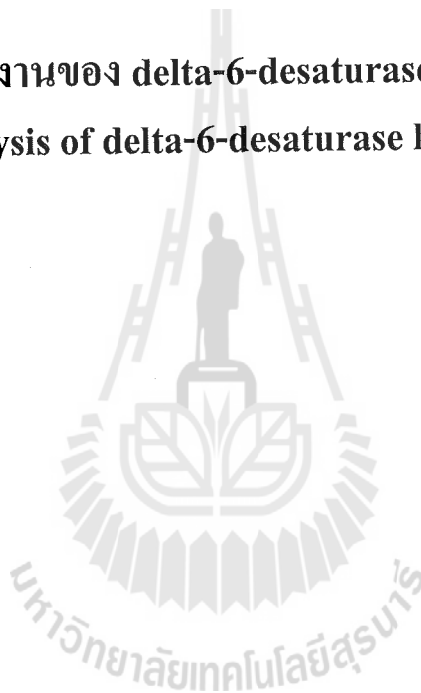


รหัสโครงการ SUT3-303-52-24-19



## รายงานการวิจัย

การวิเคราะห์การทำงานของ delta-6-desaturase like gene ในอาร์ทีเมีย  
(Expression analysis of delta-6-desaturase like gene in Artemia)



ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-303-52-24-19



## รายงานการวิจัย

### การวิเคราะห์การทำงานของ delta-6-desaturase like gene ในอาร์ทีเมีย (Expression analysis of delta-6-desaturase like gene in Artemia)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. สุรินทร์ บุญอนันตสิน

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2551-2552

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กันยายน 2558

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ นางสาวศุภมาส ถนอมมัน นางสาวอารยา แจ่มไพโร นางสาวธาราทิพย์ พิทักษ์สงค์ นักศึกษาปริญญาโท ที่ได้ช่วยดำเนินการวิจัยนี้จนสำเร็จลุล่วง

ผู้วิจัยขอขอบคุณ นายสุนัย พลายมี หัวหน้างานสัตว์น้ำ ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี รวมทั้งบุคลากรฝ่ายสนับสนุนทุกท่าน ที่ได้ให้การช่วยเหลือ ให้คำแนะนำต่าง ๆ จนทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จ ได้ด้วยดี

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

## สารบัญตาราง

หน้า

|   |    |
|---|----|
| ตารางที่ 3.7 ผลของการเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยน้ำมันลินินหรือน้ำมันปลาต่อ<br>องค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง.....                         | 49 |
| ตารางที่ 3.8 ผลของการเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยยีสต์หรือรีคอมบีแนนท์ยีสต์ร่วมกับ<br>น้ำมันลินินต่อองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย<br>ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง.....  | 53 |
| ตารางที่ 3.9 ผลของการเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยยีสต์หรือรีคอมบีแนนท์ยีสต์ร่วมกับ<br>น้ำมันลินินต่อองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย<br>ที่ระยะเวลา 18 ชั่วโมง.....  | 55 |
| ตารางที่ 3.10 ผลของการเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยยีสต์หรือรีคอมบีแนนท์ยีสต์ร่วมกับ<br>น้ำมันลินินต่อองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย<br>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<br>และผลิตภัณฑ์ตามลำดับของเอนไซม์ delta 6 desaturase ในอาร์ทีเมีย<br>กลุ่มควบคุม (ไม่ได้รับน้ำมัน) อาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยน้ำมันปลา และ<br>อาร์ทีเมียที่เลี้ยงน้ำมันลินิน .....                   | 50 |
| ภาพที่ 3.7 สัดส่วนของกรดไขมันระหว่าง C18:4n3 ต่อ C18:3n3 ซึ่งเป็นสารตั้งต้น<br>และผลิตภัณฑ์ตามลำดับของเอนไซม์ delta 6 desaturase ในอาร์ทีเมีย<br>กลุ่มควบคุม (ไม่ได้รับน้ำมัน) อาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยน้ำมันปลา และ<br>อาร์ทีเมียที่เลี้ยงน้ำมันลินิน .....                   | 51 |
| ภาพที่ 3.8 สัดส่วนของกรดไขมันระหว่าง C18:3n6 ต่อ C18:2n6 ซึ่งเป็นสารตั้งต้น<br>และผลิตภัณฑ์ตามลำดับของเอนไซม์ delta 6 desaturase ในอาร์ทีเมีย<br>ที่เลี้ยงด้วยยีสต์ปกติ (wt) ร่วมกับน้ำมันลินิน และอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วย<br>รีคอมบิแนนท์ยีสต์ (RY) ร่วมกับน้ำมันลินิน ..... | 59 |
| ภาพที่ 3.9 สัดส่วนของกรดไขมันระหว่าง C18:4n3 ต่อ C18:3n3 ซึ่งเป็นสารตั้งต้น<br>และผลิตภัณฑ์ตามลำดับของเอนไซม์ delta 6 desaturase ในอาร์ทีเมีย<br>ที่เลี้ยงด้วยยีสต์ปกติ (wt) ร่วมกับน้ำมันลินิน และอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วย<br>รีคอมบิแนนท์ยีสต์ (RY) ร่วมกับน้ำมันลินิน ..... | 60 |

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ในการอนุบาลลูกสัตว์น้ำวัยอ่อน โดยเฉพาะสัตว์น้ำกร่อย จะต้องใช้อาหารมีชีวิต (live feed) อาหารมีชีวิตที่นิยมใช้ในการอนุบาลสัตว์น้ำกร่อย โดยเฉพาะลูกกุ้งทะเลก็คือ อาร์ทีเมีย เนื่องจาก การเตรียมอาร์ทีเมียทำได้ง่ายและ สะดวก แต่ปัญหาที่พบบ่อยคือ อาร์ทีเมียมีคุณค่าทางอาหารไม่ครบตามที่ กุ้งทะเลวัยอ่อนต้องการ คือจะขาดกรดไขมันที่จำเป็น ได้แก่ arachidonic acid (AA, 20:4n6), docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n3) และ eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n3) จึงได้มีการทำให้อาร์ที เมียมีคุณค่าทางอาหารสูงขึ้น (enriched artemia) โดยการนำเอาน้ำมันปลาทะเลที่มีกรดไขมันเหล่านี้ใน ปริมาณสูง มาทำให้แตกตัวในน้ำเป็นเม็ดเล็ก ๆ เพื่อให้อาร์ทีเมียกินเป็นอาหาร ทำให้อาร์ทีเมียมี องค์ประกอบของ EPA และ DHA สูงขึ้น มีคุณค่าทางอาหารที่เหมาะสมในการนำไปอนุบาลลูกสัตว์น้ำ ทะเลวัยอ่อนมากขึ้น

น้ำมันปลาได้จากผลพลอยได้ของปลาทะเลหลายชนิด เป็นแหล่งของไขมันที่อุดม ไป ด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่จำเป็น โดยเฉพาะกรดไขมันในกลุ่ม โอเมก้า 3 (Omega3:Ω3) ปัจจุบันได้มีการนำ น้ำมันปลามาผลิตเป็นอาหารเสริมเพื่อสุขภาพสำหรับมนุษย์ การบริโภคน้ำมันปลาอาจเสี่ยงต่อการ ได้รับ สารปนเปื้อนของโลหะหนัก น้ำมันปลาที่ควรนำมาบริโภคจะต้องเป็นน้ำมันปลาที่ผ่านกระบวนการ ผลิตที่ได้มาตรฐาน เพื่อไม่มีองค์ประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัว Ω3 สูงเกินไปมีสิ่งปนเปื้อน กระแส ความนิยมในการบริโภคน้ำมันปลา กอปรกับการนำน้ำมันปลามาใช้ในอุตสาหกรรมผลิตสัตว์ โดยเฉพาะการผลิตสัตว์น้ำ และวิกฤตการณ์พลังงานที่ส่งผลทำให้ทรัพยากรประมงมีราคาสูงขึ้น และ ความเสื่อมโทรมของสภาพแวดล้อมทางทะเล ทำให้ปริมาณการผลิตน้ำมันปลาของโลกลดลง และน้ำมัน ปลาที่มีราคาสูงขึ้น ดังนั้นการหาแหล่งน้ำมันปลาทางเลือกอื่น ๆ โดยเฉพาะน้ำมันปลาที่จะสามารถนำมาใช้ ในอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์น้ำจึงเป็นสิ่งที่ควรที่จะวิจัยและพัฒนาเป็นอย่างยิ่ง

กลไกการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (polyunsaturated fatty acid) เกิดจากการทำงาน ของเอนไซม์หลายชนิด โดยปฏิกิริยาขั้นต้นของการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง จะเกิดจากการเอนไซม์ delta-6 desaturase เปลี่ยน linoleic acid (C18:2n6) เป็น gamma-linolenic acid (C18:3n6) และเปลี่ยน alpha-linolenic acid (C18:3n3) เป็น stearidonic acid (C18:4n3) ซึ่งในสัตว์มีกระดูกสันหลังหลายชนิดมี ความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงนี้ได้มาก หรือน้อย แตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิด ปลา ทะเลบางชนิดไม่สามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงนี้ได้ในระดับที่เพียงพอ จึงจำเป็นต้องได้รับการ บริโภค การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงนี้ในอาร์ทีเมีย จึงเป็นสิ่งที่ควรดำเนิน เพื่อเป็นการพัฒนาการปรับปรุงคุณค่าทางโภชนาของอาร์ทีเมียให้มีคุณค่าที่

เหมาะสมในการเป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อน ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าจึงจะใช้เทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์ในการสำรวจการทำงานของเอนไซม์  $\delta$ -6 desaturase ที่ทำงานในกระบวนการเริ่มต้นของการสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง และพัฒนาวิธีการที่จะให้อาร์ทีเมียใช้ประโยชน์จากน้ำมันแหล่งอื่น ๆ แทนน้ำมันปลาแล้วยังมีคุณค่าทางโภชนาการใกล้เคียงกับการเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยน้ำมันปลา เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาคุณภาพของอาร์ทีเมียในการเป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนต่อไป

### การตรวจเอกสารวิชาการ

อาร์ทีเมีย หรือ โรทะเล หรือ ไรน้ำเค็ม หรือ ไรสีน้ำตาล (Brine shrimp) (*Artemia sp.*) เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง จัดอยู่ในพวก crustacean ลำตัวเป็นข้อปล้อง แบ่งออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนหัว (head) มี 6 ปล้อง ส่วนอก (thorax) มี 11 ปล้อง ส่วนท้อง (abdomen) มี 8 ปล้อง อาร์ทีเมียโตเต็มวัยเพศผู้มีขนาดเล็กกว่าเพศเมีย เพศผู้ (ขนาดเมื่อโตเต็มวัยประมาณ 8-10 มิลลิเมตร) มีหนวดคู่ที่ 2 ขนาดใหญ่และมีรูปร่างคล้ายตะขอเพื่อเกาะจับอาร์ทีเมียเพศเมีย และบริเวณปล้องแรกของส่วนท้องเพศผู้จะอวัยวะเพศผู้ 1 คู่ อาร์ทีเมียเพศเมีย (ขนาดเมื่อโตเต็มวัยประมาณ 10-12 มิลลิเมตร) จะมีหนวดคู่ที่ 2 ขนาดเล็ก และบริเวณปล้องแรกของช่องท้องจะเป็นบริเวณที่เก็บตัวอ่อนหรือไข่ อาร์ทีเมียมีหลายสายพันธุ์ สามารถสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศ (sexually reproducing species; bisexual species) และแบบไม่อาศัยเพศ (parthenogenesis) (FAO [[http://www.fao.org/fisery/culturedspecies/Artemia\\_spp/en](http://www.fao.org/fisery/culturedspecies/Artemia_spp/en)], 2013)

อาร์ทีเมียจัดเป็นแพลงก์ตอนสัตว์ที่นิยมใช้เป็นอาหารในการอนุบาลลูกสัตว์น้ำวัยอ่อนที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ จัดเป็นอาหารหลักของการอนุบาลลูกสัตว์น้ำ ได้มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในการอนุบาลสัตว์น้ำเศรษฐกิจและสัตว์น้ำสวยงาม อาร์ทีเมียได้ถูกนำมาใช้ในการอนุบาลลูกสัตว์น้ำวัยอ่อน โดยเฉพาะในกุ้งทะเล (80-85 เปอร์เซ็นต์) (FAO [[http://www.fao.org/fisery/culturedspecies/Artemia\\_spp/en](http://www.fao.org/fisery/culturedspecies/Artemia_spp/en)], 2013) เช่น ใช้ในการอนุบาลลูกกุ้งทะเล (*Peneaus monodon*, *P. indicus*, *P. Chinensis*) (Xu et al., 1993; Immanuel et al., 2001) ลูกปลาทะเล (Sargent et al., 1997; Cho et al., 2001) ทั้งนี้เนื่องจากอาร์ทีเมียสามารถเก็บอยู่ในรูปไข่แห้ง (cyst) ที่คงสภาพมีชีวิตได้นาน เมื่อต้องการนำมาใช้ ก็เพียงแต่นำมาเพาะในน้ำเค็ม สามารถฟักออกเป็นตัวในระยะเวลาสั้น จึงนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์น้ำได้สะดวก การจัดการทำได้ง่าย การเก็บรักษาทำได้สะดวก ดังนั้นคุณค่าทางโภชนาการของอาร์ทีเมียจึงเป็นสิ่งสำคัญที่นำไปสู่การผลิตลูกพันธุ์สัตว์น้ำเค็มวัยอ่อนคุณภาพดี

การอนุบาลสัตว์น้ำเค็มวัยอ่อนหลายชนิด จำเป็นต้องใช้อาหารมีชีวิต (live feed) ถึงแม้ว่าในธรรมชาติอาร์ทีเมียจะไม่ได้เป็นอาหารของสัตว์น้ำเค็มเหล่านี้ก็ตาม คุณค่าทางโภชนาการของอาร์ทีเมียในระยะอนุบาล (Nauplii) และระยะโตเต็มวัย (Adults) แสดงดังตารางที่ 1.1 ในการอนุบาลสัตว์น้ำเค็มวัยอ่อนโดยส่วนใหญ่จะใช้ตัวอ่อนของอาร์ทีเมีย (*Artemia nauplii*) เพราะสะดวกในการจัดการ ได้แก่ ปัญหาที่มักจะพบก็คือ *Artemia nauplii* ยังมีคุณค่าทางโภชนาการไม่ครบตามความต้องการของสัตว์น้ำเค็มวัยอ่อน เพราะขาดกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (polyunsaturated fatty acid, PUFA) (Navarro et al., 1992) ซึ่งจัดเป็นกรดไขมันที่จำเป็น (essential fatty acid; EFA) ในสัตว์น้ำเค็มวัยอ่อน จะเห็นได้ว่าอาร์ทีเมียที่ต่างสายพันธุ์ยังมีความผันแปรของ eicosapentaenoic acid (EPA; C20:5n3) ซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงที่จำเป็น โดยเฉพาะกุ้งกุลาดำ กุ้งขาว และ

ปลาทะเลวัยอ่อน เนื่องจากสัตว์น้ำวัยอ่อนเหล่านี้ต้องการกรดไขมันชนิดนี้ในการดำรงชีวิตให้เป็นปกติ เพราะ PUFA เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของ เซลล์เมมเบรน ใช้ในการพัฒนาการมองเห็น การพัฒนาระบบประสาทให้เป็นปกติ และนำไปใช้ผลิต eicosanoid ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของฮอร์โมนที่สำคัญหลายชนิด (Bell and Dick, 1993; Watanabe, 1993; Watanabe and Kiron, 1994; Bell et al., 1995; Deering et al., 1997)

ตารางที่ 1.1 คุณค่าทางโภชนาการ (ค่าเฉลี่ย (%)  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ของอาร์ทีเมียในระยะนอเพิลีสและระยะตัวเต็มวัย

| คุณค่าทางโภชนาการ | นอเพิลีส (Nauplii) | ตัวเต็มวัย (Adult) |
|-------------------|--------------------|--------------------|
| โปรตีน            | 52.2 $\pm$ 8.8     | 56.4 $\pm$ 5.6     |
| ไขมัน             | 18.9 $\pm$ 4.5     | 11.8 $\pm$ 5.0     |
| เถ้า              | 9.7 $\pm$ 4.6      | 17.4 $\pm$ 6.3     |
| คาร์โบไฮเดรต      | 14.8 $\pm$ 4.8     | 12.1 $\pm$ 4.4     |

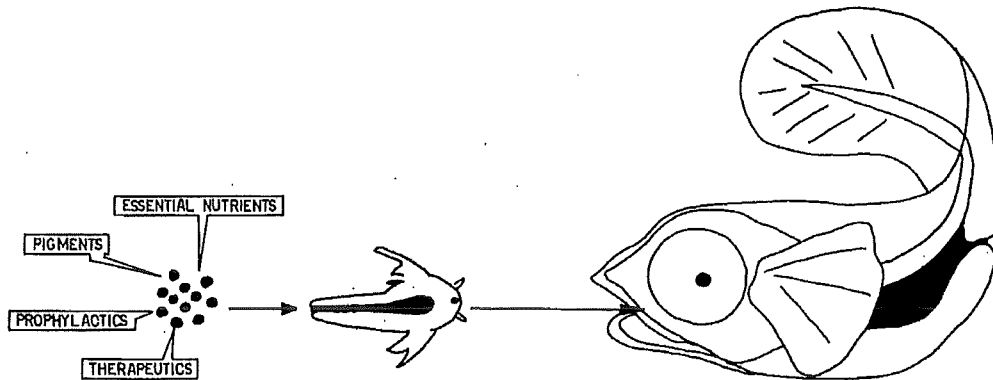
(Leger et al., 1986 อ้างโดย Leger et al., 1987)

ตารางที่ 1.2 ความผันแปรขององค์ประกอบเปอร์เซ็นต์ eicosapentaenoic acid [EPA (C20:5n3)] ในอาร์ทีเมียสายพันธุ์ต่าง

| สายพันธุ์อาร์ทีเมีย | ประมาณ EPA (C20:5n3) (% area) |
|---------------------|-------------------------------|
| San Francisco Bay   | 0.3 – 13.3                    |
| Brazil              | 3.5 – 10.6                    |
| China               | 1.3 – 15.4                    |
| Canada              | 5.2 – 9.5                     |
| Utah –southern arm  | 2.7 – 3.6                     |
| - northern arm      | 0.3 – 0.4                     |

(Leger et al., 1986 อ้างโดย Leger et al., 1987)

ถึงแม้ว่าอาร์ทีเมียมีหลายชนิดหลายสายพันธุ์ที่สามารถนำมาใช้ในการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อนได้ แต่อาร์ทีเมียส่วนใหญ่ยังมีคุณค่าทางอาหารไม่ครบตามความต้องการของสัตว์น้ำวัยอ่อน นอกจากนี้สัตว์น้ำวัยอ่อนแต่ละชนิดอาจมีความต้องการสารอาหารที่จำเป็นบางชนิดที่แตกต่างกัน และการที่จะนำสารอาหารที่จำเป็นเหล่านี้ให้สัตว์น้ำวัยอ่อนกินโดยตรงทำได้ยาก เพราะสัตว์น้ำวัยอ่อนไม่ยอมกินยาหรือสารอาหารต่าง ๆ เหล่านี้โดยตรง จึงได้มีการทำ enriched artemia คือการทำให้อาร์ทีเมียมีคุณค่าทางอาหารเพิ่มขึ้น ก่อนที่จะนำไปอนุบาลลูกกุ้งทะเล และปลาทะเล เนื่องจากอาร์ทีเมียเป็นสัตว์น้ำที่กรองกินอาหารจากมวลน้ำ (filter feeder) กล่าวคือจะกินสิ่งแขวนลอยทุกอย่างในน้ำที่มีขนาดเล็กกว่าช่องปาก อาร์ทีเมียจึงเป็นตัวนำพา (carrier) ในการนำสารอาหารที่จำเป็น รงควัตถุ (ในกรณีของปลาสวยงาม) วิตามินและ/หรือสารที่กินเพื่อป้องกันโรค (porphyllactic) ยา เข้าสู่ร่างกายของสัตว์น้ำวัยอ่อน (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1.1 การใช้อาร์ทีเมียเป็นตัวนำพา (carrier) ในการนำสารอาหารที่จำเป็น (essential nutrient) รังควัตถุ สารอาหารที่ป้องกันโรค หรือ ยา เข้าสู่สัตว์น้ำวัยอ่อน

ที่มา : Leger et al., 1987

อาร์ทีเมียส่วนใหญ่มีปริมาณกรดไขมันที่จำเป็นจำพวกกรดไขมันในกลุ่ม PUFA ต่ำ ได้แก่ arachidonic acid (AA, 20:4n6), docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n3) และ eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n3) ได้มีการนำเอาน้ำมันปลาต่าง ๆ ที่มีกรดไขมันในกลุ่ม PUFA สูง มาบดให้แตกตัวเป็นเม็ดเล็กในน้ำ (emulsion) แล้วนำไปเลี้ยงอาร์ทีเมีย อาร์ทีเมียจะกรองกินเม็ดน้ำมันเหล่านี้เข้าไปในตัว ทำให้มีปริมาณ PUFA สูงขึ้นในตัวอาร์ทีเมีย (Southgat and Lou, 1995; McEvoy et al., 1996; Navarro et al., 1999) ดังตารางที่ 1.2 Immanuel และคณะ (2004) พบว่าเมื่ออาร์ทีเมียได้รับการเสริมน้ำมันตับปลาเข้าไป จะมี PUFA สูงขึ้น และมีกรดไขมันที่อิ่มตัว (Saturated fatty acid) ลดลง และ Martins และคณะ (2006) พบว่าเมื่อนำอาร์ทีเมียไปเลี้ยงด้วยกรดไขมันที่อิ่มตัวจะมีปริมาณกรดไขมันที่อิ่มตัวในร่างกายเพิ่มขึ้น และเมื่อนำอาร์ทีเมียไปเลี้ยงด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (Highly unsaturated fatty acid; HUFA) อาร์ทีเมียจะมีปริมาณ HUFA สูงขึ้น และมีปริมาณ HUFA- $\omega$ 3 เพิ่มขึ้น โดยมี C20:5n3 และ C20:6n3 สูงกว่าอาร์ทีเมียที่ไม่ได้เสริม HUFA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) (ตารางที่ 1.3) จากข้อมูลดังกล่าวนี้ชี้ให้เห็นว่าเมื่อนำอาร์ทีเมียไปเลี้ยงในสารอาหารชนิดใด จะส่งผลให้อาร์ทีเมียมีสารอาหารนั้นในตัวอาร์ทีเมียเพิ่มสูงขึ้น และเมื่อนำอาร์ทีเมียไปเลี้ยงสัตว์น้ำวัยอ่อน ก็จะเป็นการให้อาร์ทีเมียเป็นตัวนำพาสารอาหารนั้นเข้าสู่สัตว์น้ำวัยอ่อน

นอกจากการปรับปรุงคุณค่าทางโภชนาการของอาร์ทีเมียด้วยการเลี้ยงอาร์ทีเมียในน้ำที่มีเม็ดชั้นของ น้ำมันปลา ยังมีการศึกษาการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของอาร์ทีเมียด้วยการเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยแพลงก์ตอนพืชหลายชนิดที่มีส่วนประกอบของ PUFA (Volkman et al., 1989; Vazhappilly and Chen, 1998; Chakraborty et al., 2007) เพื่อนำไปใช้อุบลูกุ้งทะเลและลูกปลาทะเล ได้มีรายงานการศึกษาการเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยแพลงก์ตอนพืช *Chlorella salina*, *Chaetoceros calcitrans*, *Nannochloropsis salina* และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ผลการศึกษาพบว่าอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วย *N. salina* มีองค์ประกอบของ arachidonic acid (AA; C20:4 $\omega$ 6), EPA และ DHA สูงที่สุด คือเท่ากับ 9.50 %, 25.80 % และ 4.18 % ตามลำดับ และพบว่าปริมาณ PUFA ของอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วย *N. salina* เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมงปริมาณสูงที่สุด และลดลงเมื่อเลี้ยงต่อเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยองค์ประกอบของกรดไขมันของอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วย *N. salina* แสดงดังตารางที่ 1.4 (Chakraborty et al., 2007)

ตารางที่ 1.3 องค์ประกอบของกรดไขมัน PUFA ในอาร์ทีเมียระยะ Nauplii ที่เลี้ยงด้วยน้ำมันชนิดต่าง ๆ (enriched artemia)

| เอกสารอ้างอิง/<br>ชนิดของน้ำมัน                                       | ระดับน้ำมันที่<br>เสริม  | Total SFA  | Total MUFA  | Total PUFA   | C18:2n6  | C18:3n3   | C20:4n3                                      | C20:5n3  | C22:5n3                                      | C22:6n3   |
|---|--|--|---|--|--|---|--|--|--|---|
| หน่วย : area percent FAME (โดยน้ำหนักแห้ง)*                           |  |  |   |  |  |   |  |  |  |   |
| Immanuel et al.<br>(2001; 2004) /<br><i>Odonus niger</i><br>liver oil | 0 %<br>1 %<br>2 %<br>3 %<br>4 %  | 47.05<br>29.34<br>31.00<br>28.40<br>23.04<br>26.50 | 30.41<br>30.23<br>28.60<br>30.10<br>29.06<br>26.30        | 22.54<br>31.03<br>32.10<br>37.40<br>44.18<br>39.60       | 12.87<br>8.90<br>8.76<br>8.87<br>10.14<br>9.50           | 0.21<br>17.24<br>18.7<br>20.4<br>22.9<br>19.8             | 2.66<br>1.90<br>1.16<br>2.12<br>3.31<br>3.60 | 2.86<br>2.45<br>2.75<br>4.32<br>5.10<br>4.65             | 1.64<br>0.24<br>0.16<br>0.46<br>0.83<br>1.05 | 2.3<br>0.3<br>0.6<br>1.23<br>1.9<br>0.95                  |
| หน่วย : g / 100 g total fatty acids                                   |  |  |   |  |  |   |  |  |  |   |
| Martins et al., 2006  | artemia<br>Artemia +<br>SFA<br>300 mg L <sup>-1</sup><br>Artemia +<br>HUFA<br>300 mg L <sup>-1</sup> | 25.5 <sup>c</sup><br>77.1 <sup>a</sup>             | 25.7 <sup>a</sup><br>6.3 <sup>c</sup><br>9.7 <sup>b</sup> | 8.2 <sup>a</sup><br>2.0 <sup>b</sup><br>7.9 <sup>a</sup> | 4.3 <sup>a</sup><br>0.9 <sup>b</sup><br>1.0 <sup>b</sup> | 21.1 <sup>a</sup><br>5.4 <sup>b</sup><br>7.9 <sup>b</sup> | 0.2<br>0<br>0.2                              | 2.2 <sup>b</sup><br>0.4 <sup>c</sup><br>3.8 <sup>a</sup> | nd<br>nd<br>nd                               | 0.2 <sup>b</sup><br>0.6 <sup>ab</sup><br>2.2 <sup>a</sup> |

SFA = saturated fatty acid, MUFA = monounsaturated fatty acid, PUFA = polyunsaturated fatty acid, HUFA = highly unsaturated fatty acid

ตารางที่ 1.4 องค์ประกอบของกรดไขมัน (% ของกรดไขมันทั้งหมด) ของอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยแพลงก์ตอนพืช *N. salina* เป็นระยะเวลา 8 และ 24 ชั่วโมง

| กรดไขมัน                 | <i>N. salina</i> | อาร์ทีเมียก่อนเลี้ยง<br>แพลงก์ตอน | อาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วย <i>N. salina</i> |            |
|--------------------------|------------------|-----------------------------------|--|------------|
|                          |                  |                                   | 8 ชั่วโมง                                | 18 ชั่วโมง |
| C14:0                    | 0.39             | 0.32                              | 0.68                                     | 3.25       |
| C15:0                    | 3.10             | 0.21                              | 1.10                                     | 1.69       |
| C16:0                    | 21.0             | 8.07                              | 8.34                                     | 10.06      |
| C18:0                    | 0.94             | 4.91                              | 2.24                                     | 2.30       |
| $\Sigma$ SFA             | 25.43            | 13.51                             | 12.36                                    | 17.3       |
| C16:1n7                  | 20.10            | 9.62                              | 5.08                                     | 4.11       |
| C16:1n9                  | Nd               | 16.30                             | 9.98                                     | 8.45       |
| C18:1n7                  | 0.50             | 2.21                              | 3.65                                     | 3.80       |
| C18:1n9                  | 9.40             | 24.26                             | 25.72                                    | 31.29      |
| $\Sigma$ MUFA            | 30.00            | 52.39                             | 44.43                                    | 47.65      |
| C16:2n4                  | 0.05             | nd                                | 0.82                                     | 0.92       |
| C16:3n4                  | 0.05             | 0.41                              | 0.88                                     | 0.56       |
| C16:3n6                  | 0.31             | 8.08                              | 9.82                                     | 5.41       |
| C18:2n6                  | 2.10             | 8.50                              | 0.38                                     | 0.25       |
| C18:3n6                  | nd               | 0.32                              | 0.67                                     | 0.75       |
| C18:3n3                  | 0.40             | 4.10                              | 5.19                                     | 5.26       |
| C18:4n3                  | 0.15             | 0.85                              | 1.65                                     | 1.51       |
| C18:4n6                  | 0.32             | 0.18                              | 0.46                                     | 0.38       |
| C20:4n6                  | 9.50             | 2.30                              | 14.15                                    | 13.0       |
| C20:5n3                  | 25.80            | 3.18                              | 8.05                                     | 4.28       |
| C22:5n3                  | 0.35             | 0.05                              | 0.01                                     | 0.01       |
| C22:6n3                  | 4.18             | 0.10                              | 1.85                                     | 0.45       |
| $\Sigma$ PUFA            | 43.21            | 28.07                             | 43.93                                    | 32.78      |
| $\Sigma$ n3: $\Sigma$ n6 | 2.52             | 0.43                              | 0.66                                     | 0.58       |

SFA = saturated fatty acid,  $\Sigma$ MUFA = ผลรวมของ monounsaturated fatty acid,  $\Sigma$ PUFA = ผลรวมของ polyunsaturated fatty acid,  $\Sigma$ n3:  $\Sigma$ n6 = ผลรวมของกรดไขมัน  $\omega$ 3 ต่อ ผลรวมของกรดไขมัน  $\omega$ 6 (Chakraborty et al., 2007)



