

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

กรดแกมมาลิโนเลนิก (γ -linolenic acid) เป็นกรดไขมันจำเป็นไม่อิ่มตัว ที่ร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นเองในบางเงื่อนไข มีความสำคัญต่อสรีรวิทยา และการทำงานของระบบประสาท โดยเป็นสารตั้งต้น ในการสังเคราะห์สาร Eicosanoid ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายฮอร์โมน

การผลิตกรดแกมมาลิโนเลนิก เกิดขึ้นได้ดี ในระยะที่ เซลล์กำลังเจริญเติบโต โดยเฉพาะในช่วงที่เป็นเอ็กซ์โปเนนเชียล (Somashekar และคณะ, 2002) ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์มีการเจริญสูงสุด การเลี้ยงแบคทีเรีย (Batch) จะมีข้อจำกัดของน้ำตาลเริ่มต้นในช่วงแรก ของการหมักที่มีความเข้มข้นสูง และสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ ทำให้ได้ชีวมวล และกรดแกมมา ลิโนเลนิกน้อย ได้มีการนำระบบ การเลี้ยงแบบกึ่งกะ (Fed batch fermentation) มาแก้ปัญหานี้ โดยการเติมกลูโคสลงไปเป็นระยะๆ เพื่อ รักษาระดับน้ำตาลในระบบให้อยู่ในปริมาณที่เซลล์สามารถเจริญได้ดี และยังสามารถยืดระยะเวลา ของช่วงเอ็กซ์โปเนนเชียลให้นานขึ้น ทำให้สามารถผลิตกรดแกมมาลิโนเลนิกได้มากขึ้น (นุชาสินี นวลขำ, 2549) แต่จากผลการวิจัย พบว่า ถึงแม้จะได้ปริมาณเซลล์สูงมาก (63.43 g/L) และมีการผลิต กรดแกมมาลิโนเลนิกสูงถึง 1163.6 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 2.03 % (w/w) เมื่อคิดเทียบต่อน้ำหนักแห้ง แต่ไม่สามารถดำเนินการทดลองต่อไปได้เนื่องจากปริมาณเซลล์ที่หนาแน่นมากขึ้น ก่อปัญหาเกี่ยวกับการถ่ายเทมวลและอากาศภายในถังหมัก ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงเสนอการหมักแบบต่อเนื่อง เพื่อการผลิต GLA จากรา *Mucor rouxii* โดยศึกษาที่อัตราการเจริญ (μ) ต่าง ๆ (หรือ Dilution rate ต่างๆ) ระหว่างการหมักแบบต่อเนื่อง

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

ศึกษาการผลิต GLA แบบต่อเนื่อง จากรา *Mucor rouxii* โดยวิธีการหมักแบบต่อเนื่องที่ Dilution rate ต่าง ๆ เพื่อหาช่วง Dilution rate ที่เหมาะสมต่อการผลิต GLA

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

- (1) ศึกษาค่าอัตราการเจริญสูงสุดของรา *Mucor rouxii* เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาค่า Critical dilution rate ในการหมักแบบต่อเนื่อง
- (2) ศึกษาการผลิต GLA ที่ dilution rate ต่าง ๆ ในการหมักแบบต่อเนื่องของรา *Mucor rouxii*
- (3) วิเคราะห์รูปร่างระหว่างหมัก โดย image analyzer

บทที่ 2 การตรวจเอกสาร

กรดแกลูตามิกโนเลนิก สามารถผลิตได้จากพืชและจุลินทรีย์ มีการศึกษา การผลิต กรดแกลูตามิกโนเลนิก ในราเส้นใยอย่างกว้างขวาง เช่น ใน *Mucor inaequisporus* พบว่าการผลิตในแบบกะ (batch fermentation) ให้กรดแกลูตามิกโนเลนิก 36% (w/w) (Emelyanova, 1996) และใน *Mortierella ramanniana* MM 15-1 สามารถผลิตได้ 18.3 % (w/w) ในการหมักแบบกะ (Hiruta และคณะ, 1996) ส่วนใน *Mucor rouxii* สามารถผลิตได้ 39.7% (w/w) โดยกระบวนการหมักแบบกะ ซึ่งถือว่ามีความคุ้มค่าสูง (Hansson และคณะ, 1989)

การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation) เป็นระบบการหมัก ที่มีการเติมอาหาร ลงในระบบและมีการเก็บเกี่ยวผลผลิตเกิดขึ้นพร้อมๆ กันรักษาระดับปริมาตรระหว่างการหมัก ให้คงที่ โดยวิธีที่เรียกว่าแบบ Chemostat

จากงานวิจัยของ Teresa และคณะ (2003) ได้ศึกษาการผลิต กรดแกลูตามิกโนเลนิกใน *Mucor fragilis* โดยใช้ระบบการหมักแบบกะ เปรียบเทียบกับการหมักแบบ ต่อเนื่อง พบว่า สามารถผลิตกรดแกลูตามิกโนเลนิกได้ 2.5 g GLA/g biomass และ 2.17 g GLA/g biomass ตามลำดับ จากข้อมูล แม้ว่าการหมักแบบต่อเนื่อง ให้ผลผลิตต่ำกว่าแบบกะ แต่ข้อดี คือ สามารถเก็บเกี่ยว ผลผลิตได้ยาวนานกว่าและไม่ต้องเริ่มต้นกระบวนการหมักใหม่ ดังนั้น การนำระบบการหมัก แบบต่อเนื่อง มาใช้ในการผลิตกรดแกลูตามิกโนเลนิก จะเป็นผลดี ต่อการผลิต กรดแกลูตามิกโนเลนิก ในระดับที่ใหญ่ขึ้น จนถึงการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

2.1 ราที่ผลิตกรดแกลูตามิกโนเลนิก

มีการศึกษาการผลิตกรดแกลูตามิกโนเลนิกจากราอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะรา ที่มีความสามารถในการผลิตกรดแกลูตามิกโนเลนิกในกลุ่ม Phycomycete ใน Class Oomycetes และ Zygomycete ไม่พบราใน Class อื่น เช่น Ascomycetes และ Basidiomycetes (Shaw, 1965)

2.2 รา *Mucor*

Mucor rouxii เป็นราใน Class Zygomycete หรือ order Mucorales ใน Family Mucorace ลักษณะเป็นเส้นใยสีขาว ไม่มีผนังกัน เจริญเติบโตได้ทั้งลักษณะเป็นเส้นใย หรือคล้ายยีสต์ (yeast-like form) จึงจัดอยู่ในกลุ่ม dimorphic fungi ขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมในการเจริญ มีการสร้าง Zygospore ซึ่งมีลักษณะผิวหนา และขรุขระ และมีการสร้างสปอร์ที่เป็น asexual spore เรียกว่า Sporangiospore อยู่ภายใน Sporangium

2.2.1. ลักษณะเส้นใย

เส้นใยของ *Mucor* spp. มีลักษณะเรียวยาวเล็ก อัดแน่น พัฒนามาจากสปอร์ทั้ง 3 ชนิดรวมทั้งสามารถเจริญมาจากเซลล์ที่มีรูปร่างคล้ายยีสต์ ในสภาวะที่ขาดออกซิเจน มีการศึกษา *Mucor rouxii* พบว่า EDTA สามารถชักนำให้เกิดลักษณะ เป็นเส้นใยได้ ในสภาวะไม่มีออกซิเจน (Zorzopulos และคณะ, 1973)

2.2.2. ลักษณะคล้ายยีสต์

พัฒนามาจากสปอร์ชนิด sporangiospore, arthrospore และสามารถเปลี่ยนจากรูปร่างเส้นใยมาเป็นลักษณะคล้ายยีสต์ได้เช่นเดียวกัน (Bartnicki – Garcia, 1963 ; Sypherd และคณะ, 1978) มีรูปร่างกลมผนังเซลล์บางกว่าเซลล์ที่มีรูปร่างเป็นเส้นใย องค์ประกอบในเส้นใยและ เซลล์ที่มี รูปร่างคล้ายยีสต์ส่วนใหญ่เป็น chitin และ chitosan ซึ่งมีสัดส่วน ไม่แตกต่างกันมากนัก ในเซลล์ทั้งสองชนิด องค์ประกอบที่แตกต่างกันในสัดส่วนค่อนข้างมากได้แก่ mannose และ protein ส่วนไขมันพบว่าในเซลล์ที่มีรูปร่างเป็นเส้นใยมีปริมาณไขมันมากกว่าเซลล์ที่มีรูปร่างคล้ายยีสต์เล็กน้อย

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อลักษณะสัณฐานวิทยา

โดยทั่วไปปัจจัยที่มีผลต่อลักษณะสัณฐานวิทยาของ *Mucor* spp. ได้แก่

1. ความเข้มข้นน้ำตาล hexose ซึ่งเป็นปัจจัยที่จำเป็นในการเกิดลักษณะคล้ายยีสต์
2. สภาวะของออกซิเจนในสิ่งแวดล้อม (Bartnicki- Garcia, 1963 : Sypherd และคณะ, 1978)

พบว่าทั้งสองสภาวะมีผลต่อการสร้าง sporangiospore, arthrospore และ vegetative cell ในการเลี้ยงทั้งบนอาหารแข็ง (solid state fermentation) และ อาหารเหลว (submerged fermentation)

มีการศึกษาพบว่า *Mucor* ในแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน และสภาวะแวดล้อม เป็นปัจจัยที่มีผล ต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยา เช่น ใน *Mucor rouxii* พบว่าสามารถพัฒนา ไปเป็นเซลล์ ที่มีรูปร่างคล้ายยีสต์ได้เมื่อเจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน และมีน้ำตาล hexose เป็นองค์ประกอบ ในอาหาร และมีการให้คาร์บอนไดออกไซด์ (มากกว่า 0.3 atm) หรือมีปริมาณน้ำตาลสูง (มากกว่า 8%) แต่จะเจริญไปเป็นเส้นใยถ้าเจริญในสภาวะที่แตกต่างไปจากนี้ (Bartnicki- Garcia, 1968)

ใน *Mucor genevensis* พบว่าเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีน้ำตาล hexose สูงเพียงอย่างเดียว ก็สามารถชักนำให้เกิดลักษณะคล้ายยีสต์ได้ (Roger และคณะ, 1974) หรือใน *Mucor racemosus* เมื่อเลี้ยงในสภาวะ ไม่มีออกซิเจน พบว่าสามารถเจริญเป็นเซลล์ที่มีรูปร่างคล้ายยีสต์ ได้โดยไม่จำเป็น ต้องมีการให้คาร์บอนไดออกไซด์หรือมีความเข้มข้นน้ำตาล hexose สูง ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน (Sypherd, 1978) และจากการศึกษาใน *Mucor* หลายสายพันธุ์ พบว่า การเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีน้ำตาล hexose เป็นองค์ประกอบ จะไม่สามารถพัฒนา ไปเป็นเซลล์ที่มีรูปร่างคล้ายยีสต์ได้ (Orlowski, 1991)

นอกจากน้ำตาล hexose ซึ่งจำเป็นต่อการเจริญไปเป็นเซลล์ที่มีรูปร่างคล้ายยีสต์แล้ว แหล่งไนโตรเจนยังเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกปัจจัยหนึ่ง โดยพบว่า การเจริญไปเป็นเซลล์ ที่มีรูปร่าง คล้ายยีสต์ นั้นมี

ความจำเพาะต่อแหล่งไนโตรเจนมากกว่าการเจริญไปเป็นเส้นใย เช่น ใน *M. racemosus* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี ammonium salt เพียงอย่างเดียวก็สามารถเจริญไปเป็นเส้นใยได้ แต่ในการเจริญ ไปเป็นเซลล์ที่มีลักษณะคล้าย ยีสต์นั้นนอกเหนือไปจาก ammonium salt แล้วต้องมี glutamate เป็นองค์ประกอบในอาหารด้วย (Peters และ Sypherd , 1979)

2.4 ผลของสภาวะแวดล้อมต่อการผลิตไขมันและกรดไขมันในรา

2.4.1 แหล่งคาร์บอน

มีการศึกษา ชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตกรดแกมมาลิโนเลนิก ในราหลาย สายพันธุ์ เช่น ใน *Mucor rouxii* และรายงานว่า กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่เหมาะสมต่อการผลิต กรดแกมมา ลิโนเลนิก มากที่สุด (Somashekar และคณะ, 2002) ซึ่งสอดคล้อง กับงานวิจัยของ Hansson และ Dostálek (1988) ซึ่ง ศึกษาการผลิต GLA ใน *Mortierella ramanniana* CBS 112.08

นอกจากชนิดของแหล่งคาร์บอนแล้ว ปริมาณของแหล่งคาร์บอน ก็มีผลต่อ การผลิตกรด แกมมาลิโนเลนิกเช่นเดียวกัน ใน *Mortierella ramanniana* MM-15-1 พบว่า การใช้กลูโคส ความเข้มข้นสูงมีผล ต่อการเกิด osmotic pressure ในอาหาร ซึ่งอาจไปยับยั้ง การเจริญ และการสังเคราะห์ ไขมันของเซลล์ (Hiruta และคณะ, 1996) ทำให้การสังเคราะห์กรดแกมมา ลิโนเลนิกมีปริมาณต่ำ สอดคล้องกับการศึกษาใน *Mucor rouxii* ATCC 24905 พบว่า ความเข้มข้น กลูโคสเพิ่มขึ้น มีผลทำให้ร้อยละของกรดแกมมาลิโนเลนิกเมื่อเทียบต่อ กรดไขมันทั้งหมดลดลง (พรทิพย์, 2538)

2.4.2 แหล่งไนโตรเจน

เมื่อศึกษาถึงผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตกรดแกมมาลิโนเลนิกใน *Mucor rouxii* ATCC 24905 พบว่าเมื่อความเข้มข้น NH_4Cl ลดลงทำให้ชีวมวลและกรดไขมันทั้งหมดเพิ่มขึ้น (พรทิพย์, 2538) ซึ่ง สนับสนุนว่าเมื่อความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำ และเกิดสภาวะ ขาดแคลนไนโตรเจนจะ ชักนำให้เกิดการสะสมของไขมัน เนื่องจาก มีการสังเคราะห์โปรตีน รวมทั้ง การแบ่งเซลล์ลดลง และมีการนำ คาร์บอนในอาหารไปสร้างไขมันภายในเซลล์ (Wynn และคณะ , 2001) ผลที่ได้คล้ายกับการศึกษาใน *Mortierella ramanniana* ซึ่งสามารถผลิต กรดแกมมาลิโนเลนิกได้ ปริมาณสูงในอาหารที่มีปริมาณไนโตรเจน ต่ำและเกิดสภาวะการขาดแคลนไนโตรเจนและชีวมวลที่ได้มี ปริมาณน้อย (Hansson และ Dostálek, 1988) และ ใน *Mucor inaequisporus* พบว่าในช่วง logarithmic phase ามีการผลิตไขมันเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (Emelyanova, 1996)

2.4.3 ไอออนของโลหะ

ไอออนของโลหะบางชนิดช่วยเพิ่มการผลิตกรดแกมมาลิโนเลนิก มีการศึกษาใน *Mortierella ramanniana* พบว่าเมื่อเลี้ยงราชนิดนี้ในอาหารที่มี Cu^{2+} และ Zn^{2+} เป็นองค์ประกอบ ราสามารถผลิตกรดแกมมาลิโนเลนิกได้ในปริมาณสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่มี Cu^{2+} และ Zn^{2+} (Hansson และ Dostálek, 1988) ผลที่ได้คล้ายกับการศึกษาผลของ Zn^{2+} ต่อการผลิตกรดแกมมาลิโนเลนิกใน *Mucor rouxii* ATCC 24905 ซึ่งพบว่าการผลิตกรดไขมันโดยที่ความเข้มข้นของ Zn^{2+} ปริมาณ 5 mg/L และ 10 mg/L มีผลทำให้ กรดแกมมาลิโนเลนิกในองค์ประกอบ ของกรดไขมัน ทั้งหมดสูงขึ้น (เสาวลักษณ์, 2540)

2.4.4 ช่วงเวลาในการเจริญ

การสะสมของกรดไขมันในเซลล์แบ่งเป็น 2 ระยะ คือ ระยะที่มีสารอาหารมากเพียงพอ เป็นช่วงที่เซลล์มีปริมาณกรดไขมันค่อนข้างคงที่และระยะที่ 2 เป็นช่วงที่แหล่งไนโตรเจนหมดไป ทำให้ การสังเคราะห์โปรตีน ในระยะนี้ลดลงทำให้เซลล์ใช้แหล่งคาร์บอนเปลี่ยนเป็นกรดไขมัน(Wynn และคณะ, 2001) ส่วนการสะสมของกรดไขมันในรา มี 2 รูปแบบคือ เกิดการสังเคราะห์ และสะสม กรดไขมันอย่างรวดเร็ว ในช่วง logarithmic phase จากนั้นนำไขมันไปใช้ในช่วง stationary phase และในบางสายพันธุ์มีการสะสมไขมันตามปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้น (Emelyanova, 1996)

