



ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดอะราชิโดนิกจากแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากทะเล

A. maritima TISTR 1715

Factors Affecting of Arachidonic Acid Production from Marine Gliding Bacterium

A. maritima TISTR 1715

สุชนัด แซ่เล้า

Sutanate Saelao

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master of Science in Biotechnology

Prince of Songkla University

2553

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดอะราซิโคนิกจากแบคทีเรียไกลดิ้งที่แยกได้จากทะเล
Aureispira maritima TISTR 1715
ผู้เขียน นายสุชนนต์ แซ่เล้า
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อักรวิทย์ กาญจนโอภาส) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภศิลา มณีรัตน์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อักรวิทย์ กาญจนโอภาส)

.....กรรมการ
(ดร.ทรงศรี แก้วสุวรรณ)

.....กรรมการ
(ดร.ทรงศรี แก้วสุวรรณ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วรรณมา ชูฤทธิ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดอะราชิโดนิกจากแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากทะเล
Aureispira maritima TISTR 1715
ผู้เขียน นายสุรเนต แซ่เล้า
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2552

บทคัดย่อ

การคัดเลือกแบคทีเรียไกลดิงจากทะเลจำนวน 85 ไอโซเลต ที่ผลิตกรดอะราชิโดนิกและวิเคราะห์สารสกัดที่ได้ด้วยเทคนิค GC (โดยเลี้ยงในอาหารเหลว SAP2) พบว่ามีเพียง 3 ไอโซเลต ได้แก่ KB01-042, TISTR 1715 และ 1719 เท่านั้นที่สามารถสร้างกรดอะราชิโดนิก โดยแบคทีเรียไกลดิงสายพันธุ์ *Aureispira maritima* TISTR 1715 ผลิตกรดอะราชิโดนิกสูงสุดเท่ากับ 3.67 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียไกลดิงดังกล่าวในอาหารเหลว modified SAP2 เป็นเวลา 2 วัน แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตสูงสุด ให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.54 กรัมต่อลิตร และผลิตกรดอะราชิโดนิกสูงสุดที่เวลา 3 วัน โดยผลิตกรดอะราชิโดนิกเท่ากับ 5.99 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง เมื่อศึกษาการคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราชิโดนิกของแบคทีเรียไกลดิง *A. maritima* TISTR 1715 ด้วยวิธี Plackett-Burman design พบว่าทริปโตมันและอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียไกลดิงของอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่พีเอชเริ่มต้นและความเร็วรอบในการเขย่าเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดอะราชิโดนิกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และผลของแหล่งคาร์บอน 3 ชนิดที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ได้แก่ กลูโคส ฟรุคโตสและซูโครสที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 พบว่าแหล่งคาร์บอนทั้ง 3 ชนิด ให้ผลการเจริญเติบโตของแบคทีเรียไกลดิงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ซูโครสที่เพิ่มผลผลิตกรดอะราชิโดนิกได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

RSM

4.02 (2.05) 3.59 (21.50)
เทียบกับศึกษาเบื้องต้นโดยเลี้ยงนาน 3 *A. maritima* TISTR 1715

Thesis Title Factors Affecting of Arachidonic Acid Production from Marine Gliding Bacterium *Aureispira maritima* TISTR 1715
Author Mr. Sutanate Saelao
Major Program Biotechnology
Academic Year 2009

ABSTRACT

Eighty-five isolates of marine gliding bacteria were cultured in liquid SAP2 medium and screened for arachidonic acid (ARA) production using Gas Chromatography technique (CG). Only 3 isolates (i.e. KB01-042, TISTR 1715 and 1719) were found to produce ARA. Among these, *Aureispira maritima* TISTR 1715 showed the highest ARA content of 3.67 mg/g (dry cell weight, DCW). Its growth and ARA production in modified liquid SAP2 medium reached the maximum of 0.54 g/l and 5.99 mg/g DCW at 2 and 3 day-cultivation, respectively. Statistically based experiment design, Plackett-Burman protocol, was applied for the optimization of biomass and arachidonic acid (ARA) production in *Aureispira maritima* TISTR 1715. Tryptone and culture temperature showed significant effects on biomass production, whereas pH and agitation rate significantly affected ARA production. Among the 3 selected carbon sources (glucose, fructose and sucrose) tested at 1.0% w/v concentration, no significant difference was found on growth. Sucrose, however, significantly increased ARA yield compared to the basic SAP2 medium. Those four critical factors were subsequently optimized using the Response Surface Methodology (RSM) technique. The validity of the optimum conditions was verified by separated experiments in which the biomass and ARA yield were increased 4.02-fold (2.05 g/l), and 3.59-fold (21.50 mg/g DCW), respectively, when compared to data obtained from non-optimized culture conditions after 3 day-cultivation. The results suggested that *A. maritima* TISTR 1715 might be a potential bacterial strain for the further large scale investigation regarding the commercial production of ARA. To our knowledge, this is the first report of the statistical optimization of biomass and ARA production by marine gliding bacterium.

กิตติกรรมประกาศ

การเขียนวิทยานิพนธ์นี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กรรมการผู้แทนจากบัณฑิตวิทยาลัย ที่สละเวลาอันมีค่ายิ่งในการให้ข้อคิดเห็น เสนอแนะ และ

(Bangkok MIRCEN)

(.)

ที่ให้ความอนุเคราะห์การใช้เครื่องมือ

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้กำลังใจรวมทั้งสนับสนุนการศึกษาของ

กำลังใจที่มีให้เสมอ รวมทั้งเจ้าหน้าที่คณะอุตสาหกรรมเกษตรและทุกท่านที่มีได้กล่าวนาม ณ ที่นี้ ที่

สารบัญ

	หน้า
.....	(6)
LIST OF TABLES.....	(8)
LIST OF FIGURES.....	(10)
1.	1
.....	1
.....	2
.....	42
2.	43
.....	43
.....	45
3.	56
คัดเลือกแบคทีเรีย ไกลดิงที่แยกได้จากทะเลที่ผลิตกรดอะราชีโดนิก.....	57
.....	66
.....	69
.....	91
.....	95
.....	107
	(6)

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
	<i>A. maritima</i> TISTR 1715
 108
4. 111
 113
 133
 141

LIST OF TABLES

Table		Page
1.	List of polyunsaturated fatty acids (PUFAs).....	6
2.	Pro-inflammatory effects of PGE ₂ and 4-series LTs.....	14
3.	List of arachidonic acid producing microorganism	20
4.	Effect of carbon sources on arachidonic acid production from <i>Mortierella alpina</i>	22
5.	Effect of nitrogen sources and C:N ratio on arachidonic acid production from <i>Mortierella alpina</i>	24
6.	Initial block for Plackett-Burman designs.....	31
7.	Plackett-Burman design for 12 runs and up to 11 two-level factors.....	32
8.	The Central Composite Design of independent variables.....	35
9.	A matrix X for a Central Composite Design experiment involving three factors...	38
10.	Variables showing factors used in Plackett-Burman design.....	49
11.	Plackett-Burman design generated by fractional rotation of full factorial design where A, ₁ ... ₀ are independent variables and P ₁ ,... ₄ are dummy variables.....	50
12.	The coded levels and real values of the independent variables in the Central Composite Design.....	53
13.	The Central Composite Design of the significant variables (in coded level) with DCW and ARA yield.....	53
14.	Regression equation for dry cell weight of marine gliding bacterium <i>A. maritima</i> TISTR 1715.....	55
15.	Regression equation for ARA yield of marine gliding bacterium <i>A. maritima</i> TISTR 1715.....	55
16.	Optimal values of tryptone, pH, agitation speed and temperature for DCW and ARA yield with prediction.....	56
17.	Biomass and ARA production from the marine gliding bacteria.....	63

LIST OF TABLES (Cont.)

Table		Page
18	The Plackett–Burman design matrix for evaluating variables influencing DCW and ARA yield by cell cultures of <i>A. maritima</i> TISTR 1715.....	89
19	Statistical analysis of Plackett-Burman design showing the calculated regression coefficient, <i>t</i> -, <i>p</i> -values and confidence level of each variable for DCW and ARA yield by cell cultures of <i>A. maritima</i> TISTR 1715.....	90
20	The Central Composition Design of the significant variables (in coded levels), along with the response (DCW and ARA yield) by cell cultures of <i>A. maritima</i> TISTR 1715.....	96
21	Analysis of variance (ANOVA) for response surface linear, quadratic and cubic model of DCW and ARA yield by cell cultures of <i>A. maritima</i> TISTR 1715.....	97
22	Analysis of variance (ANOVA) for response surface quadratic model of DCW by cell cultures of <i>A. maritima</i> TISTR 1715.....	101
23	Analysis of variance (ANOVA) for response surface quadratic model for ARA yield by cell cultures of <i>A. maritima</i> TISTR 1715.....	102
24	Optimal values of tryptone, pH, agitation speed and temperature for maximum DCW and ARA yield with corresponding predicted and actual data.....	108

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1.	Structures and double bond positions of polyunsaturated fatty acids	7
2.	Pathways of polyunsaturated fatty acid synthesis.....	8
3.	Cellular fatty acid synthetic pathway.....	10
4.	Pathways for the formation of PUFAs in microorganisms using the 'conventional' fatty acid synthesis (FAS) route	11
5	Proposed biosynthetic pathway of EPA in <i>Shewanella</i> sp.....	13
6	Outline of the pathway of eicosanoid synthesis from arachidonic acid.....	15
7	GC chromatogram of standard arachidonic acid methyl ester.....	59
8	GC chromatograms of fatty acid methyl esters from marine gliding bacteria KB01-42 (A), TISTR 1715 (B) and TISTR 1719 (C).....	60
9	GC chromatograms of fatty acid methyl esters from marine gliding bacteria KB01-42 (A), TISTR 1715 (B) and TISTR 1719 (C) spiked with standard arachidonic acid methyl ester.....	61
10	Comparison of mass spectra of peak with RT of 13.41 min in the marine gliding bacterium TISTR 1715 (A) and authentic arachidonic acid standard (B).....	62
11	Growth curve (A) and ARA production (B) of marine gliding bacterium <i>A. maritima</i> TISTR 1715 grown in the modified SAP2 liquid medium.....	68
12	Effect of carbon sources at 1.0% (w/v) concentration on cell growth (A) and ARA yield (B) of marine gliding bacterium <i>A. maritima</i> TISTR 1715.	94
13	Three dimension surface and contour diagram plots of DCW (g/l) as the function of pH and tryptone (A), as the function of agitation speed and tryptone (B), and as the function of temperature and tryptone (C)	103
13	Three dimension surface and contour diagram plots of DCW (g/l) as the function of agitation speed and pH (D), as the function of temperature and pH (E), and as the function of temperature and agitation speed (F) (Cont.).....	104

LIST OF FIGURES (Cont.)

Figure		Page
14	Three dimension surface and contour diagram plots of ARA yield (mg/g DCW) as the function of pH and tryptone (A), as the function of tryptone and agitation speed (B), and as the function of temperature and tryptone (C).....	105
14	Three dimension surface and contour diagram plots of ARA yield (mg/g DCW) as the function of agitation speed and pH (D), as the function of temperature and pH (E), and as the function of temperature and agitation speed (F) (Cont.).....	106
15	Growth curve (A) and ARA yield (B) of marine gliding bacterium <i>A. maritima</i> TISTR 1715 grown under the optimal culture conditions.....	110
16	Standard curve of arachidonic acid methyl ester.....	136

บทที่ 1

บทนำ

บทนำสั้นเรื่อง

กรดอะราชิโดนิก (arachidonic acid; ARA) เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวที่ประกอบด้วยคาร์บอนจำนวน 20 อะตอมมีจำนวนพันธะคู่ 4 พันธะ ตรงตำแหน่งที่ 5, 8, 11 และ 14 จัดอยู่ในกลุ่มของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวชนิดโอเมก้า 6 (Ω-6) กรดอะราชิโดนิกเป็นกรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกาย ที่มนุษย์ไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้โดยตรงและหากได้รับไม่เพียงพอจะทำให้ร่างกายขาดความสมดุลและความแข็งแรงได้ เนื่องจากเป็นส่วนประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ เซลล์ประสาท เซลล์สมอง เรตินา และยังเป็นสารตั้งต้นของอีโคซานอยด์ (eicosanoid) ต่างๆ ในร่างกาย (Gill and Valivety, 1997; Funk, 2001) นอกจากนี้ยังมีรายงานความสำคัญของกรดอะราชิโดนิกต่อหญิงมีครรภ์ เนื่องจากมีความจำเป็นต่อการพัฒนาทางสมองและสายตาของทารก

ปัจจุบันความต้องการกรดอะราชิโดนิกในอุตสาหกรรมอาหารและยา มีเพิ่มมากขึ้น (Ward and Singh, 2005) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมนมผงสำหรับทารก (ปัจจุบันนมผงสำหรับเด็กในตลาดโลกมีมูลค่าสูงถึง 10,000 ล้านดอลลาร์สหรัฐต่อปี โดยนมผงสำหรับเด็กจำเป็นต้องผสมกรดอะราชิโดนิกเป็นส่วนประกอบตามข้อกำหนดการอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ และองค์การอนามัยโลกกำหนด (FAO/WHO, 1995)) นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้กรดอะราชิโดนิกในอาหารสำหรับสัตว์น้ำ เพื่อเพิ่มการรอดชีวิตของสัตว์น้ำในสภาวะที่มีการแพร่ระบาดของเชื้อโรค *Tertrahymena* sp. และช่วยลดความเครียดของสัตว์น้ำจากสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงอย่างเฉียบพลัน (Van-Anholt *et al.*, 2004; Khozin-Goldberg *et al.*, 2006)

แหล่งที่สำคัญของกรดอะราชิโดนิกส่วนมากได้มาจาก ปลาทะเล ดับหมุ และไข่แดง แต่การบริโภคดับหมุและไข่แดงนั้น นอกจากจะได้รับการกรดอะราชิโดนิกแล้วยังได้รับคอเลสเตอรอลที่ร่างกายไม่ต้องการในปริมาณมากด้วย ส่วนการผลิตจากปลาทะเลซึ่งมีจำหน่ายแพร่หลายอยู่ในรูปน้ำมันปลา (fish oil) แต่การผลิตดังกล่าวขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของปลาในแต่ละฤดูกาล รวมทั้งแหล่งที่จับปลา ทำให้ขาดความสม่ำเสมอ ยากต่อการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบ (Certlk and shimiza, 1999) ตลอดจนอาจมีการปนเปื้อนของสารพิษ สารเคมี หรือโลหะหนักต่างๆ ได้ เช่น asdioxin โปรทและตะกั่ว (Ratlidge, 2004) นอกจากนี้อาจจะมีการใช้สารเคมีที่ไม่พึงประสงค์ อันส่งผลต่อการยอมรับของผู้บริโภคบางกลุ่มได้ ดังนั้นการศึกษา ค้นคว้าและวิจัยหาแหล่งผลิตกรดอะราชิโดนิกชนิดใหม่ จึงเป็นทางเลือกหนึ่งเพื่อเพิ่มคุณภาพและปริมาณการผลิตกรดไขมันที่ความต้องการ

อย่างต่อเนื่อง จุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีคุณสมบัติในการเจริญเติบโตที่เร็วกว่าพืชและสัตว์ รวมทั้งมีความสามารถในการสะสมไขมันหรือน้ำมันภายในเซลล์ จุลินทรีย์ที่มีรายงานการผลิตกรดอะราซิโคนิก ได้แก่ สาหร่ายเซลล์เดี่ยว *Porphyridium cruentum* และ *Parietochoris incisa* (Bigogno *et al.*, 2002; Durmaz *et al.*, 2007) รา *Mortierella alpina* (Zhu *et al.*, 2003) และแบคทีเรียจากทะเลบางสายพันธุ์ เช่น *Plesiocystis pacifica* SIR-1, *Aureispira marina* gen. nov., sp. nov., *Aureispira maritima* sp. nov., *Krokinobacter eikastus* PMA-26, *Krokinobacter diaphorus* MSKK-32 (Iizuka *et al.*, 2003; Hosoya *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2006; Hosoya *et al.*, 2007) เป็นต้น

ผลการศึกษาเกี่ยวกับการแยกและจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียไกลดิงจากชายฝั่งทะเลทางภาคใต้ของประเทศไทยพบว่า มีแบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถสร้างกรดอะราซิโคนิกได้ในปริมาณที่แตกต่างกันอยู่ในช่วงร้อยละ 33.4-46.3 ของกรดไขมันทั้งหมด (Hosoya *et al.*, 2006; 2007) ซึ่งเป็นลักษณะที่ไม่พบในแบคทีเรียทั่วไป ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียไกลดิงจากทะเลที่สามารถผลิตกรดอะราซิโคนิก และศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดอะราซิโคนิกและการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่สร้างกรดไขมันดังกล่าว รวมทั้งศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มการเจริญเติบโตและผลิตกรดอะราซิโคนิกของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ เพื่อนำไปสู่การพัฒนาเป็นแหล่งผลิตชนิดใหม่ที่มีคุณภาพทดแทนแหล่งผลิตปัจจุบันในอุตสาหกรรมอาหารเสริม ยา และอาหารสำหรับสัตว์น้ำที่มีมูลค่าสูงทางเศรษฐกิจ

การตรวจเอกสาร

1. แบคทีเรียไกลดิง (Gliding bacteria)

แบคทีเรียไกลดิง คือ กลุ่มของแบคทีเรียแกรมลบที่มีลักษณะเฉพาะตัวคือการเคลื่อนที่ได้โดยการเลื่อนตัว (gliding) บนพื้นผิวที่แข็ง โดยไม่ได้อาศัยแฟลกเจลลา (flagella) และมีรูปร่างลักษณะที่แตกต่างกันไป เช่น ลักษณะที่เป็นแท่ง (rod) เส้นยาว (filament) หรือเป็นเกลียว (spiral) สามารถพบได้ทั้งในดิน ในน้ำจืดและน้ำเค็ม (Reichenbach and Dworkin, 1992; Iizuka *et al.*, 1998; Reichenbach, 1999) และแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

1.1 กลุ่มที่มีการสร้าง fruiting body

แบคทีเรียไกลดิงกลุ่มที่สร้าง fruiting body ได้แก่ Myxobacteria ซึ่งจัดอยู่ใน Order Myxobacterales มีลักษณะโคโลนีเป็น swarm colony คล้ายแผ่นฟิล์มบางกระจายอยู่บนแผ่นวุ้น เมื่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกลุ่มนี้ เซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง โดยที่เซลล์จับรวมตัวกันและยกตัวสูงขึ้นเป็น fruiting body ซึ่งมีขนาดระหว่าง 50-500 μm

สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ภายใน fruiting body จะเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ให้มีขนาดสั้นลงจนมีลักษณะเป็นรูปกลม ที่เรียกว่า myxospore (Reichenbach and Dworkin, 1992; Dworkin, 1996; Gaspari *et al.*, 2005; Iizuka *et al.*, 1998)

แบคทีเรียไกลดิงในกลุ่มของ Myxobacteria สามารถพบได้จากดินเป็นส่วนใหญ่ ทั้งนี้เนื่องจาก Myxobacteria มีการสร้าง fruiting body ที่เป็นลักษณะเฉพาะตัวที่ง่ายต่อการสังเกตและแยกแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ และการเก็บตัวอย่างดินหรือตัวอย่างที่อยู่บนบกสามารถทำได้ง่ายและสะดวกกว่าการเก็บตัวอย่างในทะเล (Iizuka *et al.*, 1998; Nedashkovskaya *et al.*, 2003) นอกจากนี้ยังพบว่า Myxobacteria สามารถเจริญเติบโตได้ในที่ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง เช่น ตะกอนดินบริเวณชายฝั่งทะเลและในน้ำทะเล แต่การศึกษาเพื่อแยก Myxobacteria จากตะกอนดินในทะเลยังไม่แพร่หลาย (Iizuka *et al.*, 1998) อย่างไรก็ตามมีรายงานการพบค้นพบแบคทีเรียไกลดิงสายพันธุ์ใหม่ที่แยกได้จากทะเล โดยผลศึกษาลำดับของนิวคลีโอไทด์ของ 16s rDNA ในรายงานดังกล่าวพบว่าแบคทีเรียไกลดิงเหล่านี้อยู่ในกลุ่มของ Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides และจัดอยู่ในจีนัสใหม่ชื่อ *Tenacibaculum* ได้แก่ *Tenacibaculum maritimum*, *T. ovolyticum*, *T. mesophilum* gen. nov., sp. nov. และ *T. amylolyticum* gen. nov., sp. nov. (Suzuki *et al.*, 2001)

1.2 กลุ่มที่ไม่สร้าง fruiting body

แบคทีเรียไกลดิงกลุ่มที่ไม่สร้าง fruiting body ได้แก่ แบคทีเรียใน Sub-Order และ Order ต่างๆ ดังนี้ คือ Sub-Order Chlorobiinae, Order Beggiatoales, Order Leucotrichales และ Order Cytophagale เป็นต้น ลักษณะโคโลนิของแบคทีเรียในกลุ่มนี้อาจมีลักษณะคล้ายกับรากของต้นไม้ โคโลนิของ Cytophagale มีสีต่างๆ เช่น สีเหลือง สีส้มและสีแดงอิฐ เนื่องจากพบรงควัตถุในกลุ่มของแคโรทีนอยด์ แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถพบได้ในดินที่มีพีเอชเป็นกลาง ซากเน่าเปื่อย มูลสัตว์ ดิน พืช หรือแม้แต่ในทะเล เช่น ซากสาหร่าย ตะกอนดิน ซากสัตว์ทะเล เป็นต้น (Weeks, 1969; Stewart and Brown, 1971; Reichenbach, 1992; Johansen *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2007) ได้แก่ *Aureispira marina*, *A. maritima*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Flexibacter filiformis*, *Lysobacter antibioticus* gen. nov., sp. nov., *L. brunescens* sp. nov., และ *L. enzymogenes* sp. nov., (Christensen and Cook, 1978; Lunsdorf and Schairer, 2001; Hosoya *et al.*, 2006, 2007)

2. กรดไขมัน (Fatty acid)

กรดไขมันเป็นสารที่จัดอยู่ในกลุ่มไขมัน (lipid) ที่ประกอบด้วยไฮโดรคาร์บอนสายยาวและหมู่คาร์บอกซิลิก (carboxylic group, -COOH) โดยมักมีจำนวนคาร์บอนเป็นเลขคู่ตั้งแต่ 14 ถึง 24 อะตอม ส่วนมากในธรรมชาติพบกรดไขมันที่มีความยาวของคาร์บอน 16 และ 18 อะตอม โดยมากไฮโดรคาร์บอนสายตรงไม่มีการแตกกิ่งก้านสาขาออกไป หมู่อัลคิล (alkyl) อาจเป็นชนิด

อิ่มตัว (saturated) หรือไม่อิ่มตัว (unsaturated) หากไม่อิ่มตัวที่ตำแหน่งพันธะคู่จะมีการจัดเรียงตำแหน่งของอะตอมโมเลกุล (configuration) แบบซิส (*cis*) คุณสมบัติของกรดไขมันขึ้นอยู่กับความยาวของสายไฮโดรคาร์บอนหรือจำนวนคาร์บอนอะตอม และความไม่อิ่มตัวภายในโมเลกุล หากสายไฮโดรคาร์บอนสั้นและมีความไม่อิ่มตัวสูง กรดไขมันหรืออนุพันธ์กรดไขมันจะมีสถานะเป็นของเหลวมากยิ่งขึ้นและมีจุดหลอมเหลวต่ำ

การนับตำแหน่งคาร์บอนเพื่อบอกตำแหน่งพันธะคู่ในสายไฮโดรคาร์บอนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสามารถทำได้ 2 วิธี คือ

1. นับจากปลายคาร์บอกซิล (carboxyl end, -COOH) และนับทุกตำแหน่งของคาร์บอนตัวแรกที่มีพันธะคู่ ใช้สัญลักษณ์การนับเป็น Δ หรือ delta
2. นับจากปลายเมทิล (methyl end, -CH₃) ใช้สัญลักษณ์เป็น ω (โอเมก้า) หรือ n และนิยมนับตำแหน่งคาร์บอนของพันธะคู่ๆ แรกเพียงตำแหน่งเดียวเท่านั้น ดังแสดงใน Figure 1

การจำแนกประเภทของกรดไขมันแบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ

2.1 กรดไขมันชนิดอิ่มตัว (Saturated fatty acid)

กรดไขมันชนิดอิ่มตัว เป็นกรดไขมันที่มีเพียงพันธะเดี่ยวมีความยาวของสายคาร์บอนสั้น เนื่องจากไม่มีพันธะคู่ (double bond) จึงทำให้มีจุดหลอมเหลวสูง (มากกว่า 60 องศาเซลเซียส) ส่วนใหญ่จะพบในไขมันสัตว์และน้ำมันพืชบางชนิด เช่น น้ำมันมะพร้าวและน้ำมันปาล์มซึ่งมีสภาพเป็นไขหรือแข็งตัวเมื่ออุณหภูมิต่ำ

2.2 กรดไขมันไม่อิ่มตัว (Unsaturated fatty acid)

2.2.1 กรดไขมันไม่อิ่มตัวพันธะเดี่ยว (Monounsaturated fatty acids: MUFAs)

เป็นกรดไขมันที่ประกอบด้วยพันธะคู่ 1 พันธะ ตัวอย่างเช่น กรดปาล์มิโทเลอิก (palmitoleic acid, 16:1) และกรดโอเลอิก (oleic acid, 18:1) เป็นต้น

2.2.2 กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงหรือกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated fatty acids: PUFAs)

เป็นกรดไขมันที่มีความยาวของสายคาร์บอนตั้งแต่ 18 คาร์บอนขึ้นไป และมีพันธะคู่อยู่ในโมเลกุลไม่ต่ำกว่า 2 พันธะคู่ ดังแสดงใน Table 1 สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่ กรดไขมันไม่อิ่มตัวโอเมก้า-3 (ω -3) และโอเมก้า-6 (ω -6) โดยนับจากตำแหน่งของพันธะคู่ที่ใกล้ปลายด้านหมู่เมทิล (methyl end) (Gill and Valivety, 1997) ดังนี้

2.2.2.1 กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงกลุ่มโอเมก้า-3 (ω -3 PUFAs)

กรดไขมันไม่อิ่มตัวในกลุ่มโอเมก้า-3 เป็นกรดไขมันที่มีพันธะคู่แรกในสายคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 เมื่อนับจากปลายเมทิล ได้แก่ กรดแอลฟา-ไลโนเลนิก (α -linolenic acid; ALA, 18:3 ω -3) กรดอีโคซาไตรอีโนอิก (eicosatrienoic acid; ETA, 20:3 ω -3) กรดอีโคซาเตตราอีโนอิก (eicosatetraenoic acid; ETA, 20:4 ω -3) กรดอีโคซาเพนตะอีโนอิก (eicosapentaenoic acid; EPA, 20:5 ω -3) กรดโดโคซาเพนตะอีโนอิก (docosapentaenoic acid; DPA, 22:5 ω -3) และกรดโดโคซาเฮกซะอีโนอิก (docosahexaenoic acid; DHA, 22:6 ω -3)

2.2.2.2 กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงกลุ่มโอเมก้า-6 (ω -6 PUFAs)

กรดไขมันไม่อิ่มตัวในกลุ่มโอเมก้า-6 เป็นกรดไขมันที่มีพันธะคู่แรกในสายคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 เมื่อนับจากปลายเมทิล ได้แก่ กรดไลโนเลอิก (linoleic acid; LA, 18:2 ω -6) กรดแกมมา-ไลโนเลนิก (γ -linolenic acid; GLA, 18:3 ω -6) กรดไดโฮโมแกมมาไลโนเลนิก (dihomo- γ -linolenic acid; DHGLA, 20:3 ω -6) กรดอะราชิโดนิก (arachidonic acid; ARA, 20:4 ω -6) กรดอะดรีนิก (adrenic acid; AA, 22:4 ω -6) และกรดโดโคซาเพนตะอีโนอิก (docosapentaenoic acid; DPA, 22:5 ω -6)

สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงแตกต่างกัน (Figure 2) ในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ เช่น *Caenorhabditis elegans* มีชนิดกรดไขมันหลายชนิด รวมทั้งกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงจำพวก กรดอะราชิโดนิกและกรดอีโคซาเพนตะอีโนอิก (Satouchi *et al.*, 1993) ในขณะที่พืชชั้นสูงสามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงที่มีความยาวของคาร์บอนได้ไม่เกิน 18 อะตอมเท่านั้น ได้แก่ กรดไลโนเลอิกและแอลฟาไลโนเลนิก (Somerville *et al.*, 1996) ซึ่งกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงเหล่านี้ทำหน้าที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (MaConn and Browse, 1996; 1998) อย่างไรก็ตามมนุษย์และสัตว์ชั้นสูงไม่สามารถผลิตกรดไลโนเลอิกและกรดแอลฟา-ไลโนเลนิกได้ เนื่องจากขาดเอนไซม์ที่สำคัญคือ Δ^{12} - และ Δ^{15} -desaturase (Figure 2) ดังนั้นกรดไขมันทั้ง 2 ชนิด จึงจัดเป็นกรดไขมันจำเป็น (essential fatty acid) สำหรับร่างกายมนุษย์ ซึ่งจำเป็นต้องได้รับการบริโภคอาหารเท่านั้น แต่มนุษย์สามารถเปลี่ยนกรดไลโนเลอิก (LA) ไปเป็นกรดอะราชิโดนิก (ARA) และเปลี่ยนกรดแอลฟา-ไลโนเลนิก (ALA) ไปเป็นกรดอีโคซาเพนตะอีโนอิก (EPA) และกรดโดโคซาเฮกซะอีโนอิก (DHA) ได้ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์กลุ่ม elongases และ desaturases อย่างไรก็ตามกระบวนการเพิ่มความยาวของสายโซ่คาร์บอนและเกิดพันธะคู่ของกรดไขมันใน microsome ของเซลล์เกิดขึ้นค่อนข้างช้าและไม่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย (Dyerburg, 1986) ดังนั้นกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงทั้ง ω -3 PUFAs และ ω -6 PUFAs จึงจัดเป็นกรดไขมันที่ร่างกายจำเป็นต้องได้รับเพื่อการเจริญเติบโตและพัฒนาอย่างปกติต่อไป

นอกจากนี้ในปัจจุบันกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงทั้ง ω -3-PUFAs และ ω -6-PUFAs ได้เข้ามามีบทบาทสำคัญทางการแพทย์และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและเครื่องสำอาง (nutraceuticals) มากขึ้น เนื่องจากสารกลุ่มนี้จัดเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์อีโคซานอยด์ต่างๆ อันนำไปสู่การสร้างสมดุลของระบบต่างๆ ในร่างกาย ตลอดจนช่วยควบคุมอาการของโรคต่างๆ เช่น โรคเบาหวาน (diabetes) โรคมะเร็ง (cancer) และโรคหลอดเลือดหัวใจ (cardiovascular disease) เป็นต้น (Simpoulos, 1991; Bracco and Deckelbaum, 1992)

Table 1. List of polyunsaturated fatty acids (PUFAs).

Common name	Systematic name
ω-3 Polyunsaturated fatty acids	
α -Linolenic acid (ALA)	$\Delta^9, \Delta^{12}, \Delta^{15}$ -Octadecatrienoic acid
Eicosapentaenoic acid (EPA)	$\Delta^5, \Delta^8, \Delta^{11}, \Delta^{14}, \Delta^{17}$ -Eicosapentaenoic acid
Docosahexaenoic acid (DHA)	$\Delta^4, \Delta^7, \Delta^{10}, \Delta^{13}, \Delta^{16}, \Delta^{19}$ -Docosahexaenoic acid
ω-6 Polyunsaturated fatty acids	
Linolenic acid (LA)	Δ^9, Δ^{12} -Octadecadienoic acid
γ -Linolenic acid (GLA)	$\Delta^6, \Delta^9, \Delta^{12}$ -Octadecatrienoic acid
Arachidonic acid (ARA)	$\Delta^5, \Delta^8, \Delta^{11}, \Delta^{14}$ -Eicosatetraenoic acid

Modified from Swaaf (2003)

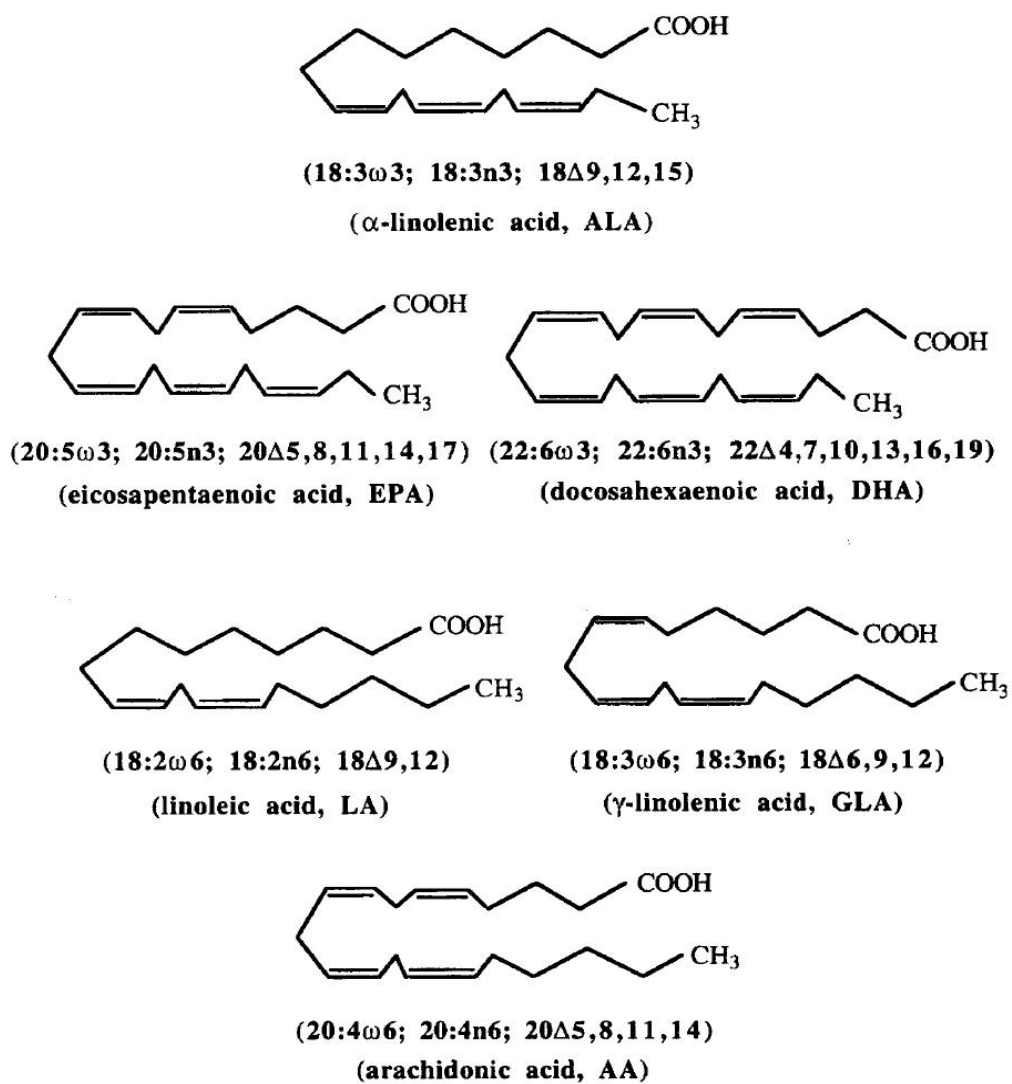


Figure 1. Structures and double bond positions of polyunsaturated fatty acids.

Source: Russell and Nichols (1999)

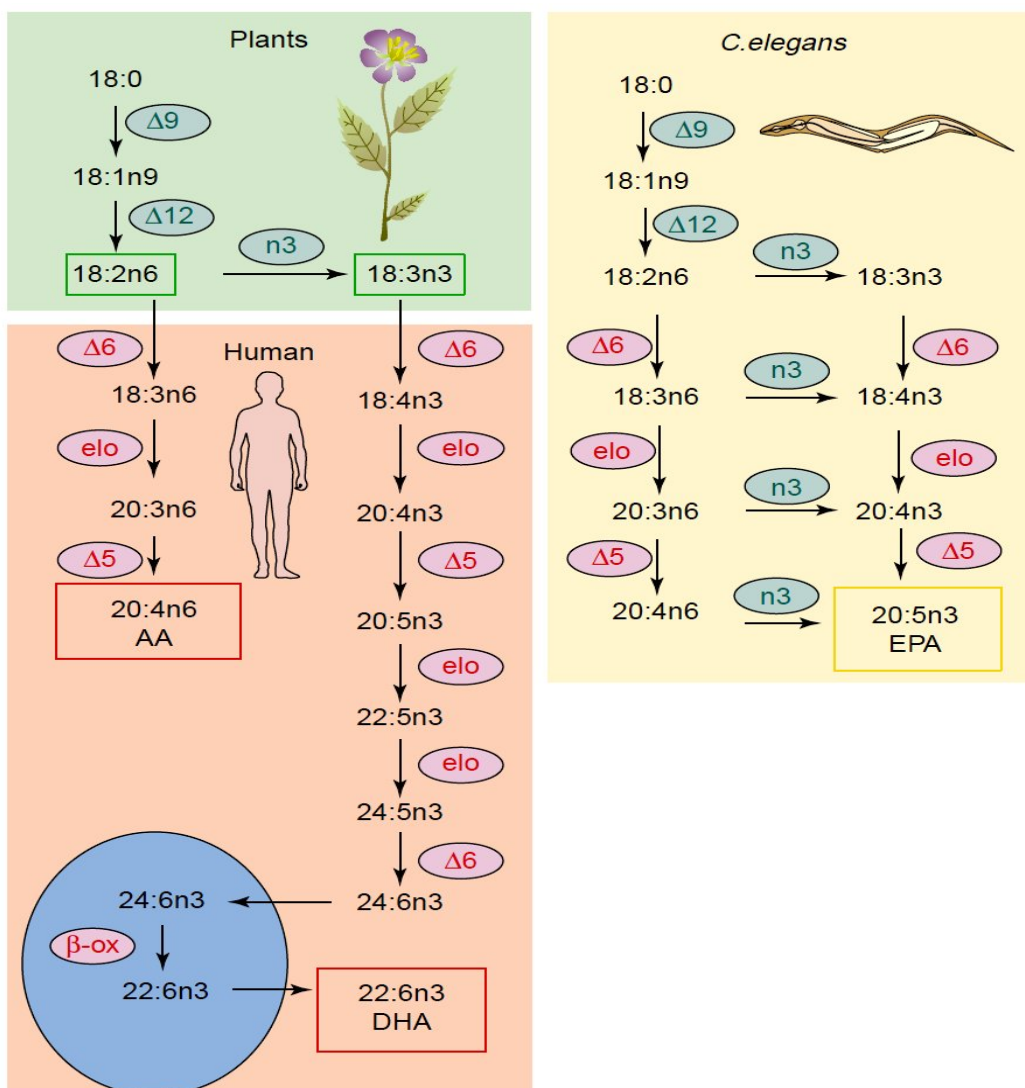
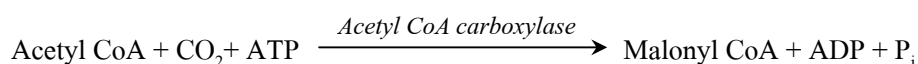


Figure 2. Pathways of polyunsaturated fatty acid synthesis. Enzymes are indicated in ovals and major products are boxed. (a) Plants produce linoleic acid (18:2n6) and linolenic acid (18:3n3) using Δ^{12} and n3-desaturase activities. (b) Mammals lack Δ^{12} and n3-desaturase activities and obtain 18:2n6 and 18:3n3 from their diets. Mammals produce a range of fatty acids from these essential fatty acids using a series of desaturation and elongation reactions in the endoplasmic reticulum. Abundant mammalian fatty acids include arachidonic acid (20:4n6) and docosahexaenoic acid (22:6n3) (DHA). (c) By contrast, *C. elegans* possesses all of the desaturase activities required to produce arachidonic acid (20:4n6) and eicosapentaenoic acid (EPA) (20:5n3), but is unable to elongate C20 PUFAs further.

Source: Wallis *et al.*, (2002)

3. การสังเคราะห์กรดไขมันในจุลินทรีย์

กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันในสิ่งมีชีวิตโดยทั่วไปเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) โดยเอนไซม์ Fatty Acid Synthase (FAS) complex ปฏิริยาเริ่มจาก acetyl CoA ถูกเปลี่ยนเป็น malonyl CoA โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ acetyl CoA carboxylase



จากนั้น acetyl CoA และ malonyl CoA จะทำปฏิริยากับ acyl carrier protein (ACP) ได้เป็น acetyl-ACP และ malonyl-ACP ซึ่งจะรวมตัวกันได้ acetoacetyl-ACP โดยการทำงานของเอนไซม์ β -ketoacyl-ACP synthase (KS) ในขั้นต่อไปมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิริยา ได้แก่ β -ketoacyl-ACP reductase (KR), β -hydroxyacyl-ACP dehydrase (DH) และ enoyl-ACP reductase (ER) ได้ butyryl-ACP เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของปฏิริยา จากนั้นปฏิริยาจะเกิดขึ้นซ้ำเดิมทั้งหมด โดยการเติมคาร์บอนครั้งละ 2 อะตอม จนกระทั่งได้กรดพาล์มิติก (Voet, 1990) ดังแสดงใน Figure 3 (Ritter, 1996)

3.1 การสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในจุลินทรีย์กลุ่มยูคาริโอต

การสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในจุลินทรีย์กลุ่มยูคาริโอต อาศัยปฏิริยา 2 ปฏิริยาที่เรียกว่า ปฏิริยาการเพิ่มความยาวของสายโซ่คาร์บอน (chain elongation) โดยเอนไซม์ elongase และปฏิริยาการเกิดพันธะคู่เพิ่มขึ้นในสายโซ่คาร์บอน (desaturation) โดยเอนไซม์ fatty acyl desaturase

ปฏิริยาการเพิ่มความยาวของสายโซ่คาร์บอน โดยการเติมคาร์บอนจำนวน 2 อะตอม ในโมเลกุลของกรดไขมันที่ปลายด้านคาร์บอกซิลของกรดไขมัน (ทั้งชนิดอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว) เพื่อเพิ่มความยาวของสายโซ่คาร์บอนในโมเลกุลโดยเอนไซม์ elongase กรดไขมันที่ทำปฏิริยาจะอยู่ในรูป fatty acyl CoA ซึ่งการเพิ่มความยาวของคาร์บอนครั้งละ 2 อะตอม อาศัย malonyl CoA และ NADPH (Voet, 1990)



ส่วนปฏิริยาการเกิดพันธะคู่เพิ่มขึ้นในสายโซ่คาร์บอนเป็นปฏิริยาการเกิดพันธะคู่ภายในโมเลกุลของกรดไขมันที่ตำแหน่งจำเพาะเจาะจง โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์

desaturase ซึ่งต้องการโมเลกุลของออกซิเจน และ NADPH (Christopher *et al.*, 1981; Ratledge, 1987; Ratledge, 1992) ดังแสดงใน Figure 4 ซึ่งเป็นวิถีในการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงของราสายพันธุ์ *M. alpina*

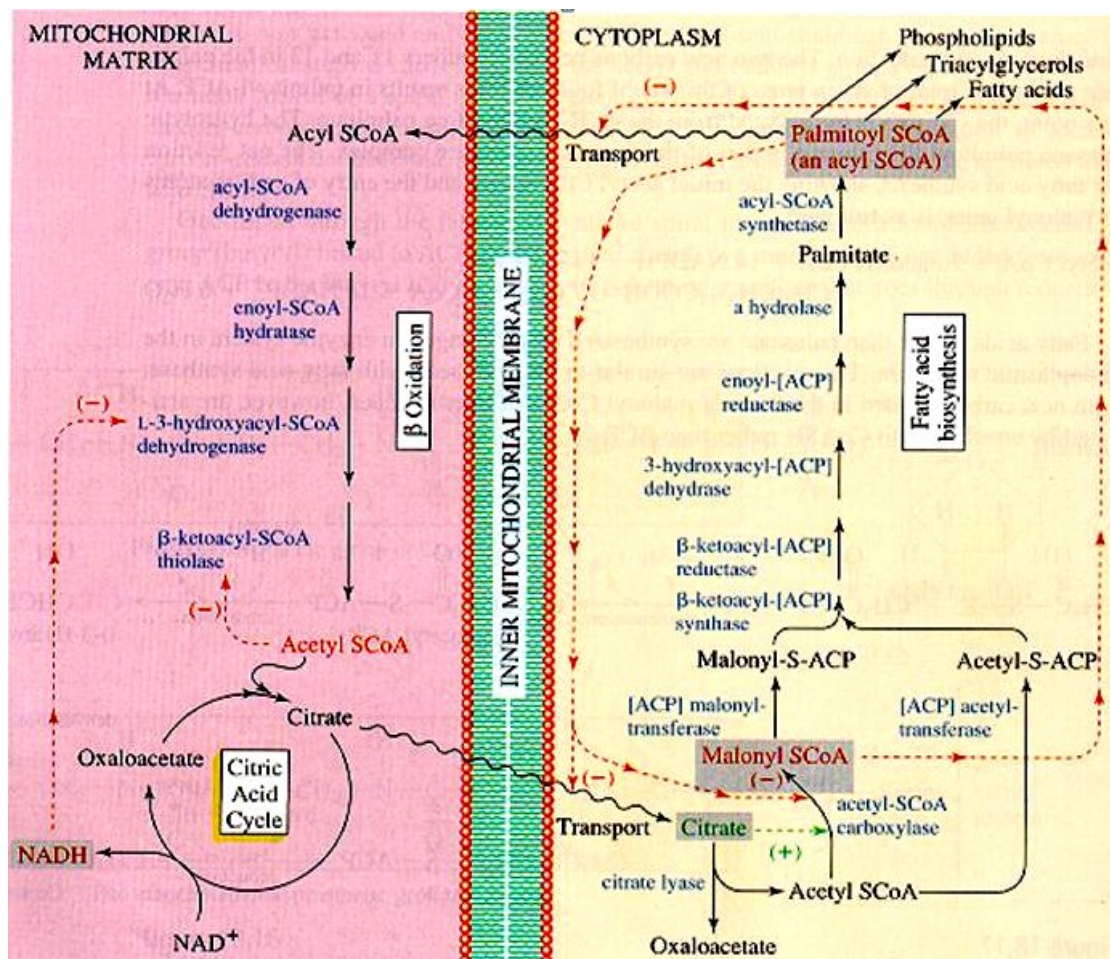


Figure 3. Cellular fatty acid synthetic pathway. The flux of carbon from the mitochondrion, via citrate efflux and acetyl-CoA formation in the cytosol, then into fatty acids and finally into long chain PUFAs (LCPUFA) occurring in the membranes of the endoplasmic reticulum, is shown by the continuous lines. The system uses pyruvate (from glycolysis) as the provider of intramitochondrial acetyl-CoA and for citric acid production.

Source: Ritter (1996)

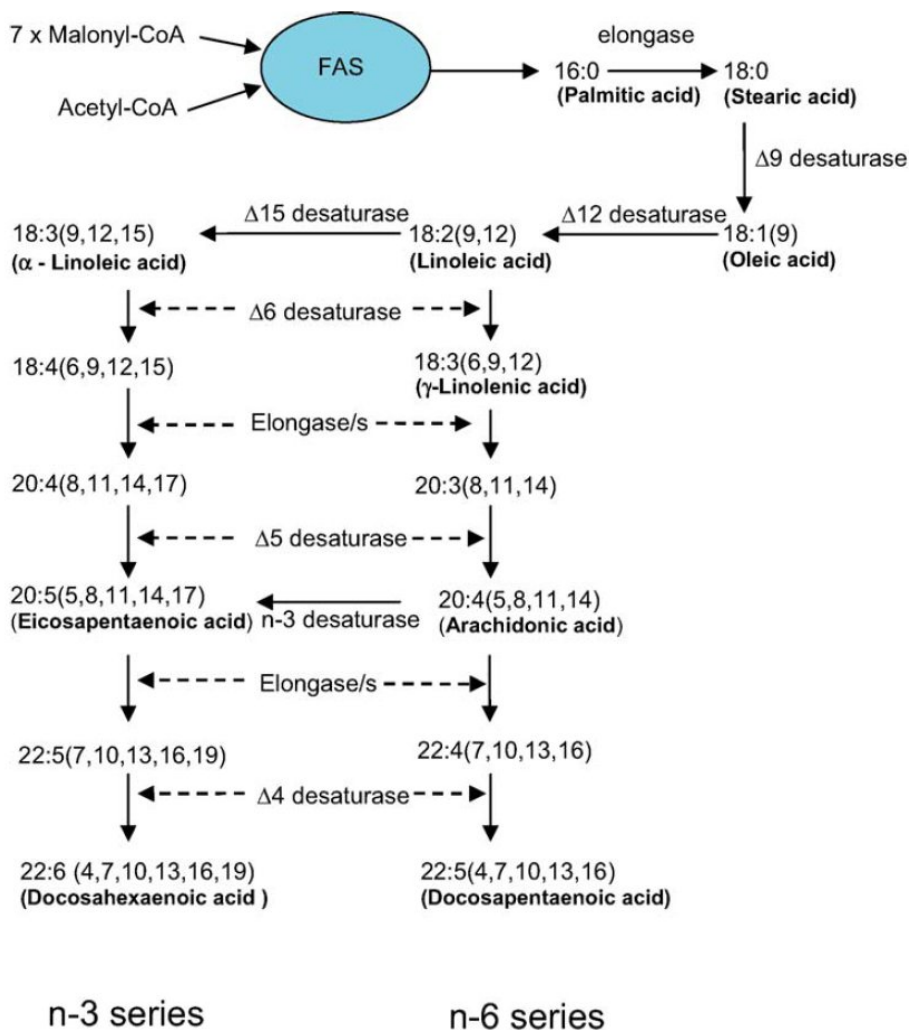


Figure 4. Pathways for the formation of PUFAs in microorganisms using the ‘conventional’ fatty acid synthesis (FAS) route. Fatty acids are synthesised from acetyl-CoA and malonyl-CoA using the FAS complex of enzymes. The saturated fatty acid, stearic acid is then successively desaturated and elongated through a series of reactions leading to the formation of various PUFAs. PUFAs fall into two categories, the *n*-3 and *n*-6 series, depending on the position of the final double bond nearest the terminal methyl group. In *M. alpina*, which is used for the production of ARA, there is a Δ^{17} (*n*-3) desaturase that can then form EPA under certain conditions.

