วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 27 (ฉบับที่ 1) มกราคม – เมษายน พ.ศ. 2565
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 27 (No.1) January – April 2022 บทความวิจัย

สัณฐานวิทยาและวิธีติดตามการเจริญของ *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 ที่เลี้ยงในฟลาสก์และในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

Morphology and Growth Monitoring Methods of *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 Cultivated in Flask and Bioreactor

เกศยา คำรังษี, เทพปัญญา เจริญรัตน์ และ สุเปญญา จิตตพันธ์*

Katsaya Khumrangsee, Theppanya Charoenrat and Supenya Chittapun*

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

Department of Biotechnology, Faculty of Science and technology, Thammasat University

Received : 8 April 2021

Revised : 10 June 2021

Accepted : 28 June 2021

บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีการติดตามการเจริญมีความสำคัญต่อกระบวนการเลี้ยงเชื้อออแรนธิโอไคเตรียม เพื่อผลิตชีวมวลสำหรับใช้เป็นแหล่งดีเอชเอ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษารูปแบบการตรวจวัดการเจริญร่วมกับการสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 ที่เลี้ยงในฟลาสก์และถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยเลี้ยง *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 แบบแบทช์ด้วยอาหารเหลว GYP ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บรรจุอาหารเหลว 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในสภาวะไม่มีแสง จากนั้นจึงนำมาศึกษาการเลี้ยงเชื้อแบบเฟด-แบทช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 22 ลิตร บรรจุอาหารเหลว 6 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมพีเอชที่ 6.0 อัตราการกวน 450 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 ลิตรอากาศต่อลิตรอาหารต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าการเลี้ยง *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 แบบแบทช์ในฟลาสก์ให้อัตราการเจริญจำเพาะและน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 0.11 ต่อชั่วโมง และ 12.47 ± 0.70 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพพบว่าการเลี้ยงเชื้อในช่วง 0 – 20 ชั่วโมง ให้อัตราการเจริญจำเพาะ 0.21 ต่อชั่วโมง และน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 15.20 ± 0.44 กรัมต่อลิตร ช่วง 20 – 42 ชั่วโมง ซึ่งให้อาหารเหลวที่มีสัดส่วนแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนสูง ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 25.17 ± 0.23 กรัมต่อลิตร และเมื่อเข้าสู่ช่วง 42 - 72 ชั่วโมง ซึ่งให้อาหารเหลวที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 38.87 ± 0.71 กรัมต่อลิตร เชื้อ *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะตามการเจริญและการสะสมไขมัน วิธีวัดน้ำหนักเซลล์แห้งสามารถนำมาใช้ติดตามการเจริญได้ทั้งการเลี้ยงเชื้อแบบแบทช์และเฟด-แบทช์ ส่วนวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงและการนับเซลล์สามารถใช้ติดตามการเจริญในถังปฏิกรณ์ชีวภาพช่วงการเลี้ยง 0 – 42 ชั่วโมง ดังนั้นการพัฒนาวิธีการติดตามกระบวนการเลี้ยงเชื้อ *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 สามารถใช้วิธีวัดค่าการดูดกลืนแสง การนับเซลล์ และน้ำหนักเซลล์แห้งได้ และเมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารปราศจากไนโตรเจนเซลล์จะสะสมไขมัน การตรวจวัดน้ำหนักเซลล์แห้งร่วมกับการศึกษาสัณฐานวิทยาเป็นวิธีที่เหมาะสมในการติดตามการเจริญ

คำสำคัญ : การเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ ; ค่าการดูดกลืนแสง ; การนับเซลล์ ; น้ำหนักเซลล์แห้ง ; อัตราการเจริญจำเพาะ

Abstract

The development of growth monitoring method is significant for the biomass production of *Aurantiochytrium* as a DHA resource. This study aimed to examine the growth measurement methods and morphological observation of *Aurantiochytrium* cultured in flasks and bioreactors. The batch cultivation of *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 was carried on 50 mL of GYP broth in 250 mL flask. The cultivation was performed at 30 °C on 200 rpm rotary shaker under dark condition. Then, the fed-batch fermentation was examined in 22 L bioreactor contained 6 L GYP broth. The incubation was carried on 30 °C, pH 6.0, 450 rpm of agitation speed and 1.0 VVM of aeration rate. Samples were taken every 4 h for 72 h. In shaking flask, it was found that the batch cultivation of *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 gave specific growth rate (SGR) and maximum dry cell weight (DCW) at 0.11 h^{-1} and 12.47 ± 0.70 g L^{-1}, respectively. The fed-batch cultivation was performed in 22 L bioreactor contained 6 L of GYP broth. The result showed that cell cultivation during 0 - 20 h showed SGR and maximum DCW at 0.21 h^{-1} and 38.87 ± 0.71 g L^{-1}, respectively. Fed-batch cultivation during 20 - 42 h and 42 – 72 h showed maximum DCW at 25.17 ± 0.23 g L^{-1} and 38.87 ± 0.71 g L^{-1}, respectively. *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 morphology changed according to growth and lipid accumulation phases. DCW can be used as growth parameters to monitor the growth of *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 cultured both in flask and in bioreactor. Optical density and cell count can be used to tracking the growth of cells during 0 - 42 h in fed-batch cultivation in bioreactor. Therefore, all growth parameters can be use as growth monitor method during the development of *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 biomass production processes. Until the lipid accumulation phase, fed with broth containing no nitrogen source, DCW associated with morphology are acceptable parameters to monitor the cell growth.

Keywords : fed-batch cultivation ; optical density ; cell count ; dry cell weight ; specific growth rate

***Corresponding author. E-mail** : supenyac@tu.ac.th

บทนำ

กรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิก หรือ ดีเอชเอ (Docosahexaenoic acid, DHA) เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในกลุ่มของโอเมก้า-3 มีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาระบบประสาทและการมองเห็นของมนุษย์ (Takahata *et al*., 1998) และช่วยป้องกันโรคเส้นเลือดในสมองแตกและโรคเกี่ยวกับหลอดเลือดหัวใจ (Sanders *et al*., 2006) ปัจจุบันนิยมเลี้ยงออแรนธิโอไคเตรียม (*Aurantiochytrium*) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มของทรอสโทไคตริดส์ (Thraustochytrids) เพื่อใช้เป็นแหล่งดีเอชเอทดแทนปลาทะเลซึ่งเป็นแหล่งดีเอชเอดั้งเดิม ทั้งนี้เนื่องจากออแรนธิโอไคเตรียมมีอัตราการเจริญสูง ใช้พื้นที่ในการเลี้ยงน้อย ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นพลังงานในการเจริญ และสามารถผลิตดีเอชเอได้มากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมด (Raghukumar, 2008) นอกจากนี้ไขมันที่สกัดได้จากออแรนธิโอไคเตรียมมีความคงตัวต่อการเกิดออกซิเดชันมากกว่าไขมันที่ผลิตได้จากปลาทะเล (Kendrick & Ratledge, 1992) อีกทั้งออแรนธิโอไคเตรียมยังสามารถผลิตและสะสมสควาลีน (Squalene) และแคโรทีนอยด์ (Carotenoids) ได้อีกด้วย (Aki *et al*., 2003; Kaya *et al*., 2011) สควาลีนเป็นสารตัวกลางสำหรับกระบวนการสังเคราะห์สารกลุ่มสเตอรอล (Sterol) นิยมนำมาเป็นสารช่วยทางเภสัชกรรมในการนำส่งวัคซีนและยาต่างๆ ช่วยส่งเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันจึงใช้เป็นสารป้องกันการเสื่อมระหว่างการรักษาโรคมะเร็ง และเป็นสารทำหน้าที่ให้ความชุ่มชื้นและสารต้านอนุมูลอิสระในเครื่องสำอาง (Huang *et al*., 2003; Aasen *et al*., 2016) ส่วนแคโรทีนอยด์เป็นสารสีธรรมชาติที่นิยมใช้เป็นอาหารเสริมและใช้ประโยชน์ด้านเภสัชกรรม เนื่องจากมีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระและช่วยป้องกันโรคเกี่ยวกับหลอดเลือดหัวใจ (Murthy *et al*.,2005; Raposo *et al*., 2015) และยังใช้เป็นส่วนผสมอาหารสำหรับการเลี้ยงสัตว์น้ำและสัตว์ปีกเพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหารอีกด้วย (Johnson & An,1999) ชีวมวลของออแรนธิโอไคเตรียมซึ่งอุดมไปด้วยสารสำคัญหลายชนิดจึงเป็นที่ต้องการในงานทางเทคโนโลยีชีวภาพด้านต่างๆ ฉะนั้นการพัฒนากระบวนการเลี้ยงออแรนธิโอไคเตรียมจึงมีความจำเป็นต่อการผลิตชีวมวลให้เพียงพอต่อการนำไปใช้ประโยชน์ กระบวนการเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเป็นรูปแบบการเลี้ยงที่สามารถเพิ่มปริมาณเซลล์และส่งเสริมให้มีการผลิตสารสำคัญต่างๆ ที่ต้องการได้

