

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 วัสดุอุปกรณ์

- ฟลาสก์ขนาด 250, 500, 1000 มิลลิลิตร
- ลูกปัดเชื้อและตะเกียงแอลกอฮอล์
- หลอดทดลอง
- ปิเปตขนาด 1, 5, 10 มิลลิลิตร
- ไมโครปิเปต
- เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator)
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (incubator shaker)
- เครื่องเขย่าผสมสารละลาย (Vortex mixer)
- เครื่องชั่ง (balance)
- เครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
- ก๊าซออกซิเจน
- ตู้เป่าเชื้อ (Laminar Flow)
- ถังหมัก (Fermentor)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
- ตู้อบแห้ง (hot air oven)

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Enrichment medium YPG
- Selective medium YPG
- Production medium

3.1.3 สารเคมี

- โซเดียมไฮดรอกไซด์ บริษัท APA AJAX
- กรดไดโนโตรซาลิไซลิก บริษัท APA AJAX
- โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เตรต บริษัท APA AJAX
- กรดไฮโครคลอริก บริษัท APA AJAX
- โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ บริษัท APA AJAX
- ไพรดีน บริษัท PANREAC
- ไอโซออกเทน บริษัท APA AJAX
- เอทานอล บริษัท BHD
- โซเดียมอะซิเตต บริษัท APA AJAX
- ทริส (ไฮดรอกซีเมทิล) อะมิโนมีเทน บริษัท USB
- โซเดียมฟอสเฟต บริษัท APA AJAX
- กรดเบนโซอิก บริษัท APA AJAX
- กรดปาล์มดิก บริษัท APA AJAX
- ไอโอดีน บริษัท APA AJAX
- โพแทสเซียมไอโอไดด์ บริษัท APA AJAX
- เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส บริษัท EAC
- เอนไซม์กลูโคอะไมเลส บริษัท EAC

3.2 การคัดเลือกยีสต์สะสมไขมัน

ทำการคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตไขมันโดยคัดเลือกจากแหล่งธรรมชาติและของเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรม ดังนี้ น้ำอ้อยคั้นที่เริ่มเน่า ลูกแป้ง ฟางข้าว และกากถั่วเหลืองจากโรงงานผลิตน้ำมันถั่วเหลือง นำตัวอย่างเดิมลงไป ในอาหาร Selective YPG medium (กรัม/ลิตร : glucose 20, peptone 10, yeast extract 10 และ ampicilin 500 หน่วย) บ่ม ในตู้บ่มแบบเขย่า (Incubator shaker) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาทำการเกลี่ยเชื้อ (spread plate) บนอาหารแข็ง Selective YPG agar (glucose 20 กรัม/ลิตร, peptone 10 กรัม/ลิตร, yeast extract 10 กรัม/ลิตร, วุ้น 15 กรัม/ลิตร และ ampicilin 500 หน่วย) แล้วบ่มที่ตู้บ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (วิเชียร ขงมานิตชัยและคณะ, 2544, 2545; Zhu et al., 2008) คัดเลือกยีสต์ที่มีโคโลนีเดี่ยว เพื่อจำแนกชนิด

การเก็บรักษายีสต์ที่ได้จากการคัดเลือกทำโดยเก็บไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ YPG agar ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผิวหน้าเอียงประกอบด้วย กลูโคส 20 กรัม/ลิตร, yeast extract 10 กรัม/ลิตร, peptone 10 กรัม/ลิตรและวุ้น 15 กรัม/ลิตร

3.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ

นำยีสต์ที่ได้จากการคัดแยกมาเพาะเลี้ยงในอาหาร YPG broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในอาหาร YPG Agar ในจานเพาะเชื้อ โดยการหยดตัวอย่างเชื้อ (drop plate) 20 ไมโครลิตร ลงบนอาหารแข็ง โดยแปรผันอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงที่ 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส บ่มในตู้บ่มนาน 48 ชั่วโมง แล้ววัดขนาดของโคโลนีเพื่อเปรียบเทียบขนาดโคโลนีแต่ละอุณหภูมิ

