

สภาวะสารอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตมวลเซลล์ และโอเมก้า-3 จากทรอสโทไคทริดส์

Optimization of Nutrient Condition for Cell Mass and Omega-3 Production from Thraustochytrids

พญจจิกร ศุภพล* และชุตินา แก้วพิบูลย์

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง

ตำบลบ้านพร้าว อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง 93110

ลิตา ปรีदानนท์

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค)

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอกองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Preuttiporn Supaphon* and Chutima Keawpiboon

Department of Biology, Faculty of Science, Thaksin University, Phatthalung Campus,

Ban Phrao, Pa Payom, Phatthalung 93110

Sita Preedanon

National Center for Genetic and Engineering and Biotechnology (BIOTEC),

Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตมวลเซลล์และกรดไขมันโอเมก้า-3 จากทรอสโทไคทริดส์ และศึกษาสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อที่มีศักยภาพโดยลำดับเบสในนิวคลีโอไทด์ ศึกษาการผลิตมวลเซลล์และโอเมก้า-3 โดยอาหารที่มีกลูโคส 3 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมแหล่งไนโตรเจน (1 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด, 1 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัดและเพปโตน, 1 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด เพปโตน และทริปโตน) เพื่อประเมินผลของชุดการทดลองเหล่านี้ จึงศึกษาปริมาณมวลเซลล์และโอเมก้า-3 โดยวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งและแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่าทรอสโทไคทริดส์ ไอโซเลท TC9-TSU สามารถผลิตมวลเซลล์ได้สูงสุดเท่ากับ 32.87 กรัมต่อลิตร ในอาหาร 6 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส และ 1 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด เพปโตน และทริปโตน นอกจากนี้เชื้อไอโซเลทนี้ยังสามารถผลิตกรดไขมันโอเมก้า-3 ได้สูงที่สุด (52.56 เปอร์เซ็นต์) โดยพบกรดไขมันดีโคซาเฮกซาอีโนอิก (docosahexaenoic acid, 22:6n3) ดีพีเอ (docosapentaenoic acid, 22:5n3) และ อีพีเอ (eicosapentaenoic acid, 20:5n3) จากผลการจัดจำแนกทรอสโทไคทริดส์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสในนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S ของไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ พบว่าไอโซเลท TC9-TSU จัดจำแนกได้

เป็น *Aurantiochytrium limacinum* (รหัสนิวคลีโอไทด์ MG279107) จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าทออสโทไคทริดส์เป็นแหล่งทางเลือกสำหรับการผลิตโอเมก้า-3 กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนที่น่าสนใจสำหรับประยุกต์ในขนาด

คำสำคัญ : ทออสโทไคทริดส์; มวลเซลล์; กรดไขมันโอเมก้า-3

Abstract

This research aimed to evaluate the effect of carbon and nitrogen sources on the production of cell mass and omega-3 fatty acids by thraustochytrids and phylogenetic relationships of the potential isolates based on their nucleotide sequences. Thraustochytrids were studied for biomass and omega-3 fatty acids production by using 3 and 6 % glucose concentrations supplemented with nitrogen from different sources, including 1 % yeast extract, 1 % yeast extract and peptone, and 1 % yeast extract, peptone and tryptone. To assess the effects of these different treatments, we determined the cell mass and omega-3 fatty acids concentration by dried cells weight and gas chromatography–mass spectrometry, respectively. The maximum dried cell weight (32.87 g/L) was obtained from isolate TC9-TSU using initial concentrations of 6 % glucose and 1 % yeast extract, peptone and tryptone. Under these conditions, this isolate gave the highest level of PUFAs production (52.56 %), with DHA (docosahexaenoic acid, 22:6n3), DPA (docosapentaenoic acid, 22:5n3), and EPA (eicosapentaenoic acid, 20:5n3). In addition, the potential isolate TC9-TSU was identified based on *18S rDNA* nucleotide sequences as *Aurantiochytrium limacinum* (accession number MG279107). This result showed that thraustochytrids are an interested alternative source of omega-3 polyunsaturated fatty acids production for further application.

Keywords: thraustochytrids; cell mass; omega-3 fatty acid

1. บทนำ

การศึกษาเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์อาหารที่สามารถป้องกันหรือรักษาโรคได้รับความสนใจในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา โดยเฉพาะในกลุ่มผลิตภัณฑ์ที่มีองค์ประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) โดยพบว่า PUFAs เป็นกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของสมองและเยื่อหุ้มเซลล์ รวมถึงเซลล์ต่าง ๆ PUFAs เป็นกรดไขมันจำเป็นเนื่องจากไม่สามารถสังเคราะห์ได้เองตามความต้องการ

ของร่างกาย กรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดนี้ได้นำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ทั้งเป็นแหล่งพลังงานและอาหารเสริม นอกจากนี้มีการนำไปใช้เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำหรืออนุบาลสัตว์น้ำขนาดเล็ก [1,2] กรดไขมันโอเมก้า-3 เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนประกอบด้วยดีเอชเอ (docosahexaenoic acid, 22:6n3) ดีพีเอ (docosapentaenoic acid, 22:5n3) และอีพีเอ (eicosapentaenoic acid, 20:5n3) โดยกรดไขมันโอเมก้า-3 มีประโยชน์ต่อการพัฒนาสมอง

ของทารก นอกจากนี้มีรายงานว่ามียาประโยชน์ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ ข้ออักเสบ ภาวะหลอดเลือดแข็ง และป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด เบาหวาน มะเร็งลำไส้ และมะเร็งปอด [3-6] โดยแหล่งของกรดไขมันชนิดนี้ได้จากปลาทะเลและปลาน้ำจืดบางชนิดเป็นหลัก แต่พบปัญหาหลายประการด้วยกัน ได้แก่ ทรัพยากรที่ใช้ในการสกัดกรดไขมันมีปริมาณจำกัด นอกจากนี้กรดไขมันที่ได้ขึ้นกับชนิดของปลา อายุ เพศ ฤดูกาล รวมถึงแหล่งที่อยู่อาศัย [7] องค์ประกอบของน้ำมันปลามีกรดไขมันหลายชนิดทำให้ยากต่อการแยกให้บริสุทธิ์ กรดไขมันจากปลามีกลิ่นคาวปลาและยังถูกออกซิไดส์ได้ง่ายทำให้คุณภาพลดน้อยลงอีกด้วย ซึ่งทำให้กรดไขมันที่ได้มีความแปรปรวนสูง จากปัญหาดังกล่าวนักวิจัยจึงมองหาแหล่งทางเลือกใหม่เพื่อใช้ในการผลิตกรดไขมัน โดยมีรายงานว่าทรอสโทโคทริดส์ (thraustochytrids) มีศักยภาพในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน โดยทรอสโทโคทริดส์เป็นจุลินทรีย์ที่พบได้ทั่วไปในป่าชายเลน น้ำทะเล สาหร่ายทะเล และหญ้าทะเล มีบทบาทสำคัญในระบบนิเวศ ทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายสารอาหารและเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ [8] เพาะเลี้ยงง่าย โดยสามารถเพิ่มปริมาณได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และที่สำคัญ คือ ภายในเซลล์ทรอสโทโคทริดส์มีไขมันสะสมสูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 [9] พบดีเอชเอเป็นกรดไขมันหลักมีสัดส่วน 30-40 เปอร์เซ็นต์ ของกรดไขมันทั้งหมดเมื่อเปรียบเทียบคุณภาพของกรดไขมันที่ได้จากปลาและทรอสโทโคทริดส์พบว่ากรดไขมันที่ได้จากทรอสโทโคทริดส์มีคุณภาพและความบริสุทธิ์สูงกว่ากรดไขมันจากปลา [10] ดังนั้นจุลินทรีย์ทะเลกลุ่มทรอสโทโคทริดส์จึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาเป็นแหล่งผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีศักยภาพ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ [8,9]

