บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

2.1.1 อุปกรณ์

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (psychrotherm incubator shaker) รุ่น G-27 แบบหมุน (rotary)	New Brunswick Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น KS-3000P	Kubota ประเทศญี่ปุ่น
เครื่องปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ (refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21	Beckman ประเทศสหรัฐอเมริกา
เครื่องชั่งหยาบ (laboratory balance) รุ่น L2200P	Sartorius ประเทศเยอรมัน
เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) รุ่น A200S	Sartorius ประเทศเยอรมัน
เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS spectrophotometer) รุ่น UV-160	Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น
เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น 240	Corning ประเทศสหรัฐอเมริกา

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต
ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow รุ่น BV-124	ISSCO ประเทศสหรัฐอเมริกา
ตู้อบแห้ง (hot air oven) รุ่น UL 60	Memmert ประเทศเยอรมัน
หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น HA-36	Hirayama Manufacturing Corporation ประเทศญี่ปุ่น
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น W 760	Memmert ประเทศเยอรมัน
เครื่องให้ความร้อน (stirring hot plate) รุ่น DS 201HS	DMS ประเทศญี่ปุ่น
เครื่องทำให้แห้งระบบสุญญากาศ (lyophillizer) รุ่น Eyela FD-1	Tokyo Rikakikai ประเทศญี่ปุ่น
ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (incubater)	Memmert ประเทศเยอรมัน
เครื่องเพอริสตอลติกปั๊ม รุ่น LKB Microperpex	Bromma ประเทศสวีเดน
เครื่องทำให้ระเหยเป็นไอ (evaporator) รุ่น RE 52	Yamato ประเทศญี่ปุ่น
ถังหมัก (fermentor) ขนาด 5 ลิตร รุ่น MD-300 พร้อมชุดควบคุม	Marubishi ประเทศญี่ปุ่น
เครื่องอัดอากาศ (air compressor)	Hitachi ประเทศญี่ปุ่น
เครื่องควบคุมระบบน้ำหล่อเย็น (circulation type handy cooler) รุ่น TRL-108	Thomas Kagaka ประเทศญี่ปุ่น
เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography, GC) รุ่น 3400CX	Varian ประเทศสหรัฐอเมริกา
แคปพิลลารีคอลัมน์ (capillary column) ที่เคลือบด้วย OV-225 ขนาด (I.D.) 0.2 มล. ยาว 25 ม.	Restex ประเทศสหรัฐอเมริกา

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต
เครื่องไฮเพอร์ฟอแมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) รุ่น LC-8A ชุดควบคุมระบบ SLC-8A คอลัมน์ชนิด Shim-pack ISC-07/S 1504Na และ เครื่องวิเคราะห์ผล C-R4A Chromatopac	Shimadzu Corporation ประเทศญี่ปุ่น

2.1.2 เคมีภัณฑ์

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	
กรดบอริก	MERCK	ประเทศเยอรมัน
กรดซัลฟามิก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดซัลฟิวริกเข้มข้น	MERCK	ประเทศเยอรมัน
กรดนิโคตินิก	BDH	ประเทศอังกฤษ
กรดปาล์มิติก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดแพนโตเธนิก	MERCK	ประเทศเยอรมัน
กรดโฟลิก	MERCK	ประเทศเยอรมัน
กรดลิโนเลอิก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดสเตียริก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดโอเลอิก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กลีเซอรอล	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
คลอโรฟอร์ม	BAKER	ประเทศสหรัฐอเมริกา
โซเดียมคลอไรด์	MERCK	ประเทศเยอรมัน
โซเดียมไธโอซัลเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
โซเดียมไฮดรอกไซด์	MERCK	ประเทศเยอรมัน
ทริปโตเฟน	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
ไธอะมีน	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	
ไบโอติน	MERCK	ประเทศเยอรมัน
โปแตสเซียมคลอไรด์	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
พอลีเปปโตน	DIFCO	ประเทศสหรัฐอเมริกา
ไพริดอกซิน	MERCK	ประเทศเยอรมัน
ฟีนอล	BAKER	ประเทศสหรัฐอเมริกา
เฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
เมไธโอนีน	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
เมธานอล	BDH	ประเทศอังกฤษ
แมงกานีสซัลเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
เมอร์คูริกซัลเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
ไรโบเฟลวิน	MERCK	ประเทศเยอรมัน
ไลซีน	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
สารสกัดจากยีสต์	DIFCO	ประเทศสหรัฐอเมริกา
เอธานอล	BDH	ประเทศอังกฤษ
แอมโมเนียมซัลเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
เฮกเซน	AJAX	ประเทศออสเตรเลีย

