

*Mucor* เป็นราในกลุ่มที่สามารถผลิตกรดแกมมาไลโนเลนิกได้สูง งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการผลิตกรดแกมมาไลโนเลนิกในถังหมักด้วยวิธีการเลี้ยงแบบกึ่งกะจากรา *Mucor rouxii* ATCC 24905 โดยการเติมอาหารแตกต่างกัน 4 แบบคือ เติมกลูโคสทุก 4 ชั่วโมง (แบบที่ 1) เติมอาหารทุก 4 ชั่วโมง (แบบที่ 2) เติมอาหารแบบต่อเนื่อง (แบบที่ 3) และเติมอาหารเติมทุก 4 ชั่วโมงร่วมกับแบบต่อเนื่อง (แบบที่ 4)

จากการทดลองพบว่า ในการเติมกลูโคสเพียงอย่างเดียว (แบบที่ 1) น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดแกมมาไลโนเลนิกไม่แตกต่างจากแบบกะทั่วไป โดยได้น้ำหนักแห้ง 7.19 g/L และกรดแกมมาไลโนเลนิก 213.9 g/L หรือ 3.00 g-GLA/g-DW และเมื่อป้อนอาหารที่มีองค์ประกอบเช่นเดียวกับอาหารในถังหมักทุก 4 ชั่วโมง (แบบที่ 2) ได้น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นสูงสุด 41.49 g/L และกรดแกมมาไลโนเลนิกเพิ่มขึ้นเป็น 1136.6 g/L หรือ 2.76% g-GLA/g-DW แต่เมื่อเปลี่ยนวิธีการป้อนอาหารเป็นแบบต่อเนื่อง (แบบที่ 3) ซึ่งทำให้เซลล์เจริญได้ดีในช่วงแรก ๆ แต่ก็พบว่าน้ำหนักเซลล์ลดลง เหลือเพียง 36.70 g/L ในเวลาต่อมา และได้กรดแกมมาไลโนเลนิกสูงสุดเพียง 600 mg/L หรือ 1.64 g-GLA/g-DW ในการทดลองที่มีการเติมอาหารทุก 4 ชั่วโมงร่วมกับแบบต่อเนื่อง (แบบที่ 4) เพื่อให้ได้ทั้งปริมาณเซลล์และปริมาณกรดแกมมาไลโนเลนิกสูง พบว่าได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 63.43 g/L และกรดแกมมาไลโนเลนิกสูงถึง 1163.6 mg/L หรือ 2.03 g-GLA/g-DW ซึ่งนับว่าสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานอื่น ๆ

การศึกษากรดไขมันทั้งหมดต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่า การเติมกลูโคสเพียงอย่างเดียว (แบบที่ 1) มีการสะสมกรดไขมันทั้งหมดต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดคือ 28.81% (g-TFA/g-DW) ซึ่งสูงกว่าแบบอื่น ๆ เช่นการเติมอาหารทุก 4 ชั่วโมง (แบบที่ 2) หรือการเติมอาหารแบบต่อเนื่อง (แบบที่ 3) และการเติมอาหารทุก 4 ชั่วโมงร่วมกับแบบต่อเนื่อง (แบบที่ 4) ซึ่งได้ปริมาณกรดไขมันทั้งหมดต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเป็น 13.56% (g-TFA/g-DW) 11.13% (g-TFA/g-DW) และ 9.32% (g-TFA/g-DW) ตามลำดับ

สัดส่วนกรดแกมมาลิโนเลนิกต่อกรดไขมันทั้งหมด แบบที่เติมกลูโคสอย่างเดียวพบรูปแบบเช่นเดียวกับแบบกะ คือมีสัดส่วนกรดแกมมาลิโนเลนิกสูงในช่วงต้นการเจริญ ชั่วโมง ที่ 12 คือ 29.92% (g-GLA/g-TFA) จากนั้นลดลงเป็น 11.51% (g-GLA/g-TFA) ชั่วโมงที่ 24 และสัดส่วนค่อนข้างคงที่ต่อมา ส่วนแบบที่มีการเติมอาหารแบบเดียวกับในถังหมักทุก 4 ชั่วโมง (แบบที่ 2) แม้ว่า สัดส่วนกรดแกมมาลิโนเลนิกต่อกรดไขมันทั้งหมดลดลงในช่วง 24 ชั่วโมงแรก แต่ต่อมากลับเพิ่มขึ้น และสูงกว่าแบบกะและแบบที่ 1 โดยสัดส่วนไม่เปลี่ยนแปลงมากนักตลอดระยะเวลาที่มีการป้อนอาหาร และเมื่อเปลี่ยนการป้อนอาหารเป็นแบบต่อเนื่อง (แบบที่ 3) ได้น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มมากขึ้น รวมทั้งได้สัดส่วนกรดแกมมาลิโนเลนิก ต่อกรดไขมันทั้งหมดค่อนข้างคงที่ ไม่ลดลงมากนักเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับแบบที่มีการป้อนอาหารทุก 4 ชั่วโมงร่วมกับแบบต่อเนื่อง (แบบที่ 4) ที่ได้สัดส่วนกรดแกมมาลิโนเลนิกต่อกรดไขมันทั้งหมดค่อนข้างสูงและมีสัดส่วนค่อนข้างคงที่ระหว่างการป้อนสารอาหาร โดยสัดส่วนกรดแกมมาลิโนเลนิกต่อ กรดไขมันทั้งหมดมีแนวโน้มสูงสุดในแบบที่ 4 โดยสัดส่วนกรดแกมมาลิโนเลนิกสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 คือ 33.00% (g-GLA/g-TFA) และลดลงเหลือ 20.98% (g-GLA/g-TFA) ในชั่วโมงที่ 24 จากนั้นการผลิตกรดไขมันเพิ่มขึ้นและค่อนข้างคงที่ โดยมีสัดส่วนกรดแกมมาลิโนเลนิกต่อกรดไขมันทั้งหมดเฉลี่ยเท่ากับ 22% (g-GLA/g-TFA) ตลอดการทดลอง