Source: Ratledge (2004)

3.2 การสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในจุลินทรีย์ในกลุ่มโปรคาริโอต

กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในจุลินทรีย์กลุ่มโปรคาริโอต ได้แก่ แบคทีเรีย สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เป็นต้น เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในไซโทพลาสซึม โดยการเพิ่มความยาวของสายโซ่คาร์บอน (elongation) โดยเริ่มจากโมเลกุลของ acetyl-CoA จากนั้น acetyl-CoA และ malonyl-CoA จะทำปฏิกิริยากับ acyl carrier protein (ACP) และรวมตัวกันได้เป็น acetoacetyl-ACP โดยการทำงานของเอนไซม์ β -ketoacyl-ACP synthase (KS) ปฏิกิริยาขั้นต่อไปมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาคือ ได้แก่ β -ketoacyl-ACP reductase (KR), β -hydroxyacyl-ACP dehydrase (DH) และ enoyl-ACP reductase (ER) ได้ butyryl-ACP เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของปฏิกิริยา จากนั้นการเพิ่มความยาวของสายโซ่คาร์บอนครั้งละ 2 อะตอม ด้วยปฏิกิริยา keto reduction โดย malonyl-CoA และเอนไซม์ KS และ KR เติมพันธะคู่ในสายโซ่คาร์บอนดังกล่าวด้วยเอนไซม์ DH รวมทั้งเปลี่ยนตำแหน่งของพันธะคู่ในสายโซ่คาร์บอนด้วยเอนไซม์ 2, 2 isomerase (2, 2I) และ 2, 3 isomerase (2, 3I) ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นซ้ำจนกระทั่งได้กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (Kaulmann and Hertweck, 2002; Wallis *et al.*, 2002) ดังแสดงใน Figure 5

อย่างไรก็ตามสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในสิ่งมีชีวิตชนิดโปรคาริโอตมีความแตกต่างจากชนิดยูคาริโอต โดยที่เอนไซม์ที่ใช้เพื่อทำให้เกิดปฏิกิริยาการเพิ่มความยาวของสายโซ่คาร์บอนและการเติมพันธะคู่ ทั้งนี้สิ่งมีชีวิตชนิดโปรคาริโอตใช้เอนไซม์กลุ่ม Polyketide Synthase (PKS) เพื่อเพิ่มความยาวของสายโซ่คาร์บอนและการเติมพันธะคู่ แต่การสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในสิ่งมีชีวิตชนิดยูคาริโอตใช้อาศัยเอนไซม์กลุ่ม elongases ในปฏิกิริยาการเพิ่มความยาวของสายโซ่คาร์บอน และในปฏิกิริยาการเกิดพันธะคู่อาศัยเอนไซม์กลุ่ม desaturases รวมทั้งออกซิเจน ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (Ratledge, 2004) แต่ออกซิเจนไม่จำเป็นต่อกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในกลุ่มโปรคาริโอต (Kaulmann and Hertweck, 2002)

4.1 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของกรดอะราชิโดนิก

4.1.1 สารตั้งต้นของสารกลุ่มอีโคซานอยด์ (Eicosanoid)

อีโคซานอยด์เป็นสารสื่อกลางที่สำคัญของกระบวนการอักเสบ (Lewis *et al.*, 1990, Tilley *et al.*, 2001) ซึ่งเกิดในกระบวนการเมแทบอลิซึมของร่างกายมนุษย์จากกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงที่มีจำนวนคาร์บอน 20 อะตอม กรดอะราชิโดนิกจึงเป็นสารตั้งต้น (precursor) ที่สำคัญชนิดหนึ่งของการสังเคราะห์สารกลุ่มอีโคซานอยด์ต่างๆ ได้แก่ PGs, TXs และ LTs (Figure 6) อีโคซานอยด์แต่ละชนิดจะมีบทบาทและหน้าที่แตกต่างกัน เช่น TXA₂ มีหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นที่ดีในการกระตุ้นให้เกิดการรวมตัวของเกร็ดเลือด (platelet aggregation) และการบีบรัดตัวของเส้นเลือด (vasoconstriction) นอกจากนี้ PGE₂ และ 4-series LTs มีผลต่อการเกิดกระบวนการอักเสบ (pro-inflammation) (Tilley *et al.*, 2001) ดังแสดงใน Table 2 ต่อมา มีการศึกษาของ Miles และคณะ (2002) พบว่า PGE₂ สามารถยับยั้งสารกลุ่มที่ชักนำให้เกิดกระบวนการอักเสบ เช่น cytokines, tumour necrosis factor (TNF)- α และ interleukin (IL)-1 เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่า PGE₂ สามารถยับยั้งเอนไซม์ 5-lipoxygenase ทำให้ลดการสร้าง 4-series LTs รวมทั้งกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ 15-lipoxygenase ทำให้เพิ่มการผลิตสาร lipoxins จึงทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการอักเสบ ดังนั้น PGE₂ จึงเป็นทั้งสารชักนำและยับยั้งการเกิดกระบวนการอักเสบที่เกิดขึ้นในร่างกาย (Levy *et al.*, 2001; Gewirtz *et al.*, 2002; Vachier *et al.*, 2002; Serhan *et al.*, 2003) และ PGI₂ ทำหน้าที่กระตุ้นการขยายตัวของเส้นเลือด (vasodilatation) และเป็นตัวต้านการรวมตัวของเกร็ดเลือด (Weber *et al.*, 1986)

Table 2. Pro-inflammatory effects of PGE₂ and 4-series LTs.

PGE ₂	LTB ₄	LTC ₄ , D ₄ and E ₄
-Induces fever	-Increase vascular permeability	-Increase vascular
-Increase vascular permeability	-Enhances local blood flow	permeability
-Vasodilator	-Chemotactic agent for leukocytes	-Bronchoconstrictor
-Causes pain	-Induces release of lysosomal enzyme	-Increase mucous
-Enhances pain caused by other agents	-Induces release of reactive oxygen species by granulocytes	secretion
-Increases Production of IL-6	-Increases production of TNF, IL-1 and IL-6	-Increase hypersensitivity

Abbreviations used: IL, interleukin; TNF, tumour necrosis factor.

Source: Calder (2009)

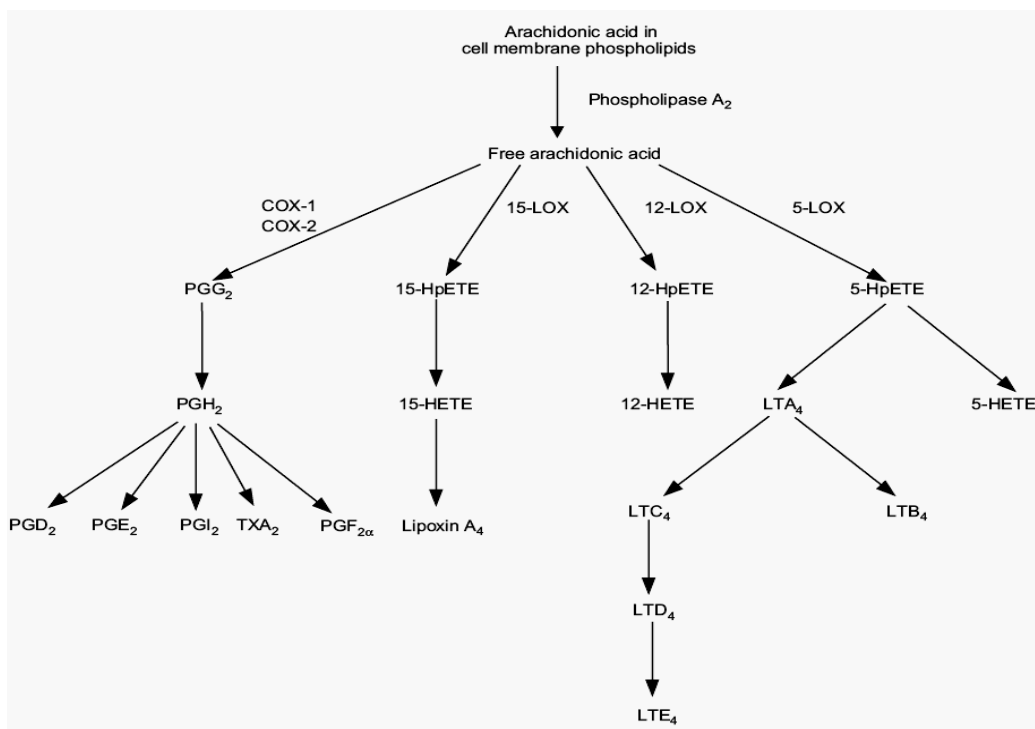


Figure 6. Outline of the pathway of eicosanoid synthesis from arachidonic acid. COX, cyclooxygenase; HETE, hydroxyleicosatetraenoic acid; HpETE, hydroperoxyeicosatetraenoic acid; LOX, lipoxygenase; LT, leukotriene; PG, prostaglandin; TX, thromboxane.

Source: Calder (2009)

4.1.2 ความสำคัญของกรดอะราชิโดนิกต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาการของมนุษย์

กรดอะราชิโดนิกเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงที่พบได้ในปริมาณสูงในน้ำมันของหญิงมีบุตร (Jensen, 1999) มีรายงานว่ากรดอะราชิโดนิกมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและส่งเสริมพัฒนาการทางสายตาและสมองของเด็กทารกให้ดีขึ้น เนื่องจากกรดอะราชิโดนิกเป็นส่วนประกอบสำคัญของเซลล์ประสาทส่วนกลางในร่างกายมนุษย์ (Sastry, 1985; Giusto *et al.*, 2000; Innis *et al.*, 2001) แม้ว่าร่างกายสามารถสังเคราะห์กรดอะราชิโดนิกได้จากกรดไขมันจำเป็นไลโนเลอิก แต่การได้รับกรดอะราชิโดนิกจากกรดไลโนเลอิกเพียงอย่างเดียวซึ่งมีอยู่อย่างจำกัด จึงไม่เพียงพอต่อความต้องการของเด็กทารก (Carnielli *et al.*, 2007) ดังนั้นในผลิตภัณฑ์นมผงสำหรับเด็กทารกจึงกำหนดให้มีการเสริมกรดอะราชิโดนิกเสมอ เพื่อช่วยเสริมการเจริญเติบโตรวมทั้งพัฒนาการทางสมองและการมองเห็นของเด็กทารก

Birch และคณะ (2005) ศึกษาผลของการเสริมกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในนมผงต่อพัฒนาการทางสายตาของเด็กทารกอายุตั้งแต่ 6-39 สัปดาห์ โดยให้นมผงที่มีการเสริมด้วยกรดอะราชิโคนิกในปริมาณเท่ากับร้อยละ 0.72 ของกรดไขมันทั้งหมด พบว่าปริมาณกรดอะราชิโคนิกในเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุมร้อยละ 15-18 อย่างไรก็ตามผลการเจริญเติบโตของเด็กทารกทางด้านกายภาพ เช่น น้ำหนัก ส่วนสูงและความกว้างรอบศีรษะไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แต่การให้นมผงที่เสริมกรดอะราชิโคนิกมีผลเพิ่มศักยภาพการมองเห็นของเด็กทารก (visual evoked potential; VEP) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

Fang และคณะ (2005) ศึกษาผลของการเสริมกรดอะราชิโคนิกในนมผงต่อการพัฒนาของระบบประสาทในเด็กทารกที่มีอายุตั้งแต่ 30-7 สัปดาห์ โดยการเสริมกรดอะราชิโคนิกร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก ต่อปริมาณนมผง 110 กิโลแคลอรี ต่อน้ำหนักตัวเด็ก 1 กิโลกรัมต่อวัน เป็นเวลา 0-4 เดือน และลดปริมาณการให้นมผงลงเหลือปริมาณ 70 กิโลแคลอรีต่อน้ำหนักเด็ก 1 กิโลกรัมต่อวัน จากเดือนที่ 5 ถึงเดือนที่ 6 วัดการเจริญเติบโตของเด็กทารกทุกเดือน พบว่าเด็กทารกที่ได้รับนมผงที่เสริมด้วยกรดอะราชิโคนิกให้ผลของน้ำหนักตัว ส่วนสูงและความกว้างรอบศีรษะไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ในขณะที่ค่าดัชนี psychomotor development index (PDI) และ mental development index (MDI) ซึ่งบ่งบอกถึงการพัฒนาทางระบบประสาทและการเรียนรู้ พบว่าเด็กทารกที่รับนมผงที่เสริมกรดอะราชิโคนิกมีค่าดัชนี PDI และ MDI เท่ากับ 102.2 ± 10.5 และ 96.1 ± 8.6 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ที่มีค่าดัชนี PDI และ MDI เท่ากับ 95.4 ± 13.2 และ 91.7 ± 10.4 ตามลำดับ

4.1.3 คุณสมบัติของกรดอะราชิโคนิกในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

กรดอะราชิโคนิกเป็นกรดไขมันที่มีความสำคัญต่อกระบวนการชีวภาพต่างๆ ในร่างกาย เช่น กระบวนการเกิดการอักเสบและเป็นสารสื่อสัญญาณชีวภาพ (signal transduction) (Seeds *et al.*, 1999) นอกจากนี้กรดอะราชิโคนิกยังสามารถยับยั้งสารสื่อกลางที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (Begin *et al.*, 1986) ชนิดต่างๆ ได้แก่ เซลล์มะเร็งตับ Hep-G2, 777 และ JM2 (Muzio *et al.*, 1999; Wu and Cederbaum, 2001) มะเร็งปอด (Muzio *et al.*, 2006; Trombetta *et al.*, 2007)

Rizzo และคณะ (1999) ศึกษาผลของกรดอะราชิโคนิกต่อเซลล์มะเร็ง พบว่าการบ่มเซลล์มะเร็งเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ร่วมกับกรดอะราชิโคนิกที่ความเข้มข้น $100 \mu\text{M}$ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรังแบบไมอีลอยด์ได้ร้อยละ 77 เมื่อ

เปรียบเทียบกับชุดควบคุมทั้งนี้อาจเนื่องจากการดื้อราชิโคเนคสามารถชักนำกระบวนการ apoptosis ภายในเซลล์ ซึ่งทำให้เซลล์มะเร็งตาย

Muzio และคณะ (2006) ศึกษาผลกรดื้อราชิโคเนคยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด A549 เนื่องจากการดื้อราชิโคเนคมีผลยับยั้งการสร้างโปรตีนชนิด ALDH3A1 ในเซลล์มะเร็งปอด โดยบ่มเซลล์มะเร็งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ร่วมกับกรดื้อราชิโคเนคที่ความเข้มข้น 25 μM พบว่าสามารถลดจำนวนเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 40 เมื่อเทียบกับชุดควบคุม และในขณะเดียวกันเมื่อเพิ่มความเข้มข้นกรดื้อราชิโคเนคเป็น 50 μM และเพิ่มระยะเวลาในการบ่มเซลล์มะเร็งเป็น 48 ชั่วโมง มีผลทำให้เซลล์มะเร็งมีผลจำนวนลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เท่ากับร้อยละ 64 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

Trombetta และคณะ (2007) ศึกษาผลกรดื้อราชิโคเนคและกรดโคโคเฮกซะอีโนอิกในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ A549 โดยเมื่อบ่มเซลล์มะเร็งปอดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ร่วมกับกรดื้อราชิโคเนคที่ความเข้มข้น 25 μM พบว่ากรดื้อราชิโคเนคมีผลลดจำนวนเซลล์มะเร็งปอด A549 ลงเท่ากับร้อยละ 9 และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นกรดื้อราชิโคเนคเป็น 50 และ 100 μM ในระยะเวลาการบ่มเซลล์มะเร็งเท่ากัน ส่งผลให้เซลล์มะเร็งปอด A549 มีจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เท่ากับร้อยละ 33 และ 55 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม นอกจากนี้เมื่อบ่มเซลล์มะเร็งปอดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ร่วมกับกรดโคโคเฮกซะอีโนอิกที่ระดับความเข้มข้น 50 และ 100 μM ทำให้เซลล์มะเร็งปอด A549 มีจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เท่ากับร้อยละ 49 และ 65 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

4.1.4 ผลของกรดื้อราชิโคเนคต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

กรดื้อราชิโคเนคเป็นกรดไขมันที่ไม่เพียงจำเป็นต่อมนุษย์เท่านั้น ยังจำเป็นสำหรับสัตว์บกและสัตว์น้ำเนื่องจากการดื้อราชิโคเนคเป็นกรดไขมันที่จำเป็นต่อกระบวนการชีวภาพต่างๆ ในร่างกาย เช่น ระบบสืบพันธุ์ ระบบภูมิคุ้มกันและการตอบสนองต่อการอักเสบของร่างกาย เป็นต้น (Tocher, 2003) ในอดีตที่ผ่านมากรดื้อราชิโคเนคอาจถูกมองข้ามในเรื่องคุณค่าของสารอาหาร แต่กรดื้อราชิโคเนคมีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีผลต่อคุณภาพของไข่และตัวอ่อนในสัตว์น้ำ ตลอดจนระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำ (Castell *et al.*, 1994; Bessonart *et al.*, 1999; Bell and Sargent, 2003)

Furuita และคณะ (2003) ศึกษาผลของปริมาณกรดื้อราชิโคเนคต่อคุณภาพของไข่ปลาทะเล *Paralichthys olivaceus* โดยทดลองให้กรดื้อราชิโคเนคที่ความเข้มข้นตั้งแต่ร้อยละ 0.1, 0.6 และ 1.2 ของอาหาร ในช่วงก่อนและหลังฤดูวางไข่รวมเป็นระยะเวลา 3 เดือน พบว่าความเข้มข้นของกรดื้อราชิโคเนคร้อยละ 0.6 ของอาหาร สามารถช่วยเพิ่มสมรรถภาพในการวางไข่ของ

ปลาทะเล *P. olivaceus* ให้ปริมาณของไข่สูงถึง 126,500 ฟองต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัมต่อการวางไข่ 1 ครั้ง อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มปริมาณกรดอะราชิโดนิกในอาหารปลาที่มีผลทำให้ลดสมรรถภาพในการวางไข่แก่ของปลา *P. olivaceus* โดยให้ปริมาณของไข่เท่ากับ 61,100 ฟองต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัมต่อการวางไข่ 1 ครั้ง เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนของสารในกลุ่มอีโคซานอยด์ในตัวปลา จึงส่งผลกระทบต่อพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ รวมทั้งปริมาณและคุณภาพของไข่

Van-Anholt และคณะ (2004) ศึกษาผลของกรดอะราชิโดนิกต่อความเครียดแบบเฉียบพลันและเรื้อรังที่เกิดขึ้นในลูกปลาทะเล *Sparus aurata* โดยให้กรดอะราชิโดนิกในปริมาณสูงเท่ากับร้อยละ 2.4 ของไขมันทั้งหมดในอาหาร แก่ลูกปลาทะเล *S. aurata* ที่มีอายุ 28 วัน จากนั้นหยุคให้อากาศเป็นเวลา 90 วินาที เพื่อทดสอบการตอบสนองต่อความเครียดแบบเฉียบพลันที่เกิดขึ้น พบว่าสามารถลดความเครียดที่เกิดขึ้นได้อย่างดีโดยวัดจากระดับของสารคอร์ติซอล (cortisol) ที่เกิดขึ้นในตัวอ่อน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ให้กรดอะราชิโดนิกในปริมาณต่ำ นอกจากนี้เมื่อศึกษาผลของกรดอะราชิโดนิกต่อความเครียดแบบเรื้อรังในลูกปลาทะเล *S. aurata* โดยค่อย ๆ ลดความเค็มลงจากร้อยละ 42 เหลือร้อยละ 25 ภายใน 1 ชั่วโมง ทุก ๆ วัน โดยวัดระดับของสารคอร์ติซอลและกิจกรรมของเอนไซม์ Na^+ และ K^+ -ATPase พบว่าการให้กรดอะราชิโดนิกปริมาณสูงแก่ลูกปลาจะทำให้ระดับสารคอร์ติซอลลดลง ในช่วงระยะเวลา 30 นาทีแรกเท่านั้น จากนั้นระดับของสารคอร์ติซอลจะเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งสัมพันธ์กับกิจกรรมของเอนไซม์ Na^+ และ K^+ -ATPase ที่เพิ่มสูงขึ้น เพื่อรักษากระบวนการออสโมซิสและป้องกันการเกิด hypo-osmotic ในลูกปลาทะเล *S. aurata*

Khozin-Goldberg และคณะ (2006) ศึกษาผลกรดอะราชิโดนิกต่อการรอดชีวิตของปลาหางนกยูงในสภาวะที่มีเซลล์ปรสิต *Tetrahymena* sp. โดยการให้อาหารที่เสริมด้วยกรดอะราชิโดนิก 12.5, 25, 37.5 และ 50 มิลลิกรัมต่อกรัมอาหาร โดยเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน ในอ่างที่มีเซลล์ปรสิต *Tetrahymena* sp. ที่ความเข้มข้น 1,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่าเมื่อเลี้ยงปลาหางนกยูงด้วยอาหารที่เสริมกรดอะราชิโดนิกในปริมาณ 25 มิลลิกรัมต่อกรัมอาหาร ปลาหางนกยูงมีการรอดชีวิตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

Lund และคณะ (2007) ศึกษาผลของการเสริมกรดอะราชิโดนิก กรดอีโคซาเพนตะอีโนอิกและกรดโดโคซาเฮกซะอีโนอิกในอาหารปลา ต่อการเจริญเติบโตและการสร้างเม็ดสี (malpigmentation) ในระยะตัวอ่อนของปลาทะเล *Solea solea* พบว่าการเสริมกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงทั้ง 3 ชนิด คือ กรดอะราชิโดนิก กรดอีโคซาเพนตะอีโนอิกและกรดโดโคซาเฮกซะอีโนอิกในอาหารปลา ไม่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) ในปลา *S. solea* ในระยะตัวอ่อน เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงทั้ง 3 ชนิดในอาหารที่มีปริมาณต่ำ แต่เมื่อเพิ่มปริมาณกรดอะราชิโดนิกในอาหารเท่ากับร้อยละ 30 ของอาหาร พบว่าทำให้ผลการสร้างเม็ดสี

ของปลาทะเลดังกล่าวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) โดยมีค่าเท่ากับร้อยละ 83.4 ± 0.7 เมื่อเทียบกับชุดควบคุมให้ผลการสร้างเม็ดสีเท่ากับร้อยละ 25.0 ± 2.8

4.2 แหล่งที่มาของกรดอะราชิโดนิก

กรดอะราชิโดนิกสามารถพบได้ทั่วไปในเนื้อสัตว์และปลาทะเล เช่น เครื่องใน สัตว์ ไข่แดง ปลาซาดีน ทูน่าและเฮอรัริง (Burja *et al.*, 2006) รวมทั้งจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ สาหร่ายเซลล์เดี่ยว *Porphyridium cruentum* และ *Parietochoris incisa* (Bigogno *et al.*, 2002; Durmaz *et al.*, 2007) รา *Mortierella alpina* (Zhu *et al.*, 2003) และแบคทีเรียจากทะเลบางสายพันธุ์ เช่น *Plesiocystis pacifica* SIR-1, *Aureispira marina* gen. nov., sp. nov., *Aureispira maritima* sp. nov., *Krokinobacter. eikastus* PMA-26, *Krokinobacter diaphorus* MSKK-32 (Iizuka *et al.*, 2003; Hosoya *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2006; Hosoya *et al.*, 2007) เป็นต้น ซึ่งจุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วจึงสามารถผลิตกรดอะราชิโดนิกได้คราวละมากๆ ตลอดจนในการเพาะเลี้ยงสามารถควบคุมการผลิตได้ง่ายไม่ขึ้นกับความแปรปรวนของสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติ ในขณะที่การบริโภคเนื้อสัตว์ เช่น ส่วนของเครื่องในสัตว์และไข่แดง แม้ว่าจะได้รับกรดอะราชิโดนิกเป็นจำนวนมาก แต่ผู้บริโภคยังได้รับโคเลสเตอรอล ซึ่งเป็นไขมันที่เป็นปัญหาต่อสุขภาพในปริมาณที่มากด้วย นอกจากนี้การบริโภคน้ำมันปลาที่มีจำหน่ายอย่างแพร่หลาย ซึ่งผลิตจากปลาทะเล อาจมีกลิ่นรสที่ไม่พึงประสงค์ รวมทั้งอาจมีการปนเปื้อนของสารพิษ สารเคมีหรือโลหะหนักได้ เช่น asdioxins, polychlorinated biphenyls (PCBs) ปรอทและตะกั่ว (Certik and Shimizu, 1999; Ratledge, 2004) เป็นต้น

โดยทั่วไปจุลินทรีย์มีการสังเคราะห์ไขมันและเก็บไว้ภายในเซลล์ปริมาณค่อนข้างน้อย นอกจากนี้มีเพียงจุลินทรีย์บางชนิดเท่านั้นที่มีความสามารถที่สะสมไขมันภายในเซลล์ (oleaginous microorganism) โดยมีปริมาณไขมันที่สะสมภายในเซลล์มากกว่าหรือร้อยละ 20 ของน้ำหนักเซลล์ ซึ่งไขมันเหล่านี้ถูกเก็บไว้เพื่อเป็นแหล่งพลังงาน (storage material) แต่แบคทีเรียทั่วไปไม่มีการสร้างไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol) แต่จะมีการผลิตโพลิเมอร์ในกลุ่ม poly- β -hydroxy-butyrate (PHB) และ poly- β -hydroxy-alkanoates (PHA) เพื่อเป็นแหล่งพลังงาน (storage polymers) หรือเพื่อรักษาสภาพการไหลของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane fluidity) เมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีอุณหภูมิต่ำ โดยเซลล์จะพยายามปรับตัวโดยลดสัดส่วนของกรดไขมันอิ่มตัวจากไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ทั้งหมดและเพิ่มการสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง เนื่องจากไขมันไม่อิ่มตัวมีจุดหลอมเหลวต่ำกว่าไขมันอิ่มตัว จึงเป็นการปรับตัวเพื่อรักษาสภาพการไหลของเยื่อหุ้มเซลล์ (Caldwell, 1995) สำหรับการผลิตและสะสมไขมันรวมทั้งกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงไว้ในเซลล์ในปริมาณสูงนั้น พบมากในยีสต์บางชนิด ราและสาหร่ายเซลล์เดียวบางชนิด (Ratledge,

2004) ดังนั้นจุลินทรีย์จึงเป็นอีกแหล่งผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง จำพวกกรดอะราชิโดนิก ดังแสดงใน Table 3

อย่างไรก็ตามคุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการนำมาใช้ผลิตเชิงอุตสาหกรรมควรมีคุณสมบัติดังนี้ (Ward and Singh, 2005)

- มีลักษณะพันธุกรรมและยีนคงที่
- เจริญเติบโตเร็วและให้อัตราการผลิตสูง
- เลี้ยงง่ายในสภาวะควบคุม
- เจริญเติบโตได้ดีในอาหารราคาถูกและให้ผลผลิตสูง
- ไม่ผลิตสารพิษ
- ไม่เป็นเชื้อก่อโรค

Table 3. List of arachidonic acid producing microorganism.

Microorganism	Types of polyunsaturated fatty acids	References
Bacteria		
<i>Aureispira marina</i>	20:4 ω 6	Hosoya <i>et al.</i> , (2006)
<i>Aureispira maritima</i>	20:4 ω 6	Hosoya <i>et al.</i> , (2007)
Barophilic bacteria strain 16C1 and 16D2	18:2 ω 6, 18:3 ω 6, 18:3 ω 3, 20:3 ω 6,	Yano <i>et al.</i> , (1998)
	20:4 ω 6, 20:4 ω 3, 20:5 ω 3, 22: 6 ω 3	
<i>Krokinobacter eikastus</i>	20:4 ω 6	Khan <i>et al.</i> , (2006)
<i>Plesiocystis pacifica</i>	20:4 ω 6	Iizuka <i>et al.</i> , (2003)
<i>Psychoflexus torques</i>	20:4 ω 6, 20:5 ω 3	Bowman <i>et al.</i> , (1998)
Fungi		
<i>Mortierella elongata</i> NRRL 5513	20:4 ω 6	Cheng <i>et al.</i> , (1999)
<i>Mortierella alpina</i>	20:4 ω 6	Lan <i>et al.</i> , (2002)
<i>Mortierella alpina</i> I ₄₉ -N ₁₈	20:4 ω 6	Yuan <i>et al.</i> , (2002)
<i>Mortierella sp.</i>	20:4 ω 6	Zhu <i>et al.</i> , (2003)

Table 3. (Cont.).

Microorganism	Types of polyunsaturated fatty acids	References
Microalgae		
<i>Parietochloris incise</i>	20:4 ω 6, 20:5 ω 3	Bigogono <i>et al.</i> , (2002)
<i>Porphyridium cruentum</i>	20:4 ω 6, 20:5 ω 3	Certik and Shimiza (1999)
<i>Pythium insidiosum</i>	20:4 ω 6	Kyle (1994)
Thraustochytrids		
(fungoid protists)		
Thraustochytrids strains 43B and 46B	20:4 ω 6, 20:5 ω 3, 22: 6 ω 3	Barclay (1997)
Moss		
<i>Physcomitrella patens</i>	18:2 ω 6, 18:3 ω 6, 18:3 ω 3, 20:3 ω 6, 20:3 ω 3, 20:4 ω 6, 20:5 ω 3	Grimsley <i>et al.</i> , (1981); Kaewsuwan <i>et al.</i> , (2006)

5. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและผลิตกรดไขมันอะโรมาติกในจุลินทรีย์

การผลิตกรดอะโรมาติกของจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับปัจจัยทางเคมีและกายภาพในการเพาะเลี้ยง โดยปัจจัยทางเคมี ได้แก่ องค์ประกอบ ซึ่งหลักๆ คือ ชนิด ปริมาณของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ส่วนปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ อุณหภูมิ พีเอช ความเค็มและปริมาณออกซิเจน เป็นต้น นอกจากนี้อายุและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ยังมีผลต่อการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงด้วยเช่นกัน

5.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอน (Carbon sources)

แหล่งของคาร์บอนเป็นสารอาหารที่จำเป็นในการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะโรมาติกของเซลล์จุลินทรีย์ โดยพบว่าการใช้สารละลายแป้ง (soluble starch) เป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 ของอาหารเพาะเลี้ยง ราสายพันธุ์ *Mortierella alpina* ATCC 32222 จะให้น้ำหนักชีวมวลเท่ากับ 7.20 กรัมต่อลิตร และปริมาณกรดอะโรมาติกเท่ากับ 0.83 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การใช้กลูโคส มอลโทสและกาแลคโตส เป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นเดียวกัน พบว่าการเลี้ยงราโดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้น้ำหนักชีวมวลเท่ากับ 7.50 กรัมต่อลิตร และให้ปริมาณกรดอะโรมาติกเท่ากับ 0.67 กรัมต่อลิตร ส่วนการเลี้ยงราโดยใช้น้ำตาลชนิดอื่นเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้น้ำหนักชีวมวลและปริมาณกรดอะโรมาติกที่ลดลง นอกจากนี้การใช้น้ำมันพืชชนิด

ต่าง ๆ ในอาหารเพาะเลี้ยง *M. alpina* ATCC 32222 พบว่าเราสามารถเจริญเติบโตได้ดีขึ้นและผลิตกรดอะราชิโดนิกเพิ่มมากขึ้นด้วย มีรายงานว่าน้ำมันถั่วเหลือง (soybean oil) น้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน (sunflower oil) และน้ำมันเมล็ดลินิน (linseed oil) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 ของอาหารเพาะเลี้ยง รวมทั้งมีสารละลายแป้งที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 มีผลต่อการเพิ่มน้ำหนักชีวมวลเป็น 17.10, 17.30 และ 17.50 กรัมต่อลิตรของอาหารเพาะเลี้ยง และปริมาณกรดอะราชิโดนิก 1.79, 1.69 และ 1.92 กรัมต่อลิตรของอาหารเพาะเลี้ยงตามลำดับ ในขณะที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายแป้งมีผลให้น้ำหนักชีวมวลและปริมาณกรดอะราชิโดนิกเพิ่มขึ้นเช่นกัน โดยสารละลายแป้งที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 ของอาหารเพาะเลี้ยง ให้น้ำหนักชีวมวลและปริมาณกรดอะราชิโดนิกสูงสุดเท่ากับ 18.40 และ 2.64 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายแป้งเป็นร้อยละ 12 น้ำหนักชีวมวลและปริมาณกรดอะราชิโดนิกลดลงเท่ากับ 17.90 และ 0.30 กรัมต่อลิตร (Jang *et al.*, 2005) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Nisha และ Venkataeswaran (2008) ทำการทดลองโดยใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 ของอาหารเพาะเลี้ยง สำหรับ *M. alpina* CBS 528.72 จะให้น้ำหนักชีวมวลและกรดอะราชิโดนิกสูงสุดเท่ากับ 6.70 และ 0.97 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่การใช้ฟรุกโตส แลคโตส แรฟไฟโนสและแมนโนสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นเดียวกันจะมีน้ำหนักชีวมวลและปริมาณกรดอะราชิโดนิกที่ลดลง โดยมีน้ำหนักชีวมวลเท่ากับ 5.40, 4.60, 4.60 และ 1.40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และให้กรดอะราชิโดนิกเท่ากับ 0.53, 0.10, 0.09 และ 0.12 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 4

Table 4. Effect of carbon sources on arachidonic acid (ARA) production from *Mortierella alpina*.

Carbon sources	Organism	Biomass (g/L)	ARA (g/L)	References
2.0% soluble starch	<i>M. alpina</i> ATCC 32222	7.20	0.83	Jang <i>et al.</i> , (2005)
2.0% glucose	<i>M. alpina</i> ATCC 32222	7.50	0.68	Jang <i>et al.</i> , (2005)
2.0% galactose	<i>M. alpina</i> ATCC 32222	5.10	0.17	Jang <i>et al.</i> , (2005)
2.0% maltose	<i>M. alpina</i> ATCC 32222	4.30	0.10	Jang <i>et al.</i> , (2005)
1.0% soy bean oil (+2.0% soluble starch)	<i>M. alpina</i> ATCC 32222	17.10	1.79	Jang <i>et al.</i> , (2005)
1.0% sunflower oil (+2.0% soluble starch)	<i>M. alpina</i> ATCC 32222	17.30	1.69	Jang <i>et al.</i> , (2005)
1.0% linseed oil (+2.0% soluble starch)	<i>M. alpina</i> ATCC 32222	17.50	1.92	Jang <i>et al.</i> , (2005)

Table 4. (Cont.).

Carbon sources	Organism	Biomass (g/L)	ARA (g/L)	References
1.0% soluble starch	<i>M. alpina</i> ATCC 32222	4.20	0.07	Jang <i>et al.</i> , (2005)
4.0% soluble starch	<i>M. alpina</i> ATCC 32222	9.60	1.29	Jang <i>et al.</i> , (2005)
6.0% soluble starch	<i>M. alpina</i> ATCC 32222	14.00	1.75	Jang <i>et al.</i> , (2005)
8.0% soluble starch	<i>M. alpina</i> ATCC 32222	17.80	2.01	Jang <i>et al.</i> , (2005)
10.0% soluble starch	<i>M. alpina</i> ATCC 32222	18.40	2.64	Jang <i>et al.</i> , (2005)
12.0% soluble starch	<i>M. alpina</i> ATCC 32222	17.90	0.30	Jang <i>et al.</i> , (2005)
2.0% glucose	<i>M. alpina</i> CBS 528.72	6.70	0.97	Nisha and Venkateswaran (2008)
2.0% fructose	<i>M. alpina</i> CBS 528.72	5.40	0.53	Nisha and Venkateswaran (2008)
2.0% lactose	<i>M. alpina</i> CBS 528.72	4.60	0.10	Nisha and Venkateswaran (2008)
2.0% raffinose	<i>M. alpina</i> CBS 528.72	4.60	0.09	Nisha and Venkateswaran (2008)
2.0% mannose	<i>M. alpina</i> CBS 528.72	1.40	0.12	Nisha and Venkateswaran (2008)

5.2 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนและอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน (Nitrogen sources and C:N ratio)

แหล่งไนโตรเจนเป็นอีกปัจจัยที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง เนื่องจากใช้ในการสังเคราะห์สารพันธุกรรม เอนไซม์และส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์ มีรายงานว่าการใช้กลูตามัทเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับรา *Mortierella alpina* พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูตามัทในอาหารเพาะเลี้ยง ส่งผลเพิ่มการผลิตกรดอะราชีโดนิก โดยกลูตามัทที่ความเข้มข้น 0.8 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดอะราชีโดนิกสูงสุดเท่ากับ 1.40 กรัมต่อลิตร จาก 0.84 กรัมต่อลิตร ในชุดควบคุมที่ไม่เติมกลูตามัท แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูตามัทเป็น 1.0 และ 1.2 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดอะราชีโดนิกลดลงเท่ากับ 0.92 และ 0.81 กรัมต่อลิตร (Yu *et al.*, 2003) ในขณะที่การเติมยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 เป็นแหล่งไนโตรเจนแก่รา *M. alpina*

I₄₉-N₁₈ ให้น้ำหนักชีวมวลและผลผลิตกรดอะราชิโดนิกสูงสุดเท่ากับ 22.00 และ 3.50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่เดียวกันเมื่อใช้เปปโตเน เนื้อสกัด (beef extract) KNO₃ และ NaNO₃ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นเดียวกันจะมีน้ำหนักชีวมวลลดลงเท่ากับ 14.00, 7.00, 5.00 และ 5.00 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และผลผลิตกรดอะราชิโดนิกที่ลดลงเท่ากับ 1.50, 2.00, 0.50 และ 0.45 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Yuan *et al.*, 2002) อย่างไรก็ตามการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และอนินทรีย์ร่วมกันในอาหารเพาะเลี้ยงรา *M. alpina* ATCC 32222 โดยมี KNO₃ และยีสต์สกัดในอัตราส่วน 2:1 ให้น้ำหนักชีวมวลและปริมาณกรดอะราชิโดนิกสูงสุดเท่ากับ 7.20 และ 0.83 กรัมต่อลิตรของอาหารตามลำดับ แต่เมื่อลดหรือเพิ่มอัตราส่วนของ KNO₃ ต่อยีสต์สกัดจะส่งผลต่อน้ำหนักชีวมวลและปริมาณกรดอะราชิโดนิก ซึ่งอัตราส่วนของ KNO₃ ต่อยีสต์สกัดเท่ากับ 1:3, 1:2, 1:1 และ 3:1 ให้น้ำหนักชีวมวลเท่ากับ 9.30, 7.20, 8.50 และ 6.90 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และปริมาณกรดอะราชิโดนิกเท่ากับ 0.47, 0.43, 0.53 และ 0.73 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Jang *et al.*, 2005) นอกจากนี้ อัตราส่วนคาร์บอนและไนโตรเจนมีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราชิโดนิกของรา *M. alpina* โดยพบว่าอัตราส่วนคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงที่น้อยหรือมากเกินไปส่งผลให้จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตและผลิตกรดอะราชิโดนิกที่ลดลง โดยอัตราส่วนคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสม 12:1 ให้น้ำหนักชีวมวลเท่ากับ 20.00 กรัมต่อลิตร ในขณะที่อัตราส่วนคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสม 14.9:1 ให้ปริมาณกรดอะราชิโดนิกเท่ากับ 1.50 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้เมื่อลดหรือเพิ่มอัตราส่วนคาร์บอนและไนโตรเจนทำให้น้ำหนักชีวมวลและปริมาณกรดอะราชิโดนิกลดลง ดังแสดงใน Table 5 (Koike *et al.*, 2001)

Table 5. Effect of nitrogen sources and C:N ratio on arachidonic acid (ARA) production from *Mortierella alpina*.

Nitrogen source	Organism	Biomass (g/L)	ARA (g/L)	References
0.4% glutamate	<i>M. alpina</i>	23.27	1.22	Yu <i>et al.</i> , (2003)
0.6% glutamate	<i>M. alpina</i>	23.51	1.25	Yu <i>et al.</i> , (2003)
0.8% glutamate	<i>M. alpina</i>	24.43	1.40	Yu <i>et al.</i> , (2003)
1.0% glutamate	<i>M. alpina</i>	24.47	0.92	Yu <i>et al.</i> , (2003)
1.2% glutamate	<i>M. alpina</i>	24.78	0.81	Yu <i>et al.</i> , (2003)

Table 5. (Cont.).

Nitrogen source	Organism	Biomass (g/L)	ARA (g/L)	References
0.8% yeast extract	<i>M. alpina</i> I ₄₉ -N ₁₈	22.00	3.50	Yuan <i>et al.</i> , (2002)
0.8% peptone	<i>M. alpina</i> I ₄₉ -N ₁₈	14.00	1.50	Yuan <i>et al.</i> , (2002)
0.8% beef extract	<i>M. alpina</i> I ₄₉ -N ₁₈	7.00	2.00	Yuan <i>et al.</i> , (2002)
0.8% KNO ₃	<i>M. alpina</i> I ₄₉ -N ₁₈	5.00	0.50	Yuan <i>et al.</i> , (2002)
0.8% NaNO ₃	<i>M. alpina</i> I ₄₉ -N ₁₈	5.00	0.45	Yuan <i>et al.</i> , (2002)
(1:3) KNO ₃ : yeast extract	<i>M. alpina</i> ATCC 32222	9.30	0.47	Jang <i>et al.</i> (2005)
(1:2) KNO ₃ : yeast extract	<i>M. alpina</i> ATCC 32222	7.20	0.43	Jang <i>et al.</i> (2005)
(1:1) KNO ₃ : yeast extract	<i>M. alpina</i> ATCC 32222	8.50	0.53	Jang <i>et al.</i> (2005)
(2:1) KNO ₃ : yeast extract	<i>M. alpina</i> ATCC 32222	7.20	0.83	Jang <i>et al.</i> (2005)
(3:1) KNO ₃ : yeast extract	<i>M. alpina</i> ATCC 32222	6.90	0.73	Jang <i>et al.</i> (2005)
(4.9:1) C:N ratio	<i>M. alpina</i>	12.50	0.10	Koike <i>et al.</i> , (2001)
(5.6:1) C:N ratio	<i>M. alpina</i>	12.00	0.20	Koike <i>et al.</i> , (2001)
(6.7:1) C:N ratio	<i>M. alpina</i>	13.00	0.45	Koike <i>et al.</i> , (2001)
(12:1) C:N ratio	<i>M. alpina</i>	20.00	1.25	Koike <i>et al.</i> , (2001)
(14.9:1) C:N ratio	<i>M. alpina</i>	17.00	1.50	Koike <i>et al.</i> , (2001)
(18.9:1) C:N ratio	<i>M. alpina</i>	16.80	1.20	Koike <i>et al.</i> , (2001)
(20.4:1) C:N ratio	<i>M. alpina</i>	15.00	1.20	Koike <i>et al.</i> , (2001)

5.3 โคแฟกเตอร์ (Cofactor)

โดยทั่วไปการทำงานของเอนไซม์ในสิ่งมีชีวิตจำเป็นต้องอาศัยโคแฟกเตอร์เพื่อทำให้เกิดปฏิกิริยา อีออนของโลหะ เช่น Ca²⁺, Mg²⁺, Fe²⁺ และ Zn²⁺ เป็นโคแฟกเตอร์ที่สำคัญของเอนไซม์ต่างๆ อาทิเช่น adenylate kinase, glucose 6-phosphatase, catalase, และ DNA polymerase (Aggett, 1985; Dedyukhina and Eroshin, 1991; Poole, 1997) ตามลำดับ ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และมีรายงานว่า Ca²⁺ เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ acetyl-CoA carboxylase ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการเปลี่ยน acetyl-CoA เป็น malnoyl-CoA ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดไขมัน (Guchhait *et al.*, 1974) นอกจากนี้มีรายงาน

การศึกษาผลของ Ca^{2+} ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแกมมาไลโนเลนิกของราสายพันธุ์ *M. ramanniana* โดยเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วย CaCl_2 เท่ากับ 5, 50 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า CaCl_2 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 500 มิลลิกรัมต่อลิตรให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 2.20 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ CaCl_2 ที่ความเข้มข้น 5 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตรให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.90 และ 1.80 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ CaCl_2 ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตกรดแกมมาไลโนเลนิกสูงสุดเท่ากับ 0.45 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง รองลงมา คือ 500 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตกรดแกมมาไลโนเลนิกสูงเท่ากับ 0.30 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ (Dyal *et al.*, 2005)

Mg^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์อีกชนิดหนึ่งของเอนไซม์ที่เป็นสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงของจุลินทรีย์ และมีรายงานว่า MgSO_4 มีผลเพิ่มการผลิตกรดแกมมาไลโนเลนิกของราสายพันธุ์ *Cunninghamella* sp. 2A1 เล็กน้อย โดยเลี้ยงรา *Cunninghamella* sp. 2A1 ในอาหารที่เติม $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้น 1.5 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดแกมมาไลโนเลนิกเท่ากับร้อยละ 0.03 ของกรัมเซลล์แห้ง เปรียบเทียบชุดควบคุมที่ไม่เติม $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ในอาหารเพาะเลี้ยง ให้ปริมาณกรดแกมมาไลโนเลนิกเท่ากับร้อยละ 0.02 ของกรัมเซลล์แห้ง (Guchhait *et al.*, 1974; Muhid *et al.*, 2008) แต่รายงานการศึกษาของ Kang และคณะ (2007) พบว่าการเติม MgSO_4 เท่ากับ 15.0 กรัมต่อลิตร ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่าย *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304 มีผลลดการผลิตกรดโดโคซาเฮกซะอีโนอิก ซึ่งมีปริมาณกรดโดโคซาเฮกซะอีโนอิกเท่ากับร้อยละ 41.92 ของกรดไขมันทั้งหมด เมื่อเปรียบเทียบกับกรเลี้ยงสาหร่าย *T. aureum* ATCC 34304 ที่ไม่เติมมีการเติม MgSO_4 ในอาหารเพาะเลี้ยง ให้ผลผลิตกรดโดโคซาเฮกซะอีโนอิกเท่ากับร้อยละ 46.55 ของกรดไขมันทั้งหมด

5.4 อุณหภูมิ (Temperature)

อุณหภูมิเป็นปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการสร้างกรดไขมันภายในเซลล์จุลินทรีย์ โดยพบว่าการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิต่ำจะกระตุ้นให้จุลินทรีย์สร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวหรือกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการเลี้ยงจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันที่อุณหภูมิสูงกว่า ทั้งนี้เพื่อรักษาคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ในการแลกเปลี่ยนสารและกระบวนการทำงานภายในเซลล์ให้ปกติ เนื่องจากกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงเหล่านี้จะไม่แข็งตัวเป็นไขที่อุณหภูมิต่ำ (Wen and Chen, 2003) นอกจากนี้มีรายงานว่าอุณหภูมิส่งผลต่อการละลายของเพิ่มออกซิเจนในอาหารเพาะเลี้ยง โดยที่อุณหภูมิต่ำทำให้เพิ่มออกซิเจนที่ละลายในอาหารเพาะเลี้ยงส่งผลให้การผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงเพิ่มขึ้น เนื่องจากเมื่อออกซิเจนภายในเซลล์มากเพียงพอต่อ

ความต้องการของเอนไซม์ desaturase ซึ่งเป็น oxygen-dependent enzyme ที่ทำให้เกิดพันธะคู่ในสายโซ่คาร์บอนของกรดไขมัน (Brown and Rose, 1969)

Nichols และคณะ (1997) พบว่าเมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *Shewanella gelidimarina* ACAM 456T ที่แยกได้จากทะเล ที่อุณหภูมิ 0.3 องศาเซลเซียส ถึง 10 องศาเซลเซียส จะมีผลทำให้การผลิตกรดโอโคซาเพนตะอีโนอิกภายในเซลล์เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงกว่า และมีรายงานว่าเมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *Shewanella* sp. ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับการเลี้ยงแบคทีเรียเดียวกันที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง เพิ่มขึ้น 2.5 เท่า เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Gentile *et al.*, 2003)

นอกจากนี้ Jiang และ Chen (2000) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิและการเปลี่ยนอุณหภูมิต่อการผลิตกรดโอโคซาเฮกซะอีโนอิกในสาหร่ายทะเล *Cryothecodinium cohnii* พบว่าสาหร่ายชนิดนี้เจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 15-30 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิสูง (30 องศาเซลเซียส) จะให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด แต่ที่อุณหภูมิต่ำ (15 องศาเซลเซียส) จะเพิ่มการสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะมากกว่า โดยเซลล์สาหร่ายผลิตกรดโอโคซาเฮกซะอีโนอิกได้สูงสุด ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ในระยะแรกของ stationary phase นอกจากนี้เมื่อเปลี่ยนอุณหภูมิในการเลี้ยงสาหร่ายจากอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (48 ชั่วโมง) ไปที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส (24 ชั่วโมง) ให้ผลผลิตกรดโอโคซาเฮกซะอีโนอิกเพิ่มขึ้นเท่ากับร้อยละ 19.9 จากชุดควบคุม

5.5 พีเอช (pH)

จุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ดีในพีเอชที่แตกต่างกัน ซึ่งพีเอชเริ่มต้นในอาหารเพาะเลี้ยงส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในจุลินทรีย์มีผลให้การเจริญเติบโตและการสร้างกรดไขมันในเซลล์จุลินทรีย์จึงแตกต่างกันเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีค่าพีเอชต่างกัน (Wen and Chen, 2003; Hwang *et al.*, 2005) สำหรับการเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียว *Phaeodactylum tricorutum* ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีพีเอชตั้งแต่ 6.0 ถึง 8.8 ให้น้ำหนักชีวมวลของสาหร่ายเซลล์เดียวไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่ปริมาณกรดโอโคซาเพนตะอีโนอิกที่เซลล์ผลิตขึ้นแตกต่างกันในแต่ละสภาวะของพีเอช โดยผลิตกรดโอโคซาเพนตะอีโนอิกจะสูงสุดเท่ากับ 72.10 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่พีเอช 7.6 (Yongmanitchai and Ward, 1991) สำหรับการผลิตกรดอะราชิโดนิกจาก *Mortierella alpine* I₄₉-N₁₈ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอชตั้งแต่ 4.0 ถึง 10.0 พบว่าราเจริญเติบโตสูงสุดที่พีเอช 8.0 ให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 30.00 กรัมต่อลิตร และผลิตกรดอะราชิโดนิกได้สูงสุดที่พีเอช 8.5 เท่ากับร้อยละ 70.0 ของกรดไขมันทั้งหมด (Yuan *et al.*, 2002) นอกจากนี้มีรายงานของ นลินี เพชรเทียนชัย (2545) ที่ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตกรดไลโนเลอิกในแบคทีเรียจาก

ทะเลสาบพันธุ์ ON-17 พบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ในพีเอชเริ่มต้นค่อนข้างกว้าง ตั้งแต่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.0 ถึง 10.0 แต่มีการเจริญเติบโตสูงสุดที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.5 โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 2.61 กรัมต่อลิตร ในขณะที่เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 การผลิตกรดไลโนเลอิกสูงสุดเท่ากับร้อยละ 1.77 ของกรดไขมันทั้งหมด

5.6 การให้ออกซิเจน (Aeration)

ออกซิเจนเป็นปัจจัยสำคัญในการผลิตพลังงานในจุลินทรีย์ทุกชนิดที่มีกระบวนการหายใจโดยใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ดังนั้นการเพิ่มออกซิเจนจึงมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต ส่วนการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง จะพบว่าออกซิเจนมีผลต่อการเกิดพันธะคู่ของกรดไขมัน โดยเฉพาะในกระบวนการที่ทำให้เกิดพันธะคู่ในสายโซ่คาร์บอนโดยเอนไซม์ desaturase ซึ่งทำหน้าที่ในการกระบวนการเกิดพันธะคู่ในโมเลกุลของกรดไขมัน เนื่องจากเอนไซม์ชนิดนี้เป็น oxygen-dependent-enzyme ที่ต้องการออกซิเจนในการเกิดทำงาน ดังนั้นปริมาณของออกซิเจนที่ละลายในอาหารเพาะเลี้ยงมีต่อปฏิกิริยาการเติมออกซิเจน (oxygenation) ส่งผลต่อการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในจุลินทรีย์ (Ratledge, 1992)

