การเก็บรักษาสาหร่าย *Spirulina platensis* ด้วยวิธีการแช่เยือกแข็ง

Cryopreservation of *Spirulina platensis*

มานิตา โมธรรม

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทคัดย่อ

การเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่าย *Spirulina platensis* สองสายพันธุ์คือ *S. platensis* CMU2 และ *S. platensis* GD1 แบบระยะยาว ด้วยวิธีการแช่เยือกแข็ง โดยการลดอุณหภูมิเป็นขั้นที่ 25, 4 และ -20 °C ขั้นละ 30 นาที แล้วเก็บรักษาตัวอย่างที่ – 80 °C หลังทำการเก็บรักษาเซลล์ที่ระยะเวลา 3 เดือน พบว่าอัตราการรอดชีวิตของสาหร่ายทั้ง 2 สายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ ความเข้มข้นของเซลล์ 2 ระดับ มีผลต่ออัตราการรอดชีวิต ความเข้มข้นแบบไม่เจือจางเซลล์มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าคิดเป็น 25.16% การใช้ cryoprotectant 4 ชนิด ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15% พบว่ากลีเซอรอล (Glycerol) ที่ความเข้มข้น 5% มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดที่ 30.63% รองลงมาคือ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) และซีรัมวัว (Calf serum) 23.75% ที่ความเข้มข้น 10% เท่ากัน ส่วนซีรัมม้า (Horse serum) ไม่พบอัตราการรอดชีวิต การละลายเซลล์ที่ 40 °C พบอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าที่ 25 °C และพบว่าเมื่อเวลาเก็บนานขึ้นอัตราการรอดชีวิตต่ำลง

คำสำคัญ : cryopreservation, cryoprotectant, *Spirulina platensis*

Abstract

The cryopreservation of the two strains of *Spirulina platensis*: *S. platensis* CMU2 and *S. platensis* GD1, was examined by step freezing at 25, 4, and -20 °C for 30 min each, then preserved at -80 °C. After three months, viability of these two strains were not significantly different. Cell concentration was found to affect cell viability. Undiluted cell showed higher than diluted cells viability at 25.16%. Four cryoprotectants were tested with 3 different concentrations of 5, 10 and 15%. Five percent glycerol showed highest viability (30.63%), followed by 10% dimethysulfoxide (23.75%) and calf serum (23.75%). No viability was observed with horse serum. Thawing cells at 40 °C showed higher survival than at 25 °C. Prolong storage was found to reduce cell survival.

Keyword: cryopreservation, cryoprotectant, *Spirulina platensis*

คำนำ

ปัจจุบันสาหร่าย *Spirulina* ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายโดยใช้เป็นอาหารเพื่อเสริมสร้างสุขภาพ สร้างภูมิคุ้มกันโรค ช่วยให้ระบบขับถ่ายเป็นปรกติและป้องกันการเกิดโรคโลหิตจางในผู้ที่รับประทานอาหารมังสวิรัติ สาหร่าย *Spirulina platensis* เป็นสายพันธุ์ที่มีความเหมาะสมในการนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อนำมาเป็นอาหารเสริมของมนุษย์ เนื่องจากมีลักษณะเซลล์ขนาดใหญ่เก็บเกี่ยวได้ง่าย มีคุณค่าทางโภชนาการสูง ทั้ง

ทางด้านปริมาณโปรตีนซึ่งมีถึง 50 – 70 % ของน้ำหนักแห้ง ประกอบด้วยกรดอะมิโนครบถ้วน นอกจากนั้นยังมีกรดไขมัน เช่น gamma-linolenic acid (GLA) ที่มีคุณภาพสูง รวมทั้งมีวิตามินและเกลือแร่หลายชนิด ทำให้ได้รับความสนใจทางการแพทย์และอุตสาหกรรม สารที่สำคัญอีกชนิดคือรงควัตถุกลุ่มไฟโคบิลิโปรตีน (Phycobiliprotein) โดยเฉพาะรงควัตถุไฟโคไซยานิน (phycocyanin) และอัลโลไฟโคโซยานิน (allophycocyanin) สามารถนำมาใช้เป็นสารติดตามในงานด้าน immuno assays microscopy เนื่องจากมีคุณสมบัติในการเรืองแสง (Venkataraman,1983) สาเหตุอีกประการหนึ่งที่ทำให้สาหร่าย *Spirulina* มีความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นอาหารเสริมคือ ผนังเซลล์ของสาหร่าย *Spirulina* ไม่มีเซลล์ลูโลสแต่ประกอบด้วยมิวโคโพลีแซคคาไรด์ (solf mucopolysaccharide) ทำให้สามารถย่อยได้ง่าย โดยสามารถถูกย่อยได้ประมาณ 85 - 95 % (รัตนาและคณะ, 2550 อ้างถึง Henrikson, 1997) นอกจากเป็นอาหารเสริมของคนแล้ว ยังใช้สาหร่ายชนิดนี้เป็นอาหารเสริมในสัตว์เศรษฐกิจหลายชนิด เช่น กุ้ง และ ปลา และมีสารออกฤทธิ์ที่ใช้เป็นตัวยารักษาโรคบางชนิดได้ (ยุวดี, 2546) สาหร่าย *Spirulina* จัดได้ว่าเป็นจุลินทรีย์เศรษฐกิจ มีการผลิตในอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวาง จึงจำเป็นต้องมีการเก็บรักษาสายพันธุ์ให้มีชีวิตอยู่ในระยะเวลานาน ทั้งนี้เพื่อให้คงคุณสมบัติทางด้านพันธุกรรม การปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ และการติดฉลากเชื้อผิดพลาดเนื่องจากการถ่ายเชื้อบ่อยๆ อีกทั้งเป็นการประหยัดแรงงานในการเปลี่ยนถ่ายอาหาร และให้คงสายพันธุ์สาหร่ายที่มีคุณภาพดีสำหรับการเพาะเลี้ยงต่อไป

