การคัดแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิกจากป่าชายเลน นครศรีธรรมราช

Isolation of Docosahexaenoic Acid Producing Microorganism from Mangrove in Nakhon Si Thammarat

สุดารัตน์ แท่นเนี่ยว[*1], นิยม กำลังดี[1] และภูวดล บางรักษ์[1]

Sudarat Thanneaw[*1], Niyom Kamlangdee[1] and Phuwadol Bangrak[1]

[1]สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ อำเภอท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราช 80161

[*]Corresponding author e-mail: sudarat_microwu@hotmail.com

บทคัดย่อ

การคัดแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิกจากป่าชายเลน นครศรีธรรมราช สามารถคัดแยกไอโซเลตของ Thraustochytrids จำนวน 7 ไอโซเลต (PN-123, PN142, PN-152, BJ-11, BJ-21, BJ-51 และ BJ-61) โดยใช้อาหาร yeast extract peptone agar (YEP agar) ที่ผสมน้ำทะเลความเค็ม 15 ppt. และเติมยาปฏิชีวนะสเตรบโตมัยซิน (streptomycin) และเพนนิซิลลิน (penicillin) ความเข้มข้นเท่ากับ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อศึกษาการเจริญและการผลิตกรดไขมันของแต่ละสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ พบว่าไอโซเลต PN-152 มีมวลชีวภาพสูงสุดเท่ากับ 3.06 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ไอโซเลต BJ-61 เจริญได้น้อยที่สุด มีมวลชีวภาพ เท่ากับ 1.98 กรัมต่อลิตร ผลการวิเคราะห์การสะสม DHA ของแต่ละไอโซเลตด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟฟี พบว่าไอโซเลต PN-123, PN142, PN-152, BJ-11, BJ-21, BJ-51 และ BJ-61 มีการสะสม DHA เป็น 10.73, 1.53, 73.43, 11.83, 18, 3.07 และ 19.83 มิลลิกรัมต่อกรัมตามลำดับ ไอโซเลตที่มีการสะสม DHA สูงสุด คือ PN152 คิดเป็นสัดส่วนต่อกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงทั้งหมดเท่ากับร้อยละ 97.63 (% total PUFAs)

คำสำคัญ: Thraustochytrids, กรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิก, ป่าชายเลน

Abstract

Isolation of docosahexaenoic acid producing microorganism from mangrove in Nakhon Si Thammarat. Seven thraustochytrid strains (PN-123, PN142, PN-152, BJ-11, BJ-21, BJ-51 and BJ-61) were isolated from mangrove using the yeast extract peptone agar (YEP agar) adding 500 mg/l each of streptomycin and penicillin, initial salinity of isolation media at 15 ppt. and incubation at 25ºC for 2-3

days. A comparison was made of their DHA content and amount of biomass, cell growth of the isolated strains in YGPS with 200 rpm shaking for 5 days showed that PN-152 yielded the highest dried cell mass at 3.06 g/L and BJ-61 grew poorly with 1.98 g/L of biomass. Gas chromatography analysis discerned these strains, with the production DHA varied: 10.73, 1.53, 73.43, 11.83, 18, 3.07 and 19.83 mg/g of dried biomass for isolate PN-123, PN142, PN-152, BJ-11, BJ-21, BJ-51 and BJ-61 respectively. The strain with highest DHA yield is PN152, it produces up to 73.43 g of cell dry weight per gram and 97.63 % DHA of total polyunsaturated fatty acid.

