

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5080203

ชื่อโครงการ : การศึกษาการสร้าง C₂₂-polyunsaturated fatty acids (PUFAs) ในมอส *Physcomitrella patens* โดยยีนที่ควบคุมเอนไซม์ Δ^5 -elongase จากสาหร่าย *Pavlova* sp.

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน : 1. ดร.ทรงศรี แก้วสุวรรณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2. ศ.ดร.นันทวัน บุญยะมิตร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address : 1. songsrik@psu.ac.th

2. pynby@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี 6 เดือน

บทคัดย่อ

การศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในมอส *Physcomitrella patens* โดยใช้วิธีทางสถิติ Plackett-Burman พบว่ามีปัจจัยทางกายภาพ 2 ปัจจัยคือ พีเอช และอุณหภูมิ ที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงหลายชนิด ได้แก่ กรดไลโนเลอิก แกมมา-ไลโนเลนิก แอลฟา-ไลโนเลนิก โอโคซะไดโอนิก ไค-โฮโม-แกมมา-ไลโนเลนิก อะแรคซิโดนิก และโอโคซะเพนเตอโนิก) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนปัจจัยทางเคมี 3 ปัจจัยคือ ซูโครส แคลเซียมคลอไรด์ และแมกนีเซียมซัลเฟตส่งผลต่อการผลิตกรดไขมันเพียงบางชนิดเท่านั้น โดยการใช้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูงมีแนวโน้มเพิ่มการผลิตกรดไขมันไลโนเลอิก กรดอะแรคซิโดนิก และกรดโอโคซะเพนเตอโนิก แต่การเพิ่มความเข้มข้นของแร่ธาตุแคลเซียมและแมกนีเซียม กลับมีผลลดการสร้างกรดอะแรคซิโดนิก และโอโคซะเพนเตอโนิก

กรดอะดรีนิกเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงกลุ่มโอเมก้า-6 ที่มีศักยภาพในการนำไปใช้เป็นยา แต่ในสภาวะธรรมชาติของมอส *P. patens* ที่ไม่พบกรดไขมันดังกล่าว ปัจจุบันมีการศึกษากระบวนการชีวสังเคราะห์ของน้ำมันจากพืช ตลอดจนการศึกษาทางด้านพันธุวิศวกรรมกันอย่างแพร่หลาย ดังนั้นการปรับเปลี่ยนวิถีชีวสังเคราะห์ของกรดไขมันเพื่อให้พืชผลิตน้ำมันชนิดใหม่จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ การศึกษานี้จึงได้นำยีน Δ^5 -elongase จากสาหร่าย *Pavlova* sp. ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงที่มีความยาว 22 คาร์บอน มาศึกษาในมอสเพื่อให้มอสสามารถผลิตกรดอะดรีนิก พบว่ายีนดังกล่าวสามารถแสดงออกในมอสได้ภายใต้การควบคุมของ 35S promoter จำนวน 2 ชุดซ้ำกัน โดยทำให้เนื้อเยื่อมอสผลิตกรดอะดรีนิกได้เท่ากับ 0.42 มิลลิกรัมต่อลิตร จากสารตั้งต้นกรดอะแรคซิโดนิกที่มีอยู่ตามธรรมชาติในเนื้อเยื่อมอส และเมื่อทำให้ปรับสภาวะในการเพาะเลี้ยงโดยวิธี response surface methodology (RSM) พบว่ามอสสามารถผลิตกรดอะดรีนิกได้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติได้เท่ากับ 4.51 มิลลิกรัมต่อลิตร งานวิจัยนี้นับเป็นการศึกษาแรกเกี่ยวกับการแสดงออกของเอนไซม์ในการสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในพืชชั้นต่ำที่ไม่มีเมล็ดโดยไม่มีการเติมสารตั้งต้นของกรดไขมันแต่อย่างใด

คำหลัก : มอสฟิสโคมิทราลา พาเทนส์ · สาหร่ายแพบโลวา · กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง · เกล็ดไฟฟ้า-อีลองเกส · กรดอะดรีนิก

Abstract

Project Code : MRG5080203

Project Title : Biosynthesis of C₂₂-polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in the moss *Physcomitrella patens* by the algae *Pavlova* sp. Δ^5 -elongase

Investigators : 1. Dr. Songsri Kaewsuwan, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University
2. Prof. Dr. Nuntavan Bunyaphrathatsara, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

E-mail Address : 1. songsrik@psu.ac.th 2. pynby@mahidol.ac.th

Project Period : 2 Years 6 Months

Abstract

Identification of the parameters that had significant effects on polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and biomass production by the moss *Physcomitrella patens* was performed using nine culture variables (temperature, agitation speed, pH, sucrose, di-ammonium tartrate, CaCl₂·2H₂O, MgSO₄·7H₂O, KH₂PO₄ and KNO₃) with the statistical design technique of Plackett-Burman. Statistical analysis revealed that two physical variables (pH and temperature) had significant effects on the production of both biomass and PUFAs (linoleic acid, LA; γ -linolenic acid, GLA; α -linolenic acid, ALA; eicosadienoic acid, EDA; di-homo- γ -linolenic acid, DHGLA; arachidonic acid, ARA; eicosapentaenoic acid, EPA). Three nutritional variables (sucrose, CaCl₂ and MgSO₄) had an influence only on the production of some of the PUFAs. Of the two levels used in this study, higher concentrations of sucrose had a positive effect on LA, ARA and EPA production, whereas higher concentrations of metal ions (CaCl₂ and MgSO₄) had a negative effect only on ARA and EPA production.

Adrenic acid (ADA), an Ω -6 PUFA naturally absent in *P. patens*, has attracted much interest due to its pharmaceutical potential. Exploiting the wealth of information currently available on *in planta* oil biosynthesis, and coupling this information with the tool of genetic engineering, it is now feasible to deliberately alter fatty acid biosynthetic pathways to generate unique oils in commodity crops. In this study, a Δ^5 -elongase gene from the algae *Pavlova* sp. related to the biosynthesis of C₂₂-PUFAs was targeted to enable production of ADA in *P. patens*. Heterologous expression of this gene was under the control of a tandemly duplicate 35S promoter. It was established that ADA (0.42 mg/l) was synthesized in *P. patens* from endogenous ARA via the expressed *Pavlova* sp. Δ^5 -elongase in the moss. In an attempt to maximize ADA production, medium optimization was effected by the response surface methodology (RSM), resulting in a significant elevation of ADA (4.51 mg/l) production under optimum conditions. To the best of our knowledge, this is the first study describing the expression of a PUFA synthesizing enzyme in non-seed lower plant without supplying the exogenous fatty acid.

Keywords : *Physcomitrella patens* · *Pavlova* sp. · Polyunsaturated fatty acids · Δ^5 -elongase · Adrenic acid