บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เป็นจุลินทรีย์กลุ่ม *Schizochytrium* ที่แยกได้จากบริเวณป่าชายเลนในประเทศไทยได้แก่ ป่าชายเลนบางขุนเทียน จังหวัดกรุงเทพฯ เกาะช้าง จังหวัดตราด อ่าวตกเกาะแตน จังหวัดพังงา ได้จุลินทรีย์ทั้งหมด 10 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดไขมัน DHA ได้ และสายพันธุ์ที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้คือ *Schizochytrium* sp. BCC 25505 จากป่าชายเลนบางขุนเทียน จังหวัดกรุงเทพฯ

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

3.2.1 อุปกรณ์

- Incubator Shaker รุ่น Innova™ 4900 บริษัท New Brunswick ประเทศสหรัฐอเมริกา
- Freeze dryer รุ่น Supermodulyo บริษัท Savant ประเทศสหรัฐอเมริกา
- pH meter รุ่น Metler ประเทศอังกฤษ
- Centrifuge รุ่น RC5C บริษัท Sorvall ประเทศอังกฤษ
- Microcentrifuge รุ่น D-78532 บริษัท Hettich zentrifugen ประเทศเยอรมัน
- High Performance Liquid Chromatography (HPLC) รุ่น 2690 บริษัท Waters ประเทศสหรัฐอเมริกา
- Gas Chromatography (GC) รุ่น GC-17A บริษัท Shimadzu Corporation ประเทศญี่ปุ่น
- UV/Visible spectrophotometer รุ่น Cary บริษัท Varian
- Microscopy บริษัท Olympus ประเทศญี่ปุ่น
- Atomic Absorption Spectrometer รุ่น GBC932 บริษัท Scientific equipment PTY Ltd. ประเทศออสเตรเลีย

- Low temperature incubator รุ่น 815 บริษัท Precision Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา

- Autopipette บริษัท Gilson ประเทศฝรั่งเศส

- Hot air oven รุ่น Modell 700 บริษัท Memmert ประเทศเยอรมัน

- Boiling bath รุ่น BS-01 บริษัท Applied Medic ประเทศสหรัฐอเมริกา

- Sonicator รุ่น Crest บริษัท Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา

- Autoclave รุ่น SS-325 บริษัท Tomy Seiko ประเทศญี่ปุ่น

- Vortex รุ่น Genie2 บริษัท Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา

- ตู้ถ่ายเชื้อแบบ larminar flow รุ่น BH2000 series Class II บริษัท Biological Safety cabinets ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.2 **สารเคมี**

- เกลือทะเลสังเคราะห์ จากบริษัท Sigma-Alrich ประเทศเยอรมัน

- เปปโตน จากบริษัท Dickinson & company ประเทศสหรัฐอเมริกา

- ผงยีสต์สกัด จากบริษัท Dickinson & company ประเทศสหรัฐอเมริกา

- ผงวุ้น จากบริษัท Difco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา

- กรดซัลฟูริคเข้มข้น 95-97 เปอร์เซ็นต์ จากบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

- เฮกเซน จากบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

- เมทานอล จากบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

- คลอโรฟอร์ม จากบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

- Butylated hydroxytoluene (BHT) จากบริษัท Sigma chemical ประเทศสหรัฐอเมริกา

- D(+) Glucose anhydrous จากบริษัท Carlo Ersa reagent ประเทศอิตาลี

- NaCl จากบริษัท Carlo Ersa reagent ประเทศอิตาลี

- $MgSO_4.7H_2O$ จากบริษัท Carlo Ersa reagent ประเทศอิตาลี

- Na_2SO_4 จากบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

- Polyoxyethylene sorbitan monooleate (Tween 80) จากบริษัท Sigma-Alrich ประเทศเยอรมัน

- Vitamins KAO & Michayluk vitamin solution (100x) จากบริษัท Sigma-Alrich ประเทศเยอรมัน

