ผลของอัตราการกวนและการให้อากาศต่อการเจริญเติบโตของ *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 ที่เพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

Effect of Agitation and Aeration on the Growth of *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 Fed-batch Cultured in Bioreactor

เกศยา คำรังษี[1] เทพปัญญา เจริญรัตน์[1] ณฐินี สุวรรณสิงห์[1] และสุเปญญา จิตตพันธ์[1*]

Katsaya Khumrangsee[1] Theppanya Charoenrat[1] Natinee Suvanasingha[1] and Supenya Chittapun[1*]

บทคัดย่อ

การกวนและการให้อากาศเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อเซลล์และการเจริญเติบโตของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของอัตราการกวนและการให้อากาศต่อการเจริญเติบโตของ *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยเพาะเลี้ยง *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 แบบเฟด-แบทช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 22 ลิตร ด้วยอาหาร GYP ในระยะแบทช์ และอาหาร GYP feed และ glucose feed ในช่วงเฟด-แบทช์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0 และแปรผันอัตราการกวนที่ 450-800 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0-1.5 วีวีเอ็ม เก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง เพื่อตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง หาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง และวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าอัตราการกวนที่ 450 รอบต่อนาที ร่วมกับอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเซลล์ ทำให้สามารถเพาะเลี้ยงเซลล์ในระบบเฟด-แบทช์ได้อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 64 ชั่วโมง โดยมีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.21 ต่อชั่วโมง ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 30.50±0.44 กรัมต่อลิตร และผลได้ของเซลล์จากสับสเทรตเมื่อสิ้นสุดกระบวนการเพาะเลี้ยงในระบบเฟด-แบทช์ด้วยอาหารเหลว glucose Feed เท่ากับ 0.45±0.05 กรัมเซลล์ต่อกรัมกลูโคส ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนากระบวนการเพาะเลี้ยง *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 ในถังปฏิกรณ์เพื่อพัฒนาไปสู่ระดับอุตสาหกรรมต่อไป

[1] สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

[*] Corresponding author e-mail: supenyac@tu.ac.th, chittapun@gmail.com

Received: 18 May 2021, Revised: 2 June 2021, Accepted: 4 June 2021

คำสำคัญ: การหมัก อัตราการกวน อัตราการให้อากาศ ค่าการละลายของออกซิเจน

Abstract

Agitation and aeration are important factors, which play a vital role in cell characteristics and cell growth during cultivation in the bioreactor. This research aimed to study the effects of agitation and aeration rates on the growth of *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 cultured in the fermenter. The fed-batch cultivation of *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 was conducted in a 22 L bioreactor, feeding with GYP medium in batch phase and with GYP feed and glucose feed during the fed-batch stage. The process was operated at 30°C, pH 6.0 under different agitation (450-800 rpm) and aeration (0-1.5 vvm) rates. The sample was collected every 4 h to measure the absorbance, determine dry cell weight and analyze the concentration of reducing sugar. The results showed that the stirring rate of 450 rpm and associated with an appropriate aeration rate, which adjusted according to the cell growth was proper to enabled the fed-batch cell culture to continue for 64 h with the specific growth rate of 0.21 h^{-1} and the maximum dry cell weight of 30.50±0.44 g/L. The yield at the end of the culture in the fed-batch system was 0.45±0.05 g cell/g glucose. This finding can be used as fundamental data to develop *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 cultivation in the bioreactor for further upscale to the industrial level.

Keywords: Fermentation, Agitation rate, Aeration rate, Dissolved oxygen

บทนำ

Aurantiochytrium เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มของทรอสโทไคตริดส์ (Thraustochytrids) ที่ได้รับความสนใจในการใช้ประโยชน์ทางด้านโภชนศาสตร์มากมาย เนื่องจากสามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acids) ได้ในปริมาณสูง โดยเฉพาะกรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิก หรือดีเอชเอ (docosahexaenoic acid: DHA) ที่สามารถสะสมได้ปริมาณมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมด (Raghukumar, 2008) ดีเอชเอเป็นกรดไขมันซึ่งเป็นโครงสร้างสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ เนื้อเยื่อสมอง และดวงตา (Zeng *et al*., 2011; Song *et al*., 2015) ดีเอชเอมีผลต่อพัฒนาการของสมองในทารกและเด็กแรกเกิด โดยจะสะสมอยู่ในรูปของพลาสมาฟอสโฟลิพิด (plasma phospholipid) ทารกสามารถรับดีเอชเอได้ตั้งแต่อยู่ในครรภ์และยังสามารถรับผ่านทางการบริโภคนมจากมารดา (Romeu-Nadal *et al*., 2008) นอกจากนี้ดีเอชเอยังช่วยลดอัตราเสี่ยงของการเกิดโรคหลอดเลือด