Keywords: thraustochytrids, docosahexaenoic acid, mangrove forest

บทนำ

กรดไขมันกลุ่มโอเมกา-3 เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acids) ที่มีความสำคัญสำหรับกระบวนการต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะ docosahexaenoic acid (DHA 22:6, n=3) ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาสมองของทารก นอกจากนี้ยังมีความสำคัญสำหรับป้องกันความผิดปกติในระบบภูมิคุ้มกัน ระบบการหมุนเวียนเลือด ระบบประสาท การอักเสบ รวมทั้งยังควบคุมการทำงานของสมองและการมองเห็นให้เป็นไปอย่างปกติ แต่ร่างกายมนุษย์ไม่มีเอนไซม์สำหรับสังเคราะห์ DHA จึงจำเป็นต้องได้รับจากการบริโภคอาหาร และจากการที่ DHA มีความสำคัญอย่างมากในทางการแพทย์และด้านโภชนาการ จึงทำให้ความต้องการไขมันและน้ำมันที่มีกรดไขมันดังกล่าวเป็นองค์ประกอบมีเพิ่มมากขึ้น แม้ว่าปลาทะเลจะเป็นแหล่งสำคัญของ DHA แต่ในการสกัดมาใช้ประโยชน์นั้นยังประสบปัญหาหลายประการ เช่น ปัญหาด้านกลิ่น รสชาติ ความคงตัวของสารสกัด และกระบวนการสกัดที่ยุ่งยาก ทำให้กระบวนการผลิตกรดไขมันจากน้ำมันปลาทะเลมีค่าใช้จ่ายสูง การผลิตขนาดใหญ่ทำได้ยาก (Poontawee, 2007) จากปัญหาที่เกิดขึ้นจึงได้มีทางเลือกใหม่โดยการผลิตจากจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรียในทะเล รา และสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) ที่สามารถคัดแยกได้จากป่าชายเลนเพราะ DHA ที่สะสมในปลาทะเลส่วนใหญ่นั้นได้มาจากการสะสมผ่านห่วงโซ่อาหารที่มีแพลงตอนทะเลเป็นผู้ผลิตขั้นต้น Thraustochytrids จึงเป็นทางเลือกใหม่ในการนำมาใช้เพื่อผลิต DHA โดยเฉพาะสกุล *Thraustochytrium* และ *Schizochytrium* ถือว่าเป็นแหล่งผลิต DHA ที่สำคัญ (Ward and Singh, 2005) เนื่องจากเป็นเซลล์เดี่ยว ที่มีลักษณะรูปร่างค่อนข้างกลม จึงสามารถเพาะเลี้ยงได้ง่ายกว่าราเส้นใย (Wu *et al*., 2005) Thraustochytrids พบแพร่กระจายมากในป่าชายเลน เนื่องจากจุลินทรีย์กลุ่มนี้เจริญได้โดยอาศัยใบพืชที่ร่วงหล่นในป่าชายเลน นักวิจัยส่วนใหญ่จึงคัดแยกสายพันธุ์ Thraustochytrids ได้จากทะเล และน้ำทะเลบริเวณแนวชายฝั่ง (Gupta, Battow and Puri, 2012) ตัวอย่างดิน ใบ และรากหายใจของพันธุ์ไม้ในป่าชายเลน (Hong *et al*., 2011)

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกไอโซเลตของ Thraustochytrids จากป่าชายเลนนครศรีธรรมราช และคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิต DHA มาใช้ประโยชน์ในการผลิตกรดไขมันต่อไป

อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างใบของโกงกางใบเล็ก (*Rhizophora apiculata*) ที่มีสีน้ำตาล จากป่าชายเลนบริเวณที่มีน้ำขึ้น - น้ำลงในพื้นที่ชายฝั่งอำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช พร้อมทั้งบันทึกความเค็ม ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิของจุดที่เก็บตัวอย่างใบโกงกางแล้วนำมาคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิต DHA ในห้องปฏิบัติการวิจัยจุลชีววิทยาโมเลกุล มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

การคัดแยกจุลินทรีย์ที่ผลิต DHA

นำตัวอย่างชิ้นส่วนใบโกงกางมาทำความสะอาดด้วยน้ำทะเลปราศจากเชื้อความเค็ม 15 กรัมต่อลิตร ที่เติมยาปฏิชีวนะ streptomycin และ penicillin ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย แล้วตัดตัวอย่างใบไม้ออกเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร นำชิ้นตัวอย่างใบไม้ไปวางลงบนอาหารแข็ง YEP ที่เติมยาปฏิชีวนะยับยั้งแบคทีเรียแล้ว หยดน้ำทะเลความเค็ม 15 กรัมต่อลิตร ที่ปราศจากเชื้อลงไปประมาณ 0.5 มิลลิลิตร พันทับรอบจานอาหารด้วยแผ่นพาราฟิล์ม เพื่อป้องกันการระเหยของน้ำ นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 วัน ระหว่างนั้นต้องตรวจการเจริญของเชื้อทุกวัน และเมื่อมีการเจริญเป็นโคโลนีแล้วย้ายลงสู่อาหาร YEP ใหม่จนกว่าจะได้เชื้อบริสุทธิ์แล้วนำมาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรที่บรรจุอาหารเหลว YPGS ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นจึงเปลี่ยนลงในอาหารใหม่ทุกๆ 1 เดือน เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

