บทที่ 2

ผลงานวิจัยและงานเขียนอื่น ๆที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลิปิด (lipid)

ลิปิด (lipid) เป็นกลุ่มของสารประกอบอินทรีย์ซึ่งแตกต่างจากโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และกรดนิวคลีอิคในด้านคุณสมบัติการละลาย โดยลิปิดมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ (water-insoluble หรือ hydrophobic) หรือละลายน้ำได้น้อยมาก แต่สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) ซึ่งเป็นสารละลายที่ไม่มีขั้ว (nonpolor) เช่น อีเทอร์(ether) คลอโรฟอร์ม (chloroform) เฮกเซน (hexane) เบนซีน (benzene) เป็นต้น

ลิปิดเป็นสารประกอบชีวโมเลกุลที่พบในสิ่งมีชีวิตทั่วไปทั้งในพืชและสัตว์ มีหน้าที่หลักเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์หรือเซลล์เมมเบรน (cell membrane) ซึ่งโครงสร้างทางเคมีของลิปิดที่พบในธรรมชาติค่อนข้างหลากหลายขึ้นอยู่กับหน้าที่ทางชีวภาพ โดยลิปิดสามารถแบ่งตามลักษณะโครงสร้างทางเคมี ได้ดังนี้

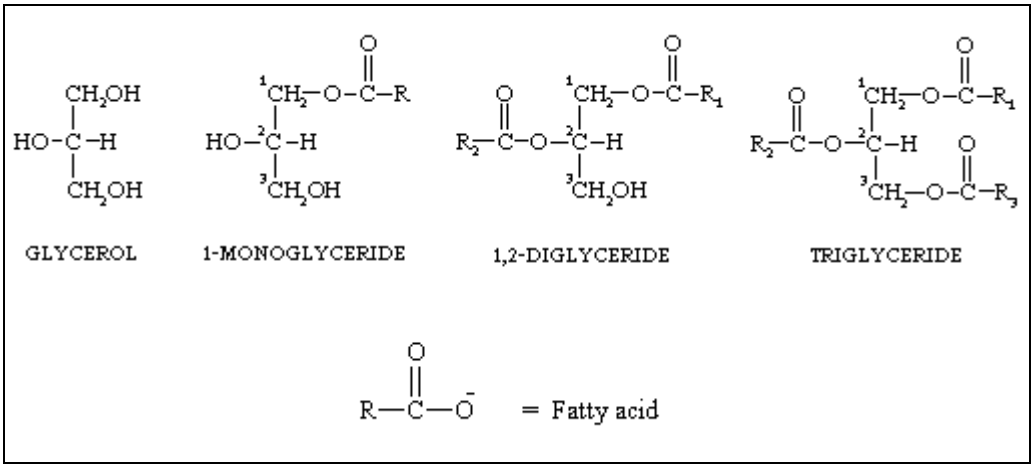
1. **ลิปิดธรรมดา (Simple lipid)**

เป็นลิปิดที่ประกอบด้วยเอสเทอร์ของกรดไขมัน (fatty acid) กับแอลกอฮอล์ (alcohol) ชนิดต่างๆ ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

ก. ไขมัน (Fats) เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมัน (fatty acid) จับกับกลีเซอรอล (glycerol) 1 โมเลกุลด้วยพันธะเอสเทอร์ เรียกว่า เอซิลกลีเซอรอล (acylglycerol) โดยสายของกรดไขมันเรียกว่า หมู่เอซิล (acyl group, R-COO-) แบ่งได้ตามจำนวนกรดไขมันที่มีอยู่ในโมเลกุล คือ โมโนกลีเซอไรด์ (monoglyceride) ไดกลีเซอไรด์ (diglyceride) และไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) หรือไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol) ซึ่งเป็นสารประกอบกลีเซอไรด์ที่พบได้มากที่สุดในธรรมชาติ โดยถ้ามีลักษณะเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้องเรียกว่าไขมัน แต่ถ้าเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้องเรียกว่า น้ำมัน (oil)

รูปที่ 2.1

แสดงสูตรโครงสร้างของกลีเซอไรด์ชนิดต่างๆ



ข. ขี้ผึ้ง (Waxes) เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมัน (fatty acid) จับกับแอลกอฮอล์ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลหมู่เดียว (monohydric alcohols) (มี –OH เพียงหมู่เดียว) ได้แก่ ไขมันที่เคลือบผิวนอกของพืช และสัตว์

2. **ลิปิดเชิงซ้อน** (Complex lipid)

เป็นลิปิดที่ประกอบด้วยเอสเทอร์ของกรดไขมันกับแอลกอฮอล์ที่มีหมู่อื่นปนอยู่ด้วย เช่น ฟอสโฟลิปิด (phospholipids) สฟิงโกลิปิด (sphingolipid) ไกลโคลิปิด (glycolipids) และ ลิปิดเชิงซ้อนอื่นๆ เช่น sulfolipids aminolipids lipoprotein ตัวอย่างของลิปิดเชิงซ้อนที่สำคัญได้แก่

ก. ฟอสโฟลิปิด (phospholipid)

ฟอสโฟลิปิด (phospholipid) หรือฟอสโฟกลีเซอไรด์ (phosphoglyceride) เป็นลิปิดที่มีโครงสร้างต่างจากกลีเซอรอล คือหมู่ -OH หมู่ที่ 3 ของกลีเซอรอล จะต่ออยู่กับแอลกอฮอล์ชนิดอื่นๆ ด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ (phosphodiester) ฟอสโฟลิปิดชนิดที่ไม่มีหมู่แอลกอฮอล์คือ กรดฟอสฟาติดิค (phosphatidic acid) ซึ่งพบเพียงเล็กน้อยในเซลล์ และทำหน้าที่เป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์ ฟอสโฟลิปิดอื่นๆ ฟอสโฟลิปิดส่วนใหญ่จะพบเป็นองค์ประกอบหลักในเยื่อหุ้มต่างๆ เช่น เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) และเยื่อหุ้มออร์กาเนลล์ (organelle membrane) ต่างๆ ตัวอย่างของฟอสโฟลิปิด และสูตรโครงสร้างของฟอสโฟลิปิดชนิดต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 2.1 และรูปที่ 2.1

