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

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

จุลินทรีย์ทะเล: แหล่งทางเลือกใหม่ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง

Marine Microbes:

New Alternative Source of Highly Unsaturated Fatty Acids

สมถวิล จริตควร รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์ และ วิภูษิต มัณฑะจิตร

QL 608 S8 T6
22 ส.ค. 2552
248955
บริการ
23 มิ.ย. 2552

ทุนอุดหนุนการวิจัย
งบประมาณแผ่นดิน ปีการศึกษา 2545
มหาวิทยาลัยบูรพา

บทคัดย่อ

ได้ทำการคัดแยกจุลินทรีย์ทะเลจากตัวอย่างน้ำบริเวณแนวปะการังจากเกาะมันใน จังหวัดระยอง เกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี และเกาะเต่า จังหวัดสุราษฎร์ธานี และจากตัวอย่างใบหญ้าทะเล จากอ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี อ่าวมะขามป้อม จังหวัดระยอง อ่าวสัตหีบ และเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี ผลปรากฏว่า พบยีสต์จากตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณแนวปะการังทั้งสิ้น 7 ชนิด ได้แก่ *Saccharomyces* sp.1, *Saccharomyces* sp.2, *Saccharomyces* sp.3, *Kloeckera* sp., *Nadsonia* sp., *Zygosaccharomyces* sp.2, *Zygosaccharomyces* sp.1 เมื่อวิเคราะห์กรดไขมันในยีสต์พบทั้งกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว โดยพบว่า *Kloeckera* sp. ที่เลี้ยงด้วยอาหาร PDB ผลิตกรดไขมัน Palmitic acid (C16:0) ได้มากที่สุดถึงร้อยละ 30.19 ของกรดไขมันทั้งหมด *Saccharomyces* sp.2 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร SB ผลิตกรดไขมัน C18:1 n-9 ได้สูงสุดร้อยละ 47.73 ของกรดไขมันทั้งหมด *Zygosaccharomyces* sp.2 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร SB ผลิตกรดไขมัน C18:2 n-6 ได้มากที่สุดร้อยละ 28.17 ของกรดไขมันทั้งหมด และ C18:3 n-6 พบสูงสุดใน *Saccharomyces* sp.3 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร SB (3.45 % ของกรดไขมันทั้งหมด) ส่วนดีเอชเอ (C22:6 n-3) พบสูงสุดใน *Saccharomyces* sp.2 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร YM (2.38 % ของกรดไขมันทั้งหมด) สำหรับจุลินทรีย์ทะเลในกลุ่มทรอสโทคิทริด (Thraustochytrids) พบทั้งสิ้น 30 isolates จากตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณเกาะเต่า แต่ไม่สามารถแยกเชื้อให้บริสุทธิ์และเลี้ยงต่อได้ ส่วนใบหญ้าทะเลไม่พบจุลินทรีย์ทะเลในกลุ่ม Thraustochytrids

ABSTRACT

Marine microbes from the coral reef area of Ko Man Nai , Rayong Province; Ko Sri Chang, Chon Buri Province; and Ko Toa, Surattani Province and seagrass leaves from Kung Kra Ben Bay, Chantaburi Province; Ma Kam Pom Bay, Rayong Province; Sataheep Bay and Ko Samarsarn, Chon Buri Province, were isolated by screening test for polyunsaturated fatty acids. The results showed that 7 species of yeasts were found from water samples of coral reef area : *Saccharomyces* sp.1, *Saccharomyces* sp.2, *Saccharomyces* sp.3, *Kloeckera* sp., *Nadsonia* sp., *Zygosaccharomyces* sp.2, *Zygosaccharomyces* sp.1. Fatty acid compositions of isolated yeasts were found both saturated fatty acids and unsaturated fatty acids. *Kloeckera* sp. cultured in PDB medium had the highest amount of Palmitic acid (C16:0) which found to be 30.19% of total fatty acids while the highest content of oleic acid (C18:1 n-9) was accumulated in *Saccharomyces* sp.2 reared with SB medium comprised 47.73 % of total fatty acids. *Zygosaccharomyces* sp.2 in SB medium had the highest amount of linoleic acid (C18:2 n-6) containing 28.17 % of total fatty acids. However, *Saccharomyces* sp.3 in SB medium produced the highest amount of linolenic acid (C18:3 n-6) at 3.45 % of total fatty acids and the highest DHA (C22:6 n-3) proportion was produced by *Saccharomyces* sp.2 reared with YM medium (2.38 % of total fatty acids). Thirty isolates of thraustochytrid were found from Ko Toa, Surattani Province but their culture could not be maintained and also no thraustochytrid group was found from seagrass leaves.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย จากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยบูรพา ผู้วิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณอาจารย์นรินทร์รัตน์ คงจันตรี คุณมยุรา ประยูรพันธ์ คุณลลิดา เชาว์เรืองฤทธิ์ คุณขวัญใจ บุญแต่ง คุณนวนาฏ ศุขสุนทร คุณอัญชลี จันทร์คง และคุณรณวัน บุญประกอบ ที่ช่วยในการเก็บตัวอย่างและศึกษาในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ภาควิชาวาริชศาสตร์ที่อำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์ต่างๆ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
สมมุติฐานของการศึกษา	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	2
สถานที่ทำการทดลอง	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา	
ลิปิด	4
ชนิดของลิปิด	4
กรดไขมัน	5
การผลิตกรดไขมัน	6
กรดไขมันจากจุลินทรีย์	12
ทรอสโทคิทริด (Thraustochytrids)	15
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	17
ยีสต์	18
ลิปิดในยีสต์	19
ปัจจัยการเจริญเติบโตต่อปริมาณของลิปิดในเซลล์ยีสต์	22
การกระจายของลิปิดในเซลล์ยีสต์	22
การสร้างกรดไขมันในยีสต์	23
ยีสต์ในระบบนิเวศทางทะเล	24
การแยกเชื้อยีสต์	24

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

การจัดจำแนกเชื้อยีสต์ 24

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ 27

สารเคมี 27

วิธีการทดลอง 29

1. การเก็บตัวอย่าง 29
2. การแยกเชื้อจุลินทรีย์ทะเล 30
3. การวิเคราะห์กรดไขมัน 31

บทที่ 4 ผลการทดลอง 33

1. จุลินทรีย์ทะเลที่แยกจากตัวอย่างน้ำบริเวณแนวปะการังและเมือกที่ขูดจากก้อนปะการัง 33
2. จุลินทรีย์ทะเลที่แยกจากตัวอย่าง หญ้าทะเล 36
3. ปัจจัยสิ่งแวดล้อมบางประการในบริเวณที่เก็บตัวอย่าง 40

บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง 41

อภิปรายผลการทดลอง 41

สรุปผลการทดลอง 43

ข้อเสนอแนะ 44

เอกสารอ้างอิง 45

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	กรดไขมันอิ่มตัวชนิดต่างๆ	5
2	กรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดต่างๆ	6
3	ปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวในราชั้นต่ำ	14
4	ยีสต์ที่พบจากตัวอย่างน้ำทะเลและเมือกที่ขูดจากก้อนปะการัง	32
5	ลักษณะรูปร่างของยีสต์ที่พบ ณ สถานีต่างๆ	33
6	ผลการทดสอบการเจริญของยีสต์ในอาหาร Glucose / Nitrate Agar และ Glucose / Yeast Extract Broth	34
7	การเจริญของยีสต์ในอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB), Yeast and Mold (YM), Czapecdox Broth (CZB) และ Sabourand Broth (SB)	35
8	กรดไขมันในยีสต์ที่เลี้ยงด้วยอาหารแตกต่างกัน	37
9	คุณภาพน้ำทะเลบริเวณปะการังและแหล่งหญ้าทะเลในบริเวณที่ทำการศึกษา	40

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	เอนไซม์ fatty acid synthetase complex กับการสังเคราะห์กรดไขมัน	7
2	ปฏิกิริยา activation และการนำกรดไขมันเข้าไมโตคอนเดรีย	8
3	การเกิดบีต้า – ออกซิเดชั่นของกรดไขมันเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง	9
4	Desaturation- Elongation parthway ของกรด Acetic (CH_3COOH)	10
5	Elongation and desaturation pathways ของครอบครัว n-7, n-9, n-6 and n-3 ที่ถูกสร้างขึ้นในสัตว์	11
6	แทลลัสของทรอสโทคิทริด	16
7	วงจรชีวิตของทรอสโทคิทริด	16

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันมนุษย์เห็นความสำคัญของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (Highly unsaturated fatty acid, HUFA) โดยเฉพาะกลุ่มโอเมก้า-3 อันได้แก่ ดีเอชเอ (DHA, docosahexaenoic acid) และ อีพีเอ (EPA, eicosapentaenoic acid) เนื่องจากเป็นองค์ประกอบที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อสุขภาพของมนุษย์ สามารถนำมาใช้ทางการแพทย์เพื่อบำบัดและรักษาโรคต่างๆ ซึ่งสามารถออกฤทธิ์ในเชิงป้องกันโรคและภาวะผิดปกติบางชนิด เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด (atherosclerosis), มะเร็ง (cancer), โรคข้อ (rheumatoid arthritis) และโรคที่เกี่ยวข้องกับความชราภาพ ในทศวรรษที่ผ่านมา มนุษย์ยิ่งเห็นความสำคัญของกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 มากขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งดีเอชเอ โดยมีผลทำให้การตั้งครรภ์และการคลอดบุตรเป็นไปอย่างปกติ รวมทั้งการพัฒนาการของสมอง และการมองเห็น โดยจะเห็นผลชัดเจนในวัยทารกและเด็ก และได้มีการเสริมปริมาณดีเอชเอในนมผงกระป๋องสำเร็จรูปสำหรับเด็กอีกด้วย ปกติแล้วกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงชนิดดีเอชเอพบมากในส่วนของสมองและเรตินา แต่ร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์เองได้ จึงต้องบริโภคจากอาหารที่มีกรดไขมันดังกล่าว และการสะสมกรดไขมันไม่อิ่มตัวในร่างกายนั้น สามารถถ่ายทอดหรือส่งต่อทางห่วงโซ่อาหารได้

แหล่งของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงที่นำมาผลิตเชิงพาณิชย์นั้น จะสกัดจากน้ำมันปลา และน้ำมันตับปลา แต่แหล่งดังกล่าวมักจะมีปัญหาหลายประการอันเนื่องมาจากความไม่สม่ำเสมอของกรดไขมัน การควบคุมคุณภาพ และน้ำมันปลามีกรดไขมันหลากหลายชนิดทำให้ยากต่อการแยกกรดไขมันตัวที่ต้องการให้บริสุทธิ์ได้ นอกจากนั้นคุณภาพของกรดไขมันไม่อิ่มตัวยังขึ้นกับปลาที่จับได้ในแต่ละฤดูกาลหรือแหล่งที่จับ รวมทั้งการไม่ยอมรับของผู้บริโภคบางกลุ่มเพราะการมีกลิ่นคาวปลาในผลิตภัณฑ์ดังกล่าว และน้ำมันปลายังถูกออกซิไดซ์ได้ง่ายทำให้คุณภาพลดน้อยลงอีกด้วย (Sargent et al., 1999) จากปัญหาข้างต้นจึงน่าที่จะคัดเลือกหาสายพันธุ์สิ่งมีชีวิตที่มีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง เพื่อนำมาเป็นทางเลือกใหม่ของแหล่งกรดไขมันที่ต้องการ

จุลินทรีย์ทะเลในกลุ่ม Thraustochytrids เช่น *Thraustochytrium* spp. และ *Schizochytrium* spp. มีรายงานพบการสะสมไขมันภายในเซลล์สูงถึง 30 % และมีความหลากหลายของชนิดกรดไขมันไม่มาก แต่มีปริมาณของอีพีเอ หรือดีเอชเอค่อนข้างสูง โดยเฉพาะดีเอชเอ มีปริมาณสูงถึง 30 - 40 % ของกรดไขมันทั้งหมด (Bajpai et al., 1991a, 1991b; Li and Ward, 1994; Barclay and Zeller, 1996, Bowles et al., 1999) ซึ่งน่าจะนำมาเป็นแหล่งทดแทนกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงจากน้ำมันปลาได้ นอกจากนั้นจุลินทรีย์ทะเลในกลุ่มนี้มีกลิ่นน้อยมากเมื่อเทียบกับน้ำมันปลา ควบคุมคุณภาพของกรดไขมันได้และมีปริมาณดีเอชเอสูงกว่าที่พบในน้ำมันปลาอีกด้วย (Nakahara et al., 1996) ในแง่ของการ

ควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ และการผลิตภายใต้สภาวะควบคุมในห้องปฏิบัติการจะสามารถทำให้การผลิตในเชิงการค้าทำได้ง่ายและสะดวกยิ่งขึ้น ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่จะคัดแยกจุลินทรีย์จากน้ำทะเล เพื่อเป็นแหล่งของกรดไขมันที่มีประโยชน์ต่อมนุษย์และเป็นแหล่งสารอาหารที่สำคัญต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อสำรวจและคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ทะเลที่มีการสะสมกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงชนิดดีเอชเอ และอีพีเอ จากบริเวณแนวปะการังและหญ้าทะเล
2. เพื่อศึกษาศักยภาพในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงจากจุลินทรีย์ทะเลสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ และมีการสะสมกรดไขมันชนิดดีเอชเอ และอีพีเอ
3. เพื่อเป็นแนวทางในการใช้จุลินทรีย์ทะเลมาเป็นแหล่งของกรดไขมันจำเป็นชนิดดีเอชเอ และอีพีเอ ในการเสริมหรือทดแทนจากแหล่งอื่น ๆ

สมมุติฐานของการศึกษา

จุลินทรีย์ทะเลที่คัดแยกได้มีชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่แตกต่างกัน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

จากการศึกษาครั้งนี้จะได้สายพันธุ์จุลินทรีย์ทะเลจากบริเวณแนวปะการังและหญ้าทะเล ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง กลุ่มโอเมก้า–3 ที่มีความสำคัญได้แก่ ดีเอชเอ และอีพีเอ นอกจากนั้นผลที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเสริมกรดไขมันดังกล่าวในอาหารเลี้ยงสัตว์เช่น ไก่ หมู ปลาและกุ้ง เป็นต้น ซึ่งเป็นการถ่ายทอดกรดไขมันดังกล่าวมาสู่มนุษย์ในที่สุด นอกจากนั้นการนำจุลินทรีย์ทะเลที่ได้ไปสกัดน้ำมันที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง เพื่อประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ ตลอดจนอาหารเสริมของมนุษย์ในอนาคต ซึ่งเป็นประโยชน์ในการช่วยลดการเสียดุลย์การค้ากับต่างประเทศ จากการนำเข้าอาหารเสริมที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงนี้

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ และสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

ขอบเขตของการวิจัย

ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มที่คาดว่ามีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงจากตัวอย่างน้ำทะเล บริเวณแนวปะการัง และตัวอย่างหญ้าทะเล แล้ววิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัว

บทที่ 2

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

ลิปิด (Lipid)

ลิปิด หมายถึง กรดไขมันและอนุพันธ์ รวมถึงสารอื่นๆ ที่ทำหน้าที่ใกล้ชิดกับกรดไขมันและอนุพันธ์ (วินัย ดะห์ลัน, มปป.) ลิปิดเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญทางชีวเคมีของเมมเบรน มีผลต่อขบวนการควบคุมสมดุลของน้ำและเกลือแร่ (Osmoregulation และ Ionic regulation) การสืบพันธุ์ การนำสารอาหารไปใช้ ตลอดจนการลำเลียงสารอาหาร (Borlongan and Benitez, 1992) สามารถสกัดได้จากเซลล์หรือเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตที่ละลายได้ในสารอินทรีย์ เช่น คลอโรฟอร์ม อีเทอร์ เบนซีน เป็นต้น (Voet and Voet, 1995) ลิปิดที่พบในธรรมชาติมักไม่อยู่ในสภาพอิสระ จะประกอบอยู่กับชีวโมเลกุลอื่น เช่น ถ้ารวมอยู่กับคาร์โบไฮเดรตเรียกว่าไกลโคลิปิด (glycolipid) และรวมอยู่กับโปรตีนเรียกว่าลิโปโปรตีน (lipoprotein) ลิปิดแบ่งออกได้หลายประเภท ส่วนใหญ่ประกอบด้วยองค์ประกอบที่เรียกว่ากรดไขมัน

ชนิดของลิปิด

ลิปิดสามารถจำแนกได้หลายแบบคือ

1. ลิปิดจำแนกตามโครงสร้างทางเคมี แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

1.1. Simple lipid เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันกับแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ ซึ่งแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยๆ ได้แก่

1.1.1 ไขมัน (fat) เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมัน 3 โมเลกุล กับกลีเซอรอล 1 โมเลกุล เรียกว่า ไตรกลีเซอรอล หรือไตรเอซิลกลีเซอรอล ไขมันมีสถานะเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้อง หากมีสถานะเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง เรียกว่า น้ำมัน (oils)

1.1.2 แวกซ์ (waxes) เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันกับแอกอฮอล์ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลเพียงหมู่เดียว (monohydric alcohol) และมีน้ำหนักโมเลกุลสูง

1.2 Compound lipid เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันกับแอลกอฮอล์และมีสารอื่นรวมอยู่ด้วย ได้แก่

1.2.1 ฟอสฟอลิปิด (phospholipid) เป็นกลุ่มของลิปิดที่โมเลกุลประกอบด้วยกรดไขมัน แอลกอฮอล์ กรดฟอสฟอริค เบสที่มีไนโตรเจน และอาจมีสารประกอบอื่นๆ ด้วย

1.2.2 ไกลโคลิปิด (Glycolipid) เป็นกลุ่มของลิปิดที่โมเลกุล ประกอบด้วยกรดไขมัน คาร์โบไฮเดรต เบสที่มีไนโตรเจน แต่ไม่มีกรดฟอสฟอริค

1.2.3 ลิปิดเชิงประกอบอื่นๆได้แก่ ไลโปโปรตีน ซัลโฟลิค และอะมิโนลิค

1.3 Derived lipid เป็นสารประกอบที่ได้จากไฮโดรไลซิลของลิปิด 2 กลุ่มแรกได้แก่ กรดไขมัน กลีเซอรอล โมโนกลีเซอไรด์ รวมทั้งสเตอรอยด์ โคเลสเตอรอล วิตามินที่ละลายได้ในไขมัน แคโรทีนอยด์ พรอสตาแกลนดิน เทอร์ปีน ควีโนน และคีโตนบอดีส์ (ศิริวรรณ เพชรสมบัติ, 2541)

2. ลิปิดจำแนกตามคุณสมบัติ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

2.1 Neutral lipid ได้แก่ ไตรกลีเซอไรด์ โคเลสเตอรอล สเตอรอยด์อื่นๆ รวมทั้งวิตามินที่ละลายในไขมัน คือ วิตามินเอ วิตามินดี วิตามินอี และวิตามินเค ลิปิดกลุ่มนี้มีสมบัติเป็นกลาง