อย่างไรก็ตาม ปริมาณกรดไขมันในทรอสโท-

โคทริดส์ สามารถเปลี่ยนแปลงได้ขึ้นกับองค์ประกอบของอาหารและปริมาณอาหารที่ใช้เลี้ยง เช่น องค์ประกอบของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน รวมทั้งปัจจัยของสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ เช่น อุณหภูมิ ความเค็ม ความเข้มข้น และปริมาณออกซิเจน โดยพบว่าองค์ประกอบของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเป็นปัจจัยสำคัญ โดยส่งผลต่อปริมาณมวลเซลล์ และสัดส่วนของกรดไขมันภายในเซลล์ [11] หากสามารถหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ชนิดนี้ให้มีปริมาณมวลเซลล์สูงและให้มีกรดไขมันที่ต้องการจึงอาจเป็นแนวทางในการเพิ่มศักยภาพและแหล่งทางเลือกของการผลิตกรดไขมันเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคต ดังนั้นงานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะศึกษาผลของอาหาร โดยเฉพาะแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตมวลเซลล์และการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (โอเมก้า-3) โดยทรอสโทโคทริดส์อาจช่วยลดปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้น และสามารถเพิ่มแหล่งทางเลือกในการผลิตโอเมก้า-3 ในการนำไปใช้กับอุตสาหกรรมการผลิตอาหารเสริมและการผลิตอาหารสัตว์น้ำเศรษฐกิจในอนาคต นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มฐานข้อมูลศักยภาพของกรดไขมันโอเมก้า-3 ที่ผลิตจากทรอสโทโคทริดส์อีกด้วย

2. วิธีการดำเนินงานวิจัย

2.1. การเก็บตัวอย่างและการแยกทรอสโทโคทริดส์

เก็บตัวอย่างหญ้าทะเล สาหร่าย และน้ำทะเลแบบสุ่ม บริเวณหาดปากเมง จังหวัดตรัง จำนวน 2 ครั้ง ในเดือนพฤษภาคม ถึงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2560 โดยนำตัวอย่างใส่ในหลอดที่มีน้ำทะเลและเกสรสน (pine pollen) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำหลอดตัวอย่างที่ได้มาแยกทรอสโทโคทริดส์โดยวิธีเหยื่อล่อ (pine pollen baiting method) [12] ในห้องปฏิบัติการ

การ โดยบ่มหลอดตัวอย่างที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้ทรอสโทโคทริดส์มาเกาะบนเกสรสน แล้วดูดเกสรสนด้วยปิเปตปราศจากเชื้อปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาหยดลงบนอาหารแข็ง 3 เพอร์เซ็นต์ กลูโคส และ 1 เพอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด (3 เพอร์เซ็นต์ GY) ที่เตรียมด้วยน้ำทะเล และผสมสารปฏิชีวนะสเตربتัยมัยซินและเพนิซิลลิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นกระจายเชื้อ และนำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน โดยสังเกตผลทุกวันภายใต้กล้องจุลทรรศน์และแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ในอาหารแข็ง 3 เพอร์เซ็นต์ GY ที่ไม่ผสมสารปฏิชีวนะเพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

2.2 การเตรียมหัวเชื้อทรอสโทโคทริดส์

นำทรอสโทโคทริดส์บริสุทธิ์ที่แยกได้ทั้งหมดมาจัดกลุ่มตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้ออายุ 7 วัน บนอาหารแข็ง 3 เพอร์เซ็นต์ GY โดยสังเกตลักษณะของโคโลนี ขนาด ขอบ และสีของโคโลนี นอกจากนี้ยังศึกษาลักษณะของเซลล์ในอาหารเหลวภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อใช้ในการจัดกลุ่มร่วมกัน [13-17] จากนั้นคัดเลือกเชื้อที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างกัน มาเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ด้วยอาหารเหลว 3 เพอร์เซ็นต์ GY ปริมาตร 150 มิลลิลิตร โดยเชื้อ 10 โคโลนี ลงในอาหารเหลว และนำฟลาสก์ไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ไม่เขย่า เป็นเวลา 7 วัน เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

2.3 คัดเลือกทรอสโทโคทริดส์ที่เจริญได้ดีที่สุดโดยวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง

นำหัวเชื้อทรอสโทโคทริดส์ที่เตรียมไว้ 1 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารทั้งหมด 6 สูตร จำนวน 4 ฟลาสก์ ต่อ 1 ไอโซเลท ได้แก่ อาหาร 3 เพอร์เซ็นต์ กลูโคส และ 1 เพอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด (3 เพอร์เซ็นต์ GY), 3 เพอร์เซ็นต์ กลูโคส 1 เพอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด และ เพปโตน (3 เพอร์เซ็นต์ GYP), 3 เพอร์เซ็นต์ กลูโคส 1

เปอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด เพปโตน และทริปโตน (3 เพอร์เซ็นต์ GYPT), 6 เพอร์เซ็นต์ กลูโคส และ 1 เพอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด (6 เพอร์เซ็นต์ GY), 6 เพอร์เซ็นต์ กลูโคส 1 เพอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด และเพปโตน (6 เพอร์เซ็นต์ GYP), 6 เพอร์เซ็นต์ กลูโคส 1 เพอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด เพปโตน และทริปโตน (6 เพอร์เซ็นต์ GYPT) โดยแต่ละฟลาสก์มีอาหารปริมาตร 250 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ ขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ไม่เขย่า เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเก็บเซลล์และคัดเลือกไอโซเลทที่มีอัตราการเจริญสูงที่สุดโดยวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ทำการเก็บเซลล์จากอาหารแต่ละสูตร โดยนำไปหมუნเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ล้างเซลล์ด้วย 0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปทำให้แห้งโดยการทำให้แบบแช่เยือกแข็งชั่งน้ำหนักเซลล์แห้ง และเก็บเซลล์ไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส

2.4 การสกัดและวิเคราะห์กรดไขมัน

นำตัวอย่างเซลล์แห้งของไอโซเลทที่เจริญได้ดีที่สุดในอาหารทั้ง 6 สูตร สูตรละประมาณ 0.01-0.05 กรัม ใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วเติม 10 เปอร์เซ็นต์ กรดไฮโดรคลอริกในคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วเติมคลอโรฟอร์ม:เมทานอล (อัตราส่วน 1:1) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม นำไปวางใน water bath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติมเฮกเซน ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัว ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม นำไปหมუნเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดเฉพาะส่วนใสชั้นบนใสในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ นำของเหลวที่ได้ส่งไปวิเคราะห์กรดไขมันด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปคโตรเมทรี ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และคำนวณหาสัดส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเทียบกับกรดไขมันทั้งหมดดังนี้ สัดส่วนของกรดไขมันแต่ละชนิด (เปอร์เซ็นต์) = (พื้นที่ใต้กราฟของกรดไขมันชนิดนั้น ๆ ÷ พื้นที่ใต้กราฟของกรดไขมันทั้งหมด) × 100

2.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลน้ำหนักเซลล์แห้งและสัดส่วนของกรดไขมันในชุดการทดลองต่าง ๆ มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variances, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยโปรแกรม GraphPad Prism เวอร์ชัน 5.0

2.6 การจัดจำแนกทรอสโทโคทริดส์ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

2.6.1 การสกัดดีเอ็นเอ

เลี้ยงทรอสโทโคทริดส์บริสุทธิ์ในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว 3 เปอร์เซ็นต์ GY ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเก็บเซลล์ โดยหมุนเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เติสส่วนใสทิ้ง และล้างเซลล์ด้วย 0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ จากนั้นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อีกครั้ง ดัดแปลงตามวิธีของ Mo และ Rinkvich (2001) [18] จากนั้นสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด DNeasy Plant Mini kit (บริษัท QIAGEN) ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยเจลอเล็กโทรโฟรีซิสแบบอะกาโรส ในบัฟเฟอร์ที่อีเอ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่กำลังไฟ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30-40 นาที ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.025 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับแลบดีเอ็นเอมาตรฐาน

