Thesis Title Phycobiliprotein from Thermotolerant Cyanobacteria Isolated from Hot Spring and Its Antioxidative Activity

Author Mr. Chayakorn Pumas

Degree Doctor of Philosophy (Biotechnology)

Thesis Advisory Committee

Lect. Dr. Chartchai Khanongnuch	Advisor
Assoc. Prof. Dr. Yuwadee Peerapornpisal	Co-advisor
Prof. Dr. Saisamorn Lumyong	Co-advisor
Assoc. Prof. Pimporn Leelapornpisid	Co-advisor

ABSTRACT

Four cyanobacterial strains including *Cyanosarcina* sp. SK40, *Leptolyngbya* sp. KC45, *Phormidium* sp. PD40-1 and *Scytonema* sp. TP40 were selected and investigated for the phycobiliprotein (PBPs) content and the thermostable antioxidant activity of their cell-free extracts. The highest content of phycobiliprotein was found in *Leptolyngbya* sp. KC45 and the main PBPs was phycoerythrin (PE). Among the PBPs in four thermotolerant cyanobacteria, the PE from *Leptolyngbya* sp. KC45 exhibited the highest thermal stability as 80% of the original level remained after being heated to 60ºC for 30 min. Antioxidant activities determined by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) and reducing power assay was also found in the highest value in cell free extract of *Leptolyngbya* sp. KC45.

Phycoerythrin was purified from the *Leptolyngbya* sp. KC45 with the purity index of 17.388 measured at A565/A280. SDS-PAGE analysis revealed that the purified PE consisted of the α- and β-subunit with the molecular mass of 18 and 21 kDa, respectively. The native protein was concluded to be hexamer with a molecular mass of approximately 235 kDa based on the results from SDS-PAGE and gel

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

filtration, respectively. N-terminal amino acid sequences shared the highest percent of identities with *Fremyella diplosiphon* Fd33 (100% for α- and 90% for β-subunit). Phycoerythrin and its DPPH scavenging activity remained at approximately 80% of the original level after being heated at 60°C for 30 min.

Phycoerythrin encoding genes were sequenced and found that the β-subunit gene consisting of 555 nucleotides (nt) coding for 184 amino acids, while the α-subunit gene consisting of 495 nt coding for 164 amino acids. The deduced proteins showed high homology with PE from *F. diplosiphon* Fd33 (95% identity for α- and 96% for β-subunit). *cpe*B (PE β-subunit gene) and *cpe*A (PE α-subunit gene) of *Leptolyngbya* sp. KC45 were successfully cloned and expressed in *E. coli* BL21 (DE3). The recombinant protein of both α- and β-subunit was found as an inclusion body. Reduction of expression level by decreasing of IPTG concentration and expression temperature could not improve the water solubility of recombinant protein. The insoluble portion was tried to refold and renature by On column chromatography and the purified soluble recombinant proteins were assembled with bilin, unfortunately the precipitation of protein was observed after bilin addition. The *cpe*B and *cpe*A genes were co-expressed with a vector containing bilin synthesis gene, pKT278. Both recombinant proteins from the two vectors were successfully co-expressed. Apo-protein was detected in an inclusion body and exhibited the binding affinity toward bilin, however, the color and fluorescence properties of PE were not able to be observed.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ไฟโคบิลิโปรตีนจากไซยาโนแบคทีเรียทนความร้อนที่แยกจากน้ำพุร้อนและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ผู้เขียน นายชยากร ภูมาศ

