การใช้ทรีฮาโลสเป็นสารรักษาสภาพเซลล์ต่อการเก็บรักษาโรติเฟอร์ (*Brachionus rotundiformis*) ในรูปแบบเข้มข้นที่การเก็บรักษาต่างกัน

Usage of Trehalose as Cryoprotectant Agent on Preservation of Marine Rotifer (*Brachionus rotundiformis*) in Concentrate Form at Different Storage

วุฒิชัย อ่อนเอี่ยม[1] วาสนา อากรรัตน์[1] และประภาพร ดีมาก[2]

Vutthichai Oniam[1], Wasana Arkronrat[1] and Prapapron Deemark[2]

[1]สถานีวิจัยประมงคลองวาฬ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ตำบลคลองวาฬ อำเภอเมือง จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ 77000

[2]กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กองวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง กรุงเทพฯ 10900

[1]Klongwan Fisheries Research Station, Faculty of Fisheries, Kasetsart University,

Klongwan Subdistrict, Muang District, Prachuap Khiri Khan 77000.

[2]Coastal Aquaculture Technology Research Group, Coastal Aquaculture Research and Development Division,

Department of Fisheries, Bangkok 10900.

* Corresponding author, e-mail address: toey.oniam@gmail.com

บทคัดย่อ

ศึกษาการใช้ทรีฮาโลสเป็นสารรักษาสภาพเซลล์ต่อการเก็บรักษาโรติเฟอร์ (*Brachionus rotundiformis*) ในรูปแบบเข้มข้น เพื่อเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรีย และคุณค่าทางโภชนาการระหว่างการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4ºC โดยไม่ใช้ทรีฮาโลส (control) เก็บด้วยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 ºC โดยไม่ใช้ทรีฮาโลส (T1) และใช้ทรีฮาโลสที่ระดับ 0.5% (T2), 1% (T3) และ 2% (T4) โดยปริมาตร (v/v) ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 2-12 สัปดาห์ ผลการศึกษาพบว่า การใช้ทรีฮาโลสที่ระดับ 1% และ 2% โดยปริมาตร สามารถใช้รักษาสภาพเซลล์ของโรติเฟอร์ที่เก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 ºC ได้นานถึง 12 สัปดาห์ และดีกว่าการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 ºC ที่ใช้ทรีฮาโลสที่ระดับ 0.5% ไม่ใช้ทรีฮาโลส และแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 ºC โดยไม่ใช้ทรีฮาโลส ตามลำดับ นอกจากนี้ การใช้ทรีฮาโลสสที่ระดับ 1% และ 2% โดยปริมาตร ไม่มีผลข้างเคียงต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรีย โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน รวมไปถึงปริมาณกรดไขมัน EPA และ DHA ของโรติเฟอร์ระหว่างการเก็บรักษา

คำสำคัญ: โรติเฟอร์ (*Brachionus rotundiformis*) สารรักษาสภาพเซลล์ ทรีฮาโลส

Abstract

Usage of trehalose as cryoprotectant agent on the preservation of marine rotifer *Brachionus rotundiformis*) in concentrated forms was investigated, and compared bacterial cell count and proximate composition between stored by refrigerating (4 ºC) without trehalose (control), biomass-freezing (-20 ºC) without trehalose (T1), with 0.5% (T2), 1% (T3) and 2% (T4) trehalose as cryoprotectant agents (v/v), at 2-12 weeks. The results showed that usage of 1% and 2% trehalose for preservation of rotifer in concentrate forms optimally stored by biomass-freezing at 12 weeks

rather than stored by biomass-freezing with 0.5% trehalose, without trehalose and stored by refrigerating, respectively. In addition, 1% and 2% trehalose as cryoprotectant agent did not affect the bacteria, protein, carbohydrate and lipid contents, including eicosapentaenoic acid (EPA) and decosahexaenoic acid (DHA) contents in rotifer during stored at 2 to 12 weeks.

Keywords: rotifer (*Brachionus rotundiformis*), cryoprotectant agent, trehalose

คำนำ

โรติเฟอร์ (*Brachionus rotundiformis*) เป็นแพลงก์ตอนสัตว์ชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญในการอนุบาลลูกสัตว์น้ำ ซึ่งนักเพาะพันธุ์สัตว์น้ำทั่วโลกนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการเป็นอาหารเริ่มแรกของสัตว์น้ำวัยอ่อน เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูง และเหมาะสมกับการพัฒนาการของลูกสัตว์น้ำ นอกจากนี้ ยังเป็นแพลงก์ตอนสัตว์ที่สามารถแพร่ขยายพันธุ์ได้รวดเร็ว ทำให้สามารถเลี้ยงในปริมาณมากได้ง่ายภายในระยะเวลาอันสั้น (Wongrat, 2000; Dhert *et al*., 2001; Ajah, 2010) อย่างไรก็ตาม การผลิตโรติเฟอร์ปริมาณมากในระดับฟาร์มของเกษตรกรนั้น มีข้อจำกัดอยู่หลายประการทั้งในด้านปริมาณ และคุณภาพ รวมทั้งมีต้นทุนการผลิตที่สูง โดยเฉพาะในช่วงที่สภาพภูมิอากาศแปรปรวน เกษตรกรมักประสบปัญหากับการเพาะเลี้ยง โรติเฟอร์ คือ มีการปนเปื้อนสูงเมื่อเลี้ยงปริมาณมากในบ่อกลางแจ้ง ทำให้ไม่สะดวกในการจัดเตรียม และการนำไปใช้ประโยชน์ ก่อให้เกิดปัญหาโรติเฟอร์ไม่เพียงพอต่อการนำมาอนุบาลลูกสัตว์น้ำ จนส่งผลกระทบถึงการพัฒนาการ และอัตรารอดตายของลูกสัตว์น้ำได้ ซึ่งการเก็บเกี่ยว และเก็บรักษาแพลงก์ตอนด้วยการแช่เย็น (อุณหภูมิ 3 ถึง 4 °C) หรือการแช่แข็ง (อุณหภูมิ -18 ถึง -20 °C) ไว้ใช้ในช่วงที่ขาดแคลนก็เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการแก้ไขปัญหาดังกล่าว (Wongrat, 2000)

