

การผลิตรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่มีการแสดงออกของเอ็นไซม์ Delta 6
desaturase จากปลาซวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*) และ
การใช้รีคอมบิแนนท์ยีสต์นี้เป็นโปรไบโอติกส์ในอาหารปลา

นางสาวชนิษฐา ดิษทัต



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2558

**PRODUCTION OF RECOMBINANT YEAST
EXPRESSING DELTA 6 DESATURASE FROM
STRIPED CATFISH (*Pangasianodon hypophthalmus*)
AND ITS USE AS DIETARY PROBIOTICS IN FISH FEED**

Khanittha Ditthab



**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Animal Production Technology**

Suranaree University of Technology

Academic Year 2015

การผลิตรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่มีการแสดงออกของเอ็นไซม์ Delta 6 desaturase จาก
ปลาซวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*) และการใช้รีคอมบิแนนท์ยีสต์นี้
เป็นโปรไบโอติกส์ในอาหารปลา

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นักวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(รศ. ดร.ปราโมทย์ แพงคำ)

ประธานกรรมการ

(รศ. ดร.สุรินทร์ บุญอนันตาสาร)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

(ผศ. น.สพ. ดร.ภคณี จุฬพิทยานันท์)

กรรมการ

(อ. ดร.สมร พรชื่นชูวงศ์)

กรรมการ

(ผศ. ดร.อมรรัตน์ โมฬี)

กรรมการ

(ศ. ดร.ชูกิจ ลิมปิจำนงค์)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการและนวัตกรรม

(ศ. ดร.หนึ่ง เตียอำรุง)

คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

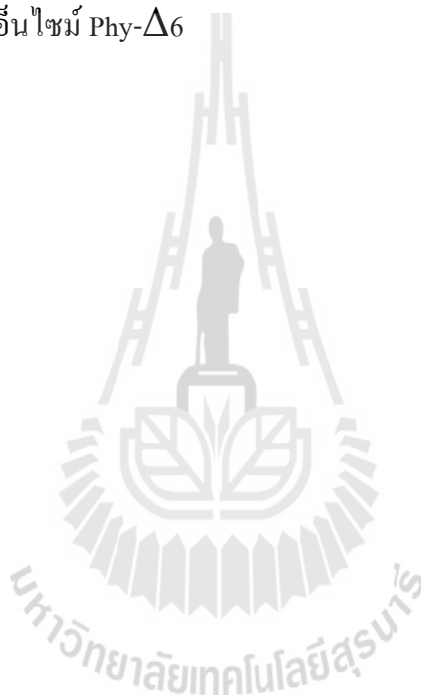
ขนิษฐา คิชพัท : การผลิตรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ Delta 6 desaturase จากปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*) และการใช้รีคอมบิแนนท์ยีสต์นี้เป็นโปรไบโอติกส์ในอาหารปลา (PRODUCTION OF RECOMBINANT YEAST EXPRESSING DELTA 6 DESATURASE FROM STRIPED CATFISH (*Pangasianodon hypophthalmus*) AND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

กรดไขมันในน้ำมันปลาจัดเป็นอาหารที่มีคุณค่าที่จำเป็นต่อร่างกาย โดยเฉพาะกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูง (PUFA) ปลาสวายจัดเป็นปลาน้ำจืดที่มีการสะสมไขมัน และกรดไขมัน PUFA ในปริมาณสูง การศึกษาในปลาน้ำจืดพบว่าปลาน้ำจืดมีความสามารถในการสังเคราะห์กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูง และเอนไซม์ delta 6 desaturase ($\Delta 6$) จัดเป็นเอนไซม์หนึ่งที่มีความสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูง ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการโคลนยีน $\Delta 6$ เพื่อผลิตเป็นรีคอมบิแนนท์ยีสต์ และใช้รีคอมบิแนนท์ยีสต์นี้เป็นโปรไบโอติกส์เพื่อเสริมในอาหารปลา

การศึกษานี้ได้ทำการโคลนและศึกษาโครงสร้างของยีน fatty acyl $\Delta 6$ 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 จากการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ *Phy- $\Delta 6$* ในยีสต์ RYRY-pTEF WT พบว่ายีสต์ RY สามารถเปลี่ยนกรดไขมัน C18 : 2n6 ไปเป็น C18 : 3n6 และสามารถเปลี่ยนกรดไขมัน C18 : 3n3 ไปเป็น C18 : 4n3 ได้ แต่ไม่พบการเปลี่ยนกรดไขมันดังกล่าวในยีสต์ RY-pTEF และ WT

การศึกษานี้ได้ทำการเสริมโปรไบโอติกส์ในอาหารปลาสวาย 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-pTEF 10^6) เซลล์ต่อกรัมและที่ระดับ 10^8 (RY-pTEF 10^8) เซลล์ต่อกรัมอาหาร กลุ่มทดลองที่ใช้อาหารเสริมยีสต์ RY ที่ระดับ 10^6 (RY 10^6) เซลล์ต่อกรัมอาหาร และที่ระดับ 10^8 (RY 10^8) เซลล์ต่อกรัมอาหาร ที่ระยะเวลาการศึกษา 120 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่ากลุ่มที่เสริมโปรไบโอติกส์ทุกกลุ่มมีน้ำหนักตัวน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

องค์ประกอบทางเคมีในเนื้อปลา ค่าโลหิตวิทยา และค่าเคมีในเลือดพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติปลาในกลุ่มทดลองที่มีการเสริมยีสต์มีค่าพารามิเตอร์ของระบบภูมิคุ้มกันเพิ่มสูงขึ้น และพบการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ปลาในกลุ่มที่มีการเสริมยีสต์โดยปลาในกลุ่มทดลองเหล่านี้มีจำนวนจุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์และราสูงขึ้น และประชากรจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Vibrio* spp. ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) นอกจากนี้พบว่า เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มทดลอง WT10⁶ WT10⁸ RY-pTEF10⁶ RY-pTEF10⁸ ปลาในกลุ่มทดลอง RY10⁶ และ RY10⁸ มีการเพิ่มขึ้นของกรดไขมัน C18 : 3n6 และ C18 : 4n3 ในเนื้อปลาและไขมันในช่องท้องปลา อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีสต์ RY เมื่อถูกใช้เป็นโปรไบโอติกในอาหารปลามีความสามารถในการผลิตเอ็นไซม์ Phy- $\Delta 6$



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 ($\Delta 6$) is an essential enzyme in PUFA biosynthesis pathways. In this study, delta 6 desaturase of striped catfish (Phy- $\Delta 6$) was cloned to produce recombinant yeast. In addition, the efficacy of the use of dietary recombinant yeast expressing Phy- $\Delta 6$ as probiotic were investigated.

Cloning and characterization of fatty acyl $\Delta 6$ 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 probiotic were conducted. The striped catfish were fed seven treatment diets including basal diet (control), basal diet supplemented with 10^6 WTg⁻¹ diet (WT10⁶), and 10^8 WT g⁻¹diet (WT10⁸), basal diet supplemented with 10^6 RY-pTEF g⁻¹diet (RY-pTEF10⁶), and 10^8 RY-pTEF g⁻¹diet (RY-pTEF10⁸), basal diet supplemented with 10^6 RY g⁻¹diet (RY10⁶), and 10^8 RY g⁻¹diet (RY10⁸) 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, WT10⁶, WT10⁸, RY-pTEF10⁶, RY-pTEF10⁸ with RY10⁶ and RY10⁸ 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_____

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีเนื่องจากได้รับทุนการศึกษาเรียนดีระดับบัณฑิตศึกษาจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สุรินทร์ บุญอนันตบุตร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสทางการศึกษา ให้คำแนะนำปรึกษาด้านวิชาการแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด รวมทั้งช่วยตรวจสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รศ. ดร.ปราโมทย์ แพงคำ อ. ดร.สมร พรชื่นชูวงศ์ ผศ. นสพ. ดร.ภคนิจ คุปพิทยานันท์ และ ผศ. ดร.อมรรัตน์ โมฬี ที่ได้สละเวลามาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และกรุณาให้ความรู้ คำปรึกษาด้านวิชาการ คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ คุณสุนัย พลายมี หัวหน้างานสัตว์น้ำ ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความช่วยเหลืออำนวยความสะดวกด้านสถานที่ทำการทดลอง และให้คำปรึกษาด้านวิชาการมาโดยตลอด

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ และพี่น้องสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ทุกท่าน ที่ให้คำปรึกษาด้านวิชาการ ความช่วยเหลือระหว่างการทำวิทยานิพนธ์ และให้กำลังใจที่ดีมาโดยตลอดสำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้กับบิดา มารดาและทุกคนในครอบครัว ซึ่งเป็นที่รักและเคารพยิ่ง ตลอดจนครูอาจารย์ทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีให้แก่ผู้วิจัยตลอดมา

ชนิษฐา ดิษทัต

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ	ฎ

บทที่

1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย.....	2
1.3 สมมติฐานของงานวิจัย.....	2
1.4 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
2 ปรัชญ์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ชีววิทยาของปลาสาวย (<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>).....	3
2.1.1 ลักษณะทั่วไป.....	3
2.1.2 วงจรชีวิต	4
2.2 สถานะการเลี้ยงปลาสาวยในปัจจุบัน	4
2.3 น้ำมันปลา.....	5
2.4 กระบวนการผลิตกรดไขมัน LC-PUFA (Long chain polyunsaturated fatty acid).....	6
2.5 ชีววิทยาของยีสต์ (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	8
2.6 รีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอเทคโนโลยีในยีสต์.....	15
3 วิธีดำเนินการวิจัย	20
3.1 ปลาสาวยที่ใช้ทำการศึกษา.....	20
3.2 สถานที่ทำการทดลอง.....	20

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3	แผนการทดลองที่ 1 ผลิตภัณฑ์ <i>S. cerevisiae</i> ให้มีการผลิตเอ็นไซม์ Delta 6 Desaturase ของปลาซวาย (<i>P. hypophthalmus</i>)	20
3.3.1	การโคลน cDNA ของยีน Delta 6 desaturase	20
3.3.2	การผลิต recombinant yeast.....	28
3.3.3	การวิเคราะห์การทำงานของเอ็นไซม์ delta 6 desaturase ในยีสต์	30
3.4	แผนการทดลองที่ 2 ศึกษาผลของการเสริมยีสต์ที่มีการตัดต่อยีน Delta 6 desaturase ต่อองค์ประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง.....	31
3.4.1	การวางแผนการทดลอง	31
3.4.2	การเตรียมเซลล์ยีสต์สำหรับการนำไปผสมอาหารปลา.....	31
3.4.3	การเตรียมอาหาร	32
3.4.4	การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ.....	33
3.4.5	การเก็บข้อมูลวัดอัตราการเจริญเติบโต และอัตราการรอด	33
3.4.6	การวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยา	35
3.4.7	การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเลือด	36
3.4.8	การวิเคราะห์ค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ.....	38
3.4.9	การวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร	39
3.4.10	การวิเคราะห์ค่าองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อปลา.....	39
3.4.11	การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในเนื้อปลา.....	39
3.4.12	การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ.....	40
4	ผลการศึกษา	41
4.1	ผลการทดลองที่ 1 ผลิตภัณฑ์ <i>S. Cerevisiae</i> ให้มีการผลิตเอ็นไซม์ Delta 6 desaturase ของปลาซวาย (<i>P. hypophthalmus</i>)	41
4.1.1	ผลของการโคลน delta 6 desaturase cDNA จากปลาซวาย (<i>P. hypophthalmus</i>)	41
4.1.2	ผลของการผลิต Recombinant yeast (RY).....	43

สารบัญ (ต่อ)

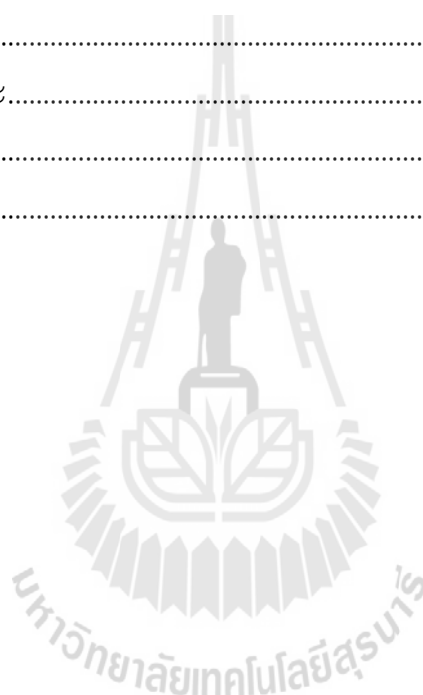
หน้า

4.1.3 ผลของการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน <i>Phy-Fad2</i> ในเซลล์ยีสต์ ด้วยวิธี Realtime PCR	44
4.1.4 ผลของการศึกษาการทำงานของเอ็นไซม์ <i>Phy-Δ6</i> ในยีสต์ RY	45
4.2 ผลการทดลองที่ 2 ศึกษาผลของการเสริมยีสต์ที่มีการตัดต่อยีน <i>Phy-Fad2</i> ในอาหารปลาสวาย.....	47
4.2.1 ผลของการเสริมในอาหารปลาสวายต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต อัตราการรอด.....	47
4.2.2 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสวายต่อองค์ประกอบทางโภชนา ในตัวปลาสวาย.....	48
4.2.3 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสวายต่อค่าโลหิตวิทยา.....	50
4.2.4 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสวายต่อค่าเคมีในเลือด.....	51
4.2.5 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสวายต่อค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ	53
4.2.6 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสวายต่อประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้	54
4.2.7 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสวายต่อกรดไขมันในกล้ามเนื้อปลา	55
4.2.8 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสวายต่อกรดไขมันในไขมันช่องท้อง ปลาสวาย.....	56
5 การอภิปรายผล.....	65
5.1 ผลการทดลองที่ 1 ผลิตยีสต์ <i>S. Cerevisiae</i> ให้มีการผลิตเอ็นไซม์ <i>Phy-Δ6</i> จากปลาสวาย (<i>P. hypophthalmus</i>)	65
5.2 ผลการทดลองที่ 2 ศึกษาผลของการเสริมยีสต์ที่มีการตัดต่อยีน <i>Delta 6</i> <i>desaturase</i> ในอาหารปลาสวาย.....	66
5.2.1 ผลต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตและอัตราการรอด	66
5.2.2 ผลต่อองค์ประกอบทางโภชนาในตัวปลาสวาย.....	68
5.2.3 ผลต่อค่าโลหิตวิทยาของปลาสวาย	68
5.2.4 ผลต่อค่าเคมีในเลือดปลาสวาย	69
5.2.5 ผลต่อค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในตัวปลาสวาย.....	70

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5.2.6 ผลต่อประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ปลาสด	71
5.2.7 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสดต่อกรดไขมันในเนื้อปลา และไขมันปลา	71
6 สรุปและข้อเสนอแนะ	73
6.1 สรุป	73
6.2 ข้อเสนอแนะ	73
เอกสารอ้างอิง	74
ประวัติผู้เขียน	82



สารบัญตาราง

ตารางที่

หน้า

2.1	ปริมาณสัตว์น้ำจืดจากการเพาะเลี้ยง จำแนกตามชนิดสัตว์น้ำ ปี 2543-2555	5
2.2	แสดงผลการเสริมยีสต์ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตในปลาชนิดต่าง ๆ	12
2.3	แสดงผลของการเสริมยีสต์ต่อระบบภูมิคุ้มกันปลาชนิดต่าง ๆ	13
2.4	แสดงผลของการเสริมยีสต์ต่อค่าโลหิตวิทยาในปลาชนิดต่าง ๆ	14
2.5	ผลของการแสดงของเอ็นไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวของ รีคอมบิแนนท์ยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ	17
3.1	โปรแกรมที่ใช้ในการศึกษา	22
3.2	การจัดกลุ่มการทดลอง	31
3.3	ปริมาณวัตถุดิบที่ใช้ในการทำอาหารปลา	32
3.4	องค์ประกอบทางเคมีในอาหารปลาที่ใช้ในการทดลอง	33
3.5	แสดงคุณภาพน้ำในระหว่างการทดลอง	33
4.1	แสดงผลของความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>Phy-Fad2</i> ของปลาสาวยกับของปลาชนิดอื่น ๆ	43
4.2	แสดงผลของความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>Phy-Fad2</i> ของปลาสาวยกับปลาชนิดอื่น ๆ	43
4.3	แสดงองค์ประกอบของกรดไขมันเมื่อได้รับ C18 : 2n6 เป็นสารตั้งต้น	45
4.4	แสดงองค์ประกอบของกรดไขมันเมื่อได้รับ C18 : 3n3 เป็นสารตั้งต้น	46
4.5	ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสาวยต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต และอัตราการรอดที่ระยะเวลาการเลี้ยง 60 วัน และ 120 วัน (Mean±SD)	48
4.6	ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสาวยต่อค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 60 วันและ 120 วัน (Mean±SD)	53
4.7	ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสาวยต่อประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 60 วันและ 120 วัน (Mean±SD)	55
4.8	ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสาวยต่อกรดไขมันในกล้ามเนื้อปลา ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 60 วัน (Mean±SD)	57

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่

หน้า

4.9 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสดต่อกรดไขมันในกล้ามเนื้อปลา ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 120 วัน (Mean±SD)	59
4.10 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสดต่อกรดไขมันในไขมันปลาในช่องท้อง ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 60 วัน (Mean±SD)	61
4.11 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสดต่อกรดไขมันในไขมันปลาในช่องท้อง ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 120 วัน (Mean±SD)	63



สารบัญภาพ

ภาพที่

หน้า

2.1	สัดส่วนการการส่งออกปลาสดของไทย	5
2.2	แสดงกลไกการสังเคราะห์กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูง	7
2.3	ส่วนประกอบภายในเซลล์ยีสต์.....	9
2.4	การเจริญของเซลล์ยีสต์.	10
2.5	ส่วนประกอบของ p427TEF Yeast expression vector	16
3.1	แผนภาพพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM [®] -T Easy (A) และลำดับนิวคลีโอไทด์และ Multi Cloning site ของพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM [®] -T Easy (B) (Promega).....	24
3.3	ช่อง hemocytometer chamber ที่ใช้นับจำนวนเม็ดเลือด	35
3.6	ปริมาตรเลือดทั้งหมด และปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่นใน microhematocrit capillary tube ที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงแล้ว	13
4.1	แสดงผลของขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน <i>Phy-Fad2</i> ที่ผ่านการทำ PCR และ ตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis.....	41
4.2	แสดงผลของการตรวจสอบการสักคพลาสมิดด้วย PCR และตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis.....	42
4.3	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>Phy-Fad2</i> ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 1,338 bp.....	42
4.4	แสดงลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>Phy-Fad2</i> ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนทั้งหมด 445 กรดอะมิโน	42
4.5	แสดงผลของการตรวจสอบความเป็นรีคอมบิแนนท์ยีสต์ ด้วย PCR และ ตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis.....	44
4.6	แสดงปริมาณการแสดงออกของยีน <i>Phy-Fad2</i> ในเซลล์ยีสต์ <i>S. cerevisiae</i>	44
4.7	ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสดต่อองค์ประกอบทางโภชนา (wet weight) ในตัวปลาสดที่ระยะเวลาการเลี้ยง 60 วัน (Mean±SD)	49
4.8	ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสดต่อองค์ประกอบทางโภชนา (wet weight) ในตัวปลาสดที่ระยะเวลาการเลี้ยง 120 วัน (Mean±SD)	49

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่

หน้า

4.9 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสดต่อค่าโลหิตวิทยาที่ระยะเวลา การเลี้ยง 60 วัน (Mean±SD).....	50
4.10 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสดต่อค่าโลหิตวิทยาที่ระยะเวลา การเลี้ยง 120 วัน (Mean±SD).....	51
4.11 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสดต่อค่าเคมีในเลือดที่ระยะเวลา การเลี้ยง 60 วัน (Mean±SD).....	52
4.12 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสดต่อค่าเคมีในเลือดที่ระยะเวลา การเลี้ยง 120 วัน (Mean±SD).....	52



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

กรดไขมันที่จำเป็นจัดเป็นอาหารที่มีคุณค่าที่พบมากในน้ำมันปลาโดยเฉพาะปลาทะเลหลายชนิด เช่น ปลาทูน่า ปลาแซลมอน ปลาซาร์ดีน ปลากะตัก ปลาแฮร์ริง ปลาทู ปลาทูน่า เป็นต้น โดยชนิดของกรดไขมันที่จำเป็นในกลุ่มโอเมก้า 3 คือ Eicosapentaenoic acid (EPA) และ Docosahexanoic acid (DHA) ปัจจุบันน้ำมันปลาได้มีการนำมาผลิตเป็นอาหารเสริมที่เป็นที่ต้องการอันดับต้น (ConsumerLab.com, 2011) แต่อย่างไรก็ตามการนำน้ำมันปลาไปใช้ในการผลิตเป็นอาหารเสริมสำหรับมนุษย์นั้นประสบปัญหาการปนเปื้อนสารปรอท (Hg) เพราะน้ำมันปลาที่ผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารส่วนใหญ่มาจากปลาทะเลขนาดใหญ่ เช่น ปลาค็อด ปลาทูน่า ปลาแซลมอน แต่เพราะปลาทะเลขนาดใหญ่เหล่านี้อยู่บนสุดของห่วงโซ่อาหารทางทะเล จึงมีความเป็นไปได้ที่จะสะสมและปนเปื้อนสารที่เป็นพิษ เนื่องจากน้ำทะเลหลายแห่งมีสารพิษตกค้างอยู่ในปริมาณสูง (Evers et al., 2005) และปลาที่จับได้ก็อาจมีการปนเปื้อนของสารพิษต่าง ๆ เช่น Dioxin; Methyl mercury และ polychlorinated biphenyl ซึ่งมีการรายงานพบว่าปริมาณสารปรอทในทะเลนั้นมีการปนเปื้อนสูงถึง 35% (Nicola et al., 2009) ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อสารปรอทในปลาทะเล และอาจตกค้างถึงน้ำมันปลาได้ สำหรับการผลิตน้ำมันปลาเป็นอาหารเสริมในประเทศไทยนั้นยังไม่มีข้อมูลที่แน่ชัด เพราะเนื่องจากน้ำมันปลาที่ใช้ในประเทศไทยนั้นได้มีการนำเข้าจากต่างประเทศ ดังนั้นการหาแนวทางการเพิ่มกรดไขมันที่จำเป็นให้กับปลาน้ำจืดที่มีการสะสมไขมันในร่างกายสูงโดยใช้เทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะเพิ่มปริมาณกรดไขมันที่จำเป็นในปลาน้ำจืดเพื่อนำไปสู่การผลิตน้ำมันปลาสำหรับใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับมนุษย์ได้ และสำหรับปลาน้ำจืดที่มีการสะสมไขมันในร่างกายสูงนั้นพบว่าปลาซิว (Striped catfish Tra catfish Basa catfish Swai Creamy Dory) เป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งที่มีการสะสมไขมันในเนื้อปลาในปริมาณที่สูงถึง 2.55 กรัม/100 กรัมน้ำหนักเนื้อปลาสด นอกจากนี้ยังพบว่าปลาซิวมีการสะสมกรดไขมันที่จำเป็นทั้ง EPA และ DHA มีปริมาณสูงถึง 0.76 มิลลิกรัม และ 10.00 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักเนื้อปลาสด ตามลำดับ (Ho et al., 2009)

ปัจจุบันมีการศึกษาถึงบทบาทและหน้าที่ของยีน Delta 6 desaturase ในสัตว์ซึ่งมีผลต่อการผลิตเอ็นไซม์ Delta 6 desaturase ซึ่งใช้ในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันที่จำเป็นในกลุ่มโอเมก้า 3 และโอเมก้า 6 โดยมีการศึกษาในปลา gilthead seabream พบว่า เมื่อมีการสะสมกรดไขมันที่จำเป็น

ในเนื้อปลาสูงชัน มีผลทำให้ยีน Delta 6 desaturase มีการแสดงออกที่สูงตามไปด้วย (Seiliez et al., 2003) ดังนั้นจึงมีแนวทางในการใช้ประโยชน์ของยีน Delta 6 desaturase ในปลาสาวยโดยการโคลน ยีน Delta 6 desaturase และผลิตรีคอมบิแนนต์ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) เพื่อให้ยีสต์มีการ ผลิตเอ็นไซม์ Delta 6 desaturase และเข้าสู่กระบวนการการสังเคราะห์กรดไขมันที่จำเป็น เพื่อเป็น การเพิ่มการสะสมกรดไขมันที่จำเป็นในปลาสาวยต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อผลิตรีคอมบิแนนต์ยีสต์ *S. cerevisiae* ที่มีความสามารถในการผลิตเอ็นไซม์ Delta 6 desaturase ของปลาสาวย

1.2.2 เพื่อศึกษาผลของการเสริมรีคอมบิแนนต์ยีสต์ที่ระดับต่าง ๆ ในอาหารปลาสาวยต่อ องค์ประกอบของกรดไขมันในเนื้อปลาสาวยที่บริโภคอาหารผสมรีคอมบิแนนต์ยีสต์

1.3 สมมติฐานของงานวิจัย

1.3.1 เมื่อนำยีน Delta 6 desaturase ที่ได้จากปลาสาวยมาตัดต่อพันธุกรรมเข้าสู่ยีสต์ *S. cerevisiae* แล้ว ยีสต์สามารถผลิตเอ็นไซม์ Delta 6 desaturase

1.3.2 เมื่อนำยีสต์ที่มีการผลิตเอ็นไซม์ Delta 6 desaturase มาเสริมในอาหารปลาสาวยแล้ว ปลาสาวยมีการสะสมของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเพิ่มขึ้น

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้มุ่งเน้นที่จะทำการโคลน cDNA ของยีน delta 6 desaturase จากปลาสาวย และนำมาเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ p427TEF Yeast expression vector จากนั้นทำการถ่ายโอน เข้าสู่ยีสต์ *S. cerevisiae* แล้วจึงนำยีสต์ดังกล่าวไปเสริมในอาหารปลาสาวยเพื่อดูองค์ประกอบของ กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในเนื้อปลาสาวย

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลการศึกษาวิจัยในครั้งนี้คาดว่าจะได้เป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการผลิตสัตว์น้ำ โดยทำ ให้ได้ยีสต์ *S. cerevisiae* ที่มีการแสดงออกของเอ็นไซม์ Delta 6 desaturase เพื่อนำไปใช้ในอาหาร สัตว์น้ำซึ่งจะมีผลทำให้มีการสะสมกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในสัตว์น้ำเพิ่มสูงขึ้น

บทที่ 2

ปรัทัศนัวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชีววิทยาของปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*)

ปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*) เป็นปลาน้ำจืดประเภทไม่มีเกล็ด เช่นเดียวกับ ปลาเทโพ ปลาเทพาและสังกะวาด เป็นปลาที่มีขนาดใหญ่มาก รองจากปลาบึก ขนาดใหญ่ที่สุดมีความยาว ถึง 150 เซนติเมตร ปลาชนิดนี้มีพบในแถบ ประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว กัมพูชา เวียดนามและไทย ปลาสวายเป็นปลาที่มีบทบาทสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศอีกชนิดหนึ่ง ในการเลี้ยงปลาเป็นอาชีพ ปลาสวายเป็นปลาอีกชนิดหนึ่งที่ได้รับคามนิยมในการเลี้ยงอย่างกว้างขวาง สามารถเลี้ยงได้ทั้งในบ่อ ในกระชัง และเลี้ยงได้ทั้งชนิดเดี่ยว หรือเลี้ยงรวมกันกับปลาชนิดอื่น เช่น ปลาดุกเพียน ปลานิล นับว่าเป็นปลาที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่ง เพราะปลาสวายเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว และไม่ค่อยมีโรคพยาธิเบียดเบียนเช่นปลาอื่น ๆ นอกจากนั้นยังเป็นปลาที่กินอาหารได้เกือบทุกชนิด แม้เศษอาหารจากร้านค้าครัวเรือนหรือมูลสัตว์ เช่น มูลไก่ มูลสุกร ฯลฯ ก็ใช้เป็นอาหารปลาสวายได้เป็นอย่างดีอีกทั้งปลาสวายเนื้อมีรสดีมีปริมาณมากสามารถปรุงแต่งเป็นอาหาร ได้หลายแบบหลายรส (ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดพะเยา สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์) โดยอนุกรมวิธานของปลาสวายเป็นดังนี้

อนุกรมวิธานของปลาสวาย *P. hypophthalmus* (Taxonomy)

ไฟลัม (Phylum) : Chordata

ชั้น (Class) : Actinopterygii

อันดับ (Order) : Siluriformes

วงศ์ (Family) : Pangasiidae

สกุล (Genus) : *Pangasianodon*

สปีชีส์ (Species) : *P. hypophthalmus*

2.1.1 ลักษณะทั่วไป

ปลาสวายมีรูปร่างค่อนข้างเรียวยาว หัวค่อนข้างกว้าง แต่ไม่แบนมากนัก ปากอยู่ต่ำ กว้างหุบมีตาขนาดเล็กมีหนวด 2 คู่ คือ หนวดขากรรไกรบน 1 คู่ และหนวดขากรรไกรล่าง 1 คู่ ซึ่งหนวดคู่แรกมีความกว้างกว่าหนวดคู่ที่ 2 เส้นข้างตัวมีลักษณะเป็นเส้นสมบูรณ์ ส่วนสัคของลำตัวที่สำคัญ ๆ

คือ ความยาวสุดของลำตัวประมาณ 4 เท่าครึ่งของ ความยาวส่วนหัว ส่วนความยาวมาตรฐานลำตัว ยาวประมาณเกือบ 4 เท่าครึ่งของความกว้างลำตัว ครีบหลังมีก้านแข็ง 1 ก้าน มีลักษณะฟันเลื่อย และ มีก้านแขนง 6 ก้าน มีครีบไขมันขนาดเล็กอยู่ระหว่างครีบหลังและครีบหาง ครีบกันมีก้านแข็ง 4 ก้าน และก้านแขนง 30-32 ก้าน ครีบหูมีก้านแข็ง 1 ก้าน และก้านแขนง 6 ก้าน ลักษณะภายในที่สำคัญ มีซี่เหงือก 20 ซี่ มีฟันซี่เล็ก ๆ เรียงเป็นแถวบนขากรรไกรบนทั้ง 2 คู่ มีฟันบนเพดานเรียงเป็น 2 แถว ปลาสวายที่แก่เต็มวัยจะมีลำตัวเป็นสีเทาดำบริเวณด้านหลังและมีสีขาวบริเวณตั้งแต่ด้านข้างของลำตัว จากส่วนหน้าถึงโคนหางขนานไปกับเส้นข้างตัวทั้งด้านบนและด้านล่างทำให้แลดู สวขงามมาก (Gustiano et al., 2003)

2.1.2 วงจรชีวิต

ปลาสวายตัวผู้มีท้องเรียบไม่นูนพื้นที่ท้องแข็งกว่าตัวเมีย ลักษณะช่องเพศเป็นรูปวงรี แคบ เล็ก มีสีแดงอ่อน เมื่อใช้มือบีบที่ช่องเพศเบา ๆ จะมีน้ำเชื้อสีขาวไหลออกมาให้เห็นได้ชัด ส่วนตัว-เมียมีลักษณะที่พอจะสังเกตได้ชัด คือบริเวณส่วนท้องอูมเป่ง กลมนูนออกมาเห็นได้ถนัด พื้นที่ท้องมี ผิวเนียนนึ่ม ลักษณะของช่องเพศ เป็นรูปรีมีขนาดกว้างใหญ่กว่าของตัวผู้ นอกจากนั้นตรงบริเวณ ช่องเพศยังมีลักษณะพองเป่งปรากฏเป็นสีแดงเข้มฤดูและแหล่งวางไข่ ปลาสวายจะวางไข่ตามแหล่ง น้ำธรรมชาติในบริเวณที่มีน้ำท่วมในฤดูน้ำมาก ซึ่งอยู่ในช่วงเดือนมีนาคมถึงเดือนพฤษภาคม ไข่ ปลาสวายจะฟักออกเป็นตัวในระยะเวลา 27-33 ชั่วโมงหลังจากวางไข่ ที่อุณหภูมิ 28-31 องศา เซลเซียส

