

การศึกษาการกระจายของเอ็นไซม์และการวิเคราะห์อัตราการไหล  
ผ่านของคาร์บอนในปฏิกิริยาชีวเคมีในเชื้อที่ผลิตไขมัน

โดย

มนตรี ฉายสว่าง

สนับสนุนงบประมาณโดย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์

ประจำปีงบประมาณ 2558

LOCALIZATION OF RELATED ENZYME AND METABOLIC  
FLUX IN OLEAGINOUS SPECIES

By

Montri Chaisawang

Granted by

Rajamangala University of Technology Rattanakosin

Fiscal year 2015



## กิตติกรรมประกาศ

การทำโครงการวิจัยในครั้งนี้ ได้สำเร็จลุล่วงไปได้ดีด้วยความช่วยเหลือจากหลายฝ่าย จึงขอ  
อนุญาตขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ผู้ให้ทุนวิจัย ตลอดจน (.วช) อธิการบดี รอง  
อธิการบดีฝ่ายวิจัย ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา และเจ้าหน้าที่ประจำสถาบันวิจัยและพัฒนา  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ที่ให้คอยความช่วยเหลือ ให้ข้อมูล ตรวจสอบและสนับสนุน  
โครงการวิจัยมาโดยตลอด

ขอขอบคุณคณาบดีคณะศิลปศาสตร์ รองคณบดีคณะศิลปศาสตร์ หัวหน้าสาขาวิชาและคณาจารย์  
ประจำสาขาวิชาศึกษาทั่วไป ที่ให้การสนับสนุนสถานที่ในการทำโครงการวิจัย และขอขอบคุณคณะศิลป  
ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี พื้นที่เพาะช่าง คณะวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และมหาวิทยาลัยสยาม ที่อำนวยความสะดวกในการทำ  
วิจัยรวมถึงห้องสมุดตามมหาวิทยาลัยต่างๆ ที่ให้ข้อมูลอันเป็นประโยชน์

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ครูบาอาจารย์ผู้ประสิทธิ์ประสาทความรู้ นักวิชาการ  
ทุกท่าน แหล่งข้อมูลต่างๆ ที่ผู้วิจัยนำมาใช้อ้างอิง ขอคุณสมาชิกในครอบครัวทุกคน ตลอดจนเพื่อนๆ พี่ๆ  
น้องๆ ที่ให้กำลังใจและความช่วยเหลือต่างๆ จนทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จด้วยดี

มนตรี ฉายสว่าง

มีนาคม พ.ศ. 2559



## บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : A40 / 2558

ชื่อโครงการ : การศึกษาการกระจายของเอนไซม์และการวิเคราะห์อัตราการผลิตไขมันของคาร์บอน  
ในปฏิกิริยาชีวเคมีในเชื้อที่ผลิตไขมัน

ชื่อนักวิจัย : ดร. มนตรี ฉายสว่าง

การโตของเชื้อ *thraustochytrid* มีความเป็นไปได้ในการผลิตกรดไขมันอิ่มตัวหรือมีความยาวปานกลาง สำหรับการผลิตไบโอดีเซล และกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่ในโมเลกุลตั้งแต่ 2 อันขึ้นไป ได้แก่ กรดอะราคิโดนิก, กรดอีโคซะเพนตะอีโนอิก, กรดโดโคซาเพนซาอีโนอิก และ กรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิก สำหรับการใช้ในทางโภชนเภสัช โดยใช้การเลี้ยงในขวดทดลองชนิดที่มีแผ่นกั้น (baffled shake flask) และศึกษาโมเดลทางชีวเคมีด้วยวิธีการวิเคราะห์อัตราการผลิต

ผลการวิจัยพบว่า

1. ในการวิจัยนี้ได้เสนอเชื้อ *Thraustochytrium* sp. B01 เป็นสายพันธุ์ใหม่โดยยึดหลักด้วยลำดับเบส 18S rRNA โดยพบว่าเป็นเชื้อที่ใกล้เคียงและอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *Thraustochytrium* sp.
2. ศึกษาสรีรวิทยาการโตและการสะสมไขมันของเชื้อโดยศึกษาพีเอชเริ่มต้น, ความเข้มข้นของน้ำทะเล, ความเข้มข้นของกลูโคส และอุณหภูมิ พบว่าเชื้อโตได้ดีในสภาวะที่เหมาะสมโดยเปรียบเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้า และมีผลผลิตกรดไขมัน 0.35 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อเลี้ยงด้วยกลูโคส ซึ่งพบว่ามีเป็นไปได้ในการผลิตในระดับใหญ่
3. ข้อมูลจากกิจกรรมเอนไซม์พบว่าในสภาวะเหมาะสมมีอัตราการผลิตไขมันผ่าน HMP pathway น้อย ทำให้มีปริมาณ NADPH ไม่เพียงพอต่อความต้องการใช้ในการผลิตกรดไขมัน ดังนั้นเชื้อจึงใช้เอนไซม์ malic และ isocitrate dehydrogenase ในการช่วยสร้าง NADPH ให้เพียงพอ

คำสำคัญ : “Thraustochytrids” “การวิเคราะห์การไหล” “เอนไซม์วิทยา” “การจัดหมวดหมู่”

E-mail Address : Montri.Cha@rmutr.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : ตุลาคม 2558 - มีนาคม 2559

## Abstract

**Code of project** : A40 / 2558

**Project name** : Localization of related enzyme and metabolic flux in oleaginous species

**Researcher name** : Dr. Montri Chaisawang

Just as important is the high amount of MCFA and LC-PUFA produced by *Thraustochytrium* sp. B01, a potential source for large-scale oil production for biodiesel and DHA. Heterotrophic growth of thraustochytrid has potential in coproducing saturated fatty acid (SFA) or medium chain fatty acid (MCFA) for biodiesel and long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA), namely arachidonic acid (ARA), eicosapentaenoic acid (EPA), docosapentaenoic acid (DPA) and docosahexaenoic acid (DHA) for use in nutraceuticals. In this study, we proposed new Thailand thraustochytrid strains on the basis of 18S rRNA sequencing. The result showed a close phylogenetic relationship and highest percentage of similarity to *Thraustochytrids* sp. strain. Physiological screening including initial pH, seawater concentration, glucose concentration and temperature was carry out for optimization of culture conditions of *Thraustochytrid* sp. B01 for biomass and total fatty acid production. The lipid productivity of 0.35 g/L/h was obtained by *Thraustochytrium* sp. B01 with glucose as carbon source in baffled shake flask cultivation indicating a potential source for large-scale oil production for biodiesel and DHA. The production of NADPH for fatty acid biosynthesis is dependent of malic enzyme, isocitrate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase, respectively.

**Keywords:** “Thraustochytrids” “metabolic flux analysis” “enzymology” “Classification”

**E-mail Address** : Montri.Cha@mutr.ac.th

**Period of project** : October 2015 – March 2016

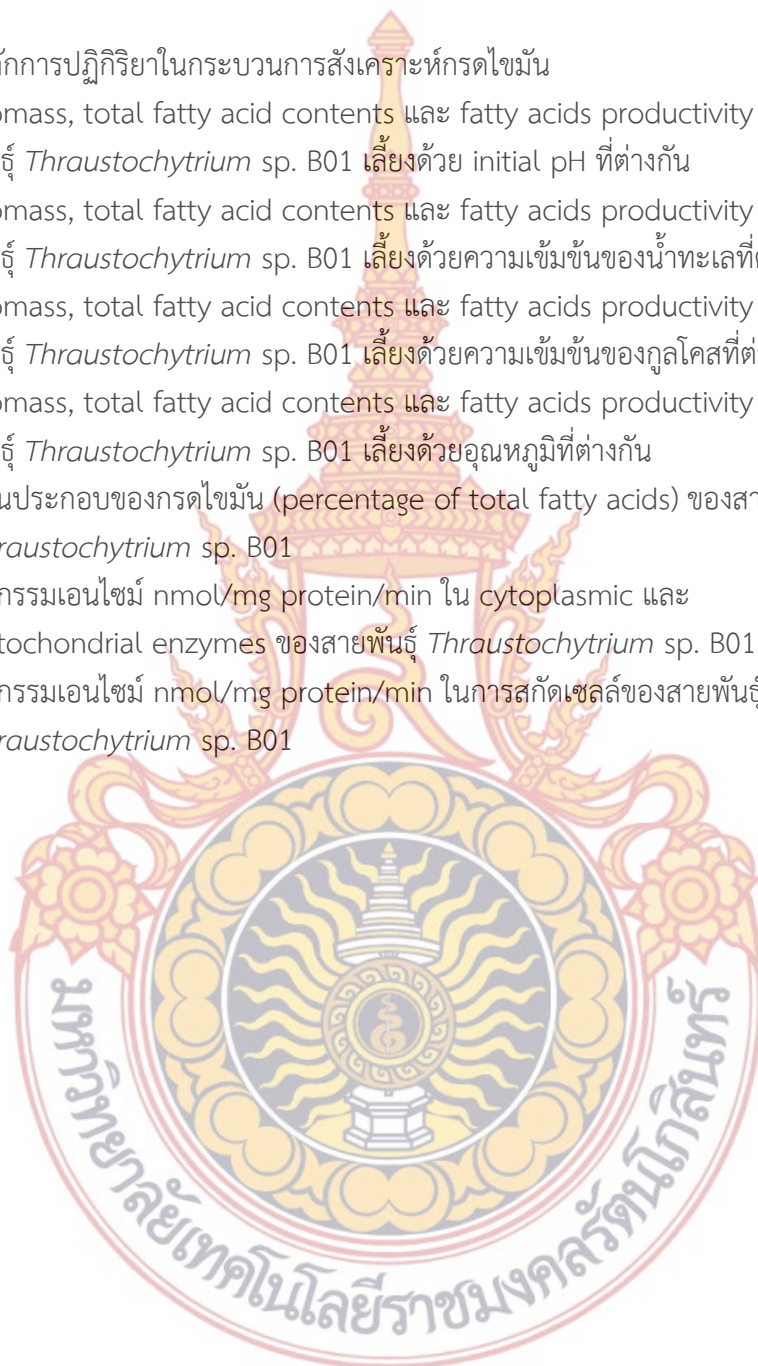
## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
สัญลักษณ์และคำย่อ	ฌ
<b>บทที่ 1</b>	<b>บทนำ</b>
	1
	1
	2
	2
	2
	2
	3
<b>บทที่ 2</b>	<b>ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง</b>
	4
	4
	5
	6
	6
	8

	เลขหน้า
6. การวิเคราะห์อัตราการไหลผ่านของเมแทบอลิซึมและโมเดลปริมาณสารสัมพันธ์ในกระบวนการสะสมไขมัน (Metabolic flux analysis and stoichiometric model during lipogenesis)	12
7. วิทยาเอนไซม์ (Enzymology)	13
8. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	13
<b>บทที่ 3</b> <b>ระเบียบวิธีการวิจัย</b>	16
1. ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง	16
2. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	16
3. วิธีการทดลอง	16
4. สถิติที่ใช้ในการวิจัย	28
<b>บทที่ 4</b> <b>ระเบียบวิธีการวิจัย</b>	29
1. การแยกสายพันธุ์ด้วยระบบ 18S rRNA	29
2. อัตราการสะสมไขมันต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อม	31
3. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์และอัตราการไหลผ่าน	34
<b>บทที่ 5</b> <b>สรุปผล อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ</b>	38
1. สรุปผลการวิจัย	38
2. การอภิปรายผล	38
3. ข้อเสนอแนะ	39
<b>บรรณานุกรม</b>	40
ภาคผนวก ก ลำดับเบส 18s rRNA ของเชื้อ <i>Thraustochyrium</i> sp. B01	44
<b>ประวัติผู้วิจัย</b>	46

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. หลักการปฏิกิริยาในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน	9
2. Biomass, total fatty acid contents และ fatty acids productivity ของสายพันธุ์ <i>Thraustochytrium</i> sp. B01 เลี้ยงด้วย initial pH ที่ต่างกัน	31
3. Biomass, total fatty acid contents และ fatty acids productivity ของสายพันธุ์ <i>Thraustochytrium</i> sp. B01 เลี้ยงด้วยความเข้มข้นของน้ำทะเลที่ต่างกัน	32
4. Biomass, total fatty acid contents และ fatty acids productivity ของสายพันธุ์ <i>Thraustochytrium</i> sp. B01 เลี้ยงด้วยความเข้มข้นของกลูโคสที่ต่างกัน	32
5. Biomass, total fatty acid contents และ fatty acids productivity ของสายพันธุ์ <i>Thraustochytrium</i> sp. B01 เลี้ยงด้วยอุณหภูมิที่ต่างกัน	33
6. ส่วนประกอบของกรดไขมัน (percentage of total fatty acids) ของสายพันธุ์ <i>Thraustochytrium</i> sp. B01	33
7. กิจกรรมเอนไซม์ nmol/mg protein/min ใน cytoplasmic และ mitochondrial enzymes ของสายพันธุ์ <i>Thraustochytrium</i> sp. B01	35
กิจกรรมเอนไซม์ nmol/mg protein/min ในการสกัดเซลล์ของสายพันธุ์ <i>Thraustochytrium</i> sp. B01	36





## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1.	ลักษณะโครงสร้างและวงจรชีวิตของ <i>Thraustochytrium</i> spp. (A) เริ่มจาก thallus (a) โตโดยการขยายขนาด และเริ่มแบ่ง nuclear เพื่อผลิตเป็น sporangium (b) การแยกตัวของ protoplast (c) ซึ่งเกิดขึ้นใน sorus (d) ผนังเซลล์เริ่มแตกออก (e) เพื่อผลิต zoospores (f) และเริ่มเป็น thalli ใหม่อีกครั้ง (B) วงจรชีวิตของ <i>Schizochytrium</i> spp. เริ่มจาก thallus (a) แบ่งออกเป็น 2 เซลล์เพื่อสร้างเป็น tetrad 4 เซลล์ (b) และกลุ่มของเซลล์ (c) แต่หละเซลล์เริ่มเป็น sorus (d) และปล่อยออกมาในรูปของ zoospores (e) ซึ่งสามารถกลายเป็น thalli ใหม่อีกครั้ง	5
2.	แสดง 'transhydrogenase cycle' และ citrate-malate cycle ซึ่งสามารถผลิตสารตั้งต้น acetyl-CoA และ NADPH สำหรับการผลิต PUFA ใน oleaginous microorganisms (Wynn et al., 2001) 1: pyruvate carboxylase, 2: malate dehydrogenase, 3: malic enzyme, 4: pyruvate dehydrogenase, 5: citrate synthase, 6: ATP-citrate lyase, 7: citrate-malate translocase	7
3.	เมแทบอลิซึมการสังเคราะห์กรดไขมันในจุลินทรีย์	10
4.	polyketide pathway ถูกพบใน marine bacteria บางชนิด และพบใน eukaryotes เช่น <i>Aurantiochytrium</i> , เอ็นไซม์หลักได้แก่ ACP: acyl carrier protein, KS: 3-ketoacyl-ACP synthase, KR: 3-hydroxyacyl-ACP reductase, D/I: bifunctional dehydrase/isomerase, ER: enoyl-ACP reductase (Qiu, 2003)	11
5.	polyketide pathway ถูกพบใน marine bacteria บางชนิด และพบใน eukaryotes เช่น <i>Thraustochytrium</i> , เอ็นไซม์หลักได้แก่ ACP: acyl carrier protein, ACCase, acetyl-CoA carboxylase; KS, $\beta$ -ketoacyl-ACP synthase; KR, $\beta$ -ketoacyl-ACP reductase; DH/IS, $\beta$ -hydroxyacyl-ACP dehydratase/isomerase; ER, enoyl reductase (Cao, 2012)	12

ภาพที่	หน้า
6. แสดงการกระจายตัวของ flux ในช่วง exponential phase, decelerating phase, stationary phase และหลังจากเติม $\text{NaNO}_3$ ในสภาวะ limited N-source	14
7. แสดง metabolic models ใน central metabolism สำหรับการสังเคราะห์ Acetyl-CoA และ NADPH ระหว่างการสังเคราะห์ไขมันซึ่งประกอบไปด้วย 4 โมเดลที่เป็นไปได้	15
8. ใบจากต้นโกงกางในป่าชายเลน ที่ตัดจากต้นและลอยน้ำมา	17
9. ใบจากต้นโกงกางในป่าชายเลนได้ถูกเก็บในถุงพลาสติก	18
10. ใบจากต้นโกงกางนำมาตัด และวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง	19
11. เชื้อที่โตนำมาแยกให้เป็นเชื้อที่มีสายพันธุ์เดียว	19
12. วิธีการนำลำดับเบส 18sRNA ไปเทียบคู่เบสในฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information	21
13. แสดงการเปรียบเทียบลำดับเบสและตัดด้วยโปรแกรม MEGA 6	21
14. ผลจากการเปรียบเทียบสายพันธุ์โดยใช้ลำดับเบส 18sRNA ในฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information	29
15. แสดงการเปรียบเทียบสายพันธุ์ <i>Thraustochytrium</i> sp. B(A)01 ที่ใช้เทคนิค 18S rRNA gene และ <i>Cryptocodium cohnii</i> เป็น outgroup	30
16. อัตราการไหลผ่าน ( $\text{mmol/gFFB/h}$ ) ของเชื้อ <i>Thraustochytrium</i> sp. A01 โตใน mineral medium ที่อุณหภูมิ $25\text{ }^{\circ}\text{C}$	37

