



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

ปริญญญา

จุลชีววิทยา

สาขา

จุลชีววิทยา

ภาควิชา

เรื่อง การผลิตกรดอะราคิโดนิกจากราเส้นใย *Mortierella* sp.

Production of Arachidonic Acid from A Filamentous Fungus, *Mortierella* sp.

นามผู้วิจัย นางสาววริยา ศรีสะอาด

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ยวีเชียร ขงมานิตชัย, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ศาสตราจารย์สาวิตรี ลิ้มทอง, Dr. Eng.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์ ร้อยเอก ชัยวัฒน์ กิตติกุล, วท.ม.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การผลิตกรดอะราคิโดนิกจากราเส้นใย *Mortierella* sp.

Production of Arachidonic Acid from A Filamentous Fungus, *Mortierella* sp.

โดย

นางสาววริยา ศรีสะอาด

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วาริษา ศรีสะอาด 2553: การผลิตกรดอะราคิโดนิกจากราเส้นใย *Mortierella* sp.

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา) สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์วิเชียร ขงมานิตชัย, Ph.D. 141 หน้า

คัดแยกราเส้นใย *Mortierella* จากดินทางภาคเหนือของประเทศไทย จำนวน 5 จุด 26 ตัวอย่าง เพื่อใช้เป็นแหล่งทางเลือกสำหรับการผลิตกรดไขมัน arachidonic acid (ARA) ผลของการคัดเลือกรอบแรกพบว่าจาก *Mortierella* sp. ที่แยกได้ทั้งหมดจำนวน 151 ไอโซเลท มี 56 ไอโซเลทที่สะสม ARA มากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมดและผลจากการคัดเลือกรอบสอง โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวพบว่าไอโซเลท WA-1 มีการเจริญและการสะสม ARA สูงสุดเท่ากับ 26.9 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด จากนั้นทำการศึกษาสภาวะและสารอาหารหลักในสูตรอาหาร (แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน) ที่เหมาะสมในการทดลองระดับฟลask พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงได้แก่ อุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 5.0 อัตราการให้อากาศระดับสูง (ปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตรในฟลask ขนาด 500 มิลลิลิตร) ทำการเพาะเลี้ยงนาน 9–10 วัน โดยใช้สูตรอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคส 6 เปอร์เซ็นต์ และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ soy isolate 0.84 เปอร์เซ็นต์, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.4 เปอร์เซ็นต์, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.005 เปอร์เซ็นต์ และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็นอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 17:1 การเพาะเลี้ยงในสภาวะนี้จะได้มวลเซลล์มากกว่า 50 กรัมต่อลิตร และปริมาณ ARA ประมาณ 45 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด ในการจัดจำแนกด้วยข้อมูลทางสัณฐานวิทยา พบว่าไอโซเลท WA-1 อยู่ในสกุล *Mortierella* ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ *Mortierella alpina*

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Wariya Srisa-ard 2010: Production of Arachidonic Acid from A Filamentous Fungus, *Mortierella* sp.. Master of Science (Microbiology), Major Field: Microbiology, Department of Microbiology. Thesis Advisor: Mr. Wichien Yongmanitchai, Ph.D. 141 pages.

A total of 151 filamentous *Mortierella* sp. were isolated from 26 soil samples collected from 5 locations in northern region of Thailand as an alternative source of arachidonic acid (ARA) production. Results from primary screening showed that among the isolates obtained, 56 strains accumulated ARA > 25% of total fatty acid. Secondary screening revealed that the strain WA-1 exhibited the highest growth and ARA production at 26.9%. Optimization of culture condition and major medium composition (carbon and nitrogen sources) in flask condition showed that the suitable culture conditions were temperature at 25°C, initial pH at 5.0, high aeration rate and 9–10 days culture time. Investigation on medium composition showed that 6% glucose and 0.3% (NH₄)₂SO₄ together with 0.84 % soy isolate, 0.4% K₂HPO₄·3H₂O, 0.005% CaCl₂·2H₂O and 0.05% MgSO₄·7H₂O (C:N ratio 17:1) were optimal for this organism. Under these conditions, *Mortierella* sp. WA-1 produced cell mass over 50 g/L and ARA content was approximately 45% of total fatty acid. Morphological characteristics indicate that the isolate WA-1 was closest to *Mortierella alpina*.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.วิเชียร ยงมานิตชัย ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ศาสตราจารย์ ดร.สาวิตรี ลิ้มทอง กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาสละเวลาช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตรวจสอบและให้ข้อเสนอแนะต่างๆ ในด้านการเรียน การทำวิทยานิพนธ์ การเขียนวิทยานิพนธ์ ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ และกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.มรณิ ดุ้ยเต็มวงศ์ ประธานการสอบ และอาจารย์ศศิธร จินดามรกฏ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบพระคุณสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร องค์การมหาชน (ARDA) ที่ได้อนุเคราะห์งบประมาณการวิจัยในครั้งนี้ จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทความรู้ให้แก่ข้าพเจ้า อันนำไปสู่กระบวนการความคิด วางแผน แก้ไขในการวิจัยให้สำเร็จได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.เดือนรัตน์ ชลอุดมกุลและพีสิริวัฒน์ ญเจริญไพบูลย์ ที่คอยให้คำแนะนำ ให้ความช่วยเหลือทั้งเรื่องการเรียนรู้และการทำวิจัยด้วยดีตลอดมา ขอขอบคุณบุคลากร เจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา พี่ เพื่อน น้องภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน รวมถึงบุคคลที่ไม่ได้กล่าวไว้ ณ ที่นี้ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำต่างๆแก่ข้าพเจ้า ในระหว่างการวิจัย

สิ่งสำคัญที่สุดขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อวิเศษ ศรีสะอาด คุณแม่จรรยาศรี ศรีสะอาด พี่วิชุดา ศรีสะอาด และญาติพี่น้องทุกท่าน ที่ได้สนับสนุนทั้งทุนทรัพย์และโอกาสในการศึกษา ตลอดจนคอยช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีให้แก่ข้าพเจ้าในทุกๆเรื่องจนข้าพเจ้าได้มีวันนี้

วาริษา ศรีสะอาด

มิถุนายน 2553

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(7)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	41
อุปกรณ์	41
วิธีการ	44
ผลและวิจารณ์	62
สรุปและข้อเสนอแนะ	111
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	113
ภาคผนวก	126
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและการเตรียมสารละลาย	127
ภาคผนวก ข การเก็บรักษา <i>Mortierella</i>	132
ภาคผนวก ค กรดไขมันมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดไขมัน	134
ภาคผนวก ง โครมาโทแกรมการแยกกรดไขมันมาตรฐาน	
ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี	136
ภาคผนวก จ ลำดับเบสของยีน 18S rRNA ของรา <i>Mortierella</i> sp. WA-1	138
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	141

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 การยอมรับในการใช้ DHA และ ARA จากสถาบันทางโภชนาการชั้นนำ	9
2 รายชื่อบริษัทที่ได้มีการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ SCO PUFAs หรือผลิตภัณฑ์ที่มี PUFAs เป็นองค์ประกอบ	12
3 ไพรมอร์สำหรับการเพิ่มจำนวนยีน ribosomal RNA	51
4 ข้อมูลลำดับเบสของยีน 18S rRNA ของสายพันธุ์อ้างอิงทั้ง 16 สายพันธุ์ใน division Eumycota จาก GenBank database	52
5 ข้อมูลตัวอย่างดินที่เก็บมาจากภาคเหนือทั้ง 5 จุด	62
6 ลักษณะทางกายภาพของแหล่งตัวอย่างดินและไอโซเลทที่เก็บ	63
7 องค์ประกอบของกรดไขมันใน <i>Mortierella</i> ที่คัดเลือกได้จำนวน 151 ไอโซเลท เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง PDA ที่มีกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน	68
8 องค์ประกอบของกรดไขมันใน <i>Mortierella</i> ที่คัดเลือกจากดินซึ่งมีศักยภาพในการผลิต ARA สูงจำนวน 12 ไอโซเลท ก่อนคัดเลือกให้เหลือเพียงไอโซเลทที่มีศักยภาพในการผลิต ARA สูงที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว PDB ที่มีกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน	79
9 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะของราไอโซเลท WA-1	86
10 ผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะของราไอโซเลท WA-1	89
11 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะของราไอโซเลท WA-1	92
12 ผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะของราไอโซเลท WA-1	95
13 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะของราไอโซเลท WA-1	99

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
14	ผลของระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลาย พันธะของราไอโซเลท WA-1	103
15	ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะของ ราไอโซเลท WA-1	106
16	ผลของอัตราการใช้อากาศต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลาย พันธะของราไอโซเลท WA-1	109

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 การจัดกลุ่มของกรดไขมัน	5
2 โครงสร้างของกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะกลุ่มโอเมกา-6 จำพวก ARA	6
3 วิธีการสังเคราะห์ acetyl-CoA และ NADPH โดยผ่านทาง citrate/malate cycle และ cytosolic “transhydrogenase” เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ไขมันในจุลินทรีย์กลุ่ม oleaginous	20
4 วิธีการเปลี่ยน PUFAs ในจุลินทรีย์โดยใช้เส้นทางการสังเคราะห์กรดไขมัน (FAS) ซึ่งเป็นการสังเคราะห์แบบดั้งเดิม	22
5 แผนผังอธิบายสมมุติฐานของการสังเคราะห์ไขมัน	23
6 การจำแนกประเภท <i>Mortierella</i>	25
7 ลักษณะโคโลนีของราสกุล <i>Mortierella</i> บนอาหารแข็ง	26
8 ลักษณะสปอร์ ก้านชูสปอร์และถุงหุ้มสปอร์ของราสกุล <i>Mortierella</i>	27
9 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ DNA Trap (DNA TEC kits, DNA technology Laboratory)	48
10 ตำแหน่งของไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ในการทำ PCR	51
11 การสกัดไขมันโดยวิธีการดัดแปลงของ Bligh and Dyer (1959)	59
12 ขั้นตอน transmethylation กรดไขมันตามวิธีการของ Holub and Skeaff (1987)	60
13 ลักษณะโคโลนีของ <i>Mortierella</i> ที่หลากหลาย	66
14 ลักษณะของราไอโซเลท WA-1 บนอาหารแข็ง	80
15 ลักษณะของราไอโซเลท WA-1	81
16 ลักษณะของเส้นใยราไอโซเลท WA-1 เมื่อย้อมด้วยสี Nile red	82
17 ขนาดโมเลกุลของยีน 18S rRNA ของราไอโซเลท WA-1 จากการทำ PCR	83
18 Phylogenetic tree สร้างด้วยวิธี neighbour-joining แสดงความสัมพันธ์ของยีน 18S rRNA ของไอโซเลท WA-1 กับสายพันธุ์อ้างอิงทั้ง 16 สายพันธุ์	84

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่

หน้า

19

กราฟแสดงผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะของราไอโซเลท WA-1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว soy isolate ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร บรรจุในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็ว 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 7 วัน

87

20

กราฟแสดงผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะของราไอโซเลท WA-1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว soy isolate ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร บรรจุในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่า อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็ว 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 7 วัน

90

21

กราฟแสดงผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะของราไอโซเลท WA-1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว soy isolate ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร บรรจุในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็ว 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 7 วัน

93

22

กราฟแสดงผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะของราไอโซเลท WA-1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว soybean protein ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร บรรจุในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็ว 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 7 วัน

96

23

กราฟแสดงผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะของราไอโซเลท WA-1 โดยการเพาะเลี้ยงในหลอดรูปตัวแอลซึ่งบรรจุอาหารเหลว soy isolate ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มในเครื่อง temperature gradient incubator ที่มีการปรับอุณหภูมิในช่วง 10 ถึง 34 องศาเซลเซียส เครื่องดังกล่าวมีการเขย่าขึ้นลงด้วยอัตรา 35 ครั้งต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

101

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
24	กราฟแสดงผลของระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะของราไอโซเลท WA-1 โดยการเพาะเลี้ยงในฟลาस्कขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว soy isolate ปริมาตร 100 มิลลิลิตรบ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7, 8, 9 และ 10 วัน	104
25	กราฟแสดงผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะของราไอโซเลท WA-1 โดยการเพาะเลี้ยงในฟลาस्कขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว soy isolate ปริมาตร 100 มิลลิลิตรบ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน	107
26	กราฟแสดงผลของอัตราการให้อากาศต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะของราไอโซเลท WA-1 โดยการเพาะเลี้ยงในฟลาस्कขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว soy isolate ในปริมาณที่แตกต่างกันออกไป บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน	110
ภาพผนวกที่		
ง1	โครมาโทแกรมการแยกกรดไขมันมาตรฐานด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี	137

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

bp	=	base pairs
°C	=	degree Celsius
DNA	=	deoxyribonucleic acid
dNTPs	=	deoxynucleoside triphosphate
g	=	gram
L	=	litre
%	=	percent
μl	=	microlitre
μM	=	microMolar
mg	=	milligram
ml	=	millilitre
mm	=	millimetre
min	=	minute
M	=	Molar (mol per litre)
MW	=	molecular weight
N	=	Normal
OD	=	optical density
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
RNA	=	ribonucleic acid
rpm	=	rotation per minute
sec	=	second
T _m	=	melting temperature
w/w	=	weight per weight

การผลิตกรดอะราคิโดนิกจากราเส้นใย *Mortierella* sp.

Production of Arachidonic Acid from A Filamentous Fungus, *Mortierella* sp.

คำนำ

กรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะ (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) โดยเฉพาะในกลุ่ม โอเมกา-6 จำพวกกรดอะราคิโดนิก (Arachidonic acid, ARA) เป็นกรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกาย ร่างกายของพวกสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมไม่สามารถสังเคราะห์กรดไขมันดังกล่าวได้เนื่องจากขาดระบบ เอนไซม์ที่จำเป็นในการสังเคราะห์กรดไขมันในกลุ่มนี้ ดังนั้นจึงต้องได้รับจากอาหารเท่านั้น

มีรายงานว่า ARA มีบทบาทสำคัญในการช่วยควบคุมคุณสมบัติทางกายภาพของเมมเบรน (flexibility fluidity and selective permeability properties to membrane) (Yamada *et al*, 1989; Gill and Valivety, 1997) รวมถึงเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารที่ทำหน้าที่คล้ายฮอร์โมน (hormone-like metabolites) หลากหลายชนิด เช่น prostaglandins, leukotrienes, thromboxanes และ prostacyclin ซึ่งมีความสำคัญในทางการวิจัยทางการแพทย์ (Marx, 1982; Das *et al.*, 1987)

มีการศึกษาพบว่า ARA มีประโยชน์ทางการแพทย์มากมาย เช่น สามารถลดไขมันใน ตับ (Goheen *et al.*, 1980) ป้องกันเชื้อเมือกในกระเพาะอาหาร (Hollander *et al.*, 1982; Doyle *et al.*, 1989) รักษาโรคไข้เรื้อรัง (Hebborn *et al.*, 1988) ทำลายเซลล์มะเร็ง (Canuto *et al.*, 1991) พัฒนาไลโปเมแทบอลิซึมของคนไข้ที่เป็นโรคตับแข็ง (cirrhotic patients) (Okita *et al.*, 1993) มีความสำคัญต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด โดยมีผลในการป้องกันและรักษาอาการความดัน โลหิตสูง (antihypertensive action) รวมถึงช่วยในการขยายหลอดเลือด (vasodilatation) นอกจากนี้ ยังสามารถช่วยในส่วนของอาการคลาเรียซ์ได้ (Gill and Valivety, 1997) และ ARA ยังมี บทบาทสำคัญต่อการเจริญและพัฒนาระบบทางสมองในเด็กแรกเกิดอีกด้วย (Carlson *et al.*, 1993; Birch *et al.*, 2000)

ปัจจุบันพบว่าได้มีการนำ ARA มาใช้ประโยชน์ในหลายๆด้าน เช่น นำไปใช้ทางการแพทย์ เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและครีมบำรุง เติมน้ำมันลงในอาหารเพื่อเพิ่มคุณค่าให้กับ อาหารทั้งในอาหารคนและอาหารสัตว์ (food and feed additive) และนำไปใช้ทางผลิตภัณฑ์อาหาร

เสริมและยา ซึ่งกรดไขมัน ARA ที่ผลิตจาก *Mortierella* spp. ได้มีการพิจารณาแล้วว่าไม่ก่อโรคและไม่เป็นพิษต่อบริโภค มีรายงานถึงความปลอดภัยของราในกลุ่มนี้รวมถึงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากรากลุ่มดังกล่าว (Hempenius *et al.*, 1997; Koskelo *et al.*, 1997)

แหล่งของ ARA ได้แก่ เนื้อเยื่อสัตว์, ปลา (*Brevoortia*, *Clupea*) และมอส (*Clenidium molluscum*) (Gill and Valivety, 1997) แต่เนื่องจากแหล่งดังกล่าวมีปริมาณ ARA ค่อนข้างต่ำไม่เพียงพอความต้องการ ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาค้นคว้าหาแหล่งอื่นมาทดแทนและต้องมีความปลอดภัยและมีปริมาณมากพอ ซึ่งแหล่งที่มีศักยภาพดังกล่าวก็คือจุลินทรีย์ เนื่องจากมีอัตราการเจริญสูง สามารถเจริญได้ในวัตถุดิบชนิดต่างๆ สามารถควบคุมคุณภาพได้ง่าย ปราศจากสิ่งเจือปน รวมถึงการคัดเลือกจากธรรมชาติและการปรับปรุงสายพันธุ์ทำได้ง่าย (Certik and Shimizu, 1999)

มีรายงานว่าสามารถพบ ARA ได้ในเซลล์ของโปรโตซัว สาหร่าย และราบางชนิด (Yongmanitchai and Ward, 1989; Shimizu *et al.*, 1989) โดยแหล่งดังกล่าวที่พบว่ามีการผลิต ARA ได้แก่ ราในสกุล *Mortierella* โดยเฉพาะ *Mortierella alpina* ซึ่งมีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีปริมาณของ ARA ภายในเซลล์สูง (Bajpai *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1995) นอกจากนี้ยังสามารถพบในรากลุ่ม *Conidiobolus nanodes*, *Enthomophthara exitalis*, *Blastocladiella emersonii* สาหร่าย เช่น *Porphyridium cruentum*, *Sargrassum salicifolium*, *Euglena gracilis*

เนื่องจาก ARA เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจและมีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในหลายๆด้านดังนั้นจึงมีความสนใจที่จะคัดแยกราในสกุล *Mortierella* และทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะในกลุ่มโอเมกา-6 จำพวก ARA ในปริมาณที่สูง รวมถึงทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม (optimization) ต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัว ซึ่งคาดว่าจะการปรับสภาวะในการเลี้ยงที่เหมาะสมนี้จะสามารถเพิ่มศักยภาพในการผลิตและสามารถนำไปปรับใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมได้

วัตถุประสงค์

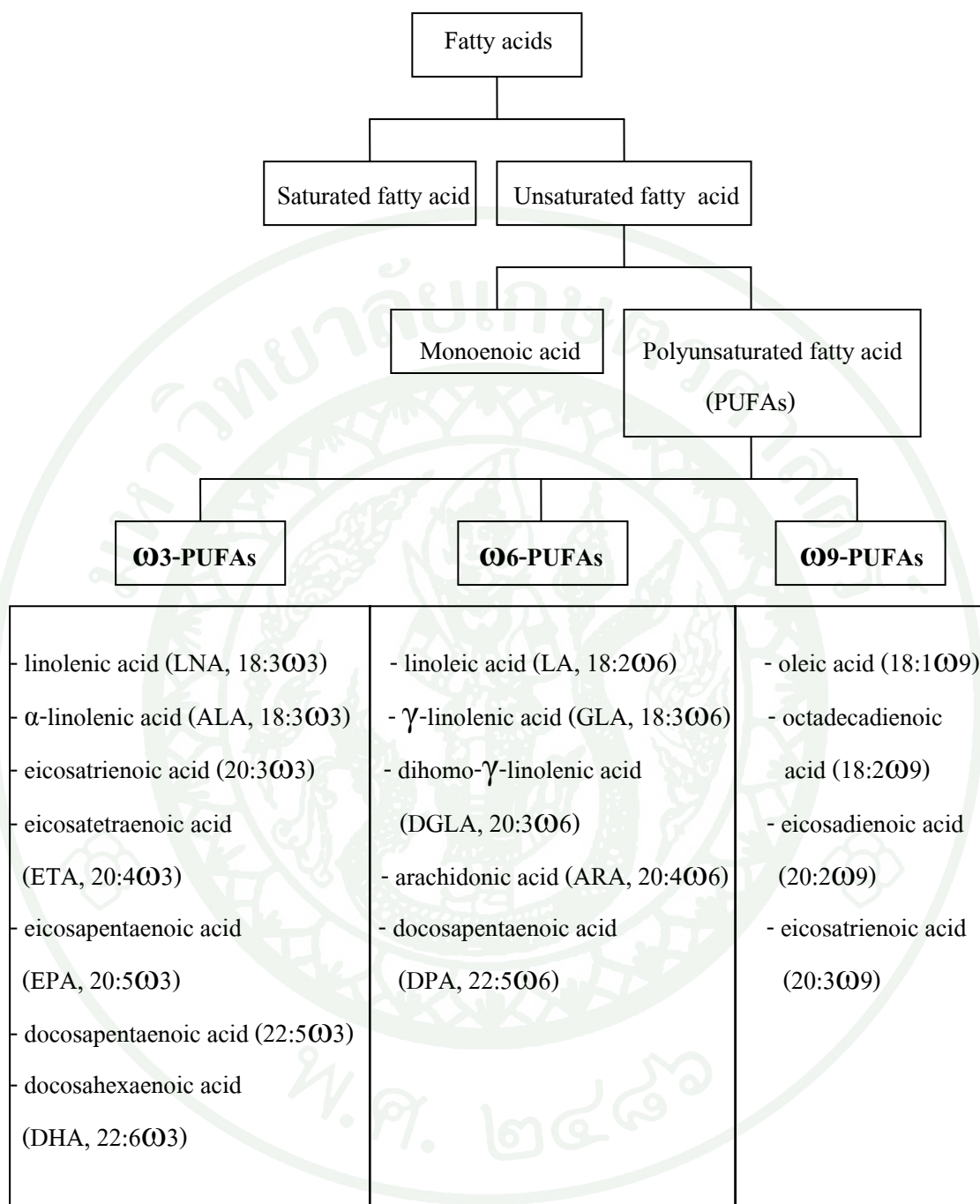
1. เพื่อคัดแยกราเส้นใย *Mortierella* sp. ที่สามารถผลิตกรดไขมันโอเมกา-6 (กรดอะราคิโดนิก) จากธรรมชาติ
2. เพื่อการจัดจำแนก *Mortierella* sp. ที่คัดเลือกได้โดยใช้การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์
3. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสังเคราะห์กรดไขมันอะราคิโดนิกของรา *Mortierella* sp. ที่คัดเลือกได้

การตรวจเอกสาร

ลักษณะทั่วไปของกรดไขมันและการจัดกลุ่ม

กรดไขมันเป็นกรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acid) ซึ่งมีหมู่ -COOH เพียงหมู่เดียวต่อกับไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) สายยาว กรดไขมันส่วนใหญ่จะมีจำนวนคาร์บอนอะตอมเป็นเลขคู่ระหว่าง 4-36 ที่พบมากจะมีจำนวนคาร์บอน 16 และ 18 อะตอม กรดไขมันแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กรดไขมันที่อิ่มตัว (saturated fatty acid) เป็นกรดไขมันที่มีเฉพาะพันธะเดี่ยวและกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) ซึ่งเป็นกรดไขมันที่มีเฉพาะพันธะคู่ (มนตรี และคณะ, 2542) กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวนั้นยังสามารถแบ่งออกได้เป็นอีก 2 กลุ่ม คือ กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวแบบพันธะเดี่ยว (monoenoic acid) และกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวหลายพันธะ (polyunsaturated fatty acids) หรือที่เรียกย่อๆว่า PUFAs ซึ่งเป็นกลุ่มของกรดไขมันที่มีจำนวนพันธะคู่ (double bond) ในสายคาร์บอนมากกว่า 1 พันธะ เป็นกรดไขมันที่จำเป็นเนื่องจากร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์และต้องได้รับจากอาหาร PUFAs สามารถจำแนกออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะกลุ่มโอเมกา-3, 6 และ 9 โดยอาศัยตำแหน่งของพันธะคู่พันธะแรก (first double bond) ในสายคาร์บอนโดยนับจากปลายเมทิล (methyl end) โดยกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะกลุ่มโอเมกา-3 ได้แก่ linolenic acid, α -linolenic acid, eicosatrienoic acid, eicosatetraenoic acid, eicosapentaenoic acid, docosapentaenoic acid และ docosahexaenoic acid ในกลุ่มโอเมกา-6 ได้แก่ linoleic acid, γ -linolenic acid, dihomo- γ -linolenic acid, arachidonic acid และ docosapentaenoic acid และในกลุ่มโอเมกา-9 ได้แก่ oleic acid, octadecadienoic acid, eicosadienoic acid และ eicosatrienoic acid

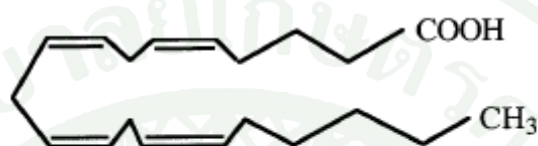
แสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 การจัดกลุ่มของกรดไขมัน

ความสำคัญของกรดไขมัน ARA

Arachidonic acid (5,8,11,14-*cis*-eicosatetraenoic acid, 20:4) หรือที่เรียกย่อๆว่า ARA เป็นกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวหลายพันธะชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญ โดยมีพันธะคู่แบบ *cis* ลักษณะโครงสร้างของกรดไขมัน ARA แสดงดังภาพที่ 2



(20:4 ω 6; 20:4n6; 20 Δ 5,8,11,14)
(arachidonic acid, AA)

ภาพที่ 2 โครงสร้างของกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะกลุ่มโอเมกา-6 จำพวก ARA

ที่มา: Russell and Nichols (1999)

ARA เป็นกรดไขมันที่จำเป็น ซึ่ง ARA ถูกนำไปใช้ในหลายๆด้านดังนี้

1. การแพทย์

มีรายงานว่า ARA มีบทบาทสำคัญในการช่วยควบคุมคุณสมบัติทางกายภาพของเมมเบรน (Yamada *et al.*, 1989; Stredanska and Sajbidor, 1993; Gill and Valivety, 1997; Higashiyama *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2002) เช่น การควบคุมคุณสมบัติในการยอมให้สารผ่านเข้าออกของเมมเบรน (permeability of membrane) การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของโปรตีนที่จับอยู่กับเมมเบรน (membrane-bound protein) เช่น การเป็นตำแหน่งจับจำเพาะ (receptor) การขนส่งสารโดยผ่าน ATPases โปรตีนขนส่ง (transport protein) และช่องทางการผ่านเข้าออกของไอออนต่างๆ (ion channels) การเกิดปฏิกิริยาระหว่างกันของ extracellular component เช่น โปรตีนที่จับกับไขมัน (fatty acid binding protein) histocompatibility complexes เป็นต้น (Gill and Valivety, 1997)

นอกจากนี้ยังเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์สารที่ทำหน้าที่คล้ายฮอร์โมน (hormone-like metabolites) ได้แก่ prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes และ prostacyclin (Marx, 1982; Das *et al.*, 1987; Simopoulos, 1989; Stredanska and Sajbidor, 1993; Gill and Valivety, 1997; Park *et al.*, 1999; Higashiyama *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2002) สารดังกล่าวจะช่วยให้การทำงานของอวัยวะต่างๆ ภายในร่างกายดำเนินไปอย่างเป็นปกติ โดย prostaglandins เกี่ยวข้องกับการบีบรัดตัวของกล้ามเนื้อเรียบรวมถึง oxytocin ซึ่งจำเป็นต่อการหดตัวของผนังมดลูกในช่วงของการคลอดบุตรและเพื่อการหลุดลอกของเยื่อบุผนังมดลูกในขณะมีประจำเดือน (Erasmus, 1993) สำหรับ thromboxanes เกี่ยวข้องกับการบีบรัดตัวของกล้ามเนื้อเรียบด้วยแต่ก็มีผลต่อการแข็งตัวของเกล็ดเลือด (Lehninger, 1993) ส่วน leukotrienes นั้นมีบทบาทสำคัญต่อการตอบสนองต่อการอักเสบและปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับภูมิแพ้ (Lehninger, 1993) ถึงแม้ว่าสารดังกล่าวอาจจะถูกสังเคราะห์มาจากสารตั้งต้นกรดไขมันตัวเดียวกัน แต่สารเหล่านั้นก็ไม่ได้มีหน้าที่คล้ายคลึงกันในร่างกาย ยกตัวอย่างเช่น prostaglandin PGI₂ ช่วยในการป้องกันการแข็งตัวของเกล็ดเลือด ในขณะที่ PGE₂ ช่วยการเร่งการแข็งตัวของเกล็ดเลือดซึ่งทั้ง PGI₂ และ PGE₂ ต่างก็มี ARA เป็นสารตั้งต้นทั้งคู่ (Erasmus, 1993)

มีการศึกษาพบว่ากรดไขมัน ARA มีประโยชน์ทางการแพทย์มากมาย เช่น สามารถลดไขมันในตับ (Goheen *et al.*, 1980) ป้องกันเชื้อเมือกในกระเพาะอาหาร (Hollander *et al.*, 1982; Doyle *et al.*, 1989) รักษาโรคหืดเรื้อรัง (Hebborn *et al.*, 1988) ทำลายเซลล์มะเร็ง (Canuto *et al.*, 1991) พัฒนาไลปิดเมแทบอลิซึมของคนที่ไข้ที่เป็นโรคตับแข็ง (cirrhotic patients) (Okita *et al.*, 1993) มีความสำคัญต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด โดยมีผลในการป้องกันและรักษาอาการความดันโลหิตสูง (antihypertensive action) รวมถึงช่วยในการขยายหลอดเลือด (vasodilatation) นอกจากนี้ยังสามารถช่วยในส่วนของการคลายเครียดได้ (Gill and Valivety, 1997) และ ARA ยังมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญและพัฒนาระบบทางสมองในเด็กแรกเกิดอีกด้วย (Carlson *et al.*, 1993; Birch *et al.*, 2000; Hwang *et al.*, 2005)

2. ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและครีมบำรุง

Xiang-qin *et al.* (2002) รายงานว่าจากการทดลองพิสูจน์แล้วว่า ARA มีผลต่อความสามารถในการดูดซึมสารของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่ง ARA จะช่วยให้ความชุ่มชื้นแก่ผิวและช่วยปกป้องผิว โดยสามารถแก้ปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นกับผิว เช่น รอยแผลบนผิวหนัง, ความไม่สมดุลของฮอร์โมน และการขาด PUFAs ดังนั้น ARA จึงมีส่วนช่วยในการบำรุงผิวหน้าเพื่อให้ดูงดงามยิ่งขึ้น

นอกจากนี้ยังพบว่า ARA ถูกนำมาเป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับเส้นผม ซึ่งจะช่วยให้เส้นผมแข็งแรง นุ่มสลวยและเป็นเงางาม

3. อาหารเสริมสำหรับมนุษย์และสัตว์

พบว่า ARA ถูกนำไปเติมลงไปในการอาหาร (food additive) เพื่อเพิ่มคุณค่าให้กับอาหารมนุษย์ หนึ่งในนั้นคือการเติมลงไปในการผลิตนมผงสำหรับเด็กทารกควบคู่ไปกับกรดไขมัน DHA (docosahexaenoic acid) ซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะในกลุ่มโอเมกา-3 เนื่องจาก ARA และ DHA ต่างมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญและการพัฒนาการทางสมองในเด็กทารก ซึ่งในน้ำนมมารดานั้นมีกรดไขมันดังกล่าวรวมถึงกรดไขมันที่จำเป็นอื่นๆ ในขณะที่ในนมผงเลี้ยงทารกจะไม่มีกรดไขมันทั้งสองชนิดนี้ ดังนั้นจึงให้มีการเติมกรดไขมันดังกล่าวลงไปในการผลิตนมผง (Gill and Valivety, 1997; Birch *et al.*, 2000; Ratledge *et al.*, 2004) ซึ่งในส่วนของการผลิต ARA ที่ผลิตจาก *Mortierella* spp. มีรายงานถึงความปลอดภัยของราสกุลนี้รวมถึงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากราสกุลดังกล่าว (Hempenius *et al.*, 1997; Koskelo *et al.*, 1997) ซึ่งสอดคล้องกับ Ward and Singh (2005) ที่กล่าวไว้ว่ากรดไขมัน ARA ที่ผลิตจาก *Mortierella* spp. และกรดไขมัน DHA ที่ผลิตจาก *Schizochytrium* spp., *Ulkenia* spp. และ *Cryptocodinium* spp. ไม่ก่อโรคและไม่เป็นพิษต่อผู้บริโภค นอกจากนี้ ARA และ DHA ยังได้รับการยอมรับจากสถาบันทางโภชนาการชั้นนำอย่างแพร่หลายแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การยอมรับในการใช้ DHA และ ARA จากสถาบันทางโภชนาการชั้นนำ

เหตุการณ์	ปี ค.ศ.
FAO และ WHO แนะนำว่านมผงสำหรับเลี้ยงทารกควรมียอดประกอบคล้ายคลึงกับในน้ำนมมารดา	1975
Generally Recognized as Safe (GRAS) ยอมรับให้น้ำมัน Menhaden เป็นแหล่งของ PUFAs ให้ใช้ในอาหารสำหรับผู้ใหญ่ได้	1987
European Society of Pediatric Gastroenterology แนะนำว่าอาหารสำหรับเลี้ยงทารกทั้งในช่วงปฐมวัยและก่อนปฐมวัยควรมี ARA และ DHA เป็นส่วนประกอบ	1991
The British Nutrition Foundation แนะนำเช่นเดียวกันกับ European Society of Pediatric Gastroenterology ว่าควรมี ARA และ DHA เป็นส่วนประกอบสำหรับอาหารเลี้ยงทารก	1992
คณะกรรมการร่วมของ FAO และ WHO แนะนำให้มี ARA และ DHA เป็นส่วนประกอบสำหรับอาหารที่ใช้เลี้ยงทารกช่วงปฐมวัยและก่อนปฐมวัย	1993
Ministry of Health ของประเทศฮอลแลนด์ อนุญาตให้อาหารสำหรับเลี้ยงทารกได้รับเครื่องหมายการค้าพิเศษในการนำเอา ARA และ DHA มาเป็นส่วนประกอบ	1995
องค์กรผู้เชี่ยวชาญอิสระของอเมริกาสรุปให้ใช้ ARA และ DHA ในการเติมลงในอาหารสำหรับเลี้ยงทารกได้	1996
การประชุมของผู้สนับสนุนโดย NIH และ The International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids ในวอชิงตัน ดีซี ได้ให้ข้อสรุปว่า ควรใช้ ARA และ DHA ในการเติมลงไปในการอาหารสำหรับเลี้ยงทารก	1999

ตารางที่ 1 (ต่อ)

เหตุการณ์	ปี ค.ศ.
มูลนิธิเพื่อสุขภาพเด็กให้คำแนะนำในการประชุม Acta Paediatrica ว่าสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงทารกควรมี ARA และ DHA เป็นส่วนประกอบ	2001
The Canadian Government's Health ของประเทศแคนาดาได้ให้ข้อมูลเพื่อการอนุมัติการใช้ DHASCO และ ARASCO ในสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงทารกได้สำเร็จในแคนาดา	2003

ที่มา: Ward and Singh (2005)

นอกจากนี้ยังพบว่า ARA ถูกนำมาใช้เป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ (feed additive) ได้มีการนำ ARA ไปใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น กุ้ง โดยจะไปมีผลต่อการวางไข่ของกุ้ง เนื่องจากกุ้งจะใช้ ARA ที่ได้รับจากอาหารไปเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ prostaglandins ซึ่งจะทำหน้าที่กระตุ้นรังไข่ให้มีการตกไข่ และพบว่าแม่กุ้งที่ได้รับ ARA เพียงพอในช่วงโตเต็มวัยก่อนที่จะมีการวางไข่ (spawning) จะทำให้ไข่มีอัตราการฟักเป็นตัวสูง (hatching rate) ส่วนตัวอ่อนที่มีลักษณะผิดปกติ (abnormal larvae) จะเกิดขึ้นน้อย ปริมาณของไข่ที่ได้รับการผสมพันธุ์ (fertilized egg) จะสูง และมีอัตราการรอดชีวิตของตัวอ่อน (larvae survival) สูงอีกด้วย Xiang-qin *et al.* (2002) ยังได้รายงานสนับสนุนถึงการให้ ARA เป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ว่าจากการทดลองในสัตว์แสดงให้เห็นได้ชัดเจนว่า ARA ช่วยลดระดับคลอเลสเตอรอลในร่างกายของสัตว์ และ ARA ยังมีส่วนช่วยพัฒนาคุณภาพขนของสัตว์เศรษฐกิจ โดยจะช่วยให้งามสัตว์ดังกล่าวนุ่มและเป็นเงางาม ดังนั้น ARA จึงเป็นกรดไขมันที่จำเป็นชนิดหนึ่งที่เหมาะสมแก่การเพิ่มคุณค่าให้กับอาหารสัตว์ต่างๆ ไม่ว่าจะเป็น แมว สุนัข ปลา และนก เพื่อให้สัตว์ดังกล่าวมีสุขภาพดีสมบูรณ์และแข็งแรง

4. ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมและยา

ARA ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในทางยาและผลิตภัณฑ์อาหารเสริม (Eroshin *et al.*, 2000; Xiang-qin *et al.*, 2002) เนื่องจาก ARA เป็นส่วนประกอบของไขมันซึ่งอยู่ภายในสมองและตา กรดไขมันดังกล่าวจะช่วยเซลล์ประสาทในการส่งผ่านข้อมูลต่างๆ จากการที่ ARA เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารที่ทำหน้าที่คล้ายฮอร์โมน (hormone-like metabolites) ในกลุ่ม prostaglandins,

thromboxanes, leukotrienes และ prostacyclin ดังนั้นจึงมีส่วนช่วยให้ร่างกายทำงานได้อย่างเป็นปกติ

Single cell oils (SCOs) เชิงพาณิชย์

ในปัจจุบันมูลค่าทางการตลาดทั่วโลกของนมผงสำหรับเลี้ยงทารกในแต่ละปีอยู่ที่ประมาณ 10 พันล้านเหรียญสหรัฐ โดย ARA และ DHA ถูกนำมาใช้เป็นส่วนประกอบสำหรับเพิ่มคุณค่าทางอาหารให้นมผงในหลายประเทศทั่วโลก ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวต่างก็มีผลิตภัณฑ์น้ำมันที่ได้จาก SCOs เป็นส่วนประกอบ ในตลาดนมพ่นออกสหรัฐอเมริกาพบว่าใช้ DHA ได้จากน้ำมันปลาหรือ ω -3 ที่ได้จากไขไก่มาเป็นส่วนประกอบ บริษัท Martek ในสหรัฐอเมริกาเป็นบริษัทสำคัญที่นำ ARA และ DHA มาใช้ในอุตสาหกรรมดังกล่าว ซึ่งพบว่า DHA ที่ผลิตจากสาหร่าย *Cryptocodinium cohnii* มี DHA อยู่ 40-50 เปอร์เซ็นต์แต่ไม่พบ EPA หรือ PUFAs เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ ส่วน ARA ที่ผลิตได้จาก *M. alpina* มี ARA อยู่ 40-50 เปอร์เซ็นต์ และไขมันอื่นๆอีกเพียงเล็กน้อย

