วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 26 (ฉบับที่ 3) กันยายน – ธันวาคม พ.ศ. 2564
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 26 (No.3) September – December 2021 บทความวิจัย

แนวทางการผลิตโรติเฟอร์ (*Brachionus rotundiformis*) ในรูปแบบเข้มข้นเพื่อการค้า : การผลิต และการเก็บรักษา

Guidelines for Production of Rotifer (*Brachionus rotundiformis*) in Concentrate Forms to Commercial : Production and Preservation

วาสนา อากรรัตน์* และวุฒิชัย อ่อนเอี่ยม

Wasana Arkronrat* and Vutthichai Oniam

สถานีวิจัยประมงคลองวาฬ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Klongwan Fisheries Research Station, Faculty of Fisheries, Kasetsart University

Received : 4 November 2020

Revised : 23 February 2021

Accepted : 1 March 2021

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษารูปแบบการผลิต และการเก็บรักษาโรติเฟอร์ (*Brachionus rotundiformis*) ในรูปแบบเข้มข้นเพื่อการค้า ผลการศึกษาพบว่า การเลี้ยงโรติเฟอร์ด้วยแพลงก์ตอนพืชสกุล *Nannochloropsis* sp. ที่ปริมาณเซลล์ประมาณ 10^5 เซลล์/มิลลิลิตร นาน 3 วัน มีความเหมาะสมต่อการผลิตเพื่อเก็บเกี่ยวผลผลิตในรูปแบบเข้มข้น โดยโรติเฟอร์จะมีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยอยู่ที่ 1.6±0.5 ตัว/วัน ผลผลิตเฉลี่ยอยู่ที่ 117.0±17.4 กรัม/ปริมาตรน้ำ 1 ตัน มีปริมาณโปรตีนเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 32.0±3.8 ต่อน้ำหนักแห้ง คาร์โบไฮเดรตเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 12.0±1.9 ต่อน้ำหนักแห้ง ไขมันเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 14.9±1.3 ต่อน้ำหนักแห้ง กรดไขมัน EPA เฉลี่ยเท่ากับ 1.4±0.0 มิลลิกรัม/กรัม และกรดไขมัน DHA เฉลี่ยเท่ากับ 0.3±0.1 มิลลิกรัม/กรัม ซึ่งหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิตถ้าใช้กลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 15 โดยปริมาตร หรือวิตามินซีความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยปริมาตร เป็นสารรักษาสภาพเซลล์ จะสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 ถึง -20 องศาเซลเซียส ได้นานถึง 8 สัปดาห์ โดยไม่มีผลกระทบต่อสภาพเซลล์ การสะสมของปริมาณแบคทีเรีย และคุณค่าทางโภชนาการของผลผลิตที่เก็บรักษา การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า การผลิตโรติเฟอร์ในรูปแบบเข้มข้นตามรูปแบบการผลิตนี้ สามารถเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับให้เกษตรกรรายย่อย หรือผู้สนใจทั่วไปนำไปใช้ประโยชน์ในการประกอบอาชีพต่อไปได้

คำสำคัญ : โรติเฟอร์ในรูปแบบเข้มข้น ; การผลิต ; การเก็บรักษา

Abstract

The objectives of this study were to investigate the production and preservation of marine rotifer (*Brachionus rotundiformis*) in concentrate forms to commercial. The results showed that rotifer cultured by using *Nannochloropsis* sp. at cell density about 10^5 cell/ml for 3 days was optimal for rotifer production in concentrate forms. The average growth rate and productivity of rotifer were 1.6±0.5 rotifer/day and 117.0±17.4 g/1 ton of water, respectively. The average protein, carbohydrate and lipid contents of rotifer were 32.0±3.8, 12.0±1.9 and 14.9±1.3 % dry weight, respectively. The eicosapentaenoic acid (EPA) and decosahexaenoic acid (DHA) contents of rotifer were 1.4±0.0 and 0.3±0.1 mg/g, respectively. The post-harvest of rotifer in concentrate forms if usage of 15% glycerol, or 3% ascorbic acid as cryoprotectant agents (v/v) for preservation, its optimally stored by biomass-freezing (-18 to -20 ºC), and did not affect the cell condition, bacteria and proximate composition in product of rotifer in concentrate forms during stored at 8 weeks. This study indicates that an alternative option is to use production plan to rotifer in concentrate forms production in hatchery for small scale farming or other person in the future.

Keywords : rotifer in concentrate forms ; production ; preservation

***Corresponding author. E-mail** : ffiswna@ku.ac.th

บทนำ

โรติเฟอร์ (*Brachionus rotundiformis*) เป็นแพลงก์ตอนสัตว์ที่มีความสำคัญในการอนุบาลลูกสัตว์น้ำชายฝั่งที่นักเพาะพันธุ์สัตว์น้ำทั่วโลกนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการเป็นอาหารเริ่มแรกของสัตว์น้ำวัยอ่อนเหล่านี้ เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูง นอกจากนี้ยังเป็นแพลงก์ตอนสัตว์ที่สามารถแพร่ขยายพันธุ์ได้รวดเร็ว ทำให้สามารถเลี้ยงในปริมาณมากได้ง่ายภายในระยะเวลาอันสั้น (Wongrat, 2000 Dhert *et al*., 2001; Ajah, 2010) การผลิตลูกพันธุ์สัตว์น้ำชายฝั่งที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจสูง เช่น ปลากะรัง ปลากะพงขาว และกุ้งทะเลในปัจจุบันมีโรงเพาะฟักขนาดเล็ก ขนาดกลาง และขนาดใหญ่ ซึ่งกระบวนการผลิตอาจจะแตกต่างกันบ้าง แล้วแต่ประสบการณ์และความชำนาญของผู้เลี้ยง โดยการหาวิธีการที่ทำให้ลูกสัตว์น้ำมีอัตรารอดสูง แข็งแรง และปราศจากโรค เมื่อนำไปเลี้ยงต่อมีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีเป็นที่ต้องการอย่างยิ่งของเกษตรกร และผู้ประกอบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั่วไป ซึ่งความสำเร็จเหล่านี้มีปัจจัยอยู่หลายประการ และการผลิตโรติเฟอร์ก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญอยู่ไม่น้อย แต่ถึงอย่างไรก็ตาม การผลิตโรติเฟอร์ปริมาณมากในระดับฟาร์มของเกษตรกรนั้นมีข้อจำกัดอยู่หลายประการทั้งในด้านปริมาณ และคุณภาพ รวมทั้งมีต้นทุนในการผลิตที่สูง โดยเฉพาะในช่วงที่สภาพภูมิอากาศแปรปรวน เกษตรกรมักประสบปัญหากับการเพาะเลี้ยงโรติเฟอร์ คือ มีการปนเปื้อนสูงเมื่อเลี้ยงปริมาณมาก ในบ่อกลางแจ้ง ทำให้ไม่สะดวกในการจัดเตรียม และการนำไปใช้ประโยชน์ ก่อให้เกิดปัญหาโรติเฟอร์ไม่เพียงพอต่อการนำมาอนุบาลลูกสัตว์น้ำ จนส่งผลกระทบถึงการพัฒนาการ และอัตรารอดตายของลูกสัตว์น้ำได้ ซึ่งการเก็บเกี่ยว และเก็บรักษาแพลงก์ตอนด้วยการแช่เย็น (อุณหภูมิ 3 ถึง 4 องศาเซลเซียส) หรือการแช่แข็ง (อุณหภูมิ -18 ถึง -20 องศาเซลเซียส) ไว้ใช้ในช่วงที่ขาดแคลนก็เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการแก้ไขปัญหาดังกล่าว (Wongrat, 2000) นอกจากนี้ การต่อยอดการผลิตโรติเฟอร์แบบมหามวลเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์โรติเฟอร์ในรูปแบบเข้มข้นที่มีคุณภาพพร้อมใช้สามารถขยายผลสู่เชิงการค้าได้ เช่นเดียวกับหนอนแดง และอาร์ทีเมียแช่แข็งที่มีการจำหน่าย ณ ปัจจุบัน ด้วยเหตุนี้ การผลิตโรติเฟอร์แบบมหามวลเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์โรติเฟอร์ในรูปแบบเข้มข้นที่มีคุณภาพพร้อมใช้จึงเป็นประเด็นวิจัยของการศึกษาครั้งนี้ เพื่อการแก้ไขปัญหาขั้นตอนการผลิตที่ยุ่งยาก ใช้พื้นที่มากในการทำงาน คุณภาพและปริมาณที่ไม่แน่นอน รวมไปถึงปัญหาการขาดแคลนโรติเฟอร์ในช่วงที่สภาพอากาศแปรปรวนของผู้ประกอบการเพาะอนุบาลลูกสัตว์น้ำชายฝั่ง

จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า การใช้ทรีฮาโลสเป็นสารรักษาสภาพเซลล์ต่อการเก็บรักษาโรติเฟอร์ในรูปแบบเข้มข้น ด้วยการใช้ทรีฮาโลสที่ระดับร้อยละ 1 และ 2 โดยปริมาตร (v/v) สามารถใช้รักษาสภาพเซลล์ของโรติเฟอร์ที่เก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งได้ และดีกว่าการเก็บรักษาด้วยการใช้ทรีฮาโลสที่ระดับร้อยละ 0.5 และไม่ใช่ทรีฮาโลส (Oniam *et al*., 2019) แต่อย่างไรก็ตาม สารรักษาสภาพเซลล์ หรือที่เรียกว่า antifreeze agent หรือ preservative agent หรือ cryoprotectant agent เป็นสารเคมีที่ป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อเสียหายในระหว่างการแช่แข็ง และการทำให้ละลายเนื่องจากการแข็งตัวของน้ำภายในและนอกเซลล์ ซึ่งในขบวนการเก็บรักษาด้วยการแช่แข็ง เยื่อหุ้มเซลล์เป็นส่วนที่ได้รับความเสียหายมากที่สุดโดยการแตก และฉีกขาด ซึ่งสารรักษาสภาพเซลล์มีอยู่หลายชนิด และแต่ละชนิดมีคุณสมบัติแตกต่างกัน และอาจทำให้องค์ประกอบของโปรตีนเปลี่ยนโครงสร้างไปได้ (Linhart *et al*., 1993; Conlon *et al*., 1998; Heasman *et al*., 2001) การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษารูปแบบการผลิตโรติเฟอร์แบบมหามวลที่เหมาะสมต่อการเก็บเกี่ยวแบบเข้มข้น และศึกษาผลของสารรักษาสภาพเซลล์ที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาโรติเฟอร์ในรูปแบบเข้มข้น ทั้งนี้เพื่อหาแนวทางการผลิตและการเก็บรักษาที่เหมาะสมต่อการขยายผลสู่เชิงพาณิชย์ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ศึกษารูปแบบการผลิตโรติเฟอร์แบบมหามวลที่เหมาะสมต่อการเก็บเกี่ยวแบบเข้มข้น

1.1 การวางแผนการทดลอง

การศึกษานี้จะเลี้ยงโรติเฟอร์ด้วยอาหารต่างชนิดกัน ซึ่งอาหารที่นิยมใช้เลี้ยงโรติเฟอร์ คือ แพลงก์ตอนพืชกลุ่มสีเขียวสกุลคลอเรลลา (*Chlorella* sp.) ซึ่งแพลงก์ตอนพืชแต่ละสกุลก็จะมีคุณค่าทางโภชนาการที่แตกต่างกันออกไป ดังนั้น สมมติฐานของการศึกษานี้ คือ ถ้าเลี้ยงโรติเฟอร์ด้วยแพลงก์ตอนพืชที่หลากหลายชนิด น่าจะช่วยเพิ่มคุณภาพและผลผลิตของโรติเฟอร์ได้ดีกว่าที่เลี้ยงโรติเฟอร์ด้วยแพลงก์ตอนพืชเพียงชนิดเดียว โดยการศึกษานี้วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) แบ่งออกเป็น 7 ชุดการทดลอง ๆ ละ 5 ซ้ำ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 (control) เลี้ยงโรติเฟอร์ด้วยแพลงก์ตอนพืชสกุล *Chlorella*

ชุดการทดลองที่ 2 (T1) เลี้ยงโรติเฟอร์ด้วยแพลงก์ตอนพืชสกุล *Nannochloropsis*

ชุดการทดลองที่ 3 (T2) เลี้ยงโรติเฟอร์ด้วยแพลงก์ตอนพืชสกุล *Tetraselmis*

ชุดการทดลองที่ 4 (T3) เลี้ยงโรติเฟอร์ด้วยแพลงก์ตอนพืชสกุล *Chlorella*+*Nannochloropsis* (50:50)

ชุดการทดลองที่ 5 (T4) เลี้ยงโรติเฟอร์ด้วยแพลงก์ตอนพืชสกุล *Chlorella*+*Tetraselmis* (50:50)

ชุดการทดลองที่ 6 (T5) เลี้ยงโรติเฟอร์ด้วยแพลงก์ตอนพืชสกุล *Nannochloropsis*+*Tetraselmis* (50:50)

ชุดการทดลองที่ 7 (T6) เลี้ยงโรติเฟอร์ด้วยแพลงก์ตอนพืชสกุล *Chlorella*+*Nannochloropsis*+*Tetraselmis* (50:25:25)

1.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงโรติเฟอร์

นำหัวเชื้อแพลงก์ตอนพืชทั้ง 3 สกุล (*Chlorella* sp., *Nannochloropsis* sp. และ *Tetraselmis* sp.) จากห้องปฏิบัติการที่มีความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 10^6 เซลล์/มล. หรือหัวเชื้อที่อยู่ในระยะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว มาเพาะขยายปริมาณมากภายในถังพลาสติกขนาด 200 ลิตร ที่อัตราส่วนหัวเชื้อ : น้ำขยาย เท่ากับ 1:25 ในน้ำความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน (ppt) ใส่ปุ๋ยสำหรับการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนพืชกลุ่มสีเขียวน้ำเค็มที่ดัดแปลงมาจากสูตรของ Wongrat (2000) ซึ่งประกอบด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต (21-0-0) 50 กรัม ยูเรีย (46-0-0) 5 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 2.5 กรัม และเฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) 0.5 กรัม ต่อปริมาตรน้ำ 1 ลูกบาศก์เมตร เพาะขยายเป็นเวลา 2 วัน จึงนำมาเพาะขยายต่อในบ่อคอนกรีตขนาด กว้าง 1.5 × ยาว 2.0 × สูง (ลึก) 1.2 เมตร ที่ปริมาตรน้ำ 3,000 ลิตร (สกุลละ 3 บ่อ) นาน 3 วัน จึงนำแพลงก์ตอนพืชมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงโรติเฟอร์ที่ปริมาณเซลล์แพลงก์ตอนพืช 10^5 เซลล์/มิลลิลิตร