## สัญลักษณ์และคำย่อ

สัญลักษณ์	ความหมาย
ACL	ATP-citrate lyase
ACP	Acyl carrier protein
ATP	Adenosine-5'-triphosphate
AcCoA	Acetyl-coenzyme A
BF	Baffled flask
CAT	Carnitine acetyltransferase
CIT	Citrate
CoA	Coenzyme A
°C	Degree Celsius
DH	Dehydrogenase
DHA	Docosahexaenoic acid (C22:6n3)
DNA	Deoxyribonucleic acid
DPA	Docosapentanoic acid (C22:5n6)
et al.	Et alii (Latin), and other
ed. (eds.)	Editor, editors, edition, edited by
FAS	Fatty acid synthase
GAP	Glyceraldehyde-3-phosphate
GLU	Glucose
GLY	Glycerol
G6P	Glucose-6-phosphate
g	Gram
HMP	Hexose monophosphate pathway
h	Hour
i.e.	Id est (Latin), that is
kg	kilogram

สัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

สัญลักษณ์	ความหมาย
L	Liter
mg	Milligram
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimole
min	Minute
MSG	Monosodium glutamate
M	Molarity
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide (reduced form)
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form)
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized form)
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (oxidized form)
nM	Nanomole



## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การเลี้ยง *thraustochytrids* มีความเป็นไปได้ในการผลิตสาร 2 ชนิด คือ กรดไขมันชนิด *medium chain fatty acid (MCFA)* สำหรับการผลิตเป็น *biodiesel* และกรดไขมันชนิด *omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA)* โดยเฉพาะ *docosahexaenoic acid (DHA)* สำหรับการใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยา (*nutraceuticals*) กรดไขมัน *Docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 n-3)* มีความจำเป็นต่อการทำงานของสมองในสภาวะปกติ (Garelli, A.; Rotstein, N.P.; Politi, L.E., 2006) และเป็นตัวรับแสงที่สำคัญต่อมนุษย์ด้วย (SanGiovanni, J.P.; Chew, E.Y., 2005) รวมถึงการพัฒนาสมองของเด็กทารกวัยก่อน 1 ปี และการเรียนรู้ของเด็ก กรดไขมัน DHA สามารถสกัดได้จากน้ำมันปลา แต่ในปัจจุบันมีการลดลงของปริมาณปลาในท้องทะเล สารพิษในสิ่งแวดล้อม อีกทั้งฤดูกาลที่มีผลต่อส่วนประกอบของไขมัน ดังนั้นจึงจำเป็นในการหาแหล่งไขมันอื่นโดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไขมันได้เพื่อหลีกเลี่ยงสารพิษ จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไขมันมีหลายชนิดแต่ชนิดที่สามารถผลิตในแง่อุตสาหกรรมนั้นคือ *heterotrophic microbes* เพราะสามารถเลี้ยงในพื้นที่จำกัดและสามารถควบคุมสิ่งแวดล้อมในการผลิตได้ โดยเฉพาะการเลี้ยงในถังหมักได้ (*fermenter*) หรือการเลี้ยงแบบเขย่า (*Shake flask cultivation*) เช่น อุณหภูมิ และ pH เป็นต้น การศึกษาทางสรีรวิทยายังมีข้อจำกัดโดยเฉพาะ *dinoflagellate* *Cryptheconidium cohnii* (Ward, O.P.; Singh, A., 2005) และ *thraustochytrids* ชนิด *Aurantiochytrium* แต่อย่างไรก็ตาม ลักษณะพิเศษที่ *thraustochytrids* มีคือมี *gene* ที่เรียกว่า *polyketide system* ที่สำคัญในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัว และเป็นระบบที่เติมพันธะคู่แบบ *isomerization/dehydration* มากกว่าการเติมพันธะคู่แบบการใช้ออกซิเจน (Qui, X., 2003) จุดที่น่าสนใจตอนนี้คือการศึกษการผลิตไขมันใน *thraustochytrids* นั้นมีการวิจัยทางด้านการวิเคราะห์อัตราการไหลผ่านในกระบวนการสังเคราะห์ไขมันยังน้อยอยู่ จุดประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อศึกษากิจกรรมเอ็นไซม์เพื่อเป็นข้อมูลในการสร้างโมเดลทางชีวเคมีที่ถูกต้องในการสังเคราะห์ไขมันโดยเฉพาะข้อมูลของการกระจายของเอ็นไซม์ในส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ยังไม่มีการตีพิมพ์มาก่อนใน *thraustochytrids* นอกจากนี้ยังวิเคราะห์และเปรียบเทียบอัตราการสังเคราะห์ *medium chain fatty acid* และ DHA ในเชื้อชนิดต่างๆ ด้วย

#### 2. วัตถุประสงค์การวิจัย

การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการวิเคราะห์อัตราการไหลผ่านเพื่อใช้ในการผลิตไขมัน จากข้อมูลเอ็นไซม์และอัตราการผลิตไขมัน จะสามารถนำไปอธิบายกลไกการผลิตไขมันที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาการเพิ่มปริมาณไขมันต่อไป ผู้ที่ได้รับผลประโยชน์คือนักวิทยาศาสตร์สาขาการหมัก และสาขา

อื่นๆ รวมถึงนักพันธุวิศวกรรมที่ต้องการนำผลลัพธ์ของอัตราการไหลผ่านนี้ไปประยุกต์ใช้ในการผลิตไขมันในเชื้อสายพันธุ์นี้หรือสายพันธุ์อื่นๆ ให้มีปริมาณสูงตามต้องการ

### 3. คำถามการวิจัย / สมมติฐานการวิจัย

เอนไซม์ที่สำคัญต่อการสังเคราะห์กรดไขมันในเชื้อ *Thraustochytrium* sp. B02 กระจายอยู่ในส่วนใดของเซลล์ และมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์กรดไขมันอย่างไรในเชื้อสายพันธุ์นี้

### 4. กรอบแนวคิดการวิจัย

สิ่งที่โครงการนี้ต้องดำเนินการปฏิบัติคือ

- ก) แยกเชื้อและหาสภาวะที่เหมาะสมพร้อมทั้งสูตรอาหาร
- ข) การวัดกิจกรรมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับขบวนการสังเคราะห์ไขมันในเชื้อ *thraustochytrids*
- ค) การแยก mitochondria และวัดกิจกรรมเอนไซม์
- ง) การวิเคราะห์อัตราการไหลผ่านของคาร์บอนในปฏิกิริยาชีวเคมีขณะเชื้อสะสมไขมัน

### 5. นิยามศัพท์

**thraustochytrids** กลุ่มสิ่งมีชีวิตซึ่งเป็นสาหร่ายเซลล์เดียวซึ่งสามารถสะสมไขมันสูงโดยเฉพาะ DHA และ EPA

**metabolic flux analysis** การศึกษาและวิเคราะห์หาขุมทางหลักในกระบวนการปฏิกิริยาชีวเคมีภายในเซลล์

**enzymology** การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์

**Classification** การจัดกลุ่มของสิ่งมีชีวิตออกเป็นหมวดหมู่ในลำดับชั้นต่างๆ

### 6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลสำเร็จของการวิจัยนี้คือนักวิจัยสามารถเลี้ยงและวัดกิจกรรมเอนไซม์ของเซลล์ที่ผลิตไขมัน มีความรู้และความสำเร็จในการแยกไมโทคอนเดรียอย่างง่ายจากเซลล์ที่ผลิตไขมัน อีกทั้งได้โมเดลที่ถูกต้องสำหรับการผลิตไขมัน ผลงานวิจัยนี้สามารถนำไปต่อยอดในการผลิตไขมันเพื่อผลิตเป็นไบโอดีเซลทั้งในเชื้อ *Thraustochytrium* หรือในเชื้อชนิดอื่น โดยใช้เทคนิคการตัดต่อพันธุกรรม โครงการวิจัยนี้อาจมีส่วนในการเพิ่มศักยภาพในการผลิต ของอุตสาหกรรมการผลิตไขมัน DHA และ biodiesel จึงเป็นโอกาสในการสร้างอุตสาหกรรมใหม่ในประเทศไทย

## บทที่ 2

### บททวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

#### 1. การจำแนกสายพันธุ์ของ *thraustochytrids* (Classification of *thraustochytrids*)

*Thraustochytrium* sp. ถูกจัดอยู่ใน Kingdom *Straminipila*, Phylum *Heterokonta* class *Labyrinthulomycetes*, order *Labyrinthulales* และ family *Thraustochytriaceae* (Dick, 2001) ปัจจุบันสายพันธุ์ถูกจัดอยู่ใน *Thraustochytriaceae* ซึ่งมี 11 genera คือ genus *Althornia*, *Aplanochytrium*, *Aurantiochytrium*, *Japanochytrium*, *Oblongichytrium*, *Schizochytrium*, *Thraustochytrium*, *Ulkenia*, *Sicyoidochytrium*, *Parietichytrium* and *Botryochytrium* (Yokoyama et al., 2007a)

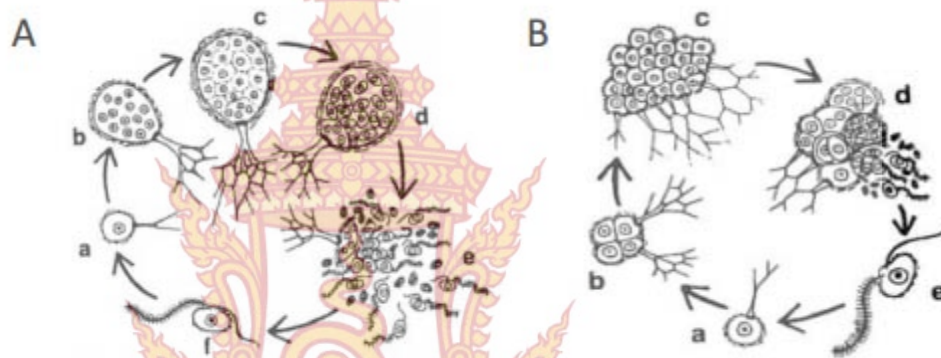
*Thraustochytrids* เป็นกลุ่มหนึ่งของ marine, osmoheterotrophic, fungoid protists ในหลายๆ ครั้ง *Thraustochytrids* ถูกอ้างว่าเป็นสาหร่ายเซลล์เดียว (microalgae) เมื่อมีการตีความในแง่ของการประยุกต์ใช้ในทางเทคโนโลยีชีวภาพ แม้ว่าจะมีความใกล้เคียงกับสาหร่ายสีน้ำตาล อย่างไรก็ตาม *thraustochytrids* ไม่ถูกจัดเป็นสาหร่าย (Armenta et al., 2012).

สารสี หรือ pigments ( $\beta$ -carotene, echinenone, canthaxanthin, phoenicoxanthin, and astaxanthin) เป็นสาร intermediates ใน pathway ของการสร้าง astaxanthin จาก  $\beta$ -carotene ซึ่งเป็นเกณฑ์ในการจำแนกสายพันธุ์ ฤทธิ์ของสายพันธุ์ *Aurantiochytrium* จะสามารถผลิต pigments ได้ในปริมาณที่สูงเป็นผลให้ colonies เป็นสีส้ม (Yokoyama & Honda, 2007) อย่างไรก็ตามผลของการศึกษาด้วย molecular phylogeny (18S rRNA gene tree) แนะนำว่าสายพันธุ์ *Aurantiochytrium* ไม่ใช่สายพันธุ์ *Schizochytrium* ดังนั้นการจำแนกสายพันธุ์ต้องใช้หลายเกณฑ์ เช่น ลักษณะของโครงสร้าง (morphology), ชนิดของ polyunsaturated fatty acids (PUFA) และ carotenoid pigments (Yokoyama & Honda, 2007) รวมถึง 18S rRNA sequencing

การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ *Aurantiochytrium* ประกอบด้วย lipid bodies ซึ่งพัฒนาไปเป็น eight zoospore ใน zoosporangium ซึ่ง zoospore ภายใน zoosporangium จะปล่อยออกมาในรูปของ zoospore (ภาพที่ 2.1)

*Thraustochytrids* หลายสายพันธุ์แบ่งตัวโดยการปล่อย heterokont และมี biflagellate ซึ่งเป็นสายยาวรวมถึง straminopilan zoospores anterior, tinsel flagellum และ a shorter, posterior, whiplash flagellum การสร้าง zoospores ในแต่ละสายพันธุ์นั้นแตกต่างกันระหว่าง genera และ

taxonomic (Raghukumar, 2002) เช่น genus *Thraustochytrium* สร้าง zoospores โดยการแบ่งตัวโดยตรงจาก cytoplasmic เป็น 9 mature cells และเกิด sporangium ส่วน genus *Schizochytrium* แบ่งแบบ bipartition ออกเป็น 2 ส่วนของ vegetative cell (ภาพที่ 2.1) แต่ละส่วนของกลุ่มเซลล์พัฒนาไปเป็น zoosporangium หรือ sorus ซึ่งสร้าง zoospores ต่อไป (Porter, 1990; Yokoyama et al., 2007b) ภายใน genera โดยปกติ species ได้ถูกคัดแยกด้วยจำนวนการแบ่งตัว ขนาด และลักษณะของ sporangia



ภาพที่ 1 ลักษณะโครงสร้างและวงจรชีวิตของ *Thraustochytrium* spp. (A) เริ่มจาก thallus (a) โตโดยการขยายขนาด และเริ่มแบ่ง nuclear เพื่อผลิตเป็น sporangium (b) การแยกตัวของ protoplast (c) ซึ่งเกิดขึ้นใน sorus (d) ผนังเซลล์เริ่มแตกออก (e) เพื่อผลิต zoospores (f) และเริ่มเป็น thalli ใหม่อีกครั้ง (B) วงจรชีวิตของ *Schizochytrium* spp. เริ่มจาก thallus (a) แบ่งออกเป็น 2 เซลล์ เพื่อสร้างเป็น tetrad 4 เซลล์ (b) และกลุ่มของเซลล์ (c) แต่หกละเซลล์เริ่มเป็น sorus (d) และปล่อยออกมาในรูปของ zoospores (e) ซึ่งสามารถกลายเป็น thalli ใหม่อีกครั้ง (Porter, 1990)

## 2. จุลินทรีย์ที่ผลิตไขมัน (Oleaginous microorganisms)

โดยปกติจุลินทรีย์สามารถผลิตไขมันได้ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ membranes (Certik, Megova, & Horenitzky, 1999) แต่มีบางจุลินทรีย์ที่สามารถสะสมไขมันได้มากกว่า 20% ซึ่งสะสมอยู่ในเซลล์ซึ่งเรียกจุลินทรีย์จำพวกนี้ว่า “oleaginous” ซึ่งเป็นการเก็บไขมันภายในเซลล์ หรือที่เรียกว่า oil vacuoles ในรูปของ triacylglycerols ดังนั้นคำว่า “oleaginous species” คือ จุลินทรีย์ที่สามารถสะสมไขมันได้มากกว่า 20% ของน้ำหนัก บาง oleaginous species สามารถสะสมได้มากถึง 70% ของน้ำหนัก ปกติหน้าที่ของการสะสมไขมันนั้นเพื่อเก็บเป็นพลังงานซึ่งไว้ใช้ตอนขาดอาหาร แต่หน้าที่หลักของไขมันคือ การสร้างเซลล์เมม หน้าที่ต่างๆ รวมถึงโครงสร้างต่างๆ ของ membrane การสะสมไขมันนั้นพบใน yeasts, fungi, bacteria บางชนิด, protists และ algae บางชนิด ในกรณีของ non-oleaginous



species หรือจุลินทรีย์ที่ไม่สะสมไขมันเกิน 20% ของน้ำหนัก เช่น *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งมีไขมันเพียง 3-7% (w/w) ซึ่งเป็นส่วนของเซลล์เมมเบรน