มีการศึกษาใน *Mucor inaequisporus* พบว่าในช่วง logarithmic phase การผลิต ไขมันเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และลดลงเมื่อจุลินทรีย์มีอายุเพิ่มขึ้น (Emelyanova, 1996) ให้ผลสอดคล้องกับ *Mucor fragilis* ที่มีการผลิตกรดแกมมาลิโนเลนิกลดลงในช่วง stationary phase (Silva และคณะ, 2003) หรือการศึกษาใน *Mucor* sp. 1b และ *Mucor rouxii* ATCC 386 ที่มีการผลิต กรดแกมมา ลิโนเลนิกได้สูงสุดในช่วง logarithmic phase และลดลงเมื่อเข้าสู่ช่วง stationary phase (Somashekar และคณะ , 2002) และใน *Mucor rouxii* ATCC 24905 พบว่า กรดแกมมาลิโนเลนิก มีสัดส่วน สูงกว่า กรดไขมันชนิดอื่นๆในช่วง early logarithmic phase โดยพบปริมาณสูงสุดที่ 45.6 % ของกรดไขมัน ทั้งหมด (เสาวลักษณ์, 2540)

2.4.5 ผลจากอุณหภูมิ

จากงานวิจัยของเสาวลักษณ์ (2540) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิต กรดแกมมา ลิโนเลนิก ใน *Mucor rouxii* ATCC 24905 พบว่าที่อุณหภูมิต่ำ จะทำให้ราชนิดนี้สามารถผลิตกรด แกมมาลิโนเลนิกได้สูงกว่าที่เลี้ยงในอุณหภูมิสูง และที่ทุกอุณหภูมิที่ศึกษา (10, 15, 25 และ 30 องศาเซลเซียส) รามีการ ผลิต กรด ไขมันเพิ่มมากขึ้นตั้งแต่ช่วง logarithmic phase จนถึง stationary phase โดยมีการสะสมกรดไขมันมากที่สุด ในช่วง stationary phase แต่อัตราส่วนของกรดแกมมาลิโนเลนิกต่อ กรดไขมันทั้งหมด พบในทางตรงกันข้ามกับการเพิ่มของกรดไขมันทั้งหมดในเส้นใยรา

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตกรดไขมันและองค์ประกอบของกรดไขมันในรา Mucorales โดยเฉพาะ *Mucor* sp. และ *Mortierella* sp. พบว่าให้ผลเช่นเดียวกัน โดยพบว่า เมื่อเลี้ยงรา ที่

อุณหภูมิต่ำ (20°C) ผลิตกรดแกมมาลิโนเลนิกได้ 21.0% (w/w) ของกรดไขมันทั้งหมด ในขณะที่ การเลี้ยงที่ อุณหภูมิสูง (30°C) ผลิตกรดแกมมาลิโนเลนิกได้ 14.6% (w/w) ของกรดไขมันทั้งหมด (Hansson และ Dostálek, 1988)

2.5 กระบวนการหมักที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดแกมมาลิโนเลนิกจากรา

การเลี้ยงราเพื่อผลิตกรดแกมมาลิโนเลนิกสามารถทำได้ทั้งในอาหารแข็งและอาหารเหลว สถานะการเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็ง สามารถใช้แหล่งอาหารราคาถูก เช่น ของเหลือจากอุตสาหกรรมอาหาร (Conti และคณะ, 2001) เช่น การใช้เปลือกข้าวเป็นแหล่งอาหารในการเลี้ยง *Cunninghamella japonica* สามารถผลิตกรดแกมมาลิโนเลนิกได้ 3.5 g/kg moist substrate (Stredansky และคณะ, 2000) และใน *Cunninghamella elegans* CCF 1318 เมื่อเลี้ยงบนข้าวบาร์เลย์ร่วมกับมอลต์ สามารถผลิตกรด แกมมาลิโนเลนิกได้ 14.2 mg/g dry substrate (Conti และคณะ, 2001) การเลี้ยงราในอาหารเหลว เป็นสถานะที่ศึกษากันอย่างกว้างขวางโดยรูปแบบการเลี้ยงมีทั้งแบบกะ (Batch fermentation) แบบกึ่งกะ (Fed batch fermentation) และแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation) โดยแหล่งอาหารและ สภาพที่ใช้ในการเลี้ยงแตกต่างกันออกไป

2.5.1 การหมักแบบกะ (Batch fermentation)

กระบวนการหมักแบบกะเป็นการหมักที่มีการเติมอาหารลงไปเพียงครั้งเดียว มีการ ศึกษาการ ผลิต กรดแกมมาลิโนเลนิกในกระบวนการหมักแบบกะอย่างแพร่หลาย เช่น ใน *Mortierella ramanniana* var. *ramanniana* ในอาหารที่มี dextrose 5% yeast extract 1% และมีการ เติม Mn^{2+} 5 mg/L และน้ำมันสกัดเมล็ด ป่าน (flax oil) ลงไปในอาหาร พบว่าสามารถผลิต กรดแกมมา ลิโนเลนิกได้ 15.8 % ของกรดไขมันทั้งหมด และได้ปริมาณไขมัน 54.2% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Dyal และคณะ, 2005)

การศึกษาใน *Mortierella alpina* 32222 ถึงผลขององค์ประกอบ ในอาหาร และสถานะ แวดล้อม เมื่อเลี้ยงในระบบการเลี้ยงแบบกะพบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอน และ KNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจนในอัตราส่วน 2:1 สามารถผลิตกรดไขมันได้ดี โดยผลิตกรดแกมมาลิโนเลนิกได้ 17.0 mg/g-carbon กรดไขมันที่ผลิตได้ทั้งหมดเท่ากับ 194.2 mg/g-carbon (Jang และคณะ, 2005)

การศึกษาใน *Mucor rouxii* โดยศึกษาถึงชนิดของแหล่งอาหาร พบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ กลูโคสและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ KNO_3 และมีการเติม sesame oil ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า สามารถชักนำให้ *M. rouxii* สามารถผลิตกรดไขมันได้ ในปริมาณสูงขึ้น โดยปริมาณไขมันที่ผลิตได้คือ 44.5% (w/w) และปริมาณกรดแกมมาลิโนเลนิก ที่ได้เท่ากับ 13.8% (w/w) (Somashekar และคณะ, 2002)

การศึกษากการผลิตกรดไขมันจาก *Mucor inaequisporus* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเอทานอล เป็น แหล่งคาร์บอนพบว่าสามารถสะสมไขมันได้ตั้งแต่ช่วง logarithmic phase และมีการผลิตกรด แกมมาลิโนเล

นิกเป็นสัดส่วนกับกรดไขมันทั้งหมดเท่ากับ 36 % (w/w) และมีปริมาณ กรดแกมมา ลิโนเลนิก ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 2% (w/w) (Emelyanova, 1996)

2.5.2 การหมักแบบกึ่งกะ (Fed -batch fermentation)

การเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ (Fed- batch fermentation) เป็นการหมักที่มีการเติมสับสเตรท เป็นระยะ อาจมีการดิงน้ำหมักออกมาหรือไม่มีการดิงน้ำหมักออก ทำให้ปริมาตรสารต่างๆ ในถังหมักอาจเพิ่มขึ้นหรือเปลี่ยนแปลงได้ตามเวลาที่ใช้ในการหมัก ในกรณี ที่มีการเติมสับสเตรท ที่มีความเข้มข้นสูง ปริมาตรของน้ำหมักจะเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก (Dunn และคณะ, 2003) การหมักแบบกึ่งกะ เป็นเทคนิค การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูง โดยเฉพาะในสภาวะขั้วขั้ว การเจริญของจุลินทรีย์ จากสับสเตรท ความเข้มข้นสูงทำได้โดย ควบคุมอัตราการเติมสับสเตรท ที่จะทำให้การเพาะเลี้ยง อยู่ในสภาวะที่ เหมาะสมต่อการเติบโตหรือการเกิดผลิตภัณฑ์ตลอดเวลา

มีการศึกษาการหมักแบบกึ่งกะในราหลายชนิดด้วยกัน เช่น ใน *Mortierella alpina* ในการเลี้ยงแบบกึ่งกะพบว่า รมีการสะสมไขมัน โดยเฉพาะ ARA (Arachinodic acid) ได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหาร ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลต่ำ แต่เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลต่ำกว่า 10 g/L ว่าจะหยุดการเจริญ เนื่องจากมีแหล่งอาหารไม่เพียงพอ โดยพบว่าเมื่อเลี้ยงแบบกึ่งกะ สามารถผลิต ARA ได้ 7.74 g/L ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ การเลี้ยงแบบกะ

การศึกษาการผลิตกรดแกมมาลิโนเลนิกโดยการเลี้ยงแบบกึ่งกะใน *Mucor rouxii* CBS 416.77 โดยใช้ น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน รักษาระดับความเข้มข้นน้ำตาลที่ 20 – 50 g/L พบว่าสามารถผลิตกรดแกมมาลิโนเลนิกได้ 0.85 g/L และปริมาณไขมัน 14.3 g/L และสามารถผลิตไขมันที่มีกรดแกมมาลิโนเลนิกเป็นองค์ประกอบได้สูงถึง 39.7% ของกรดไขมันทั้งหมด ในช่วงที่มีอัตราการเจริญสูงสุด (maximum growth rate) (Hansson และคณะ, 1989)

มีการศึกษาใน *Mucor circinelloides* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแป้ง เป็นแหล่งคาร์บอน ในการเลี้ยงแบบกึ่งกะ พบว่า สามารถผลิตกรด แกมมาลิโนเลนิกได้ 505 mg/L โดยมีสัดส่วน ของกรดแกมมาลิโนเลนิก ต่อกรดไขมันทั้งหมด เท่ากับ 19.4% (w/w) (Immelman และคณะ, 1997)

2.5.3 การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation)

ในการเลี้ยงรา *Mucor rouxii* CBS 416.77 ในระบบการหมักแบบต่อเนื่อง โดยศึกษาที่ dilution rate ต่างๆ พบว่าสามารถผลิตกรดแกมมาลิโนเลนิกได้สูงเมื่อใช้ dilution rate สูง แสดงให้เห็นว่าราชนิดนี้เมื่อมีการเจริญเติบโตสูงมีความสามารถในการผลิตกรดแกมมาลิโนเลนิกได้ดีกว่าขณะที่มีอัตราการเจริญต่ำ และจากการทดลอง พบว่าสัดส่วน ของกรดแกมมาลิโนเลนิก ในไขมันทั้งหมดเท่ากับ 37.5% (w/w) และ

สามารถผลิตกรดแกมมาลิโนเลนิกได้เท่ากับ 318 mg/L ปริมาณไขมันทั้งหมดที่ผลิตได้เท่ากับ 980 mg/L (Hansson และคณะ, 1989)

การศึกษากระบวนการหมักแบบต่อเนื่องใน *Mucor inaequisporus* ในอาหารที่มีกลูโคส และเอธานอลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเลี้ยงในอาหารที่มีเอธานอลเป็นแหล่งคาร์บอนก่อน เพื่อชักนำให้ เกิดการสะสมไขมันจากนั้นจึงเติมอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนลงไปเพื่อให้เราสามารถเพิ่มจำนวน และสามารถเจริญจนได้ปริมาณชีวมวลสูงขึ้น จากการทดลอง พบว่า สัดส่วนของกรดแกมมาลิโนเลนิก ต่อกรดไขมันทั้งหมด เป็น 37.0 % (w/w) และปริมาณกรดแกมมาลิโนเลนิกในน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 2.5- 2.7 % (w/w) ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่าผลการทดลองที่ได้จากการทดลองแบบกะ (Emelyanova, 1996)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาใน *Mucor fragilis* CCMI 142 ในการผลิตกรด แกมมา ลิโนเลนิกแบบต่อเนื่องในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และเติมเอธานอล เป็นช่วง ๆ ตลอด การทดลอง เพื่อกระตุ้นให้เรามีการผลิตกรดไขมันมากขึ้น พบว่าการเติมเอธานอล 0.5 % (v/v) สามารถผลิตกรดแกมมาลิโนเลนิกได้สูงสุด 2.44 g GLA/ g biomass (Silva และคณะ, 2003)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1.1 วัสดุอุปกรณ์

1. ถังหมัก (Fermenter) ระดับห้องปฏิบัติการ
 2. ตู้อบแห้งควบคุมอุณหภูมิ (hot air oven)
 3. ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator)
 4. ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Incubator shaker)
 5. เครื่องแก้ว เช่น ฟลาสก์, จานเลี้ยงเชื้อ, ปิเปต, บีกเกอร์, กระจกตวง เป็นต้น
 6. อุปกรณ์วิเคราะห์โดย Image analyzer (Instruments for Image Analysis Technique)
- Software: Olympus micro imaged DP70 for Windows Software, Media Cybernetics Inc., Silver Spring, USA
 - Microscope: Microscope: Olympus BX51 series microscope and Olympus Automatic Exposure Photomicrographic System Model PM-10 AK, Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan
 - Video Camera: Olympus DP70 Color Video Camera Model DXC-151AP, Sony Corporation, Japan

3.1.2 สารเคมี

3.2 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดแกมมาไลโนเลนิก

ใน 1 ลิตรของอาหารประกอบด้วย :

Yeast extract	5.0	g
KH ₂ PO ₄	2.4	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5	g
CaCl ₂	0.1	g
NH ₄ Cl	0.79	g
FeCl ₃ ·6H ₂ O	15	mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	7.5	mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.5	mg
MnSO ₄ ·H ₂ O	10	mg

โดยมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นที่ต้องการ และปรับ pH เป็น 5.5 ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

3.3 สภาพที่ใช้ในการเลี้ยงราในถังหมัก

เลี้ยง *Mucor rouxii* ATCC 24905 ใน Fermenter รุ่น Bioflo 110 ขนาด 2 L ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 1.5 L (working volume) โดยมีองค์ประกอบดังแสดงในหัวข้อ 13.2 ปลุกสปอร์ลงไปโดยใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น 3×10^7 สปอร์ต่อปริมาตรอาหาร 50 mL ปริมาตรอากาศ 1 vvm ที่อุณหภูมิ 30 °C ความเร็วรอบในการกวน 600 rpm pH เริ่มต้น 5.5 และไม่ควบคุม pH ตลอดระยะการหมัก

3.4 การเลี้ยงราในอาหารเหลว

3.4.1 จุลินทรีย์

1. ราชายพันธุ์ *Mucor rouxii* ATCC 24905 เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt extract agar ที่อุณหภูมิ 4 °C และทำการย้ายเชื้อบนอาหารใหม่ทุก 3 เดือน

2. การเตรียมหัวเชื้อ : เลี้ยงรา *Mucor rouxii* ATCC 24905 ในอาหาร YPG ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 5 วัน ขูดสปอร์ราเพื่อนำไปใช้สำหรับเป็นหัวเชื้อต่อไป

3.4.2 การหมักแบบกะ

เลี้ยง *Mucor rouxii* ATCC 24905 แบบกะในถังหมัก (โดยใช้สภาวะดังข้อ 13.3) ปริมาณกลูโคสเริ่มต้น 30 g/L เก็บตัวอย่างวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณกรดไขมัน

3.4.3 การเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

เลี้ยง *Mucor rouxii* ATCC 24905 แบบกะ โดยใช้สภาวะดังข้อ 13.3 นาน 18 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะอยู่ในช่วง late logarithmic phase จากนั้นดำเนินการหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation) โดยต่อเข้ากับ reservoir ที่บรรจุอาหารเพื่อป้อนเข้าสู่ถังหมัก ปรับ dilution rate ให้ได้ตามต้องการ และปล่อยให้เกิดการไหลของน้ำหมักเข้าสู่ถังหมักแบบต่อเนื่อง นาน 3 resident time เป็นอย่างต่ำ เพื่อให้เข้าสู่ steady state ในการหมักแบบต่อเนื่อง

3.5 วิเคราะห์ต่างๆ

3.5.1 การวัดการเจริญของรา *Mucor rouxii* ATCC 24905

หาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยกรองตัวอย่างผ่านกระดาษกรอง Whatman number 4 ที่ทราบ น้ำหนักแน่นอน แล้ว ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำไปอบที่ 80 °C จนกว่า น้ำหนักแห้งจะคงที่

3.5.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Chaplin, 1986)

โดยวิธี Dinitrosalicylic acid ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

1. ปิเปตสารตัวอย่างที่มีปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมมา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง
2. เติมน้ำตาลละลาย DNS 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที
3. หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในน้ำแข็ง
4. เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร อ่านค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ จากกราฟมาตรฐาน ซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 0 – 3 กรัมต่อลิตร เป็นมาตรฐาน

3.5.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน

ก. การเตรียมเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันด้วยวิธี Direct transmethylation ที่ดัดแปลง มาจากวิธีของ Lapage และ Roy (Lapage and Roy, 1984)