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

อ. ดร ชาติชาย โขนงนุช	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
รศ.ดร. ยุวดี พีรพรพิศาล	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ศ. ดร. สายสมร ลำยอง	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
รศ. พิมพร ลีลาพรพิสิฐ	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การศึกษาปริมาณไฟโคบิลิโปรตีนและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทนร้อนในไซยาโนแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Cyanosarcina* sp. SK40, *Leptolyngbya* sp. KC45, *Phormidium* sp. PD40-1 และ *Scytonema* sp. TP40 พบว่า *Leptolyngbya* sp. KC45 เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่มีปริมาณไฟโคบิลิ-โปรตีนสูงที่สุด และชนิดของไฟโคบิลิโปรตีนที่พบส่วนมากคือไฟโคอีริธริน การศึกษาเปรียบเทียบความทนร้อนของไฟโคบิลิโปรตีนจากไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์พบว่าไฟโคอีริธรินจาก *Leptolyngbya* sp. KC45 มีความทนอุณหภูมิสูงที่สุด โดยยังคงเหลือปริมาณรงควัตถุดังกล่าว 80% หลังบ่มที่ 60°C เป็นเวลา 30 นาที จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากไซยาโน-แบคทีเรียพบว่า *Leptolyngbya* sp. KC45 ยังคงเป็นสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเมื่อวัดด้วยวิธี DPPH และ reducing power assay

ไฟโคอีริธรินจาก *Leptolyngbya* sp. KC45 ถูกทำให้บริสุทธิ์ โดยมีสัดส่วนค่าการดูดกลืนแสง A565/A280 เป็น 17.38 ผลการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE พบว่าไฟโคอีริธรินจาก *Leptolyngbya* sp. KC45 ประกอบด้วยโปรตีนขนาด 21 และ 18 kDa และผลการวิเคราะห์โดย gel

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

filtration ทำให้ทราบว่าโปรตีนดังกล่าวมีโครงสร้างแบบหกหน่วยย่อย ซึ่งมีขนาดประมาณ 235 kDa การวิเคราะห์ลำดับของกรดอะมิโนส่วนปลาย N พบว่ามีความคล้ายคลึงกับไฟโคอีริธรินจากไซยาโนแบคทีเรีย *Fremyella diplosiphon* Fd33 (100% identity สำหรับ α-subunit และ 90% ของ β-subunit) ผลการศึกษาการทนอุณหภูมิสูงของไฟโคอีริธรินบริสุทธิ์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่ายังคงเหลือไฟโคอีริธริน และ DPPH scavenging activity ถึง 80% ของปริมาณเริ่มต้นหลังบ่มที่ 60°C เป็นเวลา 30 นาที

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไฟโคอีริธรินยีน พบว่ายีนของ β-subunit ประกอบด้วย 555 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งถอดรหัสได้เป็น 184 กรดอะมิโน ในขณะที่ยีนของ α-subunit ประกอบด้วย 495 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งถอดรหัสได้เป็น 164 กรดอะมิโน ลำดับกรดอะมิโนของไฟโคอีริธรินที่ถอดรหัสได้มีความเหมือนกันสูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับไฟโคอีริธรินจาก *F. diplosiphon* Fd33 (95% identity ของ α-subunit และ 96% ของ β-subunit) ยีน *cpe*B และ *cpe*A ถูกโคลนและแสดงออกใน *E. coli* BL21 (DE3) อย่างไรก็ตามรีคอมบิแนนท์โปรตีน ของ α-subunit หรือ β-subunit แสดงออกในรูปของ inclusion body การลดระดับการแสดงออกของยีนโดยการลดความเข้มข้นของ IPTG และอุณหภูมิสำหรับการแสดงออก ไม่สามารถแก้ปัญหาการเกิด inclusion body ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้ โปรตีนที่ไม่ละลายน้ำถูกนำมาผ่านขั้นตอนการทำให้คลายตัวและจัดเรียงโครงสร้างใหม่โดยเทคนิค On column chromatography และนำโปรตีนบริสุทธิ์มาประกอบเข้ากับบิลิน อย่างไรก็ตามพบว่าเกิดการตกตะกอนของโปรตีนภายหลังการเติมบิลิน

ยีน *cpe*B และ *cpe*A ถูกโคลนและแสดงออกร่วมกันกับเวคเตอร์ที่มียีนสำหรับการสังเคราะห์บิลิน (pKT278) พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนจากทั้ง 2 เวคเตอร์สามารถแสดงออกร่วมกันได้ และอะโปโปรตีนที่แสดงออกในรูป inclusion body ยังคงแสดงความสามารถในการจับกับบิลินได้ อย่างไรก็ตามไม่สามารถตรวจพบการเกิดสีและการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved