สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ศักยภาพในการผลิตทรอสโทไคตริดส์
เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์

Potential Production of Thraustochytrids
for Animal Feed Industries

สมถวิล จริตควร เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์ และ สุดารัตน์ สวนจิตร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ 2554

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

01 80691
1 ต.ค. 2558
357930
เริ่มบริการ
30 ก.ย. 2559
อภินันทนาการ

บทคัดย่อ

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและผลิตกรดไขมันของทรอสโทไคตริดส์ (*Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072) ในขวดรูปชมพู่และถังหมัก โดยแบ่งออกเป็น 5 การทดลองคือ 1). เปรียบเทียบการเจริญของ *A. mangrovei* S4TP 072 ด้วยอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสทางการค้าความเข้มข้น 6% และน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 6% ด้วยการเลี้ยงแบบเขย่าในขวดรูปชมพู่ พบว่าอาหารที่ใช้กลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังมีผลทำให้ *A. mangrovei* S4TP 072 เจริญได้ดีกว่าอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสทางการค้า 2). การเจริญของ *A. mangrovei* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสทางการค้า 6% และน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 6%, 12% และ 18% ด้วยการเลี้ยงแบบเขย่าในขวดรูปชมพู่ พบว่า *A.mangroveii* S4TP 072 เจริญและผลิตกรดไขมันโดยเฉพาะดีเอชเอได้ดีที่สุด เมื่อเลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 12% 3). การเจริญของ *A. mangrovei* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 12% ที่ pH ต่าง ๆ ด้วยการเลี้ยงแบบเขย่าในขวดรูปชมพู่ พบว่า *A. mangroveii* เจริญและผลิตดีเอชเอได้ดีใกล้เคียงกันในทุกระดับ pH 4). การเจริญของ *A. mangrovei* S4TP 072 ด้วยอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 12%, 18% และ 24% ภายใต้สภาวะที่เหมาะในถังหมัก พบว่า *A. mangrovei* S4TP 072 เจริญและผลิตดีเอชเอได้ดี เมื่อเลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 12% 5). การเจริญของ *A. mangrovei* S4TP 072 ด้วยอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 12 % ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม โดยเปรียบเทียบสูตรอาหารที่เติมและไม่เติม 0.1% $MgCl_2$ ในถังหมัก พบว่า *A. mangroveii* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่ไม่เติม 0.1% $MgCl_2$ มีการเจริญดีกว่าสูตรอาหารที่เติม 0.1% $MgCl_2$ ภายใน 4 วัน

จากการศึกษาสามารถสรุปสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง *A. mangroveii* S4TP 072 ด้วยน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง คือความเข้มข้น 12% pH 6.5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้ปริมาณดีเอชเอและอีพีเอเท่ากับ 18.41 และ 0.14 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด ตามลำดับ และกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังสามารถนำมาเป็นวัตถุดิบทดแทนแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยง *A. mangroveii* S4TP 072 เพื่อลดต้นทุนการผลิตในเชิงพาณิชย์ต่อไป

คำสำคัญ: ทรอสโทไคตริดส์, น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง, กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง, กรดไขมันชนิดดีเอชเอ

Abstract

This experiment studied the optimal condition in implementing glucose from cassava starch hydrolysis as a carbon source to grow and produce fatty acids of thraustochytrid (*Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072) in shake flask and fermenter. This experiment divided into 5 experiments; 1) compare the growth of *A. mangrovei* S4TP 072 with 6% commercial glucose and 6% glucose from cassava starch hydrolysis using shake flask. It was found that media used with glucose from cassava starch hydrolysis showed the better growth in *A. mangrovei* S4TP 072 than that of commercial glucose. 2). The growth of *A. mangrovei* S4TP 072 in media composed of 6% commercial glucose and 6%, 12% and 18% glucose from cassava starch hydrolysis using shake flask. This was found that glucose from cassava starch hydrolysis at a concentration of 12% showed the best growth and DHA production. 3). The growth of *A. mangrovei* S4TP 072 cultured with 12% glucose from cassava starch hydrolysis at various pH using shake flask. The result showed no differences in growth and DHA production at any pH level. 4). The growth of *A. mangrovei* S4TP 072 with glucose from cassava starch hydrolysis at the concentrations of 12%, 18% and 24% in the fermenter. It was found that glucose from cassava starch hydrolysis at a concentration of 12% showed the best growth and DHA production. 5). The growth of *A. mangrovei* S4TP 072 with 12 % glucose from cassava starch hydrolysis under the optimal condition with and without 0.1% $MgCl_2$ in fermenter. It was found that the media without 0.1% $MgCl_2$ grew better than that added with 0.1% $MgCl_2$ within 4 days.

This results conclude that the optimal condition, 12% of glucose from cassava starch hydrolysis at pH 6.5 for 48 hours, could produce DHA and EPA as 18.41 and 0.14 percent of total fatty acid, respectively. The glucose from cassava starch hydrolysis can be used as an alternative carbon source to reduce production cost of *A. mangroveii* S4TP 072 for commerce.

Key words: Thraustochytrids, glucose from cassava starch hydrolysis, Polyunsaturated fatty acid, Docosahexaenoic acid (DHA)

ประกาศคุณูปการ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนจากรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ปีงบประมาณ 2554 มหาวิทยาลัยบูรพา ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณภาควิชาวาริชศาสตร์ ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมกระบวนการชีวภาพ โครงการบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา เจ้าหน้าที่ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ ขอขอบคุณ คุณมรกต กระจ่าง คุณอุทุมพร อุ่ยยก คุณทวินันท์ ตรุษงาม คุณพิมพร หลั่งจิตติกุล และคุณสมพร ซังฮี้ ที่ช่วยเหลือให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

สมถวิล จริตควร
เศรษฐวัตร ฉ่ำศาสตร์
สุดารัตน์ สวนจิตร

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ค
ประกาศคุณูปการ ง
สารบัญ จ
สารบัญตาราง ฉ
สารบัญภาพ ช
บทที่
1 บทนำ 1
    ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
    วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2
    ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย 2
    สถานที่ทำการทดลอง 2
    ขอบเขตของการวิจัย 3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
    การหมัก 4
    ชนิดของการหมัก 4
    ปัจจัยที่มีผลต่อการหมัก 5
    ทรอสโทไคตริดส์ 5
    การแพร่กระจายทรอสโทไคตริดส์ 6
    แหล่งที่สำคัญของกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 7
    งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 9
3 วิธีดำเนินการวิจัย 12
4 ผลการทดลองและอภิปราย 20
    สรุป และข้อเสนอแนะ 34
รายการอ้างอิง 35
ภาคผนวก 40

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4.1 น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร และปริมาณน้ำตาลกลูโคส ของ *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคส 6% และน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง 6% 21

4.2 น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ จากการเลี้ยง *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ด้วยสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคสทางการค้า 6% และน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 6%, 12% และ 18% 24

4.3 น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ จากการเลี้ยง *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ด้วยอาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 12% ที่ pH ต่าง ๆ 24

4.4 น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร และปริมาณน้ำตาลกลูโคส ของ *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง 12%, 18% และ 24% ที่ pH 6.5 ในถังหมัก 29

4.5 น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร และปริมาณน้ำตาลกลูโคส ของ *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง 12% ที่ pH 6.5 ทั้งที่เติมและไม่เติม $MgCl_2$ ในถังหมัก 32

ภาคผนวกที่ 1 ปริมาณกรดไขมันที่ได้จากการเลี้ยง *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ด้วยอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 6%, 12% และ 18% ด้วยการเลี้ยงแบบเขย่าในขวดรูปชมพู่ 49

ภาคผนวกที่ 2 ปริมาณกรดไขมันที่ได้จากการเลี้ยง *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ด้วยอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 12% ที่ pH ต่าง ๆ ด้วยการเลี้ยงแบบเขย่าในขวดรูปชมพู่ 52

ภาคผนวกที่ 3 ปริมาณกรดไขมันที่ได้จากการเลี้ยง *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ด้วยอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 12%, 18% และ 24% (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ภายใต้สภาวะที่เหมาะในถังหมัก 57

ภาคผนวกที่ 4 ปริมาณกรดไขมันที่ได้จากการเลี้ยง *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ด้วยอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 12 % (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม กับอาหารที่เติม $MgCl_2$ 0.1 % (w/v) และไม่เติม $MgCl_2$ 0.1 % (w/v) ในถังหมัก 62

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
4.1	การเจริญของ *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 (น้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคสทางการค้า 6% และน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง 6%	22
4.2	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ของการทดลองการเจริญของ *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคสทางการค้า 6% และน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง 6%	22
4.3	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสของการทดลองการเจริญของ *Aurantiochytrium mangroveii* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคสทางการค้า 6% และน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง 6%	22
4.4	การเจริญของ *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 (น้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคสทางการค้า 6% และน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง 6% 12% และ 18%	25
4.5	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ของการทดลองการเจริญของ *Aurantiochytrium mangroveii* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคสทางการค้า 6%และน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง 6% 12% และ 18%	25
4.6	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสของการทดลองการเจริญของ *Aurantiochytrium mangroveii* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคสทางการค้า 6% และน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง 6%, 12% และ 18%	25
4.7	ปริมาณกรดไขมันชนิดดีเอชเอที่ได้จากการเลี้ยง *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ด้วยอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 6%, 12% และ 18% ด้วยการเลี้ยงแบบเขย่าในขวดรูปชมพู่	23
4.8	การเจริญของ *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 (น้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่เลี้ยง ด้วยอาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง 12% ที่ pH ต่าง ๆ	27
4.9	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ของการทดลองการเจริญของ *Aurantiochytrium mangroveii* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง 12% ที่ pH ต่าง ๆ	27
4.10	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสของการทดลองการเจริญของ *Aurantiochytrium mangroveii* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 12% ที่ pH ต่าง ๆ	27
4.11	ปริมาณกรดไขมันชนิดดีเอชเอที่ได้จากการเลี้ยง *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ด้วยอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 12% ที่ pH ต่าง ๆ ด้วยการเลี้ยงแบบเขย่าในขวดรูปชมพู่	26

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

4.12 การเจริญของ *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 (น้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 12%, 18% และ 24% 30

4.13 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ของการทดลองการเจริญของ *Aurantiochytrium mangroveii* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 12%, 18% และ 24% 30

4.14 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสของการทดลองการเจริญของ *Aurantiochytrium mangroveii* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเติมน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 12%, 18% และ 24% 30

4.15 ปริมาณกรดไขมันชนิดดีเอชเอที่ได้จากการเลี้ยง *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ด้วยอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 12%, 18% และ 24% (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ภายใต้สภาวะที่เหมาะในถังหมัก 28

4.16 การเจริญของ *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 (น้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเติมน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 12% ที่เติมและไม่เติมแมกนีเซียมคลอไรด์ 0.1 % 33

4.17 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรของการทดลองการเจริญของ *Aurantiochytrium mangroveii* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเติมน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 12% ที่เติมและไม่เติมแมกนีเซียมคลอไรด์ 0.1 % 33

4.18 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสของการทดลองการเจริญของ *Aurantiochytrium mangroveii* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเติมน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 12% ที่เติมและไม่เติมแมกนีเซียมคลอไรด์ 0.1 % 33

4.19 ปริมาณกรดไขมันชนิดดีเอชเอที่ได้จากการเลี้ยง *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ด้วยอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 12 % (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม กับอาหารที่เติม $MgCl_2$ 0.1 % (w/v) และไม่เติม $MgCl_2$ 0.1 % (w/v) ในถังหมัก 31

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ทรอสโทไคตริดส์ (Thraustochytrids) เป็นจุลินทรีย์ทะเลที่จัดอยู่ใน Kingdom Straminipila (Moss, 1985; Leander and Poeter, 2001; Raghukumar, 2002) มีบทบาทสำคัญในระบบนิเวศในทะเลและน้ำกร่อยโดยทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลาย และเป็นอาหารที่สำคัญของสัตว์ต่างๆ เนื่องจากทรอสโทไคตริดส์มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (Highly unsaturated fatty acid, HUFA) ในปริมาณที่สูงมาก โดยเฉพาะกลุ่มโอเมก้า-3 อันได้แก่ ดีเอชเอ (DHA, docosahexaenoic acid) และยังมีกรดไขมันชนิดอีพีเอ (EPA, eicosapentaenoic acid) และกลุ่มโอเมก้า-6 ได้แก่เออาร์เอ (ARA, arachidonic acid) อีกด้วย โดยกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงดังกล่าวจัดเป็นสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์ สามารถนำมาใช้ทางการแพทย์เพื่อบำบัดและรักษาโรคต่างๆ และสามารถออกฤทธิ์ในเชิงป้องกันโรคและภาวะผิดปกติบางชนิดเช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด มะเร็ง โรคข้อ และโรคที่เกี่ยวข้องกับความชราภาพ (Lewis et al., 1999; Ward and Singh, 2005) อีกทั้งดีเอชเอยังมีผลทำให้การตั้งครรภ์และการคลอดบุตรเป็นไปอย่างปกติ รวมทั้งการพัฒนาการของสมองและการมองเห็น โดยจะเห็นผลชัดเจนในวัยทารกและเด็ก ปกติแล้วกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงชนิดดีเอชเอพบมากในส่วนของสมองและเรตินา แต่ร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์เองได้ จึงต้องบริโภคจากอาหารที่มีกรดไขมันดังกล่าว และการสะสมกรดไขมันไม่อิ่มตัวในร่างกายนั้นสามารถถ่ายทอดหรือส่งต่อทางห่วงโซ่อาหารได้ นอกจากนั้นทรอสโทไคตริดส์ยังมีคาร์โรทีนอยด์ ได้แก่ β-คาร์โรทีน แซนโทฟิลล์ แอสตาแซนทิน และแคนตาแซนทิน (Aki et al, 2003) ซึ่งเป็นสารแอนตีออกซิแดนท์ที่สำคัญต่อสุขภาพของมนุษย์

สำหรับประเทศไทยมีรายงานเกี่ยวกับทรอสโทไคตริดส์ประมาณ 15 ปีที่ผ่านมา และยังมีการศึกษาค่อนข้างน้อยมาก โดยมีการศึกษาในส่วนของความหลากหลายของทรอสโทไคตริดส์จากป่าชายเลน (Jaritkhuan *et al*., 2004, 2005; Chatdumrong *et al*., 2004) เพื่อเป็นฐานข้อมูลทางวิชาการที่สำคัญในด้านความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตในประเทศไทย และมีการศึกษาเกี่ยวกับการนำทรอสโทไคตริดส์มาเป็นแหล่งอาหารในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั้งในแง่ของการให้ทรอสโทไคตริดส์เป็นแหล่งอาหารเสริมกรดไขมันให้กับอาหารมีชีวิต เช่นอาร์ทีเมีย ก่อนที่จะนำอาร์ทีเมียไปเลี้ยงสัตว์น้ำวัยอ่อนต่อไป เพื่อให้สัตว์น้ำวัยอ่อนแข็งแรงและมีอัตรารอดสูงขึ้น (สมถวิล จริตควร และ Jones, 2550) รวมถึงการนำทรอสโทไคตริดส์ไปผสมเป็นอาหารเม็ดในการเลี้ยงลูกกุ้งกุลาดำวัยอ่อน เพื่อให้มีอัตรารอดสูงขึ้นและมีปริมาณดีเอชเอในตัวกุ้งสูงขึ้นอีกด้วย (Jaritkhuan *et al*., 1998; Jaritkhuan and Jones, 1999; Jaritkhuan and Jones, 2001, Jaritkhuan, 2002)

อย่างไรก็ตามตั้งแต่อดีตถึงปัจจุบัน แหล่งของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงที่นำมาผลิตในเชิงพาณิชย์นั้นสกัดจากน้ำมันปลาและน้ำมันตับปลา แต่เนื่องจากชนิดของปลาที่นำมาสกัดกรดไขมันรวมถึงแหล่งและฤดูกาลที่จับ มีผลต่อปริมาณและชนิดของกรดไขมัน ทำให้การควบคุมคุณภาพของกรดไขมันทำได้ค่อนข้างยาก นอกจากนั้นการมีกลิ่นคาวปลาในผลิตภัณฑ์ดังกล่าวไม่เป็นที่พึงประสงค์ของผู้บริโภคบางกลุ่ม และน้ำมันปลามีกรดไขมันหลากหลายชนิดทำให้ยากต่อการแยกกรดไขมันชนิด

ที่ต้องการให้บริสุทธิ์ได้ และน้ำมันปลายังถูกออกซิไดซ์ได้ง่ายทำให้คุณภาพลดน้อยลง (Sargent *et al.*, 1999) จากปัญหาข้างต้นทำให้มนุษย์หันมาคัดเลือกหาสายพันธุ์สิ่งมีชีวิตที่มีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง เพื่อเป็นแหล่งทางเลือกใหม่ของกรดไขมันดังกล่าว ซึ่งทรอสโทไคตริดส์ เช่น *Schizochytrium* spp. และ *Thraustochytrium* spp. มีการสะสมไขมันภายในเซลล์สูงถึง 30 % และมีความหลากหลายของชนิดกรดไขมันไม่มาก แต่มีปริมาณของเออาร์เอ อีพีเอ หรือดีเอชเอค่อนข้างสูง โดยเฉพาะดีเอชเอ มีปริมาณสูงถึง 30 - 40 % ของกรดไขมันทั้งหมด (Bajpai *et al.*, 1991a, 1991b; Li and Ward, 1994; Barclay and Zeller, 1996, Bowles *et al.*, 1999; Jaritkhuan *et al.*, 2004, 2005) ซึ่งน่าจะนำมาเป็นแหล่งทดแทนกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงจากน้ำมันปลาได้เป็นอย่างดี นอกจากนั้นทรอสโทไคตริดส์มีกลิ่นน้อยมากเมื่อเทียบกับน้ำมันปลา สามารถควบคุมคุณภาพของกรดไขมันได้และมีปริมาณดีเอชเอสูงกว่าที่พบในน้ำมันปลา (Nakahara *et al.*, 1996) ในแง่ของการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์และการผลิตภายใต้สภาวะควบคุมในห้องปฏิบัติการจะสามารถทำให้การผลิตในเชิงการค้าทำได้ง่ายและสะดวกยิ่งขึ้น

ทรอสโทไคตริดส์แต่ละชนิดและสายพันธุ์สามารถเจริญและผลิตไขมันและดีเอชเอได้ในปริมาณที่แตกต่างกันมาก (Ward and Singh, 2005; Fan and Chen, 2007) ขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ สภาวะที่ใช้เลี้ยงเช่น อุณหภูมิ ความเค็ม ความเป็นกรด-เบส และส่วนประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยง เป็นต้น (Chi et al., 2007) สำหรับแหล่งอาหารที่นิยมใช้เลี้ยงเช่น กลูโคส ยีสต์สกัด และเปปโตน เป็นต้น ซึ่งแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนดังกล่าวยังมีราคาค่อนข้างสูง ทำให้ต้นทุนสูงตามไปด้วย ซึ่งถ้าต้องเลี้ยงให้ได้เซลล์แห้งในปริมาณมากๆ เพื่อนำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ จำเป็นต้องมีต้นทุนที่ต่ำ ถ้าสามารถใช้แหล่งอาหารราคาถูกที่สามารถหาได้ภายในประเทศมาทดแทนจะก่อให้เกิดประโยชน์อย่างมาก ทั้งในแง่ของการนำผลิตภัณฑ์หรือสินค้าภายในประเทศมาเพิ่มมูลค่า แล้วยังเป็นการลดการนำเข้าสินค้าจากต่างประเทศอีกด้วย

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกทรอสโทไคตริดส์สายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการผลิตกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า–3 โดยเฉพาะดีเอชเอได้ในปริมาณสูง มาศึกษาถึงแหล่งอาหารราคาถูกที่หาได้ภายในประเทศและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของทรอสโทไคตริดส์ในขวดรูปชมพู่และถังหมัก

วัตถุประสงค์หลักของโครงการวิจัย

เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและผลิตกรดไขมันของทรอสโทไคตริดส์ในขวดรูปชมพู่และถังหมัก

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

ได้แหล่งและสูตรอาหารราคาถูกที่หาได้ภายในประเทศมาใช้ในการเลี้ยงทรอสโทไคตริดส์ซึ่งเป็นการลดดุลการค้าจากการนำเข้าจากต่างประเทศ และทราบสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของทรอสโทไคตริดส์ในขวดรูปชมพู่และถังหมัก

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการภาควิชาวาริชศาสตร์ และห้องปฏิบัติการวิศวกรรมกระบวนการชีวภาพ โครงการบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ขอบเขตของการวิจัย

เลือกสายพันธุ์ที่มีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงกลุ่มโอเมก้า–3 ที่ได้จากการคัดแยกทรอสโทไคตริดส์จากพันธุ์ไม้ป่าชายเลน ในเขตจังหวัดฉะเชิงเทรา มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนราคาถูกต่อการเจริญของทรอสโทไคตริดส์ในขวดรูปชมพู่และถังหมักหรือถังปฏิกรณ์

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การหมัก (Fermentation)

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

ชนิดของการหมัก

การหมักแบ่งออกเป็น 4 ประเภท คือ

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

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

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

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

การหมัก แบ่งตามลักษณะของกระบวนการที่ใช้ได้เป็น 4 แบบ คือ

1. การเลี้ยงเซลล์แบบครั้งเดียว (Batch Fermentation) เป็นการหมักแบบไม่ต่อเนื่องและเป็นการเลี้ยงจุลินทรีย์เจริญในภาชนะซึ่งเป็นหลอดแก้ว หรือฟลาสก์ หรือถังหมักโดยไม่มีการเปลี่ยน

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

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

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

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

ปัจจัยที่มีผลต่อการหมัก

ในการหมักแบบคราวเดียว หรือต่อเนื่อง หรือแบบอื่น ๆ ที่เลือกใช้เพื่อผลิตผลจากกระบวนการหมักให้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และประหยัดต้นทุนมากที่สุดแล้ว จำเป็นต้องคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

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

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

ทรอสโทไคตริดส์ (Thraustochytrids)

1.ลักษณะทั่วไปของทรอสโทไคตริดส์

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

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

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

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

การแพร่กระจายทรอสโทไคตริดส์

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

แหล่งที่สำคัญของกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3

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

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

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

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

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

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

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

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. **ทรอสโทไคตริดส์ที่ใช้ในการทดลอง**
   Aurantiochytrium mangrovei S4TP 072
2. **อาหารเลี้ยงเชื้อ** (วิธีการเตรียม แสดงในภาคผนวก ก)
   2.1 กลูโคส (D (+) – Monohydrate) Riedel – de Haen
   2.2 กลูโคสจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง
   2.3 ยีสต์สกัด (Yeast Extract) Hi - media
   2.4 เปปโตน (Peptone) Hi - media
   2.5 น้ำทะเล
3. **สารเคมี**
   3.1 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) UNIVAR
   3.2 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) UNIVAR
   3.3 เมทานอล (Methanol) UNIVAR
   3.4 เฮกเซน (Hexane) UNIVAR
   3.5 กรดซัลฟูริค (H_2SO_4) MERCK
   3.6 โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) UNIVAR
   3.7 BHT (Butylated Hydroxt-Toluene) FLUKA
   3.8 กรดไขมันมาตรฐาน 19 : 0 Nonadecanoic Acid (Internal Standard) SIGMA
   3.9 แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) UNIVAR
   3.10 กรดไฮโดรคลอริก (HCl) UNIVAR
   3.11 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) UNIVAR
   3.12 แร่ธาตุ (Trace Element Solution) (ภาคผนวก ก)
   3.13 สารละลายดีเอนเอส (3,5-Dinitrosalicylic Acid) (ภาคผนวก ค)
   3.14 แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) UNIVAR
4. **ยาปฏิชีวนะ** (วิธีการเตรียม แสดงในภาคผนวก ข)
   4.1 คานามัยซิน (Kanamycin)
   4.2 สเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต (Streptomycin Sulfate)
5. **อุปกรณ์และเครื่องมือ**
   5.1 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี (Gas Chromatography) GC 6890
   5.2 เครื่องเขย่า (Incubator Shaker) INNOVA
   5.3 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง METTELER TOLEDO AG-285
   5.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) SAYO HARRIER 18/80 (Refrigerated)
   5.5 เครื่อง Vortex mixer (Vortex -Genie2)