นลินี เพชรเทียนชัย (2545) ศึกษาผลของความเร็วรอบในการเขย่าต่อการเจริญเติบโตและผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงของแบคทีเรียจากทะเลสาบพันธุ์ ON-17 พบว่าการเจริญเติบโตและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงของแบคทีเรียมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อความเร็วรอบในการเขย่าเพิ่มขึ้น โดยที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที จะทำให้การผลิตกรดไลโนเลอิกสูงสุดเท่ากับร้อยละ 1.31 ของกรดไขมันทั้งหมด ในขณะที่ความเร็วรอบในการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ให้การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ON-17 สูงสุดในรูปน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 2.10 กรัมต่อลิตร

Higashiyama และคณะ (1999) ศึกษาปริมาณของออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงต่อการผลิตกรดอะราชิโดนิกของราสายพันธุ์ *M. alpina* 1S-4 พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณของออกซิเจนที่ละลายในอาหารเพาะเลี้ยงให้อยู่ในช่วง 10-15 ppm ให้ผลผลิตกรดอะราชิโดนิกเท่ากับร้อยละ 18.4 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งเพิ่มขึ้น 1.6 เท่าจากชุดควบคุมที่มีปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเท่ากับ 7 ppm ที่ให้ผลผลิตกรดอะราชิโดนิกเท่ากับร้อยละ 11.5 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเพาะเลี้ยงเป็น 20-30 ppm กลับมีผลผลิตกรดอะราชิโดนิกลดลงเท่ากับร้อยละ 16.7 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

5.7 ความเค็ม (Salinity)

ความเค็มมีผลต่อความดันออสโมติกภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ โดยความเค็มที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ความดันออสโมติกภายในเซลล์เพิ่มขึ้นและมีผลต่อการปรับสภาพของจุลินทรีย์

ดังนั้นจุลินทรีย์จึงปรับสภาพความคงตัวของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane rigidity) โดยการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง ซึ่งขึ้นอยู่กับความดันออสโมติกภายในเซลล์ที่เปลี่ยนแปลง (Singh and Ward, 1997) โดยมีรายงานการศึกษาผลของความเค็มต่อการผลิตกรดคอโคซาเพนตะอีโนอิกและกรดโคโคซาเฮกซะอีโนอิกของสาหร่ายเซลล์เดียว *Pavlova lutheri* พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ NaCl เท่ากับ 35.0 และ 45.0 กรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเซลล์ ตามลำดับ ให้ปริมาณกรดคอโคซาเพนตะอีโนอิกและกรดโคโคซาเฮกซะอีโนอิกเท่ากับ 4.61 และ 2.91 มิลลิกรัมต่อกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ลดลงจากชุดควบคุมที่เลี้ยงเซลล์สาหร่ายในอาหารที่มีความเข้มข้นของ NaCl เท่ากับ 25.0 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดคอโคซาเพนตะอีโนอิกและกรดโคโคซาเฮกซะอีโนอิกเท่ากับ 3.90 และ 2.25 มิลลิกรัมต่อกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อลดความเข้มข้นของ NaCl เท่ากับ 5.0 กรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเซลล์ ทำให้ผลผลิตกรดคอโคซาเพนตะอีโนอิกและกรดโคโคซาเฮกซะอีโนอิกเพิ่มขึ้นเท่ากับ 4.61 และ 2.94 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Carvalho *et al.*, 2006)

Kang และคณะ (2007) ศึกษาความระดับเข้มข้นของเกลือที่มีต่อการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงของสาหร่ายเซลล์เดียว *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304 พบว่าเมื่อเลี้ยงสาหร่ายชนิดดังกล่าวในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้น NaCl เท่ากับ 10.0 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดโคโคซาเฮกซะอีโนอิกเท่ากับร้อยละ 46.65 ของกรดไขมันทั้งหมด ซึ่งเพิ่มขึ้น 1.05 เท่าจากชุดควบคุมที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้น NaCl เท่ากับ 5.0 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ปริมาณกรดโคโคซาเฮกซะอีโนอิกเท่ากับร้อยละ 44.26 ของกรดไขมันทั้งหมด

5.8 อายุของจุลินทรีย์ (Age)

จุลินทรีย์หลายชนิดมีการสะสมไขมันสำหรับใช้เป็นพลังงานเมื่อเซลล์มีอายุมากขึ้น ไขมันเหล่านี้ประกอบไปด้วยกรดไขมันทั้งชนิดอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว การสร้างและสะสมของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในจุลินทรีย์มีลักษณะเป็น sigmoid curve เช่นเดียวกับการเจริญเติบโตของเซลล์โดยมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่งถึงจุดสูงสุดที่ late log phase หรือ early stationary phase หลังจากนั้นจะมีการลดลงอย่างเห็นได้ชัดในช่วง late stationary phase และ death phase (Erwin, 1973) อย่างไรก็ตามในแบคทีเรียบางชนิด เช่น *S. putrefaciens* ACAM342 (Nichols *et al.*, 1994) มีการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในช่วง exponential phase สูงกว่าในช่วง stationary phase นอกจากนี้การผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงของสิ่งมีชีวิตบางชนิด ได้แก่ โปรโตซัวสังเคราะห์แสง *Ochromonas danica* (Gellerman and Schlenk, 1979) สาหร่ายเซลล์เดียว *Phaeodactylum tricorutum* (Yongmanitchai and Ward, 1991) และราใน Genus *Mortierella* บางชนิด (Shimizu *et al.*, 1989a; Shinmen *et al.*, 1989) จะเพิ่มขึ้นตามอายุของเซลล์จุลินทรีย์ (Li *et al.*, 2006)

6. วิธีการออกแบบการทดลองในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

6.1 การทดลองแบบดั้งเดิมหรือแบบทีละปัจจัย (One factor at a time; OFAT)

การทดลองแบบดั้งเดิมเป็นการทดลองที่ศึกษาปัจจัยที่สนใจ (factor) โดยกำหนดให้ปัจจัยอื่นๆ คงที่ และเมื่อได้ค่าผลการทดลองที่ดีที่สุดแล้วจึงเปลี่ยนระดับของปัจจัยที่ศึกษาและเมื่อให้ผลการทดลองที่ดีที่สุดแล้ว จึงเปลี่ยนไปศึกษาปัจจัยตัวที่สอง และทำอย่างนี้ไปเรื่อย ๆ จนครบทุกปัจจัยที่ต้องการศึกษา ซึ่งวิธีการทดลองนี้ใช้กันอย่างแพร่หลายในงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์และวิศวกรรมศาสตร์ เนื่องจากมีข้อดี คือ ขั้นตอนการทดลองไม่ยุ่งยาก แต่อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ก็มีข้อเสีย คือ ไม่สามารถทราบผลของปัจจัยที่มีร่วมกันได้ รวมทั้งใช้เวลานานหากทำการศึกษาหลายปัจจัย นอกจากนี้ผลการทดลองที่ได้จากวิธีการดังกล่าวอาจจะให้ผลการทดลองได้ไม่ดีที่สุด (Giesbrecht and Gumpertz, 2004; Box, 2006)

6.2 การทดลองทางสถิติ (Experimental design)

การทดลองทางสถิติเป็นการทดลองที่ศึกษาปัจจัยที่สนใจ โดยใช้ความรู้ทางคณิตศาสตร์มาประยุกต์ เพื่อให้ได้การทดลองที่มีความครอบคลุม รวมทั้งลดระยะเวลาและทรัพยากรในการทดลอง ตัวอย่าง เช่น การทดลองแบบแฟคทอเรียล (factorial) เป็นการทดลองที่ศึกษาปัจจัยและระดับของปัจจัยที่ต้องการศึกษาได้ในเวลาเดียวกัน นอกจากนี้ยังทราบผลของปัจจัยที่มีผลร่วมกัน (interaction) (Box *et al.*, 2005) แต่การทดลองแบบแฟคทอเรียลจะมีชุดการทดลองเป็นจำนวนมากหากมีระดับของปัจจัยที่ต้องการศึกษาหลายระดับ ดังนั้นจึงนิยมทำการทดลองเพียงสองระดับเท่านั้น

6.2.1 การคัดเลือกปัจจัย และวางแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman

การวางแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman เป็นการทดลองเพื่อคัดเลือกปัจจัยที่มีความสำคัญหรือมีอิทธิพลต่อการทดลองที่จะศึกษา แต่ไม่ทราบปัจจัยที่มีผลร่วมกัน (interaction) ในการทดลอง โดยศึกษาปัจจัยละ 2 ระดับ คือ ระดับต่ำ (low, -) และระดับสูง (high, +) นอกจากนี้จำนวนการทดลอง (run) จะมีค่ามากกว่าจำนวนปัจจัยที่ต้องการศึกษาอย่างน้อยอยู่ 1 เสมอ หรือ $k+1$ ซึ่งกำหนดให้เป็นจำนวน 4 เท่าของเลขอนุกรม เช่น 4, 8, 12, 16, 20, ..., เป็นต้น และจำนวนปัจจัยที่ต้องการศึกษาจะมีตัวแปรคัมมือน้อย 2 เสมอ เพื่อสามารถคำนวณค่าความแปรปรวนจากผลการทดลองและค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากสมการได้ ดังนั้นเมื่อมีจำนวนปัจจัยเท่ากับ 11 ปัจจัย จะมีจำนวนการทดลองเท่ากับ 12 การทดลอง ดังแสดงใน Table 6 อย่างไรก็ตามหากจำนวนปัจจัยที่ต้องการศึกษามีเพียง 9 ปัจจัย ต้องกำหนดจำนวนการทดลองเท่ากับ 12 การทดลองเช่นกัน นอกจากนี้ตารางแผนการทดลอง (design matrix) แบบ Plackett-Burman ได้กำหนดรหัส

(code) ซึ่งเป็นระดับต่ำ (-) และระดับสูง (+) ในแถวแรกของตาราง ดังแสดงใน Table 6 โดยแถวถัดไปเริ่มต้นด้วยรหัสตัวสุดท้ายของแถวก่อนหน้าและต่อด้วยรหัสในตำแหน่งแรกของแถวก่อนหน้า ทำเช่นนี้ไปจนครบทุกการทดลอง โดยกำหนดรหัสของการทดลองสุดท้ายให้ทุกปัจจัยที่ศึกษาอยู่ในระดับต่ำ ดังแสดงใน Table 7 สำหรับการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman design จำนวนความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value) โดยวิเคราะห์ด้วย t -test ซึ่ง t -test เป็นค่าสถิติที่ทดสอบเพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) และสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) นอกจากนี้การเลือกใช้ค่าสถิติ t ทดสอบเพื่อช่วยให้ผลการวิจัยมีความถูกต้อง น่าเชื่อถือ ข้อมูลต้องลักษณะเชิงปริมาณและข้อมูลต้องมีการแจกแจงปกติ (Hogg and Craig, 1978)

Table 6. Initial block for Plackett–Burman designs.

Run	Initial block
8	+ + + - + - -
12	+ + - + + + - - - + -
16	+ + + + - + - + + - - - -
20	+ + - - + + + + - + - + - - - + + -
24	+ + + + + - + - + + - - + + - - + - + - - - -

Source: Plackett and Burman (1946)

คำนวณผลของแต่ละตัวแปร ($E_{(xi)}$) ความแปรปรวน (V_{eff}) ค่าความคลาดเคลื่อน (SE) และ (t_{xi}) รวมทั้งความมีนัยสำคัญ (p -value) โดยใช้การวิเคราะห์แบบ t -test

$$\text{ผลของแต่ละตัวแปรคำนวณได้จากสมการ } E_{(xi)} = 2 \left(\frac{\sum M_{i+} - M_{i-}}{N} \right)$$

$E_{(xi)}$ คือ ผลของตัวแปรที่ทำการทดสอบ

M_{i+} คือ ผลการทดลองที่ได้ เมื่อทดสอบตัวแปรนั้นในระดับสูง

M_{i-} คือ ผลการทดลองที่ได้ เมื่อทดสอบตัวแปรนั้นในระดับต่ำ

N คือ จำนวนการทดลองทั้งหมด

$$\text{ความแปรปรวนคำนวณได้จากสมการ } V_{\text{eff}} = \frac{\sum (E_d)^2}{n}$$

V_{eff} คือ ความแปรปรวน

E_d คือ ผลการทดลองที่ได้จากตัวแปรคัมมี

n คือ จำนวนตัวแปรคัมมี

ความคลาดเคลื่อนคำนวณได้จากสมการ $SE = \sqrt{V_{eff}}$

ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p -value) ของแต่ละตัวแปรที่ทำการทดลองคำนวณได้จากสมการ $t_{(xi)} = \frac{E_{(xi)}}{SE}$, (at n degree of freedom, Df)

จากผลการคำนวณความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของแต่ละตัวแปรโดยสมการข้างต้นสามารถคัดเลือกตัวแปรที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value) โดยเปิดตารางแจกแจง t ซึ่งกำหนดค่าองศาอิสระ (degree of freedom) เท่ากับจำนวนตัวแปรคัมมี โดยกำหนดค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Chi *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2007) ดังนั้นหากค่า t จากการคำนวณมากกว่าค่า t จากตาราง แสดงว่าปัจจัยดังกล่าวมีอิทธิพลหรือมีความสำคัญต่อการทดลองที่ศึกษาที่ระดับความเชื่อมั่น (confidence level) มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 95 อย่างไรก็ตามระดับความเชื่อมั่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman design ต้องมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 80 จึงยอมรับหรือเชื่อมั่นว่าปัจจัยหรือตัวแปรดังกล่าวมีอิทธิพลต่อการทดลอง (Lee *et al.*, 1999)

Table 7. Plackett–Burman design for 12 runs and up to 11 two-level factors.

Run	Factors										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
2	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
3	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
4	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
5	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
6	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+
7	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+
8	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+
9	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-
10	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+
11	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Source: Plackett and Burman (1946)

สำหรับการประยุกต์ในงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ มีรายงานที่ประสบความสำเร็จในการคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดไขมันอิ่มตัวสูงด้วยวิธี Plackett-Burman design จากการศึกษาครั้งนี้

Wen และ Chen (2001) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดไอโคซาเพนตะอีโนอิกของไคอะตอม *Nitzschia laevis* ด้วยวิธี Plackett-Burman design โดยมีปัจจัยที่ต้องการศึกษาทั้งหมด 13 ปัจจัย พบว่า NaCl, CaCl₂, trace element ฟือซเรียมต้นและอุณหภูมิ เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของไคอะตอม *N. laevis* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 99.7, 91.7, 94.4, 90.5 และ 99.9 ตามลำดับ นอกจากนี้ NaCl, trace element และอุณหภูมิ ยังเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดไอโคซาเพนตะอีโนอิกของไคอะตอม *N. laevis* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 99.4, 90.1 และ 99.9 ตามลำดับ

Chi และคณะ (2007) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดโคโคซาเฮกซะอีโนอิกของสาหร่ายเซลล์เดี่ยว *Schizochytrium limacinum* ด้วยวิธี Plackett-Burman design จากการทดลองมีปัจจัยที่ต้องการศึกษาทั้งหมด 15 ปัจจัย ซึ่งแบ่งเป็นปัจจัยทางเคมีและกายภาพ พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่าย *S. limacinum* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับหรือมากกว่าร้อยละ 90 คือ NH₄Cl, CH₃COONH₄, trace element และอุณหภูมิ นอกจากนี้ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดโคโคซาเฮกซะอีโนอิกของสาหร่าย *S. limacinum* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับมากกว่าร้อยละ 90 คือ CH₃COONH₄, trace element และอุณหภูมิ

Song และคณะ (2007) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดโคโคซาเฮกซะอีโนอิกของสาหร่ายเซลล์เดี่ยว *Schizochytrium limacinum* OUC88 ด้วยวิธี Plackett-Burman design โดยมีปัจจัยที่ต้องการศึกษาทั้งหมด 10 ปัจจัย พบว่าปัจจัยทางกายภาพทั้งหมด ได้แก่ อุณหภูมิ อัตราการให้อากาศ ความเร็วรอบในการเขย่าและอายุของเซลล์ เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่าย *S. limacinum* OUC88 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 98.1, 97.6, 96.7 และ 95.2 ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าอุณหภูมิ อัตราการให้อากาศและความเร็วรอบในการเขย่า ยังเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดโคโคซาเฮกซะอีโนอิกของสาหร่ายเซลล์เดี่ยว *S. limacinum* OUC88 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 96.9, 95.5 และ 96.6 ตามลำดับ

6.2.2 การศึกษาสถานะที่เหมาะสมด้วยวิธีพื้นผิวผลตอบสนอง (Response surface methodology, RSM)

วิธีการพื้นผิวผลตอบสนอง (Response surface methodology, RSM) เป็นการทดลองเพื่อหาสถานะที่เหมาะสมที่สุดของผลตอบสนอง ซึ่งเป็นกระบวนการที่ใช้ความรู้ทางคณิตศาสตร์และสถิติในการวางแผนการทดลอง และมีการประยุกต์ใช้ RSM อย่างกว้างขวางในงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์และด้านอุตสาหกรรม (Khuri and Cornell, 1987) นอกจากนี้วิธี RSM มีแผนการทดลองที่นิยมใช้อยู่ 2 แผนการทดลอง คือ

1. แผนการทดลองแบบบ็อกซ์-วิลสัน (Box–Wilson Experimental Design)
2. แผนการทดลองแบบบ็อกซ์-เบ็นเกน (Box–Behnken Design)

ซึ่งในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะแผนการทดลองแบบ บ็อกซ์-วิลสัน เนื่องจากการทดลองดังกล่าวมีการใช้อย่างแพร่หลายในงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ และสามารถแก้ปัญหาของการออกแบบ 3^n factorial designs ในการศึกษาปัจจัยที่มากกว่า 2 ตัวแปรเชิงปริมาณ และให้ผลการทดลองที่ครอบคลุมการกว่าแผนการทดลองแบบบ็อกซ์-เบ็นเกน ซึ่งต้องทำการทดลองค่อนข้างมากในการออกแบบ 3^n factorial designs (ไพโรจน์ วิริยจารี, 2544) ดังนั้นเพื่อจะลดจำนวนสิ่งทดลอง Box and Wilson (1951) คิดค้นการแผนการทดลองประกอบศูนย์กลาง (Central Composite Design, CCD) ซึ่งพัฒนาจากแผนการทดลองแบบแฟกเทอเรียลที่มีระดับของปัจจัย 2 ระดับ (2^n factorial design) อย่างไรก็ตามแผนการทดลองแบบ CCD จึงเพิ่มระดับการทดลองแฟกเทอเรียล ที่จุดศูนย์กลาง (center) และแนวแกน (axial) โดยแบ่งเป็น 5 ระดับ คือ ระดับต่ำสุด ($-\alpha$) ต่ำ (-1) กลาง (0) สูง (+1) และระดับสูงสุด ($+\alpha$) (Cochran and Cox, 1957) เพื่อสามารถสร้างรูปแบบความสัมพันธ์ที่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นโค้งหรือตัวแบบความสัมพันธ์อันดับสองได้ และในการวางแผนการทดลอง CCD มีจำนวนการทดลองเท่ากับ $2^n + (2n+6)$ สำหรับการทดลองที่มีปัจจัยหรือตัวแปรต้น 4 ตัวแปร ดังแสดงใน Table 8 มีจำนวนการทดลองทั้งสิ้น 30 การทดลอง เปรียบเทียบกับ 3^n factorial designs มีจำนวนการทดลองทั้งหมด 81 การทดลอง สำหรับรหัสของปัจจัยหรือตัวแปรอิสระในการวางแผนการทดลองสามารถคำนวณจากสมการ

$$x_i = (X_i - X_{cp}) / \Delta X_i$$

x_i คือ รหัสที่ใช้ในการวางแผนการทดลองแบบ CCD

X_i คือ ค่าจริงของระดับปัจจัยในการทดลอง

X_{cp} คือ ค่าจริงของระดับกลางของปัจจัยในการทดลอง

ΔX_i คือ ผลต่างของระดับปัจจัย

Table 8. The Central Composite Design of independent variables.

Run	Independent variables			
	A	B	C	D
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1
15	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1
17	-2	0	0	0
18	+2	0	0	0
19	0	-2	0	0
20	0	+2	0	0
21	0	0	-2	0
22	0	0	+2	0
23	0	0	0	-2
24	0	0	0	+2
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0
28	0	0	0	0
29	0	0	0	0
30	0	0	0	0

Source: Song *et al.*, (2007)

นอกจากนี้วิธีการนี้ให้ความสำคัญกับความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต้นกับผลตอบสนอง ความสัมพันธ์ดังกล่าวแสดงเป็นสมการพหุนามกำลังสอง (Myers, 1995) ดังแสดงในสมการ คือ

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_i \chi_i + \sum_{i=1}^4 \beta_{ii} \chi_i^2 + \sum_{i,j=1}^4 \beta_{ij} \chi_i \chi_j$$

โดย β_0 คือ ค่าคงที่

β_i คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นตรงโดย i คือ ลำดับของตัวแปร

β_{ii} คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นโค้งโดย i คือ ลำดับของตัวแปร

β_{ij} คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยที่มีผลร่วมกันโดย i และ j คือ ลำดับของตัวแปร

จากสมการข้างต้นสามารถเขียนสมการใหม่ได้โดยให้ Y_i แทนค่าตัวแปรการตอบสนอง Y และ X_{1i} แทน X_1 และ X_{2i} แทน X_2 และ X_{ni} แทน X_n ดังนั้นจะได้สมการดังนี้

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 \chi_{1i} + \dots + \beta_n \chi_{ni} + \beta_{11} \chi_{1i}^2 + \dots + \beta_{nn} \chi_{ni}^2 + \beta_{12} \chi_{1i} \chi_{2i} + \dots + \beta_{n-1,n} \chi_{n-1i} \chi_{ni}$$

$$= 1, 2, \dots, n$$

หากค่า b_p , b_{ii} และ b_{ij} ใช้ประมาณค่า β , β_{ii} และ β_{ij} แทนค่าในสมการข้างต้นจะได้สมการใหม่เป็น

$$Y_i = b_0 + b_1 \chi_{1i} + \dots + b_n \chi_{ni} + b_{11} \chi_{1i}^2 + \dots + b_{nn} \chi_{ni}^2 + b_{12} \chi_{1i} \chi_{2i} + \dots + b_{n-1,n} \chi_{n-1i} \chi_{ni}$$

การประมาณค่า b_p , b_{ii} และ b_{ij} จากสมการปกติเพื่อหาค่าประมาณกำลังสองโดยพิจารณาดังนี้

$$Y = \begin{pmatrix} Y_1 \\ Y_n \\ Y_{nn} \\ Y_n \end{pmatrix} \quad b = \begin{pmatrix} b_1 \\ b_n \\ b_{nn} \\ b_{n-1,n} \end{pmatrix}$$

Y คือ เวกเตอร์ผลตอบสนองจากตัวแปรหรือปัจจัยที่ทำการทดลอง

b คือ เวกเตอร์สัมประสิทธิ์ของตัวแปร

$$X = \begin{pmatrix} 1 & X_{11} \dots X_{n1} & X_{11}^2 \dots X_{n1}^2 & X_{11} X_{21} \dots X_{n-1,1} X_{n1} \\ 1 & X_{12} \dots X_{n2} & X_{12}^2 \dots X_{n2}^2 & X_{12} X_{22} \dots X_{n-1,2} X_{n2} \\ \cdot & & & \\ \cdot & & & \\ 1 & X_{1N} \dots X_{nN} & X_{1N}^2 \dots X_{nN}^2 & X_{1N} X_{2N} \dots X_{n-1,N} X_{nN} \end{pmatrix}$$

$$X' = \begin{pmatrix} 1 & 1 & \dots & 1 \\ X_{11} \dots X_{n1} & X_{12} \dots X_{n2} & & X_{1N} \dots X_{nN} \\ X_{11}^2 \dots X_{n1}^2 & X_{12}^2 \dots X_{n2}^2 & & X_{1N}^2 \dots X_{nN}^2 \\ \cdot & & & \\ \cdot & & & \\ X_{11}X_{21} \dots X_{n-1,1}X_{n1} & X_{12}X_{22} \dots X_{n-1,2}X_{n2} & & X_{1N}X_{2N} \dots X_{1,N}X_{nN} \dots X_{nN} \end{pmatrix}$$

X คือ เมทริกซ์ของตัวแปรหรือปัจจัยที่ทำการทดลอง

X' คือ แอดจอยด์เมทริกซ์ (adjoint matrix) เป็นเมทริกซ์สลับเปลี่ยนของเมทริกซ์ X ซึ่งมีสมาชิกเป็นสมาชิกในเมทริกซ์ X

ค่า X ในเมทริกซ์ของ N แถว โดยแถวที่ i ของเมทริกซ์ X จะเกี่ยวข้องกับจุดออกแบบที่ i และค่า 1 ในเมทริกซ์ X เป็นจุดออกแบบของค่าสัมประสิทธิ์คงที่ (β_0) และเมทริกซ์ X' เป็นเมทริกซ์ที่นำค่าแถวที่ i ของเมทริกซ์ X มาเป็นค่าในคอลัมน์ที่ j ของเมทริกซ์ X'

สำหรับการออกแบบแผนการทดลองแบบ CCD ต้องทำการออกแบบเมทริกซ์ X สำหรับสร้างสมการให้สอดคล้องกับข้อมูลในลำดับที่สอง ขั้นตอนแรกให้กำหนดค่า α เป็นระดับสูงสุดและต่ำสุด สามารถคำนวณได้จากสมการ $\alpha = n_0^{1/4}$

α คือ ระดับสูงสุดและต่ำสุดในการออกแบบแผนการทดลองแบบ CCD

n_0 คือ จุดการออกแบบแฟกทอเรียล (2^n factorial; $n_0 = \frac{1}{2} 2^n$)

n คือ จำนวนปัจจัยหรือตัวแปรที่ศึกษา

และขั้นตอนต่อมาให้เขียนเมทริกซ์การวางแผนการทดลองแบบ CCD โดยสามารถออกแบบเมทริกซ์ในลักษณะเชิงตั้งฉาก (orthogonal) เพื่อสร้างสมการลำดับที่สองให้สอดคล้องกับข้อมูล นอกจากนี้คือคอลลัมน์ผลในเชิงเส้นโค้ง (quadratic effects) สามารถคำนวณได้จากการนำค่าในแต่ละคอลลัมน์ลบด้วยค่าเฉลี่ย (C) ทำให้ได้เมทริกซ์ X ดังแสดงใน Table 9 นอกจากนี้เมทริกซ์ $X'X$ เป็นเมทริกซ์ที่ใช้เครื่องหมายในแถวที่ i และคอลลัมน์ที่ j ของเมทริกซ์ X คูณกับแถวที่ i ของเมทริกซ์ X' ได้ ซึ่งเป็นผลรวมของ $X'X = X_1 X_1' + X_2 X_2' + \dots + X_n X_n'$

สำหรับค่า C สามารถคำนวณได้จากสมการ
$$C = \frac{\sum_{i=1}^N X_i^2}{N}$$

C คือ ค่าเฉลี่ยของระดับตัวแปรเพื่อใช้ในการสร้างเมทริกซ์ของผลเชิงเส้นโค้ง

X_i คือ ระดับของตัวแปรที่ออกแบบ

N คือ จำนวนการทดลองของแต่ละตัวแปร

Table 9. A matrix X for a Central Composite Design experiment involving three factors.

	Independent variables									
	β_0	x_1	x_2	x_3	x_1^2-C	x_2^2-C	x_3^2-C	x_1x_2	x_1x_3	x_2x_3
	+1	-1	-1	-1	1-C	1-C	1-C	+1	+1	+1
	+1	+1	+1	-1	1-C	1-C	1-C	+1	-1	-1
	+1	+1	-1	+1	1-C	1-C	1-C	-1	+1	-1
	+1	-1	+1	+1	1-C	1-C	1-C	-1	-1	+1
	+1	0	0	0	0-C	0-C	0-C	0	0	0
	+1	0	0	0	0-C	0-C	0-C	0	0	0
	+1	+1	-1	-1	1-C	1-C	1-C	-1	-1	+1
	+1	-1	+1	-1	1-C	1-C	1-C	-1	+1	-1
	+1	-1	-1	+1	1-C	1-C	1-C	+1	-1	-1
X =	+1	+1	+1	+1	1-C	1-C	1-C	+1	+1	+1
	+1	0	0	0	0-C	0-C	0-C	0	0	0
	+1	0	0	0	0-C	0-C	0-C	0	0	0
	+1	-1.63	0	0	$(-1.63)^2-C$	0-C	0-C	0	0	0
	+1	+1.63	0	0	$(+1.63)^2-C$	0-C	0-C	0	0	0
	+1	0	-1.63	0	0-C	$(-1.63)^2-C$	0-C	0	0	0
	+1	0	+1.63	0	0-C	$(+1.63)^2-C$	0-C	0	0	0
	+1	0	0	-1.63	0-C	0-C	$(-1.63)^2-C$	0	0	0
	+1	0	0	+1.63	0-C	0-C	$(+1.63)^2-C$	0	0	0
	+1	0	0	0	0-C	0-C	0-C	0	0	0
	+1	0	0	0	0-C	0-C	0-C	0	0	0

Source: ไพโรจน์ วิจารณ์ (2544)

คำนวณการประมาณค่าสัมประสิทธิ์ได้จากสมการ $b = X'Y (X'X)^{-1}$

b คือ เวกเตอร์ของค่าสัมประสิทธิ์ของสมการ

X คือ เมตริกของตัวแปรหรือปัจจัยที่ศึกษา

X' คือ เมตริกซ์สลับเปลี่ยนของเมตริก X

Y คือ เมตริกของค่าตอบสนองที่ได้จากการทดลอง

คำนวณผลความคลาดเคลื่อนผลรวมของกำลังสอง (Sum square) ความเบี่ยงเบนความคลาดเคลื่อนของผลรวมกำลังสอง (Mean square) และความมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value) โดยใช้ ANOVA

ผลรวมกำลังสองทั้งหมดคำนวณได้จากสมการ (Sum Square total, SS_{to})

$$SS_{to} = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{N}, (Df = N-1)$$

y_i คือ ผลการตอบสนองที่ได้แต่ละชุดจากทดลอง

N คือ จำนวนการทดลองทั้งหมด

ผลรวมกำลังสองของเชิงเส้นตรง (Sum square regression linear, SS_{rl}) เชิงเส้นโค้ง (Sum square regression quadratic, SS_{rq}) และผลรวมกัน (Sum square regression interaction, SS_{ri}) ของรูปแบบความสัมพันธ์ลำดับที่สอง คำนวณได้ดังนี้

$$SS_{rl} = \sum_{i=1}^n b_i g_i \quad (Df = n)$$

b_i คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นตรง โดย i คือ ลำดับของตัวแปร

g คือ ผลรวมของค่าตอบสนองคูณกับเมตริก X' ในเทอมของเชิงเส้นตรง โดย i คือ ลำดับของตัวแปร

n คือ จำนวนปัจจัย

$$SS_{rq} = \sum_{i=1}^n b_{ii} g_i^2 \quad (Df = n)$$

b_{ii} คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นโค้ง โดย i คือ ลำดับของตัวแปร

g_i คือ ผลรวมของค่าตอบสนองคูณกับเมตริก X' ในเทอมของเชิงเส้นโค้ง โดย i คือ ลำดับของตัวแปร

n คือ จำนวนปัจจัยหรือตัวแปรในการศึกษา

$$SS_{ri} = \sum_{i,j=1}^n b_{ij} g_i g_j \quad (Df = m \frac{(m-1)}{2})$$

b_{ij} คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยที่มีผลรวมกันโค้ง โดย i และ j คือ ลำดับของตัวแปร

$g_i g_j$ คือ ผลรวมของค่าตอบสนองคูณกับเมตริก X' ในเทอมที่มีผลรวมกัน โดย i และ j คือ ลำดับของตัวแปร

m คือ จำนวนตัวแปรที่มีผลรวมกัน

ผลรวมกำลังสองของรูปแบบสมการถดถอย (Sum Square regression, SSR)

คำนวณได้จาก $SSr = SSrl + SSrq + SSri$ ($Df = n \frac{(n+3)}{2}$)

ผลรวมความคลาดเคลื่อนกำลังสองของการทดลอง (Sum Square error, SSE)

คำนวณได้จาก $SSE = SSto - SSr$ ($Df = N - n \frac{(n+3)}{2}$)

คำนวณความเบี่ยงเบนกำลังสองของรูปแบบสมการถดถอย (Mean square regression, MSr) คำนวณได้จาก $MSr = \frac{SSr}{Df_{ssr}}$

SSr คือ ผลรวมกำลังสองของรูปแบบสมการถดถอย

Df_{ssr} คือ องศาอิสระของผลรวมกำลังสองของรูปแบบสมการถดถอย

คำนวณความเบี่ยงเบนของความคลาดเคลื่อนกำลังสอง (Mean square error, MSE)

คำนวณได้จาก $MSE = \frac{SSE}{Df_{sse}}$

SSE คือ ความคลาดเคลื่อนกำลังสองของการทดลอง

Df_{sse} คือ องศาอิสระของผลรวมกำลังสองของความคลาดเคลื่อนกำลังสองในการทดลอง

ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (*p*-value) ของสมการพหุนามกำลังสองหรือรูปแบบสมการถดถอยคำนวณได้จากสมการ

$$F = \frac{MSr}{MSE}$$

จากผลการคำนวณความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของสมการพหุนามกำลังสองโดยสมการข้างต้นสามารถคำนวณค่า *F*-value เพื่อหาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*p*-value) โดยเทียบค่าที่ได้จากการคำนวณโดยสมการกับค่าที่ได้จากการตารางแจกแจง *F* ซึ่งกำหนดค่าองศาความอิสระ (degree of freedom) เท่ากับจำนวนองศาอิสระของผลรวมกำลังสองของรูปแบบสมการถดถอย (Df_1) และจำนวนองศาอิสระของผลรวมกำลังสองของความคลาดเคลื่อนกำลังสอง (Df_2) (ไพโรจน์ วิริยจารี, 2544) โดยกำหนดค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังนั้นหากค่า *F*-value ที่ได้จากการคำนวณมากกว่าค่า *F*-value จากตาราง *F* แสดงว่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าตอบสนอง (*Y*) และปัจจัยหรือตัวแปรที่ศึกษาสามารถอธิบายด้วยความสัมพันธ์ลำดับที่สอง (quadratic model)

สำหรับการประยุกต์ในงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ พบรายงานที่ประสบความสำเร็จจากการศึกษาระดับที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดไขมันอิ่มตัวสูงด้วยวิธี RSM และวางแผนการทดลองแบบ CCD หลายการศึกษาดังนี้

Wen และ Chen (2001) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดโอโคซาเพนตะอีนอกจากไดอะตอม *N. laevis* วางแผนการทดลองแบบ CCD โดยกำหนดตัวแปรอิสระ คือ ความเข้มข้นของ NaCl ในช่วง 8.0-24.0 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ CaCl_2 ในช่วง 0.10-0.31 กรัมต่อลิตร พีเอช 6.5-8.5 และอุณหภูมิ 16.0-28.0 องศาเซลเซียส พบว่าสภาวะที่เหมาะสมให้การเจริญเติบโตสูงสุดของไดอะตอม *N. laevis* คือ NaCl ที่ความเข้มข้น 8.0 กรัมต่อลิตร CaCl_2 ที่ความเข้มข้น 0.10 กรัมต่อลิตร พีเอช 8.5 และอุณหภูมิ 19.8 องศาเซลเซียส ให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 9.0 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดโอโคซาเพนตะอีนอกคือ NaCl ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 14 กรัมต่อลิตร CaCl_2 ที่ความเข้มข้น 0.10 กรัมต่อลิตร พีเอช 8.5 และอุณหภูมิ 18.0 องศาเซลเซียส ซึ่งมีปริมาณกรดโอโคซาเพนตะอีนอกเท่ากับ 280 มิลลิกรัมต่อลิตร

Chi และคณะ (2007) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและการผลิตกรดโอโคซาเพนตะอีนอกจากสาหร่ายเซลล์เดียวสายพันธุ์ *Schizochytrium limacinum* โดยวางแผนการทดลองแบบ CCD และกำหนดตัวแปรอิสระที่ศึกษา 4 ตัวแปร คือ ความเข้มข้นของ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 0.2-1.0 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้น NH_4Cl 0.005-0.049 กรัมต่อลิตร ปริมาตรของไอออนโลหะหนัก 10.0-30.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และอุณหภูมิ 14.0-26.0 องศาเซลเซียส พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและการผลิตกรดโอโคซาเพนตะอีนอกของสาหร่ายเซลล์เดียวสายพันธุ์ *S. limacinum* คือ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ที่ความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร NH_4Cl ที่เข้มข้น 0.04 กรัมต่อลิตร ปริมาตรของไอออนโลหะหนัก 30.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และอุณหภูมิ 19.2 องศาเซลเซียส ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 22.0 กรัมต่อลิตร และปริมาณกรดโอโคซาเพนตะอีนอกเท่ากับ 4.91 กรัมต่อลิตร

Song และคณะ (2007) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและการผลิตกรดโอโคซาเพนตะอีนอกจากสาหร่ายเซลล์เดียวสายพันธุ์ *S. limacinum* OUC88 โดยวางแผนการทดลองแบบ CCD และกำหนดตัวแปรอิสระที่ศึกษา 4 ตัวแปร คือ ความเร็วรอบในการเขย่า 150-250 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.02-1.48 ลิตรต่อนาทีต่อลิตร อุณหภูมิ 23.0-26.0 องศาเซลเซียส และอายุของกล้าเชื้อเริ่มต้นในช่วงกลางของระยะ exponential จนถึงระยะ stationary พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดโอโคซาเพนตะอีนอกจากเซลล์สาหร่ายสายพันธุ์ *S. limacinum* OU88 คือ ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.48 ลิตรต่อนาทีต่อลิตร อุณหภูมิ 23.0 องศาเซลเซียส และอายุของกล้าเชื้อเริ่มต้นในช่วงกลางของระยะ exponential ให้น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณกรดโอโคซาเพนตะอีนอกเท่ากับ 24.10 และ 4.70 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Jin และคณะ (2009) ศึกษาที่เหมาะสมในการผลิตกรดอะราชีโดนิกจากราสาหร่ายพันธุ์ *M. alpina* ME-1 ด้วยวิธี RSM โดยวางแผนการทดลองแบบ CCD และกำหนดตัวแปรอิสระที่

ศึกษา 4 ตัวแปร คือ ความเข้มข้นของ KNO_3 1.0-3.0 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของเอทานอล 20.0-60.0 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 10.0-25.0 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 2-6 วัน พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดอะราซิโคนิก คือ KNO_3 ที่ความเข้มข้น 2.62 กรัมต่อลิตร เอทานอลที่ความเข้มข้น 42.44 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 13.7 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 5.6 วัน ซึ่งได้ปริมาณกรดอะราซิโคนิกเท่ากับ 19.20 กรัมต่อลิตร

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียไกลดิงจากทะเลที่ผลิตกรดอะราซิโคนิก
2. เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราซิโคนิก โดยแบคทีเรียไกลดิงจากทะเลที่คัดเลือกได้
3. เพื่อศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราซิโคนิก โดยแบคทีเรียไกลดิงจากทะเลที่คัดเลือกได้

ขอบเขตงานวิจัย

คัดเลือกแบคทีเรียไกลดิงที่มีคุณสมบัติในการสร้างกรดอะราซิโคนิกจากทะเลของประเทศไทย เพื่อนำแบคทีเรียไกลดิงสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้มาศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราซิโคนิก และหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราซิโคนิก

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุและอุปกรณ์

1. จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา คือ แบคทีเรียไกลดิงจากทะเล จำนวน 85 ไอโซเลต

2. อาหารเพาะเลี้ยง

2.1 อาหารที่ใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียไกลดิงที่ผลิตกรดอะราชิไดนิค

อาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียไกลดิงจากทะเลที่ผลิตกรดอะราชิไดนิค คือ อาหารเหลวสูตร SAP2 (ภาคผนวก ก)

2.2. อาหารที่ใช้ในการทดลอง

อาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการศึกษาผลของระยะเวลาในการเจริญเติบโตและการผลิตของกรดอะราชิไดนิคจากทะเลที่คัดเลือกได้ คือ อาหารเหลวสูตร modified SAP2 (ภาคผนวก ก)

3. สารเคมี

- Conc. H₂SO₄ (LAB-SCAN, IRELAND)
- Ethanol (LAB-SCAN, IRELAND)
- Heptane (LAB-SCAN, IRELAND)
- Methanol (LAB-SCAN, IRELAND)
- Methyl arachidonate (NU-CHECK PREP, USA)
- ทริปโตเนน (Tryptone) (DIFCO, USA)
- ยีสต์สกัด (Yeast Extract) (HIMEDIA, INDIA)
- กลูโคส (Glucose) (COMMERCIAL GRADE)
- ซูโครส (Sucrose) (COMMERCIAL GRADE)
- ฟรุคโตส (Fructose) (LAB-SCAN, IRELAND)
- Agar (COMMERCIAL GRADE)
- NaCl (LAB-SCAN, IRELAND)
- KCl (UNIVAR, NEW ZEALAND)

- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (UNIVAR, NEW ZEALAND)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (UNIVAR, NEW ZEALAND)
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (UNIVAR, NEW ZEALAND)
- KNO_3 (UNIVAR, NEW ZEALAND)
- NH_4NO_3 (UNIVAR, NEW ZEALAND)

4. อุปกรณ์

- เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (shaker incubation) รุ่น VS-8480SRN บริษัท Vision-Scientific
- เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (shaker incubation) รุ่น KMC-8480SR-L บริษัท LMS
- เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (shaker incubation) รุ่น Innova-4230 บริษัท New Brunswick
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท Tomy Seiko
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) รุ่น 527044 บริษัท Hotpack
- เครื่องหมุนเหวี่ยงแยกควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น WS-Epp-5403 บริษัท Eppendorf AG
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Genesys-10UV บริษัท Thermo Electron Corporation
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-เบส (pH meter) รุ่น W350 บริษัท Memmert
- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (analytical weighing balance) รุ่น BP 210 บริษัท Sartorius
- เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (precision weighing balance) รุ่น HF-1200 บริษัท A&D
- เครื่อง Gas Chromatography Flame Ionization Detector (GC-FID) รุ่น HP-6890 บริษัท Agilent Technology
- คอลัมน์ polyethylene glycol รุ่น HP-INNOWax ขนาด $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.25 \mu\text{m}$ บริษัท Agilent Technology
- อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ เช่น งานเพาะเชื้อและหลอดทดลอง เป็นต้น

วิธีการวิเคราะห์

1. วิธีการเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง

1.1 การเตรียมกรดอะราชิโดนิคมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ข)

1.2 การเตรียมอนุพันธ์ของกรดไขมันในรูปของเมทิลเอสเทอร์ (Fatty Acid Methyl Esters, FAMES) พร้อมการสกัด

ชั่งน้ำหนักเซลล์แบคทีเรียแห้งที่ได้จากทดลอง 0.01 กรัม ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร เติม 2.5% H_2SO_4 ที่ละลายใน MeOH ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เป่าด้วยแก๊สไนโตรเจนเพื่อไล่อากาศในหลอด ปิดฝาให้สนิท นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ิฟิเคชันได้กรดไขมันในรูปอนุพันธ์ของเมทิลเอสเทอร์ (Fatty Acid Methyl Esters; FAMES) แล้วนำตัวอย่างออกมาตั้งทิ้งไว้จนมีอุณหภูมิของตัวอย่างเท่ากับอุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างผสมให้เข้ากัน โดยเขย่าหลอดทดลอง 5 ครั้ง สกัดกรดไขมันที่อยู่ในรูปอนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ด้วยตัวทำละลายเฮปเทน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยเขย่าหลอดทดลอง 10 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้จนเกิดการแยกชั้น ดูดสารสกัดชั้นเฮปเทน (ชั้นบน) มาใส่ในหลอดแก้วขนาดเล็ก (GC vial) นำไประเหยให้แห้งแล้วละลายด้วยเฮปเทนและปิดฝาให้สนิท ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC) (สำหรับในการคัดเลือกแบคทีเรียไกลดิงจากทะเลที่ผลิตกรดอะราชิโดนิค ทำโดยละลายอนุพันธ์ของกรดไขมันด้วยตัวทำละลายเฮปเทนปริมาตร 50 ไมโครลิตร และดูดสารละลายที่ได้ลงในหลอดแก้วขนาดเล็กมาก (insert) ส่วนการศึกษาในส่วนอื่นจะละลายอนุพันธ์ของกรดไขมันด้วยตัวทำละลายเฮปเทน ปริมาตร 500 ไมโครลิตร) โดยเปรียบเทียบค่า retention time (RT) ของกรดไขมันที่วิเคราะห์ได้กับอนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ของกรดอะราชิโดนิคมาตรฐาน และนำพื้นที่ใต้กราฟมาคำนวณปริมาณกรดไขมันจากกราฟมาตรฐานที่เตรียมจากข้อ 1.1 (ดัดแปลงจาก Kaewsuwan *et al.*, 2006)

1.3 การวิเคราะห์ปริมาณของกรดอะราชิโดนิคในการคัดเลือกแบคทีเรียไกลดิงจากทะเลโดยวิธี Gas Chromatography (GC)

นำตัวอย่างที่เตรียมตามวิธีการในข้อที่ 1.2 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC รุ่น HP-6890 ซึ่งใช้คอลัมน์ชนิด HP-INNOWax และใช้ Flame Ionization Detector (FID) โดยให้อุณหภูมิของคอลัมน์ที่ใช้เริ่มต้น 185 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิขึ้นในอัตรา 3.50 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิที่ 235 องศาเซลเซียส และคงอุณหภูมิไว้ที่ 235 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ใช้เวลารวมทั้งสิ้น 16.28 นาที เปรียบเทียบชนิดของอนุพันธ์

เมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันจากค่า RT และยืนยันผลการทดลองด้วยการวิเคราะห์ mass spectrum ด้วยเครื่อง GC-MS กับอนุพันธ์เมธิลเอสเทอร์ของกรดอะโรมาติกมาตรฐาน กำหนดปริมาณของกรดอะโรมาติกโดยใช้พื้นที่ใต้กราฟเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่เตรียมจากข้อ 1.1 (ในภาคผนวก ข) (ดัดแปลงจาก Kaewsuwan *et al.*, 2006)

2. การเตรียมกล้าเชื้อ

กล้าเชื้อจะใช้ในทุกการทดลองที่ต้องใช้อาหารเหลว (ยกเว้นในการคัดเลือกแบคทีเรียไกลดิงจากทะเลที่ผลิตกรดอะโรมาติก) ซึ่งจะเตรียมโดยเลี้ยงแบคทีเรียไกลดิงที่คัดเลือกได้ว่ามีการผลิตกรดอะโรมาติกในปริมาณสูงสุดในอาหารแข็งสูตร modified SAP2 (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นตัดชิ้นวุ้นขนาด 1×1 เซนติเมตร ลงในอาหารเหลว modified SAP2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียส โดยการเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน และถ่ายเชื้อที่ได้อ้อยละ 10 ลงในอาหารเหลว modified SAP2 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นนำมาวัดการเจริญเติบโตโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร และปรับให้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.0 โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงที่ฆ่าเชื้อแล้ว

3. การคัดเลือกแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากทะเลที่ผลิตกรดอะโรมาติก

เลี้ยงแบคทีเรียไกลดิงบนอาหารแข็ง SAP2 (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นตัดชิ้นวุ้นขนาด 1×1 เซนติเมตร ลงในอาหารเหลว SAP2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน เก็บตะกอนเซลล์แบคทีเรียโดยวิธีการหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้มาทำแห้งด้วยวิธีการแช่เยือกแข็ง (freeze dry) ชั่งน้ำหนักแห้งที่ได้และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

นำเซลล์แห้งของแบคทีเรียไกลดิงจากทะเล จำนวน 85 ไอโซเลต น้ำหนักประมาณ 0.01 กรัม ไปเตรียมอนุพันธ์ของกรดไขมันในรูปของเมธิลเอสเทอร์และวิเคราะห์ปริมาณกรดอะโรมาติกตามวิธีการในข้อ 1.2-1.3 เพื่อทำการคัดเลือกแบคทีเรียไกลดิงสายพันธุ์ที่มีการผลิตกรดอะโรมาติก ในแต่ละไอโซเลตทำซ้ำ 2 ครั้ง และคัดเลือกแบคทีเรียไกลดิงที่ผลิตกรดอะโรมาติกในปริมาณที่สูงที่สุดเพียง 1 ไอโซเลต ไปศึกษาขั้นต่อไป (ดัดแปลงจาก Patnayak and Sree, 2005)

4. การศึกษาระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโตและกรดอะราชีโดนิกของแบคทีเรียไกลดิ้งที่คัดเลือกได้

เลี้ยงแบคทีเรียไกลดิ้งที่คัดเลือกได้ที่มีการผลิตกรดอะราชีโดนิกในปริมาณสูงสุดจากข้อที่ 3 นำมาเตรียมกล้าเชื้อตามวิธีการในข้อที่ 2 และถ่ายเชื้อร้อยละ 10 ลงในอาหารเหลว modified SAP2 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน เก็บเซลล์แบคทีเรียทุก 1 วัน โดยนำมาหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ได้เซลล์เปียกที่ตกตะกอนอยู่ นำเซลล์ทั้งหมดถ่ายลงใน vial ที่แห้งสนิทและทราบน้ำหนัก นำ vial ที่บรรจุเซลล์ไปทำแห้งด้วยวิธีการแช่เยือกแข็ง (freeze dry) แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก รายงานผลของน้ำหนักชีวมวลที่ได้ในรูปของน้ำหนักแห้งตามลำดับ นำเซลล์แห้งส่วนหนึ่งไปเตรียมอนุพันธ์ของกรดไขมันในรูปของเมทิลเอสเทอร์พร้อมการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณกรดอะราชีโดนิกตามวิธีการข้อ 1.2-1.3 ในแต่ละการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียไกลดิ้งต่อการผลิตกรดอะราชีโดนิกได้สูงสุด รวมถึงกำหนดระยะเวลาในการเลี้ยงแบคทีเรียไกลดิ้งในการทดลองขั้นต่อไป (ดัดแปลงจาก Jiang and Chen, 2000)

5. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและผลิตกรดอะราชีโดนิกของแบคทีเรียไกลดิ้งจากทะเลที่คัดเลือกได้

5.1 การคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราชีโดนิกของแบคทีเรียไกลดิ้งที่คัดเลือกได้ด้วยวิธี Plackett-Burman design

เลี้ยงแบคทีเรียไกลดิ้งสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ที่มีการผลิตกรดอะราชีโดนิกในปริมาณสูงสุดจากข้อ 3 นำมาเตรียมกล้าเชื้อตามวิธีการในข้อที่ 2 ถ่ายเชื้อร้อยละ 10 ลงในอาหารเหลว โดยมีองค์ประกอบ ปริมาณของสารอาหารและสภาวะการเพาะเลี้ยง ดังแสดงใน Table 10 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยศึกษาปัจจัยทางเคมี ได้แก่ แหล่งคาร์บอน กลูโคส (glucose) ฟรุคโตส (fructose) และซูโครส (sucrose) แหล่งไนโตรเจน ทริปโตเน (tryptone) ยีสต์สกัด (yeast extract) KNO_3 และ NH_4NO_3 เกลือ $NaCl$ และ KCl โลหะหนัก $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ และ $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ส่วนปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ พีเอชเริ่มต้น ความเร็วรอบในการเขย่าและอุณหภูมิ โดยแต่ละปัจจัยหรือตัวแปรแบ่งเป็น 2 ระดับ คือ สูง (+) และต่ำ (-) และมี 4 ตัวแปรดัมมี่ (dummy) ดังแสดงใน Table 10 ซึ่งประกอบด้วยทั้งหมด 20 การทดลอง (runs)

ดังแสดงใน Table 10 ในแต่ละการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง โดยเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียไกลดิงนาน 3 วัน (ตามระยะเวลาที่มีการผลิตกรดอะราชีโดนิกสูงสุดจากการทดลองในข้อที่ 4) แยกตัวเซลล์ออกจากน้ำหมักด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ได้เซลล์เปียกที่ตกตะกอนอยู่ นำเซลล์ทั้งหมดถ่ายลงใน vial ที่แห้งสนิทและทราบน้ำหนัก นำ vial ที่บรรจุเซลล์อยู่ไปทำแห้งโดยวิธีการแช่เยือกแข็ง (freeze dry) แล้วนำมาชั่งน้ำหนักแห้ง รายงานผลของน้ำหนักชีวมวลที่ได้ในรูปของน้ำหนักแห้งตามลำดับ นำเซลล์ที่ได้ไปเตรียมอนุพันธ์ของกรดไขมันในรูปของเมทิลเอสเทอร์พร้อมการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณกรดอะราชีโดนิกตามวิธีการในข้อที่ 1.2-1.3 นำผลของน้ำหนักแห้งและปริมาณของกรดอะราชีโดนิกมาวิเคราะห์ทางสถิติ

คำนวณผลของแต่ละตัวแปร ($E_{(xi)}$) ความแปรปรวน (V_{eff}) ค่าความคลาดเคลื่อน (SE) และ ($t_{(xi)}$) รวมทั้งความมีนัยสำคัญ (p -value) โดยใช้ t -test

$$\text{ผลของแต่ละตัวแปรคำนวณได้จากสมการ } E_{(xi)} = 2 \left(\frac{\sum M_{i+} - M_{i-}}{N} \right)$$

$E_{(xi)}$ คือ ผลของตัวแปรที่ทำการทดสอบ

M_{i+} คือ น้ำหนักเซลล์แห้ง หรือ ปริมาณกรดอะราชีโดนิกที่ได้ เมื่อทดสอบด้วยตัวแปรนั้นในระดับสูง

M_{i-} คือ น้ำหนักเซลล์แห้ง หรือ ปริมาณกรดอะราชีโดนิกที่ได้ เมื่อทดสอบด้วยตัวแปรนั้นในระดับต่ำ

N คือ จำนวนการทดลองทั้งหมด

$$\text{ความแปรปรวนคำนวณได้จากสมการ } V_{eff} = \frac{\sum (E_d)^2}{n}$$

V_{eff} คือ ความแปรปรวน

E_d คือ น้ำหนักเซลล์แห้ง หรือ ปริมาณกรดอะราชีโดนิกที่ได้จากตัวแปรดัมมี่

n คือ จำนวนตัวแปรดัมมี่

$$\text{ความคลาดเคลื่อนคำนวณได้จากสมการ } SE = \sqrt{V_{eff}}$$

ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p -value) ของแต่ละตัวแปรที่ทำการทดลองคำนวณได้จากสมการ

$$t_{(xi)} = \frac{E_{(xi)}}{SE}$$

คัดเลือกเลือกปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและผลิตกรดอะราชีโดนิก ซึ่งกำหนดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.05 ($p < 0.05$) หรือมีระดับความเชื่อมั่น

(confidence level) มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 95.0 เพื่อนำไปศึกษาในขั้นต่อไป (ดัดแปลงจาก Wen and Chen, 2001)

Table 10. Variables showing factors used in Plackett–Burman design.