2.6.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา

ลูกโซ่พอลิเมอเรสและการอ่านลำดับเบส

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน 18S ของอาร์เอ็นเอของไรโบโซม โดยใช้ไพรเมอร์ NS1 (GTAGTCATATGCTTGTCTC) / NS4 (CTTCCGTCATTCCTTTAAG) และ Thr404f (CTGAGAGACGGCTACCACATCCAAGG) / Thr1017r (GACTACGATGGTACTAATCATCTTCG) [19] โดยใช้ชุดเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ แท็คดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (Taq DNA polymerase, Thermo Scientific) โดยส่วนผสมและปริมาตรของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยน้ำนาโนเพียว 38 ไมโครลิตร, 50 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ 2.5 ไมโครลิตร, บัฟเฟอร์พีซีอาร์ความเข้มข้น 10 เท่า 2.5 ไมโครลิตร, 10 มิลลิโมลาร์ดีเอ็นทีพี (dNTPs) 1.0 ไมโครลิตร, 10 ไมโครโมล ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ 1.0 ไมโครลิตร, 10 ไมโครโมล รีเวิร์ดไพรเมอร์ 1.0 ไมโครลิตร, 2 หน่วยต่อไมโครลิตร แท็คดีเอ็นเอพอลิเมอเรส 0.5 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอแม่แบบ น้ำหนัก 100-500 นาโนกรัม ปริมาตร 1.0 ไมโครลิตร เมื่อเตรียมส่วนต่าง ๆ แล้วนำเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิหรือ T100TM thermal cycler (BIO-RAD laboratories, Inc.) โดยปฏิกิริยาในแต่ละขั้นของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (ตารางที่ 1)

จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โดยเจลอเล็กโทรโฟรีซิสแบบอะกาโรสในบัฟเฟอร์ที่อีเอ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่กำลังไฟ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30-40 นาที ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ที่ความเข้มข้น 0.025 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทำให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริสุทธิ์ด้วยชุดปฏิบัติการสำเร็จรูป (QIAquick PCR Purification Kits) ก่อนส่งอ่านลำดับเบสโดยบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี

2.6.3 การจัดเรียงลำดับเบสของดีเอ็นเอ (sequence alignment) และการวิเคราะห์สาย

สัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยวิธี maximum parsimony และ Bayesian inference

ตรวจสอบคุณภาพลำดับเบสของดีเอ็นเอ แต่ละเส้นด้วยโปรแกรม BioEdit 7.2.5 [20] จากนั้น นำลำดับเบสแต่ละเส้นไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLASTN เพื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล ของ GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) คัดเลือกลำดับเบสที่ให้ค่าความเหมือนกับลำดับเบส ของเชื้อตัวอย่าง นำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Muscle 3.8 [21] สร้างแผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ด้วยวิธี maximum parsimony (MP) โปรแกรม PAUP* 4.0b10 [22] โดยกำหนดค่าบูทสแตรปเท่ากับ 1,000 และกำหนดค่า Kishino-Hasegawa (KH) tests [23] และหาเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเพื่อเป็นค่าความเชื่อมั่น ที่ใช้ในการอ่านผลและการจัดจำแนกทรอสโทโคทริคส์ การวิเคราะห์แผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่สร้าง ด้วยวิธี MP กำหนดให้คำนวณค่าทางสถิติต่าง ๆ ประกอบด้วย tree length consistency index (CI), retention index (RI), relative consistency index (RC) และ homoplasy index (HI) และค่าความ เชื่อมั่นบูทสแตรป ตามลำดับ และเลือก MPTs (most parsimonious trees) ที่แสดงโทโพโลยี (topology) ที่ดีที่สุดด้วยวิธีทางสถิติ K-H tests โดยพิจารณาที่ค่า บูทสแตรปซึ่งมากกว่าหรือเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นวิเคราะห์แผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ร่วมกับวิธี Bayesian inference (BI) วิเคราะห์ด้วย โปรแกรม MrModeltest 2.2 [24] วิธี Markov chain Monte Carlo (MCMC) โมเดล (GTR+I+G) พิจารณา ค่าบูทสแตรปที่มากกว่าหรือเท่ากับ 0.95 นอกจากนี้ยัง พิจารณาเปอร์เซ็นต์ความเหมือน เพื่อเพิ่มความ น่าเชื่อถือในการวิเคราะห์ หลังจากนั้นข้อมูลลำดับเบส ของตัวอย่างที่ได้จากศึกษาครั้งนี้จะฝากไว้ในฐานข้อมูล ของ GenBank รวมทั้งได้ฝากเก็บข้อมูลการวิเคราะห์

สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในฐานข้อมูล TreeBASE (<https://treebase.org/treebase-web/home.html>) เพื่อเพิ่มฐานข้อมูลและเป็นประโยชน์ต่อศึกษาอื่น ๆ ในอนาคต

ตารางที่ 1 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย ปฏิบัติการลูกโซ่พอลิเมอเรส ดัดแปลงตาม วิธีของ Harel และคณะ [13]

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (เวลา)	จำนวน รอบ
1. ขั้นตอนเริ่มต้น	95 องศาเซลเซียส (4 นาที)	1 รอบ
2. การแยกสายดีเอ็นเอ แม่แบบ	94 องศาเซลเซียส (30 วินาที)	35 รอบ
3. การจับกันระหว่างสาย โพรเมอร์และสายดีเอ็นเอ แม่แบบ	50 องศาเซลเซียส (40 วินาที)	
4. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ สายใหม่	72 องศาเซลเซียส (1.30 นาที)	
5. ขั้นตอนสุดท้าย	72 องศาเซลเซียส (20 นาที)	1 รอบ

3. ผลการวิจัยและอภิปรายผล

3.1 การแยกและคัดเลือกทรอสโทโคทริคส์

การคัดแยกทรอสโทโคทริคส์จากหญ้าทะเล สาหร่าย และน้ำทะเล ได้เชื้อทั้งหมด 40 ไอโซเลท (17 ไอโซเลท จากหญ้าทะเล 13 ไอโซเลท จากสาหร่าย ทะเล และ 10 ไอโซเลท จากน้ำทะเล) จัดกลุ่มตาม ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด 3 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 โคโลนิบนอาหารแข็งมีสีขาวขุ่น ทึบ แสง โคโลนิแบนเรียบ ขอบไม่เรียบ พบอะมิบอยด์เซลล์ บริเวณขอบโคโลนิ และเซลล์ในอาหารเหลวเป็นเซลล์ เดี่ยว ๆ ค่อนข้างกลม พบอะมิบอยด์เซลล์ ขนาดเซลล์ ประมาณ 5-25 ไมโครเมตร กลุ่มที่ 2 โคโลนิบนอาหาร

สีขาวขุ่น ทึบแสง โคลิโคนันธุน ในอาหารเหลวเซลล์กลม ส่วนใหญ่เกาะเป็นกลุ่ม มีเซลล์เดี่ยว ๆ กระจายเล็กน้อย พบอะมิบอยด์เซลล์ ขนาดเซลล์ประมาณ 5-50 ไมโครเมตร และกลุ่มที่ 3 โคลิโคนันธุนในอาหารสีขาวขุ่นค่อนข้างกลมทึบ ทึบแสง ขอบไม่เรียบ เซลล์ในอาหารเหลวเกาะเป็นกลุ่มขนาดใหญ่ พบอะมิบอยด์เซลล์ เซลล์มีขนาดประมาณ 5-10 ไมโครเมตร โดยในการศึกษานี้ใช้เพียงข้อมูลของลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นในการจัดจำแนกเท่านั้น จึงไม่สามารถระบุได้ในระดับสกุล จากนั้นนำตัวแทนของเชื้อในแต่ละกลุ่มจำนวน 3 ไอโซเลท ไปศึกษาสภาวะของสารอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตมวลเซลล์ โดยวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง และการผลิตกรดไขมันโอเมก้า-3 โดยแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี

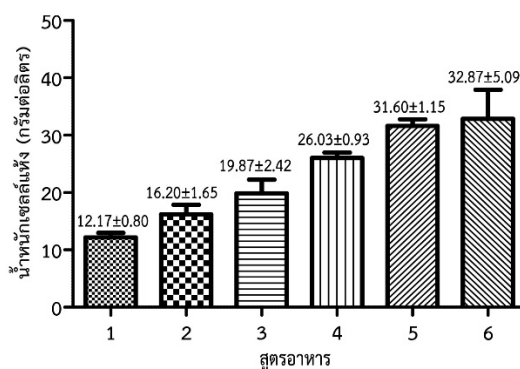
3.2 ผลของอาหารต่อการผลิตมวลเซลล์

ผลการศึกษาการเจริญของทรอสโทโคทริคส์โดยวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง (รูปที่ 1) พบว่าเชื้อไอโซเลท TC9-TSU (มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาในกลุ่มที่ 3) เจริญได้ดีที่สุด โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยสูงสุดในอาหารสูตรที่ 6 (6 เปอร์เซ็นต์ GYPT) มีค่า 32.87 ± 5.09 กรัมต่อลิตร ซึ่งพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์กับอาหารชนิดอื่น ($P < 0.05$) และเจริญได้ดีรองลงมาในอาหารสูตรที่ 5 (6 เปอร์เซ็นต์ GYP) มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักเซลล์แห้ง 31.60 ± 1.15 กรัมต่อลิตร และอาหารสูตรที่ 4 (6 เปอร์เซ็นต์ GY) 26.03 ± 0.93 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

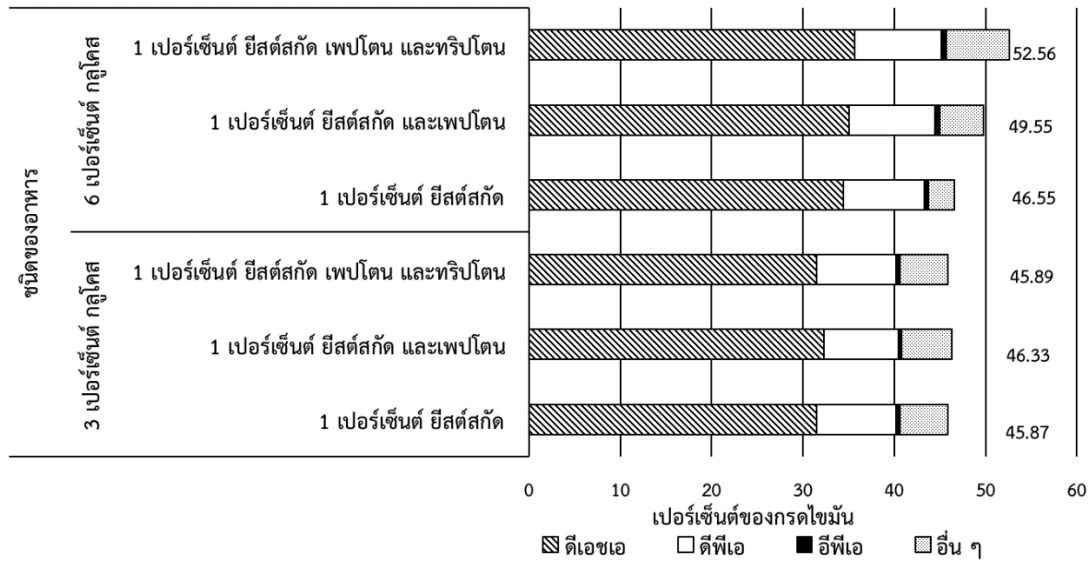
3.3 ผลการวิเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน

ผลการวิเคราะห์สัดส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (โอเมก้า-3) (รูปที่ 2) ด้วยแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี พบว่ากรดไขมันดีเอชเอ ดีพีเอ และอีพีเอ เป็นกรดไขมันหลัก โดยมีสัดส่วนของ

ดีเอชเอสูงที่สุดในอาหาร 6 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด เพปโตน และทริปโตน 35.66 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ดีพีเอ 9.47 เปอร์เซ็นต์ และอีพีเอ 0.59 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบสัดส่วนกรดไขมันในอาหารแต่ละชนิดพบว่าเชื้อเจริญได้ดีและมีสัดส่วนของกรดไขมันโอเมก้า-3 ในอาหารที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 6 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าอาหารที่มีกลูโคส 3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) แต่สัดส่วนของกรดไขมันโอเมก้า-3 ภายในกลุ่มของอาหารที่มีกลูโคส 6 เปอร์เซ็นต์ และกลูโคส 3 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$)



รูปที่ 1 ผลของอาหารต่อการเจริญ (น้ำหนักเซลล์แห้ง) ของทรอสโทโคทริคส์ ไอโซเลท TC9-TSU ในอาหารสูตร 1 : 3 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด, สูตร 2 : 3 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด และเพปโตน, สูตร 3 : 3 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด เพปโตน และทริปโตน, สูตร 4 : 6 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด, สูตร 5 : 6 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด และเพปโตน และ สูตร 6 : 6 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด เพปโตน และทริปโตน



รูปที่ 2 ผลของอาหารต่อสัดส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (โอเมก้า-3) ของทรอสโทโคทริดส์ ไอโซเลท TC9-TSU ในอาหารสูตร 1 : 3 เเปอร์เซ็นต์ กลูโคส 1 เเปอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด, สูตร 2 : 3 เเปอร์เซ็นต์ กลูโคส 1 เเปอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด และเพปโติน, สูตร 3 : 3 เเปอร์เซ็นต์ กลูโคส 1 เเปอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด เพปโติน และทริบโดิน, สูตร 4 : 6 เเปอร์เซ็นต์ กลูโคส 1 เเปอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด, สูตร 5 : 6 เเปอร์เซ็นต์ กลูโคส 1 เเปอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด และเพปโติน และ สูตร 6 : 6 เเปอร์เซ็นต์ กลูโคส 1 เเปอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด เพปโติน และทริบโดิน

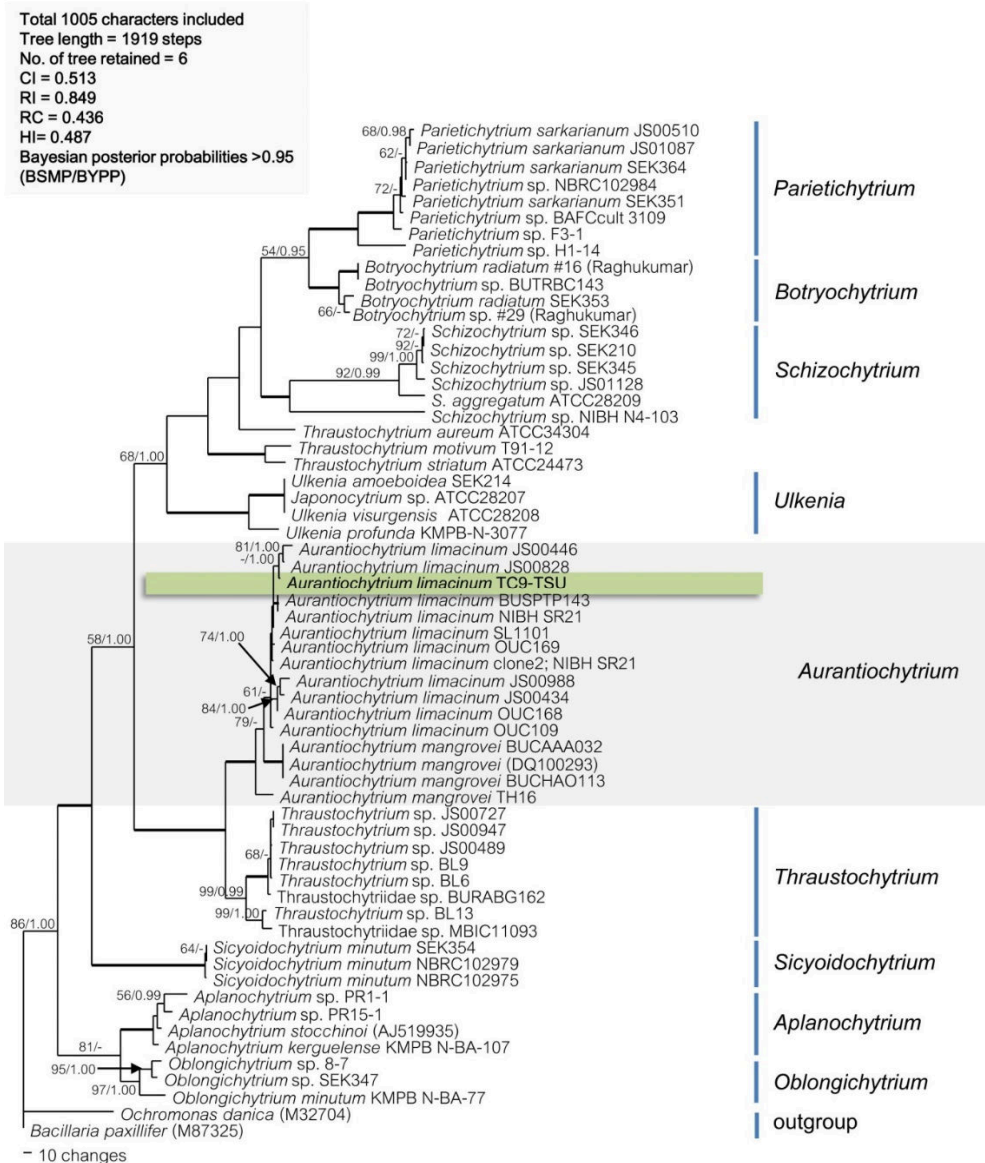
3.4 การจัดจำแนกทรอสโทโคทริดส์โดยวิธีทางชีวโมเลกุล

