P-ISSN 0858-4435
E-ISSN 2651-1231

วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี Homepage : *http://li01.tci-thaijo.org/index.php/tstj*
ปีที่ 30 ฉบับที่ 4 (กรกฎาคม-สิงหาคม 2565) หน้า [37-48]

ยีนและการสังเคราะห์ทางชีวภาพของกรดไขมันโดโคซาเฮกซาโนอิก ใน *Moritella marina*

Gene and Biosynthesis of Docosahexaenoic Acid in *Moritella marina*

ณิชาภัทร วิเศษชลธาร, ชมภูนุช กลิ่นวงษ์*
ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร 10330
Nichaphat Wisetchonlathan, Chompunuch Glinwong*
Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330
Received 1 April 2022; Received in revised 4 June 2022; Accepted 10 June 2022

บทคัดย่อ

กรดไขมันโดโคซาเฮกซาโนอิก หรือดีเอชเอ เป็นกรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกาย โดยปริมาณที่แนะนำต่อวัน คือ 250-500 มิลลิกรัม เนื่องจากร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์กรดไขมันประเภทนี้ขึ้นเองได้ จึงจำเป็นต้องรับประทานเพิ่มจากแหล่งอาหารเสริม สำหรับการผลิตดีเอชเอในอุตสาหกรรม แบคทีเรียจากทะเลถือเป็นแหล่งทางเลือกสำหรับการผลิตดีเอชเอในการศึกษาหลัก *Moritella marina* เป็นอีกหนึ่งแหล่งผลิตที่มีประสิทธิภาพที่จะนำมาใช้เพื่อศึกษาการผลิตดีเอชเอ เนื่องจากมีความสามารถในการผลิตดีเอชเอผ่านสองวิถีทาง คือการสังเคราะห์โพลีคีไทด์แบบไม่ใช้ออกซิเจน (polyketide synthase: PKS) และวิถีการสังเคราะห์ธรรมดาแบบใช้ออกซิเจน โดยอาศัยเอนไซม์ desaturase และ elongase ซึ่งประสิทธิภาพของกระบวนการสังเคราะห์ดีเอชเอก็จะแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ บทความนี้กล่าวถึง เส้นทางชีวภาพสำหรับการสังเคราะห์กรดไขมันดีเอชเอใน *M. marina* รวมถึงยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ดีเอชเอผ่านเอนไซม์ polyketide synthase และวิถีที่ใช้เอนไซม์ desaturase และ elongase ที่มีความสำคัญต่อการสังเคราะห์ดีเอชเอ และกลยุทธ์ในการเพิ่มความสามารถในการผลิต เพื่อให้เห็นแนวโน้มในการพัฒนา *M. marina* เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการเพิ่มผลิตประสิทธิภาพของกระบวนการผลิตดีเอชเอในอนาคต

คำสำคัญ: *Moritella marina*; แบคทีเรียจากทะเล; กรดไขมันโดโคซาเฮกซาโนอิก (ดีเอชเอ); วิถีในการสังเคราะห์ทางชีวภาพ

***ผู้รับผิดชอบบทความ:** chompunuch.v@chula.ac.th **doi:** 10.14456/tstj.2022.40

Abstract

Docosahexaenoic acid, or DHA, is an essential fatty acid that the human body cannot directly synthesized. Thus, a daily intake of 250-500 mg DHA as a dietary supplement is recommended. For industrial DHA production, marine bacteria have been considered potential alternative producers of DHA. *Moritella marina* is an efficient source for in this study since it could produce omega-3 fatty acids such as DHA via two pathways: anaerobic polyketide synthase (PKS) type II and conventional aerobic pathway using desaturase and elongase. This article presents the discussion of biological pathways for the synthesis of DHA and related genes in the pathway of polyketide synthase and metabolic pathways related to enzyme desaturase and elongase. *M. marina,* which has been reported to produce high levels of DHA compared to other strains, was selected as an important model for the strategies to increase DHA production. This article discusses trends in the development of *M. marina* to be applied in further studies.

Keywords: *Moritella marina*; Marine bacteria; Docosahexaenoic acid (DHA); Biosynthesis pathway

1. บทนำ

โอเมก้า 3 คือกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวที่มีพันธะคู่สองตำแหน่งขึ้นไป (Omega-3 polyunsaturated fatty acids: ω-3 PUFAs) กรดไขมันในกลุ่มนี้ได้แก่ กรดไขมันดีเอชเอ (Docosahexaenoic acid: DHA) และกรดไขมันอีพีเอ (Eicosapentaenoic acid: EPA) ซึ่งเป็นกรดไขมันสำคัญที่มีความจำเป็นต่อร่างกาย โดยปริมาณที่แนะนำต่อวัน คือ 250-500 มิลลิกรัม ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมไม่สามารถสังเคราะห์ดีเอชเอได้ต้องได้รับผ่านการรับประทานอาหารเป็นหลัก หรือสามารถรับประทานอาหารที่มีกรดไขมันแอลฟาลิโนเลอิก (α-linolenic acid: ALA) ผสมอยู่ และอาศัยการสังเคราะห์ทางชีวภาพเพื่อสังเคราะห์ดีเอชเอจากกรดไขมันแอลฟาลิโนเลอิกที่รับประทานเข้าไป [1] แต่ถึงอย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการสังเคราะห์กรดไขมันกลุ่มโอเมก้า 3 ผ่านเส้นทางที่กล่าวมานี้สามารถสังเคราะห์ดีเอชเอได้น้อยกว่า 1% ของปริมาณกรดไขมันแอลฟาลิโนเลอิกที่รับประทานเข้าไป โดยสมองของมนุษย์ต้องการดีเอชเอปริมาณที่แนะนำต่อวันคือ 2.4–3.8 มิลลิกรัมต่อวัน [2] ดังนั้นเพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการจึงจำเป็นต้องรับประทานแหล่งอาหารจำพวกปลาเข้าไปโดยตรง หรือผ่านการรับประทานอาหารเสริมในกลุ่มของกรดไขมันโอเมก้า 3 แบคทีเรียจากทะเลเป็นหนึ่งในทางเลือกสำหรับการผลิตดีเอชเอ แทนน้ำมันปลาที่ได้จากปลาทะเล เนื่องจากการใช้ต้นทุนในการผลิตสำหรับพื้นที่ที่ใช้ในการทำประมงหรือเพาะเลี้ยงปลาโดยเฉพาะ ขณะที่แบคทีเรียจากทะเลจะมีต้นทุนการผลิตที่ต่ำกว่าเนื่องจากไม่มีการปนเปื้อนของโลหะหนัก และยังใช้ทรัพยากรที่น้อยกว่าในกระบวนการเพาะเลี้ยง ไม่ว่าจะเป็นอาหารหรือพื้นที่ในการเพาะเลี้ยง อีกทั้งแบคทีเรียยังมีความสามารถในการเจริญเติบโตได้รวดเร็วกว่าแหล่งผลิตอื่นๆ นอกจากนี้ยังเหมาะสำหรับกลุ่มคนที่ไม่รับประทานเนื้อสัตว์อีกด้วย รวมถึงในขั้นตอนของการต่อยอดโดยใช้เทคโนโลยีตัดต่อพันธุกรรมเข้ามาช่วยนั้น ในแบคทีเรียยังมีขั้นตอนที่ซับซ้อนน้อยกว่าแหล่งตัวอย่างอื่นๆ [3] โดยมีรายงานว่าแบคทีเรียจากทะเลมีความสามารถในการผลิตดีเอชเอนั้นอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในที่อุณหภูมิต่ำ (pshychrophilic bacteria) เนื่องจากแบคทีเรียเหล่านี้มีความสามารถในการปรับตัวต่ออุณหภูมิโดยการปรับเปลี่ยนสัดส่วนการสะสมไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์และบางสายพันธุ์สามารถสังเคราะห์กลุ่มของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวได้ผ่านเส้นทางการสังเคราะห์พอลีคีไทด์ (polyketide