1. ชั่งเซลล์แห้งบดละเอียด 100 mg ใส่ใน vial เล็กๆ เติม 0.1 ml ของ internal standard (21:0) จำนวน 2 ml ของ 5% HCl ใน เมทานอล
2. กวนโดยใช้ magnetic bar และให้ความร้อน 80°C นาน 1 ชั่วโมง
3. เติมน้ำและ 0.1 BHT ในเฮกเซน อย่างละ 1 ml
4. เขย่าแรงๆ ทิ้งให้แยกชั้น
5. ดูดชั้นกรองเฮกเซนผ่าน Na_2SO_4 ใน Pasteur pipette เก็บส่วนที่ผ่านการกรองเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบ ของกรดไขมันโดยใช้ก๊าซโครมาโตกราฟี (GC)

ข. การวิเคราะห์องค์ประกอบของเอทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันโดยใช้ก๊าซโครมาโตกราฟี (Gas chromatography)

วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง Gas chromatography model 17A ของบริษัท Shimadzu ซึ่งประกอบด้วย คอลัมน์ capillary ยาว 30 m เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร อุณหภูมิคอลัมน์ 205 °C injector 250°C และ detector 160°C มี ก๊าซไนโตรเจนเป็นตัวพา (carrier gas) ใช้ Detector แบบ FID (Flame Ionization Detector)

บทที่ 4

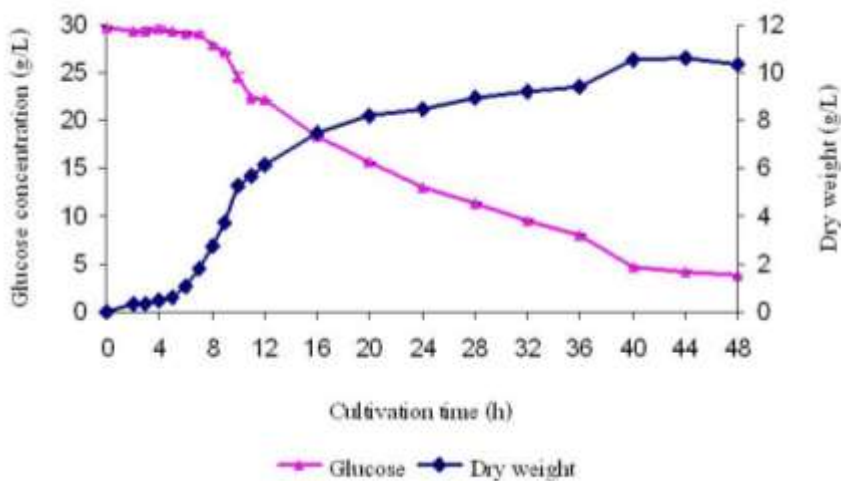
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การหมักแบบกะ (Batch fermentation)

4.1.1 การเจริญเติบโตของเซลล์ (Cell Growth)

เลี้ยงรา *M. rouxii* ATCC 24905 ในถังหมักขนาด 1.5 ลิตร ด้วยอาหาร modified fermentation medium (MFM) และเก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลกลูโคส น้ำหนักเซลล์แห้ง GLA กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบและปริมาณกรดไขมันทั้งหมด และวิเคราะห์อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (maximum specific growth rate , μ_m) ของ รา *M. rouxii* ATCC 24905 ระหว่างกระบวนการหมักในระบบ Batch

ผลการทดลองพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งของ *M. rouxii* ATCC 24905 เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 2-12 ชั่วโมงของการหมัก ซึ่งสอดคล้องกับการลดลงของปริมาณน้ำตาลกลูโคส (รูปที่ 4.1) และพบว่าที่เวลา 44 ชั่วโมงของการหมักได้ค่าน้ำหนักแห้งของเซลล์แห้งสูงสุด (10.6 g/L)

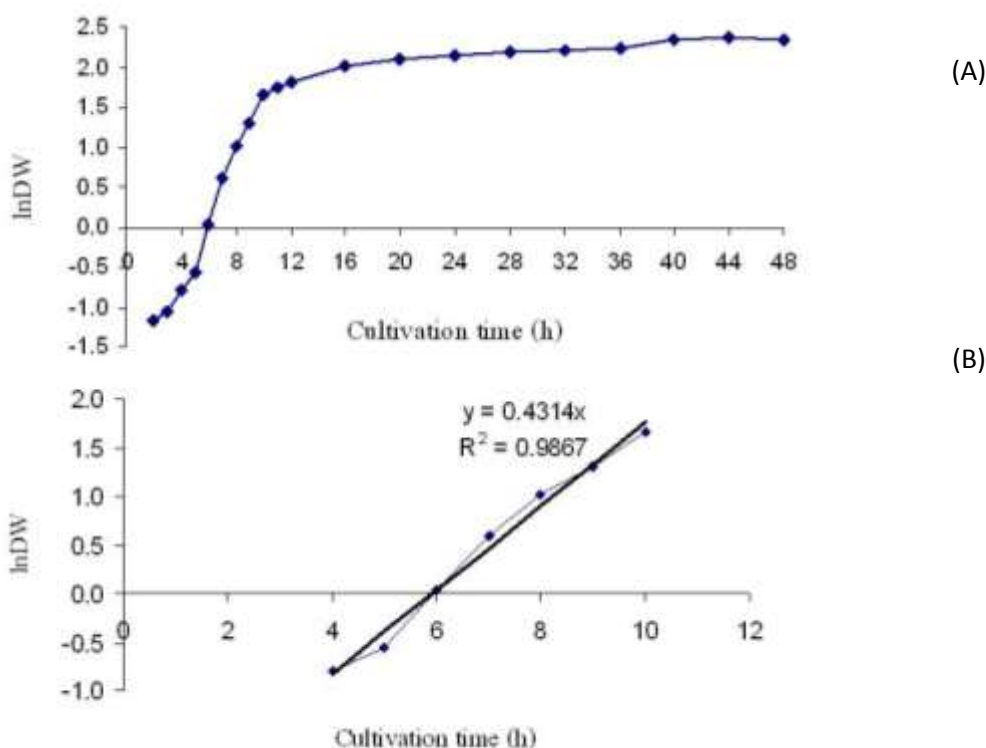


รูปที่ 4.1 ปริมาณกลูโคส และน้ำหนักเซลล์แห้งของ *M. rouxii* ATCC 24905 ในการหมักแบบกะ ในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่มีปริมาตรอาหาร 1.5 L MFM, 30°C, 600 rpm

4.1.2 การวิเคราะห์อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (Maximum specific growth rate)

โดยนำค่าน้ำหนักแห้งของ *M. rouxii* ATCC 24905 ที่ระยะ 4-10 ชั่วโมงซึ่งเป็นระยะ logarithmic มาใช้ในการคำนวณค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด โดยใช้สมการการเจริญเติบโต (growth equation) ดังแสดงในรูป 4.2 ที่แสดง natural logarithmic scale dry weight (lnDW) ของรา *M. rouxii* ATCC 24905

$$dX/dT = \mu X \quad \text{where } X = \text{DW}, T = \text{time}$$



รูปที่ 4.2 การหาอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_m) ของ *M. rouxii* ATCC 24905 ในการหมักแบบกะในอาหาร 1.5 L MFM, 30°C, 600 rpm แสดงการพล็อตระหว่าง lnDW กับเวลาที่เวลา 0-48 ชม. ระหว่างการหมัก (A) การพล็อตระหว่าง lnDW เฉพาะช่วง logarithmic phase , 4-10 ชม. (B)

วิเคราะห์ค่า μ_m โดยสมการการเจริญเติบโต (Ahmad and Holland, 1994):

$$dX/dT = \mu X \quad \dots\dots\dots(1)$$

$$\int (1/X) dX = \int \mu dT \quad \dots\dots\dots(2)$$

$$\ln X = \mu T \quad \dots\dots\dots(3) \quad (y = mx ; m = \mu = \text{slope})$$

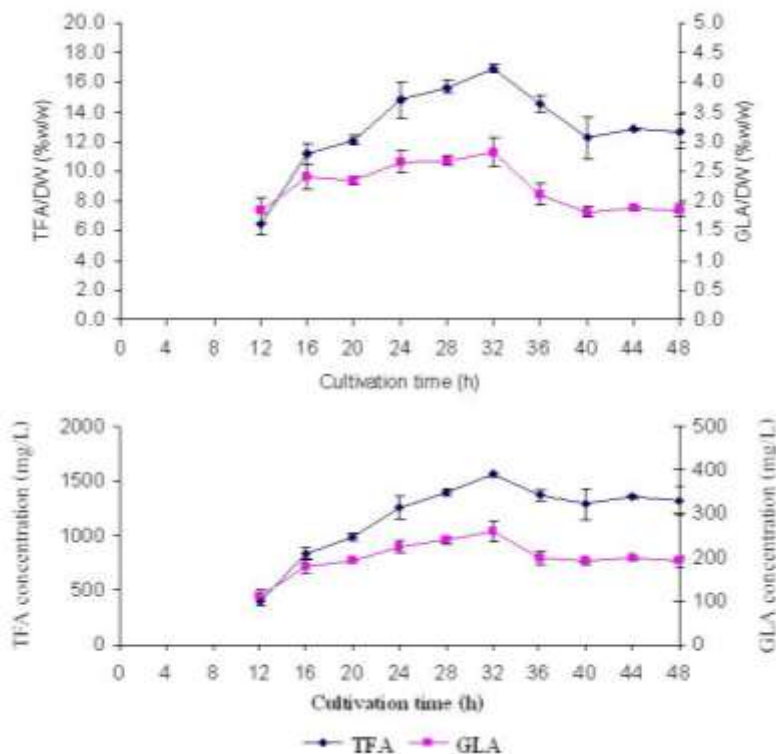
จากรูป 4.2 $y = 0.4314 x$; เมื่อ $y = \ln DW$ and $x = \text{time } (T)$

$$\ln DW = 0.4314 T \quad \text{ดังนั้น, } \mu = 0.4314 \text{ h}^{-1}$$

จากการทดลอง สรุปได้ว่าอัตราการเจริญสูงสุดของรา *M. rouxii* ATCC 24905 เท่ากับ 0.4314 h^{-1} ซึ่งค่าดังกล่าวนี้ จะเป็นค่าสูงสุดของ dilution rate ในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง หรือคือค่า D_{critical} โดยการหมักแบบ Continuous culture dilution rate ต้องต่ำกว่าอัตราการเจริญสูงสุดเพื่อหลีกเลี่ยงการ wash-out

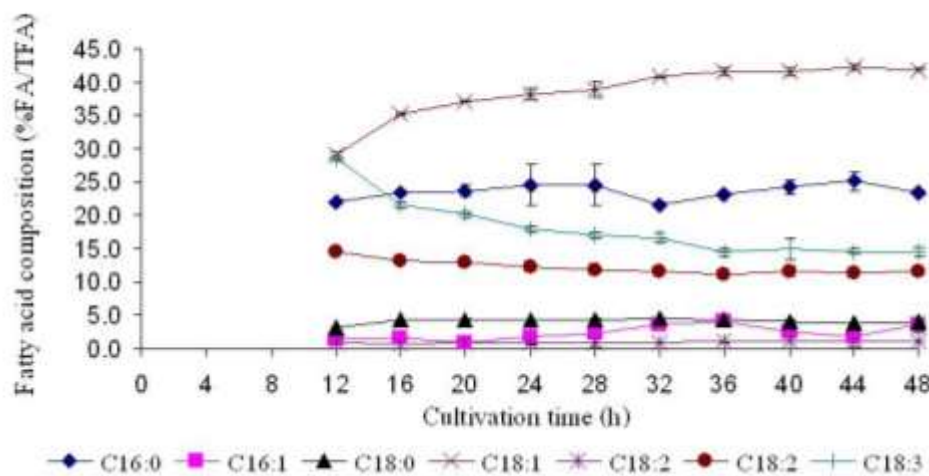
4.1.3 ปริมาณกรดไขมันทั้งหมด องค์ประกอบของกรดไขมัน และการผลิต GLA

ปริมาณกรดไขมันทั้งหมดและ GLA ในเซลล์แห้งของรา *M. rouxii* ATCC 24905 ที่ได้จากกระบวนการหมักแบบกะมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการหมักและมีค่าลดลงภายหลังจากระยะ logarithmic phase (รูป 4.3) ปริมาณของกรดไขมันทั้งหมดและ GLA ของเซลล์แห้งมีค่าสูงสุดเท่ากับ 16.9% (w/w) และ 2.8 % (w/w) ซึ่งความเข้มข้นของปริมาณกรดไขมันทั้งหมดและ GLA เท่ากับ 1559.8 mg/L และ 258.3 mg/L ตามลำดับ พรทิพย์ พึ่งม่วง (1995) รายงานว่า ปริมาณ GLA ในเซลล์แห้งและปริมาณความเข้มข้น GLA ของรา *M. rouxii* ATCC 24905 ในการเลี้ยงแบบกะ (shake flask) มีค่าเท่ากับ 2.9 % และ 274 mg/L ตามลำดับ



รูปที่ 4.3 ปริมาณกรดไขมันทั้งหมด (TFA) และ GLA ในน้ำหนักแห้ง (A), ความเข้มข้น TFA และ GLA (B) ในการหมักแบบกะของ *M. rouxii* ATCC 24905 ในอาหาร 1.5 L MFM ที่ 30°C , 600 rpm

ในรา *M. rouxii* ATCC 24905 นั้น พบองค์ประกอบของกรดไขมันที่สำคัญได้แก่ กรดพาลมิติก (C16:0), กรดพาลมิโทเลอิก (C16:1), กรดสเตียริก (C18:0), กรดโอเลอิก (C18:1), กรดลิโนเลอิก (C18:2) และกรดแกมมา-ลิโนเลนิก (C18:3) (หรือ GLA) โดยกรดไขมันที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนในระหว่างกระบวนการหมักได้แก่กรดไขมันชนิด C18 โดยกรดโอเลอิก (C18:1) มีสัดส่วนเพิ่มขึ้นในขณะที่กรดแกมมา-ลิโนเลนิก(C18:3) จะลดลงในระยะ stationary phase (รูปที่ 4.4) เนื่องจากกรดแกมมา-ลิโนเลนิก (C18:3) เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเมมเบรนและมีความจำเป็นต่อการงอกของ sporangiospore (Khunyoshyeng, 2002) นอกจากนี้ปริมาณกรดโอเลอิก (C18:1) มีสัดส่วนที่สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับกรดไขมันชนิดอื่นตั้งแต่ที่ระยะ late-logarithmic phase จนถึงสิ้นสุดกระบวนการหมัก ซึ่งกรดไขมันโอเลอิก (C18:1) นั้นเกิดจากการ desaturation ของกรดสเตียริก (C18:0) เป็นกรดโอเลอิก(C18:1) กรดลิโนเลอิก (C18:2) และแกมมา-ลิโนเลนิก (C18:3) ตามลำดับ (Ratledge, 2004) ดังนั้นที่ระยะ stationary phase จะมีการสะสมของ saturated fatty acid (C18:0)และ monounsaturated fatty acid (C18:1) เนื่องจากกระบวนการสร้างเมมเบรนที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบนั้นลดลง (Emelyanova, 1996) นอกจากนี้กรดโอเลอิก (C18:1) ยังทำหน้าที่เป็น storage lipid ในระยะ stationary phase ของรา *M. rouxii* ATCC 24905 อีกด้วย อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้ไม่พบความแตกต่างขององค์ประกอบของกรดพาลมิติก (C16:0) กรดพาลมิโทเลอิก (C16:1) กรดสเตียริก (C18:0) กรดลิโนเลอิก (C18:2) ตลอดระยะเวลาในกระบวนการหมัก



รูปที่ 4.4 แสดงสัดส่วนกรดไขมันชนิดต่าง ๆ ในกรดไขมันทั้งหมดของ *M. rouxii* ATCC 24905 ในการหมักแบบกะในถังหมักที่มีอาหาร 1.5 L MFM ที่ 30°C, 600 rpm

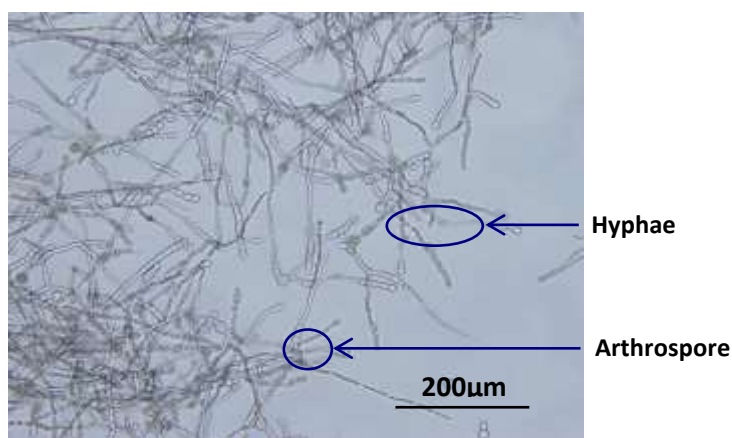
ในตาราง 4.1 แสดง Productivity และ GLA ของรา *M. rouxii* ATCC 24905 ในกระบวนการหมักแบบกะ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.24 g/L/h และ 4.3×10^{-3} g/g/h ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าต่าง ๆ ที่ได้จากการหมัก *M. rouxii* ATCC 24905 ในการหมักแบบกะ ในอาหาร MFM (modified fermentation medium)

