รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ศักยภาพของจุลินทรีย์ทะเล: แหล่งกรดไขมันชนิดจำเป็น

Potential of Marine Microbes : As the Source of Essential Fatty Acids

ณิษา สิรนนท์ธนา

จารุนันท์ ประทุมยศ

จันทร์จรัส วัฒนะโชติ

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2557A10803048
สัญญาเลขที่ 145/2557

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ศักยภาพของจุลินทรีย์ทะเล: แหล่งกรดไขมันชนิดจำเป็น
Potential of Marine Microbes : As the Source of Essential Fatty Acids

ณิษา สิรนนท์ธนา
จารุนันท์ ประทุมยศ
จันทร์จรัส วัฒนะโชติ
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

มีนาคม พ.ศ. 2558

ศักยภาพของจุลินทรีย์ทะเล: แหล่งกรดไขมันชนิดจำเป็น

ณิษา สิรนนท์ธนา จารุนันท์ ประทุมยศ และจันทร์จรัส วัฒนะโชติ
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา อ. เมือง จ. ชลบุรี 20131

บทคัดย่อ

การเลี้ยงยีสต์ *Pichia* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยที่ความเค็ม 25 พีพีที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบการเจริญสูงสุดในระยะเวลาการเลี้ยงที่ 72 ชั่วโมง จากการวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันในตัวอย่างเซลล์ยีสต์ พบกรดไขมันชนิดอิ่มตัว (SFAs) ปริมาณสูงสุด 29.34 %TFA (4.99 mg/g wet wt. ; 14.18 mg/g dry wt.) มี Palmitic acid (C16:0) เป็นกรดไขมันหลัก 24.48%TFA (4.19 mg/g wet wt.; 11.90 mg/g dry wt.) รองลงมาเป็นชนิดไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (PUFAs) 22.51%TFA (4.45 mg/g wet wt.; 12.71 mg/g dry wt.) และ Linoleic acid (C18:2n6) เป็นกรดไขมันหลัก 18.40%TFA (3.62 mg/g wet wt, 10.33 mg/g dry wt.) และจากการวิเคราะห์คุณค่าอาหาร (Proximate analysis) มีค่าโปรตีนร้อยละ 42 ไขมันร้อยละ 0.22 ความชื้นร้อยละ 66 เถ้าร้อยละ 2 ส่วนปริมาณกรดไขมันจากเม็ดเจลที่ตรึงเซลล์ยีสต์ *Pichia* sp. ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต พบกรดไขมันอิ่มตัว SFAs สูงสุด 32.61%TFA (0.08mg/g wet wt.; 0.87 mg/g dry wt.) มี Palmitic acid, C16:0 เป็นองค์ประกอบหลัก 21.20%TFA (0.033 mg/g wet wt; 0.380mg/g dry wt.) รองลงมาเป็นชนิดไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (MUFAS) 20.36%TFA (0.04 mg/g wet wt.; 0.45 mg/g dry wt.) มี Oleic acid (C18:1n9) เป็นกรดไขมันหลักในปริมาณ 17.8%TFA (0.027 mg/g wet wt;0.314 mg/g dry wt.) และพบกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (PUFAS) 9.93%TFA (0.05 mg/g wet wt.; 0.54 dry wt.) โดยมี Linolenic acid (C18:3n3) เป็นกรดไขมันหลักในปริมาณ 6.79 %TFA (0.033 mg/g wet wt.; 0.372 mg/g dry wt.) ส่วนในแอคทีโนมัยซีทจำนวน 22 ตัวอย่าง ที่คัดแยกจากดินป่าชายเลนจังหวัดชลบุรี ระยอง จันทบุรี และ จังหวัดชุมพร เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 ระยะเวลา 3-14 วัน ผลการศึกษาพบปริมาณรวมกรดไขมันสูงสุดในตัวอย่าง CP-PH 3-9 ที่คัดแยกจากดินป่าชายเลนจังหวัดชุมพร ในปริมาณร้อยละ 41.96 กรดไขมันเป็นชนิดอิ่มตัว (SFAs: 37.63 %TFA) ชนิดกรดไขมันหลักที่พบได้แก่ Palmitic acid (C16:0) และ Stearic acid (C18:0) ส่วนกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (PUFAs) พบในปริมาณที่ต่ำ โดยกรดไขมันชนิดจำเป็น Linoleic acid (C18:2n6) พบในตัวอย่าง CP-PH 8-8 ปริมาณ (0.86±0.03%TFA) และ **α**-Linolenic Acid (C18:3n3) พบในตัวอย่าง CP-PH 3-9 ในปริมาณ 0.29±0.02%TFA

Potential of MarineMicrobes: As the Source of Essential Fatty Acids

Nisa Siranonthana Jarunan Pratoomyot and JanjarusWattnachot
Institute of Marine Science, Burapha University, Bangsaen, Chonburi, 20131

Abstract

The marine yeast *Pichia* sp. was cultured in a sugarcane bagass media adjusted to a salinity of 25 ppt. for a period of 96 h. The cell density of the *Pichia* sp. was examined every 24 h under a microscope using a haemacytometer. Growth of the *Pichia* sp. was observed peak at 72 h. Determination of fatty acid composition was taken only at the culture period of 72 h. The fatty acid profile of the *Pichia* sp. cells was dominant in saturated fatty acids (SFAs) and polyunsaturated fatty acids (PUFAs). The SFAs and PUFAs compositions of the *Pichia* sp. cells were 29.34 %TFA (4.99 mg/g wet wt.; 14.18 mg/g dry wt.) and 22.51%TFA (4.45 mg/g wet wt.; 12.71 mg/g dry wt.) respectively. Of the SFAs, palmitic acid was the main fatty acid (24.48%TFA; 4.19 mg/g wet wt.; 11.90 mg/g dry wt.) while linoleic acid was the main fatty acid of the PUFAs (18.40%TFA; 3.62 mg/g wet wt., 10.33 mg/g dry wt.). Proximate analysis of the *Pichia* sp. showed a composition of 42% protein, 0.22 % fat, 66 % moisture and 2 % ash.

The *Pichia* sp. cells were also encapsulated in 1.2% of calcium alginate. Results showed that the immobilized *Pichia* sp. had highest composition of SFAs (32.61%TFA; 0.08 mg/g wet wt.; 0.87 mg/g dry wt.), followed by monounsaturated fatty acids (MUFAs) (20.36%TFA (0.04 mg/g wet wt.; 0.45 mg/g dry wt.) and PUFAs (9.93%TFA (0.05 mg/g wet wt.; 0.54 dry wt.). The principal fatty acid of the SFAs was palmitic acid (21.20%TFA; 0.03 mg/g wet wt.; 0.38 mg/g dry wt.). Of the MUFAs and PUFAs, oleic and linolenic acids were the primary fatty acids of the MUFAs and PUFAs, respectively. The oleic acid was detected in the amount of 17.8%TFA (0.027 mg/g wet wt;0.314 mg/g dry wt.) and linolenic acid was found in the quantity of 6.79 %TFA (0.033 mg/g wet wt.; 0.372 mg/g dry wt.)

Twenty two samples of Actinomycetes isolated from mangrove sediments in the area of Chon Buri, Rayong, Chanthaburi and Chumporn Provinces were cultured in the ISP-2 media for a period of 3-14 days before fatty acid analysis. The samples from Chumporn province revealed higher amount of fatty acid than the samples from other areas. The “CP-PH 3-9” sample contained total fatty acid (TFA) in the amount of 41.96% of which the SFAs and PUFAs were found in the majority and minority quantities respectively. The “CP-PH 3-9” had SFAs about 37.63 %TFA with the palmitic and stearic acids were the predominant fatty acids. Of the PUFAs, the linoleic acid was found in the “CP-PH8-8” sample in the amount of 0.86±0.03%TFA and linolenic acid was observed in the “CP-PH 3-9” sample in the quantity of 0.29±0.02%TFA.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 145/2557

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	1
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง	4
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	18
อุปกรณ์และวิธีการ	24
ผลการทดลอง	31
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	43
สรุปผลการศึกษา	49
เอกสารอ้างอิง	51
ภาคผนวก	59

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	กรดไขมันอิ่มตัวชนิดต่าง ๆ	7
2	กรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดต่าง ๆ	8
3	สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่ผลิตโดยแอคติโนแบคทีเรีย	17
4	ชนิดและปริมาณกรดไขมันในตัวอย่างแอคติโนมัยซีทคัดแยกจากดินชายฝั่งจังหวัดชลบุรีและจันทบุรี (%TFA)	35
5	ชนิดและปริมาณกรดไขมันในตัวอย่างแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกจากดินป่าชายเลน จังหวัดชุมพร (%TFA)	36
6	ชนิดและปริมาณกรดไขมันในตัวอย่างแอคติโนมัยซิทที่คัดแยกจากดินป่าชายเลน จังหวัดชุมพร (%TFA)	37
7	ชนิดและปริมาณกรดไขมันในตัวอย่างแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกจากดินป่าชายเลน จังหวัดชุมพร (%TFA)	38
8	ชนิดและปริมาณกรดไขมันในตัวอย่างแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกจากดินป่าชายเลน จังหวัดชุมพร (%TFA)	39
9	ชนิดและปริมาณกรดไขมันในตัวอย่างแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกจากดินชายฝั่งจังหวัดระยอง (%TFA)	40
10	ชนิดและปริมาณกรดไขมันในตัวอย่างแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกจากดินชายฝั่งจังหวัดระยอง (%TFA)	41
11	ชนิดและปริมาณกรดไขมันในตัวอย่างแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกจากดินชายฝั่งจังหวัดระยอง (%TFA)	42

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การเขียนสัญลักษณ์กรดไขมัน	6
2	การสังเคราะห์กรดไขมัน	11
3	ขั้นตอนการสลายกรดไขมัน	12
4	กระบวนการทรานเอสเทอริฟิเคชั่น	15
5	ชนิดและปริมาณกรดไขมันในเซลล์ยีสต์ Pichia sp. ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยที่มีความเค็ม 25 พีพีที ที่เวลา 72 ชั่วโมง (%TFA)	32
6	ชนิดและปริมาณกรดไขมันในเซลล์ยีสต์ Pichia sp. ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยที่มีความเค็ม 25 พีพีที ที่เวลา 72 ชั่วโมง (mg/g)	32
7	ชนิดและปริมาณกรดไขมันจากเซลล์ตรึงยีสต์ Pichia sp. ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต (%TFA)	33
8	ชนิดและปริมาณกรดไขมันจากเซลล์ตรึงยีสต์ Pichia sp. ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต (mg/g)	34

ศักยภาพของจุลินทรีย์ทะเล: แหล่งกรดไขมันชนิดจำเป็น
Potential of Marine Microbes : As the Source of Essential Fatty Acids

บทนำ

จุลินทรีย์ (Microorganisms) เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีจำนวนชนิดหรือสปีชีส์มากที่สุดเมื่อเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น มีความหลากหลายทางชีวภาพ (Biological diversity) ในเชิงความหลากหลายของชนิด (Species diversity) ความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity) และความหลากหลายของแหล่งที่อยู่อาศัย (Ecological diversity) สูงมาก เมื่อเทียบกับสิ่งมีชีวิตกลุ่มอื่น เชื่อกันว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่นักจุลชีววิทยาพบและศึกษาจนถึงปัจจุบันคิดเป็นประมาณ1%ของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดบนโลก (http://www.environNet.in.th) จุลินทรีย์มีประโยชน์ในหลายด้านเช่น ด้านสิ่งแวดล้อม นำมาบำบัดสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนของสารพิษ ทางด้านการแพทย์ จุลินทรีย์ถูกนำมาใช้เป็นตัวกลางในการผลิตสารที่จำเป็นบางอย่างที่เกี่ยวข้องกับทางการแพทย์และการรักษาโรค ด้านอุตสาหกรรม ด้านการเกษตร เป็นต้น ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในทางการแพทย์ เช่น ยีสต์ Saccharomyces cerevisiae และแบคทีเรีย E.coli ใช้ผลิตสารอินซูลินซึ่งเป็นสารที่มีความสำคัญในการควบคุมปริมาณน้ำตาลในเลือด แบคที่เรีย E.coli ใช้ในการผลิตฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตในคน เป็นต้น แบคทีเรียทะเลแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ แบคทีเรียที่ถูกพัดพามาจากแหล่งอื่นและแบคทีเรียที่มีถิ่นกำเนิดในทะเลในบริเวณนั้น ๆ แบคทีเรียทั้งสองกลุ่มนี้อาศัยอยู่ที่ผิวน้ำ ในชั้นของน้ำ ตะกอนดิน และอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ เช่น *Psudomonas insolita* พบอยู่ในฟองน้ำคลาสเดโมสปองเจีย (Class demospongiae) ชนิด *Halichondria panacea* แบคทีเรียบางชนิดอาศัยอยู่ในลำไส้และทางเดินอาหารของสัตว์ทะเล เช่น *Clostridium welchii, C. sporogenes, C. tetani* พบในทางเดินอาหารของปลา ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้ช่วยในการย่อยสลายสารอินทรีย์ ทำให้ปลาได้รับสารอาหารในการเจริญเติบโต (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2534) แบคทีเรียทะเลมีประโยชน์ต่อระบบนิเวศทางทะเล ช่วยให้เกิดการหมุนเวียนของแร่ธาตุ ทำให้แหล่งน้ำอุดมสมบูรณ์ เป็นแหล่งอาหารของสัตว์น้ำวัยอ่อน และแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการสร้างสาร ซึ่งมีศักยภาพในการนำมาพัฒนาทางเภสัชวิทยา สารที่สร้างจากแบคทีเรียเรียกว่า สารเมตาบอไรต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolites) นำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ โดยเฉพาะยีสต์มีการศึกษาถึงคุณสมบัติพบว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีปริมาณโปรตีนในเซลล์สูงและยังประกอบไปด้วยไขมัน วิตามินแร่ธาตุหลายชนิด และ แอคติโนมัยซีทจัดเป็นแบคทีเรียที่มีคุณค่าและมีคุณประโยชน์มหาศาลต่อเศรษฐกิจต่องานด้านทคโนโลยีชีวภาพเนื่องจากเป็นแหล่งของการผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพจำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารยับยั้งเซลล์มะเร็ง สารแอนติไบโอติก และสารยับยั้งระบบภูมิคุ้มกัน (Selvameenal et al., 2009)

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งพบทั่วไปในธรรมชาติ ทั้งแหล่งที่อยู่บนบก ในน้ำ รวมทั้งแหล่งที่อยู่ที่มีความรุนแรง เช่น มีความเค็มสูง และมีความเย็นจัด แหล่งที่อยู่ซึ่งยีสต์ชอบคือ พืช โดยพบยีสต์ได้ทั้งดอก ผล ใบ ลำต้น และยางไม้ ทั้งนี้เพราะพืชนอกจากจะมีความสามารถในการสังเคราะห์น้ำตาล และ พอลิแซ็กคาไรด์หลายชนิดแล้ว พืชยังสามารถสังเคราะห์สารประกอบคาร์บอนชนิดอื่น ๆ ได้อีกหลายชนิดนอกจากนี้พืชยังให้เกลือแร่ชนิดต่าง ๆ และสารอื่น ๆ ที่ยีสต์ต้องการปริมาณเล็กน้อย จึงทำให้มีซับสเตรทที่หลากหลายสำหรับการเจริญ ซึ่งยีสต์ต้องการแหล่งที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง ที่ทำให้ยีสต์เจริญเติบโต ได้รวดเร็ว สามารถให้จำนวนปริมาณเซลล์ได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น เนื่องจากยีสต์ไม่กลายพันธุ์ มีความคงตัวทางพันธุกรรมสูงและไม่ก่อให้เกิดโรค (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549) ทำให้ยีสต์มีความสำคัญทางด้านอุตสาหกรรมในปัจจุบันเป็นอย่างมาก

ในการเป็นตัวกลจักรในการผลิต โดยยีสต์จะเปลี่ยนวัตถุดิบให้เป็นผลิตภัณฑ์ชนิดใหม่ ผลิตภัณฑ์เหล่านี้เกิดขึ้นจากกระบวนการสร้างและการสลายสารอินทรีย์โดยยีสต์ ปฏิกิริยาการเกิดแบบนี้เรียกว่า “การหมัก” อาทิ เช่น อุตสาหกรรมเครื่องดื่ม ได้แก่ เบียร์ สุรา และไวน์ อุตสาหกรรมอาหาร และอาหารเสริม ได้แก่ ซีอิ้ว เต้าเจี้ยว น้ำปลา นมเปรี้ยว และโยเกิร์ต อุตสาหกรรมด้านความสวยความงาม ได้แก่ เครื่องสำอาง อุตสาหกรรมการผลิตเชื้อเพลิง ได้แก่ ก๊าซชีวภาพที่ได้จากการหมักมูลสัตว์หรือเศษใบไม้ (Harley, 2004) รวมถึงอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ได้แก่ การนำยีสต์มาเป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์เพื่อใช้ประโยชน์ในสองทางด้วยกันคือ เป็นแหล่งโปรตีนที่เราเรียกว่า “โปรตีนเซลล์เดียว” (Single cell protein) และอีกในแง่หนึ่งคือ เป็นตัวช่วยเสริมสุขภาพของสัตว์หรือเราเรียกว่าเป็น “โปรไบโอติค” (probiotic) ให้กับสัตว์เลี้ยง ซึ่งจะทำให้สัตว์แข็งแรง และมีภูมิต้านทานโรคสูงขึ้น (Moore and Landecker, 1996) นอกจากนี้ยีสต์ยังมีปริมาณกรดไขมันที่เป็นประโยชน์มากสำหรับมนุษย์และสัตว์ รวมทั้งสัตว์น้ำ ดังนั้น จึงมีการศึกษาเพื่อหาแนวทางในการเพิ่มปริมาณกรดไขมันจากยีสต์ให้สูงขึ้น จากคุณสมบัติของยีสต์ ที่มีช่วงชีวิตสั้น และมีการใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงน้อย สิ่งที่สำคัญคือ ยีสต์สามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีองค์ประกอบคล้ายคลึงกันกับพืชเช่น กรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9) และกรดไขมันไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6) ซึ่งเป็นกรดไขมันจำเป็นที่ร่างกายมนุษย์เรานั้นไม่สามารถสร้างขึ้นเองได้ (สมถวิล จริตควร, สุดารัตน์ สวนจิตร และเศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์, 2551) ดังนั้นจึงมีการศึกษาเพื่อหาแนวทางในการเพิ่มปริมาณกรดไขมันจากยีสต์ให้สูงขึ้น

กรดไขมันจำเป็น (Essential Fatty Acids) เป็นกรดไขมันที่มีบทบาทสำคัญต่อสุขภาพของมนุษย์ โดยถูกนำมาใช้เป็นอาหารเสริม และใช้ในทางการแพทย์ โดยเฉพาะโอเมก้า 3 (Linolenic หรือ Alpha Linoleic Acid) ป้องกันการเกิดโรคหัวใจและอัมพาต ลดการอักเสบ ของโรคไขข้อเสื่อมรูมาตอยด์ ลดอาการปวดหัวไมเกรนและปวดประจำเดือน เพิ่มภูมิคุ้มกันร่างกายและลดอาการของ โรคภูมิแพ้ โอเมก้า 6 (Linoleic Acid) ป้องกันการเกิดโรคหัวใจ โดยการลดการแข็งตัวของเลือดด้วย การลดการจับกลุ่มของเกล็ดเลือดทำให้หลอดเลือดที่หัวใจเป็นปกติ ลดอัตราการเกิดโรคความดันโลหิตสูง ลดการขยายตัวของเซลล์มะเร็ง ป้องกันโรคสมองเสื่อมหรือโรคอัลไซเมอร์ โดยลดการแข็งตัวของเยื้อหุ้มเม็ดเลือดแดงทำให้สมองได้รับอ๊อกซิเจนมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า EPA และ DHA มีบทบาทในการควบคุมการตอบสนองการอักเสบผ่านการผลิตสารที่เรียกว่า Eicosanoids (Lee et al 2009; Oliver et al 2010) รวมทั้งยังนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์ องค์ประกอบคุณค่าทางอาหารที่ให้สัตว์น้ำกินมีบทบาทอย่างมากในการเพิ่มการรอดตายและการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำวัยอ่อน โดยเฉพาะกรดไขมัน ซึ่งกรดไขมันที่จำเป็นสำหรับสัตว์น้ำวัยอ่อน ได้แก่ Ecosapentaenoic acid และ Docosahexaenoic acid เนื่องจากสัตว์น้ำวัยอ่อนบางชนิดไม่สามารถสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่จำเป็นได้จะต้องได้รับจากการกินอาหารเท่านั้น (สุพิศ ทองรอด, 2535) จากการที่มีความต้องการในการบริโภคกรดไขมันเหล่านี้เพิ่มขึ้น ทำให้มีการนำเทคนิคต่าง ๆ มาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์สิ่งมีชีวิตให้มีศักยภาพในการผลิตกรดไขมันได้ตามที่ต้องการ มีการค้นหาแหล่งกรดไขมันจากสิ่งมีชีวิตกันอย่างกว้างขวางและด้วยหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตในทะเลก่อให้เกิดสารอาหารและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทางทะเลมีศักยภาพที่ดีหลายชนิด เช่นกรดไขมันไม่อิ่มตัว Sterols โปรตีน Polysaccharides สารต้านอนุมูลอิสระและสี เป็นต้น สารเหล่านี้มีประโยชน์ต่อสุขภาพสามารถต้านมะเร็งหรือป้องกันการอักเสบได้ (Bhatnagarl, KimSK 2010; Sinéad Lordan et al 2011)โดยเฉพาะจุลินทรีย์เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถเจริญได้รวดเร็วในอาหารที่ไม่ซับซ้อนใช้วัตถุดิบได้หลากหลายและราคาถูก การคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมจากธรรมชาติสามารถทำได้ง่ายเนื่องจากมีความหลากหลายสูงการปรับปรุงสายพันธุ์ก็สามารถทำได้ง่ายโดยอาจใช้วิธีเปลี่ยนแปลงระบบเอนไซม์หรือวิถีในการสังเคราะห์ อีกทั้งกรดไขมันจากจุลินทรีย์สามารถทาให้บริสุทธิ์ได้ง่ายกว่าจากแหล่งอื่น ซึ่งสามารถนำมาทดแทนการผลิตทางเกษตรกรรมหรือการผลิตจากน้ำมันสัตว์ได้ ปัจจุบันแหล่งวัตถุดิบในการสกัด

DHA จะมาจากน้ำมันปลาทะเล แต่ปริมาณของ DHA ในน้ำมันปลามีอยู่จำกัด (ประมาณ 7-14%) (กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม, 2552) ทำให้ในการผลิตต้องใช้ปลาจำนวนมาก และมลพิษเกิดขึ้นในทะเล เช่น การปนเปื้อนโดยสารฆ่าแมลงและโลหะหนัก อาจส่งผลกระทบต่อทั้งคุณภาพและปริมาณของกรดไขมันที่ได้ ดังนั้นการผลิต DHA จากจุลินทรีย์ทะเลน่าจะเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่น่าสนใจ โดยเฉพาะเชื้อยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารหลายอย่างและชนิดและกรดไขมันจากยีสต์มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับกรดไขมันที่ได้จากพืช ซึ่งเป็นกรดไขมันชนิดจำเป็น (กอบกุล เหล่าเท้ง, 2001) การศึกษาในครั้งนี้มุ่งเน้นการใช้วัตถุดิบที่เหลือใช้ทางการเกษตรในเขตจังหวัดชลบุรี เช่น ชานอ้อย กากมัน กากน้ำตาล มาใช้ในการหมักเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับวัสดุเหลือใช้ ปัจจุบันวัสดุที่เหลือใช้จากทางการเกษตรและอุตสาหกรรมถือเป็นแหล่งในการเจริญและการสร้างพลังงานที่ดี ทั้งนี้เพื่อลดต้นทุนและการใช้ทรัพยากรจากธรรมชาติอย่างคุ้มค่า จากการศึกษาพบว่าแหล่งที่พบยีสต์ที่เจริญเติบโตได้รวดเร็วและสามารถให้จำนวนเซลล์ได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น คือ แหล่งที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง ปัจจุบันวัสดุที่เหลือใช้ ดังเช่น กากชานอ้อย พบว่ามีองค์ประกอบหลักของน้ำตาลซูโครส (Sucrose) ที่ประกอบด้วยน้ำตาล 2 โมเลกุล คือ น้ำตาลกลูโคส (Glucose) และน้ำตาลฟรุกโตส (Fructose) กากชานอ้อยถือเป็นชีวมวลที่เหลือใช้จากทางการเกษตร จึงมีความเป็นไปได้ที่นำกากชานอ้อยมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตของยีสต์ ในการศึกษาครั้งนี้ จึงมีการเลี้ยงยีสต์โดยการใช้กากชานอ้อยเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน

เนื่องจากปัญหาการดื้อยา Antibiotic จึงมีการนำสารเสริมชีวนะ (Probiotic) มาใช้ในการเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลาย โดยหาผลผลิตจากสารประกอบต่าง ๆ ที่มีประโยชน์ต่อต้านเชื้อ สารประกอบที่นำมาศึกษาได้แก่ วิตามิน กรดไขมัน และ Digestive enzymes (Niall et al, 2006) และมีการศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของกรดไขมันชนิดอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวชนิดคาร์บอนสายยาวซึ่งรายงานแสดงให้เห็นว่ากรดไขมันสายยาวคาร์บอนมากกว่า 10 ตัว จะ Induced lysis of bacterial protoplasts (Nieman, 1954; Galbbraith & Millter, 1973a-c) และจากงานวิจัยพบว่าอาหารที่มีกรดไขมันชนิด n-3 สูงจะเพิ่มอัตราการอยู่รอดและลดความรุนแรงของเชื้อโรคที่เกิดตามธรรมชาติได้ (Ergas, 2002; Simupoulos, 2002) เช่นเดียวกับงานวิจัยผลของโภชนาการด้านกรดไขมันในการต่อต้านโรค (Autoimmune disease) ของ Harbige (1998) ที่กล่าวว่าอาหารที่มี กรดไขมันชนิด n- 3 สูง จะเพิ่มอัตราการอยู่รอดและลดความรุนแรงของโรคในสัตว์ทดลองเช่นกัน ปลาตู้น้ำเค็มเป็นปลาที่ยอมรับต่อโรคติดเชื้อได้ง่าย เช่น เชื้อแบคทีเรีย โปรตัวซัว โรคปลาที่พบได้บ่อยในการเลี้ยงปลาตู้น้ำเค็มได้แก่ โรคพยาธิ โรคติดเชื้อจากแบคทีเรียและไวรัส ซึ่งโรคที่เกิดจากโปรตัวซัว จะสังเกตเห็นได้ช้าก่อให้เกิดความเสียหายมากมายต่อการเพาะเลี้ยง ปัจจุบันมีการคิดค้นวัคซีนป้องกันโรคปลาและใช้สารเคมีบางชนิดเพื่อเพิ่มภูมิคุ้มกันต่อโรคให้ปลากิน เพื่อทดแทนการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะซึ่งมีราคาแพง ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาสารสกัดไขมันจากจุลินทรีย์ทะเลโดยเฉพาะจากยีสต์ทะเล หรือแบคทีเรียทะเล/แอคติโนมัยซีท ซึ่งรูปแบบของไขมันและกรดไขมัน ที่ได้จะเป็นข้อมูลพื้นฐาน เพื่อนำไปพัฒนารูปแบบการเพาะเลี้ยงให้ได้ปริมาณมาก และใช้เป็นองค์ประกอบในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อเสริมสุขภาพสำหรับมนุนย์ ตลอดจนพัฒนาเป็นสารกระตุ้นภูมิสำหรับสัตว์น้ำ อันจะเป็นทางเลือกใหม่ของอุตสาหกรรม การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและต่อไป

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง

ลิปิด (Lipid)

ลิปิด หมายถึง กรดไขมันและอนุพันธ์รวมถึงสารอื่น ๆ ที่ทำหน้าที่คล้ายคลึงกับกรดไขมันและอนุพันธ์ลิปิดเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญทางชีวเคมีของเมมเบรน มีผลต่อกระบวนการควบคุมของน้ำ และเกลือแร่ (Osmoregulation และ Ionic regulation) การสืบพันธุ์ การนำอาหารไปใช้ ตลอดจนการลำเลียงสารอาหาร สามารถสกัดได้จากเซลล์หรือเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตที่ละลายได้ในสารอินทรีย์ เช่น คลอโรฟอร์ม อีเทอร์ และเบนซีน เป็นต้น ลิปิดที่พบในธรรมชาติมักไม่อยู่ในสภาพอิสระ จะประกอบกับชีวมวลอื่น เช่น ถ้ารวมอยู่กับคาร์โบไฮเดรตเรียกว่า “ไกลโคลิปิด (Glycolipid)” และรวมอยู่กับโปรตีนเรียกว่า “ลิโปโปรตีน (Lipoprotein)” นอกจากนี้ ลิปิดแบ่งออกได้หลายประเภท ส่วนใหญ่ประกอบด้วยองค์ประกอบที่เรียกว่า “กรดไขมัน (Fatty acid)” (สุกัญญา สุนทรส และวิเชียร ริมพณิชยกิจ, 2553)

บทบาทและความสำคัญของลิปิด

1. เป็นโครงสร้างของเนื้อเยื่อหุ้มเซลล์และอวัยวะเซลล์ (Biological membrane)

2. เป็นสารอาหารที่ให้พลังงานมากที่สุดเมื่อเทียบต่อน้ำหนักที่เท่ากัน โดยไขมัน 1 กรัม ให้พลังงานโดยประมาณ 9 กิโลแคลอรี โปรตีนให้พลังงานโดยประมาณ 5 กิโลแคลอรี และคาร์โบไฮเดรตให้พลังงานเพียง 4 กิโลแคลอรี

3. เป็นสารให้ความอบอุ่นและช่วยป้องกันอวัยวะต่าง ๆ ภายในร่างกายไม่ให้กระทบกระเทือน และยังเป็นฉนวนป้องกันการสูญเสียความร้อนจากร่างกาย

4. เป็นตัวเคลือบหรือฉาบผิวสิ่งมีชีวิต เพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำหรือป้องกันไม่ให้น้ำเข้าภายในและยังมีผลป้องกันการติดเชื้อด้วย

5. เป็นแหล่งของสารอาหารที่สำคัญบางอย่างได้แก่ วิตามินที่ละลายในไขมัน (Vitamin A, D, E, K) รวมทั้งฮอร์โมน เช่น พรอสทาเกลนดิน (Prostaglandin), สเทอรอยด์ (Steroid) และกรดไขมัน

6. เป็นส่วนประกอบผนังเซลล์ของแบคทีเรียและพืชชั้นสูง รวมทั้งผิวหนังและระบบประสาทของสัตว์มีกระดูกสันหลัง และเป็นองค์ประกอบของปีกและลำตัวแมลง (พัชรี บุญศิริ และคณะ, 2551)

ชนิดของลิปิด

ลิปิดสามารถจำแนกได้หลายแบบคือ

1. ลิปิดจำแนกตามโครงสร้างทางเคมี แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ

1.1 Simple lipid เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันกับแอลกอฮอล์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อย ๆ ได้แก่

1.1.1 ไขมัน (Fat) เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมัน 3 โมเลกุล กับ กลีเซอรอล 1 โมเลกุล เรียกว่า “ไตรกลีเซอรอล หรือ ไตรเอซิลกลีเซอรอล” ไขมันมีสถานะเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้อง หากมีสถานะเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง เรียกว่า “น้ำมัน (Oils)”