สารรักษาสภาพเซลล์หรือที่เรียกว่า antifreeze agent หรือ preservative agent หรือ cryoprotectant agent เป็นสารเคมีที่ป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อเสียหายในระหว่างการแช่แข็ง และการทำให้ละลายเนื่องจากการแข็งตัวของน้ำภายใน และนอกเซลล์ ซึ่งในขบวนการเก็บรักษาด้วยการแช่แข็งนั้น เยื่อหุ้มเซลล์เป็นส่วนที่ได้รับความเสียหายมากที่สุดโดยการแตกและฉีกขาด ดังนั้น การเติมสารรักษาสภาพเซลล์ก่อนนำไป แช่แข็งหรือเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นธรรมดาก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถรักษาคุณภาพของเซลล์แพลงก์ตอนได้ แต่ถึงอย่างไรก็ตามต้องคำนึงถึงผลข้างเคียงของสารที่ใช้เก็บรักษาแพลงก์ตอนด้วย เนื่องจากสารแต่ละชนิดมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน ซึ่งสารรักษาสภาพเซลล์บางชนิดอาจทำให้องค์ประกอบของโปรตีนเปลี่ยนโครงสร้างไป บางชนิดเป็นสารละลายเข้มข้นที่ช่วยให้แบคทีเรียเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว หรือบางชนิดมีคุณสมบัติทำให้เซลล์แพลงก์ตอนรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อนยากกับการนำมาใช้ประโยชน์ เป็นต้น (Linhart *et al*., 1993; Conlon *et al*., 1998; Wongrat, 2000; Brand and Diller, 2004)

ทรีฮาโลส ($C_{12}H_{22}O_{11}$) เป็นสารรักษาสภาพเซลล์ชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติเป็น non-reducing sugar มีความเสถียรสูง เฉื่อยต่อการทำปฏิกิริยากับสารอื่น ไม่เป็นพิษกับสิ่งมีชีวิตและมีราคาถูก โดยมีการนำมาประยุกต์ใช้ในการเตรียมเวชภัณฑ์ เครื่องสำอาง รวมไปถึงอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งนิยมใช้เป็นสารรักษาสภาพ

เซลล์ของโปรตีน และเยื่อหุ้มเซลล์จากการแช่เย็น การแช่แข็งและการละลาย (Conlon *et al*., 1998; Khalili *et al*., 2009) ด้วยคุณสมบัติดังกล่าว การนำทรีฮาโลสมาประยุกต์ใช้ในเก็บรักษาแพลงก์ตอนจึงเป็นประเด็นที่ควรศึกษาวิจัย ด้วยเหตุนี้ การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้น และระยะเวลาที่เหมาะสมของการใช้ทรีฮาโลสเป็นสารรักษาสภาพเซลล์ต่อการเก็บรักษาโรติเฟอร์ ทั้งนี้ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเก็บรักษาโรติเฟอร์สำหรับอนุบาลลูกสัตว์น้ำในยามที่ขาดแคลน ซึ่งน่าจะช่วยแก้ไขปัญหาการเพาะเลี้ยงโรติเฟอร์ของเกษตรกรได้

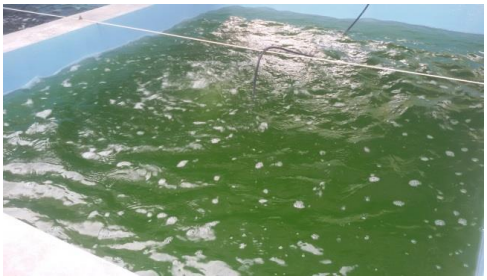
อุปกรณ์และวิธีการ

การวางแผนการวิจัย

ศึกษาการใช้ทรีฮาโลสเป็นสารรักษาสภาพเซลล์ต่อการเก็บรักษาโรติเฟอร์ในรูปแบบเข้มข้น (น้ำหนักเปียก) ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 สัปดาห์ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 5 ชุดการทดลอง ๆ ละ 3 ซ้ำ ดังนี้ ชุดการทดลองที่ 1 เก็บรักษาที่ความเย็น 4 ºC (Refrigerating) (control) ชุดการทดลองที่ 2 เก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 ºC (Biomass-freezing) (T1) ชุดการทดลองที่ 3 เก็บรักษาโดยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยทรีฮาโลสเข้มข้น 0.5% โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่ความเย็น -20 ºC (T2) ชุดการทดลองที่ 4 เก็บรักษาโดยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยทรีฮาโลสเข้มข้น 1% โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่ความเย็น -20 ºC (T3) และชุดการทดลองที่ 5 เก็บรักษาโดยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยทรีฮาโลสเข้มข้น 2% โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่ความเย็น -20 ºC (T4)

