

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ นางสาวศุภมาส ถนอมมัน นางสาวอารยา แจ่มไพโร นางสาวธาราทิพย์ พิทักษ์สงค์ นักศึกษาปริญญาโท ที่ได้ช่วยดำเนินการวิจัยนี้จนสำเร็จลุล่วง

ผู้วิจัยขอขอบคุณ นายสุนัย พลายมี หัวหน้างานสัตว์น้ำ ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี รวมทั้งบุคลากรฝ่ายสนับสนุนทุกท่าน ที่ได้ให้การช่วยเหลือ ให้คำแนะนำต่าง ๆ จนทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ผู้วิจัยขอขอบคุณนางสาวศิริวรรณ เพชรสมบัติ หัวหน้างานกลุ่มห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ และนายมานะ ชาญเวช พนักงานวิทยาศาสตร์ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ ที่ได้ให้การช่วยเหลือ และคำแนะนำต่าง ๆ ในการทำงานวิจัยนี้

ท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณคณาจารย์ บุคลากรและนักศึกษา ของสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ที่ได้ให้การช่วยเหลือ คำแนะนำ และการสนับสนุนในด้านต่าง ๆ สำหรับงานวิจัยนี้

ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ได้ให้เงินทุนสนับสนุนการวิจัย และขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ในการให้ความอนุเคราะห์การใช้เครื่องมือการวิจัย และฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีในการทำงานวิจัยนี้

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการโคลนยีน delta-6 desaturase (*fads2*) จากปลาไนลเพื่อนำมาโคลนเข้าสู่ pYES 2.1 เพื่อสร้างพลาสมิด pYoni-*fads2* และนำเข้าสู่ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อให้มีการแสดงออกเอ็นไซม์ delta-6 desaturase เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยน้ำตาลกาแลคโตส พบว่ายีน *onifads2* ที่ได้จากปลาไนมีโครงสร้างของยีนตรงกับโครงสร้างของยีน *fads2* ในปลาต่าง ๆ และมีความคล้ายคลึงของกรดอะมิโนกับปลาอื่น ๆ อยู่ในช่วง 72.6%–80.9% การวิเคราะห์การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ด้วยวิธี Reverse transcription PCR (RT-PCR) พบว่ารีคอมบิแนนท์ยีสต์ (RY) ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้แสดงออกด้วยน้ำตาลกาแลคโตสเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีการผลิต mRNA ของยีน *onifads2* รีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่เลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคส ($4.82 \pm 0.59 \text{ mg g}^{-1}$) หรือน้ำตาลกาแลคโตส ($5.63 \pm 0.28 \text{ mg g}^{-1}$) มีปริมาณไขมันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) RY ที่เลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลกาแลคโตสมีกรดไขมัน C18:2n6 และ C18:3n3 ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเอ็นไซม์ delta-6 desaturase ในปริมาณต่ำ และพบว่า RY ที่เลี้ยงด้วยน้ำตาลกาแลคโตส มี C18:4n3 สูงกว่า C18:4n3 ใน RY ที่เลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

การวิจัยนี้ได้ศึกษาถึงผลของการใช้ RY ต่อการเพิ่มปริมาณของ PUFA ในอาร์ทีเมีย โดยทำการเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วย RY หรือ ยีสต์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (กลุ่มควบคุม, WT) เป็นระยะเวลา 12, 18 และ 24 ชั่วโมง พบว่าอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วย RY มีกรดไขมันกลุ่ม n6 ได้แก่ C18:2n6, C18:3n6, C20:3n6 และ C20:4n6 และ กรดไขมันกลุ่ม n3 ได้แก่ C18:3n3, C18:4n3, C20:3n3, C20:5n3 สูงกว่าอาร์ทีเมียกลุ่มควบคุม และพบว่าสัดส่วนของ C18:3n6 ต่อ C18:2n6 และ สัดส่วนของ C18:4n3 ต่อ C18:3n3 ในอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วย RY มีค่าสูงกว่าค่าสัดส่วนดังกล่าวในอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยยีสต์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน นอกจากนี้ยังพบ C22:6n3 ในอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วย RY ต่อมาได้ทำการศึกษาถึงผลของการใช้น้ำมันปลาและน้ำมันลินิน (FSO) ต่อองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย ผลการทดลองพบว่าอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยน้ำมันลินินมีปริมาณกรดไขมัน C18:2n6 และ C18:3n3 สูงขึ้นมาก ในขณะที่อาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยน้ำมันปลามีปริมาณกรดไขมัน C20:5n3 และ C22:6n3 สูงขึ้นมาก การทดลองต่อมาได้ทำการศึกษาผลของการเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วย RY ร่วมกับน้ำมันลินิน (RY+FSO) ต่อองค์ประกอบไขมันในอาร์ทีเมีย ผลการทดลองพบว่าอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วย RY + FSO มีกรดไขมัน C18:3n6, C18:4n3 และ C20:5n3 สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วย WT+FSO และการทดลองนี้ยังพบ C22:6n3 ในอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วย RY + FSO การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า รีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่มีการแสดงออกของยีน *onifads2* สามารถเพิ่มปริมาณ PUFA ในอาร์ทีเมียได้

