การตกตะกอนและการเก็บรักษาคีโตเซอรอส (*Chaetoceros gracilis*) แบบเข้มข้น

Precipitation and preservation of concentrated Chaetoceros (*Chaetoceros gracilis*)

กุลวดี ว่องวิไลรัตน์[1], วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย[1], สรวิศ เผ่าทองศุข[2] และ บุญรัตน์ ประทุมชาติ[1*]

Kulwadee Wongwilairat[1], Verapong Vuthiphandchai[1], Sorawit Powtongsook[2] and Boonyarath Pratoomchat[1*]

บทคัดย่อ: การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาถึงวิธีการที่เหมาะสมในการตกตะกอนและเก็บรักษาคีโตเซอรอส เพื่อนำมาปรับใช้ต่อการอนุบาลลูกสัตว์น้ำวัยอ่อน โดยนำคีโตเซอรอสมาตกตะกอนด้วยสารไคโตซานโพลิเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง (CPS) ไคโตซานโอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง (COS) และไคโตซานโอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกปู (COC) เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า ประสิทธิภาพการรวมตะกอนของ CPS สูงที่สุด (> 90%) และค่อนข้างคงที่ ที่ความเข้มข้น 40 - 60 มก./ล. รองลงมา คือ COS และ COC ที่ความเข้มข้น 60 มก./ล.ตามลำดับ คีโตเซอรอสที่ตกตะกอนด้วย CPS สามารถฟื้นตัวได้ดี โดยจำนวนเซลล์ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) กับชุดควบคุม ขณะที่คีโตเซอรอสที่ใช้ COS ในการตกตะกอนฟื้นตัวได้ช้ากว่า อย่างไรก็ตาม การใช้ COS ตะกอนคีโตเซอรอสที่ได้ เซลล์มีลักษณะการจับกันเป็นกลุ่มเล็กและไม่หนาแน่น ซึ่งมีความเหมาะสมต่อการอนุบาลลูกกุ้งขาว จึงนำคีโตเซอรอสมาตกตะกอนด้วย COS และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ - 20 ^{O}ซ ร่วมกับ กลีเซอรอล (Gly) เข้มข้น 10%(v/v) เป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็ง พบว่า ภายหลังจากทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 72 ชั่วโมง คีโตเซอรอสที่ผ่านการตกตะกอนด้วย COS ทั้งที่ผสมและไม่ผสม Gly มีอัตรารอดของเซลล์ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ซึ่งมากกว่าการเก็บรักษาเซลล์คีโตเซอรอสสดแบบปกติที่ไม่มีการตกตะกอน วิธีการนี้จึงเป็นการเก็บเกี่ยวเซลล์คีโตเซอรอสให้ได้ในรูปแบบที่เข้มข้น และช่วยในการยืดอายุการเก็บรักษาเซลล์ ทำให้ลดพื้นที่การใช้งาน สะดวกต่อการจัดเก็บ และลดค่าใช้จ่ายในการขนส่งเชิงพาณิชย์ได้ในอนาคต

คำสำคัญ: คีโตเซอรอส, ไคโตซาน, การตกตะกอน, การเก็บรักษา

ABSTRACT: This research aimed to investigate the appropriate method for precipitation and preservation of concentrated *Chaetoceros* for larviculture of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Chaetoceros* precipitated by using of extracted chitosan from shrimp shell in polymer type (CPS), extracted chitosan in oligomer type of shrimp shell (COS) and extracted chitosan in oligomer type of crab shell (COC), respectively. The results showed that there were highest efficient of flocculation (> 90%) of CPS ranged from 40 to 60 mg/l and followed by using of COS and COC at 60 mg/l, respectively. *Chaetoceros* were precipitated with CPS can recovery well and not different in cell count ($p > 0.05$) with control while it was slower recovery when using COS. However, the characteristic of precipitated *Chaetoceros* with the use of COS was loose and small form which was suitable for larviculture of *L. vannamei*.

[1] สาขาวิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี
Department of Aquatic Science, Faculty of Science, Burapha University, Chon buri.

[2] ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ
Center of Excellence for Marine Biotechnology, Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok

* Corresponding author: boonyara@buu.ac.th

Thus, precipitation of *Chaetoceros* can be used with COS and preserved at -20 ^{O}C combinations with and without 10% (v/v) glycerol (Gly) as cryoprotectant for further utilization. The survival rate of precipitated *Chaetoceros* after it had been preserved for 72 hours presented that *Chaetoceros* precipitated with COS, both of with and without Gly, were not different ($p>0.05$), but these rates were better than the regular method of using the fresh *Chaetoceros* for preserving without precipitation. Therefore, this method is one method for the cell harvesting in a concentrated form and can extend the preserved cells, which have some benefits in reducing and easing the space of storage, including to reduce the cost of commercial transportation in the future as well.
Keywords: *Chaetoceros*, Chitosan, Precipitation, Preservation

บทนำ

คีโตเซอรอสเป็นสาหร่ายขนาดเล็ก เซลล์เดียวในกลุ่มไดอะตอมชนิดหนึ่ง ซึ่งจัดเป็นแพลงก์ตอนถาวร และผู้ผลิตเบื้องต้นในระดับห่วงโซ่อาหารของสัตว์น้ำ (วันเพ็ญ, 2549) นับว่าเป็นชนิดอาหารเป็นธรรมชาติที่มีความสำคัญเป็นอย่างมากต่อการอนุบาลลูกสัตว์น้ำ เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการ มีวิตามินและเกลือแร่ครบถ้วน มีขนาดเหมาะสมต่อสัตว์น้ำขนาดเล็ก (ธิดา, 2542; Hargreaves, 2006) โดยเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งจะนิยมใช้คีโตเซอรอสในการเป็นอาหารลูกกุ้งในระยะซูเอี้ย (zoea) ซึ่งได้จากการซื้อคีโตเซอรอสสดมาจาก ผู้จัดจำหน่ายที่ทำการคัดแยกหัวเชื้อ และเพาะขยายคีโตเซอรอสโดยเฉพาะ แล้วจึงนำไปใช้อนุบาลลูกกุ้งโดยตรง มีข้อเสีย คือ การผลิตและจำหน่ายในรูปของเซลล์สดจะมีคุณภาพไม่คงที่ และเก็บได้ไม่นาน อีกทั้งการขนส่งพร้อมน้ำเลี้ยงที่มีน้ำหนักมาก ทำให้ต้นทุนการขนส่งสูง ปัจจุบันจึงมีการใช้วิธีการตกตะกอนเพื่อเก็บเกี่ยวเซลล์คีโตเซอรอสก่อนนำไปใช้เป็นอาหารลูกกุ้ง ซึ่งพบว่าไคโตซานเป็นสารโพลีเมอร์ธรรมชาติมีคุณสมบัติในการรวมตะกอนเซลล์สาหร่ายได้ อีกทั้งเป็นสารที่สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และไม่ทำให้เซลล์คีโตเซอรอสมีความเป็นพิษ (Wang and Tang, 2001; Lertsutthiwong et al., 2009) นอกจากนี้ยังพบว่าการเก็บรักษาเซลล์คีโตเซอรอสด้วยวิธีการแช่แข็ง (Freezing) ที่อุณหภูมิประมาณ - 20 ^{O}ซ. ร่วมกับสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งโดยลดจุดเยือกแข็งในการเก็บรักษาเซลล์ สามารถยืดอายุเซลล์ให้มีชีวิตรอดได้นานขึ้น (นิธิวดี, 2543; สมบูรณ์, 2553) รวมถึงการใช้พื้นที่ในการเก็บรักษาน้อยลง ทำให้สะดวกต่อการเคลื่อนย้าย ช่วยประหยัดแรงงาน และค่าใช้จ่ายต่อการขนส่งมากขึ้น

ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการเก็บเกี่ยวด้วยไคโตซานและเก็บรักษาเซลล์ คีโตเซอรอสแบบเข้มข้น อันจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงลูกกุ้ง และลูกสัตว์ทะเลชนิดอื่นๆ ต่อไป

วิธีการศึกษา

การเก็บเกี่ยวคีโตเซอรอสด้วยวิธีการตกตะกอนร่วมกับเทคนิคการปรับค่า pH

นำเซลล์คีโตเซอรอส จากสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ความหนาแน่นเซลล์มากกว่า 10^6 เซลล์/มล. มาทำการตกตะกอน และเปรียบเทียบผลระหว่างชุดทดลองกับชุดควบคุม โดยชุดทดลองจะใช้ไคโตซาน 3 ชนิด ได้แก่ ไคโตซานโพลิเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง, ไคโตซานโอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง และไคโตซานโอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกปู จากบริษัท ต้าหมิง เอ็นเตอร์ไพรส์ จำกัด เป็นสารตกตะกอนที่ระดับความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 20, 30, 40, 50 และ 60 มก./ล. ร่วมกับเทคนิคการปรับค่า pH ในระหว่างการตกตะกอนดัดแปลงมาจากวิธีการของ Lertsutthiwong et al. (2009) โดยเติมสารละลายตั้งต้นของไคโตซานแต่ละชนิดลงในตัวอย่างคีโตเซอรอสที่เตรียมไว้ จากนั้นปรับลดค่า pH ให้เป็น 6.5 โดยใช้กรดอะซิติกความเข้มข้น 1 โมล หลังจากผ่านไป 60 นาที ค่า pH จะถูกปรับให้เป็น 8.5 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมล ส่วนชุดควบคุมจะเติมน้ำกลั่นธรรมดา

ทำการวัดประสิทธิภาพการตกตะกอนเซลล์คีโตเซอรอสโดยนำตัวอย่างที่ทำการตกตะกอนทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องมาวัดค่าดูดกลืนแสง หลังการตกตะกอนที่ระยะเวลา 0, 15, 30, 45, 60, 120 และ 180 นาที โดยใช้ปิเปตดูดตัวอย่างห่างจากก้นบีกเกอร์ประมาณ 1 เซนติเมตร ออกมาครั้งละ 10 มิลลิลิตร ตามวิธีการของ Riaño et al. (2012) ในช่วงก่อนและหลังการทดสอบการตกตะกอนที่ระยะเวลาต่างๆ กัน โดยใช้น้ำทะเลเป็นค่าตั้งต้น (blank) เพื่อนำไปหาค่าประสิทธิภาพการตกตะกอน ประเมินโดยการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสง (optical density: OD) ของตัวอย่างที่ระดับ 550 นาโนเมตร ทำการทดลองความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ จากนั้นนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การตกตะกอน ตามวิธีการของ Cheng et al. (2011) มีสูตรดังนี้

$$Flc\ \% = \frac{(Abs_{550,initial} - Abs_{550,post\ flocculation})}{(Abs_{550,initial} - Abs_{550,blank})} x\ 100\%$$

กำหนดให้ Flc % คือ ประสิทธิภาพในการตกตะกอน

$Abs_{550,\ initial}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ในช่วงเริ่มต้นก่อนการตกตะกอน

$Abs_{550,\ post\ flocculation}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ในช่วงหลังการตกตะกอน

$Abs_{550,\ blank}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ในน้ำหรือสารละลายตั้งต้นก่อนการแขวนลอยตัวอย่าง

นำตะกอนเซลล์คีโตเซอรอสจากการตกตะกอนด้วยไคโตซานแต่ละชนิด มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงแพลงก์ตอนสูตรของกิลลาร์ด (ลัดดา, 2541) แล้วทำการตรวจนับความหนาแน่นของจำนวนเซลล์ด้วยสไลด์นับเม็ดเลือดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ตามวิธีการของ Fox (1983) ทุกๆ 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบความสามารถในการฟื้นตัวของเซลล์คีโตเซอรอสภายหลังการตกตะกอน จากการคำนวณอัตราการเจริญเติบโต

เก็บรักษาคีโตเซอรอสที่ผ่านการตกตะกอนด้วยวิธีการแช่แข็งที่ระดับอุณหภูมิ - 20 ^{o}ซ.

นำคีโตเซอรอสที่ผ่านการตกตะกอนด้วยไคโตซานมาปรับความหนาแน่นของเซลล์ใหม่ให้ได้จำนวนเซลล์มากกว่า 10^{7} เซลล์/มล. มาผสมกับกลีเซอรอล 10%(v/v) เป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง บ่มทิ้งไว้ 10 นาที นับจำนวนเซลล์เพื่อใช้เป็นจำนวนเซลล์เริ่มต้นในกระบวนการเก็บรักษา ดูดสารละลายใส่หลอดเก็บตัวอย่าง จากนั้นนำมาลดอุณหภูมิลงด้วยน้ำแข็งแห้ง จนถึงจุดเยือกแข็งที่ระดับ - 20 ^{o}ซ. แล้วจึงย้ายไปเก็บรักษาต่อในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ - 20 ± 2 ^{o}ซ. นำตัวอย่าง คีโตเซอรอสภายหลังการเก็บรักษาที่เวลา 0, 24 และ 72 ชั่วโมง มาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาที ให้ละลายแล้วทำการย้อมเซลล์ด้วยสีย้อม Evan's blue ตามวิธีการของ Harrison (1988 อ้างถึงใน นิธิวดี, 2543) จากนั้นทำการวัดผลด้วยการตรวจนับเซลล์ที่รอดชีวิตด้วยกล้องจุลทรรศน์ นำผลที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์อัตรารอดของเซลล์ มีสูตรดังนี้

(จำนวนเซลล์ *Chaetoceros* เริ่มต้น – จำนวนเซลล์ *Chaetoceros* ที่มีชีวิตรอดภายหลังการเก็บรักษา) x 100
จำนวนเซลล์ *Chaetoceros* เริ่มต้น

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลประสิทธิภาพการตกตะกอนในแต่ละระดับความเข้มข้นของสารไคโตซานทั้ง 3 ชนิด, อัตราการฟื้นตัวของเซลล์คีโตเซอรอสภายหลังการตกตะกอน และอัตรารอดของเซลล์คีโตเซอรอสภายหลังการเก็บรักษาในช่วงเวลาต่างๆ โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance: ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS for Windows

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ประสิทธิภาพการตกตะกอนคีโตเซอรอสด้วยไคโตซาน

การใช้ไคโตซานโพลิเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้งที่ความเข้มข้น 40 - 60 มก./ล. ให้ประสิทธิภาพการตกตะกอนไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$) โดยพบว่ามีประสิทธิภาพการตกตะกอนสูงมากถึง 84 - 93% ตั้งแต่ 15 นาทีแรกของการตกตะกอน โดยยังคงมีค่าประสิทธิภาพการตกตะกอนสูงกว่า ($p < 0.05$) ต่อเนื่องระหว่างช่วงเวลา 60, 120 และ 180 นาที รองลงมา คือไคโตซานโอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง โดยประสิทธิภาพการตกตะกอนเซลล์คีโตเซอรอสมากขึ้นเมื่อใช้ไคโตซานโอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้งในระดับความเข้มข้นสูงขึ้น ($p < 0.05$) ซึ่งให้ประสิทธิภาพการตกตะกอนสูงมากที่สุด คือ 74.60 ± 0.33% ที่ระดับความเข้มข้น 60 มก./ล. ตลอดระยะเวลาการตกตะกอนจาก 15 ถึง 180 นาที ส่วนการตกตะกอนเซลล์คีโตเซอรอสด้วยไคโตซานโอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกปู ให้ประสิทธิภาพการตกตะกอนต่ำที่สุด โดยที่ความเข้มข้น 60 มก./ล .สามารถตกตะกอนได้ 49.89 ± 4.50% (**Table 1**)

Table 1 Flocculation efficiency of *Chaetoceros* using different types of chitosan at 5 concentrations.