Dry weight (g/L)	%GLA in DW (%w/w)	GLA concentration (mg/L)	Productivity on	
			Cell (g/L/h)	GLA (g/g/h)
10.6	2.8	258.3	0.24	4.3×10^{-3}

4.1.4 สัณฐานวิทยา (Morphology)

เลี้ยงรา *M. rouxii* ATCC 24905 แบบกะ ที่มี 3% glucose ในอาหาร MFM พบว่า รา *M. rouxii* ATCC 24905 มีการเจริญจาก sporangiospore จนถึง non-septate hypha ซึ่งเป็นลักษณะปกติของราชนิดนี้ และพบว่ารา *M. rouxii* ATCC 24905 มีการเจริญแบบเส้นใยและพบ arthrospore ที่ระยะ late-logarithmic phase (รูปที่ 4.5) ซึ่งการพัฒนาของ arthrospore ที่เกิดมากในระยะ stationary phase นั้นเป็นผลมาจากการรับอนินในแหล่งอาหารมีไม่เพียงพอต่อการเจริญ (Barrera, 1985) นอกจากนี้ความเครียดจากสิ่งแวดล้อมเช่น pH ต่ำ ปริมาณความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้นสูง สามารถชักนำให้เกิดการสร้าง arthrospore ของรา *M. rouxii* ATCC 24905 ได้เช่นกัน



รูปที่ 4.5 สัณฐานวิทยาของ *M. rouxii* ATCC 24905 ในการหมักแบบกะในถังหมัก ที่ระยะ late-logarithmic phase (18 h) (200x) ถูกตรึงและแสดง arthrospore และ hyphae

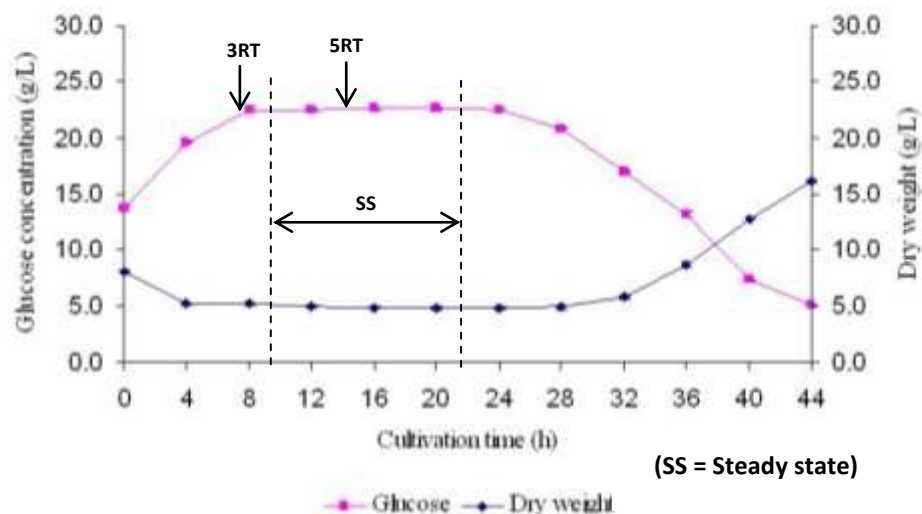
4.2 กระบวนการหมักแบบต่อเนื่องของรา *M. rouxii* ATCC 24905 ที่ dilution rate 0.3 h^{-1}

4.2.1 การเจริญเติบโตของเซลล์ (Cell Growth)

เลี้ยงรา *M. rouxii* ATCC 24905 ในถังหมักขนาด 1.5 ลิตร ในอาหาร modified fermentation medium (MFM) ในระบบการหมักแบบกะจนเข้าสู่ระยะ late-logarithmic phase (18 ชั่วโมง) หลังจากนั้นเข้า

สู่กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง (0 ชั่วโมง) โดยทำการเติมอาหาร MFM สู่ถังหมักด้วย dilution rate ที่ 0.3h^{-1} ซึ่งควบคุมโดย peristaltic pump ค่า RT (resident time) ที่ 3RT และ 5RT ของกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง ที่ dilution rate ที่ 0.3h^{-1} มีค่าเท่ากับ 9.9 และ 16.6 ชั่วโมง ตามลำดับนับจากจุดเชื่อมต่อของกระบวนการหมัก เก็บตัวอย่างทุกชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส น้ำหนักแห้ง GLA องค์ประกอบของกรดไขมันและ ปริมาณกรดไขมันทั้งหมด และวิเคราะห์ค่า maximum specific growth rate (μ_m) ในกระบวนการหมักอีก เช่นกัน (ซ้ำ)

น้ำหนักเซลล์แห้งของรา *M. rouxii* ATCC 24905 หลังจากหมักแบบกะ 18 ชม. และต่อเข้ากับ กระบวนการหมักแบบต่อเนื่องมีค่าเท่ากับ 8.1 g/L และมีความเข้มข้นกลูโคสเท่ากับ 13.8 g/L จากนั้นระบบเข้าสู่สภาวะ steady state ระหว่าง 12 – 24 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงในระบบต่อเนื่อง โดยที่ระยะ steady state พบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และกลูโคสมีค่าเท่ากับ 4.9 g/L และ 22.6 g/L ตามลำดับ (รูปที่ 4.6) แต่ภายหลังจาก 24 ชั่วโมงพบว่าเกิดการสะสมของน้ำหนักเซลล์แห้งภายในถังหมักเนื่องจากเกิดการเกาะจับกันเป็นก้อนของ pellet ที่ dilution rate ที่ 0.3h^{-1} นี้และสะสมภายในถังหมักเพิ่มขึ้น (ไม่สามารถออกจากถังหมักโดยระบบปั๊มได้) ดังนั้นสภาวะ steady state ของ dilution rate ที่ 0.3h^{-1} จึงถูกรบกวนภายหลังจาก 24 ชม. ของการหมัก และ Effluent ที่สภาวะ steady state ประกอบไปด้วยกลูโคสความเข้มข้นสูง (22.6 g/L)

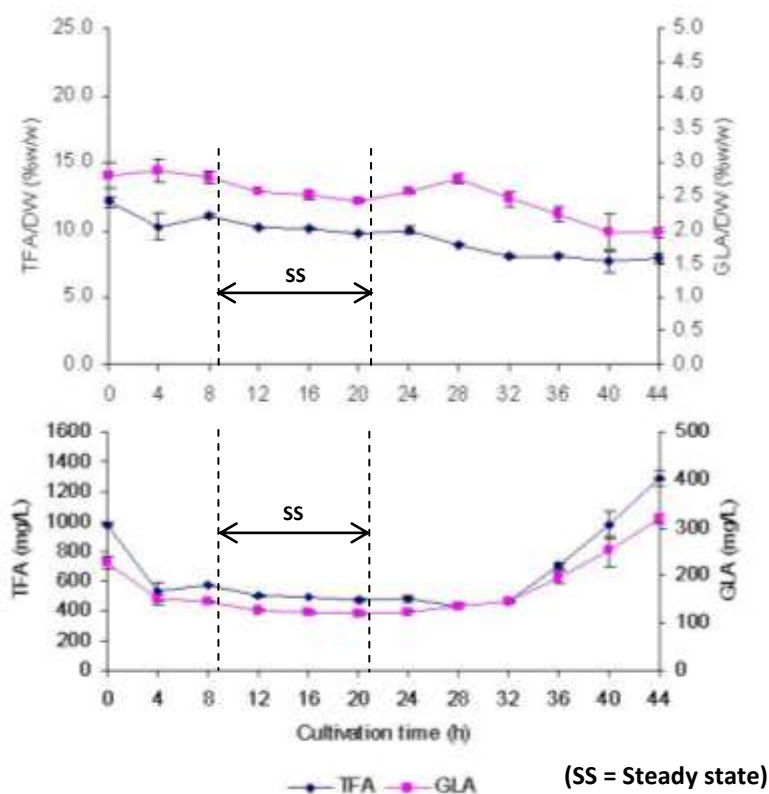


รูปที่ 4.6 แสดงปริมาณกลูโคส และน้ำหนักแห้งของ *M. rouxii* ATCC 24905 ในการหมักแบบต่อเนื่องในอาหาร 1.5 L MFM ที่ dilution rate 0.3h^{-1} , 30°C , 600 rpm ลูกศรชี้ระยะเวลาที่ 3 RT และ 5 RT

4.2.2 ปริมาณกรดไขมันทั้งหมด องค์ประกอบของกรดไขมัน และ การผลิต GLA

ในรูปที่ 4.7 แสดงปริมาณกรดไขมันทั้งหมดและความเข้มข้นของ GLA ของ *M. rouxii* ATCC 24905 ในการหมักแบบต่อเนื่องที่ dilution rate เท่ากับ 0.3 h^{-1} พบว่าที่จุดเชื่อมต่อกับระบบการหมักแบบต่อเนื่อง (0 ชม.) มีปริมาณกรดไขมันทั้งหมดและ GLA ในน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 12.1% (w/w) และ 2.8% (w/w) ซึ่งมีความเข้มข้นของกรดไขมันและ GLA เท่ากับ 978.9 mg/L และ 226.8 mg/L ตามลำดับ

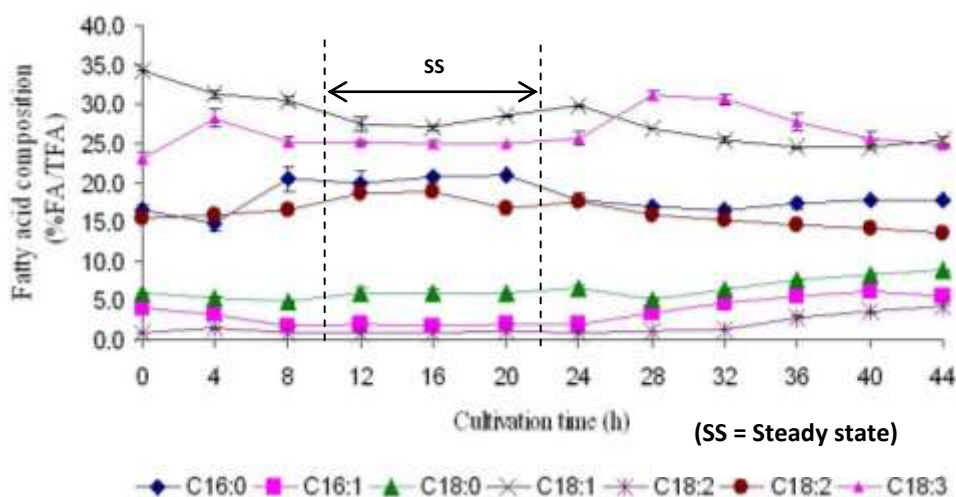
ที่สภาวะ steady state พบว่าในเซลล์แห้งมีปริมาณกรดไขมันทั้งหมดและ GLA ลดลงเป็น 10.0% (w/w) และ 2.5% (w/w) ซึ่งมีความเข้มข้นของกรดไขมันและ GLA เท่ากับ 488.3 mg/L และ 122.9 mg/L ตามลำดับ นอกจากนี้การใช้ dilution rate สูงที่ 0.3 h^{-1} ยังส่งผลให้รา *M. rouxii* ATCC 24905 เกิดการเจริญที่รวดเร็ว ซึ่งในสภาวะการเจริญที่รวดเร็วนี้อาจทำให้กระบวนการใช้น้ำตาลกลูโคสของ *M. rouxii* ATCC 24905 ไม่เกิดการสะสมของกรดไขมันภายในเซลล์มากเท่ากับที่ dilution rate ต่ำกว่า



รูปที่ 4.7 แสดงปริมาณ TFA และ GLA ในน้ำหนักแห้ง, ความเข้มข้น TFA และ GLA ของ *M. rouxii* ATCC 24905 ในการหมักแบบต่อเนื่องที่มีอาหาร 1.5 L MFM ที่ dilution rate 0.3 h^{-1} , 30°C , 600 rpm

รูปที่ 4.8 แสดงองค์ประกอบกรดไขมัน *M. rouxii* ATCC 24905 ที่ dilution rate 0.3 h^{-1} พบว่าปริมาณกรดโอเลอิก (C18:1) มีค่าลดลงจาก 34.3% (%g-FA/g-TFA) ที่จุดเชื่อมต่อ (0 ชม.) และมีค่า 28.2% ที่สภาวะ steady state

ปริมาณกรดพาลเมติก (C16:0) และ GLA (C18:3) เพิ่มขึ้นเล็กน้อย จาก 16.5% และ 23.1% (ณ จุดเชื่อมต่อ ที่ยังเป็น unsteady state) เป็น 19.9% และ 25.2% ที่สภาวะ steady state ตามลำดับ Ratledge และ Wynn (2002) รายงานว่าการสะสมของไขมันนั้น จะเกิดขึ้นเมื่อทำการเลี้ยงด้วยอัตราการเจริญต่ำ ด้วยเหตุนี้เอง ในการทดลองนี้การเลี้ยงรา *M. rouxii* ATCC 24905 ในช่วงการเจริญที่รวดเร็วที่ dilution rate ที่ 0.3 h^{-1} จึงไม่พบการสะสมของไขมัน โดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดพาลมิโทเลอิก (C16:1), กรดเสตียริก (C18:0), และกรดลิโนเลอิก (C18:2) ตลอดระยะเวลาเพาะเลี้ยง



รูปที่ 4.8 แสดงสัดส่วนกรดไขมันชนิดต่าง ๆ ในกรดไขมันทั้งหมดของ *M. rouxii* ATCC 24905 ในการหมักแบบต่อเนื่องในอาหาร 1.5 L MFM ที่ dilution of 0.3 h^{-1} , 30°C , 600 rpm

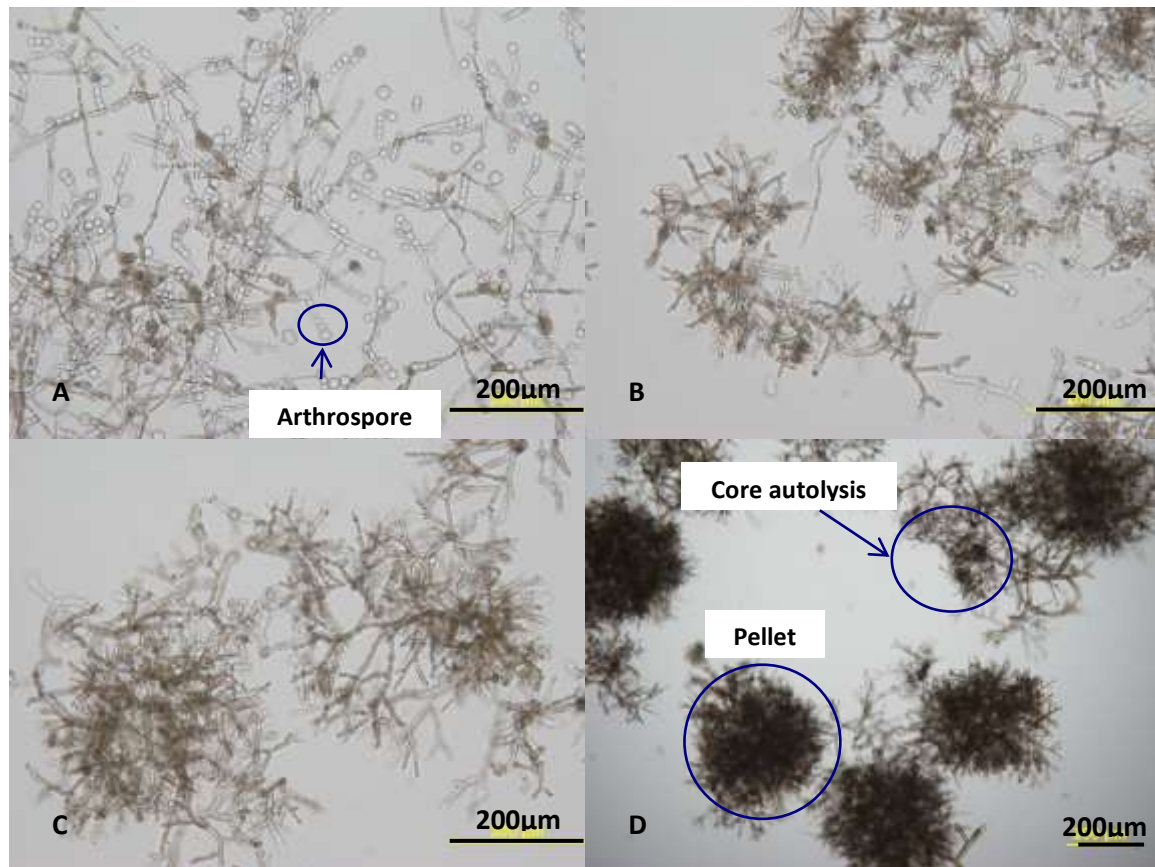
ในตาราง 4.2 แสดงถึง productivity และ GLA ของรา *M. rouxii* ATCC 24905 ที่ dilution rate เท่ากับ 0.3 h^{-1} พบค่า productivity และ GLA เท่ากับ 1.47 g/L/h และ $7.5 \times 10^{-3} \text{ g/g/h}$ ตามลำดับ พบว่าค่า productivity และ GLA ที่ได้จากการหมักแบบต่อเนื่องที่ dilution rate 0.3 h^{-1} มีค่าสูงกว่ากระบวนการหมักแบบกะ (0.24 g/L/h และ $4.3 \times 10^{-3} \text{ g/g/h}$)

