บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การหมัก (Fermentation)

การหมัก (Fermentation) ในทางจุลชีววิทยาอุตสาหกรรมหมายถึง กระบวนการผลิตผลผลิตใด ๆ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จำนวนมาก (Mass Culture) ซึ่งจะครอบคลุมทั้งกระบวนการแบบใช้และไม่ใช้ออกซิเจน ส่วนทางชีวเคมี หมายถึงการสร้างพลังงานจากกระบวนการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ โดยมีสารอินทรีย์เป็นตัวให้และตัวรับอิเล็กตรอน และเป็นกระบวนการแบบไม่ใช้ออกซิเจนเท่านั้น

ชนิดของการหมัก

การหมักแบ่งออกเป็น 4 ประเภท คือ

1. การหมักที่ให้ผลผลิตเป็นตัวเซลล์ (Microbial Cell or Biomass) ได้แก่ การผลิตเซลล์ยีสต์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมขนมอบ และการผลิตเซลล์จุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นอาหารมนุษย์หรือสัตว์ (Single Cell Protein)

2. การหมักที่ให้ผลผลิตเป็นเอนไซม์ (Microbial Enzyme) การผลิตเอนไซม์สามารถผลิตได้จากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ แต่แหล่งที่สำคัญที่สุดได้แก่จุลินทรีย์ เนื่องจากผลิตได้ครั้งละมาก ๆ ในระยะเวลาสั้นๆ และสามารถปรับปรุงให้ได้ผลผลิตสูงกว่าการผลิตจากพืชหรือสัตว์ และเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ มักใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับอาหาร

3. การหมักที่ให้ผลผลิตเป็นสารเมแทบอไลท์ (Microbial Metabolite) สารเมแทบอไลท์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์แบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ สารเมแทบอไลท์ปฐมภูมิ (Primary Metabolite) เป็นสารที่มีความจำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น กรดอะมิโน นิวคลีโอไทด์ โปรตีน กรดนิวคลีอิก ลิปิด และคาร์โบไฮเดรต สารเมแทบอไลท์ที่มีความสำคัญทางการค้าและผลิตขึ้นโดยการหมักเช่น เอทธานอล กรดซิตริก กรดกลูตามิก อะซิโตน บิวทานอล ไลซีน นิวคลีโอไทด์ โพลีแซคคาไรด์ และวิตามิน เป็นต้น ส่วนสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิ (Secondary Metabolite) เป็นสารที่เกิดจากผลผลิตจากกระบวนการเมแทบอลิซึมปฐมภูมิ (Primary Metabolism) ซึ่งพบในจุลินทรีย์บางชนิดในช่วง Stationary Phase ของการเจริญ และอาจพบในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่อง (Continuous Culture) ที่มีอัตราการเจริญต่ำ สารเหล่านี้มีความสำคัญในอุตสาหกรรมการหมักเนื่องจากมีผลต่อจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บางชนิด เป็นสารส่งเสริมการเจริญหรือมีคุณสมบัติเป็นยารักษาโรค

4. การหมักที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปของสารประกอบที่เติมลงไป (Transformation process) เป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารประกอบให้อยู่ในรูปที่คล้ายกัน แต่มีราคาสูงขึ้น ซึ่งสามารถทำได้โดยใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ หรือสารเคมีเป็นตัวเร่งทำให้เกิดปฏิกิริยา Oxidation, Amination, Dehydrogenation, Dehydroxylation, Dehydration, Decarboxylation, Deamination, Condensation หรือ Isomerization (สมใจ ศิริโภค, 2537)

การหมัก แบ่งตามลักษณะของกระบวนการที่ใช้ได้เป็น 4 แบบ คือ

1. การเลี้ยงเซลล์แบบครั้งเดียว (Batch Fermentation) เป็นการหมักแบบไม่ต่อเนื่องและเป็นการเลี้ยงจุลินทรีย์เจริญในภาชนะซึ่งเป็นหลอดแก้ว หรือฟลาสก์ หรือถังหมักโดยไม่มีการเปลี่ยน

อาหาร จุลินทรีย์มีการเจริญตามปกติโดยมีระยะต่าง ๆ คือ ระยะพักตัว (Lag Phase) ระยะทวีคูณ (Exponential Phase) ระยะคงที่ (Stationary Phase) และระยะตาย (Death Phase) วิธีนี้พบว่าสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายและพื้นที่

2. การเลี้ยงเซลล์แบบต่อเนื่อง (Continuous Fermentation) เป็นการเลี้ยงจุลินทรีย์โดยให้เซลล์เจริญในช่วงระยะกำลังเจริญทวีคูณตลอดเวลา โดยมีอัตราการไหลเข้า-ออกของอาหารเท่ากันตลอดเวลา นิยมใช้ปั๊มช่วยดึงอาหารเข้า-ออกตลอดเวลา