2.2 Amphiphilic lipid ได้แก่ ฟอสโฟลิปิดชนิดต่างๆ เช่น เลซิติน และสฟิงโกมัยอิลิน ลิปิดกลุ่มนี้มีสมบัติเป็น bilayer เนื่องจากส่วนของโมเลกุลมีทั้งที่เป็นโพลาร์ (polar) ซึ่งละลายน้ำได้ และส่วนที่เป็นนอนโพลาร์ (nonpolar) ซึ่งไม่ละลายน้ำ ดังนั้นสารประกอบพวกฟอสโฟลิปิดจึงหมุนตัวอยู่ที่ผิวของสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่า หรือบนผิวน้ำ หรือแทรกตัวอยู่ระหว่างผิวของของเหลว 2 ชนิดที่ไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน สมบัติของฟอสโฟลิปิดเหล่านี้ จึงมีความสำคัญต่อการทำหน้าที่เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างของเซลล์เมมเบรนและการนำไปใช้ประโยชน์เป็น surfactants หรือ emulsifying agent

3. ลิปิดจำแนกตามหน้าที่ในสิ่งมีชีวิต แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

3.1 ลิปิดที่ทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมพลังงาน ลิปิดส่วนใหญ่ที่สะสมอยู่ในร่างกายจะอยู่ในรูปไตรกลีเซอไรด์ นอกจากนี้ยังพบได้ตามเนื้อเยื่อต่างๆ ทั้งของพืชและสัตว์ เป็นแหล่งสะสมพลังงานให้กับเซลล์ กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ที่ร่างกายสะสมไว้จะผันแปรตามชนิดของกรดไขมันในโมเลกุลของไตรกลีเซลไรด์ที่ได้รับจากอาหาร

3.2 ลิปิดทำหน้าที่เป็นโครงสร้าง ได้แก่ฟอสโฟลิปิด และ โคเลสเตอรอล ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของเนื้อเยื่อต่างๆ ในร่างกาย และเนื้อเยื่อสมอง ชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบมีความสำคัญต่อชนิดของเนื้อเยื่อซึ่งมีความจำเพาะเจาะจง ถึงแม้ว่าชนิดของกรดไขมันจะผันแปรตามชนิดและปริมาณอาหารที่ร่างกายได้รับก็ตาม แต่ร่างกายสามารถสังเคราะห์ลิปิดบางชนิดได้ (อัคนิตย์ อิทธิอาภา, 2541)

กรดไขมัน (Fatty acids)

กรดไขมันเป็นสารที่พบมากที่สุดในกลุ่มลิปิด แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1. กรดไขมันอิ่มตัว (Saturated fatty acids) เป็นกรดไขมันที่โซ่คาร์บอนสั้นและไม่มีพันธะคู่ (double bond) จึงทำให้มีจุดหลอมเหลวสูง (มากกว่า 60 ^{0}C) ดังนั้นกรดไขมันชนิดนี้จึงแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง และกรดอะซีติด (Acetic, CH_3COOH) จะเป็นต้นกำเนิดของกรดไขมันอิ่มตัว โดยขบวนการ elongation คือการเพิ่มจำนวนคาร์บอนเข้าไปครั้งละ 2 อะตอม น้ำมันที่มีกรดไขมันอิ่มตัวเป็นองค์ประกอบอยู่มากจะอยู่ในสภาพที่เป็นไขและมีสภาพแข็งตัวเมื่ออุณหภูมิต่ำ หรือในฤดูหนาว เช่น น้ำมันหมู น้ำมันวัว เป็นต้น กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่พบเป็นองค์ประกอบในน้ำมันทั่วไป เช่น Myristic acid (14:0) Palmitic acid (16:0) และ Stearic acid (18:0)

2.. กรดไขมันไม่อิ่มตัว (Unsaturated fatty acids) เป็นกรดไขมันที่มีโซ่คาร์บอนยาว (18-22 อะตอม) และมีพันธะคู่ตั้งแต่ 1-6 คู่ กรดไขมันกลุ่มนี้ มีจุดหลอมเหลวต่ำ โดยจุดหลอมเหลวของกรดไขมันแต่ละชนิด ขึ้นอยู่กับจำนวนคาร์บอนอะตอม จำนวนพันธะคู่ในโมเลกุลและตำแหน่งของพันธะคู่ โดยทั่วไปกรดไขมันไม่อิ่มตัวอยู่ในสภาพที่เป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง และบางชนิดยังเป็นของเหลวที่จุดเยือกแข็ง เช่น ลิโนเลนิค (18:3 n-3) ซึ่งมีจุดหลอมเหลวที่ -10^{0} C ในขณะที่กรดอีพีเอ (20:5 n-3) มีโซ่คาร์บอนโมเลกุลยาวถึง 20 โมเลกุล มีพันธะคู่ 5 คู่ จึงทำให้กรดไขมันชนิดนี้มี จุดหลอมเหลวต่ำคือ -54.4 ^{0}C เป็นต้น กรดไขมันไม่อิ่มตัวพบเป็นองค์ประกอบอยู่มากในพืชและน้ำมันจากสัตว์น้ำ ดังตารางที่ 1 และตารางที่ 2 (กฤษณา รุ่งเรืองศักดิ์, 2521)

ตารางที่ 1 กรดไขมันอิ่มตัวชนิดต่างๆ (อัคนิตย์ อิทธิอาภา, 2541)

ชื่อสามัญ	สูตร	สัญลักษณ์ย่อ	จุดหลอมเหลว(C^{0})
กรดบิวไทริค(butyric)	$C_4H_8O_2$	4:0	-7.9
กรดคาโพรอิค(capoic)	$C_6H_{12}O_2$	6:0	-3.4
กรดคาไพริค(caprylic)	$C_8H_{16}O_2$	8:0	16
กรดคาพริค(capric)	$C_{10}H_{20}O_2$	10:0	31
กรดลอริค(lauric)	$C_{12}H_{24}O_2$	12:0	44
กรดไมริสตริก(myristic)	$C_{14}H_{28}O_2$	14:0	54
กรดปามิติก(palmitic)	$C_{16}H_{32}O_2$	16:0	63
กรดสเตรียริค(stearic)	$C_{18}H_{36}O_2$	18:0	70
กรดอะราชิดิก(arachidic)	$C_{20}H_{40}O_2$	20:0	76

ตารางที่ 2 กรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดต่างๆ (อัคนิตย์ อิทธิอาภา, 2541)

ชื่อสามัญ	สูตร	สัญลักษณ์	จุดหลอมเหลว(C^0)
กรดปามิโตเลอิค (palmitoleic)	$C_{16}H_{30}O_2$	16:1, n-7	0.5
กรดโอเลอิค (oleic)	$C_{18}H_{34}O_2$	18:1, n-9	13.4
กรดไลโนเลอิค (linoleic)	$C_{18}H_{32}O_2$	18:2, n-6	-5.0
กรดไลโนเลนิค (linolenic)	$C_{18}H_{30}O_2$	18:3, n-3	-11.0
กรดอะราชิโดนิค (arachidonic)	$C_{20}H_{32}O_2$	20:4, n-6	-49.5
กรดไอโคซะเพนตะอีโนอิค (ecosapentaenoic)	$C_{20}H_{30}O_2$	20:5, n-3	-54.0
กรดโดโคซะเฮกซะอีโนอิก (docosahexaenoic)	$C_{22}H_{32}O_2$	22:6, n-3	-44.0

กรดไขมันไม่อิ่มตัว สามารถแบ่งย่อยออกเป็น 2 ชนิด คือ

2.1 Monounsaturated fatty acid คือ กรดไขมันที่มีพันธะคู่เพียงคู่เดียว เช่น 16:1 n-7 และ 20:1 n-9 เป็นต้น กรดไขมันเหล่านี้สามารถสังเคราะห์ขึ้นมาได้โดยกรดไขมันไม่อิ่มตัว

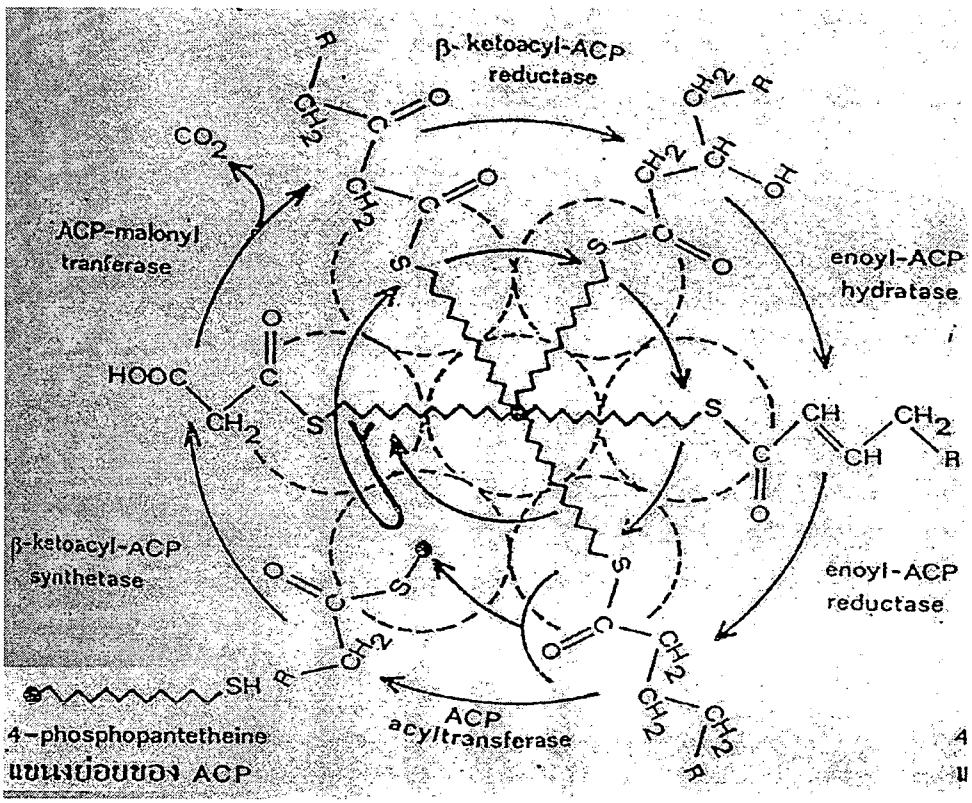
2.2 Polyunsaturated fatty acid (PUFA) คือกรดไขมันที่มีจำนวนพันธะคู่ตั้งแต่ 2 คู่ขึ้นไป เช่น 18:2 n-6, 18:3 n-6, 20:4 n-6 และ 20:5 n-3 เป็นต้น และกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 20 และจำนวนพันธะคู่ตั้งแต่ 3 ขึ้นไป จะเรียกว่า Highly unsaturated fatty acid (HUFA) โดยทั่วไปใช้เรียกกรดไขมันในกลุ่มโอเมก้า-3 (n-3) ดังนั้น n-3 HUFA จึงประกอบไปด้วย 20:3 n-3, 20:4 n-3, 20:5 n-3, 22:6 n-3) (Luthisungneon, 1998)

การผลิตกรดไขมัน

1. การสังเคราะห์กรดไขมัน

การสังเคราะห์กรดไขมัน เกิดขึ้นในไซโตปลาซึม โดยโปรตีน 7 ชนิด ประกอบด้วยเอนไซม์ 6 ชนิดรวมเรียกว่า fatty acid synthetase complex และ acyl carrier protein มี acetyl CoA เป็นสารตั้งต้น เมื่อ malonyl CoA ที่ถูกสร้างจาก acetyl CoA ถูกเปลี่ยนเป็น malonyl-ACP และเข้าขบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน ซึ่งประกอบไปด้วย 6 ปฏิกริยาคล้ายวัฏจักร โดยใช้เอนไซม์ทั้ง 6 ดังภาพที่ 1

(ดาวัลย์ ฉิมภู่, 2538) หนึ่งวัฏจักรของการสังเคราะห์จะเพิ่มคาร์บอนสองตัวจนได้กรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนตามที่ต้องการ

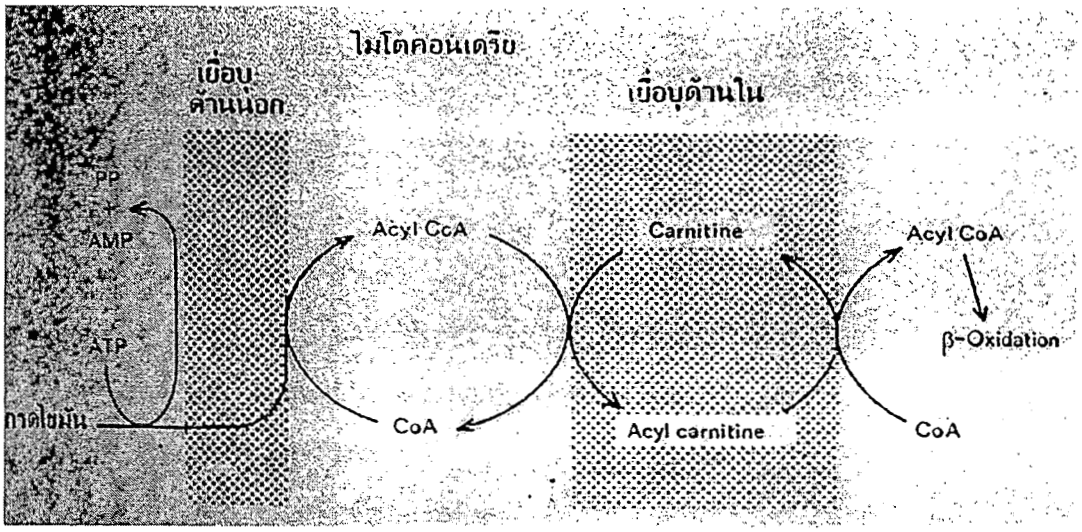


ภาพที่ 1 เอนไซม์ fatty acid synthetase complex กับการสังเคราะห์กรดไขมัน (ดาวัลย์ ฉิมภู่, 2538)

กรดไขมันที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจะถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์ลิปิดอื่นๆ เช่นไตรเอซิลกลีเซอรอล และ ฟอสโฟกลีเซอไรด์ เก็บสะสมไว้ นอกจากวิถีทางที่กล่าวมาแล้วเซลล์ยังมีขบวนการสังเคราะห์ลิปิดอื่นๆ อีก ซึ่งวิถีเหล่านั้นจะขึ้นอยู่กับชนิดและประเภทของลิปิด

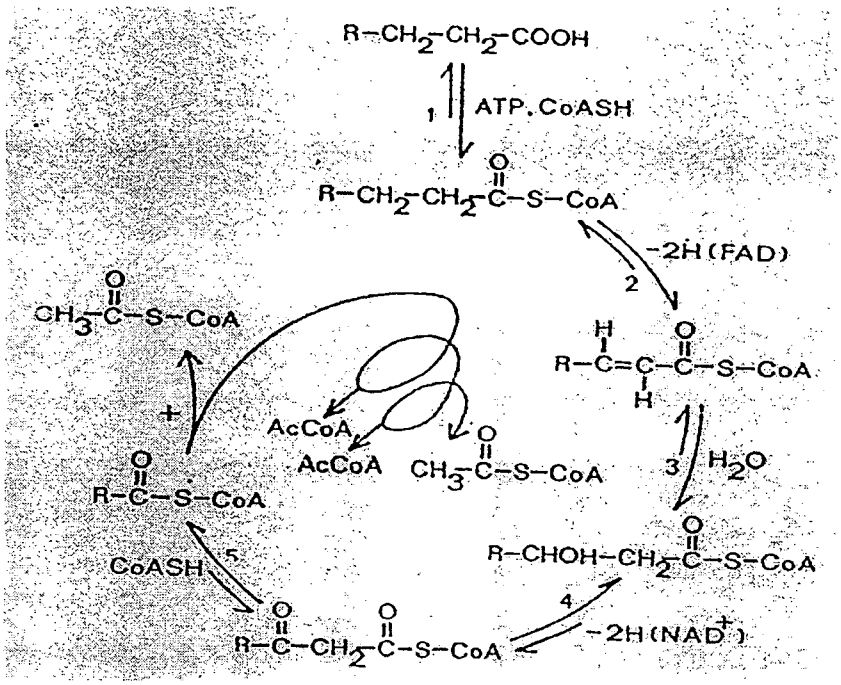
2. การสลายกรดไขมัน

ลิปิดที่สะสมไว้ในรูปของไตรเอซิลกลีเซอรอล และฟอสโฟกลีเซอไรด์ จะถูกย่อยโดยเอนไซม์ไลเปส และฟอสโฟไลเปส ตามลำดับ ให้ได้กรดไขมันอิสระซึ่งจะถูกนำเข้าไมโตคอนเดรีย โดยตัวพา carnitine ในรูปของ acyl carnitine (สุนันทา ภิญญาวัธน์, 2535) ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ปฏิกิริยา activation และการนำกรดไขมันเข้าไมโตคอนเดรีย (สุนันทา ภิญญาวัธน์, 2535)

กรดไขมันเหล่านี้ จะถูกนำไปใช้ในการสร้างพลังงานให้แก่เซลล์ โดยเข้าขบวนการ บีต้า-ออกซิเดชั่น ดังรูปที่ 3 ผลผลิตสุดท้ายสำหรับกรดไขมันอิ่มตัวที่มีจำนวนคาร์บอนเป็นเลขคู่ คือ acetyl CoA, $FADH_2$ และ NADH ส่วนกรดไขมันอิ่มตัวที่มีจำนวนคาร์บอนเป็นเลขคี่ จะได้ propionyl CoA เพิ่มขึ้นอีก 1 โมเลกุล โดย acetyl CoA จะถูกนำเข้าวัฏจักรเครบส์ และขบวนการ oxidative phosphorylation สำหรับการสร้างพลังงานในรูป ATP ส่วน $FADH_2$ และ NADH จะเข้าสู่ขบวนการ oxidative phosphorylation โดยตรง สำหรับ propionyl CoA ก็จะถูกเปลี่ยนเป็น succinate เข้าสู่วัฏจักรเครบส์ต่อไป นอกจากนี้ไขมันอาจถูกสลายโดยขบวนการ ω-oxidation ซึ่งยังไม่ทราบหน้าที่แน่นอน หรือโดยขบวนการ α-oxidation ซึ่งพบในพืชตลอดจนเซลล์สมองและเซลล์ตับ (กฤษณา รุ่งเรืองศักดิ์, 2521)

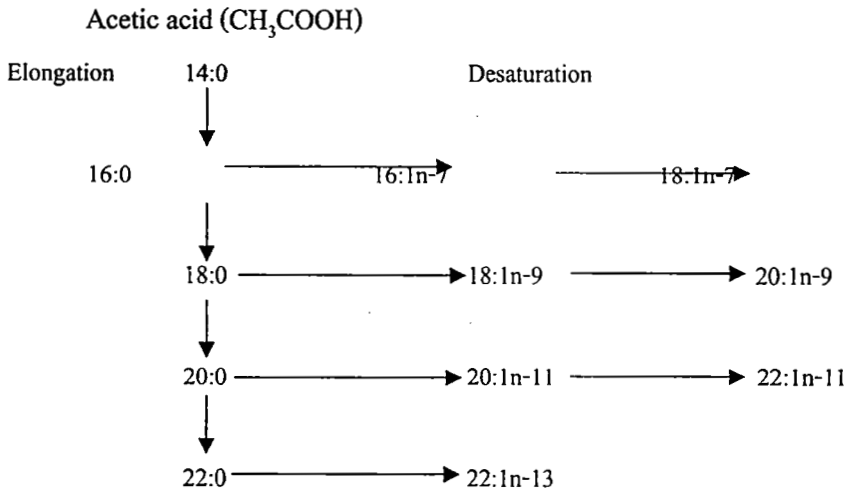


ภาพที่ 3 การเกิดบีต้า-ออกซิเดชั่นของกรดไขมันเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง (กฤษณา รุ่งเรืองศักดิ์, 2521)