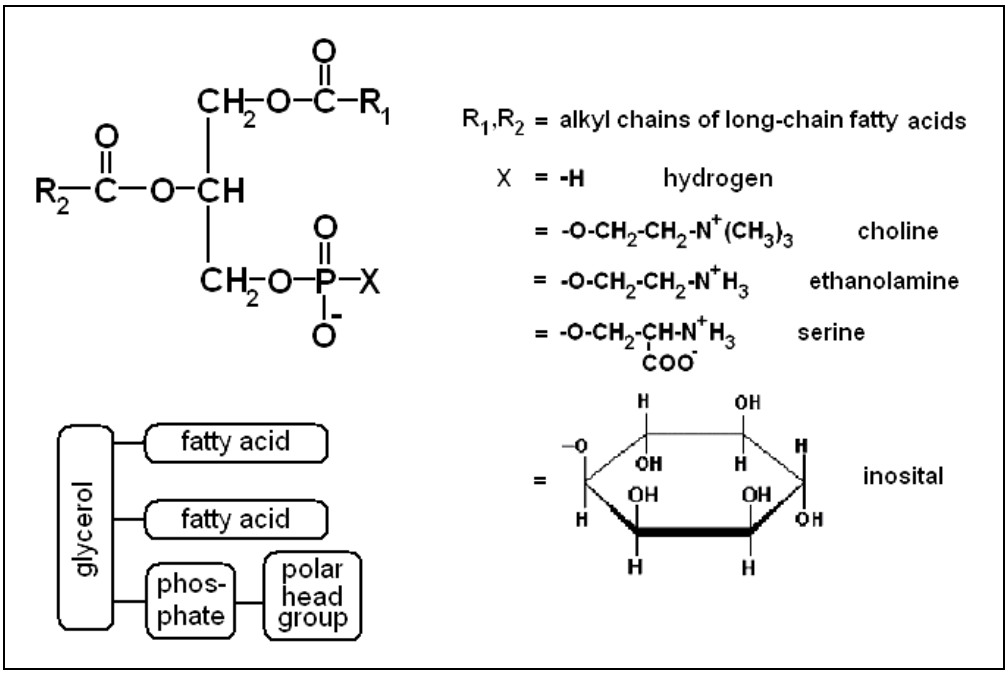
ตารางที่ 2.1

แสดงฟอสโฟลิปิดชนิดต่างๆ

Phospholipid	-X group
Phosphatidic acid	Hydrogen
Phosphatidyl choline	Choline
Phosphatidyl ethanolamine	Ethanolamine
Phosphatidyl serine	Serine
Phosphatidyl inositol	Inositol

รูปที่ 2.2

แสดงสูตรโครงสร้างทั่วไปของฟอสโฟลิปิด



(http://www.humc.edu/research/medicine/biochemistry/bioc800/lip-lobj.htm)

เมื่อพิจารณาโครงสร้างโมเลกุล พบว่าฟอสโฟลิปิดประกอบด้วยส่วนที่มีขั้ว (polor) คือส่วนที่มีประจุ ได้แก่หมู่ phosphate และ nitrogenous base กับส่วนที่ไม่มีขั้ว(non-polar) คือสายไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon chain) จากกรดไขมัน สารที่มีคุณสมบัติสองอย่างในตัว เรียกว่า amphipathic ทำให้ฟอสโฟลิปิดมีความสำคัญในการเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ เพราะสามารถจัดเรียงโมเลกุลเป็นแบบที่เรียกว่า lipid bilayer ซึ่งเป็นการเรียงโมเลกุลของลิปิดเป็น 2

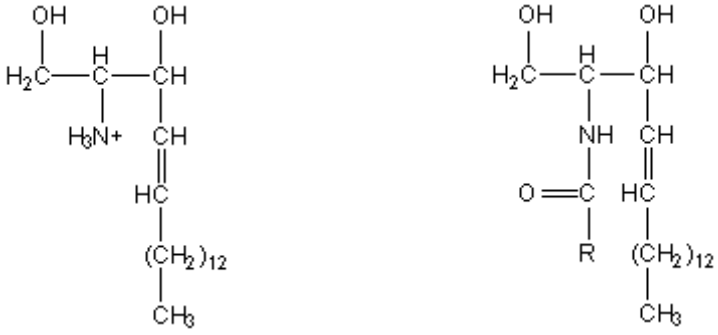
แถว โดยหันปลายด้านที่ไม่มีขั้วเข้าหากันด้านในแล้วหันส่วนที่มีขั้วออกด้านนอกซึ่งเป็นส่วนที่สัมผัสกับน้ำ ลิปิดที่เป็น amphipathic เมื่ออยู่ในตัวกลางที่เป็นสารละลาย จะเกิดการรวมโมเลกุลเป็นแบบที่เรียกว่าไมเซลล์ (micelles) โดยฟอสโฟลิปิดจะเรียงโมเลกุลเป็นวงกลม ที่ส่วนที่ไม่มีขั้วจะรวมกันด้านในและหันส่วนมีขั้วออกด้านนอกเพราะส่วนนอกเป็นส่วนที่สัมผัสกับน้ำ

ข. สฟิงโกลิปิด (Sphingolipid)

สฟิงโกลิปิดเป็นอนุพันธ์ของสฟิงโกซีน (sphingosine) ซึ่งมีกรดไขมันต่ออยู่กับหมู่ $-NH_2$ ของสฟิงโกซีนด้วยพันธะเอไมด์ (amide bond) สารประกอบที่ได้เรียก ceramide (รูปที่ 3) สฟิงโกลิปิด เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเซลล์เมมเบรน แบ่งเป็น 3 ชนิด คือ สฟิงโกไมอีลิน (sphingomyelin) ซีเรโบไซด์ (cereboside) และแกงกลิโอไซด์ (glangioside)

รูปที่ 2.3

แสดงสูตรโครงสร้างของ Sphingosine และ Ceramide



Sphingosine Ceramide

ค. ไกลโคลิปิด (Glycolipids)

ไกลโคลิปิด (Glycolipids) หรือ เซรีโบรไซด์(Cerebrosides) เป็นกลุ่มของลิปิดที่มีโมเลกุลประกอบด้วย กรดไขมัน คาร์โบไฮเดรต และด่างที่มีไนโตรเจน พบมากที่เซลล์เมมเบรนของสิ่งมีชีวิตที่มีการสังเคราะห์แสง เช่น สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (cyanobacteria) และคลอโร-พลาสต์ของพืช

3. อนุพันธ์ของลิปิด (Lipid derivatives)

เป็นสารประกอบต่างๆ ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสลิปิดใน 2 กลุ่มแรกที่กล่าวมา ได้แก่ กลีเซอรอล (glycerol), กรดไขมัน (fatty acid) eicosanoids (prostaglandins, prostacyclins, thromboxanes) รวมถึงสารประกอบเทอร์พีน เช่น โคเลสเตอรอล (cholesterol) สเตียรอยด์ (steroids) กรดน้ำดี (bile acid) คาโรทีนอยด์ (carotenoids) วิตามินที่ละลายในไขมัน (Fat-soluble vitamins) และคีโตนบอดีส์ (ketone bodies) เป็นต้น

ลิปิดมีหน้าที่สำคัญหลายอย่างภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ดังนี้

1. เป็นแหล่งสะสมพลังงาน(energy storage)ให้กับสิ่งมีชีวิต ไขมันสามารถเก็บพลังงานได้มากกว่าคาร์โบไฮเดรตเท่าตัว
2. เป็นส่วนประกอบของเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) เรียกว่า ลิปิดเมมเบรน ซึ่งมีคุณสมบัติในการยอมให้สารบางชนิดผ่านเข้าออกได้
3. ทำหน้าที่เป็นฉนวนป้องกันการสูญเสียความร้อนจากเนื้อเยื่อต่างๆ และช่วยควบคุมอุณหภูมิร่างกายให้คงที่
4. เป็นบริเวณที่เกิดกระบวนการทางชีวเคมีหลายอย่าง เช่น การสร้าง ATP ในไมโตคอนเดรียและกระบวนการสังเคราะห์แสงของคลอโรพลาสต์
5. เป็นตัวควบคุมกระบวนการ metabolism หรือทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์

2.2 กรดไขมัน (Fatty acid)

เป็นสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่ม carbon compounds ประกอบด้วย hydrocarbon ที่ต่อกันเป็นโซ่ยาวและมี -COOH (carboxylic group) อยู่ปลายข้างหนึ่งของโมเลกุล ดังนั้นจึงมีสูตรโมเลกุลทั่วไปเป็น R-COOH โดย R- คือหมู่แอลคิล (alkyl) โดยกรดไขมันจะมีจำนวนคาร์บอนเป็นเลขคู่อยู่ระหว่าง 4-30 ตัว และในธรรมชาติจะพบกรดไขมันเป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอลที่อยู่ในไขมันและน้ำมัน และพบฟอสโฟกลีเซอไรด์เป็นส่วนใหญ่ แต่พบกรดไขมันในรูปอิสระน้อย

