

การผลิตกรดไขมันโอเมก้า-3 และการย่อยสลายในกระเพาะ หมักของ Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* ที่มียีน

Fatty Acid Desaturase 2 (*FAD2*)

Omega-3 Fatty Acids Production and Ruminant Degradability of Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Harboring Fatty Acid Desaturase 2 Gene (*FAD2*)

โสภารักษ์ เขมราช^{1/} ศุภมิตร เมฆฉาย^{1/} และ เสาวลักษณ์ แย้มหมื่นอาจ^{1/*}
Soparak Khemarach^{1/}, Supamit Mekchay^{1/} and Saowaluck Yammeun-ar^{1/*}

(Received: 30 December 2014; Accepted: 18 May 2015)

Abstract: The objective of this study were produce recombinant *Saccharomyces cerevisiae* harboring fatty acid desaturase 2 gene (*FAD2*) isolated from *Saccharomyces kluyveri*, then evaluated omega-3 of recombinant *S. cerevisiae* and ruminal degradability of roughage supplemented with recombinant *S. cerevisiae*. Total DNA extracted from *S. kluyveri* was used for PCR amplification using *FAD2* gene primer. PCR products was cloned using plasmid vector pTA2 and transformed with *S. cerevisiae*. The fatty acids were analyses by gas chromatography. The ruminal degradability by *in vitro* gas production technique was designed as 3x3 factorial in completely randomized design (CRD) arrangement of 9 treatments. The factors were type of roughage (guinea grass silage: GN), rice straw: RS and napier grass silage: NP), and yeast supplementation (control: C, *S. cerevisiae* :SC and recombinant *S. cerevisiae* harboring *FAD2* gene from *S. kluyveri*: SCSK). The rumen fluid was collected from four fistulated Thai native cattles. Gas production were determined at 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72 and 96 h of incubation while the microbial biomass yield (MBY) were determined at 24 h of incubation. The results found that the Linoleic acid (C18:2, LA), Alpha-linolenic acid (C18:3, ALA) and Eicosapentaenoic acid (C20:5, EPA) content of recombinant *S. cerevisiae* higher than *S. cerevisiae* ($P<0.05$). Gas production at 2-12 hours of napier grass silage was significantly highest. Gas production at 24 and 48 hours of roughage supplemented with SCSK was significantly highest. It can be concluded that recombinant *S. cerevisiae* produced LA, ALA and EPA higher than *S. cerevisiae*. The roughage supplemented with recombinant *S. cerevisiae* have highest OMD and SCFA.

Keywords: Omega-3 fatty acid, *S. cerevisiae*, *S. kluyveri*, fatty acid desaturase 2 (*FAD2*), ruminal degradability

^{1/} ภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200

^{1/} Department of Animal and Aquatic Science, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200

* Corresponding author: E-mail address: saowaluck.y@cmu.ac.th

บทคัดย่อ: วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้ เพื่อผลิต recombinant *Saccharomyce cerevisiae* ที่มีชิ้นส่วนของยีนที่ถูกคัดแยกมาจาก *Saccharomyce kluyveri* และประเมินปริมาณกรดไขมันโอเมก้า-3 จาก recombinant *S. cerevisiae* รวมทั้งประเมินค่าการย่อยสลายในกระเพาะหมักของอาหารหยาบที่ได้รับการเสริม recombinant *S. cerevisiae* DNA ที่สกัด จาก *S. kluyveri* นำไปทำปฏิกิริยา PCR amplification โดยใช้ fatty acid desaturase 2 primer (FAD2) ผลผลิต PCR นำไปโคลนโดย pTA2 พลาสมิดเวกเตอร์ แล้วนำเข้าไปยัง *S. cerevisiae* หลังจากนั้นวิเคราะห์กรดไขมันโดยใช้ Gas chromatography และหาค่าการย่อยสลายในกระเพาะหมักโดยวิธี *in vitro* gas production technique มีการจัดกลุ่มทดลองด้วยวิธี 3x3 factorial ในแผนการทดลองแบบสุ่มโดยตลอด (CRD) ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ปัจจัยที่ 1 คือ ชนิดของอาหารหยาบ ประกอบด้วย หญ้าเนเปียร์หมัก หญ้ากินนีหมัก และ ฟางข้าว ปัจจัยที่ 2 คือ การเสริมยีสต์ ประกอบด้วย กลุ่มควบคุม (C), กลุ่มที่เสริม *S. cerevisiae* (SC) และกลุ่มที่เสริม recombinant *S. cerevisiae* ที่มียีน FAD2 จาก *S. kluyveri* (SCSK) ประกอบด้วย 9 กลุ่มทดลอง ทำการเก็บน้ำจากกระเพาะหมักจากโคพื้นเมืองจำนวน 4 ตัว ทำการวัดปริมาณแก๊สที่ 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง และวัดปริมาณจุลินทรีย์ (microbial biomass yield, MBY) หลังจากการหมักย่อยที่ 24 ชั่วโมง จากการวิเคราะห์กรดไขมัน พบว่า กรดไขมัน Linoleic acid (C18:2, LA), Alpha-linolenic acid (C18:3, ALA) และ Eicosapentaenoic acid (C20:5, EPA) ของ recombinant *S. cerevisiae* มีปริมาณมากกว่า *S. cerevisiae* อย่างมีนัยสำคัญ สำหรับปริมาณแก๊สสุทธิที่เกิดขึ้นในชั่วโมงที่ 2-12 ของหญ้าเนเปียร์หมักมีค่าสูงที่สุด ปริมาณแก๊สสุทธิที่ 24 ของอาหารหยาบที่เสริมด้วย recombinant *S. cerevisiae* จะมีปริมาณแก๊สสุทธิสูงที่สุด สรุปได้ว่า recombinant *S. cerevisiae* สามารถผลิต LA, ALA และ EPA ได้มากกว่า *S. cerevisiae* อาหารหยาบที่เสริมด้วย recombinant *S. cerevisiae* จะมีปริมาณ OMD และ SCFA สูงที่สุด