3.4 การทดสอบการสะสมไขมันของยีสต์ที่คัดแยกได้ด้วยวิธี Sudan Black B

นำยีสต์ที่คัดแยกได้มาทำการคัดเลือกยีสต์ที่สามารถผลิตและสะสมไขมันได้ด้วยวิธี Sudan Black ซึ่งเป็นสีข้อมไขมัน โดยใช้ย้อมไตรกลีเซอไรด์ที่มีในเซลล์ยีสต์สะสมไขมัน ซึ่งจะอยู่ในรูปของหยดไขมันเล็กๆภายในเซลล์

วิธีการ

การเตรียมสาร Sudan Blank B โดยการชั่งสาร Sudan Blank 0.3 กรัม ผสมกับสารละลาย Ethyl alcohol 70 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

1. เตรียมสไลด์ที่สะอาด หยดน้ำลงบนสไลด์ 1-2 หยด เช็ดเชื้อจากโคโลนีเล็กน้อยลงบนหยดน้ำแล้วเกลี่ยเชื้อให้กระจาย ระวังอย่าให้นานเกินไป (ด้วยเทคนิคการปลอดเชื้อ)
2. ปลอ่ยรอยเสมียร์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำสไลด์ผ่านเปลวไฟบนตะเกียงอย่างรวดเร็ว 3-4 ครั้ง โดยรอยเสมียร์อยู่ข้างบนสไลด์เพื่อไม่ให้ถูกเปลวไฟ
3. หยดสี Sudan Blank ให้ทั่วรอยเสมียร์เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นเบาๆ ปลอ่ยทิ้งไว้ให้แห้งแล้วส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100X

3.5 วิธีวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ (ดัดแปลงจากวิธีของพัคตร์ประไพ ประจำเมือง, 2546)

3.5.1 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

เตรียมสารละลายแป้งมันสำปะหลัง 2.5 เปอร์เซ็นต์โดยเติมแป้งมันสำปะหลัง 2.5 กรัมใน Tris-hydrochloric buffer ความเข้มข้น 50 mM ความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 ปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

เจือจางเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย Tris-hydrochloric buffer ความเข้มข้น 50 mM ความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7

วิธีวิเคราะห์

1. ดูดสารละลายแป้งใน Tris-hydrochloric buffer (2.5 เปอร์เซ็นต์ w/v) ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง นำไปอุ่นที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
2. เติมสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันในหลอดทดลอง
3. นำไปบ่มทันทีที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
4. เติมสารละลายกรดไคนโตรซาลิไซลิก ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปิดปากหลอดด้วยลูกแก้ว นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที
5. ทำให้เย็นลงทันที แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

6. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับ blank เพื่อประเมินค่าความเข้มข้นของ น้ำตาลรีดิวส์ในสารละลาย

สำหรับหลอดควบคุม (Control) เตรียมโดยเติมเฉพาะสารละลาย Tris-hydrochloric buffer สารละลาย แป้งและสารละลายไดโนโตรซาลิไซลิก

การคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์

หน่วยเป็น SUD (Starch Digestion Unit)

1 หน่วยกิจกรรมของเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้งแล้วทำให้เกิดกลูโคส 1 ไมโครโมล/นาที่ในสภาวะที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์นั้นๆ โดยคำนวณจากสูตร

$$\text{SDU/ml.enz} = \frac{(A-A_0) \times V_t \times D \times 1000}{K_s \times V_e \times T \times MW} \quad \text{ไมโครโมล/มล.นาที่}$$

โดยที่

A = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ที่วัดจากสารละลายปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับ สารละลายแป้ง 2.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม

A₀ = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ที่วัดจากหลอด control

V_e = ปริมาณเอนไซม์ (มิลลิลิตร)