1.3 ศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของการผลิตโรติเฟอร์แบบมหามวล

นำแพลงก์ตอนพืชทั้ง 3 สกุลมาเลี้ยงโรติเฟอร์ตามแผนการทดลองที่กำหนด โดยใช้บ่อคอนกรีตขนาด กว้าง 1.5 × ยาว 2.0 × สูง (ลึก) 1.2 เมตร ที่ปริมาตรน้ำ 2,000 ลิตร จากนั้นใส่เชื้อโรติเฟอร์ลงในบ่อที่ความหนาแน่นประมาณ 10-20 ตัว/มล. สุ่มนับจำนวนโรติเฟอร์โดยใช้สไลด์นับแพลงก์ตอน (Sedgwick-rafter counting chamber) นับด้วย hand counter ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทุก 12 ชั่วโมง จนกว่าโรติเฟอร์ไม่เพิ่มจำนวน หรือจนกว่าความหนาแน่นของโรติเฟอร์เริ่มลดลง เพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโต (K) ดังสมการ

$$K = \frac{\ln N_t - \ln N_o}{t}$$

เมื่อ K = อัตราการเจริญเติบ (ตัว/วัน) N_o= ความหนาแน่นของโรติเฟอร์เริ่มต้น (ตัว) N_t = ความหนาแน่นของโรติเฟอร์เมื่อนำมาวิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโต (ตัว) ที่ระยะเวลา t

1.4 การเก็บเกี่ยวโรติเฟอร์ในรูปแบบเข้มข้นจากการผลิตแบบมหามวล

เลี้ยงโรติเฟอร์แบบ batch culture คือ ให้แพลงก์ตอนพืชเป็นอาหารครั้งเดียว และเก็บเกี่ยวผลผลิตทั้งหมดของโรติเฟอร์ที่มีอัตราการเจริญเติบโตอยู่ในระยะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว (Exponential phase หรือ Log phase) ซึ่งระยะเวลาการเลี้ยง หรือระยะเวลาเก็บเกี่ยวผลผลิตจะอ้างอิงจากผลการศึกษาในข้อ 1.2 โดยนับจำนวนโรติเฟอร์ก่อนการเก็บเกี่ยว จากนั้นเก็บเกี่ยวโรติเฟอร์โดยใช้สวิง หรือถุงกรองแพลงก์ตอนขนาดช่องตา 75 ไมโครเมตร ด้วยการเปิดท่อระบายน้ำออกจากบ่อเลี้ยง นำถุงกรองแพลงก์ตอนที่มีขนาดช่องตาใหญ่กว่า 200 ไมโครเมตร มากรองที่ปากท่อเพื่อดักจับตะกอน รอจนกว่าเก็บเกี่ยวโรติเฟอร์หมดบ่อ แล้วเก็บรวบรวมโรติเฟอร์ใส่ในถังขนาด 5 ลิตร แล้วนำมากรองผ่านถุงกรองแพลงก์ตอนขนาดช่องตา 75 ไมโครเมตรอีกครั้ง เพื่อเก็บโรติเฟอร์ในรูปแบบเข้มข้น หรือเก็บผลผลิตแบบน้ำหนักเปียกต่อไป (Oniam *et al.*,2019)

1.5 เปรียบเทียบผลผลิต และคุณภาพของโรติเฟอร์ในรูปแบบเข้มข้น

เปรียบเทียบปริมาณผลผลิตของโรติเฟอร์ที่ได้ในแต่ละชุดการทดลอง (จำนวนตัว และน้ำหนักเปียก) และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (proximate composition) ได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน รวมทั้งองค์ประกอบกรดไขมัน ได้แก่ ปริมาณ EPA (Eicosapentaenoic acid) และ DHA (Docosahexanoic acid) ของโรติเฟอร์ในแต่ละชุดการทดลองตามวิธีมาตรฐานของ ISO-Analysis animal feed stuffs (AOAC, 2000)

2. <u>ศึกษาผลของสารรักษาสภาพเซลล์ที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาโรติเฟอร์ในรูปแบบเข้มข้น</u>

2.1 การวางแผนการทดลอง

จากการศึกษาในหัวข้อที่ 1 เมื่อได้รูปแบบการผลิตโรติเฟอร์แบบมหามวลที่เหมาะสมต่อการเก็บเกี่ยวแบบเข้มข้นแล้ว ขั้นตอนต่อไปคือ การเก็บรักษา ซึ่งวิธีการเก็บรักษาที่ดีต้องคงไว้ซึ่งคุณค่าทางโภชนาการครบถ้วน และสภาพเซลล์ยังคงไว้ซึ่งสภาพเดิม ดังนั้น สมมติฐานของการศึกษานี้ คือ การเก็บรักษาโรติเฟอร์ในรูปแบบเข้มข้นด้วยวิธีการที่เหมาะสมที่สุดน่าจะนำไปสู่ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพ โดยการศึกษานี้วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) แบ่งออกเป็น 11 ชุดการทดลอง ๆ ละ 3 ซ้ำ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 (control) เก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -18 ถึง -20 องศาเซลเซียส (Biomass-freezing)

ชุดการทดลองที่ 2 (TF1) เก็บรักษาโดยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยทรีฮาโลสความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร ก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -18 ถึง -20 องศาเซลเซียส

ชุดการทดลองที่ 3 (TF2) เก็บรักษาโดยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -18 ถึง -20 องศาเซลเซียส

ชุดการทดลองที่ 4 (TF3) เก็บรักษาโดยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -18 ถึง -20 องศาเซลเซียส

ชุดการทดลองที่ 5 (TF4) เก็บรักษาโดยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 6 โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -18 ถึง -20 องศาเซลเซียส

ชุดการทดลองที่ 6 (TF5) เก็บรักษาโดยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -18 ถึง -20 องศาเซลเซียส

ชุดการทดลองที่ 7 (TF6) เก็บรักษาโดยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 15 โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -18 ถึง -20 องศาเซลเซียส

ชุดการทดลองที่ 8 (TF7) เก็บรักษาโดยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -18 ถึง -20 องศาเซลเซียส

ชุดการทดลองที่ 9 (TF8) เก็บรักษาโดยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยวิตามินซีความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -18 ถึง -20 องศาเซลเซียส

ชุดการทดลองที่ 10 (TF9) เก็บรักษาโดยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยวิตามินซีความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -18 ถึง -20 องศาเซลเซียส

ชุดการทดลองที่ 11 (TF10) เก็บรักษาโดยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยวิตามินซีความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -18 ถึง -20 องศาเซลเซียส