3. การเลี้ยงเซลล์แบบกึ่งต่อเนื่อง (Semi-Continuous Culture) เป็นการเลี้ยงเซลล์แบบ Batch Culture เมื่อได้เซลล์ตามต้องการแล้ว จึงดูดเซลล์ออกให้เหลือในถังหมักประมาณหนึ่งในสี่เป็นอย่างมาก แล้วเติมอาหารใหม่ (Fresh Medium) ลงไปอีกเท่าเดิม อาหารเก่าที่เหลืออยู่หนึ่งในสี่เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น

4. การเลี้ยงเซลล์แบบเติมอาหารเป็นระยะ (Fed-Batch Cultivation) คือ Batch Culture ที่มีการเติมอาหารต่อเนื่องหรือเป็นระยะ ๆ โดยไม่มีการถ่ายเทอาหารออกเพื่อให้จุลินทรีย์เจริญและใช้อาหารได้อย่างเต็มที่ การหมักแบบนี้ส่วนใหญ่ใช้เพื่อแก้ปัญหาเรื่องความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้น ซึ่งถ้าใช้มากไปอาจมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ หรืออาจทำให้มีปัญหาในการใช้ออกซิเจนในปริมาณที่เพียงพอได้ (สมใจ ศิริโภค, 2537; บุษบา ยงสมิทธ์, 2540)

ปัจจัยที่มีผลต่อการหมัก

ในการหมักแบบคราวเดียว หรือต่อเนื่อง หรือแบบอื่น ๆ ที่เลือกใช้เพื่อผลิตผลจากกระบวนการหมักให้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และประหยัดต้นทุนมากที่สุดแล้ว จำเป็นต้องคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

1. ปัจจัยภายใน เช่น การเจริญของเซลล์มีผลต่อผลผลิตที่ต้องการ การเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของจุลินทรีย์ การใช้สับสเตรต การตายของจุลินทรีย์เป็นผลมาจากสารยับยั้งการย่อยสลายตัวเอง ความเสียหายจากใบพัดหรือกลไกต่าง ๆ การสะสมของสารเมแทบอไลท์ การใช้ออกซิเจนและความเข้มข้นของออกซิเจนละลายน้ำ การเกิดคาร์บอนไดออกไซด์และออกซิเจนละลายน้ำ กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง การเกิดฟองและการทำลายฟอง pH และ redox potentials ความหนืดหรือความสม่ำเสมอของอาหาร การกระจายความเข้มข้นในอาหารเหลวความร้อนในระหว่างการหมัก ลักษณะการไหลของอาหาร

2. ปัจจัยภายนอก เช่น การเลี้ยงเชื้อ ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ การทำให้อาหารปราศจากเชื้อ อุณหภูมิ รวมทั้งระบบการระบายความร้อน การเกิดฟองอากาศในอาหาร การกวนและการให้อากาศ ความดันอากาศภายในถังหมัก โดยทั่วไปต้องเลือกสภาวะปัจจัยภายนอกที่มีผลต่อการคงสภาพของปัจจัยภายใน ซึ่งหลักการขยายการหมักคือ การปรับระดับที่ดีที่สุดของปัจจัยเหล่านี้ให้คงที่ที่สุด (บุษบา ยงสมิทธ์, 2540)

ทรอสโทไคตริดส์ (Thraustochytrids)

1.ลักษณะทั่วไปของทรอสโทไคตริดส์

ทรอสโทไคตริดส์มีรูปร่างเป็นทรงกลมเดี่ยวๆ (monocentric) ประกอบด้วยส่วนเอคโตพลาสมิคเนท (ectoplasmic net) ที่ยื่นยาวออกมายึดเกาะพื้นผิว สำหรับการดูดซึมธาตุอาหารและขนส่งเอนไซม์เอนไซม์ไลติก (lytic) ไปยังซับสเตรท แล้วย่อยสลายดูดซึมสารอาหารเพื่อไป เลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของทัลลัส (Bowles, 1997) เอคโตพลาสมิคเนท สร้างมาจากส่วนที่เรียกว่าซาจีโนเจน