K_s = ค่าที่วัดได้จากความชันของกราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวส์ (ลิตร/กรัม)

V_t = ปริมาตรสารละลายปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับ สารละลายแป้ง 2.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) (มิลลิลิตร)

D = จำนวนเท่าของการเจือจางสารละลายเอนไซม์

T = เวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ กับ สารละลายแป้ง 2.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) (นาที่)

MW = มวลโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสเป็น 180 กรัม/โมล

3.5.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคสไมเลส

เตรียมสารละลายแป้งมันสำปะหลัง 2.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) โดยเติมแป้งมันสำปะหลัง 2.5 กรัมใน acetate buffer ความเข้มข้น 20 mM ความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4.3 ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

เจือจางเอนไซม์กลูโคสไมเลสให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย acetate buffer ความเข้มข้น 20 mM ความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4.3

วิธีวิเคราะห์

1. ดูดสารละลายแป้งใน acetate buffer (2.5 เปอร์เซ็นต์ w/v) ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง นำไปอุ่นที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. เติมสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันในหลอดทดลอง

3. นำไปบ่มทันทีที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. ดำเนินการวิเคราะห์เช่นเดียวกันกับการหากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสดังที่ได้กล่าวมาแล้ว

3.6 การศึกษาการย่อยมันเทศด้วยเอนไซม์ในระดับห้องปฏิบัติการ (ดัดแปลงวิธีการจากพัคตร์ประไพ ประจำเมือง, 2546)

3.6.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของมันเทศ

เตรียมมันเทศที่ความเข้มข้น 4, 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปต้มเพื่อเลือกความเข้มข้นสูงสุดที่ยังสามารถกวนด้วยแท่งแม่เหล็กได้ ซึ่งความเข้มข้นสูงสุดที่ได้นี้จะใช้ในการเตรียมสารละลายแป้งเพื่อหาความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อไป

3.6.2 การศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่เหมาะสมในการย่อยมันเทศ

เตรียมตัวอย่างมันเทศที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 6 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรดต่างเป็น 6.5 - 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์บ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาทีแล้วจึงย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส โดยทำการแปรผันปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 500 – 100,000 หน่วย/มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างทุกๆ 20 นาที จนครบ 120 นาที จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS method และวิเคราะห์ปริมาณแป้งด้วยวิธีไอโอดีน

3.6.3 การศึกษาหาความเข้มข้นมันเทศที่เหมาะสมในการย่อยมันเทศด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดยการย่อยแบบกึ่งกะ (Fed - batch)

เตรียมตัวอย่างมันเทศที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 6 เปอร์เซ็นต์ หรือ 6 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตรปรับความเป็นกรดต่างเป็น 6.5 - 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์บ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาทีแล้วจึงย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เติมน้ำตาลที่มีปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการทดลอง 3.6.2 แปรผันการเติมน้ำมันเทศที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุดการทดลอง แสดงดังตารางที่ 3.1 เก็บตัวอย่างจนครบ 120 นาที จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS method และวิเคราะห์ปริมาณแป้งด้วยวิธีไอโอดีน

ตารางที่ 3.1 ชุดการทดลองที่ใช้ในการทดลองเพื่อหาความเข้มข้นมันเทศที่เหมาะสมในการย่อยมันเทศด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดยการย่อยแบบกึ่งกะ (Fed - batch)

ชุดการทดลอง (ความเข้มข้นมันเทศ ทั้งหมด)	ความเข้มข้นมันเทศ เริ่มต้น (กรัม/ลิตร) (เวลาเริ่มต้น)	ความเข้มข้นมันเทศ ที่เติม (กรัม/ลิตร) (เติมที่ 20 นาที)	ความเข้มข้นมันเทศ ที่เติม (กรัม/ลิตร) (เติมที่ 50 นาที)	ความเข้มข้นมันเทศ ที่เติม (กรัม/ลิตร) (เติมที่ 90 นาที)
1 (60, control)	60	-	-	-
2 (90)	60	30	-	-
3 (120)	60	30	30	-
4 (150)	60	30	30	30