pathway) เช่น *Shewanella* spp. [4-6], *Cowellia psychrerythraea* [7], และ *Moritella marina* [1] ซึ่งระดับความสามารถในการผลิตดีเอชเอนั้นจะแตกต่างกันไปในจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ สำหรับบทความนี้จะกล่าวถึง *M. marina* เนื่องจากความสามารถในการผลิตดีเอชเอของ *M. marina* มีรายงานว่าผลิตได้มากกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น รวมถึงมีรายงานการศึกษากลยุทธ์ต่างๆ ในการเพิ่มความสามารถสำหรับการผลิตดีเอชเอของ *M. marina* เพื่อนำมาใช้เป็นประโยชน์ในการพัฒนาทางเลือกสำหรับอุตสาหกรรมการผลิตดีเอชเอ

2. แบคทีเรียในสกุล *Moritella*

แบคทีเรียในสกุล *Moritella* เป็นถูกจัดอันดับในวงศ์ *Moritellaceae* อันดับ *Alteromonadales* และชั้น *Gammaproteobacteria* โดยในปัจจุบันแบคทีเรียที่ถูกจัดอยู่ในสกุล *Moritella* มีเพียง 7 สปีชีส์ และแสดงความสัมพันธ์ของทั้ง 7 สปีส์ในแผนภูมิภาพที่ 1 (Figure 1) ซึ่งทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative) ที่เจริญได้ดีในอาหารที่มีเกลือ 15-30% และเจริญได้ในสภาพแวดล้อมที่มีหรือไม่มีออกซิเจนก็ได้ (halophilic facultative anaerobes) สามารถแยกออกได้จากสิ่งแวดล้อมทางทะเล เช่น น้ำทะเล ตะกอนทะเล ในบริเวณล่องลึกในมหาสมุทร หรือสามารถพบได้ในบริเวณทะเลที่ระดับความลึกมากกว่า 500 เมตร ในสภาพแวดล้อมมีอุณหภูมิต่ำและความดันสูง อีกทั้งแบคทีเรียในสกุล *Moritella* ยังถูกใช้เป็นโมเดลสำหรับการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ที่ปรับตัวตามอุณหภูมิที่ต่ำลง โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตอยู่ที่ต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียสแต่มากกว่า 4 องศาเซลเซียส [8]

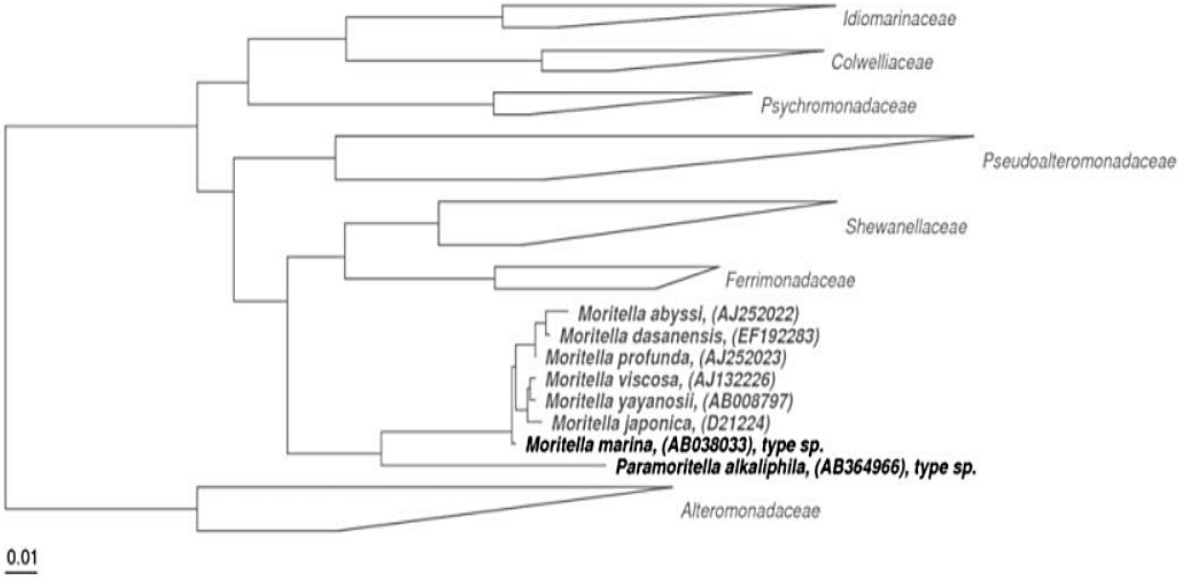

Figure 1 *16S rRNA* Phylogenetic relationship of bacteria in the family Moritellaceae from the nucleotide sequence analysis of *16S rRNA)* [8].

