

<http://journal.rmutp.ac.th/>

แบบจำลองพื้นผิวตอบสนองและการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มการผลิตกรดแกมมา-ไลโนเลนิกในมอส *Physcomitrella patens* โดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง

พิชิต โชตก*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา

96 ถนนปรีดีพนมยงค์ ตำบลประตูลี้ อำเภอเมืองพระนครศรีอยุธยา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา 13000

รับบทความ 14 เมษายน 2563 แก้ไขบทความ 10 พฤศจิกายน 2563 ตอรับบทความ 17 ธันวาคม 2563

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เพื่อสร้างแบบจำลองสำหรับการผลิตกรดแกมมา-ไลโนเลนิก (GLA) สูงสุดโดยมอส *Physcomitrella patens* ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (RSM) การทดลองด้วยวิธี RSM ร่วมกับการวางแผนการทดลองแบบเซ็นทรัลคอมโพสิต 3 ปัจจัย (ความเข้มข้นของซูโครส โพลีแซคคาไรด์ในเทรต และกลูตาเมต) และ 5 ระดับ (-2, -1, 0, +1 และ +2) ประกอบด้วย 20 การทดลองเพื่อใช้หาสูตรอาหารที่เหมาะสม ผลจากการทดลอง พบว่าข้อมูลจากการทดลองสามารถนำไปใช้สร้างแบบจำลองพหุนามกำลังสองด้วยสัมประสิทธิ์การตัดสี่เหลี่ยม (R^2) มากกว่า 0.95 สำหรับการผลิต GLA การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) แสดงให้เห็นว่าแบบจำลองมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.0001$) และความเข้มข้นของซูโครส (20-100 กรัมต่อลิตร) และกลูตาเมต (0.5-2.5 กรัมต่อลิตร) มีผลต่อการผลิต GLA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งการผลิต GLA เพิ่มขึ้น 4.61 เท่า ในสูตรอาหารที่ปรับปรุงให้เหมาะสมด้วยวิธี RSM (ซูโครส 62.92 กรัมต่อลิตร โพลีแซคคาไรด์ในเทรต 0.80 กรัมต่อลิตร และกลูตาเมต 1.42 กรัมต่อลิตร) เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารพื้นฐาน BCD ซึ่งค่าที่ได้จากการทดลองนี้ (16.37 มิลลิกรัม GLA ต่อลิตร) ใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการทำนาย (16.20 มิลลิกรัม GLA ต่อลิตร)

คำสำคัญ : มอส *Physcomitrella patens*; กรดแกมมา-ไลโนเลนิก; พื้นผิวตอบสนอง; การวางแผนการทดลองแบบเซ็นทรัลคอมโพสิต

* ผู้มีพันธะประสานงาน โทร: +668 1578 9980, ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์: pichit_chodok@yahoo.com

<http://journal.rmutp.ac.th/>

Response Surface Modeling and Optimization of Media Nutrients for Enhanced Production of γ -linolenic Acid in the Moss *Physcomitrella patens* Using Response Surface Methodology

Pichit Chodok*

Faculty of Science and Technology, Phranakorn Si Ayutthaya Rajabhat University
96 Pridi Banomyong, Pratu chai, Phranakhon Si Ayutthaya, Phranakhon Si Ayutthaya 13000

Received 14 April 2020; Revised 10 November 2020; Accepted 17 December 2020

Abstract

The objective of this study is to obtain a model that maximize production of γ -linolenic acid (GLA) by the moss *Physcomitrella patens*, employing response surface methodology (RSM). The RSM with a three-variables (sucrose, potassium nitrate and glutamate concentrations) and five-level (-2, -1, 0, 1 and 2) central composite design (CCD) including 20 experimental runs was employed to optimize the medium composition. Results showed that the experimental data could be appropriately fitted into a second-order polynomial model with a coefficient of determination (R^2) more than 0.95 for GLA production. Analysis of variance (ANOVA) revealed that the model was highly significant ($p < 0.0001$) and the effects of the sucrose (20-100 g/L) and glutamate (0.5-2.5 g/L) concentrations on GLA production were significant ($p < 0.05$). The GLA production with the optimized culture medium (sucrose concentration of 62.92 g/L, potassium nitrate of 0.80 g/L and glutamate concentration of 1.42 g/L) by RSM increased 4.61 folds when compared with the standard BCD medium. This experimental value (16.37 mg GLA/L) fit well with the predicted values (16.20 mg GLA/L).

Keywords : Moss *Physcomitrella Patens*; γ -linolenic Acid; Response Surface Methodology; Central Composite Design

1. บทนำ

กรดแกมมา-ไลโนเลนิก (γ -linolenic Acid, GLA) เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวในกลุ่มโอเมก้า-6 (Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acid) ที่มีจำนวนคาร์บอน 18 อะตอม และ 3 พันธะคู่ในตำแหน่งคาร์บอนที่ 6, 9 และ 12 เมื่อนับจากปลายคาร์บอกซิล (Carboxyl End) พบในน้ำมันของมนุษย์ และพืชชั้นสูงบางชนิด ได้แก่ อีฟนิงพริมโรส (Evening Primrose) โบราจ (Borage) และแบล็คเคอร์แรนท์ (Blackcurrant) มีปริมาณ GLA เท่ากับร้อยละ 9, 21 และ 17 ตามลำดับ [1] ในปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์โภชนเภสัช (Nutraceutical) จาก GLA ออกมาจำหน่ายในท้องตลาดหลากหลายชนิด จึงทำให้ GLA เป็นกรดไขมันสายยาวกลุ่มโอเมก้า-6 ที่ได้รับความนิยมเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ประกอบกับมีรายงานการวิจัยทางเภสัชวิทยาของ GLA เป็นที่ประจักษ์แล้วว่า มีประโยชน์ เนื่องจาก GLA จัดเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์เอโคซานอยด์ (Eicosanoid Precursors) ซึ่งได้แก่ Prostaglandins E1 และ 15-hydroxyeicosatrienoic Acid (15HETE) [1] ดังนั้นการรับประทาน GLA มีผลป้องกันการเกิดโรคอัลไซเมอร์ [2], [3] มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อวัณโรค *Mycobacterium tuberculosis* (Anti-tubercular Activity) [4] ช่วยป้องกันโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ [5] ป้องกันโรคผื่นภูมิแพ้ผิวหนัง [6], [7] ลดความเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็งเต้านม [8] และป้องกันโรคเบาหวาน [9] จากประโยชน์และความสำคัญของ GLA ส่งผลให้มียานวิจัยมากมายต่างมุ่งเน้นในการหาแหล่งผลิต GLA ชนิดใหม่ ๆ จากพืช ได้แก่ *Aizoon canariense* [10] พืชในวงศ์ Boraginaceae เช่น *Borago morisiana*, *B. pygmaea*, *B. trabutii* และ *B. longifolia* [11], [12] แบล็คเคอร์แรนท์ (*Ribes nigrum* L.) เรดเคอร์แรนท์ (Redcurrant) เช่น *Ribes rubrum* L. กุสเบอร์รี่ (Gooseberry) เช่น *Ribes uva-crispa* L., *Jostaberry* (*Ribes nidrigolaria* Bauer) [13] พืชในสปีชีส์ *Echium* เช่น *Echium sericeum*