คำสำคัญ: กรดไขมันโอเมก้า-3 *S. cerevisiae* *S. Kluyveri* fatty acid desaturase 2 (FAD2) การย่อยสลายในกระเพาะหมัก

คำนำ

กรดไขมันไม่อิ่มตัวโอเมก้า-3 (Omega - 3; ω - 3 PUFAs) เช่น eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5) และ docosahexaenoic acid (22:6 ω -3; DHA) มีความสำคัญช่วยลดอาการของโรคหัวใจ โรคหอบหืด โรคเบาหวาน และโรคเส้นเลือดตีบให้ต่ำลง ทั้งยังพบอีกว่า กรดไขมันโอเมก้า-3 มีส่วนเกี่ยวข้องกับการพัฒนาสมอง โรคมะเร็ง โรคกล้ามเนื้ออักเสบ โรคข้ออักเสบรูมาตอย โรค สะเก็ดเงิน และโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท (Simopoulos, 2010) มนุษย์และสัตว์ไม่สามารถที่จะสังเคราะห์กรดไขมันโอเมก้า-3 ได้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องได้รับจากอาหาร แหล่งของ EPA และ DHA ซึ่งส่วนใหญ่จะมาจากแหล่งที่เป็นธรรมชาติ เช่น ปลา ทะเลและสาหร่ายทะเล นอกจากนี้ยังมีจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถผลิต EPA และ DHA เช่น *Saccharomyces kluyveri* (Kajiwara *et al.*, 2001) แต่จุลินทรีย์ดังกล่าวมี

ข้อจำกัดในด้านการเพาะเลี้ยง เนื่องจากควบคุมสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตได้ยาก อีกทั้งจุลินทรีย์ดังกล่าวมีอัตราการเติบโตต่ำ ในปัจจุบันจึงได้มีการทดลองคัดแยกยีน fatty acid desaturase 2 (FAD2) ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดไขมันโอเมก้า-3 ได้แก่ desaturase มาใส่ในจุลินทรีย์อื่นที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่า เช่น *S. cerevisiae* ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพและสะดวกต่อการใช้งาน (Chemler *et al.*, 2006: Watanabe *et al.*, 2004) นอกจากนี้ *S. cerevisiae* สามารถใช้เป็นสารเสริมในอาหารของโคนมได้ เนื่องจากยีสต์จะสามารถเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเซลล์ในกระเพาะและระบบทางเดินอาหารของสัตว์และใช้อาหารพวกคาร์โบไฮเดรตและเยื่อใย (fiber) ซึ่งสัตว์สามารถย่อยและใช้ประโยชน์ได้ รวมทั้งตัวเซลล์ยีสต์ที่เพิ่มขึ้นเมื่อถูกย่อยสลายจะได้สารอาหารโปรตีนเพิ่มขึ้นด้วย ยีสต์ชนิดนี้จะประกอบด้วยเอนไซม์จำนวนมากบางส่วนถูกขับออกมาในลำไส้และ

ช่วยเสริมเอนไซม์ที่มีอยู่แล้วในทางเดินอาหารจึงช่วยให้เพิ่มอัตราการย่อยได้ดีขึ้น (Denev *et al.*, 2007) ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ คือเพื่อคัดแยกยีน FAD2 จาก *S. kluyveri* แล้วนำไปตัดต่อให้กับ *S. cerevisiae* และประเมินองค์ประกอบของกรดไขมันโอเมก้า-3 ของ recombinant *S. cerevisiae* ที่มียีน FAD2 และประเมินค่าการย่อยสลายในกระเพาะหมักของอาหารหมักที่ได้รับการเสริม recombinant *S. cerevisiae* ที่มียีน FAD2 โดยวิธี *in vitro* gas production technique

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

นำเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* และ *S. kluyveri* จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย โดยจะนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย โดยยีสต์จะถูกเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast extract/Peptone/Dextrose (YPD) pH 7.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (°C) ระยะเวลาในการบ่ม 48-72 ชั่วโมง

2. การสกัดดีเอ็นเอและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR)

นำเชื้อยีสต์ *S. kluyveri* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัด DNA สำเร็จรูป NucleoSpin[®] tissue (Macherey-nagel gmbh & co. Kg, Germany) จากนั้นทำการตรวจวัดคุณภาพและวัดปริมาณของ DNA ที่ช่วงความยาวคลื่นแสง 260 nm และ 280 nm โดยความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ สารละลาย DNA (100 ng/μl) ของจุลินทรีย์ ถูกใช้เป็น DNA ต้นแบบ (template) ในปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน FAD2 (forward primer 5'-GAGGAATTCACAGGCAGCATGGGAAGGGA-3', reverse primer 5'-GACTGCGGCCGCTCTGCTGCTT CATTGTGGAG-3') โดยโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิของปฏิกิริยา PCR คือ 95 °C 3 นาที/ 95 °C 30 วินาที/ 54-58 °C 30 วินาที จำนวน 35 รอบ/ 72 °C 3 นาที/ 72 °C 5 นาที แล้วจึงตรวจสอบผลผลิต PCR บน

polyacrylamide gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น 6% และส่องภายใต้แสง ultraviolet