2.2 การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกสายพันธุ์ยีสต์จากน้ำทิ้ง

2.2.1 การเก็บตัวอย่างน้ำทิ้ง

เตรียมอุปกรณ์การเก็บตัวอย่างน้ำทิ้ง ได้แก่ ขวดแก้ว มีฝาเกลียวปิดมิดชิด ก่อนใช้ควรล้างด้วยน้ำสะอาดหลายๆ ครั้ง แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่น เก็บตัวอย่างน้ำทิ้งที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบจากบ่อดักไขมันก่อนการบำบัดแบบจ้วง (grab sampling) เป็นบริเวณ 3 จุด ปิดปากขวดแก้ว นำเข้าห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจวิเคราะห์ทางกายภาพและทางเคมี ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณไขมัน ชนิดและปริมาณกรดไขมัน ปริมาณโปรตีน ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ค่าบีโอดีและค่าซีโอดี สามารถเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งไว้ในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

โดยระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ทางกายภาพและทางเคมีไม่ควรเกิน 72 ชั่วโมง (ธงชัย พรรณสวัสดิ์, 2535)

2.2.2 การคัดแยกสายพันธุ์ยีสต์จากน้ำทิ้ง

2.2.2.1 นำปิเปตดูดตัวอย่างน้ำทิ้งปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนจานเพาะเชื้ออาหารแข็งสำหรับคัดแยกยีสต์จากน้ำทิ้ง 3 สูตร (ภาคผนวก ก) เกลี่ยน้ำทิ้งให้ทั่ว (spread) บนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทั้ง 3 สูตร ด้วยแท่งแก้วงอ (glass spreader)

2.2.2.2 นำเข็มเขี่ยเชื้อ (loop) แตะตัวอย่างน้ำทิ้ง แล้วลาก (streak) ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเช่นเดียวกับข้อ 2.1

บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดแยกยีสต์ที่เติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทั้ง 3 สูตร จากนั้นทำให้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บรวบรวมไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.3 การเก็บรักษาและการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

2.3.1 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

เขี่ยเชื้อจุลินทรีย์ที่รวบรวมไว้ โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อลากลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งลาดเอียง (agar slant) สูตรอาหาร YM (ภาคผนวก ก) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำมาเขี่ยลากเชื้อลงบนอาหารแข็งสูตรเดิม (subculture) ทุกๆ 1 เดือน

2.3.2 การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

เลี้ยงเชื้อยีสต์ที่รวบรวมได้บนอาหารแข็งลาดเอียง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อคือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำทิ้ง และน้ำทิ้งที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนบางชนิด (ภาคผนวก ก) เปรียบเทียบกับการเติบโตของยีสต์ในน้ำทิ้งที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอน การเตรียมเซลล์แขวนลอยทำโดยเติมน้ำที่ปราศจากไอออนและผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรต่อหลอดอาหารแข็งลาดเอียง ปิเปตเซลล์แขวนลอยปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสูตร YM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเติบโตดีแล้ว นำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000

รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ถ่ายเซลล์ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซนต์ กระจายเชื้อ (resuspend) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.30-0.35 ถ่ายเซลล์แขวนลอยปริมาตรร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำทิ้งปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร

2.4 การศึกษาการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์

2.4.1 เปรียบเทียบสมบัติและองค์ประกอบภายในเซลล์ยีสต์ที่รวบรวมได้ เพื่อคัดเลือกยีสต์ที่มีสมบัติเหมาะสมในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์จากน้ำทิ้ง

เลี้ยงเชื้อยีสต์ที่รวบรวมได้ตามวิธีการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในข้อ 2.3.2 บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร หาน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ไขมัน (กรัมต่อลิตร) โปรตีน (กรัมต่อลิตร) และน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือในน้ำทิ้ง (กรัมต่อลิตร) นำผลที่ได้มาเขียนกราฟแสดงการเติบโต นำเซลล์ยีสต์แต่ละสายพันธุ์อีกส่วนมาทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศ แล้ววิเคราะห์องค์ประกอบภายในเซลล์ยีสต์ ได้แก่ ปริมาณโปรตีนภายในเซลล์ ปริมาณกรดนิวคลีอิกทั้งหมด ชนิดและปริมาณวิตามิน ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนตามลำดับ ส่วนน้ำหมักที่เหลือจากการเลี้ยงเชื้อในน้ำทิ้ง นำมาปั่นแยกเซลล์ออกที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมาวิเคราะห์หาค่าบีโอดีและค่าซีโอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร) ตามวิธีของสมาคมวิศวกรสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย (ธงชัย พรรณสวัสดิ์, 2535) เปรียบเทียบค่าบีโอดีและค่าซีโอดีก่อนและหลังการเลี้ยงเชื้อ นำข้อมูลทั้งหมดมาคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่มีสมบัติเหมาะสมในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ ในขั้นตอนต่อไป