และ *Echium parviflorum* [14] และพืชในวงศ์ Grossulariaceae เช่น *Ribes pallidiflorum*, *R. glabellum* และ *R. pubescens* [15] รวมทั้งงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสกัด GLA จากสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ตัวอย่างเช่น การสกัด GLA จากเชื้อรา *Mucor zychoe* MTCC 5420 [16] และสาหร่ายเกลียวทอง *Spirulina platensis* [17] รวมทั้งการปรับปรุงพันธุ์ด้วยกระบวนการทางเทคโนโลยีพันธุวิศวกรรม และการพัฒนาวิธีและสูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อรา ได้แก่ *Yarrowia lipolytica* [18] *M. circinelloides* [19] และ *Aspergillus oryzae* [20] ดังนั้นการผลิต GLA ด้วยวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง ที่ได้รับความสนใจ และมีการศึกษากันอย่างต่อเนื่อง

มอส *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp. เป็นพืชชั้นต่ำ (Lower Plant) ที่สามารถผลิต GLA ได้ เนื่องจากมีวิถีของการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวทั้งในกลุ่มโอเมก้า-3 และโอเมก้า-6 [21], [22] แต่อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงเซลล์ *P. patens* ในสูตรอาหารพื้นฐาน BCD ยังมีการผลิตกรดไขมันชนิดนี้ในปริมาณน้อยมาก ซึ่งผลิตได้เพียง 3.55 มิลลิกรัม GLA ต่อลิตร การปรับปรุงสูตรอาหารเพื่อเพิ่มปริมาณการผลิต GLA ด้วยกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจ สอดคล้องกับงานวิจัยของ P. Chodok [23] ได้ศึกษาผลของสารอาหาร 3 ชนิด ได้แก่ น้ำตาลซูโครส โปแทสเซียมไนเตรต และกลูตาเมตต่อการเพิ่มการผลิต กรดไดโฮโม-แกมมา-ไลโนเลนิก (Dihomo- γ -linolenic Acid, DHGLA) ในเซลล์ *P. patens* ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM) พบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ *P. patens* ในสูตรอาหารที่เหมาะสมสามารถผลิต DHGLA ได้เพิ่มขึ้น 8.67 เท่า หรือเพิ่มขึ้นจาก 1.27 เป็น 11.01 มิลลิกรัม DHGLA ต่อลิตร จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารอาหารทั้ง 3 ชนิดนี้มีส่วนช่วยให้เซลล์ *P. patens* ผลิตกรดไขมัน DHGLA ได้เพิ่มขึ้น จึงมีความเป็นไปได้ที่จะช่วยเพิ่มการผลิต

GLA ด้วยเช่นกัน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารอาหารทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ น้ำตาล ซูโครส โพรแทสเซียมไนเตรต และกลูตาเมตที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มการผลิต GLA ในเซลล์ *P. patens* ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง และวางแผนการทดลองแบบ เซ็นทรัลคอมโพสิต (Central Composite Design, CCD) โดยมีปัจจัยที่ศึกษาจำนวน 3 ปัจจัย และ 5 ระดับ (-2, -1, 0, +1, +2) ประกอบด้วย 20 ชุดการทดลอง ซึ่งองค์ความรู้และข้อมูลพื้นฐานที่ได้สามารถนำไปประยุกต์สู่การพัฒนากระบวนการผลิต GLA ในระดับอุตสาหกรรมเชิงพาณิชย์ รวมทั้งการใช้ประโยชน์ในทางแพทย์ เกษษกรรม เครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์อาหาร และผลิตภัณฑ์โภชนเภสัชต่อไปในอนาคต

2. ระเบียบวิธีวิจัย

2.1 สายพันธุ์มอส *Physcomitrella patens*

อาหาร สภาวะของการเพาะเลี้ยง และการเตรียมเซลล์

สายพันธุ์มอสที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ คือ *Physcomitrella patens* (Gransden Strain) ได้รับมาจาก Prof. Ralph S. Quatrano (Washington University, St. Louis, USA) ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร BCD ภายใต้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์สีขาว ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส [23] การเตรียมเซลล์เริ่มต้นโดยการนำเซลล์ *P. patens* ในระยะโปรโตนีมา (Protonema) ที่มีอายุ 14 วัน ปริมาณ 1 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลว BCD ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บั่นให้ละเอียดด้วยเครื่อง Homogenizer (OMNI THQ, USA) ที่ความเร็ว 25,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นดูดสารละลายเซลล์แขวนตะกอน (Cell Suspension) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลว BCD ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250

มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงด้วยเครื่องเขย่า (New Brunswick Scientific Innova 2 1 0 0 , Champaign, IL, USA) ที่ความเร็ว 125 รอบต่อนาที ในระหว่างการเพาะเลี้ยงมีการให้แสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ รวมทั้งควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส เมื่อเพาะเลี้ยงครบ 7 วัน นำเซลล์ *P. patens* ที่ได้ไปใช้ในการทดลองต่อไป [23]

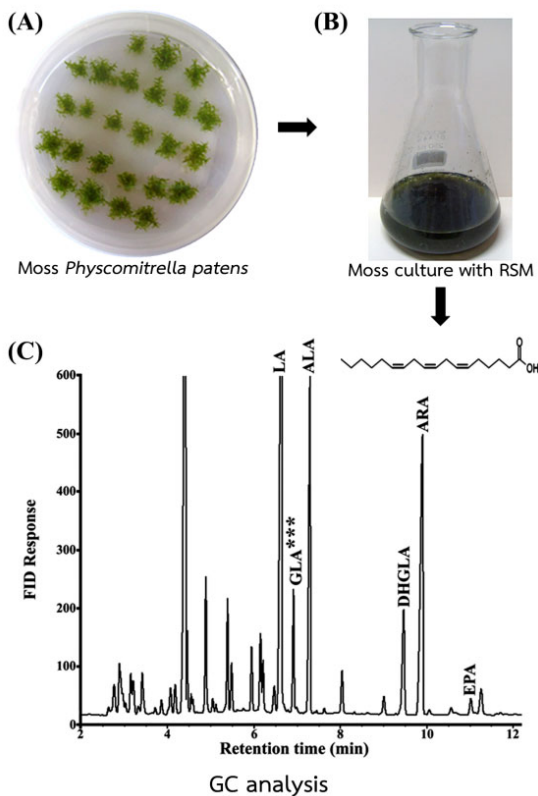
2.2 การศึกษาผลของซูโครส โพรแทสเซียมไนเตรต และกลูตาเมตที่เหมาะสมต่อการเพิ่มการผลิต GLA ในเซลล์ *P. patens* ด้วยวิธี RSM และวางแผนการทดลองแบบ CCD