(Sagenogen) (Chilton, 1995; Honda *et al.*, 1998) ส่วนที่เป็นเอคโตพลาสมิกเนทไม่มีผนังเซลล์และออแกนแนล (หน่วยเล็ก ๆ ที่อยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ทำหน้าที่เสมือนหนึ่งเป็นอวัยวะของเซลล์) ส่วนไซโทพลาสซึมของทัลลัสจะแยกจากรูเมนของเอคโตพลาสมิกเนท โดยไปรวมกับซาจีโนเจน (Moss, 1986) ซึ่งเป็นลักษณะพิเศษของทรอสโทไคตริดส์ แม้ว่าจะยังไม่สามารถยืนยันหน้าที่ของซาจีโนเจนได้ชัดเจน แต่คาดว่าน่าจะเป็นส่วนสำคัญที่ช่วยในระบบการทำงานของเอคโตพลาสมิกเนท และช่วยป้องกันไม่ให้ออแกนแนลภายในทัลลัสไหลไปยังเอคโตพลาสมิกเนท (Bowles, 1997) ลักษณะของเอคโตลาสมิคเนทแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน

บทบาทของทรอสโทไคตริดส์ในระบบนิเวศ จุลินทรีย์ทะเลในกลุ่มทรอสโทไคตริดส์จัดเป็นพวกเฮเทอโรโทรฟคือ ต้องการสารอินทรีย์และออกซิเจนเพื่อใช้ในการเจริญ ส่วนใหญ่ดำรงชีวิตเป็นแซโพรไฟต์ (saprophyte) ใช้เอคโตพลาสมิกเนททำหน้าที่ส่งเอนไซม์ออกมาย่อยสลายสารอินทรีย์ที่เน่าเปื่อยจากโมเลกุลใหญ่ให้เป็นโมเลกุลที่เล็ก แล้วดูดซึมกลับไปยังทัลลัส เพื่อใช้ในการเจริญและเพิ่มจำนวนเซลล์ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2544) ทรอสโทไคตริดส์จึงทำหน้าที่ย่อยสลายอินทรีย์สาร ซึ่งเป็นการเพิ่มและหมุนเวียนแร่ธาตุต่าง ๆ ในระบบนิเวศ (Naganuma *et al.*, 1998) และพบว่าบางกลุ่มเป็นปรสิตเช่น หอย หมึก และฟองน้ำ (Alderman & Jones, 1971) เนื่องจากทรอสโทไคตริดส์มีปริมาณดีเอชเอสูงถึง 30-40 เปอร์เซนต์ของกรดไขมันทั้งหมด จึงทำให้มีความสำคัญในแง่ของแหล่งกรดไขมันในธรรมชาติ ซึ่งกรดไขมัน เหล่านี้สามารถถ่ายทอดไปตามห่วงโซ่อาหาร ทำให้เกิดความอุดมสมบูรณ์ในระบบนิเวศน์ (Findlay *et al.*, 1986 cited in Bremer, 2000)

บทบาทของทรอสโทไคตริดส์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ แหล่งของกรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่มโอเมก้า-3 ปัจจุบันที่ใช้ในทางการค้าประกอบไปด้วย 3 แหล่งใหญ่ ๆ คือ น้ำมันปลา สาหร่ายขนาดเล็ก และทรอสโทไคตริดส์ ซึ่งพบว่าทรอสโทไคตริดส์มีสัดส่วนดีเอชเอสูงกว่าอีพีเอ ขณะที่น้ำมันที่ได้จากปลานั้นมีสัดส่วนดีเอชเอต่ำกว่าอีพีเอ โดยทั่วไปสัตว์น้ำมีความต้องการปริมาณดีเอชเอสูง (เวียง เชื้อโพธิ์หัก, 2542) จึงได้มีการนำทรอสโทไคตริดส์มาใช้ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหารให้กับโรติเฟอร์และอาร์ทีเมีย เพื่อให้มีปริมาณ n-3 PUFAs สูง ก่อนที่จะนำไปใช้ในการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อนต่อไปซึ่งกรดไขมันเหล่านี้มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญ เติบโตและอัตราการรอดของสัตว์น้ำวัยอ่อน ดังนั้นการเสริมปริมาณดีเอชเอให้กับสัตว์น้ำถือเป็นการถ่ายทอดดีเอชเอไปตามห่วงโซ่อาหาร เพื่อเพิ่มหรือเสริมปริมาณดีเอชเอให้กับมนุษย์ทางอ้อม (Barclay & Zeller, 1996)