Variables	Factors	Value (+)	Value (-)	Unit
A	Glucose	10	1	g/l
B	Fructose	10	1	g/l
C	Sucrose	10	1	g/l
D	KNO ₃	5	0.5	g/l
E	NH ₄ NO ₃	5	0.5	g/l
F	Yeast extract	5	0.5	g/l
G	Tryptone	5	0.5	g/l
H	Initial pH	8.0	6.0	-
I	Temperature	25	15	□ C
J	Agitation speed	200	100	rpm
K	NaCl	15	7.5	g/l
L	KCl	0.35	0.18	g/l
M	MgCl ₂ .6H ₂ O	5.4	2.7	g/l
N	MgSO ₄ .7H ₂ O	2.7	1.4	g/l
O	CaCl ₂ .2H ₂ O	0.5	0.25	g/l
P ₁	Dummy 1	-	-	-
P ₂	Dummy 2	-	-	-
P ₃	Dummy 3	-	-	-
P ₄	Dummy 4	-	-	-

Table 11. Plackett-Burman design generated by fractional rotation of full factorial design where A,..., O are independent variables and P₁,..., P₄ are dummy variables.

Run	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄
1	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
2	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+
3	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+
4	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
5	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-
6	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
7	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-
8	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
9	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-
10	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
11	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-
12	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
13	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+
14	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+
15	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+
16	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
17	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
18	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+
19	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+, high level; -, low level.

5.2 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะซิโตนิกของแบคทีเรียไกลดิงที่คัดเลือกได้

เลี้ยงแบคทีเรียไกลดิงสายพันธุ์ที่ผลิตกรดอะซิโตนิกในปริมาณที่สูงที่สุดจากข้อที่ 3 นำมาเตรียมกล้าเชื้อตามวิธีการในข้อที่ 2 ถ่ายเชื้อร้อยละ 10 ลงในอาหารเหลว modified SAP2 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีองค์ประกอบของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ได้แก่ กลูโคส ฟรุกโตสและซูโครส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 ของอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งชุดควบคุม คือ อาหารเหลว modified SAP2 ที่ไม่ได้เติมแหล่งคาร์บอน เลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 3 วัน (ตามระยะเวลาที่มีการผลิตกรดอะซิโตนิกสูงสุดจากการทดลองข้อที่ 4) แยกตัวเซลล์ออกจากน้ำหมักโดยการหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง และได้เซลล์เปียกที่ตกตะกอนอยู่ นำเซลล์ทั้งหมดถ่ายลงใน vial ที่แห้งสนิทและทราบน้ำหนัก นำ vial ที่บรรจุเซลล์อยู่ไปทำแห้งโดยวิธีการแช่เยือกแข็ง (freeze dry) แล้วนำมาชั่งน้ำหนักแห้ง รายงานผลของน้ำหนักชีวมวลที่ได้ในรูปแบบน้ำหนักแห้ง นำเซลล์ที่ได้ไปเตรียมอนุพันธ์ของกรดไขมัน ในรูปของเมทิลเอสเทอร์พร้อมการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิโตนิกตามวิธีการในข้อที่ 1.2-1.3 ในแต่ละการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง เลือกชนิดแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อผลิตกรดอะซิโตนิกปริมาณที่สูงสุด เพื่อนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป (ดัดแปลงจาก Bajpai *et al.*, 1991)

5.3 การศึกษาระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะซิโตนิกของแบคทีเรียไกลดิงที่คัดเลือกได้ด้วยวิธี Response Surface Methodology (RSM) และวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD)

วิธีพื้นผิวผลตอบสนอง (Response surface methodology, RSM) สามารถใช้หา ระดับของปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดต่อการตอบสนองได้ วิธีพื้นผิวผลตอบสนองเป็นวิธีที่สร้างสมการของความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระ (ระดับของปัจจัย) กับตัวแปรตอบสนอง (response) โดยใช้วิธีการวิเคราะห์การถดถอย (regression) เพื่อหาค่าความเหมาะสมของระดับในแต่ละปัจจัยที่สนใจ ศึกษา (Montgomery, 1999; 2001) การออกแบบพื้นผิวผลตอบสนองสำหรับการทดลองนี้เลือกใช้ การออกแบบส่วนประสมกลางแบบหมุนได้ (Central composite design, CCD) ซึ่งมีพื้นฐานมาจาก 2^k แฟกตอเรียล (factorial 2^k) โดยใช้ตัวแปรที่คัดเลือกได้จากการทดลองในข้อ 5.1 จำนวน 4 ตัวแปร ได้แก่ ความเข้มข้นของทริปโตเนน 0.8-9.2 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 6.32-9.68 ระดับความเร็วรอบในการเขย่า 36-204 รอบต่อนาที และอุณหภูมิ 16.6-33.4 องศาเซลเซียส โดยแบ่งระดับของตัวแปร

อิสระเป็น 5 ระดับ ได้แก่ -1.68, -1, 0, +1 และ +1.68 ดังแสดงใน Table 12 มีจำนวนการทดลองทั้งหมด 30 การทดลอง (Runs) ดังแสดงใน Table 13 และในแต่ละการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง

เลี้ยงแบคทีเรียโกลดิ้งสายพันธุ์ที่ผลิตกรดอะซิโตนิกสูงสุดจากข้อที่ 3 นำมาเตรียมกล้าเชื้อ ตามวิธีการในข้อที่ 2 ถ่ายเชื้อร้อยละ 10 ลงในอาหารเหลว ที่มีองค์ประกอบต่างๆ ดังแสดงใน Table 13 โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อที่ 5.2 (ซูโครส) ความเข้มข้นร้อยละ 1 ยีสต์สกัดเพื่อเป็นแหล่งวิตามินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 NaCl 15 กรัมต่อลิตร KCl 0.35 กรัมต่อลิตร $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 5.4 กรัมต่อลิตร $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.7 กรัมต่อลิตร และ $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงนาน 3 วัน (ตามระยะเวลาที่มีการผลิตกรดอะซิโตนิกสูงสุดจากการทดลองข้อที่ 4) แยกตัวเซลล์ออกจากน้ำหมักโดยการหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ได้เซลล์เปียกที่ตกตะกอนอยู่ นำเซลล์ทั้งหมดถ่ายลงใน vial ที่แห้งสนิท และทราบน้ำหนัก นำ vial ที่บรรจุเซลล์อยู่ไปทำแห้งโดยวิธีการแช่เยือกแข็ง (freeze dry) แล้วนำมาชั่งน้ำหนักแห้ง รายงานผลของน้ำหนักชีวมวลที่ได้ในรูปของน้ำหนักแห้งตามลำดับ นำเซลล์ที่ได้ไปเตรียมอนุพันธ์ของกรดไขมัน ในรูปของเมทิลเอสเทอร์พร้อมการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิโตนิกตามวิธีการในข้อที่ 1.2-1.3

เมื่อทำการทดลองตามที่ออกแบบดังแสดงใน Table 13 จำนวน 30 การทดลองแล้ว นำผลของน้ำหนักแห้งและการผลิตกรดอะซิโตนิกที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธีการทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม Design Expert Version 7.0 trial (State Ease, Minneapolis, MN) และกำหนดระดับความเชื่อมั่นเท่ากับหรือสูงกว่าร้อยละ 95.0 (ดัดแปลงจาก Song *et al.*, 2007) เนื่องจากวิธีการพื้นผิวตอบสนองให้ความสำคัญกับความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระกับผลตอบสนอง ความสัมพันธ์ดังกล่าวสามารถแสดงในแบบจำลองพหุนามกำลังสองที่ใช้ในการอธิบายความสัมพันธ์ (Myers, 1995) ดังสมการ

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_i \chi_i + \sum_{i=1}^4 \beta_{ii} \chi_i^2 + \sum_{i,j=1}^4 \beta_{ij} \chi_i \chi_j \dots\dots\dots(1)$$

โดย β_0 คือ ค่าคงที่

β_i คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นตรงโดย i คือ ลำดับของตัวแปร

β_{ii} คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นโค้งโดย i คือ ลำดับของตัวแปร

β_{ij} คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยที่มีผลร่วมกัน โดย i และ j คือ ลำดับของตัวแปร

Table 12. The coded levels and real values of the independent variables in the Central Composite Design.

Variables	Symbol	Unit	-1.68	-1	0	+1	+1.68
Tryptone	X_1	g/L	0.8	2.5	5.0	7.5	9.2
Initial pH	X_2	-	6.32	7.00	8.00	9.00	9.68
Agitation speed	X_3	rpm	36	70	120	170	204
Temperature	X_4	°C	16.6	20.0	25.0	30.0	33.4

Table 13. The Central Composite Design of the significant variables (in coded level) with DCW and ARA yield.

Run	X_1	X_2	X_3	X_4
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1
6	+1	+1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1

DCW, Dry cell weight; ARA, Arachidonic acid.

X_1 , tryptone; X_2 , initial pH; X_3 , agitation speed; X_4 , temperature.

Table 13. (Cont.)

Run	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
15	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1
17	-1.68	0	0	0
18	+1.68	0	0	0
19	0	-1.68	0	0
20	0	+1.68	0	0
21	0	0	-1.68	0
22	0	0	+1.68	0
23	0	0	0	-1.68
24	0	0	0	+1.68
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0
28	0	0	0	0
29	0	0	0	0
30	0	0	0	0

DCW, Dry cell weight; ARA, Arachidonic acid.

X₁, tryptone; X₂, initial pH; X₃, agitation speed; X₄, temperature.

5.4 การศึกษาความถูกต้องของการใช้สมการทำนายการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราชิโดนิกของแบคทีเรียโกลดิ้งที่คัดเลือกได้

เลี้ยงแบคทีเรียโกลดิ้งสายพันธุ์ที่ผลิตกรดอะราชิโดนิกสูงสุดจากข้อที่ 3 นำมาเตรียมกล้าเชื้อตามวิธีการในข้อที่ 2 ถ่ายเชื้อร้อยละ 10 ลงในอาหารเหลว ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีองค์ประกอบของระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราชิโดนิกที่ได้จากข้อ 5.3 ได้แก่ ทริปโตนที่ความเข้มข้น 7.7 และ 9.0 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 7.5 และ 7.9 ความเร็วรอบในการเขย่า 154 และ 170 รอบต่อนาที และ บ่มที่อุณหภูมิ 21.6 และ 17.8 องศาเซลเซียส ซึ่งได้จากสมการทำนายระดับที่เหมาะสมของปัจจัยต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราชิโดนิก ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 14 and 15 นอกจากนี้สมการที่ 2 ยังสามารถทำนายน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 2.18 กรัมต่อลิตร และ

สมการที่ 3 สามารถทำนายผลผลิตกรดอะราชิโดนิกสูงสุดเท่ากับ 21.19 กรัมต่อลิตร ดังแสดงใน Table 16 รวมทั้งแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อที่ 5.2 (ซูโครส) ความเข้มข้นร้อยละ 1 ของอาหารเพาะเลี้ยง และยีสต์สกัดเพื่อเป็นแหล่งวิตามินตามสูตรอาหารพื้นฐาน modified SAP2 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 NaCl 15 กรัมต่อลิตร KCl 0.35 กรัมต่อลิตร $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 5.4 กรัมต่อลิตร $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.7 กรัมต่อลิตร และ $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงใน 10 เลี้ยงนาน 3 วัน (ตามระยะเวลาที่ผลิตกรดอะราชิโดนิกสูงสุด) แยกตัวเซลล์ออกจากน้ำหมักโดยการหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ได้เซลล์เปียกที่ตกตะกอนอยู่ นำเซลล์ทั้งหมดถ่ายลงใน vial ที่แห้งสนิทและทราบน้ำหนัก นำ vial ที่บรรจุเซลล์อยู่ไปทำแห้งโดยวิธีการแช่เยือกแข็ง (freeze dry) แล้วนำมาชั่งน้ำหนักแห้ง รายงานผลของน้ำหนักชีวมวลที่ได้ในรูปของน้ำหนักแห้งตามลำดับ นำเซลล์ที่ได้ไปเตรียมอนุพันธ์ของกรดไขมันในรูปของเมทิลเอสเทอร์พร้อมการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณกรดอะราชิโดนิกตามข้อที่ 1.2-1.3 นำผลของน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณกรดอะราชิโดนิกที่ได้จากการทดลองกับผลของน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณกรดอะราชิโดนิกที่ทำนายโดยสมการมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วย paired *t*-test (ดัดแปลงจาก Wen and Chen, 2001)

Table 14. Regression equation for dry cell weight of marine gliding bacterium *A. maritima* TISTR 1715.

regression equation
$\text{Dry cell weight (g/l)} = -19.4787 + 0.3570X_1 + 3.2544X_2 + 0.0285X_3 + 0.5132X_4 - 0.0147X_1X_2 + 0.0014X_1X_3 - 0.0024X_1X_4 + 0.0013X_2X_3 - 0.0019X_2X_4 - 0.0004X_3X_4 - 0.0259X_1^2 - 0.2146X_2^2 - 0.0001X_3^2 - 0.0097X_4^2$

Table 15. Regression equation for ARA yield of marine gliding bacterium *A. maritima* TISTR 1715.

regression equation
$\text{ARA yield (mg/g DCW)} = -99.1200 - 3.6030X_1 + 31.0034X_2 + 0.1813X_3 - 0.2744X_4 + 0.3026X_1X_2 + 0.0137X_1X_3 - 0.0125X_1X_4 - 0.0156X_2X_3 + 0.0194X_2X_4 - 0.0009X_3X_4 - 0.0115X_1^2 - 1.9983X_2^2 - 0.0003X_3^2 - 0.0068X_4^2$

ARA, Arachidonic acid.

Table 16. Optimal values of tryptone, pH, agitation speed and temperature for DCW and ARA yield with prediction.

Experiment	X ₁ (g/l)	X ₂	X ₃ (rpm)	X ₄ (°C)	DCW	ARA yield
					(g/l)	(mg/g DCW)
					Predicted	Predicted
1	7.7	7.5	154	21.6	2.18	16.98
2	9.0	7.9	170	17.8	2.07	21.19

X₁, tryptone; X₂, initial pH; X₃, agitation speed; X₄, temperature.

DCW, Dry cell weight; ARA, Arachidonic acid.

6. การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราชิโดนิกของแบคทีเรียโกลดิ้งที่คัดเลือกได้ในสภาวะเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม

เลี้ยงแบคทีเรียโกลดิ้งสายพันธุ์ที่ผลิตกรดอะราชิโดนิกในปริมาณที่สูงที่สุดจากข้อที่ 3 นำมาเตรียมกล้าเชื้อตามข้อที่ 2 ถ่ายเชื้อร้อยละ 10 ลงในอาหารเหลว ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีองค์ประกอบของระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราชิโดนิกจากข้อที่ 5.4 ได้แก่ ทริปโตเนนความเข้มข้น 9.0 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 7.9 ความเร็วรอบในการเขย่า 170 รอบต่อนาที และบ่มที่อุณหภูมิ 17.8 องศาเซลเซียส รวมทั้งแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อที่ 5.2 (ซูโครส) ความเข้มข้นร้อยละ 1 และอีสต์สกัดเพื่อเป็นแหล่งวิตามินตามสูตรอาหารพื้นฐาน modified SAP2 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 NaCl 15 กรัมต่อลิตร KCl 0.35 กรัมต่อลิตร MgCl₂·6H₂O 5.4 กรัมต่อลิตร MgSO₄·7H₂O 2.7 กรัมต่อลิตร และ CaCl₂·2H₂O 0.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เลี้ยงเป็นระยะเวลานาน 7 วัน เก็บเซลล์แบคทีเรียทุก 1 วัน โดยนำมาหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักโดยการหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ได้เซลล์เปียกที่ตกตะกอนอยู่ นำเซลล์ทั้งหมดถ่ายลงใน vial ที่แห้งสนิทและทราบน้ำหนัก นำ vial ที่บรรจุเซลล์ไปทำแห้งด้วยวิธีการแช่เยือกแข็ง (freeze dry) แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก รายงานผลของน้ำหนักชีวมวลที่ได้ในรูปของน้ำหนักแห้งตามลำดับ นำเซลล์แห้งส่วนหนึ่งไปเตรียมอนุพันธ์ของกรดไขมันในรูปของเมทิลเอสเทอร์พร้อมการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณกรดอะราชิโดนิกตามข้อ 1.2-1.3 เพื่อกำหนดระยะเวลาในการเลี้ยงแบคทีเรียโกลดิ้งที่ผลิตกรดอะราชิโดนิกสูงสุดในอาหารสูตรที่เหมาะสม (ดัดแปลงจาก Wu *et al.*, 2003)

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การคัดเลือกแบคทีเรียโกลดิ้งที่แยกได้จากทะเลที่ผลิตกรดอะราชิโดนิก

การคัดเลือกแบคทีเรียโกลดิ้งจากทะเลจำนวน 85 ไอโซเลต โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว SAP2 และวิเคราะห์กรดไขมันที่เตรียมอยู่ในรูปของอนุพันธ์เมซิลเอสเทอร์ด้วยเทคนิค GC โดยพิจารณาจากค่า RT ของพีค (peak) ที่ถูกชะออกจากคอลัมน์เปรียบเทียบกับอนุพันธ์เมซิลเอสเทอร์กรดอะราชิโดนิกมาตรฐาน ซึ่งมีค่า RT เท่ากับ 13.40 นาที ดังแสดงใน Figure 7 จากผลการวิเคราะห์กรดไขมันที่เตรียมอยู่ในรูปของอนุพันธ์เมซิลเอสเทอร์ของแบคทีเรียทั้งหมด 85 ไอโซเลต พบว่ามีเพียง 3 ไอโซเลต ที่คาดว่าสร้างกรดอะราชิโดนิก คือ KB01-042, TISTR 1715 และ 1719 เนื่องจากพบพีคที่มีค่า RT เท่ากับ 13.38, 13.41 และ 13.40 นาที ตามลำดับ ดังแสดงใน Figure 8A, 8B and 8C ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับกรดอะราชิโดนิกมาตรฐานและเมื่อทำการทดลองด้วย spiking technique โดยการเติมอนุพันธ์เมซิลเอสเทอร์กรดอะราชิโดนิกมาตรฐานลงในสารตัวอย่างของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลตดังกล่าว พบว่ากรดไขมันที่เตรียมอยู่ในรูปของอนุพันธ์เมซิลเอสเทอร์ในตัวอย่าง รวมกับกรดอะราชิโดนิกมาตรฐานเป็นพีคเดียวกัน ไม่มีการแตกของยอดพีค ดังแสดงใน Figure 9A, 9B and 9C นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์กรดไขมันดังกล่าวด้วยเทคนิค GC-MS พบว่า mass spectrum ของกรดไขมันที่เตรียมอยู่ในรูปของอนุพันธ์เมซิลเอสเทอร์ของแบคทีเรียโกลดิ้ง TISTR 1715 มี molecular ion เท่ากับ 318 ซึ่งเป็นมวลโมเลกุลของอนุพันธ์เมซิลเอสเทอร์ของกรดอะราชิโดนิก และมีตำแหน่ง mass spectrum ที่ 150 ซึ่งแสดงว่าเป็นกรดไขมันชนิดโอเมก้า-6 รวมทั้งมี fragmentation pattern เช่นเดียวกับกรดอะราชิโดนิกมาตรฐาน ดังแสดงใน Figure 10 แสดงว่าแบคทีเรียโกลดิ้งจากทะเลทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ KB-042, TISTR 1715 และ 1719 สามารถผลิตกรดอะราชิโดนิกได้

อย่างไรก็ตามพบว่าแบคทีเรียโกลดิ้ง KB01-042, TISTR 1715 และ 1719 สามารถผลิตกรดไขมันชนิดอื่นๆ ได้แก่ กรดปาล์มิติก (palmitic acid, 16:0; RT = 5.30 min) ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 0.54, 17.12 และ 9.76 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ ส่วนการผลิตกรดปาล์มิโทเลอิก (palmitoleic acid, 16:1; RT = 5.62 min) ในไอโซเลต KB01-042 ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 0.04 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง นอกจากนี้ยังพบการผลิตกรดโอเลอิก (oleic acid, 18:1; RT = 8.20 min) ในไอโซเลต TISTR 1715 มีปริมาณเท่ากับ 0.46 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ซึ่งสอดคล้องจากการวิเคราะห์

ของ Ratledge และ Wilkinson (1988) ที่ศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในแบคทีเรีย พบว่ามีการผลิตกรดไขมันชนิดพาล์มิติกเป็นหลัก รองลงมาเป็นกรดพาล์มิโทเลอิกและกรดโอเลอิก ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรียไกลดิง พบว่าแบคทีเรียไกลดิง KB01-042 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.17 ± 0.02 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ TISTR 1715 และ 1719 ซึ่งมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.16 ± 0.02 และ 0.14 ± 0.02 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนการผลิตกรดอะโรมาติกของแบคทีเรียไกลดิง พบว่าแบคทีเรียไกลดิง TISTR 1715 มีการผลิตกรดอะโรมาติกสูงสุดเท่ากับ 3.67 ± 0.45 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง หรือ 0.60 ± 0.14 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมา คือ TISTR 1719 และ KB01-42 มีการผลิตกรดอะโรมาติกเท่ากับ 1.72 ± 0.11 และ 0.82 ± 0.14 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง หรือคิดเป็น 0.23 ± 0.04 และ 0.14 ± 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 17

แบคทีเรียที่ผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวส่วนใหญ่จะเจริญเติบโตได้ในอุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) เช่น *Shewanella olleyana* สามารถผลิตกรดโอโคซาเพนตะอีโนอิกได้เท่ากับร้อยละ 19.2 ของกรดไขมันทั้งหมด ในขณะที่ *Shewanella* sp. GA-22 สามารถผลิตกรดอะโรมาติกและกรดโอโคซาเพนตะอีโนอิกเท่ากับร้อยละ 1.3 และ 3.6 ของกรดไขมันทั้งหมด เมื่อเลี้ยงในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Skerratt *et al.*, 2002; Gentile *et al.*, 2003) นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียจากทะเลบางชนิดสามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงได้ ตัวอย่างเช่น *Plesiocystis pacifica* ซึ่งผลิตกรดอะโรมาติกได้เท่ากับร้อยละ 17.5 ของกรดไขมันทั้งหมด และ *Bacillus subtilis* (RRL-8) ที่แยกได้จากฟองน้ำสามารถผลิตกรดแกมมาไลโนเลนิก (γ -linolenic acid; 18:3) และกรดโอโคซาเพนตะอีโนอิกเท่ากับร้อยละ 4.5 และ 3.8 ของกรดไขมันทั้งหมด ตามลำดับ (Izuka *et al.*, 2003; Patnayak and Sree, 2005) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าแบคทีเรียจากทะเลที่พบการผลิตกรดอะโรมาติก เช่น *Plesiocystis pacifica* SIR-1, *Aureispira marina* gen. nov., sp. nov., *Aureispira maritima* sp. nov., *Krokinobacter. eikastus* PMA-26, *Krokinobacter diaphorus* MSKK-32 (Iizuka *et al.*, 2003; Hosoya *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2006; Hosoya *et al.*, 2007) ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบอาจเนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบมีลักษณะของผนังเซลล์ (cell wall) ที่เรียกว่า outer membrane ซึ่งประกอบด้วยฟอสโฟลิปิดเป็นหลัก แตกต่างจากแบคทีเรียแกรมบวกที่ผนังเซลล์คือ เปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ซึ่งประกอบด้วยพอลิแซคคาไรด์และโปรตีน (Poole, 1997) ซึ่งอาจทำให้แบคทีเรียแกรมลบสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงเพื่อรักษาสภาพความคงตัวของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane rigidity) จากสภาพแวดล้อมในทะเล ได้แก่ ความเค็ม (Singh and Ward, 1997) อุณหภูมิ (Wen and Chen, 2003) และความดัน (DeLong and Yayanos, 1986; Allen *et al.*, 1999) อย่างไรก็ตาม

ตามการสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงของแบคทีเรียขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ และสภาพแวดล้อมที่แบคทีเรียอาศัยอยู่

ดังนั้นจากการเลี้ยงแบคทีเรียโกลดิงจากทะเลจำนวน 85 ไอโซเลต ในอาหาร SAP2 เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25 เซลเซียที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พบว่ามีแบคทีเรียโกลดิงเพียง 3 ไอโซเลตเท่านั้นที่สร้างกรดอะราชิโดนิก โดยแบคทีเรียโกลดิง TISTR 1715 ผลิตกรดอะราชิโดนิกสูงสุด จึงได้คัดเลือกแบคทีเรียโกลดิงจากทะเล TISTR 1715 ซึ่งจัดเป็น *Aureispira maritima* (ภาคผนวก ข) เพื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราชิโดนิกขั้นต่อไป

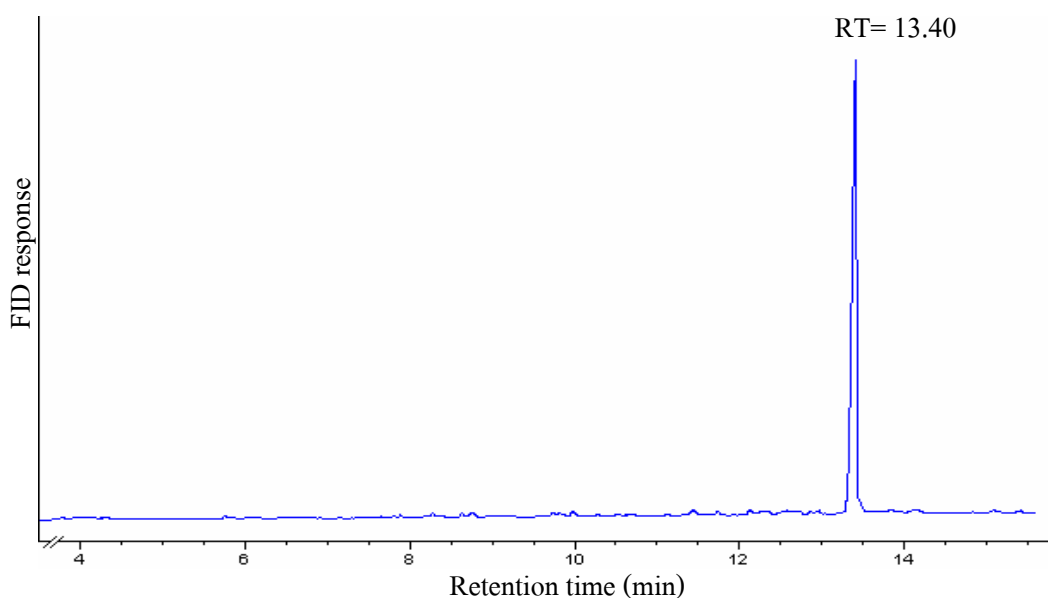


Figure 7. GC chromatogram of standard arachidonic acid methyl ester.

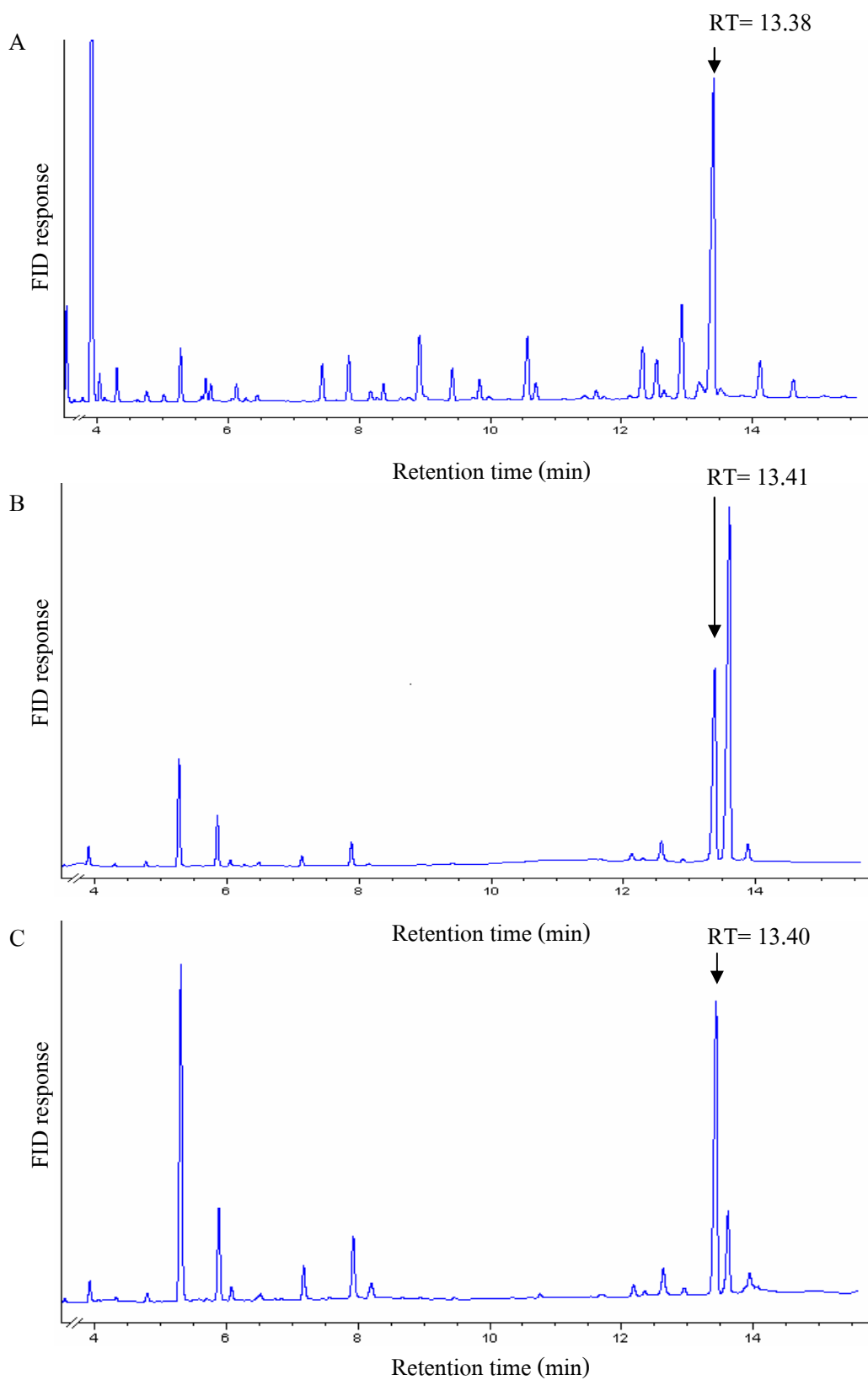


Figure 8. GC chromatograms of fatty acid methyl esters from marine gliding bacteria KB01-42 (A), TISTR 1715 (B) and TISTR 1719 (C).

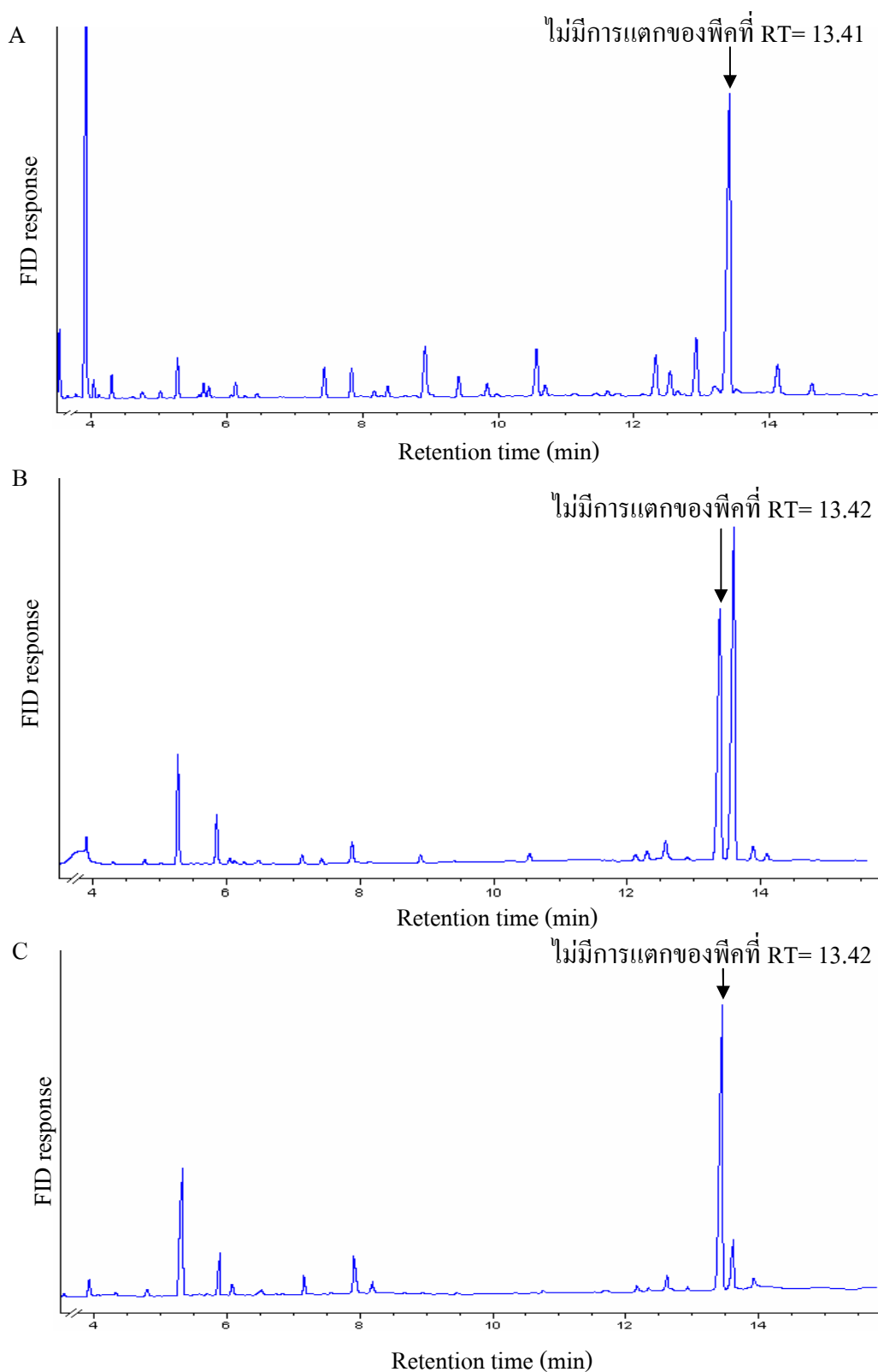


Figure 9. GC chromatograms of fatty acid methyl esters from marine gliding bacteria KB01-42 (A), TISTR 1715 (B) and TISTR 1719 (C) spiked with standard arachidonic acid methyl ester.

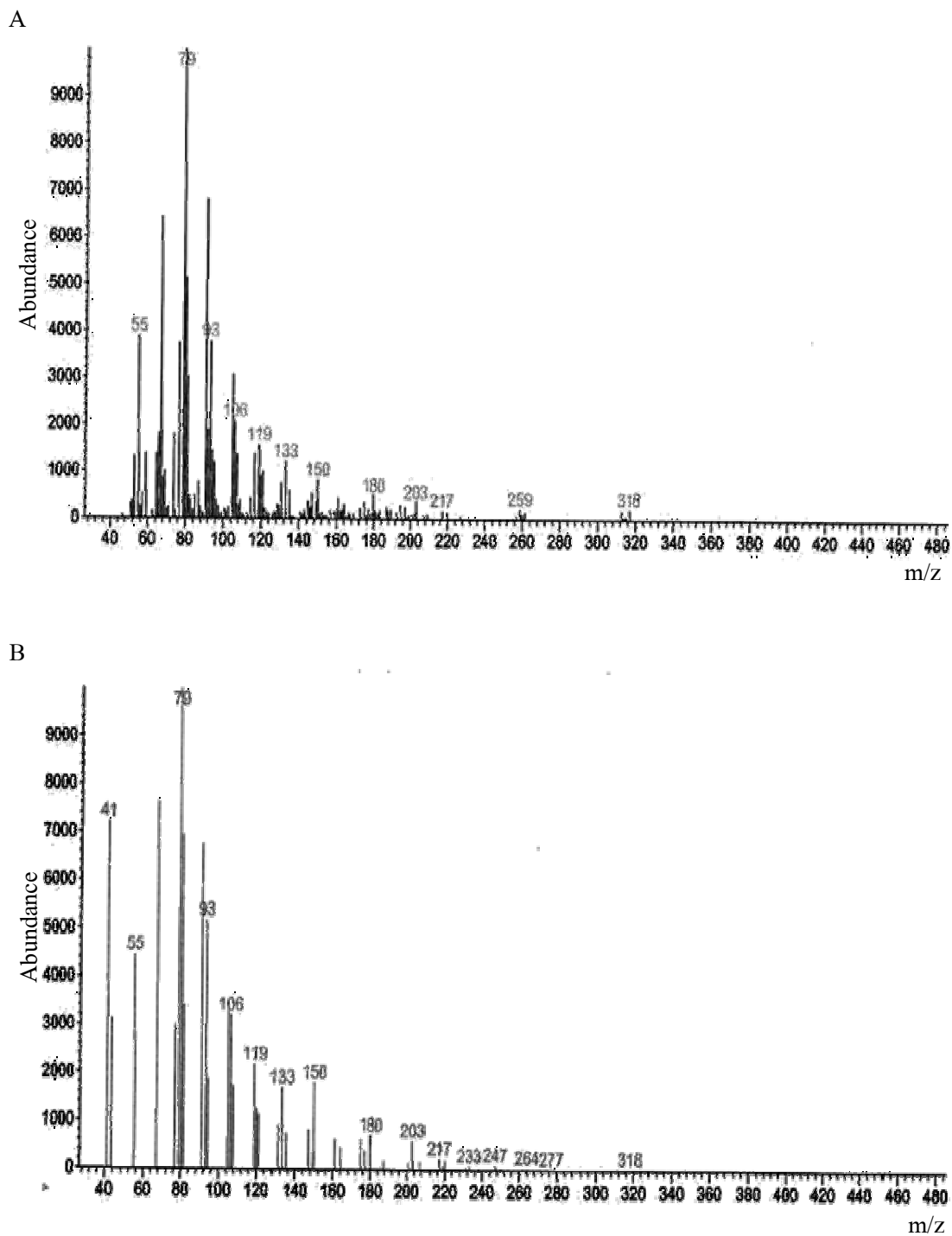


Figure 10. Comparison of mass spectra of peak with RT of 13.41 min in the marine gliding bacterium TISTR 1715 (A) and authentic arachidonic acid standard (B).

Table 17. Biomass and ARA production from the marine gliding bacteria.

No.	Code	Biomass (g/l)	ARA yield (mg/g DCW)	ARA production (mg/l)
1	32 GB	1.02 ± 0.13	-	-
2	37 GB	0.64 ± 0.04	-	-
3	39 GB	1.06 ± 0.22	-	-
4	46 GB	0.57 ± 0.01	-	-
5	52 GB	0.52 ± 0.12	-	-
6	28.5 SA	0.24 ± 0.09	-	-
7	59 SA	0.75 ± 0.09	-	-
8	68 SA	1.00 ± 0.13	-	-
9	74 SA	1.25 ± 0.28	-	-
10	KB01-19	0.16 ± 0.01	-	-
11	KB01-36	0.17 ± 0.04	-	-
12	KB01-42	0.17 ± 0.02	0.82 ± 0.14	0.14 ± 0.05
13	GB 003	0.98 ± 0.01	-	-
14	GB 011	0.72 ± 0.22	-	-
15	GB 012	0.75 ± 0.09	-	-
16	GB 015	0.65 ± 0.18	-	-
17	GB 016	1.05 ± 0.04	-	-
18	GB 017	0.97 ± 0.77	-	-
19	GB 019	0.79 ± 0.13	-	-
20	GB 056	0.74 ± 0.02	-	-
21	GB 088	0.17 ± 0.02	-	-
22	GB 097	0.37 ± 0.07	-	-
23	GB 099	0.60 ± 0.04	-	-
24	GB 100	0.85 ± 0.14	-	-
25	GB 101	1.43 ± 0.32	-	-
26	GB 102	0.21 ± 0.01	-	-
27	GB 104	0.41 ± 0.00	-	-
28	GB 108	0.77 ± 0.21	-	-
29	GB 110	1.67 ± 0.24	-	-
30	GB 111	0.41 ± 0.13	-	-
31	GB 112	1.09 ± 0.42	-	-
32	GB 121	0.07 ± 0.04	-	-
33	GB 122	0.76 ± 0.01	-	-
34	GB 123	0.50 ± 0.11	-	-

Table 17. (Cont.).

No.	Code	Biomass (g/l)	ARA yield (mg/g DCW)	ARA production (mg/l)
35	GB210	0.04 ± 0.00	-	-
36	GB212	0.04 ± 0.01	-	-
37	GB213	0.04 ± 0.00	-	-
38	GB215	0.05 ± 0.00	-	-
39	GB216	0.06 ± 0.02	-	-
40	GB217	0.05 ± 0.01	-	-
41	GB218	0.04 ± 0.00	-	-
42	GB219	0.06 ± 0.01	-	-
43	GB220	0.03 ± 0.00	-	-
44	GB221	0.04 ± 0.00	-	-
45	GB222	0.02 ± 0.00	-	-
46	GB223	0.06 ± 0.02	-	-
47	GB224	0.08 ± 0.01	-	-
48	GB225	0.07 ± 0.01	-	-
49	GB226	0.04 ± 0.00	-	-
50	GB227	0.04 ± 0.01	-	-
51	GB228	0.05 ± 0.00	-	-
52	GB229	0.04 ± 0.01	-	-
53	GB230	0.03 ± 0.08	-	-
54	GB231	0.04 ± 0.00	-	-
55	GB232	0.02 ± 0.00	-	-
56	GB234	0.03 ± 0.01	-	-
57	GB236	0.04 ± 0.00	-	-
58	GB237	0.06 ± 0.05	-	-
59	GB238	0.06 ± 0.07	-	-
60	GB239	0.03 ± 0.00	-	-
61	GB240	0.03 ± 0.00	-	-
62	GB241	0.01 ± 0.00	-	-
63	GB242	0.02 ± 0.00	-	-
64	GB243	0.09 ± 0.01	-	-
65	TISTR 1696	1.20 ± 0.07	-	-
66	TISTR 1701	1.16 ± 0.19	-	-
67	TISTR 1704	1.46 ± 0.40	-	-

Table 17. (Cont.).

No.	Code	Biomass (g/l)	ARA yield (mg/g DCW)	ARA production (mg/l)
68	TISTR 1705	2.49 ± 0.19	-	-
69	TISTR 1712	0.88 ± 0.24	-	-
70	TISTR1715	0.16 ± 0.02	3.67 ± 0.45	0.60± 0.14
71	TISTR 1719	0.14 ± 0.02	1.72 ± 0.11	0.23 ± 0.04
72	TISTR 1725	0.29 ± 0.08	-	-
73	TISTR 1726	0.36 ± 0.09	-	-
74	TISTR 1727	1.35 ± 0.30	-	-
75	TISTR 1728	0.88 ± 0.04	-	-
76	TISTR 1730	0.40 ± 0.04	-	-
77	TISTR 1731	1.26 ± 0.17	-	-
78	TISTR 1733	0.68 ± 0.03	-	-
79	TISTR 1736	1.05 ± 0.03	-	-
80	TISTR 1762	0.47 ± 0.02	-	-
81	TISTR 1771	0.48 ± 0.03	-	-
82	TISTR 1773	1.73 ± 0.13	-	-
83	TISTR 1774	0.95 ± 0.15	-	-
84	TISTR 1775	1.49 ± 0.44	-	-
85	TISTR 1777	1.02 ± 0.02	-	-

DCW, Dry cell weight; ARA, Arachidonic acid.

2. การศึกษาระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะซิโตนิกของแบคทีเรียไกลดิงสายพันธุ์ *A. maritima* TISTR 1715

จากการศึกษาผลของระยะเวลาในการเลี้ยงแบคทีเรียไกลดิงสายพันธุ์ *A. maritima* TISTR 1715 โดยเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร modified SAP2 เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที พบว่าแบคทีเรียไกลดิง *A. maritima* TISTR 1715 มีการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียสูงสุดที่เวลา 2 วัน โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.54 ± 0.01 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นแบคทีเรียเริ่มมีการเจริญเติบโตลดลง จนมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.16 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงนาน 7 วัน ตามลำดับ ดังแสดงใน Figure 11A โดยค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเพาะเลี้ยงเท่ากับ 7.5 จากนั้นเพิ่มสูงขึ้นเป็น 8.5 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน เนื่องจากในอาหารเหลว modified SAP2 ประกอบด้วยทริปโตเจนและยีสต์สกัด แบคทีเรียจึงย่อยทริปโตเจนและยีสต์สกัดได้เป็นเปปไทด์และกรดอะมิโน เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ในขณะที่เดียวกันจะปลดปล่อยแอมโมเนียจากการย่อยสลายกรดอะมิโนดังกล่าว เมื่อแอมโมเนียที่เกิดขึ้นรวมตัวกับน้ำจะเกิดเป็นแอมโมเนียมไอออนและไฮดรอกซิล ซึ่งหมู่ไฮดรอกซิลจะทำให้ค่าพีเอชในอาหารเพาะเลี้ยงเพิ่มสูงขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Park และ Lee (1998) ซึ่งศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ทนความร้อนสูง *Sulfolobus solfataricus* พบว่าแอมโมเนียที่เกิดจากยีสต์สกัด ซึ่งเกิดจากการย่อยของแบคทีเรีย *S. solfataricus* ส่งผลต่อค่าพีเอชในอาหารเพาะเลี้ยง โดยเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีอัตราส่วนยีสต์สกัดต่อกลูโคสเท่ากับ 3:1 ในอาหาร มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 3.0 พบว่าที่เวลา 72 ชั่วโมง แบคทีเรีย *S. solfataricus* มีการเจริญเติบโตสูงสุด ซึ่งมีความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 1.2 กรัมต่อลิตร และตรวจพบปริมาณแอมโมเนียมไอออนเท่ากับ 35.0 มิลลิโมล ซึ่งทำให้ค่าพีเอชในอาหารเพาะเลี้ยงเปลี่ยนจาก 3.0 เป็น 5.6

สำหรับการผลิตกรดอะซิโตนิก พบว่าที่เวลา 3 วัน การผลิตกรดอะซิโตนิกสูงสุดเท่ากับ 5.99 ± 0.53 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ดังแสดงใน Figure 11B และลดลงหลังจาก 3 วัน ซึ่งมีปริมาณกรดอะซิโตนิกเท่ากับ 1.66 ± 0.12 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน จะเห็นได้ว่าการผลิตกรดอะซิโตนิกจากแบคทีเรียไกลดิง *A. maritima* TISTR 1715 เพิ่มขึ้นสูงสุดในช่วง early decline phase และมีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโต (Growth-associated production) เช่นเดียวกับการทดลองของ Patnayak และ Sree (2005) ซึ่งได้คัดเลือกแบคทีเรียที่มีผลิตภัณฑ์ไขมันไม่อิ่มตัวสูงจากฟองน้ำทะเล พบว่ามีแบคทีเรีย 1 ไอโซเลต คือ RLL-8 สามารถผลิตกรดแกมมาไลโนเลนิกและกรดอีโคซาเพนตะอีโนอิก เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร nutrient broth บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าแบคทีเรีย RLL-8 มีการผลิตกรดแกมมาไล

โนเลนิกและกรดอะมิโนโคซาเพนตะอีโนอิกเพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง exponential phase ที่เวลา 2 วัน และมีการผลิตได้สูงสุดในช่วง stationary phase ที่เวลา 3 วัน แต่ในการศึกษาการผลิตกรดอะมิโนโคซาเพนตะอีโนอิกในแบคทีเรีย *Shewanella putrefaciens* ACAM 342 พบว่าการผลิตของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงที่แบคทีเรียผลิตใน exponential phase มีปริมาณสูงกว่าใน stationary phase (Nichols *et al.*, 1994) อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์หลายชนิดมีการสะสมไขมันสำหรับใช้เป็นพลังงานเมื่อเซลล์มีอายุมากขึ้น ซึ่งไขมันเหล่านี้ประกอบไปด้วยกรดไขมันทั้งชนิดอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในจุลินทรีย์มีลักษณะคล้ายกับการเจริญเติบโต โดยจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งถึงจุดสูงสุดที่ late log phase หรือ early stationary phase และหลังจากนั้นจะมีปริมาณลดลงอย่างชัดเจนในช่วง late stationary phase หรือ decline phase (Erwin, 1973) อาจเนื่องจากการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงของจุลินทรีย์เกิดขึ้นภายในเซลล์ ดังนั้นเมื่อเซลล์มีการตายเกิดขึ้นจะเกิดจากกระบวนการย่อยสลายตัวเซลล์ (auto lysis) โดยเอนไซม์บางชนิดภายในเซลล์ (Poole, 1997) ซึ่งอาจทำให้กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงภายในเซลล์ถูกย่อยสลายโดยกระบวนการของเอนไซม์จากตัวเซลล์เอง หรือเซลล์อื่น ส่งผลให้โมเลกุลของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงแตกหรือเปลี่ยนแปลงเป็นสารชนิดอื่นได้ (Vote, 1990; Vote and Vote, 2004) ดังจะเห็นได้จากการศึกษาดังต่อไปนี้

Jang และคณะ (2005) ได้ศึกษาการผลิตกรดอะมิโนโคซาเพนตะอีโนอิกจากรา *Mortierella alpina* ATCC 32222 พบว่าในช่วงเวลาในการเลี้ยงรา *M. alpina* ATCC 32222 ในอาหาร basal medium ที่มี soluble starch ร้อยละ 2.0 เป็นแหล่งคาร์บอน และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8 วัน พบว่ารา *M. alpina* ATCC 32222 ให้ผลผลิตกรดอะมิโนโคซาเพนตะอีโนอิกสูงสุดในระยะเวลาการเลี้ยง 6 วัน ซึ่งอยู่ในช่วง stationary phase เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงรา *M. alpina* ATCC 32222 การผลิตกรดอะมิโนโคซาเพนตะอีโนอิกเริ่มมีการลดลงเนื่องจากราได้เข้าสู่ระยะ decline phase นอกจากนี้ Lan และคณะ (2002) ได้ศึกษาผลของกลูตาเมตต่อการผลิตกรดอะมิโนโคซาเพนตะอีโนอิกโดยเลี้ยงรา *M. alpina* ในอาหาร PDD medium ที่ประกอบด้วยกลูตาเมตร้อยละ 0.8 เขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน พบว่ารา *M. alpina* มีการผลิตกรดอะมิโนโคซาเพนตะอีโนอิกสูงสุดในระยะเวลา 7 วัน ซึ่งอยู่ในช่วงของ stationary phase และเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มขึ้นการผลิตกรดอะมิโนโคซาเพนตะอีโนอิกเริ่มลดลง เนื่องจากราเริ่มเข้าสู่ระยะ decline phase เช่นกัน

ดังนั้นจากผลการทดลองระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะมิโนโคซาเพนตะอีโนอิกของแบคทีเรีย *A. maritima* TISTR 1715 ในอาหารเหลว modified SAP2 ที่เวลา 2 วัน ให้ผลการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสูงสุด และผลิตกรดอะมิโนโคซาเพนตะอีโนอิกได้สูงสุดในระยะเวลา 3 วัน จึงกำหนดระยะเวลาในการเลี้ยงแบคทีเรีย *A. maritima* TISTR 1715 ในการทดลองต่อไปเป็นระยะเวลา 3 วัน

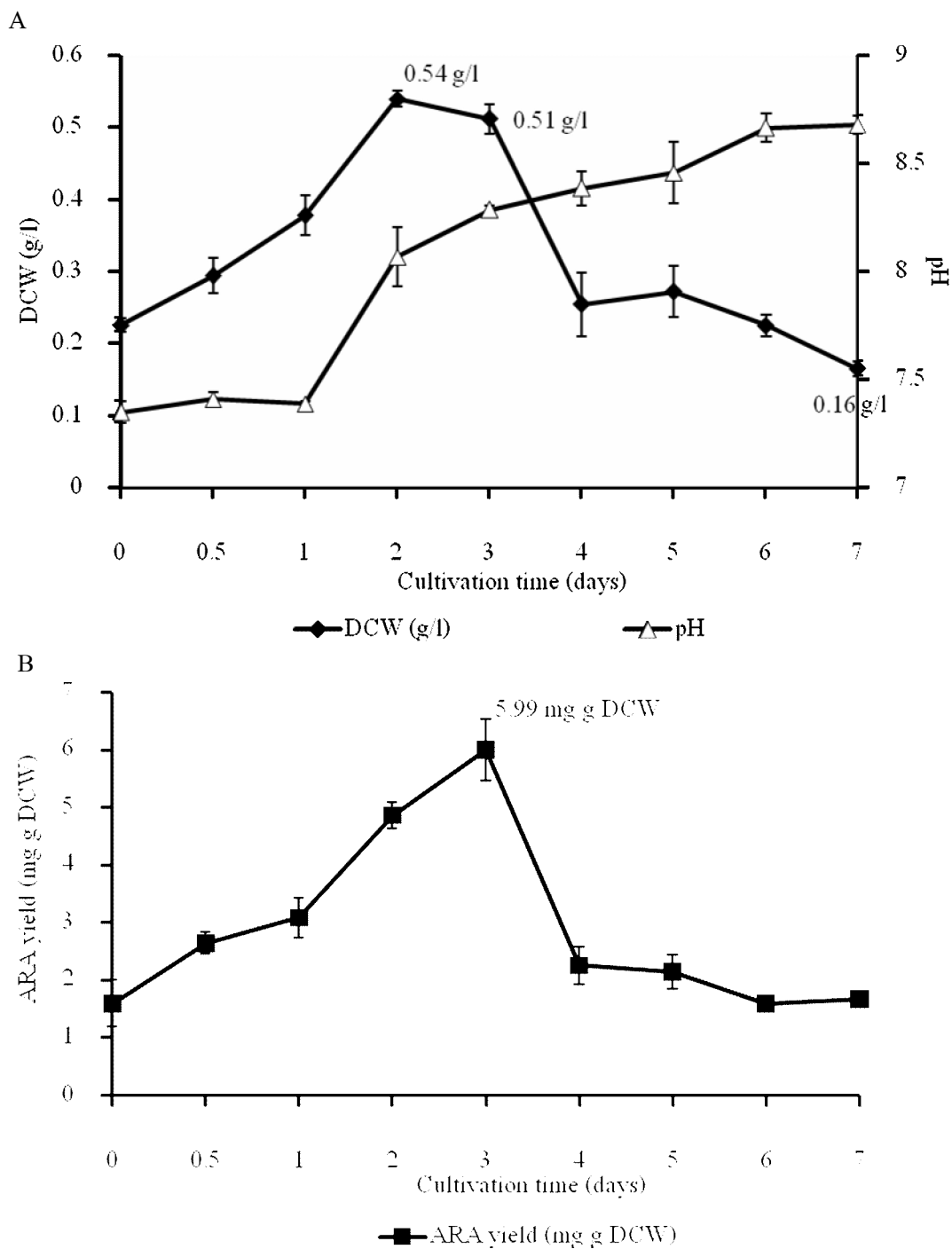


Figure 11. Growth curve (A) and ARA production (B) of marine gliding bacterium *A. maritima* TISTR 1715 grown in the modified SAP2 liquid medium. Vertical lines indicate S.D. DCW, Dry cell weight; ARA, Arachidonic acid.

3. การศึกษาปัจจัยที่มีต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราชิโคนิกของแบคทีเรียไกลดิงสายพันธุ์ *A. maritima* TISTR 1715

3.1 การคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราชิโคนิกของแบคทีเรียไกลดิงสายพันธุ์ *A. maritima* TISTR 1715 ด้วยวิธี Plackett-Burman design

จากการศึกษาการคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราชิโคนิกจากแบคทีเรียไกลดิง *A. maritima* TISTR 1715 ด้วยวิธี Plackett-Burman design ในอาหารเหลว ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีองค์ประกอบของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และโลหะหนักต่างๆ รวมทั้งการปรับพีเอชเริ่มต้น ความเร็วในการเขย่า และอุณหภูมิ ดังแสดงใน Table 10 รวมทั้งหมด 20 การทดลอง ดังแสดงใน Table 18 พบว่าการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราชิโคนิกอยู่ในช่วง 0.11-1.94 กรัมต่อลิตร และ 0.09-4.85 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ โดยการทดลองที่ 2 ให้การเจริญเติบโตในรูปน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 1.94 ± 0.06 กรัมต่อลิตร และผลผลิตกรดอะราชิโคนิกสูงสุดเท่ากับ 4.85 ± 0.03 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ดังแสดงใน Table 18 และเมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วย *t*-test พบว่า ทริปโตเนอและอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียไกลดิง *A. maritima* TISTR 1715 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น (confidence level) เท่ากับร้อยละ 95.6 และ 95.4 ตามลำดับ นอกจากนี้พีเอชและความเร็วรอบในการเขย่าเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดอะราชิโคนิกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 95.0 และ 97.5 ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 18

การคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงของจุลินทรีย์ด้วยวิธี Plackett-Burman design เป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้ในการคัดเลือกปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการตอบสนองต่าง ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เพื่อนำไปศึกษาถึงระดับของปัจจัยที่มีผลต่อการตอบสนองต่อไปซึ่งมีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย ตัวอย่างเช่น Chi และคณะ (2007) ได้คัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดโคโคซาเฮกซะอีโนอิกของสาหร่ายเซลล์เดี่ยวด้วยวิธี Plackett-Burman design พบว่า $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, NH_4Cl แร่ธาตุ (trace element) และอุณหภูมิ มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดโคโคซาเฮกซะอีโนอิกของสาหร่ายเซลล์เดี่ยวสายพันธุ์ *Schizochytrium limacinum* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.10$) นอกจากนี้การศึกษาของ Song และคณะ (2007) ในการคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดโคโคซาเฮกซะอีโนอิกของเซลล์สาหร่ายสายพันธุ์ *Schizochytrium limacinum* OUC88 ด้วยวิธี Plackett-Burman

design ซึ่งพบว่าอุณหภูมิ อัตราการให้อากาศ ความเร็วรอบในการเขย่าและอายุของเซลล์มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดโคโคซาเฮกซะอีโนอิก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จากการทดลองพบว่าทริปโตน (G) เป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียไกลดิง *A. maritima* TISTR 1715 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยพบว่าในชุดการทดลองที่ 2, 3 และ 9 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของทริปโตน 5 กรัมต่อลิตร มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.94, 1.71 และ 1.45 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ 14, 16 และ 18 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของทริปโตน 0.5 กรัมต่อลิตร มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.11, 0.13 และ 0.28 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Table 18) จึงเห็นได้ว่าชุดการทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีทริปโตนความเข้มข้นสูงส่วนใหญ่ส่งผลให้แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าในอาหารที่มีทริปโตนความเข้มข้นต่ำในบางชุดการทดลอง อาจเนื่องจากทริปโตนเป็นเปปไทด์ที่ได้จากโปรตีนเคซีน (casein) โดยกระบวนการย่อยของเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) ซึ่งอุดมไปด้วยกรดอะมิโนต่างๆ ได้แก่ กรดแอสปาดิก (aspartic acid) ทรีโอนิน (threonine) เซอรีน (serine) กรดกลูตามิก (glutamic acid) โพรลีน (proline) ไกลซีน (glycine) อะลานีน (alanine) วารีน (valine) เมทไทโอนีน (methionine) ไอโซลิวซีน (isoleucine) ลิวซีน (leucine) ไทโรซีน (tyrosine) ฟีนีลอะลานีน (phenylalanine) ไลซีน (lysine) ฮิสทีดีน (histidine) อาร์จินีน (arginine) และซิสทีน (cystine) โดยมีปริมาณเท่ากับร้อยละ 6.42, 3.67, 4.94, 19.68, 9.80, 1.81, 2.96, 6.18, 2.79, 5.01, 8.39, 5.54, 5.03, 7.41, 2.90, 3.46 และ 0.37 กรัมของเคซีน ตามลำดับ (Ellinger and Boyne, 1965) ซึ่งจะเห็นได้ว่าทริปโตนมีปริมาณของกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตค่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณของกรดอะมิโนชนิดเดียวกันในยีสต์สกัด ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน ได้แก่ กรดแอสปาดิก ทรีโอนิน เซอรีน กรดกลูตามิก โพรลีน ไกลซีน อะลานีน วารีน เมทไทโอนีน ไอโซลิวซีน ลิวซีน ไทโรซีน ฟีนีลอะลานีน ไลซีน ฮิสทีดีน อาร์จินีน และซิสทีน ในปริมาณเท่ากับร้อยละ 2.07, 0.47, 0.66, 4.35, 0.55, 1.98, 0.58, 0.42, 0.03, 0.43, 0.61, 0.44, 0.40, 0.26, 0.59, 0.28 และ 0.53 ของกรัมยีสต์สกัด ตามลำดับ (Eden *et al.*, 2002) ซึ่งแหล่งไนโตรเจนมีความจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียทั่วไป เพื่อการสังเคราะห์สารพันธุกรรมและส่วนประกอบต่างๆของเซลล์ อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนจำพวกอินทรีย์และอนินทรีย์ได้แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น การศึกษาของ Hosoya และคณะ (2006) พบว่าแบคทีเรียไกลดิง *A. marina* สามารถใช้สารอินทรีย์ได้แก่ เคซีนและเจลาติน (gelatin) เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีกว่าพวกสารอนินทรีย์ที่มีไนเตรตเป็นองค์ประกอบ สอดคล้องกับการศึกษาของ Haung และคณะ (2001) ได้ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของ *Thraustochytrium* sp. KK17-3 พบว่าเมื่อเลี้ยง *Thraustochytrium* sp. KK17-3 ใน

อาหารที่ประกอบด้วยทริปโตเคนความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 1 ของอาหารเพาะเลี้ยง ให้การเจริญเติบโตในรูปน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 7.10 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ NH_4NO_3 , NaNO_3 ยีสต์สกัดและยูเรีย ให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 5.80, 5.40, 4.50 และ 2.30 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้การใช้กลูตามัท (glutamate) ที่ความเข้มข้น 0.8 กรัมต่อลิตรในอาหารเพาะเลี้ยงราสายพันธุ์ *M. alpina* พบว่าทำให้รามีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น 1.2 เท่า โดยน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 25.00 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมกลูตามัทในอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 20.83 กรัมต่อลิตร (Lan *et al.*, 2002) ในขณะที่การเติมยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.4 ของอาหารเพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนให้แก่รา *Mortierella alliacea* YN-15 พบว่าให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 33.00 กรัมต่อลิตร มากกว่าที่ใช้ malt extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งให้น้ำหนักเซลล์แห้งเพียง 6.50 กรัมต่อลิตร (Aki *et al.*, 2001)

อุณหภูมิ (I) เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียไกลคิง *A. maritima* TISTR 1715 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่าในชุดการทดลองที่ 1, 7, 13, 14, 15, 16, 18 และ 20 ซึ่งเลี้ยงแบคทีเรียไกลคิงที่อุณหภูมิ 15.0 องศาเซลเซียส โดยมีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.37, 0.38, 0.34, 0.11, 0.13, 0.13, 0.28 และ 0.34 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเปรียบเทียบกับในชุดการทดลองที่ 2, 3, 8, 9 และ 17 ซึ่งเลี้ยงแบคทีเรียไกลคิงในอุณหภูมิ 25.0 องศาเซลเซียส โดยมีน้ำหนักแห้งในเท่ากับ 1.94, 1.71, 1.18, 1.45 และ 1.08 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 18 แสดงว่าแบคทีเรียไกลคิงในชุดการทดลองที่เลี้ยงในอุณหภูมิต่ำ (15.0 องศาเซลเซียส) มีแนวโน้มการเจริญเติบโตค่อนข้างต่ำ เมื่อเทียบกับชุดการทดลองส่วนใหญ่ที่เลี้ยงในอุณหภูมิ 25.0 องศาเซลเซียส เนื่องจากที่อุณหภูมิต่ำจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ จึงทำให้แบคทีเรียหยุดหรือชะลอการเจริญเติบโต (Poole, 1997) อย่างไรก็ตามแบคทีเรียที่แยกได้จากทะเลแต่ละชนิดจะมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตแตกต่างกัน ยกตัวอย่างเช่น แบคทีเรียไกลคิงจากทะเล *A. marina* และ *A. maritima* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตในช่วงอุณหภูมิที่ 25.0-30.0 และ 30.0 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Hosoya *et al.*, 2006; 2007) ในขณะที่แบคทีเรียจากทะเล *Shewanella olleyana* และ *Shewanella* sp. GA 22 มีการเจริญเติบโตสูงสุดที่อุณหภูมิ 20-22 และ 15 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Skerratt *et al.*, 2002; Gentile *et al.*, 2003) แต่จากการทดลองนี้ อุณหภูมิไม่มีผลต่อการผลิตกรดอะซิโตนิกในแบคทีเรียไกลคิง *A. maritima* TISTR 1715 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.887$) ซึ่งแตกต่างจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่อุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตกรดอะซิโตนิก ตัวอย่างเช่น รายงานของ Jang และคณะ (2000) เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตกรดอะซิโตนิกของรา *M. alpina* ATCC 32222 ในอาหารแข็ง โดยเฉพาะเลี้ยง *M. alpina* ATCC 32222 ในอาหารแข็ง ที่อุณหภูมิ 20.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน ให้ผลผลิตกรดอะซิโตนิก

เท่ากับ 33.35 มิลลิกรัมต่อกรัมอาหาร เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ตามด้วยการลดอุณหภูมิลงเหลือ 12.0 องศาเซลเซียส แล้วเลี้ยงต่อเป็นเวลา 3 วัน พบว่าการลดอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงลงทำให้เพิ่มการผลิตกรดอะซิโตนิกได้สูงขึ้นเท่ากับ 48.73 มิลลิกรัมต่อกรัมอาหาร นอกจากนี้ Jang และคณะ (2005) ยังได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยเพาะเลี้ยง *M. alpina* ATCC 32222 ในอาหารเหลว basal medium ที่ประกอบด้วยสารละลายแป้ง (soluble starch) ร้อยละ 2 ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 12.0-25.0 องศาเซลเซียส พบว่า *M. alpina* ATCC 32222 สามารถผลิตกรดอะซิโตนิกได้เพิ่มขึ้นเมื่อที่อุณหภูมิต่ำ โดยที่อุณหภูมิ 12.0 องศาเซลเซียส มีการผลิตกรดอะซิโตนิก สูงสุดเท่ากับ 882.40 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมา คือ การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ ที่ 15.0, 20.0 และ 25.0 องศาเซลเซียส ซึ่งผลิตกรดอะซิโตนิกเท่ากับ 871.90, 826.30 และ 630.60 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เนื่องจากอุณหภูมิที่ลดต่ำลงจะกระตุ้นให้จุลินทรีย์สร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงชนิดเดียวกันที่อุณหภูมิสูงกว่า ทั้งนี้เพื่อรักษา คุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ในการแลกเปลี่ยนสารและกระบวนการทำงานภายในเซลล์ให้ปกติ เนื่องจากกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงเหล่านี้จะไม่เกิดการแข็งตัวเป็นไขที่อุณหภูมิต่ำ (Wen and Chen, 2003)

ค่าพีเอชเริ่มต้น (H) เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดอะซิโตนิกของแบคทีเรีย ไกลดิง *A. maritima* TISTR 1715 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) พบว่าในชุดการทดลองที่ 5, 9 และ 12 ซึ่งเลี้ยงแบคทีเรียไกลดิงที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 มีการผลิตกรดอะซิโตนิกในปริมาณ เท่ากับ 0.09, 0.10 และ 0.34 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ โดยปริมาณของกรดอะซิโตนิก ต่ำกว่าในชุดการทดลองที่ 2, 3, 8, 10, 11 และ 16 ซึ่งเลี้ยงแบคทีเรียไกลดิงที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 ซึ่งปริมาณกรดอะซิโตนิกเท่ากับ 4.85, 3.96, 4.30, 4.29, 4.34 และ 3.99 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 18 ซึ่งจะเห็นได้ว่าชุดการทดลองส่วนใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร ที่มีพีเอชเริ่มต้นสูง (pH 8.0) ส่งผลให้ผลผลิตกรดอะซิโตนิกสูงกว่าในชุดการทดลองที่เพาะเลี้ยง ในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นต่ำ (pH 6.0) อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ดีใน พีเอชที่แตกต่างกัน ดังนั้นการสร้างกรดไขมันจึงแตกต่างกันในสภาวะเลี้ยงที่มีค่าพีเอชต่างกัน ตัวอย่างเช่น การศึกษาผลของพีเอชต่อการผลิตกรดอะซิโตนิกของรา *M. alpina* พบว่าเมื่อควบคุม พีเอชโดยการเติม NH_4OH เท่ากับร้อยละ 14 ในอาหารเพาะเลี้ยงมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.0 ทำให้ผลผลิต กรดอะซิโตนิกเท่ากับ 18.8 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ชุดควบคุมที่พีเอชเท่ากับ 5.5 ได้ผลผลิตกรดอะซิโตนิกเท่ากับ 7.2 กรัมต่อลิตร (Hwang *et al.*, 2005) ในขณะที่ Wen และ Chen (2003) ได้ศึกษา ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตกรดอิกโซเพนตะอีโนอิกของสาหร่ายเซลล์เดียว *P. tricornutum* ใน อาหารเพาะเลี้ยงที่มีพีเอชตั้งแต่ 6.0 ถึง 8.0 พบว่ามีปริมาณชีวมวลของสาหร่ายเซลล์เดียวไม่แตกต่าง

กันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ปริมาณกรดอีโคซาเพนตะอีโนอิกที่ผลิตขึ้นจะแตกต่างกันในแต่ละสภาวะที่มีค่าพีเอช ต่างๆ ซึ่งปริมาณของกรดอีโคซาเพนตะอีโนอิกจะมีปริมาณสูงสุดในการเลี้ยงที่ค่าพีเอชเท่ากับ 7.6 นอกจากนี้ Yuan และคณะ (2002) ได้ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตกรดอะราชิโดนิกจากรา *M. alpina* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอชตั้งแต่ 4.0-10.0 พบว่าเราสามารถผลิตกรดอะราชิโดนิกได้มากที่สุดที่พีเอช 8.0 แต่ Higashiyama และคณะ (1998) ได้ศึกษาผลของพีเอชต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราชิโดนิกของรา *M. alpina* 1S-4 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นตั้งแต่ 4.6-8.1 พบว่าเรามีการเจริญและผลิตกรดอะราชิโดนิกสูงสุดในช่วงพีเอชเริ่มต้น 6.1-6.6 ซึ่งปริมาณของกรดอะราชิโดนิกเท่ากับ 3.0 กรัมต่อลิตร หรือเพิ่มขึ้น 1.26 เท่า จากชุดควบคุมที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.6 ซึ่งมีปริมาณกรดอะราชิโดนิกเท่ากับ 2.38 กรัมต่อลิตร

การให้อากาศโดยการแปรผัน (J) พบว่าเป็นอีกปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตกรดอะราชิโดนิกของแบคทีเรียไกลดิง *A. maritima* TISTR 1715 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่าในชุดการทดลองที่ 2, 8 และ 11 โดยเลี้ยงแบคทีเรียที่ความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 100 รอบต่อนาที ให้ปริมาณกรดอะราชิโดนิกเท่ากับ 4.85, 4.30 และ 4.34 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 18 ซึ่งมีปริมาณกรดอะราชิโดนิกสูงกว่าในทุกชุดการทดลองที่เพาะเลี้ยงด้วยความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที ซึ่งจะเห็นได้ว่าผลผลิตกรดอะราชิโดนิกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เมื่อลดความเร็วรอบในการเขย่าลงจาก 200 เป็น 100 รอบต่อนาที (Table 18) ซึ่งความเร็วรอบของการเขย่ามีความสัมพันธ์กับปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเพาะเลี้ยง เนื่องจากการเพิ่มความเร็วรอบในการเขย่าจะทำให้อาหารเพาะเลี้ยงมีการเคลื่อนไหวและสัมผัสกับอากาศเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้เพิ่มปริมาณออกซิเจนที่ละลาย (dissolve oxygen) ในอาหารเพาะเลี้ยง โดยออกซิเจนที่ละลายในอาหารจะมีผลต่อปฏิกิริยาการเติมออกซิเจน (oxygenation) ส่งผลต่อการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในจุลินทรีย์ (Ratledge, 1992) แต่การเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีออกซิเจนในอาหารเพาะเลี้ยงในปริมาณที่ค่อนข้างสูง ทำให้จุลินทรีย์ต้องเพิ่มพลังงานภายในเซลล์จึงเกิดกระบวนการกรดไขมัน (β -oxidation of fatty acid) เพื่อให้ได้เป็นพลังงาน นำมาใช้ปรับตัวให้เหมาะสมในสภาวะที่มีออกซิเจนที่ละลายในอาหารเพาะเลี้ยงในปริมาณสูง (Sato, 1990; Grynberg and Demaison, 1996) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของนลินี เพชรเทียนชัย (2545) ในการศึกษาผลของความเร็วรอบในการเขย่าต่อการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงของแบคทีเรียน้ำเค็ม ON-17 ในอาหาร seawater medium ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าการผลิตกรดไลโนเลนิกเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเร็วรอบในการเขย่าจาก 100 เป็น 180 รอบต่อนาที โดยมีการผลิตกรดไลโนเลนิกเท่ากับร้อยละ 1.31 ของกรดไขมันทั้งหมด แต่เมื่อความเร็วรอบในการเขย่าเพิ่มขึ้นเท่ากับ 200 รอบต่อนาที การผลิตกรดไลโนเลนิกกลับลดลงเท่ากับร้อยละ 1.18 ของกรด

ไขมันทั้งหมด นอกจากนี้มีรายงานถึงปริมาณของออกซิเจนที่ละลายในอาหารต่อการผลิตกรดอะราซิโคติกของรา *M. alpina* 1S-4 พบว่าเมื่อปริมาณของออกซิเจนที่ละลายในอาหารเพาะเลี้ยงอยู่ในช่วง 10.0-15.0 ppm ผลผลิตกรดอะราซิโคติกเพิ่มขึ้นเท่ากับร้อยละ 18.4 ของน้ำหนักเซลล์แห้งหรือเพิ่มขึ้น 1.6 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเท่ากับ 7.0 ppm ซึ่งมีผลผลิตกรดอะราซิโคติกเท่ากับร้อยละ 11.5 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่เมื่อเพิ่มปริมาณของออกซิเจนที่ละลายสูงขึ้นในอาหารเพาะเลี้ยงในช่วง 20.0-30.0 ppm กลับทำให้ผลผลิตกรดอะราซิโคติกลดลงเท่ากับร้อยละ 16.7 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Higashiyama *et al.*, 1998)

กลูโคส (A) เป็นปัจจัยที่ไม่มีผลทั้งต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียไกลดิ้ง *A. maritima* TISTR 1715 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยพบว่าในชุดการทดลองที่ 1, 3, 4, 9, 11, 13, 14, 15, 16 และ 19 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียไกลดิ้งดังกล่าวในอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นในระดับสูงเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร จะมีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.37, 1.71, 0.26, 1.45, 0.54, 0.34, 0.11, 0.13, 0.13 และ 0.43 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Table 18) ส่วนในชุดการทดลองที่ 2, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 17, 18 และ 20 ที่เลี้ยงแบคทีเรียไกลดิ้งดังกล่าวในอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคสที่ความเข้มข้นในระดับต่ำเท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.94, 0.43, 0.99, 0.38, 1.18, 0.86, 0.28, 1.08, 0.28 และ 0.34 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Table 18) ซึ่งจะเห็นได้ชุดการทดลองส่วนใหญ่ที่เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคสระดับต่ำ (1 กรัมต่อลิตร) จะมีการเจริญเติบโตสูงกว่าในชุดการทดลองที่เลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคสสูง (10 กรัมต่อลิตร) ซึ่งสอดคล้องกับค่า coefficient ซึ่งมีค่าเท่ากับ -0.012 ซึ่งมีแนวโน้มของการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเมื่อลดความเข้มข้นของกลูโคสลงเล็กน้อยจากระดับสูง ในขณะที่การผลิตกรดอะราซิโคติกในชุดการทดลองที่ 1, 3, 4, 9, 11, 13, 14, 15, 16 และ 19 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียไกลดิ้งดังกล่าวในอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคสเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดอะราซิโคติกเท่ากับ 0.44, 3.96, 1.23, 0.10, 4.34, 2.77, 2.53, 2.26, 3.99 และ 2.53 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ส่วนในชุดการทดลองที่ 2, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 17, 18 และ 20 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคสเท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดอะราซิโคติกเท่ากับ 4.85, 0.09, 1.35, 3.78, 4.30, 4.29, 0.34, 2.99, 1.31 และ 2.82 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ซึ่งจะเห็นได้ว่าชุดการทดลองส่วนใหญ่ที่เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารประกอบด้วยกลูโคสต่ำ (1 กรัมต่อลิตร) ส่งให้ผลผลิตกรดอะราซิโคติกสูงกว่าชุดการทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคสสูง (10 กรัมต่อลิตร) ซึ่งสอดคล้องกับค่า coefficient ซึ่งมีค่าเท่ากับ -0.099 ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าการเจริญเติบโตและผลผลิตกรดอะราซิโคติกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อลดความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเพาะเลี้ยงลง อย่างไรก็ตามการใช้กลูโคสเป็นแหล่งพลังงานของจุลินทรีย์โดยทั่วไป ซึ่งใช้ในการเจริญเติบโต รวมทั้งมีผลต่อการผลิตกรดไขมันไม่

อิมตัวสูงในจุลินทรีย์ (Jang *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2005) ในการทดลองของ Wu และคณะ (2005) ได้ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดโคโคซาเฮกซะอีโนอิกของสายพันธุ์เชื้อราเดี่ยวสายพันธุ์ *Schizochytrium* sp. S31 พบว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนให้การเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ 5.51 กรัมต่อลิตร รองลงมา ได้แก่ ฟรุกโตส มอสโตส ซูโครสและแลคโตส โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 5.24, 3.04, 3.09 และ 2.78 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่การผลิตกรดโคโคซาเฮกซะอีโนอิกของ *Schizochytrium* sp. S31 พบการผลิตกรดโคโคซาเฮกซะอีโนอิกในปริมาณสูงเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้กลูโคสและฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนเท่านั้น โดยการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนให้ปริมาณกรดโคโคซาเฮกซะอีโนอิกสูงสุดเท่ากับ 0.31 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ ฟรุกโตส ซึ่งให้ปริมาณกรดโคโคซาเฮกซะอีโนอิกเท่ากับ 0.25 กรัมต่อลิตร ส่วนแหล่งคาร์บอนอื่นๆ มีผลต่อการผลิตกรดโคโคซาเฮกซะอีโนอิกในเซลล์ปริมาณน้อยมาก นอกจากนี้กลูโคสในอาหารเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นในระดับสูงและต่ำ มีผลทั้งเพิ่มและลดการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราชิไดนิคของแบคทีเรียในแต่ละชุดการทดลองแตกต่างกันออกไป อาจเนื่องจากในชุดการทดลองมีการเติมแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ได้แก่ ฟรุกโตสและซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นในระดับสูงและต่ำ จึงทำให้ปริมาณของคาร์บอนในแต่ละชุดการทดลองแตกต่างกันออกไป โดยแบคทีเรียไกลดิงดังกกล่าวจึงใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ใช้ได้ง่ายก่อนและใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่นถัดไปจึงอาจส่งผลให้เกิดความแปรปรวนของน้ำหนักเซลล์แห้งและการผลิตกรดอะราชิไดนิคในชุดการทดลองที่การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman design ดังนั้นผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย *t*-test จึงให้ความเชื่อมั่นทางสถิติของการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราชิไดนิคเท่ากับร้อยละ 71.4 และ 27.2 ตามลำดับ ซึ่งมีระดับความเชื่อมั่นต่ำกว่าระดับความเชื่อมั่นที่กำหนดในการทดลองที่ร้อยละ 95.0 ส่งผลให้กลูโคสเป็นปัจจัยที่ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราชิไดนิคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ฟรุกโตส (B) เป็นอีกปัจจัยที่ไม่มีผลต่อทั้งการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราชิไดนิคของแบคทีเรียไกลดิง *A. maritima* TISTR 1715 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยพบว่าในชุดการทดลองที่ 1, 2, 4, 5, 10, 12, 14, 15, 16 และ 17 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยฟรุกโตสเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.37, 1.94, 0.26, 0.43, 0.86, 0.28, 0.11, 0.13, 0.13 และ 1.08 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ชุดการทดลองที่ 3, 6, 7, 8, 9, 11, 13, 18, 19 และ 20 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียไกลดิงดังกกล่าวในอาหารที่ประกอบด้วยฟรุกโตสเท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.71, 0.99, 0.38, 1.18, 1.45, 0.54, 0.34, 0.28, 0.43 และ 0.34 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Table 18) ซึ่งจะเห็นได้ชุดการทดลองส่วนใหญ่ที่เลี้ยงแบคทีเรียไกลดิงดังกกล่าวในอาหารที่ประกอบด้วยฟรุกโตสต่ำ (1 กรัมต่อลิตร) ส่งผลให้การเจริญเติบโตสูงกว่าในชุดการทดลองที่

เลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยฟรุกโตสสูง (10 กรัมต่อลิตร) ซึ่งสอดคล้องกับค่า coefficient ซึ่งมีค่าเท่ากับ -0.010 ซึ่งมีแนวโน้มของการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเมื่อลดความเข้มข้นของฟรุกโตสลงเล็กน้อยจากระดับสูง นอกจากนี้การผลิตรคอะราซิโดนิกในชุดการทดลองที่ 1, 2, 4, 5, 10, 12, 14, 15, 16 และ 17 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยฟรุกโตสเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดอะราซิโดนิกเท่ากับ 0.44, 4.85, 1.23, 0.09, 4.29, 0.34, 2.53, 2.26, 3.99 และ 2.99 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ และในชุดการทดลองที่ 3, 6, 7, 8, 9, 11, 13, 18, 19 และ 20 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วยฟรุกโตสเท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดอะราซิโดนิกเท่ากับ 3.97, 1.35, 3.78, 4.30, 0.10, 4.34, 2.77, 1.31, 2.53 และ 2.82 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ (Table 18) ซึ่งจะเห็นได้ว่าชุดการทดลองส่วนใหญ่เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วยฟรุกโตส ระดับต่ำ (1 กรัมต่อลิตร) ส่งผลให้การผลิตกรดอะราซิโดนิกสูงกว่าในชุดการทดลองที่เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วยฟรุกโตสสูง (10 กรัมต่อลิตร) สอดคล้องกับค่า coefficient ซึ่งมีค่าเท่ากับ -0.213 ซึ่งการผลิตกรดอะราซิโดนิกแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อลดความเข้มข้นของฟรุกโตสลงจากระดับสูง ดังนั้นเมื่อลดความเข้มข้นของฟรุกโตสลงการเจริญเติบโตและการผลิตรคอะราซิโดนิกเพิ่มขึ้นอย่างไรก็ตามฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เป็นแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโตรวมทั้งการผลิตไขมันไม่อิ่มตัว แต่การออกแบบชุดการทดลองโดยวิธี Plackett-Burman design ซึ่งใช้ ฟรุกโตสและแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ได้แก่ กลูโคสและซูโครส ที่ความเข้มข้นในระดับสูงและต่ำ ซึ่งส่งผลต่อการเพิ่มและลดการเจริญเติบโตและการผลิตรคอะราซิโดนิกของแบคทีเรียไกลดิงดังกล่าวในแต่ละชุดการทดลองแตกต่างกันออกไป ดังนั้นผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย *t*-test จึงให้ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติของการเจริญเติบโตและการผลิตรคอะราซิโดนิกเท่ากับร้อยละ 66.0 และ 53.4 ต่ำกว่าที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 แสดงว่าฟรุกโตสเป็นปัจจัยที่ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตรคอะราซิโดนิกของแบคทีเรียไกลดิง *A. maritima* TISTR 1715 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ซูโครส (C) เป็นแหล่งคาร์บอนที่เป็นปัจจัยที่ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตรคอะราซิโดนิกของแบคทีเรียไกลดิง *A. maritima* TISTR 1715 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เช่นกัน โดยพบว่าในชุดการทดลองที่ 2, 3, 5, 6, 11, 13, 15, 16, 17 และ 18 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียไกลดิงดังกล่าวในอาหารที่ประกอบด้วยซูโครสเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.94, 1.71, 0.43, 0.99, 0.54, 0.34, 0.13, 0.13, 1.08 และ 0.28 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ 1, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 19 และ 20 ที่เลี้ยงแบคทีเรียไกลดิงในอาหารที่ประกอบด้วยซูโครสเท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.37, 1.71, 0.38, 1.18, 1.45, 0.86, 0.28, 0.11, 0.43 และ 0.34 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Table 18) จะเห็นได้ว่าชุดการ

ทดลองส่วนใหญ่ที่เลี้ยงแบคทีเรียไกลคิงในอาหารที่ประกอบด้วยซูโครสสูง (10 กรัมต่อลิตร) ส่งให้การเจริญเติบโตสูงกว่าในชุดการทดลองที่เลี้ยงแบคทีเรียไกลคิงในอาหารที่ประกอบด้วยซูโครสต่ำ (1 กรัมต่อลิตร) สอดคล้องกับค่า coefficient ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.010 โดยบ่งบอกถึงแนวโน้มของการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสในระดับสูง สำหรับการผลิตรดอะราซิไดนิกของแบคทีเรียไกลคิงในชุดการทดลองที่ 2, 3, 5, 6, 11, 13, 15, 16, 17 และ 18 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยซูโครสเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดอะราซิไดนิกเท่ากับ 4.85, 3.96, 0.09, 1.35, 4.34, 2.77, 2.26, 3.99, 2.99 และ 1.31 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ ในขณะที่ชุดการทดลองที่ 1, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 19 และ 20 ให้ปริมาณกรดอะราซิไดนิกเท่ากับ 0.44, 1.23, 1.35, 3.78, 4.30, 0.10, 4.29, 0.34, 2.53, 2.53 และ 2.82 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ (Table 18) ซึ่งเห็นได้ว่าชุดการทดลองส่วนใหญ่ที่เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วยซูโครสสูง ส่งให้ผลผลิตกรดอะราซิไดนิกสูงกว่าชุดการทดลองที่เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วยซูโครสต่ำ สอดคล้องกับค่า coefficient ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.278 แสดงว่าการเจริญเติบโตและการผลิตรดอะราซิไดนิกของแบคทีเรียไกลคิงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซูโครส จะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มปริมาณของซูโครสซึ่งเป็นไดแซคคาไรด์ (disaccharide) ที่ประกอบด้วยกลูโคสและฟรุกโตสอย่าง 1 โมเลกุล ทำให้กลูโคสและฟรุกโตสเพิ่มขึ้นทั้งสองชนิด นอกจากนี้เนื่องจากแบคทีเรียไกลคิง *A. maritima* อาจสามารถผลิตเอนไซม์ซูเครส (sucrase) (Hosoya *et al.*, 2007) จึงสามารถนำกลูโคสและฟรุกโตสเข้าวัฏจักรไกลโคไลซิส (glycolysis) และเครป (Kreb's cycle) จึงให้พลังงานมากกว่าโมโนแซคคาไรด์ส่งผลให้เพิ่มการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์กรดไขมันได้ดี (Voet and Voet, 2004) กว่าชุดการทดลองที่ใช้กลูโคสหรือฟรุกโตสเดี่ยวๆ ในระดับสูง ซึ่งจะเห็นจากการศึกษาของ Dyal และคณะ (2005) ได้ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตรดแกมมาไลโนเลนิกของรา *Mortierella ramanniana* พบว่าการใช้ซูโครสและฟรุกโตสที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 ของอาหารเพาะเลี้ยง ให้การเจริญเติบโตของรา *M. ramanniana* ในรูปของน้ำหนักชีวมวลสูงทั้ง 2 แหล่งคาร์บอน ในขณะที่การใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนให้การผลิตรดแกมมาไลโนเลนิกสูงเท่ากับ 0.012 กรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง สูงกว่าการใช้ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีการผลิตรดแกมมาไลโนเลนิกเท่ากับ 0.010 กรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง อย่างไรก็ตามในชุดการทดลองที่ออกแบบด้วยวิธี Plackett-Burman design มีการเติมแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ได้แก่ กลูโคสและฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นในระดับสูงและต่ำ ส่งผลให้ปริมาณของคาร์บอนในแต่ละชุดการทดลองแตกต่างกันออกไปส่งผลให้เกิดความแปรปรวนของน้ำหนักเซลล์แห้งและการผลิตรดอะราซิไดนิกในชุดการทดลองสูง และผลการวิเคราะห์ทางสถิติซูโครสเป็นปัจจัยที่ไม่มีผลต่อทั้งการเจริญเติบโตและการผลิตรดอะราซิไดนิกของแบคทีเรียไกลคิง *A. maritima* TISTR 1715

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) จึงต้องแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นโดยทำการทดลองแยกเพื่อศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนทั้ง 3 ชนิด ต่อทั้งการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะซิโตนิกของแบคทีเรียไกลดิง *A.maritima* TISTR 1715

สำหรับ KNO_3 (D) เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไม่มีผลทั้งต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะซิโตนิกของแบคทีเรียไกลดิง *A. maritima* TISTR 1715 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) พบว่าในชุดการทดลองที่ 3, 4, 6, 7, 12, 14, 17, 18 และ 19 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วย KNO_3 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.71, 0.26, 0.99, 0.38, 0.28, 0.11, 0.13, 1.08, 0.28 และ 0.43 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับในชุดการทดลองที่ 1, 2, 5, 8, 9, 10, 11, 13, 15, 16 และ 20 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียไกลดิงในอาหารที่ประกอบด้วย KNO_3 เท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.37, 1.94, 0.43, 1.18, 1.45, 0.86, 0.54, 0.34, 0.13 และ 0.34 กรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่าชุดการทดลองส่วนใหญ่ที่เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วย KNO_3 ต่ำ (0.5 กรัมต่อลิตร) ส่งให้การเจริญเติบโตของแบคทีเรียสูงกว่าชุดการทดลองที่ประกอบด้วย KNO_3 สูง (5 กรัมต่อลิตร) สอดคล้องกับค่า coefficient ซึ่งค่าเท่ากับ -0.010 โดยการเจริญเติบโตมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อลดความเข้มข้นของ KNO_3 ลง สำหรับการผลิตกรดอะซิโตนิกของแบคทีเรียไกลดิงในชุดการทดลองที่ 3, 4, 6, 7, 12, 14, 17, 18 และ 19 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วย KNO_3 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดอะซิโตนิกเท่ากับ 3.96, 1.23, 1.35, 3.78, 0.34, 2.53, 3.99, 2.99, 1.31 และ 2.553 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้งตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับในชุดการทดลองที่ 1, 2, 5, 8, 9, 10, 11, 13, 15, 16 และ 20 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วย KNO_3 เท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดอะซิโตนิกเท่ากับ 0.44, 4.85, 0.09, 4.30, 0.10, 4.29, 4.34, 2.77, 2.26 และ 2.82 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้งตามลำดับ จะเห็นได้ว่าชุดการทดลองส่วนใหญ่ที่เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วย KNO_3 ต่ำ ส่งให้ผลผลิตกรดอะซิโตนิกของแบคทีเรียสูงกว่าชุดการทดลองที่ประกอบด้วย KNO_3 สูง สอดคล้องกับค่า coefficient ซึ่งมีค่าเท่ากับ -0.111 ดังนั้นการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะซิโตนิกของแบคทีเรียไกลดิงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อลดความเข้มข้นของ KNO_3 ลง อาจเนื่องมาจากเมื่อเติม KNO_3 ในอาหารเลี้ยงเพาะเลี้ยง จะเกิดการแตกตัวเป็น K^+ และ NO_3^- ซึ่ง NO_3^- สามารถเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในจุลินทรีย์ (Jang *et al.*, 2005) อย่างไรก็ตาม NO_3^- แบคทีเรียจากทะเลบางชนิด เช่น *Croceibacter atlanticus*, *Owenweeksia hongkongensis*, *Tenacibaculum maritimum*, *A. marina* และ *A. maritima* ไม่สามารถใช้ NO_3^- เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ (Cho and Giovannoni, 2003; Lau *et al.*, 2005, Suzuki *et al.*, 2005; Hosoya *et al.*, 2006; 2007) อาจเนื่องจากขาดเอนไซม์ nitrate reductase (Bonete *et al.*, 2008) ในการนำ NO_3^-

เข้าภายในเซลล์เพื่อใช้ในการสังเคราะห์กรดอะมิโน ดังนั้นการเติม KNO_3 ในอาหารเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นในช่วง 0.5-5.0 กรัมต่อลิตร จึงไม่ส่งผลต่อทั้งการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะมิโนโคโรนิกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

NH_4NO_3 (E) เป็นแหล่งไนโตรเจนและเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ไม่มีผลต่อทั้งการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะมิโนโคโรนิกของแบคทีเรียไกลคิง *A. maritima* TISTR 1715 โดยพบว่าในชุดการทดลองที่ 1, 4, 5, 7, 8, 13, 15, 17, 18 และ 19 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียไกลคิงในอาหารที่ประกอบด้วย NH_4NO_3 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.37, 0.26, 0.43, 0.38, 1.18, 0.34, 0.13, 1.08, 0.28 และ 0.43 กรัมต่อลิตร และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ 2, 3, 6, 9, 10, 11, 12, 14, 16 และ 20 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วย NH_4NO_3 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.94, 1.71, 0.99, 1.45, 0.86, 0.54, 0.28, 0.11, 0.13 และ 0.34 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าชุดการทดลองส่วนใหญ่ที่เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วยความเข้มข้น NH_4NO_3 ต่ำ ส่งผลให้ผลการเจริญเติบโตสูงกว่าชุดการทดลองที่เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วยความเข้มข้น NH_4NO_3 สูง สอดคล้องกับค่า coefficient ซึ่งมีค่าเท่ากับ -0.017 ซึ่งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อลดความเข้มข้นของ NH_4NO_3 ลง สำหรับกรดอะมิโนโคโรนิกในชุดการทดลองที่ 1, 4, 5, 7, 8, 13, 15, 17, 18 และ 19 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียไกลคิงในอาหารที่ประกอบด้วย NH_4NO_3 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดอะมิโนโคโรนิกเท่ากับ 0.44, 1.23, 0.09, 3.78, 4.30, 2.776, 2.26, 2.99, 1.31 และ 2.53 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ 2, 3, 6, 9, 10, 11, 12, 14, 16 และ 20 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วย NH_4NO_3 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดอะมิโนโคโรนิกเท่ากับ 4.85, 3.96, 1.35, 0.10, 4.29, 4.34, 0.34, 2.53, 3.99 และ 2.82 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ แสดงว่าการผลิตกรดอะมิโนโคโรนิกในชุดการทดลองส่วนใหญ่ที่เลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วย NH_4NO_3 ต่ำ มีแนวโน้มในการเพิ่มการผลิตกรดอะมิโนโคโรนิกเมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่เลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วย NH_4NO_3 สูง สอดคล้องกับค่า coefficient ซึ่งมีค่าเท่ากับ -0.343 ดังนั้นการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะมิโนโคโรนิกของแบคทีเรียไกลคิงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อลดความเข้มข้นของ NH_4NO_3 อาจเนื่องจาก NH_4NO_3 ในอาหารเพาะเลี้ยงเกิดการแตกตัวเป็น NH_4^+ และ NO_3^- ซึ่ง NH_4^+ ที่เพิ่มสูงขึ้นส่งผลทำให้ค่าพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นซึ่งส่งผลต่อทั้งการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะมิโนโคโรนิก นอกจากนี้รายงานว่าการเพิ่มความเข้มข้น NH_4^+ เท่ากับ 200 μM ในอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus arabinosus* มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ triose-phosphate isomerase (Tsuyuki and Macleod, 1950) อาจส่งผลต่อกระบวนการสังเคราะห์พลังงานและสารตั้งต้นในการเจริญเติบโต ตลอดจนการผลิตกรดไขมัน

ภายในเซลล์แบคทีเรีย สอดคล้องกับการศึกษาของ Sayed และ Kenny (1978) ได้ศึกษาผลของความเข้มข้น NH_4^+ ต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Ureaplasma urealyticum* พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NH_4Cl เท่ากับ 40 และ 60 mM ของอาหารเพาะเลี้ยง ส่งผลให้การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *U. urealyticum* ลดลงเท่ากับ 8×10^6 และ 1×10^6 CFU/ml ลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติม NH_4Cl ให้ปริมาณเซลล์เท่ากับ 2.5×10^7 CFU/ml อย่างไรก็ตาม NH_4NO_3 ที่ความเข้มข้นช่วง 0.5-5.0 กรัมต่อลิตรในอาหารเพาะเลี้ยง จึงเป็นปัจจัยที่ไม่มีผลต่อทั้งการเจริญเติบโตและผลิตกรดอะซิโตนิกของแบคทีเรียไกลดิ้ง *A. maritima* TISTR 1715 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ยีสต์สกัด (F) เป็นปัจจัยที่ไม่มีผลต่อทั้งการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะซิโตนิกของแบคทีเรียไกลดิ้งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ พบว่าในชุดการทดลองที่ 1, 2, 5, 6, 8, 9, 14, 16, 18 และ 19 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วยยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.37, 1.94, 0.43, 0.99, 1.18, 1.45, 0.11, 0.13, 0.28 และ 0.43 กรัมต่อลิตร และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ 3, 4, 7, 10, 11, 12, 13, 15, 17 และ 20 โดยเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยยีสต์สกัดเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.71, 0.26, 0.38, 0.86, 0.54, 0.28, 0.34, 0.13, 1.08 และ 0.34 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Table 18) จะเห็นได้ว่าชุดการทดลองส่วนใหญ่ที่เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วยยีสต์สกัดสูง ส่งผลให้แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตสูงกว่าชุดการทดลองที่เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารยีสต์สกัดต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับค่า coefficient ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.007 แสดงว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยีสต์สกัดจะทำให้การเจริญเติบโตของแบคทีเรียมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น อาจเนื่องจากยีสต์สกัดเป็นแหล่งของกรดอะมิโน ได้แก่ กรดแอสปาทิก หรืออินิน เซอริน กรดกลูตามิก โพรลีน ไกลซีน อะลานีน วาริน เมทไทโอนีน ไอโซลิวซีน ลิวซีน ไทโรซีน ฟีนิลอะลานีน ไลซีน ฮิสทีดีน อาร์จินีน และซิสทีน ตามลำดับ (Edens *et al.*, 2002) นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งของวิตามินบีต่างๆ จึงส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ดี สำหรับการผลิตกรดอะซิโตนิกในชุดการทดลองที่ 1, 2, 5, 6, 8, 9, 14, 16, 18 และ 19 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วยยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดอะซิโตนิกเท่ากับ 0.44, 4.85, 0.09, 1.35, 4.30, 0.10, 2.53, 3.99, 1.31 และ 2.53 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่เลี้ยงในอาหารที่มียีสต์สกัดเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร ในชุดการทดลองที่ 3, 4, 7, 10, 11, 12, 13, 15, 17 และ 20 ให้ปริมาณกรดอะซิโตนิกเท่ากับ 3.96, 1.23, 3.78, 4.29, 4.34, 0.34, 2.77, 2.26, 2.99 และ 2.82 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ (Table 18) ซึ่งจะเห็นได้ว่าชุดการทดลองส่วนใหญ่ที่เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่มียีสต์สกัดต่ำจะส่งผลให้การผลิตกรดอะซิโตนิกสูงกว่าชุดการทดลองที่มียีสต์สกัดสูง สอดคล้องกับค่า coefficient ซึ่งมีค่าเท่ากับ -0.364 แสดงว่าการผลิตกรดอะซิโตนิกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อลดความเข้มข้นของ