หัวใจตีบ (coronary artery diseases) โรคเบาหวาน (diabetes) โรคหัวใจ (cardiovascular diseases) และโรคทางระบบประสาท (neuropsychiatric disorders) เช่น ภาวะสมองเสื่อม (cognitive decline) โรคอัลไซเมอร์ (alzheimer) และโรคซึมเศร้า (depression) ได้อีกด้วย (Yaguchi *et al.*, 1997; Chin *et al.*, 2006; Chatdumrong *et al.*, 2007; Chi *et al.*, 2009) เนื่องจากชีวมวลของ *Aurantiochytrium* สามารถใช้เป็นแหล่งดีเอชเอทดแทนดีเอชเอที่ผลิตจากปลาทะเลได้ การเพาะเลี้ยง *Aurantiochytrium* เพื่อผลิตชีวมวลและนำไปใช้ประโยชน์จึงได้รับความสนใจในการศึกษาวิจัยมากขึ้น การพัฒนาต้นแบบกระบวนการเพาะเลี้ยง *Aurantiochytrium* เพื่อผลิตชีวมวลนั้นมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายประการ เช่น ชนิดของสารอาหาร ความเข้มข้นของสารอาหาร ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) อุณหภูมิ การกวน และการให้อากาศ จากปัจจัยที่กล่าวมาการกวนและการให้อากาศเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญซึ่งส่งผลกระทบต่อเซลล์ *Aurantiochytrium* และการถ่ายเทมวลสารในระบบ ซึ่งส่งผลต่อชีวมวลที่ผลิตได้ โดยเซลล์ *Aurantiochytrium* มีรูปร่างกลม ผนังบาง และสะสมไขมันภายในเซลล์ (Honda *et al.*, 1998; Yokoyama and Honda, 2007) เมื่อมีการสะสมไขมันเป็นปริมาณมากอาจทำให้เยื่อหุ้มเซลล์อ่อนแอและแตกได้ (Jakobsen *et al.*, 2008) รวมทั้งการเจริญเติบโตของ *Aurantiochytrium* เป็นแบบทวีคูณ (successive bipartition) ซึ่งมีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการเพิ่มอัตราการกวนมีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยช่วยเพิ่มความสม่ำเสมอของออกซิเจนและอาหารในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ และอัตราการกวนที่มากกว่า 400 รอบต่อนาที ช่วยให้ *Aurantiochytrium limacinum* mh0186 ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเจริญเติบโตได้ดี (Nagono *et al.*, 2009) ส่วนอัตราการให้อากาศมีผลต่ออัตราการถ่ายเทมวลของออกซิเจนในระบบ ซึ่งอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมนั้นขึ้นอยู่กับขนาดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ปริมาตรอาหาร ความดันในระบบ และอุณหภูมิระหว่างการเพาะเลี้ยง (เทพปัญญา และวรสิทธิ์, 2553) ฉะนั้นอัตราการกวนและการให้อากาศที่เหมาะสมแก่ระบบนอกจากจะช่วยลดความเสียหายที่เกิดขึ้นกับเซลล์และช่วยให้ปริมาณออกซิเจนในระบบมีเพียงต่อการนำไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมแล้ว ยังส่งเสริมการเจริญเติบโตอีกด้วย งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศต่อการเจริญเติบโตของ *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 ที่เพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาต้นแบบกระบวนการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตชีวมวล *Aurantiochytrium* ให้ได้ปริมาณสูงต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. จุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อ

งานวิจัยนี้ใช้จุลินทรีย์ *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยทรัพยากรชีวภาพสาหร่าย คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และอาหารเลี้ยงเชื้อคืออาหารแข็งและอาหารเหลว GYP ที่ละลายในน้ำทะเลสังเคราะห์ที่มีความเค็ม 15 กรัมต่อลิตร โดยอาหารแข็งใช้สำหรับเก็บรักษาเชื้อประกอบด้วย กลูโคส 4 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 2 กรัมต่อลิตร เพปโตน 1 กรัมต่อลิตร และผงวุ้นความเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร และอาหารเหลวใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อประกอบด้วย กลูโคส 30 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร เพปโตน 20 กรัมต่อลิตร และเติมยาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล (chloramphenicol) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. การเตรียมกล้าเชื้อสำหรับเพาะเลี้ยงระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

แยกโคโลนีเดี่ยวจากอาหารแข็งลงในอาหารเหลว GYP ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ในสภาวะที่ไม่มีแสง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และเพิ่มขนาดการเพาะเลี้ยงทุก 72 ชั่วโมง เป็นปริมาตร 50 และ 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร ตามลำดับ

3. ศึกษาผลของอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศต่อการเจริญเติบโตของ *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร จนครบ 72 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปรับให้มีค่าเริ่มต้นเท่ากับ 1 จากนั้นถ่ายเชื้อ 600 มิลลิลิตร (10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง) ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (sartorius stedim BIOSTAT® C plus) ขนาด 22 ลิตร โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว GYP ปริมาตร 6 ลิตร ควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 โดยระบบที่ 1 ควบคุมอัตราการกวน เริ่มต้นที่ 800 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0-1 ลิตรต่อลิตร.นาที (วีวีเอ็ม) และระบบที่ 2 ควบคุมอัตราการกวนเริ่มต้นที่ 450 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0-1.5 ลิตรต่อลิตร.นาที (วีวีเอ็ม) สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำหมักจากทั้ง 2 ระบบ ทุก 4 ชั่วโมง จนกระทั่งกลูโคสถูกใช้จนหมด จึงเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อเนื่องด้วยระบบเฟด-แบทช์ โดยการเติมอาหารเหลว GYP feed และอาหารเหลว glucose feed ตามลำดับ ใช้ระบบ DOT STAT ควบคุมอัตราการเติมอาหาร และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0 อัตราการกวน 450 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1-1.5 วีวีเอ็ม เก็บตัวอย่างทุก 2-4 ชั่วโมง จนกระทั่งน้ำตาลถูกใช้หมด ตัวอย่างที่ได้นำมาตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง หาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง และวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์

4. การวิเคราะห์ตัวอย่าง

4.1 ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยการนำตัวอย่างน้ำหมักมาเจือจางในอัตราส่วนที่เหมาะสมด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (SP-880 Metertech Inc.)