มีรายงานว่า Abbott Laboratories ได้ยื่นข้อเรียกร้องให้ FDA อนุญาตให้สามารถนำ DHA ที่ผลิตจากน้ำมันปลาและ ARA ที่ผลิตได้จากรามมาเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์นมผงเพื่อเพิ่มคุณค่าแก่ผลิตภัณฑ์ดังกล่าว การมีน้ำมันที่ได้จากการผลิตของจุลินทรีย์เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์จะช่วยให้เพิ่มราคาขายปลีกของผลิตภัณฑ์ดังกล่าวขึ้นไปอีก 10-20 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นว่าผลิตภัณฑ์นมผงมีมูลค่าทางการตลาดที่สูงมาก ซึ่งหากมีแหล่งของ DHA และ ARA ที่สามารถลดต้นทุนการผลิตได้ก็นับว่าเป็นสิ่งที่ดี (Ward and Singh, 2005) มีรายงานถึงรายชื่อบริษัทที่ได้มีการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ Single cell oil PUFAs หรือผลิตภัณฑ์ที่มี PUFAs เป็นองค์ประกอบแสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 รายชื่อบริษัทที่ได้มีการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ SCO PUFAs หรือผลิตภัณฑ์ที่มี PUFAs เป็นองค์ประกอบ

รายชื่อบริษัท	ประเทศ
Avantis S.A.	ฝรั่งเศส
BASF A.G.	เยอรมนี
Friesland Brands A.G.	เนเธอร์แลนด์
Gist-brocades	เนเธอร์แลนด์
Heinz-Wattie's	นิวซีแลนด์
Hoffmann-LaRoche A.G.	สวิตเซอร์แลนด์
Jamieson	แคนาดา
Laboratorios Ordesa	สเปน
Maarbarot	อิสราเอล
Martek Inc.	สหรัฐอเมริกา
Mead Johnson Nutritionals	แคนาดา
Nagase and Co.	ญี่ปุ่น
Nestle S.A.	สวิตเซอร์แลนด์
Novartis	สวิตเซอร์แลนด์
Nutricia	นิวซีแลนด์
Nutrinova Celanese A.G.	เยอรมนี
Pronova	นอร์เวย์
Ross Products (Div of Abbott)	สหรัฐอเมริกา
Suntory Ltd.	ญี่ปุ่น
Walmart	สหรัฐอเมริกา
Wyeth	สหรัฐอเมริกา

ที่มา: Ward and Singh (2005)

แหล่งผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะในกลุ่ม ARA

1. พืช

กรดไขมัน ARA ที่ได้จากพืชนั้นมีรายงานน้อยมาก มักพบว่าพืชจะมีการสังเคราะห์กรดไขมัน linoleic acid (LA, C18:2 ω 6) และ γ -linolenic acid (GLA, 18:3 ω 6) เป็นหลักซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมเป็น 18 (C₁₈ PUFAs) ที่จัดอยู่ในกลุ่มโอเมกา-6 เช่นเดียวกับกรดไขมัน ARA โดยแหล่งดังกล่าวคือเมล็ดของพืชบางชนิด เช่น เมล็ดป่าน (linseed) เมล็ดทานตะวัน (sunflower) งา (sesame) ดอกคำฝอย (safflower) ฝ้าย (cotton seed) ข้าวโพด (corn) เมล็ดองุ่น (grape seed) และวอลนัท (walnut) (Cordian, 2002) และพบว่าแหล่งของกรดไขมัน GLA ในพืชที่หายากและเป็นแหล่งทางการค้าที่สำคัญ คือ น้ำมันจากเมล็ดพืช 3 ชนิด ได้แก่ evening primrose (*Oenothera biennis*) มีปริมาณกรดไขมัน 8-10% (w/w) borage seeds (*Borago officinalis*) 24-25% (w/w) และ black currant seeds (*Ribes nigrum*) (Lawson, 1988) ในส่วนของกรดไขมัน arachidonic acid (ARA, C20:4 ω 6) พบรายงานเพียงพืชชั้นต่ำจำพวกมอส (*Ctenidium molluscum*) (Certik and Shimizu, 1998; Christie, 2010) ลิเวอร์เวิร์ด และเฟิร์น เท่านั้น ในส่วนของพืชชั้นที่สูงกว่าพบรายงานเพียงในพืช Kauri pine (*Agathis robusta*) เท่านั้นที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันดังกล่าว (Christie, 2010)

Dyal and Narine (2005) กล่าวว่าถึงแม้ว่าพืชจะเป็นแหล่งทางเลือกหลักในการผลิตกรดไขมันเพื่อการบริโภคของมนุษย์แต่ข้อเสียเปรียบของการใช้พืชเป็นแหล่งผลิต คือ ต้องใช้พื้นที่มากในการเพาะปลูก ซึ่งสอดคล้องกับ (Dyal *et al.*, 2005) รวมถึงมีวงจรชีวิตค่อนข้างยาวและมีการเจริญช้าอาจส่งผลให้ต้องใช้ระยะเวลานานจึงจะได้ผลผลิตออกมา นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับฤดูกาลและลักษณะภูมิประเทศที่อาจส่งผลต่อความไม่สม่ำเสมอของกรดไขมันที่ได้ทั้งทางด้านคุณภาพและปริมาณ รวมไปถึงการปรับปรุงยีนในพืช (gene manipulation) เพื่อพัฒนาผลผลิตอาจเป็นไปได้ยากในปัจจุบันนี้ เนื่องจากอาจเสี่ยงต่อกลุ่มผู้บริโภคที่ต่อต้านการทำ GMOs (genetically modified organisms)

2. สัตว์

แหล่งของกรดไขมัน ARA ที่เป็นแหล่งหลักที่ใช้ในทางการค้า และเป็นแหล่งดั้งเดิมในการผลิตกรดไขมันดังกล่าว ได้แก่ เครื่องในสัตว์ เช่น ตับ เนื้อเยื่อ ปลา (*Brevoortia*, *Clupea*) น้ำมันปลารวมไปถึงไข่แดง (Gill and Valivety, 1997; Singh and Ward, 1997; Lan *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2003; Hwang *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2006) แต่เนื่องจากปริมาณกรดไขมันดังกล่าวมีอยู่ในปริมาณที่น้อยไม่เพียงพอกับความต้องการ ประกอบกับปัจจุบันอาจจะมีการปนเปื้อนสารพิษ สารเคมี รวมถึงโลหะหนัก ซึ่งอาจจะส่งผลต่อคุณภาพและปริมาณของกรดไขมันที่ได้

Ratlidge (2004) กล่าวไว้ว่าได้มีการถกเถียงกันถึงเรื่องของความเหมาะสมในการใช้น้ำมันปลาเป็นอาหารเสริม เนื่องจากในปัจจุบันมีมลภาวะทางทะเลมากมาย เช่น การปนเปื้อนของสารจำพวก dioxin, PCBs และโลหะหนักต่างๆรวมทั้งสารปรอท ซึ่งสารดังกล่าวจะถูกเก็บสะสมไว้ในตัวปลา, ไข่ปลา โดยเฉพาะบริเวณตับของปลา ส่งผลให้พบการปนเปื้อนของสารอันตรายต่างๆในกรดไขมันที่สกัดได้จากแหล่งดังกล่าว และในบางประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา ได้กำหนดห้ามใช้น้ำมันที่ได้จากปลาในการใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับเด็กและทารกโดยเด็ดขาด

3. จุลินทรีย์

จุลินทรีย์สามารถสังเคราะห์ไขมันเพื่อทำหน้าที่ที่สำคัญเกี่ยวกับโครงสร้างของจุลินทรีย์เอง อย่างไรก็ตามมีจุลินทรีย์เพียงไม่กี่ชนิดที่สามารถสะสมไขมันภายในเซลล์ได้มากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ซึ่งเรียกจุลินทรีย์เหล่านี้ว่า Oleagenous microorganism โดยจุลินทรีย์จะเก็บไขมันไว้ในถุงไขมัน (oil vacuoles) ในรูปของ triacylglycerols ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิต ARA ซึ่งน้ำมันที่ได้นั้นถือเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่า มีความสำคัญทั้งในเชิงพาณิชย์และสุขภาพ จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันดังกล่าวได้แก่

3.1 แบคทีเรีย

มีรายงานว่าแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในทะเลบางสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมัน ARA ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวคือ *Shewanella gelidimarina* แต่มีการสะสมในปริมาณค่อนข้างต่ำ อย่างไรก็ตามแบคทีเรียสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารให้กับแพลงก์ตอนสัตว์ เช่น rotifer จากนั้นเมื่อมีสัตว์น้ำอื่นๆมาบริโภค rotifer สัตว์น้ำเหล่านั้นก็จะได้รับกรดไขมันดังกล่าวส่ง

ต่อกันเป็นทอดๆ ภายในสายใยอาหาร (Russell and Nichols, 1999) ดังนั้นหากมีความเข้าใจในวิธีการสังเคราะห์กรดไขมันและกลไกการควบคุมในแบคทีเรียก็จะช่วยเพิ่มระดับการผลิตกรดไขมันดังกล่าว โดยอาศัยการจัดการยีนในแบคทีเรีย ซึ่งอาจจะศึกษาถึงการควบคุมเอนไซม์การส่งถ่ายยีนเข้าสู่สิ่งมีชีวิตเพื่อกระตุ้นหรือเปลี่ยนแปลงศักยภาพในการผลิตกรดไขมัน ซึ่งนำไปสู่การผลิตในเชิงการค้า (Facciotti *et al.*, 1998)

3.2 สาหร่าย

สาหร่าย เป็นแหล่งผลิตกรดไขมันที่จำเป็นเบื้องต้นที่ถูกนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Tatsuzawa and Takizawa, 1995) โดยสาหร่ายที่เป็นแหล่งของการผลิตกรดไขมัน ARA ได้แก่ *Porphyridium cruentum*, *Sargrassum salicifolium*, *Euglena gracilis* (Certik and Shimizu, 1998) และพบว่านอกเหนือจากสาหร่ายที่กล่าวมายังมีสาหร่ายอีกสปีชีส์คือ *Parietochloris incisa* ที่มีประสิทธิภาพในการผลิต ARA (Bigogno *et al.*, 2002) ซึ่งผลิตได้สูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมดซึ่งมีจำนวนมากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ของมวลชีวภาพ และมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ของ ARA เป็นโมเลกุล triacylglycerol (TAG) Ward and Singh (2005) รายงานว่าการผลิต ARA ในสาหร่ายจำพวก photoautotrophic เช่น *Porphyridium cruentum* และ *Parietochloris incisa* มีการผลิตที่เหมาะสมภายใต้สภาวะที่มีการเจริญต่ำ คือสภาวะที่ไม่มีไนโตรเจน หรือ สภาวะที่มีแหล่งไนโตรเจนที่จำกัด

ข้อเสียเปรียบของการใช้สาหร่ายเป็นแหล่งผลิต ARA คือ มีการเจริญช้าอาจส่งผลให้ต้องใช้ระยะเวลาจนจึงจะได้ผลผลิตที่ต้องการ

3.3 รา

ในปีค.ศ.1967 มีรายงานว่าราบางสปีชีส์ในสกุล *Entomophthora*, *Delacroixia*, *Conidiobolus*, *Phytium* และ *Phytophthora* มีความสามารถในการผลิต ARA ได้ในระดับสูง โดย ARA ที่ผลิตได้จาก *Entomophthora exitalis*, *E. ignobilis*, *E. thaxteriana* เท่ากับ 27.1 เปอร์เซ็นต์ 19.1 เปอร์เซ็นต์ และ 18.8 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมดตามลำดับ (Tyrrell, 1967) และ Kyle (1994) กล่าวถึงการผลิต ARA โดย *Pythium insidiosum* พบว่ามีอัตราการเจริญสูงเมื่อเลี้ยงในอาหาร กลูโคส-yeast extract โดยเมื่อเลี้ยงไป 50 ชั่วโมง ให้มวลชีวภาพสูงถึง 15 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีองค์ประกอบของน้ำมันเป็น 5-6 เปอร์เซ็นต์ (0.75-0.9 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็น ARA 30-35 เปอร์เซ็นต์)

แต่ปริมาณและผลผลิตของ ARA มีเพียงแค่ 0.3 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและ 0.5 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ นอกจากนี้มีรายงานว่าพบ ARA ภายในเซลล์ของราบางชนิด (Yongmanitchai and Ward, 1989; Shinmen *et al.*, 1989; Gandhi and Wette, 1991) มีรายงานว่าราเส้นใยในสกุล *Mortierella* ที่อยู่ใน Phycomycete มีความสามารถในการผลิต ARA (Totani and Oba, 1987; Shinmen *et al.*, 1989; Sajbidor *et al.*, 1990; Bajpai *et al.*, 1991; Zhelifonova *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1995; Eroshin *et al.*, 1996a, 1996b; Eroshin *et al.*, 2000) ซึ่งสอดคล้องกับ Sajbidor *et al.* (1990) รวมถึง Ward and Singh (2005) กล่าวว่าราชั้นต่ำในสกุล *Mortierella* สะสม ARA ในเปอร์เซ็นต์ที่สูงเมื่อเทียบกับกรดไขมันชนิดอื่นและโดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Mortierella alpina* ที่มีรายงานในปี ค.ศ.1987 ว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง สามารถผลิต ARA ได้ 68.5-78.8 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด (Totani and Oba, 1987) ซึ่งสอดคล้องกับที่มีรายงานว่า *M. alpina* มีปริมาณ ARA สะสมภายในเซลล์สูง (Bajpai *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1995; Ward, 1995; Higashiyama *et al.*, 1998, 2002; Eroshin *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2006)

ข้อดีของการผลิตกรดไขมันโดยใช้จุลินทรีย์ (Certik and Shimizu, 1999)

1. จุลินทรีย์กลุ่ม oleaginous microorganism สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการสังเคราะห์กรดไขมัน
2. กรดไขมันที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ถึงแม้จะมีปริมาณน้อย แต่เป็นกรดไขมันชนิดที่มีมูลค่าสูงกว่าที่ผลิตได้ในพืช เช่น น้ำมันถั่วเหลือง (soybean oil) น้ำมันปาล์ม (palm oil) น้ำมันเมล็ดทานตะวัน (sunflower oil) ที่ถึงแม้จะผลิตกรดไขมันได้ปริมาณมาก แต่เป็นกรดไขมันชนิดที่มีมูลค่าต่ำ
3. จุลินทรีย์มีอัตราการเจริญเติบโตสูงในแหล่งอาหารที่ไม่ซับซ้อน มีความหลากหลายและราคาถูก จึงเป็นการลดค่าใช้จ่ายในด้านวัตถุดิบ
4. การผลิตกรดไขมันโดยจุลินทรีย์สามารถทำได้ตลอดปี ไม่ขึ้นกับฤดูกาล สภาพภูมิประเทศหรือภูมิอากาศ รวมถึงใช้พื้นที่ไม่มากในการเลี้ยง

5. การผลิตกรดไขมันโดยจุลินทรีย์สามารถควบคุมคุณภาพของกรดไขมันได้ง่ายกว่าแหล่งผลิตอื่นๆเช่นการทำให้มีความบริสุทธิ์จนถึงระดับที่นำไปใช้ในทางเภสัชกรรมได้ (pharmaceutical-grade)

6. การเหนี่ยวนำจุลินทรีย์ให้เกิดกระบวนการ transformation เช่น oxidation desaturation และ hydrogenation เพื่อปรับปรุงโครงสร้างกรดไขมันให้เป็นที่ต้องการได้

7. การสร้างสายพันธุ์กลายที่มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์จำเพาะ เช่น เอนไซม์ desaturase ทำให้เกิดสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันชนิดที่ต้องการได้ดีขึ้น

8. จุลินทรีย์กลุ่ม oleaginous microorganism สามารถเป็นเจ้าบ้าน (host cell) ที่เหมาะสมในการถ่ายโอนยีนจากแหล่งอื่น เช่น พืชหรือสัตว์ในการทำโคลนนิ่ง (cloning) เพื่อให้มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันชนิดที่ต้องการซึ่งเดิมไม่พบในจุลินทรีย์ได้

9. จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้เป็นตัวแทนในการศึกษากระบวนการทางชีวเคมี กระบวนการควบคุมกระบวนการเมแทบอลิซึมและการทำงานของกรดไขมันเนื่องจากจุลินทรีย์มีระบบออร์กาเนลล์ที่แยกส่วนเป็นบริเวณต่างกันในเซลล์ (organelle compartmentation) ทำให้การศึกษาในจุลินทรีย์สามารถทำได้ง่ายกว่าสิ่งมีชีวิตชั้นสูงหลายเซลล์ที่มีความซับซ้อนมากกว่า

10. การควบคุมกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์โดยการปรับสภาวะในการเพาะเลี้ยงหรือการควบคุมปริมาณสารอาหารเพื่อให้มีการยับยั้ง หรือการผลิตกรดไขมันที่ต้องการสามารถทำได้ง่าย

การสังเคราะห์กรดไขมันในจุลินทรีย์

จุลินทรีย์บางสายพันธุ์สามารถสะสมกรดไขมันได้ในปริมาณมากถึง 70 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์ทั้งหมด และนอกจากนี้น้ำมันที่สะสมในเซลล์จุลินทรีย์นั้นส่วนใหญ่จะไม่อยู่ในรูปของ triacylglycerol ซึ่งพบในน้ำมันที่ได้จากพืช จากข้อมูลต่างๆที่กล่าวมาข้างต้น จึงใช้ตรรกะเหล่านี้ในการบ่งชี้ยีนที่ใช้กำหนดการสร้างเอนไซม์หลักที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์และสะสมกรด

ไขมัน ซึ่งนำไปสู่การจัดการจุลินทรีย์ให้ได้สายพันธุ์ที่สามารถผลิตหรือสะสมไขมันชนิดที่ต้องการ โดยเฉพาะ PUFAs ออกมาในปริมาณมาก ประการสำคัญคือในปัจจุบันไม่มีพืชชนิดใดที่สามารถผลิต PUFAs ที่มีความยาวเกิน 18 คาร์บอน (C_{18}) ซึ่งการจะทำให้พืชสามารถผลิต PUFAs ดังกล่าวออกมานั้นจำเป็นต้องมีกระบวนการตัดแต่งพันธุกรรมของพืช หรือ GMO ซึ่งถึงแม้จะได้ GM oils ที่ต้องการและผลิตออกมาได้จริง ก็อาจเกิดข้อถกเถียงถึงความเหมาะสมต่อการใช้ผลิตภัณฑ์ที่เป็น GMO เพื่อใช้เป็นอาหารสำหรับทารกและเด็กตามมา (Ratledge, 2004)

สิ่งมีชีวิตทุกชนิดจะต้องมีการสังเคราะห์ไขมันอย่างน้อยจำนวนหนึ่งในการสร้างผนังเซลล์ และใช้ในการทำหน้าที่ต่างๆ มีจุลินทรีย์เพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่สามารถสะสมไขมันไว้ภายในเซลล์ ได้มากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ทั้งหมด ซึ่งเป็นลักษณะของการเก็บสำรองไขมัน (reserve storage) ในรูปของ triacylglycerol เพื่อเป็นพลังงานสะสม แต่แบคทีเรียโดยทั่วไปแล้วจะสร้าง Poly-β-hydroxy-butyrate (PHB) และ alkanolates เพื่อเป็นพลังงานสะสมในรูปของโพลิเมอร์แทน ในส่วนของการสะสมน้ำมันนั้น จะพบเพียงจุลินทรีย์ในกลุ่มของยีสต์-ราบางสายพันธุ์ และพบในสาหร่ายบางชนิดเท่านั้น ซึ่งมีอัตราส่วนที่น้อยมากเมื่อเทียบกับประชากรทั้งหมด สิ่งมีชีวิตเหล่านี้จะถูกเรียกว่า สายพันธุ์ oleaginous จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า วิธีในชีวสังเคราะห์กรดไขมันของยีสต์ในจุลินทรีย์กลุ่ม oleaginous มีกระบวนการเดียวกันกับพวก non-oleaginous ตัวอย่างเช่น *Saccharomyces cerevisiae* เป็นต้น (Ratledge, 2004)

Ratledge (2004) กล่าวว่ากระบวนการสะสมกรดไขมันในเซลล์นั้นจุลินทรีย์ต้องเจริญในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนที่มากเกินไป แต่มีปริมาณไนโตรเจนที่จำกัด เมื่อจุลินทรีย์เจริญเซลล์จะใช้แหล่งไนโตรเจนหมดอย่างรวดเร็วเนื่องจากมีอยู่อย่างจำกัด ในขณะที่การใช้แหล่งคาร์บอนยังคงดำเนินต่อไป (ปกติแล้วจะใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน) ซึ่งผลที่ตามมาก็คือการนำไปสู่กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน ซึ่งเป็นผลมาจากการสร้าง triacylglycerols มากมายภายในตัวเซลล์จนเกิดเป็นหยดน้ำมัน ซึ่งหยดน้ำมันที่สะสมนี้สามารถมีได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์ แต่ก็ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์จุลินทรีย์ด้วยจุลินทรีย์ในกลุ่ม non-oleaginous ความหมายทั่วไปคือ จุลินทรีย์ในกลุ่มที่ไม่มีการสะสมกรดไขมัน เมื่อนำจุลินทรีย์ในกลุ่มดังกล่าวมาเลี้ยงในอาหารเดียวกับที่เลี้ยงจุลินทรีย์ในกลุ่ม oleaginous จะมีเพียงการเจริญเพื่อแบ่งเซลล์ต่อไปเรื่อยๆ หรือมีการนำเอาคาร์โบไฮเดรตที่ได้จากอาหารมาเปลี่ยนเป็นโพลิแซ็กคาไรด์ ในหลายๆรูปแบบ เช่น กลูแคน แมนแนน หรือไกลโคเจน เป็นต้น และไขมันที่พบจะพบเพียง 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้งทั้งหมดหรืออาจจะไม่พบไขมันที่สะสมเลย

Ratlledge (2004) สรุปถึงกระบวนการสะสมไขมันของจุลินทรีย์ ซึ่งจำเป็นต้องใช้พื้นฐานของชีวเคมีของการผลิตกรดไขมันซึ่งถือว่าเป็นกลไกพื้นฐาน โดยในจุลินทรีย์ทั่วไปพบว่าการสะสมไขมันมีกลไกสองลักษณะดังต่อไปนี้คือ

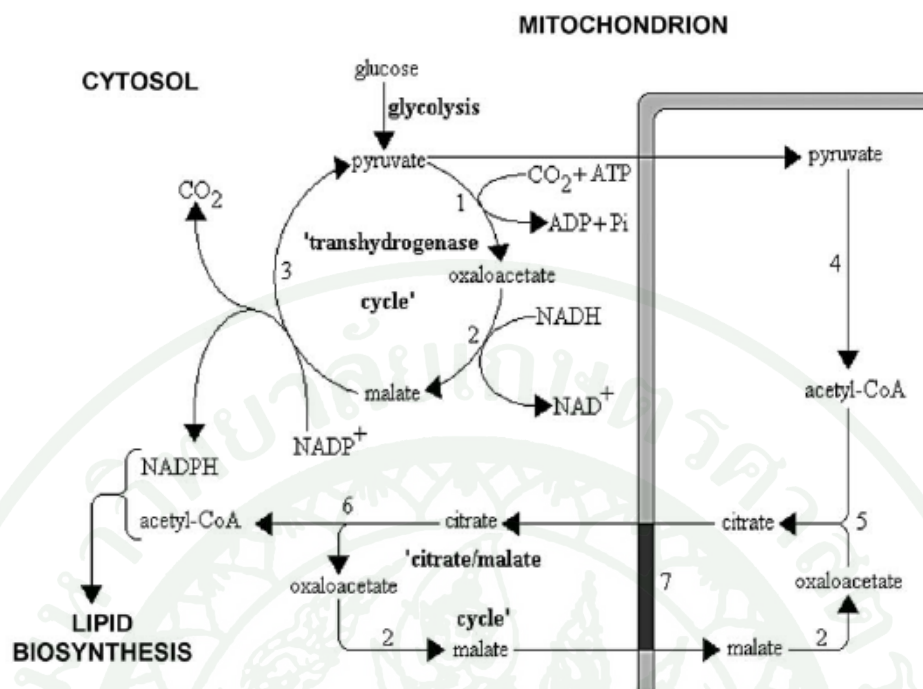
1. มีความสามารถในการสร้าง acetyl-CoA อย่างต่อเนื่องและถูกนำเข้าสู่ไซโตซอลโดยตรงอย่างต่อเนื่อง ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นที่สำคัญสำหรับการสังเคราะห์กรดไขมัน (FAS)
2. มีความสามารถในการสร้าง NADPH ในยามที่เซลล์ขาด NADPH ซึ่ง NADPH นั้นเป็นสารตั้งต้นตัวสำคัญเทียบเท่ากับ acetyl-CoA สำหรับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน

รูปแบบของ acetyl-CoA ที่พบในจุลินทรีย์ในกลุ่มที่สะสมกรดไขมัน จะพบว่าสามารถสร้าง ATP ด้วยการอาศัยเอนไซม์ citrate lyase ซึ่งกระบวนการดังกล่าวจะพบในจุลินทรีย์กลุ่มสำคัญที่สามารถสะสมกรดไขมันได้



การที่ระบบจะทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ citric acid (ถือว่าเป็นสารตั้งต้น) จะต้องสามารถพร้อมที่จะเข้าสู่ไซโตซอลบริเวณผนังเซลล์ ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดการสังเคราะห์กรดไขมัน citric acid เป็นองค์ประกอบหนึ่งของ Tricarboxylic acid (TCA) cycle ที่มีการทำงานอยู่ในไมโทคอนเดรีย ซึ่งจุลินทรีย์ที่เป็น oleaginous เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความพิเศษเฉพาะตัวตรงที่ยอมให้มีการสะสม citrate ในปริมาณมาก ซึ่งจะเข้าสู่กระบวนการ citrate/malate cycle เมื่อมีการส่ง citrate ตรงเข้าสู่ไซโตซอล ทำให้เกิด acetyl-CoA ที่มีความจำเป็นต่อการสังเคราะห์กรดไขมัน

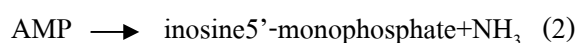
แสดงดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 วิธีการสังเคราะห์ acetyl-CoA และ NADPH โดยผ่านทาง citrate/malate cycle และ cytosolic “ transhydrogenase ” เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ไขมันในจุลินทรีย์กลุ่ม oleaginous โดยเอนไซม์หมายเลข 1 คือ pyruvate decarboxylase, 2 คือ malate dehydrogenase, 3 คือ malic enzyme, 4 คือ pyruvate dehydrogenase, 5 คือ citrate synthase, 6 คือ ATP:citrate lyase และ 7 คือ citrate/malate translocase

ที่มา: Ratledge (2004)

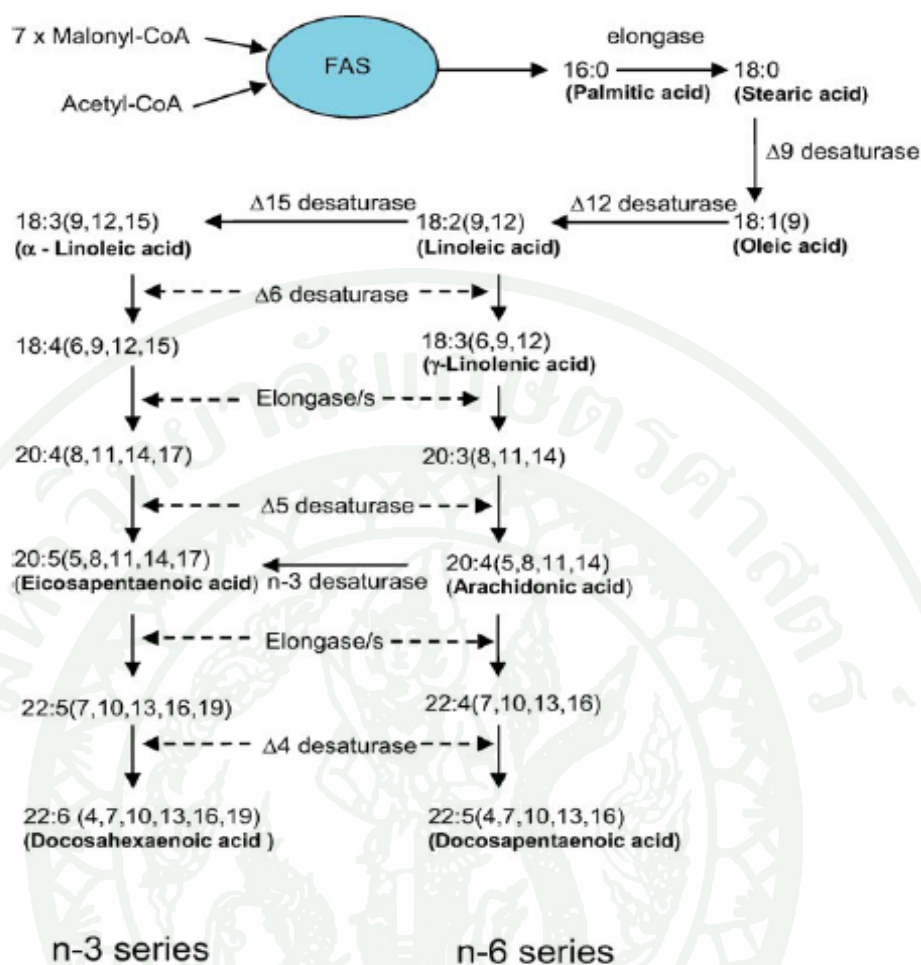
กิจกรรมของเอนไซม์ isocitrate dehydrogenase ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งของ TCA cycle จะขึ้นอยู่กับ การสร้าง AMP ซึ่งปริมาณของ AMP จะมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ AMP deaminase ตามสมการดังนี้



ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวจะทำงานเมื่อปริมาณของไนโตรเจนที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์กลุ่มที่สะสมไขมันมีอยู่อย่างจำกัด

ซึ่งการจำกัดปริมาณของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์จะนำไปสู่การหยุดปฏิกิริยาของการสร้าง acetyl-CoA ออกมา

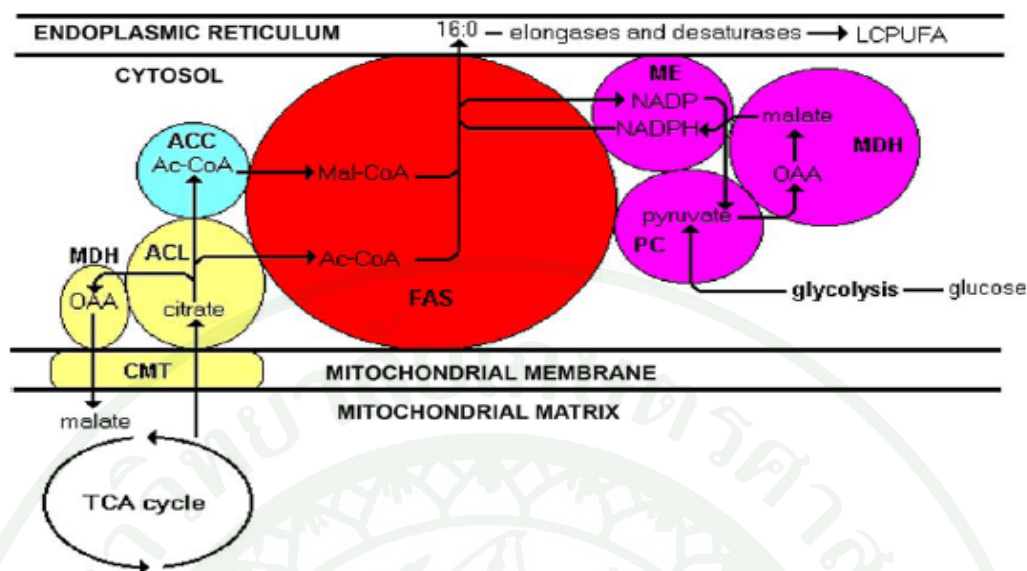
- เมื่อมีการใช้ไนโตรเจน จุลินทรีย์เหล่านี้จะแสดงการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ AMP deaminase ซึ่งมีกิจกรรมที่มากกว่าในเซลล์ปกติก่อนที่จะขาดแคลนไนโตรเจน
- เมื่อกิจกรรมของ AMP deaminase เพิ่มขึ้น จะส่งผลให้ AMP ที่อยู่ในเซลล์ลดลง ทำให้ content ของไมโทคอนเดรียเพิ่มขึ้น
- ปริมาณ AMP ในไมโทคอนเดรียหมดไป ทำให้เกิดการหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ isocitrate dehydrogenase จากการทำงานในเซลล์
- จากผลที่เกิดขึ้น isocitrate จึงไม่สามารถนำเข้าสู่เมแทบอลิซึมได้ทำให้เกิดการสะสมและมีปริมาณที่สมดุลกับ citric acid ในเซลล์
- ทำให้เกิดการสะสมของ citrate ในไมโทคอนเดรียในปริมาณมาก เกิดการขนส่ง citrate เพื่อเปลี่ยนให้เป็น malate
- citrate ถูกนำเข้าสู่ cytosol และถูก ACL ตัดจนกลายเป็น acetyl-CoA และ oxaloacetate
- จากนั้น acetyl-CoA จะถูกนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน



ภาพที่ 4 วิธีการเปลี่ยน PUFAs ในจุลินทรีย์โดยใช้เส้นทางการสังเคราะห์กรดไขมัน (FAS) ซึ่งเป็นการสังเคราะห์แบบดั้งเดิม

ที่มา: Ratledge (2004)

จากภาพแสดงการสังเคราะห์ PUFAs ในจุลินทรีย์ โดยใช้วิธีการสังเคราะห์แบบดั้งเดิม ซึ่งกรดไขมันจะถูกสังเคราะห์มาจาก acetyl-CoA และ malonyl-CoA โดย acetyl-CoA นั้นจะถูกสร้างผ่านทางเอนไซม์ acetyl-CoA carboxylase (ดังภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 แผนผังอธิบายสมมุติฐานของการสังเคราะห์ไขมัน

LCPUFA คือ long chain PUFAs, OAA คือ oxaloacetate, AC-CoA คือ acetyl-CoA, Mal-CoA คือ malonyl-CoA, FAS คือ fatty acid synthase, ACL: ATP คือ citrate lyase, ACC คือ acetyl-CoA carboxylase, CMT คือ citrate/malate translocase, ME คือ malic enzyme, PC คือ pyruvate carboxylase และ MDH คือ malate dehydrogenase

ที่มา: Ratledge (2004)

วิถี FAS แบบดั้งเดิมนี้จะใช้เอนไซม์หลายตัวในการสังเคราะห์กรดไขมันที่อิ่มตัวและ stearic acid จะถูกสร้างพันธะคู่และเพิ่มความยาวของสายคาร์บอน โดยอาศัยเอนไซม์ต่างๆ ดังภาพที่ 4 จนกระทั่ง PUFAs ที่ได้มีโครงสร้างแตกต่างกันออกไป PUFAs จะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในกลุ่มโอเมกา-3 และ โอเมกา-6 ซึ่งขึ้นอยู่กับตำแหน่งของพันธะคู่สุดท้ายที่อยู่ใกล้กับปลายเมทิล โดยเฉพาะอย่างยิ่งในรา *M. alpina* สามารถถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ Δ^{17} desaturase หรือเรียกรวมว่า n-3 desaturase เพื่อเปลี่ยนกรดไขมันในกลุ่มโอเมกา-6 ให้เป็นกลุ่มโอเมกา-3 ได้ (เปลี่ยน ARA ให้เป็น EPA เมื่ออยู่ในสถานะที่เหมาะสม) ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะขั้นตอนของกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันและเปลี่ยนเป็นกรดไขมันในกลุ่มโอเมกา-6 ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้คือ หลังจาก acetyl-CoA และ malonyl-CoA ผ่าน FAS จะได้ palmitic acid ออกมา เมื่อเอนไซม์ elongase ทำงานจะเปลี่ยน palmitic acid ให้เป็น stearic acid แล้วจะเกิดการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ Δ^9 desaturase เพื่อที่จะเปลี่ยน stearic acid ให้เป็น oleic acid จากนั้นอาศัยเอนไซม์ Δ^{12} desaturase ใน

การเปลี่ยนให้กลายเป็น linoleic acid ผ่านกระบวนการ desaturation (โดยเอนไซม์ $\Delta 6, \Delta 5, \Delta 4$ desaturase) และ elongation ซึ่งถ้าเริ่มต้นจาก linoleic acid สุดท้ายจะได้ γ -linolenic acid และ arachidonic acid แต่ถ้าเริ่มต้นจาก adrenic acid (22:4 *cis*7, 10, 13, 16) สุดท้ายจะได้ docosapentaenoic acid- $\omega 6$

ลักษณะทั่วไปของราสกุล *Mortierella*

Mortierella เป็นราทั่วไปที่พบในดิน มีการเจริญที่รวดเร็ว พบการสร้างสปอร์จำนวนมาก สามารถคัดแยกได้ด้วยวิธีในการคัดแยกราทั่วไป ส่วนใหญ่แล้ว *Mortierella* มีบทบาทในระบบนิเวศน์ในแง่ของการเป็นผู้ย่อยสลายอินทรีย์สาร (saprophytic) สกุลดังกล่าวพบครั้งแรกโดย Linnemann ในปีค.ศ.1941 ซึ่งต่อมา Zhycha *et al.* (1970) ทำการจัดจำแนก *Mortierella* จำนวน 83 สายพันธุ์ ออกเป็น 11 section ต่อมา Tuner รายงานวิธีในการจัดจำแนกลักษณะของแต่ละ section เพื่อความสะดวกในการค้นคว้าและจัดจำแนก หลังจากนั้นนักวิทยาศาสตร์ชาวรัสเซียรายงานเกี่ยวกับความรู้ใหม่ๆ ที่เกี่ยวข้องกับสกุลดังกล่าวขึ้น สกุล *Mortierella* จัดอยู่ใน family Mortierellaceae (A. Fischer) โดยโครงสร้างส่วนใหญ่แล้วมีความคล้ายคลึงกับราในกลุ่ม Mucoraceae ซึ่งถุงหุ้มสปอร์ไม่พบคอลลูเมลลาและสปอร์เมื่อแตกออกจะพบลักษณะสปอร์เดี่ยวหรือสองสปอร์ก็ได้ ส่วนของเส้นสาหร่ายนั้นมีการแตกกิ่งก้านสาขาออก และพบว่าราในกลุ่มนี้มีกลิ่นเฉพาะตัวคล้ายกระเทียม อ้างโดย (Domsch *et al.*, 1993) ราในสกุล *Mortierella* มีการจัดจำแนกประเภทสำหรับ classification (ดังภาพที่ 6)

Kingdom Fungi

Division Eumycota

Subdivision Zygomycotina

Class Zygomycete

Order Mucorales

Family Mortierellaceae

Genus *Mortierella*

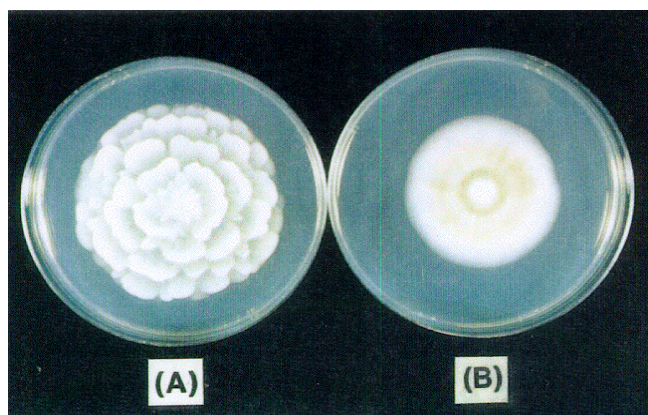
Subgenus *Mortierella*

Micromucor

ภาพที่ 6 การจำแนกประเภท *Mortierella*

ที่มา: Streekstra (1997)

