

การเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella protothecoides* BUUC1602 จากหัวเชื้อที่เก็บรักษาด้วยเทคนิคการตรึงเซลล์ในแคลเซียมอัลจินต

มะลิวัลย์ คุตะโค¹ จันทรจักรัส วัฒนะโชติ² ยุทธยา อยู่เย็น³ นงนุช รุ่งสว่าง⁴ รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ⁵
ปวีณา ตปนิยวรวงศ์⁶ ภควรรณ เศรษฐมงคล^{7*}

Received : June 14, 2022

Revised : July 21, 2022

Accepted : July 24, 2022

บทคัดย่อ

หัวเชื้อสาหร่ายเป็นหนึ่งในปัจจัยที่สำคัญต่อการเติบโตของสาหร่ายในกระบวนการเลี้ยง งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการเติบโตของ *Chlorella protothecoides* BUUC1602 จากการเลี้ยงด้วยหัวเชื้อที่ได้จากวิธีการตรึงและเก็บรักษาเซลล์ที่แตกต่างกัน ในการทดลองขั้นแรกเลี้ยงสาหร่ายด้วยวิธีแบบเซลล์แขวนลอยและเซลล์ตรึงสาหร่ายด้วยอาหารสูตรกลลาร์ด F/2 ความเค็ม 30 พีเอสยู วางขวดเลี้ยงสาหร่ายภายใต้อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ 26 ± 1 องศาเซลเซียส และให้แสง 4000 ลักซ์ พบว่าอัตราการเติบโตจำเพาะของสาหร่ายที่เลี้ยงแบบเซลล์แขวนลอยและเซลล์ตรึง เท่ากับ 0.34 และ 0.53 ต่อวัน ตามลำดับ ขั้นตอนต่อมา ทดลองเตรียมเม็ดเซลล์ตรึงสาหร่ายบนแคลเซียมอัลจินต ทั้งรูปแบบที่ไม่เติมกลีเซอรอล และเติมกลีเซอรอลให้มีความเข้มข้น 5% ปริมาตรต่อปริมาตร แล้วนำเม็ดเซลล์ตรึงสาหร่ายเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และทำแห้งด้วยวิธีการระเหิด เก็บรักษาเม็ดเซลล์ตรึงที่ผ่านขั้นตอนเก็บรักษาเซลล์ไว้เป็นเวลา 30 วัน จากนั้นจึงละลายเม็ดเซลล์ตรึง และนำสาหร่ายไปเลี้ยงแบบเซลล์แขวนลอย พบว่า การใช้หัวเชื้อสาหร่ายในรูปของเซลล์ตรึงที่มีการเติมกลีเซอรอล และผ่านขั้นตอนการเก็บรักษาเซลล์ด้วยวิธีการระเหิด ทำให้สาหร่ายมีการเติบโตได้ดีกว่าชุดการทดลองอื่น โดยให้เซลล์สูงสุด 138×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอัตราการเติบโตจำเพาะ 0.69 ต่อวัน แสดงให้เห็นว่า หากต้องการเก็บรักษาเซลล์สาหร่าย *C. protothecoides* BUUC1602 เพื่อใช้งานเป็นหัวเชื้อที่สะดวกในการเก็บรักษาสภาพ สามารถทำได้ด้วยวิธีการตรึงเซลล์สาหร่ายบนแคลเซียมอัลจินตที่มีกลีเซอรอลเป็นส่วนผสม และผ่านการทำแห้งด้วยวิธีการระเหิดได้

คำสำคัญ: การเก็บรักษาเซลล์ การตรึงเซลล์ การเติบโต แคลเซียมอัลจินต สาหร่ายขนาดเล็ก

¹ อาจารย์ คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี อีเมล: maliwan@buu.ac.th

² นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา อีเมล: janjarus@buu.ac.th

³ ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยสวนดุสิต อีเมล: yutthaya_yuy@dusit.ac.th,

⁴ นักวิจัยประจำสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยสวนดุสิต อีเมล: nongnuch_uta@dusit.ac.th

⁵ อาจารย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อีเมล: rachanimuk@buu.ac.th

⁶ ผู้ช่วยนักวิจัยอาวุโส ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ อีเมล: paveena.tap@biotec.or.th

⁷ อาจารย์ คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี อีเมล: pakawan-p@go.buu.ac.th

* ผู้นิพนธ์หลัก อีเมล: pakawan-p@go.buu.ac.th

GROWTH OF MICROALGAE *Chlorella protothecoides* BUUC1602 FROM INOCULUM PRESERVED BY CELL IMMOBILIZATION TECHNIQUE IN CALCIUM ALGINATE

Maliwan Kutako¹ Janjarus Watanachote² Yutthaya Yuyen³ Nongnuch Rungsawang⁴
Rachanimuk Hiransuchalert⁵ Paveena Tapaneeyaworawong⁶ Pakawan Setthamongkol^{7*}

Abstract

Microalgae inoculum is one of the important factors for their growth in the culture process. This research investigated the growth of *Chlorella protothecoides* BUUC1602 from inoculated cultures obtained by different immobilization and storage methods. Earlier in the experiment, microalgae were cultured by cell suspension and immobilization method using the stock culture in form of cell suspension with Guillard's F/2 media, salinity 30 PSU. The microalgae culture flask was placed at room temperature of 26 ± 1 °C and exposed to 4000 lux. The results revealed that the specific growth rates of microalgae cultured with cell suspension and immobilization methods were 0.34 and 0.53 per day, respectively. Then, microalgae were immobilized on calcium alginate. The microalgal bead was prepared without and add glycerol to a concentration of 5% volume per volume. The immobilized microalgae beads were then stored using different methods i.e. freezing at -20 °C and drying by lyophilization method. Microalgae beads were kept for 30 days, dissolved, and cultured in an F/2 media as suspended cells. The results showed that the microalgae inoculum in form of an immobilized microalgae bead with glycerol added and preserved by the lyophilized method had a better growth of microalgae compared to the other experiments. It produced a maximum cell density of 138×10^4 cells/ml and a specific growth rate of 0.69 per day. The finding confirms that for storage of the inoculum of *C. protothecoides* BUUC1602 and for convenience to maintain then it should be created by immobilizing the microalgae on calcium alginate with glycerol added and drying by lyophilization method.