4.2 หาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยนำตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ (microcentrifuge) ที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง นำตะกอนเซลล์ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และชั่งด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

4.3 วิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS) (Miller, 1959) โดยนำตัวอย่างส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมาเจือจางในอัตราส่วนที่เหมาะสม ผสมตัวอย่างปริมาตร 500 ไมโครลิตรกับสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิกปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแช่ในน้ำเย็นเป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคส

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

การหาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและการวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ทำ 3 ซ้ำ และนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ข้อมูลที่ได้นำมาเขียนกราฟ และคำนวณหาค่าการเจริญเติบโตจำเพาะโดยใช้โปรแกรม sigma plot version 11.0

ผลการวิจัย

1. การเจริญเติบโตของ *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 ที่เพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

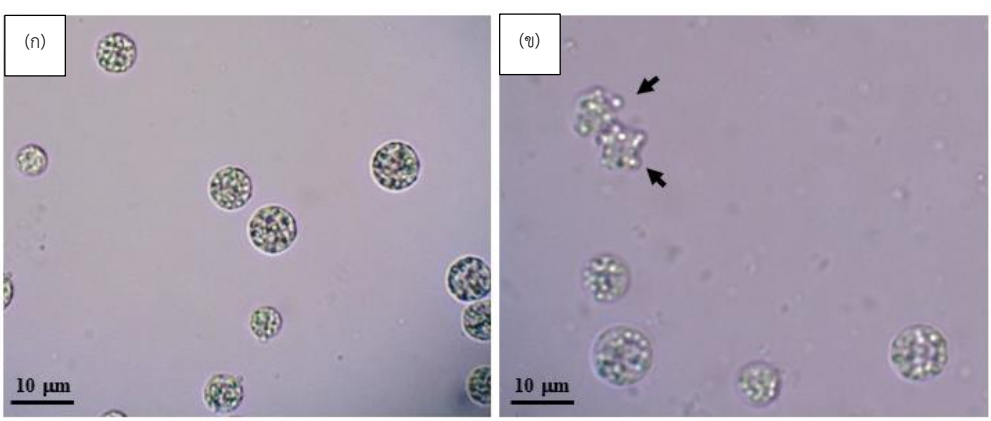
1.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอัตราการกวนที่ 450-800 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0-1.5 วีวีเอ็ม

เริ่มต้นกระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์ *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแบทช์เป็นเวลา 28 ชั่วโมง ด้วยอาหารเหลว GYP ปริมาตร 4 ลิตร โดยควบคุมอัตราการกวนเท่ากับ 800 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 วีวีเอ็ม หลังจากถ่ายกล้าเชื้อลงสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เซลล์มีค่าการดูดกลืนแสงและน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้นเท่ากับ 1.01 และ 0.37±0.15 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตลดลงอย่างรวดเร็ว โดยมีค่าการดูดกลืนแสงและน้ำหนักเซลล์แห้งน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณ

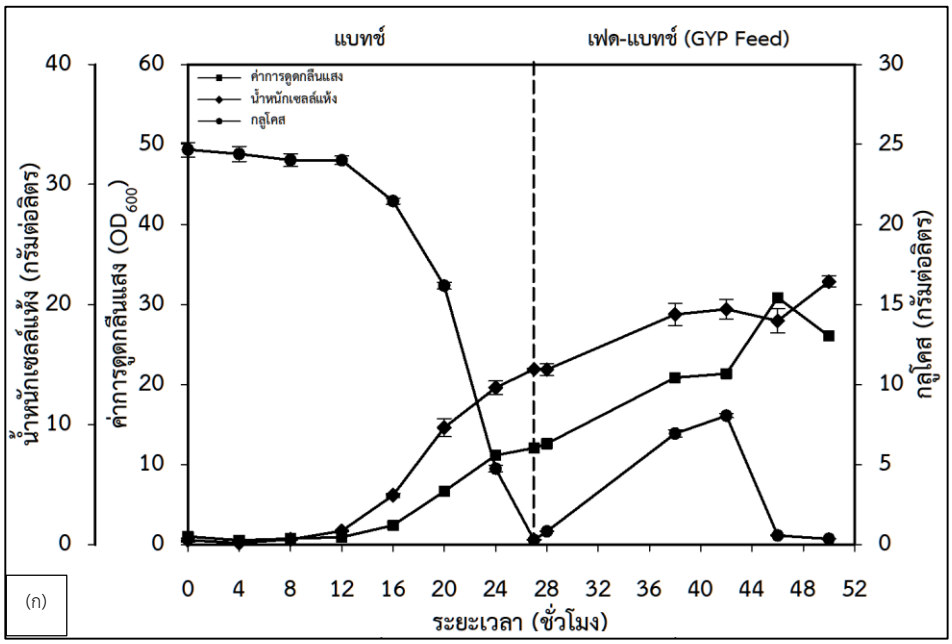
เซลล์เริ่มต้น เมื่อศึกษาลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีเศษเซลล์จำนวนมากกระจายตัวในน้ำหมัก (cell debris) และผนังเซลล์บางส่วนถูกทำลาย (ภาพที่ 1) ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์ได้รับผลกระทบจากแรงเฉือน (shear force) ที่เกิดจากความเร็วรอบของใบกวนที่มากเกินไป จึงปรับลดอัตราการกวนลงเหลือ 600 รอบต่อนาที และปิดการให้อากาศแก่ระบบชั่วคราว เพื่อให้ระบบมีอัตราการถ่ายเทมวลของออกซิเจนเข้าสู่เซลล์เหมาะสมกับปริมาณเซลล์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ใช้ออกซิเจนในระบบอย่างต่อเนื่อง กระทั่งค่าการละลายของออกซิเจน (dissolved oxygen tension; DOT) ลดลงเหลือ 20 เปอร์เซ็นต์ จึงปรับอัตราการให้อากาศเข้าสู่ระบบเพิ่มขึ้นเป็น 0.5 วีวีเอ็ม เพื่อให้ปริมาณออกซิเจนในระบบมีเพียงพอที่เซลล์จะนำไปใช้ในกระบวนการสร้างพลังงานและเผาผลาญสารอาหาร เพื่อการเจริญเติบโต เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 ชั่วโมง ค่าการละลายของออกซิเจนในระบบลดลงเหลือ 20 เปอร์เซ็นต์อีกครั้ง แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตและนำออกซิเจนไปใช้จนทำให้ออกซิเจนในระบบลดลง จึงปรับอัตราการให้อากาศเข้าสู่ระบบเพิ่มเป็น 1 วีวีเอ็ม เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมงปรากฏว่าค่าการละลายของออกซิเจนในระบบมีค่าลดลงเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องจากเซลล์มีความหนาแน่นน้อยและมีอัตราการเจริญเติบโตน้อย จึงปรับลดอัตราการกวนลงเท่ากับ 450 รอบต่อนาที เพื่อให้เหมาะสมกับความหนาแน่นของเซลล์ และให้เซลล์สามารถใช้อาหารและออกซิเจนในการเจริญเติบโตได้อย่างเหมาะสม เมื่อเพาะเลี้ยงแบบแบทช์เป็นเวลา 27 ชั่วโมง เซลล์ใช้แหล่งคาร์บอนจนหมด ส่งผลให้ค่าการละลายของออกซิเจนในระบบเพิ่มสูงขึ้นเนื่องจากเซลล์ลดการนำออกซิเจนไปใช้สำหรับกระบวนการหายใจและสังเคราะห์พลังงานในการเจริญเติบโต หลังสิ้นสุดกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ เซลล์มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 12.06 และมีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 14.60±0.10 กรัมต่อลิตร