เก็บรักษาโรติเฟอร์ในรูปแบบเข้มข้นในถุงซิปที่ปริมาตรถุงละ 100 กรัม (น้ำหนักเปียก) ตรวจสอบคุณภาพของโรติเฟอร์ด้วยการตรวจสภาพเซลล์ และการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิต และที่ระยะเวลาเก็บรักษาผลผลิตนาน 4 และ 8 สัปดาห์ ดังนี้

2.2 การตรวจสภาพเซลล์

ใช้หลักการประเมินสภาพเซลล์ (Cell Condition Index) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ตามวิธีของ Heasman *et al*. (2001) คือ ระดับ 1 หมายถึง แย่มาก สภาพเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง (เซลล์แตก) มากกว่าร้อยละ 75 ระดับ 2 หมายถึง ไม่ดี สภาพเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง (เซลล์แตก) มากกว่าร้อยละ 50 ระดับ 3 หมายถึง น่าพอใจ สภาพเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง (เซลล์แตก) น้อยกว่าร้อยละ 50 ระดับ 4 หมายถึง ดี สภาพเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง (เซลล์แตก) น้อยกว่าร้อยละ 10 และระดับ 5 หมายถึง ดีมาก สภาพเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

2.3 การนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในผลิตภัณฑ์

ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจากตัวอย่างโรติเฟอร์ (Total plate count) หลังการเก็บเกี่ยวผลผลิต และที่ระยะเวลาเก็บรักษาผลผลิตนาน 4 และ 8 สัปดาห์ ด้วยวิธี Total Count Method โดยคำนวณแบคทีเรียทั้งหมดในหน่วยซีเอฟยู/มิลลิลิตร (CFU/ml)

2.4 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและกรดไขมัน

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี และกรดไขมันตามวิธีการในข้อ 1.4 โดยวิเคราะห์ 2 ครั้ง ได้แก่ วิเคราะห์ตัวอย่างก่อนเก็บรักษา (1 ตัวอย่าง จำนวน 3 ซ้ำ) และวิเคราะห์ตัวอย่างหลังเก็บรักษาตามชุดการทดลองทั้ง 11 ชุด (11 ตัวอย่างๆ ละ 3 ซ้ำ) ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 8 สัปดาห์

3. <u>การวิเคราะห์ผลทางสถิติ</u>

วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเพื่อหาความแตกต่างของข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในแต่ละการศึกษาตามข้อ 1 และ 2 ด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยวิเคราะห์ และประมวลผลด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistic for Windows (Version 21.0; IBM Corp., Armonk, NY. USA)

ผลการวิจัย

<u>1. ผลผลิตโรติเฟอร์แบบเข้มข้น</u>

ผลการศึกษาพบว่า โรติเฟอร์ในชุด T1 มีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันสูงกว่าโรติเฟอร์ในชุด Control, T2, T3 และ T6 (P<0.05) แต่ไม่แตกต่างกับอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยของโรติเฟอร์ในชุด T4 และ T5 (P>0.05) แต่ถึงอย่างไรก็ตาม ในด้านผลผลิตโรติเฟอร์แบบเข้มข้นที่ทำการเก็บเกี่ยวที่ระยะเวลาเลี้ยง 3 วัน พบว่า ผลผลิตในชุด Control, T1, T2, T3, T4 และ T5 ไม่มีความแตกต่างกัน (P>0.05) และสูงกว่าผลผลิตในชุด T6 (P<0.05) (ตารางที่ 1) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ในด้านการผลิตแบบเข้มข้น การเลี้ยงโรติเฟอร์ตามรูปแบบชุด Control, T1, T2, T3, T4 และ T5 มีความเหมาะสมมากกว่าการเลี้ยงโรติเฟอร์แบบ T6

ตารางที่ 1 อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยและผลผลิตในรูปแบบเข้มข้นของโรติเฟอร์ในแต่ละชุดการทดลอง (Mean±SD.)

ชุดการทดลอง	อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ย (ตัว/วัน)	ผลผลิตเฉลี่ย (กรัม/ตัน)
Control	1.0±0.1^{bc}	97.8±15.4^{a}
T1	1.6±0.5^{a}	117.0±17.4^{a}
T2	0.8±0.3^{bc}	97.6±10.0^{a}
T3	0.9±0.2^{bc}	103.6±13.9^{a}
T4	1.3±0.2^{ab}	113.8±15.7^{a}
T5	1.2±0.7^{ab}	101.8±14.2^{a}
T6	0.5±0.1^{c}	57.6±7.0^{b}
P-value	0.019	0.048

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งที่มีอักษรต่างกัน (a, b, c) หมายความว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P<0.05)

2. คุณภาพของผลผลิตโรติเฟอร์ในรูปแบบเข้มข้น

ด้านคุณค่าทางโภชนาการ พบว่า ปริมาณโปรตีนเฉลี่ยของผลผลิตโรติเฟอร์ที่ได้จากชุดการทดลอง T2 และ T5 สูงกว่าชุดการทดลองที่ T1 (P<0.05) ปริมาณคาร์โบไฮเดรตของแต่ละชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ปริมาณไขมันของชุดการทดลอง T2, T3 และ T6 สูงกว่า T4 (P<0.05) ปริมาณกรดไขมัน EPA ของชุด Control, T1 และ T5 สูงกว่า T2 และ T6 (P<0.05) และปริมาณกรดไขมัน DHA ของชุดการทดลอง T4 สูงกว่า T3 และ T5 (P<0.05) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ปริมาณโปรตีน (ร้อยละต่อน้ำหนักแห้ง) คาร์โบไอเดรต (ร้อยละต่อน้ำหนักแห้ง) ไขมัน (ร้อยละต่อน้ำหนักแห้ง) กรดไขมัน EPA (มิลลิกรัม/กรัม) และกรดไขมัน DHA (มิลลิกรัม/กรัม) ของโรติเฟอร์ที่เก็บเกี่ยวแบบเข้มข้นที่รูปแบบการผลิตต่างกัน (Mean±SD.)

ชุดทดลอง	โปรตีน	คาร์โบไอเดรต	ไขมัน	EPA	DHA
Control	36.3±3.2^{ab}	12.0±1.9^{a}	15.4±2.2^{ab}	1.6±0.4^{a}	0.2±0.1^{ab}
T1	32.0±3.8^{b}	12.0±1.9^{a}	14.9±1.3^{ab}	1.4±0.0^{a}	0.3±0.1^{ab}
T2	37.3±3.7^{a}	11.4±2.2^{a}	16.5±0.7^{a}	0.9±0.1^{b}	0.3±0.1^{ab}
T3	36.0±1.6^{ab}	11.5±1.2^{a}	17.0±1.6^{a}	1.1±0.3^{ab}	0.2±0.1^{b}
T4	33.3±1.7^{ab}	11.7±0.4^{a}	12.5±1.8^{b}	1.3±0.1^{ab}	0.5±0.1^{a}
T5	38.0±1.5^{a}	11.8±1.8^{a}	13.9±1.1^{ab}	1.4±0.2^{a}	0.1±0.0^{b}
T6	36.6±1.3^{ab}	12.1±0.6^{a}	17.0±1.6^{a}	0.9±0.2^{b}	0.2±0.2^{ab}
P-value	0.049	0.998	0.028	0.030	0.041