เป็นที่น่าสนใจสำหรับความสามารถในการผลิตกลุ่มของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวโดยเฉพาะกรดไขมันอีพีเอและ ดีเอชเอ เนื่องจากมีรายงานว่า *M. marina* MP-1 สามารถผลิตดีเอชเอได้มากกว่าสองเท่าเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ อีก 9 สายพันธุ์ในงานวิจัยของ Morita และคณะ ในปี 2005 [9] และในการศึกษาอีกงานวิจัยหนึ่งของ Fang และคณะ (2000) [10] ระบุว่า *Moritella yayanosii* strain DB21MT-5 มีสัดส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในผนังเซลล์อยู่เกือบ 70% ของไขมันทั้งหมดในผนังเซลล์ ซึ่งเป็นเหตุผลว่าทำไมแบคทีเรียนี้สามารถปรับตัวในภาวะที่อุณหภูมิต่ำ หรือความดันสูง และอาศัยอยู่ในสภาวะที่เป็นทะเลลึกได้ เนื่องจากกรดไขมันไม่อิ่มตัวในผนังเซลล์จะช่วยป้องกันการเกิด hyper-fluid ในผนังเซลล์ รวมถึงทำให้ผนังเซลล์มีเสถียรภาพและความคงทนต่ออุณหภูมิที่ต่ำ รวมถึงความดันที่สูงขึ้นได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้กรดไขมันไม่อิ่มตัวยังมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (free radicals) หรือ Reactive oxygen species (ROSs) ได้ ทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่สะสมกรดไขมันเหล่านี้ไว้จะทำหน้าที่เสมือนเกาะป้องกันแบคทีเรียจากอนุมูลอิสระที่จะเข้ามาทำปฏิกิริยาและเกิดเป็นพิษต่อเซลล์ เช่น การป้องกันเซลล์จากความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) โดยมีการนำปฏิกิริยานี้ที่สารต้านอนุมูลอิสระกระทำต่อกรดไขมันที่สะสมในผนังเซลล์มาประยุกต์ใช้กับการตรวจสอบคุณลักษณะทางชีวเคมีและการคัดแยกเบื้องต้นสำหรับแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวอย่างแพร่หลาย [11]

3. วิถีเมแทบอลิซึมสำหรับการสังเคราะห์กรดไขมันดีเอชเอ

M. marina MP-1 สามารถสังเคราะห์ดีเอชเอและกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวอื่นๆ ได้ผ่าน 2 วิถี โดยวิถีแรกเป็นเส้นทางการสังเคราะห์แบบไม่ใช้ออกซิเจนผ่านการสังเคราะห์พอลีคีไทด์ประเภท 2 (polyketide synthase type II) เป็นการอาศัยกลุ่มของเอนไซม์ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม และมีหน้าที่การสังเคราะห์กรดไขมันในวิถีเมแทบอลิซึมเดียวกัน โดยเอนไซม์จะทำงานร่วมกัน [12] การสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวในกลุ่มโอเมก้า-3 ผ่านเส้นทางนี้ แสดงในภาพที่ 2 (Figure 2) โดยจะเริ่มจากการรวมตัวของ malonyl-CoA ร่วมกับ acetyl-CoA โดยการทำงานของ **β**- ketoacyl-ACP synthase (KS) เกิดเป็น **β**-keto butyryl-ACP จากนั้นการสังเคราะห์จะถูกดำเนินผ่านกระบวนการของปฏิกิริยา reduction, dehydration และ condensation และจะเกิดวนหลายๆ รอบ เพื่อสังเคราะห์กรดไขมันที่เป็นสายยาวอย่างอีพีเอ (C20:5) และดีเอชเอ (C22:6) [13, 14] โดย อาศัยการทำงานของ KS, ketoacyl-ACP reductase (KR), hydroxy decanoyl-ACPdehydratase (DH), และ enoyl reduction (ER) ที่ถูกควบคุมด้วยยีนสำคัญ 5 ยีน ดังนี้ *polyunsaturated fatty acidA (pfaA), polyunsaturated fatty acidB (pfaB), polyunsaturated fatty acidC (pfaC), polyunsaturated fatty acidD (pfaD),* และ *polyunsaturated fatty acidE (pfaE)* [15]

สำหรับอีกวิถีในการสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวในกลุ่มโอเมก้า 3 เป็นเส้นทางการสังเคราะห์ในแบคทีเรียแบบใช้ออกซิเจน โดยอาศัยเอนไซม์ 2 ประเภท คือ desaturase และ elongase ในการสังเคราะห์ ซึ่งกระบวนการจะเริ่มจากกรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid) ถูกทำให้อิ่มตัวด้วยการสร้างพันธะคู่ที่ตำแหน่ง C12, C15, C6, C5 และC4 ด้วยเอนไซม์ Δ-12 desaturase, Δ-15 desaturase, Δ-6 desaturase, Δ-5 desaturase, และ Δ-4 desaturase ตามลำดับ และเอนไซม์ elongase ทำให้เกิดการสังเคราะห์สายคาร์บอนที่ยาวขึ้น สุดท้ายจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันดีเอชเอที่โครงสร้างประกอบด้วยคาร์บอน 22 ตำแหน่งและมีพันธะคู่ 6 ตำแหน่ง (C22:6 Δ4, 7, 10, 13, 16, 19) (Figure 3)

