

การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวด้วยวิธีอย่างง่าย

ประด็นันท์ เอี่ยมสะอาด^{1*}

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) จัดว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่น่าสนใจในเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีรายงานเกี่ยวกับบทบาทสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะอย่างยิ่งระบบการทำงานต่าง ๆ ในร่างกายมนุษย์ จึงเป็นที่นิยมในการพัฒนากรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวให้เป็นผลิตภัณฑ์ทางยาและการแพทย์ การวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกชนิดของแบคทีเรียจากตัวอย่างธรรมชาติด้วยวิธีการที่ง่ายและรวดเร็ว โดยอาศัยคุณสมบัติในการต้านสารอนุมูลอิสระของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวที่เชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์ขึ้น โดยการทดสอบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.1% ผลการทดลองพบว่าสามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวได้จำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ SS_Sa2, SS_Sa1.1, KT_W1Y, BK_PD3 และ BK_SD4 และจากการจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน 16S rDNA ร่วมกับการศึกษาความสัมพันธ์ของลำดับวิวัฒนาการ พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต SS_Sa2, SS_Sa1.1, KT_W1Y, BK_PD3 และ BK_SD4 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudoxanthomonas* sp., *Bacillus subtilis*, *Burkholderia* sp., *Vibrio* sp. และ *Pseudomonas fluorescens* ที่ความใกล้เคียงเท่ากับ 99, 98, 99, 97 และ 98 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ผลจากการศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบถึงความหลากหลายของสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวได้ ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาเป็นแหล่งของผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพหรือยารักษาโรคต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ : แบคทีเรียที่ผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว, การทดสอบด้วยสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์, การคัดเลือกด้วยวิธีอย่างง่าย, การจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรีย

¹ สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา

*ผู้นิพนธ์หลัก e-mail: pradinunt.e@aru.ac.th, pradinunt@gmail.com

SCREENING AND IDENTIFICATION OF POLYUNSATURATED FATTY ACID PRODUCING BACTERIA BY SIMPLIFIED METHOD

Pradinunt Eiamsa-ard^{1*}

Abstract

Nowadays, polyunsaturated fatty acid (PUFAs) has been intensively interested since they possess the vital roles in the human health, implicated in pharmaceutical and health products. The objectives of this study were isolation of the PUFAs producing bacteria through the simplified method within short period of time based on an application of antioxidative effect of PUFAs against to the oxidizing agent. Here, the screening of PUFAs producing bacteria was performed by direct visualization using the 0.1% H₂O₂ plate assay. Five bacterial isolates including SS_Sa2, SS_Sa1.1, KT_W1Y, BK_PD3 and BK_SD4 were exhibited in the presence of H₂O₂ through the intracellular PUFA production. In addition, the bacterial identification was then confirmed by using 16S rDNA sequencing analysis followed by phylogenetic relationship evaluation. Five PUFAs producing bacteria were successfully classified as *Pseudoxanthomonas* sp., *Bacillus subtilis*, *Burkholderia* sp., *Vibrio* sp. and *Pseudomonas fluorescens*, respectively. Therefore, the results would be proposed the diverse bacterial strains toward PUFA production and considerably activation of PUFA production providing the further nutraceutical and pharmaceutical industrial.

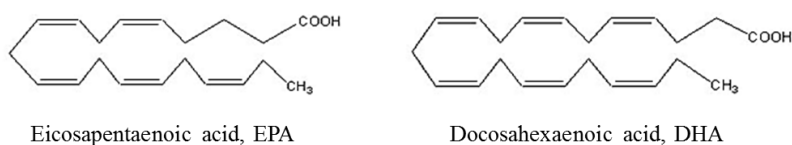
Keywords : PUFA producing bacteria, H₂O₂-plate assay, Simplified screening method, Bacterial identification

¹ Department of Environmental Science, Faculty of Science and Technology, Phranakorn si Ayutthaya Rajabhat University, Phranakorn si Ayutthaya