สมบัติในการละลายและจุดหลอมเหลวของกรดไขมันจะขึ้นอยู่กับความยาวของโมเลกุลและดีกรีของความไม่อิ่มตัว (degree of unsaturation) กรดไขมันที่มีสายยาวและมีพันธะคู่น้อยจะมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ และถ้าสายของกรดไขมันที่ยาวขึ้นจะมีจุดหลอมเหลวและจุดเดือดเพิ่มขึ้น กรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนน้อยกว่า 10 อะตอม จะมีลักษณะเป็นของเหลวที่

อุณหภูมิห้อง ถ้ามากกว่า 10 อะตอม จะเป็นของแข็ง สำหรับกรดไขมันไม่อิ่มตัวยิ่งมีพันธะคู่มาก จะมีจุดหลอมเหลวต่ำกว่ากรดไขมันอิ่มตัวที่มีจำนวนคาร์บอนเท่ากัน

เมื่อกรดไขมันอยู่ใน physiological pH (pH~7.4) carboxylic group จะอยู่ในรูป $-COO^-$ (pKa~4.8) ทำให้กรดไขมันมีคุณสมบัติเป็น amphipathic nature คือ มีทั้งส่วนที่เป็น hydrophilic (polar) และ hydrophobic(non-polar) และสามารถจับกับโมเลกุลของน้ำ แต่อย่างไรก็ตามจะเห็นว่า long-chain fatty acid ส่วนของ hydrophobic (สายโซ่ hydrocarbon) จะเด่นกว่า จึงทำให้โมเลกุลไม่ค่อยละลายน้ำ

กรดไขมันสามารถแบ่งตามลักษณะของพันธะคู่ภายในโมเลกุลเป็น 2 ชนิด คือ กรดไขมันอิ่มตัว และ กรดไขมันไม่อิ่มตัว ดังนี้

1. กรดไขมันอิ่มตัว (Saturated fatty acid)

เป็นกรดไขมันที่มีอะตอมของคาร์บอน (C) ต่อกันด้วยพันธะเดี่ยว (covalent single bond) และไม่มีพันธะคู่ภายในสายไฮโดรคาร์บอน มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_nH_{2n}O_2$ โดยกรดไขมันชนิดอิ่มตัวที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยที่สุด คือ กรดบิวทิริก(butyric acid)ซึ่งมีคาร์บอน 4 อะตอม ตัวอย่างของกรดไขมันอิ่มตัว เช่น กรดปาล์มิติก (palmitic acid) มีคาร์บอน 16 อะตอม (C16:0) และ กรดสเตียริก (steric acid) มีคาร์บอน 18 อะตอม (C18:0) เป็นต้น

2 กรดไขมันไม่อิ่มตัว (Unsaturated fatty acid)

เป็นกรดไขมันที่มีพันธะคู่ (double bond) ตั้งแต่ 1 ตำแหน่งขึ้นไปอยู่ระหว่างคาร์บอนอะตอมในโมเลกุลและมีการเรียงตัวแบบ cis-configuration ทั้งนี้ตำแหน่งของพันธะคู่ในกรดไขมันต้องมีระยะห่างกัน 3 คาร์บอนอะตอม ดังนี้ $-CH=CH-CH_2-CH=CH-$ โดยกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวยังแบ่งเป็นกลุ่มย่อยตามจำนวนพันธะคู่ ได้ดังนี้

ก. Monounsaturated fatty acid (MUFA)

เป็นกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่ 1 พันธะ มีสูตรทางเคมีเป็น $C_nH_{2n-1}COOH$ เช่น กรดปาล์มิโตเลอิก (palmitoleic, C16:1) และกรดโอเลอิก (oleic acid, C18:1)

ข. Polyunsaturated fatty acid (PUFA)

เป็นกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะ เช่น กรดลิโนเลอิก (linoleic acid, C18:2) กรดลิโนเลนิก (linolenic acid, C18:3) และ กรดอะราคิโดนิค (arachidonic acid, C20:4)

2.2.1 **กรดไขมันจำเป็น** (Esserstial fatty acids)

เป็นกรดไขมันที่ไม่สามารถสร้างได้ แต่กรดไขมันประเภทนี้มีความสำคัญและจำเป็นต่อการดำรงชีวิตแบบปกติของมนุษย์ กรดไขมันนี้จึงเรียก กรดไขมันจำเป็น (essential fatty acid) มี 2ชนิด คือ 18:2$\Delta^{9,12}$ (linoleic acid, ω-6 fatty acid) และ 18:3$\Delta^{9,12,15}$ (linolenic acid, ω - 3 fatty acid) นอกจากนั้นยังพบว่า Arachidonic acid มีความสำคัญต่อร่างกายมาก และต้องสร้างมาจากกรด linoleic ดังนั้นจึงจัด Arachidonic acid (20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$) เป็นกรดไขมันจำเป็นด้วย ร่างกายต้องได้รับกรดไขมันจำเป็นทุกชนิดให้เพียงพอจากการรับประทานอาหารไขมัน โดยเฉพาะไขมันจากพืช ยกเว้นน้ำมันมะพร้าว(วรรณรัตน์,ออนไลน์ ; Sandra ,2004)

หน้าที่สำคัญของกรดไขมันจำเป็น เช่น กรด arachidonic acid (20:4) ใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารกลุ่ม Eicosanoids (prostaglandins, Prostacyclins, Thromboxanes) ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติคล้ายฮอร์โมนทำหน้าที่หลายอย่าง เช่น

1.พรอสตาแกลนดิน (prostaglandins,PG) มีทั้งหมด 6 กลุ่ม คือ PGA, PGB,PGC,PGD, PGE และ PGF แต่ละกลุ่มมีโครงสร้างที่แตกต่างกันไป จึงมีการทำงานที่แตกต่างกันไปตามชนิดของ prostaglandin เช่น ช่วยในการหลั่งน้ำย่อยที่กระเพาะอาหาร ช่วยลดอาการปวดบวมแดงอักเสบที่พบในร่างกาย

2.พรอสตาซัยคลิน (Prostacyclins) สร้างมากพรอสตาแกลนดินจีสอง (PGG_2) ที่ผนังหลอดเลือดอาร์เทอรี (artery wall,) มีฤทธิ์ยับยั้งไม่ให้เกิด platelet aggregation และช่วยขยาย coronary arteries ทำให้ความดันลดลง

3.ธรอมบอกเซน (Thromboxanes) สร้างจาก PGG_2 ที่ platelets มีฤทธิ์กระตุ้นให้เกิด platelets aggregation ทำให้โลหิตหยุดไหล ทำให้ coroneryarteries หดตัวทำให้ความดันเลือดเพิ่ม (วรรณรัตน์,ออนไลน์)

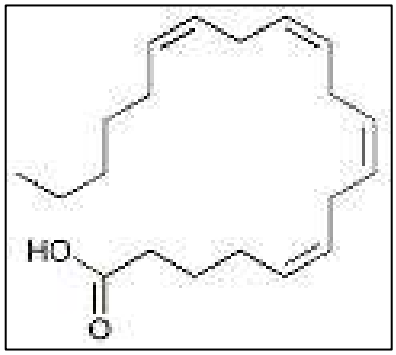
2.2.2 **กรดไขมันโอเมก้า** (Omega fatty acid)

คือกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่เรียกโดยระบุตำแหน่งพันธะคู่เพียงตำแหน่งเดียวจากปลายหมู่เมธิล แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือ ω -7 มีกรดไขมันต้นแบบคือ Palmitoleic acid , ω -9 มีกรดไขมันต้นแบบคือ Oleic acid, ω -6 มีกรดไขมันต้นแบบคือ Linoleic acid, ω -3 มีกรดไขมันต้นแบบคือ Linolenic acid กรดไขมันต้นแบบเหล่านี้สามารถนำไปใช้สร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดอื่น เช่น Arachidonic acid (20:4, ω -6) สร้างมาจากกรดไขมัน Linoleic acid (18:2, ω -6) ทั้งนี้กรดไขมันต่างประเภทกันไม่สามารถเปลี่ยนหรือนำไปสังเคราะห์กรดไขมันอื่นๆที่ไม่ได้

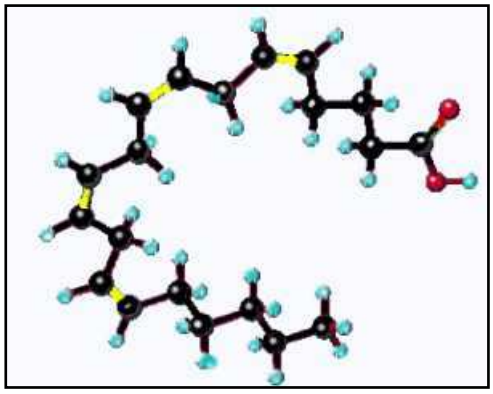
อยู่ในประเภทเดียวกัน กรดไขมันโอเมก้า 3 และ 6 จัดเป็นกรดไขมันที่มีความสำคัญทางโภชนาการมาก เช่น ecosapentaenoic (EPA) 20:5, ω -3 และ decosahexaenoic (DHA) 22:6, ω -3 กรดไขมันทั้งสองพบมากในน้ำมันจากปลา (fish oil) ในร่างกายสามารถสร้างจากกรดไขมันต้นแบบคือ linolenic acid กรด EPA ช่วยป้องกันการแข็งตัวของหลอดเลือด กรด DHA ช่วยในด้านความจำ และ การมองเห็น

2.2.3 **กรดอะราคิโดนิค** (Arachidonic acid)

Arachidonic acid (5,8,11,14-cis-eicosatetraenoic acid) จัดอยู่ในกลุ่มของ omega-6 class polyunsaturated fatty acid เป็นองค์ประกอบหลักที่ช่วยในการผ่านเข้าออกสารของเซลล์และช่วยทำให้ memnrane มีความยืดหยุ่น และไม่แข็งตัวเมื่ออยู่ในอุณหภูมิต่ำ(Kenichi *et al.* ,2002 ; Milan,1998)ทั้งยังเป็นกรดไขมันที่จำเป็นและเป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารชีวโมเลกุลกลุ่ม Eicosanoid ที่สำคัญ เช่น prostaglandins , thromboxanes และ leukotrienes ทั้งยังมีการแสดงออกทางชีวภาพที่หลากหลาย (Kenichi *et al.*,1998 ; Chengling,2002)



รูปที่ 2.4 แสดงโครงสร้าง ARA 2มิติ ของ Arachidonic acid (www.mpcfaculty.net)



รูปที่ 2.5 แสดงโครงสร้าง ARA 3มิติ ของ Arachidonic acid (www.cyberlipid.org/fa/acid003.htm)

2.3 **การสังเคราะห์กรดไขมัน** (Fatty acid biosynthesis)

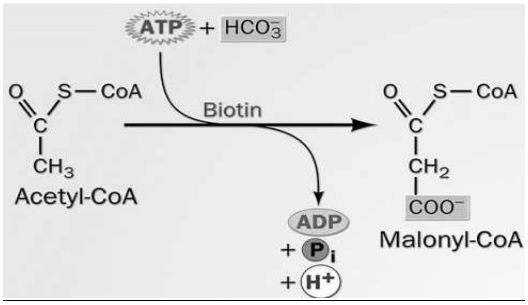
การสังเคราะห์กรดไขมันในสิ่งมีชีวิตจะเกิดขึ้นที่ไซโตพลาสม(cytoplasm) ด้วยการทำงานร่วมกันขององค์ประกอบต่างๆ ได้แก่ multienzyme complex(fatty acid synthetase) ประกอบด้วยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในขบวนการสังเคราะห์กรดไขมันทั้งหมด และ acyl carrier protein(ACP)

ขั้นตอนในการสังเคราะห์กรดไขมัน มีดังนี้

1) การเปลี่ยน Acetyl-CoA เป็น malonyl-CoA โดยทำปฏิกิริยากับคาร์บอนไดออกไซด์และใช้ ATP เป็นแหล่งพลังงาน ปฏิกิริยานี้ถูกเร่งโดยเอนไซม์ Acetyl-CoA carboxylase แสดงได้ตามปฏิกิริยาข้างล่าง

รูปที่ 2.6

แสดงกระบวนการเปลี่ยน Acetyl -CoAเป็น Malonyl-CoA



ซึ่ง acetyl-CoA ส่วนใหญ่จะถูกสังเคราะห์ขึ้นภายใน mitochondria แต่การสังเคราะห์กรดไขมันเกิดขึ้นที่ cytoplasm ดังนั้นจึงต้องมีการขนส่ง acetyl-CoA ออกสู่ cytoplasm โดยรวมตัวกับ oxaloacetate เกิดเป็น citrate ซึ่งสามารถผ่านเมมเบรนของ mitochondria ออกไปได้ ที่ cytoplasm โมเลกุลของ citrate จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ citrate lyase ได้ acetyl-CoA และ oxaloacetate ซึ่งจะสามารถถูกเปลี่ยนไปเป็น malate หรือ pyruvate แล้วนำส่งกลับเข้าสู่ mitochondria ได้อีกครั้ง

2) acetyl-CoA และ malonyl-CoA ต่างทำปฏิกิริยากับ acyl carrier protein (ACP) ของเอนไซม์ fatty acid synthase complex กลายเป็น acetyl-ACP และ malonyl-ACP ตามลำดับ

3) เกิดปฏิกิริยา Condensation มีการรวมตัวของ acetyl-ACP และ malonyl-ACP ได้ Acetoacetyl- ACP โดยการทำงานของเอนไซม์ β-ketoacyl–ACP synthase

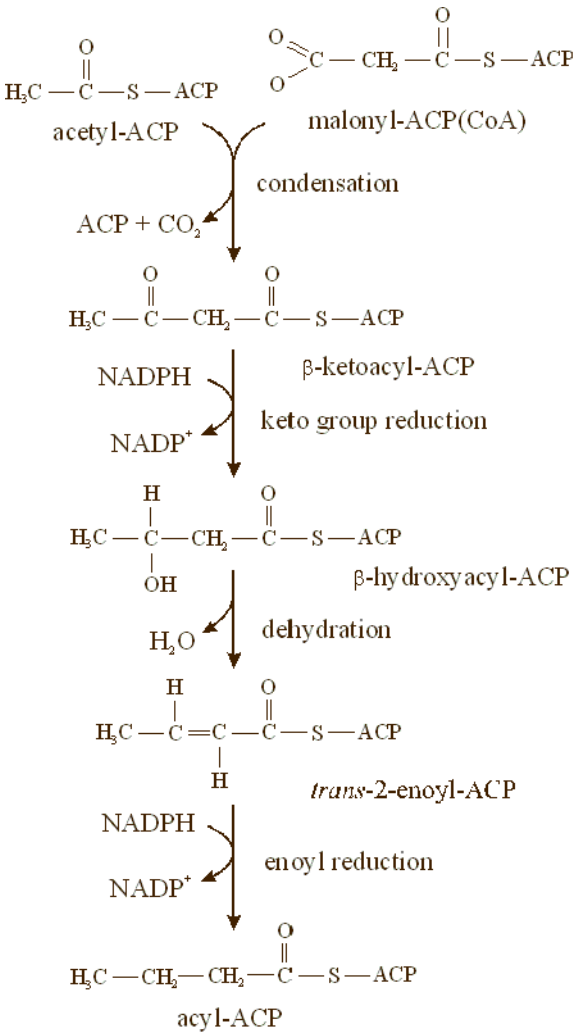
4) เกิดปฏิกิริยา Reduction มีการรีดิวซ์ acetoacetyl–ACP ด้วยเอนไซม์ β-ketoacyl–ACP reductase และมี NADPH เป็นตัวช่วยเกิดเป็น D- β-hydroxybutyryl-ACP