1. Fatty acid thiokinase
2. Fatty acyl-CoA dehydrogenase
3. Enoyl hydrase
4. β-Hydroxyacyl dehydrogenase
5. ββ-Ketoacyl thiolase

ในการสลายกรดไขมัน acetyl CoA ที่อาจถูกเปลี่ยนไปเป็น acetoacetate และ D-β-hydroxybutyrate สารนี้รวมทั้งอะซิโตน เรียกว่า คีโตนบอดี จะถูกส่งผ่านไปยังกระแสเลือดเข้าสู่เซลล์ เพื่อให้เกิดออกซิเดชั่นอย่างสมบูรณ์ในวัฏจักรเครบส์ ปกติเลือดจะมีปริมาณคีโตนบอดีต่ำมาก ในขณะที่ร่างกายขาดพลังงานจากสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต ลิปิดจะถูกย่อยสลายเป็นกรดไขมันเพื่อนำไปใช้ในการสร้างพลังงานทดแทน ทำให้ปริมาณ acetyl CoA สูง มีผลให้ปริมาณคีโตนบอดีสูงขึ้นด้วย ถ้าหากมีปริมาณคีโตนบอดีสะสมอยู่มากในเลือด จะทำให้เกิดภาวะ ketosis (ดาวัลย์ ฉิมภู่, 2538)

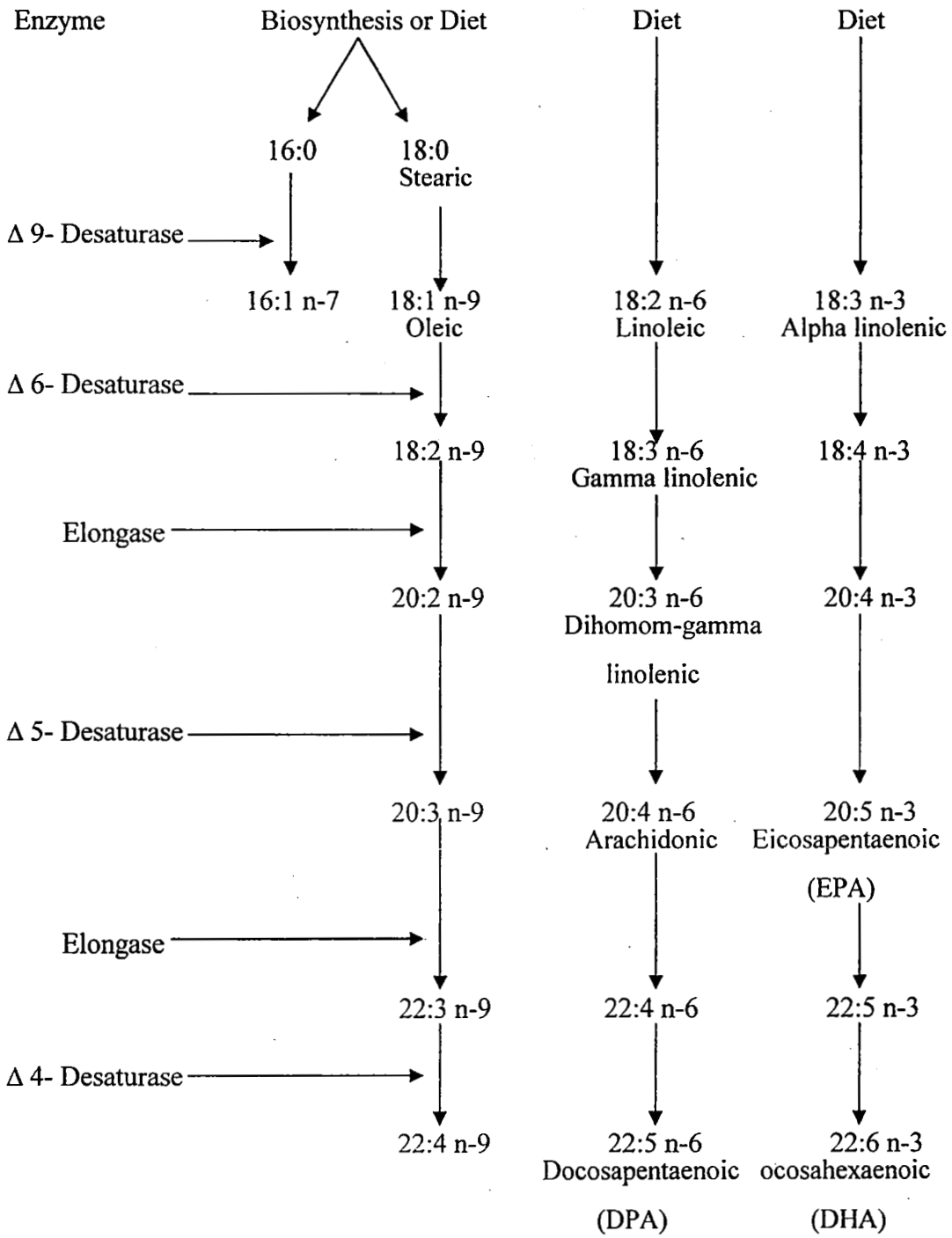
กรดไขมันต้นกำเนิดของแต่ละกลุ่ม จะถูกนำไปสังเคราะห์กรดไขมันที่มีความสำคัญต่อร่างกาย ซึ่งจะมีจำนวนคาร์บอนที่สูงขึ้น (โดยขบวนการ Elongation) และมีความไม่อิ่มตัวสูงขึ้น คือมีจำนวนพันธะคู่มากขึ้น (โดยขบวนการ Desaturation) ดังภาพที่ 4 ทั้งนี้กรดไขมันต้นกำเนิดจะสามารถสังเคราะห์กรดไขมันเฉพาะภายในกลุ่มเท่านั้นดังภาพที่ 5



ภาพที่ 4 Desaturation-Elongation parthway ของกรด Acetic (CH_3COOH) (สุพิศ ทองรอด, 2535)

สำหรับกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงเช่น กลุ่มกรดไขมันโอเมก้า-3 พบว่า แมทาบอลิซึม ในร่างกายมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

กรดไขมันในกลุ่มโอเมก้า-3 นี้สามารถป้องกันและรักษาโรคบางชนิดได้ เนื่องจากในระบบเมทาบอลิซึมมีการเปลี่ยนกรดไขมันเป็นสารพวก eicosanoid ที่มีคุณสมบัติคล้ายฮอร์โมน เช่น prostaglandin (PG) thromboxanes (TX) และ leukotrienes (LT) กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงมีอยู่ 2 ประเภท คือ กลุ่มโอเมก้า-3และโอเมก้า-6 จะถูกใช้เป็นสารตั้งต้นของการสร้าง eicosanoid ที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกันมากแต่ eicosanoid ที่ได้มาจากกรดไขมันทั้งสองกลุ่มนี้จะมีหน้าที่ในทางตรงกันข้าม เช่น การสร้าง thromboxanes A_2 จาก arachidonic acid จะทำให้เกิดการรวมกลุ่มของเกล็ดเลือดซึ่งจะถูกยับยั้งด้วย thromboxanes A_3 ที่สร้างมาจากอีพีเอ ที่มีคุณสมบัติต้านการรวมตัวของเกล็ดเลือดบริเวณผนังหลอดเลือด (เดือนทิพย์ ปียรัตน์, 2538) ทำให้สามารถลดความหนืดของเลือดลงและช่วยเพิ่มระดับภาวะของเหลวในเมมเบรน



ภาพที่ 5 Elongation and desaturation pathways ของครอบครัว n-7, n-9, n-6 and n-3 ที่ถูกสร้างขึ้นในสัตว์ (ดัดแปลงจาก Bell *et al.*, 1986 และ Gunstone, 1996)

กรดไขมันจากจุลินทรีย์

กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงที่นำมาผลิตเชิงพาณิชย์สกัดจากน้ำมันปลาและน้ำมันตับปลา แต่น้ำมันปลาและน้ำมันตับปลา มักพบปัญหาอันเนื่องมาจากความไม่สม่ำเสมอของกรดไขมัน การควบคุมคุณภาพ และน้ำมันปลามีกรดไขมันหลากหลายชนิดทำให้ยากต่อการแยกกรดไขมันตัวที่ต้องการให้บริสุทธิ์ได้ นอกจากนั้นคุณภาพของกรดไขมันไม่อิ่มตัวยังขึ้นกับปลาที่จับได้ในแต่ละฤดูกาล หรือแหล่งที่จับ รวมทั้งการไม่ยอมรับของผู้บริโภคบางกลุ่มเพราะการมีกลิ่นคาวปลาในผลิตภัณฑ์ดังกล่าว และน้ำมันปลายังถูกออกซิไดซ์ได้ง่ายทำให้คุณภาพลดน้อยลง (Sargent et al., 1999)

ผลผลิตของน้ำมันปลาทั่วโลกประมาณ 1 ล้านตัน คิดเป็นปริมาณของกรดไขมันในกลุ่มโอเมก้า-3 ประมาณ 100,000-250,000 ตัน เมื่อนำมาสกัดเป็นอีพีเอและดีเอชเอ พอสำหรับคนเพียง 55-140 ล้านคนที่มีความต้องการบริโภควันละ 5 กรัมเท่านั้น อย่าไรก็ตามน้ำมันปลาเหล่านี้ เกือบทั้งหมดถูกนำไปใช้ในการผลิตมาการีน โดยผ่านกระบวนการ hydrogenation เนื่องจากคุณภาพน้ำมันปลาต่ำเกินกว่าที่จะนำไปใช้กับการบริโภคโดยตรง (เดือนทิพย์ ปิยรัตน์, 2538)

นักวิทยาศาสตร์ได้หันมาสนใจคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง เพื่อนำมาเป็นทางเลือกใหม่ของแหล่งกรดไขมันที่ต้องการ จุลินทรีย์ที่มีโอกาสนำมาใช้ในการผลิตกรดไขมันมีทั้งกลุ่มที่เป็นโปรคาริโอตได้แก่ แบคทีเรีย และไซยาโนแบคทีเรีย ส่วนพวกยูคาริโอตได้แก่ รา สาหร่าย และโปรโตซัว จุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มนี้มีองค์ประกอบของกรดไขมันแตกต่างกัน กลุ่มโปรคาริโอต (prokaryotes) เช่น แบคทีเรียต่างๆ มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว C18:1 เป็นส่วนใหญ่ ยกเว้นแบคทีเรียบางชนิดที่พบว่ามีอีพีเอรวมอยู่ด้วย ส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่พบในกลุ่มไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) ส่วนมากจะมีจำนวนคาร์บอนอะตอมและพันธะคู่จำกัดเพียง C18:3 เท่านั้น ส่วนพวกยูคาริโอต (eukaryotes) กรดไขมันที่พบมักจะอยู่ในรูป polar lipid ซึ่งมีโครงสร้างแตกต่างกันมาก เช่น ความยาวของสายคาร์บอน ความไม่อิ่มตัวและตำแหน่งพันธะคู่ โดยที่สาหร่ายและรา จะมี PUFA ในรูป C18:3 เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งอาจเป็นได้ทั้งกรดไขมันโอเมก้า-3 และ โอเมก้า-6 (Otero et al., 1997)

1. โปรคาริโอต

1.1 แบคทีเรีย ส่วนใหญ่จะสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวในวิถี anaerobic โดยปกติแล้วไม่สร้างสาย polyenoic fatty acids ได้โดยตรงเช่นเดียวกับสิ่งมีชีวิตชั้นสูง แต่จะสร้างสาย monoenoic fatty acids โดยอาศัยปฏิกิริยา desaturation ต่อมามีการศึกษาพบว่าแบคทีเรียทะเล 88 ชนิด สามารถผลิตอีพีเอ ได้ในช่วง 0.1-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบสายพันธุ์ที่ผลิตอีพีเอได้สูงคือ สกุล *Alteromonas* สามารถผลิตอีพีเอได้ถึง 26 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 25^{0}C แต่สามารถผลิตอีพีเอได้สูงถึง 40% ของกรดไขมันทั้งหมด ที่อุณหภูมิ 4^{0}C โดยไม่มีการผลิต PUFA ตัวอื่นนอกจากอีพีเอ (เดือนทิพย์ ปิยรัตน์, 2538) ส่วน *Shewanella purrefaciens* ที่แยกได้จากลำไส้ของปลาทะเลบางชนิด สามารถผลิตกรดไขมันชนิดอีพีเอได้แต่ไม่พบดีเอชเอ (Yazama et al. , 1992) นอกจากนี้แหล่งของกรดไขมันโอเมก้า-3 ที่ได้จากสาหร่าย

ทะเลขนาดเล็กได้มีผู้ให้ความสนใจมากกว่าแบคทีเรีย เนื่องจากมันเป็นผู้ผลิตขั้นต้นของอีพีเอและดีเอชเอในทะเล และยังเป็นแหล่งที่สำคัญในการส่งต่อกรดไขมันดังกล่าวไปยังสัตว์ทะเลอื่นๆ ตามห่วงโซ่อาหาร รวมทั้งมนุษย์อีกด้วย

1.2 ไซยาโนแบคทีเรีย กรดไขมันส่วนใหญ่ที่ผลิตได้คือกรดไขมันที่มีคาร์บอน 12-18 อะตอม และมีพันธะคู่สูงสุด 4 คู่ ดังนั้นจึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (Grima et al., 1994)

2. พวกยูคาริโอต

2.1 ยีสต์ ส่วนใหญ่พบกรดไขมันไม่อิ่มตัวพันธะเดี่ยว สำหรับ PUFA ที่มีอยู่จะเป็น C18:2 (linoleic acid) และ C18:3 (linolenic acid) ตัวอย่างเช่น *Candida, Crytococcus, Hansenula, Lipomyces, Rhodotorula* (Zelles, 1997)

2.2 เชื้อรา กรดไขมันในเชื้อราจะคล้ายคลึงกับที่พบในจุลินทรีย์อื่น โดยจะเป็นกรดไขมันอิ่มตัว และกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีความยาวของคาร์บอนอะตอม 10-24 ตัว ส่วนใหญ่เป็นกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอน 16-18 ตัว เช่น C16:0, C18:1 และ C18:2 ซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว (Stahl and Klug, 1996)

ราชั้นสูง Class Ascomycetes และ Basidiomycetes รวมทั้ง Deuteromycetes มีปริมาณอีพีเอหรือดีเอชเอน้อยมากหรือไม่มีเลย (Yongmanitchai and Ward, 1989) ส่วนในกลุ่มของราชั้นสูง *Penicillium* พบว่าการวิเคราะห์กรดไขมันสามารถจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อได้ และพบว่า *Penicillum* ส่วนใหญ่จะผลิตกรดไขมันพวก C16:0, C18:1 และ linoleic C18:3 ส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงจะผลิตในปริมาณที่น้อยกว่า (Silva et al., 1998)

สำหรับราชั้นต่ำใน Class Phycomycetes เป็นเพียงกลุ่มเดียวที่อาจใช้เป็นแหล่งผลิต PUFA โดยเฉพาะ Order Mucorales จะมี ∝- linolenic acid (C18:3) ในปริมาณมาก และหลายสายพันธุ์ที่พบอีพีเอและเออาร์เอ (C20:4) ในปริมาณสูง เช่น *Mortierella ramanniana* และ *M. vinacea* ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ สภาวะการเพาะเลี้ยง และอุณหภูมิ (Jareonkitmongkol et al., 1992)

2.3 สาหร่าย (Algae) สาหร่ายเซลล์เดียวและหลายเซลล์เป็นแหล่งเริ่มต้นของการผลิตอีพีเอและดีเอชเอในปลาทะเล โดยองค์ประกอบของกรดไขมันที่พบในปลาและแพลงก์ตอนพืชเหมือนกัน จึงเข้าใจว่าปลาได้กรดไขมันจากการสะสมผ่านทางห่วงโซ่อาหารโดยมีสาหร่ายน้ำเค็มเป็นผู้ผลิต สาหร่ายสีเขียว Class Chlorophyceae มีการสะสมไขมันสูง แต่กรดไขมันอิ่มตัวอย่าง ยิ่งยวดจะอยู่ในรูปไอโซเมอร์ ดังตารางที่ 3 และจากการเลี้ยง *Chlorella* แบบ autotrophic ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของ CO_2 พบว่าสร้าง 16:0, 18:3, 16:4, 18:2, 16:3 ซึ่งคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญของจุลินทรีย์เซลล์เดียว เช่น พวกสาหร่ายสังเคราะห์แสง (Dickson et al., 1969)

ตารางที่ 3 ปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวในราชั้นต่ำ (เดือนทิพย์ ปิยรัตน์, 2538)

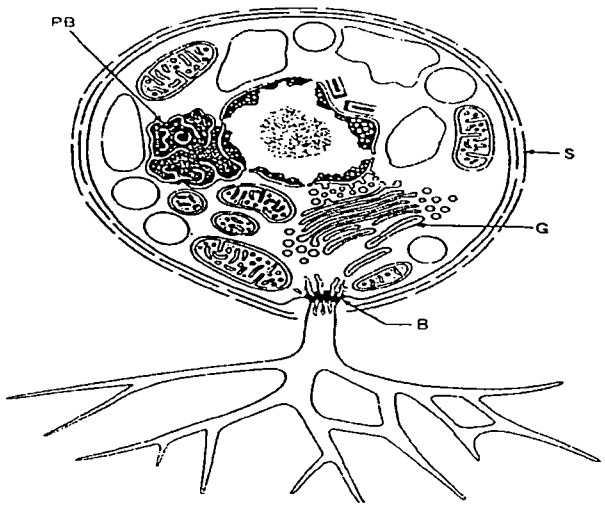
สิ่งมีชีวิต	กรดไขมันไม่อิ่มตัว (% of fatty acids)							
	18:2	18:3	18:4	20:3	20:4	20:5	22:5	22:6
Class Chytridomycetes								
Dermocystidium sp.	2	0	24	2	2	5	-	2
Class Oomycetes								
Order Peronosporales								
Pythium sp.	14	1	5	3	2	10	-	-
P. acanthicum	12	1	2	3	3	9	-	-
P. debaryanum	16	5	0	1	4	0	-	7
Phytophthora infestrans	5	0	0	2	10	0	-	8
Order Saprolegniales								
Schizochytrium aggregatum	3	0	2	2	4	4	-	11
Thraustochytrium aureum	2	0	0	0	5	6	-	34
Class Zygomycetes								
Order Entomophthorales								
Conidiobolus denaesporus	2	2	0	1	9	0	-	0
C. osmodes	6	2	0	0	14	0	-	0
Entomophthora sp.	4	2	0	0	12	0	-	0
E. obscura	0	0	0	1	4	0	-	24
E. thaxteriana	5	2	0	2	19	0	-	0
Order Mucorales								
Mortierella alpina	15	10	-	3	30	15	-	-
M. elongata 1S-4	8	4	-	-	17	-	-	-
M. elongata 1S-5	4	4	-	-	15	-	-	-
M. elongata 2S-13	6	14	-	-	20	-	-	-
M. hydrophila	10	11	-	3	14	10	-	-
M.renispora	8	6	2	6	6	27	-	-

ตารางที่ 3 (ต่อ)