ภาพที่ 3.1 การเตรียมวัตถุดิบมันเทศ

3.6.4 การศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์กลูโคสไมเลสที่เหมาะสมในการย่อยมันเทศ

นำสารละลายที่ได้จากการย่อยจากการทดลองข้อ 3.6.3 มาปรับความเป็นกรดให้ได้ 4.3 - 4.5 ด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) กรดซัลฟิวริก เก็บตัวอย่างไว้เป็นชุดควบคุมที่ 0 ชั่วโมง เติมเอนไซม์กลูโคสไมเลส ที่มีการแปรผันความเข้มข้นเอนไซม์กลูโคสไมเลสที่ 500 – 10,000 หน่วย/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ที่มีการเขย่าที่ 160 รอบ/นาที เก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 3, 6 และทุกๆ 12 ชั่วโมงจนครบ 48 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยต้มในอ่างน้ำเดือด 10 นาที จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS method (פקตร์ประไพ ประจำเมือง, 2546)

3.7 การศึกษาการย่อยมันเทศด้วยเอนไซม์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 50 ลิตร

จากการศึกษาการย่อยมันเทศด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคสไมเลสในระดับห้องปฏิบัติการที่สามารถได้ปริมาณความเข้มข้นของมันเทศและความเข้มข้นเอนไซม์ที่เหมาะสมแล้วจึงนำสภาวะที่ได้มาศึกษาในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เพื่อพัฒนาสู่การผลิตในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพระดับโรงงานต้นแบบขนาด 50 ลิตรโดยใช้ปริมาตรการย่อย 30 ลิตร เป็นการย่อยแบบกึ่งกะ (Fed-batch) ด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสแล้วย่อยต่อด้วยเอนไซม์กลูโคสไมเลสโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองจากข้อ 3.6



ภาพที่ 3.2 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 50 ลิตร

3.8. การวิเคราะห์ปริมาณแป้งด้วยวิธีไอโอดีน (ดัดแปลงวิธีการมาจากพัคตร์ประไพ ประจำเมือง, 2546)

การเตรียมสารละลายแป้งมาตรฐาน โดยการผสม Na_2HPO_4 1.33 กรัม กับ Benzoic acid 0.43 กรัมในน้ำกลั่น 60 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปต้มให้เดือดจากนั้นเติมสารละลายแป้งมันสำปะหลัง 0.1 กรัม ในน้ำเย็น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปรับปริมาณให้ได้ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานแป้งที่มีความเข้มข้น 1 กรัม/ลิตร

การเตรียมสารละลาย Stock Iodine ผสม Iodine 5 กรัม กับ KI 10 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันเก็บไว้ในขวดสีชา ก่อนนำมาวิเคราะห์ปริมาณแป้งให้เจือจาง Stock Iodine กับน้ำกลั่น 1:9

วิธีวิเคราะห์ปริมาณแป้ง

1. ดูดตัวอย่างมา 0.1 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลายไอโอดีน 2.4 มิลลิลิตร
3. ผสมให้เข้ากันผสมให้เข้ากันและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างมาเทียบกับค่าในกราฟมาตรฐานที่แปรผันความเข้มข้นของแป้งระหว่าง 0.2 – 1 กรัม/ลิตร

3.9 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (Miller, 1959)

เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส โดยใช้สารละลายกลูโคสที่มีความเข้มข้นระหว่าง 0-1 กรัมต่อลิตร แทนตัวอย่าง

เตรียมสารละลาย DNS โดยสารละลาย Sodium hydroxide 1.6 กรัม, 3,5- dinitrosalicylic acid 0.9 กรัม, potassium sodium tartate 28.22 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร โดยการเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

