ศุภมาศ ถนอมมัน : การผลิตเอนไซม์ delta 6 desaturase ของปลานิลในยีสต์เพื่อใช้เสริมในอาหารปลา (PRODUCTION OF NILE TILAPIA DELTA 6 DESATURASE IN YEAST FOR SUPPLEMENTATION IN FISH FEED) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรินทร บุญอนันธนสาร, 69 หน้า.

ปลานิลเป็นปลาที่ความสำคัญทางเศรษฐกิจ เอนไซม์ delta 6 desaturase เป็นเอนไซม์ตัวแรกในปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงสายยาว มีหน้าที่เปลี่ยนกรดไขมัน linoleic acid (C18:2n6) และ alpha-linolenic acid (C18:3n3) เป็น gamma-linolenic acid (C18:3n6) และ stearidonic acid (C18:4n3) ตามลำดับ การศึกษานี้ได้ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน delta 6 desaturase ของปลานิล และการแสดงออกของ mRNA ของยีน delta 6 desaturase ระหว่างการพัฒนาการของตัวอ่อนระยะต่าง ๆ นอกจากนี้ได้ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ delta 6 desaturase โดยการสร้างรีคอมบีแนนท์ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) ที่มีการนำเอายีนเอนไซม์ delta 6 desaturase ที่เชื่อมต่อกับโปรโมเตอร์ *Gal*1 เข้าสู่เซลล์ และศึกษาถึงศักยภาพการนำไปใช้เป็นสารเสริมชีวนะ

cDNA ของยีน delta 6 desaturase มีส่วนของ coding sequence เท่ากับ 1,338 bp เมื่อทำการแปลรหัสจะมีจำนวนกรดอะมิโนเท่ากับ 445 ตัว พบการแสดงออกของยีน delta 6 desaturase ในไข่ปลาที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ และในทุกระยะการพัฒนาการของตัวอ่อน จากการวิเคราะห์โดยใช้ RT-PCR และพบว่ายีสต์ที่มีการถ่ายยีน delta 6 desaturase (ยีสต์ RY) มีการแสดงออกของยีน delta 6 desaturase เมื่อทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกาแลคโตสที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อศึกษาการทำงานของยีน delta 6 desaturase ภายใต้สภาวะการเหนี่ยวนำด้วยกาแลคโตสนั้น พบว่า delta 6 desaturase มีอัตราการการเปลี่ยนกรดไขมัน C18:2n6 เป็น C18:3n6 และ C18:3n3 เป็น C18:4n3 เท่ากับ 39 เปอร์เซ็นต์ และ 7 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นอกจากนี้ยังสามารถเปลี่ยนกรดไขมัน dihomo-gamma-linolenic acid (C20:3n6) ได้เท่ากับ 4 เปอร์เซ็นต์ซึ่งแสดงว่าเอนไซม์ delta 6 desaturase ของปลานิลสามารถทำหน้าที่ของเอนไซม์ delta 5 desaturase ได้ด้วยจึงจัดเป็น bifunctional enzyme

เพื่อศึกษาถึงผลของการเสริมยีสต์ RY ต่อการเพิ่มปฏิกิริยาการเอนไซม์ delta 6 desaturase เมื่อเสริมลงในอาหารปลานิล ได้ทำการทดลองเลี้ยงปลาได้อาหารที่เสริม ยีสต์ RY หรือยีสต์ที่ไม่ได้มีการถ่ายยีน (ยีสต์ NT) เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์โดยมี 5 กลุ่มการทดลอง ประกอบด้วย 1. อาหารสูตรพื้นฐาน 2. อาหารสูตรพื้นฐานที่เสริมยีสต์ NT และให้ทุกวัน 3. อาหารสูตรพื้นฐานที่เสริมยีสต์ NT และให้วันเว้นวัน 4. อาหารสูตรพื้นฐานที่เสริมยีสต์ RY และให้ทุกวัน 5. อาหารสูตรพื้นฐานที่เสริมยีสต์ RY และให้วันเว้นวัน ผลการศึกษาพบว่า สมรรถนะการเจริญเติบโต และอัตราการรอดของปลาทุกกลุ่มทดลองไม่แตกต่างกัน และไม่พบว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าองค์ประกอบทางเคมีของตัวปลา ค่าโลหิตวิทยา และค่ากลูโคสในเลือด การ