2.2 สถานะการเลี้ยงปลาสวายในปัจจุบัน

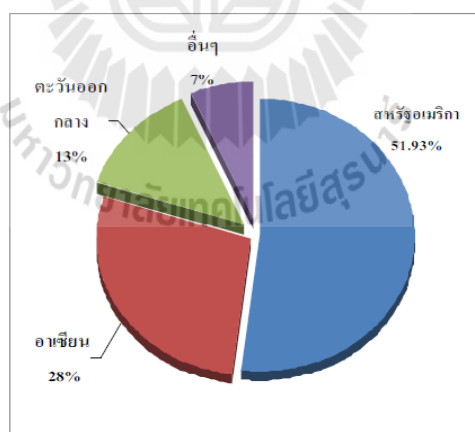
ประมาณการผลิตปลาสวายที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแนวโน้มนับที่สูงขึ้นอย่างต่อเนื่องไทยซึ่ง พบว่าตั้งแต่ปี พ.ศ. 2543 จนถึงปี พ.ศ. 2555 ปริมาณการผลิตปลาสวายมีแนวโน้มที่สูงขึ้นเพื่อ ตอบสนองความต้องการของตลาด (ตารางที่ 2.1) โดยมีตลาดการส่งออกปลาสวายหลักคือ ประเทศ สหรัฐอเมริกา รองลงมาคือกลุ่มประเทศในอาเซียนและตะวันออกกลาง เช่น ประเทศลาว กัมพูชา สิงคโปร์ พม่า ซาอุดีอาระเบีย คูเวต และสหรัฐอเมริกาบริติช (ภาพที่ 2.1) ในส่วนการนำเข้าไทย นำเข้าจากเวียดนามและจากประเทศออสเตรเลีย จุดประสงค์การนำเข้าส่วนหนึ่งเพื่อบริโภคใน ประเทศ และมีการนำมาแปรรูปเพื่อส่งออกต่อไปในรูปผลิตภัณฑ์ปลาสวาย เช่น ปลาสวายฟิลเล่ แห้งแข็ง อย่างไรก็ตามพบว่าประเทศเวียดนามยังเป็นผู้ผลิตรายสำคัญในสินค้าปลาสวายและ ผลิตภัณฑ์ คาดว่าผลผลิตปลาสวายจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเนื่องจากรัฐบาลเวียดนามมีการวางแผนขยาย การลงทุนเพื่อการเพาะเลี้ยงซึ่งจะมีผลต่อราคาปลาสวายทำให้มีแนวโน้มลดลง อย่างไรก็ตามคาดว่า ปลาสวายจะเป็นสินค้าหลักในตลาดปลาทั่วโลกและจะมีอิทธิพลต่อราคาปลาเนื้อขาวชนิดอื่น ๆ อย่างแน่นอน อีกทั้งยังพบว่า ผลผลิตปลาสวายจากประเทศจีนมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นแต่ยังมีการ

เพาะเลี้ยงน้อยกว่าปลานิล ผลผลิตส่วนใหญ่ใช้บริโภคภายในประเทศและมีการส่งออกน้อย การส่งออกกว่า 90% ไปยังสหรัฐฯ และเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดฟิเล่

ตารางที่ 2.1 ปริมาณสัตว์น้ำจืดจากการเพาะเลี้ยง จำแนกตามชนิดสัตว์น้ำ ปี 2543-2555

ปริมาณ (Unit) : 1,000 ตัน (Ton)

ปี Year	รวม Total	ปลา Fish									กุ้ง Giant prawn	สัตว์น้ำ อื่นๆ Others
		รวมปลา Sub-Total fish	ปลานิล Nile tilapia	ปลาไน Common carp	ปลาตะเพียน Common silver barb	ปลาสลิค Snake skin gourami	ปลาคูก Walking catfish	ปลาช่อน Striped snake- head fish	ปลาสร้อย Striped catfish	ปลาอื่นๆ Other fish		
2543 (2000)	271.0	259.7	82.4	5.5	46.3	21.6	76.0	4.4	13.2	10.3	9.9	1.4
2544 (2001)	279.7	262.8	84.5	4.8	42.2	22.5	77.9	6.8	14.6	9.5	13.3	3.6
2545 (2002)	294.5	275.1	83.8	5.1	44.2	24.2	86.5	5.5	14.8	11.0	15.4	4.0
2546 (2003)	361.1	329.0	98.3	4.5	49.1	34.1	101.6	4.1	23.1	14.2	28.1	4.0
2547 (2004)	523.7	486.4	160.2	6.1	66.8	35.3	159.3	10.2	30.7	17.8	32.6	4.7
2548 (2005)	539.4	506.3	203.7	5.0	60.6	35.9	142.2	12.3	26.5	20.1	28.7	4.4
2549 (2006)	527.4	498.3	205.3	4.5	55.0	36.9	146.5	9.1	22.5	18.5	25.4	3.7
2550 (2007)	525.1	489.1	213.8	4.1	56.3	34.0	136.6	8.1	21.0	15.2	32.1	3.9
2551 (2008)	522.5	485.1	217.2	4.1	54.3	28.5	136.5	8.3	21.5	14.7	33.2	4.2
2552 (2009)	521.9	490.1	221.0	3.1	47.2	34.2	130.1	7.8	30.2	16.5	26.8	5.0
2553 (2010)	496.6	469.5	204.7	2.4	42.0	34.4	140.8	4.3	27.0	13.9	22.4	4.7
2554 (2011)	384.4	358.8	155.5	2.2	30.4	33.3	100.9	3.8	20.7	12.0	21.1	4.5
2555 (2012)	454.3	431.2	203.0	1.9	33.3	26.8	124.5	4.1	25.9	11.7	18.7	4.4



ภาพที่ 2.1 สัดส่วนการส่งออกปลาสวายของไทย

ที่มา : ส่วนตรวจการค้าสัตว์น้ำ สำนักบริหารจัดการด้านการประมง

2.3 น้ำมันปลา

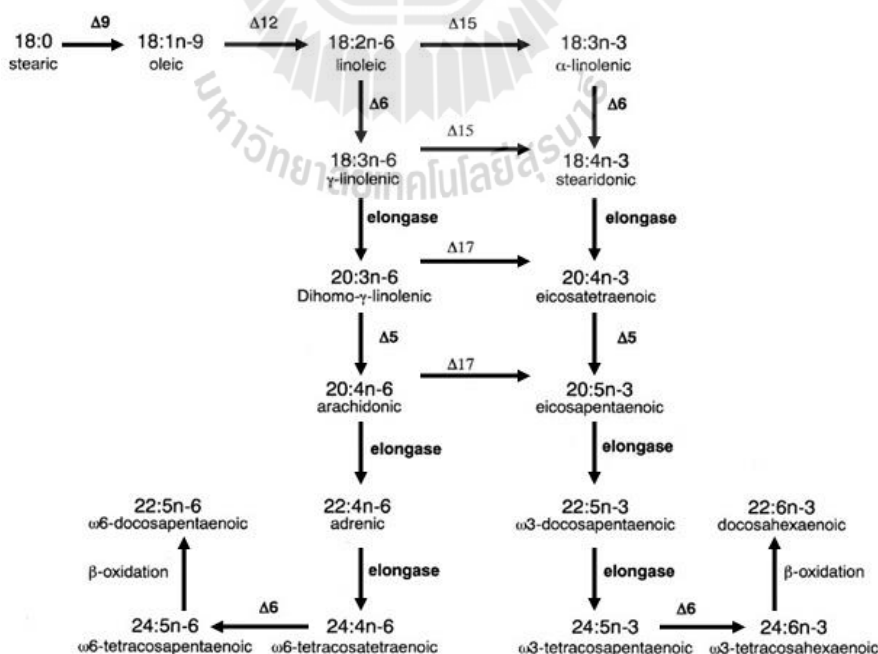
น้ำมันปลาซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีหลายพันธะคู่ (polyunsaturated fatty acid) น้ำมันปลาสกัดจากเนื้อ หัวและหางของปลาทะเลซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่

เป็นที่นิยมและมีจำหน่ายทั่วโลก โดยพบว่าน้ำมันปลาได้ถูกนำมาใช้บริโภคโดยตรงประมาณ 13% ของการใช้น้ำมันปลาทั้งหมด (IFFO/WHO, 2011) น้ำมันปลามีส่วนประกอบสำคัญเป็นการไขมันกลุ่มโอเมก้า 3 ได้แก่ EPA และ DHA การรับประทาน EPA และ DHA ซึ่งเป็นกรดไขมันที่ร่างกายสร้างเองไม่ได้ มีผลดีต่อสุขภาพในการป้องกันโรคเกี่ยวกับหัวใจและหลอดเลือด โดยร่างกายใช้ EPA เป็นหนึ่งในสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารไอโคซานอยด์ (eicosanoids) ซึ่งเป็นกลุ่มสารเคมีที่มีคุณสมบัติคล้ายฮอร์โมนที่ออกฤทธิ์เฉพาะที่ (local hormone) (สมพงษ์, 2538) บางชนิดทำหน้าที่ดูแลการทำงานของเซลล์เม็ดเลือด ช่วยทำให้กล้ามเนื้อของหลอดเลือดหดตัวขยายตัว บางชนิดทำงานสร้างอาการอักเสบต่าง ๆ เพื่อใช้เป็นกลไกป้องกันร่างกาย สารกลุ่มนี้มีส่วนเกี่ยวข้องในการควบคุมระบบการแข็งตัวของเลือด การหดตัวของหลอดเลือด และการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ ซึ่งเป็นกลุ่มกล้ามเนื้อที่อยู่ตามอวัยวะต่าง ๆ ของร่างกาย (Caterina et al., 2001; วินัย, 2538) มีการศึกษาหาวิธีการที่เพิ่มกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงในเนื้อปลา โดยการหาแหล่งของอาหารที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง เพื่อใช้เสริมในอาหารสัตว์ต่างๆ จากการศึกษาการสะสมกรดไขมันในปลานิล โดยการใช้ น้ำมันเมล็ดป่าน (Flaxseed oil) ที่ระดับ 0 1.25 2.50 3.75 และ 5.00 เปอร์เซ็นต์ เสริมในอาหารปลา พบว่าการใช้น้ำมันเมล็ดป่าน มีการสะสมของกรดไขมัน EPA DHA และ Alfa-linolenic acid เพิ่มขึ้น ($P < 0.05$) ตามระดับการเสริมน้ำมันเมล็ดป่านที่เพิ่มขึ้นในอาหาร (Aguiar et al., 2007) นอกจากการหาแหล่งอาหารที่มีผลต่อการเพิ่มกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงแล้ว ยังมีการศึกษาถึงปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการสะสมกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงพบว่า กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงเหล่านี้สามารถสะสมเพิ่มสูงขึ้นได้เมื่อมีการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงนี้มีการทำงานเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งพบว่าเอนไซม์ Delta 6 desaturase นี้จึงเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อกระบวนการการสังเคราะห์กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูง โดยมีการศึกษาพบว่าปลาที่มีการสะสมกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูง มีผลทำให้การแสดงออกของเอนไซม์ Delta 6 desaturase สูงขึ้นตามไปด้วย (Ram et al., 2008)

2.4 กระบวนการผลิตกรดไขมัน LC-PUFA (Long chain polyunsaturated fatty acid)

กลไกการสังเคราะห์กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงจะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม เป็นกรดไขมันในกลุ่ม n6 มีกรดไขมันต้นแบบคือ Linoleic acid และกลุ่ม n3 มีกรดไขมันต้นแบบคือ α -Linolenic acid ในการสังเคราะห์กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวในเนื้อเยื่อของสัตว์ เริ่มแรกเอนไซม์ Delta 6-desaturase จะเข้าไปเปลี่ยน Linoleic acid ได้ Grama-linolenic acid (GLA) ต่อจากนั้นจะเข้าสู่ elongase system ซึ่งจะมีการเติมคาร์บอนเข้าไป 2 ตัว ทำให้เกิดสังเคราะห์ Dihomo grama -linolenic acid (DGLA) ส่วนกรดไขมันในกลุ่ม n3 เริ่มแรกเอนไซม์ Delta 6-desaturase จะเข้าไปเติมพันธะคู่ α -Linolenic acid ได้ Stearidonic acid (STA) ต่อจากนั้นจะเข้าสู่ Elongase system ซึ่งจะมีการเติมคาร์บอนเข้า

ไป 2 ตัว ทำให้เกิดสังเคราะห์ Eicosatetraenoic acid (ETA) หลังจากเอนไซม์ delta 5-desaturase จะเข้าไปเปลี่ยน DGLA และ ETA จะได้ Arachidonic acid (AA) และ Eicosapentaenoic acid (EPA) ตามลำดับ ต่อจากนั้นจะเข้าสู่กระบวนการ Elongation โดยมีการเติมคาร์บอนเข้าไป 2 ตัว ซึ่งจะมีการสังเคราะห์ n3 Docosapentaenoic acid (DPA) เกิดขึ้น และ DPA จะถูกเติมพันธะคู่ด้วยเอนไซม์ Delta 4 desaturase ทำให้ได้ DHA และในปัจจุบันได้มีทางเลือกอีกทางที่จะสามารถสังเคราะห์ DHA ได้ โดยมีกระบวนการ Elongation 2 steps จาก EPA ไปยัง DPA และจาก DPA ไปยัง n3 Tetracosapentaenoic acid (TPA) หลังจากนั้น TPA จะถูกเติมพันธะคู่ด้วยเอนไซม์ Delta 6 desaturase ได้ n3 Tetracosahexaenoic acid (THA) และในที่สุด THA ก็จะเปลี่ยนกลับไปเป็น DHA โดยกระบวนการ β -oxidation ใน peroxisome ส่วนกรดไขมันในกลุ่ม n6 ก็เช่นเดียวกัน AA จะเข้าสู่กระบวนการ Elongation โดยมีการเติมคาร์บอนเข้าไป 2 ตัว ซึ่งจะมีการสังเคราะห์ Adrenic acid (ADA) เกิดขึ้นและ ADA จะถูกเติมพันธะคู่ด้วยเอนไซม์ Delta 4 desaturase ทำให้ได้ n6 Docosapentaenoic acid (DPA) และได้มีทางเลือกอีกทางที่จะสามารถสังเคราะห์ DPA ได้ โดยมีกระบวนการ Elongation 2 steps จาก AA ไปยัง ADA และจาก ADA ไปยัง n6 Tetracosatetraenoic acid (TTA) หลังจากนั้น TTA จะถูกเติมพันธะคู่ด้วยเอนไซม์ Delta 6 desaturase ได้ n6 Tetracosapentaenoic acid (TPA) และสุดท้าย TPA ก็จะเปลี่ยนกลับไปเป็น DPA โดยกระบวนการ β -oxidation เหมือนกัน (Pereira et al., 2003) ดังแสดงในภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2 แสดงกลไกการสังเคราะห์กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูง

ที่มา : Pereira et al., 2003

2.5 ชีววิทยาของยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*)

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์พวุกยูคาริโอต มีการดำรงชีวิตเป็นเซลล์เดี่ยว (unicellular form) มีรูปหลายแบบ คือ กลม (round, spheroidal, spherical) รี (ellipsoidal) รูปไข่ (oval และ ovoidal) รูปเลมมอน (apiculate) สามเหลี่ยม (triangular) ยาว (elongated) และเป็นสาย (filamentous) ขนาดของยีสต์แตกต่างกันในแต่ละชนิด ในยีสต์ที่ได้มีการศึกษานั้น *Saccharomyces cerevisiae* เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างรี ความกว้างประมาณ 1-7 ไมโครเมตร และความยาวของเซลล์ 5-10 ไมโครเมตร (Schulze et al., 1995) อนุกรมวิธานของยีสต์ *S. cerevisiae* มีดังนี้

อนุกรมวิธานของยีสต์ *S. cerevisiae* (Taxonomy)

ไฟลัม (Phylum) : Ascomycota

ชั้น (Class) : Hemiascomycetes

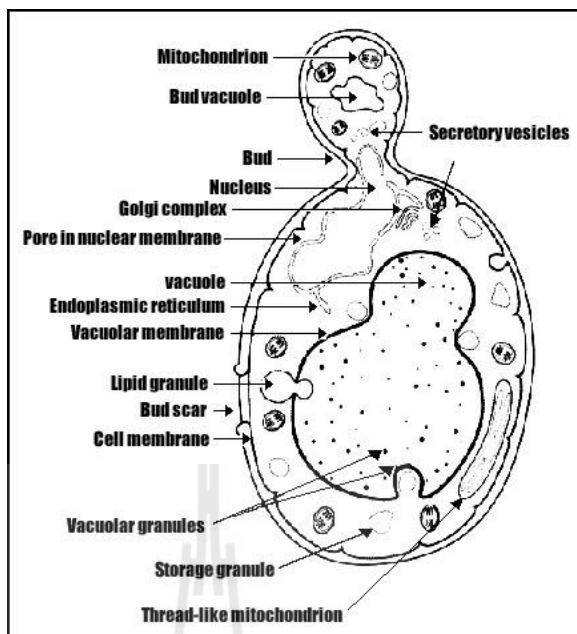
อันดับ (Order) : Saccharomycetales

วงศ์ (Family) : Saccharomycetaceae

สกุล (Genus) : *Saccharomyces*

สปีชีส์ (Species) : *Saccharomyces cerevisiae*

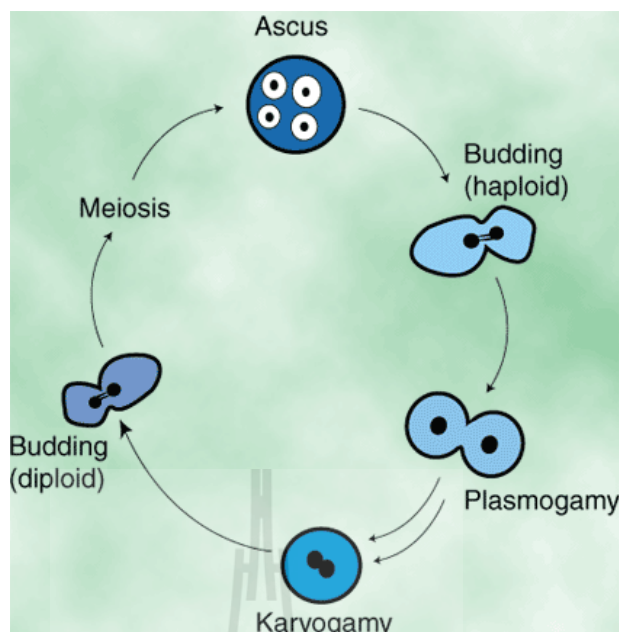
เซลล์ยีสต์ประกอบด้วยโครงสร้างต่าง ๆ เช่น ผนังเซลล์ (Cell wall) ส่วนใหญ่เป็นกลูแคน (Glucan) และแมนแนน (Mannan) เยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) ส่วนใหญ่เป็นพอลิเมอร์ไขมันและโปรตีน คาร์โบไฮเดรตในปริมาณเล็กน้อย มีบางส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ที่ยื่นเข้าไป (Invagination) ในไซโทพลาสซึม นิวเคลียส (Nucleus) มีรูปร่างกลมรี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5 ไมโครเมตร จะเห็นนิวเคลียสของยีสต์ได้ในเซลล์ที่กำลังมีการแตกหน่อ ไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) มีรูปร่างกลมหรือรูปท่อนหน้าที่สำคัญของไมโทคอนเดรียคือ การสร้างพลังงานในรูปของ ATP จากการหายใจในสภาวะที่มีออกซิเจน เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (Endoplasmic reticulum) เป็นโครงสร้างภายในไซโทพลาสซึม มีหน้าที่ช่วยในช่วงเริ่มต้นของการแตกหน่อโดยการสร้างเวสิเคิล (Vesicle) ที่บรรจุเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ และองค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์แวคิวโอล (Vacuole) ขนาดของแวคิวโอลเปลี่ยนแปลงตามการเจริญของเซลล์ ทำหน้าที่คล้ายไลโซโซม (Lysosome) ในการย่อยโปรตีนทั่ว ๆ ไปในเซลล์ไซโทพลาสซึม (Cytoplasm) เป็นของเหลวที่มีลักษณะคล้ายวุ้นและมีความเป็นกรด ส่วนที่พบแขวนลอยอยู่ในไซโทพลาสซึมคือ ไมโครบอดี (Microbody) ไรโบโซม (Ribosome) โปรทีโอโซม (Proteasome) อนุภาคลิพิด (Lipid particle) (สาวิตรี, 2549)



ภาพที่ 2.3 ส่วนประกอบภายในเซลล์ยีสต์

ที่มา : www.bakeinfo.co.nz/school/images/yeast.

การเจริญของเซลล์ยีสต์เกิดโดยการเพิ่มขนาดจนถึงขนาดที่เหมาะสม (Critical size) เซลล์จะมีการแบ่งเพิ่มจำนวน ในระหว่างนั้นนิวเคลียสมีการแบ่งแบบไมโทซิส การสังเคราะห์ไซโทพลาสซึม และออร์แกเนลล์ต่าง ๆ เกิดขึ้น การแบ่งเซลล์ของยีสต์ซึ่งเป็นการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศ ส่วนใหญ่เกิดโดยการแตกหน่อ (Budding) ฟิวชั่น (Fission) การเพิ่มจำนวนแบบนี้เกิดโดยการที่เซลล์ขยายออกตามยาว และออร์แกเนลล์ต่าง ๆ รวมทั้งนิวเคลียสและไซโทพลาสซึมเพิ่มเป็นสองเท่า จากนั้นมีการสร้างผนังกั้นขวาง (Septum หรือ Cross wall) แบ่งเซลล์ออกเป็น 2 ส่วนเท่า ๆ กัน และท้ายที่สุดแบ่งเป็น 2 เซลล์ ปกติการเพิ่มจำนวนจะเกิดในสถานะที่เหมาะสมเท่านั้น ในกรณีของ *S. cerevisiae* ถ้ามีอาหารเพียงพอจะเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าภายในระยะเวลาสั้น และถ้าอาหารหมดลงยีสต์นั้นจะเข้าสู่ระยะที่ไม่มีการแตกหน่อซึ่งเป็นระยะที่เซลล์ยังคงมีชีวิต แต่เมื่อกลับมาอาหารขึ้นมากเซลล์ก็สามารถเจริญได้ต่อไป (Sherman et al., 2002)



ภาพที่ 2.4 การเจริญของเซลล์ยีสต์

ที่มา : www.sparknotes.com/.../fungi/section2.rhtml

ยีสต์ (*S. cerevisiae*) เป็นจุลินทรีย์ที่จัดอยู่ในกลุ่มที่มีประโยชน์ต่อร่างกายของมนุษย์และสัตว์ซึ่งในปัจจุบันนี้ได้มีการนำยีสต์มาเป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ ยีสต์เป็นแหล่งโปรตีนที่เราเรียกว่า โปรตีนเซลล์เดี่ยว (Single cell protein) เนื่องจากมีโปรตีนทั้งหมดคปริมาณสูงและมีการดะมิโนจำเป็นครบถ้วน โดยเฉพาะมีไลซีนปริมาณสูง นอกจากนั้นเซลล์ของยีสต์ยังประกอบด้วยเกลือแร่หลายชนิด เช่น โครเมียม ซีลีเนียม โมลิบดีนัม และสังกะสี รวมทั้งวิตามินหลายชนิดโดยเฉพาะวิตามินบีรวม ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อสัตว์ ยิ่งกว่านั้นยีสต์ยังมีรสชาติดี ช่วยเพิ่มความน่าบริโภคของอาหาร และอีกในแง่หนึ่งคือเป็นตัวช่วยเสริมสุขภาพของสัตว์หรือที่เราเรียกว่าเป็น โปรไบโอติก (Probiotic) ให้กับสัตว์เลี้ยง ซึ่งจะทำให้สัตว์แข็งแรง มีภูมิต้านทานโรคสูงขึ้น (Jonewell et al., 1993)

มีการศึกษาถึงผลของการเสริมยีสต์ *S. cerevisiae* ต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโต ซึ่งพบว่าเมื่อมีการเสริมยีสต์ที่ระดับ 0 1 1.5 และ 2% ในสูตรอาหารปลา African catfish พบว่าที่ระดับ 2% มีผลทำให้ Final weight มีค่าสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และมีผลทำให้ค่า FCR มีต่ำที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (Essa et al., 2011) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในปลานิลโดยการเสริมยีสต์ที่ระดับ 0 0.25 0.5 1 2 และ 5% ในสูตรอาหาร พบว่าเมื่อมีการเสริมยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ระดับ 5% ในสูตรอาหารมีผลทำให้ประสิทธิภาพการเจริญเติบโตสูงกว่าอาหาร

ควบคุมและการเสริมยีสต์ที่ระดับอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (Tawwab et al., 2008) และการศึกษาการเสริมยีสต์ที่ระดับ 0 1 และ 2% ในสูตรอาหารพบว่า การเสริมยีสต์ที่ระดับ 2% ในสูตรอาหารมีผลทำให้ปลา Beluga มีประสิทธิภาพการเจริญเติบโตสูงกว่าอาหารควบคุมและสูงกว่าการเสริมยีสต์ที่ระดับอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (Hoseinifar et al., 2011) ดังที่แสดงในตารางที่ 2.2

นอกจากนี้ในส่วนของการเสริมยีสต์ *S. cerevisiae* ต่อระบบภูมิคุ้มกันโดยทำการเสริมยีสต์ที่ระดับ 0 1 2 และ 4% ในสูตรอาหารพบว่า เมื่อมีการเสริมยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ระดับ 2% ในปลา Hybrid striped bass มีผลทำให้ค่า NBT test และค่า Intracellular superoxide anion ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงสุขภาพปลาที่ดีมีค่าสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (Li et al., 2003) เช่นเดียวกับการศึกษาเปรียบเทียบการใช้ยีสต์กับการใช้โปรไบโอติกทางการค้า (Grobiotic™ AE) ที่ระดับ 1% และ 2% ในสูตรอาหารพบว่าเมื่อมีการเสริมยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ระดับ 1% มีผลทำให้ค่า Extracellular superoxide anion สูงกว่า การเสริมยีสต์ที่ระดับอื่น ๆ และการเสริม Premix ทางการค้าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (Li et al., 2004) ซึ่งแสดงในตารางที่ 2.3

และการศึกษาการเสริมยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ระดับ 1% และ 2% ในสูตรอาหาร พบว่าไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า Red blood cell ค่า Hemoglobin และค่า Hematocrit อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่พบว่า ทั้งสามค่ามีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อมีการเสริมยีสต์ที่ระดับสูงขึ้น (Hoseinifar et al., 2011) และการศึกษาในปลานิลโดยการเสริมยีสต์ที่ระดับ 0 0.25 0.5 1 2 และ 5% ในสูตรอาหาร พบว่า เมื่อมีการเสริมยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ระดับ 5% มีผลทำให้ค่า Red blood cell Hemoglobin Hematocrit Albumin และค่า Globulin สูงกว่าการใช้ยีสต์ที่ระดับอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (Tawwab et al., 2008) ซึ่งแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.2 แสดงผลการเสริมยีสต์ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตในปลาชนิดต่าง ๆ

Fish	Period (day)	Species Yeast	Level	IW (g)	FW (g)	Weight Gain (g)	SGR(%/day)	FCR	Survival (%)	Ref.
African catfish <i>Clarias gariepinus</i>	186	<i>S.cerevisiae</i> (Brewer's yeast)	0%	34.26±0.41	760.2±5.1 ^d	-	-	1.39±0.05 ^a	92.96±1.06	Essa
			1%	34.26±0.40	796.1±4.5 ^c	-	-	1.32±0.05 ^{ab}	93.77±0.71	et al.
			1.5%	34.33±0.38	840.7±4.2 ^b	-	-	1.30±0.06 ^{ab}	93.93±0.49	(2011)
			2%	34.27±0.42	913.3±4.8 ^a	-	-	1.26±0.04 ^b	94.00±0.48	
Nile tilapia <i>Oreochromis niloticus</i>	84	<i>S. cerevisiae</i> (Live yeast)	0%	0.33±0.088 ^a	7.22±0.11 ^d	6.89±0.098 ^d	3.673±0.015 ^c	1.72±0.028 ^a	96.7±1.7 ^a	Tawwab
			0.25	0.34±0.033 ^a	8.00±0.06 ^c	7.66±0.061 ^c	3.760±0.019 ^{bc}	1.61±0.073 ^{ab}	95.0±2.9 ^a	et al.
			0.5	0.34±0.033 ^a	8.50±0.23 ^{bc}	8.16±0.228 ^{bc}	3.832±0.023 ^b	1.55±0.052 ^b	100.0±0.0 ^a	(2008)
			1.0	0.33±0.088 ^a	9.90±0.29 ^a	9.57±0.028 ^a	4.049±0.011 ^a	1.48±0.034 ^c	95.0±2.9 ^a	
			2.0	0.33±0.012 ^a	10.05±0.11 ^a	9.72±0.089 ^a	4.067±0.030 ^a	1.39±0.045 ^{cd}	100.0±0.0 ^a	
			5.0	0.32±0.058 ^a	10.00±0.29 ^a	9.68±0.294 ^a	4.098±0.054 ^a	1.35±0.032 ^d	96.7±1.7 ^a	
Beluga <i>Huso huso</i>	42	<i>S. cerevisiae</i> Brewer's yeast	0%	11.2±0.6	29.2±2.6 ^a	18.1±2.5 ^a	2.27±0.21 ^a	2.053±0.10 ^a	87.0±4.2	Hoseini-
			1%	11.4±0.5	36.9±4.8 ^{ab}	25.6±4.9 ^{ab}	2.79±0.33 ^{ab}	1.83±0.11 ^{ab}	92.6±3.2	far et al.
			2%	11.4±0.4	38.5±3.4 ^b	27.1±2.7 ^b	2.89±0.22 ^b	1.79±0.07 ^b	93.5±4.2	(2011)

หมายเหตุ : ตัวอักษร a b c d ในแถวแนวนึง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

: IW คือ Initial weight

: FW คือ Final weight

ตารางที่ 2.3 แสดงผลของการเสริมยีสต์ต่อระบบภูมิคุ้มกันปลาชนิดต่าง ๆ

Fish	Period (day)	Species Yeast	Level	NBT test (mg ml ⁻¹)	Lysozyme (10 ³ Units/l)	ESA (nmol O ₂ ⁻)	ISA (O.D. at 620 nm)	Ref.
Hybrid striped bass	112	<i>S. cerevisiae</i>	0%	1.99 ^c	1246.7	0.897	2.679 ^c	Li et al.
<i>Morone chrysops</i> X <i>M. saxatilis</i>		Brewer's yeast	1%	2.59 ^{ab}	1073.3	1.039	3.694 ^b	(2003)
			2%	3.09 ^a	965	1.293	4.511 ^{ab}	
			4%	2.31 ^{bc}	1155	1.091	4.86 ^a	
Hybrid striped bass	49	<i>S. cerevisiae</i>	0%	1.20	473	7.21 ^c	1.28	Li et al.
<i>M. chrysops</i> X <i>M. saxatilis</i>		Brewer's yeast	1%	1.40	515	11.22 ^a	1.55	(2004)
		GroBiotic TM AE	2%	1.58	472	10.55 ^a	1.66	
			1%	1.28	448	9.71 ^{a,b}	1.79	
			2%	1.31	640	8.34 ^{b,c}	1.59	

หมายเหตุ : ตัวอักษร a b c d ในแถวแนวนึง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