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งที่มีอักษรต่างกัน (a, b) หมายความว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P<0.05)

2. ผลของสารรักษาสภาพเซลล์ที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาโรติเฟอร์ในรูปแบบเข้มข้น

การศึกษานี้ เลี้ยงโรติเฟอร์ด้วยแพลงก์ตอนพืชสกุล *Nannochloropsis* sp. ที่ปริมาณเซลล์แพลงก์ตอนพืช 10^5 เซลล์/มิลลิลิตร นาน 3 วัน และจึงเก็บเกี่ยวผลผลิตโรติเฟอร์แบบเข้มข้น โดยแบ่งใส่ในถุงซิปที่ปริมาตรถุงละ 100 กรัม (น้ำหนักเปียก) ก่อนนำไปเก็บรักษาด้วยวิธีการต่าง ๆ (Oniam *et al*., 2019) ผลการศึกษาพบว่า

2.1 สภาพเซลล์ของผลผลิตโรติเฟอร์ในรูปแบบเข้มข้น

จากการประเมินสภาพเซลล์ (cell condition index) พบว่า การเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (T1) สภาพเซลล์ของโรติเฟอร์อยู่ในระดับไม่ดี (ระดับ 2) ถึงแย่มาก (ระดับ 1) ส่วนการเก็บรักษาด้วยวิธีการอื่น ๆ พบว่า สภาพเซลล์ของโรติเฟอร์อยู่ในระดับดีมาก (ระดับ 5) ระดับดี (ระดับ 4) และระดับน่าพอใจ (ระดับ 3) ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 4-8 สัปดาห์ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบรูปร่างเสียสภาพของผลผลิตโรติเฟอร์ในรูปแบบเข้มข้นที่วิธีการเก็บรักษาต่างกัน

ชุดทดลอง	ระดับการประเมินสภาพเซลล์		
	หลังเก็บผลผลิต	เก็บรักษาผลผลิตนาน 4 สัปดาห์	เก็บรักษาผลผลิตนาน 8 สัปดาห์
เก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -18 ถึง -20 องศาเซลเซียส (control)	5	2	1
เก็บรักษาโดยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยทรีฮาโลสความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -18 ถึง -20 องศาเซลเซียส (TF1)	5	4	4
เก็บรักษาโดยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -18 ถึง -20 องศาเซลเซียส (TF2)	5	4	4
เก็บรักษาโดยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -18 ถึง -20 องศาเซลเซียส (TF3)	5	4	4
เก็บรักษาโดยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 6 โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -18 ถึง -20 องศาเซลเซียส (TF4)	5	4	4
เก็บรักษาโดยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -18 ถึง -20 องศาเซลเซียส (TF5)	5	4	3
เก็บรักษาโดยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 15 โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -18 ถึง -20 องศาเซลเซียส (TF6)	5	3	3
เก็บรักษาโดยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -18 ถึง -20 องศาเซลเซียส (TF7)	5	4	4
เก็บรักษาโดยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยวิตามินซีความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -18 ถึง -20 องศาเซลเซียส (TF8)	5	3	3
เก็บรักษาโดยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยวิตามินซีความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -18 ถึง -20 องศาเซลเซียส (TF9)	5	3	3
เก็บรักษาโดยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยวิตามินซีความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -18 ถึง -20 องศาเซลเซียส (TF10)	5	3	3

2.2 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่พบในผลผลิตโรติเฟอร์ในรูปแบบเข้มข้นขณะเก็บรักษา

การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดของผลผลิตโรติเฟอร์ในรูปแบบเข้มข้นในแต่ละชุดการทดลอง พบว่า ที่ระยะเวลาการเก็บรักษาที่ 4 สัปดาห์ จะพบปริมาณแบคทีเรียในชุดการทดลองที่ TF8 มากกว่าชุดการทดลองที่ TF1, TF2, TF3, TF9 และ TF10 (P<0.05) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ที่ระยะเวลาการเก็บรักษาที่ 4 สัปดาห์ การเก็บรักษาผลผลิตโรติเฟอร์

ในรูปแบบเข้มข้นที่วิธีการเก็บรักษาตามชุดการทดลองที่ TF1, TF2, TF3, TF9 และ TF10 มีความเหมาะสมในการดำเนินการ โดยเฉพาะการเก็บรักษาตามชุดการทดลองที่ TF10 พบว่า มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดสะสมเฉลี่ยอยู่ที่ 0.73±0.55 × 10^5 ซีเอฟยู/มิลลิลิตร เท่านั้น ส่วนการเก็บรักษาที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณแบคที่เรียทั้งหมดที่พบในผลผลิตของโรติเฟอร์ในรูปแบบเข้มข้นในแต่ละชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่พบในผลผลิตโรติเฟอร์ในรูปแบบเข้มข้นที่วิธีการเก็บรักษาต่างกัน (Mean±SD.)

ชุดทดลอง	ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (× 10^5 ซีเอฟยู/มิลลิลิตร)		
	หลังเก็บผลผลิต	เก็บรักษาผลผลิตนาน 4 สัปดาห์	เก็บรักษาผลผลิตนาน 8 สัปดาห์
control	4.20±1.53^{a}	2.40±0.57^{ab}	2.03±0.40^{a}
TF1	4.20±1.53^{a}	1.80±0.54^{bc}	1.81±1.52^{a}
TF2	4.20±1.53^{a}	1.80±0.25^{bc}	1.92±0.93^{a}
TF3	4.20±1.53^{a}	1.77±0.42^{bc}	1.71±1.15^{a}
TF4	4.20±1.53^{a}	2.38±0.26^{ab}	1.04±0.05^{a}
TF5	4.20±1.53^{a}	2.43±0.67^{ab}	1.28±0.86^{a}
TF6	4.20±1.53^{a}	1.98±0.86^{abc}	0.86±0.54^{a}
TF7	4.20±1.53^{a}	2.01±0.79^{abc}	0.90±0.34^{a}
TF8	4.20±1.53^{a}	3.17±1.48^{a}	1.70±0.67^{a}
TF9	4.20±1.53^{a}	1.18±0.06^{bc}	2.55±0.83^{a}
TF10	4.20±1.53^{a}	0.73±0.55^{c}	2.12±1.10^{a}
P-value	1.000	0.027	0.348

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งที่มีอักษรต่างกัน (a, b) หมายความว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P<0.05)

