บทคัดย่อ

โดยทั่วไปไขมันในอาหารส่งผลต่อองค์ประกอบของกรดไขมันในปลา และต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมและกระบวนการทางสรีรวิทยาในร่างกายปลา โครงการวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาผลการตอบสนองของปลานิลในด้านเมตาบอลิซึมและกระบวนการทางสรีรวิทยาในตับและลำไส้ เมื่อปลานิลได้รับอาหารที่มีแหล่งของไขมันแตกต่างกัน ยีน Fatty acid delta-6 desaturase (*fads2*) ผลิตเอ็นไซม์ delta-6 desaturase (Δ6) ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่สำคัญในกระบวนการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงสายยาว (long chain polyunsaturated fatty acid ;LC PUFA) การศึกษานี้จึงได้ทำการศึกษาผลของการรีคอมบีแนนท์ยีสต์ที่แสดงออกยีน *fads2* เป็นสารเสริมในอาหารต่อการสะสมกรดไขมันในปลานิล

ในการทดลองที่ 1 ได้ทำการศึกษาผลของไขมันพืชที่แตกต่างกันในอาหารต่อเมตาบอลิซึมและกระบวนการทางสรีรวิทยาในตับและลำไส้โดยใช้เทคโนโลยีโปรติโอมิกส์ ทำการเลี้ยงปลาทดลองด้วยอาหารที่มีแหล่งของไขมันแตกต่างกัน ได้แก่ น้ำมันปาล์ม (Palm oil; PO) น้ำมันลินซีด (Linseed oil; LO) และน้ำมันถั่วเหลือง (Soybean oil; SBO) เป็นระยะเวลา 90 วัน ผลการทดลองพบว่าปลาทุกกลุ่มทดลองมีสมรรถนะการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน องค์ประกอบกรดไขมันในตับปลาทดลองแตกต่างกัน และอาหารทดลองส่งผลกระทบต่อองค์ประกอบของกรดไขมันที่สะสมในตับปลา ปลาทดลองที่เลี้ยงด้วย PO ที่เป็นแหล่งของกรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acids; SFA) ส่งผลให้มีค่าดัชนีตับสูง และมีองค์ประกอบของไขมันและโปรตีนในตับสูง ปลาทดลองที่เลี้ยงด้วย SBO ที่เป็นแหล่งของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในกลุ่มโอเมก้า 6 (n-6 polyunsaturated fatty acids; n-6 PUFAs) ส่งผลให้มีองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตในตับสูงแต่มีโปรตีนลดลง ผลการวิเคราะห์โปรติโอมิกส์ในตับพบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนหลายชนิด โดยโปรตีนเหล่านี้เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของไขมัน คาร์โบไฮเดรต และกรดอะมิโน พบระดับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการความเครียดจากกระบวนการออกซิเดชัน ภูมิคุ้มกัน และกระบวนการอักเสบ มีระดับเพิ่มสูงขึ้นในปลาทดลองที่เลี้ยงด้วย SBO ปลาทดลองที่เลี้ยงด้วย LO ที่เป็นแหล่งของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในกลุ่มโอเมก้า 3 (n-3 polyunsaturated fatty acids; n-3 PUFAs) มีการสะสมของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ cytoskeleton เพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้ผลการศึกษาโปรติโอมิกส์ในลำไส้พบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนหลายชนิดได้แก่ GRP78, ACTB, PFN2, TPM3, KRT18 ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต และโครงสร้าง cytoskeleton นอกจากนี้การศึกษานี้ได้ทำการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนของโปรตีนที่มีระดับแตกต่างกันในตับด้วยเทคนิค qRT-PCR ผลการศึกษาพบว่าระดับการแสดงออกของยีนและระดับโปรตีนที่วิเคราะห์โดยโปรติโอมิกส์ที่มีความสัมพันธ์กันในยีน *atp5b*, *krt18*, และ *seleno* จากผลการศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่ากรดไขมันอิ่มตัวจัดเป็นแหล่งพลังงานสำหรับกิจกรรมในชีวิต กรดไขมันในกลุ่มโอเมก้า 3 และ 6 เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมและสรีรวิทยาที่สำคัญต่อการดำรงชีวิต ซึ่งมีผลต่อการดำรงชีวิตที่เป็นปกติและเป็นผลดีต่อสุขภาพปลานิล