ออแรนธิโอไคเตรียมเป็นเซลล์ที่มีผนังเซลล์บาง รูปร่างกลม มีการแบ่งเซลล์แบบ Successive bipartition ระยะซูโอสปอร์จะมีรูปร่างรีจนถึงทรงกลม และพบแฟกเจลลา 2 เส้น (Honda *et al*., 1998; Yokoyama & Honda, 2007) มีการสะสมไขมันภายในเซลล์ และมีขนาดและสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงไปตามระยะของการเจริญ การติดตามการเจริญของจุลินทรีย์ระหว่างการเลี้ยงสามารถตรวจวัดได้จากค่าการดูดกลืนแสง การนับเซลล์ และการวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง การวัดค่าการดูดกลืนแสงเป็นวิธีการเบื้องต้นและนิยมใช้ในการติดตามการเจริญของจุลินทรีย์ขณะเลี้ยง แต่เนื่องจากออแรนธิโอไคเตรียมมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงตามระยะของการเจริญและการสะสมไขมัน ซึ่งอาจทำให้การติดตามการเจริญและการสะสมไขมันโดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงไม่สอดคล้องกัน ฉะนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเจริญโดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง นับเซลล์ ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา และวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งของออแรนธิโอไคเตรียมที่เลี้ยงในฟลาสก์และเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 22 ลิตร เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการเลือกใช้วิธีการติดตามการเจริญของออแรนธิโอไคเตรียมในการพัฒนากระบวนการเลี้ยงออแรนธิโอไคเตรียมให้มีความเสถียรและสามารถผลิตชีวมวลได้สูง

วิธีดำเนินการวิจัย

สายพันธุ์จุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อ

จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยทรัพยากรชีวภาพสาหร่าย คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และอาหารที่ใช้ในเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ อาหาร GYP (Glucose Yeast extract Peptone) ชนิดแข็ง ประกอบด้วย กลูโคส 4 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 2 กรัมต่อลิตร เพปโตน 1 กรัมต่อลิตร เกลือสำหรับเตรียมน้ำทะเลเทียม (artificial seawater) 15 กรัมต่อลิตร และผงวุ้นความเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร และอาหารเหลว GYP ประกอบด้วย กลูโคส 30 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร เพปโตน 20 กรัมต่อลิตร เกลือสำหรับเตรียมน้ำทะเลเทียม 15 กรัมต่อลิตร และเติมยาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล (Chloramphenicol) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

การศึกษาการเจริญของ Aurantiochytrium sp. FIKU018 *ที่เลี้ยงในระดับฟลาสก์*

เขี่ยเชื้อโคโลนีเดี่ยวจากอาหารแข็ง GYP ลงอาหารเหลว GYP ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในสภาวะที่ไม่มีแสง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และขยายขนาดการเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อ โดยนำกล้าเชื้อจากฟลาสก์ 125 มิลลิลิตร 10 มิลลิลิตร เติมในอาหารเหลว GYP 90 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในสภาวะที่ไม่มีแสง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำกล้าเชื้อจากฟลาสก์ 500 มิลลิลิตรที่ได้ไปใช้ศึกษาการเจริญในระดับฟลาสก์ โดยถ่ายกล้าเชื้อจากฟลาสก์ 500 มิลลิลิตร 5 มิลลิลิตร ลงสู่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว GYP ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ให้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในสภาวะที่ไม่มีแสง เก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยสุ่มปิเปตต์น้ำหมักจากฟลาสก์ครั้งละ 5 มิลลิลิตร แบ่งตัวอย่างที่สุ่มได้ 2 มิลลิลิตร สำหรับวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยใช้สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (SP880 Metertech Inc., Taiwan) และใช้อาหาร GYP เป็น blank และใช้ในการเจือจางตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร สำหรับนำไปตรวจสอบสัณฐานวิทยาของเซลล์และนับเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (OLYMPUS CX31, Japan) ที่ต่อกับกล้องถ่ายรูป (Dino-Eye digital eye-piece camera, Taiwan) 1 มิลลิลิตร สำหรับนำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง และ 1 มิลลิลิตรสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ทำการทดลอง 4 ซ้ำ

การศึกษารูปแบบการเจริญของ Aurantiochytrium sp. FIKU018 *ที่เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ*

การเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเฟด-แบทช์ เริ่มต้นการเลี้ยงแบบแบทช์โดยถ่ายกล้าเชื้อที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1 ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (Sartorius stedim BIOSTAT® C plus) ขนาด 22 ลิตร โดยเริ่มเลี้ยง 0 - 20 ชั่วโมงในระบบแบทช์ด้วยอาหารเหลว GYP ปริมาตร 6 ลิตร ควบคุมสภาวะการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมพีเอชที่ 6.0 ตลอดการเลี้ยง อัตราการกวน 450 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ลิตรอากาศต่อลิตรอาหารต่อนาที (วีวีเอ็ม) ทั้งนี้ การเลือกควบคุมพีเอชที่ 6.0 เนื่องจากเป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการเลี้ยง *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 ซึ่งเป็นข้อมูลที่ได้จากการทดลองเบื้องต้น สำหรับการควบคุมอัตราการกวนที่ 450 รอบต่อนาที เนื่องจากในการทดลองเบื้องต้นพบว่าการใช้อัตราการกวนสูงกว่านี้จะส่งผลใช้เซลล์หยุดการเจริญเนื่องจากความเครียดจากแรงเฉือน (Shear stress) ในระหว่างการเลี้ยง ทำการเก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง ตรวจวัดความเข้มข้นกลูโคสโดยวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ทุกครั้ง

