ขนิษฐา ดิษทับ : การผลิตรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่มีการแสดงออกของเอ็นไซม์ Delta 6 desaturase จากปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*) และการใช้รีคอมบิแนนท์ยีสต์นี้เป็นโปรไบโอติกส์ในอาหารปลา (PRODUCTION OF RECOMBINANT YEAST EXPRESSING DELTA 6 DESATURASE FROM STRIPED CATFISH (*Pangasianodon hypophthalmus*) AND ITS USE AS DIETARY PROBIOTICS IN FISH FEED) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.สุรินทร บุญอนันธนสาร, 82 หน้า.

กรดไขมันในน้ำมันปลาจัดเป็นอาหารที่มีคุณค่าที่จำเป็นต่อร่างกาย โดยเฉพาะกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูง (PUFA) ปลาสวายจัดเป็นปลาน้ำจืดที่มีการสะสมไขมัน และกรดไขมัน PUFA ในปริมาณสูง การศึกษาในปลาน้ำจืดพบว่าปลาน้ำจืดมีความสามารถในการสังเคราะห์กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูง และเอ็นไซม์ delta 6 desaturase (Δ6) จัดเป็นเอ็นไซม์หนึ่งที่มีความสำคัญในกระบวนการการสังเคราะห์กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูง ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการโคลนยีน Δ6 เพื่อผลิตเป็นรีคอมบิแนนท์ยีสต์ และใช้รีคอมบิแนนท์ยีสต์นี้เป็นโปรไบโอติกส์ยีสต์เพื่อเสริมในอาหารปลา

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการ โคลนและศึกษาโครงสร้างของยีน **fatty acyl Δ6 desaturase** ของปลาสวาย (*Phy-Fad2*) พบว่ายีน *Phy-Fad2* ประกอบด้วยจำนวนนิวคลีโอไทด์ 1,338 คู่เบส สามารถแปลเป็นโปรตีนได้ 445 กรดอะมิโน ต่อมาได้ทำการเชื่อมต่อยีน *Phy-Fad2* กับเวกเตอร์ที่มีส่วนของ translation elongation factor (*TEF*) เป็น promoter แล้วย้ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์ยีสต์ (RY) ทำการศึกษาระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *Phy-Fad2* นอกจากนี้ได้ทำสร้างเวกเตอร์ที่มีเฉพาะโปรโมเตอร์ ***TEF*** และนำเข้าสู่เซลล์ยีสต์ (RY-pTEF) และยีสต์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (WT) ใช้เป็นเป็นกลุ่มควบคุม จากการศึกษาการทำงานของเอ็นไซม์ Phy-Δ6 ในยีสต์ RYRY-pTEF WT พบว่ายีสต์ RY สามารถเปลี่ยนกรดไขมัน C18 : 2n6 ไปเป็น C18 : 3n6 และสามารถเปลี่ยนกรดไขมัน C18 : 3n3 ไปเป็น C18 : 4n3 ได้ แต่ไม่พบการเปลี่ยนกรดไขมันดังกล่าวในยีสต์ RY-pTEF และ WT

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเสริมโปรไบโอติกยีสต์ในอาหารปลาสวาย โดยได้จัดกลุ่มทดลองเป็น 7 กลุ่ม คือ อาหารกลุ่มควบคุม กลุ่มทดลองที่ใช้อาหารเสริมยีสต์ WT ที่ระดับ 10^6(WT 10^6) เซลล์ต่อกรัมอาหารและที่ระดับ 10^8(WT 10^8) เซลล์ต่อกรัมอาหารกลุ่มทดลองที่ใช้อาหารเสริมยีสต์ RY-pTEF ที่ระดับ 10^6(RY-pTEF10^6) เซลล์ต่อกรัมและที่ระดับ 10^8(RY-pTEF10^8) เซลล์ต่อกรัมอาหาร กลุ่มทดลองที่ใช้อาหารเสริมยีสต์ RY ที่ระดับ 10^6(RY10^6) เซลล์ต่อกรัมอาหาร และที่ระดับ 10^8(RY10^8) เซลล์ต่อกรัมอาหาร ที่ระยะเวลาการศึกษา 120 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่ากลุ่มที่เสริมโปรไบโอติกยีสต์ทุกกลุ่มมีน้ำหนักตัวน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