องค์ประกอบของกรดไขมันบางชนิดในอาร์ทีเมียที่ได้รับอิมัลชันของน้ำมันปลา จะมีการเปลี่ยนแปลงเมื่อมีการอดอาหารอาร์ทีเมีย แสดงให้เห็นว่าอาร์ทีเมียได้นำกรดไขมันที่ได้รับไปใช้ประโยชน์ Coutteau และ Mourente (1997) ได้ศึกษาโดยการเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยน้ำมันปลา 2 ชนิด คือ อิมัลชัน triacylglycerols (ICES 30/4/C/3) และ fatty acid ethyl ester (ICES 30/4/C/EE) เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงพบว่า อาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยอิมัลชันของน้ำมันปลาทั้ง 2 ชนิดมีไขมันสูงขึ้น ซึ่งการเพิ่มขึ้นของไขมันนั้นมาจากการสะสม neutral lipid ชนิด triacylglycerol แล้วจึงทำการอดอาหารอาร์ทีเมียเป็นระยะเวลา 24 และ 72 ชั่วโมง และพบว่าอาร์ทีเมียที่อดอาหารเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ได้มีการใช้ประโยชน์ของ neutral lipid ชนิด triacylglycerol เนื่องจากพบว่าปริมาณ neutral lipid ชนิด triacylglycerol ลดลง 27-30 % และพบว่าอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยน้ำมันปลาทั้ง 2 ชนิดมีปริมาณ  $\Omega$ 3-HUFA เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดยเพิ่มขึ้นจาก 6.3 % (8.2 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) เป็น 20.4 % และ 21.8 % (40.4 และ 43.2 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ) และในระหว่างการอดอาหารของอาร์ทีเมีย อาร์ทีเมียมีการใช้ C18:4n3, C22:5n3 และ C22:6n3 แต่พบว่าปริมาณของ C18:0, C20:4n6 และ C20:5n3 ไม่เปลี่ยนแปลง (ตารางที่ 1.5)

การศึกษาการใช้ประโยชน์ของไขมันที่ได้รับจากการ enrichment โดยการให้ fatty acid ethyl esters ที่มีการติดฉลากสารรังสี เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการอดอาหารอีก 24 ชั่วโมง พบว่า อาร์ทีเมียสามารถเปลี่ยน fatty acid ethyl esters เป็น triacylglycerols และอาร์ทีเมียเปลี่ยน triacylglycerols โดยการนำไปใช้ในกระบวนการ catabolism เป็นกรดไขมันในโครงสร้างของเซลล์เมมเบรน นอกจากนี้พบว่าเมื่อให้อาร์ทีเมียได้รับ  $[U-^{14}C]C22:6n3$  อาร์ทีเมียสามารถเปลี่ยน C22:6n3 เป็น C20:5n3 (Navarro et al., 1999) ยังมีรายงานเมตาบอลิซึมของกรดไขมันในอาร์ทีเมียเพิ่มเติม โดยได้มีการรายงานว่าอาร์ทีเมียที่ได้รับการอดอาหารนาน 24 ชั่วโมง มีปริมาณ DHA ลดลง โดยเปลี่ยน DHA เป็น EPA และโดยการนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและการใช้ เป็นแหล่งพลังงาน และอุณหภูมิที่ต่ำจะลดการลดต่ำลงของกรดไขมันที่จำเป็น และได้มีการแนะนำการนำ อาร์ทีเมียที่มีการ enrichment ไปใช้ประโยชน์สำหรับการอนุบาลลูกสัตว์น้ำ ว่าควรกระทำภายใน 24 ชั่วโมง และถ้าเป็นไปได้ควรนำ อาร์ทีเมียที่มีการ enrichment ไปใช้ในการอนุบาลลูกสัตว์น้ำทันที (Estevez et al., 1998)

น้ำมันปลาซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีหลายพันธะคู่ (PUFA) น้ำมันปลามีส่วนประกอบสำคัญเป็นกรดไขมันกลุ่ม โอเมก้า 3 ได้แก่ EPA และ DHA การนำน้ำมันปลา หรือน้ำมันตับปลาผสมกับน้ำเพื่อให้แตกตัวเป็นเม็ดน้ำมันขนาดเล็กเพื่อให้อาร์ทีเมียกินเป็นอาหารเพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ เป็นวิธีการที่เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของอาร์ทีเมียได้อย่างแพร่หลาย ช่วยทำให้ลูกกุ้งทะเลวัยอ่อน และลูกปลาทะเลวัยอ่อนได้รับกรดไขมันที่จำเป็นมากขึ้น ส่งผลให้ทนทานต่อความเครียดที่เกิดจากความเค็มของน้ำไม่เหมาะสมได้ ลดอัตราการตายในระหว่างการอนุบาลได้ (Kraul et al., 1993; Rees et al., 1994; Citarasu et al., 1998; Immanuel et al., 2004; Martins et al., 2006) แม้ว่าการใช้วิธีดังกล่าวจะมีข้อควรระวัง เพราะอาจทำให้เกิดการออกซิเดชันของ PUFA (Hartvigsen et al., 2000) ทำให้อาร์ทีเมียได้รับสารพิษที่เกิดจากการออกซิเดชันของน้ำมันปลา เป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำวัยอ่อนได้

ตารางที่ 1.5 องค์ประกอบของไขมันและกรดไขมัน (มีลิกนัมต่อกรัมไขมันแห้ง) ของอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยไขมันปลา และอดอาหารเป็นระยะเวลา 24 และ 72 ชั่วโมง

| กรดไขมัน                 | อาร์ทีเมีย<br>ก่อนเลี้ยง<br>น้ำมันปลา | ไขมันไตรกลีเซอไรด์ (ICES 30/4/C/3) |                     |                                    | ไขมันกรดไขมันเอทิล (ICES30/4/C/EE) |                     |                     |
|--------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|---------------------|------------------------------------|------------------------------------|---------------------|---------------------|
|                          |                                       | ไขมันไตรกลีเซอไรด์ (ICES 30/4/C/3) |                     | ไขมันกรดไขมันเอทิล (ICES30/4/C/EE) |                                    | อาหาร 72<br>ชั่วโมง | อาหาร 72<br>ชั่วโมง |
|                          |                                       | เลี้ยง 24 ชั่วโมง                  | อาหาร 24<br>ชั่วโมง | เลี้ยง 24 ชั่วโมง                  | อาหาร 24 ชั่วโมง                   |                     |                     |
| Total lipid              | 200.4 ± 0.5                           | 281.7 ± 13.6                       | 267.6 ± 0.2         | 239.4 ± 2.3                        | 286.9 ± 12.4                       | 283.4 ± 3.5         | 249.9 ± 14.1        |
| Total neutral lipid      | 129.3 ± 2.3                           | 129.3 ± 2.3                        | 207.2 ± 4.9         | 165.3 ± 5.6                        | 214.9 ± 5.9                        | 205.0 ± 5.5         | 175.0 ± 1.9         |
| Neutral -Triacylglycerol | 82.1 ± 2.2                            | 82.1 ± 2.2                         | 158.2 ± 3.8         | 110.5 ± 4.9                        | 157.7 ± 6.0                        | 152.8 ± 3.6         | 115.0 ± 1.0         |
| C18:2n6                  | 7.2 <sup>d</sup>                      | 9.9 <sup>b</sup>                   | 8.8 <sup>bcd</sup>  | 7.9 <sup>cd</sup>                  | 12.3 <sup>a</sup>                  | 11.9 <sup>a</sup>   | 9.2 <sup>bc</sup>   |
| C18:3n3                  | 34.7 <sup>a</sup>                     | 30.5 <sup>ab</sup>                 | 27.6 <sup>bc</sup>  | 25.0 <sup>cd</sup>                 | 27.5 <sup>bc</sup>                 | 27.1 <sup>bc</sup>  | 21.0 <sup>d</sup>   |
| C18:4n3                  | 4.7 <sup>a</sup>                      | 2.9 <sup>b</sup>                   | 2.3 <sup>b</sup>    | 1.5 <sup>cd</sup>                  | 2.5 <sup>b</sup>                   | 2.2 <sup>bc</sup>   | 1.0 <sup>d</sup>    |
| C20:4n6                  | 1.0 <sup>b</sup>                      | 3.4 <sup>a</sup>                   | 3.4 <sup>a</sup>    | 3.5 <sup>a</sup>                   | 1.3 <sup>b</sup>                   | 1.4 <sup>b</sup>    | 1.2 <sup>b</sup>    |
| C20:5n3                  | 7.1 <sup>b</sup>                      | 16.8 <sup>a</sup>                  | 17.2 <sup>a</sup>   | 18.6 <sup>a</sup>                  | 17.8 <sup>a</sup>                  | 17.3 <sup>a</sup>   | 17.3 <sup>a</sup>   |
| C22:5n3                  | 0.0 <sup>c</sup>                      | 1.4 <sup>ab</sup>                  | 1.0 <sup>abc</sup>  | 0.7 <sup>bc</sup>                  | 2.0 <sup>a</sup>                   | 1.8 <sup>a</sup>    | 1.2 <sup>ab</sup>   |
| C22:6n3                  | 0.2 <sup>d</sup>                      | 21.0 <sup>a</sup>                  | 15.2 <sup>b</sup>   | 8.7 <sup>c</sup>                   | 22.3 <sup>a</sup>                  | 15.1 <sup>b</sup>   | 7.9 <sup>c</sup>    |
| ∑SFA                     | 25.5 <sup>cd</sup>                    | 34.8 <sup>a</sup>                  | 32.0 <sup>ab</sup>  | 28.7 <sup>bc</sup>                 | 27.8 <sup>bc</sup>                 | 26.4 <sup>cd</sup>  | 22.4 <sup>d</sup>   |
| ∑MUFA                    | 47.9 <sup>c</sup>                     | 61.0 <sup>c</sup>                  | 57.0 <sup>c</sup>   | 51.7 <sup>c</sup>                  | 96.2 <sup>a</sup>                  | 95.5 <sup>a</sup>   | 75.6 <sup>b</sup>   |
| ∑Ω6-PUFA                 | 8.7 <sup>d</sup>                      | 15.5 <sup>a</sup>                  | 14.0 <sup>ab</sup>  | 12.2 <sup>bc</sup>                 | 14.5 <sup>ab</sup>                 | 13.7 <sup>ab</sup>  | 10.9 <sup>cd</sup>  |
| ∑Ω3-PUFA                 | 47.5 <sup>c</sup>                     | 73.8 <sup>a</sup>                  | 64.6 <sup>ab</sup>  | 55.0 <sup>bc</sup>                 | 73.2 <sup>a</sup>                  | 64.6 <sup>ab</sup>  | 49.0 <sup>c</sup>   |

∑SFA = ผลรวมของ saturated fatty acid, ∑MUFA = ผลรวมของ monounsaturated fatty acid, ∑Ω6-PUFA = ผลรวมของ Ω6-polyunsaturated fatty acid, ∑Ω3-PUFA =

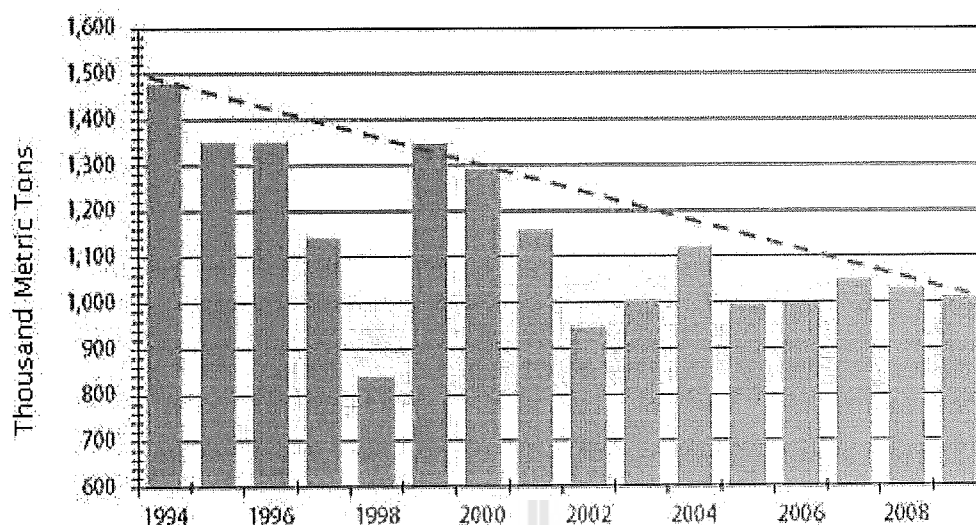
ผลรวมของ Ω3-polyunsaturated fatty acid (Coutteau and Mourente, 1997)

ในปัจจุบันน้ำมันปลาจัดเป็นอาหารที่เสริมสุขภาพ มีความนิยมบริโภคมากขึ้น ในขณะที่ผลผลิตน้ำมันปลาของโลกมีแนวโน้มลดลง (FAO/WHO, 2011; <http://www.globefish.org/fish-oil-february-2010.html>) จึงส่งผลให้น้ำมันปลามีแนวโน้มราคาสูงขึ้น (ภาพที่ 1) ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อต้นทุนการผลิตสัตว์น้ำ ดังนั้นการหาแหล่งน้ำมันอื่น หรือการนำเทคโนโลยีอื่น ๆ มาร่วมด้วยเพื่อปรับปรุงคุณภาพของน้ำมันพืช ให้ใกล้เคียงน้ำมันปลา เพื่อนำไปใช้ในการปรับปรุงคุณภาพอาร์ทีเมียให้มีองค์ประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงที่เป็นกรดไขมันที่จำเป็นต่อการอนุบาลลูกสัตว์น้ำทะเล จึงเป็นสิ่งที่ควรวิจัยและพัฒนาอย่างยิ่ง

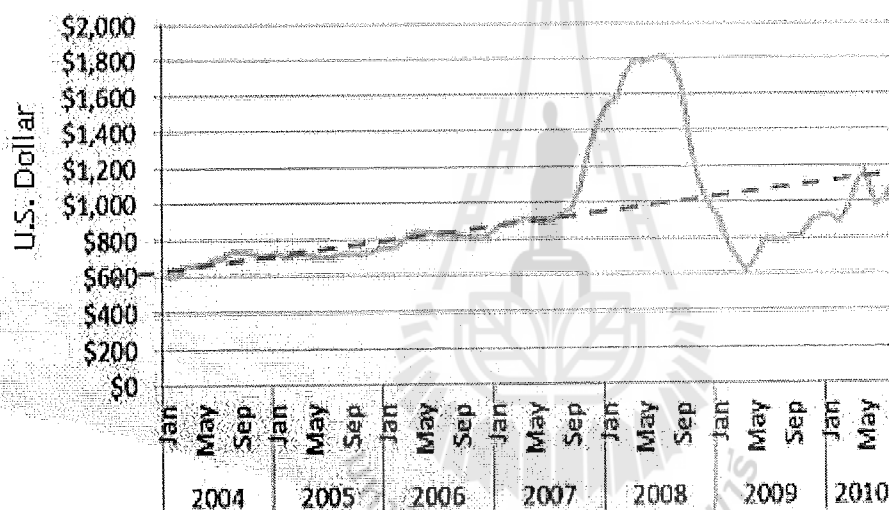
กระบวนการผลิตกรดไขมันในกลุ่ม PUFA ประกอบไปด้วยขั้นตอนต่าง ๆ โดยมีเอนไซม์ต่าง ๆ เข้ามาเกี่ยวข้อง กระบวนการนี้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม เป็นกรดไขมันในกลุ่ม  $\omega$ -6 และกลุ่ม  $\omega$ -3 ซึ่งมีกรดไขมันสารตั้งต้นคือ Linoleic acid (C18:2n6) และ  $\alpha$ -Linolenic acid (C18:3n3) ตามลำดับ กระบวนการสังเคราะห์ในกลุ่ม  $\omega$ -6 เริ่มจากเอนไซม์ delta 6-desaturase จะเปลี่ยน Linoleic acid (C18:2n6) เป็น gamma-linolenic acid (GLA; C18:3n6) ต่อจากนั้นจะเข้าสู่ปฏิกิริยาการต่อสายยาว (elongation system) ซึ่งจะมีการเติมคาร์บอนเข้าไป 2 ตัว ทำให้เกิดสังเคราะห์ dihomogramma-linolenic acid (DGLA; C20:3n6) ต่อจากนั้นมีการเพิ่มพันธะคู่โดย delta 5-desaturase เปลี่ยน C20:3n6 เป็น arachidonic acid (AA; C20:4n6) แล้วจึงเข้าสู่ปฏิกิริยาการต่อสายยาว (elongase system) ซึ่งจะมีการเติมคาร์บอนเข้าไป 2 ตัว เปลี่ยนเป็น adrenic acid (C22:4n6) และมีการเติมคาร์บอนเข้าไปอีก 2 ตัว ทำให้เกิดสังเคราะห์  $\omega$ 6-tetracosatetraenoic acid (C24:4n6)

สำหรับปฏิกิริยาของการสังเคราะห์กรดไขมันในกลุ่ม  $\omega$ -3 (ภาพที่ 2) เป็นดังนี้ เอนไซม์ delta 6-desaturase จะเปลี่ยน  $\alpha$ -Linolenic acid (C18:3n3) เป็น stearidonic acid (STA; C18:4n3) ต่อจากนั้นจะมีการเติมคาร์บอนเข้าไป 2 ตัวในกระบวนการ elongation system ซึ่งจะมีการเติมคาร์บอนเข้าไป 2 ตัว ทำให้เกิดสังเคราะห์ eicosatetraenoic acid (ETA; C20:4n3) หลังจากนั้นเอนไซม์ delta 5-desaturase จะเปลี่ยน C20:4n3 ได้เป็น eicosapentaenoic acid (EPA; C20:5n3) ต่อจากนั้นจะเข้าสู่กระบวนการ elongation โดยมีการเติมคาร์บอนเข้าไป 2 ตัว เปลี่ยนเป็น  $\omega$ 3-docosapentaenoic acid (DPA; C22:5n3) และ DPA จะถูกเติมพันธะคู่ด้วยเอนไซม์ delta 4-desaturase ทำให้ได้ docohexaenoic acid (DHA; C22:6n3) (Sprecher, 2000; Pereira et al. 2003; Horrobin, 1993) ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้จะมีน้อยมาก หรือทำงานได้น้อยในปลาและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จึงทำให้ปลาและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมไม่สามารถผลิต PUFA ได้เอง จึงต้องได้รับจากอาหารที่มีส่วนประกอบของ PUFA

(ก)



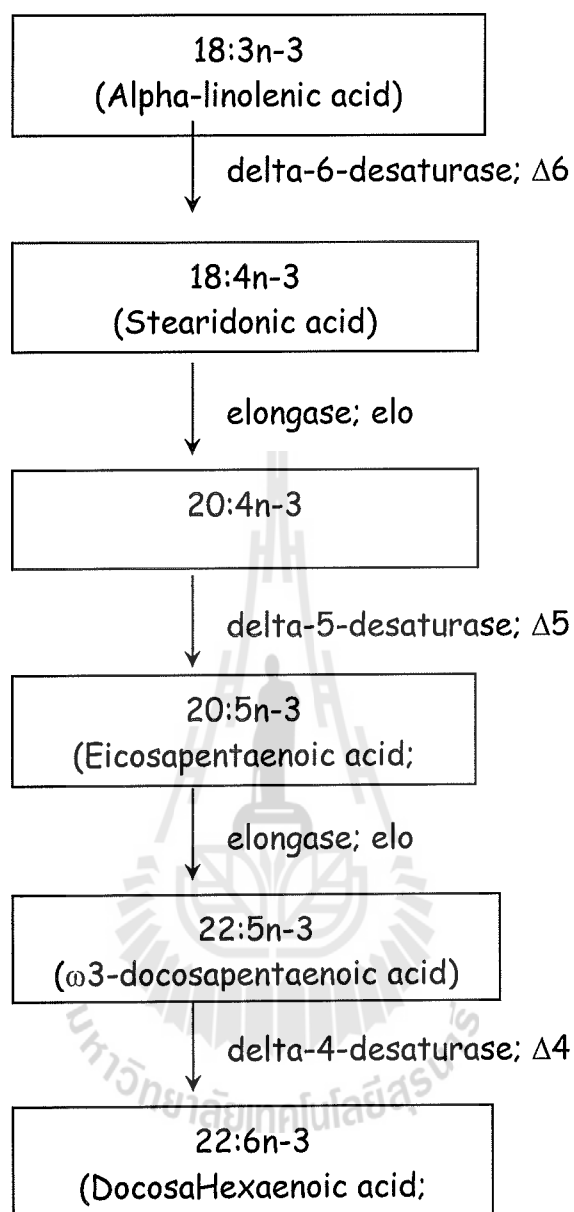
(ข)



ภาพที่ 1.2 สถานะน้ำมันปลาของโลก (ก) ผลผลิตน้ำมันปลาของโลกที่มีแนวโน้มลดลง (ข) ราคาน้ำมันปลาเฉลี่ย (ประเทศเนเธอร์แลนด์) มีแนวโน้มสูงขึ้น

ที่มา: [http://www.faqs.org/sec-filings/110110/OMEGA-PROTEIN-CORP\\_8-](http://www.faqs.org/sec-filings/110110/OMEGA-PROTEIN-CORP_8-)

K/g134825ex99\_1s11gbgd.jpg



ภาพที่ 1.3 เอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเปลี่ยนกรดไขมัน 18:3n-3 เป็น EPA และ DHA

ความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีในการตัดต่อดีเอ็นเอ ได้นำไปสู่การศึกษาถึงยีนที่ทำหน้าที่ในการสร้างเอนไซม์เหล่านี้ในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ เช่น ได้มีการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากลำไส้ปลาแมคเคอเรล เชื้อดังกล่าวนี้มีความใกล้เคียงกับเชื้อจุลินทรีย์ *Shewanella putrefaciens* ซึ่งมีคุณลักษณะในการสร้าง EPA ได้สูงถึง 24-40 % ของกรดไขมันทั้งหมด นอกจากนี้ได้มีการนำเอาชิ้นส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง EPA ถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* พบว่ามีการผลิต EPA ใน *E. coli* (Yazawa, 1996)

เอนไซม์ delta6-desaturase เป็น membrane-bound desaturase ที่พบใน endoplasmic reticulum ของสัตว์ ในปลาน้ำจืดบางชนิด เช่น ปลาเทรา ปลาไน ปลาหมอ ปลาบู่ สามารถเปลี่ยนกรดไขมันตั้งต้น C18 ไปเป็น EPA และ DHA ได้ ในขณะที่ปลาน้ำเค็มที่ได้ทำการศึกษามากมาย เช่น turbot และ seabream ไม่สามารถทำได้ (อ้างโดย Hastings et al., 2001) เป็นที่น่าสนใจว่าปลาน้ำจืดสามารถเปลี่ยนกรดไขมันตั้งต้น C18 ไปเป็น EPA และ DHA ได้ (Agaba et al., 2004) แต่เมื่อมีการสร้างปลาน้ำจืดจำพวกโอโทได้รับการถ่ายยีน masu salmon delta6-desaturase-like gene ส่งผลทำให้ปลาน้ำจืดมีปริมาณ EPA และ DHA สูงขึ้น (Alimuddin et al., 2005) การทำงานของ delta6-desaturase ในสัตว์จะขึ้นกับอาหารที่ได้รับ อายุ และฮอร์โมน (Pereira et al., 2003; Nakamura et al., 2000) การศึกษาถึงลำดับเบส และลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของยีน  $\Delta 6$ -desaturase ในคนและในหนู พบว่าเอนไซม์นี้ประกอบด้วยกรดอะมิโน 444 ตัว และมีความตรงกัน 87 % ระหว่างลำดับของกรดอะมิโนของ  $\Delta 6$ -desaturase ของหนู mouse และคน (Cho et al., 1999; Sato et al., 2001) นอกจากนี้การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน *fads 2* ในปลากระดูกแข็งต่าง ๆ ตารางที่ 1.6 พบว่ายีน *fads 2* ของปลามีความคล้ายคลึงกันสูง 72 – 80 เปอร์เซ็นต์

สัตว์น้ำแต่ละชนิดมีความหลากหลายของปริมาณ EPA และ DHA เป็นองค์ประกอบในตัว ซึ่งความหลากหลายนี้มีสาเหตุเนื่องมาจากอาหารที่กินและพันธุกรรมของการแสดงออกของยีนที่สร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนกรดไขมันตั้งต้น C18 ไปเป็น EPA และ DHA สัตว์น้ำบางชนิดที่มีการทำงานของเอนไซม์เหล่านี้ ก็จะสามารถผลิต EPA และ DHA ได้ การศึกษาวิจัยครั้งนี้จะทำการวิเคราะห์ mRNA ของยีน delta-6-desaturase ในอาร์ทีเมีย ว่ามีการทำงานได้หรือไม่ โดยการวิเคราะห์ที่ระดับ transcription เพื่อทำการโคลน delta-6-desaturase like cDNA เส้นสมบูรณ์ของอาร์ทีเมีย เพื่อนำไปใช้ในการตัดต่อยีนเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ เพื่อที่จะนำยีน *fads 2* นี้ไปใช้ประโยชน์ในการเปลี่ยนแปลงกรดไขมันในอาร์ทีเมีย อย่างไรก็ตามถ้าหากว่าพบว่าอาร์ทีเมียไม่มีการแสดงออกของยีน *fads 2* ที่สร้างเอนไซม์ delta6-desaturase งานวิจัยก็จะดำเนินการโคลนยีน *fads 2* จากปลาน้ำจืดที่เป็นปลาน้ำจืด และนำไปใช้ในการสร้างรีคอมบิแนนท์ยีสต์ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมียให้มีปริมาณของ PUFA สูงขึ้น

ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) เป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อผลิตภัณฑ์อาหารอย่างกว้างขวาง และเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์และสัตว์ ปัจจุบันได้มีนำยีสต์มาใช้เป็นโปรตีนเซลล์เดี่ยว (single cell protein) ที่เป็นประโยชน์ต่ออาหารสัตว์เศรษฐกิจหลายชนิด เป็นแหล่งโปรตีนทางเลือกคุณภาพดี นอกจากนี้ยีสต์ยังเป็นประโยชน์ด้านการเป็นสารเสริมชีวณะ (probiotic) ซึ่งก็คือจุลินทรีย์เสริมสุขภาพของ สัตว์เพื่อทำให้สัตว์มีภูมิคุ้มกันต้านทานโรคสูงขึ้น จึงได้มีการศึกษาการใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* ในแง่สารเสริมชีวณะในสัตว์ เศรษฐกิจหลายชนิด เนื่องจากเซลล์ของยีสต์มีองค์ประกอบของ

( $\beta$ -glucans, mannan oligosaccharides, nucleic acids) ซึ่งส่งผลให้ปลามีภูมิคุ้มกันต้านทานโรค โดยเฉพาะภูมิคุ้มกันต้านทานโรคแบบไม่จำเพาะเจาะจงสูงขึ้นยีสต์ยังเป็นประโยชน์ด้าน การเป็นสารเสริมชีวณะ (probiotic) ซึ่งก็คือจุลินทรีย์เสริมสุขภาพของสัตว์เพื่อให้สัตว์มีภูมิคุ้มกันต้านทานโรคสูงขึ้น (Ortuno et al., 2002)

ยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตชั้นสูงเซลล์เดี่ยวที่มีกลไกภายในเซลล์เช่นเดียวกับสัตว์ ยังมีคุณสมบัติในการนำมาใช้เป็นจุลินทรีย์เซลล์เจ้าบ้าน เพื่อผลิตโปรตีนที่สนใจซึ่งคงคุณสมบัติทางชีวภาพเหมือนโปรตีนธรรมชาติ โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาตัดต่อยีนของโปรตีน และนำเข้าดีเอ็นเอพาหะเข้าไปในเซลล์ยีสต์ เพื่อยีสต์ผลิตโปรตีนที่ ต้องการให้มีปริมาณสูงขึ้นภายในระยะเวลาอันสั้น ได้มีการศึกษาการตัดต่อยีน delta-6 desaturase และ Elongase ของ ปลา cobia ในยีสต์ *Cerevisiae* พบว่ายีสต์มีการแสดงออกของยีนทั้งสอง และเอ็นไซม์ที่ผลิตได้จากยีสต์สามารถทำงานได้ (Zheng et al., 2009) และให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาของ Qiu et al. (2002) ที่ทำการศึกษางานของ ยีน delta 6 desaturase ของ borage ในยีสต์ *S. cerevisiae* และ Zank et al. (2002) ที่ได้ทำการศึกษางานของยีน elongase ของ มอส (*Physcomitrella patens*) ในยีสต์ รายงานการศึกษา (ตารางที่ 1.6) จะเป็นการสรุปการสร้างรีคอมบีแนนท์ยีสต์ *S. Cerevisiae* โดยใช้พลาสมิดในกลุ่ม pYES ซึ่งมี *GALI* เป็นโปรโมเตอร์



ตารางที่ 1.6 ตารางเปรียบเทียบขนาดของ Coding Sequence (CDS) ของยีน delta 6 desaturase ในปลาชนิดต่างๆ

| เอกสารอ้างอิง                 | ชนิดปลา   | CDS      | จำนวนกรดอะมิโน | Cytochrome b <sub>5</sub> | Fatty acid desaturase domain | % Identities |
|-------------------------------|---|----------|----------------|---------------------------|------------------------------|--------------|
| Morais et al. (2011)          | Atlantic Bluefin tuna<br>( <i>Thunnus thynnus</i> ) | 1,338 bp | 445            | 21-95                     | 158-417                      | 89           |
| Zheng et al. (2009)           | Cobia( <i>Rachycentron canadum</i> )                | 1,329 bp | 442            | 18-92                     | 155-413                      | 83           |
| González-Rovira et al. (2009) | Sea bass<br>( <i>Dicentrarchus labrax</i> )         | 1,338 bp | 445            | 21-95                     | 158-416                      | 84           |
| Tocher et al. (2006a)         | Atlantic Cod ( <i>Gadus morhua</i> )                | 1,344 bp | 447            | 23-97                     | 161-419                      | 76           |
| Zheng et al. (2004a)          | Rainbow trout<br>( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )     | 1,365 bp | 454            | 30-104                    | 167-425                      | 75           |
| Zheng et al. (2004a)          | Seabream ( <i>Sparus aurata</i> )                   | 1,338 bp | 445            | 21-95                     | 158-416                      | 83           |
| Zheng et al. (2004a)          | Turbot ( <i>Scophthalmus maximus</i> )              | 1,338 bp | 445            | 21-95                     | 158-416                      | 82           |
| Zheng et al. (2005b)          | Atlantic salmon ( <i>Salmo salar</i> )              | 1,365 bp | 454            | 30-104                    | 167-425                      | 75           |
| Gen bank<br>XM_003440470      | Nile tilapia ( <i>O. niloticus</i> )                | 1,338 bp | 445            | 21-95                     | 158-417                      | 99           |
| Zheng et al. (2004a)          | Common Carp<br>( <i>Cyprinus carpio</i> )           | 1,335 bp | 444            | 20-94                     | 157-416                      | 70           |
| Hastings et al. (2001)        | Zebrafish ( <i>Danio rerio</i> )                    | 1,590 bp | 444            | 21-94                     | 157-416                      | 71           |