5.6 เครื่องอบแห้งระบบทำความเย็น (Freezer Dryer) LABCONCO
5.7 หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) TOMY SS-325
5.8 เครื่องให้ความร้อน (Hot Plate) FRAMO-GERATETECCHNIK M21/1
5.9 แท่งแม่เหล็ก (Magnetic Stirrer)
5.10 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH Meter) METROHM 713
5.11 เครื่องวัดความเค็ม (Refractometer) PORTABLE
5.12 โถดูดความชื้น (Dessicator)
5.13 ถังหมักขนาด 5 ลิตร (Bioflo IV)
5.14 ตู้ทำความเย็นอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (Deep freezer) ULTRALOW, SANYO
5.15 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS Spectrophotometer)
5.16 อ่างปรับอุณหภูมิ (Water bath) Memmert
5.17 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) Memmert
5.18 Auto pipette (Pipetman, Gilson)
5.19 ฟลาส์กขนาด 500 มิลลิลิตร
5.20 กล่องน้ำแข็ง

การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

เตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น ปริมาตร 300 มิลลิลิตร โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร (เตรียมอาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร จำนวน 3 ซ้ำ) ปรับ pH เท่ากับ 6.5 เขย่าบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

วิธีการทดลอง

1. ศึกษาการเจริญของ *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสทางการค้าความเข้มข้น 6% และน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 6% ด้วยการเลี้ยงแบบเขย่าในขวดรูปชมพู่

1.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1.1 น้ำตาลกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำทะเลความเข้มข้น 15 ppm ให้ได้ปริมาตร 2,250 มิลลิลิตร ปรับค่า pH เท่ากับ 6.5 แบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ใบละ 45 มิลลิลิตร จำนวน 45 ใบ

1.1.2 น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 40 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 324.9 มิลลิลิตร และยีสต์สกัด 30 กรัมต่อลิตร ใส่น้ำทะเลความเข้มข้น 25 ppm ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ปริมาตรรวม

3,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH เท่ากับ 6.5 แบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ใบละ 45 มิลลิลิตร จำนวน 45 ใบ

1.2 นำอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 1.1 นึ่งฆ่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.3 เติมหัวเชื้อเริ่มต้นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละขวดๆ ละ 5 มิลลิลิตร จากนั้นเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่าง 3 ซ้ำ (ขวดรูปชมพู่ 3 ใบ) ทุก ๆ 12 ชั่วโมง ทำการวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเก็บเซลล์แห้งเพื่อชั่งน้ำหนักและวิเคราะห์กรดไขมันต่อไป

2. ศึกษาการเจริญของ *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสทางการค้า 6% และน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 6%, 12% และ 18% ด้วยการเลี้ยงแบบเขย่าในขวดรูปชมพู่

2.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1.1 น้ำตาลกลูโคสทางการค้า 6% เตรียมโดยใช้น้ำตาลกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำทะเลความเข้มข้น 15 ppm ให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH เท่ากับ 6.5 แบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ใบละ 45 มิลลิลิตร จำนวน 10 ใบ

2.1.2 น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้นเป็น 6% เตรียมโดยใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 40 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร (จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 6%) และยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำทะเลความเข้มข้น 15 ppm ให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH เท่ากับ 6.5 จากนั้นแบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ใบละ 45 มิลลิลิตร จำนวน 10 ใบ

2.1.3 น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้นเป็น 12% เตรียมโดยใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (น้ำตาลกลูโคส 40 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร (จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 12%) และยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำทะเลความเข้มข้น 15 ppm ให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH เท่ากับ 6.5 จากนั้นแบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ใบละ 45 มิลลิลิตร จำนวน 10 ใบ

2.1.4 น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้นเป็น 18% เตรียมโดยใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (น้ำตาลกลูโคส 40 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 450 มิลลิลิตร (จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 18%) และยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำทะเลความเข้มข้น 15 ppm ให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH เท่ากับ 6.5 จากนั้นแบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ใบละ 45 มิลลิลิตร จำนวน 10 ใบ

2.2 นำอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 2.1 นึ่งฆ่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.3 เติมหัวเชื้อเริ่มต้นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อขวดละ 5 มิลลิลิตร จากนั้นเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน เก็บตัวอย่าง 2 ซ้ำ (ขวดรูปชมพู่ 2 ใบ) ทุก ๆ 24 ชั่วโมง ทำการวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเก็บเซลล์แห้งเพื่อชั่งน้ำหนักและวิเคราะห์กรดไขมันต่อไป

3. การเจริญของ *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 12% ที่ pH 5 ระดับ (6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0) ด้วยการเลี้ยงแบบเขย่าในขวดรูปชมพู่

3.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.1 น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (น้ำตาลกลูโคส 40 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร (จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 12%) และยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำทะเลความเข้มข้น 15 ppm ให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH เท่ากับ 6.0 จากนั้นแบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ใบละ 45 มิลลิลิตร จำนวน 10 ใบ

3.1.2 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เช่นเดียวกับ ข้อ 3.1.1 แต่ปรับค่า pH ให้ได้ 4 ระดับ คือ 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 ระดับละ 10 ใบ

3.2 นำอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 3.1 นึ่งฆ่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.3 เติมหัวเชื้อเริ่มต้นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อขวดละ 5 มิลลิลิตร จากนั้นเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน เก็บตัวอย่าง 2 ซ้ำ (ขวดรูปชมพู่ 2 ใบ) ทุก ๆ 24 ชั่วโมง ทำการวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเก็บเซลล์แห้งเพื่อชั่งน้ำหนักและวิเคราะห์กรดไขมันต่อไป

4. ศึกษาการเจริญของ *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ด้วยอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 12%, 18% และ 24% (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ภายใต้สภาวะที่เหมาะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

4.1 เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (40% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ความเข้มข้น 12%

4.1.1 ใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง 900 มิลลิลิตร (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ใส่ในขวดรูปชมพู่ นำสารละลายนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

4.1.2 เตรียมยีสต์สกัด 30 กรัม ละลายในน้ำทะเลความเข้มข้น 15 psu ใส่ในถังปฏิกรณ์และปรับปริมาตรด้วยน้ำทะเลให้ได้ 1,800 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที

4.1.3 เติมสารละลายน้ำตาลกลูโคสจากข้อ 4.1.1 และหัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 300 มิลลิลิตร ลงในถังปฏิกรณ์จากข้อ 4.1.2 (ปริมาตรอาหารรวมทั้งหมดเป็น 3 ลิตร)

4.1.4 เลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการเติมอากาศ 1 vvm การกวนผสม 500 รอบต่อนาที ปรับค่า pH เท่ากับ 6.5 ด้วย 2 N HCl และ 4 N NaOH ทำการทดลอง 2 ซ้ำ และเก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง ทำการวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเก็บเซลล์แห้งเพื่อชั่งน้ำหนักและวิเคราะห์กรดไขมันต่อไป

4.2 เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (40% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ความเข้มข้น 18%

4.2.1 ใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง 1,350 มิลลิลิตร มิลลิลิตร (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ใส่ในขวดรูปชมพู่ นำสารละลายนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

4.2.2 เตรียมยีสต์สกัด 30 กรัม ละลายในน้ำทะเลความเข้มข้น 15 psu ใส่ในถังปฏิกรณ์และปรับปริมาตรด้วยน้ำทะเลให้ได้ 1,350 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที

4.2.3 เติมสารละลายน้ำตาลกลูโคสจากข้อ 4.1.1 และหัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 300 มิลลิลิตร ลงในถังปฏิกรณ์จากข้อ 4.1.2 (ปริมาตรอาหารรวมทั้งหมดเป็น 3 ลิตร)

4.2.4 เลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการเติมอากาศ 1 vvm การกวนผสม 500 รอบต่อนาที ปรับค่า pH เท่ากับ 6.5 ด้วย 2 N HCl และ 4 N NaOH ทำการทดลอง 2 ซ้ำ และเก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง ทำการวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเก็บเซลล์แห้งเพื่อชั่งน้ำหนักและวิเคราะห์กรดไขมันต่อไป

4.3 เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (40% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ความเข้มข้น 24%

4.3.1 ใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง 1,800 มิลลิลิตร มิลลิลิตร (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ใส่ในขวดรูปชมพู่ นำสารละลายนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

4.3.2 เตรียมยีสต์สกัด 30 กรัม ละลายในน้ำทะเลความเข้มข้น 15 psu ใส่ในถังปฏิกรณ์และปรับปริมาตรด้วยน้ำทะเลให้ได้ 900 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที

4.3.3 เติมสารละลายน้ำตาลกลูโคสจากข้อ 4.1.1 และหัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 300 มิลลิลิตร ลงในถังปฏิกรณ์จากข้อ 4.1.2 (ปริมาตรอาหารรวมทั้งหมดเป็น 3 ลิตร)

4.3.4 เลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการเติมอากาศ 1 vvm การกวนผสม 500 รอบต่อนาที ปรับค่า pH เท่ากับ 6.5 ด้วย 2 N HCl และ 4 N NaOH ทำการทดลอง 2 ซ้ำ และเก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง ทำการวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเก็บเซลล์แห้งเพื่อชั่งน้ำหนักและวิเคราะห์กรดไขมันต่อไป

5. ศึกษาการเจริญของ *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ด้วยอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 12 % (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ภายใต้สภาวะที่เหมาะ โดยเปรียบเทียบสูตรอาหารที่เติม และไม่เติม $MgCl_2$ 0.1 % (w/v) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

5.1 เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (40% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ความเข้มข้น 12% โดยไม่เติม $MgCl_2$ 0.1 % (w/v)

5.1.1 ใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง 900 มิลลิลิตร มิลลิลิตร (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ใส่ในขวดรูปชมพู่ นำสารละลายนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

5.1.2 เตรียมยีสต์สกัด 30 กรัม ละลายในน้ำทะเลความเข้มข้น 15 psu ใส่ในถังปฏิกรณ์ และปรับปริมาตรด้วยน้ำทะเลให้ได้ 1,800 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที

5.1.3 เติมสารละลายน้ำตาลกลูโคสจากข้อ 5.1.1 และหัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 300 มิลลิลิตร ลงในถังปฏิกรณ์จากข้อ 5.1.2 (ปริมาตรอาหารรวมทั้งหมดเป็น 3 ลิตร)

5.1.4 เลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการเติมอากาศ 1 vvm การกวนผสม 500 รอบต่อนาที ปรับค่า pH เท่ากับ 6.5 ด้วย 2 N HCl และ 4 N NaOH ทำการทดลอง 2 ซ้ำ และเก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง ทำการวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเก็บเซลล์แห้งเพื่อชั่งน้ำหนักและวิเคราะห์กรดไขมันต่อไป

5.2 เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (40% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ความเข้มข้น 12% โดยเติม $MgCl_2$ 0.1 % (w/v)

5.2.1 ใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง 900 มิลลิลิตร มิลลิลิตร (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ใส่ในขวดรูปชมพู่ นำสารละลายนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

5.2.2 เตรียมยีสต์สกัด 30 กรัม และ แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2.6H_2O$) 6.41 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำทะเลความเค็ม 15 psu ใส่ในถังปฏิกรณ์ให้ได้ 1,800 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที

5.2.3 เติมสารละลายน้ำตาลกลูโคสจากข้อ 5.2.1 และหัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 300 มิลลิลิตร ลงในถังปฏิกรณ์จากข้อ 5.2.2 (ปริมาตรอาหารรวมทั้งหมดเป็น 3 ลิตร)

5.1.4 เลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการเติมอากาศ 1 vvm การกวนผสม 500 รอบต่อนาที ปรับค่า pH เท่ากับ 6.5 ด้วย 2 N HCl และ 4 N NaOH ทำการทดลอง 2 ซ้ำ และเก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง ทำการวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเก็บเซลล์แห้งเพื่อชั่งน้ำหนักและวิเคราะห์กรดไขมันต่อไป

การเก็บเซลล์

การเก็บเซลล์ *Aurantiochytrium mangrovei* ในอาหารทุกสูตร โดยนำมาปั่นใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เมื่อเซลล์ตกตะกอน เทอาหารเหลวที่อยู่ด้านบนออกและเก็บใส่หลอดทดลอง เพื่อนำไปวัดน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS Method) (เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์ และคณะ, 2548) จากนั้นส่วนที่ตกตะกอนให้ล้างด้วยน้ำกลั่นโดยทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้ง เทสารละลายด้านบนทิ้ง นำตัวอย่างที่ได้ไปเข้าเครื่องอบแห้งระบบทำความเย็น (Freeze Dryer) แล้วนำไปชั่งน้ำหนักแห้งของเซลล์

การวิเคราะห์กรดไขมัน (ดัดแปลงจาก Shimizu et al., 1988)

1. ชั่งตัวอย่างเซลล์ของ *Aurantiochytrium mangrovei* ประมาณ 0.1-0.2 กรัมน้ำหนักแห้ง ใส่ในขวดปากเกลียวที่มีฝาปิดขนาด 20 มิลลิลิตร

2ใ เติม 2% กรดซัลฟูริค (H_2SO_4) ในเมทานอล (methanol) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Internal Standard 200 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ค) ผ่านด้วยก๊าซไนโตรเจน แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น

3. เติมเฮกเซน (ที่มี BHT 10 ส่วนในล้านส่วน) 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งให้แยกชั้น

3.1 ดูดของเหลวที่อยู่ชั้นบน ใส่ในหลอดทดลองกรองผ่านโซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) เพื่อดูดความชื้นออก

3.2 ของเหลวที่ได้ใส่ในขวดปากเกลียวที่มีฝาปิด และผ่านด้วยก๊าซไนโตรเจนจนแห้ง เก็บใส่ตู้เย็น เพื่อรอการวัดด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี

3.3 นำตัวอย่างจากข้อ 3.2 เติมเฮกเซน 300 ไมโครลิตร แล้วฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี

สภาวะเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี

ใช้ Flame Ionization Detector เป็นเครื่องตรวจวัดสัญญาณ และคอลัมน์ ใช้ Capillary Column HP-INNOWAX polyethylene glycol (30 m x 250 μm x 0.25 μm) อุณหภูมิของคอลัมน์เริ่มต้นที่ 175 องศาเซลเซียส คงไว้เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ 210 องศาเซลเซียส คงไว้เป็นเวลา 1 นาที แล้วค่อย ๆ เพิ่มขึ้น 2 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ 230 องศาเซลเซียส คงไว้เป็นเวลา 1 นาที โดยใช้ฮีเลียมเป็นตัวพา ส่วนอุณหภูมิของ Injector และ Detector คือ 250 องศาเซลเซียส คำนวณหาปริมาณกรดไขมัน โดยเปรียบเทียบกับกรดไขมันมาตรฐาน (Standard Fatty Acid)

การวัดน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS Method)(เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์ และคณะ, 2548 ดัดแปลงจาก Fujio and Morita, 1997)

1. ดูดสารละลายที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงแล้วจากข้อ 3 ปริมาตร 1 มิลิลิตร ลงในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำร้อน 5 นาที เพื่อทำปฏิกิริยา จากนั้นนำมาแช่ในน้ำเย็นเป็นเวลา 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา
3. เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดหาความเข้มข้นด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร
4. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณจากความเข้มข้นของกลูโคส (กรัม/ลิตร)

$$= \frac{\text{(ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตรที่ได้) x อัตราการเจือจาง}}{\text{ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน}}$$

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปราย

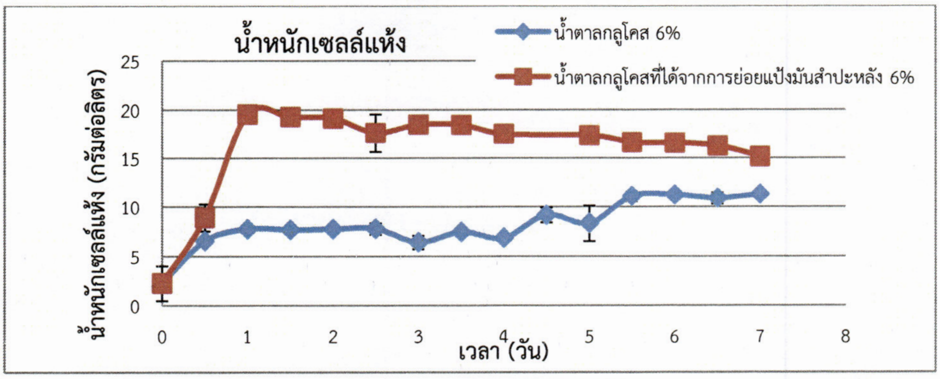
1. การเจริญของ *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสทางการค้าความเข้มข้น 6% และน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 6% ด้วยการเลี้ยงแบบเขย่าในขวดรูปชมพู่

การเจริญของ *A. mangrovei* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 6% และน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 6% แสดงในตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.1-4.3 จะเห็นว่า *A. mangrovei* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง มีการเจริญสูงสุดเท่ากับ 19.08- 19.23 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นมวลชีวภาพมีปริมาณลดลงเหลือ 15.15 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ภายใน 7 วัน ในขณะที่ *A. mangroveii* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคสทางการค้าความเข้มข้น 6% ที่ 24 ชั่วโมง มีมวลชีวภาพเท่ากับ 10.90-11.30 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ภายใน 132-168 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม ผลจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ในการทดลองนี้สอดคล้องกับมวลชีวภาพ (น้ำหนักเซลแห้ง) (ภาพที่ 4.2) เมื่อพิจารณาการเจริญของ *A. mangroveii* S4TP 072 กับปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไปพบว่า *A. mangroveii* S4TP 072 มีการเจริญสูงสุดในช่วงเวลาที่ปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างชัดเจนภายใน 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.3) Prabu, Raksha and Karuppuchamy (2012) รายงานการเลี้ยง *Thraustochytrium aureum* พบว่า แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตกรดไขมัน ได้แก่ กลูโคสและซูโคส ซึ่งดีกว่าฟลุคโตส กลีเซอรอลและเอทานอล

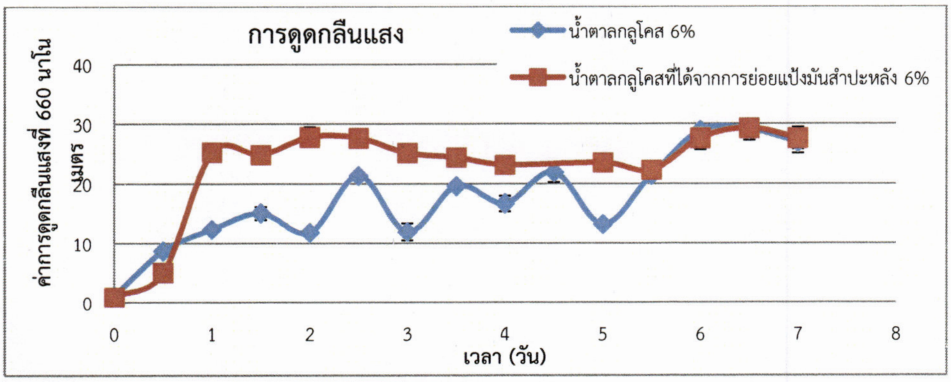
จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าอาหารที่ใช้กลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังมีผลทำให้ *A. mangrovei* S4TP 072 เจริญได้ดีกว่าอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสทางการค้า จึงเลือกกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังมาเป็นแหล่งทางเลือกใหม่ของแหล่งคาร์บอนในการเจริญของ *A. mangrovei* S4TP 072 ในการทดลองขั้นต่อไป คือ ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังต่อการเจริญและผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง โดยเฉพาะดีเอชเอ

ตารางที่ 4.1 น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร และปริมาณน้ำตาลกลูโคสของ *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคส 6% และน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง 6%

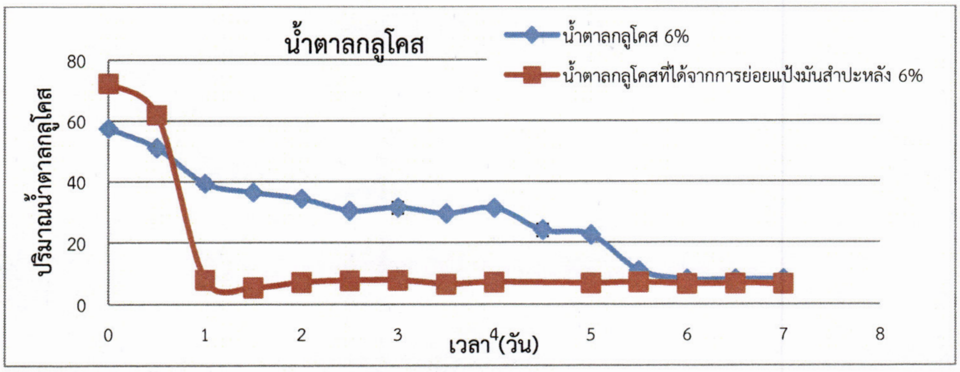
	น้ำตาลกลูโคส 6%			น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง 6%		
Time	Cell (g/L)	OD_{660}	Glucose (g/L)	Cell (g/L)	OD_{660}	Glucose (g/L)
0	2.23±0.29	1.15±0.03	57.24±1.60	2.23±1.75	0.93±0.06	72.20±1.35
12	6.53±0.29	8.68±0.12	50.80±1.47	8.91±1.37	5.07±0.07	61.95±0.93
24	7.73±0.15	12.35±0.05	39.24±1.61	19.51±0.41	25.30±0.67	7.59±0.37
36	7.65±0.25	15.10±1.10	36.21±0.86	19.23±0.25	24.90±1.06	5.17±0.48
48	7.73±0.36	11.83±0.05	34.12±0.72	19.08±0.37	27.83±1.63	6.86±0.36
60	7.77±0.57	21.33±0.60	30.14±1.04	17.58±1.95	27.67±0.48	7.45±0.91
72	6.40±0.67	11.93±1.47	31.23±1.95	18.45±0.25	25.20±0.25	7.58±0.21
84	7.43±0.43	19.57±0.50	29.20±0.85	18.41±0.27	24.47±0.64	6.29±0.98
96	6.83±0.11	16.70±1.27	31.00±1.32	17.48±0.50	23.23±0.29	6.92±0.58
108	9.15±0.75	21.93±1.69	23.85±1.95	-	-	-
120	8.30±1.80	13.25±0.25	22.34±0.08	17.33±0.39	23.57±1.19	6.60±0.48
132	11.10±0.51	21.40±0.20	10.64±0.20	16.61±0.53	22.33±0.41	6.86±0.61
144	11.23±0.46	28.85±0.25	7.67±0.06	16.55±0.32	27.65±1.85	6.38±0.68
156	10.90±0.58	29.05±1.75	7.62±0.00	16.25±0.74	29.30±0.19	6.48±0.49
168	11.30±0.32	26.97±1.80	7.70±0.06	15.15±0.55	27.67±1.78	6.32±0.80



ภาพที่ 4.1 การเจริญของ *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 (น้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคสทางการค้า 6% และน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง 6%



ภาพที่ 4.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ของการทดลองการเจริญของ *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคสทางการค้า 6% และน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง 6%



ภาพที่ 4.3 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสของการทดลองการเจริญของ *Aurantiochytrium mangroveii* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคสทางการค้า 6% และน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง 6%

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

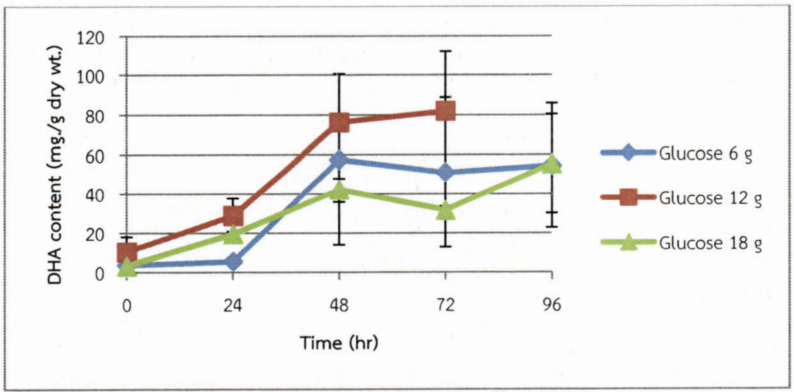
636.0855
ส248ฉ
ฉ.4

2. การเจริญของ *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสทางการค้า 6% และน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 6%, 12% และ 18% ด้วยการเลี้ยงแบบเขย่าในขวดรูปชมพู่