Keywords: Cell preservation, Cell Immobilization, Growth, Calcium alginate, Microalgae

¹ Lecturer, Faculty of Marine Technology, Burapha University, Chanthaburi Campus,
e-mail: maliwan@buu.ac.th

² Scientist, senior professional level, Institute of Marine Science, Burapha University, email: janjarus@buu.ac.th

³ Director, Research and Development Institute, Suan Dusit University, e-mail: yutthaya_yuy@dusit.ac.th,

⁴ Researcher, Research and Development Institute, Suan Dusit University, e-mail: nongnuch_uta@dusit.ac.th

⁵ Lecturer, Faculty of Science, Burapha University, e-mail: rachanimuk@buu.ac.th

⁶ Senior research assistance, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, e-mail: paveena.tap@biotec.or.th

⁷ Lecturer, Faculty of Marine Technology, Burapha University, Chanthaburi Campus, e-mail:
pakawan-p@go.buu.ac.th

* Corresponding author, e-mail: pakawan-p@go.buu.ac.th

บทนำ

สาหร่ายทะเลขนาดเล็ก (Marine microalgae) สามารถสร้างอาหารได้เองจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงเช่นเดียวกับพืช และมีลักษณะการเติบโตคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย เพราะมีการแบ่งเซลล์แบบทวิคูณ จึงใช้ระยะเวลาการเลี้ยงในแต่ละรอบสั้นกว่าพืชอื่น ๆ อีกทั้งสาหร่ายขนาดเล็กอุดมไปด้วยสารประกอบทางชีวภาพที่มีประโยชน์หลายชนิด ทั้งในรูปของสารสี กรดไขมัน และโปรตีน เป็นต้น (Spolaore et al., 2006) จึงมีการนำสาหร่ายไปใช้ประโยชน์หลายด้าน เช่น การใช้เป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อน ผลิตภัณฑ์ชีวภาพที่มีมูลค่าเป็นแหล่งผลิตเชื้อเพลิง และผสมในอาหารมนุษย์และสัตว์ (Caporgno et al., 2019)

สาหร่าย *Chlorella protothecoides* BUUC1602 เป็นสาหร่ายสีเขียวที่แยกได้จากอ่าวหมู่ อำเภอสทิงพระ จังหวัดสงขลา (จุฑพงษ์ พิรุฬห์ภาวดี, 2559) และสามารถเลี้ยงสาหร่ายดังกล่าวในสภาวะห้องปฏิบัติการได้โดยใช้อาหารสูตรกลีลาร์ด F/2 (Stein, 1973) ความเค็ม 30 พีเอสยู (PSU) สาหร่ายเติบโตได้ดีให้ผลผลิตเซลล์สูง 499×10^7 เซลล์ต่อลิตรต่อวัน นอกจากนี้ยังมีไขมันสูงถึง 25% ของน้ำหนักแห้ง และอุดมไปด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัว เช่น กรดปาล์มมิติก (Palmitoleic acid, C16:1) กรดโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9) และกรดไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6) (สมเกียรติ แวนมณี และคณะ, 2562) สาหร่าย *Chlorella* มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดมากกว่า 40% ของน้ำหนักแห้ง รวมถึงมีการโบไฮเดรตในรูปของพอลิแซ็กคาไรด์ (Polysaccharide) เช่น เซลลูโลส (Cellulose) แป้ง (Starch) และที่ที่น่าสนใจ คือ มีเบต้า-กลูแคน (β -glucan) เป็นองค์ประกอบ เพราะสารประกอบดังกล่าวช่วยเสริมสร้างและกระตุ้นภูมิคุ้มกันของมนุษย์และสัตว์ (Ibrahim & Elbaily, 2020) จึงแสดงให้เห็นว่าสาหร่าย *Chlorella* สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพของมนุษย์และผสมในอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนได้ ในการเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กจำเป็นต้องมีหัวเชื้อสาหร่ายที่พร้อมใช้งาน กล่าวคือ สภาพเซลล์ต้องสมบูรณ์ เติบโตอยู่ในระยะทวีคูณ (Exponential phase) และไม่มีการปนเปื้อน เทคนิคโดยทั่วไปที่ใช้ในการรักษาหัวเชื้อสาหร่าย คือ การแช่ให้สาหร่ายเติบโตบนอาหารแข็งและเลี้ยงไว้ในอาหารเหลว ซึ่งจำเป็นต้องอาศัยแรงงานสำหรับดำเนินการย้ายเชื้อลงอาหารใหม่เป็นประจำ เพื่อป้องกันไม่ให้อาหารตายเนื่องจากขาดแคลนสารอาหาร การเก็บรักษาจุลินทรีย์ไว้ที่อุณหภูมิต่ำ (-80 ถึง -196 องศาเซลเซียส) และวิธีการทำแห้งด้วยวิธีการระเหิดเป็นวิธีที่สามารถเก็บรักษาหัวเชื้อจุลินทรีย์ได้เป็นระยะเวลานาน แต่วิธีการนี้จำเป็นต้องใส่สารป้องกันเซลล์ (Cryoprotectant) เช่น กลีเซอรอล (Glycerol) เมทานอล (Methanol) และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide, DMSO) เป็นต้น เพื่อไม่ให้เซลล์เกิดความเสียหายในระหว่างขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง (Kihika et al., 2022)

เทคนิคการตรึงเซลล์ (Immobilized cells) เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่ใช้ในการเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อให้ผลิตเอนไซม์ และเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ทั้งนี้การตรึงเซลล์จุลินทรีย์มีหลายวิธี เช่น การยัดตัวนำ (Carrier-binding method) ที่เชื่อมเซลล์จุลินทรีย์โดยตรงกับตัวนำที่ไม่ละลายน้ำ การตรึงเซลล์แบบเชื่อมไขว้ (Cross-linking method) เป็นการเชื่อมเซลล์จุลินทรีย์เข้าด้วยกันโดยมีพันธะทางเคมีด้วยการใช้กลูตารัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde) และการตรึงเซลล์แบบการดักจับ (Gel Entrapping) ที่ห่อหุ้มเซลล์ไว้ในวัสดุที่ทำหน้าที่เป็นเยื่อเลือกผ่าน (Semipermeable membrane) หรือห่อหุ้มเซลล์ไว้ภายในช่องว่างในเจลของสารพอลิเมอร์ (Polymer) ทั้งนี้การเซลล์ตรึงบนแคลเซียมอัลจิเนตเป็นการห่อหุ้มเซลล์ไว้ในผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นเจล (Gel) ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของโซเดียมอัลจิเนต (Sodium alginate) และแคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride) ซึ่งโซเดียมอัลจิเนตเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถเกิดเป็นเจลได้เมื่อมีการเชื่อมไขว้เข้ากับไอออนของโลหะเกิดร่างแหไอออนิก ไอออนของโลหะที่มีประจุสูงที่นิยมใช้ได้แก่ Ca^{2+} เทคนิคการตรึงเซลล์แบบดังกล่าวเป็นที่นิยม เนื่องจากทำได้ง่าย รวดเร็วและสารเคมีที่ใช้ไม่เกิดอันตรายต่อเซลล์ (Vasilieva et al., 2016) ในปัจจุบันมี