เก็บเชื้อที่เพาะเลี้ยงไว้ 5 วัน ไอโซเลตละ 50 มิลลิลิตรใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยง และทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งไป แล้วล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง ปริมาตรครั้งละ 10 มิลลิลิตร ครั้งสุดท้ายเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อลงไปอีก 5 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้ตะกอนของเชื้อแขวนลอยในน้ำกลั่น และทำเซลล์แห้งด้วยวิธี freeze-dried ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วน้ำมาชั่งน้ำหนัก

การวิเคราะห์กรดไขมัน

การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน ทำได้โดยต้องเตรียม fatty acid methyl ester (FAME) จากเซลล์สาหร่ายที่แห้งด้วยวิธี freeze-dried ประมาณ 30 มิลลิกรัม เติมลงในหลอดแก้วฝาเกลียว แล้วเติมสารละลายผสม

ระหว่างกรดซัลฟิวริกร้อยละ 4 ในเมทานอล ลงไปปริมาณ 2 มิลลิลิตร เติมกรด hepatodecaenoic acid (C17:0) ปริมาณ 3.0 มิลลิกรัมลงไปในแต่ละหลอด เพื่อเป็นมาตรฐานเริ่มต้น นำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้ววางทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมน้ำกลั่นและเฮปเทนอย่างละ 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดแต่ละหลอด เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารประมาณ 1 นาที แล้วทำการแยกเก็บ fatty acid methyl ester (FAME) โดยการหมุนเหวี่ยงแล้วเก็บ FAME ไว้ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณและชนิดกรดไขมันด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟีแบบคาปิลลารี่ (capillary gas chromatography) ที่ใช้ระบบตรวจแบบ FID ตั้งค่าอุณหภูมิ detector เท่ากับ 250 องศาเซลเซียสและใช้คอลัมน์แบบคาปิลลารี่ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 250 ไมโครเมตร และยาว 30 เมตร ตั้งค่าอุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับ 235 องศาเซลเซียส มี hepatodecaenoic acid (C17:0) เป็น initial standard ใช้ตัวอย่าง FAMEs ตัวอย่างละ 1 ไมโครลิตร ใช้ไฮโดรเจนเป็นก๊าซพา (carrier gas) ที่อัตราเร็วเท่ากับ 100 มิลลิลิตรต่อนาที วิเคราะห์ชนิดกรดไขมันโดยเปรียบเทียบค่า relative retention times (Kamlangdee and Fan, 2003) กับกรดไขมันมาตรฐานความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Sigma Chemical company)

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ผลการคัดแยกจุลินทรีย์ที่ผลิต DHA

การศึกษาครั้งนี้เก็บตัวอย่างใบโกงกาง จากป่าชายเลนในจังหวัดนครศรีธรรมราช มาคัดแยกไอโซเลตของ Thraustochytrids ได้ทั้งหมด 7 ไอโซเลต ดังแสดงใน Table 1 บริเวณที่เก็บตัวอย่างมีสภาพทางกายภาพแตกต่างกัน (Table 1) พื้นที่เก็บตัวอย่างเป็นป่าชายเลนทางด้านฝั่งอ่าวไทย ลักษณะโดยทั่วไปเป็นดินเลนที่มีพืช ป่าชายเลนขึ้นอย่างหนาแน่น ได้แก่ โกงกางใบเล็ก (*Rhizophora apiculata*) โกงกางใบใหญ่ (*R. macronata*) และแสมทะเล (*Avicennia marina*) ระดับความเค็มของน้ำทะเลในแต่ละบริเวณที่เก็บตัวอย่างนั้นมีความแตกต่างกัน คือ จุดเก็บตัวอย่างคลองบางจากมีระดับความเค็มเท่ากับ 22 ppt. ส่วนบริเวณปากพนังมีระดับความเค็มสูงถึง 33 ppt. สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่างของจุดเก็บตัวอย่างอยู่ระหว่าง 6.73-7.78

Table 1. *Schizochytrium* spp. strains isolated from mangrove in Nakhon Si Thammarat and environmental conditions of sampling sites.