3. การโคลนยีน

แถบดีเอ็นเอของยีนแต่ละยีนถูกนำมาเชื่อมต่อกับเข้ากับเวกเตอร์ pTA 2 vector (TOYOBO CO., LTD., Japan) หลังจากที่ได้ recombinant vector แล้วนำไปใส่ใน *S. cerevisiae* (transformation) ด้วยวิธี heat shock หลังจากนั้นเติม YPD broth จำนวน 950 μl และนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 25 °C นาน 1 ชั่วโมง นำส่วนผสมแบคทีเรียจำนวน 200 μl ไป spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD Agar ที่ผสม ampicillin, X-Gal และ IPTG จำนวน 20 μl (ความเข้มข้น 10 mg/ml) หลังจากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C ซ้ำมคืน เลือกลโคไลที่มีสีขาว ลงใน 1X PCR buffer จำนวน 40 μl และ YPD broth จำนวน 500 μl ซึ่งที่มี ampicillin 10 mg/ml แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงตรวจสอบโคลนที่มีชิ้นส่วนของยีน FAD2 ซึ่งถูกเชื่อมเข้ากับ vector ด้วยปฏิกิริยา PCR บน polyacrylamide gel electrophoresis ที่มีความเข้มข้น 6% ภายใต้แสง ultraviolet

4. การวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมัน (fatty acids analysis)

การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่ การสกัดไขมันโดยวิธี saponify ด้วย 0.5 M KOH ในเอทานอล โดยนำเซลล์ตะกอนแห้งของเซลล์มา 0.05 g : น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร (ml) มาเติม 0.5 M KOH ในเอทานอล 80% 4 ml ปิดจุกให้แน่น แล้วต้มด้วยน้ำเดือด 100 °C เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาทำให้เย็นลง เติมน้ำ HCl 5.0 ml และ isooctane 5.0 ml เขย่าอย่างแรงประมาณ 200-300 ครั้ง จากนั้นเก็บส่วนใสชั้นบนไว้ (จักรวารวรรณ, 2530) การเตรียม fatty acid methyl ester (FAME) ระบุส่วนใสที่ได้ จนได้น้ำหนัก 0.5 กรัม ในขวดก้นกลม ขนาด 250 ml เติมสารละลาย 0.5 M NaOH ใน methanol 5 ml แล้วจึง reflux ที่อุณหภูมิ 110-120 °C 5 นาที จนได้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ทิ้งให้เย็น จากนั้นเติม 20% boron-trifluoride ใน methanol แล้ว

reflux ต่อ 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เทสารละลายที่ได้ลงในหลอดทดลองขนาด 50 ml เติม hexane ลงไป 5 ml และเกลี่ยอิมตัวลงไป 10 ml เขย่าให้เข้ากันและทิ้งไว้ให้แยกชั้น (Morrison and Smith, 1964) เก็บสารละลายชั้นบนมา 1 µl ฉีดเข้าเครื่อง Gas Chromatography (GC) (SCION 436-GC, Bruker, Germany)

5. การหาค่าการย่อยสลายในกระเพาะหมักโดยวิธี *in vitro* gas production technique

จัดกลุ่มทดลองด้วยวิธี 3x3 factorial ในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ปัจจัยที่ 1 คือ ชนิดของอาหารหยาบ ประกอบด้วย หญ้าเนเปียร์หมัก หญ้ากินนีหมัก และ ฟางข้าว ปัจจัยที่ 2 คือ การเสริมยีสต์ ประกอบด้วย กลุ่มควบคุม คือ ไม่เสริมยีสต์ (C), กลุ่มที่เสริม *S. cerevisiae* (SC) และกลุ่มเสริม recombinant *S. cerevisiae* ที่มียีน *FAD2* จาก *S. kluyveri* (SCSK) ประกอบด้วย 9 กลุ่มทดลอง

เก็บของเหลวจากกระเพาะหมักของโคพื้นเมืองที่ได้รับการผ่าตัดใส่ท่อเก็บตัวอย่างที่กระเพาะหมัก (rumen fistula) จำนวน 4 ตัว น้ำหนักเฉลี่ย 218 ± 28 กิโลกรัม ที่ได้รับอาหารข้นวันละ 1 กิโลกรัม และอาหารหยาบเป็นเปลือกขังข้าวโพดให้กินแบบเต็มที่ โดยทำการเก็บของเหลวจากกระเพาะหมักก่อนให้อาหารเช้าแล้วผสมกับสารละลาย liquor buffer จำนวน 30 มิลลิลิตรต่อ 1 หลอด โดยมีส่วนผสมของ น้ำกลั่น 14 ml, Buffer solution 10 ml, Macro mineral solution 5 ml, Resazurin solution (0.1% (w/v)) 0.025 ml, Micro mineral solution 0.0025 ml, Reduction solution 1 ml และ Rumen fluid 10 ml. ลงในหลอดที่มีเชื้อตัวอย่างจุลินทรีย์ และตัวอย่างพืชอาหารสัตว์ ที่บดผ่านตะแกรง 1 มิลลิเมตร ประมาณ 200 มิลลิกรัม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 39 °C อ่านค่าแก๊สที่เวลา 2,4, 6,8,10,12, 24, 48,72 และ 96 ชั่วโมงแล้วจึงนำมาคำนวณค่าแก๊สสุทธิ, ค่าพลังงานเมตาบอลิซึม (ME), การย่อยสลายของอินทรีย์วัตถุ (OMD) ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ (SCFA) ตามวิธีของ Blümmel and Ørskov (1993) จากสูตร

$$GP_i \text{ (ml/200 mg DM)} = \frac{(V_i - V_0 - GP_0) \times 200 \times (F_h + F_c) / 2}{W}$$

$$\text{Metabolizable energy: (ME, MJ/Kg DM)} = 2.20 + 0.136G_v + 0.057CP + 0.0029CF$$

$$\text{Organic matter digestibility: (OMD \%)} = 14.88 + 0.88G_v + 0.45CP + 0.651XA$$

