บทที่ 4

ผลการทดลอง

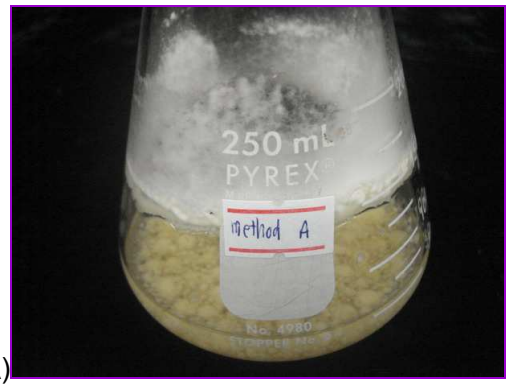
การศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง *Mortierella* sp. BCC2863 เพื่อผลิตกรดอะราคิโดนิค หรือ Arachidonic acid (ARA) โดยเป็นการศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการผลิตกรดอะราคิโดนิค ศึกษาวิธีการเตรียมหัวเชื้อ ความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมทั้งแหล่งอาหารคาร์บอนและแหล่งอาหารไนโตรเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งอิทธิพลของปริมาณน้ำตาลกลูโคสต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราคิโดนิคของ *Mortierella* sp. BCC2863

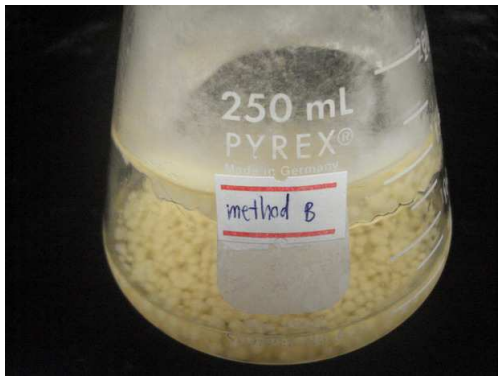
อาหารสูตรอ้างอิงในการทดลองปรับปรุงจากสูตรอาหารของ (Zhu และคณะ,2002) ประกอบด้วย glucose 30 กรัม/ลิตร Yeast extract 10 กรัม/ลิตร $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 กรัม/ลิตร $K_2HPO_4.3H_2O$ 4 กรัม/ลิตร และ $CaCl_2.2H_2O$ 0.1 กรัม/ลิตร นอกจากนี้อาหารสูตรนี้ยังถูกใช้ในการเตรียมหัวเชื้อและการศึกษาสภาวะทางกายภาพที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมีค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิ

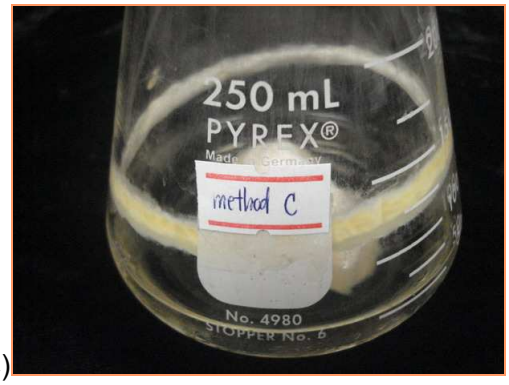
4.1 การเตรียมหัวเชื้อในการเลี้ยงรา *Mortierella* sp. BCC2863 เพื่อผลิต ARA

จากการศึกษาการคัดเลือกวิธีการเตรียมหัวเชื้อที่เหมาะสม ดังหัวข้อ 3.4.1.1 พบว่า วิธีที่ 1 การเจริญเติบโตของเชื้อจะมีขนาดของ pellet ที่ไม่สม่ำเสมอกัน มีการเกาะตัวกันเป็นก้อนซึ่งมีสาเหตุมาจากการการสับชิ้นวุ้นของ plate ที่เลี้ยงเชื้อเริ่มต้นไม่ละเอียดเพียงพอ วิธีที่ 2 พบว่าเชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็วและได้ขนาดของ pellet ที่มีความสม่ำเสมอกันและยังได้เซลล์ที่มีปริมาณมาก และวิธีที่ 3 ซึ่งเป็นการเตรียมหัวเชื้อที่เติม glass bead และน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร พบว่า น้ำกลั่นจะมีความขุ่นมากขึ้นและมีเส้นใยปนอยู่เล็กน้อยแต่เมื่อนำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์กลับไม่สามารถมองเห็นสายใยราได้ จึงได้ทดสอบการเจริญเติบโตโดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอ้างอิง พบว่า เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้แต่เซลล์จะเกิดการจับตัวกันเป็น pellet ขนาดใหญ่ ซึ่งวิธีการนี้ไม่เหมาะที่จะนำมาเตรียมเชื้อตั้งต้น ดังนั้นจาก 3 วิธี สรุปได้ว่า วิธีที่ 2 เป็นวิธีที่เหมาะสมและใช้วิธีนี้เป็นเทคนิคมาตรฐานสำหรับการทดลองในลำดับต่อไป

รูปที่ 4.1
แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของราที่เกิดขึ้นจากวิธีเตรียมหัวเชื้อ
A) วิธีที่ 1 B) วิธีที่ 2 และ C) วิธีที่ 3

(A) 

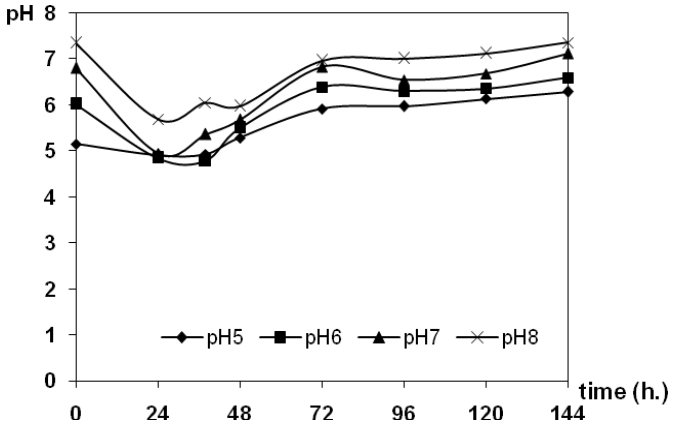
(B) 

(C) 

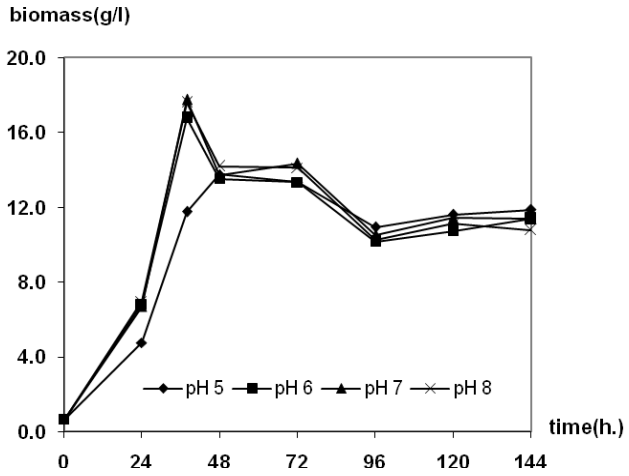
4.2 ผลของความเป็นกรดด่าง (pH) เริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอ้างอิงต่อการเจริญเติบโตของรา *Mortierella* sp. BCC2863 เพื่อผลิต ARA

เมื่อศึกษาถึงอิทธิพลของความเป็นกรดด่าง (pH) เริ่มต้น ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยช่วง pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอ้างอิงที่ทำการศึกษาอยู่ระหว่าง 5-8 ดังแสดงในรูปที่ 4.2 พบว่า ชั่วโมงที่ 38 ค่า pH จะลดลงต่ำสุดขณะที่เป็นช่วงเวลาที่เชื้อเจริญเติบโตสูงสุด จากรูปที่ 4.2 และรูปที่ 4.3 จะเห็นได้ว่า ช่วง pH ที่เหมาะสมจะอยู่ระหว่าง 6-8 ซึ่งให้ปริมาณเซลล์สูงถึง 17 กรัม/ลิตร จากนั้นค่า pH จะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นส่วนการเจริญเติบโตจะลดลงจนคงที่ตั้งแต่เวลา 96 ชั่วโมง จนสิ้นสุดกระบวนการหมัก การลดลงของค่า pH ในช่วง 48 ชั่วโมงแรกน่าจะมีสาเหตุมาจากการใช้กลูโคสของรา ซึ่งจะมีการสร้างกรดอินทรีย์ขึ้น ขณะที่ค่า pH ที่สูงขึ้นจะสอดคล้องกับความเข้มข้นที่ลดลงของราซึ่งเป็นการสลายตัวของเซลล์อันเนื่องมาจากการขาดแคลนอาหารคาร์บอนทำให้มีการปลดปล่อยแอมโมเนียมทำให้ pH สูงขึ้น ดังรูปที่ 4.3