การใช้เทคนิคตรึงเซลล์สาหร่ายเพื่อใช้ประโยชน์ในหลายด้าน เช่น ผลิตสารเมแทบอลิท์ และใช้บำบัดโลหะหนัก ธาตุอาหาร หรือสารที่ก่อให้เกิดมลพิษทางน้ำ เป็นต้น เนื่องจากเมื่อตรึงเซลล์แล้วสามารถแยกเซลล์ตรึงสาหร่ายออกจากน้ำเลี้ยงได้ง่าย จึงสะดวกในการนำเซลล์ไปใช้งาน หรือการนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้งานซ้ำ (Moreno-Garrido, 2008; บุรินทร์ มนตรีวิสัย และคณะ, 2564) นอกจากนี้การตรึงเซลล์ยังใช้เป็นเทคนิคในการเก็บรักษา หัวเชื้อสาหร่าย โดย Senko et al. (2022) ได้รายงานว่าการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียว (Green microalgae) สาหร่ายสีแดง (Red microalgae) ไดอะตอม (Diatom) และไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria) บางชนิดได้นานกว่าหนึ่งปี

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาวิธีการตรึงเซลล์และเก็บรักษาเซลล์สาหร่าย *C. protothecoides* BUUC1602 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการเลี้ยงสาหร่าย ที่มุ่งหมายให้สามารถเก็บรักษาหัวเชื้อสาหร่ายได้เป็นเวลานาน ประหยัดพื้นที่ในการจัดเก็บ ไม่สิ้นเปลืองแรงงานและเวลาในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ เพื่อย้ายสาหร่ายลงในอาหารสำหรับใช้เป็นหัวเชื้อ (Subculture)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก *C. protothecoides* BUUC1602 ที่เลี้ยงแบบเซลล์แขวนลอยและเซลล์ตรึงบนแคลเซียมอัลจิเนต
2. เพื่อศึกษาการเติบโตของ *C. protothecoides* BUUC1602 จากการเลี้ยงด้วยหัวเชื้อที่ได้จากวิธีการตรึงและเก็บรักษาเซลล์ที่แตกต่างกัน

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สาหร่ายที่ใช้ในการทดลอง

สาหร่ายสีเขียว *C. protothecoides* BUUC1602 ที่แยกได้จากชายฝั่งทะเลอ่าวไทย บริเวณจังหวัด จันทบุรี (จตุพงษ์ พิรุฬห์ภาวดี, 2559) เก็บรักษาหัวเชื้อไว้ ณ หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี โดยเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร F/2 ที่เตรียมจากน้ำทะเลความเค็ม 30 พีเอสยู วางบนชั้นไฟที่ให้แสง 4000 ลักซ์ และควบคุมอุณหภูมิห้อง 26 ± 1 องศาเซลเซียส

2. การทดลองที่ 1 ศึกษาการเติบโตของ *C. protothecoides* BUUC1602 ที่เลี้ยงแบบเซลล์แขวนลอยและเซลล์ตรึงบนแคลเซียมอัลจิเนต

ทำการเลี้ยงสาหร่าย *C. protothecoides* BUUC1602 แบบเซลล์แขวนลอยและเซลล์ตรึง การเลี้ยงสาหร่ายแบบเซลล์แขวนลอย ได้เลี้ยงสาหร่ายในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุอาหารสูตร F/2 ความเค็ม 30 พีเอสยู ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมหหัวเชื้อสาหร่ายปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นวางขวดเลี้ยงสาหร่ายบนชั้นไฟที่มีความเข้มแสง 4000 ลักซ์ เติมหอากาศที่ผ่านตัวกรองที่มีขนาดรูพรุน 0.22 ไมครอน และควบคุมอุณหภูมิห้อง 26 ± 1 องศาเซลเซียส ส่วนการเลี้ยงสาหร่ายแบบเซลล์ตรึง ได้ใช้วิธีการตรึงเซลล์ที่ดัดแปลงจาก Chen (2006) เริ่มจากละลายโซเดียมอัลจิเนต 1.5 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ให้ความร้อน 90-95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ได้เป็นสารละลายโซเดียมอัลจิเนต จากนั้นละลายแคลเซียมคลอไรด์ 1.5 กรัม ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ได้เป็นสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ นำสารละลายโซเดียมอัลจิเนตที่เตรียมไว้ผสมกับหัวเชื้อสาหร่าย ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเทใส่หลอดฉีดยา ปริมาตร 50 มิลลิลิตร หยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่เตรียมไว้และแช่เม็ดเจล นาน 20 นาที เพื่อให้เม็ดเจลคงรูป นำเม็ดเซลล์ตรึงสาหร่าย

ปริมาตร 70 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่และเติมอาหาร F/2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเลี้ยงสาหร่ายในสถานะเช่นเดียวกันกับการเลี้ยงสาหร่ายแบบเซลล์แขวนลอย

ทำการทดลองเลี้ยงสาหร่ายแบบเซลล์แขวนลอยและเซลล์ตรึง แบบละ 3 ซ้ำ เป็นเวลา 8 วัน และติดตามการเติบโตของสาหร่ายด้วยวิธีการนับเซลล์บนสไลด์นับเม็ดเลือด (Haemocytometer) ซึ่งเซลล์ตรึงสาหร่ายต้องละลายเม็ดเซลล์ตรึงด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก Romo & Pérez-Martínez (1997) โดยใช้จำนวนเม็ดเซลล์ตรึงสาหร่าย (เม็ด) ต่อน้ำกลั่น (มิลลิลิตร) ต่อสารละลายโซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟต (Sodium hexametaphosphate) เข้มข้น 0.08 โมลาร์ เท่ากับ 5:1.2:0.3 ตามลำดับ แล้วนับจำนวนสาหร่ายบนสไลด์นับเม็ดเลือดที่มีความลึกของ Chamber เท่ากับ 0.1 มิลลิเมตร จากนั้นคำนวณความหนาแน่นเซลล์ (Cell density) และอัตราการเติบโตจำเพาะของสาหร่าย (Specific growth rate, μ) ดังสมการที่ 1 และ 2 ตามลำดับ (Guillard & Sieracki, 2005)

$$\text{Cell density (cells/ml)} = \frac{\text{Number of cell} \square \times 10,000}{\text{Number of squares}} \quad (1)$$

$$\mu \text{ (per day)} = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1} \quad (2)$$