นำเซลล์ *P. patens* ที่เตรียมได้จากข้อ 2.1 มาศึกษาผลของความเข้มข้นของซูโครส (20, 40, 60, 80 และ 100 กรัมต่อลิตร) โพรแทสเซียมไนเตรต (0.4, 0.6, 0.8, 1.0 และ 1.2 กรัมต่อลิตร) และกลูตาเมต (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 กรัมต่อลิตร) ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มการผลิต GLA ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (RSM) และวางแผนการทดลองแบบ CCD แสดงดังรูปที่ 1 โดยแบ่งระดับของปัจจัยออกเป็น 5 ระดับ คือ -2, -1, 0, +1 และ +2 และมีจำนวนของการทดลองรวมทั้งหมด 20 ชุดการทดลอง (ตารางที่ 1) และในแต่ละชุดการทดลองเพาะเลี้ยงจำนวน 3 ซ้ำ [23]

จากนั้นทำการทดลองโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ *P. patens* ภายใต้สภาวะของการเขย่าที่ความเร็ว 125 รอบต่อนาที ให้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ และควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน เมื่อทำการทดลองเสร็จตามที่ได้ออกแบบการทดลองไว้ ทั้ง 20 ชุดการทดลอง ทำการเก็บตัวอย่างเซลล์ *P. patens* จากขวดรูปชมพู่โดยการกรอง และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อจำนวน 2 ครั้ง และนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องแช่เยือกแข็ง (Freez Dry) หลังจากนั้นนำตัวอย่างเซลล์ *P. patens* ไปบดให้ละเอียด

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณ GLA ด้วยเครื่อง Gas chromatography (GC)

นำเซลล์ *P. patens* ที่บดละเอียดปริมาณ 200 มิลลิกรัม นำไปสกัดกรดไขมัน และทำปฏิกิริยานอนุพันธ์ของกรดไขมันในรูปของเมทิลเอสเทอร์ (Fatty Acid Methyl Ester, FAME) ตามวิธีของ P. Chodok และคณะ [22] จากนั้นนำตัวอย่างที่เตรียมไว้ ซึ่งมีปริมาตร 2 ไมโครลิตร มาทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatography-Flame Ionization Detector (GC-FID) รุ่น HP-6890 (Agilent, California, USA) และเปรียบเทียบชนิดของอนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ของ GLA จากค่า Retention Time และคำนวณหาปริมาณของ GLA (หน่วยเป็นมิลลิกรัม GLA ต่อลิตร) โดยใช้พื้นที่ใต้กราฟเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน [22]



รูปที่ 1 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มการผลิต GLA โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์มอส *P. patens* ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง

2.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำค่าการผลิต GLA จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ *P. patens* ทั้ง 20 ชุดการทดลองไปวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม Design-Expert Version 8.0.3 Trial (State Ease, Minneapolis, MN, USA) โดยแบ่งการวิเคราะห์ออกเป็น 5 ส่วน ดังต่อไปนี้ (1) การตรวจสอบคุณภาพ และความเหมาะสมของข้อมูล ได้แก่ (1.1) ส่วนตกค้างของข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ (1.2) ความแปรปรวนของข้อมูลมีเสถียรภาพ และ (1.3) ข้อมูลมีความเป็นอิสระ (2) การพิจารณารูปแบบ และการสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์เพื่อทำนายค่าการผลิต GLA ซึ่งพิจารณาจากผลสรุปทางสถิติของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (Model Summary Statistics) และการสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ทำนายค่าการผลิต GLA ในรูปแบบสมการที่ (1)

$$Y = \beta_0 + \beta_1A + \beta_2B + \beta_3C + \beta_{12}AB + \beta_{13}AC + \beta_{23}BC + \beta_{11}A^2 + \beta_{22}B^2 + \beta_{33}C^2 \quad (1)$$

เมื่อ Y คือ การผลิต GLA ในขณะที่ A, B และ C คือ ปัจจัยที่ศึกษา, β_0 คือ ค่าคงที่สมการ, β_1, β_2 และ β_3 คือ สัมประสิทธิ์ของสมการเส้นตรง, β_{12}, β_{13} และ β_{23} คือ สัมประสิทธิ์ของสมการปฏิสัมพันธ์ และ β_{11}, β_{22} และ β_{33} คือ สัมประสิทธิ์ของสมการกำลังสอง

(3) การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) โดยกำหนดระดับความเชื่อมั่นมากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 95 (4) การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R^2) ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจปรับแก้ (Adjusted R^2) และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of Variation (%), C.V. %) และ (5) การสร้างพื้นผิวตอบสนอง 2 และ 3 มิติ (2D-contour and 3D Surface Plots) โดยการสร้างกราฟโครงร่างของการผลิต GLA จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

2.5 การศึกษาความถูกต้องของแบบจำลองทาง

คณิตศาสตร์เพื่อใช้ทำนายค่าการผลิต GLA

นำเซลล์ *P. patens* ที่เตรียมได้จากข้อ 2.1 มาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่เหมาะสมตามที่ได้ทำนายด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการผลิต GLA (สมการที่ (2)) โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยการเขย่าที่ความเร็ว 125 รอบต่อนาที ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณการผลิต GLA ด้วยเครื่อง GC-FID และเปรียบเทียบการผลิต GLA ที่ได้จากการทำนาย (Predicted Value) กับผลที่ได้จากการทดลองจริง (Experimental Value) รวมทั้งคำนวณร้อยละความผิดพลาด (% Error)

3. ผลการศึกษาและอภิปรายผล

3.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นของซูโครส โพรแทสเซียมไนเตรต และกลูตาเมตที่เหมาะสมต่อการเพิ่มการผลิต GLA ในเซลล์ *P. patens*

ผลของการศึกษาความเข้มข้นของซูโครส โพรแทสเซียมไนเตรต และกลูตาเมตที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มการผลิต GLA ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ *P. patens* เมื่อออกแบบการทดลองด้วยวิธี RSM และวางแผนการทดลองแบบ CCD แสดงดังตารางที่ 1 พบว่าการผลิต GLA ในแต่ละชุดการทดลองมีค่าแตกต่างกันอยู่ในช่วง 6.18-16.36 มิลลิกรัม GLA ต่อลิตร โดยชุดการทดลองที่ผลิต GLA ได้สูงสุด คือ การทดลองที่ 17 เท่ากับ 16.36 มิลลิกรัม GLA ต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ *P. patens* ในอาหารเหลวสูตร BCD ร่วมกับการเติมซูโครส 60 กรัมต่อลิตร โพรแทสเซียมไนเตรต 0.8 กรัมต่อลิตร และกลูตาเมต 1.5 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 1) และในขณะที่การทดลองที่ 12 เซลล์ *P. patens* ผลิต GLA ได้น้อยที่สุดเท่ากับ 6.18