รูปที่ 4.2
แสดงค่า pH ในการเลี้ยงที่มี pH เริ่มต้นระหว่าง 5-8

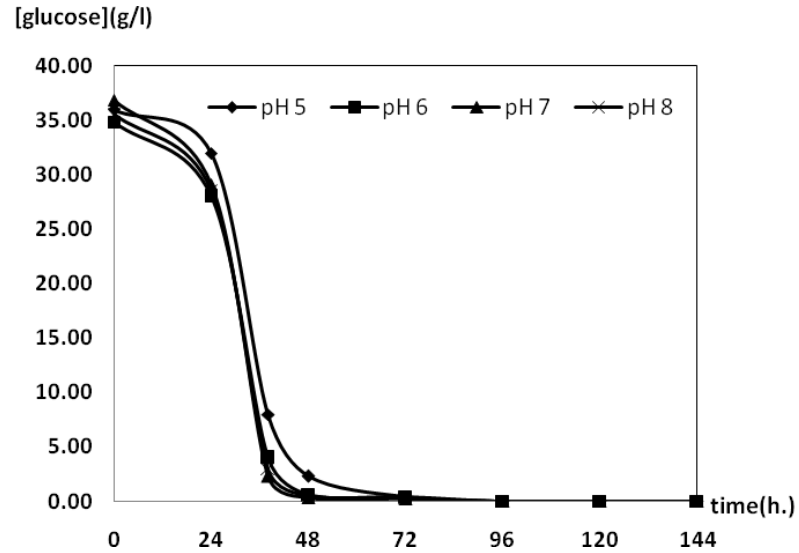


รูปที่ 4.3
แสดงค่าความเข้มข้นเซลล์ (g/l)ในการเลี้ยงที่มี pH เริ่มต้นระหว่าง 5-8



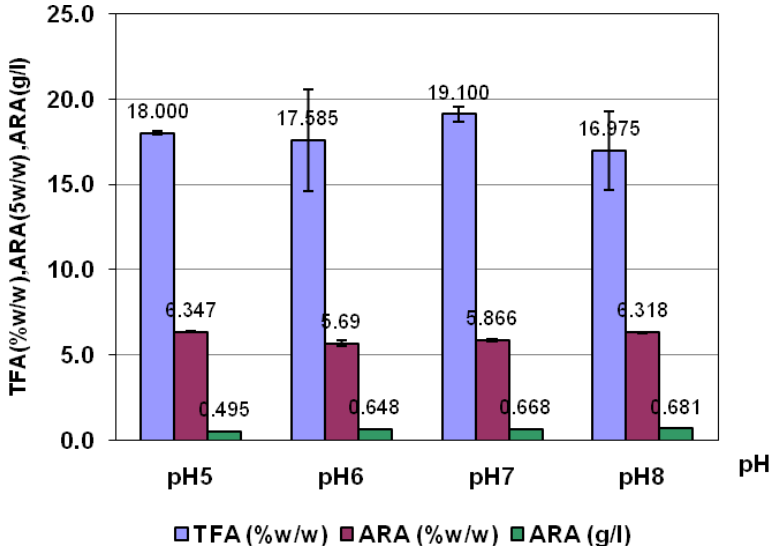
รูปที่ 4.4

แสดงค่าความเข้มข้นกลูโคส (g/l) ในการเลี้ยงที่มี pH เริ่มต้นระหว่าง 5-8



รูปที่ 4.5

แสดงปริมาณกรดไขมันทั้งหมด (Total fatty acid) และ ARA เมื่อคิดเทียบต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และความเข้มข้นของ ARA (g/l) ในการเลี้ยงที่มี pH เริ่มต้นระหว่าง 5-8 ที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมง



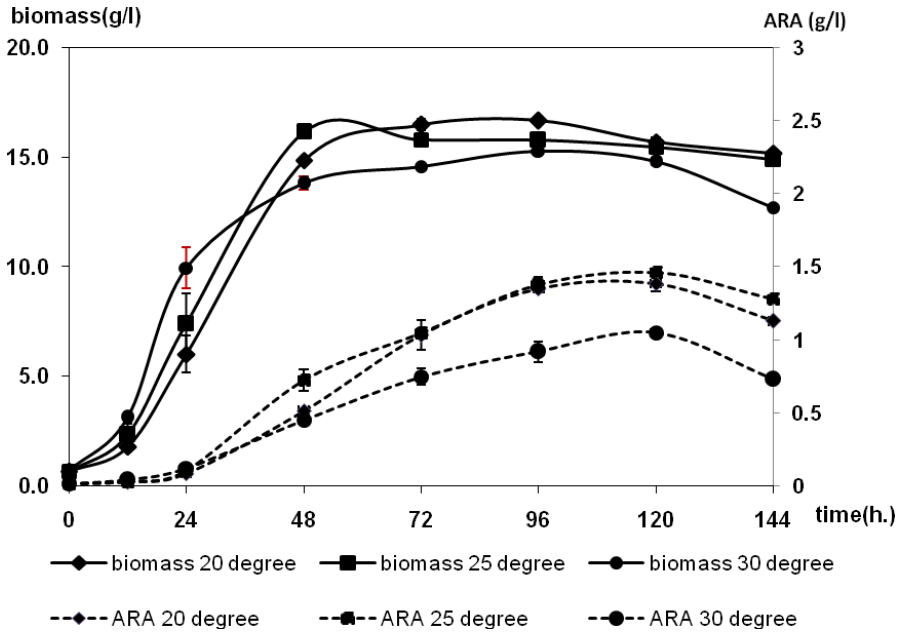
จากรูปที่ 4.4 แสดงให้เห็นว่าสภาวะการเลี้ยงที่มีค่า pH เริ่มต้นระหว่าง 6 - 8 อัตราการใช้กลูโคสของราไม่มีความแตกต่าง ยกเว้นที่ pH 5 ซึ่งราจะต้องปรับตัวนานกว่าทำให้มีการใช้กลูโคสน้อยในระยะแรกเมื่อเทียบกับสภาวะอื่น สอดคล้องกับการเติบโตของราในสภาวะที่ pH เท่ากับ 5 ซึ่งน้อยกว่าในสภาวะอื่นๆ จากรูปที่ 4.5 จะเห็นว่าการผลิตกรดไขมันทั้งหมด (Total fatty acid) และ ARA ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและความเข้มข้นของ ARA เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าทุกค่า pH จะให้ค่ากรดไขมันทั้งหมด (Total fatty acid) และ ARA ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและความเข้มข้นของ ARA ที่ไม่แตกต่างกันมากนัก สำหรับค่า pH ที่ให้ความเข้มข้นของ ARA สูงสุดคือ pH 8 เท่ากับ 0.68 กรัม/ลิตร ใกล้เคียงกับ pH 7 เท่ากับ 0.67 กรัม/ลิตร ดังนั้น pH ที่เลือกใช้จึงอยู่ประมาณ 7 ซึ่งเป็นค่า pH ที่เป็นกลางและตรงกับค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.3 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของรา *Mortierella* sp. BCC2863 เพื่อผลิต ARA

จากรูปที่ 4.6 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิต ARA เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิที่แตกต่างกัน คือ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส คืออุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่รามีความสามารถในการเจริญเติบโตและการสร้างกรดไขมันได้สูงกว่าที่อุณหภูมิที่ 20 และ 30 องศาเซลเซียส โดยชั่วโมงที่ 120 ซึ่งเป็นเวลาที่มีการสะสมของ ARA มากที่สุด หลังจากที่กลูโคสถูกใช้หมดที่ชั่วโมงที่ 48 (จากรูปที่ 4.7) ราสามารถสร้าง ARA ได้สูงถึง 1.45 กรัม/ลิตร และมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่สูงถึง 15 กรัม/ลิตร แสดงว่าหลังจากที่อาหารคาร์บอนหมดลงราจะเติบโตเข้าสู่สภาวะ stationary phase และมีการสร้างและสะสมกรดไขมันภายในเซลล์เพิ่มสูงขึ้น แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียสเหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและการสร้าง ARA ในรา *Mortierella* sp. BCC2863

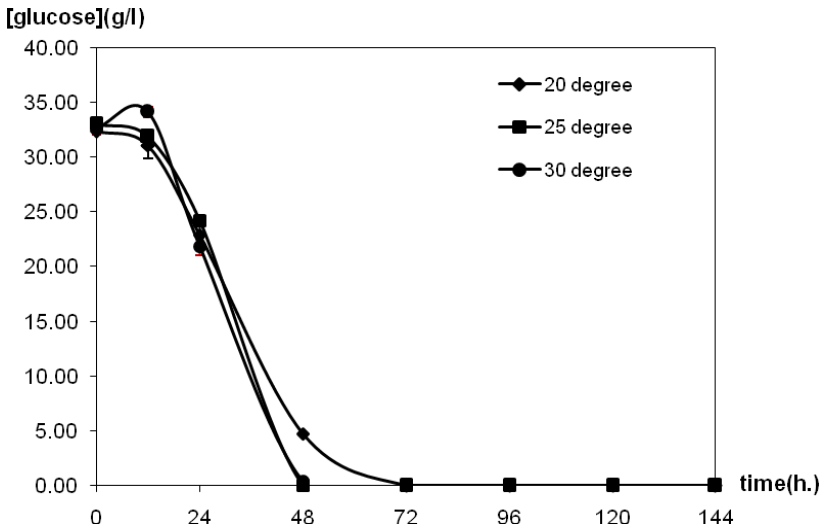
รูปที่ 4.6

แสดงค่าปริมาณเซลล์ (g/l) และปริมาณ ARA (g/l) ของราเมื่อทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.7

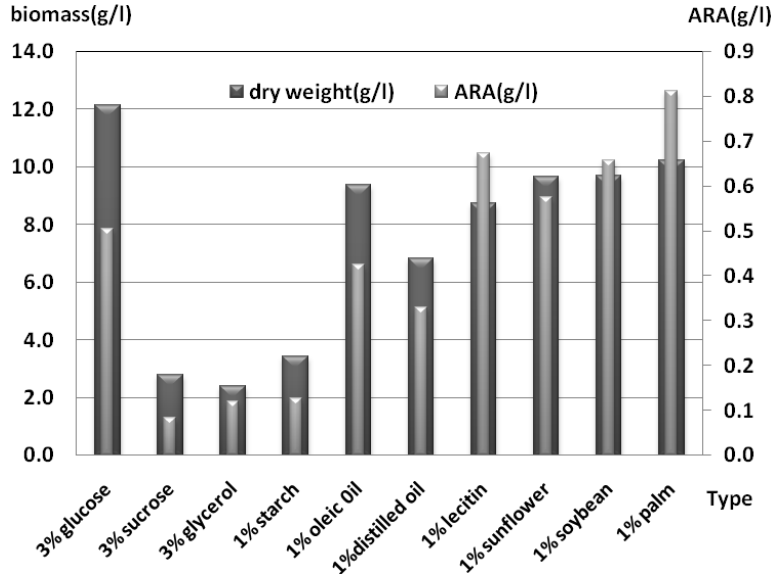
แสดงค่าความเข้มข้นกลูโคส (g/l) ของราเมื่อทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส



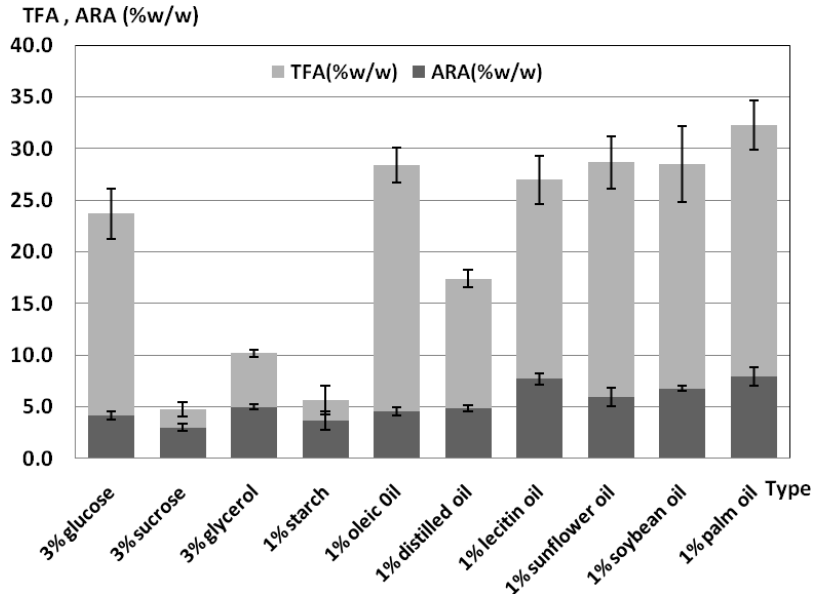
4.4 ผลของแหล่งคาร์บอน (C-source) และแหล่งไนโตรเจน (N-source) ต่อการเติบโตของรา *Mortierella* sp. BCC2863 เพื่อผลิต ARA

จากการศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอน (carbon source) ชนิดต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และการสร้าง ARA โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย yeast extract 10 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน ในสภาวะการเลี้ยงด้วย 3% glucose และ 1% palm oil เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 12.13 และ 10.22 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ขณะที่ 1% palm oil, 1% lecithin, และ 1% soybean ให้ความเข้มข้นของ ARA สูงสุดที่ 0.81, 0.67 และ 0.66 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.8

รูปที่ 4.8
แสดงความเข้มข้นของเซลล์และ ARA เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ
โดยเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง



รูปที่ 4.9
แสดงปริมาณกรดไขมันทั้งหมด และ ARA ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ โดยเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง



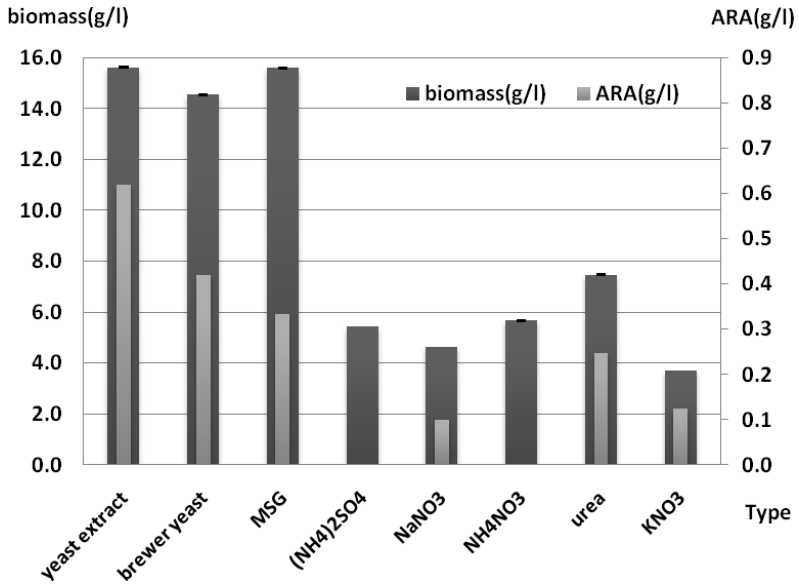
ผลของปริมาณกรดไขมันทั้งหมดและปริมาณ ARA เมื่อคิดต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (TFA, ARA (%w/w)) พบว่า 1% palm oil ให้ค่าสูงสุด คือ 32.28 และ 7.94 %w/w ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.9 เมื่อศึกษาถึงผลได้ของเซลล์ (Yx/s) และผลได้ของ ARA(Yp/s) พบว่า 1% palm oil ให้ค่าสูงสุด คือ 1.02 และ 0.08 ตามลำดับ อีกทั้ง 1% palm oil ยังคงให้ค่า specific productivity สูงสุดที่ 0.83 mg/g.hr จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า palm oil เหมาะสมสำหรับการนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนการใช้กลูโคส ซึ่งองค์ประกอบของน้ำมันจะมีกรดไขมันตัวอื่นๆในการเป็นสารตั้งในการผลิต ARA

จากรูปที่ 4.10 การศึกษาแหล่งอาหารไนโตรเจนที่เหมาะสำหรับการเจริญเติบโตและการสร้าง ARA เมื่อเลี้ยงราเป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยใช้ 1% yeast extract , 1% MSG และ 1% brewer yeast เป็นแหล่งอาหารไนโตรเจนพบว่า 1% yeast extract , 1% MSG และ 1% brewer yeast ให้ความเข้มข้นของเซลล์แห้งสูงถึง 15.63, 15.61 และ 14.55 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ขณะที่ 1% yeast extract , 1% brewer yeast และ 1% MSG ให้ความเข้มข้นของ ARA สูงถึง 0.69, 0.42 และ 0.33 กรัม/ลิตร ตามลำดับ และเมื่อคำนวณผลของปริมาณกรดไขมันทั้งหมดและปริมาณ ARA ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (TFA, ARA (%w/w)) พบว่า 1% MSG ให้ค่าสูงสุด

คือ 17.38 และ 2.14 %w/w ตามลำดับ ส่วน 1% yeast extract ให้ค่ารองลงมาคือ 14.27 และ 3.96 %w/w ตามลำดับ โดยมีสัดส่วนของปริมาณ ARA ต่อปริมาณกรดไขมันทั้งหมดสูงสุด และเมื่อศึกษาถึงผลได้ของเซลล์ (Yx/s) และผลได้ของ ARA(Yp/s) พบว่า 1% yeast extract ให้ค่าสูงสุด คือ 1.56 และ 0.06 ตามลำดับ

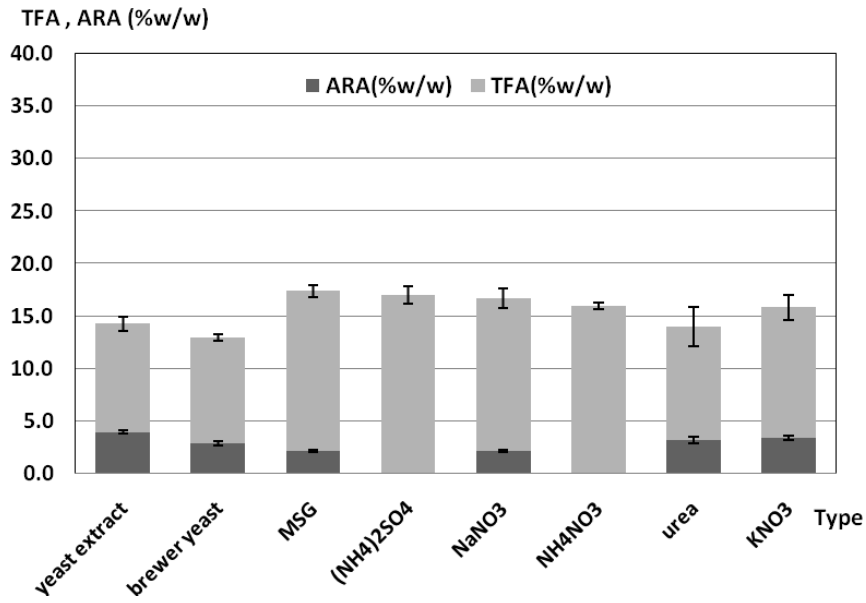
สรุปได้ว่า yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสำหรับการเจริญเติบโตของรา *Mortierella* sp. BCC2863 **ซึ่งจะใช้เป็นอาหารไนโตรเจนสำหรับการศึกษาในลำดับต่อไป**

รูปที่ 4.10
แสดงความเข้มข้นของเซลล์และ ARA เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ
เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง



รูปที่ 4.11

แสดงการผลิตกรดไขมันทั้งหมด (Total fatty acid) และ ARA ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 96 ชั่วโมง



4.5 ผลของความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญเติบโตและการผลิต ARA ในรา *Mortierella* sp. BCC2863 ในระดับขวดเขย่า

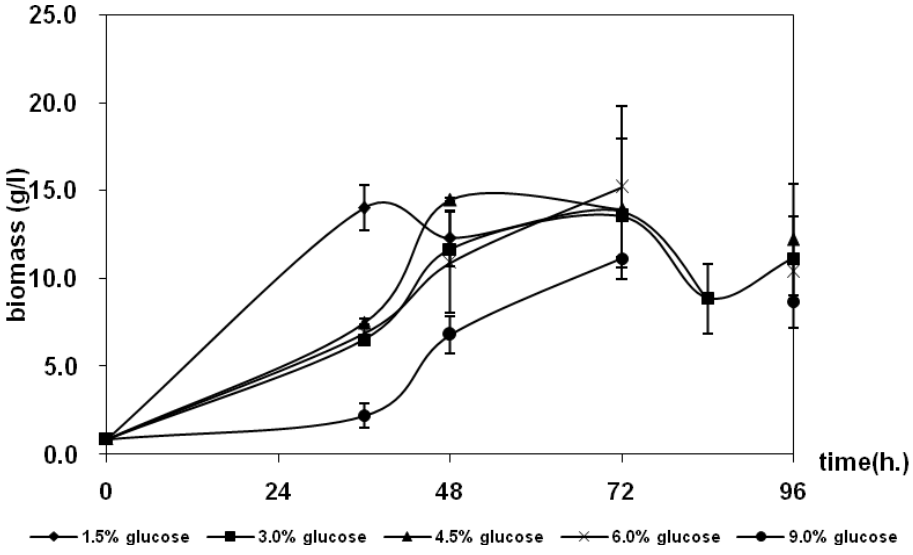
ในการศึกษาผลของน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆในการเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญเติบโตและการสร้าง ARA โดยการศึกษาใช้ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 15 ,30 ,45 ,60 และ 90 กรัม/ลิตร จากรูปที่ 4.12 พบว่าเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสสูงขึ้นจะทำให้ระยะ lag phase นานขึ้น อย่างไรก็ตามการใช้กลูโคสก็เป็นไปในทิศทางเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.13 ส่วนการผลิต ARA นั้น จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาการเลี้ยงเพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.14