ผลการศึกษาผลของอาหารต่อการผลิตมวลเซลล์และกรดไขมันโอเมก้า-3 ผู้วิจัยได้นำทรอสโทโคทริดส์ที่มีศักยภาพในการผลิตกรดไขมันโอเมก้า-3 มาจัดจำแนกชนิด โดยศึกษาสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล ผลการศึกษาพบว่าทรอสโทโคทริดส์ 1 สายพันธุ์ คือ TC9-TSU อยู่ในอาณาจักร Chromista หมวด Labyrinthulomycota ชั้น Labyrinthulomycetes อันดับ Thraustochytriales วงศ์ Thraustochytriaceae และจากการวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการส่วนของดีเอ็นเอบริเวณยีน 18S ของอาร์เอ็นเอของไรโบโซม ทรอสโทโคทริดส์ที่แยกได้จากการศึกษานี้ร่วมกับจุลินทรีย์กลุ่มทรอสโทโคทริดส์ทั้งหมด 61 ลำดับชั้น ซึ่งสามารถจำแนกได้เป็น 9 สกุล

ดังนี้ *Parietichytrium*, *Botryochytrium*, *Schizochytrium*, *Ulkenia*, *Aurantiochytrium*, *Thraustochytrium*, *Sicyoidochytrium*, *Aplanochytrium* และ *Oblongichytrium* และมี 2 ลำดับชั้น คือ *Ochromonas danica* (M32704) และ *Bacillaria paxillifer* (M87325) เป็นกลุ่มของเชื้อที่คาดว่ามีการวิวัฒนาการมาก่อน โดยจากศึกษาสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการสามารถจำแนกข้อมูลออกเป็น 9 เคลด (clade) มีลักษณะรวมทั้งหมด 1,005 ลักษณะ ประกอบด้วยลักษณะที่มีความเหมือนกัน 426 ลักษณะ parsimony-informative 488 ลักษณะ parsimony-uninformative 91 ลักษณะ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี maximum parsimony ได้แผนภูมิวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตที่แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของสิ่งมีชีวิตน้อยที่สุด (parsimonious trees, MPTs)

ทั้งหมด 6 รูปแบบ ซึ่งมีค่า tree length, CI, RI, RC และ HI เท่ากับ 1,919 steps, 0.513, 0.849, 0.436 และ 0.487 ตามลำดับ โดยแสดงแผนภูมิสายสัมพันธ์

เชิงวิวัฒนาการที่ดีที่สุดจากการวิเคราะห์ด้วย K-H test (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 แผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ได้จากการวิเคราะห์ดีเอ็นเอบริเวณยีน 18S อาร์เอ็นเอของโรโบโซมใน TC9-TSU โดยหลักการ maximum parsimony (MP) มีค่าความเชื่อมั่น bootstrap (BSMP) ซึ่งมากกว่าหรือเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ (ซ้าย) และค่าความน่าเชื่อถือของข้อมูลด้วยทฤษฎีของเบย์ (Bayesian posterior probabilities, BYPP) ที่มากกว่าหรือเท่ากับ 0.95 (ขวา) (เส้นทึบ คือ ค่า BSMP = 100 เปอร์เซ็นต์ / BYPP = 1.00)

จากแผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ TC9-TSU พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสมาชิกในสกุล *Aurantiochytrium* โดยมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Aurantiochytrium limacinum* (BCC51316, BCC60447) ที่ความเชื่อมั่นบัพทศาสตร์ของ MP ต่ำกว่าร้อยละ 50 แต่ค่าความน่าเชื่อถือของข้อมูลด้วยทฤษฎีของเบย์ (Bayesian posterior probabilities, BYPP) มากถึง 1.00 และจากการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่าง TC9-TSU และ *Aurantiochytrium limacinum* (BCC51316, BCC60447) ซึ่งเป็นลำดับขั้นที่อยู่ใกล้เคียงกันในชั้นย่อยของ *Aurantiochytrium* พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 98.2-98.5 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงจำแนก TC9-TSU เป็น *Aurantiochytrium limacinum* โดยมีรหัสนิวคลีโอไทด์ (GenBank accession number: MG279107) และรหัสแผนภาพสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (TreeBase submission ID: 21759)

จากผลการแยกเชื้อในการศึกษานี้สามารถแยกเชื้อทรอสโทโคทริดส์ได้ทั้งหมด 40 ไอโซเลท ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้าที่สามารถแยกเชื้อได้จำนวนมาก [25,26] ซึ่งจำนวนไอโซเลทที่ได้ อาจมาจากหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ สถานที่เก็บตัวอย่าง อุณหภูมิ และชนิดของตัวอย่าง โดยปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อการเจริญของทรอสโทโคทริดส์ มีรายงานการศึกษาสถานะต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญของทรอสโทโคทริดส์ พบว่าทรอสโทโคทริดส์เจริญได้ดีในบริเวณที่สารอินทรีย์สูง โดยเฉพาะบริเวณชายฝั่ง อาจเนื่องจากบริเวณนี้มีซากพืชและซากสัตว์ในปริมาณสูง มีสารพวกคาร์โบไฮเดรต น้ำตาล และสารอินทรีย์ไนโตรเจน จึงส่งผลต่อการเจริญของทรอสโทโคทริดส์ โดยเชื้อทำหน้าที่ในการย่อยสลายสารอินทรีย์เหล่านี้ นอกจากนี้เชื้อเจริญได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 25-27 องศาเซลเซียส และมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ประมาณ 5-9

[27,28] จากผลการศึกษานี้สามารถจัดจำแนกทรอสโทโคทริดส์ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ทั้งหมด 3 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มมีลักษณะของโคโลนีและเซลล์แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้ใช้เพียงลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นในการจัดจำแนก จึงไม่อาจระบุหรือจำแนกเชื้อในระดับสกุลได้ เนื่องจากพบว่ามีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อในหลายสกุลของทรอสโทโคทริดส์ เช่น *Thraustochytrium Ulkenia* และ *Schizochytrium* มีลักษณะคล้ายคลึงกัน ได้แก่ สีของโคโลนี ขอบของโคโลนี และการพบอะมีบอยด์เซลล์ เป็นต้น ดังนั้นหากต้องการจัดจำแนกควรใช้การศึกษาวงจรชีวิต และสารพันธุกรรมของเชื้อในการจัดจำแนกร่วมด้วย [17] ในการศึกษาครั้งนี้คัดเลือกเชื้อที่มีศักยภาพในการผลิตมวลเซลล์และกรดไขมันได้สูงสุดมาจัดจำแนกโดยศึกษาลำดับเบสบริเวณยีน 18S อาร์เอ็นเอของไรโบโซม วิเคราะห์โดยวิธี maximum parsimony ร่วมกับ Bayesian inference ซึ่งเมื่อพิจารณาร่วมกับข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ พบว่าสามารถจัดจำแนกเชื้อไอโซเลท TC9-TSU ได้เป็น *A. limacinum* โดยทรอสโทโคทริดส์ *A. limacinum* ที่พบในการศึกษานี้โดยดูกรายงานมาก่อนหน้านี้ และมีศักยภาพในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวโอเมก้า-3 ได้ดี [29-33]