2.3 องค์ประกอบทางเคมีและกรดไขมันหลังการเก็บรักษาที่ 8 สัปดาห์

คุณค่าทางโภชณาการหลังการเก็บรักษาโรติเฟอร์แบบเข้มข้นที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 8 สัปดาห์ พบว่า ชุดการทดลองที่ TF7 คงรักษาคุณค่าของโปรตีนได้ดีกว่าของชุดการทดลองที่ TF1, TF9 และ TF10 (P<0.05) และไม่แตกต่างกับชุดการทดลองอื่น ๆ ในด้านของคุณค่ากรดไขมัน EPA พบว่า ชุดการทดลองที่ TF9 และ TF6 คงรักษาคุณค่าของ EPA ได้ดีกว่าของชุดการทดลองที่ control, TF1, TF3 และ TF4 (P<0.05) และไม่แตกต่างกับชุดการทดลองอื่น ๆ นอกจากนี้ ในด้านของคุณค่าทางโภชณาการอื่น ๆ ได้แก่ คาร์โบไอเดรต ไขมัน และกรดไขมัน DHA ผลการศึกษาพบว่า การเก็บรักษาในแต่ละชุดการทดลองไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง หรือยังสามารถคงคุณค่าของคุณค่าทางโภชนาการเหล่านี้ได้ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ปริมาณโปรตีน (ร้อยละต่อน้ำหนักแห้ง) คาร์โบไอเดรต (ร้อยละต่อน้ำหนักแห้ง) ไขมัน (ร้อยละต่อน้ำหนักแห้ง) กรดไขมัน EPA (มิลลิกรัม/กรัม) และกรดไขมัน DHA (มิลลิกรัม/กรัม) ของผลผลิตโรติเฟอร์ในรูปแบบเข้มข้นที่วิธีการเก็บรักษาต่างกัน ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 8 สัปดาห์ (Mean±SD.)

ชุดทดลอง	โปรตีน	คาร์โบไอเดรต	ไขมัน	EPA	DHA
control	33.6±0.9^{ab}	10.8±0.4^{a}	13.8±0.9^{a}	0.8±0.2^{bc}	0.1±0.1^{a}
TF1	32.1±1.9^{b}	11.9±1.0^{a}	12.8±0.6^{a}	0.9±0.1^{bc}	0.1±0.1^{a}
TF2	33.6±2.1^{ab}	11.6±1.9^{a}	12.7±0.7^{a}	0.9±0.0^{abc}	0.1±0.0^{a}
TF3	33.9±0.7^{ab}	11.3±0.2^{a}	12.1±1.7^{a}	0.7±0.2^{c}	0.1±0.1^{a}
TF4	34.5±0.3^{ab}	12.4±1.5^{a}	14.1±0.8^{a}	0.9±0.2^{bc}	0.3±0.1^{a}
TF5	33.2±3.1^{ab}	11.7±1.4^{a}	12.5±1.8^{a}	0.9±0.1^{abc}	0.1±0.1^{a}
TF6	33.4±1.1^{ab}	11.7±1.0^{a}	12.8±2.0^{a}	1.2±0.0^{a}	0.1±0.0^{a}
TF7	35.4±1.9^{a}	10.7±0.4^{a}	12.8±0.8^{a}	1.1±0.3^{ab}	0.2±0.1^{a}
TF8	33.8±0.2^{ab}	11.7±0.4^{a}	13.0±2.5^{a}	1.1±0.3^{ab}	0.1±0.0^{a}
TF9	32.0±2.0^{b}	11.4±1.7^{a}	12.6±1.4^{a}	1.2±0.0^{a}	0.0±0.0^{a}
TF10	31.9±0.3^{b}	11.2±0.2^{a}	13.9±1.1^{a}	0.9±0.0^{abc}	0.2±0.1^{a}
P-value	0.048	0.833	0.798	0.027	0.554

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งที่มีอักษรต่างกัน (a, b, c) หมายความว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P<0.05)

วิจารณ์ผลการวิจัย

โรติเฟอร์เป็นแพลงก์ตอนสัตว์ที่กินอาหารได้หลายชนิด ได้แก่ สาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) ยีสต์ แบคทีเรีย และตะกอนในน้ำ ซึ่งอาหารที่ดีและเหมาะสมที่สุดในการเลี้ยงโรติเฟอร์ คือ คลอเรลลาน้ำกร่อย (*Chlorella* sp.) (Wongrat, 2000) อย่างไรก็ตาม จากผลการศึกษารูปแบบการผลิตโรติเฟอร์แบบมหามวลต่อการเก็บเกี่ยวผลผลิตโรติเฟอร์แบบเข้มข้นครั้งนี้ การเลี้ยงโรติเฟอร์ด้วยแพลงก์ตอนพืชสกุล *Chlorella* sp. (Control) *Nannochloropsis* sp. (T1) *Tetraselmis* sp. (T2) *Chlorella* sp.+*Nannochloropsis* sp. (50:50) (T3) *Chlorella* sp.+*Tetraselmis* sp. (50:50) (T4) และ *Nannochloropsis* sp.+*Tetraselmis* sp. (50:50) (T5) มีความเหมาะสมมากกว่าการเลี้ยงโรติเฟอร์ด้วย *Chlorella* sp.+*Nannochloropsis* sp.+*Tetraselmis* sp. (50:25:25) (T6) เนื่องจากการเลี้ยงตามชุดควบคุม T1, T2, T3, T4 และ T5 มีผลผลิตโรติเฟอร์แบบเข้มข้นเฉลี่ย (97.6±10.0 – 113.8±15.7 กรัม/ตัน) สูงกว่าชุด T6 (57.6±7.0 กรัม/ตัน) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ปัจจัยด้านอาหารที่ใช้เลี้ยงโรติเฟอร์เพื่อผลิตและเก็บเกี่ยวโรติเฟอร์แบบเข้มข้นมีผลต่อผลผลิตที่ได้ นอกจากนี้ยังมีผลต่อคุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ ปริมาณโปรตีน ไขมัน กรดไขมัน EPA และกรดไขมัน DHA ที่มีอยู่ในผลผลิตโรติเฟอร์แบบเข้มข้นอีกด้วย จากผลการศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าการเลี้ยงโรติเฟอร์ด้วย *Nannochloropsis* sp. มีความเหมาะสมต่อการนำมาผลิตโรติเฟอร์เพื่อเก็บเกี่ยวผลผลิตในรูปแบบเข้มข้นมากที่สุด เนื่องจาก การเก็บเกี่ยวผลผลิตโรติเฟอร์ในรูปแบบเข้มข้นต้องคำนึงถึงคุณภาพของโรติเฟอร์ที่เลี้ยงโดยเฉพาะอัตราการเจริญเติบโตของโรติเฟอร์ที่บ่งบอกถึงความสมบูรณ์ของสภาพการเลี้ยง หรือปัจจัย

