

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้

3.1.1 วัสดุอุปกรณ์

- Fermentor: Biostat B , B.Braun , Germany
- Analytical balance : Sartorius analytic,Gottingen, Germany
- pH meter : Metler, UK
- Incubator shaker : Innova™ 4900 , New Brunswick, USA
- Vortex mixer : Vortex-2 Genie G-560E ,Scientific Industries Inc., New York, USA
- Centrifuge : Sorvall RC5C, UK
- Microcentrifuge : Hettich zentrifugen, D-78532, Germany
- Freeze dryer : Savant Supermodulyo, USA
- Spectrometer : GBC932 Scientific equipment PTY Ltd.,Australia
- Gas chromatography (GC): Shimudzu17A gas chromatography equipped with an auto-injector and flame ionization detector, Japan
- Gas Chromatography column : OmegawaxTM250 (0.25 μ m X 0.25mm X 30m), Supelco, USA
- Larminar flow BH2000 series ClassII Biological Safety cabinets, USA
- Hot air oven Model 700, Memmert ,Germany
- Sonicator : Scientific ,USA
- Autoclave : Tomy SS-325 , Japan
- Blender: Cole primer, Instrument Company, Germany

3.1.2 สารเคมี

- Magnesium sulphate ($MgSO_4 \cdot 7 H_2O$) : Carlo Erba reagent, Italy
- Dipotassium hydrogen phosphate ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$) : Carlo Ersa reagent, Italy

- Calcium chloride ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) : E. Merck, Germany
- Sulfuric acid (H_2SO_4) 95-97% : E. Merck, Germany
- Sodium sulphate (Na_2SO_4) : E. Merck, Germany
- methanol : E. Merck, Germany
- *n*-hexane : E. Merck, Germany
- Butylate hydroxytoluene (BHT) : Sigma chemical Co., USA
- Heptadecanoic acid ($\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{COOH}$) : Sigma chemical Co., USA
- Chloroform (CHCl_3) : E. Merck, Germany
- Polyoxyethylene sorbitan monooleate (Tween 80) : Sigma-Alrich, Germany
- Urine Reagent Strips : Tecco DIAGNOSTICS, Netherlands
- glucose commercial
- Glucose liquicolor : Human, Germany

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Yeast extract : Becton, Dickinson & company Sparis, USA
- Potato dextrose agar (PDA) : Becton, Dickinson & company Sparis, USA

3.2 สายพันธุ์จุลินทรีย์

สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา คือ ราสายพันธุ์ *Mortierella* sp. BCC2863 เป็นสายพันธุ์ที่ได้จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ เก็บรักษาในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar slant (PDA slant) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการเปลี่ยนอาหาร เลี้ยงบนอาหารใหม่ ทุก 2 เดือน

3.3 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการเตรียมอาหาร แบ่งเป็น 2 ส่วน คือ

ส่วนที่ 1 ประกอบด้วย (ปริมาณต่อ 1 ลิตร)

- Yeast extract	10	กรัม
- MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.5	กรัม
- K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	4	กรัม
- CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1	กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ส่วนที่ 2 การเตรียมกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.4 สภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

3.4.1 การศึกษาหาสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Mortierella* sp. BCC2863 และการผลิต ARA

3.4.1.1 การศึกษาเพื่อหาวิธีที่เหมาะสมในการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นในการเลี้ยงรา *Mortierella* sp. BCC2863

การทดลองในส่วนนี้จะทำการทดลองในขวดเขย่าขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว 50 มิลลิลิตร โดยมีขั้นตอนในการดำเนินการวิจัย ดังนี้

1. การเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็ง (stock plate)

ทำการเลี้ยงร่าสายพันธุ์ *Mortierella* sp. BCC2863 ใน plate (sterilize plate) และขวดเขย่าปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว PDA (potato 4 กรัม/ลิตร dextrose 20 กรัม/ลิตร agar 15 กรัม/ลิตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

2. การศึกษาหาวิธีที่เหมาะสมในการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น มี 3 วิธี ดังนี้

วิธีที่ 1) ตัดชิ้นวุ้นจาก stock plate ขนาด 1x1 ตร.ซม. สับให้ละเอียด เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร

วิธีที่ 2) เลี้ยงตามวิธีที่ 1 เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำมาปั่นละเอียดโดยใช้เครื่องปั่น (blender) นาน 2 นาที จากนั้นนำหัวเชื้อปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร หรือ 5% (โดยปริมาตร) ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร

วิธีที่ 3) เตรียม stock plate ในขวดเขย่าขนาด 250 มิลลิลิตร เติม glass bead และ น้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นนำหัวเชื้อปริมาณ 2.5 มิลลิลิตร หรือ 5% (โดยปริมาตร) ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 50 มิลลิลิตร โดยหัวเชื้อที่ได้จากทั้ง 3 วิธีจะถูกเลี้ยงในอาหารเหลวชนิด GY (glucose 30 กรัม/ลิตร Yeast extract 10 กรัม/ลิตร $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0.5 กรัม/ลิตร $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 4 กรัม/ลิตร $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1 กรัม/ลิตร) โดยเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 วัน และแต่ละช่วงเวลาจะทำการเก็บตัวอย่าง 2 ซ้ำจนกลูโคสในอาหารถูกใช้จนหมดจึงยุติการเลี้ยง นำตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์น้ำหนักรีดแห้ง ความเข้มข้นของกลูโคส และวิเคราะห์ปริมาณ ARA เลือกวิธีเตรียมหัวเชื้อที่ให้น้ำหนักรีดแห้งและปริมาณ ARA สูงที่สุดสำหรับการทดลองต่อไป

3.4.1.2 การศึกษาอิทธิพลของค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญเติบโตและการผลิต ARA

นำหัวเชื้อที่ได้จากการเตรียมในหัวข้อ 3.4.1.1 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับค่าพีเอช ต่างๆกัน คือ 5,6,7 และ 8 ตามลำดับ โดยใช้อาหารเหลว GY (glucose 30 กรัม/ลิตร Yeast extract 10 กรัม/ลิตร $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0.5 กรัม/ลิตร $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 4 กรัม/ลิตร $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1 กรัม/ลิตร) โดยเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 6 วัน และแต่ละช่วงเวลาจะทำการเก็บตัวอย่าง 2 ซ้ำ นำตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์น้ำหนักรีดแห้ง ความเข้มข้นของกลูโคส และปริมาณ ARA

3.4.1.3 การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิต ARA

นำหัวเชื้อที่ได้จากการเตรียมในหัวข้อ 3.4.1.1 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆกัน คือ 20,25 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยใช้อาหารเหลว GY (glucose 30 กรัม/ลิตร Yeast extract 10 กรัม/ลิตร $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0.5 กรัม/ลิตร $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 4 กรัม/ลิตร $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1 กรัม/ลิตร) โดยเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน และแต่ละช่วงเวลาจะทำการเก็บตัวอย่าง 2 ซ้ำจนกลูโคสในอาหารถูกใช้จนหมดจึงยุติการเพาะเลี้ยง นำตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์น้ำหนักรีดแห้ง ความเข้มข้นของกลูโคส และปริมาณกรด ARA

3.4.2 การศึกษาอิทธิพลของอาหารคาร์บอน (C-source) และอาหารไนโตรเจน (N-source) ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อเจริญเติบโตและการผลิต ARA

การทดลองในส่วนนี้ทำการทดลองในขวดเขย่า เพื่อศึกษาเบื้องต้นถึงความสามารถในการใช้สารอาหารคาร์บอนและไนโตรเจนในการเจริญเติบโตและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวของราเพื่อทดแทนการใช้กลูโคส

คาร์บอนที่นำมาใช้ ได้แก่ glucose , sucrose , glycerol ความเข้มข้น 30 กรัม/ลิตร starch , sunflower oil , soybean oil , palm oil และ by product จากโรงงานน้ำมันซึ่งประกอบด้วย oleic oil , distilled oil และ crude lecithin ความเข้มข้น 10 กรัม/ลิตร ในการทดลองจะแยกเตรียม stock ของแหล่งคาร์บอนต่างๆ แล้วเติมลงในอาหารเหลวที่เตรียมไว้ มีองค์ประกอบคือ Yeast extract 10 กรัม/ลิตร $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0.5 กรัม/ลิตร $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 4 กรัม/ลิตร $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1 กรัม/ลิตร tween 80 1 กรัม/ลิตร เก็บตัวอย่างเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน และแต่ละช่วงเวลาจะทำการเก็บตัวอย่าง 2 ขั้ว นำตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ ARA

ไนโตรเจนที่นำมาใช้ในการศึกษา คือ yeast extract , brewer yeast , MSG , $(NH_4)_2SO_4$, $NaNO_3$, NH_4NO_3 , urea ความเข้มข้น 10 กรัม/ลิตร และ ในอาหารเหลวจะนำแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ใส่ร่วมกับอาหารเหลวที่มี glucose 30 กรัม/ลิตร $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0.5 กรัม/ลิตร $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 4 กรัม/ลิตร $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1 กรัม/ลิตร เก็บตัวอย่างเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน และแต่ละช่วงเวลาจะทำการเก็บตัวอย่าง 2 ขั้ว ตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ ARA

3.4.3 การศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมต่อการเติบโตและการผลิต ARA