Sampling sites	Isolate	Substrate[a]	Temperature	Salinity	pH
Pakphanang	PN123, PN142, PN152	Brown	25 °C	33 ppt.	6.733
Bangjak	BJ11, BJ21, BJ51, BJ61	Brown	26 °C	22 ppt.	7.784

[a]All the thraustochytrid strains (PN-123, PN142, PN-152, BJ-11, BJ-21, BJ-51 and BJ-61) were isolated from submerged *Rhizophora apiculata* leaves in mangrove.

ลักษณะโคโลนีของThraustochytrids ทั้ง 7 ไอโซเลตที่เจริญบนอาหาร YEP agar โคโลนีค่อนข้างกลม ขนาดใหญ่ สีขาว นูน ขอบไม่เรียบ (Fig.1) เมื่อนำโคโลนีมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบเซลล์เดี่ยวๆ

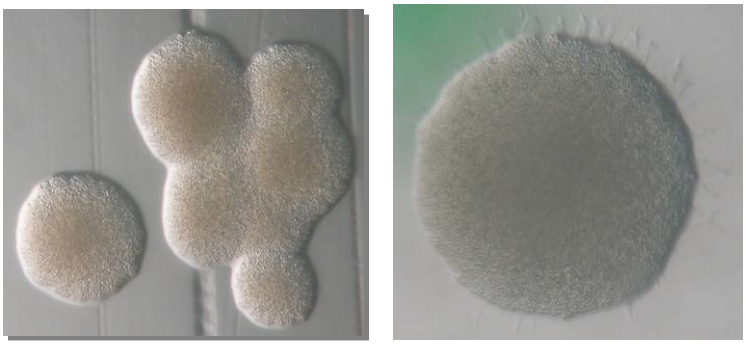

Fig. 1 Colony of *Schizochytrium* spp. on YEP agar

ขนาดใหญ่ และมีการแบ่งเซลล์เป็นแบบ binary division ทำให้เห็นเซลล์ระยะ diads, tetrads และอยู่กันเป็นกลุ่มขนาดใหญ่ ดัง Fig.2 ซึ่งลักษณะการแบ่งเซลล์ ที่มีการแบ่งครั้งละ 2 เซลล์ (binary cell division) ของ vegetative cell นั้นเป็นลักษณะที่ใช้ในการจัดจำแนกสกุล *Schizochytrium* (Yokoyama and Honda, 2007)

ผลการเจริญของจุลินทรีย์ที่ผลิต DHA

การเจริญของ Thraustochytrids จำนวน 7 ไอโซเลต เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว Yeast extract glucose peptone sea salt medium (YGPS) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน พบว่าไอโซเลต PN-152 มีมวลชีวภาพ (น้ำหนักแห้ง) สูงสุดเท่ากับ 3.06 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ ไอโซเลต

BJ-21 มีมวลชีวภาพ (น้ำหนักแห้ง) เท่ากับ 3.03 กรัมต่อลิตร และไอโซเลต BJ-61 เจริญได้น้อยที่สุด มีมวลชีวภาพ (น้ำหนักแห้ง) เท่ากับ 1.98 กรัมต่อลิตร ดัง Table 2

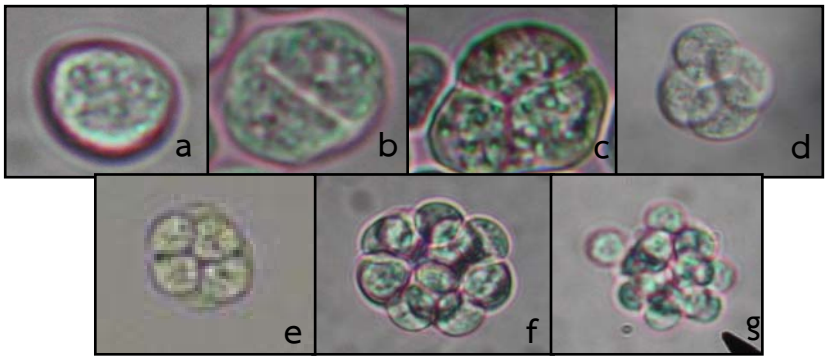

Fig. 2 Microphotographs of *Schizochytrium* spp. under light microscope (40X) show binary cell division on the YEP agar (a-f; (a) mature cell (b) diads, (c-d) tetrads (e-g) cluster of cells).