การเจริญของ *A. mangroveii* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสทางการค้า 6% และน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 6%, 12% และ 18% พบว่า *A. mangroveii* S4TP 072 เจริญได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 12% โดยพิจารณาจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร (ตารางที่ 4.2 และภาพที่ 4.5) รองลงมาคือ ความเข้มข้น 6% และ 18% ในขณะที่น้ำตาลกลูโคสทางการค้า 6% มีผลต่อการเจริญน้อยสุด สอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่วัดได้ ซึ่งพบว่า *A. mangroveii* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง 6%, 12% และ น้ำตาลกลูโคสทางการค้า 6% มีค่าลดลงอย่างมาก ส่วนน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 18% ยังมีปริมาณเหลืออยู่มากสุด (ตารางที่ 4-2 และภาพที่ 4.6)

สำหรับผลการเจริญในส่วนของมวลชีวภาพ พบว่า *A. mangroveii* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง 18% มีค่าสูงสุด (ภาพที่ 4.4) ทั้งนี้ ในการเก็บเซลล์ *A. mangroveii* S4TP 072 มาหาน้ำหนักเซลแห้งมีการปนเปื้อนของน้ำตาลจำนวนมาก จึงทำให้น้ำหนักเซลแห้งมีค่ามากกว่าปกติ ในการทดลองนี้จึงไม่นำค่าน้ำหนักเซลแห้งมาพิจารณา

เมื่อพิจารณาปริมาณกรดไขมันที่เวลา 3 วัน พบว่า ปริมาณดีเอชเอมีค่าสูงสุดเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาล 12 % (81.86±30.25 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาล 6% และ 18% (50.94±38.07 และ 31.47±2.16 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนัก) ตามลำดับ (ตารางภาคผนวกที่ 1 และภาพที่ 4.7) ส่วนปริมาณอีพีเอมีมากสุดที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาล 6% (0.93±0.67 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนัก) รองลงมาคือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาล 12% และ 18% (0.65±0.06 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนัก และ 0.41±0.10 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนัก) ตามลำดับ



ภาพที่ 4.7 ปริมาณกรดไขมันชนิดดีเอชเอที่ได้จากการเลี้ยง *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ด้วยอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 6%, 12% และ 18% ด้วยการเลี้ยงแบบเขย่าในขวดรูปชมพู่

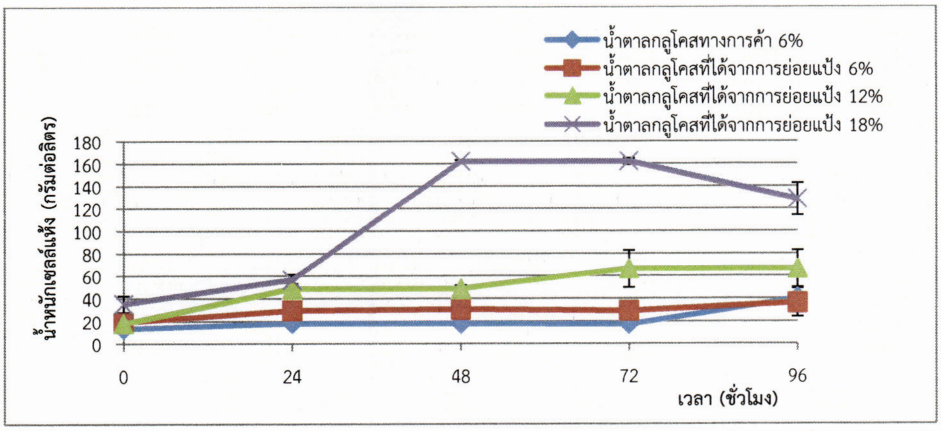
357930

ตารางที่ 4.2 น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ จากการเลี้ยง *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ด้วยสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคสทางการค้า 6% และน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 6%, 12% และ 18%

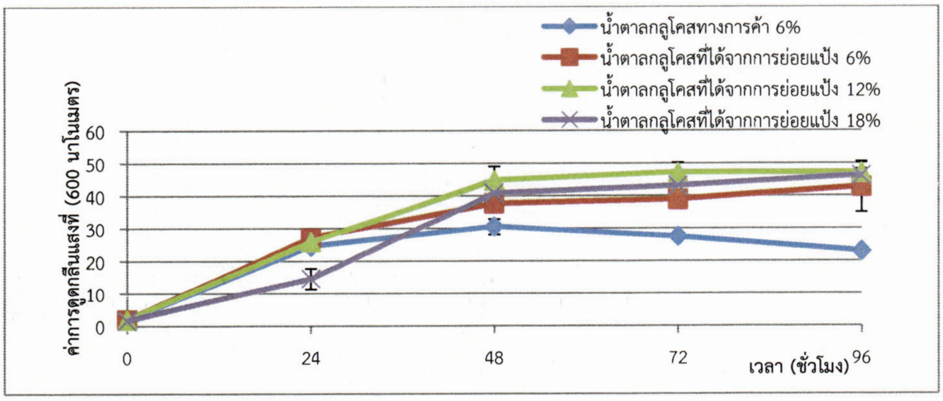
Time (hr)	น้ำตาลกลูโคสทางการค้า			น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น								
	6%			6%			12%			18%		
	Dry biomass (g/L)	OD_{660}	Glucose (g/L)	Dry biomass (g/L)	OD_{660}	Glucose (g/L)	Dry biomass (g/L)	OD_{660}	Glucose (g/L)	Dry biomass (g/L)	OD_{660}	Glucose (g/L)
0	13.05±0.05	1.69±0.03	62.81±1.48	19.00±0.10	1.85±0.11	77.16±0.00	17.95±4.75	1.85±0.12	157.01±1.26	35.10±7.20	1.59±0.50	214.03±3.24
24	17.85±0.85	24.45±0.15	25.76±0.40	29.45±0.25	27.05±2.45	18.30±3.55	48.30±4.70	25.80±0.50	111.42±1.89	56.30±5.00	14.50±3.20	213.31±2.88
48	17.60±1.50	30.50±2.40	8.63±0.54	30.50±0.40	37.70±0.90	7.78±0.13	48.25±3.15	44.60±4.40	20.77±0.45	161.75±1.15	40.75±2.55	124.82±7.02
72	17.20±0.30	27.40±0.10	8.72±0.54	29.15±1.25	38.95±0.65	8.45±0.72	66.10±16.70	47.05±3.15	21.40±0.00	161.70±2.80	43.00±0.20	140.65±3.96
96	39.80±0.00	11.45±11.45	7.64±0.00	36.20±12.30	42.75±7.75	10.43±1.08	66.10±16.70	47.05±3.15	21.40±0.00	128.15±14.45	46.15±2.05	106.47±0.00

ตารางที่ 4.3 น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ จากการเลี้ยง *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ด้วยอาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 12% ที่ pH ต่าง ๆ

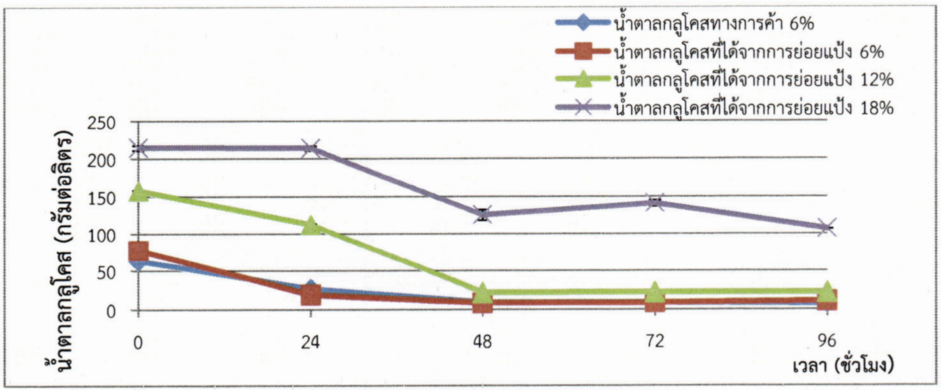
	pH 6.0			**pH 6.5**			**pH 7.0**			**pH 7.5**			**pH 8.0**		
Time (hr)	Dry biomass (g/L)	OD_{660}	Glucose (g/L)	Dry biomass (g/L)	OD_{660}	Glucose (g/L)	Dry biomass (g/L)	OD_{660}	Glucose (g/L)	Dry biomass (g/L)	OD_{660}	Glucose (g/L)	Dry biomass (g/L)	OD_{660}	Glucose (g/L)
0	159.70±2.10	2.12±0.01	144.63±4.33	156.25±0.45	2.18±0.04	143.51±1.42	158.65±0.65	2.20±0.05	144.33±0.00	157.45±0.55	2.11±0.02	139.48±3.06	151.70±1.80	2.23±0.05	132.01±7.39
24	130.25±0.05	25.60±0.50	107.39±0.67	132.00±0.40	24.55±1.25	108.88±4.40	133.90±0.20	24.55±0.75	106.64±2.61	132.35±1.05	23.80±0.50	103.43±2.09	131.95±0.75	23.60±0.40	94.48±2.54
48	82.55±0.55	35.65±1.55	44.03±0.45	80.90±0.20	36.55±1.45	44.55±0.67	80.95±0.05	35.70±0.30	34.40±0.82	81.25±0.15	36.60±1.20	32.46±0.52	81.35±0.25	34.60±1.10	27.39±0.52
72	80.20±1.20	36.20±0.70	40.75±4.18	81.85±0.35	36.05±1.45	43.88±0.60	81.30±0.30	35.60±0.50	34.40±0.67	82.00±0.10	36.95±0.65	31.42±0.07	82.65±1.55	35.45±0.85	28.28±0.22
96	79.85±0.45	31.20±0.10	45.00±0.07	81.75±0.65	31.10±0.40	43.73±0.15	78.30±1.30	32.95±0.75	34.10±0.07	78.30±0.10	33.35±0.55	31.94±0.30	79.60±0.10	31.55±1.35	27.76±1.19



ภาพที่ 4.4 การเจริญของ *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 (น้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคสทางการค้า 6% และน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง 6% 12% และ 18%



ภาพที่ 4.5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ของการทดลองการเจริญของ *Aurantiochytrium mangroveii* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคสทางการค้า 6% และน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง 6% 12% และ 18%



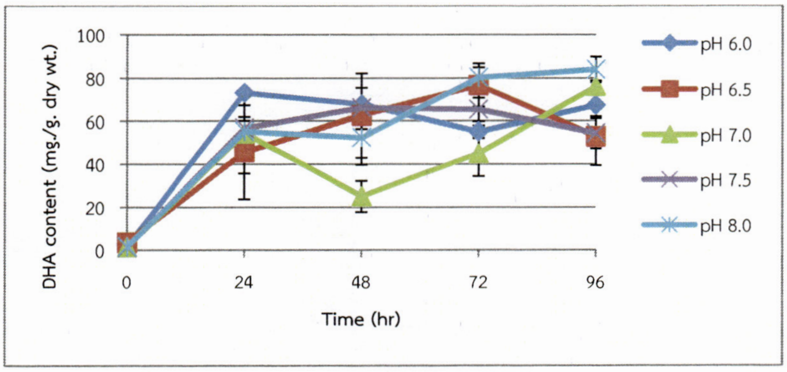
ภาพที่ 4.6 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสของการทดลองการเจริญของ *Aurantiochytrium mangroveii* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคสทางการค้า 6% และน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง 6%, 12% และ 18%

จากการศึกษาพบว่าน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 12% มีผลทำให้ *A. mangroveii* S4TP 072 มีการเจริญและผลิตกรดไขมันดีเอชเอในปริมาณสูง จึงเลือกความเข้มข้นดังกล่าวในการศึกษาขั้นต่อไปคือ ศึกษาความเป็นกรด-เบส (pH) ที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตกรดไขมันชนิดดีเอชเอ

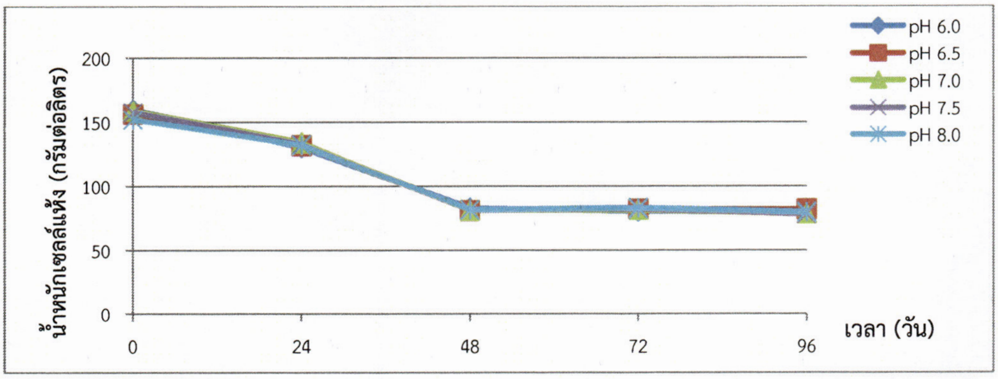
3. การเจริญของ *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 12% ที่ pH ต่าง ๆ ด้วยการเลี้ยงแบบเขย่าในขวดรูปชมพู่

การเจริญของ *A. mangroveii* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 12% ที่ pH ต่าง ๆ พบว่า *A. mangroveii* เจริญได้ดีใกล้เคียงกันในทุกระดับ pH (ตารางที่ 4.3 และภาพที่ 4.8-4.10)

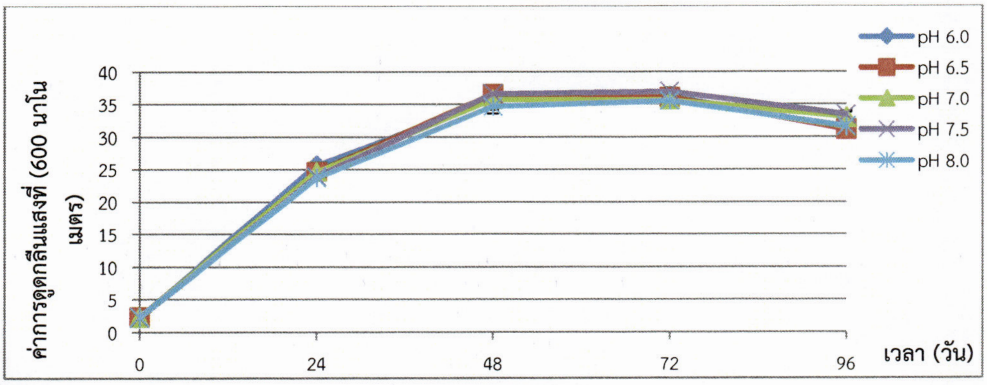
เมื่อพิจารณาปริมาณกรดไขมันที่เวลา 2 วัน พบว่า ปริมาณดีเอชเอมีค่าสูงสุดเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ pH 8 (83.84±5.84 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH 7 และ 6 เท่ากับ 76.02±2.83 และ 67.13±51.08 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนัก ตามลำดับ (ตารางภาคผนวกที่ 2 และภาพที่ 4.11) ส่วนปริมาณอีพีเอมีมากสุดที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่ pH 7 (1.39±0.13 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนัก) รองลงมาคือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH 8 และ 6 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน เท่ากับ 1.29±0.02 และ 1.22±0.91 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนัก ตามลำดับ สอดคล้องกับ Kumon *et al.* (2002); Perveen *et al.* (2006); Raghukumar (2008) และ Singh & Ward (1997) ที่รายงานว่าทรอสโทไคตริดส์สามารถเจริญและผลิตกรดไขมันได้ในพีเอชตั้งแต่ 5-8 โดยมียีนเฉพาะที่สามารถควบคุมให้มันทนอยู่ได้ทั้งสภาวะที่เป็นกรดและเบส Prabu, Raksha and Karuppuchamy (2012) รายงานการเลี้ยง *Thraustochytrium aureum* ที่พีเอช 7 ด้วยอาหารที่มี glucose 15 gm/L, yeast extract 15 gm/L, NaCl 10 gm/L และ KH_2PO_4 1.0 gm/L พบว่าเชื้อเจริญและผลิตดีเอชเอในปริมาณที่มากกว่าอาหารที่มีความเป็นกรดและเบส



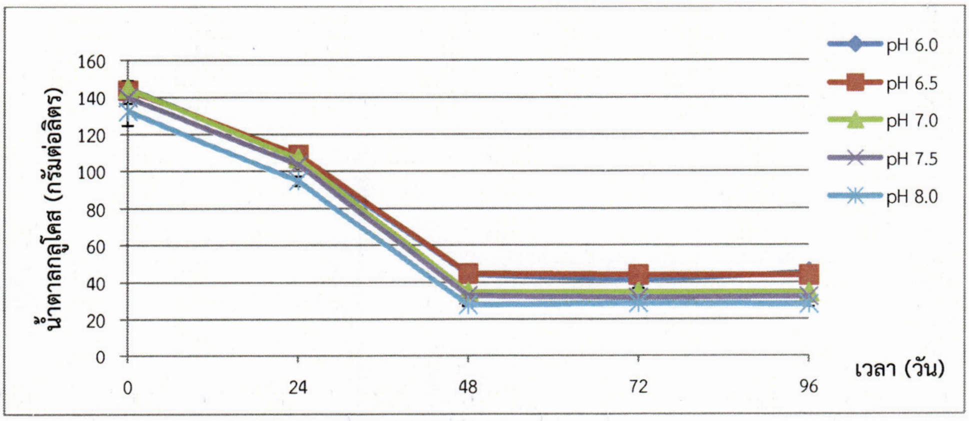
ภาพที่ 4.11 ปริมาณกรดไขมันชนิดดีเอชเอที่ได้จากการเลี้ยง *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ด้วยอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 12% ที่ pH ต่าง ๆ ด้วยการเลี้ยงแบบเขย่าในขวดรูปชมพู่



ภาพที่ 4.8 การเจริญของ *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 (น้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง 12% ที่ pH ต่าง ๆ



ภาพที่ 4.9 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ของการทดลองการเจริญของ *Aurantiochytrium mangroveii* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง 12% ที่ pH ต่าง ๆ

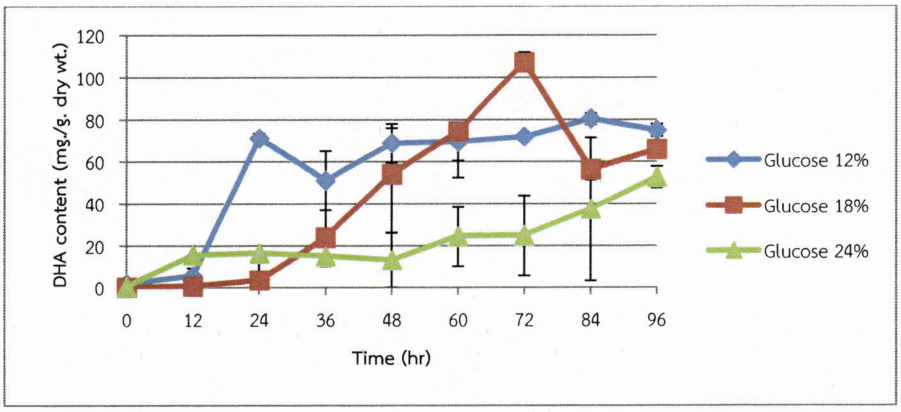


ภาพที่ 4.10 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสของการทดลองการเจริญของ *Aurantiochytrium mangroveii* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 12% ที่ pH ต่าง ๆ

4. การเจริญของ *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ด้วยอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 12%, 18% และ 24% (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ภายใต้สภาวะที่เหมาะในถังหมัก

การทดลองการเจริญของ *A. mangrovei* S4TP 072 ในถังหมักด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 12 %, 18% และ 24% เป็นระยะเวลา 4 วัน พบว่า น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 660 นาโนเมตร และปริมาณน้ำตาลกลูโคส ได้ผลดังตารางที่ 4.4 และภาพที่ 4.12 - 4.14 จะเห็นว่า *A. mangrovei* S4TP 072 เจริญได้ดีเมื่อเลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 12% ในขณะที่ความเข้มข้น 18% และ 24 % มีการเจริญที่ใกล้เคียงกันภายใน 4 วัน

เมื่อพิจารณาปริมาณกรดไขมันที่เวลา 4 วัน พบว่า ปริมาณดีเอชเอและอีพีเอมีค่าสูงสุดเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาล 12 % (74.97±2.96 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ 1.03±0.06 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาล 18 % และ 24% (65.85±1.84 และ 0.71±0.03 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง กับ 52.59±5.00 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ 0.31±0.23 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ (ภาพที่ 4.15)

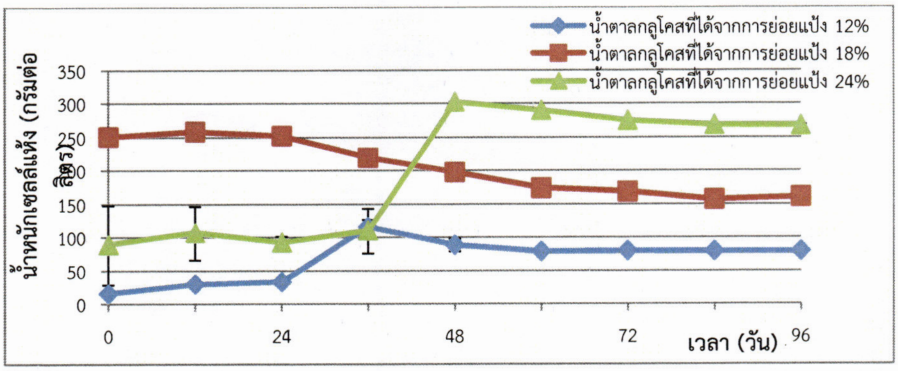


ภาพที่ 4.15 ปริมาณกรดไขมันชนิดดีเอชเอที่ได้จากการเลี้ยง *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ด้วยอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 12%, 18% และ 24% (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ภายใต้สภาวะที่เหมาะในถังหมัก

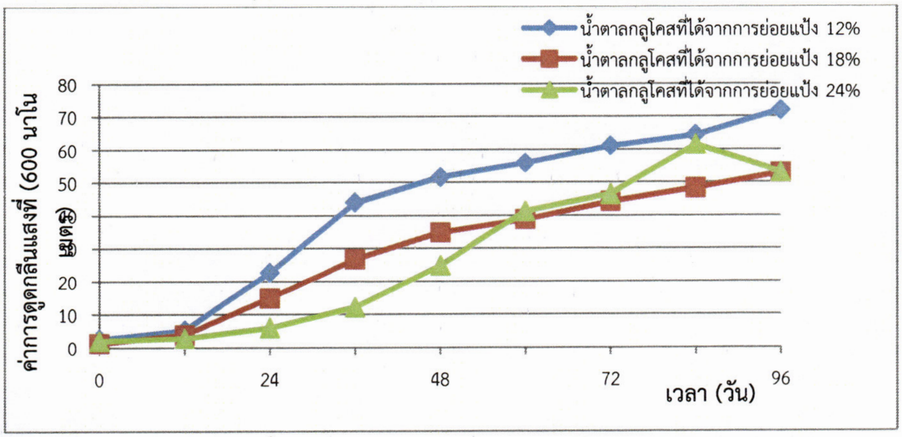
จากการศึกษาพบว่าอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 12% เหมาะสมต่อการการเจริญและผลิตกรดไขมันดีเอชเอของ *A. mangroveii* S4TP 072 จึงทำการศึกษาขั้นต่อไปว่า $MgCl_2$ มีผลต่อการเจริญหรือไม่ จึงเลือกความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 12% มาศึกษาผลของการเติม $MgCl_2$ ต่อการเจริญและผลิตกรดไขมันชนิดดีเอชเอในถังหมัก

ตารางที่ 4.4 น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร และปริมาณน้ำตาลกลูโคสของ *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง 12%, 18% และ 24% ที่ pH 6.5 ในถังหมัก