ในส่วนนี้จะทำการทดลองในขวดเขย่า โดยใช้กลูโคสที่ระดับความเข้มข้นระหว่าง 15- 90 กรัม/ลิตร โดยเตรียมอาหารเหลว GY (Yeast extract 10 กรัม/ลิตร $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0.5 กรัม/ลิตร $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 4 กรัม/ลิตร $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1 กรัม/ลิตร) แล้วเติมกลูโคสลงไปให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง และแต่ละช่วงเวลาจะทำการเก็บตัวอย่าง 2 ขั้ว จนกลูโคสในอาหารถูกใช้จนหมดจึงยุติการเลี้ยง นำตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของกลูโคส และปริมาณ ARA

3.4.4 การเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตรเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์และ ARA

ทำการเลี้ยงในระบบการหมักแบบ batch โดยใช้อาหารเหลว GY ประกอบด้วย glucose 60 กรัม/ลิตร Yeast extract 10 กรัม/ลิตร $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0.5 กรัม/ลิตร $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 4 กรัม/ลิตร $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1 กรัม/ลิตร ถ่ายยาล้าเชื้อจากขวดเขย่าจำนวน 150 มิลลิลิตร หรือ 5% (โดยปริมาตร) ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหาร GY 3 ลิตร สภาวะควบคุมในกระบวนการหมัก ซึ่งได้แก่ อุณหภูมิ, อัตราการให้อากาศ, อัตราการกวน ดังนี้

อุณหภูมิ	25	องศาเซลเซียส
อัตราการกวน	500	รอบ/นาที
อัตราการให้อากาศ	1	ลิตร/ลิตร.นาที

เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 144 ชั่วโมง และแต่ละช่วงเวลาจะทำการเก็บตัวอย่าง 2 ซ้ำ จนกลูโคสในอาหารถูกใช้จนหมดจึงยุติการเพาะเลี้ยง นำตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของกลูโคส และปริมาณ ARA

3.5 วิธีการวิเคราะห์ต่างๆ

3.5.1 การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อ

หาน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยนำตัวอย่างที่ได้ในแต่ละช่วงเวลามาทำการกรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman no.1) แล้วจึงทำการล้างเซลล์ที่ได้ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งเพื่อล้างอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากเซลล์จนหมด แล้วจึงนำไปทำแห้งโดยใช้เครื่อง freeze dryer เป็นเวลา 2 วัน จนน้ำหนักเซลล์คงที่

3.5.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของกลูโคส

นำสารตัวอย่างส่วนน้ำใสที่ได้จากการกรองมาทำการเจือจางให้เหมาะสมแล้ววิเคราะห์ความเข้มข้นกลูโคส โดยใช้วิธีทดสอบด้วยสารละลาย Glucose liquicolor (Human) โดยใช้กลูโคสเป็นสารมาตรฐาน สารละลาย Glucose liquicolor เป็นการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ glucose oxidase และ peroxidase ต่อสารละลายกลูโคส

3.5.2.1 วิธีทดสอบความเข้มข้นของกลูโคส ด้วยสารละลาย Glucose liquicolor

มีขั้นตอนดังนี้

- 1) ปิเปตสารละลาย Glucose liquicolor 0.5 มิลลิลิตรและน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

- 2) ปิเปตสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายกลูโคสมาตรฐาน 10 ไมโครลิตร ลงในสารละลายที่เตรียมไว้ ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
- 3) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร (OD_{500}) โดยใช้ น้ำกลั่น เป็น blank
- 4) การทำกราฟมาตรฐาน (standard curve) ใช้กลูโคสเป็นสารมาตรฐาน โดยเติมสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงในสารละลาย Glucose liquicolor แล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำวิธีเดียวกันกับตัวอย่าง
- 6) นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง โดยคำนวณจาก

$$\text{ความเข้มข้นของกลูโคส(กรัมต่อลิตร)} = \frac{(OD_{500 \text{ nm}}) \times \text{อัตราสารเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}}$$

3.5.2.2 การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานและการสร้างกราฟมาตรฐาน กลูโคส

เตรียมโดยเจือจางสารละลายกลูโคสจากความเข้มข้นเริ่มต้น 5 กรัม/ลิตร ให้ได้ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร แล้วจึงเจือจางต่อให้ได้ความเข้มข้นช่วง 0 – 1 กรัม/ลิตร ดังแสดงในตารางที่ 3.1 ดังนี้