$$\text{Short chain fatty acid (SCFA, mol)} = 0.0239G_v - 0.0601$$

จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ที่เกิดจากการหมัก (microbial biomass yield; MBY) โดยทำการบ่มตัวอย่างพืชอาหารสัตว์ที่ 24 ชั่วโมง แล้วนำตัวอย่างที่เหลือจากการบ่มไปหักออกจากตัวอย่างเริ่มต้น จะได้ค่าปริมาณอาหารที่ย่อยสลายปรากฏ (apparent degradable substrate) จากนั้นนำส่วนที่ไม่ย่อยสลาย (apparent undegradable substrate) มาต้มกับ neutral detergent solution ส่วนที่เหลือจะเป็นโภชนะที่ไม่ถูกย่อยสลายอย่างแท้จริง (true undegradable substrate) เมื่อนำค่าที่ได้หักออกจากตัวอย่างเริ่มต้นจะได้ค่า True degraded substrate คำนวณค่า Microbial biomass yield ตามวิธีของ Blümmel *et al.* (1997) จากสูตร

$$\text{Microbial biomass yield (mg)} = \frac{\text{True degraded substrate} - \text{Apparent degradable substrate}}{\text{substrate}}$$

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลกรดไขมันจะนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) และข้อมูลการย่อยสลายในกระเพาะหมักทั้งหมดมาวิเคราะห์ความแปรปรวน ตามแผนการทดลองแบบ 3x3 factorial ในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ มีกลุ่มทดลองทั้งหมด 9 กลุ่มทดลอง และเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range test (Steel and Torrie, 1984)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1 การผลิต recombinant *S. cerevisiae* ที่มียีน FAD2 จาก *S. kluyveri*

ชิ้นส่วน DNA ของยีน FAD2 ถูกนำไปเชื่อมต่อกับกับเวกเตอร์ pTA2 และถูกนำไปทรานส์ฟอร์มเข้ากับ *S. cerevisiae* ด้วยวิธี heat shock หลังจากนั้นถูกนำไปโคลนและนำเข้ากับ *S. cerevisiae* ได้สำเร็จ โดยจะแสดงออกเป็นโคโลนีสีขาวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD agar ตรวจสอบโคโลนีเหล่านี้โดย 6% polyacrylamide gel electrophoresis และส่องภายใต้ ultraviolet ด้วยเครื่อง gel documentation (ภาพที่ 1) พบขนาดของแถบดีเอ็นเอของยีน FAD2 ที่ถูกคัดแยกมาจาก *S. kluyveri* 1335 bp

2. กรดไขมันรวมของ recombinant *S. cerevisiae* ที่มียีน FAD2 ที่คัดแยกจากจุลินทรีย์

การประเมินกรดไขมันด้วยเครื่อง Gas Chromatography ของ *S. cerevisiae* และ recombinant *S. cerevisiae* แสดงในภาพที่ 2 พบว่าเส้นกราฟของ recombinant *S. cerevisiae* ปรากฏจุดที่ตำแหน่งของกรดไขมัน C20:5 (EPA) มีที่ retention time 56.57 min (ภาพที่ 2B) แต่ใน *S. cerevisiae* ไม่แสดงจุดในตำแหน่งดังกล่าว (ภาพที่ 2A) ในขณะที่ตำแหน่งของกรดไขมัน Elaidic acid (C18:1t, EA) และกรดไขมัน ALA ก็ปรากฏในเส้นกราฟของ recombinant *S. cerevisiae* ในระดับต่ำ

แต่ตำแหน่งของกรดไขมัน LA ปรากฏเส้นกราฟของตำแหน่งดังกล่าวสูงที่ retention time 47.37 min. (ภาพที่ 2B)

ปริมาณกรดไขมัน LA ของ SCSK มีปริมาณมากกว่า SC อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P=0.002$) (33.80 เทียบกับ 0.52% of total fatty acid) ในขณะที่ปริมาณกรดไขมัน ALA ของ SCSK ก็มีปริมาณมากกว่า SC อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.001$) (2.66 เทียบกับ 0% of total fatty acid) นอกจากนี้แล้ว ปริมาณของกรดไขมัน EPA ของ SCSK มีปริมาณมากกว่า SC อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P=0.012$) (4.31 เทียบกับ 0% of total fatty acid) (ตารางที่ 1) จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า ยีน FAD2 ที่คัดแยกจาก *S. kluyveri* ถูกนำไปเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ได้และนำเข้าไปในยัง *S. cerevisiae* ได้สำเร็จ และ Recombinant *S. cerevisiae* สามารถผลิต LA, ALA และ EPA ได้มากกว่า *S. cerevisiae* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาที่มีการที่คัดแยกยีน FAD2 จาก *Kluyveromyces lactis* ที่สามารถผลิตเอนไซม์ $\Delta 12$ fatty acid desaturase นำเข้าไปยัง *S. cerevisiae* พบว่าสามารถเปลี่ยน C18:1t ไปเป็น LA ได้โดยที่ยีน FAD2 เป็นยีนที่สามารถควบคุมเอนไซม์ $\Delta 12$ fatty acid desaturase (Kainou *et al.*, 2006) ทั้งยังเปลี่ยน ALA เป็น EPA โดย $\Delta 6$ -desaturase และ $\Delta 5$ -desaturase (Gregory *et al.*, 2011)



Figure 1 PCR production of recombinant *S. cerevisiae* harboring FAD2 gene from *S. kluyveri* (SCSK)