NBT test คือ Nitro blue tetrazolium test

ESA คือ Extracellular superoxide anion

ISA คือ Intracellular superoxide anion

ตารางที่ 2.4 แสดงผลของการเสริมยีสต์ต่อค่าโลหิตวิทยาในปลาชนิดต่าง ๆ

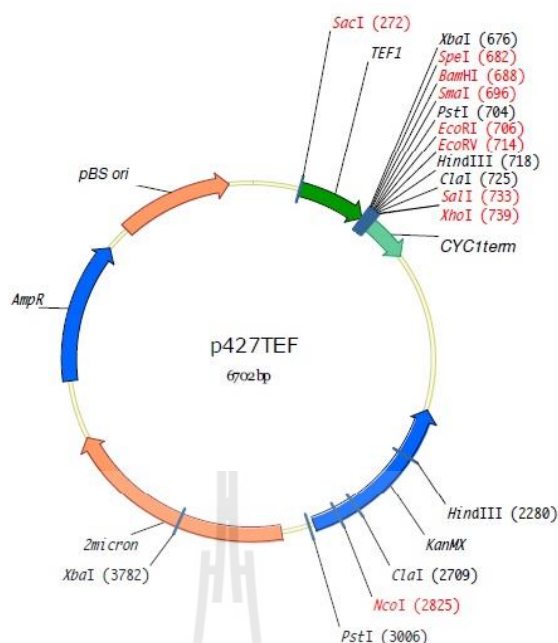
Fish	Period (day)	Species Yeast	Level	RBC ($\times 10^6$ cell/ul)	Hemoglobin content (g/dl)	Hematocrit (%)	Albumin (g/L)	Globulin (g/L)	Ref.
Beluga	42	<i>S. cerevisiae</i>	0%	0.74 $\pm$ 16.12	6.56 $\pm$ 0.85	19.71 $\pm$ 18.53	-	-	Hoseinifar et al. (2011)
<i>Huso huso</i>		Brewer's yeast	1%	0.72 $\pm$ 0.75	6.55 $\pm$ 0.63	20.46 $\pm$ 1.06	-	-	
			2%	0.70 $\pm$ 19.82	6.77 $\pm$ 0.84	21.45 $\pm$ 1.21	-	-	
Nile tilapia	84	<i>S. cerevisiae</i>	0%	1.74 $\pm$ 0.138 ^b	5.03 $\pm$ 2.93 ^b	12.67 $\pm$ 0.917 ^b	16.2 $\pm$ 0.9 ^c	19.9 $\pm$ 2.3 ^d	Tawwab et al. (2008)
<i>Oreochromis niloticus</i>		Brewer's yeast	0.25%	1.81 $\pm$ 0.087 ^b	5.43 $\pm$ 2.89 ^b	13.43 $\pm$ 0.921 ^b	16.8 $\pm$ 0.8 ^c	30.2 $\pm$ 0.7 ^c	
			0.5%	1.59 $\pm$ 0.045 ^b	4.80 $\pm$ 3.21 ^b	12.23 $\pm$ 0.984 ^b	17.3 $\pm$ 0.9 ^{bc}	41.4 $\pm$ 2.1 ^{ab}	
			1.0%	2.54 $\pm$ 0.142 ^a	7.50 $\pm$ 4.07 ^a	16.90 $\pm$ 0.322 ^a	19.7 $\pm$ 0.8 ^a	46.4 $\pm$ 4.5 ^a	
			2.0%	2.58 $\pm$ 0.170 ^a	7.78 $\pm$ 3.05 ^a	16.70 $\pm$ 0.153 ^a	18.7 $\pm$ 1.5 ^{ab}	37.5 $\pm$ 2.6 ^b	
			5.0%	2.41 $\pm$ 0.058 ^a	8.43 $\pm$ 4.88 ^a	16.87 $\pm$ 0.406 ^a	18.6 $\pm$ 0.5 ^{ab}	36.5 $\pm$ 3.1 ^b	

หมายเหตุ : ตัวอักษร a b c d ในแถวแนวนึง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

2.6 รีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอเทคโนโลยีในยีสต์

รีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอ (Recombinant DNA technology) ซึ่งอาจเรียกว่า พันธุวิศวกรรม (Genetic engineering) หรือการโคลนยีน (Gene cloning) เป็นการสร้างคอมบิชั่นใหม่ระหว่างสปีชีส์ที่ไม่มีความสัมพันธ์กันเลยและไม่เกิดในธรรมชาติ โดยการรวมดีเอ็นเอที่สร้างโดยวิธีการใดก็ได้ที่ภายนอกเซลล์เข้าไปในดีเอ็นเอของไวรัส พลาสมิดแบคทีเรีย หรือพาหะ (Vector) อื่น เพื่อยอมให้ถูกนำไปในสิ่งมีชีวิตให้อาศัย (Host organism) ที่ไม่ใช่สิ่งมีชีวิตให้อาศัยตามธรรมชาติ แต่สิ่งมีชีวิตให้อาศัยนั้นยอมให้ดีเอ็นเอเข้าไปเพิ่มจำนวนอย่างต่อเนื่องทำให้ลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตนั้นเปลี่ยนแปลงไป กระบวนการรีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอเทคโนโลยีนั้นสิ่งที่ต้องการเป็นพื้นฐาน คือ พาหะ สำหรับการถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรม ซึ่งอาจเป็นพลาสมิดดีเอ็นเอ หรือ ดี-เอ็นเอพาหะอื่น ๆ ชิ้นดีเอ็นเอที่มียีนที่เราสนใจ เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ และเอ็นไซม์ไลเกส (Ligase) และการนำพาหะที่มีรีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย (Tottora et al., 1998) โดยวิธีการ การแยกพาหะ หรือพาหะการโคลน (Cloning vector) การแยกดีเอ็นเอจากเซลล์ผู้ให้ (Donor cell) การนำชิ้นดีเอ็นเอที่มียีนที่สนใจเข้าสู่พาหะในหลอดทดสอบ การนำพาหะที่มีรีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย ซึ่งพาหะนั้นต้องเพิ่มจำนวนได้ และเซลล์ที่ได้คือเซลล์รีคอมบิแนนต์ เซลล์รีคอมบิแนนต์ถูกเลี้ยงเพื่อสร้างโคลน (Clone) ที่มีเซลล์ซึ่งมีพันธุกรรมเหมือนกันอยู่เป็นจำนวนมาก

พลาสมิด (Plasmid) ซึ่งเป็นพาหะการโคลน มีหน้าที่ในการเคลื่อนย้าย ดีเอ็นเอระหว่างสิ่งมีชีวิต ทั่ว ๆ ไป มีลักษณะเป็นโมเลกุลของดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก และส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นวงแหวน (Circular form) พาหะควรมีความสามารถในการถ่ายแบบตัวเอง (Self-replication) ในเซลล์ให้อาศัย หรือต้องสามารถรวมเข้าไปในโครโมโซมของเซลล์ให้อาศัยอย่างรวดเร็ว นอกจากนั้น พาหะต้องมียีนเครื่องหมาย (Gene marker) ที่ช่วยในการคัดเลือกร่างกาย ดังตัวอย่างพาหะการโคลนยีนในยีสต์ p427TEF Yeast expression vector



ภาพที่ 2.5 ส่วนประกอบของ p427TEF Yeast expression vector

ที่มา : www.dualsystems.com

การ Expression ของยีน delta 6 desaturase ในยีสต์

Zheng et al. (2000) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน Delta 6 desaturase ของ cobia ในยีสต์ *S. cerevisiae* โดยวัดอัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้น (substrates) เป็นผลิตภัณฑ์ในเซลล์ยีสต์ พบว่า ยีสต์ มีการแสดงออกของเอ็นไซม์ Delta 6 desaturase ซึ่งมีการเปลี่ยน 18 : 3n3 เป็นผลิตภัณฑ์ 18 : 4n3 ถึง 50.8% เช่นเดียวกับการศึกษาของ Qiu et al. (2002) ได้ศึกษาการทำงานของยีน Delta 6 desaturase ของ Borage ในยีสต์ *S. cerevisiae* โดยทำการวัดปริมาณของ substrate ที่ถูกนำเข้าไปใน เซลล์ยีสต์ ออกมาเป็นผลิตภัณฑ์ (Product) พบว่า Delta 6 desaturase มีการทำงานโดยการเปลี่ยน 18 : 2n6 เป็นผลิตภัณฑ์ 18 : 3n6 ได้ดี และ Zank et al. (2009) ได้ศึกษาการทำงานของยีน Elongase ของมอส (*Physcomitrella patens*) ในยีสต์พบว่าปริมาณของ substrate 18 : 3n6 ที่ถูกนำเข้าไปใน เซลล์ยีสต์ออกมาเป็นผลิตภัณฑ์ (Product) 20 : 3n6 ถึง 51% แสดงว่ามีการทำงานของเอ็นไซม์ Delta 6 desaturase ในเซลล์ยีสต์เช่นเดียวกับการศึกษาของ Zheng et al. (2004) ที่ทำการศึกษา เอ็นไซม์ Delta 5 และ Delta 6 desaturase ในปลา Common carp Rainbow trout Gilthead seabream และ Turbot ในเซลล์ยีสต์ และการศึกษาการทำงานของเอ็นไซม์ Delta 6 desaturase Atlantic bluefin tuna ซึ่งพบว่าเอ็นไซม์ Delta 5 และ Delta 6 desaturase สามารถเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็น ผลิตภัณฑ์ได้

ตารางที่ 2.5 ผลของการแสดงของเอ็นไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *S. cerevisiae* ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ

Species	Enzyme	Substrate	Substrate	Product	Product	Conversion (%)	References
			accumulation (wt. %)		accumulation (wt. %)		
<i>Physcomitrella patens</i>	Elongase	18 : 2n6	80.4	20 : 2n6	3.1	3.7	Zank et al., 2000
		18 : 3n6	31.7	20 : 3n6	32.4	51.0	
		18 : 3n3	52.0	20 : 3n3	1.6	3.0	
		18 : 4n3	23.8	20 : 4n3	19.8	45.0	
Borage (<i>Borago officinalis</i>)	Delta 6 desaturase	16 : 1	6.02	16 : 2	0.13	-	Qiu et al., 2002
		18 : 1	7.91	18 : 2	0.08	-	
		18 : 2n6	26.62	18 : 3n6	6.13	-	
		18 : 3n3	21.13	18 : 4n3	5.72	-	
Cobia (<i>Rachycentron canadum</i>)	Delta 6 desaturase	18 : 3n3	-	18 : 4n3	-	50.8	Zheng et al., 2009
		18 : 2n6	-	18 : 3n6	-	36.5	
		20 : 4n3	-	20 : 5n3	-	2.4	
		20 : 3n6	-	20:4n6	-	0.2	

ตารางที่ 2.5 ผลของการแสดงของเอ็นไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *S. cerevisiae* ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ (ต่อ)

Species	Enzyme	Substrate	Substrate accumulation (wt. %)	Product	Product accumulation (wt. %)	Conversion (%)	References
Common carp (<i>Cyprinus carpio</i>)	Delta 6 desaturase	18 : 3n3	-	18 : 4n3	-	7.0	Zheng et al., 2004
		18 : 2n6	-	18 : 3n6	-	1.5	
	Delta 5 desaturase	20 : 4n3	-	20 : 5n3	-	0.5	
		20 : 3n6	-	20 : 4n6	-	0.4	
Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Delta 6 desaturase	18 : 3n3	-	18 : 4n3	-	31.5	
		18 : 2n6	-	18 : 3n6	-	3.6	
	Delta 5 desaturase	20 : 4n3	-	20 : 5n3	-	0.2	
		20 : 3n6	-	20 : 4n6	-	0.0	
Gilthead seabream (<i>Sparus aurata</i>)	Delta 6 desaturase	18 : 3n3	-	18 : 4n3	-	23.1	
		18 : 2n6	-	18 : 3n6	-	12.2	
	Delta 5 desaturase	20 : 4n3	-	20 : 5n3	-	0.2	
		20 : 3n6	-	20 : 4n6	-	0.1	

ตารางที่ 2.5 ผลของการแสดงของเอ็นไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวของรีคอมบิแนนท์ ยีสต์ *S. cerevisiae* ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ (ต่อ)

Species	Enzyme	Substrate	Substrate accumulation (wt. %)	Product	Product accumulation (wt. %)	Conversion (%)	References
Turbot (<i>Psetta maximus</i>)	Delta 6 desaturase	18 : 3n3	-	18 : 4n3	-	59.5	Zheng et al., 2004
		18 : 2n6	-	18 : 3n6	-	31.2	
	Delta 5 desaturase	20 : 4n3	-	20 : 5n3	-	0.1	
		20 : 3n6	-	20 : 4n6	-	0.0	
Atlantic bluefin tuna (<i>Thunnus thynnus</i>)	Delta 6 desaturase	18 : 3n3	-	18 : 4n3	-	31.2	Morais et al., 2011
		18 : 2n6	-	18 : 3n6	-	19.7	

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาวิจัยครั้งนี้แบ่งออกเป็น 2 การทดลองดังนี้

การทดลองที่ 1 ผลิตภัณฑ์ *S. cerevisiae* ให้มีการผลิตเอ็นไซม์ Delta 6 desaturase ของปลา-
สวาย

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของการเสริมยีสต์ที่มีการตัดต่อยีน Delta 6 desaturase ต่อ
องค์ประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง

3.1 ปลาสวายที่ใช้ทำการศึกษา

ปลาสวายขนาดประมาณ 60 กรัมจากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (งานสัตว์น้ำ)
มาพักเลี้ยงเพื่อปรับสภาพในบ่อดินเพื่อลดความเครียดเนื่องจากการขนย้ายเป็นเวลา 1 สัปดาห์ โดย
ทำการเลี้ยงปลาในกระชัง ขนาด 8 m³ โดยให้อาหารวันละ 2 ครั้ง ที่เวลา 09.00 น. และ 16.00 น.

3.2 สถานที่ทำการทดลอง

ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (งานสัตว์น้ำ) อาคารเครื่องมือ 10 ศูนย์เครื่องมือ
วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.3 แผนการทดลองที่ 1 ผลิตภัณฑ์ *S. cerevisiae* ให้มีการผลิตเอ็นไซม์ Delta 6 Desaturase ของปลาสวาย (*P. hypophthalmus*)

3.3.1 การโคลน cDNA ของยีน Delta 6 desaturase

การเก็บตัวอย่างตับปลาสวาย

นำปลาสวายที่มีน้ำหนักประมาณ 50 g มาทำการเก็บตับ โดยทำการสลับปลาสวายใน
2-phenoxyethanol หลังจากนั้นทำการเปิดช่องท้องและทำการเก็บตับประมาณ 50-100 mg ใส่ใน
หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 1.5 ml แล้วนำตัวอย่างตับไปเก็บในตู้ -80 °C

การสกัด RNA

นำตัวอย่างตับของปลาสวายที่เก็บในตู้ -80 °C มาพักในถังน้ำแข็ง โดยตัวอย่างตับ
ปลาสวายมีน้ำหนักประมาณ 50-100 mg ทำการใส่สาร Trizol 500-1000 µl แล้วจึงบดตัวอย่างให้

ละลายและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 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 สารละลายและวางที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำหลอดไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดสารละลายออกทิ้งเหลือไว้เฉพาะตะกอนของอาร์เอ็นเอ ต่อมาทำการล้างตะกอนด้วย 80% Ethanol ใส่เป็น 2 เท่าของสารละลายอาร์เอ็นเอ หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการดูดสารละลายทิ้งอีกครั้ง และเปิดฝาหลอดวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-15 นาที เพื่อให้เอทานอลระเหยออกไป หลังจากนั้นละลายตะกอนอาร์เอ็นเอในน้ำ DEPC 225 µl ทำการผสมเบา ๆ เพื่อให้ตะกอนละลาย จากนั้นใส่ DNase I (5 U/µl) 1 µl และ 10x DNase buffer 25 µl 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 สารละลายจะแยกชั้นโดยส่วนของอาร์เอ็นเอจะอยู่ชั้นบน ทำการดูดสารส่วนบนย้ายไปยังหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์หลอดใหม่ หลังจากนั้นทำการตกตะกอนอาร์เอ็นเออีกครั้งด้วย 3M sodium acetate pH 5.2 ใส่ 0.1 ส่วนต่อ 1 ส่วนของสารละลายที่อยู่ในหลอด และสาร Absolute ethanol โดยใส่ 3 เท่าของสารในหลอด และทำการ vortex สารละลาย นำหลอดไปตั้งไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงหรือที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 16-18 ชั่วโมง เพื่อเป็นการตกตะกอนอาร์เอ็นเอ เมื่อครบเวลานำหลอดไปทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดสารละลายออกทิ้งเหลือไว้เฉพาะตะกอนของอาร์เอ็นเอ ทำการล้างตะกอนด้วย 80% Ethanol 2 เท่าของสารละลายอาร์เอ็นเอ หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที ทำการดูดสารละลายทิ้งอีกครั้ง และเปิดฝาหลอดวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-15 นาที เพื่อให้เอทานอลระเหยออกไป จากนั้นละลายตะกอนอาร์เอ็นเอทั้งหมด (Total RNA) ในน้ำ DEPC 30 µl และเก็บ Total RNA ในตู้เย็น -80 °C โดยทำการแบ่ง Total RNA ออกเป็นส่วน ๆ เพื่อหลีกเลี่ยงการแช่แข็งและละลายหลาย ๆ ครั้ง

การสังเคราะห์ First stand cDNA

นำ Total RNA ของตับปลาสาวยที่ได้ส่วนหนึ่งไปวัดความเข้มข้นของ RNA ที่ทำการดูดกลืนแสง 260 นาโนเมตร (nm) หลังจากนั้นทำการสังเคราะห์ first strand cDNA จาก total RNA

โดยใช้ First-stand cDNA synthesis Kit (GE Healthcare) โดยมีการเตรียมสารละลายสำหรับสังเคราะห์ first strand cDNA ดังนี้ Total RNA ความเข้มข้น 1-5 µg/µl ใส่ bulk first-strand cDNA reaction mix 5 µl ใส่ 20 mM DTT solution 1 µl ใส่ Oligo-dT primer มีความเข้มข้น 0.2 µg ต่อ µl ใส่ 1 µl และน้ำ Deionized (DI) เพื่อปรับปริมาตรให้สารละลายทั้งหมดเท่ากับ 15 µl ทำการผสม Total RNA และน้ำ DI ที่คำนวณปริมาตรแล้วในหลอดไมโครเซนทริฟิวส์ผสมให้เข้ากันหลังจากนั้นนำหลอดไปตั้งที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 10 นาที และแช่ลงในถังน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นนำหลอดไปตั้งที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที และเก็บตัวอย่าง cDNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

การออกแบบไพรเมอร์

ทำการการค้นข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของยีน Delta 6 desaturase ของปลาปลาสวาย (*P. hypophthalmus*) ในเว็บไซต์ของ NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) เพื่อนำมาเป็นข้อมูลในการออกแบบไพรเมอร์ (Primer) สำหรับการโคลน coding sequence (CDS) ของยีน delta 6 desaturase

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

PHF6R_F	ACT AGT GAA TCC GAA TTC ATG GGC GGC GGA GGA CAC CGG GGT G
PHF6R_R	AGA TCT AAG CTT GTC GAC TCT AGA TTA TTT GTG AAG GTA GGC ATC TAG
D6PH_F_RT	GCA CTC CTT TCG ACA TTT GG
D6PH_R_RT	CTT GTG CTG TGG TTA TAG GG

การโคลน cDNA ยีน Delta 6 desaturase โดยวิธีการ PCR

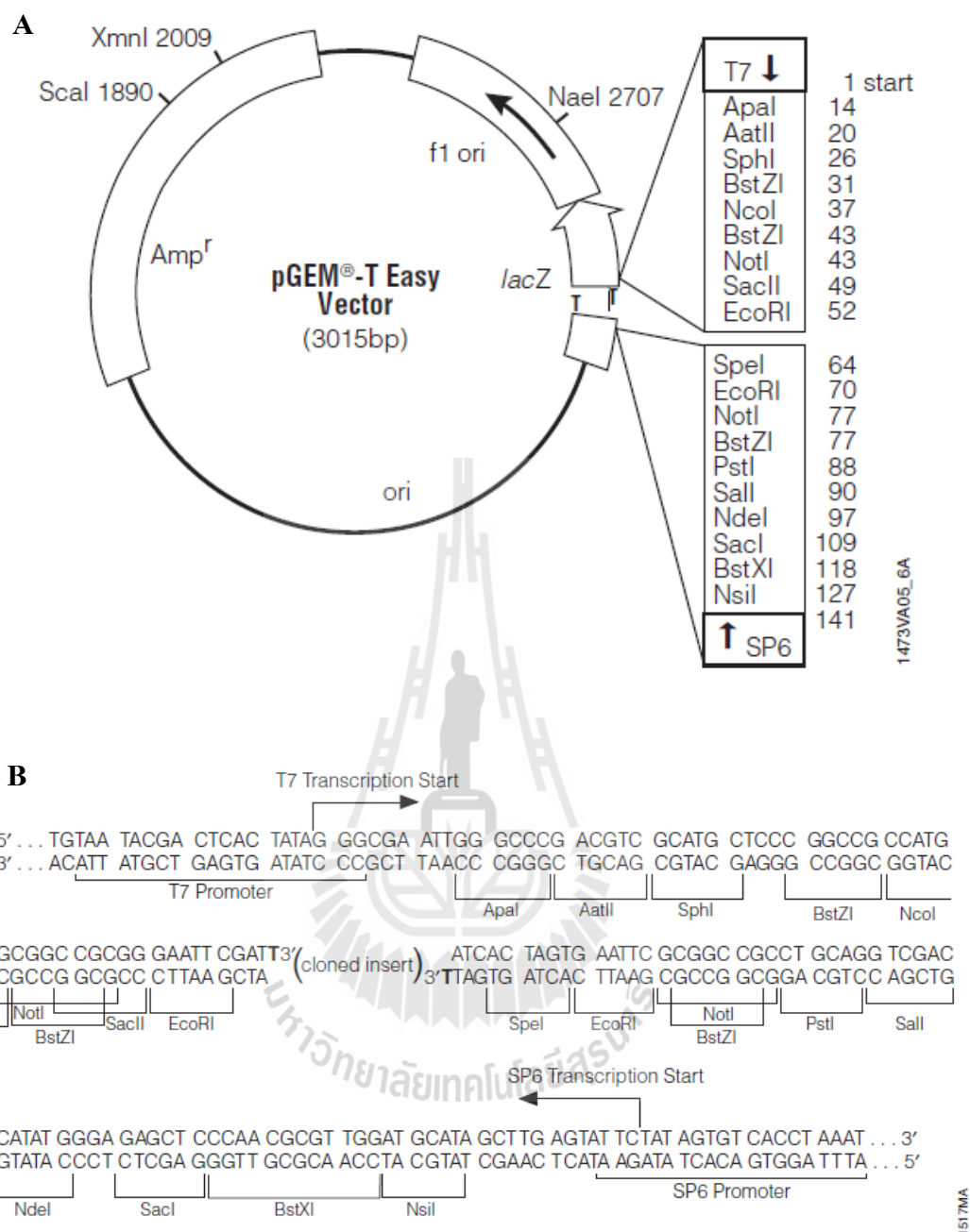
นำ primer ที่ได้ออกแบบในขั้นตอนตามตารางที่ 3.1 มาใช้ในการทำ PCR โดยใช้ primer PHF6R_F คู่กับ primer PHF6R_R ซึ่งมีการเตรียมปฏิกิริยาสำหรับทำ PCR โดยใช้ LA Taq kit (Takara) โดยให้มีปริมาณทั้งหมดเท่ากับ 10 µl ซึ่งประกอบไปด้วย 5 U/µl LA Taq (Takara Shuzo, Shiga, Japan) 10x buffer LA Taq 25 mM MgCl₂, 2.5 mM dNTP 10 µM primer forward 10 µM primer reverse 10 µM โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ที่เป็น first strand cDNA จากตับปลาสวาย สำหรับการทำ PCR โดยมีสภาวะการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอในเครื่อง PCR ดังนี้ 95 °C เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ ต่อมา 94 °C เป็นเวลา 45 วินาที 62 °C 30 วินาที และ 72 °C 60 วินาที ติดต่อกันจำนวน 40 รอบ และเข้าสู่ 72 °C เวลา 15 นาที จำนวน 1 รอบ

การวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย Agarose gel electrophoresis และการทำชิ้นดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลให้บริสุทธิ์

ทำการเตรียม Agarose gel ตามความเข้มข้นที่ต้องการแล้วเทลงในถาดสำหรับเตรียมเจล เมื่อเจลแข็งตัวแล้วนำมาวางใน Chamber และเท 0.5X TBE buffer ให้มีระดับสูงกว่าเจลหลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ผสมกับสียติดตาม (Loading dye) ในอัตราส่วน 3 : 1 จากนั้นจึงโหลดลงในหลุม (Well) เมื่อโหลดตัวอย่างเสร็จแล้วจึงทำการต่อขั้วไฟฟ้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า (Power supply) โดยตั้งความต่างศักย์ไฟฟ้าให้คงที่ 90 โวลต์ ตั้งไว้ประมาณ 30 นาที หรือ 1 ชั่วโมง หรือจนสีน้ำเงินของโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนมาถึงถึงขอบเจลอีกด้านหนึ่ง หลังจากนั้นนำออกมาตรวจสอบแถบดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจล โดยดูภายใต้เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต และบันทึกผลการทดลองด้วยการถ่ายภาพ หลังจากนั้นการทำชิ้นดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลให้บริสุทธิ์โดยในขั้นตอนนี้จะใช้ Agarose gel ที่มีความเข้มข้นสูง เช่น 2% Agarose gel เพื่อที่จะทำให้สามารถแยกขนาดของดีเอ็นเอได้ดีและชัดเจนยิ่งขึ้น และเมื่อทราบขนาดของดีเอ็นเอเป็นไปตามที่คาดการณ์แล้วจึงทำการตัดเจลตรงบริเวณของดีเอ็นเอที่ต้องการ ใส่ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ เมื่อได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกับที่ต้องการ ทำการแยกดีเอ็นเอออกจาก Agarose gel ด้วย Ultra Clean™ 15 DNA Purification Kit (Mo Bio Laboratories, Inc.) โดยการชั่งน้ำหนักเจลที่อยู่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ หลังจากนั้นใส่สาร Ultra TBE melt 0.5 เท่าของน้ำหนักเจล และใส่ Ultra salt 0.5 เท่าของน้ำหนักเจล นำหลอดไปตั้งที่อ่างควบคุมอุณหภูมิแบบแห้ง ที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 10 นาที โดยทำการเขย่า (vortex) หลอดเป็นครั้งคราว หลังจากเจลละลายหมดแล้ว หลังจากนั้นใส่ Ultra bind 6 µl เขย่าสารให้เข้ากันและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 นาที ทำการดูดสารละลายทิ้ง แล้วเติม Ultra Wash 1 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 นาที ทำการดูดสารละลายทิ้งอีกครั้ง และเปิดฝาลอดวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เอทานอลระเหยออกไป หลังจากนั้นใส่น้ำ DI 12 µl วางไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 5 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 นาที และนำดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบผลด้วย Agarose gel electrophoresis

การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM-T Easy

การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับเวกเตอร์ มีปฏิกิริยาประกอบไปด้วย pGEM®-T Easy vector 50 ng/µl 2X Rapid ligation buffer T4 DNA ligase 3 U/µl และชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (DNA fragment) 4ng/µl หลังจากนั้นผสมเบา ๆ และนำไปปั่นเหวี่ยงให้สารตกลงมาที่ก้นหลอด จากนั้นนำหลอดไปตั้งอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง และนำหลอดไปตั้งในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง



ภาพที่ 3.1 แผนภาพพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM®-T Easy (A) และลำดับนิวคลีโอไทด์และ Multi Cloning site ของพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM®-T Easy (B) (Promega)

การสร้างคอมพีเทนท์เซลล์ (Competent cell)

นำเชื้อ *E. coli* JM109 (Promega) มา streak บน LB plate และนำไปบ่มเชื้อในตู้
อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ต่อมานำโคโลนีเดี่ยวจาก LB plate มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ
SOB และนำหลอดไปวางในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่า (Shaker) ที่อุณหภูมิ 37 °C ความเร็วรอบ

200 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ต่อมานำเชื้อแบคทีเรียจากหลอดทดลองมา 100 μ l ลงเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ SOB ที่เตรียมอยู่ในขวดรูปชมพู่ 30 ml และนำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 5-7 ชั่วโมง ซึ่งจะเป็นเวลาที่เซลล์แบคทีเรียเจริญเติบโตถึงระยะ Log phase หลังจากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงเทใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 50 ml และแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำหลอดไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 3,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งเหลือไว้เฉพาะส่วนของตะกอนแบคทีเรีย จากนั้นใส่สาร transformation buffer 1 ส่วนต่อ 3 ส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการละลายตะกอนแบคทีเรียโดยการเขย่าหลอดในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำหลอดไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 3,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทส่วนของสารละลายทิ้งเหลือไว้เฉพาะส่วนของตะกอนแบคทีเรีย และใส่สาร transformation buffer 1 ส่วนต่อ 12.5 ส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นทำการละลายตะกอนแบคทีเรียโดยการเขย่าหลอดในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาใส่สาร DMSO 168 μ l โดยทำการหยดทีละหยดและทำการเขย่าตลอดเวลาเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นทำการแบ่งออกเป็นส่วน ๆ ใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 1.5 ml หลอดละ 100 μ l แล้วเก็บในตู้ -80 °C

การเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์เข้าสู่เชื้อเซลล์เจ้าบ้าน

นำ competent cell 100 μ l ออกจากตู้ -80 °C วางในถังน้ำแข็ง และใส่ดีเอ็นเอที่มีการเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ (recombinant DNA) แล้วใช้มือเขย่า (mix) หลอดเบา ๆ และนำหลอดไปตั้งในถังน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำหลอดไปตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบแห้งที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 90 วินาที และเมื่อครบเวลารับนำหลอดไปวางในน้ำแข็งทันทีที่ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว SOC 900 μ l ลงในหลอด และนำหลอดไปวางในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่มีความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยภายในตู้มีอุณหภูมิ 37 °C หลังจากนั้นนำเซลล์ที่อยู่ในหลอดออกมา 500 μ l spread ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2XYT Agar ที่เป็น selective media (ที่มี X-gal, IPTG และ Ampicillin) เพื่อทำการแยกโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่พลาสมิดมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (Insert) นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปวางที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่มีอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง และจากการที่ spread เชื้อลงบน plate ที่มี Ampicillin, IPTG และ X-gal จะทำให้สามารถคัดโคโลนีที่ต้องการได้ ซึ่งโคโลนีของเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดที่ไม่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการจะเป็นโคโลนีสีฟ้า ส่วนโคโลนีสีขาว นั้นแสดงว่าเซลล์แบคทีเรียได้รับ พลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ วันต่อมาทำการคัดเลือกโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่คาดการณ์ว่าไม่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ 1-2 โคโลนี และเลือกโคโลนีที่คาดการณ์ว่ามีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการมาทำเป็น plate ต้นฉบับไว้ (Master plate)

การวิเคราะห์ Recombinant DNA ด้วยวิธีการอย่างง่าย (Cracking)

นำไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (autoclave) ไปจิ้มเชื้อใน master plate นำไปใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ หลังจากนั้นใส่สาร CB และสาร 10 mM EDTA ในอัตรา 1 ต่อ 1 และหยดสาร LB ลงบนฝาหลอดประมาณ 1 μ l จากนั้นนำหลอดไป vortex และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (spin down) เพื่อให้สาร LB ตกลงมาที่ก้นหลอด จากนั้นนำไป vortex และวางในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลานำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที ภายในหลอดจะมีส่วนของตะกอนเซลล์แบคทีเรีย และ recombinant DNA ที่อยู่ในส่วนของสารละลาย โดยนำสารละลายในหลอด 7 μ l มาตรวจสอบผลด้วย Agarose gel electrophoresis และหลังจากนั้นนำสารละลายดังกล่าวข้างต้นไปใช้เป็น DNA template ในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบ รีคอมบิแนนท์ ดีเอ็นเออีกครั้งหนึ่ง

การสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis

เมื่อทราบว่าโคโลนีของแบคทีเรียใดมีชิ้นส่วนของ recombinant DNA แล้ว จึงนำมาเลี้ยงเชื้อเพื่อขยายจำนวนแบคทีเรีย โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว 2XYT 3 ml หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่า (shaker) ที่อุณหภูมิ 37 °C ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาเก็บ glycerol stock และสกัดพลาสมิด การเก็บในส่วน of glycerol stock นำเซลล์ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 500 μ l ใส่ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ หลังจากนั้นใส่ 30% glycerol 700 μ l แล้วทำการ vortex และเก็บรักษาเซลล์ในตู้ -80 °C หลังจากนั้นนำเซลล์ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อในส่วนที่เหลือใส่ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทส่วนลอย (supernatant) ทิ้ง จากนั้นใส่สาร Solution I 200 μ l แล้วนำไป vortex ให้ตะกอนละลายจะได้สารละลายสีขุ่น ต่อมาใส่สาร Solution II 200 μ l ทำการผสมเบา ๆ ประมาณ 5-10 ครั้ง จะได้สารละลายสีใสและหนืด และใส่สาร Solution III 200 μ l ทำการผสมเบา ๆ ประมาณ 5-10 ครั้ง จะได้สารละลายสีใสและมีตะกอนขาวขุ่น จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการย้ายส่วนของ supernatant ไปยังหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์หลอดใหม่ และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการย้ายส่วนของ supernatant ไปยังหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์หลอดใหม่อีกครั้ง หลังจากนั้นใส่ Isopropanol 1 เท่าของสารละลายในหลอด และนำไป vortex วางตั้งในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อทำการตกตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นนำหลอดไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที ทำการดูดสารละลายออกทิ้งเหลือไว้เฉพาะตะกอนของดีเอ็นเอ และเปิดฝาลอดวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-15 นาที เพื่อให้ Isopropanol ระเหยออกไป หลังจากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย 1X TE buffer ใส่ 1 ส่วนต่อ 2 ส่วนของสารละลายและตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที โดยในระหว่างนี้ทำการ