ตารางที่ 4.2 แสดงค่าต่าง ๆ ที่ได้จากการหมักแบบต่อเนื่องในสภาวะ steady state ของ *M. rouxii* ATCC 24905 ในอาหาร MFM (modified fermentation medium) ที่ dilution rate 0.3 h^{-1}

Dry weight (g/L)	%GLA in DW (%w/w)	GLA concentration (mg/L)	Productivity on	
			Cell (g/L/h)	GLA (g/g/h)
4.9	2.5	122.9	1.47	7.5×10^{-3}

4.2.3 สัณฐานวิทยา (Morphology)

ลักษณะสัณฐานวิทยาของรา *M. rouxii* ATCC 24905 ในการเลี้ยงแบบกะ ก่อนที่จะเข้าสู่ระบบการหมักแบบต่อเนื่อง มีลักษณะเป็น hypha ที่มี arthrospore (รูปที่ 4.9A) ซึ่ง arthrospore จะประกอบด้วย mycelium ที่มีกิ่งก้านสาขามากมายและมีทิศทางที่ไม่แน่นอน (รูปที่ 4.9B) อย่างไรก็ตามที่สภาวะ steady state พบว่า mycelium ของรา *M. rouxii* ATCC 24905 มีการเจริญเกาะกันเป็นกลุ่ม (รูปที่ 4.9C-D) ซึ่งการเกาะกลุ่มกันของ mycelium นี้อาจส่งผลให้ได้ปริมาณ GLA ที่น้อยลงเนื่องจาก mycelium ที่เกาะกันเป็นกลุ่มก้อนได้รับออกซิเจนและสารอาหารไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตตลอดจนมีผลต่อกระบวนการ desaturation ของกรดไขมัน นอกจากนี้ยังพบว่า เซลล์ราที่เกาะกันเป็นกลุ่มนี้ ภายในยังเกิดการตาย เนื่องจากเกิดการย่อยตัวเอง (autolysis) และการขาดออกซิเจนและสารอาหารภายในเช่นเดียวกัน (Clark, 1962)



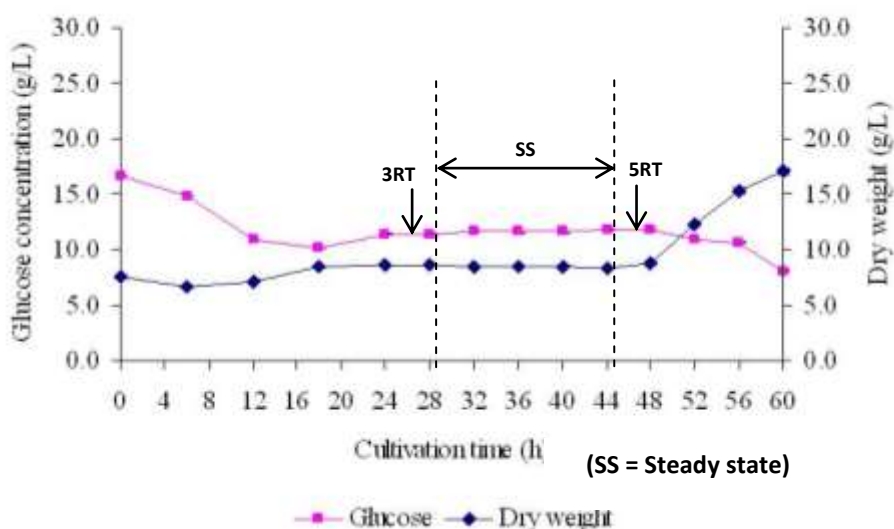
รูปที่ 4.9 สัณฐานวิทยาของ *M. rouxii* ATCC 24905 ในการหมักแบบต่อเนื่องในอาหาร 1.5 L MFM ที่ dilution rate 0.3 h^{-1} ที่ระยะเวลาการหมักที่เวลา 0 h (A), 8 h (B), 16 h (C) and 28 h (D) (200x, except D=100x) ลูกศร แสดง arthrospore, pellet และการเกิด core autolysis

4.3 กระบวนการหมักแบบต่อเนื่องของรา *M. rouxii* ATCC 24905 ที่ dilution rate 0.1 h^{-1}

4.3.1 การเจริญเติบโตของเซลล์ (Cell Growth)

เลี้ยงรา *M. rouxii* ATCC 24905 ในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่มีอาหาร 1.5 ลิตร MFM ในระบบการหมักแบบกะ จนเข้าสู่ระยะ late-logarithmic phase (18 ชม.) และศึกษา dilution rate ที่ 0.1 h^{-1}

น้ำหมักเซลล์แห้งของรา *M. rouxii* ATCC 24905 ก่อนต่อเข้ากับระบบการหมักแบบต่อเนื่องที่ชม. ที่ 18 มีค่า 7.6 g/L และกลูโคส 16.6 g/L และในระบบการหมักต่อเนื่องที่ สภาวะ steady state ของกระบวนการหมัก ซึ่งเกิดขึ้นระหว่างชม.ที่ 32 – 48 ชม. พบน้ำหมักเซลล์แห้ง และกลูโคสมีค่าเท่ากับ 8.6g/L และ 11.5 g/L ตามลำดับ (รูปที่ 4.10) แต่หลังจาก 48 ชม. พบการสะสมของเซลล์ร่ายในถังหมัก เนื่องจากเกิดการเกาะจับกันของเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายยีสต์ (Yeast like form) เป็นผลให้ระบบถูกรบกวน และเสียสภาวะ steady state หลังการหมัก 48 ชม.

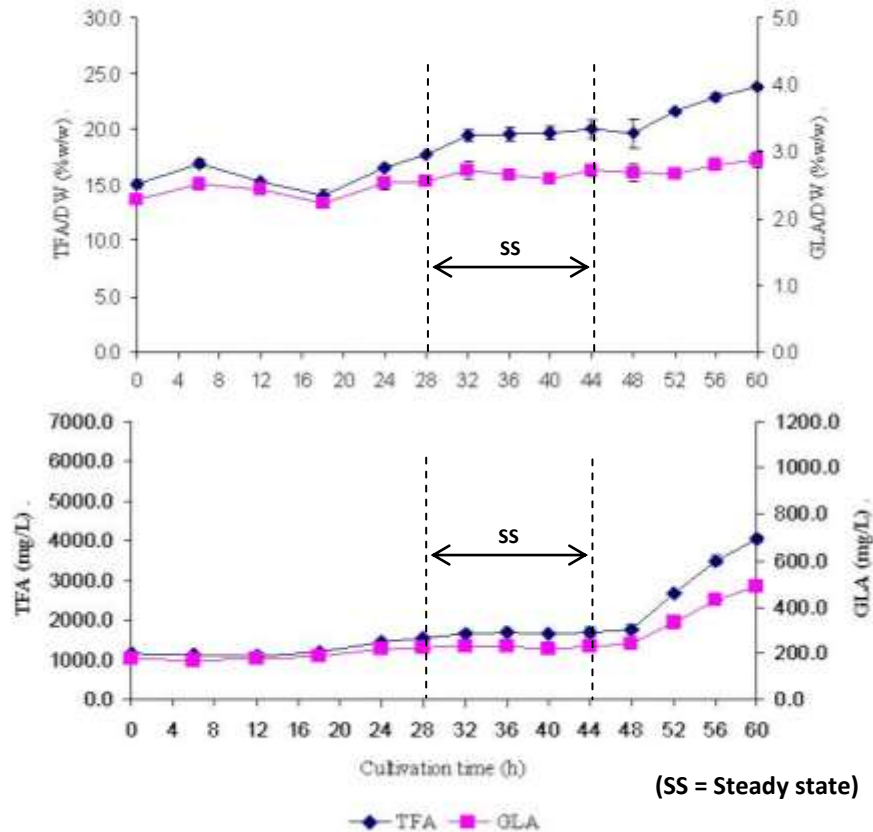


รูปที่ 4.10 แสดงปริมาณกลูโคส และน้ำหมักแห้งของ *M. rouxii* ATCC 24905 ในการหมักแบบต่อเนื่องในอาหาร 1.5 L MFM ที่ dilution rate 0.1 h^{-1} , 30°C , 600 rpm ลูกศรชี้ระยะเวลาที่ 3RT และ 5RT

4.3.2 ปริมาณกรดไขมันทั้งหมด องค์ประกอบของกรดไขมัน และการผลิต GLA

ในรูปที่ 4.11 แสดงปริมาณกรดไขมันทั้งหมดและความเข้มข้นของ GLA ของรา *M. rouxii* ATCC 24905 ที่ dilution rate 0.1 h^{-1} โดยปริมาณเซลล์หลังจากการหมักแบบกะ มีปริมาณกรดไขมันและ GLA ในน้ำหมักแห้งเท่ากับ 15.1% (w/w) และ 2.5 % (w/w) และความเข้มข้นกรดไขมันทั้งหมดและ GLA เท่ากับ 1149.0 mg/L และ 173.2 mg/L ตามลำดับ

ที่สภาวะ steady state พบปริมาณกรดไขมันทั้งหมดและ GLA ในเซลล์แห้ง เป็น 18.6% (w/w) และ 2.6% (w/w) และความเข้มข้นของกรดไขมันและ GLA เท่ากับ 1593.2 mg/L และ 223.5 mg/L ตามลำดับ พบว่าปริมาณกรดไขมันทั้งหมดในเซลล์แห้งของ *M. rouxii* ATCC 24905 ที่ dilution rate 0.1h^{-1} มีค่าสูงกว่าที่ dilution rate ที่ 0.3h^{-1} นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ dilution rate ที่ 0.1h^{-1} ยังพบการสะสมของกรดไขมันมากกว่าที่ dilution rate ที่ 0.3h^{-1} แต่ไม่พบความแตกต่างของปริมาณ GLA เมื่อใช้ dilution rate ที่แตกต่างกัน

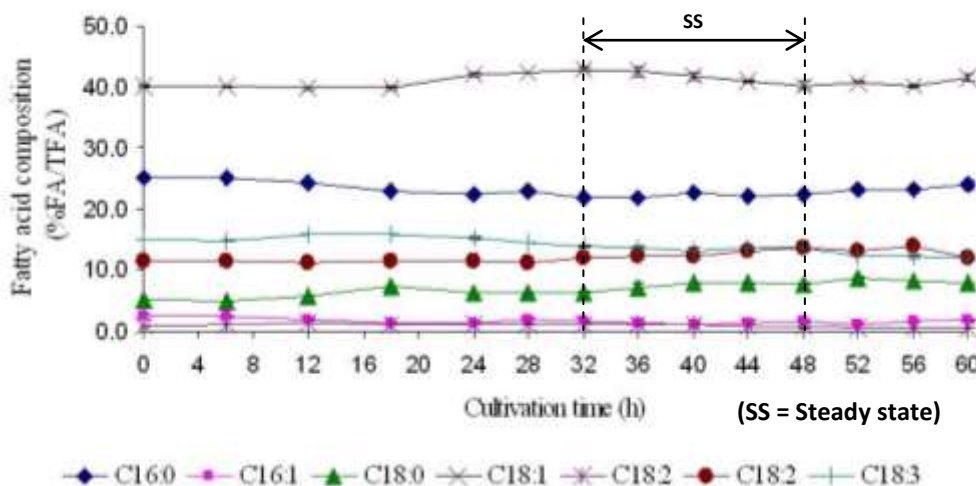


รูปที่ 4.11 แสดง TFA และ GLA ในน้ำหมักแห้ง, ความเข้มข้น TFA และ GLA ของ *M. rouxii* ATCC 24905 ในการหมักแบบต่อเนื่องที่ 1.5 L MFM ที่ dilution rate 0.1h^{-1} , 30°C , 600 rpm

รูปที่ 4.2 แสดงองค์ประกอบกรดไขมันของรา *M. rouxii* ATCC 24905 ที่ dilution rate 0.1h^{-1} พบว่าสัดส่วนของกรดโอเลอิก (C18:1) ที่สภาวะ steady state มีค่าใกล้เคียงกับเซลล์ที่เลี้ยงในระบบ Batch ก่อนต่อเข้ากับระบบต่อเนื่อง โดยพบการสะสมกรดไขมันของรา *M. rouxii* ATCC 24905 ที่ dilution rate 0.1h^{-1} มีค่าไม่แตกต่างกับในระยะ late-logarithmic phase ของกระบวนการหมักแบบกะ ซึ่งสภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี

ความเข้มข้นของกลูโคสต่ำ (ที่ dilution rate ต่ำ) อาจส่งผลต่อการสะสมของกรดไขมันเพื่อการอยู่รอดในสภาวะอดอาหาร (Rogers *et al.*, 1974)

ปริมาณกรดพาลเมติก (C16:0) และ GLA (C18:3) ไม่แตกต่างจากเซลล์ในระบบการหมักแบบกะก่อนต่อเข้ากับระบบต่อเนื่อง โดยมีปริมาณลดลงเล็กน้อย จาก 25.2% และ 15.1% (ในระบบกะ) เป็น 22.2% และ 13.6% ที่สภาวะ steady state ที่ dilution rate 0.1 h^{-1} พบว่าปริมาณกรดพาลมิโทเลอิก (C16:1), กรดสเตียริก (C18:0), และกรดลิโนเลอิก (C18:2) ไม่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาเพาะเลี้ยง



รูปที่ 4.12 แสดงสัดส่วนกรดไขมันชนิดต่าง ๆ ในกรดไขมันทั้งหมดของ *M. rouxii* ATCC 24905 ในการหมักแบบต่อเนื่องใน 1.5 L MFM ที่ dilution rate 0.1 h^{-1} , 30°C , 600 rpm

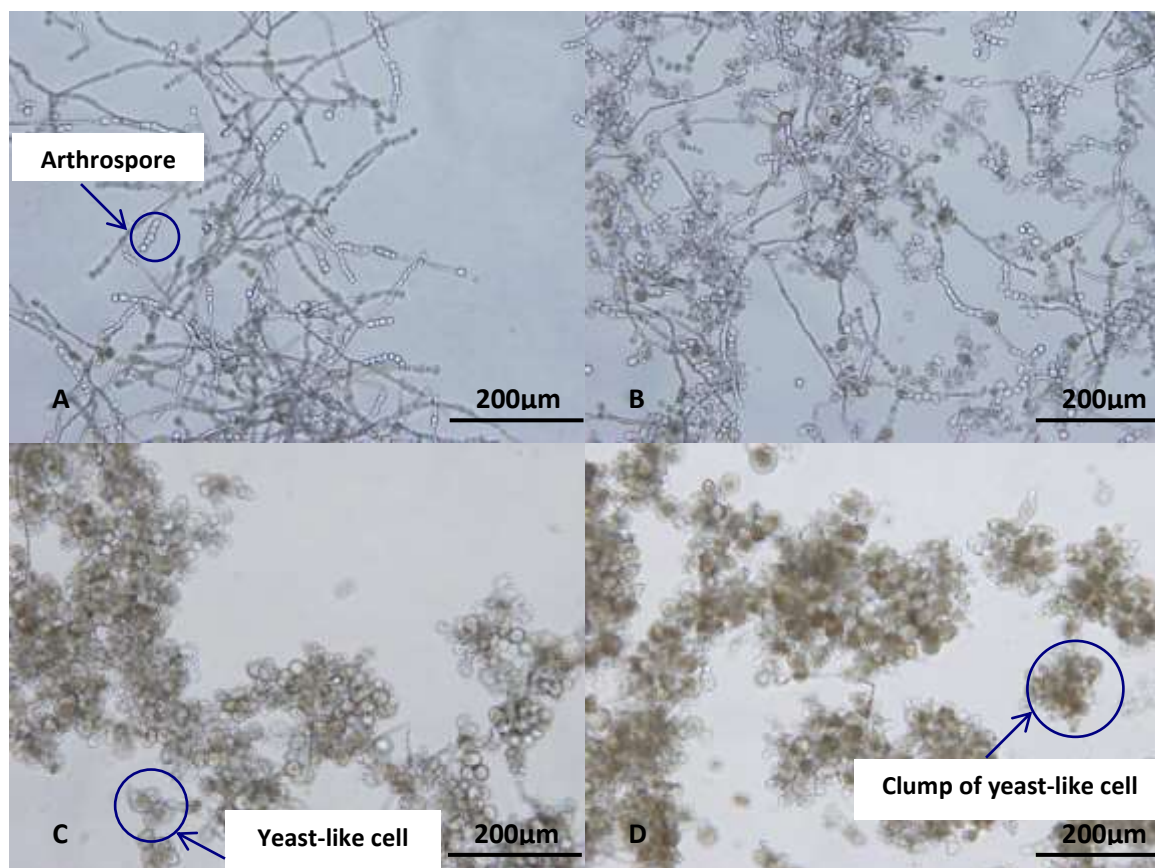
ในตาราง 4.3 แสดงถึง productivity และ GLA ของรา *M. rouxii* ATCC 24905 ที่ dilution rate 0.1 h^{-1} พบค่า productivity และ GLA เท่ากับ 0.86 g/L/h และ $2.6 \times 10^{-3} \text{ g/g/h}$ ตามลำดับ ถึงแม้ว่าค่า productivity และ GLA ที่ได้จากระบบการหมักแบบต่อเนื่องที่ dilution rate เท่ากับ 0.1 h^{-1} จะมีค่าน้อยกว่าที่ dilution rate 0.3 h^{-1} แต่ได้ปริมาณความเข้มข้นของ GLA ที่มากกว่า