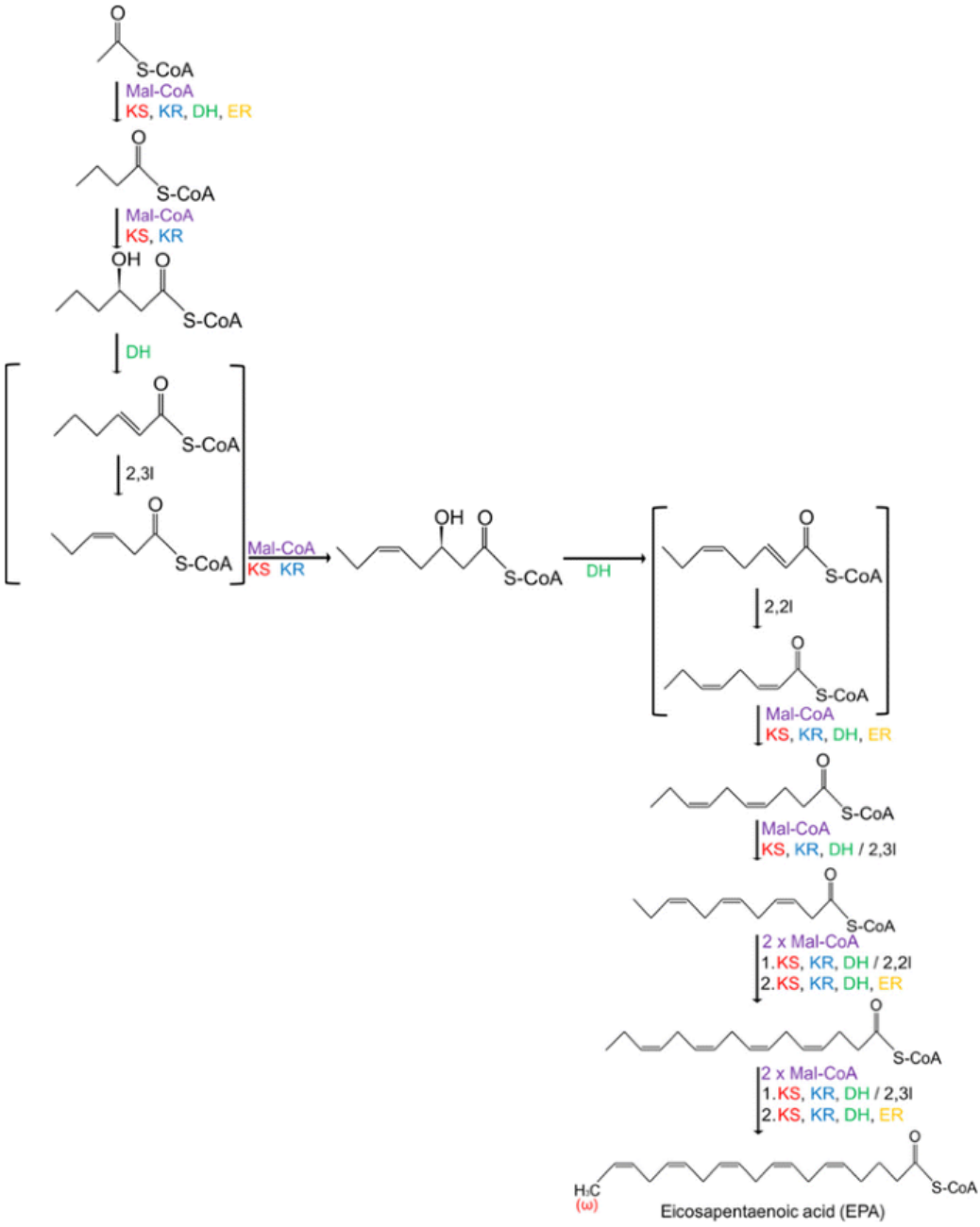

Figure 2 Long chain fatty acid synthesis via ketoacyl synthase (KS), keto-reductase (KR), dehydratase (DH), enoyl-reductase (ER) (Long-chain fatty acid synthesis via polyketide biosynthesis pathway. The main enzymes in the reaction are ketoacyl synthase (KS), keto-reductase (KR), dehydratase (DH), and enoyl-reductase (ER).) [3].

4. ยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตดีเอชเอใน *M. marina* MP-1

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตดีเอชเอผ่านเส้นทางการสังเคราะห์พอลีคีไทด์นั้นเป็นกลุ่มยีนที่สำคัญ 5 ยีน ได้แก่ *pfaA, pfaB, pfaC, pfaD* และ *pfaE* ซึ่งพื้นฐานโครงสร้างของทั้งห้ายีนนี้มีความคล้ายคลึงกันทางโครงสร้าง แต่จะแตกต่างกันเล็กน้อยขึ้นกับแต่ละสายพันธุ์ โดยในแบคทีเรีย *M. marina* MP-1 เป็นกลุ่มของยีน *pfa* ชนิดที่ 2 ที่เกี่ยวกับเส้นทางการสังเคราะห์ผ่านการสังเคราะห์พอลีคีไทด์ประเภท 2 จะมีความสำคัญต่อปริมาณการผลิตดีเอชเออยู่ที่ยีน *pfaA* ซึ่งจะถอดรหัสและแปลรหัสได้multifunction protein ประกอบด้วยโดเมนของ 3-keto-acyl synthase (KS), acyltransferase (AT), 3-keto-acyl reductase (KR) และ acyl carrier protein (ACP) ที่เป็นบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำ [3] มีรายงานว่าจำนวนลำดับซ้ำของโดเมน ACP ของยีน *pfaA* มีนัยสำคัญต่อปริมาณในการผลิตกรดไขมันอย่างดีเอชเอ อีกทั้งยีน *pfaA* ยังถูกใช้เป็นยีนหลักสำหรับการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสังเคราะห์ดีเอชเออีกด้วย [16] ซึ่งใน *M. marina* MP-1 จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ACP ซ้ำ 5 ซ้ำในยีน *pfaA* (Figure 4)

งานวิจัยส่วนหนึ่งได้ใช้กระบวนการพันธุวิศวกรรมในการโคลนยีน *pfaABCDE* จาก *M. marina* MP-1 เข้าสู่ *Escherichia coli* ก่อนการนำไปเพิ่มปริมาณการผลิตดีเอชเอร่วมกับกระบวนการอื่นๆ พบว่าการมียีนแค่ 5 ยีนนี้ก็เพียงพอที่จะทำให้มีความสามารถในการสังเคราะห์กรดไขมันดีเอชเอเพิ่มขึ้นมาใน *E. coli* ได้ แต่มีรายงานว่าปริมาณการผลิตดีเอชเอโดยการใช้ยีนจาก จาก *M. marina* MP-1 โคลนเข้าสู่ *E. coli* นั้น เมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่ 15 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าอยู่ที่ 3.7% ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมด ซึ่งเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม *M. marina* MP-1 ที่ผลิตได้ 5.9% [1,7,17] พบว่ามีปริมาณการผลิตที่ลดลง ดังนั้นถึงแม้จะมีการใช้กระบวนการพันธุวิศวกรรมตัดต่อยีนที่เกี่ยวข้องกับสังเคราะห์ดีเอชเอเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* ที่สามารถนำมาใช้เป็นเป็นโมเดลต้นแบบสำหรับการศึกษาการผลิตดีเอชเอได้สำเร็จ ทำให้ง่ายต่อการเพาะเลี้ยง รวมทั้งลดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงได้ แต่ความสามารถของการผลิตก็ยังคงด้อยกว่าสายพันธุ์ *M. marina* MP-1 ดั้งเดิม จึงควรคำนึงถึงการประยุกต์ใช้วิธีอื่นๆ ร่วมด้วยเพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตให้เพิ่มขึ้น เช่น การปรับสภาวะในกระบวนการหมัก โดยที่ยังคงทำการศึกษาในแหล่งที่เป็นโมเดลสำหรับการศึกษาอย่าง *E. coli* ได้