### 3. กรดไขมันสายยาวที่ไม่อิ่มตัว (Polyunsaturated Fatty Acid: PUFA)

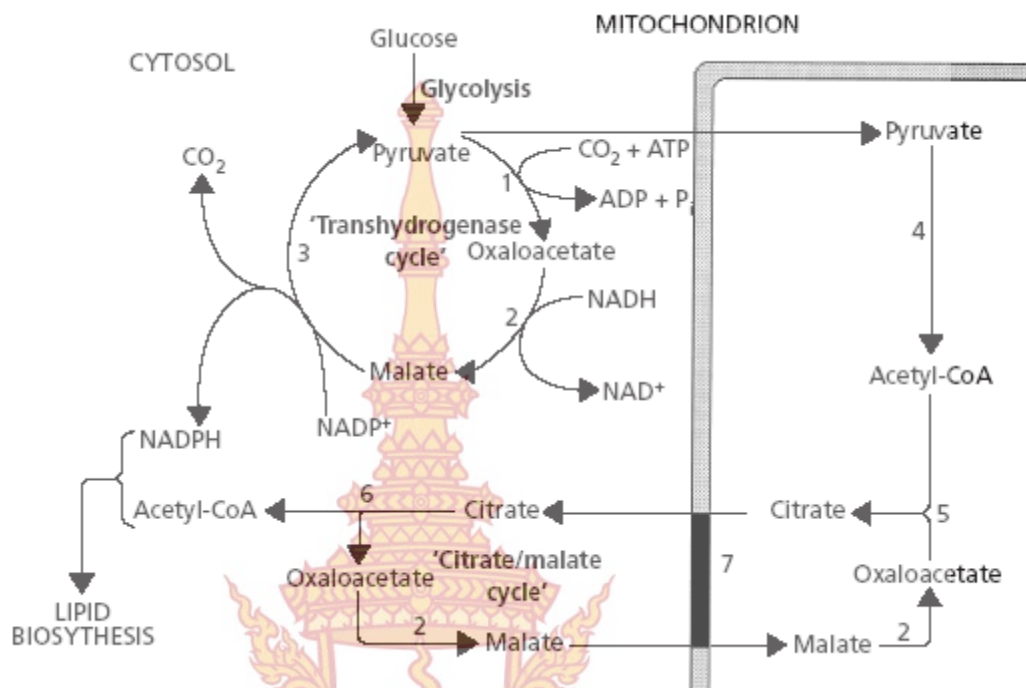
ไขมันจากเซลล์นั้นสามารถเติมในอาหารซึ่งทำหน้าที่เป็น nutritional supplement ในอาหารให้ในการเลี้ยงปลา หรืออาหารสัตว์ เพื่อเป็นการเพิ่ม omega-3 จาก unsaturated fatty acid (PUFA) ซึ่งจะเห็นว่ากรดไขมันสามารถสกัดและใช้เป็นการเสริมอาหารและยาได้ (Nutraceuticals)

ในทางอุตสาหกรรมกรดไขมันที่ผลิตจากจุลินทรีย์ยังมีราคาที่สูงเนื่องมาจากราคาของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจึงผลิตแบบต่อเนื่อง รวมถึงไม่จำเป็นต้องใช้พื้นที่ในปริมาณมากเหมือนการผลิตไบโอดีเซล ที่ต้องปลูกต้นไม้ที่สะสมกรดไขมัน ดังนั้น triacylglycerols (TG) อาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง ในทางแก้ไขเรื่องราคาอาหารสำหรับเลี้ยงนั้น มีผู้วิจัยได้พัฒนาคาร์โบไฮเดรตที่มี xylose ซึ่งช่วยลดราคาของอาหารได้ ในขั้นที่ 2 คือใช้เทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพในการเพิ่มผลผลิตและเพิ่มปริมาณไขมัน ขั้นที่ 3 คือ ใช้การเลี้ยงแบบโหมดต่างๆ fed-batch หรือ continuous fermentation ในการเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ เป็นต้น (Li, Zhao, & Bai, 2007)

### 4. ชีวเคมีในการสะสมไขมัน (Biochemistry of oil accumulation)

จุลินทรีย์ที่สะสมไขมันภายในนั้นส่วนใหญ่ต้องมีปริมาณอาหารหรือ carbon source สูงแต่มีปริมาณไนโตรเจนที่จำกัด เมื่อไนโตรเจนหมดไปจากอาหาร เซลล์จะเริ่มสะสมไขมันแบบ oil droplets Ratledge (2004) ได้ให้เหตุผลในการเกิดภาวะการสะสมไขมัน oleaginity ออกเป็น 2 ส่วน

1. ความสามารถในการสร้าง acetyl-CoA แบบต่อเนื่องใน cytosol ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญสำหรับเอนไซม์ fatty acid synthetase (FAS)
2. ความสามารถในการสร้าง NADPH ซึ่งเป็นสารรีดิวซ์และเป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดไขมันด้วย ผ่านทาง transhydrogenase cycle (PYR→OAA→MAL→PYR) (Wynn, Hamid, Li, & Ratledge, 2001)



ภาพที่ 2 แสดง 'transhydrogenase cycle' และ citrate-malate cycle ซึ่งสามารถผลิตสารตั้งต้น acetyl-CoA และ NADPH สำหรับการผลิต PUFA ใน oleaginous microorganisms (Wynn et al., 2001) 1: pyruvate carboxylase, 2: malate dehydrogenase, 3: malic enzyme, 4: pyruvate dehydrogenase, 5: citrate synthase, 6: ATP-citrate lyase, 7: citrate-malate translocase

เมตาบอลิซึมในการผลิตไขมันใน oleaginous microorganisms คือการมีเอนไซม์ ATP-citrate lyase (ACL) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการผลิต acetyl-CoA และมี oxaloacetate (OAA) เป็น by-product โดยมี citrate เป็นสารตั้งต้น ซึ่งเชื่อว่า citrate ที่สะสมใน mitochondria นั้นเกิดจากการถูกทำให้เอนไซม์ NAD<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase ไม่ทำงานหรือมีกิจกรรมเอนไซม์ที่ลดลง และ citrate ที่สะสมนั้นถูกปั๊มออกมาอยู่ใน cytosol ด้วย malate-citrate cycle และโดยเปลี่ยนเป็น acetyl-CoA ด้วย ACL แล้วถูกใช้เพื่อเป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดไขมันต่อไป (Botham & Ratledge, 1979)

OAA ที่เกิดขึ้นจาก citrate cleavage จะถูกเปลี่ยนไปเป็น malate ด้วย pyruvate carboxylase ปฏิกริยาตามมาเป็น malate dehydrogenase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ active และมีกิจกรรมเอนไซม์สูงซึ่งพบใน *Aurantiochytrium* สูงถึง 7,000 nmol/mg protein/min (Chaisawang et al., 2014) และในบางจุลินทรีย์ เช่น *Candida* 107 (Botham & Ratledge, 1979) รวมถึง *Mucor circinelloides* (Kendrick & Ratledge, 1992) ปฏิกริยาที่สามใน transhydrogenase cycle คือ malic enzyme ซึ่งมีใน oleaginous species เนื่องจาก malic enzyme เป็นแหล่งของ NADPH ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไขมันด้วยกลไกของ fatty acid synthetase และ polyketide synthase (PKS)

บางสายพันธุ์พบว่าไม่สามารถตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ malic enzyme ได้ในบางสายพันธุ์ เช่น *Lipomyces* sp. และ *Candida* sp. (Bruinenberg, van Dijken, & Scheffers, 1983) อีกทั้งเอนไซม์ ACL ไม่ปรากฏในบางสายพันธุ์ทำให้ไม่สามารถสะสมไขมันได้สูงเท่ากับสายพันธุ์ที่มี เอนไซม์ เอนไซม์ isocitrate dehydrogenase สามารถทำงานได้เมื่อขาด AMP ใน *Aurantiochytrium* ดังนั้นเป็นไปได้ว่ามีการใช้ pathway อื่นๆ ในการสร้าง NADPH เช่น 6-phosphogluconate dehydrogenase ใน HMP pathway ดังนั้นการศึกษาทางด้าน enzymology และ metabolic flux analysis จึงมีความสำคัญในการตรวจสอบ pathway ที่ใช้ในสายพันธุ์นั้นๆ อีกทั้งยังสามารถปรับเปลี่ยน pathway ที่เซลล์ใช้ด้วยกระบวนการทาง genetic engineering หรือการเหนี่ยวนำให้กลายพันธุ์

Henriksen, Christensen, Nielsen, and Villadsen (1996) ได้วิจารณ์ routes ในการสร้าง acetyl-CoA ใน cytosolic compartment ซึ่งมีความสำคัญต่อปริมาณ ATP และ NADPH ที่ใช้ในการโตของเซลล์ เช่นใน *Penicillium chrysogenum* ซึ่งมี 3 route ในการสร้าง acetyl-CoA คือ 1. pyruvate decarboxylase ตามด้วย acetaldehyde dehydrogenase (ผ่านทาง acetate) 2. การป้อน acetyl-CoA ออกไปสู่ cytosolic compartment ด้วย carnitine carrier system และ 3. pyruvate/malate shunt (citrate-malate translocase)

## 5. ปฏิกิริยาชีวเคมีของการสังเคราะห์กรดไขมัน (The biochemistry of fatty acid formation)

ปฏิกิริยาในการสังเคราะห์กรดไขมัน ในรอบแรกส่วนของ acetyl ถูกใช้เป็น primer และ malonyl moiety ถูกใช้ในการต่อสายทำให้เกิด acyl-ACPs (butyryl-ACP) ซึ่งเป็น primers ต่อไปในกลไกการสังเคราะห์ (ตาราง 2.1) NADPH เป็น hydrogen donor ทั้งปฏิกิริยา keto group และ enoyl reduction

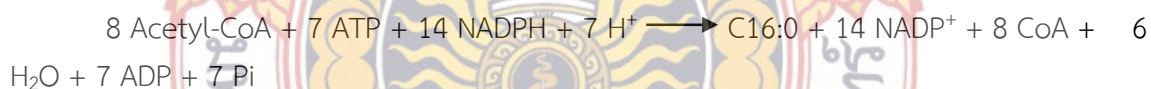
### ตารางที่ 1 หลักการปฏิกิริยาในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน (Stryer, 1988)

ขั้นที่	ปฏิกิริยา	เอนไซม์
1	$\text{Acetyl-CoA} + \text{HCO}_3^- + \text{ATP} \longrightarrow \text{Malonyl-CoA} + \text{ADP} + \text{P}_i + \text{H}^+$	Acetyl-CoA
carboxylase		
2	$\text{Acetyl-CoA} + \text{ACP} \longrightarrow \text{Acetyl-ACP} + \text{CoA}$	Acetyl transacylase
3	$\text{Malonyl-CoA} + \text{ACP} \longrightarrow \text{Malonyl-ACP} + \text{CoA}$	Malonyl
transacylase		
4	$\text{Acetyl-ACP} + \text{Malonyl-ACP} \longrightarrow \text{Acetoacetyl-ACP} + \text{ACP} + \text{CO}_2$	Acyl-malonyl-ACP
condensing enzyme		
5	$\text{Acetoacetyl-ACP} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \longrightarrow \text{D-3-hydroxybutyryl-ACP} + \text{NADP}^+$	$\beta$ -Ketoacyl-ACP-
reductase		
6	$\text{D-3-hydroxybutyryl-ACP} \longrightarrow \text{Crotonyl-ACP} + \text{H}_2\text{O}$	3-Hydroxyacyl-
ACP-	dehydratase	
7	$\text{Crotonyl-ACP} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \longrightarrow \text{Butyryl-ACP} + \text{NADP}^+$	Enoyl-ACP
reductase		

หลังจากขั้นที่ 7 ตามตาราง การต่อสายจะต่อทุก 2 โมเลกุล (2 คาร์บอน) และต่อจนได้ palmitate (C16:0) ดังสมการ



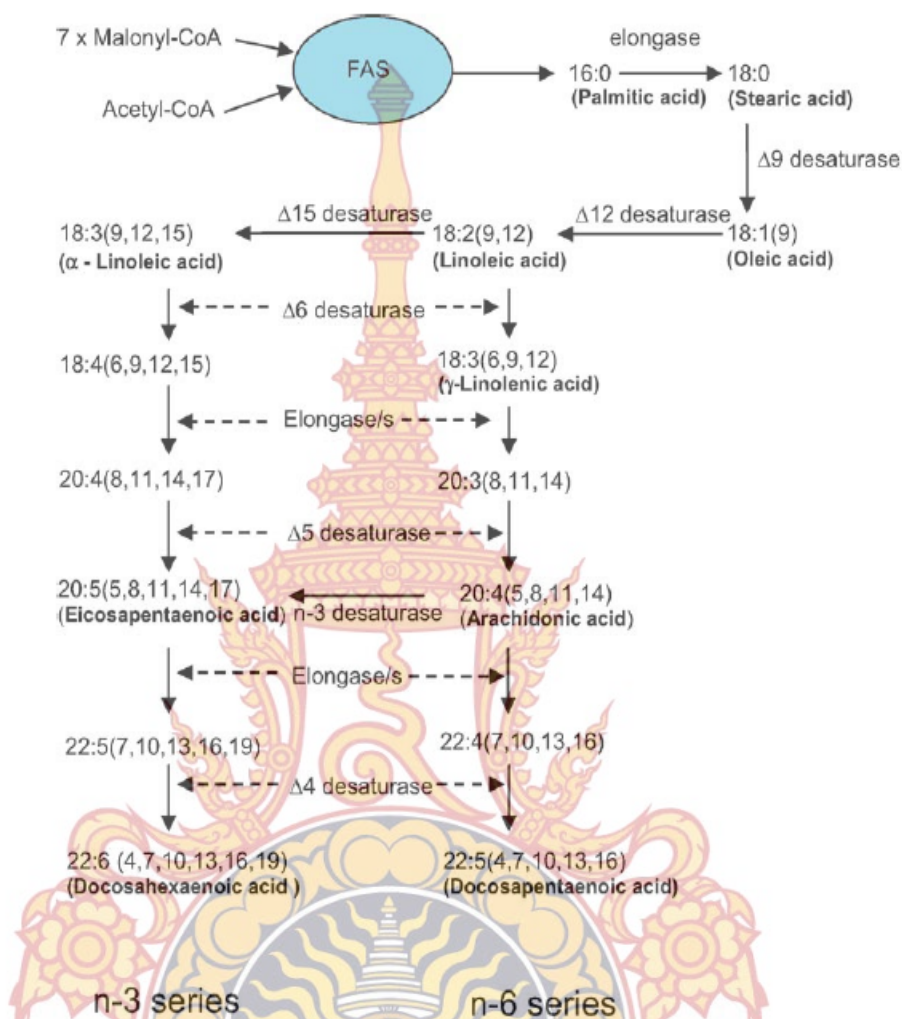
ดังนั้น stoichiometry ของการสร้าง palmitate คือ



แต่เนื่องจาก 7 malonyl-CoA ถูกสังเคราะห์จาก 7 acetyl-CoA ดังนั้น stoichiometry คือ



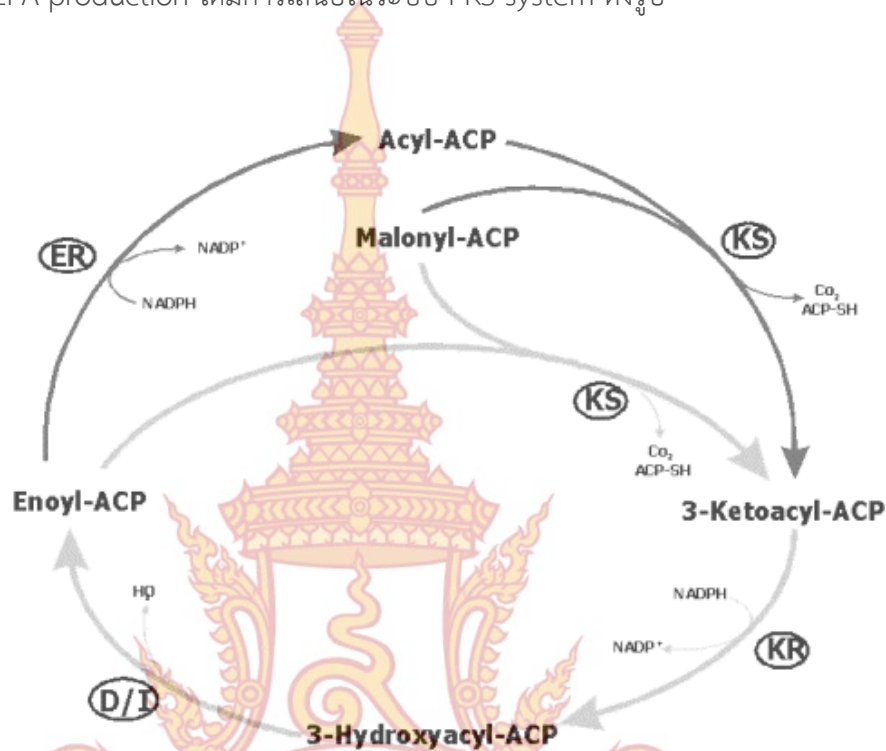
มีรายงานว่ามีการสร้างกรดไขมันมี 2 ระบบ คือ ระบบที่ 1 'fatty acid synthase' หรือ FAS ซึ่งพบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นก ยีสต์ เชื้อรา และบางแบคทีเรีย (รูป 2.3) ระบบที่ 2 คือ FAS ที่พบในพืช แบคทีเรียส่วนใหญ่ และ cyanobacteria ซึ่งใช้ชนิด polypeptide ที่แตกต่างจากระบบที่ 1 ในการสังเคราะห์ PUFA เอนไซม์ elongase และ desaturase ถูกทำการต่อสายและเติม double bond ใน palmitic acid ซึ่งมี 2 pathway ที่มีการแสดงไว้ทั้งแบบ n3 และ n6 ซึ่งขึ้นอยู่กับสารตั้งต้นเป็นกรดไขมัน C18:2 หรือ C18:3



ภาพที่ 3 เมแทบอลิซึมการสังเคราะห์กรดไขมันในจุลินทรีย์ (Ratledge, 2004)