การเลี้ยง และเก็บเกี่ยวโรติเฟอร์

เพาะขยายแพลงก์ตอนพืชสกุลคลอเรลลา (*Chlorella* spp.) แบบปริมาณมาก (mass culture) โดยเริ่มจากถังพลาสติกขนาด 200 ลิตร ที่อัตราส่วนหัวเชื้อ : น้ำขยาย เท่ากับ 1:25 น้ำความเค็ม 15 ppt ใช้ปุ๋ยสำหรับการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนพืชกลุ่มสีเขียวน้ำเค็ม (Wongrat, 2000) เพาะขยายเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำคลอเรลลามาเพาะขยายต่อภายในบ่อคอนกรีตขนาด 1.5×2.0×1.2 เมตร ที่ปริมาตรน้ำ 3,000 ลิตร นานประมาณ 3 วัน หรือที่ความหนาแน่นเซลล์ของคลอเรลลาประมาณ 1×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร จึงใส่หัวเชื้อโรติเฟอร์ลงไปในบ่อ เลี้ยงโรติเฟอร์นาน 3 วัน จึงเก็บเกี่ยวผลผลิตโรติเฟอร์ในรูปแบบเข้มข้น จากนั้นแบ่งรักษาโรติเฟอร์เก็บไว้ภายในถุงซิปที่ปริมาตรถุงละ 50 กรัม (น้ำหนักเปียก) เพื่อนำไปศึกษาต่อไป (Figure 1)



(a)

(b)

(c)

(d)

(e)

(f)

Figure 1 Process of marine rotifer (*Brachionus rotundiformis*) production in concentrate form: (a) rotifer reared in 3,000 L concrete tanks, (b) characteristics of water in rotifer tank before harvest, (c) rotifer harvesting (about 3-4 days after cultured), (d) post-harvest, and (e-f) product of rotifer in concentrate forms.

การตรวจสอบคุณภาพของโรติเฟอร์

ตรวจสอบคุณภาพของโรติเฟอร์ระหว่างการเก็บรักษาของในแต่ละชุดการทดลองด้วยการ (I) ตรวจสภาพเซลล์ (II) การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรีย และ (III) การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ

(I) การตรวจสภาพเซลล์ โดยใช้หลักการประเมินสภาพเซลล์ (Cell Condition Index) ซึ่งแบ่งเป็น 5 ระดับ ตามวิธีของ Heasman *et al*. (2001) ดังนี้

ระดับที่ 1 หมายถึง แย่มาก สภาพเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง (เซลล์แตก) > 75%

ระดับที่ 2 หมายถึง ไม่ดี สภาพเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง (เซลล์แตก) > 50%

ระดับที่ 3 หมายถึง น่าพอใจ สภาพเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง (เซลล์แตก) < 50%

ระดับที่ 4 หมายถึง ดี สภาพเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง (เซลล์แตก) < 10%

ระดับที่ 5 หมายถึง ดีมาก สภาพเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

(II) การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรีย โดยหาปริมาณแบคทีเรียโดยใช้อาหาร TSA (Tryptic Soy Agar) นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ บันทึกผล หาค่าเฉลี่ย แล้วคำนวณเป็นจำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง (CFU/ml) ดังสมการ

$$b = c \times 10 \times 10^{f} \qquad (1)$$

เมื่อ b = ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (CFU/ml)

c = จำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ (CFU)

f = จำนวนเท่าของความเจือจางที่นับจำนวนได้

(III) การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ โดยวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (proximate composition) ได้แก่ โปรตีนด้วยวิธี Kjeldal method, คาร์โบไฮเดรตด้วยวิธี Nitrogen free extract (NFE) และไขมันด้วยวิธี Ether Extract รวมทั้งกรดไขมันชนิดที่ไม่อิ่มตัวสูง (Polyunsaturated fatty acid ; PUFA) ได้แก่ eicosapentaenoid acid (20:5n3; EPA) และ decosahexaenoic acid (22:6n3; DHA) ด้วยวิธี Gas chromatography ตามหลักการของ Association of Official Analytical Chemists methods (Helrich, 1990)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเพื่อหาความแตกต่างของข้อมูลคุณภาพโรติเฟอร์ที่ได้ในแต่ละชุดการทดลองด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมัน 95% โดยวิเคราะห์ และประมวลผลด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistic for Windows (Version 21.0; IBM Corp., Armonk, NY. USA)

ผลการวิจัย

การเพาะเลี้ยงโรติเฟอร์ในบ่อคอนกรีตขนาด 1.5×2.0×1.2 เมตร โดยให้แพลงก์ตอนพืชสกุลคลอเรลลาเป็นอาหาร ที่ปริมาตรน้ำ 3,000 ลิตร พบว่า ที่ปริมาณความหนาแน่นของโรติเฟอร์เริ่มต้นเฉลี่ย 20.1±6.5 ตัว/มิลลิลิตร โรติเฟอร์จะเพิ่มจำนวนสูงสุดที่ระยะเวลาการเลี้ยงเฉลี่ย 3.0±1.2 วัน โดยมีปริมาณความหนาแน่นเฉลี่ยเท่ากับ 113.7±26.4 ตัว/มิลลิลิตร และได้ผลผลิตโรติเฟอร์ในรูปแบบเข้มข้นเฉลี่ย 348.3±25.6 กรัม/บ่อ ซึ่งจากการใช้หลักการประเมินสภาพเซลล์ (cell condition index) พบว่า หลังการเก็บเกี่ยวสภาพเซลล์ของโรติเฟอร์อยู่ในระดับดีมาก (ระดับ 5) คือ สภาพเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง และหลังการเก็บเกี่ยวที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 2-12 สัปดาห์ ของการเก็บรักษาที่ความเย็น 4 ºC (control) การเก็บรักษาโดยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยทรีฮาโลสเข้มข้น 1% โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่ความเย็น -20 ºC (T3) และการเก็บรักษาโดยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยทรีฮาโลสเข้มข้น 2% โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่ความเย็น -20 ºC (T4) สภาพเซลล์ของโรติเฟอร์อยู่ในระดับดี (ระดับ 4) คือ สภาพเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง หรือเซลล์แตก < 10% ส่วนการเก็บรักษาโดยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยทรีฮาโลสเข้มข้น 0.5% โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่ความเย็น -20 ºC (T2) พบว่า สภาพเซลล์ของโรติเฟอร์อยู่ในระดับน่าพอใจ (ระดับ 3) คือ สภาพเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง หรือเซลล์แตก < 50% แต่สำหรับการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 ºC (T1) พบว่า สภาพเซลล์ของโรติเฟอร์อยู่ในระดับไม่ดี (ระดับ 2) ถึงแย่มาก (ระดับ 1) คือ สภาพเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง หรือเซลล์แตก > 50% และ >75% เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น ตามลำดับ (Table 1)

Table 1 Cell condition index data of rotifer preservation in concentrated forms at different stored.