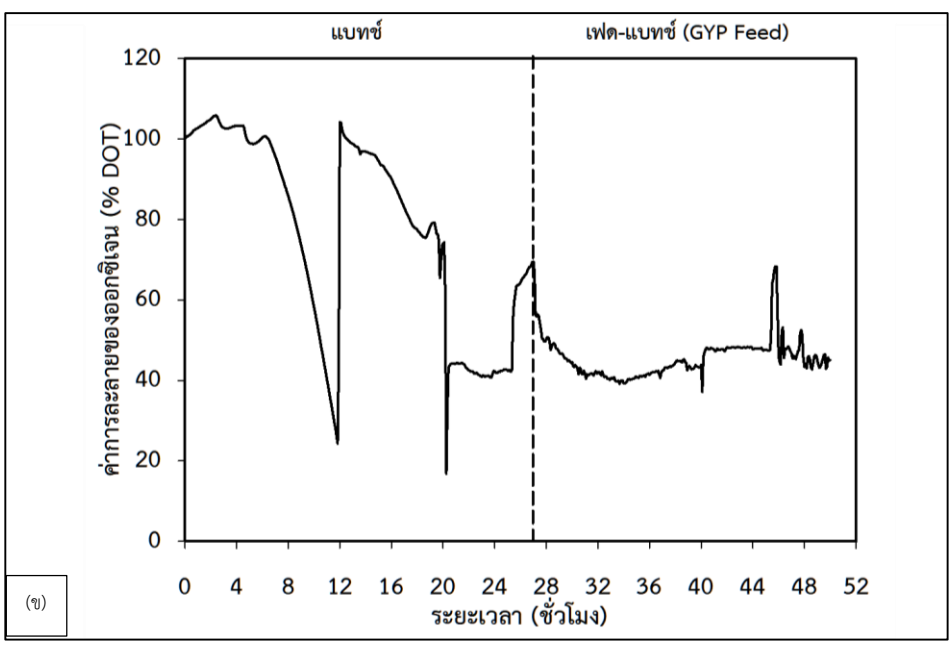
จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อเนื่องในระบบเฟด-แบทช์ด้วยอาหารเหลว GYP feed ปริมาตร 1 ลิตร ด้วยรูปแบบการเติมอาหารแบบคงที่ (constant feed) เพื่อเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตและความหนาแน่นของเซลล์ ควบคุมอัตราการกวนคงที่เท่ากับ 450 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศคงที่ที่ 1 วีวีเอ็ม ระหว่างการเพาะเลี้ยงในชั่วโมงที่ 28-40 พบว่าเซลล์ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโตน้อยลง ส่งผลให้ค่าการละลายของออกซิเจนในระบบมีค่าลดลงเพียงเล็กน้อย จึงทำการเพิ่มอัตราการให้อาหารเข้าสู่ระบบ ส่งผลให้ปริมาณกลูโคสมีค่าสูงขึ้น (ภาพที่ 2) หลังจากนั้นหยุดการเติมอาหารเข้าสู่ระบบการเพาะเลี้ยงชั่วคราว เพื่อทดสอบว่าเซลล์ยังสามารถนำแหล่งคาร์บอนที่เหลืออยู่ในระบบไปใช้ในการเจริญเติบโตได้หรือไม่ หลังจากเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 50 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีค่าการเจริญเติบโตคงที่และลดลงตามลำดับ จากผลการทดลองที่เกิดขึ้นทำให้ไม่สามารถดำเนินการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ โดยใช้ระบบ DOT STAT ควบคุมอัตราการเติมอาหาร เนื่องจากเซลล์มีการเจริญเติบโตและการใช้แหล่งคาร์บอนน้อยจึงทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนต่ำจนทำให้ค่าการละลายของออกซิเจนเปลี่ยนแปลงน้อยมากจนไม่สามารถใช้สัญญาณจากค่า DOT มาใช้ในการควบคุมการเติมสับสเทรตในระบบ DOT STAT การที่เชื้อมีการเจริญเติบโตช้ามากและหยุดการเจริญเติบโตใน