Table 2. Biomass production of Thraustochytrids after culturing for 5 days in YGPS

Isolate	Biomass (g/50 ml)				Biomass (g/L)
	1st	2nd	3rd	Average	
PN123	0.1088	0.1094	0.1094	0.11	2.18±0.01 [a]
PN142	0.1225	0.1228	0.1227	0.12	2.45±0.00 [b]
PN152	0.1530	0.1539	0.1523	0.15	3.06±0.02 [c]
BJ11	0.1412	0.1415	0.1414	0.14	2.83±0.00 [d]
BJ21	0.1523	0.1513	0.1513	0.15	3.03±0.01 [e]
BJ51	0.1222	0.1214	0.1220	0.12	2.44±0.01 [b]
BJ61	0.0989	0.0997	0.0985	0.10	1.98±0.01 [f]

Means within column not sharing the same superscript are significantly different ($p<0.05$)

มวลชีวภาพ (น้ำหนักเซลล์แห้ง) ของ Thraustochytrids ทั้ง 7 ไอโซเลต อยู่ระหว่าง 1.98 ถึง 3.06 กรัมต่อลิตร โดยทั้ง 5 ไอโซเลต (PN123, PN152, BJ11, BJ21 และ BJ51) มีการเจริญที่แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) สำหรับไอโซเลต PN142 และ BJ51 มีการเจริญที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) คือมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ

2.45±0.00 และ 2.44±0.01 กรัมต่อลิตรตามลำดับ แต่แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) กับไอโซเลต PN123, PN152, BJ11, BJ21 และ BJ51 ซึ่งมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 2.18±0.01, 3.06±0.02, 2.83±0.00, 3.03±0.01 และ 1.98±0.01 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (Polyunsaturated fatty acids, PUFAs)

จากการวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันจากเซลล์สาหร่ายที่ทำแห้ง พบว่าเชื้อ Thraustochytrids ที่คัดแยกได้ทั้ง 7 ไอโซเลต ไม่มีการสะสมกรดไขมัน EPA ขณะที่มีการสะสมกรดไขมัน DHA อยู่ในช่วง 3.07-73.43 มิลลิกรัมต่อกรัม (น้ำหนักเซลล์แห้ง) ไอโซเลตที่สะสมกรดไขมัน DHA สูงสุด คือ PN152 เท่ากับ 73.43 มิลลิกรัมต่อกรัม และไอโซเลตที่สะสมกรดไขมัน DHA น้อยสุด คือ PN142 เท่ากับ 1.53 มิลลิกรัมต่อกรัม ส่วนไอโซเลต PN123, BJ11, BJ21, BJ51 และ BJ61 มีการสะสมกรดไขมัน DHA เท่ากับ 10.73, 11.83, 18, 3.07 และ 19.83 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ (แสดงดัง Table 3)) และเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ DHA ที่สะสมภายในเซลล์กับน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยการทดสอบค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, *r*) พบว่าตัวแปรทั้งสองไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) นั้นคือการสะสม DHA ภายในเซลล์ไม่ได้ขึ้นอยู่กับน้ำหนักเซลล์แห้งที่เพิ่มขึ้น สำหรับสัดส่วนการสะสมกรดไขมันอื่นๆ ของทั้ง 7 ไอโซเลต พบว่า ทุกไอโซเลต (PN123, PN142, PN152 BJ11, BJ21, BJ51 และ BJ61) ไม่มีการสะสมกรดไขมัน C20:5 แต่มีการสะสมกรดไขมัน C22:6 (DHA) คิดเป็นร้อยละ 92.87, 52.34, 97.63, 97.51, 95.48, 82.22 และ 96.01 ของกรดไขมันอิ่มตัวสูงทั้งหมด (%total PUFAs) ตามลำดับ ดัง Fig.3