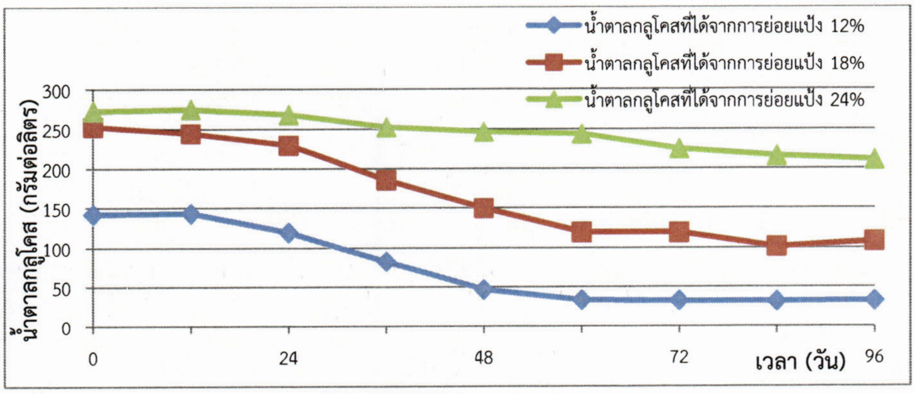
	Glucose 12 %			Glucose 18 %			Glucose 24 %		
Time (hr)	Cell (g/L)	OD$_{660}$	Glucose (g/L)	Cell (g/L)	OD$_{660}$	Glucose (g/L)	Cell (g/L)	OD$_{660}$	Glucose (g/L)
0	15.13±0.93	2.40±0.09	141.41±3.32	250.28±6.58	1.13±0.21	252.24±10.64	88.53±59.88	1.87±0.28	272.49±3.69
12	29.45±2.50	5.07±0.41	142.79±3.60	258.00±4.25	3.75±0.15	243.81±13.92	106.43±40.23	2.69±0.14	274.61±7.65
24	33.13±2.08	22.55±5.20	118.92±9.40	251.88±4.38	14.78±1.18	228.85±15.15	91.80±9.10	5.78±0.88	267.88±8.85
36	115.30±11.15	43.88±0.23	82.04±18.25	219.20±0.90	26.70±2.40	185.39±4.09	109.63±33.93	11.98±3.47	251.94±1.75
48	88.03±9.63	51.48±2.68	46.18±12.82	197.30±4.55	34.68±5.33	149.52±8.42	301.65±0.50	24.68±3.78	245.76±4.61
60	78.35±0.50	55.75±5.60	33.09±0.65	173.80±2.15	38.73±5.43	119.46±10.37	289.08±0.13	41.20±5.50	242.81±1.48
72	79.28±1.13	61.03±1.78	32.17±0.28	168.33±1.83	44.20±6.55	118.91±9.42	274.15±0.20	46.40±4.75	223.82±9.77
84	78.75±1.05	64.33±1.38	31.43±0.28	157.05±1.00	48.25±9.15	101.18±2.04	267.70±2.45	61.38±2.78	215.06±4.89
96	78.73±0.23	71.70±7.60	32.36±0.28	160.92±1.07	52.78±11.03	108.12±11.13	266.98±1.18	52.95±5.55	210.18±5.16



ภาพที่ 4.12 การเจริญของ *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 (น้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 12%, 18% และ 24%



ภาพที่ 4.13 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ของการทดลองการเจริญของ *Aurantiochytrium mangroveii* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 12%, 18% และ 24%



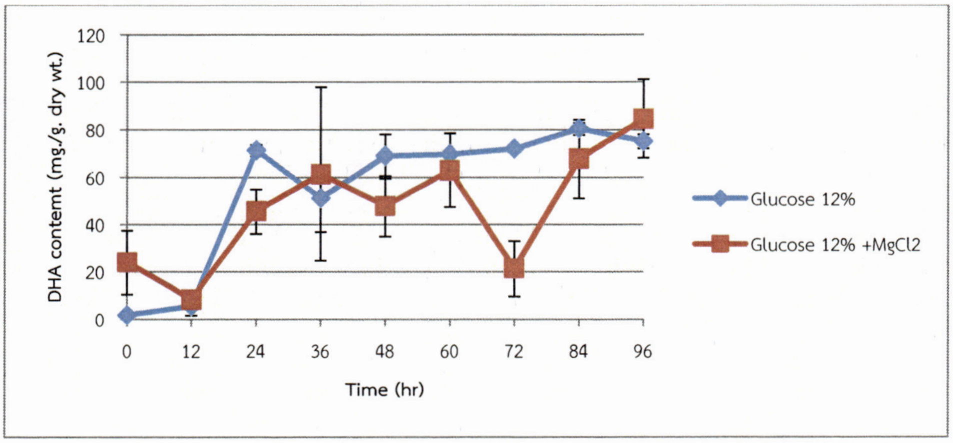
ภาพ 4.14 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสของการทดลองการเจริญของ *Aurantiochytrium mangroveii* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเติมน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 12%, 18% และ 24%

5. การเจริญของ *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ด้วยอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 12 % (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ภายใต้สภาวะที่เหมาะ โดยเปรียบเทียบสูตรอาหารที่เติม และไม่เติม $MgCl_2$ 0.1 % (w/v) ในถังหมัก

จากการศึกษาการเจริญของ *A. mangroveii* S4TP 072 ในถังหมักด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 12 % จะเห็นว่า *A. mangroveii* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่ไม่เติม $MgCl_2$ 0.1 % (w/v) มีการเจริญดีกว่าสูตรอาหารที่เติม $MgCl_2$ 0.1 % (w/v) ภายใน 4 วัน (ตารางที่ 4.5 และภาพที่ 4-16 ถึง 4-18)

เมื่อพิจารณาปริมาณกรดไขมันที่เวลา 4 วัน พบว่า ปริมาณดีเอชเอและอีพีเอมีค่าสูงสุดเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม 0.1% $MgCl_2$ (84.55±16.46 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ 1.38±0.32 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติม 0.1% $MgCl_2$ มีปริมาณดีเอชเอและอีพีเอ เท่ากับ 74.97±2.96 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ 1.03±0.06 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (ตารางภาคผนวกที่ 4 และภาพที่ 4-19)

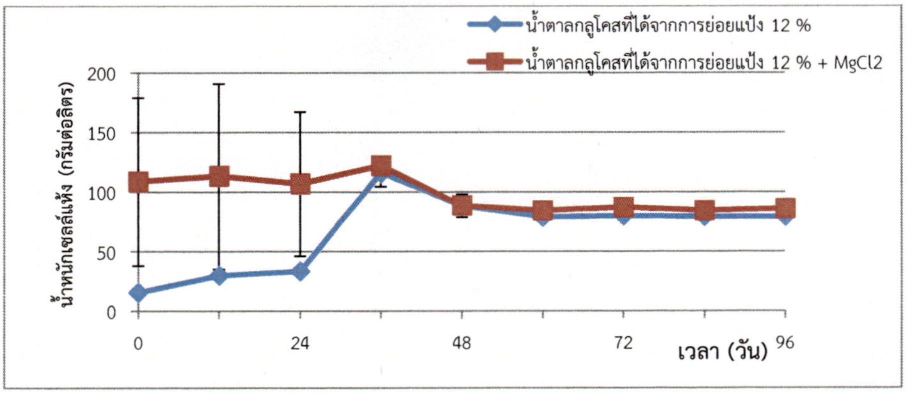
อย่างไรก็ตาม การเติมหรือไม่เติม 0.1% $MgCl_2$ ในการเลี้ยง *A. mangroveii* S4TP 072 ให้ผลต่อการเจริญและผลิตกรดไขมันชนิดดีเอชเอที่ไม่แตกต่างกันมากนัก ซึ่งยังไม่พบรายงานวิจัยการเติม 0.1% $MgCl_2$ ดังกล่าว



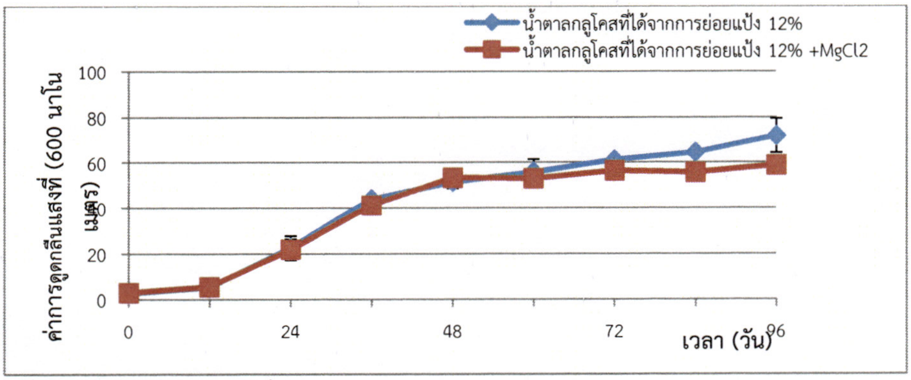
ภาพที่ 4.19 ปริมาณกรดไขมันชนิดดีเอชเอที่ได้จากการเลี้ยง *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ด้วยอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 12 % (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม กับอาหารที่เติม $MgCl_2$ 0.1 % (w/v) และไม่เติม $MgCl_2$ 0.1 % (w/v) ในถังหมัก

ตารางที่ 4.5 น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร และปริมาณน้ำตาลกลูโคสของ *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง 12% ที่ pH 6.5 ทั้งที่เติมและไม่เติม $MgCl_2$ ในถังหมัก

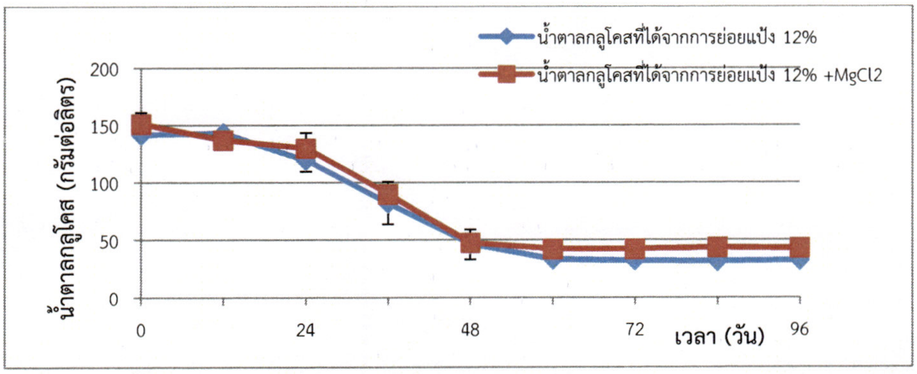
	Glucose 12 % without $MgCl_2$			Glucose 12 % with $MgCl_2$		
Time (hr)	Dry biomass (g/L)	OD_{660}	Glucose (g/L)	Dry biomass (g/L)	OD_{660}	Glucose (g/L)
0	15.13±0.93	2.40±0.09	141.41±3.32	108.33±70.19	2.84±0.81	150.79±10.00
12	29.45±2.50	5.07±0.41	142.79±3.60	112.75±77.61	5.37±1.10	136.95±0.09
24	33.13±2.08	22.55±5.20	118.92±9.40	106.53±60.23	21.90±4.50	129.83±13.52
36	115.30±11.15	43.88±0.23	82.04±18.25	121.50±2.70	41.23±3.08	89.97±2.69
48	88.03±9.63	51.48±2.68	46.18±12.82	88.23±0.53	53.38±2.18	47.35±2.13
60	78.35±0.50	55.75±5.60	33.09±0.65	84.05±5.40	53.03±2.68	42.11±0.54
72	79.28±1.13	61.03±1.78	32.17±0.28	86.73±2.68	56.40±0.30	42.22±0.36
84	78.75±1.05	64.33±1.38	31.43±0.28	84.08±4.58	55.70±0.60	43.42±0.17
96	78.73±0.23	71.70±7.60	32.36±0.28	85.70±3.80	58.85±0.30	42.82±0.57



ภาพที่ 4.16 การเจริญของ *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 (น้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเติมน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 12% ที่เติมและไม่เติมแมกนีเซียมคลอไรด์ 0.1 %



ภาพที่ 4.17 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรของการทดลองการเจริญของ *Aurantiochytrium mangroveii* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเติมน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 12% ที่เติมและไม่เติมแมกนีเซียมคลอไรด์ 0.1 %



ภาพที่ 4.18 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสของการทดลองการเจริญของ *Aurantiochytrium mangroveii* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเติมน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 12% ที่เติมและไม่เติมแมกนีเซียมคลอไรด์ 0.1 %

จากการศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังสามารถนำมาทดแทนเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยง *A. mangroveii* S4TP 072 ได้ ซึ่งยังไม่พบรายงานวิจัยเกี่ยวกับวัตถุดิบนี้ โดยเลี้ยงที่ความเข้มข้น 12% เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้ปริมาณดีเอชเอและอีพีเอเท่ากับ 18.41 และ 0.14 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด แต่เมื่อเทียบปริมาณกรดไขมันกับรายงานการใช้วัตถุดิบอื่นๆ มาใช้เพื่อลดต้นทุนการผลิต พบว่าได้ปริมาณที่น้อยกว่า ดังการศึกษาของ Quilodran et al. (2009) ที่ใช้ของเหลือจากโรงงานเบียร์เลี้ยง Thraustochytriidae sp., M12-X1 ได้มวลชีวภาพ เท่ากับ 2.3 กรัม/ลิตร และปริมาณดีเอชเอและอีพีเอเท่ากับ 39.5–61.7 และ 7.4–11.3 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด โดยเลี้ยงในถังหมักขนาด 100 มล. Liang et al. (2010) เลี้ยง *S. limacinum* SR21 ด้วย Sweet sorghum juice ได้มวลชีวภาพ เท่ากับ 9.4 กรัม/ลิตร และปริมาณดีเอชเอและอีพีเอเท่ากับ 34.28 และ 0.61 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด โดยเลี้ยงในถังหมักขนาด 100 มล. ในขณะที่ Ethier et al. (2011) เลี้ยง *S. limacinum* SR21 ด้วย Crude glycerol ได้มวลชีวภาพ เท่ากับ 4-15 กรัม/ลิตร และปริมาณดีเอชเอเท่ากับ 24.86 และ 0.61 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด โดยเลี้ยงในถังหมักขนาด 4500 มล. เป็นต้น

สรุปผลการศึกษา

น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังสามารถนำมาเป็นวัตถุดิบทดแทนกลูโคสทางการค้า ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยง *A. mangroveii* S4TP 072 ได้ โดยเลี้ยงที่ความเข้มข้น 12% pH 6.5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้ปริมาณดีเอชเอและอีพีเอเท่ากับ 18.41 และ 0.14 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด

ข้อเสนอแนะ

ควรหาแหล่งอาหารอื่นๆ ที่เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่มีราคาถูกในการเลี้ยงทรอสโทไคตริดส์ เพื่อลดต้นทุนการผลิตในเชิงพาณิชย์ต่อไป

รายการอ้างอิง

กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. (2546). *เทคโนโลยีของแป้ง* (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิยาลัยเกษตรศาสตร์.

กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์. (2548). *การปรับปรุงสภาวะที่เหมาะสมของการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ เพื่อผลิตเอนไซม์ในการสลายแป้งมันสำปะหลัง*. รายงานการวิจัย. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยบูรพา.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, ปรีชา สุวรรณพินิจ (2557). จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 10. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ 735 หน้า.

บุษบา ยงสมิทธ์ (2540). จุลชีววิทยาการหมักวิตามินและสารสี ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ : 275 หน้า

รัศมี ศุภศรี. (2536). *ไขมันและบทบาทของ omega-3 fatty acid กับ การอุดตันของหลอดเลือด. อาหาร, 23* (4). ม.ป.ท. 242-245.

ลลิดา เชาว์เรืองฤทธิ์. (2548). *ผลของความเค็มและอุณหภูมิต่อการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงชนิดดีเอชเอโดย Schizochytrium spp.*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, สาขาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

วิเชียร ยงมานิตชัย.(2551). *สาหร่ายเซลล์เดียวผลิตเป็นอาหารเสริมต้นทุนต่ำ*. วันที่ค้นข้อมูล 23 กุมภาพันธ์ 2551, เข้าถึงได้จากhttp://www.dailynews.co.th/web/html/popup_news.

เวียง เชื้อโพธิ์หัก. (2542). *โภชนาศาสตร์สัตว์น้ำและการให้อาหารสัตว์น้ำ* ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 255 หน้า.

ศิริวรรณ เนติวรานนท์. (2547). บทบาทของไขมันต่อสุขภาพ. *วารสารจาร์พา,11*(80), 62-66.

สมถวิล จริตควร และ E.B.G. Jones. (2550). จุลินทรีย์ทะเล (*Schizochytrium* sp.) จากป่าชายเลน: แหล่งกรดไขมันเสริมคุณค่าให้อาร์ทีเมีย (*Artemia*). การประชุมวิชาการระบบนิเวศป่าชายเลนแห่งชาติ "ป่าชายเลน: รากฐานเศรษฐกิจพอเพียงของชุมชนชายฝั่ง" วันที่ 12-14 กันยายน 2550.ณ โรงแรมฮอลิเดย์อินน์ รีสอร์ท ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี

สมใจ ศิริโภค (2537). เทคโนโลยีการหมัก ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ. กรุงเทพฯ 250 หน้า

Alexopoulos, C. W., Charles, W. M., & Blackwell, M. (1996). *Introductory mycology*. (4th ed.). New York: John WAiley & Sons.

Alderman, D. J., Harrison, J. L., Bremer, G. B., & Jones, E. B. G. (1974). Taxonomic revisions in the marine biflagellate fungi: The ultrastructural evidence. *Marine Biology, 25,* 345-357.

Alderman, D. J., & Jones, E. B. G. (1971). Physiological requirement of two marine Phycomycetes, *Althornia crochii* and *Ostracoblabe implexa. Trans. Br. Mycol. Soc., 57*(2), 213-225.

รายการอ้างอิง (ต่อ)

Bahnweg, G. (1979). Studies on the physiology of thraustochytriales I. Growth requirements and nutrition of *Thraustchytrium* spp., *Schizochytrium* sp., *Japonochytrium* sp., *Labyrinthulaids* sp., *Ulkenia* sp. Veroff. Inst. Meeresforsch. *Bremerhaven*, *17*, 245-268.

Bailey, R.B.; DiMasi, D.; Hansen, J.M.; Mirrasoul, P.L.; Ruecker, C.M.; Veeder III,;Grorge, T.; Kaneko, T. and Barclay, W.R. (2003). Enhanced production of lipids containing polyunsaturated fatty acids by very high density cultures of eukaryotic microbes in fermentors. United States Patent 6,607,900.

Bajpai, P. Pramod, Bajpai, K. and Owen, P. Ward (1991a). Production of docosahexaenoic acid by *Thraustochytriumaureum*, Appl. Microbiol.Biotechnol., 35 : 706-710.

Bajpai, P. K.; Bajpai, P.; and Ward, O.P. (1991b). Optimization of production of docosahexaenoic acid (DHA) by *Thraustochytriumaureum*ATCC 34304. JAOCS, 68: 509-514.

Barclay, W. R. and Zeller, S. (1996). Nutritional enhancement of *n*-3 and *n*-6 fatty acids in rotifers and *Artemia* nauplii by feeding spray-dried *Schizichytrium*sp. Journal of The World Aquaculture Society 27: 314-322.

Bowles, R. D.; Hunt, A. E.; Bremer, G. B.; Duchars, M. G.; and Eaton, R. A. (1999). Long- chain *n*-3 polyunsaturated fatty acid production by members of the marine protistan group the thraustochytrids: screening of isolates and optimisation of docosahexaenoicacid production. Journal of Biology, 70: 193-202.

Chatdumrong, W.; Yongmanitchai, W.; Limtong, S. and Worawattanamateekul, W. (2004). Variation of polyunsaturated fatty acids profile of Thraustochytrids isolated from mangrove forest in Thailand.Paper presented at 9th International Marine and Freshwater Mycology Symposium. 14-19 November,2004. Chiang Mai, Thailand.

Chi, Z.;.Pyle, D.; Wen, Z.; Frear, C. and Chen, S. (2007). A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. Process Biochem, 42: 210-214.

Chilton, P. M. (1995). *An invertigation into the use of marine protest Thraustochytrium aureum as a dietary supplement providing Omega-3 polyunsaturates.* Doctoral Dissertation. Biology science, University of Portsmouth.

Fan, K.W.; Chen, F.; Jones, E.B.G. and Vrijmoed.L.L.P. (2000). Utilization of food processing waste byThraustochytrids. In: Aquatic Mycrology across the Millennium (eds K.D. Hyde, W.H. Ho and S.B. Pointing). Fungal Diversity 5: 185-194.

รายการอ้างอิง (ต่อ)

Fan, K. W., Chen, F. J., Jones, E. B. G., & Vrijmoed, L. P. (2001). Eicosapentaenoics acid and docosahexaenoic acids production by and okara-utilizing potential of thraustochytrids. *Journal of Industrial and Biotechnology, 27*, 199-202.

Honda, D., Yokochi, T., Nakahara, T., Erata, M., & Higashihara, T. (1998). *Schizochytrium limacinum* sp. Nov., a new thraustochytrids from a mangrove area in the west pacific ocean, *Mycol. Res., 102*(4), 439-448

Jaritkhuan, S.; E.B.G. Jones and Bremer, G. (1998). Thraustochytrids as a food source in Aquaculture. Paper presented at The Asia-Pacific Mycological Conference on Biodiversity and Biotechnology, 6-9 July, 1998. HuaHin, Thailand.

Jaritkhuan, S. (2002).Thraustochytrids: a new alternative source of fatty acids for aquaculture. In: Fungi in Marine Environments (ed. K.D. Hyde). Fungal Diversity Research Series 7: 345-357.

Kilikian, B.V., 1996, Production of glucoamylase by fed-batch culture of *Aspergillusawamori* NRRL 3112, Reviwed Microbiology, Vol. 27, No. 2, Pp. 137-141.

Li, Z.Y. and Ward, O.P. (1994). Production of docosahexaenoic acid by *Thraustochytrium roseum*. J. Industrial Microbiology., 13: 238-241.

Liang Y, Sarkany N, Cui Y, Yesuf J, Trushenki J, Blackburn JW. (2010). Use of sweet sorghum juice for lipid production by Schizochytrium limacinum SR21. Bioresour Technol;101:3623–7.

Leander, C. A., Porter, D., & Leander, B. S. (2004). Comparative morphology and molecular phylogeny of aplanochytrids (Labyrinthulomycota). *European Journal of Protistology, 40*, 317-328

Lewis, T.E.; Nichol, P.D. and McMeekin, T.A. (1999). The biotechnological potential of thraustochytrids. Mar Biotechnol 1:580-587.

Moss, S. T. (1986). The biology of the Thraustochytriales and Labyrinthuloides. In S. T. Moss (ed.), *The Biology of Marine Fungi.* np.

Naganuma, T., Takasugi, H., & Kimura, H. (1998). Abundance of thraustchytrids in coastal plankton. *Marine Ecology Progress Series, 162*, 105-110.

Nakahara, T., Yokochi, T., Higashihara, T., Tanaka, S., Yaguchi, T., & Honda, D. (1996). Production of decosahezaenoic and decosapentaenoic acids by *Schizochytrium* sp. isolated from Yap Islands. *Journal of the American oil Chemists Society, 73(11),* 1421-1426.

รายการอ้างอิง (ต่อ)

Prabu,R.; Raksha,S., and Karuppuchamy,S. (2012). Effect of sodium sulphate salinity for production of docosahexaenoic acid (DHA) by *Thraustochytrids aureum* RAK-21. Asian Biomedicine. 6(5); 693-701.

Pedersen,H., Beyer, M. and Nielsen, J. 2000. Glucoamylase production in batch chemostat and fed- batch cultivation by and industrial strain of *Aspergillusniger*, Applied Microbiology and Biotechnology, Vol.53, No. 3, pp. 272-277.

Perveen, Z.; Ando, H.; Ueno, A.; Ito, Y.; Yamamoto, Y.; Yamada, Y.; Takagi, T.; Kaneko, T.; Kogame, K. and Okuyama, H. (2006). Isolation and characterization of a novel thraustochytrid-like microorganism that efficiently produces docosahexaenoic acid. Biotechnology Letters. 28: 197-202.

Poontawe, R; Aki, T. and Yongmanitchai, W. 2007. Optimization of DHA and astaxanthin production by *Schizochytrium* sp. Isolated from mangrove forests in Thailand. Summary Book JSPS-NRCTCoreUniversity Program (1998-2008) on Development of Thermotolerant Microbial Resources and Their Applications. Kasetsart University, Bangkok.

Porter, D. (1989). *Handbook of protoctista*: Phylum Labyrinthulomycota net slime mold. n.p.

Quilodran B, Hinzpeter I, Quiroz A, Shene C. (2009). Evaluation of liquid residues from beer and potato processing for the production of docosahexaenoic acid (C22:6n-3, DHA) by native thraustochytrid strains. World J Microbiol Biotechnol. 25:2121–8.

Quilodran B, Hinzpeter I, Hormazabal E, Quiroz A, Shene C. Docosahexaenoic acid (C22: 6n-3, DHA) and astaxanthin production by Thraustochytriidae sp. AS4-A1 a native strain with high similitude to Ulkenia sp.: evaluation of liquid residues from food industry as nutrient sources. Enzyme Microb Technol 2010;47:24–30.

Raghukumar, S. (1992). Bacterivory: a novel dual role for thraustochytrid in the sea. *Marine Biology, 113*, 165-169.

Sargent , J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D., & Estevez, A. (1999). Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture, 177*, 191-199.

Shimizu, S.; Kawashima, H.; Shinmen, Y.; Akitomo, K.; and Yamada, H.; (1988). Production of eicosapentaenoic acid by *Mortierella*fungi. JAOCS, 65: 1455-1459.

Singh, A and Ward. O.P. (1997). Microbial production of docosahexaenoic acid (DHA, C22:6). In: Advances in applied microbiology.Neidleman, S.L. and Laskin, A.I. (edi.).Academic Press. New York. pp.: 271-311.

รายการอ้างอิง (ต่อ)

Unagul, P. and Verduyn, C. (2004). Production of docosahexaenoic acid (DHA) by the marine protest *Schizochytriummangrovei* Sk-02: effect of medium and culture conditions. Paper presented at 9th International Marine and Freshwater Mycology Symposium. 14-19 November, 2004. Chiang Mai, Thailand.

Verduyn, C.; Unagul, P.; Phadungruengkij, S.; Pongsuteeragul, T. and Suphantharika, M. (2004). Production of docosahexaenoic acid (C22:6 n-3) by *Schizochytriummangrovei* Sk-02: high density cultivation and metabolic aspects. Paper presented at the9th International Marine and Freshwater Mycology Symposium. 14-19 November,2004. Chiang Mai, Thailand.

Ward, O.P. and Singh.A. (2005). Omega-3/6 fatty acids: alternative sources of production. Process Biochem. 40: 3627-3652.

Wong, M.K.M., Tsui, C.K.M., Au, D.W.T., & Vrijmoed, L.L.P. (2008) Docosahexaenoic acid production and ultrastructure of the thraustochytrid *Aurantiochytrium mangrovei* MP2 under high glucose concentrations. *Mycoscience*, 49, 266–270.

Yaguchi, T.; Tanaka, T.; Nakahara, T. and Higashihara, T. (1997). Production of high yields of docosahexaenoic acid by *Schizochytrium*sp. Strain SR21. J. Am. Oil. Chem Soc. 74: 1431-1434.

Yokochi, T., Honda, D., Higashihara, T., & Nakahara, T. (1998). Optimization of docosahexaenioc acids production by *Schizochytrium limacinum* SR21. *Applied Microbiology and Biotechnology, 49*, 72-76.

Yongmanitchai, W. and Ward , O.P. (1989). Omega-3 fatty acids : Alternative sources of production. Process Biochemistry. pp. 117-125.

Zhu L, Zhang X, Ren X, Zhu Q. Effects of culture conditions on growth and docosahexaenoic acid production from Schizochytrium limacinum. J Ocean Univ China (English Edition) 2008;7:83–8.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและยาปฏิชีวนะ

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงหัวเชื้อ

1. อาหารแข็ง GYP (Glucose, Yeast Extract, Peptone) มีสูตรดังนี้

กลูโคส	1	กรัม
ยีสต์สกัด	1	กรัม
เปปโตน	1	กรัม
วุ้น	10	กรัม
น้ำทะเลความเค็ม 15 ส่วนในพันส่วน	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดคนให้เข้ากันในน้ำทะเลความเค็ม 15 ส่วนในพันส่วน ต้มให้ละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เติมยาปฏิชีวนะอัตราส่วน 1 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 ลิตร เพื่อให้ความเข้มข้นสุดท้ายของคานามัยซินเท่ากับ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. อาหารเหลว GY (Glucose, Yeast Extract) มีสูตรดังนี้

กลูโคส	60	กรัม
ยีสต์สกัด	10	กรัม
น้ำทะเลความเค็ม 15 ส่วนในพันส่วน	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำทะเลความเค็ม 15 ส่วนในพันส่วน ปรับความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 6.5 ด้วย 1N HCl หรือ 1M NaOH นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารทดลอง

สูตรที่ 1 กลูโคสและยีสต์สกัด มีสูตรดังนี้

กลูโคส	60	กรัม
ยีสต์สกัด	10	กรัม
น้ำทะเลความเค็ม 15 ส่วนในพันส่วน	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำทะเลความเค็ม 15 ส่วนในพันส่วน ปรับความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 6.5 ด้วย 1N HCl หรือ 1M NaOH นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สูตรที่ 2 กลูโคสเหลวที่สกัดจากแป้งมันสำปะหลังและยีสต์สกัด มีสูตรดังนี้

กลูโคสที่สกัดจากแป้งมันสำปะหลัง	150	มิลลิลิตร
ยีสต์สกัด	10	กรัม
น้ำทะเลความเค็ม 15 ส่วนในพันส่วน	1000	มิลลิลิตร

ละลายยีสต์สกัดในน้ำทะเลความเค็ม 15 ส่วนในพันส่วน ปรับความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 6.5 ด้วย 1N HCl หรือ 1M NaOH นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และนำกลูโคสที่สกัดจากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ผสมกับสารละลายยีสต์สกัด

การเตรียมยาปฏิชีวนะ

การเตรียมยาปฏิชีวนะ มีส่วนผสม ดังนี้

คานามัยซิน (Kanamycin)	3	กรัม
สเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต (Streptomycin Sulphate)	3	กรัม
น้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดคนให้เข้ากัน กรอง (Filter Sterile) ด้วยกระดาษกรองขนาดตา 0.23 ไมโครเมตร ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดเท่ากับ 300 กรัมต่อลิตร จากนั้นใส่ลงในขวดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ข

การเตรียม 3, 5 – dinitrosalicylic acid (DNS) และการเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส

1. การเตรียม 3, 5 – dinitrosalicylic acid (DNS)

เตรียมโดยชั่งดีเอ็นเอส 10 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายด่างทีละน้อย (NaOH 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) คนให้ละลายเข้ากัน นำไปอุ่นในอ่างน้ำร้อนจนกระทั่งได้สารละลายใส จากนั้นเติม Potassium Sodium Tartrate (Rochelle Salt) ลงไปทีละน้อยจนครบ 300 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

2. การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส

เตรียมโดยชั่งกลูโคส 0.100 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 – 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนี้

หลอดที่	สารละลายกลูโคส เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	สารละลายมาตรฐานกลูโคส มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
1	0.0	1.0	0
2	0.2	0.8	0.2
1	0.4	0.6	0.2
4	0.6	0.4	0.2
5	0.8	0.4	0.2
6	1.0	0.0	1.0

ทำการดูดสารละลายมาตรฐานกลูโคส (ความเข้มข้น 0 - 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ตามตารางข้างต้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายดีเอ็นเอสปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร นำหลอดทดลองไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่เย็นอีก 5 นาที เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร จากนั้นเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสง

ภาคผนวก ค

การเตรียม Internal Standard และการคำนวณปริมาณกรดไขมัน

การเตรียม Internal Standard

Internal Standard (ความเข้มข้น 0.005 กรัมต่อมิลลิลิตร)

1. Standard fatty acid 19:0 (Nonadecanoic acid) ปริมาณ 0.025 กรัม ใส่ใน Volumetric flask ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

2. เติม Hexane ให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

3. ปิดฝาให้สนิท เขย่าเบา ๆ จน Standard fatty acid 19:0 (Nonadecanoic acid) ละลายเข้ากัน

การคำนวณปริมาณกรดไขมัน

การคำนวณหาปริมาณกรดไขมัน สามารถคำนวณโดยใช้โครมาโตแกรมที่วิเคราะห์จากเครื่อง Gas Chromatography โดยคำนวณพื้นที่ใต้พีค (Peak Area) ของกรดไขมันที่ต้องการทราบ นำมาเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้พีคของกรดไขมันมาตรฐาน

ภาคผนวก ง

ผลการทดลองกรดไขมัน

ตารางภาคผนวกที่ 1 ปริมาณกรดไขมันที่ได้จากการเลี้ยง *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ด้วยอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 6%, 12% และ 18% ด้วยการเลี้ยงแบบเขย่าในขวดรูปชมพู่

	6 Gram 0 hr		12 Gram 0 hr		18 Gram 0 hr		6 Gram 24 hr		12 Gram 24 hr		18 Gram 24 hr	
Fatty acid	mg. dry wt.	% Of total FA	mg. dry wt.	% Of total FA	mg. dry wt.	% Of total FA	mg. dry wt.	% Of total FA	mg. dry wt.	% Of total FA	mg. dry wt.	% Of total FA
12:0	0.06±0.04	0.12±0.01	0.17±0.13	0.28±0.10	0.02±0.01	0.08±0.01	1.00±0.21	0.30±0.02	0.70±0.29	0.35±0.02	0.44±0.20	0.27±0.05
13:0	21.34±19.85	37.41±11.92	0.64±0.51	1.08±0.33	10.16±0.72	35.67±5.13	20.58±4.39	6.11±0.72	6.58±5.63	2.41±1.54	14.35±1.37	9.79±2.14
14:0	1.19±0.67	2.49±0.36	4.32±2.05	10.57±2.70	0.58±0.05	2.03±0.02	25.40±6.24	7.45±0.69	17.47±7.61	8.56±0.44	10.19±5.23	6.03±1.47
14:1	0.10±0.08	0.15±0.10	0.11±0.06	0.25±0.03	0.04±0.03	0.14±0.11	0.37±0.12	0.12±0.05	0.29±0.10	0.15±0.02	0.12±0.04	0.08±0.00
15:0	2.09±1.05	4.61±1.07	3.09±2.17	5.95±0.55	1.13±0.15	3.92±0.22	32.22±2.38	10.00±1.91	13.13±9.36	5.36±1.92	20.44±3.53	13.60±1.93
16:0	12.55±6.05	28.24±5.37	22.69±16.98	41.19±7.87	7.41±0.98	25.62±1.49	222.26±40.10	66.00±1.86	122.20±58.40	58.36±0.14	72.07±33.31	43.44±7.84
16:1	0.18±0.12	0.34±0.16	0.06±0.04	0.14±0.02	0.04±0.01	0.13±0.03	0.43±0.06^{a}	0.13±0.01	0.21±0.09^{b}	0.10±0.01	0.18±0.01^{b}	0.13±0.03
17:0	0.97±0.53	2.03±0.51	0.83±0.43	1.93±0.37	0.57±0.11	1.96±0.25	9.75±1.51^{a}	3.07±0.81	3.29±2.38^{b}	1.33±0.50	5.49±0.32^{ab}	3.79±0.96
17:1	0.03±0.04	0.09±0.09	0.06±0.04	0.10±0.03	0.02±0.01	0.06±0.02	0.33±0.13	0.11±0.05	0.16±0.05	0.08±0.02	0.13±0.03	0.08±0.01
18:0	1.06±0.72	2.02±0.29	0.56±0.19	1.55±0.63	0.50±0.09	1.74±0.18	5.05±0.42^{a}	1.53±0.10	2.48±1.30^{ab}	1.15±0.07	2.03±0.59^{b}	1.30±0.02
18:1 n-9	0.38±0.33	0.67±0.18	0.11±0.03	0.30±0.13	0.46±0.27	1.69±1.05	0.26±0.06	0.08±0.03	0.21±0.15	0.09±0.03	0.14±0.00	0.10±0.03
18:2 n-6	0.41±0.16	1.15±0.49	0.27±0.19	1.39±1.29	0.46±0.42	1.49±1.36	0.55±0.14^{a}	0.17±0.06	0.14±0.05^{b}	0.07±0.01	0.86±0.05^{a}	0.62±0.22
18:3 n-6	0.14±0.13	0.15±0.10	0.05±0.02	0.22±0.18	0.07±0.03	0.25±0.08	0.21±0.05	0.07±0.02	0.06±0.02	0.03±0.00	0.15±0.02	0.10±0.02
18:3 n-3	0.16±0.13	0.27±0.08	0.06±0.01	0.22±0.17	0.12±0.01	0.41±0.00	0.20±0.08	0.06±0.03	0.08±0.03	0.04±0.01	0.17±0.01	0.12±0.04
20:0	0.16±0.15	0.28±0.09	0.13±0.04	0.35±0.14	0.09±0.01	0.32±0.00	0.68±0.12	0.20±0.01	0.45±0.23	0.21±0.01	0.62±0.09	0.46±0.20
20:3 n-6	0.20±0.13	0.40±0.10	0.26±0.17	0.52±0.02	0.10±0.01	0.34±0.08	0.19±0.06^{b}	0.06±0.02	0.70±0.23^{a}	0.37±0.07	0.49±0.00^{ab}	0.34±0.10
20:4 n-6	0.11±0.12	0.17±0.09	0.03±0.03	0.03±0.03	0.01±0.00	0.03±0.00	0.05±0.06	0.02±0.02	0.08±0.04	0.04±0.00	0.07±0.00	0.05±0.02
20:3 n-3	0.11±0.09	0.16±0.14	0.09±0.00	0.33±0.22	0.10±0.03	0.34±0.09	0.00±0.00	0.00±0.00	0.31±0.26	0.12±0.07	0.39±0.19	0.23±0.05
22:0	0.09±0.04	0.25±0.09	0.16±0.10	0.34±0.01	0.05±0.01	0.18±0.03	0.21±0.03	0.06±0.00	0.55±0.24	0.27±0.01	0.32±0.02	0.22±0.06
20:5 n-3	0.13±0.10	0.21±0.06	0.32±0.29	0.45±0.30	0.11±0.06	0.38±0.18	0.12±0.01	0.04±0.01	0.23±0.09	0.12±0.01	0.36±0.14	0.29±0.18
22:5 n-3	0.75±0.42	2.26±0.98	1.88±1.43	3.36±0.73	0.64±0.09	2.20±0.14	1.09±0.22^{b}	0.33±0.05	5.45±1.44^{a}	2.94±0.71	3.43±0.54^{ab}	2.30±0.36
22:6 n-3	3.34±1.94	9.92±4.43	10.05±8.07	17.00±5.43	2.94±0.41	10.17±0.65	5.11±0.37^{b}	1.55±0.15	28.55±9.12^{a}	14.96±2.76	19.29±1.60^{ab}	13.21±3.04
others	3.78±2.96	6.53±1.55	3.08±0.68	12.44±9.48	3.56±0.71	12.24±1.55	8.85±3.60	2.55±0.85	5.82±2.46	2.87±0.19	6.13±1.51	3.98±0.26

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ)

	6 Gram 48 hr		12 Gram 48 hr		18 Gram 48 hr		6 Gram 72 hr		12 Gram 72 hr		18 Gram 72 hr	
Fatty acid	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA
12:0	1.10±0.25	0.30±0.05	1.53±0.00	0.37±0.02	1.05±0.01	0.43±0.02	0.88±0.32^{b}	0.27±0.00	2.14±0.27^{a}	0.47±0.02	1.04±0.14^{b}	0.52±0.06
13:0	17.43±5.23	5.45±2.41	11.22±0.10	2.72±0.14	11.20±0.94	4.55±0.14	14.16±2.16	5.85±2.73	11.51±0.94	2.59±0.63	12.37±1.26	6.22±0.68
14:0	23.86±6.81	6.23±0.33	36.40±1.18	8.80±0.24	23.49±1.09	9.56±0.06	20.81±8.45	6.28±0.48	43.86±6.17	9.52±0.24	20.93±1.19	10.52±0.52
14:1	0.75±0.33	0.19±0.05	0.95±0.14	0.23±0.02	0.53±0.01	0.22±0.01	0.74±0.39	0.21±0.05	0.98±0.33	0.21±0.04	0.42±0.05	0.21±0.03
15:0	21.72±3.41^{a}	6.15±1.29	13.74±0.72^{ab}	3.32±0.02	8.84±0.21^{b}	3.60±0.10	18.05±3.18^{a}	6.28±1.20	18.64±1.43^{a}	4.09±0.37	7.80±0.14^{b}	3.92±0.04
16:0	214.55±38.47	58.70±5.40	236.69±18.98	57.08±1.17	131.45±12.30	53.38±2.21	180.13±51.01^{ab}	58.77±4.35	256.55±32.00^{a}	55.81±2.34	105.71±0.91^{b}	53.13±0.86
16:1	0.48±0.16	0.12±0.02	0.46±0.03	0.11±0.01	0.39±0.00	0.16±0.01	0.29±0.19^{b}	0.09±0.04	0.86±0.14^{a}	0.19±0.00	0.35±0.05^{ab}	0.18±0.02
17:0	6.93±1.55^{a}	2.03±0.66	3.30±0.28^{ab}	0.80±0.02	2.33±0.14^{b}	0.95±0.01	6.01±0.48^{a}	2.22±0.65	4.48±0.18^{b}	0.99±0.13	2.08±0.00^{c}	1.04±0.01
17:1	0.55±0.18	0.18±0.09	0.40±0.02	0.10±0.01	0.31±0.02	0.13±0.00	0.44±0.18	0.20±0.11	0.47±0.16	0.10±0.02	0.22±0.02	0.11±0.01
18:0	5.20±0.74^{a}	1.49±0.34	4.40±0.63^{ab}	1.06±0.09	2.52±0.32^{b}	1.02±0.08	4.54±0.73^{a}	1.60±0.33	4.82±0.45^{a}	1.05±0.08	2.18±0.24^{b}	1.10±0.13
18:1 n-9	0.16±0.09	0.05±0.03	0.18±0.01	0.04±0.00	0.26±0.00	0.10±0.00	0.23±0.10	0.08±0.03	0.33±0.19	0.07±0.03	0.15±0.01	0.07±0.01
18:2 n-6	0.39±0.21	0.12±0.07	0.19±0.03	0.05±0.01	0.18±0.00	0.07±0.00	0.28±0.14	0.10±0.04	0.32±0.20	0.08±0.06	0.34±0.11	0.17±0.06
18:3 n-6	0.28±0.15	0.09±0.05	0.05±0.02	0.01±0.00	0.09±0.04	0.04±0.02	1.08±1.14	0.53±0.61	0.13±0.05	0.03±0.01	0.14±0.04	0.07±0.02
18:3 n-3	0.23±0.12	0.07±0.04	0.10±0.01	0.02±0.00	0.12±0.00	0.05±0.00	0.22±0.04^{a}	0.09±0.05	0.20±0.04^{ab}	0.04±0.00	0.08±0.01^{b}	0.04±0.00
20:0	0.67±0.26	0.20±0.08	0.77±0.12	0.19±0.02	0.60±0.21	0.24±0.07	0.76±0.18	0.26±0.03	1.17±0.31	0.25±0.03	0.57±0.18	0.29±0.09
20:3 n-6	1.64±1.15	0.36±0.23	1.83±0.09	0.45±0.05	1.35±0.06	0.55±0.00	1.57±1.19	0.37±0.25	2.44±0.89	0.51±0.11	0.56±0.48	0.28±0.24
20:4 n-6	0.08±0.12	0.02±0.02	0.19±0.00	0.05±0.00	0.16±0.02	0.06±0.01	0.17±0.14	0.04±0.03	0.31±0.12	0.06±0.01	0.48±0.36	0.24±0.18
20:3 n-3	0.15±0.10	0. 04±0.02	0.22±0.05	0.05±0.01	0.28±0.08	0.11±0.03	0.16±0.12	0.04±0.02	1.10±0.88	0.21±0.16	0.11±0.02	0.05±0.01
22:0	1.23±0.47	0.31±0.08	1.96±0.77	0.46±0.16	1.18±0.15	0.49±0.09	0.96±0.59	0.25±0.10	1.03±0.23	0.22±0.01	0.57±0.07	0.29±0.03
20:5 n-3	0.88±0.54	0.21±0.10	0.59±0.05	0.14±0.02	0.58±0.01	0.23±0.01	0.93±0.67	0.22±0.13	0.65±0.06	0.15±0.04	0.41±0.10	0.21±0.05
22:5 n-3	10.80±7.86	2.36±1.52	14.92±0.78	3.60±0.03	9.37±1.30	3.80±0.33	8.84±6.25	2.14±1.22	14.24±5.76	2.95±0.76	5.37±0.23	2.70±0.09
22:6 n-3	57.36±43.24	12.36±8.59	76.05±1.26	18.41±0.80	41.91±6.06	17.23±3.37	50.94±38.07	11.93±7.83	81.86±30.25	17.07±3.70	31.47±2.16	15.80±0.97
others	10.42±1.59	3.00±0.81	8.00±0.02	1.94±0.12	18.30±12.68	7.20±4.78	6.54±1.72^{b}	2.18±0.28	14.76±1.90^{a}	3.35±0.97	6.05±0.10^{b}	3.04±0.07

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ)

	6 Gram 96 hr		18 Gram 96 hr	
Fatty acid	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA
12:0	1.61±0.59	0.37±0.07	1.78±0.02	0.48±0.02
13:0	17.73±1.36	4.86±1.91	14.31±6.03	3.78±1.49
14:0	35.07±12.34	8.00±1.22	37.75±2.19	10.10±0.25
14:1	1.36±0.66	0.29±0.10	0.54±0.33	0.15±0.09
15:0	20.75±1.61	5.49±1.68	13.69±0.01	3.67±0.13
12:0	247.03±50.98	60.05±3.49	212.79±32.58	56.72±6.81
16:1	0.79±0.29	0.18±0.03	0.89±0.37	0.24±0.11
15:0	6.27±1.06	1.76±0.82	3.69±0.15	0.99±0.07
17:1	0.50±0.15	0.15±0.09	0.35±0.13	0.10±0.04
18:0	5.73±0.41	1.49±0.36	4.55±0.52	1.21±0.10
18:1 n-9	0.07±0.09	0.03±0.04	0.26±0.06	0.07±0.02
18:2 n-6	0.54±0.11	0.13±0.01	0.49±0.18	0.13±0.05
18:3 n-6	0.35±0.13	0.11±0.07	0.17±0.04	0.05±0.01
18:3 n-3	0.21±0.05	0.06±0.03	0.15±0.10	0.04±0.03
20:0	0.63±0.41	0.18±0.11	0.78±0.11	0.21±0.04
20:3 n-6	1.68±0.97	0.34±0.18	1.76±0.92	0.48±0.26
20:4 n-6	0.19±0.09	0.04±0.01	0.23±0.12	0.06±0.04
20:3 n-3	0.25±0.13	0.05±0.02	0.32±0.15	0.09±0.04
22:0	1.17±0.55	0.25±0.09	1.10±0.51	0.30±0.15
20:5 n-3	1.25±0.23	0.31±0.06	1.10±0.71	0.30±0.20
22:5 n-3	9.76±5.53	1.98±1.04	9.66±3.44	2.62±1.01
22:6 n-3	54.43±31.66	10.98±6.05	55.40±25.18	15.07±7.25
others	11.98±4.40	2.88±0.68	12.72±3.29	3.38±0.77