จนกระทั่งกลูโคสถูกใช้จนหมด จากนั้นชั่วโมงที่ 20 – 42 เลี้ยงด้วยระบบเฟด-แบทช์ต่อทันที โดยการเติมอาหารที่มีเกลือสำหรับเตรียมน้ำทะเลเทียม 15 กรัมต่อลิตร กลูโคส 200 กรัมต่อลิตร เพปโตน 20 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร และโมโนโซเดียมกลูตาเมต 50 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนเสริม (ระบบเฟด-แบทช์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนสูงเท่ากับ 2.5 เป็นอาหาร) ปริมาตรอาหารที่ใช้ในระยะนี้เท่ากับ 1 ลิตร โดยใช้ระยะเวลาในการเติมประมาณ 22 ชั่วโมง และตามด้วยระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ที่ใช้อาหารที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจนในช่วงชั่วโมงที่ 42- 72 ด้วยการเติมอาหารที่มีเกลือสำหรับเตรียมน้ำทะเลเทียม 15 กรัมต่อลิตร และกลูโคส 500 กรัมต่อลิตร ปริมาตรอาหารที่ใช้ในระยะนี้เท่ากับ 1 ลิตร โดยใช้ระยะเวลาในการเติมประมาณ 30 ชั่วโมง ควบคุมอัตราการเติมอาหารด้วยระบบ DOT STAT (Dissolve Oxygen Tension stat) ซึ่งเป็นระบบควบคุมการเติมอาหารแบบย้อนกลับโดยอาศัยสัญญาณของค่าออกซิเจนละลายที่เปลี่ยนแปลงในการควบคุมการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อในระหว่างการเลี้ยงแบบเฟด-แบท โดยขอบเขตในการควบคุมอยู่ในช่วง DOT เท่ากับ 20 - 40 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว ซึ่งอาหารจะถูกปั๊มเข้าสู่ระบบเมื่อค่า DOT มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว และจะหยุดปั๊มเมื่อค่า DOT มีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว ควบคุมสภาวะในการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 อัตราการกวน 450 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ลิตรอากาศต่อลิตรอาหารต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อนำไปตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร นับเซลล์สัณฐานวิทยาของเซลล์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณไขมันเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง

การวิเคราะห์การเจริญ

1. วิเคราะห์จำนวณเซลล์ด้วยการนับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยดูดตัวอย่างสารแขวนลอยเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เจือจางในอัตราส่วนที่เหมาะสมแล้วปิเปตต์ตัวอย่างลงฮีโมไซโตมิเตอร์ (Hemocytometer) นับและคำนวณจำนวนเซลล์ตามสมการที่ (1)

$$\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่นับได้จากตาราง 9 ช่อง} \times 25}{9 \times 10^{-4}} \quad (1)$$

2. วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง โดยนำตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาผ่านการหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ (Microcentrifuge) ที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกตะกอนเซลล์ จากนั้นล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยการล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วนำตะกอนเซลล์ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งตามสมการ (2)

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักหลอดที่มีเซลล์ (กรัม)} - \text{น้ำหนักหลอดเปล่า (กรัม)}}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง (มิลลิลิตร)} \times 10^{-3}} \quad (2)$$

3. การประมาณค่าอัตราการเจริญใช้วิธีเชิงกราฟ (Trovão *et al.*, 2020) โดยอาศัยความสัมพันธ์ระหว่างการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักเซลล์แห้งและเวลาดังสมการที่ 3 ซึ่งเมื่อเขียนกราฟระหว่าง lnx กับเวลา จะหาค่าอัตราการเจริญจำเพาะได้จากความชันของกราฟ

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t \quad (3)$$

เมื่อ x คือ น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) x_0 คือ น้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเริ่มการเลี้ยง (กรัมต่อลิตร) t คือ เวลา (ชั่วโมง) และ μ คือ อัตราการเจริญจำเพาะ (ชั่วโมง$^{-1}$)

<u>การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์และไขมัน</u>

1. วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS) (Miller, 1959) โดยนำส่วนใสที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงตัวอย่างมาทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในระดับที่เหมาะสม แล้วนำตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางแล้วปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิกปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปต้มในน้ำอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคสและคำนวณตามสมการ (4)

$$\text{ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)} = \frac{OD_{540} \times \text{อัตราการเจือจาง}}{\text{ความเข้มข้นของกราฟมาตรฐาน} \times 10^{-3}} \quad (4)$$

2. วิเคราะห์ปริมาณไขมัน (ดัดแปลงจาก Coakley *et al.*, 2003 และ Liu *et al.*, 2011) โดยนำตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตรมาผ่านการทำแห้งด้วยเครื่อง Freeze-Dry สกัดไขมันจากตัวอย่างแห้งด้วยไอโซโพรพานอล (Isopropanol) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมจนเข้ากันแล้วเติมเฮกเซน (Hexane) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้จนตัวอย่างเกิดการแยกชั้น สกัดซ้ำอีกครั้งด้วย Hexane ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วแยกส่วนใสด้านบนของสารละลายไปวิเคราะห์ปริมาณไขมันด้วยการระเหย Hexane ออกด้วยแก๊ส CO_2 คำนวณปริมาณไขมัน (Total Lipid) ตามสมการ (5)

$$\text{ปริมาณไขมันทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักหลอดที่มีไขมัน (กรัม)} - \text{น้ำหนักหลอดเปล่า (กรัม)}}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง (มิลลิลิตร)} \times 10^{-3}} \quad (5)$$

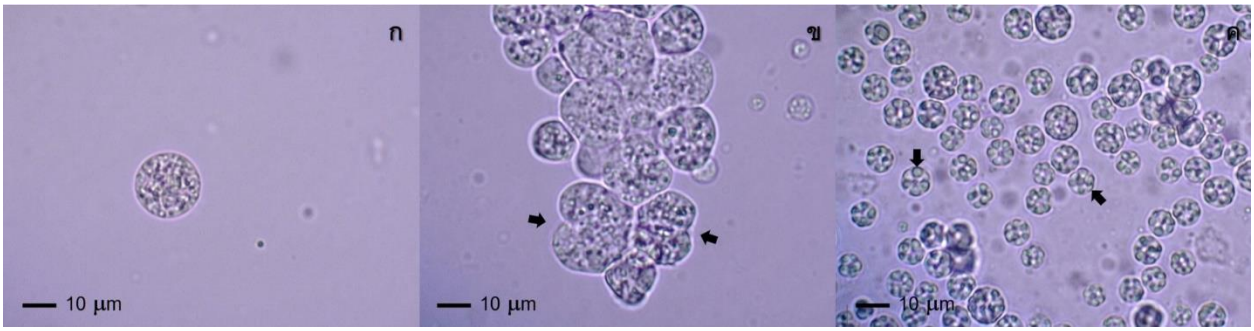
การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองระดับฟลาสก์และถังปฏิกรณ์ชีวภาพจะแสดงในลักษณะของ ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ผลการวิจัย

สัณฐานวิทยาของ Aurantiochytrium sp. FIKU018

ลักษณะทั่วไปของเซลล์ *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 เมื่อตรวจสอบใต้กล้องจุลทรรศน์ พบเซลล์ปกติ (Vegetative cell) (ภาพที่ 1ก) มีรูปร่างกลม ผนังเซลล์บาง เซลล์มีขนาดระหว่าง 5 – 10 ไมโครเมตร เพิ่มจำนวนด้วยการแบ่งตัวแบบทวีคูณจาก 1 เซลล์เป็น 2 เซลล์ และ 2 เซลล์เป็น 4 เซลล์ ตามลำดับ (Successive bipartition) ทำให้เซลล์มีลักษณะเป็นกลุ่มก้อน (Cell cluster) (ภาพที่ 1ข) เมื่อเจริญเติบโตและอยู่ในสภาวะที่เหมาะสม จะสังเกตเห็นบริเวณใสภายในเซลล์ซึ่งคือหยดไขมัน (Oil droplet) ที่สะสมภายในเซลล์ได้ชัดเจน (ภาพที่ 1ค)