5) เกิดปฏิกิริยา Dehydrationด้วยเอนไซม์ β-hydroxyacyl–ACP dehydrase มีการสูญเสียน้ำออกไป 1 โมเลกุล

6) เกิดปฏิกิริยา Reduction เป็นการรีดิวซ์ครั้งสุดท้ายด้วยเอนไซม์ enoyl-ACP reductase จนกระทั่งได้ Butyryl–ACP ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีจำนวนคาร์บอน 4 อะตอม

รูปที่ 2.7

แสดงกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน



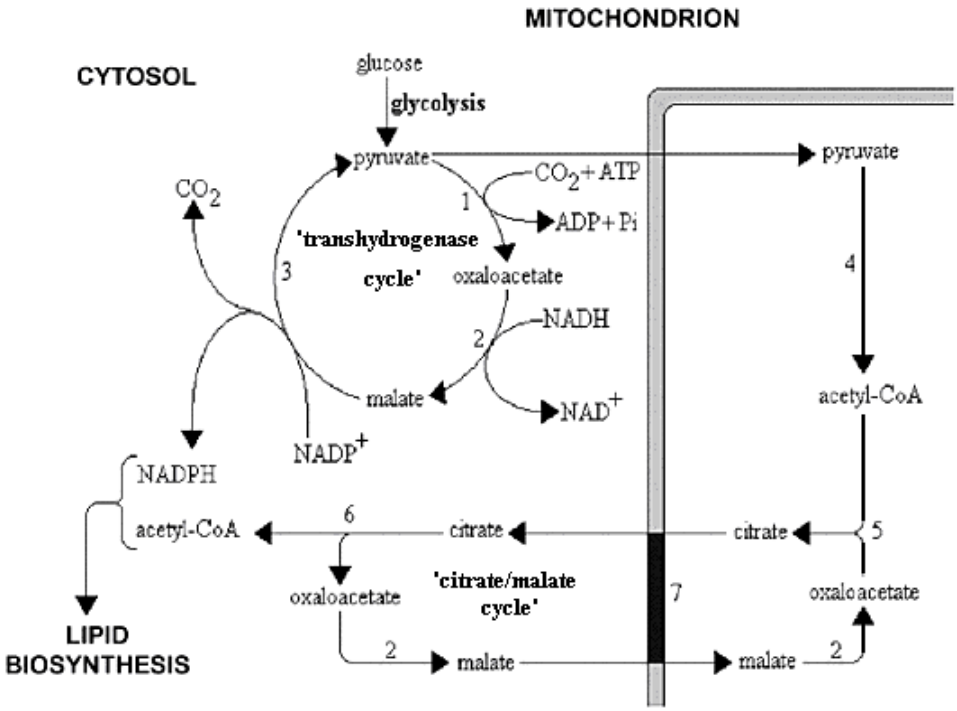
ในการสังเคราะห์กรดปาลมิติก (palmitic acid) จะเกิดกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันตามข้างต้นทั้งสิ้น 7 รอบ โดยแต่ละรอบนั้นเป็นการเติมคาร์บอนทีละ 2 อะตอม จะได้สมการในการสังเคราะห์กรดปาลมิติก ดังนี้

$$8\ \text{Acetyl-CoA} + 7\text{ATP} + 14\text{NADPH} \longrightarrow \text{palmitic acid(16:0)} + 14\text{NADP}^{+} + 8\text{CoA} + 6\text{H}_2\text{O} + 7\text{ADP} + 7\text{Pi}$$

กรดปาลมิติก (palmitic acid) เป็นกรดไขมันหลักที่ถูกสร้างขึ้นในเซลล์สัตว์ การต่อสายยาวของกรดไขมันจะพบใน SER (smooth endoplasmic reticulum) และใน mitochondria โดยการเพิ่มความยาวจาก palmityl CoA เกิดเป็น stearoyl CoA ซึ่งจะเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) ต่อไป

รูปที่ 2.8

แสดงการขนส่ง Acetyl-CoA จากไมโตคอนเดรียสู่ไซโตพลาสม เพื่อใช้ในการสังเคราะห์กรดไขมัน และลิปิดใน oleaginous microorganism (Ratledge, 2004)



Enzymes:

1 = pyruvate decarboxylase ; 2 = malate dehydrogenase;

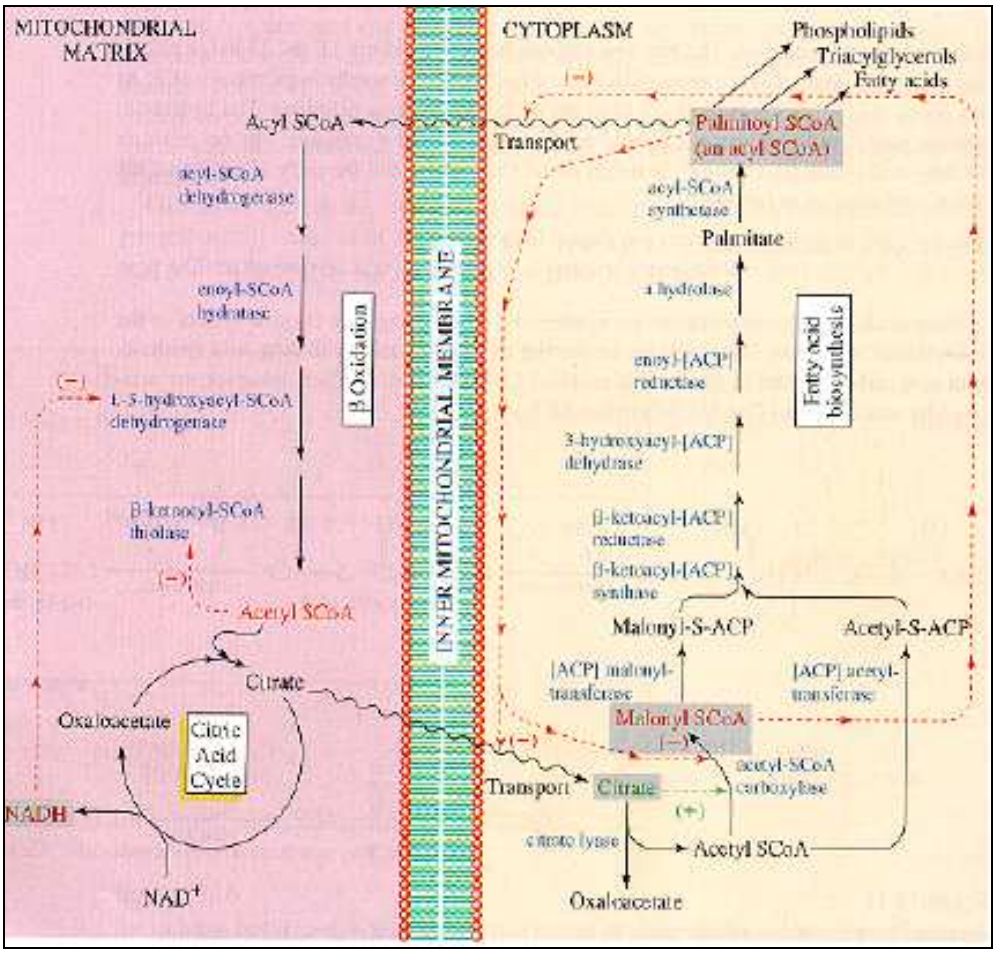
3 = malic enzyme ; 4 = pyruvate dehydrogenase;