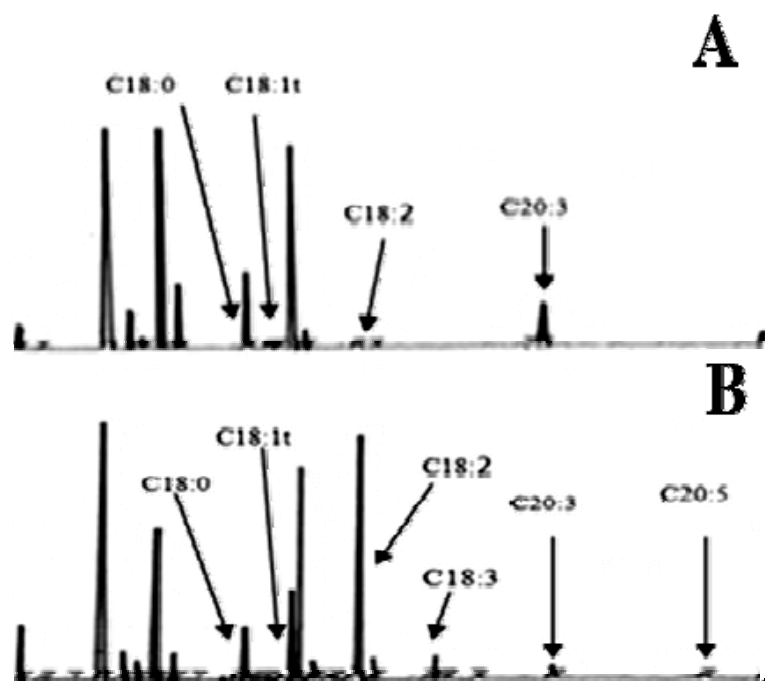


Figure 2 Gas chromatogram of total fatty acid. (A) Gas chromatogram of fatty acid in *S. cerevisiae* (SC)
(B) Gas chromatogram of fatty acid in *S. cerevisiae* harboring *FAD2* gene from *S. kluyveri* (SCSK)

Table 1 Comparison of fatty acid profiles between *S. cerevisiae* (SC) and recombinant *S. cerevisiae* harboring *FAD2* gene from *S. kluyveri* (SCSK)

Fatty acid		% of total fatty acid		SEM	P-value
		SC	SCSK		
Myristic acid	C14:0	7.57	6.67	1.359	0.781
Palmitic acid	C16:0	19.50	18.08	4.394	0.892
Palmitoleic acid (PA)	C16:1	31.32	22.97	7.479	0.633
Stearic acid (PA)	C18:0	4.87	3.79	1.152	0.817
Elaidic acid (EA)	C18:1t	0.52	0.74	0.178	0.413
Oleic acid (OA)	C18:1c	13	6.70	3.949	0.483
Linoleic acid (LA)	C18:2	0.52 ^b	33.80 ^a	7.695	0.002
Gamma Linolenic acid (GLA)	C18:3	0	0.29	0.146	0.374
Alpha-linolenic acid (ALA)	C18:3	0 ^b	2.66 ^a	0.595	<0.001
Eicosapentaenoic acid (EPA)	C20:5	0 ^b	4.31 ^a	1.054	0.012

^{a-b} Means within a row with different superscripts differ ($P < 0.05$)

3. การหาค่าการย่อยสลายในกระเพาะหมักโดยวิธี *in vitro* Gas production technique

จากการศึกษาการย่อยสลายในกระเพาะหมักของอาหารหยาบ สำหรับปัจจัยในการเสริมยีสต์ซึ่งประกอบด้วย กลุ่มควบคุม กลุ่ม SC และกลุ่ม SCSK พบว่าในชั่วโมงที่ 24 และ 48 อาหารหยาบที่เสริม SCSK จะมีปริมาณแก๊สสุทธิสูงที่สุด (ตารางที่ 2) เนื่องจาก *S. kluyveri* จะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำตาลในกรณีที่ไม่มีออกซิเจนมากกว่า *S. cerevisiae* จึงมีประสิทธิภาพในการผลิตพลังงานได้ดีในกระเพาะหมัก (Jean-Luc, 2012)

ในชั่วโมงที่ 48 กลุ่มควบคุมมีปริมาณแก๊สสุทธิที่ต่ำกว่ากลุ่ม SC และกลุ่ม SCSK อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < 0.001$) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการเสริมกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันหมักยีสต์ในแพะลูกผสมพื้นเมือง-แองโกลนูเบียน 50% ที่พบว่า การเสริมกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันหมักยีสต์ในอาหารชั้นที่ระดับ 75% จะมีการย่อยได้ของโภชนะเจลียสูงกว่ากลุ่มอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ (ปิ่นและอัจฉรา, 2557) ทั้งนี้เนื่องมาจากยีสต์ที่เสริมเข้าไปบางส่วนไปกระตุ้นให้บริเวณทิวาในรูเมนให้เหมาะสม และสามารถเพิ่มประชากรในกลุ่มที่ย่อยสลายเยื่อใยได้อย่าง มีนัยสำคัญโดยไปลดระยะเวลาใน

Table 2 Effect of roughage type and yeast supplementation on gas production (ml) and estimate parameter