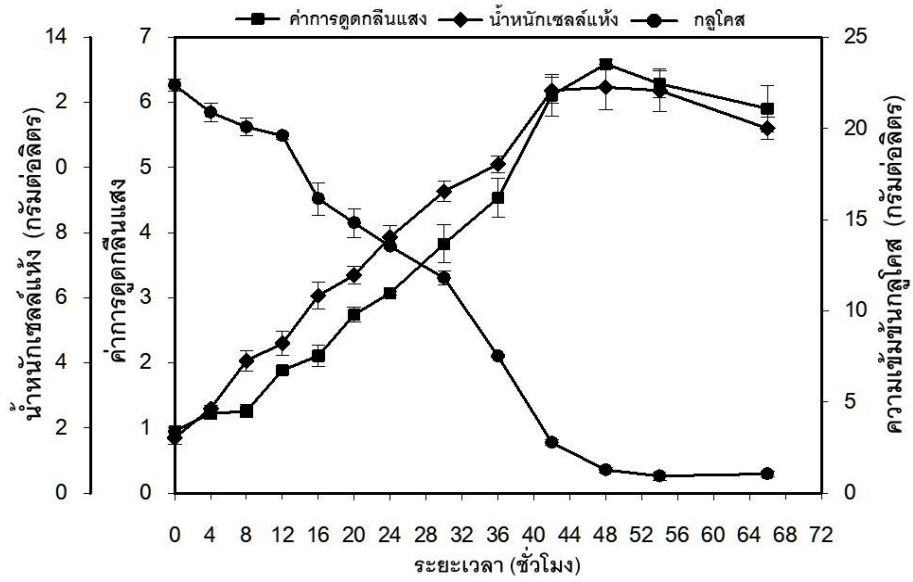
ภาพที่ 1 สัณฐานวิทยาของเซลล์ *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 ใต้กล้องจุลทรรน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า ก. เซลล์ปกติ ข. กลุ่มเซลล์ที่เกิดจากการแบ่งเซลล์ (ลูกศรชี้เซลล์ที่อยู่ในระหว่างการแบ่งเซลล์) ค. การสะสมของหยดไขมันในเซลล์ (ลูกศรชี้หยดไขมันในเซลล์) (scale bar = 10 ไมโครเมตร)

การเจริญของ Aurantiochytrium sp. FIKU018 *ในฟลาสก์*

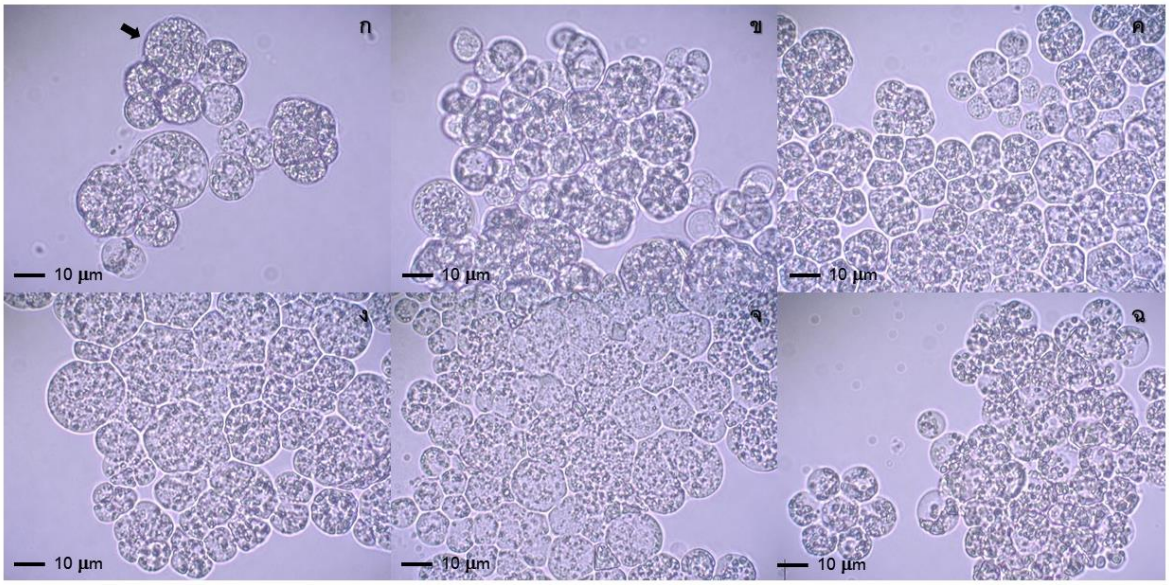
เซลล์ *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 ที่เลี้ยงในฟลาสก์มีการเจริญอย่างรวดเร็ว (Log phase) ในช่วง 8 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงและมีการเจริญอย่างต่อเนื่อง เมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 44 ชั่วโมง เซลล์มีการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ (Stationary phase) และเซลล์เริ่มเข้าสู่ระยะการตาย (Death phase) ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณกลูโคสคงเหลือในระบบ (ภาพที่ 2) โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.11 ต่อชั่วโมง ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 6.59 ± 0.07 และน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 12.47 ± 0.70 กรัมต่อลิตร

เมื่อพิจารณาสัณฐานวิทยาร่วมกับการเจริญของเซลล์ พบว่า หลังจากถ่ายกล้าเชื้อลงสู่ฟลาสก์ในชั่วโมงที่ 0 พบเซลล์ปกติมีรูปร่างกลม ขนาดใหญ่กว่า 10 ไมโครเมตร (ภาพที่ 3ก) ระหว่างเลี้ยงเซลล์มีการแบ่งตัวแบบทวีคูณ เมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (ภาพที่ 3ข) พบเซลล์ปกติมีจำนวนมากขึ้นจากการแบ่งตัวและมีขนาดต่างกัน ส่งผลให้เซลล์มีค่าการ