Abstract

In this study, heterogenous expression of delta-6 desaturase (*fads2*) from Nile tilapia was produced to increase polyunsaturated fatty acid (PUFA) in artemia. First, the full-length cDNA of *fads2* (*oni-fads2*) was cloned from Nile tilapia. The *oni-fads2* was cloned into pYES 2.1 to generate pY*oni-fads2* and subsequently expressed in *Saccharomyces cerevisiae* under galactose induction. The RT-PCR was conducted to determine the expression of the recombinant *S. cerevisiae* (RY) that carried pY*oni-fads2*. The result showed that the transcript of the *oni-fads2* was conspicuously detected 24 h after galactose induction. No significant difference ($P > 0.05$) in the lipid content of RY was observed between RY grown in galactose ($5.63 \pm 0.28 \text{ mg g}^{-1}$) and glucose ($4.82 \pm 0.59 \text{ mg g}^{-1}$) as the carbon source. The endogenous substrates C18:2n6 and C18:3n3 were detectable when RY was grown in the presence of galactose and glucose. Furthermore, the level of C18:4n3 in the RY was higher in galactose-induction than that in SC media-glucose.

In order to investigate whether RY could increase PUFA content in artemia, artemia nauplii were fed with RY or non-transformed yeast (control yeast; WT) for 12, 18 and 24 h. The result showed that RY enriched artemia had higher amount of n6-PUFA (C18:2n6, C18:3n6, C20:3n6, C20:4n6) and n3-PUFA (C18:3n3, C18:4n3, C20:3n3, C20:5n3) when compared with that of WT enriched artemia. Ratio of C18:3n6 to C18:2n6 and C18:4n3 to C18:3n3 in RY enriched artemia were higher than that in WT enriched artemia. In addition, C22:6n3 was detectable in the RY enriched artemia. Next, the artemia nauplii were fed with fish oil (oil rich in C20:5n3 and C22:6n3) or flax seed oil (FSO) (oil rich in C18:2n6 and C18:3n3) to compare the fatty acid composition of enriched artemia. Compared to the control artemia (artemia without enrichment), fish oil enriched artemia had high content of C20:5n3 and C22:6n3 while FSO enriched artemia had high content of C18:2n6 and C18:3n3. The last experiment was conducted to investigate the fatty acid composition of the combination enrichment of RY and FSO in artemia (RY+FSO). Comparing with WT and FSO enriched artemia (WT+FSO), RY+FSO enriched artemia had greater amount of C18:3n6, C18:4n3 and C20:5n3. Additionally, RY+FSO had higher ratio of C18:3n6 to C18:2n6 and C18:4n3 to C18:3n3 than that in WT+FSO enriched artemia. Moreover, C22:6n3 was detectable in the RY+FSO enriched artemia. Taken together, RY expression *onifads2* could increase PUFA amount in artemia.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	16
ขอบเขตของการวิจัย	16
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	16
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย.....	18
บทที่ 3 ผลการวิจัย	
3.1 ผลการศึกษา.....	30
3.2 อภิปรายผลการศึกษา.....	61
บทที่ 4 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัย	66
ข้อเสนอแนะ	67
บรรณานุกรม	68
ภาคผนวก	75
ประวัติผู้วิจัย	76

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1.1	คุณค่าทางโภชนา (ค่าเฉลี่ย (%) \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ของอาร์ทีเมียในระยะอเพิกลิสและระยะตัวเต็มวัย	3
ตารางที่ 1.2	ความผันแปรขององค์ประกอบเปอร์เซนต์ eicosapentaenoic acid [EPA (C20:5n3) ในอาร์ทีเมียสายพันธุ์ต่าง	3
ตารางที่ 1.3	องค์ประกอบของกรดไขมัน PUFA ในอาร์ทีเมียระยะ Nauplii ที่เลี้ยงด้วยน้ำมันชนิดต่าง ๆ (enriched artemia)	5
ตารางที่ 1.4	องค์ประกอบของกรดไขมัน (% ของกรดไขมันทั้งหมด) ของอาร์ทีเมีย ที่เลี้ยงด้วยแพลงก์ตอนพืช <i>N. salina</i> เป็นระยะเวลา 8 และ 24 ชั่วโมง	6
ตารางที่ 1.5	องค์ประกอบของไขมันและกรดไขมัน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ของอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยอิมัลชันน้ำมันปลา และอดอาหารเป็น ระยะเวลา 24 และ 72 ชั่วโมง	8
ตารางที่ 1.6	ตารางเปรียบเทียบขนาดของ Coding Sequence (CDS) ของยีน $\delta 6$ desaturase ในปลาชนิดต่าง ๆ.....	14
ตารางที่ 1.7	ผลการสร้างรีคอมบีแนนท์ยีสต์ในยีสต์ชนิด <i>S. cerevisiae</i> โดยเวกเตอร์ ในกลุ่ม pYES และ โปรโมเตอร์ <i>GAL1</i>	15
ตารางที่ 2.1	องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันปลา และน้ำมันลินิน.....	28
ตารางที่ 3.1	องค์ประกอบของกรดไขมันของรีคอมบีแนนท์ยีสต์ (RY) (ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน).....	35
ตารางที่ 3.2	ผลของการเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยยีสต์หรือรีคอมบีแนนท์ยีสต์ต่อ องค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง.....	38
ตารางที่ 3.3	ผลของการเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยยีสต์หรือรีคอมบีแนนท์ยีสต์ต่อ องค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย ที่ระยะเวลา 18 ชั่วโมง.....	40
ตารางที่ 3.4	ผลของการเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยยีสต์หรือรีคอมบีแนนท์ยีสต์ต่อ องค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง.....	42
ตารางที่ 3.5	ผลของการเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยน้ำมันลินินหรือน้ำมันปลาต่อ องค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง.....	47
ตารางที่ 3.6	ผลของการเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยน้ำมันลินินหรือน้ำมันปลาต่อ องค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย ที่ระยะเวลา 18 ชั่วโมง.....	48

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.7 ผลของการเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยน้ำมันลินินหรือน้ำมันปลาต่อ องค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง.....	49
ตารางที่ 3.8 ผลของการเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยยีสต์หรือรีคอมบีแนนท์ยีสต์ร่วมกับ น้ำมันลินินต่อองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง.....	53
ตารางที่ 3.9 ผลของการเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยยีสต์หรือรีคอมบีแนนท์ยีสต์ร่วมกับ น้ำมันลินินต่อองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย ที่ระยะเวลา 18 ชั่วโมง.....	55
ตารางที่ 3.10 ผลของการเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยยีสต์หรือรีคอมบีแนนท์ยีสต์ร่วมกับ น้ำมันลินินต่อองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง.....	57

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1.1 การใช้อาร์ทีเมียเป็นตัวนำพา (carrier) ในการนำสารอาหารที่จำเป็น (essential nutrient) รงควัตถุ สารอาหารที่ป้องกันโรค หรือ ยา เข้าสู่สัตว์น้ำวัยอ่อน.....	4
ภาพที่ 1.2 สถานะน้ำมันปลาของโลก (ก) ผลผลิตน้ำมันปลาของโลกที่มีแนวโน้มลดลง (ข) ราคาน้ำมันปลาเฉลี่ย (ประเทศเนเธอร์แลนด์) มีแนวโน้มสูงขึ้น	10
ภาพที่ 1.3 เอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเปลี่ยนกรดไขมัน 18:3n-3 เป็น EPA และ DHA	11
ภาพที่ 2.1 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGal-onifads 2 ประกอบด้วยยีน <i>fads 2</i> ของปลาไนล (onifads 2) ซึ่งถูกขับเคลื่อนด้วย โปรโมเตอร์ <i>GAL1</i>	24
ภาพที่ 3.1 การวิเคราะห์โครงสร้างของโปรตีน Onifads 2 ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ delta-6 desaturase ของปลาไนล.....	31
ภาพที่ 3.2 การเปรียบเทียบ โปรตีน OniFads 2 กับ โปรตีน Fads 2 ของปลาชนิดต่าง ๆ เปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนของ Onifads กับ Fads ของปลาแต่ละชนิดแสดงด้วยตัวเลขหน้าลำดับกรดอะมิโนของ ปลาแต่ละชนิด.....	33
ภาพที่ 3.3 การวิเคราะห์การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ด้วยวิธี Reverse transcription PCR (RT-PCR)	34
ภาพที่ 3.4 สัดส่วนของกรดไขมันระหว่าง C18:3n6 ต่อ C18:2n6 ซึ่งเป็นสารตั้งต้น และผลิตภัณฑ์ตามลำดับของเอ็นไซม์ delta 6 desaturase ในอาร์ทีเมีย ที่เลี้ยงด้วยยีสต์ปกติ (wt) และอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วย รีคอมบิแนนท์ยีสต์ (RY)	44
ภาพที่ 3.5 สัดส่วนของกรดไขมันระหว่าง C18:4n3 ต่อ C18:3n3 ซึ่งเป็นสารตั้งต้น และผลิตภัณฑ์ตามลำดับของเอ็นไซม์ delta 6 desaturase ในอาร์ทีเมีย ที่เลี้ยงด้วยยีสต์ปกติ (wt) และอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วย รีคอมบิแนนท์ยีสต์ (RY)	45

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 3.6 สัดส่วนของกรดไขมันระหว่าง C18:3n6 ต่อ C18:2n6 ซึ่งเป็นสารตั้งต้น และผลิตภัณฑ์ตามลำดับของเอนไซม์ delta 6 desaturase ในอาร์ทีเมีย กลุ่มควบคุม (ไม่ได้รับน้ำมัน) อาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยน้ำมันปลา และ อาร์ทีเมียที่เลี้ยงน้ำมันลินิน	50
ภาพที่ 3.7 สัดส่วนของกรดไขมันระหว่าง C18:4n3 ต่อ C18:3n3 ซึ่งเป็นสารตั้งต้น และผลิตภัณฑ์ตามลำดับของเอนไซม์ delta 6 desaturase ในอาร์ทีเมีย กลุ่มควบคุม (ไม่ได้รับน้ำมัน) อาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยน้ำมันปลา และ อาร์ทีเมียที่เลี้ยงน้ำมันลินิน	51
ภาพที่ 3.8 สัดส่วนของกรดไขมันระหว่าง C18:3n6 ต่อ C18:2n6 ซึ่งเป็นสารตั้งต้น และผลิตภัณฑ์ตามลำดับของเอนไซม์ delta 6 desaturase ในอาร์ทีเมีย ที่เลี้ยงด้วยยีสต์ปกติ (wt) ร่วมกับน้ำมันลินิน และอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วย รีคอมบิแนนท์ยีสต์ (RY) ร่วมกับน้ำมันลินิน	59
ภาพที่ 3.9 สัดส่วนของกรดไขมันระหว่าง C18:4n3 ต่อ C18:3n3 ซึ่งเป็นสารตั้งต้น และผลิตภัณฑ์ตามลำดับของเอนไซม์ delta 6 desaturase ในอาร์ทีเมีย ที่เลี้ยงด้วยยีสต์ปกติ (wt) ร่วมกับน้ำมันลินิน และอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วย รีคอมบิแนนท์ยีสต์ (RY) ร่วมกับน้ำมันลินิน	60