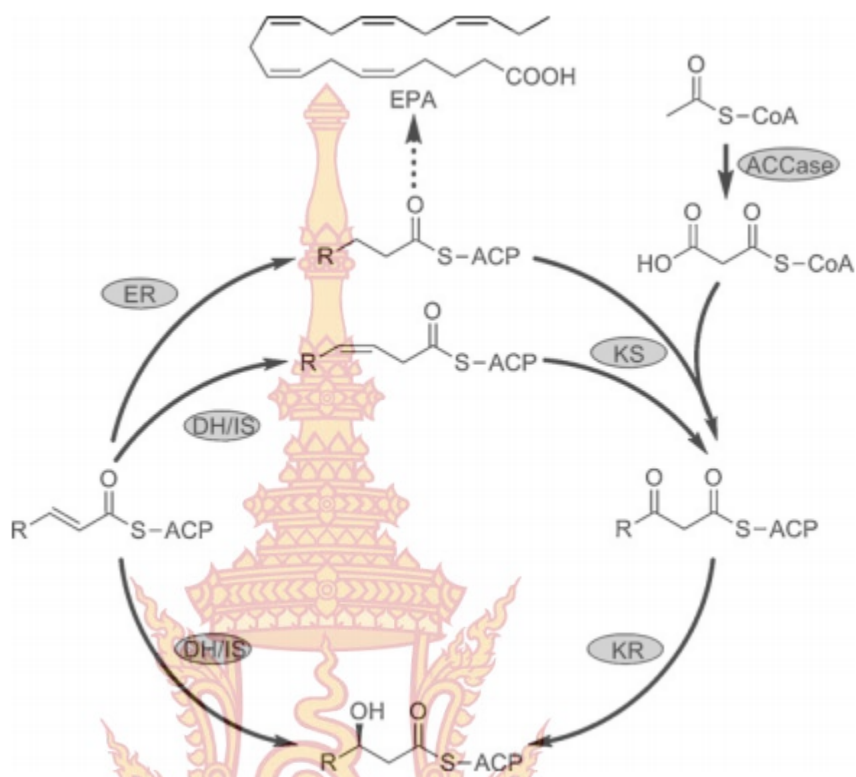
Pathway อื่นที่สามารถสังเคราะห์ DHA ได้ คือ polyketide synthase pathway ได้มีการแนะนำใน (รูป 2.4) *Aurantiochytrium* (Qui, 2003) pathway นี้แตกต่างจาก FAS pathway ตรงที่ไม่ต้องการออกซิเจนสำหรับปฏิกิริยา desaturation ในการเติม double bonds ลงใน acyl chain แต่ที่เหมือนกันคือ มีการใช้โปรตีน acyl carrier protein (ACP) ต่อพันธะแบบ สำหรับการสังเคราะห์สาย (ปฏิกิริยานี้ต้องการ 1 ATP) กลไกที่สมบูรณ์คือการรวมตัวของ acyl-ACP และ malonyl-ACP เพื่อสังเคราะห์ ketoacyl-ACP และถูกเปลี่ยนเป็น hydroxyacyl-ACP จากนั้น dehydration ปล่อยโมเลกุลของน้ำจาก hydroxyacyl-ACP เป็นผลให้เกิด unsaturated enoyl-ACP และ reduction ของ enoyl-ACP ไปเป็น saturated acyl chain ในกลไกของ polyketide synthesis จะไม่รวมปฏิกิริยา

dehydration และ reduction เป็นผลให้พบ double bonds ในปริมาณที่สูง (Qui, 2003) ตัวอย่างในการสังเคราะห์ EFA production ได้มีการเสนอในระบบ PKS system ดังรูป



ภาพที่ 4 polyketide pathway ถูกพบใน marine bacteria บางชนิด และพบใน eukaryotes เช่น *Aurantiochytrium*, เอ็นไซม์หลักได้แก่ ACP: acyl carrier protein, KS: 3-ketoacyl-ACP synthase, KR: 3-hydroxyacyl-ACP reductase, D/I: bifunctional dehydrase/isomerase, ER: enoyl-ACP reductase (Qui, 2003)

Pathway การสังเคราะห์ DHA และ DPA ได้มีการนำเสนอในงานวิจัยของ มนตรี และคณะ (2014) ส่วนการสังเคราะห์ EPA ได้มีการนำเสนอโดย Cao และคณะ (2012)



ภาพที่ 5 polyketide pathway ถูกพบใน marine bacteria บางชนิด และพบใน eukaryotes เช่น *Thraustochytrium*, เอ็นไซม์หลักได้แก่ ACP: acyl carrier protein, ACCase, acetyl-CoA carboxylase; KS,  $\beta$ -ketoacyl-ACP synthase; KR,  $\beta$ -ketoacyl-ACP reductase; DH/IS,  $\beta$ -hydroxyacylACP dehydratase/isomerase; ER, enoyl reductase (Cao, 2012)

## 6. การวิเคราะห์อัตราการไหลผ่านของเมแทบอลิซึมและโมเดลปริมาณสารสัมพันธ์ ในกระบวนการสะสมไขมัน (Metabolic flux analysis and stoichiometric model during lipogenesis)

ปัจจุบันการวิเคราะห์อัตราการไหลผ่านของเมแทบอลิซึมเป็นเทคนิคที่ถูกใช้ในงานของ bioprocess/biochemical engineering เพื่อที่ใช้ในการติดตาม physiology ของเซลล์ และการปรับปรุงสายพันธุ์สำหรับการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่า metabolic flux analysis เป็นวิธีที่ติดตามการทำงานของเมแทบอลิซึมของเซลล์ โดยที่อัตราการไหลผ่านปฏิกิริยาชีวเคมีถูกคำนวณโดยอาศัยปริมาณสารสัมพันธ์ของปฏิกิริยาชีวเคมีที่มีการสมดุลสมการโดยอาศัย mass balances ของ intracellular metabolites ด้วยเหตุนี้การประมาณกิจกรรมของแต่ละ pathway ในกิจกรรมของเซลล์

ซึ่งเป็นการ intracellular fluxes ภายใต้สภาวะแวดล้อมต่างๆ เช่น ระดับของออกซิเจน เพื่อที่จะหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงต่อไป (Lee, Berthiaume, Stephanopoulos, & Yarmush, 1999)

## 7. วิทยาเอนไซม์ (Enzymology)

การตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์แบบ *In vitro* หรือในหลอดทดลอง เพื่อใช้ตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ในเมแทบอลิซึมจริงในเซลล์ *in vivo* ในขณะที่มีและไม่มีเอนไซม์รวมถึง cofactor ที่จำเพาะภายใต้การโตในสภาวะที่จำเพาะ แต่ในความเป็นจริงการวัดกิจกรรมเอนไซม์นั้นไม่สามารถบอกถึงอัตราการไหลผ่านจริงในเซลล์แบบ *in vivo* ได้เนื่องจากมีหลายปัจจัยเช่น โมเลกุลบางชนิดสามารถกระตุ้นกิจกรรมเอนไซม์ได้ และบางสภาวะสิ่งแวดล้อมสามารถลดกิจกรรมเอนไซม์ได้ แม้ว่ากิจกรรมเอนไซม์ใน *in vitro* จะไม่สามารถทำนายค่าอัตราเร็วใน *in vivo* ได้ แต่ในหลายครั้งการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์มีความสัมพันธ์โดยตรงกับค่าอัตราเร็วที่ทำนายได้ เช่น กิจกรรมเอนไซม์ของ glucose-6-phosphate dehydrogenase ลดลงเป็นสัดส่วนกับการลดลงของการไหลผ่านใน HMP pathway และกิจกรรมเอนไซม์ของ citrate synthase เพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนกับ flux ของ TCA cycle flux (Moreira dos Santos, Raghevendran, Kötter, Olsson, & Nielsen, 2004)

## 8. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

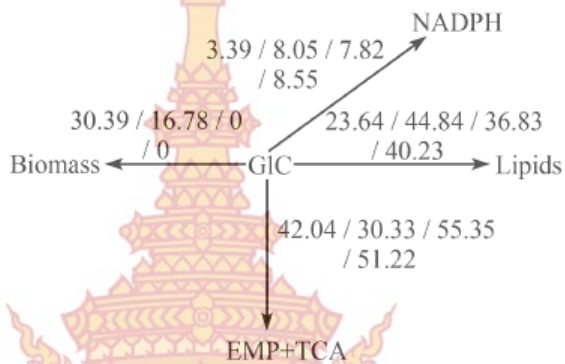
มีงานวิจัยที่แสดงถึงการผลิตไขมันจากเชื้อต่างๆ เช่น genus *Aurantiochytrium*, *Schizochytrium*, *Thraustochytrium* and *Ulkenia* เป็นต้น ซึ่งมีความสามารถในการใช้ชนิดของอาหารที่แตกต่างกันรวมถึงอัตราการผลิตไขมันที่แตกต่างกันด้วย เชื้อ Australian thraustochytrid (Lee Chang et al., 2014) สายพันธุ์ *Aurantiochytrium* sp. สามารถใช้ glucose จาก 2 ถึง 4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่ม glucose เป็น 4 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปริมาณเซลล์แห้ง (Biomass yield) เพิ่มขึ้นด้วย factor เฉลี่ย 1.7 แต่มีข้อจำกัดคือ *Ulkenia* sp. strain TC 010 และ *Thraustochytrium* sp. strain TC 033 ไม่สามารถใช้ glucose ได้ ในขณะที่ *Schizochytrium* sp. strain TC 002 ใช้ glucose น้อยกว่าครึ่งแม้ว่าใช้เลี้ยงเชื้อไปนานแล้วถึง 14 วัน และเชื้อ *Thraustochytrium* sp. strain TC 004 ใช้ glucose ที่ 4 % w/v แต่ไม่ใช้ที่ 2 % w/v แสดงให้เห็นว่าเชื้อมีข้อจำกัดในการใช้ระดับน้ำตาลที่แตกต่างกัน

งานวิจัยของ Lagunas and Gancedo (1973) ได้รายงานไว้ว่า reported that the HMP pathway เป็น pathway หลักในการสังเคราะห์ NADPH ในอาหารที่มี glucose ใน *Saccharomyces cerevisiae* แต่ transhydrogenation ไม่มีความสำคัญในการสังเคราะห์ NADPH *Saccharomyces cerevisiae* มีกิจกรรมเอนไซม์ NADH kinase ที่ต่ำมากซึ่งเปลี่ยน NAD(H) และ ATP ไปเป็น NADP(H) และ ADP ดังนั้นวิถีของ transhydrogenation จึงไม่ได้นำมารวมใน model

มีรายงานไม่ก็รายงานที่ใช้เทคนิคของ stoichiometric model ในการคำนวณ metabolic fluxes ในการสร้างกรดไขมัน arachidonic acid เช่นใน *Mortierella alpine* (Mingjie, He, Kun, Jie, & Zhen, 2007) ในที่นี้ค่าพลังงาน energetics ของการสร้างกรดไขมันซึ่งใช้ปฏิกิริยาชีวเคมียังไม่มีการ

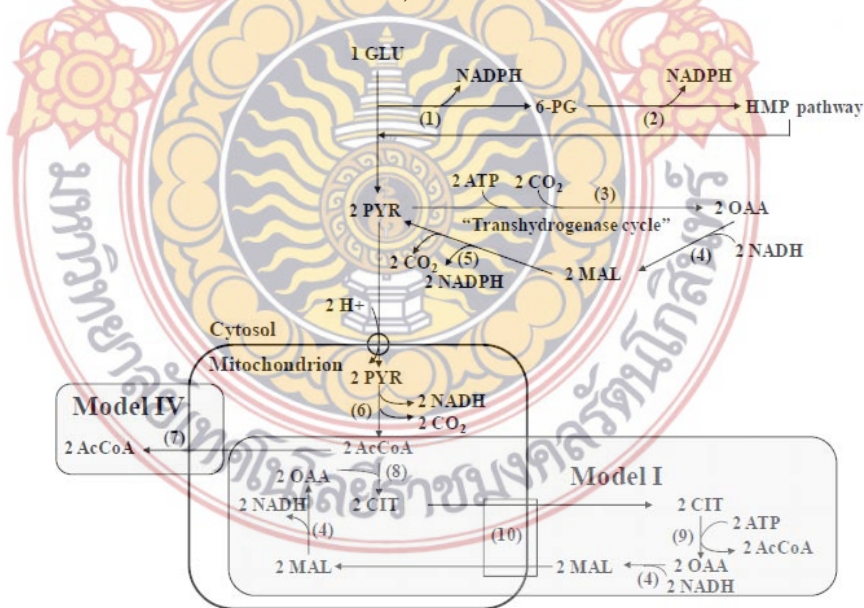


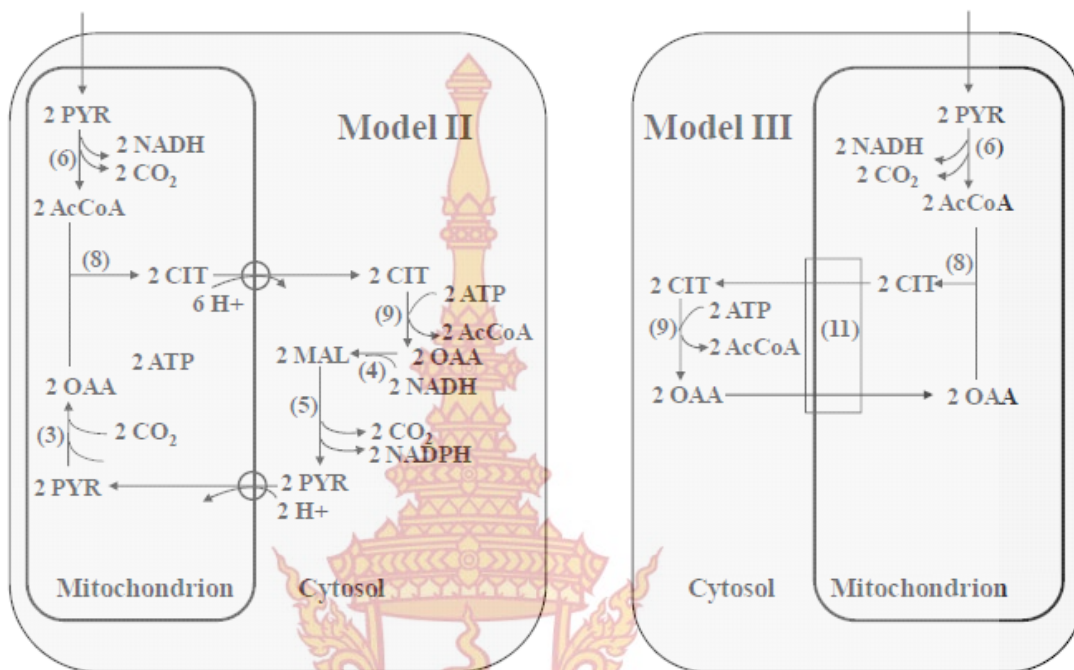
ประมาณค่าที่แท้จริงในกระบวนการสร้างกรดไขมันโดยเฉพาะการสังเคราะห์กรดไขมัน DHA ใน protist แต่มีรายใน *Mortierella alpine* (Mingjie, 2007) ซึ่งใช้ P/O ratio เท่ากับ 2.5 ซึ่งเป็นค่าที่สูงกว่าค่าที่แท้จริงทำให้การประมาณค่า flux ไม่ใกล้เคียงกับความเป็นจริง แต่อย่างไรก็ตาม model ได้แสดงให้เห็นว่าสถานะ limited nitrogen source ทำให้มีอัตราการไหลผ่านของคาร์บอนไปยังการสังเคราะห์ไขมันเพิ่มมากขึ้นดังภาพที่ 2.5 และค่าของ flux สามารถนำไปใช้ในงานของ Bioinformatics ได้อีกด้วย



ภาพที่ 6 แสดงการกระจายตัวของ flux ในช่วง exponential phase, decelerating phase, stationary phase และหลังจากเติม NaNO<sub>3</sub> ในสถานะ limited N-source

แต่เริ่มมีรายงานการประมาณค่า P/O ratio ใน *Aurantiochytrium* sp. B072 ในหลาย models ดังภาพที่ 2.6 (Chaisawang et al., 2014) ซึ่งได้เสนอว่า model 2 เป็นโมเดลที่เป็นไปได้มากที่สุดและยังมี P/O ratio ใกล้เคียงกับที่มีรายงานใน แบคทีเรีย, ยีสต์ และเชื้อรา





ภาพที่ 7 แสดง metabolic models ใน central metabolism สำหรับการสังเคราะห์ Acetyl-CoA และ NADPH ระหว่างการสังเคราะห์ไขมันซึ่งประกอบไปด้วย 4 โมเดลที่เป็นไปได้



## บทที่ 3 ระเบียบวิธีการวิจัย

### 1. ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

เชื้อ *Thraustochytrium* ได้มาจากใบไม้ที่ตกอยู่บนโคลนที่มีน้ำทะเลหรือลอยน้ำมาในบริเวณป่าชายเลนในหลายจังหวัด เช่น ชลบุรี กาญจนบุรี ภูเก็ต และกรุงเทพฯ

### 2. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

Polymerase Chain Reaction (PCR)  
Gas Chromatography  
High Performance Liquid Chromatography (HPLC)  
Centrifugation  
Spectrophotometer  
Microscope