ที่ความเข้มข้นกลูโคส 15 กรัม/ลิตร รามีการเจริญเติบโตสูงสุดที่ 36 ชั่วโมง ให้ปริมาณน้ำหนักเซลล์ 14.01 กรัม/ลิตร ส่วนที่ความเข้มข้นกลูโคส 30 กรัม/ลิตร รามีการเจริญเติบโตสูงสุดที่ 72 ชั่วโมง ให้ปริมาณน้ำหนักเซลล์ 13.52 กรัม/ลิตร ซึ่งสัมพันธ์กับเวลาที่กลูโคสถูกนำไปใช้จนหมด ส่วนที่ความเข้มข้นกลูโคส 45 ,60 และ 90 กรัม/ลิตร นั้นรามีการเจริญเติบโตสูงสุดที่ 72 ชั่วโมง ให้ปริมาณน้ำหนักเซลล์ 13.93 , 15.19 และ 11.13 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

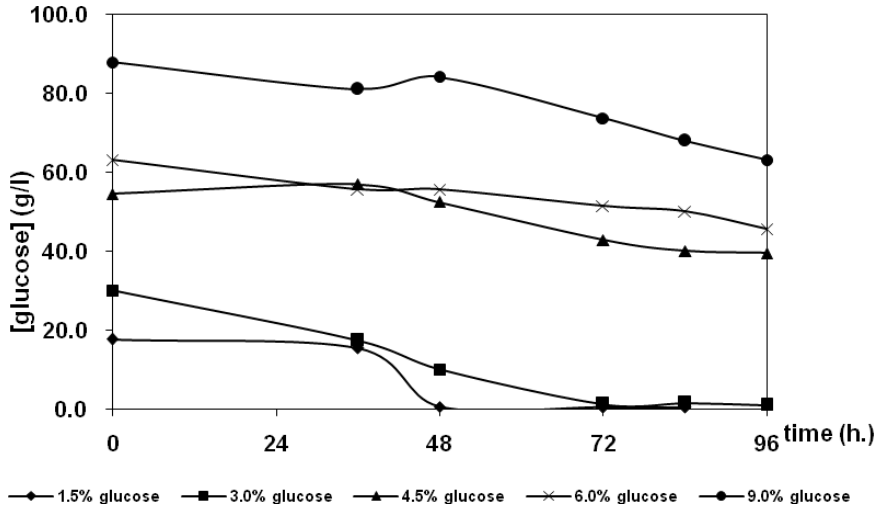
จากรูปที่ 4.15 เมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง จะพบว่าเมื่อความเข้มข้นกลูโคสเพิ่มสูงขึ้น จะทำให้ความเข้มข้นของเซลล์เพิ่มขึ้นและลดลงตามลำดับ โดยความเข้มข้นของเซลล์แห้งสูงสุดอยู่ที่ 12.20 กรัม/ลิตร ขณะที่ความเข้มข้นกลูโคส 30 และ 60 กรัมต่อลิตร จะให้ความเข้มข้น

ของเซลล์รองลงไปคือ 11.14 และ 10.37 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ปริมาณ ARA สูงสุดอยู่ที่ความเข้มข้นกลูโคส 30 กรัม/ลิตร คือ 0.67 กรัม/ลิตร ขณะที่ความเข้มข้นกลูโคส 45 และ 60 กรัม/ลิตร จะให้ความเข้มข้นของ ARA ลดลงตามลำดับคือ 0.59 และ 0.56 กรัม/ลิตร สำหรับความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นที่ 90 กรัม/ลิตรนั้น จะได้ความเข้มข้นของเซลล์และ ARA ต่ำที่สุด จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของกลูโคสที่สูงเกินไป เป็นค่าความเข้มข้นที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบของรา

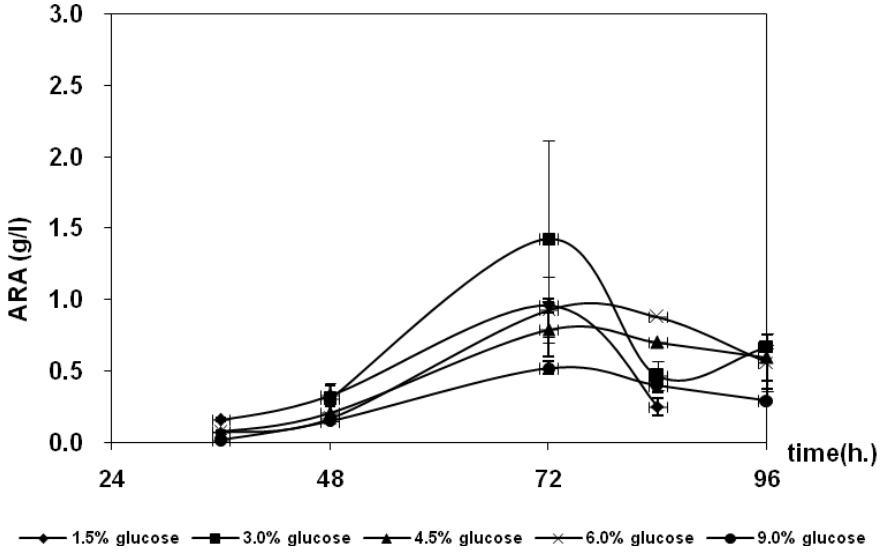
รูปที่ 4.12
แสดงความเข้มข้นของเซลล์ (g/l) เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสระหว่าง 15-90 กรัม/ลิตร



รูปที่ 4.13
แสดงการใช้น้ำตาลกลูโคส (g/l) เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส
ระหว่าง 15 - 90 กรัม/ลิตร

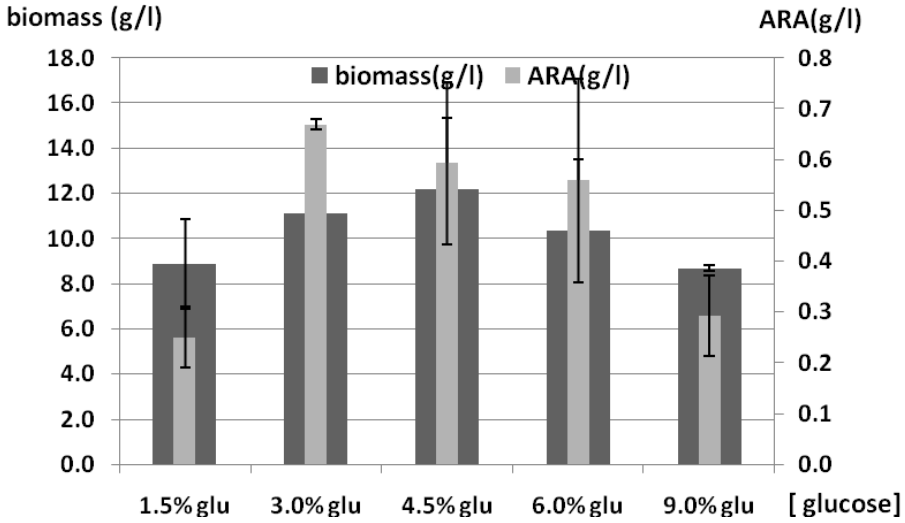


รูปที่ 4.14
แสดงความเข้มข้นของ ARA (g/l) เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส
ระหว่าง 15 - 90 กรัม/ลิตร



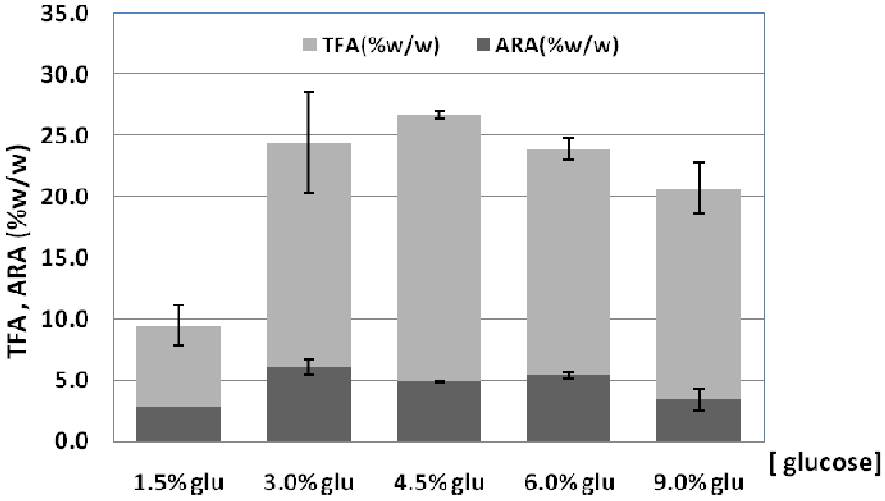
รูปที่ 4.15

แสดงความเข้มข้นของเซลล์และ ARA (g/l) เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส ระหว่าง 15-90 กรัม/ลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง



รูปที่ 4.16

แสดงการผลิตกรดไขมันทั้งหมด(Total fatty acid) และ ARA ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสระหว่าง 15-90 กรัม/ลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง

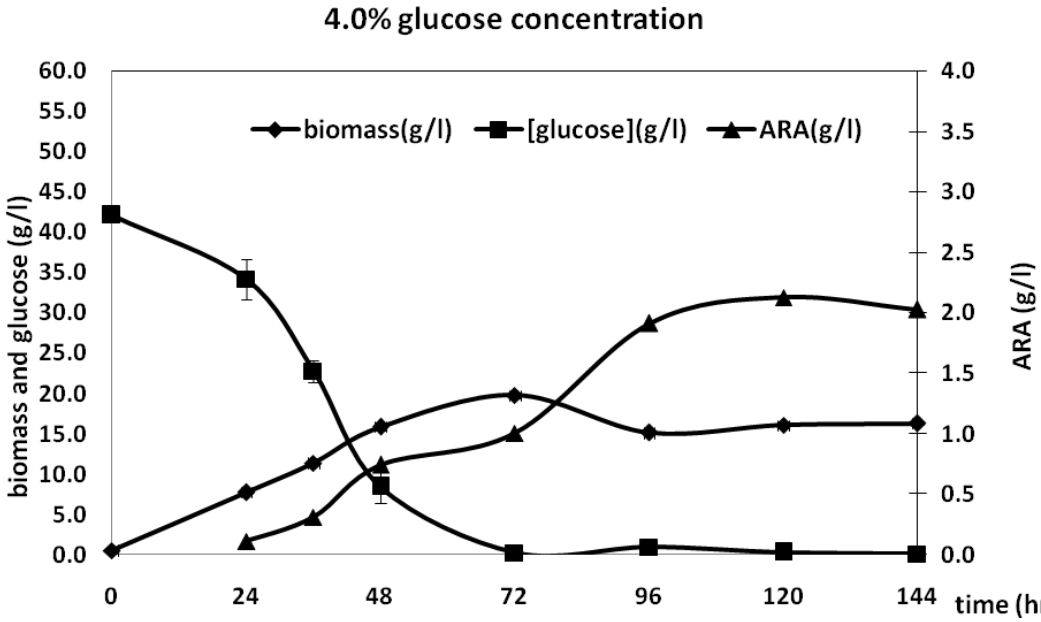


จากผลการทดลองที่ได้จึงเลือกความเข้มข้นกลูโคสที่ 40 และ 60 กรัม/ลิตร เพื่อนำมาศึกษาซ้ำ โดยเพิ่มระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงและควบคุมสภาวะการเลี้ยงให้ดียิ่งขึ้น เพื่อเพิ่มปริมาณการสะสมของ ARA หลังจากที่เชื้อมีการเจริญเติบโตเข้าสู่ช่วง stationary phase