สมาชิกที่อยู่ในสกุลนี้ ตัวอย่างเช่น *Mortierella alpina*, *M. chlamydospora*, *M. indohii*, *M. minutissima*, *M. multivaricata*, *M. parvispora*, *M. polycephala*, *M. verticillata*, *M. hyaline*, *M. wolfii* เป็นต้น ราสกุลดังกล่าวเป็นราเส้นใย (filamentous fungi) ที่เส้นใยไม่มีผนังกั้น (non septate hyphae) จินัส *Mortierella* เมื่อเลี้ยงในอาหารแข็งส่วนใหญ่โคโลนีมักเป็นสีขาวมีเส้นใยที่ละเอียดไม่ฟู โคโลนีจะเจริญแผ่ไปตามพื้นผิวอาหาร แสดงดังภาพที่ 7 การสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์สามารถทำได้โดยการส่องกับจานอาหารโดยตรง โดยไม่ต้องทำการ fix เส้นใยหรือสามารถใช้เทคนิค slide culture ทำให้สามารถเห็นลักษณะของเส้นใย เส้นใยอากาศ สปอร์ ก้านชูสปอร์และถุงหุ้มสปอร์ได้อย่างชัดเจน ในส่วนของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) ก้านชูสปอร์นั้นไม่มีผนังกั้น ก้านชูสปอร์ที่พบอาจเป็นแบบเดี่ยวหรือแบบแตกแขนง บางครั้งอาจพบการพองตัวตรงส่วนฐานของก้านชูสปอร์และบริเวณส่วนปลายของของก้านชูจะพบถุงหุ้มสปอร์แสดงดังภาพที่ 8 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่างอุณหภูมิ 15-25 องศาเซลเซียส และมีความสามารถในการย่อยโคตินได้

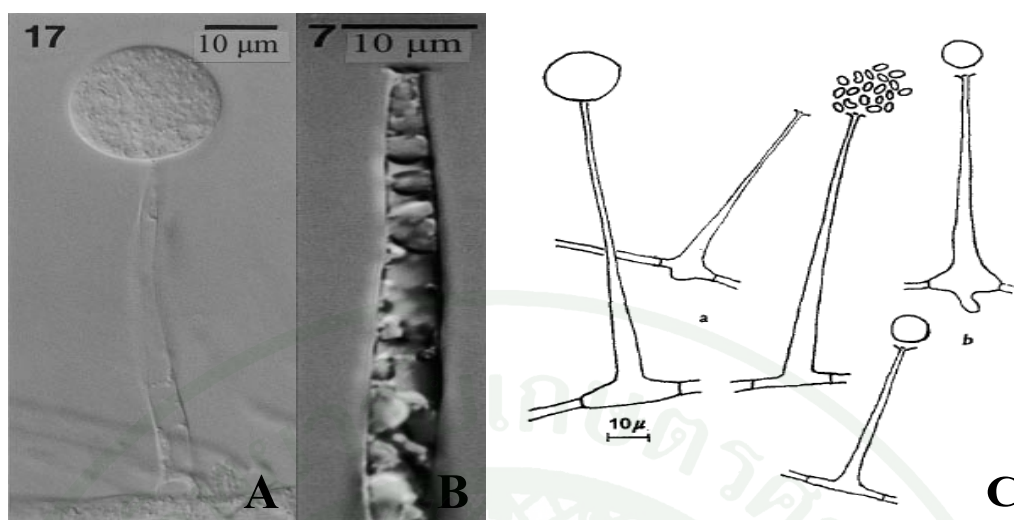


ภาพที่ 7 ลักษณะโคโลนีของราสกุล *Mortierella* บนอาหารแข็ง

A) *M. alpina* 1S-4 สมาชิกของ subgenus *Mortierella* ลักษณะโคโลนีคล้ายดอกกุหลาบ (rosette)

B) *M. isabellina* CBS 194.28 สมาชิกของ subgenus *Micromucor* ลักษณะโคโลนีราบเรียบแผ่เป็นวงกลม

ที่มา: Shimizu (2009)



ภาพที่ 8 ลักษณะสปอร์ ก้านชูสปอร์และถุงหุ้มสปอร์ของราสกุล *Mortierella*

- A) ก้านชูสปอร์และถุงหุ้มสปอร์ของ *M. hyalina*
 B) ก้านชูสปอร์ของ *M. hyalina* ที่ถุงหุ้มสปอร์หลุดออกไป
 C) สปอร์ ก้านชูสปอร์และถุงหุ้มสปอร์ของ *M. alpina*

ที่มา: A) และ B) Weber and Tribe (2003), C) Turner and Pugh (1961)

บทบาทและความสำคัญของราสกุล *Mortierella* ในการผลิตกรดไขมัน ARA

ราเส้นใยสกุล *Mortierella* ถูกพบว่ามีความสามารถในการผลิต ARA (Kendrick and Ratledge, 1992; Botha *et al.*, 1999) ซึ่งสอดคล้องกับที่มีรายงานว่าราชั้นต่ำในสกุล *Mortierella* สะสม ARA ในเปอร์เซ็นต์ที่สูงในส่วนของไขมันโดยรวม (Sajbidor *et al.*, 1990; Ward and Sign, 2005) ในปีค.ศ.1987 มีรายงานว่ารา *M. elongata* มีความสามารถในการผลิต ARA ได้สูงถึง 0.99 มิลลิกรัมต่อลิตร (22 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) (Yamada *et al.*, 1987) ราในสกุล *Mortierella* มีสอง subgenus คือ *Mortierella* และ *Micromucor* (Amano *et al.*, 1992) Higashiyama *et al.* (2002) กล่าวว่าไม่มีเพียง subgenus *Mortierella* ที่สามารถสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะที่มีคาร์บอน 20 อะตอมได้ ซึ่งกรดไขมันหนึ่งในนั้นคือ ARA ในขณะที่ subgenus *Micromucor* สังเคราะห์ได้เพียงกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะที่มีคาร์บอน 18 อะตอม Amano *et al.* (1992) รายงานว่าจากการศึกษาถึงองค์ประกอบของกรดไขมันที่ผลิตโดย subgenus *Mortierella* ทั้งหมด 50 สายพันธุ์ พบว่า *alpina* ผลิต ARA ได้สูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ว่า

M. alpina มีประสิทธิภาพในการผลิต ARA (Zhou, 2000) และสอดคล้องกับรายงานที่ว่า *M. alpina* มีปริมาณ ARA สะสมภายในเซลล์สูง (Bajpai *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1995; Ward, 1995; Higashiyama *et al.*, 1998,2002; Eroshin *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2006)

Eroshin *et al.* (1996) อธิบายถึงวิธีการในการคัดเลือก *Mortierella* โดยการใช้แอสไพริน เพื่อแยก *Mortierella* ที่สามารถผลิต ARA ออกจากสมาชิกอื่นของจีนัสนี้ที่ไม่สามารถผลิตกรดไขมันดังกล่าวได้

Carreiro and Koske (1992) กล่าวว่า การคัดแยกราที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส แทนการคัดแยกที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสนั้นพบว่าส่วนใหญ่แล้วเป็น *Mortierella* ที่อยู่ใน subgenus *Mortierella* ซึ่งจากรายงานหลายฉบับพบว่า subgenus ดังกล่าวสามารถผลิต 20:4 (ω6) หรือ ARA ได้ (Amano *et al.*, 1992) หลังจากนั้น 5 ปี Chen *et al.* (1997) ได้ทำการคัดแยกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิต ARA โดยใช้อุณหภูมิต่ำ โดยพบว่าส่วนใหญ่เป็น *M. alpina* เช่นเดียวกับ Botha *et al.* (1999) ที่ได้พัฒนาวิธีการคัดแยก *Mortierella* โดยทำการคัดแยกที่อุณหภูมิต่ำเช่นกัน โดยคัดแยกที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส พบว่าส่วนใหญ่เป็น *Mortierella* ใน subgenus *Mortierella* ซึ่งทั้งหมดมีความสามารถในการผลิต ARA

Shinmen *et al.* (1989) ทำการคัดแยก *Mortierella* จากดินซึ่งมีศักยภาพในการผลิต ARA ได้ในปริมาณที่สูง

Park *et al.* (1999) กล่าวว่า ใ้ว่ามีการศึกษาถึงผลของรูปร่างของเซลล์ต่อการผลิต ARA ของ *M. alpina* ซึ่งมีผลมาจากปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยง เช่น แห้งในโตรเจน ซึ่งจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและการผลิต ARA จากการสังเกตรูปร่างของเซลล์โดยสังเกตในส่วนของขนาด pellet, พื้นที่ของเส้นใย, อัตราส่วนของพื้นที่เส้นใยต่อพื้นที่ของแกนกลาง pellet และความขรุขระของเส้นใยโดยใช้ซอฟต์แวร์ทั่วไป

หลายสายพันธุ์ของราในสกุล *Mortierella* ที่พบว่าผลิต ARA ได้สูงภายใต้สภาวะในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม (Totani and Oba 1988; Shinmen *et al.*, 1989; Radwan, 1991) และมีการศึกษาถึงการผลิต ARA โดยการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง (Totani *et al.*, 1992; Certik and Shimizu, 1999)

Aki *et al.* (2001) ทำการคัดแยก *Mortierella* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิต ARA โดยทำการคัดแยกมาจากแหล่งน้ำจืด ซึ่งคัดแยกได้ทั้งหมดจำนวน 1000 ไอโซเลตจากนั้นนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Glucose Yeast extract (GY) พบว่ามีไอโซเลตที่สามารถผลิต ARA ได้สูงถึง 64 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด จากนั้นนำไปศึกษาทางสัณฐานวิทยาและสรุปว่าเป็น *M. alliacea*

การผลิต ARA ในระดับอุตสาหกรรมนั้นได้มีการพัฒนาผลผลิต ARA และลดระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงซึ่งมีผลต่อค่าใช้จ่ายในการผลิต โดยในส่วนของผลผลิต ARA ที่สูงนั้นเคยมีรายงานว่าสูงกว่า 10 กรัมต่อลิตร (Higashiyama *et al.*, 1998; Singh and Ward, 1997; Totani *et al.*, 1992) ซึ่งสนับสนุนว่า *M. alpina* มีศักยภาพสูงในการผลิต ARA

Higashiyama *et al.* (2002) กล่าวว่าไว้วามีรายงานหลายฉบับที่บ่งชี้ว่า *M. alpina* และผลิตภัณฑ์จากราดังกล่าวมีความปลอดภัย (Hempinus *et al.*, 1997; Koskelo *et al.*, 1997; Streekstra, 1997; Burn *et al.*, 1999)

Zhu *et al.* (2002) ทำการศึกษาการสกัดกรดไขมัน ARA จากราก *M. alpina* และศึกษาการเพิ่มการผลิตกรดไขมันดังกล่าว โดยทำการเลี้ยงราก *M. alpina* แล้วนำมาทำการสกัดไขมันพบว่า การสกัดไขมันจากเซลล์แห้งนั้นให้ผลผลิตไขมันสูงกว่าที่สกัดไขมันจากเซลล์เปียก นอกจากนี้ยังพบว่า urea inclusion เป็นเทคนิคที่ช่วยเพิ่มการผลิตกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว

Zhu *et al.* (2006) ทำการศึกษา *M. alpina* M6 พบว่าการผลิต ARA ได้ดี ซึ่งสายพันธุ์นี้ได้จากการคัดเลือกโดยใช้อุณหภูมิต่ำและทำการตรวจสอบขั้นต้นเพื่อดูปริมาณ ARA ของสายพันธุ์ดังกล่าวด้วยการย้อมสีโคโลนีด้วยสี triphenyltetrazolium chloride (Zhu *et al.*, 2004)

ในปีค.ศ.1997 Singh and Ward (1997) รายงานถึงการผลิต ARA ได้ในปริมาณที่สูงที่สุด โดยทำการเพาะเลี้ยง *M. alpina* ATCC 32222 ในอาหารที่ประกอบไปด้วยเป็ถั่วเหลือง น้ำมันพืช และโซเดียมไนเตรทและกลูโคส ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้ระบบ fed-batch พบว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสให้มวลชีวภาพและการผลิต ARA เท่ากับ 52.4 กรัมต่อลิตรและ 9.1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับและพบว่าที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสให้มวลชีวภาพไม่แตกต่างกันแต่สังเกตพบว่าผลผลิต ARA เพิ่มขึ้นถึง 11.1 กรัมต่อลิตรหลังจากทำการเพาะเลี้ยงไป 11 วัน

Kyle (1997) ใช้อาหารที่ประกอบไปด้วยกลูโคสและแป้งถั่วเหลืองหรือ yeast extract เพื่อเป็นอาหารสำหรับเลี้ยง *M. alpina* โดยทำการเพาะเลี้ยงในถังหมักที่มีการควบคุมพีเอชให้เป็น 5.5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ จนกระทั่งการเจริญอยู่ในระยะ exponential จากนั้นพีเอชจะเพิ่มสูงขึ้นจนถึง 6.8 โดยจะทำการควบคุมพีเอชให้อยู่ในช่วง 6.8-7.3 ด้วยการเติมกรด ซึ่งทำการควบคุมอุณหภูมิให้เท่ากับ 28 องศาเซลเซียสและความเข้มข้นของออกซิเจนมากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ หลังจากผ่านไป 144 ชั่วโมงพบว่าให้มวลชีวภาพเท่ากับ 34.5 กรัมต่อลิตร และมีน้ำมัน 36 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักโดยน้ำหนัก) หรือคิดเป็น 13 กรัมต่อลิตร ประกอบด้วย ARA 32.9 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้ำมันที่ได้นี้ไม่มี EPA และได้รับการพิจารณาแล้วว่าเหมาะต่อการใช้เป็นส่วนผสมในนมผง

Yuan *et al.* (2002) ทำการศึกษาการผลิต ARA ในรา *M. alpina* I₄₉ - N₁₈ โดยศึกษาในระดับฟลาस्कและถังหมักขนาด 50 ลิตร ซึ่งศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต เช่น อุณหภูมิ, พีเอช เริ่มต้น, ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง, แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน รวมถึงมีการเติมน้ำตาลลงไป ในช่วงของการหมัก พบว่าในสภาวะที่เหมาะสมราสามารถผลิต ARA ในระดับฟลาस्क และในถังหมัก 50 ลิตรเป็น 4.55 และ 5.11 กรัมต่อลิตรตามลำดับ โดยมีเปอร์เซ็นต์ ARA สูงที่สุดเป็น 70.20 เปอร์เซ็นต์ และ 53.01 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

Barclay (2003) อธิบายถึงกระบวนการสำหรับการผลิต ARA โดย *M. schumuckeri* ในอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคสและแป้งถั่วเหลืองหรือยีสต์สำหรับทำขนมปังที่สูญเสียความสามารถไป (inactive) พบว่าหลังจากผ่านไป 65.5 ชั่วโมง ให้มวลชีวภาพเท่ากับ 20-22 กรัมต่อลิตร และให้ ARA และความสามารถในการผลิตเท่ากับ 2.3 กรัมต่อลิตรและ 0.84 กรัมต่อลิตรต่อวันตามลำดับ

นักวิจัยหลายท่านสังเกตพบว่า *Mortierella* หลายสายพันธุ์ที่เซลล์มักจะเจริญเป็น pellet นั้นให้อัตราการเจริญและให้การผลิต ARA ไม่ดีเท่ากับเซลล์ที่เจริญเป็นเส้นใย (Bajpai *et al.*, 1991a, 1991b)

Higashiyama *et al.* (1998) ทำการเพาะเลี้ยง *M. alpina* 1S-4 ในถังหมักขนาด 50 ลิตร เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต ARA พบว่าในสภาวะดังกล่าวสามารถผลิต ARA ได้เท่ากับ 9.8 กรัมต่อลิตรเมื่อใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 7 วัน จากนั้นจึงทำการขยายขนาดการหมักโดยทำการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 10 กิโลลิตร (ขนาดถังหมักระดับอุตสาหกรรม) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมเป็นเวลา 8 วัน พบว่าสามารถผลิต ARA ได้ถึง 10.9 กรัมต่อลิตร

การผลิต ARA โดยการใช้ *M. alpina* เคยมีการศึกษาในระบบ batch และ fed-batch ในหลายขนาด ซึ่งให้ผลผลิต ARA ในช่วง 3-13 กรัมต่อลิตร (Li et al., 1995; Chen et al., 1997; Higashiyama et al., 1998, 2002; Eroshin et al., 2000) ซึ่งมีหลายปัจจัยที่มีผลต่อผลผลิต ARA เช่น รูปร่างของเซลล์ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน การเติมแร่ธาตุและความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลาย (Bajpai et al., 1991; Chen et al., 1997; Higashiyama et al., 1998, 1999, 2002; Park et al., 1999)

Zhu et al. (2003) กล่าวถึงวิธีการสำหรับการผลิต ARA โดยการเลี้ยง *M. alpina* ในอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคสหรือ soybean meal ที่ทำการสกัดไขมันออกไปและโซเดียมไนเตรท ซึ่งให้ผลผลิต ARA เท่ากับ 1.87 กรัมต่อลิตร (17.3 เปอร์เซ็นต์ของไขมันทั้งหมด) จากมวลชีวภาพ 31.2 กรัม ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน

จากการคัดแยก *M. alpina* สายพันธุ์ที่มีการผลิต ARA ในระดับที่สูง โดยการใช้การย้อมด้วย triphenyltetrazolium chloride (TTC) เข้ามาร่วมด้วย พบว่าเปอร์เซ็นต์ความเข้มของสีดังกล่าวแปรผันตรงกับปริมาณของ ARA ที่สะสมอยู่ในเส้นใย โดยพบสายพันธุ์ *M. alpina* M6 มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มของสีที่ย้อมสูงที่สุดและมี ARA สูงที่สุด (72.3 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งมีปริมาณสูงถึง 1.87 กรัม (Zhu et al., 2004)

Hwang et al. (2005) ทำการศึกษถึงการเพิ่มปริมาณการผลิต ARA ของรา *M. alpina* DSA-12 โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในระบบ batch และ fed-batch เพื่อทำการเปรียบเทียบผลผลิตที่ได้ ซึ่งการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบ fed-batch นั้น ทำการเลี้ยงในสองสภาวะที่แตกต่างกันเพื่อเปรียบเทียบปริมาณการผลิต ARA โดยที่ในการเพาะเลี้ยงแต่ละครั้งมีการให้กลูโคสในปริมาณที่แตกต่างกัน รวมถึงมีการควบคุมพีเอชของสภาวะในการเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันโดยใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 14 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรพบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อดังกล่าวในระบบ fed-batch ที่สภาวะที่มีการให้กลูโคสในแต่ละครั้งเป็น 32 กรัมต่อลิตร และใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 14 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรเป็นแหล่งไนโตรเจนและควบคุมพีเอชระหว่างที่ทำการเพาะเลี้ยงจะช่วยเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์เป็น 72.5 กรัมต่อลิตร, ความเข้มข้นไขมันรวมเป็น 45.8 กรัมต่อลิตร และมีการผลิต ARA เป็น 18.8 กรัมต่อลิตร หลังจากผ่านการเพาะเลี้ยงไป 12.5 วัน ซึ่งค่าดังกล่าวเป็นค่าที่สูงกว่าการเพาะเลี้ยงในแบบ batch

มีรายงานว่าความสามารถในการผลิต ARA นั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น รูปร่างของเซลล์ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน การเติมแร่ธาตุและความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลาย (Bajpai *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1997; Higashiyama *et al.*, 1998, 1999, 2002; Park *et al.*, 1999)

Stredanska and Sajbidor (1993) พบว่าคาร์บอนและไนโตรเจนมีอิทธิพลต่อการสะสมไขมัน และการผลิต ARA โดยทำการศึกษาในเชื้อรา *M. alpina* CCF 185 โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน บน rotary shaker พบว่าการใช้ กลูโคส, แป้ง และเด็กทริน เป็นแหล่งคาร์บอน จะจะมีการผลิตไขมันและ ARA ค่อนข้างสูง และยังพบว่าการผลิต ARA จะสูงที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีการเติม yeast extract หรือ โซเดียมไนเตรทลงไปเพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน นอกจากนี้ยังพบอีกว่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 40:1 ให้ผลผลิตดีที่สุด โดยใช้โซเดียมไนเตรทที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน

Streekstra (1997) กล่าวว่า *M. alpina* เป็นราที่สามารถพบได้ทั่วไปในดินซึ่งสายพันธุ์ดังกล่าวไม่ก่อให้เกิดโรคและไม่สร้างสปอร์ที่ก่อให้เกิดอาการแพ้ภายใต้สภาวะที่ทำการเพาะเลี้ยง เพื่อให้ได้ผลผลิต รวมถึงไม่พบการผลิต mycotoxin นอกจากนี้ยังพบอีกว่าเมื่อเลี้ยงสายพันธุ์ดังกล่าวบนอาหารแข็งพบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ ในขณะที่เมื่อทำการเลี้ยงในอาหารเหลว (เพื่อใช้ในการผลิต ARA) กลับไม่พบความสามารถดังกล่าว ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า *M. alpina* เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวนั้นเหมาะสำหรับการผลิต ARA เพื่อนำไปเป็นส่วนผสมในอาหาร

ปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์กรดไขมัน ARA

กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่ได้จากจุลินทรีย์นั้นจะมีคุณภาพทางด้านองค์ประกอบและปริมาณของกรดไขมันดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น สายพันธุ์และอายุของจุลินทรีย์ สภาวะแวดล้อมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง เช่น องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน) ค่าพีเอช อุณหภูมิ ระยะเวลาที่ใช้ในการบ่ม รวมถึงการให้อากาศ (Kawashima *et al.*, 2000; Kavadia *et al.*, 2001; Sandra and Narine, 2005)

1. องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (nutrient composition)

1.1 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

Jang *et al.* (2005) รายงานว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *M. alpina* ATCC 32222 ในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) เช่น กลูโคส กาแล็กโทส โมเลกุลคู่ (disaccharide) ได้แก่ มอลโทส คาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ เช่น แป้ง (soluble starch) และ กลีเซอรอล พบว่า ที่ 10 เปอร์เซ็นต์ soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด สำหรับการผลิต ARA และพบว่าแป้งและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีสำหรับการเจริญของเซลล์ และการผลิต ARA ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Chen and Chang (1994) ที่ทำการศึกษาใน *M. alpina* CBS 210.32 และ Shinmen *et al.* (1989) ที่ทำการศึกษาใน *M. alpina* IS-4 และสอดคล้องกับรายงานของ Yamada *et al.* (1987) เช่นกันที่พบว่ากลูโคสจะสนับสนุนการเจริญและการผลิต ARA ใน *M. elongata* เมื่อศึกษาถึงผลของความเข้มข้นของกลูโคส Jang *et al.* (2005) รายงานว่าเมื่อใช้ กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าจะมีน้ำหนักเซลล์แห้ง การผลิต ARA สูงที่สุดที่ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับ Yuan *et al.* (2002) ที่ได้ทำการศึกษาใน *M. alpina* I₄₉-N₁₈ และจะลดลง เมื่อความเข้มข้นของกลูโคสสูงกว่า 8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับ Sajbidor *et al.* (1990) ที่ได้ ทำการศึกษาการผลิต ARA ในรา *Mortierella* sp. S-17 โดยกล่าวว่าความเข้มข้นของกลูโคสใน ระดับที่สูงขึ้นจะมีผลไปยับยั้งการเจริญและการเก็บสะสมของไขมันในเส้นใยและสอดคล้องกับ Totani *et al.* (1992) เช่นกันที่ได้รายงานว่าความเข้มข้นกลูโคสที่สูงกว่า 20 เปอร์เซ็นต์จะยับยั้งการ เจริญของ *M. alpina* นอกจากนี้ยังพบว่าที่ความเข้มข้นกลูโคสระดับสูงนั้นจะชักนำให้เซลล์มีรูปร่าง เป็นเส้นใย แต่ในการศึกษาใน *M. alpina* ATCC 16266 และ *M. alpina* ATCC 32222 กลับพบว่าจะ ให้น้ำหนักเซลล์แห้งและการผลิต ARA สูงที่กลูโคส 10 เปอร์เซ็นต์ (Bajpai *et al.*, 1991a, 1991b) สอดคล้องกับ Zhu *et al.* (2003) ซึ่งให้ผลที่แตกต่างกับรายงานของ Yuan *et al.* (2002) ที่กล่าวว่า น้ำหนักเซลล์แห้งและการผลิต ARA จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสสูงกว่า 8 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Koike *et al.* (2001) ได้รายงานไว้ว่าองค์ประกอบของกรดไขมันจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความ เข้มข้นของกลูโคสจาก 2-12 เปอร์เซ็นต์ โดยศึกษาใน *M. alpina* CBS 754.68 แต่องค์ประกอบและ ปริมาณของ ARA กลับลดลง

Aki *et al.* (2001) ทำการศึกษาการผลิต ARA ในรา *M. alliacea* YN-15 โดยทำการ เเพาะเลี้ยงในอาหาร 25 ลิตรที่มีกลูโคส 12 เปอร์เซ็นต์, yeast extract 3 เปอร์เซ็นต์ซึ่งได้น้ำหนักแห้ง 46.1 กรัมต่อลิตร, ไขมันรวม 19.5 กรัมต่อลิตร และ ARA 7.1 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด

5 ลิตร การใช้ soluble starch ของร่าดังกล่าวจะถูกกระตุ้นโดยการเติมกรดไขมันโอเลอิก, น้ำมันถั่วเหลือง, แอมโมเนียมซัลเฟต หรือ โปแทสเซียมฟอสเฟต ลงไปใน starch-based medium นอกจากนี้ยังพบอีกว่าถ้าใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนหลักใน pre-pilot scale จะช่วยเพิ่มการผลิต ARA ได้เป็น 5 กรัมต่อลิตร

1.2 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

Ratlidge (1989) เสนอว่าในสภาวะที่มีปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่สูงและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่ต่ำจะช่วยเพิ่มการเก็บสะสมของไขมัน และ Ratlidge (2004) เสนอว่าการสะสมของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในจุลินทรีย์นั้นจะขึ้นกับการมีแหล่งคาร์บอนในอาหารที่มากเกินไป แต่มีปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่จำกัด ดังนั้นเมื่อจุลินทรีย์มีการเจริญ แหล่งไนโตรเจนที่มีอยู่จึงหมดไปอย่างรวดเร็ว แต่จุลินทรีย์จะใช้แหล่งคาร์บอนต่อไป (ซึ่งส่วนมากมักจะเป็นกลูโคสหรือคาร์โบไฮเดรตกลุ่มอื่นๆ) จึงเกิดเป็นช่องทางในการสังเคราะห์กรดไขมัน triacylglycerols ที่ขับออกนอกเซลล์ในรูปของหยดไขมัน (oil droplet)

ในปีค.ศ.2002 มีรายงานว่ากลูตามัทช่วยเพิ่มการผลิต ARA แต่ไม่พบว่ากลูตามัทช่วยสนับสนุนการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะชนิดอื่นๆ ใน *M. alpina* โดยเมื่อทำการเพาะเลี้ยงร่าดังกล่าวเป็นเวลา 7 วันพบว่าให้มวลเซลล์และการผลิต ARA เท่ากับ 25 กรัมต่อลิตรและ 1.4 กรัมต่อลิตรตามลำดับ (Lan *et al.*, 2002) ในปีถัดมา Yu *et al.* (2003) ได้พัฒนาการผลิต ARA ใน โดยศึกษาถึงผลของความเข้มข้นของกลูตามัทที่มีผลต่อการผลิต ARA ใน *M. alpina* ทำการศึกษาในระดับฟลasks พบว่ากลูตามัทช่วยสนับสนุนการเจริญของ *Mortierella* ช่วยเร่ง metabolism ของ สารตั้งต้นและช่วยเพิ่มการผลิต ARA โดยไปกระตุ้นที่ Pentose Phosphate Pathway (PPP) ซึ่งความเข้มข้นของกลูตามัท 0.8 กรัมต่อลิตรให้การผลิต ARA ที่สูงที่สุดเท่ากับ 1.41 กรัมต่อลิตร และเมื่อศึกษาในถังหมักแบบอากาศลอยตัวขนาด 10 ลิตรพบว่ากลูตามัทความเข้มข้น 0.8 กรัมต่อลิตรนั้นให้การผลิต ARA เท่ากับ 0.93 กรัมต่อลิตรซึ่งสูงกว่าเมื่อเทียบกับการไม่เติมกลูตามัทซึ่งให้การผลิต ARA เท่ากับ 0.56 กรัมต่อลิตร

Jang *et al.* (2005) รายงานว่า เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการใช้แหล่งไนโตรเจนที่มีไนเตรทเป็นองค์ประกอบ เช่น โปแทสเซียมไนเตรท, โซเดียมไนเตรท, แอมโมเนียมไนเตรท และแหล่งไนโตรเจนที่ไม่มีไนเตรทเป็นองค์ประกอบ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรีย โดยทำการศึกษาใน *M. alpina* ATCC 32222 พบว่าที่มีไนเตรทเป็นองค์ประกอบจะมีการเจริญของเซลล์

การผลิต ARA ในระดับที่สูงกว่าที่ไม่มีในเตรทเป็นองค์ประกอบมาก และเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเฉพาะที่มีในเตรทเป็นองค์ประกอบพบว่าโปแทสเซียมในเตรทมีการผลิตมวลเซลล์ การผลิต ARA สูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับ Chang and Chen (1994) ที่บ่งชี้ว่า โปแทสเซียมในเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดสำหรับการผลิต ARA ใน *M. alpina* CBS 210.32 จากนั้น Jang *et al.* (2005) จึงทำการเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนที่มีการผสมกันของโปแทสเซียมในเตรท และ yeast extract ในอัตราส่วนที่แตกต่างกันพบว่าอัตราส่วนระหว่างโปแทสเซียมในเตรท และ yeast extract ที่ 2:1 มีการผลิต ARA สูงที่สุด และได้กล่าวว่าการผสมโปแทสเซียมในเตรท และ yeast extract เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนจะช่วยกระตุ้นการเจริญของเซลล์และการผลิต ARA โดย yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่สนับสนุนการเจริญของเซลล์แต่ไม่ได้สนับสนุนต่อการผลิต ARA แต่ Yuan *et al.* (2002) กลับพบว่า yeast extract มีประสิทธิภาพในการเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยให้การผลิต ARA สูงที่สุด เมื่อศึกษาใน *M. alpina* I₄₉-N₁₈

Park *et al.* (1999) ทำการศึกษาถึงแหล่งไนโตรเจนที่หลากหลายซึ่งใช้สำหรับการเลี้ยง *M. alpina* CBS 754.68 เช่น yeast extract, soybean meal, corn steep liquor, Pharmamedia (Pharmamedia เป็นชื่อทางการค้าของแป้งชนิดหนึ่ง ซึ่งได้จาก embryo ของเมล็ดฝ้าย ลักษณะเป็นผงละเอียด สีเหลือง โดยองค์ประกอบพื้นฐานของ Pharmamedia คือ non hydrolyzed globular protein), fish meal และ gluten meal พบว่าแหล่งไนโตรเจนดังกล่าวมีผลต่อการผลิต ARA และมีผลต่อรูปร่างของเส้นใย โดยเมื่อใช้ yeast extract, gluten meal หรือ corn steep liquor พบว่าเส้นใยมีรูปร่างเป็น pellet ผิวเรียบ (pellet กลม) เมื่อใช้ soybean meal, Pharmamedia หรือ fish meal เส้นใยมีรูปร่างเป็น pellet ที่ขอบไม่เรียบยื่นออกไปเป็นรัศมีรอบๆ pellet ซึ่ง pellet แบบดังกล่าวเหมาะสมต่อการผลิต ARA มากกว่า pellet แบบกลม มีรายงานว่า yeast extract 1 เปอร์เซ็นต์เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิต ARA และ yeast extract ที่เติมลงไปจะไปสนับสนุนการเจริญของเซลล์ (Bajpai and Bajpai, 1992)

Hwang *et al.* (2005) พัฒนาการผลิต ARA โดยการเลี้ยง *M. alpina* ในระบบ fed-batch ซึ่งใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนและควบคุมพีเอช ซึ่งจากการศึกษาดังกล่าวสนับสนุนว่าการร่วมกันระหว่างการให้กลูโคสและให้ NH₄⁺ ในระหว่างการเพาะเลี้ยงนั้นช่วยสนับสนุนการเจริญของ *M. alpina* ซึ่งสามารถนำไปปรับใช้สำหรับการผลิต ARA ในระดับอุตสาหกรรม

Totani *et al.* (1992) ใช้เพปโทนและรำข้าวของข้าวสาลีในการเลี้ยง *M. alpina* โดยพบว่าให้การผลิต ARA ในระดับสูงถึง 10 กรัมต่อลิตร และพบว่าอาหารที่ประกอบด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต โซเดียมไนเตรท แอมโมเนียมอะซิเตทหรือแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนนั้นให้มวลชีวภาพค่อนข้างต่ำ

1.3 อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน

Sajbidor *et al.* (1990) ทำการศึกษาการผลิต ARA ในรา *Mortierella* sp. S-17 โดยทำการศึกษาถึงอิทธิพลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิต ARA ซึ่งทำการเลี้ยงรา *Mortierella* sp. S-17 ในอาหาร semi synthetic medium ที่มีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่แตกต่างกัน และพบว่าราดังกล่าวมีการเก็บสะสม ARA ในระดับที่สูงในอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ค่อนข้างกว้าง การผลิต ARA เพิ่มขึ้นเรื่อยๆเมื่ออัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเพิ่มขึ้นจนถึง 20 ซึ่งพบว่าการผลิต ARA จะมีการผลิตได้สูงที่สุดเมื่ออัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 10 โดยผลผลิตที่ได้เป็น 12.7 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

Koike *et al.* (2001) รายงานว่าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต ARA จะอยู่ที่ 15-20 ซึ่งทำการศึกษาใน *M. alpina* CBC 754.68 และพบว่าเมื่ออัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงกว่า 20 จะส่งผลให้น้ำหนักเส้นใยและการผลิต ARA ลดลงซึ่งมีผลมาจากการมีแหล่งไนโตรเจนที่จำกัด และได้สรุปว่าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนมีความสำคัญของการผลิต ARA โดยรูปร่าง pellet ไม่ได้มีผลต่อการผลิต ARA เมื่ออัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนน้อยกว่า 20 แต่เมื่อปริมาณ pellet มีจำนวนตั้งแต่ 20 มิลลิกรัมต่อลิตรขึ้นไปจึงจะมีผลต่อการผลิต ARA โดยเมื่อเพาะเลี้ยงผ่านไป 10 วันที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสพบว่าให้มวลเซลล์และการผลิต ARA ในช่วง 30-40 กรัมต่อลิตร และ 2-3.5 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

มีการศึกษาพบว่าที่อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต PUFA's ใน *M. alpina* ATCC 32222 อยู่ในช่วงจาก 5.1-9.0 ซึ่งที่ 5.2 จะมีการผลิต ARA สูงที่สุด ส่วนที่ 9.0 มีการเจริญของเซลล์สูงที่สุด (Jang *et al.*, 2005)

1.4 การเติมน้ำมันลงไปในการเลี้ยงเชื้อ

Shinmen *et al.* (1989) ป่งชี้ว่าการเติมน้ำมันมะกอก (olive oil) และน้ำมันถั่วเหลือง (soybean oil) ลงไปในการเลี้ยงเชื้อจะช่วยเพิ่มการสะสมของ ARA

Jang *et al.* (2005) รายงานว่าในการเลี้ยงเชื้อที่มีการเติม 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของน้ำมันเมล็ดป่าน (linseed oil) จะช่วยเพิ่มการผลิต PUFAs โดยการศึกษาใน *M. alpina* ATCC 32222 และยังมีรายงานอีกว่าการเติม 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำมันจะช่วยเพิ่มการผลิตมวลเซลล์ และน้ำมันจากเมล็ดป่านจะให้การผลิตมวลเซลล์สูงสุด ซึ่งในกรณีของการผลิต PUFAs พบว่าการเติมด้วยน้ำมันจากเมล็ดป่านจะให้การผลิต ARA ในระดับที่สูง การผลิต EPA จะสูงเมื่อเติมด้วยน้ำมันเมล็ดป่านเช่นกัน ส่วน DHA จะมีผลิตได้สูงเมื่อเติมด้วยน้ำมันดอกทานตะวัน (sunflower oil)

1.5 การเติมแร่ธาตุ

Totani *et al.* (2000) ทำการศึกษาความต้องการแร่ธาตุในการเลี้ยง *M. alpina* โดยพบว่าฟอสฟอรัส โพแทสเซียม เหล็กและแมงกานีสจำเป็นต่อการเจริญ ส่วนเหล็กและแมงกานีสนั้นมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์ไขมัน ซึ่งหากเติมเพียงแคเหล็กหรือแมงกานีสอย่างเดียวนั้นอาจให้ผลการผลิตไขมันไม่ดีเท่าที่ควร

ในปีค.ศ.1992 มีการศึกษาถึงอิทธิพลของแคลเซียม แมกนีเซียม แมงกานีสและเหล็กที่มีผลต่อ *Mortierella* sp. ในการผลิต ARA พบว่าความเข้มข้นของแมงกานีสที่ต่ำทำให้ผลต่อการผลิต ARA แต่เมื่อความเข้มข้นสูงนั้นจะส่งผลให้การสะสมของไขมันไม่ดีเท่าที่ควร (Sajbidor *et al.*, 1992)

Kyle (1996) พบว่าการเติมเหล็ก สังกะสี และทองแดง ช่วยกระตุ้นการผลิต ARA ใน *M. alpina* และการเติมฟอสฟอรัสลงไปในอาหารสำหรับเลี้ยงให้ผลดี คือ เอนไซม์ acetyl-CoA carboxylase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้สำหรับเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน acetyl-CoA ไปเป็น malonyl-CoA ซึ่งต้องการโคแฟกเตอร์เพื่อมาเป็น cofactor (Guchhait *et al.*, 1974) ซึ่งแร่ธาตุที่เติมลงไปเพื่อเป็น cofactor ของระบบเอนไซม์ดังกล่าวนี้จะช่วยเร่งปฏิกิริยาให้กับลำดับขั้นต้นๆของการสังเคราะห์กรดไขมัน

Higashiyama et al. (1998) ทำการศึกษาผลของการเติมแร่ธาตุที่มีต่อรูปร่างเส้นใย และการผลิต ARA ของ *M. alpina* โดยทำการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 50 ลิตร ซึ่งอาหาร ประกอบด้วยแป้งถั่วเหลือง กลูโคส ร่วมกับ KH_2PO_4 , Na_2SO_4 , CaCl_2 และ MgCl_2 พบว่าเหมาะสม ต่อการผลิต ARA โดยให้การผลิต ARA ถึง 9.8 กรัมต่อลิตรหลังจากเพาะเลี้ยงไป 7 วัน พบว่าเส้นใย ส่วนใหญ่มีรูปร่างเป็น pellet (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร) อย่างไรก็ตามในกรณีของการ เติมเพียง KH_2PO_4 เส้นใยส่วนใหญ่มีรูปร่างเป็นเส้นสาย ซึ่งลักษณะเช่นนี้จะทำให้เกิดความหนืด เพิ่มขึ้นถึง 2240 cp ส่งผลให้ต้องเพิ่มอัตราเร็วในการกวนมากขึ้น เพื่อรักษาการซึมผ่านของ ออกซิเจน อย่างไรก็ตามสิ่งนี้อาจเป็นสาเหตุให้เส้นใยถูกทำลายจาก shear stress ซึ่งจะมีผลต่อการ ผลิต ARA และเมื่ออาหารประกอบด้วย Na_2SO_4 , CaCl_2 และ MgCl_2 เส้นใยส่วนใหญ่มีรูปร่างเป็น pellet ขนาดใหญ่ (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-4 มิลลิเมตร) pellet ขนาดใหญ่จะจำกัดการส่งผ่าน ของสารต่างๆเพื่อที่จะซึมผ่านเข้าไปยังผนังของ pellet อาจเป็นสาเหตุให้การผลิต ARA ลดต่ำลง

2. อุณหภูมิ

Bajpai et al. (1991b); Bajpai and Bajpai (1992) บ่งชี้ว่าการผลิตมวลเซลล์ และการ ผลิต ARA ของ *M. alpina* ATCC 32222 จะลดลงเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเปลี่ยนจาก 25 องศา เซลเซียสไปเป็น 28 องศาเซลเซียส และการผลิต EPA สามารถพบได้เฉพาะที่อุณหภูมิในการบ่มที่ 10 องศาเซลเซียส ถึง 15 องศาเซลเซียส