ระยะเวลาสั้นทั้งที่ในระบบยังคงมีสารอาหารมากเกินพอเป็นการแสดงให้เห็นถึงความไม่สมบูรณ์ของเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะของเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 ชั่วโมง (ภาพที่ 1 ข) ที่แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่ามีเซลล์แตก ทั้งนี้ถึงแม้ว่าจะมีการปรับลดอัตราการกวนจาก 800 รอบต่อนาที เป็น 600 รอบต่อนาที และ 450 รอบต่อนาที ตามลำดับแล้วก็ตาม แต่ระบบที่เซลล์ผ่านทำให้มีความอ่อนแอมาแล้วก็เป็นเรื่องที่ยากที่จะฟื้นฟูความแข็งแรงของเซลล์จนสามารถทำให้เซลล์กลับมาเจริญเติบโตอย่างเต็มประสิทธิภาพอีกครั้ง หลังสิ้นสุดกระบวนการเพาะเลี้ยง เซลล์มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 26.05 และมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 21.90±0.46 กรัมต่อลิตร จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยอัตราการกวนที่ 450-800 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศ 0-1 วีวีเอ็ม แสดงให้เห็นว่าอัตราการถ่ายเทมวลของออกซิเจนตลอดกระบวนการเพาะเลี้ยงไม่ได้จำกัด แต่ปัจจัยสำคัญที่ทำให้เซลล์เสียหายจนการเพาะเลี้ยงสิ้นสุดลงในระยะเวลาสั้น คือ แรงเฉือนที่เกิดจากการกวนด้วยอัตราที่สูงเกินเกินไป (800 รอบต่อนาที) ดังนั้นเพื่อทดสอบสมมติฐานนี้ผู้วิจัยจึงทำการทดลองถัดไปโดยลดค่าอัตราการกวนเป็น 450 รอบต่อนาที ซึ่งเป็นค่าอัตราการกวนที่ทำให้เกิดการผสมอย่างทั่วถึง



ภาพที่ 1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 ที่เพาะเลี้ยงแบบแบทช์ด้วยอาหารเหลว GYP ด้วยอัตราการกวน 800 รอบต่อนาที (ก) เริ่มต้น (ข) 4 ชั่วโมง และลูกศรชี้แสดงให้เห็นลักษณะเซลล์แตก





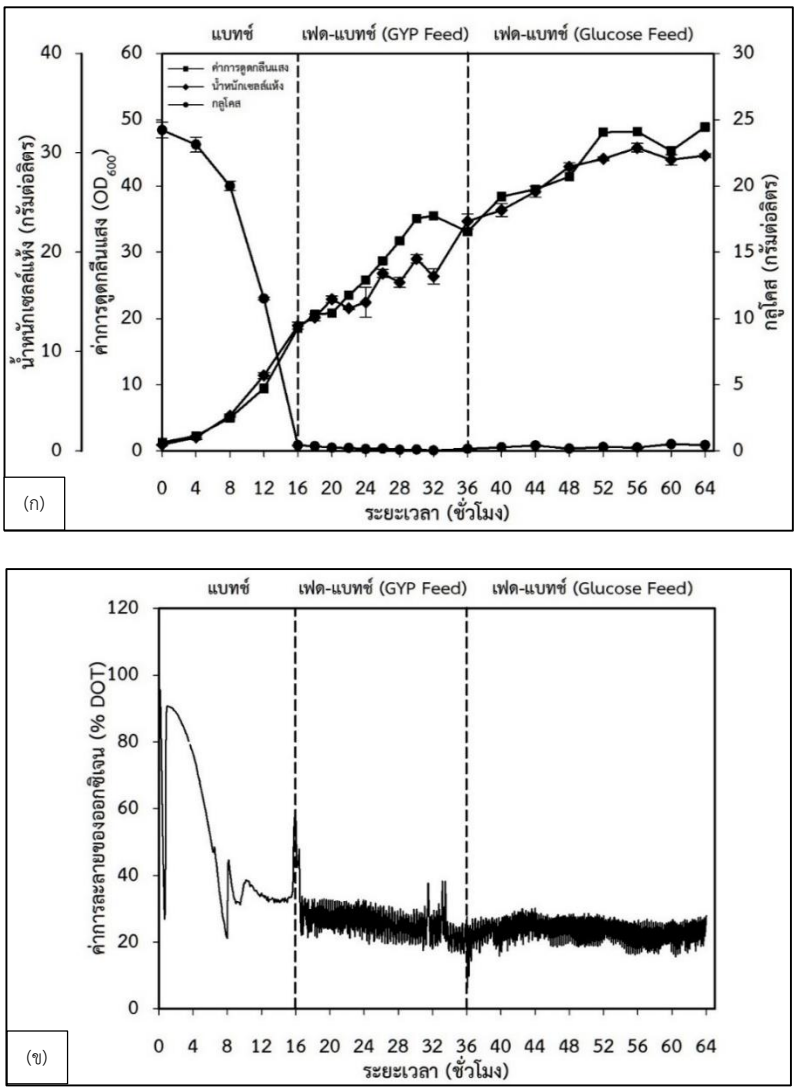
ภาพที่ 2 การเจริญเติบโตของ *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพระบบเฟด-แบทช์ด้วยอัตราการกวน 450-800 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0-1 วีวีเอ็ม เป็นระยะเวลา 52 ชั่วโมง (ก) การเจริญเติบโตและความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในระบบเพาะเลี้ยง (ข) ค่าการละลายของออกซิเจนในระบบเพาะเลี้ยง

1.2 เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอัตราการกวนที่ 450 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0-1.5 วีวีเอ็ม