4.5.1 ผลของความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 40 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญเติบโตและการผลิต ARA ในรา *Mortierella* sp. BCC2863 ในระดับขวดเขย่า

รูปที่ 4.17

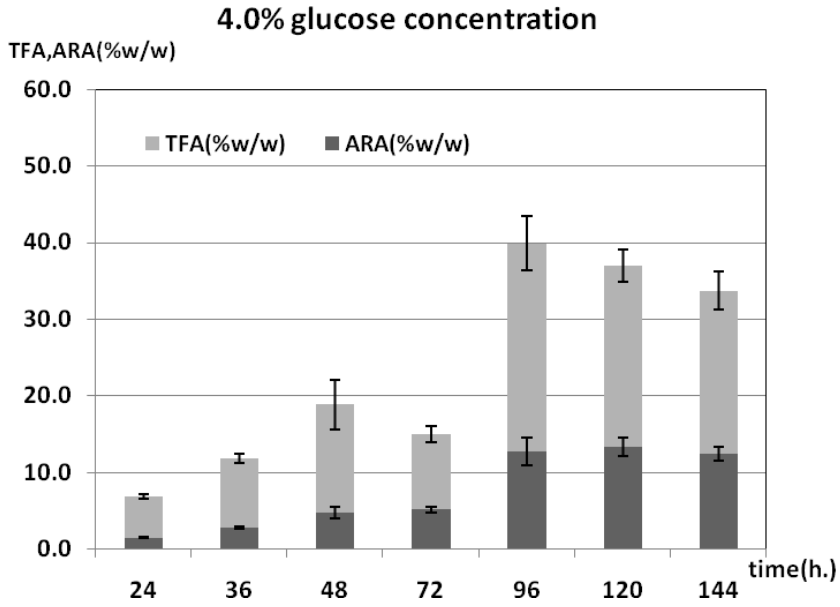
แสดงความเข้มข้นของกลูโคส (g/l) เซลล์ (g/l) และ ARA (g/l) เมื่อเลี้ยงราในอาหารที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 40 กรัม/ลิตร



จากการศึกษาพบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตผลิตชีวมวลในรูปของน้ำหนักเซลแห้งเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มมากขึ้น โดยมีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 48 ชั่วโมง และเริ่มเข้าสู่ stationary phase ที่ระยะเวลาประมาณ 72 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 4.17 โดยชั่วโมงที่ 72 ให้ปริมาณน้ำหนักเซลล์สูงสุด คือ 19.78 กรัม/ลิตร ซึ่งสัมพันธ์กับเวลาที่กลูโคสถูกใช้จนหมด หลังจากการเจริญเติบโตเข้าสู่ช่วง stationary phase แล้วจะมีการผลิตและสะสมกรดไขมันภายในเซลล์ที่สูงขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น โดยชั่วโมงที่ 120 จะได้ความเข้มข้นของ ARA ที่ผลิตขึ้นสูงสุดถึง 2.13 กรัม/ลิตร

รูปที่ 4.18

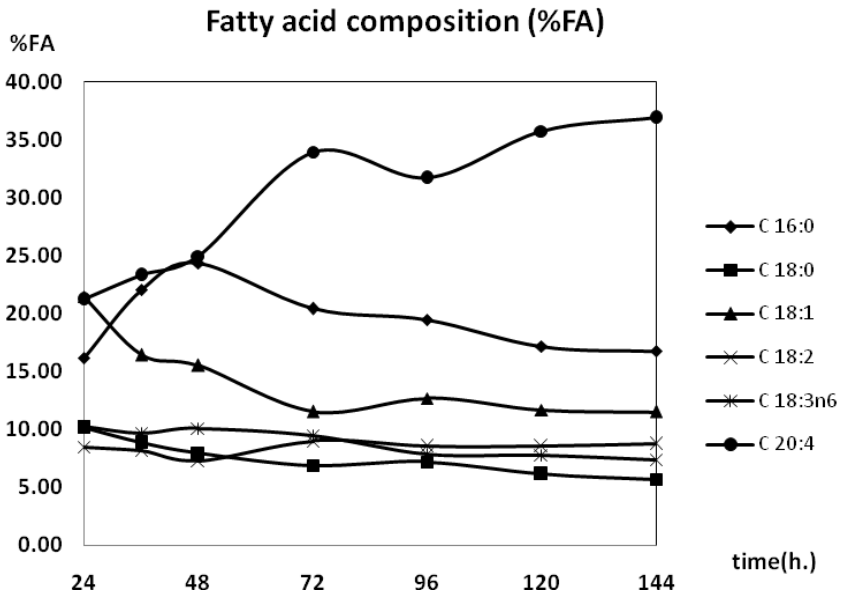
แสดงการผลิตกรดไขมันทั้งหมด (Total fatty acid) และ ARA ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 40 กรัม/ลิตร



จากการศึกษาปริมาณกรดไขมันทั้งหมดและปริมาณ ARA ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (TFA, ARA (%w/w)) ดังแสดงในรูปที่ 4.18 พบว่ามีค่าสูงสุดที่ 96 ชั่วโมง คือ 40.0 และ 12.0 (%w/w) ตามลำดับ การผลิตไขมันทั้งหมด (total fatty acid in dry weight) สูงขึ้นตามระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ และมีการสะสมสูงสุด เมื่อเชื้อเจริญอยู่ใน stationary phase ทั้งนี้เนื่องมาจากการเกิดสภาวะขาดแคลนไนโตรเจน (Nitrogen deficiency) และจากการทดลองยังพบอีกว่าสัดส่วนของ ARA (%w/w) ต่อปริมาณกรดไขมันทั้งหมด (TFA (%w/w)) จะสูงขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น

รูปที่ 4.19

แสดงองค์ประกอบของกรดไขมัน (Fatty acid profile) ที่ระยะเวลาต่างๆ
เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 40 กรัม/ลิตร



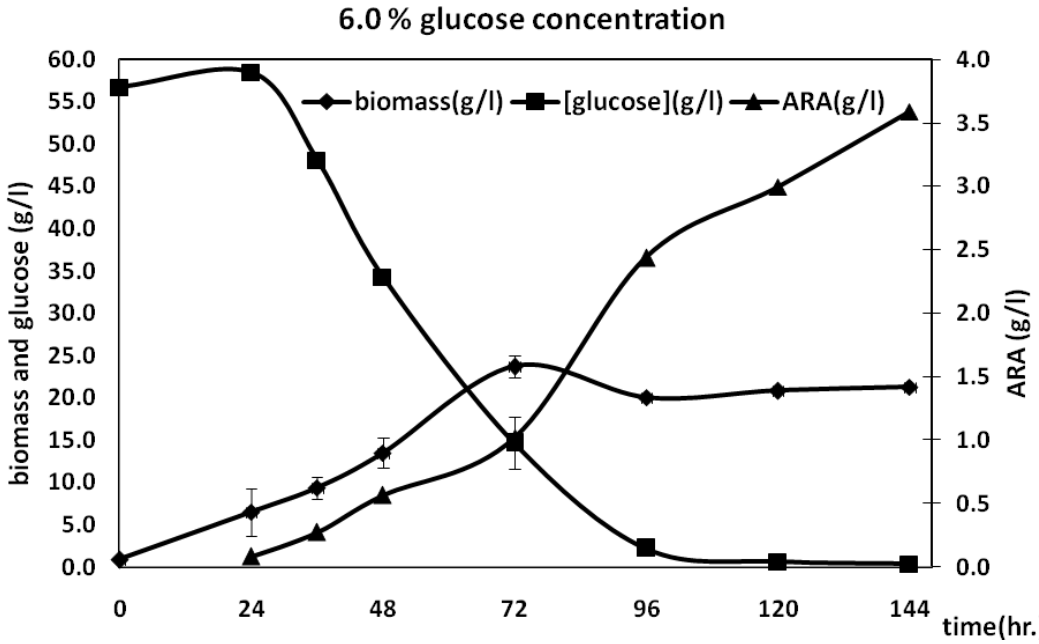
จากรูปที่ 4.19 พบว่าองค์ประกอบของกรดไขมัน (fatty acid composition) ที่เชื้อผลิตจากการทดลอง มีการเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ โดยเฉพาะเมื่อเชื้อเจริญอยู่ในช่วง log phase (48 ชั่วโมง) แต่ในขณะที่เชื้อเจริญอยู่ใน stationary phase องค์ประกอบของกรดไขมันที่เชื้อผลิตเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย เห็นได้ว่าสัดส่วนของ ARA(%FA) ต่อกรดไขมันทั้งหมดที่สร้างขึ้นจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น โดยเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 144 ชั่วโมง รามีการสะสม ARA เป็นองค์ประกอบหลักสูงถึง 36.89 %FA ในทางตรงกันข้ามการเปลี่ยนแปลงของกรดไขมันไม่อิ่มตัว palmitic acid (16:0), stearic acid (18:0) จะมีสัดส่วนที่ลดลง เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว เป็น oleic acid (18:1), lenoleic acid (18:2) , gamma-linoleic acid (18:3n6) และ ARA (20:4) ตามลำดับ อีกทั้งเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นจะมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเกิดการสังเคราะห์ความไม่อิ่มตัวสูงขึ้นในสภาวะที่มีการให้อากาศอย่างเพียงพอ โดยที่ oleic acid (18:1), lenoleic acid (18:2) ทำหน้าที่เป็น precursor ในการสร้าง ARA ส่งผลให้สัดส่วนของ oleic acid (18:1), lenoleic acid (18:2) ลดลงเมื่อสัดส่วนของ ARA สูงขึ้น