ตารางที่ 1.7 ผลการสร้างรีคอมบีแนนท์ยีสต์ในยีสต์ชนิด *S. cerevisiae* โดยเวกเตอร์ในกลุ่ม pYES และโปรโมเตอร์ *GALI*

| เอกสารอ้างอิง          | ยีนที่นำมาสร้างรีคอมบีแนนท์ยีสต์   |   | ผลการแสดงออกของยีน  |
|------------------------|--|---|---|
|                        | สิ่งมีชีวิต  | ยีน                                     |   |
| Dyer et al. (2004)     | <i>Aleurites fordii</i><br>(Tung)  | Omega-3 desaturase<br>(FAD3)            | -รีคอมบีแนนท์ยีสต์มีการเปลี่ยน linoleic acid เป็น linolenic acid<br>- อุณหภูมิมีผลการทำงานของเอ็นไซม์ของรีคอมบีแนนท์ยีสต์<br>- รีคอมบีแนนท์ยีสต์ที่มียีน FAD3 ที่ได้จาก Tung มีการทำงานสูงกว่า FAD3 ที่ได้จาก rapeseed  |
| Qiu et al. (2002)      | <i>Borago officinalis</i> L.   | $\Delta 6$ desaturase                   | ยีสต์มีการผลิตรีคอมบีแนนท์เอ็นไซม์ $\Delta 6$ desaturase และเอ็นไซม์ที่ผลิตได้สามารถเปลี่ยนกรดไขมัน 18:2(9,12) และ 18:3(9,12,15) ที่เติมลงไปให้อาหาร เป็น 18:3(6,9,12) (6.13 %) และ 18:4(6,9,12,15) (5.72 %) ตามลำดับ   |
| Kajiwara et al. (1996) | <i>Arabidopsis thaliana</i>  | $\Delta$ -12 fatty acid desaturase gene | พบ overexpression ในรีคอมบีแนนท์ยีสต์ และทำให้รีคอมบีแนนท์ยีสต์มีความทนทานต่อเอทานอลระดับสูง (15 %) ได้มากกว่ายีสต์กลุ่มควบคุม (ไม่ใช้รีคอมบีแนนท์)   |
| Meyer et al. (2004)    | สาหร่าย<br><i>Ostreococcus tauri</i> (ELO1)<br><i>O. tauri</i> (ELO2)<br><i>Thalassiosira pseudomana</i> (ELO1)<br><i>T. pseudomana</i> (ELO2)<br>ปลาเทรา<br><i>Onchorhynchus mykiss</i> (ELO)<br><i>Xenopus laevis</i> (ELO)<br><i>Ciona intestinalis</i> (ELO) |   | การทำงานของเอ็นไซม์ elongase ที่ได้จากสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีความจำเพาะกับกรดไขมันแต่ละชนิดแตกต่างกัน เอ็นไซม์ ELO1 ที่ได้จากสาหร่ายมีความจำเพาะต่อ ( $\Delta 6$ -)C18-PUFA และ ELO2 จะมีความจำเพาะต่อ และ ( $\Delta 5$ -)C20-PUFA เอ็นไซม์ elongase ที่ได้จาก <i>O. mykiss</i> , <i>X. laevis</i> , <i>C. intestinalis</i> สามารถทำงานได้กับกรดไขมันตั้งต้นทั้ง C18-PUFA และ C20-PUFA |

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อสำรวจการแสดงออกของยีนที่สร้างเอนไซม์ delta-6-desaturase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนกรดไขมันตั้งต้น C18 ไปเป็น EPA และ DHA ในอาร์ทีเมียวัยอ่อน (*artemia nauplii*)
2. เพื่อศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในรีคอมบิแนนท์ยีสต์ (*recombinant Saccharomyces cerevisiae*) ที่สามารถสร้างเอนไซม์ delta-6-desaturase
3. เพื่อศึกษาผลของการนำน้ำมันพืช และ รีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ delta-6-desaturase ไปเลี้ยงในอาร์ทีเมีย ต่อองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย

## ขอบเขตของการวิจัย

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาถึงการแสดงออกของยีนที่ผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิต EPA และ DHA และศึกษาผลของการนำยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูง มาแสดงออกในยีสต์ แล้วจึงประเมินการใช้ประโยชน์ของยีน โดยการเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีนในยีสต์ต่อการเปลี่ยนแปลงกรดไขมันในอาร์ทีเมียที่ได้รับการเลี้ยงด้วยน้ำมันพืช

ขอบเขตของโครงการนี้จึงเป็นการโคลนยีนของเอนไซม์ที่ผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง โดยจะทำการโคลนยีน *fads 2* ที่ทำหน้าที่ในการสร้าง delta-6-desaturase จากอาร์ทีเมีย แล้วจึงนำเอายีน *fads 2* ไปเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออก (expression) ในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อสร้างรีคอมบิแนนท์ยีสต์ (*recombinant yeast*) จากนั้นจึงจะนำเอารีคอมบิแนนท์ยีสต์ไปใช้ประโยชน์ในการเพิ่มองค์ประกอบของกรดไขมันที่จำเป็นในอาร์ทีเมีย โดยนำไปเลี้ยงอาร์ทีเมียร่วมกับน้ำมันพืชที่มีกรดไขมันในกลุ่มโอเมก้า 3 สูง ได้แก่ น้ำมัน flax seed ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

## ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ผลการสำรวจเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง ในอาร์ทีเมีย จะเป็นประโยชน์ในด้านการเป็นองค์ความรู้ในการวิจัยเชิงเปรียบเทียบ กับการแสดงออกของยีนในกระบวนการนี้ในสัตว์น้ำต่อไป และการนำเอายีนนี้มาเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออก (expression) ในยีสต์ โดยการผลิตรีคอมบิแนนท์ยีสต์ เป็นการผลิตผลิตภัณฑ์ที่อาจจะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์น้ำต่อไป นอกจากนี้การนำเอาตรีคอมบิแนนท์ยีสต์มาเลี้ยงอาร์ทีเมียร่วมกับน้ำมันพืช เพื่อทดสอบการทำงานของเอนไซม์ delta-6 desaturase ในการเปลี่ยนแปลงกรดไขมันในอาร์ทีเมีย ยังเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงคุณภาพของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูง ซึ่งเป็นกรดไขมันที่จำเป็นในสัตว์น้ำทะเลวัยอ่อน จึงจะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในการอนุบาลลูกสัตว์น้ำทะเลวัยอ่อนต่อไป

ผลการวิจัยนี้จะถ่ายทอดไปสู่นักวิชาการและเกษตรกรที่อยู่ในกลุ่มธุรกิจการผลิตสัตว์น้ำ โดยเฉพาะสัตว์น้ำทะเล โดยการนำไปประชุมวิชาการทั้งที่จัดในประเทศและการประชุมวิชาการในระดับนานาชาติ รวมทั้งการนำไปเขียนผลงานเพื่อเผยแพร่ในวารสารวิชาการทางด้านเทคโนโลยีประมง



## บทที่ 2

### วิธีการดำเนินการวิจัย

สถานที่ทำการทดลอง                      อาคารศูนย์เครื่องมือ 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

#### วิธีการดำเนินการวิจัย

การศึกษานี้เป็น โคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง คือการโคลนยีน *fads 2* ที่ทำหน้าที่ในการผลิตเอ็นไซม์ *delta-6 desaturase* โดยในขั้นต้นจะทำการสำรวจการแสดงออกของยีน *fads 2* ในอาร์ทีเมีย เนื่องจากไม่พบการแสดงออกของยีน *fads 2* ในอาร์ทีเมีย จึงเป็นการนำเอารีคอมบีแนนท์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่มีพลาสมิดเวกเตอร์ที่มียีน *fads 2* ที่สามารถผลิตเอ็นไซม์ *delta-6 desaturase* จากปลานิล มาเลี้ยงอาร์ทีเมียร่วมกับน้ำมันพืชที่มีกรดไขมัน โอเมก้า 3 สูง ดังนั้นการวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในอาร์ทีเมีย และการทดลองที่ 2 การนำเอารีคอมบีแนนท์ยีสต์ *S. cerevisiae* ที่มีพลาสมิดเวกเตอร์ที่มียีน *fads 2* ที่สามารถผลิตเอ็นไซม์ *delta-6 desaturase* จากปลานิล มาเลี้ยงอาร์ทีเมียร่วมกับน้ำมันพืชที่มีกรดไขมัน โอเมก้า 3 สูง เพื่อศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย

การทดลองที่ 1 การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในอาร์ทีเมีย

#### 1. ตัวอย่างอาร์ทีเมีย

##### 1.1 อาร์ทีเมียในระยะ nauplii

นำไข่อบแห้งของอาร์ทีเมียมาเพาะให้เป็น *Artemia nauplii*

โดยการนำมาใส่ในน้ำทะเลที่มี การปรับ ความเค็มที่เหมาะสม (ประมาณ 25-30 ส่วนในพันส่วน; ppt) ให้ อากาศในน้ำอย่างแรง เพื่อให้ไข่อาร์ทีเมียมีการลอยวนอยู่ในน้ำสม่ำเสมอ ไม่กองทับกัน จนไข่อาร์ทีเมียฟักเป็นตัว ทำการแยกเปลือกไข่ออกจากอาร์ทีเมีย โดยทำให้ระดับน้ำด้านบนมีด เพื่อให้ อาร์ทีเมียเคลื่อนที่เข้าหาแสงที่ระดับน้ำด้านล่าง แล้วเก็บตัวอย่างอาร์ทีเมียวัยอ่อน ไปใช้ในการวิเคราะห์ การแสดงออกของยีน

##### 1.2 อาร์ทีเมียระยะ โตเต็มวัย

ตัวอย่างอาร์ทีเอ็มเอ โดเต็ม้วยได้จากแหล่งเลี้ยงปลาสวยงาม นำมาเก็บตัวอย่าง 2 ส่วน ได้แก่ 1) ส่วนหัวและส่วนอกรวมกัน 2) ส่วนของลำตัว

## 2. การวิเคราะห์หา mRNA ของเอนไซม์ delta-6-desaturase ( $\Delta 6$ ) ในอาร์ทีเอ็มเอ

1. ทำการศึกษารวบรวมข้อมูล cDNA และลำดับของกรดอะมิโนของเอนไซม์ delta-6-desaturase ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ จาก <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> เพื่อนำมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ โดยการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ในการทำ alignment ของกรดอะมิโน และ cDNA แล้วทำการเปรียบเทียบเพื่อหาส่วนที่มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุด เพื่อทำการออกแบบไพรเมอร์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ แสดงดังตารางที่ 2.1

2. ทำการสกัด Total RNA จากตัวอย่างอาร์ทีเอ็มเอในข้อที่ 1

โดยตัวอย่างเนื้อเยื่อต้องมีน้ำหนักประมาณ 50-100 มิลลิกรัม (mg) และใส่สาร Trizol 500-1000  $\mu$ l แล้วทำการบดตัวอย่างให้ละเอียด และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที หลังจากนั้นใส่ chloroform 1 ส่วนต่อ 5 ส่วน ของสารละลายในหลอด ทำการผสม (vortex) และนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ด้วยความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที สารละลายจะแยกชั้นโดยส่วนของอาร์เอ็นเอจะอยู่ชั้นบน ทำการดูดสารส่วนบนย้ายไปยังหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์หลอดใหม่ หลังจากนั้นทำการตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย isopropanol โดยใส่สาร isopropanol เท่ากับสารละลายอาร์เอ็นเอที่ย้ายมา ทำการ vortex สารละลาย และวางที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำหลอดไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดสารละลายออกทิ้งเหลือไว้เฉพาะตะกอนของอาร์เอ็นเอ ต่อมาทำการล้างตะกอนด้วย 80% ethanol 2 เท่าของสารละลายอาร์เอ็นเอ หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการดูดสารละลายทิ้งอีกครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-15 นาที เพื่อให้เอทานอลระเหยออกไป หลังจากนั้นละลายตะกอนอาร์เอ็นเอในน้ำ DEPC 225  $\mu$ l ทำการผสมเบา ๆ เพื่อให้ตะกอนละลาย จากนั้นใส่ DNase I (5U/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l และสาร RQ 1 DNase 10x buffer 25  $\mu$ l เพื่อกำจัดดีเอ็นเอที่เหลือไว้แต่อาร์เอ็นเอ นำหลอดไปตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบแห้ง โดยตั้งอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที และทำลายเอนไซม์ DNase I ด้วยอุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดยใส่ phenol : chloroform (1 ส่วนต่อ 1 ส่วนของสารละลายที่มีอยู่) ทำการ vortex และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที สารละลายจะแยก

| ไพรเมอร์          | ลำดับนิวคลีโอไทด์                         | ยีน          | เอ็นไซม์ที่ผลิต    |
|-------------------|---|--------------|--------------------|
| NiFad6-F1 (start) | 5'- ATG GGA GGT GGA AGC CAG CAG ACG G -3' | <i>fads2</i> | Delta-6 desaturase |
| NiFad6-R1 (stop)  | 5'- TCA TTT ATG GAG ATA TGC ATC C-3'      | <i>fads2</i> | Delta-6 desaturase |
| FADd6_1           | 5'- TGC AGC ATG ACT TTG GCC ACC TGT C-3'  | <i>fads2</i> | Delta-6 desaturase |
| FADd6_2           | 5'-GGT GGA ACC ATC GAC ACT TCC AGC A-3'   | <i>fads2</i> | Delta-6 desaturase |
| B6R1              | 5'- CCA CCC AGT CAT GGC GGG AGA TCA -3'   | <i>fads2</i> | Delta-6 desaturase |
| B6R2              | 5'- GAG TTC GGC CAA GTA CGA AGA GGT -3'   | <i>fads2</i> | Delta-6 desaturase |
| ART-R1            | 5'- GTT GTG VCG TGG CAT KGT -3'           | <i>fads2</i> | Delta-6 desaturase |
| ART-R2            | 5'- GGA AAY AGR TGR TGY TCR AT-3'         | <i>fads2</i> | Delta-6 desaturase |
| D6-F1             | 5'-CGA GCA GTC CTT CTT CAA CGA CTG G-3'   | <i>fads2</i> | Delta-6 desaturase |
| D6-R1             | 5'-CTC TCC GAT CAG CAG CGG CTT CAG A-3'   | <i>fads2</i> | Delta-6 desaturase |
| D5F1              | 5'- CTC AAY TWT CAA ATM GAA CAC CAT T -3' |              | Delta-5 desaturase |
| D5F2              | 5'- ATT ACC MCH HGG TGG CYC CNA TTG T -3' |              | Delta-5 desaturase |
| D4F1              | 5'- CGT BWC HMG GAC VGA TTT CGA ATG G -3' |              | Delta-4 desaturase |
| D4F2              | 5'- CNY TBA TGY TAG CYG TTC AYG AAA T -3' |              | Delta-4 desaturase |
| D4R1              | 5'- T RTA RTG CTC VGA DAT AAA ATG MCC -3' |              | Delta-4 desaturase |
| D4R2              | 5'- C MAC RGG GTG NAA TCC CAT BGC CAT -3' |              | Delta-4 desaturase |
| D3F1              | 5'- G RAC CAT GWT BTG GGC TCT CTT TGT -3' |              | Delta-3 desaturase |
| D3F2              | 5'- CAT GAC TGC GGW CAT GGW WSY TTC T -3' |              | Delta-3 desaturase |

ชั้น โดยส่วนของอาร์เอ็นเอจะอยู่ชั้นบน ทำการดูดสารส่วนบนย้ายไปยังหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์หลอดใหม่ หลังจากนั้นทำการตกตะกอนอาร์เอ็นเออีกครั้งด้วย 3 M sodium acetate pH 5.2 (อัตรา 1: 10 ของสารละลาย) และ absolute ethanol (3เท่าของxib,k9iสารละลาย) และทำการ vortex สารละลาย นำหลอดไปตั้งไว้ที่อุณหภูมิ  $-80^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง เพื่อตกตะกอนอาร์เอ็นเอ ทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอน RNA ด้วยความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดสารละลายออกทิ้งเหลือไว้เฉพาะตะกอนของอาร์เอ็นเอ และทำการล้างตะกอนด้วย 80% ethanol 2 เท่าของสารละลายอาร์เอ็นเอ หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 5 นาที ทำการดูดสารละลายทิ้งอีกครั้ง และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-15 นาที เพื่อให้เอทานอลระเหยออกไป จากนั้นละลายตะกอนอาร์เอ็นเอทั้งหมด (total RNA) ในน้ำ DEPC 30  $\mu\text{l}$  และเก็บ total RNA ในตู้เย็น  $-80^{\circ}\text{C}$

### 3. การสังเคราะห์ The first strand cDNA และการโคลน cDNA ของยีน *fads 2* ด้านปลาย 3' ด้วยเทคนิค 3'RACE

#### 3.1 การสังเคราะห์ The first strand cDNA

นำ total RNA จากข้อ 2. ไปวัดความเข้มข้นของ RNA ที่ค่าการดูดกลืนแสง 260 นาโนเมตร (nm) หลังจากนั้นทำการสังเคราะห์ the first strand cDNA จาก total RNA ข้อ 2 โดยใช้ SMART™ RACE cDNA amplification kit และตามวิธีการของชุดสารละลาย

#### 3.2 การโคลน cDNA ของยีน *fads 2* ด้านปลาย 3'

การโคลน cDNA ของยีน *fads 2* ใช้เทคนิค 3'RACE (3'Rapid amplification of cDNA end) ซึ่งเป็นการโคลนโดยการทำ nested PCR ซึ่งเป็นการทำ PCR 2 ครั้ง ได้แก่ primary PCR และ nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์เส้นต่าง ๆ จากตารางที่ 2.1 ซึ่งมีการเตรียมปฏิกิริยาสำหรับทำ PCR โดยใช้ LA Taq kit (Takara) โดยให้มีปริมาณทั้งหมดเท่ากับ 10  $\mu\text{l}$  ประกอบไปด้วย

- 5 U/ $\mu\text{l}$  LA Taq (Takara Shuzo, Shiga, Japan)
- 10x buffer LA Taq
- 25 mM  $\text{MgCl}_2$
- 2.5 mM dNTP
- 10  $\mu\text{M}$  primer forward และ 10  $\mu\text{M}$  primer reverse

สถานะการทำ PCR เป็นดังนี้ 95°C เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ ต่อมา 95°C เป็นเวลา 45 วินาที, 59°C 45 วินาที และ 72°C 90 วินาที ติดต่อกันจำนวน 40 รอบ และเข้าสู่ 72°C 5 นาที จำนวน 1 รอบ

หลังจากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย Agarose gel electrophoresis และทำการแยกผลผลิต PCR ที่มีขนาดที่น่าจะเป็นไปได้ ไปทำการเชื่อมต่อ (ligation) กับ พลาสมิด pGEM

### 3.3 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับเวกเตอร์

การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับเวกเตอร์ มีปฏิกิริยาประกอบไปด้วย pGEM<sup>®</sup>-T Easy vector 50 ng/  $\mu$ l, 2X Rapid ligation buffer, T4 DNA ligase 3 U/ $\mu$ l และชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (DNA fragment) บ่ม ที่อุณหภูมิ 16°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วทำการเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์เข้าสู่เชื้อเซลล์เจ้าบ้าน ต่อจากนั้นทำการสกัดพลาสมิด เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่โคลนได้

## 4. การศึกษาเบื้องต้นของโครงสร้างยีน *Onifads 2*

การวิเคราะห์โครงสร้างของยีน *Onifads 2* โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป IntroProScan (<http://www.ebi.ac.uk>) ในการทำนายส่วนของ Cytochrome b 5, fatty acid desaturase domains และส่วนของ transmembrane และวิเคราะห์ hydrophobicity ด้วยโปรแกรม SVMtm TRansmembrane Domain Predictor (<http://ccb.imb.uq.edu.au/svmtm/>) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับยีน *fads2* ในปลาอื่น ๆ โดยใช้ Clustal X2.1

## 5. การเลี้ยงรีคอมบีแนนท์ยีสต์

รีคอมบีแนนท์ยีสต์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นรีคอมบีแนนท์ยีสต์ที่มีรีคอมบีแนนท์พลาสมิด pGal-onifads2 (ภาพที่ 2.1) โดยมีส่วนของยีน *Onifads 2* ที่เชื่อมต่อกับโปรโมเตอร์ *GAL 1* ดังนั้น การเลี้ยงรีคอมบีแนนท์ยีสต์ให้มีการผลิตเอนไซม์ delta-6 desaturase ของปลานิล จะต้องมีการเหนี่ยวนำด้วยน้ำตาลกาแลคโตส (galactose) ดังนี้

นำยีสต์ RY มาเลี้ยงในอาหาร sc-minimal medium + 2% glucose 2 ml ในหลอดสำหรับเลี้ยงเชื้อและนำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C ที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อยีสต์จากหลอดทดลองมาขยายเชื้อเพิ่มลงในอาหาร sc-minimal medium + 2% glucose 60 ml ในขวดรูปชมพู่และนำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C ที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ต่อมานำวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm แล้วนำเชื้อยีสต์ที่ได้มา

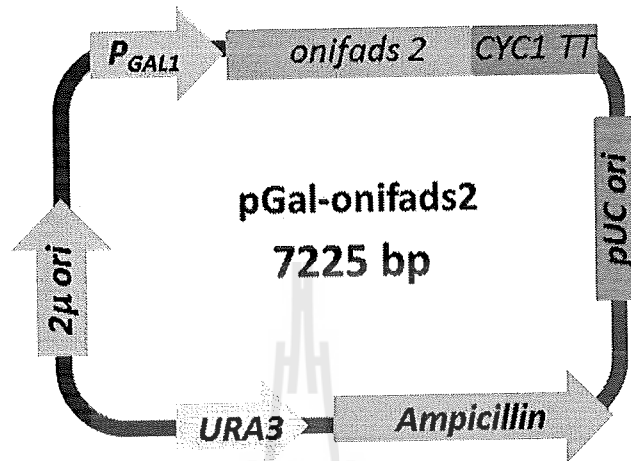


เจือจางให้เหลือค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm เท่ากับ 0.4 หลังจากนั้นนำเซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงได้ เทใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 50 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 1,957×g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แห้งไว้เฉพาะส่วนของตะกอนเซลล์ยีสต์ จากนั้นล้างตะกอนด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อ sc-minimal medium + 2% galactose 3 ml จากนั้นทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ sc-minimal medium + 2% galactose เพื่อให้ น้ำตาล galactose เหลือยวนำทำให้เกิดการแสดงออกของ เอ็นไซม์ delta-6 desaturase โดยทำการเลี้ยงที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง และทำการเก็บเซลล์ยีสต์เพื่อนำไปใช้

## 6. การเลี้ยงยีสต์ปกติ

นำยีสต์ปกติ (wt) มาเลี้ยงในอาหาร sc-minimal medium + 2% glucose + uracil 2 ml ในหลอดสำหรับเลี้ยงเชื้อและนำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C ที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อยีสต์จากหลอดทดลองมาขยายเชื้อเพิ่มลงในอาหาร sc-minimal medium + 2% glucose + uracil 60 ml ในขวดรูปชมพู่และนำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C ที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการเก็บเซลล์ยีสต์เพื่อนำไปใช้





ภาพที่ 2.1 รีคอมบีแนนท์พลาสมิด pGal-onifads 2 ประกอบด้วยยีน *fads 2* ของปลานิล (*onifads 2*) ซึ่งถูกขับเคลื่อนด้วยโปรโมเตอร์ *GAL1*

## 7. การศึกษาการแสดงออกของรีคอมบีแนนท์ยีสต์ด้วย Reverse transcription PCR (RT-PCR)

นำเซลล์รีคอมบีแนนท์ยีสต์ (RY) มาสกัด Total RNA และ ทำการสังเคราะห์ the first stand cDNA ของยีน *onifads2* โดยใช้ Hexamers และ Specific primer (V5 c-term) ในการศึกษาครั้งนี้ใช้  $\beta$ -actin เป็นยีนอ้างอิง (internal reference) เพื่อเป็นตัวมาตรฐานในการวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *onifads2* ในยีสต์ RY ที่ทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ sc-minimal medium + 2% galactose ที่ระยะ 0 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ FADd6\_1 และ ART\_R2 สำหรับยีน *onifads2* และไพรเมอร์ Sc-actin-F คู่กับ Sc-actin-R สำหรับยีน  $\beta$ -actin โดยใช้ชุดสารเคมีสำหรับการทำ PCR GoTaq® (Promega) โดยมีสภาวะการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอในเครื่อง PCR (PCR condition) ดังนี้ 95°C เป็นเวลา 4 นาที จำนวน 1 รอบ ต่อมา 95°C เป็นเวลา 45 วินาที, 59°C เป็นเวลา 45 วินาที และ 72°C เป็นเวลา 45 วินาที ติดต่อกันจำนวน 40 รอบ และเข้าสู่ 72°C เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบขนาด ดีเอ็นเอด้วย Agarose gel electrophoresis

## 8. การวิเคราะห์ห้องค้ประหอบกรดไขมัน

ทำการชั่งตัวอย่าง (ยีสต์ RY ใช้ 5 กรัม , อาร์ทีเมียใช้ 5 กรัม) ลง โถปั่น ขนาด 30 ml เติม Chloroform : Methanol (2 : 1) 30 ml ปั่นละเอียด ที่ 1,957×g 5 นาที แล้วนำไปกรองผ่าน Buchner funnel ด้วย กระดาษกรองเบอร์ 1 นิดล้างส่วนที่ค้างอยู่ในโถปั่นและกระดาษกรองด้วย Chloroform : Methanol (2 : 1) แล้วนำส่วนที่กรองได้เทลงในกรวยแยก แล้วเติม 0.03 M MgCl<sub>2</sub> 24 ml แล้วเติม 1% BHT 1 ml ทำการเขย่าให้สารผสมเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเปิดควาล้วเพื่อให้เกิดฟอง แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นอย่างน้อย 6 ชั่วโมง เก็บไว้ในที่ไม่มีแสงสว่าง เมื่อแยกชั้นแล้วจึงไขส่วน chloroform ชั้นล่างออกใส่ในขวดแก้วกันกลมที่ทราบน้ำหนักแน่นอน แล้วนำไประเหย chloroform ออกใน Rotary evaporator จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนัก จดบันทึกน้ำหนัก

การทำ saponification โดยใส่ Isooctane ลงไป 2 ml และ internal standard 1 ml นำไปทำให้แห้ง ภายใต้สภาวะที่มีแก๊สไนโตรเจน และเติม 0.5 N NaOH ใน methanol 1.5 ml เขย่าให้ผสมกัน นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 7 นาที มีการเขย่าเป็นครั้งคราว แล้วนำมาทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม 14% BF<sub>3</sub>-MtOH 2 ml แล้วผสมให้เข้ากัน แล้วต้มที่ อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นจน ได้ อุณหภูมิประมาณ 30-40°C จึงเติม Isooctane 1 ml เขย่าให้ผสมกัน และดูดส่วนของ Isooctane ไปใส่ในขวดใหม่ แล้วนำไปทำให้แห้ง ภายใต้สภาวะที่มีแก๊สไนโตรเจน จากนั้นเติม Hexane 1 ml แล้วนำไปฉีด Gas Chromatography

การวิเคราะห์ห้องค้ประกอบของกรดไขมัน โดยใช้ Gas Chromatography (GC) ใช้ปริมาณสารที่ฉีด 1  $\mu$ l โดยใช้เครื่อง GC รุ่น GC2014 (Shimadzu, Japan) โดยใช้คอลัมน์ RESTEK Rtx®-Wax (Restek, Bellefonte, PA, USA) ขนาด 30 m×0.25 mm ID×0.25  $\mu$ m โดยใช้แก๊สไฮโดรเจนเป็น carrier gas

ที่ความเร็ว 20 เซนติเมตรต่อวินาที อัตราส่วนการปล่อยสาร 25 : 1 อุณหภูมิ injector เท่ากับ 230°C อุณหภูมิ detector เท่ากับ 250°C และมีสถานะการเปลี่ยนอุณหภูมิของคอลัมน์โดยเริ่มต้นที่ 140°C เพิ่มอุณหภูมิเป็น 220°C ด้วยอัตรา 4 °C ต่อนาที และให้อุณหภูมิคอลัมน์อยู่ที่ 220 °C เป็นระยะเวลา 40 นาที สำหรับสารมาตรฐาน (standard FAME) ใช้ 37 component FAME standard (Supelco, Sigma, USA) ทำการวิเคราะห์ชนิด fatty acid โดยการเปรียบเทียบกับ retention time และ พื้นที่ peak กับสารมาตรฐาน

**การทดลองที่ 2 การนำเอารีคอมบีแนนท์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่มีพลาสมิดเวกเตอร์ที่มียีน *fads 2* ที่สามารถผลิตเอ็นไซม์ delta-6 desaturase จากปลานิล มาเลี้ยงอาร์ทีเมียร่วมกับ น้ำมันพืชที่มีกรดไขมันโอเมก้า 3 สูง เพื่อศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย**

การทดลองนี้เป็นการนำเอารีคอมบีแนนท์ยีสต์ที่มีการแสดงออกยีน *Onifads 2* ซึ่งเป็นยีน *fads 2* ของปลานิลมาใช้ในการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย โดยมีการให้สารตั้งต้นเป็นน้ำมันพืชโดยในขั้นต้นจะมีการวิเคราะห์ถึงโครงสร้างของยีน *Onifads 2* วิเคราะห์ความคล้ายคลึงกับยีน *fads 2* ของปลาต่าง ๆ ที่ได้มีการศึกษาไว้แล้ว และทำการวิเคราะห์ถึงการแสดงออกของรีคอมบีแนนท์ยีสต์ที่ระดับการ transcription ตามด้วยองค์ประกอบของกรดไขมันของรีคอมบีแนนท์ยีสต์แล้ว จึงนำไปใช้เลี้ยงอาร์ทีเมียร่วมกับน้ำมันเมล็ดลินิน

1. การเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยยีสต์หรือรีคอมบีแนนท์ยีสต์ต่อองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย

#### 1.1 แผนการทดลอง

| กลุ่มที่ | ชนิดยีสต์และความหนาแน่น                |
|----------|--|
| 1        | ยีสต์ปกติ (wt) $5 \times 10^3$         |
| 2        | ยีสต์ปกติ (wt) $5 \times 10^4$         |
| 3        | ยีสต์ปกติ (wt) $5 \times 10^5$         |
| 4        | ยีสต์รีคอมบีแนนท์ (RY) $5 \times 10^3$ |
| 5        | ยีสต์รีคอมบีแนนท์ (RY) $5 \times 10^4$ |
| 6        | ยีสต์รีคอมบีแนนท์ (RY) $5 \times 10^5$ |

## 1.2 การเตรียมยีสต์

ทำการเตรียมรีคอมบีแนนท์ยีสต์เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ข้อ 2 และยีสต์ปกติเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ข้อ 3 แล้วนับจำนวนยีสต์แล้ว