Storage time	Cell condition index value				
	Control	T1	T2	T3	T4
Week 0	5	5	5	5	5
Week 2	5	2	3	4	4
Week 4	4	2	3	4	4
Week 6	4	1	3	4	4
Week 8	4	1	3	4	4
Week 10	4	1	3	4	4
Week 12	4	1	3	4	4

Note: Control = stored at 4 ºC (Refrigerating) without trehalose, T1 = stored at -20 ºC (Biomass-freezing) without trehalose, T2 = stored at -20 ºC with 0.5% trehalose (v/v), T3 = stored at -20 ºC with 1% trehalose (v/v), and T4 = stored at -20 ºC with 2% trehalose (v/v). Cell condition scoring criteria, 1 = very high proportion of cell wall breakdown (>75%), 2 = high proportion of cell wall breakdown (>50%), 3 = moderate cell wall damage (<50%), 4 = minor cell wall breakdown (<10%) and 5 = perfect-normal.

การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเมื่อเทียบระหว่างโรติเฟอร์ก่อนการเก็บเกี่ยวและหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิตแบบเข้มข้น พบว่า ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดก่อนการเก็บเกี่ยว ($9.5\pm1.6\times10^5$ CFU/ml) และหลังการเก็บเกี่ยว ($9.2\pm3.2\times10^5$ CFU/ml) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$, ANOVA) และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่พบในโรติเฟอร์ที่วิธีการเก็บรักษาต่างกัน พบว่า ชุดควบคุมจะพบปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดมากกว่าชุดการทดลอง T1, T2, T3 และ T4 ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 สัปดาห์ ($P<0.05$, ANOVA) ส่วนผลการเก็บรักษาโรติเฟอร์ตามชุดการทดลองที่ T1, T2, T3 และ T4 ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 2, 4, 6, 8 และ 12 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่พบไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$, ANOVA) (Table 2)

ส่วนการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของโรติเฟอร์ก่อนการเก็บเกี่ยวและหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิตแบบเข้มข้น พบว่า ค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรตีน (36.3±3.7%) คาร์โบไฮเดรต (11.0±1.1%) และไขมัน (17.4±2.7%) รวมไปถึงกรดไขมัน EPA (1.5±0.5 มิลลิกรัม/กรัม) และ DHA (0.6±0.2 มิลลิกรัม/กรัม) ของโรติเฟอร์ก่อนการเก็บเกี่ยวและหลังการเก็บเกี่ยว (36.0±1.6%, 12.0±1.9%, 17.0±1.6%, 1.4±0.2 มิลลิกรัม/กรัม และ 0.5±0.1 มิลลิกรัม/กรัม ตามลำดับ) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$, ANOVA) และเมื่อเปรียบเทียบคุณค่าทางโภชนาการของโรติเฟอร์ที่วิธีการเก็บรักษาต่างกัน พบว่า ปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน รวมไปถึงกรดไขมัน EPA และ DHA ของโรติเฟอร์ในแต่ละชุดการทดลองที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 2 -12 สัปดาห์ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$, ANOVA) (Table 3-7)

Table 2 Comparison of total bacterial cell count in rotifer (concentrate form) with and without trehalose as cryoprotectant agent at different storage times.

Treatments	Total bacteria content ($\times10^5$ CFU/ml)						
	Week 0	Week 2	Week 4	Week 6	Week 8	Week 10	Week 12
Control	9.2 ± 3.2^{a}	8.5 ± 1.3^{a}	11.6 ± 2.9^{a}	8.7 ± 2.8^{a}	12.4 ± 6.5^{a}	9.4 ± 2.9^{a}	13.1 ± 7.1^{a}
T1	9.2 ± 3.2^{a}	3.2 ± 3.1^{b}	1.56 ± 0.5^{b}	3.3 ± 0.6^{b}	2.7 ± 2.6^{b}	3.0 ± 1.9^{bc}	3.3 ± 2.3^{b}
T2	9.2 ± 3.2^{a}	2.4 ± 0.5^{b}	2.4 ± 0.6^{b}	3.1 ± 1.5^{b}	2.4 ± 1.3^{b}	2.3 ± 0.3^{bc}	4.2 ± 2.3^{b}
T3	9.2 ± 3.2^{a}	2.4 ± 1.5^{b}	1.7 ± 0.6^{b}	2.0 ± 1.7^{b}	2.1 ± 0.7^{b}	0.2 ± 0.3^{c}	2.0 ± 0.4^{b}
T4	9.2 ± 3.2^{a}	4.1 ± 0.6^{b}	2.6 ± 0.5^{b}	1.7 ± 1.1^{b}	1.7 ± 1.5^{b}	5.8 ± 3.6^{ab}	4.2 ± 2.8^{b}

Note: Means within the same column with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

Table 3 Comparison of protein content in rotifer (concentrate form) with and without trehalose as cryoprotectant agent at different storage times.