### 3. วิธีการทดลอง

#### 3.1 เชื้อและการเพาะเชื้อต่อช่วง (Strain and subculture for maintenance)

เชื้อ *Thraustochytrium* sp. A01 ได้มาจากใบไม้ที่ตกอยู่บนโคลนบริเวณป่าชายเลนจังหวัดต่างๆ เลือกเฉพาะใบที่มีรอยต่างและรอยแตกเท่านั้น นำใบไม้แช่ในน้ำป่าชายเลนใสในถุง ภายใน 3 ชั่วโมง นำใบไม้ตัดเฉพาะส่วนรอยต่าง และรอยแตก  $1 \times 1$  cm รวมถึงตัดให้ละเอียดด้วยใบมีด และนำมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ และกระจายให้ทั่วอาหารด้วย sterilized loop อาหารที่ใช้เลี้ยงในขั้นต้นคือ YPG agar ที่ใส่ยาฆ่าเชื้อแบคทีเรียเพื่อป้องกันเชื้อแบคทีเรียโต ส่วนประกอบของ YPG agar คือ sea salts, 15 g/L (gram per liter); glucose, 1 g/L; yeast extract, 1 g/L; peptone, 1 g/L;  $MnCl_2$ , 1 mg/L; และ agar, 15 g/L จากนั้นเพาะเลี้ยงเชื้อต่อช่วงด้วย YPG agar โดยการต่อช่วง (subcultured) ทุกๆ 1 เดือน ในกรณีที่ไมใช้เชื้อทำการเก็บที่อุณหภูมิ  $-80^\circ C$  ใน glycerol อัตราส่วน glycerol ต่อ อาหารเลี้ยงเชื้อ 1:2



ภาพที่ 8 ใบจากต้นโกก่างในป่าชายเลน ที่ตกจากต้นและลอยน้ำมา





ภาพที่ 9 ใบจากต้นโกก่างในป่าชายเลนได้ถูกเก็บในถุงพลาสติก





ภาพที่ 10 ใบจากต้นโกกงนำมาตัด และวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง

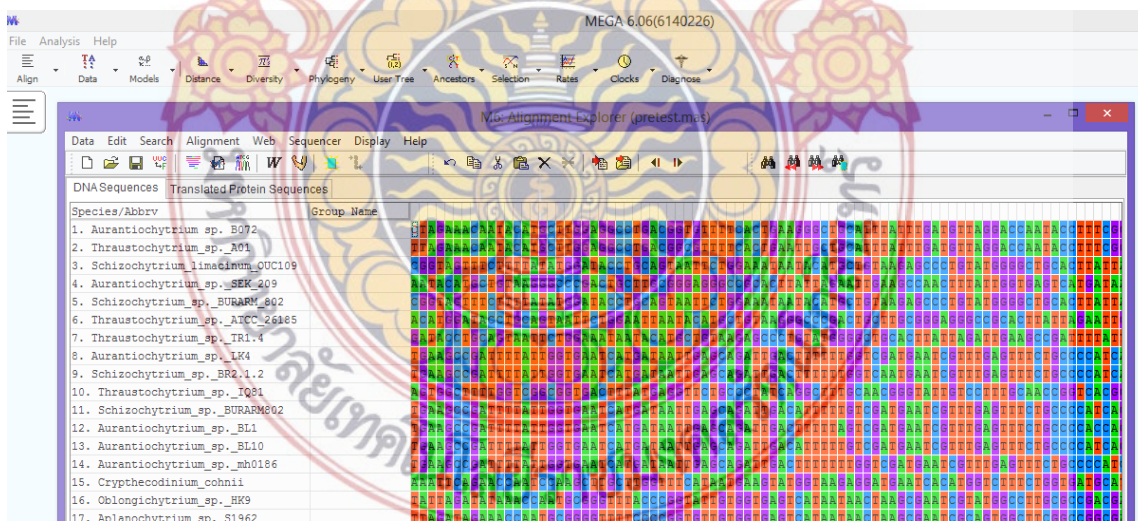


ภาพที่ 11 เชื้อที่โตนำมาแยกให้เป็นเชื้อที่มีสายพันธุ์เดียว

### 3.2 การจำแนกชนิดของสายพันธุ์ (Identification of strain)

นำเชื้อที่แยกได้ไปเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (agar plate) เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นเมื่อเชื้อโตทำการย้ายเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวไปเลี้ยงในหลอดทดลอง 50 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ 10 มิลลิลิตร ที่มีส่วนประกอบของ น้ำเกลือทะเล (artificial seawater), glucose 4 กรัมต่อลิตร, yeast extract 2 กรัมต่อลิตร, peptone 1 กรัมต่อลิตร ภายใต้การควบคุมอุณหภูมิที่ 25 °C ในเครื่องเขย่า (150 rpm) เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นแยกเซลล์ออกด้วยการปั่นเหวี่ยง (centrifugation (9,000×g, 10 min)) เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยน้ำกลั่น (sterile deionized water) และทำแห้งก่อนทำการสกัด DNA การสกัด DNA สกัดด้วย DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA) จากนั้นใช้ DNA ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis (0.8% agarose) จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณ 18S rRNA gene ด้วย primer 2 ชั้น คือ forward primer: 5'-TCCTGCCAGTAGTCATATGC-3' and reverse primer: 5'-TGATCCTCTCGCAGGTTTAC-3' ตามการศึกษาของ Chaisawang *et al.* (6), Grzebyk *et al.* (12) and Yang *et al.* (32) จากนั้นเพิ่มปริมาณ genomic DNA ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ที่มีส่วนประกอบดังนี้ 50  $\mu$ L of 1× Taq PCR buffer (New England Biolabs, UK), 0.2 mM dNTP, 0.2  $\mu$ M of 16S1N, and 16S2N primers และ 2.5 U Taq polymerase (New England Biolabs, UK) จากนั้นทำการแยกสาย DNA ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 5 นาที PCR โปรแกรมที่ตั้งไว้คือ 30 วินาที ที่ 94°C และ 30 วินาที ที่ 60.8°C (annealing temperature) 2 นาที ที่ 72 °C ทำทั้งหมด 40 รอบ และ 7 นาทีสำหรับเพิ่มปริมาณที่ (final extension) ที่ 72 °C จากนั้นส่งหาลำดับ (DNA sequencing) ผลที่ได้ 18S rRNA gene sequences ทำการเปรียบเทียบลำดับใน GenBank database ของ National Center for Biotechnology Information โดยใช้ Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) และ โปรแกรม (multiple alignment program CLUSTAL W โดยใช้ MEGA6 software) ค่าของ bootstrap ถูกวิเคราะห์ซ้ำจำนวน 1,000 รอบ (32)

ภาพที่ 12 วิธีการนำลำดับเบส 18sRNA ไปเทียบคู่เบสในฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information



ภาพที่ 13 แสดงการเปรียบเทียบลำดับเบสและตัดด้วยโปรแกรม MEGA 6

### 3.3 การเลี้ยงเชื้อแบบเขย่า (Shake flask cultivation)



เชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งถูกย้ายจากหลุมไปยัง Erlenmeyer flask (250 mL) ประกอบด้วย 50 mL GPY-broth pH 6.5 และทำการเขย่าที่ 200 rpm ภายใต้อุณหภูมิ 25 °C ใน orbital shaker (Innova 4900, New Brunswick, USA) หลังจาก 22 ชั่วโมง O.D. ของ zoospore หรือกรณีลงเชื้อด้วยเซลล์ประมาณ 2 ทำการลงเชื้อให้ได้ 5% (v/v) ของ inoculum ใน 100 mL ของ experimented culture โดยให้มี O.D. ประมาณ 1 อาหารเลี้ยงเชื้อใน 500 mL cotton stopped baffled flasks มี mineral medium ทำการบ่มเชื้อใน orbital shaker ที่ 200 rpm ภายใต้อุณหภูมิต่างๆ หรือที่ 25 °C ตามเก็บเชื้อจนกระทั่งอาหารเลี้ยงเชื้อหมด

ในการเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ เช่น glucose, fructose, glycerol หรือ olive oil ซึ่งเป็นแหล่ง carbon source และ 10 g/L yeast extract หรือบางกรณี 10 g/L peptone เป็นแหล่ง nitrogen รวมถึง vitamin และ trace elements อาหารเลี้ยงเชื้อใส่ 15 g/L sea salts, 1 mg/L  $MnCl_2$  และ initial pH 6.5 และทำการศึกษาการโตใน mineral medium ซึ่งประกอบด้วย 60-120 g/L glucose เป็นแหล่ง carbon source, 3-18 g/L monosodium glutamate เป็น nitrogen source, 0.6 g/L  $K_2HPO_4$  เป็น potassium source และ 15 g/L sea salts อาหาร mineral medium ได้มีการเติม vitamins and trace elements ดังนี้ สารละลาย trace mineral solution ประกอบด้วย มิลลิกรัมต่อลิตร,  $Na_2EDTA$ , 15 mg;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 4.5 mg;  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ , 0.3 mg;  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ , 9.0 mg;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 0.3 mg;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 3.0 mg;  $NaHCO_3$ , 100 mg;  $KH_2PO_4$ , 200 mg;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 200 mg;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1 mg;  $H_3BO_3$ , 1.0 mg; สารละลาย vitamin ประกอบด้วย มิลลิกรัมต่อลิตร, para-aminobenzoic acid (PABA), 0.20 mg; riboflavin, 0.1 mg; biotin, 0.05 mg; folic acid, 0.04 mg; nicotinic acid, 1.00 mg; myo-inositol, 25.00 mg; thiamine hydrochloride (B1), 0.50 mg; pyridoxine hydrochloride (B6), 0.50 mg; cyanocobalamine (B12), 0.10 mg จากนั้นใช้ filter-sterilized (0.20  $\mu m$ ) กรองวิตามินลงสู่อาหาร glucose และ แหล่ง carbon อื่นๆ ถูก autoclaved แยกที่ 110 °C นาน 15 นาที จากนั้นปรับ initial pH ให้เหมาะสมเช่น pH 6.5 ก่อนทำให้ปราศจากเชื้อ (sterilization) ที่ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที หลังจาก sterilize สารละลายวิตามินที่มีส่วนประกอบข้างต้นได้ถูกใส่ในอาหารก่อนการ inoculation ด้วยเชื้อ

### 3.4 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล (Analysis of culture supernatant)

Glucose ถูกทำการวัดปริมาณด้วย commercial glucose oxidase kit (Sigma, St. Louis, USA) Fructose, glycerol, and sorbitol ถูกทำการวัดปริมาณด้วย HPLC (Waters, Milford, USA) เครื่องมือใช้ Sugar Pak 1 column (6.5x300mm) สารละลายที่เป็น mobile phase คือ 50 mg/L Ca-EDTA มี flow rate เท่ากับ 0.5 mL/min detector เป็น refractive index (RI) detector ซึ่งใช้ตรวจวัดปริมาณน้ำตาล อุณหภูมิของ column และ detector เป็น 90 °C และ 35 °C

Monosodium glutamate (MSG) ใน supernatant ทำการวัดด้วย TNBS (trinitrobenzo sulfonic acid) procedure (Adler-Nissen, 1979) supernatant ถูกผสมด้วย TNBS solution (0.17

mL ใน 50 mL distilled water) ที่มีส่วนประกอบของ 0.21 M sodium phosphate buffer pH 8.2 Glycine ถูกใช้เป็น standard และใช้ absorbance ที่ 340 nm Ammonium analysis was assayed by the phenol-hypochloride method (Weatherburn, 1967).

### 3.5 วิเคราะห์ปริมาณเซลล์แห้ง (Assay of culture dry weight)

ตัวอย่างปริมาณ 2 mL ถูกเก็บด้วยวิธี centrifuge ที่  $9,000\times g$  เป็นเวลา 10 min ที่  $4^{\circ}\text{C}$  Biomass ที่เก็บได้ถูกทำการล้างด้วย distilled water 2 รอบ ส่วนของเซลล์ถูกทำให้แห้งด้วยวิธี freeze dry ส่วนเซลล์ที่แห้งแล้วถูกชั่งเพื่อให้ทราบน้ำหนักแห้ง

### 3.6 วิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน (Analysis of fatty acid)

นำเซลล์แห้งประมาณ 15-20 mg ที่ได้จากการ freeze-dried ถูกนำมาทำ esterified ด้วย 4% sulphuric acid ใน methanol และ butylated hydroxytoluene (antioxidant) สำหรับ 1 h ที่  $90^{\circ}\text{C}$  Heptadecanoic acid หรือ nonadecanoic acid (Sigma, St. Louis, USA) ถูกใช้เป็น internal standard ตัวอย่างได้ถูกฉีดด้วย auto-injector ในอัตราส่วน 1:100 split ใน Shimadzu gas chromatography instrument (GC-17A) ซึ่งมี Supelco Omegawax<sup>TM</sup> 250 fused silica เป็น capillary column (30m x0.25 mm) ส่วนของอุณหภูมิของ injector และ detector ถูกกำหนดที่  $250^{\circ}\text{C}$  และ  $260^{\circ}\text{C}$  ตามลำดับ โปรแกรมสำหรับการวิเคราะห์คือ อุณหภูมิของ column เท่ากับ  $200^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 10 min และถูกเพิ่มเป็น  $230^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 17 นาที Helium ถูกใช้เป็น carrier gas ด้วย linear velocity ที่ 30 cm/s

ปริมาณ Total fatty acid content ทำการวัดด้วยวิธี Bligh and Dyer (1959) นำเซลล์แห้งประมาณ 20 mg ทำการสกัดด้วย chloroform-methanol-distilled water (1:2:0.8 v/v/v) ตามด้วย sonication (Sonicator Model. 500 S/N 5737, Langford) ประมาณ 15 นาที และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 18 ชั่วโมง จากนั้นเติม 1.25 mL ของ chloroform และ 1 M NaCl จากนั้น vortexed และ centrifuged ที่  $1,000\times g$  เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นส่วนล่าง (lower phase) ถูกทำให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน ที่อยู่ใน vial ที่ชั่งน้ำหนักแล้ว จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนัก

### 3.7 วิธีการเตรียมสารสกัดจากเซลล์โดยการแยกผนังเซลล์ออก (Preparation of cell free extracts)

เซลล์เป็ยอกที่มีเซลล์แห้งประมาณ 300 mg จากตัวอย่างในช่วงหลังของ log phase ถูกเก็บด้วยวิธี low speed centrifugation ( $10,000\times g$ ) และล้างเซลล์ 1 รอบด้วย 4 mL ของ extraction buffer ซึ่งประกอบด้วย 100 mM Tris-HCl buffer pH 7.2, 10% (w/v) glycerol, 1 mM dithiothreitol and 1 mM EDTA (Titriplex III) และเติม 4 mL of extraction buffer อีกครั้ง ในกรณีของ NADPH and NADH dehydrogenase เติมสาร 1 % v/v ของ Triton X 100 ใน extraction buffer

เซลล์ถูกทำให้แตกด้วยวิธี vortexing กับ 1 g ของ glass bead ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 °C เซลล์และเซลล์ที่ไม่แตกถูกแยกออกด้วย high speed centrifugation (Backman, LE-80K) ที่ 100,000×g 4 °C เป็นเวลา 30 นาที ส่วนใส่ถูกแยกออกและถูกใช้เป็น cell free extract ที่ใช้สำหรับการวัดเอนไซม์ซึ่งมีโปรตีนอยู่ประมาณ 2-4.5 mg protein/mL ระหว่างการวัด cell free extract จะต้องอยู่ในน้ำแข็งตลอดเวลา ในกรณีแยกไมโทคอนเดรีย เซลล์ถูกย่อยด้วย protease และทำให้แตกด้วย vortexing กับ 1 g ของ glass bead ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง เป็นเวลา 30 วินาที

### 3.8 การวัดกิจกรรมเอนไซม์ (Enzyme assays)

กิจกรรมเอนไซม์ถูกวัดด้วยเครื่อง Jasco model B-530 spectro-photometer ที่มีความยาว 1-cm light path cell (Tokyo, Japan) ที่อุณหภูมิ 30 °C น้ำที่ใช้ในการวัดเป็น milli-q water ในการวัดจำเป็นต้องเช็ค linearity ของวิธีโดยใช้ 2 ความเข้มข้นของ cell free extract อัตราการเกิดปฏิกิริยาแปรผันตรงกับปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ ทั้ง buffer และ cofactor มีการเปลี่ยนแปลงเพื่อตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ด้วย กิจกรรมเอนไซม์ถูกตามที่ 340 nm ที่อุณหภูมิที่ 30 °C โดยตามปริมาณการเกิดและถูกใช้ของ NAD(P)<sup>+</sup> or NAD(P)H ( $\epsilon_{340} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )

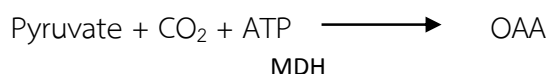
### 3.9 เอนไซม์ใน HMP pathway (Enzymes of the HMP pathway)

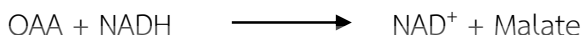
Glucose-6-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.49) ถูกตรวจวัดในปฏิกิริยาที่มีส่วนประกอบของ 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM NADP<sup>+</sup> และ cell free extract เริ่มต้นปฏิกิริยาด้วยการเติม 10 mM glucose-6-phosphate disodium salt (Harris, Diderich, van der Krogt, Luttk, Raamsdonk, Bovenberg, van Gulik, et al., 2006)

6-Phosphogluconate dehydrogenase (EC 1.1.1.44) ถูกตรวจวัดในปฏิกิริยาที่มีส่วนประกอบของ 50 mM glycylglycine buffer, pH 8.0, 0.4 mM NADP<sup>+</sup> และ cell free extract เริ่มต้นปฏิกิริยาด้วยการเติม 4 mM 6-phosphogluconate trisodium salt (Bruinenberg, van Dijken, & Scheffers 1983)

### 3.10 เอนไซม์ใน “transhydrogenase cycle” (Enzymes of the “transhydrogenase cycle”)

Pyruvate carboxylase (EC 6.4.1.49) ถูกวัดโดยควบคู่ปฏิกิริยากับ malate dehydrogenase และตามด้วยการออกซิเดชันของ NADH ที่ 340 nm (Wynn, Kendrick, & Ratledge, 1997) ปฏิกิริยามีส่วนประกอบของ 100 mM Tris-HCl pH 7.8, 3.5 mM ATP, 20 mM KHCO<sub>3</sub>, 6.7 MgSO<sub>4</sub>, 5 Units malate dehydrogenase, 10 mM pyruvate, 0.15 mM NADH ปฏิกิริยาเริ่มต้นด้วยการเติม 10 mM pyruvate.





Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37) ถูกตรวจวัดในปฏิกิริยาที่มีส่วนประกอบของ 100 mM potassium phosphate buffer, pH 8.0, 0.15 mM NADPH หรือ NADH และ cell free extract ปฏิกิริยาเริ่มต้นด้วยการเติม 1 mM oxaloacetic acid (Harris et al., 2006)

Malic enzyme [L-malate: NAD<sup>+</sup> oxidoreductase (decarboxylation); EC 1.1.1.39] decarboxylate ใช้ NAD<sup>+</sup> เป็นโคเอนไซม์

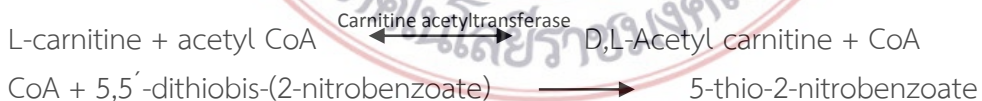
ในกรณีของ NADP<sup>+</sup> เป็นโคเอนไซม์ [L-malate: NADP<sup>+</sup> oxidoreductase (decarboxylation); EC 1.1.1.40] Malic enzyme ถูกตรวจวัดโดยมีส่วนประกอบดังนี้ 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM NADP<sup>+</sup> และ cell free extract ปฏิกิริยาเริ่มต้นด้วยการเติม 100 mM L(-)-malic acid (Harris et al., 2006) และ 25 mM L(-)-malic acid ซึ่งใช้สำหรับกิจกรรมสูงสุด นอกจากนี้ 0.4 mM NAD<sup>+</sup> ถูกใช้แทนด้วย NADP<sup>+</sup> เพื่อตรวจสอบ

### 3.11 เอนไซม์สำหรับการสร้าง acetyl-CoA (Enzymes of the acetyl-CoA producing)

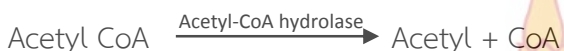
ATP-citrate lyase (EC 4.1.3.8) ถูกวัดกิจกรรมเอนไซม์ตามวิธีของ Srere, 1962 โดยมี การปรับปรุงส่วนประกอบเล็กน้อยโดยมีปฏิกิริยา คือ OAA เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ malate dehydrogenase ตามโดยการออกซิเดชันของ NADH ที่ 340 nm ปฏิกิริยาประกอบด้วย 0.1 mM Tris pH 7.3, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.3 mM CoA, 10 mM mercaptoethanol or thioethanol, 0.15 mM NADH, 5 mM ATP, and 20 mM potassium citrate, 50 Unit malate dehydrogenase ปฏิกิริยาเริ่มต้นด้วยการเติม 5 mM ATP



Carnitine acetyltransferase (EC 2.3.1.7) ถูกวัดกิจกรรมเอนไซม์โดยตามการสร้าง CoA จาก acetyl-CoA และ L-carnitine โดยใช้สาร 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoate) โดยตามกิจกรรมเอนไซม์ ที่ 412 nm และมี molar extinction coefficient เท่ากับ 13.6 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Kohlhaw & Tan-Wilson, 1977) ส่วนประกอบปฏิกิริยา คือ 0.1 M Tris/HCl pH 7.8, 0.25 mM Acetyl-CoA, 2 mM L-Carnitine และ 0.4 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoate) ปฏิกิริยาเริ่มต้นด้วยการเติม cell free extract



Acetyl-CoA hydrolase (EC 3.1.2.1) ถูกเช็คเพื่อตรวจสอบโดยไม่เติม L-carnitine ในปฏิกิริยา กิจกรรมเอนไซม์ Carnitine acetyltransferase ต้องลบกิจกรรมของ Acetyl-CoA hydrolase activity (ปกติจะมีกิจกรรมเอนไซม์ Acetyl-CoA hydrolase)



### 3.12 เอนไซม์ใน Tricarboxylic acid cycle (Enzymes in TCA cycle)

Isocitrate dehydrogenase (EC 1.1.1.41 (NADH), 1.1.1.42 (NADPH)) ปฏิกิริยาประกอบด้วย 100 mM potassium phosphate buffer pH 7.0, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM NADP<sup>+</sup>/NAD<sup>+</sup> และ cell extract ปฏิกิริยาเอนไซม์เริ่มต้นด้วยการเติม 5 mM D,L-isocitric acid trisodium salt (Harris et al., 2006) ทำการตรวจสอบโคเอนไซม์ AMP ว่าเป็น activator หรือไม่

### 3.13 เอนไซม์ใน oxidative phosphorylation (Enzyme of the oxidative phosphorylation pathway)

NADPH dehydrogenase (EC 1.6.99.1) และ NADH dehydrogenase (EC 1.6.99.3) ถูกตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์ด้วย ferricyanide เป็นตัวรับอิเล็กตรอน ส่วนประกอบของปฏิกิริยา คือ 50 mM phosphate buffer pH 6.0, 5 mM potassium cyanide, 1 mM potassium ferricyanide และ 0.15 mM NADPH หรือ NADH ปฏิกิริยาเริ่มต้นด้วยการเติม cell free extract และติดตามกิจกรรมเอนไซม์ที่ 340 nm (Bruinenberg, van Dijken, Kuenen, & Scheffers, 1985)

### 3.14 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Analysis of protein)

ความเข้มข้นของโปรตีนถูกตรวจวัดด้วยวิธี Lowry method (Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951) ซึ่งมี Bovine serum albumin (fatty acid free; Sigma) ถูกใช้เป็น standard

### 3.15 ความหมายและการคำนวณ (Definition and calculation)

Fatty acid free biomass (FFB, g/L) คือ น้ำหนักเซลล์แห้งที่ปราศจากไขมันซึ่งถูกคำนวณด้วยการลบ total fatty acid content (g/L) จากน้ำหนักแห้ง หรือ biomass (g/L) อัตราการไหลผ่าน หรือ Flux (mmol/gFFB/h) คือ อัตราการไหลผ่านของ metabolite ใน metabolic pathway รวมถึงการไหลผ่านข้าม permeable membrane ในหน่วยของ mmol ของสารตั้งต้นต่อกรัมของ FFB ต่อชั่วโมง ค่า flux สามารถคำนวณด้วยการเพิ่มขึ้นของ slope ของกรดไขมันต่อกรัม FFB ต่อเวลา (g/gFFB/h) ค่าอัตราส่วนของ C/N ratio ถูกคำนวณจากจำนวนคาร์บอน (g/L) ต่อจำนวนไนโตรเจน (g/L) ค่า overall productivity ของ total fatty acid และ DHA ถูกคำนวณจากปริมาณของ TFA (g/L) หรือ DHA (g/L) ต่อจำนวนเวลาทั้งหมดของการเลี้ยง ค่า intracellular fluxes ของ acetyl-CoA-provision ถูกคำนวณจาก acetyl-CoA requirement สำหรับการสังเคราะห์กรดไขมัน ค่า maximum flux ถูกคำนวณจาก

กิจกรรมเอนไซม์  $V_{max}$  (Postma, Verduyn, Scheffers, & van Dijken (1989) ยกตัวอย่างเช่น specific activity ของ ACL เท่ากับ 203 nmol/mg protein/min ซึ่งเท่ากับ 3.9 mmol/gFFB/h ( $203 \times (33/40) \times 60 \times (38.8/100) \times 1000 \times 10^{-6}$ ) ซึ่งยอมรับว่าอัตราส่วน soluble/total protein เท่ากับ 33/40 ซึ่ง condition นี้มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 65.4 % ใน FFB

### 3.16 โมเดลปริมาณสารสัมพันธ์ (Stoichiometric model)

โมเดลทางชีวเคมีใช้โมเดลที่ 2 ของ Chaisawang, 2012 โดยย่อ acetyl-CoA เป็นสารตั้งต้นในการสร้าง malonyl-CoA ซึ่งจะผลิตเป็นกรดไขมันผ่านทางระบบ pathway FAS และ PKS การสร้าง acetyl-CoA พบใน cytosol โดย citrate ซึ่งมาจาก mitochondria และจะถูกตัดเป็น acetyl-CoA และ OAA โดย ATP-citrate lyase (ACL) (Evan et al., 1983a) ซึ่งมีความสำคัญในการสะสมไขมันใน oleaginous yeast และ *Thraustochytrium* วิธีการสร้าง acetyl-CoA metabolism และ NADPH ใน *Thraustochytrium* ได้ทำการตรวจสอบโดยวิธีทางกิจกรรมเอนไซม์ซึ่งใช้ในโมเดล

## 4. สถิติที่ใช้ในการวิจัย

ในแต่ละชุดข้อมูลได้ทำการหาค่าเฉลี่ยแบบ triplicate observations ข้อมูลดิบถูกใช้ในการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS (SPSS Inc., 1998, Chicago, IL, USA) version 15 สำหรับ windows (Duncan's test). ความแตกต่างที่มีนัยสำคัญ (Significant difference) ถูกรายงานโดย  $P$  value < 0.05



บทที่ 4  
ผลการวิจัย/ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. การแยกสายพันธุ์ด้วยระบบ 18S rRNA

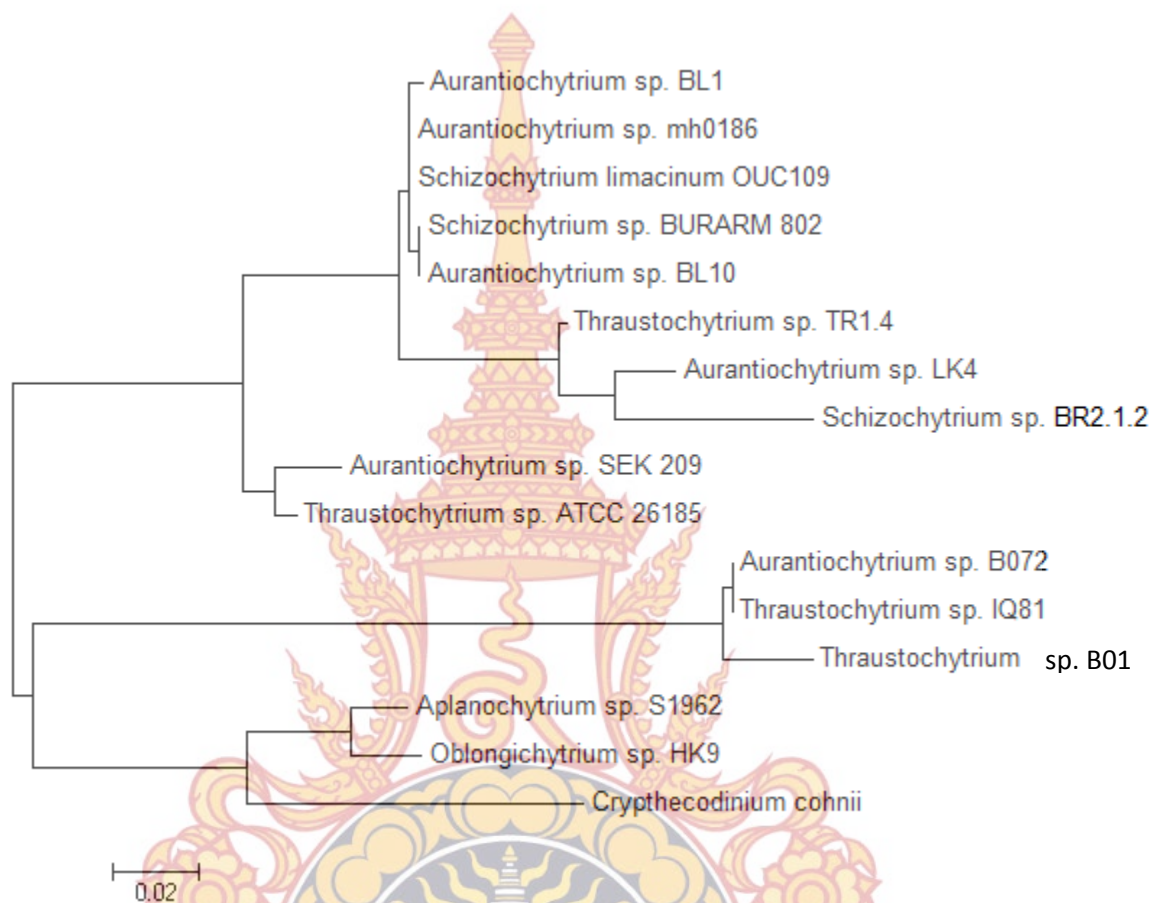
การวิเคราะห์ 18S rRNA เชื้อ *Thraustochytrium* sp. สายพันธุ์ B01 ถูกจัดให้อยู่ใน *Thraustochytrium* sp. ซึ่งมีความเหมือนกับ *Thraustochytrium* sp. IQ81 (96% identity และ 89% coverage) ซึ่งพบว่าแยกเชื้อได้จากชายฝั่งทะเลของชิลี และกรดไขมันในสายพันธุ์ B01 พบว่าใกล้เคียงกับ genus *Thraustochytrium* ซึ่งประกอบไปด้วย arachidonic acid (ARA, C20:4 n6) ซึ่งต่างจาก genus *Aurantiochytrium* ที่มีปริมาณ ARA น้อยมาก (Fan et al., 2009) ด้วยเหตุนี้จึงเป็นเหตุผลที่จัดสายพันธุ์ B01 เป็น *Thraustochytrium* sp. B01

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Thraustochytrium sp. IQ81 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2046	2046	89%	0.0	96%	<a href="#">KF718865.1</a>
<a href="#">Thraustochytrium sp. EMRG523 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1548	1548	89%	0.0	87%	<a href="#">KM374696.1</a>
<a href="#">Thraustochytrium aff. kinnei BAFCCult 3490 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1546	1546	89%	0.0	87%	<a href="#">HQ228964.1</a>
<a href="#">Thraustochytrium aff. kinnei BAFCCult 3485 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1546	1546	89%	0.0	87%	<a href="#">HQ228962.1</a>
<a href="#">Thraustochytrium sp. EMRG525 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1544	1544	89%	0.0	87%	<a href="#">KM374697.1</a>
<a href="#">Thraustochytrium aff. kinnei BAFCCult 3509 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1543	1543	89%	0.0	87%	<a href="#">HQ228983.1</a>
<a href="#">Thraustochytrium sp. KL1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1539	1539	89%	0.0	87%	<a href="#">FJ821498.1</a>
<a href="#">Thraustochytrium kinnei 18S ribosomal RNA (18S rRNA)</a>	1535	1535	89%	0.0	87%	<a href="#">L34668.1</a>
<a href="#">Thraustochytrium sp. EMRG510 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1525	1525	89%	0.0	87%	<a href="#">KM374688.1</a>
<a href="#">Thraustochytrium aff. kinnei BAFCCult 3503 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1523	1523	89%	0.0	87%	<a href="#">HQ228970.1</a>
<a href="#">Thraustochytrium sp. EMRG517 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1521	1521	89%	0.0	87%	<a href="#">KM374691.1</a>
<a href="#">Thraustochytrium aff. kinnei BAFCCult 3507 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1517	1517	89%	0.0	87%	<a href="#">HQ228974.1</a>
<a href="#">Thraustochytrium sp. EMRG516 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1510	1510	89%	0.0	87%	<a href="#">KM374690.1</a>
<a href="#">Thraustochytrium aff. kinnei BAFCCult 3497 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1505	1505	89%	0.0	87%	<a href="#">HQ228967.1</a>
<a href="#">Thraustochytrium aff. kinnei BAFCCult 3494 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1503	1503	89%	0.0	87%	<a href="#">HQ228965.1</a>
<a href="#">Uncultured eukaryote clone D3P05H08 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1503	1503	80%	0.0	90%	<a href="#">EF100402.1</a>

ภาพที่ 14 ผลจากการเปรียบเทียบสายพันธุ์โดยใช้ลำดับเบส 18sRNA ในฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information



ภาพที่ 15 แสดงการเปรียบเทียบสายพันธุ์ *Thraustochytrium* sp. B01 ที่ใช้เทคนิค 18S rRNA gene และ *Cryptocodinium cohnii* เป็น outgroup