ผสม (mix) เบา ๆ เพื่อให้ตะกอนละลาย จากนั้นใส่ RNase (10 mg/ml) 3 μ l (ใส่ RNase 1 μ l ต่อสารละลายในหลอด 100 μ l) และนำหลอดไปตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบแห้ง โดยตั้งอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที โดยในระหว่างนี้ทำการผสม (mix) เบา ๆ ทุก 10 นาที เมื่อครบเวลานำหลอดมาตั้งที่อุณหภูมิห้องแล้วใส่ Phenol และสาร Chloroform ในอัตรา 0.5 ส่วนต่อ 0.5 ส่วนของสารละลายที่มีอยู่ในหลอด ทำการ vortex และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที สารละลายจะแยกชั้น โดยส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอจะอยู่ชั้นบนทำการดูดสารส่วนบนย้ายไปยังหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์หลอดใหม่ หลังจากนั้นทำการตกตะกอนดีเอ็นเออีกครั้งด้วย 3 M sodium acetate pH 4.8 ใส่ 0.1 ส่วนต่อ 1 ส่วนของสารที่อยู่ในหลอด และสาร Absolute ethanol โดยใส่ 3 เท่าของสารในหลอด ทำการ vortex สารละลาย และตั้งไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือเป็นเวลาประมาณ 16-18 ชั่วโมง เพื่อเป็นการตกตะกอน ดีเอ็นเอ เมื่อครบเวลาจึงทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดสารละลายออกทิ้งเหลือไว้เฉพาะตะกอนของดีเอ็นเอ ทำการล้างตะกอนด้วย 80% Ethanol 1 ml หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที ทำการดูดสารละลายทิ้งอีกครั้ง และเปิดฝาหลอดวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-15 นาที เพื่อให้เอทานอลระเหยออกไป ทำการละลายตะกอนดีเอ็นเอในน้ำ DI 30 μ l นำดีเอ็นเอมาตรวจสอบผลด้วย Agarose gel electrophoresis และนำพลาสมิดดีเอ็นเอส่วนหนึ่งไปวัดความเข้มข้นของ DNA ที่ค่าการดูดกลืนแสง 260 นาโนเมตร (nm) โดยใช้เครื่องวัดความเข้มข้น (Nanodrop)

การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยการตัดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ

การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะปฏิกิริยาประกอบด้วย 10X H buffer (Takara) 7 μ l *Eco*RI enzyme 15 U/ μ l 5 μ l *Sal*I enzyme 15 U/ μ l 5 μ l Plasmid DNA 1 μ g/ μ l 10 μ l และน้ำ DI 48 μ l เพื่อปรับปริมาตรให้สารละลายเท่ากับ 70 μ l หลังจากนั้นทำการผสมสาร (mix) ด้วยมือเบา ๆ แล้ววางหลอดในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบแห้งที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นตรวจสอบผลด้วย Agarose gel electrophoresis หลังจากที่ได้ทราบผลว่าพลาสมิดไอดีที่มีชิ้นส่วนของ recombinant DNA แล้วจึงทำการส่งตัวอย่างวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน Delta 6 desaturase กับข้อมูลที่ได้มีการรายงานไว้ในฐานข้อมูลของ GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) โดยใช้โปรแกรม BlastN และ BlastX และทำการเปรียบเทียบความตรงกัน (Alignment) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม EBI Tools Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)

3.3.2 การผลิต recombinant yeast

การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอของยีน Delta 6 desaturase เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ p427TEF Yeast expression vector (pTEF) ทำการเชื่อมต่อดีเอ็นเอของยีน Delta 6 desaturase เข้ากับเวกเตอร์ pTEF มีปฏิกิริยาประกอบไปด้วย 1 µg/µl pTEF vector 1 µl 2x buffer 7 µl ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (DNA fragment) ความเข้มข้น 1 ng/µl ปริมาตร 5 µl และ T4 Ligase ปริมาตร 1 µl หลังจากนั้นผสมเบา ๆ และนำไปปั่นเหวี่ยงให้สารตกลงมาที่ก้นหลอด จากนั้นนำหลอดไปตั้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และเมื่อครบเวลาริบนำหลอดไปวางในน้ำแข็งทันที เตรียมสำหรับการทำการเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์เข้าสู่เชื้อเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* JM109 (Promega)

การเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์เข้าสู่เชื้อเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* JM109 (Promega)

การเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์เข้าสู่เชื้อเซลล์เจ้าบ้าน โดยนำ competent cell *E. coli* JM109 ออกจากตู้ -80 °C วางในถังน้ำแข็ง และใส่ดีเอ็นเอที่มีการเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ (Ligation reaction) 7 µl แล้วใช้มือเขย่า (mix) หลอดเบา ๆ และนำหลอดไปตั้งในถังน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำหลอดไปตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบแห้งที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 1.5 นาที และเมื่อครบเวลาริบนำหลอดไปวางในน้ำแข็งทันทีตั้งทิ้งไว้ 3 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว SOC 900 µl ลงในหลอด และนำหลอดไปวางในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่มีความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยภายในตู้มีอุณหภูมิ 37 °C หลังจากนั้นนำเซลล์ที่อยู่ในหลอดออกมา 100 µl ใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้น LB (ที่มี 2XYT และ Ampicillin) แล้วทำการเกลี่ยเชื้อ (spread) ให้ทั่วผิวน้ำของอาหารเลี้ยงเชื้อ นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปวางที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่มีอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นสุ่มเลือกโคโลนีมาทำเป็น plate ต้นฉบับไว้ (master plate) ต่อจากนั้นทำการวิเคราะห์ Recombinant DNA ด้วยวิธีการอย่างง่าย (Cracking) การสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis ตามขั้นตอนข้างต้น

การสร้างคอมพิเทนท์เซลล์ยีสต์ (Competent *S. cerevisiae* cells)

เตรียมคอมพิเทนท์เซลล์ยีสต์โดยใช้ DSY-5 general purpose yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) expression strain โดยนำเชื้อ *S. cerevisiae* มา streak บน YPD plate และนำไปบ่มเชื้อในตู้อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง วันต่อมาโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่เตรียมอยู่ในหลอดเลี้ยงเชื้อ และนำหลอดไปวางในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่า (shaker) อุณหภูมิ 30 °C ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ต่อมานำวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ให้ได้ค่าประมาณ 3-5 แล้วนำเชื้อยีสต์ที่ได้มาเจือจางให้เหลือค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm เท่ากับ 0.2-0.4 และนำไปเลี้ยงต่อในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่มีอุณหภูมิ 30 °C ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 3-6 ชั่วโมง ให้ได้เชื้อยีสต์ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm เท่ากับ

0.6-1 หลังจากนั้นนำเซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงเทใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 10 ml ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 1,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งเหลือไว้เฉพาะส่วนของตะกอนเซลล์ยีสต์ จากนั้นทำการละลายตะกอนในสาร solution I (Wash solution) 10 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 1,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทส่วนของสารละลายทิ้งเหลือไว้เฉพาะส่วนของตะกอนเซลล์ยีสต์ และทำการละลายตะกอนในสาร Solution II (Lithium cation solution for making cells competent) 1 ml หลังจากนั้นทำการแบ่งออกเป็นส่วน ๆ ใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 1.5 ml หลอดละ 50 μ l เพื่อหลีกเลี่ยงการแช่แข็งและการละลายหลาย ๆ ครั้ง และเก็บในตู้ -80 °C

การเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์เข้าสู่เชื้อเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae*

นำ Competent *S. cerevisiae* cells 50 μ l ออกจากตู้ -80 °C วางในถังน้ำแข็ง ใส่ดีเอ็นเอที่มีการเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ (recombinant DNA) 1-5 μ g และใส่สาร Solution III 500 μ l แล้วใช้มือเขย่า (mix) หลอดเบา ๆ หลังจากนั้นนำหลอดไปตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบแห้งที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และทำการเขย่า (mix) หลอดเบา ๆ ทุก 15 นาที หลังจากนั้นใส่อาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว YPD ที่มี Selective media (G418) ปริมาตร 900 μ l แล้วนำหลอดไปวางในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่า (shaker) อุณหภูมิ 30 °C ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 2 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนใสทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว YPD ที่มี Selective media (G418) ปริมาตร 150 μ l แล้วทำการเกลี่ยเชื้อ (spread) ให้ทั่วผิวน้ำของอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้น YPD ที่มี Selective media (G418) นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปวางที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่มีอุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 2-4 วัน ต่อมาทำการคัดเลือกโคโลนีของเชื้อยีสต์มาทำเป็น plate ดันฉบับไว้ (master plate)

การวิเคราะห์ Recombinant Yeast (ยีสต์ RY) ด้วยวิธีการ Bead beater

ใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (autoclave) นำไปเขี่ยเชื้อยีสต์ใน master plate นำไปใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ หลังจากนั้นใส่สารละลาย 10 mM EDTA 1 μ l หลังจากนั้นใส่ glass bead (ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1 mm) 0.04 กรัม ใส่ Lyticase buffer 100 μ l แล้วทำการสั่นสะเทือนด้วยเครื่อง Bead beater ครั้งละ 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงนำไปที่ความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนใสด้านบนในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์หลอดใหม่ นำสารละลายมาเจือจางด้วยน้ำ DI ในอัตราส่วน 1 : 10 เท่า แล้วนำไปทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบในขั้นต้นตามตารางที่ 3.1 มาใช้ในการทำ PCR ทำการเตรียมสารละลายผสมสำหรับการทำ PCR ประกอบด้วย 5X GoTaq® Flexi Buffer 25 mM MgCl₂ 1 mM dNTP Mix 10 μ M primer forward 10 μ M primer reverse 5 U/ μ l GoTaq® DNA

polymerase และน้ำ DI เพื่อปรับปริมาตรสารละลายทั้งหมดเท่ากับ 10 μ l โดยมีสภาวะการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอในเครื่อง PCR (PCR condition) ดังนี้ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ ต่อมา 95 °C เป็นเวลา 45 วินาที 62 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 °C เป็นเวลา 60 วินาที ติดต่อกัน จำนวน 40 รอบ และเข้าสู่ 72 °C เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 1 รอบ หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วย Agarose gel electrophoresis ต่อจากนั้นทำการสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis ขึ้นตอนข้างต้น

3.3.3 การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ delta 6 desaturase ในยีสต์

การตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ delta 6 desaturase ยีสต์ RY

นำยีสต์ RY มาเลี้ยงในอาหาร YPD (G418) ปริมาตร 10 ml ในหลอดสำหรับเลี้ยงเชื้อ และนำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 °C ที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อยีสต์จากหลอดทดลองมาขยายเชื้อเพิ่มลงในอาหาร YPD (G418) 1000 ml ในขวดรูปชมพู่ แล้วเติม Linoleic Acid (C18 : 2n6) สำหรับการวิเคราะห์กรดไขมัน omega 6 และการเติม α -Linolenic Acid (C18 : 3n3) สำหรับการวิเคราะห์กรดไขมัน omega 3 ที่ความเข้มข้น 0.8 mM และนำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 °C ที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปเซนทริเฟวที่ 4000 rpm ที่อุณหภูมิ 10 °C แล้วนำเซลล์ยีสต์ที่ได้ไปสกัดไขมันเพื่อศึกษากรดไขมัน

การสกัดกรดไขมันจากยีสต์ RY

ทำการชั่งยีสต์ RY 10 g ลงโถปั่น ขนาด 50 ml เติม Chloroform : Methanol (2 : 1) 30 ml ปั่นละเอียด ที่ 3,000 rpm 5 นาที แล้วนำไปกรองผ่าน Buchner funnel ด้วย กระดาษกรองเบอร์ 1 ฉีดล้างส่วนที่ค้างอยู่ในโถปั่นและกระดาษกรองด้วย Chloroform : Methanol (2 : 1) แล้วนำส่วนที่กรองได้เทลงในกรวยแยก (Separatory funnel) แล้วเติม 0.03 M $MgCl_2$ 24 ml แล้วเติม 1% BHT 1 ml ทำการเขย่าให้สารผสมเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเปิดวาล์วเพื่อให้แก๊สออกแล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นอย่างน้อย 6 ชั่วโมง เก็บไว้ในที่ที่ไม่มีแสงสว่าง เมื่อแยกชั้นแล้วจึงไขส่วน chloroform ชั้นล่างออกใส่ในหลอดแก้วกันกลมที่ทราบน้ำหนักแน่นอน แล้วนำไประเหย chloroform ออกภายใต้สภาวะที่มีแก๊สไนโตรเจน จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนัก จดบันทึกน้ำหนัก แล้วใส่ Isooctane ลงไป 2 ml และ internal standard 1 ml เพื่อนำไปทำ saponification โดยการไปทำให้แห้ง ภายใต้สภาวะที่มีแก๊สไนโตรเจน และเติม 0.5 N NaOH ใน Methanol 1.5 ml เขย่าให้ผสมกันนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 7 นาที มีการเขย่าเป็นครั้งคราว แล้วนำมาทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม 14% BF_3 ใน Methanol 2 ml แล้วผสมให้เข้ากันแล้วต้มที่ อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นจนได้อุณหภูมิประมาณ 30-40 °C จึงเติม Isooctane 1 ml เขย่าให้ผสมกัน และดูดส่วนของ Isooctane

ไปใส่ในขวดใหม่แล้วนำไปทำให้แห้งภายใต้สภาวะที่มีแก๊สไนโตรเจน จากนั้นเติม Hexane 1 ml แล้วนำไปฉีด Gas Chromatography

3.4 แผนการทดลองที่ 2 ศึกษาผลของการเสริมยีสต์ที่มีการตัดต่อยีน Delta 6 desaturase ต่อองค์ประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง

3.4.1 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design (CRD)) โดยมีจำนวนกลุ่มการทดลอง 7 กลุ่ม กลุ่มการทดลองมีจำนวนละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 30 ตัว ใช้ปลาสดขนาดประมาณ 60 กรัม โดยมีระดับการเสริมยีสต์ WT, RY-pTEF และยีสต์ RY (ตารางที่ 3.2) ทำการเลี้ยงปลาสดเป็นเวลาทั้งหมด 120 วัน

ตารางที่ 3.2 การจัดกลุ่มการทดลอง

กลุ่มทดลอง	S. <i>cerevisiae</i> (cell/g feed)	ยีสต์ Recombinant pTEF vector (cell/g feed)	ยีสต์ Recombinant $\Delta 6$ desaturase (cell/g feed)	จำนวนปลา (ตัว)				
				ซ้ำที่	ซ้ำที่	ซ้ำที่	ซ้ำที่	ซ้ำที่
				1	2	3	4	5
basal diet	-	-	-	30	30	30	30	30
WT10 ⁶	5×10 ⁶	-	-	30	30	30	30	30
WT10 ⁸	5×10 ⁸	-	-	30	30	30	30	30
RY-pTEF 10 ⁶	-	5×10 ⁶	-	30	30	30	30	30
RY-pTEF 10 ⁸	-	5×10 ⁸	-	30	30	30	30	30
RY10 ⁶	-	-	5×10 ⁶	30	30	30	30	30
RY10 ⁸	-	-	5×10 ⁸	30	30	30	30	30

3.4.2 การเตรียมเซลล์ยีสต์สำหรับการนำไปผสมอาหารปลา

นำยีสต์ *S. cerevisiae* มาเลี้ยงในอาหาร YPD ปริมาตร 10 ml (Inoculum) ในหลอดสำหรับเลี้ยงเชื้อและนำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 °C ที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อยีสต์จากหลอดทดลองมาขยายเชื้อเพิ่มลงในอาหาร YPD 1000 ml ในขวดรูปชมพู่ นำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 °C ที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปเซนทริเฟวที่ 4000 rpm 20 นาที ที่อุณหภูมิ 10 °C แล้วนำเซลล์ยีสต์ที่ได้ผสมกับ 1% Guar gum ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ในอัตราส่วน 1 มิลลิลิตรต่อ 1 กรัมเซลล์

ยีสต์สด แล้วนำเข้าตู้ - 80 °C ทิ้งที่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเข้าเครื่อง Freeze dryer ที่อุณหภูมิ -80 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมงหรือจนกว่าจะแห้ง แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C จนกว่าจะนำมาใช้ผสมอาหารปลา

3.4.3 การเตรียมอาหาร

อาหารที่ใช้ในการทดลองนี้คำนวณให้มีปริมาณโปรตีนไม่ต่ำกว่า 32 เปอร์เซ็นต์ ตามส่วนผสมในตารางที่ 3.2 และทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีดังตารางที่ 3.4 จากนั้นนำอาหารที่อัดเม็ดแล้ว มาทำการผสมเชื้อยีสต์ตามกลุ่มการทดลองต่าง ๆ และผสมให้ทั่วแล้วผึ่งลมให้แห้ง จากนั้นนำอาหารในสูตรพื้นฐาน (ไม่ได้เสริมยีสต์) และอาหารที่ได้ผสมยีสต์ มาเคลือบด้วยน้ำมันพืชปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหารโดยการฉีดพ่นบนอาหารและผสมให้ทั่ว ผึ่งลมให้แห้ง เก็บอาหารที่อุณหภูมิ 4 °C

ตารางที่ 3.3 ปริมาณวัตถุดิบที่ใช้ในการทำอาหารปลา

วัตถุดิบอาหารสัตว์	ปริมาณวัตถุดิบอาหาร (%)						
	Basal diet	WT10 ⁶	WT10 ⁸	Emp10 ⁶	Emp10 ⁸	RY10 ⁶	RY10 ⁸
ปลาป่น				25			
กากถั่วเหลือง				35			
ปลายข้าว				14.5			
รำ				10			
มันสำปะหลัง				10			
น้ำมันพืช				2			
สารเหนียว				2			
พรีมิกซ์				1			
วิตามินซี				0.5			
Wild type yeast		10 ⁶	10 ⁸				
(cell/g feed)							
Emptory plasmid yeast			10 ⁶	10 ⁸			
(cell/g feed)							
Recombinant yeast			10 ⁶	10 ⁸			
(cell/g feed)							

ตารางที่ 3.4 องค์ประกอบทางเคมีในอาหารปลาที่ใช้ในการทดลอง

	Crude Protein (%)	DM (%)	Ash (%)	Crude Fiber (%)	Crude fat (%)
Basal diet	32.60±0.34	93.24±0.67	10.16±0.82	3.31±0.35	7.18±0.01
WT10 ⁶	32.93±0.19	93.03±0.69	10.58±0.08	3.17±0.00	7.78±0.04
WT10 ⁸	32.80±0.16	93.01±1.08	10.29±0.39	3.70±0.28	7.69±0.03
Emp10 ⁶	32.84±0.34	93.12±0.75	10.26±0.43	3.36±0.50	7.50±0.11
Emp10 ⁸	32.60±0.27	93.29±0.76	10.21±0.20	3.58±0.18	7.64±0.04
RY10 ⁶	32.91±0.37	93.33±0.48	10.36±0.54	3.76±0.17	7.77±0.12
RY10 ⁸	32.67±0.21	93.44±0.23	10.14±0.62	3.91±0.17	7.30±0.10

3.4.4 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

ในระหว่างการทดลองทำ การวัดค่า pH โดยใช้เครื่อง pH Meter ค่าออกซิเจนละลายในน้ำ โดยใช้เครื่อง dissolved oxygen meter ตั้ปลาห้ละ 1 ครั้ง

ตารางที่ 3.5 แสดงคุณภาพน้ำในระหว่างการทดลอง

ข้อมูล	ค่าที่วัดได้
อุณหภูมิอากาศ	30.28±1.75
อุณหภูมิน้ำ	28.28±1.75
ค่า pH	6.80±0.22
ค่าการละลายออกซิเจนในน้ำ	3.29±0.27

3.4.5 การเก็บข้อมูลวัดอัตราการเจริญเติบโต และอัตราการรอด

ก่อนการทดลองจะทำการชั่งน้ำหนักและวัดยาวของปลา เพื่อเก็บข้อมูลน้ำหนักและความยาวของปลาเริ่มต้นการทดลอง ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง 12 สัปดาห์ ทำการชั่งอาหารปลาที่ใช้ไปทุกวัน เพื่อเก็บข้อมูลน้ำหนักอาหารที่ใช้ไป และบันทึกการตายของปลาเพื่อเก็บข้อมูลอัตราการรอด โดยมีค่าที่ใช้วัดอัตราการเจริญเติบโตในการทดลองดังนี้

1. น้ำหนักปลาเฉลี่ย (g) (Weight average)

$$\text{น้ำหนักเฉลี่ย (g)} = \frac{\text{น้ำหนักปลารวม (g)}}{\text{จำนวนปลาทั้งหมด}}$$

2. น้ำหนักปลาเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น (g) (Weight gain, Wg)

$$Wg (g) = W_{t+1} - W_t$$

เมื่อ W_{t+1} คือ น้ำหนักปลาเฉลี่ยครั้งสุดท้าย

W_t คือ น้ำหนักเฉลี่ยครั้งก่อน

3. อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate, SGR)

$$SGR = \frac{(\ln W_{t+1} - \ln W_t) \times 100}{T}$$

เมื่อ W_{t+1} คือ น้ำหนักปลาเฉลี่ยครั้งสุดท้าย

W_t คือ น้ำหนักปลาเฉลี่ยครั้งก่อน

T คือ ระยะเวลาการทดลอง (วัน)

4. ความยาวเฉลี่ยของปลา (Length average)

$$\text{ความยาวเฉลี่ย (cm)} = \frac{\text{ความยาวของปลารวม (เซนติเมตร)}}{\text{จำนวนปลาทั้งหมด}}$$

5. อัตราการรอดตาย (% Survival rate)

$$(\%) \text{ อัตราการรอดตาย} = \frac{\text{จำนวนปลาที่เหลือ}}{\text{จำนวนปลาที่ปล่อยเริ่มต้น}} \times 100$$

6. อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (Feed Conversion Ratio, FCR)

$$FCR = \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่ให้ปลากิน (g)}}{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น}}$$

การวิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโตและการบันทึกผลการทดลอง

ทำการเก็บรวบรวมข้อมูลการเจริญเติบโต อัตรารอด และประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลาสายทุก ๆ 60 วัน โดยทำการสุ่มชั่งน้ำหนัก วัดความยาว และบันทึกจำนวนปลาสาย เพื่อศึกษา ด้านการเจริญเติบโต และอัตรารอดในแต่ละชุดทดลอง ได้แก่ น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain : WG) อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (daily gain : DG) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate : SGR%) อัตรารอด (survival rate : SV%) และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว (feed conversion ratio : FCR) ที่ระยะเวลา 12 สัปดาห์ทำการเก็บตัวอย่างเลือดปลา จากเส้นเลือด caudal vein ด้วยเข็มขนาด 21G ความยาว 1 นิ้ว ใช้กระบอกฉีดยาขนาด 3 ml ใส่เลือดลงในหลอดที่มีสาร

ป้องกันการแข็งตัวของเลือด Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) วางบนน้ำแข็งก่อนจะนำไปวิเคราะห์ค่าเคมีในเลือด เก็บตัวอย่างเนื้อปลาโดยใช้มีดผ่าตัดแต่เฉพาะเนื้อปลา แล้วนำไปบดให้ละเอียด เก็บในตู้ -20 °C เพื่อนำไปวิเคราะห์หองค์ประกอบของกรดไขมันในเนื้อปลา เก็บปลาทั้งตัวนำไปบดละเอียด เก็บในตู้ -20 °C เพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาของปลา และเก็บลำไส้ปลาเพื่อนำไปศึกษาประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ปลา

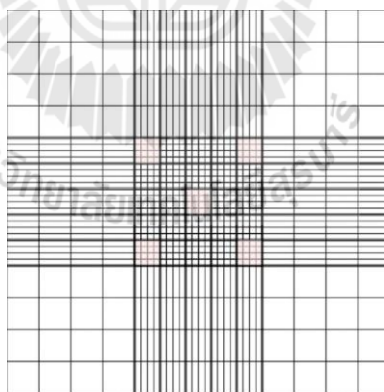
3.4.6 การวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยา

การวิเคราะห์จำนวนเม็ดเลือดรวม (Total haemocyte count : THC)

ตามวิธีของกิจการ อุษณีย์ และจิราพร (2543) โดยเจาะเลือดปลาจาก caudal vein ด้วยเข็มขนาด 21G ความยาว 1.5 นิ้ว ใช้กระบอกฉีดขนาด 3 ml ผสมกับสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ผสมให้เข้ากันเบา ๆ หลังจากนั้นหยดเลือดปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนสไลด์ (haemocytometer) นับจำนวนเม็ดเลือดทั้งหมดด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่า โดยนับในช่องใหญ่ทั้งหมด 5 ช่อง ตรงบริเวณมุมบน ล่าง ซ้าย ขวา และ ตรงกลาง ดังรูปภาพที่ 3.2

การคำนวณปริมาณเม็ดเลือด (total hemocytes count) จำนวนเซลล์เม็ดเลือด/mm³

$$= \text{เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้ทั้งหมด 5 ช่อง} \times 10^4 \times \text{ค่า dilution}$$



ภาพที่ 3.3 ช่อง hemocytometer chamber ที่ใช้นับจำนวนเม็ดเลือด

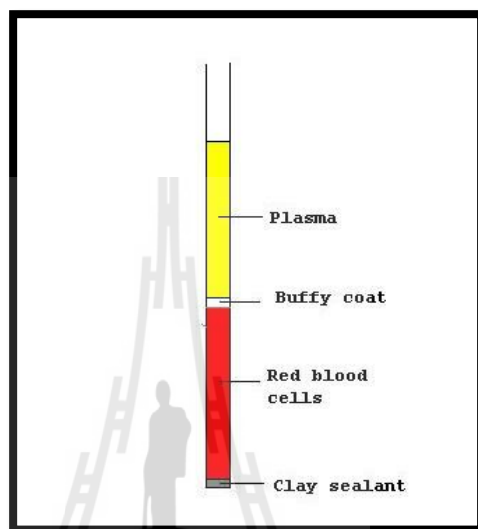
ที่มา : ดัดแปลงมาจาก: <http://www.microbehunter.com/the-hemocytometer-counting-chamber/>

การวัดค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น

บรรจุเลือดปลาที่มีสารป้องกันการแข็งตัวใน microhematocrit capillary tube ประมาณ 4 ใน 5 ของความยาว tube แล้วปิดปลายด้านหนึ่งด้วยดินน้ำมัน นำไปปั่นตกตะกอนที่

ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีคำนวณเปอร์เซ็นต์ฮีมาโตคริตโดยวัดสัดส่วนของเม็ดเลือดแดงอัดแน่นต่อปริมาตรของเลือดทั้งหมด (ภาพที่ 3.5)

$$\% \text{ ฮีมาโตคริต} = \frac{\text{ปริมาตรของเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (เซนติเมตร)}}{\text{ปริมาตรเลือดทั้งหมด (เซนติเมตร)}} \times 100$$



ภาพที่ 3.4 ปริมาตรเลือดทั้งหมด และปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่นใน microhematocrit capillary tube ที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงแล้ว

ที่มา : <http://loudoun.nvcc.edu/vetonline/vet131/introduction.htm>

การวัดค่าฮีโมโกลบิน

ใช้ชุด Hemoglobin set (Cyanmethemoglobin Method) เติมน้ำยา Drabkin Reagent ลงในหลอดแก้ว 5 ml ใส่เลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (EDTA) ลงในหลอด 20 µl เขย่าให้เข้ากัน ตั้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้ Drabkin Reagent เป็น Blank ปรับ 0 จากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงไปคำนวณหาค่าฮีโมโกลบินจากกราฟมาตรฐานซึ่งอยู่ในชุด Hemoglobin set

3.4.7 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเลือด

การวิเคราะห์ค่า serum glucose ใช้ชุด liquid-glucose (GOD-PAP method)

โดยใช้น้ำยาลำเร็จรูปของบริษัท BIOTEH โดยเติม enzyme reagent 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเปิดซีรั่มลงในหลอด 5 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น

500 นาโนเมตรโดยใช้ enzyme reagent เป็น blank หลังจากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาค่า glucose โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่มีสารละลายมาตรฐาน (glucose standard) ความเข้มข้น 0 25 50 75 และ 100 (mg/dl) (Trinder, 1969)

การวิเคราะห์ค่า Serum total protein ใช้ชุด total protein set (biuret method)

โดยใช้น้ำยาลำเรียงรูปของบริษัท BIOTEH โดยเติม biuret reagent ลงในหลอด 300 ไมโครลิตร แล้วปิเปตซีรัมลงในหลอด 5 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาทีนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร โดยใช้ biuret reagent เป็น blank หลังจากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาค่า total protein โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่มีสารละลายมาตรฐาน (protein standard) ความเข้มข้น 0 1.5 3 4.5 และ 6 (mg/dl) (Weichselbaum, 1964; Rosenthal and Cenditt, 1956)

การวิเคราะห์ค่า serum triglycerides ใช้ชุด triglycerides liquid stable reagent (GPO-PAP method) โดยใช้น้ำยาลำเรียงรูปของบริษัท Erba Mannheim

โดยเติม triglycerides reagent 500 ไมโครลิตร แล้วปิเปตซีรัมลงในหลอด 5 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 670 นาโนเมตรโดยใช้ triglycerides reagent เป็น blank หลังจากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาค่า triglycerides โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่มีสารละลายมาตรฐาน (triglycerides standard) ความเข้มข้น 0 66.25 132.5 198.75 และ 265 (mg/dl) (Jacobs and Van Dnmark, 1960; Kodischeck and Umbreit, 1969; Trinder, 1969; Schelttler and Nussel, 1975)

การวิเคราะห์ค่า serum cholesterol ใช้ชุด liquid-cholesterol (CHOD-PAP method)

โดยใช้น้ำยาลำเรียงรูปของบริษัท BIOTEH โดยเติม enzyme reagent (liquid CHOD-POD enzyme) ลงในหลอด 500 ไมโครลิตร ปิเปตซีรัมลงในหลอด 5 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตรโดยใช้ enzyme reagent (liquid CHOD-POD enzyme) เป็น blank หลังจากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาค่า cholesterol โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่มีสารละลายมาตรฐาน (cholesterol standard) ความเข้มข้น 0 50 100 150 และ 200 (mg/dl) (Richmond, 1973; Thomas, Laborand Diagnose, 1992)

การวิเคราะห์ค่า serum urea nitrogen (BUN) ใช้ชุด liquid-BUN (urease colorimetric method)

โดยใช้น้ำยาลำเรียงรูปของบริษัท BIOTEH โดยเติม working enzyme reagent (ละลาย liquid urease ด้วย BUN enzyme diluent) ลงในหลอด 500 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ปิเปตซีรัมลงในหลอด 10 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

จากนั้นเติม color reagent (เจือจาง conc. BUN color reagent 1 ส่วน ด้วยน้ำกลั่น 3 ส่วน) 500 มิลลิลิตร ในหลอดเดิม ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร โดยใช้ working enzyme reagent ผสมกับ color reagent เป็น blank หลังจากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาค่า urea nitrogen โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่มีสารละลายมาตรฐาน (BUN standard) ความเข้มข้น 0 3 9 15 และ 21 (mg/dl) (Searcy, Rearchy, Reardon, and Foremwn, 1967)

การวิเคราะห์ค่า serum chloride ใช้ชุด chloride set (thiocyanate method)

โดยใช้น้ำ ยาสำเร็จรูปของบริษัท BIOTEH โดยการเติม chloride reagent 500 ไมโครลิตร หลังจากนั้นปิเปตซีรัมลงในหลอด 7.5 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร โดยใช้ chloride reagent เป็น blank หลังจากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาค่า chloride โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่มีสารละลายมาตรฐาน (chloride standard) ความเข้มข้น 0 25 50 75 และ 100 (mg/dl) (Swain, 1956)

3.4.8 การวิเคราะห์ค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ

การวิเคราะห์ lysozyme activity

เป็นการวิเคราะห์การทำลายแบคทีเรียแกรมบวก *Micrococcus lysodeikiticus* ของ lysozyme ในซีรัมของปลาซวยเทียบกับการทำลายแบคทีเรียแกรมบวก *M. lysodeikiticus* ของ lysozyme จากไข่ขาวของไก่ที่ความเข้มข้น 0 2.5 5 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ โดยทำการใส่ standard lysozyme หลุมละ 10 ไมโครลิตร จำนวน 3 ซ้ำ และใส่ซีรัมหลุมละ 10 ไมโครลิตร จำนวน 3 ซ้ำ ลงในถาดหลุม (96 well plate) หลังจากนั้นสารละลายเชื้อ *M. lysodeikiticus* ในหลุมที่มี standard lysozyme และซีรัมหลุมละ 190 ไมโครลิตร แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 15 นาที โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร โดยบันทึกค่าการดูดกลืนแสงทุก ๆ 15 นาที