ดังนั้นในการเจริญเติบโตและการผลิต ARA ในเชื้อรา *Mortierella* sp. BCC2863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 40 กรัม/ลิตร ในระดับขวดเขย่านี้ เมื่อต้องการเก็บผลิตภัณฑ์ ARA ที่ได้ จะใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 120 ชั่วโมงเป็นช่วงที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากได้ค่าผลได้ของเซลล์(Yx/s) เท่ากับ 0.38 ผลได้ของ ARA (Yp/s) เท่ากับ 0.05 และคุณภาพของผลิตภัณฑ์ (Yp/x) เท่ากับ 0.13

4.5.2 ผลของความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 60 กรัม/ลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญเติบโตและการผลิต ARA ในรา *Mortierella* sp. BCC2863 ในระดับขวดเขย่า

รูปที่ 4.20

แสดงความเข้มข้นของกลูโคส (g/l) เซลล์ (g/l) และ ARA (g/l) เมื่อเลี้ยงราในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 60 กรัม/ลิตร

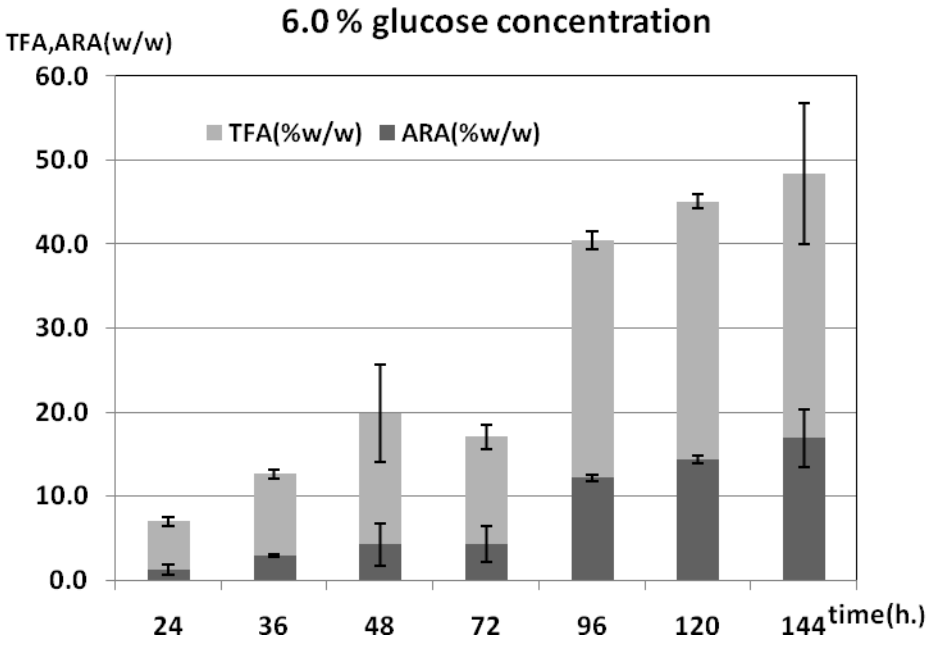


จากการศึกษาพบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตผลิตชีวมวลในรูปของน้ำหนักเซลแห้งเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มมากขึ้น โดยมีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 24-72 ชั่วโมง และเริ่มเข้าสู่ stationary phase ที่ระยะเวลาประมาณ 72 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 4.20 โดยชั่วโมงที่ 72 ให้ปริมาณน้ำหนักเซลล์สูงสุด คือ 23.71 กรัม/ลิตร ซึ่งสัมพันธ์กับการลดลงของกลูโคส จนกลูโคสถูกนำไปใช้จนหมดในชั่วโมงที่ 96 หลังจากที่การเจริญเติบโตของราเข้าสู่ช่วง stationary phase จะมีการผลิตและสะสมกรดไขมัน ทำให้มีการผลิตกรดไขมัน และสะสมภายใน

เซลล์ที่สูงขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น โดยชั่วโมงที่ 144 ปริมาณ ARA ที่ผลิตขึ้นได้ปริมาณสูงสุด คือ 3.59 กรัม/ลิตร และจากรูปที่ 4.20 ยังแสดงให้เห็นว่าหลังจากชั่วโมงที่ 144 ปริมาณ ARA ที่สร้างขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นอย่างต่อเนื่องตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น

รูปที่ 4.21

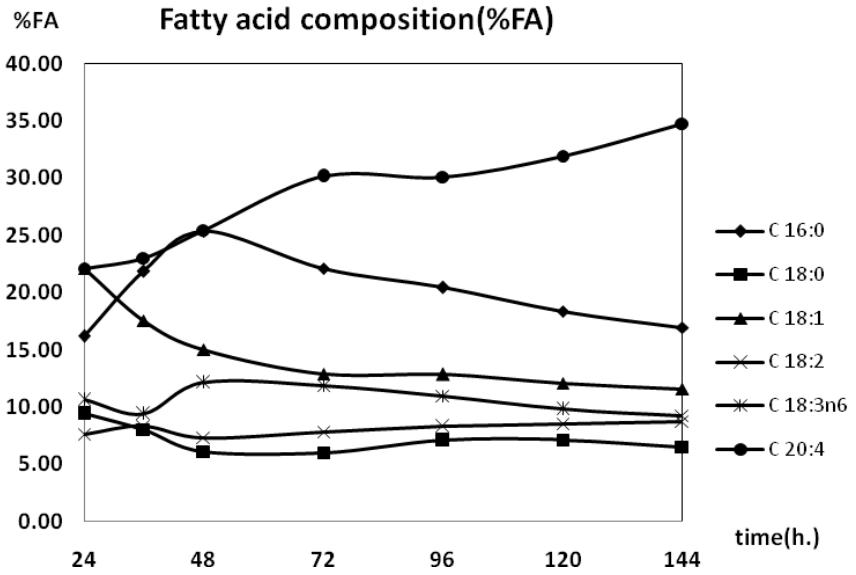
แสดงการผลิตกรดไขมันทั้งหมด(Total fatty acid) และ ARA ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 60 กรัม/ลิตร



และเมื่อศึกษาผลของปริมาณกรดไขมันทั้งหมดและปริมาณ ARA ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (TFA, ARA (%w/w)) ดังแสดงในกราฟที่ 4.18 พบว่าการผลิตไขมันทั้งหมด (total fatty acid in dry weight) สูงขึ้นตามระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อและมีการสะสมสูงสุด เมื่อเชื้อเจริญอยู่ใน stationary phase ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการสะสมกรดไขมันเนื่องจากมีการจำกัดของอาหารไนโตรเจน ทั้งนี้ยังพบอีกว่าสัดส่วนของ ARA (%w/w) ต่อปริมาณกรดไขมันทั้งหมด (TFA (%w/w) จะสูงขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น โดยพบว่าในสภาวะที่ใช้ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 60 กรัม/ลิตร สัดส่วนของการสะสม ARA (%w/w) ต่อปริมาณกรดไขมันทั้งหมด (TFA (%w/w) ยังคงสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง

รูปที่ 4.22

แสดงองค์ประกอบของกรดไขมัน (Fatty acid profile) เมื่อเลี้ยงราในอาหารที่มีความเข้มข้นน้ำของตาลกลูโคส 60 กรัม/ลิตร



องค์ประกอบของกรดไขมัน (fatty acid composition) ที่เชื้อผลิตขึ้นจากการทดลอง พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ โดยเฉพาะเมื่อเชื้อเจริญอยู่ในช่วง log phase (72 ชั่วโมง) แต่ในขณะที่เชื้อเจริญอยู่ใน stationary phase องค์ประกอบของกรดไขมันที่เชื้อผลิตเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย เห็นได้ว่าสัดส่วนของ ARA(%FA) ต่อกรดไขมันทั้งหมดที่สร้างขึ้นจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น โดยเมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 144 ชั่วโมง เชื้อรามีการสะสม ARA เป็นองค์ประกอบหลักสูงถึง 34.75 %FA

ดังนั้นในการเจริญเติบโตและการผลิต ARA ในรา *Mortierella* sp. BCC2863 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร ในระดับขวดเขย่านี้ เมื่อต้องการเก็บผลิตภัณฑ์ ARA ที่ได้ จะใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงนานถึง 144 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากได้ค่าผลได้ของเซลล์(Yx/s) เท่ากับ 0.38 ผลได้ของ ARA (Yp/s) เท่ากับ 0.06 และคุณภาพของผลิตภัณฑ์ (Yp/x) เท่ากับ 0.17

ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบตัวแปรต่างๆ ที่ได้จากการทดลองในหัวข้ออิทธิพลของน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นเริ่มต้น 40 และ 60 กรัม/ลิตร ที่เลี้ยงราเป็นเวลา 144 ชั่วโมง พบว่าการเจริญเติบโตและการผลิต ARA ที่ความเข้มข้นกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร จะให้ความเข้มข้นของเซลล์

สูงสุดที่ 21.27 กรัม/ลิตร และ ARA ที่ 3.59 กรัม/ลิตร รวมถึงผลการทดลองวัดปัจจัยอื่นๆ ก็พบว่ามีค่าสูงกว่าเมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 40 กรัม/ลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1

ตารางแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของเซลล์, กรดไขมันทั้งหมด, ARA และตัวแปรต่างๆ ที่เวลา144 ชั่วโมง ในการเลี้ยงรา *Mortierella* sp. BCC2863 ในอาหารที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 40 และ 60 กรัม/ลิตร