1.1.2 แวกซ์ (Waxes) เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันกับแอลกอฮอล์ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลเพียงหมู่เดียว (Monohydric alcohol) และมีน้ำหนักโมเลกุลสูง

1.2 Compound lipid เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันกับแอลกอฮอล์และมีสารอื่นรวมอยู่ด้วย ได้แก่

1.2.1 ฟอสโฟลิปิด (Phospholipid) เป็นกลุ่มของลิปิดที่โมเลกุลประกอบด้วยกรดไขมัน แอลกอออล์ กรดฟอสฟอริค เบสที่มีไนโตรเจน และอาจมีสารประกอบอื่น ๆ

1.2.2 ไกลโคลิปิด (Glycolipid) เป็นกลุ่มของลิปิดที่โมเลกุลประกอบด้วยกรดไขมัน คาร์โบไฮเดรต เบสที่มีไนโตรเจน แต่ไม่มีกรดฟอสฟอริค

1.2.3 ลิปิดเชิงประกอบอื่น ๆ ได้แก่ ไลโปโปรตีน และอะมิโนลิค

1.3 Derived lipid เป็นสารประกอบที่ได้จากไฮโดรไลซิสของลิปิด 2 กลุ่มแรก ซึ่งได้แก่ กรดไขมัน กลีเซอรอล โมโนกลีเซอไรค์ สเตอรอยด์ โคเลสเตอรอล วิตามินที่ละลายได้ในไขมัน แคโรทีนอยด์ พรอสตาแกลนดิน เทอร์ปีน ควีโนน และคีโตนบอดีส์ (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

2. ลิปิดจำแนกตามคุณสมบัติ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ

2.1 Neutral lipid ได้แก่ ไตรกลีเซอไรค์ โคเลสเตอรอล สเตอรอยด์อื่น ๆ รวมทั้งวิตามินที่ละลายในไขมันคือ วิตามินเอ วิตามินดี วิตามินอี และวิตามินเค ลิปิดกลุ่มนี้มีสมบัติเป็นกลาง

2.2 Amphiphilic lipid ได้แก่ ฟอสโฟลิปิดชนิดต่าง ๆ เช่น เลซิติน และสฟิงโกมัยอิลิน ลิปิดกลุ่มนี้มีสมบัติเป็น Bilayer เนื่องจากส่วนของโมเลกุลมีทั้งเป็นโพลาร์ (Polar) ซึ่งละลายน้ำได้ และส่วนที่เป็นนอนโพลาร์ (Nonpolar) ซึ่งไม่ละลายน้ำ ดังนั้นสารประกอบพวกฟอสโฟลิปิดจึงหมุนตัวอยู่ที่ผิวของสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่าหรือบนผิวน้ำ หรือแทรกตัวอยู่ระหว่างผิวของของเหลว 2 ชนิดที่ไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน สมบัติของฟอสโฟลิปิดเหล่านี้ จึงมีความสำคัญต่อการทำหน้าที่เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างของเซลล์เมมเบรน และการนำไปใช้ประโยชน์เป็น Surfactants หรือ Emulsifying agent (สมศักดิ์ วรคามิน, 2552)

3. ลิปิดจำแนกตามหน้าที่ในสิ่งมีชีวิต แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ

3.1 ลิปิดที่ทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมพลังงาน ลิปิดส่วนใหญ่ที่สะสมอยู่ในร่างกายจะอยู่ในรูปไตรกลีเซอไรด์ นอกจากนี้ยังพบได้ตามเนื้อเยื่อต่าง ๆ ทั้งของพืชและสัตว์ เป็นแหล่งสะสมพลังงานให้แก่เซลล์ กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ที่ร่างกายสะสมไว้จะแปรผันตามชนิดกรดไขมันในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ที่ได้รับจากอาหาร

3.2 ลิปิดที่ทำหน้าที่เป็นโครงสร้าง ได้แก่ ฟอสโฟลิปิด และ โคเลสเตอรอล ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของเนื้อเยื่อต่าง ๆ ในร่างกาย และเนื้อเยื่อสมอง ชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบมีความสำคัญต่อชนิดของเนื้อเยื่อซึ่งมีความจำเพาะเจาะจง ถึงแม้ว่าชนิดของกรดไขมันจะผันแปรตามชนิดและปริมาณอาหารที่ร่างกายได้รับก็ตาม แต่ร่างกายสามารถสังเคราะห์ลิปิดบางชนิดได้ (ประดิษฐ์ มีสุข, 2547)

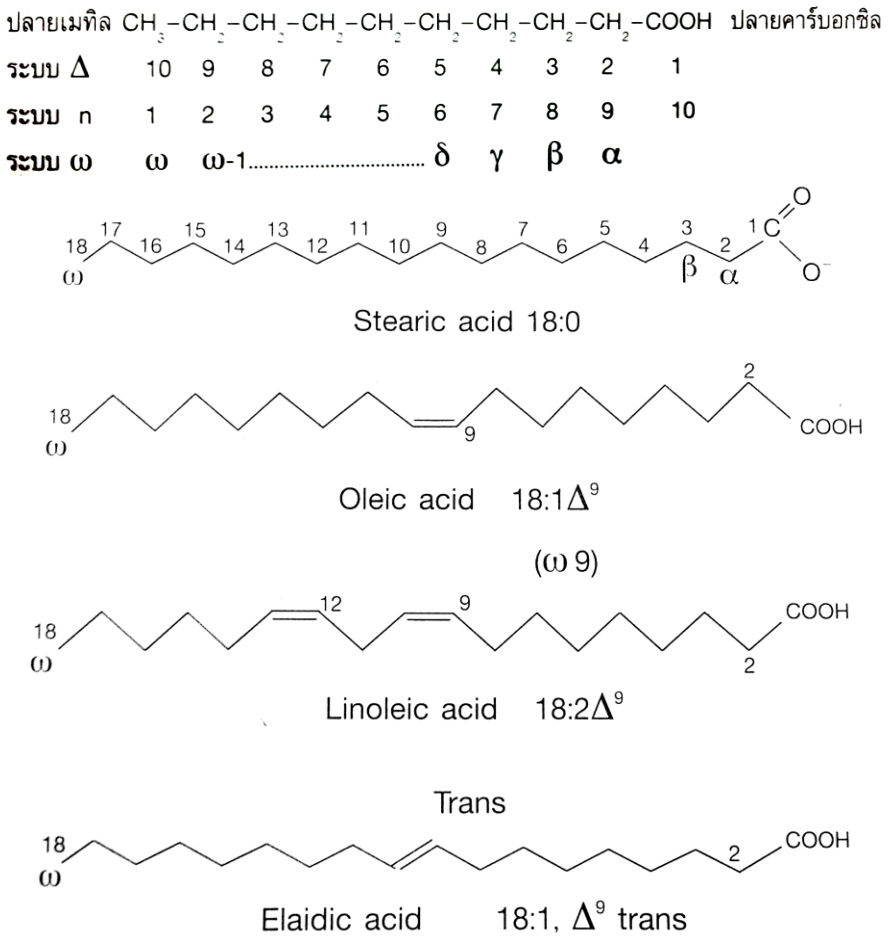
กรดไขมัน (Fatty acid)

กรดไขมันจัดเป็นกรดคาร์บอกซิลิค (Carboxylic acid) ที่มีหมู่ –COOH เพียงหมู่เดียวต่อกับไฮโดรคาร์บอนสายยาวเส้นตรง กรดไขมันที่พบในธรรมชาติมักมีจำนวนคาร์บอนอะตอมเป็นจำนวนคู่ ระหว่าง 4 - 24 อะตอม และพบในรูปกรดไขมันอิสระ (Free fatty acid) เล็กน้อย แต่ส่วนใหญ่พบในรูปที่ละลายในไขมัน (Saponifiable lipid) (ศุภศิษฏ์ อรุณรุ่งสวัสดิ์, 2541)

การเรียกชื่อกรดไขมันและการเขียนสัญลักษณ์

กรดไขมันแต่ละชนิดต่างกันที่ความยาวของโมเลกุล จำนวนพันธะและตำแหน่งพันธะคู่ การเรียกชื่อกรดไขมันมีทั้งการเรียกชื่อสามัญ เรียกตามระบบ และการใช้สัญลักษณ์ ชื่อสามัญเป็นชื่อที่ ผู้ค้นพบตั้งขึ้นโดยมีที่มาแตกต่างกัน ชื่อตามระบบใช้เรียกชื่อกรดไขมันเพื่อให้มาตรฐานเดียวกัน โดยการแสดงจำนวนคาร์บอนเป็นภาษากรีก และตามด้วย –anoic สำหรับกรดไขมันอิ่มตัว และ –enoic สำหรับกรดไขมันไม่อิ่มตัว การเรียกชื่อกรดไขมันนิยมเรียกชื่อสามัญ ตามด้วยการใช้สัญลักษณ์ เพราะสัญลักษณ์สามารถบอกความยาวโมเลกุล จำนวนคาร์บอนและตำแหน่งพันธะคู่ในกรณีที่เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว การใช้สัญลักษณ์ประกอบด้วยเลข 2 ชุด ซึ่งมีเครื่องหมาย : คั่น ตัวเลขข้างหน้าเครื่องหมาย : แสดงจำนวนคาร์บอน ตัวเลขข้างหลังเครื่องหมาย : แสดง

จำนวนพันธะคู่ ในการนับจำนวนคาร์บอนเพื่อบอกตำแหน่งพันธะคู่ในปัจจุบันใช้อยู่ 3 ระบบคือ ระบบ Δ, n และ ω (Omega) โดยระบบ Δ และ n นับคาร์บอนทุกอะตอมแต่มีทิศทางที่แตกต่างกัน ขณะที่ระบบ ω ไม่นับคาร์บอนของฟังก์ชัน (คาร์บอกซิล) ระบบ Δ เริ่มนับจากหมู่คาร์บอกซิลขณะที่ระบบ ω เริ่มนับจากคาร์บอนอะตอมแรกที่อยู่ติดกับหมู่คาร์บอนซิล (หมู่ฟังก์ชั่น) ส่วนระบบ n เริ่มนับจากปลายโมเลกุลด้านเมทิล ($-CH_3$) จะเห็นได้ว่าระบบการนับจำนวนคาร์บอนเพื่อบอกตำแหน่งพันธะคู่แตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากถูกตั้งขึ้นมาจากกลุ่มนักวิทยาศาสตร์ที่สนใจบทบาททางชีวภาพที่แตกต่างกัน กล่าวคือ ระบบ Δ และ ω นิยมใช้ในกระบวนการสลายไขมันที่เรียกว่า “วิถี β - ออกซิเดชั่น” ส่วนระบบ n นิยมใช้ในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน



ภาพที่ 1 การเขียนสัญลักษณ์กรดไขมัน

ภาพที่ 1 ตัวอย่างกรดไขมันอิ่มตัวมีชื่อสามัญว่า กรดไขมันสเตียริกมีคาร์บอน 18 อะตอมมีสัญลักษณ์เป็น 18:0 สำหรับกรดไขมันไม่อิ่มตัวมีชื่อสามัญว่ากรดไขมันโอเลอิก มีคาร์บอน 18 อะตอม มี 1 พันธะคู่ (cis-) ที่ระหว่างตำแหน่งที่ 9 กับ 10 จะใช้สัญลักษณ์เป็น 18:1 n9 หรือกรดไขมันไลโนเลอิกที่มีคาร์บอน 18 อะตอม มี 2 พันธะคู่ (cis-) ที่ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 9 กับ 10 และที่ตำแหน่งที่ 12 กับ 13 เขียนสัญลักษณ์เป็น 18:2 $\Delta^{9, 12}$ หรือ $\Delta^{-6, -9}$ จะเห็นได้ว่าปลายพันธะคู่แบบ cis ไม่ต้องเขียนคำว่า cis ไว้ แต่ถ้าเป็นแบบ trans ต้อง

เขียนคำว่า trans ไว้ด้วย เช่น กรดไขมันอีไรดิก (Elaidic acid) มีคาร์บอน 18 อะตอม มี 1 พันธะคู่ (trans) เขียนสัญลักษณ์เป็น $18:1\Delta^{9(trans)}$ (ดาวัลย์ ฉิมภู่, 2550)

กรดไขมันที่พบมากที่สุดในกลุ่มลิปิด แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ

1. กรดไขมันอิ่มตัว (Saturated fatty acids) เป็นกรดไขมันที่มีโซ่คาร์บอนสายสั้นและยาวและไม่มีพันธะคู่ (Double bond) จึงทำให้มีจุดหลอมเหลวสูง (กรดไขมันอิ่มตัวที่มีโซ่คาร์บอนยาวบางชนิดอาจมีจุดหลอมเหลวมากกว่า 60 องศาเซลเซียส) ดังนั้นกรดไขมันชนิดนี้จึงแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง และกรดอะซิติก (Acetic, CH_3COOH) เป็นต้นกำเนิดของการสังเคราะห์กรดไขมันอิ่มตัวโดยขบวนการ Elongation คือ การเพิ่มจำนวนคาร์บอนเข้าไปครั้งละ 2 อะตอม น้ำมันที่มีกรดไขมันอิ่มตัวเป็นองค์ประกอบอยู่มากจะอยู่ในสภาพที่เป็นไขและมีสภาพแข็งตัวเมื่ออุณหภูมิต่ำ หรือในฤดูหนาว เช่น น้ำมันหมู น้ำมันวัว เป็นต้น กรดไขมันอิ่มตัวที่พบเป็นองค์ประกอบในน้ำมันทั่วไป เช่น กรดไขมันไมริสติก (Myristic acid, C14:0), กรดไขมันปาล์มิติก (Palmitic acid, C16:0) และกรดไขมันสเตียริก (Stearic acid, C18:0)

ตารางที่ 1 กรดไขมันอิ่มตัวชนิดต่าง ๆ (อาภัสสรา ชมิดท์, 2543)

ชื่อสามัญ	สูตร	สัญลักษณ์ย่อ	จุดหลอมเหลว (องศาเซลเซียส)
กรดบิวไทริก (Butyric)	$C_4H_8O_2$	4:0	- 7.9
กรดคาโพรอิก (Capoic)	$C_6H_{12}O_2$	6:0	- 3.4
กรดคาไพริก (Caprylic)	$C_8H_{16}O_2$	8:0	16
กรดคาพริก (Capric)	$C_{10}H_{20}O_2$	10:0	31
กรดลอริก (Lauric)	$C_{12}H_{24}O_2$	12:0	44
กรดไมริสติก (Myristic)	$C_{14}H_{28}O_2$	14:0	54
กรดปาล์มิติก (Palmitic)	$C_{16}H_{32}O_2$	16:0	63
กรดสเตรียริก (Stearic)	$C_{18}H_{36}O_2$	18:0	70
กรดอะราชิติก (Arachidic)	$C_{20}H_{40}O_2$	20:0	76

2. กรดไขมันไม่อิ่มตัว (Unsaturated fatty acids) เป็นกรดไขมันที่มีโซ่คาร์บอนยาว (16 - 22 อะตอม) และมีพันธะคู่ตั้งแต่ 1 - 6 กรดไขมันกลุ่มนี้ มีจุดหลอมเหลวต่ำ โดยจุดหลอมเหลวของกรดไขมันแต่ละชนิด ขึ้นอยู่กับจำนวนคาร์บอนอะตอม จำนวนพันธะคู่ในโมเลกุลและตำแหน่งของพันธะคู่โดยทั่วไปกรดไขมันไม่อิ่มตัวอยู่ในสภาพที่เป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง และบางชนิดยังเป็นของเหลวที่จุดเยือกแข็ง เช่น กรดไขมันไลโนเลนิก (Linolenic acid, C18:3n3) ซึ่งมีจุดหลอมเหลวที่ - 11 องศาเซลเซียส ในขณะที่กรดไขมันอีพีเอ (Eicosapentaenoic acid, C20:5n3) มีโซ่คาร์บอนโมเลกุลยาวถึง 20 โมเลกุล มีพันธะคู่ 5 คู่ จึงทำให้กรดไขมันชนิดนี้มีจุดหลอมเหลวต่ำคือ - 54 องศาเซลเซียส เป็นต้น กรดไขมันไม่อิ่มตัวพบเป็นองค์ประกอบอยู่มากในน้ำมันพืชและน้ำมันจากสัตว์น้ำ (พัชรี บุญศิริ, เปรมใจ อารีจิตรานุสรณ์ และอุบล ชาอ่อน, 2551)

กรดไขมันไม่อิ่มตัว สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม

2.1 กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (Monounsaturated fatty acid, MUFA) เป็นกรดไขมันที่โซ่คาร์บอนเชื่อมกันในสายด้วยพันธะคู่เพียง 1 ตำแหน่ง พบได้ในไขมันแทบทุกชนิด และพบมากมี 2

ชนิด คือ กรดไขมันปาล์มิโตเลอิก (Plamitoleic acid, C16:1n7) และกรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9)

2.2 กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated fatty acid, PUFA) เป็นกรดไขมันที่โซ่คาร์บอนเชื่อมกันในสายด้วยพันธะคู่ตั้งแต่ 2 ตำแหน่งขึ้นไป นอกจากนี้กรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 20 คาร์บอนอะตอมขึ้นไป และมีจำนวนพันธะคู่มากกว่า 2 ตำแหน่งขึ้นไป เรียกกรดไขมันกลุ่มนี้ว่า “Highly unsaturated fatty acid, HUFA” โดยทั่วไปจะใช้เรียกกรดไขมันในกลุ่มโอเมก้า 3 เช่น กรดไขมันอิโคซะไตรอีโนอิก (Eicosatrienoic acid, C20:3n3), กรดไขมันไอโคซะไตรอีโนอิก (Eicosatetraenoic acid, C20:4n3), กรดไขมันอีพีเอ (Eicosapentaenoic acid, C20:5n3) และกรดไขมันดีเอชเอ (Docosahexaenoic acid, C22:6n3) หรือกลุ่มโอเมก้า 6 เช่น กรดไขมันเออาร์เอ (Arachidonic acid, C20:4n6) เป็นต้น กรดไขมันในกลุ่มนี้มีจุดหลอมเหลวที่ต่ำ และจุดหลอมเหลวของกรดไขมันแต่ละชนิดขึ้นกับจำนวนของคาร์บอนอะตอม จำนวนพันธะคู่ในโมเลกุล และตำแหน่งของพันธะคู่ (พิทักษ์ สูตอนันต์, 2552)

ตารางที่ 2 กรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดต่าง ๆ (พัชรี บุญศิริ และคณะ, 2551)

ชื่อสามัญ	สูตร	สัญลักษณ์ย่อ	จุดหลอมเหลว (องศาเซลเซียส)
กรดปาล์มิโตเลอิก (Palmitoleic)	$C_{16}H_{30}O_2$	16:1, n-7	0.5
กรดโอเลอิก (Oleic)	$C_{18}H_{34}O_2$	18:1, n-9	13.4
กรดไลโนเลอิก (Linoleic)	$C_{18}H_{32}O_2$	18:2, n-6	- 5.0
กรดไลโนเลนิก (Linolenic)	$C_{18}H_{30}O_2$	18:3, n-3	- 11.0
กรดอะราชิโดนิก (Arachidonic)	$C_{20}H_{32}O_2$	20:4, n-6	- 49.5
กรดอิโคซะเพนตะอีโนอิก (Eicosapentaenoic)	$C_{20}H_{30}O_2$	20:5, n-3	- 54.0
กรดโดโคซะเฮกซะอีโนอิก (Docosahexaenoic)	$C_{22}H_{32}O_2$	22:6, n-3	- 44.0

ความสำคัญของกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า 3 และโอเมก้า 6

กลุ่มโอเมก้า 3

กรดไขมันโอเมก้า 3 เป็นกลุ่มของกรดไขมันชนิดที่ไม่อิ่มตัวสูง เป็นหนึ่งในกรดไขมันที่จำเป็น (Essential Fatty acid) สำหรับร่างกาย ซึ่งในสูตรโครงสร้างโมเลกุลจะมีพันธะคู่อยู่ไม่น้อยกว่า 3 ตำแหน่ง โดยพันธะคู่แรกจะอยู่ที่ตำแหน่งของคาร์บอนตัวที่ 3 นับจากปลายโมเลกุลด้านที่มีกลุ่มของเมธิล (Methyl group) เข้าไป และส่วนพันธะคู่ต่อไปจะอยู่ตรงตำแหน่งคาร์บอนถัดไปครั้งละ 3 ตำแหน่ง (Anderson, 1994)

กรดไขมันไลโนเลนิก (Linolenic acid) เป็นกรดไขมันชนิดกรดไขมันไม่อิ่มตัว (Unsaturated fatty acid) มีจำนวนคาร์บอน 18 อะตอม และมีพันธะคู่ (double bond) 3 ตำแหน่ง ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 9, 12 และ 15 เป็น Polyunsaturated fatty acid กรดไขมันไลโนเลนิก เป็นกรดไขมันที่มีความจำเป็นต่อร่างกาย (Essential fatty acid) เนื่องจากเป็นสารตั้งต้นของกรดไขมันกลุ่มเดียวกันที่มีโซ่คาร์บอนสายยาว (Anderson, 1994) แหล่งที่พบโดยทั่วไปพบน้ำมันพืช เช่น น้ำมันเมล็ดแฟลก น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันคาโนลา และสาหร่าย

สไปรูลินา (Spirulina) ส่วนประกอบของกรดไขมันในน้ำมันและไขมันที่ใช้รับประทาน เช่น น้ำมันปลา และน้ำมันตับปลา

กรดไขมันอีพีเอ (Eicosapentaenoic acid, C20:5n3) เป็นกรดไขมันที่สร้างมาจากกรดไขมัน ไลโนเลนิกและเป็นสารตั้งต้นของ eicosanoids อีพีเอเป็นกรดไขมันที่มีคุณสมบัติ ลดการจับตัวของเกล็ดเลือดและสร้างสารที่ทำให้เส้นเลือดขยายตัวได้ดี จึงลดความเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจขาดเลือดได้จากสมมติฐานทางการแพทย์ของการเกิดโรคหัวใจอุดตันพบว่าการเกิดลิ่มเลือด (Thrombogenesia) เป็นสาเหตุที่สำคัญประการหนึ่งของปัญหาโรคหัวใจและหลอดเลือด Thromboxanes A_3 ที่สร้างมาจากกรดไขมันอีพีเอที่มีคุณสมบัติต้านการรวมตัวของเกล็ดเลือดบริเวณผนังหลอดเลือด ทำให้สามารถลดความหนืดของเลือดลง และช่วยเพิ่มระดับของเหลวในเมมเบรน ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้สามารถพบได้ในน้ำมันปลาชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะปลาทะเล ดังนั้นการบริโภคปลาเป็นประจำย่อมลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจขาดเลือดได้ (สมศักดิ์ วรคามิน, 2552) แหล่งที่พบโดยทั่วไปพบมากในน้ำมันปลา (Fish oil), น้ำมันลินสีด (Linseed oil), น้ำมันวอลนัท (Walnut oil), น้ำมันคาโนล่า (Canola oil), น้ำมันถั่วเหลือง (Soybean oil), น้ำมันข้าวโพด และสาหร่าย (Aslan and Triadafilopoulos, 1992)

กรดไขมันดีเอชเอ (Docosahexaenoic acid, C22:6n3) เป็นกรดไขมันที่สร้างมาจากกรดไขมันไลโนเลนิกเช่นเดียวกับกรดไขมันอีพีเอ มีความสำคัญต่อร่างกายและมีผลโดยตรงต่อสุขภาพมนุษย์ (โดยเฉพาะทารก) พบได้ที่บริเวณเรตินาของดวงตาและผนังเซลล์ทั่วร่างกาย ทำให้เซลล์มีความไวต่อการรับสัญญาณประสาทและที่สำคัญที่สุดคือ เป็นส่วนประกอบของเซลล์สมองซึ่งพบในปริมาณสูง กรดไขมันดีเอชเอที่เข้าไปในสมองจะเสริมสร้างการเจริญเติบโตของปลายประสาทที่เรียกว่า “เดนไดรต์ (Dendrite)” ซึ่งทำหน้าที่ถ่ายทอดสัญญาณส่งผ่านข้อมูลระหว่างสมองด้วยกันทำให้เกิดการเรียนรู้และการจดจำ นอกจากนี้กรดไขมันดีเอชเอยังช่วยป้องกันการเกิดโรคทางหัวใจและหลอดเลือด ช่วยบำบัดโรคที่เกี่ยวข้องกับความชราภาพ และมีผลทำให้การตั้งครรภ์และการคลอดบุตรเป็นไปตามปกติ (สมศักดิ์ วรคามิน, 2552) แหล่งที่พบโดยทั่วไปพบในปลาทะเล น้ำนมแม่ ไข่แดง และสาหร่ายทะเล

กลุ่มโอเมก้า 6

โครงสร้างของกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า 6 เป็นกลุ่มของกรดไขมันชนิดที่ไม่อิ่มตัวสูง เป็นกรดไขมันที่จำเป็น (Essential fatty acid) ต่อร่างกายมนุษย์ เป็นกรดไขมันที่มีพันธะคู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 จากปลายด้านเมทธิล กรดไขมันกลุ่มโอเมก้า 6 มีหลายชนิด โดยมีเพียงบางชนิดมีความสำคัญต่อการทำงานร่างกาย ได้แก่ กรดไขมันไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6) และกรดไขมันเออาร์เอ (Arachidonic acid, C20:4n6) (Abbey and Nestel, 1994)

กรดไขมันไลโนเลอิก กรดไขมันไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6) เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีจำนวนคาร์บอน 18 อะตอม และมีพันธะคู่ 2 คู่ พันธะคู่อยู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 9 และ 12 มีชื่อเคมีว่า 9, 12 octadecadienoic acid จัดเป็น Polyunsaturated fatty โครงสร้างที่พบตามธรรมชาติเป็นแอลฟา-ไลโนเลอิก (Alpha - linoleic acid) กรดไขมันไลโนเลอิกถือเป็นกรดไขมันจำเป็นที่เป็นสารตั้งต้นของกรดไขมันกลุ่มเดียวกันที่มีโซ่คาร์บอนสายยาว (Adler and Holub, 1997) แหล่งที่พบโดยทั่วไปพบมากในน้ำมันพืช เช่น น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันงา น้ำมันถั่วลิสง น้ำมันข้าวโพด น้ำมันเมล็ดฝ้าย น้ำมันเมล็ดทานตะวัน น้ำมันเมล็ดคำฝอย และน้ำมันปลา

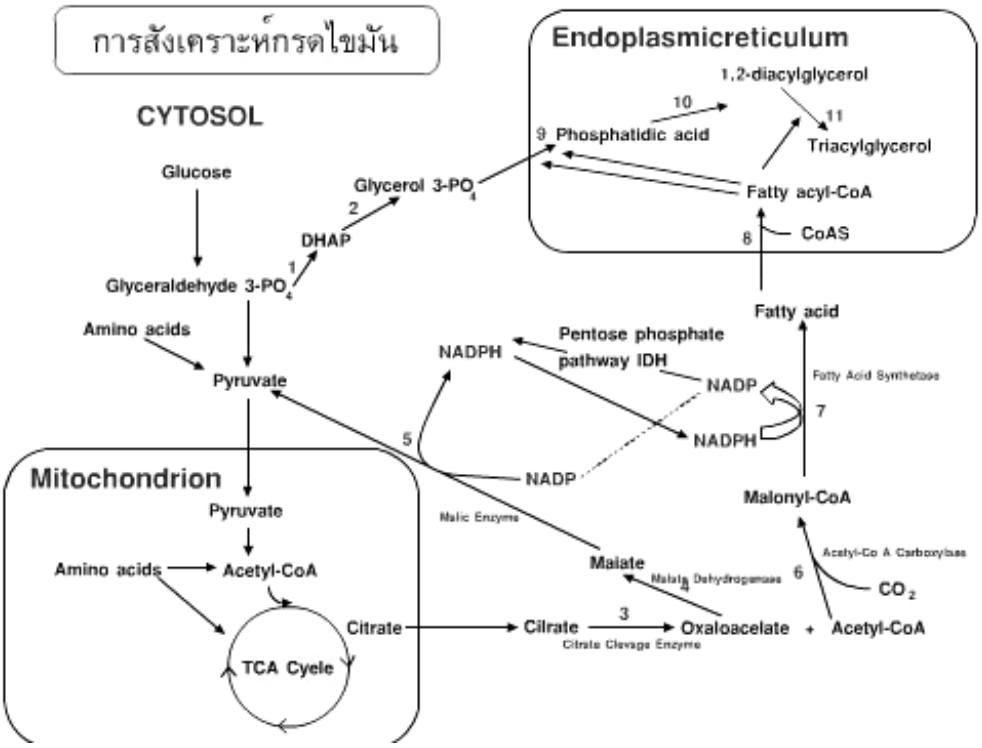
กรดไขมันเออาร์เอ (Arachidonic acid, C20:4n6) เป็นกรดไขมันที่สร้างมาจากกรดไขมันไลโนเลอิกและเป็นสารเริ่มต้นของ Eicosanoids เช่น Thromboxanes A_2 มีคุณสมบัติในการทำให้เม็ดเลือดเกาะกลุ่ม กรดไขมันเออาร์เอ มีบทบาทในการสร้างและการเก็บความจำระยะยาวของทารกซึ่งเป็นพื้นฐานของการเรียนรู้

ช่วยเพิ่มความไวของการรับแสงในส่วนเรตินาของลูกตา และความสามารถในการมองเห็น กรดไขมันเออาร์เอ เป็นส่วนประกอบหลักของซินแนปซ์หรือจุดเชื่อมต่อระหว่างเซลล์ประสาท และมีบทบาทเป็นตัวนำข้อมูลตรงรอยต่อของซินแนปซ์และภายในเซลล์ นอกจากนี้กรดไขมันเออาร์เอ ยังช่วยเพิ่มความเร็วในการส่งสัญญาณประสาทระหว่างเซลล์ประสาทของทารกเพื่อนำข้อมูลมาเก็บไว้ในสมอง ซึ่งเป็นการช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพของกระบวนการเรียนรู้และความจำในระยะยาว (Albert and Henneks, 1998) แหล่งที่พบ โดยทั่วไปพบมากในน้ำมันตับปลา น้ำมันจากปลาทะเล น้ำมันเมล็ดคำฝอย น้ำมันดอกทานตะวัน และน้ำมันถั่วเหลือง (http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1650/arachidonic-acid-กรดอะราคิโดนิก)

การสังเคราะห์กรดไขมัน (Fatty acid synthesis)

การสังเคราะห์กรดไขมัน หมายถึง การนำเอาอะซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetyl - Co A) ที่ได้จากการสลายกรดอะมิโน การสลายกรดไขมันหรือการสลายกลูโคสมาใช้การสร้างหรือสังเคราะห์กรดไขมันเพื่อเป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อเซลล์ การสังเคราะห์ดังกล่าวเกิดในไซโทพลาซึม และจำเป็นต้องใช้พลังงานจำนวนหนึ่งในการนำเอาคาร์บอนมาต่อกันทีละ 2 อะตอม (Elongation) หรือสร้างพันธะคู่ (Desaturation) ซึ่งอาจมีความแตกต่างกันในปลาแต่ละชนิด ฉะนั้นมีผลทำให้องค์ประกอบกรดไขมันที่พบในเนื้อเยื่อ เช่น ตับ กล้ามเนื้อ และเนื้อเยื่อไขมันจึงมีความแตกต่างกัน

