

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : BGJ4580014

ชื่อโครงการ : การผลิตแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจากทะเลที่ผลิตกรดอะมิโนลิวูลินิก และการนำไปใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ชื่อนักวิจัย : นางสาว อมรรัตน์ ตั้งประสิทธิ์ภาพ

รศ.ดร. พูนสุข ประเสริฐสรรพ

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

รศ.ดร. กิจการ สุขมาดย์

ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ดร.กัลยาณ์ ศรีธัญญลักษณ์

หน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง (CENTEX SHRIMP)

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail address : amomrattangpras@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ 2 ปี

บทคัดย่อ จากการปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็ม *Rhodobacter sphaeroides* SH5 เพื่อเพิ่มการสะสมกรดอะมิโนลิวูลินิก (5-aminolevulinic acid; ALA) ภายในเซลล์ด้วยวิธีการต่างๆ 4 วิธี คือ การใช้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) การใช้สาร N-methyl-N'-nitrosoguanidine (NTG) การใช้แสง UV ร่วมกับ NTG และการใช้สาร NTG ร่วมกับการใช้แสง UV พบว่า สามารถแยกเชื้อสายพันธุ์กลายได้ จำนวน 50 สายพันธุ์ ซึ่งมีเพียง 5 สายพันธุ์ที่ผลิตกรดอะมิโนลิวูลินิกได้สูง แต่มีเพียง 2 สายพันธุ์ที่มีความคงตัวในการผลิตกรดอะมิโนลิวูลินิก คือ สายพันธุ์กลาย U10 และ N20 อย่างไรก็ตาม ผลผลิตของกรดอะมิโนลิวูลินิกภายในเซลล์ที่ได้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับผลผลิตของสายพันธุ์ดั้งเดิม ดังนั้นจึงใช้สายพันธุ์ดั้งเดิมในการทดลองขั้นต่อไป

จากการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณกรดอะมิโนลิวูลินิกภายในเซลล์ของ *Rhodobacter sphaeroides* SH5 ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะให้อากาศ-ไร้แสง พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MGG ที่มีการเติมเกลือ (3% NaCl) กรดลิวูลินิกและธาตุเหล็กเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมโดยให้กรดอะมิโนลิวูลินิกภายในเซลล์สูงสุด (226 $\mu\text{g/gDCW}$) ที่ชั่วโมงที่ 30 และจากการศึกษาเบื้องต้น พบว่า ค่า LD_{50} ของ ALA ต่อกุ้งกุลาดำ (น้ำหนักเฉลี่ย 15 ± 2 กรัม) มีค่า 113 ส่วนในล้านส่วน (ppm) ในระยะเวลา 7 วัน ดังนั้น ALA จึงมีความเป็นพิษต่ำในกุ้งกุลาดำ เมื่อนำเซลล์ที่ผลิต

ได้ไปผสมในอาหารกึ่งกลาดำ จำนวน 5 สูตร เพื่อศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของกึ่งกลาดำ พบว่า ทุกสูตรที่ให้กึ่งกินไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย อัตราการแลกเนื้อ รวมทั้งบางส่วนของระบบภูมิคุ้มกันของกึ่งได้แก่ เอนไซม์โปรตีนออกซิเดส ความต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ระหว่างกึ่งชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมแบคทีเรียและกึ่งชุดควบคุม อย่างไรก็ตาม มีการเพิ่มจำนวนของเม็ดเลือดรวมทั้งหมด เม็ดเลือดที่มีแกรนูล และเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (SOD) ของกึ่งที่ได้รับอาหารที่มีกรดอะมิโนลิวลินิกบริสุทธิ์ และกรดอะมิโนลิวลินิกที่อยู่ในเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงมากกว่าที่พบในกึ่งชุดควบคุม ($P>0.05$) และ SOD activity มีค่าสูงสุดในชุดการทดลองที่ใช้เซลล์ของ *Rhodobacter sphaeroides* SH5 ที่ผลิตได้ แสดงว่ากรดอะมิโนลิวลินิกที่อยู่ภายใน ไม่มีผลต่ออัตราการเจริญ แต่มีผลต่อเม็ดเลือดของกึ่งและกิจกรรมของเอนไซม์ ดังนั้น กรดอะมิโนลิวลินิกจึงมีคุณสมบัติเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้กับกึ่ง