จะเห็นได้ว่าปัจจุบันมีการคัดแยก Thraustochytrids อย่างแพร่หลาย (Yang *et al*., 2010, Hong *et al*., 2011) เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิต DHA มาใช้ประโยชน์ ดังเช่น Hong *et al*. (2011) ได้คัดแยก thraustochytrids จากป่าชายเลนในประเทศมาเลเซีย แล้วนำมาเพาะเลี้ยง พบว่าสายพันธุ์ KRS101 มีมวลชีวภาพสูงสุดเท่ากับ 50.2 กรัมต่อลิตร มีการสะสม DHA เท่ากับ 21.8 กรัมต่อลิตร (ร้อยละ 44 ของมวลชีวภาพ) (ร้อยละ 40 ของกรดไขมันทั้งหมด) Burja *et al*. (2006) ได้คัดแยกสายพันธุ์ *Thraustochytrium* จากชายฝั่งตะวันออกของแคนาดา พบว่า สายพันธุ์ ONC-T18 เป็นสายพันธุ์ที่ผลิต DHA ได้ร้อยละ 35 ของกรดไขมันทั้งหมด สำหรับ Thraustochytrids ที่ คัดแยกได้จากป่าชายเลน นครศรีธรรมราช ไอโซเลต PN152 มีมวลชีวภาพสูงสุด มีการสะสม DHA เท่ากับ 73.43 มิลลิกรัมต่อกรัม คิดเป็นสัดส่วนต่อกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงทั้งหมดเท่ากับร้อยละ 97.63 จัดเป็นไอโซเลตที่เหมาะสมจะนำไปศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิต DHA เพราะการเจริญของจุลินทรีย์ที่ผลิต DHA นั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการด้วยกัน ตั้งแต่ สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ไปจนถึงสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง เช่น อุณหภูมิ ความเค็ม รวมทั้งองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเฉพาะแหล่งคาร์บอน

Table 3. Fatty acid composition and docosahexaenoic acid (DHA) yields of freeze-dried *Schizochytrium* spp strains.

Isolate	Percentage in total PUFAs							DHA (mg/g)
	C18:3	C20:2	C20:3	C20:4	C20:5	C22:2	C22:6	
PN123	2.85	3.09	0.00	1.19	0.00	0.00	92.87	10.73
PN142	12.15	11.21	0.00	14.02	0.00	10.28	52.34	1.53
PN152	0.29	0.80	0.37	0.91	0.00	0.00	97.63	73.43
BJ11	0.00	1.36	0.00	1.13	0.00	0.00	97.51	11.83
BJ21	0.00	3.21	0.00	1.31	0.00	0.00	95.48	18
BJ51	0.00	8.15	0.00	9.63	0.00	0.00	82.22	3.07
BJ61	0.00	2.66	0.00	1.33	0.00	0.00	96.01	19.83

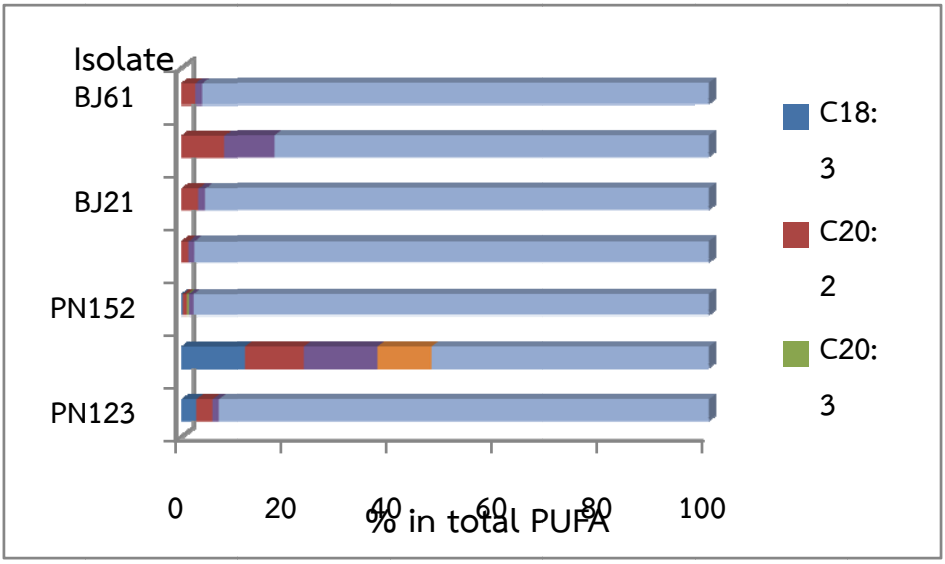

Fig. 3 Fatty acid profiles of *Schizochytrium* spp strains in this study, C18:3; Linolenic acid, C20:2; Eicosadienoic acid, C20:3; Eicosatrienoic acid, C20:4; Arachidonic acid, C20:5; Eicosapentaenoic acid, C22:2; Docosatrienoic acid, C22:6; Docosahexaenioc acid)