Concentrations	Times					
	15 min	30 min	45 min	60 min	120 min	180 min
Control	1.50±0.14	1.75±0.15	2.26±0.38	3.34±0.30	6.35±0.30	7.52±0.25
Extracted chitosan from shrimp shell in polymer type						
20 mg/l	41.84±6.34^{c}	76.17±0.89^{c}	80.85±1.37^{c}	83.55±1.86^{d}	88.03±1.49^{d}	89.79±0.65^{c}
30 mg/l	70.20±2.59^{b}	83.95±0.59^{b}	87.62±1.21^{b}	89.12±0.36^{c}	92.52±0.83^{c}	93.88±0.47^{b}
40 mg/l	84.08±4.55^{a}	91.97±1.53^{a}	93.06±0.24^{a}	92.92±0.36^{a}	97.69±0.36^{a}	99.05±0.36^{a}
50 mg/l	89.76±0.87^{a}	94.27±0.60^{a}	95.66±0.46^{a}	95.66±0.35^{a}	97.92±0.30^{a}	98.96±0.30^{a}
60 mg/l	93.06±0.97^{a}	93.92±0.62^{a}	95.49±0.92^{a}	96.00±0.17^{a}	97.57±0.35^{a}	98.79±0.35^{a}
Extracted chitosan from shrimp shell in oligomer type						
20 mg/l	-5.13±0.43^{d}	-2.85±0.57^{d}	-1.57±1.21^{d}	0.57±1.17^{d}	11.25±2.06^{e}	16.24±3.24^{d}
30 mg/l	-5.70±0.87^{d}	-2.56±0.49^{d}	-0.29±1.11^{d}	5.56±1.08^{d}	22.79±0.38^{d}	29.91±1.50^{c}
40 mg/l	4.08±1.38^{c}	9.85±2.72^{c}	17.30±1.12^{c}	19.55±2.34^{c}	29.96±1.48^{c}	34.46±1.86^{c}
50 mg/l	12.52±2.32^{b}	22.93±2.25^{b}	29.39±2.81^{b}	33.61±2.61^{b}	45.43±1.98^{b}	49.37±2.08^{b}
60 mg/l	20.32±1.43^{a}	36.68±1.29^{a}	47.83±1.43^{a}	50.93±1.31^{a}	68.28±1.06^{a}	74.60±0.33^{a}
Extracted chitosan form crab shell in oligomer type						
20 mg/l	8.91±0.33^{c}	9.48±0.16^{c}	10.92±0.50^{c}	10.92±0.58^{d}	12.93±0.60^{cd}	16.57±0.63^{c}
30 mg/l	8.33±0.16^{c}	9.01±0.58^{c}	11.30±0.35^{c}	13.22±0.29^{d}	19.64±0.34^{bc}	26.82±0.75^{b}
40 mg/l	13.52±0.94^{b}	14.06±0.70^{b}	15.93±1.51^{b}	16.60±0.88^{bc}	23.70±1.29^{b}	27.18±0.35^{b}
50 mg/l	16.47±1.23^{a}	18.21±0.94^{a}	19.28±1.06^{ab}	20.21±0.94^{b}	25.70±0.46^{b}	31.33±1.84^{b}
60 mg/l	14.86±0.34^{ab}	16.67±1.19^{a}	20.49±1.91^{a}	25.23±3.13^{a}	42.79±5.34^{a}	49.89±4.49^{a}

Note: Different capital letters indicate significant differences between concentration by ANOVA at $P < 0.05$.
The values are means ± SE (n = 3).

การทดลองสามารถสรุปได้ว่า ประสิทธิภาพการรวมตะกอนของไคโตซานขึ้นอยู่กับชนิดของไคโตซานที่นำมาใช้ โดยจะมีผลอย่างมากต่ออัตราการตกตะกอน และลักษณะของก้อนตะกอนที่เกิดขึ้น ซึ่งลักษณะตะกอนเซลล์คีโตเซอรอสที่ได้จากการตกตะกอนของไคโตซานโอลิโกเมอร์ทั้ง 2 ชนิด มีลักษณะเป็นปุยหลวมๆ ค่อยๆ จมลงด้านล่างอย่างช้าๆ เนื่องจากไคโตซานโอลิโกเมอร์จัดเป็นโพลิเมอร์ที่มีโครงสร้างของสายพันธะเป็นแบบสายสั้น จึงมีความสามารถในการเกาะจับกับเซลล์คีโตเซอรอสได้น้อยกว่าในไคโตซานแบบโพลิเมอร์ซึ่งมีโครงสร้างของสายพันธะเป็นแบบยาว จึงสามารถจับเซลล์คีโตเซอรอสในมวลน้ำได้ดี ตะกอนเซลล์คีโตเซอรอสที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นปุยแน่น ขนาดใหญ่ จับตัวและจมตัวลงด้านล่างอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้การที่เซลล์คีโตเซอรอสเกิดการรวมตัวและจับกลุ่มกันนั้น เป็นผลมาจากการที่ไคโตซานเป็นสารโพลีเมอร์ที่มีประจุบวกอย่างรุนแรง ประกอบกับสารประกอบในธรรมชาติส่วนใหญ่ รวมทั้งเซลล์คีโตเซอรอสจะเป็นประจุลบ มีผลทำให้ไคโตซานเป็นตัวสร้างตะกอนและตัวตกตะกอนที่ดี เพราะสายโพลีเมอร์ของไคโตซานจะเข้าไปเป็นสะพานเชื่อมต่อระหว่างอนุภาคของสารแขวนลอยที่มีประจุลบนั้นแข็งแรงและทนทานต่อแรงผลัก โดยเฉพาะสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่จนเกิดเป็นตะกอนขึ้น (สราวุธ, 2555; Lalov et al., 2000; Divakaran and Pillai, 2001; Wibowo et al., 2007(เมื่อเกิดการเชื่อมโยงระหว่างเซลล์คีโตเซอรอสโดยสายโซ่ของไคโตซานจนมีน้ำหนักมากพอจะตกตะกอนลงอย่างรวดเร็ว (Divakaran and Pillai, 2002) ซึ่งประสิทธิภาพการตกตะกอนโดยไคโตซานนั้นจะมีการรวมตัวเป็นปุยตะกอนได้เร็วเมื่อมีความหนาแน่นของสารแขวนลอยสูง (สราวุธ, 2555) ทั้งนี้ จากผลการตกตะกอนไคโตซานโอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกปูมีประสิทธิภาพในการตกตะกอนในระดับต่ำกว่า 50% จึงไม่สามารถเก็บเกี่ยวตะกอนเซลล์ได้ จึงเลือกเฉพาะเซลล์คีโต เซอรอสจากการตกตะกอนด้วยไคโตซานโพลิเมอร์ และไคโตซานโพลิเมอร์ที่สกัดจากเปลือกกุ้งที่ระดับความเข้มข้น 60 มก./ล. เนื่องจากเป็นระดับความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพในการตกตะกอนสูง สามารถเก็บเกี่ยวตะกอนเซลล์คีโต เซอรอสได้ดีที่สุด มาขยายลงในอาหารเลี้ยงแพลงก์ตอน พบว่าอัตราการฟื้นตัวของเซลล์คีโตเซอรอสภายหลังการตกตะกอนโดยเซลล์คีโตเซอรอสที่ตกตะกอนด้วยสาร ไคโตซานโพลิเมอร์สามารถฟื้นตัวในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีมากกว่าเซลล์คีโตเซอรอสที่ตกตะกอนด้วยสารไคโตซานโอลิโกเมอร์ ($p < 0.05$) และมีจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นไม่มีความแตกต่างกับชุดควบคุม ($p > 0.05$) ในวันที่ 8 วันของการเพาะเลี้ยง (**Figure 1**)

