T 130584

Spirulina platensis เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันแกมม่าลิโนลินิก (γ-linolenic acid หรือ GLA) ซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่ใช้อย่างแพร่หลายในด้านเภสัชกรรมและอาหารเสริมสุขภาพ โดยมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการเติมพันธะคู่ในกระบวนการสังเคราะห์ GLA อยู่ 3 ชนิด คือ Δ^9 desaturase, Δ^{12} desaturase และ Δ^6 desaturase ที่เติมพันธะคู่ให้กับกรดสเตียริก (stearic acid), กรดโอลิอิก (oleic acid) และ กรดลิโนลิอิก (linoleic acid) ตามลำดับ งานวิจัยนี้สนใจศึกษาความสามารถของเอนไซม์ Δ^6 desaturase ซึ่งคาดว่าเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาใน rate–limiting step ของกระบวนการเติมพันธะคู่ (desaturation) การศึกษาจลนศาสตร์ (kinetics) ของเอนไซม์ Δ^6 desaturase ใน *Spirulina platensis* สายพันธุ์ C1 โดยใช้ลิโนลิเอทในรูปเกลือโซเดียมเป็นสับสเตรท (substrate) พบว่า *S. platensis* มีความสามารถในการนำลิโนลิเอทจากภายนอกเข้าสู่เซลล์ เพื่อนำไปใช้ในการสังเคราะห์ GLA ได้ โดยที่ปริมาณของ GLA เพิ่มมากขึ้นถึงร้อยละ 77 เมื่อเติมลิโนลิเอทความเข้มข้น 0.8 มิลลิโมลาร์ การคำนวนค่า V_{max} และ ค่า K_m โดยใช้สมการ Michaelis–Menten จะได้ค่าเท่ากับ 0.98 มิลลิกรัม GLA/กรัมของโปรตีน ชั่วโมง และ 0.4 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ นอกจากนี้ *S. platensis* ยังมีความสามารถในการนำโอลิเอทจากแหล่งภายนอกเข้าสู่เซลล์และเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของไกลโคลิปิด (glycolipid) เพื่อนำไปสังเคราะห์ GLA ได้เช่นเดียวกับลิโนลิเอท แต่ปริมาณ GLA ที่สร้างขึ้นน้อยกว่าเมื่อเติมลิโนลิเอท โดย GLA เพิ่มขึ้นสูงสุดร้อยละ 22 เมื่อเติมโอลิเอทความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้ยังพบว่าอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อการสังเคราะห์ GLA ของ *S. platesis* เช่นกัน เมื่อทำการเปลี่ยนอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงทันทีจาก 35 องศาเซลเซียส เป็น 22 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณของ GLA ที่ 22 องศาเซลเซียส สูงกว่าที่ 35 องศาเซลเซียส ประมาณร้อยละ 13 เมื่อเติมลิโนลิเอท และร้อยละ 20 เมื่อเติมโอลิเอท ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิที่ลดต่ำลงมีส่วนเหนี่ยวนำให้การทำงานของเอนไซม์ (enzymatic activity) Δ^6 desaturase สูงขึ้น

เมื่อทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของลิปิดชนิดต่างๆ คือ monogalactosyl diacylglycerol (MGDG), digalactosyl diacylglycerol (DGDG), sulfoquinovosyl diacylglycerol (SQDG) และ phosphatidyl glycerol (PG) ของเซลล์ที่เจริญที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และเซลล์ที่ย้ายจาก 35 องศาเซลเซียส ไปยัง 22 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณ GLA ที่เพิ่มสูงขึ้นถูกสะสมอยู่ในชั้น MGDG และ DGDG เป็นส่วนใหญ่ ขณะที่ ลิโนลิเอทและโอลิเอท ที่เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ถูกนำไปสะสมอยู่ในชั้น PG และ SQDG เป็นส่วนใหญ่และยังแสดงให้เห็นว่า *S. platensis* มีความสามารถในการนำเอาสับสเตรทจากแหล่งภายนอกเข้าสู่เซลล์ได้ในปริมาณสูง รวมทั้งยังเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของไกลโคลิปิด เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการเติมพันธะคู่ของกรดไขมันภายในเซลล์ได้ จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการเติมสับเตรทจากแหล่งภายนอกอาจจะนำไปใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการพัฒนาการผลิต GLA จาก *S. platensis* ให้ได้ในระดับที่ต้องการต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ (Keywords) : สไปรูลินา / Δ^6 desaturase / การเติมพันธะคู่ของกรดไขมัน / กรดแกมม่าลิโนลินิก (GLA)

Abstract

TE 139564

Spirulina platensis is a high potential cyanobacterium to be used as a source for γ-linolenic acid (GLA) production. GLA is a polyunsaturated fatty acid that has been commercially used for pharmaceutical and food supplement. The enzymes involved in the desaturation steps are Δ^9, Δ^{12} and Δ^6 desaturases, which introduce double bonds to stearic acid, oleic acid and linoleic acid, respectively. The present study is focused on the Δ^6 desaturase, which is thought to play a key role in rate limiting step of the GLA biosynthesis. The kinetics of Δ^6 desaturase in *Spirulina platensis* strain C1 was studied. The results showed that *S. platensis* can uptake exogenously added sodium linoleate, which is the substrate of Δ^6 desaturase, into the cells and then transformed the substrate to glycolipid form. Subsequently, the Δ^6 desaturase used the substrate in the form of glycolipid in the desaturation process to synthesize γ-linolenic acid (GLA). When the culture was supplemented with 0.8 mM of sodium linoleate, the amount of GLA increased approximately 77 % compared to the control (without sodium linoleate supplementation). The V_{max} and K_m were 0.98 mg GLA/g protein·h and 0.4 mM, respectively. In addition, sodium oleate supplementation gave similar results to the sodium linoleate supplementation. However, the increase amount of GLA synthesized after the addition of 0.5 mM sodium oleate was approximately 22 % compared to the control (without supplemented sodium oleate). Furthermore, when the growth temperature was shifted from 35 °C to 22 °C, GLA content at 22°C was approximately 13 % and 20 % higher than that of at 35 °C when supplemented with linoleate and oleate, respectively. The result implied that low temperature had an effect on the enzymatic activity of Δ^6 desaturase, yielding the increase of GLA production in the cells.

By analysis of fatty acid composition in lipid classes, monogalactosyl diacylglycerol (MGDG), digalactosyl diacylglycerol (DGDG), sulfoquinovosyl diacylglycerol (SQDG) and phosphatidyl glycerol (PG) isolated from the cells grown at 35°C and the cells grown under shifted temperature from 35 °C to 22 °C, the result revealed that most of GLA content was accumulated in MGDG and DGDG. While exogenously added linoleate and oleate were accumulated in PG and SQDG. These findings suggested that the substrate supplementation might be an alternative way of the development of GLA production in *S. platensis*.

Keywords : *S. platensis* / Δ^6 desaturase / fatty acid desaturation / γ-linolenic acid (GLA)