Treatments	Protein content (% dry weight)						
	Week 0	Week 2	Week 4	Week 6	Week 8	Week 10	Week 12
Control	36.0±1.6 [a]	37.2±3.3 [a]	38.0±1.5 [a]	38.1±3.6 [a]	32.0±3.8 [a]	34.4±0.3 [a]	34.4±1.6 [a]
T1	36.0±1.6 [a]	36.3±3.2 [a]	32.6±4.0 [a]	34.8±3.9 [a]	33.5±2.1 [a]	34.8±1.3 [a]	33.2±2.9 [a]
T2	36.0±1.6 [a]	36.7±3.1 [a]	34.4±3.2 [a]	34.5±1.8 [a]	31.2±3.8 [a]	32.0±2.0 [a]	33.2±2.0 [a]
T3	36.0±1.6 [a]	32.9±3.8 [a]	37.3±3.7 [a]	35.2±2.4 [a]	34.1±1.3 [a]	34.3±1.8 [a]	31.6±4.5 [a]
T4	36.0±1.6 [a]	34.3±3.6 [a]	36.5±3.7 [a]	34.4±4.2 [a]	33.4±3.0 [a]	34.4±2.0 [a]	34.5±0.8 [a]

Note: Means within the same column with same superscripts are not significantly different (P>0.05).

Table 4 Comparison of carbohydrate content in rotifer (concentrate form) with and without trehalose as cryoprotectant agent at different storage times.

Treatments	Carbohydrate content (% dry weight)						
	Week 0	Week 2	Week 4	Week 6	Week 8	Week 10	Week 12
Control	12.0±1.9 [a]	12.0±1.8 [a]	12.3±1.7 [a]	11.7±0.8 [a]	11.6±1.2 [a]	11.5±0.4 [a]	11.6±1.4 [a]
T1	12.0±1.9 [a]	12.1±0.4 [a]	11.7±0.7 [a]	11.2±0.8 [a]	11.8±0.5 [a]	11.2±0.4 [a]	11.2±0.6 [a]
T2	12.0±1.9 [a]	12.3±1.7 [a]	11.8±1.4 [a]	11.9±1.9 [a]	11.6±1.1 [a]	12.2±1.8 [a]	12.1±1.0 [a]
T3	12.0±1.9 [a]	11.3±1.4 [a]	11.0±1.7 [a]	11.6±1.6 [a]	11.7±1.5 [a]	11.6±1.6 [a]	11.5±2.0 [a]
T4	12.0±1.9 [a]	12.0±2.1 [a]	11.6±2.0 [a]	11.4±1.8 [a]	11.6±1.5 [a]	11.7±1.9 [a]	11.7±2.1 [a]

Note: Means within the same column with same superscripts are not significantly different (P>0.05).

Table 5 Comparison of lipid content in rotifer (concentrate form) with and without trehalose as cryoprotectant agent at different storage times.

Treatments	Lipid content (% dry weight)						
	Week 0	Week 2	Week 4	Week 6	Week 8	Week 10	Week 12
Control	17.0±1.6 [a]	14.7±2.4 [a]	14.5±1.7 [a]	14.1±2.4 [a]	14.4±1.3 [a]	13.0±2.2 [a]	13.1±2.5 [a]
T1	17.0±1.6 [a]	16.5±0.7 [a]	15.5±0.3 [a]	14.8±0.4 [a]	14.8±1.5 [a]	13.9±1.1 [a]	13.4±0.5 [a]
T2	17.0±1.6 [a]	16.4±1.2 [a]	15.7±1.6 [a]	14.0±1.6 [a]	13.0±2.2 [a]	12.6±2.8 [a]	11.9±2.3 [a]
T3	17.0±1.6 [a]	15.0±2.4 [a]	15.8±1.9 [a]	14.3±0.9 [a]	13.8±0.8 [a]	13.0±0.7 [a]	13.2±0.4 [a]
T4	17.0±1.6 [a]	15.1±1.0 [a]	14.7±1.7 [a]	13.8±1.1 [a]	13.0±1.0 [a]	13.1±0.5 [a]	12.4±0.6 [a]

Note: Means within the same column with same superscripts are not significantly different (P>0.05).

Table 6 Comparison of eicosapentaenoic acid (EPA) content in rotifer (concentrate form) with and without trehalose as cryoprotectant agent at different storage times.

Treatments	Eicosapentaenoic acid content (mg/g)						
	Week 0	Week 2	Week 4	Week 6	Week 8	Week 10	Week 12
Control	1.4±0.2 [a]	1.3±0.1 [a]	1.1±0.2 [a]	1.1±0.1 [a]	0.9±0.1 [a]	0.8±0.2 [a]	0.8±0.2 [a]
T1	1.4±0.2 [a]	1.4±0.5 [a]	1.3±0.1 [a]	1.0±0.1 [a]	0.9±0.2 [a]	0.7±0.1 [a]	0.8±0.1 [a]
T2	1.4±0.2 [a]	1.3±0.2 [a]	1.2±0.3 [a]	0.9±0.2 [a]	0.9±0.1 [a]	0.9±0.2 [a]	0.8±0.1 [a]
T3	1.4±0.2 [a]	1.3±0.3 [a]	1.1±0.1 [a]	0.9±0.1 [a]	0.9±0.0 [a]	0.9±0.0 [a]	0.7±0.0 [a]
T4	1.4±0.2 [a]	1.3±0.1 [a]	1.1±0.1 [a]	1.0±0.0 [a]	1.0±0.1 [a]	0.9±0.1 [a]	0.9±0.0 [a]

Note: Means within the same column with same superscripts are not significantly different (P>0.05).

Table 7 Comparison of decosahexaenoic acid (DHA) content in rotifer (concentrate form) with and without trehalose as cryoprotectant agent at different storage times.

Treatments	Decosahexaenoic acid content (mg/g)						
	Week 0	Week 2	Week 4	Week 6	Week 8	Week 10	Week 12
Control	0.5±0.1 [a]	0.4±0.1 [a]	0.1±0.1 [a]	0.1±0.1 [a]	0.1±0.1 [a]	0.0±0.0 [a]	0.0±0.0 [a]
T1	0.5±0.1 [a]	0.4±0.3 [a]	0.3±0.1 [a]	0.2±0.2 [a]	0.0±0.1 [a]	0.0±0.0 [a]	0.1±0.1 [a]
T2	0.5±0.1 [a]	0.4±0.1 [a]	0.1±0.0 [a]	0.1±0.1 [a]	0.1±0.1 [a]	0.0±0.0 [a]	0.0±0.0 [a]
T3	0.5±0.1 [a]	0.3±0.0 [a]	0.3±0.1 [a]	0.1±0.1 [a]	0.1±0.1 [a]	0.1±0.1 [a]	0.0±0.0 [a]
T4	0.5±0.1 [a]	0.3±0.2 [a]	0.3±0.1 [a]	0.2±0.1 [a]	0.1±0.1 [a]	0.0±0.1 [a]	0.1±0.0 [a]

Note: Means within the same column with same superscripts are not significantly different (P>0.05).

นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างคุณค่าทางโภชนาการของโรติเฟอร์ในแต่ละช่วงเวลา (สัปดาห์) พบว่า ที่ระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น ปริมาณไขมัน กรดไขมัน EPA และ DHA ของโรติเฟอร์จะมีปริมาณลดลง หรือน้อยกว่าช่วงแรกของการเก็บรักษา (ช่วง 2 สัปดาห์แรก) อย่างเห็นได้ชัด โดยเฉพาะที่ระยะเวลาการเก็บรักษาประมาณ 4-6 สัปดาห์ขึ้นไป (P<0.05, ANOVA) ส่วนปริมาณโปรตีน และคาร์โบไฮเดรตที่ระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับช่วงแรกของการเก็บรักษา (P>0.05, ANOVA) (Figure 2)

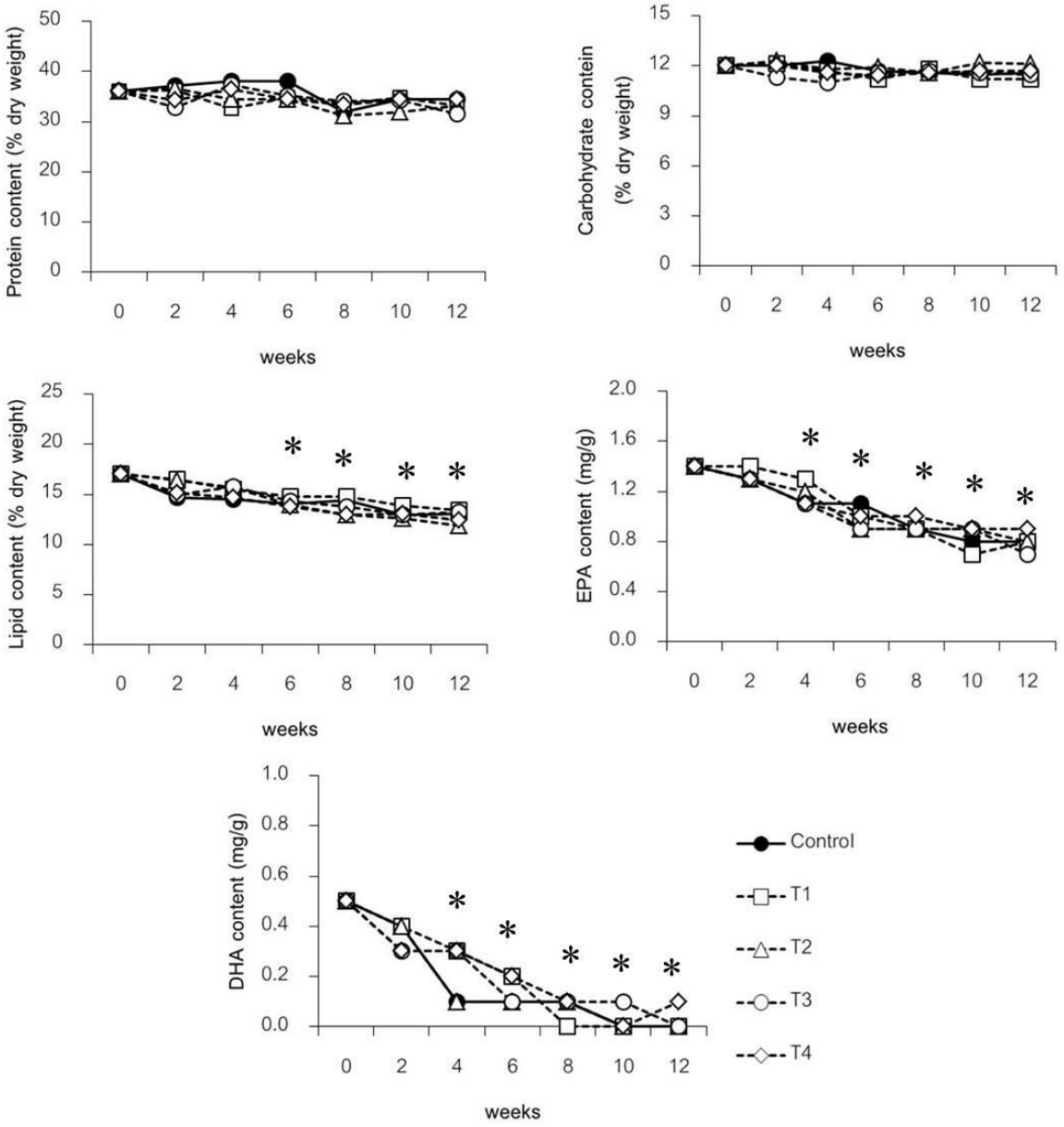


Figure 2 Changes of protein, carbohydrate, lipid, EPA and DHA contents in rotifer (concentrate form) at during storage time. An asterisk denotes statistical significance, *P*<0.05.