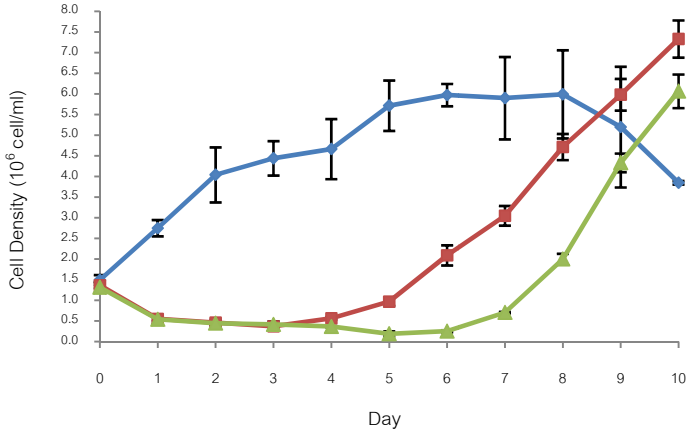

Figure 1 The recovery rates of precipitated *Chaetoceros* in medium culture.

Note: Means ± SE (n=3). control polymer oligomer

ผลการตกตะกอนและตรวจสอบลักษณะตะกอนภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า ไคโตซานโอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง มีลักษณะการจับกันของเซลล์อย่างหลวมๆ เซลล์มีการรวมตัวจับกับเป็นกลุ่มขนาดเล็ก จึงน่ามีความเหมาะสมต่อการนำไปปรับใช้ประโยชน์ต่อการเป็นอาหารอนุบาลลูกกุ้งขาว หรือลูกสัตว์ทะเลอื่นๆ มากกว่าจึงเลือกใช้ไคโตซานโอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้งเป็นสารในการตกตะกอนและนำมาเก็บรักษาต่อ

การเก็บรักษาคีโตเซอรอสที่ผ่านการตกตะกอนด้วยวิธีการแช่แข็งที่ระดับอุณหภูมิ - 20 ^{O}ซ.

การเก็บรักษาคีโตเซอรอสที่ผ่านการตกตะกอนด้วยไคโตซานโอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง ด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ - 20 ^{O}ซ. ร่วมกับกลีเซอรอลเข้มข้น 10%(v/v) เป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง พบว่า คีโตเซอรอสที่ทำการเก็บรักษามีอัตรารอดลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น ซึ่งคีโตเซอรอสที่ผ่านการตกตะกอนด้วยไคโตซานโอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้งทั้งที่ผสมและไม่ผสมกลีเซอรอลในการเก็บรักษาที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง มีอัตรารอดของเซลล์ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) คือ 76.75 ± 7.77% และ 70.11 ± 6.83% ตามลำดับ กับชุดควบคุม ซึ่งมีอัตรารอดของเซลล์ 62.20 ± 2.63% โดยมีอัตรารอดมากกว่าเซลล์คีโตเซอรอสสดที่ผสมกับกลีเซอรอล ($p < 0.05$) (Table 2)

Table 2 The survival rates of *Chaetoceros* after preservation at 0, 24 and 72 hours.