องค์ประกอบทางเคมีในเนื้อปลา ค่าโลหิตวิทยา และค่าเคมีในเลือดพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติปลาในกลุ่มทดลองที่มีการเสริมยีสต์มีค่าพารามิเตอร์ของระบบภูมิคุ้มกันเพิ่มสูงขึ้น และพบการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ปลาในกลุ่มที่มีการเสริมยีสต์โดยปลาในกลุ่มทดลองเหล่านี้มีจำนวนจุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์และราสูงขึ้น และประชากรจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Vibrio* spp. ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) นอกจากนี้พบว่า เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มทดลอง $WT10^6$ $WT10^8$ $RY\text{-}pTEF10^6$ $RY\text{-}pTEF10^8$ ปลาในกลุ่มทดลอง $RY10^6$ และ $RY10^8$ มีการเพิ่มขึ้นของกรดไขมัน C18 : 3n6 และ C18 : 4n3 ในเนื้อปลาและไขมันในช่องท้องปลา อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีสต์ RY เมื่อถูกใช้เป็นโปรไบโอติกในอาหารปลามีความสามารถในการผลิตเอ็นไซม์ Phy-Δ6

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ปีการศึกษา 2558 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

KHANITTHA DITTHAB : PRODUCTION OF RECOMBINANT YEAST EXPRESSING DELTA 6 DESATURASE FROM STRIPED CATFISH (*Pangasianodon hypophthalmus*) AND ITS USE AS DIETARY PROBIOTICS IN FISH FEED. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SURINTORN BOONANUNTANASARN, Ph.D., 82 PP.

PANGASIANODON HYPOPHTHALMUS/*SACCHAROMYCES CEREVISIAE*/POLYUNSATURATED FATTY ACIDS/DELTA 6 DESATURASE

Fish contain a variety of fatty acids (FA) especially polyunsaturated fatty acids (PUFAs), which have a range of health benefits. Striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) is a freshwater fish that contain high amounts of fat and PUFAs. Most fresh water fish were reported to contain PUFA biosynthesis pathways, and delta 6 desaturase (Δ6) is an essential enzyme in PUFA biosynthesis pathways. In this study, delta 6 desaturase of striped catfish (Phy-Δ6) was cloned to produce recombinant yeast. In addition, the efficacy of the use of dietary recombinant yeast expressing Phy-Δ6 as probiotic were investigated.

Cloning and characterization of fatty acyl Δ6 desaturase cDNA from striped catfish (*Phy-Fad2*) was conducted. The *Phy-Fad2* has open reading frames of 1338 base pairs specifying a protein of 445 amino acids. Later, an expression vector containing *Phy-Fad2* cDNA driven by the translation elongation factor (*TEF*) promoter was constructed. The recombinant plasmid was transformed into *Saccharomyces cerevisiae* to generate recombinant yeast expressing *Phy-Fad2* (RY). The clone that expressed the highest level of *Phy-Fad2* mRNA was selected to use for further studies. In addition, the vector containing *TEF* promoter alone was constructed and transformed

into *S. cerevisiae* to generate recombinant yeast RY-pTEF. Moreover, non-transformed *S. cerevisiae* (WT) was used as the negative control group. The activities of Phy-Δ6 of RY, RY-pTEF and WT, the results showed that RY converted C18 : 2n6 and C18 : 3n3 to C18 : 3n6 and C18 : 3n3, respectively while RY-pTEF and WT did not.

The effects of the use of RY as a dietary probitoic were conducted. The striped catfish were fed seven treatment diets including basal diet (control), basal diet supplemented with 10^6 WTg^{-1} diet (WT10^6), and 10^8 WT g^{-1}diet (WT10^8), basal diet supplemented with 10^6 RY-pTEF g^{-1}diet (RY-pTEF10^6), and 10^8 RY-pTEF g^{-1}diet (RY-pTEF10^8), basal diet supplemented with 10^6RY g^{-1}diet (RY10^6), and 10^8 RY g^{-1}diet (RY10^8) for 120 days. Compared to the control diet, dietary supplementation with yeast had higher body weight, weight gain, specific growth rate and FCR ($P<0.05$). The proximate composition of fish body, hematological indices and blood chemistry among experimental treatment diets were not significantly different. Compared to the control diet, dietary supplementation with yeast had higher immune parameters. Dietary supplementation with yeast modified microbial population in the intestines by increasing the number of intestinal yeast and fungi and reducing the number of *Vibrio* spp. ($P<0.05$). Compared to the control group, WT10^6, WT10^8, RY-pTEF10^6, RY-pTEF10^8 with RY10^6 and RY10^8 had a higher amount of C18 : 3n6 and C18 : 4n3 in the muscle and abdomen fat of fish ($P<0.05$), suggesting that RY could exert Phy-Δ6 when used as a dietary probiotic.

School of Animal Production Technology Student's Signature_____

Academic Year 2015 Advisor's Signature_____