*Corresponding author, e-mail: pradinunt.e@aru.ac.th, pradinunt@gmail.com

บทนำ

กรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) เป็นกรดไขมันชนิดที่มีความยาวของไฮโดรคาร์บอนตั้งแต่ 18 คาร์บอนอะตอม และภายในโครงสร้างประกอบด้วยพันธะคู่มากกว่า 2 ตำแหน่ง (Russell and Nichols, 1999) ซึ่งกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวนี้จัดเป็นสารประกอบที่มีความสำคัญต่อสุขภาพของมนุษย์เป็นอย่างมาก เช่น อีพีเอ (eicosapentaenoic acid, EPA) และดีเอชเอ (docosahexaenoic acid, DHA) (ภาพที่ 1) เป็นส่วนประกอบหลักในฟอสโฟลิปิดที่อยู่ภายในโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ ภายในเซลล์และเนื้อเยื่อ เช่น การปรับอุณหภูมิในร่างกาย การป้องกันและบรรเทาโรคเรื้อรังต่างๆ (Dyall and Michael-Titus, 2008; สิริวรรณ แก้วสุวรรณ, 2561)



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวชนิด อีพีเอ (eicosapentaenoic acid, EPA) และ ดีเอชเอ (docosahexaenoic acid, DHA) (ปรับปรุงจาก Russell and Nichols, 1999)

นอกจากนี้ยังพบว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 20 อะตอม ได้แก่ กรดไดโฮโม-แกมมา-ไลโนเลนิก (di-homo- γ -linolenic acid, DHGLA) กรดอะแรคคิโดนิก (arachidonic acid, ARA) และอีพีเอ เป็นกรดไขมันที่เป็นสารตั้งต้นของสารชีวโมเลกุลชนิดอีโคซานอยด์ (eicosanoids) ซึ่งประกอบด้วยสารกลุ่มโพรสตาแกลนดิน (PG) ทروมบอกเซน (TX) และลิวโคไตรอิน (LT) มีบทบาทในการด้านการอักเสบ ระบบภูมิคุ้มกัน การทำงานของหลอดเลือด และสารสื่อประสาทต่างๆ รวมทั้งมีความสำคัญต่อพัฒนาการของทารก และการป้องกันโรคอัลไซเมอร์ในผู้สูงอายุอีกด้วย (Horrobin and Manku, 1983; Pereira *et al.*, 2003; Swanson *et al.*, 2012; Zárate *et al.*, 2017) จากที่ได้กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวเป็นกลุ่มสารชีวโมเลกุลที่มีความสำคัญในทางเภสัชกรรม ทั้งในการนำมาใช้เป็นยารักษาโรคและการพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์ด้านอาหารเสริมสุขภาพ โดยทั่วไปกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ทั้งในกลุ่มพืชน้ำมัน เช่น ถั่วเหลืองและข้าวโพด พบกรดไขมันชนิดที่มีความยาว 18 คาร์บอนอะตอมเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ กรดไลโนเลอิก (linoleic acid, LA) และกรดแอลฟา-ไลโนเลนิก (α -linolenic acid, ALA) (Selvaraju *et al.*, 2012; Peiretti *et al.*, 2018) นอกจากนี้กลุ่มสิ่งมีชีวิตในทะเลไม่ว่าจะเป็นสาหร่ายหรือปลาทะเลจัดเป็นแหล่งสำคัญของกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีความยาวของสายไฮโดรคาร์บอนมากกว่า 18 อะตอม โดยเฉพาะอีพีเอและดีเอชเอ (Albert *et al.*, 2013)

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวจากแบคทีเรียซึ่งสามารถพัฒนาให้เป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับการผลิตน้ำมันที่มีส่วนประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากแบคทีเรียมีอัตราการเจริญที่รวดเร็ว รวมทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้และวิธีการเพาะเลี้ยงสามารถดำเนินการได้โดยง่าย (Elrazak *et al.*, 2013) ทั้งนี้วิธีการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวจากตัวอย่างธรรมชาติสามารถดำเนินการได้ในหลายวิธี แต่อย่างไรก็ตามการคัดเลือกด้วยวิธี