การแพร่กระจายทรอสโทไคตริดส์

ทรอสโทไคตริดส์เป็นจุลินทรีย์ที่พบได้ทั่วไปตามแหล่งน้ำเค็ม เช่น ปากแม่น้ำ ชายฝั่งทะเล อ่าวและมหาสมุทรทั่วโลก (Bremer, 1974; Bahnweg, 1979; Chilton, 1995; Nakahara *et al.*, 1996, Naganuma *et al.*, 1998) โดยพบทั้งในดิน น้ำ พืช สาหร่าย ซากเน่าเปื่อย (Porter, 1989; Chilton, 1995)โดยพบทรอสโทไคตริดส์ในบริเวณปากแม่น้ำที่มีสารอินทรีย์อุดมสมบูรณ์มากกว่าน้ำที่อยู่ห่างชายฝั่งออกไป และพบว่าพืชที่มีระบบท่อลำเลียง เช่น สาหร่ายทะเลและหญ้าทะเล จัดเป็นแหล่งที่อยู่ที่สำคัญของทรอสโทไคตริดส์ (Alexopoulos, 1996) ซึ่งการแพร่กระจายของทรอสโทไคตริดส์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันตามแหล่งที่อยู่อาศัย (Bremer, 2000) และบางชนิดเป็นปรสิตของหอย หมึก และฟองน้ำ (Alderman & Jones, 1971; Porter, 1989)

แหล่งที่สำคัญของกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3

น้ำมันปลา (fish oil) อุดมไปด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงกลุ่มโอเมก้า-3 ชนิดที่พบและมีความสำคัญคือ แอลฟา-ไลโนลีนิค อีพีเอและดีเอชเอ ไขมันที่มีอยู่ในเนื้อปลาจะเป็นส่วนประกอบของเซลล์ต่าง ๆ โดยเฉพาะเซลล์สมอง มีส่วนช่วยป้องกันการแข็งตัวของไขมันในเส้นเลือด นอกจากนี้กระบวนการเมตาบอลิซึมของปลาก็มีส่วนอย่างมาก ในการสร้างและรักษากรดไขมันเหล่านี้ไว้ เนื่องจากปลามีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวในกลุ่มโอเมก้า-3 สูง ทำให้ไขมันปลาแตกต่างจากไขมันสัตว์ชนิดอื่น ๆ คือ มีสภาพเป็นของเหลวที่อุณหภูมิต่ำ มีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของปลาคงสภาพเป็นของเหลวอยู่ได้ในน้ำแข็ง ปลาจึงสามารถย่อยและดูดซึมไขมันไปใช้ได้ จึงทำให้ปลาทะเลมีระดับกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงมาก จากการศึกษาเกี่ยวกับปริมาณอีพีเอและดีเอชเอในปลาชนิดต่าง ๆ กัน พบว่า มีปริมาณอีพีเอและดีเอชเอระหว่าง 4-37 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด แต่ปริมาณกรดไขมันภายในตัวปลามีความแปรปรวนค่อนข้างสูง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ คือ ชนิดของปลา เพศ ฤดูกาล หรือแม้แต่แหล่งที่อยู่อาศัย ทั้งในธรรมชาติและการเพาะเลี้ยง (Sargent *et al.*, 1999) รวมทั้ง กลิ่นรส และคุณภาพที่ลดลง เนื่องจากน้ำมันปลาถูกออกซิไดซ์ได้ง่ายจึงทำให้ไม่เป็นที่นิยมของผู้บริโภค

นักวิทยาศาสตร์ได้หันมาให้ความสนใจแหล่งไขมันที่ได้จากสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ พวกสาหร่ายและแพลงก์ตอนต่าง ๆ Yongmanitchai and Ward (1989) รายงานว่า สาหร่ายขนาดเล็กสายพันธุ์ *Isochrysis* spp. มีกรดไขมันชนิด 18:4 และดีเอชเอในปริมาณสูง แต่มีปริมาณอีพีเอเพียงเล็กน้อย ในขณะที่ *Monochrysis luteri, Coccolithus huxleyi* และ *Cricosphaera elongata* มีปริมาณอีพีเอ 17-28 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด และจากการศึกษาปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในสาหร่ายเซลล์เดียวพบว่า *Chaetoceros* sp., *Isochrysis* sp. และ *Tetraselmis* sp. มีปริมาณอีพีเอเท่ากับ 8.43±0.29, 0.41± 0.21 และ 3.34± 0.04 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ โดย *Chaetoceros* sp. และ *Isochrysis* sp. มีปริมาณดีเอชเอเท่ากับ 0.70±0.03 และ 7.13±0.23 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ปริมาณรวมอีพีเอและดีเอชเอพบสูงสุดใน *Chaetoceros* sp. เท่ากับ 9.13±0.32 รองลงมาคือ *Isochrysis* sp. มีปริมาณ 8.54±0.44 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