## 2. อัตราการสะสมไขมันต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อม

ผลของ initial pH ต่อปริมาณเชื้อ (biomass) และ อัตราการผลิตกรดไขมันทั้งหมด (total fatty acid productivity) ระหว่างการสังเคราะห์ไขมัน (lipogenic phase) ของสายพันธุ์ *Thraustochytrium* sp. B01 พบว่าค่าสุดท้ายหรือ final pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเบสใกล้ pH 8 จากผลการทดลองพบว่า *Thraustochytrium* sp. B01 สามารถทน pH ได้กว้าง (pH 4-8) สำหรับการโต ซึ่งพบว่าไม่มีผลต่อ biomass และ fatty acid productivity ระหว่าง pH 3 ถึง 8



ตารางที่ 2 Biomass, total fatty acid contents และ fatty acids productivity ของสายพันธุ์ *Thraustochytrium* sp. B01 เลี้ยงด้วย initial pH ที่ต่างกัน

Initial medium pH	Biomass (g/L)	Fatty acid content (g/L)	Fatty acid productivity (g/L/h)
3	27 ± 1 <sup>a</sup>	18 ± 0.8 <sup>a</sup>	0.22 ± 0.03 <sup>a</sup>
4	28 ± 2 <sup>a,b</sup>	19 ± 0.7 <sup>a,b</sup>	0.27 ± 0.02 <sup>b</sup>
5	29 ± 1 <sup>a,b</sup>	20 ± 1.0 <sup>b</sup>	0.28 ± 0.01 <sup>b</sup>
6	30 ± 1 <sup>b</sup>	20 ± 0.8 <sup>b</sup>	0.30 ± 0.02 <sup>b</sup>
7	29 ± 1 <sup>a,b</sup>	19 ± 0.7 <sup>a,b</sup>	0.30 ± 0.03 <sup>b</sup>
8	27 ± 2 <sup>a,b</sup>	18 ± 1.0 <sup>a</sup>	0.28 ± 0.02 <sup>b</sup>

ตัวอักษร a และ b ที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลของปริมาณความเข้มข้นของ sea salt ที่มีผลต่อ biomass และ total fatty acid productivity ระหว่างการสังเคราะห์ไขมันของ *Thraustochytrium* sp. B01 จากผลการทดลองพบว่า biomass สูงสุดที่ 15 g/L ของความเข้มข้นน้ำทะเล อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นต่ำโดยเฉพาะไม่ใช้น้ำทะเลพบว่ามีระดับ biomass เท่ากับ 18 g/L จากการศึกษาสามารถบอกได้ว่าสายพันธุ์ B01 สามารถโตได้โดยไม่มีเกลือ แต่อย่างไรก็ตาม biomass สูงสุดพบที่ความเข้มข้นเกลือเท่ากับ 15 g/L

ตารางที่ 3 Biomass, total fatty acid contents และ fatty acids productivity ของสายพันธุ์ *Thraustochytrium* sp. B01 เลี้ยงด้วยความเข้มข้นของน้ำทะเลที่ต่างกัน

Sea water concentration (% g/L)	Biomass (g/L)	Fatty acid content (g/L)	Fatty acid productivity (g/L/h)
0	18 ± 2 <sup>a</sup>	14 ± 0.7 <sup>a</sup>	0.14 ± 0.02 <sup>a</sup>
5	26 ± 1 <sup>b</sup>	19 ± 0.7 <sup>b</sup>	0.29 ± 0.02 <sup>b</sup>
10	29 ± 1 <sup>c,d</sup>	20 ± 1.0 <sup>b</sup>	0.29 ± 0.04 <sup>b</sup>
15	30 ± 1 <sup>d</sup>	19 ± 0.9 <sup>b</sup>	0.35 ± 0.05 <sup>c</sup>
20	27 ± 1 <sup>b,c</sup>	19 ± 0.8 <sup>b</sup>	0.32 ± 0.03 <sup>b,c</sup>
30	28 ± 2 <sup>b,c,d</sup>	20 ± 0.8 <sup>b</sup>	0.31 ± 0.04 <sup>b,c</sup>

ตัวอักษร a, b, c และ d ที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลของกลูโคสต่อ biomass และ total fatty acid productivity ระหว่างการสังเคราะห์ไขมันพบว่า biomass และ fatty acid productivity ของ B01 ใน 90 g/L glucose medium มีอัตราการสังเคราะห์กรดไขมันสูงกว่าความเข้มข้นอื่น ดังนั้นสามารถบอกได้ว่าเชื้อสามารถโตได้ในอาหารที่มีกลูโคสสูง 150 g/L glucose และความเข้มข้นต่ำ 15 g/L glucose แต่อัตราการสังเคราะห์ไขมันที่ตีน้อยอยู่ในช่วงกว้าง 30-120 g/L glucose

ตารางที่ 4 Biomass, total fatty acid contents และ fatty acids productivity ของสายพันธุ์ *Thraustochytrium* sp. B01 เลี้ยงด้วยความเข้มข้นของกลูโคสที่ต่างกัน

Glucose concentration (g/L)	Biomass (g/L)	Fatty acid content (g/L)	Fatty acid productivity (g/L/h)
15	5 ± 1 <sup>f</sup>	3 ± 0.7 <sup>f</sup>	0.17 ± 0.03 <sup>a</sup>
30	9 ± 2 <sup>e</sup>	5 ± 0.5 <sup>c</sup>	0.33 ± 0.02 <sup>b,c</sup>
60	18 ± 1 <sup>d</sup>	10 ± 0.7 <sup>d</sup>	0.34 ± 0.01 <sup>b,c</sup>
90	30 ± 1 <sup>c</sup>	19 ± 0.9 <sup>c</sup>	0.35 ± 0.05 <sup>b,c</sup>
120	36 ± 1 <sup>b</sup>	22 ± 0.4 <sup>b</sup>	0.30 ± 0.01 <sup>b</sup>
150	47 ± 3 <sup>a</sup>	27 ± 0.8 <sup>a</sup>	0.18 ± 0.01 <sup>a</sup>

ตัวอักษร a, b, c, d, e และ f ที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลของอุณหภูมิต่อการสังเคราะห์กรดไขมันพบว่าที่อุณหภูมิต่ำ 10 °C ความเข้มข้นของกลูโคสลดลงขณะเลี้ยงด้วยอัตราที่ต่ำ และยังเหลือปริมาณกลูโคสอีก 20 g/L ซึ่งต่างจาก condition อื่นที่มีอัตราการลดลงของกลูโคสสูงและเชื้อใช้กลูโคสหมด อย่างไรก็ตามหลาย condition อัตราส่วนของ DHA ต่อ DPA หรืออัตราส่วนของ omega-3 ต่อ omega-6 คงที่ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ไขมันและ biomass พบที่ 25 °C ซึ่งพบว่าใกล้เคียงกับที่พบในเชื้อ oleaginous ที่อุณหภูมิระหว่าง 20 ถึง 30 °C (Arafiles et al., 2011)

ตารางที่ 5 Biomass, total fatty acid contents และ fatty acids productivity ของสายพันธุ์ *Thraustochytrium* sp. B01 เลี้ยงด้วยอุณหภูมิที่ต่างกัน

Temperature (°C)	Biomass (g/L)	Fatty acid content (g/L)	Fatty acid productivity (g/L/h)
15	12 ± 2 <sup>a</sup>	15 ± 1.0 <sup>a</sup>	0.07 ± 0.01 <sup>a</sup>
20	28 ± 2 <sup>c</sup>	16 ± 0.9 <sup>a</sup>	0.28 ± 0.02 <sup>b</sup>
25	30 ± 1 <sup>c</sup>	19 ± 0.9 <sup>b</sup>	0.35 ± 0.05 <sup>c</sup>
30	22 ± 2 <sup>b</sup>	15 ± 0.4 <sup>a</sup>	0.27 ± 0.04 <sup>b</sup>

ตัวอักษร a, b และ c ที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

กรดไขมันที่พบในสายพันธุ์ B01 เหมือนกับในสายพันธุ์ *Thraustochytrium* spp. ซึ่งมีปริมาณ EPA และ DHA เป็นกรดไขมันหลักตามด้วย ARA และ DPA ที่อุณหภูมิต่ำ 15 °C ปริมาณ DHA และ EPA เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิ 25 °C แต่มีอัตราการผลิตกรดไขมันที่ต่ำ อย่างไรก็ตามสายพันธุ์นี้มี

ชนิดกรดไขมันที่ดีซึ่งสามารถใช้เป็นอาหารสัตว์และอาหารเสริมในระดับอุตสาหกรรมได้ต่อไปเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิเหมาะสม

ตารางที่ 6 ส่วนประกอบของกรดไขมัน (percentage of total fatty acids) ของสายพันธุ์ *Thraustochytrium* sp. B01

Temperature (°C)	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C20:4 n-6 (ARA)	C20:5 n-3 (EPA)	C22:5 n-6 (DPA)	C22:6 n-3 (DHA)
15	6.3±0.2	29.5±0.0	19.1±0.3	0.1±0.0	6.0±0.1	13.0±0.4	6.0±0.0	20.0±0.2
20	5.4±0.1	26.0±0.1	14.0±0.2	0.1±0.0	8.0±0.2	17.3±0.2	7.8±0.1	21.4±0.0
25	6.6±0.0	33.2±0.2	20.0±0.0	0.2±0.0	6.0±0.1	12.0±0.4	6.0±0.2	16.0±0.1

ได้มีการทดลองใส่ emulsifier บางตัวเช่น เบต้ากลูแคน แชนแทนกัม กัวกัม พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างนัยสำคัญของ Biomass และกรดไขมันแต่อย่างใด เพียงแต่มีอัตราการสร้างกรดไขมันที่ลดลง อาจเนื่องมาจากปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับ การลดออกซิเจนโดยตรง อีกทั้งเบต้ากลูแคนไม่สามารถกระตุ้นการสร้างกรดไขมันได้

### 3. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์และอัตราการไหลผ่าน

จากผลการทดลองการแยกไมโทคอนเดรียพบว่า NADP<sup>+</sup>-malic enzyme และ 6-Phosphogluconate dehydrogenase อยู่ใน cytosolic ส่วน Pyruvate carboxylase, NAD<sup>+</sup>-isocitrate dehydrogenase, Fumarase อยู่ในไมโทคอนเดรีย แต่ส่วน NADP<sup>+</sup>-isocitrate dehydrogenase พบทั้งสองส่วน ดังนั้นเอนไซม์นี้กระจายตัวไปในหลายส่วนของเซลล์ (compartments) ดังนั้น NADP<sup>+</sup> ที่ได้จากกิจกรรมเอนไซม์ isocitrate dehydrogenase นั้นสามารถใช้ในการสร้างไขมันได้ ส่วนหนึ่งโดยเฉพาะใน cytosol ส่วน compartment อื่นๆอาจรวมไปอยู่กับส่วนของไมโทคอนเดรีย ดังนั้นค่ากิจกรรมเอนไซม์ในส่วน cytosol สามารถนำมาคำนวณอัตราการไหลผ่านได้ ดังนั้นเอนไซม์ G-6-PDH, NADP<sup>+</sup>-ICDH และ malic enzyme เป็นเอนไซม์ที่สร้าง NADPH ที่ใช้ในการสังเคราะห์กรดไขมัน ส่วน NADPH ที่สร้างจาก NADP<sup>+</sup>-ICDH ในไมโทคอนเดรีย ไม่สามารถผ่านผนังไมโทคอนเดรียออกมาใช้เพื่อสังเคราะห์กรดไขมันได้ ในส่วนของ NADH และ NADPH oxidase จากผลการทดลองพบว่าไม่พบกิจกรรมเอนไซม์ ดังนั้นจึงไม่ได้นำมาคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ตัวอื่นด้วย

ตารางที่ 7 กิจกรรมเอนไซม์ nmol/mg protein/min ใน cytoplasmic และ mitochondrial enzymes ของสายพันธุ์ *Thraustochytrium* sp. B01

Enzyme	Activity	
	Cytosol	Mitochondria
Pyruvate carboxylase	27 ± 3	272 ± 2
6-Phosphogluconate dehydrogenase	120 ± 1	18 ± 2
Isocitrate dehydrogenase (NAD <sup>+</sup> )	7 ± 1	92 ± 1
Isocitrate dehydrogenase (NADP <sup>+</sup> )	70 ± 6	68 ± 4
Fumarase	222 ± 12	2174 ± 14
Malic enzyme (NAD <sup>+</sup> )	174 ± 3	18 ± 1
Malic enzyme (NADP <sup>+</sup> )	213 ± 1	N.D.

Unidentified activity (N.D.)

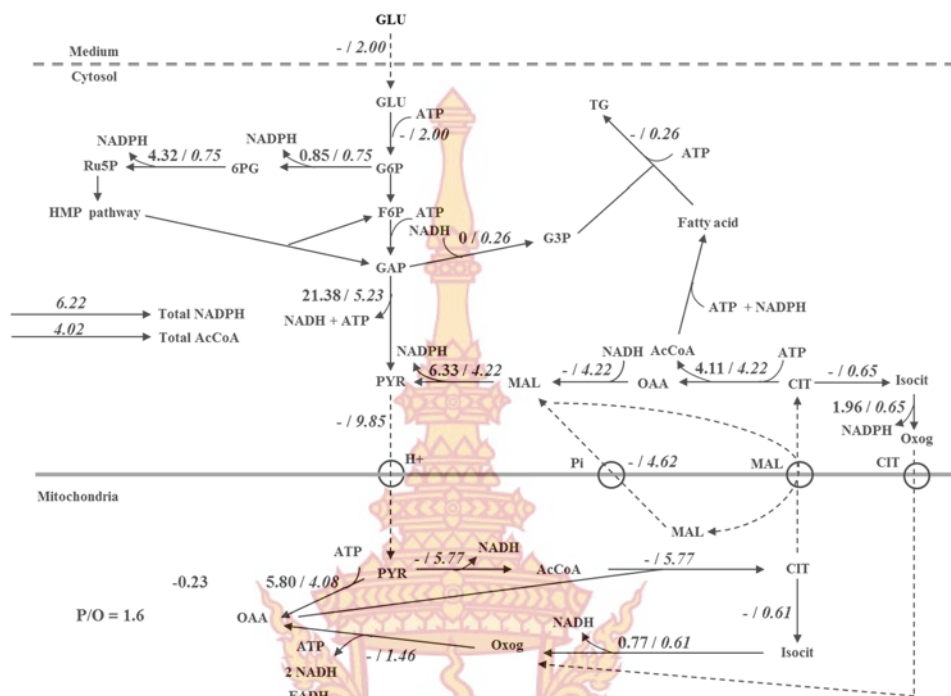
จากผลการทดลองกิจกรรมเอนไซม์พบว่า ATP:citrate lyase และ Carnitine acetyltransferase (CAT) เป็นเอนไซม์สังเคราะห์ acetyl-CoA แต่เนื่องจาก CAT มีเพียงงานวิจัยจำนวนน้อยมากที่เสนอว่าเป็น acetyl-CoA provision พบในเชื้อยีสต์ ถึงแม้จะมีรายงานในเชื้อราบางชนิดก็ตาม แต่ในหลายรายงานเชื่อว่า ATP:citrate lyase ก็ยังคงเป็นเอนไซม์สังเคราะห์ acetyl-CoA ในส่วนที่สองคือ NADPH จากผลการทดลองพบว่า ME เป็นเอนไซม์หลักในการผลิต G-6-PDH ก็ยังคงเป็นเอนไซม์ที่ผลิต NADPH ด้วยเช่นกันเพราะเนื่องจากคาร์บอนต้องไหลผ่านปฏิกิริยานี้ก่อนเนื่องจากกิจกรรมเอนไซม์ของ HMP pathway ยังมีอยู่ไม่หมดไป และอีกแหล่งการสังเคราะห์ NADPH คือ isocitrate dehydrogenase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถผลิต NADPH ได้ใน cytosolic compartment

ตารางที่ 8 กิจกรรมเอนไซม์ nmol/mg protein/min ในการสกัดเซลล์ของสายพันธุ์ *Thraustochytrium* sp. B01

Enzyme	Enzyme activity		
	10 h <sup>1</sup>	18 h <sup>2</sup>	24 h <sup>3</sup>
ATP:Citrate lyase	88 ± 6	90 ± 17	164 ± 19
Carnitine acetyltransferase	264 ± 7	233 ± 5	243 ± 9
Malic enzyme (NADP <sup>+</sup> )	211 ± 45	224 ± 23	228 ± 7
Malic enzyme (NAD <sup>+</sup> )	217 ± 12	213 ± 18	217 ± 33
Isocitrate dehydrogenase (NADP <sup>+</sup> )	52 ± 4	97 ± 1	89 ± 3
Isocitrate dehydrogenase (NAD <sup>+</sup> )	56 ± 0	22 ± 0	35 ± 2
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	111 ± 2	72 ± 3	62 ± 2
6-Phosphogluconate dehydrogenase	234 ± 1	224 ± 5	214 ± 2

<sup>1</sup> Growth phase (ปริมาณไนโตรเจนเหลือ 50%) <sup>2</sup> ช่วงการสังเคราะห์ไขมันเริ่มต้น <sup>3</sup> ช่วงสุดท้ายของการสังเคราะห์ไขมัน