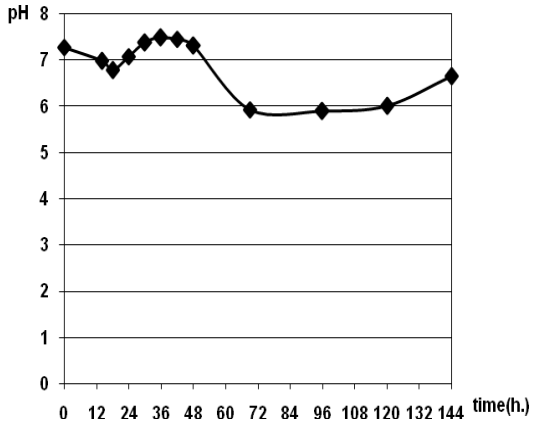
condition	4% glucose	6% glucose
biomass (g/l)	16.298 ± 0.17	21.277 ± 0.03
TFA(%w/w)	33.70 ± 2.42	48.37 ± 8.36
ARA(%w/w)	12.43 ± 0.90	16.87 ± 3.42
ARA(g/l)	2.026	3.590
ARA(%FA)	36.89 ± 0.63	34.75 ± 1.98
Yx/s	0.388	0.380
Yp/s	0.048	0.064
Yp/x	0.124	0.168

ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับการศึกษาในสายพันธุ์ *Mortierella alpina* ที่พบว่ามีการสร้างกรดอะราคิโดนิคสูงถึง 4-6 กรัม/ลิตร รายงานโดย Hung-Der Jang และคณะ (2004) จึงมีความเป็นไปได้ว่าราที่ทำการศึกษานี้ อาจจะมีประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตและการสร้างกรดไขมันได้ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Mortierella alpine* ดังนั้นจึงนำสภาวะการเลี้ยงเชื้อ ที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 60 กรัม/ลิตร มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการศึกษาปรับปรุงสภาวะการเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์และกรดไขมันที่สูงขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาดเล็ก เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์และกรดไขมันให้สูงขึ้น เพื่อนำไปใช้ให้เกิดมูลค่าเพิ่มทางด้านอุตสาหกรรมต่างๆ ต่อไป

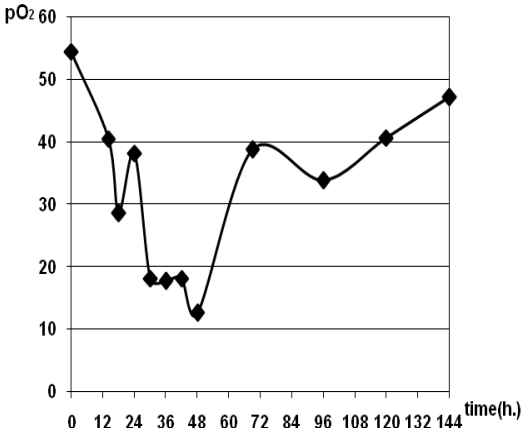
4.6 ผลของความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญเติบโตและการผลิต ARA ในรา *Mortierella* sp. BCC2863 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

ผลการทดลองที่ได้จากการทดลองในระดับขวดเขย่าทำให้สามารถหาสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมได้ในระดับหนึ่ง และเพื่อให้ได้ปริมาณชีวมวลที่สูงขึ้นเพื่อนำไปใช้ต่อในระดับอุตสาหกรรม จึงได้พัฒนาการเลี้ยงโดยใช้ถังหมักขนาดเล็กเพื่อเพิ่มปริมาณชีวมวลให้สูงขึ้น โดยใช้สูตรอาหารที่ให้ความเข้มข้นของเซลล์และสูงที่สุด จากการศึกษาในระดับขวดเขย่า ระบบที่ใช้ในการศึกษาการเลี้ยงในถังหมักจะเป็นระบบการเลี้ยงแบบ batch fermentation โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ใช้ปริมาณหัวเชื้อ 5%v/v ภายใต้สภาวะควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซียสเซียส อัตราการกวน 500 รอบ/นาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm จากนั้นเก็บเซลล์มาวิเคราะห์ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไขมันทั้งหมดและองค์ประกอบของกรดไขมัน ที่ช่วงเวลาต่างๆ

รูปที่ 4.23
แสดงค่า pH ที่เวลาต่างๆ ในการเลี้ยงรา *Mortierella* sp. BCC2863
ในอาหารที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 60 กรัม/ลิตร ในถังหมัก



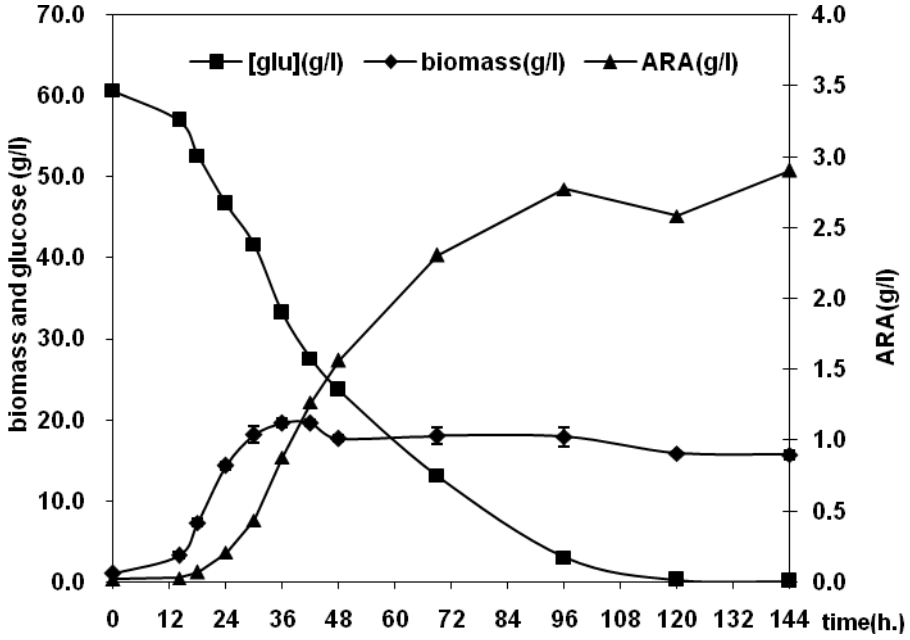
รูปที่ 4.24
แสดงค่า pO_2ที่เวลาต่างๆ ในการเลี้ยงรา *Mortierella* sp. BCC2863
เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 60 กรัม/ลิตร ในถังหมัก



จากรูปที่ 4.23 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH ที่เวลาต่างๆ จะเห็นได้ว่า เกิดการเปลี่ยนแปลงค่า pH ลดต่ำลงจาก 7.28 เนื่องจากเชื้อมีการใช้กลูโคสในการเจริญเติบโต และรูปที่ 4.24 แสดงค่า pO_2 หรือค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำหมัก พบว่ามีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโต (ดังแสดงในรูปที่ 4.25) โดยเชื้อราต้องการออกซิเจนในปริมาณที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและการผลิตกรดไขมันภายในเซลล์ รูปที่ 4.24 แสดงให้เห็นว่าเมื่อเลี้ยงราเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ค่า pO_2 ลดลงต่ำกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ทำให้การเลี้ยงถูกจำกัดออกซิเจน ราจึงหยุดการสร้างมวลเซลล์ ทั้งนี้ระยะเวลาดังกล่าวเป็นเวลาที่แหล่งไนโตรเจนถูกใช้จนหมด (รายละเอียดดังแสดงในหัวข้อที่ 4.7) แต่เมื่อในระบบยังมีกลูโคสเหลืออยู่ จึงถูกนำไปใช้ในการสร้างกรดไขมันและสะสมภายในเซลล์

รูปที่ 4.25

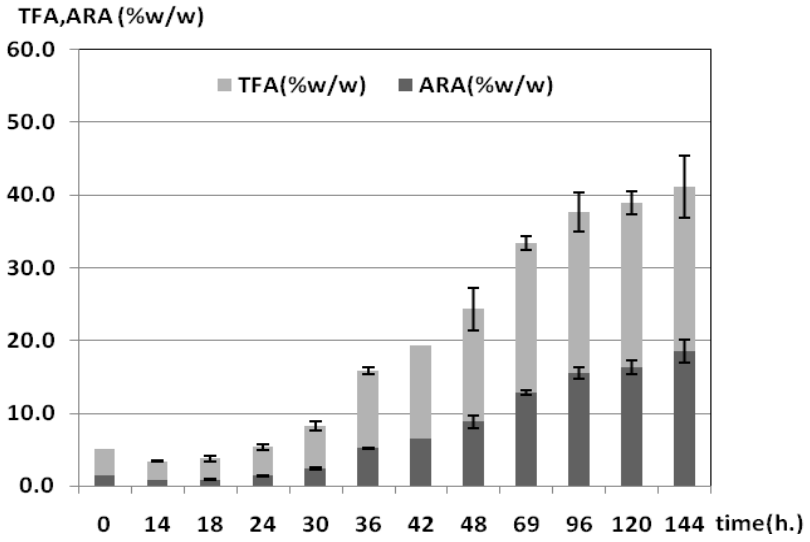
แสดงความเข้มข้นของกลูโคส (g/l) เซลล์ (g/l) และ ARA (g/l) เมื่อเลี้ยงราในอาหาร
ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 60 กรัม/ลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร



จากรูปที่ 4.5 แสดงให้เห็นว่า รามีความเข้มข้นของน้ำหนักเซลแห้งเพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มขึ้น โดยมีการเพิ่มอย่างรวดเร็วในระยะ log phase (ระหว่าง 12-36 ชั่วโมง) และเข้าสู่ stationary phase ตั้งแต่เวลา 36 ชั่วโมง ซึ่งเป็นชั่วโมงที่ให้ความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดที่ 19.58 กรัม/ลิตร หลังจากนั้นความเข้มข้นของเซลล์จะคงที่จนสิ้นสุดการทดลอง รานั้นพบว่ามีการสร้างและสะสมกรดไขมันภายในเซลล์ที่สูงขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น โดยมีความเข้มข้นของ ARA สูงสุดที่ 2.77 กรัม/ลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง

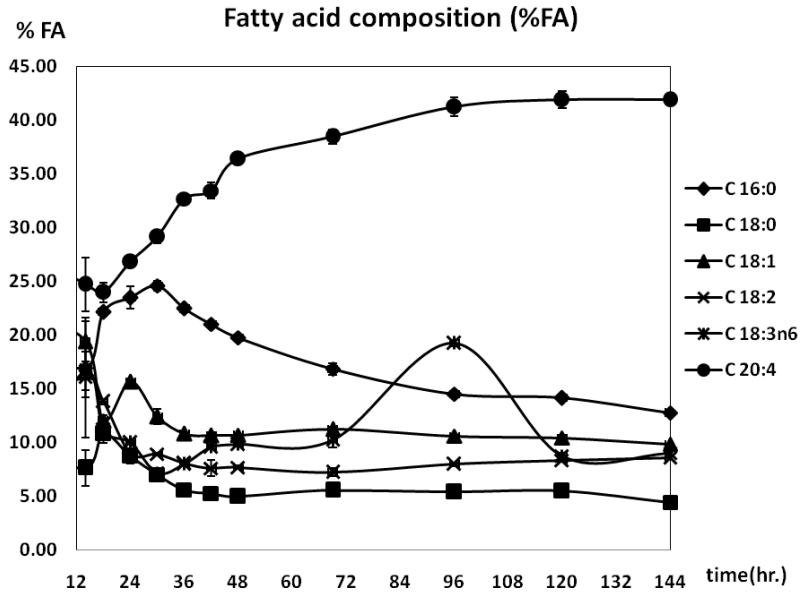
รูปที่ 4.26

แสดงการผลิตกรดไขมันทั้งหมด (Total fatty acid) และ ARA ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงรา ในอาหารที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 60 กรัม/ลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร



จากผลการศึกษาปริมาณกรดไขมันทั้งหมดและปริมาณ ARA ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (TFA, ARA (%w/w)) ดังแสดงในรูปที่ 4.26 อธิบายได้ว่ากรดไขมันทั้งหมด (total fatty acid) จะมีปริมาณและการสะสมที่สูงขึ้นตามระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อราเจริญอยู่ในระยะ stationary phase ทั้งนี้เนื่องมาจากการขาดแคลนอาหารไนโตรเจน ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการสะสมกรดไขมันของราที่ผลิตกรดไขมันเพื่อเป็นอาหารสะสมภายในเซลล์ จากผลการทดลองยังพบอีกว่า สัดส่วนของ ARA (%w/w) ต่อปริมาณกรดไขมันทั้งหมด (TFA (%w/w) จะสูงขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น และมีแนวโน้มที่จะสูงขึ้นต่อไปหลังจากที่สิ้นสุดการทดลองที่ชั่วโมงที่ 144

รูปที่ 4.27
แสดงองค์ประกอบของกรดไขมัน (Fatty acid profile) เมื่อเลี้ยงราในอาหาร
ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 60 กรัม/ลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร



จากรูปที่ 4.27 แสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบของกรดไขมัน (fatty acid composition) ที่เชื้อผลิตขึ้นภายในเซลล์ จะมีการเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ โดยเฉพาะเมื่อราเจริญอยู่ในช่วง log phase (12-36 ชั่วโมง) แต่เมื่อระยะการเจริญอยู่ในช่วง stationary phase องค์ประกอบของกรดไขมันที่เชื้อผลิตขึ้น จะมีเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย และยังพบอีกว่าสัดส่วนของ ARA (%FA) ต่อกรดไขมันทั้งหมดที่สร้างขึ้นจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่เวลา 144 ชั่วโมง พบว่ารามีการสะสม ARA เป็นองค์ประกอบหลักสูงถึง 41.13 %FA

ดังนั้นในการเลี้ยงรา *Mortierella* sp. BCC2863 เพื่อผลิต ARA ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 60 กรัม/ลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตรนี้ เมื่อต้องการเก็บผลิตภัณฑ์ ARA พบว่าระยะเวลาการเลี้ยงที่ 96 ชั่วโมง เป็นช่วงที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากพบว่าค่าผลได้ของเซลล์ (Yx/s) เท่ากับ 0.30 ผลได้ของ ARA (Yp/s) เท่ากับ 0.05 และคุณภาพของผลิตภัณฑ์ (Yp/x) เท่ากับ 0.16

4.7 Nitrogen balance

เนื่องจากกระบวนการสร้างและสะสมกรดไขมันในราจะเกิดขึ้นมากในสภาวะจำกัดไนโตรเจน (nitrogen limit) เพื่อแสดงให้เห็นอิทธิพลของการจำกัดปริมาณไนโตรเจนจึงนำการคำนวณสมดุลไนโตรเจน หรือ Nitrogen Balance มาใช้ศึกษาในช่วงเวลาต่างๆ โดยตั้งสมมติฐานที่ว่าราจะมีการใช้แหล่งอาหารไนโตรเจนจนหมด

การคำนวณ Nitrogen Balance เป็นการพิสูจน์ว่ามีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบไนโตรเจนในระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยง โดยในการทดลองนี้แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ คือ yeast extract ซึ่งเป็น organic compound ซึ่งพบว่ามีองค์ประกอบของไนโตรเจนอยู่ประมาณ 10% โดยในการพิสูจน์ว่าแหล่งอาหารไนโตรเจนถูกใช้จนหมดนี้จะคำนวณหาจากการทดลองที่ 4.5 และ 4.6 เพื่อแสดงว่าไนโตรเจนได้ถูกนำไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตจนหมด โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของ yeast extract เท่ากับ 10 กรัม/ลิตร

1. องค์ประกอบไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

yeast extract ความเข้มข้น 10 กรัม/ลิตร

มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบอยู่ 10%

ดังนั้นในอาหารจะมีไนโตรเจน = (10 x 0.1) g(nitrogen)/L

= 1 g(nitrogen)/L

molecular weight ของ nitrogen เท่ากับ 14

ดังนั้นในอาหารจะมีไนโตรเจน = [(1/14) g(nitrogen)/L]

= 0.0714 mol/l หรือ M

= 71.43 mM

2. สูตรโครงสร้างของเซลล์รา

Chemical formular เท่ากับ $CH_{1.79}O_{0.50}N_{0.20}$

molecular weight ของเซลล์ เท่ากับ 26.59

ดังนั้นอัตราส่วนของไนโตรเจนในเซลล์ เท่ากับ 2.8/26.59 = 0.105

เมื่อได้ค่าอัตราส่วนไนโตรเจนของเซลล์แล้วจึงนำไปใช้ในการเปลี่ยนความเข้มข้นของเซลล์ให้กลายเป็นความเข้มข้นไนโตรเจน

3. การคำนวนสมดุลไนโตรเจน

ตัวอย่างการคำนวนนี้เป็นสภาวะการเลี้ยงราในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 40 กรัม/ลิตร ที่ชั่วโมงการเลี้ยงที่ 0 และ 36 ชั่วโมง (ข้อมูลจากภาคผนวก ก.15)

การคำนวณนี้กำหนดให้ไนโตรเจนจาก yeast extract และเซลล์จากหัวเชื้อเริ่มต้นเป็นแหล่งไนโตรเจนขาเข้า ซึ่งถูกเปลี่ยนเป็นเซลล์ที่เพิ่มขึ้นทั้งหมด และกำหนดให้เป็นแหล่งไนโตรเจนขาออก

3.1 nitrogen balance ขาเข้า ที่ชั่วโมงการเลี้ยงที่ 0 ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ

1) nitrogen จาก yeast extract เท่ากับ 71.43 mM

2) nitrogen จากหัวเชื้อเริ่มต้น 0.546 กรัม/ลิตร

มี nitrogen = 0.105 x 0.546 = 0.057 g/l

= (0.057 X 1000)/14 = 4.095 mM

ดังนั้นความเข้มข้นของไนโตรเจนขาเข้าเท่ากับ 71.43 + 4.095 = 75.52 mM

3.2 nitrogen balance ขาออก ที่ชั่วโมงการเลี้ยงที่ 36

nitrogen จาก biomass 9.995 กรัม/ลิตร

มี nitrogen = 0.105 x 9.995 = 1.05 g/l

= (1.05 X 1000)/14 = 74.96 mM

ตารางที่ 4.2

ตารางแสดงสรุปการคำนวณความเข้มข้นของไนโตรเจนที่ช่วงระยะเวลาต่างๆ จากความเข้มข้นของรา *Mortierella* sp. BCC2863 ที่ไม่รวมกรดไขมันที่สะสมภายในเซลล์ ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 40 และ 60 กรัม/ลิตร

	Nitrogen balance	
time(hr)	4% glucose	6% glucose
0	77.28	76.00
24	54.248	45.37
36	74.963	61.31
48	105.075	81.12
72	126.172	124.98
96	68.160	89.56
120	76.045	85.83
144	81.042	82.57

จากการศึกษาเพื่อหาสมดุลของธาตุไนโตรเจน ระหว่างชั่วโมงที่ 0 และชั่วโมงต่างๆ จากผลการทดลองในหัวข้อที่ 4.5 และ 4.6 พบว่า การศึกษาในขวดเขย่าที่น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 4% และ 6% พบว่า ความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เข้ามาในระบบมีค่าใกล้เคียงกันคือประมาณ 78.02 และ 76.00 mM ขณะที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนภายในเซลล์ ที่คำนวนจากสูตรโมเลกุลของจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของน้ำหนักเซลล์แห้ง หลังจากได้หักปริมาณของกรดไขมันที่สะสมภายในเซลล์ออกแล้ว พบว่ามีปริมาณของไนโตรเจนภายในเซลล์มีค่าคงที่เฉลี่ยตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 ถึง 144 ทั้งสองสภาวะที่ 91.29 mM และ 92.81 ตามลำดับ

ขณะที่การศึกษาในถังหมักที่น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 6% พบว่าความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เข้ามาในระบบมีค่าเริ่มต้นประมาณ 78.73 mM ซึ่งใกล้เคียงกับในขวดเขย่า ขณะที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนภายในเซลล์คำนวนจากสูตรโมเลกุลของจุลินทรีย์เฉลี่ยและความเข้มข้นของน้ำหนักเซลล์แห้ง หลังจากได้หักปริมาณของกรดไขมันที่สะสมภายในเซลล์ออกแล้ว พบว่ามีปริมาณของไนโตรเจนภายในเซลล์มีค่าคงที่เฉลี่ยตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ถึง 144 ที่ 96.35 mM

แสดงว่าทั้งสามสภาวะมีการใช้ไนโตรเจนหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 สำหรับการเลี้ยงในขวดเขย่า และชั่วโมงที่ 24 ในถังหมัก หลังจากนั้นความเข้มข้นของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นจึงเพิ่มจากปริมาณกรดไขมันสะสมที่เพิ่มขึ้น