เสริมยีสต์ NT และยีสต์ RY ในอาหารปลานิลมีผลทำให้แบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio spp.* มีจำนวนลดลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีสต์ NT และ ยีสต์ RY สามารถใช้เป็นสารเสริมชีวนะได้ จากผลที่สามารถแยกเชื้อยีสต์ RY จากลำไส้ปลาได้นั้น แสดงว่ายีสต์ RY สามารถมีชีวิตอยู่ได้ในสภาวะแวดล้อมของลำไส้ปลา การเสริมยีสต์ RY ในอาหารปลานิลทำให้มีกรดไขมัน C18:4n3 และ C18:3n6 สะสมในเนื้อปลานิลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ชี้ให้เห็นว่ายีสต์ RY สามารถเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ delta 6 desaturase และการเสริมยีสต์ RY ในอาหารปลานิลทำให้มีปริมาณของกรดไขมัน docosahexaenoic acid (C22:6n3) ในเนื้อปลานิลเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มการเสริมยีสต์ NT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่ายีสต์ RY สามารถเพิ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงสายยาวตัวอื่นได้ในปลาได้ด้วย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
ปีการศึกษา 2555

ลายมือชื่อนักศึกษา ศุภมาศ ถนอมมั่น
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

SUPAMAS TANOMMAN : PRODUCTION OF NILE TILAPIA DELTA 6 DESATURASE IN YEAST FOR SUPPLEMENTATION IN FISH FEED. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SURINTORN BOONANUNTANASARN, Ph.D., 69 PP.

DELTA 6 DESATURASE ENZYME/LONG CHAIN POLYUNSATURATED FATTY ACID/RECOMBINANT YEAST/*Saccharomyces cerevisiae*/*Oreochromis niloticus*

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is an economically important freshwater fish. Fatty acid delta 6 desaturase enzyme (Δ6), which converts linoleic acid (C18:2n6) and alpha-linolenic acid (C18:3n3) to gamma-linolenic acid (C18:3n6) and stearidonic acid (C18:4n3), respectively, is the first enzyme in the biosynthesis pathway of long chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA). This study aimed to investigate Δ6 mRNA expression during embryogenesis. In addition, its biological functions were determined using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* (RY). Furthermore, the potential use of RY as probiotic was investigated.

Cloned Δ6 gene from Nile tilapia comprised of 1,338 bp coding sequence which encoded Δ6 of 445 amino acid residues. RT-PCR was performed to evaluate the expression of Δ6 in unfertilized egg and embryos during middle blastula, late blastula, gastrula, body segment formation, pharyngula, and hatching stages. The expression of Δ6 was detected in all stages tested, indicating that Δ6 is essential for embryo development.

RY was generated by transformation of *S.cerevisiae* with a plasmid containing Δ6 driven by *Gal*1 promoter. The expression of Δ6 in RY was detected by RT-PCR after 24 h induction with galactose. It exhibited 39% and 7% of Δ6 activity toward

C18:2n6 and C18:3n3, respectively. It also displayed 4% of fatty acid delta 5 desaturase (Δ5) toward dihomo-gamma-linolenic acid (C20:3n6), indicating that Nile tilapia Δ6 had Δ5 and Δ6 bifunction.

In order to investigate whether RY could increase Δ6 activity when used as feed additive, Nile tilapia was fed with basal diet (B) supplemented with RY or nontransformed yeast (NT) for 12 weeks. Completely randomized designed experiment with five treatments consisting of the basal diet (T1), every day B+NT-feeding (T2), every other day B+NT-feeding (T3), every day B+RY-feeding (T4), every other day B+RY-feeding (T5) was carried out. The growth performance and survival rate of fish were not significantly different among treatments. There were no significant variations in body composition, hematological blood parameters and blood glucose among experimental groups. Fish fed with diet supplemented with RY or NT showed significant reduction in *Vibrio spp.*, demonstrating that both RY and NT could have probiotic effect. RY could be isolated from the intestine of Nile tilapia, which suggested that RY survived in the intestinal environment of the fish. Fish fed with the RY supplemented diet had higher C18:4n3 and C18:3n6 than that fed with B and B+NT. The result suggested that RY could increase Δ6 activity when it was used as feed additive in Nile tilapia. Moreover, the amount of docosahexaenoic acid (C22:6n3) in fish fed with the RY supplemented diet was higher when compared with that in fish fed with the NT supplemented diet, indicating that dietary RY could also increase other LC-PUFA in fish.

School of Animal Production Technology Student's Signature Supamas Tanomman

Academic Year 2012 Advisor's Signature

Co-advisor's Signature