

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

##### 3.1.1 วัสดุอุปกรณ์

- หลอดทดลอง
- ฟลาสก์ขนาด 250, 500, 1000 มิลลิลิตร
- หลอดไมโครเซนติฟิวจ์
- ปิเปตขนาด 1, 5, 10 มิลลิลิตร
- ไมโครปิเปต
- ตู้เขี่ยเชื้อและตะเกียงแอลกอฮอล์
- เครื่องชั่ง (balance)
- เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)
- เครื่องเขย่าผสมสารละลาย (Vortex mixer)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (incubator shaker)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
- เครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator)
- ก่อจตุรศรสน์
- ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar Flow)
- ตู้อบแห้ง (hot air oven)
- ถังหมัก (Fermentor)

##### 3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Enrichment medium YPG
- Production medium

### 3.1.3 สารเคมี

- ก๊าซเซอร์บอลบริสุทธิ์ 99.5 เปอร์เซ็นต์ บริษัท APA AJAX
- กรดไฮโดรคลอริก(HCl) บริษัท APA AJAX
- โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์(KOH) บริษัท APA AJAX
- ไอโซออกเทน(isooctane) บริษัท APA AJAX
- เอทานอล บริษัท BHD
- กรดอะซิติกบริษัท APA AJAX
- แอมโมเนียมอะซิเตตบริษัท APA AJAX
- อะซิติกอะซิโตนบริษัท APA AJAX
- กรดปาล์มติก บริษัท APA AJAX
- โซเดียมเมตาเปอร์ริโอเดตบริษัท CARLO ERBA
- ไพรดีน บริษัท PANREAC
- cupric acetate บริษัท APA AJAX

### 3.2 การเตรียมเชื้อและการเก็บรักษาเชื้อ

ก่อนนำเชื้อยีสต์ *Pichia* sp. Scj 01 มาใช้ในการทดลอง สามารถเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YPG (glucose 20 กรัม/ลิตร, peptone 10 กรัม/ลิตร, yeast extract 10 กรัม/ลิตร) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส บ่มในตู้บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหาร Production medium (yeast extract 0.5 กรัม/ลิตร,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 กรัม/ลิตร,  $(NH_4)_2SO_4$  1.0 กรัม/ลิตร,  $KH_2PO_4$  1.0 กรัม/ลิตร) ที่เติมกลีเซอรอล 1 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6

การเก็บรักษาเชื้อทำได้โดยเก็บไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPG agar ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผิวหน้าเพียงประกอบด้วย กลูโคส 20 กรัม/ลิตร, yeast extract 10 กรัม/ลิตร, peptone 10 กรัม/ลิตร และวุ้น 15 กรัม/ลิตร (Pan et al., 2009)

### 3.3 การวิเคราะห์ปริมาณไขมันโดยวิธี Colorimetric method (ดัดแปลงจาก Know and Rhee, 1986; รัตนภรณ์ ลีสิงห์, 2551 และ อัจฉรวรรณ ทองมี, 2530)

#### 3.3.1 การเตรียมสารเคมี

- สารละลาย copper reagent ซึ่ง cupric acetate 25 กรัมละลายในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร ปรับ pH 6.1 ด้วย pyridine ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น จากนั้นกรองก่อนเก็บไว้ใช้

- การเตรียมสารละลาย 1.5 M KOH ใน ethanol 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง KOH 84.165 กรัมละลายใน ethanol 80 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

- เตรียมสารละลาย 2.5 M HCl

#### 3.3.2 การเตรียม cell suspension ของจุลินทรีย์

ซึ่งเซลล์น้ำหนักเปียกมา 1 กรัมล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นจึงละลายเซลล์ในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร จะได้สารแขวนลอยเซลล์ 0.1 กรัม/มิลลิลิตร

#### 3.3.3 การสกัดไขมันจากเซลล์ยีสต์

การสกัดไขมันทำโดยการไฮโดรไลซ์ไตรกลีเซอไรด์แล้วสกัดเอาไขมันออกจากเซลล์โดยการซาฟอนนิฟิเคชันด้วย 1.5 M KOH ในเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ โดยการนำเอาเซลล์แขวนลอย 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดจุกเกลียวขนาด 20 มิลลิลิตร เติม 1.5 M KOH ในเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 4 มิลลิลิตร ปิดจุกให้แน่นต้มในน้ำเดือด 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำให้เย็นลง เติม 2.5 M HCl จำนวน 6 มิลลิลิตร และ isooctane 5 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง 200-300 ครั้ง/นาที ไขมันอิสระจะถูกสกัดออกมาอยู่ในชั้นของ isooctane จากนั้นนำไปหา ปริมาณกรดไขมันทั้งหมดโดยวิธี colorimetric method

#### 3.3.4 การหาปริมาณกรดไขมันในเซลล์ยีสต์

ทำโดยเปิดสารละลายสกัดไขมันในชั้นของ isooctane จากจุลินทรีย์ในข้อ 3.3.3 มา 3 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับ copper reagent 1 มิลลิลิตร ปิดจุกเขย่าแรงๆ 1-2 นาที ทิ้งไว้สักครู่จนสารละลายแยกชั้น ดูดสารละลายส่วนบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 715 นาโนเมตรแล้วเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดไขมัน

### 3.4 การวัดการเจริญโดยวิธี Cell dry weight

นำกระดวยกรองหรืออคูมิเนียมพอยล์ที่พบเป็นรูปทรงมาอบที่ 90 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมงนำไปทำให้เย็นในโถอบแห้ง แล้วนำมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอนโดยใช้เครื่องชั่งละเอียดปีเปิดสารแขวนลอย (Suspension) ของเชื้อลงในหลอด Centrifuge ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งดูดเซลล์แขวนลอยลงบนกระดวยกรองนำไปอบที่ตู้อบ 90 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถอบแห้งแล้วนำไปชั่งน้ำหนักโดยใช้เครื่องชั่งละเอียดจนได้น้ำหนักคงที่ น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น คือ น้ำหนักของเซลล์จุลินทรีย์ต่อน้ำหนัก 5 มิลลิลิตร

### 3.5 การวิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอล(ดัดแปลงจาก Bondioland Bella, 2005)

#### 3.5.1 การเตรียมสารละลาย

- สารละลาย A: acetic acid stock solution 1.6 Mเตรียมโดยชั่ง acetic acid มา 9.6 กรัมละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

- สารละลาย B: Ammonium acetate stock solution 4 Mเตรียมโดยชั่ง Ammonium acetate มา 30.8 กรัมละลายในน้ำกลั่นจากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

- สารละลาย C: Acetylacetone solution 0.2 Mเตรียมใหม่ทุกครั้งดังนี้ ปิเปิด acetyl acetone มา 200 ไมโครลิตร(หรือ 195 มิลลิกรัม) ละลายในสารละลาย A ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และละลายในสารละลาย B ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

- สารละลาย D: Sodium periodate solution 10 mMเตรียมใหม่ทุกครั้งดังนี้ :Sodium meta periodate 21 มิลลิกรัม ละลายในสารละลาย A ปริมาตร 5 มิลลิลิตรและละลายในสารละลาย B ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

- Working solution เป็นอัตราส่วนน้ำต่อเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 ในอัตราส่วน 1:1 ใช้เป็นตัวทำละลายกลีเซอรอลเพื่อการวิเคราะห์ตัวอย่าง

#### 3.5.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานของกลีเซอรอล

- ละลายกลีเซอรอลบริสุทธิ์ 250 มิลลิกรัมด้วย working solution ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตรได้กลีเซอรอลที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็น stock สารละลายกลีเซอรอล

- เจือจาง stock สารละลายกลีเซอรอลให้มีเข้มข้นต่างๆ โดยดูด stock สารละลายกลีเซอรอลมา 0, 1, 2, 3 และ 4 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง

- เติม working solution ให้แต่ละหลอดมีปริมาตรสารละลายรวมเป็น 5 มิลลิลิตรจากนั้นเขย่านาน 30 วินาที ให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน โดยแต่ละหลอดมีความเข้มข้นของกลีเซอรอลเป็น 0, 2, 4, 6 และ 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

- เติมสารละลาย C ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตรนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที เขย่าเป็นระยะๆ และหลังจากนั้นแช่ในน้ำที่มีอุณหภูมิคงที่ประมาณ (20-25 องศาเซลเซียส) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายในแต่ละหลอดที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตรและคำนวณความเข้มข้นของกลีเซอรอลแต่ละหลอดเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของกลีเซอรอล

#### 3.5.3 การหาปริมาณกลีเซอรอลในตัวอย่าง

สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอลในตัวอย่างนำน้ำหมักมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 4,000 รอบ/นาที่นาน 10 นาที จากนั้นดูดส่วนใสมาวิเคราะห์ ทำการเจือจางด้วย working solution และหาปริมาณกลีเซอรอลด้วยวิธี colorimetric method ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร คำนวณปริมาณกลีเซอรอลของตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานกลีเซอรอล ดังสมการ (1) กลีเซอรอลดิบที่นำมาใช้ในการทดลองได้รับความอนุเคราะห์จากสาขาวิชาวิศวกรรมเครื่องกล คณะวิศวกรรม มหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณกลีเซอรอลพบว่า มีกลีเซอรอล 55.60%

$$\text{ปริมาณกลีเซอรอล, g/l} = (\text{OD} / \text{slope}) \times \text{อัตราเจือจาง} \quad (1)$$

### 3.6 การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมันที่ทนร้อนโดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยการออกแบบการทดลองทางสถิติโดยการหาพื้นที่การตอบสนอง (Response Surface Design)

