเวณใกล้กับผิวน้ำของการเลี้ยงและขาดแคลนแสงในบริเวณที่ลึกลงไป จึงมีแนวคิดว่าหากลดสารสีที่รับแสง (light-harvesting pigments) อาจป้องกันการดูดกลืนแสงมากเกินไปโดยไม่ส่งผลกระทบต่ออัตราการสังเคราะห์แสง จึงได้สร้าง *Synechocystis* PCC 6714 ดัดแปรพันธุกรรมที่ขาดแคลนไฟโคไซยานิน (phycocyanin) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของไฟโคบิลิโซม (phycobilisome) เป็นสารสีรับแสงในไซยาโนแบคทีเรีย ไซยาโนแบคทีเรียดัดแปรพันธุกรรมที่ขาดไฟโคไซยานินนี้สามารถลดการยับยั้งโดยแสงและเพิ่มการสังเคราะห์แสง [52]



### 3.7 บทสรุป

พันธุวิศวกรรมในไซยาโนแบคทีเรียยังอยู่ในระยะเริ่มต้น ไซยาโนแบคทีเรียที่ได้รับการสำรวจและประสบความสำเร็จในการทำพันธุกรรมมีน้อยมาก อุปสรรคสำคัญคือการขาดระบบถ่ายโอนยีนในไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียมักสร้างเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอสซึ่งทำลายดีเอ็นเอแปลกปลอม จึงทำให้การพัฒนาาระบบถ่ายโอนยีนทำได้ยาก พันธุวิศวกรรมในไซยาโนแบคทีเรียเพื่อประยุกต์ทางเทคโนโลยีชีวภาพยังมีการพัฒนาไม่มากนัก เช่น ผลิตภัณฑ์โปรตีนและเคมีรวมทั้งเชื้อเพลิงชีวภาพ นอกจากนี้ยังมีการดัดแปรพันธุกรรมในไซยาโนแบคทีเรียเพื่อให้ได้เซลล์ที่แข็งแรงเหมาะสมที่จะใช้ผลิตในอุตสาหกรรม เนื่องจากมีการสำรวจศึกษาไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ เพิ่มขึ้น รวมทั้งมีความก้าวหน้าอย่างรวดเร็วด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล วิศวกรรมเมแทบอลิกที่ทำนายผลกระทบจากการดัดแปรยีนได้แม่นยำยิ่งขึ้นและเทคโนโลยีใหม่ ๆ สำหรับการดัดแปรพันธุกรรม ความก้าวหน้าเหล่านี้ทำให้ความสนใจที่จะนำไซยาโนแบคทีเรียไปใช้ทางด้านอุตสาหกรรมมีการขยายตัวอย่างต่อเนื่อง มีความเป็นไปได้สูงมากที่ไซยาโนแบคทีเรียจะถูกพัฒนาให้เทียบเท่ากับ *E. coli* สำหรับอุตสาหกรรมในยุคต่อไป

## เอกสารอ้างอิง

1. Berla BM, Saha R, Immethun CM, Maranas CD, Moon TS, Pakrasi HB. Synthetic biology of cyanobacteria: unique challenges and opportunities. *Front Microbiol.* 2013; 4: 10.3389.
2. Ramey CJ, Barón-Sola Á, Aucoin HR, Boyle NR. Genome engineering in cyanobacteria: where we are and where we need to go. *ACS Synth Biol.* 2015; 4: 1186-1196.
3. Imamura S, Asayama M. Sigma factors for cyanobacterial transcription. *Gene Regul Syst Biol.* 2009; 3: 65.
4. Huang H-H, Camsund D, Lindblad P, Heidorn T. Design and characterization of molecular tools for a synthetic biology approach towards developing cyanobacterial biotechnology. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38: 2577-2593.
5. Chungjatupornchai W, Fa-aoonsawat S. The *rnnA* promoter as a tool for the improved expression of heterologous genes in cyanobacteria. *Microbiol Res.* 2014; 169: 361-368.
6. Wu J, Zhao F, Wang S, Deng G, Wang J, Bai J, Lu J, Qu J, Bao Q. cTFbase: a database for comparative genomics of transcription factors in cyanobacteria. *BMC Genomics.* 2007; 8: 1.
7. Chungjatupornchai W, Fa-aoonsawat S, Panyim S. Characterization of regions of the cyanobacterial *tRNA<sup>pro</sup>* gene that affect the expression of a  $\beta$ -glucuronidase reporter gene. *FEMS Microbiol Lett.* 2002; 211: 57-64.
8. Heidorn T, Camsund D, Huang H-H, Lindberg P, Oliveira P, Stensjö K, Lindblad P. Synthetic biology in cyanobacteria engineering and analyzing novel functions. *Methods Enzymol.* 2010; 497: 539-579.
9. Agrawal GK, Kato H, Asayama M, Shirai M. An AU-box motif upstream of the SD sequence of light-dependent *psbA* transcripts confers mRNA instability in darkness in cyanobacteria. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29: 1835-1843.
10. Lindberg P, Park S, Melis A. Engineering a platform for photosynthetic isoprene production in cyanobacteria, using *Synechocystis* as the model organism. *Metab Eng.* 2010; 12: 70-79.
11. Agervald Å, Zhang X, Stensjö K, Devine E, Lindblad P. CalA, a cyanobacterial AbrB protein, interacts with the upstream region of *hypC* and acts as a repressor of its transcription in the cyanobacterium *Nostoc* sp. strain PCC 7120. *Appl Environ Microbiol.* 2010; 76: 880-890.
12. Chungjatupornchai W, Senawong T, Panyim S. Isolation and characterization of *Synechococcus* PCC 7942 promoters: *tRNA<sup>pro</sup>* gene functions as a promoter. *Curr Microbiol.* 1999; 38: 210-216.
13. Elhai J. Strong and regulated promoters in the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *FEMS Microbiol Lett.* 1993; 114: 179-184.

14. Luque I, Vázquez-Bermúdez MF, Paz-Yepes J, Flores E, Herrero A. In vivo activity of the nitrogen control transcription factor NtcA is subjected to metabolic regulation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *FEMS Microbiol Lett.* 2004; 236: 47-52.
15. Boyle NR, Page MD, Liu B, Blaby IK, Casero D, Kropat J, Cokus SJ, Hong-Hermesdorf A, Shaw J, Karpowicz SJ, Gallaher SD, Johnson S, Benning C, Pellegrini M, Grossman A, Merchant SS. Three acyltransferases and nitrogen-responsive regulator are implicated in nitrogen starvation-induced triacylglycerol accumulation in *Chlamydomonas*. *J Biol Chem.* 2012; 287: 15811-15825.
16. Sakurai I, Stazic D, Eisenhut M, Vuorio E, Steglich C, Hess WR, Aro E-M. Positive regulation of *psbA* gene expression by cis-encoded antisense RNAs in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol.* 2012; 160: 1000-1010.
17. Mitschke J, Georg J, Scholz I, Sharma CM, Dienst D, Bantscheff J, Voß B, Steglich C, Wilde A, Vogel J. An experimentally anchored map of transcriptional start sites in the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proc Natl Acad Sci.* 2011; 108: 2124-2129.
18. Plansangkate P, Fa-aoonsawat S, Panyim S, Chungjatupornchai W. The light-responsive promoter of cyanobacterial *ORF 76* gene overlaps with the *htpG* terminator. *FEMS Microbiol Lett.* 2004; 235: 341-347.
19. Chungjatupornchai W, Fa-aoonsawat S. Translocation of green fluorescent protein to cyanobacterial periplasm using ice nucleation protein. *J Microbiol.* 2009; 47: 187-192.
20. Labarre J, Chauvat F, Thuriaux P. Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803. *J Bacteriol.* 1989; 171: 3449-3457.
21. Monshupanee T, Fa-aoonsawat S, Chungjatupornchai W. A cyanobacterial strain with all chromosomal rRNA operons inactivated: a single nucleotide mutation of 23S rRNA confers temperature-sensitive phenotypes. *Microbiology-SGM.* 2006; 152: 1417-1425.
22. Kuhlemeier C, Thomas A, Van der Ende A, Van Leen R, Borrias W, Van den Hondel C, Van Arkel G. A host-vector system for gene cloning in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *Plasmid.* 1983; 10: 156-163.
23. Elhai J, Wolk CP. Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. *Methods Enzymol.* 1988; 167: 747-754.
24. Argueta C, Yuksek K, Summers M. Construction and use of GFP reporter vectors for analysis of cell-type-specific gene expression in *Nostoc punctiforme*. *J Microbiol Methods.* 2004; 59: 181-188.
25. Mermet-Bouvier P, Chauvat F. A conditional expression vector for the cyanobacteria *Synechocystis* sp. strains PCC 6803 and PCC 6714 or *Synechococcus* sp. strains PCC 7942 and PCC 6301. *Curr Microbiol.* 1994; 28: 145-148.

26. Elhai J, Wolk CP. A versatile class of positive-selection vectors based on the nonviability of palindrome-containing plasmids that allows cloning into long polylinkers. *Gene*. 1988; 68: 119-138.
27. Wolk CP, Cai Y, Panoff J-M. Use of a transposon with luciferase as a reporter to identify environmentally responsive genes in a cyanobacterium. *Proc Natl Acad Sci*. 1991; 88: 5355-5359.
28. Andersson CR, Tsinoremas NF, Shelton J, Lebedeva NV, Yarrow J, Min H, Golden SS. Application of bioluminescence to the study of circadian rhythms in cyanobacteria. *Methods Enzymol*. 2000; 305: 527-542.
29. Summers ML, Wallis JG, Campbell EL, Meeks JC. Genetic evidence of a major role for glucose-6-phosphate dehydrogenase in nitrogen fixation and dark growth of the cyanobacterium *Nostoc* sp. strain ATCC 29133. *J Bacteriol*. 1995; 177: 6184-6194.
30. Whitehead PR, Brown NL. Three restriction endonucleases from *Anabaena flos-aquae*. *Microbiology-SGM*. 1985; 131: 951-958.
31. Shestakov S, Khyen NT. Evidence for genetic transformation in blue-green alga *Anacystis nidulans*. *Mol Gen Genet*. 1970; 107: 372-375.
32. Wolk CP, Vonshak A, Kehoe P, Elhai J. Construction of shuttle vectors capable of conjugative transfer from *Escherichia coli* to nitrogen-fixing filamentous cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci*. 1984; 81: 1561-1565.
33. Golden SS, Sherman LA. A hybrid plasmid is a stable cloning vector for the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *J Bacteriol*. 1983; 155: 966-972.
34. Tsinoremas NF, Kutach AK, Strayer CA, Golden SS. Efficient gene transfer in *Synechococcus* sp. strains PCC 7942 and PCC 6301 by interspecies conjugation and chromosomal recombination. *J Bacteriol*. 1994; 176: 6764-6768.
35. Williams JG, Szalay AA. Stable integration of foreign DNA into the chromosome of the cyanobacterium *Synechococcus* R2. *Gene*. 1983; 24: 37-51.
36. Yoshihara S, Geng X, Okamoto S, Yura K, Murata T, Go M, Ohmori M, Ikeuchi M. Mutational analysis of genes involved in pilus structure, motility and transformation competency in the unicellular motile cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol*. 2001; 42: 63-73.
37. Okamoto S, Ohmori M. The cyanobacterial PilT protein responsible for cell motility and transformation hydrolyzes ATP. *Plant Cell Physiol*. 2002; 43: 1127-1136.
38. Nakasugi K, Svenson CJ, Neilan BA. The competence gene, *comF*, from *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 is involved in natural transformation, phototactic motility and piliation. *Microbiology-SGM*. 2006; 152: 3623-3631.

39. Stevens SE, Porter RD. Transformation in *Agmenellum quadruplicatum*. Proc Natl Acad Sci. 1980; 77: 6052-6056.
40. Grigorieva G, Shestakov S. Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. FEMS Microbiol Lett. 1982; 13: 367-370.
41. Onai K, Morishita M, Kaneko T, Tabata S, Ishiura M. Natural transformation of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1: a simple and efficient method for gene transfer. Mol Genet Genomics. 2004; 271: 50-59.
42. Iwai M, Katoh H, Katayama M, Ikeuchi M. Improved genetic transformation of the thermophilic cyanobacterium, *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. Plant Cell Physiol. 2004; 45: 171-175.
43. Murry MA, Wolk CP. Identification and initial utilization of a portion of the smaller plasmid of *Anabaena variabilis* ATCC 29413 capable of replication in *Anabaena* sp. strain M-131. Mol Gen Genet. 1991; 227: 113-119.
44. Jeamton W, Dulsawat S, Tanticharoen M, Vonshak A, Cheevadhanarak S. Overcoming intrinsic restriction enzyme barriers enhances transformation efficiency in *Arthrospira platensis* C1. Plant Cell Physiol. 2017; 58: 822-830.
45. Chiang G, Schaefer M, Grossman A. Transformation of the filamentous cyanobacterium *Fremyella diplosiphon* by conjugation or electroporation. Plant Physiol Biochem. 1992; 30: 315-325.
46. Cogley JG, Zerweck E, Reyes R, Mody A, Seludo-Unson JR, Jaeger H, Weerasuriya S, Navankasattusas S. Construction of shuttle plasmids which can be efficiently mobilized from *Escherichia coli* into the chromatically adapting cyanobacterium, *Fremyella diplosiphon*. Plasmid. 1993; 30: 90-105.
47. Flores E, Wolk CP. Identification of facultatively heterotrophic, N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria able to receive plasmid vectors from *Escherichia coli* by conjugation. J Bacteriol. 1985; 162: 1339-1341.
48. Chungjatupornchai W. Expression of the mosquitocidal-protein genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and the herbicide-resistance gene *bar* in *Synechocystis* PCC 6803. Curr Microbiol. 1990; 21: 283-288.
49. Griese M, Lange C, Soppa J. Ploidy in cyanobacteria. FEMS Microbiol Lett. 2011; 323: 124-131.
50. Hess WR. Cyanobacterial genomics for ecology and biotechnology. Curr Opin Microbiol. 2011; 14: 608-614.
51. Cai Y, Wolk CP. Use of a conditionally lethal gene in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequences. J Bacteriol. 1990; 172: 3138-3145.

52. Ruffing AM. Engineered cyanobacteria: teaching an old bug new tricks. *Bioeng bugs*. 2011; 2: 136-149.
53. Cai YA, Murphy JT, Wedemayer GJ, Glazer AN. Recombinant phycobiliproteins: recombinant C-phycocyanins equipped with affinity tags, oligomerization, and biospecific recognition domains. *Anal Biochem*. 2001; 290: 186-204.
54. Kawata Y, Yamano N, Kojima H, Itoh S. Expression of salmon growth hormone in the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum*. *Biotechnol Lett*. 1991; 13: 851-856.
55. Chungjatupornchai W, Fa-Aroonsawat S. Biodegradation of organophosphate pesticide using recombinant cyanobacteria with surface-and intracellular-expressed organophosphorus hydrolase. *J Microbiol Biotechnol*. 2008; 18: 946-951.
56. Chungjatupornchai W, Kamlangdee A, Fa-aroonsawat S. Display of organophosphorus hydrolase on the cyanobacterial cell surface using *Synechococcus* outer membrane protein a as an anchoring motif. *Appl Biochem Biotechnol*. 2011; 164: 1048-1057.
57. Kuritz T, Wolk CP. Use of filamentous cyanobacteria for biodegradation of organic pollutants. *Appl Environ Microbiol*. 1995; 61: 234-238.
58. Zhou J, Zhang H, Zhang Y, Li Y, Ma Y. Designing and creating a modularized synthetic pathway in cyanobacterium *Synechocystis* enables production of acetone from carbon dioxide. *Metab Eng*. 2012; 14: 394-400.
59. Wang B, Wang J, Zhang W, Meldrum DR. Application of synthetic biology in cyanobacteria and algae. *Front Microbiol*. 2012; 3: 344.
60. Niederholtmeyer H, Wolfstädter BT, Savage DF, Silver PA, Way JC. Engineering cyanobacteria to synthesize and export hydrophilic products. *Appl Environ Microbiol*. 2010; 76: 3462-3466.

# บทที่ 4

## พันธุวิศวกรรมในจุลสาหร่าย

### 4.1 บทนำ

จุลสาหร่ายเป็นยูแคริโอต (eukaryote) มีคลอโรพลาสต์ซึ่งคาดว่าวิวัฒนาการมาจากไซยาโนแบคทีเรีย [1] จุลสาหร่ายมีความหลากหลาย (biodiversity) คาดว่ามีประมาณ 200,000 ถึงหลายล้านสปีชีส์ (species) [2] จึงมีองค์ประกอบทางเคมีหลากหลายมาก เป็นแหล่งของสารธรรมชาติใหม่ ๆ สารเคมีมูลค่าสูง และการประยุกต์ใช้ทางเทคโนโลยีชีวภาพ (ดูรายละเอียดในบทที่ 1) เพื่อให้จุลสาหร่ายผลิตสารธรรมชาติปริมาณมาก หรือเกิดคุณสมบัติใหม่ เช่น ผลิตสารใหม่หรือเจริญเติบโตในบ่อเปิดหรือในสภาวะที่สับสน (extreme conditions) เพื่อลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อน เป็นต้น เหล่านี้จะนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงครั้งใหญ่ในอุตสาหกรรมที่ใช้เทคโนโลยีชีวภาพจุลสาหร่าย จึงต้องปรับปรุงพันธุ์ให้จุลสาหร่ายมีคุณสมบัติตามต้องการ โดยใช้วิศวกรรมเมแทบอลิก (metabolic engineering) ซึ่งรวมถึงการใช้พันธุวิศวกรรม (genetic engineering) จัดการให้ยีนในวิถีเมแทบอลิก (metabolic pathway) มีการแสดงออกเหมาะสมแก่การสังเคราะห์สารเป้าหมายจำนวนมาก (ดูรายละเอียดในบทที่ 2) การทำพันธุวิศวกรรมต้องใช้ความรู้ด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล (molecular genetics) เช่น การควบคุมการแสดงออกของยีน และเทคโนโลยีการถ่ายโอนยีน (gene transformation) เป็นต้น ปัจจุบันจุลสาหร่ายที่ใช้ทำพันธุวิศวกรรมมีน้อยมาก มีประมาณ 25 สปีชีส์เท่านั้นที่ประสบความสำเร็จในการพัฒนาระบบถ่ายโอนยีนในนิวเคลียส องค์ความรู้ส่วนใหญ่ในจุลสาหร่ายได้จากการศึกษาสายพันธุ์ต้นแบบ *Chlamydomonas reinhardtii* ในบทนี้จะกล่าวถึงการควบคุมการแสดงออกของยีน องค์ประกอบของพันธุวิศวกรรมทั้งในนิวเคลียสและคลอโรพลาสต์ของจุลสาหร่าย รวมทั้งกรณีศึกษาและการประยุกต์จุลสาหร่ายดัดแปรพันธุกรรม

## 4.2 การควบคุมการแสดงของยีนในจุลสาหร่าย

การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน (recombinant protein) ในจุลสาหร่ายเพื่อใช้ในเชิงพาณิชย์นั้น จำเป็นต้องมีผลผลิตที่สูงอย่างสม่ำเสมอ ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อระดับการแสดงออกของยีนที่สร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน เช่น ในนิวเคลียสมีการแสดงออกของยีนเป็นแบบยูแคริโอต (eukaryote) และในคลอโรพลาสต์เป็นแบบโพรแคริโอต (prokaryote) การเลือกใช้ชนิดของโปรโมเตอร์ (promoter) การใช้โคดอน (codon usage) สัญญาณการตัดเชื่อม (splicing signal) และยีนไซเลนซิง (gene silencing) เป็นต้น นอกจากนี้ตำแหน่งที่รีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ (recombinant DNA) แทรกรวมเข้ากับนิวเคลียร์จีโนม (nuclear genome) หรือคลอโรพลาสต์จีโนม (chloroplast genome) ก็มีผลกระทบต่อการแสดงออกของยีนเช่นกัน

### 4.2.1 การควบคุมการแสดงออกของยีนในนิวเคลียส

#### 1) โพรโมเตอร์

เพื่อให้เฮเทอโรโลกัสยีน (heterologous gene) มีการแสดงออกอย่างมีประสิทธิภาพ จึงต้องใช้โพรโมเตอร์ที่ทำงานแข็งแรง (strong promoter) โดยทั่วไปมักใช้เอนโดจีนัสโพรโมเตอร์ (endogenous promoter) ถ่ายโอนเข้านิวเคลียร์จีโนมของจุลสาหร่าย อย่างไรก็ตาม จุลสาหร่ายส่วนใหญ่มีข้อมูลทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลน้อย อาจไม่มีข้อมูลโพรโมเตอร์เลย จึงมักนำโพรโมเตอร์จาก *C. reinhardtii* มาใช้ในจุลสาหร่ายสายพันธุ์อื่น ๆ เพื่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน

โพรโมเตอร์ *RbcS2* ของยีนสร้างไรบูโลสบิสฟอสเฟตคาร์บอกซีเลส หน่วยย่อยเล็ก 2 (ribulose biphosphate carboxylase small subunit 2) สามารถทำงานอย่างมีประสิทธิภาพใน *C. reinhardtii* ที่ดัดแปรพันธุกรรม [3] เมื่อนำโพรโมเตอร์ *RbcS2* มาเชื่อมต่อด้าน 3' ของโพรโมเตอร์ *Hsp70A* ของยีนสร้างโปรตีนฮีตช็อก 70 เอ (heat shock protein 70A) ซึ่งเป็นตัวส่งเสริมการถอดรหัส (transcriptional enhancer) และสามารถเหนี่ยวนำด้วยความร้อน (heat inducible) [4] ผลที่ได้เป็นโพรโมเตอร์ลูกผสม *Hsp70A-RbcS2* (AR) [4] ที่เหมาะสำหรับการแสดงออกของยีนในนิวเคลียร์จีโนม ในบางกรณีส่วนของโพรโมเตอร์อาจยับยั้งการแสดงออกของเฮเทอโรโลกัสยีน เช่น เมื่อถ่ายโอนยีน *ble* ที่ดื้อต่อยาซีโอซีน (zeocine) โดยอยู่ภายใต้การควบคุมของโพรโมเตอร์ *RbcS2* เซลล์ทรานส์ฟอร์มแมนต์ (transformant) ที่ได้มีถึง 80% ที่เกิดยีนไซเลนซิง (ยีนไม่ทำงาน) แต่เมื่อถ่ายโอนยีน *ble* โดยอยู่ภายใต้การควบคุมของโพรโมเตอร์ AR มีการเกิดยีนไซเลนซิงเพียง 36% ของเซลล์ทรานส์ฟอร์มแมนต์เท่านั้น [5] การดัดแปลงโพรโมเตอร์ AR



โดยใส่อินทรอน (intron) ของยีน *RbcS2* เข้าไประหว่างโพรโมเตอร์ *Hsp70A* และ *RbcS2* ช่วยเพิ่มการแสดงออกของยีนที่ถูกควบคุม [6]

โพรโมเตอร์ *Cyc6* ของยีนสร้างไซโทโครมซี 6 (cytochrome c6) ที่ตอบสนองต่อโลหะ (metal responsive) และถูกยับยั้งด้วยทองแดง (copper) เมื่อนำมาใช้เหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนใน *C. reinhardtii* บริเวณลำดับดีเอ็นเอที่ตอบสนองต่อทองแดง (*CuRE*) จะตอบสนองต่อทั้งนิกเกิล (nickel) และไอออนโคบอลต์ (cobalt ions) ด้วย แต่จะถูกยับยั้งด้วย EDTA [7] ตัวอย่างของโพรโมเตอร์ในนิวเคลียสได้แสดงไว้ในตารางที่ 4-1

## 2) การส่งรีคอมบิแนนท์โปรตีนไปยังตำแหน่งเป้าหมาย

การส่งรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่สร้างขึ้นจากการถ่ายโอนยีนในนิวเคลียสไปยังเป้าหมายที่ตำแหน่งต่าง ๆ ของเซลล์ เช่น คลอโรพลาสต์ ไมโทคอนเดรีย และการหลั่งออกนอกเซลล์ (secretion) ทำได้โดยเชื่อมต่อยีนสร้างเปปไทด์เป้าหมาย (targeting peptide หรือ TP) เข้ากับด้าน 5' ของยีนสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน มีความพยายามนำโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้ทำนาย TP ของพืชชั้นสูงมาใช้กับจุลสาหร่ายสีเขียวแต่ไม่ได้ผล จึงได้พัฒนาโปรแกรม PredAlgo ด้วยข้อมูลจาก *C. reinhardtii* เพื่อใช้ทำนาย TP ที่มีเป้าหมายไปยังคลอโรพลาสต์หรือไมโทคอนเดรีย [8] เมื่อเร็ว ๆ นี้การศึกษาจีโนมของ *Phaeodactylum tricornutum* และ *Thalassiosira pseudonana* ช่วยการวิเคราะห์โมทีฟ (motif) TP ของยีนในนิวเคลียสที่ส่งไปยังเป้าหมายที่คลอโรพลาสต์ของไดอะตอม [9] นอกจากนี้มีการสร้างเวกเตอร์ (vector) ที่มีส่วนของ TP ที่เจาะจงส่งรีคอมบิแนนท์โปรตีนไปยังเป้าหมาย ได้แก่ นิวเคลียส คลอโรพลาสต์ ไมโทคอนเดรีย เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (endoplasmic reticulum หรือ ER) และการหลั่งออกนอกเซลล์ [10]

## 3) สัญญาณการตัดเชื่อม

อินทรอนซึ่งประกอบด้วยสัญญาณการตัดเชื่อม มีผลกระทบเชิงบวกต่อการแสดงออกของยีนในยูแคริโอต เนื่องจากการตัดเชื่อมจะเร่งเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ออกจากนิวเคลียส ดังนั้น การใส่เอนโคจิ้นอินทรอนอาจช่วยปรับปรุงการแสดงออกของเฮเทอโรโลกส์ยีนได้ เช่น พบว่าเฮเทอโรโลกส์ยีนมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นใน *C. reinhardtii* เมื่อมีอินทรอน 1 (intron1) ของเอนโคจิ้นยีน *RbcS2* [11]

## 4) ยีนไซเลนซิง

ยีนไซเลนซิงเป็นกลไกสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนในยูแคริโอต โดยควบคุมหลังกระบวนการถอดรหัส (posttranscriptional gene regulation) ที่พบมากคือการรบกวน

อาร์เอ็นเอ (RNA interference หรือ RNAi) เป็นกลไกที่ใช้โมเลกุลอาร์เอ็นเอขนาดเล็กที่มีลำดับเบสจำเพาะไปรบกวนการแสดงออกของยีนเป้าหมายในเซลล์ โดยเอนไซม์ดีเซอร์ (dicer) ตัดอาร์เอ็นเอสายคู่ (double-stranded RNA) ที่มาจากจีโนมของเจ้าบ้านเป็นอาร์เอ็นเอชนิดไม่กำหนดรหัส (noncoding RNA) ได้โมเลกุลอาร์เอ็นเอขนาดเล็กเรียกว่า ไมโครอาร์เอ็นเอ (microRNA หรือ miRNA) ส่วนการตัดอาร์เอ็นเอสายคู่ที่มาจากภายนอกเซลล์ได้โมเลกุลอาร์เอ็นเอขนาดเล็กเรียกว่า สมอลล์อินเทอร์เฟียริงอาร์เอ็นเอ (small interfering RNA หรือ siRNA) เมื่อ miRNA หรือ siRNA สายเดี่ยวที่เป็นแอนติเซนส์ (antisense) รวมกับอาร์โกนาออต (argonaute) และโปรตีนอื่น ๆ เป็นอาร์เอ็นเอไอโซเลนซิงคอมเพล็กซ์ (RNAi-silencing complex หรือ RISC) แล้วนำทางไปพบเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกัน (complementary) เพื่อทำลายเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมาย เป็นการป้องกันมิให้แปลรหัสเป็นโปรตีน RNAi พบในจุลสาหร่ายหลายสายพันธุ์ เช่น *C. reinhardtii*, *Volvox carteri*, *Dunaliella salina*, *P. tricornutum* และ *Euglena gracilis* เป็นต้น โดยเฉพาะใน *C. reinhardtii* มีการศึกษาวิถียีนไซเลนซิง และใช้เป็นเครื่องมือในการน็อกดาวน์ (knockdown) ยีนอย่างเจาะจง [12] ในด้านหนึ่งยีนไซเลนซิงซึ่งส่งผลให้การแสดงออกของเฮเทอโรโลกัสยีนในนิวเคลียสไม่เสถียรและทำให้ได้รีคอมบิแนนท์โปรตีนต่ำ แต่อีกด้านหนึ่งกลไกนี้ใช้ควบคุมอย่างเจาะจงให้เอนโดจีนัสยีนทำงานลดลง (down regulation) สามารถใช้ตรวจสอบการทำหน้าที่ของยีนต่าง ๆ นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้ในพันธุวิศวกรรมเมแทบอลิก เช่น ใช้ลดการทำงานของยีนในกลไกกลัยโคซิเลชัน (glycosylation) เพื่อดัดแปลงรูปแบบ (pattern) ของกลัยโคซิเลชัน เป็นต้น