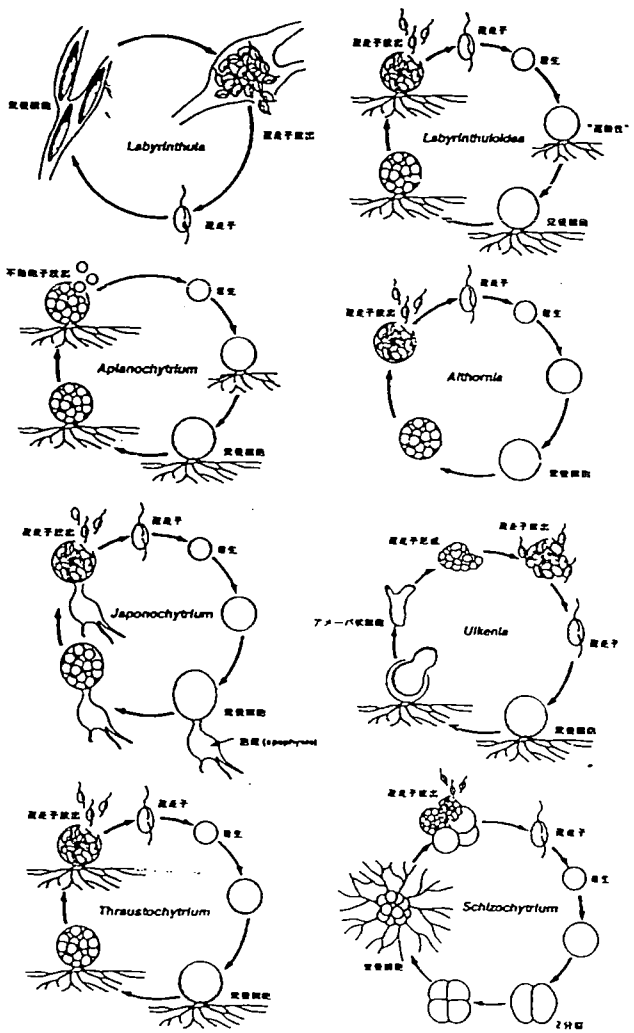
สิ่งมีชีวิต	กรดไขมันไม่อิ่มตัว (.% of total fatty acids)							
	18:2	18:3	18:4	20:3	20:4	20:5	22:5	22:6
Bacillariophyceae								
Asterionella japonica	1	0	0	-	11	20	3	-
Biddulphia sinensis	0	-	0	-	-	24	1	-
Chaetoceros eptentrionale	11	0	-	2	21	4	-	
Lauderia borealis	1	0	-	-	1	30	1	-
Navicula inceria	0	0	-	-	-	16	-	-
Nitzschia closterium	3	-	-	-	-	17	-	-
Phaeodactylum tricornutum	3	-	-	-	-	28	-	-
Skeletonema costatum	1	1	2	-	-	14	0	2

ทรอสโทคิทริด (Thraustochytrids)

ทรอสโทคิทริด เป็นจุลินทรีย์ทะเลที่จัดอยู่ในอาณาจักรสตรามิโนพิลา (Kingdom Straminopila) ซึ่งเป็นอาณาจักรที่มีลักษณะร่วมระหว่างเชื้อราและสาหร่ายทะเล พวกนี้มีบทบาทสำคัญในระบบนิเวศน์ โดยเป็นผู้ย่อยสลายและเป็นปรสิตของพืชหลายชนิด (อนุเทพ ภาสุระ, 2540; Manella et al., 1987) ทรอสโทคิทริดวงศ์ Thraustochytriaceae มีรูปร่างเป็นทรงกลม มีเอคโตพลาสมิคเน็ท (ectoplasmic net) หรือไรซอยด์ (rhizoid) ที่มีลักษณะเป็นร่างแห ช่วยในการดูดซึมอาหารและยึดเกาะดับซับเสตท ซึ่งถูกสร้างโดยซาจีโนเจน (sagenogen) ดังภาพที่ 6 (Alexopoulos et al., 1996) ทรอสโทคิทริดมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการสร้างซูโอสปอร์ (zoospores) ซึ่งลักษณะและจำนวนของซูโอสปอร์ภายในสปอร์แรงเจียม (sporangium) ตลอดจนรูปแบบการปล่อยซูโอสปอร์ออกจากสปอร์แรงเจียม ใช้ในการจำแนกชนิดของทรอสโทคิทริดได้ วงจรชีวิตของทรอสโทคิทริด แสดงในภาพที่ 7



ภาพที่ 6 แทลลัสของทรอสโทคิทริด: B = bothrosome, G = golgi body, S = scale, PB = paranuclear body (Alexopoulos, 1996)



ภาพที่ 7 วงจรชีวิตของทรอสโทคิทริด (Honda, 2001)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Thraustochytrids จัดเป็นกลุ่ม Fungoid protists ที่มีปริมาณกรดไขมันดีเอชเอสูงถึง 30 - 50 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าปริมาณดีเอชเอจะแตกต่างกันไปในแต่ละอุณหภูมิที่เลี้ยง ถ้าเลี้ยงในอุณหภูมิต่ำ ปริมาณดีเอชเอ ในเซลล์จะมากกว่าเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิสูง (Bajpai et al., 1991a)

Kendrick and Ratledge (1992) ศึกษากรดไขมันในจุลินทรีย์ทะเล *Thraustochytrium aureum* พบว่าผลิตกรดไขมันในกลุ่มโอเมก้า-3 โดยมีปริมาณของดีเอชเอสูงถึง 30 % ของกรดไขมันทั้งหมดในไตรเอซิลกรีเซอรอล ส่วนกรดไขมันตัวอื่น ๆ ที่พบได้แก่ C20:5, C22:5. C24:2 และ C26:2 อย่างไรก็ตาม T. *aureum* สายพันธุ์ ATCC 34304 และ ATCC 28211 ประกอบด้วยดีเอชเอถึง 47.4 % และ 52.3 % ตามลำดับ (Bajpai et al., 1991) แต่จากการศึกษาของ Singh and Ward (1996) พบว่า ดีเอชเอ ใน *Thraustochytrium* spp. และ *Schizochytrium* spp. มีค่าอยู่ในช่วง 1.5 –35 %ของกรดไขมันทั้งหมด

Iida et al. (1995) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตดีเอชเอของจุลินทรีย์ทะเลในกลุ่ม Thraustochytrids (*Thraustochytrids aureum* ATCC 34304) พบว่าสามารถผลิตกรดไขมันได้ถึง 5.79 g/l และ 400 mg/l ของกรดไขมันทั้งหมด และเมื่อเลี้ยงในขวดรูปชมพู่มีการผลิตดีเอชเอมากกว่าในถังหมัก

Nakahara et al. (1996) ทำการคัดแยกจุลินทรีย์ในทะเลในกลุ่ม Thraustochytridsสายพันธุ์ SR-21 จากแนวปะการังบริเวณหมู่เกาะ Yap พบว่าจุลินทรีย์ชนิดนี้มีปริมาณกรดไขมันดีพีเอ (22:5 n-6, DPA) ในปริมาณเท่ากับดีเอชเอ (22:6 n-3, DHA) SR-21 อยู่ในสกุล *Schizochytrium* Phylum Labyrinthulomycota มีการสร้าง zoosporangium และ zoospore หลังจากเลี้ยงในขวดรูปชมพู่และทำการหมัก พบว่าผลผลิตดีเอชเอและดีพีเอมีค่าเท่ากับ 2.0 g/l และ 0.44 g/l

Jaritkhuan et al. (1998) พบว่าจุลินทรีย์ทะเลในกลุ่ม Thraustochytrids (*Schizochytrium* sp.) มีปริมาณดีเอชเอสูงถึง 30-40 % ของกรดไขมันทั้งหมด เมื่อนำไปเป็นอาหารของอาร์ทีเมีย มันสามารถเพิ่มปริมาณดีเอชเอในอาร์ทีเมีย และเมื่อนำอาร์ทีเมียที่อุดมไปด้วยดีเอชเอนี้ไปเลี้ยงลูกกุ้งกุลาดำ (PL4-PL16) จะทำให้ลูกกุ้งมีปริมาณดีเอชเอสูงตามไปด้วยในลักษณะของการถ่ายทอดตามห่วงโซ่อาหาร และสามารถนำ Thraustochytrids ชนิดนี้ไปผสมเป็นอาหารเม็ดในการเลี้ยงลูกกุ้งกุลาดำวัยรุ่นเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอชเอในตัวกุ้งให้สูงขึ้นได้ดีอีกด้วย ซึ่งเป็นการเพิ่มหรือเสริมปริมาณดีเอชเอให้กับมนุษย์ทางอ้อมนั่นเอง (Jaritkhuan and Jones, 1999) นอกจากนั้นยังได้ทำการทดลองนำจุลินทรีย์ทะเลในกลุ่ม Thraustochytrids (*Schizochytrium* sp.) ไปทดลองกับลูกปลากะพงขาวเช่นเดียวกับลูกกุ้งกุลาดำ (Jaritkhuan, 2002)

Bowles et al. (1999) ได้ทำการคัดแยกเชื้อรา Thraustochytrids จากแต่ละแหล่งที่แตกต่างกัน 3 แหล่งได้ 57 ไอโซเลท ศึกษาน้ำหนักแห้ง การผลิตกรดไขมัน และการผลิตดีเอชเอ พบว่าแต่ละแหล่งที่ทำการคัดแยกมีดีเอชเอแตกต่างกัน เชื้อที่แยกได้จากบริเวณที่มีอุณหภูมิหนาวเย็นจะมีปริมาณดีเอชเอ

มากกว่าร้อยละ 50 ของกรดไขมันทั้งหมด ในขณะที่เชื้อจากบริเวณที่อบอุ่น จะมีน้ำหนักของเซลล์มากกว่าร้อยละ 37 (w/w) และปริมาณดีเอชเอต่ำ

Leano (2001) ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ในไฟลั่ม Straminipiles จากใบไม้ที่ร่วงหล่นในป่าชายเลน ประเทศฟิลิปปินส์ พบคือ *Halophytophthora* spp, *Schizochytrium* spp.และ *Thraustochytrium* sp. โดยจุลินทรีย์ทะเลดังกล่าวทำหน้าที่ในการย่อยสลายใบไม้

ยีสต์ (Yeasts)

ยีสต์เป็นราชั้นสูงในกลุ่ม sac fungi (Ascomycetes) ซึ่งอยู่ใน Phylum Ascomycota ยีสต์เป็นราที่มีเซลล์เดียว ซึ่งเซลล์อาจจะมีลักษณะกลม หรือรูปไข่ หรือบางทีอาจพบอยู่ในลักษณะหลายเซลล์ต่อกันสั้น ๆ หรือลักษณะคล้ายเส้นใยและมีการแตกกิ่งแขนง ยีสต์มีการเจริญเติบโตด้วยการแตกหน่อ และมีการแบ่งเซลล์แบบ Mitosis ที่ไม่เท่ากัน (Unequal Cytoplasmic Division) หน่อใหม่ที่เกิดขึ้นจะค่อย ๆ เจริญและแยกออกจากเซลล์แม่ในที่สุด

ยีสต์มี Mitochondria อยู่ภายในเซลล์ ขณะเมื่อมีออกซิเจนยีสต์สามารถออกซิไดส์น้ำตาลได้อย่างสมบูรณ์ เพื่อให้ได้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ แต่ Mitochondria ของยีสต์จะไม่ทำงานภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ดังนั้นยีสต์จึงต้องมีการปรับตัวเพื่อให้ได้พลังงานมาใช้ในเซลล์จากขบวนการ Anaerobic glycolysis โดยเมื่อมีอาหารและอากาศอย่างเพียงพอ ยีสต์ก็ยังสามารถใช้พลังงานจาก Anaerobic process ได้

ในวงชีวิตของยีสต์มีทั้งระยะที่เป็น Haploid และ Diploid ในระยะที่เป็น Diploid state นั้น เซลล์จะมีการสืบพันธุ์แบบ Asexual โดยการแบ่งเซลล์แบบ Mitosis และมีการแตกหน่อ (Budding)และอาจจะมีการแตกหน่อต่อไปเรื่อย ๆ หลังจากนั้นจะมีการสร้าง Haploid ascospore ภายในถุง ascus และ ascospore เหล่านี้ก็จะมีสารพันธุกรรมเช่นเดียวกับเซลล์แม่เดิม เมื่อเจริญขึ้นก็จะมีการแตกหน่อต่อไป ส่วนการสืบพันธ์แบบอาศัยเพศ (Sexual Reproduction) เมื่อมีการรวมกัน (Fusion) ของเซลล์ haploid 2 เซลล์ ก็จะได้ระยะ Diploid ใหม่อีกครั้งหนึ่งในวงชีวิตของยีสต์

เรารู้จักยีสต์ในขบวนการหมัก เพื่อให้เกิดการสร้างแอลกอฮอล์มาเป็นเวลานานตั้งแต่สมัยของหลุยส์ปาสเตอร์ เนื่องจากยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถเจริญได้ทั้งในที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (Facultative Organisms) คือสามารถสร้างพลังงานเพื่อใช้ในเซลล์ของตัวเองจากสารอินทรีย์ที่เหมาะสมภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน และภายในเซลล์ของยีสต์น้ำตาลจะถูกเปลี่ยนไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ เพื่อสร้างพลังงานภายใต้สภาวะที่มีอากาศ ดังนั้นน้ำตาลจึงเป็นแหล่งของการสร้างพลังงานของเซลล์ยีสต์ได้ และถ้าไม่มีอากาศปริมาณการสร้างพลังงานต่อโมเลกุลของน้ำตาลก็จะน้อยลงไปด้วย ตรงกันข้ามในขณะที่ไม่มีอากาศ จะเกิดขบวนการหมัก “Fermentation” ของน้ำตาล

และได้เอธานอลจากขบวนการหมักแทน การนำยีสต์มาใช้ประโยชน์ส่วนใหญ่จึงเป็นเรื่องของขบวนการหมักเพื่อให้ได้แอลกอฮอล์ โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมการทำเหล้า ไวน์ เบียร์ เป็นต้น

เมื่อมีการวิเคราะห์ลิปิดและกรดไขมันด้วยวิธีทางโครมาโตกราฟี โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Thinlayer และ Gas-Liquid Chromatography ข้อมูลความรู้ทางด้านองค์ประกอบของสารพวกลิปิดของเซลล์ยีสต์จึงเริ่มมีการรายงานมากขึ้น (Rose และ Harrison, 1971) และไม่นานมานี้เองนักชีวเคมีและนักสรีรวิทยาของเซลล์เริ่มมองเห็นคุณค่าและความสำคัญของลิปิดที่เซลล์เมมเบรนของยีสต์

ลิปิดในยีสต์ (Yeast Lipids)

1. <u>ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณลิปิดในยีสต์</u> ปริมาณลิปิดที่พบในยีสต์จะมีมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับ

1.1 ชนิดของยีสต์ ปริมาณลิปิดทั้งหมดที่พบในเซลล์ของยีสต์จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของยีสต์ โดยพบลิปิดอยู่ในช่วง 7-15 % (น้ำหนักแห้ง) เช่น *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula glutinis*, *Candida lipolytica* และ *Blastomyces dermatilidis* เป็นต้น และยีสต์บางชนิด อาจเรียกได้ว่าเป็น "Fat Yeast" เนื่องจากมีปริมาณลิปิดในเซลล์สูงมากถึง 30 – 60 % ของน้ำหนักแห้ง เช่น *Lipomyces starkeyi* และ *Rhodotorula graminis* เป็นต้น

1.2 วิธีการที่ใช้ในการสกัดลิปิด

ลิปิดเป็นสารประกอบที่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์มากบ้างน้อยบ้าง และผู้ที่ทำการสกัดมักจะใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกันหรือไม่ก็ผสมกัน ในการสกัดเพื่อหาปริมาณลิปิดได้มีรายงานที่ทำการสกัดลิปิดในยีสต์ด้วยปัจจัยที่แตกต่างกันไป พบว่าวิธีการสกัดที่ดีที่สุด คือ การสกัดยีสต์ที่ทำให้แห้งด้วยวิธี Freeze-Dried และใช้ Chloroform และ Methanol ในอัตราส่วน 1:1 (Federsen, 1962 อ้างโดย Rose and Harrison, 1971) โดยทำการสกัดลิปิดจาก *Cryptococcus Terriculus* ซึ่งบางรายงานใช้ Ethanol และ Benzene ในอัตราส่วน 1:4 (Kahane, 1963 อ้างโดย Rose and Harrison, 1971)

1.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโต

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและมีผลต่อองค์ประกอบของลิปิดในเซลล์ ยกเว้นการสร้างลิปิดใน "Fat Yeast" ตัวอย่างการสกัดลิปิดในเซลล์ของ *C. utilis* ที่เจริญใน Bath culture เมื่อเลี้ยงจนถึง Stationary phase หลังจากนั้นเมื่อกลูโคสในอาหารหมดไป ปริมาณของลิปิดในเซลล์ก็จะลดลงเรื่อย ๆ (Dawson and Crig, 1966 อ้างโดย Rose and Harrison, 1971)

อุณหภูมิในการเลี้ยงก็เป็นปัจจัยที่สำคัญอีกปัจจัยหนึ่ง เมื่อลดอุณหภูมิของการเลี้ยงยีสต์ *C. lipolytica* ลงจาก 25 องศาเซลเซียส เป็น 10 องศาเซลเซียส จะสามารถเพิ่มปริมาณลิปิดได้จาก 6.6% ถึง 8.5% (Kate and Baxter, 1962 อ้างโดย Rose and Harrison, 1971)

จากรายงานของ Castell et. al. (1969) อ้างโดย Rose and Harrison (1971) พบว่า pH และความเข้มข้นของ CO_2 มีอิทธิพลต่อปริมาณลิปิดในเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces. cerevisiae* โดยเมื่อ pH ของอาหารที่เลี้ยงที่ 5.5 และให้ปริมาณ Bicarbonate และ CO_2 ปริมาณลิปิดจะเพิ่มขึ้นถึง 2.7% แต่อย่างไรก็ตามถ้าเพิ่ม pH เป็น 6.0 และความเข้มข้นของ CO_2 คงที่ แต่เพิ่มความเข้มข้นของ Bicarbonate จะไม่มีการเพิ่มของปริมาณลิปิดในเซลล์

นอกจากนี้ปริมาณของลิปิดในเซลล์ยีสต์ ยังแปรเปลี่ยนตามความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย ถ้าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นจาก 0% เป็น 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาณลิปิดของ *C. albicans* เพิ่มสูงขึ้นจาก 0.32 เป็น 6.29% แต่อย่างไรก็ตามการเจริญเติบโตของยีสต์จะถูกยับยั้งได้ถ้ามีปริมาณเกลือเข้มข้นสูง นอกจากนี้ยังพบอีกว่าเมื่อมีการเลี้ยงยีสต์ในปริมาณความเข้มข้นของเกลือสูง ๆ นั้น พบว่าเซลล์ยีสต์จะมีการเจริญในหลาย ๆ ระยะใน bath culture แม้จะมีการเก็บเซลล์หลังจาก 48 ชั่งโมง พร้อม ๆ กัน (Rose and Harrison, 1971)