เมื่อ X_2 และ X_1 คือ ความหนาแน่นเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ณ เวลา t_2 และ t_1 (วัน) และ $\ln$ คือ Natural logarithm

3. การทดลองที่ 2 ศึกษาการเติบโตของ *C. protothecoides* BUUC1602 จากการเลี้ยงด้วยหัวเชื้อที่ได้จากวิธีการตรึงและเก็บรักษาเซลล์ที่แตกต่างกัน

การทดลองนี้ประกอบด้วย วิธีการตรึงเซลล์สาหร่าย การเก็บรักษาเม็ดเซลล์ตรึงสาหร่าย และการทดลองเพิ่มจำนวนสาหร่าย โดยใช้หัวเชื้อในรูปแบบของเม็ดเซลล์ตรึงสาหร่ายที่เตรียมได้

การตรึงเซลล์สาหร่ายได้ทำ 2 วิธีการ คือ (1) ได้ตรึงเซลล์สาหร่ายดังวิธีการเช่นเดียวกับหัวเชื้อที่ 2 ซึ่งไม่มีการเติมกลีเซอรอล และ (2) ตรึงเซลล์สาหร่ายโดยเตรียมสารละลายโซเดียมอัลจินเตเช่นเดียวกับวิธีการทดลองหัวเชื้อที่ 2 ผสมกับหัวเชื้อสาหร่ายที่มีความหนาแน่นเซลล์ 435×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 15 มิลลิลิตร และเติมกลีเซอรอล 5 มิลลิลิตร (คิดเป็น 5% ปริมาตรต่อปริมาตร) ผสมให้เข้ากัน แล้วเทใส่หลอดฉีดยาและหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ แช่ไว้เป็นเวลา 20 นาที ได้เป็นเม็ดเซลล์ตรึงสาหร่ายที่มีกลีเซอรอลเป็นส่วนประกอบ จากนั้นกรองเม็ดเซลล์ตรึงสาหร่ายด้วยผ้าขาวบางที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

การเก็บรักษาเม็ดเซลล์ตรึงสาหร่าย เริ่มจากนำเม็ดเซลล์ตรึงสาหร่ายที่ไม่มีและมีการเติมกลีเซอรอลไปผ่านกรรมวิธีการเก็บรักษาหัวเชื้อ 2 วิธีการ คือ (1) เก็บในตู้แช่อุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน และ (2) นำไปทำแห้งด้วยวิธีการระเหิด (Lyophilization) โดยนำเม็ดเซลล์ตรึงสาหร่ายไปแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำไปทำให้แห้งด้วยวิธีการระเหิดโดยใช้เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dryer) จนกระทั่งเม็ดเจลแห้ง และเก็บเม็ดเจลเซลล์ตรึงสาหร่ายไว้ที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน

การทดลองเพิ่มจำนวนสาหร่ายโดยใช้หัวเชื้อในรูปแบบของเม็ดเซลล์ตรึงสาหร่ายที่ผ่านกรรมวิธีการเก็บรักษาแตกต่างกัน มีขั้นตอนเริ่มจากนำเม็ดเซลล์ตรึงสาหร่ายมาแช่ในอาหารเหลวสูตรกิลลาร์ด F/2 เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำเม็ดเซลล์ตรึงสาหร่ายไปละลายตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Romo & Pérez-Martínez (1997) นำ

สารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วนำตะกอนเซลล์สาหร่ายใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรกิลลาร์ด F/2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร วางขวดเลี้ยงในชั้นไฟที่ให้แสง 4000 ลักซ์ และควบคุมอุณหภูมิห้อง 26 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน ติดตามการเติบโตของสาหร่ายด้วยวิธีการนับจำนวนเซลล์

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้คำนวณค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากนั้นวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี One-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Tukey HSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$) โดยใช้โปรแกรมสถิติ R (Team, 2020)

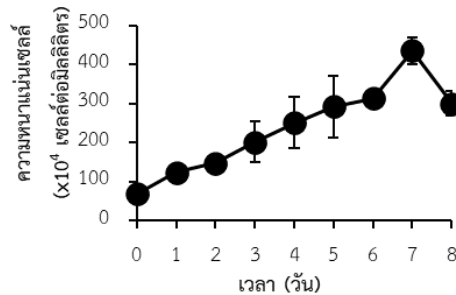
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. การเติบโตของ *C. protothecoides* BUUC1602 ที่เลี้ยงแบบเซลล์แขวนลอยและเซลล์ตรึง

การเลี้ยงสาหร่ายแบบเซลล์แขวนลอยพบว่าเซลล์มีการเติบโตได้ทันที โดยไม่มีระยะพักเซลล์ (Lag phase) แสดงให้เห็นว่าสภาวะแวดล้อมในอาหารที่เลี้ยงนั้นเหมาะสมต่อการเติบโตของสาหร่าย (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2543) และสาหร่ายให้เซลล์สูงสุดเท่ากับ 435.33×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 1) ซึ่งความหนาแน่นเซลล์สูงสุดที่ได้จากงานวิจัยนี้อาจน้อยกว่าการศึกษารายอื่น โดย จตุพงษ์ พิรุฬห์ภาวดี (2559) ได้เลี้ยงสาหร่ายชนิดเดียวกัน แต่ได้ใช้ความเข้มแสง 4,300 ลักซ์ ในการเลี้ยงสาหร่าย ซึ่งมากกว่างานวิจัยในครั้งนี้ ทำให้ได้เซลล์สูงสุดถึง 893.33×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้อาจเนื่องจากความเข้มแสงที่ใช้ในการทดลองมีความแตกต่างกัน และ Amini Khoeyi et al. (2012) พบว่าการเลี้ยง *Chlorella* ด้วยความเข้มแสง 5,400 ลักซ์ สามารถให้เซลล์สูงสุดได้ถึง 900×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าหากมีการเพิ่มความเข้มแสงในการเลี้ยงสาหร่าย *C. protothecoides* BUUC1602 แบบเซลล์แขวนลอย ให้มีความเข้มแสงมากกว่า 4,000 ลักซ์ อาจจะช่วยให้สาหร่ายเติบโตได้มากกว่านี้ ซึ่งการเลี้ยงสาหร่ายแบบเซลล์แขวนลอยเป็นเทคนิคที่นิยมเลี้ยงสาหร่าย โดยเซลล์สาหร่ายจะลอยเป็นอิสระในมวลน้ำ และมีการถ่ายโอนมวลของก๊าซ (คาร์บอนไดออกไซด์และออกซิเจน) และสารอาหาร (เช่น ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส) ระหว่างเฟสของแข็ง (เซลล์สาหร่าย) และเฟสของเหลว (น้ำเลี้ยงสาหร่าย) ได้ดี (Lin-Lan et al., 2018) เมื่อต้องการเก็บเกี่ยวเซลล์จะต้องใช้วิธีการแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยง เช่น การกรองแบบ Microfiltration การปั่นเหวี่ยงและการตกตะกอน เป็นต้น ซึ่งจำเป็นต้องใช้ต้นทุนและใช้เวลาในการดำเนินงานค่อนข้างมาก