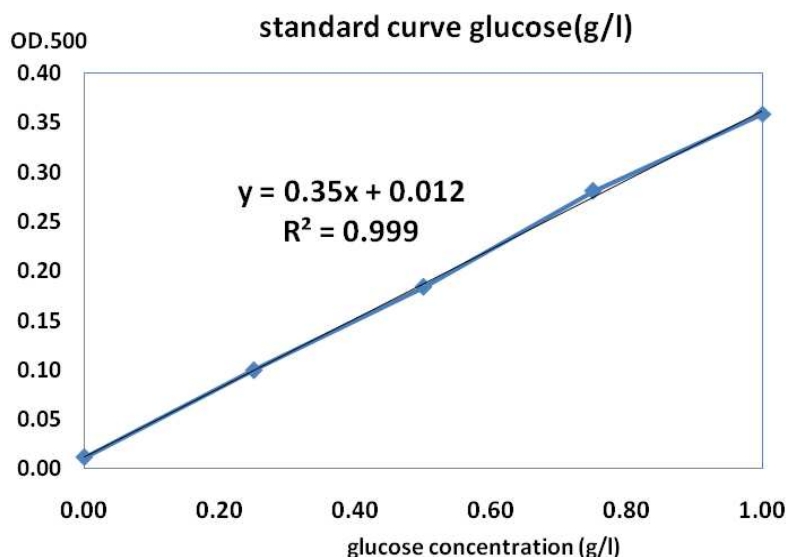
ตารางที่ 3.1

ตารางแสดงการเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ความเข้มข้น 0-1 กรัม/ลิตร

หลอดที่	การเจือจาง		ความเข้มข้นของกลูโคส	
	สารมาตรฐาน (μ l)	น้ำกลั่น (μ l)	(mg/ml)	OD 500 nm
1	0	40	0	0.012
2	10	30	0.25	0.100
3	20	20	0.50	0.184
4	30	10	0.75	0.281
5	40	0	1.00	0.359

รูปที่ 3.1

แสดงกราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคส สำหรับวิธีทดสอบโดยใช้สารละลาย
glucose liquicolor



จากกราฟ จะได้สมการ ของ Standard curve คือ $y = 0.35x + 0.012$

3.5.3 การวิเคราะห์กรดไขมัน

นำเซลล์แห้งที่ได้มาซึ่งน้ำหนัก 50 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดสกัดจากนั้นเติม Internal standard (heptadecanoic acid (C17:0)) ปริมาณ 100 ไมโครลิตร และ 5% H_2SO_4 ใน MeOH ปริมาณ 2 มิลลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ให้เย็น จากนั้นเติม hexane 1 มิลลิตร และ น้ำกลั่น 1 มิลลิตร ตามลำดับผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ให้เกิดการแยกชั้นแล้วจึงดูดชั้น hexane (ส่วนบน) พร้อมเติม Na_2SO_4 จากนั้นจึงดูดส่วนใสใส่ในหลอดสำหรับวิเคราะห์ gas chromatography (GC) ด้วยเครื่อง gas chromatography (GC) (SHIMADZU) ซึ่งประกอบไปด้วยคอลัมน์ Omegawax™ 250 fused silica capillary ขนาด 30 เมตร X 0.25 มิลลิเมตร (Supelco, USA) และ AOC-20i Auto injector ส่วน detector เป็นชนิด flame ionization detector (FID) โดยการทำงานของเครื่องจะกำหนดอุณหภูมิที่แตกต่าง ดังนี้ อุณหภูมิ injector คือ 250 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิ detector คือ 260 องศาเซลเซียส และใช้ฮีเลียมเป็น carrier gas ที่ความเร็ว 30 เซนติเมตรต่อวินาที ส่วนอุณหภูมิคอลัมน์ คือ 200 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 230 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 12 นาที จากนั้นวิเคราะห์ข้อมูลของ chromatogram (พีค) ที่ปรากฏเปรียบเทียบกับ ระยะเวลาที่ปรากฏผลพีคของกรดไขมันมาตรฐาน (fatty acid methyl ester standards (No.189-19 : from Sigma))

การคำนวณค่ากรดไขมัน

- สัดส่วนของกรดไขมันในกรดไขมันทั้งหมด (FA/TFA) = $\frac{\text{พื้นที่ของกรดไขมัน} \times 100}{\text{พื้นที่ทั้งหมด}}$

- การคำนวณกรดอะราคิโดนิกต่อน้ำหนักแห้ง (%ARA/DW)

$$\% \text{ ARA/DW} = \left(\frac{\text{พื้นที่ C20:4}}{\text{พื้นที่ internal std.}} \right) \times \left(\frac{\text{น้ำหนัก internal std.}}{\text{น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง}} \right) \times 100$$

- การคำนวณปริมาณอะราคิโดนิก (ARA concentration)

$$\text{ARA concentration} = \left(\frac{\% \text{ ARA/DW} \times \text{น้ำหนักแห้งในหน่วยกรัม/ลิตร}}{100} \right) \times 1000$$