Jang et al. (2005) ทำการศึกษาถึงผลของอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยเพาะเลี้ยง *M. alpina* ATCC 32222 ในช่วงอุณหภูมิที่แตกต่างกันตั้งแต่ 12 องศาเซลเซียส ถึง 28 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียสมีการผลิต ARA และ total PUFAs สูงที่สุด นอกจากนี้ยังพบอีก ว่าที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสให้น้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight) สูงที่สุด

Yuan et al. (2002) ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิต ARA ใน *M. alpina* I₄₉-N₁₈ โดยทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 10, 15, 20, 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส ซึ่งพบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนั้นให้การเจริญที่ดี แต่อย่างไรก็ตามที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสให้การผลิต ARA ที่ สูงที่สุด ซึ่งบ่งชี้ว่าที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสะสมของ ARA

3. ฟีเอช

ในปีค.ศ.1991 Bajpai *et al.* (1991) ทำการศึกษาผลของฟีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการผลิตมวลเซลล์และการผลิต ARA ใน *M. alpina* ATCC 16266 โดยมีการปรับฟีเอชของอาหารให้อยู่ในช่วง 3.8 ถึง 8.0 ซึ่งพบว่า *M. alpina* ผลิตมวลเซลล์ เปอร์เซ็นต์ความไม่อิ่มตัวของไขมัน และผลิต ARA ได้สูงที่สุดที่ฟีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0

Leman and Brakoniecka-Sikorska (1996) ทำการศึกษาถึงผลของฟีเอชต่อการผลิตกรดไขมันที่อิ่มตัวและไม่อิ่มตัวแบบพันธะเดี่ยวของ *M. ramanniana* var. *angulispora* IFO 8187 ซึ่งมีการปรับฟีเอชที่หลากหลาย พบว่าปริมาณกรดไขมันที่อิ่มตัวและไม่อิ่มตัวแบบพันธะเดี่ยวมีแนวโน้มที่จะลดลงเมื่อค่าฟีเอชเพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่องค์ประกอบของ PUFAs มีแนวโน้มที่จะสูงขึ้นเมื่อเพิ่มค่าฟีเอช

Yuan *et al.* (2002) ทำการศึกษาผลของฟีเอชเริ่มต้นที่มีต่อการผลิต ARA ใน *M. alpina* I₄₉-N₁₈ โดยทำการศึกษาที่ฟีเอชเริ่มต้นจาก 4.0 ถึง 10.0 พบว่าที่ฟีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 นั้นให้มวลเซลล์และการผลิตไขมันสูงที่สุด อย่างไรก็ตาม ARA ในไขมันและในอาหารกลับสูงที่สุดที่ฟีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.5

4. ระยะเวลาที่ใช้ในการบ่ม

Yuan *et al.* (2002) ทำการศึกษาถึงผลของระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มต่อการผลิตมวลเซลล์และการผลิต ARA ใน *M. alpina* I₄₉-N₁₈ ในระดับฟลาस्कโดยทำการเพาะเลี้ยงราดังกล่าวเป็นเวลาทั้งหมด 13 วัน พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงที่สุดคือที่ระยะเวลา 6 วัน ซึ่งระยะเวลาดังกล่าวให้มวลเซลล์และการผลิต ARA สูงที่สุด

5. การให้อากาศ

Kendrick and Ratledge (1992) รายงานว่าค่าการละลายของออกซิเจน (DO) ที่ 2-3 ฟีฟิเอมมีผลต่อการผลิต PUFAs

Nakahara *et al.* (1992); Du preez *et al.* (1997); Hansson *et al.* (1989); Totani *et al.* (1992); Emelyanova (1997) มีความพยายามที่จะจำกัดค่า DO และควบคุมอัตราการให้อากาศ

Linberg and Molin (1993); Shimizu (1991) รายงานว่ามีความเป็นไปได้ในการเพิ่มค่า DO โดยใช้การหมักที่อุณหภูมิต่ำ แต่เทคนิคนี้มีข้อจำกัดเนื่องจากอุณหภูมิมีผลต่อองค์ประกอบของกรดไขมัน

จากการศึกษาผลของปริมาณก๊าซออกซิเจนที่ละลาย (DO) ที่มีต่อรูปร่างของราและการผลิต ARA ในรา *M. alpina* 1S-4 ที่เลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าความเข้มข้นของค่า DO ที่เหมาะสมอยู่ที่ 10-15 พีพีเอ็ม ซึ่งจะช่วยกระตุ้นการผลิต AA กว่า 6 เท่า เมื่อเทียบกับค่า DO ที่ 7 พีพีเอ็ม และพบอีกว่าการผลิต ARA ให้ผลไม่แตกต่างกันในวิธีให้ออกซิเจนแบบ oxygen-enrichment (OE) และวิธี pressurization (PR) (Higashiyama *et al.*, 1998)

จุลินทรีย์ที่สังเคราะห์กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวหลายพันธะโดยใช้วิถี aerobic ต้องการออกซิเจนในการทำให้เกิดพันธะคู่ในสายคาร์บอน (desaturation) ของกรดไขมัน การให้อากาศอย่างเพียงพอมีผลทำให้การสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะเพิ่มขึ้น (ธัญวัฒน์, 2545)

2.4 อาหารเหลว SB (soybean protein)

เป็นอาหารที่ใช้สำหรับเตรียมกล้าเชื้อ ประกอบด้วยกลูโคส 50 กรัม, soy protein 4.5 กรัม, โปแทสเซียมไนเตรท 3 กรัม, ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 4 กรัม, แคลเซียมคลอไรด์ 0.05 กรัม และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัม เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร และปรับพีเอชเป็น 5.5

2.5 อาหารเหลว SI (soy isolate) ที่มีกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์

เป็นอาหารที่ใช้สำหรับการเลี้ยงเชื้อ ประกอบด้วยกลูโคส 60 กรัม, soy isolate 8.4 กรัม, แอมโมเนียมซัลเฟต 3 กรัม, ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 4 กรัม, แคลเซียมคลอไรด์ 0.05 กรัม และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัม เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร และปรับพีเอชเป็น 5.5

3. สารเคมี

- 3.1 กรดไขมันมาตรฐาน (Sigma, Co., Ltd.) (ภาคผนวก ก)
- 3.2 คลอแรมฟินิคอล (chloramphenicol)
- 3.3 คลอโรฟอร์ม (chloroform)
- 3.4 เมทานอล (methanol)
- 3.5 ปีโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether)
- 3.6 กรดซัลฟิวริก (sulfuric acid)
- 3.7 เฮกเซน (hexane)
- 3.8 เอทานอล (ethanol or ethyl alcohol)
- 3.9 เอทิดียมโบรไมด์ (ethidiumbromide)
- 3.10 ไตรฟีนิลเตตราโซเลียมคลอไรด์ (triphenyltetrazolium chloride)
- 3.11 บอเรท (borate)
- 3.12 กรดบอริก (boric acid)
- 3.13 Nile red (9-diethylamino-5H-benzo[a]phenoxazine-5-one)

4. เครื่องมือ

4.1 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Olympus, Japan)

4.2 เครื่องแก้ว เช่น ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร, Petri dish, หลอดทดลองขนาด 25 x 20 เซนติเมตร, Teflon coated screw cap test tube ขนาด 16 x 100 มิลลิเมตร, ปิเปตต์แก้ว, พลาสเจอร์ปิเปตต์ (Pasteur pipette), หลอดทดลองรูปตัวแอล (Pyrex, USA)

4.3 เครื่องเขย่า (Rotary shaker Innova 2000, New Brunswick Scientific, New Jersey, USA)

4.4 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Temperature gradient incubator Model TN-3, Toyo, Kagaku Sangyo Co., LTD., Tokyo, Japan)

4.5 เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง (Satorius AG Göttingen Model LC621S, Germany)

4.6 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Satorious, USA)

4.7 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Labofuge 200, Hereaus, Germany)

4.8 เครื่องปั่นเหวี่ยงสำหรับ microcentrifuge tube (Spectrafuge 16M Labnet)

4.9 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงช่วงคลื่นยูวี (UV-visible Spectrophotometer, UV-PharmaSpec 1700, Shimizu, Japan)

4.10 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter ORION Model SA520, USA)

4.11 ชุดกรอง (membrane filter) และเยื่อกรอง (nitrocellulose membrane filter, Whatman)

4.12 ตู้ดูดความชื้น (Desiccator)

- 4.13 ตู้บ่มเชื้อ (low temperature incubator, Precission 815, USA)
- 4.14 ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Incubator shaker, TAITEC Bio-Shaker BR-300 LF, Japan)
- 4.15 ตู้อบแห้ง (Hot air oven, Memmert, Germany)
- 4.16 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave, TOMY SS-325, TOMY SEIKO CO., LTD, Japan)
- 4.17 เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแบบแคปิลลารี Capillary (GC-14B, Shimadzu, Japan)
- 4.18 อิเล็กโตรโฟเรซิส (Submarine type electrophoresis system Mupid[®]-ex, Advance Co., LTD, Japan)
- 4.19 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)(Waters, Massachusetts, USA)
- 4.20 โซโมจิไนเซอร์ (IKA[®] T10 basic ultra-turrax, Japan)
- 4.21 Magnetic bar และ magnetic stirrer (Framo[®] Gerätetechnik D-7821, France)
- 4.22 ไมโครปิเปตต์ (pipetman, Gilson, France)
- 4.23 Vortex mixer (Vortexgenie 2TM Model 6-560E, Genie Scientific Industries, INC., USA)

วิธีการ

1. การแยกและคัดเลือกราสกุล *Mortierella* จากดินที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมัน ARA

1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณระหว่างทางไปอุทยานแห่งชาติ รวมถึงภายในอุทยานแห่งชาติทางภาคเหนือของประเทศไทย โดยทำการเก็บดินลึกจากผิวดินประมาณ 3-5 เซนติเมตร เก็บตัวอย่างประมาณ 100 – 200 กรัมในถุงพลาสติก

1.2 การแยก *Mortierella* sp. จากตัวอย่างดิน

ทำการแยก *Mortierella* จากตัวอย่างดินโดยใช้เทคนิคการเจือจางดินแล้วทำการเกลี่ยบนอาหารวุ้น PDA ที่มีกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ผสมสารปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล 200 พีพีเอ็ม บ่มจานอาหารที่อุณหภูมิ 4 และ 10 องศาเซลเซียสประมาณ 2-3 สัปดาห์ นำจานอาหารดังกล่าวมาบ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณหนึ่งสัปดาห์ เมื่อโคโลนี *Mortierella* เริ่มปรากฏ นำโคโลนีที่เจริญบนอาหารวุ้น PDA มาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 10 เท่า และทำการแยกเชื้อโดยใช้เทคนิค sub culture และ re-subculture จนได้เชื้อบริสุทธิ์

Mortierella บริสุทธิ์ที่แยกได้ถูกนำมาเก็บรักษานบนอาหารวุ้นเยือก PDA ที่มีกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถูกปิดทับด้วยพาราฟินเหลวและเก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือเก็บในดินที่อุณหภูมิห้อง, 4 และ 10 องศาเซลเซียส (ภาคผนวก ข)

1.3 การคัดเลือก *Mortierella* ที่สามารถผลิตกรดไขมัน ARA

1.3.1 การคัดเลือกรุ่นปฐมภูมิ (primary screening)

ถ่ายราจาก stock culture ลงบนอาหารวุ้น PDA ที่มีกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน จากนั้นทำการขูดเส้นใยเพื่อนำไปเข้าสู่กระบวนการของการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน

1.3.2 การคัดเลือกรุ่นทุติยภูมิ (Secondary screening)

ถ่ายราจาก stock culture (ไอโซเลทที่ได้จากการคัดเลือกรุ่นปฐมภูมิ ซึ่งมีปริมาณองค์ประกอบของกรดไขมัน ARA สูงกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด) ลงบนอาหารวุ้น PDA ที่มีกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว PDB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยทำการบ่มเชื้อในตู้บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน แล้วจึงทำการเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันเพื่อคัดเลือกไอโซเลทที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมัน ARA ที่สูงที่สุดเพื่อทำการทดสอบขั้นต่อไป

2. การศึกษาพื้นฐานวิทยาของราที่คัดเลือก

ทำการศึกษาพื้นฐานวิทยาของราที่คัดเลือกได้ เช่น ลักษณะโคโลนี ได้แก่ สี ขนาด รูปร่าง รวมถึงศึกษาลักษณะโครงสร้างของเซลล์และสปอร์แบบมีเพศ รวมทั้งตำแหน่งของสปอร์แบบมีเพศเพื่อประกอบการจัดจำแนกและทำการย้อมโคโลนีด้วยสี Triphenyltetrazolium chloride (TTC) (ภาคผนวก ก) เพื่อศึกษาเบื้องต้นว่าเส้นใยมีการสะสมไขมันมากหรือน้อย รวมถึงย้อมเส้นใยด้วยสี Nile red ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์เพื่อตรวจดูไขมันที่สะสมอยู่ภายในเส้นใยของราดังกล่าว

การย้อมสี Triphenyltetrazolium chloride (TTC)

เริ่มจากการนำโคโลนี *Mortierella* ที่เจริญบนอาหารวุ้น PDA อายุประมาณ 9 วันมาย้อมด้วยสี TTC จากนั้นนำไปบ่มภายใต้สภาวะมืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 คืน แล้วจึงนำมาศึกษาเบื้องต้นว่าเส้นใยมีการสะสมไขมันมากหรือน้อย

การย้อมสีเม็ดไขมันด้วยสี Nile red (9-diethylamino-5H-benzo[a]phenoxazine-5-one)

ทำการเตรียมสารละลาย Nile red ซึ่งมีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการนำไปละลายในเอทานอล เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสโดยไม่ให้โดนแสง ในส่วนของการย้อมสีดังกล่าวทำดังนี้คือ หยด cell suspension ของจุลินทรีย์ลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด จากนั้นหยดสี Nile red ที่เตรียมไว้ลงไปอีก 1 หยด ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์แล้วจึงนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์เพื่อตรวจดูการเรืองแสงของเม็ดไขมันซึ่งสะสมอยู่ภายในเซลล์

3. การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 18S rRNA และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ

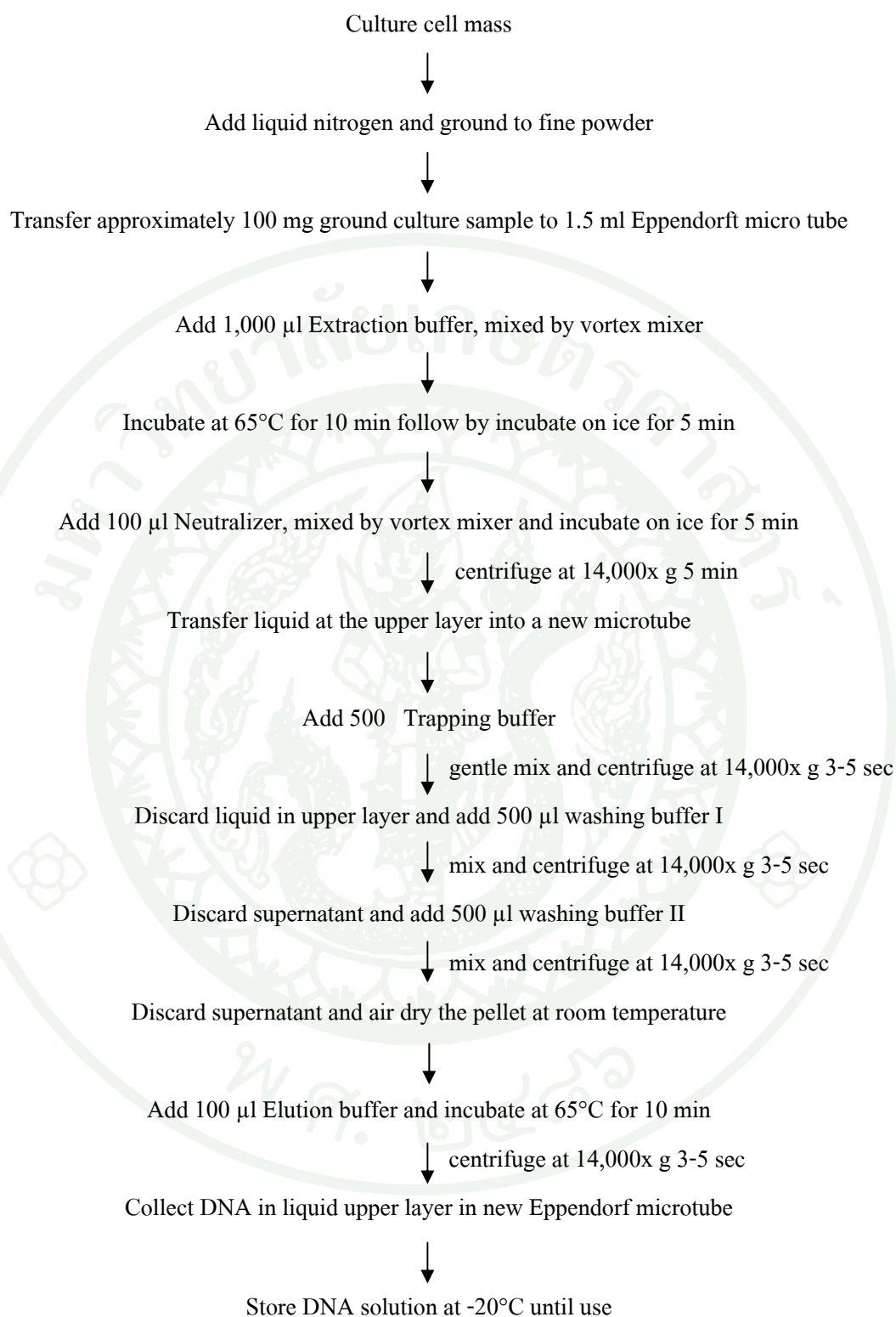
ศึกษาลำดับเบสของยีน 18S rRNA เพื่อใช้ในการจำแนกโดยการเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม Clustal W และสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA Version 4.0 (Tamura *et al.*, 2007)

3.1 การเตรียมตัวอย่าง

เลี้ยง *Mortierella* sp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ในอาหารเหลวภายใต้สภาวะที่เหมาะสมเป็นเวลา 7 วัน ทำให้เซลล์แตกโดยการบดในโกร่งที่ฆ่าเชื้อแล้วโดยใช้ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) ซึ่งช่วยทำให้เซลล์มีลักษณะเปราะและสามารถบดเป็นผง (powdered) ได้ง่าย

3.2 การสกัดดีเอ็นเอ

นำเซลล์ที่บดละเอียดจากข้อ 3.1 ประมาณ 100 มิลลิกรัมใส่ลงใน Eppendorf microtube ขนาด 1.5 มิลลิตร แล้วสกัดดีเอ็นเอด้วย DNA Trap (DNA TEC kits, DNA technology Laboratory) โดยการเติม Extraction buffer ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำหลอดออกจากตู้ปั่นวางบนน้ำแข็ง นาน 5 นาทีแล้วเติม Neutralizer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer นำไปวางบนน้ำแข็งต่อ 5 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000x g นาน 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นใช้ micropipette ดึงของเหลวใสส่วนบนใส่ลงใน Eppendorf microtube หลอดใหม่ เติม Trapping buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าหลอดเบาๆ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000x g นาน 3-5 วินาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติม Washing buffer I ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000x g นาน 3-5 วินาที เทส่วนใสทิ้ง เติม Washing buffer II ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000x g นาน 3-5 วินาที เทส่วนใสทิ้ง เปิดฝาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าของเหลวจะระเหยออกจากตะกอนจนหมดแล้วจึงเติม Elution buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที (เพื่อให้ดีเอ็นเอละลายออกมา) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000x g นาน 3-5 วินาที ดึงส่วนใสที่เป็นดีเอ็นเอใส่ Eppendorf microtube หลอดใหม่ เก็บรักษาดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 9 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ DNA Trap (DNA TEC kits, DNA technology Laboratory)

3.3 การเพิ่มปริมาณยีนโดยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอของ *Mortierella* sp. ที่สกัดได้จากชั้นต้น มาเพิ่มปริมาณยีนบริเวณ 18S rRNA โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ NS1 (5' GTAGTCATATGCTTGTCTC 3') และ NS8 (5' TCCGCAGGTTACCTACGGA 3') (White *et al.*, 1990) ซึ่งสารเคมีในปฏิกิริยาหรือ PCR reaction mixture ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

PCR reaction mixture	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
2 μ M ของ deoxy nucleoside triphosphate mix (dNTPs 4 ชนิด ได้แก่ dATP, dTTP, dCTP และ dGTP)	1.0
10x Taq buffer	1.0
25 mM MgCl ₂	0.8
5 μ M ของ NS1 primer	0.5
5 μ M ของ NS8 primer	0.5
5 unit Taq polymerase enzyme (Fermentas)	0.1
Deionized water	4.1
DNA template (~ 50-200 นาโนกรัม)	2.0
รวม	10.0

สภาวะในการทำพีซีอาร์ด้วยเครื่อง PCR (Gene Amp[®] PCR System 9700) เริ่มต้นจาก denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วยขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ จำนวน 20 รอบ ดังนี้ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที และ final extension ต่อที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที (Abe *et al.*, 2005)

3.4 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

คัดสารละลายดีเอ็นเอปริมาณ 2 ไมโครลิตรผสมกับ loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร (อัตราส่วน 1:1) หยดลงหลุมอะกาโรสเจล 1.2 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE (ภาคผนวก ข) โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 35 นาที ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นานประมาณ 10-15 นาที และล้างเอธิเดียมโบรไมด์ด้วยน้ำเปล่าเป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

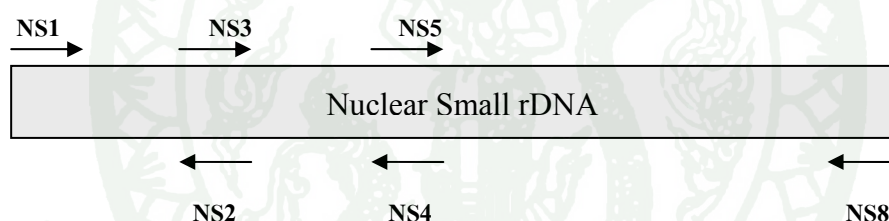
3.5 การทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์และการหาลำดับเบส

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด purified ดีเอ็นเอสำเร็จรูป NucleoSpin[®] Extract I และ II (Macherey-Nagel-04/2004/revo1) โดยผสม NT buffer เข้ากับผลิตภัณฑ์ PCR ในอัตราส่วน 2:1 จากนั้นนำคอลัมน์ NucleoSpin[®] สวมลงบนหลอด collecting tube ที่มีปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมตัวอย่างลงในหลอด NucleoSpin[®] แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000g เป็นเวลา 1 นาที ค้างคอลัมน์ NucleoSpin[®] ออก เทของเหลวที่ตกลงมายัง collecting tube ไป แล้วสวมหลอดทั้งสองไว้ดังเดิม จากนั้นชะคอลัมน์ด้วย NT3 buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000g เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวที่ผ่านการกรองทิ้ง สวมหลอดทั้งสองไว้ดังเดิม จากนั้นทำให้คอลัมน์แห้ง โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000g เป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงเท NT3 buffer ออก โดยระวังไม่ให้คอลัมน์สัมผัสกับ buffer แล้วจึงชะดีเอ็นเอโดยการย้ายเอาคอลัมน์ NucleoSpin[®] ไปไว้ในหลอดไมโครพิวซ์ที่ปลอดเชื้อ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม NE buffer สำหรับชะ ปริมาตร 15-50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000g เป็นเวลา 1 นาที เก็บส่วนใสที่ได้ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ PCR ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว เพื่อส่งหาลำดับเบสตามวิธีการมาตรฐานของ MacroGen Advancing through Genomics (MacroGen Inc.) ประเทศเกาหลีด้วยไพร์เมอร์ 6 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มจำนวนชิ้น ribosomal RNA

Primer name	Primer sequence	Direction	Mw	Product Size (bp)	Tm (°C)
NS1	5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3'	Forward	5781.8	555	56
NS2	5'-GGCTGCTGGCACCAGACTTGC-3'	Reverse	6417.2		68
NS3	5'-GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC-3'	Forward	6426.2	597	68
NS4	5'-CTTCCGTCAATTCCTTTAAG-3'	Reverse	6017.0		56
NS5	5'-AACTTAAAGGAATTGACGGAAG-3'	Forward	6835.4	687	57
NS8	5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3'	Reverse	6074.0		65

ที่มา: White *et al.* (1990)



ภาพที่ 10 ตำแหน่งของไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ในการทำ PCR

ที่มา: White *et al.* (1990)

3.6 การบ่งชี้สายพันธุ์ *Mortierella* sp. จากลำดับเบสของ 18S rRNA บางส่วนและการสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม CLUSTAL W และ MEGA version 4.0

ลำดับเบสที่ได้รับในรูปของ ABI format นำมาเปิดด้วยโปรแกรม CHROMAS เพื่ออ่านโครมาโตแกรมที่ได้ ตรวจสอบความถูกต้องและความสัมพันธ์กันของตำแหน่งยอดกราฟกับตัวอักษรลำดับเบสที่ได้ ตัดส่วนต้นและปลายของลำดับเบสที่ไม่ชัดเจนออกจนเหลือเพียงส่วนที่น่าเชื่อถือของลำดับเบส นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ Genbank โดยใช้ BLASTn program และ alignment

สร้าง phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม MEGA Version 4.0 ด้วยวิธี neighbour-joining โดยเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของเบสบนสายดีเอ็นเอในช่วงยีน 18S rRNA กับสายพันธุ์อ้างอิงทั้ง 16 สายพันธุ์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information, USA (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (แสดงดังตารางที่ 4) โดย *Saccharomyces cerevisiae* AB526221 ถูกใช้เป็น outgroup เลือกโมเดล Kimura II parameter ในการคำนวณ

ตารางที่ 4 ข้อมูลลำดับเบสของยีน 18S rRNA ของสายพันธุ์อ้างอิงทั้ง 16 สายพันธุ์ใน division Eumycota จาก GenBank database

Organisms	GenBank accession number
<i>Basidiobolus haptosporus</i>	AF368504
<i>Basidiobolus microspores</i>	AF368505
<i>Dissophora decumbens</i>	AF157133
<i>Echinosporangium transversal</i>	AF113424
<i>Endogone lactiflua</i>	DQ536471
<i>Endogone pisiformis</i>	DQ322628
<i>Mortierella alpina</i>	AJ271630
<i>Mortierella chlamydospora</i>	AF157143
<i>Mortierella indohii</i>	EU688965
<i>Mortierella minutissima</i>	EU736293
<i>Mortierella multidivariata</i>	AF157144
<i>Mortierella parvispora</i>	AY129549
<i>Mortierella polycephala</i>	X89436
<i>Mortierella verticillata</i>	AB016017
<i>Mortierella wolfii</i>	AF113425
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AB526221

4. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมัน ARA (Optimization of medium composition)

นำ *Mortierella* sp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกมาศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต ARA โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว soy isolate ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตรที่ประกอบด้วยกลูโคส 6 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.3 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับ soy isolate 0.84 เปอร์เซ็นต์ ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.4 เปอร์เซ็นต์ แคลเซียมคลอไรด์ 0.005 เปอร์เซ็นต์และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นสูตรอาหารพื้นฐาน (basal medium) เพาะเลี้ยงในตู้บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็ว 120 รอบต่อนาที จำนวน 3 ขั้ว เป็นเวลา 7 วัน วิเคราะห์การเจริญ วิเคราะห์น้ำตาล และองค์ประกอบของกรดไขมัน ตามวิธีการข้อ 6

4.1 อิทธิพลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน (Effect of carbon sources and carbon concentration)

4.1.1 อิทธิพลของชนิดของแหล่งคาร์บอน

การศึกษาถึงชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมนั้นใช้อาหารที่มีแหล่งคาร์บอน 5 ชนิด คือ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ได้แก่ กลูโคสและฟรุคโทส น้ำตาลโมเลกุลคู่ คือ ซูโครส คาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ คือ กลูโคสไซรัป และกลีเซอรอล เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเป็นสูตรอาหารมาตรฐานที่ใช้กลูโคส เพื่อหาแหล่งของคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบต่อไป

4.1.2 อิทธิพลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 4.1.1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 2, 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อหาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบต่อไป

4.2 อิทธิพลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน (Effect of nitrogen sources and nitrogen concentration)

4.2.1 อิทธิพลของชนิดของแหล่งไนโตรเจน

การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมโดยใช้อาหารเหลวที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนจากข้อ 4.1.1 และ ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนจากข้อ 4.1.2 ตามลำดับ โดยใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ ยูเรีย, โพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3), แอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, corn-steep liquor, peptone, yeast extract, โมโนโซเดียมกลูตาเมต (monosodium glutamate, MSG) และ skim milk รวม 8 แหล่ง เปรียบเทียบกับสูตรอาหารมาตรฐานซึ่งใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นโพแทสเซียมไนเตรท 0.3 เปอร์เซ็นต์ เพื่อหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบขั้นต่อไป

4.3 อิทธิพลของอัตราส่วนแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน

เมื่อได้แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 4.2.1 แล้ว จึงทำการศึกษาถึงอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมโดยแหล่งคาร์บอน คือ กลูโคส 6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะคงกลูโคสที่ความเข้มข้นดังกล่าวไว้แต่ทำการปรับอัตราส่วนของแหล่งไนโตรเจนให้แตกต่างกัน ซึ่งมีอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 10:1, 25:1, 30:1, 40:1, 50:1 และ 60:1 ส่วนในชุดควบคุมมีอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 17:1 (สูตรอาหารที่ประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจน 2 ชนิดคือ soybean protein 0.45 เปอร์เซ็นต์และโพแทสเซียมไนเตรท 0.3 เปอร์เซ็นต์) เพื่อหาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

5. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมัน ARA (optimization of culture condition)

นำ *Mortierella* sp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้มาทำการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมัน ARA โดยในทุกการทดสอบนั้นใช้อาหารเหลว soy isolate ที่มีกลูโคส 6 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงในตู้บ่มแบบเขย่าอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที

เป็นเวลา 7 วัน (จำนวน 3 ซ้ำ) เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์การเจริญ วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล และองค์ประกอบของกรดไขมันตามวิธีการในข้อ 6

5.1 อิทธิพลของระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (Effect of incubation period)

เพาะเลี้ยง *Mortierella* sp. ในอาหารเหลว soy isolate ที่มีกลูโคส 6 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร จำนวน 12 พลาสติก บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที และเก็บตัวอย่างในวันที่ 7, 8, 9 และ 10 วัน วิเคราะห์การเจริญ องค์ประกอบของกรดไขมันและปริมาณน้ำตาล ตามวิธีการในข้อ 6 สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและปริมาณ ARA (เปอร์เซ็นต์) เพื่อหาระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

5.2 อิทธิพลของอุณหภูมิ (Effect of temperature)

ปรับอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงในช่วงตั้งแต่ 10-34 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่องควบคุมอุณหภูมิหรือ temperature gradient incubator (Model TN-3, Yokyo Kagaku Sangyo CO., LTD. Tokyo Japan) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ คือ เริ่มจากเพาะเลี้ยง *Mortierella* ในอาหารเหลว soy protein ที่มีกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ (starter culture) สำหรับทำ inoculum จากนั้นนำ inoculum ดังกล่าวมาวัดค่าความขุ่นของเซลล์โดยการวัดค่า OD₆₀₀ เพื่อคำนวณหาปริมาตรกล้าเชื้อที่ต้องใช้เพื่อให้เซลล์เริ่มต้นมีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 1 แล้วจึงทำการถ่ายกล้าเชื้อจุลินทรีย์ลงในอาหารเหลว soy isolate ที่มีกลูโคส 6 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตรซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดรูปตัวแอล เพาะเลี้ยง *Mortierella* sp. ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิโดยควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 10-34 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยอัตราขึ้นลง 35 ครั้งต่อนาทีเป็นเวลา 7 วัน แล้วทำการวิเคราะห์การเจริญ วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลและองค์ประกอบของกรดไขมัน ตามวิธีการในข้อ 6

5.3 อิทธิพลของการปรับพีเอชเริ่มต้น (Effect of initial pH)

ปรับพีเอชเริ่มต้นของการอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงให้เป็น 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 โดยใช้เครื่อง pH meter (Orion, model SA 520, USA) ในการวัดพีเอชทำการปรับพีเอชด้วยสารละลาย 1 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือ 1 N ไฮโดรคลอริก

5.4 อิทธิพลของอัตราการให้อากาศ (Effect of aeration rates)

ปรับอัตราการให้อากาศโดยการปรับปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อภายในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร จากเดิมที่ใช้อาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร (อัตราส่วนปริมาตรอาหารต่อปริมาตรของภาชนะคิดเป็น 1:5) ให้เป็น 50, 75, 125, 150, 175 และ 200 มิลลิลิตร ซึ่งจะทำให้อัตราส่วนของอาหารต่อภาชนะคิดเป็น 1:10, 3:20, 5:20, 3:10, 7:20 และ 2:5 ตามลำดับ

6. การวิเคราะห์ข้อมูลในการหมัก

6.1 การวิเคราะห์การเจริญ

6.1.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (Cell dry weight)

ชั่งน้ำหนักเริ่มต้นของแผ่นเยื่อกรอง (nitrocellulose membrane filter, Whatman®) ที่มีขนาด 0.8 ไมโครเมตร นำไปกรองเซลล์จุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยทำการบีบอัดมาปริมาตร 5 มิลลิลิตรเพื่อทำการกรอง โดยต่อชุดกรองเข้ากับเครื่องปั๊มสุญญากาศเพื่อช่วยในการดึงน้ำออกให้เหลือเพียงเซลล์จุลินทรีย์ติดค้างบนแผ่นเยื่อกรอง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร 2 ครั้งแล้วจึงนำแผ่นเยื่อกรองไปลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ อบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (น้ำหนักคงที่) แล้วนำไปใส่ใน desiccator เพื่อให้ปราศจากความชื้นก่อนนำไปชั่งหาน้ำหนักสุดท้าย นำค่าที่ได้คำนวณตามสูตรที่ (1)

$$\text{สูตรที่ (1)} \quad \text{Dry weight (DW)} = (W_f - W_i) \times 1000/V$$

$$\begin{aligned} \text{โดย } DW &= \text{น้ำหนักเซลล์แห้งหน่วยกรัมต่อลิตร} \\ W_i &= \text{น้ำหนักเริ่มต้นซึ่งเป็นน้ำหนักรวมของแผ่นเยื่อกรองและจานอาหารเลี้ยงเชื้อ} \\ W_f &= \text{น้ำหนักสุดท้ายซึ่งเป็นน้ำหนักรวมของแผ่นเยื่อกรอง, จานอาหารเลี้ยงเชื้อ และเซลล์จุลินทรีย์ หน่วยกรัม} \\ V &= \text{ปริมาตรของตัวอย่างที่กรอง หน่วยมิลลิลิตร} \end{aligned}$$

หมายเหตุ ปริมาณเซลล์ที่ได้จะเท่ากับกรัมของน้ำหนักแห้งต่อปริมาตรอาหาร 1 ลิตร

6.1.2 การหามวลชีวภาพโดยวิธีวัดค่าความขุ่น (Cell optical density)

วิธีการนี้เป็นวิธีที่ใช้ในการวัดความเจริญของเซลล์ทางอ้อมโดยการวัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (UV-visible Spectrophotometer, UV-PharmaSpec 1700, Shimizu, Japan) โดยใช้ cuvette ที่มีขนาด (light path) กว้าง 1 เซนติเมตร โดยใช้น้ำกลั่นในการตั้งค่า blank นำตัวอย่างน้ำเลี้ยงจุลินทรีย์มาวัดค่าความขุ่น โดยจะต้องทำการเจือจางตัวอย่างให้เหมาะสมด้วยน้ำกลั่นเพื่อให้ค่าความขุ่นไม่เกิน 1.0 ซึ่งเป็นค่าที่เชื่อถือได้

6.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน

การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันทำได้โดยการสกัดไขมันจากจุลินทรีย์โดยใช้วิธีการซึ่งปรับปรุงมาจากวิธีการของ Bligh and Dyer (1959) ดังภาพที่ 11 เริ่มจากการเตรียมตัวอย่าง โดยป้อนอาหารเลี้ยงเชื้อราปริมาณ 2 มิลลิลิตร บรรจุในหลอดเทฟลอนฝาเกลียวขนาด 16x100 มิลลิเมตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงเทส่วนใสทิ้งลงเหลือไว้เพียงเซลล์ที่ต้องการ จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงไป ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer เป็นเวลา 15 วินาที แล้วจึงเข้าสู่ขั้นตอนของการสกัดไขมัน โดยในขั้นนี้เป็นการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ขั้นต้นด้วยการเติม chloroform:methanol (1:2) 3.75 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที แล้วเติม chloroform ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติมกรดไขมันมาตรฐานที่ใช้เป็นสาร internal standard คือ Pentadecanoic acid (15:0) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 15 วินาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,300 รอบต่อนาที เพื่อให้เกิดการแยกชั้นของสารละลายระหว่างน้ำและ chloroform จากนั้นเก็บสารละลายชั้นล่างซึ่งเป็นชั้น chloroform ลงในหลอดเทฟลอนฝาเกลียวหลอดใหม่ เพื่อเข้าสู่ขั้นตอนของการเปลี่ยนรูปของกรดไขมันดังกล่าวให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ของ methyl ester (derivatization) ด้วยกระบวนการ transmethylation ตามวิธีการของ Holub and Skeaff (1987) ดังภาพที่ 12 ซึ่งในขั้นนี้เป็นการนำเอาไขมันที่ละลายในชั้น chloroform ซึ่งบรรจุในหลอดเทฟลอนฝาเกลียวมาระเหยแห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศ จากนั้นทำการ transesterification โดยการเติม 6 เปอร์เซนต์ sulfuric acid ใน methanol ลงไปปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที และนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง เมื่อครบเวลากำหนดนำหลอดทดลองเทฟลอนฝาเกลียวดังกล่าวมาทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงเติม petroleum ether ลงไปปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสม

ให้เข้ากันนาน 1 นาที แล้วจึงเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที เพื่อเป็นการล้างกรด เก็บส่วนของกรดไขมันซึ่งละลายอยู่ภายในชั้นของ petroleum ether (ชั้นบน) ลงในหลอดเทฟลอนฝาเกลียวหลอดใหม่ จากนั้นนำไปประเหยจนแห้งภายใต้สุญญากาศ แล้วจึงละลายกรดไขมันที่อยู่ในรูปอนุพันธ์ของ methyl ester ด้วย hexane ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแบบคาปิลลารี (capillary gas chromatography; GC-14B, Shimadzu, Japan) ที่มีการบันทึกข้อมูลด้วยเครื่องบันทึกผล integrator (C-R6A Chromatopac, Shimadzu) ประกอบกับบริเวณที่ฉีดมี split injector และใช้ระบบตรวจแบบ flame ionization detector (FID) คอลัมน์ที่ใช้เป็นชนิดคาปิลลารีที่ทำด้วย fused silica megabore column ความยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 0.540 มิลลิเมตร ที่เคลือบภายในด้วยฟิล์มหนา 1 ไมโครเมตร ซึ่งประกอบด้วยสาร cyanopropyl 25 เปอร์เซ็นต์ phenyl 25 เปอร์เซ็นต์ methylsiloxane 50 เปอร์เซ็นต์ (Durabond 225, J&W Scientific, CA, USA) อุณหภูมิคอลัมน์ที่ใช้งานเท่ากับ 210 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของ injector และ detector เท่ากับ 250 องศาเซลเซียส ปริมาตรตัวอย่างที่ฉีดคือ 1 ไมโครลิตร และอัตราการแบ่งตัวอย่าง (split rates) เท่ากับ 100:1 ใช้แก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สพา (carrier gas) และปรับอัตราการไหลของแก๊สเท่ากับ 40 มิลลิลิตรต่อนาที การวิเคราะห์เชิงปริมาณจะใช้การวิเคราะห์แบบเดิมสาร internal standard (pentadecanoic acid, 15:0) แล้วทำการคำนวณเปรียบเทียบเวลาคงตัว (retention time) ของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของรากับเวลาคงตัวของกรดไขมันมาตรฐานชนิดต่างๆ เพื่อการระบุชนิดของกรดไขมัน ซึ่งรายงานผลออกมาในรูปของเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด ซึ่งกรดไขมันทั้งหมดคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์