วิจารณ์ผล

จากผลการศึกษาการเก็บรักษาโรติเฟอร์ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 2-12 สัปดาห์ พบว่า การเก็บรักษาโดยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยทรีฮาโลสเข้มข้น 1-2% โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่ความเย็น -20 ºC สภาพเซลล์ของโรติเฟอร์อยู่ในระดับดี คือ สภาพเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง หรือเซลล์แตก < 10% ส่วนการเก็บรักษาโดยการเติมทรีฮาโลสเข้มข้น 0.5% โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่ความเย็น -20 ºC พบว่า สภาพเซลล์ของโรติเฟอร์อยู่ในระดับน่าพอใจ คือ สภาพเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง หรือเซลล์แตก < 50% ส่วนการเก็บรักษาด้วย

วิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 ºC โดยไม่เติมสารรักษาสภาพเซลล์ พบว่า สภาพเซลล์ของโรติเฟอร์อยู่ในระดับไม่ดี ถึงแย่มาก คือ สภาพเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง หรือเซลล์แตก > 50% และ >75% เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น ตามลำดับ ดังนั้น การใช้ทรีฮาโลสที่ระดับ 1-2% โดยปริมาตรสามารถใช้รักษาสภาพเซลล์ของโรติเฟอร์ที่เก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งได้นานถึง 12 สัปดาห์ (เซลล์มีการเปลี่ยนแปลง หรือเซลล์แตก < 10%) และดีกว่าการใช้ทรีฮาโลสที่ระดับ 0.5% (เซลล์แตกมากกว่า 10%) ซึ่งการใช้ทรีฮาโลสที่ระดับ 0.5-2% โดยปริมาตร ไม่ส่งผลกระทบ หรือผลข้างเคียงต่อปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน กรดไขมัน EPA และ DHA ของโรติเฟอร์ที่เก็บรักษา แต่ถึงอย่างไรก็ตาม จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า ปริมาณไขมัน กรดไขมัน EPA และ DHA ของโรติเฟอร์มีแนวโน้มลดลงจากช่วงแรกของการเก็บรักษาอย่างเห็นได้ชัด โดยเฉพาะที่ระยะเวลาการเก็บรักษาประมาณ 4-6 สัปดาห์เป็นต้นไป ทั้งนี้สันนิฐานได้ว่า การเปลี่ยนแปลงคุณค่าของสารอาหารที่เกิดขึ้นนี้ไม่ได้เกิดจากผลข้างเคียงของการใช้ทรีฮาโลสเป็นสารรักษาสภาพเซลล์ เนื่องจากว่าปริมาณไขมัน กรดไขมัน EPA และ DHA ในชุดการทดลองที่ไม่ได้เติมทรีฮาโลส (ชุดควบคุม) ก็ลดลงเช่นกัน แสดงให้เห็นว่า อาจเกิดจากการสูญเสียคุณค่าของสารอาหารในระหว่างการเก็บที่มาจากปัจจัยอื่น เช่น ออกซิเจน ความชื้น และระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บ เป็นต้น (Ward and Baj, 1988; Jiang, 2000) นอกจากนี้ การเก็บรักษาโรติเฟอร์ด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20ºC โดยการใช้ทรีฮาโลสเป็นสารรักษาสภาพเซลล์ที่ระดับ 0.5-2% สามารถควบคุมปริมาณแบคทีเรียไม่ให้มีการเปลี่ยนแปลง หรือเพิ่มขึ้นระหว่างการเก็บรักษาได้ดีกว่าการเก็บรักษาที่ความเย็น 4 ºC

โดยทั่วไปแล้วปริมาณการเติมสารรักษาสภาพเซลล์เพื่อใช้ในการเก็บรักษาแพลงก์ตอนจะอยู่ที่ 1-5% โดยปริมาตร แต่ทั้งนี้ปริมาณของสารรักษาสภาพเซลล์ที่ใช้จะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ชนิด หรือองค์ประกอบทางเคมีของสารรักษาสภาพเซลล์ กลไกการออกฤทธิ์ของสารรักษาสภาพเซลล์ และผลข้างเคียงของสารรักษาสภาพเซลล์ต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของแพลงก์ตอน เป็นต้น เนื่องจากสารรักษาสภาพเซลล์แต่ละชนิดมีกลไกการทำงานในการป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ที่แตกต่างกัน (Linhart *et al*., 1993; Conlon *et al*., 1998; Wongrat, 2000; Brand and Diller, 2004 Arkronrat *et al*., 2016) ตัวอย่างเช่น 2% กลูโคสมีประสิทธิภาพในการรักษาสภาพเซลล์ไข่ริ้นน้ำจืด (*Chironomus fuscipes*) น้อยกว่า 1% ทรีฮาโลส เนื่องจากทรีฮาโลสเป็นกลุ่มของสารรักษาสภาพเซลล์ที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ ส่วนกลูโคสเป็นกลุ่มของสารรักษาสภาพเซลล์ที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ โดยสารรักษาสภาพเซลล์ที่ออกฤทธิ์ภายในจำเป็นต้องซึมผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์เพื่อทำหน้าที่ป้องกันอันตรายไม่ให้เกิดขึ้นขณะแช่แข็ง และละลาย ในขณะที่กลุ่มสารรักษาสภาพที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์จะทำหน้าที่ป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ขณะที่อยู่นอกเซลล์ ซึ่งขณะแช่แข็งเยื่อหุ้มเซลล์จะเป็นส่วนที่ได้รับความเสียหายมากที่สุด ด้วยเหตุนี้ การใช้สารรักษาสภาพเซลล์ที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์จึงใช้ในปริมาณที่น้อยกว่า และจะมีประสิทธิภาพในการรักษาสภาพเซลล์สูงกว่า (Thipkonglars, 2010)