อย่างไรก็ตามมีรายงานแสดงถึงอิทธิพลของการขาดวิตามินต่อปริมาณการสร้างลิปิดในยีสต์ Haskell and Snall (1965) อ้างโดย Rose and Harrison (1971) พบว่าในยีสต์ *Hanseniaspora valbyensis* ที่ขาดวิตามิน Pyridoxine มีปริมาณลิปิดน้อยลงถึง 40% ของเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีวิตามินอย่างเพียงพบ และยังพบว่ายีสต์ที่เลี้ยงในอาหารที่ขาด panthothenate ก็มีการสร้างลิปิดที่น้อยกว่ายีสต์ที่เลี้ยงในอาหารปกติที่ไม่ขาดวิตามิน ซึ่งเป็นการทดลองที่พบในยีสต์ *Saccharomyces cererisiae* (Klein and Lipmann, 1953 อ้างโดย Rose and Harrison, 1971) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ายีสต์ที่เลี้ยงโดยให้ขาด inositol ก็จะมีการสร้าง phosphatidyl-inositol ลดลงด้วย

2. <u>องค์ประกอบของลิปิดในยีสต์</u>

2.1 ลิปิดภายในเซลล์ ซึ่งประกอบด้วย triacylglyceral, phospholipid และส่วนที่เป็น hydrocarbons ทั้ง triacylglyceral และ phospholipids รวมทั้ง sterols นับเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของลิปิดในเซลล์ยีสต์ ซึ่งองค์ประกอบทั้ง 3 ชนิดนี้สามารถแยกออกได้ด้วย Thin Layer Chromatography triacylglyceral เป็น triesters ของ glycerol และกรดไขมัน ซึ่งกรดไขมันมีตั้งแต่ C8หรืออาจน้อยกว่านี้จนถึง C24 แต่ส่วนใหญ่กรดไขมันที่พบคือ C16 และ C18 ซึ่งมีทั้งกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวโดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดไขมันชนิด C16:1 และ C18:1

สำหรับ Mono-enoic acid ในไขมันในยีสต์มักเป็น $\Delta^{9,10}$ ใน *C. utilis* จะมีกรดไขมันที่เป็น C18:3 แต่กรดไขมันเหล่านี้ มักจะไม่ถูกตรวจพบเมื่อมีการสกัดในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Diacylglyceral และ Mono-acylglyceral เป็นตัวแทนของ Diesters และ monoesters ของ glyceral ที่มีกรดไขมันที่มี long-chain ที่พบในการสกัดเซลล์ยีสต์

Phospholipids เป็น diesters ที่มาแทนที่ด้วย Sn-glycero-3-phosphoric acid ที่มีกรดไขมันที่มี long-chain phospholipids ที่พบมากได้แก่ phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol และ phosphatidylserine. ซึ่งสามารถแยกได้ด้วยวิธี TLC

ยีสต์บางชนิด เช่น *Lipomyces starkeyi* จะพบ phosphatidylserine เป็นปริมาณมากถึง 18 % ในขณะที่ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Saccharomyces carlsbergensis* พบในปริมาณน้อย ประมาณ 4 % (Litter, 1968 อ้างโดย Rose and Harrison, 1971)

2.2 ลิปิดภายนอกเซลล์

สำหรับ Extracellular lipids นั้นมีรายงานว่ามากกว่า 200 สายพันธุ์ของยีสต์ พบว่ามี extracellular lipid (Ruimen,1963 อ้างโดย Rose and Harrison, 1971) โดยปกติยีสต์ทุกชนิด ยกเว้นสายพันธุ์ที่แยกได้จากกระเพาะของปลาเทร้า ที่พบว่ามีการสร้างลิปิดออกมาภายนอกเซลล์นั้นเป็นยีสต์ที่ได้มาจากพืชทั้งสิ้น ส่วนใหญ่แยกได้จากบริเวณส่วนใบพืช (Ruimen,1956 อ้างโดย Rose and Harrison, 1971) ลิปิดที่ถูกสร้างออกมานอกเซลล์ยีสต์มีทั้งหมด 4 กลุ่มคือ

1. Sphingolipids พบปริมาณน้อยในส่วนของลิปิดภายในเซลล์ ในยีสต์หลายชนิด

2. Polyol fatty acid ester กลีเซอไรด์ ที่พบอยู่ภายในเซลล์ยีสต์ที่เป็น fatty acid esters ของ trihydric alcohol glycerol ความจริงแล้ว gercerides ไม่ได้ถูกสร้างออกมาภายนอกเซลล์โดยยีสต์ แต่ fatty acid esters ของ polyols อื่นๆ นั้นถูกสร้างออกมาภายนอกเซลล์ ลิปิดนี้ถูกสร้างออกมาภายนอกเซลล์ของ *Rhodotorula graminis* ซึ่งแยกได้จากผิวของใบต้นส้มในอินโดนีเซียและซูรินาม (Ruimen,1956 อ้างโดย Rose and Harrison, 1971) ทำให้เกิด hydrolysis และได้ polyhydric alcohols และ fatty acids และได้ผลอย่างเดียวกันนี้เมื่อมีการวิเคราะห์ปริมาณของลิปิดที่ส่งออกมาภายนอกเซลล์โดยยีสต์ *Rhodotorula. glutinis* (Deinema,1961 อ้างโดย Rose and Harrison, 1971) นอกจากนั้นยังพบกรดไขมันชนิด palmitic และ oleic เป็นปริมาณมากด้วย

3. Sophorosides ของ hydroxy fatty acids ในยีสต์ *Candida bogoriensis* และ *Torulopsis apicola* สร้าง extracellular lipid ในลักษณะที่ hydroxy group ของ fatty acid ต่อเชื่อมอยู่กับ glycosidic group ของ carbohydrate

4. Substituted acid ยีสต์ *Rhodotorula* ชนิดหนึ่งที่แยกได้จากกระเพาะของปลาเทร้า สามารถสร้าง 8,9,13 –trihydroxydocosanoic acid ซึ่งสามารถถูก acetylated และ esterified ในบางส่วนของ long-chain acids

ปัจจัยการเจริญเติบโตต่อปริมาณของลิปิดในเซลล์ยีสต์

ปริมาณลิปิดที่เป็นองค์ประกอบในยีสต์จะแปรเปลี่ยนตามปัจจัยต่างๆ ของการเจริญเติบโตด้วย ซึ่งเพียงแค่องค์ประกอบทางเคมีของอาหารเปลี่ยนไป ก็จะเห็นเยื่อหุ้มต่างๆ เปลี่ยนแปลงไปด้วย กลไกสำคัญที่ทำให้ปัจจัยสิ่งแวดล้อมเหล่านี้มีผลต่อองค์ประกอบของลิปิดในเซลล์ก็ยังไม่มีใครทราบแน่ชัด และคงจะต้องเป็นงานวิจัยที่สำคัญที่ต้องค้นหากันต่อไปในอนาคต

1. อัตราการเจริญเติบโต นักวิจัยส่วนใหญ่มักจะศึกษาที่ปริมาณการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบของลิปิดของยีสต์ ในช่วงระยะต่างๆ ของการเจริญใน batch culture (Dawson and Craig,1966) ซึ่งส่วนใหญ่แล้วจะมีผลต่อปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัว รวมทั้งสัดส่วนของ phospholipid ด้วย นอกจากนี้ยังพบด้วยว่า ในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ถ้าเลี้ยงที่ 30 °C ก็มีแนวโน้มที่จะสร้างกรดไขมัน C16 สูงกว่ากรดไขมันที่มี C18 และมีปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มากกว่า ถ้าการเจริญมีอัตราช้าลง (Hunter and Rose, 1971)

2. อุณหภูมิในการเจริญ อุณหภูมิในการเจริญของจุลินทรีย์มีผลต่อองค์ประกอบของลิปิดของเซลล์ เป็นที่ทราบกันมากว่าครึ่งศตวรรษในแทบจะทุกชนิดของสิ่งมีชีวิตว่าเมื่ออุณหภูมิในการเจริญลดลงจากอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum) การสร้างไขมันที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวนี้มักจะเพิ่มมากขึ้นไปด้วย ซึ่งอิทธิพลนี้ได้มีรายงานไว้ในการเลี้ยงแบบ batch-culture ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (Hunter and Rose, 1971) และยีสต์ *C. utilis* (Farrell and Rose, 1971) รวมทั้งยีสต์ *C. lipoliytica* (Katis and Baxter,1962) ซึ่งพบว่าเมื่อเลี้ยงโดยควบคุมให้มีปริมาณออกซิเจนคงที่ ปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัวจะถูกสร้างมากขึ้นเมื่ออุณหภูมิในการเจริญลดลงและเป็นการเลี้ยงยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* NCYC366 เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำลงจาก 30 °C ไปที่ 15 °C พบว่ามี phospholipid เพิ่มขึ้นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง phosphatidylcholine และ phosphatidic acid

2. ปริมาณออกซิเจน จากรายงานของ Jollow et al. (1968) พบว่า *Saccharomyces cerevisiae* ที่เจริญภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศในการเลี้ยงแบบ batch-culture สามารถสร้างลิปิดชนิดที่มีกรดไขมันอิ่มตัวได้ในปริมาณมากกว่าที่เลี้ยงแบบมีออกซิเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดไขมันที่มีคาร์บอน 10 ถึง 14 (C10 - C14)

การกระจายของลิปิดในเซลล์ของยีสต์

นอกจาก fat yeast แล้ว โดยทั่วไปลิปิดในยีสต์จะพบอยู่ตามบริเวณเยื่อหุ้มต่างๆ และพบว่ามีลิปิดก้อนเล็กๆ (droplets) อยู่ในเซลล์ของ fat yeasts และพวกนี้จะเป็นแหล่งของ triacylglycerols มีหลายรายงานด้วยเช่นกันที่พบว่ามี lipid droplets ภายในเซลล์ของยีสต์ที่ไม่ได้เป็น fat yeast เช่น *Saccharomyces cerevisiae* และ *C. utilis* แม้ว่าจะไม่ทราบว่าภายใน droplets เหล่านี้มีลิปิดชนิดใดอยู่บ้าง (Rose and Harrison, 1971) และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณของลิปิดของยีสต์ทั้งหมดกับ spharoplast

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

membrane ของ *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 366 แล้ว (Longley et al. (1968) อ้างโดย Rose and Harrison, 1971) พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนในเรื่องของปริมาณลิปิด แต่มีความแตกต่างอยู่บ้างในเรื่องของ phospholipid ซึ่งข้อมูลนี้ขัดแย้งอยู่บ้างกับที่คิดว่า มีการสะสมของ droplets ของ triacylglycerol ในช่วงของ logarithmic phase ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* แต่อย่างไรก็ตามยังเป็นสิ่งที่บอกไม่ได้แน่นอนในเรื่องนี้ แต่ก็มีความเป็นไปได้ที่ non-fat yeasts มีการสะสม lipid droplets เฉพาะในระยะ stationary phase ของการเจริญตามความคาดหมายของข้อมูลจาก Dawson and Craig (1966) และ Baraud et al.. (1970)

ที่ผนังเซลล์ของยีสต์พบลิปิดอยู่ประมาณ 1 – 12 % ของน้ำหนักแห้ง หรือประมาณ 0.1 – 1 % ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งความแตกต่างของข้อมูลนี้มีความเป็นไปได้ ทั้งในด้านของสรีรวิทยาของเซลล์ หรือแม้แต่ความไม่แน่นอนหรือไม่เที่ยงตรงของวิธีการวัดน้ำหนัก ซึ่งเป็นไปได้สำหรับการวัดน้ำหนักของสิ่งของปริมาณน้อยๆ เช่นผนังเซลล์ ในผนังเซลล์ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่ามีลิปิดอยู่ถึง 8 - 10 % (Nickerson, 1959) และยังมีรายงานอีกด้วยว่า ปริมาณของลิปิดของผนังเซลล์ยีสต์นั้นแปรเปลี่ยนตามความจำกัดของอาหารที่ใช้เลี้ยงด้วย เนื่องจากพบว่า ผนังเซลล์ยีสต์มีลิปิดอยู่มากที่สุด เมื่อมี NH_4^+ อย่างจำกัด ซึ่งพบลิปิดถึง 8 % ของน้ำหนักแห้งของผนังเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์ที่เลี้ยงด้วยการจำกัดปริมาณของกลูโคส แม้จะมีหลักฐานน้อยมากแต่ดูเหมือนว่า การกระจายของลิปิดชนิดต่างๆ ตามชนิดของเยื่อหุ้มนั้น (เช่น เยื่อหุ้มเซลล์ เยื่อหุ้ม vacuole เยื่อหุ้ม mitochondria เยื่อหุ้มนิวเคลียส) จะไม่ค่อยเหมือนกันเท่าไรนัก

การสร้างกรดไขมันในยีสต์

ในการสร้างกรดไขมันทั้ง fatty acid synthase และ acetyl-Co A carboxylase เป็นเอนไซม์หลักที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง ถ้าเป็นในยีสต์ fatty acid synthase เป็นโมเลกุลที่ซับซ้อนประกอบด้วย α-subunits และ β-subunits ชนิดละ 6 units ซึ่งถูกสร้างขึ้นจาก gene *FAS2* และ *FAS1* ตามลำดับ ส่วน acetyl-Co A carboxylase ซึ่งเป็นโมเลกุลแบบ homotetramer ถูกสร้างขึ้นจาก geneFAS3/ACC (*Chirala,* www.bcm.tmc.edu/biochem/fac/chirala.html) ในเชื้อราที่มีเส้นใย วิธีการสร้าง fatty acid มีการ desaturation และ elcongation จากกรด stearic (18:0) เพื่อให้ได้กรดไขมันที่มีความยาวมากขึ้น และเป็น polyunsaturated fatty acid (PUFAs) และสารที่ใช้เป็น substrate ในการสร้างกรด oleic (18:1) จากการ Δ9- desaturation ของกรด stearic คือ stearoyl-CoA (MacKenzie et. al., 2002)

ว๗๑
ส๒๔๙
๑.๖
248955

ยีสต์ในระบบนิเวศทางทะเล

ยีสต์สามารถพบได้ในน้ำทะเล และยีสต์หลายชนิดอาจเป็น allochthonous terrestrial form ยีสต์ที่พบได้เสมอได้แก่ ยีสต์ในสกุล *Candida, Torulopsis, Cryptococcus, Trichosporon, Saccharomyees* และ *Rhodotorala* นอกจากนี้ยังพบ *Rhodosporidium* ซึ่งเป็น basidiomycete-related yeast ในระบบนิเวศทางทะเลด้วยเช่นกัน (Atlas and Bartha,1981)

การแยกเชื้อยีสต์

ยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตที่พบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไปเช่นเดียวกับจุลินทรีย์อื่นๆ ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย เชื้อรา มีบ้างเหมือนกันที่เชื้อราบางชนิดที่เจริญเร็วกว่า ตัวอย่างเช่น *Rhizopus* อาจจะเจริญเร็วกว่าและคลุมโคโลนีของยีสต์เวลาที่มีการแยกเชื้อ แต่โดยทั่วไปแล้วยีสต์ที่เจริญเร็วก็สามารถแยกเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ ได้ โดยไม่ต้องใช้สารยับยั้งการเจริญช่วย อาหารที่นิยมใช้ในการแยกเชื้อยีสต์ส่วนใหญ่ คือ อาหาร Malt extract Agar และปรับ pH 5.5 จะช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้หลายกลุ่ม หรือการเติมสารแอนติไบโอติกบางชนิดลงไปในอาหารก็จะช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ เช่น เติม penicillin 60 ug/ml หรือ streptomycin 100 ug/ml ลงใน Malt extract Agar หรืออาหารแป้งอื่น ๆ ก็จะช่วยทำให้สามารถแยกเชื้อยีสต์ได้ดีขึ้น (Compbell and Duffus, 1991)

การจัดจำแนกเชื้อยีสต์

ยีสต์ที่แยกได้ใหม่ ๆ จะนำมาจัดจำแนกชนิด ซึ่งก็มีพื้นฐานจากวิธีการจัดจำแนกเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งยีสต์ก็เป็นสิ่งมีชีวิตในกลุ่มของเชื้อรา และการจัดจำแนกในระดับ family และ genus ก็ใช้การพิจารณาลักษณะรูปร่างทางสัณฐานเป็นเกณฑ์ เช่น ลักษณะของ vegetative cells และรูปร่างของสปอร์ แต่ถ้าจะจำแนกถึงระดับ species จะใช้การทดสอบทาง physiology ประกอบด้วย เช่นเดียวกับที่ใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรีย การพิจารณาลักษณะรูปร่างของสปอร์อาจไม่แน่นอน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ และยีสต์ที่จัดจำแนกใหม่ ๆ อาจมีความยากลำบากในการแยกความแตกต่างของสปอร์ ตามวิธีการจัดจำแนกของ Kreger-van Rij (1984) ก็มีการทดสอบทาง physiology ช่วยด้วยเช่นกัน และทำให้การจัดจำแนกง่ายขึ้น (Compbell and Duffus, 1991)

Identification Key ในการจัดจำแนกในระดับสกุลของยีสต์ที่สร้าง Ascospore รวมทั้งยีสต์ที่ไม่สร้างสปอร์ (ดัดแปลงจากวิธีการของ Kreger-van Rij (1984)

1. ascospore มีลักษณะรูปกระสวยหรือรูปเข็ม และมี multilateral budding
   a. สร้าง pseudomycelium, fermentation w/-, NO_3^- - ..... *Metschnikowia*
   b. สร้าง truemycelium, fermentation w/-, NO_3^- - ..... *Nematospora*
2. สร้าง ascospore รูปร่างกลม รูปไข่ รูปไต รูปหมวก หรือคล้ายดาวเสาร์
   a. การเจริญของ vegetative cell แบ่งตัวแบบ binary fission สร้างหรือไม่สร้าง true/ pseudomycelium, fermentation + ... *Schizosaccharomyces*
   b. การเจริญของ vegetative cell มีการแตกหน่อที่ขั้วเซลล์ (polar budding)
      (i) สปอร์คล้ายหมวกหรือเป็นปุ่ม ๆ มีสปอร์ผิวหยาบเกิดขึ้นในเซลล์แม่..... *Hanseniaspore*
      (ii) สปอร์รูปร่างหยาบหรือเป็นปุ่ม ๆ เกิดขึ้นในหน่อ (bud) ..... *Nadsonia*
      (iii) สปอร์รูปร่างกลม มีการจับคู่ (conjugate) เป็นคู่ ๆ ในถุง ascus..... *Saccharomycodes*
   c. การเจริญของ vegetative cell เป็นการแตกหน่อแบบ multilateral budding
      (i) ไม่สร้าง pseudomycelium สปอร์กลมหรือรูปไข่ conjugated asci, fermentation w/-, NO_3^- -..... *Debaryomyces*
      (ii) สร้าง pseudomycelium หรืออาจเป็น true mycelium สปอร์กลม หรือคล้ายหมวก หรือ ดาวเสาร์ fermentation w/-, NO_3^- -..... *Pichia*
      (iii) คล้าย *Pechia* แต่สปอร์รูปร่างคล้ายดาวเสาร์ แยกกัน และมี conjugated asci ..... *Schwanniomyces*
      (iv) สร้าง pseudomycelium หรืออาจเป็น true mycelium สปอร์รูปร่างคล้ายหมวกหรือดาวเสาร์ fermentation w/-, NO_3^- + ... *Hansenula*
      (v) ไม่สร้าง pseudomycelium สปอร์รูปร่างกลม รูปไข่ หรือรูปไต, liberated fermentation +, NO_3^- - ..... *Kluyveromyces*
      (vi) อาจสร้าง pseudomycelium สปอร์กลมหรือรูปไข่ ไม่ liberated fermentation +, NO_3^- - ..... *Saccharomyces*
      (vii) เหมือน *Saccharomyces* แต่มีconjugated asci ..... *Zyqosaccharomyces*
      (viii) เหมือน *Saccharomyces* แต่สร้าง ascospore หลังจากมี conjugation ระหว่างเซลล์แม่และหน่อ..... *Torulaspora*
3. สร้าง ascospore ใน separate ascus และมี lateral budding ..... *Lipomyces*

