บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. ทรอสโทไคตริดส์ที่ใช้ในการทดลอง

Aurantiochytrium mangrovei S4TP 072

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ (วิธีการเตรียม แสดงในภาคผนวก ก)

2.1 กลูโคส (D (+) – Monohydrate) Riedel – de Haen

2.2 กลูโคสจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง

2.3 ยีสต์สกัด (Yeast Extract) Hi - media

2.4 เปปโตน (Peptone) Hi - media

2.5 น้ำทะเล

3. สารเคมี

3.1 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) UNIVAR

3.2 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) UNIVAR

3.3 เมทานอล (Methanol) UNIVAR

3.4 เฮกเซน (Hexane) UNIVAR

3.5 กรดซัลฟูริค (H_2SO_4) MERCK

3.6 โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) UNIVAR

3.7 BHT (Butylated Hydroxt-Toluene) FLUKA

3.8 กรดไขมันมาตรฐาน 19 : 0 Nonadecanoic Acid (Internal Standard) SIGMA

3.9 แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) UNIVAR

3.10 กรดไฮโดรคลอริก (HCl) UNIVAR

3.11 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) UNIVAR

3.12 แร่ธาตุ (Trace Element Solution) (ภาคผนวก ก)

3.13 สารละลายดีเอนเอส (3,5-Dinitrosalicylic Acid) (ภาคผนวก ค)

3.14 แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) UNIVAR

4. ยาปฏิชีวนะ (วิธีการเตรียม แสดงในภาคผนวก ข)

4.1 คานามัยซิน (Kanamycin)

4.2 สเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต (Streptomycin Sulfate)

5. อุปกรณ์และเครื่องมือ

5.1 เครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟฟี (Gas Chromatography) GC 6890

5.2 เครื่องเขย่า (Incubator Shaker) INNOVA

5.3 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง METTELER TOLEDO AG-285

5.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) SAYO HARRIER 18/80 (Refrigerated)

5.5 เครื่อง Vortex mixer (Vortex -Genie2)

5.6 เครื่องอบแห้งระบบทำความเย็น (Freezer Dryer) LABCONCO

5.7 หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) TOMY SS-325

5.8 เครื่องให้ความร้อน (Hot Plate) FRAMO-GERATETECCHNIK M21/1

5.9 แท่งแม่เหล็ก (Magnetic Stirrer)

5.10 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH Meter) METROHM 713

5.11 เครื่องวัดความเค็ม (Refractometer) PORTABLE

5.12 โถดูดความชื้น (Dessicator)

5.13 ถังหมักขนาด 5 ลิตร (Bioflo IV)

5.14 ตู้ทำความเย็นอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (Deep freezer) ULTRALOW, SANYO

5.15 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS Spectrophotometer)

5.16 อ่างปรับอุณหภูมิ (Water bath) Memmert

5.17 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) Memmert

5.18 Auto pipette (Pipetman, Gilson)

5.19 ฟลาส์กขนาด 500 มิลลิลิตร

5.20 กล่องน้ำแข็ง

การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

เตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น ปริมาตร 300 มิลลิลิตร โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร (เตรียมอาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร จำนวน 3 ซ้ำ) ปรับ pH เท่ากับ 6.5 เขย่าบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

วิธีการทดลอง

1. ศึกษาการเจริญของ *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสทางการค้าความเข้มข้น 6% และน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 6% ด้วยการเลี้ยงแบบเขย่าในขวดรูปชมพู่

1.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1.1 น้ำตาลกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำทะเลความเข้มข้น 15 ppm ให้ได้ปริมาตร 2,250 มิลลิลิตร ปรับค่า pH เท่ากับ 6.5 แบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ใบละ 45 มิลลิลิตร จำนวน 45 ใบ

1.1.2 น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 40 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 324.9 มิลลิลิตร และยีสต์สกัด 30 กรัมต่อลิตร ใส่น้ำทะเลความเข้มข้น 25 ppm ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ปริมาตรรวม

3,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH เท่ากับ 6.5 แบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ใบละ 45 มิลลิลิตร จำนวน 45 ใบ

1.2 นำอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 1.1 นึ่งฆ่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.3 เติมหัวเชื้อเริ่มต้นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละขวดๆ ละ 5 มิลลิลิตร จากนั้นเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่าง 3 ซ้ำ (ขวดรูปชมพู่ 3 ใบ) ทุก ๆ 12 ชั่วโมง ทำการวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเก็บเซลล์แห้งเพื่อชั่งน้ำหนักและวิเคราะห์กรดไขมันต่อไป