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าต่าง ๆ ที่ได้จากการหมักแบบต่อเนื่องในสภาวะ steady state ของ *M. rouxii* ATCC 24905 ในอาหาร MSM (modified fermentation medium) ที่ dilution rate 0.1 h^{-1}

Dry weight (g/L)	%GLA in DW (%w/w)	GLA concentration (mg/L)	Productivity on	
			Cell (g/L/h)	GLA (g/g/h)
8.6	2.6	223.5	0.86	2.6×10^{-3}

4.3.3 สัณฐานวิทยา (Morphology)

สัณฐานวิทยาของรา *M. rouxii* ATCC 24905 เมื่อเลี้ยงในระบบการหมักแบบกะ ก่อนต่อเข้ากับระบบการหมักแบบต่อเนื่อง มีลักษณะเป็น arthrospore ซึ่งอยู่ในระยะ late-logarithmic phase (รูปที่ 4.13A) ซึ่งพบว่า arthrospore มีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาเพาะเลี้ยงและมีการพัฒนาต่อไปจนเข้าลักษณะเป็น yeast-like form (รูปที่ 4.13B-C) ที่สภาวะ steady state จะพบรา *M. rouxii* ATCC 24905 เจริญในทิศทางที่ไม่แน่นอน และอยู่ในรูปของ yeast-like form เป็นส่วนใหญ่ (รูป 4.13D) และที่ เวลา 48 ชม. พบการเกาะกันของ yeast-like cells เป็นก้อนทำให้ระบบเสถียรเนื่องจาก ปัมหรือท่อ feed อาหารออกไปไม่สามารถลำเลียงเซลล์ไปยังส่วนเก็บของเสียได้ อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่า การเกิด yeast-like form เป็นรูปร่างที่ส่งผลดีต่อกระบวนการหมักกรดไขมันมากกว่าเซลล์ที่อยู่ในรูปเส้นใย hyphal เนื่องจาก การส่งผ่านสารอาหารและออกซิเจนไปสู่เซลล์ สามารถทำได้ดีกว่า (Znidarsic and Pavko, 2001)



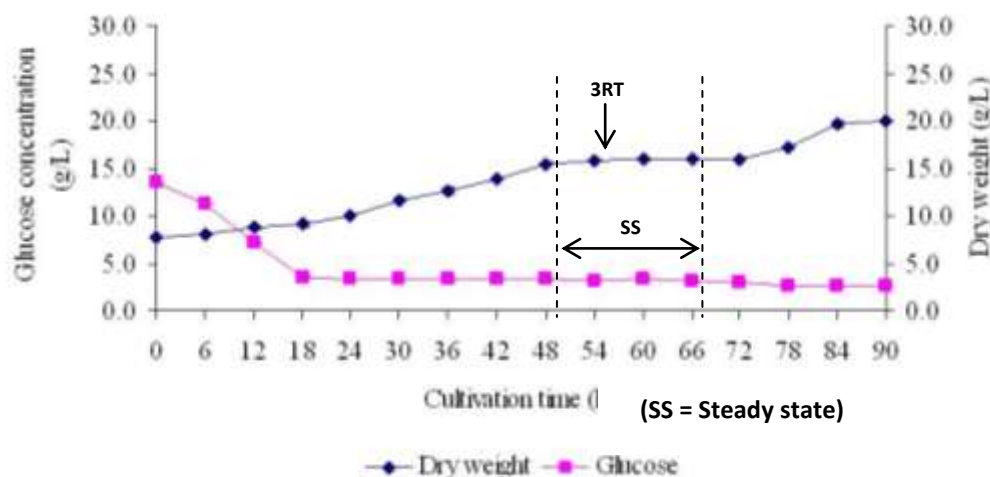
รูปที่ 4.13 สันฐานวิทยาของ *M. rouxii* ATCC 24905 ในการหมักแบบต่อเนื่องในอาหาร 1.5 L MFM ที่ dilution rate 0.1h^{-1} ที่ระยะเวลาการหมักที่ 0 h (A), 12 h (B), 40 h (C) และ 52 h (D) (200x).
 ลูกศรแสดง arthrospore, yeast-like cell และการจับตัวกันของ yeast-like cell (clump of yeast-like cell)

4.4 กระบวนการหมักแบบต่อเนื่องของรา *M. rouxii* ATCC 24905 ที่ dilution rate 0.05h^{-1}

4.4.1 การเจริญเติบโตของเซลล์ (Cell Growth)

เลี้ยงรา *M. rouxii* ATCC 24905 ในถังหมักขนาด 1.5 ลิตร ในอาหาร MFM ในระบบการหมักแบบกะจนเข้าสู่ระยะ late-logarithmic phase (18 ชม.) และต่อเข้ากับระบบการหมักแบบต่อเนื่อง โดยเติมอาหาร MFM สู่อ่างหมักด้วย dilution rate ที่ 0.05h^{-1} ซึ่ง 3RT และ 5RT ที่ dilution rate 0.05h^{-1} มีค่าเท่ากับ 60 และ 100 ชม. ตามลำดับ เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์กลูโคส น้ำหนักแห้ง GLA องค์ประกอบของกรดไขมันและปริมาณกรดไขมันทั้งหมด

น้ำหนัเซลล์แห้งของรา *M. rouxii* ATCC 24905 ก่อนต่อเข้ากับระบบต่อเนื่องมีค่าเท่ากับ 7.7g/L และ กลูโคสเท่ากับ 13.5g/L และที่ สภาวะ steady state ของกระบวนการหมักซึ่งเกิดระหว่างชม.ที่ 52–70 ชม. ของการเพาะเลี้ยง พบว่าน้ำหนัเซลล์แห้ง และความเข้มข้นกลูโคสมีค่าเท่ากับ 15.9 g/L และ 3.2 g/L ตามลำดับ (รูปที่ 4.14) แต่ภายหลัง 72 ชม. พบการสะสมของชีวมวลภายในถังหมักเนื่องจากเกิดการเกาะจับกัน ของเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายยีสต์ (yeast like cells) ซึ่งทำให้ระบบถูกรบกวน และเสถียรน้อยที่สุดในที่สุด



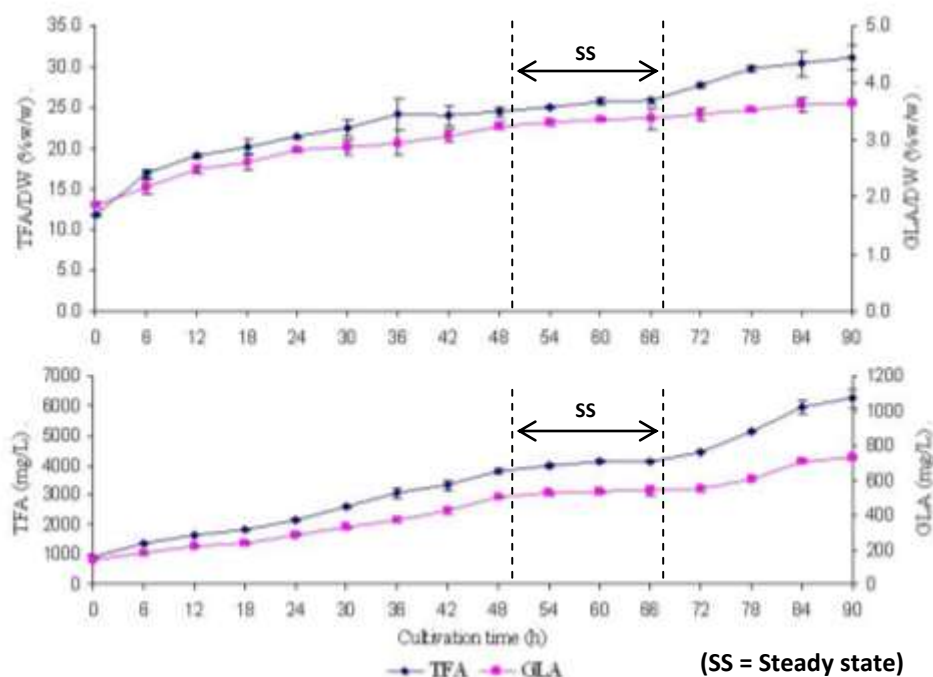
รูปที่ 4.14 แสดงปริมาณกลูโคส และน้ำหนัแห้งของ *M. rouxii* ATCC 24905 ในการหมักแบบต่อเนื่องใน อาหาร 1.5 L MFM ที่ dilution rate 0.05 h^{-1} , 30°C , 600 rpm ลูกศรชี้ระยะเวลาที่ 3 RT

4.4.2 ปริมาณกรดไขมันทั้งหมด องค์ประกอบของกรดไขมัน และการผลิต GLA

ในรูปที่ 4.15 แสดงปริมาณกรดไขมันทั้งหมดและความเข้มข้น GLA ของรา *M. rouxii* ATCC 24905 ที่ dilution rate 0.05 h^{-1} โดยพบว่าหลังการเลี้ยงในระบบบะ ก่อนต่อเข้ากับระบบต่อเนื่อง (0 ชม.) เซลล์แห้งมี ปริมาณกรดไขมันทั้งหมดและ GLA เท่ากับ 11.8% (w/w) และ 1.9% (w/w) และความเข้มข้นของกรดไขมัน ทั้งหมดและ GLA เท่ากับ 1111.1 mg/L และ 174.8 mg/L ตามลำดับ

ที่สภาวะ steady state ที่ dilution rate 0.05 h^{-1} พบว่าเซลล์แห้งมีปริมาณกรดไขมันทั้งหมดและ GLA มีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 26.1% (w/w) และ 3.4% (w/w) และความเข้มข้นของกรดไขมันทั้งหมดและ GLA เท่ากับ 4159.2 mg/L และ 536.5 mg/L ตามลำดับ

สรุปได้ว่า ปริมาณกรดไขมันทั้งหมดในเซลล์แห้งของรา *M. rouxii* ATCC 24905 มีค่าสูงที่ dilution rate ที่ 0.1 h^{-1} แต่ที่ dilution rate 0.05 h^{-1} มีการสะสมของกรดไขมันดีกว่าที่ dilution rate ที่ 0.1 h^{-1} และ 0.3 h^{-1} รวมทั้งมีปริมาณ GLA ที่มากกว่าด้วย

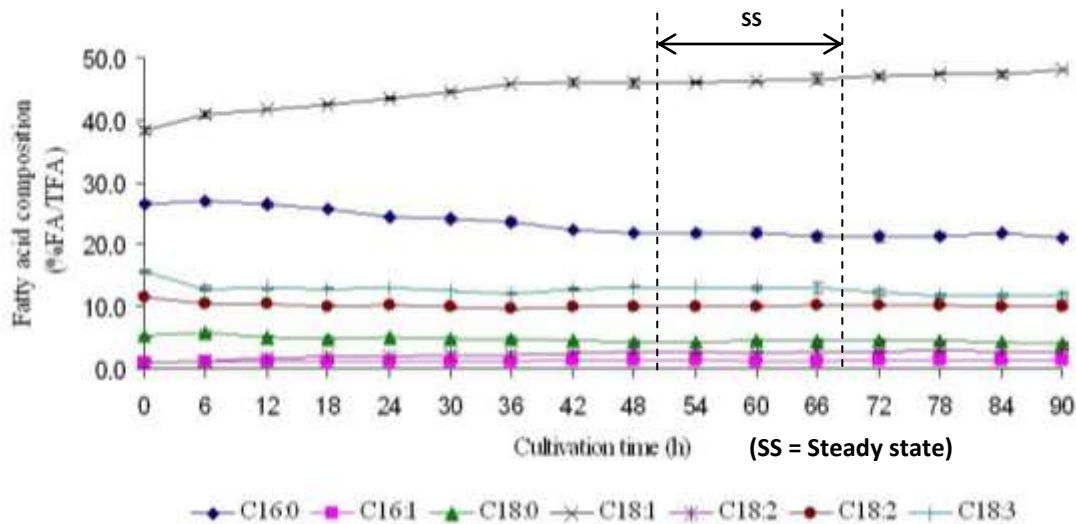


รูปที่ 4.15 แสดง TFA และ GLA ในน้ำหนักแห้ง, ความเข้มข้นของ TFA และ GLA ของ *M. rouxii* ATCC 24905 ในการหมักแบบต่อเนื่องที่มีอาหาร 1.5 L MFM ที่ dilution rate 0.05 h^{-1} , 30°C , 600 rpm

สัดส่วนของกรดไขมันชนิดต่าง ๆ ใน Total fatty acid ของรา *M. rouxii* ATCC 24905 ที่ dilution rate เท่ากับ 0.05 h^{-1} แสดงในรูปที่ 4.16 พบว่าสัดส่วนของกรดโอเลอิก (C18:1) ที่สภาวะ steady state มีค่าเป็น 46.4% (ก่อนต่อเข้ากับระบบต่อเนื่องมีค่าเป็น 38.4% ในระบบกะ) ในขณะที่กรดพาลเมติก (C16:0) และ GLA มีค่าเป็น 21.6% และ 13.0% (ก่อนต่อเข้ากับระบบต่อเนื่องมีค่าเป็น 26.6% และ 15.7% ในระบบกะ) ตามลำดับ

แสดงให้เห็นว่าในระบบการหมักแบบต่อเนื่องที่ dilution rate ต่ำ เมทาบอลิซึมของการใช้น้ำตาลในรา *M. rouxii* ATCC 24905 เกี่ยวข้องกับการสร้างกรดไขมันเพื่อการสะสมภายในเซลล์มากกว่าการสร้างชีวมวล มีรายงานว่าภายหลังสิ้นสุดกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ และกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องโดยใช้อัตราการผลิตเติบโตต่ำ ของรา *M. ramaniana* และ *M. rouxii* CBS 416.77 พบปริมาณกรดโอเลอิกสูงในขณะที่ยังพบ

องค์ประกอบ GLA ที่ต่ำ (Hansson *et.al.*, 1989) ในการทดลองนี้ปริมาณกรดพาลมิโทเลอิก (C16:1), กรดสเตียริก (C18:0), และกรดลิโนเลอิก (C18:2) ไม่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาเพาะเลี้ยง



รูปที่ 4.16 แสดงสัดส่วนกรดไขมันชนิดต่าง ๆ ในกรดไขมันทั้งหมดของ *M. rouxii* ATCC 24905 ในการหมักแบบต่อเนื่องในอาหาร 1.5 L MFM ที่ dilution rate 0.05 h^{-1} , 30°C , 600 rpm