กระบวนการเหล่านี้ เริ่มจากอะซิติลโคเอนไซม์เอจะรวมกับออกซาโลอะซิเตท (Oxaloacetate) ได้เป็นซิเตรท (Citrate) ซึ่งจะถูกนำออกมาจากไมโทคอนเดรียมาอยู่ในไซโทพลาซึมแล้วถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ซิเตรทคลีเวจ (Citrate Clevage Enzyme หรือ Citrate Lyase) ได้เป็นออกซาโลอะซิเตทและอะซิติลโคเอนไซม์เอ ต่อมาออกซาโลอะซิเตทจะถูกรีดิวซ์เป็นมาเลท (Malate) โดยเอนไซม์มาเลทดีไฮโดรจิเนส (Malate Dehydrogenase) แล้วมาเลทก็จะถูกออกซิไดส์ด้วยเอนไซม์มาลิค (Malic Enzyme) ได้เป็นไพรูเวท (Pyruvate) ซึ่งจะกลับเข้าไปในไมโทคอนเดรียอีกครั้ง ส่วนอะซิติลโคเอนไซม์เอจะทำปฏิกิริยากับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์โดยอาศัย เอนไซม์อะซิติลโคเอนไซม์เอคาร์บอกซิเลส (Acetyl - Co A Carboxylase) ได้เป็นมาโลนิลโคเอนไซม์เอ (Malonyl - Co A) ซึ่งต่อมาจะถูกนำมาสังเคราะห์ให้เป็นกรดไขมันโดยการใช้เอนไซม์ แฟตตีเอซิดซินทีเทส (Fatty Acid Synthetase) และพลังงาน (NADPH) (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 การสังเคราะห์กรดไขมัน (ดาวัลย์ ฉิมภู่, 2550)

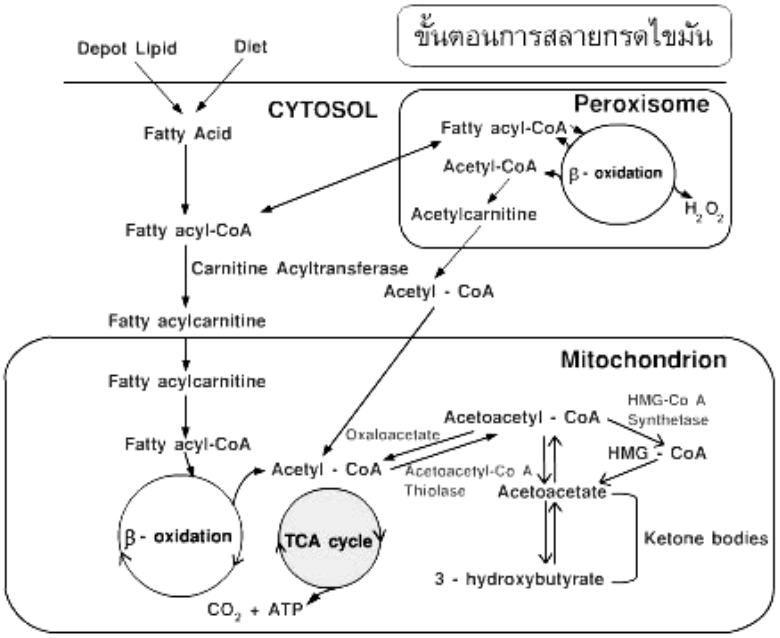
การศึกษาการสังเคราะห์กรดไขมันดังกล่าว โดยการใช้อะซิเตท (Acetate) ที่ผ่าน (Labeled) สารกัมมันตภาพรังสีฉีดเข้าไปในปลาแล้ววิเคราะห์เนื้อเยื่อปลา พบว่าปลามีความสามารถนำเอาอะซิเตทไปสังเคราะห์เป็นกรดไขมันที่อิ่มตัว (Saturated fatty acid) หรือกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว (Unsaturated fatty acid) ซึ่งมี 1 พันธะคู่ (Monoenoic Acid) เท่านั้น ปลาจะสามารถสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (PUFA) สูงได้ก็ต่อเมื่อต้องได้รับสารตั้งต้นจากอาหาร ซึ่งได้แก่ กรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9), กรดไขมันไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6) และกรดไขมันไลโนเลนิก (Linolenic acid, C18:3n3) เท่านั้น (ดาวัลย์ ฉิมภู่, 2550)

การสลายกรดไขมัน

การสลายกรดไขมันหรือการเผาผลาญกรดไขมัน หมายถึง การนำกรดไขมันมาออกซิไดส์เพื่อให้ได้พลังงานออกมา โดยอาจเกิดขึ้นได้ทั้งในไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) และในเพอร์ออกซิโซม (Peroxisome) กระบวนการเหล่านี้เริ่มจากกรดไขมันที่ได้จากการย่อยและดูดซึมอาหาร จะอยู่ในไซโทพลาสซึม แต่จะถูกนำเข้าไปในไมโทคอนเดรียเพื่อการสลายกรดไขมัน โดยกรดไขมันจะรวมกับโคเอนไซม์เอ (Coenzyme A) ได้เป็นแฟตตีเอซิลโคเอนไซม์เอ (Fatty Acyl - Co A) จากนั้นแฟตตีเอซิลโคเนไซม์เอจะเปลี่ยนเป็นแฟตตีเอซิลคาร์นิทีน (Fatty Acylcarnitine) โดยอาศัยเอนไซม์คาร์นิทีนเอซิลทรานเฟอเรส (Carnitine Acyltransferase) เป็นตัวนำกรดไขมันเข้าผนังไมโทคอนเดรีย แล้วจึงเปลี่ยนกลับมาเป็นแฟตตีเอซิลโคเอนไซม์เออีกครั้งหนึ่ง ต่อมาแฟตตีเอซิลโคเอนไซม์จะถูกนำไปสลายในไมโทคอนเดรียโดยกระบวนการที่เรียกว่า “เบตา-ออกซิเดชั่น (β - oxidation)” ได้เป็นอะซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetyl - Co A) ซึ่งจะถูกนำเข้าวัฏจักรไทรคาร์บอกซิลิคเพื่อให้ได้พลังงานออกมา อย่างไรก็ตามพบว่า ในบางครั้งอะซิติลโคเอนไซม์เอไม่ได้ถูกสลายให้เกิดพลังงาน เพราะขาดออกซาโลอะซิเตท (Oxaloacetate) ทำให้อะซิติลโคเอนไซม์เอ 2 ตัวรวมกันเป็นอะซิโตอะซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetoacetyl - Co A) โดยอาศัยเอนไซม์อะซิโตอะซิติลโคเอนไซม์เอไทโอเลส (Acetoacetyl - Co

A Thiolase) จากนั้นอะซิโตอะซิติลโคเอนไซม์เอจะถูกเร่งโดยเอนไซม์ เอชเอ็มจี โคเอนไซม์เอ ซินทีเทส (HMG - Co A Synthetase) ได้เป็น เอชเอ็มจี โคเอนไซม์เอ (HMG - Co A) และพร้อมที่จะเปลี่ยนเป็นอะซิโตอะซิเตท (Acetoacetate) และ 3 - ไฮดรอกซีบิวไทเรท (3 - Hydroxybutyrate) ซึ่งจัดเป็นสารจำพวกคีโตนบอดี (Ketone Body) โดยคีโตนบอดี้จะถูกส่งผ่านไปยังกระแสเลือดและเข้าสู่เซลล์เพื่อการออกซิเดชั่นอย่างสมบูรณ์ในวัฏจักรไตรคาร์บอกซิลิค (ภาพที่ 3)

สำหรับการสลายกรดไขมันในเพอร์ออกซิโซมมีความแตกต่างกับการสลายกรดไขมันในไมโทคอนเดรียหลายประการ เช่น คาร์นิทีนไม่ได้ช่วยนำกรดไขมันเข้าไปในเพอร์ออกซิโซม และแฟตตีเอซิลโคเอนไซม์เอจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์อะซิติลโคเอนไซม์เอออกซิเดส (Acyl - Co A Oxidase) ได้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen Peroxide) อีกทั้งจะไม่มีวัฏจักรไทรคาร์บอกซิลิคมาเกี่ยวข้อง ฉะนั้นอะซิติลโคเอนไซม์เอนี้ จึงอาจถูกลำเลียงไปยังไมโทคอนเดรีย เพื่อการสลายกรดไขมันภายใน ไมโทคอนเดรียได้อีกทางหนึ่ง (พัชรี บุญศิริ และคณะ, 2551)



ภาพที่ 3 ขั้นตอนการสลายกรดไขมัน (พัชรี บุญศิริ และคณะ, 2551)

แหล่งของกรดไขมัน

แหล่งกรดไขมันจากพืช

กรดไขมันที่พบในพืชโดยทั่วไปเป็นกรดไขมันชนิดอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว และพบในปริมาณสูงในน้ำมันพืช เช่น น้ำมันปาล์ม น้ำมันมะพร้าว น้ำมันมะกอก น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันถั่วลิสง เป็นต้น ใน อุณหภูมิห้องมีลักษณะเป็นน้ำมัน (ของเหลว) ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากว่าการหักงอของสายไฮโดรคาร์บอนตรงบริเวณที่เกิดพันธะคู่ ทำให้โมเลกุลไม่สามารถเรียงตัวเป็นระเบียบและอัดตัวแน่นเหมือนไขมัน กรดไขมันที่พบได้แก่ กรดไขมันปาล์มิติก (Plamitic acid, C16:0), กรดไขมันสเตียริก (Steric acid, C18:0), กรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9), กรดไขมันไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6) และกรดไขมันไลโนเลนิก (Linolenic acid, C18:3n3) สำหรับปัจจัยที่มีผลต่อการสะสมปริมาณกรดไขมันในเมล็ดพืช คือ ปัจจัยทางด้านกายภาพ ได้แก่

สภาพแวดล้อมที่เพาะปลูก ความชื้น อุณหภูมิ แสง ปัจจัยทางเคมี ได้แก่ ชนิดของเมล็ดพืช และองค์ประกอบของสารอาหาร (เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ, 2543)

แหล่งกรดไขมันจากสัตว์

กรดไขมันจากสัตว์ส่วนใหญ่ประกอบขึ้นจากกรดไขมันชนิดอิ่มตัวมากกว่าพืช ซึ่งมีสถานะเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้อง พบได้ในสัตว์บก สัตว์น้ำ และในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งกรดไขมันที่พบในไขมันสัตว์เช่น กรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9) และกรดไขมันปาล์มิติก (Plamitic acid, C16:0) เป็นต้น (พิมพร วัชรางค์กุล, ม.ป.ป.) ส่วนในสัตว์น้ำ มักพบมากในปลาทะเลโดยเฉพาะในปลาที่อาศัยเขตที่มีอากาศหนาวเย็นจะมีกรดไขมันอยู่ทุกส่วนของร่างกาย ในปลาทะเลพบกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอน 20 - 22 อะตอมสูง (เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ, 2543) และกรดไขมันส่วนมากที่พบในปลาทะเลเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวประเภทกรดไขมันจำเป็นกลุ่มโอเมก้า 3 สูงที่สุด รองลงมาคือ กรดไขมันจำเป็นกลุ่มโอเมก้า 6 ในสัตว์น้ำมีปริมาณไขมันต่ำแต่มีปริมาณกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า 3 สูงกว่าสัตว์บกและสัตว์ปีกโดยเฉพาะกรดไขมันอีพีเอ (Eicosapentaenoic acid, C20:5n3) และกรดไขมันดีเอชเอ (Docosahexaenoic acid, C22:6n3) เช่น ปลาซาร์ดีน ปลาแฮร์ริ่ง ปลาแม็คคาเรล ปลาแฮงโชว์วี่ ปลาทูน่า พบกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า 3 ในสัดส่วน 2.5 - 8 กรัมต่อเนื้อปลา 200 กรัม นอกจากนี้ยังพบกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า 3 ในปลาน้ำจืดของไทยหลายชนิด เช่น ปลาสวาย ปลาช่อน ที่มีปริมาณกรดไขมันโอเมก้า 3 เทียบเท่ากับปลาทะเล (Birch and Hoffman, 1992)

แหล่งกรดไขมันจากจุลินทรีย์

กรดไขมันในแบคทีเรียส่วนใหญ่จะเป็นพวก Straight-chain เช่น MUFAs กลุ่มหลักที่พบได้แก่ Oleic series หรือ Vaccenic series และกลุ่มกรดไขมันในแบคทีเรียที่ไม่เหมือนในสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ได้แก่ b-OH, Cyclopropane และ Branchedchain (Lechevalier, 1989) ในแบคทีเรียบางชนิดจะอยู่ในรูป กรดไขมันอิสระ หรือในรูปของ glycerides แต่ส่วนใหญ่แล้วจะเป็นโมเลกุลเริ่มจาก Phospholipids glycolipids จนถึง Lipoproteins กรดไขมันจากจุลินทรีย์มีทั้งในจุลินทรีย์กลุ่มโปรคาริโอตและจุลิทรีย์กลุ่มยูคาริโอต ดังเช่น แบคทีเรียและไซยาโนแบคทีเรีย อะมีบา โปรโตซัว จุลสาหร่าย ตลอดจนจุลินทรีย์ต่าง ๆ ล้วนแล้วแต่มีกรดไขมันที่มีสายอะตอมคาร์บอนยาว มีความไม่อิ่มตัวสูงมีพันธะคู่หลายตำแหน่ง เป็นองค์ประกอบของเซลล์ทั้งสิ้น โดยมีปริมาณมากหรือน้อยแตกต่างกันไปตามชนิดและแหล่งที่อยู่ของจุลินทรีย์นั้น ๆ (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549) ยีสต์และรามีองค์ประกอบของกรดไขมันที่คล้ายคลึงกับพืช ถือเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันสูง ในจุลินทรีย์กลุ่มยูคาริโอตนี้ ยีสต์มีประสิทธิภาพการผลิตกรดไขมันสูงกว่ารา ซึ่งยีสต์แต่ละชนิดสามารถสะสมลิปิดได้สูงสุดถึง 40 - 70 ของชีวมวล โดยปริมาณลิปิดที่สร้างขึ้นจะแตกต่างกันตามสายพันธุ์และสภาวะการเลี้ยง (ปาริชาติ สักกะทำนุ, 2544) ยีสต์ผลิตกรดไขมันตั้งแต่คาร์บอน 8 อะตอม จนถึงคาร์บอน 24 อะตอม ซึ่งกรดไขมันส่วนใหญ่ที่พบในยีสต์จะพบกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว สำหรับกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนที่พบจะเป็นกรดไขมันไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6) และกรดไขมันไลโนเลนิก (Linolenic acid, C18:3n3) ตัวอย่างเช่น *Canida* sp., *Crytococcus* sp., *Hansenula* sp., *Lipomyces* sp. และ *Rhodotorula* sp. (Zelles, 1997) นอกจากนี้ยังพบกรดไขมันที่จำเป็นกลุ่มโอเมก้า 3 ที่ผลิตได้จากยีสต์ คือ กรดไขมันอีพีเอ (Eicosapentaenoic acid, C20:5n3) และกรดไขมันดีเอชเอ (Docosahexaenoic acid, C22:6n3) (สมศักดิ์ วรคามิน, 2552)

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต ปริมาณลิปิด และกรดไขมันในเซลล์ยีสต์

ปริมาณลิปิดที่เป็นองค์ประกอบในยีสต์จะเปลี่ยนตามปัจจัยต่าง ๆ ของการเจริญเติบโตด้วยซึ่งเพียงแค่องค์ประกอบทางเคมีของอาหารเปลี่ยนแปลงไปก็จะเห็นเยื่อหุ้มต่าง ๆ เปลี่ยนแปลงไปด้วย กลไกสำคัญที่ทำ

ให้ปัจจัยสิ่งแวดล้อมเหล่านี้มีผลต่อองค์ประกอบของลิปิดในเซลล์ก็ยังไม่มีใครทราบแน่ชัด และคงจะต้องเป็นงานวิจัยที่สำคัญที่ต้องค้นหากันต่อไปในอนาคต

1. อัตราการเจริญเติบโต นักวิจัยส่วนใหญ่มักจะศึกษาที่ปริมาณการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบของลิปิดของยีสต์ ในช่วงระยะต่าง ๆ ของการเจริญใน Batch culture ซึ่งส่วนใหญ่แล้วจะมีผลปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัว รวมทั้งสัดส่วนของ Phospholipid ด้วย นอกจากนี้ยังพบด้วยว่า ในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่เลี้ยงในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีแนวโน้มที่จะสร้างกรด ไขมันปาล์มิติก (Palmitic acid, C16:0) สูงกว่า กรดไขมันสเตียริก (Stearic acid, C18:0) และมีปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มากกว่ากรดไขมันอิ่มตัว ถ้าการเจริญมีอัตราช้าลง

2. อุณหภูมิในการเจริญ อุณหภูมิในการเจริญของจุลินทรีย์มีผลต่อองค์ประกอบของลิปิดของเซลล์ เมื่ออุณหภูมิในการเจริญลดลงจากอุณหภูมิที่เหมาะสม (Optimum) การสร้างไขมันที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวนี้มักจะเพิ่มมากขึ้นไปด้วย ซึ่งอิทธิพลนี้ได้มีการรายงานไว้ในการเลี้ยงแบบ Batch – culture ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และยีสต์ *C. utilis* รวมทั้งยีสต์ *C. lipollytica* ซึ่งพบว่าเมื่อเลี้ยงโดยควบคุมให้มีปริมาณออกซิเจนคงที่ ปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัวจะถูกสร้างมากขึ้นเมื่ออุณหภูมิในการเจริญลดลง ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* NCYC366 เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส พบว่ามี Phospholipid เพิ่มขึ้นอย่างมากโดยเฉพาะอย่างยิ่ง Phosphatidylcholine และ Phosphatidic acid

3. ปริมาณออกซิเจน *Saccharomyces cerevisiae* ที่เจริญภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศในการเลี้ยงแบบ batch culture สามารถสร้างลิปิดชนิดที่มีกรดไขมันอิ่มตัวได้ในปริมาณมากกว่าที่เลี้ยงแบบมีออกซิเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดไขมันที่มีคาร์บอน 10 ถึง 14 อะตอม

4. ค่าพีเอชและปริมาณ CO_2 พีเอชและความเข้มข้นของ CO_2 มีอิทธิพลต่อปริมาณลิปิดในเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่พีเอชของอาหาร 5.5 และให้ Bicarbonate และ CO_2 พบว่าปริมาณลิปิดจะเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 2.7 แต่ปริมาณลิปิดในเซลล์ยีสต์ไม่เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.0 และเพิ่มความเข้มข้นของ bicarbonate แต่ปริมาณความเข้มข้นของ CO_2 คงที่

5. ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าความเข้มข้นของโซดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น จากร้อยละ 0 เป็นร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาณลิปิดของ *Candida albicans* เพิ่มสูงขึ้นจากร้อยละ 0.32 เป็นร้อยละ 6.29 แต่อย่างไรก็ตามการเจริญเติบโตของยีสต์จะถูกยับยั้งได้ถ้ามีปริมาณเกลือเข้มข้นสูงเกินไป

6. วิตามิน การขาดวิตามินมีผลต่อปริมาณลิปิดในยีสต์ ในยีสต์ *Hanseniaspora valbyensis* ที่เลี้ยงในอาหารที่ขาดวิตามิน Pyridoxine มีปริมาณลิปิดน้อยลงถึงร้อยละ 40 เปรียบเทียบกับเซลล์ยีสต์ชนิดเดียวกันที่เลี้ยงในอาหารที่มีวิตามินอย่างเพียงพอ และยังพบว่ายีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่เลี้ยงในอาหารที่ขาด Panthothenate ก็มีการสร้างลิปิดที่น้อยกว่ายีสต์ที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่ขาดวิตามินอี นอกจากนี้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มี Inositol ก็จะมีการสร้าง Phosphatidy - inositol ลดลงด้วย (สมถวิล จริตควร และคณะ, 2551)

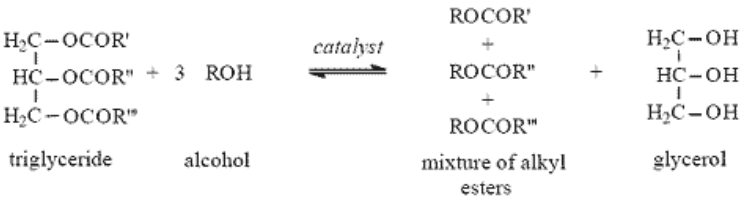
การสร้างกรดไขมันในยีสต์

ในการสร้างกรดไขมันทั้งเอนไซม์ *Fatty acid synthase* และ *Acetyl - CoA carboxylase* เป็นเอนไซม์หลักที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง ถ้าเป็นในยีสต์ Fatty acid synthase เป็นโมเลกุลที่ซับซ้อนประกอบด้วย α - subunits และ β - subunits ชนิดละ 6 Units ซึ่งถูกสร้างขึ้นจาก Gene *FAS2* และ *FAS1* ตามลำดับ ส่วน *Acetyl - CoA carboxylase* ซึ่งเป็นโมเลกุลแบบ Homotetramer ถูกสร้างขึ้นจาก Gene FAS3 ในเชื้อราที่มีเส้นใย วิธีการสร้าง Fatty acid มีการ Desaturation และ Elcongation จากกรดไขมันส

เตียริก (Stearic acid, C18:0) เพื่อให้ได้กรดไขมันที่มีความยาวมากขึ้น และเป็น Polyunsaturated fatty acid (PUFAs) และสารที่ใช้เป็น Substrate ในการสร้างกรดไขมันโอเลอิก (Oleic, C18:1) จากการ Δ9 - desaturation ของกรดไขมันสเตียริก คือ Stearoyl - CoA (Mackenzie et al., 2002)

ทรานเอสเทอริฟิเคชั่นด้วยกรด (Acid - catalysed transesterification)

การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟ *(Chromatograph)* อาศัยหลักการที่ว่าสารตัวอย่างที่ใช้แยกต้องเป็นสารที่ระเหยกลายเป็นไอง่าย กรดไขมันในโครงสร้างเซลล์ส่วนมากอยู่ในรูปเอสเทอร์กับไขมันชนิดอื่น ๆ ดังนั้นในการวิเคราะห์จึงต้องแทนที่เอสเทอร์ของกรดไขมันในโครงสร้างเซลล์ด้วยแอลกอฮอล์ (ส่วนมากเป็นเมทานอล) ให้เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันกับแอลกอฮอล์ ให้ได้ผลผลิต Fatty acid methyl ester ที่มีจุดเดือดและจุดหลอมเหลวต่ำกว่า และระเหยกลายเป็นไอง่าย



ภาพที่ 4 กระบวนการทรานเอสเทอริฟิเคชั่น
ที่มา *: http://www.barascientific.com/article/Biodiesel2/biodiesel_2.php*

กระบวนการทรานเอสเทอริฟิเคชั่น

สามารถทำได้หลายวิธีดังต่อไปนี้ การใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการทรานเอสเทอร์ฟิเคชั่น อาทิเช่น Sulfuric, phosphoric, Hydrochloric organic, Sulfonic acid ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดนี้ได้รับการพัฒนาขึ้นเพื่อแก้ไขข้อจำกัดของตัวเร่งด่าง โดยข้อดีของการใช้ตัวเร่งประเภทกรดคือ ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีปริมาณผลได้สูงและยังสามารถใช้กับสารตั้งต้นที่มีคุณภาพด้อยกว่าน้ำมันบริสุทธิ์ได้ (เช่น มีกรดไขมันอิสระปนอยู่) อย่างไรก็ตาม ตัวเร่งดังกล่าวจะส่งผลให้เกิดการกัดกร่อนของอุปกรณ์ที่ใช้ อีกทั้งกระบวนการใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะเกิดปฏิกิริยาได้ช้ากว่าการใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งเหมาะสำหรับกลีเซอไรด์ที่มีปริมาณ free fatty acid สูงและมีน้ำมาก โดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมีที่เรียกว่า “ทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชั่น (แอลกอฮอล์ไลซิส) และ เอสเทอร์ริฟิเคชั่น” โดยมีสารตั้งต้นเป็นน้ำมัน (ไตรกลีเซอร์ไรด์) หรือกรดไขมันซึ่งทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ (ทั้งเมทานอล หรือเอทานอล แต่ส่วนใหญ่ใช้เมทานอลเนื่องจากให้ประสิทธิภาพการผลิตที่สูงกว่า) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอลคิลเอสเทอร์หรือไบโอดีเซล
ที่มา : http://www.barascientific.com/article/Biodiesel2/biodiesel_2.php

กากชานอ้อย

กากชานอ้อย ประกอบด้วยเซลลูโลส และไซโลส ซึ่งจุลินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ยีสต์สามารถใช้น้ำตาลจากกากชานอ้อยเป็นวัตถุดิบในการผลิตผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ลำต้นของอ้อยประกอบด้วยน้ำร้อยละ 84 โปรตีนร้อยละ 0.2 ไขมันร้อยละ 0.5 เถ้าที่ละลายน้ำได้ร้อยละ 12 แคลเซียม 8 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ และเหล็ก 1.3 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ ส่วนของลำต้นที่หีบเอาน้ำออก มีส่วนประกอบคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนักของชานอ้อยเปียก ประกอบด้วย ความชื้นร้อยละ 46 - 52 เส้นใยร้อยละ 13 - 52 ของแข็งที่ละลายน้ำได้ (ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาล) ร้อยละ 2.6 กรดอะมิโน ได้แก่ Aspartic acid 13.25 ร้อยละมิลลิกรัม, Threonine 5.58 ร้อยละ

มิลลิกรัม, Methionine 7.84 ร้อยละมิลลิกรัม, Valine 3.33 ร้อยละมิลลิกรัม, Leucine 5.75 ร้อยละมิลลิกรัม, Tyrosine 1.51 ร้อยละมิลลิกรัม และ Alanine 3.56 ร้อยละมิลลิกรัม นอกจากนี้ยังมีสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเนื้องอก (Antitumor Substance) ร้อยละ 0.1 อาจเป็นพวกสารโพลีแซกคาไรด์ ซึ่งเป็นสารประกอบน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม เช่น น้ำตาลกลูโคส (Glucose) และน้ำตาลฟรุกโตส (Fructose) น้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม เช่น ไซโลส (Xylose) เป็นน้ำตาลไม่พบอิสระ แต่พบน้ำตาลในโครงสร้างโพลีแซกคาไรด์ อีกทั้งน้ำตาลในกากชานอ้อยเหล่านี้มักมีองค์ประกอบหลักเป็นพวกสารลิกโนเซลลูโลสซึ่งจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายในสภาพธรรมชาติ (เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ, 2543)

แอคติโนมัยซีท (Actinomycetes)

แอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่สามารถสร้างเส้นใย *(Hyphae)* เป็นสายยาวซึ่งส่วนใหญ่สามารถสร้างได้ทั้งเส้นใยใต้ผิวอาหาร (Substrate mycelium) และเส้นใยเหนือผิวอาหาร (Aerial mycelium) หรืออาจพบเฉพาะเส้นใยใต้ผิวอาหารเป็นแบคทีเรียที่มีปริมาณ Mol %G+C ที่สูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป คือประมาณ 55-78 % โคโลนีของแอคติโนมัยซีทมีลักษณะที่แตกต่างจากโคโลนีของแบคทีเรียอื่น ๆ คือมีลักษณะทึบแสงเส้นใยเหนือผิวอาหารแห้งและมีลักษณะเป็นผงเมื่อมองด้วยตาเปล่า และสามารถสังเกตได้ชัดเจน หรือผิวโคโลนีอาจเรียบคล้ายหนังสัตว์ หรือเป็นรอยย่นเป็นเส้นใยสั้น ๆ สังเกตด้วยตาเปล่าคล้ายกำมะหยี่สามารถสร้างรงควัตถุสีต่าง ๆ เช่น สีขาว เทา เขียว เหลืองส้ม แดง น้ำตาล ชมพู ม่วง และสีดำ เป็นต้น และที่สำคัญแบคทีเรียหลายชนิดในกลุ่ม แอคติโนมัยซีท มีความสามารถในการสร้างสารแอนติไบโอติกที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด เช่น ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย รา ไวรัส โปรโตซัวรวมทั้งสารที่สามารถต้านเซลล์มะเร็ง หรือเซลล์เนื้องอก (Williams et al., 1989) นับว่าเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่มีความสำคัญทางการแพทย์และทางเภสัชกรรมเป็นอย่างมาก (รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์)

ประโยชน์ของแอคติโนแบคทีเรีย

แอคติโนมัยซีทสามารถผลิตสารปฏิชีวนะ เอนไซม์ สารสี หรือสารอื่น ๆ ได้ จากข้อมูลล่าสุดพบว่าสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่สร้างมาจากแอคติโนมัยซีท (45%) เชื้อรา (38%) และแบคทีเรียชนิดอื่น (17%) โดยจุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุดเป็นเชื้อในสกุล Streptomyces ซึ่งผลิตสารปฏิชีวนะได้ 70% (ประมาณ 8,000 ชนิด) ของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอคติโนมัยซีทส์ทั้งหมด (McCarthy and Williams, 1990) เอนไซม์ที่แอคติโนแบคทีเรียสามารถผลิตได้มีหลายชนิดได้แก่ Xylanase, Cellulose, Amylase และ Chitinase เป็นต้น เอนไซม์ Amylase ที่มีคุณสมบัติในการย่อยแป้งแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีหลายจีนัสที่สามารถผลิต Amylase ได้ ได้แก่ *Micromonospora, Nocardia* และ *Streptomyces* (Das, 1996) เอนไซม์ Amylase สามารถนาไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมด้านต่าง ๆ เช่น การลดความหนืดของแป้งในอุตสาหกรรมทอผ้า การเพิ่มหรือการผลิตสารให้ความหวานในอุตสาหกรรมเบียร์ หรือเครื่องดื่ม เป็นต้น ส่วนเอนไซม์ Chitinase ที่มีคุณสมบัติในการย่อยไคตินซึ่งเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ของรา หรือเป็นองค์ประกอบของ Exoskeleton ของพวก Arthropod จีนัสที่สามารถผลิต Chitinase ได้แก่ *Streptomyces* (Dahiya, 2006) เอนไซม์ Chitinase สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ ได้เช่น นำมาทำ Protoplast ของราเพื่อศึกษาองค์ประกอบของผนังเซลล์ของรา การสังเคราะห์สารต่าง ๆ การนำมาเป็น สารควบคุมทางชีวภาพ เช่นใช้ควบคุมราที่ก่อโรคพืช และ การนำมาย่อยสลายของเสียทางอุตสาหกรรมการแช่แข็งอาหารทะเลเป็นการเพิ่มมูลค่าของของเสียในอุตสาหกรรม เป็นต้น สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่ผลิตโดยแอคติโนแบคทีเรียที่มีรายงานในช่วงปี ค.ศ. 2003-2005 แสดงดังตารางที่ 3 และจากการศึกษาของ N. Gopi Reddy และคณะในปี