การวิเคราะห์ ACH 50

การวิเคราะห์ค่า alternative complement pathway ทำตามวิธีการของ Montero et al. (1998) ดังนี้ นำเม็ดเลือดแดงแพะมาล้างด้วยสารละลาย GVB-EGTA (Gelatin Veranol Buffer; 10 mM batbital 145 mM NaCl 0.1 % gelatin 0.5 mM MgCl_2 10 mM EGTA pH 7.3-7.4) 3 ครั้ง แล้วปรับความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงให้เท่ากับ 2×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตรในบัฟเฟอร์เดิมทำการเจือจางซีรัมด้วย GVB-EGTA ให้ได้ปริมาตรเท่ากับ 250 ไมโครลิตรที่ระดับ 10% 5 % 2.5 % 1.25% และ 0.625% ใช้ GVB-EGTA ในหลอดที่จัดเป็นกลุ่ม spontaneous lysis และใช้น้ำกลั่นเป็นหลอดที่มีการ haemolysis 100% เติมสารละลายเม็ดเลือดแดงที่ปรับความเข้มข้นแล้ว 100 ไมโครลิตร ในหลอดที่มีซีรัมหลอดที่มีบัฟเฟอร์อย่างเดียวยและหลอดที่มีน้ำกลั่นอย่างเดียวยตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

90 นาที แล้วเติมสารละลาย 0.85% NaCl ลงไปทุกหลอดหลอดละ 1 มิลลิลิตรนำไปปั่นที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายส่วนบนมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ Total immunoglobulin (Total ig)

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในพลาสมาทำโดยใช้ชุดทดสอบ colorimetric Lowry micro-method (Sigma) การวัดค่าปริมาณ total immunoglobulin ทำตามวิธีการที่ได้รายงานไว้ใน Siwicki et al. (1994) โดยการวิเคราะห์ทำโดยการตกตะกอนของ total immunoglobulin ด้วยสารละลาย 12% polyethylene glycol แล้ววัดปริมาณโปรตีนของสารละลายหลังตกตะกอนปริมาณ total immunoglobulin หาได้จากค่าความแตกต่างระหว่างปริมาณโปรตีนก่อนตกตะกอนและปริมาณโปรตีนหลังตกตะกอน

3.4.9 การวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร

หลังจากทดลองเป็นระยะเวลา 60 และ 120 วัน จะทำการสุ่มเก็บตัวอย่างลำไส้ปลาสดวางครึ่งละ 2 ตัวต่อกระชัง โดยใช้มีดผ่าตัดที่ปลอดเชื้อกรีดบริเวณช่องท้องจนเห็นทางเดินอาหาร แล้วทำการเลาะเพื่อแยกส่วนที่เป็นลำไส้ออกมา นำลำไส้ปลาสดมาบดให้ละเอียดในที่บดปลอดเชื้อ แล้วนำมาเจือจางด้วย 0.85% sodium chloride ในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 และ 1 : 100 (ten-folded dilutions) จากนั้นการตรวจนับเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี viable plate count ในอาหารเลี้ยงเชื้อ thiosulphate citrate bile salt sucrose (TCBS) plate count agar (PCA) sabouraud dextrose agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง และ lactobacillus agar (MRS) bifidobacterium agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เพื่อบันทึกจำนวนโคโลนี

3.4.10 การวิเคราะห์ค่าองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อปลา

เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ระยะเวลา 60 และ 120 วัน จะทำการสุ่มเก็บตัวอย่างเนื้อสวายจากแต่ละทรีตเมนต์ หลังจากนั้นนำไปบดให้ละเอียด เพื่อนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี (proximate analysis) ด้วยวิธี AOAC (2000) ได้แก่ การวิเคราะห์โปรตีน (crude protein) ไขมัน (crude lipid) เถ้า (ash) และความชื้น (moisture)

3.4.11 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในเนื้อปลา

ทำการชั่งเนื้อปลาที่ทำกรบดละเอียดแล้ว 5 g ลงโถปั่น ขนาด 1000 ml เติม Chloroform : Methanol (2 : 1) 60 ml ปั่นละเอียด ที่ 3000 rpm 5 นาที แล้วนำไปกรองผ่าน Buchner funnel ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จัดล้างส่วนที่ค้างอยู่ในโถปั่นและกระดาษกรองด้วย Chloroform : Methanol (2 : 1) แล้วนำส่วนที่กรองได้เทลงในกรวยแยก (Separatory funnel) แล้วเติม 0.03 M $MgCl_2$ 24 ml แล้วเติม 1% BHT 1 ml ทำการเขย่าให้สารผสมเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเปิดวาล์วเพื่อให้แก๊สออก แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นอย่างน้อย 6 ชั่วโมง เก็บไว้ในที่ที่ไม่มีแสงสว่าง เมื่อแยกชั้นแล้วจึงไขส่วน

chloroform ชั้นล่างออกใส่ในขวดแก้วกันกลมที่ทราบน้ำหนักแน่นอน แล้วนำไประเหย chloroform ออกใน Rotary evaporator จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนัก จดบันทึกน้ำหนัก แล้วใส่ Isooctane ลงไป 2 ml และ internal standard (C17 : 0) 1 ml เพื่อนำไปทำ saponification โดยการไปทำให้แห้งภายใต้สภาวะที่มีแก๊สไนโตรเจน และเติม 0.5 N NaOH ใน methanol 1.5 ml เขย่าให้ผสมกันนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 7 นาที มีการเขย่าเป็นครั้งคราว แล้วนำมาทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วเติม 14% BF₃-MeOH 2 ml แล้วผสมให้เข้ากัน แล้วต้มที่ อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นจนได้อุณหภูมิประมาณ 30-40 °C จึงเติม Isooctane 1 ml เขย่าให้ผสมกัน และดูดส่วนของ Isooctane ไปใส่ในขวดใหม่ แล้วนำไปทำให้แห้ง ภายใต้สภาวะที่มีแก๊สไนโตรเจน จากนั้นเติม Hexane 1 ml แล้วนำไปฉีด Gas Chromatography (GC) โดยใช้เครื่อง GC รุ่น GC2014 (Shimadzu, Japan) โดยใช้คอลัมน์ SP™-2560 Capillary GC Column (Sigma-Aldrich Pte Ltd) ขนาด 100 m × 0.25 mm ID × 0.20 µm โดยใช้แก๊สไนโตรเจนเป็น carrier gas ที่ความเร็ว 20 เซนติเมตรต่อวินาที อัตราส่วนการปล่อยสาร 25 : 1 อุณหภูมิ injector เท่ากับ 230 °C อุณหภูมิ detector เท่ากับ 250 °C และมีสภาวะการเปลี่ยนอุณหภูมิของคอลัมน์โดยเริ่มต้นที่ 140 °C เพิ่มอุณหภูมิเป็น 220 °C ด้วยอัตรา 4 °C ต่อนาที เป็นเวลา 40 นาที ปริมาณสารที่ฉีด 1 µl คัดแปลงวิธีจาก Morrison and Smith (1964) ใช้ 37 component FAME standard (Supelco, Sigma, USA) เป็น standard ทำการวิเคราะห์ fatty acid โดยการเปรียบเทียบกับ standard

3.4.12 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้ analysis of variance (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้ (DMRT) duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 16.0 วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยใช้ pair sample T-testss

บทที่ 4

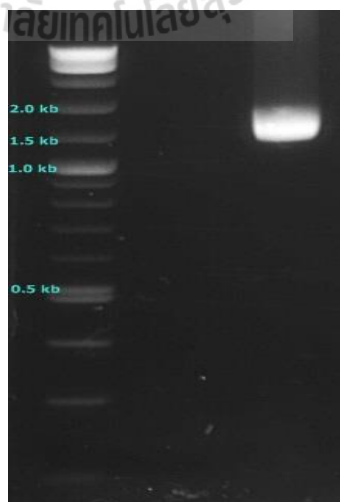
ผลการศึกษา

4.1 ผลการทดลองที่ 1 ผลิตภัณฑ์ *S. Cerevisiae* ให้มีการผลิตเอนไซม์ Delta 6 desaturase ของปลาซวาย (*P. hypophthalmus*)

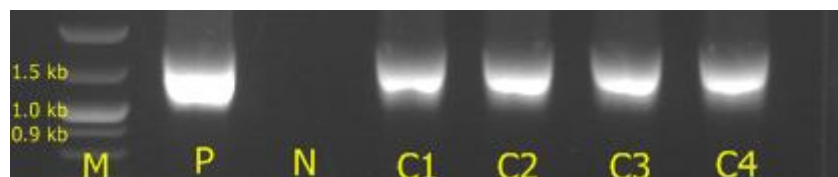
4.1.1 ผลของการโคลน delta 6 desaturase cDNA จากปลาซวาย (*P. hypophthalmus*)

การโคลน cDNA ของยีน delta 6 desaturase (*Phy-Fad2*) ในปลาซวาย พบว่าได้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกับชิ้นดีเอ็นเอที่คาดการณ์ไว้ (ภาพที่ 4.1) จึงนำเอาผลผลิต PCR มาทำให้บริสุทธิ์และนำมาเชื่อมต่อกับ pGEM-T easy vector ได้เป็นพลาสมิดลูกผสม และทำการถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่ (transformation) จุลินทรีย์ *E. Coli* จากนั้นทำการสุ่มโคลน 5 โคลนนี้มาสกัดพลาสมิดลูกผสมและทำวิเคราะห์ยีน *Phy-Fad2* ด้วยวิธี colony-PCR แสดงดังภาพที่ 4.2 โดยพบว่าผลผลิต PCR ที่ได้มีขนาดประมาณ 1,300 คู่เบส ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ายีน *Phy-Fad2* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,388 คู่เบส (ภาพที่ 4.3) และมีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับยีน *Fad2* ของปลาอื่น ๆ (ตารางที่ 4.1)

ยีน *Phy-Fad2* แปลเป็นโปรตีนเอนไซม์ delta 6 desaturase (*Phy-Δ6*) แสดงดังภาพที่ 4.4 ประกอบด้วยกรดอะมิโนได้ 445 กรดอะมิโนและโปรตีน *Phy-Δ6* มีความคล้ายคลึงของกรดอะมิโนกับเอนไซม์ $\Delta 6$ ของปลาอื่น ๆ แสดงดังตารางที่ 4.2



ภาพที่ 4.1 แสดงผลของขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *Phy-Fad2* ที่ผ่านการทำ PCR และตรวจสอบด้วย Agarosegel electrophoresis



ภาพที่ 4.2 แสดงผลของการตรวจสอบการสกัดพลาสมิดด้วย PCR และตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis

หมายเหตุ : M = Marker; P = Positive control; N = Negative control; C1-C4 = Bacteria Colony1-4

1	ATGGGCGGCGGAGGACACCGGGGTGAGCAGCTGGGGTCAGGAGAGAGCGGCTCATGCGCA	60
61	CAGTACACCTGGGAAGAAAGTGCAGAAGCACAATCGCAGGGGTGATCAATGGCTGGTGATT	120
121	GAGAGAAAAGTGTACAATGTGAGTGAGTGGACGAAAAGACACCTGGAGGACGCAGAGTT	180
181	CTAGCGCACTATGCTGGAGAGGACGCAACGGATGCATTTACGGCCTTCCATCCGGATCAG	240
241	CGATTCGTCGCGAAGTTTCATGAAGCCGCTGCTGCTGGGAGAGTTGGCGCCTTCGGAGCCC	300
301	AGTCAAGACCATGGCAAAAACGCTGCTTTAATGGAAGATTTCCGGGCCTTGCGTAAGCAG	360
361	TTGGAGGCACAGGGCTTGTTCGACACAGCCCGCTGTTTTTATCCTATACCTTGGACAC	420
421	ATTCTGCTCTTGGAGGCCCTGTCTTTAGCACTCCTTTGACATTTGGCAATGGCTGGATT	480
481	ATGACAATTCTAGTGTCTGTCACTAGGCCACTGCACAGGCTCAGGCTGGCTGGCTTCAG	540
541	CATGACTTTGGCCACCTGTCACTTTTCAAAAATTCACCTGGGATCACGTAGTGCACAAA	600
601	TTTGTCTATTGGACACCTGAAGGGGGCTTCTGCAAAATGGTGGAACCATCGCCACTTTCAG	660
661	CACCATGCTAAGCCCAATGTGGTCAAGAAGGACCCTGACATCAACATGCTGAACATACTG	720
721	GTCTTGGGAAACATCCTGCCTGTTGAGTATGGGACTAAAAAGTTGAAGCACTTGCCCTAT	780
781	AACCATCAGCACAAGTACTTCTTTTGTATGGCCCTCCCTGCTCATACCACTGTACTTT	840
841	AACATGCACATTTTGCAAACGATGTATTTGCAACGGGATTGGGTGGATTTTGCATGGTAT	900
901	CTGTCTACTATGCACGTTACCTCACGTGTATGTTCCCTATTATGGAGTTCTGGGATCT	960
961	TTCGTGCTTCTGACTTTTGTAAAGTTTATGGAGAGTCACTGGTTTGTGTGGGTGACCCAG	1020
1021	ATGAACCACATTTCCCATGGACATTGACTATGACAAAAATGATGACTGGCTCAGCATGCAG	1080
1081	TTGAAAGCTACTTGTAAATATTGAGCATTACGCGTTCAATGATTGGTTTCAGCGCCATCTC	1140
1141	AACTTCCAGATTGAGCACCATCTCTTTCCCATGATGCCCTCGCCATAACTATAGCCGTGCG	1200
1201	GCTCCTCAAGTACGAAAACCTTTGTGAGAAGTACGGAGTTAAGTATCAGGTCAAAGGCCTG	1260
1261	TGGGAATCCTGGTGTGACATTGTGAGGCTTTGAAGAAGTCTGGTGAGCTGTGGCTAGAT	1320
1321	GCCTACCTTCACAAATAA	1380

ภาพที่ 4.3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Phy-Fad2* ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 1,338 bp

1	MGGGGHRGEQLGSGESGSCAQYTWEVQKHNRGDQWLVIERKVYNVSEWTKRHPGGRRV	60
61	LAHYAGEDATDAFTAFHPDQRFVRKFMKPLLLGELAPSEPSQDHGKNAALMEDFRALRKQ	120
121	LEAQGLFRTSPLFFILYLGHILLLEALSLALLSTFGNGWIMTILVSVILATAQAQAGWLQ	180
181	HDFGHLVSVFKNSTWDHVVKFVIGHLKGASANWNHRHFQHHAKPNVVKDPDINMLNIL	240
241	VLGNILPVEYGTKKLKHLPYNHQHYFFLIGPPLLIPLYFNMHILQTMYLQRDWVDFAWY	300
301	LSYYARYLTCYVPYYGVLGSFVLLTFVRFMESHWFVWVTQMNHIMPMDIDYDKNDWLSMQ	360
361	LKATCNIEHSAFNDWFSGHLNFQIEHHLFPMMPRHYSRAAPQVRKLCEKYGVKYQVKGL	420
421	WESWCDIVRSLKKSGELWLDAYLHK	480

ภาพที่ 4.4 แสดงลำดับกรดอะมิโนของยีน *Phy-Fad2* ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนทั้งหมด 445 กรดอะมิโน

ตารางที่ 4.1 แสดงผลของความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Phy-Fad2* ของปลาสาวยกับของปลาชนิดอื่น ๆ

Description	Identity	Accession
<i>Pangasianodon hypophthalmus</i> delta-6 desaturase mRNA, complete cds	99%	JX035811.1
<i>Pangasianodon hypophthalmus</i> delta-6 desaturase mRNA, partial cds	99%	JN565290.1
<i>Pangasius larnaudii</i> fatty acyl desaturase mRNA, complete cds	96%	KC994461.1
<i>Ictalurus punctatus</i> delta-6 desaturase mRNA, partial cds	93%	EF125211.1
<i>Clarias macrocephalus</i> fatty acyl desaturase mRNA, complete cds	91%	KF006248.1
<i>Clarias macrocephalus</i> x <i>Clarias gariepinus</i> fatty acyl desaturase mRNA, complete cds	89%	KC994463.1
<i>Tachysurus fulvidraco</i> fatty acyl Delta6 desaturase (Delta6FAD) mRNA, complete cds	88%	KJ831068.1
<i>Dicentrarchus labrax</i> fatty acid delta-6 desaturase genomic sequence, complete cds	83%	FP671139.1
PREDICTED: <i>Astyanax mexicanus</i> fatty acid desaturase 2-like (LOC103027972), mRNA	81%	XM_007235121.1
PREDICTED: <i>Jaculus jaculus</i> fatty acid desaturase 1 (Fads1), mRNA	79%	XM_004667560.2
<i>Barbonymus gonionotus</i> delta-6 fatty acyl desaturase (Fadsd6) mRNA, partial cds	79%	JX678221.1

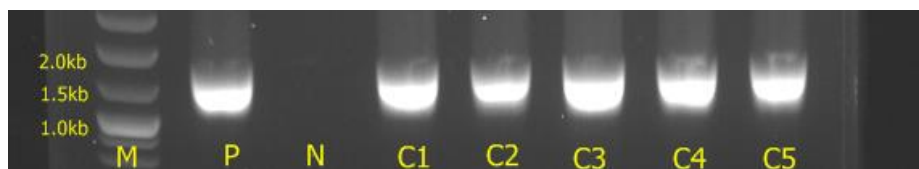
ตารางที่ 4.2 แสดงผลของความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนของยีน *Phy-Fad2* ของปลาสาวยกับปลาชนิดอื่น ๆ

Description	Identity	Accession
delta-6 desaturase [<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>]	100%	AFN21428.1
fatty acyl desaturase [<i>Pangasius larnaudii</i>]	95%	AGR45585.1
fatty acyl desaturase [<i>Clarias macrocephalus</i>]	90%	AGR45589.1
fatty acyl desaturase [<i>Clarias macrocephalus</i> x <i>Clarias gariepinus</i>]	87%	AGR45587.1
PREDICTED: fatty acid desaturase 2-like [<i>Astyanax mexicanus</i>]	81%	XP_007235183.1
fatty acyl Delta6 desaturase [<i>Tachysurus fulvidraco</i>]	83%	AJQ20793.1
PREDICTED: fatty acid desaturase 2-like [<i>Xiphophorus maculatus</i>]	70%	XP_005807012.1
PREDICTED: fatty acid desaturase 2-like [<i>Cyprinodon variegatus</i>]	71%	XP_015248154.1
PREDICTED: fatty acid desaturase 2-like [<i>Poecilia latipinna</i>]	70%	XP_014901745.1
PREDICTED: fatty acid desaturase 2-like [<i>Poecilia formosa</i>]	70%	XP_007556957.1
PREDICTED: fatty acid desaturase 2-like [<i>Oreochromis niloticus</i>]	70%	XP_005470690.1
PREDICTED: fatty acid desaturase 2-like [<i>Poecilia reticulata</i>]	70%	XP_008410347.1
delta 6 desaturase [<i>Scatophagus argus</i>]	70%	AHA62794.1

4.1.2 ผลของการผลิต Recombinant yeast (RY)

การศึกษานี้ได้ทำการตัดต่อยีน *Phy-Fad2* เพื่อเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pTEF เพื่อให้ได้พลาสมิดลูกผสมที่มียีน pTEF-*Phy-Fad2* (ภาพที่ 3.2) โดยพลาสมิดลูกผสม pTEF-*Phy-Fad2* จะมีโปรโมเตอร์ TEF (Transcription Elongation Factor) ที่เป็นบริเวณสั่งการและควบคุมการแสดงออกของยีน *Phy-Fad2* เมื่อนำพลาสมิดลูกผสม pTEF-*Phy-Fad2* ถ่ายสู่ยีสต์ *S. cerevisiae* ได้เป็นรีคอมบีแนนท์ยีสต์ (RY) และได้ทำการสุ่มโคลนนิ่งของรีคอมบีแนนท์ยีสต์มาตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม pTEF-

Phy-Fad2 โดยทำการสกัดพลาสมิดจากเซลล์รีคอมบีแนนท์ยีสต์ และทำการตรวจสอบยีน *Phy-Fad2* ด้วยวิธี colony-PCR ภาพที่ 4.5 ซึ่งสามารถตรวจพบยีน *Phy-Fad2* แสดงว่ารีคอมบีแนนท์ยีสต์ที่ผลิตได้นี้มียีน *Phy-Fad2*

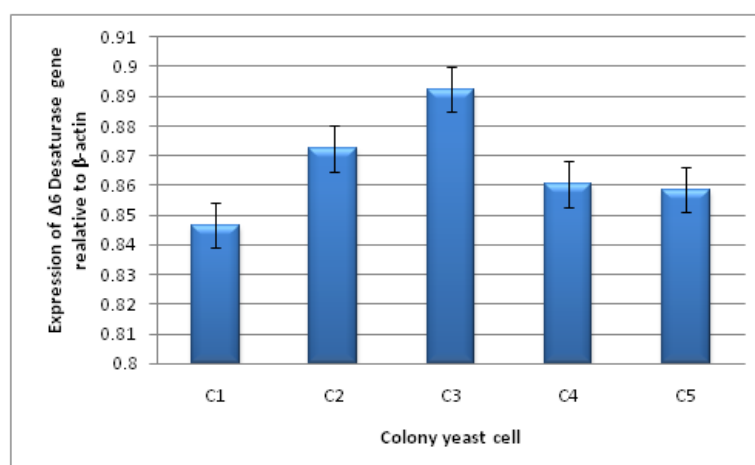


ภาพที่ 4.5 แสดงผลของการตรวจสอบความเป็นรีคอมบีแนนท์ยีสต์ ด้วย PCR และตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis

หมายเหตุ : M = Marker; P = Positive control; N = Negative control; C1-C5 = Yeast Colony1-5

4.1.3 ผลของการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *Phy-Fad2* ในเซลล์ยีสต์ ด้วยวิธี Realtime PCR

ทำการสุ่มรีคอมบีแนนท์ยีสต์ (RY) ที่มีการตรวจพบยีน pTEF-*Phy-Fad2* จำนวน 5 โคโลนี (C1 C2 C3 C4 และ C5) มาวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *Phy-Fad2* ด้วยวิธี Realtime-RT-PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ D6PH_F_RT กับ D6PH_R_RT (ตารางที่ 3.1) ผลการศึกษาแสดงดังภาพที่ 4.6 พบว่าโคโลนี C3 มีการแสดงออกสูงที่สุด หรือมีปริมาณ mRNA ของยีน *Phy-Fad2* มากที่สุด ดังนั้นการทดลองนี้จึงใช้รีคอมบีแนนท์ยีสต์ โคโลนี RY3 ในการศึกษาการทำงานของเอ็นไซม์ *Phy-Δ6* ต่อไป



ภาพที่ 4.6 แสดงปริมาณการแสดงออกของยีน *Phy-Fad2* ในเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae*

4.1.4 ผลของการศึกษาการทำงานของเอ็นไซม์ Phy- $\Delta 6$ ในยีสต์ RY

การศึกษานี้ได้ทำการผลิตรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่มีพลาสมิด pTEF ซึ่งมีแผนที่และโครงสร้างแสดงดังภาพที่ เป็นพลาสมิดที่มีส่วนอื่นต่าง ๆ เช่นเดียวกับ pTEF-*Phy-Fad2* แต่ไม่มียีน *Phy-Fad2* ดังนั้นเรียกรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่มีพลาสมิด pTEF ว่า RY-pTEF

การศึกษการทำงานของเอ็นไซม์ Phy- $\Delta 6$ ในยีสต์ RY3 โดยการเลี้ยงยีสต์ 3 ชนิด ได้แก่ ยีสต์ wildtype (WT) RY-pTEF และ RY ในอาหาร YPD ที่มีการเติมกรดไขมันตั้งต้น (substrate) ในกลุ่ม n-6 คือ C18 : 2n6 มีผลทำให้เกิดปริมาณของกรดไขมัน C18 : 3n6 ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ (product) มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้พบว่าปริมาณของกรดไขมันชนิด C20 : 3n6 มีปริมาณสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณของกรดไขมันชนิด C20 : 3n6 ในยีสต์ ในยีสต์ WT และ RY-pTEF ผลแสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงองค์ประกอบของกรดไขมันเมื่อได้รับ C18 : 2n6 เป็นสารตั้งต้น

Fatty acid	C18 : 2n6 Substrate		
	RY (mg/g lipid)	RY-pTEF (mg/g lipid)	WT (mg/g lipid)
C8 : 0	0.34±0.005	0.34±0.010	0.34±0.004
C10 : 0	0.95±0.030	0.94±0.030	0.93±0.045
C12 : 0	1.14±0.030	1.16±0.040	1.11±0.030
C14 : 0	1.03±0.020	1.04±0.040	1.04±0.025
C16 : 0	15.57±0.100	15.67±0.320	15.34±0.330
C18 : 0	8.41±0.210	8.39±0.250	8.53±0.100
C20 : 0	0.44±0.010	0.44±0.002	0.44±0.002
C22 : 0	0.18±0.003	0.09±0.002	0.10±0.003
C16 : 1	1.55±0.083	1.59±0.087	1.60±0.120
C18 : 1n9 cis	11.15±0.130	11.30±0.068	11.09±0.040
C22 : 1n9	0.09±0.004	0.08±0.003	0.09±0.003
C18 : 2n6 cis	9.95±0.725	13.75±0.45	14.46±0.35
C18 : 3n6	0.28±0.004	-	-
C20 : 3n6	0.06±0.003	-	-
C20 : 2n6	0.20±0.002	0.20±0.003	0.20±0.002
C22 : 6n3	0.45±0.007	0.44±0.029	0.46±0.030
Sum SFA	28.05±0.220	28.07±0.150	27.82±0.270
Sum MUFA	12.78±0.170	12.97±0.110	12.77±0.150
Sum PUFA	11.03±0.730	14.39±0.440	15.11±0.330
Sum n6	10.48±0.730	13.95±0.450	14.65±0.340
Sum n3	0.45±0.010	0.44±0.030	0.46±0.030

ได้มีการศึกษาการทำงานของเอ็นไซม์ Phy- $\Delta 6$ ในยีสต์ RY เพิ่มเติม ในกลุ่มของกรดไขมัน n-3 โดยการเลี้ยงยีสต์ 3 ชนิด ได้แก่ ยีสต์ WT RY-pTEF และ RY ในอาหาร YPD ที่มีการเติมกรดไขมันตั้งต้นในกลุ่ม n3 คือ C18 : 3n3 มีผลทำให้เกิดปริมาณของกรดไขมัน C18 : 4n3 ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 4.4 และยังพบว่าปริมาณของกรดไขมันชนิด C20 : 4n3 มีปริมาณสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ ในยีสต์ WT และ RY-pTEF

ตารางที่ 4.4 แสดงองค์ประกอบของกรดไขมันเมื่อได้รับ C18 : 3n3 เป็นสารตั้งต้น

Fatty acid	C18 : 3n3 Substrate		
	RY (mg/g lipid)	RY-pTEF (mg/g lipid)	WT (mg/g lipid)
C8 : 0	0.35±0.010	0.35±0.020	0.35±0.020
C10 : 0	1.06±0.020	0.98±0.050	1.04±0.020
C12 : 0	1.06±0.030	1.03±0.070	1.05±0.040
C14 : 0	1.01±0.050	1.04±0.040	1.05±0.060
C16 : 0	15.45±0.620	16.36±0.850	16.11±0.380
C18 : 0	8.43±0.150	8.21±0.150	8.54±0.270
C20 : 0	0.45±0.010	0.43±0.010	0.45±0.010
C22 : 0	0.19±0.003	0.12±0.004	0.14±0.004
C16 : 1	1.45±0.056	1.33±0.230	1.48±0.130
C18 : 1n9C	11.45±0.180	11.80±0.200	11.61±0.350
C22 : 1n9	0.06±0.004	0.06±0.003	0.06±0.003
C18 : 3n3	19.37±0.400	26.32±0.160	26.34±0.240
C18 : 4n3	0.75±0.010	-	-
C20 : 4n3	0.75±0.020	0.28±0.010	0.27±0.001
C22 : 6n3	0.64±0.010	0.64±0.030	0.66±0.030
Sum SFA	28.01±0.790	28.54±0.780	28.71±0.560
Sum MUFA	12.96±0.130	13.18±0.390	13.15±0.480
Sum PUFA	21.50±0.390	27.24±0.140	27.27±0.220
Sum n3	21.50±0.39	27.24±0.14	27.27±0.22

4.2 ผลการทดลองที่ 2 ศึกษาผลของการเสริมยีสต์ที่มีการตัดต่อยีน *Phy-Fad2* ในอาหารปลาสาวย

4.2.1 ผลของการเสริมในอาหารปลาสาวยต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต อัตราการรอด

การทดลองการเสริมยีสต์ในอาหารปลาประกอบด้วย กลุ่มทดลอง 7 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มทดลองที่ใช้อาหารพื้นฐาน (Control) กลุ่มทดลองที่ใช้อาหารเสริมยีสต์ wildtype ที่ระดับ 5×10^6 (WT 10^6) เซลล์ต่อกรัมอาหาร กลุ่มทดลองที่ใช้อาหารเสริมยีสต์ wildtype ที่ระดับ 5×10^8 (WT 10^8) เซลล์ต่อกรัมอาหาร กลุ่มทดลองที่ใช้อาหารเสริมยีสต์ Empty plasmid (RY-pTEF) ที่ระดับ 5×10^6 (RY-pTEF 10^6) เซลล์ต่อกรัมอาหาร กลุ่มทดลองที่ใช้อาหารเสริมยีสต์ Empty plasmid (RY-pTEF) ที่ระดับ 5×10^8 (RY-pTEF 10^8) เซลล์ต่อกรัมอาหาร กลุ่มทดลองที่ใช้อาหารเสริมยีสต์ Recombinant yeast (RY) ที่ระดับ 5×10^6 (RY 10^6) เซลล์ต่อกรัมอาหาร และกลุ่มทดลองที่ใช้อาหารเสริมยีสต์ Recombinant yeast (RY) ที่ระดับ 5×10^8 (RY 10^8) เซลล์ต่อกรัมอาหาร

ผลการศึกษาการเลี้ยงปลาด้วยอาหารเสริมยีสต์ทั้ง 6 กลุ่มทดลอง เป็นระยะเวลา 120 วัน โดยทำการเก็บข้อมูล 2 ช่วง คือที่ระยะเวลา 60 และ 120 วัน ผลการทดลองสมรรถนะการเจริญเติบโตและอัตราการรอดที่ระยะเวลา 60 วัน แสดงดังตารางที่ 4.5 พบว่าปลาทั้ง 6 กลุ่มทดลอง มีน้ำหนักตัวสุดท้าย (Final weight) น้ำหนักตัวที่เพิ่ม (Weight gain) ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate) ค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) เมื่อทดลองเลี้ยงปลาเป็นระยะเวลา 120 วัน (ตารางที่ 4.5) พบว่าปลาในกลุ่มทดลองที่มีการเสริมยีสต์ทั้งหมด ได้แก่ กลุ่ม WT 10^6 WT 10^8 RY-pTEF 10^6 RY-pTEF 10^8 RY 10^6 RY 10^8 มีค่าน้ำหนักตัวสุดท้าย น้ำหนักตัวที่เพิ่ม ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ สูงกว่ากลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และปลาทดลองที่มีการเสริมยีสต์ทั้ง 6 กลุ่มดังกล่าวมีค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อต่ำกว่ากลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

อัตราการรอดของปลาทดลองทุกกลุ่มทดลองที่ทดลองเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วันและ 120 วัน (ตารางที่ 4.5) มีค่าอยู่ในระหว่าง 95-97 เปอร์เซ็นต์ และไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