5. การผลิตดีเอชเอ และกลยุทธ์ในการเพิ่มความสามารถในการผลิตดีเอชเอของ *M. marina* MP-1

M. marina MP-1 เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในที่อุณหภูมิต่ำ (Psychrophilic bacteria) และในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง (Halophilic bacteria) ดังนั้นอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงต้องมีปริมาณของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) หรือเกลือมากกว่าปกติ สามารถเพาะเลี้ยงใน marine medium 2216 ได้ และใช้อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส รวมทั้งแบคทีเรียชนิดนี้เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) แต่จะเจริญได้ดีกว่าเมื่ออยู่ในสถาวะที่มีออกซิเจน ดังนั้นจึงต้องทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในเครื่องเขย่าสารที่ 150-170 รอบต่อนาที เพื่อให้ได้รับออกซิเจนอย่างเพียงพอ

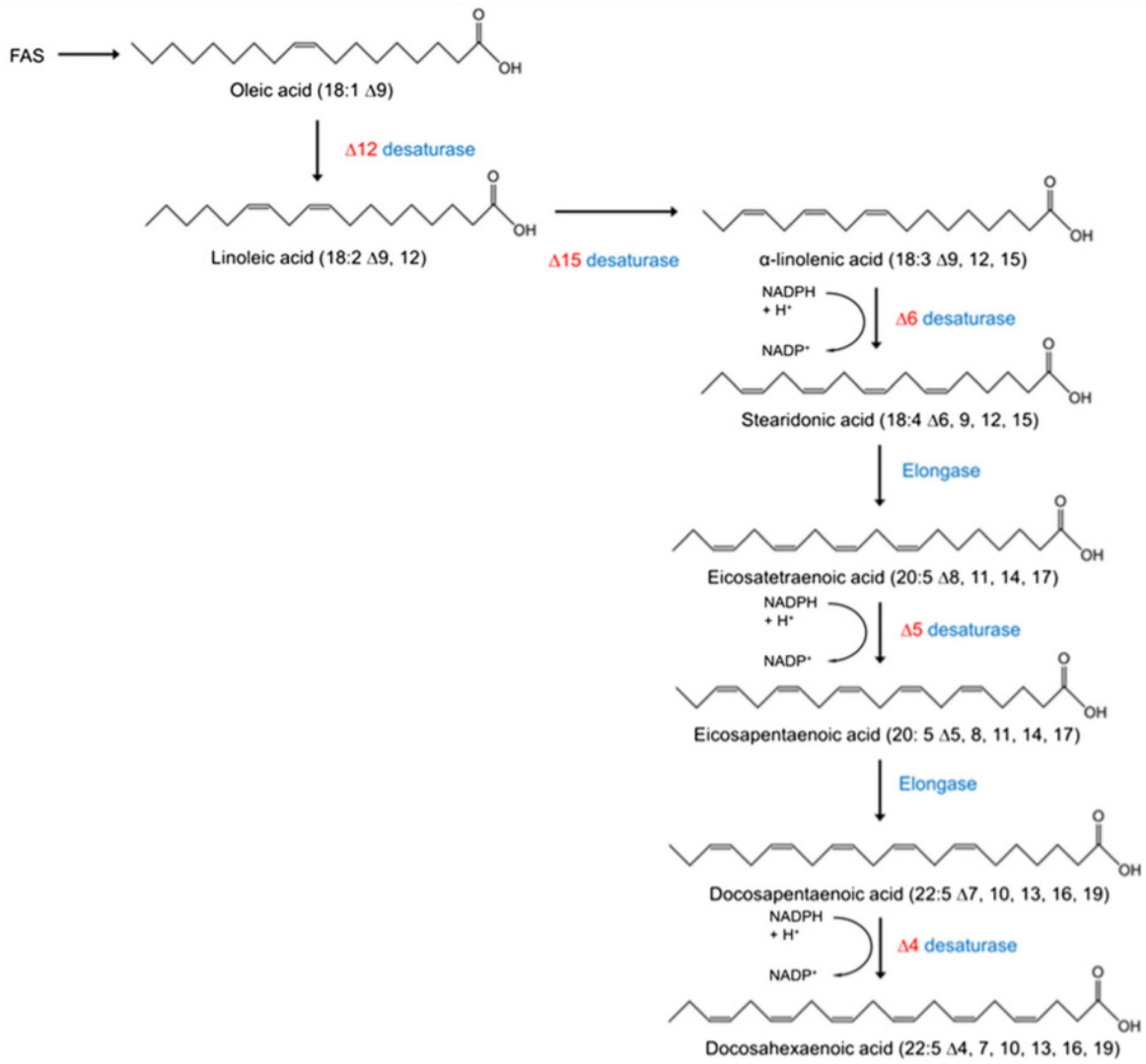

Figure 3 biosynthesis pathway of long-chain omega-3 fatty acids in anaerobic bacteria, uses desaturase and elongase [3].