จากการตรึงเซลล์สาหร่ายบนแคลเซียมอัลจิเนตได้เม็ดเซลล์ตรึงสาหร่ายที่มีลักษณะเป็นเม็ดเจล และมีรูปร่างหลายรูปแบบ โดยพบแบบวงกลมเป็นส่วนใหญ่ นอกจากนั้นเป็นแบบวงรีและหยดน้ำ (ภาพที่ 2) เม็ดเซลล์ตรึงสาหร่ายมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.9 ± 0.22 เซนติเมตร น้ำหนักโดยเฉลี่ยเท่ากับ 0.05 ± 0.003 กรัมต่อเม็ด เมื่อเลี้ยงเซลล์ตรึงสาหร่าย *C. protothecoides* BUUC1602 พบว่า เซลล์ตรึงสามารถเติบโตได้ดีและกระจายทั่วเม็ดตรึง เมื่อส่องผ่านภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเซลล์ไม่มีความเสียหาย รวมถึงในระหว่างการเลี้ยงไม่มีเซลล์สาหร่ายหลุดออกจากเม็ดเซลล์ตรึง ในวันที่ 7 ของการทดลอง พบว่า สาหร่ายมีจำนวนสูงสุดเท่ากับ 91.3×10^4 เซลล์ต่อเม็ดเจล จากนั้นการเติบโตของสาหร่ายเริ่มลดลง (ภาพที่ 3) เนื่องจากอัลจิเนตเป็นสารพอลิเมอร์ที่สกัดจากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล และสามารถเกิดเป็นเจลได้เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีไอออนของโลหะ เช่น Al^{3+} และ Ca^{2+} ซึ่งทำได้ง่าย สะดวกและรวดเร็ว และด้วยลักษณะที่เป็นพอลิเมอร์จึงมีช่องว่างให้เซลล์สาหร่ายอาศัยอยู่และมีการเคลื่อนที่ผ่านของของเหลวและก๊าซได้ดี อีกทั้งสารเคมีที่ใช้ในการตรึงเซลล์ไม่มีความเป็นพิษต่อสาหร่าย ดังนั้นจึงนิยมใช้เทคนิคนี้ในการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ที่มีชีวิต เช่น แบคทีเรียและสาหร่าย (สมใจ ศิริโชค

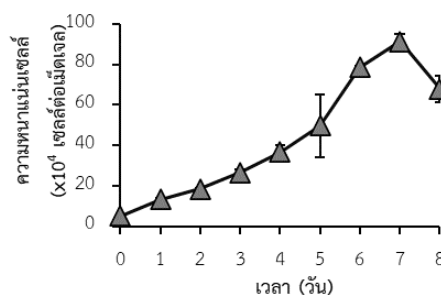
, 2547; Vasilieva et al., 2016) ทั้งนี้ Perez-Garcia et al. (2010) ก็ได้ตรึงเซลล์สาหร่ายน้ำจืด *Chlorella vulgaris* ร่วมกับแบคทีเรีย *Azospirillum brasilense* เป็นตัวช่วยส่งเสริมให้จำนวนเซลล์ตรึง *Chlorella* เติบโตได้มากกว่างานวิจัยในครั้งนี้



ภาพที่ 1 การเติบโตของ *C. protothecoides* BUUC1602 ที่เลี้ยงแบบเซลล์แขวนลอย เป็นระยะเวลา 8 วัน



ภาพที่ 2 เม็ดเซลล์ตรึงสาหร่าย *C. protothecoides* BUUC1602 บนแคลเซียมอัลจิเนต



ภาพที่ 3 การเติบโตของ *C. protothecoides* BUUC1602 ที่เลี้ยงแบบเซลล์ตรึง เป็นระยะเวลา 8 วัน

ผลจากการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่าการเลี้ยงสาหร่าย *C. protothecoides* BUUC1602 ที่ตรึงบนแคลเซียมอัลจิเนตมีความสามารถในการเติบโตได้ดี โดยมีอัตราการเติบโตจำเพาะ 0.53 ต่อวัน (ตารางที่ 1) และสอดคล้องกับ Jimenez-Perez et al. (2004) ที่รายงานว่าการตรึงเซลล์ไม่ได้มีผลต่อการแบ่งเซลล์ของสาหร่าย และเม็ดเซลล์ตรึงสาหร่ายนี้ยังมีข้อได้เปรียบในด้านความสะดวกในการเก็บรักษาไว้เป็นหัวเชื้อ

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยอัตราการเติบโตจำเพาะและความหนาแน่นเซลล์สูงสุด ($\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ของสาหร่าย *C. protothecoides* BUUC1602 ที่เลี้ยงแบบเซลล์แขวนลอยและแบบเม็ดเซลล์ตรึง

รูปแบบการเลี้ยงสาหร่าย	อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อวัน)	ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด
แบบเซลล์แขวนลอย	0.34($\pm$ 0.06)	435.33($\pm$ 34.50) $\times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร
แบบเซลล์ตรึงบนแคลเซียม อัลจิเนต	0.53($\pm$ 0.02)	91.3($\pm$ 3.61) $\times 10^4$ เซลล์ต่อเม็ดเจล

2. การเติบโตของ *C. protothecoides* BUUC1602 จากการเลี้ยงด้วยหัวเชื้อที่ได้จากวิธีการตรึงและเก็บรักษาเซลล์โดยใช้กลีเซอรอล

เมื่อเตรียมเม็ดเซลล์ตรึงสาหร่ายแบบที่ไม่มีและมีกลีเซอรอลเป็นส่วนผสม 5% จากนั้นนำไปผ่านกรรมวิธีการเก็บรักษาสภาพแตกต่างกัน 2 วิธี ได้แก่ การแช่เยือกแข็งที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน การทำแห้งด้วยวิธีการระเหิด แล้วเก็บเม็ดเจลเซลล์ตรึงสาหร่ายไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 วัน เช่นกัน ลักษณะเม็ดเซลล์ตรึงสาหร่ายที่ผ่านกรรมวิธีดังกล่าว แสดงดังภาพที่ 4



ก.