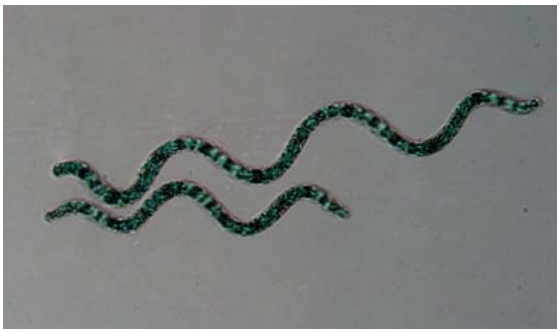
การเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่ายมีหลายวิธีเช่น การเก็บแบบแห้งเยือกแข็ง (freeze drying) ซึ่งเป็นการดึงน้ำออกจากเซลล์สาหร่ายเพื่อลดการทำงานภายในเซลล์ แต่การเก็บแบบแห้งเยือกแข็งไม่ประสบผลสำเร็จมากนักในการเก็บรักษาสาหร่ายกลุ่มไซยาโนแบคทีเรีย (Day *et al*., 2000) ปัจจุบันวิธีการที่นิยมใช้กันมากคือการเก็บแบบแช่เยือกแข็ง (cryopreservation) ซึ่งเป็นการเก็บภายใต้อุณหภูมิต่ำความเย็น 4 °C ถึง -196 °C และการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวซึ่งให้ผลดีกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ แต่การเก็บในไนโตรเจนเหลวจำเป็นต้องมีค่าใช้จ่ายและมีเครื่องมือและสารเคมีที่ต้องใช้ในการลดอุณหภูมิซึ่งมีราคาแพง (สมบูรณ์, 2539)

ในงานวิจัยครั้งนี้จึงทำการศึกษาหาวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่าย *S. platensis* ด้วยวิธีการเก็บแบบแช่เยือกแข็งเพื่อยืดอายุสาหร่ายให้มีชีวิตยาวนาน โดยใช้วัสดุอุปกรณ์ที่มีอยู่แล้วให้คุ้มค่าที่สุด และสามารถใช้เป็นทรัพยากรเชื้อพันธุ์สำหรับนำไปใช้ในการเรียนการสอน และอุตสาหกรรมการผลิตสาหร่าย *Spirulina* ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. การเตรียมเซลล์

นำสาหร่าย *Spirulina platensis* สองสายพันธุ์ คือ *Spirulina platensis* CMU2 (ภาพ 1) จากห้องปฏิบัติการวิจัยสาหร่ายประยุกต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และ *Spirulina platensis* GD1 (ภาพ 2) จากบริษัท GD1 ของบุญสมฟาร์ม อำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่ นำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร Zarrouk (Zarrouk,1966) ปริมาตรอาหาร 800 ml ใช้หัวเชื้อ 10 % บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C ภายใต้ความเข้มแสง Cool – white fluorescent lamp 650 lux เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน วัดความหนาแน่นของสาหร่ายเริ่มต้นโดยวัดค่าความขุ่นของการเพาะเลี้ยง (optical density: OD) โดยเครื่อง Spectrophotometer รุ่น DR 2000 และนับจำนวนฟิลาเมนต์โดยใช้ haemacytometer จากนั้นจึงทำการเก็บรักษาเซลล์ โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของเซลล์ 2 ความเข้มข้น คือ ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 100% และปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่เจือจาง 50%



20 µm

ภาพ 1 ลักษณะของเซลล์สาหร่าย *S. platensis* CMU2 **ภาพ** 2 ลักษณะของเซลล์สาหร่าย *S. platensis* GD1