ทรอสโทโคทริดส์ใช้แหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญ โดยเมื่อทรอสโทโคทริดส์ใช้กลูโคส ในช่วงแรกกลูโคสเข้าไปในเซลล์และถูกเก็บสะสมเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน ในภายหลังเข้าสู่กระบวนการสลายและสร้างสารอินทรีย์ต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญ นอกจากนี้ทรอสโทโคทริดส์ยังต้องการแหล่งไนโตรเจน โดยแหล่งไนโตรเจนนั้นเป็นแหล่งอาหารที่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์สารอาหารต่าง ๆ ทั้งกรดอะมิโน กรดนิวคลีอิก และโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ การหาสถานะที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนและแหล่ง

ไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยงทอราสโทโคทริคัส จึงจำเป็นสำหรับการเจริญของเซลล์และการผลิตสารของทอราสโทโคทริคัสโดยตรง [34,35] โดยทั่วไปแล้วแหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้ คือ กลูโคส และแหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ในการเลี้ยงเชื้อทอราสโทโคทริคัส คือ ยีสต์สกัดเพปโตน และทริปโตน [36] ในการศึกษาที่ประเมินผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตมวลเซลล์และการผลิตกรดไขมันโอเมก้า-3 ของทอราสโทโคทริคัส ไอโซเลท TC9-TSU *A. limacinum*

เมื่อพิจารณาผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมันโอเมก้า-3 ของ *A. limacinum* โดยใช้ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน (กลูโคส) ที่ระดับความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และ 6 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนเท่ากันในอาหารทุกสูตร คือ 1 เปอร์เซ็นต์ แต่เลือกใช้แหล่งของไนโตรเจน 1 ชนิด (ยีสต์สกัด) 2 ชนิด (ยีสต์สกัดและเพปโตน) และ 3 ชนิด (ยีสต์สกัด เพปโตน และทริปโตน) โดยแหล่งไนโตรเจนทั้ง 3 ชนิด มีองค์ประกอบแตกต่างกัน โดยยีสต์สกัดได้จากเซลล์ยีสต์ อุดมไปด้วยโปรตีน วิตามิน และแร่ธาตุหลายชนิด โดยส่วนใหญ่เป็นโปรตีน และกรดอะมิโนมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่เพปโตนเป็นโปรตีนจากสัตว์ ประกอบด้วยเพปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโน ส่วนทริปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากเคซีน ซึ่งเป็นโปรตีนในน้ำนมจากสัตว์ มีกรดอะมิโนหลายชนิดและคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ มีรายงานก่อนหน้านี้นี้ของ Chene และคณะ [37] ที่ศึกษาแหล่งของไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ต่อการเจริญและการผลิตสารสควอลีน (squalene) ของ *Aurantiochytrium* sp. พบว่าหากใช้เพปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน ในการเลี้ยงเชื้อ เซลล์จะเจริญได้ดีโดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูง แต่ปริมาณสารที่ได้ต่ำ หากใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่ง

ไนโตรเจน พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารสควอลีนได้สูง แต่ปริมาณมวลเซลล์ต่ำ และเมื่อใช้ทริปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารและมวลเซลล์ได้สูง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาองค์ประกอบของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างกัน เพื่อหาองค์ประกอบของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตมวลเซลล์และกรดไขมันโอเมก้า-3 นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาแหล่งของไนโตรเจนในทอราสโทโคทริคัสสายพันธุ์อื่น พบว่าหากใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนในการเลี้ยง *S. limacinum* SR21 เซลล์เจริญได้ดี แต่หากต้องการให้ผลิตกรดไขมันดีเอชเอได้ในปริมาณสูง ควรเสริมด้วยคอร์น สตีพ ลิกัวร์ (corn steep liquor) หรือน้ำหมักข้าวโพด ขณะที่ *Shizochytrium* sp. S31 สามารถผลิตมวลเซลล์และดีเอชเอได้สูงในอาหารที่มีเพียงยีสต์สกัด [38]

จากการศึกษาสภาวะของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *A. limacinum* ไอโซเลท TC9-TSU เมื่อพิจารณาน้ำหนักเซลล์และกรดไขมันโอเมก้า-3 ของเชื้อที่เลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคส ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และแหล่งไนโตรเจนทั้ง 3 ชุดการทดลอง เปรียบเทียบกับอาหารที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 6 เปอร์เซ็นต์ ที่มีแหล่งไนโตรเจนทั้ง 3 ชุดการทดลอง เช่นเดียวกัน พบว่าเชื้อเจริญในชุดอาหาร 3 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 12.17-19.87 กรัมต่อลิตร และมีสัดส่วนของกรดไขมันเท่ากับ 45.87-45.89 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ชุดการทดลองที่มีกลูโคส 6 เปอร์เซ็นต์ พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งและกรดไขมันโอเมก้า-3 สูงขึ้น 26.03-32.87 กรัมต่อลิตร และ 46.55-52.56 เปอร์เซ็นต์ และหากพิจารณาน้ำหนักเซลล์แห้งและกรดไขมันโอเมก้า-3 โดยเปรียบเทียบองค์ประกอบของแหล่งไนโตรเจนภายในชุดการทดลองที่มีกลูโคส 6 เปอร์เซ็นต์ พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งและกรดไขมันโอเมก้า-3 สูงสุดในอาหารที่แหล่งไนโตรเจน

3 ชนิด เป็นองค์ประกอบเท่ากับ 32.87 กรัมต่อลิตร และ 52.56 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งผลการศึกษาสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ เนื่องจากความเข้มข้นและชนิดของแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดมีผลต่อการผลิตมวลเซลล์และการผลิตกรดไขมันโอเมก้า-3 อย่างไรก็ตาม มีรายงานการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน พบว่าสัดส่วนและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนสูง มีผลให้เชื้อเจริญได้ดี และได้มวลเซลล์น้อย นอกจากนี้ยังอาจยับยั้งการเจริญของเซลล์ Corsinovi และคณะ [6] มีรายงานเกี่ยวกับสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน โดย Nakazawa และคณะ [39] ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Aurantiochytrium* sp. 4W-1b โดยใช้ความเข้มข้นของกลูโคส 3 เปอร์เซ็นต์ 6 เปอร์เซ็นต์ 9 เปอร์เซ็นต์ และ 12 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเซลล์เจริญได้ดีที่สุดและมีมวลเซลล์สูงสุดในอาหารที่มีกลูโคส 6 เปอร์เซ็นต์ และสามารถผลิตกรดไขมันรวมได้สูงถึง 83.73 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Wong และคณะ [31] ศึกษาการผลิตดีเอชเอของ *A. mangrovei* MP2 ภายใต้ความเข้มข้นของกลูโคสสูงในช่วง 6-10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าหากใช้ความเข้มข้นของกลูโคสในช่วงดังกล่าวสามารถผลิตดีเอชเอได้เพิ่มขึ้น 19 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้มีการศึกษาการเจริญและการผลิตดีเอชเอของ *A. mangrovei* KF6 พบว่าเมื่อใช้กลูโคส 6 เปอร์เซ็นต์ และยีสต์สกัด 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตมวลเซลล์ได้ 15.2 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณดีเอชเอ 20.3 เปอร์เซ็นต์ [40] Chen และคณะ [37] ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญของ *Aurantiochytrium* sp. โดยวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์ พบว่าหากใช้แหล่งของไนโตรเจนรวม ซึ่งประกอบด้วยโมโนโซเดียมกลูตาเมต ยีสต์สกัด และ