มิลลิกรัม GLA ต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วย ซูโครส โพรแทสเซียมไนเตรต และกลูตาเมต 60, 1.2 และ 1.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 1) และเมื่อเปรียบเทียบการผลิต GLA ระหว่างการทดลองครั้งนี้กับรายงานการวิจัยของ P. Chodok และคณะ [22] พบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ *P. patens* ร่วมกับการออกแบบการทดลองด้วยวิธี RSM และ CCD มีการผลิต GLA (6.18-16.36 มิลลิกรัม GLA ต่อลิตร) ได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ *P. patens* ในอาหารเหลวสูตรพื้นฐาน BCD ซึ่งสามารถผลิต GLA ได้เพียง 3.55 มิลลิกรัม GLA ต่อลิตร ดังนั้นจากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าปัจจัยทั้ง 3 ได้แก่ ความเข้มข้นของซูโครส โพรแทสเซียมไนเตรต และกลูตาเมตเป็นสารอาหารที่ช่วยส่งเสริมให้เซลล์ *P. patens* ผลิต GLA ได้เพิ่มมากขึ้น 1.74-4.61 เท่า

3.2 ผลการวิเคราะห์คุณภาพ และความเหมาะสมของข้อมูลที่ได้จากการทดลอง

การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) และสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่มีการปรับแก้ (adjusted R^2) และสัมประสิทธิ์ของความผันแปร (Coefficient of variation, C.V.(%)) รวมทั้งการวิเคราะห์สมการถดถอยพหุคูณจำเป็นต้องมีการตรวจสอบคุณภาพ และความเหมาะสมของข้อมูลที่ได้จากการทดลอง ได้แก่ (1) การตรวจสอบส่วนตกค้างของข้อมูลว่ามีการแจกแจงปกติหรือไม่ แสดงดังรูปที่ 2A พบว่าข้อมูลของการผลิต GLA โดยเซลล์ *P. patens* มีการกระจายตัวตามแนวเส้นตรงซึ่งแสดงให้เห็นว่าส่วนตกค้างของข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ (2) การตรวจสอบความเสถียรของความแปรปรวนโดยใช้แผนภูมิการกระจายของส่วนตกค้างต่อค่าที่ถูกทำนาย แสดงดังรูปที่ 2B พบว่าส่วนตกค้างของข้อมูลการผลิตกรดไขมัน GLA มีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอทั้งในทางบวกและทางลบ แสดงว่าข้อมูลที่ได้มีความ

เสถียรภาพของความแปรปรวน และ (3) การตรวจสอบความเป็นอิสระของข้อมูลโดยใช้กราฟของค่าส่วนตกค้างต่อลำดับการทดลอง แสดงดังรูปที่ 2C พบว่าส่วนตกค้างของข้อมูลการผลิตกรดไขมัน GLA มีการกระจายตัวแบบไร้รูปแบบ แสดงว่าข้อมูลที่ได้จากการทดลองมี

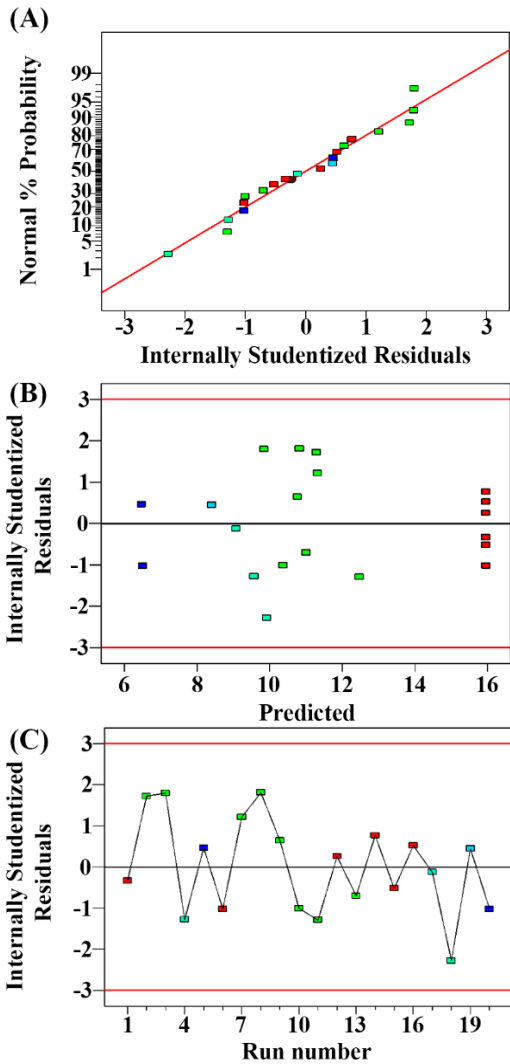
ความเป็นอิสระ จากผลการวิเคราะห์คุณภาพ และความเหมาะสมของข้อมูลที่ได้จากการทดลองเป็นไปตามสมมติฐานที่ตั้งไว้ 3 ข้อ จึงสรุปได้ว่าข้อมูลที่ได้จากการทดลองทั้งหมดมีคุณภาพ และมีความเหมาะสม

ตารางที่ 1 ผลของความเข้มข้นของซูโครส (A) โพแทสเซียมไนเตรต (B) และกลูตามาต (C) ต่อการเพิ่มการผลิต GLA ในมอส *P. patens* ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง และการวางแผนการทดลองแบบ CCD

Factors	Unit	Level				
		-2	-1	0	+1	+2
Sucrose (A)	g/L	20	40	60	80	100
Potassium nitrate (B)	g/L	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
Glutamate (C)	g/L	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5

Runs	Sucrose (A)	Potassium nitrate (B)	Glutamate (C)	GLA production (mg/L)	
				Experimental	Predicted
1	40(-1)	0.6(-1)	1.0(-1)	10.48	9.85
2	80(+1)	0.6(-1)	1.0(-1)	12.01	12.47
3	40(-1)	1.0(+1)	1.0(-1)	11.75	11.32
4	80(+1)	1.0(+1)	1.0(-1)	10.99	10.76
5	40(-1)	0.6(-1)	2.0(+1)	9.03	9.08
6	80(+1)	0.6(-1)	2.0(+1)	10.76	11.01
7	40(-1)	1.0(+1)	2.0(+1)	11.46	10.82
8	80(+1)	1.0(+1)	2.0(+1)	9.12	9.57
9	20(-2)	0.8(0)	1.5(0)	9.18	9.92
10	100(+2)	0.8(0)	1.5(0)	11.85	11.29
11	60(0)	0.4(-2)	1.5(0)	6.62	6.47
12	60(0)	1.2(+2)	1.5(0)	6.18	6.51
13	60(0)	0.8(0)	0.5(-2)	10.04	10.37
14	60(0)	0.8(0)	2.5(+2)	8.55	8.41
15	60(0)	0.8(0)	1.5(0)	16.23	15.96
16	60(0)	0.8(0)	1.5(0)	15.78	15.96
17	60(0)	0.8(0)	1.5(0)	16.36	15.96
18	60(0)	0.8(0)	1.5(0)	15.68	15.96
19	60(0)	0.8(0)	1.5(0)	16.09	15.96
20	60(0)	0.8(0)	1.5(0)	15.42	15.96