ในการทดลองที่ 2 ได้ทำการศึกษาผลของน้ำมันพืชรวม และน้ำมันปลาต่อเมตาบอลิซึมและกระบวนการทางสรีรวิทยาในปลานิลโดยใช้เทคโนโลยีโปรติโอมิกส์ ทำการเลี้ยงปลาทดลองด้วยอาหารที่มีแหล่งของไขมันแตกต่างกัน ได้แก่ น้ำมันพืชรวม (Mix vegetable oil; VO) น้ำมันปลา (Fish oil; FO) และอาหารสูตรการค้า เป็นระยะเวลา 90 วัน ผลการทดลองพบว่าปลาทุกกลุ่มทดลองมีสมรรถนะการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน ไขมันในอาหารส่งผลต่อค่าเคมีในเลือด ปลาทดลองที่เลี้ยงด้วย VO มีค่ากลูโคส ไตรกลีเซอไรด์ และอัลบูมินในเลือดสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่เลี้ยงด้วย FO แหล่งของไขมันในอาหารส่งผลต่อระดับโปรตีนในตับ ได้แก่ FBP1, TYR3, ELA1, PNPO, FTH1, HSP70, ACTB และ PBLD โปรตีนในลำไส้ ได้แก่ ANPEP, ACTB และ GSTM3 นอกจากนี้แหล่งของไขมันในอาหารส่งผลต่อระดับโปรตีนในพลาสมา ได้แก่ . KNG1, AT3, FGA, APOA1, BTD, HRG, HRGX1, C1qTNF, TRFO และ RBP โดยโปรตีนเหล่านี้เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตและกรดอะมิโน กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันและการอักเสบ และ โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ cytoskeleton

ในการทดลองที่ 3 ได้ผลิตไมโครเอ็นแค็บซูลรีคอมบีแนนท์ยีสต์ที่มีการแสดงออกยีน *fads2* เพื่อใช้เป็นโปรไบโอติกที่ผลิต delta-6 desaturase (Δ6) (RY-Δ6) ได้ทำการศึกษาผลของการใช้ RY-Δ6 เป็นโปรไบโอติกต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต องค์ประกอบทางเคมีของร่างกาย ค่าเคมีของเลือด ค่าทางโลหิตวิทยา จุลินทรีย์ในลำไส้ จุลสัณฐานวิทยาของลำไส้ และองค์ประกอบของกรดไขมันในตับและในเนื้อปลา กลุ่มทดลองในการทดลองนี้มีทั้งหมด 7 กลุ่มทดลอง (กลุ่มทดลองละ 4 ซ้ำ) แต่ละกลุ่มทดลองจะเลี้ยงปลาด้วยอาหารแต่ละสูตรดังนี้ สูตรที่ 1 คืออาหารพื้นฐานรวมกับน้ำมันลินซีด 2 % สูตรที่ 2 คืออาหารพื้นฐานรวมกับน้ำมันลินซีด 2 % และยีสต์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (WT) 10^6 CFU/ g feed สูตรที่ 3 คืออาหารพื้นฐานรวมกับน้ำมันลินซีด 2 % และยีสต์ WT 10^8 CFU/ g feed สูตรที่ 4 คืออาหารพื้นฐานรวมกับน้ำมันลินซีด 2 % และ RY-Δ6 10^6 CFU/ g feed สูตรที่ 5 คืออาหารพื้นฐานรวมกับน้ำมันลินซีด 2 % และ RY-Δ6 10^8 CFU/ g feed สูตรที่ 6 คืออาหารพื้นฐานรวมกับน้ำมันปลา 2 % และสูตรที่ 7 คืออาหารทางการค้า ทำการเลี้ยงปลาด้วยอาหารทดลองทั้ง 7 กลุ่มทดลองเป็นระยะเวลา 90 วัน ผลการทดลองพบว่ายีสต์ WT และ RY-Δ6 เพิ่มสมรรถนะการเจริญเติบโตของปลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) อัตราการรอดของปลาทุกกลุ่มทดลองไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) องค์ประกอบทางเคมีในเนื้อและตัวปลา ค่าเคมีของเลือด (กลูโคส คอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ โปรตีน อัลบูมิน แคลเซียม เหล็ก SGOT และ SGPT) และค่าทางโลหิตวิทยาไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มทดลอง ($P > 0.05$) ผลการศึกษาพบว่ายีสต์ WT และ RY-Δ6 เพิ่มค่าทางภูมิคุ้มกัน (อิมมูโนโกลบูลิน, ไลโซไซม์ และ ACH50) ความสูงของวิลไล และลดประชากรจุลินทรีย์ *Vibrio* spp ในลำไส้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) พบว่าปลาที่เลี้ยงด้วยยีสต์ RY-Δ6 มีการเพิ่มขึ้นของระดับของกรดไขมัน C18:3n-6 และ C18:4n-3 ในตับและเนื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แสดงให้เห็นว่า RY-Δ6 สามารถสร้างเอ็นไซม์ delta-6 desaturase ดังนั้นโดยสรุปไมโครเอ็นแค็บซูลรีคอมบีแนนท์ยีสต์ RY-Δ6 สามารถใช้เป็นโปรไบโอติกที่เป็นประโยชน์ในด้านสมรรถนะการเจริญเติบโต ภูมิคุ้มกัน จุลสัณฐานของลำไส้ ประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ นอกจากนี้รีคอมบีแนนท์ยีสต์ RY-Δ6 สามารถผลิตเอ็นไซม์ delta-6 desaturation และเปลี่ยนแปลงการสะสมกรดไขมันในเนื้อและตับปลานิล