Item	Roughage*			SEM	Yeast**			SEM	P-value		
	GN	RS	NP		C	SC	SCSK		R	Y	R X Y
Gas production											
2	2.01 ^b	1.94 ^b	5.19 ^a	0.28	2.78	2.96	3.40	0.28	<0.01	0.313	0.582
4	4.16 ^b	2.78 ^b	8.19 ^a	0.50	4.93	4.93	5.27	0.51	<0.01	0.865	0.758
6	5.84 ^b	3.56 ^c	10.07 ^a	0.51	6.58	6.32	6.56	0.47	<0.01	0.918	0.554
8	8.90 ^b	5.24 ^c	12.85 ^a	0.46	9.36	8.71	8.91	0.43	<0.01	0.614	0.033
10	11.98 ^b	7.87 ^c	16.04 ^a	0.61	12.01	11.46	12.41	0.56	<0.01	0.507	0.176
12	14.13 ^b	10.13 ^c	18.45 ^a	0.70	13.69	13.69	15.33	0.70	<0.01	0.207	0.668
24	24.12	23.41	25.35	0.73	22.43 ^b	23.69 ^b	26.76 ^a	0.78	0.207	0.005	0.248
48	37.99 ^a	33.91 ^b	39.56 ^a	0.59	33.38 ^b	33.87 ^a	39.21 ^a	0.79	<0.001	<0.001	0.002
72	48.00	45.62	42.91	2.04	48.80	43.69	44.04	2.16	0.210	0.255	0.972
96	50.54	47.01	45.98	1.88	42.65	46.24	46.65	1.88	0.076	0.084	0.396
Parameter											
ME	6.15 ^a	5.66 ^b	6.36 ^a	0.09	5.92 ^b	5.98 ^b	6.27 ^a	0.90	<0.001	0.030	0.053
OMD	47.51 ^b	47.22 ^b	49.63 ^a	0.42	48.00	47.60	48.75	0.51	0.001	0.179	<0.001
SCFA	0.52 ^b	0.48 ^c	0.56 ^a	0.01	0.48 ^b	0.51 ^b	0.57 ^a	0.01	0.001	0.001	0.011
Microbial biomass											
mg	0.06 ^a	0.04 ^b	0.04 ^b	0.01	0.04	0.04	0.05	0.01	<0.01	0.081	0.036
% of true digested	66.16 ^a	49.79 ^b	50.50 ^b	0.98	55.64	54.71	56.09	0.98	<0.001	0.615	0.003

^{a,b,c} Means within a row with different superscripts differ ($P < 0.05$)

* roughage type = guinea grass silage (GN), rice straw (RS) and napier grass silage (NP)

** yeast supplementation = control (C), *S. cerevisiae* (SC) and recombinant *S. cerevisiae* harboring *FAD2* gene from *S. kluyveri* (SCSK)

การเจริญเติบโตในช่วง lag phase และตัวเซลล์ยีสต์ที่ตายแล้วจะเป็นแหล่งวิตามินบี ซึ่งจะไปช่วยในการเจริญเติบโตต่อไป (Girard and Dawson, 1995)

สำหรับปัจจัยชนิดของอาหารหยาบ (หญ้าเนเปียร์หมัก หญ้ากีนีหมัก และฟางข้าว) พบว่าปริมาณแก๊สสุทธิที่เกิดขึ้นในช่วงวันที่ 2, 4, 6 และ 12 ของฟางข้าว มีปริมาณแก๊สสุทธิต่ำกว่าหญ้าเนเปียร์หมักและหญ้ากีนีหมัก (ตารางที่ 3) สาเหตุมาจากฟางข้าวมีผนังเซลล์ที่ประกอบด้วย เซลลูโลส 30-51% เฮมิเซลลูโลส 6-28% และลิกนิน 4-10% ค่าการย่อยได้ผนังเซลล์เท่ากับ 35-50% ซึ่งเป็นค่าการย่อยได้ที่ต่ำเนื่องจากผนังเซลล์มี

ลิกนินซึ่งจะไปเกาะอยู่กับเฮมิเซลลูโลสทำให้ไม่ถูกย่อยสลาย นอกจากนี้สาร phenolic acid ที่มีอยู่ในลิกนินมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จากจุลินทรีย์สารดังกล่าวจะไปขวางกั้นบริเวณที่เอนไซม์จะเข้าไปทำปฏิกิริยา (เสาวลักษณ์, 2542)

นอกจากนี้ยังพบว่า การย่อยสลายของอินทรีย์วัตถุ (OMD) และปริมาณกรดไขมันระเหยได้ (SCFA) ของหญ้าเนเปียร์หมักมีค่าสูงกว่าฟางข้าวและหญ้ากีนี อย่างไรก็ตามการย่อยสลายของอินทรีย์วัตถุของหญ้าเนเปียร์และหญ้ากีนีในการศึกษาครั้งนี้มีค่าต่ำกว่าการย่อยสลายของอินทรีย์วัตถุของหญ้าเนเปียร์และ

Table 3 Gas production (ml) and estimate parameter of roughage* supplement with yeast**