จากการคำนวณ flux จากกิจกรรมเอนไซม์ NADP<sup>+</sup>-ICDH พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ไม่เพียงพอต่อการสร้าง NADPH สำหรับการสังเคราะห์กรดไขมัน ดังนั้นจึงต้องการกิจกรรมเอนไซม์จาก ME และ G-6-PDH ในการสร้างด้วย โดยเฉพาะ ME ซึ่งมีปริมาณกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดและพบมากในเชื้อจำพวก oleaginous species แต่เนื่องจากกิจกรรมเอนไซม์ใน HMP pathway ยังมีอยู่จำนวนหนึ่งดังนั้นคาร์บอนจึงไหลผ่าน pathway นี้ รวมถึง ICDH เนื่องจากมีอ้างอิงว่า aconitase กระจายอยู่ที่ทั้ง cytosol และ ไมโทคอนเดรีย ดังนั้นโมเดลได้มีการรวมทั้ง ICDH และ HMP pathway ที่เหลือคำนวณจาก ME โดยการยึดปริมาณการไหลผ่านเข้า HMP pathway ก่อน และตามด้วย ICDH และจากการคำนวณพบว่า P/O ratio เท่ากับ 1.6 ซึ่งคำนวณโดยรวมปริมาณ ATP สำหรับ maintenance แล้ว พบว่าค่าที่ได้อยู่ในช่วงปกติที่พบในเชื้อยีสต์ ดังนั้นโมเดลนี้จึงถูกใช้อธิบายการไหลผ่านของคาร์บอนได้



ภาพที่ 16 อัตราการไหลผ่าน (mmol/gFFB/h) ของเชื้อ *Thraustochytrium* sp. B01 โตใน mineral medium ที่อุณหภูมิ 25 °C



## สรุปผล อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

## 1. สรุปผลการวิจัย

การโตของเชื้อ *thraustochytrid* มีความเป็นไปได้ในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีความยาวปานกลาง สำหรับการผลิตไบโอดีเซล และกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่ในโมเลกุลตั้งแต่ 2 อันขึ้นไป ได้แก่ กรดอะราคิโดนิก, กรดอีโคซะเพนตะอีโนอิก, กรดโดโคซาเพนซาอีโนอิก และ กรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิก สำหรับการใช้ในทางโภชนเภสัช ในการวิจัยนี้ได้เสนอเชื้อ *thraustochytrid* สายพันธุ์ใหม่โดยยึดหลักด้วยลำดับเบส 18S rRNA โดยพบว่าเป็นเชื้อที่ใกล้เคียงและอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *Thraustochytrium* sp. และยังคงศึกษาสรีรวิทยาการโตและการสะสมไขมันของเชื้อโดยศึกษาพีเอชเริ่มต้น, ความเข้มข้นของน้ำทะเล, ความเข้มข้นของกลูโคส และอุณหภูมิ พบว่าเชื้อโตได้ดีในสภาวะที่เหมาะสม และมีผลผลิตกรดไขมัน 0.35 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ mineral medium ในขวดทดลองชนิดที่มีแผ่นกั้น (baffled shake flask) ซึ่งพบว่ามีเป็นไปได้ในการผลิตในระดับใหญ่ต่อไป เมื่อลดอุณหภูมิพบว่าการสร้างกรดไขมันเพิ่มขึ้นแต่พบว่าอัตราการผลิตน้อยลง การศึกษากิจกรรมเอนไซม์ได้ดำเนินการวัดและพบว่าการกระจายตัวของเอนไซม์ไม่เหมือนกับที่มีรายงานในเชื้อราที่ผลิตไขมัน แต่คล้ายกับเชื้อสายพันธุ์ *Rhodospiridium toruloides* และยังคงศึกษาอัตราการไหลผ่านโดยใช้โมเดลจากเชื้อ *Aurantiochytrium* sp. และใช้ข้อมูลจากกิจกรรมเอนไซม์พบว่าในสภาวะเหมาะสมมีอัตราการไหลผ่าน HMP pathway น้อยทำให้มีปริมาณ NADPH ไม่เพียงพอต่อความต้องการใช้ในการผลิตกรดไขมัน ดังนั้นเชื้อจึงใช้เอนไซม์ malic และ isocitrate dehydrogenase ในการช่วยสร้าง NADPH ให้เพียงพอ

## 2. การอภิปรายผล

จากผลการวิจัยพบว่าเชื้อสายพันธุ์ *Thraustochytrium* sp. A01 สามารถโตได้ใน mineral medium ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาถูกกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ yeast extract และ peptone ดังนั้นเชื่อว่าเชื้อสายพันธุ์นี้สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดในการผลิตในโรงงานอุตสาหกรรมได้ดี อีกทั้งมีอัตราการผลิตที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานก่อนหน้า อีกทั้งมีข้อดีเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *Aurantiochytrium* เนื่องจากเชื้อสายพันธุ์นี้สามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิด กรดอะราคิโดนิก และ กรดอีโคซะเพนตะอีโนอิก ได้ซึ่งสามารถนำไปผลิตเป็นยาและอาหารเสริมต่อไปได้ (nutraceuticals) ในอุตสาหกรรม อีกทั้งเชื้อไม่มีความจำเป็นต้องลดอุณหภูมิเกิน 10 องศาเซลเซียส เพียงแค่ 5 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถผลิตกรดไขมันได้เพิ่มขึ้นในกรณีที่อุตสาหกรรมต้องการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัว ซึ่งสามารถลด

ต้นทุนในการผลิตในอุตสาหกรรมได้ และสามารถเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องได้ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมซึ่งใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตไบโอดีเซลเนื่องด้วยเชื้อมีอัตราการผลิตสูงสุด และจากการศึกษาκιกรรมเอนไซม์และอัตราการไหลผ่านพบว่าเชื้อใช้เอนไซม์ glucose-6-phosphate น้อยและใช้ malic enzyme รวมถึง isocitrate dehydrogenase เป็นส่วนที่ผลิต NADPH ที่ใช้ในการสังเคราะห์กรดไขมัน ดังนั้นจึงเป็นเอนไซม์ที่อาจใช้ในการตัดแต่งพันธุกรรมต่อไปให้มีลักษณะดังกล่าวเพื่อลดปริมาณคาร์บอนที่สูญเสียไปใน HMP pathway และเพิ่มการผลิต NADPH ด้วย isocitrate dehydrogenase ซึ่งช่วยให้เชื้อสามารถลดการสูญเสียพลังงานในรูปแบบ ATP หลังจากกระบวนการผลิต NADPH ของ malic enzyme ดังนั้นโมเดลนี้อาจสามารถนำไปใช้ในการตัดแปรสารพันธุกรรมโดยการเพิ่ม isocitrate dehydrogenase ใน cytosolic compartment ต่อไปได้ และอาจนำไปใช้ในการพัฒนาเชื้อยีสต์ที่มีกระบวนการสังเคราะห์ไขมันแบบเดียวกันนี้ต่อไป เนื่องจากเชื้อยีสต์มีอัตราการโตเร็วกว่าเชื้อ *Thraustochytrium* sp. A01 แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ isocitrate dehydrogenase ในเชื้อสายพันธุ์นี้ก็มีความน่าสนใจ เพราะว่ามีกลไกการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิมตัวอยู่แล้วด้วย PKS system

### 3. ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องการเปลี่ยนแปลงการผลิตไขมันโดยใช้แสง UV เพื่อให้สร้างไขมันที่สูงขึ้นหรือเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของไขมันโดยหลีกเลี่ยงการใช้การตัดแต่งพันธุกรรม อีกทั้งควรมีการศึกษาในการเลี้ยงแบบ fed-batch เพื่อให้มีอัตราการผลิตที่สูงขึ้นต่อไป





## บรรณานุกรม

- Arafiles, K.H.V., Alcantara, J.C.O., Cordero, P.R.F., Batoon, J.A.L., Galura, F.S., Leaño, E.M. and Dedeles, G.R. (2010). Cultural optimization of *Thraustochytrids* for biomass and fatty Acid production. *Mycosphere*. Vol. 2. pp. 521–531
- Armenta RE, Valentine MC (2012) Single-cell oils as a source of omega-3 fatty acids: an overview of recent advances. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 16 pages,
- Cao Y, Cao Y & Zhao M (2012) Biotechnological production of eicosapentaenoic acid: From a metabolic engineering point of view. *Process Biochemistry*. 47:1320–1326
- Dick MW (2001) *Straminipilous fungi*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands, pp 670.
- Kim Jye Lee Chang & Carol Mancuso Nichols & Susan I. Blackburn & Graeme A. Dunstan & Anthony Koutoulis & Peter D. Nichols (2014) Comparison of *Thraustochytrids* *Aurantiochytrium* sp., *Schizochytrium* sp., *Thraustochytrium* sp., and *Ulkenia* sp. for Production of Biodiesel, Long-Chain Omega-3 Oils, and Exopolysaccharide. *Mar Biotechnol*. 16:396–411
- Dunbar, B.S., Bosire, R.V. and Deckelbaum, R.J. (2014). Omega 3 and omega 6 fatty acids in human and animal health: An African perspective. *Molecular and Cellular Endocrinology*. Vol. 398. pp. 69-77
- Fan, K.W., Jiang, Y., Ho, L.T. and Chen, F. (2009). Differentiation in fatty acid profiles of pigmented and nonpigmented *Aurantiochytrium* isolated from Hong Kong mangroves. Vol. 57. pp. 6334–6341
- Fraeye, I., Bruneel, C., Lemahieu, C., Buyse, J., Muylaert, K. and Foubert, I. (2012). Dietary enrichment of eggs with omega-3 fatty acids. *Food Research International*. Vol. 48. pp. 961–969
- Grzebyk, D., Sako, Y. and Berland, B. (1998). Phylogenetic analysis of nine species of *Prorocentrum* (Dinophyceae) inferred from 18S ribosomal DNA sequences, morphological comparisons, and description of *Prorocentrum panamensis*, sp. nov. *Journal of Phycology*. Vol. 34. pp. 1055-1068
- Maki, K.C., Mauro, K.Y., Dicklin, M.R., Schild, A.L. and Geohas, J.G. (2014). A new, microalgal DHA- and EPA-containing oil lowers triacylglycerols in adults with mild-to-

- moderate hypertriglyceridemia. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. Vol. 91. pp. 141–148
- Perveen, Z., Ando, H., Ueno, A., Ito, Y., Yamamoto, Y., Yamada, Y., Takagi, T., Kaneko, T., Kogame, K. and Okuyama, H. (2006). Isolation and characterization of a novel thraustochytrid-like microorganisms that efficiently produces docosahexaenoic acid. *Biotechnology Letters*. Vol. 28. pp. 197–202
- Porter D (1990) Phylum Labyrinthulomycota. In: Margulis L, Corliss JO (eds) *Handbook of protocista: the structure, cultivation, habitats, and life histories of the eukaryotic microorganisms and their descendants exclusive of animals, plants, and fungi: a guide to the algae, ciliates, foraminifera, sporozoa, water molds, slime molds, and the other protocists*. Jones and Bartlett Publishers, Boston, MA, USA, pp 388 – 398.
- Rossi, R., Pastorelli, G., Cannata, S. and CorinoRecent, C. (2010). Advances in the use of fatty acids as supplements in pig diets. *Animal Feed Science and Technology*. Vol. 162. pp. 1-11
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. Vol. 30. pp. 2725-2729
- Unagul, P., Assantachai, C., Phadungruenlujij, S., Pongsuteeragul, T., Suphantharika, M. and Verduyn, C. (2005). Properties of the docosahexaenoic acid-producer *Schizochytrium mangrovei* SK2: effects of glucose, temperature and salinity and their interaction. *Botanica Marina*. Vol. 48. pp. 387-394
- Yang, H.L., Lu, C.K., Chen, S.F., Chen, Y.M. and Chen, Y.M. (2010). Isolation and characterization of Taiwanese heterotrophic microalgae: screening of strains for docosahexaenoic acid (DHA) production. *Marine Biotechnology*. Vol. 12. pp. 173-185
- Yokoyama R, Salleh B, Honda D (2007a) Taxonomic rearrangement of the genus *Ulkenia* sensu lato based on morphology, chemotaxonomical characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): emendation for *Ulkenia* and erection of *Botryochytrium*, *parietichytrium*, and *Sicyoidochytrium* gen. nov. *Mycoscience* 48:329 – 341.
- Yokoyama R, Honda D (2007b) Taxonomic rearrangement of the genus *Schizochytrium* sensu lato based on morphology, chemotaxonomic characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): emendation for *Schizochytrium*

and erection of *Aurantiochytrium* and *Oblongichytrium* gen. nov. *Mycoscience* 48:199 – 211.





ภาคผนวก

ลำดับเบส 18s rRNA ของเชื้อ *Thraustochytrium* sp. B01

CTGCGAACGGCTCATTATATCAGTAATAATTTCTTCGGTAGTTTCTTTTATATGGATACCTGCAGTA  
ATTCTGGAAATAATACATGCTGTAAGAGCCCTGTATGGGGCTGCACTTATTAGATTGAAGCCGATTT  
TATTGGTGAATCATGATAATTGAGCAGATTGACTTTTTTGGTCGATGAATCGTTTTGAGTTTCTGCC  
CATCAGTTGTCCACGGTAGTGTATTGGACTACGGGGACTATAACGGGGGACGGAAAGTTAGGGCTC  
GACTCCGGAAAGGGAGCCTGAAAAACGGCTACCATATCCTTTAGAAACAATACATGCTTGGAGGCC  
TGACGGCGTTTTCACTGAATTGCTGCATTTATTTGATGTTAGGACCAATACCTTTCGGGGTGATTCC  
GGTGATTAGAGTAATACTATGCGAACCGCAGTGGCTTTTTGGTCGGCGGTGACTTTTTGAGGTTCTGCC  
CTATCAGGCTTTGCAACCGGTATTGTCCTTTGCAACCGGTCACGGGTGACGGAGAATCAGGGTTCCG  
ATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTA  
CTATGCCAACGCGGCGAAGTAGTGACGATTAATAGGACTGGGTAGCGCTTTGCGTTATCTTTGTCCA  
ATGAGAGCAATGTAAGAGCCTCATCGAGGATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCCTTC  
GGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTACACTTAAGTTGTTGCAGTTATTAAGCTCGTAGTCTAATGTATG  
GGAGTTGCAAAGTGGGTGCTTGGGTTGGTTTTGCCGACTTTGCAATACTCGCTCCGCTTATTTGCTT  
GAAAAGCTCTCTTTTATAGAAGGCAAATGTTTCACTGTAAGTAAAATCACTCCCTCAACAGCAAGGT  
TATCTTGATATGAATTAGTATGGGATGATGAGATAGGCTCGGTCCGTATGGTGTTGGTTTTAGTGTT  
CTGAGAATGATGAAGAGGGACAATTGGGGGTATTTCGTATTTACATGTCAGAGGTGGAATTCCTGGAT  
TTTGAAAAGACGAACATAATGCGAAAGCATCTACCAAAGATGTTATCATTGATCAAGAACGAGGGATT  
TGGGGATCGAAGATGATTAGATATCATCGTAGTCTAAACCATAAACTATGCCGACTTGCGATTGTTT  
TGTGTCATTTAATGAGCAGAACAACAATTTTTCAAAAAGCTTGGGGTAACGGGGGAAGAAGGGC  
CCAAAGCCGAAACTAAAAGAAATGACGAAAGGCACAACAAGCCGGAACCCGCGCCTAAATTGATGT  
TAAACGGAAAACTAACAAGGCCATTTAAAAGAAAGAAATGAAAAAATGAAAACCTTTCTGAATCC  
AAGGGGGGGGGGCAAGGCCCGTCTTAAGTGGGGGAACCAATTGGTCGGGTAAATCCCGTAAACAA  
ACAAAACAAACCCAAACAACCAAGGGGGGCTAAGGCCAAAAAGGGAATGCCTCTTAAAAGGAAAA  
TTCCGGTTTAACCGAAAGAAAGTTGGGGCATTAAAAAGGCTGGGAAGCCCCTAAAACAAACGATCC  
CTCGCCCCACTATATAGCGCGGGATAGGAAAACATAGTACGCCTTAACCTTTTAAAGGAACTTTCCG  
GTTTTCCGGGCGAAAATTT



ประวัติผู้วิจัย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

## ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ สกุล ดร. มนต์รี ฉายสว่าง

2. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ ประจำ คณะ ศิลปะศาสตร์ สาขาวิชา ศึกษาทั่วไป (วิทยาศาสตร์)

3. หน่วยงานที่สามารถติดต่อได้

คณะศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์

86 ถนน ตรีเพชร เขต พระนคร กรุงเทพฯ 10200

Tel: 02-623-8790-5 to 6501-6503, Fax: 02-623-8790-5 to 6502

e-mail: [Montri.Cha@rmutr.ac.th](mailto:Montri.Cha@rmutr.ac.th), [montri.chaisawang@yahoo.com](mailto:montri.chaisawang@yahoo.com)

4. ประวัติการศึกษา

ปริญญาเอก มหาวิทยาลัยมหิดล หลักสูตร ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ,  
2555

ปริญญาโท มหาวิทยาลัยมหิดล หลักสูตร วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ,  
2547

ปริญญาตรี มหาวิทยาลัยบูรพา หลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา ชีวเคมี, 2545

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ นอกเหนือจากการศึกษา

-

6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

-