ตารางภาคผนวกที่ 2 ปริมาณกรดไขมันที่ได้จากการเลี้ยง *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ด้วยอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 12% ที่ pH ต่าง ๆ ด้วยการเลี้ยงแบบเขย่าในขวดรูปชมพู่

	pH 6.0		pH 6.5		pH 7.0		pH 7.[illegible]		pH 6.0	
Fatty acid	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA
12:0	0.01±0.00	0.10±0.01	0.02±0.01	0.13±0.02	0.02±0.00	0.15±0.06	0.01±0.00	0.11±0.00	0.02±0.00	0.13±0.01
13:0	1.80±0.17	15.32±1.17	1.48±0.02	10.25±4.97	2.44±0.92	16.77±1.71	1.94±0.34	18.12±1.55	1.75±0.26	15.91±0.61
14:0	0.26±0.01	2.24±0.33	0.61±0.25	3.41±0.36	0.30±0.01	2.33±0.60	0.31±0.05	2.99±0.71	0.36±0.06	3.26±0.22
14:1	0.02±0.02	0.18±0.13	0.02±0.01	0.11±0.01	0.12±0.12	0.66±0.64	0.08±0.07	0.67±0.62	0.01±0.01	0.04±0.04
15:0	0.61±0.03	5.21±0.64	1.13±0.59	5.85±0.23	0.64±0.08	4.80±0.82	0.55±0.07	5.13±0.17	0.57±0.03	5.21±0.27
16:0	3.35±0.08	29.03±5.64	7.39±3.91	37.98±1.90	3.57±0.25	27.04±6.01	2.99±0.38	28.12±1.01	3.21±0.23	29.38±1.17
16:1	0.02±0.02	0.23±0.16	0.03±0.02	0.13±0.07	0.01±0.00	0.04±0.01	0.01±0.00	0.09±0.02	0.00±0.00	0.03±0.03
17:0	0.30±0.03	2.61±0.70	0.66±0.35	3.38±0.18	0.47±0.09	3.46±0.33	0.33±0.02	3.12±0.13	0.36±0.00	3.32±0.40
17:1	0.04±0.03	0.28±0.22	0.02±0.01	0.04±0.01	0.13±0.13	0.74±0.69	0.01±0.01	0.07±0.07	0.01±0.00	0.11±0.01
18:0	0.54±0.25	4.27±1.35	0.60±0.34	3.00±0.31	0.45±0.07	3.31±0.43	0.33±0.08	3.16±1.02	0.37±0.01	3.40±0.27
18:1 n-9	0.12±0.07	0.93±0.39	0.07±0.00	0.46±0.23	0.17±0.07	1.13±0.14	0.10±0.00	0.90±0.10	0.09±0.01	0.79±0.02
18:2 n-6	0.28±0.05	2.37±0.02	0.66±0.40	3.22±0.52	0.28±0.04	2.05±0.32	0.22±0.01	2.12±0.26	0.26±0.04	2.33±0.10
18:2 n-6	0.13±0.11	0.97±0.73	0.02±0.00	0.11±0.05	0.12±0.09	0.72±0.45	0.10±0.00	0.96±0.10	0.00±0.0[illegible]	0.66±0.22
18:3 n-3	0.15±0.09	1.20±0.58	0.11±0.01	0.70±0.27	0.22±0.18	1.30±0.90	0.01±0.00	0.28±0.03	0.10±0.06	1.00±0.69
20:0	0.12±0.03	1.01±0.10	0.20±0.16	0.84±0.42	0.11±0.01	0.80±0.16	0.12±0.05	1.15±0.55	0.12±0.06	1.04±0.44
20:3 n-6	0.03±0.01	0.25±0.01	0.09±0.03	0.50±0.08	0.15±0.12	0.88±0.59	0.08±0.02	0.74±0.23	0.00±0.00	0.51±0.02
20:4 n-6	0.06±0.04	0.44±0.26	0.02±0.01	0.23±0.17	0.05±0.03	0.29±0.11	0.06±0.03	0.63±0.34	0.13±0.04	1.20±0.22
20:3 n-3	0.02±0.02	0.21±0.03	0.15±0.12	0.64±0.33	0.11±0.08	0.66±0.38	0.03±0.02	0.19±0.19	0.02±0.00	0.19±0.02
22:0	0.17±0.17	1.20±1.20	0.06±0.02	0.36±0.09	0.01±0.01	0.12±0.12	0.06±0.03	0.43±0.16	0.05±0.02	0.43±0.13
20:5 n-3	0.03±0.02	0.24±0.11	0.02±0.00	0.12±0.06	0.02±0.00	0.19±0.04	0.01±0.00	0.12±0.00	0.05±0.03	0.41±0.25
22:5 n-3	0.36±0.00	3.14±0.51	0.80±0.45	4.02±0.40	2.23±1.89	13.05±9.67	0.31±0.03	2.93±0.01	0.37±0.02	3.36±0.21
22:6 n-3	1.30±0.14	11.44±3.10	3.38±1.87	17.14±1.39	1.19±0.20	9.63±4.16	1.13±0.12	10.59±0.12	1.44±0.05	13.24±1.03
others	2.19±1.16	17.17±6.79	1.44±0.78	7.32±0.53	1.30±0.09	9.84±2.20	1.85±0.21	17.38±0.43	1.56±0.37	14.03±1.77

ตารางภาคผนวกที่ 2 (ต่อ)

	pH 6.0		pH 6.5		pH 7.0		pH 7.5		pH 6.0	
Fatty acid	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA
12:0	0.85±0.12	0.26±0.01	0.43±0.22	0.22±0.01	0.52±0.16	0.23±0.01	0.52±0.04	0.22±0.01	0.63±0.11	0.25±0.00
13:0	2.02±0.39	0.61±0.06	2.06±0.07	1.38±0.63	2.32±0.46	1.05±0.16	2.08±0.22	0.86±0.05	2.30±0.35	0.91±0.01
14:0	20.54±2.61	6.21±0.17	9.92±4.43	5.28±0.25	13.19±4.39	5.70±0.02	14.03±0.65	5.79±0.00	15.53±2.13	6.17±0.17
14:1	1.48±0.89	0.42±0.23	0.33±0.15	0.17±0.00	0.240.24±	0.08±0.08	0.35±0.03	0.14±0.01	0.58±0.19	0.22±0.04
13:0	25.26±4.12	7.61±0.49	14.35±6.55	7.59±0.26	18.55±5.85	8.07±0.19	18.08±1.77	7.44±0.39	19.96±3.33	7.89±0.02
16:0	170.15±20.80	51.47±1.15	96.70±50.66	48.98±2.64	113.82±40.63	48.74±1.15	123.38±5.50	50.89±0.07	127.99±25.37	50.34±1.75
16:1	0.52±0.01	0.16±0.01	0.25±0.09	0.14±0.02	0.21±0.15	0.08±0.04	0.28±0.02	0.12±0.00	0.24±0.17	0.09±0.05
13:0	7.12±1.14	2.15±0.13	4.28±1.75	2.33±0.21	5.50±1.84	2.37±0.00	5.15±0.37	2.12±0.06	5.55±0.73	2.21±0.07
17:1	0.42±0.03	0.13±0.00	0.23±0.11	0.12±0.00	0.28±0.08	0.12±0.01	0.27±0.01	0.11±0.00	0.18±0.06	0.08±0.04
18:0	3.44±0.59	1.04±0.08	2.06±0.84	1.12±0.11	2.80±1.06	1.19±0.06	2.64±0.13	1.09±0.10	2.82±0.33	1.12±0.06
18:1 n-9	0.43±0.04	0.13±0.00	0.30±0.09	0.17±0.00	0.40±0.09	0.18±0.02	0.28±0.06	0.11±0.02	0.26±0.16	0.12±0.08
18:2 n-6	0.21±0.00	0.07±0.01	0.17±0.02	0.11±0.04	0.19±0.02	0.09±0.02	0.24±0.11	0.10±0.05	0.31±0.13	0.12±0.03
18:3 n-6	0.12±0.01	0.04±0.00	0.17±0.02	0.08±0.05	0.15±0.03	0.08±0.03	0.09±0.01	0.04±0.00	0.16±0.04	0.07±0.03
18:3 n-3	0.21±0.00[a]	0.06±0.01	0.08±0.01[b]	0.05±0.02	0.21±0.03[a]	0.11±0.05	0.16±0.02[ab]	0.07±0.01	0.21±0.04[a]	0.04±0.00
20:0	0.66±0.06	0.20±0.00	0.41±0.14	0.23±0.04	0.58±0.16	0.26±0.02	0.53±0.02	0.22±0.02	0.78±0.17	0.33±0.12
20:3 n-6	2.14±0.13	0.65±0.03	1.27±0.53	0.69±0.06	1.57±0.47	0.69±0.03	1.37±0.14	0.57±0.03	1.52±0.00	0.62±0.10
20:4 n-6	0.22±0.01	0.07±0.01	0.14±0.06	0.07±0.00	0.18±0.03	0.08±0.02	0.15±0.01	0.04±0.00	0.17±0.01	0.07±0.03
20:3 n-3	0.22±0.01	0.07±0.01	0.24±0.05	0.18±0.11	0.47±0.24	0.19±0.04	0.27±0.13	0.11±0.06	0.34±0.01	0.14±0.03
22:0	0.98±0.05	0.30±0.04	0.70±0.33	0.37±0.01	0.90±0.33	0.39±0.01	0.85±0.05	0.35±0.00	0.87±0.18	0.34±0.01
20:5 n-3	0.41±0.41	0.14±0.14	0.52±0.21	0.28±0.03	0.64±0.12	0.29±0.05	0.57±0.07	0.23±0.02	0.67±0.01	0.27±0.04
22:5 n-3	9.25±3.77	2.72±0.87	8.12±4.05	4.18±0.08	9.48±3.21	4.09±0.01	10.27±0.33	4.24±0.06	9.94±1.67	3.93±0.01
22:6 n-3	72.97±0.29	22.34±2.15	45.54±21.75	23.76±0.18	54.32±18.71	23.37±0.21	56.69±3.35	23.37±0.31	55.18±6.73	21.98±0.95
others	10.23±1.47[a]	3.18±0.76	4.18±1.06[b]	2.49±0.65	5.17±0.25[b]	2.56±0.97	4.17±1.15[b]	1.74±0.56	6.60±0.58[ab]	2.65±0.21

ตารางภาคผนวกที่ 2 (ต่อ)

	pH 6.0		pH 6.5		pH 7.0		pH 6.5		pH 8.0	
Fatty acid	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA
12:0	0.83±0.10	0.32±0.02	0.77±0.21	0.33±0.02	0.33±0.10	0.36±0.01	0.84±0.12	0.34±0.00	0.64±0.15	0.29±0.02
13:0	2.64±0.19	1.02±0.02	2.98±0.42	1.45±0.64	3.59±0.41	4.46±1.70	4.19±1.50	1.65±0.37	1.78±0.58	0.76±0.03
14:0	19.18±1.96	7.39±0.41	17.68±5.94	7.33±0.11	6.51±2.38	7.03±0.68	19.51±3.42	7.88±0.24	15.81±4.97	6.83±0.17
14:1	0.56±0.13	0.21±0.04	0.57±0.18	0.24±0.00	0.23±0.10	0.24±0.05	0.63±0.10	0.25±0.00	0.52±0.25	0.21±0.05
15:0	9.04±0.52	3.49±0.04	8.31±2.80	3.44±0.06	2.65±0.84	2.90±0.12	8.12±1.27	3.29±0.04	7.08±2.23	3.06±0.08
16:0	133.02±8.20	51.38±0.77	123.25±41.74	51.03±0.94	40.87±13.43	44.64±2.45	122.93±16.36	49.95±0.61	124.34±37.89	53.85±0.80
14:1	0.30±0.04	0.12±0.01	0.30±0.12	0.12±0.01	0.13±0.03	0.14±0.00	0.29±0.06	0.12±0.01	0.28±0.08	0.12±0.00
17:0	2.38±0.16	0.92±0.02	2.07±0.74	0.85±0.04	0.66±0.22	0.72±0.05	1.86±0.21	0.76±0.03	2.11±0.60	0.92±0.01
17:1	0.37±0.05	0.14±0.01	0.35±0.10	0.15±0.01	0.10±0.10	0.09±0.09	0.41±0.08	0.16±0.01	0.31±0.10	0.13±0.00
16:0	2.13±0.00^{ab}	0.83±0.04	2.00±0.67^{ab}	0.83±0.01	0.67±0.22^{b}	0.73±0.04	1.85±0.19^{ab}	0.76±0.03	2.53±0.64^{a}	1.11±0.04
18:1 n-9	0.11±0.00^{ab}	0.04±0.00	0.10±0.01^{ab}	0.03±0.01	0.06±0.01^{b}	0.07±0.01	0.10±0.01^{ab}	0.04±0.00	0.14±0.02^{a}	0.06±0.01
18:2 n-6	0.12±0.01	0.05±0.00	0.11±0.05	0.04±0.01	0.08±0.02	0.09±0.00	0.11±0.02	0.04±0.00	0.15±0.03	0.07±0.01
18:3 n-6	0.11±0.00^{a}	0.05±0.00	0.10±0.02^{a}	0.04±0.01	0.05±0.01^{b}	0.05±0.00	0.12±0.02^{a}	0.05±0.00	0.13±0.00^{a}	0.06±0.02
18:3 n-3	0.11±0.01	0.04±0.00	0.10±0.03	0.04±0.00	0.06±0.01^{b}	0.04±0.00	0.10±0.02^{a}	0.04±0.00	0.23±0.13	0.09±0.03
20:0	1.14±0.69	0.45±0.29	0.36±0.18	0.14±0.03	0.18±0.04	0.20±0.01	0.44±0.06	0.18±0.00	0.65±0.22	0.28±0.01
20:3 n-6	1.64±0.07	0.63±0.00	1.53±0.61	0.62±0.06	0.62±0.21	0.68±0.04	1.51±0.22	0.61±0.00	1.22±0.41	0.52±0.02
20:4 n-6	0.18±0.02	0.07±0.01	0.17±0.07	0.05±0.00	0.08±0.02	0.05±0.00	0.16±0.02	0.04±0.00	0.21±0.10	0.06±0.02
20:3 n-3	0.15±0.01^{ab}	0.05±0.00	0.14±0.05^{ab}	0.04±0.00	0.05±0.01^{b}	0.05±0.0[illegible]	0.14±0.02^{ab}	0.05±0.00	0.27±0.11^{a}	0.11±0.02
22:0	0.96±0.13	0.37±0.03	0.91±0.35	0.37±0.03	0.32±0.10	0.35±0.01	0.96±0.21	0.38±0.03	0.99±0.36	0.42±0.03
20:5 n-3	0.64±0.05	0.25±0.01	0.61±0.19	0.26±0.00	0.26±0.07	0.28±0.00	0.63±0.11	0.25±0.01	0.55±0.18	0.24±0.01
22:5 n-3	12.46±0.12	4.82±0.18	11.52±3.29	4.86±0.20	4.80±1.20	5.37±0.16	12.29±1.68	4.99±0.04	11.42±2.86	5.03±0.22
22:6 n-3	67.50±0.59	26.14±0.99	62.57±19.64	26.14±0.24	24.98±7.13	27.64±0.20	65.94±9.61	26.75±0.02	52.34±12.73	23.11±1.19
others	3.14±0.44	1.21±0.11	3.60±0.79	1.56±0.17	2.96±0.75	3.81±1.89	3.42±0.46	1.39±0.01	6.22±2.31	2.63±0.24

ตารางภาคผนวกที่ 2 (ต่อ)

	pH 6.0		pH 6.[illegible]		pH 6.0		pH 7.5		pH 8.0	
Fatty acid	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA
12:0	0.56±0.01^{b}	0.26±0.01	0.86±0.10^{a}	0.28±0.05	0.62±0.14^{ab}	0.35±0.02	0.84±0.03^{ab}	0.30±0.01	0.72±0.00^{ab}	0.23±0.01
13:0	2.62±0.06	1.21±0.04	6.22±2.60	1.92±0.71	6.88±1.56	3.92±0.18	5.94±3.66	2.01±1.14	2.71±0.46	0.89±0.19
14:0	14.46±0.63	6.66±0.08	22.57±1.68	7.19±0.97	14.08±4.96	7.72±0.69	20.99±1.35	7.44±0.10	20.13±0.68	6.55±0.07
14:1	0.38±0.03	0.18±0.03	0.55±0.00	0.17±0.01	0.40±0.11	0.22±0.00	0.54±0.09	0.20±0.05	0.54±0.15	0.17±0.04
12:0	7.33±0.47^{b}	3.37±0.03	11.06±0.37^{a}	3.51±0.33	6.06±1.91	3.36±0.16	9.18±0.74^{ab}	3.25±0.01	9.29±0.31^{ab}	3.02±0.03
16:0	111.16±7.57^{ab}	51.12±0.65	166.98±4.26^{a}	52.87±1.87	86.75±26.24^{b}	48.28±1.64	150.79±19.52^{a}	53.17±2.75	160.72±5.00^{a}	52.28±0.69
16:1	0.26±0.02	0.12±0.02	0.40±0.05	0.17±0.01	0.24±0.09	0.13±0.02	0.43±0.02	0.15±0.02	0.31±0.04	0.10±0.01
17:0	2.27±0.06^{ab}	1.05±0.03	3.07±0.42^{a}	0.97±0.07	1.40±0.35^{b}	0.79±0.02	2.64±0.40^{a}	0.93±0.07	2.66±0.08^{a}	0.87±0.01
17:1	0.28±0.02^{b}	0.13±0.00	0.41±0.03^{a}	0.13±0.02	0.00±0.00^{c}	0.00±0.00	0.33±0.01^{ab}	0.12±0.01	0.04±0.04^{c}	0.01±0.01
16:0	2.49±0.00^{ab}	1.15±0.06	2.96±0.52^{a}	0.93±0.11	1.31±0.29^{b}	0.75±0.04	3.10±0.67^{a}	1.08±0.15	3.13±0.09^{a}	1.02±0.02
18:1 n-9	0.19±0.01	0.09±0.01	0.13±0.01	0.04±0.00	0.08±0.01	0.05±0.01	0.16±0.06	0.06±0.02	0.14±0.02	0.05±0.01
18:2 n-6	0.16±0.02^{ab}	0.07±0.01	0.15±0.00^{b}	0.05±0.00	0.11±0.04^{b}	0.06±0.00	0.23±0.02^{a}	0.08±0.00	0.12±0.00^{b}	0.04±0.00
18:3 n-6	0.13±0.05	0.06±0.02	0.13±0.01	0.04±0.0[illegible]	0.08±0.01	0.05±0.00	0.13±0.02	0.05±0.00	0.13±0.01	0.04±0.00
18:3 n-3	0.08±0.01	0.04±0.01	0.11±0.01	0.04±0.00	0.08±0.02	0.05±0.00	0.10±0.01	0.04±0.01	0.11±0.01	0.04±0.00
20:0	0.49±0.01	0.23±0.01	0.67±0.17	0.21±0.04	0.34±0.07	0.19±0.01	0.73±0.20	0.25±0.05	0.61±0.03	0.20±0.00
20:3 n-6	1.22±0.12^{ab}	0.57±0.09	1.85±0.11^{a}	0.58±0.00	0.46±0.31^{b}	0.33±0.26	1.84±0.33^{a}	0.67±0.17	1.55±0.10^{a}	0.10±0.01
20:4 n-6	0.15±0.00	0.07±0.00	0.23±0.02	0.07±0.00	0.82±0.72	0.38±0.30	0.21±0.03	0.06±0.02	0.21±0.01	0.07±0.00
20:3 n-3	0.28±0.08	0.13±0.05	0.19±0.05	0.06±0.02	0.12±0.05	0.05±0.01	0.23±0.03	0.08±0.00	0.14±0.00	0.04±0.00
22:0	0.88±0.01	0.39±0.02	1.10±0.14	0.35±0.02	0.58±0.18	0.32±0.01	1.70±0.71	0.59±0.21	1.23±0.07	0.40±0.01
20:5 n-3	0.77±0.01	0.35±0.01	0.97±0.00	0.31±0.02	0.66±0.20	0.37±0.01	0.80±0.19	0.29±0.09	0.82±0.03	0.27±0.00
22:5 n-3	10.88±0.94^{bc}	5.00±0.16	14.70±2.43^{ab}	4.62±0.49	8.23±1.71^{c}	4.71±0.32	12.20±0.01^{abc}	4.34±0.34	17.05±0.72^{a}	5.54±0.01
22:6 n-3	54.97±2.88^{ab}	25.30±0.08	76.60±10.10^{a}	24.10±1.72	44.91±10.64^{b}	25.48±0.93	65.18±5.47^{ab}	23.37±3.76	80.21±4.81^{a}	26.06±0.41
others	5.31±0.39	2.46±0.32	4.59±0.59	1.45±0.10	3.79±0.71	2.42±1.06	4.18±0.82	1.47±0.17	5.01±1.93	1.60±0.56

ตารางภาคผนวกที่ 2 (ต่อ)

	pH 6.0		pH 6.5		pH 7.0		pH 7.5		pH 8.0	
Fatty acid	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA
12:0	0.62±0.45^{bc}	0.25±0.02	0.89±0.01^{a}	0.37±0.00	0.82±0.04^{a}	0.21±0.06	0.58±0.02^{c}	0.30±0.04	0.69±0.01^{b}	0.21±0.00
13:0	2.06±1.67^{b}	0.81±0.04	8.63±1.76^{a}	3.63±0.75	2.87±0.47^{b}	0.72±0.11	3.37±1.35^{b}	1.86±0.96	2.54±0.29^{b}	0.79±0.06
14:0	16.61±12.48^{ab}	6.58±0.23	19.66±1.00^{a}	8.26±0.40	20.29±0.14^{a}	5.34±1.64	13.52±2.02^{b}	6.92±0.02	19.89±0.78^{a}	6.20±0.00
14:1	0.51±0.36^{a}	0.20±0.02	0.48±0.07^{a}	0.20±0.03	0.57±0.01^{a}	0.15±0.04	0.34±0.05^{b}	0.17±0.00	0.44±0.01^{ab}	0.14±0.00
15:0	8.20±6.21^{ab}	3.24±0.09	8.94±0.92^{a}	3.75±0.38	9.09±0.14^{a}	2.41±0.79	5.89±1.01^{b}	3.00±0.08	9.40±0.50^{a}	2.93±0.04
16:0	127.20±99.69^{ab}	50.16±0.57	122.29±16.53^{ab}	51.37±6.83	143.54±3.36^{ab}	38.13±12.75	95.66±19.56^{b}	48.51±2.89	167.48±5.94^{a}	52.24±0.18
16:1	0.37±0.32	0.15±0.02	0.31±0.01	0.13±0.01	0.34±0.02	0.09±0.02	0.21±0.02	0.11±0.01	0.24±0.10	0.07±0.03
17:0	1.64±2.10	0.60±0.47	1.95±0.26	0.82±0.11	2.29±0.08	0.61±0.21	1.51±0.28	0.77±0.03	2.93±0.04	0.91±0.02
17:1	0.17±0.24	0.06±0.06	0.43±0.02	0.18±0.01	0.19±0.19	0.03±0.03	0.28±0.01	0.15±0.02	0.36±0.00	0.11±0.00
18:0	2.83±2.29	1.11±0.06	1.75±0.25	0.74±0.11	8.97±6.34	1.84±0.93	1.74±0.32	0.88±0.03	3.51±0.03	1.10±0.05
18:1 n-9	0.19±0.15^{a}	0.07±0.00	0.11±0.00^{bc}	0.04±0.00	0.11±0.01^{bc}	0.03±0.01	0.08±0.00^{c}	0.04±0.00	0.16±0.03^{ab}	0.03±0.01
18:2 n-6	0.16±0.06	0.07±0.00	0.12±0.02	0.05±0.01	0.15±0.01	0.04±0.01	0.10±0.00	0.05±0.01	0.17±0.03	0.05±0.01
18:3 n-6	0.09±0.07	0.04±0.00	0.12±0.02	0.05±0.01	0.13±0.01	0.09±0.02	0.10±0.01	0.05±0.00	0.11±0.03	0.03±0.01
18:3 n-3	0.12±0.10^{ab}	0.05±0.00	0.14±0.02^{ab}	0.06±0.01	0.12±0.01^{ab}	0.03±0.01	0.08±0.01^{b}	0.04±0.00	0.15±0.00^{a}	0.05±0.00
20:0	0.76±0.76	0.29±0.10	0.30±0.05	0.13±0.02	0.40±0.10	0.10±0.01	0.32±0.11	0.16±0.03	0.89±0.09	0.28±0.04
20:3 n-6	1.74±1.23	0.70±0.07	1.35±0.25	0.57±0.10	1.74±0.05	0.46±0.16	1.10±0.08	0.57±0.04	0.96±0.73	0.29±0.22
20:4 n-6	0.24±0.18	0.10±0.01	0.19±0.03	0.06±0.01	0.26±0.02	0.07±0.03	0.18±0.02	0.04±0.00	0.94±0.64	0.30±0.21
20:3 n-3	0.15±0.10	0.06±0.06	0.09±0.09	0.06±0.01	0.10±0.01	0.09±0.02	0.10±0.01	0.05±0.00	0.23±0.07	0.07±0.02
22:0	1.07±0.83^{a}	0.42±0.00	0.71±0.13^{b}	0.30±0.05	1.06±0.04^{a}	0.28±0.08	0.66±0.11^{b}	0.34±0.01	1.35±0.00^{a}	0.42±0.02
20:5 n-3	1.22±0.91	0.48±0.02	1.09±0.26	0.46±0.11	1.39±0.13	0.38±0.15	0.90±0.07	0.47±0.03	1.29±0.02	0.40±0.02
22:5 n-3	12.55±9.94^{b}	4.94±0.12	9.36±1.69^{b}	3.94±0.72	14.20±0.61^{ab}	3.80±1.33	10.52±1.61^{b}	5.37±0.03	17.76±1.09^{a}	5.53±0.12
22:6 n-3	67.13±51.0823^{ab}	26.56±0.56	52.76±13.43^{b}	22.19±5.70	76.02±2.83^{ab}	20.28±7.03	54.25±6.90^{b}	27.83±0.55	83.84±5.84^{a}	26.12±0.81
others	7.69±0.21	3.07±0.38	6.31±0.67	2.65±0.29	135.87±131.80	24.93±23.52	3.99±2.19	2.25±1.45	5.34±1.72	1.69±0.60