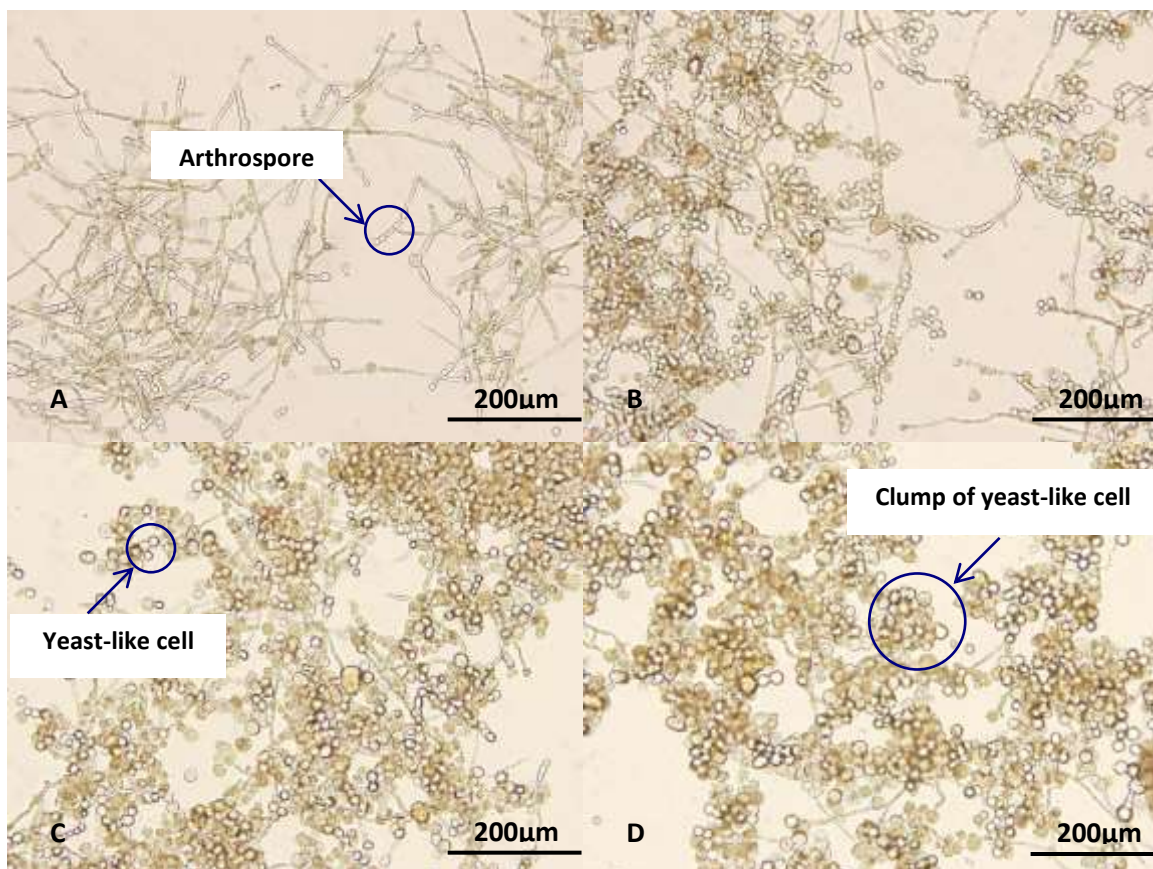
ตาราง 4.4 แสดงถึง productivity และ GLA ของรา *M. rouxii* ATCC 24905 ที่ dilution rate เท่ากับ 0.05 h^{-1} พบว่ามีค่า productivity และ GLA เท่ากับ 0.80 g/L/h และ $1.7 \times 10^{-3} \text{ g/g/h}$ ตามลำดับ ถึงแม้ว่าค่า productivity และ GLA ที่ได้จากการหมักแบบต่อเนื่องที่ dilution rate เท่ากับ 0.05 h^{-1} จะมีค่าน้อยกว่าที่ dilution rate เท่ากับ 0.3 h^{-1} และ 0.1 h^{-1} แต่ได้ปริมาณความเข้มข้นของ GLA ที่มากกว่า

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าต่าง ๆ ที่ได้จากการหมักแบบต่อเนื่องในสถานะ steady state ของ *M. rouxii* ATCC 24905 ในอาหาร MFM (modified fermentation medium) ที่ dilution rate 0.05 h^{-1}

Dry weight (g/L)	%GLA in DW (%w/w)	GLA concentration (mg/L)	Productivity on	
			Cell (g/L/h)	GLA (g/g/h)
15.9	3.4	536.5	0.80	1.7×10^{-3}

4.4.3 สัณฐานวิทยา (Morphology)

สัณฐานวิทยาของรา *M. rouxii* ATCC 24905 ในสภาวะการหมักแบบกะ ก่อนต่อเข้ากับระบบการหมักแบบต่อเนื่อง พบลักษณะ hypha ประกอบด้วย arthrospore ซึ่งเป็นเซลล์ระยะ late-logarithmic phase ในกระบวนการหมักแบบกะ (รูปที่ 4.17A) พบปริมาณ arthrospore เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาเพาะเลี้ยงและมีการพัฒนาลักษณะเป็น yeast-like form (รูปที่ 4.13 B-C) และที่สภาวะ steady state จะพบรา *M. rouxii* ATCC 24905 ในรูปของ yeast-like form เป็นส่วนใหญ่ มีการเจริญโดยการแตกหน่อและมีทิศทางการเจริญที่ไม่แน่นอน (รูป 4.13D) และหลังจาก 48 ชม.ของการหมักแบบต่อเนื่อง พบการเกาะกันของ yeast-like cells



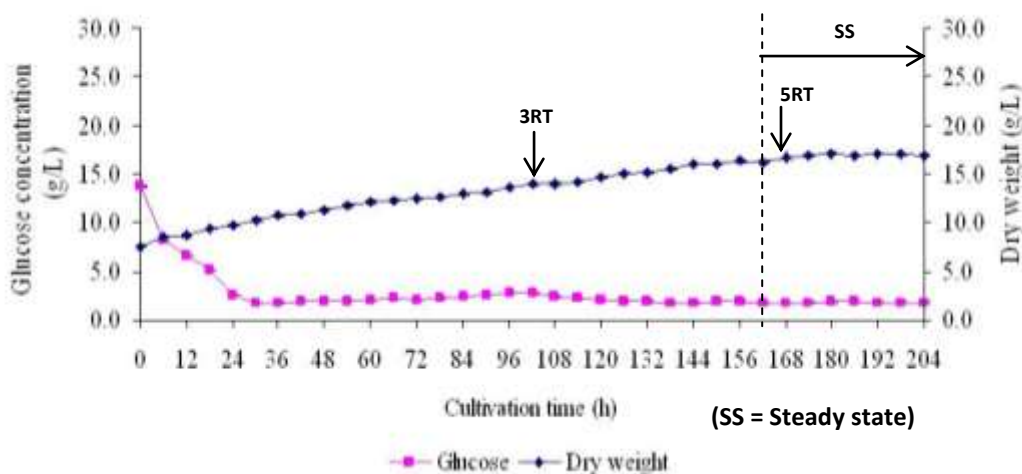
รูปที่ 4.17 สัณฐานวิทยาของ *M. rouxii* ATCC 24905 ในการหมักแบบต่อเนื่องในอาหาร 1.5 L MFM ที่ dilution rate of 0.05 h^{-1} ที่ระยะเวลาการหมักที่ 0 h (A), 24 h (B), 48 h (C) และ 72 h (D) (200x). ลูกศรแสดง arthrospore, yeast-like cell และการเกาะกลุ่มกันของ yeast-like cell (clump of yeast-like cell)

4.5 กระบวนการหมักแบบต่อเนื่องของรา *M. rouxii* ATCC 24905 ที่ dilution rate 0.03 h^{-1}

4.5.1 การเจริญเติบโตของเซลล์ (Cell Growth)

ทำการเลี้ยงรา *M. rouxii* ATCC 24905 ในถังหมักขนาด 1.5 ลิตร ใน MFM ในระบบการหมักแบบกะเป็นเวลา 18 ชม. ก่อนต่อเข้ากับระบบการหมักแบบต่อเนื่อง โดยการเติมอาหาร MFM สู้งถังหมักด้วย dilution rate 0.03 h^{-1} เก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์กลูโคส น้ำหนักแห้ง กรดไขมันทั้งหมด GLA ชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบ (3RT และ 5RT ของ dilution rate 0.05 h^{-1} เท่ากับ 100 และ 166.7 ชม. ตามลำดับ)

น้ำหนักแห้งของรา *M. rouxii* ATCC 24905 ในระบบการหมักแบบกะ ก่อนต่อเข้ากับระบบต่อเนื่อง มีค่าเท่ากับ 7.5 g/L และความเข้มข้นกลูโคสเท่ากับ 13.8 g/L ที่สภาวะ steady state ของกระบวนการหมักซึ่งเกิดขึ้นที่ 162 ชม.จนสิ้นสุดเวลาการเพาะเลี้ยง พบน้ำหนักเซลล์แห้ง และความเข้มข้นของกลูโคสมีค่าเท่ากับ 16.8 g/L และ 1.8 g/L ตามลำดับ (รูปที่ 4.18) ที่ dilution rate นี้ (0.03 h^{-1}) ไม่พบการสะสมของชีวมวลเกิดขึ้นระหว่างการหมัก ซึ่งทำให้พบสมดุลหรือ steady state เกิดขึ้นได้ตลอดระยะเวลาการหมัก (204 ชม.)



รูปที่ 4.18 แสดงปริมาณกลูโคส และน้ำหนักแห้งของ *M. rouxii* ATCC 24905 ในการหมักแบบต่อเนื่องในอาหาร 1.5 L MFM ที่ dilution rate 0.03 h^{-1} , 30°C , 600 rpm

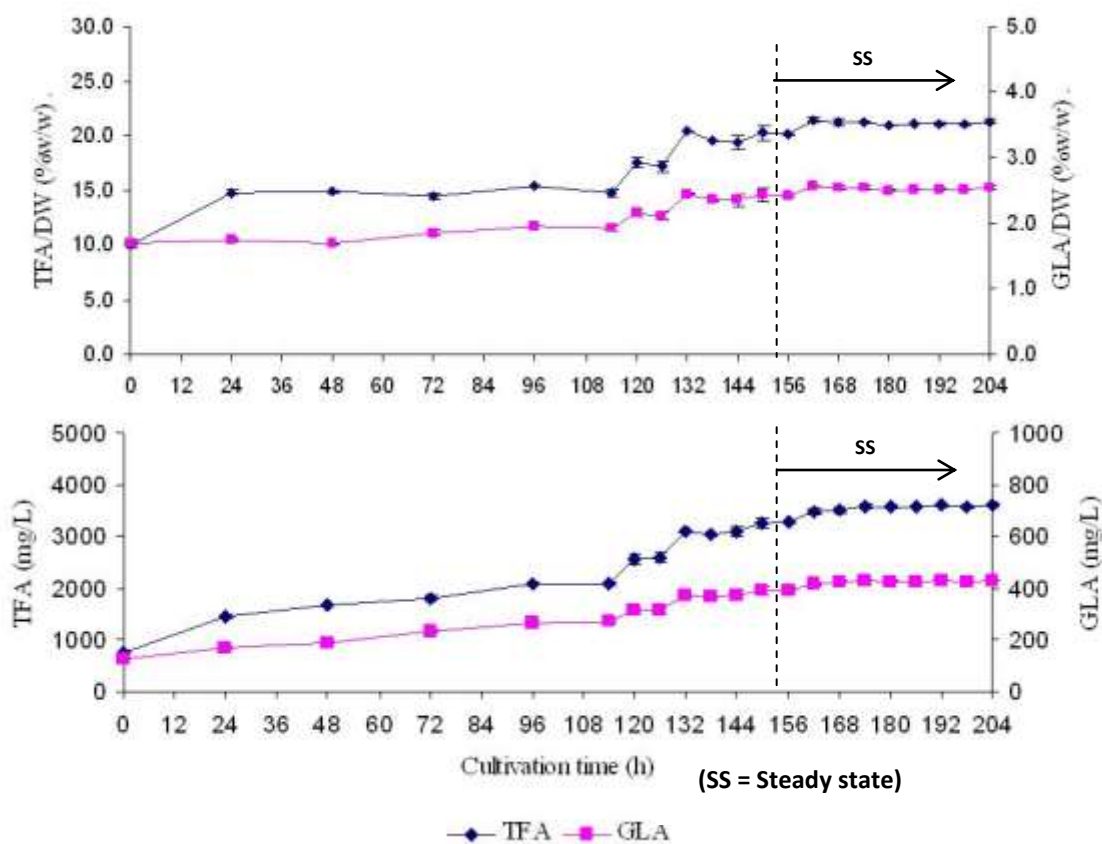
4.5.2 ปริมาณกรดไขมันทั้งหมด องค์ประกอบของกรดไขมัน และการผลิต GLA

ในรูปที่ 4.19 แสดงปริมาณกรดไขมันทั้งหมดและความเข้มข้นของ GLA ของรา *M. rouxii* ATCC 24905 ในระบบการหมักแบบต่อเนื่องที่ dilution rate เท่ากับ 0.03 h^{-1} โดยเซลล์ในระบบการหมักแบบกะ ก่อนต่อเข้ากับระบบการหมักแบบต่อเนื่อง (0 ชม.) ในเซลล์แห้งมีปริมาณกรดไขมันทั้งหมดและ GLA เท่ากับ

10.1% (w/w) และ 1.7% (w/w) และความเข้มข้นของกรดไขมันทั้งหมดและ GLA เท่ากับ 755.8 mg/L และ 127.0 mg/L ตามลำดับ

ที่สภาวะ steady state พบว่าเซลล์แห้งมีปริมาณกรดไขมันทั้งหมดและ GLA เป็น 21.2% (w/w) และ 2.5% (w/w) และความเข้มข้นของกรดไขมันทั้งหมดและ GLA เท่ากับ 3563.6 mg/L และ 425.4 mg/L ตามลำดับ

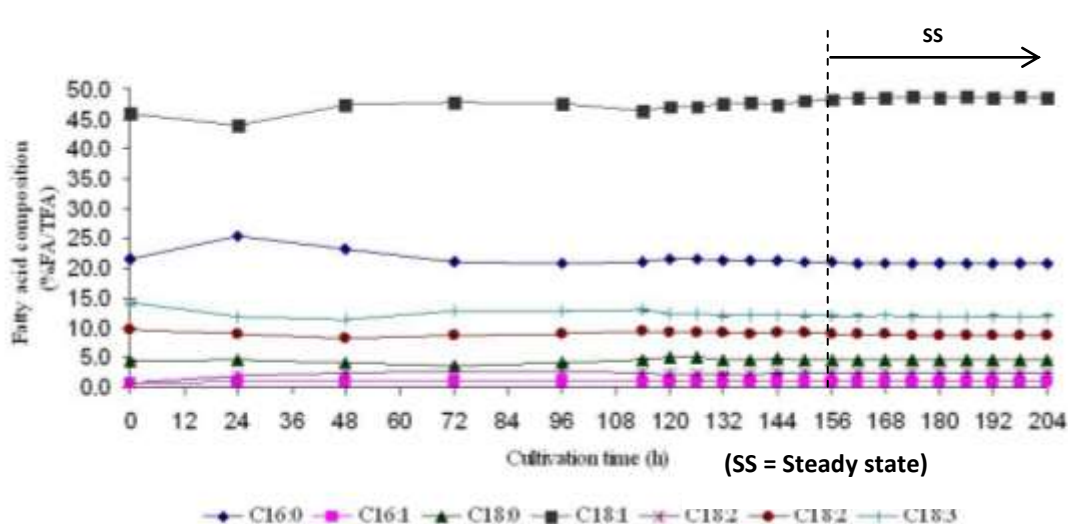
พบว่าปริมาณกรดไขมันทั้งหมดในเซลล์แห้งรา *M. rouxii* ATCC 24905 และการสะสมกรดไขมัน ที่ dilution rate 0.03 h^{-1} มีค่าน้อยกว่าที่ dilution rate 0.05 h^{-1} รวมทั้งปริมาณของ GLA ในเซลล์แห้ง ที่ dilution rate 0.03 h^{-1} (2.5 % w/w) น้อยกว่า ที่ dilution rate 0.05 h^{-1} (3.4 % w/w)



รูปที่ 4.19 แสดง TFA และ GLA ในน้ำหมักแห้ง , ความเข้มข้น TFA และ GLA ของ *M. rouxii* ATCC 24905 ในการหมักแบบต่อเนื่องที่มีอาหาร 1.5 L MFM ที่ dilution rate 0.03 h^{-1} , 30°C , 600 rpm

รูปที่ 4.20 แสดงองค์ประกอบกรดไขมันของรา *M. rouxii* ATCC 24905 ที่เลี้ยงด้วยกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องที่ dilution rate เท่ากับ 0.03 h^{-1} พบว่าสัดส่วนของกรดโอเลอิก (C18:1) ที่สภาวะ steady state มีค่า 48.6% ในขณะที่ GLA (C18:3) มีปริมาณเป็น 11.9 %

ผลการทดลองพบว่ากระบวนการหมักแบบต่อเนื่องที่ dilution rate 0.03 h^{-1} มีปริมาณกรดไขมันสะสมในปริมาณสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ dilution rate อื่น ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าเมทานอลิสมของรา *M. rouxii* ATCC 24905 ในสภาวะการเจริญเติบโตที่ช้า จะมีการใช้น้ำตาลที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกรดไขมันสะสมมากกว่า ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลวิจัยที่มีรายงานรูปแบบการสะสมไขมันในยีสต์และราที่เกิดที่อัตราการเจริญเติบโตช้า (Ratledge and Boulton, 1985) ในการทดลองนี้ปริมาณกรดพาลมิโทเลอิก (C16:1), กรดสเตียริก (C18:0), และกรดลิโนเลอิก (C18:2) ไม่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาเพาะเลี้ยง



รูปที่ 4.20 แสดงสัดส่วนกรดไขมันชนิดต่าง ๆ ในกรดไขมันทั้งหมดของ *M. rouxii* ATCC 24905 ในการหมักแบบต่อเนื่องในอาหาร 1.5 L MFM ที่ dilution rate 0.03 h^{-1} , 30°C , 600 rpm