1. Sample preparation

Culture sample 2 ml in teflon coated screw cap test tube (16x100)

↓ centrifuge at 3,300 rpm, 15 min
cell pellet

↓ Add 0.5 ml distill water

↓ mix 15 sec

Cell suspension

↓ Extract lipids

2. Lipid extraction

Cell suspension+chloroform:methanol (1:2) 3.75 ml

↓ mix 1 min

Add 1.25 ml chloroform

↓ mix 1 min

Add 100 µl internal standard (15:0)

Add distilled water 1.25 ml

↓ mix 15 sec

centrifuge at 3,300 rpm, 15 min

↓ Phase separation

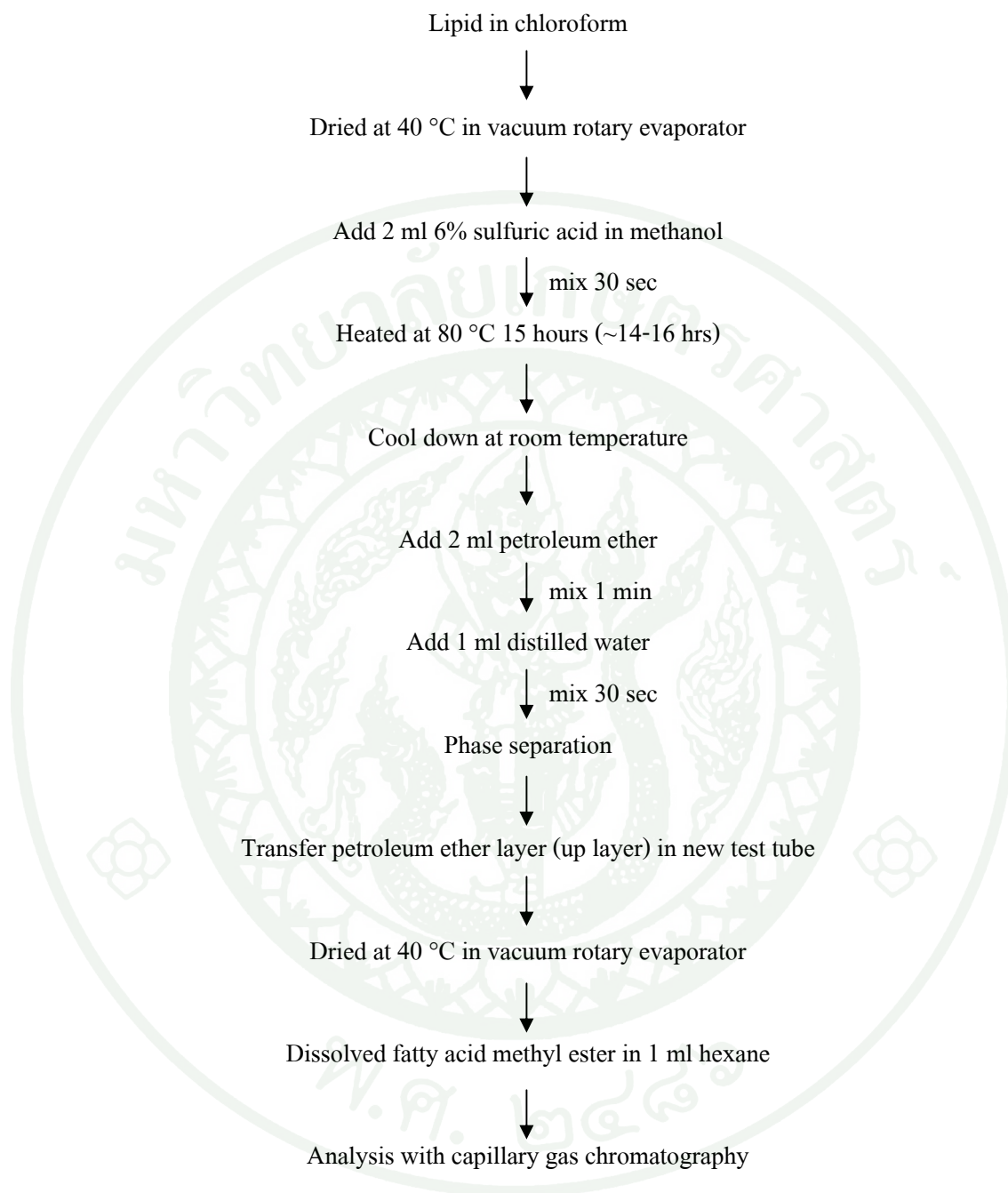
↓ Transfer chloroform layer in new test tube

↓ Lipid in chloroform

ภาพที่ 11 การสกัดไขมันโดยวิธีการดัดแปลงของ Bligh and Dyer (1959)

ที่มา: Yongmanitchai and Ward (1989)

3. Transmethylation of fatty acids



ภาพที่ 12 ขั้นตอน transmethylation กรดไขมันตามวิธีการของ Holub and Skeaff (1987)

ที่มา: Yongmanitchai and Ward (1989)

6.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล

กรองน้ำเลี้ยงเซลล์ด้วยคลັບกรองขนาด 13 มิลลิเมตรที่มีขนาดของรู 0.2 ไมโครเมตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) (Waters, Massachusetts, USA) ซึ่งมีน้ำเป็น mobile phase ผ่านคอลัมน์ (Sugar column, Shodex, Shoko, Co., Ltd.) ด้วยอัตรา 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิคอลัมน์ 80 องศาเซลเซียส และตรวจวัดปริมาณด้วย Refractive Index detector

สถานที่และระยะเวลาทำการทดลอง

1. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร
2. ทำการวิจัยตั้งแต่เดือนเมษายน 2549 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2553

ผลและวิจารณ์

1. การแยกและคัดเลือก *Mortierella* จากดินที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมัน ARA

1.1 การเก็บตัวอย่าง

เมื่อศึกษาดินที่เก็บมาจากทางภาคเหนือทั้งหมด 5 จุด แสดงข้อมูลดังตารางที่ 5 รวมทั้งสิ้น 26 ตัวอย่าง คือ จุด A (5 ตัวอย่าง) จุด B (4 ตัวอย่าง) จุด C (5 ตัวอย่าง) จุด D (3 ตัวอย่าง) และจุด E (9 ตัวอย่าง) พบว่าดินแต่ละจุดมีลักษณะที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งลักษณะทางกายภาพของแหล่งตัวอย่างดินและไอโซเลทที่เก็บ แสดงดังตารางที่ 6

ตารางที่ 5 ข้อมูลตัวอย่างดินที่เก็บมาจากภาคเหนือทั้ง 5 จุด

จุดเก็บ ตัวอย่าง	สถานที่ เก็บตัวอย่าง	พิกัด GPS	ระดับความสูง จากน้ำทะเล
จุด A	บ้านน้ำไคร้ อ.ท่าวังผา	N 19°08'07.6"	NE 307.44 m
	จ.น่าน	E 100°44'21.9"	
จุด B	ป่า อ.แม่จัน จ.เชียงราย	N 20°07'04.6"	N 372.71 m
		E 099°52'13.0"	
จุด C	โครงการหลวงดอยอ่างขาง	N 19°54'12.1"	N 340.72 m
	อ. ฝาง จ. เชียงใหม่	E 099°01'50.7"	
จุด D	ดินในแปลงทดลองผัก	N 19°54'12.1"	N 340.72 m
	โครงการหลวง ดอยอ่างขาง	E 099°01'50.7"	
	อ. ฝาง จ. เชียงใหม่		
จุด E	ป่า อ.ฝาง จ.เชียงใหม่	No data	No data

ตารางที่ 6 ลักษณะทางกายภาพของแหล่งตัวอย่างดินและไอโซเลทที่เก็บ

จุดเก็บ ตัวอย่าง	ตัวอย่าง	ลักษณะของดิน	ไอโซเลท
จุด A	A-1	ดินสีน้ำตาลอ่อน เนื้อดินแห้ง และบางจุดดินมีการจับตัวกัน เป็นก้อนแข็ง	WA-90, 91
	A-2	ดินสีน้ำตาลอ่อน เนื้อดินแห้ง และบางจุดดินมีการจับตัวกัน เป็นก้อนแข็ง	-
	A-3	ดินสีน้ำตาลอ่อน บางจุดมีสี เทาปนเล็กน้อย เนื้อดินแห้ง และบางจุดดินมีการจับตัวกัน เป็นก้อนแข็ง	WA-98
	A-4	ดินสีน้ำตาลอ่อน เนื้อดินแห้ง และบางจุดดินมีการจับตัวกัน เป็นก้อนแข็ง	-
	A-5	ดินสีน้ำตาลอ่อน เนื้อดินแห้ง แข็ง ส่วนใหญ่เกาะกลุ่มกัน เป็นก้อน มีเศษไม้เล็กน้อย	-
จุด B	B-1	ดินสีน้ำตาลอ่อน เนื้อดินแห้ง บางจุดเกาะกันเป็นก้อน	WA-2, 3, 4, 5, 6, 8
	B-2	ดินสีน้ำตาลอ่อน เนื้อดินแห้ง มีเศษหินปะปนและบางจุดดิน มีการจับตัวกันเป็นก้อนแข็ง	WA-10, 12, 13, 14, 15, 16
	B-3	ดินสีน้ำตาลอ่อน เนื้อดินแห้ง มีรากพืชปะปนเล็กน้อยและ บางจุดดินมีการจับตัวกันเป็น ก้อนแข็ง	WA-17, 18, 19, 20

ตารางที่ 6 (ต่อ)

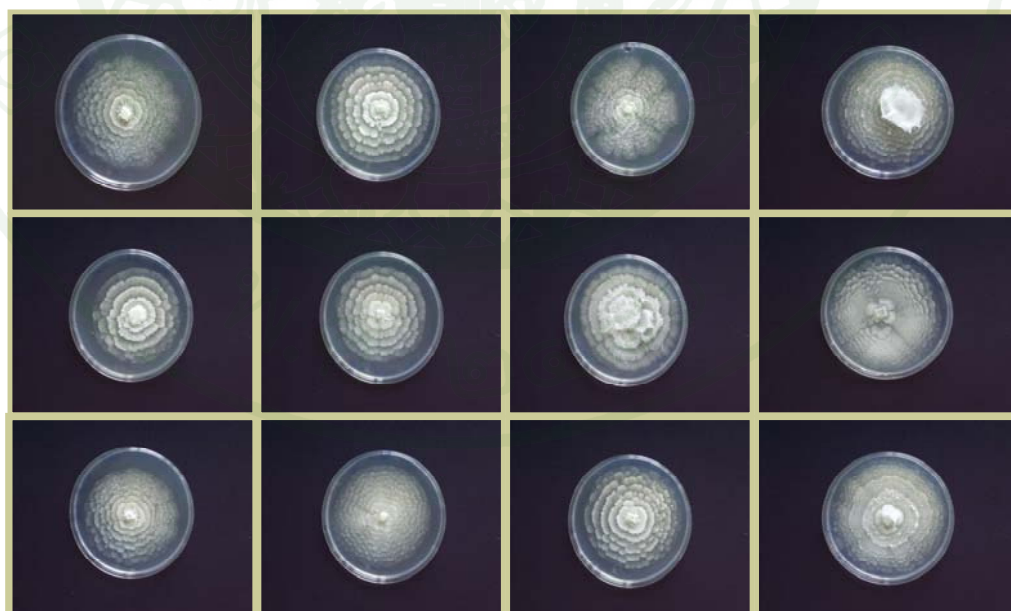
จุดเก็บ ตัวอย่าง	ตัวอย่าง	ลักษณะของดิน	ไอโซเลท
จุด B	B-4	ดินสีน้ำตาลอ่อน เนื้อดินแห้ง แข็ง ส่วนใหญ่เกาะกลุ่มกัน เป็นก้อน	WA-21, 22
จุด C	C-1	ดินสีน้ำตาล เนื้อดินแห้ง บาง จุดพบดินจับตัวเป็นก้อน มี เศษไม้ปนบ้าง	WA-1, 9, 11, 26, 29, 31, 65, 66, 37, 40, 46
	C-2	ดินสีน้ำตาลอ่อน เนื้อดินแห้ง และแข็ง มีเศษหินปะปน	WA-23, 64, 68, 69, 75, 85, 93, 116, 138
	C-3	ดินสีน้ำตาลปนแดงเล็กน้อย เนื้อดินแห้ง บางจุดพบการ เกาะกลุ่มของดินเป็นก้อน	WA-24, 25, 27, 28, 30, 32
	C-4	ดินสีน้ำตาลอ่อน เนื้อดินแห้ง ส่วนใหญ่เกาะกลุ่มเป็นก้อน แข็ง มีหินปะปน	WA-33, 34, 35, 36, 38, 39, 41, 42, 43, 44, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 67, 70, 71, 72, 73, 74, 76
	C-5	ดินสีน้ำตาลปนเทาเล็กน้อย เนื้อดินแห้ง มีเศษหินและเศษ รากไม้ปะปน	WA-77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 86, 87, 88, 89
จุด D	D-1	ดินสีน้ำตาลปนเทา เนื้อ ละเอียดและแห้ง มีเศษหิน ปะปน	WA-92, 94, 95, 96, 97, 99, 100, 101, 102
	D-2	ดินสีน้ำตาลแดง เนื้อดินแห้ง มีเศษรากไม้ปะปน บางจุดดิน เกาะตัวกันเป็นก้อน	WA-103, 104, 105
	D-3	ดินสีน้ำตาล เนื้อดินแห้ง บาง จุดดินเกาะกลุ่มเป็นก้อน มีเศษ ไม้ปะปนเล็กน้อย	WA-106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115

ตารางที่ 6 (ต่อ)

จุดเก็บ ตัวอย่าง	ตัวอย่าง	ลักษณะของดิน	ไอโซเลท
จุด E	E-1	ดินสีน้ำตาลแดง เนื้อดินแห้ง บางจุดดินเกาะกลุ่มกันเป็น ก้อน	WA-117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129
	E-2	ดินสีน้ำตาลเทา เนื้อดินแห้ง บางจุดดินเกาะกันเป็นก้อน และพบเศษรากพืชปะปน	WA-130, 131, 132, 133
	E-3	ดินสีน้ำตาลปนเทา เนื้อดิน แห้ง พบดินเกาะกันเป็นก้อน เล็กน้อย	WA-134, 135, 136, 137, 139, 140
	E-4	ดินสีน้ำตาลปนเทา เนื้อดิน แห้ง มีเศษหินปะปน บางจุด ดินเกาะกันเป็นก้อน	-
	E-5	ดินสีน้ำตาลอ่อน เนื้อดินแห้ง มีเศษหินและรากไม้ปะปน	WA-141, 142
	E-6	ดินสีน้ำตาลปนเทา เนื้อดิน แห้ง มีเศษไม้ปะปน บางจุดดิน เกาะกันเป็นก้อน	WA-143, 144
	E-7	ดินสีน้ำตาลเทา เนื้อดินแห้ง มี เศษไม้และเศษหินปะปน	WA-145, 146, 147
	E-8	ดินสีน้ำตาล เนื้อดินแห้ง มีเศษ ไม้ปนเล็กน้อย บางจุดดินเกาะ ตัวกันเป็นก้อน	-
	E-9	ดินสีน้ำตาลปนเทา เนื้อดิน แห้ง มีเศษหินและรากพืช ปะปนเล็กน้อย	WA-148, 149, 150, 151

1.2 การคัดแยก *Mortierella* จากดิน

การคัดแยก *Mortierella* ทำได้โดยการเจือจางตัวอย่างดิน จากนั้นนำแต่ละความเจือจางมาเกลี่ยลงบนอาหารวุ้น PDA ซึ่งเติมสารปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล บ่มที่อุณหภูมิ 4 และ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 สัปดาห์ แล้วจึงนำมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งโคโลนีเจริญ การบ่มที่อุณหภูมิต่ำเป็นวิธีที่สำคัญวิธีหนึ่งซึ่งช่วยในการคัดแยกเพื่อให้ได้ราที่ต้องการ ซึ่งจากการคัดแยกเชื้อพบราเป็นส่วนใหญ่ พบยีสต์เพียงเล็กน้อย โดยในเบื้องต้นจะทำการคัดแยกเฉพาะราที่มีลักษณะโคโลนีคล้ายดอกกุหลาบ ซึ่งเป็นลักษณะโคโลนีเฉพาะของราในสกุล *Mortierella* ที่สามารถสังเกตเห็นได้ง่ายด้วยตาเปล่า ซึ่งจากการคัดแยกจากตัวอย่างดินแต่ละจุดนั้นพบว่ามีจำนวนของราที่มีแนวโน้มที่จะอยู่ในสกุล *Mortierella* รวมถึงความหลากหลายของลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันออกไป แสดงดังภาพที่ 13 โดยดินตัวอย่างที่พบโคโลนีที่มีแนวโน้มที่จะอยู่ในสกุล *Mortierella* มากที่สุดคือ จุด C จำนวน 73 ไอโซเลต รองลงมาคือ จุด E จำนวน 34 ไอโซเลต จุด D จำนวน 22 ไอโซเลต จุด B จำนวน 19 ไอโซเลต ตามลำดับ ส่วนดินตัวอย่างที่พบน้อยที่สุดคือ จุด A จำนวน 3 ไอโซเลต ซึ่งรวมทั้งหมดแล้วสามารถคัดแยก *Mortierella* ได้ทั้งหมดจำนวน 151 ไอโซเลต โดยราที่ได้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันหลายรูปแบบ (ดังภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 ลักษณะโคโลนีของ *Mortierella* ที่หลากหลาย

1.3 การคัดเลือก *Mortierella* ที่สามารถผลิตกรดไขมัน ARA

1.3.1 การคัดเลือกขึ้นปฐมภูมิ

ทำการทดสอบความสามารถในการสร้างกรดไขมัน ARA จาก *Mortierella* ที่แยกได้จากดินรวมทั้งสิ้น 151 ไอโซเลท โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารวุ้น PDA ที่มีกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน เพื่อคัดเลือก *Mortierella* ที่มีศักยภาพในการผลิต ARA (ไอโซเลทที่มีปริมาณ ARA มากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด) ผลการคัดเลือกขึ้นปฐมภูมิ พบว่าจากรา *Mortierella* ที่คัดแยกได้ทั้งหมด 151 ไอโซเลท มีจำนวน 56 ไอโซเลท ที่มีปริมาณของ ARA ตามเกณฑ์ที่กำหนด ดังแสดงดังตารางที่ 7 จึงนำราที่ได้ไปศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 7 องค์ประกอบของกรดไขมันใน *Mortierella* ที่คัดเลือกได้จำนวน 151 ไอโซเลท เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง PDA ที่มีกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน

<i>Mortierella</i> isolate no.	% of total fatty acids										
	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3 α	18:3 γ	20:4	20:5	22:6
WA-1	-	16.1	-	7.1	4.6	6.7	3.3	-	54.8	-	-
WA-2	-	46.0	-	10.7	10.6	7.2	2.3	-	13.9	-	-
WA-3	-	24.7	-	7.3	4.7	8.7	2.8	-	38.3	-	-
WA-4	-	35.1	-	12.6	7.3	7.6	3.4	-	24.2	-	-
WA-5	2.1	22.7	-	9.0	5.3	5.2	2.2	-	36.6	-	-
WA-6	1.7	18.5	-	11.8	6.8	6.4	3.0	-	38.7	-	-
WA-7	-	51.2	-	11.7	6.8	6.0	2.7	-	17.8	-	-
WA-8	1.7	24.5	-	12.8	8.2	10.6	3.8	-	22.4	-	-
WA-9	0.7	18.5	-	10.3	3.7	7.2	2.8	-	43.9	-	-
WA-10	1.1	19.5	-	7.1	7.8	5.7	3.3	-	38.9	-	-
WA-11	-	13.7	-	9.2	2.9	3.4	2.4	-	46.9	-	-
WA-12	-	23.1	-	10.6	9.9	14.9	4.4	-	37.2	-	-
WA-13	2.5	26.0	-	12.8	8.6	9.3	3.3	-	21.9	-	-
WA-14	2.4	26.6	-	11.9	8.9	9.7	3.5	-	22.2	-	-
WA-15	-	31.0	-	12.0	9.0	7.9	3.4	-	25.0	-	-
WA-16	2.2	23.1	-	11.4	8.1	9.6	3.4	-	24.5	-	-

ตารางที่ 7 (ต่อ)

<i>Mortierella</i> isolate no.	% of total fatty acids										
	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3 α	18:3 γ	20:4	20:5	22:6
WA-17	-	21.9	-	11.6	40.1	10.4	8.0	-	-	-	-
WA-18	3.7	30.0	-	14.5	26.0	6.1	2.0	-	4.3	-	-
WA-19	1.9	24.5	-	12.7	9.2	11.1	4.2	-	23.9	-	-
WA-20	2.1	25.9	-	13.6	9.1	10.3	3.7	-	21.2	-	-
WA-21	2.7	29.5	-	13.2	12.4	9.7	3.1	-	16.8	-	-
WA-22	1.1	36.8	-	11.9	10.4	8.2	3.0	-	17.9	-	-
WA-23	1.0	23.4	-	8.7	10.1	9.4	3.7	-	37.0	-	-
WA-24	1.1	43.1	-	8.4	10.8	7.2	2.8	-	16.4	-	-
WA-25	1.2	32.8	-	12.9	8.8	9.8	2.9	-	20.2	-	-
WA-26	0.6	13.4	0.6	13.3	4.1	6.6	4.8	-	45.6	-	-
WA-27	1.2	16.2	0.7	13.2	7.1	9.9	3.6	-	37.19	-	-
WA-28	-	43.6	-	9.6	12.2	8.0	2.6	-	13.6	-	-
WA-29	0.5	13.1	0.5	7.8	5.8	4.4	3.3	-	52.4	-	-
WA-30	4.0	25.9	0.3	13.2	32.8	5.9	2.2	-	5.9	-	-

ตารางที่ 7 (ต่อ)

<i>Mortierella</i> isolate no.	% of total fatty acids										
	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3 α	18:3 γ	20:4	20:5	22:6
WA-31	0.5	13.7	0.7	8.2	5.1	4.0	3.3	-	52.2	-	-
WA-32	1.4	22.7	1.0	9.1	13.7	12.2	4.4	-	24.1	-	-
WA-33	1.1	23.1	0.6	8.5	10.0	6.1	3.7	-	34.9	-	-
WA-34	-	21.6	-	7.9	4.6	7.8	2.3	-	37.6	-	-
WA-35	1.3	25.8	-	9.9	8.7	8.6	2.8	-	31.6	-	-
WA-36	1.2	24.6	0.6	8.4	9.3	6.1	3.8	-	33.9	-	-
WA-37	0.7	18.0	-	5.4	3.2	6.6	2.7	-	47.7	-	-
WA-38	-	39.2	-	10.7	13.0	8.2	2.9	-	15.3	-	-
WA-39	-	22.9	-	10.2	11.8	9.7	5.8	-	24.4	-	-
WA-40	0.4	12.3	0.8	11.2	7.5	6.7	3.5	-	45.5	-	-
WA-41	-	27.2	-	9.2	12.3	8.6	3.4	-	33.2	-	-
WA-42	1.5	21.5	-	15.5	4.9	4.6	2.3	-	37.8	-	-
WA-43	-	40.9	-	10.8	11.5	7.5	2.9	-	21.2	-	-
WA-44	2.8	45.2	-	7.7	15.0	1.9	-	-	18.4	-	-
WA-45	-	20.0	-	12	3.7	3.0	-	-	32.7	-	-
WA-46	1.2	17.1	-	6.6	4.2	8.0	3.6	-	45.5	-	-

ตารางที่ 7 (ต่อ)

<i>Mortierella</i> isolate no.	% of total fatty acids										
	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3 α	18:3 γ	20:4	20:5	22:6
WA-47	0.5	24.5	0.9	9.7	9.0	-	9.1	-	30.3	-	-
WA-48	-	29.0	-	9.3	6.0	9.4	2.8	-	30.2	-	-
WA-49	1.7	24.4	0.9	9.7	13.3	11.7	3.7	-	23.2	-	-
WA-50	1.0	22.1	0.9	9.5	7.1	7.8	3.2	-	33.6	-	-
WA-51	3.2	28.6	-	13.7	12.9	9.6	2.5	-	18.5	-	-
WA-52	-	25.8	-	4.3	9.3	8.7	5.8	-	38.3	-	-
WA-53	3.2	23.4	-	11.2	12.3	9.3	3.4	-	24.9	-	-
WA-54	0.8	22.8	0.8	10.9	7.6	6.0	3.6	-	35.1	-	-
WA-55	2.7	30.7	-	13.8	13.1	10.5	3.0	-	20.4	-	-
WA-56	1.7	42.5	-	10.9	13.1	8.1	2.4	-	16.7	-	-
WA-57	1.6	25.1	-	14.5	8.9	10.4	3.6	-	22.9	-	-
WA-58	-	38.1	-	10.8	12	8.2	3.2	-	22.6	-	-
WA-59	1.0	22.9	1.6	6.5	10.7	6.6	3.9	-	33.9	-	-
WA-60	0.4	12.2	-	8.1	6.2	5.3	3.4	0.3	39.5	-	-
WA-61	-	-	43.5	9.1	16.4	-	6.7	3.5	17.4	-	-
WA-62	1.6	25.9	-	13.7	9.6	11.1	3.4	-	22.0	-	-
WA-63	1.3	39.3	-	-	9.0	8.1	3.2	-	25.0	-	-

ตารางที่ 7 (ต่อ)

<i>Mortierella</i> isolate no.	% of total fatty acids										
	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3 α	18:3 γ	20:4	20:5	22:6
WA-64	1.4	21.9	-	6.9	4.2	7.8	3.3	0.6	40.4	-	-
WA-65	0.4	10.6	0.4	5.9	2.1	3.1	3.4	-	62.6	-	-
WA-66	0.3	8.8	0.3	5.0	2.0	3.3	3.1	-	65.8	-	-
WA-67	-	12.8	-	8.2	11.0	6.9	2.8	-	34.0	-	-
WA-68	1.5	21.7	-	8.8	3.9	5.1	2.6	-	41.7	-	-
WA-69	0.9	18.2	0.5	9.8	5.1	6.6	4.0	-	44.0	-	-
WA-70	13.6	14.9	9.2	16.2	13.5	6.5	4.7	4.4	-	-	-
WA-71	1.6	23.7	8.7	9.7	5.1	4.9	2.8	-	31.5	-	-
WA-72	1.4	25.8	-	13.4	9.4	9.7	3.6	-	23.0	-	-
WA-73	0.9	12.1	0.6	8.6	4.3	8.1	3.7	-	45.0	-	-
WA-74	1.3	22.1	-	9.4	4.1	5.1	2.5	-	38.9	-	-
WA-75	1.4	23.1	-	8.4	3.9	5.7	2.8	-	42.6	-	-
WA-76	-	34.3	-	13.9	20.9	11.0	-	-	19.9	-	-
WA-77	2.3	26.0	-	10.6	10.9	11.1	3.2	-	24.1	-	-
WA-78	-	54.3	-	17.2	8.5	-	-	-	8.7	-	-
WA-79	-	31.8	-	16.2	23.7	11.0	-	-	17.3	-	-
WA-80	1.7	28.6	1.5	12.7	11.8	8.7	3.3	-	22.1	-	-

ตารางที่ 7 (ต่อ)

<i>Mortierella</i> isolate no.	% of total fatty acids										
	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3 α	18:3 γ	20:4	20:5	22:6
WA-81	-	45.9	-	11.5	17.7	8.0	-	-	12.6	-	-
WA-82	1.6	29.2	-	13.5	8.9	10.1	2.9	-	19.3	-	-
WA-83	1.4	27.0	-	10.3	4.6	6.2	2.4	-	35.2	-	-
WA-84	2.7	30.5	-	14.0	11.7	4.0	1.0	-	15.2	-	-
WA-85	-	17.5	-	7.7	3.5	4.8	3.2	-	48.2	-	-
WA-86	0.9	21.8	-	7.0	3.9	4.7	1.5	-	36.0	-	-
WA-87	1.4	20.2	0.8	12.0	5.7	10.7	3.8	-	34.5	-	-
WA-88	3.8	24.8	-	11.9	15.2	9.8	3.4	-	19.6	-	-
WA-89	1.5	37.9	-	7.7	15.5	9.1	3.9	-	17.4	-	-
WA-90	-	11.4	0.6	7.1	49.2	11.6	16.6	-	-	-	-
WA-91	4.2	27.7	-	16.0	25.2	5.4	3.1	-	8.5	-	-
WA-92	0.5	17.0	0.5	9.2	47.9	10.8	10.1	-	-	-	-
WA-93	0.9	21.9	-	6.8	4.8	8.1	3.0	-	40.0	-	-
WA-94	4.7	26.5	0.4	14.2	24.7	5.6	3.0	-	9.7	-	-

ตารางที่ 7 (ต่อ)

<i>Mortierella</i> isolate no.	% of total fatty acids										
	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3 α	18:3 γ	20:4	20:5	22:6
WA-95	2.7	27.5	-	11.2	10.7	10.4	4.0	-	25.0	-	-
WA-96	3.5	27.0	0.6	12.4	25.0	8.0	3.0	-	9.1	-	-
WA-97	2.5	27.4	-	11.6	13.8	10.4	3.5	-	23.1	-	-
WA-98	2.4	28.0	-	-	12.0	10.4	4.0	-	-	-	-
WA-99	2.4	25.1	0.6	10.2	14.0	10.1	3.9	-	24.5	-	-
WA-100	3.0	28.8	0.7	12.7	26.8	9.0	3.1	-	9.1	-	-
WA-101	-	15.4	-	8.0	37.4	20.9	15.6	-	1.1	-	-
WA-102	6.4	38.7	-	12.1	23.9	5.0	-	-	9.9	-	-
WA-103	-	13.3	-	-	56.8	11.0	19.1	-	-	-	-
WA-104	4.4	32.1	-	7.4	38.7	6.4	3.3	-	7.7	-	-
WA-105	-	9.9	-	6.4	53.9	11.1	18.7	-	-	-	-
WA-106	-	14.8	-	9.5	46.9	12.5	9.9	-	3.8	-	-
WA-107	-	24.6	-	15.1	5.1	6.8	2.5	-	30.1	-	-
WA-108	-	10.4	-	7.3	46.9	12.7	17.6	-	2.5	-	-
WA-109	-	11.5	-	7.4	47.8	13.0	17.8	-	-	-	-
WA-110	0.9	32.2	-	11.7	12.6	8.2	2.4	-	23.2	-	-
WA-111	6.2	30.4	-	19.5	28.0	5.0	-	-	6.1	-	-

ตารางที่ 7 (ต่อ)

<i>Mortierella</i> isolate no.	% of total fatty acids										
	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3 α	18:3 γ	20:4	20:5	22:6
WA-112	-	14.9	0.5	12.6	49.4	8.9	7.7	-	1.2	-	-
WA-113	3.9	29.8	1.0	5.5	35.8	7.2	2.4	-	8.5	-	-
WA-114	-	17.2	-	9.9	48.2	10.3	9.4	-	1.2	-	-
WA-115	-	20.0	-	16.4	42.9	6.9	6.4	-	1.2	-	-
WA-116	1.2	19.5	-	7.8	3.8	7.3	2.6	-	40.8	-	-
WA-117	6.2	30.6	0.6	10.6	23.9	3.9	2.8	-	9.5	-	-
WA-118	0.4	31.3	0.6	10.8	24.4	4.0	2.9	-	9.8	-	-
WA-119	1.3	19.1	0.4	8.1	7.7	9.8	3.7	-	37.8	-	-
WA-120	-	12.0	-	-	56.5	11.8	19.7	-	-	-	-
WA-121	-	13.2	-	6.2	53.0	11.9	15.8	-	-	-	-
WA-122	-	12.5	-	8.7	50.0	12.5	14.1	-	-	-	-
WA-123	0.6	24.5	-	6.0	10.9	9.5	0.7	-	33.3	-	-
WA-124	0.9	19.2	-	11.7	7.1	8.8	4.1	-	33.2	-	-
WA-125	-	13.3	-	8.5	50.7	13.5	14.1	-	-	-	-
WA-126	1.7	20.1	-	9.3	7.7	9.6	4.0	-	36.8	-	-
WA-127	-	11.8	-	-	49.5	10.5	20.0	-	-	-	-
WA-128	-	-	-	-	100.0	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 7 (ต่อ)

<i>Mortierella</i> isolate no.	% of total fatty acids										
	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3 α	18:3 γ	20:4	20:5	22:6
WA-129	-	11.0	-	-	58.2	12.2	12.5	-	-	-	-
WA-130	1.1	19.5	-	9.3	7.8	10.6	3.8	-	33.6	-	-
WA-131	-	32.4	-	26.5	41.0	-	-	-	-	-	-
WA-132	1.9	26.3	-	11.6	9.3	11.0	3.9	-	24.2	-	-
WA-133	1.2	20.0	-	8.4	6.2	9.5	3.7	-	36.0	-	-
WA-134	2.5	26.1	-	11.3	12.6	10.1	3.6	-	24.0	-	-
WA-135	3.4	27.4	0.4	10.8	20.9	8.9	4.0	-	9.3	-	-
WA-136	3.0	28.8	-	13.4	24.3	5.3	3.3	-	11.6	-	-
WA-137	0.4	19.1	0.7	9.1	42.1	12.5	11.1	-	0.9	-	-
WA-138	-	18.3	-	11.6	3.9	5.4	2.8	-	43.0	-	-
WA-139	11.4	11.3	8.8	10.3	13.1	3.1	6.8	6.8	1.9	-	-
WA-140		18.4	2.2	8.7	36.9	15.2	4.5	1.7	1.5	-	-
WA-141	1.1	21.0	-	7.2	4.2	8.3	2.6	-	39.7	-	-
WA-142	1.4	21.2	-	10.8	8.0	10.1	3.9	-	31.0	-	-
WA-143	0.4	21.5	0.5	9.9	41.1	12.1	-	-	1.7	-	-
WA-144	-	39.4	-	-	37.1	23.6	-	-	-	-	-

ตารางที่ 7 (ต่อ)

<i>Mortierella</i> isolate no.	% of total fatty acids										
	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3 α	18:3 γ	20:4	20:5	22:6
WA-145	-	17.4	-	8.5	46.0	11.3	8.2	-	1.8	-	-
WA-146	-	12.2	-	5.5	49.5	-	14.5	-	2.0	-	-
WA-147	-	39.0	-	9.9	6.4	2.6	-	-	21.2	-	-
WA-148	0.9	21.6	-	9.3	12.6	0.8	2.6	0.9	20.0	-	-
WA-149	1.0	19.6	-	9.6	10.6	16.5	2.9	1.3	23.1	-	-
WA-150	-	26.4	-	12.2	19.2	7.2	-	-	9.1	-	-
WA-151	-	19.0	-	9.2	12.4	15.1	2.4	1.1	22.6	-	-

1.3.2 การคัดเลือกขึ้นทุติยภูมิ

นำ *Mortierella* ที่คัดเลือกได้ทั้ง 56 ไอโซเลทจากข้อ 1.3.1 มาคัดเลือกให้เหลือเพียงไอโซเลทที่มีศักยภาพสูงที่สุดในการผลิต ARA ซึ่งผลการทดลองของสายพันธุ์ที่ผลิต ARA สูง 12 อันดับแรก แสดงดังตารางที่ 8 โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Potato Dextrose Broth (PDB) ที่มีกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

จากการคัดเลือกขึ้นทุติยภูมิพบว่าไอโซเลท WA-1 ซึ่งแยกได้จากดินที่เก็บจากโครงการหลวงดอยอ่างขาง อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ ประกอบด้วยกรดไขมันหลายชนิด โดยพบว่า palmitic acid (16:0) เป็นกรดไขมันที่พบในปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 30.3 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ arachidonic acid (20:4) หรือ ARA, stearic acid (18:0), oleic acid (18:1), linoleic acid (18:2) และ α -linolenic acid (18:3 α) น้อยที่สุด โดยพบว่ามีปริมาณเท่ากับ 26.9, 14.0, 10.8, 5.5, และ 2.3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกสายพันธุ์ดังกล่าวเพื่อใช้สำหรับการศึกษาขั้นต่อไปเนื่องจากไอโซเลทดังกล่าวผลิตกรดไขมัน ARA สูงที่สุดในจำนวน 12 ไอโซเลท จากผลที่ได้นั้นเมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดไขมัน ARA ในขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิพบว่าไอโซเลท WA-1 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA (ขั้นปฐมภูมิ) สามารถผลิต ARA ได้เปอร์เซ็นต์สูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว PDB (ขั้นทุติยภูมิ) มาก ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากการให้อากาศ เพราะการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง PDA เราสามารถเจริญแผ่ไปตามพื้นผิวของอาหารได้ส่งผลให้เส้นใยมีพื้นที่ผิวมากในการสัมผัสกับอากาศส่งผลต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมัน ในขณะที่การเพาะเลี้ยงใน PDB ซึ่งบรรจุอาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตรในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตรนั้นถึงแม้จะมีการเขย่าอย่างต่อเนื่องแต่ความเร็วรอบในการเขย่าอาจไม่เพียงพอทำให้เส้นใยสัมผัสกับอากาศได้ไม่ทั่วถึง ดังนั้นการเจริญและการผลิตกรดไขมันจึงไม่ดีเท่าที่ควร

ตารางที่ 8 องค์ประกอบของกรดไขมันใน *Mortierella* ที่คัดเลือกจากดินซึ่งมีศักยภาพในการผลิต ARA สูงจำนวน 12 ไอโซเลท ก่อนคัดเลือกให้เหลือเพียง ไอโซเลทที่มีศักยภาพในการผลิต ARA สูงที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว PDB ที่มีกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในตู้ บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

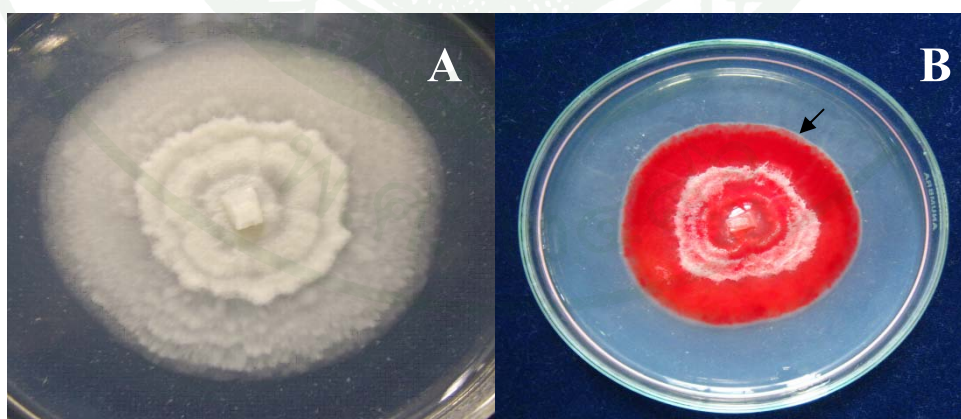
<i>Mortierella</i> isolate no.	Cell dry weight (g/L)	% of Total fatty acids											
		14:0	15:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3 α	18:3 γ	20:4	20:5	22:6
WA-1	10.28	-	-	30.3	-	14.0	10.8	5.5	2.3	-	26.9	-	-
WA-3	10.91	-	-	37.2	-	13.1	10.2	7.9	-	-	25.9	-	-
WA-5	6.32	-	-	41.0	-	11.5	11.7	8.2	-	-	22.7	-	-
WA-34	9.17	-	-	38.0	-	14.4	11.2	8.0	2.1	-	21.2	-	-
WA-54	6.88	-	-	31.8	-	11.7	12.3	5.5	3.3	-	31.1	-	-
WA-65	4.9	-	-	40.1	-	21.7	13.1	-	-	-	25.1	-	-
WA-68	9.65	-	-	37.7	-	11.9	10.6	7.4	-	-	25.2	-	-
WA-83	6.96	-	-	41.8	-	11.5	17.2	10.0	-	-	18.1	-	-
WA-85	10.52	-	-	32.5	-	12.5	9.3	7.8	3.0	-	28.7	-	-
WA-87	8.06	-	-	29.3	-	18.9	10.0	7.7	-	-	28.4	-	-
WA-93	6.88	-	-	39.5	-	13.4	10.0	6.9	-	-	24.9	-	-
WA-116	7.99	-	-	38.6	-	11.6	9.3	7.6	-	-	23.3	-	-