ดูดกลืนแสงและน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง หลังเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 36 - 42 ชั่วโมง (ภาพที่ 3ค – 3ง) เซลล์มีปริมาณมากขึ้นและกลุ่มเซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น โดยพบไขมันในเซลล์เริ่มรวมตัวกันเป็นหยดไขมันกระจายตัวอยู่ทั่วในเซลล์ เมื่อเลี้ยงเซลล์ในชั่วโมงที่ 48 (ภาพที่ 3จ) พบกลุ่มก้อนเซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น หยดไขมันในเซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้นและกระจายตัวออกจากกัน พบไขมันบางส่วนถูกปลดปล่อยออกนอกเซลล์ ส่งผลให้มีช่องว่างภายในเซลล์เพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาค่าการดูดกลืนแสงและน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่า มีค่าสูงที่สุดเนื่องจากเป็นช่วงเวลาสุดท้ายที่มีอาหารเหลืออยู่ในระบบ เมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 66 ชั่วโมง (ภาพที่ 3ฉ) พบหยดไขมันภายในเซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้นอย่างชัดเจน บางเซลล์มีการปลดปล่อยไขมันออกมานอกเซลล์ เนื่องจากในฟลาสก์ปริมาณสารอาหารไม่เพียงพอต่อการเจริญของเซลล์ ส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสงและน้ำหนักเซลล์แห้งลดลง ตามลำดับ จากผลการศึกษาการเจริญของเซลล์ในระดับฟลาสก์ พบว่า เซลล์*Aurantiochytrium* sp. FIKU018 ที่เลี้ยงในฟลาสก์มีขนาดแตกต่างกันและเกาะกลุ่มเป็นก้อนทุกช่วงระยะการเจริญ เนื่องจากการเลี้ยงในฟลาสก์อาศัยการเขย่าทำให้เซลล์กระจายตัวไม่สม่ำเสมอ สำหรับการติดตามการเจริญของเซลล์ระดับฟลาสก์ สามารถตรวจสอบด้วยการใช้ค่าการดูดกลืนแสงร่วมกับการวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งเหมาะสมที่สุด เนื่องจากค่าที่ได้มีความสัมพันธ์กับการใช้กลูโคสของเซลล์และระยะเวลาในการเลี้ยง นอกจากนั้นยังสามารถศึกษาการเจริญของเซลล์ด้วยการสังเกตลักษณะสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไปร่วมกับการวิเคราะห์ข้างต้นได้ แต่ไม่สามารถตรวจวัดการเจริญด้วยวิธีการนับเซลล์ได้ เนื่องจากเซลล์มีการเกาะกลุ่มทำให้ตัวอย่างกระจายตัวไม่สม่ำเสมอและยากในการนับจำนวน



ภาพที่ 2 การเจริญของ *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 ในอาหาร GYP ที่เลี้ยงในฟลาสก์เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง



ภาพที่ 3 เซลล์ *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 ที่กำลังขยาย 400 เท่า ในอาหาร GYP ที่เลี้ยงในฟลาสก์ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ก. เริ่มต้น (ลูกศรชี้เซลล์ขนาดใหญ่สุดของกลุ่มเซลล์) ข. 16 ชั่วโมง ค. 36 ชั่วโมง ง. 42 ชั่วโมง จ. 48 ชั่วโมง และ ฉ. 66 ชั่วโมง (scale bar = 10 ไมโครเมตร)

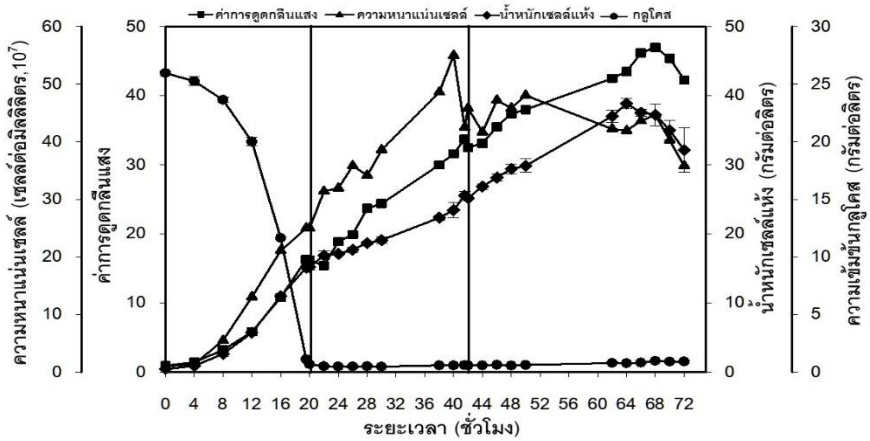
การเจริญของ Aurantiochytrium sp. FIKU018 *ที่เลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ*

เซลล์ *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 ที่เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 16 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยง โดยเซลล์มีอัตราการเจริญจำเพาะ เท่ากับ 0.21 ต่อชั่วโมง เมื่อเลี้ยงเซลล์แบบแบทช์เป็นระยะเวลา 20 ชั่วโมง เซลล์ใช้แหล่งคาร์บอนในการเจริญจนหมดลง (ภาพที่ 4) เพื่อให้เซลล์มีการเจริญต่อเนื่องจึงเลี้ยงเซลล์ต่อในระบบเฟด-แบทช์ด้วยการเติมอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนสูงเพื่อเพิ่มการเจริญและความหนาแน่น เซลล์มีค่าการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง เมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 42 ชั่วโมง พบว่า เซลล์มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นจาก 16.30 เป็น 33.70 และน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นจาก 15.10 ± 0.17 เป็น 25.53 ± 0.60 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ความหนาแน่นเซลล์มีค่าสูงสุดเท่ากับ 55.00 x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตรในชั่วโมงที่ 40 และมีค่าลดลงเหลือ 42.50 x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตรในชั่วโมงที่ 42 จากนั้นเลี้ยงเซลล์ต่อเนื่องในระบบเฟด-แบทช์ด้วยอาหารเหลวที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจนเพื่อเพิ่มการสังเคราะห์ไขมันในเซลล์ ระหว่างการเลี้ยงในช่วงแรกของระยะนี้เซลล์ยังมีการเจริญอย่างต่อเนื่องซึ่งอาจเนื่องมาจากการมีแหล่งไนโตรเจนหลงเหลือจากการเลี้ยงในระยะก่อนหน้า เมื่อวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงระหว่างการเลี้ยง เซลล์มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเป็น 47.00 ในชั่วโมงที่ 68 ในขณะที่น้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 64 โดยมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 38.87 ± 0.71 กรัมต่อลิตร และมีค่าการเจริญลดลงในช่วงท้ายของการเลี้ยงตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ความหนาแน่นของเซลล์ระหว่างการเลี้ยงในชั่วโมงที่ 42 - 72 พบว่า ความหนาแน่นของเซลล์ไม่สัมพันธ์กับระยะเวลาในการเลี้ยง โดยมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด เท่ากับ 48.06 x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วงท้ายของกระบวนการเลี้ยงเซลล์ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการติดตามการเจริญใน

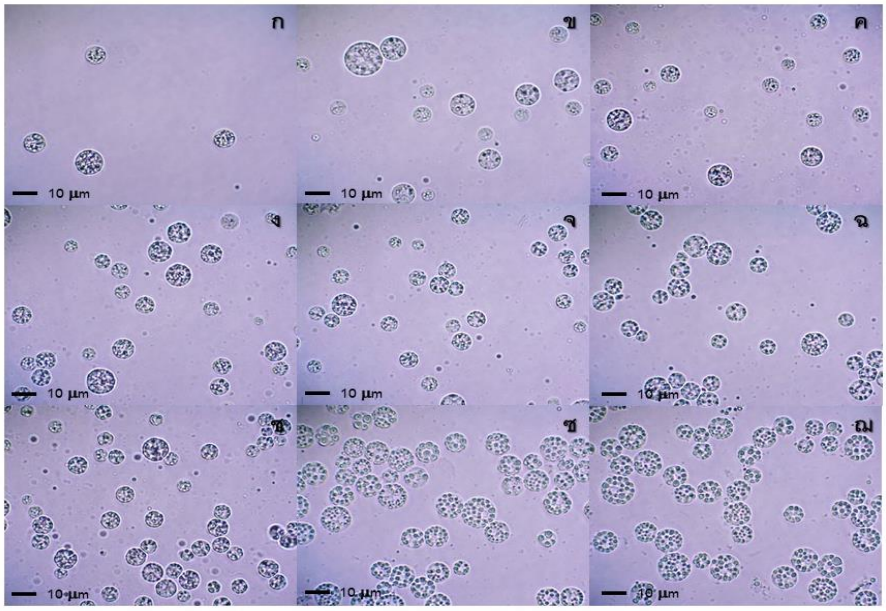
ระยะเฟด-แบทช์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน ไม่สามารถใช้การนับเซลล์ในการติดตามการเจริญได้ และหลังจากชั่วโมงที่ 64 ของการเลี้ยงเมื่อเซลล์สะสมไขมันสูงสุดเท่ากับ 28.7 กรัมต่อลิตร (49.3 เปอร์เซ็นต์ของชีวมวล) การติดตามโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงไม่สอดคล้องกับน้ำหนักเซลล์แห้ง สังเกตได้จากชั่วโมงที่ 68 ค่าการดูดกลืนยังคงเพิ่มขึ้น ในขณะที่ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากหลังชั่วโมงที่ 64 เซลล์ปลดปล่อยไขมันสู่น้ำหมักมากขึ้น โดยสังเกตได้จากเมื่อนำน้ำหมักไปผ่านการหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์เพื่อแยกตะกอนเซลล์ น้ำหมักที่ผ่านการแยกตะกอนเซลล์มีลักษณะขุ่น จึงอาจมีผลทำให้ค่าการดูดกลืนแสงของชั่วโมงการเลี้ยงที่ 64 เป็นต้นไปเพิ่มขึ้น