H₂O₂ plate assay โดยอาศัยหลักการของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidative effect) ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวที่มีต่อสารออกซิไดส์ (reactive oxygen species, ROS) เป็นเทคนิคที่น่าสนใจในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวได้ (Tilay and Annapure, 2012; Yoshida *et al.*, 2016) ซึ่งช่วยให้ทราบผลการทดลองในระยะเวลาอันสั้นและวิธีการดำเนินงานวิจัยไม่ยุ่งยาก เป็นพื้นฐานสำคัญในการวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันและศึกษาแนวทางการเพิ่มปริมาณการผลิตในระดับสูงต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

การดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้ได้จัดทำขึ้นเพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างธรรมชาติที่มีคุณสมบัติในการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวด้วยเทคนิค H₂O₂ plate assay และจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดแยกได้ด้วยการศึกษาความสัมพันธ์ระดับวิวัฒนาการด้วยวิธีการทางพันธุศาสตร์โมเลกุล

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างธรรมชาติ

เก็บตัวอย่างน้ำ ตะกอนดิน เศษใบไม้ กิ่งไม้ จากแหล่งน้ำจืดในพื้นที่จังหวัดพระนครศรีอยุธยา จำนวน 2 แหล่ง ได้แก่ คลองในสวนสมเด็จพระศรีนครินทร์และคลองท่อ และตัวอย่างจากน้ำทะเลในบ่อเลี้ยงกุ้ง บ่อเลี้ยงหอยแครง เขตพื้นที่บางขุนเทียน สำหรับการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) สำหรับตัวอย่างจากแหล่งน้ำจืด และอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertani (LB) (0.5% Yeast extract, 1% Tryptone, 1% NaCl, 1.5% agar) ที่เพิ่มปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 0.5% สำหรับตัวอย่างจากน้ำทะเล (ปรับปรุงจาก Tilay and Andapure, 2012) เมื่อเจือจางตัวอย่างแบบเป็นลำดับขั้นเพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อที่เหมาะสมแล้ว จึงเพาะเลี้ยงเชื้อลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง NA และ LB สำหรับตัวอย่างจากน้ำจืดและน้ำทะเล ตามลำดับ บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงคัดเลือกไอโซเลตของแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีที่น่าสนใจ เช่น โคโลนีที่มีสีส้ม สีเหลือง ผิวหนามนวล เป็นต้น แล้วเพาะเลี้ยงจนได้เชื้อบริสุทธิ์ก่อนนำไปทดสอบในขั้นต่อไป

2. การศึกษาการผลิตกรดไขมันกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวด้วยเทคนิค H₂O₂ plate assay

เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างทั้งหมดนำมาทดสอบความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว โดยศึกษาความสามารถในการต้านสารกลุ่มออกซิไดส์ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species, ROS) ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้สารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นตัวแทนของสารกลุ่ม ROS โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) และ LB broth (ที่มีการเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.5%) สำหรับเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำจืดและน้ำทะเล ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเซลล์ได้เท่ากับ 1.0 ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร แล้วจึงฉีดเชื้อลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เกลี่ยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม วางกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (paper disc) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วตรงกลางรอยเชื้อ แล้วจึงหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.1, 0.5 และ 1% ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นกระดาษกรอง จากนั้นบ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งไอโซเลตที่สามารถเจริญได้

บริเวณที่หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แสดงถึงความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว (ปรับปรุงจาก Nishida *et al.*, 2006; Tilay and Andapure, 2012)

3. การจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ 16S rDNA

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) และ LB broth (ที่มีการเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.5%) สำหรับเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำจืดและน้ำทะเล ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง แล้วจึงเก็บเซลล์แบคทีเรียเพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดทางการค้า (GF-1 extraction kit, Vivantis) จากนั้นเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนบริเวณ 16S rDNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ที่ใช้ไพรเมอร์ 27F: 5' AGAGTTTGATCMTGGCT CAG 3' และ 1389R: 5' ACGGGCGGTGTGTACAAG 3' (Lane, 1991) ร่วมกับการใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, USA) แล้วจึงส่งตัวอย่างดีเอ็นเอวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Macrogen Inc. Korea)

4. การศึกษาเปรียบเทียบสายพันธุ์และความสัมพันธ์ของลำดับวิวัฒนาการ

ศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ 16S rDNA ของตัวอย่างแบคทีเรียจากฐานข้อมูล GenBank ใน National Center for Biotechnology Information server (NCBI) โดยใช้โปรแกรม BLASTn algorithm จากนั้นศึกษาความสัมพันธ์ของลำดับวิวัฒนาการของแบคทีเรียที่คัดแยกได้โดยการสร้างแผนภูมิลำดับวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม PHYLIP (version 3.695) และโปรแกรมการสร้างแผนภูมิลำดับวิวัฒนาการ TREEVIEW (version 0.5.0)

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างธรรมชาติ

เชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีที่น่าสนใจ เช่น มีสีส้ม สีเหลือง ผิวหน้ามีความมันวาว แยกได้จากตัวอย่างน้ำ ตะกอนดิน เศษใบไม้ กิ่งไม้ จากแหล่งน้ำจืดในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา สามารถแยกเป็นเชื้อบริสุทธิ์ได้จำนวน 13 ไอโซเลต ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างจากแหล่งน้ำทะเล เขตบางขุนเทียน สามารถคัดแยกได้จำนวน 14 ไอโซเลต และเมื่อแยกจนได้เชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์แล้วจึงนำเชื้อแบคทีเรียทุกไอโซเลตที่แยกได้ไปทดสอบความสามารถในการผลิตกรดไขมันกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวเป็นลำดับต่อไป

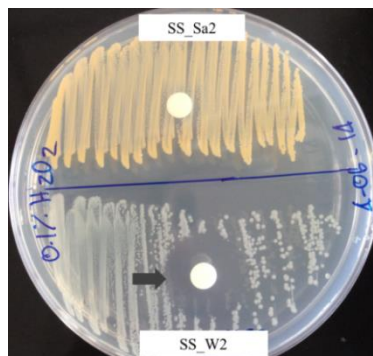
2. การศึกษาการผลิตกรดไขมันกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวด้วยเทคนิค H₂O₂ plate assay

การทดสอบความสามารถในการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H₂O₂ plate assay) สามารถนำมาใช้ในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวได้และยังนับว่าเป็นเทคนิคที่ง่ายและรวดเร็ว โดยอาศัยหลักการของความสามารถในการคงตัวหรือต้านต่อสภาวะที่มีสารอนุมูลอิสระของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว (Yoshida *et al.*, 2016) จากการทดสอบความสามารถในการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 27 ไอโซเลต ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.1, 0.5 และ 1% พบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลตสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.01% อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่น้อยเกินไป และเมื่อทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1% พบว่าเชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 และ 1% สังเกตจากการเกิดโซนยับยั้ง (inhibition zone) รอบกระดาศกรอง ในขณะที่การทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 0.1% มีแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้จำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต SS_Sa2, SS_Sa1.1, KT_W1Y, BK_PD3 และ BK_SD4 (ตารางที่ 1) ตัวอย่างการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและการเกิดโซนยับยั้งแสดงในภาพที่ 2

ตารางที่ 1 เชื้อแบคทีเรียผลิตผลิตภัณฑ์ไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวที่แยกได้จากแหล่งตัวอย่างธรรมชาติ