4. ไม่สร้าง sexual spores

a. สร้าง Belistospores

(i) มีรงควัตถุสีแดงหรือสีชมพู อาจสร้าง pseudomycelium หรือ true mycelium fermentation -, NO_3^- +/- .....*Sporobolomyces*

(ii) ไม่สร้างรงควัตถุ นอกนั้นเหมือน *Sporobolomyces* .....*Ballera*

b. มี Polar budding

(i) อาจสร้างหรือไม่สร้าง pseudomycelium, fermentation +, NO_3^- - .....*Kloeckera*

(ii) เช่นเดียวกับ *Kloeckera* แต่ไม่ fermentation.....*Schizoblastosporion*

c. เซลล์มีรูปร่างคล้ายสามเหลี่ยม (Triangular) หรือมีสี่หน้า (Tetrahedral cell) และมี budding ที่มุม fermentation -, NO_3^- - .....*Trigonopsis*

d. เซลล์รูปร่าง ogive หรือมี multilateral budding, มีการสร้างกรด acetic สร้าง pseudomycelium หรือ true mycelium, fermentation +/w, NO_3^- +/- .....*Brettanomyces*

e. สร้าง multilateral budding 2

(i) สร้างรงควัตถุสีแดง ส้มหรือเหลือง ปกติจะเจริญแบบ mucoid colony (สร้างเมือกออกมานอกcell) fermentation -, NO_3^- +/- ไม่เจริญใน inositol (Wickerham'sYeast Nitrogen Base + 1% inositol).....*Rhodotorula*

(ii) ปกติไม่สร้างรงควัตถุ เจริญแบบ mucoid colony (มี capsule หรือslime) fermentation -, NO_3^- +/-, inositol.....*Cryptococcus*

(iii) ไม่สร้างรงควัตถุ สร้าง true mycelium ที่มี arthrospores อาจสร้าง asexual endospores, fermentation w/-, NO_3^- - .....*Trichosporon*

(iv) ม่สร้าง pigment หรือบางทีอาจสร้าง pigment สีน้ำตาล (น้อยมาก) อาจมีหรือไม่มี true mycelium หรือ pseudomycelium, fermentation +/w/-, NO_3^- - .....*Candida*

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

สารเคมี

1. อาหารที่ใช้คัดแยกและเลี้ยงเชื้อทรอสโทรคิทริด

   กลูโคส (glucose)

   ยีสต์สกัด (yeast extractX

   เปปโตน (peptone)

   สเต็ปโตไมซิน (streptomycin)

   เพนนิซิลิน (penicilin)

   พีบีเอส (phosphate buffered saline, PBS)

   1.1 0.34 g/l KH_2PO_4

   1.2 1.21 g/l K_2HPO_4

   1.3 8 g/l NaCl

2. อาหารเลี้ยงเชื้อและอาหารสำหรับแยกเชื้อยีสต์

   Yeast Extract-Malt Extract Agar

   Sabourand Dextrose Broth

   Potato Dextrose Broth

   Czapek Dox Liquid Medium

3. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดสอบทางชีวเคมี และการทดสอบทางสัณฐานวิทยา

   Malt Extract Broth

   Sodium acetate Agar

   Corn Meal Agar

   Glucose/Yeast Extract Broth

   Glucose/Nitrate Agar

   Wickerham's Yeast Carbon Base

4. สารเคมี

   Sodium acetate

   Glucose

   Yeast Extract

Bromcresol purple

KNO_3

แอลกอฮอล์ 70%

5. วัสดุสิ้นเปลืองอื่น ๆ

Aluminium Foil

Sealing Film

Plastic wrap

สำลี

กระดาษกรอง whatman No.1

Membrane filter (Cellulose Nitrate) ขนาด 0.2 um.

Slide และ Cover glass

กระดาษเช็ดเลนส์

กระดาษชั่งสาร

กระดาษวัด pH

6. อุปกรณ์เครื่องแก้ว

กระบอกฉีดยา

Petri dish

Test tube ขนาดเล็ก

บีกเกอร์ ขนาด 50, 100, 250, 1000 ml.

Conical Flasks ขนาด 300 ml.

Pipette

Autopipette

7. เครื่องมือ

ตู้บ่มเชื้อ / ตู้บ่มเชื้อ Incubator shaker

ตู้อบเครื่องแก้ว

Autoclave

ตู้เย็น

Ultra Centrifuge

Freeze dry

เครื่องชั่ง 2, 4 ตำแหน่ง

กล้องจุลทรรศน์

กล้อง Electron Microscope ZSEM)

เครื่องกรองแบคทีเรีย

8. สารเคมีในการวิเคราะห์กรดไขมัน

กรดซัลฟูริค (H_2SO_4)

เมทานอล (methanol)

เฮกเซน (hexanes)

บีเอชที (butylated hydroxy-toluene)

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4)

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง

1.1 การเก็บตัวอย่างน้ำบริเวณแนวปะการัง

บริเวณแนวปะการังที่ทำการเก็บตัวอย่างน้ำ ได้แก่

1. เกาะมันใน จังหวัดระยอง เก็บทั้งสิ้น 2 ครั้ง โดยการเก็บตัวอย่างครั้งแรก ได้เก็บเฉพาะตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณปะการังจำนวน 5 สถานีๆ ละ 3 ซ้ำ แต่ในการเก็บตัวอย่างครั้งที่สอง ได้เก็บตัวอย่างเพิ่มขึ้น โดยแยกเป็น 2 ส่วน คือน้ำทะเลบริเวณปะการังจำนวน 5 สถานีๆ ละ 3 ซ้ำ และการขูดเมือกที่ก้อนปะการังอีก 5 ชนิดๆ 3 ซ้ำ คือ *Acropora* sp. (เขากวางแบบโต๊ะ), *Favia* sp. (วงแหวน), *Porites* sp. (โขด), *Symphylia* sp. (สมองร่องใหญ่) และ *Diploastrea* sp. (ดาวใหญ่)

2. เกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี เก็บตัวอย่างรวม 2 ครั้ง โดยเก็บตัวอย่างแยกเป็น 2 ส่วน คือน้ำทะเลบริเวณปะการังจำนวน 5 สถานีๆ ละ 3 ซ้ำ และขูดเมือกที่ก้อนปะการัง 5 ชนิดๆ 3 ซ้ำ คือ *Acropora* sp., *Favia* sp., *Porites* sp., *Symphylia* sp. และ *Diploastrea* sp. และวัดปัจจัยสิ่งแวดล้อมบางประการเช่นอุณหภูมิ ความเค็ม ความเป็นกรด-เบส และปริมาณออกซิเจนในน้ำ เป็นต้น

3. บริเวณเกาะเต่า จังหวัดสุราษฎร์ธานี เก็บตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณปะการังจำนวน 5 สถานีๆ ละ 3 ซ้ำ

1.2 การเก็บตัวอย่างหญ้าทะเล

เก็บตัวอย่างหญ้าทะเลจากบริเวณต่างๆ และวัดปัจจัยสิ่งแวดล้อมบางประการ เช่น อุณหภูมิ ความเค็ม ความเป็นกรด-เบส และปริมาณออกซิเจนในน้ำ เป็นต้น บริเวณที่เก็บตัวอย่างได้แก่

1. อ่าวคุ้งกระเบนจำนวน 2 ครั้ง ได้ตัวอย่างหญ้าทะเล 2 ชนิด คือกุ๊ยช่ายเข็ม (*Halodule pinifolia*) และหญ้าชะเงา (*Enhalus acoroides*) โดยเก็บใบหญ้าทะเลที่มีสีเขียว สีเทา-เขียว และสีน้ำตาล

2. อ่าวมะขามป้อม จังหวัดระยอง ได้ตัวอย่างหญ้าทะเล 1 ชนิด คือ กุ๋ยช่ายเข็ม โดยเก็บตัวอย่างใบหญ้าทะเลที่มีสีแตกต่างกัน 6 สีๆ ละ 10 ใบ คือ เขียวอ่อน เขียวแก่ น้ำตาลปนเขียว น้ำตาลอ่อน น้ำตาลแข้ม และดำเริ่มเน่า

2. สัตหีบ จังหวัดชลบุรี ได้ตัวอย่างหญ้าทะเล 1 ชนิด คือกุ๋ยช่ายเข็มโดยเก็บตัวอย่างใบหญ้าทะเลที่มีสีแตกต่างกันสีๆ ละ 15 ใบ คือเทาตลอดใบ และ เทาปนเขียว

3. เกาะแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี โดยมีตัวอย่าง 2 ชนิด กุ๊ยช่ายเข็ม (*Halodule pinifolia*) และหญ้าชะเงา (*Enhalus acoroides*) โดยเก็บตัวอย่างใบหญ้าทะเลที่มีสีแตกต่างกัน 6 สีๆ ละ 10 ใบ คือ เขียวปนเทา เทาอ่อน เทาแก่ เขียวปนน้ำตาล น้ำตาลอ่อน และ น้ำตาลแก่

2. การแยกเชื้อจุลินทรีย์ทะเล

2.1 การแยกและเลี้ยงเชื้อยีสต์

2.1.1 นำตัวอย่างน้ำทะเลที่เก็บมาใหม่ ๆ มาแยกเชื้อยีสต์โดยใช้ปริมาณ 0.1 ml ของตัวอย่างน้ำใส่ลงในอาหาร Yeast Extract-Malt Extract Agar และปริมาณ 5 ml โดยวิธีกรองผ่าน Cellulose Nitrate membrane ขนาด 0.2 ไมโครเมตร แล้ววางลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

2.1.2 นำเชื้อที่เจริญบนจานเพาะเชื้อมาทำให้บริสุทธิ์ โดย steak ลงบนอาหาร Yeast Extract-Malt Extract Agar หลาย ๆ ครั้ง จนได้เชื้อบริสุทธิ์ หลังจากนั้นจึงเก็บไว้ในอาหารวุ้นเอียงเพื่อใช้ในการทดสอบทางสัณฐานวิทยา และทางชีวเคมีต่อไป

2.1.3 นำเชื้อยีสต์บริสุทธิ์มาเลี้ยงใน 0.5 % Sodium Nitrate Agar บ่มเชื้อที่ 30-32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อนำมาตรวจดูลักษณะรูปร่างของสปอร์ โดยวิธี Wet mount

2.1.4 เลี้ยงเชื้อยีสต์ที่บริสุทธิ์ลงในอาหาร Corn Meal Agar โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เพื่อนำมาตรวจดูลักษณะรูปร่างของเซลล์ pseudomycelium หรือ true mycelium ถ้ามี รวมทั้งตรวจดู arthospores

2.1.5 นำเชื้อยีสต์มาเลี้ยงบน Glucose/Nitrate agar (Wickerham's Yeast Carbon Base + 0.5 % KNO_3 หรือ $NaKNO_3$) โดยบ่มเชื้อที่ 30-32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นตรวจสอบดูว่าเชื้อมีการเจริญหรือไม่

2.1.6 นำเชื้อยีสต์ที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร Sabouraud Dextrose Broth, Potato Dextrose Broth, Czapek Dox Liquid Medium เพื่อให้ได้ปริมาณมาก ๆ โดยเลี้ยงใน Conical flask ขนาด 30 ml แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อพร้อมกับเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้วจึงเก็บเซล โดยนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Ultra Centrifuge ที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำเซลล์ยีสต์ไปทำให้แห้งเพื่อนำไปตรวจหาปริมาณและชนิดกรดไขมัน

2.1.7 นำยีสต์ที่บริสุทธิ์แล้วมาจัดจำแนกชนิด ตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Kuger-van Rij (1984)

2.2 การแยกเชื้อจุลินทรีย์ทะเลกลุ่ม Thraustochytrids

นำตัวอย่างที่เก็บได้มาแยกหาเชื้อจุลินทรีย์ทันทีเมื่อนำกลับมาห้องปฏิบัติการ โดยตัวอย่างน้ำจากบริเวณปะการัง นำมากรองแล้วจึงดูดตัวอย่างน้ำที่กรองได้ใส่ลงบนอาหารวุ้น GYP (กลูโคส : ยีสต์สกัด : เปปโตน = 5 : 1 : 1) ส่วนตัวอย่างเมือกที่ขูดจากก้อนปะการัง ทำการดูดเมือกและน้ำใส่บนอาหารวุ้น GYP

ส่วน ตัวอย่างหญ้าทะเลแต่ละใบ นำมาล้างในน้ำทะเลสะอาด แล้วตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ใบละ 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปปักลงบนอาหารวุ้น GYP แล้วเทน้ำทะเลสะอาดลงไปเล็กน้อย

3. การวิเคราะห์กรดไขมัน

ทำการวิเคราะห์กรดไขมันที่มีอยู่ในเซลของจุลินทรีย์ที่แยกได้ โดยวิธีที่ดัดแปลงจาก Shimizu *et al.* (1988) และ Christie (1989) ดังนี้

3.1 ชั่งตัวอย่างแห้ง 0.1-0.2 กรัม เติมกรดซัลฟูริค (ในเมทานอล) 2 % ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และ internal standard 0.2 มิลลิลิตร (19:0) ผ่านด้วยก๊าซไนโตรเจน แล้วนำไปใส่ใน water bath ให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

3.2 เติม hexanes (ใส่ BHT 10 ppm) 2 มิลลิลิตร และ น้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งให้แยกชั้น

3.3 ดูดของเหลวชั้นบนใส่ในหลอดทดลอง แล้วกรองผ่าน Na_2SO_4 จากนั้นผ่านด้วย ก๊าซไนโตรเจนจนแห้ง เก็บในตู้เย็น เพื่อรอการวัดด้วยเครื่อง Gas Chromatography

3.4 นำตัวอย่างฉีดเข้าเครื่อง Gas Chromatography อ่านค่าโครมาโตแกรม โดยเทียบกับ standard fatty acids

บทที่ 4

ผลการทดลอง

จากการศึกษาจุลินทรีย์ทะเลที่แยกจากตัวอย่างน้ำบริเวณแนวปะการังและเมือกที่ขูดจากก้อนปะการังและตัวอย่างหญ้าทะเลได้ผลดังนี้

1. จุลินทรีย์ทะเลที่แยกจากตัวอย่างน้ำบริเวณแนวปะการังและเมือกที่ขูดจากก้อนปะการัง

1.1 ยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณแนวปะการังและเมือกที่ขูดจากก้อนปะการัง

จากการเก็บตัวอย่างน้ำทะเลและเมือกจากก้อนปะการังจากสถานีต่างๆ มาแยกเชื้อยีสต์ในอาหาร yeast extract : malt extract agar ที่ 32 องศาเซลเซียส และบ่มเชื้อไว้ 24 - 48 ชั่วโมง พบยีสต์จากตัวอย่างน้ำทะเลที่เก็บจากเกาะมันใน 3 ไอโซเลท เกาะเต่า 1 ไอโซเลท และจากตัวอย่างเมือกที่ขูดจากก้อนปะการังพบยีสต์ 4 ไอโซเลท (ตารางที่ 4) และรูปร่างลักษณะของยีสต์ที่พบแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 4 ยีสต์ที่พบจากตัวอย่างน้ำทะเลและเมือกที่ขูดจากก้อนปะการัง

สถานที่เก็บตัวอย่าง	แหล่งของตัวอย่าง	ชนิดของปะการัง	ชนิดของยีสต์ที่พบ
เกาะมันใน จังหวัดระยอง	ตัวอย่างน้ำทะเล		*Saccharomyces* sp.1
			Kloeckera sp.
			Nadsonia sp.
เกาะเต่า จังหวัดสุราษฎร์ธานี	ตัวอย่างน้ำทะเล		*Saccharomyces sp.*2
เกาะมันใน จังหวัดระยอง	เมือกที่ขูดจากก้อนปะการัง	*Symphylia*	พบยีสต์ 2 ชนิด คือ *Zygosaccharomyces* sp.1 และ *Zygosaccharomyces* sp.2
		Acropora	พบยีสต์ 1 ชนิด คือ *Bullora* แต่ไม่สามารถเลี้ยงได้นาน
		Pocillopola	พบยีสต์ 1 ชนิด คือ *Saccharomyces sp.*3
		Porites	พบยีสต์ แต่ไม่สามารถเลี้ยงได้นาน
		Favia	ไม่พบยีสต์
		Pavona	ไม่พบยีสต์
		Diploastrea	ไม่พบยีสต์

ตารางที่ 4 (ต่อ)

สถานที่เก็บตัวอย่าง	แหล่งของตัวอย่าง	*ชนิดของปะการัง*	ชนิดของยีสต์ที่พบ
เกาะค้างคาว จังหวัดชลบุรี	เมือกที่ขูดจากก้อนปะการัง	*Symphylia*	ไม่พบยีสต์
		Acropora	ไม่พบยีสต์
		Porites	ไม่พบยีสต์
		Favia	ไม่พบยีสต์
		Pavona	ไม่พบยีสต์
		Diploastrea	ไม่พบยีสต์

ตารางที่ 5 ลักษณะรูปร่างของยีสต์ที่พบ ณ สถานีต่างๆ

Species	**Cells**	**Spores**	**Budding**	**Pseudomycelium or True mycelium**
จากน้ำทะเล เกาะมันใน				
Saccharomyces sp.1	Ovoid, 3-4 μm	Round	Polar budding	-
Kloeckera sp.	Oval, 2-3 μm	-	Polar budding	-
Nadsonia sp.	Oval	Round	Polar budding	-
จากน้ำทะเล เกาะเต่า				
*Saccharomyces sp.*2	Spherical oval, 5-10 μm	Round	Lateral budding, multilateral budding, Binary fission sometimes, bud has ascospores	Short and long mycelium
จากน้ำทะเล เกาะเต่า				
Zygosaccharomyces sp.1	Spherical oval, 5-9 μm	Round	Lateral budding	-
Zygosaccharomyces sp.2	Spherical oval, 4-9 μm	Round	Lateral budding, bud has ascospores	+ (sheet mycelium)
*Saccharomyces sp.*3	Oval, 6-10 μm	Round	Lateral budding, Binary fission sometimes,	-
Bullora	Rod shape	Ballistospore	Ballistospore	Short pseudomycelium

1.1.1 การเจริญของยีสต์ในอาหาร glucose/nitrate agar และ glucose/yeast extract broth

จากการศึกษาการเจริญของยีสต์ในอาหาร glucose/nitrate agar และ glucose/yeast extract broth เพื่อตรวจสอบการใช้ไนเตรทและตรวจสอบการหมักกลูโคสตามลำดับได้ผลดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบการเจริญของยีสต์ในอาหาร glucose/nitrate agar และ glucose/yeast extract broth (w = weak, - = ไม่เจริญเติบโต, + = เจิญเติบโต)

Species	glucose/nitrate agar	glucose/yeast extract broth
Saccharomyces sp.1	-	W
Kloeckera sp.	-	W
Nadsonia sp.	-	W
Zygosaccharomyces sp.1	-	W
Zygosaccharomyces sp.2	-	W
Saccharomyces sp.1	W	-
Bullora	+	-
*Saccharomyces sp.*3	-	W