เริ่มต้นกระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์ *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแบทช์เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ด้วยอาหารเหลว GYP ปริมาตร 6 ลิตร ควบคุมอัตราการกวนคงที่เท่ากับ 450 รอบต่อนาทีตลอดการเพาะเลี้ยง และปรับอัตราการให้อากาศเริ่มต้นเท่ากับ 1 วีวีเอ็ม หลังถ่ายกล้าเชื้อลงสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เซลล์มีค่าการดูดกลืนแสงและน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้นเท่ากับ 1.29 และ 0.63±0.06 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ หลังจากเก็บเกี่ยวเซลล์ในชั่วโมงเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยง ทำการปิดอัตราการให้อากาศชั่วคราวเพื่อให้เซลล์นำออกซิเจนในระบบมาใช้ในการเผาผลาญสารอาหารและสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ และเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่อง กระทั่งปริมาณออกซิเจนลดลงเหลือ 20 เปอร์เซ็นต์ ในช่วง 30 นาทีแรกของการเพาะเลี้ยง ปรับอัตราการให้อากาศเข้าสู่ระบบเพิ่มเป็น 0.5 วีวีเอ็ม เพื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนในระบบ เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง ปริมาณออกซิเจนภายในระบบถูกนำไปใช้ในการเจริญเติบโตจนมีค่าลดลงเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์อีกครั้ง จึงปรับอัตราการให้อากาศเข้าสู่ระบบเพิ่มขึ้นเป็น 1 วีวีเอ็ม เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแบทช์เป็นเวลา 16 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ใช้แหล่งคาร์บอนจนหมด โดยปริมาณกลูโคสในระบบมีค่าลดลง (ภาพที่ 3) ส่งผลให้ปริมาณออกซิเจนในระบบมีค่าสูงขึ้น เซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ในช่วง 0-12 ชั่วโมงแรก และมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.21 ต่อชั่วโมง หลังสิ้นสุดกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์เซลล์มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 18.55 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 12.60±0.36 กรัมต่อลิตร และผลได้ของเซลล์จากสับสเทรต ($Y_{X/S}$) ในช่วงการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ เท่ากับ 0.40±0.04 กรัมต่อกรัม

จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อเนื่องในระบบเฟด-แบทช์ด้วยอาหารเหลว GYP feed ปริมาตร 1 ลิตร เพื่อเพิ่มความหนาแน่นเของเซลล์ เติมอาหารเข้าสู่ระบบโดยใช้ระบบ DOT STAT หลังจากเติมอาหารเข้าสู่ระบบ ปรับลดอัตราการให้อากาศลงเหลือ 0.5 วีวีเอ็ม เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 ชั่วโมง เซลล์มีค่าการดูดกลืนแสงคงที่ จึงปรับอัตราการให้อากาศเพิ่มเป็น 1 วีวีเอ็ม ส่งผลให้เซลล์ตอบสนองต่อออกซิเจนที่ป้อนเข้าสู่ระบบมากขึ้น และเซลล์มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (ภาพที่ 3) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง เซลล์ใช้แหล่งคาร์บอนจนหมดส่งผลให้ปริมาณออกซิเจนในระบบมีค่าสูงขึ้นอีกครั้ง โดยเซลล์มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 33.1 น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 23.10±0.75 กรัมต่อลิตร และผลได้ของเซลล์จากสับสเทรตในช่วงการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ด้วยอาหารเหลว GYP feed เท่ากับ 0.74±0.06 กรัมต่อกรัม จากนั้นเพาะเลี้ยงต่อด้วยอาหารเหลว glucose feed ปริมาตร 1 ลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 44 ชั่วโมง เซลล์มีค่าการดูดกลืนแสงและน้ำหนักเซลล์แห้งคงที่ จึงปรับอัตราการให้อากาศเข้าสู่ระบบเพิ่มเป็น 1.5 วีวีเอ็ม เพื่อให้มีออกซิเจนเพียงพอในการนำไปใช้สร้างพลังงาน เจริญเติบโต และสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ได้อย่างต่อเนื่อง เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 56 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตและการใช้ออกซิเจนคงที่ จึงหยุดกระบวนการ

เพาะเลี้ยงและเมื่อสิ้นสุดกระบวนการ เซลล์มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 48.2 น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 30.50±0.44 กรัมต่อลิตร และผลได้ของเซลล์จากสับสเทรตเมื่อสิ้นสุดกระบวนการเพาะเลี้ยงในระบบเฟด-แบทช์ด้วยอาหารเหลว glucose feed เท่ากับ 0.45±0.05 กรัมต่อกรัม จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยอัตราการกวนคงที่ 450 รอบต่อนาที ร่วมกับการให้อากาศที่เหมาะสม ส่งผลให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้อย่างต่อเนื่อง ช่วยให้ปริมาณชีวมวลที่ผลิตได้มากขึ้น



ภาพที่ 3 การเจริญเติบโตของ *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพระบบเฟด-แบทช์ด้วยอัตราการกวน 450 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0-1.5 วีวีเอ็ม เป็นระยะเวลา 64 ชั่วโมง (ก) การเจริญเติบโตและความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในระบบเพาะเลี้ยง (ข) ค่าการละลายของออกซิเจนในระบบเพาะเลี้ยง