Treatments	Times		
	0 hr.	24 hr.	72 hr.
Control	96.58±1.27^{a}	83.78±1.42^{a}	62.20±2.63^{b}
A	83.93±1.86^{b}	49.56±1.61^{b}	49.56±1.61^{ab}
B	94.34±3.12^{a}	85.12±4.18^{a}	70.11±6.83^{a}
C	92.13±1.77^{a}	82.90±4.05^{a}	76.75±7.77^{a}

Note: Different capital letters indicate significant differences between group by ANOVA at $P < 0.05$.
The values are means ± SE (n=3).

Control = Fresh *Chaetoceros*
A = Fresh *Chaetoceros* with glycerol
B = *Chaetoceros* preserving with chitosan from shrimp shell in oligomer type
C = *Chaetoceros* preserving with chitosan from shrimp shell in oligomer type + glycerol

ทั้งนี้พบว่า ไคโตซานอาจมีความสามารถในการปกป้องเซลล์มากกว่าการเลือกใช้กลีเซอรอล เมื่อเปรียบเทียบกับการเก็บรักษาคีโตเซอรอสสดที่ผสมสารกลีเซอรอลในการเก็บรักษาซึ่งมีอัตราการรอดต่ำกว่า 50% ภายใต้ระยะเวลาการเก็บรักษาที่เท่ากันคือ 72 ชั่วโมง ซึ่งให้ผลไม่สอดคล้องกับ นิธิวดี (2543) ที่ศึกษาการเก็บรักษา *C. calcitrans* ด้วยวิธีการเดียวกัน ชนิดและความเข้มข้นของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งที่เท่ากัน คือการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ร่วมกลีเซอรอลเข้มข้น 10%(v/v) ซึ่งสามารถรักษาเซลล์คีโตเซอรอสให้มีอัตรารอด 100% ได้นานถึง 6 สัปดาห์ โดยเซลล์คีโตเซอรอสมีอัตรารอดลดลงต่ำกว่า 50% ในสัปดาห์ที่ 14 ของการเก็บรักษา อย่างไรก็ตาม จากการที่กลุ่มตัวอย่างคีโต เซอรอสที่ผ่านการตกตะกอนด้วยไคโตซานโอลิโกเมอร์ที่สกัดจากเปลือกกุ้งนั้นจะมีอัตราการรอดสูง อาจเป็นผลมาจากการจับกลุ่มกันของเซลล์

และการถูกห่อหุ้มด้วยสายโพลิเมอร์ที่ใช้เป็นตัวจับเซลล์คีโตเซอรอสแขวนลอยในมวลน้ำให้เกิดการตกตะกอน สายโพลิเมอร์ของไคโตซานโอลิโกเมอร์อาจมีคุณสมบัติในการเป็นฉนวนปกป้องเซลล์ลดการถูกทำลายของผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการเก็บรักษาไคโตซานอาจสามารถจัดอยู่ในประเภทของสารประกอบจำพวกโพลิเมอร์และดีเกรดีทีฟ (degraditive) ซึ่งประสิทธิภาพของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากการลดจุดเยือกแข็ง จะสัมพันธ์กับโครงสร้างทางเคมีของสารนั้น โดยทั่วไปแล้วสารที่สามารถป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งได้ดีจะต้องมีหมู่ไฮโดรเจนคาร์บอนอยู่ในโมเลกุลด้วยสามหมู่หรือมากกว่า (สมบูรณ์, 2553)