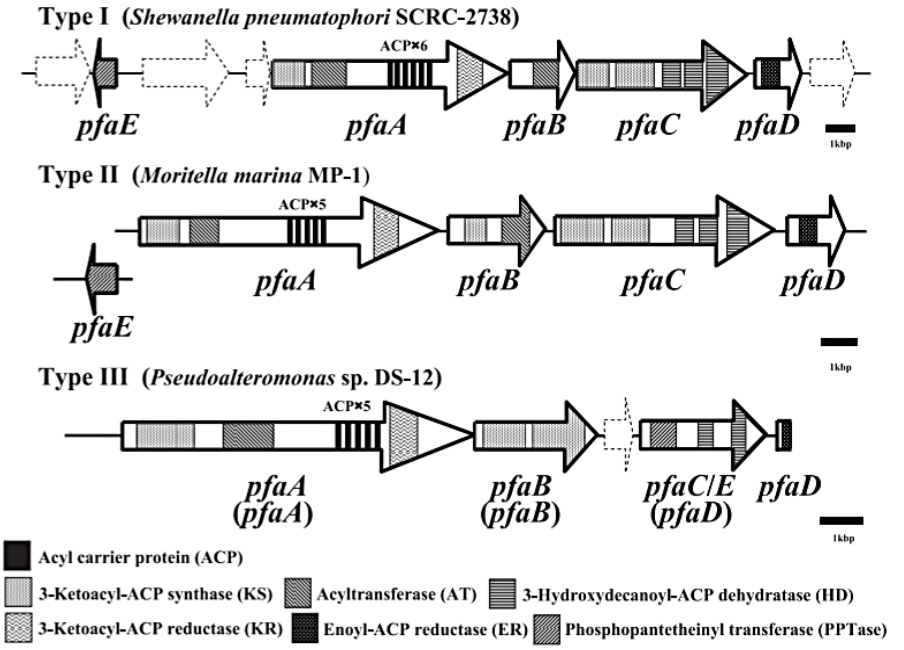

Figure 4 Structure of EPA and DHA-related genes via polyketide biosynthesis pathways in bacteria [15].

6. การปรับตัวต่ออุณหภูมิและความดัน

ในงานวิจัยของ Kautharapu และคณะในปี 2013 [18] ได้ทำการทดสอบเงื่อนไขต่างๆ ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ เพื่อดูผลต่อปริมาณการผลิตดีเอชเอ โดยได้ทำการทดสอบอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงสามอุณหภูมิได้แก่ 10, 15 และ 20 องศาเซลเซียส พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมงที่ 10 องศาเซลเซียสสามารถผลิตดีเอชเอได้มากที่สุดที่ 14±3 มิลลิกรัมดีเอชเอ/ลิตร แต่มิได้แตกต่างจากอุณหภูมิอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

สืบเนื่องมาจากความสามารถในการปรับสัดส่วนของกรดไขมันที่สะสมไว้ในผนังเซลล์ของแบคทีเรียทางทะเล เมื่อต้องพบกับสภาพแวดล้อมที่เย็นจัดหรือภายใต้ความดันที่สูง ดังนั้นการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเหล่านี้โดยทำการเลียนแบบสภาพแวดล้อมดังกล่าวอย่างงานวิจัยที่กล่าวไปที่ทำการทดสอบในอุณหภูมิต่ำต่างๆ จึงส่งผลให้แบคทีเรียเหล่านี้สามารถเพิ่มการผลิตดีเอชเอได้มากขึ้นจากสภาพแวดล้อมแบบปกติ

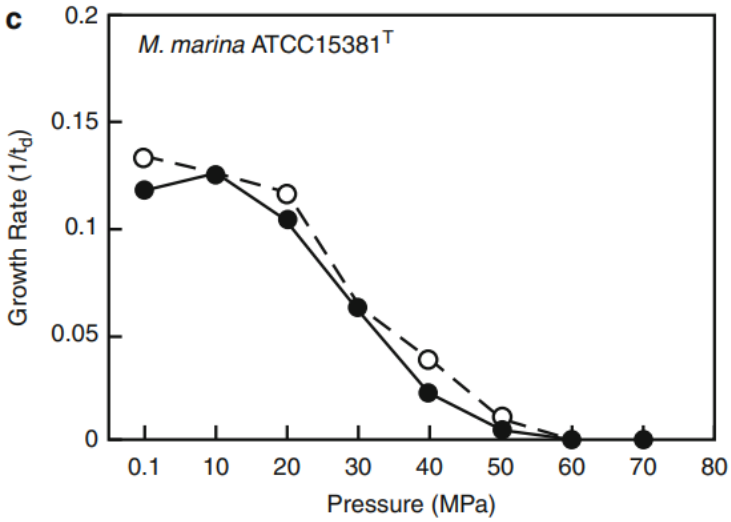

Figure 5 Comparison of *M. marina* MP-1 growth under different pressure. At 10 °C, represented by a black circle and a solid trend line, and at 15°C was represented by a white circle. [19].

จากภาพที่ 5 (Figure 5) พบว่า แม้ *M. marina* MP-1 จะมีความสามารถในการปรับตัวต่อความอยู่รอดภายใต้สภาพแวดล้อมที่มีแรงดันและอุณหภูมิต่ำ แต่ก็สามารถอยู่รอดได้เพียงระดับหนึ่งเท่านั้น คาดว่าเป็นผลจากข้อจำกัดในการสังเคราะห์กรดไขมัน หรือขีดจำกัดของความสามารถในการสะสมกรดไขมันเหล่านั้นไว้ที่ผนังเซลล์ แต่ทั้งนี้ทั้งนั้นถึงแม้จะเป็นแบคทีเรียสกุล *Moritella* เหมือนกันแต่ความสามารถในการปรับตัวก็แตกต่างกัน โดยใน *M. marina* MP-1 จะเจริญเติบโตได้ดีในความดันบรรยากาศ 0.1 MPa ที่ 15 องศาเซลเซียส ในขณะที่ *M. japonica* DSK1T จะเจริญเติบโตได้ดีในความดันบรรยากาศ 50 MPa ที่ 15 องศาเซลเซียส [19]

7. การจำกัดปริมาณคาร์บอน และเสริมไนโตรเจนในอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยง

การเพิ่มปริมาณไนโตรเจนในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงจะสามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของ *M. marina* MP-1 ได้ และผลต่อปริมาณการผลิตดีเอชเอโดยรวมเพิ่มขึ้น ในงานวิจัยของ Kautharapu และคณะในปี 2013 [18] ทำการทดลองโดยการเติม 10 กรัมต่อลิตรของทริปโตน (tryptone) หรือ 10 กรัมต่อลิตรของยีสต์สกัด (yeast extract) สามารถเพิ่มผลิตภัณฑ์ในส่วนของดีเอชเอจาก 11±1 มิลลิกรัมดีเอชเอ/ลิตร เป็น 30±1 มิลลิกรัมดีเอชเอ/ลิตร และ 16±1 มิลลิกรัมดีเอชเอ/ลิตร ตามลำดับ การเสริมด้วยทั้งทริปโตนและยีสต์สกัดสามารถเพิ่มปริมาณการผลิตดีเอชได้มากถึง 5 เท่า ในขณะเดียวกันการเติมแหล่งคาร์บอนในอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงอย่างกลูโคส (glucose) และกลีเซอรอล (glycerol) สามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตได้เช่นกัน แต่ปริมาณโดยรวมของดีเอชเอไม่ได้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญแต่อย่างใด แต่เมื่อทำการเสริมอาหารด้วยการจำกัดปริมาณคาร์บอน ร่วมกับการเสริมไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการเติม กลีเซอรอล ทริปโตน และยีสต์สกัดพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณการผลิตดีเอชเอได้สูงสุด 82±5 มิลลิกรัมดีเอชเอ/ลิตร