GLA คือ กรดแกมมา-ไลโนเลนิก (γ -linolenic Acid)



รูปที่ 2 กราฟของตกค้างของข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ (A) แผนภูมิการกระจายของส่วนตกค้างต่อค่าที่ถูกทำนาย (B) และกราฟของค่าส่วนตกค้างต่อลำดับการทดลอง (C)

3.3 การพิจารณารูปแบบและการสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์เพื่อใช้ทำนายการผลิตกรดไขมัน GLA

นำข้อมูลของการผลิต GLA ที่ได้จากตารางที่ 1 มาวิเคราะห์เพื่อหารูปแบบของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่เหมาะสมสำหรับทำนายค่าการผลิต GLA โดยเซลล์ *P. patens* โดยพิจารณาผลสรุปทางสถิติของ

แบบจำลอง (Model Summary Statistics) แสดงดังตารางที่ 2 พบว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์กำลังสาม (Cubic Model) ได้รับความยอมรับให้เป็นแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการทำนายค่าการผลิต GLA เนื่องจากมีค่า R^2 สูงสุดเท่ากับ 0.9962 แต่อย่างไรก็ตามมีข้อความเตือนเกี่ยวกับการเป็นคู่แฝด (Aliased) เนื่องจากการทดลองไม่เพียงพอที่ทำให้เกิดแบบจำลองทางคณิตศาสตร์กำลังสามได้ จึงต้องเลือกแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่มีค่า R^2 รองลงมาคือ แบบจำลองทางคณิตศาสตร์กำลังสอง (Quadratic Model) มาใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างค่าตัวแปรต่าง ๆ (ความเข้มข้นของซูโครส โพรแทสเซียมไนเตรต และกลูตาเมต) กับค่าการผลิต GLA แทน เนื่องจากมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9835 และมีข้อความเตือนเกี่ยวกับการแนะนำ (Suggested) เพื่อให้ใช้แบบจำลองนี้ รวมทั้งมีค่า $p < 0.0001$ (ตารางที่ 2) ดังนั้นจากข้อมูลของการทดลองสามารถนำมาเขียนแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (Coded Equation) ได้ดังสมการที่ (2)

$$\begin{aligned} \text{GLA production (mg/L)} = & 15.96 + 0.34A + 0.01B \\ & - 0.49C - 0.79AB - 0.17AC + 0.068BC - 1.34A^2 - \\ & 2.37B^2 - 1.64C^2 \end{aligned} \quad (2)$$

เมื่อ GLA production (mg GLA/L) คือ การผลิต GLA (มิลลิกรัม GLA ต่อลิตร) ในขณะที่ A, B และ C คือ ความเข้มข้นของซูโครส โพรแทสเซียมไนเตรต และกลูตาเมต ตามลำดับ มีหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

3.4 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน

ผลจากการวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อตรวจสอบความเหมาะสม และคุณภาพของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ในสมการที่ (2) การตรวจสอบความเหมาะสมใช้ค่าโมเดล (Model) และค่าความสมบูรณ์ (Lack of Fit) แสดงดังตารางที่ 3 พบว่าค่าโมเดลของการผลิต GLA โดยเซลล์ *P. patens* มีนัยสำคัญยิ่งทาง

สถิติ ($p < 0.0001$) และเมื่อตรวจสอบความสมรูปพบว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ในสมการที่ (2) ไม่ขาดความเหมาะสมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.0739$) จึงสรุปได้ว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ในสมการที่ (2) สามารถใช้ทำนายค่าการผลิต GLA ได้อย่างถูกต้อง

ส่วนคุณภาพของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์สำหรับการผลิต GLA (สมการที่ (2)) สามารถประเมินได้จากค่า R^2 มีค่าเท่ากับ 0.9835 (ตารางที่ 3) แสดงว่าข้อมูลที่ได้จากการทดลองจริง (Experimental Data) เข้ากันได้กับข้อมูลที่ได้จากการทำนาย (Predicted Data) ถึงร้อยละ 98.35 แสดงดังรูปที่ 3 ซึ่งได้รับอิทธิพลจากปัจจัยทั้ง 3 ได้แก่ ความเข้มข้นของซูโครส

โพแทสเซียมไนเตรต และกลูตามेटสูงถึงร้อยละ 98.35 ส่วนที่เหลืออีกร้อยละ 1.65 เป็นผลจากปัจจัยอื่นที่ไม่สามารถควบคุมได้ ในขณะที่ค่า Adjusted R^2 เป็นค่าที่ใช้ตรวจสอบความแม่นยำของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ในสมการที่ (2) แสดงดังตารางที่ 2 พบว่าการผลิต GLA มีค่า Adjusted R^2 เท่ากับ 0.9687 (ตารางที่ 3) อธิบายได้ว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ในสมการที่ (2) มีความแม่นยำในการทำนายค่าการผลิต GLA สูงถึงร้อยละ 96.87 ส่วนค่า C.V. (%) พบว่ามีเท่ากับร้อยละ 4.91 (ตารางที่ 3) สามารถอธิบายได้ว่าค่าที่ได้จากการทดลองจริง และค่าที่ได้จากการทำนายมีความแตกต่างกันน้อยมาก (รูปที่ 3)

ตารางที่ 2 ผลสรุปทางสถิติของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์สำหรับการผลิต GLA โดยเซลล์ *P. patens*

Source	Sum of squares	df	Mean square	F-value	p-value Prob > F	Remark
Sequential model sum of squares for GLA production						
Mean	2727.98	1	2727.98			
Linear	5.73	3	1.91	0.16	0.9233	
2FI	5.33	3	1.78	0.12	0.9453	
Quadratic	185.62	3	61.87	188.07	<0.0001	Suggested
Cubic	2.52	4	0.63	4.95	0.0416	Aliased
Residual	0.77	6	0.13			
Total	2927.95	20	146.40			
Source	Std. Dev.	R^2	Adjusted R^2	Predicted R^2	Press	Remark
Model summary statistics for GLA production						
Linear	3.48	0.0287	-0.1535	-0.4511	290.18	
2FI	3.81	0.0553	-0.3807	-0.6307	326.10	
Quadratic	0.57	0.9835	0.9687	0.8878	22.44	Suggested
Cubic	0.36	0.9962	0.9879	0.8722	25.56	Aliased