สรุป

จากการศึกษาพบว่า สารไคโตซานที่มีประสิทธิภาพการรวมตะกอนคีโตเซอรอสดีที่สุด ได้แก่ ไคโตซานโพลิเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง ความเข้มข้นที่เหมาะสมคือตั้งแต่ 40 มก./ล. ขึ้นไป สามารถตกตะกอนได้มากกว่า 90 % ภายในระยะเวลา 30 นาที รองลงมา คือ ไคโตซานโอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง ความเข้มข้นที่เหมาะสมคือตั้งแต่ 60 มก./ล. ขึ้นไป จึงสามารถตกตะกอนได้มากกว่า 70% ภายในระยะเวลา 180 นาที โดยคีโตเซอรอสที่ตกตะกอนด้วยไคโตซานโพลิเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้งมีการฟื้นตัวของเซลล์ภายหลังการตกตะกอนได้เร็วกว่าคีโตเซอรอสที่ตกตะกอนด้วยไคโตซานโอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้ง โดยสามารถขยายจำนวนเซลล์ได้ให้ผลไม่แตกต่างกับชุดควบคุม คือ คีโตเซอรอสสดที่ไม่ผ่านการตกตะกอนซึ่งมีจำนวนเซลล์สูงสุดของระยะการเจริญเติบโตอยู่ในระยะคงที่ ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง และเมื่อนำตะกอนเซลล์คีโตเซอรอสเข้มข้นมาเก็บรักษา พบว่าคีโตเซอรอสที่ทำการเก็บรักษามีอัตรารอดลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น โดยที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง คีโตเซอรอสที่ตกตะกอนด้วยไคโตซานโอลิโกเมอร์สกัดจากเปลือกกุ้งทั้งที่ผสมและไม่ผสมกับกลีเซอรอลในการเก็บรักษามีอัตรารอดของเซลล์ดีที่สุด และให้ผลไม่แตกต่างกัน

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำภาคปลาย ปีการศึกษา 2555 และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ภายใต้โครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม-พวอ. ระดับปริญญาโท ประจำปี 2556 และบริษัท เมษา คอร์ปอเรชั่น จำกัด ทั้งนี้ ความเห็นในรายงานผลการวิจัยเป็นของผู้รับทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และบริษัท เมษา คอร์ปอเรชั่น จำกัด ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป

เอกสารอ้างอิง

ธิดา เพชรมณี. 2542. คู่มือการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอน. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, กรุงเทพฯ.

นิธิวดี ทุมวัน. 2543. ผลของการเก็บรักษาคีโตเซอรอสที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของกรดไขมันอีพีเอ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ลัดดา วงศ์รัตน์. 2541. คู่มือการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอน. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วันเพ็ญ ภูติจันทร์. 2549. วิทยาสาหร่าย. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์. 2553. เทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

สราวุธ เจียรพร. 2555. แนวทางการใช้ไคโตซานในการเลี้ยงกุ้ง. อะควาบิซ. 52: 74-77.

Cheng, Y.-S., Y. Zheng, J.M. Labavitch, and J.S. VanderGheynst. 2011. The impact of cell wall carbohydrate composition on the chitosan flocculation of *Chlorella.* Process Biochemistry. 46: 1927-1933.

Divakaran, R., and V.N.S. Pillai. 2001. Flocculation of kaolinite suspensions in water by chitosan. Water Research. 35: 3904-3908.

Divakaran, R., and V.N.S. Pillai. 2002. Flocculation of algae using chitosan. Journal of Applied Phycology. 14: 419-422.

Fox, J.M. 1983. Intensive algal culture techniques. In: CRC Handbook of mariculture. Volume 1. Crustacean Aquaculture. McVey, J.P. (Ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 43-69.

Hargreaves, J.A. 2006. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. Aquacultural Engineering. 34: 344-363.

Lalov, I.G., I.I. Guerginov, M.A. Krysteva, and K. Fartsov. 2000. Treatment of waste water from distilleries with chitosan. Water Research. 34: 1503-1506.

Lertsutthiwong, P., S. Sutti, and S. Powtongsook. 2009. Optimization of chitosan flocculation for phytoplankton removal in shrimp culture ponds. Aquacultural Engineering. 41: 188-193.

Riaño, B., B. Molinuevo, and M.C. García-González. 2012. Optimization of chitosan flocculation for microalgal-bacterial biomass harvesting via response surface methodology. Ecological Engineering. 38: 110-113.

Wang, D., and H. Tang. 2001. Modified inorganic polymer flocculant-PFSi: Its preparation, Characterization and coagulation behavior. Water Research. 35: 3418-3428.

Wibowo, S., G. Velazquez, V. Savant, and J.A. Torres. 2007. Effect of chitosan type on protein and water recovery efficiency from surimi wash water treated with chitosan-alginate complexes. Bioresource Technology. 98: 539-545.