Item	Control			<i>S. cerevisiae</i>			recombinant <i>S. cerevisiae</i>			SEM	<i>P</i> <Value
	GN	RS	NP	GN	RS	NP	GN	RS	NP		
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9		
Gas production											
2	1.92 ^c	1.63 ^c	4.78 ^b	1.91 ^c	2.24 ^c	5.96 ^a	2.20 ^c	1.96 ^c	6.05 ^a	0.35	<0.001
4	4.07 ^b	2.26 ^b	8.66 ^a	3.45 ^b	3.17 ^b	8.17 ^a	4.95 ^b	2.92 ^b	7.94 ^a	0.52	<0.001
6	6.47 ^b	2.82 ^c	10.45 ^a	4.94 ^{bc}	4.05 ^{bc}	9.98 ^a	6.11 ^b	3.80 ^{bc}	9.76 ^a	0.60	<0.001
8	10.86 ^a	3.92 ^d	13.31 ^a	7.57 ^{bc}	5.61 ^{cd}	12.95 ^a	8.25 ^b	6.20 ^{cd}	12.29 ^a	0.69	<0.001
10	13.33 ^{ab}	6.11 ^e	16.58 ^a	10.97 ^{bcd}	8.11 ^{de}	15.29 ^a	11.63 ^{bc}	9.37 ^{cde}	16.24 ^a	0.76	<0.001
12	13.65 ^{bc}	8.46 ^d	18.96 ^a	13.14 ^{bc}	10.30 ^{cd}	19.30 ^a	15.60 ^{ab}	11.62 ^{cd}	18.76 ^a	0.81	<0.001
24	22.48 ^{bc}	19.89 ^c	24.91 ^{ab}	22.57 ^{bc}	23.69 ^{abc}	24.81 ^{ab}	27.31 ^a	26.65 ^{ab}	26.32 ^{ab}	0.58	0.020
48	35.52 ^b	26.91 ^c	37.70 ^{ab}	41.38 ^a	34.54 ^b	40.68 ^a	37.08 ^{ab}	40.27 ^a	40.28 ^a	0.92	<0.001
72	52.32	47.43	46.66	45.08	44.84	41.16	46.60	44.60	40.92	1.16	0.533
96	61.18 ^a	48.47 ^b	48.23 ^b	47.10 ^b	45.61 ^b	46.02 ^b	59.34 ^a	46.94 ^b	43.68 ^b	1.33	0.001
Estimated Parameter											
ME	6.07 ^{abcd}	5.25 ^e	6.44 ^{ab}	5.87 ^{cd}	5.77 ^d	6.30 ^{abc}	6.51 ^a	5.96 ^{bcd}	6.34 ^{abc}	0.85	0.001
OMD	48.39 ^b	44.61 ^c	51.00 ^a	45.43 ^c	47.95 ^b	49.43 ^{ab}	48.72 ^{ab}	49.06 ^{ab}	48.47 ^b	0.41	<0.001
SCFA	0.50 ^{bcd}	0.40 ^e	0.54 ^{abc}	0.47 ^d	0.49 ^{cd}	0.56 ^{ab}	0.58 ^a	0.55 ^{abc}	0.56 ^{ab}	0.01	<0.001
Microbial biomass											
mg	0.05 ^{ab}	0.04 ^{bc}	0.03 ^c	0.06 ^a	0.04 ^{bc}	0.03 ^c	0.06 ^a	0.04 ^c	0.05 ^{ab}	0.00	<0.001
% of true digested	66.20 ^{ab}	52.58 ^{cd}	48.15 ^{de}	62.40 ^b	52.64 ^{cd}	49.10 ^{cde}	69.89 ^a	44.14 ^e	54.24 ^c	2.01	<0.001

^{a,b,c} Means within a row with different superscripts differ (*P*<0.05)

* roughage type = guinea grass silage (GN), rice straw (RS) and napier grass silage (NP)

** yeast supplementation = control (C), *S. cerevisiae* (SC) and recombinant *S. cerevisiae* harboring *FAD2* gene from *S. kluyveri* (SCSK)

หญ้ากีนีจากการศึกษาของ นฤมล และคณะ (2545) คือ 47.51 เทียบกับ 61.50 และ 49.63 เทียบกับ 61.39 ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากโปรตีนของหญ้ากีนีและหญ้าเนเปียร์ของการศึกษาครั้งนี้มีปริมาณน้อยกว่า (86 เทียบกับ 124.25 และ 70 เทียบกับ 71.55 g/kg) จึงมีโภชนาที่เป็นสารตั้งต้นสำหรับจุลินทรีย์นำไปใช้ในการย่อยสลายและสามารถผลิตแก๊สได้น้อยกว่า (Van Soest, 1994)

นอกจากนี้ยังพบปฏิกริยาร่วมระหว่างชนิดของอาหารหยาบและการเสริมยีสต์ โดยพบว่าฟางข้าวจะมีการตอบสนองต่อการเกิดแก๊สสุทธิที่ 8 และ 48 ชั่วโมง เมื่อได้รับการเสริมเชื้อจำพวกราหรือยีสต์จะทำให้ลิกนินถูกย่อยสลายไป โดยราหรือยีสต์เหล่านี้จะสามารถผลิตเอนไซม์ในการย่อยลิกนินโดยจะทำปฏิกริยา hydrogen peroxide กระตุ้นปฏิกริยาออกซิเดชั่น ดึงเอาอิเล็กตรอนออกจาก phenolic ring ของลิกนินทำให้โพลีเมอร์ของลิกนินแตกตัว เอนไซม์จากจุลินทรีย์จึงสามารถเข้าไปทำงานได้ (Elisashrili *et al.*, 2007) ทั้งนี้ปริมาณลิกนิน ของฟางข้าวสูงกว่าอาหารหยาบชนิดอื่นจึงทำให้ตอบสนองต่อการเสริมเอนไซม์ได้ดีกว่าชนิดอื่น (Han, 1975) ในส่วนของปฏิกริยาร่วมระหว่างชนิดของอาหารหยาบและการเสริมยีสต์ต่อปริมาณจุลินทรีย์ โดยพบว่าฟางข้าวจะมีการตอบสนองต่อการผลิตปริมาณจุลินทรีย์ที่เกิดจากการหมัก ได้น้อยกว่าหญ้าเนเปียร์หมัก และหญ้ากีนีหมัก ทั้งนี้เนื่องจากการสังเคราะห์จุลินทรีย์โปรตีนในกระเพาะหมักของโคจะอาศัยผลผลิตจากการทำงานของจุลินทรีย์ คือ กรดไขมันระเหยได้ จากการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต และกรดอะมิโนและแอมโมเนียจากการย่อยสลายโปรตีน (Van Soest, 1994) ผลผลิตเหล่านี้จะขึ้นอยู่กับคุณค่าทางโภชนาของอาหารหยาบ ในฟางข้าวพบว่ามีคุณค่าทางโภชนาที่ต่ำกว่าหญ้าชนิดอื่นจึงทำให้มีสารตั้งต้นในการผลิต Microbial biomass ต่ำกว่าอาหารหยาบชนิดอื่น