2.4.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ในขวดเขย่า

2.4.2.1 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับเลี้ยงเป็นกล้าเชื้อ

เลี้ยงเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้บนอาหารแข็งลาดเอียง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก) การเตรียมเซลล์แขวนลอยทำโดยเติมน้ำที่ปราศจากไอออนและผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรต่อหลอดอาหารแข็งลาดเอียง ปิเปตเซลล์แขวนลอยปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ลงในอาหาร

สำหรับเตรียมหัวเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร วิธีนี้ทำให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ประมาณ 0.05 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) นำผลที่ได้มาเขียนกราฟแสดงการเติบโต แล้วคัดเลือกอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับเป็นกล้าเชื้อ

2.4.2.2 การคัดเลือกอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์

ถ่ายกล้าเชื้อที่คัดเลือกอายุในช่วงต่างๆ จากข้อ 2.4.2.1 ลงในน้ำทิ้ง ซึ่งใช้เป็นอาหารสำหรับการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ (ภาคผนวก ก) ปริมาตรร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ทำให้ได้น้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้นประมาณ 0.7 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร หาน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) และไขมันที่เหลือในน้ำทิ้ง (กรัมต่อลิตร) นำผลที่ได้มาเขียนกราฟแสดงการเติบโต คัดเลือกอายุกล้าเชื้อที่สามารถเติบโตในน้ำทิ้ง โดยใช้ระยะเวลาในช่วงระยะการพักตัวสั้นที่สุด และมีประสิทธิภาพในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์สูงสุด

2.4.2.3 ศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนในการดัดแปลงน้ำทิ้ง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์

ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 2.4.2.1 โดยใช้อายุกล้าเชื้อที่ได้จากข้อ 2.4.2.2 ตามลำดับ ลงในน้ำทิ้ง แปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนดังนี้ ใช้สารอนินทรีย์ไนโตรเจนคือแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 0-20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารอินทรีย์ไนโตรเจนคือสารสกัดจากยีสต์ปริมาณ 0-3 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร หาน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) และโปรตีนภายในเซลล์ (กรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) นำผลที่ได้มาเขียนกราฟแสดงการเติบโต คัดเลือกปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์

2.4.3 การเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

2.4.3.1 เปรียบเทียบการเติบโตและการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ ในขวดเขย่า และในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมที่ศึกษาได้ดังที่กล่าวมาแล้ว

ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 2.4.2.1 โดยใช้อายุกล้าเชื้อที่ได้จากข้อ 2.4.2.2 ตามลำดับ ลงในถังหมัก ซึ่งมีปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น 2.7 ลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อคือ น้ำทิ้งดัดแปลงที่ได้จากข้อ 2.4.2.3 ปริมาณกล้าเชื้อร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เลี้ยงเชื้อที่อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 ตลอดการเลี้ยงเชื้อ เก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร หาน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) และปริมาณไขมัน (กรัมต่อลิตร) นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ในขวดเขย่า

2.4.3.2 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์

ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 2.4.2.1 โดยใช้อายุกล้าเชื้อที่ได้จากข้อ 2.4.2.2 ตามลำดับ ลงในถังหมัก ซึ่งมีปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น 2.7 ลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อคือ น้ำทิ้งดัดแปลงที่ได้จากข้อ 2.4.2.3 ปริมาณกล้าเชื้อร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) แปรผันภาวะในการหมักที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 37 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 4-6 อัตราการกวนในช่วง 300-600 รอบต่อนาที พร้อมกับอัตราการให้อากาศในช่วง 0.5-1.5 vvm เก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร หาน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) และโปรตีนภายในเซลล์ (กรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) นำผลที่ได้มาเขียนกราฟแสดงการเติบโต คัดเลือกภาวะในการหมักที่เหมาะสม และมีประสิทธิภาพในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์สูงสุด

2.4.3.3 การเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ โดยใช้กระบวนการหมักแบบ batch

ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 2.4.2.1 โดยใช้อายุกล้าเชื้อที่ได้จากข้อ 2.4.2.2 ตามลำดับ ลงในถังหมัก ซึ่งมีปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น 2.7 ลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อคือ น้ำทิ้งดัดแปลงที่ได้จากข้อ 2.4.2.3 ปริมาณกล้าเชื้อร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ควบคุมภาวะในการหมักที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.3.2 เก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา

72 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร หาน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ปริมาณไขมันในน้ำทิ้ง (กรัมต่อลิตร) ค่าบีโอดีและค่าซีโอดีของน้ำทิ้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่ลดลงภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อ

2.4.3.4 การเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์ โดยใช้กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง

ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 2.4.2.1 โดยใช้อายุกล้าเชื้อที่ได้จากข้อ 2.4.2.2 ตามลำดับ ลงในถังหมัก ซึ่งมีปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น 2.7 ลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อคือ น้ำทิ้งดัดแปลงที่ได้จากข้อ 2.4.2.3 ปริมาณกล้าเชื้อร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ควบคุมภาวะในการหมักที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.4.3.2 จัดระบบถังหมักสำหรับใช้ในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง ควบคุมปริมาตรน้ำหมักโดยใช้ท่อไหลล้นและต่อเครื่องเพอริสตอลติกปั๊มเข้ากับท่อทางออก โดยให้อัตราการไหลของสารอาหารใหม่เข้าสู่ถังหมักในอัตราเดียวกันกับการปล่อยน้ำหมักออกจากถังหมัก แปรผันอัตราการเจือจางที่ 0.093, 0.124, 0.155, 0.186, 0.217, 0.248 และ 0.279 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ เพื่อหาอัตราการเจือจางที่เหมาะสมสำหรับการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์สูงสุด เก็บตัวอย่างน้ำหมักแต่ละช่วงอัตราการเจือจาง โดยใช้เวลาในการศึกษานาน 288 ชั่วโมง (12 วัน) นำน้ำหมักแต่ละช่วงเวลามาหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) และปริมาณไขมันในน้ำหมัก (กรัมต่อลิตร) นำผลที่ได้มาเขียนกราฟแสดงการเติบโต หาอัตราการเจือจางที่เหมาะสมในการผลิตมวลชีวภาพของยีสต์

2.5 วิธีวิเคราะห์

2.5.1 ค่าความเป็นกรดด่าง

ใช้เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter)

2.5.2 การวัดการเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์โดยหาค่าความเข้มข้นเซลล์ ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

นำน้ำหมักที่เก็บได้ในแต่ละช่วงเวลา ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำมาปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยน้ำกลั่น ละลายเซลล์และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 5 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม นำไปวัดค่าการ

ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (ภาคผนวก ค)

2.5.3 การหาปริมาณไขมันในน้ำทิ้งและในน้ำหมัก

โดยใช้วิธีของ Rydin และคณะ (1990) นำตัวอย่างน้ำทิ้งหรือน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร เติมเฮกเซนและเอธานอล อย่างละ 10 มิลลิลิตร นำไปเขย่าอย่างแรงเป็นเวลา 20 นาที นำส่วนสารประกอบอินทรีย์มาสกัดซ้ำ 2 ครั้งด้วยเฮกเซนปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำส่วนที่ได้จากการสกัดไประเหยแห้งภายใต้สุญญากาศจนน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักและคำนวณ เป็นกรัมต่อลิตร

2.5.4 การหาปริมาณโปรตีนในน้ำทิ้งและในน้ำหมัก

โดยใช้วิธีของ Lowry และคณะ (1951) นำตัวอย่างน้ำทิ้งหรือน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Lowry C (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที เติมสารละลาย Lowry D (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณโปรตีน (bovine serum albumin, BSA) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (ภาคผนวก ค)

2.5.5 การหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในน้ำทิ้งและในน้ำหมัก

ด้วยวิธี Phenol-sulphuric method นำตัวอย่างน้ำทิ้งหรือน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอล เข้มข้น 5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เขย่าแรงๆ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณน้ำตาลกลูโคส และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร (ภาคผนวก ค)