8. การใช้ Cerulenin และการใช้ความรู้ด้านพันธุวิศวกรรม เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตดีเอชเอ

Cerulenin สามารถยับยั้ง *fatty acid biosynthetic geneB (FabB)* และ *fatty acid biosynthetic*

geneF (FabF) ซึ่งเป็นยีนที่ถอดรหัสและแปลรหัสได้ 3-ketoacyl-ACP synthase I และ 3-ketoacyl-ACP synthase II ตามลำดับ ทำให้กระบวนการที่จะสังเคราะห์กรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวสายสั้นจากสารตั้งต้นคือ malonyl-CoA ร่วมกับ acetyl-CoA ซึ่งเป็นสารตั้งต้นเดียวกันกับการสังเคราะห์ดีเอชเอหยุดชะงักลง จึงเกิดการสะสมของสารตั้งต้นมากขึ้น (*Figure 6*) ดังนั้นการใช้ cerulenin เสริมในอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย จะสามารถเพิ่มการผลิตดีเอชเอได้ผ่านการสะสมสารตั้งต้นอย่าง malonyl-CoA และ acetyl-CoA ที่เพิ่มขึ้นได้ นอกจากนี้ในส่วนของยีน *fatty acid biosynthetic geneH (FabH)* ที่พบในวิถีการสังเคราะห์กรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวในแบคทีเรีย เป็นยีนที่ถอดรหัสและแปลรหัสได้เอนไซม์ในการสังเคราะห์กรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวสายสั้นจากสารตั้งต้นที่เป็น malonyl-CoA และ acetyl-CoA ตามปกติ เอนไซม์ที่สังเคราะห์จากยีนนี้ไม่ได้ถูกยับยั้งด้วย cerulenin ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *fatty acid biosynthetic geneH (FabH)* ดังนั้นเพื่อเพิ่มผลผลิตของการสังเคราะห์ดีเอชเอจากการสะสมของสารตั้งต้นในการผลิตดีเอชเออย่างเช่นสารตัวกลาง malonyl-CoA และ Acetyl-CoA ในเซลล์ อาจทำได้โดยการใช้ความรู้ด้านพันธุวิศวกรรม เช่นการทำยับยั้งการทำงานของยีน (gene knock-out) ยีน *fatty acid biosynthetic geneH (FabH)* ร่วมด้วย ในกระบวนการที่ก็จะเพิ่มการผลิตดีเอชเอได้ผ่านการสะสมสารตั้งต้นอย่าง malonyl-CoA และ acetyl-CoA ที่เพิ่มขึ้นได้ด้วยเช่นกัน [1]

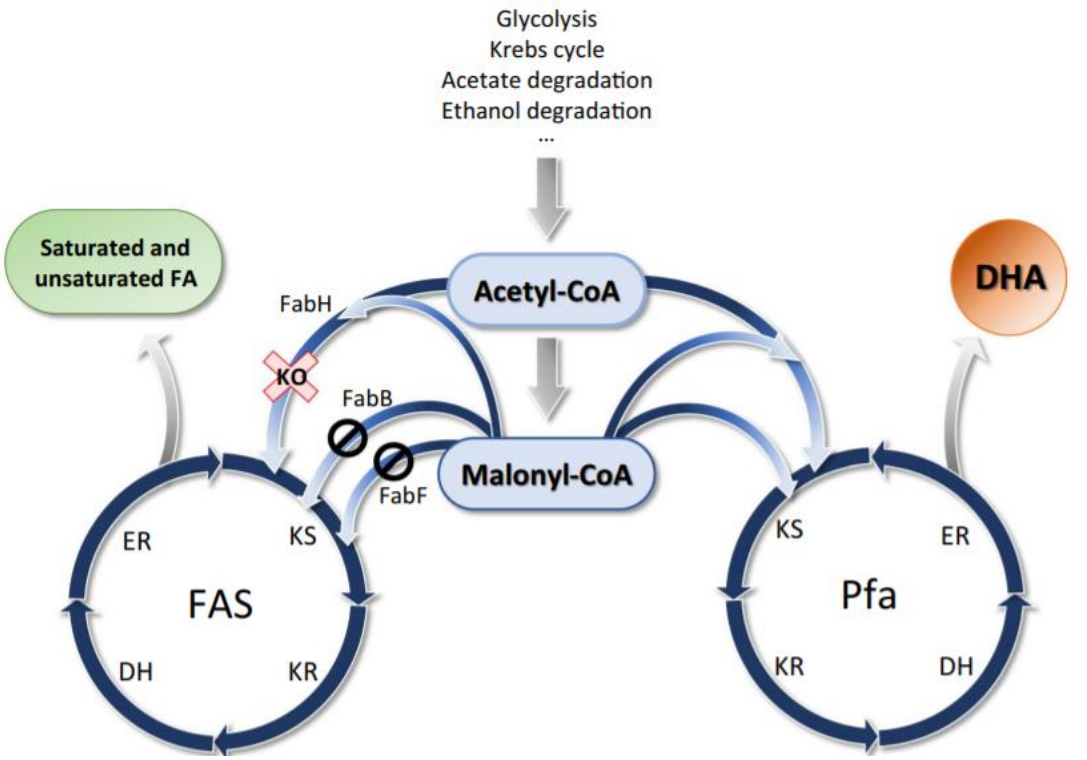

Figure 6 Model of fatty acid synthesis pathway and polyunsaturated fatty acid pathway using malonyl-CoA and acetyl-CoA as a co-substrate [1].