เมื่อพิจารณาสัณฐานวิทยาของเซลล์ระหว่างการเลี้ยงร่วมกับการวิเคราะห์ค่าการเจริญของเซลล์ หลังถ่ายกล้าเชื้อลงสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ พบเซลล์ปกติมีรูปร่างกลม ขนาดประมาณ 10 ไมโครเมตร แต่ละเซลล์แยกออกจากกันชัดเจนไม่เกาะกลุ่มเช่นเดียวกับการเลี้ยงในฟลาสก์ (ภาพที่ 5ก และ 5ข) เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง เซลล์มีปริมาณเพิ่มขึ้นจากการแบ่งเซลล์แบบทวีคูณ (ภาพที่ 5ค) โดยเซลล์ยังมีขนาดคงที่ประมาณ 10 ไมโครเมตร ซึ่งสอดคล้องกับค่าการดูดกลืนแสง การนับเซลล์และน้ำหนักเซลล์แห้งที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง เมื่อเลี้ยงเซลล์ในระบบเฟด-แบทช์ด้วยอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนสูงในชั่วโมงที่ 20 – 42 เซลล์ปกติมีปริมาณเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 5ง – 5ฉ) ไขมันภายในเซลล์เริ่มรวมกลุ่มอัดแน่นกันเป็นหยดไขมัน ซึ่งสอดคล้องกับค่าการดูดกลืนแสง การนับเซลล์ และน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อการเลี้ยงดำเนินเข้าสู่ระบบเฟด-แบทช์ที่ใช้อาหารเหลวปราศจากแหล่งไนโตรเจนในชั่วโมงที่ 42 – 72 (ภาพที่ 5ช – 5ฌ) พบว่าเมื่อเลี้ยงออแรนธิโอไคเตรียมเป็นเวลา 64 ชั่วโมง เซลล์ปกติมีขนาดใหญ่มากกว่า 10 ไมโครเมตร ภายในเซลล์พบหยดไขมันขนาดใหญ่ขึ้นและกระจายทั่วเซลล์ จากการสังเกตพบว่ามีไขมันบางส่วนถูกปลดปล่อยออกนอกเซลล์ ทำให้ภายในเซลล์มีช่องว่างระหว่างหยดไขมันเพิ่มขึ้น เมื่อนับเซลล์พบว่าเซลล์ในระบบเฟด-แบทช์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน มีจำนวนไม่คงที่และแนวโน้มไม่สอดคล้องกับน้ำหนักเซลล์แห้ง ทั้งนี้เนื่องจากการเลี้ยงด้วยอาหารเหลวที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจนเป็นการชักนำเซลล์เข้าสู่กระบวนการสร้างและสะสมไขมัน ทำให้เซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น (ภาพที่ 5ซ) และส่งผลต่อเนื่องให้ค่าการดูดกลืนแสงและน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 68 ชั่วโมง น้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าลดลงทั้งนี้เนื่องจากไขมันบางส่วนถูกปล่อยออกนอกเซลล์ ประกอบกับปริมาณอาหารในระบบไม่เพียงพอต่อการเจริญ ทำให้เซลล์ต้องมีการนำสารอาหารส่วนที่สะสมไว้มาใช้การเจริญ ขณะเดียวกันค่าการดูดกลืนแสงยังคงเพิ่มขึ้น ซึ่งไม่สอดคล้องกับน้ำหนักเซลล์แห้ง ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากไขมันที่ปล่อยออกมานอกเซลล์ทำให้แขวนลอยอยู่ในน้ำหมักเป็นผลให้ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ยังคงสูงขึ้น จากผลการศึกษาการเจริญของ *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 ที่เลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ พบว่า เซลล์ *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 สามารถเจริญเติบโตได้ดีโดยเซลล์มีการกระจายในน้ำหมักอย่างสม่ำเสมอ สำหรับการวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ในช่วงการเลี้ยงระบบแบทช์และระบบเฟด-แบทช์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนสูง สามารถติดตามการเจริญของเซลล์ได้ด้วยการใช้ค่าการดูดกลืนแสง การนับเซลล์ และน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่เมื่อการเลี้ยงเข้าสู่ระบบเฟด-แบทช์ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน พบว่าควรใช้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งในการติดตามการเจริญและการสะสมไขมันสูงสุดได้ ส่วนค่าการดูดกลืนแสงสามารถติดตามการเจริญเติบของเซลล์ได้ในช่วงต้น แต่ไม่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อระบุการเจริญในช่วงของการสะสมไขมันได้ ฉะนั้นการติดตามการเจริญและสะสมไขมันในระบบเฟด-แบทช์ด้วยอาหารเหลวที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน

ต้องพิจารณาข้อมูลทั้งค่าการดูดกลืนแสงและค่าน้ำหนักเซลล์แห้งในระหว่างการปรับปรุงกระบวนการเลี้ยงเชื้อ เพื่อหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวชีวมวลของ *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 ตามวัตถุประสงค์ในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป



ภาพที่ 4 การเจริญของ *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 ในอาหาร GYP ที่เลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง



ภาพที่ 5 เซลล์ *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 ที่กำลังขยาย 400 เท่า ในอาหาร GYP ที่เลี้ยงเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ในระบบแบทช์ 0 – 20 ชั่วโมง (ก. เริ่มต้น ข. 8 ชั่วโมง ค. 16 ชั่วโมง) ระยะเฟด-แบทช์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนสูง 20 – 42 ชั่วโมง (ง. 20 ชั่วโมง จ. 30 ชั่วโมง และ ฉ. 40 ชั่วโมง) และระยะเฟด-แบทช์ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน 42 – 72 ชั่วโมง (ช. 48 ชั่วโมง ซ. 64 ชั่วโมง และ ฌ. 72 ชั่วโมง) (scale bar = 10 ไมโครเมตร)