จากการศึกษาพบว่าสัณฐานวิทยาของราในการเลี้ยงแบบกึ่งกะทั้ง 4 แบบมีผลต่อรูปร่างระหว่างการหมักคือ พบรูปร่างที่เป็นเส้นใยในการเลี้ยงแบบที่มีการป้อนกลูโคสเพียงอย่างเดียว (แบบที่ 1) แต่เมื่อมีการป้อนอาหารแบบเดียวกับในถังหมักทุก 4 ชั่วโมง (แบบที่ 2) พบราเจริญเป็นรูปร่างคล้ายยีสต์และเมื่อเปลี่ยนเป็นการป้อนอาหารแบบต่อเนื่อง (แบบที่ 3) พบเซลล์ที่มีรูปร่างเป็น arthrospore ภายใน 24 ชั่วโมง จากนั้นพบรูปร่างที่เป็นทั้งเส้นใยและรูปร่างคล้ายยีสต์ร่วมกัน โดยมีรูปแบบที่เป็นเส้นใยมากกว่า (ระหว่าง 24 – 48 ชั่วโมง) แต่เมื่อเซลล์หนาแน่นมากขึ้น พบรูปร่างคล้ายยีสต์มากขึ้นในชั่วโมงที่ 84 ส่วนในการป้อนอาหารทุก 4 ชั่วโมงร่วมกับแบบต่อเนื่อง (แบบที่ 4) พบเซลล์รูปร่างคล้ายยีสต์อย่างเดียตลอดการทดลอง

*Mucor sp.*, one of a few fungi that produce high  $\gamma$ -linolenic acid, was chosen for the work. Fed-batch fermentation by *Mucor rouxii* ATCC 24905 of different feeding patterns was performed at 4 conditions. Feeding only glucose solution every 4 hours (Feeding 1), feeding with medium solution every 4 hours (Feeding 2), continuous feeding with medium solution (Feeding 3) and feeding with medium solution every 4 hours combined with continuous feeding (Feeding 4) were compared.

In Feeding 1 (glucose feeding), the biomass and concentration of  $\gamma$ -linolenic acid obtained were similar to batch fermentation. The highest biomass was 7.19 g/L, whereas  $\gamma$ -linolenic acid concentration was 213.9 g/L or 3.00 g-GLA/g-DW. Biomass and amount of  $\gamma$ -linolenic acid from Feeding 2 (medium feeding) was risen up to 41.49 g/L and 1136.6 mg/L or 2.76 g-GLA/g-DW, respectively. But in Feeding 3 (continuous feeding with medium solution) biomass was decreased to 36.70 g/L, amounts of  $\gamma$ -linolenic acid was 600 mg/L or 1.64 g-GLA/g-DW. For Feeding 4 (feeding with medium solution every 4 hours combined with continually feeding), the highest biomass and concentration of  $\gamma$ -linolenic acid obtained was 63.43 g/L and 1163.6 mg/L or 2.03 g-GLA/g-DW, respectively.

The proportion of total fatty acid in dry weight of Feeding 1 was 28.81 % (g-TFA/g-DW), which was higher than that of the other feedings that 13.56 % (g-TFA/g-DW), 11.13 % (g-TFA/g-DW) and 9.32 % (g-TFA/g-DW) were obtained in Feeding 2, 3 and 4, respectively.

The proportion of  $\gamma$ -linolenic acid in total fatty acid in Feeding 1 was similar to batch fermentation.  $\gamma$ -Linolenic acid content was rapidly increased to 29.92% (g-GLA/g-TFA) at 12 hr, after that it was decreased to 11.51% (g-GLA/g-TFA) at 24 hr and remained stable. In case of Feeding 2, although the proportion of  $\gamma$ -linolenic acid in total fatty acid was declined in 24 hr, later on, it was risen up and kept constant. The high biomass was also obtained from Feeding 3 with a stable proportion of  $\gamma$ -linolenic acid in total fatty acid. The results in Feeding 3 is consistent with Feeding 4, which offered high and stable proportions of  $\gamma$ -linolenic acid. The highest concentration of  $\gamma$ -linolenic acid content in Feeding 4 was 33.00 % (g-GLA/g-TFA) in 12 hr and decreased to 20.98% (g-GLA/g-TFA) at 24 hr. Then fatty acid production was increased and stable. The average concentration of  $\gamma$ -linolenic acid content was 22 % (g-GLA/g-TFA).

The morphology of *M. rouxii* ATCC 24905 appeared in different forms under different feedings. The filamentous form occurred in Feeding 1, while yeast-like cell was developed in Feeding 2. But in Feeding 3, arthrospore was found at 24 hr, after that yeast-like form and filamentous form occurred and then developed all to be yeast-like cell again at 84 hr. In case of Feeding 4, yeast-like cell occurred under the feeding condition.