การอภิปรายผลการวิจัย

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าอัตราการกวน 450 รอบต่อนาที ร่วมกับการปรับอัตราการให้อากาศตามการเจริญเติบโตของเซลล์เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 แบบเฟด-แบทช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เนื่องจากไม่พบเซลล์แตกในระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยงและการถ่ายเทมวลของออกซิเจนอยู่ในระดับที่สูงจนไม่พบปัญหาการจำกัดออกซิเจน ซึ่งพิจารณาได้จากการที่ตลอดระยะเวลาของการเพะเลี้ยงไม่มีช่วงใดเลยที่ค่าออกซิเจนละลายลดลงต่ำกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ จากข้อมูลเบื้องต้นแสดงให้เห็นว่าแรงเฉือนเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงออแรนธิโอไคเตรียม อัตราการกวนที่สูงจนทำให้เกิดแรงเฉือนที่ทำให้เซลล์แตกเป็นสิ่งที่จำเป็นต้องหลีกเลี่ยง ซึ่งค่าอัตราการกวนที่ใช้ในงานวิจัยนี้แตกต่างจากงานวิจัยที่มีการเพาะเลี้ยงทรอสโทไคตริดส์ในระบบเฟด-แบทช์ที่เคยรายงานมา ทั้งนี้ในแต่ละงานวิจัยมีการปรับรูปแบบอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศเหมาะสมแตกต่างกัน เนื่องจากการกวนและการให้อากาศมีผลต่อปริมาณออกซิเจนและการถ่ายเทมวลสารในระบบ ฉะนั้นด้วยปริมาตรของอาหารและชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ในระบบเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน จึงมีผลให้อัตราการกวนและอัตราการให้อากาศแตกต่างกันไปเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Chi *et al*. (2009) ที่เพาะเลี้ยง *Schizochytrium limacinum* SR21 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพระบบแบทช์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยการควบคุมค่าการละลายของออกซิเจนเท่ากับ 10 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ผลการศึกษาพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยปริมาณออกซิเจนที่สูงในช่วงแรกส่งผลให้เซลล์เจริญเติบโตได้ดี และเมื่อลดปริมาณออกซิเจนในระบบลงภายหลังของการเพาะเลี้ยง ทำให้เซลล์สามารถสะสมไขมันได้มากขึ้น เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงเซลล์ผลิตชีวมวลสูงสุด เท่ากับ 37.9 กรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ren *et al.* (2010) ที่ศึกษาการเจริญเติบโตของ *Schizochytrium* sp. ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพระบบเฟด-แบทช์ด้วยการแปรผันอัตราการให้อากาศ โดยควบคุมอัตราการให้อากาศเริ่มต้นในปริมาณสูง และปรับลดลงในภายหลัง เพื่อเพิ่มอัตราการผลิตชีวมวลและไขมันของเซลล์ เป็นเวลา 132 ชั่วโมง ส่งผลให้เซลล์ผลิตชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 71 กรัมต่อลิตร นอกจากนั้น Qu *et al.* (2010) และ Chang *et al.* (2013) ศึกษาการเพิ่มผลผลิตดีเอชเอจาก *Schizochytrium* sp. ด้วยการควบคุมค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลของออกซิเจน (K_La) พบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยควบคุมค่า K_La ที่สูงส่งผลให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็วและผลิตชีวมวลได้ปริมาณมาก ในขณะที่ค่า K_La ต่ำส่งผลให้เซลล์ผลิตไขมันและดีเอชได้ในปริมาณสูง เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง พบว่าเซลล์สามารถผลิตชีวมวลได้สูงสุด เท่ากับ 92.72 และ 151.4 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 160 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ ผลการศึกษาจากงานวิจัยดังกล่าวข้างต้น พบว่าการให้อากาศที่มากขึ้นในช่วงแรกของกระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์ส่งผลให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดีและช่วยเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ได้ ซึ่งค่า K_La เป็นค่าที่สัมพันธ์กับอัตราการถ่ายเทมวลของออกซิเจนในน้ำหมักโดยสามารถอธิบายได้ดังสมการ (1)

$$\frac{dC}{dt} = OTR = K_L a\Delta C = K_L a(C^* - C) \qquad (1)$$

เมื่อ OTR คือ อัตราการถ่ายเทมวลออกซิเจน (oxygen transfer rate) (มิลลิกรัมต่อลิตร. ชั่วโมง)

K_L คือ สัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลของออกซิเจน (เมตรต่อวินาที)

a คือ สัดส่วนระหว่างพื้นที่ผิวกับปริมาตรของฟองอากาศ (เมตร$^{-1}$)

ΔC คือ ความเข้มข้น driving force (มิลลิกรัมต่อลิตร)

C คือ ความเข้มข้นของออกซิเจนในสารละลาย (มิลลิกรัมต่อลิตร)

C* คือ ความเข้มข้นของออกซิเจนภายใต้สภาวะสมดุล (มิลลิกรัมต่อลิตร)

t คือ เวลา (วินาที)

จากสมการ (1) แสดงให้เห็นว่าอัตราการถ่ายเทมวลของออกซิเจนมีความเกี่ยวข้องกับ 3 ตัวแปรสำคัญ คือ K_L a และ ΔC ในทางปฏิบัติการหาค่า K_L และ a ทำได้ยาก ดังนั้นจึงมีการรวมตัวแปรทั้งสองเข้าด้วยกันเป็น $K_L a$ โดยเรียกตัวแปรใหม่นี้ว่า ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนเชิงปริมาตร (ชั่วโมง$^{-1}$) ทั้งนี้ ค่า $K_L a$ เป็นค่าที่บอกถึงประสิทธิภาพของถังหมักในการถ่ายเทมวลของออกซิเจนซึ่งมีความสำคัญในการออกแบบถังหมักและกระบวนการหมัก ค่า $K_L a$ เป็นค่าที่ขึ้นกับการออกแบบถังหมักและการดำเนินการหมัก ปัจจัยที่มีผลต่อค่า $K_L a$ ได้แก่ อัตราการให้อากาศ อัตราการกวน ความดันย่อยของออกซิเจนในอากาศที่ใช้เติม และการเติมสารต้านการเกิดฟอง ในขณะที่อุณหภูมิและความดันรวมในถังหมักเป็นปัจจัยที่มีผลต่อค่า C* อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ ตลอดกระบวนการเพาะเลี้ยงค่าออกซิเจนละลายมีค่าสูงกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าออกซิเจนไม่จำกัด หรืออาจกล่าวได้ว่าค่าอัตราการถ่ายเทมวลของออกซิเจนมีค่าสูงกว่าอัตราการใช้ออกซิเจน ดังนั้นค่าออกซิเจนละลายของระบบจึงเป็นพารามิเตอร์หนึ่งที่เป็นภาพสะท้อนให้เห็นว่าอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศมีค่าที่เหมาะสมหรือไม่ อย่างไรก็ตามการเพิ่มอัตราการกวนอาจส่งผลให้แรงเฉือนสูงขึ้นจนส่งผลเสียต่อเซลล์ (เทพปัญญา และวรสิทธิ์, 2553)