2011 ที่ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง *Streptomyces rochei* (MTCC 10109) และศึกษาฤทธิ์ Antifungal และ Antibacterial ที่ก่อให้เกิดโรคกลุ่ม *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* พบสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงคือ pH 7.5 และอุณหภูมิ 32°C โดยมี 2% Glycerol และ 1% Peptone เป็นแหล่ง Carbon และ Nitrogen และจากรายงานการศึกษาของ Hotam Singh Chaudhary และคณะในปี 2013 เกี่ยวกับแอคติโนมัยซีทและความสามารถในการผลิตสาร Secondary metabolites พบว่ามีความสำร็จในการนำไปใช้ประโยชน์ทางยา และสารอินทรีย์เคมี และในปัจจุบันพบปัญหาเชื้อดื้อยาพิ่มมากขึ้น ทำให้มีความต้องการสาร Antibiotics ตัวใหม่ ๆ ซึ่งสารที่ได้จากแอคติโนมัยซีทจะเป็นแหล่งที่สามารถผลิตสาร Antibiotics ตัวใหม่ได้ (New bioactive) จากการศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อแอคติโนมัยซีทในดินจากแหล่งต่าง ๆ ได้แก่ Forest, Pasture, Rain-fed และ Irrigated cultivated land ประเทศ Iran และผลของแหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจน ที่มีต่อ Extracellular phosphatase activity แหล่งไนโตรเจนที่ผู้ศึกษานำมาทดลอง ได้แก่ Malt extract, Meat extract, Soybean meal, Arginine, NH_4NO_3, $(NH_4)_2SO_4$, $NaNO_3$ แหล่งคาร์บอนได้แก่ Glucose, Maltose, Lactose, Fructose, Sucrose, Pea flour, Glycerol, Maltodextrine และมีการใช้ Medium SPG, MGA, ISP2, LB+rice bran, Corn starch (Ghorbani-Nasrabadi, R., 2013) และจากการศึกษาของ Sakthi Velayudham, Kasi Murugan ในปี 2012 ที่ศึกษาความหลากหลายและฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกจาก Diverse environments อินเดีย พบว่าสารสกัดจากแอคติโนมัยซีทจะมีฤทธิ์ยับยั้ง *Escherichia coli* (MTCC 739), *Bacillus cereus* (MTCC 1272), *Staphylococcus aureus* (MTCC 1144), *Pseudomonas aeruginosa* (MTCC 1688), *Proteus mirabilis* (MTCC 1425) และ *Klebsiella pneumonia* (MTCC 109) และจากการศึกษาของ (A. B. Arbat, S. N. Zodpe. 2014) พบว่า *Streptomyces* sp. มีฤทธิ์ยับยั้ง Gram +ve bacteria และ *Nocardia* sp., มีฤทธิ์ยับยั้งกลุ่ม Gm –ve bacteria ซึ่งเชื้อทั้งสองสายพันธุ์คัดแยกจาก saline soil และรายงานกล่าวว่าแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกจากดินมีศักยภาพที่จะเป็นแหล่ง Novel antibiotics

ตารางที่ 3 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่ผลิตโดยแอคติโนแบคทีเรีย

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	**แอคติโนแบคทีเรีย**	**กิจกรรมการยับยั้ง**
Abyssomicins	*Verrucosispora sp.*	Antibacterial
Aureoverticillactam	*Streptomyces aureoverticillatus*	Anticancer
Bonactin	*Streptomyces* sp.	Antibacterial; antifungal
Caprolactones	*Streptomyces* sp.	Anticancer
Chandrananimycins	*Actinomadura* sp.	Antialgal; antibacterial; anticancer; antifungal
Chinikomycins	*Streptomyces* sp.	Anticancer
Chloro-dihydroquinones	Novel actinobacteria	Antibacterial; anticancer
Diazepinomicin	*Micromonospora sp.*	Antibacterial; anticancer; antiflammatory
3, 6-disubstituted indoles	*Streptomyces* sp.	Anticancer

ตารางที่ 3 (ต่อ)

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	แอคติโนแบคทีเรีย	กิจกรรมการยับยั้ง
Frigocyclinone	*Streptomyces griseus*	Antibacterial
Gutingimycin	*Streptomyces* sp.	Antibacterial
Helquinoline	*Janibacter limosus*	Antibacterial
Himalomycins	*Streptomyces* sp.	Antibacterial
Komodoquinone A	*Streptomyces* sp.	Neuritogenic activity
Lajollamycin	*Streptomyces nodosus*	Antibacterial
Marinomycins	*Marinispora*	Antibacterial; anticancer
Mechercharmycins	*Thermoactinomyces sp.*	Anticancer
Salinosporamide A	*Salinispora tropica*	Anticancer
Sporalides	*Salinispora tropica*	Unknown biological activity
Trioxacarcins	*Streptomyces* sp.	Antibacterial; anticancer; antimalarial

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มีการศึกษาวิจัยในเรื่องกรดไขมันในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ เพิ่มมากขึ้น สิ่งมีชีวิตที่นำมาศึกษามีทั้งพืช สัตว์และจุลินทรีย์ โดยพบองค์ประกอบกรดไขมันในตัวอย่างที่ศึกษาโดยส่วนมากมีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ C16-18 ตัว กรดไขมันที่พบมากที่สุดคือ Palmitic acid (C16:0), Stearic acid (C18:0), และ Linolenic acid (C18:3) เป็นต้น (วิเชษฐ์ ลีลามานิตย์, 2540) ในการศึกษาปริมาณกรดไขมันที่พบในจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ นั้นจะพบกรดไขมันต่างชนิดมากน้อยแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ โดยมีรายงานว่าจุลินทรีย์พวกโปรคารีโอต ได้แก่ แบคทีเรียและไซยาโนแบคทีเรีย และพวกยูคารีโอต ได้แก่รา โปรโตซัว และสาหร่าย จะมีองค์ประกอบของกรดไขมันต่างกัน โดยแบคทีเรียต่าง ๆ นั้นจะพบว่ามีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัว Oleic acid (C18:1) อยู่เป็นจำนวนมาก และในแบคทีเรียบางชนิดจะพบ EPA ประกอบอยู่ด้วย (Dennis, 1993) กรดไขมันนอกจากมีประโยชน์ด้านการแพทย์แล้ว ยังมีประโยชน์ในการใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานด้านการจัดจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตอีกด้วย โดยใช้องค์ประกอบกรดไขมันเป็นตัวจำแนก (พนิดา พงศ์ภาณุมาพร, 2543) การใช้องค์ประกอบกรดไขมันในการจำแนกเชื้อจุลินทรีย์นั้น มีใช้กันอย่างกว้างขวางทั้งในเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์และรา และยังมีประโยชน์ในการแยกความแตกต่างของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) ที่คล้ายกันมากออกจากกันได้ และ จากรายงาน Zaky AS และคณะ (2014) กล่าวว่า Marine yeasts มีความเฉพาะที่หลากหลายมากกว่า Terrestrial yeasts เช่น Osmosis tolerance, Special chemical productivity และ Production of industrial enzymes และ Marine yeasts มีศักยภาพที่ดีมากเหมาะแก่การนำไปพัฒนาในหลากหลายอุตสาหกรรม เช่น Bioethanol, Pharmaceutical และ Enzyme production

จากความสัมพันธ์ระหว่างฟองน้ำและแบคทีเรียที่อาศัยในฟองน้ำซึ่งเป็นความสัมพันธ์ที่ก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์งานวิจัยจำนวนมากเกี่ยวกับสิ่งมีชีวิตทั้งสองชนิดนี้ เช่น สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดของแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค เป็นต้น จากประสิทธิภาพของฟองน้ำและแบคทีเรียที่อาศัยในฟองน้ำทางด้านเภสัชภัณฑ์ ทำให้เกิดสิ่งที่น่าสนใจในด้านการนำมาใช้ประโยชน์ทางการเพาะเลี้ยงแพลงก์

ตอนสัตว์เพื่อลดต้นทุนการเพาะเลี้ยง กล่าวคือเมื่อสกัดสารจากฟองน้ำธรรมชาติ และจากแบคทีเรียที่อาศัยในฟองน้ำแล้วทราบถึงชนิดและปริมาณกรดไขมันที่จำเป็นต่อสัตว์น้ำวัยอ่อน และแบคทีเรียใดที่สามารถสังเคราะห์กรดไขมันที่จำเป็นสำหรับสัตว์น้ำวัยอ่อนได้ดี โดยเฉพาะกรดไขมันกลุ่ม PUFA เช่น 20:5 n-3 และ 22:6 n-3 เป็นต้น ข้อมูลที่ได้สามารถนำไปเป็นประโยชน์ด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำหรือแพลงก์ตอนสัตว์ชนิดอื่นเช่น โรติเฟอร์ หรือลูกหอยวัยอ่อน ซึ่งการนำไปใช้อาจเป็นการเลี้ยงด้วยแบคทีเรียชนิดเดียวหรือเลี้ยงเสริมกับอาหารชนิดอื่น มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการศึกษากรดไขมันในแบคทีเรียและการนำแบคทีเรียไปใช้ประโยชน์มาการเพาะเลี้ยง ซึ่งผลการศึกษามีความหลากหลายแตกต่างกันดังนี้

Brown, et al (1996) ศึกษาองค์ประกอบคุณค่าทางอาหารของแบคทีเรียทะเล 7 ชนิด ได้แก่ *Aeromonas* sp. ACM 4771 *Derxia* sp. ACM 4771 *Derxia* sp. ACM 4772 *Derxia* sp. ACM 4773 *Methylophilus methylotrophus* NCIB 10515 *Pseudomonas testosteroni* ACM 4768 *Pseudomonas testosteroni* ACM 4769 *Pseudomonas* sp. ACM 4770 และยีสต์ 6 ชนิด *Debaryomyces hansenii* ACM 4784 *Dipodascus capitatus* ACM 4779 *Dipodascus* sp. ACM 4780 *Dipodascus* sp. 4778 *Dipodascus* sp. ACM 4781 *Dipodascus* sp. ACM 4782 เพื่อใช้เป็นอาหารของลูกหอยวัยอ่อน โดยเปรียบเทียบผลกับยีสต์ 2 ชนิดที่ใช้กันทั่วไปคือ *Candida utilis* ACM 4774 *Saccharomyces cerevisiae* ACM 4775 ผลการศึกษาพบว่าทั้งยีสต์และแบคทีเรียมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก (25-49 % น้ำหนักแห้ง) มีไขมันเป็นองค์ประกอบ 2.5-11 5 % น้ำหนักแห้ง) และทั้งยีสต์และแบคทีเรียไม่มี กรดไขมัน 20:5 n-3 และ 22:6 n3 ซึ่ง Brown ได้สรุปว่าสามารถนำยีสต์และแบคทีเรียมาใช้เป็นอาหารได้โดยนำมาเป็นส่วนผสมของอาหารที่ให้

Leonardos and Lucas (2000) อ้างถึง Yasuda and Taga (1980) Intriago and Jone (1993) รายงานถึงการใช้แบคทีเรียเป็นอาหารสัตว์น้ำว่าแบคทีเรียบางชนิดเมื่อใส่ร่วมกับแพลงก์ตอนพืชที่ใช้เลี้ยงสัตว์น้ำวัยอ่อน (อาร์ทีเมีย) ทำให้สัตว์น้ำวัยอ่อนมีการเจริญเติบโตดีขึ้นมากกว่าเลี้ยงด้วยแพลงก์ตอนพืชอย่างเดียว นอกจากนี้ Douillet and Langdon (1993, 1996) ได้ทดลองเลี้ยงลูกหอย *Crassostrea gigas* พบว่าแบคทีเรียชนิด axenic ที่มีในระบบเลี้ยงลูกหอยทำให้ลูกหอยมีการเจริญเติบโตดีขึ้น อ้างโดย Leonardos and Lucas (2000)

Intriago and Jone (1993) ทดลองเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยอาหารที่มีแบคทีเรีย Flexibacter 18 mg/l เป็นส่วนผสมร่วมกับครอเลสเตอรอล 100mg/l และ 500mg/l และเลี้ยงร่วมกับ 5 cells/ml of Rhodomonas (0.25, 0.5, 2.5mg/l) เปรียบเทียบกับเลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่มีแบคทีเรีย Flexibacter เป็นส่วนผสม ได้แก่10 cells/ml แพลงก์ตอนพืช (0.50mg/l), 20 cells/ml แพลงก์ตอนพืช (1.0mg/l), 50 cells/ml แพลงก์ตอนพืช (2.50 mg/l), 100 cells/ml แพลงก์ตอนพืช (5.00mg/l) และเปรียบเทียบกับการเลี้ยงด้วยแบคทีเรีย Flexibacter strain Inp3 18 mg/l อย่างเดียว พบว่าสามารถเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยแบคทีเรีย Flexibacter strain Inp3 อย่างเดียวได้โดยที่ได้อัตราการรอดตายมีความแตกต่างกันเล็กน้อย แต่น้ำหนักแห้งและความยาวแตกต่างกัน อาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยแบคทีเรีย Flexibacter ร่วมกับแพลงก์ตอนพืช 50 cells/ml มีการเจริญเติบโตดีที่สุด และอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยแบคทีเรีย Flexibacter ร่วมกับแพลงก์ตอนพืช 100 cells/ml มีกรดไขมันที่จำเป็นสำหรับสัตว์น้ำวัยอ่อน PUFA มากที่สุด และสรุปว่าแบคทีเรียไม่ใช่เป็นอาหารเพียงอย่างเดียวแต่ยังช่วยในการย่อยแพลงก์ตอนพืชด้วย

Nichols and McMeekin (2002) ศึกษาแบคทีเรียที่สามารถผลิต Polyunsaturated fatty acids เพื่อใช้เป็นดัชนีชี้วัดทางชีววิทยา พบว่าแบคทีเรียกลุ่ม Shewanella และ Colwellia สามารถผลิต EPA ได้ เช่น 20:4 n-3 และ 22:6 n-3 แต่แบคทีเรียไม่ทุกชนิดที่สามารถผลิตกรดไขมันได้

Nichols (2003) ทบทวนรายงานการวิจัยในช่วง 16 ปีที่ผ่านมาถึงการกระจายและความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียที่ผลิต PUFA ได้ ในสภาวะแวดล้อมทางทะเล พบว่าแบคทีเรียที่สามารถผลิต PUFA อยู่ในสกุล Shewanella, Colwellia, Moritella, Pseudomonas, Psychoroflexus และ Photobacterium ซึ่งพบในลำไส้ปลิงทะเล ทะเลน้ำแข็งแอนตาร์ติก ตะกอนดิน หอย ต่อมหมึกของปลาหมึก ในทะเลลึกและในน้ำทะเลประเทศญี่ปุ่น นอกจากนี้ได้สรุปถึงบทบาทของแบคทีเรียในสภาวะแวดล้อมทางทะเล พบว่ามี 2 อย่าง ได้แก่ เป็นแหล่งของอาหารขั้นต้นของสัตว์กินเนื้อ สัตว์หน้าดิน สัตว์ที่กินอาหารโดยวิธีการกรอง และ เป็นส่วนประกอบของชุมชนสัตว์ทะเล นอกจากนี้ยังรายงานเพิ่มเติมว่าสิ่งมีชีวิตเล็ก ๆ ในทะเลหลายชนิดไม่สามารถสังเคราะห์กรดไขมัน n-3 polyunsaturated (PUFA) ได้ ต้องอาศัยจากอาหารที่กินเท่านั้น

Shirasakawa, et al (1995) ศึกษาเชื้อ *Shewanella putrefaciens*, *Marinomonas comunis, Enterobacter agglomerans, Pseudomonas fluorescens*, ในลำไส้ปลาทะเลพบว่าเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้สามารถผลิตกรดไขมันชนิด Furan-ring และจากการศึกษาของ Srivibool and Jarikhuab ในปี 2007. กล่าวว่ายีตส์ทะเลเป็นแหล่งทางเลือกใหม่สำหรับกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว โดยพบกรดไขมัน DHA 1.19 mg/g dry wt. จากตัวอย่างยีสต์ที่คัดแยกจากน้ำทะเลจากเกาะเต่า จังหวัดระยอง

Doumenq, et al. (1999) ศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อม ได้แก่ชนิดแหล่งคาร์บอน อุณหภูมิ ระยะการเจริญเติบโตและการให้และไม่ให้ออกซิเจนต่อองค์ประกอบกรดไขมันของเชื้อแบคทีเรีย Denitrifying marine, *Pseudomonas nautica* strain IP 617 โดยใช้ n-eicosane, Sodium acetate และ Rich medium เป็นแหล่งคาร์บอน และควบคุมอุณหภูมิที่ 13°C, 20°C และ 30°C ผลการศึกษาสามารถแบ่งตามลำดับความสำคัญต่อการผลิตกรดไขมันดังนี้ แหล่งคาร์บอน อุณหภูมิ ระยะการเจริญเติบโต ออกซิเจน ความแตกต่างระหว่างแหล่งคาร์บอน n-eicosane (nC20) กับอีก 2 ชนิด คือมีทั้งกรดไขมันอิ่มตัว กรดไขมันแบบมีกิ่งก้าน (20:1 n-9, 20:0) และ 10 Methyl branched series) ส่วนผลของอุณหภูมิต่อ *Pseudomonas nautica* strain IP 617 พบว่ามีกระบวนการ Acyl chain length thermoregulation ของกรดไขมัน Monounsaturated ซึ่งเป็นกรดไขมันหลัก ซึ่งมีผลให้เมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นมีผลต่ออัตราส่วนของ C18:1/16:1 เพิ่มขึ้น ส่วนผลของระยะการเจริญเติบโตและการให้ออกซิเจนไม่มีความแตกต่างกันต่อการผลิตกรดไขมัน

Mei, et al., (2010) ศึกษากรดไขมันในยีสต์ *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a ที่แยกจากผิวของปลาทะเลที่มีปริมาณไขมันมาก จากการย่อยของแป้งมันสำปะหลังของยีสต์ *R. mucilaginosa* ในอาหารเลี้ยงยีสต์แบบหมักไม่ต่อเนื่อง (Batch fermentation) พบว่า มีการให้ผลผลิตของกรดไขมันร้อยละ 47.9 โดยมวล ในขณะที่การย่อยของแป้งมันสำปะหลังของยีสต์ *R. mucilaginosa* ในอาหารเลี้ยงยีสต์แบบหมักกะ (Fed - batch fermentation) พบกรดไขมันร้อยละ 52.9 โดยมวล และผู้วิจัยสรุปว่า ยีสต์ที่มาจากทะเล *R. mucilaginosa* TJY15a ส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดไขมันปาล์มิติก (Palmitic acid, C16:0), กรดไขมันปาล์มิโตเลอิก (Palmitoleic acid, C16:1n7), กรดไขมันสเตียริก (Stearic acid, C18:0), กรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9) และกรดไขมันไลโนเลอิก (Linolenic acid, C18:2n6)

Gutierrez and Da Silva (1993) ศึกษาไขมัน และองค์ประกอบของกรดไขมันของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* M-300A และ *Saccharomyces uvarum* IZ-1904 ที่เจริญในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีกรดไขมันชนิดกรดไขมันไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6) สูงสุด ประมาณร้อยละ 42 ของกรดไขมันทั้งหมด กรดไขมันที่พบรองลงมาคือ กรดไขมันปาล์มิติก (Pamitic acid, C16:0) กรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9) และพบกรดไขมันแอลฟาไลโนเลนิก (**α** - Linolenic acid, C18:3n3) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดลิปิดที่ได้นั้นมีปริมาณ 1.02 - 3.13 กรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักแห้ง ขึ้นอยู่กับชนิดของกากน้ำตาลและสายพันธุ์ของยีสต์

Evans and Ratledge (1992) ศึกษาอาหารที่ใช้เลี้ยงยีสต์ และองค์ประกอบของกรดไขมันในยีสต์ *Candida curvata* โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการศึกษาคือ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลแลคโตส และเอทานอล พบว่ายีสต์ *C. curvate* สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์มากที่สุดในแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลแลคโตส รองลงมาคือ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส และเอทานอล ตามลำดับ พบว่ากรดไขมันจากยีสต์ *C. curvata* ที่เลี้ยงในแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลไซโลส ผลิตกรดไขมันอิ่มตัวชนิดกรดไขมันปาล์มิติก (Palmitic acid, C16:0) และกรดไขมันสเตียริก (Stearic acid, C18:0) สูงที่สุด แต่กลับให้กรดไขมันไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6) ที่เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวน้อยที่สุด ตรงกันข้ามกับยีสต์ที่เลี้ยงในแหล่งคาร์บอนที่เป็นเอทานอล ที่ผลิตกรดไขมันอิ่มตัวชนิดกรดไขมันปาล์มิติก (Palmitic acid, C16:0) น้อยที่สุด และผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดกรดไขมันไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6) สูงที่สุด

Anamnart et al., (2004) การศึกษาถึงองค์ประกอบของกรดไขมันในยีสต์ *Hansenulo polymorpha* CBS 1976 ที่เลี้ยงในอุณหภูมิ 20, 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่ายีสต์ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิสูงมีปริมาณของกรดไขมันอิ่มตัวเพิ่มขึ้นสูงกว่ายีสต์ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำ ส่วนยีสต์ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงกว่ายีสต์ที่เลี้ยงในอุณหภูมิสูง ยีสต์ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ผลิตกรดไขมันปาล์มิติก (Pamitic acid, C16:0) และกรดไขมันสเตียริก (Stearic acid, C18:0) สูงที่สุด ส่วนยีสต์ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดกรดไขมัน ไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6) และกรดไขมันแอลฟาไลโนเลนิก (**α** – Linolenic acid, C18:3n3) สูงที่สุดเนื่องจากเซลล์ของยีสต์ต้องรักษาความยืดหยุ่นของเยื่อหุ้มเซลล์ให้เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตในแต่ละอุณหภูมิ

Montet et al., (1985) ทำการเลี้ยงยีสต์ *Candida lipolytica* YB 423 - 12 ในอาหารเลี้ยงเชื้อวายเอนบี (Yeast nitrogen base, YNB) ปริมาตร 6.7 กรัมต่อลิตร และใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นกรดไขมันในรูปสบู่แอมโมเนียของน้ำมันเรพลีต และน้ำมันปาล์มในปริมาณร้อยละ 0.5 น้ำหนักต่อปริมาตร โดยพบว่าปริมาณไขมันที่ได้สูงกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน 4 - 8 เท่า อีกทั้งองค์ประกอบกรดไขมันในเซลล์ยีสต์เป็นชนิดเดียวกับชนิดกรดไขมันจากแหล่งคาร์บอนที่เติมลงไปกล่าวคือ ยีสต์ *C. lipolytica* สามารถเจริญในอาหารที่มีไขมัน และนำไขมันไปสะสมไว้ภายในเซลล์ได้มากกว่าเชื้อที่เลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคสอย่างเดียว

มนูเทพ กนกศิลป์ (2550) ศึกษาปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตไขมันของยีสต์ *Rhodotorula gracilis* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM พบว่า พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของยีสต์คือ 6.0 โดยให้น้ำหนักแห้ง 1.44 กรัมต่อลิตร (ของอาหารเลี้ยงเชื้อ) ในที่ 72 ชั่วโมง แต่มีการสะสมไขมันต่ำคือ เพียงร้อยละ 9.3 (ของน้ำหนักแห้ง) ขณะที่พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 5.5 เป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันโดยให้น้ำหนักแห้ง 0.83 กรัมต่อลิตร (ของอาหารเลี้ยงเชื้อ) และมีการสะสมไขมันสูงถึงร้อยละ 16.7 อย่างไรก็ตาม ยีสต์ที่เจริญในอาหาร YM ที่มีพีเอช 5.5 และ 6.0 และเลี้ยงในสภาวะขาดแหล่งไนโตรเจน ต่างก็สามารถเพิ่มการสะสมไขมันสูงขึ้นเป็นร้อยละ 23 และการสะสมไขมันนี้จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วใน 7 ชั่วโมงแรกของการเกิดสภาวะขาดแหล่งไนโตรเจน สำหรับยีสต์ที่เลี้ยงการเจริญในอาหารที่จำกัดปริมาณไนโตรเจน เซลล์ยีสต์จะเริ่มสะสมไขมันเพิ่มขึ้นขณะที่การเจริญเข้าสู่ Stationary phase การเติมแหล่งไนโตรเจน หลังจากเลี้ยงเซลล์ที่ 32 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาที่เซลล์เริ่มเข้าสู่ Stationary phase ไม่สามารถเพิ่มการเจริญหรือเพิ่มการสะสมไขมันได้ เมื่อเลี้ยงเซลล์ต่อไปที่ 72 ชั่วโมง เซลล์ที่ได้มีน้ำหนักแห้ง 1.10 กรัมต่อลิตร และมีการสะสมไขมันร้อยละ 16.1

Christophe et al., (2012) การเปรียบเทียบองค์ประกอบกรดไขมันของพืชผลิตน้ำมัน เช่น น้ำมันจากเมล็ดคาโนล่า (Rapeseed Oil), ปาล์มน้ำมัน (Oil palm), น้ำมันจากเมล็ดทานตะวัน (Sunflower) และ

จุลินทรีย์ในยีสต์ *Rhodoturula* sp., *Rhodosporidium* sp., *Yarrowia* sp., *Lipomyces* sp., *Trichosporon* sp. และ *Cryptococcus* sp. เป็นต้น โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลกลูโคส พบว่ายีสต์ดังกล่าวสามารถผลิตกรดไขมันได้ทั้งกรดไขมันชนิดอิ่มตัวและกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว คล้ายคลึงกับพืชผลิตน้ำมัน กรดไขมันอิ่มตัวที่พบคือ กรดไขมันปาล์มิติก (Palmitic acid, C16:0), และกรดไขมันสเตียริก (Stearic acid, C18:0) เป็นต้น และกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่พบคือ กรดไขมันปาล์มิโตเลอิก (Plamitoleic acid, C16:1n7), กรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9), กรดไขมันไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6) และกรดไขมันไลโนเลนิก (Linolenic acid, C18:3n3) จุลินทรีย์กลุ่มยีสต์มีองค์ประกอบกรดไขมันไม่แตกต่างจากพืชน้ำมันแต่ปริมาณกรดไขมันที่พบขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์กลุ่มยีสต์นั้น ๆ ซึ่งยีสต์ *Trichosporon* sp. ผลิตกรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9) ร้อยละ 57 ของกรดไขมันทั้งหมด ไม่แตกต่างจากน้ำมันจากเมล็ดคาโน่ล่า ผลิตกรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9) ร้อยละ 56 - 64 ของกรดไขมันทั้งหมด เป็นต้น

อิงสุรัจจ์ สังข์เงิน และชนิดาภา ยิ่งประยูร (2554) ศึกษาองค์ประกอบกรดไขมันในยีสต์ BS 1-2 และเชื้อยีสต์ BS 6-2 ที่ทำการคัดแยกได้จากน้ำทะเลบริเวณชายหาดบางแสนในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยในน้ำกลั่น อาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยที่มีความเค็ม 30 พีพีที อาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยที่มีความเค็ม 30 พีพีที ที่กรองกากชานอ้อยก่อนนำเข้าเครื่องหม้อนึ่งความดันอัตโนมัติ และอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยที่มีความเค็ม 30 พีพีที ที่กรองก่อนกากชานอ้อยหลังนำออกจากเครื่องหม้อนึ่งความดันอัตโนมัติ ผลการศึกษาพบว่าจำนวนเซลล์ของยีสต์ BS 1-2 และยีสต์ BS 6-2 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยทั้ง 4 ชนิด มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นสูงที่สุดที่ 72 ชั่วโมง และวิธีการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยที่มีความเค็ม 30 พีพีที ที่กรองกากชานอ้อยก่อนนำเข้าเครื่องหม้อนึ่งความดันอัตโนมัติให้จำนวนเซลล์สูงสุด ยีสต์ BS 6-2 มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 2.4×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และยีสต์ทั้งสองชนิดที่เลี้ยงเป็นระยะเวลาที่ 72 ชั่วโมง ซึ่งมีกรดไขมันชนิดกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวเป็นองค์ประกอบสูงสุด ร้อยละ 43.78 ± 0.15 และร้อยละ 40.66 ± 0.35 ของกรดไขมันทั้งหมดตามลำดับ ชนิดของกรดไขมันที่พบมาก คือ กรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9) สูงที่สุด รองลงมาคือ กรดไขมันปาล์มิติก (Palmitic acid, C16:0) และกรดไขมันไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6) ตามลำดับ

Andreishcheva et al., (1999) ศึกษายีสต์ *Yarrowia lipolytica* ที่เลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.01, 1.5, 3, 4, 5, 6 และ 9 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Basel medium ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของเกลือที่แตกต่างกันมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงขนาด รูปร่าง และระดับกลีเซอรอลภายในเซลล์ยีสต์ ความเข้มข้นของเกลือที่ระดับร้อยละ 6 และ 9 มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของกรดไขมันปาล์มิติก (Palmitic acid, C16:0), กรดไขมันปาล์มิโตเลอิก (Plamitoleic acid, C16:1n7) และกรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9) และการลดลงของกรดไขมันสเตียริก (Stearic acid, C18:0) และกรดไขมันไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6)

Martina et al., (2004) ทำการเลี้ยงยีสต์ชนิดชอบความเค็ม (Halophilic) กลุ่ม *Hortaea werneckii* และ *Phaeotheca triangularis* และชนิดทนความเค็ม (Halotolerant) *Aureobasidium pullulans* ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0, 0.5, 10, 17, 25 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ YNB ที่มียีสต์สกัด 1.7 กรัม ไนโตรเจน 0.8 กรัม $(NH_4)_2SO_4$ 5 กรัม และกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และพีเอชอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 การบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ผลการศึกษาพบว่ายีสต์กลุ่ม *H. werneckii* และ *P. triangularis* มีการเจริญที่ดี และมีกรดไขมันปาล์มิติก (Palmitic acid, C16:0), กรดไขมันสเตียริก (Stearic acid, C18:0), กรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9) และ กรดไขมันไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6) โดยพบกรดไขมันสเตรียริก (Stearic acid, C18:0) และกรดไขมันโอเลอิก (Oleic

acid, C18:1n9) สูงสุด ร้อยละ 24 และ 25 ของกรดไขมันทั้งหมด ในยีสต์ *H. werneckii* และ *P. triangularis* ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 25 ส่วนยีสต์กลุ่ม *A. pullulans* มีการเจริญที่ดี และมีกรดไขมันปาล์มิติก (Palmitic acid, C16:0), กรดไขมันสเตียริก (Stearic acid, C18:0), กรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9) และกรดไขมันไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6) โดยพบกรดไขมันไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6) สูงสุด ร้อยละ 50 ของกรดไขมันทั้งหมด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 10

จากการศึกษาผลของความค็มและความเป็นกรดด่างต่อผลผลิต ของ ยีสต์ *Debaryomyces hansenii* (S8) *Debaryomyces hansenii* (S100), *Candida sake* (S165) และ *Candida tropicalis* (S186). โดยใช้ Molasses เป็นแหล่งคาร์บอน เปรียบเทียบกับ Glucose, Sucrose และ Rice water พบสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญที่ pH 6 ความเค็ม 30 ppt เหมาะกับยีสต์ S8 & S186 ความเค็ม 25 ppt เหมาะกับยีสต์ S100 20 ppt เหมาะกับยีสต์ S165 ยีสต์ทั้งสี่สายพันธ์เจริญได้ดีที่สุด โดยใช้ Molasses (ปริมาณน้ำตาล 9mg/ml) เป็นอาหารเสริมกับ Peptone (0.75%), Yeast extract (0.5%) และ $MgSO_4$ (0.25%) (Sarlin and Phillp, 2013)