1.1.2 การเจริญในอาหารชนิดต่างๆ

จากการทดลองนำยีสต์ที่พบทุกชนิดมาเลี้ยงในอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB), Yeast and Mold (YM), Czapecdox Broth และ พบว่า *Saccharomyces* sp.1, *Kloeckera* sp., *Nadsonia* sp., *Zygosaccharomyces* sp.1, *Saccharomyces* sp.2, *Saccharomyces* sp.3 เจริญได้ดีในอาหาร Potato Dextrose Broth แต่เมื่อเลี้ยงในอาหาร YM ยีสต์ที่เจริญได้คือ *Saccharomyces* sp.1, *Kloeckera* sp., *Nadsonia* sp., *Saccharomyces* sp.2 ส่วนยีสต์ที่เจริญในอาหาร Sabourand Broth ได้แก่ *Kloeckera* sp., *Nadsonia* sp., *Zygosaccharomyces* sp.2, *Saccharomyces* sp.2, *Saccharomyces* sp.3 ส่วนยีสต์ที่สามารถเจริญเติบโตได้เมื่อเลี้ยงด้วยอาหาร Czapecdox Broth คือ *Saccharomyces* sp.1 และ *Kloeckera* sp. (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 การเจริญของยีสต์ในอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB), Yeast and Mold (YM), Czapecdox Broth และ Sabourand Broth

Species	Potato Dextrose Broth (PDB)	Yeast and Mold (YM)	Czapecdox Broth	Sabourand Broth
Saccharomyces sp.1	+	+	W1	-
Kloeckera sp.	+	+	W1	-
Nadsonia sp.	+	+	-	-
Zygosaccharomyces sp.1	-	+	-	-
Zygosaccharomyces sp.2	+	+	-	-
*Saccharomyces sp.*2	+	+	-	-
Bullora	+	+	-	-
*Saccharomyces sp.*3	+	+	-	-

หมายเหตุ *Bullora* sp. ที่แยกได้จากเมือกของ *Acoropora* sp. มีชีวิตอยู่ได้ในระยะสั้นๆ ในห้องทดลอง

1.1.3 ปริมาณกรดไขมันที่พบในยีสต์ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่แตกต่างกัน

จากการวิเคราะห์กรดไขมันในยีสต์ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่แตกต่างกัน ได้ผลดังตารางที่ 8 จะเห็นว่า ยีสต์สามารถสร้างกรดไขมันได้หลากหลายชนิด กรดไขมันที่สามารถจำแนกได้ได้แก่ กรดไมริสตริก (myristic acid, C14:0), กรดปามิติก (palmitic acid, C16:0), กรดปามิโตเลอิค (palmitoleic acid, C16:1 n-7), กรดสเตรียริค (stearic acid, C18:0), กรดโอเลอิค (oleic acid , C18:1 n-9), กรดไลโนเลอิค (linoleic acid, C18:2 n-6), กรดแกมมา-ไลโนเลนิค (γ - linolenic acid, C18:3 n-6) เป็นต้น ส่วนบางชนิดพบกรดโดโคซะเฮก-ซะอีโนอิก (docosahexaenoic acid, C22:6 n-3, ดีเอชเอ) ซึ่งเป็นกรดไขมันกลุ่มเป้าหมาย มีประมาณ 0.55 – 2.38 % ของกรดไขมันทั้งหมด โดยพบสูงสุดใน *Saccharomyces* sp.2 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร YM โดยกรดไขมันดังกล่าวพบว่า C16:0, C18:1 n-9 และ C18:2 n-6 มีในปริมาณสูง ซึ่ง C16:0 พบสูงสุดใน *Kloeckera* sp. ที่เลี้ยงด้วยอาหาร PDB (30.19% ของกรดไขมันทั้งหมด) C18:1 n-9 พบสูงสุดใน *Saccharomyces* sp.2 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร SB (47.73 % ของกรดไขมันทั้งหมด) และ C18:2 n-6 พบสูงสุดใน *Zygosaccharomyces* sp.2 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร SB (28.17 % ของกรดไขมันทั้งหมด) ส่วน C18:3 n-6 พบสูงสุดใน *Saccharomyces* sp.3 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร SB (3.45 % ของกรดไขมันทั้งหมด) แต่ไม่พบกรดไขมันชนิดกรดอะราชิโดนิค (arachidonic acid, C20:4 n-6) และกรดไอโคซะเพนตะอีโนอิค (ecosapentaenoic acid, C20:5 n-3) อย่างไรก็ตามเมื่อเลี้ยงยีสต์ชนิดเดียวกัน

ด้วยอาหารต่างชนิดกัน ผลปรากกฏว่ายีสต์สามารถผลิตกรดไขมันทั้งชนิดและปริมาณได้แตกต่างกัน คือ *Saccharomyces* sp.2 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร YM สามารถผลิตกรดไขมันดีเอชเอได้ 2.38 % ของกรดไขมันทั้งหมด แต่ถ้าเลี้ยงด้วยอาหาร SB ไม่พบดีเอชเอ ส่วน *Saccharomyces* sp.3 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร PDB สามารถผลิตกรดไขมันชนิด C22:6 n-3 (0.77 % ของกรดไขมันทั้งหมด) แต่ถ้าเลี้ยงด้วยอาหาร SB ไม่พบดีเอชเอเช่นกัน ในขณะที่ *Saccharomyces* sp.1 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหาร PDB ไม่สามารถผลิตกรดไขมันชนิดดีเอชเอได้ ส่วน *Zygosaccharomyces* sp.2 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหาร PDB และ SB ไม่พบการสร้างกรดไขมันชนิดดีเอชเอเช่นกัน

1.2 ทรอสโทรคิทริดที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณแนวปะการังและเมือกที่ขูดจากก้อนปะการัง

จากการเก็บตัวอย่างน้ำทะเลจากสถานีต่างๆ และเมือกจากก้อนปะการัง โดยขูดเมือกจากปะการัง 5 ชนิดคือ *Acropora* sp., *Favia* sp., *Porites* sp., *Symphylia* sp. และ *Diploastrea* sp. มาแยกเชื้อทรอสโทรคิทริดทั้งในอาหารวุ้น glucose: yeast extract : peptone และยังใช้เกสรสนเป็นเหยื่อล่อ ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะสมในการล่อจุลินทรีย์ทะเลในกลุ่มนี้ ผลปรากฏว่าไม่พบเชื้อจุลินทรีย์ทะเลในกลุ่ม Thraustochytrids ที่เกาะมันในและเกาะค้างคาว แต่ที่เกาะเต่าพบการเจริญของ Thraustochytrids 30 isolates จาก 150 ตัวอย่างที่ทำการแยก โดยพบที่สถานีที่ 1 จำนวน 10 isolates สถานีที่ 2 จำนวน 5 isolates สถานีที่ 3 จำนวน 10 isolates สถานีที่ 4 จำนวน 3 isolates และสถานีที่ 5 จำนวน 2 isolates โดยขนาดของ Thraustochytrids ที่พบมีขนาดเล็กมาก ประมาณ 5-8 ไมคอน เท่านั้น อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถแยกเชื้อให้บริสุทธิ์และเลี้ยงต่อได้ เนื่องจากเมื่อทำการ steak plate เชื้อ Thraustochytrids ไม่เจริญเติบโตต่อ ส่วนการตัดชิ้นวุ้นเพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์พบว่าเซลล์แตกเสมอและตายในที่สุด

2. จุลินทรีย์ทะเลที่แยกจากตัวอย่างหญ้าทะเล

จากการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ทะเลในกลุ่ม Thraustochytrids จากตัวอย่างใบหญ้าทะเลชนิดกุ่ยช่ายเข็ม และหญ้าชะเงา โดยเก็บใบหญ้าทะเลที่มีสีเขียวอ่อน เขียวแก่ เขียวปนเทา เทาปนเขียว เทาอ่อน เทาแก่ เขียวปนน้ำตาล น้ำตาลปนเขียว น้ำตาลอ่อน น้ำตาลเข้ม และดำเริ่มเน่า ผลปรากฏว่าไม่พบจุลินทรีย์ทะเลในกลุ่ม Thraustochytrids เลย

ตารางที่ 8 กรดไขมันในยีสต์ที่เลี้ยงด้วยอาหารแตกต่างกัน

Fatty acid	*Saccharomyces* sp.1 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร PDB		*Saccharomyces* sp.2 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร SB		*Saccharomyces* sp.2 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร YM		*Saccharomyces* sp.3 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร PDB	
	mg/g dry wt.	% of total fatty acid	mg/g dry wt.	% of total fatty acid	mg/g dry wt.	% of total fatty acid	mg/g dry wt.	% of total fatty acid
14:0	0.69±0.07	3.26±0.05	0.13±0.02	0.28±0.04	2.36±1.27	5.10±0.23	0.72±0.11	1.51±0.03
16:0	6.17±0.71	29.33±0.81	6.07±0.60	12.51±1.19	12.71±4.84	28.69±3.78	9.32±1.01	19.81±1.24
16:1n-7	1.95±0.30	9.24±0.63	0.70±0.06	1.45±0.11	3.50±3.45	6.59±4.24	6.57±1.58	13.80±0.99
18:0	1.08±0.08	5.15±0.05	3.01±0.17	6.22±0.34	2.87±1.25	6.38±0.47	2.94±0.01	6.31±1.05
18:1 n-9	4.26±0.71	20.21±1.64	23.13±0.07	47.73±0.03	13.41±6.37	29.48±0.82	10.87±2.12	22.92±0.58
18:2 n-6	3.99±0.59	18.96±1.14	9.83±0.02	20.28±0.03	0.90±0.49	2.55±2.35	10.33±2.04	21.79±0.58
18:3 n-6	0.26±0.04	1.24±0.08	0.14±0.05	0.29±0.10	0.03±0.04	0.06±0.05	0.95±0.08	2.04±0.53
22:6 n-3	0	0	0	0	1.19±0.93	2.38±0.85	0.32±0.45	0.77±1.08
Others	2.61±0.67	12.61±4.30	5.45±0.81	11.25±1.71	8.83±5.23	18.77±2.04	5.30±1.71	11.04±1.78
Total	21.01±1.83	100.00	48.46±0.18	100.00	45.81±22.89	100.00	47.31±8.07	100.00

ตารางที่ 8 (ต่อ)

Fatty acid	*Saccharomyces* sp.3 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร SB		*Kloeckera* sp. ที่เลี้ยงด้วยอาหาร PDB		*Nadsonia* sp. ที่เลี้ยงด้วยอาหาร SB		*Nadsonia* sp. ที่เลี้ยงด้วยอาหาร CZD	
	mg/g dry wt.	% of total fatty acid	mg/g dry wt.	% of total fatty acid	mg/g dry wt.	% of total fatty acid	mg/g dry wt.	% of total fatty acid
14:0	0.33±0.01	0.52±0.10	1.36±0.01	3.65±0.21	0.25±0.01	0.44±0.02	4.22±4.61	4.22±4.50
16:0	8.77±0.33	14.09±3.43	11.26±0.30	30.19±1.02	10.35±0.50	18.72±0.75	19.97±0.33	20.68±1.60
16:1n-7	3.99±0.06	6.38±1.22	3.43±0.37	9.16±0.43	3.54±0.29	6.39±0.46	2.10±0.11	2.18±0.25
16:0	5.66±0.56	8.97±0.98	1.99±0.13	5.35±0.68	3.71±0.65	6.38±1.22	6.40±0.46	6.61±0.08
18:1 n-9	14.50±0.44	23.29±5.49	6.88±0.94	18.36±1.40	19.41±0.62	35.11±0.81	26.79±0.88	27.74±2.59
18:2 n-6	13.84±0.93	22.01±3.08	6.95±0.71	18.59±0.77	8.48±0.74	15.34±1.21	20.51±0.08	21.22±1.37
18:3 n-6	2.37±2.07	3.45±2.53	0.53±0.06	1.42±0.24	0.34±0.20	0.61±0.36	0.31±0.44	0.33±0.47
22:6 n-3	0	0	0.21±0.03	0.55±0.10	0	0	0	0
Others	14.35±10.30	21.28±11.76	4.75±0.15	12.72±0.36	9.20±2.54	16.67±4.74	16.53±2.65	17.02±1.70
Total	63.80±13.16	0	37.35±2.26	100.00	55.27±0.48	100.00	96.83±5.89	100.00

ตารางที่ 8 (ต่อ)

Fatty acid	*Zygosaccharomyces* sp.1 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร PDB		*Zygosaccharomyces* sp.2 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร PDB		*Zygosaccharomyces* sp.2 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร SB	
	mg/g dry wt.	% of total fatty acid	mg/g dry wt.	% of total fatty acid	mg/g dry wt.	% of total fatty acid
14:0	0.54±0.04	2.59±0.64	0.33±0.03	0.64±0.01	1.76±2.07	3.50±4.12
16:0	1.90±0.37	9.09±0.92	7.73±0.11	15.20±1.04	8.12±0.03	16.28±0.06
16:1 n-7	0.93±0.05	4.47±0.97	3.68±0.27	7.27±1.13	3.71±0.59	7.43±1.24
16:0	0.17±0.01	0.80±0.09	4.88±0.07	9.60±0.65	4.69±0.39	9.41±0.85
18:1 n-9	0.20±0.01	0.94±0.02	8.28±0.41	16.32±2.14	8.72±0.70	17.48±1.53
18:2 n-6	0.20±0.01	1.16±0.67	13.22±0.80	26.07±3.71	14.05±0.99	28.17±2.18
18:2 n-6	0.15±0.02	0.71±0.59	0.94±0.14	1.83±0.12	0.44±0.62	0.89±1.25
22:6 n-3	0	0	0	0	0	0
Others	16.74±3.45	80.23±2.074	11.94±5.33	23.07±8.55	8.40±1.54	16.83±2.98
Total	20.86±4.68	100	50.99±4.18	100	49.89±0.33	100

3. ปัจจัยสิ่งแวดล้อมบางประการในบริเวณที่เก็บตัวอย่าง

จากการวัดปัจจัยสิ่งแวดล้อมบางประการ ได้แก่ ความเค็ม อุณหภูมิ ออกซิเจนที่ละลายน้ำและความเป็นกรด-เบส จากน้ำทะเลบริเวณแนวปะการังและแหล่งหญ้าทะเล ได้ผลดังตารางที่ 9 พบว่าคุณภาพน้ำต่างๆ อยู่ในเกณฑ์ปกติ

ตารางที่ 9 คุณภาพน้ำทะเลบริเวณปะการังและแหล่งหญ้าทะเลในบริเวณที่ทำการศึกษา

บริเวณที่เก็บตัวอย่าง	ความเค็ม	อุณหภูมิ	ออกซิเจนที่ละลายน้ำ	ความเป็นกรด-เบส
บริเวณปะการัง				
เกาะมันใน	28-30	28.5-29.7	5.77-6.67	8.02-8.18
เกาะค้างคาว	30	33.6	6.5	5.71
เกาะเต่า	31-33	31	6.5	8.39-8.44
แหล่งหญ้าทะเล				
อ่างมะขามป้อม	31	30	6.5	7.6
อ่าวสัตหีบ	31	31	6.8	8.8
แสมสาร	33	31.4-32	6.42-6.95	7.6-8.0
คุ้งกระเบน	33	27.8	6.45	7.6

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

อภิปรายผลการทดลอง

1. จุลินทรีย์ทะเลที่แยกจากตัวอย่างน้ำบริเวณแนวปะการังและเมือกที่ขูดจากก้อนปะการัง

1.1 ยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณแนวปะการังและเมือกที่ขูดจากก้อนปะการัง

จากการศึกษาพบยีสต์จากตัวอย่างน้ำทะเลทั้งสิ้น 7 ชนิด ได้แก่ *Saccharomyces* sp.1, *Saccharomyces* sp.2, *Saccharomyces* sp.3, *Kloeckera* sp. *Nadsonia* sp. *Zygosaccharomyces* sp.2 *Zygosaccharomyces* sp.1 แต่จากการศึกษาของ Atlas and Bartha (1981) พบยีสต์ในน้ำทะเล ได้แก่ ยีสต์ในสกุล *Candida, Torulopsis, Cryptococcus, Trichosporon, Saccharomyees* และ *Rhodotorala* นอกจากนี้ยังพบ *Rhodosporidium* ซึ่งเป็น basidiomycete-related yeast ในระบบนิเวศทางทะเลด้วยเช่นกัน

กรดไขมันที่พบในยีสต์ส่วนใหญ่เป็นพวกกรดไขมันไม่อิ่มตัวพันธะเดี่ยว ส่วน PUFA ที่มีอยู่จะเป็น C18:2 (linoleic acid) และ C18:3 (linolenic acid) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Zelles (1997) เมื่อนำยีสต์มาเลี้ยงด้วยอาหารที่แตกต่างกัน พบว่ายีสต์ต่างชนิดกันสามารถผลิตกรดไขมันได้แตกต่างกัน และยีสต์ชนิดเดียวกันแต่เลี้ยงด้วยอาหารต่างชนิดกัน มีผลต่อปริมาณและชนิดของ กรดไขมันที่แตกต่างกันด้วย กล่าวคือ *Saccharomyces* sp.2 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร YM สามารถผลิตกรดไขมันชนิดดีเอชเอ (C22:6, n-3) ได้ แต่เมื่อเลี้ยงด้วยอาหาร SB ไม่พบดีเอชเอ ในขณะที่ *Saccharomyces* sp.3 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร PDB สามารถผลิตกรดไขมันชนิดดีเอชเอได้ แต่เมื่อเลี้ยงด้วยอาหาร SB ไม่พบดีเอชเอเช่นกัน ส่วน *Saccharomyces* sp.1 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร PDB ไม่สามารถผลิตกรดไขมันชนิดดีเอชเอได้ ส่วน *Zygosaccharomyces* sp.2 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหาร PDB และ SB ไม่พบการสร้างกรดไขมันชนิดดีเอชเอเช่นกัน ดังนั้นถ้าต้องการเลี้ยงยีสต์ให้ผลิตดีเอชเอจึงต้องพิจารณาทั้งชนิดและอาหารที่ใช้เลี้ยงเป็นสำคัญ ซึ่งควรเลี้ยงยีสต์ในอาหารที่มีไนโตรเจนค่อนข้างจำกัด (N-limited medium) รวมถึงปัจจัยสิ่งแวดล้อมอื่นๆ เช่น อุณหภูมิ ออกซิเจน และความเป็นกรด-เบส เป็นต้น แต่จากการศึกษาครั้งนี้ยีสต์ที่พบผลิตกรดไขมันค่อนข้างน้อย จึงไม่จัดอยู่ในกลุ่ม fat yeast อย่างไรก็ตามยีสต์เหล่านี้สามารถนำมาปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อให้มีการสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวได้ต่อไปในอนาคต

เมื่อพิจารณาปริมาณดีเอชเอในยีสต์ที่ทำการศึกษานี้ มีปริมาณค่อนข้างน้อยมากเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น โดยพบประมาณ 0.55 - 2.38 % ของกรดไขมันทั้งหมด ในขณะที่ทรอสโทรคิทริด (*Schizochytrium* sp.) ผลิตดีเอชเอได้ประมาณ 30 - 40 % ของกรดไขมันทั้งหมด (Jaritkhuan, 2002) สาหร่ายทะเลขนาดเล็กชนิด *Isochrysis* spp. มีดีเอชเอ และ กรดไขมันชนิด C18:4