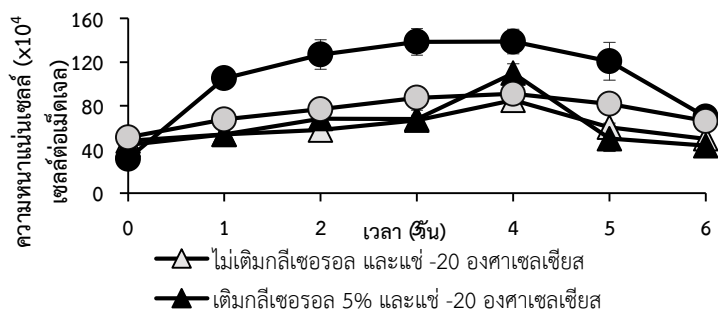
ข.

ภาพที่ 4 ลักษณะเม็ดเซลล์ตรึงสาหร่าย *C. protothecoides* BUUC1602 ที่ผ่านการรักษาสภาพด้วยกรรมวิธีการแช่ที่ -20 องศาเซลเซียส (ก.) และการทำแห้งด้วยวิธีการระเหิด (ข.)

เมื่อนำเม็ดเซลล์ตรึงสาหร่ายที่ผ่านกรรมวิธีการเก็บรักษาสภาพ (ภาพที่ 4) มาฟื้นสภาพเซลล์ โดยแช่ในอาหารเหลวสูตร F/2 และละลายเม็ดเซลล์ตรึงเพื่อนำสาหร่ายมาเป็นหัวเชื้อในการเลี้ยง พบว่าหัวเชื้อสาหร่ายที่ได้จากเม็ดเซลล์ตรึงสาหร่าย *C. protothecoides* BUUC1602 ที่ไม่ผสมกลีเซอรอล และผ่านการเก็บรักษาแบบแช่ที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 วัน เซลล์มีการเติบโตทันทีโดยไม่มีระยะพักเซลล์ และสาหร่ายมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดในวันที่ 4 ของการทดลอง เท่ากับ 85.07×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเช่นเดียวกันกับหัวเชื้อสาหร่ายที่มาจากเม็ดเซลล์ตรึงสาหร่ายที่มีผสมกลีเซอรอล ให้มีความเข้มข้น 5% ก็พบว่า สาหร่ายเติบโตอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันแรกของการเลี้ยงและสาหร่ายมีจำนวนเซลล์สูงสุดในวันที่ 4 ของการทดลอง เท่ากับ 109.87×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 5) ซึ่งเห็นได้ว่าการผสมกลีเซอรอลในเม็ดเซลล์ตรึง ช่วยให้สาหร่ายเติบโตได้ดีกว่าเม็ดเซลล์ตรึงที่ไม่เติมกลีเซอรอล เพราะการเก็บรักษาเซลล์จุลินทรีย์ด้วยวิธีการแช่เยือกแข็งควรใส่สารป้องกันเซลล์ เช่น กลีเซอรอล เพื่อให้สารดังกล่าวซึมเข้าสู่ภายในเซลล์ ทำให้จุดเยือกแข็งของของเหลวภายในเซลล์ลดลง และส่งผลให้เซลล์มีอัตราการรอดสูงขึ้น เนื่องจากกลีเซอรอลเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและดูดซับน้ำได้ดี จึงสามารถซึม

ผ่านเข้าและออกจากเซลล์ได้ดีเช่นกัน ด้วยเหตุนี้กลีเซอรอลจะช่วยป้องกันไม่ให้เซลล์เสียหายหรือถูกทำลายจากการเกิดผลึกน้ำแข็งในเซลล์ และช่วยรักษาสสมดุลความเข้มข้นของสารละลายภายในและภายนอกเซลล์ ดังนั้นสาหร่ายจึงฟื้นคืนสภาพและสามารถเติบโตได้ดี (Tanniou et al., 2012) และเช่นเดียวกับ ชลี ไพบูลย์กิจกุล และคณะ (2560) ที่รายงานว่า การเก็บรักษาสาหร่าย *Chlorella* sp. ด้วยวิธีแช่เยือกแข็งควรเติมกลีเซอรอล 5% จะช่วยให้สาหร่ายมีอัตราการรอดสูงกว่าความเข้มข้นที่ 10% ทั้งนี้ข้อดีการรักษาแบบแช่เยือกแข็ง -20 องศาเซลเซียส เป็นวิธีที่ใช้ต้นทุนน้อยและง่าย เพราะไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ที่จำเพาะ นอกจากนี้เทคนิคการแช่เยือกแข็งสามารถใช้เก็บรักษาเซลล์สาหร่ายได้เช่นกัน โดยมีรายงานว่าสาหร่าย *Chlorella vulgaris* CCAP 211/21A สามารถเก็บรักษาหัวเชื้อได้นานถึง 4 เดือน ณ อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส และสาหร่ายมีเซลล์ที่มีชีวิตสูงถึง 94% (Kapoor et al., 2019)