จากรายงานของ Wasu Pathom-aree และคณะ (2014) ที่ทำการศึกษาอนุกรมวิธานของแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกจากดินบริเวณ Mariana Trench พบ *Williamsia muralis*. เป็นแอคติโนมัยซีทชนิดใหม่ พบ Oleic, Palmitic และ Tuber culostearic acids และ Hexadecenoic acid เป็นกรดไขมันหลักใน Cellular fatty acids (Wasu Pathom-aree et al., 2014) และจากรายงานของ C. Y. H wang และคณะ (2015) ที่ทำการศึกษาพบแอคติโนมัยซีท *Rhodococcus rhodnii, Rhodococcus aetherivorans* และ *Rhodococcus ruber* ที่แยกจากน้ำฝน Bering Sea พบว่าเซลล์เจริญดีที่สุดที่ 25 °C และที่ pH 6.5–7.0 ในสภาวะ เกลือทะเล (Sea salts) 0–2% (w/v) พบ iso-$C_{16:0}$, $C_{17:1}$**ω**8*c* and 10-methyl $C_{17:0}$ เป็นกรดไขมันหลักใน Cellular fatty acids (C. Y. Hwang et al, 2015) และจากการศึกษาของ Zhi Huang และคณะพบแอคติโนมัยซีท *Arthrobacter woluwensis* (98.4% sequence similarity), *Arthrobacter humicola* (97.5%), *Arthrobacter globiformis* (97.4%), *Arthrobacter oryzae* (97.3%) and *Arthrobacter cupressi* (97.0%). ที่คัดแยกจากดินในป่า Nanjing, Jiangsu ประเทศจีน พบ anteiso-$C_{15:0}$, anteiso-$C_{17:0}$ และ iso-$C_{15:0}$ เป็นกรดไขมันหลักใน Cellular fatty acids โดยมีสภาวะการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °C, pH 7.0 และ 3% NaCl (w/v). (Zhi Huang et al, 2015). จากรายงานของ Gaiyun Zhang และคณะ (2015) พบแอคติโนมัยซีทตัวใหม่ *Nesterenkonia alkaliphila* sp. ที่แยกจากดินตะกอนในทะเลลึกของมหาสมุทรแปซิฟิคฝั่งตะวันตก พบสภาวะที่เหมาะสมการเลี้ยงอยู่ที่อุณหภูมิ 40 °C, pH 9.0 และ 1% (w/v) NaCl พบ anteiso-$C_{17:0}$ (50.9%) and anteiso-$C_{15:0}$ (29.8%) เป็นกรดไขมันหลัก โดยพบไขมันในสายพันธุ์ เป็นชนิด F10^{T}เป็น Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylglycerol, Phosphatidylinositol, Unknown glycolipids 2 ชนิด และ Unknown lipids 2 ชนิด (Gaiyun Zhang et al., 2015) มีรายงานการวิจัยที่ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงแอคติโนมัยและแบคทีเรีย/ยีสต์ อย่างแพร่หลาย ซึ่งแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของสาร Secondary metabolites เหล่านี้ ในการวิจัยนี้มุ่งเน้นที่ศึกษาชนิดของไขมัน และองค์ประกอบของอาหารที่อยู่ในยีสต์ หรือแบคทีเรียทะเล/แอคติโนมัยซีท ซึ่งรูปแบบของไขมันและกรดไขมัน ที่ได้จะเป็นข้อมูลเพื่อนำไปพัฒนารูปแบบการเพาะเลี้ยงให้ได้ปริมาณมาก และใช้ประกอบในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อเสริมสุขภาพสำหรับมนุนย์ ตลอดจนพัฒนาเป็นสารกระตุ้นภูมิสำหรับสัตว์น้ำ อันจะเป็นทางเลือกใหม่ของอุตสาหกรรม ยา อาหาร และการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

สารเคมี

Methanol, AR grade	BDH, England
Chloroform, AR grade	BDH, England
n-Hexane, AR grade	Merck, Germany
Sulfuric acid, AR grade	Merck, Germany
Butylated hydroxytoluene (BHT), AR grade	Sigma, USA
Potassium chloride, AR grade	Merck, Germany
Sodium chloride, AR grade	Merck, Germany
Potassium hydrogen carbonate, AR grade	Fluka, Switzerland
Sodium sulfate anhydrous, AR grade	Merck, Germany

สารมาตรฐานกรดไขมัน Supelco 37-Component FAME Mix Supelco, USA

แก๊สฮีเลียม

แก๊สไฮโดรเจน

แก๊สไนโตรเจน

Air zreo

เครื่องมือและอุปกรณ์

Gas Chromatograph Agilent Technologies 7820A GC system, ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง Sartorius laboratory balance, ประเทศเยอรมัน

Hot air oven Yamato, Japan

คอลัมน์กรดไขมัน HP - INNOWAX เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร เคลือบด้วย Polyethylene glycol หนา 0.25 ไมโครเมตร ความยาว 30 เมตร: ประเทศสหรัฐอเมริกา

กรวยแยกขนาด 2000 ml, 100 ml

ขวดลดปริมาตร/หลอดลดปริมาตร

ออโตเมติกปิเปต (Automatic pipette): Boeco, ประเทศเยอรมัน

เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigrated centrifuge): TOMY SEIKO, ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องวิเคราะห์โปรตีน KJELTC SYSTEM ยี่ห้อ Foss TECATOR, ประเทศสวีเดน

เครื่องวิเคราะห์ปริมาณไขมัน: ยี่ห้อ Foss Soxtec 2043, ประเทศสวีเดน

เตาเผาอุณหภูมิสูง Furnace Valcan A550

วิธีการทดลอง

การเตรียมหัวเชื้อยีสต์

เตรียมหัวเชื้อยีสต์ *Pichia* sp. (BS 6-2) ที่แยกได้จากน้ำทะเลบริเวณชายหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี ได้รับการจำแนกชนิดโดย คุณรัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรีโดยการเขี่ยหัวเชื้อยีสต์จากอาหารเลี้ยงเชื้อ YM medium แบบเหลว จากนั้นปิเปตหัวเชื้อ 1, 000

ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM medium ที่มีปริมาตร 20 มิลลิลิตรจากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เพื่อให้ได้ ค่าการดูดกลืนแสงของหัวเชื้อที่เตรียมมีค่าเท่ากับ 0.2

การเตรียมวัตถุดิบ

กากชานอ้อยจากตลาดแหลมแท่น อำเภอแสนสุข จังหวัดชลบุรี ตัดกากชานอ้อยให้เป็นชิ้นลูกเต๋าขนาดใกล้เคียงกัน โดยใช้อัตราส่วนของ กากชานอ้อย 1 กรัม ต่อน้ำทะเลเทียม (Artificial Sea Water) 10 มิลลิลิตร ที่ระดับความเค็ม 25 พีพีที น้ำทะเลเทียม (Artificial Sea Water) องค์ประกอบและวิธีการเตรียมน้ำทะเลเทียม (แสดงในภาคผนวก ก)

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากกากชานอ้อยในน้ำทะเลเทียม (Artificial Sea Water) 25 พีพีที

ทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และทำการกรองกากชานอ้อยออก 3 ครั้ง (กรองด้วยบุชเนอร์ ตามด้วยผ้าขาวบาง และสุดท้ายกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอน ก่อนนำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันอัตโนมัติ องค์ประกอบและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (แสดงในภาคผนวก ก)

การเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อย ที่ระดับความเค็ม 25 พีพีที

นำหัวเชื้อยีสต์ที่เตรียมไว้ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดฝาเกลียว ขนาด 1, 000 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยปริมาตร 500 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) เก็บตัวอย่างที่ 72 ชั่วโมง

การเตรียมตัวอย่างยีสต์

นำตัวอย่างเซลล์ยีสต์ ที่ได้จากการเลี้ยงมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 2, 500 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง หลังจากนั้นทำการล้างเซลล์ยีสต์ จำนวน 2 ครั้ง ด้วยสารละลาย 0.85 เปอร์เซ็นต์ Normal saline (NaCl) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยง จากนั้นเทส่วนใสทิ้งก่อนนำเซลล์ยีสต์ไปสกัดไขมันและกรดไขมัน

การเตรียมตัวอย่างแอคติโนมัยซีท

แยกเชื้อจากดินตะกอนชายฝั่ง /ป่าชายเลน โดยใช้ Selective medium 2 ชนิด (Mineral Agar Guase I (MAG1)และ Starch Casein Agar แยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ก่อนนำมาเลี้ยงให้เจริญและสร้างสปอร์บนจานเพาะเชื้อ ในอาหารเหลว ISP2 (มีน้ำทะเล 25-30%) บ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 7-14 วัน แล้วเก็บเซลล์ด้วยวิธีปั่นเหวี่ยง ล้างด้วย Nornal saline เก็บเซลล์ เพื่อตรวจวิเคราะห์ชนิดกรดไขมัน วิธีการเดียวกับเซลล์ยีสต์

การวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณกรดไขมันด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟ

ขั้นตอนการวิเคราะห์กรดไขมันแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ขั้นตอนการสกัดไขมันในตัวอย่าง (Folch et al., 1957) และขั้นตอนการทำทรานเอสเทอริฟิเคชั่นด้วยกรด (Acid - catalysed transesterification) หลังจากนั้นนำไปวัดปริมาณกรดไขมันด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (ดัดแปลงวิธีของ Christie, 2003)

การสกัดไขมันในตัวอย่าง

1. ชั่งตัวอย่างเซลล์เปียก ในบีกเกอร์ 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายผสมคลอโรฟอร์ม : เมทานอล (2: 1) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่ผสม BHT 0.01 เปอร์เซ็นต์ นำไปสกัด ด้วยเครื่องอัลตร้าโซนิคเป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนบนใส่กรวยแยก และทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง นำสารละลายที่ได้นำมารวมกันในกรวยแยก ในส่วนของน้ำเลี้ยงสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม

2. เติมสารละลาย 0.88 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมคลอไรด์ ปริมาณ 1 ใน 4 ของปริมาตร สารละลายที่แยกได้จากการสกัด (12.5 มิลลิลิตร) ปิดฝากรวยแยก เขย่าประมาณ 1 นาที ปล่อยไว้ให้แยกชั้น

3. ชั่งน้ำหนักฟลาสก์ก้นกลม เทสารละลายชั้นล่างลงในฟลาสก์ก้นกลมผ่านกรวยแก้วที่บรรจุโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส เพื่อดูดความชื้น

4. นำสารละลายในฟลาสก์ก้นกลมไประเหยตัวทำละลายโดยใช้เครื่องระเหยสารแบบสูญญากาศ

5. นำฟลาสก์ก้นกลมที่มีไขมันทำให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน

6. ชั่งน้ำหนักฟลาสก์และไขมันด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง เพื่อหาน้ำหนัก

7. ละลายไขมันด้วยสารละลายผสมคลอโรฟอร์ม : เมทานอล (2 : 1) ที่ผสม BHT 0.01 เปอร์เซ็นต์ ให้มีความเข้มข้น 1000 ppm เพื่อนำไปทรานเอสเทอริฟิเคชั่นต่อไป

การทรานเอสเทอริฟิเคชั่น

1. ปิเปตไขมันปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร ชนิดฝาเกลียว จากนั้นเติมสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ กรดซัลฟูริกในเมทานอล 10 มิลลิลิตร นำไปใส่ในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง

2. นำสารละลายออกจากตู้อบทิ้งไว้ให้เย็น ถ่ายสารละลายใส่กรวยแยก ชะสารที่ตกค้างในหลอดทดลองด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเก็บรวมกันในกรวยแยก

3. เติมเฮกเซน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในกรวยแยก และเขย่า 1 นาที ปล่อยไว้ให้แยกชั้น เก็บสารละลายชั้นบนไว้ (เฮกเซน) และถ่ายสารละลายชั้นล่างลงในหลอดทดลองเดิม เพื่อนำมาสกัดด้วยเฮกเซน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเขย่า 1 นาที ปล่อยไว้ให้แยกชั้น ใช้หลอดดูดสารดูดสารละลายชั้นบน ใส่รวมกับสารละลายในกรวยแยกอันเดิม

4. เติมสารละลายโพแทสเซียมไบคาร์บอเนต 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ลงในกรวยแยก และเขย่าเล็กน้อย 1 นาที ปล่อยไว้ให้แยกชั้น เก็บสารละลายชั้นบน

5. เทสารละลายที่เก็บไว้ในกรวยแยกลงในฟลาสก์ก้นกลมผ่านกรวยแก้วที่บรรจุโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส

6. นำฟลาสก์ก้นกลมไประเหยตัวทำละลายโดยใช้เครื่องระเหยสารแบบสูญญากาศและเป่าแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน หลังจากนั้นละลายด้วยเฮกเซน (n - hexane) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ก่อนถ่ายลงในขวด Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการนำไปฉีดด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

7. นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณกรดไขมันด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ และชนิดของอุปกรณ์ตรวจวัดเป็น Flame Ionizertion Detecter (FID) คอลัมน์ที่ใช้เป็นคอลัมน์ชนิด HP - INNOWax ความยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร และเคลือบด้วย Polyethylene glycol หนา 0.25 ไมโครเมตร ปริมาตรที่ฉีด 1 ไมโครลิตร สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์มีดังนี้ ฉีดด้วยระบบ split ในอัตราการ spit เท่ากับ 10: 1 อัตราการไหลของแก๊สฮีเลียม (แก๊สพา) 1.1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ ณ จุดฉีดสารเท่ากับ 240 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่อุปกรณ์ตรวจวัด (ดีเทคเตอร์) เท่ากับ 260 องศาเซลเซียส

โปรแกรมอุณหภูมิวิเคราะห์เริ่มต้นที่ 150 องศาเซลเซียส คงอุณหภูมิไว้เป็นเวลา 0.50 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 170 องศาเซลเซียส ในอัตราการเพิ่ม 5 องศาเซลเซียสต่อนาทีและคงอุณหภูมิไว้ 10 นาที หลังจากนั้นเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 190 องศาเซลเซียส ในอัตราการเพิ่ม 3 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงอุณหภูมิไว้ 15 นาที หลังจากนั้นเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 210 องศาเซลเซียส ในอัตราการเพิ่ม 2 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงอุณหภูมิไว้ 15 นาที รวมระยะเวลาทั้งหมดในการวิเคราะห์ 54 นาที

การแยกและการตรวจวัด

การวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันในเชื้อยีสต์ ในเซลล์ยีสต์ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต และในตัวอย่างเชื้อแอคติโนมัยซีท เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดไขมัน 37 ชนิด (Supelco 37-Component FAME MixSupelco, USA) การวิเคราะห์หาชนิดของกรดไขมันในตัวอย่าง ใช้การเปรียบเทียบเวลาที่พีคของสารตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์เทียบกับเวลาของสารมาตรฐานซึ่งทราบแล้วว่าแต่ละพีคเป็นสารมาตรฐานชนิดใด ส่วนการหาปริมาณของกรดไขมัน เทียบกับปริมาณกรดไขมันทั้งหมด (%TFA) ทำโดยใช้การเปรียบเทียบพื้นที่ใต้พีคของตัวอย่างกับพื้นที่ทั้งหมดการ

สารมาตรฐาน Supelco 37-Component FAME Mix Supelco, USA

1. Butyric Acid (C4:0)
2. Caproic Acid (C6:0)
3. Caprylic Acid (C8:0)
4. Capric Acid (C10:0)
5. Undecanoic Acid (C11:0)
6. Lauric Acid (C12:0)
7. Tridecanoic Acid (C13:0)
8. Myristic Acid (C14:0)
9. Myristoleic Acid (C14:1)
10. Pentadecanoic Acid (C15:0)
11. cis-10-Pentadecenoic Acid (C15:1)
12. Palmitic Acid (C16:0)
13. Palmitoleic Acid (C16:1)
14. Heptadecanoic Acid (C17:0)
15. cis-10-Heptadecenoic Acid (C17:1)
16. Stearic Acid (C18:0)
17. Oleic Acid (C18:1n9c)
18. Elaidic Acid (C18:1n9t)
19. Linoleic Acid (C18:2n6c)
20. Linolelaidic Acid (C18:2n6t)
21. γ-Linolenic Acid (C18:3n6)
22. α-Linolenic Acid (C18:3n3)
23. Arachidic Acid (C20:0)
24. cis-11-Eicosenoic Acid (C20:1n9)
25. cis-11, 14-Eicosadienoic Acid (C20:2)
26.cis-8, 11, 14-EicosatrienoicAcid (C20:3n6)
27. cis-11, 14, 17-Eicosatrienoic Acid (C20:3n3)
28. Arachidonic Acid (C20:4n6)
29. cis-5, 8, 11, 14, 17-Eicosapentaenoic Acid (C20:5n3)
30. Heneicosanoic Acid (C21:0)
31. Behenic Acid (C22:0)
32. Erucic Acid (C22:1n9)
33. cis-13, 16-Docosadienoic Acid (C22:2)
34.cis-4, 7, 10, 13, 16, 19-Docosahexaenoic (C22:6n3)
35. Tricosanoic Acid (C23:0)
36. Lignoceric Acid (C24:0)
37. Nervonic Acid (C24:1n9)

คำนวณ % กรดไขมัน

%กรดไขมัน = 100 x พื้นที่ใต้พีคของกรดไขมัน / A

A = พื้นที่ใต้พีคกรดไขมันทั้งหมด – (พื้นที่ใต้พีคเฮกเซน + พื้นที่ใต้พีค BHT)

การวิเคราะห์โปรตีนรวม (Kjeldahl method, AOAC, 2000)

การวิเคราะห์หาโปรตีนรวมทำโดยวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน โดยชั่งตัวอย่างใส่ลงในหลอดแก้ว นำไปย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้นในสภาพที่มีความร้อนและสารเร่งปฏิกิริยา จนกระทั่งได้สารละลายใส ส่วนของอินทรียวัตถุจะสลายตัวไป สารประกอบไนโตรเจนทั้งที่เป็นส่วนของโปรตีนแท้และไม่ใช่โปรตีน (ยกเว้นที่อยู่ในรูปของไนเทรตและไนไทรต์) จะถูกเปลี่ยนให้เป็นแอมโมเนียมซัลเฟต หลังจากทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมสารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ลงไป แล้วทำการกลั่น แอมโมเนียจะถูกไล่ออกมา ทำการจับไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ด้วยกรดบอริกที่มีความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปไตเตรทกับกรดเกลือมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล คำนวณหาความเข้มข้นของไนโตรเจน เนื่องจากโปรตีนมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบโดยเฉลี่ย 16 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงคำนวณหาค่าโปรตีนรวมได้โดย

$$\% \text{ โปรตีนรวม (CP)} = \% \text{ ไนโตรเจน} \times 6.25$$

ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

โดยใช้เครื่อง KJELTEC SYSTEM โดยจะแบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ

ขั้นตอนการย่อย

1. เปิดเครื่อง Digestor ปรับความร้อนจนได้อุณหภูมิ 430 องศาเซลเซียส
2. ชั่งตัวอย่าง 0.2-0.3 กรัม ผสมกับ 3.5 กรัม K_2SO_4 + 0.4 กรัม $CuSO_45H_2O$ เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นจำนวน 15 มิลลิกรัม ลงในหลอดย่อย
3. ทิ้งไว้ให้เครื่องทำงาน (ประมาณ 45 นาที หรือจนตัวอย่างใส)
4. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

ขั้นตอนการกลั่น

1. เตรียม 4 เปอร์เซ็นต์ Boric Acid ปริมาณ 25 มิลลิลิตร หยดอินดิเคเตอร์ จะได้สารสีส้มแดง
2. นำตัวอย่างที่รอให้เย็นจากการย่อยมาเติมน้ำกลั่นหลอดละ 50 มิลลิลิตร
3. ต่อหลอดย่อย เข้ากับเครื่องกลั่นแล้วเปิดเครื่อง
4. เติม NaOH 40 เปอร์เซ็นต์ ตัวอย่างจะเปลี่ยนเป็นสีดำ
5. เปิด Stream on
6. ใช้เวลาในการกลั่นประมาณ 4 นาที สารละลายที่กลั่นเก็บได้จะเปลี่ยนเป็นสีเขียว (ประมาณ 150 มิลลิลิตร)
7. ปิด Stream on
8. นำตัวอย่างที่ได้ไปไตเตรทกับ HCl 0.1 N จนได้จุดยุติ จดปริมาณ HCl

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์โปรตีนจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์โปรตีน} = \frac{(VA - VB) \times N \times 0.014 \times DF \times 100 \times CF}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

VA = ปริมาณของ HCl ที่ใช้ในการไตเตรทตัวอย่างอาหาร (มิลลิลิตร)
VB = ปริมาณของ HCl ที่ใช้ในการไตเตรท Blank (มิลลิลิตร)
N = นอร์มัลของ HCl
DF = Dillution Factor
CF = Conversion Factor

การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน (ด้วยเทคนิค Soxhlet extraction) (AOAC, 2000)

การวิเคราะห์หาไขมันในตัวอย่างทำได้โดยใช้ตัวทำละลาย Petroleum ether ที่เป็นสารอินทรีย์เป็นตัวสกัด ด้วยเครื่องมือที่เรียกว่าซอกเทค (Soxtech) Foss Soxtoc 2043 สารที่ถูกสกัดได้แบ่งเป็น 2 พวกคือ สารพวกไขมัน คือกลีเซอไรด์ของกรดไขมัน กรดไขมันอิสระ สเตอรอล เลคซิติน และไขมันที่ระเหยได้ และสารพวกที่ไม่ใช่ไขมัน แต่ตัวทำละลายสามารถสกัดออกมาได้ด้วยคือ เม็ดสีต่าง ๆ เรซิน สารประกอบพวกอัลคาไลและพวกวิตามินที่ละลายในไขมัน ได้แก่ A D E และ K เนื่องจากสารที่ไม่ใช่ไขมันนี้มีปริมาณน้อยมาก เมื่อเทียบกับสารพวกไขมัน ดังนั้น สารพวกที่ไม่ใช่ไขมัน จึงไม่มีผลต่อการวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน จากการที่สารที่ถูกสกัดมีทั้งพวกที่เป็นไขมันและไม่ใช่ไขมัน จึงเรียกสารทั้งสองพวกนี้ว่า Crude fat ไขมันและสารที่ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น วิตามินที่ละลายได้ในไขมัน ฮอร์โมนจำพวกสเตอรอยด์และสารสี เช่น คลอโรฟีลล์ และแคโรทีนอยด์ ตลอดจนลิพิดประเภทอื่น ๆ จะถูกชะออกมา เมื่อกลั่นแยกเอาตัวทำละลายนี้ออกไปแล้ว ส่วนที่เหลืออยู่ถือว่าเป็นไขมัน

การสกัดไขมันในตัวอย่างเซลล์ยีสต์ *Pichia sp.*

1. ชั่งตัวอย่างที่หาความชื้นแล้ว ประมาณ 1 กรัม ใส่บนกระดาษกรอง
2. นำตัวอย่างที่ห่ออยู่ในกระดาษกรอง ใส่ลงในทิมเบิล
3. นำทิมเบิลใส่ใน Extraction Unit it of Soxhlet ซึ่งเชื่อมต่อกับ 1046 Service Unit โดยใช้เครื่อง Adapter แล้วนำ Extraction cup ไปอบแล้วชั่งนำหนักที่แน่นอน
4. เติมปิโตรเลียมอีเทอร์ลงใน Extraction cup ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 50 มิลลิลิตร ประกอบเครื่อง Soxhlet เข้าด้วยกัน
5. ให้ความร้อนทำการสกัดไขมันจากตัวอย่างนานประมาณ 1– 2 ชั่งโมง
6. กลั่นเอาปิโตรเลียมอีเทอร์ออกจากไขมัน นำ Extraction cup และไขมันไปอบที่อุณหภูมิ 103 นาน 30 นาที ชั่งน้ำหนัก

น้ำหนักไขมัน = (น้ำหนักไขมัน + น้ำหนัก Cups) - น้ำหนัก Cups เปล่า

ปริมาณไขมันทั้งหมด (ร้อยละโดยน้ำหนัก) = น้ำหนักไขมัน x 100/น้ำหนักตัวอย่าง (แห้ง)

การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (AOAC, 2000)

1. อบถ้วย Crucible ในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ทำให้เย็นใน Desiccator นำมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

2. ชั่งตัวอย่างใส่ลงในถ้วย Crucible ที่อบแห้ง และบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (A)

3. นำถ้วย Crucible ที่บรรจุตัวอย่างเข้าอบที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 16-18 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นใน Desiccator (B)

4. นำไปชั่งน้ำหนัก จนได้น้ำหนักคงที่

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นจากสูตร

เปอร์เซ็นต์ความชื้น = น้ำหนักที่หายไป (A-B) (กรัม) x 100/น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า

เถ้า (Ash) หมายถึง ปริมาณสารอนินทรีย์ที่มีอยู่ในอาหาร หลังจากที่เผาสารอินทรีย์หมดแล้ว ในการหามักจะใช้ความร้อนเผาสารอินทรีย์ ดังนั้นค่าเถ้าที่ได้จึงไม่จำเป็นต้องเท่ากับปริมาณสารเกลือแร่ทั้งหมดที่มีอยู่ในอาหารตอนแรก สารอนินทรีย์หรือเกลือแร่บางส่วน จะสูญเสียไปโดยการระเหยเพราะความร้อนที่ใช้ในการเผานั่นเอง ค่าเถ้าที่ได้จึงเป็นตัวบ่งชี้ถึงคุณภาพของอาหารนั้น ๆ

วิธีวิเคราะห์

1. อบถ้วย Crucible ในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ทำให้เย็นใน Desiccator นำมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอน (A)

2. นำตัวอย่าง 0.5-1 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้อง (Crucible)

3. นำไปเผาในเตาเผา (Muffle furnace) ที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จนตัวอย่างกลายเป็นเถ้าแล้วทิ้งไว้ให้เย็น Desiccator ชั่งน้ำหนักตัวอย่างซ้ำอีกครั้ง (B)

4. สารที่เหลืออยู่ในถ้วย คือ ส่วนของสารอนินทรีย์ หรือเถ้า ที่ประกอบด้วยแร่ธาตุชนิดต่าง ๆ เป็นองค์ประกอบ นำมาคำนวณหาค่าจากสูตร

% เถ้า = (B-A) x 100/นน. ตัวอย่าง (กรัม)

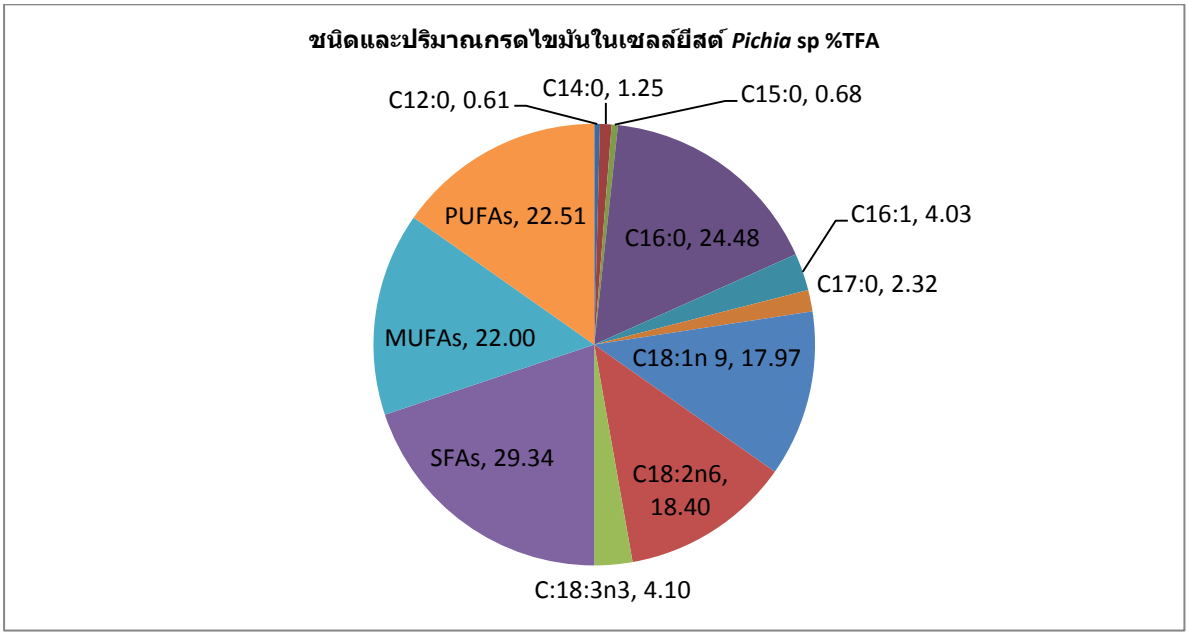
ผลการทดลอง

ผลการศึกษาชนิดและปริมาณกรดไขมันในตัวอย่างเซลล์ยีสต์ *Pichia* sp. (BS 6-2) และเซลล์ยีสต์ ที่ตรึงด้วยด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

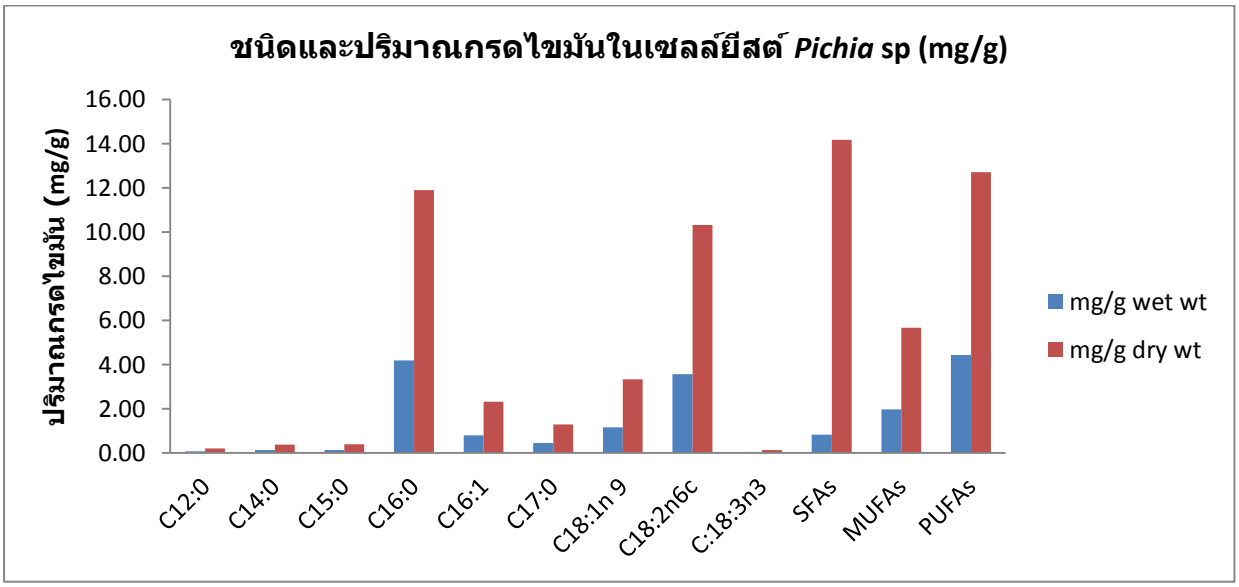
ชนิดและปริมาณกรดไขมันในยีสต์ *Pichia* sp.