- Urine Reagent Strips จากบริษัท Teco DIAGNOSTICS ประเทศเนเธอร์แลนด์
- Standard 189-19 FAME Mix จากบริษัท Supelco ประเทศสหรัฐอเมริกา
- Penicillin G sodium salt จากบริษัท Bio Basic ประเทศแคนาดา
- Streptomycin Sulfate จากบริษัท Bio Basic ประเทศแคนาดา
- Acid oil, deodorizer distillate and crude lecithin จากบริษัทธนากร ผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช ประเทศไทย

3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

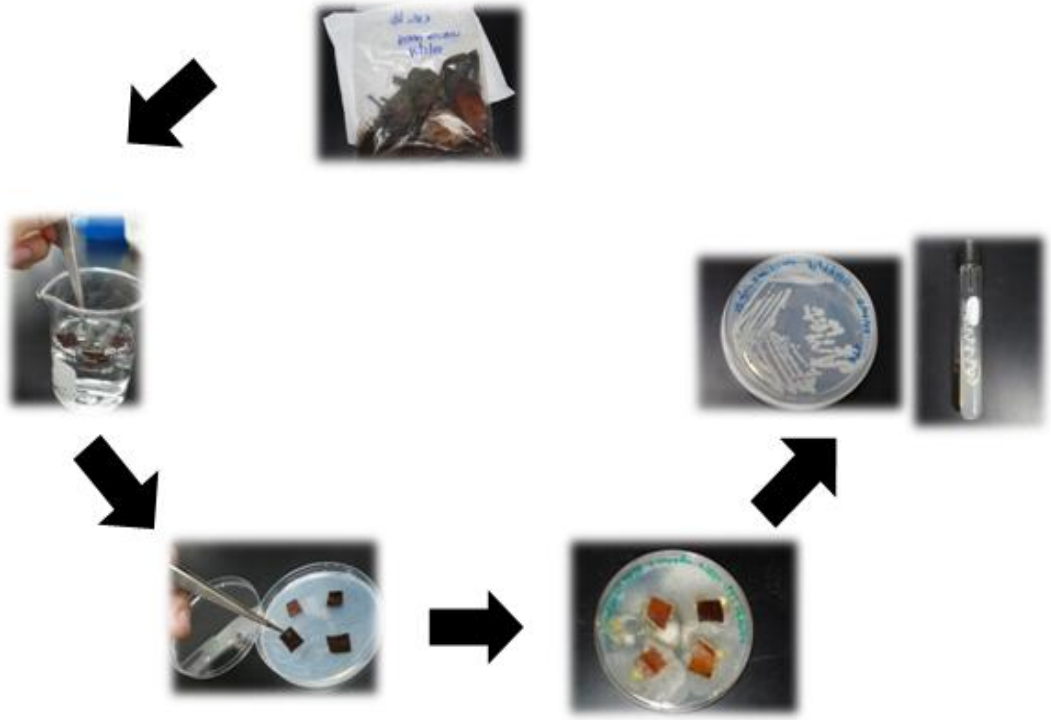
3.3.1 การคัดแยกจุลินทรีย์

เก็บตัวอย่างใบไม้และดอกไม้จากป่าชายเลนบางขุนเทียน จังหวัดกรุงเทพฯ เกาะช้าง จังหวัดตราด อ่าวตกเกาะแตน จังหวัดพังงา มาตัดเป็นแผ่นเล็กๆ ขนาด 1x1 เซนติเมตร นำมาล้าง 3 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่เติม Streptomycin และ Penicillin เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย จากนั้น นำมาวางลงบนอาหารแข็งชนิด GPY ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร เปปโตน 1 กรัมต่อลิตร ผงยีสต์สกัด 1 กรัมต่อลิตร เกลือทะเลสังเคราะห์ 15 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น 15 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-2 วัน และคัดแยกจุลินทรีย์กลุ่ม *Schizochytrium* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หลังจากนั้นทำการคัดแยกจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส บนหลอดที่มีอาหาร GPY ดังรูปที่ 3.1 โดยจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ทั้งหมดจะเก็บรักษาที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ

3.3.2 การสกัดและวิเคราะห์กรดไขมันจากจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากธรรมชาติ

เลี้ยงจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ด้วยอาหารเหลวชนิด GPY ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปบ่มเขย่าด้วยเครื่อง Incubator Shaker ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน เก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze-dried) และสกัดกรดไขมันเพื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี

รูปที่ 3.1
ขั้นตอนการคัดแยกจุลินทรีย์จากป่าชายเลน



3.3.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมจากการเติมน้ำตาลกลูโคส

3.3.3.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

เลี้ยงจุลินทรีย์ *Schizochytrium* sp. BCC 25505 ด้วยอาหารแข็งชนิด GPY เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นเจาะวุ้นในเพลทขนาด 1.5x1.5 ซม. 2 หลุม และล้างด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อ 15 กรัมต่อลิตร 10 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง จากนั้นดูด Zoospore suspension ในหลุมมา 1 มิลลิลิตร เติมลงอาหารเหลวชนิด GPY ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปบ่มเขย่าด้วยเครื่อง Incubator Shaker ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ให้อยู่ในช่วง 0.4 (เจือจางตัวอย่าง 10 เท่า) ก่อนเติมลงในอาหารแต่ละการทดลอง และยืนยันความบริสุทธิ์ของจุลินทรีย์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นเติมกล้าเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ทุกการทดลอง

3.3.3.2 ผลของความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส

เตรียมจุลินทรีย์เช่นเดียวกับข้อ 3.3.3.1 นำมาเติมลงในอาหารที่ประกอบด้วย ผงยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร Trace elements (วิธีการเตรียมดังภาคผนวก ข) จาก Stock trace elements ความเข้มข้น 100 เท่า ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร $MgSO_4$ 1 มิลลิโมลาร์ และน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นตั้งแต่ 30-150 กรัมต่อลิตร โดยเตรียมอาหารปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร สำหรับการเลี้ยงด้วยน้ำ ตาลกลูโคส 30 และ 60 กรัมต่อลิตร และเตรียมอาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในบัฟเฟอร์ฟลาสก์ (Baffled flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร สำหรับการเลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคส 90, 120 และ 150 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำไป ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และนำไปบ่มเขย่าด้วยเครื่อง Incubator Shaker ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที และเก็บเซลล์ที่ช่วงเวลาต่างๆ จนกระทั่งจุลินทรีย์ใช้น้ำตาลกลูโคสหมด จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วนำเซลล์ที่ได้ไปทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง เพื่อวิเคราะห์ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ DHA จากนั้นนำส่วนใส (Supernatant) ที่แยกออกมาได้ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส

3.3.4 ผลของ NaCl, Na_2SO_4 และ $MgSO_4$

เตรียมจุลินทรีย์เช่นเดียวกับข้อ 3.3.3.1 นำมาเติมลงในอาหารที่ประกอบด้วย ผงยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร Trace elements 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร และเติม NaCl 2 ระดับคือ 0 และ 12 มิลลิโมลาร์ Na_2SO_4 2 ระดับคือ 0 และ 6 มิลลิโมลาร์ และ $MgSO_4$ 2 ระดับคือ 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ เทียบกับการเลี้ยงด้วยอาหารที่เติมเกลือทะเลสังเคราะห์ 15 กรัมต่อลิตร โดยเตรียมอาหารปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร และนำไป ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที โดยออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียล (Factorial) 2 ระดับ 3 ปัจจัย (2^3) ดังตารางที่ 3.1 จากนั้นนำไปบ่มเขย่าด้วยเครื่อง Incubator Shaker ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที และเก็บเซลล์ที่ช่วงเวลาต่างๆ จนกระทั่งจุลินทรีย์ใช้น้ำตาลกลูโคสหมด ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 49 ชั่วโมง จากนั้นนำไปโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วนำเซลล์ที่ได้ไปทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง เพื่อวิเคราะห์ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ DHA จากนั้นนำส่วนใสที่แยกออกมาได้ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส

ตารางที่ 3.1

การออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียล 3 ปัจจัยๆ ละ 2 ระดับคือ NaCl 0 และ 12 มิลลิโมลาร์ (mM), Na_2SO_4 0 และ 6 mM และ $MgSO_4$ 1 และ 10 mM เปรียบเทียบกับการใช้เกลือทะเลสังเคราะห์ 15 กรัมต่อลิตร

Flask(s)	NaCl (mM)	Na_2SO_4 (mM)	$MgSO_4$ (mM)
1	0	6	1
2	0	0	10
3	12	6	1
4	12	0	10
5	12	6	10
6	0	0	1
7	0	6	10
8	12	0	1
9 (Control)	Artificial Sea Salts 15 g/L		

3.3.5 ผลของธาตุ (Elements) ที่เป็นองค์ประกอบหลักในเกลือทะเล

เตรียมจุลินทรีย์เช่นเดียวกับข้อ 3.3.3.1 นำมาเติมลงในอาหารที่ประกอบด้วย ผงยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร Trace elements 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร และ $MgSO_4$ ปริมาณ 0 และ 10 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ โดยเตรียมอาหารปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร และนำไป ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปบ่มเขย่าด้วยเครื่อง Incubator Shaker ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที และเก็บเซลล์ที่ช่วงเวลาต่างๆ จนกระทั่งจุลินทรีย์ใช้น้ำตาลกลูโคสหมด จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วนำเซลล์ที่ได้ไปทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง เพื่อวิเคราะห์ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ DHA จากนั้นนำส่วนใสที่แยกออกมาได้ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส และปริมาณ Na^+, Mg^{2+}, Cl^- และ SO_4^{2-} ตามลำดับ

3.3.6 ผลของปริมาณ $MgSO_4$ และความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสม

เตรียมจุลินทรีย์เช่นเดียวกับข้อ 3.3.3.1 นำมาเติมลงในอาหารที่ประกอบด้วย ผงยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร Trace elements 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 120-180 กรัมต่อลิตร และ $MgSO_4$ ปริมาณ 10-40 มิลลิโมลาร์ ดังตารางที่ 3.2 โดยเตรียมอาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในบัฟเฟอร์ฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร และนำไปผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปบ่มเขย่าด้วยเครื่อง Incubator Shaker ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที และ เก็บเซลล์ที่ช่วงเวลาต่างๆ จนกระทั่งจุลินทรีย์ใช้น้ำตาลกลูโคสหมด จากนั้นนำไปโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วนำเซล ล์ที่ได้ไปทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง เพื่อวิเคราะห์ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ DHA จากนั้นนำส่วนใสที่แยกออกมาได้ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส

ตารางที่ 3.2

การออกแบบสภาวะการเลี้ยง *Schizochytrium* sp. BCC 25505 ด้วยอาหารที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส และปริมาณ $MgSO_4$ ต่างกัน

Salt	Glucose Concentration (g/L)		
	120	150	180
$MgSO_4$	← 10 mM →		
	← 20 mM →		
	← 30 mM →		
	← 40 mM →		

3.3.7 การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ประโยชน์จากผลพลอยได้กระบวนการผลิตน้ำมันพืช

3.3.7.1 ผลของการใช้ผลพลอยได้ต่อการเจริญและการผลิต DHA

เตรียมจุลินทรีย์เช่นเดียวกับข้อ 3.3.3.1 นำมาเติมลงในอาหารที่ประกอบด้วย ผงยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร Trace elements 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร $MgSO_4$ 10 มิลลิโมลาร์ Tween 80 ปริมาณ 0.2 กรัมต่อลิตร และผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันพืชทั้ง 3 ชนิดได้แก่ acid

oil, distillate และ lecithin ความเข้มข้น 10-50 กรัมต่อลิตร โดยเตรียมอาหารปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร และนำไป ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปบ่มเขย่าด้วยเครื่อง Incubator Shaker ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที และเก็บเซลล์ที่ช่วงเวลาต่างๆ จากนั้นนำไปโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยเฮกเซน 2 ครั้ง แล้วนำเซลล์ที่ได้ไปทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง เพื่อวิเคราะห์ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ DHA และ lipid class โดย Thin Layer Chromatography (TLC)

3.3.7.2 ผลของการใช้ผลพลอยได้ร่วมกับน้ำตาลกลูโคสต่อการเจริญและการผลิต DHA

เตรียมจุลินทรีย์เช่นเดียวกับข้อ 3.3.3.1 นำมาเติมลงในอาหารที่ประกอบด้วย ผงยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร Trace elements 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร $MgSO_4$ 10 มิลลิโมลาร์ Tween 80 ความเข้มข้น 0.2 กรัมต่อลิตร acid oil, distillate และ crude lecithin ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร และเติมน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ คือ 15, 30 และ 45 กรัมต่อลิตร และชุดทดลองควบคุมมี 2 ชุดคือ ชุด ควบคุมแรกเป็นการทดลองที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ คือ 15, 30 และ 45 กรัมต่อลิตร ไม่มีการเติมผลพลอยได้ลงในอาหาร ส่วนชุดทดลองควบคุมต่อมาคือชุดทดลองที่มีการเติม acid oil, distillate และ crude lecithin ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ไม่มีการเติมน้ำตาลกลูโคสลงในอาหาร โดยเตรียมอาหารปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร และนำไปผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปบ่มเขย่าด้วยเครื่อง Incubator Shaker ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที และ เก็บเซลล์ที่ช่วงเวลาต่างๆ จากนั้นนำไปโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยเฮกเซน 2 ครั้ง แล้วนำเซลล์ที่ได้ไปทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง เพื่อวิเคราะห์ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ DHA จากนั้นนำส่วนใสที่แยกออกมาได้ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ส่วนผลพลอยได้ไม่ได้มีการนำไปวิเคราะห์ปริมาณที่เหลืออยู่ในส่วนใส เนื่องจากปัญหาทางด้านอุปกรณ์ และผลพลอยได้ที่นำมาใช้ในการทดลองเป็น crude by-product ไม่ใช่ pure product ดังนั้นการติดตามการลดลงของผลพลอยได้จึงเป็นไปได้ยาก

3.4 การวิเคราะห์

3.4.1 การวัดน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำตัวอย่างที่เก็บในแต่ละช่วงเวลาไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง (Fan, Chen, Jones & Vrijmod, 2000, pp. 186-187) เพื่อล้างอาหารออกจากเซลล์จนหมด สำหรับการทดลองที่มีการใช้น้ำมันเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวหรือการเติมน้ำมันร่วมกับการเติมกลูโคส จะล้างเซลล์ด้วยเฮกเซน 2 ครั้ง แล้วจึงนำไปทำแห้งแบบเยือกแข็งโดยใช้เครื่อง Freeze Dryer เป็นเวลา 2 วัน เพื่อ วิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลกลูโคส

ส่วนใสที่แยกได้หลังจากการปั่นเหวี่ยง นำมาเจือจางด้วยน้ำที่ผ่านการกำจัดไอออน (Deionized Water) เพื่อให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 0-20 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ Waters Sugar-Pak I ขนาด 6.5 x 300 มิลลิเมตร เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) คือ Deionized Water อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิคอลัมน์ 90 องศาเซลเซียส และใช้ Detector wavelength RI 16x โดยกรองตัวอย่างก่อนการฉีดเข้าเครื่อง HPLC ด้วย Filter membrane ขนาด 0.2 ไมครอน (μm) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร (การทดลองที่มีการใช้น้ำมันเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว หรือการเติมน้ำมันร่วมกับการเติมกลูโคส ตัวอย่างจะถูก De-fatted โดยการสกัดด้วยคลอโรฟอร์มด้วยอัตราส่วน 1:1 ก่อนการกรอง)