สรุปผลการวิจัย

ในการคัดแยก *Schizochytrium* spp. จากป่าชายเลน บริเวณจังหวัดนครศรีธรรมราชได้ 7 ไอโซเลต (PN-123, PN142, PN-152, BJ-11, BJ-21, BJ-51 และ BJ-61) พบว่าไอโซเลต PN-152 มีการเจริญและสะสม DHA สูงสุด คือมีมวลชีวภาพ (น้ำหนักแห้ง) เท่ากับ 3.06 กรัมต่อลิตร และสะสม DHA เท่ากับ 73.43 มิลลิกรัมต่อกรัมตามลำดับ คิดเป็นสัดส่วนต่อกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงทั้งหมดเท่ากับร้อยละ 97.63 (% total PUFAs) ส่วนไอโซเลต BJ-61 เจริญได้น้อยที่สุด มีมวลชีวภาพ (น้ำหนักแห้ง) เท่ากับ 1.98 กรัมต่อลิตร และไอโซเลตที่สะสมกรดไขมัน DHA น้อยสุด คือ PN142 เท่ากับ 1.53 มิลลิกรัมต่อกรัม *Schizochytrium* spp. ไอโซเลต PN-152 จึงเป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิต DHA สูงเหมาะที่จะนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผลงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ และ สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

เอกสารอ้างอิง

Burja, A.M., Radianingtyas, H., Windust, A. and Barrow, C.J. (2006). Isolation and characterization of polyunsaturated fatty acid producing Thraustochytrium species: screening of strains and optimization of omega-3 production. Applied Microbiology Biotechnology. doi 10.1007/s00253-006-0419-1

Gupta, A., Barrow, C. J. and Puri, M. (2012). Omega-3 biotechnology: Thraustochytrids as a novel source of omega-3 oils. Biotechnology advances, 30, 1733-1745.

Hong, W. K., Rairrakhwada, D., Seo, P. S., Park, S. Y., Hur, B. K., Kim, C. H. and Seo, J. W.. (2011). Production of Lipids Containing High Levels of Docosahexaenoic acid by a newly Isolated Microalga, *Aurantiochytrium* sp. KRS101. Applied Biochemical Biotechnology, 164, 1468-1480.

Kamlangdee, N. Chansopon, S and Kamsook, R. (2000). Selection of Useful Polyunsaturated Fatty acid Producing Fungi Isolated from Mangrove Area. Walailak university. Nakhon Si Thammarat. 27 pages. [in Thai]

Kamlangdee, N. and Fan, K.W. (2003). Polyunsaturated fatty acids production by *Schizichytrium* sp. isolated from mangrove. *Songklanakarin* Journal Science Technology, 25(5), 643-650.

Poungchor, P. (2009). Effect of *Shizochytrium* sp. On Growth and Survival of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone). Master of Science (Fisheries Science). Kasetsart university. Bangkok. 101 pages. [in Thai]

Poontawee, R. (2007). Optimization of DHA and Astaxanthin Production by Thraustochytrids from mangrove forest. Master of Science (microbiology). Kasetsart university. Bangkok. 246 pages. [in Thai]

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

Wu, S.T., Yu, S.T. and Lin, L.P. (2005). Effect of culture conditions on docosahexaenoic acid and production by *Schizochytrium* sp. S31. Process Biochemistry, 40, 3103-3108.

Yang, H. L., Lu, C. K., Chen, S. F., Chen, Y. Mao and Chen, Y. Min. (2010). Isolation and Characterization of Taiwanese Heterotrophic Microalgae: Screening of Strain for Docosahexaenoic Acid (DHA) Production. Marine Biotechnology, 12, 173-185.

Yokoyama, R. and Honda, D. (2007). Taxonomic rearrangement of the genus *Schizochytrium* sensu lato based on morphology, chemotaxonomic characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): emendation for *Schizochytrium* and erection of *Aurantiochytrium* and *Oblongichytrium* gen. nov. Mycoscience, 48, 199-211.

Zeller, S., Barclay, W. and Abril, R. (2001). Production of Docosahexaenoic acid from Microalgae. In Shahidi, F. and Finley, J. W. (Eds), *Omega-3 Fatty acids Chemistry, Nutrition, and Health Effects*. (pp. 108-124). Washington, DC: American Chemical Society.