2. ผลการศึกษาพื้นฐานวิทยาของ *Mortierella* ที่คัดเลือก

จากการนำราไอโซเลท WA-1 ที่เจริญบนอาหารแข็ง Czapek และ PDA มาศึกษาลักษณะโคโลนี เส้นใย สปอร์ ภูงหุ้มสปอร์และก้านขุสปอร์ ด้วยการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดาและย้อมเส้นใยด้วยสี Nile red ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์เพื่อตรวจดูไขมันที่สะสมอยู่ภายในเส้นใยของราดังกล่าว พบว่ามีลักษณะดังต่อไปนี้

2.1 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA

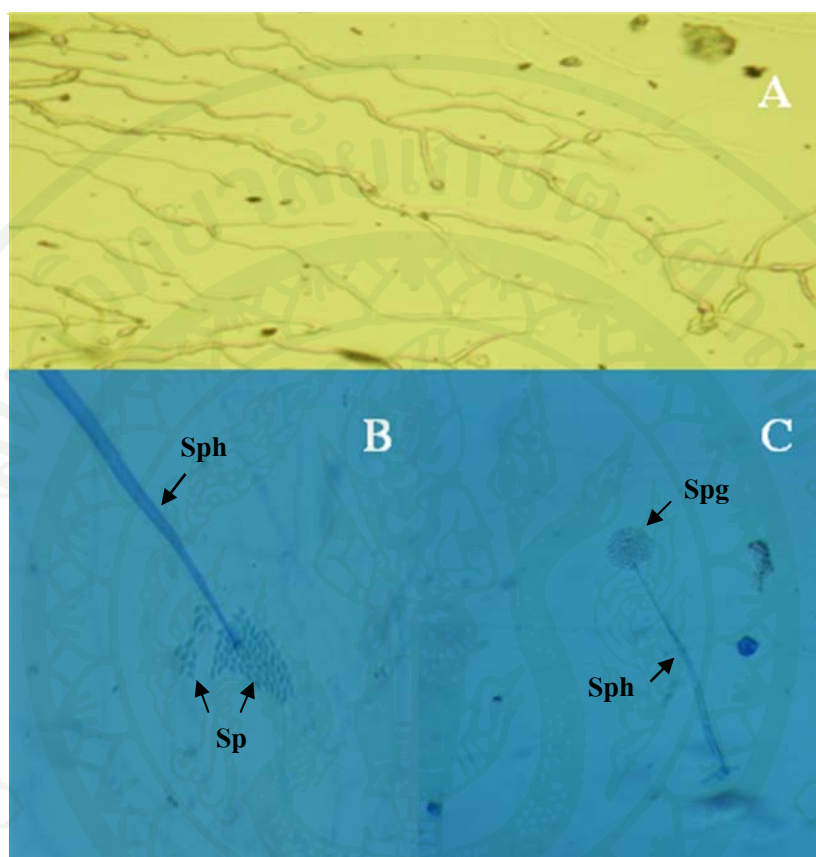
ราไอโซเลท WA-1 สามารถเจริญได้ดีบนอาหารแข็ง PDA ซึ่งเมื่อเจริญบนอาหารดังกล่าวมีลักษณะดังต่อไปนี้ คือ เส้นใยมีสีขาวไม่ฟู โคโลนีเจริญราบเรียบไปกับผิวหน้าของอาหาร เมื่อสังเกตที่โคโลนีจะพบว่ามีลักษณะเป็นกลีบซ้อนๆกันคล้ายกับดอกกุหลาบขาว ซึ่งเป็นลักษณะที่สังเกตได้ง่ายด้วยตาเปล่า และนอกจากนี้ยังได้ทำการย้อมสีโคโลนีไอโซเลท WA-1 ด้วยสี triphenyl tetrazoliumchloride (TTC) เพื่อเป็นการศึกษาเบื้องต้นว่าเส้นใยมีการสะสมไขมันมากหรือน้อย ถ้าหากเส้นใยมีไขมันสะสมอยู่มากเมื่อทำการย้อมด้วยสี TTC แล้วจะเห็นเป็นสีแดงเข้ม โดย TTC เป็นสารออกซิแดนซ์ที่สามารถถูกรีดิวซ์จากไม่มีสีให้กลายเป็นมีสีแดงของ Triphenylformazan (TF) (Zhu *et al.*, 2004) ซึ่งจากการย้อมสีพบว่าโคโลนีไอโซเลท WA-1 เป็นสีแดงเข้มทั้งโคโลนี (ลูกศรชี้) แสดงดังภาพที่ 14B



ภาพที่ 14 ลักษณะของราไอโซเลท WA-1 บนอาหารแข็ง

- A) ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง PDA อายุ 10 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
- B) ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง PDA ที่ถูกย้อมด้วยสี TTC

2.2 ลักษณะเส้นใย สปอร์ (sporangiospore) ถุงหุ้มสปอร์ (sporangium) และก้านชูสปอร์ (sporangiophore) ของราไอโซเลท WA-1 บนอาหารแข็ง Czapek ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดาแสดงดังภาพที่ 15



ภาพที่ 15 ลักษณะของราไอโซเลท WA-1

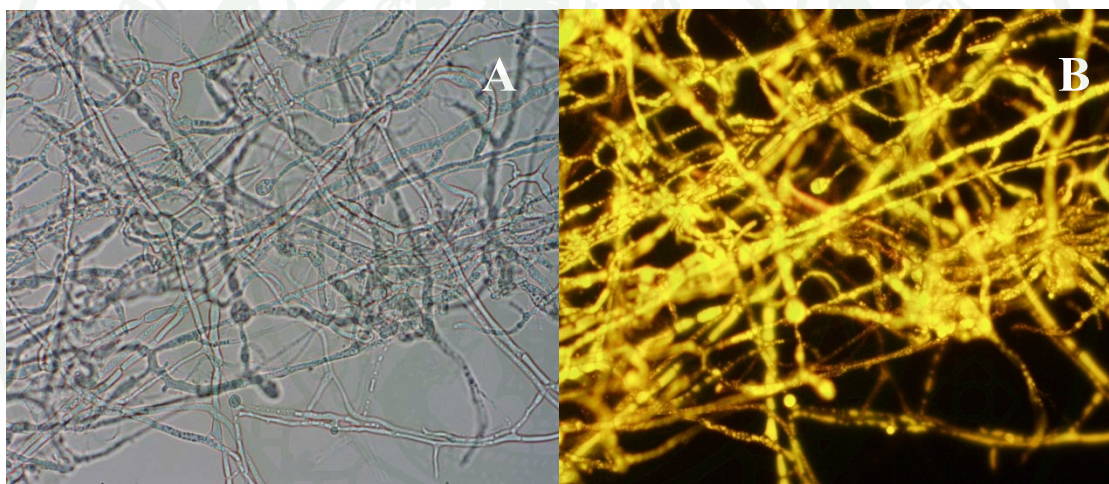
- A) ลักษณะเส้นใยที่เจริญบนอาหารแข็ง Czapek (กำลังขยาย 100 เท่า)
- B) ลักษณะ sporangiospore (Sp) และ sporangiophore (Sph) (ลูกศรชี้) (กำลังขยาย 400 เท่า)
- C) ลักษณะ sporangium (Spg) และ sporangiophore (Sph) (ลูกศรชี้) (กำลังขยาย 200 เท่า)

จากภาพสังเกตเห็นว่ารราไอโซเลท WA-1 เป็นราเส้นใยที่ไม่มีผนังกั้น (non septate hyphae) ในส่วนของก้านชูสปอร์นั้นเป็นแบบธรรมดา ไม่แตกกิ่งก้าน ไม่มีคอลลุมเลตาแต่พบลักษณะคล้ายปลอกคอ (collar) ยื่นออกมาเล็กๆตรงส่วนบน ไม่พบผนังกั้นภายในก้านชูสปอร์ ก้านชูสปอร์มีลักษณะกว้างและส่วนฐานมีการพองตัวออก สามารถพบถุงหุ้มสปอร์อยู่ที่ส่วนปลายโดยถุงหุ้มสปอร์ที่พบติดอยู่กับก้านชูสปอร์นั้นมีลักษณะค่อนข้างกลม ภายในถุงหุ้มสปอร์บรรจุสปอร์ไว้เป็นจำนวนมาก สังเกตเห็นว่าสปอร์ของราดังกล่าวมีรูปร่างค่อนข้างรี ผนังเรียบและโปร่งแสง

จากภาพพบสปอร์จำนวนมากอยู่ตรงส่วนปลายของก้านชูสปอร์ ซึ่งถุงหุ้มสปอร์ได้แตกออก หลงเหลือให้เห็นเพียงกลุ่มสปอร์ดังกล่าว จากลักษณะสัณฐานวิทยาที่กล่าวมานั้นมีลักษณะ คล้ายคลึงกับ *Mortierella alpina*

2.3 ลักษณะเส้นใยราไอโซเลท WA-1 ย้อมด้วยสี Nile red ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ฟลูออเรสเซนซ์

จากการย้อมเส้นใยราด้วยสี Nile red ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าในเส้นใยของรา ดังกล่าวมีการสะสมของไขมันในปริมาณค่อนข้างมาก ซึ่งสังเกตได้จากการเรืองแสงสีเหลืองทอง ดังภาพที่ 16B



ภาพที่ 16 ลักษณะของเส้นใยราไอโซเลท WA-1 เมื่อย้อมด้วยสี Nile red

- A) ลักษณะของเส้นใยราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดา
- B) ลักษณะของเส้นใยราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์

จากการศึกษาฐานวิทย์ของราไอโซเลท WA-1 จึงจัดจำแนกเป็น

Division Eumycota

Subdivision Zygomycotina

Class Zygomycete

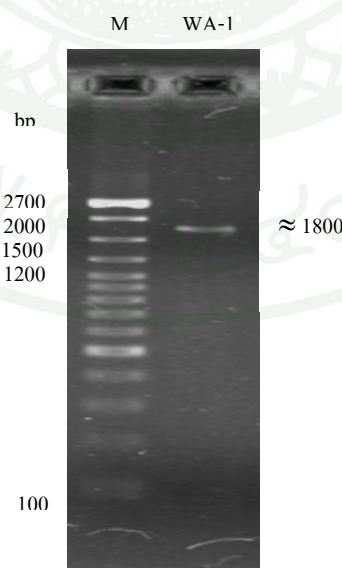
Order Mucorales

Family Mortierellaceae

Genus *Mortierella*

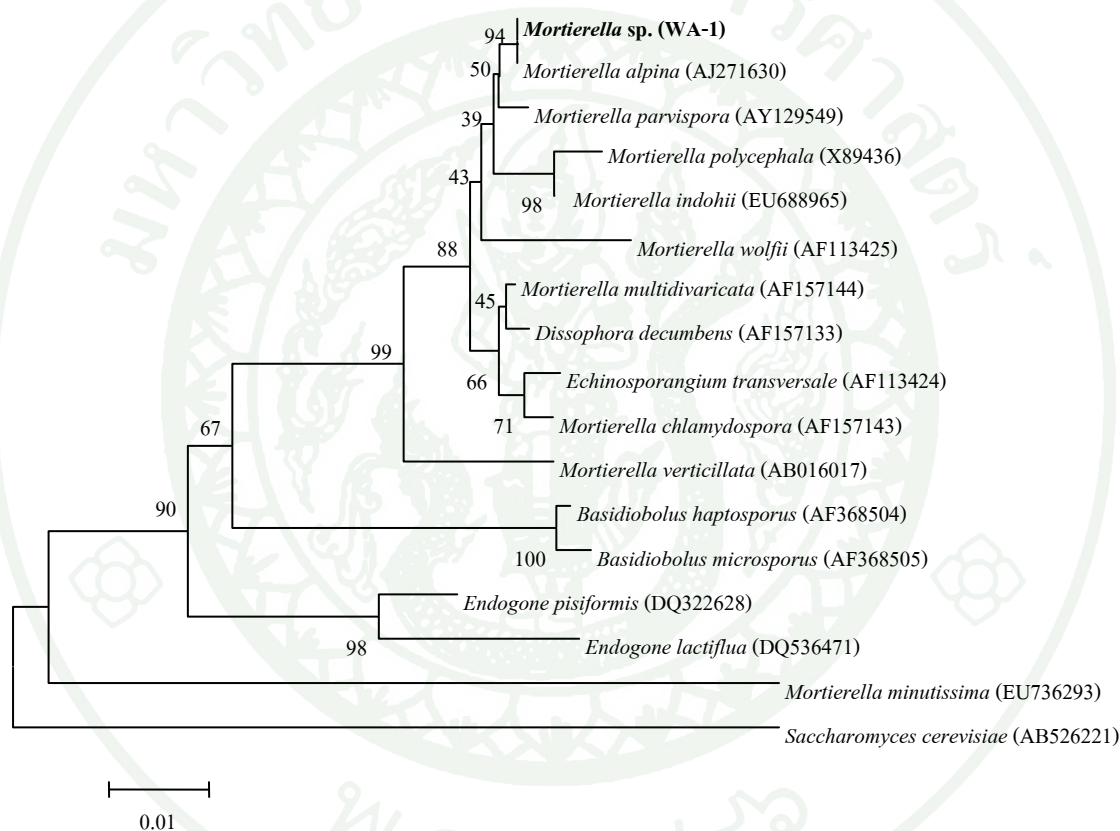
3. การจัดจำแนกด้วยลำดับเบสของยีน 18S rRNA และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ

นารราไอโซเลท WA-1 ที่มีศักยภาพในการผลิตกรดไขมัน ARA สูงที่สุดมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว soybean protein สกัดดีเอ็นเอ จากตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ยูนิเวอร์ซอลไพรเมอร์ 2 ชนิดคือ NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') และ NS8 (5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3') ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ได้จากยีน 18S rRNA ของ *Saccharomyces cerevisiae*, *Dictyostelium discoideum* และ *Styloichia pustulata* (Dams *et al.*, 1988) จากการศึกษาดีเอ็นเอที่สกัดได้จากไอโซเลท WA-1 มีขนาดประมาณ 1,800 bp แสดงดังภาพที่ 17



ภาพที่ 17 ขนาดโมเลกุลของยีน 18S rRNA ของราไอโซเลท WA-1 จากการทำ PCR

จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้ไพรมอร์ 6 ชนิด คือ NS1, NS2, NS3, NS4, NS5 และ NS8 ตามวิธีการมาตรฐานของ MacroGen Advancing through Genomics, Inc. แล้วจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลจาก NCBI โดยใช้ BLASTn program จากนั้นนำลำดับเบสของสายดีเอ็นเอของยีน 18S rRNA ของไอโซเลท WA-1 มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยการสร้าง phylogenetic tree แบบ neighbour-joining โดยเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิงทั้ง 16 สายพันธุ์ ซึ่งสามารถแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการดังภาพที่ 18



ภาพที่ 18 Phylogenetic tree สร้างด้วยวิธี neighbour-joining แสดงความสัมพันธ์ของยีน 18S rRNA ของไอโซเลท WA-1 กับสายพันธุ์อ้างอิงทั้ง 16 สายพันธุ์

จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 18S rRNA ของราไอโซเลท WA-1 เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ NCBI พบว่าไอโซเลท WA-1 มียีน 18S rRNA คล้ายคลึงกับ *Mortierella alpina* AJ271630 ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าไอโซเลทดังกล่าวอยู่ในสกุล *Mortierella alpina*

4. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมัน ARA (Optimization of medium composition)

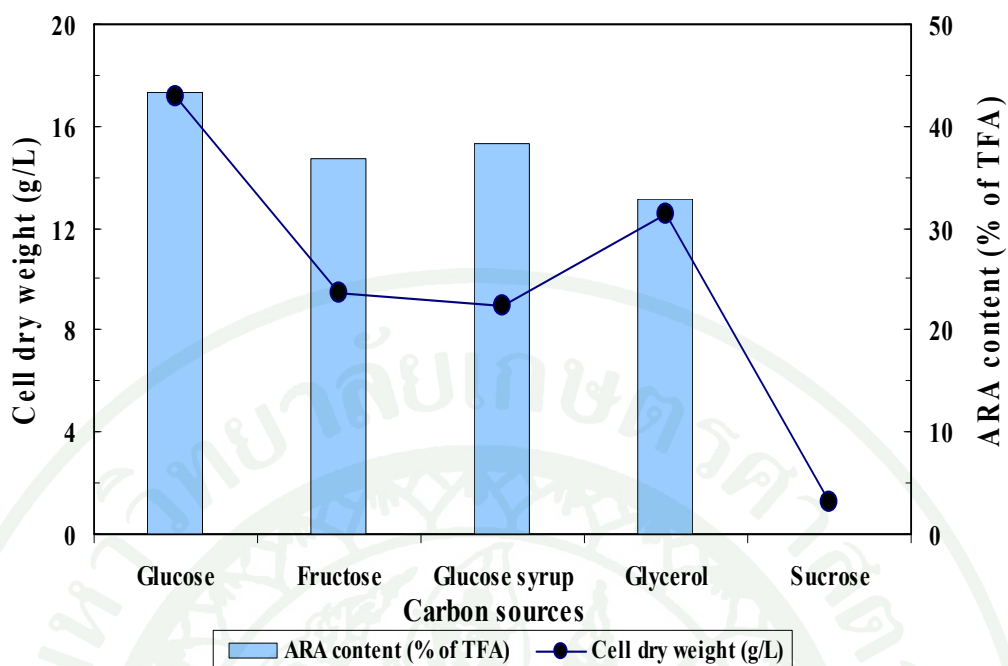
4.1 อิทธิพลของชนิดของแหล่งคาร์บอน (Effect of carbon sources)

การศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมัน ARA นั้น ศึกษาโดยเพาะเลี้ยงราไอโซเลท WA-1 ในอาหารเหลว soy isolate ซึ่งเป็นสูตรอาหารพื้นฐานที่ดัดแปลงมาจากสูตรอาหาร soybean protein (Zhu *et al.*, 2004) โดยอาหาร soy isolate ประกอบด้วยโปแตสเซียมไนเตรท 0.3 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับ soy isolate 0.84 เปอร์เซ็นต์ ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.4 เปอร์เซ็นต์ แคลเซียมคลอไรด์ 0.005 เปอร์เซ็นต์ และ แมกนีเซียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ที่แตกต่างกันออกไป 5 ชนิด คือ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ได้แก่ กลูโคสและฟรุคโทส น้ำตาลโมเลกุลคู่ ได้แก่ ซูโครส คาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ ได้แก่ กลูโคสไซรัป และกลีเซอรอล ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็ว 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 7 วัน ผลแสดงดังตารางที่ 9 และภาพที่ 19

จากการศึกษาพบว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดที่สนับสนุนการเจริญและการผลิตกรดไขมัน ARA ของราไอโซเลท WA-1 โดยมีมวลเซลล์สูงสุดเท่ากับ 17.18 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณกรดไขมัน ARA เท่ากับ 43.4 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Yamada *et al.* (1987) ที่ทำการศึกษาใน *M. elongata* Shinmen *et al.* (1989) ที่ทำการศึกษาใน *M. alpina* IS-4 Chen and Chang (1994) ทำการศึกษาใน *M. alpina* CBS 210.32 Yuan *et al.* (2002) ; Jang *et al.* (2005) ที่ได้ศึกษาใน *M. alpina* ATCC 32222 ซึ่งต่างก็กล่าวไว้ว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการเจริญของเซลล์และการผลิต ARA รวมไปถึง Ratledge (1989) ที่สนับสนุนว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเพื่อการผลิตกรดไขมันในจุลินทรีย์มากที่สุดเนื่องจากกลูโคสสามารถเปลี่ยนไปเป็นไขมันได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยราหลายชนิด แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมรองลงมาคือ กลีเซอรอล ฟรุคโทส และกลูโคสไซรัป ซึ่งให้มวลเซลล์และการผลิตกรดไขมัน ARA ไม่แตกต่างกันมากนัก ในส่วนของซูโครสนั้นเป็นแหล่งคาร์บอนที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมัน ARA ที่สุดพบว่า *M. alpina* WA-1 มีการเจริญที่ต่ำมากและไม่พบการผลิตกรดไขมัน ARA ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Bajpai *et al.* (1991); Yuan *et al.* (2002) ซึ่งศึกษาใน *M. alpina* ATCC 16266 และ *M. alpina* I₄₉-N₁₈ ตามลำดับ

ตารางที่ 9 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะของราไอโซเลท WA-1

Carbon sources	Cell dry weight (g/L)	% of Total fatty acids										
		14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3 α	18:3 γ	20:4	20:5	22:6
Glucose	17.18	-	21.2	-	8.6	9.4	8.7	-	-	43.4	-	-
Fructose	9.49	-	21.1	-	11.2	10.0	9.6	-	-	36.8	-	-
Glucose syrup	8.96	-	23.8	-	7.5	10.2	10.1	1.4	-	38.4	-	-
Sucrose	1.29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycerol	12.52	-	19.8	-	10.0	11.5	13.6	4.6	-	32.8	-	-



ภาพที่ 19 กราฟแสดงผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะของราไอโซเลท WA-1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว soy isolate ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร บรรจุในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็ว 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 7 วัน

4.2 อิทธิพลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

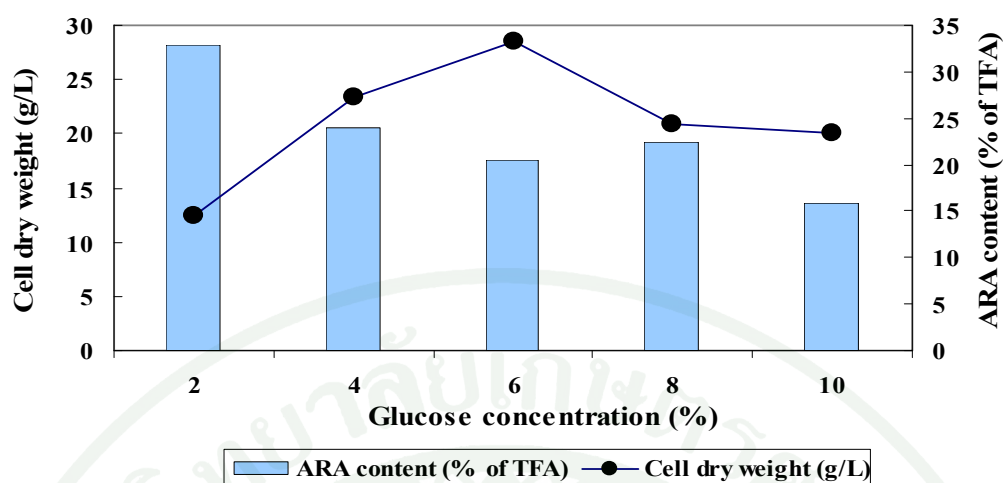
การศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมัน ARA ของราไอโซเลท WA-1 โดยใช้อาหารเหลว soy isolate ซึ่งเป็นสูตรอาหารมาตรฐาน โดยมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม (จากข้อ 4.1) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน 5 ระดับดังนี้ คือ 2, 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับอาหารชุดควบคุมซึ่งประกอบด้วยกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร บรรจุอาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็ว 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 7 วัน แสดงผลดังตารางที่ 10 และภาพที่ 20

จากการศึกษาพบว่าที่ความเข้มข้นกลูโคส 6 เปอร์เซ็นต์เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมัน ARA ของราไอโซเลท WA-1 ถึงแม้ว่าที่ความเข้มข้นกลูโคส 2

เปอร์เซ็นต์จะให้การผลิต ARA สูงที่สุดเท่ากับ 32.8 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด แต่ให้มวลเซลล์ที่ต่ำที่สุดเท่ากับ 12.36 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ที่ความเข้มข้นกลูโคส 6 เปอร์เซ็นต์มีการผลิตมวลเซลล์สูงที่สุดเท่ากับ 28.51 กรัมต่อลิตร แต่ให้การผลิตกรดไขมัน ARA ในปริมาณที่น้อยกว่าที่ความเข้มข้นกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์เพียงเล็กน้อย โดยมีการผลิตกรดไขมัน ARA เท่ากับ 20.6 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด กล่าวคือหากเปอร์เซ็นต์การผลิต ARA สูงกว่าแต่ให้การผลิตมวลเซลล์น้อยก็จะส่งผลต่อผลผลิต ARA ในภาพรวม คือผลผลิต ARA โดยรวมที่ได้ก็จะน้อยกว่าสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน พบว่าที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 6 เปอร์เซ็นต์ กลูโคสแทบไม่หลงเหลืออยู่เลย เป็นผลมาจากราโอโซเลทดังกล่าวใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญ ซึ่งเหลือกลูโคสเพียง 0.48 เปอร์เซ็นต์ จากที่พบว่าที่ความเข้มข้นกลูโคส 6 เปอร์เซ็นต์ ให้การผลิตมวลเซลล์สูงที่สุดนั้นสอดคล้องกับรายงานของ Jang *et al.* (2005) ที่ศึกษาใน *M. alpina* ATCC 32222 และ Yuan *et al.* (2002) ที่ได้ทำการศึกษาใน *M. alpina* I₄₉-N₁₈ ซึ่งกล่าวไว้ว่าที่ความเข้มข้นดังกล่าวให้มวลเซลล์สูงที่สุดเช่นกัน ความเข้มข้นกลูโคสที่เหมาะสมรองลงมาคือ ที่ความเข้มข้นกลูโคส 4, 8 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยที่ความเข้มข้นกลูโคสมากกว่า 8 เปอร์เซ็นต์จะสังเกตเห็นว่าการเจริญและการผลิต ARA ของ โอโซเลทดังกล่าวจะเริ่มลดลง ซึ่งสอดคล้องกับ Jang *et al.* (2005) ที่ศึกษาใน *M. alpina* ATCC 32222 ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากการที่กลูโคสมีความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้นอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนของอาหารก็จะเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน ซึ่งเมื่ออัตราส่วนดังกล่าวสูงถึงระดับหนึ่งจะไปมีผลต่อการสังเคราะห์สารประกอบที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ เช่น โปรตีนและกรดนิวคลีอิกลดลง ส่งผลให้การเจริญลดต่ำลง ส่วนความเข้มข้นที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมัน ARA คือที่ความเข้มข้นกลูโคส 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้การเจริญและการผลิตกรดไขมัน ARA เท่ากับ 25.06 กรัมต่อลิตรและ 16.4 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมดตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่ค่อนข้างต่ำ ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากปรากฏการณ์แรงดันออสโมติก (osmotic pressure) คือเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสสูงเกินกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ จะไปเพิ่มแรงดันออสโมติกภายในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่งผลให้ราโอโซเลทดังกล่าวสูญเสียน้ำไปจากเซลล์ จึงทำให้การเจริญและการผลิตกรดไขมัน ARA ค่อนข้างต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับ Sajbidor *et al.* (1990) ที่ได้ทำการศึกษาการผลิต ARA ในรา *Mortierella* sp. S-17 โดยกล่าวว่าความเข้มข้นของกลูโคสในระดับที่สูงขึ้นจะมีผลไปยับยั้งการเจริญและการเก็บสะสมของไขมันในเส้นใย แต่ในการศึกษาใน *M. alpina* ATCC 16266 และ *M. alpina* ATCC 32222 กลับพบว่าจะให้ น้ำหนักเซลล์แห้งและการผลิต ARA สูงที่กลูโคส 10 เปอร์เซ็นต์ (Bajpai *et al.*, 1991a, 1991b) ซึ่งสอดคล้องกับ Zhu *et al.* (2003) ที่ศึกษาใน *M. alpina* ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นกลูโคสที่ 6 เปอร์เซ็นต์สำหรับใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการทดสอบขั้นต่อไป

ตารางที่ 10 ผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะของราไอโซเลท WA-1

Glucose conc. (%)		Cell dry weight (g/L)	% of Total fatty acids										
initial	final		14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3 α	18:3 γ	20:4	20:5	22:6
2.0	0	12.36	-	25.3	-	10.2	11.4	7.6	1.2	-	32.8	-	-
4.0	0	23.43	1.3	24.0	-	11.6	16.2	12.5	1.7	1.4	24.0	-	-
6.0	0.48	28.51	1.1	21.9	-	12.7	16.7	14.8	3.3	-	20.6	-	-
8.0	1.81	20.82	1.1	21.1	-	14.8	16.4	12.9	2.6	-	22.4	-	-
10.0	3.96	20.13	1.1	20.6	-	16.5	16.1	13.7	2.7	-	15.8	-	-



ภาพที่ 20 กราฟแสดงผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะของราไอโซเลท WA-1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว soy isolate ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร บรรจุในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็ว 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 7 วัน

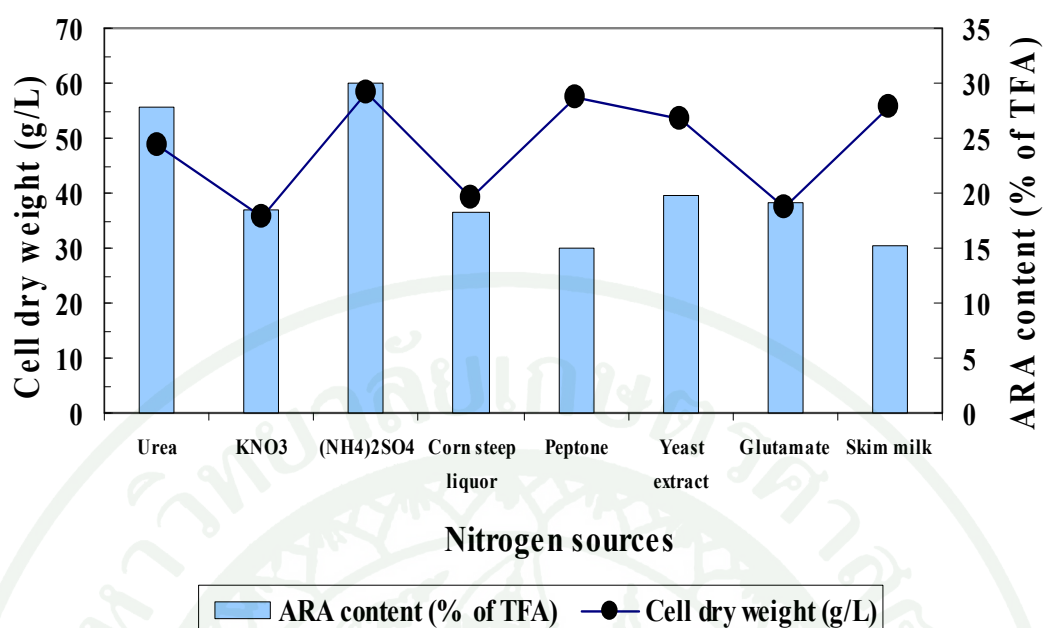
4.3 อิทธิพลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

เนื่องจากสามารถใช้ไนโตรเจนในรูปแบบต่างๆได้หลายรูป (Deacon, 1997) จึงได้ทำการศึกษาถึงอิทธิพลและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมัน ARA ของราไอโซเลท WA-1 โดยใช้สูตรอาหารเหลว soy isolate ที่มีความเข้มข้นกลูโคสที่เหมาะสมที่ 6 เปอร์เซ็นต์ (จากข้อ 4.2) โดยมีแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งคิดเป็นไนโตรเจนเท่ากับ 0.04 เปอร์เซ็นต์ โดยมีแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน 8 แหล่ง ดังนี้ คือ ยูเรีย, แอมโมเนียมซัลเฟต, corn-steep liquor, เพปโทน, yeast extract, กลูตาเมต และ skim milk โดยมีการปรับแหล่งไนโตรเจนให้เท่ากันทำการเปรียบเทียบกับอาหารชุดควบคุมซึ่งมีโปแทสเซียมไนเตรต ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน ทำการเพาะเลี้ยงในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตรซึ่งบรรจุอาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 7 วัน ผลการวิเคราะห์การเจริญและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะแสดงดังตารางที่ 11 และภาพที่ 21

จากการศึกษาพบว่าแอมโมเนียมซัลเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมัน ARA ของราไอโซเลท WA-1 โดยให้มวลเซลล์สูงสุดเท่ากับ 58.14 กรัมต่อลิตรและมีการผลิตกรดไขมัน ARA เท่ากับ 30.0 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังผ่านการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วันพบว่าราไอโซเลทดังกล่าวใช้กลูโคสเพื่อการเจริญจนเกือบหมด จากกลูโคสเริ่มต้น 6 เปอร์เซ็นต์ เหลือกลูโคสเพียง 1.70 เปอร์เซ็นต์ แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมรองลงมาคือ ยูเรีย ซึ่งให้มวลเซลล์เท่ากับ 48.60 กรัมต่อลิตรและให้การผลิตกรดไขมัน ARA เท่ากับ 27.9 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด จากผลที่ได้ในครั้งนี้พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรีย ให้มวลเซลล์และการผลิตกรดไขมัน ARA ก่อนข้างสูงแต่ Jang *et al.* (2005) ศึกษาใน *M. alpina* ATCC 32222 กลับพบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรียให้ค่าดังกล่าวต่ำ เวย์โตน, skim milk และ yeast extract นั้นพบว่าให้มวลเซลล์ค่อนข้างสูงเท่ากับ 57.53, 55.66 และ 53.55 กรัมต่อลิตรตามลำดับ แต่ถึงอย่างไรก็ตามก็ไม่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไขมัน ARA ในส่วนของ yeast extract ได้มีรายงานของ Jang *et al.* (2005) ที่ได้กล่าวไว้ว่า yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่สนับสนุนการเจริญของเซลล์แต่ไม่ได้สนับสนุนต่อการผลิต ARA ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาที่ได้ในครั้งนี้ ในส่วนของโปแทสเซียมไนเตรท (KNO_3), corn-steep liquor และกลูตาเมทพบว่าให้มวลเซลล์และการผลิตกรดไขมัน ARA ในระดับปานกลาง ซึ่งไม่แตกต่างกัน และ Jang *et al.* (2005) ได้รายงานว่าโปแทสเซียมไนเตรทให้การผลิตมวลเซลล์และการผลิต ARA สูงที่สุด (เมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มเฉพาะที่มีไนเตรทเป็นองค์ประกอบ) ซึ่งสอดคล้องกับ Chang and Chen (1994) ที่บ่งชี้ว่าโปแทสเซียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดสำหรับการผลิต ARA เมื่อศึกษาใน *M. alpina* CBS 210.32 ส่วนกลูตาเมทนั้นก็ได้มีรายงานว่ากลูตาเมทช่วยเพิ่มการผลิต ARA โดยศึกษาใน *M. alpina* (Lan *et al.*, 2002) ซึ่งสอดคล้องกับ Yu *et al.* (2003) พบว่ากลูตาเมทช่วยสนับสนุนการเจริญของ *Mortierella* ช่วยเร่ง metabolism ของ สารตั้งต้นและช่วยเพิ่มการผลิต ARA ดังนั้นจึงเลือกใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการศึกษาในขั้นต่อไป

ตารางที่ 11 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะของราไอโซเลท WA-1

Nitrogen sources	Nitrogen con. (%)	Glucose con. (%)		Cell dry weight (g/L)	% of Total fatty acids										
		initial	final		14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3 α	18:3 γ	20:4	20:5	22:6
Urea	0.3	6.0	0.55	48.60	-	21.5	-	5.8	25.1	10.0	4.3	-	27.9	-	-
KNO ₃	0.3	6.0	0	35.63	1.1	21.2	-	11.7	17.2	14.0	3.2	-	18.5	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.3	6.0	1.70	58.14	0.9	22.2	-	10.4	11.5	9.5	4.5	-	30.0	-	-
Corn-steep liquor	0.3	6.0	2.21	39.06	-	26.3	-	10.3	22.0	11.7	3.0	-	18.3	-	-
Peptone	0.3	6.0	2.07	57.53	-	26.8	-	13.4	22.9	11.8	3.1	-	14.9	-	-
Yeast extract	0.3	6.0	2.40	53.55	-	26.9	-	12.5	18.2	17.0	6.3	-	19.8	-	-
Glutamate	0.3	6.0	0.78	37.40	-	22.3	-	14.4	15.2	12.1	4.0	-	19.2	-	-
Skim milk	0.3	6.0	1.41	55.66	3.2	22.6	-	13.9	24.7	11.0	4.3	-	15.3	-	-



ภาพที่ 21 กราฟแสดงผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะของราไอโซเลท WA-1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว soy isolate ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร บรรจุในฟลasks ขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็ว 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 7 วัน

4.4 อิทธิพลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน

ทำการศึกษาถึงอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมโดยแหล่งคาร์บอน คือ กลูโคส 6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะคงกลูโคสที่ความเข้มข้นดังกล่าวไว้แต่ทำการปรับอัตราส่วนของแหล่งไนโตรเจนให้แตกต่างกัน ซึ่งมีอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 10:1, 25:1, 30:1, 40:1, 50:1 และ 60:1 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งมีอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 17:1 (สูตรอาหารที่ประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจน 2 ชนิดคือ soybean protein 0.45 เปอร์เซ็นต์ และโปแทสเซียมไนเตรท 0.3 เปอร์เซ็นต์) โดยทำการเพาะเลี้ยงในฟลasks ขนาด 500 มิลลิลิตร บรรจุอาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็ว 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 7 วัน เพื่อหาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป ซึ่งแสดงผลดังตารางที่ 12 และภาพที่ 22

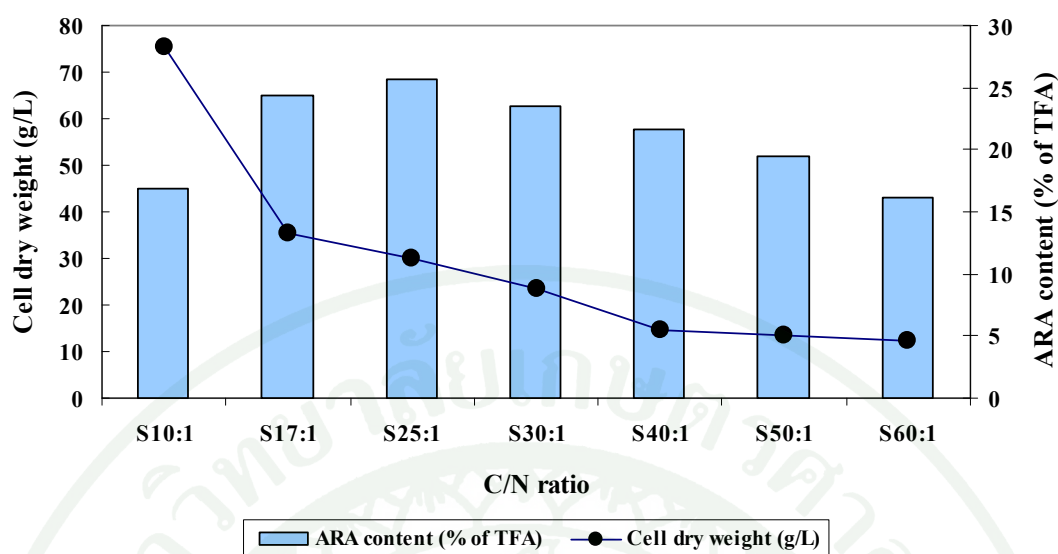
จากการศึกษาพบว่าเมื่อค่า C:N ratio เพิ่มขึ้นการเจริญของราไอโซเลท WA-1 จะลดลงที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากเมื่อค่า C:N ratio สูงถึงระดับหนึ่งการสังเคราะห์สารประกอบที่มี

ไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ เช่น โปรตีนและกรดนิวคลีอิกจะลดลงเป็นผลทำให้การเจริญถูกยับยั้ง โดย C:N ratio ที่ 10:1 ให้มวลเซลล์สูงที่สุดเท่ากับ 75.21 กรัมต่อลิตรแต่กลับให้การผลิต ARA ในปริมาณที่ค่อนข้างต่ำเท่ากับ 16.9 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด ที่ C:N ratio เท่ากับ 17:1 และ 25:1 ให้มวลเซลล์ในระดับปานกลางและการผลิต ARA สูงกว่า C:N ratio ค่าอื่น โดยที่ C:N ratio เท่ากับ 17:1 ให้มวลเซลล์เท่ากับ 35.29 กรัมต่อลิตรและ 24.4 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด ตามลำดับ ส่วนที่ C:N ratio เท่ากับ 25:1 ให้มวลเซลล์และการผลิต ARA เท่ากับ 30.02 กรัมต่อลิตร และ 25.7 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมดตามลำดับ แต่ถึงอย่างไรก็ตามหากเปรียบเทียบถึงผลผลิต ARA ในภาพรวมระหว่าง C:N ratio 17:1 กับ 25:1 แล้วพบว่า C:N ratio ที่เหมาะสมคือ 17:1 เนื่องจากที่ C:N ratio ดังกล่าวให้การผลิต ARA ใกล้เคียงกับ 25:1 แต่ให้มวลเซลล์ที่สูงกว่า ดังนั้นจึงส่งผลต่อผลผลิต ARA โดยรวม และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังผ่านการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน พบว่าราไอโซเลทดังกล่าวใช้กลูโคสเพื่อการเจริญจนเกือบหมด จากกลูโคสเริ่มต้น 6 เปอร์เซ็นต์ เหลือกลูโคสเพียง 1.24 เปอร์เซ็นต์ ส่วน C:N ratio ที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต ARA คือที่ 60:1 ซึ่งให้มวลเซลล์และการผลิต ARA ต่ำที่สุดเท่ากับ 12.18 กรัมต่อลิตรและ 16.2 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมดตามลำดับ Burja *et al.* (2006) กล่าวว่าจุลินทรีย์ที่เป็น oleaginous microorganisms จะสะสมไขมันเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีแหล่งไนโตรเจนจำกัด และมีแหล่งคาร์บอนอุดมสมบูรณ์ เพราะเมื่อแหล่งของไนโตรเจนหมดลงจุลินทรีย์จะใช้แหล่งของคาร์บอนต่อไปแต่จะไม่มีแบ่งเซลล์ต่อไปอีกเนื่องจากการขาดแคลนไนโตรเจนจะยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนและกรดนิวคลีอิกเป็นผลทำให้มีการเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนไปเป็นไขมันในรูปไขมันสะสม

ตารางที่ 12 ผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะของราไอโซเลท WA-1

C/N ratio	Glucose con. (%)		Cell dry weight (g/L)	% of Total fatty acids										
	initial	final		14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3 α	18:3 γ	20:4	20:5	22:6
S10:1	6.0	2.79	75.21	0.9	18.6	-	14.7	12.3	20.1	2.9	0.7	16.9	-	-
S17:1	6.0	1.24	35.29	1.1	20.2	-	14.3	8.7	13.2	3.6	0.6	24.4	-	-
S25:1	6.0	2.07	30.02	1.1	18.9	-	13.3	8.0	11.3	3.7	0.6	25.7	-	-
S30:1	6.0	2.67	23.38	2.2	18.9	-	13.5	7.8	10.6	3.7	-	23.5	-	-
S40:1	6.0	2.72	14.68	1.8	19.2	-	13.4	7.7	10.1	3.4	-	21.7	-	-
S50:1	6.0	3.33	13.39	2.1	19.8	-	13.3	7.9	9.7	3.4	-	19.5	-	-
S60:1	6.0	3.91	12.18	-	20.8	-	13.3	7.9	9.1	2.9	-	16.2	-	-

หมายเหตุ S เป็นอาหารที่ประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจน 2 ชนิด ได้แก่ soybean protein และ โปแตสเซียมไนเตรท



ภาพที่ 22 กราฟแสดงผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะของราไอโซเลท WA-1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว soybean protein ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร บรรจุในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

5. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมัน ARA (Optimization of culture condition)

5.1 อิทธิพลของอุณหภูมิ

ในการศึกษาถึงอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมัน ARA นั้นทำการเพาะเลี้ยงราไอโซเลท WA-1 ในหลอดรูปตัวแอลซึ่งบรรจุอาหารเหลว soy isolate ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มในเครื่อง temperature gradient incubator ที่มีการปรับอุณหภูมิในช่วง 10 ถึง 34 องศาเซลเซียส เครื่องดังกล่าวมีการเขย่าขึ้นลงด้วยอัตรา 35 ครั้งต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ผลแสดงดังตารางที่ 13 และภาพที่ 23

จากการศึกษาพบว่าราไอโซเลท WA-1 เจริญได้ค่อนข้างดีที่อุณหภูมิต่ำคืออุณหภูมิในช่วงระหว่าง 10 ถึง 26 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นช่วงค่อนข้างกว้าง จะสังเกตเห็นว่าเมื่ออุณหภูมิที่ใช้

ในการบ่มสูงกว่า 25 องศาเซลเซียส การเจริญและการผลิต ARA ของราดังกล่าวจะลดลง ซึ่งสอดคล้องกับ Bajpai *et al.* (1991b); Bajpai and Bajpai (1992) ที่ได้บ่งชี้ว่าการผลิตมวลเซลล์ และการผลิต ARA ของ *M. alpina* ATCC 32222 จะลดลงเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเปลี่ยนจาก 25 องศาเซลเซียสไปเป็น 28 องศาเซลเซียส จากการศึกษาพบการผลิตมวลเซลล์และการผลิต ARA สูงสุดที่อุณหภูมิ 18.5 และ 20 องศาเซลเซียสตามลำดับ ในขณะที่ Jang *et al.* (2005) กลับพบว่าการผลิตมวลเซลล์และการผลิต ARA สูงสุดที่อุณหภูมิ 20 และ 12 องศาเซลเซียสตามลำดับ เมื่อทำการศึกษาใน *M. alpina* ATCC 32222 นอกจากนี้ยังสังเกตพบว่เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 28 องศาเซลเซียสการเจริญและการผลิตกรดไขมันนั้นเริ่มลดลง ซึ่งสอดคล้องกับ (Bajpai *et al.*, 1991b; Bajpai and Bajpai, 1992) และเมื่ออุณหภูมิสูงถึง 34 องศาเซลเซียสการเจริญนั้นต่ำมากและไม่พบการผลิตกรดไขมัน ARA อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในครั้งนี้อุณหภูมิที่เหมาะสมคือที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ซึ่งให้มวลเซลล์เท่ากับ 34.31 กรัมต่อลิตรและให้การผลิต ARA สูงที่สุดเท่ากับ 44.7 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังผ่านการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน พบว่าราไอโซเลทดังกล่าวใช้กลูโคสเพื่อการเจริญจนเกือบหมด จากกลูโคสเริ่มต้น 6 เปอร์เซ็นต์ เหลือกลูโคสเพียง 0.75 เปอร์เซ็นต์ ถึงแม้ว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสจะมีการเจริญและการผลิตกรดไขมัน ARA ที่น้อยกว่าที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสแต่ก็เพียงเล็กน้อย โดยให้มวลเซลล์และให้การผลิตกรดไขมัน ARA เท่ากับ 35.22 กรัมต่อลิตรและ 36.2 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมดตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังผ่านการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน พบว่าราไอโซเลทดังกล่าวใช้กลูโคสเพื่อการเจริญจนเกือบหมดเช่นกัน จากกลูโคสเริ่มต้น 6 เปอร์เซ็นต์ เหลือกลูโคสเพียง 0.80 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

จากหลายการทดลองที่ผ่านมา รวมถึงการศึกษาในครั้งนี้พบว่าการบ่มที่อุณหภูมิต่ำจะช่วยให้กระตุ้นให้การผลิตกรดไขมัน ARA สูงขึ้น ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากจุลินทรีย์มีการปรับตัวเพื่อให้อยู่รอดในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำ ซึ่งโดยปกติแล้วเมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมจะมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของกรดไขมันบางชนิดเพื่อให้จุลินทรีย์สามารถอยู่รอดได้ (Russell, 1984) โดยมีแนวโน้มที่จะผลิตกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวเพิ่มสูงขึ้นเพื่อรักษาสภาวะของของเหลวในเมมเบรน (membrane fluidity) (Suutari and Lassko, 1994) ในส่วนของ การเจริญนั้นพบว่าลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงหรือต่ำเกินไป ซึ่งเมื่ออุณหภูมิสูงหรือต่ำเกินไปจะไปมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) ในกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) และวัฏจักรเครปส์ (Kreb's cycle) ทำให้เมแทบอลิซึมของแหล่งคาร์บอนลดลง ดังนั้นจึงส่งผลต่อการผลิตกรดไขมันดังกล่าว เนื่องจากกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะไม่ว่าจะเป็นกลุ่มใดก็ตามต่างก็เป็นสาร

เมแทบอไลต์ปฐมภูมิ (primary metabolite) โดยจะมีการผลิตควบคู่ไปกับการเจริญ (Jang *et al.*, 2005) ดังนั้นหากต้องการผลผลิตกรดไขมัน ARA ในปริมาณที่สูงควรเริ่มจากการเลี้ยงรากล่าวด้วยอุณหภูมิประมาณ 25 ถึง 30 องศาเซลเซียสเพื่อให้รามีการเจริญที่ดีซึ่งจะให้มวลเซลล์ที่สูง จากนั้นจึงย้ายไปเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำก็จะสามารถช่วยเพิ่มผลผลิตกรดไขมันดังกล่าวได้

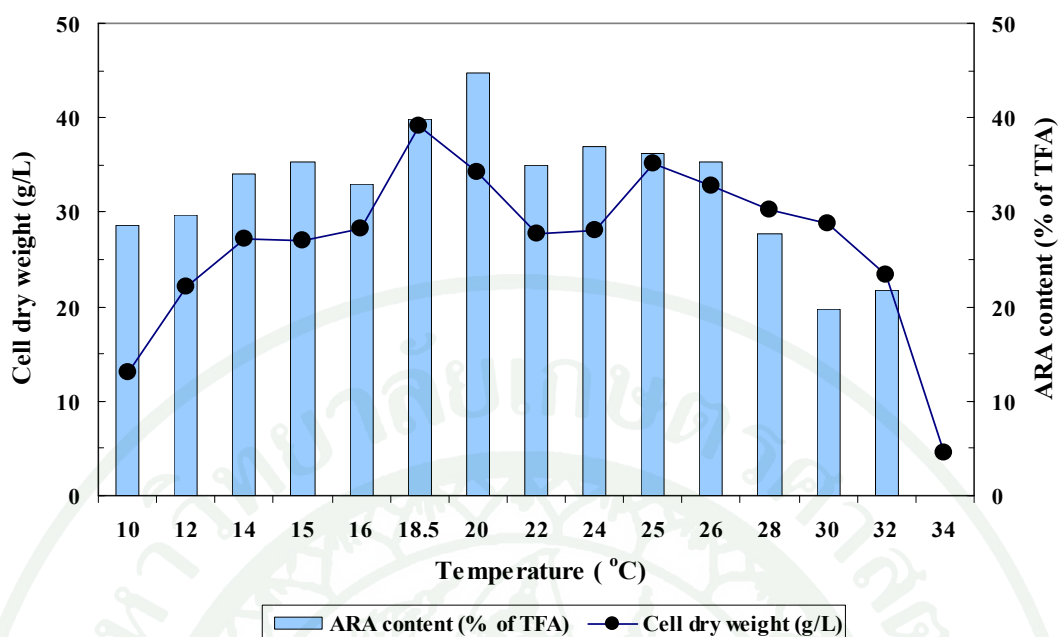


ตารางที่ 13 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะของราไอโซเลท WA-1

Temperature (°C)	Glucose con. (%)		Cell dry weight (g/L)	% of Total fatty acids										
	initial	final		14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3 α	18:3 γ	20:4	20:5	22:6
10.0	6.0	2.33	12.97	3.1	24.5	-	19.5	10.0	8.5	1.7	-	28.6	-	-
12.0	6.0	1.89	22.18	2.6	19.0	-	16.1	7.4	7.3	3.8	-	29.7	-	-
14.0	6.0	1.66	27.24	2.0	17.6	-	15.5	6.7	6.8	4.0	-	34.1	-	-
15.0	6.0	1.90	26.96	1.8	17.3	-	15.0	6.6	6.7	3.8	-	35.4	-	-
16.0	6.0	1.53	28.26	1.8	18.0	-	15.3	7.2	7.4	4.0	-	33.0	-	-
18.5	6.0	1.40	39.06	1.3	16.8	-	11.9	6.9	6.9	4.3	-	39.8	-	-
20.0	6.0	0.75	34.31	1.0	15.2	-	10.2	5.4	6.1	4.1	-	44.7	-	-
22.0	6.0	1.25	27.75	1.2	20.35	-	11.9	10.2	8.5	4.9	-	35.0	-	-
24.0	6.0	1.43	28.11	1.2	18.1	-	9.9	10.9	8.4	4.7	-	37.0	-	-
25.0	6.0	0.80	35.22	0.9	16.7	-	10.1	11.6	8.4	4.3	-	36.2	-	-
26.0	6.0	0.47	32.73	0.8	16.8	-	10.5	11.5	8.8	4.2	-	35.3	-	-
28.0	6.0	1.34	30.2	0.8	20.2	-	9.1	16.3	10.4	3.8	-	27.7	-	-

ตารางที่ 13 (ต่อ)

Temperature (°C)	Glucose con. (%)		Cell dry weight (g/L)	% of Total fatty acids										
	initial	final		14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3 α	18:3 γ	20:4	20:5	22:6
30.0	6.0	1.12	28.82	-	21.1	-	11.3	21.2	12.0	2.9	-	19.8	-	-
32.0	6.0	3.30	23.32	-	25.2	-	10.9	15.9	13.4	3.1	-	21.7	-	-
34.0	6.0	5.00	4.49	-	70.9	-	15.5	20.2	22.5	-	-	-	-	-



ภาพที่ 23 กราฟแสดงผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะของราไอโซเลท WA-1 โดยการเพาะเลี้ยงในหลอดรูปตัวแอลซึ่งบรรจุอาหารเหลว soy isolate ปริมาตร 10 มิลลิลิตรบ่มในเครื่อง temperature gradient incubator ที่มีการปรับอุณหภูมิในช่วง 10 ถึง 34 องศาเซลเซียส เครื่องดังกล่าวมีการเขย่าขึ้นลงด้วยอัตรา 35 ครั้งต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

5.2 อิทธิพลของระยะเวลาที่ใช้ในการบ่ม

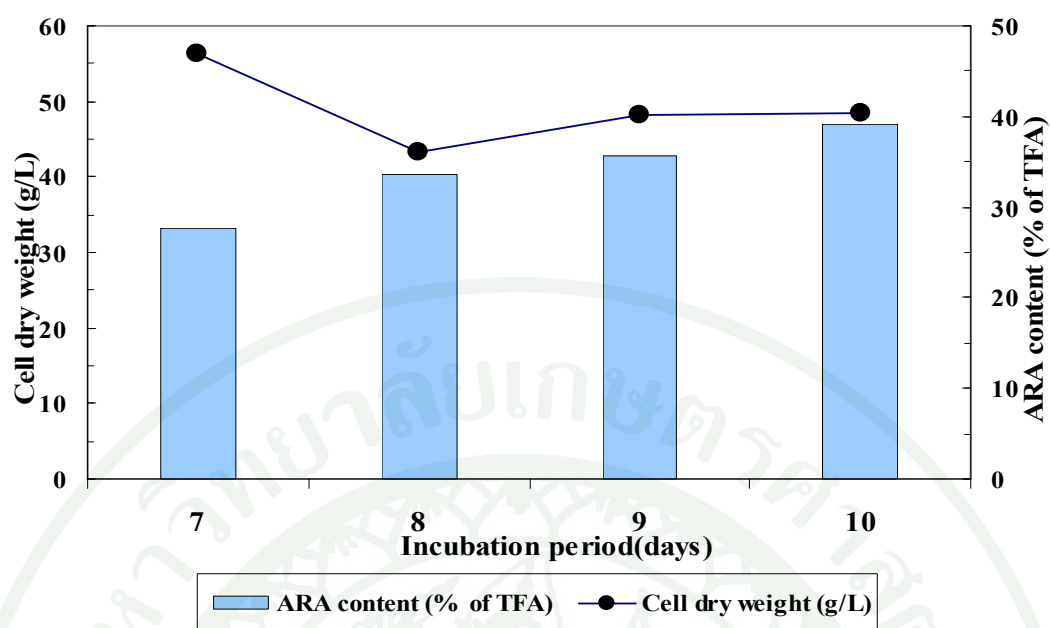
ในการศึกษาอิทธิพลของระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มทำการเพาะเลี้ยงราไอโซเลท WA-1 ในอาหารเหลว soy isolate ปริมาตร 100 มิลลิลิตรบรรจุในฟลasks ขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 5.1 ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7, 8, 9 และ 10 วัน ผลแสดงดังตารางที่ 14 และภาพที่ 24

จากการศึกษาพบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มช่วงจากวันที่ 7 จนกระทั่งถึงวันที่ 10 นั้นช่วยกระตุ้นการผลิตกรดไขมัน ARA ให้เพิ่มสูงขึ้น ถ้าหากมีการเพาะเลี้ยงต่อไปอีกมีแนวโน้มว่าการสะสมปริมาณกรดไขมัน ARA จะเพิ่มขึ้น แต่ในส่วนของ การเจริญนั้นดูเหมือนว่าจะคงที่ ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากกลูโคสซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่อยู่ภายในอาหารถูกใช้เพื่อการเจริญในระยะ log phase อย่างรวดเร็ว โดยน้ำตาลจะถูกใช้หมดไปก่อนวันที่ 7 จากผลการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่วันที่ดังกล่าวจนถึงวันที่ 10 นั้นพบว่าไม่เหลือกลูโคสอยู่เลย ดังนั้นจึงส่งผล

ให้การเจริญคงที่ และหากทำการเพาะเลี้ยงต่อไปอีก จากวันที่มีการสะสมของกรดไขมัน ARA สูงที่สุดแล้ว คาดว่าหลังจากนั้นการสะสมของกรดไขมันดังกล่าวจะลดลง เนื่องมาจากกลูโคสเพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารได้ถูกใช้ไปจนหมด ซึ่งก่อนหน้านี้จุลินทรีย์ได้ใช้กลูโคสเพื่อสังเคราะห์กรดไขมันสำหรับเก็บไว้เป็นแหล่งสำรอง (reserve storage) ขามขาดแคลน และเมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม หรือขาดแคลนสารอาหาร ซึ่งในที่นี้ก็คือขาดแหล่งคาร์บอน ดังนั้นจุลินทรีย์จึงจำเป็นต้องดึงกรดไขมันที่เก็บสำรองไว้ออกมาใช้เพื่อเป็นแหล่งพลังงานจึงทำให้กรดไขมันมีปริมาณลดลง (Holdworth and Ratledge, 1988) การศึกษาในครั้งนี้พบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มที่เหมาะสมคือที่ระยะเวลา 9-10 วัน ซึ่งวันที่ 9 ให้มวลเซลล์เท่ากับ 48.15 กรัมต่อลิตรและการผลิตกรดไขมัน ARA เท่ากับ 35.7 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด ในวันที่ 10 ให้มวลเซลล์เท่ากับ 48.39 และการผลิตกรดไขมัน ARA เท่ากับ 39.1 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด ในขณะที่ Yuan *et al.* (2002) พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงคือที่ระยะเวลา 6 วัน ซึ่งระยะเวลาดังกล่าวให้มวลเซลล์และการผลิต ARA สูงที่สุด โดยทำการศึกษาใน *M. alpina* I₄₉-N₁₈

ตารางที่ 14 ผลของระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะของราไอโซเลท WA-1

Time (days)	Glucose con. (%)		Cell dry weight (g/L)	% of Total fatty acids										
	initial	final		14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3 α	18:3 γ	20:4	20:5	22:6
7	6.0	0	56.40	0.7	21.2	-	11.5	9.5	10.4	3.8	-	27.6	-	-
8	6.0	0	43.19	0.4	20.0	-	10.7	8.2	8.7	4.0	-	33.6	-	-
9	6.0	0	48.15	-	18.3	0.5	9.6	7.4	8.4	3.8	-	35.7	-	-
10	6.0	0	48.39	-	17.8	-	9.2	7.1	7.9	4.0	-	39.1	-	-



ภาพที่ 24 กราฟแสดงผลของระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะของราไอโซเลท WA-1 โดยการเพาะเลี้ยงพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว soy isolate ปริมาตร 100 มิลลิลิตรบ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7, 8, 9 และ 10 วัน

5.3 อิทธิพลของพีเอชเริ่มต้น

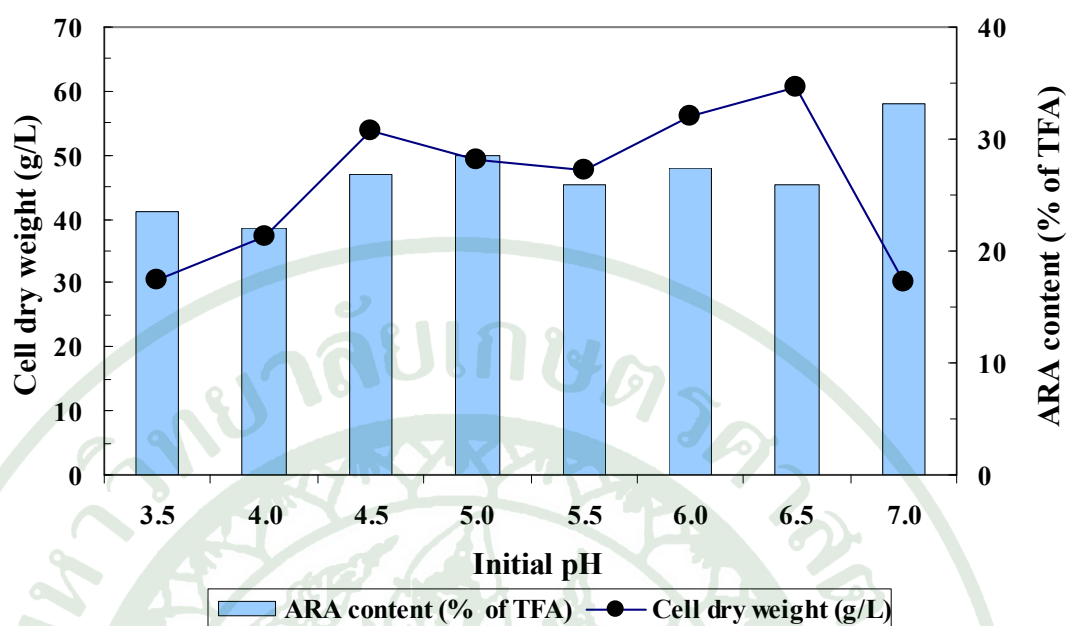
การศึกษาถึงอิทธิพลของพีเอชเริ่มต้นทำโดยการเพาะเลี้ยงราไอโซเลท WA-1 ในอาหารเหลว soy isolate ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บรรจุในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งอาหารดังกล่าวได้มีการปรับพีเอชเริ่มต้นที่แตกต่างกันดังนี้ คือ 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 7 วันผลแสดงดังตารางที่ 15 และภาพที่ 25

จากการศึกษาพบว่าราไอโซเลท WA-1 เจริญได้ค่อนข้างดีในพีเอชเริ่มต้นในช่วง 4.5 ถึง 6.5 ซึ่งเป็นช่วงพีเอชที่ค่อนข้างกว้างและเมื่อพีเอชต่ำกว่า 4.5 หรือสูงกว่า 6.5 การเจริญจะลดลงส่งผลให้การผลิตมวลเซลล์ลดลง ที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 ให้มวลเซลล์สูงที่สุดเท่ากับ 60.72 กรัมต่อลิตร ส่วนการผลิตกรดไขมัน ARA ผลิตได้สูงสุดที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 ในขณะที่ Bajpai *et al.* (1991) ได้ทำการศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการผลิตมวลเซลล์และการ

ผลิตกรดไขมัน ARA ใน *M. alpina* ATCC 16266 โดยพบว่าการผลิตมวลเซลล์ และการผลิตกรดไขมัน ARA สูงสุดที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 จากการศึกษาในครั้งนี้ถึงแม้ว่าที่พีเอชเริ่มต้น 7.0 ให้การผลิตกรดไขมัน ARA ที่สูงที่สุดเท่ากับ 33.1 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด แต่ให้มวลเซลล์ต่ำที่สุดเท่ากับ 30.25 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงส่งผลให้ปริมาณการผลิตกรดไขมัน ARA ในภาพรวมยังไม่สูงมากนัก และจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแบบแคปิลลารี (GC) บ่งชี้ว่าที่พีเอชเริ่มต้น 5.0 ถูกเลือกให้เป็นพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมถึงแม้ว่าจะให้การเจริญในระดับกลางๆ แต่จากโครมาโทแกรมให้พื้นที่กราฟกรดไขมัน ARA ขนาดใหญ่ที่สุด ซึ่งสะท้อนถึงปริมาณของกรด ARA ที่มีปริมาณสูงสุด อย่างไรก็ตามที่พีเอชเริ่มต้น 5.0 นั้นให้มวลเซลล์เท่ากับ 49.10 กรัมต่อลิตร และให้ปริมาณการผลิตกรดไขมัน ARA เท่ากับ 28.5 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังผ่านการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน พบว่าราไอโซเลทดังกล่าวใช้กลูโคสเพื่อการเจริญจนเกือบหมด จากกลูโคสเริ่มต้น 6 เปอร์เซ็นต์ เหลือกลูโคสเพียง 0.08 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 15 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะของราไอโซเลท WA-1

Initial pH	Glucose con. (%)		Cell dry weight (g/L)	% of Total fatty acids										
	initial	final		14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3 α	18:3 γ	20:4	20:5	22:6
3.5	6.0	0.96	30.31	1.2	27.5	-	8.8	17.9	11.8	4.3	-	23.4	-	-
4.0	6.0	0.12	37.16	0.8	26.0	-	9.4	18.7	13.0	4.3	-	22.0	-	-
4.5	6.0	0.10	53.89	0.7	25.1	-	9.5	15.7	11.2	4.3	-	26.9	-	-
5.0	6.0	0.08	49.10	0.5	21.3	0.5	10.6	13.8	12.4	4.4	-	28.5	-	-
5.5	6.0	0	47.52	0.6	19.1	-	13.0	14.0	14.7	4.5	-	25.9	-	-
6.0	6.0	0	55.98	0.7	19.4	-	13.4	11.7	14.3	4.2	-	27.4	-	-
6.5	6.0	0	60.72	-	20.7	-	14.4	12.7	14.5	4.5	-	26.0	-	-
7.0	6.0	0	30.25	-	20.1	-	13.7	8.8	12.2	4.3	-	33.1	-	-



ภาพที่ 25 กราฟแสดงผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะของราไอโซเลท WA-1 โดยการเพาะเลี้ยงพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว soy isolate ปริมาตร 100 มิลลิลิตรบ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

5.4 อิทธิพลของอัตราการให้อากาศ

การศึกษาถึงอิทธิพลของอัตราการให้อากาศทำได้โดยการเพาะเลี้ยงราไอโซเลท WA-1 ในอาหารเหลว soy isolate ที่มีการปรับปริมาณอาหารที่แตกต่างกันดังนี้ คือ 50, 75, 100, 125, 150, 175 และ 200 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุใน พลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตรโดยอาศัยหลักการที่ว่าปริมาณอาหารในพลาสติกจะมีอัตราส่วนผกผันกับปริมาณการละลายของออกซิเจน จากนั้นนำไป บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 7 วัน แสดงผลดังตารางที่ 16 และภาพที่ 26

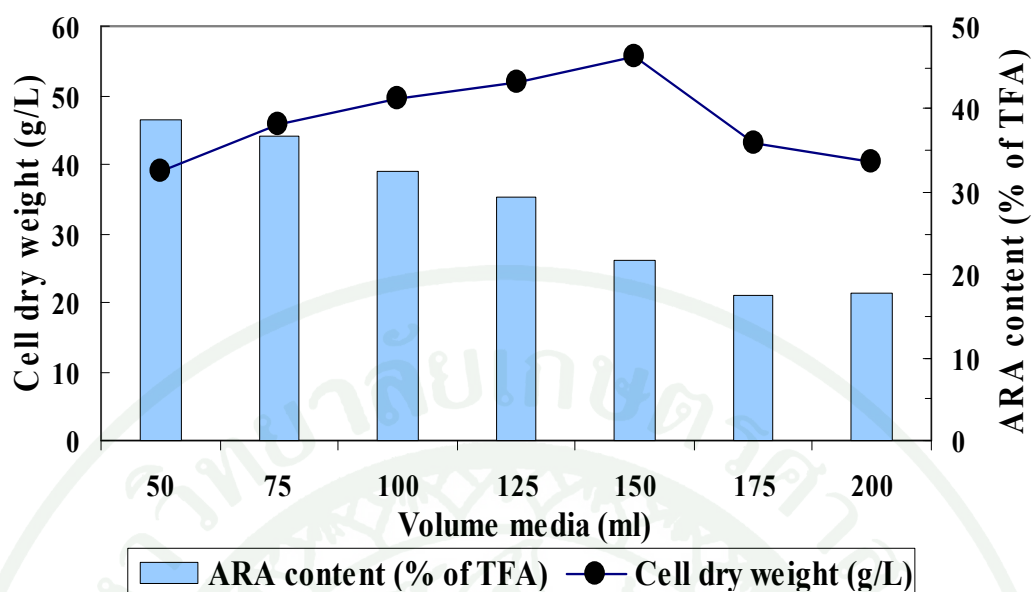
Goldstein and Belsky (1964) ได้กล่าวไว้ว่าออกซิเจนเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มที่ต้องการออกซิเจนโดยเฉพาะรา ซึ่งการให้อากาศมีผลต่อการเจริญของเซลล์ผลิตกรดไขมัน (fatty acid yield) และการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มี 2 (dienoic) และ 3 (trienoic) พันธะคู่ (Chen and Johns, 1991) เนื่องจาก desaturase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำให้เกิดพันธะคู่ขึ้นในโมเลกุลของกรดไขมันเป็น oxygen-dependent enzyme ซึ่งในการทำงานของเอนไซม์

จำเป็นจะต้องมีโมเลกุลของออกซิเจนมารับโมเลกุลของไฮโดรเจน โดยได้จากการรีดิวซ์ กรดไขมันที่ใช้เป็นสารตั้งต้นได้เป็นน้ำ ซึ่งถ้ามีโมเลกุลของออกซิเจนอยู่ในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงมากจะมีผลทำให้เพิ่มปริมาณการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะได้ (รุ่งฤดี, 2543)

Higashiyama *et al.* (1998) ได้ทำการศึกษาใน *M. alpina* 1S-4 โดยทำการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าความเข้มข้นของค่าการละลายของออกซิเจน (Dissolve Oxygen, DO) ที่สูงกว่าในระดับ 10-15 พีพีเอ็ม จะช่วยกระตุ้นการผลิต ARA ได้สูงกว่า 6 เท่า เมื่อเทียบกับค่า DO ที่ 7 พีพีเอ็ม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ที่เห็นได้ชัดเจนว่าที่อัตราการให้อากาศในระดับที่สูงกว่า (ปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตร) จะให้การผลิตกรดไขมัน ARA ในปริมาณที่มากกว่า โดยพบว่าปริมาณการผลิตกรดไขมัน ARA จะลดหลั่นลงไปตามระดับอากาศที่ได้รับ ถึงแม้ว่ามวลเซลล์จะสูงที่สุดที่อัตราการให้อากาศในระดับปานกลางก็ตาม ซึ่งที่ปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตรนั้นได้รับอากาศในระดับที่สูงที่สุด พบว่าให้ปริมาณการผลิตกรดไขมัน ARA ที่สูงที่สุดเท่ากับ 38.7 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด และให้มวลเซลล์เท่ากับ 39.11 กรัมต่อลิตร และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังผ่านการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน พบว่าราไอโซเลทดังกล่าวใช้กลูโคสเพื่อการเจริญจนเกือบหมด จากกลูโคสเริ่มต้น 6 เปอร์เซ็นต์ เหลือกลูโคสเพียง 0.13 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ปริมาตรอาหาร 150 มิลลิลิตร ซึ่งได้รับอากาศในระดับปานกลาง พบว่าให้มวลเซลล์สูงที่สุดเท่ากับ 55.47 กรัมต่อลิตร และให้การผลิต ARA เท่ากับ 21.8 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด

ตารางที่ 16 ผลของอัตราการใช้อากาศต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะของราไอโซเลท WA-1

Volume of media in 500 ml flask	Glucose con. (%)		Cell dry weight (g/L)	% of Total fatty acids										
	initial	final		14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3 α	18:3 γ	20:4	20:5	22:6
50	6.0	0.13	39.11	0.4	15.0	0.4	9.3	6.3	7.6	4.5	-	38.7	-	-
75	6.0	0.11	45.86	0.4	15.9	0.5	9.2	6.6	8.8	4.3	-	36.6	-	-
100	6.0	0.11	49.49	0.4	18.7	0.2	10.1	7.6	10.0	4.3	-	32.6	-	-
125	6.0	0.10	51.84	0.5	18.3	0.7	10.8	8.2	11.6	4.2	-	29.4	-	-
150	6.0	0.19	55.47	0.4	18.6	0.4	13.5	12.0	13.8	3.9	-	21.8	-	-
175	6.0	0.62	42.93	-	21.3	-	15.5	13.7	12.1	3.2	-	17.5	-	-
200	6.0	1.24	40.24	0.7	18.7	0.4	15.2	14.2	13.6	3.8	-	17.9	-	-



ภาพที่ 26 กราฟแสดงผลของอัตราการใช้อากาศต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะของราไอโซเลท WA-1 โดยการเพาะเลี้ยงพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว soy isolate ในปริมาณที่แตกต่างกันออกไป บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน

สรุปและข้อเสนอแนะ

ทำการคัดแยกและคัดเลือกราก *Mortierella* จากบริเวณจังหวัดต่างๆในภาคเหนือของประเทศไทย ได้จำนวนทั้งสิ้น 151 ไอโซเลท ทำการคัดเลือกขึ้นปฐภูมิและทุติยภูมิ โดยทดสอบคุณสมบัติในการสร้างกรดไขมัน ARA พบว่า *Mortierella* sp. ไอโซเลท WA-1 ซึ่งแยกได้จากดินบริเวณโครงการหลวงดอยอ่างขาง อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่มีศักยภาพในการผลิต ARA สูงสุด ดังนั้นจึงคัดเลือกมาการศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต ARA

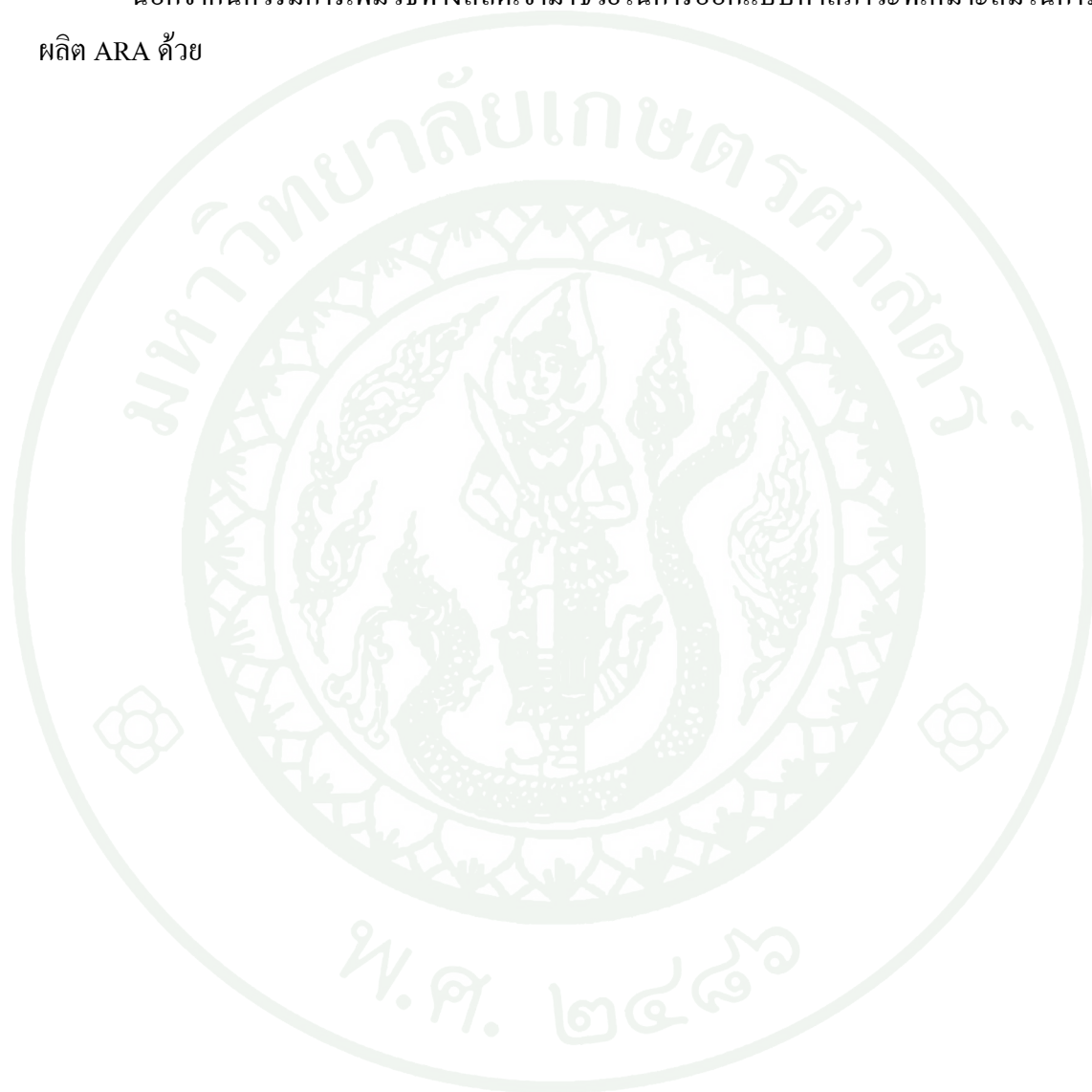
ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับการศึกษาทางพันธุศาสตร์โดยการพิจารณาจากลำดับเบสของยีน 18S rRNA เปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับเบสของยีน 18S rRNA ของจุลินทรีย์ในฐานข้อมูล NCBI เพื่อสร้าง phylogenetic tree ร่วมกันกับจุลินทรีย์อ้างอิง 16 สายพันธุ์พบว่า *Mortierella* sp. WA-1 จัดอยู่ในสกุล *Mortierella alpina*

ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสูตรอาหารที่เหมาะสมพบว่าชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต ARA ในไอโซเลท WA-1 คือ กลูโคส โดยในอาหารที่มีกลูโคสเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ให้มวลเซลล์และการผลิต ARA สูงสุดเท่ากับ 31.63 กรัมต่อลิตรและ 21.11 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมดตามลำดับ สำหรับแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต ARA คือแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับ soy isolate 0.84 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้มวลเซลล์และการผลิต ARA สูงสุดเท่ากับ 58.14 กรัมต่อลิตรและ 29.97 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด โดยเมื่ออัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 17:1 ให้มวลเซลล์และการผลิต ARA เท่ากับ 35.29 กรัมต่อลิตรและ 24.4 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด

การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต ARA ได้แก่ อุณหภูมิ พีเอช ระยะเวลาที่ใช้ในการบ่ม และอัตราการให้อากาศ โดยพบว่าไอโซเลท WA-1 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำคือในช่วง 10-26 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต ARA เท่ากับ 25 องศาเซลเซียส ส่วนการปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารพบว่าไอโซเลทดังกล่าวสามารถเจริญได้ดีช่วงพีเอชที่กว้างคือตั้งแต่ 4.5 ถึง 6.5 ซึ่งพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.0 เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต ARA ส่วนระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มพบว่าการเพาะเลี้ยงในช่วงตั้งแต่วันที่ 7 จนถึงวันที่ 10 ช่วยกระตุ้นการผลิต ARA ให้เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มที่เหมาะสมคือที่ระยะเวลา 9-10 วัน โดยวันที่ 9 ให้มวลเซลล์เท่ากับ 48.15 กรัมต่อลิตรและการผลิตกรดไขมัน ARA

เท่ากับ 35.7 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด ในวันที่ 10 ให้มวลเซลล์เท่ากับ 48.39 และการผลิตกรดไขมัน ARA เท่ากับ 39.1 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด ในส่วนของอัตราการให้อากาศพบว่าที่อัตราการให้อากาศในระดับสูง มีผลทำให้ราเจริญและสร้าง ARA ได้ดีที่สุด

นอกจากนี้ควรมีการเพิ่มวิธีทางสถิติเข้ามาช่วยในการออกแบบหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต ARA ด้วย



เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ธัญวัฒน์ ใจใส. 2545. การคัดเลือกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัว
หลายพันธะจากจุลินทรีย์ป่าชายเลน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มนตรี จุฬาวรรณ, ชัยนุสรณ์ สวัสดิวัฒน์, ยงยุทธ ยุทธวงศ์, ภิญโญ พานิชพันธ์, ประหยัด
โกมารทัต, พิณทิพย์ รื่นวงษา, ชัยยศ วิทิตสุวรรณกุล, บุรชัย สอนยานนท์, สุมาลี ตั้ง
ประดับกุล และ มธุรส พงษ์ลิขิตมลค. 2542. **ชีวเคมี**. พิมพ์ครั้งที่ 2 ห้างหุ้นส่วนจำกัด
จิรัชการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

รุ่งฤดี ทิวทอง. 2543. การคัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงเพื่อการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวอย่าง
ยิ่งยวด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Abe, T., E. Sakuradani, T. Asno, H. Kanamaru, Y. Ioka and S. Shimizu. 2005. Identification of
mutation sites on Δ^6 desaturase genes from *Mortierella alpina* 1S-4 mutants. **Biosci.**
Biotechnol. Biochem. 5: 1021-1024.