2.5.6 การหาปริมาณแอมโมเนียมในน้ำหมัก

ใช้วิธีของ Kemper (1974) โดยนำน้ำหมักที่ทำการปั่นแยกเซลล์ออกแล้วมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม นำน้ำหมักที่เจือจางแล้วปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมโปแตสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย EDTA (ภาคผนวก ข) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ววางทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นเติมฟีนอลไนโตรพัสไซดีรีเอเจนท์ (ภาคผนวก ข) 2 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ไฮโปคลอไรดีรีเอเจนท์ (ภาคผนวก ข) 4 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นปลอดประจุ 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 636 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณแอมโมเนียม-ไนโตรเจน (NH^{+}_{4}-N) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 636 นาโนเมตร (ภาคผนวก ค) คำนวณหาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

2.5.7 การวิเคราะห์ค่าบีโอดี (Biochemical Oxygen Demand, BOD) เป็นการวัดปริมาณออกซิเจนที่ถูกใช้หมดไปใน 15 วัน ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ตามวิธีของสมาคมวิศวกรสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย (ธงชัย พรรณสวัสดิ์, 2535)

2.5.7.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำก่อนการวิเคราะห์ (Pretreatment)

ในกรณีที่ตัวอย่างน้ำไม่เป็นกลางต้องให้มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.5-7.5 โดยใช้กรดซัลฟิวริก 0.5 โมลต่อลิตร หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลต่อลิตร กำจัดสารคลอรีนตกค้าง โดยตั้งทิ้งไว้ 1-2 ชั่วโมง คลอรีนจะสลายตัวไปเอง น้ำที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างแล้วถ้ายังมีคลอรีนเหลืออยู่ ต้องกำจัดออกโดยการเติมสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ ซึ่งต้องหาปริมาตรโซเดียมซัลไฟต์ที่ใช้ โดยนำตัวอย่างน้ำปริมาตรระหว่าง 100-1,000 มิลลิลิตร เติมกรดอะซิติก 50 เปอร์เซนต์ หรือกรดซัลฟิวริก 2 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ 10 มิลลิลิตร ไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ 0.0125 โมลต่อลิตร (ภาคผนวก ข) โดยใช้น้ำแป้งเป็นอินดิเคเตอร์ หลังจากเติมสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ตามปริมาตรที่คำนวณได้ลงในตัวอย่างแล้วกวนให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10-20 นาที

2.5.7.2 การวิเคราะห์ค่าบีโอดี

รินตัวอย่างน้ำที่ปรับปรุงแล้วตามข้อ 2.5.7.1 ลงใส่ขวดบีโอดีจนเต็ม 3 ขวด ปิดจุกให้แน่นโดยมีน้ำหล่อที่ปากขวด นำขวดหนึ่งมาหาค่าออกซิเจนละลาย (D_1) ก่อน

อีกสองขวดนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน หลังจาก 5 วันแล้ว นำตัวอย่างมาหาค่าออกซิเจนละลาย (D_2) ที่เหลือ

โดย ค่าบีโอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร) = $D_1 - D_2$

เมื่อ D_1 = ค่าออกซิเจนละลายที่หาได้ในวันแรก

D_2 = ค่าออกซิเจนละลายที่หาได้ในวันที่ 5

2.5.7.3 การหาค่าออกซิเจนละลาย

การหาค่าออกซิเจนละลายจากตัวอย่างน้ำ ซึ่งเก็บไว้ในขวดบีโอดีขนาด 250-300 มิลลิลิตร โดยเติมสารละลายแมงกานีสซัลเฟต (ภาคผนวก ข) 1 มิลลิลิตร และสารละลายอัลคาไล-ไอโอไดด์-เอไซด์ (ภาคผนวก ข) 1 มิลลิลิตร ลงในขวดบีโอดีที่ใส่ตัวอย่างน้ำโดยให้ปลายปิเปตอยู่ใต้ผิวของตัวอย่างน้ำ ปิดจุกขวดระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ผสมให้เข้ากันโดยคว่ำขวดขึ้นลงอย่างน้อย 15 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนจนได้ปริมาตรน้ำใส เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 มิลลิลิตร โดยให้กรดค่อยๆไหลลงไปข้างๆ คอขวด ปิดจุก ผสมให้เข้ากัน โดยคว่ำขวดขึ้นลงจนกระทั่งตะกอนละลายหมด ตวงสารละลายจากขวดบีโอดี 201 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดทดลองขนาด 500 มิลลิลิตร ไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟต (ภาคผนวก ข) 0.0021 โมลต่อลิตร จนกระทั่งสารละลายมีสีเหลืองอ่อน เติมน้ำแป้ง 2-3 หยด จะได้สีน้ำเงินเข้ม ไทเทรตต่อไปจนกระทั่งสีน้ำเงินหายไป อ่านปริมาตรของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ โดยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟต 0.0021 โมลต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มีค่าสมมูลย์พอดีกับค่าออกซิเจนละลาย 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.5.8 การวิเคราะห์ค่าซีโอดี (Chemical Oxygen Demand, COD) โดยหาปริมาณออกซิเจนที่ต้องการใช้ในการออกซิไดส์สารอินทรีย์ ด้วยสารเคมีที่มีอำนาจในการออกซิไดส์สูง ในสารละลายที่เป็นกรด วิเคราะห์ตามวิธีของสมาคมวิศวกรสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย (ธงชัย พรรณฉวัฉดิ์, 2535)