การวิเคราะห์ทำได้โดยดูดตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย DNS 0.5 มิลลิลิตร ลงไปผสมกับตัวอย่าง ต้มหลอดทดลองในน้ำเดือด 10 นาทีเพื่อทำปฏิกิริยา และหยุดปฏิกิริยาโดยจุ่มหลอดทดลอง ในน้ำเย็นทันที เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างมาเทียบกับค่าในกราฟมาตรฐาน

3.10 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลด้วยเทคนิค HPLC (High Performance Liquid Chromatography) (ดัดแปลงวิธีการมาจากพัคตร์ประไพ ประจำเมือง, 2546)

นำสารละลายตัวอย่างมากรองด้วยเมมเบรน Millipore ขนาด 0.45 ไมโครเมตรก่อนนำไปวิเคราะห์การหาปริมาณน้ำตาลที่สนใจ ซึ่งใช้ตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตรในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography) โดยใช้คอลัมน์ Sugar pack 1 ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ในน้ำที่กำจัดไอออนเป็นสารละลายตัวพา ซึ่งต้องกรองด้วยเมมเบรน Millipore ขนาด 0.45 ไมโครเมตรก่อน ด้วยอัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตร/นาทีและใช้ Refractive Index Detector เป็นตัวตรวจวัด

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในสารละลายโดยเปรียบเทียบเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) กับพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายตัวอย่างกับสารละลายน้ำตาลชนิดต่างๆมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนและฉีดเข้าเครื่อง HPLC ด้วยวิธีการและสภาวะเดียวกันกับตัวอย่าง

3.11 การวิเคราะห์ปริมาณไขมันโดยวิธี Colorimetric method (ดัดแปลงจาก Know and Rhee, 1986; รัตนภรณ์ ลีสิงห์, 2551 และ อัจฉราวรรณ ทองมี, 2530)

3.11.1 การเตรียมสารเคมี

- สารละลาย copper reagent ซึ่ง cupric acetate 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร ปรับ pH 6.1 ด้วย pyridine ปรับเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น (กรองก่อนเก็บไว้ใช้)

- การเตรียมสารละลาย 1.5 M KOH ใน ethanol 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง KOH 84.165 กรัม ละลายใน ethanol 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรให้ครบ 1000 มล. และสารละลาย 2.5 M HCl

3.11.2 การเตรียม cell suspension ของจุลินทรีย์

โดยชั่งเซลล์น้ำหนักเปียกมา 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร จะได้สารแขวนลอยเซลล์ 0.1 กรัม/มิลลิลิตร

3.11.3 การสกัดไขมันจากเซลล์ยีสต์

การสกัดไขมันทำได้โดยการไฮโดรไลซ์ไตรกลีเซอไรด์แล้วสกัดไขมันออกจากเซลล์โดยการซาฟอนนิฟิเคชันด้วย 1.5 M KOH ในเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ โดยการนำเซลล์แขวนลอย 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดจุกเกลียวขนาด 20 มิลลิลิตร เติม 1.5 M KOH ในเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 4 มิลลิลิตร ปิดจุกให้แน่น ต้มในน้ำเดือด 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำให้เย็นลง เติม 2.5 M HCl จำนวน 6 มิลลิลิตร และ isooctane 5 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง 200-300 ครั้ง/นาที เพื่อนำไปสกัดไขมันอิสระออกมาอยู่ในชั้นของ isooctane จากนั้นนำไปหาปริมาณกรดไขมันทั้งหมดโดยวิธี colorimetric method

3.11.4 การหาปริมาณกรดไขมันในเซลล์ยีสต์

ทำโดยปิเปตสารละลายสกัดไขมันจากจุลินทรีย์ในข้อ 3.11.3 มา 3 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับ copper reagent 1 มิลลิลิตร ปิดจุกเขย่าอย่างแรงๆ 1-2 นาที ทิ้งไว้สักครู่จนสารละลายแยกชั้น ดูดสารละลายส่วนบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 715 นาโนเมตรแล้วเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดไขมัน

3.12 การวัดการเจริญโดยวิธี Cell dry weight

นำกระดาศกรองหรืออลูมิเนียมฟอยล์ที่พับเป็นรูปกระต่ายมาอบที่ 90 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมงนำไปทำให้เย็นในโถอบแห้ง แล้วนำมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอนโดยใช้เครื่องชั่งละเอียด ปิเปตสารแขวนลอย (Suspension) ของเชื้อลงในหลอด Centrifuge ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ดูดเซลล์แขวนลอยลงบนกระดาศกรองนำไปอบที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถอบแห้งแล้วนำไปชั่งน้ำหนักโดยใช้เครื่องชั่งละเอียดจนได้น้ำหนักคงที่ น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น คือ น้ำหนักของเซลล์จุลินทรีย์ต่อน้ำหนัก 5 มิลลิลิตร

3.13 การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมันที่ทนร้อนโดยใช้น้ำตาลจากการย่อยมันเทศเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยการออกแบบการทดลองทางสถิติโดยการหาพื้นที่การตอบสนอง (Response Surface Design)

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

3.13.1 การคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไขมันของยีสต์สะสมไขมันไอโซเลท Scj 01 โดยวิธี

Plackett burman

วิธีนี้สามารถลดจำนวนการทดลองปัจจัยจำนวนมากๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อให้ทราบปัจจัยที่สำคัญจริงๆ ที่มีผลต่อระบบที่กำลังทดลอง โดยในการทดลองนี้ได้คัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการทดลองทั้งหมด 5 ปัจจัย และกำหนดระดับของค่าปัจจัยสำหรับการวัดผลกระทบของแต่ละปัจจัยโดยกำหนดระดับของปัจจัย 2 ค่าด้วยกัน คือ ค่าต่ำ (-1) ค่าสูง (+1) ของแต่ละปัจจัยมีตารางการออกแบบดังแสดงในตารางที่ 3.2 โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Production medium ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 6 วัน

ตารางที่ 3.2 แสดงระดับและปัจจัยที่ใช้คัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไขมันของยีสต์สะสมไขมันโดยวิธี

Plackett burman

รหัส	ปัจจัย	ค่าต่ำ (-1)	ค่าสูง (+1)
A	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์)	2.5	10
B	ความเป็นกรด-ด่าง	5	7
C	ความเร็วรอบในการเขย่า (รอบ/นาที)	100	200
D	ความเข้มข้นน้ำตาล* (กรัม/ลิตร)	60	100
E	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	30	40

* น้ำตาลที่ได้จากการย่อยมันเทศด้วยเอนไซม์

3.13.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไขมันของยีสต์ด้วยการออกแบบทางสถิติด้วยวิธี Box-Behnken

design

การประมาณสัมประสิทธิ์ของพื้นที่การตอบสนองที่เป็นเส้นโค้ง (Response Surface Design) เพื่อประเมินหาความเหมาะสมในสภาวะของการทดลอง การออกแบบ Box-Behnken ต้องการ 3 ระดับของแต่ละปัจจัยที่ต้องการศึกษา โดยระดับเหล่านี้จะถูกใช้สัญลักษณ์โดยระดับต่ำ (-1) ระดับกลาง (0) และระดับสูง (+1) มีตารางการออกแบบดังตารางที่ 3.3 โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Production medium ที่ประกอบด้วยน้ำเชื่อมมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวส์ 100 กรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 6 วัน

ตารางที่ 3.3 ปัจจัยและระดับปัจจัยที่ใช้ในการออกแบบการทดลองด้วย Box-Behnken ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไขมันของยีสต์