ลำดับที่	ไอโซเลต	บริเวณที่เก็บตัวอย่าง
1	SS_Sa2	เศษใบไม้ สวนสมเด็จพระศรีนครินทร์ จ.พระนครศรีอยุธยา
2	SS_S1.1	ดิน สวนสมเด็จพระศรีนครินทร์ จ.พระนครศรีอยุธยา
3	KT_W1Y	น้ำ คลองท้อ จ.พระนครศรีอยุธยา
4	BK_PD3	น้ำในบ่อเลี้ยงหอยแครง เขตบางขุนเทียน
5	BK_SD4	ตะกอนดินในบ่อเลี้ยงกุ้ง เขตบางขุนเทียน

เชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลตสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.1% ซึ่งอาจเป็นผลมาจากความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวและสะสมที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียซึ่งเมื่อสัมผัสกับสารอนุมูลอิสระภายนอกเซลล์ จึงส่งผลให้เซลล์แบคทีเรียมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและเจริญได้ในสภาวะดังกล่าว (Nishida *et al.*, 2006) และยังพบว่าความเข้มข้นของสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ใช้ในการทดสอบสอดคล้องกับวิธีการทดสอบแยกเชื้อแบคทีเรียจากทะเลที่สามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวด้วยเทคนิค H_2O_2 plate assay ของ Tilay และ Andapure (2012)

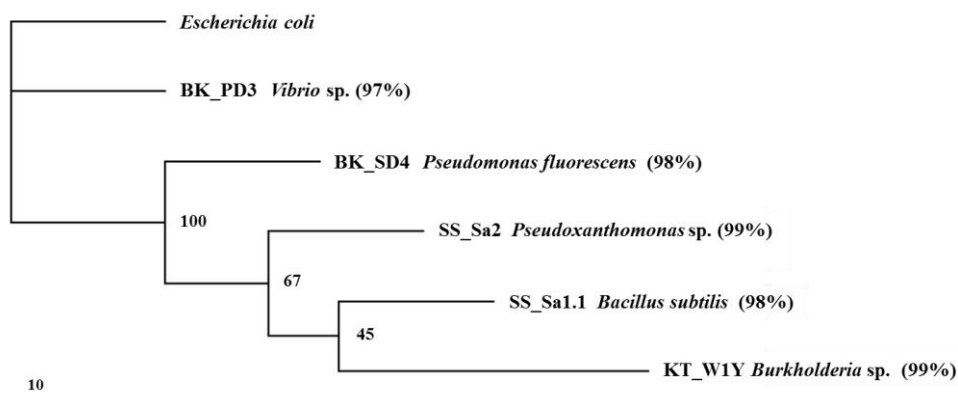


ภาพที่ 2 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต SS_Sa2 และลักษณะการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียไอโซเลต SS_W2 เมื่อทดสอบการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวด้วยเทคนิค H_2O_2 plate assay (ลูกศรแสดงการเกิดโซนยับยั้ง)

นอกจากนี้ยังพบว่าในการทดลองครั้งนี้ได้มีการใช้สารละลายโซเดียมเอไซด์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์คะตาเลส (catalase enzyme) ซึ่งเป็นเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระชนิดหนึ่งที่สามารถพบได้ในเซลล์แบคทีเรีย จึงเป็นการยืนยันได้ว่าการที่เชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีอนุมูลอิสระ เป็นผลมาจากกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวที่เชื้อแบคทีเรียผลิตได้ (Teixeira and Mota, 1992)

3. การจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยวิธีการทางพันธุศาสตร์โมเลกุล

การศึกษาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีนบริเวณ 16s rDNA ของแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวจำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต SS_Sa2, SS_Sa1.1, KT_W1Y, BK_PD3 และ BK_SD4 ผลการเปรียบเทียบสายพันธุ์แบคทีเรียพบว่าทั้ง 5 ไอโซเลตมีความแตกต่างและสามารถจัดจำแนกได้เป็น 5 สกุล เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ของลำดับวิวัฒนาการโดยการสร้างแผนภูมิลำดับวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) (ภาพที่ 3) ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์แบคทีเรียกับไอโซเลตที่คัดแยกได้ และเปอร์เซ็นต์ความใกล้เคียงของแต่ละไอโซเลต จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างธรรมชาติทั้งแหล่งน้ำจืดและน้ำทะเลมีความหลากหลายในสายพันธุ์ ซึ่งพิจารณาจากความห่างของลำดับวิวัฒนาการของแบคทีเรียในสกุลต่างๆ ทั้งนี้การเปรียบเทียบสายพันธุ์แบคทีเรียพบว่าส่วนใหญ่จัดอยู่ในสกุลที่เคยมีรายงานเกี่ยวกับการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวมาก่อนหน้านี้ เช่น แบคทีเรียไอโซเลต KT_W1Y, BK_SD4 และ BK_PD3 ซึ่งจัดอยู่ในสกุล *Burkholderia* (Inglis *et al.*, 2003), *Pseudomonas* (Nichols *et al.*, 1993) และ *Vibrio* (Elrazak *et al.*, 2013) ตามลำดับ ในขณะที่ไอโซเลต SS_Sa1.1 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* ซึ่งพบว่ามีการรายงานเกี่ยวกับการผลิตกรดแกมมา-ไลโนเลนิก (γ -linolenic acid) และอีพีเอ (Patnayak and Sree, 2005)



ภาพที่ 3 แผนภูมิลำดับวิวัฒนาการของแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว (ร้อยละของความเหมือนในการเปรียบเทียบสายพันธุ์แสดงในวงเล็บ)

สรุป

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างธรรมชาติทั้งในแหล่งน้ำจืดและน้ำทะเลเพื่อศึกษาสายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว โดยใช้เทคนิค H_2O_2 plate assay เป็นการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียโดยอาศัยหลักการของการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidative effect) ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวที่เชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์ขึ้นทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีสารออกซิไดส์ (reactive oxygen species, ROS) (Nishida *et al.*, 2007; Tilay and Annapure, 2012; Yoshida *et al.*, 2016) ผลการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียพบว่าสามารถคัดแยกเชื้อได้ทั้งสิ้นจำนวน 5 ไอโซเลต ซึ่งมีความหลากหลายของสายพันธุ์แบคทีเรียและจัดจำแนกได้เป็น 5 สกุล ประกอบด้วย *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Pseudoxanthomonas* และ *Bacillus* พบว่าส่วนใหญ่เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่เคยมีรายงานวิจัยเกี่ยวกับการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว

มาแล้ว (Nichols *et al.*, 1993; Inglis *et al.*, 2003; Patnayak and Sree, 2005; Elrazak *et al.*, 2013) แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาในครั้งนี้ยังพบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้บางสายพันธุ์ยังมีรายงานไม่มากนักเกี่ยวกับการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัว เช่น *Pseudomonas fluorescens* อย่างไรก็ตามยังคงต้องมีการศึกษาและพัฒนาการทดลอง เพื่อนำไปสู่ขั้นตอนของการวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันที่แบคทีเรียผลิตได้ รวมทั้งการพัฒนาสู่การผลิตที่ตอบสนองต่อความต้องการในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ควรมีการวิเคราะห์ในระดับสูงต่อไปเพื่อศึกษาชนิดของกรดไขมันที่แบคทีเรียผลิตได้ นำไปสู่การพัฒนาแบบการเพาะเลี้ยงและกระตุ้นให้เกิดการผลิตในปริมาณมากโดยการปรับปรุงสูตรอาหารหรือการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม เพื่อตอบสนองต่อความต้องการในด้านเภสัชกรรมและอาหารเสริมที่กำลังได้รับความสนใจในปัจจุบัน

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้รับสนับสนุนการทำวิจัยจากกองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา

เอกสารอ้างอิง

สิริวรรณ แก้วสุวรรณ. (2561). กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated Fatty Acid). สงขลา:

มาสเตอร์พีช แอนด์ โคเรซท์.