นอกจากนี้ไดอะตอมบางชนิดเช่น *Phaeodactylum tricornutum* ที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน สามารถผลิตอีพีเอได้ 3 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร และยังมีรายงานด้วยว่าไดโนแฟลกเจลเลตหลายชนิดสามารถผลิตอีพีเอและดีเอชเอได้ ส่วนในแบคทีเรียชนิด *Shewanella purtefaciens* ที่แยกได้จากลำไส้ปลาทะเลสามารถผลิตอีพีเอ แต่ไม่พบดีเอชเอ (วรพจน์ สุนทรสุข, 2541) ขณะที่ยีสต์หลายสกุลเช่น *Candida, Crytococcus, Hansenula, Lipomyces* และ *Rhodotorula* เป็นแหล่งผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวได้แก่ กรดไลโนลีอิคและกรดไลโนลีนิค (Zelles, 1997 อ้างถึงใน Bowles *et al.*, 1999) ต่อมาได้หันมาให้ความสนใจจุลินทรีย์ทะเลในกลุ่มทรอสโทไคตริดส์ เนื่องจากมีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่มโอเมก้า-3 โดยเฉพาะอีพีเอและดีเอชเอในปริมาณสูง โดยเฉพาะดีเอชเอมีปริมาณสูงถึง 30-40 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด เช่น *Thraustochytrium aureum* สายพันธุ์ ATCC 34304 และ *Thraustochytrium aureum* ATCC 28211 สามารถผลิตดีเอชเอสูงถึง 47.4 และ 52.3 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมดตามลำดับ (Bajpai *et al.*, 1991a, 1991b, Bowles *et al.*, 1999) และ *Schizochytrium mangrovei* สายพันธุ์ KF5 และ KF6 มีปริมาณดีเอชเอ 41.1 และ 40.5 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมดตามลำดับ (Fan *et al.*, 2001) จะเห็นได้ว่าทรอสโทไคตริดส์สามารถผลิตดีเอชเอได้ในปริมาณสูง รวมทั้งไม่ก่อให้เกิดปัญหาเช่นในน้ำมันปลา จึงทำให้เกิดทางเลือกใหม่ที่จะสกัดโอเมก้า-3 จากจุลินทรีย์ทะเลกลุ่มทรอสโทไคตริดส์

เนื่องจากจุลินทรีย์ในกลุ่มทรอสโทไคตริดส์สามารถผลิตอีพีเอและดีเอชเอได้ในปริมาณที่สูงมาก จึงมีผู้ให้ความสนใจในการศึกษาทางเทคโนโลยีชีวภาพและอุตสาหกรรมเกี่ยวกับอาหารและยา Kendrick and Ratledge (1992) ศึกษากรดไขมันในกลุ่มทรอสโทไคตริดส์ชนิด *Thraustochytrium aureum* พบว่ามีปริมาณกรดไขมันในกลุ่มโอเมก้า-3 สูง โดยมีปริมาณของดีเอชเอสูงถึง 30 % ของกรดไขมันทั้งหมด อย่างไรก็ตาม *T. aureum* สายพันธุ์ ATCC 34304 และ ATCC 28211 ประกอบด้วยดีเอชเอถึง 47.4 % และ 52.3 % ตามลำดับ (Bajpai, 1991) แต่จากการศึกษาของ Singh and Ward (1997) พบว่า ดีเอชเอใน *Thraustochytrium* spp. และ *Schizochytrium* spp. มีค่าอยู่ในช่วง 1.5 –35 % ของกรดไขมันทั้งหมด

อย่างไรก็ตามปริมาณกรดไขมันในจุลินทรีย์ทะเลหรือสิ่งมีชีวิตอื่นๆ สามารถเปลี่ยนแปลงได้ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบและปริมาณของอาหารที่ใช้เลี้ยง เช่น องค์ประกอบของคาร์บอน ไนโตรเจน รวมทั้งปัจจัยสิ่งแวดล้อมอื่นๆ เช่น อุณหภูมิ ความเค็ม ความเข้มแสง และปริมาณออกซิเจน เป็นต้น (Li and Ward, 1994) และจากการศึกษาของ Singh and Ward (1997) พบว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งในราและยีสต์ซึ่งสามารถเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นไขมันได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนั้นอุณหภูมิยังมีผลต่อการสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัว โดย Yongmanitchai and Ward (1989) รายงานว่าจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิลดลง และ Bajpai *et al.* (1991b) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Thraustochytrium* อยู่ในช่วง 25-28 องศาเซลเซียส Unakul and Verduyn (2004) พบว่า *Schizochytrium mangrovei* Sk-2 เจริญได้ดีเมื่อเลี้ยงด้วยกลูโคสและฟรุตโทสเป็นแหล่งคาร์บอน และยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยสภาวะที่เหมาะสมคืออุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 4-7 เป็นต้น ในขณะที่ Poontawe, Aki and Yongmanitchai (2007) ทดลองเลี้ยง *Schizochytrium* isolate SP62 ด้วย 4 % กลูโคส, 0.5 % เปปโตน, 0.5 % ยีสต์สกัด, 0.07 % แอมโมเนียมคลอไรด์, 2.25 % โซเดียมคลอไรด์ ความเป็นกรด-เบสเริ่มต้นที่ 5.0 และอุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณแอสตาแซนทินเท่ากับ 5.09 มิลลิกรัมต่อลิตร และดีเอชเอ เท่ากับ 65.9 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด

นอกจากปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อปริมาณการสร้างกรดไขมัน ได้แก่ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ และความเป็นกรด-เบส ฯลฯ แล้ว รูปร่างและความเร็วของใบพัดในถังหมักมีผลต่อการผลิตกรดไขมันเช่นกัน (Yaguchi et al.,1997 และ Lewis et al., 1999) และยังพบว่าวิธีการหรือเทคนิคการเพาะเลี้ยงยังมีผลช่วยให้การสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงได้ดีขึ้นอีกด้วย เช่น เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตได้ (Kilikian, 1996; Pedersen *et al.*, 2000) ตามหลักการแล้วการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch มีข้อได้เปรียบเหนือกว่า batch culture คือป้องกันการเกิด Crabtree effect คือการที่ substrate (carbon source) โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้ากลูโคสที่ความเข้มข้นสูงเกินไปจะทำให้จุลินทรีย์ผลิตสารอื่นที่เป็นพิษ ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของตัวจุลินทรีย์เองได้ Narang and Satyanarayana (2001) ศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะมัยเลสของ *Bacillus thermooleovorans* พบว่าการเพาะเลี้ยงในถังหมักที่สภาวะเหมาะสมทำให้ได้ปริมาณเอนไซม์สูงถึง 22 เท่า เมื่อเทียบกับ shake-flask culture และยังสามารถย่นระยะเวลาการผลิตลงได้ 12 –45 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม Bailey et al. (2003) พบว่า ปริมาณออกซิเจนในระดับต่ำมีผลต่อการผลิดดีเอชเอใน *Schizochytrium* ดังนั้นในการเลี้ยงระยะแรกในถังหมักจึงควรปรับปริมาณออกซิเจนให้ได้ประมาณ 4-8% เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ หลังจากนั้นจึงลดออกซิเจนให้เหลือ

ประมาณ 1% หรือน้อยกว่า เพื่อให้เชื้อผลิตดีเอชเอให้ได้มากๆ Verduyn *et al.* (2004) ศึกษาการเจริญเติบโตของ *Schizochytrium mangrovei* Sk-2 ทั้งใน baffled shake-flask และ fermenter โดยเลี้ยงทั้งแบบ batch และ fed-batch สามารถเลี้ยงได้น้ำหนักแห้งถึง 50 กรัมต่อลิตร และปริมาณดีเอชเอสูงถึง 13 กรัมต่อลิตร (17-27 % w/w)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Behnweg (1979) พบว่า ทรอสโทไคตริดส์สามารถเจริญได้ดีใน pH 6.0-11.0 แต่ไม่สามารถเจริญได้ดีที่ pH ต่ำกว่า 5.0 และสูงกว่า 11.0 เพราะระดับที่สูงทำให้ผนังเซลล์หนาขึ้น และศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของทรอสโทไคตริดส์ 19 สายพันธุ์ พบว่าทรอสโทไคตริดส์สามารถเจริญได้ในช่วงกว้างที่ 9-30 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อเจริญและการผลิตดีเอชที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส

Bajpai (1991) พบว่า *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304 ที่เลี้ยงในที่มีแสงสามารถผลิตดีเอชเอได้สูงถึง 269.6 มิลลิกรัม/ลิตร แต่เมื่อเลี้ยงในที่มืดสามารถผลิตดีเอชเอได้เพียง 183.8 มิลลิกรัม/ลิตร และทดลองเลี้ยง *T. aureum* ATCC 34304 โดยใช้ยีสต์สกัดและโซเดียม-กลูตาเมตเป็นแหล่งของไนโตรเจนในอัตราส่วน 0.2% : 2% กลูโคส พบว่าสามารถผลิตดีเอชปริมาณ 269.6 มิลลิกรัม/ลิตร และเมื่อเลี้ยงด้วยโซเดียมกลูตาเมตมีค่าเท่ากับ 247.1 มิลลิกรัม/ลิตร

Nagahara et al. (1996) ศึกษา *Schizochytrium* sp. ที่คัดแยกจากแนวปะการังบนเกาะ Yap Island ในประเทศญี่ปุ่นที่เลี้ยงในถังหมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ซึ่งอาหารประกอบด้วย กลูโคส 60 กรัม Corn Steep Liquor 0.7 กรัม และ $(NH_4)_2SO_4$ 2 กรัม เป็นเวลา 56 ชั่วโมง ชีวมวลเท่ากับ 21 กรัม/ลิตร เมื่อนำมาวิเคราะห์กรดไขมันพบว่า สามารถผลิตกรดไขมันดีเอชเอสูงถึง 34% ของกรดไขมันทั้งหมด ซึ่งผลผลิตดีเอชเอเท่ากับ 4.7 กรัม/ลิตร