2. ศึกษาการเจริญของ *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสทางการค้า 6% และน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 6%, 12% และ 18% ด้วยการเลี้ยงแบบเขย่าในขวดรูปชมพู่

2.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1.1 น้ำตาลกลูโคสทางการค้า 6% เตรียมโดยใช้น้ำตาลกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำทะเลความเข้มข้น 15 ppm ให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH เท่ากับ 6.5 แบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ใบละ 45 มิลลิลิตร จำนวน 10 ใบ

2.1.2 น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้นเป็น 6% เตรียมโดยใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 40 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร (จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 6%) และยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำทะเลความเข้มข้น 15 ppm ให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH เท่ากับ 6.5 จากนั้นแบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ใบละ 45 มิลลิลิตร จำนวน 10 ใบ

2.1.3 น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้นเป็น 12% เตรียมโดยใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (น้ำตาลกลูโคส 40 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร (จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 12%) และยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำทะเลความเข้มข้น 15 ppm ให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH เท่ากับ 6.5 จากนั้นแบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ใบละ 45 มิลลิลิตร จำนวน 10 ใบ

2.1.4 น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้นเป็น 18% เตรียมโดยใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (น้ำตาลกลูโคส 40 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 450 มิลลิลิตร (จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 18%) และยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำทะเลความเข้มข้น 15 ppm ให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH เท่ากับ 6.5 จากนั้นแบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ใบละ 45 มิลลิลิตร จำนวน 10 ใบ

2.2 นำอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 2.1 นึ่งฆ่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.3 เติมหัวเชื้อเริ่มต้นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อขวดละ 5 มิลลิลิตร จากนั้นเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน เก็บตัวอย่าง 2 ซ้ำ (ขวดรูปชมพู่ 2 ใบ) ทุก ๆ 24 ชั่วโมง ทำการวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเก็บเซลล์แห้งเพื่อชั่งน้ำหนักและวิเคราะห์กรดไขมันต่อไป

3. การเจริญของ *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 12% ที่ pH 5 ระดับ (6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0) ด้วยการเลี้ยงแบบเขย่าในขวดรูปชมพู่

3.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.1 น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (น้ำตาลกลูโคส 40 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร (จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 12%) และยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำทะเลความเข้มข้น 15 ppm ให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH เท่ากับ 6.0 จากนั้นแบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ใบละ 45 มิลลิลิตร จำนวน 10 ใบ

3.1.2 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เช่นเดียวกับ ข้อ 3.1.1 แต่ปรับค่า pH ให้ได้ 4 ระดับ คือ 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 ระดับละ 10 ใบ

3.2 นำอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 3.1 นึ่งฆ่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.3 เติมหัวเชื้อเริ่มต้นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อขวดละ 5 มิลลิลิตร จากนั้นเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน เก็บตัวอย่าง 2 ซ้ำ (ขวดรูปชมพู่ 2 ใบ) ทุก ๆ 24 ชั่วโมง ทำการวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเก็บเซลล์แห้งเพื่อชั่งน้ำหนักและวิเคราะห์กรดไขมันต่อไป

4. ศึกษาการเจริญของ *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ด้วยอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 12%, 18% และ 24% (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ภายใต้สภาวะที่เหมาะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

<u>4.1 เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (40% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ความเข้มข้น 12%</u>

4.1.1 ใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง 900 มิลลิลิตร (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ใส่ในขวดรูปชมพู่ นำสารละลายนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

4.1.2 เตรียมยีสต์สกัด 30 กรัม ละลายในน้ำทะเลความเข้มข้น 15 psu ใส่ในถังปฏิกรณ์และปรับปริมาตรด้วยน้ำทะเลให้ได้ 1,800 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที

4.1.3 เติมสารละลายน้ำตาลกลูโคสจากข้อ 4.1.1 และหัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 300 มิลลิลิตร ลงในถังปฏิกรณ์จากข้อ 4.1.2 (ปริมาตรอาหารรวมทั้งหมดเป็น 3 ลิตร)

4.1.4 เลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการเติมอากาศ 1 vvm การกวนผสม 500 รอบต่อนาที ปรับค่า pH เท่ากับ 6.5 ด้วย 2 N HCl และ 4 N NaOH ทำการทดลอง 2 ซ้ำ และเก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง ทำการวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเก็บเซลล์แห้งเพื่อชั่งน้ำหนักและวิเคราะห์กรดไขมันต่อไป