ใส่เมอร์คูริกซัลเฟต 0.4 กรัมลงในขวดกลั่น เติมตัวอย่างน้ำหรือตัวอย่างน้ำที่เจือจางแล้วปริมาตร 20 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐานโปแตสเซียมไดโครเมต (ภาคผนวก ข) เข้มข้น 0.25 นอร์มัล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ค่อยๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นที่มีซิลเวอร์ซัลเฟตผสมอยู่ลงไปปริมาตร 30 มิลลิลิตร ใส่ลูกแก้ว 5-10 เม็ด เขย่าให้สารละลายในขวดกลั่นทั้งหมดเข้ากัน ต่อเข้ากับเครื่องควบแน่น กลั่นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นแล้วฉีดล้างส่วนที่ค้างอยู่ในเครื่องควบแน่นด้วยน้ำกลั่น เจือจางสารละลายทั้งหมดเป็น 150 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

ไทเทรตสารละลายทั้งหมดด้วยสารละลายมาตรฐานเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต (ภาคผนวก ข) เพื่อหาปริมาตรของสารละลายโปแตสเซียมไดโครเมตที่เหลือ ใช้เฟอโรอิน อินดิเคเตอร์ (ภาคผนวก ข) 2-3 หยด ไทเทรตจนสีเปลี่ยนจากสีน้ำเงินแกมเขียวเป็นสีน้ำตาลแดง แสดงว่าถึงจุดสมดุลย์ ทำชุดควบคุมโดยใช้น้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร แทนตัวอย่างน้ำ

โดย ค่าซีโอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร) = [(A-B)xCx8,000] / ปริมาตรของตัวอย่างน้ำ (มิลลิลิตร)

เมื่อ A = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ใช้กับชุดควบคุม (มิลลิลิตร)

B = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ใช้กับตัวอย่างน้ำ (มิลลิลิตร)

C = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต (นอร์มัล)

2.5.9 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนภายในเซลล์ (cellular protein)

2.5.9.1 เจลดาห์ลโปรตีน (Kjeldahl protein) (A.O.A.C., 1975)

นำตัวอย่างเซลล์ยีสต์ 0.5 กรัม ใส่ในขวดกลั่นขนาด 300 มิลลิลิตร เติมเกลือผสมช่วยเร่งปฏิกิริยา ซึ่งประกอบด้วยโปแตสเซียมซัลเฟต 25 กรัม และคอปเปอร์ซัลเฟต 5 กรัม ลงไปจำนวน 7 กรัม เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร นำไปย่อยบนเตาหลุมจนสารละลายใส ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 37 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร กลั่นจับก๊าซแอมโมเนียที่เกิดขึ้นโดยใช้สารละลายกรดบอริกเข้มข้น 4 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) 100 มิลลิลิตร เติมอินดิเคเตอร์ (ภาคผนวก ข) 3 หยด กลั่นจนสารละลายกรดบอริกเหลือปริมาตร 250 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้มาไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานกรดเกลือที่ทราบความเข้มข้นแล้ว โดยที่

เปอร์เซนต์ไนโตรเจน = (ปริมาตรกรดเกลือxความเข้มข้นกรดเกลือx1.4) / น้ำหนักเซลล์แห้ง

เปอร์เซนต์โปรตีน = เปอร์เซนต์ไนโตรเจน x 6.25

2.5.9.2 Lowry protein (Lowry และคณะ, 1951 ; Mulchandani และคณะ, 1989)

นำน้ำหมักปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาปั่นแยกส่วนน้ำใสออก เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตั้งไว้ให้เย็น นำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม นำสารละลายโปรตีนที่

เจือจางแล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Lowry C (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที เติมสารละลาย Lowry D (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณโปรตีน (bovine serum albumin, BSA) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (ภาคผนวก ค)