2. การเตรียมสาร cryoprotectant

เตรียมสาร cryoprotectant ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 10, 20 และ 30% เมื่อนำสาร cryoprotectant ผสมกับเซลล์สาหร่ายในอัตราส่วน 1:1 จะมีความเข้มข้นสุดท้าย เป็น 5, 10 และ 15 % โดยแต่ละสารมีการเตรียมดังนี้

2.1 สารไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นและฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C นาน 15 นาที

2.2 กลีเซอรอล ทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นและกรองด้วยกระดาษกรองแบคทีเรียขนาด 0.45 µm

2.3 ซีรัมม้า (บริษัท Gibco) ทำการเจือจางด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % และกรองด้วยกระดาษกรองแบคทีเรียขนาด 0.45 µm

2.4 ซีรัมวัว (บริษัท Gibco) ทำการเจือจางด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % และกรองด้วยกระดาษกรองแบคทีเรียขนาด 0.45 µm

3. การเก็บรักษาเซลล์สาหร่าย

ผสมสาร cryoprotectant ปริมาตร 0.5 ml กับเซลล์สาหร่าย 0.5 ml *S. platensis* CMU2 (OD เท่ากับ O.692) *S. platensis* GD1 (OD เท่ากับ O.770) และชุดควบคุม (control) ซึ่งใช้อาหาร Zarrouk แทนสาร cryoprotectant แล้วบรรจุสาหร่ายที่เตรียมใน cryo tube (บริษัท Sorenson, Bioscience Inc.) ขนาด 2 ml เก็บเซลล์สาหร่าย *S. platensis* 2 สายพันธุ์ แล้วนำมาลดอุณหภูมิ เป็นขั้นตอนจากอุณหภูมิ 25, 4 และ -20 °C ในตู้แช่แข็ง (บริษัท Sandenintercool รุ่น SCM-27OSBD) ใช้เวลาขั้นตอนละ 30 นาที และเก็บที่อุณหภูมิ -80 °C ในตู้แช่แข็ง (บริษัท SANYO รุ่น MDF-392) จากนั้นทำการศึกษาอัตราการรอดชีวิตของสาหร่ายที่เวลาต่างๆ

4. การทดสอบอัตราการรอดชีวิต

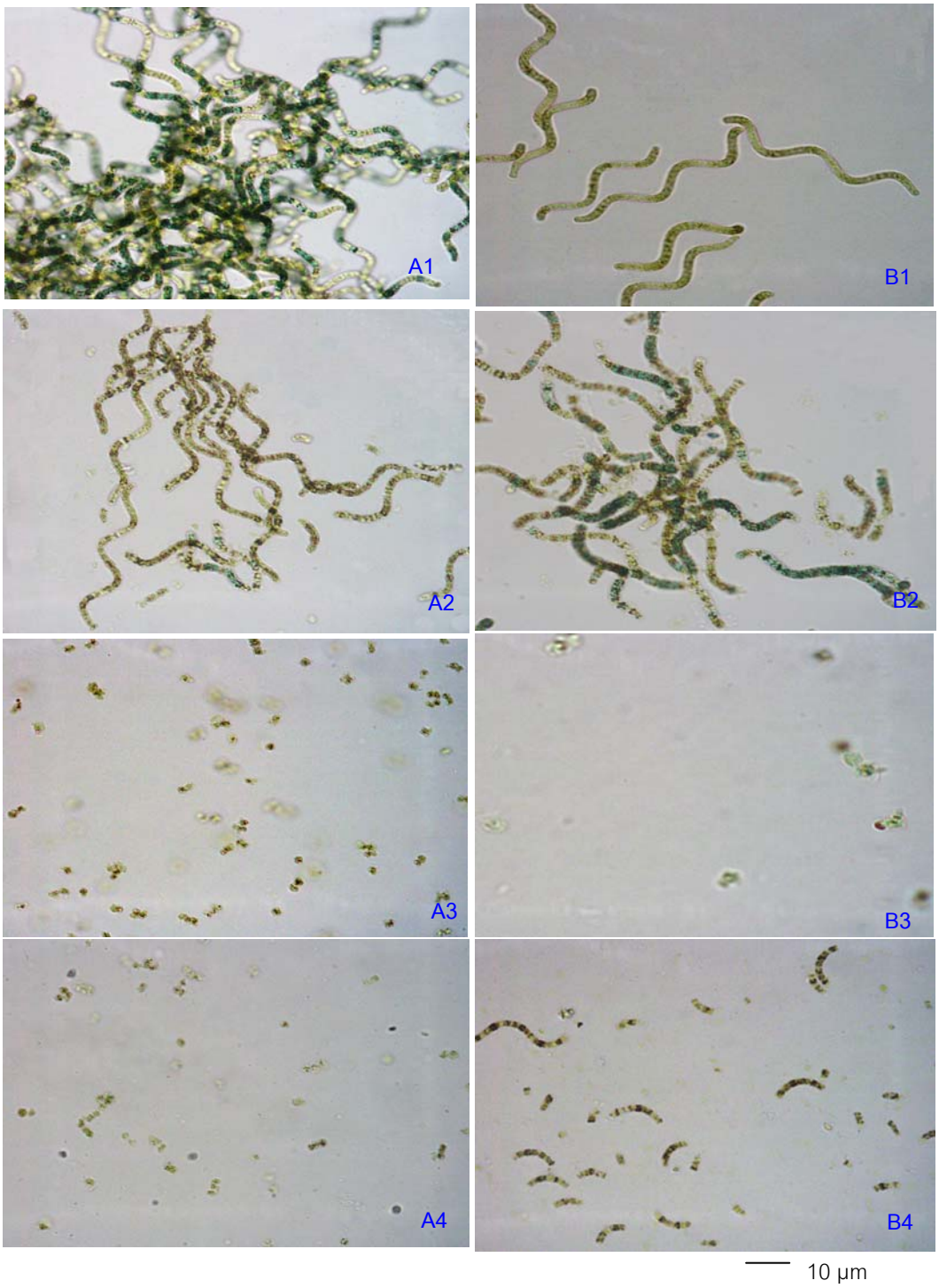
ทำการทดสอบอัตราการรอดชีวิตที่เวลาต่างๆ กันได้แก่ 24 ชั่วโมง 1, 4 และ 12 สัปดาห์ ร่วมกับผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายเซลล์ โดยนำหลอด cryo tube ที่บรรจุเซลล์สาหร่ายที่ผสมกับสาร cryoprotectant ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ มาละลายที่อุณหภูมิที่ 25 °C หรือ 40 °C (ทำการละลายที่ห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 °C และอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิที่ 40°C (บริษัท Julabo Eco Temp รุ่น TW12) ละลายหมดจากนั้นนำเซลล์ไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 10 นาที ทิ้งส่วนใส นำตะกอนเซลล์ไปเพาะเลี้ยงในอาหาร Zarrouk ปริมาตร 5 ml แต่ละชุดการทดลองทำการเพาะเลี้ยงชุดละ 5 ซ้ำ ภายใต้แสง Cool – white fluorescent lamp เป็นเวลา 21 วัน นับจำนวนตัวอย่างที่รอดชีวิต คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต

5. การศึกษาลักษณะเซลล์ของสาหร่าย *S. platensis* ทั้ง 2 สายพันธุ์ หลังจากการเก็บรักษาเซลล์ด้วยวิธีแช่เยือกแข็งระยะเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (บริษัท Olympus รุ่น BX51)

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ทำการวิเคราะห์ปัจจัย 6 ปัจจัย ได้แก่ คุณลักษณะของสายพันธุ์สาหร่าย ความเข้มข้นของเซลล์สาหร่าย ชนิดและความเข้มข้นของสารป้องกันเซลล์ อุณหภูมิที่ใช้ในการละลาย ระยะเวลาการเก็บ จำนวนชุดทดลองละ 5 ซ้ำ ทำการทดสอบความแตกต่างของจำนวนขวดที่รอดชีวิตหลังจากการทดสอบการรอดชีวิตหรือความแตกต่างของปัจจัยต่างๆ เปรียบเทียบตั้งแต่การเก็บเวลา 24 ชั่วโมง ถึงระยะเวลาการเก็บที่ 3 เดือน โดยวิธี Chi-square analysis ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS Version 14.0 for Windows

ผลการทดลอง



ภาพ 3 ลักษณะของเซลล์สาหร่าย *S. platensis* หลังจากทำการละลายและทำการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่เยือกแข็งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง **A1**- *S. platensis* CMU2 เก็บด้วย ไดเมทิลซัลฟอกไซด์, **A2**- *S. platensis* CMU2 เก็บด้วยกลีซอลรอล **A3**- *S. platensis* CMU2 เก็บด้วยซีรัมม้า, **A4**- *S. platensis* CMU2 เก็บด้วยซีรัมวัว, **B1**- *S. platensis* GD1 เก็บด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์, **B2**- *S. platensis* GD1 เก็บด้วยกลีซอรอล ,**B3**- *S. platensis* GD1 เก็บด้วยซีรัมม้า, **B4**- *S. platensis* GD1 เก็บด้วยซีรัมวัว