#### 4.2.2 การควบคุมการแสดงออกของยีนในคลอโรพลาสต์

ในการควบคุมการแสดงออกที่มีประสิทธิภาพของเฮเทอโรโลกัสยีนในคลอโรพลาสต์ของจุลสาหร่าย โดยปกติมักใช้ส่วนควบคุมชนิดเอนโดจีนัส (endogenous regulatory elements) ของยีนที่มีการแสดงออกสูง เช่น โพรโมเตอร์ *RbcL* ของยีนสร้างไรบูโลสบิสฟอสเฟตคาร์บอกซิเลส หน่วยย่อยใหญ่ (ribulose biphosphate carboxylase large subunit) โพรโมเตอร์ *psbA* ของยีนสร้างโปรตีน D1 ในระบบสังเคราะห์แสงสอง (photosystem II protein D1) และโพรโมเตอร์ *atpA* ของยีนสร้างเอทีพีเอสหน่วยย่อยแอลฟา (ATPase alpha subunit) [13] เป็นต้น (ดูตารางที่ 4-2) เมื่อยับยั้งการสะสมของเอ็มอาร์เอ็นเอจำเพาะในคลอโรพลาสต์ถึง 90% ไม่พบผลกระทบต่ออัตราการแปลรหัส [14] ดังนั้น การแสดงออกของยีนในคลอโรพลาสต์จะถูกควบคุมอย่างเข้มงวดในระดับแปลรหัสแต่ตอบสนองน้อยกว่าการควบคุมในระดับถอดรหัส

### 4.2.3 การใช้โคดอน

การใช้โคดอนหนึ่งในสิ่งมีชีวิตที่สปีชีส์ต่างกันก็อาจมีความถี่แตกต่างกัน นั่นคือโคดอนที่ใช้บ่อยในสิ่งมีชีวิตสปีชีส์หนึ่งอาจเกือบไม่ได้ใช้เลยในสิ่งมีชีวิตอีกสปีชีส์หนึ่ง การขาดทีอาร์เอ็นเอ (tRNA) ที่เข้ากันได้กับโคดอนส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการแปลรหัสและระดับการแสดงออกของเฮเทอโรโลกัสยีน พบการใช้โคดอนแตกต่างกันในจุลสาหร่ายสปีชีส์ต่างกัน และระหว่างคลอโรพลาสต์และนิวเคลียสของจุลสาหร่ายในสปีชีส์เดียวกัน การปรับโคดอนให้เหมาะสมกับออร์แกเนลล์จะช่วยปรับปรุงการแสดงออกของยีนอย่างมีนัยสำคัญ

## 4.3 พันธุวิศวกรรมในจุลสาหร่าย

แม้ปัจจุบัน *C. reinhardtii* เป็นจุลสาหร่ายสีเขียวที่นำมาใช้เพื่อการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอมากที่สุด แต่อาจไม่ใช่สายพันธุ์ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในเชิงพาณิชย์ มีจุลสาหร่ายสีเขียวอีกหลายสายพันธุ์ที่ควรพิจารณานำมาใช้ด้วยเหตุผลหลายประการ เช่น มีความแข็งแรงทนทานกว่า มีประสิทธิภาพในการสร้างผลผลิตมากกว่า หรือได้รับการรับรองว่าปลอดภัย (GRAS certified) เช่น *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. และ *Dunaliella* sp. เป็นต้น แม้ว่าสายพันธุ์เหล่านี้จะมีข้อมูลการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนไม่มากนัก แต่จากข้อมูลเท่าที่มีทำให้คาดได้ว่าการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกับ *C. reinhardtii* ดังนั้น จุลสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์อื่น ๆ ก็น่าจะมีศักยภาพในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนเช่นกัน [15] โดยปกติรีคอมบิแนนท์โปรตีนมักแสดงออกในนิวเคลียสหรือคลอโรพลาสต์ซึ่งมีข้อดีและข้อจำกัดแตกต่างกัน (ดูรายละเอียดในรูปที่ 4-1)

### 4.3.1 พันธุวิศวกรรมในนิวเคลียร์จีโนม

พันธุวิศวกรรมในนิวเคลียร์จีโนมของจุลสาหร่าย มีข้อดีของการแสดงออกของยีนในระบบยูแคริโอต ได้แก่ การควบคุมการแสดงออกของยีนที่ถ่ายโอนเข้าไปโดยการเหนี่ยวนำ โปรตีนที่สร้างขึ้นมีการพับ (protein folding) ที่ซับซ้อนอย่างมีประสิทธิภาพ และมีการดัดแปลงภายหลังการแปลรหัส เช่น การสร้างพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) และกลัยโคซิเลชัน นอกจากนี้ยังสามารถสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนไปยังตำแหน่งเป้าหมาย เช่น นิวเคลียส ไซโทพลาซึม (cytoplasm) คลอโรพลาสต์ ER ไมโทคอนเดรีย หรือการหลั่งออกนอกเซลล์ ข้อจำกัดของพันธุวิศวกรรมในนิวเคลียร์จีโนมของจุลสาหร่าย เช่น มีการสะสมของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในระดับต่ำ ซึ่งเกิดจากยีนไซเลนซิงและอิทธิพลของตำแหน่งที่ยีนแทรกตัวเข้านิวเคลียร์จีโนม (positional effects) เป็นต้น

ดีเอ็นเอที่ถ่ายโอนเข้าไปมักสอดแทรกตัวรวมกับนิวเคลียร์จีโนมแบบสุ่ม (random) ส่วนการทำพันธุวิศวกรรมที่ตำแหน่งเป้าหมายในนิวเคลียร์จีโนมด้วยโฮโมโลกัสรีคอมบิเนชัน (homologous recombination) นั้นโดยทั่วไปยังไม่มีประสิทธิภาพ ปัจจุบันมีรายงานจุลสาหร่ายเพียงสองสายพันธุ์เท่านั้น ที่โฮโมโลกัสรีคอมบิเนชันมีประสิทธิภาพสูงเพียงพอแก่การนำมาใช้ในเทคโนโลยีชีวภาพ ได้แก่ *Cyanidioschyzon merolae* [16] และ *Nannochloropsis* sp. [17] จึงเป็นอุปสรรคสำคัญที่ทำให้ไม่สามารถทำยีนนิ่งเอาต์ (knockout) และยีนที่ถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ไม่สามารถแทรกวมเข้าสู่ตำแหน่งเป้าหมายอย่างรวดเร็ว

**ตารางที่ 4-1** ตัวอย่างโปรโมเตอร์สำหรับพันธุวิศวกรรมในนิวมเคดิสของจุลสารร้าย  
ที่มา: ตารางังเดย วิภา จังจตุพรชัย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

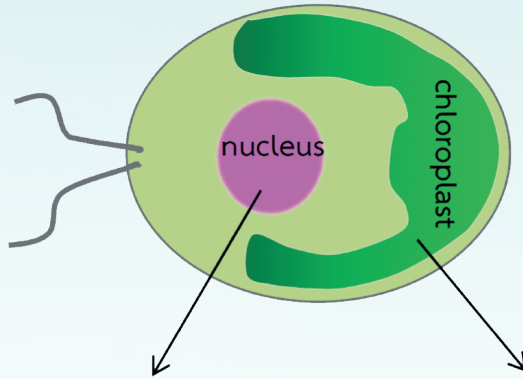
Promoter	Description	Source	Host species	Ref
$\beta$ 2-Tub	$\beta$ 2-tubulin	<i>C. reinhardtii</i>	<i>C. reinhardtii</i>	[11]
CaMV35S	Cauliflower mosaic virus 35S	Cauliflower mosaic virus	<i>Neochloris oleoabundans</i>	[18]
			<i>C. reinhardtii</i>	[19]
			<i>Amphidinium</i> sp.	[20]
			and <i>Symbiodinium</i> sp.	
			<i>Chlorella kessleri</i>	[21]
			<i>Dunaliella salina</i>	[22]
			<i>Neochloris oleoabundans</i>	[18]
<i>Cyc6</i>	Cytochrome c6	<i>C. reinhardtii</i>	<i>C. reinhardtii</i>	[23]
<i>Hsp70A</i>	Heat shock protein 70A	<i>C. reinhardtii</i>	<i>C. reinhardtii</i>	[4]
<i>RbcS2</i>	Ribulose biphosphate carboxylase small subunit 2	<i>C. reinhardtii</i>	<i>C. reinhardtii</i>	[3]

(ต่อ)

Promoter	Description	Source	Host species	Ref
AR	<i>Hsp70A-RbcS2</i> hybrid promoter	<i>C. reinhardtii</i>	<i>C. reinhardtii</i>	[4]
			<i>Volvox carteri</i>	[24]
			<i>Gonium pectorale</i>	[25]
			<i>Neochloris oleoabundans</i>	[18]
Nos	Nopaline synthase	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>C. reinhardtii</i>	[26]
			<i>Amphidinium</i> sp.	[26]
			<i>Symbiodinium</i> sp.	[26]
NR	Nitrate reductase	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	<i>Chaetoceros</i> sp.	[27]
<i>psaD</i>	Photosystem I complex protein	<i>C. reinhardtii</i>	<i>C. reinhardtii</i>	[28]

**ตารางที่ 4-2** ตัวอย่างโปรโมเตอร์สำหรับพันธุวิศวกรรมในคลอโรพลาสต์ของจุลสาหร่าย  
ที่มา: ตาราจโดย วิภา จิงจุตพรชัย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

Promoter	Description	Source	Host species	Ref
<i>atpA</i>	ATPase alpha subunit	<i>C. reinhardtii</i>	<i>C. reinhardtii</i>	[13]
<i>psbA</i>	Photosystem II protein D1	<i>C. reinhardtii</i>	<i>C. reinhardtii</i>	[13]
<i>Rbcl</i>	Ribulose biphosphate carboxylase large subunit	<i>C. reinhardtii</i>	<i>C. reinhardtii</i>	[13]
<i>cabII-1</i>	Chlorophyll-ab binding protein	<i>C. reinhardtii</i>	<i>C. reinhardtii</i>	[29]



	Nuclear genome engineering	Chloroplast genome engineering
Transformation method	Electroporation, microparticle bombardment, agitation with glass beads, silicon whiskers, <i>Agrobacterium</i> -mediated transformation	Microparticle bombardment
Gene integration	Mostly non-homologous	Homologous
Gene expression machinery	Eukaryotic	Prokaryotic
Inducible gene expression	Nutrient, chemical, physiological	Light inducible
Protein localization	Nucleus, cytoplasm, chloroplast, ER, mitochondria, secretion	Remain in chloroplast
Levels of protein accumulation	Lower, 0.25% of total soluble protein	High, 1-21% of total soluble protein
Glycosylation pattern of proteins	Similar to plants and animals	None
Gene silencing	Probable	Not probable
Inheritance of integrated gene	Mendelian	Maternal

รูปที่ 4-1 การเปรียบเทียบพันธุวิศวกรรมในนิวเคลียสและคลอโรพลาสต์ของจุลสาหร่ายสีเขียว  
ข้อมูลจาก [15, 30]

ที่มา: แผนภาพโดย วิภา จิงจตุพรชัย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล



### 4.3.2 พันธุวิศวกรรมในคลอโรพลาสต์จีโนม

เนื่องจากจุลสาหร่ายสีเขียวสืบเชื้อสายจากบรรพบุรุษที่มีไซยาโนแบคทีเรียสังเคราะห์แสง อยู่ร่วมภายใน (endosymbiosis) ซึ่งพัฒนาต่อมาเป็นคลอโรพลาสต์ (ดูบทที่ 3) ดังนั้น การแสดงออก ของยีนในคลอโรพลาสต์จึงเป็นแบบโพรแคริโอตซึ่งรวมถึงไรโบโซม (ribosome) และแฟกเตอร์ แปลรหัส (translation factors) อย่างไรก็ตาม สิ่งที่แตกต่างกันจากแบคทีเรียคือ ในคลอโรพลาสต์ มีแชเพอโรน (chaperone) หลากหลายชนิดที่ช่วยการพับของโปรตีน มีเอนไซม์โปรตีนไดซัลไฟด์ ไอโซเมอเรส (protein disulfide isomerase) และเปปทิดิลโพรลิลไอโซเมอเรส (peptidylprolyl isomerase) ซึ่งช่วยการพับของโปรตีนเชิงซ้อน (complex protein) สำหรับการสังเคราะห์แสง ริคอมบิแนนท์โปรตีนที่สร้างจากคลอโรพลาสต์จีโนมมักเกิดพันธะไดซัลไฟด์ แต่ไม่เกิดกลัยโคซิเลชัน [15] ดีเอ็นเอที่ถ่ายโอนเข้าไปในคลอโรพลาสต์จะเกิดการแทรกกรรมกับคลอโรพลาสต์จีโนมที่ตำแหน่ง เป้าหมายด้วยวิธีโฮโมโลกัสรีคอมบิเนชัน คล้ายกับที่เกิดขึ้นในจีโนมของไซยาโนแบคทีเรีย (ดูรายละเอียดในบทที่ 3) ใน *C. reinhardtii* ริคอมบิแนนท์โปรตีนที่แสดงออกจากคลอโรพลาสต์ โดยปกติจะสูงประมาณ 1-10% ของโปรตีนทั้งหมด แต่มีบางกรณีที่สูงถึง 21% [31]

### 4.3.3 วิธีการถ่ายโอนดีเอ็นเอ

กว่า 20 ปีที่ผ่านมา มีรายงานการถ่ายโอนดีเอ็นเอที่ประสบความสำเร็จในจุลสาหร่าย ประมาณ 25 สปีชีส์เท่านั้น (ดูตัวอย่างในตารางที่ 4-3) ส่วนใหญ่มักอยู่ในกลุ่มจุลสาหร่ายสีเขียว (Chlorophyceae) โดยเฉพาะ *C. reinhardtii* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีการพัฒนาวิธีทางพันธุศาสตร์ ระดับโมเลกุลก้าวหน้ามากกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ มีข้อมูลลำดับดีเอ็นเอ วิธีการถ่ายโอนดีเอ็นเอ และเวกเตอร์สำหรับแต่ละจีโนมของ *C. reinhardtii* ได้แก่ นิวเคลียร์จีโนม คลอโรพลาสต์จีโนม และไมโทคอนเดรียจีโนม [15]

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเลือกวิธีและสภาวะการถ่ายโอนดีเอ็นเอคือ คุณสมบัติของ ผนังเซลล์ (cell wall) จุลสาหร่าย ผนังเซลล์จะแตกต่างกันตั้งแต่มีความยืดหยุ่นและบางกว่า เช่น ที่พบใน *Chlamydomonas* sp., *Volvox* sp. และ *Dunaliella* sp. หรือมีความแข็งไม่ยืดหยุ่น เช่น ที่พบใน *Chlorella* sp. หรือมีความแข็งแรงแรงมากเป็นซิลิกา (silica) เช่น ที่พบในไดอะตอม การถ่ายโอนดีเอ็นเอในเซลล์แฮพลอยด์ (haploid) มีข้อได้เปรียบเพราะสามารถแสดงฟีโนไทป์ (phenotype) ได้ทันที หากเป็นเซลล์ดิพลอยด์ (diploid) ก็อาจจะเป็นอุปสรรค อย่างไรก็ตาม จุลสาหร่ายส่วนใหญ่ที่ประสบความสำเร็จในการถ่ายโอนดีเอ็นเอนั้น วงชีพของเซลล์มักสลับกัน ระหว่างแฮพลอยด์และดิพลอยด์ [32] ในที่นี้จะกล่าวถึงวิธีต่าง ๆ ที่ใช้ถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่ นิวเคลียร์ จีโนมและคลอโรพลาสต์จีโนมของจุลสาหร่าย (ดูตารางที่ 4-3) ดังนี้

## 1) การยิงอนุภาค

การถ่ายโอนดีเอ็นเอด้วยเครื่องยิงอนุภาค (microparticle bombardment, microprojectile bombardment, gene gun transformation หรือ biolistics) เป็นวิธีที่ยิงดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ โดยเคลือบดีเอ็นเอบนอนุภาคทองหรือทังสแตน (tungsten) ที่มีขนาดเล็ก (0.5-1.5 ไมโครเมตร) แล้วใช้ปืนฮีเลียม (helium driven gun) ยิงเข้าสู่เซลล์เป้าหมายด้วยความเร็วสูง (ประมาณ 500 เมตรต่อวินาที) เป็นวิธีที่ใช้กันมากในการถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์พืช

ในกรณีของจุลสาหร่ายโดยทั่วไปมักใช้วิธียิงอนุภาคสำหรับถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่คลอโรพลาสต์จีโนม ซึ่งเกิดโฮโมโลกัสรีคอมบิเนชัน ทำให้ยีนเป้าหมายสามารถสอดแทรกเข้าไปในคลอโรพลาสต์จีโนม หากเป็นกรณีถ่ายโอนยีนเข้าสู่นิวเคลียส ดีเอ็นเอที่เข้าไปจะสอดแทรกเข้าไปในนิวเคลียร์จีโนมแบบสุ่มเป็นจำนวนหลายซ้ำ (copy) ทั่วจีโนมซึ่งมักเป็นลักษณะที่ไม่ต้องการ [33] การถ่ายโอนดีเอ็นเอด้วยการยิงอนุภาคนี้สามารถใช้ได้กับจุลสาหร่ายแทบทุกสายพันธุ์รวมทั้งไดอะตอมซึ่งมีผนังเซลล์แข็ง

**ตารางที่ 4-3** ตัวอย่างจุลสาหร่ายและวิธีการถ่ายยีนดีเอ็นเอเข้าสู่นิวเคลียสรีโนไมและคลอโรพลาสต์จีโนม  
ที่มา: ตารางงัดย วิภา จึงจตุพรชัย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

Species	Genome	Transformation method	Ref
<b>Green algae</b>			
<i>C. reinhardtii</i>	Nuclear	Microparticle bombardment	[34]
	Nuclear	Glass beads	[35]
	Nuclear	Electroporation	[36]
	Nuclear	Silicon carbide whiskers	[37]
	Nuclear	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	[38]
	Chloroplast	Microparticle bombardment	[39]
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Nuclear	Microparticle bombardment	[41]
<i>Chlorella vulgaris</i>	Nuclear	Electroporation	[42]
<i>Chlorella kessleri</i>	Nuclear	Microparticle bombardment	[21]
<i>Dunaliella salina</i>	Nuclear	Electroporation	[43]
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Chloroplast	Microparticle bombardment	[44]
<i>Gonium pectorale</i>	Nuclear	Microparticle bombardment	[25]

(ต่อ)

Species	Genome	Transformation method	Ref
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Nuclear	Microparticle bombardment	[45]
	Nuclear	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	[46]
	Chloroplast	Microparticle bombardment	[47]
<i>Neochloris oleoabundans</i>	Nuclear	Electroporation	[18]
<i>Ostreococcus tauri</i>	Nuclear	Electroporation	[48]
<i>Platymonas subcordiformis</i>	Chloroplast	Microparticle bombardment	[49]
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Nuclear	Electroporation	[50]
<i>Volvox carteri</i>	Nuclear	Microparticle bombardment	[25]
<b>Heterokont algae</b>			
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Nuclear	Electroporation	[17]
<i>Isochrysis galbana</i>	Nuclear	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	[51]
<b>Diatoms</b>			
<i>Cyclotella cryptica</i>	Nuclear	Microparticle bombardment	[52]
<i>Navicula saprophila</i>	Nuclear	Microparticle bombardment	[52]

(ต่อ)

Species	Genome	Transformation method	Ref
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Nuclear	Microparticle bombardment	[53]
	Nuclear	Electroporation	[54]
	Chloroplast	Electroporation	[55]
	Episomes	Conjugation	[56]
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	Episomes	Conjugation	[56]
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	Nuclear	Microparticle bombardment	[57]
<i>Cylindrotheca fusiformis</i>	Nuclear	Microparticle bombardment	[58]
<b><u>Dinoflagellates</u></b>			
<i>Amphidinium</i> sp.	Nuclear	Silicon carbide whiskers	[20]
<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	Nuclear	Silicon carbide whiskers	[20]
<b><u>Euglenoids</u></b>			
<i>Euglena gracilis</i>	Chloroplast	Microparticle bombardment	[59]

## 2) การใช้ลูกปัดแก้วและเส้นใยซิลิกอน

การถ่ายโอนดีเอ็นเอด้วยลูกปัดแก้ว (glass beads) โดยเขย่าลูกปัดแก้วกับเซลล์พร้อมทั้ง ดีเอ็นเอและพอลิเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol) ลูกปัดแก้วส่งผลกระทบต่อผนังเซลล์ ทำให้ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ เป็นวิธีที่นิยมใช้เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและค่าใช้จ่ายน้อย แต่มีข้อเสียคือ เป็นวิธีที่ใช้ได้เฉพาะกับจุลสาหร่ายสายพันธุ์ที่ขาดผนังเซลล์ (cell wall-deficient mutants) หรือเซลล์โพรโทพลาสต์ (protoplast) ที่ผนังเซลล์ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ ซึ่งอาจไม่สามารถใช้ได้กับ จุลสาหร่ายทุกสายพันธุ์ วิธีนี้มักใช้เซลล์ที่เจริญเติบโตอยู่ในระยะแบ่งตัวทวีคูณ (log phase) ซึ่ง เซลล์อยู่ในสภาวะไมโทซิส (mitosis) ที่ไม่มีนิวเคลียร์เมมเบรน (nuclear membrane) เป็นการ ช่วยให้ดีเอ็นเอผ่านเข้าไปถึงนิวเคลียสได้สะดวก [32] การถ่ายโอนดีเอ็นเอด้วยลูกปัดแก้วส่งผลให้ ดีเอ็นเอสอดแทรกเข้าไปในนิวเคลียร์จีโนมเป็นจำนวนหลายซ้ำ ด้วยจำนวนที่น้อยกว่าวิธีการยิง อนุภาค [35] การถ่ายโอนดีเอ็นเอด้วยลูกปัดแก้วสามารถใช้ได้กับจุลสาหร่าย *C. reinhardtii* [35]

การถ่ายโอนดีเอ็นเอด้วยเส้นใยซิลิกอนคาร์ไบด์ (silicon carbide whiskers) เป็นวิธี ที่มีได้ใช้ทั่วไป เนื่องจากเส้นใยซิลิกอนคาร์ไบด์มีราคาแพงและเป็นอันตรายต่อสุขภาพ แต่วิธีนี้ มีข้อดีคือใช้ได้กับจุลสาหร่ายสายพันธุ์ลักษณะปรกติ (wild type strain) แทนที่จะเป็นสายพันธุ์ ขาดผนังเซลล์ [37]

การถ่ายโอนดีเอ็นเอด้วยลูกปัดแก้วและเส้นใยซิลิกอนคาร์ไบด์ใน *C. reinhardtii* พบว่าการใช้พลาสมิดที่เป็นเส้น (linearized plasmid) มักให้ความถี่ในการถ่ายโอนดีเอ็นเอ (transformation frequency) สูงกว่าดีเอ็นเอที่เป็นซูเปอร์คอยล์ (supercoiled DNA) [35, 37]

## 3) อิเล็กโทรพอเรชัน

อิเล็กโทรพอเรชัน (electroporation) เป็นวิธีถ่ายโอนดีเอ็นเอโดยผ่านกระแสไฟฟ้า (electric pulse) ที่มีความเข้มและระยะเวลาที่เหมาะสมไปยังเซลล์ วิธีนี้ใช้ถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้า นิวเคลียร์จีโนมของจุลสาหร่ายทั้งที่เป็นโพรโทพลาสต์ สายพันธุ์ที่ขาดผนังเซลล์ และสายพันธุ์ ลักษณะปรกติซึ่งมีผนังเซลล์ เป็นวิธีที่ใช้ได้กับจุลสาหร่ายหลายชนิด เช่น *C. reinhardtii* [36], *D. salina* [43], *Chlorella vulgaris* [42], *Scenedesmus obliquus* [50], *Nannochloropsis* sp. [17] และ *Neochloris oleoabundans* [18] เป็นต้น (ดูตารางที่ 4-3) ในกรณีไดอะตอม เช่น *P. tricornutum* ใช้วิธีอิเล็กโทรพอเรชันได้โดยปรับลดความหนาของผนังเซลล์ด้วยการเลี้ยง ในอาหารที่ปราศจากซิลิกา (silica)

#### 4) การใช้อะโกรแบคทีเรีย

การถ่ายโอนดีเอ็นเอโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium tumefaciens*) เป็นวิธีที่ปกติใช้กับพืช เนื่องจากแบคทีเรียดังกล่าวมีความสามารถในการถ่ายโอน T-DNA จากพลาสมิด Ti เข้าไปแทรกรวมกับนิวเคลียร์จีโนมของพืช เมื่อนำมาปรับใช้ในจุลสาหร่าย *C. reinhardtii* พบว่าประสิทธิภาพในการถ่ายโอนดีเอ็นเอสูงกว่าวิธีใช้ลูกบิดแก้วถึง 50 เท่า [60] วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและใช้ได้กับเซลล์ที่มีผนังเซลล์ จึงอาจปรับใช้ได้กับจุลสาหร่ายสายพันธุ์อื่น ๆ ปัจจุบันพบว่าวิธีนี้สามารถใช้ได้กับจุลสาหร่ายหลายสายพันธุ์ เช่น *Haematococcus pluvialis* [46] และ *Isochrysis galbana* [51] เป็นต้น (ดูตารางที่ 4-3)

#### 5) คอนจูเกชัน

คอนจูเกชัน (conjugation) เป็นการถ่ายโอนดีเอ็นเอโดยเซลล์สัมผัสกัน แล้วเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอจากแบคทีเรียชนิดหนึ่ง (มักจะเป็น *E. coli*) ไปสู่อีกชนิดหนึ่งโดยใช้คอนจูเกทิฟพลาสมิดชนิดวงกว้าง (broad-host-range conjugative plasmid) เมื่อเร็ว ๆ นี้มีการพัฒนาวิธีคอนจูเกชันเพื่อถ่ายโอนดีเอ็นเอจาก *E. coli* เข้าสู่โคอะตอมสองสปีชีส์ ได้แก่ *P. tricornutum* และ *T. pseudonana* [56] โดยเวกเตอร์ที่ใช้ประกอบด้วยลำดับดีเอ็นเอจากยีสต์ที่สามารถถ่ายแบบซ้ำ (replicate) ในโคอะตอมดังกล่าว ซึ่งเอพิโซม (episome) นี้สามารถคงสภาพเป็นวง (closed circle) ในนิวเคลียสโดยมีจำนวนสำเนา (copy number) เทียบเท่ากับโครโมโซมของเจ้าบ้าน วิธีนี้มีข้อดีคือเป็นวิธีที่ง่ายในการถ่ายโอนดีเอ็นเอชิ้นใหญ่เข้าสู่จุลสาหร่าย จึงมีประโยชน์ในการถ่ายโอนยีนหลาย ๆ ยีนในวิถีเมแทบอลิกร่วมกัน นอกจากนี้เนื่องจากดีเอ็นเอมิได้แทรกวมเข้ากับโครโมโซม จึงคาดว่า การแสดงออกของยีนจากเอพิโซมจะไม่ถูกระทบจากกลไกเอพิเจเนติกส์ (epigenetics) หรือตำแหน่งที่ยีนแทรกตัวเข้านิวเคลียร์จีโนม

#### 4.3.4 เครื่องหมายคัดเลือก

##### 1) เครื่องหมายคัดเลือกในนิวเคลียส

ความเสถียรของการถ่ายโอนยีนในนิวเคลียสของจุลสาหร่าย มักขึ้นกับการใช้เครื่องหมายคัดเลือก (selectable marker) ที่เหมาะสม เช่น ยีนที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหรือยาฆ่าแมลง ยีนสร้างเอนไซม์เมแทบอลิกที่ควบคุมการเจริญเติบโตภายใต้สภาวะอาหารเฉพาะ เป็นต้น ในที่นี้จะกล่าวเฉพาะยีนที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ทั่วไป (ดูตารางที่ 4-4) ยีน *ble* จากแบคทีเรีย *Streptoalloteichus hindustanus* ซึ่งดื้อต่อยาซีโอซินและฟลิโอมัยซิน (phleomycin) ใช้ได้

