อารยา แจ้งไพร : การผลิตและการทดสอบประสิทธิภาพรีคอมบิแนนท์โปรไบโอติกยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ Delta 6 desaturase ในปลา (PRODUCTION AND EFFICACY OF RECOMBINANT PROBIOTIC YEAST PRODUCING DELTA 6 DESATURASE IN FISH) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.สุรินทร บุญอนันธนสาร, 234 หน้า.

การวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตและทดสอบประสิทธิภาพรีคอมบิแนนท์โปรไบโอติก *Saccharomyces cerevisiae* (RY-Δ6) ผลิตเอนไซม์ delta 6 desaturase (Δ6) ในปลา การทดลองที่ 1 และ 2 เป็นการสร้างชุดยีนที่ผลิตเอนไซม์ delta 6 desaturase (Δ6) จากปลานิล (*Oreochromis niloticus*) พบว่าโปรโมเตอร์ translational elongation factor (p*TEF*) เป็นโปรโมเตอร์ที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ Δ6 ในการเปลี่ยนกรดไขมัน C18:2n6 เป็น C18:3n6 และกรดไขมัน C18:3n3 เป็น C18:4n3 ในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันกลุ่ม n6-PUFA และ n3-PUFA ตามลำดับ จึงได้ทำการผลิตรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *S. cerevisiae* (RY-Δ6) ซึ่งมียีน Δ6 ในจีโนมและทำการตรวจสอบโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *Oni-fads2* ที่ระดับการถอดรหัส (transcription) และการแปรรหัส (translation) ของรีคอมบีแนนท์ยีสต์ RY-Δ6 ด้วยเทคนิค RT-PCR และ Western blot ตามลำดับ รีคอมบีแนนท์ยีสต์ RY-Δ6 มีการแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ Δ6 ในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันของ n6-PUFA และ n3-PUFA นอกจากนี้สารสกัดหยาบ (crude extract) จากรีคอมบีแนนท์ยีสต์ RY-Δ6 มีการแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ Δ6 และมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันเมล็ดลินซีด โดยเพิ่มองค์ประกอบของกรดไขมัน LC-PUFA ใน n6-PUFA และ n3-PUFA ดังนั้นโดยสรุปรวมรีคอมบีแนนท์ยีสต์ RY-Δ6 น่าจะมีความสามารถในใช้การเป็น cell factory เพื่อการผลิต LC-PUFA

การทดลองที่ 3 เป็นการศึกษาผลของการเสริมรีคอมบีแนนท์ยีสต์ RY-Δ6 เป็นสารเสริมโปรไบโอติกในปลานิล โดยมี 7 กลุ่มทดลอง ประกอบด้วยอาหารพื้นฐาน อาหารพื้นฐานเสริมด้วยยีสต์ที่ไม่ถูกทรานซ์ฟอร์ม (NT) ที่ระดับ 10^6 และ 10^8 เซลล์ต่อกรัมอาหารตามลำดับ อาหารพื้นฐานเสริมด้วยรีคอมบีแนนท์ยีสต์ RY-Δ6 ที่ระดับ 10^6 และ 10^8 เซลล์ต่อกรัมอาหาร ตามลำดับ อาหารพื้นฐานเสริมด้วยน้ำมันปลา และอาหารทางการค้า โดยทำการเลี้ยงปลาด้วยอาหารทดลองดังกล่าวเป็นระยะเวลา 90 วัน ผลการศึกษาพบว่า การเสริมยีสต์ NT และรีคอมบีแนนท์ยีสต์ RY-Δ6 สามารถพัฒนาสมรรถนะการเจริญเติบโตและค่าภูมิคุ้มกันให้ดีขึ้นได้ และสามารถเพิ่มความสูงของ villus ในลำไส้ ($P<0.05$) อาหารเสริมยีสต์ NT และรีคอมบีแนนท์ยีสต์ RY-Δ6 สามารถเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ในลำไส้ของปลาได้ อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทาง

สถิติขององค์ประกอบทางเคมีของตัวปลาและเนื้อ ค่าเคมีในเลือด และค่าทางโลหิตวิทยาระหว่างกลุ่มทดลองทั้งหมด ($P<0.05$) นอกจากพบว่าอาหารเสริมรีคอมบีแนนท์ยีสต์ RY-Δ6 มีผลต่อการเพิ่มการสะสมกรดไขมัน C18:3n6 และ C18:4n3 ในตับและเนื้อของปลา ($P<0.05$)

การทดลองที่ 4 เป็นการศึกษาผลของการใช้รีคอมบีแนนท์ยีสต์ RY-Δ6 ในการเสริมให้กับอาร์ทีเมีย เพื่อใช้เป็นอาหารมีชีวิตสำหรับปลากะพงขาววัยอ่อน (*Lates calcarifer*) จากผลการทดลองพบว่า อาร์ทีเมียที่เสริมด้วยน้ำมันถั่วเหลือง หรือน้ำมันลินซีด ร่วมกับรีคอมบีแนนท์ยีสต์ RY-Δ6 สามารถพัฒนาสมรรถนะการเจริญเติบโต และอัตราการรอดชีวิตของปลากระพงวัยอ่อนให้สูงขึ้นได้ ($P<0.05$) รีคอมบีแนนท์ยีสต์ RY-Δ6 สามารถเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ในลำไส้ของปลาได้ รีคอมบีแนนท์ยีสต์ RY-Δ6 มีผลทำให้เกิดการเพิ่มกรดไขมัน C18:3n6 C18:4n3 C20:4n6 Σn3-PUFA และ Σn6-PUFA ในตัวปลาได้ นอกจากนี้อาร์ทีเมียที่เสริมน้ำมันลินซีดร่วมกับรีคอมบีแนนท์ยีสต์ RY-Δ6 สามารถเพิ่มความต้านทานต่อความเครียดของปลา เมื่อปลากระพงวัยอ่อนถูกทดสอบความเครียดด้วยแอมโมเนีย