สำหรับการเลี้ยงสาหร่าย *C. protothecoides* BUUC1602 แบบเซลล์แขวนลอย โดยใช้หัวเชื้อที่เป็นเม็ดเซลล์ตรึงที่มีกลีเซอรอล 5% และผ่านการทำแห้งด้วยวิธีการระเหิด และเก็บเม็ดเซลล์ตรึงสาหร่ายไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน พบว่า สาหร่ายมีความสามารถในการเติบโต 0.69 ต่อวัน และมีจำนวนเซลล์สูงสุด 138.80×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 5) มากกว่าชุดการทดลองอื่น ($P < 0.05$) ในขณะที่การไม่เติมกลีเซอรอล เซลล์มีความหนาแน่นสูงสุดเท่ากับ 91.00×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 2) ซึ่งสาหร่ายเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วงวันที่ 0-2 ของการทดลอง แต่เมื่อเปรียบเทียบกับ การเลี้ยงสาหร่าย *C. protothecoides* BUUC1602 แบบเซลล์แขวนลอยเช่นกัน แต่หัวเชื้อที่ใช้เลี้ยงเป็นหัวเชื้อที่เติบโตแขวนลอยในอาหารเหลว (ตารางที่ 1) กลับพบว่าสาหร่ายที่เลี้ยงโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นเม็ดเซลล์ตรึงที่มีกลีเซอรอล 5% และผ่านการทำแห้งด้วยวิธีการระเหิดให้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดน้อยกว่าการใช้หัวเชื้อที่ใช้เลี้ยงเป็นหัวเชื้อที่เติบโตแขวนลอยในอาหารเหลว 3.14 เท่า แต่การเตรียมหัวเชื้อสาหร่ายที่เติบโตแขวนลอยในอาหารเหลวให้พร้อมใช้งานนั้น อาจจำเป็นต้องมีการย้ายหัวเชื้อเป็นประจำทุกสัปดาห์ เพื่อรักษาสภาพของเซลล์สาหร่าย ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ค่อนข้างถี่ในการย้ายเชื้อ ทำให้เสียเวลาและแรงงานมาก รวมถึงการย้ายเชื้อบ่อยอาจมีความเสี่ยงที่หัวเชื้อสาหร่ายจะปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ในขณะที่เม็ดเซลล์ตรึงสาหร่ายที่ผ่านการรักษาแบบทำแห้งด้วยวิธีการระเหิดสามารถเก็บไว้ได้นาน ใช้พื้นที่เก็บน้อย และสะดวกในการดำเนินการรักษาหัวเชื้อสาหร่ายเพราะไม่จำเป็นต้องมีกระบวนการย้ายเชื้อลงอาหารใหม่ จึงเป็นเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการเก็บรักษาสาหร่ายเป็นเวลานาน



ภาพที่ 5 การเติบโตของ *C. protothecoides* BUUC1602 จากการเลี้ยงด้วยหัวเชื้อที่ได้จากการตรึงเซลล์แบบไม่มีและมีการเติมกลีเซอรอล 5% และนำเม็ดเซลล์ตรึงไปผ่านการเก็บรักษาเซลล์ด้วยวิธีแตกต่างกัน คือวิธีแช่เยือกแข็ง ณ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน และการทำแห้งด้วยวิธีการระเหิดและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยอัตราการเติบโตจำเพาะและความหนาแน่นเซลล์สูงสุด ($\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ของ *C. protothecoides* BUUC1602 จากการเลี้ยงด้วยหัวเชื้อที่ได้จากวิธีการตรึงและเก็บรักษาเซลล์แตกต่างกัน โดยในขั้นตอนการเก็บรักษาเซลล์ก่อนนำมาใช้เป็นหัวเชื้อในการเลี้ยง ได้เก็บรักษาด้วยวิธีแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 วัน และการทำแห้งด้วยวิธีการระเหิดและนำไปเก็บไว้ ณ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 วัน

วิธีการเตรียมเม็ดเซลล์ตรึงสาหร่าย	วิธีการเก็บรักษาเม็ดเซลล์ตรึงสาหร่าย	อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อวัน)	ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด ($\times 10^4$ เซลล์ต่อเม็ดเจล)
ไม่เติมกลีเซอรอล	การแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส	0.14 (± 0.01) ^c	109.87 (± 8.44) ^b
เติมกลีเซอรอล 5%	การแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส	0.10 (± 0.02) ^d	85.07 (± 6.22) ^c
ไม่เติมกลีเซอรอล	การทำแห้งด้วยวิธีการระเหิด	0.17 (± 0.03) ^b	91.00 (± 0.60) ^c
เติมกลีเซอรอล 5%	การทำแห้งด้วยวิธีการระเหิด	0.69 (± 0.06) ^a	138.80 (± 11.20) ^a

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันของข้อมูลในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

สรุป

สาหร่าย *C. protothecoides* BUUC1602 สามารถเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการตรึงเซลล์บนแคลเซียมอัลจิเนตได้ และเมื่อทดลองตรึงเซลล์สาหร่ายแบบไม่เติมและเติมกลีเซอรอล (5% โดยปริมาตร) แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน และเก็บรักษาด้วยการทำแห้งด้วยวิธีระเหิด แล้วเก็บเม็ดเซลล์ตรึงแห้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน จึงละลายเม็ดเซลล์ตรึง และนำเซลล์สาหร่ายไปใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการเพาะเลี้ยงแบบเซลล์แขวนลอยในอาหาร F/2 เห็นได้ว่าสาหร่ายที่เลี้ยงโดยใช้หัวเชื้อจากการตรึงเซลล์บนแคลเซียมอัลจิเนตที่มีกลีเซอรอล สาหร่ายเติบโตได้ดีกว่าการไม่ใส่กลีเซอรอล และสามารถเก็บรักษาเซลล์สาหร่ายด้วยเทคนิคการตรึงเซลล์ที่มีกลีเซอรอลร่วมกับวิธีการระเหิด เมื่อต้องการเพิ่มจำนวนสาหร่ายทำได้โดยแช่เม็ดเซลล์ตรึงสาหร่ายในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นละลายเม็ดเซลล์ตรึง บั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บสาหร่าย และนำสาหร่ายไปละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ วิธีการนี้เหมาะสำหรับการเก็บรักษาสาหร่ายไว้เป็นเวลานาน ในกรณีที่ต้องการใช้หัวเชื้อสาหร่ายภายในเวลา 30 วัน สามารถใช้เทคนิคการตรึงเซลล์ที่มีกลีเซอรอล และเก็บเม็ดเซลล์ตรึงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ข้อเสนอแนะ

- เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้ได้เก็บรักษาเม็ดเซลล์ตรึงสาหร่ายไว้เพียง 30 วัน จึงนำมาทดลองใช้เป็นหัวเชื้อในการเลี้ยงสาหร่าย ดังนั้นในอนาคตจึงควรทดสอบเพิ่มระยะเวลาในการเก็บรักษาเม็ดเซลล์ตรึงให้นานกว่านี้ เพื่อให้ทราบถึงระยะเวลานานที่สุดที่สามารถเก็บรักษาเม็ดเซลล์ตรึงสาหร่ายไว้เป็นหัวเชื้อ
- งานวิจัยนี้ได้เลือกสาหร่ายเพียงชนิดเดียวในการทดลอง ซึ่งเป็นสาหร่ายชนิดที่นิยมใช้ในการอนุบาลสัตว์น้ำและใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพ และเพื่อเกิดประโยชน์ในการใช้สาหร่ายในด้านอื่น อาจต้องมีการทดลอง