จากผลการศึกษาพบว่ายีสต์ *Pichia* sp. (BS 6-2) มีองค์ประกอบกรดไขมันที่ดีจึงนำเซลล์ยีสต์ มาเลี้ยงด้วยอาหารกากชานอ้อยซึ่งเป็นวัตถุดิบที่เหลือใช้ในภาคตะวันออกที่ความเค็ม 25 พีพีที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และนำเซลล์ยีสต์ *Pichia* sp. มาตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันในตัวอย่างเซลล์ยีสต์ *Pichia* sp. เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดไขมัน 37 ชนิด ผลการศึกษาองค์ประกอบกรดไขมันในตัวอย่างเซลล์ยีสต์ *Pichia* sp 9 ชนิด ได้แก่กรดลอริก (Lauric acid, C12:0), กรดไมริสติก (Myristic acid, C14:0), กรดเพนตะเดคาโนอิก (Penta-decanoic acid, C15:0), กรดปาล์มิติก (Palmitic acid, C16:0), กรดปาล์มิโอเลอิก (Palmitoleic acid, C16:1), กรดเฮปาโทเดคาโนอิก (Hepatodecaenoic acid, C17:0), กรดโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9), กรดไลโนเลอิก (Linoleic acid,C18:2n6c), กรดกรดไลโนเลอนิก (Linolenic acid, C18:3n3) โดยพบกรดไขมันอิ่มตัวทั้งหมด (Saturated fatty acid: SFA) สูงสุด 29.34 %TFA (4.99 mg/g wet wt. ; 14.18 mg/g dry wt.) มีกรดปาล์มิติก (Palmitic acid, C16:0) เป็นองค์ประกอบมากที่สุด 24.48%TFA 4.19 mg/g wet wt.; 11.90 mg/g dry wt. รองลงมาคือ กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนทั้งหมด (Polyunsaturated Fatty Acid: PUFA) 22.51%TFA (4.45 mg/g wet wt.; 12.71 mg/g dry wt และมีกรดไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6) เป็นองค์ประกอบที่มากที่สุด 18.40%TFA (3.62 mg/g wet wt, 10.33 mg/g dry wt.) นอกจากนี้ยังพบกรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9) เป็นองค์ประกอบ 17.97 %TFA (1.17 mg/g wet wt.; 3.35 mg/g dry wt.) ซึ่งเป็นองค์ประกอบในกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว ดังแสดงในภาพที่ 5-6 และจากการหาคุณค่าอาหาร (Proximate analysis) ในตัวอย่าง เซลล์ยีสต์ *Pichia* sp เลี้ยงที่ความเค็ม 25 ppt 72 ชั่วโมง พบค่าความชื้นร้อยละ 66 เถ้าร้อยละ 2 ไขมันร้อยละ 0.22 และปริมาณโปรตีนร้อยละ 42



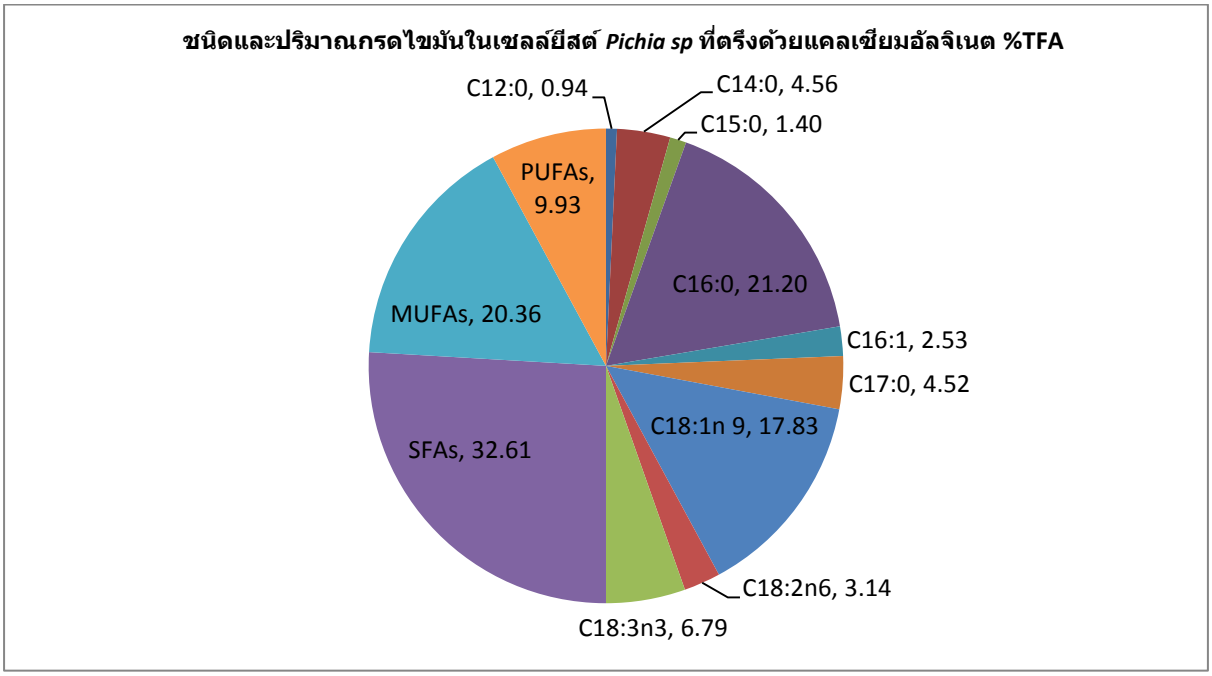
ภาพที่ 5 ชนิดและปริมาณกรดไขมันในเซลล์ยีสต์ *Pichia* sp. ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยที่มีความเค็ม 25 พีพีที ที่เวลา 72 ชั่วโมง (%TFA)



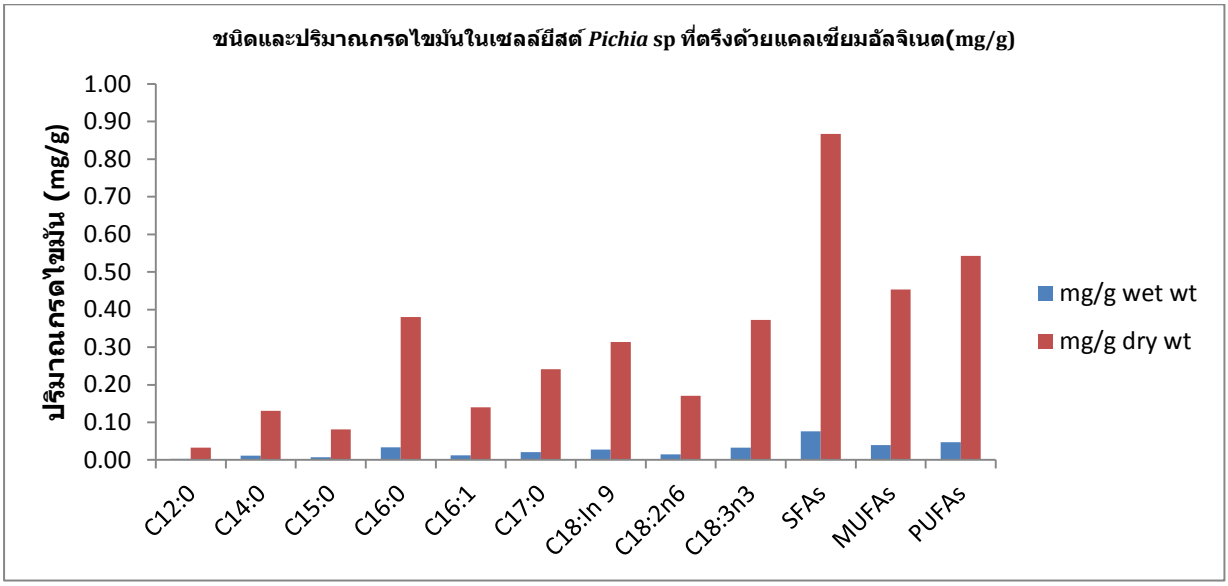
ภาพที่ 6 ชนิดและปริมาณกรดไขมันในเซลล์ยีสต์ *Pichia* sp. ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยที่มีความเค็ม 25 พีพีที ที่เวลา 72 ชั่วโมง (mg/g)

ชนิดและร้อยละกรดไขมันในเซลล์ยีสต์ *Pichia* sp. ที่ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

การวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันใน ในเซลล์ยีสต์ *Pichia* sp. ที่ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต และวิเคราะห์กรดไขมันเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดไขมัน 37 ชนิด น้ำหนักเม็ดเจลตรึงเซลล์ยีสต์แห้งที่ใช้ในการสกัดคือ 1.026 กรัม ผลการศึกษาพบกรดไขมัน 9 ชนิด ได้แก่ กรดลอริก (Lauric acid, C12:0), กรดไมริสติก (Myristic acid, C14:0), กรดเพนตะเดคาโนอิก (Pentadecanoic acid, C15:0), กรดปาล์มิติก (Palmitic acid, C16:0), กรดปาล์มิโอเลอิก (Palmitoleic acid, C16:1), กรดเฮปาโทเดคาโนอิก (Hepatodecaenoic acid, C17:0), กรดโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9), กรดไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6), กรดไลโนเลนิก (Linolenic acid C18:3n3) โดยพบกรดไขมันอิ่มตัวทั้งหมดสูงสุด (Saturated fattyacid: SFA) 32.61%TFA (0.08mg/g wet wt; 0.87 mg/g dry wt) มีกรดปาล์มิติก (Palmitic acid, C16:0) เป็นองค์ประกอบมากที่สุดปริมาณ 21.20%TFA (0.03 mg/g wet wt; 0.38 mg/g dry wt.) รองลงมาคือ กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวทั้งหมด (Monounsaturated fatty acid: MUFAS) 20.36%TFA (0.04 mg/g wet wt; 0.45 mg/g dry wt) และมีกรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid,C18:1n9) เป็นองค์ประกอบที่มากที่สุดในปริมาณ 17.8%TFA (0.027 mg/g wet wt;0.314 mg/g dry wt.) นอกจากนี้ยังพบ กรดไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6c) 3.14%TFA (0.015mg/g wet wt; 0.171 mg/g dry wt.) และพบกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (PUFAS) 9.93%TFA (0.05 mg/g wet wt; 0.54 dry wt.) โดยกรดไลโนเลนิก (Linolenic acid:C18:3n3) เป็นกรดไขมันหลักในปริมาณ 6.79 %TFA (0.033 mg/g wet wt; 0.372 mg/g dry wt.) ดังแสดงในภาพที่ 7 และ 8



ภาพที่ 7 ชนิดและปริมาณกรดไขมันจากเซลล์ตรึงยีสต์ *Pichia* sp. ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต (%TFA)



ภาพที่ 8 ชนิดและปริมาณกรดไขมันจากเซลล์ตรึงยีสต์ *Pichia* sp. ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต (mg/g)

ผลการศึกษาชนิดแลปริมาณกรดไขมันในแอคทีโนมัยซีท

จากการศึกษาชนิดและปริมาณกรดไขมันในเซลล์ ของแอคทีโนมัยซีทที่ทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP 2 เป็นระยะเวลา 3-14 วัน ที่คัดแยกจากดินชายฝั่ง และดินป่าชายเลนจังหวัดชลบุรี ระยอง จันทบุรี และ จังหวัดชุมพร รวม 22 ตัวอย่าง ประกอบด้วย BP2-29B, RY2-20, RY2-22, RY2-24, RY2-25, RY3-32, RY3-37, RY3-43, RY7-8, RY 8-3, RY 8-8, CH 54-8, CP-PH2-2, CP3-1, CP-PH3-2, CP-PH3-8, CP-PH 3-9, CP-PH 3-10, CP-PH 3-12, CP-PH 3-13, CP-PH 3-16, CP8-4B ผลการศึกษาพบ พบปริมาณกรดไขมันสูงสุดในตัวอย่าง CP-PH 3-9 ที่คัดแยกจากดินตะกอนป่าชายเลนจังหวัดชุมพร ในปริมาณร้อยละ 41.96 และพบองค์ประกอบกรดไขมันเป็นชนิดอิ่มตัว (SFAs: 9.42-37.63 %TFA) ชนิดกรดไขมันที่พบได้แก่ Palmitic acid (C16:0) และ Stearic Acid (C18:0) รองลงมาเป็นกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (MUFAs:1.85-11.28 %TFA) ชนิดกรดไขมันหลักที่พบได้แก่ Oleic Acid /Elaidic Acid (C18:1n9c, C18:1n9t) และ cis-10-Heptadecenoic Acid (C17:1) และกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (PUFAs) พบในปริมาณที่ต่ำ (nd-1.90 %TFA) ชนิดกรดไขมันหลักที่พบ ได้แก่ Linoleic Acid (C18:2n6), γ-Linolenic Acid (C18:3n6) โดยกรดไขมันชนิดจำเป็น Linoleic Acid (C18:2n6) พบปริมาณต่ำในตัวอย่าง CP-PH 3-8 (0.86±0.03%TFA), α-Linolenic Acid (C18:3n3) พบในตัวอย่าง CP-PH 3-9 (0.29±0.02%TFA) รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ชนิดและปริมาณกรดไขมันในตัวอย่างแอคติโนมัยซีทคัดแยกจากดินชายฝั่งจังหวัดชลบุรีและจันทบุรี (%TFA)

Fatty acid	**CH 54-8**	BP2-29B
C6:0	nd	nd
C12:0	0.14±0.01	nd
C13:0	nd	nd
C14:0	1.19±0.01	1.50±0.03
C14:1	nd	nd
C15:0	0.58±0.01	6.30±0.06
C15:1	nd	nd
C16:0	7.96±0.03	19.50±0.07
C16:1n7	0.39±0.00	0.80±0.06
C17:0	0.70±0.00	2.20±0.12
C17:1	0.98±0.01	0.40±0.03
C18:0	3.40±0.02	4.70±0.07
C18:1n9	1.72±0.01	1.81±0.14
C18:2n6	0.20±0.02	0.40±0.03
C18:3n6	0.14±0.00	nd
C18:3n3	nd	nd
C20:0	nd	nd
C20:1n9	nd	nd
C20:2	nd	nd
C20:3n6	nd	nd
C20:4n6	0.07±0.00	nd
C20:5n3	0.04±0.05	nd
C22:0	nd	nd
C22:1n9	nd	nd
C22:2	nd	nd
C23:0	nd	nd
C24:0	nd	nd
C22:6n3	nd	nd
C24:1n9	nd	nd
sum	**17.52**	**37.60**
SFAs	**13.98**	**34.19**
MUFAs	**3.09**	**3.01**
PUFAs	**0.46**	**0.40**

ตารางที่ 5 ชนิดและปริมาณกรดไขมันในตัวอย่างแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกจากดินป่าชายเลน จังหวัดชุมพร (%TFA)

Fatty acid	CP-PH 2-2	
	Intracellular	Extracellular
C6:0	0.23±0.13	0.15±0.04
C12:0	0.34±0.03	0.68±0.01
C13:0	0.14±0.00	0.18±0.01
C14:0	1.12±0.02	2.26±0.01
C14:1	0.18±0.00	0.33±0.03
C15:0	2.27±0.05	2.95±0.00
C15:1	0.28±0.00	nd
C16:0	10.08±0.19	18.49±0.07
C16:1n7	0.87±0.01	0.48±0.02
C17:0	10.51±0.42	1.70±0.03
C17:1	1.31±0.04	0.48±0.02
C18:0	4.27±0.04	6.46±0.02
C18:1n9	1.88±0.02	0.62±0.02
C18:2n6	0.41±0.00	0.48±0.02
C18:3n6	0.76±0.04	0.18±0.01
C18:3n3	nd	nd
C20:0	nd	nd
C20:1n9	nd	nd
C20:2	nd	nd
C20:3n6	nd	nd
C20:4n6	nd	nd
C20:5n3	nd	nd
C22:0	nd	nd
C22:1n9	nd	nd
C22:2	nd	nd
C23:0	nd	nd
C24:0	nd	nd
C22:6n3	nd	nd
C24:1n9	nd	nd
sum	**34.66**	**35.43**
SFAs	**28.97**	**32.87**
MUFAs	**4.52**	**1.91**
PUFAs	**1.17**	**0.66**

ตารางที่ 6 ชนิดและปริมาณกรดไขมันในตัวอย่างแอคติโนมัยซิทที่คัดแยกจากดินป่าชายเลน จังหวัดชุมพร (%TFA)

Fatty acid	CP3-1	CP-PH 3-2	CP-PH 3-8	CP-PH3-9
C6:0	0.10±0.04	0.25±0.08	nd	nd
C12:0	0.09±0.01	0.30±0.02	0.41±0.01	0.42±0.03
C13:0	0.13±0.00	nd	nd	nd
C14:0	0.27±0.02	1.13±0.01	3.03±0.14	1.66±0.04
C14:1	0.07±0.01	0.20±0.01	nd	nd
C15:0	3.58±0.07	1.41±0.04	2.35±0.07	1.10±0.04
C15:1	0.25±0.02	nd	nd	nd
C16:0	2.59±0.04	10.53±0.09	22.09±0.47	15.75±0.46
C16:1n7	0.32±0.01	0.66±0.14	0.93±0.04	0.62±0.04
C17:0	10.54±0.10	7.52±0.04	4.03±0.18	6.12±0.17
C17:1	9.88±0.04	1.87±0.04	nd	2.82±0.11
C18:0	1.46±0.04	4.78±0.16	9.49±0.40	5.00±0.16
C18:1n9	0.76±0.07	1.94±0.21	6.65±0.33	3.69±0.11
C18:2n6	0.19±0.01	0.35±0.02	0.86±0.03	0.68±0.01
C18:3n6	1.04±0.01	0.64±0.03	nd	0.60±0.01
C18:3n3	nd	nd	nd	0.29±0.02
C20:0	nd	nd	0.52±0.05	0.42±0.20
C20:1n9	nd	nd	nd	nd
C20:2	nd	nd	nd	nd
C20:3n6	nd	nd	nd	nd
C20:4n6	nd	nd	0.22±0.02	nd
C20:5n3	nd	nd	nd	nd
C22:0	nd	nd	0.97±0.09	1.29±0.02
C22:1n9	nd	nd	nd	0.25±0.02
C22:2	nd	nd	nd	nd
C23:0	nd	nd	nd	0.29±0.02
C24:0	nd	nd	0.60±0.06	0.81±0.02
C22:6n3	nd	nd	nd	nd
C24:1n9	nd	nd	nd	nd
sum	**31.27**	**31.58**	**31.90**	**41.96**
SFAs	**18.76**	**25.92**	**30.05**	**32.86**
MUFAs	**11.28**	**4.68**	**1.85**	**7.39**
PUFAs	**1.23**	**0.99**	**nd**	**1.70**

ตารางที่ 7 ชนิดและปริมาณกรดไขมันในตัวอย่างแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกจากดินป่าชายเลน จังหวัดชุมพร (%TFA)

Fatty acid	**CP-PH3-10**	CP-PH3-12
C6:0	**nd**	0.19±0.27
C12:0	**0.20±0.01**	0.23±0.05
C13:0	**nd**	nd
C14:0	**0.76±0.01**	1.05±0.01
C14:1	**nd**	nd
C15:0	**3.88±0.01**	0.55±0.03
C15:1	**0.44±0.02**	0.51±0.47
C16:0	**9.28±0.02**	12.69±0.03
C16:1n7	**0.44±0.02**	0.68±0.03
C17:0	**9.53±0.04**	6.01±0.03
C17:1	**3.61±0.02**	4.01±0.06
C18:0	**2.75±0.01**	4.50±0.02
C18:1n9	**0.39±0.02**	1.47±0.71
C18:2n6	**0.20±0.01**	0.36±0.02
C18:3n6	**0.25±0.01**	0.73±0.03
C18:3n3	**nd**	nd
C20:0	**0.30±0.02**	0.36±0.02
C20:1n9	**nd**	nd
C20:2	**nd**	nd
C20:3n6	**nd**	nd
C20:4n6	**nd**	nd
C20:5n3	**nd**	nd
C22:0	**0.81±0.01**	1.23±0.01
C22:1n9	**0.12±0.04**	nd
C22:2	**nd**	nd
C23:0	0.15±0.01	nd
C24:0	0.34±0.02	0.50±0.04
C22:6n3	nd	nd
C24:1n9	nd	nd
sum	**33.46**	**35.07**
SFAs	**28.00**	**27.30**
MUFAs	**5.01**	**6.67**
PUFAs	**0.44**	**1.09**

ตารางที่ 8 ชนิดและปริมาณกรดไขมันในตัวอย่างแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกจากดินป่าชายเลน จังหวัดชุมพร (%TFA)

Fatty acid	CP-PH3-13	CP-PH 3-16	CP 8-4B
C6:0	nd	nd	nd
C12:0	0.37±0.00		0.26±0.02
C13:0	0.11±0.00	nd	0.16±0.01
C14:0	1.36±0.00	1.22±0.03	3.48±0.41
C14:1	0.12±0.01	nd	nd
C15:0	1.20±0.01	0.64±0.05	5.88±0.68
C15:1	nd	nd	nd
C16:0	12.61±0.06	14.28±0.03	22.61±0.40
C16:1n7	0.44±0.01	0.58±0.02	1.73±0.19
C17:0	3.28±0.01	6.30±0.10	1.51±0.15
C17:1	0.98±0.00	2.97±0.04	0.91±0.10
C18:0	4.98±0.02	5.25±0.06	0.77±0.09
C18:1n9	3.74±0.01	0.93±0.04	0.25±0.04
C18:2n6	0.71±0.01	0.35±0.01	nd
C18:3n6	0.45±0.00	0.70±0.03	nd
C18:3n3	0.23±0.01	nd	nd
C20:0	**0.41±0.00**	**0.47±0.02**	**nd**
C20:1n9	nd	nd	nd
C20:2	nd	nd	nd
C20:3n6	nd	nd	nd
C20:4n6	0.07±0.00	nd	nd
C20:5n3	0.23±0.07	nd	nd
C22:0	1.01±0.01	1.28±0.05	nd
C22:1n9	0.16±0.00	nd	nd
C22:2	nd	nd	nd
C23:0	0.23±0.01	nd	nd
C24:0	0.52±0.00	0.47±0.02	nd
C22:6n3	nd	nd	nd
C24:1n9	nd	nd	nd
sum	**33.22**	**35.44**	**37.57**
SFAs	**26.09**	**29.90**	**34.68**
MUFAs	**5.44**	**4.49**	**2.89**
PUFAs	**1.70**	**1.05**	**nd**

ตารางที่ 9 ชนิดและปริมาณกรดไขมันในตัวอย่างแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกจากดินชายฝั่งจังหวัดระยอง (%TFA)

Fatty acid	RY2-20	RY2-22	RY2-24	RY2-25
C6:0	nd	0.07±0.001	0.29±0.02	0.15±0.04
C12:0	nd	0.12±0.03	0.22±0.01	0.19±0.02
C13:0	nd	nd	nd	nd
C14:0	1.46±0.02	0.40±0.18	0.69±0.01	0.46±0.07
C14:1	nd	0.13±0.01	0.29±0.02	0.25±0.02
C15:0	2.27±0.01	1.33±0.16	0.26±0.04	0.44±0.01
C15:1	nd	0.19±0.01	nd	nd
C16:0	14.69±0.13	4.34±0.19	5.52±0.04	4.70±0.33
C16:1n7	0.52±0.06	0.54±0.14	0.44±0.02	0.49±0.24
C17:0	12.01±0.18	5.67±0.97	1.75±0.01	2.77±0.07
C17:1	1.63±0.07	6.14±0.30	2.23±0.04	4.44±0.20
C18:0	6.70±0.04	4.22±0.16	2.49±0.03	2.39±0.35
C18:1n9	0.58±0.02	2.58±0.51	5.63±0.01	1.24±0.47
C18:2n6	0.41±0.06	0.25±0.07	0.59±0.24	0.29±0.04
C18:3n6	0.70±0.03	0.95±0.18	0.33±0.03	0.57±0.03
C18:3n3	nd	nd	nd	nd
C20:0	nd	nd	nd	nd
C20:1n9	nd	nd	nd	nd
C20:2	nd	nd	nd	nd
C20:3n6	nd	nd	nd	nd
C20:4n6	nd	nd	nd	nd
C20:5n3	nd	nd	nd	nd
C22:0	nd	nd	nd	nd
C22:1n9	nd	nd	nd	nd
C22:2	nd	nd	nd	nd
C23:0	nd	nd	nd	nd
C24:0	nd	nd	nd	nd
C22:6n3	nd	nd	nd	nd
C24:1n9	nd	nd	nd	nd
sum	**40.97**	**26.91**	**20.73**	**18.36**
SFAs	**37.13**	**16.14**	**11.22**	**11.09**
MUFAs	**2.74**	**9.57**	**8.59**	**6.42**
PUFAs	**1.11**	**1.20**	**0.92**	**0.86**

ตารางที่ 10 ชนิดและปริมาณกรดไขมันในตัวอย่างแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกจากดินชายฝั่งจังหวัดระยอง (%TFA)

Fatty acid	RY3-32	RY3-37	RY3-43	RY7-87
C6:0	0.14±0.06	0.39±0.15	0.14±0.05	0.21±0.02
C12:0	0.14±0.01	nd	0.12±0.02	0.23±0.01
C13:0	nd	nd	0.10±0.01	0.13±0.02
C14:0	0.33±0.04	0.35±0.02	0.43±0.02	1.08±0.18
C14:1	0.14±0.01	0.20±0.07	0.12±0.02	0.23±0.01
C15:0	0.31±0.07	0.43±0.02	1.49±0.19	2.05±0.27
C15:1	nd	nd	nd	nd
C16:0	3.60±0.28	3.73±0.34	3.47±0.12	9.76±0.29
C16:1n7	0.43±0.04	0.43±0.09	0.47±0.03	0.27±0.02
C17:0	0.95±0.05	1.01±0.09	10.07±0.04	7.33±0.92
C17:1	0.71±0.003	0.86±0.19	5.48±0.02	1.40±0.18
C18:0	3.95±0.35	3.77±0.29	4.16±0.11	6.79±0.01
C18:1n9	4.95±0.40	5.60±0.62	2.28±0.09	8.88±0.01
C18:2n6	0.33±0.04	0.27±0.08	0.15±0.03	0.45±0.09
C18:3n6	0.26±0.01	0.31±0.03	1.74±0.02	1.22±0.17
C18:3n3	nd	nd	nd	nd
C20:0	nd	nd	nd	nd
C20:1n9	nd	nd	nd	nd
C20:2	nd	nd	nd	nd
C20:3n6	nd	nd	nd	nd
C20:4n6	nd	nd	nd	nd
C20:5n3	nd	nd	nd	nd
C22:0	nd	nd	nd	nd
C22:1n9	nd	nd	nd	nd
C22:2	nd	nd	nd	nd
C23:0	nd	nd	nd	nd
C24:0	nd	nd	nd	nd
C22:6n3	nd	nd	nd	nd
C24:1n9	nd	nd	nd	nd
sum	**16.24**	**17.34**	**30.22**	**40.00**
SFAs	**9.42**	**9.67**	**19.98**	**27.56**
MUFAs	**6.23**	**7.08**	**8.35**	**10.78**
PUFAs	**0.59**	**0.59**	**1.90**	**1.66**

ตารางที่ 11 ชนิดและปริมาณกรดไขมันในตัวอย่างแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกจากดินชายฝั่งจังหวัดระยอง (%TFA)

Fatty acid	RY8-8	RY8-3
C6:0	0.15±0.06	0.12±0.02
C12:0	0.13±0.01	0.16±0.02
C13:0	nd	nd
C14:0	0.64±0.18	0.69±0.02
C14:1	0.12±0.01	0.16±0.03
C15:0	2.96±0.07	2.83±0.09
C15:1	nd	nd
C16:0	8.30±0.79	9.48±0.11
C16:1n7	1.39±0.07	1.43±0.02
C17:0	1.43±0.06	1.17±0.01
C17:1	0.53±0.06	0.45±0.02
C18:0	2.70±0.02	1.42±0.04
C18:1n9	0.31±0.03	0.36±0.01
C18:2n6	0.22±0.04	0.09±0.03
C18:3n6	nd	nd
C18:3n3	nd	nd
C20:0	nd	nd
C20:1n9	nd	nd
C20:2	nd	nd
C20:3n6	nd	nd
C20:4n6	nd	nd
C20:5n3	nd	nd
C22:0	nd	nd
C22:1n9	nd	nd
C22:2	nd	nd
C23:0	nd	nd
C24:0	nd	nd
C22:6n3	nd	nd
C24:1n9	nd	nd
sum	**18.87**	**18.35**
SFAs	**16.31**	**15.86**
MUFAs	**2.35**	**2.40**
PUFAs	**0.22**	**0.09**

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันจากยีสต์

การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันจากตัวอย่างเซลล์ยีสต์ *Pichia* sp. พบองค์ประกอบกรดไขมันส่วนใหญ่ เป็นชนิดไม่อิ่มตัว ได้แก่ Lauric acid (C12:0), Myristic acid (C14:0), Penta- decanoic acid (C15:0), Palmitic acid (C16:0), Palmitoleic acid (C16:1), Hepatodecaenoic acid (C17:0), Oleic acid (C18:1n9), Linoleic acid (C18:2n6c), Linolenic acid (C18:3n3) ซึ่งรายงานของ Sreedevi N. Kutty และ Rosamma Philip ในปี 2008 กล่าวว่ากรดไขมันที่พบในยีสต์จะมีลักษณะเฉพาะ ขึ้นกับสายพันธุ์ของยีสต์ แต่ส่วนใหญ่จะเป็น C16-C18 และจากการหาคุณค่าอาหาร (Proximate analysis) ในตัวอย่าง ยีสต์ *Pichia* sp เลี้ยงที่ความเค็ม 25 ppt 72 ชั่วโมง ด้วยอาหารกากชานอ้อย พบค่าความชื้นร้อยละ 66 เถ้าร้อยละ 2 ไขมันร้อยละ 0.22 และปริมาณโปรตีนร้อยละ 42 ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่ายีสต์ *Pichia* sp. มีปริมาณโปรตีนที่ค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงยีสต์ *Candida* sp. S 27 เพื่อให้ได้ผลิตผลและคุณค่าอาหารที่ดีที่สุด โดยเลี้ยงในอาหารสองชนิด Barnett and Ingram's Modified (BIM) medium และ Molasses-Yeast extract medium พบว่าเลี้ยงด้วย BIM มี Biomass เพิ่มขึ้น ร้อยละ 18.75 และพบว่าปริมาณคุณค่าอาหารไม่แตกต่างกัน โดยพบปริมาณโปรตีนร้อยละ 33.3 คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 29.6 ปริมาณไขมันร้อยละ 2.23 และเถ้า ร้อยละ 6.2 และเลี้ยงด้วย Molasses-Yeast extract medium พบปริมาณโปรตีนร้อยละ 34.23 คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 30.1 ปริมาณไขมันร้อยละ 2.58 และเถ้า ร้อยละ 7 และมีความชื้นร้อยละ 72 กรดไขมันที่พบใน Marine yeast *Candida* sp. S 27 เป็น Oleic acid (35.91 %) และ Linoleic acid (25.53 %). กรดไขมันส่วนใหญ่เป็นชนิดอิ่มตัว (SFAs) ได้แก่ Palmitic acid, Lauric acid, Myristic acid และ Stearic acid ไม่มีการตรวจพบกรดไขมันพวก HUFAs และพบว่าสภาวะที่ดีในการเลี้ยงยีสต์ *Candida* sp. S 27 ความเค็ม 4.68%, pH 5.97 และอุณหภูมิ 32.72 0C (SIMI JOSEPH P, 2009)