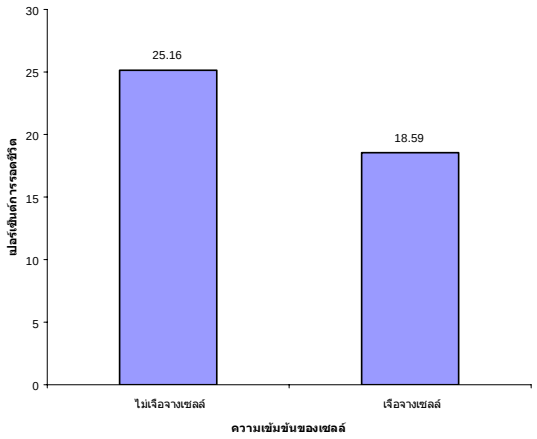
ศึกษาลักษณะของฟิลาเมนต์ *S.platensis* หลังการเก็บแบบแช่เยือกแข็งนาน 24 ชั่วโมง ด้วยสาร cryoprotectant 5% และทำการละลายเซลล์ที่ 25 °C ได้ผลดังภาพ 3 เมื่อใช้ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ พบว่า *S. platensis* CMU2 (A1) ฟิลาเมนต์บางส่วนมีสีเหลืองซีด เซลล์บางส่วนถูกทำลายด้วยความเย็น แต่เซลล์ส่วนมากไม่ผิดปกติ ส่วน *S. platensis* GD1 (B1) พบว่าฟิลาเมนต์ส่วนมากมีสีเหลืองซีด เซลล์บางส่วนถูกทำลายด้วยความเย็น ใช้กลีเซอรอล พบว่า *S. platensis* CMU2 (A2) และ *S. platensis* GD1 (B2) ฟิลาเมนต์บางส่วนมีสีเหลืองซีด เซลล์บางส่วนถูกทำลาย แต่เซลล์ส่วนมากไม่ผิดปกติหรือไม่ถูกทำลายด้วยความเย็นเช่นเดียวกับการใช้ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ การใช้ซีรัมม้า พบว่า *S. platensis* CMU2 (A3) และ *S. platensis* GD1 (B3) ลักษณะของฟิลาเมนต์ถูกทำลายผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยสารมิวโคโปรตีนและเพคตินถูกทำลาย จึงทำให้เป็นลักษณะของฟิลาเมนต์แตกออกเป็นเซลล์เล็กๆ รงควัตถุภายในเซลล์บางส่วนสลายไปพร้อมกับ supernatant การใช้ซีรัมวัว พบว่า *S. platensis* CMU2 (A4) และ *S. platensis* GD1 (B4) ฟิลาเมนต์ถูกทำลายผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยสารมิวโคโปรตีนและเพคตินถูกทำลายจึงทำให้แตกออกเป็นลักษณะของเซลล์เล็กๆ รงควัตถุภายในเซลล์บางส่วนสลายไปพร้อมกับ supernatant แต่พบว่ามีเซลล์เล็กๆ บางส่วนไม่สลายยังคงมีลักษณะเป็นฟิลาเมนต์สายสั้นๆ การตรวจสอบตัวอย่างนี้เก็บไว้ระหว่าง 24 ชั่วโมง ถึง 12 สัปดาห์พบว่าลักษณะของเซลล์ไม่มีความแตกต่างไปจากเวลา 24 ชั่วโมง

ผลการศึกษาปัจจัยการรอดชีวิตของสาหร่าย *S. platensis* หลังการเก็บรักษาด้วยเทคนิคแช่เยือกแข็ง จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ สาหร่าย *S. platensis* CMU2 จำนวนฟิลาเมนต์เริ่มต้นเท่ากับ 2.5×10^{5} (ไม่เจือจาง) และ 1.25×10^{5}(เจือจาง) จำนวนฟิลาเมนต์เริ่มต้นของ *S. platensis* GD1 เท่ากับ 1.3×10^{5} (ไม่เจือจาง) และ 0.65×10^{5} (เจือจาง) ในการใช้ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ กลีเซอรอล ซีรัมม้า และซีรัมวัว เป็นสาร cryoprotectant พบว่าอัตราการรอดชีวิตของสาหร่ายทั้งสองสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกัน ($p>0.05$) ระดับความเข้มข้นเริ่มต้นของสาหร่าย 2 ระดับ ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตมีความแตกต่างกัน ($p<0.05$) ที่ความเข้มข้นแบบไม่ทำการเจือจางเซลล์อัตราการรอดชีวิตสูงกว่าเจือจาง จำนวนที่รอดชีวิตคิดเป็น 25.16% และ 18.59% ตามลำดับ (ภาพ 4) อุณหภูมิการละลายที่ 25 °C และที่ 40 °C ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตที่แตกต่างกัน ($p<0.05$) อุณหภูมิที่ 40 °C อัตราการรอดชีวิตสูงกว่า 25°C คิดเป็น 25.31% และ 18.44% ตามลำดับ (ภาพ 5) ชนิดของสาร cryoprotectant ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตมีความแตกต่างกัน ($p<0.05$) เมื่อเก็บในกลีเซอรอล อัตราการรอดสูงสุดคิดเป็น 15.78% รองลงมาคือไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 14.69% ซีรัมวัว 10.94% ตามลำดับ (ภาพ 6) และพบว่า ความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่ 5 %,10% และ 15% มีอัตราการรอดชีวิตแตกต่างกัน ($p<0.05$) กลีเซอรอลความเข้มข้นที่ 5% มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดคิดเป็น 30.63% (ภาพ 7) พบว่าไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (ภาพ 8) ซีรัมวัว (ภาพ 9) ที่ความเข้มข้น 10% มีอัตราการรอดชีวิตที่เท่ากันคิดเป็น 23.75% ระยะเวลาการเก็บส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตที่แตกต่างกัน ($p<0.05$) ดังแสดงในตาราง 1