ทรีฮาโลสเป็นหนึ่งในสารรักษาสภาพเซลล์ที่นิยมใช้ เนื่องจากเป็นสารรักษาสภาพเซลล์ที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ โดยมีกลไกในการทำหน้าที่ป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ขณะที่อยู่นอกเซลล์ Conlon *et al*. (1998) รายงานไว้ว่า ประสิทธิภาพของสารรักษาสภาพเซลล์แต่ละชนิดขึ้นอยู่กับความสามารถในการป้องกันการเกิดการเปลี่ยนแปลงต่างๆ เช่น การเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ การเปลี่ยนแปลงขนาดของเซลล์ การเกิด

ความสมดุลของเกลือแร่และอิเลคโทรไลท์ และการเสียสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มออร์แกเนลล์ Arkronrat *et al*. (2016) รายงานว่า การใช้ทรีฮาโลสที่ระดับ 0.5-2% โดยปริมาตร สามารถรักษาสภาพเซลล์ของแพลงก์ตอนพืชสกุล *Chlorella* sp. ในรูปแบบเข้มข้นด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 ºC ได้นานถึง 12 สัปดาห์ นอกจากนี้ Chuthong (2009) รายงานว่า ระดับความเข้มข้นของทีฮาโลสที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาไรแดง หนอนแดง และอาร์ทีเมียแช่แข็ง คือ 10%, 15% และ 15% ของปริมาตร ตามลำดับ ซึ่งสามารถเก็บรักษาได้นาน 28 วัน โดยรูปร่างเสียสภาพไม่เกิน 30% แต่ถึงอย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งต่อไป ควรศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการสูญเสียคุณค่าของสารอาหารระหว่างการเก็บรักษาโรติเฟอร์ในรูปแบบเข็มข้นด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 ºC รวมไปถึงศึกษาการนำโรติเฟอร์ที่เก็บรักษาไปใช้ประโยชน์ในการอนุบาลลูกสัตว์น้ำวัยอ่อนต่อไป ทั้งนี้ เพื่อเป็นการต่อยอดองค์ความรู้ และเพื่อนำผลงานวิจัยมาใช้ประโยชน์อย่างเป็นรูปธรรม

สรุปผล

จากหลักการประเมินสภาพเซลล์การใช้ทรีฮาโลสที่ระดับ 1% และ 2% โดยปริมาตร สามารถใช้รักษาสภาพเซลล์ของโรติเฟอร์ที่เก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 ºC ได้นานถึง 12 สัปดาห์ และดีกว่าการใช้ทรีฮาโลสที่ระดับ 0.5% และไม่ใช้ทรีฮาโลส ตามลำดับ นอกจากนี้ การใช้ทรีฮาโลสที่ระดับความเข้มข้น 1% และ 2% โดยปริมาตร ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนของปริมาณแบคทีเรีย รวมไปถึงไม่มีผลข้างเคียงต่อการเปลี่ยนแปลงคุณค่าทางโภชนาการของโรติเฟอร์ที่เก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (สวพ.มก.) ที่สนับสนุนทุนศึกษาวิจัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

เอกสารอ้างอิง

Ajah, P.O. 2010. Mass culture of Rotifer (*Brachionus quadridentatus* [Hermann, 1783]) using three different algal species. African Journal of Food Science 4 (3): 80-85.

Arkronrat, W., Deemark, P., and Oniam, V. 2016. Usage of trehalose as cryoprotecting agent on preservation of marine microalgae (*Chlorella* sp. and *Chaetoceros calcitrans*) in concentrate form. *In* 6th International Fisheries Symposium (IFS 2016). Vietnam, October 30 – November 2, 2016. p. 521.

Brand, J.J., and Diller, K.R. 2004. Application and theory of algal cryopreservation. Nova Hedwigia 79 (1-2): 175-189.

Chuthong, T. 2009. Using of trehalose for increasing efficiency in preservation of frozen natural feed for aquaculture. M.S. Thesis, Kasetsart University, Bangkok. 101 p. [in Thai]

Conlon, J.M., Yano, K., Chartrel, N., Vaudry, H., and Storey, K.B. 1998. Freeze tolerance in the wool frog *Rana sylvatica* is associated with unusual structural features in insulin but not in glucagon. Journal of Molecular Endocrinology 21: 153-159.

Dhert, P., Rombaut, G., Suantika, G., and Sorgeloos, P. 2001. Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. Aquaculture 200: 129-146.

Heasman, M.P., Sushames, T.M., Diemat, J.A., Connor, W.A.O., and Foulkes, L.A. 2001. Production of Micro-algal Concentrates for Aquaculture Part 2: Development and Evaluation of Harvesting, Preservation, Storage and Feeding Technology. NSW Fisheries. New South Wales. 149 p.

Helrich, K. 1990. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Inc. Virgina. 1230 p.

Jiang, S.T. 2000. Enzyme and their effects on seafood texture. In: Seafood Enzyme Utilization and Influence on Post-harvest Seafood Quality, edited by Haard, N.F., and Simpson B.K. Marcel Dekker Inc., New York. pp. 411-450.

Khalili, B., Farshad, A., Zamiri, M.J., Rashidi, A., and Fazeli, P. 2009. Effects of sucrose and trehalose on the freezability of markhoz goat spermatozoa. Asian Australasian Journal of Animal Sciences 22 (12): 1614-1619.

Linhart, O., Billard, R., and Proteau, J.P. 1993. Cryopreservation of European catfish (*Silurus glanis* L.) spermatozoa. Aquaculture 115: 347-359.

Thipkonglars, N. 2010. Developing some techniques for using chironomid larvulae (Diptera: Chironomidae) in Aquaculture. Ph.D. Thesis, Kasetsart University, Bangkok. 234 p. [in Thai]

Ward, D.R., and Baj, N.J. 1988. Factor affecting microbiological quality of seafoods. Food Technol. 42 (3): 85-89.

Wongrat, L. 2000. Manual of Plankton Culture. Kasetsart University, Bangkok. 127 p. [in Thai]