แวดล้อมที่ดีโดยเฉพาะด้านอาหารที่ใช้เลี้ยงโรติเฟอร์ (Oniam *et al*, 2019) ซึ่งโรติเฟอร์ที่เลี่ยงด้วย *Nannochloropsis* จะมีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันสูง (1.6±0.5 ตัว/วัน) เมื่อเทียบกับโรติเฟอร์ที่เลี้ยงด้วย *Chlorella* (1.0±0.1 ตัว/วัน) และ *Tetraselmis* (0.8±0.3 ตัว/วัน) นอกจากนี้ ข้อดี หรือข้อได้เปรียบของแพลงก์ตอนพืชสกุล *Nannochloropsis* คือ มีความคงทนต่อสภาพแวดล้อมการเลี้ยง และมีปริมาณกรดไขมันชนิด EPA สูงกว่าแพลงก์ตอนพืชสองสกุลนี้ (Patil *et al*., 2007; Arkronrat *et al*., 2016a) อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าการเลี้ยงโรติเฟอร์ด้วยแพลงก์ตอนพืชสองชนิดร่วมกัน (*Chlorella*+*Tetraselmis* หรือ *Nannochloropsis*+*Tetraselmis*) จะมีอัตราการเจริญเติบเฉลี่ยไม่แตกต่างกันกับการเลี้ยงโรติเฟอร์ด้วย *Nannochloropsis* เพียงชนิดเดียว รวมไปถึงคุณค่าทางโภชนาการที่ได้ ในด้านของการบริหารจัดการผู้วิจัยเสนอแนะว่า ควรดำเนินการผลิตโรติเฟอร์ในรูปแบบเข้มข้นโดยใช้แพลงก์ตอนพืชเพียงชนิดเดียวจะสะดวกกว่า เพราะมีขั้นตอนไม่ยุ่งยากซับซ้อนเท่ากับการใช้แพลงก์ตอนพืชสองชนิด หรือมากกว่าสองชนิด ส่วนการเลี้ยงโรติเฟอร์ด้วย *Chlorella*+*Nannochloropsis*+*Tetraselmis* กลับมีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ย และผลผลิตเฉลี่ยต่ำกว่าการเลี้ยงโรติเฟอร์ด้วยแพลงก์ตอนพืชเพียงชนิดเดียว ซึ่งไม่เป็นไปตามสมมติฐานของการศึกษานี้ ที่ว่าถ้าเลี้ยงโรติเฟอร์ด้วยแพลงก์ตอนพืชที่หลากหลายชนิด น่าจะช่วยเพิ่มคุณภาพและผลผลิตของโรติเฟอร์ได้ดีกว่าที่เลี้ยงโรติเฟอร์ด้วยแพลงก์ตอนพืชเพียงชนิดเดียว ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการให้โรติเฟอร์กินอาหาร หรือกินแพลงก์ตอนพืชที่หลากหลายในเวลาเดียวกันจะมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของโรติเฟอร์โดยตรง เนื่องจากปริมาณแพลงก์ตอนพืชที่หลากหลายนั้น อาจมีคุณค่าทางโภชนาการไม่เพียงพอต่อความต้องการของโรติเฟอร์เมื่อเทียบกับการให้อาหาร หรือให้แพลงก์ตอนพืชเพียงชนิดเดียว เพราะแพลงก์ตอนพืชแต่ละชนิดมีคุณค่าทางโภชนาการที่แตกต่างกัน และมีผลต่อการเจริญเติบโตของโรติเฟอร์ที่แตกต่างกันด้วย (Ajah, 2010) แต่ถึงอย่างไรก็ตาม การเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการให้กับแพลงก์ตอนพืชที่นำมาเลี้ยงโรติเฟอร์ยังคงมีความจำเป็นต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตโรติเฟอร์ (Liammai, 2018) ซึ่งสิ่งนี้เป็นประเด็นวิจัยที่ควรนำมาประยุกต์ หรือต่อยอดการผลิตโรติเฟอร์แบบเข้มข้นต่อไป

การใช้สารรักษาสภาพเซลล์มีความสำคัญต่อการเก็บผลผลิตโรติเฟอร์ในรูปแบบเข้มข้นที่อุณหภูมิ -18 ถึง -20 องศาเซลเซียส Oniam *et al*. (2019) รายงานว่า การใช้ทรีฮาโลสที่ระดับร้อยละ 1 และ 2 โดยปริมาตร (v/v) สามารถใช้รักษาสภาพเซลล์ของโรติเฟอร์ที่เก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ได้นานถึง 12 สัปดาห์ และดีกว่าการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ที่ใช้ทรีฮาโลสที่ระดับร้อยละ 0.5 โดยทั่วไปแล้วปริมาณการเติมสารรักษาสภาพเซลล์เพื่อใช้ในการเก็บรักษาแพลงก์ตอนจะอยู่ที่ร้อยละ 1-5 โดยปริมาตร แต่ทั้งนี้ปริมาณของสารรักษาสภาพเซลล์ที่ใช้จะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ชนิด หรือองค์ประกอบทางเคมีของสารรักษาสภาพเซลล์ กลไกการออกฤทธิ์ของสารรักษาสภาพเซลล์ และผลข้างเคียงของสารรักษาสภาพเซลล์ต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของแพลงก์ตอน เป็นต้น เนื่องจากสารรักษาสภาพเซลล์แต่ละชนิดมีกลไกการทำงานในการป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ที่แตกต่างกัน (Linhart *et al*., 1993; Conlon *et al*., 1998; Wongrat, 2000; Brand & Diller, 2004; Arkronrat *et al*., 2016b) ตัวอย่างเช่น ร้อยละ 2 ของกลูโคสมีประสิทธิภาพในการรักษาสภาพเซลล์ไข่รินน้ำจืด (*Chironomus fuscipes*) น้อยกว่าร้อยละ 1 ของทรีฮาโลส เนื่องจากทรีฮาโลสเป็นกลุ่มของสารรักษาสภาพเซลล์ที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ ส่วนกลูโคสเป็นกลุ่มของสารรักษาสภาพเซลล์ที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ โดยสารรักษาสภาพเซลล์ที่ออกฤทธิ์ภายในจำเป็นต้องซึมผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์เพื่อทำหน้าที่ป้องกันอันตรายไม่ให้เกิดขึ้นขณะแช่แข็ง และละลาย ในขณะที่กลุ่มสารรักษาสภาพที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์จะทำหน้าที่ป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ขณะที่อยู่นอกเซลล์ ซึ่งขณะแช่แข็งเยื่อหุ้มเซลล์จะเป็นส่วนที่ได้รับความเสียหายมากที่สุด ด้วยเหตุนี้