การออกแบบการทดลองทางสถิติมีความประสงค์ต้องการศึกษาเพื่อหาความจริงเหล่านั้นในการทดลองปัจจัยที่ใช้ในการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสะสมไขมันของยีสต์ทนร้อน ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) ปริมาณกลีเซอรอล (กรัม/ลิตร) ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (% Inoculum) ความเร็วรอบในการเขย่า (รอบ/นาที่) โดยการแปรผันของแต่ละปัจจัยเพื่อใช้ในการออกแบบการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยในการผลิตไขมันของยีสต์สะสมไขมันที่คัดเลือกได้ การออกแบบการทดลองทางสถิติเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน ดังนี้

#### 3.6.1 การคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไขมันของยีสต์สะสมไขมัน *Pichia* sp. Scj 01 โดยวิธี Plackettburman

การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackettburman เป็นการทดลองในขั้นตอนแรกๆ ของการวิจัย เพื่อคัดกรองปัจจัยที่มีผลต่อระบบการทดลองได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยในการทดลองนี้ได้คัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการทดลองทั้งหมด 5 ปัจจัย และกำหนดระดับของค่าปัจจัยสำหรับการวัดผลกระทบของแต่ละปัจจัย โดยกำหนดระดับของปัจจัย 2 ค่าด้วยกัน คือ ค่าต่ำ (-1) และ ค่าสูง (+1) ของแต่ละปัจจัย ซึ่งมีการออกแบบดังแสดงในตารางที่ 3.1 โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Production medium ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 6 วัน

ตารางที่ 3.1 แสดงปัจจัยและระดับของปัจจัยที่ใช้คัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไขมันของยีสต์สะสมไขมัน โดยวิธี Plackettburman

รหัส	ปัจจัย	ค่าต่ำ (-1)	ค่าสูง (+1)
A	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์)	1	5
B	ปริมาณกลีเซอรอล(เปอร์เซ็นต์)	4	10
C	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	40	44
D	ความเป็นกรด-ด่าง	4	6
E	ความเร็วรอบในการเขย่า (รอบ/นาที)	100	200

### 3.6.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไขมันของยีสต์ด้วยการออกแบบทางสถิติด้วยวิธี Central Composite Design(CCD)

การประมาณสัมประสิทธิ์ของพื้นที่การตอบสนองที่เป็นเส้นโค้ง (Response Surface Design) เพื่อประเมินหาความเหมาะสมในสภาวะของการทดลอง การออกแบบ Central Composite Design ต้องการ 5 ระดับของแต่ละปัจจัยที่ต้องการศึกษา โดยระดับเหล่านี้จะถูกใช้สัญลักษณ์คือ ระดับต่ำมาก ( $-\alpha$ ) ระดับต่ำ (-1) ระดับกลาง (0) ระดับสูง (+1) และระดับสูงมาก ( $+\alpha$ ) มีตารางการออกแบบดังแสดงในตารางที่ 3.2 โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Production medium ที่มีแหล่งไนโตรเจนอย่างจำกัด ควบคุมการเขย่า 100 รอบ/นาที ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 6 วัน

ตารางที่ 3.2 แสดงปัจจัยและระดับของปัจจัยที่ใช้หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไขมันของยีสต์สะสมไขมันโดยวิธี Central Composite Design(CCD)

รหัส	ปัจจัย	ค่าต่ำมาก( $-\alpha$ )	ค่าต่ำ (-1)	ค่ากลาง (0)	ค่าสูง (+1)	ค่าสูงมาก ( $+\alpha$ )
A	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์)	0	0.5	1	1.5	2
B	ความเป็นกรด-ด่าง	4	5	6	7	8
C	ปริมาณกลีเซอรอล (เปอร์เซ็นต์)	0	2	4	6	8
D	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	34	37	0	43	46

### 3.7 การศึกษาการเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมัน *Pichia* sp. Scj 01 ในสภาวะที่เหมาะสมในระดับถังหมักชีวภาพขนาด 5 ลิตร

ในการทดลองนี้เป็นการทดลองเพื่อศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมันเพื่อสามารถผลิตไขมันได้สูงสุด โดยการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีปัจจัยที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.6 ในระดับถังหมักชีวภาพขนาด 5 ลิตร ในอาหาร Production medium ที่เติมกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน



ภาพที่ 3.1 ถังหมักชีวภาพ

### 3.8 การสกัดและวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน (AOAC, 1996)

นำตัวอย่างเซลล์ยีสต์ 1 กรัม เติมคลอโรฟอร์ม 2-3 มิลลิลิตร เติมไดเอทิลอีเทอร์ 2-3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดสารละลายมา 3 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองและทำให้ระเหยจนแห้งในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้ไอโนโตรเจน เติม 7% BF<sub>3</sub> ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และ โทลูอิน 1 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดทดลองนำไปต้มในตู้ต้มอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที เขย่าหลอดทดลองทุกๆ 10 นาที จากนั้นทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง (20-25 องศาเซลเซียส) เติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร เฮกเซน 1 มิลลิลิตร Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 กรัม ปิดฝาหลอดทดลองและเขย่าให้เข้ากันนาน 1 นาที ทิ้งให้สารละลายแยกชั้น นำสารละลายส่วนบนไปวิเคราะห์กรดไขมันด้วย GC รุ่น 6890 N ของ Agilent