ตารางภาคผนวกที่ 3 ปริมาณกรดไขมันที่ได้จากการเลี้ยง *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ด้วยอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 12%, 18% และ 24% (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ภายใต้สภาวะที่เหมาะในถังหมัก

	Glu 12 % 0 hr		Glu 24 % 0 hr		Glu 12 % 12 hr		Glu 18 % 12 hr		Glu 24 % 12 hr	
Fatty acid	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA
12:0	0.03±0.01	0.15±0.05	0.01±0.00	0.06±0.00	0.04±0.03	0.09±0.02	0.01±0.00	0.08±0.00	0.07±0.00	0.12±0.00
13:0	8.61±1.46	41.33±3.79	3.09±0.00	26.37±0.00	5.48±2.42	27.45±11.52	5.29±1.02	57.10±4.67	4.31±0.00	7.49±0.00
14:0	0.51±0.05	2.52±0.25	0.16±0.00	1.34±0.00	1.35±0.96	2.61±0.70	0.08±0.01	0.92±0.04	1.42±0.00	2.47±0.00
14:1	0.03±0.01	0.09±0.03	0.01±0.00	0.14±0.00	0.04±0.03	0.07±0.02	0.06±0.03	0.57±0.27	0.07±0.00	0.12±0.00
13:0	0.61±0.08	3.17±0.70	0.35±0.00	2.97±0.00	3.39±2.54	5.62±2.42	0.28±0.03	3.04±0.02	3.77±0.00	6.56±0.00
16:0	4.33±0.51	21.88±3.35	1.72±0.00	14.68±0.00	15.33±10.79	28.67±10.28	0.94±0.04	10.33±0.77	19.98±0.00	34.76±0.00
16:1	0.02±0.00	0.08±0.01	0.03±0.00	0.29±0.00	0.04±0.03	0.09±0.02	0.05±0.05	0.51±0.47	0.06±0.00	0.11±0.00
17:0	0.27±0.01	1.38±0.18	0.35±0.00	3.00±0.00	1.06±0.52	2.47±0.61	0.11±0.00	1.19±0.18	1.78±0.00	3.10±0.00
17:1	0.01±0.00	0.04±0.02	0.02±0.00	0.21±0.00	0.05±0.02	0.19±0.07	0.03±0.02	0.26±0.24	0.05±0.00	0.09±0.00
18:0	0.30±0.11	1.53±0.52	0.28±0.00	2.38±0.00	0.66±0.26	2.28±0.55	0.13±0.01	1.44±0.27	0.74±0.00	1.28±0.00
18:1 n-9	0.18±0.04	0.95±0.27	0.28±0.00	1.89±0.00	0.17±0.07	0.73±0.30	0.00±0.00	0.00±0.00	0.85±0.00	1.44±0.00
18:2 n-6	0.09±0.03	0.42±0.12	0.03±0.00	0.29±0.00	0.17±0.06	0.66±0.22	0.06±0.03	0.67±0.39	0.12±0.00	0.21±0.00
18:3 n-6	0.10±0.02	0.47±0.11	0.12±0.00	1.06±0.00	0.07±0.00	0.32±0.18	0.06±0.03	0.69±0.07	0.04±0.00	0.07±0.00
18:3 n-3	0.04±0.02	0.22±0.12	0.01±0.00	0.28±0.00	0.04±0.03	0.40±0.21	0.01±0.00	0.11±0.01	0.20±0.00	0.35±0.00
20:0	0.11±0.03	0.52±0.11	0.01±0.00	0.42±0.00	0.31±0.18	1.00±0.75	0.06±0.03	0.87±0.28	0.22±0.00	0.38±0.00
20:3 n-6	0.16±0.03	0.87±0.27	0.10±0.00	0.84±0.00	0.09±0.05	0.43±0.22	0.05±0.05	0.31±0.31	0.30±0.00	0.53±0.00
20:4 n-6	0.14±0.13	0.67±0.61	0.10±0.00	2.58±0.00	0.14±0.08	0.33±0.09	0.03±0.02	0.37±0.37	0.22±0.00	0.40±0.00
20:3 n-3	0.09±0.03	0.19±0.13	0.00±0.00	0.03±0.00	0.25±0.16	0.76±0.66	0.04±0.04	0.44±0.44	2.19±0.00	3.81±0.00
22:0	0.04±0.01	0.17±0.04	0.06±0.00	0.40±0.00	0.18±0.07	1.54±1.28	0.01±0.01	0.18±0.18	0.29±0.00	0.40±0.00
20:5 n-3	0.06±0.02	0.29±0.07	0.05±0.00	0.44±0.00	0.11±0.04	0.45±0.16	0.02±0.02	0.22±0.22	0.05±0.00	0.08±0.00
22:5 n-3	0.33±0.05	1.69±0.31	0.17±0.00	1.44±0.00	1.19±0.70	3.02±0.71	0.13±0.02	1.46±0.33	2.87±0.00	5.00±0.00
22:6 n-3	1.57±0.26	7.90±1.42	0.33±0.00	2.78±0.00	5.43±3.83	9.45±4.48	0.52±0.11	5.89±1.89	15.48±0.00	26.94±0.00
others	2.83±0.68	13.47±2.76	4.22±0.00	36.00±0.00	3.01±1.20	11.35±4.43	1.23±0.14	13.37±0.03	2.37±0.00	4.20±0.00

ตารางภาคผนวกที่ 3 (ต่อ)

	Glu 12 % 24 hr		Glu 18 % 24 hr		Glu 24 % 24 hr		Glu 12 % 36 hr		Glu 18 % 36 hr		Glu 24 % 36 hr	
Fatty acid	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA
12:0	0.49±0.02 ^{a}	0.14±0.00	0.02±0.00 ^{c}	0.10±0.01	0.19±0.00 ^{b}	0.15±0.00	0.37±0.10	0.16±0.01	0.18±0.11	0.17±0.02	0.16±0.00	0.14±0.00
13:0	8.10±2.38	2.39±0.68	3.39±0.45	17.46±1.29	4.28±0.00	3.32±0.00	9.87±1.30	4.87±1.21	5.41±0.73	6.73±2.84	5.18±0.00	4.69±0.00
14:0	15.06±0.74 ^{a}	4.49±0.13	0.51±0.05 ^{c}	2.61±0.10	5.33±0.00 ^{b}	4.14±0.00	11.09±3.19	4.63±0.24	4.79±2.91	4.36±0.51	3.88±0.00	3.52±0.00
14:1	0.24±0.04 ^{a}	0.07±0.01	0.00±0.00 ^{b}	0.02±0.00	0.07±0.00 ^{b}	0.06±0.00	0.28±0.11	0.17±0.02	0.13±0.07	0.12±0.01	0.13±0.00	0.12±0.00
15:0	24.00±8.79	7.26±2.70	2.60±0.20	13.44±0.26	15.67±0.00	12.17±0.00	8.39±0.85	3.91±0.55	5.52±3.20	5.13±0.39	3.85±0.00	3.49±0.00
16:0	179.18±10.60 ^{a}	53.37±2.19	5.30±0.36 ^{c}	27.42±0.23	55.47±0.00 ^{b}	43.08±0.00	122.97±31.52	52.14±1.85	50.89±30.14	46.86±4.43	36.46±0.00	33.02±0.00
16:1	0.21±0.01 ^{a}	0.06±0.00	0.02±0.00 ^{c}	0.09±0.03	0.15±0.00 ^{b}	0.12±0.00	0.14±0.03	0.06±0.00	0.09±0.05	0.06±0.00	0.05±0.00	0.04±0.00
17:0	5.47±1.82	1.65±0.56	0.59±0.03	3.07±0.03	4.40±0.00	3.42±0.00	2.05±0.22	0.94±0.10	1.43±0.62	1.48±0.18	0.99±0.00	0.89±0.00
17:1	0.39±0.03 ^{a}	0.11±0.01	0.10±0.08 ^{c}	0.54±0.43	0.14±0.00 ^{b}	0.12±0.00	0.26±0.06	0.11±0.01	0.16±0.09	0.14±0.01	0.05±0.00	0.04±0.00
18:0	3.93±0.09 ^{a}	1.17±0.02	0.23±0.03 ^{c}	1.20±0.08	1.56±0.00 ^{b}	1.21±0.00	2.68±0.46	1.19±0.07	1.20±0.53	1.24±0.14	0.69±0.00	0.63±0.00
18:1 n-9	0.23±0.05 ^{ab}	0.07±0.02	0.07±0.02 ^{c}	0.36±0.10	0.29±0.00 ^{a}	0.23±0.00	0.17±0.01	0.08±0.01	0.13±0.07	0.19±0.12	0.05±0.00	0.04±0.00
18:2 n-6	0.16±0.02	0.05±0.01	0.29±0.24	1.44±1.15	0.10±0.00	0.08±0.00	0.09±0.01	0.03±0.01	0.10±0.02	0.14±0.09	0.03±0.00	0.02±0.00
18:3 n-6	0.18±0.03	0.05±0.01	0.13±0.01	0.65±0.01	0.12±0.00	0.09±0.00	0.72±0.60	0.38±0.32	0.10±0.06	0.18±0.15	0.05±0.00	0.04±0.00
18:3 n-3	0.22±0.03 ^{a}	0.06±0.01	0.02±0.00 ^{c}	0.11±0.00	0.15±0.00 ^{b}	0.10±0.00	0.08±0.01	0.03±0.00	0.07±0.03	0.03±0.00	0.05±0.00	0.03±0.00
20:0	0.59±0.13 ^{a}	0.17±0.04	0.09±0.00 ^{b}	0.48±0.04	0.36±0.00 ^{ab}	0.28±0.00	0.59±0.11	0.26±0.01	0.31±0.07	0.36±0.12	0.17±0.00	0.16±0.00
20:3 n-6	0.17±0.04	0.05±0.01	0.40±0.33	1.96±1.57	0.42±0.00	0.33±0.00	0.45±0.25	0.17±0.02	0.34±0.10	0.39±0.11	0.23±0.00	0.20±0.00
20:4 n-6	0.36±0.13	0.11±0.04	0.15±0.00	0.76±0.04	0.08±0.00	0.06±0.00	0.32±0.11	0.16±0.06	0.16±0.09	0.31±0.25	0.03±0.00	0.03±0.00
20:3 n-3	0.23±0.07	0.07±0.02	0.14±0.12	0.74±0.65	0.13±0.00	0.10±0.00	0.30±0.13	0.13±0.08	0.37±0.18	0.37±0.02	1.51±0.00	1.37±0.00
22:0	1.30±0.33 ^{a}	0.39±0.09	0.05±0.01 ^{c}	0.27±0.04	0.42±0.00 ^{ab}	0.33±0.00	0.70±0.20	0.29±0.02	0.09±0.01	0.06±0.00	0.23±0.00	0.04±0.00
20:5 n-3	0.86±0.02 ^{a}	0.26±0.01	0.04±0.00 ^{c}	0.21±0.01	0.33±0.00 ^{b}	0.26±0.00	0.65±0.25	0.30±0.14	0.22±0.11	0.21±0.00	0.13±0.00	0.12±0.00
22:5 n-3	14.61±1.02 ^{a}	4.35±0.24	0.67±0.00 ^{c}	3.48±0.22	5.72±0.00 ^{b}	4.45±0.00	10.63±3.03	4.44±0.26	4.68±2.61	4.42±0.19	2.92±0.00	2.64±0.00
22:6 n-3	71.12±2.39 ^{a}	21.22±0.48	3.37±0.01 ^{c}	17.48±1.06	16.34±0.00 ^{b}	12.69±0.00	51.00±14.01	21.41±1.03	23.81±13.66	22.24±1.49	14.93±0.00	13.52±0.00
others	8.08±0.69 ^{ab}	2.41±0.18	1.16±0.37 ^{c}	6.12±2.25	17.05±0.00 ^{a}	13.25±0.00	8.21±2.85	4.14±1.91	3.30±0.48 .	4.75±2.97	38.60±0.00	34.96±0.00

ตารางภาคผนวกที่ 3 (ต่อ)

	Glu 12 % 48 hr		Glu 18 % 48 hr		Glu 24 % 48 hr		Glu 12 % 60 hr		Glu 18 % 60 hr		Glu 24 % 60 hr	
Fatty acid	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA
12:0	0.58±0.04^{a}	0.18±0.01	0.44±0.22^{ab}	0.19±0.00	0.14±0.05^{b}	0.12±0.06	0.54±0.07	0.16±0.01	0.57±0.18	0.18±0.00	0.21±0.12	0.19±0.01
13:0	11.26±2.08	3.44±0.44	5.41±0.62	3.02±1.25	6.06±0.21	4.87±0.51	10.10±2.71	3.27±0.93	6.23±0.10	2.17±0.64	3.48±0.56	4.97±3.19
14:0	17.25±1.25^{a}	5.33±0.10	11.93±6.03^{ab}	5.27±0.02	3.65±1.85^{b}	3.15±1.91	16.57±2.23	4.99±0.22	16.33±5.37	5.12±0.10	5.62±3.50	4.92±0.63
14:1	0.29±0.05	0.09±0.01	0.27±0.13	0.12±0.00	0.02±0.00	0.02±0.01	0.31±0.05	0.10±0.02	0.27±0.12	0.08±0.01	0.13±0.03	0.15±0.05
15:0	9.66±0.17	3.04±0.27	8.80±4.43	3.89±0.00	5.27±1.37	4.10±0.52	9.49±0.65	2.96±0.25	9.69±3.11	3.05±0.03	4.53±0.92	5.30±1.99
16:0	183.77±8.89^{a}	57.05±1.71	122.88±63.52^{ab}	53.88±0.97	35.87±19.27^{b}	31.11±19.58	190.27±28.10	56.88±2.00	175.84±57.89	55.09±1.06	56.23±34.30	49.63±5.37
16:1	0.20±0.01	0.06±0.00	0.20±0.10	0.09±0.00	0.07±0.03	0.06±0.03	0.17±0.05	0.06±0.02	1.34±0.94	0.57±0.47	0.12±0.06	0.11±0.00
17:0	2.36±0.02	0.74±0.06	2.12±1.05	0.94±0.01	1.19±0.18	0.94±0.01	1.87±0.56	0.62±0.19	2.50±0.89	0.78±0.04	1.13±0.27	1.29±0.45
17:1	0.38±0.02	0.12±0.00	0.36±0.18	0.16±0.00	0.10±0.04	0.09±0.04	0.31±0.12	0.10±0.03	0.51±0.16	0.16±0.00	0.17±0.07	0.17±0.02
18:0	3.66±0.22^{a}	1.13±0.04	2.52±1.27^{ab}	1.12±0.00	0.84±0.31^{b}	0.71±0.34	3.82±0.50	1.15±0.03	3.49±1.06	1.10±0.01	1.10±0.63	1.00±0.05
18:1 n-9	0.13±0.01	0.04±0.01	0.06±0.06	0.02±0.02	0.16±0.06	0.12±0.03	0.13±0.01	0.04±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.11±0.02	0.16±0.11
18:2 n-6	0.13±0.01	0.04±0.00	0.13±0.06	0.06±0.00	0.09±0.02	0.07±0.00	0.10±0.01	0.03±0.00	0.19±0.03	0.06±0.01	0.08±0.01	0.10±0.05
18:3 n-6	0.13±0.01	0.03±0.01	0.06±0.01	0.03±0.01	0.11±0.05	0.09±0.03	0.14±0.03	0.04±0.01	0.12±0.02	0.04±0.02	0.08±0.01	0.11±0.07
18:3 n-3	0.11±0.01	0.03±0.00	0.13±0.07	0.06±0.00	0.21±0.16	0.15±0.10	0.13±0.03	0.03±0.01	0.22±0.07	0.07±0.00	0.07±0.02	0.08±0.03
20:0	0.74±0.05^{a}	0.23±0.00	0.54±0.26^{ab}	0.24±0.00	0.20±0.07^{b}	0.17±0.08	0.76±0.10	0.23±0.00	0.76±0.22	0.24±0.01	0.27±0.11	0.27±0.04
20:3 n-6	0.67±0.22	0.20±0.06	0.62±0.31	0.27±0.00	0.25±0.13	0.22±0.14	0.26±0.14	0.10±0.07	0.59±0.40	0.16±0.08	0.32±0.15	0.31±0.03
20:4 n-6	0.28±0.12	0.09±0.04	0.13±0.06	0.06±0.00	1.39±1.32	0.97±0.91	0.19±0.05	0.04±0.01	0.40±0.15	0.16±0.10	0.11±0.02	0.16±0.10
20:3 n-3	0.11±0.08	0.03±0.02	0.77±0.45	0.32±0.04	0.03±0.03	0.03±0.03	0.20±0.01	0.08±0.01	0.14±0.09	0.04±0.02	0.04±0.04	0.03±0.03
22:0	0.72±0.24	0.22±0.07	0.07±0.05	0.03±0.01	0.19±0.19	0.17±0.17	0.97±0.13	0.30±0.01	1.12±0.34	0.36±0.00	0.47±0.47	0.28±0.28
20:5 n-3	0.34±0.11	0.10±0.03	0.40±0.21	0.17±0.01	0.11±0.11	0.11±0.11	0.44±0.10	0.14±0.03	0.43±0.35	0.11±0.08	0.20±0.17	0.14±0.09
22:5 n-3	14.77±1.87	4.50±0.25	11.13±5.70	4.89±0.06	2.68±2.68	2.47±2.47	15.18±2.23	4.58±0.24	16.39±4.83	5.20±0.10	5.12±3.12	4.52±0.48
22:6 n-3	68.76±9.25	20.93±1.35	54.10±27.84	23.76±0.35	13.03±13.04	11.98±11.99	69.43±9.04	21.16±1.28	74.43±22.01	23.59±0.43	24.32±14.16	21.95±1.43
others	8.03±2.29	2.37±0.49	2.95±1.16	1.40±0.19	54.67±52.04	38.28±35.86	9.25±0.80	2.93±0.41	5.71±2.89	1.68±0.39	3.17±0.01	4.17±2.25

ตารางภาคผนวกที่ 3 (ต่อ)

	Glu 12 % 72 hr		Glu 18 % 72 hr		Glu 24 % 72 hr		Glu 12 % 84 hr		Glu 18 % 84 hr		Glu 24 % 84 hr	
Fatty acid	mg. dry wt.	% Of total FA	mg. dry wt.	% Of total FA	mg. dry wt.	% Of total FA	mg. dry wt.	% Of total FA	mg. dry wt.	% Of total FA	mg. dry wt.	% Of total FA
12:0	0.67±0.04 ^{ab}	0.18±0.01	0.81±0.10 ^{a}	0.17±0.01	0.30±0.23 ^{b}	0.19±0.02	0.63±0.00	0.17±0.00	0.47±0.04	0.17±0.01	0.37±0.35	0.16±0.02
13:0	10.65±1.83	2.79±0.49	6.89±0.81	1.49±0.08	5.56±2.99	4.64±1.36	14.41±1.94	3.94±0.46	6.18±1.37	2.23±0.37	5.12±1.90	9.84±8.02
14:0	20.41±0.92 ^{a}	5.36±0.23	23.62±2.40 ^{a}	5.10±0.20	8.55±6.63 ^{b}	5.16±0.68	18.54±0.17	5.09±0.05	13.92±1.44	5.06±0.23	11.14±10.47	4.67±0.95
14:1	0.29±0.05	0.08±0.01	0.33±0.01	0.07±0.01	0.13±0.11	0.08±0.02	0.29±0.05	0.08±0.01	0.20±0.02	0.07±0.00	0.28±0.27	0.10±0.04
12:0	10.55±0.45 ^{ab}	2.77±0.04	13.11±1.18 ^{a}	2.83±0.08	5.35±3.22 ^{b}	4.14±0.85	9.26±0.04	2.54±0.04	7.60±0.76	2.76±0.12	6.48±5.80	3.47±0.28
16:0	228.19±9.70 ^{a}	59.79±0.64	264.32±21.34 ^{a}	57.12±0.98	88.83±68.54 ^{b}	53.92±6.56	200.00±2.02	54.89±0.52	161.89±17.37	58.88±2.87	121.21±113.63	51.62±9.45
16:1	0.26±0.02 ^{b}	0.07±0.00	0.41±0.04 ^{a}	0.09±0.00	0.16±0.07 ^{b}	0.14±0.05	0.21±0.12	0.06±0.03	0.26±0.02	0.09±0.00	0.16±0.14	0.07±0.01
17:0	2.60±0.09 ^{ab}	0.68±0.01	3.46±0.11 ^{a}	0.75±0.02	1.39±0.82 ^{b}	1.09±0.24	1.38±1.22	0.37±0.33	1.95±0.20	0.71±0.03	1.76±1.55	1.00±0.14
17:1	0.45±0.04 ^{b}	0.12±0.01	0.75±0.05 ^{a}	0.16±0.00	0.20±0.13 ^{b}	0.15±0.02	0.20±0.20	0.05±0.05	0.39±0.03	0.14±0.02	0.24±0.21	0.13±0.01
18:0	4.57±0.25 ^{a}	1.20±0.04	5.28±0.35 ^{a}	1.14±0.00	1.71±1.20 ^{b}	1.16±0.04	2.32±1.91	0.63±0.51	3.40±0.30	1.24±0.04	2.38±2.22	1.05±0.14
18:1 n-9	0.16±0.03	0.04±0.01	0.15±0.02	0.03±0.01	0.10±0.02	0.13±0.08	0.21±0.05	0.06±0.02	0.00±0.00	0.00±0.00	0.12±0.03	0.27±0.23
18:2 n-6	0.15±0.02 ^{b}	0.04±0.00	0.27±0.01 ^{a}	0.09±0.00	0.11±0.05 ^{b}	0.11±0.04	0.15±0.00	0.04±0.00	0.20±0.01	0.07±0.01	0.12±0.10	0.07±0.01
18:3 n-6	0.18±0.05	0.05±0.01	0.12±0.03	0.03±0.01	0.08±0.02	0.08±0.04	0.17±0.03	0.05±0.01	0.16±0.03	0.06±0.02	0.12±0.10	0.06±0.01
18:3 n-3	0.15±0.02 ^{b}	0.04±0.01	0.35±0.01 ^{a}	0.09±0.00	0.09±0.05 ^{b}	0.07±0.02	0.15±0.00	0.04±0.00	0.20±0.01	0.07±0.01	0.08±0.07	0.03±0.01
20:0	0.84±0.05 ^{a}	0.22±0.01	1.10±0.05 ^{a}	0.24±0.00	0.35±0.23 ^{b}	0.25±0.03	0.85±0.04	0.23±0.01	0.68±0.03	0.25±0.02	0.43±0.40	0.21±0.01
20:3 n-6	0.34±0.17	0.09±0.05	1.03±0.03	0.22±0.01	0.37±0.24	0.26±0.03	0.98±0.05	0.27±0.01	0.37±0.15	0.13±0.05	0.15±0.12	0.13±0.06
20:4 n-6	0.52±0.17	0.14±0.05	0.29±0.01	0.06±0.00	0.18±0.15	0.10±0.03	0.25±0.01	0.07±0.00	0.41±0.25	0.15±0.10	0.50±0.49	0.16±0.10
20:3 n-3	0.32±0.11	0.08±0.03	0.14±0.04	0.03±0.01	0.10±0.02	0.16±0.13	0.27±0.09	0.07±0.03	0.10±0.08	0.04±0.03	0.03±0.03	0.06±0.01
22:0	1.10±0.03 ^{b}	0.29±0.01	1.54±0.03 ^{a}	0.33±0.01	0.30±0.16 ^{c}	0.25±0.07	1.16±0.02	0.32±0.00	0.78±0.56	0.27±0.19	0.02±0.02	0.12±0.12
20:5 n-3	0.70±0.02 ^{b}	0.18±0.01	1.02±0.07 ^{a}	0.22±0.03	0.09±0.02 ^{c}	0.14±0.12	1.09±0.04	0.30±0.01	0.58±0.06	0.21±0.03	0.57±0.11	1.39±1.21
22:5 n-3	16.17±0.61 ^{b}	4.24±0.11	23.90±0.82 ^{a}	5.18±0.15	6.17±4.29 ^{c}	4.21±0.18	17.37±0.56	4.77±0.06	13.02±0.94	4.78±0.63	8.53±7.83	4.06±0.19
22:6 n-3	71.78±1.51 ^{b}	18.85±0.40	107.19±2.88 ^{a}	23.24±0.86	24.71±19.15 ^{c}	14.91±1.94	80.32±2.60	22.03±0.28	56.28±4.73	20.70±2.94	37.31±34.15	18.07±0.51
others	10.29±1.05	2.70±0.27	6.19±0.66	1.35±0.23	6.69±0.44	8.66±5.92	14.22±3.65	3.92±1.08	5.15±0.06	1.88±0.09	4.17±3.33	3.29±1.34