Yokochi et al. (1998) ศึกษาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *S. limacinum* SR21 พบว่า เมื่อเลี้ยงในอาหารกลูโคส 90 กรัม (แหล่งคาร์บอน) และ Corn Steep Liquor 20 กรัม (แหล่งไนโตรเจน)ให้ผลผลิตดีเอชเอสูงสุดเท่ากับ 4.2 กรัม/ลิตร

Yokochi, Honda, Higashihara and Nakahara (1998) พบว่า การเพาะเลี้ยง *Schizochytrium limacinum* SR21 โดยใช้ Monosaccharides (Glucose และ Fructose) และ Glycerol ให้การเจริญดี และสามารถผลิตดีเอชเอสูงมากกว่า 30% ของกรดไขมันทั้งหมด ส่วนการใช้ Di and Polysaccharides, Oleic Acid และ Linseed oil เลี้ยง *S. limacinum* SR21 มีผลในการผลิตดีเอชเอต่ำ

Bowles, Hunt, Bremer, Duchars and Eaton (1999) ศึกษา *S. mangrovei* G13 ที่คัดแยกได้จากใบลำพูที่เลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆ พบว่า เมื่อเลี้ยงในอาหารกลูโคส 40 กรัม ยีสต์สกัด 5 กรัม และโซเดียมซัลเฟต 20 กรัม ที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 107 ชั่วโมง มีผลผลิตดีเอชเอสูงสุดเท่ากับ 2.17 กรัม/ลิตร

Fan *et al.* (2001) ศึกษาทรอสโทไคตริดส์ 9 สายพันธุ์ ที่คัดแยกได้จากใบรังกะแท้จากป่าชายเลนประเทศฮ่องกง เลี้ยงในกลูโคส 60 กรัม ยีสต์สกัด 10 กรัม ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 วัน พบว่า ชีวมวลของ *S. mangrovei* (6.6-13.5 กรัม/ลิตร) มีปริมาณสูงกว่า *Thraustochytrium statum* KF9 (0.8 กรัม/ลิตร) และ *Ulkenia* sp. KF13 (4.6 กรัม/ลิตร) และปริมาณดีเอชเอของ *S. mangrovei* อยู่ในช่วง 118.1%-208.8 มิลลิกรัม/

กรัมน้ำหนักแห้ง โดย *S. mangrovei* KF2 และ *S. mangrovei* KF6 มีปริมาณดีเอชเอสูงสุดเท่ากับ 208.8 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง (ผลผลิตดีเอชเอเท่ากับ 2778.9 มิลลิกรัม/ลิตร) และ 204.3 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง (ผลผลิตดีเอชเอเท่ากับ 2762.0 มิลลิกรัม/ลิตร) ตามลำดับ

Kamlangdee and Fan (2003) ศึกษาการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวจาก *Schizochytrium* sp. จำนวน 5 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากใบ *Kandelia candel* ในป่าชายเลนบริเวณเกาะฮ่องกง เลี้ยงในกลูโคส 60 กรัม ยีสต์สกัด 10 กรัม น้ำทะเลสังเคราะห์ 15 ppt พบว่า *Schizochytrium* sp. สายพันธุ์ N-2 มีชีวมวลมากที่สุดเท่ากับ 13.2 กรัม/ลิตร สายพันธุ์ N-9 เจริญได้น้อยที่สุด โดยมีชีวมวลเท่ากับ 10.8 กรัม/ลิตร *Schizochytrium* ทั้ง 5 สายพันธุ์สะสมกรดไขมันอีพีเอปริมาณต่ำในเซลล์ ขณะที่มีการสะสมดีเอชเอในปริมาณที่สูงมีค่าเป็น 174.9, 203.6, 186.1, 171.3 และ 157.9 มิลลิกรัม/กรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ ซึ่งสายพันธุ์ N-2 มีสัดส่วนของกรดไขมันดีเอชเอสูงสุด และ *Schizochytrium* ทั้ง 5 สายพันธุ์ เจริญได้ที่ระดับความเค็มตั้งแต่ 0-30 ppt และมีค่าความเค็มที่เหมาะสมในการเจริญระหว่าง 20-30 ppt