รหัส	ปัจจัย	ค่าต่ำ (-1)	ค่ากลาง (+1)	ค่าสูง (+1)
A	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	3	4	5
B	ความเร็วรอบในการเขย่า (กรัม/ลิตร)	150	200	250
C	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์)	1.5	3	4.5

3.14 การศึกษาการเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมันในสภาวะที่เหมาะสมในระดับถังหมักชีวภาพขนาด 2 และ 5 ลิตร

ในการทดลองนี้เป็นการทดลองเพื่อศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมันเพื่อสามารถผลิตไขมันได้สูงสุดโดยการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีปัจจัยที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.13 ในระดับถังหมักชีวภาพ ขนาด 2 และ 5 ลิตร ในอาหาร Production medium



ภาพที่ 3.3 ถังหมักชีวภาพ

3.15 การสกัดและวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน (AOAC , 1996)

นำเซลล์ยีสต์ 1 กรัม เดิมคลอโรฟอร์ม 2- 3 มิลลิลิตรและไดเอทิลอีเทอร์ 2-3 มิลลิลิตร และนำไปประเหยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นเติม 7 เปอร์เซนต์ BF₃ 2 มิลลิลิตร และโทลูอีน 1 มิลลิลิตร รีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 45 นาที ทั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เฮกเซน 1 มิลลิลิตร Na₂SO₄ 1 กรัม เขย่าเป็นเวลา 1 นาที ทั้งให้แยกชั้นและนำสารละลายชั้นบนไปวิเคราะห์กรดไขมันด้วย GC (รุ่น 6890 N ของ Agilent)

3.16 การจำแนกชนิดสายพันธุ์ของยีสต์ที่คัดเลือกได้

นำยีสต์ที่คัดเลือกได้ไปทำการบ่งชี้สายพันธุ์ ส่งตัวอย่างวิเคราะห์และจำแนกชนิดโดยสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) โดยมีการจำแนกชนิดยีสต์โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1-D2 (D1-D2 region sequencing)

3.17 การทดสอบความสามารถการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอนโดยใช้ชุดทดสอบ

การเพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหาร YPG (กรัม/ลิตร : กลูโคส 20, peptone 10, yeast extract 10) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นนำไปทดสอบกับชุดทดสอบการใช้น้ำตาลตามวิธีของชุดทดสอบ (API Kit, 20 C AUX; SYSMEX bioMérieux Co., Tokyo, Japan)

3.18 การทดสอบการเจริญและการสะสมไขมันในอาหารสูตรต่างๆ

การทดสอบการเพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหาร YPG (กรัม/ลิตร : กลูโคส 20, peptone 10, yeast extract 10) ที่แปรผันแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ซึ่งแบ่งสูตรอาหารที่ใช้ในการทดลอง ดังนี้

อาหารสูตรที่ 1 อาหารสูตร YPG

อาหารสูตรที่ 2 น้ำไขมันเทศ 100 กรัม/ลิตร และกลูโคส 20 กรัม/ลิตร
(ไขมันเทศ 100 กรัมในน้ำ 1 ลิตร แล้วกรองเอาน้ำ)

อาหารสูตรที่ 3 น้ำไขมันเทศ 200 กรัม/ลิตร และกลูโคส 20 กรัม/ลิตร
(ไขมันเทศ 200 กรัมในน้ำ 1 ลิตร แล้วกรองเอาน้ำ)

อาหารสูตรที่ 4 น้ำตาลจากการย่อยไขมันเทศ 20 กรัม/ลิตร, peptone 10 กรัม/ลิตร
และ yeast extract 10 กรัม/ลิตร

อาหารสูตรที่ 5 กลีเซอรอล 20 กรัม/ลิตร, peptone 10 กรัม/ลิตร และ yeast extract 10 กรัม/ลิตร

เพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 3.13 เป็นระยะเวลา 6 วัน แล้วนำไปวิเคราะห์ผลการเจริญโดยวิธี Cell dry weight และวิเคราะห์ปริมาณไขมันโดยวิธี Colorimetric method