กับจุลสาหร่ายหลายสายพันธุ์ ยีน *aadA* สร้างอะมิโนกลัยโคไซด์ 3' แอดีนิลทรานส์เฟอเรส (aminoglycoside 3' adenylyltransferase) ที่ติดต่อยาสเปกทินอไมซิน (spectinomycin) และสเตรปโตไมซิน (streptomycin) เดิมทีใช้ *aadA* สำหรับการถ่ายโอนยีนในคลอโรพลาสต์ ต่อมานำมาปรับใช้กับการถ่ายโอนยีนในนิวเคลียสของ *C. reinhardtii* [61] และ *H. pluvialis* [47] นอกจากนี้ยังมียีน *Aph7*” สร้างอะมิโนกลัยโคไซด์ฟอสฟอทรานส์เฟอเรส (aminoglycoside phosphotransferase) จากแบคทีเรีย *Streptomyces hygroscopicus* ที่ติดต่อยาไฮโกรมัยซินบี (hygromycin B) นำมาใช้ได้กับจุลสาหร่ายหลายสายพันธุ์ เช่น *C. reinhardtii* [11] และ *N. oleoabundans* [18] เป็นต้น ยีนที่ติดต่อยาปฏิชีวนะส่วนใหญ่มักประสบความสำเร็จเมื่อนำมาใช้ในการถ่ายโอนยีน อย่างไรก็ตาม การใช้ยีนที่ติดต่อยาปฏิชีวนะเป็นเครื่องหมายคัดเลือกอาจเกิดความกังวลเกี่ยวกับสุขภาพและสิ่งแวดล้อมได้ ในกรณีที่มีการผลิตจุลสาหร่ายปริมาณมาก

## 2) เครื่องหมายคัดเลือกในคลอโรพลาสต์

ในกรณีของคลอโรพลาสต์ เครื่องหมายคัดเลือกชนิดที่ติดต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้กันบ่อย ๆ ในการถ่ายโอนยีนในคลอโรพลาสต์ของจุลสาหร่ายและพืช ได้แก่ ยีน *aadA* ที่ติดต่อยาสเปกทินอไมซินและสเตรปโตไมซิน มีการใช้ในจุลสาหร่ายหลายชนิด เช่น *C. reinhardtii* [62], *Euglena gracilis* [59], และ *H. pluvialis* [47] เป็นต้น นอกจากนี้ยังใช้ยีน *aphA6* ที่ติดต่อยาปฏิชีวนะกลุ่มอะมิโนกลัยโคไซด์ (aminoglycoside) ใน *C. reinhardtii* การใช้ *aadA* ร่วมกับ *aphA6* ทำให้ขยายความเป็นไปได้ที่จะถ่ายโอนหลาย ๆ ยีนเพื่อการแสดงออกในคลอโรพลาสต์ [63] ยีน *ereB* ซึ่งสร้างอีริโทรไมซินเอสเทอเรส (erythromycin esterase) ที่ติดต่อยาอีริโทรไมซิน (erythromycin) ประสบความสำเร็จในการใช้เป็นเครื่องหมายคัดเลือกในคลอโรพลาสต์ของ *Dunaliella tertiolecta* [44] นอกจากนี้ยีน *cat* ซึ่งสร้างคลอแรมเฟนิคอลอะซิติลทรานส์เฟอเรส (chloramphenicol acetyltransferase) ที่ติดต่อยาคลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol) สามารถใช้ใน *P. tricornutum* [55] (ดูตารางที่ 4-5)

### 4.3.5 ยีนรายงาน

ยีนรายงาน (reporter gene) เมื่อถูกขับเคลื่อนด้วยโพรโมเตอร์ของยีนที่สนใจ จะมีประโยชน์มาก สามารถใช้ตรวจสอบตำแหน่งและลักษณะการแสดงออกของยีนนั้น ยีนรายงานที่ใช้ในจุลสาหร่ายส่วนใหญ่พัฒนาโดยปรับการใช้โคดอนให้เหมาะกับคลอโรพลาสต์หรือนิวเคลียสของ *C. reinhardtii* เช่น ยีนรายงาน *gfp* สร้างโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (green fluorescent protein หรือ GFP) และยีน *luc (lux)* สร้างลูซิเฟอเรส (luciferase) เป็นต้น (ดูตารางที่ 4-6)



**ตารางที่ 4-4** ตัวอย่างเครื่องมือคัดเลือกลำหรับพันธุวิศวกรรมในนิวเคลียสของจุลสาหร่าย  
ที่มา: ตาราจันเดย์ วิภา จึงจตุพรชัย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

Selection gene	Gene product	Selectable marker	Host species	Ref
<i>ble</i>	Phleomycin binding protein	Resistance to zeocine/ phleomycin	<i>C. reinhardtii</i> <i>Dumaliella salina</i> <i>Volvox carteri</i> <i>Chlorella ellipsoidea</i>	[50] [64] [65] [66]
			<i>Phaeodactylum tricomutum</i> <i>Nannochloropsis granulata</i> / <i>gaditana/oculata/oceanica</i> / <i>salina</i>	[56] [67]
<i>aadA</i>	Aminoglycoside 3' adenyltransferase	Resistance to spectinomycin/ streptomycin	<i>C. reinhardtii</i>	[61]
<i>Aph7"</i>	Aminoglycoside phosphotransferase	Resistance to hygromycin B	<i>Haematococcus pluvialis</i> <i>C. reinhardtii</i> <i>Neochloris oleoabundans</i>	[47] [11] [18]

**ตารางที่ 4-5** ตัวอย่างเครื่องมือทางกายตัดเลือกสำหรับพันธุวิศวกรรมในเซลล์โพรทอสตของจุลสาหร่าย  
ที่มา: ตารางังเดย วิภา จึงจตุพรชัย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

Selection gene	Gene product	Selectable marker	Host species	Ref
<i>aadA</i>	Aminoglycoside 3' adenylyltransferase	Resistance to spectinomycin/streptomycin	<i>C. reinhardtii</i> <i>Euglena gracilis</i> <i>Haematococcus pluvialis</i>	[62] [59] [47]
<i>aphA6</i>	Aminoglycoside 3'-transferase	Resistance to kanamycin	<i>C. reinhardtii</i>	[63]
<i>ereB</i>	Erythromycin esterase	Resistance to erythromycin	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	[44]
<i>cat</i>	Chloramphenicol acetyltransferase	Resistance to chloramphenicol	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	[55]
<i>bar</i>	Phosphinothricin acetyltransferase	Tolerance to glufosinate	<i>Platymonas subcordiformis</i>	[49]
<i>arg9</i>	Acetylmethionine aminotransferase	Arginine free media	<i>C. reinhardtii</i>	[68]

ตารางที่ 4-6 ตัวอย่างนิรายนงานที่ใช้ในจุลสทาหร่าย  
ที่มา: ตาราางโดย วิภา จิงจตุพรชัย สทาบบัชีววิทยาตาสตรโม่แลกุล มหาวิทาลัยมหิตล

Reporter	Description	Host species	Ref
<i>gfpCt</i>	Chloroplast codon-optimized GFP	<i>C. reinhardtii</i>	[69]
<i>luxCt</i>	Chloroplast codon-optimized luciferase from <i>Vibrio harveyi</i>	<i>C. reinhardtii</i>	[13]
<i>lucCP</i>	Chloroplast codon-optimized firefly luciferase	<i>C. reinhardtii</i>	[70]
<i>Chgfp (crgfp)</i>	Nuclear codon-optimized GFP	<i>C. reinhardtii</i>	[71]
<i>crLuc</i>	Nuclear codon-optimized luciferase from <i>Renilla reniformis</i>	<i>C. reinhardtii</i>	[72]
<i>cgluc</i>	Nuclear codon-optimized <i>Gaussia princeps</i> luciferase	<i>C. reinhardtii</i>	[73]
<i>gus</i>	$\beta$ -Glucuronidase	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> ,	[74]
		<i>Amphidinium</i> sp., <i>Symbiodinium</i> sp.	[20]

## 4.4 กรณีศึกษา: กลยุทธ์การพัฒนาระบบถ่ายโอนยีนในนิวเคลียสจีโนมของจุลสาหร่ายที่ไม่มีข้อมูลพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล [18]

*Neochloris oleoabundans* เป็นจุลสาหร่ายน้ำจืดเซลล์เดียวที่มีความเป็นไปได้ในการใช้เป็นแหล่งลิพิด (lipid) เพื่อผลิตไบโอดีเซล (biodiesel) เพราะภายใต้สภาวะขาดแคลนไนโตรเจน *N. oleoabundans* ผลิตลิพิด 36-54% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และพบสูงสุดถึง 80% ของลิพิดทั้งหมดเป็นไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol หรือ TAG) ที่ส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acids) ที่มีคาร์บอนประมาณ 16-20 อะตอม [75] ซึ่งเป็นคุณสมบัติในอุดมคติสำหรับผลิตไบโอดีเซล

เนื่องจากความรู้เกี่ยวกับ *N. oleoabundans* มีอย่างจำกัด ไม่มีข้อมูลลำดับจีโนม (genomic sequences) และไม่มีรายงานเกี่ยวกับวิธีทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล เพื่อให้สามารถดัดแปรพันธุกรรมในการสังเคราะห์ TAG และศึกษาพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล วิชา จึงจัดทูลพรชัย และคณะ จึงได้พัฒนาระบบถ่ายโอนยีนเข้านิวเคลียสจีโนมของ *N. oleoabundans* อย่างเสถียร ซึ่งสิ่งสำคัญที่ต้องมีเพื่อใช้พัฒนาระบบดังกล่าว ได้แก่ 1) เครื่องหมายคัดเลือกที่เหมาะสม 2) โพรโมเตอร์ที่ขับเคลื่อนการแสดงออกของยีนเครื่องหมายคัดเลือก และ 3) ยีนรายงานเพื่อประเมินการทำงานของโพรโมเตอร์ที่เลือกมาทดลอง เนื่องจากยังไม่มีข้อมูลใน *N. oleoabundans* จึงเลือกยีนเครื่องหมายคัดเลือก โพรโมเตอร์ และยีนรายงานที่ทำงานได้ใน *C. reinhardtii* มาทดลองในเซลล์ *N. oleoabundans*

### 1) ยีนรายงานที่เหมาะสม

เพื่อประเมินประสิทธิภาพของโปรตีนรายงาน GFP จึงเลือกยีน *Acfp* ซึ่งปรับการใช้โคดอนให้เหมาะกับการแสดงออกในเซลล์มนุษย์ [76] และ *Chgfp* (*crgfp*) ซึ่งปรับการใช้โคดอนให้เหมาะกับการแสดงออกในนิวเคลียสของ *C. reinhardtii* [71] โดยสร้างพลาสมิดให้มียีนรายงานดังกล่าวอยู่ภายใต้การควบคุมของโพรโมเตอร์ *Hsp70A-RbcS2* (AR) [4] แล้วทดลองถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ด้วยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน เมื่อวัดการแสดงออกชั่วคราว (transient expression) พบว่ากิจกรรม (activity) ของ GFP ในเซลล์ที่มีการถ่ายโอนยีน *Chgfp* สูงกว่า *Acfp* ถึง 1.8 เท่า แสดงให้เห็นว่า *Chgfp* มีประสิทธิภาพมากกว่า *Acfp* เป็นการบ่งชี้ว่า การใช้โคดอนของ *N. oleoabundans* น่าจะใกล้เคียงกับของ *C. reinhardtii* มากกว่าของมนุษย์ ดังนั้น จึงเลือก *Chgfp* เป็นยีนรายงานเพื่อประเมินการทำงานของเฮเทอโรโลกัสโพรโมเตอร์ (heterologous promoter)

## 2) โพรโมเตอร์ที่ทำงานใน *N. oleoabundans*

เพื่อประเมินประสิทธิภาพการทำงานของเฮเทอโรโลกัสโพรโมเตอร์ จึงใช้วิธีอิลีกโทรพอเรชันถ่ายโอนพลาสมิดที่มียีนรายงาน *Chgfp* ที่อยู่ภายใต้การควบคุมของโพรโมเตอร์ *AR* จาก *C. reinhardtii* ซึ่งเหนี่ยวนำได้ด้วยความร้อน [4] หรือโพรโมเตอร์ทำงานถาวร (constitutive promoter) ได้แก่ โพรโมเตอร์  $\beta 2$ -tubulin ( $\beta 2$ -*Tub*) จาก *C. reinhardtii* [77] และโพรโมเตอร์ *CaMV35S* จากไวรัสก่อโรคใบด่างของดอกกะหล่ำ (cauliflower mosaic virus) [78] เมื่อวัดการแสดงออกชั่วคราวพบว่ากิจกรรมของ GFP ในเซลล์ที่ใช้โพรโมเตอร์ *AR* (เมื่อยังไม่เหนี่ยวนำ)  $\beta 2$ -*Tub* และ *CaMV35S* ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าโพรโมเตอร์ทั้งสามชนิดสามารถทำงานได้ใน *N. oleoabundans* สำหรับโพรโมเตอร์ *AR* เมื่อเหนี่ยวนำด้วยความร้อน จะมีกิจกรรมของ GFP สูงกว่าเมื่อไม่เหนี่ยวนำถึง 2.75 เท่า ดังนั้น โพรโมเตอร์ *AR* จึงมีประสิทธิภาพสูงสุด และนำมาใช้ขับเคลื่อนการแสดงออกของยีนเครื่องหมายคัดเลือก สำหรับระบบถ่ายโอนยีนเข้าสู่นิวเคลียร์จีโนมอย่างเสถียรใน *N. oleoabundans*

## 3) การถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่นิวเคลียร์จีโนมด้วยวิธีอิลีกโทรพอเรชัน

เพื่อเลือกยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมต่อการใช้เป็นเครื่องหมายคัดเลือก จึงได้ทดสอบ *N. oleoabundans* กับยาปฏิชีวนะกานามัยซิน (kanamycin) แอมพิซิลลิน (ampicillin) และไฮโกรมัยซินบี (hygromycin B หรือ HygB) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า *N. oleoabundans* ตีต่อกานามัยซินและแอมพิซิลลินที่ความเข้มข้น 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ( $\mu\text{g/ml}$ ) แต่ไวต่อ HygB โดยมีค่าความเข้มข้นของยาในระดับต่ำสุด ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ (minimal inhibitory concentration หรือ MIC) ที่ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ดังนั้น จึงใช้ HygB ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ในการคัดเลือกทรานส์ฟอร์มแตนต์ (transformant) ต่อไป

เพื่อทดสอบว่ายีน *Hyg3* (ประกอบด้วย ยีน *Aph7* และ intron1 ของยีน *RbcS2*) ซึ่งตีต่อ HygB [11] จะใช้เป็นเครื่องหมายคัดเลือกใน *N. oleoabundans* ได้หรือไม่ จึงสร้างพลาสมิด pAR-Hyg3 ซึ่งมียีน *Hyg3* อยู่ภายใต้การควบคุมของโพรโมเตอร์ *AR* (รูปที่ 4-2 ก) แล้วถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ด้วยวิธีอิลีกโทรพอเรชัน โดยใช้พัลส์เดียว (a single pulse) มีความต้านทานที่ 200 โอห์ม ( $\Omega$ ) และความจุ (capacitance) ที่ 25 ไมโครฟารัด ( $\mu\text{F}$ ) แล้วทดสอบความแรงสนามไฟฟ้า (electric field strength) ที่ความแรงต่าง ๆ ระหว่าง 500 ถึง 2,000 โวลต์ต่อเซนติเมตร (V/cm) เพื่อหาความแรงสนามไฟฟ้าที่เหมาะสมที่สุดในการทำอิลีกโทรพอเรชัน พบว่าที่ 1000 โวลต์ต่อเซนติเมตร ให้จำนวนทรานส์ฟอร์มแตนต์สูงสุด ดังนั้น 1000 โวลต์ต่อเซนติเมตร จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการทำอิลีกโทรพอเรชันต่อไป

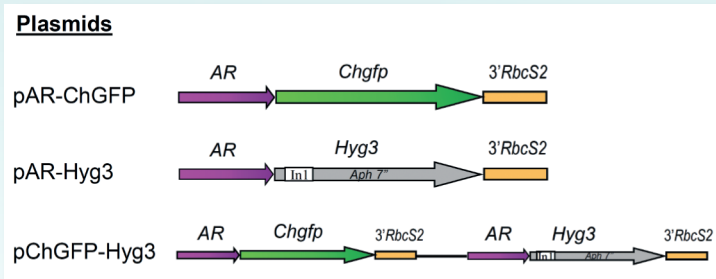
#### 4) ประสิทธิภาพของยีน *Hyg3* และ *Hyg4* ใน *N. oleoabundans*

เนื่องจากใน *C. reinhardtii* เฮเทอโรโลกัสยีนสามารถแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อมี intron1 ของเอนโดจีนัสยีน *RbcS2* [11] จึงได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพของยีน *Hyg3* (ประกอบด้วย ยีน *Aph7*" และ intron1 ของยีน *RbcS2*) และ *Hyg4* (ยีน *Aph7*" ที่ไม่มีอินทรอน) ใน *N. oleoabundans* โดยถ่ายโอนพลาสมิด pAR-*Hyg3* และ pAR-*Hyg4* (ซึ่งมียีน *Hyg3* และ *Hyg4* อยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ AR) เข้าสู่เซลล์โดยอิเล็กโทรพอเรชัน พบว่าประสิทธิภาพของการถ่ายโอนดีเอ็นเอ (transformation frequency) ของ pAR-*Hyg3* ( $5.2 \times 10^{-4}$  ทรานส์ฟอร์มแมนต์ ต่อมิลลิกรัมดีเอ็นเอ) สูงกว่า pAR-*Hyg4* ( $2.0 \times 10^{-4}$  ทรานส์ฟอร์มแมนต์ ต่อมิลลิกรัมดีเอ็นเอ) ถึง 2.6 เท่า ดังนั้น intron1 ของยีน *RbcS2* สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการถ่ายโอนดีเอ็นเอใน *N. oleoabundans* ดังนั้น ยีน *Hyg3* จึงเป็นเครื่องหมายคัดเลือกที่เหมาะสมใน *N. oleoabundans*

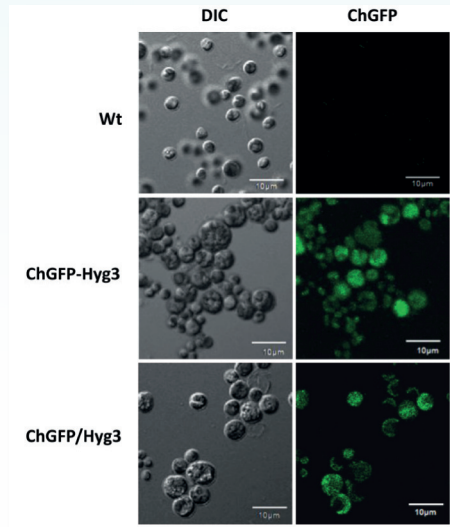
#### 5) การแสดงออกของยีน *Chgfp* ใน *N. oleoabundans*

เพื่อทดสอบระบบถ่ายโอนยีนที่พัฒนาขึ้น จึงถ่ายโอนพลาสมิด 2 แบบ ได้แก่ 1) ใช้พลาสมิด ชนิดเดียว pChgfp-*Hyg3* ที่มีทั้งยีน *Chgfp* และ *Hyg3* อยู่ในพลาสมิดเดียวกัน ได้เซลล์ ทรานส์ฟอร์มแมนต์ Chgfp-*Hyg3* และ 2) ถ่ายโอนพลาสมิดสองชนิด pAR-*Hyg3* ที่มียีน *Hyg3* และ pAR-*Chgfp* ที่มียีน *Chgfp* เข้าสู่เซลล์พร้อมกัน (co-transformation) ได้เซลล์ทรานส์ฟอร์มแมนต์ Chgfp/*Hyg3* สามารถตรวจพบฟลูออเรสเซนซ์ของ GFP ในเซลล์ทรานส์ฟอร์มแมนต์ Chgfp-*Hyg3* และ Chgfp/*Hyg3* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ดูรูปที่ 4-2) นั่นคือระบบที่พัฒนาขึ้นประสบความสำเร็จ ในการถ่ายโอนพลาสมิดทั้งสองแบบ

ความสำเร็จในการพัฒนาระบบถ่ายโอนยีนในนิวเคลียร์จีโนมนี้ ไม่เพียงแต่ทำให้สามารถ ศึกษาพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลได้ แต่ยังทำให้เป็นไปได้ที่จะทำพันธุวิศวกรรมในจุลสาหร่ายเพื่อ เพิ่มผลิตสำหรับการผลิตไบโอดีเซลต่อไป กลยุทธ์ที่ใช้พัฒนาระบบถ่ายโอนยีนในนิวเคลียร์จีโนม ที่กล่าวมานี้สามารถนำไปใช้กับจุลสาหร่ายสปีชีส์อื่น ๆ ที่ยังไม่มีข้อมูลลำดับจีโนม [18]



(ก)



(ข)

**รูปที่ 4-2** การแสดงออกของยีนสร้าง GFP ในจุลสาหร่าย *Neochloris oleoabundans*

(ก) แผนภาพพลาสมิด ที่ใช้ถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ด้วยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน AR: โพรโมเตอร์จาก *C. reinhardtii*; Chgfp: gfp ที่ปรับโคดอนให้เหมาะกับนิวเคลียสของ *C. reinhardtii*; Hyg3: ยีน Aph7” ที่มี intron1 ของยีน RbcS2

(ข) ภาพทรานส์ฟอรั่มเมนต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอลเลเซอร์สแกนนิ่ง (confocal laser scanning microscope) ทรานส์ฟอรั่มเมนต์ Chgfp-Hyg3 ได้จากการถ่ายโอน pChgfp-Hyg3 ส่วนทรานส์ฟอรั่มเมนต์ Chgfp/Hyg3 ได้จากการถ่ายโอนทั้ง pAR-Chgfp และ pAR-Hyg3 เข้าสู่เซลล์พร้อมกัน Wt: สายพันธุ์ลักษณะปกติ; DIC: differential interference; ChGFP: GFP ฟลูออเรสเซนส์ (ex: 488 nm; em: 507 nm)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Chungjatupornchai et al., 2016 [18]

## 4.5 การประยุกต์จุลสาหร่ายตัดแปรรูปพันธุกรรม

พันธุวิศวกรรมในจุลสาหร่ายยังมีการพัฒนาไม่มากนัก *C. reinhardtii* เป็นจุลสาหร่ายต้นแบบที่มีการประยุกต์ใช้ทางเทคโนโลยีชีวภาพมากที่สุด เช่น ใช้ผลิตโปรตีนบำบัดโรค ใช้เป็นวัคซีน เอนไซม์สำหรับอุตสาหกรรม และพลังงานชีวภาพ เป็นต้น

### 4.5.1 โปรตีนบำบัดโรค

#### 1) แอนติบอดี

รีคอมบิแนนท์โปรตีนตัวแรกจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ที่ผลิตในคลอโรพลาสต์ของจุลสาหร่ายคือแอนติบอดีโคลนเดี่ยว (monoclonal antibody) ของมนุษย์ ซึ่งจดจำเป้าหมายจำเพาะกับกลัยโคโปรตีนดี (glycoprotein D) ของไวรัสเฮอร์พีส์ซิมเพล็กซ์ (herpes simplex virus หรือ HSV) แอนติบอดีนี้เป็น large single chain (Lsc) ที่ประกอบด้วย IgA heavy chain ทั้งสายเชื่อมต่อกับส่วนแปรผัน (variable region) ของ light chain โดยใช้ flexible linker แล้วให้แสดงออกในคลอโรพลาสต์ของ *C. reinhardtii* รีคอมบิแนนท์โปรตีน HSV-Lsc ที่ได้เป็นชนิดละลายน้ำ (soluble protein) ซึ่งเกี่ยวพันจับคู่ (dimerized) ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ภายในเซลล์อย่างถูกต้อง และสามารถจับกับโปรตีนของ HSV [79] นอกจากนี้มีการนำยีนที่สร้าง light chain และ heavy chain ซึ่งจดจำเป้าหมายจำเพาะกับ antigen 83 (PA83) ของแอนแทรกซ์ (anthrax) มาถ่ายโอนแบบอิสระแยกจากกันเข้าสู่คลอโรพลาสต์ของ *C. reinhardtii* พบว่าทั้ง light chain และ heavy chain ที่ได้เป็นชนิดละลายน้ำ และที่สำคัญคือ light chain สองสายและ heavy chain สองสายมาประกอบกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์เป็นแอนติบอดีสมบูรณ์ที่ทำหน้าที่ได้ [80]

#### 2) อิมมูโนทอกซิน

เนื่องจากคลอโรพลาสต์ของจุลสาหร่ายมีกลไกพับ (folding) โปรตีน จึงใช้ผลิตและประกอบโปรตีนเชิงซ้อนของยูแคริโอต เช่น แอนติบอดี แต่มีกลไกการแปลรหัสที่กำเนิดจากโพรแคริโอต จึงเป็นลักษณะพิเศษเฉพาะที่เหมาะสมแก่การใช้ผลิตโปรตีนเช่นอิมมูโนทอกซิน (immunotoxin) อิมมูโนทอกซินประกอบด้วยแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับ (couple) กับทอกซินสำหรับยูแคริโอต แอนติบอดีทำหน้าที่ลำเลียง (endocytosis) ทอกซินเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้ในการบำบัดรักษาโรคมะเร็ง โดยฆ่าเซลล์มะเร็งที่เป้าหมายอย่างเจาะจง แอนติบอดีอาจเชื่อมต่อกับทอกซินโดยวิธีทางเคมีหรือพันธุกรรม อย่างไรก็ตาม การเชื่อมต่อกับวิธีทางพันธุกรรมนั้น ไม่สามารถกระทำได้ในเซลล์ยูแคริโอต เช่น เซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammalian cells) หรือยีสต์ เพราะโดย



ปกติทอกซินมักมีเป้าหมายที่กลไกการแปลรหัสของโปรตีน ดังนั้น จะส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เจ้าบ้าน ในทางตรงกันข้ามก็ไม่สามารถใช้ระบบการผลิตโปรตีนแบบโพรแคริโอต เช่น *E. coli* เพราะไม่สามารถพับโปรตีนเชิงซ้อนอย่างแอนติบอดีได้อย่างถูกต้อง จึงต้องใช้วิธีที่ยุ่งยากและมีค่าใช้จ่ายสูงในการพับโปรตีนและทำให้เกิดพันธะไดซัลไฟด์ภายนอกเซลล์ก่อน แล้วจึงใช้เพื่อการบำบัดรักษาได้ ตัวอย่างการผลิต เช่น การใช้คลอโรพลาสต์ของ *C. reinhardtii* ในการผลิตและประกอบอิมมูโนทอกซินแบบโมโนวาเลนต์ (monovalent) และไดวาเลนต์ (divalent) โดยใช้ชิ้นแอนติบอดี single chain ซึ่งจดจำเป้าหมายเจาะจงที่โปรตีน CD22 บนผิวของเซลล์บี (B cell) มาเชื่อมรวม (fused) กับส่วนการเคลื่อนย้าย (translocation) และโดเมนที่เป็นเอนไซม์ (enzymatic domain) ของเอกโซทอกซินเอ (exotoxin A) จาก *Pseudomonas aeruginosa* พบว่าอิมมูโนทอกซินทั้งแบบโมโนวาเลนต์และไดวาเลนต์ของ anti-CD22-exotoxin A สามารถจดจำอย่างเจาะจงและฆ่าเซลล์เพาะเลี้ยง (cell line) ที่มี CD22 จากเบอร์กิตต์ลิมโฟมา (Burkitt's lymphoma) โดยแบบไดวาเลนต์มีประสิทธิภาพมากกว่าแบบโมโนวาเลนต์ถึง 20 เท่า นอกจากนี้อิมมูโนทอกซินทั้งสองแบบยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้องอก (tumor) ในหนูทดลองซึ่งมีผลต่อการรอดชีวิต [81] การผลิตอิมมูโนทอกซินนี้ แสดงให้เห็นถึงการประยุกต์ที่มีลักษณะพิเศษเพื่อผลิตโปรตีนในคลอโรพลาสต์ เพราะไม่มีระบบผลิตโปรตีนอื่นใดที่จะสามารถสร้างโปรตีนดังกล่าว

### 3) สารเลียนแบบแอนติบอดี

สารเลียนแบบแอนติบอดี (antibody mimics) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่จับอย่างจำเพาะเจาะจงกับแอนติเจน แต่โดยโครงสร้างไม่มีความสัมพันธ์กับแอนติบอดี ตัวอย่างเช่น เปปไทด์หรือโปรตีนที่ประดิษฐ์ขึ้น โดยทั่วไปสารเลียนแบบแอนติบอดีมีข้อดีกว่าแอนติบอดี เช่น ละลายน้ำดีกว่า ผ่านทะลุเนื้อเยื่อได้ดีกว่า มีความเสถียรมากกว่าในสภาวะที่มีความร้อนและเอนไซม์ และค่าใช้จ่ายในการผลิตที่ถูกลงกว่า สารเลียนแบบแอนติบอดีถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้ในการบำบัดรักษาและการวินิจฉัยโรค มีรายงานการนำสารเลียนแบบแอนติบอดีซึ่งมีศักยภาพใช้เพื่อการรักษาในมนุษย์ เช่น vascular endothelial growth factor (VEGF) และ HMGB1 มาแสดงออกในคลอโรพลาสต์ของ *C. reinhardtii* พบว่าผลิตได้ประมาณ 2-3% ของโปรตีนละลายน้ำทั้งหมด (total soluble proteins) และทำงานได้ดีเทียบเท่ากับโปรตีนที่ผลิตโดยวิธีที่ใช้ในปัจจุบัน ดังนั้น แสดงให้เห็นว่าคลอโรพลาสต์ของจุลสาหร่ายสามารถใช้เป็นแหล่งผลิตโปรตีนสำหรับบำบัดรักษาโรคมมนุษย์ [82]

### 4) แอลโลไฟโคไซยานิน

แอลโลไฟโคไซยานิน (allophycocyanin) เป็นสารสี (pigment) ประกอบด้วย

หน่วยย่อยแอลฟาและบีตา (alpha and beta subunit) ซึ่งดูคลิ่นแสงเพื่อการสังเคราะห์แสง ไม่พบในพีชชั้นสูง แต่พบเฉพาะในไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีแดงเท่านั้น แอลโลไฟโคไซยานิน สามารถยับยั้งเอส-180 คาร์ซิโนมา (S-180 carcinoma) ในหนูทดลอง มีรายงานการแสดงออก ของยีนสร้างหน่วยย่อยแอลฟาและบีตาของแอลโลไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรีย *Arthrospira (Spirulina) maxima* ในคลอโรพลาสต์ของ *C. reinhardtii* พบว่าสามารถสะสมประมาณ 2-3% ของโปรตีนละลายน้ำทั้งหมด [83]

## 5) อิริโทรโปอีทิน

พันธุวิศวกรรมในนิวเคลียร์จีโนมของจุลสาหร่ายสีเขียว ได้ถูกนำมาใช้เพื่อการแสดงออก ของโปรตีนที่ใช้บำบัดโรคเช่นกัน มีข้อดีหลายอย่างเกี่ยวกับพันธุวิศวกรรมในนิวเคลียร์จีโนม โดยเฉพาะกระบวนการกลัยโคซิเลชันของโปรตีน ซึ่งเกิดเมื่อโปรตีนเดินทางผ่านวิถีการหลั่ง (secretory pathway) ER และ กอลจิ (golgi) กลัยโคซิเลชันมีความสำคัญต่อการพับ การทำหน้าที่ และความเสถียรของโปรตีน ตัวอย่าง เช่น อิริโทรโปอีทิน (erythropoietin) ของมนุษย์เป็นฮอร์โมน กลัยโคโปรตีน (glycoprotein) ที่ใช้ในการรักษาโรคโลหิตจางที่เกิดจากไตวายหรือรักษาโรคมะเร็ง ปัจจุบันอิริโทรโปอีทินผลิตจากเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม อย่างไรก็ตาม อิริโทรโปอีทินของมนุษย์ สามารถผลิตจากยีนที่แสดงออกในนิวเคลียร์จีโนมของ *C. reinhardtii* และประสบความสำเร็จ ในการหลั่งออกนอกเซลล์สู่อาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร ( $\mu\text{g/L}$ ) อิริโทรโปอีทินที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับของมนุษย์ [84]

### 4.5.2 ผลิตภัณฑ์รีคอมบิแนนท์วัคซีน

รีคอมบิแนนท์โปรตีนมีหลายชนิดที่ผลิตในจุลสาหร่ายและมีศักยภาพในการใช้เป็นวัคซีน ต่อต้านไวรัส แบคทีเรีย มาลาเรีย และโรคติดต่ออื่น ๆ เป็นต้น

#### 1) วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย

โรคปากและเท้าเปื่อย (foot and mouth disease) เป็นโรคสำคัญในปศุสัตว์ เพื่อสร้าง วัคซีนต้านโรคนี้นักวิจัยได้ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนใน *C. reinhardtii* มีการใช้ยีนสร้างโปรตีน VP1 จากไวรัสก่อโรคปากและเท้าเปื่อย มาเชื่อมรวม (fused) กับยีนสร้างหน่วยย่อยบีของ คอเลราทอกซิน (cholera toxin B subunit หรือ CTB) ซึ่งเป็นสารเสริมฤทธิ์เยื่อเมือก (mucosal adjuvant) อย่างแรงที่จับกับเยื่อผิวของลำไส้ พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน VP1-CTB ผลิต และสะสมในคลอโรพลาสต์ของ *C. reinhardtii* ได้ถึง 3% ของโปรตีนละลายน้ำทั้งหมด [85]

## 2) วัคซีนป้องกัน *Staphylococcus aureus*

แบคทีเรีย *S. aureus* ก่อโรคทางเดินหายใจ ผิวหนังติดเชื้อ และอาหารเป็นพิษ เมื่อนำยีนที่สร้างโดเมนสำหรับจับดี 2 โฟโบรเนกติน (D2 fibronectin-binding domain) ของ *S. aureus* มาเชื่อมรวมกับยีนที่สร้าง CTB แล้วนำมาแสดงออกในคลอโรพลาสต์ของ *C. reinhardtii* พบว่าสะสม D2-CTB ถึง 0.7% ของโปรตีนละลายน้ำทั้งหมด เมื่อให้วัคซีน D2-CTB ที่ผลิตจากจุลสาหร่ายแก่หนูทดลองทางปาก พบว่าสามารถกระตุ้นทั้ง IgA และ IgG นอกจากนี้ยังปกป้องหนูจาก *S. aureus* ในขนาดถึงตาย (lethal dose) ได้ [86] ซึ่งเป็นครั้งแรกที่แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของวัคซีนให้ทางปากที่ผลิตจากจุลสาหร่าย

## 3) วัคซีนโรคไวรัสดวงขาว

ไวรัสก่อโรคดวงขาว (white spot syndrome virus หรือ WSSV) ในกุ้ง ส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมเลี้ยงกุ้งทั่วโลก เพื่อทำวัคซีนจึงใช้ VP28 ซึ่งเป็นโปรตีนหลักในเปลือกหุ้มไวรัส (viral envelope protein) มาผลิตในคลอโรพลาสต์ของ *C. reinhardtii* และในนิวเคลียร์จีโนมของ *D. salina* พบว่าในคลอโรพลาสต์ของ *C. reinhardtii* มี VP28 สะสมถึง 21% ของโปรตีนทั้งหมด [87] และในนิวเคลียร์จีโนมของ *D. salina* มี VP28 สะสมถึง 3 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัม (ng/mg) ของโปรตีนทั้งหมด [88] เมื่อนำลีสเสต (lysate) ของ *D. salina* ดังกล่าวมาทดลองกับกุ้งโดยให้ทางปาก แล้วต่อมาถูกทำลายด้วย WSSV พบว่าอัตราการรอดของกุ้งที่ได้รับวัคซีนดังกล่าวสูงขึ้น (อัตราการตาย 59%) กว่ากลุ่มควบคุมเมื่อถูกทำลายด้วย WSSV ซึ่งมีอัตราการตาย 100% [88] ดังนั้น วัคซีนที่ผลิตจากจุลสาหร่ายดังกล่าว เมื่อให้ทางปากสามารถป้องกันโรคที่เกิดจากไวรัสได้

## 4) วัคซีนโรคมาลาเรีย

โรคมาลาเรีย (malaria) เกิดจากการติดเชื้อ *Plasmodium* ซึ่งมีอยู่เป็นพาหะ เป็นโรคที่คุกคามประชากรครึ่งหนึ่งของโลก มีความพยายามกำจัดโรคมาลาเรียโดยพุ่งความสนใจไปที่ยาฆ่าแมลงกำจัดยุงและวัคซีนต้านเชื้อ *Plasmodium* กลยุทธ์ที่มีแนวโน้มเป็นไปได้ที่จะกำจัดโรคมาลาเรีย ได้แก่ การผสมผสานระหว่างวัคซีนที่ปิดกั้นการแพร่เชื้อ (transmission blocking vaccine) และการบำบัดรักษาผู้ป่วยด้วยยาโปรตีน Pfs25 ซึ่งมีศักยภาพในการใช้เป็นวัคซีนที่ปิดกั้นการแพร่เชื้อ เป็นโปรตีนที่ผ่านกลัยโคซิเลชัน มีการพบที่จับซ้อนประกอบด้วยหลายพันธะไดซัลไฟด์ และผลิตโดยใช้ระบบที่ใช้ผลิตโปรตีนในปัจจุบันได้ยาก เมื่อนำมาแสดงออกในนิวเคลียร์จีโนมของ *C. reinhardtii* พบว่าโปรตีน Pfs25 สามารถพับอย่างถูกต้องสำหรับการกระตุ้นให้เกิดแอนติบอดีที่ปิดกั้นการแพร่เชื้อในหนูทดลองที่ได้รับวัคซีน Pfs25 นั่นคือสามารถผลิตแอนติบอดี

ที่จำเพาะต่อแอนติเจน Pfs25 นอกจากนี้แอนติบอดีที่ได้จากการต้านโปรตีน Pfs25 ที่ผลิตจากจุลสาหร่ายสามารถปิดกั้นการแพร่เชื้อเซลล์ไข่ (oocytes) ของ *Plasmodium* อย่างสมบูรณ์ [89]

### 4.5.3 ผลิตภัณฑ์เอนไซม์สำหรับอุตสาหกรรม

#### 1) เอนไซม์ไฟเทส

เนื่องจากปศุสัตว์ที่มีกระเพาะเดี่ยว เช่น สัตว์ปีกและสุกร ไม่มีเอนไซม์ย่อยฟอสเฟตในธัญพืชซึ่งอยู่ในรูปไฟเทต (phytate) ให้เป็นฟอสเฟตอิสระ เพื่อเพิ่มไฟเทตฟอสฟอรัส (phytate phosphorus) จากธัญพืช ทำให้ประสิทธิภาพการย่อยและดูดซึมสารอาหารของสัตว์ดีขึ้น และช่วยลดต้นทุนในการผลิตสัตว์ จึงใช้เอนไซม์ไฟเทส (phytase) เป็นอาหารเสริมสำหรับเลี้ยงสัตว์อย่างแพร่หลาย มีการนำเอนไซม์ไฟเทส AppA จาก *E. coli* มาผลิตใน *C. reinhardtii* และเมื่อเลี้ยงลูกเจี๊ยบไก่เนื้อด้วยอาหารปกติที่เสริมด้วย AppA ที่ผลิตจากจุลสาหร่าย พบว่ามีปริมาณของไฟเทตลดลงและพบฟอสเฟตอนินทรีย์ (inorganic phosphate) สูงขึ้นในมูลสัตว์ แสดงให้เห็นว่า AppA ที่แสดงออกในจุลสาหร่ายสามารถย่อยไฟเทตในระบบทางเดินอาหารและสามารถใช้จุลสาหร่ายเป็นอาหารเสริมโดยตรงโดยไม่ต้องสกัดเป็นโปรตีนบริสุทธิ์ [90]

#### 2) เอนไซม์ไซลานเนส

ในอุตสาหกรรมมีการใช้เอนไซม์ไซลานเนส (xylanase:  $\beta$ -1,4-endoxylanase) เพื่อย่อยเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ในการทำขนมอบ เครื่องดื่ม สิ่งทอ เยื่อกระดาษและกระดาษ และอาจนำไปใช้สำหรับการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพจากเซลลูโลส (cellulose) ในอนาคต การใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ไซลานเนสในหลายกรณีต้องการใช้เอนไซม์สกัดบริสุทธิ์ จึงมีการถ่ายโอนยีนสร้างเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อรา *Trichoderma reesei* เข้าสู่นิวเคลียร์จีโนมของ *C. reinhardtii* เพื่อให้หลังรีคอมบิแนนท์ไซลานเนสออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ โดยนำยีนสร้างไซลานเนสที่ปรับโคดอนแล้วมาเชื่อมรวมกับยีนสร้างเปปไทด์ส่งสัญญาณการหลั่ง (secretion signal peptide หรือ Sp) ของโปรตีนเอนโดจินัสเอริลซัลฟาเทส 1 (endogenous arylsulfatase 1) จาก *C. reinhardtii* (Sp-xyn) เพื่อป้องกันยีนไซลานเนสซึ่งมักเป็นอุปสรรคต่อการแสดงออกของเฮเทอโรโลจิสต์ยีนในนิวเคลียร์จีโนม จึงได้นำ Sp-xyn มาเชื่อมต่อบนระดับถอดรหัส (transcriptionally fused) กับ Ble ซึ่งเป็นเครื่องหมายคัดเลือก นอกจากนี้นำเปปไทด์ 2A จากไวรัส ซึ่งเป็นตัวตัดเปปไทด์ (self-processing viral peptide) มาแทรกระหว่าง Ble และ Sp-xyn ซึ่งนำไปสู่การตัด Sp-xyn ออกจาก Ble และหลังส่วนไซลานเนสออกนอกเซลล์สู่อาหารเลี้ยงเชื้อ การมีส่วนร่วมของ Ble-2A ทำให้กิจกรรมของไซลานเนสเพิ่มขึ้น 100 เท่าเมื่อเทียบกับไม่มี [6]

#### 4.5.4 ไบโอดีเซล

เนื่องจากจุลสาหร่ายมีการเจริญเติบโตและให้ชีวมวลสูงกว่าพืชชั้นสูง จึงเป็นทางเลือกสำหรับใช้เป็นแหล่งผลิตและ TAG เพื่อผลิตไบโอดีเซล มีการใช้พันธุวิศวกรรมเพื่อเพิ่มการผลิต TAG ในจุลสาหร่าย เช่น เพิ่มการแสดงออกของยีนในวิถีเคนเนดี (Kennedy pathway) ที่สังเคราะห์ TAG การยับยั้งการสร้างแป้ง (starch) และการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ไลเปส (lipase) เป็นต้น (ดูรายละเอียดในบทที่ 5 เชื้อเพลิงชีวภาพจากไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่าย)

#### 4.6 บทสรุป

ในจุลสาหร่ายการแสดงออกของยีนในนิวเคลียสเป็นแบบยูแคริโอต และในคลอโรพลาสต์เป็นแบบโพรแคริโอตที่มีกลไกพับโปรตีน คลอโรพลาสต์ของจุลสาหร่ายจึงมีลักษณะพิเศษเฉพาะนำมาประยุกต์ผลิตโปรตีนบางชนิด ที่ไม่มีระบบผลิตโปรตีนอื่นใดจะทำได้ เช่น อิมมูโนทอกซิน ซึ่งไม่สามารถผลิตได้ในเซลล์ยูแคริโอตเพราะเป็นพิษต่อเซลล์ และไม่สามารถใช้ระบบการผลิตโปรตีนในโพรแคริโอตแบบ *E. coli* เพราะไม่สามารถพับโปรตีนเชิงซ้อนได้อย่างถูกต้อง ส่วนพันธุวิศวกรรมในนิวเคลียร์จีโนมของจุลสาหร่ายโดยใช้เฮเทอโรโลกัสียนยังมีข้อจำกัด เช่น การเกิดยีนไซเลนซิง หรือการแสดงออกของยีนอย่างไม่มีประสิทธิภาพโดยไม่ทราบสาเหตุ ทำให้มีการสะสมของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในระดับต่ำ จึงเป็นคอขวดที่ต้องแก้ไข หากสามารถทำพันธุวิศวกรรมในจุลสาหร่ายด้วยเฮเทอโรโลกัสียนที่เป็นส่วนประกอบของวิเมแทบอลิก จะทำให้จุลสาหร่ายสร้างสารใหม่ ๆ ที่มีมูลค่าได้ แม้จะมีความรู้เกี่ยวกับจุลสาหร่ายเพิ่มขึ้นมาก แต่การทำให้เฮเทอโรโลกัสียนแสดงออกในระดับสูงยังคงเป็นเรื่องยาก ทั้งนี้อาจเกิดจากกลไกเอพิเจเนติกส์ ซึ่งความรู้ใหม่ ๆ เป็นส่วนสำคัญที่จะช่วยแก้ไขปัญหาดังกล่าว เช่น การพัฒนาวิธีการที่ดีกว่าสำหรับการทำยีนนิ่งออกด้วยใช้การรบกวนอาร์เอ็นเอ (RNAi) และการตัดยีนออก (gene deletion) อย่างเจาะจง โดยใช้การแทนที่ด้วยยีน (gene replacement) จะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาจุลสาหร่ายเพื่อการประยุกต์หรือการวิจัยพื้นฐาน การปฏิวัติวิธีปรับแต่งจีโนม (genome editing) โดยใช้ระบบ CRISPR-Cas9 อาจนำมาปรับใช้กับจุลสาหร่ายในอนาคตอันใกล้ สุดท้ายนี้ความก้าวหน้าอย่างรวดเร็วในด้านโอมิิกส์ของจุลสาหร่ายจะเป็นเครื่องมือช่วยให้พันธุวิศวกรรมจุลสาหร่ายบรรลุเป้าหมายในอนาคต

## เอกสารอ้างอิง

1. De Alda JAO, Esteban R, Diago ML, Houmard J. The plastid ancestor originated among one of the major cyanobacterial lineages. *Nature Commun.* 2014; 5: 4937.
2. Pulz O, Gross W. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004; 65: 635-648.
3. Stevens DR, Purton S, Rochaix J-D. The bacterial phleomycin resistance gene *ble* as a dominant selectable marker in *Chlamydomonas*. *Mol Gen Genet.* 1996; 251: 23-30.
4. Schroda M, Blöcker D, Beck CF. The *HSP70A* promoter as a tool for the improved expression of transgenes in *Chlamydomonas*. *Plant J.* 2000; 21: 121-131.
5. Schroda M, Beck CF, Vallon O. Sequence elements within an *HSP70* promoter counteract transcriptional transgene silencing in *Chlamydomonas*. *Plant J.* 2002; 31: 445-455.
6. Rasala BA, Lee PA, Shen Z, Briggs SP, Mendez M, Mayfield SP. Robust expression and secretion of Xylanase 1 in *Chlamydomonas reinhardtii* by fusion to a selection gene and processing with the FMDV 2A peptide. *PloS one.* 2012; 7: e43349.
7. Quinn JM, Kropat J, Merchant S. Copper response element and Crr1-dependent Ni<sup>2+</sup>-responsive promoter for induced, reversible gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell.* 2003; 2: 995-1002.
8. Tardif M, Atteia A, Specht M, Cogne G, Rolland N, Brugière S, Hippler M, Ferro M, Bruley C, Peltier G. PredAlgo: a new subcellular localization prediction tool dedicated to green algae. *Mol Biol Evol.* 2012: mss178.
9. Gruber A, Roca G, Kroth PG, Armbrust E, Mock T. Plastid proteome prediction for diatoms and other algae with secondary plastids of the red lineage. *Plant J.* 2015; 81: 519-528.
10. Rasala BA, Chao S-S, Pier M, Barrera DJ, Mayfield SP. Enhanced genetic tools for engineering multigene traits into green algae. *PloS one.* 2014; 9: e94028.
11. Berthold P, Schmitt R, Mages W. An engineered *Streptomyces hygrosopicus aph 7* gene mediates dominant resistance against hygromycin B in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protist.* 2002; 153: 401-412.
12. Doron L, Segal Na, Shapira M. Transgene expression in microalgae - from tools to applications. *Front Plant Sci.* 2016; 7: 505.
13. Mayfield SP, Schultz J. Development of a luciferase reporter gene, *luxCt*, for *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Plant J.* 2004; 37: 449-458.
14. Eberhard S, Drapier D, Wollman FA. Searching limiting steps in the expression of chloroplast-encoded proteins: relations between gene copy number, transcription, transcript abundance and translation rate in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 2002; 31: 149-160.

15. Rasala BA, Mayfield SP. Photosynthetic biomanufacturing in green algae; production of recombinant proteins for industrial, nutritional, and medical uses. *Photosynth Res.* 2015; 123: 227-239.
16. Minoda A, Sakagami R, Yagisawa F, Kuroiwa T, Tanaka K. Improvement of culture conditions and evidence for nuclear transformation by homologous recombination in a red alga, *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Plant Cell Physiol.* 2004; 45: 667-671.
17. Kilian O, Benemann CS, Niyogi KK, Vick B. High-efficiency homologous recombination in the oil-producing alga *Nannochloropsis* sp. *Proc Natl Acad Sci.* 2011; 108: 21265-21269.
18. Chungjatupornchai W, Kitraksa P, Fa-aoonsawat S. Stable nuclear transformation of the oleaginous microalga *Neochloris oleoabundans* by electroporation. *J Appl Phycol.* 2016; 28: 191-199.
19. Tang D, Qiao S-Y, Wu M. Insertion mutagenesis of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation and heterologous DNA. *Biochem Mol Biol Int.* 1995; 36: 1025-1035.
20. Te MR, Miller DJ. Genetic transformation of dinoflagellates (*Amphidinium* and *Symbiodinium*): expression of *GUS* in microalgae using heterologous promoter constructs. *Plant J.* 1998; 13: 427-435.
21. El-Sheekh M. Stable transformation of the intact cells of *Chlorella kessleri* with high velocity microprojectiles. *Biol Plant.* 1999; 42: 209-216.
22. Tan C, Qin S, Zhang Q, Jiang P, Zhao F. Establishment of a micro-particle bombardment transformation system for *Dunaliella salina*. *J Microbiol-Seoul.* 2005; 43: 361.
23. Quinn JM, Merchant S. Two copper-responsive elements associated with the *Chlamydomonas Cyc6* gene function as targets for transcriptional activators. *Plant Cell.* 1995; 7: 623-628.
24. Hallmann A, Wodniok S. Swapped green algal promoters: aphVIII-based gene constructs with *Chlamydomonas* flanking sequences work as dominant selectable markers in *Volvox* and vice versa. *Plant Cell Rep.* 2006; 25: 582-591.
25. Lerche K, Hallmann A. Stable nuclear transformation of *Gonium pectorale*. *BMC Biotechnol.* 2009; 9: 64.
26. Hall LM, Taylor KB, Jones DD. Expression of a foreign gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Gene.* 1993; 124: 75-81.
27. Miyagawa-Yamaguchi A, Okami T, Kira N, Yamaguchi H, Ohnishi K, Adachi M. Stable nuclear transformation of the diatom *Chaetoceros* sp. *Phycol Res.* 2011; 59: 113-119.
28. Fischer N, Rochaix J-D. The flanking regions of *PsaD* drive efficient gene expression in the nucleus of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Genet Genomics.* 2001; 265: 888-894.

29. Blankenship JE, Kindle KL. Expression of chimeric genes by the light-regulated *cabII-1* promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*: a *cabII-1/nit1* gene functions as a dominant selectable marker in a *nit1<sup>-</sup>nit2<sup>-</sup>* strain. *Mol Cell Biol.* 1992; 12: 5268-5279.
30. León-Bañares R, González-Ballester D, Galván A, Fernández E. Transgenic microalgae as green cell-factories. *Trends Biotechnol.* 2004; 22: 45-52.
31. Gong Y, Hu H, Gao Y, Xu X, Gao H. Microalgae as platforms for production of recombinant proteins and valuable compounds: progress and prospects. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2011; 38: 1879-1890.
32. Coll J. Methodologies for transferring DNA into eukaryotic microalgae: a review. *Span J Agric Res.* 2006; 4: 316-330.
33. Sodeinde OA, Kindle KL. Homologous recombination in the nuclear genome of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci.* 1993; 90: 9199-9203.
34. Debuchy R, Purton S, Rochaix J. The argininosuccinate lyase gene of *Chlamydomonas reinhardtii*: an important tool for nuclear transformation and for correlating the genetic and molecular maps of the *ARG7* locus. *EMBO J.* 1989; 8: 2803-2809.
35. Kindle KL. High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci.* 1990; 87: 1228-1232.
36. Brown LE, Sprecher S, Keller L. Introduction of exogenous DNA into *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. *Mol Cell Biol.* 1991; 11: 2328-2332.
37. Dunahay T. Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* with silicon carbide whiskers. *BioTechniques.* 1993; 15: 452-455.
38. Pratheesh P, Vineetha M, Kurup GM. An efficient protocol for the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Biotechnol.* 2014; 56: 507-515.
39. Boynton JE, Gillham NW, Harris EH, Hosler JP, Johnson AM, Jones AR, Randolph-Anderson BL, Robertson D, Klein TM, Shark KB. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science.* 1988; 240: 1534-1538.
40. Randolph-Anderson BL, Boynton JE, Gillham NW, Harris EH, Johnson AM, Dorthu M-P, Matagne RF. Further characterization of the respiratory deficient *dum-1* mutation of *Chlamydomonas reinhardtii* and its use as a recipient for mitochondrial transformation. *Mol Gen Genet.* 1993; 236: 235-244.
41. Dawson HN, Burlingame R, Cannons AC. Stable transformation of *Chlorella*: rescue of nitrate reductase-deficient mutants with the nitrate reductase gene. *Curr Microbiol.* 1997; 35: 356-362.
42. Chow K-C, Tung W. Electrotransformation of *Chlorella vulgaris*. *Plant Cell Rep.* 1999; 18: 778-780.



43. Geng D, Wang Y, Wang P, Li W, Sun Y. Stable expression of hepatitis B surface antigen gene in *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *J Appl Phycol*. 2003; 15: 451-456.
44. Georgianna DR, Hannon MJ, Marcuschi M, Wu S, Botsch K, Lewis AJ, Hyun J, Mendez M, Mayfield SP. Production of recombinant enzymes in the marine alga *Dunaliella tertiolecta*. *Algal Res*. 2013; 2: 2-9.
45. Steinbrenner J, Sandmann G. Transformation of the green alga *Haematococcus pluvialis* with a phytoene desaturase for accelerated astaxanthin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol*. 2006; 72: 7477-7484.
46. Kathiresan S, Chandrashekar A, Ravishankar G, Sarada R. Regulation of astaxanthin and its intermediates through cloning and genetic transformation of  $\beta$ -carotene ketolase in *Haematococcus pluvialis*. *J Biotechnol*. 2015; 196: 33-41.
47. Gutierrez CL, Gimpel J, Escobar C, Marshall SH, Henríquez V. Chloroplast genetic tool for the green microalgae *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Volvocales) 1. *J Phycol*. 2012; 48: 976-983.
48. Corellou F, Schwartz C, Motta J-P, Sanchez F, Bouget F-Y. Clocks in the green lineage: comparative functional analysis of the circadian architecture of the picoeukaryote *Ostreococcus*. *Plant Cell*. 2009; 21: 3436-3449.
49. Cui Y, Qin S, Jiang P. Chloroplast transformation of *Platymonas (Tetraselmis) subcordiformis* with the *bar* gene as selectable marker. *PloS one*. 2014; 9: e98607.
50. Guo S-L, Zhao X-Q, Tang Y, Wan C, Alam MA, Ho S-H, Bai F-W, Chang J-S. Establishment of an efficient genetic transformation system in *Scenedesmus obliquus*. *J Biotechnol*. 2013; 163: 61-68.
51. Prasad B, Vadakedath N, Jeong H-J, General T, Cho M-G, Lein W. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of haptophytes (*Isochrysis* species). *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014; 98: 8629-8639.
52. Dunahay TG, Jarvis EE, Roessler PG. Genetic transformation of the diatoms *Cyclotella cryptica* and *Navicula saprophila*. *J Phycol*. 1995; 31: 1004-1012.
53. Zhang C, Hu H. High-efficiency nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricorutum* by electroporation. *Mar Genom*. 2014; 16: 63-66.
54. Apt KE, Grossman A, Kroth-Pancic P. Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Mol Gen Genet*. 1996; 252: 572-579.
55. Xie W-H, Zhu C-C, Zhang N-S, Li D-W, Yang W-D, Liu J-S, Sathishkumar R, Li H-Y. Construction of novel chloroplast expression vector and development of an efficient transformation system for the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Mar Biotechnol*. 2014; 16: 538-546.
56. Karas BJ, Diner RE, Lefebvre SC, McQuaid J, Phillips AP, Noddings CM, Brunson JK, Valas RE, Deerinck TJ, Jablanovic J. Designer diatom episomes delivered by bacterial conjugation. *Nature Commun*. 2015; 6: 6925.

57. Falciatore A, Casotti R, Leblanc C, Abrescia C, Bowler C. Transformation of nonselectable reporter genes in marine diatoms. *Mar Biotechnol.* 1999; 1: 239-251.
58. Fischer H, Robl I, Sumper M, Kröger N. Targeting and covalent modification of cell wall and membrane proteins heterologously expressed in the diatom *Cylindrotheca fusiformis* (Bacillariophyceae). *J Phycol.* 1999; 35: 113-120.
59. Doetsch NA, Favreau MR, Kuscuoglu N, Thompson MD, Hallick RB. Chloroplast transformation in *Euglena gracilis*: splicing of a group III twintron transcribed from a transgenic *psbK* operon. *Curr Genet.* 2001; 39: 49-60.
60. Kumar SV, Misquitta RW, Reddy VS, Rao BJ, Rajam MV. Genetic transformation of the green alga—*Chlamydomonas reinhardtii* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Sci.* 2004; 166: 731-738.
61. Cerutti H, Johnson AM, Gillham NW, Boynton JE. A eubacterial gene conferring spectinomycin resistance on *Chlamydomonas reinhardtii*: integration into the nuclear genome and gene expression. *Genetics.* 1997; 145: 97-110.
62. Goldschmidt-Clermont M. Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: a selectable marker for site-directed transformation of *Chlamydomonas*. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19: 4083-4089.
63. Bateman J, Purton S. Tools for chloroplast transformation in *Chlamydomonas*: expression vectors and a new dominant selectable marker. *Mol Gen Genet.* 2000; 263: 404-410.
64. Sun Y, Yang Z, Gao X, Li Q, Zhang Q, Xu Z. Expression of foreign genes in *Dunaliella* by electroporation. *Mol Biotechnol.* 2005; 30: 185-192.
65. Hallmann A, Rappel A. Genetic engineering of the multicellular green alga *Volvox*: a modified and multiplied bacterial antibiotic resistance gene as a dominant selectable marker. *Plant J.* 1999; 17: 99-109.
66. Kim D-H, Kim YT, Cho JJ, Bae J-H, Hur S-B, Hwang I, Choi T-J. Stable integration and functional expression of flounder growth hormone gene in transformed microalga, *Chlorella ellipsoidea*. *Mar Biotechnol.* 2002; 4: 63-73.
67. Li F, Gao D, Hu H. High-efficiency nuclear transformation of the oleaginous marine *Nannochloropsis* species using PCR product. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2014; 78: 812-817.
68. Remacle C, Cline S, Boutaffala L, Gabilly S, Larosa V, Barbieri MR, Coosemans N, Hamel PP. The *ARG9* gene encodes the plastid-resident N-acetyl ornithine aminotransferase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell.* 2009; 8: 1460-1463.
69. Franklin S, Ngo B, Efuet E, Mayfield SP. Development of a GFP reporter gene for *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Plant J.* 2002; 30: 733-744.

70. Matsuo T, Onai K, Okamoto K, Minagawa J, Ishiura M. Real-time monitoring of chloroplast gene expression by a luciferase reporter: evidence for nuclear regulation of chloroplast circadian period. *Mol Cell Biol.* 2006; 26: 863-870.
71. Fuhrmann M, Oertel W, Hegemann P. A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 1999; 19: 353-361.
72. Fuhrmann M, Hausherr A, Ferbitz L, Schödl T, Heitzer M, Hegemann P. Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene. *Plant Mol Biol.* 2004; 55: 869-881.
73. Ruecker O, Zillner K, Groebner-Ferreira R, Heitzer M. Gaussia-luciferase as a sensitive reporter gene for monitoring promoter activity in the nucleus of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Genet Genomics.* 2008; 280: 153-162.
74. Zaslavskaja LA, Lippmeier JC, Kroth PG, Grossman AR, Apt KE. Transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) with a variety of selectable marker and reporter genes. *J Phycol.* 2000; 36: 379-386.
75. Tornabene T, Holzer G, Lien S, Burris N. Lipid composition of the nitrogen starved green alga *Neochloris oleoabundans*. *Enzyme Microb Technol.* 1983; 5: 435-440.
76. Gurskaya N, Fradkov A, Pounkova N, Staroverov D, Bulina M, Yanushevich Y, Labas Y, Lukyanov S, Lukyanov K. A colourless green fluorescent protein homologue from the non-fluorescent hydromedusa *Aequorea coerulea* and its fluorescent mutants. *Biochem J.* 2003; 373: 403-408.
77. Brunke K, Anthony J, Sternberg E, Weeks D. Repeated consensus sequence and pseudopromoters in the four coordinately regulated tubulin genes of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Cell Biol.* 1984; 4: 1115-1124.
78. Odell JT, Nagy F, Chua N-H. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature.* 1985; 313: 810-812.
79. Mayfield SP, Franklin SE, Lerner RA. Expression and assembly of a fully active antibody in algae. *Proc Natl Acad Sci.* 2003; 100: 438-442.
80. Tran M, Zhou B, Pettersson PL, Gonzalez MJ, Mayfield SP. Synthesis and assembly of a full-length human monoclonal antibody in algal chloroplasts. *Biotechnol Bioeng.* 2009; 104: 663-673.
81. Tran M, Van C, Barrera DJ, Pettersson PL, Peinado CD, Bui J, Mayfield SP. Production of unique immunotoxin cancer therapeutics in algal chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci.* 2013; 110: E15-E22.
82. Rasala BA, Muto M, Lee PA, Jager M, Cardoso RM, Behnke CA, Kirk P, Hokanson CA, Crea R, Mendez M. Production of therapeutic proteins in algae, analysis of expression of seven

- human proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Biotechnol J. 2010; 8: 719-733.
83. Su ZL, Qian KX, Tan CP, Meng CX, Qin S. Recombination and heterologous expression of allophycocyanin gene in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. Acta Biochim Biophys Sin. 2005; 37: 709-712.
84. Eichler-Stahlberg A, Weisheit W, Ruecker O, Heitzer M. Strategies to facilitate transgene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. Planta. 2009; 229: 873-883.
85. Sun M, Qian K, Su N, Chang H, Liu J, Shen G. Foot-and-mouth disease virus VP1 protein fused with cholera toxin B subunit expressed in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. Biotechnol Lett. 2003; 25: 1087-1092.
86. Dreesen IA, Charpin-El Hamri G, Fussenegger M. Heat-stable oral alga-based vaccine protects mice from *Staphylococcus aureus* infection. J Biotechnol. 2010; 145: 273-280.
87. Surzycki R, Greenham K, Kitayama K, Dibal F, Wagner R, Rochaix J-D, Ajam T, Surzycki S. Factors effecting expression of vaccines in microalgae. Biologicals. 2009; 37: 133-138.
88. Feng S, Feng W, Zhao L, Gu H, Li Q, Shi K, Guo S, Zhang N. Preparation of transgenic *Dunaliella salina* for immunization against white spot syndrome virus in crayfish. Arch Virol. 2014; 159: 519-525.
89. Gregory JA, Li F, Tomosada LM, Cox CJ, Topol AB, Vinetz JM, Mayfield S. Algae-produced Pfs25 elicits antibodies that inhibit malaria transmission. PloS one. 2012; 7: e37179.
90. Yoon S-M, Kim SY, Li KF, Yoon BH, Choe S, Kuo MM-C. Transgenic microalgae expressing *Escherichia coli* AppA phytase as feed additive to reduce phytate excretion in the manure of young broiler chicks. Appl Microbiol Biotechnol. 2011; 91: 553-563.

# เชื้อเพลิงชีวภาพจากไซยาโนแบคทีเรีย และจุลสาหร่าย

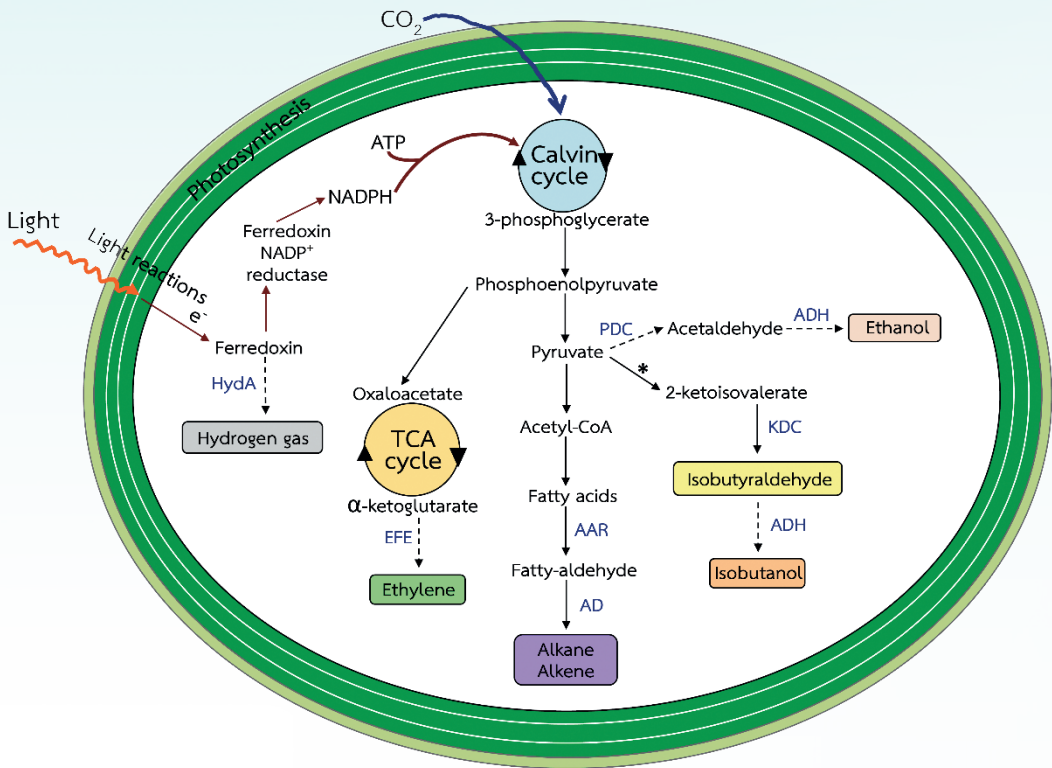
## 5.1 บทนำ

เนื่องจากเชื้อเพลิงฟอสซิล (fossil fuel) มีปริมาณลดลงและมีราคาผันผวน ประกอบกับความกังวลด้านความมั่นคงทางพลังงาน ภาวะมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมและการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศจากการใช้เชื้อเพลิงฟอสซิล ทำให้เกิดการแสวงหาและพัฒนาเชื้อเพลิงทางเลือก เพื่อมาทดแทนเชื้อเพลิงฟอสซิล เชื้อเพลิงทางเลือกที่ได้รับความนิยมมากชนิดหนึ่งคือเชื้อเพลิงชีวภาพ (biofuel) ซึ่งสามารถหมุนเวียน มีความยั่งยืน และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เชื้อเพลิงชีวภาพส่วนใหญ่ได้จากวัตถุดิบที่เป็นอาหาร เช่น ได้จากการหมักน้ำตาลที่ได้จากธัญพืชโดยใช้ยีสต์ หรือปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน (transesterification) ของน้ำมันพืชหรือสัตว์โดยเป็นวิธีดั้งเดิม จึงถือเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพรุ่นแรก (first generation biofuels) ซึ่งส่งผลกระทบต่อความมั่นคงทางอาหาร เกิดปัญหาความขัดแย้งระหว่างการใช้เป็นอาหารกับการใช้เป็นพลังงาน เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว จึงเกิดเชื้อเพลิงชีวภาพรุ่นที่สอง (second generation biofuels) ซึ่งใช้วัตถุดิบที่มีชี้อาหาร เช่น น้ำมันพืชที่มีชี้อาหาร ของเสียจากน้ำมันพืชใช้แล้ว และชีวมวลลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose biomass) ต่อมาเกิดเชื้อเพลิงชีวภาพรุ่นที่สามและสี่ (third and fourth generation biofuels) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการใช้จุลชีพสังเคราะห์แสงในการสร้างเชื้อเพลิงหมุนเวียน โดยเชื้อเพลิงชีวภาพรุ่นที่สามเป็นการใช้ชีวมวลจากไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายในกระบวนการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายสามารถสังเคราะห์แสง ตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ให้เป็นเชื้อเพลิงโดยใช้พลังงานจากแสงอาทิตย์ เจริญเติบโตได้ในน้ำเค็มหรือน้ำทิ้งโดยไม่ต้องใช้ที่ดินในการเพาะปลูก และให้ผลผลิตชีวมวลสูงกว่าพืชบก จึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะใช้เป็นวัตถุดิบ

สำหรับผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ ส่วนเชื้อเพลิงชีวภาพรุ่นที่สี่เกี่ยวข้องกับวิศวกรรมเมแทบอลิก (metabolic engineering) ของไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่าย เพื่อการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ [1, 2] โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาจัดการเพิ่มหรือลดการแสดงออกของยีนที่มีผลกระทบต่อวิถีเมแทบอลิก (metabolic pathway) เป้าหมาย (รายละเอียดเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในไซยาโนแบคทีเรียดูบทที่ 3 และในจุลสาหร่ายดูบทที่ 4) ในบทนี้จะกล่าวถึงการใช้พันธุวิศวกรรมในวิถีเมแทบอลิกของไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่าย เพื่อผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพต่าง ๆ รวมทั้งกรณีศึกษา

## 5.2 เชื้อเพลิงชีวภาพจากไซยาโนแบคทีเรีย

การทำพันธุวิศวกรรมในไซยาโนแบคทีเรียมีข้อได้เปรียบกว่าจุลสาหร่ายซึ่งเป็นยูแคริโอต (eukaryote) เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียมีการพัฒนาวิธีทำพันธุวิศวกรรมที่ดีกว่าและไม่ซับซ้อน พันธุวิศวกรรมในไซยาโนแบคทีเรียเพื่อใช้ผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพต่าง ๆ ได้แก่ ไฮโดรเจน (hydrogen) เอทานอล (ethanol) เอทิลีน (ethylene) ไอโซบิวทิลดีไฮด์และไอโซบิวทานอล (isobutyraldehyde และ isobutanol) และแอลเคน (alkane) (ดังแสดงในรูปที่ 5-1) การสังเคราะห์เชื้อเพลิงชีวภาพเหล่านี้ได้ถูกรวมเข้ากับวิถีเมแทบอลิกรวมชาติของไซยาโนแบคทีเรีย ทั้งที่เป็นปฐมภูมิ (primary) และทุติยภูมิ (secondary) โดยเฉพาะจุดต่อใหญ่สองจุดของเมแทบอลิกที่ควบคุมคาร์บอนฟลักซ์ (carbon flux) สำหรับการสังเคราะห์เชื้อเพลิงชีวภาพ ได้แก่ จุดต่อไพรูเวต (pyruvate) และ แอซิติลโคเอ (acetyl-CoA) ปัจจุบันวิศวกรรมเมแทบอลิกในไซยาโนแบคทีเรียได้มุ่งความสนใจไปที่การใส่วิถีการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพเข้าไปยังเจ้าบ้านต้นแบบ ได้แก่ *Synechocystis* sp. PCC 6803 และ *Synechococcus elongatus* PCC 7942



รูปที่ 5-1 วิถีเมแทบอลิคที่ใช้ผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพในไซยาโนแบคทีเรีย

ลูกศรทึบ หมายถึง เอนไซม์หรือวิถีตามธรรมชาติ ลูกศรประ หมายถึง ต้องใช้รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ (recombinant enzyme) เชื้อเพลิงชีวภาพเป้าหมายได้แสดงไว้ในกรอบ เอนไซม์แทนด้วยสีน้ำเงิน  
 AD: aldehyde decarbonylase; AAR: acyl-ACP reductase; ADH: alcohol dehydrogenase;  
 HydA: [FeFe] hydrogenase; PDC: pyruvate decarboxylase; KDC: ketoacid decarboxylase;  
 EFE: ethylene-forming enzyme. \*: มิได้ระบุรายละเอียดของปฏิกิริยา ข้อมูลจาก [3-6]

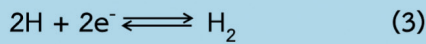
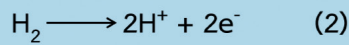
ที่มา: แผนภาพโดย วิภา จิงจตุพรชัย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

## 5.2.1 ไฮโดรเจน

ไฮโดรเจนเป็นเชื้อเพลิงที่มีความหนาแน่นของพลังงานมวล (mass energy density) สูงสุด ไม่ทำให้เกิดคาร์บอนไดออกไซด์หรือมลภาวะอื่น ๆ นำไปใช้ในการขับเคลื่อนยานอวกาศ และมีศักยภาพที่จะผลิตในเชิงพาณิชย์เพื่อการขนส่งทั้งภาคพื้นดินและทางอากาศ ไซยาโนแบคทีเรียผลิตไฮโดรเจนโดยใช้เอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ ไนโตรจีเนส (nitrogenase) อัฟเทกไฮโดรจีเนส (uptake hydrogenase) และไฮโดรจีเนสปฏิริยาสองทาง (bidirectional hydrogenase) [4, 7] (ดังแสดงในรูปที่ 5-2) เอนไซม์ไนโตรจีเนสตรังไนโตรเจนในสภาวะแวดล้อมที่เป็นแอนแอโรบิก (anaerobic) ภายในเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย แล้วให้ผลพลอยได้ (byproduct) เป็นไฮโดรเจน แต่อย่างไรก็ดีไฮโดรเจนที่ได้จะถูกรีออกซิไดซ์ (re-oxidized) อย่างรวดเร็วโดยเอนไซม์อัฟเทกไฮโดรจีเนส ส่วนเอนไซม์ไฮโดรจีเนสปฏิริยาสองทางได้อิเล็กตรอน (electron) โดยตรงจากเฟอร์รีดอกซิน (ferredoxin) หรือ NADPH ขึ้นอยู่กับชนิดของไฮโดรจีเนส [8] (ดังแสดงในรูปที่ 5-1) ข้อจำกัดหลักคือเอนไซม์ไฮโดรจีเนสปฏิริยาสองทางนี้ถูกยับยั้งโดยออกซิเจนที่ผลิตขึ้นในกระบวนการสังเคราะห์แสง นอกจากนี้การได้มาซึ่งเฟอร์รีดอกซินและ NADPH ก็เป็นคอขวด เนื่องจากเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับวิถีอื่น ๆ เช่น การหายใจ เป็นต้น การสร้างไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียพวกที่สร้างเฮเทอโรซิสต์ (heterocyst) จะมีประสิทธิภาพดีกว่าพวกที่ไม่สร้างเฮเทอโรซิสต์ มีไซยาโนแบคทีเรียมากกว่า 40 สายพันธุ์ (strains) ใน 14 จีนัส (genus) ที่สามารถผลิตไฮโดรเจนโดยธรรมชาติ แม้ว่าจะผลิตในระดับค่อนข้างต่ำ เช่น *Anabaena* sp., *Cyanothece* sp., *Nostoc* sp., *Synechocystis* sp. และ *Synechococcus* sp. เป็นต้น [9] เพื่อปรับปรุงให้ผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูงขึ้น จึงมีการทำพันธุวิศวกรรมให้ไซยาโนแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ไฮโดรจีเนสปฏิริยาสองทางจากจุลินทรีย์อื่น ๆ เพราะโดยธรรมชาติไซยาโนแบคทีเรียมีไฮโดรจีเนสชนิด [NiFe] ([NiFe] hydrogenase) ที่มักจะรับอิเล็กตรอนจาก NADPH มากกว่าจากเฟอร์รีดอกซินซึ่งให้พลังงานมากกว่า ตัวอย่างเช่น ใน *S. elongatus* PCC 7942 ที่สร้างไฮโดรจีเนส (HydA) ชนิด [FeFe] ([FeFe] hydrogenase) จาก *Clostridium acetobutylicum* (ดูรูปที่ 5-1) พบว่าสร้างไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นกว่า 500 เท่าภายใต้สภาวะแอนแอโรบิกภายนอกเซลล์ (*in vitro*) [4] และ *S. elongatus* PCC 7942 ที่สร้างไฮโดรจีเนสชนิด [NiFe] จาก *Alteromonas macleodii* ทำให้ทนทานต่อออกซิเจน 1-3% แต่อย่างไรก็ดี ยังไม่มีรายงานผลการผลิตไฮโดรเจน [10] การทำพันธุวิศวกรรมเพื่อผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น ส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับการเอาออก (deletion) ของยีน *hupL* ซึ่งสร้างเอนไซม์อัฟเทกไฮโดรจีเนส โดยทดลองในหลายสายพันธุ์ เช่น *Anabaena variabilis* ATCC 29413, *Nostoc* sp. PCC 7120, และ *Synechocystis* sp. PCC 6803 เป็นต้น ซึ่งล้วนแต่มีผลทำให้ผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้นเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ลักษณะปรกติ (wild type) [3]



นอกจากนี้วิถีการดูดซึมไนโตรเจน (nitrogen assimilation pathway) อาจมีผลลด อิเล็กตรอนสำหรับไฮโดรจีเนสส่งผลต่อการผลิตไฮโดรเจน เมื่อใช้วิธีทางพันธุวิศวกรรมทำให้วิถี การดูดซึมไนโตรเจนของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 หยุดชะงัก พบว่าเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ปฏิกริยาสองทางทำให้ผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น [11]



รูปที่ 5-2 ปฏิกริยาของเอนไซม์ผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรีย

เอนไซม์ไนโตรจีเนสเร่งปฏิกิริยา (1) ได้ไฮโดรเจน แต่ไฮโดรเจนที่ได้นี้ถูกรื้อออกซิไดซ์โดยเอนไซม์อ็อปเทก ไฮโดรจีเนสในปฏิกิริยา (2) เพื่อป้องกันการสะสมของไฮโดรเจนภายใต้สภาวะธรรมชาติ ส่วนเอนไซม์ ไฮโดรจีเนสชนิดปฏิกิริยาสองทาง ช่วยเร่งปฏิกิริยา (3) ข้อมูลจาก [4, 7]

ที่มา: แผนภาพโดย วิภา จิงจตุพรชัย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

## 5.2.2 เอทานอล

เอทานอลเป็นเชื้อเพลิงที่เผาไหม้สมบูรณ์กว่าเชื้อเพลิงทั่วไปและไร้สารมลพิษ สามารถ ผสมกับน้ำมันเบนซินหรือน้ำมันดีเซลในสัดส่วนต่าง ๆ ตามการเลือกใช้ของแต่ละประเทศ และ ใช้ได้โดยไม่ต้องดัดแปลงเครื่องยนต์ที่มีอยู่ ปัจจุบันไบโอเอทานอลส่วนใหญ่ผลิตจากพืชจำพวก แป้ง เช่น มันสำปะหลัง ข้าว ข้าวโพด และพืชประเภทน้ำตาล เช่น อ้อย เป็นต้น โดยการนำพืชมา หมัก (fermentation) เพื่อเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล จากนั้นจึงเปลี่ยนจากน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์

เอทานอลที่ผลิตจากไซยาโนแบคทีเรียมีข้อได้เปรียบกว่าที่ผลิตจากพืช เพราะไซยาโน แบคทีเรียมีความสามารถในการหมักแล้วผลิตและหลังเอทานอลออกจากเซลล์ได้เองตามธรรมชาติ

โดยไม่ต้องเติมยีสต์ (yeast) เหมือนการหมักพืชอื่น ๆ จากการคัดกรองไซยาโนแบคทีเรีย 37 สายพันธุ์ พบว่ามี 16 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้แม้ในระดับต่ำ เช่น *Oscillatoria* sp. เป็นต้น [12] การหมักเกิดขึ้นภายใต้สภาวะมืดและมีได้เป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญในเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย การหมักจึงเกิดในระดับต่ำสุดเพียงเพื่อให้เซลล์อยู่รอดเท่านั้น [13] ดังนั้น การปรับแต่งพันธุกรรม อาจช่วยให้ไซยาโนแบคทีเรียสามารถผลิตเอทานอลสูงขึ้นได้

พันธุวิศวกรรมในไซยาโนแบคทีเรียเพื่อเพิ่มการผลิตเอทานอล ทำได้โดยการถ่ายโอนยีนของแบคทีเรียที่จำเป็นต้องสร้างเอทานอล *Zymomonas mobilis* เข้าสู่เซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย ได้แก่ ยีน *pdC* ซึ่งสร้างเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลส (pyruvate decarboxylase หรือ PDC) และยีน *adhII* ซึ่งสร้างเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase หรือ ADH) (ดูรูปที่ 5-1) มีการทำพันธุวิศวกรรมดังกล่าวในไซยาโนแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ เช่น *S. elongatus* PCC 7942, *Synechococcus* sp. PCC 7002 และ *Synechocystis* sp. PCC 6803 เป็นต้น ซึ่งส่งผลให้สายพันธุ์ดัดแปรพันธุกรรมเหล่านี้สร้างเอทานอลสูงกว่าสายพันธุ์ลักษณะปกติ [4, 13, 14] บริษัทที่ผลิตเอทานอลจากไซยาโนแบคทีเรียในระดับอุตสาหกรรม ได้แก่ แอลจินอลไบโอฟูเอลส์ (Algenol Biofuels) และจูลอันลิมิเต็ด (Joule Unlimited) ในประเทศสหรัฐอเมริกา โดยทั้งสองบริษัทได้จดสิทธิบัตรหลายฉบับเกี่ยวกับการปรับปรุงไซยาโนแบคทีเรียให้ผลิตเอทานอลสูงขึ้นด้วยพันธุวิศวกรรม โดยอาศัยความรู้พื้นฐานที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น [2, 14] แต่อย่างไรก็ดี ปัจจุบันเอทานอลจากไซยาโนแบคทีเรียของทั้งสองบริษัทดังกล่าวยังไม่สามารถทำเป็นเชิงพาณิชย์ได้ เนื่องจากยังไม่สามารถแข่งขันกับราคาที่ดินผวนของเชื้อเพลิงฟอสซิลได้

### 5.2.3 เอทิลีน

เอทิลีนเป็นแอลคีนไม่อิ่มตัว (unsaturated alkene) เป็นหน่วยโครงสร้าง (building block) สำคัญมากที่สุดตัวหนึ่งที่ใช้ในการสังเคราะห์สารเคมีในระดับอุตสาหกรรม มักใช้ผลิตพลาสติก เช่น พอลิเอทิลีน (polyethylene) พอลิสไตรีน (polystyrene) พีวีซี (PVC) และเส้นใยพอลิเอสเทอร์ (polyester) เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถทำพอลิเมอไรเซชัน (polymerization) เอทิลีนไปเป็นเชื้อเพลิง เช่น น้ำมันเบนซิน น้ำมันดีเซล น้ำมันเครื่องบินไอพ่น หรือไฮเดรต (hydrate) เพื่อผลิตเอทานอล ปัจจุบันเอทิลีนผลิตจากเชื้อเพลิงฟอสซิลเท่านั้น และกระบวนการผลิตดังกล่าวปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์มากที่สุดในอุตสาหกรรมเคมี [15] จึงมีความจำเป็นในการพัฒนากระบวนการผลิตเอทิลีนที่ยั่งยืน และปลดปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์สุทธิเท่ากับศูนย์ (carbon neutral) การใช้ไซยาโนแบคทีเรียเป็นเจ้าบ้านผลิตเอทิลีนจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ใช้กระบวนการทางชีวภาพเปลี่ยนคาร์บอนไดออกไซด์เป็นเอทิลีน มีการทำพันธุวิศวกรรมโดยถ่ายโอน

ยีน *efe* ที่สร้างเอนไซม์เอทิลีนฟอร์มมิง (ethylene-forming enzyme หรือ EFE) (ดูรูปที่ 5-1) ซึ่งได้จากจุลชีพต่าง ๆ เช่น *Pseudomonas syringae* และ *Penicillium digitatum* เข้าสู่ไซยาโนแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ เช่น *S. elongatus* PCC 7942 และ *Synechocystis* sp. PCC 6803 เป็นต้น พบว่าไซยาโนแบคทีเรียที่สร้าง EFE เหล่านี้สามารถสร้างเอทิลีนได้ตามต้องการ [15, 16]

#### 5.2.4 ไอโซบิวทีรัลดีไฮด์และไอโซบิวทานอล

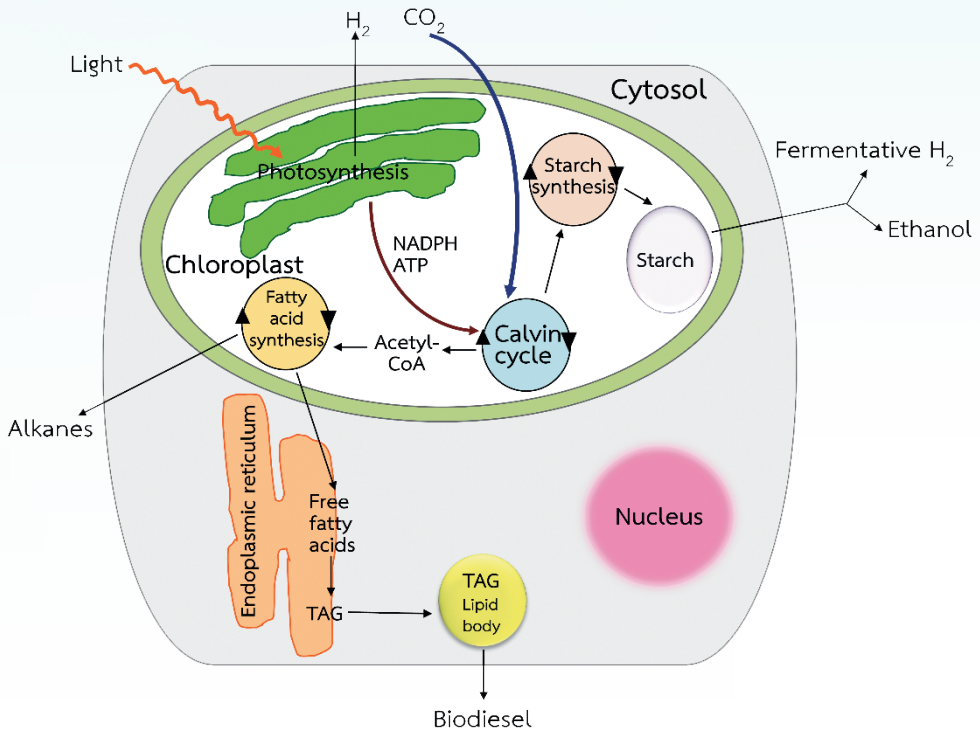
ไอโซบิวทีรัลดีไฮด์เป็นสารเคมีที่ใช้ตั้งต้นผลิตเคมีภัณฑ์อื่น ๆ เช่น กรดอะมิโนจำเป็น (essential amino acids) น้ำหอม พอลิเมอร์ ยาฆ่าแมลง และไอโซบิวทานอล เป็นต้น การถ่ายโอนยีน *kivD* ซึ่งสร้างเอนไซม์คีโตเอซิดดีคาร์บอกซิเลส (ketoacid decarboxylase หรือ KDC) จาก *Lactobacillus lactis* (รูปที่ 5-1) เข้าสู่ *S. elongatus* PCC 7942 ทำให้ผลิตไอโซบิวทีรัลดีไฮด์ที่มีจุดเดือดต่ำ (63 °C) และความดันไอ (vapor pressure) สูง ทำให้ง่ายต่อการทำให้บริสุทธิ์

ไอโซบิวทานอลเป็นตัวทำละลาย (solvent) ที่มักใช้ในอุตสาหกรรม มีความเป็นไปได้ที่จะใช้ไอโซบิวทานอลเป็นเชื้อเพลิงทดแทนเบนซิน และเป็นตัวทดแทนดีกว่าเอทานอล เพราะมีการดูดความชื้น (hygroscopicity) ต่ำกว่า มีความหนาแน่นของพลังงาน (energy density) สูงกว่า การกักตุนน้อยกว่า ค่าออกเทน (octane) สูงกว่า ยังไม่พบว่ามีสิ่งมีชีวิตชนิดใดที่สามารถผลิตไอโซบิวทานอลในระดับสูง [3, 4, 6] เพื่อให้ไซยาโนแบคทีเรียสร้างไอโซบิวทานอล จึงถ่ายโอนยีน *YqhD* ที่สร้างเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสจาก *Escherichia coli* เข้าสู่ไซยาโนแบคทีเรียซึ่งเปลี่ยนไอโซบิวทีรัลดีไฮด์เป็นไอโซบิวทานอล (ดูรูปที่ 5-1) และสกัดผลผลิตไอโซบิวทานอลออกจากเฟสของเหลว (liquid phase) ได้ถึง 50% [17]

#### 5.2.5 แอลเคน

แอลเคนเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดอิ่มตัว ที่พันธะระหว่างคาร์บอนยึดเหนี่ยวด้วยพันธะเดี่ยว มีสูตรทั่วไปเป็น  $C_nH_{2n+2}$  เช่น รูปแบบง่ายที่สุดคือมีเทน ( $CH_4$ ) ขึ้นถัดไปคืออีเทน ( $C_2H_6$ ) เป็นต้น แอลเคนที่มีคุณสมบัติของการเผาไหม้ในอุดมคติส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นแก๊ส ( $C \leq 4$ ) หรือของเหลว ( $5 \leq C \leq 20$ ) ภายใต้สภาวะมาตรฐาน และมักกลั่นจากเชื้อเพลิงฟอสซิล [4] มีการค้นพบเอนไซม์สองชนิดที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตแอลเคนในไซยาโนแบคทีเรีย ได้แก่ เอซิลเอซิลแครีเออร์โปรตีนรีดักเทส (acyl-acyl carrier protein reductase หรือ AAR) และแอลดีไฮด์ดีคาร์บอนิลเลส (aldehyde decarbonylase หรือ AD) [18] โดยเปลี่ยนกรดไขมันให้เป็นแอลเคนและแอลคีน (ดูรูปที่ 5-1) เมื่อถ่ายโอนยีนสร้างเอนไซม์ทั้งสองชนิดดังกล่าวเข้าสู่

ไซยาโนแบคทีเรียที่เรีย *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, *Synechococcus* sp. PCC 7002 และ *Synechocystis* sp. PCC 6803 พบว่าไซยาโนแบคทีเรียดัดแปรพันธุกรรมเหล่านี้สามารถสร้างแอลเคนและแอลคีนเพิ่มขึ้น [19, 20]



รูปที่ 5-3 วิถีเมแทบอลิซึมที่ใช้ผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพในจุลสาหร่ายสีเขียว

ข้อมูลจาก [21, 22]

ที่มา: แผนภาพโดย วิภา จิงจตุพรชัย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

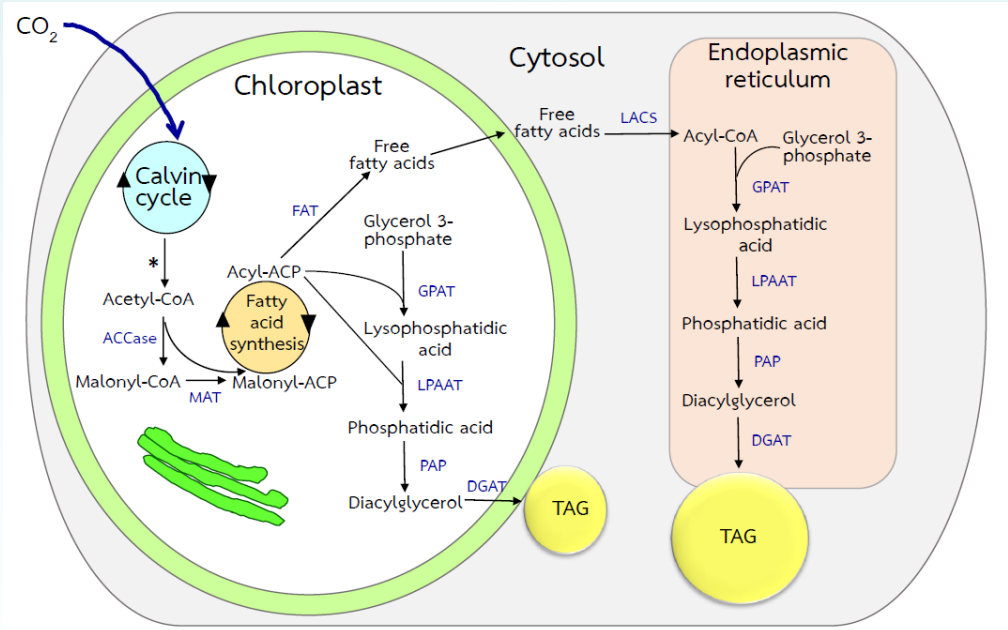
## 5.3 เชื้อเพลิงชีวภาพจากจุลสาหร่าย

จุลสาหร่ายสังเคราะห์สารหลายชนิดที่ใช้เป็นเชื้อเพลิงได้ (ดูรูปที่ 5-3) คลอโรพลาสต์ของจุลสาหร่ายนั้นวิวัฒนาการมาจากไซยาโนแบคทีเรียที่อยู่รวมภายในกับเซลล์ (endosymbiosis) [23] ดังนั้น คลอโรพลาสต์ของจุลสาหร่ายจึงสามารถสังเคราะห์สารที่ใช้เป็นเชื้อเพลิงได้คล้ายคลึงกับที่ผลิตได้ในไซยาโนแบคทีเรีย เช่น ไฮโดรเจน เอทานอล และแอลเคน (ดูรูปที่ 5-1 และ 5-3) ในที่นี้จะกล่าวเฉพาะการผลิตไบโอดีเซล (biodiesel) จากจุลสาหร่าย

ไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพที่ใช้กันทั่วไป ส่วนใหญ่ผลิตจากการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันกับน้ำมันพืช เนื่องจากจุลสาหร่ายผลิตลิพิด (lipid) และชีวมวลได้สูงกว่าพืชบก ทั้งยังสามารถเจริญเติบโตได้ในน้ำจืด น้ำเค็ม หรือน้ำทิ้ง โดยไม่ต้องใช้ที่ดินในการเพาะเลี้ยง [24, 25] ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้จุลสาหร่ายเป็นแหล่งลิพิดไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol หรือ TAG) สำหรับผลิตไบโอดีเซล เช่น *Botryococcus* sp., *Chlorella* sp., *Dunaliella* sp., *Nannochloropsis* sp., *Schizochytrium* sp. และ *Neochloris oleoabundans* เป็นต้น [25-29] อย่างไรก็ตาม ยังมีความท้าทายหลายประการที่จะต้องฟันฝ่าก่อนที่การผลิตไบโอดีเซลจากจุลสาหร่ายจะมีความคุ้มค่าในเชิงพาณิชย์ ความท้าทายที่สำคัญอย่างหนึ่งคือการขาดจุลสาหร่ายสายพันธุ์ที่มีทั้ง TAG และชีวมวลในระดับสูง [24, 30, 31] มีรายงานการสร้างลิพิดสูงขึ้นในจุลสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* ด้วยการยับยั้งการสังเคราะห์แบ่ง [32] แต่วิธีดังกล่าวมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ เมื่อทำพันธุวิศวกรรมในไดอะตอม *Cyclotella cryptica* ให้เพิ่มการแสดงออก (overexpression) ของยีนที่สร้างเอนไซม์แอซิติลโคเอคาร์บอกซิเลส (acetyl-CoA carboxylase หรือ ACCase) ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ปฏิกิริยาผันกลับไม่ได้ (committing step) และนำไปสู่วิถีการสังเคราะห์กรดไขมัน (ดูรูปที่ 5-4) พบว่าแม้มีกิจกรรม (activity) ของ ACCase เพิ่มขึ้น 2-3 เท่า แต่การสังเคราะห์ลิพิดไม่เพิ่ม [33] ดังนั้น การเพิ่มปริมาณ TAG ของจุลสาหร่ายในสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติตามต้องการ อาจทำได้ด้วยพันธุวิศวกรรมของยีนที่มีความสำคัญในวิถีการสังเคราะห์ TAG ซึ่งจะเป็นขั้นแรกในการนำไปสู่การผลิตไบโอดีเซลจากจุลสาหร่ายในเชิงพาณิชย์ [22, 25, 34]

แม้ความรู้เกี่ยวกับวิถีการสังเคราะห์ TAG ในจุลสาหร่ายมีน้อยมาก แต่ก็คาดว่าน่าจะคล้ายคลึงกับในพืชชั้นสูง [35] การสังเคราะห์ TAG ในจุลสาหร่ายสีเขียวนั้นเกิดขึ้นในคลอโรพลาสต์ก่อน และมีอีกทางหนึ่งคือการส่งกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) ออกจากคลอโรพลาสต์มาสู่ไซโทซอล (cytosol) แล้วไปยังเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (endoplasmic reticulum หรือ ER) เพื่อสังเคราะห์ TAG โดยมีไดเอซิลกลีเซอรอลเอซิลทรานส์เฟอเรส (diacylglycerol acyltransferase หรือ DGAT) เป็นเอนไซม์ในขั้นสุดท้ายและเป็นขั้นตอนที่ปฏิกิริยาผันกลับไม่ได้ ซึ่งจากการศึกษา

ในที่ขพบว่าเป็นขั้นที่ช้าที่สุดของปฏิกิริยา (rate-limiting step) [36, 37] (ดูรูปที่ 5-4) จุลสาหร่ายส่วนใหญ่มีกลุ่มไอโซฟอร์ม (isoforms) ของ DGAT โดยมียีน *DGAT* แบบที่ 1 (*DGAT1*) จำนวนหนึ่งยีนและแบบที่ 2 (*DGAT2*) จำนวนหลายยีน [35] เอนไซม์ *DGAT1* อยู่ในคลอโรพลาสต์ ส่วน *DGAT2* ซึ่งอยู่ใน ER เป็นเอนไซม์ที่ทรงพลังในการสังเคราะห์ TAG ในจุลสาหร่าย [38-40] ดังนั้นจึงมีแนวคิดเพิ่มการสะสม TAG ในจุลสาหร่ายด้วยการเพิ่มการแสดงออกของยีน *DGAT2* ซึ่งปัจจุบันมีรายงานค่อนข้างน้อยได้แก่ใน *C. reinhardtii* แม้พบการสร้างเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ของเอนโดจีนัส (endogenous) *DGAT2* เพิ่มขึ้น แต่ไม่พบการสะสม TAG เพิ่มขึ้น และไม่พบการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของกรดไขมัน [41] อย่างไรก็ตาม เมื่อให้ *DGAT2* แสดงออกภายใต้โพรโมเตอร์ที่เหนี่ยวนำด้วยการขาดแคลนฟอสฟอรัส (phosphorus-starvation) พบว่าการสร้าง TAG เพิ่มขึ้น [42] แม้การแสดงออกโดยใช้เฮเทอโรโลกัส (heterologous) *DGAT2* เพิ่มการสร้างลิพิด แต่ต่อมามีต้องประสบปัญหา silenซิง (gene silencing) [43] การสะสมลิพิดเพิ่มขึ้นพบใน *Nannochloropsis oceanica* ที่เพิ่มการแสดงออกของเอนโดจีนัส *DGAT2* [44] และ *Scenedesmus obliquus* ที่เพิ่มการแสดงออกของเฮเทอโรโลกัส *DGAT2* [45] อย่างไรก็ตาม ปริมาณ TAG สูงสุดเท่าที่พบจากรายงานดังกล่าวคือ 11% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (dry cell weight หรือ DCW)



รูปที่ 5-4 การสังเคราะห์ลิพิดไตรเอซิลกลีเซอรอลในจุลสาหร่ายสีเขียว

เอนไซม์แทนด้วยสีน้ำเงิน ACCase: acetyl-CoA carboxylase; DGAT: diacylglycerol acyltransferase; FAT: fatty acyl-ACP thioesterase; GPAT: glycerol 3-phosphate acyltransferase; LACS: long-chain acyl-CoA synthetase; LPAAT: lysophosphatidic acid acyltransferase; MAT: malonyl-CoA:ACP transferase; PAP: phosphatidic acid phosphatase; TAG: triacylglycerol; \*:

มิได้ระบุรายละเอียดของปฏิกิริยา ข้อมูลจาก [22, 46]

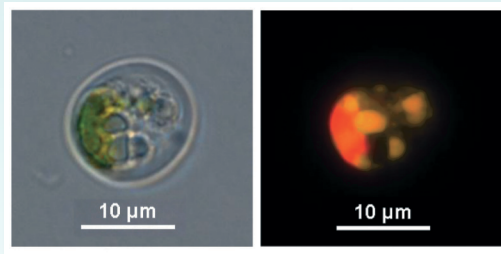
ที่มา: แผนภาพโดย วิภา จิ่งจตุพรชัย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

## 5.4 กรณีศึกษา: การปรับปรุงพันธุ์จุลสาหร่ายให้เพิ่มการสร้าง TAG ด้วยพันธุวิศวกรรม

จุลสาหร่าย *Neochloris oleoabundans* (*Ettlia oleoabundans*) [47] เมื่อย้อมด้วยสารเรืองแสงไนล์เรด (fluorescent dye Nile red) จะเห็นลิพิดบอดี (lipid body) ภายในเซลล์ (รูปที่ 5-5) เป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสมที่สุดที่จะเป็นแหล่ง TAG สำหรับการผลิตไบโอดีเซล [48] ภายใต้สภาวะขาดแคลนไนโตรเจน *N. oleoabundans* สามารถผลิตลิพิด 35-54% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และประมาณ 80% ของลิพิดทั้งหมดเป็น TAG ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acids) ที่มี 16-20 คาร์บอน [49] ที่เหมาะสำหรับการผลิตไบโอดีเซล อย่างไรก็ตาม ความรู้เกี่ยวกับ *N. oleoabundans* มีอย่างจำกัด และยังไม่มียีนข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของจีโนม

เพื่อให้สามารถศึกษาพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลและทำพันธุวิศวกรรมให้สร้าง TAG เพิ่มขึ้น วิชา จึงจัดพรชัย และคณะ จึงได้พัฒนาระบบถ่ายโอนยีนใน *N. oleoabundans* ด้วยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน (electroporation) [50] (ดูบทที่ 4) และได้โคลน cDNA ที่สร้างเอนไซม์ DGAT2 จาก *N. oleoabundans* (NeoDGAT2) [38] พร้อมทั้งตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ NeoDGAT2 ในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* H1246 ( $\Delta dga1 \Delta lro1 \Delta are1 \Delta are2$ ) [51] ซึ่งเป็นพันธุ์กลายที่ไม่มียีน DGAT ทำให้ไม่สามารถสร้าง TAG เมื่อถ่ายโอน NeoDGAT2 cDNA เข้าสู่ *S. cerevisiae* H1246 ผลปรากฏว่ายีสต์ดังกล่าวกลับมาสร้าง TAG ได้ (รูปที่ 5-6) แสดงให้เห็นว่า NeoDGAT2 cDNA สร้างเอนไซม์ DGAT2 ที่ทำหน้าที่ได้ [38] เพื่อให้ *N. oleoabundans* สร้าง TAG เพิ่มขึ้น โดยใช้วิธีทางพันธุวิศวกรรม จึงถ่ายโอน NeoDGAT2 cDNA เข้าสู่เซลล์ด้วยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันที่พัฒนาขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ลักษณะปกติ พบว่าในทรานส์ฟอร์มแมนต์ (transformant) มีนิวทรัลลิพิด (neutral lipid) เริ่มสะสมก่อนและสูงกว่า 1.9 เท่า และลิพิดบอดีก็มีขนาดใหญ่กว่า มีการสร้างเอมัลชันของ NeoDGAT2 สูงกว่า 2 เท่า และมีการสร้าง TAG ปริมาณสูงขึ้น 1.8 ถึง 3.2 เท่า ซึ่งสูงถึง  $46.1 \pm 1.6\%$  ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ทั้งพบการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของกรดไขมัน (fatty acid composition) โดย C16:0 เพิ่มขึ้นสองเท่าเป็น 49% ขณะที่ C18:0 ลดลง 3 เท่า เหลือเพียง 6% (ดังแสดงในรูปที่ 5-7) ทรานส์ฟอร์มแมนต์ที่ได้มีความคงตัว (stability) และยังคงสังเคราะห์ TAG สูงกว่าสายพันธุ์ลักษณะปกติ แม้ถูกเพาะเลี้ยงมามากกว่า 100 รุ่นในเวลา มากกว่า 4 ปี ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงการเพิ่มการสังเคราะห์ TAG ใน *N. oleoabundans* โดยเพิ่มการแสดงออกของ NeoDGAT2 ซึ่งอาจเป็นขั้นตอนแรกในการทำให้จุลสาหร่ายเป็นแหล่งผลิตไบโอดีเซลที่เป็นไปได้ทางเศรษฐกิจ กลยุทธ์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์จุลสาหร่ายที่นำเสนอในการศึกษานี้ สามารถนำมาประยุกต์กับจุลสาหร่ายสายพันธุ์อื่นที่มีคุณลักษณะเหมาะแก่การใช้ผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพในระดับอุตสาหกรรม [52]

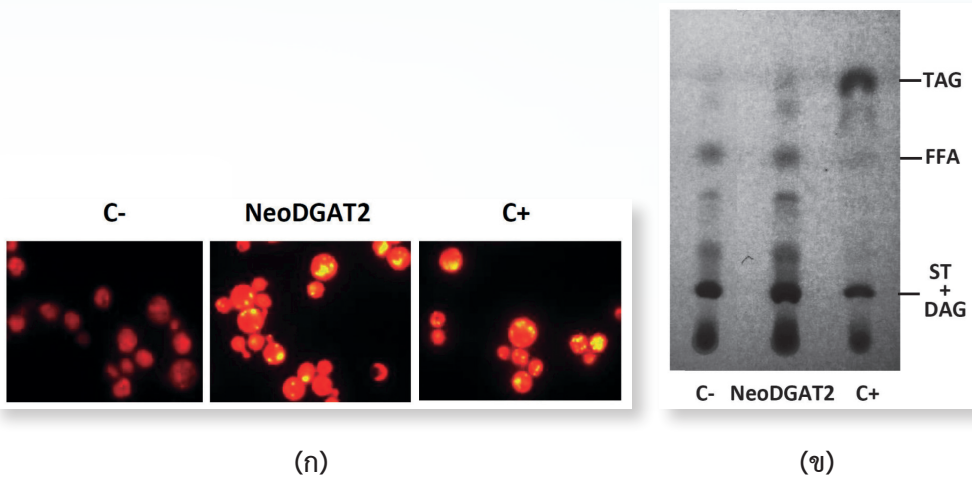




รูปที่ 5-5 ลิพิดบอดีในเซลล์ *Neochloris oleoabundans*

ลิพิดบอดีในเซลล์ย้อมด้วยสารเรืองแสงไนล์เรด รูปซ้ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ไบรต์ฟิลด์ (bright field) และรูปขวาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ลิพิดบอดีเห็นเป็นสีเหลือง ส่วนสีแดงเป็นออโตฟลูออเรสเซนซ์จากคลอโรฟิลล์ (chlorophyll autofluorescence)

ที่มา: ภาพโดย วิภา จิงจตุพรชัย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล



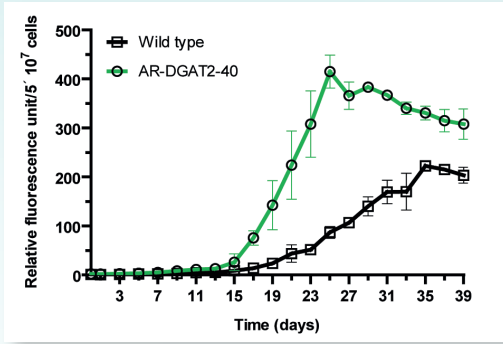
รูปที่ 5-6 การสังเคราะห์ TAG ในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่สร้าง NeoDGAT2

(ก) ลิพิดบอดีในยีสต์ที่ย้อมด้วยไนล์เรด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ลิพิดบอดีเห็นเป็นสีเหลือง

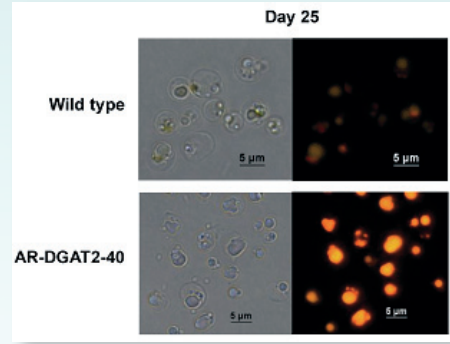
(ข) ลิพิดที่สกัดจากเซลล์ยีสต์และแยก TAG โดยใช้โครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (thin-layer chromatography) TAG: triacylglycerol; FFA: free fatty acids; ST: sterol; DAG: diacylglycerol

C-: ยีสต์พันธุ์กลาย H1246 ( $\Delta dga1 \Delta lro1 \Delta are1 \Delta are2$ ) [51] (ใช้เป็นตัวคุมเชิงลบ); NeoDGAT2: H1246 ที่สร้าง NeoDGAT2; C+: ยีสต์สายพันธุ์ลักษณะปรกติ (ใช้เป็นตัวคุมเชิงบวก)

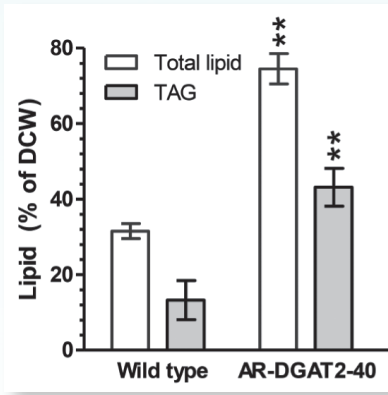
ที่มา: ภาพดัดแปลงจาก Chungjatupornchai and Watcharawipas, 2015 [38]



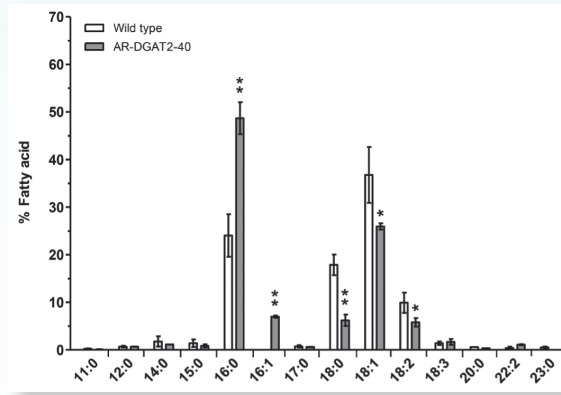
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

รูปที่ 5-7 การวิเคราะห์ลิพิดของจุลสาหร่าย *Neochloris oleoabundans* ที่เพิ่มการแสดงออกของ NeoDGAT2

เซลล์เลี้ยงในสภาวะขาดแคลนไนโตรเจน

- (ก) การตรวจนิวทรัลลิพิดด้วยการย้อมไนล์เรด ฟลูออเรสเซนซ์ของทรานส์ฟอร์แมนต์ AR-DGAT2-40 เริ่มขึ้นก่อน และมีระดับสูงกว่าสายพันธุ์ลักษณะปกติ
- (ข) ลิพิดบอดีของเซลล์จาก (ก) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ไบรต์ฟิลด์ (ภาพซ้าย) และภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (ภาพขวา) ลิพิดบอดีใน AR-DGAT2-40 มีสีทองเข้มกว่าและขนาดใหญ่กว่าสายพันธุ์ลักษณะปกติ
- (ค) ปริมาณลิพิดที่สกัดได้ต่อ % น้ำหนักเซลล์แห้ง
- (ง) ส่วนประกอบของกรดไขมันในทรานส์ฟอร์แมนต์ AR-DGAT2-40 พบ C16:0 และ C16:1 เพิ่มขึ้น แต่ C18:0, C18:1 และ C18:2 ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ลักษณะปกติ

ข้อมูลแสดง mean ± SD (n = 3) ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างทรานส์ฟอร์แมนต์ AR-DGAT2-40 กับสายพันธุ์ลักษณะปกติ (\*\*p < 0.01, \*p < 0.02, t test)

ที่มา: ภาพดัดแปลงจาก Klaitong et al., 2017 [52]

## 5.5 บทสรุป

ไฮยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตในสภาวะแวดล้อมที่หลากหลาย โดยไม่ต้องใช้ที่ดินในการเพาะปลูก และให้ผลผลิตชีวมวลสูงกว่าพืชบก ทั้งมีสายพันธุ์ที่หลากหลาย ทำให้มีวิถีเมแทบอลิซึมใหม่ ๆ ที่นำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพต่าง ๆ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้ไฮยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายเป็นวัตถุดิบผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ นอกจากนี้การทำพันธุวิศวกรรมในไฮยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายทำให้เซลล์ผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพที่ปกติไม่ผลิตในธรรมชาติ หรือเพิ่มการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพให้มากขึ้น ในช่วงสิบปีที่ผ่านมาการวิจัยอย่างมากเกี่ยวกับการใช้ไฮยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ เป็นการกระตุ้นอย่างสำคัญต่อการพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพของไฮยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่าย แต่เนื่องจากความล้ำหลังด้านการวิจัยพื้นฐานในไฮยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายทำให้การผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพมีต้นทุนสูง จึงยังไม่สามารถแข่งขันกับเชื้อเพลิงฟอสซิลได้ในเชิงพาณิชย์ มีความเป็นไปได้สูงที่จะมีการศึกษาวิจัยพื้นฐานของไฮยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายมากขึ้นในอนาคต ความก้าวหน้าใหม่ ๆ เช่น การหาลำดับดีเอ็นเอของจีโนมที่รวดเร็วขึ้น การวิเคราะห์โดยใช้เทคโนโลยีให้ข้อมูลสูง เทคนิคทางวิศวกรรมเมแทบอลิซึมและพันธุวิศวกรรม และเทคนิค CRISPR-Cas9 อาจนำมาใช้ปรับปรุงพันธุ์ไฮยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่าย เพื่อเพิ่มผลผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพให้สามารถแข่งขันได้ในเชิงพาณิชย์

## เอกสารอ้างอิง

1. Dutta K, Daverey A, Lin J-G. Evolution retrospective for alternative fuels: First to fourth generation. *Renew Energy*. 2014; 69: 114-122.
2. Lü J, Sheahan C, Fu P. Metabolic engineering of algae for fourth generation biofuels production. *Energy Environ Sci*. 2011; 4: 2451-2466.
3. Ruffing AM. Engineered cyanobacteria: teaching an old bug new tricks. *Bioeng Bugs*. 2011; 2: 136-149.
4. Ducat DC, Way JC, Silver PA. Engineering cyanobacteria to generate high-value products. *Trends Biotechnol*. 2011; 29: 95-103.
5. Wijffels RH, Kruse O, Hellingwerf KJ. Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae. *Curr Opin Biotechnol*. 2013; 24: 405-413.
6. Machado IM, Atsumi S. Cyanobacterial biofuel production. *J Biotechnol*. 2012; 162: 50-56.
7. Kufryk G. Advances in utilizing cyanobacteria for hydrogen production. *Adv Microbiol*. 2013; 3: 60-68.
8. Angermayr SA, Hellingwerf KJ, Lindblad P, de Mattos MJT. Energy biotechnology with cyanobacteria. *Curr Opin Biotechnol*. 2009; 20: 257-263.
9. Dutta D, De D, Chaudhuri S, Bhattacharya SK. Hydrogen production by cyanobacteria. *Microb Cell Fact*. 2005; 4: 36.
10. Weyman PD, Vargas WA, Tong Y, Yu J, Maness P-C, Smith HO, Xu Q. Heterologous expression of *Alteromonas macleodii* and *Thiocapsa roseopersicina* [NiFe] hydrogenases in *Synechococcus elongatus*. *PloS one*. 2011; 6: e20126.
11. Baebprasert W, Jantaro S, Khetkorn W, Lindblad P, Incharoensakdi A. Increased H<sub>2</sub> production in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 by redirecting the electron supply via genetic engineering of the nitrate assimilation pathway. *Metab Eng*. 2011; 13: 610-616.
12. Heyer H, Krumbein WE. Excretion of fermentation products in dark and anaerobically incubated cyanobacteria. *Arch Microbiol*. 1991; 155: 284-287.
13. Quintana N, Van der Kooy F, Van de Rhee MD, Voshol GP, Verpoorte R. Renewable energy from cyanobacteria: energy production optimization by metabolic pathway engineering. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011; 91: 471-490.
14. Dexter J, Armshaw P, Sheahan C, Pembroke J. The state of autotrophic ethanol production in cyanobacteria. *J Appl Microbiol*. 2015; 119: 11-24.
15. Ungerer J, Tao L, Davis M, Ghirardi M, Maness P-C, Yu J. Sustained photosynthetic conversion of CO<sub>2</sub> to ethylene in recombinant cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Energy Environ Sci*. 2012; 5: 8998-9006.