5 = citrate synthase ; 6 = ATP:citrate lyase;

7 = citrate/malate translocase

รูปที่ 2.9

แสดงกระบวนการสร้างกรดไขมันในไซโตพลาสมของสิ่งมีชีวิต



2.4. การสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัว Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) ในจุลินทรีย์

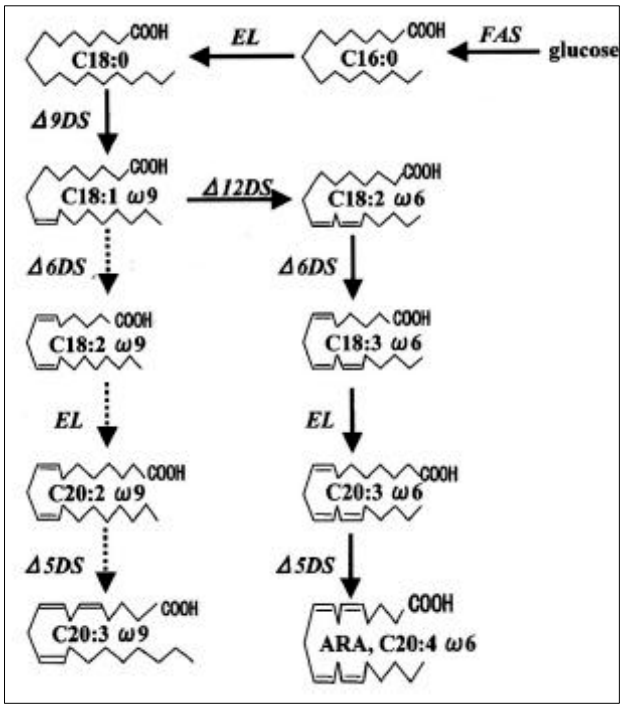
การสังเคราะห์ PUFAs จะใช้เอนไซม์ fatty acid desaturase ในการเติมพันธะคู่เข้าสู่สายของกรดไขมัน ที่เรียกว่าปฏิกิริยา desaturation โดยทั่วไปเอนไซม์ fatty acid desaturase นั้นแบ่งได้เป็น 3 ชนิด คือ acyl-CoA , acyl- ACP และ acyl-lipid desaturase โดยในราจะพบเอนไซม์ fatty acid desaturase แบบ acyl-CoA desaturase และในราจะใช้ cytochrome b_5 เป็นตัวรับอิเล็กตรอน

การสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะในราโดยทั่วไปเริ่มต้นจาก C16:0 (palmitic acid) ซึ่งเป็นกรดไขมันอิ่มตัวที่สร้างขึ้นภายในเซลล์ ด้วยปฏิกิริยา elongation จะทำให้ C16:0 เปลี่ยนเป็น C18:0 (stearic acid) จากนั้นเกิดปฏิกิริยา desaturation โดยเอนไซม์ Δ^9

desaturase ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการเติมพันธะคู่ที่คาร์บอนอะตอมระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 9 และ 10 นับจากปลายทางด้านหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl end) ได้ oleic acid (C18:0 cis 9) จากนั้น oleic acid จะเกิดปฏิกิริยา desaturation โดยเอนไซม์ Δ^{12} desaturase ได้ linoleic acid (C18:2 cis 9,12) และจากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็น gamma-linoleic acid (C18:3 cis 9,12,15) ขั้นต่อไปจะเกิดปฏิกิริยา desaturation โดยเอนไซม์ Δ^{6} desaturase ตามด้วยปฏิกิริยา elongation และ desaturation โดยเอนไซม์ Δ^{5} desaturase ตามลำดับจนได้ arachidonic acid (C 20:4 cis 5,8,11,14) ขึ้น (สุรพันธ์,2546 ; Milan,1998 ; Kenichi,2002)

รูปที่ 2.10

แสดง pathways การสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัว Arachidonic acid ในรา *Mortierella* sp.(Kenichi *et al.*,2002)



2.5 เชื้อราผลิตกรดอะราคิโดนิค : *Mortierella* sp.

รา (fungi) หมายถึง สิ่งที่มีชีวิตจำพวกยูแคริโอตชั้นต่ำ (lower eukaryotes) ที่มีนิวเคลียสแบบ eucaryotic (มี nuclear membrane) , ไม่มี chlorophyll , โครงสร้างของเซลล์(somatic structure) ของรา ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นเส้นสาย(filament) ซึ่งเมื่ออยู่รวมกันเป็นกลุ่ม เรียกว่า mycelium ราส่วนใหญ่สามารถสร้างสปอร์เพื่อใช้ในการสืบพันธุ์ซึ่งมีทั้งแบบใช้เพศ (sexual) และไม่ใช้เพศ (asexual) ผนังเส้นใยของราประกอบด้วยสาร chitin หรือ cellulose (วิจัย,2546 ; ชุลี ,2546)

ลักษณะการเจริญของรา (culture characteristics) บนอาหารต่างๆจะแตกต่างกันไปตามสภาพแวดล้อม

1.อาหารแข็ง (solid culture) ราเจริญเป็นเส้นสายบนผิงหน้าอาหารแข็ง จะแผ่ขยายออกเป็นรัศมีของวงกลม(radial growth) ซึ่งกว้างออกอย่างช้าๆ โดยอาจเห็นวงการเจริญเติบโตเกิดขึ้นเป็นชั้นๆ หรือลำดับสลับกันไป

2. อาหารเหลว (submerged culture) เมื่อมีการให้อากาศโดยการเขย่า เส้นใยจะเจริญออกทุกทิศทางแล้วรวมตัวอัดกันแน่นเป็นก้อนเชื้อกลมๆที่เรียกว่า mycelium ball หรือ mycelium pellet ที่มีลักษณะและรูปร่างต่างๆกัน เช่น ก้อนกลมเรียบ หรือก้อนกลมเป็นร่องคล้ายผลมะยม ขนาดเล็กหรือใหญ่ ขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการเจริญเติบโตในอาหารเหลวนั้น แต่ถ้าทิ้งไว้ในภาชนะโดยไม่เขย่าก็จะพบการเจริญเกิดขึ้นเฉพาะผิวหน้าเนื่องจากราโดยทั่วไปชอบเจริญในที่มีอากาศ (aerobe) (ชุลี,2546)

<u>*Mortierella* species</u>

2.5.1 อนุกรมวิธาน (Taxonomy) (วิจัย,2546; S.G. Batrakov *et al*.,2002)

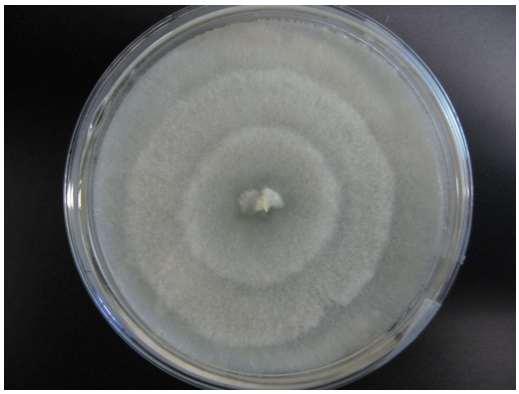
Phylum Zygomycota
Class Zygomycetes
Order Mucorales
Family Mortierellaceae
Genus *Mortierella*
Subgenera *Micromucor*
Mortierella