9. บทสรุป

แบคทีเรียสามารถใช้เป็นอีกหนึ่งทางเลือกสำหรับการเป็นแหล่งผลิตดีเอชเอได้ โดยเฉพาะใน *M. marina* ที่เป็นอีกหนึ่งแหล่งผลิตที่มีประสิทธิภาพได้ ถึงแม้ว่าปริมาณการผลิตดีเอชเอตามการรายงานในปัจจุบันจะได้ไม่เท่าแหล่งผลิตอย่างยีสต์สะสมไขมัน (Oleaginous yeast) หรือสาหร่ายขนาดเล็ก (Microalgae) ที่กำลังเป็นที่สนใจ แต่แบคทีเรียก็มีข้อดีสำหรับระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่ใช้เวลาน้อยกว่าแหล่งผลิตอื่นๆ ก็สามารถผลิตดีเอชเอได้ นอกจากนี้ระบบการเพาะเลี้ยงมีความซับซ้อนน้อยกว่าและต้องการพื้นที่ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงน้อยกว่าแหล่งผลิตอื่นๆ รวมถึงกระบวนการในการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตผ่านการใช้ความรู้ด้านพันธุวิศวกรรมที่หากทำการศึกษาในระบบของแบคทีเรียซึ่งเป็นโพรแคริโอต (prokaryote) ทำให้มีความซับซ้อนของระบบน้อยกว่าการศึกษาในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง นอกจากนี้ยังสามารถทำร่วมกับการควบคุมอุณหภูมิ ความดัน หรือการปรับเปลี่ยนสูตรอาหารอย่างการจำกัดปริมาณคาร์บอน และเสริมไนโตรเจนในอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยง หรือการใช้ cerulenin เพิ่มเติม ไปพร้อมๆ กันได้ เพื่อให้เปิดประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตดีเอชเอ

10. กิตติกรรมประกาศ

ทุนวิจัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สัญญาเลขที่ CU_GR_62_45_23_18 ประจำปีงบประมาณ 2562

11. References

[1] Giner-Robles, L., Lazaro, B., De La Cruz, F., and Moncalian, G., 2018, FabH deletion increases DHA production in *Escherichia coli expressing Pfa genes,* Microb Cell Fact. 17(1):88.

[2] Domenichiello, A.F., Kitson, A.P., and Bazinet, R.P., 2015, Is docosahexaenoic acid synthesis from α-linolenic acid sufficient to supply the adult brain?, Prog Lipid Res. 59:54-66.

[3] Moi, I.M., Leow, A.T.C., Ali, M.S.M., Rahman, R.N.Z.R.A., Salleh, A.B., and Sabri, S., 2018, polyunsaturated fatty acids in marine bacteria and strategies to enhance their production, Appl Microbiol Biotechnol. 102(14):5811-5826.

[4] Zhang, J., and Burgess, J.G., 2017, Enhanced eicosapentaenoic acid production by a new deep-sea marine bacterium *Shewanella electrodiphila* MAR441T, Plos One. 12(11):e0188081.

[5] Yoshida, K., Hashimoto, M., Hori, R., Adachi, T., Okuyama, H., Orikasa, Y., Nagamine, T., Shimizu, S., Ueno, A., and Morita, N., 2016, Bacterial long-chain polyunsaturated fatty acids: their biosynthetic genes, Functions, and Practical Use, Mar Drugs. 14(5):94.

[6] Hayashi, S., Satoh, Y., Ujihara, T., Takata, Y., and Dairi, T., 2016, Enhanced production of polyunsaturated fatty acids by enzyme engineering of tandem acyl carrier proteins, Sci Rep. 6:35441.

[7] Wan, X., Peng, Y.F., Zhou, X.R., Yang. M.G., Huang, F.H., and Moncalián, G., 2016, Effect of cerulenin on fatty acid composition and gene expression pattern of DHA-producing strain *Colwellia psychrerythraea* strain 34H, Microb Cell Fact. 15:30.

[8] Urakawa, H., 2014, The family *Moritellaceae*, pp. 477-490, In Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E.,

and Thompson. F. (Eds.), The Prokaryotes: Gammaproteobacteria, Springer, Inc., New York.

[9] Morita, N., Ichise, N., Yumoto, I., Yano, Y., Ohgiya, S., and Okuyama. H., 2005, Cultivation of microorganisms in the cultural medium made from squid internal organs and accumulation of polyunsaturated fatty acid in the cells, Biotechnol Lett. 27(13):933-41.

[10] Fang, J., Barcelona, M.J., Nogi, Y., and Kato, C., 2000, Biochemical implications and geochemical significance of novel phospholipids of the extremely barophilic bacteria from the Marianas Trench at 11,000 m, Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers. 47(6):1173–1182.

[11] Tilay, A., and Annapure, U., 2012, Novel simplified and rapid method for screening and isolation of polyunsaturated fatty acids producing marine bacteria, Biotechnol Res Int. 2012:542721, 8 p.

[12] Herbst, A.D., Townsend, C.A., and Maier, T., 2018, The architectures of iterative type I PKS and FAS, Nat Prod Rep. 35:1046-1069.

[13] Maier, T., Jenni, S., and Ban, N., 2006, Architecture of mammalian fatty acid synthase at 4.5 A resolution, Science. 311(5765):1258-1262.

[14] Napier, J.A., 2002, Plumbing the depths of PUFA biosynthesis: a novel polyketide synthase-like pathway from marine organisms, Trends Plant Sci. 7(2):51-54.

[15] Okuyama, H., Orikasa, Y., Nishida, T., Watanabe, K., and Morita, N., 2007, Bacterial genes responsible for the biosynthesis of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids and their heterologous expression, Appl and Envi Microb. 73(3):665-670.

[16] Alagarsamy, S., Sabeena Farvin, K.H., Fakhraldeen, S., Kooramattom, M.R., Al-Yamani, F., 2019, Isolation of Gram-positive Firmibacteria as major eicosapentaenoic acid producers from subtropical marine sediments, Lett in Appl Microbiol. 69(2):121-127.

[17] Orikasa, Y., Tanaka, M., Sugihara, S., Hori, R., Nishida, T., Ueno, A., Morita, N., Yano, Y., Yamamoto, K., Shibahara, A., Hayashi, H., Yamada, Y., Yamada, A., Yu, R., Watanabe, K., and Okuyama, H., 2009, pfaB products determine the molecular species produced in bacterial polyunsaturated fatty acid biosynthesis, FEMS Microbiol Lett. 295:170–176.

[18] Kautharapu, K., Rathmacher, J., and Jarboe, L., 2013, Growth condition optimization for docosahexaenoic acid (DHA) production by *Moritella marina* MP-1. Appl Microbiol Biotechnol. 97:2859–2866.

[19] Nogi, Y., Kato, C., and Horikoshi, K., 1998, *Moritella japonica* sp. nov., a novel barophilic bacterium isolated from a Japan Trench sediment, J Gen Appl Microbiol. 44(4):289-295.