ตารางภาคผนวกที่ 3 (ต่อ)

	Glu 12 % 96 hr		Glu 18 % 96 hr		Glu 24 % 96 hr	
Fatty acid	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA
12:0	0.56±0.04	0.16±0.01	0.45±0.01	0.15±0.00	0.47±0.04	0.18±0.00
13:0	10.87±2.94	3.05±0.81	11.26±0.62	3.77±0.19	5.79±1.93	2.21±0.55
14:0	16.97±0.80	4.78±0.14	13.91±0.27	4.66±0.11	13.36±2.17	5.19±0.37
14:1	0.31±0.01 ^{b}	0.09±0.00	0.19±0.00 ^{c}	0.06±0.00	0.46±0.06 ^{a}	0.18±0.01
15:0	8.87±0.40 ^{ab}	2.50±0.06	7.72±0.10 ^{c}	2.58±0.04	9.30±0.25 ^{a}	3.67±0.43
14:0	198.43±9.18	55.91±1.88	167.43±2.46	56.02±1.05	148.33±26.33	57.47±4.97
16:1	0.25±0.01	0.07±0.00	0.22±0.00	0.07±0.00	0.28±0.04	0.11±0.03
17:0	2.44±0.07	0.69±0.01	2.30±0.02	0.77±0.00	2.54±0.03	1.00±0.11
17:1	0.37±0.01	0.10±0.00	0.46±0.02	0.15±0.01	0.40±0.08	0.16±0.05
18:0	4.30±0.18 ^{a}	1.21±0.05	3.44±0.02 ^{ab}	1.15±0.00	2.96±0.54 ^{b}	1.15±0.10
18:1 n-9	0.13±0.01	0.04±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	1.28±1.14	0.55±0.50
18:2 n-6	0.14±0.01 ^{b}	0.04±0.00	0.21±0.02 ^{a}	0.07±0.01	0.22±0.01 ^{a}	0.09±0.00
18:3 n-6	0.17±0.02	0.05±0.01	0.15±0.03	0.05±0.01	0.12±0.06	0.05±0.02
18:3 n-3	0.15±0.02 ^{c}	0.04±0.01	0.24±0.01 ^{a}	0.08±0.00	0.22±0.02 ^{ab}	0.09±0.01
10:0	0.81±0.03 ^{a}	0.23±0.01	0.73±0.04 ^{ab}	0.24±0.01	0.64±0.06 ^{b}	0.25±0.00
20:3 n-6	0.52±0.24	0.14±0.07	0.62±0.06	0.21±0.02	0.35±0.14	0.14±0.07
20:4 n-6	0.36±0.11	0.10±0.03	0.21±0.00	0.07±0.00	0.42±0.25	0.16±0.08
20:3 n-3	0.26±0.07	0.08±0.02	0.12±0.08	0.04±0.03	0.21±0.19	0.07±0.07
22:0	1.06±0.04	0.30±0.01	1.04±0.03	0.35±0.01	0.98±0.13	0.38±0.01
20:5 n-3	1.03±0.06 ^{a}	0.29±0.01	0.71±0.03 ^{ab}	0.24±0.01	0.31±0.23 ^{b}	0.11±0.08
22:5 n-3	16.66±0.64 ^{a}	4.70±0.17	15.21±0.35 ^{a}	5.09±0.10	12.00±0.33 ^{b}	4.74±0.57
22:6 n-3	74.97±2.96 ^{a}	21.14±0.66	65.85±1.84 ^{ab}	22.03±0.53	52.59±5.00 ^{b}	20.90±3.88
others	15.11±6.16	4.29±1.77	6.38±0.95	2.13±0.31	2.83±1.33	1.16±0.63

ตารางภาคผนวกที่ 4 ปริมาณกรดไขมันที่ได้จากการเลี้ยง *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ด้วยอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 12 % (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม กับอาหารที่เติม $MgCl_2$ 0.1 % (w/v) และไม่เติม $MgCl_2$ 0.1 % (w/v) ในถังหมัก

	Glu 12 % No $MgCl_2$ 0 hr		Glu 12 % + $MgCl_2$ 0 hr		Glu 12 % No $MgCl_2$ 12 hr		Glu 12 % + $MgCl_2$ 12 hr		Glu 12 % No $MgCl_2$ 24 hr		Glu 12 % + $MgCl_2$ 24 hr	
Fatty acid	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA
12:0	0.03±0.01	0.15±0.05	0.13±0.07	0.12±0.01	0.04±0.03	0.09±0.02	0.18±0.14	0.25±0.14	0.49±0.02	0.14±0.00	0.34±0.12	0.13±0.02
12:0	8.61±1.46	41.33±3.79	5.60±0.97	13.85±6.58	5.48±2.42	27.45±11.52	3.00±0.31	8.39±2.53	8.10±2.38	2.39±0.68	4.04±0.20	2.08±0.47
14:0	0.51±0.05	2.52±0.25	3.41±1.71	2.82±0.23	1.35±0.96	2.61±0.70	0.85±0.12	2.14±0.38	15.06±0.74	4.49±0.13	9.76±3.62	3.68±0.56
14:1	0.02±0.01	0.09±0.03	0.16±0.10	0.14±0.04	0.04±0.03	0.07±0.02	3.29±3.26	3.71±3.61	0.24±0.04	0.07±0.01	0.25±0.10	0.09±0.02
12:0	0.61±0.08	3.17±0.70	11.69±6.26	7.93±1.97	3.39±2.54	5.62±2.42	2.80±0.39	6.89±1.24	24.00±8.79	7.26±2.70	22.91±7.63	10.41±4.88
16:0	4.33±0.51	21.88±3.35	39.70±20.64	29.77±4.73	15.33±10.79	28.67±10.28	9.93±1.22	24.87±4.23	179.18±10.60	53.37±2.19	114.21±42.90	42.86±6.91
16:1	0.02±0.00	0.08±0.01	0.21±0.12	0.14±0.04	0.04±0.03	0.08±0.02	0.06±0.03	0.10±0.03	0.21±0.01	0.06±0.00	0.16±0.04	0.07±0.01
17:0	0.27±0.01	1.38±0.18	4.55±2.25	3.92±0.20	1.06±0.52	2.47±0.61	1.30±0.22	3.14±0.53	5.47±1.82	1.65±0.56	7.79±0.24	4.06±0.98
17:1	0.01±0.00	0.04±0.02	0.12±0.06	0.10±0.02	0.05±0.02	0.19±0.07	0.11±0.06	0.20±0.08	0.39±0.03	0.11±0.01	0.16±0.06	0.08±0.02
16:0	0.30±0.11	1.53±0.52	2.00±1.04	2.03±0.43	0.66±0.26	2.28±0.55	0.58±0.16	1.38±0.37	3.93±0.09	1.17±0.02	2.91±0.88	1.19±0.10
18:1 n-9	0.18±0.04	0.95±0.27	0.41±0.20	0.66±0.22	0.17±0.07	0.73±0.30	0.16±0.03	0.48±0.17	0.23±0.05	0.07±0.02	0.23±0.04	0.12±0.04
18:2 n-6	0.09±0.03	0.42±0.12	1.95±0.99	1.54±0.27	0.17±0.06	0.66±0.22	0.32±0.10	0.73±0.26	0.16±0.02	0.05±0.01	0.16±0.03	0.09±0.02
18:3 n-6	0.10±0.02	0.47±0.11	0.24±0.11	0.51±0.22	0.07±0.04	0.32±0.18	0.09±0.04	0.20±0.08	0.18±0.03	0.05±0.01	0.12±0.04	0.04±0.03
18:3 n-3	0.04±0.02	0.22±0.12	0.59±0.14	1.21±0.47	0.09±0.05	0.40±0.21	0.11±0.02	0.27±0.06	0.22±0.03	0.05±0.01	0.16±0.02	0.08±0.01
20:0	0.11±0.03	0.52±0.11	0.44±0.21	0.52±0.10	0.31±0.18	1.00±0.75	0.12±0.03	0.30±0.07	0.59±0.13	0.17±0.04	0.60±0.13	0.27±0.02
20:3 n-6	0.16±0.03	0.87±0.27	0.96±0.53	0.61±0.20	0.09±0.05	0.43±0.22	0.31±0.25	0.40±0.27	0.17±0.04	0.05±0.01	0.23±0.09	0.14±0.08
20:4 n-6	0.14±0.13	0.67±0.61	0.14±0.02	0.36±0.16	0.14±0.08	0.33±0.09	0.22±0.03	0.55±0.11	0.36±0.13	0.11±0.04	0.48±0.21	0.17±0.04
20:3 n-3	0.04±0.03	0.19±0.13	0.43±0.13	0.82±0.48	0.25±0.16	0.76±0.66	0.11±0.05	0.26±0.10	0.23±0.07	0.07±0.02	0.21±0.09	0.11±0.06
22:0	0.04±0.03	0.17±0.04	0.42±0.18	0.42±0.15	0.18±0.07	1.54±1.28	0.11±0.05	0.30±0.08	1.30±0.33	0.39±0.09	0.70±0.14	0.31±0.02
20:5 n-3	0.06±0.02	0.29±0.07	0.42±0.22	0.34±0.04	0.11±0.04	0.45±0.16	0.10±0.03	0.25±0.10	0.86±0.02	0.26±0.01	0.50±0.03	0.27±0.08
22:5 n-3	0.33±0.05	1.69±0.31	4.88±1.81	6.54±1.94	1.19±0.70	3.02±0.71	1.64±0.34	4.31±1.02	14.61±1.02	4.35±0.24	8.21±1.95	3.58±0.26
22:6 n-3	1.57±0.26	7.90±1.42	23.93±13.52	13.41±5.99	5.43±3.83	9.45±4.48	8.22±2.10	22.14±5.84	71.12±2.39	21.22±0.48	45.56±9.37	20.47±1.69
others	2.83±0.68	13.47±2.76	6.42±1.84	12.23±4.42	3.01±1.20	11.35±4.43	13.72±11.20	18.74±11.44	8.08±0.69	2.41±0.18	17.17±6.99	9.67±5.77

ตารางภาคผนวกที่ 4 (ต่อ)

	Glu 12 % No $MgCl_2$ 36 hr		Glu 12 % + $MgCl_2$ 36 hr		Glu 12 % No $MgCl_2$ 48 hr		Glu 12 % + $MgCl_2$ 48 hr		Glu 12 % No $MgCl_2$ 60 hr		Glu 12 % + $MgCl_2$ 60 hr	
Fatty acid	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA
12:0	0.37±0.10	0.16±0.01	0.56±0.26	0.18±0.00	0.58±0.04	0.18±0.01	0.69±0.02	0.19±0.02	0.54±0.07	0.16±0.01	0.69±0.02	0.21±0.01
13:0	9.87±1.30	4.87±1.21	4.40±1.51	1.56±0.18	11.26±2.08	3.44±0.44	3.77±0.21	1.04±0.12	10.10±2.71	3.27±0.93	3.58±0.30	1.12±0.17
14:0	11.09±3.19	4.63±0.24	16.20±7.51	5.15±0.11	17.25±1.25	5.33±0.10	19.93±0.37	5.50±0.47	16.57±2.23	4.99±0.22	18.79±0.81	5.76±0.25
14:1	0.28±0.11	0.11±0.02	0.38±0.17	0.12±0.01	0.29±0.05	0.09±0.01	0.43±0.02	0.12±0.00	0.31±0.05	0.10±0.02	2.00±1.64	0.66±0.55
15:0	8.39±0.85	3.91±0.55	14.66±7.68	4.49±0.42	9.66±0.17	3.04±0.27	10.70±0.73	2.97±0.39	9.49±0.65	2.96±0.25	9.56±0.55	2.93±0.15
16:0	122.97±31.52	52.14±1.85	177.23±79.96	57.05±1.29	183.77±8.89	57.05±1.71	208.33±4.57	57.53±5.03	190.27±28.10	56.88±2.00	194.87±7.17	59.85±2.91
16:1	0.14±0.03	0.06±0.00	0.22±0.09	0.07±0.01	0.20±0.01	0.06±0.00	0.21±0.02	0.06±0.01	0.17±0.05	0.06±0.01	0.26±0.09	0.08±0.03
12:0	2.05±0.22	0.94±0.10	3.95±1.92	1.24±0.02	2.36±0.02	0.74±0.06	2.78±0.11	0.77±0.08	1.87±0.56	0.62±0.19	1.98±0.72	0.59±0.21
17:1	0.26±0.06	0.11±0.01	0.29±0.21	0.08±0.03	0.38±0.02	0.12±0.00	0.25±0.10	0.07±0.03	0.31±0.12	0.10±0.03	0.34±0.07	0.10±0.01
16:0	2.68±0.46	1.19±0.07	4.04±1.71	1.32±0.19	3.66±0.22	1.13±0.04	4.05±0.06	1.12±0.08	3.82±0.50	1.15±0.03	4.01±0.03	1.24±0.10
18:1 n-9	0.17±0.01	0.08±0.01	0.23±0.10	0.07±0.03	0.13±0.01	0.04±0.01	0.14±0.05	0.04±0.01	0.13±0.01	0.04±0.00	0.17±0.04	0.05±0.01
18:2 n-6	0.09±0.01	0.03±0.01	0.26±0.11	0.10±0.06	0.13±0.01	0.04±0.00	0.14±0.03	0.04±0.00	0.10±0.01	0.03±0.00	0.32±0.06	0.10±0.02
18:2 n-6	0.72±0.60	0.38±0.32	0.15±0.08	0.04±0.01	0.11±0.01	0.03±0.01	0.09±0.04	0.03±0.01	0.14±0.03	0.04±0.01	0.15±0.02	0.05±0.01
18:3 n-3	0.08±0.01	0.03±0.00	0.18±0.06	0.07±0.03	0.11±0.01	0.03±0.00	0.07±0.01	0.02±0.00	0.13±0.03	0.06±0.01	0.10±0.00	0.03±0.00
20:0	0.59±0.11	0.26±0.01	0.75±0.33	0.24±0.02	0.74±0.05	0.23±0.00	0.69±0.03	0.19±0.02	0.76±0.10	0.23±0.00	0.81±0.05	0.25±0.01
20:3 n-6	0.45±0.25	0.17±0.07	0.92±0.50	0.28±0.02	0.67±0.22	0.20±0.06	0.56±0.23	0.16±0.07	0.26±0.14	0.16±0.07	0.70±0.32	0.20±0.08
20:4 n-6	0.32±0.11	0.16±0.06	0.15±0.08	0.05±0.01	0.28±0.12	0.09±0.04	0.21±0.08	0.06±0.02	0.19±0.05	0.06±0.01	0.37±0.16	0.12±0.06
20:3 n-3	0.30±0.13	0.17±0.08	0.42±0.33	0.10±0.04	0.11±0.08	0.03±0.02	0.19±0.14	0.07±0.03	0.20±0.01	0.06±0.01	0.23±0.03	0.07±0.01
22:0	0.70±0.20	0.29±0.02	0.83±0.38	0.27±0.05	0.72±0.24	0.22±0.07	0.74±0.32	0.21±0.09	0.97±0.13	0.30±0.01	0.99±0.26	0.29±0.05
20:5 n-3	0.65±0.25	0.30±0.14	0.64±0.24	0.22±0.02	0.34±0.11	0.10±0.03	0.35±0.11	0.10±0.03	0.44±0.10	0.14±0.03	0.61±0.18	0.18±0.04
22:5 n-3	10.63±3.03	4.44±0.26	13.54±6.80	4.20±0.23	14.77±1.87	4.50±0.25	10.68±2.69	3.03±0.88	15.18±2.23	4.58±0.24	11.49±1.23	3.49±0.06
22:6 n-3	51.00±14.01	21.41±1.03	61.23±36.53	16.83±3.11	68.76±9.25	20.93±1.35	47.80±12.81	13.61±4.14	69.43±9.04	21.16±1.28	62.88±15.51	18.64±2.81
others	8.21±2.85	4.14±1.91	14.53±3.70	6.26±2.73	8.03±2.29	2.37±0.49	54.00±47.85	13.10±11.29	9.25±0.80	2.93±0.41	13.56±4.24	3.99±0.93

ตารางภาคผนวกที่ 4 (ต่อ)

	Glu 12 % No $MgCl_2$ 72 hr		Glu 12 % + $MgCl_2$ 72 hr		Glu 12 % No $MgCl_2$ 84 hr		Glu 12 % + $MgCl_2$ 84 hr		Glu 12 % No $MgCl_2$ 96 hr		Glu 12 % + $MgCl_2$ 96 hr	
Fatty acid	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA	mg. dry wt.	% 0f total FA
12:0	0.67±0.04	0.18±0.01	0.63±0.04	0.20±0.03	0.63±0.00	0.17±0.00	0.64±0.05	0.20±0.02	0.56±0.04	0.16±0.01	0.64±0.01	0.18±0.01
12:0	10.65±1.83	2.79±0.49	3.02±0.75	1.03±0.45	14.41±1.94	3.94±0.46	3.95±0.25	1.19±0.11	10.87±2.94	3.05±0.81	3.06±0.17	0.88±0.08
14:0	20.41±0.92	5.36±0.23	17.30±2.46	5.41±0.41	18.54±0.17	5.09±0.05	18.36±0.17	5.53±0.32	16.97±0.80	4.78±0.14	18.21±0.28	5.21±0.16
14:1	0.29±0.05	0.08±0.01	0.39±0.04	0.12±0.01	0.29±0.05	0.08±0.01	0.40±0.02	0.12±0.01	0.31±0.01	0.09±0.00	0.47±0.06	0.14±0.02
15:0	10.55±0.45	2.77±0.04	8.90±1.14	2.79±0.25	9.26±0.04	2.54±0.04	6.74±2.91	2.02±0.89	8.87±0.40	2.50±0.06	9.21±0.29	2.63±0.03
14:0	228.19±9.70	59.79±0.64	179.82±26.23	56.23±4.02	200.00±2.02	54.89±0.52	194.59±4.58	58.56±3.25	198.43±9.18	55.91±1.88	194.81±5.20	55.94±3.62
16:1	0.26±0.02	0.07±0.00	0.36±0.02	0.12±0.02	0.21±0.12	0.06±0.03	0.30±0.05	0.09±0.01	0.25±0.01	0.07±0.00	0.32±0.03	0.09±0.01
17:0	2.60±0.09	0.68±0.01	2.64±0.25	0.83±0.10	1.38±1.22	0.37±0.33	2.81±0.07	0.84±0.05	2.44±0.07	0.69±0.01	2.72±0.12	0.78±0.07
17:1	0.45±0.04	0.12±0.01	0.41±0.09	0.13±0.00	0.20±0.20	0.05±0.05	0.32±0.07	0.09±0.01	0.37±0.01	0.10±0.00	0.39±0.07	0.11±0.02
18:0	4.57±0.25	1.20±0.04	3.89±0.53	1.22±0.10	2.32±1.91	0.63±0.51	4.41±0.33	1.33±0.12	4.30±0.18	1.21±0.05	4.11±0.31	1.18±0.14
18:1 n-9	0.16±0.03	0.04±0.01	0.15±0.02	0.05±0.02	0.21±0.05	0.06±0.02	0.27±0.10	0.08±0.03	0.13±0.01	0.04±0.00	0.16±0.06	0.05±0.02
18:2 n-6	0.15±0.02	0.04±0.00	0.42±0.04	0.14±0.04	0.15±0.00	0.04±0.00	0.31±0.06	0.09±0.02	0.14±0.01	0.04±0.00	0.39±0.07	0.08±0.02
18:3 n-6	0.18±0.05	0.05±0.01	0.36±0.02	0.08±0.02	0.17±0.03	0.05±0.01	0.25±0.01	0.08±0.01	0.17±0.02	0.05±0.01	0.16±0.05	0.05±0.01
18:3 n-3	0.15±0.02	0.04±0.01	0.11±0.01	0.04±0.01	0.13±0.00	0.04±0.00	0.11±0.01	0.03±0.01	0.17±0.02	0.04±0.01	0.23±0.13	0.07±0.04
20:0	0.84±0.05	0.22±0.01	0.80±0.15	0.25±0.01	0.85±0.04	0.23±0.01	0.90±0.05	0.27±0.01	0.81±0.03	0.23±0.01	0.87±0.02	0.25±0.02
20:3 n-6	0.34±0.17	0.09±0.05	1.00±0.43	0.29±0.07	0.98±0.05	0.27±0.01	0.54±0.33	0.15±0.09	0.52±0.24	0.14±0.07	0.82±0.38	0.23±0.10
20:4 n-6	0.52±0.17	0.14±0.05	0.19±0.07	0.06±0.01	0.25±0.01	0.07±0.00	0.73±0.24	0.23±0.08	0.36±0.11	0.10±0.03	0.46±0.16	0.13±0.05
20:3 n-3	0.32±0.11	0.08±0.01	0.40±0.17	0.12±0.03	0.27±0.09	0.07±0.03	0.49±0.10	0.15±0.03	0.26±0.07	0.08±0.02	0.15±0.08	0.08±0.02
22:0	1.10±0.03	0.29±0.01	1.11±0.44	0.33±0.07	1.16±0.02	0.32±0.00	1.02±0.26	0.30±0.07	1.06±0.04	0.30±0.01	1.20±0.15	0.34±0.03
20:5 n-3	0.70±0.02	0.18±0.01	0.87±0.35	0.26±0.05	1.09±0.04	0.30±0.01	0.92±0.25	0.27±0.07	1.03±0.06	0.29±0.01	1.38±0.32	0.39±0.08
22:5 n-3	16.17±0.61	4.24±0.11	11.80±11.29	3.03±2.82	17.37±0.56	4.77±0.06	14.78±3.37	4.35±0.75	16.66±0.64	4.70±0.17	18.28±3.21	5.16±0.73
22:6 n-3	71.78±1.51	18.85±0.40	21.38±11.81	6.08±2.33	80.32±2.60	22.03±0.28	67.65±16.53	19.87±3.78	74.97±2.96	21.14±0.66	84.55±16.46	23.85±3.88
others	10.29±1.05	2.70±0.27	68.98±15.23	21.21±0.12	14.22±3.65	3.92±1.08	13.60±3.62	4.16±1.18	15.11±6.16	4.29±1.77	7.55±1.62	2.20±0.57