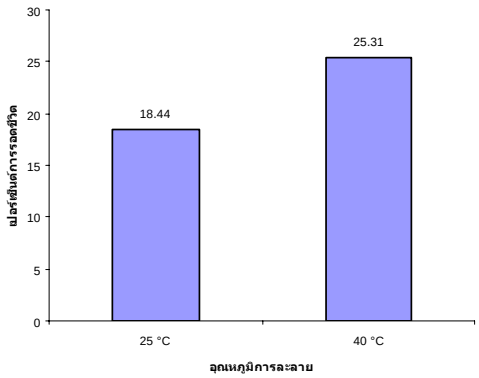
ตาราง 1 การวิเคราะห์ Chi-square ปัจจัยที่มีผลต่อการรอดชีวิตของสาหร่าย *S. platensis* ตามระยะเวลาการเก็บด้วยวิธี Cryopreservation ตั้งแต่ 24 ชั่วโมง ถึงระยะเวลา 12 สัปดาห์

ปัจจัยต่อการรอดชีวิตของสาหร่าย *S. platensis*	จำนวนที่รอดชีวิต (ขวด)				Asymp. sig
	24 ชั่วโมง	1 สัปดาห์	4 สัปดาห์	12 สัปดาห์	
1. คุณลักษณะของสายพันธุ์ 2 สายพันธุ์					0.120
S. platensis CMU2	55	31	29	10	
S. platensis GD1	69	41	24	21	
2. ความเข้มข้นของสาหร่าย 2 ระดับ					0.012*
ไม่ได้ทำการเจือจางเซลล์	59	44	39	19	
ทำการเจือจางเซลล์	65	28	14	12	
3. ชนิดของสาร cryoprotectant 4 ชนิด					0.006*
ไดเมทิลซัลฟอกไซด์	58	20	10	9	
ซีรัมม้า	0	0	0	0	
ซีรัมวัว	28	17	18	9	
กลีเซอรอล	38	35	25	13	
4. ความเข้มข้นของสาร cryoprotectant 3 ระดับ					0.011*
5%	43	27	16	9	
10%	51	26	23	14	
15%	30	19	14	8	
5. การละลายที่ 2 อุณหภูมิ					0.009*
25 °C	56	29	21	12	
40 °C	68	43	32	19	
6. ระยะเวลาการเก็บรักษา	124	72	53	31	0.000*

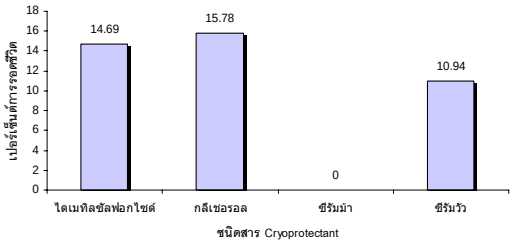
* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



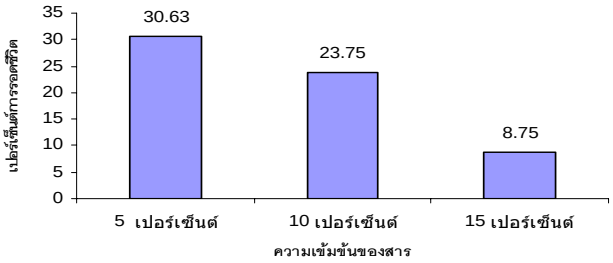
ภาพ 4 การรอดชีวิตเมื่อใช้ความเข้มข้นของ เซลล์ 2 ระดับ หลังทำการเก็บ 12 สัปดาห์



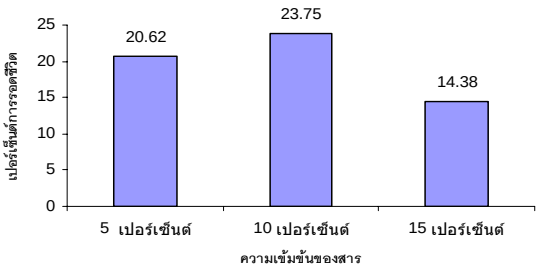
ภาพ 5 การรอดชีวิตหลังทำการละลายด้วยอุณหภูมิ 2 อุณหภูมิ หลังทำการเก็บ 12 สัปดาห์