ดั้งนั้นรีคอมบีแนนท์ยีสต์ RY-Δ6 จึงน่าจะนำมาใช้เป็นรีคอมบีแนนท์โปรไบโอติกในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง

โดยสรุป การศึกษานี้ได้อธิบายกระบวนการทางเมตาบอลิซึมและสรีรวิทยาของปลานิลที่ตอบสนองต่อไขมันในอาหารที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ได้ประเมินศักยภาพของการใช้รีคอมบีแนนท์โปรไบโอติกที่มีการแสดงออก delta-6 desaturation ในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง

Abstract

In general, dietary lipids reflect fatty acid composition in fish, metabolic responses and physiologic processes. This research aims to investigate differentially metabolic and physiological pathways which response to dietary lipid sources in Nile tilapia intestine and liver. Fatty acid delta-6 desaturase (*fads2*) expresses delta-6 desaturase (Δ6) which is the key enzyme of long chain polyunsaturated fatty acid (LC PUFA). This study also investigated the effect of using dietary supplementation of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing *fads2* on fatty acid accumulation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).

In experiment I, the effects of dietary vegetable oil of varying fatty acid composition on metabolism and physiological processes were investigated in liver and intestine of Nile tilapia using proteomic technology. Fish were fed with different DL, which included palm oil (PO), linseed oil (LO) and soybean oil (SBO) for 90 days. Growth performance appeared to be similar among the dietary groups. Hepatic fatty acid contents were reflected by dietary lipids. Dietary PO (source of saturated fatty acids; SFA) led to an increase in the hepatosomatic index as well as lipid and protein contents in liver. Dietary SBO (source of n-6 polyunsaturated fatty acids; n-6 PUFAs) increased hepatic carbohydrate contents, but decreased the hepatic protein. The proteomic analysis showed that these nutritive changes in the liver were mediated by several proteins involved in lipid, carbohydrate, and amino acid metabolism. Dietary SBO showed an increased accumulation in proteins related to oxidative stress, immune and inflammatory processes. Dietary LO (source of n-3 PUFAs) increased abundance of cytoskeleton-related proteins. In addition, dietary lipid affected the changes in the accumulation of intestinal proteins (GRP78, ACTB, PFN2, TPM3, KRT18) that are involved in carbohydrate metabolism and cytoskeleton-related protein. qRT-PCR was performed to provide supportive information for the result of proteomic study. Similar effects of DLs on mRNA levels were observed for *atp5b*, *krt18*, and *seleno*. Combined together, dietary SFA could supply as energy reservoir for regular activities. Dietary n-3 and n-6 PUFAs led to induce vital metabolic and physiologic processes which would contribute to maintaining normal health and/or providing health-related benefits.