ในการศึกษานี้สรุปได้ว่า รีคอมบีแนนท์ยีสต์ RY-Δ6 มีแสดงออกของกิจกรรมเอนไซม์ Δ6 และสามารถนำไปใช้เพื่อเป็น cell factory ในการผลิต LC-PUFA นอกจากนี้รีคอมบีแนนท์ยีสต์ RY-Δ6 มีศักยภาพในการใช้เป็นรีคอมบิแนนท์โปรไบโอติกในอาหารปลา เพื่อเพิ่มปริมาณ LC-PUFA ได้ นอกจากนี้ควรมีการศึกษาต่อไปเกี่ยวกับการใช้รีคอมบีแนนท์ยีสต์ RY-Δ6 ในอาหารของสัตว์น้ำชนิดอื่น ๆ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ ลายมือชื่อนักศึกษา อารยา

ปีการศึกษา 2560 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา สิรินทร

ARAYA JANGPRAI : PRODUCTION AND EFFICACY OF RECOMBINANT PROBIOTIC YEAST PRODUCING DELTA 6 DESATURASE IN FISH. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SURINTORN BOONANUNTANASARN, Ph.D., 234 PP.

RECOMBINANT YEAST/PROMOTER/*FADS2*/*ACT*/*PGK*/*TEF*/TILAPIA

The present study aimed to investigate the production and efficacy of recombinant probiotic *Saccharomyces cerevisiae* (RY-Δ6) producing delta 6 desaturase in fish. In experiments I-II, construction of the expression vector which produced delta 6 desaturase activity (Δ6) from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) was performed. The translational elongation factor (p*TEF*) promoters was observed to be a suitable promoter to express Δ6 to convert C18:2n6 to C18:3n6 and C18:3n3 to C18:4n3 in biosynthesis pathways of n6- and n3-PUFAs, respectively. Subsequently, recombinant *S. cerevisiae* (RY-Δ6) which stably contained the Δ6 gene in its genome was generated and confirmed by DNA sequencing. The heterogeneous expression of RY-Δ6 at the transcription and translation levels were detectable by RT-PCR and Western blot analysis, respectively. RY-Δ6 exhibited Δ6 in biosynthesis pathways of both n6- and n3-PUFAs. In addition, the crude extract of RY-Δ6 exhibited Δ6 and modified fatty acid composition of soybean and linseed oils by increasing the fatty acids of LC-PUFA in n6- and n3-PUFAs. Combined with these results, RY-Δ6 could have the potential to be used as a cell factory to produce LC-PUFA.

Experiment III investigated the effects of the dietary supplementation of RY-Δ6 as probiotic in Nile tilapia. Seven dietary treatments including basal diet, basal diets

supplemented with non-transformed yeast (NT) at 10^6 and 10^8 CFU/g feed, basal diets supplemented with RY-Δ6 at 10^6 and 10^8 CFU/g feed, basal diet supplemented with fish oil and a commercial diet were fed to fish for 90 days. Supplementation of both NT and RY-Δ6 led to significantly improved growth performance and immune parameters and increased intestinal villus height ($P<0.05$). Dietary NT and RY-Δ6 modulate intestinal microbiota. However, there were no significant differences in the chemical composition in the whole body and meat, blood chemistry and hematological indices among experimental treatments ($P<0.05$). Additionally, dietary RY-Δ6 increased the accumulation of C18:3n6 and C18:4n3 in liver and meat ($P<0.05$).

Experiment IV evaluated the effects of the use of RY-Δ6 to enrich *Artemia* for use as live feed for seabass (*Lates calcarifer*) larvae. *Artemia* co-enriched with soybean oil or linseed oil and RY-Δ6 improved the growth performance and survival rate of seabass larvae ($P<0.05$). The RY-Δ6 modulated intestinal microbiota. RY-Δ6 led to increased C18:3n6, C18:4n3, C20:4n6, ∑n3-PUFA and ∑n6-PUFA in the whole body of fish. In addition, co-enriched *Artemia* with linseed oil and RY-Δ6 could improve stress resistance of fish when they were subjected to challenge with ammonia.

In conclusion, the present study generated RY-Δ6 expressing Δ6 and demonstrated its use as a cell factory to produce LC-PUFA. In addition, RY-Δ6 has the potential to be used as dietary recombinant probiotics in fish feed to increase LC-PUFA contents. Further investigations to examine their uses in other aquafeed are required.

School of Animal Production Technology Student's Signature Arayaa

Academic Year 2017 Advisor's Signature