16. Eckert C, Xu W, Xiong W, Lynch S, Ungerer J, Tao L, Gill R, Maness P-C, Yu J. Ethylene-forming enzyme and bioethylene production. *Biotechnol Biofuels*. 2014; 7: 33.
17. Atsumi S, Higashide W, Liao JC. Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde. *Nat Biotechnol*. 2009; 27: 1177-1180.
18. Schirmer A, Rude MA, Li X, Popova E, Del Cardayre SB. Microbial biosynthesis of alkanes. *Science*. 2010; 329: 559-562.
19. Reppas NB, Ridley CP. Methods and compositions for the recombinant biosynthesis of n-alkanes. Google Patents; 2016.
20. Hu P, Borglin S, Kamennaya NA, Chen L, Park H, Mahoney L, Kijac A, Shan G, Chavarria KL, Zhang C. Metabolic phenotyping of the cyanobacterium *Synechocystis* 6803 engineered for production of alkanes and free fatty acids. *Appl Energy*. 2013; 102: 850-859.
21. Beer LL, Boyd ES, Peters JW, Posewitz MC. Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. *Curr Opin Biotechnol*. 2009; 20: 264-271.
22. Radakovits R, Jinkerson RE, Darzins A, Posewitz MC. Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. *Eukaryot Cell*. 2010; 9: 486-501.
23. De Alda JAO, Esteban R, Diago ML, Houmard J. The plastid ancestor originated among one of the major cyanobacterial lineages. *Nature Commun*. 2014; 5: 4937.
24. Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv*. 2007; 25: 294-306.
25. Mata TM, Martins AA, Caetano NS. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renew Sust Energ Rev*. 2010; 14: 217-232.
26. Cheirsilp B, Torpee S. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresour Technol*. 2012; 110: 510-516.
27. Chaichalerm S, Pokethitiyook P, Yuan W, Meetam M, Sritong K, Pugkaew W, Kungvansaichol K, Kruatrachue M, Damrongphol P. Culture of microalgal strains isolated from natural habitats in Thailand in various enriched media. *Appl Energy*. 2012; 89: 296-302.
28. Boonma S, Chaiklangmuang S, Chaiwongsar S, Pekkoh J, Pumas C, Ungsethaphand T, Tongsir S, Peerapornpisal Y. Enhanced carbon dioxide fixation and bio-oil production of a microalgal consortium. *CLEAN-Soil, Air, Water*. 2015; 43: 761-766.
29. Papone T, Kookhunthod S, Paungbut M, Leasing R. Producing of microbial oil by mixed culture of microalgae and oleaginous yeast using sugarcane molasses as carbon substrate. *J Clean Energy Technol*. 2016; 4: 253-256.
30. Pienkos PT, Darzins A. The promise and challenges of microalgal-derived biofuels. *Biofuels, Bioprod Biorefin*. 2009; 3: 431-440.
31. Sawaengsak W, Silalertruksa T, Bangviwat A, Gheewala SH. Life cycle cost of biodiesel production from microalgae in Thailand. *Energy Sustain Dev*. 2014; 18: 67-74.

32. Li Y, Han D, Hu G, Sommerfeld M, Hu Q. Inhibition of starch synthesis results in overproduction of lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnol Bioeng.* 2010; 107: 258-268.
33. Sheehan J, Camobreco V, Duffield J, Graboski M, Shapouri H. An overview of biodiesel and petroleum diesel life cycles. National Renewable Energy Lab.(NREL), Golden, CO (United States); 1998.
34. Wijffels RH, Barbosa MJ. An outlook on microalgal biofuels. *Science.* 2010; 329: 796-799.
35. Chen JE, Smith AG. A look at diacylglycerol acyltransferases (DGATs) in algae. *J Biotechnol.* 2012; 162: 28-39.
36. Jako C, Kumar A, Wei Y, Zou J, Barton DL, Giblin EM, Covello PS, Taylor DC. Seed-specific over-expression of an *Arabidopsis* cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight. *Plant Physiol.* 2001; 126: 861-874.
37. Lung SC, Weselake RJ. Diacylglycerol acyltransferase: a key mediator of plant triacylglycerol synthesis. *Lipids.* 2006; 41: 1073-1088.
38. Chungjatupornchai W, Watcharawipas A. Diacylglycerol acyltransferase type 2 cDNA from the oleaginous microalga *Neochloris oleoabundans*: cloning and functional characterization. *J Appl Phycol.* 2015; 27: 1499-1507.
39. Gong Y, Zhang J, Guo X, Wan X, Liang Z, Hu CJ, Jiang M. Identification and characterization of PtDGAT2B, an acyltransferase of the DGAT2 acyl-coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase family in the diatom *Phaeodactylum tricomutum*. *FEBS Lett.* 2013; 587: 481-487.
40. Hung C-H, Ho M-Y, Kanehara K, Nakamura Y. Functional study of diacylglycerol acyltransferase type 2 family in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett.* 2013; 587: 2364-2370.
41. La Russa M, Bogen C, Uhmeyer A, Doebbe A, Filippone E, Kruse O, Mussnug JH. Functional analysis of three type-2 DGAT homologue genes for triacylglycerol production in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biotechnol.* 2012; 162: 13-20.
42. Iwai M, Ikeda K, Shimojima M, Ohta H. Enhancement of extraplastidic oil synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* using a type-2 diacylglycerol acyltransferase with a phosphorus starvation-inducible promoter. *Plant Biotechnol J.* 2014; 12: 808-819.
43. Ahmad I, Sharma AK, Daniell H, Kumar S. Altered lipid composition and enhanced lipid production in green microalga by introduction of brassica diacylglycerol acyltransferase 2. *Plant Biotechnol J.* 2015; 13: 540-550.
44. Li D-W, Cen S-Y, Liu Y-H, Balamurugan S, Zheng X-Y, Alimujiang A, Yang W-D, Liu J-S, Li H-Y. A type 2 diacylglycerol acyltransferase accelerates the triacylglycerol biosynthesis in heterokont oleaginous microalga *Nannochloropsis oceanica*. *J Biotechnol.* 2016; 229: 65-71.

45. Chen CY, Kao AL, Tsai ZC, Chow TJ, Chang HY, Zhao XQ, Chen PT, Su HY, Chang JS. Expression of type 2 diacylglycerol acyltransferase gene DGTT1 from *Chlamydomonas reinhardtii* enhances lipid production in *Scenedesmus obliquus*. *Biotechnol J*. 2016; 11: 336-344.
46. Goncalves EC, Wilkie AC, Kirst M, Rathinasabapathi B. Metabolic regulation of triacylglycerol accumulation in the green algae: identification of potential targets for engineering to improve oil yield. *Plant Biotechnol J*. 2016; 14: 1649-1660.
47. Deason T, Silva P, Watanabe S, Floyd G. Taxonomic status of the species of the green algal genus *Neochloris*. *Plant Syst Evol*. 1991; 177: 213-219.
48. Gouveia L, Marques AE, Da Silva TL, Reis A. *Neochloris oleabundans* UTEX# 1185: a suitable renewable lipid source for biofuel production. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2009; 36: 821-826.
49. Tornabene T, Holzer G, Lien S, Burris N. Lipid composition of the nitrogen starved green alga *Neochloris oleabundans*. *Enzyme Microb Technol*. 1983; 5: 435-440.
50. Chungjatupornchai W, Kitraksa P, Fa-aoonsawat S. Stable nuclear transformation of the oleaginous microalga *Neochloris oleabundans* by electroporation. *J Appl Phycol*. 2016; 28: 191-199.
51. Sandager L, Gustavsson MH, Ståhl U, Dahlqvist A, Wiberg E, Banas A, Lenman M, Ronne H, Stymne S. Storage lipid synthesis is non-essential in yeast. *J Biol Chem*. 2002; 277: 6478-6482.
52. Klaitong P, Fa-aoonsawat S, Chungjatupornchai W. Accelerated triacylglycerol production and altered fatty acid composition in oleaginous microalga *Neochloris oleabundans* by overexpression of diacylglycerol acyltransferase 2. *Microb Cell Fact*. 2017; 16: 61.





# บทที่ 6

## แนวโน้มในอนาคต

### 6.1 บทนำ

ในช่วงสิบปีที่ผ่านมาทั่วโลกมีการวิจัยอย่างมากเกี่ยวกับการใช้ไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายสำหรับผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ (biofuel) ส่งผลให้เกิดการตื่นตัวต่อการพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพของไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายสำหรับผลิตผลิตภัณฑ์มูลค่าสูง และการประยุกต์ใช้ทางสิ่งแวดล้อม แม้ไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายมีความหลากหลาย (biodiversity) แต่สายพันธุ์ที่ใช้ทำวิจัยมีน้อยมาก มักใช้สายพันธุ์ต้นแบบ (model) จึงทำให้ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายมีอย่างจำกัด อุตสาหกรรมการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพและผลิตภัณฑ์มูลค่าสูงจากไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายยังอยู่ในระยะการวิจัยและพัฒนา (research & development phase) ทำให้ต้นทุนการผลิตสูง ไม่สามารถแข่งขันในเชิงพาณิชย์กับการผลิตจากแหล่งอื่นได้ ในที่นี้จะกล่าวถึงแนวโน้มในอนาคตของการวิจัยและพัฒนาไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่าย เพื่อให้ผลิตภัณฑ์สามารถแข่งขันในเชิงพาณิชย์ ซึ่งน่าจะเป็นการวิจัยพื้นฐานที่นำไปสู่ความรู้และความเข้าใจเกี่ยวกับ การคัดเลือกและการปรับปรุงสายพันธุ์ การเพาะเลี้ยงและการเก็บเกี่ยวชีวมวล และการผลิตสารต่าง ๆ จากชีวมวลด้วยระบบโรงกลั่นชีวภาพ (biorefinery)

### 6.2 การคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์

การคัดเลือกสายพันธุ์ไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการผลิตสารเป้าหมาย มีความสำคัญต่อความสามารถในการแข่งขันในเชิงพาณิชย์ ปัจจุบันมีไซยาโน

แบคทีเรียและจุลสาหร่ายน้อยมากที่ได้สำรวจและศึกษา ทำให้มีสายพันธุ์ให้เลือกใช้ประโยชน์อย่างจำกัด จึงหลีกเลี่ยงไม่ได้ที่ต้องมีการพัฒนาวิธีคัดกรองจำนวนมากในคราวเดียว (high throughput screening) เพื่อให้ได้สายพันธุ์ไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายที่มีคุณลักษณะตามต้องการ อนุกรมวิธาน (taxonomy) ของไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายที่ได้จากการใช้ข้อมูลจีโนม จะมีความถูกต้องและสมบูรณ์มากขึ้น สามารถใช้เป็นข้อมูลในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีคุณลักษณะเฉพาะของสปีชีส์ (species) นั้น และนำมาใช้ประโยชน์ได้ง่ายขึ้น การเลือกใช้สายพันธุ์ท้องถิ่น มีข้อดีคือมักเจริญเติบโตดีกว่าสายพันธุ์ต่างถิ่น เนื่องจากปรับตัวเข้ากับสภาวะแวดล้อมได้ดีกว่า เป็นการลดต้นทุนการผลิตอีกทางหนึ่ง

การปรับปรุงสายพันธุ์ไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายให้มีคุณลักษณะใหม่ เช่น การสังเคราะห์สารใหม่ การผลิตสารเป้าหมายโดยไม่กระทบการเจริญเติบโต การเพิ่มการผลิตแสงเพื่อเพิ่มการเจริญเติบโต การทำให้เซลล์แข็งแรงเหมาะที่จะใช้ผลิตในอุตสาหกรรมเป้าหมาย และการเปลี่ยนแปลงผิวเซลล์ให้เกาะกลุ่มตกตะกอนเองโดยไม่ต้องเติมสารเคมี เป็นต้น เหล่านี้มีความเป็นไปได้สูง เนื่องจากโอมิกส์ (omics) ของไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่าย เช่น จีโนมิกส์ (genomics) ทรานสคริปโตมิกส์ (transcriptomics) โปรตีโอมิกส์ (proteomics) และเมแทบอลอิกส์ (metabolomics) มีแนวโน้มที่จะก้าวหน้าอย่างรวดเร็ว จะนำไปสู่การใช้วิศวกรรมเมแทบอลิกและพันธุวิศวกรรมเพื่อการปรับปรุงสายพันธุ์อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ความรู้ใหม่และความก้าวหน้าทางเทคโนโลยี เช่น การรบกวนอาร์เอ็นเอ (RNAi) การตรวจแก้ไขจีโนม (genome editing) โดยใช้ระบบ CRISPR-Cas9 และเทคโนโลยีที่ให้ข้อมูลสูง (high-throughput data) จะถูกนำมาใช้มากขึ้น ทำให้มีความรู้และความเข้าใจในไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายมากขึ้น ซึ่งจะช่วยให้การปรับปรุงสายพันธุ์บรรลุเป้าหมาย

## 6.3 การเพาะเลี้ยงและการเก็บเกี่ยวชีวมวล

การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายต้องใช้แสง คาร์บอนไดออกไซด์ และแร่ธาตุ เช่น ไนโตรเจน และฟอสเฟต เป็นต้น การปรับปรุงสภาวะการเลี้ยงให้เหมาะสม เช่น แสง อุณหภูมิ สารอาหาร การระบายอากาศ มีส่วนช่วยลดต้นทุนการผลิตชีวมวลสำหรับผลิตภัณฑ์มูลค่าสูงและเชื้อเพลิงชีวภาพ ในกรณีที่ใช้ชีวมวลเพื่อผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ อาจเพาะเลี้ยงโดยใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่ปล่อยจากโรงงานอุตสาหกรรม และใช้สารอาหารแร่ธาตุจากน้ำเสีย เป็นการลดคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของภาวะโลกร้อน (global warming) ร่วมกับการบำบัดน้ำเสีย เป็นการรักษาสีสิ่งแวดล้อม ขณะเดียวกันก็ลดต้นทุนการผลิตให้สามารถแข่งขัน

ในเชิงพาณิชย์กับเชื้อเพลิงฟอสซิล (fossil fuel) มีไฮยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายเพียงไม่กี่ตัวที่สามารถเพาะเลี้ยงในระบบเปิด อย่างไรก็ตาม การพัฒนาการเพาะเลี้ยงระบบปิดต่าง ๆ ที่ทำด้วยวัสดุที่ถูกลง เช่น เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพให้แสง (photobioreactor) แบบใช้ถุงพลาสติก เป็นต้น อาจนำไปสู่การเพาะเลี้ยงระบบปิดในเชิงพาณิชย์มากขึ้นในอนาคต

การเก็บเกี่ยวชีวมวลไฮยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายในปัจจุบันมักใช้วิธีเติมสารเคมีช่วยตกตะกอน แม้เป็นวิธีที่ค่าใช้จ่ายถูกกว่าวิธีปั่นตกตะกอน แต่ก็ยังมีค่าใช้จ่ายสูง เป็นคอขวดสำหรับการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพและผลิตภัณฑ์อื่น ๆ จำเป็นต้องมีนวัตกรรมการตกตะกอนชีวมวล เช่น การเลี้ยงเซลล์ร่วมกับแบคทีเรียที่ชักนำให้เกิดการตกตะกอน หรือใช้ไฮยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติเฉพาะบนผิวเซลล์ทำให้เซลล์เกาะกลุ่มตกตะกอนเองโดยไม่ต้องเติมสารเคมี แต่มีเพียงบางสายพันธุ์เท่านั้นที่มีคุณสมบัติดังกล่าว อาจปรับปรุงไฮยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายสายพันธุ์เป้าหมายโดยวิธีพันธุวิศวกรรมให้เซลล์เกาะกลุ่มตกตะกอนเอง เป็นการลดต้นทุนการผลิตชีวมวล

## 6.4 การผลิตสารต่าง ๆ จากชีวมวลด้วยระบบโรงกลั่นชีวภาพ

โรงกลั่นชีวภาพเป็นระบบการแปรรูปชีวมวลที่เทียบเคียงกับระบบโรงกลั่นปิโตรเคมี ซึ่งแปรรูปน้ำมันดิบโดยใช้การแปรรูปหลายหน่วยผลานกันอย่างเป็นระบบ ตั้งแต่กระบวนการกลั่น การแยก การทำให้บริสุทธิ์ และการสังเคราะห์ทางเคมี เพื่อดึงเอาสารเคมีในน้ำมันดิบออกมาใช้ประโยชน์อย่างครบถ้วน ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าจำนวนมาก เช่น เชื้อเพลิงเหลว ตัวทำละลายเคมี พอลิเมอร์ และอนุกรมเคมีต่าง ๆ เป็นต้น ชีวมวลจากไฮยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายก็มีส่วนประกอบทางเคมีที่หลากหลายและซับซ้อนไม่ต่างไปจากน้ำมันดิบ หากสามารถพัฒนาระบบโรงกลั่นชีวภาพให้มีประสิทธิภาพ ดึงเอาสารเคมีในชีวมวลของไฮยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายออกมาใช้ประโยชน์มากขึ้น ดังนี้ 1) ผลิตภัณฑ์มูลค่าสูงที่ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อาหาร และยา เช่น สารสี (pigment) ลิพิด (lipid) คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) วิตามิน (vitamin) สารแอนติออกซิแดนต์ (anti-oxidant) เป็นต้น 2) ผลิตภัณฑ์เชื้อเพลิงชีวภาพ เช่น ไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) ไฮโดรเจน (hydrogen) ไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol) สำหรับไบโอดีเซล (biodiesel) แอลกอฮอล์ (alcohol) และมีเทน (methane) เป็นต้น และ 3) ปุ๋ยชีวภาพ (biofertilizer) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องวิจัยและพัฒนาวิธีและขั้นตอนการแปรรูปต่าง ๆ ของชีวมวลไฮยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายให้ครบถ้วน การได้ผลิตภัณฑ์หลากหลายจากชีวมวลตั้งต้นเดียวจะทำให้ต้นทุนการผลิตลดลง และสามารถแข่งขันกับผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากแหล่งอื่น ๆ ได้ในเชิงพาณิชย์

## 6.5 บทสรุป

แม้ปัจจุบันความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายยังไม่ลึกซึ้งมากพอที่จะแก้ไขปัญหาด่าง ๆ ที่เป็นสาเหตุทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่สามารถแข่งขันในเชิงพาณิชย์ แต่แนวโน้มในอนาคตที่จะมีการวิจัยพื้นฐานมากขึ้น นำไปสู่ความรู้และความเข้าใจที่ลึกซึ้งยิ่งขึ้น จะทำให้ไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายซึ่งมีศักยภาพสูงในการเป็น “โรงงาน” ผลิตสารธรรมชาติ ที่มีมูลค่าสูงในปริมาณมากระดับอุตสาหกรรม สามารถแข่งขันได้กับแหล่งผลิตอื่น ๆ ในเชิงพาณิชย์

## ดัชนี

## ก

กรดไขมัน,	11, 28, 35, 121, 123, 124, 128
กรดไขมันไม่อิ่มตัว,	10, 13
กรดไขมันอิ่มตัว,	98, 126
กรดไขมันอิสระ,	70, 123
กรดแลคติก,	69, 70
กลัยโคซิลเลชัน,	28, 80, 81, 87, 104, 105
กานามัยซิน,	58, 63, 64, 99
การเก็บเกี่ยวชีวมวล,	135, 136, 137
การคัดเลือกสายพันธุ์,	135, 136
การจำแนก	
จุลสาหร่าย,	5, 7
ไซยาโนแบคทีเรีย,	5
การใช้โคดอน,	49, 68, 78, 81, 94, 98
การถ่ายโอนดีเอ็นเอ,	44, 56, 57, 58, 60, 87, 88, 89, 92, 93, 99, 100
การใส่เอ็กโซแบคทีเรีย,	93
การยีนอนุภาค,	88, 92
คอนจูแกน,	50, 56, 57, 58, 59, 64, 93
ทรานส์ฟอร์มชันโดยธรรมชาติ,	50, 56, 57, 63
ลูกบิดแก้ว,	92, 93
เส้นใยซิลิกอน,	92
อิเล็กโทรพอเรชัน,	50, 56, 58, 92, 98, 99, 100, 101, 126
การบำบัดน้ำเสีย,	1, 12, 14, 136
การบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ,	67
การเพาะเลี้ยง,	9, 11, 12, 14, 20, 135, 136, 137
ระบบที่ใช้กระบวนการสะอาด,	10
ระบบที่ใช้น้ำทิ้งหรือน้ำเสีย,	10
ระบบปิด,	9, 14, 137
ระบบเปิด,	9, 14, 70, 137
การยับยั้งโดยแสง,	70
การยับยั้งอาร์อาร์เอ็นเอ,	63, 65
การแยกไฮโมไซกัส,	61
การรบกวนอาร์เอ็นเอ (อาร์เอ็นเอไอ),	31, 107, 136
การหลั่งออกนอกเซลล์,	79, 81, 104
การหายใจแสง,	21

## ค

คลอโรพลาสต์,	25, 26, 27, 29, 33, 35
คลอโรฟิลล์,	1, 5, 127
คอนจูเกทิฟพลาสมิด,	57, 58, 59, 93
คาร์โบพลาสมิด,	58, 59, 64
คาร์บอนไดออกไซด์,	1, 2, 9, 12, 14, 21, 66, 69, 70, 115, 118, 120, 136
เครื่องหมายคัดเลือก,	58, 93, 94, 98, 99, 106
แคโรทีนอยด์,	11, 12, 32, 35
บีตาแคโรทีน,	12, 13, 32, 33, 34, 35
แอสตาแซนทีน,	12, 13, 22, 32, 33, 34, 35
โครงสร้างของเซลล์,	3, 4

## จ

จีโนม	
การประกอบลำดับดีเอ็นเอ,	19, 20
การแสดงข้อมูลประกอบจีโนม,	19, 25
การหาลำดับดีเอ็นเอ,	17, 18, 20, 129
คลอโรพลาสต์จีโนม,	25, 26, 27, 78, 87, 88
นิวเคลียร์จีโนม,	25, 26, 78, 81, 82, 87, 88, 89, 92, 93, 98, 99, 100, 104, 105, 106
เมตาจีโนม,	19, 20
ไมโทคอนเดรียจีโนม,	17, 25, 87
จีโนมของจุลสาหร่าย,	25, 26, 27, 78, 81, 87, 104, 107
จีโนมของไซยาโนแบคทีเรีย,	19, 20, 21, 23, 46
จีโนมิกส์,	17, 18, 19, 25, 34, 136
จุลสาหร่าย,	25
ไซยาโนแบคทีเรีย,	19
จีโนมิกส์แลนด์,	21

## ข

ชีววิทยาสังเคราะห์,	43, 44
ชีวสารสนเทศ,	14, 17, 18, 36
เชื้อเพลิงชีวภาพ,	2, 14, 70, 71, 106, 107, 115, 116, 117, 122, 123, 126, 129, 135, 136, 137
เชื้อเพลิงฟอสซิล,	115, 120, 121, 129, 137
ไซน์-ดัลการีน,	49

**ซ**

ซิกมาแฟกเตอร์,	45
ซีโอซีน,	78, 93
ไซลานเนส,	106

**ด**

ไดเอซิลลิเซอร์รอลเอซิลทรานส์เฟอเรส,	123
-------------------------------------	-----

**ต**

ตำแหน่งจับของไรโบโซม,	44, 47, 49
ไตรเอซิลลิเซอร์รอล,	28, 98, 123, 125, 137

**ท**

ทรานสคริปโตม,	17, 27, 28, 29, 31, 32, 34
ทรานสคริปโตมิกส์,	17, 27, 34, 136
เทคโนโลยีที่ให้ข้อมูลสูง,	17, 18, 22, 25, 34, 36, 136
เทระซัยคลิน,	58

**น**

นิวทริลลิทิด,	126, 128
โนพาสินซินเทส,	46
ไนโตรจีนเนส,	118, 119
ไนล์เรด,	126, 127, 128

**บ**

บิดาแคโรทีนซีโทเลส,	21, 34
บูรณาการโอมิิกส์,	18, 22, 31, 36
แบบจำลองเมแทบอลิก,	29, 30
ไบโอเซนเซอร์,	68
ไบโอดีเซล,	14, 98, 100, 107, 123, 126, 137

**ป**

ปุ๋ยชีวภาพ,	1, 12, 14, 137
เปปทิติลโพรลิลไอโซเมอเรส,	87
โปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง,	68
โปรตีนไดซัลไฟด์ไอโซเมอเรส,	87
โปรตีนเรืองแสงสีเขียว,	46, 47, 94
โปรตีโอม,	17, 28
โปรตีโอมิกส์,	17, 28, 35, 136