การใช้สารรักษาสภาพเซลล์ที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์จึงใช้ในปริมาณที่น้อยกว่า และจะมีประสิทธิภาพในการรักษาสภาพเซลล์สูงกว่า (Thipkonglars, 2010) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่า คุณค่าทางโภชณาการหลังการเก็บรักษาโรติเฟอร์แบบเข้มข้นของด้วยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยปริมาตร คงรักษาคุณค่าของโปรตีนได้ดีกว่าการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยทรีฮาโลสความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร เติมวิตามินซีความเข้มข้นร้อยละ 3 และ 5 โดยปริมาตร ในด้านของคุณค่ากรดไขมัน EPA พบว่า เก็บรักษาด้วยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 15 โดยปริมาตรรักษาคุณค่าของ EPA ได้ดีกว่าเก็บรักษาด้วยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 4 และ 6 โดยปริมาตร ส่วนในด้านของคุณค่าทางโภชณาการอื่น ๆ ได้แก่ คาร์โบไอเดรต ไขมัน และกรดไขมัน DHA พบว่าการเก็บรักษาในแต่ละชุดการทดลองไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง หรือยังสามารถคงคุณค่าของคุณค่าทางโภชนาการเหล่านี้ได้ แสดงให้เห็นว่า ชนิดและปริมาณของสารรักษาสภาพเซลล์ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ควรคำนึงถึงในการนำมาใช้เก็บรักษาโรติเฟอร์ในรูปแบบเข้มข้น โดยหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิตถ้าใช้กลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 15 โดยปริมาตร หรือวิตามินซีความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยปริมาตร เป็นสารรักษาสภาพเซลล์ของโรติเฟอร์ในรูปแบบเข้มข้นจะสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 ถึง -20 องศาเซลเซียสได้นานถึง 8 สัปดาห์ โดยไม่มีผลกระทบต่อสภาพเซลล์ การสะสมของปริมาณแบคทีเรีย และคุณค่าทางโภชนาการของโรติเฟอร์ที่เก็บรักษา ซึ่งกลีเซอรอลมีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในการแช่น้ำเชื้อปลา แต่ข้อควรระวังของการใช้กลีเซอรอล คือ ต้องใช้ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมจึงจะเกิดประสิทธิภาพสูงสุด เช่น การใช้กลีเซอรอลร้อยละ 15-20 โดยปริมาตร จะส่งผลให้น้ำเชื้อปลายี่สก (*Probarcus jullieni*) ตายหมดในนาทีแรก แต่ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2-5 โดยปริมาตร สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ได้ เป็นต้น (Linhart *et al*., 1993) นอกจากนี้ มีรายงานว่านิยมใช้กลีเซอรอลร้อยละ 2 โดยปริมาตร ในการเก็บรักษาแพลงก์ตอนพืชอีกด้วย (Wongrat, 2000) ส่วนวิตามินซีนอกจากมีคุณสมบัติเป็นสารรักษาสภาพเซลล์ที่ดีแล้ว (Heasman *et al*., 2001) ได้มีการนำวิตามินซีมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำกันอย่างหลากหลาย ทั้งในด้านใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำ ใช้เพิ่มคุณค่าโภชนาการอาหารสัตว์น้ำ เป็นต้น (De Silva & Davy, 2010)

สรุปผลการวิจัย

จากผลการศึกษาแนวทางการผลิตโรติเฟอร์ (*Brachionus rotundiformis*) ในรูปแบบเข้มข้นเพื่อการค้าของการศึกษาครั้งนี้ สรุปได้ดังนี้

1. ด้านการผลิต

อาหารที่ใช้เลี้ยงโรติเฟอร์เพื่อผลิตและเก็บเกี่ยวโรติเฟอร์ในรูปแบบเข้มข้นมีผลต่อผลผลิตและคุณค่าทางโภชนาการของผลผลิตโรติเฟอร์แบบเข้มข้น โดยการเลี้ยงโรติเฟอร์ที่ความหนาแน่นเริ่มต้นประมาณ 10 ตัว/มิลลิลิตรด้วยแพลงก์ตอนพืชสกุล *Nannochloropsis* sp. ที่ปริมาณเซลล์ประมาณ 10^5 เซลล์/มิลลิลิตร นาน 3 วัน มีความเหมาะสมต่อการผลิตโรติเฟอร์เพื่อเก็บเกี่ยวผลผลิตในรูปแบบเข้มข้น โดยโรติเฟอร์จะมีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันเท่ากับ 1.6±0.5 ตัว/วัน ผลผลิตเฉลี่ยเท่ากับ 117.0±17.4 กรัม/ตัน ปริมาณโปรตีนเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 32.0±3.8 ต่อน้ำหนักแห้ง คาร์โบไฮเดรตเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 12.0±1.9 ต่อน้ำหนักแห้ง ไขมันเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 14.9±1.3 ต่อน้ำหนักแห้ง กรดไขมัน EPA เฉลี่ยเท่ากับ 1.4±0.0 มิลลิกรัม/กรัม และกรดไขมัน DHA เฉลี่ยเท่ากับ 0.3±0.1 มิลลิกรัม/กรัม

2. ด้านการเก็บรักษาผลผลิต

หลังเก็บเกี่ยวผลผลิตโรติเฟอร์แบบเข้มข้นจากบ่อเลี้ยง (น้ำหนักเปียก) สามารถเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยกลีเซอรอล (glycerol) ความเข้มข้นร้อยละ 15 โดยปริมาตร หรือเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยวิตามินซี (ascorbic acid) ความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยปริมาตร แล้วสามารถนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 ถึง -20 องศาเซลเซียส ได้นานถึง 8 สัปดาห์ โดยไม่ส่งผลกระทบต่อสภาพเซลล์ การสะสมของปริมาณแบคทีเรีย และคุณค่าทางโภชนาการของผลผลิตที่เก็บรักษา

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณในการดำเนินการโครงการนี้ (ทุนส่งเสริมการศึกษาวิจัย คณะประมง ประจำปี พ.ศ.2561) ขอขอบคุณ คุณประภาพร ดีมาก กองวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง ที่ช่วยเหลือในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ขอขอบคุณ คุณมนตรี บัวบาล ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งประจวบคีรีขันธ์ กรมประมง ที่ช่วยเหลือในการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย และผู้วิจัยขอขอบคุณบุคลากรของสถานีวิจัยประมงคลองวาฬทุกท่าน ที่ช่วยเหลือการดำเนินการในภาคสนาม ตลอดจนช่วยเก็บข้อมูลจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงตามเป้าประสงค์

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.

A.O.A.C. (2000). *Official Methods of Analysis*. 17th ed., Virginia: .Association of Official Analytical Chemists.

Arkronrat, W., Deemark, P., & Oniam, V. (2016a). Growth performance and proximate composition of mixed cultures of marine microalgae (*Nannochloropsis* sp. & *Tetraselmis* sp.) with monocultures. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, *38*(1), 1-5.

Arkronrat, W., Deemark, P., & Oniam, V. (2016b). 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)*. (p. 521). Vietnam: Can Thu.

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

Conlon, J.M., Yano, K., Chartrel, N., Vaudry H., & 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.

De Silva, S.S. & Davy, F.B. (2010). *Success Stories in Asian Aquaculture*. New York: Springer.

Dhert, P., Rombaut, G., Suantika, G., & 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., O'Connor, W.A., & Foulkes, L.A. (2001). *Production of Micro-algal Concentrates for Aquaculture Part 2*: *Development and Evalution of Harvesting, Preservation, Storage and Feeding Technology*. New South Wales: NSW Fisheries.

Liammai, S. (2018). *Enrichment technique of rotifers with Isochrysis aff. Galbana clone T-Iso supplemented with nitrate under optimal salinity and light intensity*. Bangkok: M.S. Thesis, Kasetsart University. (in Thai)

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

Lubzens, E., Tandler, A., & Minkoff, G. (1989). Rotifer as food in aquaculture. *Hydrobiologia*, *186/187*, 339-400.

Oniam, V., Arkronrat, W., & Deemark, P. (2019). Usage of trehalose as cryoprotectant agent on preservation of marine rotifer (*Brachionus rotundiformis*) in concentrate form at different storage. *Journal of Fisheries Technology Research, 13*(1), 75-87.

Patil, V., Kallqvist, T., Olsen, E., Vogt, G., & Gislerod, H.R. (2007). Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquaculture International*, *15,* 1-9.

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

Wongrat, L. (2000). *Manual of Plankton Culture*. Bangkok: Kasetsart University. (in Thai)