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้พบว่าอัตราการกวนที่ 450 รอบต่อนาทีร่วมกับการควบคุมอัตราการให้อากาศที่ 0-1.5 วีวีเอ็ม เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยง *Aurantiochytrium* sp. FIKU018 ในระบบเฟด-แบชท์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยอัตราการกวนที่ 450 รอบต่อนาทีนอกจากไม่ทำให้เซลล์ได้รับความเสียหายแล้วยังทำให้เซลล์เซลล์สามารถเจริญเติบโตและผลิตชีวมวลได้ในปริมาณมาก รวมทั้งการควบคุมอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมช่วยให้อัตราการถ่ายเทมวลของออกซิเจนตลอดกระบวนการเพาะเลี้ยงไม่ได้

จำกัด ทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้ดี ซึ่งข้อมูลนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงให้สามารถผลิตชีวมวลและสะสมดีเอชเอปริมาณสูง เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

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

เอกสารอ้างอิง

เทพปัญญา เจริญรัตน์ และวรสิทธิ์ โทจำปา. (2553). *ปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก*. ปทุมธานี: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

Chang, G., Gao, N., Tian, G., Wu, Q., Chang, M. and Wang, X. (2013). Improvement of docosahexaenoic acid production on glycerol by *Schizochytrium* sp. S31 with constantly high oxygen transfer coefficient. *Bioresource Technology*, 142, 400-406.

Chatdumrong, W., Yongmanitchai, W., Limtong, S. and Worawattanamateekul, W. (2007). Optimization of docosahexaenoic acid (DHA) production and improvement of astaxanthin content in a mutant *Schizochytrium limacinum* isolated from mangrove forest in Thailand. *Kasetsart Journal (Natural Science)*, 41(2), 324-334.

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

Chin, H.J., Shen, T.F., Su, H.P. and Ding, S.T. (2006). *Schizochytrium limacinum* SR-21 as a source of docosahexaenoic acid: optimal growth and use as a dietary supplement for laying hens. *Australian Journal of Agricultural Research*, 57(1), 13-20.

Honda, D., Yokochi, T., Nakahara, T., Erata, M. and 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.

Jakobsen, N.A., Aasen, M.I., Josefsen, D.K. and Strøm, R.A. (2008). Accumulation of docosahexaenoic acid-rich lipid in thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. strain T66: effects of N and P starvation and O_2 limitation. *Applied Microbiology Biotechnology*, 80(2), 297-306.

Nagano, N., Taoka, Y., Honda, D. and Hayashi, M. (2009). Optimization of culture conditions of growth and docosahexaenoic acid production by a marine Thraustochytrid, *Aurantiochytrium limacinum* mh0186. *Journal of Oleo Science*, 58(12), 623-628.

Qu, L., Ji, J.X., Ren, J.L., Nie, K.Z., Feng, Y., Wu, J.W., Ouyang, K.P. and Huang, H. (2010). Enhancement of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. using a two-stage oxygen supply control strategy based on oxygen transfer coefficient. *Letter in Applied Microbiology*, 52(1), 22-27.

Raghukumar, S. (2008). Thraustochytrid marine protists: production of PUFAs and other emerging technologies. *Marine Biotechnology*, 10(6), 631-640.

Ren, J.L., Ji, J.X., Huang, H., Qu, L., Feng, Y., Tong, Q.Q. and Ouyang, K.P. (2010). Development of stepwise aeration control strategy for efficient docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. *Applied Microbiology Biotechnology*, 87(5), 1649-1656.

Romeu-Nadal, M., Castellote, A.I., López-Sabater, M.C. (2008). Effect of cold storage on vitamins C and E and fatty acids in human milk. *Food Chemistry*, 106(1), 65-70.

Song, X., Zang, X. and Zhang, X. (2015). Production of high docosahexaenoic acid by *Schizochytrium* sp. using low-cost raw materials from food industry. *Journal of Oleo Science*, 64(2), 197-204.

Yaguchi T., Tanaka S., Yokochi T., Nakahara T., Higashihara T. (1997). Production of high yields of docosahexaenoic acid by *Schizochytrium* sp. strain SR21. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74(11), 1431-1434.

Yokoyama, R. and Honda, D. (2007). Taxonomic rearrangement of the genus *Schizochytrium* sensu lato based onmorphology, chemotaxonomic characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): Emendation for *Schizochytrium* and erection of *Aurantiochytrium* and *Oblongichytrium* gen. nov. *Mycoscience*, 48(4), 199-211.

Zeng, Y., Ji, X.J, Lian, M., Ren, L.J., Jin, L.J, Ouyang, P.K. and Huang, H. (2011). Development of a temperature shift strategy for efficient docosahexaenoic acid production by a marine fungoid protist, *Schizochytrium* sp. HX-308. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164(3), 249-255.