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากผลการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 พบว่าสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yokoyama และ Honda (2007) ที่รายงานลักษณะเซลล์ของ *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 ว่ามีรูปร่างกลม ผนังเซลล์บาง เซลล์ปกติมักกระจายอยู่ในอาหารในรูปของเซลล์เดี่ยว (Single cells) และไม่พบองค์ประกอบของร่างแหเอคโตพลาสมิค โดยทั่วไปเซลล์มีการสืบพันธุ์แบบแบ่งเซลล์แบบทวีคูณทำให้สามารถพบเซลล์ที่มีลักษณะเป็นกลุ่มก้อนระหว่างการเลี้ยง (Raghukumar, 2002) เมื่อพิจารณาการเจริญของ *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 ที่เลี้ยงในระดับฟลาสก์และในถังปฏิกรณ์ชีวภาพระบบแบทช์ พบว่าเซลล์ที่เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีอัตราการเจริญและมีการกระจายตัวของเซลล์ดีกว่าการเลี้ยงในฟลาสก์ ทั้งนี้เนื่องจากในการเจริญช่วงแรกเซลล์ต้องการออกซิเจนปริมาณสูงเพื่อนำไปใช้ในการสังเคราะห์สารเมทาบอไลท์ปฐมภูมิ (Primary metabolite) เพื่อใช้เป็นโครงสร้างของเซลล์ใหม่ เช่น กรดนิวคลีอิก เอนไซม์ และโปรตีนต่างๆ (Ratledge & Wynn., 2002; Chi *et al*., 2009) ดังนั้น ออกซิเจนจึงสำคัญต่อการหายใจระดับเซลล์เพื่อการเจริญ ซึ่งการเลี้ยงเซลล์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีทั้งการกวน (Agitation) และการให้อากาศ (Aeration) ส่งผลให้อัตราการถ่ายเทมวลของออกซิเจน (Oxygen transfer rate) เข้าสู่เซลล์มีประสิทธิภาพมากกว่าการเลี้ยงในฟลาสก์ที่อาจเกิดปัญหาออกซิเจนจำกัดภายใต้สภาวะที่เซลล์มีความเข้มข้นสูง ในการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์เซลล์จึงมีอัตราการเจริญช้ากว่าในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ รวมทั้งการกวนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพยังช่วยให้เซลล์กระจายตัวได้ดีขึ้น ลดการเกาะกลุ่มกันของเซลล์ และส่งผลให้ออกซิเจน สารอาหาร และเซลล์ในระบบผสมรวมเป็นเนื้อเดียวกันได้ดีขึ้น (Homogeneous) เป็นผลให้การดูดซึมอาหารเข้าสู่เซลล์รวมถึงการถ่ายเทความร้อนมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Mantzouridou *et al*., 2002; Zhou *et al*., 2018) ฉะนั้นการติดตามการเจริญของ *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 ที่เลี้ยงในฟลาสก์ควรตรวจวัดจากค่าการดูดกลืนแสงและค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนการติดตามการเจริญของเซลล์ที่เลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพช่วง 0 – 20 ชั่วโมง สามารถใช้วิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง การนับเซลล์ และการวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งได้ เมื่อพิจารณาการเจริญของเซลล์ในช่วง 20 - 42 ชั่วโมงของการเลี้ยง ซึ่งเป็นช่วงเฟด-แบทช์ที่มีการเติมอาหารที่มีสัดส่วนแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนสูง เมื่อพิจารณาสัณฐานวิทยาของเซลล์จะทำให้ทราบระยะการเจริญของเซลล์และทราบว่าเซลล์เริ่มสะสมไขมัน โดยทั่วไปการเลี้ยงจุลินทรีย์ผลิตไขมัน (Single cell oils) ในสภาวะที่แหล่งอาหารมีอัตราส่วนความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงจะทำให้เพิ่มอัตรา การเจริญพร้อมกับอัตราการสร้างไขมันของเซลล์ (Ratledge, 2004) ซึ่งในช่วงนี้สามารถใช้การวัดค่าการดูดกลืนแสง การนับเซลล์ และการวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งในการติดตามการเจริญของ *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 ได้ และเมื่อเข้าสู่ช่วง 42 - 72 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงเฟด-แบทช์ที่มีการเติมอาหารที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน ส่งผลต่อการเจริญและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 จากการศึกษา Yokochi *et al*. (1998), Burja *et al*. (2006) และ Furlan *et al*. (2017) พบว่าการเลี้ยงเซลล์ในกลุ่ม ทรอสโทไคตริดส์ในอาหารที่ความเข้มข้นของคาร์บอนมีมากเกินพอและความเข้มข้นของไนโตรเจนไม่จำกัด นอกจากจะทำให้เซลล์ผลิตชีวมวลได้มากขึ้นแล้วยังชักนำให้สังเคราะห์ไขมันได้ในปริมาณที่มากขึ้นด้วย โดยแสดงให้เห็นในผลจากการเลี้ยง *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 ในช่วง 20 - 42 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ ซึ่งเป็นช่วงที่มีการเติมอาหารเหลวที่มีสัดส่วนแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนสูง อย่างไรก็ตามเมื่อเข้าสู่ระยะเฟด-แบทช์ในช่วง 42 – 72 ชั่วโมง ที่มีการเติมอาหารเหลวที่ปราศจากแหล่งไนไตรเจน พบว่าการเจริญของเซลล์ลดลงโดยยังคงมีการสะสมไขมัน

อย่างต่อเนื่อง ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยข้างต้น กล่าวคือ เมื่อชักนำให้เซลล์เข้าสู่สภาวะที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์ไขมัน ทำให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตพร้อมกับสะสมไขมัน โดยติดตามได้จากสัณฐานวิทยาของเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์ นอกจากนั้นในการติดตามการเจริญของเซลล์พบว่าสามารถใช้วิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อติดตามในเบื้องต้นได้ แต่เมื่อถึงระยะหนึ่งเซลล์มีการสะสมไขมันภายในเซลล์ และมีไขมันบางส่วนที่ถูกปลดปล่อยจากเซลล์สู่น้ำหมัก ส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสงมีความแปรปรวนในช่วงท้ายของการเลี้ยง ส่วนการติดตามการเจริญด้วยการนับเซลล์นั้นไม่เหมาะสม เนื่องจากพบทั้งเซลล์มีที่มีการเพิ่มขนาดและมีการสะสมไขมันและเกาะกลุ่ม ทำให้ค่าที่ได้จากการนับเซลล์ไม่สามารถใช้บอกสภาวะการเจริญ ฉะนั้นในการติดตามการเจริญของเซลล์ *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่เลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ในช่วง 42 - 72 ชั่วโมง ที่เติมอาหารเหลวที่ปราศจากแหล่งไนไตรเจนควรตรวจวัดจากน้ำหนักเซลล์แห้งร่วมกับการศึกษาสัณฐานวิทยาใต้กล้องจุลทรรศน์จึงจะเหมาะสมที่สุด

