บทที่ 2
การทดลอง

2.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย :

ผลผลิตทางการเกษตรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือหลายชนิดถูกนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ แต่เมื่อคำนึงถึงคุณค่าส่วนที่เป็นโปรตีนแล้วพบว่ามีปริมาณต่ำมาก ทำให้ต้องมีการซื้ออาหารในรูปของโปรตีนหรืออาหารสำเร็จรูปมาเพิ่มเติม ซึ่งนับวันอาหารโปรตีนจากธรรมชาติจะมีจำนวนน้อยลงเรื่อยๆ จึงควรจะมีการพัฒนาหาโปรตีนจากแหล่งอื่นที่ใช้เวลาในการผลิตสั้น และมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ซึ่งการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวก็เป็นทางเลือกทางหนึ่งในการแก้ปัญหา

ในกระบวนการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวโดยใช้แป้งเป็นวัตถุดิบมีอยู่หลายวิธีที่รู้จักกันดีคือ Swedish symba process และกระบวนการ Amylo process ซึ่งในแต่ละกระบวนการจะต้องใช้จุลินทรีย์ 2 สายพันธุ์ในการผลิต และขั้นตอนในการผลิตมีหลายขั้นตอนซึ่งไม่สะดวก การทดลองนี้จึงได้เลือกยีสต์สายพันธุ์ *Schwanniomyces occidentalis* ซึ่งจากข้อมูลเบื้องต้นพบว่าสามารถใช้แป้งเป็นซับสเตรท และมีปริมาณโปรตีนสูงพอที่นำมาผลิตโปรตีนเซลล์เดียวได้ จึงมีความสนใจที่จะทำการวิจัยเพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากแป้งมันสำปะหลังขึ้น เนื่องจากแป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูก และมันสำปะหลังเป็นพืชที่ปลูกมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ การวิจัยในครั้งนี้จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการแปรรูปผลิตผลทางด้านการเกษตร ให้เป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ ซึ่งสามารถนำกลับมาใช้ประโยชน์ในทางการเกษตรกรรมได้อีกด้วย

2.2 วัตถุประสงค์ของการทดลอง

2.2.1 เพื่อศึกษาการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากแป้งมันสำปะหลัง โดยใช้เชื้อยีสต์ *Schwanniomyces occidentalis*

2.2.2 ศึกษาหาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังและเวลาที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว

2.3 ขอบเขตการศึกษา

2.3.1 เพื่อเปรียบเทียบหายีสต์สายพันธุ์ที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว ระหว่าง *Schwanniomyces occidentalis* TISTR 5346 และ 5555

2.3.2 ศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว

2.3.3 วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนและปริมาณไขมันในโปรตีนเซลล์เดียวที่ผลิตได้

2.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

2.4.1 ได้สายพันธุ์ยีสต์ที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว

2.4.2 ได้ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว

2.4.3 ทราบองค์ประกอบสำคัญในเซลล์ยีสต์ที่ใช้ผลิตโปรตีนเซลล์เดียว (ปริมาณโปรตีนและไขมัน)

2.5 เชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการทดลอง

2.5.1 *Schwanniomyces occidentalis* TISTR 5346

2.5.2 *Schwanniomyccs ocadentalis* TISTR 5555

2.6 อาหารเลี้ยงเชื้อ (ดูภาคผนวก)

2.6.1 YM Broth

2.6.2 YM agar

2.6.3 Starch agar

2.6.4 Fermentation medium

2.7 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลองและการวิเคราะห์

2.7.1 Autoclave (KOKUSAN H-88LL)

2.7.2 Laminar air flow (GELMAN SCIENCES BH 143 CL II)

2.7.3 Spectrophotometer (MILTON-ROY, SPECTRONIC 401)

2.7.4 Refrigerated centrifuge (KOKUSAN, H-251 CS)

2.7.5 Incubator shaker (GALLENKAMP, INR-401)

2.7.6 Hot air oven (MEMMERT, U-25)

2.7.7 Desiccator

2.7.8 Vortex mixer

2.7.9 Hot plate stirrer

2.7.10 Haemacytometer

2.7.11 กล้องจุลทรรศน์ (OLYMPUS, B601)

2.7.12 เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (SATORIUS,A210P)

2.8 วิธีการทดลอง

2.8.1 การเปรียบเทียบหาสายพันธุ์ยีสต์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ดีกว่า จากยีสต์ 2 สายพันธุ์

2.8.1.1 การเตรียมเชื้อ

1) เตรียมอาหาร YM agar นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ เทลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

2) นำเชื้อยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ streak ลงบนอาหารในข้อ 1 เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว บ่มในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

2.8.1.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อคัดเลือก

1) เตรียมอาหาร starch agar นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ เทลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีปลอดเชื้อ เป็นจำนวน 20 จาน