ตารางที่ 3 การวิเคราะห์ความแปรปรวน ค่าสัมประสิทธิ์สมการการถดถอย และค่าสถิติของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์สำหรับการผลิต GLA โดยเซลล์ *P. patens*

Source	Regression coefficients	Standard error	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value Prob > F
Model	15.96	0.23	196.68	9	21.85	66.43	<0.0001
A-Sucrose	0.34	0.14	1.89	1	1.89	5.75	0.0375

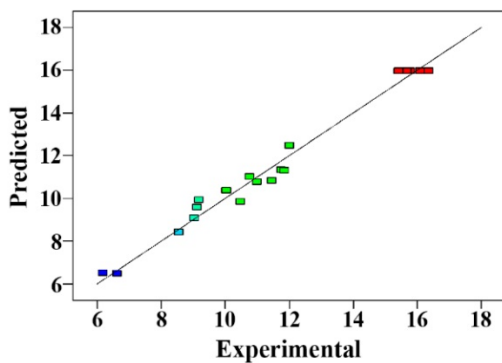
ตารางที่ 3 การวิเคราะห์ความแปรปรวน ค่าสัมประสิทธิ์สมการการถดถอย และค่าสถิติของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์สำหรับการผลิต GLA โดยเซลล์ *P. patens* (ต่อ)

Source	Regression coefficients	Standard error	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value Prob > F
B-Potassium nitrate	0.01	0.14	0.0016	1	0.0016	0.004863	0.9458
C-Glutamate	-0.49	0.14	3.84	1	3.84	11.68	0.0066
AB	-0.79	0.20	5.06	1	5.06	15.37	0.0029
AC	-0.17	0.20	0.24	1	0.24	0.72	0.4149
BC	0.068	0.20	0.036	1	0.036	0.11	0.7461
A ²	-1.34	0.11	45.00	1	45.00	136.79	<0.0001
B ²	-2.37	0.11	140.82	1	140.82	428.03	<0.0001
C ²	-1.64	0.11	67.86	1	67.86	206.26	<0.0001
Residual			3.29	10	0.33		
Lack of Fit			2.64	5	0.53	4.10	0.0739
Pure Error			0.65	5	0.13		
Corrected Total			199.97	19			

$R^2 = 0.9835$

Adjusted $R^2 = 0.9687$

C.V.% = 4.91



รูปที่ 3 การเปรียบเทียบค่าการผลิต GLA ที่ได้จากการทดลองจริง (Experimental Value) กับค่าที่ได้จากการทำนาย (Predicted Value)

ส่วนการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์สมการการถดถอย พหุคูณของปัจจัยทั้ง 3 ได้แก่ ความเข้มข้นของซูโครส (A) โพแทสเซียมไนเตรต (B) และกลูตาเมต (C) ในแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ในสมการที่ (2) ว่ามีอิทธิพลต่อการผลิต GLA โดยเซลล์ *P. patens* หรือไม่

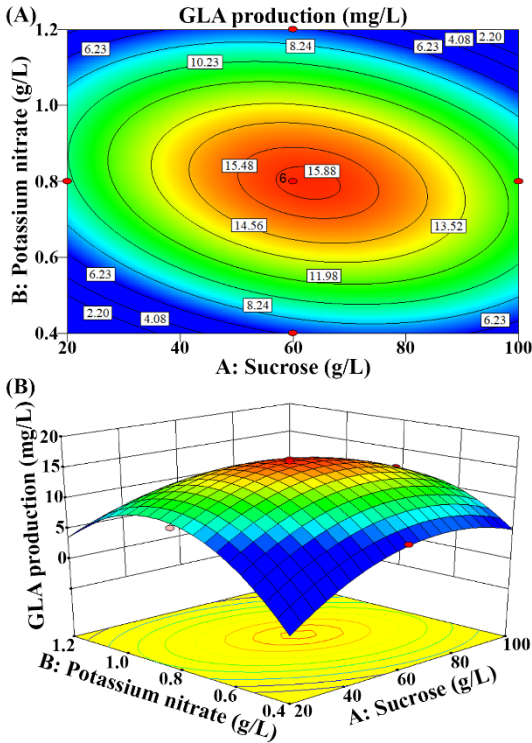
โดยพิจารณาจากพจน์เชิงเส้น (Linear Terms) พจน์อิทธิพลร่วม (Interaction Terms) และพจน์กำลังสอง (Square Terms) แสดงดังตารางที่ 3 เมื่อพิจารณาพจน์ในแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการผลิต GLA พบว่าพจน์ A, C, AB, A², B² และ C² เป็นพจน์ที่มีผลต่อการผลิต GLA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในเซลล์ *P. patens* ส่วนพจน์อื่น ๆ ได้แก่ B, AC และ BC เป็นพจน์ที่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ต่อแบบจำลองทางคณิตศาสตร์สำหรับทำนายค่าการผลิต GLA (ตารางที่ 3)

3.5 การสร้างกราฟพื้นผิวตอบสนองของการผลิต GLA ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ *P. patens*

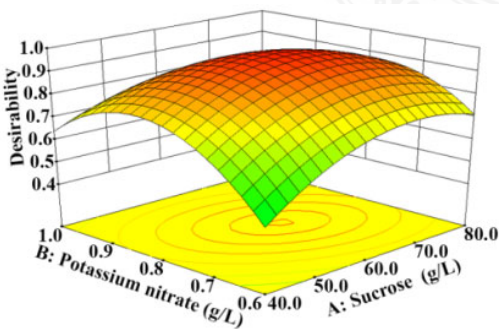
จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ในสมการที่ (2) นำมาสร้างกราฟพื้นผิว 2 มิติ (รูปที่ 4A) และ 3 มิติ (รูปที่ 4B) เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของซูโครสและโพแทสเซียมไนเตรต (AB) ต่อการเพิ่มการผลิต GLA

ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ *P. patens* โดยที่ความเข้มข้นของกลูตามัต (C) อยู่ในระดับกลาง (1.5 กรัมต่อลิตร) โดยซูโครสเมื่อถูกย่อยด้วยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์-