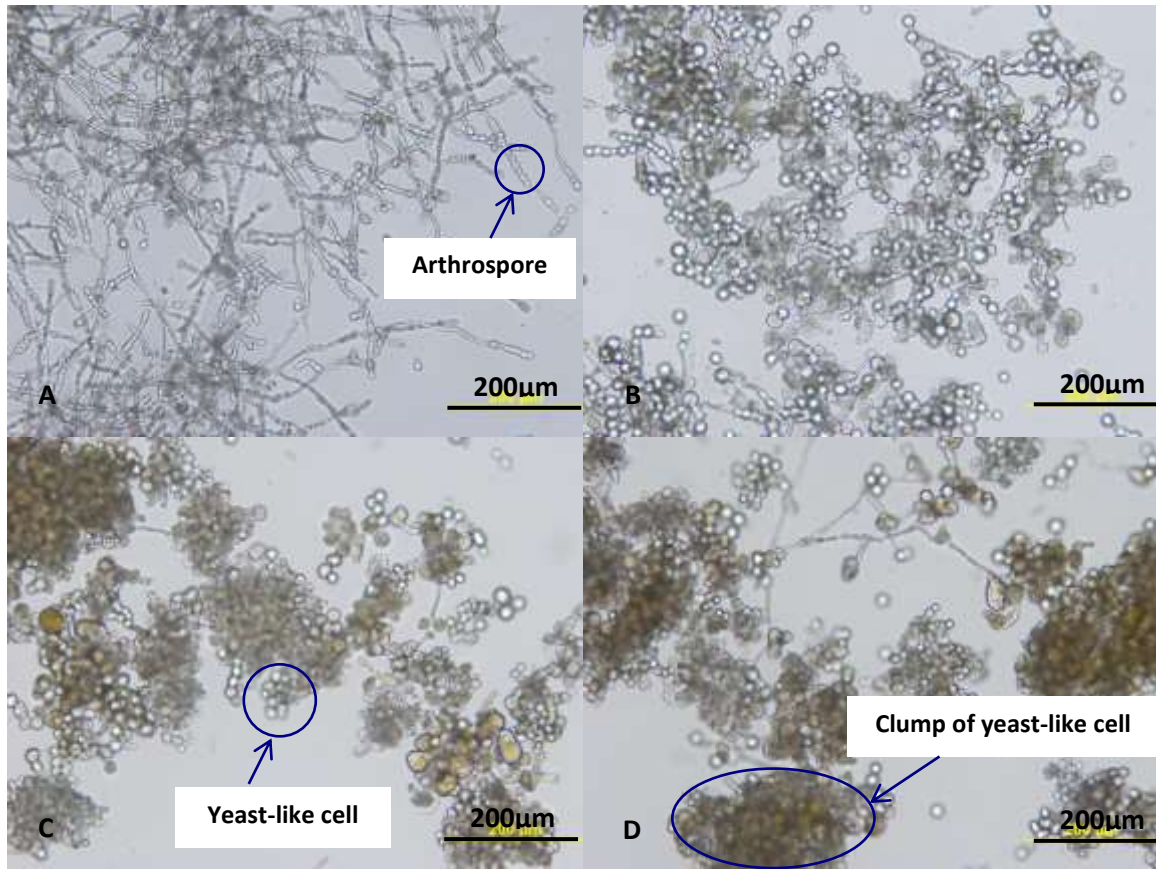
ตาราง 4.5 แสดงถึง productivity และ GLA ของรา *M. rouxii* ATCC 24905 ที่ dilution rate เท่ากับ 0.03 h^{-1} พบว่ามีค่า productivity และ GLA เท่ากับ 0.50 g/L/h และ $7.6 \times 10^{-3}\text{ g/g/h}$ ตามลำดับ ผลการทดลองไม่เพียงแต่พบว่าที่ dilution rate ที่ 0.03 h^{-1} จะให้ค่า productivity และ GLA ที่ต่ำแล้วยังได้ปริมาณและความเข้มข้นของ GLA ในปริมาณต่ำกว่าที่ dilution rate ที่ 0.05 h^{-1} อีกด้วย

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าต่าง ๆ ที่ได้จากการหมักแบบต่อเนื่องในสภาวะ steady state ของ *M. rouxii* ATCC 24905 ในอาหาร MFM (modified fermentation medium) ที่ dilution rate 0.03 h^{-1}

Dry weight (g/L)	%GLA in DW (%w/w)	GLA concentration (mg/L)	Productivity on	
			Cell (g/L/h)	GLA (g/g/h)
16.8	2.5	425.4	0.50	7.6×10^{-4}

4.5.3 ลักษณะสัณฐานวิทยา (Morphology)

ลักษณะสัณฐานวิทยาของรา *M. rouxii* ATCC 24905 ในการเลี้ยงแบบกะ ก่อนที่จะต่อเข้ากับระบบการหมักแบบต่อเนื่อง (0 ชม.) มีลักษณะเป็น hypha ที่ประกอบด้วย arthrospore (รูปที่ 4.21A) ซึ่งปริมาณของ arthrospore เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาเพาะเลี้ยงและมีการพัฒนาต่อไปเป็น yeast-like cells (รูปที่ 4.21 B-D) ที่สภาวะ steady state จะพบรา *M. rouxii* ATCC 24905 ในรูปของ yeast-like cells เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งมีลักษณะสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกับการเลี้ยงที่ dilution rate ที่ 0.01 และ 0.05 h^{-1}



รูปที่ 4.21 สัณฐานวิทยาของ *M. rouxii* ATCC 24905 ในการหมักแบบต่อเนื่องที่ dilution rate 0.03 h^{-1} ที่ระยะเวลาการหมักที่ 0 h (A), 96 h (B), 162 h (C) และ 204 h (D) (200x) ลูกศรแสดง arthrospore, yeast-like cell ลักษณะ การจับตัวเป็นก้อนของ yeast-like cell (clump of yeast-like cell)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ ศึกษาผลของการใช้ dilution rate ที่ค่าต่าง ๆ คือ 0.30, 0.10, 0.05 และ 0.03h^{-1} ในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องของรา *M. rouxii* ATCC 24905 ที่มีผลต่อการเจริญเติบโต สันฐานวิทยา การผลิต GLA และกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบ และวิเคราะห์ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ($\mu_{\max}$) ของรา *M. rouxii* ที่เลี้ยงด้วยระบบการหมักแบบกะ สรุปได้ดังนี้

1. ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดในกระบวนการหมักแบบกะด้วยอาหาร MFM ที่คำนวณจากน้ำนักเซลล์แห้งที่เจริญในช่วง logarithmic phase (4-10 ชม. ของการเพาะเลี้ยง) มีค่าเท่ากับ 0.43h^{-1} แสดงในรูปของ " $\mu_{\max}$ " ซึ่งเป็นค่าประมาณการ (estimate value)
2. การศึกษาการหมักแบบต่อเนื่องที่ dilution rate ที่ 0.30, 0.10, 0.05 และ 0.03h^{-1} พบว่าที่ dilution rate สูงคือ 0.30h^{-1} ได้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ต่ำคือ 4.9g/L ในขณะที่เดียวกันการใช้ dilution rate ที่ 0.10, 0.05 และ 0.03h^{-1} มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 8.6, 15.9 และ 16.8g/L ตามลำดับ การเปลี่ยนแปลงลักษณะสันฐานวิทยาของรา *M. rouxii* ATCC 24905 เกิดขึ้นเพื่อตอบสนองต่อสถานะสิ่งแวดล้อมที่กดดันหรือเป็นอันตรายต่อเซลล์ ดังนั้นที่ dilution rate สูง (0.30h^{-1}) จะเกิดการเกาะกันของเซลล์ ในขณะที่การใช้ dilution rate ที่ต่ำ (0.10, 0.05 และ 0.03h^{-1}) พบการเจริญลักษณะคล้ายยีสต์ (Yeast-like cells) ซึ่งมีผลดีต่อการหมักแบบต่อเนื่อง เนื่องจากช่วยลดปัญหาในเรื่องของความหนืด การแพร่ผ่านสารอาหารและออกซิเจนและทำให้การหมักเป็นเนื้อเดียวกัน
3. การใช้ dilution rate ต่ำ (0.05h^{-1}) ทำให้เกิดการสะสมของไขมันของรา *M. rouxii* ATCC 24905 ให้ปริมาณกรดไขมันทั้งหมดและ GLA ในน้ำนักแห้งสูงสุด (26.1% (w/w) และ 3.4% (w/w) ตามลำดับ) โดยมีค่าความเข้มข้นของกรดไขมันทั้งหมดและ GLA เท่ากับ 536.5 และ 26.8mg/L ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการใช้ dilution rate ต่ำที่ 0.05h^{-1} พบว่ามีปริมาณสัดส่วนของกรดโอเลอิกในปริมาณที่สูงเนื่องจากเกิดการสะสมของไขมัน ซึ่งกรดไขมันโอเลอิกเป็นกรดไขมันหลักที่มีการสะสมเมื่อรา *M. rouxii* ATCC มีอัตราการเจริญเติบโตช้า

บทที่ 6 เอกสารอ้างอิง

พรทิพย์ พึ่งม่วง, 2538, ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการผลิตกรดแกมมาลิโนเลนิคใน มิวคอร์ รอคซิไอน์, วิทยานิพนธ์ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า ธนบุรี

เสาวลักษณ์ วัฒนะชัย, 2540, ผลของอุณหภูมิและไอออน ของสังกะสีต่อการสร้างกรด แกมมา ลิโนเลนิคในมิวคอร์ รอคซิไอน์, วิทยานิพนธ์ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า ธนบุรี

นุชาสินี นวลขำ, 2549, การผลิตกรดแกมมาลิโนเลนิคจาก *Mucor rouxii* ATCC 24905 แบบกึ่งกะ, วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

Ahmad, M.N. and Holland , C.R.,1994, “Growth kinetics of single-cell protein in batch fermenters”, **Journal of Food Engineering**, Vol. 26, pp. 443-452.

Barrera, C., 1985, “Formation and ultrastructure of *Mucor rouxii* arthrospores. *Journal Bacteriology*, Vol. 155, pp. 886-895.

Bartnicki-Garcia, S., 1963, “Symposium on biochemical bases of morphogenesis in fungi III. Mold-yeast dimorphism of *Mucor*”. **Bacteriological Reviews**, Vol. 27, No. 3, pp. 293-304.

Bartnicki-Garcia, S., 1968, “Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi”. **Annual Review Microbiology**, Vol. 22, pp. 87-108.

Chaplin, M. F., 1986, “Monosaccharides”, In **Carbohydrate Analysis : A Practical Approach**, Chaplin M.F. and Kennedy, J.F. (Eds.), IRL Press, Oxford, England, pp. 1-13.

Clark, D.S., 1962, “Submerged citric acid fermentation of ferrocyanide-treated beet molasses: morphology of pellets of *Aspergillus niger*”. **Canadian Journal of Microbiology**, Vol. 8, pp. 133-136.

Conti, E., Stredansky, M., Stredanska, S. and Zanetti, F., 2001, “ γ - linolenic acid production by solid- state fermentation of Mucorales strains on cereals”, **Bioresource Techonology**, Vol. 76, No. 3, pp. 283 – 286.

Dunn, I.J., Heinzle, E., Ingham, J. and Prenosil, J.E., 2003, **Biological reaction engineering**, 2nd ed., Wiley-VCH , Weinheim, pp. 58 – 60.

Dyal, S.D., Bouzidi, L. and Narine, S.S., 2005, “Maximizing the production of γ -linolenic acid in *Mortierella ramanniana* var. *ramanniana* as a function of pH, temperature and carbon source, nitrogen source, metal ions and oil supplementation”, **Food Research International**, Vol. 38, pp.815 – 829.

Emelyanova, E.V. , 1996, “ γ - linolenic acid production by *Cunninghammella japonica* in solid-state fermentation”, **Process Biochemistry** , Vol. 31, No. 5, pp. 431 – 434.

Hansson, L. and Dostálek, M., 1988, “Effect of culture conditions on mycelial growth and production of γ - linolenic acid by the fungus *Mortierella ramanniana*”, **Applied Microbiology and Biotechnology**, Vol. 28, pp. 240-246.

Hansson, L., Dosstálek, M. and Storenby, B., 1989, “Production of γ -linolenic acid by the fungus *Mucor rouxii* in fed-batch and continuous cultures”. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Vol. 31, pp. 223-227.

Hiruta, O., Futamura, T., Takebe, H., Satoh, A., Kamisaka, Y., Yakochi, T., Nakahara, T. and Suzuki, O., 1996, “Optimization and scale up of γ -linolenic acid production by *Mortierella ramanniana* MM 15-1, a high γ -linolenic acid producing mutant”. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Vol. 82, pp. 366-370.

Immelman, M., Du Preez, J.C. and Killian, S.G., 1997, “Effect of C:N ratio on γ - linolenic acid production by *Mucor circinelloides* grown on acetic acid.”, **Applied Microbiology**, Vol. 20, pp. 158 – 164.

Jang,H.D., Lin, Y.Y. and Yang, S.S., 2005, “Effect of culture media and conditions on polyunsaturated fatty acids production by *Mortierella alpina*”, **Bioresource Technology**, Vol 96, pp. 1633-1644.

Khunyoshyeng, S., Cheevadhanarak, S., Rachdawong, S. and Tanticharoen, M., 2002, “Differential expression of desaturases and changes in fatty acid composition during sporangiospore germination and development in *Mucor rouxii*”. **Fungal Genetics and Biology**, Vol. 37, pp. 13-21.

Lapage, G. and Roy, C.C., 1984, “Improve recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification”, **Journal of Lipid Research**, Vol. 26, pp. 1391 – 1296.

Orlowski, M., 1991, “*Mucor* dimorphism”. **Microbiological reviews**, American Society of Microbiology, Vol. 55, No. 2, pp. 234-258.

Peters, J. and Sypherd , P.S., 1979, “Morphology- associated expression of NAD- dependent glutamate dehydrogenase in *Mucor racemosus*”, **Journal of Bacteriology**, Vol. 137, No. 3, pp. 1137 – 1139.

Ratledge, C. and Boulton C.A., 1985, **Fats and oils**, In: Blanch H.W., Drew S., Wang D.I.C. (Ed.), *Comprehensive Biotechnology*, Pergamon Press, New York, pp. 983-1003.

Ratledge, C. and Wynn, J.P., 2002, "The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganism". **Advances in Applied Microbiology**, Vol. 51, No. 1, pp. 1-51.

Ratledge, C., 2004, "Fatty acid biosynthesis in microorganisms being use for single cell oil production". **Biochemie**, Vol. 86, pp. 807-815.

Rogers, P.J., Clark-Walker, G.D. and Stewart, P.R., 1974, "Effect of oxygen and glucose on energy metabolism and dimorphism of *Mucor genevensis* grown in continuous culture: Reversibility of yeast-mycelium conversion". **Journal of Bacteriology**, Vol. 119, NO. 1, pp. 282-293.

Shaw, R., 1965, "The occurrence of γ -linolenic acid in fungi", **Biochemica Et Biophysica Acta**, , Vol. 98, pp. 230 – 237.

Shaw, R., 1966, "Polyunsaturated fatty acids of microorganisms". **Advance Lipid Research**, Vol. 4, pp. 107-174.

Silva, T.L., Pinheiro, H.M. and Roseiro, J.C., 2003, "Stress-induced morphological and physiology change in γ -linolenic acid production by *Mucor fragilis* in batch and continuous culture". **Enzyme and Microbial Technology**, Vol. 32, pp. 880-888.

Somashekar, D., Venkateshwaran, G., Sambaiah, K. and Lokesh, B.R., 2002, "Effect of culture conditions on lipid and γ -linolenic acid production by mucoraceous fungi". **Process Biochemistry**, Vol. 38, pp. 1719-1724.

Stredansky, M. Conti, E., Stredanska, S. and Zanetti, F., 2000, " γ -linolenic acid production with *Thamnidium elegans* by solid-state fermentation on apple pomace" **Bioresource Technology**, Vol. 73, pp.41-45.

Sypherd, P.S., Borgia, P.T. and Paznokas, J.L., 1978, "The biochemistry of dimorphism in the fungus *Mucor*". **Advances in Microbial Physiology**, Vol. 18, No. 1, pp.67-104.

Teresa Lopes da Silva, H.M. Pinheiro, Jose C. Roseiro, 2003, "Stress-induced morphological and physiological changes in γ -linolenic acid production by *Mucor fragilis* in batch and continuous cultures". **Enzyme and Microbial Technology**, Vol. 32 , pp. 880-888

Wynn, J.P., Hamid, A.A., Li, Y. and Ratledge, C., 2001, "Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpine*". **Journal of Microbiology**, Vol. 147, pp. 2857-2864.

Znidarsic, P. and Pavko, A., 2001, "The morphology of filamentous fungi in submerged cultivations as a bioprocess". **Food Technology and Biotechnology**, Vol. 39, No. 3, pp. 237-252.

Zorzopulos, J., Jobaggy, A.J. and Terenzi, H.F., 1973, "Effect of ethylenediaminetetraacetate and chloramphenicol on mitochondrial activity and morphogenesis in *Mucor rouxii*". **Journal of Bacteriology**, Vol. 115, No. 3, pp. 1198-1204.