เมื่อศึกษากลไกการทำงานของกรดอะมิโนลิวลินิกในการเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยศึกษาจากการแสดงออกของ cytosol haemocyte Mn-SOD ในระดับการสังเคราะห์ mRNA (transcriptional level) โดยวิธี RT-PCR พบว่า ไม่มีความแตกต่างในการทดลองทั้ง 5 ชุด แสดงว่ากรดอะมิโนลิวลินิกไม่มีผลในระดับการสังเคราะห์ mRNA (transcriptional level) โดย Mn-SOD และ SOD activity ที่เพิ่มขึ้นน่าจะเป็นผลจากกลไกการกระตุ้นในระดับการแปลรหัสเป็นโปรตีน (translational level) ในการสังเคราะห์เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส

Abstract

Project Code : BGJ4580014

Project Title : Production of Marine Photosynthetic Bacteria Producing 5-Aminolevulinic Acid and Its Application to Aquaculture

Investigator : Miss Amornrat Tangprasittipap
Associate Professor Dr. Poonsuk Prasertsan
Department of Industrial Biotechnology, Faculty of Agro-Industry,
Prince of Songkla University, Hatyai 90112
Associate Professor Dr. Kitjakarn Supamart
Department of Aquatic Science, Faculty of Natural Resources,
Prince of Songkla University, Hatyai 90112
Dr. Kullaya Srithanyalucksana
Center of Excellence in Shrimp, Faculty of Science,
Mahidol University, Bangkok

E-mail address : amornrattangpras@hotmail.com

Project Period : 2 years

Abstract Strain improvement of halotolerant photosynthetic bacteria *Rhodobacter sphaeroides* SH5 to increase the accumulation of intracellular 5-aminolevulinic acid (ALA) using 4 mutagenesis treatments; UV, N-methyl-N'-nitro-N-Nitrosoguanidine (NTG), UV+NTG (UVN) and NTG+UV (NUV) mutation was investigated. Among 50 mutants obtained, only 5 strains produced high quantity of ALA in which 2 of them (mutant strain U10 and U20) were stable for ALA production. However, their intracellular ALA were not significantly different from that of the wild type strain. Therefore, the wild type strain was used for further studies.

Factors affecting the accumulation of intracellular ALA of *Rhodobacter sphaeroides* SH5 cultivated under aerobic-light condition were investigated. MGG medium with the addition of 3% NaCl, levulinic acid and iron was the optimum medium giving addition the highest accumulation of intracellular ALA (226 $\mu\text{g/gDCW}$) after 30 h cultivation. Preliminary test revealed that the LD_{50} of ALA to black tiger shrimp *Penaeus monodon* (average weight of 15 ± 2 g) was estimated to be 113 ppm for 7 days. Therefore, ALA is considered to be low toxicity substance for shrimp. The bacterial cells were used for preparation of 5 formulae of shrimp feed to test on shrimp immune response. It was found that there was no significantly different

($P < 0.05$) in the growth rate, survival rate, feed conversion rate (FCR), phenoloxidase (PO) activity and disease (WSSV) resistance between both bacterial-fed shrimp and control group. However, the total haemocyte, granular cell number, and superoxide dismutase (SOD) activity in shrimp fed with pure ALA and ALA accumulated in the cells were higher than those of control in all feed formulae tested ($P > 0.05$). The highest SOD activity was found in shrimp fed with the formula containing ALA intact bacterial cells. These results suggested that ALA in the cells of *R. sphaeroides* SH5 had no effect on growth rate but on shrimp haemocytes and its enzymatic activity. Therefore, ALA was considered to be an immunostimulant for shrimp.

Mechanism of ALA acted as an immunostimulant was studied from the expression profile of shrimp cytosol haemocyte Mn-SOD in the synthesis of mRNA (transcriptional level) by RT-PCR. Elongation factor was used as constitutively expressed control gene. The results showed that no significant difference was observed for all 5 treatments suggesting that ALA has no effect at transcriptional level by Mn-SOD. The increase of total SOD activity in circulating haemocytes in shrimp fed immunostimulant, would be resulted from ALA affected to translation level of SOD synthesis