**ผ**

แผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์,	5, 20, 24
------------------------------	-----------

**พ**

พลาสดิกชีวภาพ,	13, 14, 69
พลาสติดชนิดฆ่าตัวตาย,	51, 52, 56, 57, 62
พลาสติดชนิดถ่ายแบบซ้ำ,	50, 51, 52, 53, 57
พลาสติดชนิดรวมเข้ากับโครโมโซม,	50, 51, 52, 54
พลาสติดผู้ช่วย,	58, 59
พันธะไดซัลไฟด์,	81, 87, 102, 103, 105
พีซี C3,	21
พีซี C4,	21
โพรโมเตอร์,	44, 45, 46, 47, 48, 50, 55, 78, 79, 80, 83, 85, 94, 98, 99, 101
โพรเวตตีคาร์บอกซีเลส,	120

**ฟ**

ฟลักโซมิกส์,	30
ฟิโนมิกส์,	31
แฟกเตอร์ถอดรหัส,	28, 32, 45, 46
ไฟโคบิลิน,	9, 13
ไฟโคไซยานิน,	13, 66, 70
ไฟโคอิทริน,	13
แอลโลไฟโคไซยานิน,	13, 103, 104
ไฟโคบิลิโปรตีน,	66
ไฟเทส,	106

**ภ**

ภาวะโลกร้อน,	2, 136
--------------	--------

**ม**

เมทัลโลไทโอนิน,	22
เมแทบอลิซึม,	17, 29, 30, 68
เมแทบอลิซึม,	17, 29
เมแทบอลิซึม,	17, 29, 136
เมแทบอลิซึม,	2, 17, 29, 30, 68
ไมโครอาร์เอ็นเอ,	80

<b>ย</b>			
ยีนโซเลนซิง,	32, 78, 79, 80, 81, 106, 107, 124		
ยีนรายงาน,	44, 46, 50, 68, 94, 97, 98, 99		
<b>ร</b>			
โรคปากและเท้าเปื่อย,	104		
โรคมาลาเรีย,	105		
โรคไวรัสดวงขาว,	105		
โรงกลั่นชีวภาพ,	135, 137		
ไรแฟมพิซิน,	58		
<b>ล</b>			
ลิปิต,	13, 14, 32, 98, 100, 107, 123, 124,		
	125, 126, 127, 128, 137		
ลิปิตบอดี,	126, 127, 128		
ลิแวนซูเครส,	61, 62		
ลูซิเฟอเรส,	68, 94		
<b>ว</b>			
วิทิเมแทบอลิก,	27, 30, 31, 34, 35, 36, 43, 68,		
	93, 107		
วิศวกรรมเมแทบอลิก,	18, 31, 32, 35, 36, 43,		
	71, 77, 80, 136		
ไวรัสเฮอริฟส์ซิมเพลกซ์,	102		
<b>ล</b>			
สเปกติโนมายซิน,	58, 63, 94		
สัญญาณการตัดเชื่อม,	78, 79		
สารเลียนแบบแอนติบอดี,	103		
สารสี,	1, 13, 32, 66, 70, 103, 137		
<b>อ</b>			
อนุกรมวิธาน,	5, 20, 136		
ออร์กาโนฟอสเฟต	67		
ออร์กาโนฟอสฟอรัสไฮโดรเลส,	67		
อาร์อาร์เอ็นเอพันธุกลาย,	63, 64		
อาหารของคน,	1, 10, 14		
อาหารสัตว์,	1, 10, 11, 12		
อาหารเสริม,	10, 11, 13, 14, 32, 106		
		อินทรอน,	79, 100, 101
		อิมมูโนทอกซิน,	102, 103, 107
		อิริโทรพ้อทีน,	104
		อิริโทรมายซิน,	64, 94
		แอซีทิลโคเอย์บอกรีเลส,	123
		เอซิลเอซิลแคร์รีเออร์โปรตีนรีดักเทส,	121
		เอทานอล,	70, 116, 119, 120, 121, 123
		เอทิลีน,	116, 120, 121
		เอนไซม์ตัดจำเพาะ,	56, 58
		เอนโดนิวคลีเอส,	56, 57
		เอสไออาร์เอ็นเอ,	80
		แอซีโทน,	69
		แอนติเซนส์อาร์เอ็นเอ,	28, 49
		แอมพิซิลิน,	58, 99
		แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส,	120, 121
		แอลคีน,	120, 121, 122
		แอลเคน,	70, 116, 121, 122, 123
		แอลดีไฮด์ดีคาร์บอนิลเลส,	121
		ไอโซบิวทานอล,	70, 116, 121
		ไอโซบิวทิลดีไฮด์,	116, 121
		ไอโซพรีน,	68
		ไอโซพรีนซินเทส,	49, 68
		<b>ฮ</b>	
		โฮโมโลกัสรีคอมบิเนชัน,	51, 52, 55, 57, 61,
			62, 63, 82, 87, 88
		ไฮโกรมายซินบี,	94, 99
		ไฮโดรจีเนส,	118, 119, 120
		ไฮโดรเจน,	14, 70, 116, 118, 119, 123, 137

## Gene Index

### A

<i>aadA</i> ,	94, 95, 96
<i>Acgfp</i> ,	98
<i>adc</i> ,	69
<i>adhII</i> ,	120
<i>Aph7<sup>+</sup></i> ,	94, 95, 99, 100, 101
<i>aphA6</i> ,	94, 96
<i>arg9</i> ,	96
<i>atpA</i> ,	80, 85

### B

<i>bar</i> ,	58, 96
<i>ble</i> ,	78, 93, 95, 106

### C

<i>cabII-1</i> ,	85
<i>CaMV35S</i> ,	48, 83, 99
<i>cat</i> ,	94, 96
<i>cgluc</i> ,	97
<i>Chgfp</i> ,	97, 98, 99, 100, 101
<i>crLuc</i> ,	97
<i>crtO</i> ,	21
<i>ctfAB</i> ,	69
<i>Cyc6</i> ,	79, 83

### D

<i>DGAT1</i> ,	124
<i>DGAT2</i> ,	124, 126

### E

<i>efe</i> ,	121
<i>ereB</i> ,	94, 96

### G

<i>gfp</i> ,	46, 47, 50
<i>gfpCt</i> ,	97
<i>gus</i> ,	50, 97

### H

<i>Hsp70A-RbcS2 (AR)</i> ,	78, 84, 98
<i>hupL</i> ,	118
<i>Hyg3</i> ,	99, 100, 101
<i>Hyg4</i> ,	100

### I

<i>ictB</i> ,	21
<i>lspS</i> ,	68

### K

<i>kivD</i> ,	121
---------------	-----

### L

<i>lacZ</i> ,	50
<i>ldhA</i> ,	70
<i>lldP</i> ,	70
<i>lucCP</i> ,	97
<i>luxAB</i> ,	50
<i>luxCt</i> ,	97

### M

<i>mob</i> ,	58, 59
--------------	--------

### N

<i>NeoDGAT2</i> ,	126, 127, 128
<i>nirA</i> ,	48
<i>Nos</i> ,	84
<i>NR</i> ,	84

### P

<i>pdc</i> ,	120
<i>PhaEC</i> ,	69
$\lambda P_{R'}$ ,	48
<i>psaD</i> ,	84
<i>psbA</i> ,	80, 85
<i>psbA2</i> ,	48
<i>pta</i> ,	69



**R**

<i>RbcL</i> ,	21, 80, 85
<i>RbcS</i> ,	21
<i>RbcS2</i> ,	78, 79, 83, 84, 98, 99, 100, 101
<i>rrnA</i> ,	46, 47, 48, 63, 65
<i>rrnB</i> ,	46, 63, 65

**S**

<i>sacB</i> ,	61, 62
<i>stmA</i> ,	22

**T**

<i>tac</i> ,	48
<i>tra</i> ,	57, 59
<i>trc</i> ,	48
<i>tRNA<sup>Pro</sup></i> ,	48
<i>β2-Tub</i> ,	83, 99

**U**

<i>udhA</i> ,	70
---------------	----

**Y**

<i>YqhD</i> ,	121
---------------	-----

## Species Index

### A

*Agmenellum quadruplicatum*.

See *Synechococcus* sp. PCC 7002

*Agrobacterium tumefaciens*, 84, 89, 90, 93

*Alteromonas macleodii*, 118

*Amphidinium* sp., 83, 84, 91, 97

*Anabaena cylindrical*, 14

*Anabaena* sp. PCC 7120.

See *Nostoc* sp. PCC 7120

*Anabaena* sp., 6, 12, 23, 44, 56, 58, 60, 118

*Anabaena variabilis*, 56

*Anabaena variabilis* ATCC 29413, 23, 57, 60, 118

*Anacystis nidulans* R2.

See *Synechococcus elongatus* PCC 7942

*Ankistrodesmus* sp., 10, 12

*Arabidopsis thaliana*, 21, 25, 26

*Arthrospira maxima*, 6, 104

*Arthrospira maxima* CS-328, 20

*Arthrospira platensis*, 6, 13, 14, 20, 56

*Arthrospira platensis* C1, 20, 23, 28, 60

*Arthrospira platensis* NIES-39, 20

*Arthrospira platensis* Paraca, 20

*Arthrospira* sp., 1, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 20

*Arthrospira* sp. PCC 8005, 20

*Aulosira fertilissima*, 6, 14

*Aulosira* sp., 12

### B

*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, 66

*Botryococcus braunii*, 14, 27

*Botryococcus* sp., 2, 123

### C

*Caenorhabditis elegans*, 31

*Calothrix scytonemicola*, 14

*Calothrix* sp., 1, 6, 12

*Calothrix* sp. PCC 6303, 23

*Chaetoceros calcitrans*, 11

*Chaetoceros* sp., 84

*Chaetophora* sp., 2

*Chlamydomonas reinhardtii*, 7, 18, 25, 26, 27, 28,  
29, 30, 32, 35, 77, 78, 79, 80, 81, 83, 84,

85, 87, 89, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100,  
101, 102, 103, 104, 105, 106, 123, 124

*Chlamydomonas reinhardtii* cc-503, 26

*Chlamydomonas* sp., 2, 7, 10, 87

*Chlorella ellipsoidea*, 95

*Chlorella kessleri*, 83, 89

*Chlorella sorokiniana*, 89

*Chlorella* sp., 7, 10, 11, 12, 14, 81, 87, 123

*Chlorella vulgaris*, 26, 27, 89, 92

*Chlorella zofingiensis*, 33, 35

*Clostridium acetobutylicum*, 118

*Coelastrum* sp., 10

*Cyanidioschyzon merolae*, 82

*Cyanidioschyzon merolae* strain 10D, 26

*Cyanothece* ATCC 51142, 29, 30

*Cyanothece* sp., 118

*Cyanothece* sp. PCC 7822, 23

*Cyclotella cryptica*, 90, 123

*Cylindrotheca fusiformis*, 91

### D

*Drosophila melanogaster*, 31

*Dunaliella bardawil*, 12, 32

*Dunaliella salina*, 7, 34, 35, 80, 83, 89, 92, 95, 105

*Dunaliella salina* CCAP 19/18, 27

*Dunaliella* sp., 10, 81, 87, 123

*Dunaliella tertiolecta*, 89, 94, 96

### E

*Escherichia coli*, 45, 46, 47, 49, 51, 52, 53, 54, 56,  
57, 58, 59, 66, 68, 69, 70, 71,  
93, 103, 106, 107

*Ettlia oleoabundans*.

See *Neochloris oleoabundans*

*Euglena gracilis*, 80, 91, 94, 96

*Euglena* sp., 10

**F**

<i>Fischerella</i> sp.,	6
<i>Fischerella</i> sp. PCC 9339,	23
<i>Flavobacterium</i> sp.,	67
<i>Fremyella diplosiphon</i> PCC 7601,	57, 60

**G**

<i>Galdieria</i> sp.,	13
<i>Gloeocapsa alpicola</i> ,	14
<i>Gonium pectorale</i> ,	84, 89
<i>Gymnodinium</i> sp.,	8

**H**

<i>Haematococcus pluvialis</i> ,	7, 13, 32, 33, 34, 35, 90, 93, 94, 95, 96,
----------------------------------	---

**I**

<i>Isochrysis galbana</i> ,	90, 93
-----------------------------	--------

**L**

<i>Lactobacillus acidophilus</i> ,	10
<i>Lactobacillus lactis</i> ,	121
<i>Leptolyngbya</i> sp. strain BL0902,	44

**M**

<i>Micractinium</i> sp.,	10
<i>Micromonas</i> sp.,	7
<i>Micromonas</i> sp. RCC 299,	26, 27

**N**

<i>Nannochloris</i> sp.,	7
<i>Nannochloropsis gaditana</i> ,	95
<i>Nannochloropsis gaditana</i> CCMP 526,	26
<i>Nannochloropsis granulata</i> ,	27, 95
<i>Nannochloropsis oceanica</i> ,	95, 124
<i>Nannochloropsis oculata</i> ,	95
<i>Nannochloropsis</i> sp.,	8, 11, 13, 82, 90, 92, 123
<i>Navicula saprophila</i> ,	90

<i>Neochloris oleoabundans</i> ,	4, 7, 14, 28, 83, 84, 90, 92, 95, 98, 101, 123, 126, 127, 128
----------------------------------	--

<i>Neochloris</i> sp.,	2
<i>Nicotiana tabacum</i> ,	21
<i>Nitzschia</i> sp.,	9
<i>Nostoc muscorum</i> ,	6
<i>Nostoc punctiforme</i> ,	14, 53, 54
<i>Nostoc punctiforme</i> ATCC 29133,	57, 60
<i>Nostoc</i> sp.,	1, 6, 10, 12, 118
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120,	23, 48, 52, 54, 57, 58, 60, 67, 118

**O**

<i>Odontella aurita</i> ,	10
<i>Oedogonium</i> sp.,	2
<i>Oocystis</i> sp.,	10
<i>Oscillatoria acuminata</i> PCC 6304,	23
<i>Oscillatoria</i> sp.,	10, 14, 120
<i>Ostreococcus lucimarinus</i> ,	30
<i>Ostreococcus lucimarinus</i> CCE 9901,	26
<i>Ostreococcus tauri</i> ,	30, 90
<i>Ostreococcus tauri</i> OTTH 0595,	27

**P**

<i>Penicillium digitatum</i> ,	121
<i>Phaeodactylum</i> sp.,	9
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> ,	79, 80, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97
<i>Platyrnonas subcordiformis</i> ,	90, 96
<i>Porphyridium</i> sp.,	7, 10, 13
<i>Prochlorococcus</i> sp.,	2, 5, 6, 19, 20, 27
<i>Prochlorococcus</i> sp. MIT 0604,	23
<i>Prochlorothrix</i> sp.,	5, 6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ,	103
<i>Pseudomonas syringae</i> ,	121
<i>Pueraria montana</i> ,	68
<i>Pyramimonas</i> sp.,	7

## R

<i>Ralstonia eutropha</i> ,	69
<i>Renilla reniformis</i> ,	97
<i>Rhodella</i> sp.,	13

## S

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ,	31, 127
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> H1246,	126
<i>Scenedesmus obliquus</i> ,	90, 92, 124
<i>Scenedesmus</i> sp.,	7, 10, 11, 12, 81
<i>Schizochytrium</i> sp.,	13, 123
<i>Scytonema</i> sp.,	12
<i>Skeletonema costatum</i> ,	11
<i>Spirulina maxima</i> .	
<i>See Arthrospira maxima</i>	
<i>Spirulina platensis</i> .	
<i>See Arthrospira platensis</i>	
<i>Spirulina platensis</i> C1.	
<i>See Arthrospira platensis</i> C1	
<i>Spirulina</i> sp.,	
<i>See Arthrospira</i> sp.	
<i>Staphylococcus aureus</i> ,	105
<i>Streptoalloteichus hindustanus</i> ,	93
<i>Streptomyces hygroscopicus</i> ,	94
<i>Symbiodinium microadriaticum</i> ,	91
<i>Symbiodinium</i> sp.,	83, 84, 97
<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 6301,	20, 57, 60
<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942,	3, 5, 6, 19, 20,
21, 22, 23, 44, 46, 47, 48, 49, 50, 51,	
53, 54, 56, 57, 60, 61, 63, 65, 67, 69,	
70, 116, 118, 120, 121	
<i>Synechococcus</i> sp.,	1, 2, 20, 49, 118
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002,	44, 57, 60, 120, 122
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942.	
<i>See Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	
<i>Synechocystis</i> sp.,	1, 13, 68, 118
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803,	5, 18, 19, 22, 23,
28, 29, 30, 44, 46, 48, 49, 56, 57, 60,	
61, 67, 69, 116, 118, 119, 120, 121, 122	

## T

<i>Tetraselmis</i> sp.,	7
<i>Thalassiosira pseudonana</i> ,	11, 30, 79, 84, 91
<i>Thalassiosira pseudonana</i> CCMP1335,	26
<i>Thalassiosira</i> sp.,	9
<i>Thalassiosira weissXogii</i> ,	91
<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1,	57, 60, 122
<i>Tolypothrix</i> sp.,	12
<i>Tolypothrix</i> sp. PCC 7601.	
<i>See Fremyella diplosiphon</i> PCC 7601	
<i>Trentepohlia jolithus</i> ,	34
<i>Trichoderma reesei</i> ,	106

## U

<i>Uronema</i> sp.,	10
---------------------	----

## V

<i>Volvox carteri</i> ,	80, 84, 90, 95
<i>Volvox carteri</i> f. <i>nagariensis</i> ,	26
<i>Volvox</i> sp.,	2, 87

## X

<i>Xenococcus</i> sp.,	1, 5
<i>Xenococcus</i> sp. PCC 7305,	23

## Z

<i>Zymomonas mobilis</i> ,	120
----------------------------	-----

# Subject Index

## A

acetoacetate decarboxylase, 69  
 acetone, 69  
 acetyl-CoA, 34, 116  
 acetyl-CoA carboxylase, 123, 125  
 acyl-ACP reductase, 117  
 acyl-acyl carrier protein reductase, 121  
 acyl-CoA synthetase, 125  
 alcohol dehydrogenase, 117, 120  
 aldehyde decarbonylase, 117, 121  
 alkane, 70, 116  
 alkene, 120  
 aminoglycoside phosphotransferase, 94, 95  
 ampicillin, 53, 54, 58, 99  
 antibody, 47, 102, 103  
 antioxidant, 13, 32

## B

BioBricks, 44  
 biodiesel, 7, 14, 98, 123, 137  
 biodiversity, 2, 77, 135  
 biofertilizer, 6, 12, 137  
 biofuel, 2, 14, 70, 115, 135  
 bioinformatics, 14, 17  
 bioplastic, 13, 69  
 biorefinery, 135  
 bioremediation, 67  
 biosensor, 68  
 bleomycin, 54

## C

$\beta$ -carotene hydroxylase, 33  
 $\beta$ -carotene ketolase, 21, 33, 34  
 $\zeta$ -carotene desaturase, 33  
 carotenoid, 11, 32  
   astaxanthin, 7, 12, 22, 32  
    $\beta$ -carotene, 7, 12, 32

chloramphenicol, 53, 54, 58, 65, 94, 96  
 chlorophyll, 1, 5, 85, 127  
 chloroplast genome, 25, 27, 78  
 cholera toxin B subunit, 104, 105  
 CO<sub>2</sub>-concentrating mechanisms (CCM), 21  
 codon usage, 49, 78  
 cytochrome c6, 79, 83

## D

diacylglycerol acyltransferase (DGAT), 123, 125  
 dimethylallyl diphosphate, 32, 33  
 disulfide bond, 81  
 DNA transformation, 44

## E

endonuclease, 56, 57  
 endosymbiosis, 26, 87, 123  
 erythromycin, 64, 65, 94, 96  
 erythropoietin, 104  
 ethanol, 70, 116  
 ethylene, 116  
 ethylene-forming enzyme, 117, 121  
 exotoxin A, 103

## F

fatty acid composition, 126  
 fatty acyl-ACP thioesterase, 125  
 flux balance analysis, 30  
 fluxome, 30  
 fluxomics, 30  
 foot and mouth disease, 104  
 fossil fuel, 115, 137  
 free fatty acid, 70, 123, 127

## G

$\beta$ -galactosidase, 50  
 gene silencing, 32, 78, 124

gene transfer			
conjugation,	50, 56, 57, 60, 91, 93		
electroporation,	50, 60, 89, 92, 126		
natural transformation,	50, 56		
glass beads,	89, 92		
microparticle bombardment,	88, 89, 90, 91		
silicon carbide whiskers,	89, 91, 92		
genetic engineering,	31, 43, 77		
genome			
chloroplast genome,	25, 27, 78		
cyanobacterial genome,	23		
microalgal genome,	26		
mitochondrial genome,	17		
nuclear genome,	25, 26		
genome annotation,	19		
genome assembly			
comparative assembly,	19		
de novo assembly,	19		
genomic island,	21		
genomics,	17, 136		
geranylgeranyl pyrophosphate synthase,	33		
global warming,	2, 136		
$\beta$ -glucuronidase,	50		
glufosinate,	96		
glycerol 3-phosphate acyltransferase,	125		
glycosylation,	28, 80		
green fluorescent protein (GFP),	46, 47, 50, 94, 97, 98, 99, 100, 101		
<b>H</b>			
herpes simplex virus,	102		
high-throughput data,	17, 136		
homologous recombination,	51, 82		
hydrogen,	14, 70, 116, 137		
hydrogenase,	117, 118		
hygromycin B,	94, 95, 99		
<b>I</b>			
immunotoxin,	102		
intron,	79, 99, 100		
isobutanol,	70, 116		
isobutyraldehyde,	116		
isopentenyl pyrophosphate,	32, 33		
isoprene,	68		
isoprene synthase,	49, 68		
<b>K</b>			
kanamycin,	53, 58, 65, 96, 99		
ketoacid decarboxylase,	117, 121		
<b>L</b>			
lactic acid,	69		
levansucrase,	61, 62		
lipid body,	126		
lipid,	13, 98, 123, 137		
luciferase,	50, 68, 94, 97		
lycopene $\beta$ -cyclase,	33		
lysophosphatidic acid acyltransferase,	125		
<b>M</b>			
malaria,	105		
malonyl-CoA: ACP transferase,	125		
metabolic engineering,	31, 43, 77, 116		
metabolic model,	29		
metabolic pathway,	27, 43, 77, 116		
metabolite,	17, 68		
metabolome,	17		
metabolomics,	17, 136		
methylerythritol phosphate (MEP),	33, 34, 35		
mevalonate (MVA),	33, 34		
molecular genetics,	44, 77		

**N**

NCBI, 20, 23, 25, 26, 27, 34  
 neomycin, 53, 54  
 neutral lipid, 126  
 next-generation sequencing (NGS), 18  
 Nile red, 126  
 nitrogenase, 118  
 nopaline synthase, 46, 84  
 nuclear genome, 78

**O**

organophosphate 67  
 organophosphorus hydrolase, 67

**P**

phleomycin, 93, 95  
 phosphatidic acid phosphatase, 125  
 phosphorylation, 28  
 phosphotransacetylase, 69  
 photoinhibition, 70  
 photorespiration, 21  
 phycobilin, 9, 13  
   allophycocyanin, 13, 103  
   phycocyanin, 7, 13, 66, 70  
   phycoerythrin, 7, 13  
 phycobiliprotein, 66  
 phylogenetic tree, 5, 20  
 phynomics, 30  
 phytase, 106  
 phytoene desaturase, 33, 35  
 phytoene synthase, 33, 35  
 pigment, 1, 7, 13, 32, 66, 70, 103, 137  
 plasmid  
   cargo plasmid, 58  
   conjugative plasmid, 57, 93  
   helper plasmid, 58  
   integrative plasmid, 50, 54  
   replicative plasmid, 50, 54  
   suicide plasmid, 51

poly-hydroxyalkanoate, 69  
 poly-3-hydroxybutyrate, 6, 13, 69  
 polyunsaturated fatty acid  
   docosahexaenoic acid, 8, 13  
   eicosapentaenoic acid, 8, 13  
    $\gamma$ -linolenic acid, 5, 10, 13  
 promoter, 44, 48, 78, 83, 84, 85, 98, 99  
 protein-protein interaction, 28  
 proteome, 17  
 proteomics, 17, 28, 136  
 pyruvate, 34, 116, 117, 120  
 pyruvate decarboxylase, 117, 120

**R**

recombinant DNA, 43, 78  
 recombinant protein, 78  
 reporter gene, 44, 94  
 ribosome binding site (RBS), 44, 49  
 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase  
   (Rubisco), 21, 70  
 rifampicin, 58  
 RNA  
   antisense RNA, 28, 49  
   high-throughput RNA sequencing (RNA-seq), 22,  
     27, 34  
   microRNA, 80  
   noncoding RNA, 28, 80  
   small interfering RNA, 80  
 RNA interference (RNAi), 22, 31, 80, 107, 136  
 RNA polymerase (RNAP), 45  
 rRNA  
   16S rRNA, 5, 20, 26, 49  
   18S rRNA, 5  
   23S rRNA, 64  
   28S rRNA, 5

## S

segregation,	51, 61
selectable marker,	53, 54, 58, 93, 95, 96
Shine-Dalgarno (SD),	47, 49
sigma factor,	45
spectinomycin,	54, 58, 65, 94, 95, 96
splicing signal,	78
streptomycin,	53, 54, 94, 95
surface display,	50, 67
synthetic biology,	43

## T

taxonomy,	5, 20, 136
tetracycline,	58
transcription factor,	28, 45, 46
transcription terminator,	45
transcriptome,	17
transcriptomics,	17, 136
transesterification,	115
triacylglycerol (TAG),	98, 107, 123, 124, 125, 126, 127, 137
$\beta$ 2-tubulin,	83, 99

## W

white spot syndrome virus	105
---------------------------	-----

## X

xylanase,	106
-----------	-----

## Z

zeocine,	78, 95
----------	--------





### ประวัติผู้เขียน

รศ. ดร.วิภา จິงจตุพรชัย

สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

โทร. 0-2441-9003-7 ต่อ 1235

E-mail : wipa.chu@mahidol.ac.th

### การศึกษา

- 2523 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.) สาขาเทคนิคการแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- 2528 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (M.Sc.) สาขาชีววิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุล (Molecular Biology) Free University of Brussels ประเทศเบลเยียม
- 2532 ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (Ph.D.) สาขาชีววิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุล (Molecular Biology) Free University of Brussels ประเทศเบลเยียม

### สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ

ชีววิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุล พันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล พันธุวิศวกรรมศาสตร์ การควบคุมการแสดงออกของยีน แบคทีเรีย ไชยาโนแบคทีเรีย และจุลสาหร่าย

### การรับราชการ

- 2536 อาจารย์ สาขาวิชาอนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล
- 2539 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาอนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล
- 2542 รองศาสตราจารย์ สาขาวิชาอนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

### หมายเหตุ:

- สาขาวิชาอนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์ ปัจจุบันเปลี่ยนชื่อเป็นสาขาวิชาพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลและพันธุวิศวกรรมศาสตร์
- สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และสถาบันอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์ ปัจจุบันคือ สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล





โซยาโนแบคทีเรีย (สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน) และจุลสาหร่าย มีศักยภาพสูงในการประยุกต์ใช้ต่าง ๆ เช่น เป็นอาหารของคน อาหารเสริมของสัตว์ ปุ๋ยชีวภาพ ผลิตภัณฑ์มูลค่าสูง และเชื้อเพลิงชีวภาพ เป็นต้น “โซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่าย : พันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลและเทคโนโลยีชีวภาพ” เป็นหนังสือที่รวบรวมเนื้อหาเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้โซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายด้านเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ใช้องค์ความรู้พันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล แสดงให้เห็นถึงแนวคิดและความหลากหลายของเทคโนโลยีที่มีการรายงานในปัจจุบัน รวมทั้งชี้ให้เห็นถึงการพัฒนาที่เป็นไปได้ในอนาคต

- กล่าวถึง :
  - ศาสตร์โอมิกส์ (omics) ต่าง ๆ ของโซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่าย เช่น จีโนมิกส์ (genomics) โปรตีโอมิกส์ (proteomics) และเมแทบอลโอมิกส์ (metabolomics)
  - การปรับปรุงพันธุ์ให้โซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่ายเป็น “โรงงาน” สำหรับผลิตสารธรรมชาติใหม่ ๆ ในเชิงพาณิชย์ โดยใช้วิศวกรรมเมแทบอลิก (metabolic engineering) และพันธุวิศวกรรม (genetic engineering)
  - การผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพจากโซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่าย
- เหมาะสำหรับนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา นักวิจัย และนักวิชาการ