เพปโตน เซลล์เจริญได้ดีและมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 14.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษานี้ พบว่าหากใช้แหล่งไนโตรเจนรวม (ยีสต์สกัด เพปโตน และทริปโตน) ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้มวลเซลล์สูงถึง 32.87 ± 5.09 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตาม สัดส่วนและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนขึ้นกับสายพันธุ์ของทรอสโทโคทริดส์ [25,29-30,32,42-44] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเปรียบเทียบการผลิตมวลเซลล์และกรดไขมันไม่อิ่มตัวของทรอสโทโคทริดส์ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Aurantiochytrium* sp. *Schizochytrium* sp. *Ulkenia* sp. และ *Thraustochytrium* sp. โดย Chang และคณะ [42] รายงานว่า *Aurantiochytrium* sp. ในอาหารที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 4 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการเจริญสูงกว่าไอโซเลทอื่น ๆ โดยมีมวลเซลล์ 11.67 กรัมต่อลิตร และหากเปรียบเทียบปริมาณกรดไขมันโอเมก้า-3 ของทรอสโทโคทริดส์กับแหล่งผลิตกรดไขมันทางการค้า เช่น ปลาซาดีน พบว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนรวมจากปลา 47 เปอร์เซ็นต์ [45] ซึ่งปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนรวมจากทรอสโทโคทริดส์ในการศึกษานี้มีค่าสูงกว่า (52.56 เปอร์เซ็นต์) โดยเฉพาะดีเอชเอ ซึ่งพบในปลาซาดีนเพียง 25 เปอร์เซ็นต์ แต่ในการศึกษานี้พบดีเอชเอสูงถึง 35.66 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงทรอสโทโคทริดส์จึงเป็นแหล่งทางเลือกเพื่อทดแทนการผลิตกรดไขมันจากปลา ซึ่งมีหลายปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต เช่น ฤดูกาล สายพันธุ์ เพศ ขนาด แหล่งที่อยู่อาศัย และสารอาหาร [7] โดยการเพาะเลี้ยงทรอสโทโคทริดส์ในห้องปฏิบัติการ สามารถควบคุมสภาวะต่าง ๆ ได้ จึงอาจลดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อน ระยะเวลาการผลิตกรดไขมัน และมีค่าใช้จ่ายต่ำกว่า

4. สรุป

จากการศึกษา ผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่ง

ไนโตรเจนต่อการผลิตมวลเซลล์และกรดไขมันโอเมก้า-3 ของทროสโทโคทริดส์ แสดงให้เห็นว่าการผลิตกรดไขมันโอเมก้า-3 ขึ้นกับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและชนิดของแหล่งไนโตรเจน โดยในการศึกษานี้พบว่าชุดของอาหารที่มีกลูโคสความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์จะสามารถผลิตมวลเซลล์และกรดไขมันได้ดีกว่าอาหารที่มีกลูโคส 3 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อพิจารณาชุดของแหล่งไนโตรเจนในอาหารต่อการผลิตมวลเซลล์และการผลิตกรดไขมันโอเมก้า-3 พบว่าอาหารที่เติมแหล่งไนโตรเจนรวม 1 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3 ชนิดร่วมกัน ได้แก่ ยีสต์สกัด เพปโตน และทริปโตน เซลล์เจริญได้ดี โดยมีน้ำหนักแห้งเฉลี่ยสูง 26.03 ± 0.93 ถึง 32.87 ± 5.09 กรัมต่อลิตร และมีสัดส่วนของกรดไขมันโอเมก้า-3 สูงที่สุด คือ 46.55-52.56 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งกรดไขมันดีเอชเอ ดีพีเอ และอีพีเอเป็นกรดไขมันหลักที่พบ โดยผลที่ได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอาหารที่มีกลูโคส 3 เปอร์เซ็นต์ และแหล่งไนโตรเจนในชุดการทดลองอื่น ๆ ($P < 0.05$) จากผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าทროสโทโคทริดส์มีศักยภาพในการผลิตกรดไขมันโอเมก้า-3 ที่น่าสนใจ โดยเฉพาะกรดไขมัน ดีเอชเอจากทროสโทโคทริดส์ ซึ่งอาจใช้เป็นแหล่งทางเลือกเพื่อทดแทนและลดปัญหาการใช้กรดไขมันโอเมก้า-3 จากปลาในอนาคต

5. ข้อเสนอแนะ

5.1 การศึกษานี้เก็บตัวอย่างเพียง 2 ครั้ง ในเดือนพฤษภาคม-กรกฎาคม ควรเพิ่มจำนวนหรือความถี่ของการเก็บตัวอย่างเพื่อเพิ่มโอกาสการเจอเชื้อที่มีศักยภาพในการผลิตกรดไขมันโอเมก้า-3 และมีประโยชน์ในการนำไปใช้ในอนาคต

5.2 เนื่องจากการศึกษานี้ศึกษาแหล่งของคาร์บอน คือ กลูโคส และแหล่งไนโตรเจน คือ ยีสต์สกัด เพปโตน และทริปโตน ดังนั้นควรศึกษาแหล่ง

คาร์บอนและไนโตรเจนชนิดอื่น รวมถึงสภาวะอื่น ๆ ที่ใช้ในการเลี้ยงทროสโทโคทริดส์ ซึ่งอาจช่วยเพิ่มฐานข้อมูลเกี่ยวกับสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของทროสโทโคทริดส์

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากโครงการวิจัยทุนรายได้มหาวิทยาลัยทักษิณ กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยทักษิณ ประเภททุนยุทธศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2560 และขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) ที่อำนวยความสะดวกระยะเวลาการวิจัย

7. รายการอ้างอิง

- [1] Sijtsma, L. and Swaaf, D.M., 2004, Biotechnological production and applications of the omega-3 polyunsaturated fatty acid, docosahexaenoic acid, Appl. Microbiol. Biotechnol. 64: 146-153.
- [2] Jain, R., Raghukumar, S., Tharanathan, R. and Bhosle, N.B., 2005, Extracellular polysaccharide production by thraustochytrid protists, Mar. Biotechnol. 7: 184-192.
- [3] Simopoulos, A.P., Kifer, R.R., Martin, R.E. and Barlaw, S.M., 1991, Health effects of omega 3 polyunsaturated fatty acids in seafoods, World Rev. Nutr. Diet. 66: 1-592.
- [4] Shwu-Tzy, W., Shih-Tsung, Y. and Liang-Ping, L., 2005, Effect of culture conditions on docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. S31, Proc. Biochem. 40:

- 3103-3108.
- [5] Nauroth, J.M., Liu, Y.C. and Elswyk. M.V., 2010, Docosahexaenoic acid (DHA) and docosapentaenoic acid (DPA n-6) algal oils reduce inflammatory mediators in human peripheral mononuclear cells *in vitro* and paw edema *in vivo*, *Lipids* 45: 375-384.
- [6] Corsinovi, L., Bias, i F., Poli, G., Leonarduzzi, G. and Isaia, G., 2011, Dietary lipids and their oxidized products in Alzheimer's disease, *Mol. Nutr. Food Res.* 55: 161-172.
- [7] Raghukumar, S., 2008, Thraustochytrid marine protists: Production of PUFAs and other emerging technologies, *Mar. Biotechnol.* 10: 631-640.
- [8] Raghukumar, S. and Damare, V.S., 2011, Increasing evidence for the important role of Labyrinthulomycetes in marine ecosystems, *Bot. Mar.* 54: 3-11.
- [9] Lewis, T.E., Nichols, P.D. and McMeekin, T.A., 1999, The biotechnological potential of thraustochytrids, *Mar. Biotechnol.* 1: 580-587.
- [10] Leano, M.D.V., Jones, G.B.G. and Pang, K.L., 2012, Labyrinthulomycota, pp. 215-244, In *Marine Fungi and Fungal-like Organisms*, 1st Ed., Walter de Gruyter GmbH, Germany.
- [11] Shene, C., Leyton, A., Esparza, Y., Flores, L., Quilodrán, B. and Hinzpeter, I., 2010, Microbial oils and fatty acids: Effect of carbon source on docosahexaenoic acid (c22:6 n-3, DHA) production by thraustochytrid strains, *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 10: 207-216.
- [12] Chamberlian, A.H.L. and Moss, S.T., 1998, The thraustochytrids: A protest group with mixed affinities, *Biosystems* 21: 341-349.
- [13] Alderman, D.J., Harrison, J.L., Bremer, G.B. and Jone, E.B.G., 1974, Taxonomic revisions in the marine biflagellate fungi: The ultrastructural evidence, *Mar. Biol.* 25: 345-357.
- [14] Porter, D., 1989. *Handbook of Protoctista: Phylum Labyrinthulomycota Net Slime Mold*, Boston.
- [15] Honda, D., Yokochi, T., Nakahara, T., Erata, M. and Higashihara, T., 1998, *Schizochytrium limacinum* sp. Nov., a new thraustochytrids from mangrove area in the west Pacific Ocean, *Mycol. Res.* 102: 439-448.
- [16] Leander, C.A., Porter, D. and Leander, B.S., 2004, Comparative morphology and molecular phylogeny of aplanochytrids (Labyrinthulomycota), *Eur. J. Protistol.* 40: 317-328.
- [17] Yokoyama, R. and Honda, D., 2007. Taxonomic rearrangement of the genus *Schizochytrium sensu lato* 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.

- [18] Mo, C. and Rinkevich, B., 2001, A simple, reliable, and fast protocol for thraustochytrid DNA extraction, *Mar. Biotechnol.* 3: 100-102.
- [19] Harel, M., Ben-Dov, E., Rasoulouniriana, D., Siboni, N., Kramarsky-Winter, E., Loya, Y., Barak, Z., Wiesman, Z. and Kushmaro, A., 2008, A new thraustochytrid, strain Fng1, isolated from the surface mucus of the hermatypic coral *Fungia granulosa*, *FEMS Microbiol. Ecol.* 64: 378-387.
- [20] Hall, T., 2005, BioEdit: Biological Sequence Alignment Editor for Windows 95/98/NT/XP, Available Source: <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page1.html>.
- [21] Edgar, R.C., 2004, MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucl. Acids Res.* 32: 1792-1797.
- [22] Swofford, D.L., 2002. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other Methods), Version 4. Sunderland, Sinauer Associates, Massachusetts.
- [23] Kishino, H. and Hasegawa, M., 1989, Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in hominoidea, *J. Mol. Evol.* 29: 170-179.
- [24] Nylander, J.A.A., 2004, MrModeltest v. 2.0. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University: Program Distributed by the Author.
- [25] Perveen, Z., Ando, H., Ueno, A., Ito, Y., Yamamoto, Y., Yamada, Y., Takagi, T., Kaneko, T., Kogame, K. and Okuyama, H., 2006, Isolation and characterization of a novel thraustochytrid-like microorganisms that efficiently produces docosahexaenoic acid, *Biotechnol. Lett.* 28: 197-202.
- [26] Yang, H.L., Lu, C.K., Chen, S.F., Chen, Y.M. and Chen, Y.M., 2010, Isolation and characterisation of Taiwanese heterotrophic microalgae: screening of strains for docosahexaenoic acid (DHA) production, *Mar. Biotechnol.* 12: 173-185.
- [27] Bahnweg, G., 1997, Studies on the physiology of thraustochytriales I: Growth requirements and nitrogen nutrition of *Thraustochytrium* spp., *Schizochytrium* sp., *Japoochytrium* sp., *Ulkenia* spp., and *Labyrinthuloides* spp., *Veroff. Inst. Meeresforsch. Bremerhaven* 17: 245-268.
- [28] Jones, E.B.G. and Harrison, J.L., 1976, Physiology of marine phycomycetes, *Adv. Aqu. Mycol.* 3: 261-278.
- [29] 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, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 1161-1169.
- [30] Ganuza, E. and Izquierdo, M., 2007, Lipid accumulation in *Schizochytrium* G13/2S production in continuous culture, *Appl.*

- Microbiol. Biotechnol. 76: 985-990.
- [31] Wong, M.K.M., Tsui, C.K.M., Au, D.W.T. and Wrijmoed, L.L.P., 2008, Docosahe-xaenoic acid production and ultrastructure of the thraustochytrid *Aurantiochytrium mangrovei* MP2 under high glucose concentration, Mycoscience. 49: 266-270.
- [32] Ren, L.J., Huang, H., Xiao, A.H., Lian, M., Jin, L.J. and Ji, X.J. 2009, Enhanced docosahexaenoic acid production by reinforcing acetyl-CoA and NADPH supply in *Schizochytrium* sp. HX-308, Bioprocess Biosyst. Eng. 32: 837-843.
- [33] Zhou, P.P., Lu, M.B., Li, W. and Yu, L.J., 2010, Microbial production of docosahexaenoic acid by a low temperature-adaptive strain *Thraustochytriidae* sp. Z105: Screening and optimization, J. Basic Microbiol. 50: 380-387.
- [34] Xiong, Z.G., 1995, Fermentation: Process and Theory, China Medical Science and Technology Press.
- [35] Wen, Z.Y. and Chen, F., 2001, Optimization of nitrogen sources for heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis*, Enzyme Microb. Technol. 29, 341-347
- [36] Fan, K.W. and Chen, F., 2007, Production of High-Value Products by Marine Microalgae Thraustochytrids, pp. 293-324, In Yang, S.T. (Ed.), Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources: New Technologies and Applications, Elsevier.
- [37] Chen, G.Q., Fan, K.W., Lu, F.P., 2010, Optimization of nitrogen source for enhanced production of squalene from Thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp., New Biotechnol. 27: 382-389.
- [38] Shene, C., Leyton, A. Esparza, Y., Flores, L., Quilodram, B., Hinzpeter, I. and Rubilar, M., 2010, Microbial oils and fatty acids: effect of carbon source on docosahexaenoic acid (C22:6 N-3, DHA) production by thraustochytrid strain, J. Soil Sci. Plant Nutr. 10: 207-216.
- [39] Nakazawa, A., Matsuura, H., Kose, R., Ito, K., Uedo, M., Honda, D., Inouye, I., Kaya K. and Watanabe, M.M., 2012, Optimization of biomass and fatty acid production by *Aurantiochytrium* sp. Strain 4W-1b, Proc. Environ. Sci. 15: 27-33.
- [40] Fan, K.W., Vrijmoed, L.L.P. and Jone, E.B.G., 2002, Physiological studies of subtropical mangrovei thraustochytrids, Bot. Mar. 45: 50-57.
- [41] Fan, K.W. and Kamlangdee, N., 2003, Polyunsaturated fatty acids production by *Schizochytrium* sp. Isolated from mangrove, J. Sci. Technol. 25: 643-650.
- [42] Chang, K.J.L., Nichols, C.M., Blackburn, S.I., Dunstan, G.A., Koutoulis, A. and Nichols, P.D., 2014, Comparison of *Thraustochytrium* sp., *Schizochytrium* sp., *Thraustochytrium* sp. and *Ulkenia* sp. for production of biodiesel, long-chain

- omega-3 oils, and exopolysaccharide, Mar. Biotechnol. 16: 396-411.
- [43] Manikan, V., Kalil, M.S. and Hamid, A.A., 2015, Response surface optimization of culture medium for enhanced docosahexaenoic acid production by a Malaysian thraustochytrid, Sci. Rep. 5: 1-8.
- [44] Furlan, V.J.M., Maus, V., Batista, I. and Bandarra, N.M., 2017, Production of docosahexaenoic acid by *Aurantiochytrium* sp. ATCC PRA-276, Braz. J. Microbiol. 48: 359-365.
- [45] Homayooni, B., Sahari, M.A. and Barzegar, M., 2014, Concentration of omega-3 fatty acids from rainbow sardine fish oil by various methods, IFRJ. 21: 743-748.