อินเวอร์เทส (Invertase) ได้ผลิตภัณท์เป็นน้ำตาลกลูโคส และฟรักโตส เมื่อผ่านวิถีไกลโคไลซิส (Glycolysis Pathway) หรือวิถีเพนโทสฟอสเฟต (Pentose Phosphate Pathway) จะได้ผลิตภัณท์เป็นสาร Acetyl-CoA และ Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH) ซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้จำเป็นสำหรับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์กลุ่ม Fatty Acid Desaturases และ Fatty Acid Elongase และการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว [24], [25] ในขณะที่โพแทสเซียมไนเตรตเป็นสารที่ช่วยกระตุ้นการทำงานของมาลิกเอนไซม์ (Malic Enzyme) และการสังเคราะห์ NADPH [26] จากผลการทดลอง พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสในอาหารเหลว BCD จาก 20 เป็น 62 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4A และ 4B) ร่วมกับการเพิ่มความเข้มข้นของโพแทสเซียมไนเตรตจาก 0.4 เป็น 0.8 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้เซลล์ *P. patens* ผลิต GLA ได้เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และผลิต GLA ได้สูงสุดเท่ากับ 15.88 มิลลิกรัม GLA ต่อลิตร สอดคล้องกับงานวิจัยของ P. Chodok [23] พบว่าน้ำตาลซูโครส และโพแทสเซียมไนเตรตเป็น 2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มการผลิต DHGLA ในเซลล์ *P. patens* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อความเข้มข้นของซูโครสในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ *P. patens* เพิ่มขึ้นจาก 20 เป็น 60 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเพิ่มความเข้มข้นของโพแทสเซียมไนเตรตจาก 0.4 เป็น 0.75 กรัมต่อลิตร และผลิต DHGLA ได้เท่ากับ 11.11 มิลลิกรัม DHGLA ต่อลิตร แต่อย่างไรก็ตามเมื่อระดับความเข้มข้นของซูโครส และโพแทสเซียมไนเตรตในอาหารเพาะเลี้ยงสูงกว่า 62 และ 0.8 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่งผลให้เซลล์ *P. patens* ผลิต GLA ลดลงเหลือเพียง 2.20 มิลลิกรัม GLA ต่อลิตร (รูปที่ 4A และ 4B) เนื่องจากซูโครส และโพแทสเซียมไนเตรตที่ความเข้มข้นสูง ๆ มีผลในการยับยั้งการเจริญ และลดการผลิต GLA ในเซลล์ *P. patens* [23]



รูปที่ 4 กราฟพื้นผิวดอสนอง 2 มิติ (A) และ 3 มิติ (B) ที่แสดงผลของความเข้มข้นของซูโครส โพแทสเซียมไนเตรต และกลูตามัตต่อการเพิ่มการผลิต GLA ในเซลล์ *P. patens*



รูปที่ 5 กราฟความพึงพอใจโดยรวมของผลตอบสนองแบบ 3 มิติ

3.6 ผลการศึกษาความถูกต้องของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์สำหรับใช้ทำนายการผลิต GLA ในเซลล์ *P. patens*

การวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นของแต่ละปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของซูโครส โพลแซคเคอไรด์และกลูตาเมตที่มีผลต่อการเพิ่มการผลิต GLA สูงสุดโดยเซลล์ *P. patens* โดยการเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทดลองจริง และค่าที่ได้จากการทำนายด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ในสมการที่ (2) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ *P. patens* ในอาหารเหลวสูตร BCD ที่ประกอบด้วยซูโครส 62.92 กรัมต่อลิตร โพลแซคเคอไรด์ 0.80 กรัมต่อลิตร และกลูตาเมต 1.42 กรัมต่อลิตร เซลล์ *P. patens* ผลิตกรดไขมัน GLA ได้เท่ากับ 16.37 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่าการผลิต GLA ที่ได้จากการทำนายด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ในสมการที่ (2) เท่ากับ 16.20 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาค่าร้อยละของความผิดพลาด (% Error) พบว่ามีค่าเท่ากับร้อยละ 1.05 และมีค่าความพึงพอใจโดยรวมของผลตอบสนอง (Composite Desirability, D) เท่ากับ 0.967 (รูปที่ 5) ซึ่งค่าความพึงพอใจของผลตอบสนองมีค่าอยู่ระหว่าง 0 ถึง 1 ถ้าค่า D เท่ากับ 1 แสดงว่าผลตอบสนองนั้นได้รับความพึงพอใจอย่างสมบูรณ์

4. สรุป

การศึกษาผลของความเข้มข้นของซูโครส โพลแซคเคอไรด์และกลูตาเมตที่เหมาะสมต่อการเพิ่มการผลิตกรดไขมัน GLA ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ *P. patens* ด้วยวิธี RSM ร่วมกับการวางแผนการทดลองแบบ CCD พบว่าซูโครส และกลูตาเมตเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มการผลิต GLA ในเซลล์ *P. patens* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งสามารถแสดงในรูปแบบของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์กำลังสองสำหรับทำนายค่าการผลิต GLA ด้วยค่า R^2 เท่ากับ 0.9835

โดยสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มการผลิต GLA ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 62.92 กรัมต่อลิตร โพลแซคเคอไรด์ 0.80 กรัมต่อลิตร และกลูตาเมต 1.42 กรัมต่อลิตร เซลล์ *P. patens* ผลิต GLA ได้เท่ากับ 16.37 มิลลิกรัม GLA ต่อลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่าการผลิต GLA ที่ได้จากการทำนายด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์เท่ากับ 16.20 มิลลิกรัม GLA ต่อลิตร รวมทั้งมีค่าความผิดพลาด และมีค่าความพึงพอใจโดยรวมของผลตอบสนองเท่ากับร้อยละ 1.05 และ 0.967 ตามลำดับ ดังนั้นจากข้อมูลที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

การทำวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ได้สนับสนุนทุนวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2560 และขอขอบคุณสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยาที่ได้อำนวยความสะดวกและอุปกรณ์ต่าง ๆ สำหรับการดำเนินการวิจัย

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] S. Sergeant, E. Rahbar and F.H. Chilton, "Gamma-linolenic acid, dihomo-gamma linolenic, eicosanoids and inflammatory processes," *European Journal of Pharmacology*, vol. 785, pp. 77-86, Aug. 2016.
- [2] K. Youn, J. Lee, E.-Y. Yun, C.-T. Ho, M.V. Karwe, W.-S. Jeong and M. Jun, "Biological evaluation and in silico docking study of γ -linolenic acid as a potential BACE1 inhibitor," *Journal of Functional Foods*, vol. 10, pp. 187-191, Sep. 2014.