ยีสต์สกัดในอาหารลง อาจจะเป็นเพราะยีสต์สกัดประกอบด้วยกรดกลูตามัทอิสระอยู่มากจึงส่งผลต่อค่าพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยง อาจเนื่องจากยีสต์สกัดมีส่วนประกอบหลักคือกรดอะมิโน 2 ชนิด คือ กรดแอสปาร์ติกและกลูตามิกซึ่งมีปริมาณร้อยละ 2.07 และ 4.35 ของน้ำหนักยีสต์สกัด ตามลำดับ (Edens *et al.*, 2002) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็นกรดจากหมู่คาร์บอกซิล 2 หมู่ในโมเลกุล ดังนั้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยีสต์สกัดในอาหารเพาะเลี้ยง จะส่งผลให้ความเป็นกรดเพิ่มขึ้นและทำให้ค่าพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยงลดต่ำลง ซึ่งอาจส่งผลต่อการสังเคราะห์ของกรดอะราชิโดนิกในแบคทีเรียไกลคิง *A. maritima* TISTR 1715 โดยผลจากการทดลองข้างทดลอง พบว่าแบคทีเรียมีการผลิตกรดอะราชิโดนิกได้ดีในช่วงค่าพีเอช 8.0 อย่างไรก็ตามกรดกลูตามิกในรูปกลูตามัทจัดเป็นกรดอะมิโนที่มีผลช่วยเพิ่มการผลิตกรดอะราชิโดนิกของในจุลินทรีย์ เนื่องจากกลูตามัทจะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ acetyl CoA carboxylase ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวมีหน้าที่สำคัญคือ เปลี่ยน acetyl CoA เป็น malonyl CoA ซึ่ง malonyl CoA เป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในกระบวนการเพิ่มความยาวของสายโซ่คาร์บอน (elongation) และเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ glucose 6 phosphate dehydrogenase (G6PDH) จึงส่งผลให้เพิ่มผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (Certik *et al.*, 1999; Kowluru *et al.*, 2001) ซึ่งเห็นได้จากการศึกษาของ Yu และคณะ (2003) ศึกษาการใช้กรดกลูตามิกในรูปของกลูตามัทในการเพิ่มผลผลิตกรดอะราชิโดนิกของรา *Mortierella alpina* พบว่าเมื่อใช้กลูตามัทที่ความเข้มข้น 0.8 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดอะราชิโดนิกสูงสุดเท่ากับ 1.40 กรัมต่อลิตร จาก 0.84 กรัมต่อลิตร ในชุดควบคุมที่ไม่เติมกลูตามัท แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูตามัทเป็น 1.0 และ 1.2 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดอะราชิโดนิกลดลงเท่ากับ 0.92 และ 0.81 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าการผลิตกรดอะราชิโดนิกลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูตามัท อาจเนื่องจากกลูตามัทที่ความเข้มข้นสูงส่งผลให้เซลล์เปลี่ยนกลูตามัทไปเป็นกรดอะมิโนโปรลีน โดยใช้ NADPH เป็นพลังงานส่งผลให้ NADPH ที่นำไปใช้เป็นพลังงานในการผลิตกรดไขมันของเซลล์จุลินทรีย์ลดลง จึงมีผลให้ลดการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงลงด้วย (Andarwulan and Shetty, 1999)

NaCl (K) เป็นปัจจัยที่ไม่มีผลต่อทั้งการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราชิโดนิกของแบคทีเรียไกลคิง *A. maritima* TISTR 1715 พบว่าในชุดการทดลองที่ 2, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 13, 14 และ 19 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วย NaCl ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.94, 0.26, 0.43, 0.99, 0.38, 0.86, 0.54, 0.34, 0.11 และ 0.43 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ 1, 3, 8, 9, 12, 15, 16, 17, 18 และ 20 โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วย NaCl ความเข้มข้นเท่ากับ 7.5 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.37, 1.71, 1.18, 1.45, 0.28, 0.13, 0.13, 1.08, 0.28 และ 0.34 กรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่า

ชุดการทดลองส่วนใหญ่ที่เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วย NaCl ต่ำ ส่งผลให้การเจริญเติบโตของแบคทีเรียสูงกว่าชุดการทดลองที่เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วย NaCl สูง ซึ่งสอดคล้องกับค่า coefficient ซึ่งมีค่าเท่ากับ -0.003 แสดงว่าการเจริญเติบโตของแบคทีเรียมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อลดความเข้มข้นของ NaCl ลง ซึ่งความเข้มข้นของ NaCl ที่สูงเกินไปอาจส่งผลต่อความดันออสโมติกภายในเซลล์ทำให้มีผลชะลอหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย แต่แบคทีเรียไกลดิ้งที่แยกได้จากทะเลสามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มี NaCl ช่วงกว้าง ตั้งแต่ร้อยละ 0.6-4.5 ของอาหารเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย (Yoon *et al.*, 2005; Hosoya *et al.*, 2006, 2007) ดังนั้นความเข้มข้นของ NaCl ในช่วง 7.5-15.0 กรัมต่อลิตร จึงไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียไกลดิ้ง *A. maritima* TISTR 1715 อย่างนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) สำหรับการผลิตกรดอะซิโตนิกในชุดการทดลองที่ 2, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 13, 14 และ 19 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วย NaCl ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดอะซิโตนิกเท่ากับ 4.85, 1.23, 0.09, 1.35, 3.78, 4.29, 4.34, 2.77 และ 2.53 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง เทียบกับชุดการทดลองที่ 1, 3, 8, 9, 12, 15, 16, 17, 18 และ 20 โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วย NaCl ความเข้มข้นเท่ากับ 7.5 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดอะซิโตนิกเท่ากับ 0.44, 3.96, 4.30, 0.10, 0.34, 2.26, 3.99, 2.99, 1.31 และ 2.82 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง จะเห็นได้ว่าชุดการทดลองส่วนใหญ่ที่เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วย NaCl สูง จะส่งผลให้การผลิตกรดอะซิโตนิกสูงกว่าชุดการทดลองที่เลี้ยงแบคทีเรียไกลดิ้งในอาหารที่ประกอบด้วย NaCl ต่ำ สอดคล้องกับค่า coefficient ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.261 ซึ่งเห็นได้ว่าการผลิตกรดอะซิโตนิกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NaCl อาจเนื่องจากความเข้มข้นของ NaCl ที่เพิ่มในอาหารส่งผลให้ความดันออสโมติกภายในเซลล์เพิ่มสูงขึ้น และมีผลต่อการปรับสภาพของจุลินทรีย์ ดังนั้นจุลินทรีย์จึงปรับสภาพความคงตัวของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง ซึ่งขึ้นอยู่กับความดันออสโมติกภายในเซลล์ที่เปลี่ยนแปลง (Singh and Ward, 1997) สอดคล้องกับ Kang และคณะ (2007) ศึกษาความระดับเข้มข้นของ NaCl ที่มีต่อการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงของสาหร่ายเซลล์เดียว *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304 พบว่าเลี้ยงเซลล์ *T. aureum* ATCC 34304 ในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้น NaCl เท่ากับ 10.0 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดโคโคซาเฮกซะอีโนอิกเท่ากับร้อยละ 46.65 ของกรดไขมันทั้งหมด ซึ่งเพิ่มขึ้น 1.05 เท่าจากชุดควบคุมที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้น NaCl เท่ากับ 5.0 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ปริมาณกรดโคโคซาเฮกซะอีโนอิกเท่ากับร้อยละ 44.26 ของกรดไขมันทั้งหมด อย่างไรก็ตามผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย *t*-test ของการผลิตกรดอะซิโตนิกของแบคทีเรียไกลดิ้ง *A. maritima* TISTR 1715 ที่เลี้ยงแบคทีเรียไกลดิ้งในอาหารที่มีความเข้มข้นของ NaCl ในช่วง 7.5-15.0 กรัมต่อลิตร ให้ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 62.0 ต่ำกว่าระดับความเชื่อ

มันที่กำหนดที่ร้อยละ 95.0 แสดงว่า NaCl เป็นปัจจัยที่ไม่มีผลต่อการผลิตกรดอะซิโตนิกของแบคทีเรียไกลดิง *A. maritima* TISTR 1715 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

KCl (L) เป็นปัจจัยที่ไม่มีผลต่อทั้งการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะซิโตนิกของแบคทีเรียไกลดิง *A. maritima* TISTR 1715 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ พบว่าในชุดการทดลองที่ 1, 3, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 14 และ 15 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียไกลดิงในอาหารที่ประกอบด้วย KCl ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.35 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.37, 1.71, 0.43, 0.99, 0.38, 1.18, 0.54, 0.28, 0.11 และ 0.13 กรัมต่อลิตร และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ 2, 4, 9, 10, 13, 16, 17, 18, 19 และ 20 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วย KCl ความเข้มข้นเท่ากับ 0.18 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.94, 0.26, 1.45, 0.86, 0.34, 0.13, 1.08, 0.28, 0.43 และ 0.34 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะเห็นได้ว่าชุดการทดลองส่วนใหญ่ที่เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วย KCl ต่ำจะส่งผลให้การเจริญเติบโตของแบคทีเรียสูงกว่าชุดการทดลองที่เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วย KCl สูง สอดคล้องกับค่า coefficient ซึ่งมีค่าเท่ากับ -0.005 แสดงว่าการเจริญเติบโตมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อลดความเข้มข้นของ KCl ลง สำหรับการผลิตกรดอะซิโตนิกในชุดการทดลองที่ 1, 3, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 14 และ 15 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วย KCl ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.35 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดอะซิโตนิกเท่ากับ 0.44, 3.96, 0.09, 1.35, 3.78, 4.30, 4.34, 0.34, 2.53 และ 2.26 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ 2, 4, 9, 10, 13, 16, 17, 18, 19 และ 20 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วย KCl ความเข้มข้นเท่ากับ 0.18 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดอะซิโตนิกเท่ากับ 4.85, 1.23, 0.10, 4.29, 2.77, 3.99, 2.99, 1.31, 2.53 และ 2.82 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง จะเห็นได้ว่าชุดการทดลองส่วนใหญ่ที่เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วย KCl ต่ำ จะส่งผลให้การเจริญเติบโตสูงกว่าชุดการทดลองที่เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วย KCl สูง สอดคล้องกับค่า coefficient ซึ่งมีค่าเท่ากับ -0.175 ดังนั้นการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะซิโตนิกของแบคทีเรียไกลดิงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อลดความเข้มข้นของ KCl ลง อย่างไรก็ตาม KCl ที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเกิดการแตกตัวเป็น K^+ และ Cl^- ซึ่งความเข้มข้นของ K^+ ที่มากเกินไปในอาหารจะส่งผลต่อความดันออสโมติกภายในเซลล์ส่งผลให้ชะลอหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย นอกจากนี้ความดันออสโมติกภายในเซลล์ที่เพิ่มขึ้นจากการเพิ่มความเข้มข้นของ KCl ซึ่งทำให้แบคทีเรียต้องปรับสภาพความคงตัวของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงซึ่งชนิดของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นอยู่กับความดันออสโมติกภายในเซลล์ที่เปลี่ยนแปลง (Singh and Ward, 1997) สอดคล้องกับรายงานของ Intriago (1992) ได้ศึกษาผลของ KCl ต่อการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในแบคทีเรีย *Flexibacter* sp. Imp3 โดยเลี้ยงแบคทีเรีย *Flexibacter* sp. Imp3 ในอาหารที่

ประกอบด้วย KCl ความเข้มข้นเท่ากับ 30.0 กรัมต่อลิตร ให้ผลิตรวดไลโนเลอิกเท่ากับร้อยละ 1.0 ของกรดไขมันทั้งหมด แต่เมื่อลดความเข้มข้นของ KCl ในอาหารเพาะเลี้ยงลงเท่ากับ 0.7 กรัมต่อลิตร ทำให้ผลิตรวดไลโนเลอิกเท่ากับร้อยละ 0.4 ของกรดไขมันทั้งหมด อย่างไรก็ตามในการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman design และผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย *t*-test ของ KCl ความเข้มข้นในช่วง 0.18-0.35 กรัมต่อลิตร จึงเป็นปัจจัยที่ไม่มีต่อทั้งการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะโรมาติกของแบคทีเรียไกลดิ้ง *A. maritima* TISTR 1715 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

MgCl₂ (M) เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ไม่มีผลต่อทั้งการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะโรมาติกของแบคทีเรียไกลดิ้ง *A. maritima* TISTR 1715 พบว่าในชุดการทดลองที่ 2, 4, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 15 และ 16 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วย MgCl₂·6H₂O เท่ากับ 5.4 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.94, 0.26, 0.99, 0.38, 1.18, 1.45, 0.28, 0.34, 0.13 และ 0.13 กรัมต่อลิตร และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ 1, 3, 5, 9, 10, 14, 17, 18, 19 และ 20 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วย MgCl₂·6H₂O เท่ากับ 2.7 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.37, 1.71, 0.43, 0.86, 0.54, 0.11, 1.08, 0.28, 0.43 และ 0.34 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะเห็นได้ว่าชุดการทดลองส่วนใหญ่ที่เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วย MgCl₂ สูง ส่งผลให้ผลการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสูงการชุดการทดลองที่เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วย MgCl₂ ต่ำ สอดคล้องกับค่า coefficient ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.005 สำหรับการผลิตกรดอะโรมาติกในชุดการทดลองที่ 2, 4, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 15 และ 16 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วย MgCl₂·6H₂O เท่ากับ 5.4 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดอะโรมาติกเท่ากับ 4.85, 1.23, 1.35, 3.78, 4.30, 0.10, 0.34, 2.77, 2.26 และ 3.99 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ 1, 3, 5, 9, 10, 14, 17, 18, 19 และ 20 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วย MgCl₂·6H₂O เท่ากับ 2.7 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดอะโรมาติกเท่ากับ 0.44, 3.96, 0.09, 4.29, 4.34, 2.53, 2.99, 1.31, 2.53 และ 2.82 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ (Table 18) ซึ่งเห็นได้ว่าชุดการทดลองส่วนใหญ่ที่เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วย MgCl₂ ต่ำ ส่งผลให้การผลิตกรดอะโรมาติกสูงกว่าชุดการทดลองที่เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วย MgCl₂ สูง สอดคล้องกับค่า coefficient ซึ่งมีค่าเท่ากับ -0.016 ซึ่งแสดงว่าการผลิตกรดอะโรมาติกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อลดความเข้มข้นของ MgCl₂ ลง อย่างไรก็ตาม Mg²⁺ เป็นโคแฟกเตอร์ ซึ่งจำเป็นต่อการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ ในวัฏจักรไกลโคไลซิส ได้แก่ hexokinase, phosphofructokinase, phosphoglyceratekinase, enolase และ pyruvatekinase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการเปลี่ยนกลูโคสให้เป็นพลังงานและสารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (Voet and Voet, 2004) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า Mg²⁺ มีผลต่อการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงของจุลินทรีย์ โดยส่งผลต่อเอนไซม์ malic ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่

เปลี่ยนจาก malate เป็น pyruvate ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ acetyl CoA รวมทั้ง NADH ซึ่งเป็นพลังงานที่ใช้ในการสังเคราะห์กรดไขมันของจุลินทรีย์ ในขณะที่ ATP citrate lyase เป็นเอนไซม์ที่สังเคราะห์ acetyl-CoA ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน พบว่าเมื่อเลี้ยงรา *Cunninghamella* sp. 2A1 ในอาหารที่มี Mg^{2+} ความเข้มข้น 0.003 โมลาร์ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงรา *Cunninghamella* sp. 2A1 ในอาหารที่ไม่เติม Mg^{2+} พบว่าความเข้มข้น Mg^{2+} ความเข้มข้น 0.003 M ให้กิจกรรมเท่ากับ 8 และ 30 นาโมลต่อนาทีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่ไม่พบกิจกรรมของ malic enzyme และ ATP citrate lyase ในชุดควบคุม (Muhid *et al.*, 2008) นอกจากนี้ Mg^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ acetyl-CoA carboxylase ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญที่เปลี่ยน acetyl-CoA เป็น malnoyl-CoA ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดไขมัน (Guchhait *et al.*, 1974) ดังนั้นในการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman design ความเข้มข้นของ $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ในช่วง 2.7-5.4 กรัมต่อลิตร ไม่มีผลต่อทั้งการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะซิโตนิกของแบคทีเรียไกลดิง *A. maritima* TISTR 1715 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

$MgSO_4$ (N) เป็นปัจจัยที่ไม่มีผลต่อทั้งการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะซิโตนิกของแบคทีเรียไกลดิง *A. maritima* TISTR 1715 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ พบว่าชุดการทดลองที่ 3, 5, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 16 และ 17 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียไกลดิงในอาหารที่ประกอบด้วย $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ความเข้มข้นเท่ากับ 2.7 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.71, 0.43, 0.38, 1.18, 1.45, 0.86, 0.34, 0.11, 0.13 และ 1.08 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ 1, 2, 4, 6, 11, 12, 15, 18, 19 และ 20 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วย $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ความเข้มข้นเท่ากับ 1.4 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.37, 1.94, 0.26, 0.99, 0.54, 0.28, 0.13, 0.28, 0.43 และ 0.34 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าชุดการทดลองส่วนใหญ่ที่เลี้ยงแบคทีเรียไกลดิงในอาหารที่ประกอบด้วย $MgSO_4$ สูง จะส่งผลให้การเจริญเติบโตของแบคทีเรียสูงกว่าชุดการทดลองที่เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วย $MgSO_4$ ต่ำ สอดคล้องกับค่า coefficient ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.011 ซึ่งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ $MgSO_4$ ในอาหารเพาะเลี้ยง สำหรับการผลิตกรดอะซิโตนิกชุดการทดลองที่ 3, 5, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 16 และ 17 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วย $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ความเข้มข้นเท่ากับ 2.7 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดอะซิโตนิกเท่ากับ 3.96, 0.09, 3.78, 4.30, 0.10, 4.29, 2.77, 2.53, 3.99 และ 2.99 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง และเมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ 1, 2, 4, 6, 11, 12, 15, 18, 19 และ 20 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วย $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ความเข้มข้นเท่ากับ 1.4 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดอะซิโตนิกเท่ากับ 0.44, 4.85, 1.23, 1.35, 4.34, 0.34, 2.26, 1.31, 2.53 และ 2.82 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ (Table 18) ซึ่งจะเห็นได้ว่าชุดการทดลองส่วนใหญ่ที่เลี้ยง

แบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วย $MgSO_4$ สูง จะส่งผลให้การผลิตกรดอะซิโตนิกของแบคทีเรียสูงกว่าชุดการทดลองที่เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วย $MgSO_4$ ต่ำ สอดคล้องกับค่า coefficient ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.367 ซึ่งการผลิตกรดอะซิโตนิกมีแนวโน้มเพิ่มเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ $MgSO_4$ ในอาหารเพาะเลี้ยง อาจเนื่องจากผลของ SO_4^{2-} เป็นแร่ธาตุที่มีมากในน้ำทะเลธรรมชาติ (Holland, 2005) ซึ่งมีความจำเป็นต่อเมแทบอลิซึมและการสังเคราะห์สารที่จำเป็นในการเจริญเติบโต ตลอดจนการรักษาสมดุลภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่แยกได้จากทะเล (MacLeod and Onofrey, 1956; Spitznagel and Sharp, 1959) สำหรับ Mg^{2+} โคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ที่เป็นสำคัญของการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงของจุลินทรีย์ (Guchhait *et al.*, 1974; Muhid *et al.*, 2008) ซึ่งจะเห็นได้จากการศึกษา Muhid และคณะ (2008) ได้ศึกษาผลของความเข้มข้น $MgSO_4$ ต่อการผลิตกรดแกมมาไลโนเลนิกของรา *Cunninghamella* sp. 2A1 พบว่าเมื่อเลี้ยงรา *Cunninghamella* sp. 2A1 ในอาหารที่เติม $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ความเข้มข้น 1.5 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดแกมมาไลโนเลนิกเท่ากับร้อยละ 0.03 ของกรัมเซลล์แห้ง เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติม $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ในอาหารเพาะเลี้ยง ให้ปริมาณกรดแกมมาไลโนเลนิกเท่ากับร้อยละ 0.02 ของกรัมเซลล์แห้ง และมีรายงานความเข้มข้นของ $MgSO_4$ ต่อผลผลิตกรดโคโคซาเฮกซะอีโนอิกของสาหร่ายเซลล์เดียว *T. aureum* ATCC 34304 พบว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์ *T. aureum* ATCC 34304 ในอาหารที่ไม่มีการเติม $MgSO_4$ มีผลผลิตกรดโคโคซาเฮกซะอีโนอิกเท่ากับร้อยละ 46.55 ของกรดไขมันทั้งหมด เพิ่มขึ้น 1.11 เท่าจากชุดควบคุมที่เลี้ยงเซลล์โดยเติม $MgSO_4$ 15.0 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้การผลิตกรดโคโคซาเฮกซะอีโนอิกเท่ากับร้อยละ 41.92 ของกรดไขมันทั้งหมด อาจเนื่องจากผลของความดันออสโมติกที่เปลี่ยนแปลงไปในอาหารที่ไม่เติม $MgSO_4$ จึงทำให้จุลินทรีย์ต้องปรับตัวโดยเพิ่มการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงเพื่อรักษาสมดุลในการทำงานภายในเซลล์ (Kang *et al.*, 2007) อย่างไรก็ตามความเข้มข้น $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ในช่วง 1.08-2.70 กรัมต่อลิตร เป็นปัจจัยที่ไม่มีผลต่อทั้งการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะซิโตนิกของแบคทีเรียไกลดิง *A. maritima* TISTR 1715 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

$CaCl_2$ (O) เป็นแร่ธาตุหนึ่งซึ่งเป็นปัจจัยที่ไม่มีผลต่อทั้งการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะซิโตนิกของแบคทีเรียไกลดิง *A. maritima* TISTR 1715 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) พบว่าชุดการทดลองที่ 4, 6, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 17 และ 18 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียไกลดิงในอาหารที่ประกอบด้วย $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.26, 0.99, 1.18, 1.45, 0.86, 0.54, 0.11, 0.13, 1.08 และ 0.28 กรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ 1, 2, 3, 5, 7, 12, 13, 16, 19 และ 20 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียไกลดิงในอาหารที่ประกอบด้วย $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ความเข้มข้นเท่ากับ 0.25 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง

เท่ากับ 0.37, 1.94, 1.71, 0.43, 0.38, 0.28, 0.34, 0.13, 0.43 และ 0.34 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะเห็นได้ว่าชุดการทดลองส่วนใหญ่ที่เลี้ยงแบคทีเรียไกลดิงในอาหารที่ประกอบด้วย CaCl_2 สูง ส่งผลให้การเจริญเติบโตสูงกว่าชุดการทดลองที่เลี้ยงแบคทีเรียไกลดิงในอาหารที่ประกอบด้วย CaCl_2 ต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับค่า coefficient มีค่าเท่ากับ 0.003 แสดงว่าการเจริญเติบโตของแบคทีเรียมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ CaCl_2 ในอาหารเพาะเลี้ยง อาจเนื่องจาก Ca^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์ (cofactor) ของเอนไซม์ outer membrane phospholipase A (OMPLA) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในชั้นของ outer membrane ในแบคทีเรียแกรมลบ โดย Ca^{2+} เร่งกระบวนการสังเคราะห์และการรวมตัว (dimerization) ของโมเลกุลฟอสโฟลิปิด (phospholipid) (Ubarretxena-Belandia *et al.*, 1998) ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของ outer membrane ในแบคทีเรียแกรมลบ สำหรับการผลิตกรดอะซิโตนิกในชุดการทดลองที่ 4, 6, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 17 และ 18 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วย $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดอะซิโตนิกเท่ากับ 1.23, 1.35, 4.30, 0.10, 4.29, 4.34, 2.53, 2.26, 2.99 และ 1.31 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ และเมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ 1, 2, 3, 5, 7, 12, 13, 16, 19 และ 20 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วย $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้นเท่ากับ 0.25 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดอะซิโตนิกเท่ากับ 0.44, 4.85, 3.96, 0.09, 3.78, 0.34, 2.77, 3.99, 2.53 และ 2.82 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ (Table 18) จะเห็นได้ว่าชุดการทดลองส่วนใหญ่ที่เลี้ยงแบคทีเรียไกลดิงในอาหารเลี้ยงแบคทีเรียที่ประกอบด้วย CaCl_2 ต่ำ จะส่งผลให้ผลการผลิตกรดอะซิโตนิกสูงกว่าในชุดการทดลองที่เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วย CaCl_2 สูง สอดคล้องกับค่า coefficient มีค่าเท่ากับ -0.043 แสดงว่าการผลิตกรดอะซิโตนิกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อลดความเข้มข้นของ CaCl_2 อย่างไรก็ตาม Ca^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ acetyl-CoA carboxylase ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญที่เปลี่ยน acetyl-CoA เป็น malonyl-CoA ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดไขมัน (Guchhait *et al.*, 1974) สอดคล้องกับการทดลองของ Dyal และคณะ (2005) ได้ศึกษาผลของ Ca^{2+} ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแกมมาไลโนเลนิกของรา *M. ramanniana* เมื่อเลี้ยงรา *M. ramanniana* ในอาหารที่ประกอบด้วย CaCl_2 เท่ากับ 5, 50 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า CaCl_2 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 500 มิลลิกรัมต่อลิตรให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 2.20 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ CaCl_2 ที่ความเข้มข้น 5 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.90 และ 1.80 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ CaCl_2 ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตกรดแกมมาไลโนเลนิกสูงสุดเท่ากับ 0.45 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง รองลงมา คือ 500 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตกรดแกมมาไลโนเลนิกสูงเท่ากับ 0.30 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ ดังนั้นในการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman design นี้ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ที่ความเข้มข้นช่วง 0.25-0.5 กรัมต่อลิตร เป็นปัจจัย

ที่ไม่มีผลต่อทั้งการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราชิโคนิกของแบคทีเรีย *A. maritima* TISTR 1715 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ดังนั้นจากการทดลองและวิเคราะห์ทางสถิติเบื้องต้นด้วย Plackett-Burman design สามารถคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและผลิตกรดอะราชิโคนิกของแบคทีเรีย *A. maritima* TISTR 1715 ได้แก่ ความเข้มข้นของทริปโตเนอ อุณหภูมิ พีเอชเริ่มต้นและความเร็วรอบในการเขย่า เพื่อนำไปศึกษาในระดับที่เหมาะสมของปัจจัยเหล่านี้ต่อการเจริญเติบโตและผลิตกรดอะราชิโคนิกขั้นต่อไป สำหรับปัจจัยที่เป็นเกลือที่ค่าความเข้มข้นน้อยกว่าร้อยละ 95 จะคงความเข้มข้นของปัจจัยเหล่านั้นไว้ในระดับสูง ได้แก่ NaCl 15 กรัมต่อลิตร KCl 0.35 กรัมต่อลิตร $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 5.4 กรัมต่อลิตร $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.7 กรัมต่อลิตร และ $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.5 กรัมต่อลิตร ดังแสดงใน Table 10 ในขณะที่ผลการทดลองของแหล่งไนโตรเจนที่มีค่าความเข้มข้นน้อยกว่าร้อยละ 95 ได้แก่ NH_4NO_3 , KNO_3 และยีสต์สกัดพบว่าไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราชิโคนิกของแบคทีเรีย *A. maritima* TISTR 1715 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังแสดงใน Table 18 จึงตัดปัจจัยคือ NH_4NO_3 และ KNO_3 ทิ้งไป ยกเว้นยีสต์สกัดซึ่งเป็นองค์ประกอบของสูตรอาหารพื้นฐาน modified SAP2 พร้อมทั้งเป็นแหล่งของวิตามินบีต่างๆ จึงยังคงใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 1.0 กรัมต่อลิตร ตามสูตรพื้นฐาน อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองเนื่องจากแหล่งของคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส พบว่าไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราชิโคนิกของแบคทีเรีย *A. maritima* TISTR 1715 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังแสดงใน Table 18 แต่แหล่งของคาร์บอนจัดเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทั่วไป ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษานิคมของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราชิโคนิกเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอน เพื่อเลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

Table 18. The Plackett–Burman design matrix for evaluating variables influencing DCW and ARA yield by cell cultures of *A. maritima* TISTR 1715.

Run	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	DCW (g/l)	ARA yield (mg/g)
1	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	0.37±0.04	0.44±0.03
2	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	1.94±0.06	4.85±0.03
3	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	1.71±0.11	3.96±0.84
4	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	0.26±0.02	1.23±0.06
5	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	0.43±0.01	0.09±0.03
6	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	0.99±0.13	1.35±0.35
7	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	0.38±0.05	3.78±0.51
8	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	1.18±0.07	4.30±0.19
9	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	1.45±0.15	0.10±0.00
10	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	0.86±0.32	4.29±0.52
11	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	0.54±0.01	4.34±0.24
12	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	0.28±0.04	0.34±0.01
13	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	0.34±0.03	2.77±1.05
14	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	0.11±0.01	2.53±0.10
15	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	0.13±0.04	2.26±0.63
16	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	0.13±0.01	3.99±0.82
17	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	1.08±0.13	2.99±0.35
18	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	0.28±0.08	1.31±0.15
19	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	0.43±0.04	2.53±0.08
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.34±0.05	2.82±0.13

Table 19. Statistical analysis of Plackett-Burman design showing the calculated regression coefficient, *t*-, *p*-values and confidence level of each variable for DCW and ARA yield by cell cultures of *A. maritima* TISTR 1715.

	Biomass production				ARA production			
	Coefficient	<i>t</i> -value	<i>p</i> -value	Confidence e	Coefficient	<i>t</i> -value	<i>p</i> -value	Confidence e
Glucose	-0.012	-1.229	0.286	71.4	-0.099	-0.372	0.728	27.2
Fructose	-0.010	-1.081	0.34	66.0	-0.213	-0.804	0.466	53.4
Sucrose	0.010	1.036	0.359	64.1	0.278	1.048	0.354	64.6
KNO ₃	-0.010	-1.023	0.364	63.6	-0.111	-0.419	0.696	30.4
NH ₄ NO ₃	-0.017	-1.850	0.138	86.2	-0.343	-1.293	0.266	73.4
Yeast extract	0.007	0.747	0.497	50.3	-0.364	-1.374	0.241	75.9
Tryptone	0.027	2.904	0.044	95.6	0.141	0.533	0.622	37.8
pH	0.010	1.092	0.336	66.4	0.735	2.776	0.050	95.0
Temperature	0.027	2.852	0.046	95.4	-0.040	-0.151	0.887	11.3
Agitation speed	0.004	0.388	0.718	28.2	-0.927	-3.499	0.025	97.5
NaCl	-0.003	-0.339	0.752	24.8	0.261	0.987	0.38	62.0
KCl	-0.005	-0.526	0.627	37.3	-0.175	-0.660	0.545	44.5
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.005	0.504	0.641	33.9	-0.016	-0.060	0.955	0.05
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.011	1.126	0.323	67.7	0.367	1.387	0.238	76.2
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.003	0.269	0.801	19.9	-0.043	-0.163	0.879	12.1

The bold values indicate the significance at or above the 95.0% confidence level.

DCW, Dry cell weight; ARA, Arachidonic acid.

3.2 ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราซิโดนิกของแบคทีเรียไกลดิงสายพันธุ์ *A. maritima* TISTR 1715

จากการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราซิโดนิกของแบคทีเรียไกลดิง *A. maritima* TISTR 1715 ในอาหารเหลว modified SAP2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน 3 ชนิด ได้แก่ กลูโคส ฟรุกโตสและซูโครส ความเข้มข้นร้อยละ 1 ของอาหารเพาะเลี้ยง และชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอน โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน เขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที พบว่าแหล่งคาร์บอนทั้ง 3 ชนิด ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 ของอาหารเพาะเลี้ยง มีผลเพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์เพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แต่แหล่งคาร์บอนทั้ง 3 ชนิด ที่ใช้ในการทดลองให้ผลการเจริญเติบโตของแบคทีเรียไกลดิง *A. maritima* TISTR 1715 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยชุดการทดลองที่ใช้น้ำตาลฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.58 ± 0.06 กรัมต่อลิตร รองลงมา ได้แก่ กลูโคส ซูโครสและชุดควบคุมที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน ซึ่งมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.52 ± 0.07 , 0.52 ± 0.05 และ 0.42 ± 0.02 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงใน Figure 12A ซึ่งให้ผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาของนลินี เพชรเทียนชัย (2545) ที่ศึกษาแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจากทะเลสายพันธุ์ ON-17 พบว่าการใช้ฟรุกโตสเป็นแหล่งของคาร์บอนที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 ของอาหารเพาะเลี้ยง แบคทีเรียจากทะเลสายพันธุ์ ON-17 มีการเจริญเติบโตสูงสุด โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 3.26 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ กลูโคสและชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 3.16 และ 2.62 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่การศึกษา Jang และคณะ (2005) พบว่าการใช้กลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 2 ของอาหารเพาะเลี้ยง เป็นแหล่งของคาร์บอนส่งผลเพิ่มการเจริญเติบโตรา *Mortierella alpina* ATCC 32222 โดยมีน้ำหนักเซลล์สูงสุดเท่ากับ 7.5 กรัมต่อลิตร รองลงมา ได้แก่ สารละลายแป้ง (soluble starch) กลิเซอรอล กาแลคโตส และมอลโตส ซึ่งมีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 7.2, 6.5, 5.1 และ 4.3 กรัมเซลล์แห้งต่อลิตร ตามลำดับ ดังนั้นแหล่งของพลังงานที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แต่ละชนิดอาจมีความแตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม แหล่งของคาร์บอนจึงเป็นปัจจัยที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เนื่องจากเป็นแหล่งของพลังงาน รวมทั้งเป็นสารตั้งต้นในการสร้างส่วนประกอบต่างๆ ภายในเซลล์

สำหรับการผลิตกรดอะราซิโดนิกของแบคทีเรียไกลดิง *A. maritima* TISTR 1715 ในอาหารเพาะเลี้ยงที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนทั้ง 3 ชนิด ดังแสดงใน Figure 12B พบว่าซูโครสมีผลเพิ่มผลผลิตกรดอะราซิโดนิกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งมีปริมาณกรดอะราซิโดนิกเท่ากับ 7.83 ± 0.61 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง หรือ 4.06 ± 0.36

มิลลิกรัมต่อลิตร แต่การใช้ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนมีผลลดการผลิตกรดอะซิโตนิกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งมีปริมาณกรดอะซิโตนิกเท่ากับ 3.62 ± 0.03 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง หรือ 2.11 ± 0.27 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่การใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนให้ผลผลิตกรดอะซิโตนิกเท่ากับ 5.52 ± 0.51 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง หรือ 2.89 ± 0.673 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งไม่แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ซึ่งผลิตกรดอะซิโตนิกในปริมาณเท่ากับ 5.64 ± 1.60 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง หรือ 2.46 ± 0.83 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่าซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการผลิตกรดอะซิโตนิกของแบคทีเรียไกลดิง *A. maritima* TISTR 1715 สอดคล้องกับผลการคัดเลือกปัจจัยที่มีต่อการผลิตกรดอะซิโตนิกด้วยวิธี Plackett-Burman design ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าระดับความเชื่อมั่นทางสถิติของผลผลิตกรดอะซิโตนิกที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนมีค่าเท่ากับร้อยละ 64.6 สูงกว่ากลูโคสและฟรุกโตสที่มีระดับความเชื่อมั่นทางสถิติเท่ากับร้อยละ 27.2 และ 53.4 ตามลำดับ แสดงว่าการใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนส่งผลต่อผลผลิตกรดอะซิโตนิกที่ดีกว่าการเลือกใช้กลูโคสและฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน อย่างไรก็ตามการใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนให้ผลของการเจริญเติบโตของแบคทีเรียไกลดิงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม อาจเนื่องมีสูตรอาหารได้จำกัดแหล่งของไนโตรเจนซึ่งประกอบด้วยทริปโตเนนและยีสต์สกัดร้อยละ 0.1 ของอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งมีปริมาณค่อนข้างต่ำ แต่แหล่งของไนโตรเจนมีความจำเป็นต่อการสังเคราะห์สารพันธุกรรมและส่วนประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ เมื่อมีการจำกัดแหล่งไนโตรเจนจึงทำให้จุลินทรีย์หยุดหรือชะลอการเจริญเติบโตลง และจากสภาวะดังกล่าวที่มีปริมาณไนโตรเจนที่จำกัดแต่มีปริมาณคาร์บอนมาก อาจทำให้แบคทีเรียนำคาร์บอนที่เหลือใช้ไปเพิ่มการผลิตกรดไขมันเพื่อเก็บไว้ในเซลล์ (Alvarez *et al.*, 1997) สอดคล้องกับการทดลองของ Patnayak และ Sree (2005) ศึกษาอัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดไขมันของแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำในทะเล *B. subtilis* RLL-8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ปรับอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนเท่ากับ 50:1 พบว่าการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *B. subtilis* RLL-8 เพิ่มขึ้นเล็กน้อยเท่ากับ 0.77 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่อัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเท่ากับ 1:1 ให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.59 กรัมต่อลิตร สำหรับการผลิตไขมันเพิ่มขึ้นเท่ากับ 259 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดโอเลอิกเท่ากับร้อยละ 43.60 ของกรดไขมันทั้งหมด ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ให้การผลิตไขมันเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดโอเลอิกเท่ากับร้อยละ 8.90 ของกรดไขมันทั้งหมด ตามลำดับ นอกจากนี้อัตราส่วนคาร์บอนและไนโตรเจนมีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะซิโตนิกของรา *M. alpina* โดยพบว่าอัตราส่วนคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงที่น้อยหรือมาก

เกินไปส่งผลให้จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะซิติกที่ลดลง โดยอัตราส่วนคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมที่ประมาณเท่ากับ 12:1 ให้นำหนักชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 20.0 กรัมต่อลิตร ในขณะที่อัตราส่วนคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมเท่ากับ 14.9:1 ให้ปริมาณกรดอะซิติกสูงสุดเท่ากับ 1.50 กรัมต่อลิตร ซึ่งเห็นได้ว่าการปรับลดหรือเพิ่มอัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนมีผลต่อน้ำหนักชีวมวลและปริมาณกรดอะซิติกของจุลินทรีย์ (Koike *et al.*, 2001) ในขณะที่การใช้ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งทำให้ผลผลิตกรดอะซิติกต่ำกว่าชุดควบคุม อาจเนื่องจากการนำฟรุกโตสเข้าวัฏจักรไกลโคไลซิสต้องใช้เอนไซม์การทำงานของเอนไซม์ fructose-1-phosphate kinase หรือ hexokinase ให้เปลี่ยนเป็นสารตัวกลางที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต รวมทั้งเป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์กรดไขมัน อย่างไรก็ตามหากแบคทีเรียไกลดิ้งมีการผลิตเอนไซม์ดังกล่าวในปริมาณน้อย จึงอาจส่งผลให้การนำฟรุกโตสไปสร้างเป็นแหล่งพลังงานน้อยลง จึงทำให้แบคทีเรียนำพลังงานที่ได้จากฟรุกโตสส่วนใหญ่ไปใช้ในการเจริญเติบโตมากกว่าที่จะนำไปสังเคราะห์กรดไขมัน (Voet and Voet, 2004) ดังผลการเจริญเติบโตของเซลล์ใน Figure 12A ซึ่งจุลินทรีย์จะสามารถผลิตกรดไขมันได้มากหรือน้อยขึ้นกับการนำพลังงานไปใช้ในการเจริญเติบโตหรือเปลี่ยนพลังงานเป็นกรดไขมัน (Ratledge, 2002) ดังนั้นแหล่งของคาร์บอนจึงมีความสำคัญต่อการผลิตกรดอะซิติกของจุลินทรีย์แต่ละชนิด อย่างไรก็ตามความสามารถในการใช้หรือเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนให้เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจึงมีความแตกต่างกันตามสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน รวมทั้งสถานะในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ (Shimizu *et al.*, 1989b) ดังเห็นได้จากการศึกษา Jang และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษานิตของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตกรดอะซิติก พบว่าการใช้สารละลายแป้ง (soluble starch) ร้อยละ 2.0 ของอาหารเพาะเลี้ยงให้ผลผลิตกรดอะซิติกสูงสุดเท่ากับ 826.30 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมา ได้แก่ กลูโคส กลีเซอรอล รอล กาแลคโตสและมอลโตส โดยให้ปริมาณกรดอะซิติกเท่ากับ 673.10, 595.40, 171.80 และ 102.30 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ Gentile และคณะ (2003) พบว่าการใช้น้ำมันดิบ (crude oil) เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเพาะเลี้ยง *Shewanella* sp. GA-22 ให้ผลผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงรวมกันทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ กรดไลโนเลนิก กรดอะซิติกและกรดอีโคซาเพนตะอีโนอิกสูงสุดเท่ากับร้อยละ 0.035 ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวทั้งหมด รองลงมา คือการใช้กลูโคส กลีเซอรอล pyruvate และ tween 80 ซึ่งมีการผลิตกรดไลโนเลนิก กรดอะซิติกและกรดอีโคซาเพนตะอีโนอิกเท่ากับร้อยละ 0.032, 0.029, 0.018 และ 0.004 ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวทั้งหมด ตามลำดับ ในขณะที่ Aki และคณะ (1998) รายงานว่าการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งของคาร์บอนส่งผลให้รา *Achlya* sp. ma-2801 มีการผลิตกรดอะซิติกสูงสุดเท่ากับร้อยละ 21.80 ของเซลล์แห้ง

ดังนั้นจากการผลของแหล่งคาร์บอนทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ กลูโคส ฟรุคโตสและซูโครส ต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียไกลดิง *A. maritima* TISTR 1715 ให้ผลการเจริญเติบโตของแบคทีเรียไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) จากชุดควบคุม แต่อาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนให้ผลเพิ่มการผลิตกรดอะราชิโดนิกสูงสุดแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังนั้นจึงพิจารณาคัดเลือกซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

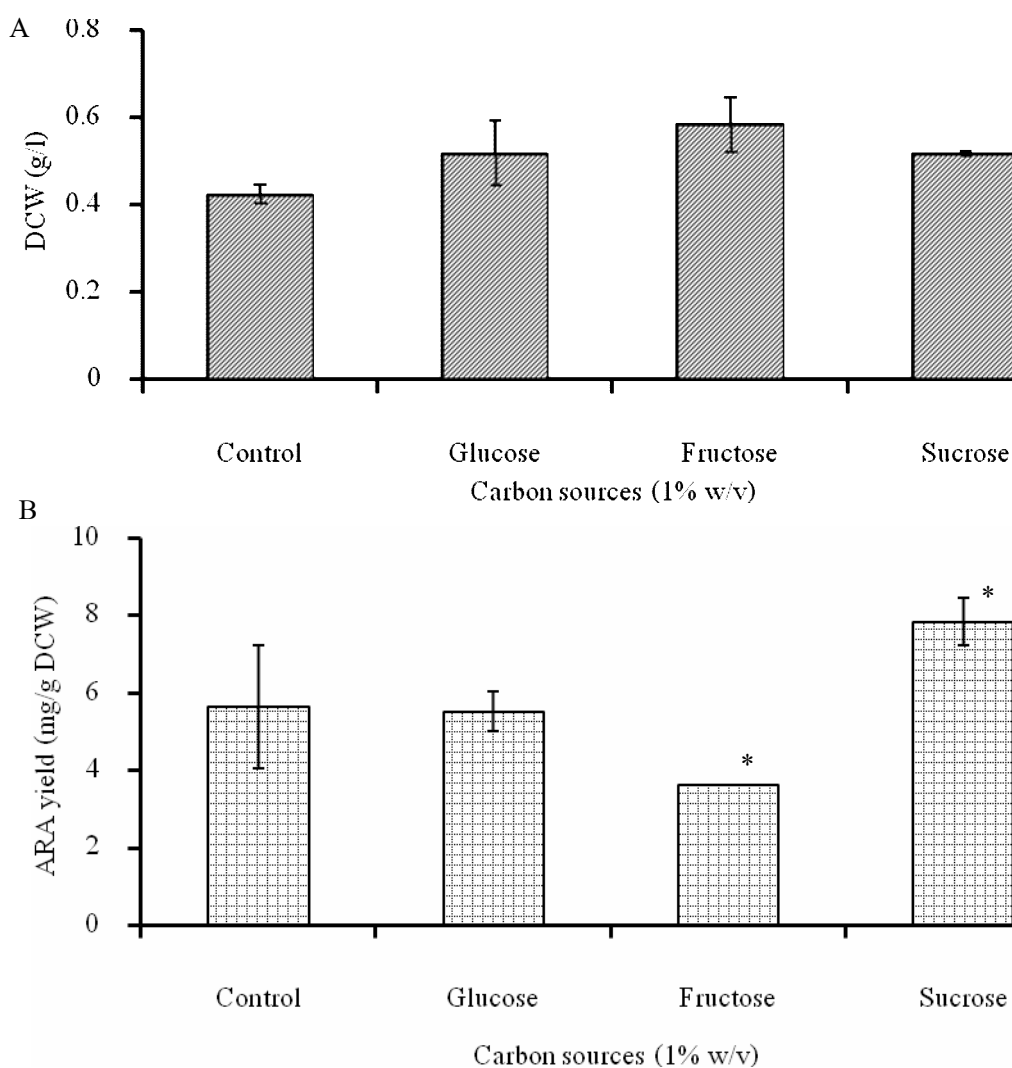


Figure 12. Effect of carbon sources at 1.0% (w/v) concentration on cell growth (A) and ARA yield (B) of marine gliding bacterium *A. maritima* TISTR 1715. The asterisks indicate significantly difference from the control at 95% confidence levels according to Duncan's multiple range tests. DCW, Dry cell weight; ARA, Arachidonic acid.

3.3 การศึกษาระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะซิติกของแบคทีเรียโกลดิ้งสายพันธุ์ *A. maritima* TISTR 1715 ด้วยวิธี Response Surface Methodology (RSM) และวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD)

จากการศึกษาระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะซิติกของแบคทีเรียโกลดิ้งสายพันธุ์ *A. maritima* TISTR 1715 ด้วยวิธี RSM และวางแผนการทดลองแบบ CCD ในอาหารเหลว ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยซูโครสและยีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 1 และ 0.1 ตามลำดับ และ NaCl 15 กรัมต่อลิตร KCl 0.35 กรัมต่อลิตร $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 5.4 กรัมต่อลิตร $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.7 กรัมต่อลิตร และ $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.5 กรัมต่อลิตร พร้อมทั้งปัจจัยที่ศึกษาประกอบด้วยความเข้มข้นของทริปโตเนน (0.8, 2.5, 5.0, 7.5 และ 9.2 กรัมต่อลิตร) พีเอชเริ่มต้น (6.32, 7.00, 8.00, 9.00 และ 9.68) ความเร็วรอบในการเขย่า (36, 70, 120, 170 และ 204 รอบต่อนาที) และอุณหภูมิ (16.6, 20, 25, 30 และ 33.4 องศาเซลเซียส) ผลดังแสดงใน Table 20 ในการทดลองทั้ง 30 ชุดการทดลอง พบว่าในชุดการทดลองที่ 8 ซึ่งเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นทริปโตเนน 7.5 กรัมต่อลิตร และพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 9.0 เขย่าด้วยความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ให้การเจริญเติบโตของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 2.00 กรัมเซลล์แห้งต่อลิตร ดังแสดงใน Table 20 ใกล้เคียงกับผลการศึกษาคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในชุดการทดลองที่ 2 ที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 1.94 กรัมต่อลิตร ดังแสดงใน Table 18

จากผลการศึกษาคัดเลือกการผลิตกรดอะซิติกของแบคทีเรียโกลดิ้ง พบว่าในชุดการทดลองที่ 23 ซึ่งเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นทริปโตเนน 5.0 กรัมต่อลิตร และค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 เขย่าด้วยความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 16.6 องศาเซลเซียส ให้ผลผลิตกรดอะซิติกสูงสุดเท่ากับ 19.43 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ดังแสดงใน Table 20 ซึ่งสูงกว่าผลการศึกษาคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดอะซิติกของแบคทีเรียโกลดิ้งด้วย Plackett-Burman design ในชุดการทดลองที่ 2 ถึง 4.01 เท่า ที่ให้ปริมาณกรดอะซิติกได้นิค 4.85 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ดังแสดงใน Table 18

ดังนั้นเมื่อนำปัจจัยที่คัดเลือกได้มาศึกษาระดับที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะซิติกของแบคทีเรียโกลดิ้ง *A. maritima* TISTR 1715 ด้วยวิธี RSM และวางแผนการทดลองแบบ CCD พบว่าสามารถเพิ่มการผลิตกรดอะซิติกได้มากขึ้นถึง 4 เท่า (19.43 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง)

Table 20. The Central Composition Design of the significant variables (in coded levels), along with the responses (DCW and ARA yield) by cell cultures of *A. maritima* TISTR 1715.