## 1.3 การเตรียมอาร์ทีเมีย

นำอาร์ทีเมียมา 2 กรัมแช่ในน้ำประปาที่ปราศจากคลอรีน 100 มิลลิตร ประมาณ 1.5-2 ชั่วโมง เตรียมน้ำเค็ม (น้ำทะเลเข้มข้นแล้วนำมาเจือจาง) ให้ได้ความเข้มข้น 25 ส่วนในพันส่วน (ppt) ปริมาณ 600 มิลลิตร แล้วให้อากาศแบบเต็มที เมื่ออาร์ทีเมียฟักออกมา (ประมาณ 18-24 ชั่วโมง) ทำการแยกอาร์ทีเมียออกจากเปลือกไข่ ล้างด้วยน้ำทะเลที่สะอาดก่อนเข้าสู่การทดลอง

ทำการใส่ยีสต์ลงในน้ำทะเลปริมาณ 1 ลิตร โดยปรับความหนาแน่นของอาร์ทีเมียที่ใช้ในการทดลองให้เท่ากับ 25,000 ตัวต่อลิตร และยีสต์ตามที่ระบุไว้ในข้อที่ 2.1.2 ที่ระยะเวลา 12, 18 และ 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันตามวิธีการที่อธิบายไว้ในการทดลองที่ 1 ข้อ 5

## 2. การเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยน้ำมันลินินและน้ำมันปลาต่อองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย

### 2.1 แผนการทดลอง

| กลุ่มที่ |                          |
|----------|--------------------------|
| 1        | อาร์ทีเมีย               |
| 2        | อาร์ทีเมีย + น้ำมันปลา   |
| 3        | อาร์ทีเมีย + น้ำมันลินิน |

### 2.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันน้ำมันลินินและน้ำมันปลา

ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันของน้ำมันปลาและน้ำมันลินินตามวิธีการที่อธิบายไว้ในข้อที่ 5 ของการทดลองที่ 1 พบว่ามีองค์ประกอบของกรดไขมันดังแสดงในตารางที่ 2.1

### 2.3 การทดลองเลี้ยงอาร์ทีเมีย

- ทำการปั่นน้ำมันปลา 0.25 กรัมต่อลิตร ในน้ำทะเล หรือน้ำมันลินิน 0.25 กรัมต่อลิตรในน้ำทะเล เพื่อทำให้เป็นอิมัลชัน (emulsion) น้ำมันลินินและน้ำมันปลา แล้วจึงเตรียมอาร์ทีเมียตามวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 2.1.3 แล้วเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยน้ำมันปลาหรือน้ำมันลินิน เป็นระยะเวลา 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ในระหว่างการเลี้ยงมีการให้อากาศอย่างเต็มที่ แล้วจึงกรองเก็บอาร์ทีเมีย เพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันดังรายละเอียดในข้อที่ 5 ของการทดลองที่ 1

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันปลา และน้ำมันลินิน

| กรดไขมัน<br>(มิลลิกรัมต่อกรัมไขมัน) | น้ำมันปลา | น้ำมันลินิน |
|-------------------------------------|-----------|-------------|
| C14:0                               | 0.23      | 0.11        |
| C16:0                               | 1.39      | 11.46       |
| C16:1                               | 0.57      | 0.16        |
| C18:0                               | 1.47      | 4.88        |
| C18:1n9                             | 1.44      | 6.29        |
| C18:2n6                             | 0.52      | 18.14       |
| C18:3n6                             | 0.06      | 0.08        |
| C20:3n6                             | 0.17      | nd          |
| C20:4n6                             | 0.07      | 0.11        |
| C18:3n3                             | 8.73      | 51.49       |
| C18:4n3                             | 0.74      | 0.08        |
| C20:3n3                             | 1.00      | 0.08        |
| C20:5n3                             | 31.30     | 1.37        |
| C22:6n3                             | 23.74     | 0.14        |
| C20:0                               | 0.19      | 0.04        |
| C20:1                               | 0.46      | 0.04        |
| C20:2                               | 0.13      | 0.09        |
| C22:0                               | 0.10      | 0.17        |
| C22:1n9                             | 0.12      | 0.05        |
| C22:2                               | 0.72      | 0.05        |
| C24:0                               | 1.65      | 0.72        |

### 3. การเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยยีสต์หรือรีคอมบีแนนท์ยีสต์ร่วมกับน้ำมันลินินต่อองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย

#### 3.1 แผนการทดลอง

| กลุ่มที่ | ชนิดยีสต์และความหนาแน่น                              |
|----------|--|
| 1        | ยีสต์ปกติ (wt) $5 \times 10^3$ + น้ำมันลินิน         |
| 2        | ยีสต์ปกติ (wt) $5 \times 10^4$ + น้ำมันลินิน         |
| 3        | ยีสต์ปกติ (wt) $5 \times 10^5$ + น้ำมันลินิน         |
| 4        | ยีสต์รีคอมบีแนนท์ (RY) $5 \times 10^3$ + น้ำมันลินิน |
| 5        | ยีสต์รีคอมบีแนนท์ (RY) $5 \times 10^4$ + น้ำมันลินิน |
| 6        | ยีสต์รีคอมบีแนนท์ (RY) $5 \times 10^5$ + น้ำมันลินิน |

#### 3.2 การเลี้ยงอาร์ทีเมีย

ทำการเตรียมยีสต์ปกติทำการเตรียมรีคอมบีแนนท์ยีสต์เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ข้อ 2 และยีสต์ปกติเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ข้อ 3 แล้วนับจำนวนยีสต์และเตรียมอาร์ทีเมียเช่นเดียวกับข้อที่ 2.1.3 และทำอิมัลชัน (emulsion) น้ำมันลินินเช่นเดียวกับข้อที่ 2.2.3 แล้วเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยยีสต์ร่วมกับน้ำมันลินินเป็นระยะเวลา 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ในระหว่างการเลี้ยงมีการให้อากาศอย่างเต็มที่ แล้วจึงกรองเก็บอาร์ทีเมีย เพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันดังรายละเอียดในข้อที่ 5 ของการทดลองที่ 1

## บทที่ 3

### ผลการวิจัย

#### 3.1 ผลการศึกษา

##### การทดลองที่ 1 การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ไขมันไม่อิ่มตัวสูงในอาร์ทีเมีย

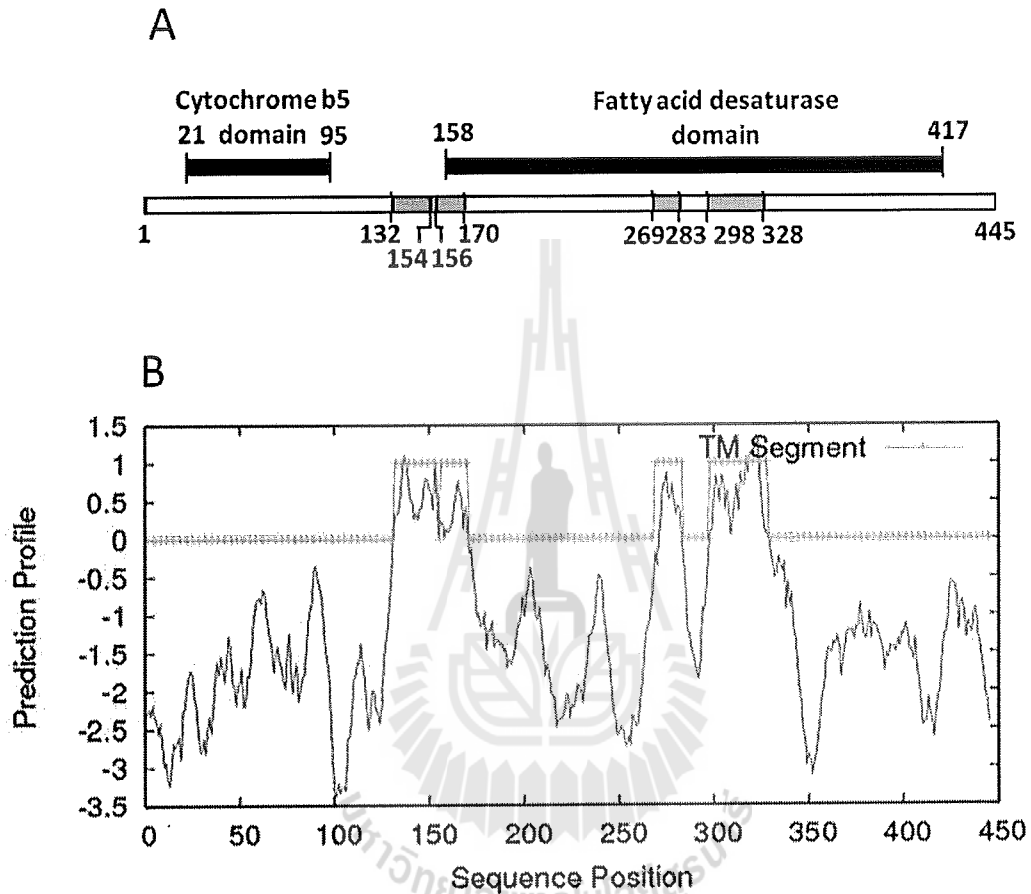
จากการโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับเอ็นไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์ไขมันไม่อิ่มตัวสูงในอาร์ทีเมีย โดยได้ทำการโคลนยีน *fads 2* ที่สร้างเอ็นไซม์ delta-6 desaturase โดยใช้ไพรเมอร์ที่สามารถเข้าไปจับกับบริเวณต่าง ๆ ของยีน หลายบริเวณ ได้ผลผลิตของ PCR น้อยมาก และเมื่อทำการโคลนผลผลิต PCR เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ก็ยังไม่ได้ชิ้นส่วนของยีนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่น่าจะเป็นยีน *fads 2* แต่อย่างใด และเมื่อทำการโคลนยีนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ไขมันไม่อิ่มตัวสูงในอาร์ทีเมียได้แก่ ยีนที่สร้างเอ็นไซม์ delta-3 desaturase, delta-4 desaturase และ delta-5 desaturase ก็ไม่สามารถโคลนยีนดังกล่าวได้ ดังนั้นการศึกษาวิจัยนี้จึงได้ไปทำการโคลนยีน *fads 2* ที่สร้างเอ็นไซม์ delta-6 desaturase จากปลาน้ำจืด เพื่อนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในอาร์ทีเมียแทน

การศึกษานี้ได้นำเอาริคอมบีแนนท์ยีสต์ (RY) ที่ได้มีการนำพลาสมิด pGal-onifads 2 ซึ่งมียีน *Onifads 2* เชื่อมต่อกับโปรโมเตอร์ GAL 1 ของยีสต์ ซึ่ง RY นี้จะสามารถสร้างเอ็นไซม์ delta-6 desaturase ได้เมื่อได้รับการเหนี่ยวนำด้วยน้ำตาลกลูโคส ก่อนที่จะมีการนำริคอมบีแนนท์ยีสต์ไปใช้ในเลี้ยงอาร์ทีเมียเพื่อเปลี่ยนองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย จะมีการศึกษาโครงสร้างของยีน *oniFads2*

โครงสร้างของยีน *oniFads2* (GenBank accession no. KF268464) ประกอบด้วยส่วนที่แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน 1338 คู่เบส ที่แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 445 ตัว โปรตีนที่ได้จากการแปลรหัสนี้มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 51.49 กิโลดาลตัน และมีค่า isoelectric point ที่ pH 6.43 โปรตีน *Onifads 2* ประกอบด้วยส่วนของ cytochrome b5 (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 21 ถึง 95) และส่วนของ and fatty acid desaturase domains were predicted (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 157 ถึง 417) (ภาพที่ 3.1) ภาพที่ 3.1 แสดงการวิเคราะห์ hydrophobicity ของโปรตีน *Onifads 2* ซึ่งประกอบด้วย transmembrane domains 4 แห่ง ภาพที่ 3.2 แสดงกลุ่มกรดอะมิโน HPGG ที่เป็นกลุ่มกรดอะมิโนของ cytochrome b5-like heme binding motif (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 54 ถึง 57) ในบริเวณ cytochrome b5 domain (ภาพที่ 3.2). ภายในบริเวณ fatty acid desaturase domain มีกลุ่มกรดอะมิโนที่เป็นหมู่กรดอะมิโนอนุรักษ์สำหรับ histidine-rich boxes (HDFGH, HFRHH, QIEHH) การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของโปรตีน *OniFads2* กับ โปรตีน *Fads2* ของปลานชนิดอื่น ๆ จะมีความคล้ายคลึงอยู่ในช่วง 72.6%–80.9% (ภาพที่ 3.2) เมื่อเปรียบเทียบความ



คล้ายคลึงของส่วน cytochrome b5 domain ของโปรตีน Onifads 2 กับ โปรตีน fads 2 ในปลาอื่น จะมี ความคล้ายคลึงอยู่ในช่วง



ภาพที่ 3.1 การวิเคราะห์โครงสร้างของโปรตีน Onifads 2 ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ delta-6 desaturase ของปลานิล

A) การวิเคราะห์โครงสร้างของโปรตีน Onifads 2 โดยใช้โปรแกรม Introproscan

B) การวิเคราะห์ hydrophobicity โดยใช้โปรแกรม SVMtm Transmembrane Domain Predictor

พบว่าโปรตีน Onifads 2 ประกอบด้วยบริเวณ hydrophobic 3 บริเวณ และ บริเวณ

transmembrane membrane 4 แห่ง

76%–93% และความคล้ายคลึงของส่วน fatty acid desaturase domain ของโปรตีน Onifads 2 กับ โปรตีน fads 2 ในปลาอื่น จะมีความคล้ายคลึงอยู่ในช่วง 73%–83%

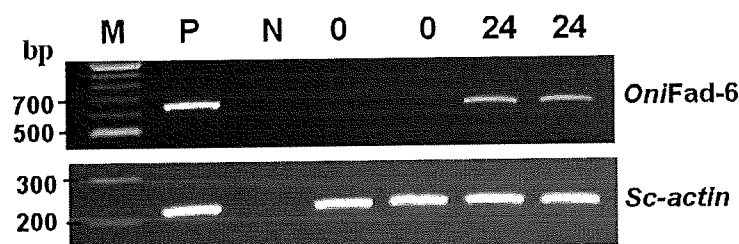
การวิเคราะห์การแสดงออกของรีคอมบีแนนท์ยีสต์ด้วยวิธี Reverse transcription PCR (RT-PCR) (ภาพที่ 3.3) ก่อนการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *onifads 2* ได้ทำการวิเคราะห์คุณภาพของ cDNA ที่เตรียมได้ โดยทำการวิเคราะห์การแสดงออกของ ยีนอ้างอิง (reference gene) ได้แก่การวิเคราะห์การแสดงออกของ mRNA ของยีน  $\beta$ -actin พบว่า RY ในระยะก่อนที่จะมีการเหนี่ยวนำด้วยน้ำตาลกาแลคโตส และหลังจากเหนี่ยวนำด้วยน้ำตาลกาแลคโตสเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีการแสดงออกของยีนอ้างอิง (reference gene) โดยมีการผลิต mRNA ของยีน  $\beta$ -actin ในระดับที่ใกล้เคียง และเมื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *onifads 2* พบว่ารีคอมบีแนนท์ยีสต์ (RY) ก่อนที่จะมีการเหนี่ยวนำด้วยน้ำตาลกาแลคโตสไม่มีการผลิต mRNA ของยีน *onifads 2* ในขณะที่ RY ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้แสดงออกด้วยน้ำตาลกาแลคโตสเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีการผลิต mRNA ของยีน *onifads 2*

การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน RY ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งพลังงาน เปรียบเทียบกับ RY ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีน้ำตาลกาแลคโตสเป็นแหล่งพลังงาน แสดงดังตารางที่ 3.1 พบว่า RY ที่เลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลกาแลคโตสมีปริมาณไขมันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P>0.05$ ) โดยที่ RY ที่เลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคสมีปริมาณไขมัน เท่ากับ  $4.82 \pm 0.59 \text{ mg g}^{-1}$  และ RY ที่เลี้ยงด้วยน้ำตาลกาแลคโตสมีปริมาณไขมัน เท่ากับ  $5.63 \pm 0.28 \text{ mg g}^{-1}$  และพบองค์ประกอบกรดไขมันหลักของ 4 ชนิด ได้แก่ C16:0, C16:1n-7, C18:0 และ C18:1n-9 ใน RY ที่เลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลทั้ง 2 ชนิด และพบว่ากรดไขมัน C18:2n6 และ C18:3n3 มีปริมาณต่ำ ทั้งใน RY ที่เลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลกาแลคโตส จะเห็นได้ว่าปริมาณกรดไขมัน C18:3n6 ใน RY ที่เลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลกาแลคโตสมีปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P>0.05$ ) แต่จะสังเกตได้ว่าปริมาณกรดไขมัน C18:3n6 ใน RY ที่เลี้ยงด้วยน้ำตาลกาแลคโตสมีปริมาณสูงกว่าปริมาณ C18:3n6 ใน RY ที่เลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคส นอกจากนี้พบว่า RY ที่เลี้ยงด้วยน้ำตาลกาแลคโตส มี C18:4n3 สูงกว่า C18:4n3 ใน RY ที่เลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P>0.05$ )

| Identity value (%) | Sequence  |
|--------------------|---|
| 80.9               | TLIALPIA PPSVRAAGVTVWVESHSSKNDGAVLDVRNFKTQVLSKRIWVH... QVLSVTAAGD |
| 80.5               | HANDARIN PLAGRGGVTVWVESHSSKNDGAVLDVRNFKTQVLSKRIWVH... QVLSVTAAGD  |
| 80.4               | COBIA GRAGGGVTVWVESHSSKNDGAVLDVRNFKTQVLSKRIWVH... QVLSVTAAGD      |
| 80.4               | B-PENCH PGGGGVTVWVESHSSKNDGAVLDVRNFKTQVLSKRIWVH... QVLSVTAAGD     |
| 80.0               | TUNA PGGGGVTVWVESHSSKNDGAVLDVRNFKTQVLSKRIWVH... QVLSVTAAGD        |
| 80.0               | STABRAS PGGGGVTVWVESHSSKNDGAVLDVRNFKTQVLSKRIWVH... QVLSVTAAGD     |
| 79.6               | GRABER PGGGGVTVWVESHSSKNDGAVLDVRNFKTQVLSKRIWVH... QVLSVTAAGD      |
| 79.6               | STABRAS PGGGGVTVWVESHSSKNDGAVLDVRNFKTQVLSKRIWVH... QVLSVTAAGD     |
| 76.6               | N-CROAKER PGGGGVTVWVESHSSKNDGAVLDVRNFKTQVLSKRIWVH... QVLSVTAAGD   |
| 76.4               | Y-CROAKER PGGGGVTVWVESHSSKNDGAVLDVRNFKTQVLSKRIWVH... QVLSVTAAGD   |
| 75.5               | TURBOT PGGGGVTVWVESHSSKNDGAVLDVRNFKTQVLSKRIWVH... QVLSVTAAGD      |
| 74.6               | COB GRAGGGVTVWVESHSSKNDGAVLDVRNFKTQVLSKRIWVH... QVLSVTAAGD        |
| 74.3               | C-PENCH PGGGGVTVWVESHSSKNDGAVLDVRNFKTQVLSKRIWVH... QVLSVTAAGD     |
| 73.3               | C-SALMON PGGGGVTVWVESHSSKNDGAVLDVRNFKTQVLSKRIWVH... QVLSVTAAGD    |
| 72.8               | SOLE PGGGGVTVWVESHSSKNDGAVLDVRNFKTQVLSKRIWVH... QVLSVTAAGD        |
| 72.8               | MUREL PGGGGVTVWVESHSSKNDGAVLDVRNFKTQVLSKRIWVH... QVLSVTAAGD       |
| 72.8               | TROUT PGGGGVTVWVESHSSKNDGAVLDVRNFKTQVLSKRIWVH... QVLSVTAAGD       |
| 72.6               | A-SALMON PGGGGVTVWVESHSSKNDGAVLDVRNFKTQVLSKRIWVH... QVLSVTAAGD    |

- กลองตีค้ำแสดง
- cytochrome b5-like
- heme-binding motif
- กลองตีขาแสดง
- บริเวณที่มีกรดอะมิโน
- Histidine mark
- (histidine rich areas)
- ดูคล้ายตีค้ำแสดง
- cytochrome b5 domain
- และดูคล้ายตีค้ำแสดง
- และดูคล้ายตีค้ำแสดง
- desaturase domain
- เครื่องหมาย (\*)
- และ (\*) แสดงว่าการคอ
- มีโนที่เปรียบเทียบกับ
- ความคล้ายคลึงกัน
- ทั้งหมด, มีความ
- คล้ายคลึงกันสูง และมี
- ความคล้ายคลึงกันน้อย
- ตามลำดับ

ภาพที่ 3.2 การเปรียบเทียบโปรตีน Omifads 2 กับโปรตีน Fads 2 ของปลาชนิดต่างๆ เพื่อใช้ค้นคว้าความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนของ Omifads กับ Fads ของปลาแต่ละชนิดแสดงดังตัวเลขหน้าลำดับกรดอะมิโนของปลาแต่ละชนิด



ภาพที่ 3.3 การวิเคราะห์การแสดงออกของรีคอมบีแนนท์ยีสต์ด้วยวิธี Reverse transcription PCR (RT-PCR) รีคอมบีแนนท์ยีสต์ (RY) ก่อนที่จะมีการเหนี่ยวนำด้วยน้ำตาลกลูโคส (0) ไม่มีการผลิต mRNA ของยีน *onifads 2* ในขณะที่ RY ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้แสดงออกด้วยน้ำตาลกลูโคสเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (24) มีการผลิต mRNA ของยีน *onifads 2* การวิเคราะห์คุณภาพของ cDNA ที่เตรียมได้ โดยทำการวิเคราะห์การแสดงออกของ ยีน  $\beta$ -actin พบว่า RY ในระยะก่อนที่จะมีการเหนี่ยวนำด้วยน้ำตาลกลูโคส (0) และหลังจากเหนี่ยวนำด้วยน้ำตาลกลูโคสเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (24) มีการแสดงออกของ ยีน  $\beta$ -actin ในระดับที่ใกล้เคียง

M คือ ดีเอ็นเอเครื่องหมายบอกขนาด

P คือ ปฏิกริยา PCR ที่มีการใส่พลาสมิดที่มียีน *onifads 2* (positive control)

N คือ ปฏิกริยา PCR ที่ไม่มีการใส่น้ำกลั่นแทนการใส่ดีเอ็นเอ (negative control)

0 คือ ปฏิกริยา PCR ที่มีการใส่ cDNA ของ RY ก่อนที่จะได้รับการเหนี่ยวนำด้วยน้ำตาลกลูโคส

24 คือ ปฏิกริยา PCR ที่มีการใส่ cDNA ของ RY ที่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วยน้ำตาลกลูโคสเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบของกรดไขมันของรีคอมบีแนนท์ยีสต์ (RY) (ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

| อาหารเลี้ยงเชื้อ | C16:0              | C16:1              | C18:0            | C18:1              | C18:2n6         | C18:3n6         | C18:3n3         | C18:4n3                       |
|------------------|--------------------|--------------------|------------------|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------------------|
| Glucose Sc-Ura   | 252.49 $\pm$ 34.25 | 310.10 $\pm$ 22.36 | 70.35 $\pm$ 5.67 | 213.09 $\pm$ 23.39 | 7.10 $\pm$ 0.47 | 0.36 $\pm$ 0.11 | 1.00 $\pm$ 0.20 | 0.32 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>  |
| Galactose Sc-Ura | 197.24 $\pm$ 6.56  | 353.79 $\pm$ 31.49 | 51.48 $\pm$ 1.57 | 225.23 $\pm$ 11.20 | 8.04 $\pm$ 0.27 | 0.55 $\pm$ 0.08 | 1.27 $\pm$ 0.22 | 15.32 $\pm$ 0.60 <sup>b</sup> |

Glucose Sc-Ura คือ RY ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ใส่น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งพลังงาน

Galactose Sc-Ura คือ RY ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ใส่น้ำตาลกาแลคโตสเป็นแหล่งพลังงาน

การทดลองที่ 2 การนำเอารีคอมบีแนนท์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่มีพลาสมิดเวกเตอร์ที่มียีน *fads 2* ที่สามารถผลิตเอนไซม์ delta-6 desaturase จากปลานิล มาเลี้ยงอาร์ทีเมียพร้อมกับ น้ำมันพืชที่มีกรดไขมันโอเมก้า 3 สูง เพื่อศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย

## 2.1 ผลของการเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยยีสต์หรือรีคอมบีแนนท์ยีสต์ต่อองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย

การศึกษาครั้งนี้ได้นำยีสต์หรือรีคอมบีแนนท์ยีสต์ที่ระดับความหนาแน่นต่าง ๆ ได้แก่  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^4$  และ  $5 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ไปเลี้ยงอาร์ทีเมียเพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงกรดไขมันในอาร์ทีเมีย ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ผลแสดงดังตารางที่ 3.2-3.4

ที่ระยะเวลาการเลี้ยงอาร์ทีเมียที่ 12 และ 18 ชั่วโมง พบว่าอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยรีคอมบีแนนท์ยีสต์มีกรดไขมัน C18:1n9 สูงกว่าอาร์ทีเมียที่ได้รับยีสต์ปกติ (กลุ่มควบคุม) ที่ทุกระดับความหนาแน่น และอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยรีคอมบีแนนท์ยีสต์ที่ทุกระดับความหนาแน่นมีกรดไขมันกลุ่ม n6 ได้แก่ C18:2n6, C18:3n6, C20:3n6 และ C20:4n6 สูงกว่าอาร์ทีเมียกลุ่มควบคุม และยังพบว่าอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยรีคอมบีแนนท์ยีสต์ที่ทุกระดับความหนาแน่นมีกรดไขมันกลุ่ม n3 ได้แก่ C18:3n3, C18:4n3, C20:3n3, C20:5n3 สูงกว่าอาร์ทีเมียกลุ่มควบคุม โดยที่สามารถพบ C22:6n3 ในอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยรีคอมบีแนนท์ยีสต์ที่ทุกระดับความหนาแน่น แต่ไม่พบในอาร์ทีเมียกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่าอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยรีคอมบีแนนท์ยีสต์ที่ระดับ  $5 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีกรดไขมัน C20:0, C20:1, C20:2, C22:0, C22:1n9, C22:2, C24:0 และ C24:1 สูงกว่าอาร์ทีเมียกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงด้วยยีสต์ปกติความหนาแน่นเท่ากัน อย่างไรก็ตามปริมาณกรดไขมันเหล่านี้ในอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยยีสต์รีคอมบีแนนท์และยีสต์ปกติที่ระดับความหนาแน่นของยีสต์ที่ระดับอื่นไม่แตกต่างกันมากนัก

ที่ระยะเวลาการเลี้ยงอาร์ทีเมียที่ 24 ชั่วโมง พบว่า กรดไขมัน C18:1n9 ของอาร์ทีเมียทั้ง 2 กลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับกรดไขมันในกลุ่ม n6 พบว่า C18:2n6 และ C20:3n6 ของอาร์ทีเมียทั้ง 2 กลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยรีคอมบีแนนท์ยีสต์ที่ระดับ  $5 \times 10^4$  และ  $5 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร มี C18:3n6 สูงกว่าอาร์ทีเมียที่ได้รับยีสต์ปกติ (กลุ่มควบคุม) และสำหรับกรดไขมันในกลุ่ม n3 พบว่า C18:3n3, C18:4n3, C20:3n3 และ C20:5n3 ของอาร์ทีเมียทั้ง 2 กลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังสามารถพบ C22:6n3 ในอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยรีคอมบีแนนท์ยีสต์ที่ทุกระดับความหนาแน่น แต่ไม่พบในอาร์ทีเมียกลุ่มควบคุม

ที่ระยะเวลาการเลี้ยงที่ 24 ชั่วโมงนี้ กลับพบว่าอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยรีคอมบีแนนท์ยีสต์ที่ระดับ  $5 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีกรดไขมัน C20:0, C20:1, C20:2, C22:0, C22:1n9, C22:2, C24:0 และ C24:1 ต่ำกว่าอาร์ทีเมียกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงด้วยยีสต์ปกติความหนาแน่นเท่ากัน ในขณะที่ปริมาณ

กรดไขมันเหล่านี้ในอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยยีสต์รีคอมบิแนนท์และยีสต์ปกติที่ระดับความหนาแน่นของยีสต์ที่ระดับอื่นไม่แตกต่างกันมากนัก