ตารางที่ 4.5 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสดต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตและอัตราการรอดที่ระยะเวลาการเลี้ยง 60 วันและ 120 วัน (Mean±SD)

treatment	Initial weight (g)	Final Weight (g)	Weight gain (g)	SGR (%/day)	FCR	Survival (%)
60 วัน						
Control	62.40±3.90	236.90±2.79	174.50±3.66	2.22±0.10	1.03±0.04	97.34±2.80
WT 10 ⁶	61.20±2.59	236.16±5.78	174.96±5.05	2.25±0.06	1.01±0.04	97.34±2.80
WT 10 ⁸	60.00±2.83	238.07±8.91	178.07±7.90	2.30±0.07	1.00±0.05	96.66±3.35
RY-pTEF 10 ⁶	60.50±3.94	234.76±3.34	174.26±6.57	2.26±0.13	1.01±0.07	97.34±2.80
RY-pTEF 10 ⁸	60.00±6.44	234.88±8.49	174.88±8.24	2.28±0.16	1.01±0.06	97.34±2.80
RY 10 ⁶	62.90±3.88	237.55±2.90	174.65±5.30	2.22±0.11	1.00±0.04	97.34±2.80
RY 10 ⁸	63.20±2.68	243.19±4.67	179.99±5.09	2.25±0.07	0.99±0.05	97.34±2.80
120 วัน						
Control	62.40±3.90	396.50±13.90 ^b	334.10±11.29 ^b	1.54±0.04 ^b	2.01±0.07 ^a	95.56±3.10
WT 10 ⁶	61.20±2.59	450.83±18.35 ^a	389.63±16.19 ^a	1.66±0.02 ^a	1.71±0.07 ^b	97.04±3.10
WT 10 ⁸	60.00±2.83	451.06±17.17 ^a	391.06±16.45 ^a	1.68±0.04 ^a	1.69±0.06 ^b	95.56±3.10
RY-pTEF 10 ⁶	60.50±3.94	450.93±19.00 ^a	390.43±15.60 ^a	1.67±0.03 ^a	1.69±0.08 ^b	96.30±2.62
RY-pTEF 10 ⁸	60.00±6.44	461.24±16.20 ^a	401.24±19.78 ^a	1.70±0.10 ^a	1.64±0.11 ^b	96.30±2.62
RY 10 ⁶	62.90±3.88	450.21±18.02 ^a	387.31±19.54 ^a	1.64±0.07 ^a	1.67±0.11 ^b	95.56±3.10
RY 10 ⁸	63.20±2.68	457.38±16.59 ^a	394.18±16.63 ^a	1.65±0.05 ^a	1.65±0.10 ^b	96.30±2.62

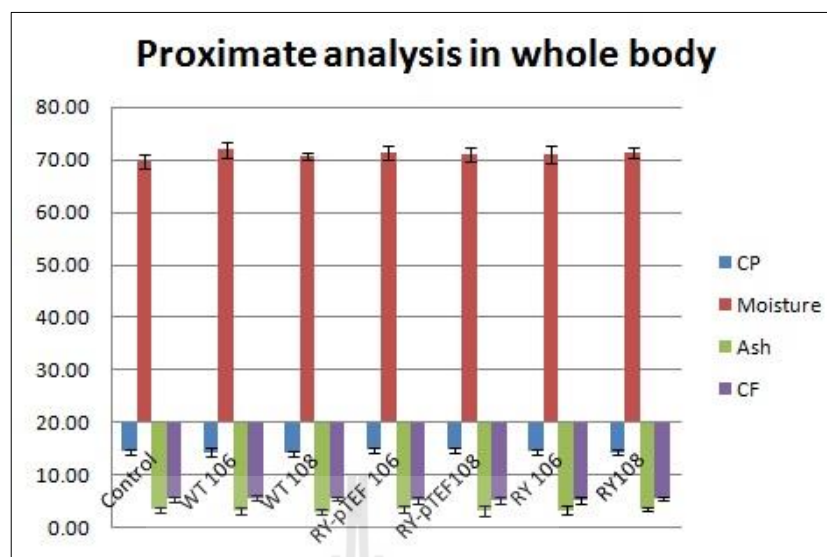
หมายเหตุ : ตัวอักษร a b ในแถวแนวนึง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

SGR = Specific growth rate

FCR = Feed conversion ratio

4.2.2 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสดต่อองค์ประกอบทางโภชนาในตัวปลาสด

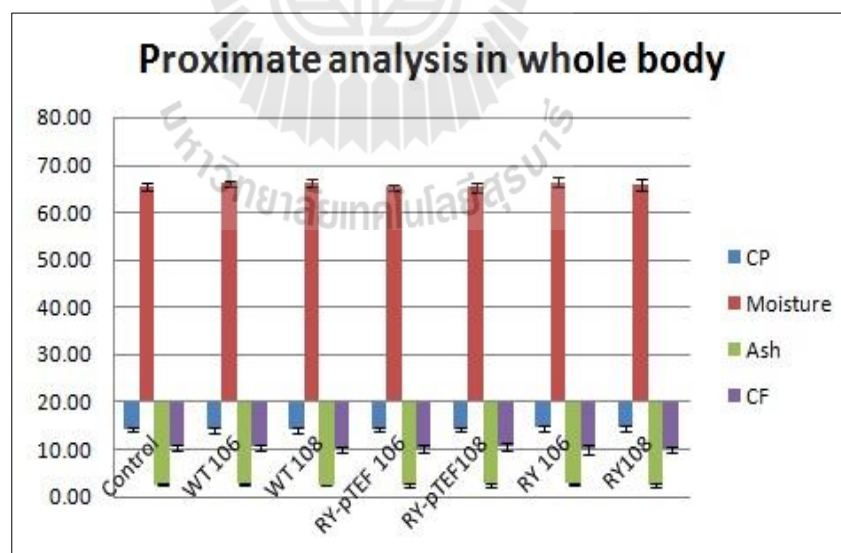
ผลการศึกษาการเสริมในอาหารปลาสดต่อองค์ประกอบทางโภชนาในตัวปลาสดที่ระยะเวลา 60 วัน และ 120 วัน ดังแสดงภาพที่ 4.7 และ 4.8 พบว่าองค์ประกอบทางโภชนาในตัวปลาสดทุกกลุ่มทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มสูตรอาหารพื้นฐาน



ภาพที่ 4.7 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสดต่อองค์ประกอบทางโภชนา (wet weight) ในตัวปลาสดที่ระยะเวลาการเลี้ยง 60 วัน (Mean±SD)

หมายเหตุ : CP = crude protein; CF = crude fat

หน่วยวัด : เปอร์เซ็นต์



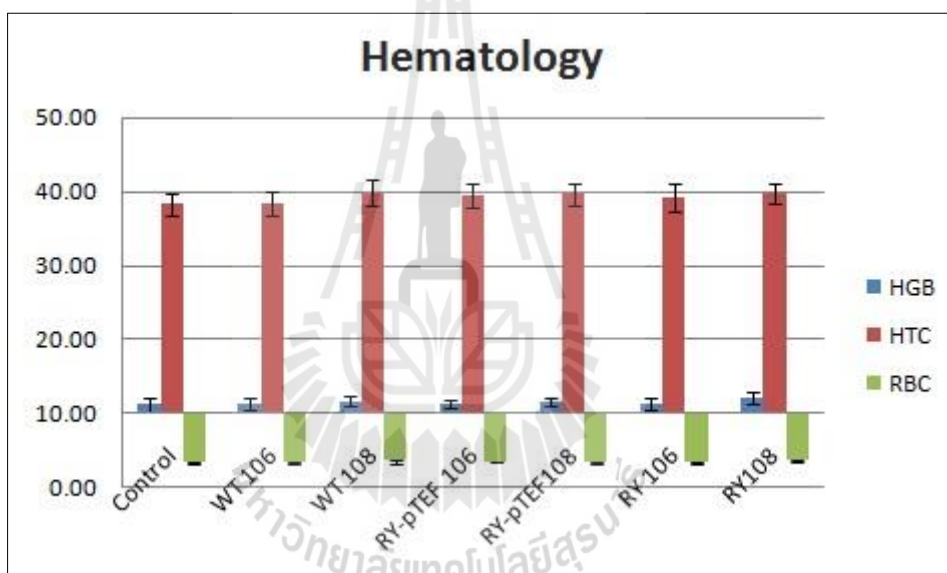
ภาพที่ 4.8 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสดต่อองค์ประกอบทางโภชนา (wet weight) ในตัวปลาสดที่ระยะเวลาการเลี้ยง 120 วัน (Mean±SD)

หมายเหตุ : CP = crude protein; CF = crude fat

หน่วยวัด : เปอร์เซ็นต์

4.2.3 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสวายต่อค่าโลหิตวิทยา

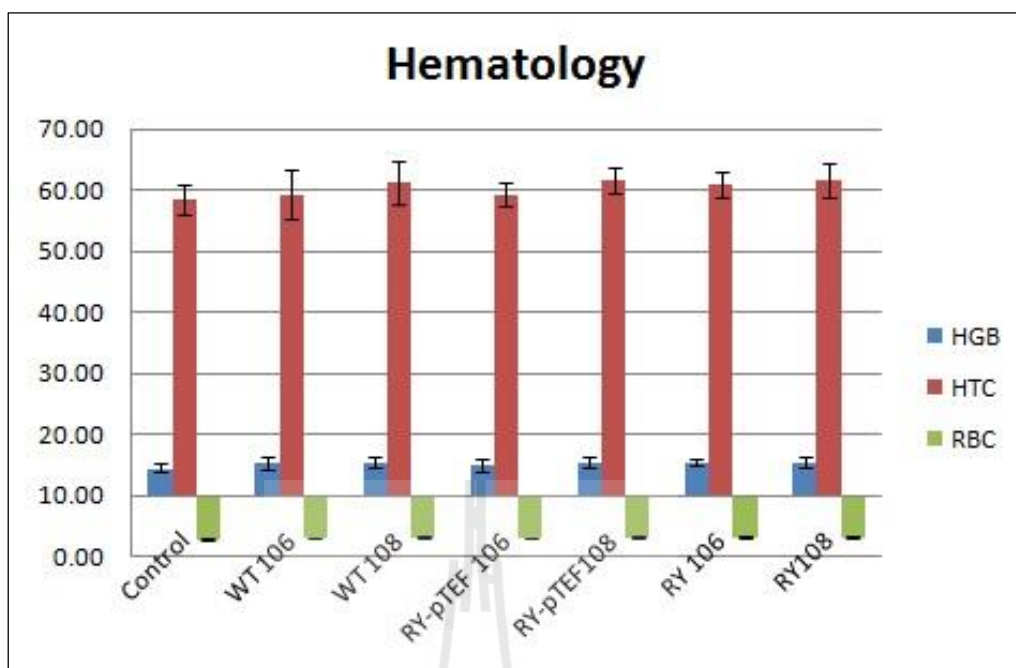
ผลการศึกษาการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสวายที่ระยะเวลา 60 วัน และ 120 วัน แสดงในภาพที่ 4.9 และ 4.10 ต่อค่าโลหิตวิทยาของปลาสวาย ได้แก่ ค่าฮีโมโกลบิน (Hemoglobin) ค่าฮีมาโตคริต (Hematocrit) และค่าจำนวนเม็ดเลือดแดง (RBC) พบว่าที่ระยะเวลาการทดลอง 60 วัน ปลาทุกกลุ่มทดลองมีค่าฮีโมโกลบิน (Hemoglobin) ค่าฮีมาโตคริต (Hematocrit) และค่าจำนวนเม็ดเลือดแดง (RBC) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มสูตรอาหารพื้นฐาน นอกจากนี้ที่ระยะเวลาการเลี้ยงที่ 120 วัน พบว่าทุกกลุ่มทดลองมีค่าฮีโมโกลบิน (Hemoglobin) ค่าฮีมาโตคริต (Hematocrit) และค่าจำนวนเม็ดเลือดแดง (RBC) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มสูตรอาหารพื้นฐานเช่นกัน



ภาพที่ 4.9 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสวายต่อค่าโลหิตวิทยาที่ระยะเวลาการเลี้ยง 60 วัน

(Mean $\pm$ SD)

หมายเหตุ : HGB = hemoglobin (g/dl); HTC = hematocrit (%); BC = red blood cell (10^6 cell/ml)

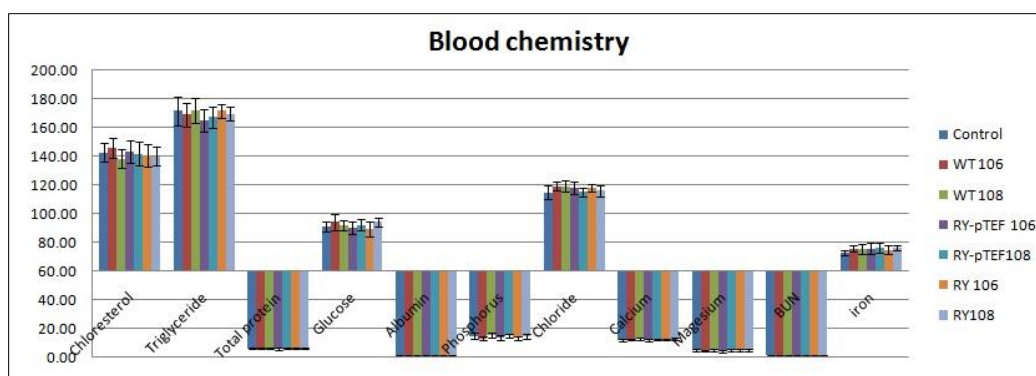


ภาพที่ 4.10 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสดต่อค่าโลหิตวิทยาที่ระยะเวลาการเลี้ยง 120 วัน
(Mean $\pm$ SD)

หมายเหตุ : HGB = hemoglobin (g/dl); HTC = hematocrit (%); RBC = red blood cell (10^6 cell/ml)

4.2.4 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสดต่อค่าเคมีในเลือด

ผลการศึกษาการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสดที่ระยะเวลา 60 วัน และ 120 วัน ดังแสดงในภาพที่ 4.11 และ 4.12 พบว่าการใช้ยีสต์เสริมในอาหารปลาสดนั้นทำให้ค่าเคมีในเลือด ได้แก่ ค่าคลอเรสเตอรอล (cholesterol) ไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) โปรตีนรวม (Total protein) กลูโคส (Glucose) อัลบูมิน (Albumin) ฟอสฟอรัส (Phosphorus) คลอไรด์ (Chloride) แคลเซียม (Calcium) แมกนีเซียม (Magnesium) ปริมาณไนโตรเจนในกระแสเลือด (BUN) และ ธาตุเหล็ก (Iron) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มสูตรอาหารพื้นฐาน



ตารางที่ 4.11 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสดต่อค่าเคมีในเลือดระยะเวลา 60 วัน
(Mean±SD)

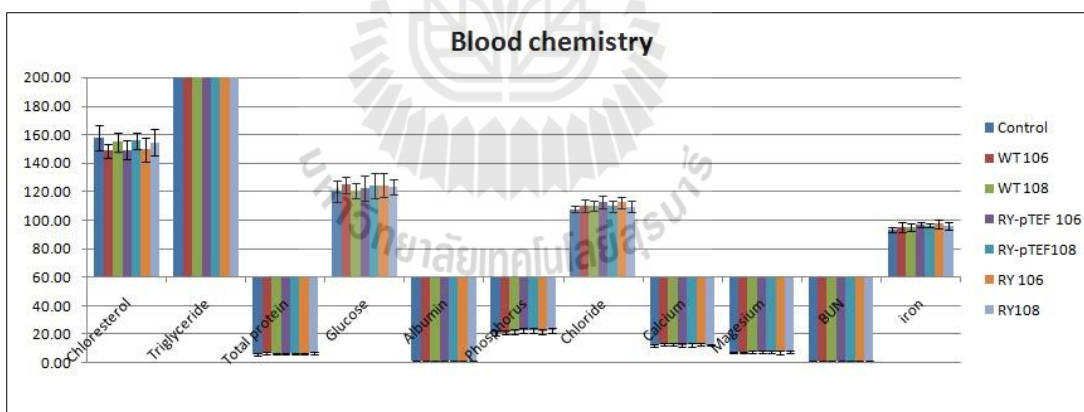
หมายเหตุ : BUN = blood urea nitrogen

หน่วยวัด : Cholesterol; triglyceride; glucose; phosphorus; calcium; magnesium; BUN = mg/dl

Total protein; albumin = g/ml

Chloride = mmol/l

Iron = µg/dl



ตารางที่ 4.12 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสดต่อค่าเคมีในเลือดระยะเวลา 120 วัน
(Mean±SD)

หมายเหตุ : BUN = blood urea nitrogen

หน่วยวัด : Cholesterol; triglyceride; glucose; phosphorus; calcium; magnesium; BUN = mg/dl

Total protein, albumin = g/ml

Chloride = mmol/l

Iron = µg/dl

4.2.5 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสดต่อค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ

ผลการศึกษการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสดที่ระยะเวลา 60 วัน ดังแสดงในตารางที่ 4.6 ต่อค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลาสดพบว่า การใช้ยีสต์เสริมในอาหารปลาสดนั้นมีผลทำให้ค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ คือ Total immunoglobulin (Total ig) ไลโซไซม์ (Lysozyme) และค่าคอมพลีเมนต์ (ACH50) สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มสูตรอาหารพื้นฐาน

ตารางที่ 4.6 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสดต่อค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะที่ระยะเวลาการเลี้ยง 60 วันและ 120 วัน (Mean $\pm$ SD)

Treatment	Total Ig (mg/ml)	Lysozyme (unit/ml)	ACH (unit/ml)
60 วัน			
Control	9.94 $\pm$ 0.52 ^b	206.88 $\pm$ 19.04 ^b	10.63 $\pm$ 0.58 ^b
WT 10 ⁶	14.42 $\pm$ 0.74 ^a	252.50 $\pm$ 21.35 ^a	12.56 $\pm$ 0.77 ^a
WT 10 ⁸	15.25 $\pm$ 0.83 ^a	254.38 $\pm$ 23.86 ^a	13.60 $\pm$ 0.86 ^a
RY-pTEF 10 ⁶	14.67 $\pm$ 0.34 ^a	246.25 $\pm$ 22.46 ^a	12.73 $\pm$ 0.69 ^a
RY-pTEF 10 ⁸	15.21 $\pm$ 0.57 ^a	253.75 $\pm$ 23.00 ^a	13.36 $\pm$ 0.72 ^a
RY 10 ⁶	14.79 $\pm$ 0.36 ^a	250.25 $\pm$ 20.64 ^a	12.78 $\pm$ 0.66 ^a
RY10 ⁸	15.26 $\pm$ 0.86 ^a	259.38 $\pm$ 21.88 ^a	13.60 $\pm$ 0.91 ^a
120 วัน			
Control	17.91 $\pm$ 0.82 ^b	368.48 $\pm$ 29.13 ^b	12.04 $\pm$ 0.96 ^b
WT 10 ⁶	24.49 $\pm$ 0.82 ^a	501.90 $\pm$ 22.99 ^a	13.86 $\pm$ 0.88 ^a
WT 10 ⁸	24.91 $\pm$ 0.96 ^a	516.19 $\pm$ 30.79 ^a	14.64 $\pm$ 0.71 ^a
RY-pTEF 10 ⁶	24.66 $\pm$ 0.42 ^a	508.67 $\pm$ 25.93 ^a	14.40 $\pm$ 0.96 ^a
RY-pTEF 10 ⁸	24.81 $\pm$ 0.22 ^a	528.38 $\pm$ 28.18 ^a	14.57 $\pm$ 0.73 ^a
RY 10 ⁶	24.47 $\pm$ 0.58 ^a	510.99 $\pm$ 31.80 ^a	13.89 $\pm$ 0.98 ^a
RY10 ⁸	24.69 $\pm$ 0.62 ^a	520.44 $\pm$ 28.06 ^a	14.69 $\pm$ 0.81 ^a

หมายเหตุ: ตัวอักษร a b ในแถวแนวนั่ง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

Total ig = total immune globulin; ACH = complement activity

และเมื่อศึกษาการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสดที่ระยะเวลา 120 วัน (ตารางที่ 4.9) ต่อกำหนดกลุ่มกันแบบไม่จำเพาะของปลาสดพบว่าการใช้ยีสต์ WT RY-pTEF และ RY เสริมในอาหารปลาสดนั้นมิผลทำให้ค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ คือ อิมมูโนโกลบูลินรวม (Total ig) ไลโซไซม์ (Lysozyme) และค่าคอมพลีเมนต์ (ACH50) สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มสูตรอาหารพื้นฐานเช่นเดียวกับผลการศึกษาที่ระยะเวลา 60 วัน และจากผลการศึกษานี้พบว่าการเสริมยีสต์ในระดับที่มากขึ้นจะมีผลทำให้ค่า Total ig Lysozyme และ ACH50 ขึ้นตามไปด้วย

4.2.6 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสดต่อประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้

ผลการศึกษาการเสริมยีสต์ที่ในอาหารปลาสดที่ระยะเวลา 60 วัน ต่อประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ในปลาสดพบว่าการใช้ยีสต์เสริมในอาหารปลาสดนั้น มีผลทำให้ประชากรจุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์และรา (Yeast & Fungi) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มสูตรอาหารพื้นฐานแต่การเสริมยีสต์ในอาหารปลาสดส่งผลให้ประชากรจุลินทรีย์ในกลุ่มของบิฟิโดแบคทีเรีย (*Bifidobacterium spp.*) แบคทีเรียรวม (Total bacteria) แบคทีเรียกลุ่มผลิตกรดแลคติก (*Lactobacillus spp.*) และแบคทีเรียก่อโรคกลุ่มวibriโอ (*Vibrio spp.*) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) (ตารางที่ 4.7)

ผลการศึกษาที่ระยะเวลาการเลี้ยง 120 วัน พบว่าประชากรจุลินทรีย์ในกลุ่มของยีสต์และรา (Yeast & Fungi) และแบคทีเรียรวม (Total bacteria) เพิ่มขึ้นโดยพบว่าการเสริมยีสต์ RY มีผลทำให้แบคทีเรียรวมเพิ่มขึ้นกว่า ยีสต์ RY-pTEF และ ยีสต์ WT ตามลำดับ มีทั้งระดับของการเสริมยีสต์ยังมีผลทำให้มีการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียรวมอีกด้วย และประชากรในกลุ่มของ *Vibrio spp.* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนประชากรจุลินทรีย์ในกลุ่มของบิฟิโดแบคทีเรีย *Bifidobacterium spp.* และแบคทีเรียกลุ่มผลิตกรดแลคติก *Lactobacillus spp.* ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) (ตารางที่ 4.7)

ตารางที่ 4.7 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสดต่อประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 60 วันและ 120 วัน (Mean±SD)

Treatment	Yeast & fungi	<i>Bifidobacterium</i> spp.	Total bacteria	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Vibrio</i> spp.	Recombinant yeast
log cfu/g						
60 วัน						
Control	4.57±0.05 ^b	4.74±0.03	5.15±0.09	4.35±0.08	4.29±0.04	-
WT 10 ⁶	4.66±0.07 ^{ab}	4.78±0.07	5.19±0.06	4.42±0.05	4.22±0.05	-
WT 10 ⁸	4.75±0.09 ^a	4.82±0.10	5.24±0.06	4.44±0.08	4.22±0.06	-
RY-pTEF 10 ⁶	4.66±0.04 ^{ab}	4.76±0.10	5.19±0.05	4.36±0.05	4.23±0.06	-
RY-pTEF 10 ⁸	4.73±0.06 ^a	4.79±0.09	5.20±0.05	4.43±0.08	4.20±0.09	-
RY 10 ⁶	4.62±0.08 ^b	4.74±0.06	5.18±0.09	4.37±0.03	4.26±0.08	3.72±0.14
RY10 ⁸	4.73±0.11 ^a	4.79±0.04	5.23±0.08	4.43±0.06	4.22±0.09	5.04±0.06
120 วัน						
Control	4.65±0.07 ^b	5.11±0.04	5.38±0.12 ^c	4.90±0.03	4.99±0.04 ^a	-
WT 10 ⁶	4.94±0.14 ^a	5.20±0.15	5.40±0.15 ^{bc}	4.89±0.10	4.93±0.13 ^a	-
WT 10 ⁸	4.98±0.10 ^a	5.22±0.07	5.43±0.10 ^{abc}	4.97±0.08	4.42±0.10 ^b	-
RY-pTEF 10 ⁶	4.92±0.12 ^a	5.11±0.04	5.38±0.09 ^c	4.88±0.05	4.92±0.12 ^a	-
RY-pTEF 10 ⁸	4.98±0.07 ^a	5.22±0.04	5.54±0.10 ^{ab}	4.96±0.04	4.33±0.08 ^b	-
RY 10 ⁶	4.93±0.08 ^a	5.13±0.08	5.40±0.14 ^{bc}	4.97±0.09	4.97±0.07 ^a	3.94±0.05
RY10 ⁸	5.00±0.08 ^a	5.23±0.14	5.56±0.03 ^a	4.97±0.04	4.36±0.10 ^b	5.17±0.03

หมายเหตุ : ตัวอักษร a b ในแถวแนวนึง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

4.2.7 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสดต่อการลดไขมันในกล้ามเนื้อปลา

จากการศึกษาผลการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสดที่ระยะเวลา 60 วัน ต่อการสะสมกรดไขมันในกล้ามเนื้อปลาพบว่าการใช้ยีสต์ WT RY-pTEF และ RY เสริมในอาหารปลาสดที่ระยะเวลา 60 วัน ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงต่อการสะสมกรดไขมันในกล้ามเนื้อปลา เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมดังที่แสดงในตารางที่ 4.8

ผลการศึกษาการเสริมยีสต์ที่ระยะเวลา 120 วัน ต่อการสะสมกรดไขมันในกล้ามเนื้อปลาพบว่าการใช้ยีสต์ WT RY-pTEF และ RY เสริมในอาหารปลาสดที่ระยะเวลา 120 วัน พบว่าการเสริมยีสต์ RY ทั้งที่ระดับ 10⁶ และ 10⁸ เซลล์ต่อกรัมอาหารมีผลต่อการสะสมกรดไขมันชนิด C18 : 3n-6 และ C18 : 4n-3 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่มีการเสริมยีสต์ WT RY-pTEF นอกจากนี้ยังพบอีกว่าการเสริมยีสต์ RY ทั้งที่ระดับ 10⁶ และ 10⁸ เซลล์ต่อกรัมอาหาร ยังมีผลทำให้กรดไขมันในกลุ่มของ n3 มีปริมาณที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทาง

สถิติ ($P < 0.05$) เช่นกัน ซึ่งเป็นการชี้ให้เห็นว่ายีสต์ RY มีความสามารถในการเปลี่ยนกรดไขมันที่เป็นสารตั้งต้นให้เป็นผลิตภัณฑ์ภายในตัวปลาซวายได้ดังที่แสดงในตารางที่ 4.9

4.2.8 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาซวายต่อการกรดไขมันในไขมันช่องท้องปลาซวาย

ผลการศึกษาการเสริมยีสต์ในอาหารปลาซวายที่ระยะเวลา 60 วัน ต่อการสะสมกรดไขมันในช่องท้องปลาซวายพบว่าการใช้ยีสต์ WT RY-pTEF และ RY เสริมในอาหารปลาซวายที่ระยะเวลา 60 วัน ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงต่อการสะสมกรดไขมันในเนื้อปลา เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมดังที่แสดงในตารางที่ 4.10

ผลการศึกษาการเสริมยีสต์ในอาหารปลาซวายที่ระยะเวลา 120 วัน ต่อการสะสมกรดไขมันในไขมันในช่องท้องปลาซวายพบว่าการใช้ยีสต์ WT, RY-pTEF และ RY เสริมในอาหารปลาซวายที่ระยะเวลา 120 วัน พบว่าการเสริมยีสต์ RY ทั้งที่ระดับ 10^6 และ 10^8 เซลล์ต่อกรัมอาหารมีผลต่อการสะสมกรดไขมันชนิด C18 : 3n-6 และ C18 : 4n-3 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่มีการเสริมยีสต์ WT RY-pTEF นอกจากนี้ยังพบอีกว่าการเสริมยีสต์ RY ทั้งที่ระดับ 10^6 และ 10^8 เซลล์ต่อกรัมอาหาร ยังมีผลทำให้กรดไขมันในกลุ่มของ n3 มีการเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เช่นกัน ซึ่งเป็นการชี้ให้เห็นว่ายีสต์ RY มีความสามารถในการเปลี่ยนกรดไขมันที่เป็นสารตั้งต้นให้เป็นผลิตภัณฑ์ภายในตัวปลาซวายได้ดังที่แสดงในตารางที่ 4.11



ตารางที่ 4.8 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสดต่อกรดไขมันในกล้ามเนื้อปลาที่ระยะเวลาการเลี้ยง 60 วัน (Mean±SD)

Fatty acid (mg/g lipid)	Control	WT 10 ⁶	WT 10 ⁸	RY-pTEF 10 ⁶	RY-pTEF 10 ⁸	RY 10 ⁶	RY10 ⁸
C16 : 0	237.67±30.16	274.78±26.95	265.65±32.98	280.29±24.31	258.56±28.01	267.33±36.55	263.47±25.14
C18 : 0	85.06±3.80	83.30±4.52	84.28±5.00	86.21±5.22	85.77±6.27	89.01±5.48	86.15±5.40
C20 : 0	2.37±0.04	2.34±0.08	2.33±0.09	2.34±0.07	2.32±0.07	2.42±0.07	2.40±0.07
C22 : 0	1.28±0.07	1.24±0.06	1.26±0.08	1.27±0.03	1.27±0.06	1.23±0.05	1.28±0.09
C24 : 0	5.95±0.42	5.98±0.44	5.97±0.44	6.19±0.65	6.32±0.72	6.46±0.60	6.18±0.30
C16 : 1	13.01±0.95	13.21±1.05	14.45±1.34	14.30±1.71	13.04±1.21	12.91±1.30	13.81±1.27
C18 : 1n9 trans	1.09±0.05	1.09±0.06	1.11±0.06	1.11±0.05	1.13±0.04	1.12±0.05	1.09±0.03
C18 : 1n9 cis	235.28±21.13	251.35±29.22	242.32±25.72	244.68±23.90	236.29±23.22	242.82±23.04	243.19±20.64
C20 : 1n9	0.68±0.01	0.67±0.03	0.66±0.04	0.66±0.03	0.65±0.04	0.64±0.04	0.67±0.03
C22 : 1n9	0.22±0.01	0.22±0.01	0.22±0.01	0.21±0.00	0.22±0.01	0.21±0.01	0.22±0.01
C24 : 1n9	0.39±0.03	0.40±0.02	0.41±0.03	0.39±0.03	0.40±0.03	0.38±0.02	0.41±0.02
C18 : 2n6 trans	1.11±0.07	1.06±0.08	1.10±0.06	1.04±0.06	1.08±0.07	1.09±0.06	1.12±0.06
C18 : 2n6 cis	82.43±7.27	88.92±8.84	83.19±6.30	86.30±6.74	80.28±7.50	80.48±2.80	81.98±6.14
C18 : 3n6	0.68±0.06	0.66±0.04	0.66±0.05	0.66±0.04	0.64±0.02	0.69±0.04	0.70±0.03

ตารางที่ 4.8 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสดต่อกรดไขมันในกล้ามเนื้อปลาที่ระยะเวลาการเลี้ยง 60 วัน (Mean±SD) (ต่อ)

Fatty acid (mg/g lipid)	Control	WT 10 ⁶	WT 10 ⁸	RY-pTEF 10 ⁶	RY-pTEF 10 ⁸	RY 10 ⁶	RY10 ⁸
C20 : 2n6	3.63±0.23	3.68±0.18	3.56±0.15	3.55±0.15	3.65±0.20	3.51±0.18	3.41±0.20
C20 : 3n6	4.34±0.24	4.52±0.25	4.33±0.29	4.49±0.33	4.58±0.32	4.59±0.34	4.65±0.23
C20 : 4n6	6.43±0.30	6.62±0.44	6.67±0.37	6.72±0.44	6.53±0.47	6.53±0.41	6.64±0.34
C22 : 2n6	0.19±0.00	0.19±0.01	0.18±0.01	0.19±0.01	0.19±0.00	0.19±0.00	0.19±0.00
C18 : 3n3	16.07±0.87	16.54±0.44	16.54±0.78	16.05±0.76	16.90±0.58	15.97±0.36	16.93±0.81
C18 : 4n3	2.28±0.15	2.28±0.17	2.26±0.18	2.26±0.12	2.26±0.17	2.38±0.10	2.38±0.11
C20 : 4n3	1.16±0.07	1.21±0.07	1.23±0.08	1.19±0.06	1.20±0.06	1.23±0.04	1.24±0.03
C20 : 5n3	0.43±0.02	0.43±0.02	0.44±0.02	0.43±0.02	0.44±0.03	0.43±0.03	0.43±0.02
C22 : 6n3	18.96±1.29	18.71±1.18	18.53±1.12	18.81±1.00	19.51±1.14	19.85±1.05	19.30±1.00
Sum SFA	332.35±29.48	367.66±31.19	359.50±33.50	376.31±28.93	354.25±26.63	366.46±35.20	359.50±29.61
Sum MUFA	250.68±21.69	266.95±30.20	259.19±26.47	261.38±24.07	251.75±23.52	258.11±23.86	259.41±20.87
Sum n6	98.83±7.27	105.69±9.09	99.71±6.49	102.98±6.89	96.97±7.06	97.09±3.37	98.72±6.46
Sum n3	39.63±1.32	38.63±1.19	39.19±0.91	39.30±1.90	39.95±1.45	40.16±0.83	40.23±0.34

ตารางที่ 4.9 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสดต่อกรดไขมันในกล้ามเนื้อปลาที่ระยะเวลาการเลี้ยง 120 วัน (Mean±SD)