<u>4.2 เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (40% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ความเข้มข้น 18%</u>

4.2.1 ใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง 1,350 มิลลิลิตร มิลลิลิตร (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ใส่ในขวดรูปชมพู่ นำสารละลายนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

4.2.2 เตรียมยีสต์สกัด 30 กรัม ละลายในน้ำทะเลความเข้มข้น 15 psu ใส่ในถังปฏิกรณ์และปรับปริมาตรด้วยน้ำทะเลให้ได้ 1,350 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที

4.2.3 เติมสารละลายน้ำตาลกลูโคสจากข้อ 4.1.1 และหัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 300 มิลลิลิตร ลงในถังปฏิกรณ์จากข้อ 4.1.2 (ปริมาตรอาหารรวมทั้งหมดเป็น 3 ลิตร)

4.2.4 เลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการเติมอากาศ 1 vvm การกวนผสม 500 รอบต่อนาที ปรับค่า pH เท่ากับ 6.5 ด้วย 2 N HCl และ 4 N NaOH ทำการทดลอง 2 ซ้ำ และเก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง ทำการวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเก็บเซลล์แห้งเพื่อชั่งน้ำหนักและวิเคราะห์กรดไขมันต่อไป

<u>4.3 เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (40% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ความเข้มข้น 24%</u>

4.3.1 ใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง 1,800 มิลลิลิตร มิลลิลิตร (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ใส่ในขวดรูปชมพู่ นำสารละลายนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

4.3.2 เตรียมยีสต์สกัด 30 กรัม ละลายในน้ำทะเลความเข้มข้น 15 psu ใส่ในถังปฏิกรณ์และปรับปริมาตรด้วยน้ำทะเลให้ได้ 900 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที

4.3.3 เติมสารละลายน้ำตาลกลูโคสจากข้อ 4.1.1 และหัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 300 มิลลิลิตร ลงในถังปฏิกรณ์จากข้อ 4.1.2 (ปริมาตรอาหารรวมทั้งหมดเป็น 3 ลิตร)

4.3.4 เลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการเติมอากาศ 1 vvm การกวนผสม 500 รอบต่อนาที ปรับค่า pH เท่ากับ 6.5 ด้วย 2 N HCl และ 4 N NaOH ทำการทดลอง 2 ซ้ำ และเก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง ทำการวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเก็บเซลล์แห้งเพื่อชั่งน้ำหนักและวิเคราะห์กรดไขมันต่อไป

5. ศึกษาการเจริญของ *Aurantiochytrium mangrovei* S4TP 072 ด้วยอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 12 % (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ภายใต้สภาวะที่เหมาะ โดยเปรียบเทียบสูตรอาหารที่เติม และไม่เติม $MgCl_2$ 0.1 % (w/v) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

<u>5.1 เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (40% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ความเข้มข้น 12% โดยไม่เติม $MgCl_2$ 0.1 % (w/v)</u>

5.1.1 ใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง 900 มิลลิลิตร มิลลิลิตร (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ใส่ในขวดรูปชมพู่ นำสารละลายนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

5.1.2 เตรียมยีสต์สกัด 30 กรัม ละลายในน้ำทะเลความเข้มข้น 15 psu ใส่ในถังปฏิกรณ์ และปรับปริมาตรด้วยน้ำทะเลให้ได้ 1,800 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที

5.1.3 เติมสารละลายน้ำตาลกลูโคสจากข้อ 5.1.1 และหัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 300 มิลลิลิตร ลงในถังปฏิกรณ์จากข้อ 5.1.2 (ปริมาตรอาหารรวมทั้งหมดเป็น 3 ลิตร)

5.1.4 เลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการเติมอากาศ 1 vvm การกวนผสม 500 รอบต่อนาที ปรับค่า pH เท่ากับ 6.5 ด้วย 2 N HCl และ 4 N NaOH ทำการทดลอง 2 ซ้ำ และเก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง ทำการวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเก็บเซลล์แห้งเพื่อชั่งน้ำหนักและวิเคราะห์กรดไขมันต่อไป

<u>5.2 เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (40% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ความเข้มข้น 12% โดยเติม $MgCl_2$ 0.1 % (w/v)</u>

5.2.1 ใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง 900 มิลลิลิตร มิลลิลิตร (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ใส่ในขวดรูปชมพู่ นำสารละลายนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