ลลิดา เชาว์เรืองฤทธิ์ (2548) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตดีเอชเอของ *Schizochytrium* 3 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากใบไม้ป่าชายเลน อ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี โดยใช้สูตรอาหารกลูโคสต่อยีสต์สกัด (6 : 1%) เลี้ยงเป็นเวลา 8 วัน พบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตดีเอชเอของ *Schizochytrium* sp. 1 BUCACD 032 คือ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเค็ม 25 ppt เป็นเวลา 6 วัน มีชีวมวล 18.21 กรัม/ลิตร และปริมาณดีเอชเอเท่ากับ 145.50 มิลลิกรัม/น้ำหนักแห้ง สายพันธุ์ *Schizochytrium mangrovei* BUCARA 021 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25องศาเซลเซียส ความเค็ม 15 ppt เป็นเวลา 4 วัน มีชีวมวล 17.67 กรัม/ลิตร และปริมาณดีเอชเอเท่ากับ 115.16 มิลลิกรัม/น้ำหนักแห้ง ส่วน *Schizochytrium* sp. 1 BUCAAA 093 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ความเค็ม 25 ppt เป็นเวลา 4 วัน มีชีวมวล 4.82 กรัม/ลิตร และปริมาณดีเอชเอ เท่ากับ 13.85 มิลลิกรัม/น้ำหนักแห้ง

Luying, Xuecheng, Xueying and Qinghua (2007) ศึกษาสภาพการเลี้ยงที่มีผลต่อการผลิตดีเอชเอของ *Schizochytrium limacinum* พบว่า อุณหภูมิ pH เริ่มต้น และความเค็มที่เหมาะสม แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน มีผลต่อการเจริญและการผลิตดีเอชเอของ *Schizochytrium limacinum* OUC88 มีค่าเท่ากับ 23 องศาเซลเซียส, 7.0 และ 18 ppt ตามลำดับ และพบว่า กลูโคสเป็นแหล่งของคาร์บอนที่ดีที่สุดที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตดีเอชเอ ส่วนแหล่งของไนโตรเจนระหว่าง Soybean Cake Hydrolysate กับผลิตภัณฑ์ที่มีราคาถูก มีผลต่อการสะสมดีเอชเอจาก *S. limacinum* เมื่อเลี้ยงในฟลาสก์มีค่าดีเอชเอสูงสุดถึง 4.08 กรัม/ลิตร ในระยะเวลา 5 วัน

วิเชียร ยงมานิตชัย (2551) จากการวิจัยที่นำ *Schizochytrium* sp. ที่แยกได้มาจากป่าชายเลนของประเทศไทย มาทำการเลี้ยงและสกัดดีเอชเอ และทดลองเลี้ยงลูกกุ้งขาว พบว่าได้ผลที่ดีมาก ดังนั้น *Schizochytrium* sp. มีความเหมาะสมในการนำมาใช้กับอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้ง การวิจัยที่จะนำ *Schizochytrium* sp. ไปเป็นอาหารลูกกุ้งจะลดปัญหาโรคระบาดและการแตกขนาดของกุ้งได้เป็นอย่างดี และพบว่าดีเอชเอยังสามารถนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และตัวอ่อนของปลาทะเลบางชนิด ทำให้ปลาได้รับดีเอชเออย่างเพียงพอในช่วงโตเต็มวัยก่อนการวางไข่ จะทำให้ไข่มีอัตราในการฟักเป็นตัวสูง ตัวอ่อนแข็งแรง ปริมาณของไข่ที่ได้รับการผสมพันธุ์สูง และมีอัตราการรอดชีวิตของตัวอ่อนสูง

Wong et al. (2008) ศึกษาการผลิตดีเอชเอและการสร้าง Ultrastructure ของทรอสโทไคตริดส์ ชนิด *Aurantiochytrium mangrovei* MP2 ในอาหารที่มีกลูโคสความเข้มข้นสูง พบว่า เซลล์ของ *A. mangrovei* MP2 มีขนาดใหญ่ขึ้น และผลิตกรดไขมันดีเอชเอ (มิลลิกรัม/ลิตร) สูงขึ้น 19 เปอร์เซ็นต์ เมื่อกลูโคสเพิ่มขึ้นจาก 6 – 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ชีวมวลและดีเอชเอเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ

Chen *et al.* (2010) ศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อ *Aurantiochytrium* sp. ในการเสริมสร้างการเจริญ และการผลิต Squalene พบว่า ปริมาณที่เหมาะสมของโมโนโซเดียมกลูตาเมต ยีสต์สกัด และทริปโตน มีค่าเท่ากับ 6.61 กรัม/ลิตร 6.13 กรัม/ลิตร และ 4.50 กรัม/ลิตร ของปริมาณ Squalene ตามลำดับ และ 6.94 กรัม/ลิตร 6.22 กรัม/ลิตร และ 4.40 กรัม/ลิตร ของผลผลิต Squalene ตามลำดับ