Fatty acid (mg/g lipid)	Control	WT 10 ⁶	WT 10 ⁸	RY-pTEF 10 ⁶	RY-pTEF 10 ⁸	RY 10 ⁶	RY10 ⁸
C16 : 0	282.63±9.25	280.15±7.88	279.12±5.72	279.70±7.49	278.50±8.36	279.20±6.62	274.68±6.53
C18 : 0	83.59±2.74	84.93±3.56	86.78±2.49	85.98±5.96	84.95±5.14	85.78±5.62	83.87±4.11
C20 : 0	2.21±0.10	2.19±0.10	2.21±0.10	2.22±0.07	2.24±0.07	2.24±0.07	2.24±0.08
C22 : 0	1.16±0.04	1.18±0.06	1.11±0.09	1.14±0.07	1.18±0.07	1.17±0.05	1.15±0.09
C24 : 0	5.68±0.37	5.86±0.24	5.94±0.29	5.74±0.13	5.92±0.31	5.86±0.28	5.75±0.38
C16 : 1	12.08±0.99	12.22±0.84	12.11±0.82	12.73±0.60	12.45±0.71	12.56±0.94	12.19±0.82
C18 : 1n9 trans	1.10±0.05	1.09±0.08	1.08±0.09	1.08±0.09	1.13±0.07	1.10±0.07	1.14±0.08
C18 : 1n9 cis	273.52±10.41	275.25±14.09	274.98±10.69	270.24±13.53	270.12±11.58	267.10±14.13	268.33±10.70
C20 : 1n9	0.66±0.03	0.68±0.03	0.68±0.03	0.69±0.04	0.69±0.04	0.70±0.02	0.70±0.02
C22 : 1n9	0.20±0.01	0.19±0.01	0.20±0.02	0.20±0.01	0.20±0.02	0.20±0.02	0.20±0.02
C24 : 1n9	0.35±0.02	0.37±0.02	0.37±0.02	0.37±0.02	0.36±0.03	0.35±0.03	0.35±0.02
C18 : 2n6 trans	1.11±0.09	1.14±0.09	1.07±0.07	1.12±0.09	1.07±0.10	1.13±0.05	1.09±0.10
C18 : 2n6 cis	86.92±2.24	82.91±4.18	85.19±3.59	86.77±3.84	85.06±3.74	83.32±2.96	85.98±4.76
C18 : 3n6	0.71±0.01 ^b	0.71±0.02 ^b	0.71±0.02 ^b	0.71±0.02 ^b	0.70±0.02 ^b	0.73±0.01 ^a	0.73±0.01 ^a

ตารางที่ 4.9 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสดต่อกรดไขมันในกล้ามเนื้อปลาที่ระยะเวลาการเลี้ยง 120 วัน (Mean±SD) (ต่อ)

Fatty acid (mg/g lipid)	Control	WT 10 ⁶	WT 10 ⁸	RY-pTEF 10 ⁶	RY-pTEF 10 ⁸	RY 10 ⁶	RY10 ⁸
C20 : 2n6	3.36±0.09	3.35±0.14	3.37±0.17	3.37±0.22	3.58±0.26	3.55±0.18	3.45±0.10
C20 : 3n6	4.00±0.19	4.06±0.15	4.03±0.30	4.08±0.30	4.09±0.30	4.16±0.22	4.22±0.27
C20 : 4n6	6.99±0.28	6.86±0.45	6.85±0.38	7.03±0.21	6.85±0.57	7.14±0.36	7.18±0.42
C22 : 2n6	0.18±0.01	0.19±0.01	0.20±0.01	0.20±0.01	0.19±0.01	0.19±0.02	0.20±0.01
C18 : 3n3	17.09±0.37	17.24±0.39	16.77±0.55	17.30±0.78	17.18±0.50	17.26±0.38	17.13±0.37
C18 : 4n3	2.31±0.30 ^b	2.31±0.27 ^b	2.45±0.22 ^b	2.40±0.21 ^b	2.46±0.24 ^b	3.07±0.36 ^a	3.11±0.27 ^a
C20 : 4n3	1.15±0.05	1.17±0.03	1.15±0.05	1.17±0.08	1.16±0.07	1.17±0.10	1.23±0.06
C20 : 5n3	0.40±0.02	0.40±0.02	0.39±0.01	0.40±0.02	0.40±0.02	0.41±0.01	0.42±0.02
C22 : 6n3	19.94±0.70	19.67±0.75	19.26±0.51	19.81±0.66	19.74±0.68	19.97±0.53	20.15±0.66
Sum SFA	103.30±1.97	99.25±4.25	101.43±3.59	103.30±4.16	101.57±3.77	100.26±2.92	102.88±4.69
Sum MUFA	287.93±10.57	289.81±14.65	289.44±10.76	285.33±13.22	284.97±11.62	282.02±14.57	282.94±11.44
Sum n6	103.30±1.97	99.25±4.25	101.43±3.59	103.30±4.16	101.57±3.77	100.26±2.92	102.88±4.69
Sum n3	40.90±1.07 ^{abc}	40.80±0.90 ^{bc}	40.04±0.45 ^c	41.09±0.56 ^{abc}	40.95±0.70 ^{abc}	41.89±1.15 ^{ab}	42.05±0.93 ^a

หมายเหตุ : ตัวอักษร a b c ในแถวแนวนึง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ตารางที่ 4.10 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสดต่อกรดไขมันในไขมันปลาในช่องท้องที่ระยะเวลาการเลี้ยง 60 วัน (Mean±SD)

Fatty acid (mg/g lipid)	Control	WT 10 ⁶	WT 10 ⁸	RY-pTEF 10 ⁶	RY-pTEF 10 ⁸	RY 10 ⁶	RY10 ⁸
C16 : 0	252.45±18.76	262.82±15.91	248.52±18.48	264.05±13.41	260.36±16.82	263.69±13.41	268.49±13.75
C18 : 0	85.37±2.68	85.40±3.08	82.82±1.06	85.09±0.96	83.98±3.42	84.47±2.56	85.44±3.83
C20 : 0	2.64±0.27	2.69±0.30	2.52±0.31	2.56±0.34	2.66±0.21	2.83±0.29	2.71±0.26
C22 : 0	1.37±0.15	1.44±0.14	1.30±0.19	1.34±0.12	1.43±0.11	1.45±0.13	1.47±0.11
C24 : 0	5.24±0.20	5.45±0.30	5.33±0.27	5.41±0.21	5.39±0.31	5.24±0.13	5.52±0.20
C16 : 1	11.49±0.84	12.23±0.70	11.83±0.96	12.19±0.58	11.83±0.89	11.90±0.60	11.88±0.95
C18 : 1n9 trans	1.16±0.07	1.14±0.09	1.15±0.07	1.16±0.09	1.14±0.08	1.10±0.06	1.15±0.08
C18 : 1n9 cis	253.54±11.62	254.90±13.99	239.09±14.16	253.44±9.99	244.80±11.95	256.03±9.80	243.32±8.94
C20 : 1n9	0.68±0.05	0.68±0.03	0.68±0.07	0.67±0.04	0.67±0.07	0.69±0.05	0.69±0.03
C22 : 1n9	0.24±0.01	0.23±0.01	0.23±0.01	0.24±0.01	0.24±0.01	0.23±0.01	0.24±0.01
C24 : 1n9	0.44±0.03	0.43±0.03	0.44±0.01	0.44±0.02	0.43±0.04	0.42±0.02	0.42±0.02
C18 : 2N6 TRANS	1.15±0.06	1.17±0.09	1.17±0.09	1.12±0.10	1.13±0.10	1.14±0.04	1.11±0.09
C18 : 2N6 CIS	85.14±3.30	84.83±3.74	83.92±2.82	83.37±1.60	82.85±1.90	83.00±3.77	86.14±1.58
C18 : 3N6	0.56±0.05	0.60±0.02	0.57±0.04	0.56±0.03	0.59±0.05	0.60±0.02	0.60±0.01

ตารางที่ 4.10 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสดต่อกรดไขมันในไขมันปลาในช่องท้องที่ระยะเวลาการเลี้ยง 60 วัน (Mean±SD) (ต่อ)

Fatty acid (mg/ g lipid)	Control	WT 10 ⁶	WT 10 ⁸	RY-pTEF 10 ⁶	RY-pTEF 10 ⁸	RY 10 ⁶	RY10 ⁸
C20 : 2 n6	3.56±0.23	3.50±0.33	3.45±0.26	3.39±0.26	3.37±0.22	3.62±0.18	3.32±0.14
C20 : 3n6	4.48±0.30	4.49±0.24	4.56±0.36	4.47±0.16	4.50±0.15	4.74±0.18	4.77±0.13
C20 : 4n6	6.95±0.12	6.92±0.23	6.72±0.31	6.88±0.28	6.87±0.15	6.98±0.24	7.05±0.27
C22 : 2n6	0.20±0.01	0.21±0.01	0.20±0.02	0.20±0.01	0.20±0.01	0.20±0.01	0.21±0.01
C18 : 3n3	16.33±0.94	16.68±1.06	16.65±1.15	15.90±1.18	15.33±0.04	15.81±0.99	15.78±0.98
C18 : 4n-3	2.19±0.19	2.11±0.12	2.15±0.20	2.13±0.24	2.15±0.24	2.22±0.19	2.38±0.11
C20 : 4n3	1.15±0.09	1.16±0.07	1.12±0.04	1.15±0.07	1.13±0.08	1.18±0.04	1.19±0.07
C20 : 5n3	0.43±0.03	0.44±0.03	0.44±0.02	0.45±0.02	0.46±0.02	0.44±0.03	0.45±0.02
C22 : 6n3	18.67±1.27	17.82±1.44	17.89±1.24	18.30±1.41	17.93±1.61	18.93±1.25	18.99±1.61
sum SFA	347.07±18.70	357.82±18.29	340.50±18.69	358.46±13.22	353.84±19.56	357.70±14.24	363.64±10.60
sum MUFA	267.57±11.83	269.63±13.77	253.44±13.75	268.15±9.71	259.14±12.32	270.40±9.83	257.71±8.94
sum n6	102.05±3.56	101.74±3.62	100.62±2.51	100.01±1.60	99.53±2.03	100.32±3.56	103.22±1.84
sum n3	38.79±1.31	38.23±2.23	38.27±2.17	37.95±2.38	37.02±2.26	38.61±2.08	38.81±2.27

ตารางที่ 4.11 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสดต่อกรดไขมันในไขมันปลาในช่องท้องที่ระยะเวลาการเลี้ยง 120 วัน (Mean±SD)

Fatty acid (mg/ g lipid)	Control	WT 10 ⁶	WT 10 ⁸	RY-pTEF 10 ⁶	RY-pTEF 10 ⁸	RY 10 ⁶	RY10 ⁸
C16 : 0	279.49±13.38	290.57±15.44	279.79±13.97	282.89±14.11	287.58±14.34	283.95±11.69	277.43±11.30
C18 : 0	86.67±1.76	85.74±2.07	87.56±1.93	87.76±1.72	85.93±1.82	85.19±2.74	84.65±2.76
C20 : 0	2.33±0.22	2.37±0.12	2.47±0.19	2.27±0.14	2.35±0.20	2.48±0.13	2.47±0.16
C22 : 0	1.44±0.08	1.42±0.07	1.40±0.09	1.45±0.09	1.50±0.06	1.47±0.06	1.48±0.06
C24 : 0	5.74±0.37	5.77±0.50	5.83±0.30	5.70±0.39	5.87±0.54	5.70±0.43	5.47±0.24
C16 : 1	13.51±1.85	13.70±1.36	13.66±1.25	12.41±1.22	12.96±1.80	14.49±1.44	13.80±1.23
C18 : 1n9 trans	1.05±0.08	1.02±0.08	1.03±0.07	1.07±0.08	1.04±0.08	1.00±0.09	1.07±0.07
C18 : 1n9 cis	281.23±5.20	284.51±9.32	283.91±7.93	283.42±7.24	283.90±8.36	279.41±9.59	283.36±5.97
C20 : 1n9	0.70±0.06	0.69±0.05	0.71±0.05	0.69±0.05	0.70±0.05	0.72±0.03	0.68±0.04
C22 : 1n9	0.23±0.02	0.26±0.03	0.25±0.03	0.24±0.02	0.25±0.02	0.26±0.04	0.26±0.01
C24 : 1n9	0.41±0.03	0.41±0.03	0.39±0.03	0.39±0.02	0.40±0.02	0.40±0.02	0.39±0.03
C18 : 2n6 trans	1.01±0.10	1.03±0.08	1.01±0.06	1.04±0.07	1.07±0.06	1.04±0.06	1.02±0.06
C18 : 2n6 cis	87.86±6.82	86.00±3.92	83.02±2.05	87.16±2.71	88.69±6.29	87.37±3.82	85.47±2.83
C18 : 3n6	0.65±0.02 ^b	0.67±0.03 ^b	0.67±0.04 ^b	0.67±0.03 ^b	0.68±0.03 ^b	0.72±0.01 ^a	0.72±0.02 ^a

ตารางที่ 4.11 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสดต่อกรดไขมันในไขมันปลาในช่องท้องที่ระยะเวลาการเลี้ยง 120 วัน (Mean±SD) (ต่อ)

Fatty acid (mg/ g lipid)	Control	WT 10 ⁶	WT 10 ⁸	RY-pTEF 10 ⁶	RY-pTEF 10 ⁸	RY 10 ⁶	RY10 ⁸
C20 : 2n6	3.49±0.23	3.72±0.24	3.49±0.39	3.35±0.38	3.58±0.26	3.58±0.25	3.58±0.22
C20 : 3n6	4.43±0.27	4.40±0.32	4.41±0.29	4.43±0.17	4.39±0.31	4.67±0.12	4.69±0.11
C20 : 4n6	6.54±0.34	6.73±0.26	6.64±0.36	6.72±0.34	6.59±0.25	6.90±0.18	6.91±0.20
C22 : 2n6	0.20±0.01	0.20±0.01	0.20±0.01	0.20±0.01	0.20±0.01	0.20±0.01	0.19±0.01
C18 : 3n3	16.80±0.69	16.87±0.49	17.16±0.40	17.01±0.65	16.96±0.78	16.99±0.62	17.20±0.37
C18 : 4n3	2.61±0.18 ^b	2.47±0.21 ^b	2.42±0.26 ^b	2.58±0.33 ^b	2.57±0.15 ^b	3.01±0.20 ^a	3.16±0.20 ^a
C20 : 4n3	1.10±0.03	1.13±0.04	1.10±0.06	1.11±0.06	1.11±0.06	1.17±0.03	1.17±0.02
C20 : 5n3	0.45±0.02	0.44±0.02	0.45±0.01	0.44±0.02	0.46±0.02	0.46±0.02	0.46±0.02
C22 : 6n3	19.16±1.39	19.43±1.55	19.16±0.66	18.75±0.31	19.56±1.27	19.89±1.37	20.19±1.22
Sum SFA	375.68±13.49	385.88±17.78	377.07±14.07	380.08±15.16	383.25±15.27	378.80±11.27	371.52±11.90
Sum MUFA	297.15±4.17	300.61±10.46	299.98±8.42	298.26±7.56	299.28±7.28	296.30±9.52	299.59±6.51
Sum n6	104.19±7.24	102.78±3.72	99.48±1.79	103.60±3.15	105.24±6.25	104.52±3.45	102.61±2.86
Sum n3	40.13±0.97 ^{ab}	40.36±1.56 ^{ab}	40.30±1.52 ^{ab}	39.90±1.72 ^b	40.68±1.59 ^{ab}	41.53±1.36 ^{ab}	42.19±1.36 ^a

หมายเหตุ : ตัวอักษร a b ในแถวแนวนอน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

บทที่ 5

การอภิปรายผล

5.1 ผลการทดลองที่ 1 ผลิตภัณฑ์ *S. Cerevisiae* ให้มีการผลิตเอนไซม์ Phy- Δ 6 จากปลาฉวย (*P. hypophthalmus*)

การสะสมกรดไขมันในตัวปลานั้นขึ้นอยู่กับสองปัจจัยสำคัญคือ จากอาหารที่ปลาได้รับโดยตรงและจากกระบวนการสังเคราะห์ของตัวปลาเอง ซึ่งปลาน้ำจืดส่วนใหญ่จะสามารถสังเคราะห์ HUFA ได้ (Racine et al., 2007) งานวิจัยส่วนใหญ่ในปัจจุบันจึงให้ความสนใจเอนไซม์ desaturase ในปลาน้ำจืดเพราะ desaturation เป็นกระบวนการหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการสังเคราะห์ HUFA ในปลา (Tocher, 2003) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า ยีนที่สร้าง delta 6 desaturase (*Phy-Fad2*) ในปลาฉวยมีจำนวนนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 1338 คู่เบส ซึ่งสามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 445 กรดอะมิโน โดยกรดอะมิโนของ *Phy-Fad2* ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้มีคล้ายคลึงกับ *Pangasian hypophthalmus* (JX035811.1) *Pangasia larnaudii* (Lamkom et al., 2013) (JX035811.1) 96 เปอร์เซ็นต์ *Clarias macrocephalus* (Sansamak et al., 2013) (KF006248.1) 91 เปอร์เซ็นต์ *C. macrocephalus* x *C. gariepinus* (Lamkom et al., 2013) (KC994463.1) 89 เปอร์เซ็นต์ และ *Tachysurus fulvidrac* (KJ831068.1) 88 เปอร์เซ็นต์

การศึกษานี้ได้ทำการเชื่อมต่อยีน *Phy-Fad2* ของปลาฉวย กับ Expression vector คือ pTEF และทำการโอนถ่ายเข้าสู่เซลล์ยีสต์แล้ว ซึ่งภายในเซลล์ยีสต์ RY นี้จะเกิดกระบวนการการถอดรหัส (Transcription) เพื่อให้ได้สาย mRNA ซึ่งได้ทำการตรวจสอบเกิดกระบวนการ transcription นี้ด้วยการศึกษาปริมาณ mRNA ด้วยวิธี Realtime PCR ซึ่งในหลาย ๆ งานทดลองได้มีการศึกษาการทำงานของยีน *fad2* ของปลากับเวกเตอร์อื่น ๆ เช่น pYES2 vector ในเซลล์ยีสต์ เช่น การศึกษาการทำงานของยีน *fad2* ของปลาไหลญี่ปุ่น (*Anguilla japonica*) (Wang et al., 2014) ปลา Nibe croaker (*Nibae mitsukurii*) (Kabeya et al., 2015) ปลาแซลมอน (*Salmo salar* L.) (Monroig et al., 2010) ปลา European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.) (Gonzalez-Rovira et al., 2009) ปลา Cobia (*Rachycentron canadum*) (Zheng et al., 2009) ปลา grouper (*Epinephelus coioides*) (Li et al., 2014) ปลา Meagre (*Argyrosomus regius*) (Monroig et al., 2013)

เมื่อยีสต์ RY สามารถสร้างกระบวนการ transcription เพื่อสร้างสาย mRNA ได้แล้ว ในขั้นตอนต่อไปยีสต์ RY จะเข้าสู่กระบวนการการแปลรหัส (Translation) เพื่อสร้างโปรตีนเอนไซม์

Phy- $\Delta 6$ จากปลาซวาย ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่ายีสต์ RY สามารถสร้างกระบวนการ translation ได้ และโปรตีนเอ็นไซม์ Phy- $\Delta 6$ ที่เกิดขึ้นยังสามารถทำงานได้ภายในเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* โดยสามารถเปลี่ยนสารตั้งต้นในกลุ่ม n3 คือ C18 : 3n3 ไปเป็น C18 : 4n3 และสามารถเปลี่ยนสารตั้งต้นในกลุ่ม n6 คือ C18 : 2n6 ไปเป็น C18 : 3n6 ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการทำงานของโปรตีนเอ็นไซม์ *Fad2* ในเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* ในปลาหลายชนิดที่พบว่าโปรตีนเอ็นไซม์ *Fad2* ในเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* สามารถทำงานได้เช่นการศึกษาทำงานของโปรตีนเอ็นไซม์ *Fad2* ของปลา Cobia ในเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* (Zheng, 2009) carp Rainbow trout Gilthead Seabream, และปลา Tuobot (Zheng, 2004) Nile tilapia (Tanomman, 2013) ปลาไหลญี่ปุ่น (*Anguilla japonica*) (Wang et al., 2014) ปลา Nibe croaker (*Nibae mitsukurii*) (Kabeya et al., 2015) ปลาแซลมอน (*Salmo salar* L.) (Monroig et al., 2010) ปลา European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.) (Gonzalez-Rovira et al., 2009) ปลา Cobia (*Rachycentron canadum*) (Zheng et al., 2009) ปลา grouper (*Epinephelus coioides*) (Li et al., 2014) ปลา Meagre (*Argyrosomus regius*) (Monroig et al., 2013)

5.2 ผลการทดลองที่ 2 ศึกษาผลของการเสริมยีสต์ที่มีการตัดต่อยีน Delta 6 desaturase ในอาหารปลาซวาย

5.2.1 ผลต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตและอัตราการรอด

โปรไบโอติกได้ถูกนำมาใช้เป็นสารเสริมในอาหารสัตว์น้ำในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อเพิ่มส่งเสริมการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ (Nayak et al., 2010; Burr et al., 2007) โปรไบโอติกที่นำมาใช้เป็นสารเสริมในอาหารสัตว์น้ำ มีทั้งโปรไบโอติกที่เป็น prokaryotic cell ได้แก่ จุลินทรีย์ (*Lactobacillus acidophilus* *Bacillus subtilis*) และโปรไบโอติกที่เป็น eukaryotic cell ได้แก่ ยีสต์ *Saccharomyces pichai* *Debaryomyces hansenii* และยีสต์ *S. cerevisiae* ได้ถูกนำมาใช้เป็นสารเสริมโปรไบโอติกในสัตว์น้ำ (Abdel-Tawwab et al., 2010; Ortuno et al., 2002)

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษการเสริมโปรไบโอติกยีสต์เป็น 2 ช่วงเวลาคือ 60 วัน และ 120 วันโดยผลการศึกษการเสริมยีสต์ WT RY-pTEF และยีสต์ RY ในอาหารปลาซวายในรูปของโปรไบโอติก พบว่า การเสริมโปรไบโอติกยีสต์ WT RY-pTEF และยีสต์ RY ที่ระยะเวลาการทดลอง 60 วันไม่ส่งผลต่อการเพิ่มสมรรถนะการเจริญเติบโตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ได้แก่ ค่า น้ำหนักตัวสุดท้าย น้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงไป (WG) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่การเสริมโปรไบโอติกยีสต์ WT RY-pTEF และยีสต์ RY ที่ระยะเวลาการทดลอง 120 วัน มีผลต่อการเพิ่มสมรรถนะการเจริญเติบโตของปลาซวายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งจากผลการศึกษาจะ

เห็นได้ว่าการเสริมโปรไบโอติกยีสต์ที่ระยะเวลาที่มากขึ้นจะส่งผลต่อการเพิ่มสมรรถนะการเจริญเติบโตของปลาได้ สอดคล้องกับการทดลองการเสริมแบคทีเรียโปรไบโอติก *L. Acidophilus* *B. subtilis* *P. acidilactici* ในปลาเรนโบว์เทราท์ที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มสมรรถนะการเจริญเติบโตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่การเสริมโปรไบโอติกที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์ส่งผลทำให้สมรรถนะการเจริญเติบโต ได้แก่ ค่า FBW (Final mean body weight) DGI (Daily growth index) PER (Protein efficiency ratio) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และ FCR ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (Ramos et al., 2015) นอกจากนี้ยังมีอีกหลายการศึกษาที่พบว่าเสริมแบคทีเรียโปรไบโอติกและโปรไบโอติกยีสต์ที่ไม่ส่งผลต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของปลาโดยการศึกษาการเสริมยีสต์ *D. hansenii* ที่ระยะเวลา 23 วันในปลา Seabass (*Dicentrarchus labrax*) พบว่าการเสริมยีสต์ *D. hansenii* ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มน้ำหนักตัวปลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (Tovar-Ramirez et al., 2002) เช่นเดียวกันกับการศึกษาการเสริมยีสต์ *S. cerevisiae* ในปลา hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) ที่ระยะเวลา 45 วัน พบว่าการเสริม *S. cerevisiae* ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มสมรรถนะการเจริญเติบโต ได้แก่ ค่า WG และค่า FCR อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (Li et al., 2003) เช่นกันการศึกษการเสริมโปรไบโอติก *L. plantarum* ในปลาเพาะ *Pangasius bocourti* ที่ระยะเวลา 28 วัน ก็พบว่าไม่ส่งผลต่อการเพิ่มสมรรถนะการเจริญเติบโต ได้แก่ ค่า SGR และค่า FCR อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (Doan et al., 2014) เช่นกัน ซึ่งจากผลการทดลองทั้งหลายที่ได้กล่าวมานี้จะเห็นได้ว่าระยะเวลาในการเสริมโปรไบโอติกในสัตว์น้ำชนิดต่าง ๆ อาจจะยังไม่ยาวนานพอที่จะส่งผลต่อการเพิ่มสมรรถนะการเจริญเติบโตได้ และสำหรับการศึกษาที่ระยะเวลาการเลี้ยง 120 วัน พบว่าการเสริมยีสต์ WT RY-pTEF และยีสต์ RY มีผลต่อการเพิ่มสมรรถนะการเจริญเติบโตคือน้ำหนักตัวสุดท้าย WG SGR และลดค่า FCR อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการเสริมยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ระยะเวลา 214 วัน ในปลาคูแอฟริกา (*Clarias gariepinus*) ที่พบว่าสามารถเพิ่มสมรรถนะการเจริญเติบโตซึ่ง ได้แก่ค่า WG SGR และ ลดค่า FCR อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (Essa et al., 2011) เช่นเดียวกันกับการเสริมแบคทีเรียโปรไบโอติก *L. Acidophilus* ในปลาช่อน (*Channa striata*) ที่ระยะเวลา 90วัน มีผลทำให้สามารถเพิ่มสมรรถนะการเจริญเติบโต ได้แก่ WG FCR และ PER อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (Talpur et al., 2014)

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าการเสริมโปรไบโอติกยีสต์ไม่มีผลต่ออัตราการรอดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ทั้งที่ระยะเวลาการเสริมโปรไบโอติกยีสต์ 60 วัน และ 120 วัน สอดคล้องกับการศึกษาการเสริมยีสต์ *D. hansenii* และ *S. Cerevisiae* ในปลา Seabass (*Dicentrarchus labrax*) และในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ที่พบว่าไม่ส่งผลต่ออัตราการรอดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (Tovar-Ramirez et al., 2002) เช่นเดียวกับการศึกษาในปลานิล

(*O. niloticus*) (Abdel-Tawwab et al., 2008) และการเสริมยีสต์ *S. cerevisiae* ในปลา hybrid striped bass (*M. chrysops* x *M. saxatilis*) (Li et al., 2003)

ซึ่งจากข้อมูลข้างต้นจึงกล่าวได้ว่า ระยะเวลาในการเสริมโปรไบโอติก มีผลต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตในปลา โดยพบว่าการเสริมโปรไบโอติกยีสต์ในปลาที่ระยะเวลายาวนานขึ้นจะมีผลต่อการเพิ่มสมรรถนะการเจริญเติบโตได้แก่ น้ำหนักตัวสุดท้าย WG SGR FCR ได้

5.2.2 ผลต่อองค์ประกอบทางโภชนาในตัวปลาสาวย

องค์ประกอบทางเคมีของตัวปลาสามารถใช้เป็นพารามิเตอร์หนึ่งที่ใช้บ่งชี้ถึงประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลา (Shearer, 1994; Machiels and Henken, 1985) ผลการเสริมโปรไบโอติกยีสต์ WT RY-pTEF และยีสต์ RY ในอาหารปลาสาวยไม่ส่งผลต่อปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้าที่สะสมในตัวปลาสาวยซึ่งจากการทดลองนี้สอดคล้องกับศึกษาในปลาเรนโบว์เทราท์ที่ได้รับการได้รับการเสริมแบคทีเรียโปรไบโอติก *B. subtilis* และ *P. acidilactici* (merifield et al, 2011) และในปลากลุ่ม livebearers (Ghosh et al., 2008) และการศึกษาเสริมโปรไบโอติก *L. acidophilus* *B. subtilis* *P. acidilactici* ในปลาเรนโบว์เทราท์ (Ramos et al., 2015) ที่พบเช่นกันว่าการเสริมโปรไบโอติกไม่ส่งผลต่อองค์ประกอบทางโภชนาในตัวปลาซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้จะเห็นได้ว่าการเสริมโปรไบโอติกยีสต์ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณค่าทางโภชนาในตัวปลาสาวย

5.2.3 ผลต่อค่าโลหิตวิทยาของปลาสาวย

ค่าโลหิตวิทยาเป็นพารามิเตอร์หนึ่งที่ใช้ในการศึกษาเมื่อมีการเสริมโปรไบโอติกให้อาหารสัตว์น้ำซึ่งค่าโลหิตวิทยาเป็นตัวบ่งบอกถึงสุขภาพของปลาได้ (Gatlin, 1997, 2002; Webster, 2002) จากการทดลองครั้งนี้พบว่า การเสริมโปรไบโอติกยีสต์ *S. cerevisiae* ไม่มีผลต่อค่าฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบิน และจำนวนเม็ดเลือดแดงตลอดช่วงระยะเวลาการทดลองที่ 60 วัน และ 120 วัน สอดคล้องกับการศึกษาการเสริมยีสต์ในปลาสาวยที่มีการกระตุ้นด้วยเชื้อก่อโรคไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าฮีมาโตคริตและจำนวนเม็ดเลือดแดง (Wanna et al., 2015) และการเสริมโปรไบโอติกยีสต์ใน Juvenile leopard grouper ไม่มีผลต่อค่าฮีโมโกลบิน (Reyes-Becerrill et al., 2008; 2011) แต่มีบางการศึกษาที่พบว่าการเสริมโปรไบโอติกยีสต์มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าโลหิตวิทยา เช่นการศึกษาการเสริมยีสต์ในปลาช่อน (*Channa striata*) มีผลทำให้จำนวนเม็ดเลือดแดงและค่าฮีโมโกลบินเพิ่มสูงขึ้นที่ระยะเวลาการทดลอง 8 สัปดาห์และที่ 12 สัปดาห์ (Talpur et al., 2014) และการเสริมโปรไบโอติกยีสต์ในปลานิลมีผลต่อการเพิ่มขึ้นระดับของฮีโมโกลบิน (Taoka et al. 2006) จะเห็นได้ว่าการเสริมโปรไบโอติกยีสต์อาจส่งผลหรือไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าโลหิตวิทยานั้นอาจขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยเช่นระยะเวลาในการเสริม อายุ และชนิดของปลาด้วย

5.2.4 ผลต่อค่าเคมีในเลือดปลาซวาย

ค่าเคมีในเลือดเป็นอีกพารามิเตอร์หนึ่งที่ทำการศึกษาเมื่อมีการเสริมโปรไบโอติกซึ่งเป็นดัชนีที่ใช้ในการชี้วัดสุขภาพ การตอบสนองทางสรีรวิทยาภาวะทางโภชนาการและสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อปลา (Cnaani et al., 2004; Hoseinifar et al., 2011a)

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า การเสริมโปรไบโอติกยีสต์ *S. cerevisiae* ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่ากลูโคสในเลือดปลาซวายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับผลการศึกษาการเสริมโปรไบโอติก LAB ในปลา Sae bass ที่พบว่าค่ากลูโคสในเลือดไม่มีการเปลี่ยนแปลงเช่นกัน (Piccolo et al., 2014) และการศึกษาในปลาเรนโบว์เทราท์ (*Oncorhynchus mykiss*) ที่มีการเสริมโปรไบโอติกร่วมกับพรีไบโอติก พบว่าไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับกลูโคสในเลือด (Mehrabi et al., 2011) อีกทั้งมีการศึกษาในปลานิลที่มีการเสริมแบคทีเรียโปรไบโอติกพบว่า การเสริมโปรไบโอติกชนิด *Micrococcus luteus* ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับกลูโคสในเลือด แต่การเสริมแบคทีเรียโปรไบโอติกชนิด *Pseudomonas* sp. และการเสริม *M. luteus* ร่วมกับ *Pseudomonas* sp. มีผลทำให้ระดับของกลูโคสเพิ่มสูงขึ้นได้ (Abd El-Rhman et al., 2009) และมีรายงานการศึกษาที่พบว่า การเสริม *S. cerevisiae* ที่ระดับที่สูงขึ้นมีผลทำให้ค่ากลูโคสในเลือดเพิ่มสูงขึ้นด้วย (Abdel-Tawwab et al., 2008) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาระยะของการเสริมโปรไบโอติกต่อระดับของค่ากลูโคสพบว่า การเสริมโปรไบโอติกที่ระยะเวลาสั้น (2 สัปดาห์) ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่ากลูโคสในเลือด แต่ที่ระยะการเสริมโปรไบโอติกในระยะยาว (4-8 สัปดาห์) ที่มีการกระตุ้นด้วยเชื้อก่อโรค มีผลทำให้ค่ากลูโคสในเลือดเพิ่มสูงขึ้น (Harikrishnan et al., 2011)