เนื่องจากกากชานอ้อยมีองค์ประกอบหลักของน้ำตาลซูโครส (Sucrose) ที่ประกอบด้วยน้ำตาล 2 โมเลกุล คือ น้ำตาลกลูโคส (Glucose) และน้ำตาลฟรุกโตส (Fructose) กากชานอ้อยถือเป็นชีวมวลที่เหลือใช้จากทางการเกษตร จึงมีความเป็นไปได้ที่นำกากชานอ้อยมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตของยีสต์ จากคุณสมบัติของยีสต์ที่มีช่วงชีวิตสั้น และมีการใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงน้อย สิ่งที่สำคัญคือ ยีสต์สามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีองค์ประกอบคล้ายคลึงกันกับพืช เช่น กรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9) และกรดไขมันไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6) ซึ่งเป็นกรดไขมันจำเป็นที่ร่างกายมนุษย์เรานั้นไม่สามารถสร้างขึ้นเองได้ (สมถวิล จริตควร และคณะ, 2551) นอกจากนี้มีรายงานว่า ปัจจัยต่าง ๆ ทางสิ่งแวดล้อมยังมีผลต่อปริมาณการผลิตกรดไขมันในยีสต์ เช่น ปัจจัยด้านความเค็ม หากความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 0 เป็นร้อยละ 10 ของน้ำหนักต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้ปริมาณกรดไขมันของยีสต์ *Candida albicans* เพิ่มขึ้น จากร้อยละ 0.32 เป็นร้อยละ 6.29 ของน้ำหนักต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ปริมาณความเข้มข้นของเกลือสูงมากเกินไปอาจจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ (Hunter and Rose, 1971) Martina et al., 2004 รายงานว่า ระดับความเค็มมีผลต่อการผลิตกรดไขมันของยีสต์ *Hortaea werneckii* และ *Phaeotheca triangularis* และ *Aureobasidium pullulans* เช่นกัน โดยพบกรดไขมันปาล์มิติก (Palmitic acid, C16:0), กรดไขมัน สเตียริก (Stearic acid, C18:0), กรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9) และกรดไขมันไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6) องค์ประกอบหลักของยีสต์ทั้งสามชนิด นอกจากนี้ กรดไขมันที่พบสูงสุดในยีสต์ *H. werneckii* และ *P. triangularis* ซึ่งเป็นยีสต์ชอบความเค็ม (Halophilic) คือ กรดไขมันสเตียริก (Stearic acid, C18:0) ซึ่งพบสูงสุดถึงร้อยละ 24 - 25 ของกรดไขมัน

ทั้งหมด เมื่อเลี้ยงในที่มีความเค็มร้อยละ 25 พีพีที แต่ยีสต์ *A. pullulans* ซึ่งเป็นยีสต์ทนความเค็ม (Halotolerant) มีพบกรดไขมันไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6) สูงสุดร้อยละ 50 ของกรดไขมันทั้งหมด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเค็มร้อยละ 10 จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีกรดไขมันที่แตกต่างกัน ในสาหร่ายเซลล์เดียว ส่วนใหญ่จะเป็นพวก Even-chain saturated หรือพวก Monounsaturated fatty acids ที่ใช้ในการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัว กรดไขมันส่วนใหญ่จะไม่อยู่ในรูปกรดไขมันอิสระแต่จะมีโครงสร้างอยู่ในรูปของโมเลกุลเชิงซ้อน (Complex molecules) เช่น Acylglycerol, Glycosylglycerol และ Acylphosphoglycerol lipids ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นกรดไขมัน 7 ชนิด คือ Myristic (C14:0), Palmitic (C16:0), Palmitoleic (C16:1n7), Stearic (C18:0), oleic (C18:1n9), Linoleic (C18:2n6) และ Linolenic โดยพบอยู่ประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด (Harwood และ Russell, 1984) Shimen และคณะ (1989) พบว่าเชื้อรา *Mortierella alpina* 20-17 สามารถผลิตกรดไขมันที่มี AA (C20:4n6) ได้มากที่สุด ส่วนกรดไขมันอื่น ๆ ในเส้นใยได้แก่ Palmitic acid, Stearic acid, Oleic acic, LA (Linoleic C18:2n6), ALA [**α**-linolenic acid (18:3n3] และ GLA (C18:3n6) Anamnart และคณะ (2004) ได้รายงานผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในยีสต์ *Hansenula polymorpha* สายพันธุ์ CBS 1976 พบว่าประกอบไปด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัว Oleic acid (C18:1n9), GLA (C18:3n6) และ ALA (C18:3n3) ส่วนกรดไขมันในแบคทีเรียพบว่าเป็นสารประกอบพวก Short-chain polyunsatu- rated fatty acid และบางส่วนเป็น Linoleic acid (GLA) (Russell และ Nichols, 1999) สำหรับโปรโตซัว Sul และคณะ (2000) ได้ศึกษาใน *Parauronema acutum* พบว่ามีกรดไขมันหลายชนิดดังนี้ คือ กรดไขมันอิ่มตัว ได้แก่ Myristic acid, Palmitic acid และ Stearic acid ซึ่งมีประมาณ 20- 30 เปอร์เซ็นต์ ของกรดไขมันทั้งหมด กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่ 1 ถึง 3 พันธะ ได้แก่ Oleic acid, LA, ALA และ ETA ซึ่งมีอยู่ประมาณ 35-50 เปอร์เซนต์ ของกรดไขมันทั้งหมด สำหรับกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง ได้แก่ EPA และ DHA มีอยู่ประมาณ 16-25 เปอร์เซ็นต์ ของกรดไขมันทั้งหมด Stredansky และคณะ (2000) ได้รายงานการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะ ในรา Pythium ultimum พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ประกอบด้วย ข้าวบาร์เลย์ (28.5 เปอร์เซ็นต์) Spent malt grains (5.75 เปอร์เซ็นต์) น้ำมันลินสีด (5.75 เปอร์เซ็นต์) และสารละลายอาหาร (60 เปอร์เซ็นต์) ที่อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน จะพบกรดไขมัน ดังนี้ คือ Myristic (C14:0) ร้อยละ 6.8, Palmitic (C16:0) ร้อยละ 14.1, Palmitoleic (C16:1n7) ร้อยละ 2.3, Stearic (C18:0) ร้อยละ 21.3, Oleic (C18:1n9) ร้อยละ 22.3, Linoleic (C18:2n6) ร้อยละ 20.4, **α**–linolenic (C18:3n3) ร้อยละ 19.6, Arachidonic (C20:4n6) ร้อยละ 5.9 และ Eicosapentaenoic (C20:5n3) ร้อยละ 7.9

การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันจากยีสต์ที่ตรึงในแคลเซียมอัลจิเนต

การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันจากตัวอย่างเซลล์ยีสต์ *Pichia sp.* ที่ผ่านการตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต พบว่ากรดปาล์มิติก (Palmitic acid, C16:0) เป็นองค์ประกอบสูงที่สุดรองลงมาคือกรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9) ตามลำดับ โดยพบกรดไขมันอิ่มตัวทั้งหมด (Saturated fatty acids : SFAs) ร้อยละ 32.61 ของกรดไขมันทั้งหมด เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (Monounsaturated Fatty acids: MUFAs) ร้อยละ 20.36 ของกรดไขมันทั้งหมด มีกรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9) เป็นองค์ประกอบที่มากที่สุดปริมาณร้อยละ 17.83 ของกรดไขมันทั้งหมด กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated Fatty Acids: PUFAs) ร้อยละ 9.93 ของกรดไขมันทั้งหมดและมีกรดไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6) เป็นองค์ประกอบที่มากที่สุดปริมาณร้อยละ 3.14 ของกรดไขมันทั้งหมด ซึ่งปริมาณและองค์ประกอบของกรดไขมันที่พบจะมีความแตกต่างกันอาจเนื่องจากปัจจัยการเลี้ยง และชนิดของยีสต์ ดัง

การศึกษาของ อัจฉราวรรณ ในปี 2530; Evans และ Ratledge ในปี 1992 ได้ศึกษาอาหารที่ใช้เลี้ยงยีสต์และองค์ประกอบของกรดไขมันในยีสต์ *Candida curvata* โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการศึกษาคือ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลแลคโตส น้ำตาลไซโลส และเอทานอล ซึ่งพบว่ากรดไขมันจากเชื้อยีสต์ *C. curvata* ในแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลไซโลส ให้กรดไขมันอิ่มตัวชนิด กรดปาล์มิติก (Palmitic acid, C16:0) และกรดสเตียริก (Stearic acid,C18:0) สูงที่สุด แต่กลับให้กรดไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6) ที่เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวน้อยที่สุด ตรงกันข้ามกับแหล่งคาร์บอนที่เป็นเอทานอล เพราะกรดไขมันจากยีสต์ *C. curvata* ในเอทานอลให้กรดไขมันอิ่มตัว พวกกรดปาล์มิติกน้อยที่สุด แต่กลับให้กรดไขมันไม่อิ่มตัว พวกกรดไลโนเลอิกสูงที่สุด ซึ่งการวิจัยครั้งนี้ได้นำกากชานอ้อยมาใช้เลี้ยงยีสต์ *Pichia* sp. (BS 6-2) ที่ความเค็ม 25 พีพีที พบว่ายีสต์มีการมีการเจริญสูงสุดที่เวลา 72 ชั่วโมง และผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวโดยเฉพาะกรดไขมันไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6) ในปริมาณที่สูง (18.40%TFA) และพบว่าให้ปริมาณกรดไขมันที่สูงกว่าเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยที่มีความเค็ม 30 และ 35 พีพีที (อัญชัญ ธนบุญรุ่งเรือง และอมรรัตน์ อุตรไชย, 2555)

แบคทีเรียและยีสต์พบได้ทั่วไปในธรรมชาติรวมทั้งในทะเล แต่ละชนิดมีคุณสมบัติแตกต่างกัน ปัจจุบันพบว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถนามาใช้เป็นอาหารสำหรับสัตว์ และยีสต์ก็เป็นจุลินทรีย์อีกชนิดที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากยีสต์บางชนิดมีคุณสมบัติของการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Immunostimulatory properties) และบางชนิดเป็นแหล่งสารอาหารโปรตีน ไขมัน และวิตามิน (Kutty และ Phillip, 2008) การนำยีสต์มาเป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ โดยใช้เป็นแหล่งโปรตีนที่เราเรียกว่า โปรตีนเซลล์เดียว (Single cell protein) หรือใช้เป็นโปรไบโอติค (Probiotic) ช่วยเสริมสุขภาพให้กับสัตว์เลี้ยง ทาให้สัตว์แข็งแรง และมีภูมิต้านทานโรคสูงขึ้น (Landecker, 1996) ยีสต์สามารถเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ในปริมาณมากโดยใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลายชนิดอย่างรวดเร็ว ทำให้มีต้นทุนในการผลิตต่ำ วัสดุที่เหลือทิ้งจากการเกษตร เช่น กากชานอ้อยนับว่าเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญและการสร้างพลังงานที่ดี ทั้งยังลดต้นทุนและเป็นการใช้ทรัพยากรอย่างคุ้มค่า

มีการศึกษาสภาวะอื่น ๆ ต่อการเจริญ การผลิตไขมัน การผลิตกรดไขมัน ของยีสต์ ดังเช่นการศึกษาผลของความเค็ม จากศึกษาของ Kamlangdee, N. and Fan, K.W. ในปี 2003 ที่ทำการศึกษา การผลิตกรดไขมันชนิด PUFAs ในตัวอย่าง *Schizochytrium* sp. strains (N-1, N-2, N-5, N-6, and N-9) ที่คัดแยกจากใบไม้ *Kandelia candel* ป่าชายเลน ประเทศฮ่องกง ที่เลี้ยงด้วยอาหาร 60 กรัมกลูโคส และ 10 กรัม ของ Yeast extract ใน 15 % น้ำทะเลเทียม pH เริ่มต้น 6.0 เลี้ยงแบบเขย่าที่ 25°C เป็นเวลา 52 ชม. พบชนิดกรดไขมัน 15:0 = 28.7%; 16:0= 21.3%; 18:0= 0.9%; 18:3= 0.2%; 20:4= 0.3%; 20:5= 0.9%; 22:4=6.7%; 22:6=36.1%; และ กรดไขมันตัวอื่น ๆ 9.3% และพบว่าความเค็มที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 20-30% และจากการศึกษาของ Lee และคณะในปี 1989 ที่ทำการศึกษาผลของความเค็มต่อองค์ประกอบกรดไขมันในตัวอย่าง *Porphyridium cruentum* (Rhodophyceae) พบว่าเชื้อเจริญได้ดีที่สุดที่ 0.45 M และ 0.8 M NaCl และพบว่าปริมาณ Palmitic acid จะลดลงเมื่อปริมาณ NaCl ใน Medium เพิ่มขึ้น และเมื่อปริมาณ NaCl ลดจาก 0.8 M NaCl มาเป็น 0.2 M ปริมาณ Palmitic acid จะเพิ่มขึ้น และปริมาณ PUFAs (Linolenic และ Arachidonic acids) จะลดลงในช่วงแรกและเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณ NaCl เพิ่มเป็น 0.8 M และที่ 1.5 M NaCl พบปริมาณ PUFAs ถึงร้อยละ 78.2%TFA และจากการศึกษาของ Kai-Chuang Chaung และคณะในปี 2012 พบว่าการเจริญ การผลิตไขมัน (Biomass) และปริมาณกรดไขมัน DHA ของยีสต์ *Aurantiochytrium mangrovei* strain BL10 มีผลมาจากปริมาณเกลือ กลูโคส Yeast extract และปริมาณออกซิเจน และ Stages ของ BL10 ผลการศึกษาพบว่าผลผลิต (Biomass) ของ BL10 จะมากขึ้นเมื่อความเค็มอยู่ระหว่าง 0.2-

3.0% เมื่อความเค็มลดลงเป็น 0.1 % Biomass, Lipid content, DHA และสัดส่วน DHA/ Palmitic acid ก็จะลดลงด้วย และมีการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อรูปแบบกรดไขมันของยีสต์จากการศึกษาของ Bárbara Rodríguez และคณะในปี 2012 ที่ทำการศึกษารูปแบบกรดไขมันของยีสต์ Torula yeast (*Candida utilis*) โดยใช้ส่าเหล้า (Distiller's vinasse) เป็นแหล่งคาร์บอนได้ปริมาณกรดไขมันโดยรวม 23.66 g/kg โดยพบกรดไขมัน Linoleic acid (C18:2n6) ในปริมาณสูงสุด (729 mg/100 g) และกรดไขมันชนิดอิ่มตัวพบ Palmitic acid (C16:0) ในปริมาณสูงสุด (21 %), และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวพบ Oleic acid (C18:1n9) ปริมาณสูงสุด (22 %) และตรวจพบกรดไขมัน Linolenic acid (C18:3n3) ด้วย และผลการศึกษาของ Bárbara Rodríguez และคณะมีความสอดคล้องกับ Gutiérrez and da Silva (1993) ที่ทำการศึกษาองค์ประกอบกรดไขมันในยีสต์สองชนิดที่เลี้ยงด้วย Sugarcane molasses โดยสรุปว่าองค์ประกอบกรดไขมันขึ้นอยู่กับชนิดของ Molasses และชนิดของยีสต์ โดยพบ Linoleic (C18:2n6) และ Palmitic acids (C16:0) ในปริมาณสูงสุด (837 และ 801 mg/100 kg, ตามลำดับ) และจากการศึกษาของ Guang-Yuan Wang และคณะในปี 2012 การผลิตกรดไขมันในยีสต์ *Pichia guilliermondii* Pcla22. พบปริมาณกรดไขมันจากยีสต์ Strain Pcla22 ที่เลี้ยงใน Oil production medium ที่มี Inulin มากกว่า 79.8% โดยกรดไขมันที่พบได้แก่ C (16:0) และ C (18:1), โดยพบ C (18:1) ในปริมาณ 57.9% จากการศึกษาของ Ines Schulze และคณะในปี 2014 ทำการศึกษาปริมาณไขมันและองค์ประกอบกรดไขมันในตัวอย่างยีสต์ *Cryptococcus podzolicus*, *Trichos poronporosum และ Pichia segobiensis* ที่คัดแยกจากดินและมีคุณลักษณะเป็น Oleaginous yeast strains โดยมี Bioreactors ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบ *C. podzolicus* ผลิตไขมัน 31.8% lipid /นน. แห้ง และเลี้ยงที่ 20°C, ขณะที่ *T. porosum* ได้ผลผลิต 34.1% ที่ 25°C และ *P. segobiensis* ได้ผลผลิต 24.6% ที่ 25°C. โดยชนิดกรดไขมันที่พบ คือ Oleic acid ; C18:1n9 ในปริมาณ 39.6 - 59.4% ในตัวอย่างเชื้อทั้งสามสายพันธุ์ ซึ่งจะเห็นได้ว่าชนิดกรดไขมันที่พบจะสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ แต่ปริมาณที่ตรวจพบมีปริมาณค่อนข้างต่ำกว่าการศึกษาของงานอื่น ๆ ดังนั้นการที่จะได้มาซึ่งปริมาณที่เพิ่มขึ้น การศึกษาสภาวะการเลี้ยงด้านอื่น เช่น แหล่งคาร์บอน ความเค็ม ความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ ตลอดจนระยะเวลาในการเลี้ยง เป็นต้น ควรต้องมีการศึกษาต่อไป

มีการศึกษาบทบาทของไขมันและกรดไขมันต่อภูมิคุ้มกันของมนุษย์ (Calder, 2007) และสัตว์น้ำจากรายงาน Balfry และ Higgs ในปี 2001 รายงานว่ากลไกการทำงานของกรดไขมันที่อาจมีผลในการต้านทานโรคและมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำคล้ายคลึงกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม กล่าวคือกลไกการทางานในด้านองค์ประกอบไขมันของเซลล์เมมเบรนฟอสโฟลิปิดของเม็ดเลือดขาว เนื่องมาจากการตอบสนองภูมิคุ้มกันเกี่ยวข้องกับกิจกรรมการทางานบนเซลล์เมมเบรนของเม็ดเลือดขาว (e.g. phagocytosis, antigen-antibody binding, Activation steps involving cytokine production) และกรดไขมันอาจไปเปลี่ยนแปลงกลไกการสื่อสาร (Signal transduction) ที่เกี่ยวข้องกับ Protein kinase C องค์ประกอบไขมันในอาหารอาจมีผลต่อการต้านทานโรคโดยทางการผลิต Eicosanoids จากกรดไขมัน Arachidinic acid, Eicosapentaenoic acid, Docosahexaenoic acid และ Dihomo-r - eicosatrienoic acid Eicosanoids products in fish e.g. lipoxins (LXA4, LXB4), Leucostrienes (LTB4, LTB5), Prostagl และ ins (PGE2, PGE3), Thromboxanes (TX) (Balfry และ Higgs, 2001) จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นจะเห็นได้ว่าไขมันมีบทบาทอย่างมากต่อระบบภูมิคุ้มกันเพราะนอกจากบทบาทความสัมพันธ์ (Interaction) ระหว่างไขมันในอาหารและระบบภูมิคุ้มกันแล้ว ไขมันยังเป็นองค์ประกอบในระดับเซลล์ (Cellular level) ดังนั้นในเม็ดเลือดขาว (Lymphocytes) จึงมีกรดไขมันที่จาเป็นและไม่จาเป็นต่อร่างกายเป็นองค์ประกอบ (Gurr, 1983) เนื่องจากว่าคุณสมบัติหนึ่งของไขมันทาให้เซลล์มีความยืดหยุ่นและมีคุณสมบัติในการให้สารซึมผ่านได้ (Fluidity และ Per-

meability) ดังนั้นกิจกรรมต่าง ๆ ของเซลล์เมมเบรนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ Membrane receptors, และ Thebinding of mitogens, Antigens และ Soluble mediators จึงเกี่ยวข้องกับกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ (Johnston, 1988) ยีสต์ซึ่งเป็นโปรตีนเซลล์เดียว (Single cell protein) เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่ได้รับความสนใจอย่างมากในยุโรปและอเมริกา เนื่องจากสามารถผลิตได้มากในระยะเวลาสั้นและใช้พื้นที่การผลิตน้อย การนำยีสต์ไปประยุกต์ใช้ในด้านอุตสาหกรรมต่าง ๆ โดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหารหรือการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (พันทิพา พงษ์เพียจันทร์, 2539) ด้วยคุณสมบัติที่ดีของยีสต์ *Pichia* sp. ด้านคุณค่าอาหารและองค์ประกอบกรดไขมัน จึงนำเซลล์ยีสต์ดังกล่าวมาตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต โดยนำมาผสมในสูตรอาหารเพื่อให้สารอาหารคงสภาพเมื่ออยู่ในน้ำในระยะเวลานานขึ้น พบว่าในเม็ดเจลตรึงด้วยเซลล์ยีสต์มีองค์ประกอบกรดไขมันที่ดีเช่นเดียวกับเซลล์ยีสต์ เพื่อการใช้ประโยชน์จากเซลล์ยีสต์ *Pichia* sp. ต่อระบบภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำ การพัฒนาการเลี้ยงยีสต์เพื่อให้ผลผลิตและปริมาณกรดไขมันที่จำเป็นจึงควรมีการศึกษาต่อไป

ชนิดและปริมาณกรดไขมันในเซลล์แอคทีโนมัยซีท

เมื่อทำการเปรียบชนิดและปริมาณกรดไขมันในตัวอย่างเซลล์แอคทีโนมัยซีทที่ทำการศึกษาในครั้งนี้กับการศึกษาที่ผ่านมาพบชนิดกรดไขมันไม่แตกต่างกัน แต่ปริมาณกรดไขมันมีความแตกต่างกัน โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 เช่นเดียวกัน อาจเนื่องจากระยะการเลี้ยงที่แตกต่างกัน ในการศึกษาครั้งนี้มีช่วงการเลี้ยง 3-14 วัน แต่การศึกษาที่ผ่านมาเซลล์แอคทีโนมัยซีทที่คัดแยกจากดินป่าชายเลนจังหวัด จันทบุรี ชลบุรี และจังหวัดนครศรีธรรมราช เลี้ยงที่ระยะเวลา 7-14 วัน โดยชนิดกรดไขมันที่พบได้แก่ C14:0, C15:0, C16:0, C16:1n7, C17:0, C17:1, C18:0, C18:1n9 และ C18:2n6 และในการศึกษาครั้งนี้ตรวจพบกรดไขมัน C18:3n6 ซึ่งไม่พบในการศึกษาครั้งก่อน และปริมาณกรดไขมันโดยรวมในการศึกษาครั้งนี้มีปริมาณน้อยกว่าการศึกษาครั้งก่อนเช่นกัน จากการศึกษาที่ผ่านมา ตัวอย่างแอคทีโนมัยซีท PL 2-2 ที่คัดแยกจากดินตะกอนป่าชายเลนจังหวัดนครศรีธรรมราช พบปริมาณของกรดไขมันสูงสุดคิดเป็นปริมาณร้อยละ 96.28 ในการศึกษาครั้งนี้แอคทีโนมัยซีท RY3-37 ที่คัดแยกจากดินตะกอนป่าชายเลนจังหวัดระยอง มีปริมาณกรดไขมันสูงสุดคิดเพียงร้อยละ 55.14

จากการศึกษาในครั้งนี้ชนิดกรดไขมันที่พบจะเป็นกรดไขมันชนิดอิ่มตัว (SFAs) ทั้งหมด โดยชนิดที่ตรวจพบปริมาณสูงสุดเป็น Plamitic acid (C16:0) เช่นเดียวกัน และพบกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน PUFAs ในปริมาณที่ค่อนข้างต่ำมาก โดยกรดไขมันชนิดจำเป็น Linoleic Acid (C18:2n6) พบ ในตัวอย่าง CP 8-4B ในปริมาณ 1.74±0.09 %TFA และ **α**-Linolenic Acid (C18:3n3) พบในตัวอย่าง CP-PH 3-9 ในปริมาณ 0.29±0.02%TFA เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในครั้งที่ผ่านมาตัวอย่างแอคติโนมัยซีท PL 2-2, PL 4-6 และ WN- POR-02-1 พบชนิดกรดไขมันเป็นชนิดไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (PUFAs) โดยชนิดที่พบปริมาณสูงสุดเป็นกรดไขมันไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6: 37.38,36.26, 28.61%TFA ตามลำดับ) ซึ่งชนิดกรดไขมันที่ตรวจพบในการศึกษาสอดคล้องกับการศึกษาของ SM Pimentel-Elardo และคณะ (2009) ทำการแยก Actinomycete จากฟองน้ำทะเล *Axinella polypoides* ที่เก็บจาก Banyuls-sur-Mer ประเทศฝรั่งเศส และทำการหาชนิดและปริมาณกรดไขมันพบ Actinomycete Strain Pol001T มีองค์ประกอบกรดไขมันเป็น Iso-C16:0 (30.78%), Anteiso-C15:0 (17.77%), Iso-C15:0 (12.03%), Anteiso-C17:0 (9.80%), Iso-C16:1 (6.92%), Iso-C14:0 (5.77%) and iso-C17:1 (4.58%). และจากการศึกษาของ Khomsan, Chanwit, Pattama, Khanit and Chitti (2013) ทำการแยก Actinomycete strain, S3-1T จากฟองน้ำทะเลที่เก็บจาก เกาะสีชัง จังหวัดชลบุรีและทำการแยกชนิดของไขมันพบมีองค์ประกอบเป็น Phosphatidylethanolamine, Phosphatidylmethylethanolamine, Phosphatidylglycerol,

Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylinositol, Phosphatidylinositol mannosides, Phosphoglycolipid and unknown polar lipids. (Khom et al, 2013) และจากการศึกษาของ Koval'chuk LP และคณะในปี 1980 พบว่ารูปแบบของกรดไขมันในตัวอย่างแอคทีโนมัยซีทขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อโดยพบกรดไขมัน C13-C19 และพบว่าเมื่อเลี้ยงใน Complex media สัดส่วนของ กรดไขมัน C14:0, C14:1, C16:0, C17:0, C17:1, C18:1, C18:2 จะเปลี่ยนไป เช่นเดียวกับการศึกษาชนิดและปริมาณกรดไขมันใน Actinomycete *Streptomonospora halophila* sp. ที่คัดแยกจาก ดินในจังหวัด Xinjiang Province ประเทศจีน พบองค์ประกอบกรดไขมันจะเป็น i-C16:0, ai-C17:0, 10-methyl C17:0 and 10-methyl C18:0 และจากการศึกษาของ Sobolevskaya, M และคณะ (2012) ทำการศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันอิสระในตัวอย่าง *Streptomyces* sp. KMM 7210 and *Nocardiopsis umidischolae* KMM 7036 จาก Okhotsk Sea โดยเลี้ยงด้วย Potato starch และ Millet broth พบว่ามีการผลิตกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว และแบบ Branched fatty acids และพบแอคติโนมัยซีท 7 สายพันธุ์ Genus Streptomyces ที่คัดแยกจากทะเลสาบ Baikal มีการผลิตกรดไขมันทั้งชนิดอิ่มตัว ไม่อิ่มตัว และแบบ Branched fatty acids เช่นเดียวกับการศึกษาของ Eun Jung Lee และคณะในปี 2011 พบแอคติโนมัยซีท *Streptomyces* sp. A1022 ที่คัดแยกจากดิน บริเวณฟาร์ม Wonju City, Gangwon ประเทศเกาหลี มีองค์ประกอบกรดไขมันแบบ Branched-chain acids โดยพบ C15:0 iso ปริมาณ 47.4%TFA และพบ C15:0 anteiso ปริมาณ 28.46%TFA และจากการศึกษาของ Michael Goodfellow และคณะในปี 2012 พบกรดไขมัน iso-C16:0 ปริมาณ 37.4 % และ C17:1 w8c ปริมาณ 24.9 % ในตัวอย่างแอคติโนมัยซีท *Verrucosispora fiedleri* sp ที่คัดแยกจากดินตะกอนประเทศนอร์เวย์ และจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงแอคติโนมัยซีท *Nocardiopsis* sp. (S-1). ที่คัดแยกจากสาหร่ายทะเล และสัตว์ทะเลชายฝั่ง Jeju Island ประเทศเกาหลี พบว่าแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อคือ Galactose และ Yeast extracts ค่า pH 7.6 อุณหภูมิ 25oC ความเข้มข้นของ โซเดียมคลอไรด์ 2.5% และเลี้ยงเป็นเวลา 8 วัน จากการศึกษาพบองค์ประกอบกรดไขมัน (Cellular fatty acid profile) 14:0 ISO = 0.48, 15:0 ISO= 0.57, 15:0 ANTEISO= 3.56,16:0 ISO= 26.82, 16:1 CIS 9=1.81, 16:0= 1.14, 17:0 ISO= 2.07, 17:0 ANTEISO= 23.42,17:1 CIS9=5.26, 17:0= 2.00, 17:0 10METHYL =1.29, 18:0 ISO= 2.35, 18:1 CIS9= 21.01, 18:0= 6.69,TBSA 18:0 10 METHYL= 1.53 ซึ่งผู้วิจัยกล่าวว่าเชื้อ แอคติโนมัยซีท *Nocardiopsis* sp ดังกล่าวมีประโยชน์ทางอุตสาหกรรมยา และอาหาร (Man-Chul Kim et al 2014) มีการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงแอคติโนมัยซีท ทั้งแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน เช่น การศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อแอคติโนมัยซีทในดินจากแหล่งต่าง ๆ ได้แก่ Forest, Pasture, Rain-fed และ Irrigated cultivated land ประเทศ Iran โดยศึกษาผลของแหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจน ที่มีต่อ Extracellular phosphatase activity แหล่งไนโตรเจนที่ผู้ศึกษานำมาทดลองได้แก่ Mmalt extract, Meat extract, Soybean meal, Arginine, NH4NO3, $(NH4)_2SO_4$ และ $NaNO_3$ แหล่งคาร์บอนได้แก่ Glucose, Maltose, Lactose, Fructose, Sucrose, Pea flour, Glycerol, Maltodextrine และมีการใช้ Medium SPG, MGA, ISP2, LB+rice bran, Corn starch (Ghorbani-Nasrabadi, R, 2013)

สรุปผลการศึกษา

1. จากการวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันในตัวอย่างเซลล์ยีสต์ *Pichia* sp. ด้วยอาหารกากชานอ้อยที่ความเค็ม 25 พีพีที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เทียบกับสารมาตรฐานกรดไขมัน 37 ชนิด ผลการศึกษาพบกรดไขมัน 9 ชนิด ได้แก่ Lauric acid, (C12:0), Myristic acid, (C14:0), Penta- decanoic acid, (C15:0), Palmitic acid, (C16:0), Palmitoleic acid, (C16:1), Hepatodecaenoic acid, (C17:0), Oleic acid, (C18:1n9), Linoleic acid, (C18:2n6c), Linolenic acid, (C18:3n3) โดยเป็นกรดไขมันชนิดอิ่มตัว (SFAs) สูงสุด 29.34 %TFA (4.99 mg/g wet wt. ; 14.18 mg/g dry wt.) มี Palmitic acid, (C16:0) เป็นกรดไขมันหลัก 24.48%TFA 4.19 mg/g wet wt.; 11.90 mg/g dry wt. รองลงมาคือ กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน PUFAs 22.51%TFA (4.45 mg/g wet wt.; 12.71 mg/g dry wt. และมี Linoleic acid, (18:2n6) เป็นกรดไขมันหลัก 18.40%TFA (3.62 mg/g wet wt., 10.33 mg/g dry wt.)