Albert, B. B., Cameron-Smith, D., Hofman, P. L. & Cutfield, W. F. (2013). Oxidation of marine omega-3 supplements and human health. *BioMed Research International*, 2013, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/464921>

Dyall, S. C., & Michael-Titus, A. T. (2008). Neurological benefits of omega-3 fatty acids. *Neuromolecular Medicine*, 10, 219–235.

Elrazak, A. A., Ward, A. C. & Glassey, J. (2013). Polyunsaturated fatty acid production by marine bacteria. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36, 1641–1652.

Horrobin, D. F. & Manku, M. S. (1983). Essential fatty acids in clinical medicine. *Nutritional and Health*, 2, 127–134.

Inglis, T. J. J., Aravena-Roman, M., Ching, S., Croft, K., Wuthiekanun, V. & Mee, B. J. (2003). Cellular fatty acid profile distinguishes *Burkholderia pseudomallei* from avirulent *Burkholderia thailandensis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 4812–4814.

Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics (In: Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., Eds.). New York, USA: John Wiley and Sons.

Nichols, D. S., Nichols, P. D. & McMeekin, T. A. (1993). Polyunsaturated fatty acids in Antarctic bacteria. *Antarctic Science*, 5, 149–160.

- Nishida, T., Orikasa, Y., Ito, Y., Yu, R., Yamada, A., Watanabe, K. & Okuyama, H. (2006). *Escherichia coli* engineered to produce eicosapentaenoic acid becomes resistant against oxidative damages. *FEBS Letters*, 580, 2731–2735.
- Patnayak, S., & Sree, A. (2005). Screening of bacterial associates of marine sponges for single cell oil and PUFA. *Letters in Applied Microbiology*, 40, 358-363.
- Peiretti, P. G., Meineri, G., Longato, E. & Tassone, S. (2018). Nutritive value and fatty acid content of soybean plant [*Glycine max* (L.) Merr.] during its growth cycle. *Italian Journal of Animal Science*, 17, 347-352.
- Pereira, S. L., Leonard, A.E. & Mukeri, P. (2003). Recent advances in the study of fatty acid desaturases from animals and lower eukaryotes. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 68, 97-106.
- Russell, N.J. & Nichols, D. S. (1999). Polyunsaturated fatty acids in marine bacteria- a dogma rewritten. *Microbiology*, 145, 767-779.
- Selvaraju, S., Raju, P., Rao, S. B., Raghavendra S., Nandi, S., Dineshkumar, D., et al. (2012). Evaluation of maize grain and polyunsaturated fatty acid (PUFA) as energy sources for breeding rams based on hormonal, sperm functional parameters and fertility. *Reproduction fertility development*, 24, 669-678.
- Swanson, D., Block, R., & Mousa, S.A. (2012). Omega-3 fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life. *Advances in Nutrition*, 3, 1–7.
- Teixeira, J. A. & Mota, M. (1992). Determination of catalase activity and its inhibition by a simple manometric method. *Biochemical Education*, 20, 174–175.
- Tilay, A. & Annapure, U. (2012). Novel simplified and rapid method for screening and isolation of Polyunsaturated fatty acids producing marine bacteria. *Biotechnology Research International*, 2012. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/542721>
- Yoshida, K., Hashimoto, M., Hori, R., Adachi, T., Okuyama, H., Orikasa, Y., et al. (2016). Bacterial long-chain polyunsaturated fatty acids: their biosynthetic genes, functions, and practical use. *Marine Drugs*, 14, <https://doi.org/10.3390/md14050094>
- Zárate R., El Jaber-Vazdekis N., Tejera N., Pérez J. A. & Rodríguez C. (2017). Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. *Clinical and Translational Medicine*, 6, <https://doi.org/10.1186/s40169-017-0153-6>