- [3] K. Youn, S. Lee and M. Jun, "Gamma-linolenic acid ameliorates $A\beta$ -induced neuroinflammation through NF- κ B and MAPK signalling pathways," *Journal of Functional Foods*, vol. 42, pp. 30-37, Mar. 2018.
- [4] W.H. Choi, "Evaluation of anti-tubercular activity of linolenic acid and conjugated-linoleic acid as effective inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis*," *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, vol. 9, no. 2, pp. 125-129, Feb. 2016.
- [5] G.J. Macfarlane, A. El-Metwally, V. De Silva, E. Ernst, G.L. Dowds and R.J. Moots, "Evidence for the efficacy of complementary and alternative medicines in the management of rheumatoid arthritis: a systematic review," *Rheumatology*, vol. 50, pp. 1672-1683, Sep. 2011.
- [6] A. Kawamura, K. Ooyama, K. Kojima, H. Kachi, T. Abe, K. Amano and T. Aoyama, "Dietary supplementation of gamma-linolenic acid improves skin parameters in subjects with dry skin and mild atopic dermatitis," *Journal of Oleo Science*, vol. 60, no. 12, pp. 597-607, 2011.
- [7] D. Simon, P.A. Eng, S. Borelli, R. Kägi, C. Zimmermann, C. Zahner, J. Drewe, L. Hess, G. Ferrari, S. Lautenschlager, B. Wüthrich and P. Schmid-Grendelmeier, "Gamma-linolenic acid levels correlate with clinical efficacy of evening primrose oil in patients with atopic dermatitis," *Advances in Therapy*, vol. 31, pp. 180-188, Jan. 2014.
- [8] M. Chas, C. Goupille, F. Arbion, P. Bougnoux, M. Pinault, M.L. Jourdan, S. Chevalier and L. Ouldamer, "Low eicosapentaenoic acid and gamma-linolenic acid levels in breast adipose tissue are associated with inflammatory breast cancer," *The Breast*, vol. 45, pp. 113-117, Jun. 2019.
- [9] K. Kavanagh, D.M. Flynn, K.A. Jenkins, M.D. Wilson and F.H. Chilton, "Stearidonic and γ -linolenic acids in echium oil improves glucose disposal in insulin resistant monkeys," *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, vol. 89, no. 1, pp. 39-45, Jul. 2013.
- [10] A. Freije, J. Alkhuzai and A.A. Al-Laith, "Fatty acid composition of three medicinal plants from Bahrain: New potential sources of γ -linolenic acid and dihomogamma-linolenic," *Industrial Crops and Products*, vol. 43, pp. 218-224, May 2013.
- [11] J.L. Guil-Guerrero, F. Gómez-Mercado, R.P. Ramos-Bueno, M.J. González-Fernández, M. Urrestarazu and M.A. Rincón-Cervera, "Sardinian Boraginaceae are new potential sources of gamma-linolenic acid," *Food Chemistry*, vol. 218, pp. 435-439, Mar. 2017.
- [12] J.L. Guil-Guerrero, F. Gómez-Mercado, R.P. Ramos-Bueno, M.J. González-Fernández, M. Urrestarazu, S. Jiménez-Becker and G. de Bélair, "Fatty acid

- profiles and sn-2 fatty acid distribution of γ -linolenic acid-rich *Borago species*,” *Journal of Food Composition and Analysis*, Anal, vol. 66, pp. 74-80, Mar. 2018.
- [13] S. Piskernik, R. Vidrih, L. Demšar, D. Koron, M. Rogelj and T.P. Žontar, “Fatty acid profiles of seeds from different *Ribes* species,” *LWT*, vol. 98, pp. 424-427, Dec. 2018.
- [14] J.L. Guil-Guerrero, M.A. Rincon-Cervera, F. Gomez-Mercado, R.P. Ramos-Bueno and E. Venegas-Venegas, “New seed oils of Boraginaceae rich in stearidonic and gamma-linolenic acids from the Maghreb region,” *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 31, no. 1, pp. 20-23, Aug. 2013.
- [15] S. Lyashenko, M.J. González-Fernández, F. Gómez-Mercado, S. Yunusova, O. Denisenko and J.L. Guil-Guerrero, “*Ribes* taxa: A promising source of γ -linolenic acid-rich functional oils,” *Food Chemistry*, vol. 301, pp. 125309, Dec. 2019.
- [16] S.U. Ahmed, K.K. Reddy, S.L. Swathy, S.K. Singh, S. Kanjilal, R.B.N. Prasad and A. Pandey, “Enrichment of γ -linolenic acid in the lipid extracted from *Mucor zychnae* MTCC 5420,” *Food Research International*, vol. 42, no. 4, pp. 449-453, May. 2009.
- [17] M.G. Sajilata, R.S. Singhal and M.Y. Kamat, “Fractionation of lipids and purification of γ -linolenic acid (GLA) from *Spirulina platensis*,” *Food Chemistry*, vol. 109, no. 3, pp. 580-586, Aug. 2008.
- [18] M.L. Sun, C. Madzak, H.H. Liu, P. Song, L.J. Ren, H. Huang and X.J. Ji, “Engineering *Yarrowia lipolytica* for efficient γ -linolenic acid production,” *Biochemical Engineering Journal*, vol. 117, pp. 172-180, Jan. 2017.
- [19] Y. Zhang, X. Luan, H. Zhang, V. Garre, Y. Song and C. Rattledge, “Improved γ -linolenic acid production in *Mucor circinelloides* by homologous overexpressing of delta-12 and delta-6 desaturases,” *Microbial Cell Factories*, vol. 16, pp. 113, Jun. 2017.
- [20] S. Jeennor, J. Anantayanon, S. Panchanawaporn, S., Khoomrung, C. Chutrakul and K. Laoteng, “Reengineering lipid biosynthetic pathways of *Aspergillus oryzae* for enhanced production of γ -linolenic acid and dihomogamma-linolenic acid,” *Gene*, vol. 706, pp. 106-114, Jul. 2019.
- [21] S. Kaewsuwan, N. Bunyapraphatsara, D.J. Cove, R.S. Quatrano and P. Chodok, “High level production of adrenic acid in *Physcomitrella patens* using the algae *Pavlova* sp. $\Delta 5$ -elongase gene,” *Bioresource Technology*, vol. 101, no. 11, pp. 4081-4088, Jun. 2010.
- [22] P. Chodok, A. Kanjana-Opas and S. Kaewsuwan, “The plackett-burman design for evaluating the production of polyunsaturated fatty acids by *Physcomitrella patens*,” *Journal of the*

- American Oil Chemists' Society*, vol. 87, pp. 521-529, Jan. 2010.
- [23] P. Chodok, "Optimization of culture media for enhanced production of dihomog- γ -linolenic acid and eicosatetraenoic acid in *Physcomitrella patens* using multi-response surface methodology," *Songklanakarin Journal of Plant Science*, vol. 5, no. 4, pp. 48-61, Oct.-Dec. 2018.
- [24] O. Tehlivets, K. Scheuringer and S.D. Kohlwein, "Fatty acid synthesis and elongation in yeast," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1771, no. 3, pp. 255-270, Mar. 2007.
- [25] M.-J. Jin, H. Huang, A.-H. Xiao, Z. Gao, X. Liu, and C. Peng, "Enhancing arachidonic acid production by *Mortierella alpina* ME-1 using improved mycelium aging technology," *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 32, pp. 117-122, May 2008.
- [26] J.P. Wynn, A.A. Hamid and C. Ratledge, "The role of malic enzyme in the regulation of lipid accumulation in filamentous fungi," *Microbiology*, vol. 145, no. 8, pp. 1911-1917, Aug. 1999.