เมื่อทำการเปรียบเทียบสัดส่วนของกรดไขมันระหว่าง C18:2n6 และ C18:3n6 ซึ่งเป็นสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ตามลำดับของเอนไซม์  $\Delta^6$  desaturase (ภาพที่ 3.4) พบว่าสัดส่วนของ C18:3n6 ต่อ C18:2n6 ในอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยรีคอมบิแนนท์ยีสต์มีแนวโน้มจะสูงกว่า สัดส่วนของ C18:3n6 ต่อ C18:2n6 ในอาร์ทีเมียในกลุ่มควบคุม และพบว่าในอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่ระดับ  $5 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง มีค่าสัดส่วนของ C18:3n6 ต่อ C18:2n6 สูงกว่าอาร์ทีเมียในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อทำการเปรียบเทียบสัดส่วนของกรดไขมันระหว่าง C18:3n3 และ C18:4n3 ซึ่งเป็นสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ตามลำดับของเอนไซม์  $\Delta^6$  desaturase (ภาพที่ 3.5) พบว่าสัดส่วนของ C18:4n3 ต่อ C18:3n3 ในอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยรีคอมบิแนนท์ยีสต์มีแนวโน้มจะสูงกว่า สัดส่วนของ C18:4n3 ต่อ C18:3n3 ในอาร์ทีเมียในกลุ่มควบคุม และพบว่าในอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่ระดับ  $5 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 12, 18 และ 24 ชั่วโมง มีค่าสัดส่วนของ C18:4n3 ต่อ C18:3n3 สูงกว่าอาร์ทีเมียในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ตารางที่ 3.2 ผลของการเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยยีสต์หรือคอมบีเนนที่ยีสต์ต่อองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง  
(ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

| กรดไขมัน<br>(มิลลิกรัมต่อกรัมไขมัน) | อาร์ทีเมีย + ยีสต์            |                                |                               | อาร์ทีเมีย + รีดคอมบีเนนที่ยีสต์ |                               |                               |
|-------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|                                     | $5 \times 10^3$               | $5 \times 10^4$                | $5 \times 10^5$               | $5 \times 10^3$                  | $5 \times 10^4$               | $5 \times 10^5$               |
| C18:1n9                             | 33.48 $\pm$ 1.60 <sup>a</sup> | 47.08 $\pm$ 2.06 <sup>c</sup>  | 40.27 $\pm$ 4.73 <sup>b</sup> | 51.95 $\pm$ 4.23 <sup>cd</sup>   | 78.96 $\pm$ 4.02 <sup>d</sup> | 54.14 $\pm$ 3.97 <sup>c</sup> |
| C18:2n6                             | 10.11 $\pm$ 1.92 <sup>a</sup> | 13.28 $\pm$ 1.83 <sup>ab</sup> | 10.97 $\pm$ 1.04 <sup>a</sup> | 16.58 $\pm$ 3.15 <sup>b</sup>    | 21.39 $\pm$ 2.94 <sup>c</sup> | 15.37 $\pm$ 1.46 <sup>b</sup> |
| C18:3n6                             | 0.58 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>  | 0.88 $\pm$ 0.09 <sup>bc</sup>  | 0.67 $\pm$ 0.10 <sup>ab</sup> | 0.97 $\pm$ 0.09 <sup>c</sup>     | 1.59 $\pm$ 0.17 <sup>d</sup>  | 1.94 $\pm$ 0.29 <sup>c</sup>  |
| C20:3n6                             | 2.45 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>  | 3.90 $\pm$ 0.56 <sup>c</sup>   | 3.60 $\pm$ 0.99 <sup>c</sup>  | 3.17 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>     | 4.29 $\pm$ 0.17 <sup>d</sup>  | 4.37 $\pm$ 0.50 <sup>d</sup>  |
| C20:4n6                             | 1.53 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>  | 2.54 $\pm$ 0.36 <sup>b</sup>   | 1.79 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>  | 2.43 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>     | 3.26 $\pm$ 0.13 <sup>c</sup>  | 3.77 $\pm$ 0.45 <sup>d</sup>  |
| C18:3n3                             | 36.82 $\pm$ 7.31 <sup>a</sup> | 49.36 $\pm$ 4.60 <sup>ab</sup> | 38.44 $\pm$ 3.03 <sup>a</sup> | 62.92 $\pm$ 12.50 <sup>b</sup>   | 84.22 $\pm$ 7.85 <sup>c</sup> | 59.31 $\pm$ 4.67 <sup>b</sup> |
| C18:4n3                             | 5.20 $\pm$ 0.96 <sup>a</sup>  | 7.68 $\pm$ 1.42 <sup>ab</sup>  | 5.20 $\pm$ 0.96 <sup>a</sup>  | 9.10 $\pm$ 1.68 <sup>b</sup>     | 13.39 $\pm$ 2.47 <sup>c</sup> | 9.84 $\pm$ 1.82 <sup>b</sup>  |
| C20:3n3                             | 0.28 $\pm$ 0.01               | 0.40 $\pm$ 0.06                | nd                            | 0.32 $\pm$ 0.02                  | 1.23 $\pm$ 0.05               | 0.98 $\pm$ 0.12               |
| C20:5n3                             | 3.48 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>  | 5.63 $\pm$ 0.81 <sup>b</sup>   | 5.83 $\pm$ 1.00 <sup>b</sup>  | 5.29 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>     | 7.16 $\pm$ 0.29 <sup>c</sup>  | 5.67 $\pm$ 0.67 <sup>b</sup>  |
| C22:6n3                             | nd                            | nd                             | nd                            | 0.10 $\pm$ 0.00                  | 0.20 $\pm$ 0.01               | 0.34 $\pm$ 0.04               |

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ภายในแถวเดียวกัน



ตารางที่ 3.2 (ต่อ)

| กรดไขมัน<br>(มิลลิกรัมต่อกรัมไขมัน) | อาร์ทีเมีย + ยีสต์       |                          |                           | อาร์ทีเมีย + ริกอมบีเมนทีสต์ |                          |                          |
|-------------------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                                     | 5 x 10 <sup>3</sup>      | 5 x 10 <sup>4</sup>      | 5 x 10 <sup>5</sup>       | 5 x 10 <sup>3</sup>          | 5 x 10 <sup>4</sup>      | 5 x 10 <sup>5</sup>      |
| C20:0                               | 0.45 ± 0.08 <sup>a</sup> | 0.59 ± 0.11 <sup>a</sup> | 0.66 ± 0.12 <sup>a</sup>  | 0.47 ± 0.09 <sup>a</sup>     | 1.34 ± 0.25 <sup>c</sup> | 0.98 ± 0.18 <sup>b</sup> |
| C20:1                               | 1.26 ± 0.06 <sup>a</sup> | 1.82 ± 0.26 <sup>b</sup> | 1.61 ± 0.28 <sup>ab</sup> | 2.23 ± 0.11 <sup>c</sup>     | 3.88 ± 0.16 <sup>d</sup> | 2.27 ± 0.27 <sup>c</sup> |
| C20:2                               | 0.68 ± 0.03 <sup>a</sup> | 0.99 ± 0.14 <sup>b</sup> | 0.68 ± 0.12 <sup>a</sup>  | 0.81 ± 0.04 <sup>ab</sup>    | 2.19 ± 0.09 <sup>c</sup> | 1.60 ± 0.19 <sup>d</sup> |
| C22:0                               | 0.33 ± 0.02              | 0.66 ± 0.09              | nd                        | 0.51 ± 0.02                  | 0.59 ± 0.02              | 1.33 ± 0.16              |
| C22:1n9                             | 0.37 ± 0.02              | 0.13 ± 0.02              | nd                        | 0.16 ± 0.01                  | 0.24 ± 0.01              | 1.59 ± 0.19              |
| C22:2                               | 0.41 ± 0.02 <sup>d</sup> | 0.02 ± 0.00 <sup>a</sup> | 0.31 ± 0.05 <sup>c</sup>  | 0.20 ± 0.01 <sup>b</sup>     | 0.08 ± 0.00 <sup>a</sup> | 0.64 ± 0.08 <sup>c</sup> |
| C24:0                               | nd                       | 0.10 ± 0.01              | nd                        | 0.05 ± 0.00                  | 0.20 ± 0.01              | 0.65 ± 0.08              |
| C24:1                               | nd                       | nd                       | nd                        | 0.17 ± 0.01                  | 0.12 ± 0.01              | 0.62 ± 0.07              |
| % lipid                             | 10.54 ± 1.25             | 10.01 ± 1.85             | 10.97 ± 1.49              | 9.86 ± 1.84                  | 10.46 ± 1.90             | 9.23 ± 1.76              |

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ภายในแถวเดียวกัน

ตารางที่ 3.3 ผลของการเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยยีสต์หรือคอมบีไบโอสต์ต่อองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย ที่ระยะเวลา 18 ชั่วโมง  
(ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

| กรดไขมัน | อาร์ทีเมีย + ยีสต์            |                                |                                | อาร์ทีเมีย + ไรคอมบีไบโอสต์   |                                |                               |
|----------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
|          | $5 \times 10^3$               | $5 \times 10^4$                | $5 \times 10^5$                | $5 \times 10^3$               | $5 \times 10^4$                | $5 \times 10^5$               |
| C18:1n9  | 38.24 $\pm$ 2.21 <sup>b</sup> | 47.61 $\pm$ 5.59 <sup>c</sup>  | 42.69 $\pm$ 2.47 <sup>bc</sup> | 20.97 $\pm$ 1.54 <sup>a</sup> | 100.49 $\pm$ 5.12 <sup>c</sup> | 60.05 $\pm$ 5.38 <sup>d</sup> |
| C18:2n6  | 9.90 $\pm$ 0.94 <sup>b</sup>  | 13.11 $\pm$ 1.39 <sup>bc</sup> | 11.10 $\pm$ 1.68 <sup>b</sup>  | 5.40 $\pm$ 0.51 <sup>a</sup>  | 30.00 $\pm$ 3.18 <sup>d</sup>  | 16.11 $\pm$ 2.44 <sup>c</sup> |
| C18:3n6  | 0.91 $\pm$ 0.14 <sup>bc</sup> | 0.73 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>   | 0.67 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>   | 0.33 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>  | 2.01 $\pm$ 0.30 <sup>d</sup>   | 1.07 $\pm$ 0.15 <sup>c</sup>  |
| C20:3n6  | 3.76 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>  | 4.12 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>   | 3.46 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup>   | 3.19 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>  | 6.71 $\pm$ 0.55 <sup>b</sup>   | 3.78 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>  |
| C20:4n6  | 0.89 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>  | 2.15 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>   | 1.91 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>   | 0.94 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>  | 4.73 $\pm$ 0.39 <sup>d</sup>   | 3.58 $\pm$ 0.42 <sup>c</sup>  |
| C18:3n3  | 36.43 $\pm$ 2.87 <sup>b</sup> | 46.58 $\pm$ 2.86 <sup>c</sup>  | 46.39 $\pm$ 4.85 <sup>c</sup>  | 22.12 $\pm$ 1.74 <sup>a</sup> | 107.28 $\pm$ 6.59 <sup>e</sup> | 72.65 $\pm$ 7.60 <sup>d</sup> |
| C18:4n3  | 5.21 $\pm$ 0.96 <sup>a</sup>  | 6.76 $\pm$ 1.25 <sup>ab</sup>  | 6.51 $\pm$ 1.20 <sup>ab</sup>  | 3.16 $\pm$ 0.58 <sup>a</sup>  | 21.89 $\pm$ 4.05 <sup>c</sup>  | 10.00 $\pm$ 1.85 <sup>b</sup> |
| C20:3n3  | nd                            | 0.37 $\pm$ 0.02                | 0.36 $\pm$ 0.04                | 0.14 $\pm$ 0.01               | 0.79 $\pm$ 0.06                | 0.47 $\pm$ 0.06               |
| C20:5n3  | 2.54 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>  | 5.54 $\pm$ 0.22 <sup>bc</sup>  | 4.66 $\pm$ 0.52 <sup>b</sup>   | 2.30 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>  | 9.64 $\pm$ 0.79 <sup>d</sup>   | 5.89 $\pm$ 0.70 <sup>c</sup>  |
| C22:6n3  | nd                            | nd                             | nd                             | 0.01 $\pm$ 0.00               | 0.59 $\pm$ 0.05                | 0.36 $\pm$ 0.04               |

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ภายในแถวเดียวกัน

ตารางที่ 3.3 (ต่อ)

| กรดไขมัน<br>(กรดไขมันต่อกรัมไขมัน) | อาร์ทีเมีย + ยีสต์        |                          | อาร์ทีเมีย + ไรคอมบีแนนท์ยีสต์ |                          |
|------------------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------------|--------------------------|
|                                    | 5 x 10 <sup>3</sup>       | 5 x 10 <sup>4</sup>      | 5 x 10 <sup>5</sup>            | 5 x 10 <sup>5</sup>      |
| C20:0                              | 0.44 ± 0.08               | 1.50 ± 0.28              | 0.86 ± 0.16                    | 2.20 ± 0.41              |
| C20:1                              | 1.18 ± 0.06 <sup>ab</sup> | 1.68 ± 0.07 <sup>c</sup> | 1.46 ± 0.16 <sup>bc</sup>      | 4.80 ± 0.39 <sup>c</sup> |
| C20:2                              | nd                        | 0.93 ± 0.04              | 0.86 ± 0.10                    | 2.80 ± 0.09              |
| C22:0                              | nd                        | 1.01 ± 0.04              | 0.66 ± 0.07                    | 1.56 ± 0.13              |
| C22:1n9                            | nd                        | nd                       | nd                             | 0.31 ± 0.03              |
| C22:2                              | nd                        | nd                       | nd                             | 0.45 ± 0.04              |
| C24:0                              | nd                        | nd                       | 0.05 ± 0.01                    | 0.21 ± 0.02              |
| C24:1                              | nd                        | nd                       | nd                             | 0.88 ± 0.07              |
| % lipid                            | 9.83 ± 1.18               | 9.33 ± 1.75              | 10.24 ± 1.40                   | 9.75 ± 1.80              |

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ภายในแถวเดียวกัน

ตารางที่ 3.4 ผลของการเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยยีสต์หรือรีคอมบีแนนท์ยีสต์ต่อองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

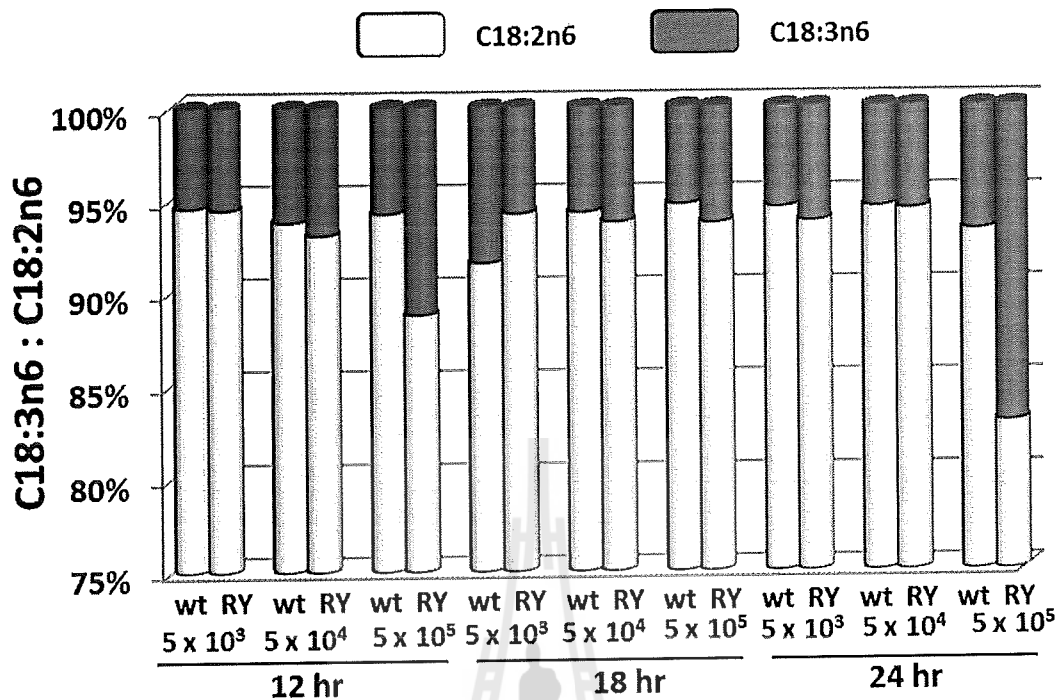
| กรดไขมัน<br>(ผลิตภัณฑ์กรดไขมัน) | อาร์ทีเมีย + ยีสต์             |                                | อาร์ทีเมีย + รีคอมบีแนนท์ยีสต์ |                               |
|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
|                                 | $5 \times 10^3$                | $5 \times 10^4$                | $5 \times 10^5$                | $5 \times 10^6$               |
| C18:1n9                         | 29.10 $\pm$ 1.68 <sup>b</sup>  | 41.04 $\pm$ 1.96 <sup>c</sup>  | 47.91 $\pm$ 2.09 <sup>d</sup>  | 20.99 $\pm$ 1.88 <sup>a</sup> |
| C18:2n6                         | 7.13 $\pm$ 1.08 <sup>a</sup>   | 11.31 $\pm$ 1.68 <sup>b</sup>  | 12.67 $\pm$ 1.74 <sup>b</sup>  | 5.45 $\pm$ 0.82 <sup>a</sup>  |
| C18:3n6                         | 0.41 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>   | 0.65 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>   | 0.91 $\pm$ 0.10 <sup>c</sup>   | 0.36 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>  |
| C20:3n6                         | 3.32 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>   | 4.46 $\pm$ 0.36 <sup>c</sup>   | 5.06 $\pm$ 0.24 <sup>d</sup>   | 3.16 $\pm$ 0.23 <sup>ab</sup> |
| C20:4n6                         | 1.52 $\pm$ 0.15 <sup>ab</sup>  | 2.08 $\pm$ 0.17 <sup>bc</sup>  | 2.27 $\pm$ 0.11 <sup>c</sup>   | 1.24 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>  |
| C18:3n3                         | 28.86 $\pm$ 3.02 <sup>ab</sup> | 37.41 $\pm$ 7.43 <sup>ab</sup> | 41.78 $\pm$ 3.90 <sup>b</sup>  | 23.79 $\pm$ 2.49 <sup>a</sup> |
| C18:4n3                         | 4.19 $\pm$ 0.77 <sup>ab</sup>  | 6.07 $\pm$ 1.12 <sup>bc</sup>  | 7.53 $\pm$ 1.39 <sup>c</sup>   | 3.18 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup>  |
| C20:3n3                         | 0.30 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>   | 0.42 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>   | 0.46 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>   | 0.15 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>  |
| C20:5n3                         | 4.30 $\pm$ 0.41 <sup>b</sup>   | 5.89 $\pm$ 0.48 <sup>c</sup>   | 6.71 $\pm$ 0.32 <sup>d</sup>   | 2.33 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>  |
| C22:6n3                         | nd                             | nd                             | nd                             | nd                            |
| อาร์ทีเมีย + รีคอมบีแนนท์ยีสต์  | 5 x 10 <sup>3</sup>            | 5 x 10 <sup>4</sup>            | 5 x 10 <sup>5</sup>            | 5 x 10 <sup>6</sup>           |
|                                 | 29.10 $\pm$ 1.68 <sup>b</sup>  | 41.04 $\pm$ 1.96 <sup>c</sup>  | 47.91 $\pm$ 2.09 <sup>d</sup>  | 20.99 $\pm$ 1.88 <sup>a</sup> |
|                                 | 7.13 $\pm$ 1.08 <sup>a</sup>   | 11.31 $\pm$ 1.68 <sup>b</sup>  | 12.67 $\pm$ 1.74 <sup>b</sup>  | 5.45 $\pm$ 0.82 <sup>a</sup>  |
|                                 | 0.41 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>   | 0.65 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>   | 0.91 $\pm$ 0.10 <sup>c</sup>   | 0.36 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>  |
|                                 | 3.32 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>   | 4.46 $\pm$ 0.36 <sup>c</sup>   | 5.06 $\pm$ 0.24 <sup>d</sup>   | 3.16 $\pm$ 0.23 <sup>ab</sup> |
|                                 | 1.52 $\pm$ 0.15 <sup>ab</sup>  | 2.08 $\pm$ 0.17 <sup>bc</sup>  | 2.27 $\pm$ 0.11 <sup>c</sup>   | 1.24 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>  |
|                                 | 28.86 $\pm$ 3.02 <sup>ab</sup> | 37.41 $\pm$ 7.43 <sup>ab</sup> | 41.78 $\pm$ 3.90 <sup>b</sup>  | 23.79 $\pm$ 2.49 <sup>a</sup> |
|                                 | 4.19 $\pm$ 0.77 <sup>ab</sup>  | 6.07 $\pm$ 1.12 <sup>bc</sup>  | 7.53 $\pm$ 1.39 <sup>c</sup>   | 3.18 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup>  |
|                                 | 0.30 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>   | 0.42 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>   | 0.46 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>   | 0.15 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>  |
|                                 | 4.30 $\pm$ 0.41 <sup>b</sup>   | 5.89 $\pm$ 0.48 <sup>c</sup>   | 6.71 $\pm$ 0.32 <sup>d</sup>   | 2.33 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>  |
|                                 | nd                             | nd                             | nd                             | nd                            |
|                                 | 49.87 $\pm$ 4.06 <sup>d</sup>  | 13.78 $\pm$ 2.04 <sup>b</sup>  | 0.81 $\pm$ 0.08 <sup>bc</sup>  | 3.11 $\pm$ 0.37 <sup>ab</sup> |
|                                 | 11.15 $\pm$ 1.53 <sup>b</sup>  | 2.29 $\pm$ 0.24 <sup>d</sup>   | 2.65 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>   | 4.24 $\pm$ 0.47 <sup>d</sup>  |
|                                 | 39.36 $\pm$ 3.52 <sup>c</sup>  | 82.34 $\pm$ 16.35 <sup>c</sup> | 14.05 $\pm$ 2.60 <sup>d</sup>  | 0.33 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>  |
|                                 | 8.00 $\pm$ 1.48 <sup>c</sup>   | 6.10 $\pm$ 0.07 <sup>d</sup>   | 0.16 $\pm$ 0.02                | 1.40 $\pm$ 0.16               |

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ภายในแถวเดียวกัน

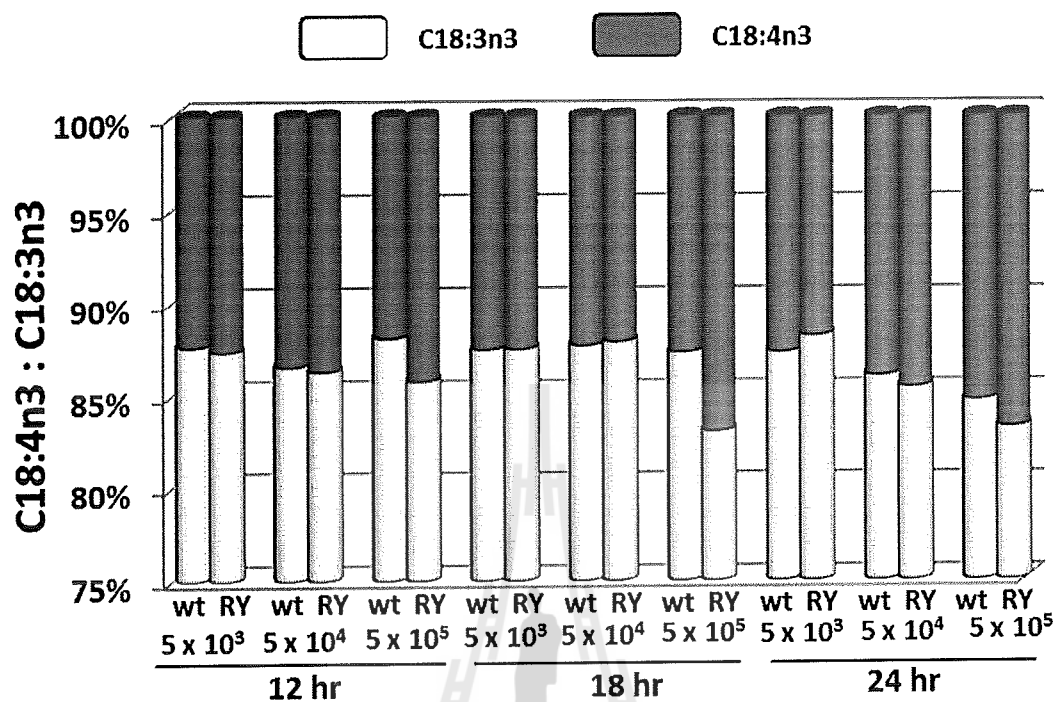
ตารางที่ 3.4 (ต่อ)

| กรดไขมัน<br>(ผลิตภัณฑ์ไขมัน) | อาร์ทีเมีย + ยีสต์         |                           |                          | อาร์ทีเมีย + ไรคอมบีแนนท์ยีสต์ |                           |                           |
|------------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                              | 5 x 10 <sup>3</sup>        | 5 x 10 <sup>4</sup>       | 5 x 10 <sup>5</sup>      | 5 x 10 <sup>3</sup>            | 5 x 10 <sup>4</sup>       | 5 x 10 <sup>5</sup>       |
| C20:0                        | 0.58 ± 0.11 <sup>abc</sup> | 0.81 ± 0.15 <sup>cd</sup> | 1.01 ± 0.19 <sup>d</sup> | 0.44 ± 0.08 <sup>a</sup>       | 0.71 ± 0.13 <sup>bc</sup> | 0.47 ± 0.09 <sup>ab</sup> |
| C20:1                        | 1.18 ± 0.11 <sup>b</sup>   | 1.60 ± 0.13 <sup>d</sup>  | 1.79 ± 0.09 <sup>c</sup> | 0.84 ± 0.12 <sup>a</sup>       | 1.70 ± 0.20 <sup>c</sup>  | 1.16 ± 0.13 <sup>b</sup>  |
| C20:2                        | 0.72 ± 0.07 <sup>b</sup>   | 1.03 ± 0.08 <sup>cd</sup> | 1.10 ± 0.05 <sup>d</sup> | 0.41 ± 0.06 <sup>a</sup>       | 0.94 ± 0.11 <sup>c</sup>  | 0.64 ± 0.07 <sup>b</sup>  |
| C22:0                        | 0.58 ± 0.06                | 0.92 ± 0.08               | 0.90 ± 0.04              | 0.28 ± 0.04                    | 1.17 ± 0.14               | 0.26 ± 0.03               |
| C22:1n9                      | nd                         | nd                        | 0.39 ± 0.02              | 0.08 ± 0.01                    | 0.89 ± 0.11               | 1.04 ± 0.12               |
| C22:2                        | nd                         | nd                        | 0.76 ± 0.04              | 1.18 ± 0.17                    | 0.54 ± 0.06               | 0.59 ± 0.07               |
| C24:0                        | 0.04 ± 0.00                | 0.16 ± 0.01               | 0.10 ± 0.00              | 0.09 ± 0.01                    | 0.35 ± 0.04               | nd                        |
| C24:1                        | nd                         | nd                        | 0.71 ± 0.03              | 0.35 ± 0.05                    | 0.46 ± 0.05               | 0.49 ± 0.05               |
| % lipid                      | 7.66 ± 1.01                | 7.24 ± 1.51               | 8.02 ± 1.20              | 7.12 ± 1.49                    | 7.60 ± 1.55               | 6.61 ± 1.43               |

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ภายในแถวเดียวกัน



ภาพที่ 3.4 สัดส่วนของกรดไขมันระหว่าง C18:3n6 ต่อ C18:2n6 ซึ่งเป็นสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ตามลำดับของเอนไซม์ delta 6 desaturase ในอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยยีสต์ปกติ (wt) และอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยรีคอมบิแนนท์ยีสต์ (RY) ที่ระดับความหนาแน่น  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^4$  และ  $5 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 12, 18 และ 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 3.5 สัดส่วนของกรดไขมันระหว่าง C18:4n3 ต่อ C18:3n3 ซึ่งเป็นสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ตามลำดับของเอนไซม์  $\Delta 6$  desaturase ในอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยยีสต์ปกติ (wt) และอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยรีคอมบิแนนท์ยีสต์ (RY) ที่ระดับความหนาแน่น  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^4$  และ  $5 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 12, 18 และ 24 ชั่วโมง

**2.2 ผลของการเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยน้ำมันลินินหรือน้ำมันปลาต่อองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย**  
การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยน้ำมันลินินหรือน้ำมันปลา เพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงกรดไขมันในอาร์ทีเมีย ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ผลแสดงดังตารางที่ 3.5-3.7

ที่ระยะเวลาการเลี้ยงอาร์ทีเมียที่ 12 ชั่วโมง พบว่าอาร์ทีเมียที่ไม่ได้รับน้ำมันอะไรเลยมีกรดไขมัน C18:1n9 สูงกว่าอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยน้ำมันปลาและน้ำมันลินิน แต่เมื่อเวลาผ่านไปเป็น 18 และ 24 ชั่วโมง พบว่าอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยน้ำมันลินินมีกรดไขมัน C18:1n9 สูงขึ้น

อาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยน้ำมันลินินจะมีกรดไขมัน C18:2n6 และ C18:3n3 สูงกว่าอาร์ทีเมียในกลุ่มทดลองอื่น ๆ และจะเห็นได้ว่าอาร์ทีเมียที่ได้รับน้ำมันลินินเป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง จะมีกรดไขมัน C18:2n6 สูงขึ้น และมีปริมาณลดลงที่ระยะเวลาการเลี้ยง 24 ชั่วโมง อาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยน้ำมันลินินมีกรดไขมัน C18:3n3 ในปริมาณสูงกว่าอาร์ทีเมียในกลุ่มอื่นทุกช่วงเวลาที่ทำการวิเคราะห์ในการทดลอง นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยน้ำมันลินินทุกช่วงระยะเวลาการทดลอง มีค่าสัดส่วนของ C18:3n6 ต่อ C18:2n6 และ C18:4n3 ต่อ C18:3n3 ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับอาร์ทีเมียที่ไม่ได้รับน้ำมันอะไรเลย ในขณะที่อาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยน้ำมันปลามีค่าสัดส่วนของ C18:3n6 ต่อ C18:2n6 และ C18:4n3 ต่อ C18:3n3 สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับอาร์ทีเมียที่ไม่ได้รับน้ำมันอะไรเลย (ภาพที่ 3.6-3.7)

อาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยน้ำมันปลามีกรดไขมัน C20:5n3 และ C22:6n3 สูงกว่าอาร์ทีเมียกลุ่มอื่น ๆ ตลอดระยะเวลาทดลอง (ตารางที่ 3.5-3.7)

กรดไขมันอื่น ๆ ได้แก่ C20:3n6, C20:4n6, C20:3n3, C20:0, C20:1, C20:2, C22:0, C22:1n9, C22:2, C24:0 และ C24:1 ไม่แตกต่างกันมากนักระหว่างอาร์ทีเมียในกลุ่มควบคุม อาร์ทีเมียที่ได้รับน้ำมันปลา และอาร์ทีเมียที่ได้รับน้ำมันลินิน ในแต่ละช่วงระยะเวลาการทดลองต่าง ๆ (ตารางที่ 3.5-3.7)



ตารางที่ 3.5 ผลของการเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยน้ำมันลินินหรือน้ำมันปลาต่อองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง (ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

| กรดไขมัน<br>(มิลลิกรัมต่อกรัมไขมัน) | อาร์ทีเมีย                     | อาร์ทีเมีย +<br>น้ำมันปลา     | อาร์ทีเมีย +<br>น้ำมันลินิน    |
|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| C18:1n9                             | 81.23 $\pm$ 1.20 <sup>c</sup>  | 46.86 $\pm$ 2.32 <sup>a</sup> | 58.20 $\pm$ 2.31 <sup>b</sup>  |
| C18:2n6                             | 21.70 $\pm$ 2.37 <sup>b</sup>  | 10.70 $\pm$ 1.17 <sup>a</sup> | 36.96 $\pm$ 4.04 <sup>c</sup>  |
| C18:3n6                             | 1.31 $\pm$ 0.12 <sup>c</sup>   | 0.83 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>  | 0.60 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>   |
| C20:3n6                             | 4.88 $\pm$ 0.55 <sup>b</sup>   | 5.63 $\pm$ 0.54 <sup>b</sup>  | 1.49 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>   |
| C20:4n6                             | 3.27 $\pm$ 0.37 <sup>b</sup>   | 1.91 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>  | 2.31 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>   |
| C18:3n3                             | 87.77 $\pm$ 17.43 <sup>b</sup> | 34.40 $\pm$ 3.20 <sup>a</sup> | 115.70 $\pm$ 9.11 <sup>b</sup> |
| C18:4n3                             | 11.77 $\pm$ 2.17 <sup>c</sup>  | 7.68 $\pm$ 1.42 <sup>b</sup>  | 4.37 $\pm$ 0.81 <sup>a</sup>   |
| C20:3n3                             | 0.47 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>   | 0.75 $\pm$ 0.07 <sup>c</sup>  | 0.17 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>   |
| C20:5n3                             | 7.26 $\pm$ 0.82 <sup>b</sup>   | 96.62 $\pm$ 9.29 <sup>c</sup> | 0.84 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>   |
| C22:6n3                             | 0.08 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>   | 30.11 $\pm$ 2.90 <sup>c</sup> | 0.05 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>   |
| C20:0                               | 1.18 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>   | 0.69 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>  | 0.50 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>   |
| C20:1                               | 2.51 $\pm$ 0.28 <sup>b</sup>   | 3.28 $\pm$ 0.32 <sup>c</sup>  | 1.30 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>   |
| C20:2                               | 1.19 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>   | 1.25 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>  | 0.78 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>   |
| C22:0                               | 0.91 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>   | 0.50 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>  | 2.45 $\pm$ 0.20 <sup>c</sup>   |
| C22:1n9                             | 0.21 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>   | 0.50 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>  | 0.34 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>   |
| C22:2                               | 0.03 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>   | 0.02 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>  | 0.08 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>   |
| C24:0                               | 0.17 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>   | 0.41 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>  | 0.15 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>   |
| C24:1                               | 0.10 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>   | 0.43 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>  | 0.04 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>   |
| % lipid                             | 8.80 $\pm$ 1.34                | 9.61 $\pm$ 1.81               | 9.59 $\pm$ 1.32                |