ค่าเคมีในเลือดที่มีผลต่อการเมตาบอลิซึมของโปรตีน ได้แก่ ค่าโปรตีน อัลบูมิน ปริมาณยูเรียในโตรเจน ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าทั้ง ค่าโปรตีน อัลบูมินและ ปริมาณยูเรียในโตรเจน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการเสริมโปรไบโอติกยีสต์ *S. cerevisiae* ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการเมตาบอลิซึมของโปรตีน สอดคล้องกับการศึกษาการเสริมยีสต์ *D. hansenii* ในปลา grouper ที่ไม่มีผลต่อค่าโปรตีนในพลาสมา (Reyes-Becerril et al., 2008, 2011) แต่มีบางการศึกษาพบว่า การเสริมยีสต์ที่ ระดับ 1-5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหารมีผลทำให้ค่าอัลบูมินเพิ่มสูงขึ้นในปลานิล และสูงที่สุดที่ระดับ 1 กรัมต่อกิโลกรัมอาหารแต่ไม่มีผลที่ระดับ 0-0.5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (Abdel-Tawwab et al., 2008) และการเสริมยีสต์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต ที่ผลต่อการเพิ่มขึ้นของโปรตีนในพลาสมาในปลานิลได้ (Taoka et al., 2006) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในปลานิลที่มีการเสริมแบคทีเรียโปรไบโอติกพบว่า การเสริมโปรไบโอติกชนิด *Micrococcus luteus* ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีนในพลาสมา แต่การเสริมโปรไบโอติกชนิด *Pseudomonas* sp. และการเสริม *M. luteus* ร่วมกับ *Pseudomonas* sp. มีผลทำให้ระดับของโปรตีนในพลาสมาลดลงได้ (Abd El-Rhman et al., 2009)

จากการทดลองครั้งนี้พบว่า การเสริมโปรไบโอติกยีสต์ *S. cerevisiae* ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า คลอเรสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ แต่มีบางการศึกษาพบว่า การเสริมโปรไบโอติก LAB มีผลต่อระดับของคลอเรสเตอรอล และ ไตรกลีเซอไรด์ ในปลา Sea bass (Piccolo et al., 2014) และในปลาคูแอฟริกา (Al-Dohail et al., 2009) และการศึกษาในปลาเรนโบว์เทราท์ (*Oncorhynchus mykiss*) ที่มีการเสริมโปรไบโอติกพร้อมกับพรีไบโอติก พบว่าไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ ไตรกลีเซอไรด์ ในเลือด (Mehrabi et al., 2011)

ระดับของแร่ธาตุซึ่งเป็นพารามิเตอร์ที่บ่งบอกถึงสภาพร่างกายของสัตว์ สมดุลแร่ธาตุ (Prabhu et al., 2014) โดยจากการศึกษาพบว่า ค่าฟอสฟอรัส คลอไรด์ แคลเซียม แมกนีเซียม และ ธาตุเหล็ก ไม่มีความแตกต่างกันในทุกกลุ่มการทดลอง อย่างไรก็ตามมีบางการศึกษาพบว่า การเสริมโปรไบโอติก LAB ในปลาคูแอฟริกา มีผลทำให้ระดับของแมกนีเซียม แคลเซียม และ คลอไรด์ ในเลือดเพิ่มสูงขึ้นได้ ซึ่งการศึกษาระดับแร่ธาตุในปลาเมื่อมีการเสริมโปรไบโอติกยีสต์นั้นยังมีการศึกษาอยู่น้อย จึงยังไม่สามารถอธิบายกลไกการเปลี่ยนแปลงที่แน่ชัดได้

5.2.5 ผลต่อค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในตัวปลาซวาย

ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเป็นกลไกที่สำคัญในการป้องกันเชื้อโรคในสัตว์น้ำ การเสริมโปรไบโอติกยีสต์ *S. cerevisiae* ในการศึกษาครั้งนี้สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาซวายได้ จากการศึกษานี้พบว่า การเสริมโปรไบโอติกยีสต์ WT RY-pTEF และยีสต์ RY มีผลทำให้ค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะซึ่งได้แก่ Total Ig Lysozyme และ Complement activity (ACH50) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ทั้งที่ระยะเวลาการเสริม 60 วัน และ 120 วัน

Total Ig ซึ่งเป็นสารโปรตีนที่อยู่ในเลือดทำหน้าที่ป้องกันการติดเชื้อโรคมีค่าสูงขึ้นเมื่อมีการเสริมโปรไบโอติกยีสต์ *S. cerevisiae* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สอดคล้องกับการศึกษาการเสริมแบคทีเรียโปรไบโอติกในปลาเรนโบว์เทราท์ (Brunt et al., 2007; Newaj-Fyzul et al., 2007; Merrifield et al., 2010)

Lysozyme เป็นโปรตีนที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายโดยทำหน้าที่ทำลายแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค โดย lysozyme จะทำการย่อยชั้น peptidoglycan ที่ผนังเซลล์แบคทีเรียที่ก่อโรค หลังจากนั้นเซลล์แบคทีเรียจะถูกย่อยด้วยกระบวนการ phagocytosis (Ellis., 2001) จากทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาการเสริมแบคทีเรียโปรไบโอติกในปลาเรนโบว์เทราท์ (Brunt et al., 2007; Newaj-Fyzul et al., 2007; Merrifield et al., 2010, 2011) ในปลา Grouper (San et al., 2010) และในปลาคู (Shelby et al., 2007) ที่พบว่าเมื่อมีการเสริมโปรไบโอติกจะมีผลทำให้ค่า Lysozyme เพิ่มขึ้น

Complement activity (ACH50) ใน ปลา สามารถสร้างได้ โดยการทำลาย lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบซึ่งเป็น

แบคทีเรียที่ก่อโรคในปลา ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า ACH50 มีค่าสูงขึ้นเมื่อมีการเสริมโปรไบโอติกยีสต์ *S. cerevisiae* เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในปลา Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) ที่พบว่าเมื่อมีการเสริมโปรไบโอติกยีสต์มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของค่า ACH 50 มากกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (Reyes-Becerril et al., 2008)

ด้วยองค์ประกอบของยีสต์คือ กลูแคนและแมนแนน ซึ่งเป็นพรีไบโอติกที่มีผลต่อการสร้างระบบภูมิคุ้มกันจึงยืนยันได้ว่ายีสต์ที่อยู่ในรูปของโปรไบโอติกที่เสริมในอาหารปลาสวยนั้นสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาได้

5.2.6 ผลต่อประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ปลาสวย

โปรไบโอติกยีสต์ *S. cerevisiae* เป็นโปรไบโอติกที่สามารถดำรงชีวิตในลำไส้ได้ ซึ่งจะมีผลต่อประชากรจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารได้ (Tovar et al., 2002) โดยอาหารที่มีการเสริมโปรไบโอติกจะสามารถปรับสมดุลของประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ได้ ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า การเสริมโปรไบโอติกยีสต์ที่ระยะเวลา 60 วัน มีผลทำให้ประชากรในกลุ่มยีสต์และราเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในปลานิลแดงที่พบว่า การเสริมโปรไบโอติก *Pediococcus acidilactici* จะมีผลการเพิ่มจำนวนประชากรจุลินทรีย์ในกลุ่ม Lactic acid bacteria (LAB) ได้ (Ferguson et al., 2010) นอกจากนี้ยังพบว่า การเสริมโปรไบโอติกยีสต์ที่ระยะเวลาที่ 120 วัน มีผลทำให้ประชากรจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Vibrio* spp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับการศึกษาของ Boonanuntanasarn et al. (2015) ที่มีการเสริม *P. acidilactici* ในอาหารกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) พบว่ามีผลทำให้ประชากรจุลินทรีย์ในกลุ่มของ LAB เพิ่มขึ้นแต่ประชากรจุลินทรีย์ในกลุ่มของ *Vibrio* spp. ในลำไส้ลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า การเสริมโปรไบโอติกยีสต์ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในกลุ่มของ *Bifidobacterium* spp. และประชากรจุลินทรีย์ในกลุ่ม LAB ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าโปรไบโอติกยีสต์ไม่ได้มีผลกับจุลินทรีย์ในกลุ่มของ *Bifidobacterium* spp. และประชากรจุลินทรีย์ในกลุ่ม LAB จากข้อมูลข้างต้นจึงชี้ให้เห็นว่าการเสริมโปรไบโอติกยีสต์มีผลทำให้ประชากรในกลุ่มของยีสต์และราเพิ่มสูงขึ้น และทำให้ประชากรจุลินทรีย์ในกลุ่มของ *Vibrio* spp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์น้ำมีปริมาณที่ลดลงได้

5.2.7 ผลของการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสวยต่อกรดไขมันในเนื้อปลา และไขมันปลา

ไขมันจัดเป็นองค์ประกอบสำคัญในร่างกายสัตว์ ซึ่งเป็นทั้งแหล่งพลังงานและกรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกาย (Sargent et al., 1989) โดยเฉพาะกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูง (PUFA) ในกลุ่มของ n3 และ n6 ซึ่งเป็นกรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกายสัตว์และมนุษย์ (Leaf and weber, 1988) สำหรับในปลากรดไขมัน PUFA ที่มีการสะสมภายในตัวปลาได้มาจาก 2 แหล่งที่มาคือ จากอาหารที่ปลาได้รับ และจากกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน PUFA ในตัวปลาเอง ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการ

เสริมยีสต์ RY ที่มีความสามารถในการผลิตเอ็นไซม์ Phy- $\Delta 6$ ที่สามารถเปลี่ยนกรดไขมัน PUFA ได้ คือ สามารถเปลี่ยนกรดไขมัน C18 : 3n-3 เป็น C18 : 4n3 ในกลุ่มของ n3 และ C18 : 2n6 เป็น C18 : 3n6 ในกลุ่มของ n6 เปรียบเทียบกับ ยีสต์ WT RY-pTEF และกลุ่มควบคุม ซึ่งจากผลการศึกษาการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสวายที่ระยะเวลา 60 วัน พบว่าการเสริมยีสต์ WT RY-pTEF และ RY ไม่ส่งผลเปลี่ยนแปลงต่อการสะสมกรดไขมันในเนื้อปลาและในไขมันในช่องท้องปลาสวาย แต่ผลการศึกษาการเสริมยีสต์ในอาหารปลาสวายที่ระยะเวลา 120 วัน พบว่าการเสริมยีสต์ RY ในอาหารปลา มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของการสะสมกรดไขมันชนิด C18 : 3n6 และ C18 : 4n3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบอีกว่าการเสริมยีสต์ RY ยังมีผลทำให้กรดไขมันในกลุ่มของ n3 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เช่นกัน จากผลการทดลองนี้จึงชี้ให้เห็นว่ายีสต์ RY มีความสามารถในการผลิตเอ็นไซม์ Phy- $\Delta 6$ และสามารถเปลี่ยนกรดไขมันที่เป็นสารตั้งต้นให้เป็นผลิตภัณฑ์ภายในตัวปลาสวายได้ สอดคล้องกับการศึกษาในปลาหลายชนิดที่พบว่ายีสต์ RY มีความสามารถในการผลิตเอ็นไซม์ Delta 6 desaturase ในทางห้องปฏิบัติการได้ เช่นการศึกษาการทำงานของยีน *fad2* ของปลาไหลญี่ปุ่น (*Anguilla japonica*) (Wang et al., 2014) ปลา Nibe croaker (*Nibae mitsukurii*) (Kabeya et al., 2015) ปลาแซลมอน (*Salmo salar* L.) (Monroig et al., 2010) ปลา European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.) (Gonzalez-Rovira et al., 2009) ปลา Cobia (*Rachycentron canadum*) (Zheng et al., 2009) ปลา grouper (*Epinephelus coioides*) (Li et al., 2014) ปลา Meagre (*Argyrosomus regius*) (Monroig et al., 2013) และมีการศึกษาการเสริมยีสต์ RY มีความสามารถในการผลิตเอ็นไซม์ Delta 6 desaturase ในอาหารปลานิลพบว่า มีผลทำให้ปลานิลมีการสะสมกรดไขมันชนิด C18 : 3n6 และ C18 : 4n3 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ศุภมาส, 2555) จากผลการศึกษาในครั้งนี้จึงสามารถกล่าวได้ว่าโปรไบโอติกยีสต์ RY มีความสามารถในการผลิตเอ็นไซม์ Phy- $\Delta 6$ และสามารถทำงานภายในตัวปลาสวายได้ คือสามารถเปลี่ยนกรดไขมัน C18 : 3n3 เป็น C18 : 4n3 ในกลุ่มของ n3 และ C18 : 2n6 เป็น C18 : 3n6 ในกลุ่มของ n6 ได้

บทที่ 6

สรุปและข้อเสนอแนะ

6.1 สรุป

จากการศึกษาครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ cDNA ของยีน *Phy-Fad2* มีความยาวเท่ากับ 1,338 คู่เบส แปรรหัสเป็นกรดอะมิโนจะมีจำนวนเท่ากับ 445 กรดอะมิโน ซึ่ง mRNA ของยีน *Phy-Fad2* ภายในยีสต์ RY สามารถแสดงออกได้ และเอนไซม์ $\text{Phy-}\Delta 6$ ที่ได้จากยีสต์ RY มีความสามารถเปลี่ยน C18 : 3n3 เป็น C18 : 4n3 และ C18 : 2n6 เป็น C18 : 3n6 ได้

การเสริมยีสต์ WT RY-pTEF และ RY ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง มีผลต่อภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง แต่มีผลต่อประชากรจุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์และรา และที่ระยะเวลาการเลี้ยง 120 วัน ส่งผลต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต และ FCR และประชากรประชากรจุลินทรีย์ในกลุ่มของไวรัสโออีกทั้งยังมีผลทำให้มีการสะสมกรดไขมัน C18 : 4n3 และ C18 : 3n6 และกรดไขมันในกลุ่ม n3 แต่ตลอดทั้งการทดลองไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง ค่าองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อปลา ค่าโลหิตวิทยา ค่าเคมีในเลือดปลา

6.2 ข้อเสนอแนะ

จากข้อมูลการศึกษาในครั้งนี้ ในด้านการนำไปใช้จริง ณ ปัจจุบันนี้ยังไม่สามารถนำไปใช้ได้เนื่องจากยังติดกับข้อกฎหมายด้าน สินค้าที่มีการติดต่อพันธุกรรม จึงทำได้แค่เพียงสามารถนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะนำไปใช้ในการศึกษา ลำดับของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน delta 6 desaturase ในปลาชนิดอื่น ๆ ได้ และยังเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาเพื่อพัฒนาความสามารถในการผลิตยีสต์ RY ให้มีความสามารถผลิตเอนไซม์ delta 6 desaturase อาจโดยการพัฒนาการตัดต่อพันธุกรรมให้ยีสต์มีการแสดงออกของเอนไซม์ delta 6 desaturase ที่เพิ่มสูงขึ้น และการปรับเปลี่ยนชนิดของยีสต์ที่มีความสามารถในการเพิ่มการสะสมของไขมันและกรดไขมันที่มากขึ้นได้ เมื่อนำไปใช้เสริมในอาหารปลาและสัตว์เศรษฐกิจอื่น ๆ เพื่อเพิ่มการสะสมกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในตัวสัตว์ให้สูงขึ้นได้

เอกสารอ้างอิง

- กิจการ ศุภมาตย์ อุษณีย์ เอกปณิธานพงศ์ และจิราพร เกษรจันทร์. (2543). ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ : I เทคนิคในการศึกษาและระบบภูมิคุ้มกันโรคและองค์ประกอบเลือดกุ้งกุลาดำ. ว. **สงขลานครินทร์ วทท.** 22(ฉบับพิเศษ): 567-580.
- วินัย ตะห์ลักัน. (2538). กรดไขมันไม่อิ่มตัวโอเมก้า -3 บทบาทใหม่ในทางการแพทย์และอุตสาหกรรม. รายงานประจำปี สมาคมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทางอาหารแห่งประเทศไทย.
- สมพงษ์ สหพงศ์. (2538). น้ำมันปลา น้ำมันลดไขมัน. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์รวมทรงศ.
- สาวิตรี ลิ้มทอง. (2549). ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศุภมาศ ถนอมมัน. (2555). การผลิตเอนไซม์ *delta 6 desaturase* ของปลานิลในยีสต์เพื่อใช้เสริมในอาหารปลา. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดพะเยา. การเลี้ยงปลาสวาย [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://www.fisheries.go.th/if-phayao>
- Abdel-Tawwab, M., Abdel-Rahman, A.M., and Ismael, N.E.M. (2008). Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**. 280: 185-189.
- Abdel-Tawwab, M., Mousa, M.A.A., and Mohammed, M.A. (2010). Effect of yeast supplement on the growth and resistance of Galilee tilapia, *Sarotherodon galilaeus* (L.) to environmental copper toxicity. **J. World Aquacult. Soc.** 41: 214-223.
- Aguiar, C.A., Morais, R.D., Santos, P.L., Stevanato, B.F., Visentainer, L.E.J., Nilson, E.S., and Visentainer, V.J. (2007). Effect of flaxseed oil in diet on fatty acid composition in the liver of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Archivos Latinoamericanos de nutricion**. 57: 273-276.
- Al-Dohail, M.A., Hashim, R., and Aliyu-Paiko, M. (2009). Effects of the probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, on the growth performance, haematology parameters and immunoglobulin

- concentration in African Catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822) fingerling. **Aquaculture Research**. 40: 1642-1652.
- AOAC. (1990). **Official Methods of Analysis**. (14th eds). Arlington, VA, USA.
- Assem, H., Khalifa, A., and Salhia, M. (2014). Physiological and microbiological indices as indicators of evaluating dietary fungi degraded date pits as a probiotic for cultured Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fingerling and its effect on fish welfare. **Egypt. J. Aquat. Res.** 40: 435-441.
- Boonanuntanasarn, S., Wongsasak, U., Pitaksong, T., and Chaijamrus, S. (2015). Effects of dietary supplementation with β -glucan and synbiotics on growth, haemolymph chemistry, and intestinal microbiota and morphology in the Pacific white shrimp. **Aquacult Nutr.** Article first published online. <http://dx.doi.org/10.1111/anu.12302>.
- Bucolo, G., and David, H. (1973). Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. **Clin Chem.** 19: 476-482.
- Burr, G., Gatlin, I.D., and Ricke, S. (2007). Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in finfish aquaculture. **J. World Aquacul. Soc.** 36: 425-436.
- Doan, H.V., Doolgindachbaporn, S., and Suksri, A. (2014). Effects of low molecular weight agar and *Lactobacillus plantarum* on growth performance, immunity, and disease resistance of basa fish (*Pangasius bocourti*, Sauvage 1880). **Fish & Shellfish Immunol.** 41: 340- 345.
- Doumas, B.T., Watson, W.A., and Biggs, H.G. (1971). Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. **Clin Chim Acta.** 31: 87-96.
- Caterina D., and Basta, G. (2001). n-3 Fatty acids and the inflammatory response biological background. **Eur. Heart. J.** D42-D49.
- Cnaani, A., Tinman, S., Avidar, Y., Ron, M., and Hulata, G. (2004). Comparative study of biochemical parameters in response to stress in *Oreochromis aureus*, *O. mossambicus* and two strains of *O. niloticus*. **Aquac. Res.** 35: 1434-1440.
- El-Rhman, A.M.A, Khattab, Y.A., and Shalaby, A.M. (2009). *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish Shellfish Immunol.** 27: 175-80.

- Essa, M.A., Mabrouk, H.A., Mohamed R.A., and Michael, F.R. (2011). Evaluating different additive levels of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, on the growth and production performances of a hybrid of two populations of Egyptian African catfish, *Clarias gariepinus*. **Aquaculture**. 320: 137-141.
- Evers, D.C., Burgess, N.M., Champoux, L., Hoskins, B., Major, A., Goodale, W.M., Taylor, Poppenga, R.J.R., and Daigle, T. (2005). Patterns and interpretation of mercury exposure in freshwater avian communities in Northeastern North America. **Ecotoxicology**. 14: 193-221.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization /World Health Organization). (2011). **Report of the joint FAO/WHO expert consultation on the risks and benefits of fish consumption**. P. 50.
- Ferguson, R.M.W., Merrifield, D.L., Harper, G.M., Rawling, M.D., Mustafa, S., Picchietti, S., Balcazar, J.L., and Davies, S.J. (2010). The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). **J. Appl. Microbiol.** 109: 851-862.
- Flegg, H.M. (1973). An investigation of determination of serum cholesterol by an enzymatic method. **Ann. Clin. Biochem.** 10: 79-84.
- Gatlin III, D.M. (1997). Nutrition and feeding of striped bass and hybrid striped bass. In R. M. Harrell (ed.). **Striped bass and other morone culture** (pp. 235-251).
- Gatlin III, D.M. (2002). Nutrition and fish health. In J. E. Halver and R. W. Hardy (eds.). **Fish nutrition** (pp. 671-702).
- Ghosh, S., Sinha, A., and Sahu, C. (2008). Dietary probiotic supplementation in growth and health of live-bearing ornamental fishes. **Aquacult Nutr.** 14: 289-299.
- González-Rovira, A., Mourente, G., Zheng, X., Tocher, D., and 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.
- Gornall, A.G., Bardawill, C.J., and David, M.M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **J. Biol. Chem.** 177: 751-766.
- Gustiano, R. (2003). **Taxonomy and phylogeny of Pangasiidae catfishes from Asia (Ostariophysi Siluriformes)**. Ph. D. Dissertation Katholieke University Leuven, Leuven, Belgium.

- Hamilton, R.H. (1966). A direct photometric method for chloride in biological fluids, employing mercuric thiocyanate and perchloric acid. **Clin Chem.** 11: 1-17.
- Harikrishnan, R., Kim, M.C., Kim, J.S., Balasundaram, C., and Heo, M.S. (2011). Immunomodulatory effect of probiotics enriched diets on *Uronema marinum* infected olive. **Fish Shellfish Immunol.** 30: 964-971.
- Ho, B. T., and Paul, D. R. (2009). Fatty acid profile of Tra Catfish (*Pangasius hypophthalmus*) compared to Atlantic Salmon (*Salmo solar*) and Asian Seabass (*Lates calcarifer*). **Int. Food. Res. J.** 16: 501-506.
- Hoseinifar, S.H., Mirvaghefi, A., and Merrifield, D.L. (2011). The effects of dietary inactive brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. ellipsoideus on the growth, physiological responses and gut microbiota of juvenile beluga (*Huso huso*). **Aquaculture.** 318: 90-94.
- Kabeya, N., Yamamoto, Y., Cummins, S.F., Elizur, A., Yazawa, R., Takeuchi, Y., Haga, Y., Satoh, S., and Yoshizaki, G. (2015). Polyunsaturated fatty acid metabolism in a marine teleost, Nibe croaker *Nibea mitsukurii*: Functional characterization of Fads2 desaturase and Elovl5 and Elovl4 elongases. **Comp. Biochem. Physiol.** 188: 37-45.
- Li, P., and Gatlin, D.M. (2003). Evaluation of brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a feed supplement for hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*). **Aquaculture.** 219: 681-692
- Li, S., Mai, K., Xu, W., Yuan, Y., Zhang, Y., and Ai, Q. (2014). Characterization, mRNA expression and regulation of Δ^6 fatty acyl desaturase (FADS2) by dietary n-3 long chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) levels in grouper larvae (*Epinephelus coioides*) **Aquaculture.** 434: 212-219.
- Machiels, M.A.N., and Henken, A.M. (1985). Growth rate, feed utilization and energy metabolism of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell 1822), as affected by dietary protein and energy metabolism. **Aquaculture.** 44: 271-284.
- Mehrabi, Z., Firouzbakhsh, F., and Jafarpour A. (2012). Effects of dietary supplementation of synbiotic on growth performance, serum biochemical parameters and carcass composition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. **J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.** 96: 474-481.
- Merrifield, D.L., Bradley, G., Harper, G.M., Baker, R.T.M., Munn, C.B., and Davies, S.J. (2011). Assessment of the effects of vegetative and lyophilized *Pediococcus acidilactici* on

- growth, feed utilization, intestinal colonization and health parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). **Aquacult. Nutr.** 17: 73-79.
- Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Bradley, G., Baker, R.T.M., and Davies, S.J. (2010). Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) I. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria. **Aquacult. Nutr.** 16: 504-510.
- Monroig, Ó., Zheng, X., Morais, S., Leaver, M.J., Taggart, J.B., and Tocher, D.R. (2010). Molecular and cell biology of lipids 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. **Biochimica et Biophysica Acta.** 1801: 1072-1081
- Monroig, Ó., Tocher, D.R., Hontoria, F., and Navarro, J.C. (2013). Functional characterisation of a Fads2 fatty acyl desaturase with $\Delta 6/\Delta 8$ activity and an Elovl5 with C16, C18 and C20 elongase activity in the anadromous teleost meagre (*Argyrosomus regius*). **Aquaculture.** 412-413: 14-22.
- Morais, S., Mourente, G., Ortega, A., Tocher, J.A. and 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.
- Nayak, S.K. (2010). Probiotics and immunity: A fish perspective. **Fish Shellfish Immunol.** 29: 2-14.
- Newaj-Fyzul, A., Al-Harbi, A.H., and Austin, B. (2014). Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. **Aquaculture.** 431: 1-11
- Nicola, P., and Robert, M. (2009). Mercury fate and transport in the global atmosphere. **Emissions measurements and models.** Springer.
- NRC. (1993). **Nutrition requirement of fish.** National Academy of Press. Washington; DC.
- Ortuño, J., Cuesta, A., Rodríguez, A., Esteban, M.A., and Meseguer J. (2002). Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Vet. Immunol. Immunopathol.** 85: 41-50

- Panigrahi, A., Kiron, V., Satoh, S., and Watanabe, T. (2010). Probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* influences the blood profile in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Fish Physiol. Biochem.** 36: 969-977.
- Pereira, S. L., Leonard, A. E., and 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.
- Pitaksong, T., Kupittayanant, P., and Boonanuntanasarn, S. (2013). The effects of vitamins C and E on the growth, tissue accumulation and prophylactic response to thermal and acidic stress of hybrid catfish. **Aquac. Nutr.** 19: 148 -162.
- Qiu, X., Hong, H., Datla, N., MacKenzie, L.S. Taylor, C.D., and Thomas, L.T. (2002). Expression of borange delta 6 desaturase in *Sacharomyces cerevisiae* and oilseed crops. **Can. J. B.** 80: 42-49.
- Racine, R.A., and Deckelbaum, R.J. (2007). Sources of very long chain unsaturated omega-3 fatty acids: Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. **Curr. Opin. Clin. Nut. Metab. Care.** 10: 123-128.
- Ram, A.J., Kuah, M.K., Lim, P.S., Kolkovski, S. and Chien A.C.S. (2008). Influence of dietary HUFA levels on reproductive performance, tissue fatty acid profile and desaturase and elongase mRNA expression in female zebrafish *Danio rerio*. **Aquaculture.** 277: 275-281.
- Reyes-Becerril, M., Salinas I, Cuesta, A., Meseguer, J., Tovar-Ramirez, D., Ascencio-Valle, F., and Esteban, M.A. (2008). Oral delivery of live yeast *Debaryomyces hansenii* modulates the main innate immune parameters and the expression of immune-relevant genes in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Fish Shellfish Immunol.** 25: 731-739.
- Reyes-Becerril, M., Tovar-Ramirez, D., Ascencio-Valle, F., Civera-Cerecedo, R., Gracia-Lopez, V., Barbosa-Solomieu, V., and Esteban, M.A. (2011). Effects of dietary supplementation with probiotic live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant systems of leopard grouper *Mycteroperca rosacea* infected with *Aeromonas hydrophila*. **Aquacult. Res.** 42: 1676-1686.
- Sargent, J.R., Bell, J.G., McEvoy, L., Tocher, D., and Estevez, A. (1999). Recent development in the essential fatty acid nutrition of fish. **Aquaculture.** 177: 191-199.

- Schulze, U. (1995). **Anaerobic physiology of *Saccharomyces cerevisiae***. Ph.D. Dissertation, Technical University of Denmark.
- Seiliez, I., Panserat, S., Corraze, G., Kaushik, S., and Bergot, P. (2003). Cloning and nutritional regulation of D6-desaturase-like enzyme in the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata*). **Comp. Biochem. Physiol.** 135: 449-460
- Sherman, F. (2002). Getting started with yeast. **Methods Enzymol.** 350: 3-41
- Sirimanapong, W., Adams, A., Ooi, E.L., Green, D.M., Nguyen, D.K., Browdy, C.L. Collet, B., and Thompson, K.D. (2015). The effects of feeding immunostimulant β -glucan on the immune response of *Pangasianodon hypophthalmus*. **Fish & Shellfish Immunol.** 45: 357-366.
- Siwicki, A.K., Anderson, D.P., and Rumsey, G.L. (1994). Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affect non-specific immunity and protection against furunculosis. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 41: 125-139.
- Tacon, A.G.J., and Metian, M. (2008). Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. **Aquaculture.** 285: 146-158.
- Talpur, A.D., Munir, M.B., Mary, A., and Hashim, R. (2014). Dietary probiotics and prebiotics improved food acceptability, growth performance, haematology and immunological parameters and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in snakehead (*Channa striata*) fingerlings. **Aquaculture.** 426-427: 14-20.
- Taoka, Y., Maeda, H., Jo, J.Y., Kim, S.M., Park, S., Yoshikawa, T., and Sakata, T. (2006). Use of live and dead probiotic cells in tilapia *Oreochromis niloticus*. **Fisheries Sci.** 72: 755-766.
- Tawwab, A.M., Rahman, A.M.A., and Ismael, E.M.N. (2008). Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged *in situ* with *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture.** 280: 158-189.
- Tocher, D.R. (2015). Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. **Aquaculture.** 449: 94-107.
- Tortora, G.J., Funke, B.R., and Case, C.L. (1998). **Microbiology: An introduction.** (6th ed.). Addison Wesley Longman: USA.

- Tovar, D., Zambonino, J., Cahu, C., Gatesoupe, F., V'azquez, R., and Lesel, R. (2002). Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. **Aquaculture**. 204: 113-123.
- Wang, S., Monroig, Ó., Tang, G., Zhang, L., You, C., Tocher, D.R., and Li, Y. (2014). Investigating long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in teleost fish: Functional characterization of fatty acyl desaturase (Fads2) and Elovl5 elongase in the catadromous species, Japanese eel *Anguilla japonica*. **Aquaculture**. 434: 57-65 .
- Weatherburn, M.W. (1967). Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Anal Chem**. 39: 971.
- Webster, C.D. (2002). Hybrid striped bass. In C.D. Webster and C. Lim (eds.). **Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture** (pp. 327-343).
- Zank, T.K., Zahringert, U., Lerchi, L., and Heinz, E. (2000). Cloning and functional expression of the first plant fatty acid elongase specific for delta 6-polyunsaturated fatty acids. **Biochem. Soc. Trans.** 28: 654-658.
- Zheng, X., Seiliez, I., Hasting, N., Tocher, D.R., Panserat, S., Dickson, C.A., Bergot, P., and Teale, A.J. (2004). Characterization and comparison of fatty acyl D6 desaturase cDNAs from freshwater and marine teleost fish species. **Comp. Biochem. Physiol.** 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 *elovl5* elongase of cobia (*Rachycentron canadum*). **Aquaculture**. 290: 122-131.
- www.bakeinfo.co.nz/school/images/yeast.
- www.dualsystems.com
- www.sparknotes.com/.../fungi/section2.rhtml

ประวัติผู้เขียน

นางสาวชนิษฐา ดิษทัต เกิดเมื่อวันที่ 12 มีนาคม พ.ศ. 2533 ที่จังหวัดกำแพงเพชร เริ่มศึกษาชั้นประถมศึกษาที่โรงเรียนบ้านวังแอมสว่างชัยวงศ์ อำเภอลองขลุง จังหวัดกำแพงเพชร ได้ศึกษาต่อชั้นมัธยมศึกษาตอนต้นที่โรงเรียนวังแอมวิทยาคม อำเภอลองขลุง จังหวัดกำแพงเพชร และตอนปลายที่โรงเรียน กำแพงเพชรพิทยาคม อำเภอเมือง จังหวัดกำแพงเพชร และสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ในปีการศึกษา 2555 และได้ศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ในปี 2555