ในสาหร่ายชนิดอื่นที่สามารถใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ในด้านต่าง ๆ เพราะหวั่นเชื้อสาหร่ายมีความสำคัญต่อการกระบวนการผลิตสาหร่าย

เอกสารอ้างอิง

- จตุพงษ์ พิรุฬห์ภาวดี. (2559). ผลของรูปแบบการเพาะเลี้ยงต่อการเติบโตและผลผลิตมวลชีวภาพของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ที่แยกได้จากอ่าวไทย จังหวัดจันทบุรี. ปัญหาพิเศษ วิทยาศาสตร์บัณฑิต คณะเทคโนโลยีทางทะเล, มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี.
- ชลี ไพบูลย์กิจกุล, มะลิวัลย์ คุดทะโค, รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ, ศศิพา ฉิมพลี และเบญจมาศ ไพบูลย์กิจกุล. (2560). ผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่ออัตราการรอดของสาหร่าย *Chlorella* sp. แก่นเกษตร, 45(ฉบับพิเศษ 1), 859-864.
- บุรินทร์ มนตรีวิสัย, อีรวัฒน์ สีทองแดง, ทรงกลด ไบยา, บงกช บุญบุรพงค์, อารณ บัวหลวง และสุรศักดิ์ ละลอกน้ำ. (2564). การผลิตเซลล์ตรึงไซยาโนแบคทีเรียออกซิซิลาทอเรีย ในการเพิ่มปริมาณออกซิเจนในน้ำเลี้ยงสังเคราะห์. วารสารเกษตรพระวรุณ, 18(2), 16-23.
- ลัดดา วงศ์รัตน์. (2543). คู่มือการเลี้ยงแพลงก์ตอนพืช. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สมเกียรติ แวนมณี, กานต์ธิดา บุญญาพงศ์, ปวีณา ตปนียารวงศ์ และมะลิวัลย์ คุดทะโค. (2562). การเติบโตและองค์ประกอบกรดไขมันของไซโคพอยด์โคพิพอด *Apocyclops royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายต่างชนิดกัน. การประชุมวิชาการระดับชาติวิจัยรำไพพรรณี ครั้งที่ 13, 19 ธันวาคม 2562 ณ แชนด์ดุนส์ เจ้าหลาวปีช รีสอร์ท. จันทบุรี: สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี.
- สมใจ ศิริโชค. (2547). จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพฯ.
- Amini Khoeyi, Z., Seyfabadi, J., & Ramezanpour, Z. (2012). Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris*. *Aquaculture International*, 20(1), 41-49.
- Caporgno, M. P., Haberkorn, I., Böcker, L., & Mathys, A. (2019). Cultivation of *Chlorella protothecoides* under different growth modes and its utilisation in oil/water emulsions. *Bioresource Technology*, 288, 121476.
- Chen, Y. C. (2006). Immobilization of twelve benthic diatom species for long term storage and as feed for post larval abalone *Haliotis diversicolor*. *Aquaculture*, 263(1-4), 97-106.
- Guillard, R. R., & Sieracki, M. S. (2005). Counting cells in cultures with the light microscope. *Algal Culturing Techniques*, 239-252.
- Ibrahim, I. A., & Elbaily, Z. I. (2020). A review: Importance of *Chlorella* and different applications. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, 65(1), 16-34.
- Jimenez-Perez, M. V., Sanchez-Castillo, P., Romera, O., Fernandez-Moreno, D., & Pérez-Martinez, C. (2004). Growth and nutrient removal in free and immobilized planktonic green algae isolated from pig manure. *Enzyme and Microbial Technology*, 34(5), 392-398.

- Kapoor, R. V., Huete-Ortega, M., Day, J. G., Okurowska, K., Slocombe, S. P., Stanley, M. S., & Vaidyanathan, S. (2019). Effects of cryopreservation on viability and functional stability of an industrially relevant alga. **Scientific Reports**, 9(1), 1-12.
- Kihika, J. K., Wood, S. A., Rhodes, L., Smith, K. F., Thompson, L., Challenger, S., & Ryan, K. G. (2022). Cryoprotectant treatment tests on three morphologically diverse marine dinoflagellates and the cryopreservation of *Breviolum* sp. (Symbiodiniaceae). **Scientific Reports**, 12(646), 1-12.
- Lin-Lan, Z., Jing-Han, W., & Hong-Ying, H. (2018). Differences between attached and suspended microalgal cells in ssPBR from the perspective of physiological properties. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 181, 164-169.
- Moreno-Garrido, I. (2008). Microalgae immobilization: current techniques and uses. **Bioresource Technology**, 99(10), 3949-3964.
- Perez-Garcia, O., De-Bashan, L. E., Hernandez, J-P., & Bashan, Y. (2010). Efficiency of growth and nutrient uptake from wastewater by heterotrophic, autotrophic, and mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* immobilized with *Azospirillum brasilense*. **Journal of Phycology**, 46(4), 800-812.
- Romo, S., & Pérez-Martínez, C. (1997). The use of immobilization in alginate beads for long-term storage of *Pseudanabaena galeata* (Cyanobacteria) in the laboratory 1. **Journal of Phycology**, 33(6), 1073-1076.
- Senko, O., Stepanov, N., Maslova, O., & Efremenko, E. (2022). “Nature-like” cryoimmobilization of phototrophic microorganisms: new opportunities for their long-term storage and sustainable use. **Sustainability**, 14(661), 1-16.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 101(2), 87-96.
- Stein, J. R. (Ed.). (1973). **Handbook of phycological methods: Culture methods and growth measurements**. New York: Cambridge University.
- Tanniou, A., Turpin, V., & Lebeau, T. (2012). Comparison of cryopreservation methods for the long term storage of the marine diatom *Haslea ostrearia* (simonsen). **Cryobiology**, 65(1), 45-50.
- Team, R. C. (2020). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Copenhagen: European Environment Agency.
- Vasilieva, S. G., Lobakova, E. S., Lukyanov, A. A., & Solovchenko, A. E. (2016). Immobilized microalgae in biotechnology. **Moscow University Biological Sciences Bulletin**, 71(3), 170-176.