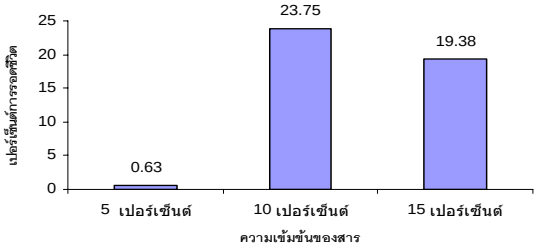
ภาพ 6 การรอดชีวิตเมื่อเก็บด้วยสาร cryoprotectants 4 ชนิด หลังทำการเก็บ 12 สัปดาห์



ภาพ 7 การรอดชีวิตเมื่อใช้กลีเซอรอล ความเข้มข้นต่างๆ หลังทำการเก็บ 12 สัปดาห์



ภาพ 8 การรอดชีวิตเมื่อใช้ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ความเข้มข้นต่างๆ หลังทำการเก็บ 12 สัปดาห์



ภาพ 9 การรอดชีวิตเมื่อใช้ซีรัมวัว ความเข้มข้นต่างๆ หลังทำการเก็บ 12 สัปดาห์

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่ามี 1 ปัจจัยที่ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของสาหร่าย *S. platensis* มีอัตราการรอดชีวิตไม่แตกต่างกัน คือ สายพันธุ์ของสาหร่ายและมี 5 ปัจจัยที่ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตแตกต่างกัน คือ ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น ชนิดของสาร cryoprotectant ความเข้มข้นของสาร cryoprotectant การละลาย และระยะเวลาการเก็บ

ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นพบว่าความเข้มข้นของเซลล์มากกว่าทำให้อัตราการรอดสูงกว่าความเข้มข้นของเซลล์น้อย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Ben-Amotz and Gilbola (1980) ที่รายงานว่าอัตราการรอดชีวิตเกี่ยวข้องกับชนิดและสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเซลล์และอัตราการเจริญเติบโต อีกปัจจัยหนึ่งคือการใช้สาร cryoprotectant แต่ละชนิดมีผลต่อการรอดชีวิตของสาหร่ายที่แตกต่างกันและพบว่าชุดควบคุมที่ไม่เติมสารในการทดลองครั้งนี้ไม่พบอัตราการรอดชีวิตของสาหร่าย โดยทั่วไป cryoprotectant ที่ใช้ในการเก็บรักษาจุลินทรีย์ คือ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ และกลีเซอรอล (Day *et al*., 2000) การวิจัยในครั้งนี้พบว่ากลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 5% สามารถเก็บรักษาสาหร่าย *S. platensis* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือไดเมทิลซัลฟอกไซด์และซีรัมวัวที่ความเข้มข้น 10% ผลการทดลองที่ได้เป็นไปในทางเดียวกันกับ Taylor and Fletcher (1999) ที่พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเก็บรักษาสาหร่ายทั่วไปอยู่ระหว่าง 5-10% ซึ่งสอดคล้องกับ Shore and Radway (2000) ที่ศึกษาความเข้มข้นของ cryoprotectant และระยะเวลาในการแช่สารและเซลล์สาหร่าย นอกจากนี้ Taylor and Fletcher (1999) ยังพบว่ากลีเซอรอลและไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 10% ทำให้สาหร่ายกลุ่มสีเขียวแกมน้ำเงิน *Anabaena* และ *Calothrix* มีอัตราการรอดถึง 82% ในการศึกษาในครั้งนี้ได้นำซีรัมวัวและซีรัมม้ามาใช้ในการเก็บรักษาสาหร่ายด้วยวิธีแช่เยือกแข็งเป็นครั้งแรก โดยศึกษาจากรายงานการวิจัยของ Hubálek *et al.* (2003) ที่มีการรวบรวมชนิดและความถี่ของการใช้สาร protectant ที่ใช้ในการเก็บรักษาจุลินทรีย์ และในการวิจัยครั้งนี้นับว่าประสบผลสำเร็จที่ซีรัมวัวที่ 10% สามารถเก็บรักษาสาหร่าย *S. platensis* และมีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 10.94% แต่ซีรัมม้าไม่สามารถใช้เป็นสาร cryoprotectant ในการเก็บรักษา สาหร่าย *Spirulina* ได้

การละลายเซลล์ก่อนการทดสอบอัตราการรอดชีวิตด้วยการแช่โดยตรงที่อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ พบว่าละลายเซลล์ที่ 40°C มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า 25°C ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Crutchfield *et al.* (1999) ที่พบว่าการละลายเซลล์ที่อุณหภูมิ 25-40°C ส่งผลให้มีอัตราการรอดชีวิตแตกต่างกันและอัตราการละลายที่ 40°C จะส่งผลให้ความเป็นพิษจาก cryoprotectant น้อยลงด้วยเหตุนี้จึงทำให้อัตราการรอดสูงขึ้น