2. จากการหาคุณค่าอาหาร (Proximate analysis) ในเซลล์ยีสต์ *Pichia* sp เลี้ยงที่ความเค็ม 25 ppt 72 ชั่วโมง พบปริมาณโปรตีนร้อยละ 42 ไขมันร้อยละ 0.22 ค่าความชื้นร้อยละ 66 และเถ้าร้อยละ 2

3. การวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันในเซลล์ยีสต์ *Pichia* sp. ที่ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต เทียบกับสารมาตรฐานกรดไขมัน 37 ชนิด พบกรดไขมัน 9 ชนิด เช่นเดียวกับเซลล์ยีสต์ *Pichia* sp. โดยพบกรดไขมันชนิดอิ่มตัวสูงสุด 32.61%TFA (0.08mg/g wet wt; 0.87 mg/g dry wt) มี Palmitic acid, (C16:0) เป็นองค์ประกอบหลักปริมาณ 21.20%TFA (0.03 mg/g wet wt; 0.38 mg/g dry wt.) รองลงมาคือ กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว 20.36 %TFA (0.04 mg/g wet wt; 0.45 mg/g dry wt) มี Oleic acid, (C18:1n9) เป็นองค์ประกอบหลักในปริมาณ 17.8%TFA (0.027 mg/g wet wt;0.314 mg/g dry wt.) และพบกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (PUFAS) 9.93%TFA (0.05 mg/g wet wt; 0.54 dry wt.) โดย Linolenic acid (C18:3n3) เป็นกรดไขมันหลัก (6.79 %TFA ;0.033 mg/g wet wt; 0.372 mg/g dry wt.) และพบ Linoleic acid, (C18:2n6) 3.14%TFA (0.015mg/g wet wt; 0.171 mg/g dry wt.)

4. จากการศึกษาชนิดและปริมาณกรดไขมันในเซลล์ของแอคติโนมัยซีทที่ทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP 2 เป็นระยะเวลา 3-14 วัน ที่คัดแยกจากดินป่าชายเลนจังหวัดชลบุรี ระยอง จันทบุรี และ จังหวัดชุมพร รวม 22 ตัวอย่าง ประกอบด้วย BP2-29B, RY2-20, RY2-22, RY2-24, RY2-25, RY3-32, RY3-37, RY3-43,RY7-8, RY 8-3, RY 8-8, CH 54-8, CP-PH2-2, CP3-1, CP-PH3-2, CP-PH3-8, CP-PH 3-9, CP-PH 3-10, CP-PH 3-12, CP-PH 3-13, CP-PH 3-16, CP8-4B ผลการศึกษาพบปริมาณกรดไขมันรวมสูงสุดในตัวอย่าง CP-PH 3-9 จังหวัดชุมพร ในปริมาณร้อยละ 41.96 และพบเป็นชนิดอิ่มตัว (SFAs:9.42-37.63 %TFA) กรดไขมันหลักที่พบได้แก่ Palmitic acid (C16:0) และ Stearic Acid (C18:0) รองลงมาเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (MUFAs:1.85-11.28 %TFA) ชนิดกรดไขมันหลักที่พบได้แก่ Oleic Acid / Elaidic Acid (C18:1n9c, C18:1n9t) และ cis-10-Heptadecenoic Acid (C17:1) และกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (PUFAs) พบในปริมาณที่ต่ำ (nd-1.90 %TFA) โดยกรดไขมันชนิดจำเป็น Linoleic Acid (C18:2n6) พบในตัวอย่าง CP-PH 3-8 (0.86±0.03%TFA), **α**-Linolenic Acid (C18:3n3) พบในตัวอย่าง CP-PH 3-9 (0.29±0.02%TFA)

งานที่จะดำเนินการต่อไป

การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าตัวอย่างยีสต์มีศักยภาพในการผลิตกรดไขมันที่จำเป็นและการสร้างกรดไขมันในยีสต์ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายด้านนอกจากด้านความเค็ม เช่น แหล่งคาร์บอน อุณหภูมิ เวลา เป็นต้น ดังนั้นการศึกษาในปีงบประมาณ 2558 ทางคณะผู้วิจัยจะหาแหล่งคาร์บอน อื่น ๆ ในการเลี้ยงยีสต์ เพื่อผลผลิตและกรดไขมันที่จำเป็นที่สูงขึ้น ส่วนในตัวอย่างสารสกัดไขมันจากเซลล์แอคติโนมัยซีท พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อกลุ่ม *vibrio* ที่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์น้ำ (Marine species) ดังนั้นการหาสภาวะที่เหมาะสมจึงมีความจำเป็นเพื่อให้ได้กรดไขมันที่สูงขึ้น นอกจากนี้จะหารูปแบบของกรดไขมัน เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการจัดจำแนกเบื้องต้นของชนิดเชื้อแอคติโนมัยซีท

เอกสารอ้างอิง

กระบวนการทรานเอสเทอริฟิเคชั่น. วันที่ค้นข้อมูล 20 มกราคม (2556), เข้าถึงได้จาก http://www.barascientific.com/article/Biodiesel2/biodiesel_2.php

กอบกุล เหล่าเท้ง. (2001). โครงการวิจัยการปรับแต่งองค์ประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในยีสต์ Hansenulapolymorpha CBS1976 โดยใช้ยีน 6-desaturase ของ Mucorrouxii ATCC24905 ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ ศูนย์สารสนเทศสิ่งแวดล้อม กรมส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม online available http://www.environNet.in.th เข้าถึงเมื่อ 5 สิงหาคม 2554

ดาวัลย์ ฉิมภู่. (2550). *ชีวเคมี* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นนทวิทย์ อารีย์ชน, สุภาวดี โกยดุล และนิลุบล กิจอันเจริญ. (2546). ผลของความเค็มและอุณหภูมิต่อความอยู่รอดของ Vibrio harveyi. *วิทย์เกษตรศาสตร์, 27*, 67 - 73.

บัญญัติ สุขศรีงาม. (2534). จุลชีววิทยาทั่วไป. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

ประดิษฐ์ มีสุข. (2547). *ชีวเคมีเบื้องต้น (เคมีชีวิต)* (พิมพ์ครั้งที่ 4). สงขลา: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยทักษิณ.

ปาริชาติ สักกะทำนุ. (2544). *สุขภาพลำไส้ใหญ่ และ FOS - โอลิโกฟรุกโตส*. กรุงเทพฯ: รวมทรรศน์.

พนิดา พงศ์ภาณุมาพร. (2543). การจำแนกราสกุล Cordyceps โดยใช้กรดไขมัน ข่าวเทคโนโลยีชีวภาพ (BIOTEC NEWS) 6:1-15

พัชรี บุญศิริ, เปรมใจ อารีจิตรานุสรณ์ และอุบล ชาอ่อน. (2551). *ตำราชีวเคมี* (พิมพ์ครั้งที่ 5). ขอนแก่น: คลังนานาวิทยา.

พันทิพา พงษ์เพียจันทร์. (2539). หลักอาหารสัตว์ เล่ม 2: หลักโภชนาศาสตร์และการประยุกต์. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

พิทักษ์ สูตอนันต์. (2552). *ชีวเคมีทั่วไป*. ชลบุรี: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยบูรพา.

พิมพร วัชรางค์กุล. (ม.ป.ป.). *กรดไขมันโอเมก้า 3 ในสัตว์น้ำ*. วันที่ค้นข้อมูล 25 พฤษจิกายน 2555, เข้าถึงได้จาก http://advisor.anamai.moph.go.th/211/21102.html

เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ. (2543). *อ้อยในฐานะเป็นพืชสมุนไพร*. วันที่ค้นข้อมูล 25 พฤศจิการยน 2555, เข้าถึงได้จาก http://www.e-busitrade.com/Noble_Sugar_Cane_2_index.htm

มนูเทพ กนกศิลป์. (2550). *ผลของสภาวะแวดล้อมต่อการผลิตไขมันของยีสต์ Rhodoto rulal-gracilis*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

วิเชษฐ์ ลีลามานิตย์. (2539). เภสัชกรกับอาหารเพื่อสุขภาพและอาหารทางการแพทย์ (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล.

ศุภศิษฐ์ อรุณรุ่งสวัสดิ์. (2541). *ชีวเคมีพื้นฐาน*. กรุงเทพฯ: พิมพ์ท๊อป.

สมถวิล จริตควร, สุดารัตน์ สวนจิตร และเศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์. (2551). *ความหลากหลายทางชีวภาพและการประยุกต์ใช้ทรอสโทโคตรริดส์จากป่าชายเลนเป็นแหล่งกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ*. ดุษฎีนิพนธ์, สาขาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

สมศักดิ์ วรคามิน. (2552). *โอเมก้า 3 น้ำมันปลา*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สาวิตรี ลิ่มทอง. (2549). *ยีสต์ : ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ.* กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุกัญญา สุนทรส และวิเชียร ริมพณิชยกิจ. (2553). *ชีวโมเลกุล* (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุพิศ ทองรอด. (2535). ความสำคัญของไขมันในอาหารสัตว์น้ำ, *วารสารการประมง 45*(4) หน้า 943-950.

อัญชัญ ธนบุญรุ่งเรือง และอมรรัตน์ อุตรไชย. (2555). การศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันใน ยีสต์ BS 6-2 ที่แยกได้จากน้ำทะเลในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยที่มีความเค็มแตกต่างกัน 3 ระดับ. บัณฑิตวิทยาลัย, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

อาภัสสรา ชมิดท์. (2543). *ชีวเคมี* (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ: รั้วเขียว.

อิงสุรัจจ์ สังข์เงิน และชนิดาภา ยิ่งประยูร. (2554). *การศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในยีสต์ (BS1-2 และ BS6-2) ที่แยกได้จากน้ำทะเลในอาหารเลี้ยงเชื้อจากกากชานอ้อย*. บัณฑิตวิทยาลัย, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

Abbey, M., & Nestel, P. J. (1994). Reduction of blood pressure and plasma triglycerides by omega 3 fatty acids. *J Hypertens*, 1041 - 1045.

Adler, A. J., & Holub, B. J. (1997). Effect of garlic and fish - oil supplementation on serum lipid and lipoprotein concentrations. *Am J, Clin Nutr.*

Albert, C. M., & Hennekens, C. H. (1998). Fish consumption and risk of sudden cardiac death. *JAMA, 279 (1)*, 23 - 28.

Anamnart, S., Wanida, W., Laoteng, K., & Petsom, A. (2004). Elongation of C16:0 to C18:0 fatty acid in methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* CBS 1976 and fatty acid auxotrophic mutants. *Jounal FEMS Microbiology Letters*, *237*, 213 - 218.

Anderson, G. J. (1994). Developmental sensitivity of the brain to dietary n - 3 fatty acid. *J Lipid Res*, *35*, 105 - 110.

Andreishcheva, E. N., Isakova, E. P., & Sidorow, N. N. (1999). Adaptation to Salt Stress in a Salt - Tolerant Strain of the Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochemistry (Moscow), 64 (9),* 1259 - 1266.

Arachidonic acid. วันที่ค้นข้อมูล 22 มกราคม (2556), เข้าถึงได้จาก http://www.foodnetwork solution.com/wiki/word/1650/arachidonic-acid-อะราคิโดนิก

Arbat, A. B., & Zodpe, S. N. (2014). Biodiversity of Actinomycetes Species Isolated from Saline Belt of Akola District. *Research Paper Microbiology, Volume: 4* Issue : 7, pp. 450-452.

Aslan, A., & Triadafilopoulos, G. (1992). Fish oil fatty acid supplementation in active ulcerative colitis Am. *J Gastroenterol*, *87 (4)*, 432 - 437.

AOAC 2000. American Society of Analytical Chemistry and Preparation Method. 999.10.

Balfry, S. K., & Higgs, D. A. (2001). Influence of dietary lipid composition on the immune system and disease resistance of finfish. *In* Lim, C. and Webster, C. D. (eds.) Nutrition and fish health. The Haworth Press, Inc. Binghamton, NY. pp. 213-234.

Bárbara Rodríguez, Christie Iben, Valdivié, M., & Mayuly Martínez.Cuban. (2012). Profile of fatty acids from torula yeast (*Candida utilis*) grown on distiller's vinasse. Journal of Agricultural Science, Volume 46, Number 2, p199-201.

Bhatnagar, I, & Kim, S. K. (2010). Immense essence of excellence: marine microbial bioactive compounds Mar Drugs. 15:8(10): 673-701.

Birch, D. G., & Hoffman, D. R. (1992). Retinal development in very - low - birth - weight infants fed diets differing in omega 3 fatty acid. *Ophthalmol Sci*, *33 (8).*

Brown, M. R., Barrett, S .M. Volkman, J. K., Nearhos, S. P., Nell, J. A., & Allan, G. L. (1996). Biochemical composition of new yeasts and bacteria evaluated ad food for bivalve aquaculture. Aquaculture 143. 341-360

Calder, P. C. (2007). Immunomodulation by omega-3 fatty acids. Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids 77, 327-335.

Calinescu, I., Chipurici, P., Trifan, A., & Badoiu, C. (2012). *Immobilisation*

Christie, W. W. (2003). Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids. 3rd editions. The Oily Press, Bridgewater, UK. 416.

Christophe, G., Kumar, R., & Gaudet, G. (2012). Recent developments in microbial oils production: a possible alternative to vegetable oils for biodiesel without competition with human food. *Brazilian archives of biology and technology, 55*, 29 - 46.

Dahiya, J. P., Wilkie, D. C., Van Kessel, A. G., & Drew, M. D. (2006). Potential strategies for controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post-antibiotic era. Animal Feed Science and Technology, 129, 60-88.

Das, U. N. (2006). Essential fatty acids: Biochemistry, physiology and pathology. *Biotechnology Journal, 1*(4), 420–439.

Docosahexaenoic acid. วันที่ค้นข้อมูล 22 มกราคม (2556), เข้าถึงได้จาก http:/www.foodnet worksolution.com/wiki/word/1904/docosahexaenoic-acid-dha

Douillet, P., Langdon, C. J. (1993). Effects of marine bacteria on the culture of axenic oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) larvae. Biological Bulletin 184:36-51

Doumenq, P., Acquaviva, M., Asia, L., Durbec, J. P., Dréau, Y. Le., Mille, G., & Bertrand, J. C. (1999). The fatty acid Changes in fatty acids of *Pseudomonas nautica*, a marine denitrifying bacterium, in response to *n*-eicosane as carbon source and various culture conditions. FEMS Microbiology Ecology. Volume 28, Issue 2, Pages 151–161

Ergas, D., Eilat, E., Mendlovic, S., & Sthoeger, Z. M. (2002). n-3 Fatty acid and the immune system in autoimmunity. *Isr Med Assoc. J. 4*(1), p.34-38.

Eun Jung Lee, Kyo Yeol Hwang, Hoi-Seon Lee, & Namhyun Chung. (2011). Characterization of a New *Streptomyces* sp. A1022 as a Potential Biocontrol Agent. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 54(3), 488-493

Evans, C. T., & Ratledge, C. (1992). A Comparison of Oleaginous Yeast, *Condida curvata*, Grown on Different Carbon Sources in Continuous and Batch Culture. *Lipids, 18 (9),* 623 - 629.

Folch, J., Lees, M., & Sloane - Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. Journal of Biological Chemistry, *226,* 497 - 509.

Gaiyun Zhang, Yubian Zhang, Xijie Yin, & Shuang Wang. (2015) *Nesterenkonia alkaliphila* sp. nov., an alkaliphilic, halotolerant actinobacteria isolated from the western Pacific Ocean. *Int J Syst Evol Microbiol. 65:516-521.*

Galbbraith, H., & Millter, T. B. (1973b). Physiochemical effects of long chain fatty acids on bacterial cell and their protoplasts. Journal of Applied Bacteriology. 36, p.647-675

Galbbraith, H., & Millter, T. B. (1973c). Physiochemical effects of long chain fatty acids on bacterial respiration and amino acid uptake. Journal of Applied Bacteriology. 36, p.659-675.a

Ghorbani-Nasrabadi, R, Greiner, R., Alikhani, H. A., Hamedi, J., & Yakhchali, B. (2013). Distribution of actinomycetes in different soil ecosystems and effect of media composition on extracellular phosphatase activity. J. Soil Sci. Plant Nutr. vol.13 no.1 *(versión On-line* ISSN 0718-9516)

Guang-Yuan Wang, Zhe Chi, Bo Song, Zhi-Peng Wang, & Zhen-Ming Chi. (2012). High level lipid production by a novel inulinase-producing yeast *Pichia guilliermondii* Pcla22. BioresourTechnol. 14; 124:77-82.

Gurr, M. I. (1983). The role of lipids in the regulation of the immune system. Progr. Lipid Res.22, 257-287.

Gutiérrez, L. E., & Da Silva, R. C. M. (1993). Fatty acid composition of cane molasses and yeasts. *Sci.agric, 50 (3),* 473 - 477.

Harbige, L. S. (1998). Dietary n-6 and n-3 fatty acid in immunity and autoimmune diseases In : Proceeding of the Nutrition Society. 57:555-562.

Harley, J. (2004). Microbiology. วันที่ค้นข้อมูล 25 พฤศจิกายน 2555, เข้าถึงได้จาก http://highered.mcgrawhill.com/sites/0072556781/ information_center

Harwood, & Russel, N. J. (1984). Lipids in plants and microbes: By J L. pp 162. George Allen & Unwin, London.

Hotam Singh Chaudhary, Bhavana Soni, Anju Rawat Shrivastava, Saurabh Shrivastava. (2013). Diversity and Versatility of Actinomycetes and its Role in Antibiotic Production. Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol. 3 (8 Suppl 1), pp. S83-S94 (Available online at http://www.japsonline.com)

Hunter, k., & Rose, A. H. (1971). Yeast lipids and membrane. *In The Yeast, 2*, 211 - 270.

Hwang, C. Y., Lee, I., Cho, Y., Lee, Y. M., Baek, K., Jung, Y.-J., Yang, Y. Y., Lee, T., Rhee, T. S., & Lee, H. K. (2015). *Rhodococcus aerolatus* sp. nov., isolated from subarctic rainwater. *Int Syst Evol Microbiol., 65:465-471;*

Ines Schulze, Silla Hansen, Steffen Großhans, Thomas Rudszuck, KatrinOchsenreither, ChristophSyldatk, & Anke Neumann. (2014). Characterization of newly isolated oleaginous yeasts *Cryptococcus podzolicus*, *Trichos poronporosum* and *Pichia segobiensis* AMB Express, 4:24.

Intriago Pablo, & Jones, D. A. (1993). Bacteria as food for artemia. Aquaculture 113, 115-127.

Johnston, P. V. (1988). Lipids modulation of immune responses. In: Chandra, R.K. (ed.) Nutrition and immunology, Alan R. Liss, Inc., New York, NY, pp. 37-86.

Kai-Chuang Chaung, Chun-Yao Chu, Yu-Ming Su, & Yi-Min Chen. (2012). Effect of culture conditions on growth, lipid content, and fatty acid composition of *Aurantiochytrium mangrovei* strain BL10. AMB Express., 2:42

Kamlangdee, N., & Fan, K. W. (2003). Polyunsaturated fatty acids production by Schizochytrium sp.isolated from mangrove Songklanakarin J. Sci. Technol., 25(5) : 643-650

Khomsan, S., Chanwit, S., Pattama, P., Khanit, S., & Chitti, T. (2013). Micromonospora spongicola sp. nov., an actinomycete isolated from a marine sponge in the Gulf of Thailand. The Journal of Antibiotics 66, 505–509.

Koval'chuk, L. P., Donets, A. T., Burtseva, S. A., Iadovina, V. N., Perepeli'tsa, E. D. (1980). Fatty acids of actinomycete phospholipids Microbiologiia. Sep-Oct; 49(5):746-50.

Kutty, S. N., & Philip, R. (2008). Marine yeasts - a review. Yeast. 25: 465-483.

Landecker, E. M. (1996). Fundamentals of the Fungi. New Jersey: prentice-hall.

Lec hevalier. (1989). Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. Biol Fertil Soils, 29 :111–129.

Lee, S. A. , H. J. Kim, K. C. Chang, J. C. Baek, J. K. Park, J. K. Shin, et al. (2009). DHA and EPA downregulate COX2 expression through suppression of NF-kappa B activity in LPS treated human umbilical vein endothelial cells. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology 13*: 301-307.

Leonardos, N., & Lucas, A. N. I. (2000). The use of larval fatty acids as an index of growth in *mytilus edulis L.* Larvae. Aquaculture 184, 155-166.

Linoleic acid. วันที่ค้นข้อมูล 22 มกราคม (2556), เข้าถึงได้จาก http://www.thepaleodiet.com /nutritional_tools/fats.shtml

Linolenic acid. วันที่ค้นข้อมูล 22 มกราคม (2556), เข้าถึงได้จาก http://www.thepaleodiet.com /nutritional_tools/fats.shtml

Mackenzie, D. A., Carter, A. T., Wongwathanarat, P., Eagles, J., Salt, J., & Archer, D. B. (2002). A third fatty acidΔ9 - desaturases from Mortierella alpine with a different substrate specificity to ole 1 p and ole 2 p. *Microbiology 148*, 1725 - 1735.

Man Cai, Xiao-Yang Zhi, Shu-Kun Tang, Yu-Qin Zhang, Li-Hua Xu, & Wen-Jun Li. (2008). Streptomonospora halophila sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from a hypersaline soil. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY (IJSEM), vol 8*(7) p.1556-1560.

Man-Chul Kim, Jeongmin Lee, Dong-Hwi Kim, Hong-Joo Son, and Moon-Soo Heo. (2014). Isolation and Identification of Antioxidant Producing Marine-Source Actinomycetes and Optimal Medium Conditions Food Sci. *Biotechnol, 23*(5): 1629-1635

Martina, T., Laurence, M., & Marjeta, S. (2004). Salt - induced changes in lipid composition and membrane fluidity of halophilic yeast - like melanized fungi. *Extremophiles*, 53 - 61.

Mei, Li., Guang, Lei Liu., Zhe, Chi., & Zhen, Ming Chi., (2010). Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marine - derived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. *Biomass and bioenergy*, *34*, 101 - 107.

Michael Goodfellow, Roselyn Brown, Lina Ahmed, Wasu Pathom-aree, Alan T. Bull, Amanda L. Jones, James E. M. Stach, Tiago Domingues Zucchi, Lixin Zhang, & Jian Wang. (2012). *Verrucosispora fiedleri* sp. nov., an actinomycete isolated from a fjord sediment which synthesizes proximicins Antonie van Leeuwenhoek published online:31 October 2012

Montet, D., Ratomahenina, R., Galzy, P., Pina, M., & Graille, J. (1985). A study of the influence of the Growth Media on Fatty Acid Composition in *Condida Lipotytica*. *Biotechnology Letters*, 7 *(10)*, 733 - 736.

Niall, G. V., Winston, D. L., & Horstkaiser. (2006). Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiology Reviews, 30*(3), p. 404-427.

Nichol, D., & McMeekin, T. A. (2002). Biomarker techniques to screen for bacteria that produce polyunsaturated fatty acids. *Journal of Microbiological Methpds, 48*. 161-170

Nichol David S. (2003). Prokaryotes and the input of polyunsaturated fatty acids to the marine food web. *FEMS Microbiology Letters 219*. 1-7

N. Gopi Reddy, D.P.N. Ramakrishna, & S.V. Rajagopal. (2011). Optimization of culture conditions of *Streptomyces rochei* (MTCC 10109) for the production of antimicrobial metabolites Egyptian. *Journal of Biology, Vol. 13*, p 21-29.

Oliver E., McGillicuddy F., Phillips C., Sinead Toomey and Helen M.Roche. (2010). The role of inflammation and macrophage accumulation in the development of obesity-induced type 2 diabetes mellitus and the possible therapeutic effects of long-chain n-3 PUFA. *Proceedings of the Nutrition Society. 69*, 232-243.

Russell, N.J., & Nichols, D. S. (1999). Polyunsaturated fatty acids in marine bacteria – a dogma rewritten. *Microbiology.145*, 767–779.

Sakthi Velayudham, Kasi Murugan. (2012). Diversity and Antibacterial Screening of Actinomycetes from Javadi Hill Forest Soil, Tamilnadu. *India Journal of Microbiology Research; 2*(2): 41-46.

Sarlin Pa thissery J., & Rosamma Philip. (2013). A MOLASSES BASED FERMENTATION MEDIUM FOR MARINE YEAST BIOMASS PRODUCTION. *International Journal of Research in Marine Sciences. 2*(2): 39-44.

Selvameenal L, Radhakrishnan M., & Balagurunathan R. (2009). Antibiotic pigment from desert soil actinomycetes; biological activity, purification and chemical screening. *Indian Journal of Pharmaceutical, 71*(5) p. 499-504.

Shrirasakawa, N., Nishi, K., & Shimizu, S. (1995). Occurrence of a furan fatty acid in marine bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta 12*:58. p225-227

SinéadLordan, R. Paul Ross, & Catherine Stanton.(2011). Marine Bioactives as Functional Food Ingredients: Potential to Reduce the Incidence of Chronic Diseases Mar Drugs; 9(6): 1056–1100.

SIMI JOSEPH P. (2009). Process Optimization for Mass Production of Marine Yeast *Candida* sp. S 27 and its Nutritional Characterization. Thesis submitted to the Cochin University of Science and Technology. DEPARTMENT OF MARINE BIOLOGY, MICROBIOLOGY AND BIOCHEMISTRY SCHOOL OF MARINE SCIENCES. KOCHI .

Simupoulos, A.P. (2002). Omega-3 fatty acids in inflammation and Autoimmune diseases. *J.Am. Coll. Nutr. 21*(6), p. 495-505.

SM Pimentel-Elardo, M. Scheuermayer, S. Kozytska and U. Hentschel. (2009). *Streptomyces axinellae* sp. nov., isolated from the Mediterranean sponge *Axinella polypoides* (Porifera) INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY (IJSEM).

Sobolevskaya, M., Shevchenko, L., Moiseenko, O., Afiyatullov, Sh.PUB. DATEMay. (2012). Fatty-acid compositions of marine isolates of the actinobacteria *Nocardiopsis umidischolae* KMM 7036 and *Streptomyces* sp. KMM 7210. Chemistry of Natural Compounds; May Vol. 48 Issue 2, p 299.

Sobolevskaya, M., Lipko (Terkina), I., Moiseenko, O., Parfenova, V., Afiyatullov, Sh.PUB. DATEJanuary (2012). Fatty-acid composition of several Lake Baikal *streptomycetes*. Chemistry of Natural Compounds; Jan, Vol. 47 Issue 6, p.880.

Sreedevi N. Kutty and Rosamma Philip. (2008). Marine yeasts-a review. John Wiley & Sons, Ltd. Volume 25, Issue 7, pages 465–483.

Stredansky M., Stredansky, E. Conti, S. Stredanska, F. Zanetti. (2000). γ-Linolenic acid production with Thamnidium elegans by solid-state fermentation on apple pomace Bioresour. Technol., 73 (1) pp. 41–45.

Wasu Pathom-aree, Yuichi Nogi, Iain C. Sutcliffe, Alan C. Ward, Koki Horikoshi, Alan T. Bull, & Michael Goodfellow. (2014). *Williamsia marianensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the Mariana Trench.(Announcing a February 2014 special issue) in the International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

Zaky, A.S., Tucker, G.A., Daw, Z.Y., Du, C. (2014). Marine yeast isolation and industrial application. FEMS Yeast Res. 14(6):813-25.

Zhi Huang, Yuan Yuan Bao, Tong Tong Yuan, Guo Xiang Wang, Lin Yan He and Xia Fang Sheng. (2015). Arthrobacter *nanjingensis sp. nov.,* a mineral-weathering bacterium isolated from forest soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 65:365-369.

ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Potato dextrose agar)

ชั่ง PDA 9.75 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร จากนั้นให้ความร้อนเดือดนาน 1 นาที ทิ้งให้พออุ่น ปิเปตใส่ภาชนะเลี้ยงเชื้อ (Plate) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในตู้ปลอดเชื้อ ทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัว

1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ YM medium

ชั่ง Yeast extract 0.39 กรัม
ชั่ง Malt extract 0.39 กรัม
ชั่ง Peptone 0.65 กรัม
ชั่ง Glucose 1.30 กรัม
ชั่ง Agar 1.95 กรัม

ปรับปริมาตรด้วยการเติมน้ำกลั่น 130 มิลลิลิตร ปิดปากฟลาสก์รูปชมพู นำเข้าเครื่องหม้อนึ่งความดันอัตโนมัติ ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อย

อาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อย กรองกากชานอ้อยก่อนเข้าเครื่องความดันอัตโนมัติ (สูตรกากชานอ้อยต่อน้ำทะเลเทียมที่มีความเค็ม 25 พีพีที ในอัตราส่วน 1:10)

ชั่งกากชานอ้อย 100 กรัม ลงในบีกเกอร์ 3,000 มิลลิลิตร เติมน้ำทะเลเทียม (Artificial Sea Water) ที่มีความเค็ม 25 พีพีที กวนและบีบกากชานอ้อยเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองกากชานอ้อยออก เทเฉพาะส่วนน้ำใส่ขวดฝาเกลียวขนาด 1,500 มิลลิลิตร ตวงอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อย 125 มิลลิลิตร ใส่ฟลาสก์รูปชมพู 250 มิลลิลิตร จำนวน 10 ขวด ปิดปากฟลาสก์รูปชมพู่ จากนั้นนำเข้าเครื่องหม้อนึ่งความดันอัตโนมัติ ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที (ทำซ้ำที่น้ำทะเลเทียม (Artificial sea water) ที่มีความเค็ม 30 และ 35 พีพีที ตามลำดับ)

2. การเตรียมน้ำทะเลเทียม (Artificial sea water) ที่มีความเค็ม 25 พีพีที

ตารางภาคผนวกที่ 1 การเตรียมน้ำทะเลเทียม

สารเคมี	25 พีพีที(กรัม)
NaCl	20.24
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	4.04
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	2.91
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0.98
KCl	0.64
$NaHCO_3$	0.32
$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	0.06
KH_2PO_4	0.04

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร และปรับ pH ที่ 7.4

3. การตรึง

การตรึงปาเปน (Papain), ทริปซิน (Trypsin), อัลบลูมิน (Albumin), บลูเดกซ์แตรน (Blue Dextrane)

1) ชั่งตัวอย่าง (ปาเปน, ทริปซิน, อัลบลูมิน, บลูเดกซ์แตรน) 0.1 กรัม ลงในบีกเกอร์ ขนาด 100 มิลลิลิตร เติม 0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ 10 มิลลิตร และ 1.5เปอร์เซ็นต์ โซเดียมอัลจิเนต ใน 0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ 40 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ได้เป็น 1.2 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมอัลจิเนต

2) ใช้กระบอกฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร ดูดสารละลายผสมในข้อ 1) ฉีดสารผ่านสายยางลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตรเม็ดเจลจะเกิดขึ้นทันทีในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ตั้งไว้ 1 ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเจลคงตัว

3) เทสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ออกจากเม็ดเจล นำเม็ดเจลที่ได้ใส่กรวยบุชเนอร์ล้างเม็ดเจลด้วย 0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ ประมาณ 200 มิลลิตร

4) ชั่งน้ำหนักและนับเม็ดเจล

การเตรียมตัวอย่างและการตรึงเซลล์ยีสต์ *Pichia sp.*

นำตัวอย่างเซลล์ยีสต์ *Pichia sp.* ที่ได้จากการเลี้ยง ปริมาตร 30 มิลลิลิตรมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง หลังจากนั้นทำการล้างเซลล์ยีสต์จำนวน 2 ครั้ง โดยการเติมสารละลาย 0.85 เปอร์เซ็นต์ Normal saline (NaCl) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร และน้าไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้งก่อนนำเซลล์ยีสต์ไปทำเซลล์ตรึงและวิเคราะห์คุณค่าทางอาหาร

การตรึงเซลล์ยีสต์ *Pichia sp.*

ชั่งเซลล์ยีสต์ *Pichia sp.*ให้ได้เซลล์ประมาณ 2.5 x 10^5 เซลล์ เติม 0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในบีกเกอร์ 100 มิลลิลิตร ผสมกับ 1.5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมอัลจิเนต 40 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันได้เป็น 1.2 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมอัลจิเนต เตรียมเม็ดเจลตามข้อการตรึง