2.5.2 **ชีววิทยาของ *Mortierella* sp.**

รา *Mortierella* มีอยู่ประมาณ 60 species โดยรากลุ่มนี้เป็นพวกที่มีชีวิตอย่างอิสระ พบทั่วไปอย่างกว้างขวางในดินและบนเศษซากพืชและสัตว์ในดิน หรืออินทรียวัตถุอื่นๆ ซึ่งราชนิดนี้มีทั้งที่เป็น heterothallic species และ homothalic species (วิจัย,2546) ลักษณะการเจริญเติบโต พบว่า *Mortierella* sp. สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วและมีลักษณะซ้อนกันเป็นวงคลื่น เส้นใยมีสีขาวถึงสีเทาอ่อน (สุรพันธ์,2546) อีกทั้งยังจัดเป็น filamentous fungi ที่มีคุณสมบัติเป็น oleaginous fungi คือ มีองค์ประกอบสำคัญภายในเซลล์เป็น lipid และมีปริมาณสูงถึง 50%ของน้ำหนักแห้ง (dry biomass) ทั้งยังมีความสามารถในการผลิต polyunsaturated fatty acid (PUFAs) ที่มีความสำคัญ เช่น gamma-linoleic acids, arachidonic acid , eicosapentaenoic (Kenichi *et al*,2002; Sandra *et al*,2004)

รูปที่ 2.11

แสดงลักษณะการเกิดโคโลนีของ *Mortierella* sp. (Domsch,1980)



2.5.3 **วงจรชีวิตของ *Mortierella* sp.**

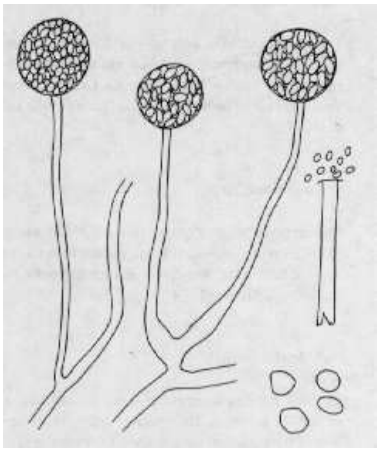
ราใน order นี้สามารถเจริญเติบโตได้ดี และเส้นใยมีการพัมนาดีแล้วผนังเซลล์ประกอบด้วยสารไคโตซาน ไคติน และกรดโพลีกลูโคโลอิก โดยการสืบพันธุ์ของรา *Mortierella* sp. มีระบบการสืบพันธุ์ทั้งอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศโดยแตกต่างกันตรงลักษณะการสร้างสปอร์ คือ สปอร์แบบอาศัยเพศ เรียกว่า zygospore และสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ เรียกว่า sporangiospore โดยระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศพบได้บ่อยกว่าการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ จึงเป็นระยะที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิต และสำคัญต่อการใช้จำแนกราสายพันธุ์นี้

1) การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เกิดขึ้นได้อย่างมากหลังจากที่เส้นใยเจริญเติบโตและแผ่ขยายไปทั่ว เส้นใยที่ให้กำเนิดอวัยวะสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ เรียก sporangiophore จะสร้างอยู่เหนือ substrate (aerial) และมักเบนเข้าหาแสง (positively phototrophic) sporangiophore อาจแตกกิ่งก้าน (branched) หรือ ไม่แตกกิ่งก้าน (simple) ส่วนปลายเป็นที่เกิดของ sporangium หรือ sporangiolum ที่อาจมีหรือไม่มี columella ผนังของ sporangium และ sporangiolum อาจคงสภาพ (persistent) หรือง่ายต่อการแตกขาด หรือสลายตัวไปกับน้ำ (diffluent) อาจมีหรือไม่มีผลึกของ calcium oxalate รูปเข็มฐานกว้าง sporangiospore ของรา *Mucorales* มีขนาดและรูปร่างแตกต่างกันไป แต่ส่วนใหญ่มีรูปร่างกลม รูปไข่ หรือค่อนข้างเป็นทรงกระบอก มักมีผนังเรียบ ยกเว้นในบาง species ที่มีผนังสปอร์ขรุขระเล็กน้อย หรือเป็นเส้นขีด (striate) เมื่อ sporangium เจริญเต็มที่จะเปิดออกทำให้สปอร์ที่อยู่ภายในเกิดการแพร่กระจายออกสู่ภายนอกได้ เมื่อสปอร์ตกลงบนที่มีความชื้นและธาตุอาหารพอเพียง จะเกิดการงอกของ germ tube และเจริญต่อไปเป็น hyphal แตกกิ่งก้านสาขา และสร้าง sporangium ต่อไป

รูปที่ 2.12

แสดงลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของรา Order *Mucorales*



http://www.botany.utoronto.ca/ResearchLabs/MallochLab/Malloch/Moulds.html

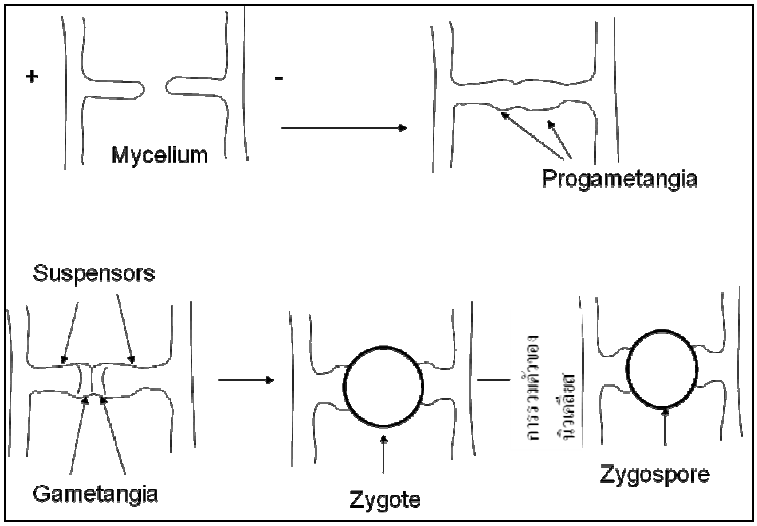
2) การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

การสืบแบบอาศัยเพศ เป็นการสร้าง zygospore จะเริ่มต้นจากการรวมตัวกันของส่วนปลายของ hyphae ที่ต่างเพศกัน เมื่อ hyphae ทั้งสองรวมตัวกันจะเกิดเป็น progametangia ที่มีลักษณะคล้ายถ้วย จากนั้นส่วนปลายของ hyphae ที่เรียกว่า gametangia ของทั้งสองเพศจะ

หลอมรวมกัน และนิวเคลียสของทั้งสอง gametangia จะรวมตัวกันเกิดเป็น zygote หลังจากนั้นจะมีการสร้างผนังหนาสีน้ำตาลขึ้นมาหุ้ม zygote ไว้ เกิดเป็น zygospore ที่สมบูรณ์ เมื่อเกิดการงอกของสปอร์ promycelium จะแทงผ่านผนังของ zygospore ออกมา ที่ส่วนปลายของ promycelium จะประกอบด้วย sporangia ที่ภายในบรรจุ sporangiospore ที่พร้อมจะงอกเป็นไมซีเลียมใหม่ต่อไป (วิจัย, 2546 ; พิไลพรรณ,2525 ; สุรพันธ์,2546)

รูปที่ 2.13

แสดงลักษณะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของรา Order *Mucorales*