Run	Parameter				DCW (g/l)		ARA yield (mg/g)	
	X ₁ (g/l)	X ₂ (pH)	X ₃ (rpm)	X ₄ (°C)	Actual	Predicted	Actual	Predicted
1	-1	-1	-1	-1	0.91	0.91	14.99	14.46
2	+1	-1	-1	-1	0.83	1.13	8.48	10.02
3	-1	+1	-1	-1	1.00	0.59	12.50	12.62
4	+1	+1	-1	-1	0.68	0.66	12.26	11.20
5	-1	-1	+1	-1	1.03	1.09	14.53	15.14
6	+1	-1	+1	-1	1.99	2.02	14.64	17.58
7	-1	+1	+1	-1	0.98	1.03	11.51	10.16
8	+1	+1	+1	-1	2.00	1.81	15.80	15.62
9	-1	-1	-1	+1	0.49	0.69	8.07	8.64
10	+1	-1	-1	+1	0.97	0.79	2.75	3.58
11	-1	+1	-1	+1	0.48	0.32	10.64	7.18
12	+1	+1	-1	+1	0.33	0.28	5.37	5.14
13	-1	-1	+1	+1	0.56	0.45	7.79	8.32
14	+1	-1	+1	+1	0.84	1.26	9.86	10.13
15	-1	+1	+1	+1	0.65	0.35	4.88	3.72
16	+1	+1	+1	+1	1.15	1.01	8.56	8.56
17	-1.68	0	0	0	0.67	1.02	10.10	12.82
18	+1.68	0	0	0	1.91	1.76	15.67	13.16
19	0	-1.68	0	0	1.95	1.48	13.07	8.99
20	0	+1.68	0	0	0.34	1.00	1.83	6.12
21	0	0	-1.68	0	0.40	0.54	7.89	9.15
22	0	0	+1.68	0	1.25	1.31	13.64	12.59
23	0	0	0	-1.68	1.54	1.59	19.43	18.12
24	0	0	0	+1.68	0.59	0.73	5.79	7.30
25	0	0	0	0	1.96	1.85	14.24	13.20
26	0	0	0	0	1.80	1.85	11.47	13.20
27	0	0	0	0	1.89	1.85	12.63	13.20
28	0	0	0	0	1.90	1.85	14.51	13.20
29	0	0	0	0	1.83	1.85	12.71	13.20
30	0	0	0	0	1.93	1.85	13.87	13.20

X₁, tryptone; X₂, initial pH; X₃, agitation speed; X₄, temperature.

DCW, Dry cell weight; ARA, Arachidonic acid.

Table 21. Analysis of variance (ANOVA) for response surface linear, quadratic and cubic model of DCW and ARA yield by cell cultures of *A. maritima* TISTR 1715.

Model	DCW (g/l)						ARA yield (mg/g DCW)					
	SS ^a	Df ^b	MS ^c	F-value	p-value	R ²	SS ^a	Df ^b	MS ^c	F-value	p-value	R ²
Linear	4.04	4	1.01	3.9	0.0138	0.38	263.20	4	65.80	6.9	0.0007	0.52
Quadratic	4.15	4	1.04	9.9	0.0004	0.85	78.60	4	19.65	3.2	0.0429	0.82
Cubic	1.43	8	0.18	9.0	0.0045	0.98	83.89	8	10.49	9.5	0.0038	0.98
					Aliased						Aliased	

^aSS, Sum of square.

^bDf, Degree of freedom.

^cMs, Mean square.

DCW, Dry cell weight; ARA, Arachidonic acid.

เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติด้วย ANOVA ดังแสดงใน Table 21 โดยคำนวณจากโปรแกรม Design expert v.7.15 พบว่าสมการเชิงเส้นตรง (linear model) ที่ทำนายการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราชิโดนิกมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่ R^2 มีค่าเท่ากับ 0.38 และ 0.52 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าค่า R^2 ก่อนข้างต่ำทำให้สมการเชิงเส้นตรงไม่มีความน่าเชื่อถือในการทำนายผลการทดลองและสมการเชิงเส้นตรงยังไม่สามารถอธิบายความสัมพันธ์ของตัวแปรที่มีผลร่วมกันได้ ในขณะที่สมการพหุนามกำลังสอง (quadratic model) และสมการพหุนามกำลังสาม (cubic model) ที่ใช้การทำนายการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราชิโดนิกมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่การวิเคราะห์ทางสถิติโดยสมการพหุนามกำลังสามไม่สามารถอธิบายความสัมพันธ์ของค่าตอบสนองและตัวแปรได้ เนื่องจากชุดการทดลองไม่เพียงพอในการคำนวณสัมประสิทธิ์ของสมการพหุนามกำลังสาม จึงให้ผลการทดลองที่ผิดพลาดเมื่อนำสมการพหุนามกำลังสามใช้ในการทำนายของปัจจัยที่เหมาะสมต่อค่าสนองตอบ (Kumar *et al.*, 2009; Tarangini *et al.*, 2009) ดังนั้นจึงพิจารณาเลือกสมการที่มีลำดับสูงสุด คือสมการพหุนามกำลังสองเพื่ออธิบายความสัมพันธ์ของการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราชิโดนิกกับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ทริปโตเฟน พีเอชเริ่มต้น ความเร็วรอบในการเขย่าและอุณหภูมิ ซึ่งสมการพหุนามกำลังสองเป็นสมการที่ทำนายน้ำหนักเซลล์แห้ง คือ

$$Y_{DCW(g/l)} = -19.4787 + 0.3570X_1 + 3.2544X_2 + 0.0285X_3 + 0.5132X_4 - 0.0147X_1X_2 + 0.0014X_1X_3 - 0.0024X_1X_4 + 0.0013X_2X_3 - 0.0019X_2X_4 - 0.0004X_3X_4 - 0.0259X_1^2 - 0.2146X_2^2 - 0.0001X_3^2 - 0.0097X_4^2 \dots\dots\dots(2)$$

ซึ่งมีค่าความเชื่อมั่น (R^2) เท่ากับ 0.85 โดยปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียไกลคิง *A. maritima* TISTR 1715 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ได้แก่ ความเข้มข้นของทริปโตเนน ความเร็วรอบในการเขย่าและอุณหภูมิ ส่วนปัจจัยที่มีผลร่วมกัน ได้แก่ ความเข้มข้นของทริปโตเนนกับความเร็วรอบในการเขย่า ดังแสดงใน Table 22

Figure 13 (A-F) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรหรือน้ำหนักเซลล์แห้งกับตัวแปรอิสระต่างๆ 2 ตัวแปร อย่างไรก็ตามทริปโตเนนและความเร็วรอบในการเขย่าเป็นปัจจัยที่มีผลอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ร่วมกันต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *A. maritima* TISTR 1715 เมื่อพีเอชเริ่มต้นและอุณหภูมิเท่ากับ 8.0 และ 25.0 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ดังแสดงใน Figure 13B ดังนั้นเซลล์แบคทีเรียจะมีการเจริญเติบโตมีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของทริปโตเนนและความเร็วรอบในการเขย่า และมีการเจริญเติบโตสูงสุด เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่มีความเข้มข้นของทริปโตเนนในช่วง 7.1-8.0 กรัมต่อลิตร และความเร็วยรอบในการเขย่าช่วง 120-160 รอบต่อนาที แต่เมื่อเพิ่มหรือลดระดับของทริปโตเนนและความเร็วรอบในการเขย่าจากที่ระบุจะทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตลดลง (Figure 13B)

นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติด้วย ANOVA ดังแสดงใน Table 21 พบว่าสมการเชิงเส้นตรง (linear model) สมการพหุนามกำลังสอง (quadratic model) และสมการพหุนามกำลังสาม (cubic model) ที่ใช้การทำนายการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะซิโตนิกมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่อย่างไรก็ตามสมการพหุนามกำลังสามไม่สามารถอธิบายความสัมพันธ์ของค่าตอบสนองและตัวแปรได้ (Kumar *et al.*, 2009; Tarangini *et al.*, 2009) จึงเลือกสมการพหุนามกำลังสองของผลผลิตกรดอะซิโตนิกเป็นสมการที่ทำนายผลผลิตกรดอะซิโตนิก คือ

$$Y_{ARA(mg/g)} = -99.1200 - 3.6030X_1 + 31.0034X_2 + 0.1813X_3 - 0.2744X_4 + 0.3026X_1X_2 + 0.0137X_1X_3 - 0.0125X_1X_4 - 0.0156X_2X_3 + 0.0194X_2X_4 - 0.0009X_3X_4 - 0.0115X_1^2 - 1.9983X_2^2 - 0.0003X_3^2 - 0.0068X_4^2 \dots\dots\dots(3)$$

ซึ่งมีค่าความเชื่อมั่น (R^2) เท่ากับ 0.82 โดยปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดอะซิโตนิกของแบคทีเรียไกลคิง *A. maritima* TISTR 1715 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) คือ อุณหภูมิ ส่วนปัจจัยที่มีผลร่วมกัน ได้แก่ ความเข้มข้นของทริปโตเนนกับความเร็วรอบในการเขย่า ในขณะที่ผลของพีเอชเริ่มต้นไม่มีผลต่อการผลิตกรดอะซิโตนิกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังแสดงใน Table 23 ซึ่งแตกต่างการผลการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman design เนื่องจากการออกแบบการ

ทดลองด้วยวิธี CCD มีวัตถุประสงค์เพื่อหาระดับของปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตกรดอะซิโตนิก ซึ่งแตกต่างจากวิธี Plackett-Burman design ที่มีวัตถุประสงค์เพื่อการคัดเลือกปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตกรดอะซิโตนิก ดังนั้นการออกแบบด้วยวิธี CCD ได้กำหนดค่าพีเอชเริ่มต้น 5 ระดับ อยู่ใน ช่วง 6.32-9.68 ดังจะเห็นได้จากการทดลองส่วนใหญ่ที่เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ค่าพีเอชเริ่มต้นอยู่ใน ช่วง 6.32-8.00 ให้ผลผลิตกรดอะซิโตนิกใกล้เคียงกัน ยกเว้นชุดการทดลองที่เลี้ยงแบคทีเรียใน อาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 9.00 และ 9.68 ซึ่งให้ผลผลิตกรดอะซิโตนิกลดลง นอกจากนี้การ วิเคราะห์ทางสถิติการทดลองแบบ CCD และ Plackett-Burman design มีความแตกต่างกันซึ่งอาจทำ ให้ผลการวิเคราะห์ทางสถิติจากทดลองแตกต่างกัน

Figure 14 (A-F) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตามหรือผลผลิตกรดอะซิโตนิกที่ได้กับตัวแปรอิสระต่างๆ 2 ตัวแปร อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของทริปโตเนนและความเร็วรอบ ในการเขย่าเป็นปัจจัยที่มีผลอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ร่วมกันต่อการผลิตกรดอะซิโตนิกของ แบคทีเรีย *A. maritima* TISTR 1715 เมื่อให้ค่าพีเอชเริ่มต้นและอุณหภูมิเท่ากับ 8.0 และ 25 องศา เซลเซียส ตามลำดับ ดังแสดงใน Figure 14B ดังนั้นเซลล์แบคทีเรียจะสามารถผลิตกรดอะซิโตนิก มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของทริปโตเนนและความเร็วรอบในการเขย่า และให้การผลิต กรดอะซิโตนิกสูงสุดเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่มีความเข้มข้นของทริปโตเนนสูงประมาณ 9.0 กรัมต่อลิตร และเพิ่มความเร็วรอบในการเขย่าประมาณ 180 รอบต่อนาที แต่หากลดความเข้มข้น ของทริปโตเนนหรือความเร็วรอบในการเขย่าปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งจากที่ระบุส่งผลให้การผลิตกรดอะราซิโตนิกของแบคทีเรียลดลง (Figure 14B)

สำหรับวิธี RSM และวางแผนทดลองแบบ CCD เป็นวิธีที่มีความน่าเชื่อถือ เนื่องจากเป็นกระบวนการที่ใช้ความรู้ทางคณิตศาสตร์ และสถิติมาใช้เพื่อช่วยในการคำนวณผลตอบแทนที่เหมาะสมที่สุด ปัจจุบันมีการประยุกต์นำวิธี RSM มาใช้กันอย่างกว้างขวางในงานด้านอุตสาหกรรม (Myers, 1995) และพบรายงานการประสบความสำเร็จจากการศึกษาระดับที่เหมาะสมต่อการเพิ่มการเจริญเติบโตและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงด้วยวิธี RSM และวางแผนการทดลองแบบ CCD ตัวอย่างเช่น

การศึกษาของ Jin และคณะ (2009) เพื่อเพิ่มผลผลิตของกรดอะซิโตนิกของรา *Mortierella alpina* ME-1 ด้วยวิธี RSM พบว่าค่าที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอะซิโตนิกของรา *M. alpina* ME-1 คือการเลี้ยงในอาหารที่มี KNO_3 และเอทานอลที่ความเข้มข้นเท่ากับ 2.62 และ 42.44 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 13.7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5.6 วัน โดยให้ผลการผลิต กรดอะซิโตนิกสูงสุดในปริมาณเท่ากับ 19.02 กรัมต่อลิตร สูงกว่าการเลี้ยงในสภาวะเดิม 1.90 เท่า ซึ่งมีปริมาณกรดอะซิโตนิกเท่ากับ 10.02 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับการศึกษาของ Wu และ Lin

(2003) ที่ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคโคซาเฮกซาอีโนอิกของเซลล์สำหรับ *Schizochytrium* sp. S31 ด้วยวิธี RSM พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคโคซาเฮกซาอีโนอิก ได้แก่ กลูโคส (27.98 กรัมต่อลิตร) ยีสต์สกัด (4.52 กรัมต่อลิตร) NaCl (24.82 กรัมต่อลิตร) พีเอชเริ่มต้น 6.96 โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ทำให้สามารถผลิตกรดโคโคซาเฮกซาอีโนอิกได้เท่ากับ 498 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเพิ่มขึ้นร้อยละ 41 จากวิธีทดลองแบบดั้งเดิม หรือแบบที่ละปัจจัย ซึ่งผลิตกรดโคโคซาเฮกซาอีโนอิกได้เท่ากับ 352 มิลลิกรัมต่อลิตร

ดังนั้นจากผลการทดลองจึงสามารถทำนายระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราชิโดนิกสูงสุดของแบคทีเรียไกลดิงสายพันธุ์ *A. maritima* TISTR 1715 จากสมการที่ 2 และ 3 จึงได้ 2 ชุดการทดลอง ได้แก่ ความเข้มข้นของทริปโตเนน (7.7 และ 9.0 กรัมต่อลิตร) ค่าพีเอชเริ่มต้น (7.5 และ 7.9) ความเร็วรอบในการเขย่า (154 และ 170 รอบต่อนาที) และที่อุณหภูมิ (21.6 และ 17.8 องศาเซลเซียส) ตามลำดับ โดยในชุดทดลองที่ 1 ซึ่งสามารถทำนายน้ำหนักของเซลล์แห้งได้สูงสุดเท่ากับ 2.18 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามสามารถทำนายการผลิตกรดอะราชิโดนิกได้เท่ากับ 16.98 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง สำหรับในชุดการทดลองที่ 2 ซึ่งสามารถทำนายการผลิตกรดอะราชิโดนิกได้สูงสุดเท่ากับ 21.19 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง และสามารถทำนายน้ำหนักเซลล์แห้งได้เท่ากับ 2.07 กรัมต่อลิตร จึงนำระดับที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราชิโดนิกที่ได้จากสมการทำนายทั้ง 2 สมการ มาตรวจสอบความถูกต้องของการใช้สมการทำนายการผลิตกรดอะราชิโดนิกของแบคทีเรีย *A. maritima* TISTR 1715 ที่ได้ต่อไป

Table 22. Analysis of variance (ANOVA) for response surface quadratic model of DCW by cell cultures of *A. maritima* TISTR 1715.

Factors	Coefficient estimate	Standard error	Sum of square	Df ^a	Mean square	F-value	P-value Prob>F
X_1 (Tryptone)	0.3570	0.130	1.060	1	1.060	10.10	0.0062
X_2 (Initial pH)	3.2544	0.070	0.430	1	0.430	4.14	0.0600
X_3 (Agitation speed)	0.0285	0.070	1.130	1	1.130	10.78	0.0050
X_4 (Temperature)	0.5132	0.070	1.420	1	1.420	13.53	0.0022
X_1X_2	-0.0147	0.070	0.022	1	0.022	0.21	0.6541
X_1X_3	0.0014	0.081	0.500	1	0.500	4.76	0.0455
X_1X_4	-0.0024	0.081	0.015	1	0.015	0.14	0.7139
X_2X_3	0.0013	0.081	0.070	1	0.070	0.70	0.4158
X_2X_4	-0.0019	0.081	0.001	1	0.001	0.15	0.9040
X_3X_4	-0.0004	0.081	0.170	1	0.170	1.65	0.2180
X_1^2	-0.0259	0.081	0.430	1	0.430	4.08	0.0617
X_2^2	-0.2146	0.080	0.750	1	0.750	7.17	0.0172
X_3^2	-0.0001	0.080	1.750	1	1.750	16.69	0.0010
X_4^2	-0.0097	0.080	0.960	1	0.960	9.20	0.0084
<i>Model</i>	-19.4787	0.080	8.970	14	0.640	6.12	0.0006
<i>Residual</i>			1.57	15	0.105		
$R^2 = 0.85$							

^aDf, degree of freedom.

The bold values indicate the significance at or above the 95.0% confidence level.

DCW, Dry cell weight.

Table 23. Analysis of variance (ANOVA) for response surface quadratic model for ARA yield by cell cultures of *A. maritima* TISTR 1715.

Factors	Coefficient estimate	Standard error	Sum of square	Df ^a	Mean square	F-value	P-value Prob>F
X_1 (Tryptone)	-3.60306	0.97	0.220	1	0.220	0.03	0.8536
X_2 (Initial pH)	31.00345	0.53	15.770	1	15.770	2.58	0.139
X_3 (Agitation speed)	0.18131	0.53	22.680	1	22.680	3.71	0.0731
X_4 (Temperature)	-0.27443	0.53	224.530	1	224.530	36.75	0.0001
X_1X_2	0.30268	0.53	9.160	1	9.160	1.50	0.2396
X_1X_3	0.01375	0.62	47.260	1	47.260	7.74	0.0140
X_1X_4	-0.01250	0.62	0.390	1	0.390	0.06	0.8038
X_2X_3	-0.01568	0.62	9.840	1	9.840	1.61	0.2237
X_2X_4	0.01941	0.62	0.150	1	0.150	0.02	0.8773
X_3X_4	-0.00099	0.62	1.000	1	1.000	0.16	0.6916
X_1^2	-0.01158	0.62	0.085	1	0.085	0.01	0.9074
X_2^2	-1.99835	0.61	65.050	1	65.050	10.65	0.0052
X_3^2	-0.00033	0.61	11.060	1	11.060	1.18	0.1984
X_4^2	-0.00685	0.61	0.480	1	0.480	0.08	0.7836
<i>Model</i>	-99.12001	0.61	409.600	14	29.26	4.79	0.0023
<i>Residual</i>			91.63	15	6.11		
$R^2=0.82$							

^aDf, degree of freedom.

The bold values indicate the significance at or above the 95.0% confidence level.

ARA, Arachidonic acid.

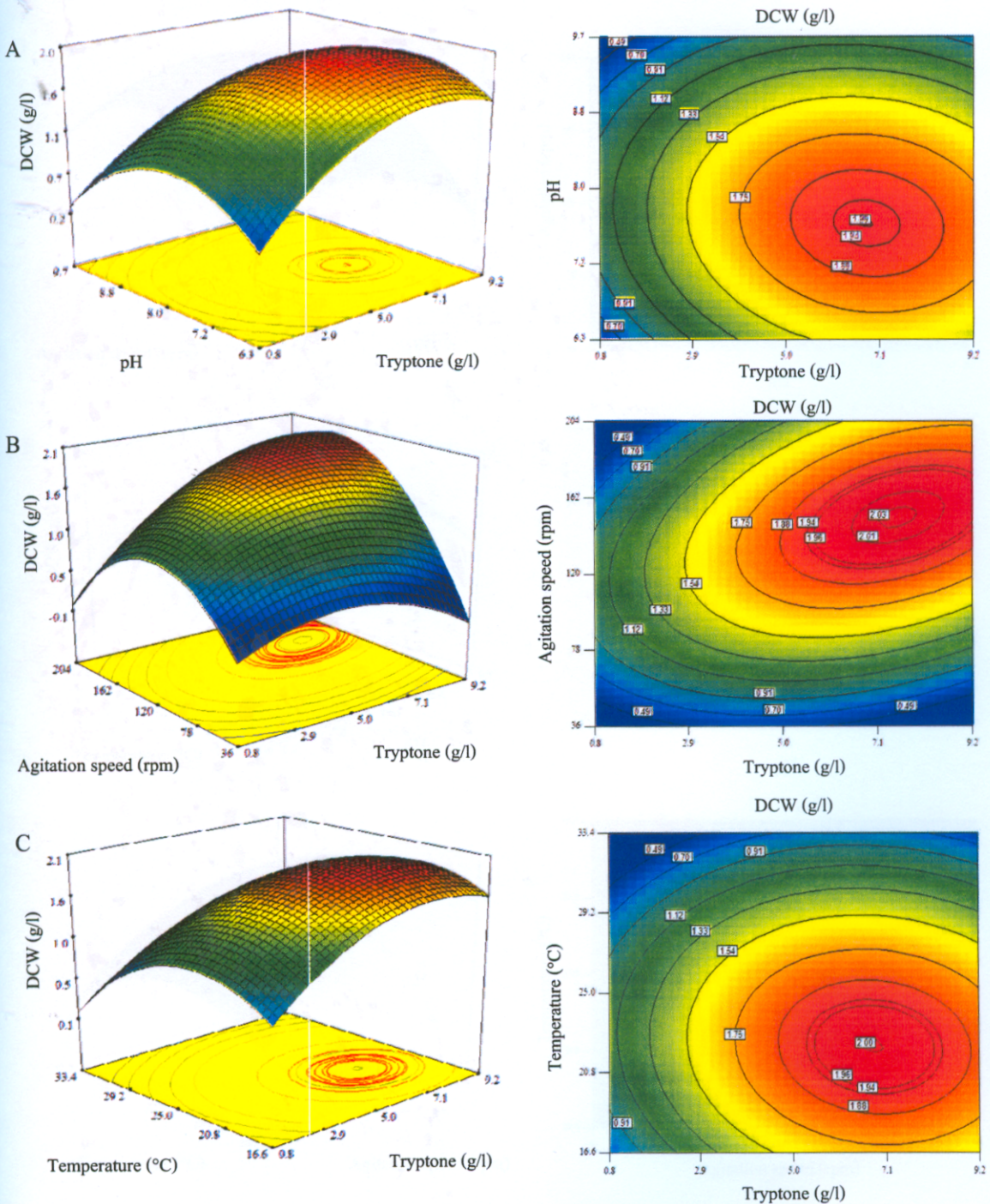


Figure 13. Three dimension surface and contour diagram plots of DCW (g/l) as the function of pH and tryptone (A) (temperature and agitation speed were kept constant at the central point level), as the function of agitation speed and tryptone (B) (temperature and pH were kept constant at the central point level), and as the function of temperature and tryptone (C) (agitation speed and pH were kept constant at the central point level).

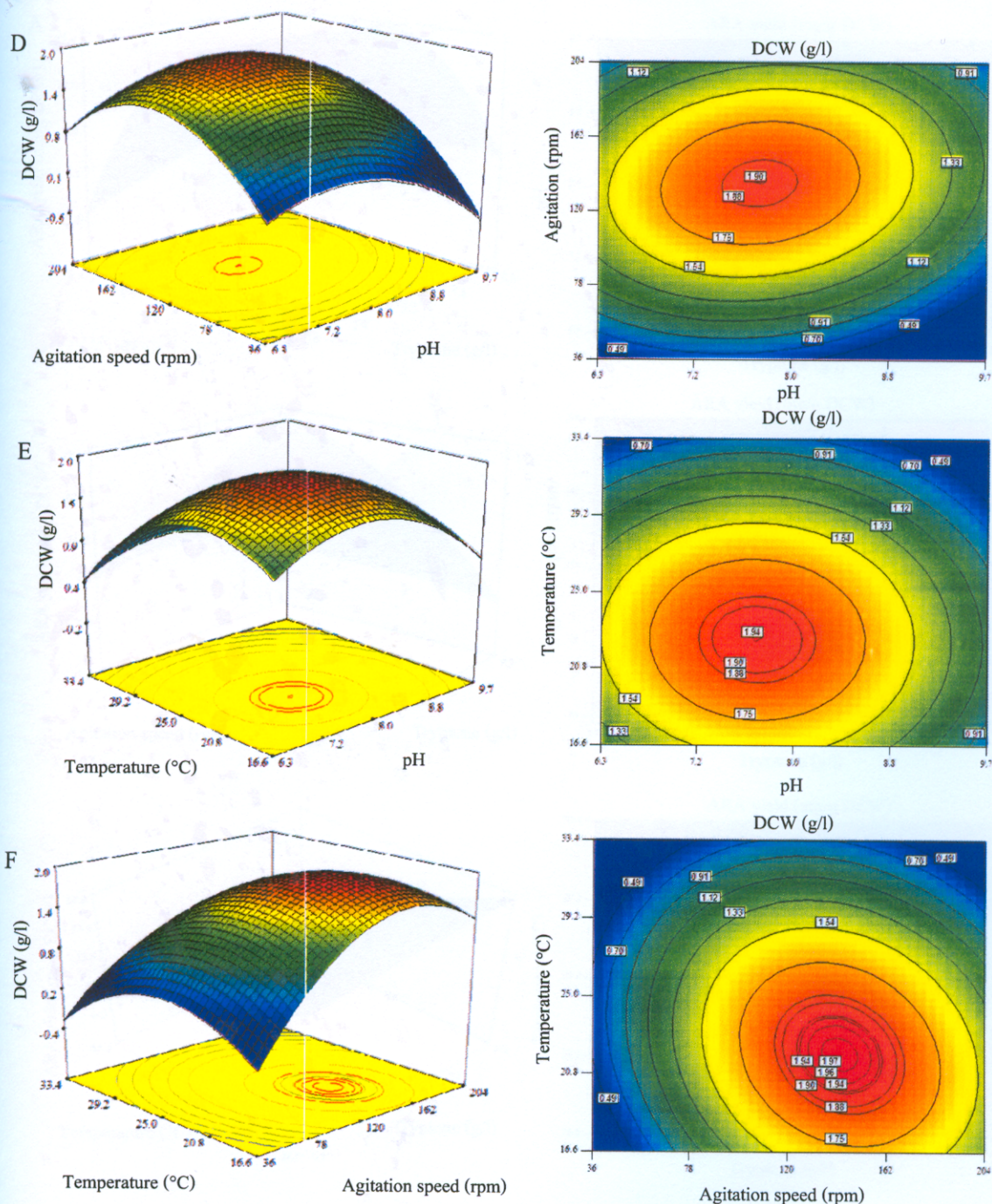


Figure 13. Three dimension surface and contour diagram plots of DCW (g/l) as the function of agitation speed and pH (D) (temperature and tryptone were kept constant at the central point level), as the function of temperature and pH (E) (tryptone and agitation speed were kept constant at the central point level), and as the function of temperature and agitation speed (F) (tryptone and pH were kept constant at the central point level) (Cont.).

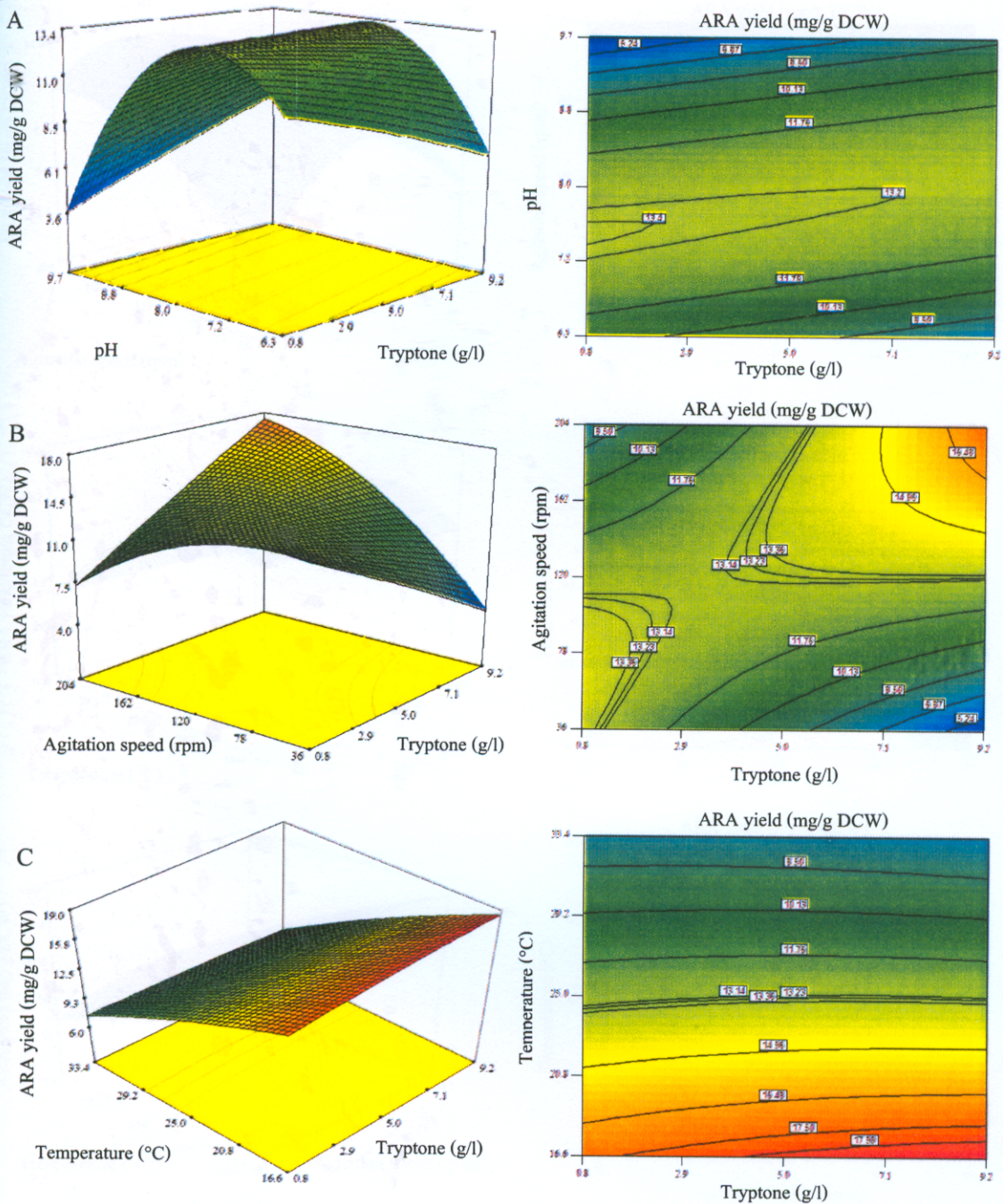


Figure 14. Three dimension surface and contour diagram plots of ARA yield (mg/g DCW) as the function of pH and tryptone (A) (temperature and agitation speed were kept constant at the central point level), as the function of tryptone and agitation speed (B) (temperature and pH were kept constant at the central point level), and as the function of temperature and tryptone (C) (agitation speed and pH were kept constant at the central point level).

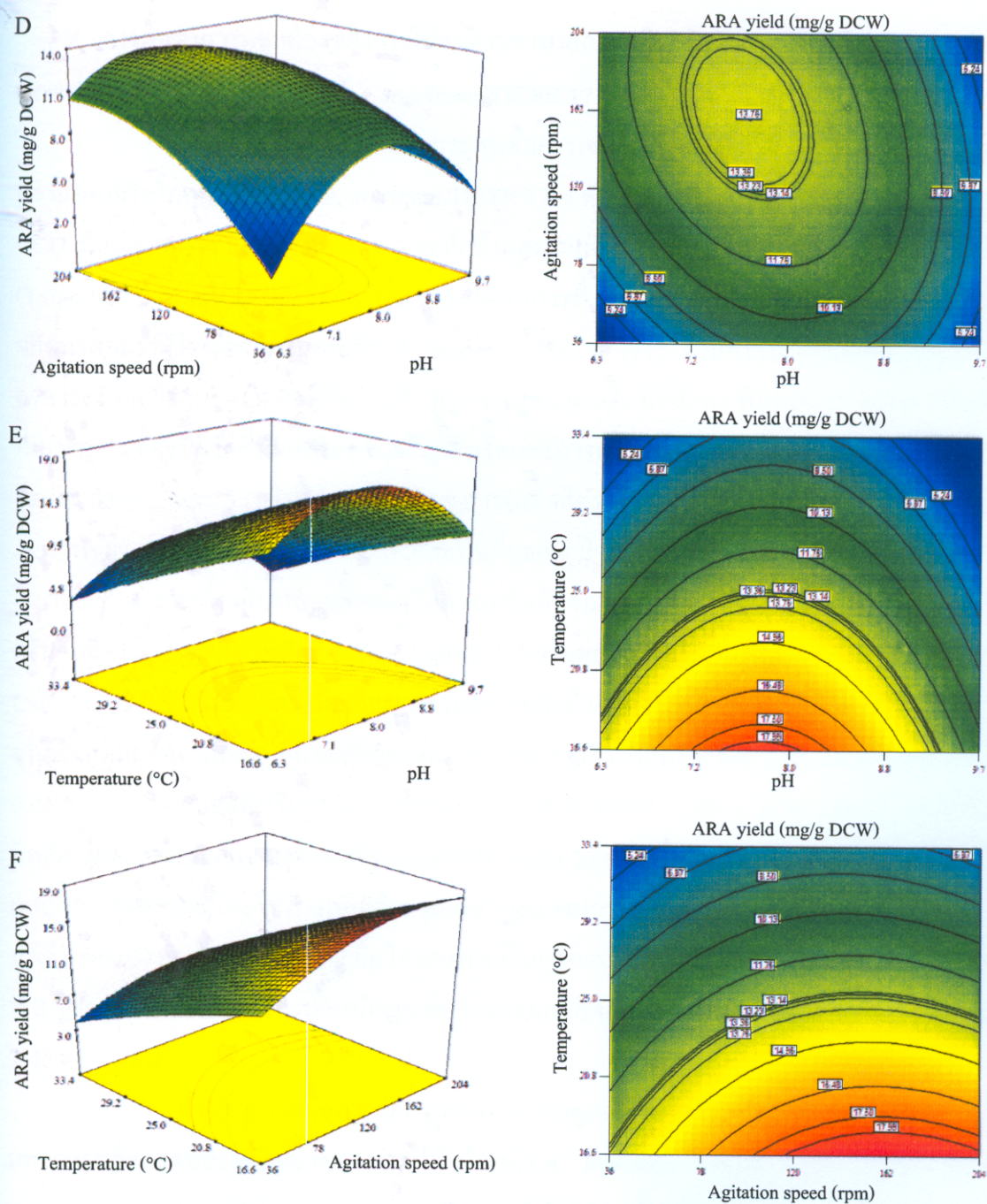


Figure 14. Three dimension surface and contour diagram plots of ARA yield (mg/g DCW) as the function of agitation speed and pH (D) (temperature and tryptone were kept constant at the central point level), as the function of temperature and pH (E) (tryptone and agitation speed were kept constant at the central point level), and as the function of temperature and agitation speed (F) (tryptone and pH were kept constant at the central point level) (Cont.).

3.4 การศึกษาความถูกต้องของการใช้สมการทำนายการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะมิโนของแบคทีเรียไกลดิงสายพันธุ์ *A. maritima* TISTR 1715

จากการศึกษาระดับที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะมิโนของแบคทีเรียไกลดิงสายพันธุ์ *A. maritima* TISTR 1715 ด้วยวิธี RSM และวางแผนการทดลองแบบ CCD เมื่อนำผลการทดลอง คือน้ำหนักเซลล์แห้งและผลผลิตกรดอะมิโนของแบคทีเรียไกลดิง (Table 20) วิเคราะห์ทางสถิติด้วย ANOVA ได้สมการที่ 2 และ 3 ทำนายการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะมิโนของแบคทีเรีย *A. maritima* TISTR 1715 ตามลำดับ โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีองค์ประกอบของระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะมิโนจากผลการทำนายโดยสมการที่ 2 และ 3 (ทริปโตเนน 7.7 และ 9.0 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 7.5 และ 7.9 ความเร็วรอบในการเขย่า 154 และ 170 รอบต่อนาที และบ่มที่อุณหภูมิ 21.6 และ 17.8 องศาเซลเซียส) ดังแสดงใน Table 24 รวมทั้งซูโครสและยีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 1 และ 0.1 ตามลำดับ และ NaCl 15 กรัมต่อลิตร KCl 0.35 กรัมต่อลิตร MgCl₂·6H₂O 5.4 กรัมต่อลิตร MgSO₄·7H₂O 2.7 กรัมต่อลิตร และ CaCl₂·2H₂O 0.5 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียไกลดิงด้วยสภาวะดังกล่าวเป็นเวลา 3 วัน พบว่าในชุดการทดลองที่ 1 และ 2 มีน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรียไกลดิงเท่ากับ 1.80 ± 0.01 และ 2.05 ± 0.06 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณผลผลิตกรดอะมิโนเท่ากับ 19.80 ± 2.78 และ 21.50 ± 0.25 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 24 และเมื่อวิเคราะห์ผลการทดลองที่ได้จริงและจากการทำนาย โดยวิธีทางสถิติด้วย paired *t*-test พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ยกเว้นผลการเจริญเติบโตของเซลล์ในชุดการทดลองที่ 1 นอกจากนี้ในชุดการทดลองที่ 2 ให้ค่าความผิดพลาดของน้ำหนักเซลล์แห้งและผลผลิตกรดอะมิโนเพียงร้อยละ 0.97 และ 1.46 ตามลำดับ

ดังนั้นจากทดลองเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของสมการทำนายการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะมิโนของแบคทีเรียไกลดิง *A. maritima* TISTR 1715 จึงพิจารณาเลือกสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองชุดที่ 2 เนื่องจากให้ผลของน้ำหนักเซลล์แห้งและผลผลิตกรดอะมิโนที่ได้จริงไม่แตกต่างกับการใช้สมการทำนาย ในขณะที่ชุดการทดลองที่ 2 ยังให้ค่าความผิดพลาดค่อนข้างต่ำ ดังนั้นจึงเลือกชุดการทดลองที่ 2 ซึ่งมีความเข้มข้นของทริปโตเนน 9.0 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.9 ความเร็วรอบในการเขย่า 170 รอบต่อนาที และอุณหภูมิ 17.8 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปศึกษาถึงระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะมิโนของแบคทีเรียไกลดิง *A. maritima* TISTR 1715 ต่อไป

Table 24. Optimal values of tryptone, pH, agitation speed and temperature for maximum DCW and ARA yield with corresponding predicted and actual data.

Exp.	X ₁ (g/l)	X ₂	X ₃ (rpm)	X ₄ (°C)	DCW (g/l)			ARA yield (mg/g DCW)		
					Actual	Predicted	Error (%)	Actual	Predicted	Error (%)
1	7.7	7.5	154	21.6	1.80 ^a	2.180 ^b	-17.43	19.80 ^a	16.980 ^a	+16.61
2	9.0	7.9	170	17.8	2.05 ^a	2.070 ^a	-0.97	21.50 ^a	21.190 ^a	+1.46

The alphabetical superscripts indicate significant difference at or above the 95.0% confidence level according to paired *t*-test.

X₁, tryptone; X₂, initial pH; X₃, agitation speed; X₄, temperature.

Exp, Experiment.

DCW, Dry cell weight; ARA, Arachidonic acid.

4. การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราชิโดนิกของแบคทีเรียโกลดิงสายพันธุ์ *A. maritima* TISTR 1715 ในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม

จากการศึกษาผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราชิโดนิกของแบคทีเรียโกลดิง *A. maritima* TISTR 1715 ในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมอันประกอบด้วยซูโครสและยีสต์ความเข้มข้นร้อยละ 1 และ 0.1 ตามลำดับ และ NaCl 15 กรัมต่อลิตร KCl 0.35 กรัมต่อลิตร MgCl₂·6H₂O 5.4 กรัมต่อลิตร MgSO₄·7H₂O 2.7 กรัมต่อลิตร และ CaCl₂·2H₂O 0.5 กรัมต่อลิตร รวมทั้งทริปโตเนน 9.0 กรัมต่อลิตร และปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.9 เขย่าความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 17.8 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 7 วัน พบว่าแบคทีเรียโกลดิงสายพันธุ์ *A. maritima* TISTR 1715 มีการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียสูงสุดเมื่อเลี้ยงนาน 4 วัน โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 2.28 ± 0.18 กรัมต่อลิตร เพิ่มขึ้น 14 เท่าจากการเลี้ยงในอาหาร SAP2 ในการทดลองเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียโกลดิงที่ผลิตกรดอะราชิโดนิกซึ่งมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.16 ± 0.02 กรัมต่อลิตร (Table 17) หลังจากนั้นแบคทีเรียเริ่มมีการเจริญเติบโตที่ลดลง โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.48 ± 0.21 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงนาน 7 วัน ดังแสดงใน Figure 15A และค่าพีเอชในอาหารเพาะเลี้ยงมีค่าเพิ่มขึ้นจากพีเอชเริ่มต้นเล็กน้อยคือจาก 7.9 เป็น 8.7 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียนาน 7 วัน ทั้งนี้เนื่องจากการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและการปลดปล่อยแอมโมเนียจากการย่อยสลายกรดอะมิโนในอาหาร เมื่อแอมโมเนียที่เกิดขึ้นรวมตัวกับน้ำ

จะเกิดเป็นแอมโมเนียมไอออนและไฮดรอกซิล ซึ่งหมู่ไฮดรอกซิลจะทำให้ค่าพีเอชในอาหารเพาะเลี้ยงเพิ่มสูงขึ้น (Park and Lee, 1998)

สำหรับการผลิตกรดอะราชีโดนิก พบว่าที่เวลา 3 วัน มีการผลิตกรดอะราชีโดนิก สูงสุดเท่ากับ 21.50 ± 0.24 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ดังแสดงใน Figure 15B ซึ่งเพิ่มขึ้น 5.85 เท่า เมื่อเปรียบเทียบการเลี้ยงในอาหาร SAP2 ในการทดลองเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียไกลดิงที่ผลิตกรดอะราชีโดนิก ซึ่งมีปริมาณกรดอะราชีโดนิกเท่ากับ 3.67 ± 0.45 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง (Table 14) แต่การผลิตกรดอะราชีโดนิกเริ่มลดลงหลังจาก 3 วัน โดยมีปริมาณกรดอะราชีโดนิกเท่ากับ 10.81 ± 0.56 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ที่เวลา 7 วัน จะเห็นได้ว่าการผลิตกรดอะราชีโดนิกจากแบคทีเรียไกลดิง *A. maritima* TISTR 1715 ก่อนข้างมีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโต (Growth-associated production) และผลิตกรดอะราชีโดนิกได้สูงสุดในช่วง exponential phase ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Nichols และคณะ (1994) ศึกษาการผลิตกรดไอโคซาเพนตะอีโนอิกในแบคทีเรีย *Shewanella putrefaciens* ACAM342 พบว่าการผลิตของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงที่แบคทีเรียผลิตใน exponential phase มีปริมาณสูงกว่าใน stationary phase

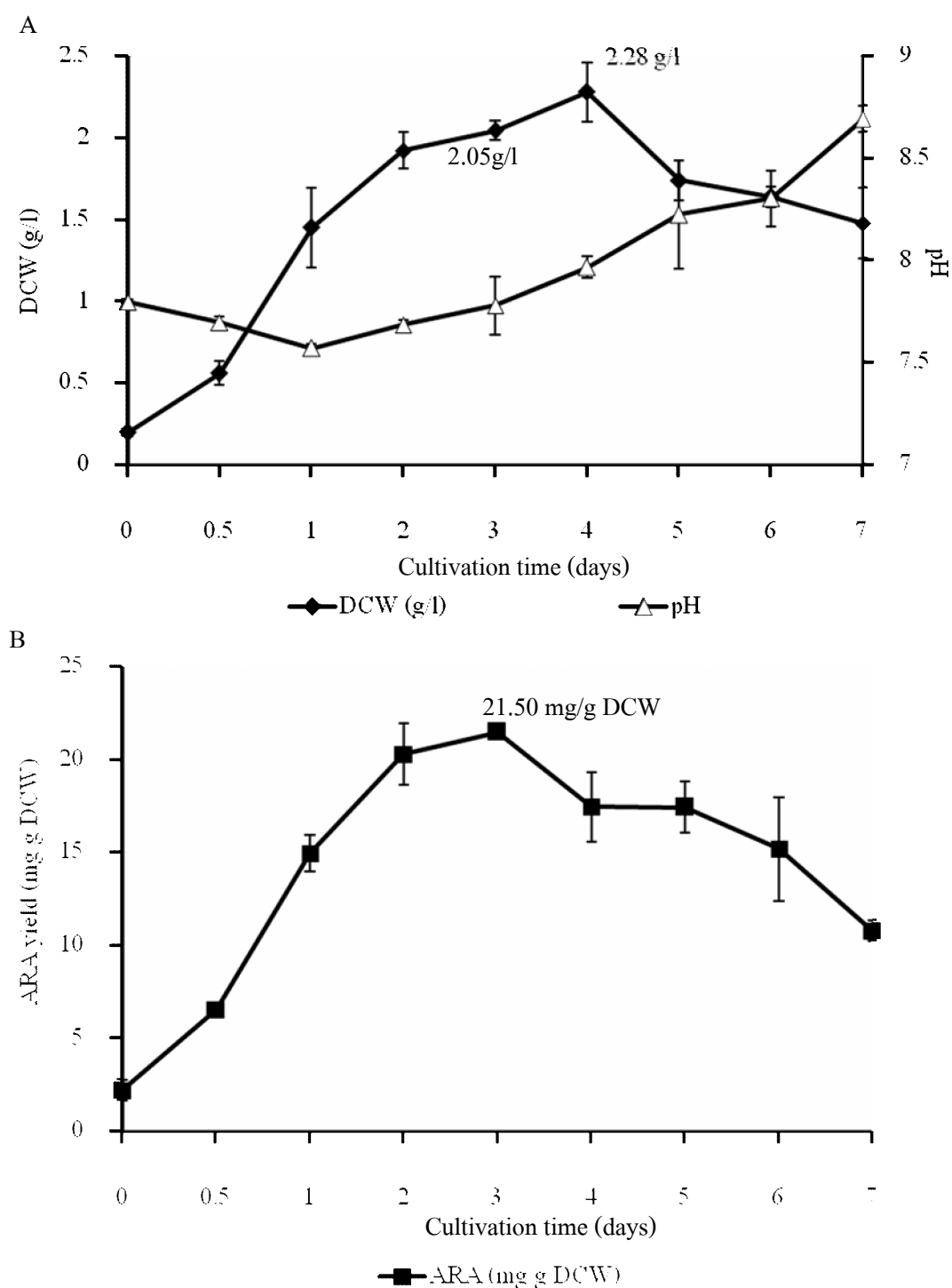


Figure 15. Growth curve (A) and ARA yield (B) of marine gliding bacterium *A. maritima* TISTR 1715 grown under the optimal culture conditions. Vertical lines indicate S.D. DCW, Dry cell weight; ARA Arachidonic acid.