2.5.10 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดนิวคลีอิกทั้งหมดภายในเซลล์ยีสต์ โดยหาได้จากผลรวมของปริมาณกรดไรโบนิวคลีอิก (ribonucleic acid, RNA) และกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (deoxyribonucleic acid, DNA) ภายในเซลล์ยีสต์

2.5.10.1 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดไรโบนิวคลีอิก วิเคราะห์โดยวิธี Orcinol (Kihlberg, 1972)

นำตัวอย่างเซลล์ยีสต์ปริมาณ 0.3 กรัม เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมกรดเปอร์คลอริกแช่เย็นเข้มข้น 14 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอน 2 ครั้งด้วยกรดเปอร์คลอริกแช่เย็นเข้มข้น 7 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เติมโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัล ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร ด้วยโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1 นอร์มัล และเติมกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น 14 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แช่เย็นที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายออซินอล (Orcinol reagent) 1 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ต้มในอ่างน้ำเดือด เป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบหาความเข้มข้นของ RNA จากกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของ RNA มาตรฐานจากยีสต์ (ภาคผนวก ค)

2.5.10.2 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก วิเคราะห์โดยวิธี Diphenylamine (Burton, 1956)

นำตัวอย่างเซลล์ยีสต์ปริมาณ 0.3 กรัม เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมกรดเปอร์คลอริกแช่เย็นเข้มข้น 14 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอน 2 ครั้งด้วยกรดเปอร์คลอริกแช่เย็นเข้มข้น 7 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เติมโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัล ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร ด้วยโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1 นอร์มัล และเติมกรดกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น 14 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แช่เย็นที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนตะกอนมาเติมกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น 5 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น 1 นอร์มัล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำส่วนผสมที่ได้มา 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายไดฟีนิลลามีน (Diphenylamine reagent) 1 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ต้มในอ่างน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบหาความเข้มข้นของ DNA จากกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของ DNA มาตรฐานจาก Calf thymus DNA (ภาคผนวก ค)

2.5.11 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันในน้ำทิ้ง โดยใช้เครื่องแคปพิลลารีก๊าซลิควิดโครมาโตกราฟี (Capillary Gas Liquid Chromatography ,GC) ตามวิธีของ Aziz และ Abu-Dagga (1991)

นำไขมันที่สกัดได้จากน้ำทิ้งในข้อ 2.5.3 ปริมาณ 20 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดมีฝาเกลียว เติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร เติมเมธานอล 2 มิลลิลิตรที่มีกรดเบนโซอิกเป็นสารละลายมาตรฐานภายในปริมาณ 2 กรัมต่อลิตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงนาน 5 นาที และปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บชั้นคลอโรฟอร์ม (ชั้นล่าง) ไประเหยคลอโรฟอร์มออกให้หมด เติมเฮกเซน 1 มิลลิลิตร แล้วนำมาวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของกรดไขมันด้วยวิธี GC ภายใต้ภาวะดังนี้

ชนิดของคอลัมน์ : แคปพิลลารีคอลัมน์ที่เคลือบด้วย OV-225 ขนาด (I.D.) 0.2 มิลลิเมตร ยาว 25 เมตร

เครื่องตรวจวัด : flame ionization detector (FID)

อุณหภูมิของ injector : 250 องศาเซลเซียส (Isothermal)

อุณหภูมิของคอลัมน์ : 180 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิของเครื่องตรวจวัด : 250 องศาเซลเซียส (Isothermal)

ก๊าซตัวพา : ฮีเลียม (He)

อัตราการไหล : 2 มิลลิลิตรต่อนาที

ปริมาตรฉีด : 1 ไมโครลิตร

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันในน้ำทิ้ง โดยการเปรียบเทียบเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของสารตัวอย่างกับเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ของสารมาตรฐานกรดไขมันที่มีคาร์บอน C14:0 ถึง C24:0

2.5.12 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณวิตามินภายในเซลล์ยีสต์ โดยใช้เครื่องไฮเพอร์ฟอแมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

นำตัวอย่างเซลล์ยีสต์ปริมาณ 0.1 กรัม ใส่ในหลอดทำปฏิกิริยา เติมสารละลาย 6 นอร์มัล ไฮโดรคลอริกปริมาตร 3 มิลลิลิตร ย่อยตัวอย่างเซลล์ยีสต์ในหลอดทำปฏิกิริยาภายใต้สุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 22 ชั่วโมง นำมาแยกเศษเซลล์ออกด้วยการกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman GF/C เจือจางด้วยสารละลายตัวพาและปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรอง Millipore ฉีดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง HPLC โดยมีภาวะดังนี้