2.5.4 **ข้อดีของการนำจุลินทรีย์มาใช้เป็นแหล่ง** PUFAs

1) จุลินทรีย์เลี้ยงง่าย เจริญเติบโตเร็ว และอาหารที่ใช้เลี้ยงมีราคาถูก
2) การผลิตสารสามารถทำได้ทั้งปีไม่ต้องขึ้นอยู่กับฤดูการเลี้ยง หรือการเพาะปลูก
3) การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อให้ได้ผลผลิตที่สูงขึ้นทำได้ง่าย
4) มีการปนเปื้อนของสารอื่นน้อย ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายในการทำให้บริสุทธิ์
5) คุณภาพของ PUFAs ที่ได้มีคุณภาพสูงกว่า PUFAs ที่ได้จากแหล่งอื่น และการควบคุมคุณภาพทำได้ง่าย

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์กรดไขมันในจุลินทรีย์

มีการศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์กรดอะราคิโดนิคในจุลินทรีย์ ดังนี้

2.6.1 องค์ประกอบของอาหาร

ก. แหล่งคาร์บอน

มีการศึกษาถึงผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตกรดอะราคิโดนิค ในราหลายสายพันธุ์ (Sajbidor และคณะ,1988) ศึกษาถึงผลของแหล่งคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบของอาหารต่อการเจริญเติบโต การสร้างลิปิด และองค์ประกอบของกรดไขมัน ในรา Order Mucorales พบว่าเมื่อราเจริญในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน ราเจริญเติบโต และสร้างลิปิดได้ในปริมาณที่ต่างกัน ขึ้นอยู่กับแหล่งคาร์บอนที่ใช้ (Somashekar และคณะ, 2002) ทำการศึกษาการผลิตกรดอะราคิโดนิคใน *Mortierella alpina* จาก คาร์บอนชนิดต่างๆ พบว่า กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอะราคิโดนิคมากที่สุด นอกจากนี้ปริมาณของแหล่งคาร์บอนยังมีผลต่อการผลิตกรดอะราคิโดนิคด้วย ซึ่งได้มีการศึกษาใน *Mortierella isabellina* โดย (Nakahara และคณะ,1992) พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารให้สูงขึ้น มีผลให้ชีวมวลของราเพิ่มขึ้น รวมทั้งอัตราส่วนของ ลิปิดต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นด้วย แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสเกิน 180 กรัมต่อลิตร พบว่า ชีวมวลลดลง รวมทั้งกรดไขมันก็ลดลงด้วย ซึ่งอธิบายได้ด้วยการศึกษาของ (Hiruta และคณะ ,1996b) ที่พบว่า การใช้กลูโคสความเข้มข้นสูงมีผลต่อการเกิด osmotic pressure ในอาหาร ซึ่งอาจไปยับยั้งการเจริญเติบโต และการสังเคราะห์กรดไขมันของเซลล์ ทำให้การสังเคราะห์กรดอะราคิโดมีปริมาณต่ำ

ข. แหล่งไนโตรเจน

มีรายงานว่าเมื่อความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำ และเกิดสภาวะขาดแคลนไนโตรเจนจะชักนำให้เกิดการสะสมลิปิดขึ้นได้ (Wynn และคณะ, 2001; Ratledge, 2004) เนื่องจากมีการสังเคราะห์โปรตีนและการแบ่งเซลล์ที่ลดลง และเกิดการนำแหล่งคาร์บอนในอาหารมาใช้ในการสร้างลิปิดภายในเซลล์ เช่นเดียวกับการศึกษาของ (พรทิพย์,2538) โดยศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตกรดแกมมาลิโนเลนิกใน *Mucor rouxii* ATCC 24905 พบว่าเมื่อให้ความเข้มข้นของ NH_4Cl ต่ำสุด (0.2 กรัมต่อลิตร) *M. rouxii* สามารถผลิตกรดแกมมาลิโน-เลนิกได้สูงขึ้น เมื่อเทียบกับการให้ NH_4Cl ที่ความเข้มข้นอื่นๆ ที่สูงกว่า ซึ่งผลที่ได้คล้ายกับการศึกษาใน *Mortierella ramanniana* ที่สามารถผลิตกรดแกมมาลิโนเลนิกได้ในปริมาณสูงในอาหารที่มีปริมาณไนโตรเจนต่ำ (Hansson และ Dostálek, 1988)

จากที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นว่า แหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ และการผลิตลิปิด (Hansson และคณะ, 1989; Farag และคณะ, 1983; Chesters และ Peberdy, 1965) ซึ่งกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ใช้เพิ่มการสะสมลิปิดในจุลินทรีย์หลายชนิด โดยพบการสะสมของลิปิดสูงสุด เมื่อความเข้มข้นของคาร์บอนในอาหารสูง และไนโตรเจนต่ำ (high C/N ratio) (Farag และคณะ, 1983; Chesters และ Peberdy, 1965; Hansson และ Dostálek, 1988)

2.6.2 ระยะในการเจริญเติบโต

การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของกรดไขมัน และ degree of unsaturation ของลิปิดในรามีผลมาจากระยะของการเติบโต (growth phase) (Laoteng และคณะ, 1999; Ferante และคณะ, 1983) โดยทั่วไปการสะสมของลิปิดจะเกิดขึ้นในช่วงท้ายของการเจริญซึ่งแหล่งไนโตรเจนหมดลง เนื่องจากการสังเคราะห์โปรตีนในระยะนี้ลดลง ทำให้เซลล์นำแหล่งคาร์บอนที่เหลืออยู่มาใช้ในการสร้างลิปิดภายในเซลล์ (Wynn และคณะ, 2001)

2.6.3 อุณหภูมิ

ผลของอุณหภูมิเกี่ยวข้องกับองค์ประกอบของกรดไขมันภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของกรดไขมันภายในเซลล์ จะเกิดขึ้นอย่างเด่นชัดเมื่อเซลล์เจริญเติบโตในสภาวะที่มีอุณหภูมิเปลี่ยนแปลง โดยทั่วไปเมื่อจุลินทรีย์เจริญที่อุณหภูมิต่ำ จะผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวมากกว่าเมื่อเจริญที่อุณหภูมิสูง เนื่องจากกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบของฟอสโฟลิปิดภายในเซลล์เมมเบรน ซึ่งเมื่อลดอุณหภูมิจะมีผลต่อการเพิ่มสัดส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัว เพื่อเพิ่ม fluidity ของ membrane lipid (Hazel และคณะ, 1991; Shimizu และคณะ, 1988) ซึ่งเป็นการปรับตัวของจุลินทรีย์เพื่อการอยู่รอด เช่นเดียวกับการศึกษาในรา *Choanephora cucurbitalum* เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำ (23 °C) พบว่าราสามารถสร้างลิปิดที่มีค่า degree of unsaturation สูงกว่าเมื่อเลี้ยงในอุณหภูมิสูง (37 °C) ซึ่งค่า degree of unsaturation บ่งบอกถึงระดับความไม่อิ่มตัว หรือการเติมพันธะคู่ของกรดไขมัน โดยพบกรดแกมมาลิโนเลนิกสูงถึง 27.5% ของกรดไขมันทั้งหมด (Deven และ Manocha, 1976) ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาในรา Mucorales โดยเฉพาะ *Mucor* sp. และ *Mortierella* sp. คือพบว่าเมื่อราเจริญที่อุณหภูมิต่ำ พบการสร้างลิปิดที่มีค่า degree of unsaturation สูงกว่าเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิสูง รวมถึงมีปริมาณกรดอะราคิโดนิคสูงขึ้นด้วย (Sumner และคณะ, 1968; Hansson และ Dostálek, 1988; Jang และคณะ, 2005)