ในปริมาณสูง แต่มีอีพีเอเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ในขณะที่ *Monochrysis luteri, Coccolithus huxleyi* และ *Cricosphaera* มีองค์ประกอบของอีพีเอถึง 17-28 % ของกรดไขมันทั้งหมด นอกจากนี้ไดอะตอมบางชนิดเช่น *Phaeodactylum tricornutum* สามารถผลิตอีพีเอได้ประมาณ 3 กรัมน้ำหนักแห้ง / ลิตร และไดโนแฟลกเจลเลตหลายชนิดสามารถผลิตอีพีเอ และ ดีเอชเอได้ในปริมาณสูงเช่นกัน (Yongmanitchai and Ward, 1989)

การควบคุมการสร้างกรดไขมันในยีสต์ค่อนข้างซับซ้อน โดยปกติแล้วเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในขบวนการสร้างกรดไขมันที่สำคัญคือ fatty acid synthase และ acetyl-Co-A carboxylase แต่สำหรับยีสต์นั้นเอนไซม์ fatty acid synthase เป็นเอนไซม์ที่ประกอบด้วย α- subunits และ β- subunits ถึงอย่างละ 6 units ส่วน acetyl-Co-A carboxylase ในยีสต์เป็นเอนไซม์ที่เป็น homotetramer (www.bcm.tmc.edu/chirala.subra hman yam, 2001)

ถ้าเป็นในสัตว์ อาหารที่ไม่มีไขมันสามารถกระตุ้นการสร้าง fatty acid synthase และ acetyl-Co-A carboxylaseได้ แต่สำหรับยีสต์อาจไม่เป็นเช่นนั้น นอกจากว่ายีนที่ควบคุม acetyl-Co-A carboxylase ในยีสต์เป็นยีนที่จำเป็น (essential) และขาดไม่ได้ จากการศึกษาพบว่ายีสต์ที่เลี้ยงด้วยอาหาร PDB ซึ่งมีไขมันต่ำ หรือในอาหารที่เติมไปด้วย N-source อย่าง YM ก็สามารถตรวจพบการสร้างกรดไขมันดีเอชเอได้

1.2 Thraustochytrids จากตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณแนวปะการังและเมือกที่ขูดจากก้อนปะการัง

จากการศึกษาครั้งนี้พบ Thraustochytrids ทั้งสิ้น 30 isolates จากน้ำในแนวปะการังที่เกาะเต่า แต่ไม่พบจากเมือกปะการัง โดยขนาดของ Thraustochytrids ที่พบมีขนาดเล็กมาก ประมาณ 5-8 ไมโครเมตรเท่านั้น โดยทั่วไปแล้ว Thraustochytrids มักมีขนาดประมาณ 40 -50 ไมโครเมตร แต่เมื่อทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ทั้งโดยวิธีเขี่ยเชื้อและเกสรสน ซึ่งจากรายงานของ Hyde และ Pointing (2000) พบว่าเหยื่อล่อที่นำมาใช้ในห้องปฏิบัติการ เพื่อคัดแยกจุลินทรีย์ทะเลโดยเฉพาะกลุ่ม Thraustochytrids ที่มีประสิทธิภาพในการล่อ ได้แก่ เกสรสน ซึ่งเป็นสนสายพันธุ์ *Pinus* แต่จากการแยกเชื้อเพื่อทำให้บริสุทธิ์นั้น ไม่สามารถแยกเชื้อให้บริสุทธิ์และเลี้ยงต่อได้ เนื่องจากเซลล์อาจไม่แข็งแรง ทำให้ไม่ค่อยเจริญและตายในที่สุด อย่างไรก็ตาม การที่ไม่พบ Thraustochytrids ในบางบริเวณอาจเนื่องมาจากการเก็บตัวอย่างน้ำทะเลดังกล่าวเป็นการสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำ ซึ่งเป็นโอกาส (probability) ที่อาจจะพบเชื้อจุลินทรีย์มากน้อยหรือไม่พบก็ได้ หรืออาจเนื่องจากบริเวณดังกล่าวไม่มีเชื้อจุลินทรีย์นั้น ๆ หรือมีน้อยมากจนไม่สามารถคัดแยกได้ อย่างไรก็ตามมีรายงานพบ Thraustochytrids ชนิด *Schizochytrium aggregatum* จากตัวอย่างน้ำที่สหรัฐอเมริกา (Goldstein and Belsky, 1964), *Aplanochytrium kerguelensis* จากตัวอย่างน้ำที่ South Indian Ocean (Bahnweg and Sparrow , 1972), *Ulkenia visurgensis* จากตัวอย่างน้ำที่ Weser Estuary,

Germany (Gaertner, 1977), *Corallochytrium limacisporum* จากตัวอย่างน้ำที่แนวปะการัง Indian Ocean (Raghu-Kumar, 1987), *Schizochytrium limacinum* จากตัวอย่างน้ำที่ Yap Island, ประเทศญี่ปุ่น (Nakahara et al. , 1996) เป็นต้น

2. จุลินทรีย์ทะเลที่แยกจากตัวอย่างหญ้าทะเล

จากการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ทะเลในกลุ่ม Thraustochytrids จากตัวอย่างใบหญ้าทะเลชนิดกุ่ยช่ายเข็ม และหญ้าชะเงา โดยเก็บใบหญ้าทะเลที่มีสีเขียวอ่อน เขียวแก่ เขียวปนเทา เทาปนเขียว เทาอ่อน เทาแก่ เขียวปนน้ำตาล น้ำตาลปนเขียว น้ำตาลอ่อน น้ำตาลเข้ม และดำเริ่มเน่า ผลปรากฏว่าไม่พบจุลินทรีย์ทะเลในกลุ่ม Thraustochytrids เลย อาจเนื่องจากใบหญ้าทะเลที่สุ่มเก็บดังกล่าวไม่มีเชื้อจุลินทรีย์นั้น ๆ หรือมีน้อยมากจนไม่สามารถคัดแยกได้ อย่างไรก็ตามมีรายงานพบ Thraustochytrids (*Halophytophthora* spp. , *Schizochytrium* spp. และ *Thraustochytrium* spp.) จากใบไม้ป่าชายเลนที่ Panay Island, Philippines (Leano, 2001) และ จากสาหร่ายทะเล (*Bryopsis plumosa*) พบ *Thraustochytrium proliferum* ที่ Massachusetts, USA (Sparrow , 1936) และสาหร่ายทะเล (*Gracillaria confervoides*) พบ *Japonochytrium marinum* ที่ Yokohama, Japan (Kobayashi and Ookubo, 1953) เป็นต้น

สรุปผลการทดลอง

1. คัดแยกยีสต์จากตัวอย่างน้ำบริเวณแนวปะการังและเมือกที่ขูดจากก้อนปะการัง พบยีสต์จากตัวอย่างน้ำทะเลทั้งสิ้น 7 ชนิด ได้แก่ *Saccharomyces* sp.1, *Saccharomyces* sp.2, *Saccharomyces* sp.3, *Kloeckera* sp., *Nadsonia* sp., *Zygosaccharomyces* sp.2, *Zygosaccharomyces* sp.1

2. กรดไขมันของยีสต์ที่แยกได้พบทั้งกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว โดยพบว่า *Kloeckera* sp. ที่เลี้ยงด้วยอาหาร PDB ผลิตกรดไขมัน Palmitic acid (C16:0) ได้มากที่สุดถึงร้อยละ 30.19 ของกรดไขมันทั้งหมด *Saccharomyces* sp.2 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร SB ผลิตกรดไขมัน C18:1 n-9 ได้มากที่สุดถึงร้อยละ 47.73 ของกรดไขมันทั้งหมด *Zygosaccharomyces* sp.2 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร SB ผลิตกรดไขมัน C18:2 n-6 ได้มากที่สุดถึงร้อยละ 28.17 ของกรดไขมันทั้งหมด ส่วน C18:3 n-6 พบสูงสุดใน *Saccharomyces* sp.3 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร SB (3.45 % ของกรดไขมันทั้งหมด) แต่ไม่พบกรดไขมันชนิดกรดอะราชิโดนิค (arachidonic acid, C20:4 n-6) และ กรดไอโคซะเพนตะอีโนอิค (ecosapentaenoic acid, C20:5) ส่วนดีเอชเอ (C22:6, n-3) พบสูงสุดใน *Saccharomyces* sp.2 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร YM (2.38 % ของกรดไขมันทั้งหมด)

3. คัดแยกจุลินทรีย์ทะเลในกลุ่มทรอสโทคิทริด (Thraustochytrids) จากตัวอย่างน้ำบริเวณแนวปะการังและเมือกที่ขูดจากก้อนปะการัง พบ Thraustochytrids จากตัวอย่างน้ำทะเลทั้งสิ้น 30 isolates แต่ไม่สามารถแยกเชื้อให้บริสุทธิ์และเลี้ยงต่อได้

4. ไม่พบจุลินทรีย์ทะเลในกลุ่ม Thraustochytrids จากตัวอย่างใบหญ้าทะเลชนิดกุ้ยช่ายเข็ม และหญ้าชะเงา

ข้อเสนอแนะ

1. ควรเก็บตัวอย่างน้ำทะเลจากแหล่งอื่นๆ เพื่อให้ได้ชนิดของจุลินทรีย์ทะเลที่แตกต่างกันมากขึ้น

2. ควรศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัว เพื่อให้ได้ปริมาณสูง

3. ควรศึกษาซับเสตทชนิดอื่นๆ ที่มีความเป็นไปได้ว่าจะพบจุลินทรีย์ทะเล โดยเฉพาะทรอสโทคิทริด เช่นสาหร่ายทะเล เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

กฤษณา รุ่งเรืองศักดิ์. (2521). ปฏิบัติการและหลักเบื้องต้นในวิชาชีวเคมี. อมรินทร์การพิมพ์, กรุงเทพ.

ดาวัลย์ ฉิมภู่. (2538). ชีวเคมีเล่ม 1 โมเลกุลชีวภาพ. กรุงเทพ:สำนักพิมพ์ประกายพรึก.

เดือนทิพย์ ปิยรัตน์. (2538). การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไขมันโอเมก้า-3 จากสาหร่ายน้ำเค็มขนาดเล็ก, คณะวิทยาศาตร์, มหาวิทยาลัยศรีนครินวิโรฒ ประสานมิตร, กรุงเทพ, ประเทศไทย.

วินัย ดะห์ลัน. มปป. สมดุลทางเมทาบอลิซึมของลิพิดกับการเกิดโรคและการป้องกัน. เมทาบอลิซึมของลิพิดกับการป้องกัน. 15 หน้า

สุนันทา ภิญญาวัธน์. (2535). ชีวเคมี 2. กรุงเทพ:สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

สุพิศ ทองรอด. (2535). ความสำคัญของกรดไขมันในอาหารสัตว์น้ำ. วารสารกรมประมง 4(2): 943-950.

อนุเทพ ภาสุระ. (2541). เอกสารประกอบการสอนวิชา ไมโคโลยี (Mycology). ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา. ชลบุรี:

อัคนิตย์ อิทธิอาภา. (2541). การหาปริมาณไขมันและเปอร์เซนต์ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่มโอเมก้า-3 ในปลาทะเลโดยเทคนิคแก๊สลิควิดโครมาโตกราฟฟี, คณะวิทยาศาตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี.

Alexopoulos, G.J., Miss, C.W., Blackwell, M. (1996). Introductory Mycology. New York: John Wiley and Son, Inc.

Atlas, R.M and Bartha, R., 1981 Microbial Ecology : Fundamentals and Applications. Addison-Wesley Publishing company.london. 550 p.

Bahnweg, G and Sparrow, F.K. (1972). *Aplanochytrium kerguelensis* gen. Spec. nov., a new phycomycete from subantartic marine waters. *Archiv fur Mikrobiologie.* 81: 45-49.

Bajpai, P.K., Bajpai, P.K., and Ward, O. (1991a). Optimization of production of docosahexaenoic acid (DHA) by *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304. Journal American Oil Chemistry Society 68 (7): 509-513.

Bajpai, P.K., Bajpai, P.K., and Ward, O. (1991b). Eicosapentaenoic acid (EPA) formation: Comparative studies with *Mortierlla* strain and production by *Mortierlla elongata.* Mycology Research 95(11):1294-1298.

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.

Bell, M.V., Henderson, R.J. and Sargent, J.R. (1986). The role of polyunsaturated fatty acids in fish. Comparative Biochemistry and Physiology, 83: 711-719.

Bowles, R.D., Hunt, A.E., Duchars,M.G., and Eaton, R.A. (1999). Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid production by member of the marine protistan group the *Thraustochytrid:* Screening of isolate and optimisation of docosahexaenoic acid production. Journal Biotechnology 70(15):193-195.

Campbell, I. and Duffus, J. H. (eds). 1991 Yeast a pratical approach. Internation Russ limited, Oxford. 289 pp.

Chirala, S. Http://www.bcm.tmc.edu/biochem/fac/chirala.html.

Chritie, W.W. (1989). Gas chromatography and lipids: a practical guide. The Oily Press, Ayr, Scotland.

Dickson, L.G.,Galloway, R.A., and Patterson, G.W. (1969). Environmentallly-induced changes in the fatty acid. Plant Physiology 44(23):1413-1418.

Gaertner, A. (1977). Revision of the Thraustochytriaceae (lower marine fungi). I. *Ulkenia* nov. gen., with description of three new species. *Veroffentlichungen des Instituts fur Meeresforschung in Bremerhaven*. 16: 139-157.

Goldstein, S. and Belsky, M. (1964). Axenic culture studies of a new marine phycomycete possessing an unusual type of asexual reproduction. American Journal of Botany. 51: 72-78.

Grima, E.M., Sancha, J.A., Camacho, F.G., Medina, A.R., Gimenez, A.G., and Alonso, D.L. (1994). The production of polyunsaturated fatty acid by microalgae:From strain selection to product purification. Process Biochemistry 30(8):711-715.

Gunstone,F.D. (1996). Fatty acid and lipid chemistry. Blackie Academic & Professional.London.252 p.

Honda, D. (2001). Phylogeny and taxonomy of labyrinthulids. Aquabiology, 132, 23 (1): 7-17.

Hyde, K.D., Pointing, S.B. (2000). The Marine Mycology : A Practical Approach. Hongkong:Fungal Diversity Press.

Iida, I., *et al* (1996). Improvement of docosahexaenoic acid production in a culture of *Thraustochytrium aureum* by medium optimization. Journal of Fermentation and Bioengineering 21(1):76-80.

Jareonkitmongkol, S., Shimizu, S., and Yamada, H. (1992). Fatty acid desaturation- defective mutants of an arachidonic acid producing fungus , *Mortierlla alpina*. 1S- 4. Journal of General Microbiology, 14(38):997-1001.

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. Hua Hin, Thailand.

Jaritkhuan, S. and E.B.G. Jones. (1999). Aquaculture feed from Thraustochytrids. Paper presented at The 7th International Marine and Freshwater Mycology Symposium. 4-9 July 1999. City University of Hong Kong, Hong Kong.

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.

Kendrick, A. and Ratledge, C. (1992). Lipids of selected molds grown for production of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. Lipids. 27: 15-20.

Kobayashi, Y. and Ookubu, M. (1953). Studies on the marine phycomycetes. Bulletin of the National Science Museum, Tokyo. 3: 53-65.

Leano, E.M. (2001). Straminipilous organisms from fallen mangrove leaves from Panay Island, Philippines. Fungal Diversity 6: 75-81.

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

Luthisungneon, P. (1998). Study on morphology, physiology and fatty acid profiles of *Aschersonia* for indentification of closely related fungal TAXA (MSc. in Biotechnology Program), King Mongkut 's University of Technology, Bangkok, Thailand.

Mackenzie, D.A., Carter, A.T., Wongwathanarat, P., Eagles, J., Salt,J. and Archer, D.B. 2002. A thrid fatty acid Δ9-desaturases from *Mortierella alpina* with a different substrate specificity to ole 1 p and ole 2 p *Microbiology* 148:1725-1735

Mannella, C.A., Frank, J. and Delihas, N. (1987). Interrelatedness of 5S RNA sequences investigated by correspondence analysis. Journal of Molecular Evolution, 24: 228-235.

Nakahara, T., Yokochi, T., Higashihara, T., Tanaka, S., Yaguchi, T., and Honda, D. (1996). Production of docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid by *Schizochytrium* sp. Isolate from Yap Island. Journal American Oil Chemistry Society 73(11):1421-1425.

Otero, A., Garcia, D., Morales, E.D., Aran, J., and Jaime, H. (1997). Manipulation of the biochemical composition of the eicosapentaenoic acid rich microalgae *Isochysis galbana* in semicontinuous culture. Biotechnology and Applied Biochemistry 26 (12):171-175.

Raghu-Kumar, S. (1987). Occurrence of the thraustochytrid, *Corallochytrium limacisporum* gen et sp. Nov. in the coral reef lagoons of Lakshadweep Islands in the Arabian Sea. Botanica Marina. 30: 83-89.

Rose, A.H. and Harrison, J.S. (eds.) 1971. The yeast : Physiology and Biochemistry of yeast.: Vol 2. Academic Russ. London. 571 p.

Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D. and 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. Journal of the American Oil Chemists Society, 65: 1455-1459.

Silva, L.T., Sousa, D.E., Pereira, P.T., Eerrao, A.M., and Roscior, J.C. (1998). Cell fatty acid profiles for the differentiation of *Penicillium* species. FEMS Microbiology Letter 164(2):303-309.

Singh, A. and Ward, O.P. (1996). Production of high yields of docosahexaenoic acid by *Thraustochytrium roseum* ATCC 28210. Journal of Industrial Microbiology, 16: 370-373.

Sparrow, F.K. (1936). Biological observations on the marine fungi of Woods Hole waters. Biological Bulletin, Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Massachusetts. 70:236-263.

Stahl, P.D., and Klug, M.J. (1996). Characterization and differentiation of filamentous fungi based on fatty acid composition . Applied and Environmental Microbiology 62 (11):4136-4141.

Uauy-Dagach, R. (1996). Omega-3 PUFA in perinatal nutrition: docosahexaenoic acid (DHA) needs during pregnancy and infancy. The paper presented at the Conference on The Essence of Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA) in Food Industry. February 14, 1996, Bangkok, Thailand. p: 24-40.

Voet, D and Voet, J.G. (1995). Biochemistry. 2nd ed. Wiley, New York, Chichester, Brisbane, Toronto and Singapore. 1361 pp.

Wallage,R.A., King,J.L. andSander, G.P. 1986. Biology the Science of life. 2nd Edition. Scott, Foresman and company. London. 1217 p.

Yaguchi, T., Tanaka, S., Yokochi, T., Nakahara, T., and Higashihara, T. (1997). Production of high yield of docosahexsaenoic acid by *Shizochytrium* sp. strain SR21. Journal American Oil Chemistry Society 74(11):1431-1436.

Yazama, K.; Watanabe, K; Ishikawa, C.; Kondo, K, and Kimura, S. (1992). Production of eicosapentaenoic acid from marine bacteria. In: Industrial applications of single cell oil. P.29-51. (Eds. D.J. Kyle, C. Ratledge). American Oil Chemists Soc., Illinois, USA.

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

Yongmanitchai, W., and Ward, O.P. (1991). Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture condition. Applied and Environmental Microbiology 57 (2):419-421.

Zelles, L. (1917). Phospholipid fatty acid profiles in selected member of soil microbial communities. Chemosphere 35(1):275-281.