In experiment II, the effects of dietary mix vegetable oils and fish oil on metabolism and physiological processes were investigated using proteomic technology in Nile tilapia. Fish were fed experimental diets including mix vegetable oils (VO), fish oil (FO) and commercial diet for 90 days. Growth performance appeared to be similar among experimental groups.

Different dietary oils affected blood chemistry parameters. Comparing with dietary FO, dietary VO led to increase blood glucose, triglyceride, cholesterol and albumin. Differential accumulation of hepatic protein including FBP1, TYR3, ELA1, PNPO, FTH1, HSP70, ACTB, PBLD were observed between different dietary lipids. Dietary lipids affected the changes in intestinal proteins such as ANPEP, ACTB and GSTM3. In addition, differential plasma protein contents included KNG1, AT3, FGA, APOA1, BTD, HRG, HRGX1, C1qTNF, TRFO, and RBP. These proteins are involved carbohydrate and amino acid metabolism, immune and inflammatory processes and cytoskeleton-related proteins.

In experiment III, recombinant *S. cerevisiae* expressing (*fads2*) was microencapsulated and used as recombinant probiotic producing Δ6 (RY-Δ6). The effects of the use of RY-Δ6 as dietary probiotic on growth performance, body composition, blood chemistry, hematological parameters, intestinal microbiota, morphology of intestine and fatty acid contents in liver and meat of Nile tilapia were evaluated. Seven treatment diets (each diet replicated four times) were as follows: 1, basal diet + 2% LO; 2, basal diet + 2% LO + 10^6 CFU/ g feed of wild type *S. cerevisiae* (WT); 3, basal diet + 2% LO + 10^8 CFU/ g feed of WT; 4, basal diet + 2% LO + 10^6 CFU/ g feed of RY-Δ6; 5, basal diet + 2% LO + 10^8 CFU/ g feed of RY-Δ6; 6, basal diet + 2% FO; 7, commercial diet. Fish were fed with experimental diets for 90 days. The results showed that dietary WT or RY-Δ6 for 90 days improved growth performance ($P < 0.05$). Survival rate was not significance difference among experimental diets. There were not significant differences in chemical composition in body and meat, blood chemistry (glucose, cholesterol, triglyceride, total protein, albumin, calcium, iron, SGOT and SGPT) and hematological indices among experimental treatments ($P > 0.05$). Dietary NT or RY-Δ6 led to increase immune parameters (Ig, lysozyme and ACH50), villus height intestine and decrease intestinal *Vibrio* spp ($P < 0.05$). The significant increases in C18:3n-6 and C18:4n-3 in liver and meat were found in Nile tilapia fed dietary RY-Δ6 for 90 day ($P < 0.05$), suggesting that RY-Δ6 could exerted delta-6 desaturase. Taken together, microencapsulated RY-Δ6 could be used as dietary probiotics to exert positive effects on growth performance, immune parameters, intestinal morphology and intestinal microbiota. Additionally, dietary RY-Δ6 could exert delta-6 desaturation activity which changed the fatty profile in meat and liver of Nile tilapia. Therefore, RY-Δ6 could be provide application to be developed to be the recombinant probiotic to produce long chain-PUFAs.

Taken together, this study demonstrated the metabolic and physiologic responses in Nile tilapia which were fed with different dietary lipid sources. In addition, the potential use of recombinant probiotic exerting delta-6 desaturation activity for producing of LC-PUFAs as dietary probiotic was evaluated.