Aki, T., Y. Nagahata, K. Ishihara, Y. Tanaka, T. Morinaga, K. Higashiyama, K. Akimoto, S.
Fujikawa, S. Kawamoto, S. Shigeta, K. Ona and O. Suzuki. 2001. Production of
arachidonic acid by filamentous fungus, *Mortierella alliacea* strain YN-15. **J. Am. Oil.**
Chem. Soc. 78: 599-604.

Amano, N., Y. Shinmen, K. Akimoto, H. Kawashima and T. Amachi. 1992. Chemotaxonomic
significance of fatty acid composition in the genus *Mortierella* (Zygomycetes,
Mortierellaceae). **Mycotaxon.** 44: 257-265.

Bajpai, P.K. and P. Bajpai. 1992. Review: arachidonic acid production by microorganisms.
Biotechnol. Appl. Biochem. 15: 1-10.

- Bajpai, P.K., P. Bajpai and O.P. Ward. 1991a. Arachidonic acid production by fungi. **Appl. Environ. Microbiol.** 57: 1255-1258.
- Bajpai, P.K., P. Bajpai and O.P. Ward. 1991b. Production of arachidonic acid by *Mortierella alpina* ATCC 32222. **J. Ind. Microbial.** 8: 179-186.
- _____, P.K., P. Bajpai and O.P. Ward. 1991b. Production of arachidonic acid production by *Mortierella alpina* ATCC 32222. **J. Indust. Microbiol.** 8: 179-186.
- Barclay WR. 2003. Method for production of arachidonic acid. **United States Patent.** 6:541-549.
- Bigogno, C., I. Khozin-Goldberg, D. Alderstein and Z. Cohen. 2002. Biosynthesis of arachidonic acid in oleaginous microalga *Parietochloris insica* (Chlorophyceae): radiolabeling studies. **Lipids**, 37: 209-216.
- Birch, EE., S. Garfield, DR. Hoffman, R. Uay and D. Birch. 2000. A randomized controlled trail of dietary supply of long-chain polyunsaturated fatty acids and mental development in term infants. **Dev. Med. Child Neurol.** 42: 174-181.
- Blight, E.G. and W.J. Dyer. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.** 37: 911-917.
- Botha, A., I. Paul, C. Roux, J.L.F. Kock, D.J. Coetzee, T. Strauss and C. Maree. 1999. An isolation procedure for arachidonic acid producing *Mortierella* species. **Anton. Van Leeuw. J. Microb.** 75: 253-256.
- Burja, A.M., H. Radianingtyas, A. Windust and C.J. Barrow. 2006. Isolation and characterization of polyunsaturated fatty acids producing *Thraustochytrium* species: screening of strains and optimization of omega-3 production. **Appl. Microbiotechnol.** 72: 1161-1169.

- Burn, R.A., G.J. Wilbert, D.A. Diersen-Schade and C.M. Kelly. 1999. Evaluation of single-cell sources of docosahexaenoic acid and arachidonic acid: 3-month rat oral safety study with an utero phase. **Food Chem. Toxicol.** 37: 23-36.
- Canuto, R.A., G. Muzio, M.E. Biocca, and M.U. Dianzani, 1991. Lipid peroxidation in rat AH-130 hepatoma cells enriched in vivo with arachidonic acid. **Cancer Res.** 51: 4603-4608.
- Carreiro, M. M. and R. E. Koske. 1992. Room temperature isolations can bias against selection of low temperature microfungi in temperate forest soils. **Mycologia.** 84: 886-900.
- Carlson, S.E., S.H. Werkman, J.M. Peeples, R.J. Cooke, and E.A. Tolley. 1993. Arachidonic acid status correlates with first year growth in preterm infants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 90: 1073-1077.
- Certik, M. and S. Shimizu. 1998. Progress in polyunsaturated fatty acid production by fungi. **Recent Res. Devel. In Oil Chem.** 2: 89-103.
- _____, M. and S. Shimizu. 1999. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. **J. Biosci. Bioeng.** 87: 1-14.
- Chang, C.C., H.C. Chen. 1994. Arachidonic acid production by *Mortierella alpina*. **J. Chin. Agric. Chem. Soc.** 32: 395-405.
- Chen, F. and M.R. Johns. 1991. Effect of C/N ratio and aeration on the fatty acid composition of heterotrophic *Chlorella sorokiniana*. **J. Appl. Phycol.** 3: 203-209.
- Chen, H.C., C.C. Chang and C.X. Chen. 1997. Optimization of arachidonic acid production by *Mortierella alpina* Wuji-H4 isolate. **J. Am. Oil. Chem. Soc.** 74: 569-578.

- Christie, W.W. 2010. **Fatty acids: methylene-interrupted doublebonds (structures occurrence and biochemistry)**. Available source: http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/fa_poly/index.htm, March 11, 2010.
- Cordian, L. 2002. **Fatty acid in oil: Fatty Acid Content of Refined Vegetable Oils**. The Paleo Diet. Available Source: <http://www.thepaleodiet.com/fatsoils.htm>, August 29, 2005.
- Das, U.N., M.E. Begin, Y.S. Huang and D.F. Horrobin. 1987. Polyunsaturated fatty acids augment free radical generation in tumor cells *in vitro*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 145: 15-24.
- Deacon, J.W. 1997. Modern mycology 3rd ed. **Black well Science. Inc., Cambridge, London.** 303 p.
- Domsch, K.H., W. Gams and T.H. Anderson. 1993. **Compendium of soil fungi (1st ed.)**. London.
- Doyle, M.J., P.R. Nemeth, M. L. Skoglund, and K.G. Mandel. 1989. *In vivo* assessment of precursor induced prostaglandin release within the rat gastric lumen. **Prostaglandins.** 38: 581-597.
- Du preez, J.C., M. Immelman, J.L.F. Kock, S.G. Killian. 1997. The effect of acetic acid concentration on the growth and production of γ -lonolenic acid by *Mucor circinelloides* CBS203.28 in fed-batch culture. **World J. Microb. Biot.** 13: 81-87.
- Dyal, S.D., L. Bouzidi and S.S. Narine. 2005. Maximizing the production of γ -lonolenic acid in *Mortierella ramanniana* var. *Ramanniana* as a function of pH, temperature and carbon source, nitrogen source, metal ions and oil supplementation. **Food Res. Int.** 38: 815-829.
- Dyal, S.D., and S.S. Narine. 2005. Implication for use of Morteierella fungi in the industrial production of essential fatty acids. **Food Res. Int.** 38: 445-467.

Emelyanova, E.V., 1997. Lipid and γ -linoleic acid production by *Mucor inaequisporus*.

Process Biochem. 32: 173-177.

Erasmus, U. (1993). **Fats that heal fats that kill**. Burnaby, BC: Alive Books.

Eroshin, V.K., E.G. Dedyukhina, T.I. Christyakova, V.P. Zhelifonova, C.P. Kurtzman and R.J. Bothast. 1996. Arachidonic-acid production by species of *Mortierella*. **World J Microb. Biot.** 12: 91-96.

_____, V.K., A.D. Satroutdinov, E.G. Dedyukhina and T.I. Christyakova. 2000. Arachidonic acid production by *Mortierella alpina* growth-coupled lipid synthesis. **Process Biochem.** 35: 1771-1175.

Facciotti, D., R.Valentine, J. Metz and 7 other authors. 1998. Cloning and characterization of polyunsaturated fatty acids (PUFA) genes from marine bacteria. **Abstracts of the Internationa Symposium on Progress and Prospectives of Marine Biotechnology**, 5-10 October, Qingdao, China.

Gandhi, S.R. and J.D. Weete. 1991. Production of polyunsaturated fatty acids arachidonic acid and eicosapentaenoic acid by the fungus *Pythium ultimum*. **J. Gen. Microbiol.** 137: 1825-1830.

Gil, A. 2002. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory diseases. **Biomed. Pharmacother.** 56: 388-396.

Gill, I. and R. Valivety. 1997. Polyunsaturated fatty acids, Part I: occurrence, biological activities and applications. **Trends Biotechnol.** 15: 401-409.

- Goheen S.C., E.C. Larkin, M. Manix, and G.A. Rao. 1980. Dietary arachidonic acid reduces fatty liver, increases diet consumption and weight gain in ethanol-fed rats. **Lipids**. 15: 328-336.
- Goldstein, S. and M. Belsky. 1964. Axenic culture studies of a new marine Phycomycete possessing an unusual type of asexual reproduction. **Am. J. Bot.** 51: 72-78.
- Guchhait, R.H., S.E. Polakis, P. Dimroth, E. Stoll, J. Moss and M.D. Lane. 1974. Acetyl-CoA carboxylase system of *E. coli*: Purification and properties of the biotin protein carboxylase, carboxytransferase and carboxyl carrier protein component. **J. Biol. Chem.** 249: 6633-6645.
- Hansson L., M. Donstalek, and B. Sorenby. 1989. Production of γ -linolenic acid by fungus *Mucor rouxii* in fed-batch and continuous culture. **Appl. Microbiol Biotechnol.** 31: 223-227.
- Hebborn, P., S. Jablonska, E.H. Beutner, A. Langer and K.G. Wolska. 1988. Action of topically applied arachidonic acid on the skin of patients with psoriasis. **Arch. Dermatol.** 124: 387-391.
- Hempenius, R.A., J.M. Van-Delft, M. prinsen and B.A. Lina. 1997. Preliminary safety assessment of arachidonic acid-enriched oil derived from *Mortierella alpina*: summary of toxicological data. **Food Chem. Toxicol.** 35: 573-581.
- Higashiyama, K., K. Murakami, H. Tsujimura, N. Matsumoto and S. Fujikawa. 1999. Effect of dissolved oxygen on the morphology of an arachidonic acid production by *Mortierella alpina* 1S-4. **Biotechnol. Bioeng.** 63: 442-448.
- Higashiyama, K., S. Fujikawa, E.Y. Park and S. Shimizu. 2002. Production of arachidonic acid by *Mortierella* fungi. **Biotechnol. Bioprocess Eng.** 7: 252-262.

- Higashiyama, K., T. Yamaguchi, K. Akimoto, S. Fujikawa and S. Shimizu. 1998. Effect of mineral addition on the growth morphology of an arachidonic acid production by *Mortierella alpina* 1S-4. **Am. Oil. Chem. Soc.** 75: 1815-1819.
- Holdworth, J.E. and C. Ratledge. 1988. Lipid turnover in oleaginous yeast. **J. Gen Microbiol.** 134: 339-346.
- Hollander, D., A. Tamawski, J. Ivey, A. Dezeery, R.D. Zipser, W.N. McKenzie and W.D. McFarland. 1982. Arachidonic acid protection of rat gastric mucosa against ethanol injury. **J. Lab. Clin. Med.** 100: 296-308.
- Holub, B.J. and C.M. Skeaff. 1987. Nutritional regulation of cellular phosphatidylinositol. **Methods in Enzymology.** 141: 234-244.
- Hwang, B.H., J.W. Kim, C.Y. Park, C.S. Park, Y.S. Kim and Y.W. Ryu. 2005. High-level production of arachidonic acid by fed-batch culture of *Mortierella alpina* using NH_4OH as a nitrogen source and pH control. **Biotechnol. Lett.** 27:731-735.
- Jang, H., Y. Lin and Sh. Yang. 2005. Effect of culture media and conditions on polyunsaturated fatty acids production by *Mortierella alpina*. **J. Biores. Technol.** 96:1633-1644.
- Kavadia, A., M. Komaitis, I. Chevalot, F. Blanchard, I. Marc and G. Aggelis. 2001. Lipid and gamma-linolenic acid accumulation in strains of Zygomycetes growing on glucose. **J. Am. Oil. Chem. Soc.** 78: 341-346.
- Kawashima, H., K. Akimoto, K. Higashiyama, S. Fujikawa and S. Shimizu. 2000. Industrial production of dihomogammalinolenic acid by a delta 5-desaturase-defective mutant of *Mortierella alpina* 1S-4 fungus. **J. Am. Oil. Chem. Soc.** 77:1135-1138.

- Kendrick, A. and C. Ratledge. 1992. Lipids of selected moulds grown for production of n-3 and n-6 polyunsaturated acids. **Lipids**. 27: 15-20.
- Koike, Y., H.J. Cai, K. Higashiyama, S. Fujikawa and M. Okabe. 2001. Effect of consumed carbon to nitrogen ratio on mycelial morphology and arachidonic acid production in cultures of *Mortierella alpina*. **J. Biosci. Bioeng.** 91: 382-389.
- Koskelo, E.K., K. Bosswell, L. Carl, S. Lanoue and D. Kyle. 1997. High level of dietary arachidonic acid triglyceride exhibit no subchronic toxicity in rats. **Lipids**. 32:397-405.
- Kyle, D.J. 1994. Microbial oil mixtures and uses thereof. **United States Patent**. 5: 374-657.
- _____, D.J. 1996. Arachidonic acid and methods for the production and use thereof. **PCT Patent WO96/21037**.
- _____, D.J. 1997. Arachidonic acid and methods for the production and use thereof. **United States Patent**. 5: 658-767.
- Lan, W.Z., W.M. Qin and L.J. Yu. 2002. Effect of glutamate on arachidonic acid production from *Mortierella alpina*. **Lett. Appl. Microbiol.** 35: 357-360.
- Lehninger, A. L., D. L. Nelson and M. M. Cox. 1993. **Principles of biochemistry** (2nd ed.). New York, NY: Worth.
- Leman, J. and A. Brakoniecka-Sikorska. 1996. Effect of growth conditions on biosynthesis of oil by *Mortierella ramanniana*. **Pol. J. Food and Nutri.** 5/46: 111-120.
- Li, Z.Y., Y. Yu, V.B. Yadav and O.P. Ward. 1995. Process for production of arachidonic concentrate by strain of *Mortierella alpina*. **Can. J. Chem. Eng.** 73: 135-139.

- Lindberg, A.M. and G. Molin. 1993. Effect of temperature and glucose supply on the production of polyunsaturated fatty acids by the fungus *Mortierella alpina* CBS 343.66 in fermenter culture. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 29:450-455.
- Lawson, L.D. and B.G. Hudhes. 1998. Triacylglycerol structure of plant and fungal oils containing γ -linoleic acid. **Lipids.** 23: 313-317.
- Marx, J.L. 1982. The leukotrienes in allergy and inflammation. **Science.** 215: 1380-1383.
- Nakahara, T., T. Yokocki, Y. Kamisaka and O. Suzuki. 1992. *Gamma*-linolenic acid from genus *Mortierella*. **Industrial applications of single cell oils.** 61-67. Champaign, IL: American oil Chemist Society.
- Okita, M., A. Miyamoto, Y. Wakabayashi and A. Watanabe. 1993. Improvement of polyunsaturated fatty acid deficiency in decompensated cirrhotic patients by arachidonic acid-rich oil capsules. 241-242. In: T. Yaguchi, H. Nakamura and M. Soma (eds.). **Advances in Polyunsaturated Fatty acid Research.** Elsevier Science Publishers B.V., The Netherland.
- Park, E.Y., Y. Koike, K. Akimoto, K. Higashiyama, S. Fujikawa and M. Okabe. 1999. Effect of nitrogen source on mycelial morphology and arachidonic production in cultures of *Mortierella alpina*. **J. Biosci. Bioeng.** 88: 61-67.
- Radwan, S.S. 1991. Sources of C₂₀-polyunsaturated fatty acids for biotechnological use. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 35:421-430.
- Ratlledge, C. 1989. **Microbial Lipids.** Vol. 2. Academic Press, London.
- _____, C. 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. **Biochimie.** 86: 807-815.

- Russell, N.J. and D.S. Nichols. 1999. Polyunsaturated fatty acids in marine bacteria- a dogma rewritten. **Microbiol.** 145: 767-779.
- Sajbidor, J., D. Kozelouiova and M. Certik. 1992. Influence of some metal ions on the lipid content and arachidonic acid production by *Mortierella* sp.. **Folia Microbiol.** 37: 404-406.
- _____, J., S. Dobronova and M. Certik. 1990. Arachidonic acid production by *Mortierella* sp. S-17: influence of C/N ratio. **Biotechnol. Lett.** 12:455-456.
- Shimizu, S. 2009. **Production of Useful Lipids by Filamentous Fungi**. Available source: <http://www.hakko.kais.kyoto-u.ac.jp/lab-e/projectAe.html>, October 1, 2009.
- _____, S., H. Kawashima, K. Akimoto, Y. Shinmen and H. Yamada. 1989. Conversion of linseed oil to an eicosapentaenoic acid containing oil by *Mortierella alpina* 1S-4 at low temperature. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 32: 1-4.
- _____, S., H. Kawashima, K. Akimoto, Y. Shinmen and H. Yamada. 1989. Production of dihomogamma-linolenic acid by *Mortierella alpina* 1S-4. **Am. Oil Chem. Soc.** 66: 237-241.
- _____, S., K. Akimoto, Y. Shinmen, H. Kawashima, M. Sugano and H. Yamada. 1991. Sesamine is a potent and specific inhibitor of Δ^5 desaturase in polyunsaturated fatty acid biosynthesis. **Lipids.** 26: 512-516.
- Shinmen, Y., S. Shimizu, K. Akimoto, H. Kawashima and H. Yamada. 1989. Production of arachidonic acid by *Mortierella* fungi: selection of a potent producer and optimization of culture conditions for large-scale production. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 31: 11-16.
- Simopoulos, A.P. 1989. Summary of the NATO advanced research workshop on dietary ω 3 and ω 6 fatty acids: biological effects and nutritional essentiality. **J. Nutr.** 119: 521-528.

- Singh, A. and O.P. Ward. 1997. Production of high yields of arachidonic acid in a fed-batch system by *Mortierella alpina* ATCC 32222. **Appl. Microbiol Biotechnol.** 48:1-5.
- Stredanska, S. and J. Sajbidor. 1993. Influence of carbon and nitrogen sources on the lipid accumulation and arachidonic acid production by *Mortierella alpina*. **Acta Biotechnol.** 13:185-191.
- Streekstra, H. 1997. On the safety of *Mortierella alpina* for the production of food ingredients, such as arachidonic acid. **J. Biotechnol.** 56: 153–165.
- Suutari M. and S. Laasko. 1994. Microbial fatty acids and thermal adaptation. **Crit Rev Microbiol.** 20: 285-328.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S.Kumar. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol. Biol. Evol.** 24: 1596-1599.
- Tatsuzawa, H. and E. Takizawa . 1995. Changes in lipid and fatty acid composition of *Pavlova lutheri*. **Phytochemistry.** 40: 397–400.
- Totani, N., K. Hyodo and T. Ueda. 2000. A study on new nitrogen source for cultivation of genus *Mortierella*. **J. Jpn. Oil Chem. Soc.** 49: 479–485.
- _____, N. and K. Oba. 1987. The filamentous fungus *Mortierella alpina*, high in arachidonic acid. **Lipids.** 22:1060-1062.
- _____, N. and K. Oba. 1988. A simple method for production of arachidonic acid by *Mortierella alpina*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 28: 135-137.
- Totani, N., K. Someya and K. Oba. 1992. Industrial production of arachidonic acid by *Mortierella*, in Industrial Applications of Single Cell Oils, edited by D.J. Kyle and C. Ratledge. **American Oil Chemist's Society**, Champaign. 52-60.

- Turner, M. 1963. Studies in the genus *Mortierella*. I. *Mortierella isabellina* and related species. **T. Brit. Mycol. Soc.** 46: 262–272.
- _____, M. and G.J.F. Pugh. 1961. Species of *Mortierella* from salt marsh. **Trans. Brit. Mycol. Soc.** 44: 243-252.
- Tyrrell, D. 1967. The fatty acid composition of 17 *Entomophthora* isolates. **Can. J. Microbiol.** 13: 755-760.
- Ward, O. 1995. Microbial production of long-chain PUFAs. **Inform.** 6: 683–688.
- _____, O.P. and A. Singh. 2005. Omega-3/6 fatty acids: alternative sources of production. **Pros Biochem.** 40: 3627-3652.
- Weber, R.W.S. and H.T. Tribe. 2003. Oil as a substrate for *Mortierella* species. **Mycologist.** 17: 134-139.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315-322. In M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White, eds. **PCR protocol: A Guide to Methods and Applications**. Academic Press, San Diego.
- Xiang-qin, W., Y. Jian-ming, Y. Cheng-ling, W. Ji and Y. Zeng-liang. 2002. The property and application of arachidonic acid. **Plasma Sci Technol.** 4: 1505-1510.
- Yamada, H., S. Shimizu and Y. Shinmen. 1987. Production of arachidonic acid by *Mortierella elongata* 1S-5. **Agric. Biol. Chem.** 51: 785-790.
- _____, H., S. Shimizu and Y. Shinmen. 1989. Biotechnological processes for production of polyunsaturated fatty acid. **J. Disper. Sci. Technol.** 10: 561-579.

Yongmanitchai, W. and O.P. Ward. 1989. Omega-3 fatty acids :alternative sources of production.

Proc. Biochem. 24:117-125.

Yu, L.J., W.M. Qin, W.Z. Lan, P.P. Zhou and M. Zhu. 2003. Improved arachidonic acids production from the fungus *Mortierella alpina* by glutamate supplementation.

Biores. Technol. 88: 265-268.

Yuan, Ch., J. Wang, Y. Shang, G. Gong, J. Yao and Z. Yu. 2002. Production of arachidonic acid by *Mortierella alpina* I₄₉-N₁₈. **Food Technol. Biotechnol.** 40:311-315.

Zhelifonova, V.P., G.A. Zinchenko, A.P. Belov, E.G. Dedyukhina and V.K. Eroshin. 1994. Study of the lipid composition in *Mortierella hygrophylla*, a producer of arachidonic acid. **Prikl Biochem Microbiol.** 30(4-5): 594-598.

Zhou, P.P., J. Yul, M. Zhu and X.G. Mei. 2000. Strain improvement of arachidonic acid production by protoplast mutagenesis. **J. Huazhong Univ. Sci.** 27: 105-108.

Zhu, M., L.J. Yu and H.B. Xu. 2004. Isolating *Mortierella alpina* strains of high yield of arachidonic acid. **Lett. Appl. Microbiol.** 39:332-335.

_____, M., L.J. Yu, W. Li, P.P. Zhou and C.Y. Li. 2006. Optimization of arachidonic acid production by fed-batch culture of *Mortierella alpina* based on dynamic analysis.

Enzyme Microb. Tech. 38: 735-740.

_____, M., L.J. Yu and Y.X. Wu. 2003. An inexpensive medium for production of arachidonic acid by *Mortierella alpina*. **J. Ind. Microbiol Technol.** 30:75-79.

_____, M., P.P. Zhou and L.J. Yu. 2002. Extraction of lipids from *Mortierella alpina* and enrichment of arachidonic acid from the fungal lipids. **Biores. Technol.**

84:93-95.





อาหารเลี้ยงและคัดแยกเชื้อทุกชนิด หลังจากผสมให้เข้ากันและปรับพีเอชตามที่ระบุด้วย 1N โซเดียมไฮดรอกไซด์หรือ 1N ไฮโดรคลอริก แล้วจึงเติมวุ้น (agar) นำไปหลอมให้ละลาย และฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

1. Czapek agar medium

Sucrose	30	กรัม
NaNO ₃	2	กรัม
K ₂ HPO ₄	1	กรัม
KCl	0.5	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5	กรัม
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	กรัม
Agar	20	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดแล้วจึงเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จากนั้นปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 ด้วย 1 N ไฮโดรคลอริก และ 1 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ เติมน้ำแล้วจึงนำไปหลอมให้ละลาย นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. Potato Dextrose Agar (PDA)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ต้มมันฝรั่งกับน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร (จนกระทั่งขึ้นมันฝรั่งนุ่ม) จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วจึงละลายส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำมันฝรั่งที่ได้ แล้วจึงปรับเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปหลอมให้วุ้นละลายแล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ หากต้องการเตรียมเป็น Potato Dextrose Broth ไม่ต้องเติมวุ้นลงไป

3. Soy isolate broth (SI)

Soy isolate	8.4	กรัม
Glucose	60	กรัม
(NH ₄) ₂ SO ₄	3	กรัม
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	4	กรัม
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.05	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดแล้วจึงเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จากนั้นปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 ด้วย 1 N ไฮโดรคลอริก และ 1 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. Soy protein broth (SB)

Soy bean flour	0.45	กรัม
Glucose	50	กรัม
KNO ₃	3	กรัม
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	4	กรัม
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.05	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ชั่งแป้งถั่วเหลืองมา 20 กรัม (ซึ่งได้จากการนำปริมาณแป้งถั่วเหลืองจากในสูตรมาคำนวณเพื่อให้ได้โปรตีน 25 เปอร์เซ็นต์) จากนั้นนำแป้งถั่วเหลืองดังกล่าวมาผสมกับน้ำในอัตราส่วนแป้ง:น้ำ เท่ากับ 1:10 ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำสารละลายแป้งถั่วเหลืองมาปรับพีเอชเท่ากับ 8.0 ด้วย 1 N ไฮโดรคลอริก และ 1 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วนำไปต้มนาน 30 นาที จากนั้นกรองส่วนใส

มาใช้ ละลายส่วนประกอบอื่นๆลงไปแล้วจึงปรับเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วปรับพีเอชให้เป็น 5.5 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. Triphenyltetrazolium chloride (TTC)

Triphenyltetrazolium chloride (TTC)	0.8	กรัม
0.2 M Borate buffer (pH 8.0)	100	มิลลิลิตร
0.2 M Boric acid (pH 8.0)	100	มิลลิลิตร

ละลาย TTC ใน 0.2 M Borate buffer ที่ปรับพีเอชเป็น 8.0 จากนั้นนำไปผสมกับ 0.2 M Boric acid ที่ปรับพีเอชให้เป็น 8.0 เก็บสารละลาย TTC ที่ได้ใส่ขวดซึ่งหุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยล์เก็บไว้ในตู้เย็น

6. Tris-Borate-EDTA buffer (TBE; 10X stock solution, pH 8.0)

Trizma base	108	กรัม
Boric acid	55	กรัม
EDTA	7.4	กรัม
NaOH	1.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดแล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นทำให้ปลอดเชื้อโดยใช้ด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

7. Tris-EDTA buffer (TE; 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)

Tris-HCl (1 M, pH 8.0)	10	มิลลิลิตร
EDTA (0.5 M, pH 8.0)	2	มิลลิลิตร
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดแล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 8 จากนั้นทำให้ปลอดเชื้อโดยใช้ด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง





ภาคผนวก ข
การเก็บรักษา *Mortierella*

1. การต่อเชื้อ (subculture)

การเก็บรักษาจุลินทรีย์ด้วยวิธีการนี้เป็นการเก็บรักษาในระยะสั้น (short term preservation) มักนิยมใช้สำหรับงานที่ต้องนำจุลินทรีย์ออกมาใช้อยู่เสมอ ซึ่งการต่อเชื้อเป็นการย้ายเชื้อจากอาหารเดิมไปยังอาหารใหม่ อาหารที่ใช้นั้นคืออาหารวุ้นเยิง PDA ซึ่งประกอบด้วยกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ ควรทำการต่อเชื้อทุกๆ 2-6 เดือน เมื่อเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แต่หากเก็บไว้ในตู้เย็นก็จะสามารถยืดระยะเวลาในการเก็บเชื้อได้นานขึ้น

2. การเก็บรักษาภายใต้ไขมัน (storage under mineral oil)

การเก็บรักษาด้วยวิธีการนี้ เริ่มจากการเลี้ยงจุลินทรีย์บนอาหารวุ้นเยิง PDA ที่ประกอบด้วยกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ เมื่อจุลินทรีย์เจริญเต็มที่แล้วจึงนำพาราฟินเหลว (liquid paraffin หรือ medical paraffin) ที่ทำให้ปราศจากความชื้นด้วยการอบแห้งที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือการให้ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง มาเททับลงบนโคโลนีที่เจริญดังกล่าว ซึ่งควรเทพาราฟินเหลวให้สูงกว่าส่วนบนของวุ้นเยิงประมาณ 1 เซนติเมตร วิธีการนี้ช่วยลดการซึมผ่านของออกซิเจนถือเป็นการลด metabolic activity และลดการสูญเสียน้ำของเซลล์ จุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์สามารถมีชีวิตรอดได้ จากนั้นเก็บเชื้อไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิห้องหรือต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส ซึ่งทำให้สามารถเก็บรักษาได้นานขึ้น โดยวิธีดังกล่าวสามารถเก็บเชื้อได้ประมาณ 1-2 ปี

3. การเก็บรักษาในดิน (soil storage)

การเก็บรักษาด้วยวิธีนี้เริ่มจากการขังดินใส่ขวด vial ในปริมาณ 1 ใน 3 ของขวด จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยการอบแห้งเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงเติมอาหารเหลว PDB ซึ่งประกอบด้วยกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้ดินมีความชื้นเท่ากับ 30 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจึงตัดชิ้นวุ้นที่มีจุลินทรีย์วางลงบนดินที่เตรียมดังกล่าว แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งจุลินทรีย์คลุมผิวหน้าดินจนเต็ม เขย่าขวดจุลินทรีย์กระจายไปให้ทั่ว แล้วจึงแบ่งเก็บที่อุณหภูมิห้อง, อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส การเก็บรักษาเชื้อด้วยวิธีนี้สามารถเก็บเชื้อได้ประมาณ 1-2 ปี



กรดไขมันมาตรฐาน (standard fatty acid) ที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดไขมันมี 10 ชนิดได้แก่ กรดไขมันมาตรฐาน Pentadecanoic acid (15:0) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งใช้เป็น internal standard รวมทั้งกรดไขมันมาตรฐานอื่นๆ ได้แก่ Myristic acid (14:0) ความเข้มข้น 9.63 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, Palmitic acid (16:0) ความเข้มข้น 10.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, Palmitoleic acid (16:1) ความเข้มข้น 10.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, Stearic acid (18:0) ความเข้มข้น 10.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, Oleic acid (18:1) ความเข้มข้น 10.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, Linoleic acid (18:2) ความเข้มข้น 10.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, α -Linolenic acid (18:3) ความเข้มข้น 10.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, γ -Linolenic acid (18:3) ความเข้มข้น 10.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ Arachidonic acid (20:4) ความเข้มข้น 10.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จาก Sigma Co., Ltd. (St. Louis, USA)

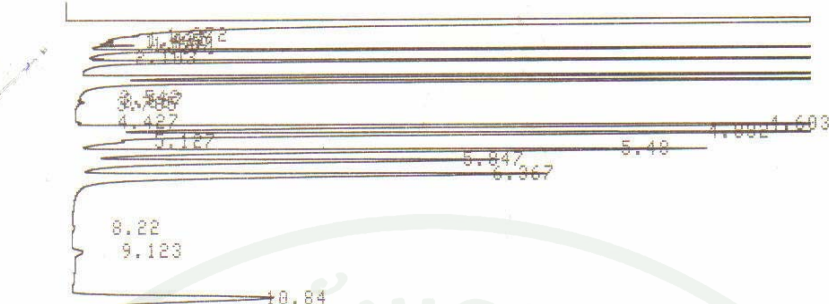
ในการเตรียมสารละลายกรดไขมันมาตรฐานดังกล่าวนี้ทำโดยการชั่งสารละลายกรดไขมันมาตรฐานแต่ละชนิดผสมกันปริมาตรอย่างละ 100 ไมโครลิตร



ภาคผนวก ง

โครมาโทแกรมการแยกกรดไขมันมาตรฐานด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

START



CHROMATOPAC C-R6A
 SAMPLE NO 0
 REPORT NO 23342

FILE 2
 METHOD 41

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1.782	41161	V		12.2953	
2	2.188	41511	V		12.3997	
3	2.75	40599			12.1273	
4	2.952	41901	V		12.5163	
5	4.603	38092	V		11.3786	
6	4.882	37068	SV		11.0727	
7	5.48	27792	V		8.3018	
8	5.847	21950	V		6.5568	
9	6.367	27673	V		8.087	
10	10.84	17624			5.2645	
TOTAL		334771			100	

หมายเหตุ

โครมาโทแกรมหมายเลข	1	คือ	Myristic acid (14:0)
โครมาโทแกรมหมายเลข	2	คือ	Pentadecanoic acid (15:0)
โครมาโทแกรมหมายเลข	3	คือ	Palmitic acid (16:0)
โครมาโทแกรมหมายเลข	4	คือ	Palmitoleic acid (16:1)
โครมาโทแกรมหมายเลข	5	คือ	Stearic acid (18:0)
โครมาโทแกรมหมายเลข	6	คือ	Oleic acid (18:1)
โครมาโทแกรมหมายเลข	7	คือ	Linoleic acid (18:2)
โครมาโทแกรมหมายเลข	8	คือ	α -Linolenic acid (18:3)
โครมาโทแกรมหมายเลข	9	คือ	γ -Linolenic acid (18:3)
โครมาโทแกรมหมายเลข	10	คือ	Arachidonic acid (20:4)

ภาพผนวกที่ ๑1 โครมาโทแกรมการแยกกรดไขมันมาตรฐานด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี



ภาคผนวก จ

ลำดับเบสของยีน 18S rRNA ของรา *Mortierella* sp. WA-1

Mortierella sp. ไอโซเลข WA-1

1	GTGTAGTCAT	ATGCTTGTCT	CAAAGATTAA	GCCATGCATG	TCTAAGTATA
51	AACAACCTTG	TACTGTGAAA	CTGCGAATGG	CTCATTAAAT	CAGTTATAGT
101	TTATTTGATT	ATACCTTACT	ACTTGGATAA	CCGTGGTAAT	TCTAGAGCTA
151	ATACATGCTA	AAAATCCCGA	CTTCTGGAAG	GGATGTATTT	ATTAGATAAA
201	AAACCAACGC	GGGCAACCGC	TTGTTTGGTG	ATTCATAATA	ACTTTTCGAA
251	TCGCATGGCC	TTGTGCTGGC	GATGTTTCAT	TCAAATTTCT	GCCCTATCAA
301	CTTTCGATGG	TAGGATAGAG	GCCTACCATG	GTTTAAACGG	GTAACGGGGA
351	ATTAGGGTTC	GATTCCGGAG	AGGGAGCCTG	AGAAACGGCT	ACCACATCCA
401	AGGAAGGCAG	CAGGCGCGCA	AATTACCCAA	TCCCGATACG	GGGAGGTAGT
451	GACAGTAAAT	AACAATACAG	GGCTTTTCAG	TCTTGTAATT	GGAATGAGTA
501	CAATTTAAAT	CTCTTAACGA	GGAACAATTG	GAGGGCAAGT	CTGGTGCCAG
551	CAGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAATAGCGT	ATATTAAAGT	TGTTGCAGTT
601	AAAAAGCTCG	TAGTTGAATT	TTAGGCCCGG	TTGGACGGTC	TGCCTTTGGG
651	TTTGTACTGT	CCTGACTGGG	CCTTACCTTC	TGGTGAGCTG	TCGTGTTGTT
701	TACTCAGCGC	GGCAGGGAAC	CAGGACTTTT	ACTTTGAAAA	AATTAGAGTG
751	TTTAAAGCAG	GCATTCGCTT	GAATACATTA	GCATGGAATA	ATAGAATAGG
801	ACTTTGGTTC	TATTTTGTTG	GTTTCTAGGA	CCGAAGTAAT	GATTAATAGG
851	GATAGTTGGG	GGCATTAGTA	TTTAATTGTC	AGAGGTGAAA	TTCTTGGAAT
901	TATGAAAGAC	TAACTTCTGC	GAAAGCATTT	GCCAAGGATG	TTTTCATTAA
951	TCAAGAACGA	AAGTTAGGGG	ATCGAAGACG	ATCAGATACC	GTCGTAGTCT
1001	TAACCATAAA	CTATGCCGAC	TAGGGATCAG	ACAAGGATAT	TTTGACTTGT
1051	TTGGCACCTT	ATGAGAAATC	AAAGTTTTTG	GGTTCCGGGG	GGAGTATGGT
1101	CGCAAGGCTG	AAACTTAAAG	GAATTGACGG	AAGGGCACCA	CCAGGAGTGG
1151	AGCCTGCGGC	TTAATTTGAC	TCAACACGGG	GAAACTCACC	AGGTCCAGAC
1201	ATAGTAAGGA	TTGACAGATT	GAGAGCTCTT	TCTTGATTCT	ATGGGTGGTG
1251	GTGCATGGCC	GTTCTTAGTT	GGTGGAGTGA	TTTGTCTGGT	TAATTCCGTT
1301	AACGAACGAG	ACCTTAACCT	GCTAAATAGT	TAGGCCAACG	TTTGTTGGTC
1351	GTCAACTTCT	TAGAGGGACT	ATTGACTATT	AGTCAATGGA	AGTTTGAGGC

1401	AATAACAGGT	CTGTGATGCC	CTTAGATGTT	CTGGGCCGCA	CGCGCGCTAC
1451	ACTGATCAAG	TCAACGAGTT	TACAACCTTG	GCCGGAAGGT	CTGGGTAATC
1501	TTTTGAAACT	TGATCGTGCT	GGGGATAGTC	CATTGCAATT	ATTGGACTTC
1551	AACGAGGAAT	TCCTAGTAAG	CGTGAGTCAT	CAGCTCGCGT	TGATTACGTC
1601	CCTGCCCTTT	GTACACACCG	CCCGTCGCTA	CTACCGATTG	AATGGCTTAG
1651	TGAGGCTTTC	GGATTGGATC	TGAGCAGCTG	GCAACAGCAG	CTTGGAAGTG
1701	AAAAGTTATC	CAAACCTGGT	CATTTAGAGG	AAGTAAAAGT	CGTAACAAGG
1751	TTTCCGTAGG	TGAACCTGCG	GAA		

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ - นามสกุล	นางสาววริษา ศรีสะอาด
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 5 ตุลาคม 2526
สถานที่เกิด	แพร่
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานทางวิชาการ	นำเสนอผลงานภาคบรรยายหัวข้อ “ Production of arachidonic acid from a filamentous fungus, <i>Mortierella</i> sp. ” ในงานประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 35 (วทท. 35) ณ เดอะ ไทด์รีสอร์ท (หาดบางแสน) จังหวัดชลบุรี ระหว่างวันที่ 15-17 ตุลาคม 2552
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-