บทที่ 4

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

เมื่อทำการคัดเลือกแบคทีเรียไกลคิงแบคทีเรียจากทะเลจำนวน 85 ไอโซเลต ที่ผลิตกรดอะซิโตนิกด้วยเทคนิค GC พบว่ามีเพียง 3 ไอโซเลตเท่านั้นที่สามารถสร้างกรดอะซิโตนิกได้แก่ KB01-042, TISTR 1715 และ 1719 โดยแบคทีเรียไกลคิงสายพันธุ์ *A. maritima* TISTR 1715 มีการผลิตกรดอะซิโตนิกสูงสุดเท่ากับ 3.67 ± 0.45 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง หรือ 0.60 ± 0.14 มิลลิกรัมต่อลิตร

แบคทีเรียไกลคิงสายพันธุ์ *A. maritima* TISTR 1715 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว modified SAP2 มีการเจริญเติบโตสูงสุดที่เวลา 2 วัน โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.54 ± 0.01 กรัมต่อลิตร และผลิตกรดอะซิโตนิกได้สูงสุดที่เวลา 3 วัน โดยผลิตกรดอะซิโตนิกได้เท่ากับ 5.99 ± 0.53 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง

เมื่อทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะซิโตนิกของแบคทีเรียไกลคิง *A. maritima* TISTR 1715 ด้วยวิธี Plackett-Burman design พบว่าทริปโตเนน และอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียไกลคิงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95.6 และ 95.4 ตามลำดับ ในขณะที่พีเอชเริ่มต้นและความเร็วรอบในการเขย่าเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดอะซิโตนิกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95.0 และ 97.5 ตามลำดับ

แหล่งคาร์บอนทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ กลูโคส ฟรุกโตสและซูโครส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 ให้ผลการเจริญเติบโตของแบคทีเรียไกลคิง *A. maritima* TISTR 1715 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แต่ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีผลเพิ่มผลผลิตกรดอะซิโตนิกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยให้ผลผลิตกรดอะซิโตนิกสูงสุดเท่ากับ 7.83 ± 0.61 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง หรือ 4.06 ± 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร

เมื่อนำปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะซิโตนิกของแบคทีเรีย *A. maritima* TISTR 1715 มาศึกษาระดับที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะซิโตนิกด้วยวิธี RSM ทำให้ได้สมการทำนายน้ำหนักเซลล์แห้งและสมการทำนายผลผลิตกรดอะซิโตนิกดังนี้

$$Y_{DCW (g/l)} = -19.4787 + 0.3570X_1 + 3.2544X_2 + 0.0285X_3 + 0.5132X_4 - 0.0147X_1X_2 + 0.0014X_1X_3 - 0.0024X_1X_4 + 0.0013X_2X_3 - 0.0019X_2X_4 - 0.0004X_3X_4 - 0.0259X_1^2 - 0.2146X_2^2 - 0.0001X_3^2 - 0.0097X_4^2$$

$$Y_{ARA (mg/g)} = -99.1200 - 3.6030X_1 + 31.0034X_2 + 0.1813X_3 - 0.2744X_4 + 0.3026X_1X_2 + 0.0137X_1X_3 - 0.0125X_1X_4 - 0.0156X_2X_3 + 0.0194X_2X_4 - 0.0009X_3X_4 - 0.0115X_1^2 - 1.9983X_2^2 - 0.0003X_3^2 - 0.0068X_4^2$$

เมื่อตรวจสอบความถูกต้องของสมการทำนายการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราชิโคนิกของแบคทีเรียไกลดิง *A. maritima* TISTR 1715 แล้วจึงพิจารณาเลือกสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมจากการทดลองชุดที่ 2 เนื่องจากให้ผลของน้ำหนักเซลล์แห้งและผลผลิตกรดอะราชิโคนิกที่ได้จริงไม่แตกต่างจากการใช้สมการทำนาย โดยมีความเข้มข้นของทริปโตเนน 9.0 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.9 ความเร็วรอบในการเขย่า 170 รอบต่อนาที และอุณหภูมิ 17.8 องศาเซลเซียส

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียไกลดิงสายพันธุ์ *A. maritima* TISTR 1715 ในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม เป็นเวลา 3 วัน แบคทีเรียมีการผลิตกรดอะราชิโคนิกสูงสุดเท่ากับ 21.50 ± 0.24 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง และมีการเจริญเติบโตสูงสุดเมื่อเลี้ยงนาน 4 วัน โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 2.28 ± 0.18 กรัมต่อลิตร

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงประสบความสำเร็จในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อเพิ่มการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราชิโคนิกของแบคทีเรียไกลดิง *A. maritima* TISTR 1715 ในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมอันประกอบด้วยซูโครสและยีสต์ความเข้มข้นร้อยละ 1 และ 0.1 ตามลำดับ และ NaCl 15 กรัมต่อลิตร KCl 0.35 กรัมต่อลิตร $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 5.4 กรัมต่อลิตร $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.7 กรัมต่อลิตร และ $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.5 กรัมต่อลิตร รวมทั้งทริปโตเนน 9.0 กรัมต่อลิตร และปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.9 เขย่าความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 17.8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ซึ่งจะให้น้ำหนักเซลล์แห้งและผลผลิตกรดอะราชิโคนิกเท่ากับ 2.05 กรัมต่อลิตร และ 21.50 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ สูงขึ้น 4.02 และ 3.59 เท่า ตามลำดับ จากการเลี้ยงในอาหาร modified SAP2 ในการทดลองผลของระยะเวลาที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราชิโคนิกของแบคทีเรีย *A. maritima* TISTR 1715 ซึ่งมีน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณกรดอะราชิโคนิกเท่ากับ 0.54 ± 0.01 กรัมต่อลิตร และ 5.99 ± 0.53 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ นอกจากนี้การเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะราชิโคนิกเพิ่มขึ้นถึง 12.65 และ 5.85 เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ การเลี้ยงในอาหารเหลว SAP2 ในการทดลองเบื้องต้นเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียไกลดิงที่ผลิตกรดอะราชิโคนิก ซึ่งมีน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณกรดอะราชิโคนิกเท่ากับ 0.16 ± 0.02 กรัมต่อลิตร และ 3.67 ± 0.45 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาผลของการลดอุณหภูมิในขณะที่เลี้ยงแบคทีเรียไกลดิงในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม โดยลดอุณหภูมิลงจาก 17.8 องศาเซลเซียสเมื่อเซลล์เริ่มเข้าสู่ระยะ exponential phase เพื่อกระตุ้นการผลิตกรดอะมิโนในเซลล์แบคทีเรียไกลดิง
2. ศึกษาแหล่งไนโตรเจนราคาถูกที่สามารถทดแทนการใช้ทริปโตเนนเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยง
3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะมิโนจากแบคทีเรียไกลดิง *A. maritima* TISTR 1715 ในถังหมักขนาดใหญ่ เพื่อเพิ่มผลผลิตกรดอะมิโนและอาจนำไปสู่การพัฒนาเป็นแหล่งผลิตชนิดใหม่ในเชิงอุตสาหกรรม

เอกสารอ้างอิง

- นลินี เพชรเทียนชัย. 2545. การคัดเลือกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะจากแบคทีเรียน้ำเค็ม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ไพโรจน์ วิริยาริ. 2544. การออกแบบพื้นที่การตอบสนอง. พิมพ์ครั้งที่ 1. ภาควิชาเทคโนโลยีการพัฒนผลผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.
- Aggett, P. J. 1985. Physiology and metabolism of essential trace elements: An outline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 14: 513-543.
- Aki, T., Matsumoto, Y., Morinaga, T., Kawamoto, S., Shigeta, S., Ono, K. and Suzuki, O. 1998. Lipid composition of a newly isolated polyunsaturated fatty acid-producing fungus, *Achlya* sp. ma-2801. *J. Ferment. Bioeng.* 86: 504-507.
- Aki, T., Nagahata, Y., Ishihara, K., Tanaka, Y., Morinaga, T., Higashiyama, K., Akimoto, K., Fujikawa, S., Kawamoto, S., Shigeta, S., Ono, K. and Suzuki, O. 2001. Production of arachidonic acid by filamentous fungus, *Mortierella alliacea* strain YN-15. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78: 599-604.
- Allen, E. E., Facciotti, D. and Bartlett, D. H. 1999. Monounsaturated but not polyunsaturated fatty acids are required for growth of the deep-sea bacterium *Photobacterium profundum* SS9 at low temperature and high pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1710-1720.
- Alvarez, H. M., Pucci, O. H. and Steinbuchel, A. 1997. Lipid storage compounds in marine bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47: 132-139.
- Andarwulan, N. and Shetty, K. 1999. Improvement of pea (*Pisum sativum*) seed vigour response by fish protein hydrolysates in combination with acetyl salicylic acid. *Process Biochem.* 35: 159-165.
- Bajpai, P. K., Bajpai, P. and Ward, O. P. 1991. Production of arachidonic acid by *Mortierella alpina* ATCC 32222. *J. Ind. Microbiol.* 8: 179-186.

- Barclay, W. R. 1997. Method of aquaculture feeding microflora having a small cell aggregate size. US. Patent 5: 688-500.
- Begin, M. E., Ells, G., Das, U. N. and Horrobin, D. F. 1986. Differential killing of human carcinoma cells supplemented with *n*-3 and *n*-6 polyunsaturated fatty acids. *J. Natl. Cancer Inst.* 77: 1053-1062.
- Bell, J. G. and Sargent, J. R. 2003. Arachidonic acid in aquaculture feeds: Current status and future opportunities. *Aquacult.* 218: 491-499.
- Bessonart, M., Izquierdo, M. S., Salhi, M., Hernandez-Cruz, C. M., Gonzalez, M. M. and Fernandez-Palacios, H. 1999. Effect of dietary arachidonic acid levels on growth and survival of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae. *Aquacult.* 179: 265-275.
- Bigogno, C., Khozin-Goldberg, I., Boussiba, S., Vonshak, A. and Cohen, Z. 2002. Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. *Phytochemistry* 60: 497-503.
- Birch, E. E., Castaneda, Y. S., Wheaton, D. H., Birch, D. G., Uauy, R. D. and Hoffman, D. R. 2005. Visual maturation of term infants fed long-chain polyunsaturated fatty acid-supplemented or control formula for 12 month. *Am. J. Clin. Nutr.* 81: 871-879.
- Bonete, M. J., Martinez-Espinosa, R. M., Pire, C., Zafrilla, B. and Richardson, D. J. 2008. Nitrogen metabolism in haloarchaea. *Saline Syst.* 4: 1-12.
- Bowman, J. P., McCammon, S. A., Lewis, T., Skerratt, J. H., Brown, J. L., Nichols, D. S. and McMeekin, T. A. 1998. *Psychroflexus torques*. gen. nov., sp. nov., a psychrophilic species from Antarctic sea ice, and reclassification of *Flavobacterium gondwanense* (Dobson *et al.*, 1993) as *Psychroflexus gondwanense* gen. nov., comb. nov. *Microbiol.* 144: 1601-1609.
- Box, G. E. P. and Wilson, K. B. 1951. On the experimental attainment of optimum conditions. *J. R. Stat. Soc.* 13: 1-45.

- Box, G. E. P. 2006. *Improving Almost Anything: Ideas and Essays*. Revised Ed. John Wiley and Sons. New York.
- Box, G. E.P., Hunter J. S. and Hunter, W. G. 2005 *Statistics for Experimenters: Design Innovation and Discovery*. 2nd Ed. John Wiley and Sons. New York.
- Boyer, P. D., Lardy, H. A. and Phillips, P. H. 1943. THE role of potassium in muscle phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 149: 673-682.
- Bracco, U. and Deckelbaum, R. J. 1992. *Polyunsaturated Fatty Acid in Human Nutrition*. Raven Press. London.
- Brown, C. M. and Rose, A. H. 1969. Fatty acid composition of *Candida utilis* as affected by growth temperature and dissolve oxygen tension. *J. Bacteriol.* 99: 371-376.
- Burja, A. M., Radianingtyas, H., Windust, A. and Barrow, C. J. 2006. Isolation and characterization of polyunsaturated fatty acid producing *Thraustochytrium* species: Screening of strains and optimization of omega-3 production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 1161-1169.
- Calder, P. 2009. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. *Biochimie* 6: 1-5.
- Caldwell, D. R. 1995. *Microbial Physiology and Metabolism*. Wm. C. Brown. Dubuque.
- Carnielli, V. P., Simonato, M., Verlato, G., Luijendijk, I., Curtis, M. D., Sauer, P. J. J. and Cogo, P. E. 2007. Synthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in preterm newborns fed formula with long-chain polyunsaturated fatty acids. *Am. J. Clin. Nutr.* 86: 1323-1330.
- Carvalho, A. P., Pontes, I., Gaspar, H. and Malcata, F. X. 2006. Metabolic relationships between macro- and micronutrients, and the eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid content of *Pavlova lutheri*. *Enzyme Microb. Technol.* 38: 358-366.

- Castell, J. D., Bell, J. G., Tocher, D. R. and Sargent, J. R. 1994. Effects of purified diets containing different combinations of arachidonic and docosahexaenoic acid on survival, growth and fatty-acid composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquacult.* 128: 315-333.
- Certik, M., Megova, J. and Horenitzky, R. 1999. Effect of nitrogen sources on the activities of lipogenic enzymes in oleaginous fungus *Cunninghamella echinulata*. *J. Appl. Microbiol.* 45: 289-293.
- Certik, M. and Shimizu, S. 1999. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *J. Biosci. Bioeng.* 87: 1-14.
- Cheng, M. H., Walker, T. H., Hullbert, G. J. and Raman, D. R. 1999. Fungal production of eicosapentaenoic acid and arachidonic acid from industrial waste streams and crude soybean oil. *Bioresour. Technol.* 67: 101-110.
- Chi, Z., Pyle, D., Wen, Z., Frear, C. and Chen, S. 2007. A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. *Process Biochem.* 42: 1537-1545.
- Christensen, P. and Cook, F. D. 1978. *Lysobacter*, a new genus of nonfruiting, gliding bacteria with a high base ratio. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 28: 367-393.
- Christopher, A., Boluton, A. and Ratledge, C. 1981. Correlation of lipid accumulation in yeasts with possession of ATP: Citrate lyase. *J. Gen. Microbiol.* 127: 169-176.
- Cho, J. C. and Giovannoni, S. J. 2003. *Croceibacter atlanticus* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium in the family *Flavobacteriaceae*. *Syst. Appl. Microbiol.* 26: 76-83.
- Cochran, W. G. and Cox, G. M. 1957. *Experiment Design*. John Wiley and Sons. New York.
- Dedyukhina, E. G. and Eroshin, V. K. 1991. Essential metal ions in the control of microbial metabolism. *Process Biochem.* 26: 31-37.

- DeLong, E. F. and Yayanos, A. A. 1986. Biochemical function and ecological significance of novel bacterial lipids in deep-sea procaryotes. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 730-737.
- Durmaz, Y., Monteiro, M., Bandarra, N., Gokpinar, S. and Tsik, O. 2007. The effect of low temperature on fatty acid composition and tocopherol of the red microalga, *Porphyridium crenatum*. *J. Appl. Phycol.* 19: 223-227.
- Dworkin, M. 1996. Recent advances in the social and development biology of the Myxobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 60: 70-102.
- Dyal, S. D., Bouzidi, L. and Narine, S. S. 2005. Maximizing the production of c-linolenic 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.
- Dyerberg, J. 1986. Linoleate-derived polyunsaturated fatty acids and prevention of atherosclerosis. *J. Nutr. Rev.* 44: 125-134.
- Edens, N. K., Reaves, L. A., Bergana, M. S., Reyzer, I. L., O'Mara, P., Baxter, J. H. and Snowden, M. K. 2002. Yeast extract stimulates glucose metabolism and inhibits lipolysis in rat adipocytes in vitro. *J. Nutr.* 132: 1141-1148.
- Elizondo, A., Araya, J. and Rodrigo, R. 2007. Polyunsaturated fatty acid pattern in liver and erythrocyte phospholipids from obese patients. *Obesity* 15: 24-31.
- Ellinger, G. M. and Boyne, E. B. 1965. Amino acid composition of some fish products and casein. *Br. J. Nutr.* 19: 587-592.
- Erwin, J. A. 1973. Comparative Biochemistry of Fatty Acid in Eukaryotic Microorganisms. *In* Lipid and Biomembranes of Eukaryotic Microorganisms. (Erwin, J. A., ed.). p. 41-143. Academic Press. New York.
- FAO/WHO, 1995. Nutrition science policy. WHO and FAO joint consultation: Fats and oils in human nutrition. *Nutr. Rev.* 53: 202-205.

- Fang, P. C., Kuo, H. K., Huang, C.-B., Ko, T. Y., Chen, C. C. and Chung, M. Y. 2005. The effect of supplementation of docosahexaenoic acid and arachidonic acid on visual acuity and neurodevelopment in larger preterm infants. *Chang Gung Med. J.* 28: 708-715.
- Funk, C. D. 2001. Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoids biology. *Science* 294: 1871-1875.
- Furuita, H., Yamamotoa, T., Shima, T., Suzukia, N. and Takeuchi, T. 2003. Effect of arachidonic acid levels in broodstock diet on larval and egg quality of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquacult.* 220: 725-735
- Gaspari, F., Paitan, Y., Mainini, M., Losi, D., Ron, E. Z. and Marinelli, F. 2005. Myxobacteria isolated in Israel as potential source of new anti-infectives. *J. Appl. Microbiol.* 98: 429-439.
- Gellerman, J. L. and Schlenk, K. 1979. Methyl directed desaturation of arachidonic acid to eicosapentaenoic acid in the Fungus *Saprolenia parasitica*. *Biochim. Biophys. Acta* 573: 23-30.
- Gentile, G., Bonasera, V., Amico, C., Giuliano, L. and Yakimov, M. M. 2003. *Shewanella* sp. GA-22, a psychrophilic hydrocarbonoclastic Antarctic bacterium producing polyunsaturated fatty acids. *J. Appl. Microbiol.* 95: 1124-1133.
- Gewirtz, A. T., Collier-Hyams, L. S., Young, A. N., Kucharzik, T., Guilford, W. J., Parkinson, J. F., Williams, I. R., Neish, A. S. and Madara, J. L. 2002. Lipoxin A₄ analogs attenuate induction of intestinal epithelial proinflammatory gene expression and reduce the severity of dextran sodium sulfate-induced colitis. *J. Immunol.* 168: 5260-5267.
- Giesbrecht, F. G. and Gumpertz, M. L. 2004. Planning, construction, and statistical analysis of comparative experiments. John Wiley and Sons. New York.
- Gill, I. and Valivety, R. 1997. Polyunsaturated fatty acids, part 1: Occurrence, biological activities and applications. *Trends Biotechnol.* 15: 401-409.

- Giusto, N., Pasquare, S., Salvador, G., Castagnet, P. and Roqe, M. 2000. Llincheta de Boschero M. Lipid metabolism in vertebrate retinal rod outer segment. *Prog. Lipid Res.* 39: 315-319.
- Grimsley, N. H., Grimsley, J. M. and Hartmann, E. 1981. Fatty acid compositions of mutants of the moss *Physcomitrella patens*. *Phytochemistry* 20: 1519-1524.
- Grynberg, A. and Demaison, L. 1996. Fatty acid oxidation in the heart. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1: 11-17.
- Guchhait, R. H., Polakis, S. E., Dimroth, P., Stoll, E., Moss, J. and Lane, M. D. 1974. Acetyl-CoA carboxylase system of *E. coli*: Purification and properties of the biotin protein carboxylase, carboxytransferase and carboxyl carrier protein components. *J. Biol. Chem.* 249: 6633-6645.
- Harris, W. S., Sands, S. A., Windsor, S. L., Ali, H. A., Stevens, T. L., Magalski, A., Porter, C. B. and Borkon A. M. 2004. Omega-3 fatty acids in cardiac biopsies from heart transplantation patients: Correlation with erythrocytes and response to supplementation. *Circulation* 110: 1645-1649.
- Healy, D. A., Wallace, F. A., Miles, E. A., Calder, P. C. and Newsholme, P. 2000. Effect of low to moderate amounts of dietary fish oil on neutrophil lipid composition and function. *Lipids* 35: 763-768.
- Higashiyama, K., Yaguchi, T., Akimoto, K., Fujikawa, S. and Shimizu, S. 1998. Enhancement of arachidonic acid production by *Mortierella alpina* 1S-4. *J. Am. Oil Soc.* 75: 1501-1505.
- Higashiyama, K., Murakami, K., Tsujimura, H., Matsumoto, N. and Fujikawa, S. 1999. Effects of dissolved oxygen on the morphology of an arachidonic acid production by *Mortierella alpina* 1S-4. *Biotechnol. Bioeng.* 63: 442-448.
- Hogg, R.V., and Craig, A.T. 1978. *Introduction to Mathematical Statistics* 4th ed. Macmillan Publishing. New York.

- Holland, H, D. 2005. Sea level, sediments and the composition of seawater. *Am. J. Sci.* 305: 220-239.
- Hosoya, S., Arunpairojana, V., Suwannachart, C., Kanjana-Opas, A. and Yokota A. 2006. *Aureispira marina* gen. nov., sp. nov., a gliding, arachidonic acid-containing bacterium isolated from the southern coastline of Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 2931-2935.
- Hosoya, S., Arunpairojana, V., Suwannachart, C., Kanjana-Opas, A. and Yokota A. 2007. *Aureispira maritima* sp. nov., isolated from marine barnacle debris. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 1948-1951.
- Huang, J., Aki, T., Hachida, K., Yokochi, T., Kaeamoto, S., Shigeta, S., Ono, K. and Suzuki, O. 2001. Profile of polyunsaturated fatty acids produced by *Thraustochytrium* sp. KK17-3. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78: 605-610.
- Hwang, B. H., Kim, J. W., Park, C. Y., Park, C. S., Kim, Y. S. and Ryu, Y. W. 2005. High-level production of arachidonic acid by fed-batch culture of *Mortierella alpina* using NH₄OH as a nitrogen source and pH control. *Biotechnol. Lett.* 27: 731-735.
- Iizuka, T., Jojima, Y., Fudou, R. and Yamanaka, S. 1998. Isolation of myxobacteria from the marine environment. *FEMS Microbiol. Lett.* 169: 317-322.
- Iizuka, T., Jojima, Y., Fudou, R., Hiraishi, A., Ahn, J. W. and Yamanaka, S. 2003. *Plesiocystis pacifica* gen. nov., sp. nov., a marine myxobacterium that contains dehydrogenated menaquinone, isolated from the Pacific coasts of Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 189-195.
- Innis S. M., Gilley, J. and Werker, J. 2001. Are human milk long-chain polyunsaturated fatty acids related to visual and neural development in breast-fed term infants. *J. Pediatr.* 139: 532-538.
- Intriago, P. 1992. The regulation of fatty acid biosynthesis in some estuarine strains of *Flexibacter*. *J. Gen. Microbiol.* 138: 109-114.

- Jang, H. D., Lin, Y. Y. and Yang, S. S. 2000. Polyunsaturated fatty acid production with *Mortierella alpina* by solid substrate fermentation. Bot. Bull. Acad. Sin. 41: 41-48.
- 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*. Bioresour. Technol. 96: 1633-1644.
- Jang, H. D. and Yang, S. S. 2008. Polyunsaturated fatty acids production with a solid-state column reactor. Bioresour. Technol. 99: 6181-6189.
- Jensen, R. G. 1999. Lipids in human milk. Lipids 34: 1243-1271.
- Jiang, D. M., Wu, Z. H., Zhao, J. Y. and Li, Y. Z. 2007. Fruiting and non-fruited myxobacteria: A phylogenetic perspective of cultured and uncultured members of this group. Mol. Phylogenet. Evol. 44: 545-552.
- Jiang, Y. and Chen, F. 2000. Effects of temperature and temperature shift on docosahexaenoic acid production by the marine microalga *Cryptocodinium cohnii*. J. Am. Oil Chem. Soc. 77: 613-617.
- Jin, M. J., Huang, H., Xiao, A. H., Gao, Z., Liu, X. and Peng, C. 2009. Enhancing arachidonic acid production by *Mortierella alpina* ME-1 using improved mycelium aging technology. Bioprocess Biosyst. Eng. 32: 117-122.
- Johansen, J. E., Nielsen, P. and Sjaholm, Carsten. 1999. Description of *Cellulophaga baltica* gen. nov., sp. nov. and *Cellulophaga fucicola* gen. nov., sp. nov. and reclassification of [*Cytophaga*] *Iytica* to *Cellulophaga lytica* gen. nov., comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 1231-1240.
- Kaewsuwan, S., Cahoon, E. B., Perroud, P. F., Wiwat, C., Panvisavas, N., Quatrano, R. S., Cove, D. J. and Bunyapraphatsara, N. 2006. Identification and functional characterization of the moss *Physcomitrella patens* Δ^5 -desaturase gene involved in arachidonic and eicosapentaenoic acid biosynthesis. J. Biol. Chem. 281: 21988-21997.

- Kang, D. H., Jeh, E. J., Seo, J. W., Chun, B. H. and Hur, B. K. 2007. Effect of salt concentration on production of polyunsaturated fatty acids in *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304. Korean J. Chem. Eng. 24: 651-654.
- Kaulmann, U. and Hertweck, C. 2002. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases. Angew. Chem. Int. Ed. 41: 1866-1869.
- Khan, S. T., Nakagawa, Y. and Harayama, S. 2006. *Krokinobacter* gen. nov., with three novel species, in the family Flavobacteriaceae. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56: 323-328.
- Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z., Pimenta-Leibowitz, M., Nechev, J. and Zilberg, D. 2006. Feeding with arachidonic acid-rich triacylglycerols from the microalga *Parietochloris incisa* improved recovery of guppies from infection with *Tetrahymena* sp. Aquacult. 255: 142-150.
- Khuri, A. I. and Cornell, J. A. 1987. Response Surface. Marcell Dekker. New York.
- Koike, Y., Cai, J. H., Higashiyama K., Fujikawa, S. and Park, Y. E. 2001. Effect of consumed carbon to nitrogen ratio on mycelia morphology and arachidonic acid production in culture of *Mortierella alpina*. J. Biosci. Bioeng. 91:382-389
- Kumar, M., Ponselvan, F. I. A., Malviya, J. R., Srivastava, V. C. and Mall, I. D. 2009. Treatment of bio-digester effluent by electrocoagulation using iron electrodes. J. Hazard. Mater. 165: 345-352.
- Kyle, D. J. 1994. Microbial oil mixtures and uses thereof. US. Patent 5: 374-657.
- Lan, W., Qin, W. and Yu, L. 2002. Effect of glutamate on arachidonic acid production from *Mortierella alpina*. Lett. Appl. Microbiol. 35: 357-360.
- Lau, K. W. K., Ng, C. Y. M., Ren, J., Lau, S. C. L., Qian, P. Y., Wong, P. K., Lau, T. C. and Wu, M. 2005. *Owenweeksia hongkongensis* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium of the phylum '*Bacteroidetes*'. J. Syst. Evol. Microbiol. 55: 1051-1057.

- Lee, M. G., Kim, E. J., Kim, N. S., Yoon, S. K., Ahn, Y. H. and Song, J. Y., 1999. Development of a serum-free medium for the production of erythropoietin by suspension culture of recombinant chinese hamster ovary cells using a statistical design. *J. Biotechnol.* 69: 85-93.
- Lewis, R. A., Austen, K. F. and Soberman, R. J. 1990. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway: Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. *N. Engl. J. Med.* 323: 645-655.
- Levy, B. D., Clish, C. B., Schmidt, B., Gronert, K. and Serhan, C. N. 2001. Lipid mediator class switching during acute inflammation: Signals in resolution. *Nat. Immunol.* 2: 612-619.
- Li, Y. H., Liu, B., Zhao, Z. B. and Bai, F. W. 2006. Optimization of culture conditions for lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Chin. J. Biotechnol.* 22: 650-656.
- Lund, I, Steinfeldt, S. J. and Hansen, B. W. 2007. Effect of dietary arachidonic acid, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on survival, growth and pigmentation in larvae of common sole (*Solea solea* L.). *Aquacult.* 273: 532-544.
- Lunsdorf, H. and Schairer, H. U. 2001. Frozen motion of gliding bacteria outlines inherent features of the motility apparatus. *Microbiol.* 147: 939-947.
- MacLceod, R. A. and Onofrey, E. 1956. Nutrition and metabolism of marine bacteria II: Observation on the relation of sea water to the growth of marine bacteria. *J. Bacteriol.* 71: 661-667.
- McConn, M. and Browse, J. 1996. The critical requirement for linolenic acid is for pollen development, not photosynthesis, in an *Arabidopsis* mutant. *Plant Cell* 8: 403-416.
- McConn, M. and Browse, J. 1998. Polyunsaturated membranes are required for photosynthetic competence in a mutant of *Arabidopsis*. *Plant J.* 15: 521-530.
- Miles, E. A., Allen, E. and Calder, P. C. 2002. In vitro effects of eicosanoids derived from different 20-carbon Fatty acids on production of monocyte-derived cytokines in human whole blood cultures. *Cytokine* 20: 215-223.

- Montgomery, D. C. 1999. Experimental Design for Product and Process Development. Statistician. 48: 159-177.
- Montgomery, D. C. 2001. Design and Analysis of Experiments. 5th ed. Wiley and Sons. New York.
- Muhid, F., Nawi, W. N. N. W., Kader, A. J. A., Yusoff, W. M. W. and Hamid, A. A., 2008. Effects of metal ion concentrations on lipid and gamma linolenic acid production by *Cunninghamella* sp. 2A1. J. Biol. Sci. 8: 62-67.
- Muzio, G., Salvo, R. A., Trombetta, A., Autelli, R., Maggiora, M., Terreno, M., Dianzani, M. U. and Canuto, R. A. 1999. Dose-dependent inhibition of cell proliferation induced by lipid peroxidation products in rat hepatoma cells after enrichment with arachidonic acid. Lipids 34: 705-711.
- Muzio, G., Trombetta, A., Maggiora, M., Martinasso, G., Vasiliou, V., Lassen, N. and Canuto, R. A. 2006. Arachidonic acid suppresses growth of human lung tumor A549 cells through down-regulation of ALDH3A1 expression. Free Radical Biol. Med. 40: 1929-1938.
- Myers, R. H. 1995. Response Surface Methodology: Process and Production Optimization Using Designed Experiments. John Wiley and Sons. New York.
- Nedashkovskaya, O. I., Suzuki, M., Vysotskii, M. V. and Mikhailov, V. V. 2003. Reichenbachia agariperforans gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium in the phylum Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53: 81-85.
- Nichols, D. S., McMeekin, T. A. and Nichols, P. D. 1994. Manipulation of polyunsaturated, branched-chain and trans-fatty acids production in *Shewanella putrefaciens* ACAM 324. Microbiol. 140: 577-584.
- Nichols, D. S., Brown, J. L., Nichols, P. D. and McMeekin, T. A. 1997. Production of eicosapentaenoic and arachidonic acids by an antarctic bacterium: Response to growth temperature. FEMS Microbiol. Lett. 152: 349-354.

- Nisha, A. and Venkateswaran, G. 2008. Effect of culture variables on mycelial arachidonic acid production by *Mortierella alpina*. Food Bioprocess Technol. DOI10.1007/s11947-008-0146-y.
- Park, C. B. and Lee, S. B. 1998. Ammonia production from yeast extract and its effect growth of the hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus*. Biotechnol. Bioprocess Eng. 3: 115-118.
- Patnayak, S. and Sree, A. 2005. Screening of bacterial associates of marine sponges for single cell oil and PUFA. Lett. Appl. Microbiol. 40: 358-363.
- Poole, R. K. 1997. Advances in Microbial Physiology. Academic Press. California.
- Plackett, R. L. and Burman, J. P. 1946. The design of optimum multifactorial experiments. Biometrika 33: 305-325.
- Ratledge, C. 1987. Lipid biotechnology: A wonderland for the microbial physiologist. J. Am. Oil Chem. Soc. 64: 1647-1656.
- Ratledge, C. and Wilkinson, S. G. 1988. Microbial Lipids. Vol. I. Academic Press. New York.
- Ratledge, C., 1992, Microbial Lipid: *In* Industrial Applications of Single Cell Oils. (Kyle, D. J. and Ratledge, C., eds.). p. 1-15. Champiagn. Illinois.
- Ratledge, C. 2002. Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. Biochem. Soc. Trans. 30: 1047-1050.
- Ratledge, C. 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. Biochime 86: 807-815.
- Reichenbach, H. 1992. The Order Cytophagales. *In* The Prokaryotes (Starr, M. P., Stolp, H., Triiper, H. G., Balows, A. and Schlegel, H. G., eds.). p. 3631-3675. Springer-Verlag. Berlin.
- Reichenbach, H. 1999. The ecology of the myxobacteria. Environ. Microbiol. 1: 15-21

- Reichenbach, H. and Dworkin, M. 1992. The Myxobacteria. *In* The Prokaryotes 2nd ed. (Starr, M. P., Stolp, H., Triiper, H. G., Balows, A. and Schlegel, H. G., eds.). p. 3416-3487. Springer. New York.
- Ritter, P. 1996. Biochemistry: a Foundation. Brooks/Cole. California.
- Rizzo, M. T., Regazzi, E., Garau, D., Akard, L., Dugan, M., Boswell, S., Rizzoli, V. and Carlo-Stella, C. 1999. Induction of apoptosis by arachidonic acid in chronic myeloid leukemia cells. *Cancer Res.* 59: 5047-5053.
- Russell, N. J. and Nichols, D. S. 1999. Polyunsaturated fatty acids in marine bacteria-a dogma rewritten. *Microbiol.* 145: 767-779.
- Sastry, P. 1985. Lipids of nervous tissue: Composition and metabolism. *Prog. Lipid Res.* 24: 69-176.
- Sato, S. 1990. Microbial production and control of cellular growth under high dissolved oxygen concentration. *Hakkokogaku* 68: 411-421.
- Satouchi, K., Hirano, K., Sakaguchi, M., Takehara, H. and Matsuura, F. 1993. Phospholipids from the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. *Lipids* 28: 837-840.
- Schacky C, Fischer, S. and Weber, P. C .1985. Long-term effects of dietary marine omega-3 fatty acids upon plasma and cellular lipids, platelet function, and eicosanoid formation in humans. *J. Clin. Invest.* 76: 1626-1631.
- Seeds, M. C. and Bass, D. A. 1999. Regulation and metabolism of arachidonic acid. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 17: 5-26.
- Serhan, C. N., Jain, A., Marleau, S., Clish, C., Kantarci, A., Behbehani, B., Colgan S. P., Stahl G. L., Merched, A., Petasis, N. A., Chan, L. and Van-Dyke, T. E. 2003. Reduced inflammation and tissue damage in transgenic rabbits overexpressing 15-lipoxygenase and endogenous anti-inflammatory lipid mediators. *J. Immunol.* 171: 6856-6865.

- Simpoulos, A. P. 1991. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am. J. Clin. Nutr.* 54: 438-63.
- Shimizu, S., Akimoto, K., Kawashiwa, H., Shinmen Y. and Yamada Y. 1989a. Microbial conversion of an oil containing γ -linolenic acid to an oil containing eicosapentaenoic acid. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 66: 342-347.
- Shimizu, S., Kawashima, H., Akimoto, K., Shinmen, Y. and Yamada, H. 1989b. Conversion of linseed oil to an eicosapentaenoic acid containing oil by *Mortierella alpina* IS-4 at low temperature. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 1-4.
- Shinmen, Y., Shimizu, S., Akimoto, K., Kawashima, H. and Yamada, H. 1989. Production of arachidonic acid by *Mortierella* fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31: 11-16.
- Singh, A. and O. P. Ward. 1997. Microbial Production of Docosahexaenoic Acid, pp. 271-313. *In* (S. L., Neidemen and A. I., Laskin, eds.). *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press. New York.
- Skerratt, H. J., Bowman, P. J. and Nichol, D. 2002. *Shewanella olleyana* sp. nov., a marine species isolated from a temperate estuary which produces high levels of polyunsaturated fatty acids. *J. Sys. Evol. Microbiol.* 52: 2101-2106.
- Song, X., Zhang, X., Kuang, C., Zhu, L. and Guo, N. 2007. Optimization of fermentation parameters for the biomass and DHA production of *Schizochytrium limacinum* OUC88 using response surface methodology. *Process Biochem.* 42: 1391-1397.
- Somerville, C. and Browse, J. 1996. Dissecting desaturation: Plants Prove Advantageous. *Trends Cell Biol.* 6:148-153.
- Spitznagel, J. K. and Sharp, D. G. 1959. Magnesium and sulphate ions as determinants in the growth and reproduction of *Mycobacterium bovis*. *J. Bacteriol.* 78: 453-462.
- Stewart, J. R. and Brown, R. M. Jr. 1971. Aligicidal nonfruiting myxobacteria with high G+C. *Arch. Microbiol.* 80: 176-190.

- Suzuki, M., Nakagawa, Y., Harayama, S. and Yamamoto, S. 2001. Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine *Cytophaga*-like bacteria: Proposal for *Tenacibaculum* gen. nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov., and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amylolyticum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1639-1652.
- Swaaf, M. E. 2003. Docosaehaenoic acid Production by Marine Alga *Cryptocodinium cohnii*. Delft University Press. Netherlands.
- Tarangini, K., Kumar, A., Satpathy, G. R. and Sangai, V. K. 2009. Statistical optimization of process parameters for Cr (VI) biosorption onto mixed cultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*. *Clean* 37: 319-327.
- Tilley, S. L., Coffman, T. M. and Koller, B. H. 2001. Mixed messages: Modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J. Clin. Invest.* 108: 15-23.
- Tocher, D. R. 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Rev. Fish Sci.* 11: 107-184.
- Trombetta A., Maggiora, M., Martinasso, G., Cotogni, P., Canuto, R. A. and Muzio, G. 2007. Arachidonic and docosaehaenoic acids reduce the growth of A549 human lung-tumor cells increasing lipid peroxidation and PPARs. *Chem. Biol. Interact.* 165: 239-250.
- Tsuyuki, H. and Macleod, R. A. 1951. Ion antagonisms affecting glycolysis by bacterial suspensions. *J. Biol. Chem.* 190: 711-719.
- Van Anholt, R. D., Spanings, F. A. T., Koven, W., Nixon, M. O. and Wendelaar Bonga S. E. 2004. Arachidonic acid reduces the stress response of gilthead seabream *Sparus aurata* L. *J. Exp. Biol.* 207: 3419-3430.

- Vachier, I., Chanez, P., Bonnans, C., Godard, P., Bousquet, J. and Chavis, C. 2002. Endogenous anti-inflammatory mediators from arachidonate in human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res.* 290: 219-224.
- Voet, J. G. 1990. Lipid Metabolism. *In Biochemistry* (Voet, D. and Voet, J. G., eds.). p. 634-641. John Wiley and Sons. New York.
- Voet, D and Voet, J. G. 2004. Metabolism. *In Biochemistry* 3rd ed (Voet, D. and Voet, J. G., eds.). p. 547-581. John Wiley and Sons. New York.
- Wallis, J. G., Watts, J. L. and Browse, J. 2002. Polyunsaturated fatty acid synthesis: What will they think of next?. *Trends Biochem. Sci.* 27: 467-473.
- Ward, O. P. and Singh, A. 2005. Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. *Process Biochem.* 40: 3627-3652.
- Weber, P. C., Fisher, S., Vonshacky, C, Lorenz, R. and Strasser, T. 1986. Dietary Omega-3-Polyunsaturated Fatty Acid and Eicosanoid Formation in Man. *In Health Effect of Polyunsaturated Fatty Acid in Seafoods.* (Simopoulos, A. P., Kifer, R. R. and Martin, R. E., eds.) p. 49-60. Academic Press. Orlando.
- Weeks, O. B., 1969. Problems concerning the relationships of Cytophagas and Flavobacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 32: 13-18.
- Wen, Z. Y. and Chen, F. 2001. Application of statistically-based experimental designs for the optimization of eicosapentaenoic acid production by the diatom *Nitzschia laevis*. *Biotechnol. Bioeng.* 75: 159-169.
- Wen, Z.Y. and Chen, F. 2003. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnol. Adv.* 21: 273-294.
- Wu, D. and Cederbaum, A. I. 2001. Sodium salicylate increases CYP2E1 levels and enhances arachidonic acid toxicity in HepG2 cells and cultured rat hepatocytes. *Mol. Pharmacol.* 59: 795-805.

- Wu, S. T. and Lin, L. P. 2003. Application of response surface methodology to optimize docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. S31. *J. Food Biochem.* 27: 127-139.
- Wu, S. T., Yu, S. T. and Lin, L. P. 2005. Effect of culture conditions on docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. S31. *Process Biochem.* 40: 3103-3108.
- Yamada, H., Shimizu, S., Shinmen, Y., Kawashima, H. and Akimoto, K. 1989. Biotechnological processes for production of polyunsaturated fatty acid. *J. Disper. Sci. Technol.* 10: 561-579.
- Yano, Y., Nakayama, A., Ishihara, K. and Saito, H. 1998. Adaptive change in membrane lipids of barophilic bacteria in response in changes to growth pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 497-485.
- Yaqoob, P., Pala, H. S., Cortina-Borja, M., Newsholme, E. A. and Calder, P. C. 2000. Encapsulated fish oil enriched in alpha-tocopherol alters plasma phospholipid and mononuclear cell fatty acid compositions but not mononuclear cell functions. *Eur. J. Clin. Invest.* 30: 260-274.
- Yongmanitchai, W. and Ward, O. P. 1991. Growth and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture condition. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 419-426.
- Yu, L. J., Qin, W. M., Lan, W. Z. Zhou, P. P. and Zhu, M. 2003. Improved arachidonic acids production from the fungus *Mortierella alpina* by glutamate supplementation. *Bioresour. Technol.* 88: 265-268.
- Yuan, C., Wang, J., Shang, Y., Gong, G., Yae, J. and Yu, Z. 2002. Production of arachidonic acid by *Mortierella alpina* I₄₉-N₁₈. *Food Technol. Biotechnol.* 40: 311-315.
- Zhu, M., Yu, L. J. and Wu, Y. X. 2003. An inexpensive medium for production of arachidonic acid by *Mortierella alpina*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30: 75-79.

Zhu, M., Zhou, P. P. and Yu, L. J. 2002. Extraction of lipids from *Mortierella alpina* and enrichment of arachidonic acid from the fungal lipids. *Bioresour. Technol.* 84: 93-95.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรและการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง

อาหารสำหรับเลี้ยงแบคทีเรียไกลดิงจากทะเล

1. อาหารแข็งสูตร SAP2

Tryptone	1.0	grams
Yeast extract	1.0	grams
Agar	15	grams
Sea water q.s.	1,000.0	militer

ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเหลวสูตร SAP2

Tryptone	1.0	grams
Yeast extract	1.0	grams
Sea water q.s.	1,000.0	militer

ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารแข็งสูตร modified SAP2 (Hosoya *et al.*, 2006)

Tryptone	1.0	grams
Yeast extract	1.0	grams
NaCl	15	grams
MgCl ₂ .6H ₂ O	5.4	grams
MgSO ₄ .7H ₂ O	2.7	grams
KCl	0.35	grams
CaCl ₂ .2 H ₂ O	0.5	grams
Agar	15.0	grams
Distilled water q.s.	1,000.0	militer

ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเหลวสูตร modified SAP2 (Hosoya *et al.*, 2006)

Tryptone	1.0	grams
Yeast extract	1.0	grams
NaCl	15	grams
MgCl ₂ .6H ₂ O	5.4	grams
MgSO ₄ .7H ₂ O	2.7	grams
KCl	0.35	grams
CaCl ₂ .2 H ₂ O	0.5	grams
Distilled water q.s.	1,000.0	militer

ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

1. การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะราชิโดนิก โดยเครื่อง GC-FID (ดัดแปลงมาจาก Kaewsuwan *et al.*, 2006)

วิธีการ

เตรียมกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยซึ่งอนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ของกรดอะราชิโดนิกมาตรฐานหนัก 5 มิลลิกรัม ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ที่ทราบน้ำหนักแล้ว ละลายด้วยเฮปเทนปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นถ่ายลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายเฮปเทนจนมีปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นอนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ของกรดอะราชิโดนิกมาตรฐานอยู่ระหว่าง 5, 10, 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งทำในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดแก้วขนาดเล็ก (GC vial) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรแล้วปิดฝาให้สนิทก่อนนำวิเคราะห์ผล

วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatography HP-6890 ซึ่งใช้คอลัมน์ชนิด HP-INNOWax Polyethylene glycol ขนาด 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm และ Flame Ionization Detector (FID) โดยให้อุณหภูมิของคอลัมน์ที่ใช้เริ่มต้น 185 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิขึ้นในอัตรา 3.50 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิที่ 235 องศาเซลเซียส และคงอุณหภูมิไว้ที่ 235 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ใช้เวลารวมทั้งสิ้น 16.28 นาที สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายกรดอะราชิโดนิกเมทิลเอสเทอร์มาตรฐานและพื้นที่ใต้กราฟ ดังแสดงใน Figure 19

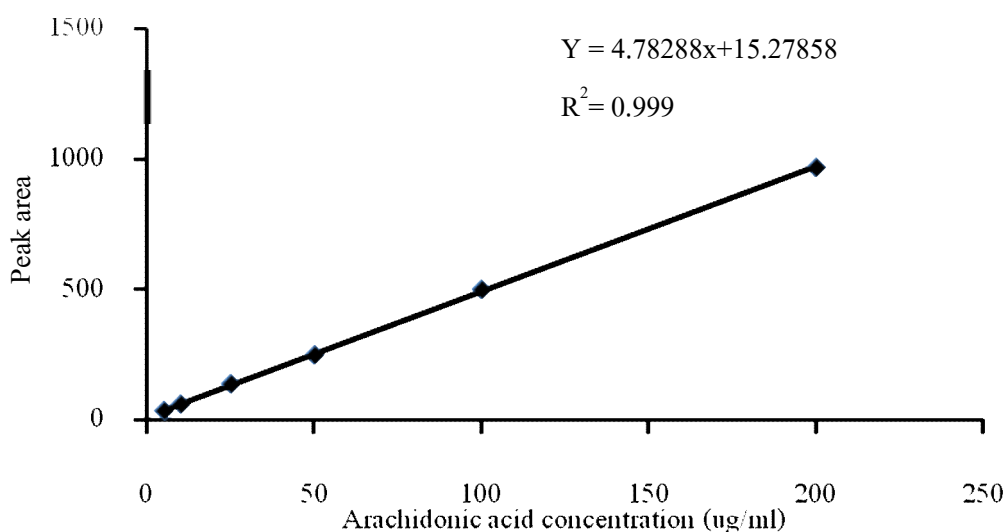


Figure 16. Standard curve of arachidonic acid methyl ester.

2. การจัดจำแนกแบคทีเรียโคลิดิง TISTR 1715 โดยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

2.1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

ในการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียโคลิดิง TISTR 1715 ใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป genomic DNA mini kit (Blood/Culture cell) ของบริษัท Geneaid ประเทศไต้หวัน และวิธีตามที่กำหนดโดยผู้ผลิต ซึ่งทำโดยเปิดสารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรีย ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติม GT buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมเอนไซม์ proteinase K (10 mg/ml) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำ microcentrifuge tube บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (เขย่า microcentrifuge tube ทุกๆ 3 นาที) วางไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม GB buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วด้วยเขย่าเครื่อง vortex mixer นาน 20 วินาที เติมเอนไซม์ RNase (10 mg/ml) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม 99% ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำมาเขย่าด้วยเครื่อง vortex mixer นาน 10 วินาที นำสารละลายทั้งหมดถ่ายลงใน GD column ใน collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทสารละลายทิ้ง เติม W1 buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที และเทสารละลายใน collection tube ทิ้ง แล้วล้างดีเอ็นเอโดยการเติม wash buffer ใน GD column ปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที แล้วเทสารละลายใน collection tube ทิ้งไป ทำให้ column matrix แห้งโดยนำมาหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที นำ GD column มาใส่ใน microcentrifuge tube หลอดใหม่ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นจึงเติม elution buffer ที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ปริมาตร 40 ไมโครลิตร แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2 การเพิ่มปริมาณของ 16S rDNA โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

2.2.1 การเตรียม reaction mixture สำหรับการเพิ่มปริมาณเพิ่มปริมาณของ 16S rDNA โดยวิธี PCR

ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR ใช้สารเคมีและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการทำ PCR ของบริษัท Takara ประเทศญี่ปุ่น โดยเติม 10x Ex taq buffer (Mg²⁺ plus) ปริมาตร 5 ไมโคร

ลิตร dNTP mixture (2.5 mM) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร primer 9F (20 μ M) และ primer 1492R (20 μ M) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase (5 unit/ μ l) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และเติม ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 2.1 ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงใน PCR tube ขนาด 0.2 มิลลิลิตร และน้ำ miliQ water ที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 37.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปต นำ PCR tube ใส่ในเครื่อง PCR โดยมีสภาวะการทำงานของเครื่องดังนี้

25 cycles	{	95°C, 2.0 min	}	Denaturing
		95°C, 0.5 min		
		50°C, 0.5 min	}	Annealing
		72°C, 1.0 min		
		72°C, 5.0 min	}	Extension

Forward primer คือ 9F (5'-GAG TTT CCT GGC TCA G-3')

Reverse primer คือ 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')

2.2.2 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และปริมาณของ 16S rDNA

การตรวจสอบความบริสุทธิ์และปริมาณของ 16S rDNA ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR โดยวิธี agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นการแยกขนาดของดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่น agarose gel ซึ่งระยะที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้จะขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอ ความเข้มข้นของ agarose gel และกระแสไฟฟ้าที่ใช้ ดีเอ็นเอที่ผ่านการแยกแล้วจะย้อมด้วย ethidium bromide solution เพื่อตรวจสอบบริสุทธิ์และปริมาณดีเอ็นเอที่เรืองแสงภายใต้รังสี UV

ขั้นตอนการตรวจสอบความบริสุทธิ์และปริมาณของดีเอ็นเอ ทำโดยเตรียม 1% agarose gel ด้วย 1x TAE buffer pH 8.0 โดยการให้ความร้อนแก่ agarose ด้วยเครื่องไมโครเวฟ เมื่อ agarose ละลายเป็นเนื้อเดียวกันทิ้งให้เย็นลงสักครู่ จากนั้นเท agarose ที่ละลายดีแล้วในภาชนะที่เตรียมไว้ วางทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เมื่อ agarose gel แข็งตัวจึงดึงหี้ออกจะได้ agarose gel ที่มีช่องสำหรับ load ดีเอ็นเอ จากนั้นปิเปต 5x dye (Organge G, SIGMA) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แล้วหยดลงบนแผ่น parafilm ผสมกับ PCR product จากข้อที่ 2.2.1 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ด้วยการดูดปิเปตขึ้นลงบนแผ่น parafilm แล้วดูดสารละลายทั้งหมดปล่อยลงในช่องเจลที่เตรียมไว้ ใช้ 1x TAE buffer pH 8.0 เป็นสารอิเล็กโทรไลต์ และให้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 23 นาที จากนั้นนำเจลที่ได้ไปแช่ในสารละลาย ethidium bromide solution เป็นเวลา 10 นาที ทำการ destain โดยแช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที จึงนำไปส่องภายใต้รังสี UV ซึ่งจะเห็นแถบของดีเอ็นเอเรืองแสง สัมกับขนาดดีเอ็นเอโดยเปรียบเทียบกับ DNA maker

2.3 การทำบริสุทธิ์ของ amplified PCR product โดย HiYield Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience, Taiwan)

นำ amplified PCR product ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เติม DF buffer ปริมาตร 5 เท่า (200 μ l) ของ PCR product ผสมให้เข้ากันด้วยปิเปต จากนั้นถ่ายสารละลายทั้งหมดลงใน DF column ที่อยู่ใน collection tube นำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน collection tube ที่เติม wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ใน DF column ที่อยู่ใน collection tube แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน collection tube ที่ จากนั้นนำ DF column ที่อยู่ใน collection tube มาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นจึงนำเฉพาะ DF column ใสลงใน microcentrifuge tube อันใหม่ เติม elution buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เก็บรักษา amplified PCR product ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.4 การหาลำดับเบสของ 16S rDNA

นำ amplified PCR product ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จากข้อ 2.3 แล้วไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริษัท Ward Medic ประเทศสิงคโปร์ โดยใช้ primer 9F และ 1492R

2.4.1 การเทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียไกลดิงที่ผลิตกรดอะราชิโดนิกที่คัดเลือกได้

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียไกลดิง TISTR 1715 ที่ได้จากการส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ มาวิเคราะห์โดยการเปรียบเทียบข้อมูล (blast) กับฐานข้อมูล ncbi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>)

ภาคผนวก ค

ผลการทดลอง

1. ลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรียที่เลี้ยงได้กลึงจากทะเล TISTR 1715

GGCTTAATACATGCAAGTCGAACGGTAACAGCAACTTCGGTTGGCTGACGAGTGGCG
CACGGGTGAGTAACGCGTACAAAACCTACCTTTTACTGGGGGAAAGTCGCTGGAAAC
GGCGAATAATCCCGCATACTACTATTAATACACATGTATAAATAGTGAAAGGCTTCG
GTCGGTAAAAGATGGTTGTGCGTCCCATTAGCTAGATGGTAAGGTAACGGCTTACCA
TGCGGACGATGGGTAGGGGGCGTGAGAGCGTGATCCCCACACGGGTACTGAGACA
CGGACCCGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATATTGGTCAATGGAGGGA
ACTCTGAACCAGCCATGCCGCGTGTGTGATGAATGCCCTTTGGGTTGTAAAGCACTTTTAT
CTGGGAAGAATGACAGGGATTAATCCTTGGAGAGACGGTACCAGAAGAATAAGCAC
CGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTATCCGGAA
TCACTGGGTTTAAAGGGTACGTAGGCGGTTTTATAAGTCAGACGTCAAAGGCTGTAG
CTAAACTATGGTACGCGTTTGAAACTGTAAGACTTGAATATGTTTCGAGGTGCATGGA
ATGCTTCATGTAGCGGTGAAATGCATAGATATGAAGTAGAACACCAATTGCGAAGGC
AGTGCCTAGGGCATTATTGACGCTGAGGTACGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATT
AGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAACGATGCTAACTGGTCATTTATCGGAATAGA
TAAGTGACTGAGGGAAACCATTAAGTTAGCCACCTGGGGAGTACGTTTCGCAAGAATG
AAACTCAAAGGAATTGACGGGGTCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCG
ATGATACGCGAGGAACCTTACCTGGGCTCGAACGCTACTAGACCGATCCTGAAAGGG
GTCTTCTCTTCGGAGCTGGTAGTGAGGTGCTGCATGGTTGTTCGTCAGCTCGTGCCGTG
AGGTGTTGGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCCTTAGTTGCCAACATG
TAATGGGTGGGGACCTAGGGGAGACTGCTCCGTAAGGGTGGAAGGAAGAGACGACA
CGTA

Forward primer: 9F (5'-GAG TTT CCT GGC TCA G-3')

Reverse primer: 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นายสุชนนต์ แซ่เล้า		
รหัสประจำตัวนักศึกษา	5011020037		
วุฒิการศึกษา			
	วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2549

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Sutanate Saelao, Songsri Kaewsuwan and Akkharawit Kanjana-Opas. 2008. A time course study and effect of carbon sources on arachidonic acid (ARA) production by marine bacterium *Aureispira marina*. The 20th Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology “TSB 2008: Biotechnology for Global Care”, Thailand, October 14th-17th 2008, pp. 164-168.