5.2.2 เตรียมยีสต์สกัด 30 กรัม และ แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2.6H_2O$) 6.41 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำทะเลความเค็ม 15 psu ใส่ในถังปฏิกรณ์ให้ได้ 1,800 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที

5.2.3 เติมสารละลายน้ำตาลกลูโคสจากข้อ 5.2.1 และหัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 300 มิลลิลิตร ลงในถังปฏิกรณ์จากข้อ 5.2.2 (ปริมาตรอาหารรวมทั้งหมดเป็น 3 ลิตร)

5.1.4 เลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการเติมอากาศ 1 vvm การกวนผสม 500 รอบต่อนาที ปรับค่า pH เท่ากับ 6.5 ด้วย 2 N HCl และ 4 N NaOH ทำการทดลอง 2 ซ้ำ และเก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง ทำการวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเก็บเซลล์แห้งเพื่อชั่งน้ำหนักและวิเคราะห์กรดไขมันต่อไป

การเก็บเซลล์

การเก็บเซลล์ *Aurantiochytrium mangrovei* ในอาหารทุกสูตร โดยนำมาปั่นใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เมื่อเซลล์ตกตะกอน เทอาหารเหลวที่อยู่ด้านบนออกและเก็บใส่หลอดทดลอง เพื่อนำไปวัดน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS Method) (เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์ และคณะ, 2548) จากนั้นส่วนที่ตกตะกอนให้ล้างด้วยน้ำกลั่นโดยทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้ง เทสารละลายด้านบนทิ้ง นำตัวอย่างที่ได้ไปเข้าเครื่องอบแห้งระบบทำความเย็น (Freeze Dryer) แล้วนำไปชั่งน้ำหนักแห้งของเซลล์

การวิเคราะห์กรดไขมัน (ดัดแปลงจาก Shimizu et al., 1988)

1. ชั่งตัวอย่างเซลล์ของ *Aurantiochytrium mangrovei* ประมาณ 0.1-0.2 กรัมน้ำหนักแห้ง ใส่ในขวดปากเกลียวที่มีฝาปิดขนาด 20 มิลลิลิตร

2ใ เติม 2% กรดซัลฟูริค (H_2SO_4) ในเมทานอล (methanol) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Internal Standard 200 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ค) ผ่านด้วยก๊าซไนโตรเจน แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น

3. เติมเฮกเซน (ที่มี BHT 10 ส่วนในล้านส่วน) 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งให้แยกชั้น

3.1 ดูดของเหลวที่อยู่ชั้นบน ใส่ในหลอดทดลองกรองผ่านโซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) เพื่อดูดความชื้นออก

3.2 ของเหลวที่ได้ใส่ในขวดปากเกลียวที่มีฝาปิด และผ่านด้วยก๊าซไนโตรเจนจนแห้ง เก็บใส่ตู้เย็น เพื่อรอการวัดด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี

3.3 นำตัวอย่างจากข้อ 3.2 เติมเฮกเซน 300 ไมโครลิตร แล้วฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี

สภาวะเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี

ใช้ Flame Ionization Detector เป็นเครื่องตรวจวัดสัญญาณ และคอลัมน์ ใช้ Capillary Column HP-INNOWAX polyethylene glycol (30 m x 250 μm x 0.25 μm) อุณหภูมิของคอลัมน์เริ่มต้นที่ 175 องศาเซลเซียส คงไว้เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ 210 องศาเซลเซียส คงไว้เป็นเวลา 1 นาที แล้วค่อย ๆ เพิ่มขึ้น 2 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ 230 องศาเซลเซียส คงไว้เป็นเวลา 1 นาที โดยใช้ฮีเลียมเป็นตัวพา ส่วนอุณหภูมิของ Injector และ Detector คือ 250 องศาเซลเซียส คำนวณหาปริมาณกรดไขมัน โดยเปรียบเทียบกับกรดไขมันมาตรฐาน (Standard Fatty Acid)

การวัดน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS Method)(เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์ และคณะ, 2548 ดัดแปลงจาก Fujio and Morita, 1997)

1. ดูดสารละลายที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงแล้วจากข้อ 3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

2. เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำร้อน 5 นาที เพื่อทำปฏิกิริยา จากนั้นนำมาแช่ในน้ำเย็นเป็นเวลา 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา

3. เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดหาความเข้มข้นด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

4. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณจากความเข้มข้นของกลูโคส (กรัม/ลิตร)

$$= \frac{\text{(ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตรที่ได้)} \times \text{อัตราการเจือจาง}}{\text{ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน}}$$