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ภายในแถวเดียวกัน

ตารางที่ 3.6 ผลของการเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยน้ำมันลินินหรือน้ำมันปลาต่อองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย ที่ระยะเวลา 18 ชั่วโมง (ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

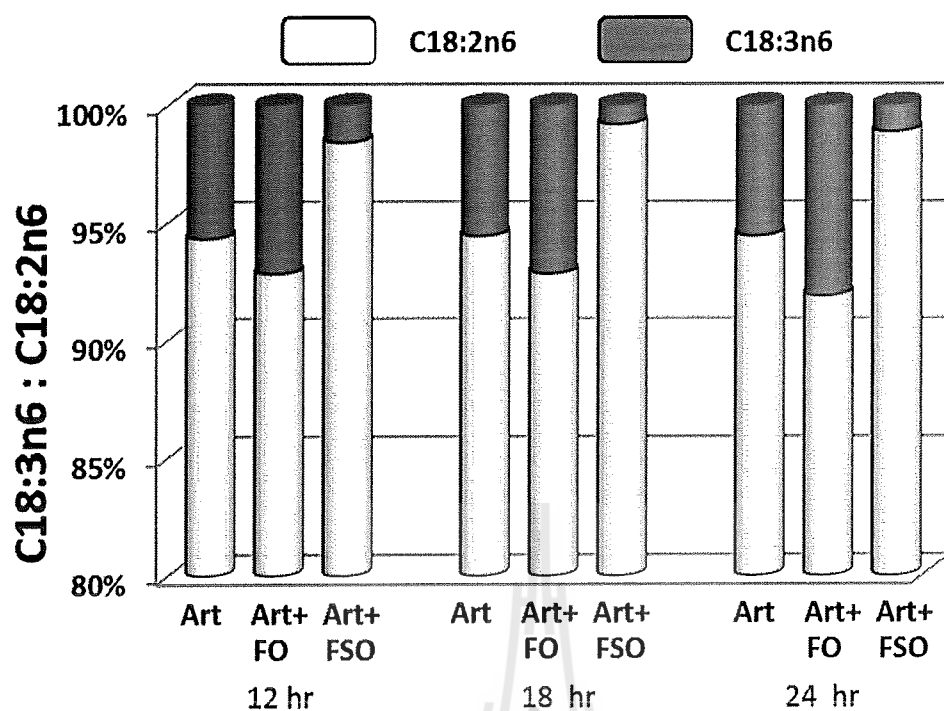
| กรดไขมัน<br>(มิลลิกรัมต่อกรัมไขมัน) | อาร์ทีเมีย                    | อาร์ทีเมีย +<br>น้ำมันปลา       | อาร์ทีเมีย +<br>น้ำมันลินิน     |
|-------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| C18:1n9                             | 75.78 $\pm$ 3.00 <sup>b</sup> | 62.18 $\pm$ 0.92 <sup>a</sup>   | 81.14 $\pm$ 6.67 <sup>b</sup>   |
| C18:2n6                             | 21.15 $\pm$ 2.31 <sup>a</sup> | 13.32 $\pm$ 1.46 <sup>a</sup>   | 75.00 $\pm$ 8.20 <sup>b</sup>   |
| C18:3n6                             | 1.25 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>  | 1.03 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>    | 0.62 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>    |
| C20:3n6                             | 5.33 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>  | 7.50 $\pm$ 1.07 <sup>c</sup>    | 1.08 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>    |
| C20:4n6                             | 3.62 $\pm$ 0.17 <sup>c</sup>  | 2.33 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>    | 1.83 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>    |
| C18:3n3                             | 88.21 $\pm$ 6.95 <sup>b</sup> | 47.99 $\pm$ 2.95 <sup>a</sup>   | 136.83 $\pm$ 14.31 <sup>c</sup> |
| C18:4n3                             | 11.88 $\pm$ 2.19 <sup>b</sup> | 10.42 $\pm$ 1.93 <sup>b</sup>   | 3.88 $\pm$ 0.72 <sup>a</sup>    |
| C20:3n3                             | 0.50 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>  | 1.07 $\pm$ 0.15 <sup>c</sup>    | 0.15 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>    |
| C20:5n3                             | 8.02 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup>  | 100.03 $\pm$ 14.32 <sup>b</sup> | 1.90 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>    |
| C22:6n3                             | 0.04 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>  | 46.76 $\pm$ 6.70 <sup>b</sup>   | 0.06 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>    |
| C20:0                               | 0.82 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>  | 1.24 $\pm$ 0.23 <sup>b</sup>    | 0.74 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>    |
| C20:1                               | 2.59 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>  | 5.05 $\pm$ 0.72 <sup>c</sup>    | 1.32 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>    |
| C20:2                               | 1.28 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>  | 1.69 $\pm$ 0.24 <sup>c</sup>    | 0.63 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>    |
| C22:0                               | 0.75 $\pm$ 0.04 <sup>ab</sup> | 0.84 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>    | 0.61 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>    |
| C22:1n9                             | 0.18 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>  | 0.84 $\pm$ 0.12 <sup>c</sup>    | 0.39 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>    |
| C22:2                               | 0.08 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>  | 0.05 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>    | 0.19 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>    |
| C24:0                               | 0.17 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>  | 0.12 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>    | 0.34 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>    |
| C24:1                               | 0.07 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>  | 0.82 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>    | 0.02 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>    |
| % lipid                             | 8.19 $\pm$ 1.27               | 8.95 $\pm$ 1.71                 | 8.93 $\pm$ 1.24                 |

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ภายในแถวเดียวกัน

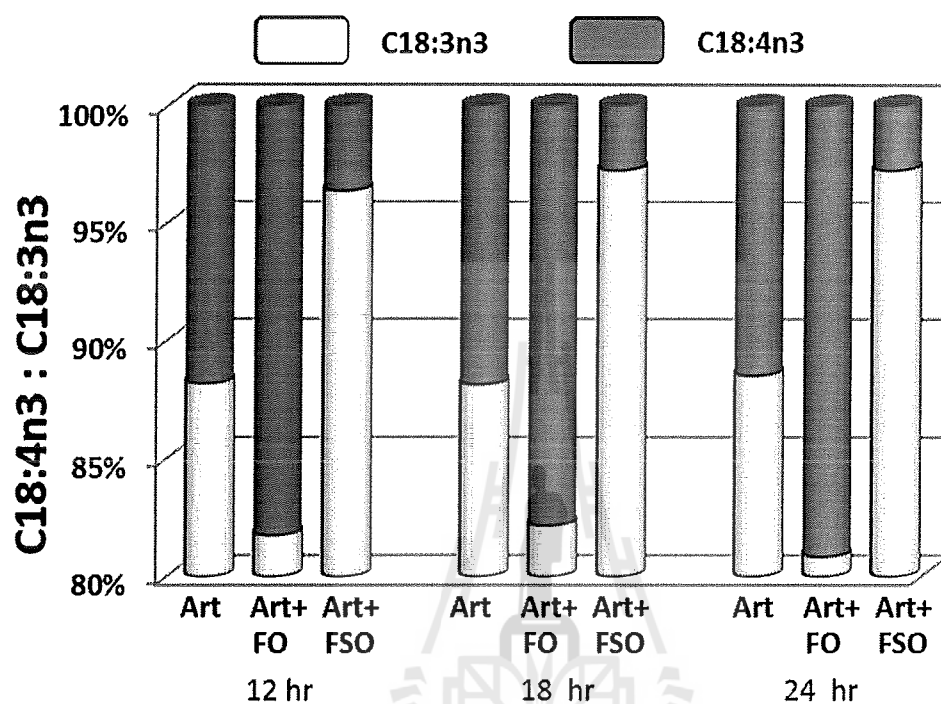
ตารางที่ 3.7 ผลของการเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยน้ำมันลินินหรือน้ำมันปลาต่อองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

| กรดไขมัน<br>(มิลลิกรัมต่อกรัมไขมัน) | อาร์ทีเมีย                    | อาร์ทีเมีย +<br>น้ำมันปลา      | อาร์ทีเมีย +<br>น้ำมันลินิน     |
|-------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| C18:1n9                             | 60.54 $\pm$ 4.98 <sup>b</sup> | 49.40 $\pm$ 0.73 <sup>a</sup>  | 72.58 $\pm$ 3.59 <sup>c</sup>   |
| C18:2n6                             | 15.24 $\pm$ 1.67 <sup>a</sup> | 9.84 $\pm$ 1.08 <sup>a</sup>   | 49.79 $\pm$ 5.44 <sup>b</sup>   |
| C18:3n6                             | 0.90 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>  | 0.87 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>   | 0.57 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>    |
| C20:3n6                             | 5.07 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>  | 7.51 $\pm$ 0.30 <sup>c</sup>   | 1.20 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>    |
| C20:4n6                             | 3.04 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>  | 1.54 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>   | 1.83 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>    |
| C18:3n3                             | 69.55 $\pm$ 7.27 <sup>b</sup> | 41.44 $\pm$ 8.23 <sup>a</sup>  | 136.91 $\pm$ 12.75 <sup>c</sup> |
| C18:4n3                             | 9.02 $\pm$ 1.67 <sup>b</sup>  | 9.82 $\pm$ 1.81 <sup>b</sup>   | 3.86 $\pm$ 0.71 <sup>a</sup>    |
| C20:3n3                             | 0.47 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>  | 1.10 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>   | 0.17 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>    |
| C20:5n3                             | 7.28 $\pm$ 0.35 <sup>b</sup>  | 101.73 $\pm$ 4.11 <sup>c</sup> | 2.02 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>    |
| C22:6n3                             | 0.19 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>  | 59.47 $\pm$ 2.40 <sup>b</sup>  | 0.05 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>    |
| C20:0                               | 0.70 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>  | 1.44 $\pm$ 0.27 <sup>b</sup>   | 0.59 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>    |
| C20:1                               | 2.15 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>  | 4.69 $\pm$ 0.19 <sup>c</sup>   | 1.24 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>    |
| C20:2                               | 1.18 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>  | 1.55 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>   | 0.63 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>    |
| C22:0                               | 0.63 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>  | 1.12 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>   | 0.42 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>    |
| C22:1n9                             | 0.15 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>  | 0.92 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>   | 0.15 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>    |
| C22:2                               | 0.03 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>  | 0.08 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>   | 0.10 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>    |
| C24:0                               | 0.17 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>  | 0.09 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>   | 0.20 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>    |
| C24:1                               | 0.54 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>  | 1.06 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>   | 0.04 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>    |
| % lipid                             | 6.25 $\pm$ 1.09               | 6.91 $\pm$ 1.47                | 6.90 $\pm$ 1.07                 |

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ภายในแถวเดียวกัน



ภาพที่ 3.6 สัดส่วนของกรดไขมันระหว่าง C18:3n6 ต่อ C18:2n6 ซึ่งเป็นสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ตามลำดับของเอนไซม์ delta 6 desaturase ในอาร์ทีเมียกลุ่มควบคุม (ไม่ได้รับน้ำมัน) (Art) อาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยน้ำมันปลา (Art+FO) และอาร์ทีเมียที่เลี้ยงน้ำมันลินิน (Art+F50) ที่ระยะเวลา 12, 18 และ 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 3.7 สัดส่วนของกรดไขมันระหว่าง C18:4n3 ต่อ C18:3n3 ซึ่งเป็นสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ตามลำดับของเอนไซม์ delta 6 desaturase ในอาร์ทีเมียกลุ่มควบคุม (ไม่ได้รับน้ำมัน) (Art) อาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยน้ำมันปลา (Art+FO) และอาร์ทีเมียที่เลี้ยงน้ำมันลินิน (Art+FOS) ที่ระยะเวลา 12, 18 และ 24 ชั่วโมง

### 2.3 ผลของการเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยยีสต์หรือรีคอมบีแนนท์ยีสต์ร่วมกับน้ำมันลินินต่อองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย

การศึกษานี้ได้นำยีสต์หรือรีคอมบีแนนท์ยีสต์ที่ระดับความหนาแน่นต่าง ๆ ได้แก่  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^4$  และ  $5 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร มาเลี้ยงอาร์ทีเมียร่วมกับน้ำมันลินิน เพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงกรดไขมันในอาร์ทีเมีย ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ผลแสดงดังตารางที่ 3.8-3.10

ที่ระยะเวลาการเลี้ยงอาร์ทีเมียที่ 12 และ 18 ชั่วโมง พบว่าอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยรีคอมบีแนนท์ยีสต์ที่ทุกระดับความหนาแน่นร่วมกับน้ำมันลินิน มีกรดไขมัน C18:3n6 และ C18:4n3 สูงกว่ากรดไขมันดังกล่าวในอาร์ทีเมียที่ได้รับยีสต์ปกติ (กลุ่มควบคุม) ร่วมกับน้ำมันลินิน แต่กลับพบว่าที่ระยะเวลาการเลี้ยง 24 ชั่วโมง ระดับกรดไขมัน C18:3n6 และ C18:4n3 ไม่แตกต่างกันมากนักในอาร์ทีเมียที่ได้รับน้ำมันลินินร่วมกับรีคอมบีแนนท์ยีสต์และยีสต์ปกติ

นอกจากนี้พบว่า พบว่าสัดส่วนของ C18:4n3 ต่อ C18:3n3 ในอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยรีคอมบีแนนท์ยีสต์ที่ระดับ  $5 \times 10^4$  และ  $5 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 12 และ 18 ชั่วโมง สูงกว่าสัดส่วนของ C18:4n3 ต่อ C18:3n3 ในอาร์ทีเมียในกลุ่มควบคุม และสัดส่วนของ C18:3n6 ต่อ C18:2n6 ในอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยรีคอมบีแนนท์ยีสต์ที่ระดับ  $5 \times 10^4$  และ  $5 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 12 และ 18 ชั่วโมง มีแนวโน้มไปในทางเดียวกับสัดส่วนของ C18:4n3 ต่อ C18:3n3 ที่กล่าวข้างต้น (ภาพที่ 3.8-3.9)

ที่ระยะเวลา 12 และ 18 ชั่วโมง อาร์ทีเมียที่ได้รับน้ำมันลินินร่วมกับรีคอมบีแนนท์ยีสต์มีกรดไขมัน C20:5n3 สูงกว่าอาร์ทีเมียที่ได้รับยีสต์ปกติร่วมกับน้ำมันลินิน อย่างไรก็ตามกรดไขมัน C20:5n3 มีค่าลดลงที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงอาร์ทีเมีย นอกจากนี้สามารถพบปริมาณกรดไขมัน C22:6n3 ในอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยรีคอมบีแนนท์ยีสต์ร่วมกับน้ำมันลินิน ในขณะที่ไม่สามารถตรวจพบค่ากรดไขมัน C22:6n3 ในอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยยีสต์ปกติร่วมกับน้ำมันลินิน (ตารางที่ 3.8-3.10)

กรดไขมันอื่น ๆ ได้แก่ C20:3n6, C20:4n6, C20:3n3, C20:0, C20:1, C20:2, C22:0, C22:1n9, C22:2, C24:0 และ C24:1 ไม่แตกต่างกันมากนักระหว่างอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยรีคอมบีแนนท์ยีสต์หรือยีสต์ปกติร่วมกับน้ำมันลินิน (ตารางที่ 3.8-3.10)

ตารางที่ 3.8 ผลของการเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยยีสต์หรือรีคอมบีแนนท์ยีสต์ร่วมกับน้ำมันลินินต่อองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง (ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

| กรดไขมัน<br>(มิลลิกรัมต่อกรัมไขมัน) | อาร์ทีเมีย + ยีสต์ + น้ำมันลินิน |                                 |                                  | อาร์ทีเมีย + รีคอมบีแนนท์ยีสต์ + น้ำมันลินิน |                                |                                  |
|-------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|--|--------------------------------|----------------------------------|
|                                     | $5 \times 10^3$                  | $5 \times 10^4$                 | $5 \times 10^5$                  | $5 \times 10^3$                              | $5 \times 10^4$                | $5 \times 10^5$                  |
| C18:1n9                             | 40.77 $\pm$ 1.95 <sup>a</sup>    | 90.27 $\pm$ 3.94 <sup>d</sup>   | 51.35 $\pm$ 6.03 <sup>b</sup>    | 75.56 $\pm$ 3.61 <sup>c</sup>                | 56.98 $\pm$ 2.49 <sup>b</sup>  | 85.29 $\pm$ 10.01 <sup>d</sup>   |
| C18:2n6                             | 29.54 $\pm$ 5.61 <sup>a</sup>    | 58.14 $\pm$ 8.00 <sup>b</sup>   | 31.80 $\pm$ 3.02 <sup>a</sup>    | 49.57 $\pm$ 9.41 <sup>b</sup>                | 33.19 $\pm$ 4.57 <sup>a</sup>  | 58.11 $\pm$ 5.52 <sup>b</sup>    |
| C18:3n6                             | 0.20 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>     | 0.75 $\pm$ 0.08 <sup>e</sup>    | 0.32 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>     | 0.70 $\pm$ 0.07 <sup>de</sup>                | 0.60 $\pm$ 0.06 <sup>cd</sup>  | 0.52 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup>     |
| C20:3n6                             | 0.84 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>     | 1.56 $\pm$ 0.13 <sup>cd</sup>   | 0.81 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>     | 1.76 $\pm$ 0.08 <sup>d</sup>                 | 1.49 $\pm$ 0.21 <sup>c</sup>   | 1.25 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>     |
| C20:4n6                             | 1.46 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>     | 2.76 $\pm$ 0.22 <sup>c</sup>    | 1.49 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>     | 2.58 $\pm$ 0.12 <sup>c</sup>                 | 2.08 $\pm$ 0.30 <sup>b</sup>   | 2.11 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>     |
| C18:3n3                             | 103.29 $\pm$ 10.42 <sup>a</sup>  | 185.66 $\pm$ 33.47 <sup>c</sup> | 132.76 $\pm$ 23.93 <sup>bc</sup> | 135.03 $\pm$ 11.03 <sup>bc</sup>             | 101.58 $\pm$ 8.29 <sup>a</sup> | 163.18 $\pm$ 13.32 <sup>bc</sup> |
| C18:4n3                             | 0.05 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>     | 1.36 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>    | 2.52 $\pm$ 0.47 <sup>c</sup>     | 5.59 $\pm$ 1.03 <sup>c</sup>                 | 4.54 $\pm$ 0.84 <sup>de</sup>  | 3.94 $\pm$ 0.73 <sup>d</sup>     |
| C20:3n3                             | 0.14 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>     | 0.24 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>    | 0.11 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>     | 0.22 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>                 | 0.19 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>   | 0.15 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>     |
| C20:5n3                             | 1.45 $\pm$ 0.14 <sup>d</sup>     | 2.46 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>    | 1.33 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>     | 2.94 $\pm$ 0.14 <sup>c</sup>                 | 2.49 $\pm$ 0.36 <sup>b</sup>   | 2.19 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>     |
| C22:6n3                             | nd                               | nd                              | nd                               | nd   | 0.16 $\pm$ 0.01                | 0.28 $\pm$ 0.03                  |

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ภายในแถวเดียวกัน

ตารางที่ 3.8 (ต่อ)

| กรดไขมัน<br>(มิลลิกรัมต่อกรัมไขมัน) | อาร์ทีเมีย + ยีสต์ + น้ำมันลินิน |                          |                          | อาร์ทีเมีย + ไรคอมบีแนนท์ยีสต์ + น้ำมันลินิน |                           |                           |
|-------------------------------------|----------------------------------|--------------------------|--------------------------|--|---------------------------|---------------------------|
|                                     | 5 x 10 <sup>3</sup>              | 5 x 10 <sup>4</sup>      | 5 x 10 <sup>5</sup>      | 5 x 10 <sup>3</sup>                          | 5 x 10 <sup>4</sup>       | 5 x 10 <sup>5</sup>       |
| C20:0                               | 0.43 ± 0.08 <sup>a</sup>         | 0.98 ± 0.18 <sup>c</sup> | 0.47 ± 0.09 <sup>a</sup> | 0.75 ± 0.14 <sup>b</sup>                     | 0.50 ± 0.09 <sup>a</sup>  | 0.64 ± 0.12 <sup>ab</sup> |
| C20:1                               | 1.04 ± 0.10 <sup>a</sup>         | 2.07 ± 0.17 <sup>d</sup> | 0.96 ± 0.05 <sup>a</sup> | 1.65 ± 0.08 <sup>c</sup>                     | 1.30 ± 0.19 <sup>b</sup>  | 1.48 ± 0.18 <sup>bc</sup> |
| C20:2                               | 0.51 ± 0.05 <sup>a</sup>         | 0.99 ± 0.08 <sup>c</sup> | 0.52 ± 0.02 <sup>a</sup> | 0.81 ± 0.04 <sup>b</sup>                     | 0.70 ± 0.10 <sup>b</sup>  | 0.69 ± 0.08 <sup>b</sup>  |
| C22:0                               | 0.32 ± 0.03 <sup>a</sup>         | 0.76 ± 0.06 <sup>d</sup> | 0.31 ± 0.01 <sup>a</sup> | 0.50 ± 0.02 <sup>bc</sup>                    | 0.44 ± 0.06 <sup>b</sup>  | 0.54 ± 0.06 <sup>c</sup>  |
| C22:1n9                             | 0.09 ± 0.01 <sup>a</sup>         | 0.24 ± 0.02 <sup>c</sup> | 0.13 ± 0.01 <sup>b</sup> | 0.18 ± 0.01 <sup>cd</sup>                    | 0.15 ± 0.02 <sup>bc</sup> | 0.20 ± 0.02 <sup>d</sup>  |
| C22:2                               | 1.21 ± 0.12                      | 0.91 ± 0.07              | nd                       | 0.08 ± 0.00                                  | 0.07 ± 0.01               | 0.14 ± 0.02               |
| C24:0                               | nd                               | 0.35 ± 0.03              | nd                       | 0.18 ± 0.01                                  | 0.13 ± 0.02               | 0.22 ± 0.03               |
| C24:1                               | nd                               | nd                       | nd                       | 0.04 ± 0.00                                  | 0.01 ± 0.00               | 0.01 ± 0.00               |
| % lipid                             | 9.60 ± 1.05                      | 10.89 ± 1.01             | 10.43 ± 1.02             | 10.69 ± 1.16                                 | 10.90 ± 1.54              | 9.54 ± 1.30               |

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ภายในแถวเดียวกัน



ตารางที่ 3.9 ผลของการเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยยีสต์หรือรีคอมบีแนนท์ยีสต์ร่วมกับน้ำมันลินินต่อองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย ที่ระยะเวลา 18 ชั่วโมง (ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

| กรดไขมัน<br>(มิลลิกรัมต่อกรัมไขมัน) | อาร์ทีเมีย + ยีสต์ + น้ำมันลินิน |                                 | อาร์ทีเมีย + รีคอมบีแนนท์ยีสต์ + น้ำมันลินิน |                                 |                                 |                                  |
|-------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|--|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
|                                     | $5 \times 10^3$                  | $5 \times 10^4$                 | $5 \times 10^3$                              | $5 \times 10^4$                 |                                 |                                  |
| C18:1n9                             | 62.27 $\pm$ 3.60 <sup>b</sup>    | 71.51 $\pm$ 8.40 <sup>b</sup>   | 39.49 $\pm$ 2.00 <sup>a</sup>                | 73.26 $\pm$ 4.24 <sup>b</sup>   | 108.51 $\pm$ 12.74 <sup>c</sup> | 74.40 $\pm$ 4.30 <sup>b</sup>    |
| C18:2n6                             | 40.74 $\pm$ 3.87 <sup>b</sup>    | 45.60 $\pm$ 4.84 <sup>b</sup>   | 25.06 $\pm$ 3.79 <sup>a</sup>                | 56.64 $\pm$ 5.38 <sup>c</sup>   | 77.53 $\pm$ 8.22 <sup>d</sup>   | 47.46 $\pm$ 7.18 <sup>bc</sup>   |
| C18:3n6                             | 0.26 $\pm$ 0.04 <sup>ab</sup>    | 0.44 $\pm$ 0.07 <sup>c</sup>    | 0.20 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>                 | 0.39 $\pm$ 0.06 <sup>bc</sup>   | 0.82 $\pm$ 0.12 <sup>c</sup>    | 0.65 $\pm$ 0.09 <sup>d</sup>     |
| C20:3n6                             | 1.10 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>     | 1.33 $\pm$ 0.23 <sup>c</sup>    | 0.57 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>                 | 0.94 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>    | 1.94 $\pm$ 0.08 <sup>d</sup>    | 1.49 $\pm$ 0.10 <sup>c</sup>     |
| C20:4n6                             | 1.82 $\pm$ 0.26 <sup>bc</sup>    | 1.85 $\pm$ 0.32 <sup>c</sup>    | 1.20 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>                 | 1.49 $\pm$ 0.07 <sup>bc</sup>   | 3.02 $\pm$ 0.12 <sup>c</sup>    | 2.19 $\pm$ 0.15 <sup>d</sup>     |
| C18:3n3                             | 115.64 $\pm$ 6.59 <sup>a</sup>   | 117.97 $\pm$ 21.27 <sup>a</sup> | 125.80 $\pm$ 19.28 <sup>a</sup>              | 158.90 $\pm$ 12.97 <sup>b</sup> | 202.89 $\pm$ 16.57 <sup>c</sup> | 144.71 $\pm$ 11.82 <sup>ab</sup> |
| C18:4n3                             | 0.12 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>     | 2.60 $\pm$ 0.48 <sup>bc</sup>   | 1.40 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>                 | 2.82 $\pm$ 0.52 <sup>c</sup>    | 6.09 $\pm$ 1.13 <sup>d</sup>    | 5.46 $\pm$ 1.01 <sup>d</sup>     |
| C20:3n3                             | 0.16 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>     | 0.29 $\pm$ 0.05 <sup>d</sup>    | 0.08 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>                 | 0.13 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>    | 0.24 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>    | 0.21 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>     |
| C20:5n3                             | 1.69 $\pm$ 0.24 <sup>b</sup>     | 1.65 $\pm$ 0.28 <sup>b</sup>    | 0.97 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>                 | 1.62 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup>    | 3.27 $\pm$ 0.13 <sup>d</sup>    | 2.61 $\pm$ 0.17 <sup>c</sup>     |
| C22:6n3                             | nd                               | nd                              | nd   | 0.06 $\pm$ 0.00                 | 0.05 $\pm$ 0.00                 | 0.14 $\pm$ 0.01                  |

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ภายในแถวเดียวกัน

ตารางที่ 3.9 (ต่อ)

| กรดไขมัน<br>(มิลลิกรัมต่อกรัมไขมัน) | อาร์ทีเมีย + ยีสต์ + น้ำมันดิน |                           |                          | อาร์ทีเมีย + ริคอมบีแนนท์ยีสต์ + น้ำมันดิน |                          |                           |
|-------------------------------------|--------------------------------|---------------------------|--------------------------|--|--------------------------|---------------------------|
|                                     | 5 x 10 <sup>3</sup>            | 5 x 10 <sup>4</sup>       | 5 x 10 <sup>5</sup>      | 5 x 10 <sup>3</sup>                        | 5 x 10 <sup>4</sup>      | 5 x 10 <sup>5</sup>       |
| C20:0                               | 0.72 ± 0.13 <sup>bc</sup>      | 0.69 ± 0.13 <sup>bc</sup> | 0.39 ± 0.07 <sup>a</sup> | 0.54 ± 0.10 <sup>ab</sup>                  | 0.79 ± 0.15 <sup>d</sup> | 0.54 ± 0.10 <sup>ab</sup> |
| C20:1                               | 1.42 ± 0.20 <sup>b</sup>       | 1.73 ± 0.30 <sup>c</sup>  | 0.79 ± 0.08 <sup>a</sup> | 1.17 ± 0.06 <sup>b</sup>                   | 1.92 ± 0.08 <sup>c</sup> | 1.38 ± 0.09 <sup>b</sup>  |
| C20:2                               | 0.68 ± 0.10 <sup>bc</sup>      | 0.89 ± 0.15 <sup>c</sup>  | 0.45 ± 0.02 <sup>a</sup> | 0.55 ± 0.03 <sup>ab</sup>                  | 1.00 ± 0.04 <sup>d</sup> | 0.70 ± 0.05 <sup>c</sup>  |
| C22:0                               | 0.57 ± 0.08 <sup>cd</sup>      | 0.48 ± 0.08 <sup>bc</sup> | 0.32 ± 0.02 <sup>a</sup> | 0.55 ± 0.03 <sup>cd</sup>                  | 0.61 ± 0.02 <sup>e</sup> | 0.43 ± 0.03 <sup>b</sup>  |
| C22:1n9                             | 0.16 ± 0.02 <sup>b</sup>       | 0.23 ± 0.04 <sup>cd</sup> | 0.07 ± 0.00 <sup>a</sup> | 0.19 ± 0.01 <sup>d</sup>                   | 0.26 ± 0.01 <sup>d</sup> | 0.22 ± 0.01 <sup>c</sup>  |
| C22:2                               | 0.66 ± 0.09                    | 0.29 ± 0.05               | nd                       | 0.15 ± 0.01                                | 0.14 ± 0.01              | 0.12 ± 0.01               |
| C24:0                               | 0.25 ± 0.04                    | nd                        | nd                       | 0.27 ± 0.01                                | 0.24 ± 0.01              | 0.17 ± 0.01               |
| C24:1                               | nd                             | nd                        | nd                       | 0.03 ± 0.00                                | 0.03 ± 0.00              | 0.04 ± 0.00               |
| % lipid                             | 8.94 ± 0.99                    | 10.16 ± 0.95              | 9.73 ± 0.97              | 9.97 ± 1.10                                | 10.17 ± 1.45             | 8.88 ± 1.23               |

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ภายในแถวเดียวกัน

ตารางที่ 3.10 ผลของการเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยยีสต์หรือร็อบบีแบคทีเรียร่วมกับน้ำมันลินินต่อองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

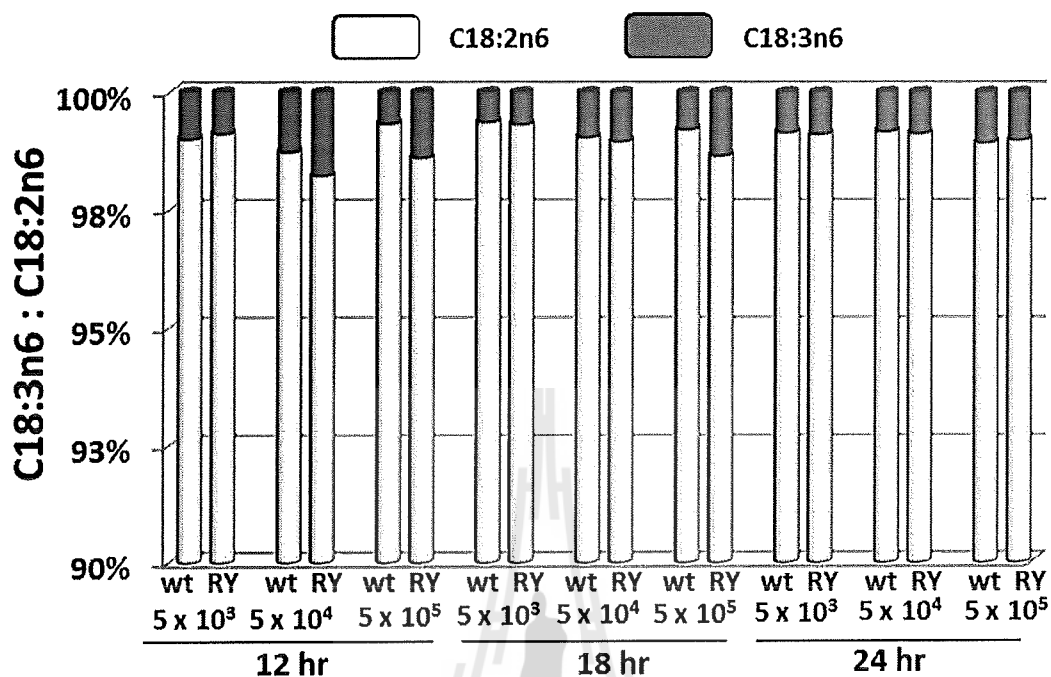
| กรดไขมัน<br>(ผลิตภัณฑ์ไขมัน) | อาร์ทีเมีย + ยีสต์ + น้ำมันลินิน |                                |                                | อาร์ทีเมีย + ร็อบบีแบคทีเรีย + น้ำมันลินิน |                               |                               |
|------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--|-------------------------------|-------------------------------|
|                              | $5 \times 10^3$                  | $5 \times 10^4$                | $5 \times 10^5$                | $5 \times 10^3$                            | $5 \times 10^4$               | $5 \times 10^5$               |
| C18:1n9                      | 65.11 $\pm$ 3.77 <sup>bc</sup>   | 61.88 $\pm$ 2.95 <sup>ab</sup> | 70.41 $\pm$ 3.56 <sup>cd</sup> | 67.75 $\pm$ 3.92 <sup>bcd</sup>            | 58.02 $\pm$ 2.77 <sup>a</sup> | 73.32 $\pm$ 3.20 <sup>d</sup> |
| C18:2n6                      | 45.16 $\pm$ 6.90                 | 43.00 $\pm$ 6.38               | 45.26 $\pm$ 6.23               | 45.67 $\pm$ 6.90                           | 43.11 $\pm$ 6.39              | 50.73 $\pm$ 6.98              |
| C18:3n6                      | 0.39 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>     | 0.36 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>   | 0.49 $\pm$ 0.05 <sup>bc</sup>  | 0.41 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>              | 0.38 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>  | 0.52 $\pm$ 0.05 <sup>d</sup>  |
| C20:3n6                      | 0.79 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>     | 1.05 $\pm$ 0.12 <sup>bc</sup>  | 1.17 $\pm$ 0.11 <sup>c</sup>   | 1.15 $\pm$ 0.11 <sup>c</sup>               | 0.95 $\pm$ 0.08 <sup>ab</sup> | 1.01 $\pm$ 0.11 <sup>bc</sup> |
| C20:4n6                      | 1.44 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>     | 1.58 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>   | 2.22 $\pm$ 0.21 <sup>c</sup>   | 1.04 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>               | 1.70 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>  | 1.70 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>  |
| C18:3n3                      | 141.76 $\pm$ 25.56               | 119.10 $\pm$ 21.47             | 142.15 $\pm$ 15.08             | 131.13 $\pm$ 10.71                         | 114.00 $\pm$ 9.31             | 147.30 $\pm$ 12.03            |
| C18:4n3                      | 1.04 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>     | 2.21 $\pm$ 0.41 <sup>b</sup>   | 2.59 $\pm$ 0.48 <sup>bc</sup>  | 3.05 $\pm$ 0.56 <sup>bc</sup>              | 2.72 $\pm$ 0.50 <sup>bc</sup> | 3.33 $\pm$ 0.62 <sup>d</sup>  |
| C20:3n3                      | 0.11 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>     | 0.21 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>   | 0.17 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>   | 0.14 $\pm$ 0.01 <sup>bc</sup>              | 0.12 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>  | 0.13 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup> |
| C20:5n3                      | 1.16 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>     | 1.38 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>   | 1.77 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>   | 1.97 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>               | 1.68 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>  | 1.74 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>  |
| C22:6n3                      | nd                               | nd                             | nd                             | 0.03 $\pm$ 0.00                            | 0.06 $\pm$ 0.00               | 0.05 $\pm$ 0.01               |

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ภายในแถวเดียวกัน

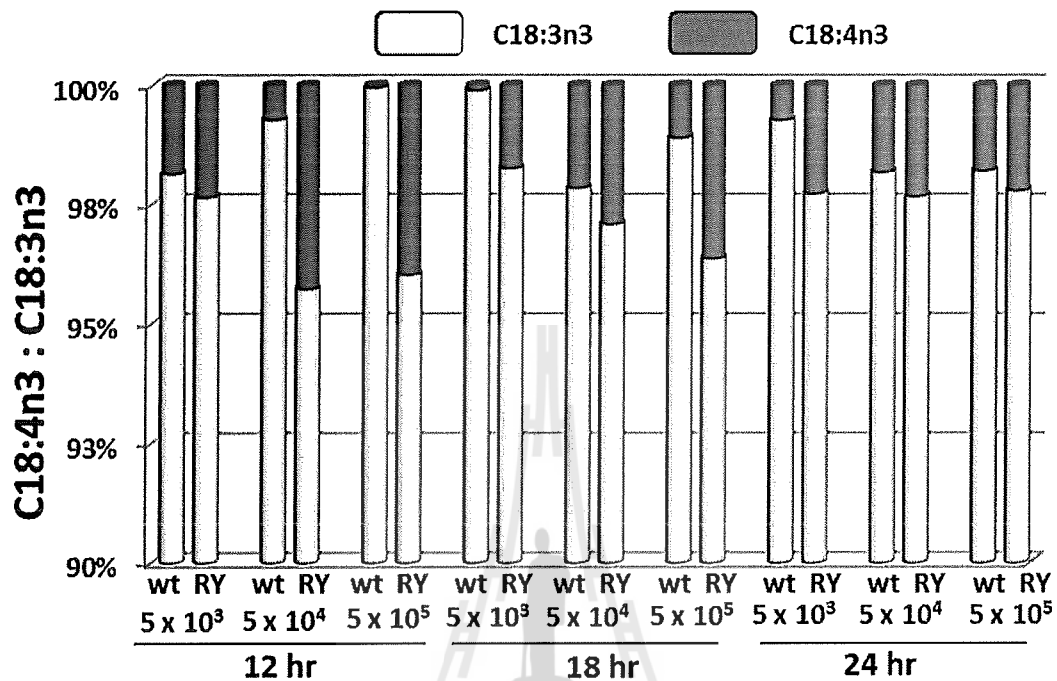
ตารางที่ 3.10 (ต่อ)

| กรดไขมัน<br>( मिलिक्रीम तैयारी ) | อาร์ทีเมีย + ยีสต์ + นามันดินิน |                           |                          | อาร์ทีเมีย + ไรคอมบีเนชันยีสต์ + นามันดินิน |                           |                           |
|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------|--------------------------|---|---------------------------|---------------------------|
|                                  | 5 x 10 <sup>3</sup>             | 5 x 10 <sup>4</sup>       | 5 x 10 <sup>5</sup>      | 5 x 10 <sup>3</sup>                         | 5 x 10 <sup>4</sup>       | 5 x 10 <sup>5</sup>       |
| C20:0                            | 0.68 ± 0.13                     | 0.64 ± 0.12               | 0.73 ± 0.14              | 0.59 ± 0.11                                 | 0.53 ± 0.10               | 0.56 ± 0.10               |
| C20:1                            | 1.20 ± 0.05 <sup>a</sup>        | 1.38 ± 0.16 <sup>a</sup>  | 1.65 ± 0.15 <sup>b</sup> | 1.37 ± 0.13 <sup>a</sup>                    | 1.15 ± 0.09 <sup>a</sup>  | 1.20 ± 0.13 <sup>a</sup>  |
| C20:2                            | 0.56 ± 0.02 <sup>a</sup>        | 0.74 ± 0.08 <sup>bc</sup> | 0.81 ± 0.08 <sup>c</sup> | 0.65 ± 0.06 <sup>ab</sup>                   | 0.60 ± 0.05 <sup>a</sup>  | 0.57 ± 0.06 <sup>a</sup>  |
| C22:0                            | 0.47 ± 0.02 <sup>ab</sup>       | 0.41 ± 0.05 <sup>a</sup>  | 0.62 ± 0.06 <sup>c</sup> | 0.50 ± 0.05 <sup>b</sup>                    | 0.46 ± 0.04 <sup>ab</sup> | 0.44 ± 0.05 <sup>ab</sup> |
| C22:1n9                          | 0.13 ± 0.01 <sup>a</sup>        | 0.14 ± 0.02 <sup>ab</sup> | 0.16 ± 0.02 <sup>c</sup> | 0.17 ± 0.02 <sup>c</sup>                    | 0.15 ± 0.01 <sup>bc</sup> | 0.16 ± 0.02 <sup>bc</sup> |
| C22:2                            | 0.63 ± 0.03 <sup>d</sup>        | 0.23 ± 0.03 <sup>c</sup>  | 0.06 ± 0.01 <sup>a</sup> | 0.13 ± 0.01 <sup>b</sup>                    | 0.10 ± 0.01 <sup>b</sup>  | 0.11 ± 0.01 <sup>b</sup>  |
| C24:0                            | 0.23 ± 0.01 <sup>nd</sup>       | nd                        | 0.32 ± 0.03              | 0.19 ± 0.02                                 | 0.08 ± 0.01               | 0.19 ± 0.02               |
| C24:1                            | nd                              | nd                        | nd                       | 0.02 ± 0.00                                 | 0.14 ± 0.01               | 0.13 ± 0.01               |
| % lipid                          | 6.90 ± 0.85                     | 7.95 ± 0.82               | 7.58 ± 0.83              | 7.78 ± 0.94                                 | 7.96 ± 1.25               | 6.79 ± 1.0                |

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ภายในแถวเดียวกัน



ภาพที่ 3.8 สัดส่วนของกรดไขมันระหว่าง C18:3n6 ต่อ C18:2n6 ซึ่งเป็นสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ตามลำดับของเอนไซม์ delta 6 desaturase ในอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยยีสต์ปกติ (wt) ร่วมกับน้ำมันลินิน และอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยรีคอมบิแนนท์ยีสต์ (RY) ร่วมกับน้ำมันลินิน ที่ระดับความหนาแน่น  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^4$  และ  $5 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 12, 18 และ 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 3.9 สัดส่วนของกรดไขมันระหว่าง C18:4n3 ต่อ C18:3n3 ซึ่งเป็นสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ตามลำดับของเอนไซม์ delta 6 desaturase ในอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยยีสต์ปกติ (wt) ร่วมกับน้ำมันลินิน และอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยรีคอมบิแนนท์ยีสต์ (RY) ร่วมกับน้ำมันลินิน ที่ระดับความหนาแน่น  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^4$  และ  $5 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิเมตร ที่ระยะเวลา 12, 18 และ 24 ชั่วโมง

### 3.2 อภิปรายผลการศึกษา

#### การทดลองที่ 1 การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงในอาร์ทีเมีย

ในการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถโคลนยีน *fads 2* จากอาร์ทีเมียได้ ถึงแม้ว่าจะได้ทำการโคลนยีนโดยใช้ total RNA ทั้งที่สกัดได้จากอาร์ทีเมียที่ฟักออกจากไข่และจากอาร์ทีเมียตัวเต็มวัย และใช้ไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบมาจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *fads 2* และได้ใช้ไพรเมอร์จำนวนหลายคู่ก็ตาม การที่ไม่สามารถโคลนยีน *fads 2* จากอาร์ทีเมีย โดยใช้ 3'RACE (3' Rapid amplification cDNA END) ได้นี้ อาจเป็นได้จาก 2 สาเหตุ คือ 1) อาร์ทีเมียมีระดับ mRNA ของ ยีน *fads 2* ต่ำ 2) อาร์ทีเมียไม่มียีน *fads 2* หรือมียีน *fads 2* แต่ทว่ายีน *fads 2* ไม่สามารถทำงานได้ เนื่องจากการศึกษานี้ทำการโคลนยีน *fads 2* โดยใช้ 3'RACE (3' Rapid amplification cDNA END) ซึ่งเป็นวิธีการที่ไม่สามารถโคลนยีนที่มีการแสดงออกในระดับต่ำ ดังนั้นควรมีการศึกษาการโคลนยีน *fads 2* โดยใช้วิธีการอื่น ๆ ต่อไป และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ในจีโนมของอาร์ทีเมีย จะทำให้ทราบว่าอาร์ทีเมียมียีน *fads 2* หรือไม่ และข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมอาร์ทีเมีย อาจจะทำให้สามารถวิเคราะห์โครงสร้างของยีน *fads 2* อันจะทำให้เข้าใจถึงการแสดงออกของยีน *fads 2* ในอาร์ทีเมียได้

จากการที่ไม่สามารถโคลนยีน *fads 2* จากอาร์ทีเมียได้ ผู้วิจัยจึงได้ปรับการทดลองไปใช้ประโยชน์จากรีคอมบีแนนท์ยีสต์ ที่ได้จากการโคลนยีน *onifads 2* จากปลานิล โดยก่อนที่จะนำเอารีคอมบีแนนท์ยีสต์ที่มียีน *onifads 2* มาใช้ในการเลี้ยงอาร์ทีเมียนั้น ได้ทำการศึกษาโครงสร้างของยีน *onifads 2* 8]

การศึกษานี้ได้ใช้รีคอมบีแนนท์ยีสต์ที่มียีน *onifads 2* (GenBank accession number KF258464) ก่อนหน้าที่จะมีการรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ *onifads 2* นี้ ได้มีการรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *fads 2* ในปลานิล (XN\_003440470 และ AB069727) โดยที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *onifads 2* (KF258464) ไม่เหมือน *fads 2* ในปลานิล (XN\_003440470 และ AB069727) เสียทีเดียว โดย *onifads 2* (KF258464) มีลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับ *fads 2* (XN\_003440470) เท่ากับ 99.1 % และ 99.6 % ตามลำดับ และ *onifads 2* (KF258464) มีลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับ *fads 2* (AB069727) เท่ากับ 98.6 % และ 95.3 % ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ส่งผลถึงความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนด้วย เช่นเดียวกัน ยกตัวอย่างเช่น ในยีน *fads 2* (AB069727) ที่มี C เพิ่มเข้ามาที่ระหว่างตำแหน่ง 1165 และ 1166 และมี G ที่หายไปตำแหน่ง 1214 ทำให้ *fads 2* (AB069727) และ *onifads 2* (KF258464) มีลำดับกรดอะมิโนในบริเวณนิวคลีโอไทด์นี้แตกต่างกัน 14 ตัว การที่ยีน *fads 2* ของปลานิลที่มีการศึกษา

จากนักวิชาการในกลุ่มต่าง ๆ มีความแตกต่างกันแสดงถึง polymorphism ของยีน *fads* ซึ่งควรจะมีการศึกษาต่อว่า การที่ยีน *fads* ของปลานิลมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันนั้นจะส่งผลต่อการทำงานของเอ็นไซม์ delta-6 desaturase อย่างไร

ยีน *onifads 2* มีโครงสร้างของยีนเช่นเดียวกับโครงสร้างยีน *fads 2* ที่ได้มีการศึกษามาก่อน เช่น โปรีติน *onifads 2* มีหมู่กรดอะมิโน HPGG ซึ่งเป็นหมู่อะมิโนอนุรักษ์ของ heme-binding motif ซึ่งอยู่ในบริเวณ cytochrome b5 superfamily domain (Na-Ranong et al., 2006; Sayanova et al., 1999) โดยที่บริเวณ cytochrome b5 เป็นบริเวณที่ทำหน้าที่เป็น heme-binding electron donor ในปฏิกิริยาการเพิ่มพันธะคู่ (Na-Ranong et al., 2006; Qiu et al., 2002; Sayanova et al., 1999) และ OniFads2 มี Y37(Trp<sub>37</sub>), G66(Gly<sub>66</sub>), F73(Phe<sub>73</sub>), และ H77(His<sub>77</sub>) ซึ่งเป็นหมู่อะมิโนที่อนุรักษ์ของ cytochrome b5 (Domergue et al., 2002) ที่บริเวณ fatty acid desaturase domain ของ OniFads2 มีหมู่อะมิโนอนุรักษ์ histidine-rich boxes I, II, และ III เป็น HDXGH, HFXHH, และ QIEHH ตามลำดับ ซึ่งจะคล้ายคลึงกับ Fads2 ในปลาหลายชนิด เช่น ปลาเรนโบว์เทรา (*Oncorhynchus mykiss*) (Seiliez et al., 2001) ปลา gilthead seabream (*Sparus aurata*) (Seiliez et al., 2003) ปลาแอตแลนติกซาลมอน (*Salmo salar* L.) (Monroig et al., 2010; Zheng et al., 2005) ปลาแอตแลนติกซาลมอน (*Gadus morhua*) (Tocher et al., 2006) ปลาช่อนทะเล (*Rachycentron canadum*) (Zheng et al., 2009) ปลา European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) (Gonzalez-Rovira et al., 2009) ปลากระพงขาว (*Lates calcarifer*) (Mohd-Yusof et al., 2010) ปลา black seabream (*Acanthopagrus schlegeli*) (Kim et al., 2011) ปลา Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) (Morais et al., 2011) โดยหมู่ histidine-rich boxes จะอยู่ที่ผนังเซลล์เมมเบรน (membrane-bound desaturases) ซึ่งมีความสำคัญต่อการจับกับธาตุเหล็กในการทำงานของเอ็นไซม์ (Shanklin et al., 1994) ถึงแม้ว่า histidine-rich motifs จะเป็นหมู่อะมิโนอนุรักษ์ แต่ก็ยังพบว่าพันธะคู่ของกรดอะมิโนในหมู่อนุรักษ์นี้ เช่น OniFads2 มีกรดอะมิโน F(Phe) ใน histidine-rich motif (HDFGH) อันแรก ซึ่งจะเหมือนกันในปลาส่วนใหญ่ ยกเว้น ในปลา masu salmon (*Onchorhynchus masou*) ปลา sole (*Solea Senegalensis*) และปลาเรนโบว์เทรา (Seiliez et al., 2001) ที่มี Y แทน นอกจากนี้พบว่า OniFads2 ในการศึกษานี้มี R(Arg) แทนที่ Q(Gln) สำหรับใน histidine-rich motif (QIEHH) อันที่สาม จากผลการศึกษาทั้งหมดนี้ แสดงให้เห็นว่ายีน *oniFads2* มีโครงสร้างของยีน และมีความคล้ายคลึงในลำดับของกรดอะมิโน กับยีน *fads 2* ในปลาอื่น ๆ สูง ดังนั้นยีน *oniFads2* ที่โคลนได้นี้น่าจะทำหน้าที่เช่นเดียวกับยีน *fads2* ในปลาอื่น ๆ

ผลการศึกษานี้พบว่าริคอมบีแนนท์ยีสต์มีการแสดงออกของยีน *oniFads2* เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยน้ำตาลกลูโคส และจะพบว่าองค์ประกอบของกรดไขมันส่วนใหญ่ในริคอมบีแนนท์ยีสต์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสหรืออาหารที่มีกาแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนไม่แตกต่างกัน คือ



C16:0, C16:1, C18:0, และ C18:1 ซึ่งเป็นกรดไขมันที่พบส่วนใหญ่ในรีคอมบีแนนท์ *S. cerevisiae* (Napier et al., 1998; Laoteng et al., 2000; Hsiao et al., 2007; Gonzalez-Rovira et al., 2009; Lu et al., 2009) รีคอมบีแนนท์ยีสต์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีกาแลคโตสมีระดับ C18:4n3 สูงกว่ารีคอมบีแนนท์ยีสต์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า รีคอมบีแนนท์ยีสต์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีกาแลคโตสมีการทำงานของเอ็นไซม์ delta-6 desaturase อย่างไม่รู้ตามปริมาณของ C18:2n6 ที่ไม่แตกต่างกันระหว่าง รีคอมบีแนนท์ยีสต์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีกาแลคโตสหรือกลูโคส ที่เป็นเช่นนี้อาจเกิดจากปริมาณของ C18:2n6 ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในรีคอมบีแนนท์ยีสต์ที่มีน้อย จึงทำให้ไม่เห็นความแตกต่างของการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารผลิตภัณฑ์ C18:3n6 หรืออีกทางหนึ่งคือรีคอมบีแนนท์ยีสต์มีประสิทธิภาพการทำงานของ เอ็นไซม์ในปฏิกิริยา n6 ต่ำ ซึ่งควรมีการศึกษาเพื่อยืนยันผลของการทำงานของรีคอมบีแนนท์เอ็นไซม์เพิ่มเติม เช่นการใส่สารตั้งต้นลงไปในการเลี้ยงรีคอมบีแนนท์ยีสต์เพื่อดูประสิทธิภาพการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นสารผลิตภัณฑ์

**การทดลองที่ 2 การนำเอารีคอมบีแนนท์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่มีพลาสมิดเวกเตอร์ที่มียีน *fads 2* ที่สามารถผลิตเอ็นไซม์ delta-6 desaturase จากปลานิล มาเลี้ยงอาร์ทีเมีย ร่วมกับน้ำมันพืชที่มีกรดไขมันโอเมก้า 3 สูง เพื่อศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย**

โดยทั่วไปแพลงก์ตอนสัตว์ (Zooplankton) ในธรรมชาติหลายชนิดมีองค์ประกอบของกรดไขมันในกลุ่ม HUFA ได้แก่ C20:5n3 และ C22:6n3 สูง เหมาะสมสำหรับเป็นอาหารสัตว์น้ำทะเลวัยอ่อน (first-feeding marine animal) แต่ยังมีปัญหาในเรื่องการจัดหา การเตรียม ซึ่งจะขึ้นกับฤดูกาล ทำให้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทะเลส่วนใหญ่มักจะใช้อาร์ทีเมีย เนื่องจากอาร์ทีเมียจะถูกทำให้อยู่ในรูปของซีสต์ออบแห้ง (cyst) และสามารถนำมาเพาะฟักเพื่ออนุบาลลูกสัตว์น้ำทะเลได้อย่างสะดวก แต่อาร์ทีเมียมักจะมีกรดไขมันในกลุ่ม HUFA ได้แก่ C20:5n3 และ C22:6n3 น้อย จึงต้องมีการเพิ่มองค์ประกอบของกรดไขมัน 2 ชนิดนี้ โดยการนำน้ำมันปลาที่มีกรดไขมัน 2 ชนิดนี้มาเลี้ยงอาร์ทีเมียหรือที่เรียกว่า enriched artemia ซึ่งน้ำมันปลามักมีราคาแพง ดังนั้นการวิจัยและพัฒนาเทคนิคในการเพิ่มองค์ประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในอาร์ทีเมียเพื่อลดการใช้ไขมันปลาจึงสิ่งที่ควรศึกษาเพื่อทำให้การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทะเลมีต้นทุนลดลง ลดการใช้ทรัพยากรประมงที่ต้นทุนสูง และทรัพยากรประมงมีปริมาณลดน้อยลง

เอ็นไซม์ delta-6 deaturase เป็นเอ็นไซม์ตัวหนึ่งทำงานในกระบวนการลดความอิ่มตัวของกรดไขมัน ดังนั้นการใช้ประโยชน์จากเอ็นไซม์ delta-6 deaturase โดยใช้ในรูปแบบของรีคอมบีแนนท์ยีสต์ เพื่อมาเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย หรือเพื่อลดความอิ่มตัว

ของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย จึงจัดเป็นก้าวแรกของการวิจัยและพัฒนาด้านองค์ประกอบของกรดไขมันอาร์ทีเมีย โดยการศึกษาครั้งนี้ในขั้นแรกได้ศึกษาถึงการทำงานของรีคอมบีแนนท์ยีสต์ต่อการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย ต่อจากนั้นจึงเป็นการศึกษาถึงผลของการใช้รีคอมบีแนนท์ยีสต์ร่วมกับน้ำมันลินินซึ่งอุดมไปด้วยกรดไขมันที่เป็นสารตั้งต้นของกระบวนการสร้าง HUFA เพื่อศึกษาถึงการทำงานของเอนไซม์ delta-6 desaturase ของปลาแซลมอน ต่อการเปลี่ยนกรดไขมันในกระบวนการสร้าง HUFA เพื่อพัฒนาองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย และนำไปสู่การพัฒนาอาร์ทีเมียให้เป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนที่มีคุณภาพดียิ่งขึ้นไป

ได้มีรายงานการศึกษาการเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยยีสต์ พบว่าอาร์ทีเมียมีกรดไขมันในกลุ่ม monounsaturated fatty acid (MUFA) และ PUFA สูงขึ้น และมีกรดไขมันอิ่มตัวลดลง (Cho et al., 2001) อย่างไรก็ตาม Chrakraborty และคณะ (2007) รายงานว่าอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยยีสต์มี PUFA ลดลง โดยเริ่มลดตั้งแต่การเลี้ยงที่ชั่วโมงที่ 6 จนถึง 24 ชั่วโมง และมี MUFA ลดลงที่ 24 ชั่วโมง ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยรีคอมบีแนนท์ยีสต์มี C18:1n9 และกรดไขมันในกลุ่ม n6 และ n3 ได้แก่ C18:2n6, C18:3n6, C20:3n6, C20:4n6, C18:3n3, C18:4n3, C20:3n3, C20:5n3 และกรดไขมัน C22:6n3 สูงกว่าอาร์ทีเมียกลุ่มควบคุมเลี้ยงด้วยยีสต์ปกติ และการเปรียบเทียบสัดส่วนของกรดไขมันสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ของเอนไซม์ delta 6 desaturase พบว่าสัดส่วนของ C18:3n6 ต่อ C18:2n6 และ สัดส่วนของ C18:4n3 ต่อ C18:3n3 ในอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยรีคอมบีแนนท์ยีสต์สูงกว่าค่าสัดส่วนดังกล่าวในอาร์ทีเมียในกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่ารีคอมบีแนนท์ยีสต์ที่มีการทำงานของเอนไซม์ delta-6 desaturase สามารถเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบกรดไขมันในอาร์ทีเมียไปในทางที่เพิ่มองค์ประกอบของ PUFA ในอาร์ทีเมียได้ อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงนี้ยังไม่มากพอที่จะทำให้อาร์ทีเมียมีคุณภาพดีพอที่จะเป็นอาหารสัตว์น้ำทะเลวัยอ่อนได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าเอนไซม์ delta-6 desaturase เพียงชนิดเดียวอาจไม่เพียงพอที่จะสร้าง HUFA ให้มากขึ้นได้ เนื่องจากในกระบวนการสร้าง HUFA ยังต้องการเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ อีกมากทั้ง elongase และ delta-5 desaturase ดังนั้นจึงต้องมีการวิจัยและพัฒนาต่อไป เช่นการสร้างรีคอมบีแนนท์ยีสต์ที่มีการทำงานของเอนไซม์ชนิดอื่นในกระบวนการสร้าง HUFA เพิ่มเติม

กรดไขมัน C20:5n3 และ C22:6n3 จัดเป็นกรดไขมันที่จำเป็น โดยเฉพาะ C22:6n3 ซึ่งมักไม่พบในอาร์ทีเมีย หรือพบในระดับน้อยมากในอาร์ทีเมีย (Rees et al., 1994; Southgate and Lou, 1995; Coutteau and Mourente, 1997; Han et al., 2000; Immanuel et al., 2001; 2004; Martin et al., 2006; Heydari and Akbary, 2011) และอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยยีสต์พบว่ามีระดับของ C22:6n3 ลดลงในช่วงระยะเวลาที่เลี้ยงนานขึ้น (Chrakraborty et al., 2007) และไม่พบ C22:6n3 ในอาร์ทีเมียที่เลี้ยงยีสต์ (Cho et al., 2001; Lim et al., 2005) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยยีสต์ปกติไม่มี C22:6n3 ในขณะที่อาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยรีคอมบีแนนท์ยีสต์สามารถตรวจพบ C22:6n3 ได้

โดยเฉพาะอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยรีคอมบีแนนท์ยีสต์ที่ระดับ  $5 \times 10^5$  ดังนั้นควรมีการศึกษาถึงว่าการเพิ่มระดับของรีคอมบีแนนท์ยีสต์หรือการเลี้ยงร่วมกับกรดไขมันที่เป็นสารตั้งต้นของกระบวนการสร้าง PUFA จะสามารถเพิ่ม C22:6n3 ให้มากขึ้นกว่าเดิมได้หรือไม่

ผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาที่ได้มีการรายงานว่าการเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยน้ำมันปลาที่มีปริมาณ C20:5n3 และ C22:6n3 สูงขึ้นกว่า (Rees et al., 1994; Southgate and Lou, 1995; Coutteau and Mourente, 1997; Han et al., 2000; 2004; Martin et al., 2006; Heydari and Akbary, 2011) แต่ทว่าอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยน้ำมันลินินไม่ผลต่อการเพิ่มขึ้นของ C20:5n3 และ C22:6n3 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาว่าอาร์ทีเมียไม่สามารถสร้างกรดไขมัน C22:6n3 ได้ (Estevez et al., 1998)

การศึกษานี้พบว่าอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยน้ำมันลินินจะมีกรดไขมัน C18:2n6 และ C18:3n3 สูงขึ้นซึ่งส่งผลให้อาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยน้ำมันลินิน มีค่าสัดส่วนของ C18:3n6 ต่อ C18:2n6 และ C18:4n3 ต่อ C18:3n3 ลดลง และรีคอมบีแนนท์ยีสต์ที่ระดับ  $5 \times 10^4$  และ  $5 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีผลทำให้ สัดส่วนของ C18:4n3 ต่อ C18:3n3 และสัดส่วนของ C18:3n6 ต่อ C18:2n6 เพิ่มขึ้นได้ แต่กรดไขมันผลิตภัณฑ์ C18:4n3 และ C18:3n6 ยังมีค่าต่ำกว่าระดับของกรดไขมันทั้ง 2 ในอาร์ทีเมียที่ได้รับรีคอมบีแนนท์ยีสต์เพียงอย่างเดียว ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นไปได้ว่า ปริมาณกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันลินินชนิดใดชนิดหนึ่งอาจมีผลต่อการขัดขวางการทำงานของ เอ็นไซม์ delta-6 desaturase ได้มีการรายงานว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (C22:6n3) มีผลต่อการขัดขวางการแสดงออกของยีน delta-6 desaturase และ C20:5n3 มีผลต่อการขัดขวางการแสดงออกของยีน delta-5 desaturase (Martins, 2009; Sato et al., 2001) และ เอ็นไซม์ delta-6 desaturase มีปฏิกิริยาการทำงานทั้ง delta-6 desaturase และ delta-5 desaturase (Tanomman et al., 2013)

## บทที่ 4

### บทสรุป

#### สรุปผลการวิจัย

1. ในการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถใช้วิธีการ 3' Rapid amplification cDNA ends โคลนยีน *fads 2* ที่สร้างเอ็นไซม์ delta-6 desaturase ในอาร์ทีเมียได้
2. ในการศึกษานี้ได้ใช้ยีน *onifads 2* ที่ได้จากปลาไนซึ่งเป็นปลาน้ำจืด และมีโครงสร้างของยีนตรงกับโครงสร้างของยีน *fads 2* ในปลาต่าง ๆ และมีความคล้ายคลึงของกรดอะมิโนกับปลาอื่น ๆ อยู่ในช่วง 72.6%–80.9%
3. ความคล้ายคลึงของส่วน cytochrome b5 domain ของโปรตีน *Onifads 2* กับ โปรตีน *fads 2* ในปลาอื่น จะมีความคล้ายคลึงอยู่ในช่วง 76%–93% และความคล้ายคลึงของส่วน fatty acid desaturase domain ของโปรตีน *Onifads 2* กับ โปรตีน *fads 2* ในปลาอื่น จะมีความคล้ายคลึงอยู่ในช่วง 73%–83%
4. การวิเคราะห์การแสดงออกของรีคอมบีแนนท์ยีสต์ด้วยวิธี Reverse transcription PCR (RT-PCR) พบว่ารีคอมบีแนนท์ยีสต์ (RY) ก่อนที่จะมีการเหนี่ยวนำด้วยน้ำตาลกาแลคโตสไม่มีการผลิต mRNA ของยีน *onifads 2* ในขณะที่ RY ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้แสดงออกด้วยน้ำตาลกาแลคโตสเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีการผลิต mRNA ของยีน *onifads 2*
5. รีคอมบีแนนท์ยีสต์ที่เลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลกาแลคโตสมีปริมาณไขมันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) โดยที่ RY ที่เลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคสมีปริมาณไขมัน เท่ากับ  $4.82 \pm 0.59 \text{ mg g}^{-1}$  และ RY ที่เลี้ยงด้วยน้ำตาลกาแลคโตสมีปริมาณไขมัน เท่ากับ  $5.63 \pm 0.28 \text{ mg g}^{-1}$
6. กรดไขมัน C18:2n6 และ C18:3n3 มีปริมาณต่ำ ทั้งใน RY ที่เลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลกาแลคโตส และกรดไขมัน C18:3n6 ใน RY ที่เลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลกาแลคโตสมีปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) ในขณะที่ RY ที่เลี้ยงด้วยน้ำตาล กาแลคโตส มี C18:4n3 สูงกว่า C18:4n3 ใน RY ที่เลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )
7. อาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยรีคอมบีแนนท์ยีสต์มีกรดไขมันกลุ่ม n6 ได้แก่ C18:2n6, C18:3n6, C20:3n6 และ C20:4n6 สูงกว่าอาร์ทีเมียกลุ่มควบคุม

8. อาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยรีคอมบีแนนท์ยีสต์มีกรดไขมันกลุ่ม n3 ได้แก่ C18:3n3, C18:4n3, C20:3n3, C20:5n3 สูงกว่าอาร์ทีเมียกลุ่มควบคุม
9. พบ C22:6n3 ในอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยรีคอมบีแนนท์ยีสต์
10. สัดส่วนของ C18:3n6 ต่อ C18:2n6 และ สัดส่วนของ C18:4n3 ต่อ C18:3n3 ในอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยรีคอมบีแนนท์ยีสต์มีค่าสูงกว่าค่าสัดส่วนดังกล่าวในอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยยีสต์ปกติ
11. อาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยน้ำมันลินินมีปริมาณกรดไขมัน C18:2n6 และ C18:3n3 สูงขึ้นมาก ในขณะที่อาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยน้ำมันปลาปริมาณกรดไขมัน C20:5n3 และ C22:6n3 สูงขึ้นมาก
12. อาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยรีคอมบีแนนท์ยีสต์ร่วมกับน้ำมันลินิน มีกรดไขมัน C18:3n6 และ C18:4n3 สูงกว่ากรดไขมันดังกล่าวในอาร์ทีเมียที่ได้รับยีสต์ปกติ (กลุ่มควบคุม) ร่วมกับน้ำมันลินิน
13. รีคอมบีแนนท์ยีสต์ที่ระดับ  $5 \times 10^4$  และ  $5 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิเมตรมีผลทำให้สัดส่วนของ C18:4n3 ต่อ C18:3n3 และ C18:3n6 ต่อ C18:2n6 ในอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยน้ำมันลินินมีค่าสูงขึ้น
14. อาร์ทีเมียที่ได้รับน้ำมันลินินร่วมกับรีคอมบีแนนท์ยีสต์มีกรดไขมัน C20:5n3 สูงกว่าอาร์ทีเมียที่ได้รับยีสต์ปกติร่วมกับน้ำมันลินิน
15. พบปริมาณกรดไขมัน C22:6n3 ในอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยรีคอมบีแนนท์ยีสต์ร่วมกับน้ำมันลินิน

#### ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากในปัจจุบันเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับเบสในระดับจีโนมสามารถทำได้ในระยะเวลาอันสั้น และมีค่าใช้จ่ายถูกลงอย่างมาก จึงควรมีการศึกษาทางด้านจีโนมของอาร์ทีเมียเพื่อจะนำไปสู่การศึกษาโครงสร้างของยีนหลายยีน โดยเฉพาะยีนที่เกี่ยวข้องกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูง

บรรณานุกรม

- Agaba, M., Tocher, D., Dickson, C.A., Dick, J.R., Teale, A.J. 2004. Zebrafish cDNA encoding multifunctional fatty acid elongase involved in gene in zebrafish. *Transgenic Res.* 14:159-165.
- Alimuddin, Yoshizaki, G., Kiron, V., Satoh, S., Takeuchi, T. 2005. Enhancement of EPA and DHA biosynthesis by over-expression of masu salmon  $\Delta$ 6-desaturase-like
- Bell, M.V., Dick, J.R. 1993. The appearance of rods in the eyes of herring and increased didocosaxaenoyl molecular species of phospholipids. *J. mar. boil. Ass. UK.* 73:679-688.
- Bell, M.V., Batty, R., Navarro, J.C., Sargent, J.R. Dick, J.R. 1995. Dietary deficiency of docosahexaenoic acid impairs vision at low light intensities in juvenile herring (*Clupea harengus* L.). *Lipids.* 30:443-449.
- Chakraborty, R.A., Chakraborty, K., Radhakrishnan, E.V. 2007. Variation in fatty acid composition of *Artemia salina* Nauplii enriched with microalgae and Baker's yeast for use in larviculture. *J. Agric. Food Chem.* 55: 4043-4051.
- Cho, H.P., Nakamura, M.T., Clarke, S.D. 1999. Cloning, expression and nutritional regulation of the mammalian  $\Delta$ 6-desaturase. *J. Biol. Chem.* 274:471-477.
- Cho, S.H., Hur, S.B., Jo, J.Y. 2001. Effect of enriched live feeds on survival and growth rates in larval Korean rockfish, *Sebastes schlegelii* Hilgendorf. *Aquacult. Res.* 32:199-208.
- Citarasu, T., Immanuel, G., Peter Marian, M. 1998. Effect of feeding *Artemia* enriched with stressol and cod liver oil on growth and stress resistance in the Indian white shrimp *Penaeus indicus* postlarvae. *Asian Fish. Sci.* 12:65-75.
- Coutteau, P., Mourente, G. 1997. Lipid classes and their content of n-3 highly unsaturated fatty acids (HUFA) in *Artemia franciscana* after hatching, HUFA-enrichment and subsequent starvation. *Marine Biol.* 130: 81-91.
- Deering, M.J., Fielder, D.R., Hewit, D.R. 1997. Growth and fatty acid composition of juvenile leather prawns, *Penaeus monodon*, fed different lipids. *Aquaculture.* 151:131-141.
- Domergue, F., Lerchl, J., Zahringer, U., Heinz, E., 2002. Cloning and functional characterization of *Phaeodactylum tricorutum* front-end desaturases involved in eicosapentaenoic acid and biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* 269, 4105-4113.
- Dyer, J.M., Chapital, D.C., Kuan, J-C.W., Shepherd, H.S., Tang, F., Pepperman, A.B. 2004. Production of linolenic acid in yeast cells expressing an omega-3 desaturase from tung (*Aleurites fordii*). *Journal of the American Oil Chemists' Society* 81: 647-651.

- Estevez, A., McEvoy, L.A., Bell, J.G., Sargent, J.R. 1998. Effects of temperature and starvation time on the pattern and rate of loss of essential fatty acids in *Artemia* nauplii previously enriched using arachidonic acid and eicosapentaenoic acid-rich emulsion. *Aquaculture* 165: 295-311.
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H.S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.
- Food and Agriculture Organization of the United Nation (FAO), 2013. Culture aquatic species information programme: *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). Available at [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis\\_niloticus/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/en)
- González-Rovira, A., Mourente, G., Zheng, X., Tocher, D.R., Pendón, C., 2009. Molecular and functional characterization and expression analysis of a  $\Delta 6$  fatty acyl desaturase cDNA of European Sea Bass *Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 298. 90-100.
- Han, K., Geurden, I., Sorgeloos, P. 2000. Enrichment strategies for *Artemia* using emulsions providing different levels of n-3 highly unsaturated fatty acids. *Aquaculture* 183: 335-347.
- Hartvigsen, K., Lund, P., Hansen, L.F., Holmer, G. 2000. Dynamic headspace gas chromatography/mass spectrometry characterization of volatiles produced in fish oil enriched mayonase during storage. *J. Agric. Food Chem.* 48:4858-4867.
- Hastings, N., Agaba, M., Tocher, D.R., Leaver, M.J., Dick, J.R., Sargent, J.R., Teale, A.J. 2001. A vertebrate fatty acid desaturase with  $\Delta 5$  and  $\Delta 6$  activities. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98(25):14304-14309.
- Heydari, M., Akbary, P. 2011. Enrichment of *Artemia* nauplii with essential fatty acids and vitamin C: Effect on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae performance. The 2<sup>nd</sup> International Conference on Agricultural and animal Science IPCBEE 22: 45-49.
- Horrobin, F.D. 1993. Fatty acid metabolism in health and disease: the role of  $\Delta$ -6-desaturase. *American Society for Clinical Nutrition* 57:732-737.
- Hsiao, T.Y., Holmes, B., Blanch, H.W., 2007. Identification and functional analysis of a delta-6 desaturase from the marine microalgae *Glossomastix chrysoplata*. *Mar. Biotechnol.* 9, 154-165.
- Immanuel, G., Palavesam, A., Peter Marian, M. 2001. Effects of feeding lipid enriched *Artemia* nauplii on survival, growth, stress resistance of postlarvae *Penaeus indicus*. *Asian Fish. Sci.* 14:377-388.
- Immanuel, G., Palavesam, A., Sivaram, V., Michael Babu, M. Peter Marian, M. 2004. Feeding trashfish *Odonus niger* lipid enriched *Artemia* nauplii on growth, stress resistance and HUFA requirements of *Penaeus monodon* postlarvae. *Aquaculture.* 237:301-313.

- Immanuel, G., Citarasu, T., Sivaram, V., Michael Babu, M. Palavesam, A. 2007. Delivery of HUFA, probiotics and biomedicine through bioencapsulated *Artemia* as a means to enhance the growth and survival and reduce the pathogenesis in shrimp *Penaeus monodon* postlarvae. *Aquacult. Int.* 15:137-152.
- Kajiwara, S., Shirai, A., Fujii, T., Toguri, T., Nakamura, K., Ohtaguchi, K. 1996. Polyunsaturated fatty acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: expression of ethanol tolerance and the FAD2 gene from *Arabidopsis thaliana*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4309-4313.
- Kim, S.H., Kim, J.B., Kim, S.Y., Roh, K.H., Kim, H.U., Lee, K.-R., Jang, Y.S., Kwon, M., Park, J.S., 2011. Functional characterization of a delta 6-desaturase gene from the black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*). *Biotechnol Lett.* 33, 1185-1193.
- Kraul, S., Ako, H., Brittain, K., Cantrell, R., Naga, T. 1993. Nutritional factors affecting stress resistance in the larval Mahimahi, *Coryphaena hipparus*. *J. World Aquac. Soc.* 24:184-193.
- Laoteng, K., Mannontarat, R., Tanticharoen, M., Cheevadhanarak, S., 2000.  $\Delta^6$ -desaturase of *Mucor rouxii* with high similarity to plant  $\Delta^6$ -desaturase and its heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 17-22.
- Leger, P., Bengston, D.A., Sorgeloos, P. 1987. The nutritional value of *Artemia*. *Artemia. Research and its application*, 24, 521-623.
- Lim, E.H., Lam, T.J., ding, J.L. 2005. Single-cell protein diet of a novel recombinant vitellogenin yeast enhances growth and survival of first-feeding tilapia (*Oreochromis mossambicus*) larvae. *The Journal of Nutrition* 513-518.
- Lu, H., Li, J.N., Chai, Y.R., Zhang, X.K., 2009. Identification and characterization of a novel  $\Delta^6$ -fatty acid desaturase gene from *Rhizopus nigricans*. *Mol. Biol. Rep.* 36, 2291-2297.
- Martins, T.G., Cavalli, R.O., Martino, R.C., Rezende, C.E.M. Wasielesky, W. 2006. Larviculture output and stress tolerance of *Farfantepenaeus paulensis* postlarvae fed *Artemia* containing different fatty acids. *Aquaculture.* 252:525-533.
- Martins, J.G. 2009. EPA but not DHA appears to be responsible for the efficacy of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acid supplementation in depression: evidence from a meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Am. Coll. Nutr.* 28: 525-542.
- McEvoy, L.A., Navarro, J.C., Hontoria, F., Amat, F., Sargent, J.R. 1996. Two novel *Artemia* enrichment diets containing polar lipid. *Aquaculture.* 144:339-352.
- Meyer, A., Kirsch, H., Domergue, F., Abbadi, A., Sperling, P., Bauer, J., Cirpus, P., Zank, T.K., Moreau, H., Roscoe, T.J. Zähringer, U., Heinzl, E. 2004. Novel fatty acid elongases and their use for the reconstitution of docosahexaenoic acid biosynthesis. *J. Lipid Res.* 45: 1899-1909.



- Mohd-Yusof, N.Y., Monroig, O., Mohd-Adnan, A., Wan, K.L., Tocher D.R., 2010. Investigation of highly unsaturated fatty acid metabolism in the Asian sea bass, *Lates calcarifer*. *Fish Physiol. Biochem.* 36, 827-843.
- Monroig, Ó., Zheng, X., Morais, S., Leaver, M.J., Taggar, J.B., Tocher, D.R., 2010. Multiple genes for functional  $\Delta^6$  fatty acyl desaturases (Fad) in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): Gene and cDNA characterization, functional expression, tissue distribution and nutritional regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1801, 1072-1081.
- Morais, S., Mourente, G., Ortega, A., Tocher, J.A., Tocher, D. R (2011). Expression of fatty acyl Desaturase and elongase genes, and evolution of DHA:EPA ratio during development of unfed larvae of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.). *Aquaculture* 313 129–139.
- Nakamura, M.T., Cho, H.P., Clarke, S.D. 2000. Regulation of hepatic delta-6 desaturase expression and its role in the polyunsaturated fatty acid inhibition of fatty acid synthase gene expression in mice. *J. Nutr.* 130: 1561-1565.
- Napier, J.A., Hey, S.J., Lacey, D.J., Shewry, P.R. 1998. Identification of a *Caenorhabditis elegans*  $\Delta^6$ -fatty-acid-desaturase by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 330, 611- 614.
- Na-Ranong, S., Laoteng, K., Kittakoop, P., Tanticharoen, M., Cheevadhanarak, S., 2006. Targeted mutagenesis of a fatty acid  $\Delta^6$ -desaturase from *Mucor rouxii*: Role of amino acid residues adjacent to histidine-rich motif II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339, 1029-1034.
- Navarro, J.C., Amat, F., Sargent, J.R. 1992. Fatty acid composition of coastal and inland *Artemia* sp. Populations from Spain. *Aquaculture, Amsterdam.* 102:219-230.
- Navarro, J.C., Henderson, R.J., McEvoy, L.A., Bell, M.V., Amat, F. 1999. Lipic conversions during enrichment of *Artemia*. *Aquaculture.* 174:155-166.
- Ortuno, J., Cuesta, A., Rodriguez, A., Esteban, M.A., Meseguer, J. 2002. Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seagrease (*Sparus aurata* L.) *Veterinary Immunology and Immunopathology* 85: 41-50.
- Pereira, S.L. Leonard, A.E., Mukerji, P. 2003. Recent advances in the study of fatty acid desaturases from animals and lower eukaryotes. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* 68:97-106.
- Qiu, X., Hong, H., Datla, N., MacKenzie, L.S. Taylor, C.D. and Thomas, L.T. 2002. Expression of boron delta 6 desaturase in *Sacharomyces cerevisiae* and oilseed crops. *Canadian Journal of Botany* 80: 42-49.

- Rees, J.F., Cure, K., Piyatiratitivorakul, S., Sorgeloos, P., Menesveta, P. 1994. Highly unsaturated fatty acid requirements of *Penaeus monodon* postlarvae; and experimental approach based on *Artemia* enrichment. *Aquaculture*. 122:193-207.
- Sargent, J.R., McEvoy, L.A., Bell, J.G. 1997. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture*, Amsterdam. 155:117-127.
- Sato, M., Adan, Y., Shibata, K., Shoji, Y., Sato, H., Imaizumi, K. 2001. Cloning of rat  $\Delta^6$ -desaturase and its regulation by dietary eicosapentaenoic or docosahexaenoic acid. *World Rev. Nutr. Diet.* 88:196-199.
- Sayanova, O., Shewry, P.R., Napier, J.A., 1999. Histidine-41 of the cytochrome *b*<sub>5</sub> domain of the borage  $\Delta^6$  fatty acid desaturase is essential for enzyme activity. *Plant Physiol.* 121, 614-646.
- Sayanova, O., Haslam, R., Venegas-Caleron, M., Napier, J.A. 2006. Identification of primula "front-end" desaturases with distinct *n*-6 or *n*-3 substrate preferences. *Planta* 224, 1269-1277.
- Seiliez, I., Panserat, S., Kaushik, S., Bergot, P., 2001. Cloning, tissue distribution and nutritional regulation of a  $\Delta^6$ -desaturase-like enzyme in rainbow trout. *Comp. Biochem. Phys. B* 130, 83-93.
- Seiliez, I., Panserat, S., Corraze, G., Kaushik, S., Bergot, P., 2003. Cloning and nutritional regulation of a  $\Delta^6$ -desaturase-like enzyme in the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Comp. Biochem. Phys. B* 135, 449-460.
- Shanklin, J., Whittle, E., Fox, B.G., 1994. Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. *Biochemistry* 33, 12787-94.
- Shields, R.J., Bell, J.G., Lizi, F.S., Gara, B., Bromage, N.R., Sargent, J.R. 1999. Natural copepods are superior to enriched *Artemia* nauplii as feed for halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus*) in terms of survival, pigmentation and retinal morphology: relation to dietary essential fatty acids. *The Journal of Nutrition* 1186-1194.
- Southgate, P.C., Lou, D.C. 1995. Improving the *n*-3 HUFA composition of *Artemia* using microcapsules containing marine oils. *Aquaculture*. 134:91-99.
- Sprecher, H., 2000. Metabolism of highly unsaturated *n*-3 and *n*-6 fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* 1486: 219-231.
- Tanomman, S., Ketudat-Cairns, K., Jangprai, A., Boonanuntanasarn, S. 2013. Characterization of fatty acid delta-6 desaturase gene in Nile tilapia and heterogenous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B.* 166: 148-156.
- Tocher, D.R., Zheng, X., Schleichriem, C., Hastings N., Dick, J.R., Teale, A.J., 2006. Highly unsaturated fatty acid synthesis in marine fish: cloning, functional characterization and nutritional

- regulation of fatty acyl  $\Delta^6$  desaturase of Atlantic Cod (*Gadus morhua* L.). *Lipids* 41, 1003-1016.
- Tocher, D.R., 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science* 11,107-184.
- Tocher, D.R., Bell, J.G., Dick, J.R., Henderson, R.J., McGhee, F., Michell, D., Morris, P.C., 2000. Polyunsaturated fatty acid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*) undergoing parr-smolt transformation and the effects of dietary linseed and rapeseed oils. *Fish Physiol. Biochem.* 23, 59-73.
- Vazhappilly, R., Chen, F. 1998. Heterotrophic production potential of omega-3 polyunsaturated fatty acids by microalgae and algae-like microorganisms. *Bot. Mar.* 40:553-558.
- Volkman, J.K., Jeffrey, S.W., Nichols, P.D., Rogers, G.I., Garland, C.D. 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 128:219-240.
- Watanabe, T. 1993. Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish. *J. World Aquac. Soc.* 24(2):152-161.
- Watanabe, T., Kiron, V. 1994. Prospects in larval fish dietetics. *Aquaculture.* 124:223-251.
- Xu, S.L., Ji, W.J., Castell, J.D., Odor, R.K. 1993. The nutritional value of dietary n-3 and n-6 fatty acids for the Chinese prawn (*Penaeus chinensis*). *Aquaculture.* 118:277-285.
- Yazawa, K. 1996. Production of eicosapentaenoic acid from marine bacteria. *Lipids* 31, S297-S300.
- Zank, T.K., Zähringer, U., Beckmann, C., Pohnert, G., Boland, W., Holtorf, H., Reski, R., Lerchl, J., Heinz, E. 2002. Cloning and functional characterisation of an enzyme involved in the elongation of  $\Delta^6$ -polyunsaturated fatty acids from the moss *Physcomitrella patens*. *The Plant Journal*, 31: 255–268.
- Zheng, X., Seiliez, I., Hastings, N., Tocher, D.R., Panserat, S., Dickson, C.A, Bergot, P., Teale, A.J. 2004. Characterization and comparison of fatty acyl D6 desaturase cDNAs from freshwater and marine teleost fish species. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 139: 269 – 279.
- Zheng, X., Seiliez I., Hasting, N., Tocher, D. R., Panserat, S., Dickson, C.A., Bergot, P., Teale, A.J. 2005. Characterization and comparison of fatty acyl D6 desaturase cDNAs from freshwater and marine teleost fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 139: 269–279.
- Zheng, X., Ding, Z., Xu, Y., Monroig, O. Morais, S. and Tocher, R.D. 2009. Physiological roles of fatty acyl desaturases and elongases in marine fish: Characterisation of cDNAs of fatty acyl

delta 6 desaturase and *elov15* elongase of cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture* 290:122-131.



## ภาคผนวก

### SC-minimal medium plate (100 ml)

|            |   |                                  |
|------------|---|----------------------------------|
| ประกอบด้วย | Yeast nitrogen base                         | 0.67 g                           |
|            | (Without amino acids with ammonium sulfate) |                                  |
|            | Glucose or raffinose                        | 2 g                              |
|            | Adenine                                     | 0.01 g                           |
|            | Arginine                                    | 0.01 g                           |
|            | Cysteine                                    | 0.01 g                           |
|            | Leucine                                     | 0.01 g                           |
|            | Lysine                                      | 0.01 g                           |
|            | Threonine                                   | 0.01 g                           |
|            | Tryptophan                                  | 0.01 g                           |
|            | Uracil                                      | 0.01 g (สำหรับ SC-minimal medium |
| + Uracil)  |   |                                  |
|            | Aspartic acid                               | 0.005 g                          |
|            | Histidine                                   | 0.005 g                          |
|            | Isoleucine                                  | 0.005 g                          |
|            | Methionine                                  | 0.005 g                          |
|            | Phenylalanine                               | 0.005 g                          |
|            | Proline                                     | 0.005 g                          |
|            | Serine                                      | 0.005 g                          |
|            | Tyrosine                                    | 0.005 g                          |
|            | Valine                                      | 0.005 g                          |
|            | Agar  | 2 g (สำหรับ plate)               |

ใส่น้ำ DI 100 ml ทำการผสมสารละลายให้เข้ากันและนำไป autoclave สำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง จะไม่ผสม Glucose หรือ raffinose ลงไปในอาหารที่นำไป autoclave เพราะจะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเหนียว จะผสมหลังจาก autoclave โดยรอให้อาหารเลี้ยงเชื้ออุ่น ๆ แล้วเติม Glucose ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ผสมสารละลายให้เข้ากันจากนั้นทำการเท plate

## ประวัติผู้วิจัย

### หัวหน้าโครงการ

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาว สุรินทร บุญอนันตนาสาร  
(ภาษาอังกฤษ) Ms. Surintorn Boonanuntasarn
2. เลขหมายประจำตัวประชาชน 3 2097 00017 95 1
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อ

สาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

อ. เมือง จ.นครราชสีมา 30000

โทรศัพท์ 044-224371, 224378

โทรสาร 044-224150

Email : [surinton@ccs.sut.ac.th](mailto:surinton@ccs.sut.ac.th)

### 5. ประวัติการศึกษา

| ระดับการศึกษา | ชื่อปริญญา          | สาขาวิชา            | สถาบันการศึกษา                |
|---------------|---------------------|---------------------|-------------------------------|
| ปริญญาตรี     | วิทยาศาสตร์บัณฑิต   | วาริชศาสตร์         | มหาวิทยาลัยบูรพา              |
| ปริญญาโท      | วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต | เทคโนโลยีชีวภาพ     | จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย         |
| ปริญญาเอก     | Ph.D.               | Aquatic Biosciences | Tokyo University of Fisheries |

### 6. ผลงานตีพิมพ์

- Boonanuntasarn, S., Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Morita, T. and Takeuchi T. 2002. Gene knock-down in rainbow trout embryos using antisense morpholino phosphorodiamidate oligonucleotides. *Mar. Biotechnol.* 4: 256-266
- Boonanuntasarn, S., Yoshizaki, G. and Takeuchi T. 2003. Specific gene silencing using small interfering RNAs in fish embryos. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 310: 1089-1095
- Boonanuntasarn, S., Yoshizaki, G., Iwai, K. and Takeuchi T. 2004. Molecular cloning, expression in albino mutants, and gene knockdown studies of two types of tyrosinase mRNA in rainbow trout embryos. *Pigment Cell Res.* 17: 413-421
- Boonanuntasarn, S., Takeuchi, T., Yoshizaki, G. 2005. High-efficiency gene knockdown using chimeric ribozymes in fish embryos. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 336: 438-443

- Boonanuntasarn, S. 2008. Gene knockdown: a powerful tool for gene function study in fish. *J. World Aquac. Soc.* 39: 311-323.
- Boonanuntasarn, S., Panyim, S., Yoshizaki, G. 2008. Characterization and organization of the U6 snRNA gene in zebrafish and usage of their promoters to express short hairpin RNA. *Marine Genomics*, doi:10.1016/j.margen.2008.10.001 (available online)
- Boonanuntasarn, B., Panyim, S., Yoshizaki, G. 2009. Usage of putative zebrafish U6 promoters to express shRNA in Nile tilapia and shrimp cell extracts. *Transgenic Res.* In press
- Jangprai, A., Boonanuntasarn, S., Yoshizaki, G. 2011. Characterization of melanocortin 4 receptor in snakeskin gourami and its expression in relation to daily feed intake and short-term fasting. *Gen. Comp. Endocrinol.* 173:27-37.
- Vechklang, K., Boonanuntasarn, S. Ponchunchoovong, S., Pirarat, N., and Wanapu, C. 2011. The potential for rice wine residual as an alternative protein source in a practical diet for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) at the juvenile stage. *Aquac Nutri.* 17:385-694.
- Pitaksong, T. Kuppitayanan, P., Boonanuntasarn, S. 2013 Effects of vitamins C and E on growth, tissue accumulation, and prophylactic response upon thermal and acidic stress in hybrid catfish. *Aquac. Nutri.* 19: 148-162.
- Phymyu, N., Boonanuntasarn, S., Jangprai, A. Yoshizaki, G. Na-Nakorn, U. 2012. Pubertal effects of 17 $\alpha$ -methyltestosterone on GH-IGF-related genes of the hypothalamic-pituitary-liver-gonadal axis and other biological parameters in male, female and sex reversed Nile tilapia. *Gen. Comp. Endocrinol.* 177: 278-292.
- Boonanuntasarn, S., Jangprai, A., Yoshizaki, G. 2012. Characterization of neuropeptide Y in snakeskin gourami and the change in its expression due to feeding status and melanocortin 4 receptor expression. *Gen. Comp. Endocrinol.* 179: 184-195.
- Boonanuntasarn, K., Janebodin, K., Suppakpatana, P., Arayapisit, T., Rodsutthi, J., Chunabundit, P., Boonanuntasarn, S., Sripairojthikoon, W. 2012. *Morinda citrifolia* leaf enhances osteogenic differentiation and mineralization by human periodontal ligament cells. *Dental material Journal.* 31(5): 1-9
- Vechklang, K., Lim, C., Boonanuntasarn, S., Welker, T., Ponchunchoovong, S., Klesius, P.H., and Wanapu, C. 2012. Growth performance and resistance to *Streptococcus iniae* of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets supplemented with GroBiotic-A and brewtech dried brewers yeast. *Journal of Applied Aquaculture.* 24:183-198.