การวิจัยในครั้งนี้พบว่าการใช้เครื่องมือที่มีอยู่อย่างจำกัดทำให้อัตราการลดอุณหภูมิเป็นไปได้ช้า ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของสาหร่ายอยู่ในระดับปานกลาง ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับงานวิจัยของ Cañavate and Lubian (1994) ที่ศึกษาการเก็บรักษาสาหร่ายทะเล *Isochrysis galbana* ด้วยวิธีการแช่เยือกแข็ง ทำการแช่ที่อุณหภูมิ -20 °C พบอัตราการรอดชีวิต 7.3% ในขณะที่แช่ที่ -80 °C ไม่มีอัตราการเจริญเติบโต เช่นเดียวกับ วัชรี (2550) ที่ศึกษาการเก็บรักษาสาหร่าย สกุล *Arthrospira platensis* TISTR 8217 และ *Spirulina* sp. TISTR 8222 และ TISTR 8250 โดยการแช่โดยตรงที่อุณหภูมิ – 85 °C สามารถมีชีวิตรอดได้

แต่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ดีเหมือนกับสาหร่ายสายพันธุ์อื่นที่ผ่านการทดสอบเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 3 เดือน แต่คาดว่าการวิจัยในครั้งนี้จะทำให้เกิดการนำไปประยุกต์ใช้กับการเก็บรักษาพันธุ์สาหร่ายอื่นๆ ต่อไปได้

สรุปได้ว่าการเก็บรักษาสาหร่าย *Spirulina platensis* ทั้งสองสายพันธุ์ เมื่อเวลา 12 สัปดาห์ ด้วยวิธีแช่เยือกแข็งใช้ความเข้มข้นของเซลล์แบบไม่เจือจาง โดยมีกลีเซอรอลความเข้มข้น 5% เป็นสาร cryoprotectant และทำการละลายเซลล์ที่อุณหภูมิ 40 °C สาหร่ายมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสมาชิกห้องปฏิบัติการวิจัยสาหร่ายประยุกต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ คุณชยากร ภูมาศ ที่ให้คำแนะนำด้านต่างๆ รองศาสตราจารย์ ดร. อารยา จาติเสถียร คำแนะนำในการใช้สถิติในการวิเคราะห์ข้อมูล บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้ และ บริษัทกรีนไดมอนด์ จำกัด ที่เอื้อเฟื้อให้สายพันธุ์สาหร่ายมาทำการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

รัตนา ชัยกล้าหาญ ณัฐยาภรณ์ ชิระสุวรรณ และบุษยา บุนนาค. 2550. สาหร่ายสไปรูลินา (อาร์โธรสไปร่า). สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี บางขุนเทียน. กรุงเทพฯ. 51หน้า.

ยุวดี พีรพรพิศาล. 2546. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินา. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่. ครั้งที่ 2. 72 หน้า.

วัชรี กัลยาลัง. 2550. การพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่ายที่ผลิตสารมูลค่าสูงระยะยาว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. ภาควิชาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย-มหาสารคาม. มหาสารคาม.

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์. 2539. เทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ. ครั้งที่ 2. 194 หน้า.

Ben-Amotz, A., and Gilboa, A. 1980. Cryopreservation of marine unicellular algae. Induction of freezing tolerance. Marine Ecology Progress. Series. 2:221-244.

Cañavate, J.P. and Lubian, L.M. 1994. Tolerance of six marine microalgae to the cryoprotectants dimethyl sulfoxide and methanol. Phycology. 30:559-565.

Crutchfield, A.L.M., Diller, K.R. and Brand, J.J. 1999. Cryopreservation of *Chlamydomonas einhardtii* (Chlorophyta) European. Phycology.34: 43-54.

Day, J.G., Fleck, R.A. and Benson, E.E. 2000. Cryopreservation-recalcitrance in microalgae: novel approaches to identify and avoid cryo-injury. Applied Phycology. 12: 369-377.

Hubálek, Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms.Cryobiology. 46:205-229.

Shore, K.A. and Radway, J.A. 2000. Optimizing cryopreservation protocols for the Hawaii Culture Collection. [*Available online*]. https://www.marbec.org/education/project/2000/report_shore. 22 กุมภาพันธ์ 2551.

Taylor, R. and Fletcher, R.L. 1999. Cryopreservation of eukaryotic algae a review of methodologies. Applied Phycology. 10: 481-501.

Venkataraman, L.V. 1983. Bluegreen alga: *Spirulina*. Mysore. Central Food Technological Research Institute. India 120.

Zarrouk, C. 1966. Contributión à l'é tude d'une Cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthése de *Spirulina maxima.* (Setch et Garner) Geitler. Ph. Dr. Thésis, University. Paris, France.