สรุป

ยีน FAD2 ที่ถูกคัดแยกจาก *S. kluyveri* ถูกนำไปเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ได้และนำเข้าไปในยีส *S. cerevisiae* แล้วสามารถควบคุมการผลิตเอนไซม์ $\Delta 12$

desaturase ซึ่งช่วยในการเปลี่ยน C18:1T (EA) เป็น C18:2 (LA) ได้ และยังมี C18:3 (ALA) และ C20:5 (EPA) มากกว่า *S. cerevisiae* นอกจากนี้ยังพบว่า อาหารหยาบที่เสริม recombinant *S. cerevisiae* ที่มียีน FAD2 จาก *S. kluyveri* มีปริมาณแก๊สสุทธิมากกว่า *S. cerevisiae* เมื่อเปรียบเทียบกับชนิดของอาหารหยาบพบว่าในฟางข้าวจะมีปริมาณแก๊สสุทธิที่ 2, 4, 6 และ 12 ชั่วโมง น้อยกว่าอาหารหยาบชนิดอื่น และพบปฏิกริยาร่วมระหว่างชนิดของอาหารหยาบและการเสริมยีสต์ โดยการเสริมยีสต์ร่วมกับฟางข้าวจะมีค่าปริมาณแก๊สสุทธิที่ 8 และ 48 ชั่วโมง รวมทั้ง ค่า OMD และ SCFA สูงที่สุด

เอกสารอ้างอิง

- นฤมล สุมาลี โชคมิเกล็ด เทิดชัย เวียรศิลป์ เกรียงศักดิ์ ไชยโรจน์ และ เอกสิทธิ์ สมคุณา. 2545. การหาค่าการย่อยได้ของอินทรีย์วัตถุและค่าพลังงานให้ประโยชน์ในอาหารโคนม โดยใช้เทคนิคการวัดแก๊สแบบไฮเซนไฮม์. วารสารเกษตร 18(2): 129-134.
- ปิ่น จันจุฬา และ อัจฉรา เพ็งหนู. 2557. การทดแทนกากถั่วเหลืองด้วยกากเนื้อในปาล์มน้ำมันหมักยีสต์ในอาหาร ขึ้นต่อการย่อยได้ และความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยได้ในกระเพาะของแพะ. วารสารเกษตร 30(2): 181-190.
- เสาวลักษณ์ แยมหมื่นอาจ. 2542. การประเมินค่าพลังงานสุทธิและการศึกษาการย่อยได้ของฟางข้าวในโคนมและแกะ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่ 113 หน้า
- อัจฉราวรรณ ทองมี. 2530. การสกัดกรดไขมันจากยีสต์ *Rhodotorula gracilis*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะพลังงานและวัสดุ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, กรุงเทพฯ. 100 หน้า

- Bluemel, M. and E. R. Orskov. 1993. Comparison of in vitro gas production and nylon bag degradability of roughage in predicting feed intake in cattle. *Animal Feed Science and Technology* 40: 109-119.
- Blummel, M., H. P. S. Makkar and K. Becker. 1997. *In vitro* gas production: a technique revisited. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 77: 24-34.
- Chemler, J. A., Y. Yan and M. A. Koffas. 2006. Biosynthesis of isoprenoids, polyunsaturated fatty acids and flavonoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*. 5:20.
- Denev, S. A., Tz. Peeva, P. Radulova, N. Stancheva, G. Staykova, G. Beev, P. Todorova and S. Tchobanova. 2007. Yeast Cultures in Ruminant Nutrition. *Bulgarinan Journal of Agricultural Science* 13: 357-374.
- Elisashvili V., N. Peninckx, E. Kachlishvili, T. N. Siklauri, E. Metreveli, T. Kharziani and G. Kvesitadze. 2007. *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. *Biotec* 99(3): 457-462.
- Girard, I. D. and K. A. Dawson. 1995. Effect of a yeast culture on growth characteristics of representative ruminal bacteria. *Journal of Animal Science* 73:264.
- Gregory, M. K., R. A. Gibson, R. J. Cook-Johnson, L. G. Cleland and M. J. James. 2011. Elongase Reactions as Control Points in Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Synthesis. *PLOS ONE* 6(12): 1-9.
- Han., W. Y. 1975. Microbial fermentation of rice straw: nutritive composition and in vitro digestibility of the fermentation products. *Applied Microbiology* 29(4): 510-514.
- Jean-Luc, S., 2012. Yeast Genomes *Saccharomyces kluyveri*. (Online). Available: <http://genolevures.org/sakl.html> (December 5, 2014)
- Kainou., K., Y. Kamisaka, K. Kimura and H. Uemura. 2006. Isolation of Δ^{12} and ω 3-fatty acid desaturase genes from the yeast *Kluyveromyces lactis* and their heterologous expression to produce linoleic and α -linolenic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Wiley InterScience* 23: 605-612
- Kajiwara., S., T. Oura and K. Shishido. 2001. Cloning of fatty acid synthase component *FAS1* gene from *Saccharomyces kluyveri* and its functional complementation of *S. cerevisiae fas 1* mutant. *Yeast* 18: 1339-1345.
- Morrison., R. W. and M. L. Smith. 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipid with boron fluoride-methanol. *Journal of Lipid Research* 5: 600-608.
- Simopoulos., P. A. 2012. The omega-6/omega-3 fatty acid ratio: health implications. *Nutrition-Sante* 17: 267-275.
- Steel, R. G. D. and J. H. Torrie. 1984. Principles and Procedures of Statistics (2nd Ed.). MC Graw Hill Book Co; Singhapore. 672 p.
- Van Soest, P. T. 1994. Nutritional Ecology of the ruminant. 2nd Ed. Cornell Univ. O&B Book, Inc. 476 p.
- Watanabe., K., T. Oura., H. Sakai and S. Kajiwara. 2004. Yeast Δ^{12} fatty acid desaturase: gene cloning, expression, and function. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 68(3): 721-727.