สรุปผลการวิจัย

การติดตามการเจริญของ *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงและวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งร่วมกับการศึกษาสัณฐานวิทยาสามารถนำมาใช้สำหรับติดตามผลในการเลี้ยงเซลล์ระดับฟลาสก์ได้ นอกจากจะทำให้ทราบรูปแบบการเจริญของเซลล์แล้ว ยังสามารถประยุกต์ใช้ค่าการดูดกลืนแสงในการตรวจวัดปริมาณเซลล์ที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในการขยายขนาดการเลี้ยงไปยังระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพได้ เมื่อเลี้ยง *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ พบว่าการติดตามการเจริญของเซลล์ที่เลี้ยงในระบบแบทช์และระบบระบบเฟด-แบทช์ที่มีสัดส่วนแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนสูง สามารถตรวจวัดได้จากค่าการดูดกลืนแสง การนับเซลล์ และการวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งร่วมกับการศึกษาสัณฐานวิทยา และเมื่อการเลี้ยงเข้าสู่ระบบเฟด-แบทช์ที่อาหารปราศจากแหล่งไนไตรเจน ควรติดตามการเจริญด้วยการวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งร่วมกับการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเซลล์เป็นหลัก เนื่องจากเซลล์ถูกชักนำให้เข้าสู่สภาวะการสะสมไขมัน การตรวจสอบสัณฐานวิทยาร่วมด้วยจะช่วยให้ทราบระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวชีวมวลให้เหมาะสมกับความต้องการของวัตถุประสงค์ในการนำชีวมวลนั้นไปใช้ประโยชน์ทางเทคโนโลยีชีวภาพต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินอุดหนุนการทำกิจกรรมส่งเสริมและสนับสนุนการพัฒนาวิทยาศาสตร์ วิจัย และนวัตกรรม (ววน.) ทุนสนับสนุนงานพื้นฐาน TUFF03/2564 ผู้วิจัยขอขอบคุณสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ที่อำนวยความสะดวกในการวิจัยทั้งสถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือในการศึกษาวิจัยนี้ และขอขอบคุณ ผศ.ดร.จันทนา ไพรบูรณ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่อนุเคราะห์จุลินทรีย์ในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Aasen, I.M., Ertesvåg, H., Heggeset, T.M.B., Liu, B., Brautaset, T., Vadstein, O., & Ellingsen, T.E. (2016). Thraustochytrids as production organisms for docosahexaenoic acid (DHA), squalene, and carotenoids, *Applied Microbiology and Biotechnology, 100,* 4309-4321.

Aki, T., Hachida, K., Yoshinaga, M., Katai, Y., Yamasaki, T., Kawamoto, S., Kakizono, T., Maoka, T., Shigeta, S., Suzuki, O., & Ono, K. (2003). Thraustochytrid as a potential source of carotenoids. *Journal of the American Oil Chemists' Society, 80,* 789-794.

Burja, M.A., Radianingtyas, H., Windust, A., & Barrow, J.C. (2006). Isolation and characterization of polyunsaturated fatty acid producing *Thraustochytrium* species: screening of strains and optimization of omega-3 production. *Applied Microbiology and Biotechnology, 72,* 1161-1169.

Chi Z., Liu Y., Frear C., & Chen S. (2009). Study of a two-stage growth of DHA-producing marine algae *Schizochytrium limacinum* SR21 with shifting dissolved oxygen level. *Applied Microbiology and Biotechnology, 81*(6), 1141-1148.

Coakley, M., Ross, R. P., Nordgren, M., Fitzgerald, G., Devery, R., & Stanton, C. (2003) Conjugated linoleic acid biosynthesis by human-derived *Bifidobacterium* species. *Journal of Applied Microbiology, 91(1),* 138-145.

Furlan, M.J.V., Maus, V., Batista, I., & Bandarra, M.N. (2017) Production of docosahexaenoic acid by *Aurantiochytrium* sp. ATCG PRA-276. *Brazilian Journal of Microbiology, 48,* 359-365.

Honda, D., Yokochi, T., Nakahara, T., Erata, M., & Higashihara, T. (1998). *Schizochytrium limacinum* sp. Nov., a new thraustochytrid from a mangrove area in the west Pacific Ocean, *Mycological Research, 102*(4), 439-448.

Huang, J., Aki, T., Yokochi, T., Nakahara, T., Honda, D., Kawamoto, S., Shigeta, S., Ono, K., & Suzuki, O. (2003). Grouping newly isolated docosahexaenoic acid-producing thraustochytrid based on their polyunsaturated fatty acid profiles and comparative analysis of 18s rRNA genes. *Marine Biotechnology, 5,* 450-457.

Johnson, E.A., & An, G.H. (1999). Astaxanthin from microbial sources. *Critical Reviews in Biotechnology, 11,* 297-326.

Kaya, K., Nakazawa, A., Matsuura, H., Honda, D., Inouye, I., & Watanabe, M.M. (2011). Thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. 18W-13a accumulates high amounts of squalene. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 75,* 2246-2248.

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

Liu, P., Shen, S.R., Ruan, H., Zhou, Q., Ma, L.L., & He, G.Q. (2011) Production of conjugated linoleic acids by *Lactobacillus plantarum* strains isolated from naturally fermented Chinese pickles. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology), 12*(11), 923-930.

Mantzouridou, F., Roukas, T., & Kotzekidou, P. (2002). Effect of the aeration rate and agitation speed on β-carotene production and morphology of *Blakeslea trispora* in a stirred tank reactor: Mathematical modeling. *Biochemical Engineering Journal, 10,* 123–135.

Miller, L.G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry, 31*(3), 426-428.

Murthy, K., Rajesha, J., Swamy, M., & Ravishankar, G. (2005). Comparative evaluation of hepatoprotective activity of carotenoids of microalgae. *Journal of Medicinal Food, 8*(4), 523–528.

Raghukumar, S. (2002). Ecology of the marine protists, the labyrinthulomycetes (thraustochytrids and labyrinthulids). *European Journal of Protistology, 38,* 127–145.

Raghukumar, S. (2008). Thraustochytrid marine Protists: production of PUFAs and other emerging technologies. *Marine Biotechnology, 10,* 631-640.

Raposo, M.F., de Morais, A.M., & de Morais, R.M. (2015). Carotenoids from marine microalgae: A valuable natural source for the prevention of chronic diseases. *Marine Drugs, 13*(8), 5128–5155.

Ratledge, C., & Wynn, J.P. (2002). The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advance in Applied Microbiology, 5,* 1-51.

Ratledge, C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie, 86,* 807-815.

Sanders, T.A.B., Gleason, K., Griffin, B., & Miller, G.J. (2006). Influence of an algal triacylglycerol containing docosahexaenoic acid (22:6 n-3) and docosapentaenoic acid (22:5 n-6) on cardiovascular risk factors in healthy men and women. *British Journal of Nutrition, 95*, 525–531.

Takahata, K., Monobe, K., Tada, M., & Weber, P.C. (1998). The benefits and risks of n-3 polyunsaturated fatty acids. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 62*, 2079–2085.

Trovão, M., Pereira, H., Costa, M., Machado, A., Barros, A., Soares, M., Carvalho, B., Silva, J, T., Varela, J., & Silva, J. (2020). Lab-Scale Optimization of *Aurantiochytrium* sp. culture medium for improved growth and DHA production. *Applied Sciences, 10*(7), 2500.

Yokochi, T., Honda, D., Higashihara, T., & Nakahara, T. (1998). Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. *Applied Microbiology and Biotechnology, 49,* 72–76.
Yokoyama, R., & Honda, D. (2007). Taxonomic rearrangement of the genus *Schizochytrium* sensu lato based on morphology, chemotaxonomic characteristics, and 18srRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): emendation for *Schizochytrium* and erection of *Aurantiochytrium* and *Oblongichytrium* gen. nov. *Mycoscience, 48,* 199-211.

Zhou, Y., Han, L., He, H., Sang, B., Yu, D., Feng, J., & Zhang, X. (2018). Effects of agitation, aeration and temperature on production of a novel glycoprotein GP-1 by *Streptomyces kanasenis*i ZX01 and scale-up based on volumetric oxygen transfer coefficient. *Molecules, 23,* 125.