ชนิดของคอลัมน์ : Shim-pack ISC-07/S 1504 Na (เบอร์ 2)

สารละลายตัวพา : สารละลาย 0.6 นอร์มัลโซเดียมซิเตรท และ 0.2 โมลาร์กรดบอริก มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 10

สารละลายมาตรฐานภายใน : สารละลายมาตรฐานวิตามินแต่ละชนิด 50 ppm ในน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

อุณหภูมิของคอลัมน์ : 40 องศาเซลเซียส

อัตราการไหล : 1 มิลลิลิตรต่อนาที

เครื่องตรวจวัด : flame ionization detector

ปริมาตรฉีด : 20 ไมโครลิตร

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณวิตามินภายในเซลล์ยีสต์ โดยการเปรียบเทียบเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ของสารละลายตัวอย่างกับเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ของสารละลายมาตรฐาน คำนวณปริมาณวิตามินภายในเซลล์ยีสต์ (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง) โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ผล C-R4A Chromatopac ในการคำนวณปริมาณวิตามินภายในเซลล์ยีสต์ เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ในภาวะเดียวกัน

2.5.13 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนภายในเซลล์ยีสต์ โดยใช้เครื่องไฮเพอร์ฟอแมนซ์ ลิควิดโครมาโตกราฟี

2.5.13.1 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนภายในเซลล์ยีสต์

นำตัวอย่างเซลล์ยีสต์ปริมาณ 0.1 กรัม ใส่ในหลอดทำปฏิกิริยา เติมสารละลาย 6 นอร์มัล ไฮโดรคลอริกปริมาตร 3 มิลลิลิตร ย่อยตัวอย่างเซลล์ยีสต์ในหลอดทำปฏิกิริยาภายใต้สุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 22 ชั่วโมง นำมาแยกเศษเซลล์ออกด้วยการกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman GF/C เจือจางด้วยสารละลายตัวพาและปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรอง Millipore ฉีดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง HPLC โดยมีภาวะดังนี้

ชนิดของคอลัมน์ : Shim-pack ISC-07/S 1504 Na (เบอร์ 2)

สารละลายตัวพา : สารละลาย 0.2 นอร์มัลโซเดียมซิเตรทในเอธานอล 7 เปอร์เซนต์ ที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 3.2

สารละลายมาตรฐานภายใน : สารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน 50 ppm ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

อุณหภูมิของคอลัมน์ : 55 องศาเซลเซียส

อัตราการไหล : 0.2 มิลลิลิตรต่อนาที

เครื่องตรวจวัด : flame ionization detector

ปริมาตรฉีด : 20 ไมโครลิตร

2.5.13.2 การวิเคราะห์ปริมาณทริปโตเฟนภายในเซลล์ยีสต์

นำตัวอย่างเซลล์ยีสต์ปริมาณ 0.1 กรัม ใส่ในหลอดทำปฏิกิริยา เติมสารละลาย 4.2 นอร์มัล โซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ย่อยตัวอย่างเซลล์ยีสต์ในหลอดทำปฏิกิริยาภายใต้สุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกภายใต้เครื่องทำความเย็น ให้มีสภาพเป็นกลาง ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายตัวพา กรองผ่านกระดาษกรอง Millipore ฉีดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง HPLC โดยมีภาวะดังนี้

ชนิดของคอลัมน์	:	Shim-pack ISC-07/S 1504 Na (เบอร์ 2)
สารละลายตัวพา	:	สารละลาย 0.6 นอร์มัลโซเดียมซิเตรท และสารละลายกรดบอริก 25 มิลลิโมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 9
สารละลายมาตรฐานภายใน	:	สารละลายมาตรฐานกรดทริปโตเฟน 28.4 ppm มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร
อุณหภูมิของคอลัมน์	:	55 องศาเซลเซียส
อัตราการไหล	:	0.4 มิลลิลิตรต่อนาที
เครื่องตรวจวัด	:	flame ionization detector
ปริมาตรฉีด	:	20 ไมโครลิตร

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนภายในเซลล์ยีสต์ โดยการเปรียบเทียบเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ของสารละลายตัวอย่างกับเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ของสารละลายมาตรฐาน คำนวณปริมาณกรดอะมิโนภายในเซลล์ยีสต์ (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง) โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ผล C-R4A Chromatopac ในการคำนวณปริมาณกรดอะมิโนภายในเซลล์ยีสต์ เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ในภาวะเดียวกัน