2) นำโคโลนีเดี่ยวที่เตรียมได้ของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ มาจุดลงบนอาหาร Starch agar โดยจุดจานอาหารละ 3 จุด ทำเชื้อละ 10 จาน

3) บ่มในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส

4) เก็บตัวอย่างเพื่อวัดความสามารถของเชื้อในการย่อยแป้ง โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone และเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี โดยเก็บจานอาหารที่เวลา 6,12,21,30,48,72,96,120, 144 ชั่วโมง

*หมายเหตุ การวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone ทำได้โดยหยดสารละลายไอโอดีนลงบนโคโลนี จะเห็นวงใสรอบโคโลนี แสดงว่าแป้งที่อยู่ใน starch agar ถูกใช้ไป ส่วนแป้งที่อยู่นอก clear zone จะเกิดสีน้ำเงินกับสารละลายไอโอดีน

5) เปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone ต่อเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ทุกช่วงเวลา และเลือกสายพันธุ์ที่มีอัตราส่วนของเส้นผ่าศูนย์กลาง clear zone : เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีที่สูงที่สุด และนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

2.8.2. การทดลองหาอาหารที่มีความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังและเวลาที่เหมาะสมเพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดียว

2.8.2.1 <u>การเตรียมกล้าเชื้อที่คัดเลือกได้เพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดียว</u>

1) นำเชื้อที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 1 เลี้ยงในอาหาร YM agar บ่มในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

2) เตรียมอาหาร YM broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตรในหลอดทดลองและปริมาตร 100 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

3) ทำการนึ่งฆ่าเชื้อ ปล่อยให้เย็น

4) นำโคโลนีเดี่ยวจากข้อ 1 ใส่ในอาหาร YM broth ในหลอดทดลองด้วยวิธีปลอดเชื้อ บ่มในตู้เขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 ชั่วโมง

5) ถ่ายเชื้อจากข้อ 4 ลงในอาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมสำหรับเป็นกล้าเชื้อโดยใช้ inoculum size 2% บ่มในตู้เขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

6) นับปริมาณเซลล์ให้ได้จำนวน 10^6-10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใช้เป็นกล้าเชื้อ

2.8.2.2 <u>การเลี้ยงเชื้อเพื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคสในสูตรอาหาร YM</u>

1) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 1% 2%, 3% และ 4% (w/v)(ภาคผนวก) ความเข้มข้นละ 400 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 1000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อ ปล่อยให้เย็น

2) เติมกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ในหัวข้อ 2.8.2.1 ลงในอาหารทั้ง 4 ฟลาสก์ โดยใช้inoculum size 2% ด้วยวิธีปลอดเชื้อ

3) นำฟลาสก์ทั้ง 4 ใบ บ่มในตู้เขย่า ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

4) เก็บตัวอย่างครั้งละ 10 มล.เพื่อนำไปวิเคราะห์ที่เวลา 0, 3, 6, 9, 12, 16, 20, 24, 30, 36 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับโดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล และปริมาณแป้งที่เหลือ ส่วนตัวเซลล์ที่ได้นำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักแห้ง และปริมาณโปรตีน (Lowry's method)(วิธีวิเคราะห์ดูในภาคผนวก)

เลือกสภาวะที่เหมาะสม (ความเข้มข้นของแป้งและเวลา) ที่เชื้อสามารถผลิตปริมาณโปรตีนต่อน้ำหนักเซลล์สูงที่สุด เพื่อใช้ในการทดลองตอนที่ 2.8.3

2.8.3. การเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกในอาหารที่มีความเข้มข้นแป้งเหมาะสมและเวลาที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 2.8.2 เพื่อเก็บเกี่ยวผลผลิตและวิเคราะห์

1. เตรียมอาหารโดยใช้ความเข้มข้นแป้งที่เหมาะสม จากการทดลองที่ 2.8.2 ปริมาตรรวม 2,400 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร จำนวน 6 ฟลาสก์

2. นึ่งฆ่าเชื้อ ปล่อยให้เย็น

3. เติมกล้าเชื้อยีสต์ที่เตรียมไว้ลงในอาหารทั้ง 6 ฟลาสก์ โดยใช้ inoculum size 2% ด้วยวิธีปลอดเชื้อ

4. นำฟลาสก์ทั้งหมดบ่มในตู้เขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

5. นำน้ำหมักที่ได้ทั้งหมด มาเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส, เวลา 10 นาที ล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ

6. นำส่วนตัวเซลล์ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเก็บในเดสซิเคเตอร์จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์

7. นำมาทำการวิเคราะห์ (ดูในภาคผนวก)

-น้ำหนักแห้ง

-ปริมาณโปรตีน (Kjeldahl Method)

-ปริมาณไขมัน (Soxhlet extraction)