3.4.3 การสกัดและการวิเคราะห์กรดไขมัน

ชั่งน้ำหนักเซลล์แห้งปริมาณ 10-20 มิลลิกรัม ใส่หลอดสกัด จากนั้นเติม Internal standard (Nonadecanoic acid; C19:0) (วิธีการเตรียมดังภาคผนวก ค) ปริมาณ 100 ไมโครลิตร (μL) หรือ 1 มิลลิกรัม ต่อตัวอย่าง และเติมกรดซัลฟูริค 4 เปอร์เซ็นต์ ในเมทานอล ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มใน Water bath อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น หลังจากนั้นเติม เฮกเซน 1 มิลลิลิตร และ น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ให้เกิดการแยกชั้น แล้วจึงดูดส่วนใสในชั้นเฮกเซนออก (ส่วนบน) และเติม Na_2SO_4 ปริมาณเล็กน้อยเพื่อดูดความชื้นออกจากตัวอย่าง จากนั้นจึงดูดส่วนใสใส่ในหลอดสำหรับวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี ซึ่งประกอบด้วยคอลัมน์ Omegawax™ 250 Fused Silica

Capillary และ AOC-20i Auto Injector ส่วน Detector จะใช้ Flame Ionization Detector (FID) โดยอุณหภูมิ Injector คือ 250 องศาเซลเซียส และ Detector คือ 260 องศาเซลเซียส และใช้ฮีเลียมเป็น Carrier gas ที่ความเร็ว 30 เซนติเมตรต่อวินาที ส่วนอุณหภูมิคอลัมน์คือ 200 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจะเพิ่มขึ้นเป็น 230 องศาเซลเซียส และคงอุณหภูมินี้ไว้ 12 นาที และ เปรียบเทียบเวลาของแต่ละพีคกับสารละลายมาตรฐาน Fatty Acid Methyl Ester Standards (No.189-19) และ pure DHA-FAME (Sigma, USA)

3.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณ Na^+, Mg^{2+}

ส่วนใสที่แยกได้หลังจากการปั่นเหวี่ยง นำมาเจือจางด้วยกรดไนตริก 1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ Na^+ คือ 10-300 ppm และความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ Mg^{2+} คือ 0-20 ppm และวิเคราะห์ปริมาณแคทไอออนโดยเครื่อง Atomic Absorption Spectroscopy (AAS) รุ่น GBC 732 plus ต่อกับแก๊สอะเซทิลีน โดยการวิเคราะห์ Na^+ ใช้ความยาวคลื่น 330.2 นาโนเมตร และการวิเคราะห์ Mg^{2+} ใช้ความยาวคลื่น 202.6 นาโนเมตร

3.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณ Cl^-, SO_4^{2-}

ส่วนใสที่แยกได้หลังจากการปั่นเหวี่ยง นำมาเจือจางด้วยน้ำที่ผ่านการกำจัดไอออน (Deionized Water) เพื่อให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 18.75-300 ppm และวิเคราะห์ปริมาณ Cl^-, SO_4^{2-} ด้วยเครื่อง HPLC ซึ่งประกอบด้วยคอลัมน์ IC-PAK Anion HR ขนาด 4.6 x 7.5 มิลลิเมตร เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย Borate gluconate 20 มิลลิลิตรต่อลิตร, n-butanol 20 มิลลิลิตรต่อลิตร และ acetonitrile 120 มิลลิลิตรต่อลิตร ตามลำดับ ปรับปริมาตรโดยใช้ Deionized Water โดยอุณหภูมิคอลัมน์ 25 องศาเซลเซียส และใช้ 432 conductivity detector และอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที