บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

วัตถุดิบที่ใช้ในงานวิจัย

กากยีสต์หมักแอลกอฮอล์ *Saccharomyces cerevisiae* (SC 90) จากกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ของงานทดลองผลิตภัณฑ์เชื้อเพลิง โครงการส่วนพระองค์ สวนจิตรลดา

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

Absolute ethanol (C_2H_5OH)	AR grade
Acetic acid (CH_3C00H)	AR grade
Acetone (($CH3)_2CO$)	AR grade
Boric acid (H_3BO_3)	AR grade
3,5-dinitrosalicylic acid ($C_7H_4N_2O_7$)	AR grade
Hydrochloric acid (HCl)	AR grade
Sodium carbonate (Na_2CO_3)	AR grade
Sodium hydroxide (NaOH)	AR grade
Sodium potassium tartrate ($C_4H_4KNaO_64H_2O$)	AR grade
Sulfuric acid (H_2SO_4)	AR grade
Petroleum ether	AR grade
Ethanol (C_2H_5OH)	AR grade
Gum arabic powder (Rama Production, Thailand)	Food grade
Whey protein powder (Vicchi Enterprise, Thailand)	Food grade
Spray dried yeast beta-glucan (Innovacan®, Specialty Biotech, Thailand)	

เอนไซม์ที่ใช้ในงานวิจัย

Savinase® 16L TYPE EX (Novo-Nordisk, Denmark)	Commercial grade
Alcalase® 2.4L (Novo-Nordisk, Denmark)	Food grade
Yeast Beta-Glucan Assay Kit; K-YBGL (Megazyme, Ireland)	

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

Centrifuge (Hettich, ROTANTA 460R,Germany)

Digestion unit สำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (BUCHI, K-424, Switzerland)

Distillation unit สำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (BUCHI, B-324, Switzerland)

Homogenizer (Ystral GmbH, x10/25, Germany)

Hot air oven (Memmert, USA)

Hot plate stirrer (Framo-Geratetechnik, M 21/1, Germany)

Furnace (Carbolite, CWF 1200, England)

Phase contrast microscope (Nikon, UFX-DX, Japan)

pH meter (Mettler Toledo, 204)

Weight balance (Sartorius BP 310, Germany)

Rotary evaporator (Eyela, SB 651, Japan)

Spectophotometer (Spectronic 20 Genesys, USA)

Vortex mixer (CTL, CTL-107, Germany)

Water bath shaker (Julabo, SW 23, Germany)

Water bath (Memmert, USA)

ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การแยกเซลล์ยีสต์จากน้ำหมักแอลกอฮอล์ (น้ำหมักส่า)

นำน้ำหมักแอลกอฮอล์ ที่หมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (วิธีการหมักแสดงในภาคผนวก ก) ประมาณ 60 ลิตร มากรองแยกของแข็งขนาดใหญ่ออกด้วยผ้ากรองขนาด 125 ไมครอน (N200 Saatilon, Japan) จากนั้นนำน้ำหมักแอลกอฮอล์ไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ยีสต์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 xg อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที และล้างเซลล์ยีสต์ด้วยน้ำกลั่นที่มีค่า pH เท่ากับ 6.08 ± 0.12 จำนวน 3 รอบ โดยใช้อัตราส่วนเซลล์ต่อน้ำกลั่น เท่ากับ 1:3 โดยน้ำหนัก ในการล้างแต่ละรอบ แยกส่วนเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 8,000xg อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา15 นาที เมื่อล้างครบ 3 รอบ วิเคราะห์ค่าการสูญเสียของยีสต์ (Niumthanorm,1997) และนำเซลล์ยีสต์มาชั่งน้ำหนัก เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

3.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของยีสต์

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ไขมัน เถ้า ความชื้น ตามวิธี AOAC (1995) คาร์โบไฮเดรต โดยวิธี Phenol-sulfuric acid (แสดงในภาคผนวก ข) และปริมาณเบต้ากลูแคน (แสดงในภาคผนวก ง)

3.3 **การศึกษาการรอดชีวิตของยีสต์ระหว่างการเก็บแช่เย็น**

ตรวจนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของยีสต์สดที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน โดยใช้วิธี Methylene blue technique (วิธีแสดงในภาคผนวก ค) และหยดสารละลายเซลล์ยีสต์ลงบนแผ่นสไลด์นับเซลล์ นำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า เซลล์ที่มีชีวิตจะไม่ติดสีน้ำเงิน ส่วนเซลล์ที่ตายจะติดสีน้ำเงิน คำนวณหาจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต

3.4 **การศึกษาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการย่อยสลายผนังเซลล์ยีสต์ ใช้วิธีการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ (ออโตไลซิส)** (ดัดแปลงวิธีของ Thammakiti, 2002; Chao และคณะ,1980)

เตรียมสารแขวนลอยยีสต์ที่แยกได้จากข้อ 3.1 ให้มีปริมาณของแข็งประมาณ 15 % (w/w) ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับ pH เท่ากับ 5.0 ด้วย 0.1 M NaOH นำไปให้ความร้อนในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (water bath shaker) โดยศึกษาภาวะของอุณหภูมิ 3 ระดับ ได้แก่ 45, 50 และ 60 °C และเวลา 3 ระดับ ได้แก่ 12 , 24 และ 48 ชั่วโมง (เขย่าตลอดเวลาที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที) เมื่อครบตามระยะเวลาเพิ่มอุณหภูมิเป็น 80 °C นาน 15 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ จากนั้นทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และนำไปปั่นเหวี่ยงแยกของเหลว ที่ความเร็วรอบ 8,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที จะได้ส่วนของยีสต์ออโตไลเสท และส่วนของผนังเซลล์ ล้างผนังเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 รอบ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

ออกแบบการทดลองแบบ 3^2 Factorial in CRD (Completely Randomized Design) ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้ F-statistic และ Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox,1957)

3.4.1 วิเคราะห์จำนวนเซลล์ยีสต์ที่เกิดการย่อยสลายตัวเอง (เซลล์ที่แตก) (Gatesoupe,1999)

นำตัวอย่างผนังเซลล์ (จากข้อ3.4) เจือจางกับน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเหมาะสม (หากเซลล์ยีสต์มีจำนวนเซลล์มากเกินไป) จากนั้นหยดลงบนสไลด์นับเซลล์ (Haemacytometer) แล้วนำไปนับจำนวนเซลล์ที่แตกภายใต้ Phase contrast microscope (Nikon,UFX-DX, Japan) กำลังขยาย 400 เท่า เซลล์ที่แตกจะมีสีเข้มมืดทึบ ส่วนเซลล์ที่ไม่แตกจะสว่าง คำนวณหาค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่แตก ดังนี้

จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร = จำนวนเซลล์ที่นับได้ x 5 x 10^4 x dilution factor

3.4.2 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในออโตไลเสท (Lowry และคณะ,1951) และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในส่วนผนังเซลล์ (Chang,1994) (วิธีการแสดงในภาคผนวก ข)

นำตัวอย่างส่วนของผนังเซลล์มาวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยใช้ Kjeldahl' method (AOAC,1995) และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (crude protein content) โดยนำปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดคูณกับ 6.25 (วิธีการแสดงในภาคผนวก ข)

3.4.3 วิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (Kochert, 1978)

นำตัวอย่างส่วนของผนังเซลล์และตัวอย่างออโตไลเสท หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร (วิธีการแสดงในภาคผนวก ข)

3.4.4 วิเคราะห์ปริมาณเบต้ากลูแคนในผนังเซลล์ โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป (Yeast Beta -Glucan Assay Kit; K-YBGL) (วิธีการแสดงในภาคผนวก ง)

3.4.5 วิเคราะห์ปริมาณไขมันในผนังเซลล์ (AOAC,1995) (วิธีการแสดงในภาคผนวก ข)

3.4.6 วิเคราะห์ปริมาณเถ้าในผนังเซลล์ (AOAC,1995) (วิธีการแสดงในภาคผนวก ข)

3.5 การสกัดโปรตีนส่วนที่ละลายน้ำจากผนังเซลล์ยีสต์ โดยการสกัดด้วยน้ำร้อน (Hot water treatment) (ตามวิธีของ Liu และคณะ , 2006)

เตรียมสารแขวนลอยผนังเซลล์ยีสต์ ที่แยกได้จากข้อ 3.4 ให้มีปริมาณของแข็งประมาณ 10 % (w/v) ปรับ pH เท่ากับ 7.0 ด้วย 0.1 M NaOH นำมาให้ความร้อนภายใต้ความดันที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง และทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 45 °C นำไปปั่นเหวี่ยงแยก ที่ความเร็วรอบ 8,000 xg ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนตะกอน (ผนังเซลล์) มาล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง

ออกแบบการทดลองแบบ CRD ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox,1957)

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด ปริมาณไขมัน และปริมาณเถ้าในส่วนของผนังเซลล์ (วิธีการแสดงในภาคผนวก ข) และวิเคราะห์ปริมาณเบต้ากลูแคนในส่วนของผนังเซลล์ (วิธีการแสดงในภาคผนวก ง)

3.6 ภาวะที่เหมาะสมของการสกัดโปรตีนจากผนังเซลล์ยีสต์ ด้วยเอนไซม์โปรติเอส (Protease treatment) (ดัดแปลงวิธีของ Freimund และคณะ, 2003)

นำส่วนตะกอน (ผนังเซลล์) ที่ได้จากการขั้นตอนการสกัดด้วยน้ำร้อน (จากข้อ 3.5) มาปรับปริมาณของแข็งเป็น 15% (w/v) ด้วยน้ำกลั่น ปรับค่า pH เท่ากับ 10.5 ด้วย 0.1 N NaOH เติมเอนไซม์ Savinase® 16L TYPE EX ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.3 และ 0.5 % (w/v) และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 45 °C ใน water bath shaker ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที และเวลาในการสกัด 3, 4 และ 5 ชั่วโมง เมื่อครบตามระยะเวลา หยุดปฏิกิริยาโดยปรับสารแขวนลอยยีสต์ให้เป็นกลางด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น ปั่นเหวี่ยงแยกเอาส่วนของเหลวใส (supernatant) ทิ้ง และล้างส่วนตะกอน (sediment) ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง สำหรับเอนไซม์ Alcalase® 2.4L ขั้นตอนในการทดลองเหมือนเดิมแต่ ปรับค่า pH เท่ากับ 7.5 ด้วย 0.1 N NaOH และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 °C เมื่อครบตามระยะเวลาหยุดปฏิกิริยา โดยลดอุณหภูมิลง 50 °C เวลา 30 นาที หรือเพิ่มอุณหภูมิสูงกว่า 60 °C ที่ pH 4

ออกแบบการทดลองแบบ 3^2 Factorial in CRD ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้ F-statistic และ Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox,1957)

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด ปริมาณไขมัน และปริมาณเถ้าในส่วนของผนังเซลล์ (วิธีการแสดงในภาคผนวก ข) และวิเคราะห์ปริมาณเบต้ากลูแคนในส่วนของผนังเซลล์ (วิธีการแสดงในภาคผนวก ง)

3.7 ศึกษาการสกัดไขมันส่วนผนังเซลล์ยีสต์จากตัวทำละลายอินทรีย์

นำส่วนตะกอน (ข้อ 3.6) มาทำแห้งโดยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและสกัดไขมัน ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 5 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน : เมทานอล เมทานอลบริสุทธิ์ เอทานอลบริสุทธิ์ เอทานอล (95 %) และอะซีโตน โดยใช้อัตราส่วนตะกอนแห้ง (ผนังเซลล์) ต่อตัวทำละลายอินทรีย์เท่ากับ 1:4 โดยปริมาตร ทำการสกัดภายใต้ภาวะ reflux นาน 2 ชั่วโมง และนำมากรอง เพื่อเก็บตะกอน และนำตะกอนที่ได้มาล้างด้วยตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิด จำนวน 3 รอบ และทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 °C นาน 30 นาที ได้สารสกัดเบต้ากลูแคน

ออกแบบการทดลองแบบ CRD ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox,1957)

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด ปริมาณไขมัน และปริมาณเถ้า (วิธีการแสดงในภาคผนวก ข) และวิเคราะห์ปริมาณเบต้ากลูแคนในสารสกัดเบต้ากลูแคนที่สกัดได้ (วิธีการแสดงในภาคผนวก ง)

3.8 ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัดเบต้ากลูแคน

ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัดเบต้ากลูแคนที่สกัดได้เปรียบเทียบกับเบต้ากลูแคนจากยีสต์ที่มีจำหน่ายเชิงการค้าในประเทศไทย เพื่อพิจารณาความแตกต่างทางด้านสมบัติเชิงหน้าที่ ได้แก่ ความสามารถในการดูดซับน้ำ ความสามารถในการดูดซับน้ำมัน และความสามารถในการทำให้อิมัลชันคงตัว

วางแผนการทดลองทางสถิติแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้ F-statistic และ Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox,1957)

3.8.1 ความสามารถในการดูดซับน้ำ (Water-holding capacities)

(ตามวิธีของ Sosulski,1962)

ชั่งน้ำหนักหลอดเซ็นตริฟิวจ์ (W_1) ขนาด 25 มิลลิลิตร ที่จะใช้บรรจุตัวอย่าง และชั่งตัวอย่างส่วนของผนังเซลล์ สารสกัดเบต้ากลูแคนที่สกัดได้และเบต้ากลูแคนที่จำหน่ายเชิงการค้าอย่างละ1.0 กรัม ใส่ลงในหลอดเซ็นตริฟิวจ์ เติมน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร และใช้แท่งแก้วคนประมาณ 30 วินาที จนได้เป็นสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที นำของผสมที่ได้ไปเซ็นตริฟิวจ์ ที่ความเร็วรอบ 2000 xg นาน 25 นาที ใช้ Pasteur pipette ดูดส่วนน้ำใสออก และทำให้แห้งที่ 50 °C นาน 30 นาที นำหลอดเซ็นตริฟิวจ์ใส่ใน desicator และชั่งน้ำหนักหลอดที่มีตัวอย่างค้างอยู่ (W_2) คำนวณค่าความสามารถในการดูดซับน้ำตามสูตร

$$\text{ความสามารถในการดูดซับน้ำ (g/g)} = \frac{(W_2 - W_1)}{\text{น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง (g)}}$$

3.8.2 ความสามารถในการดูดซับน้ำมัน (Oil-holding capacities)

(ตามวิธีของ Lin และ Humbert, 1974)

ชั่งน้ำหนักหลอดเซ็นตริฟิวจ์ (W_1) ขนาด 25 มิลลิลิตร ที่จะใช้บรรจุตัวอย่าง และชั่งตัวอย่างส่วนของผนังเซลล์ สารสกัดเบต้ากลูแคนที่สกัดได้และเบต้ากลูแคนที่จำหน่ายเชิงการค้าอย่างละ 1.0 กรัม ใส่ลงในหลอดเซ็นตริฟิวจ์ เติมน้ำมันถั่วเหลือง 15 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากันประมาณ 1 นาที และตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที นำไปเซ็นตริฟิวจ์ ที่ความเร็วรอบ 2000 xg

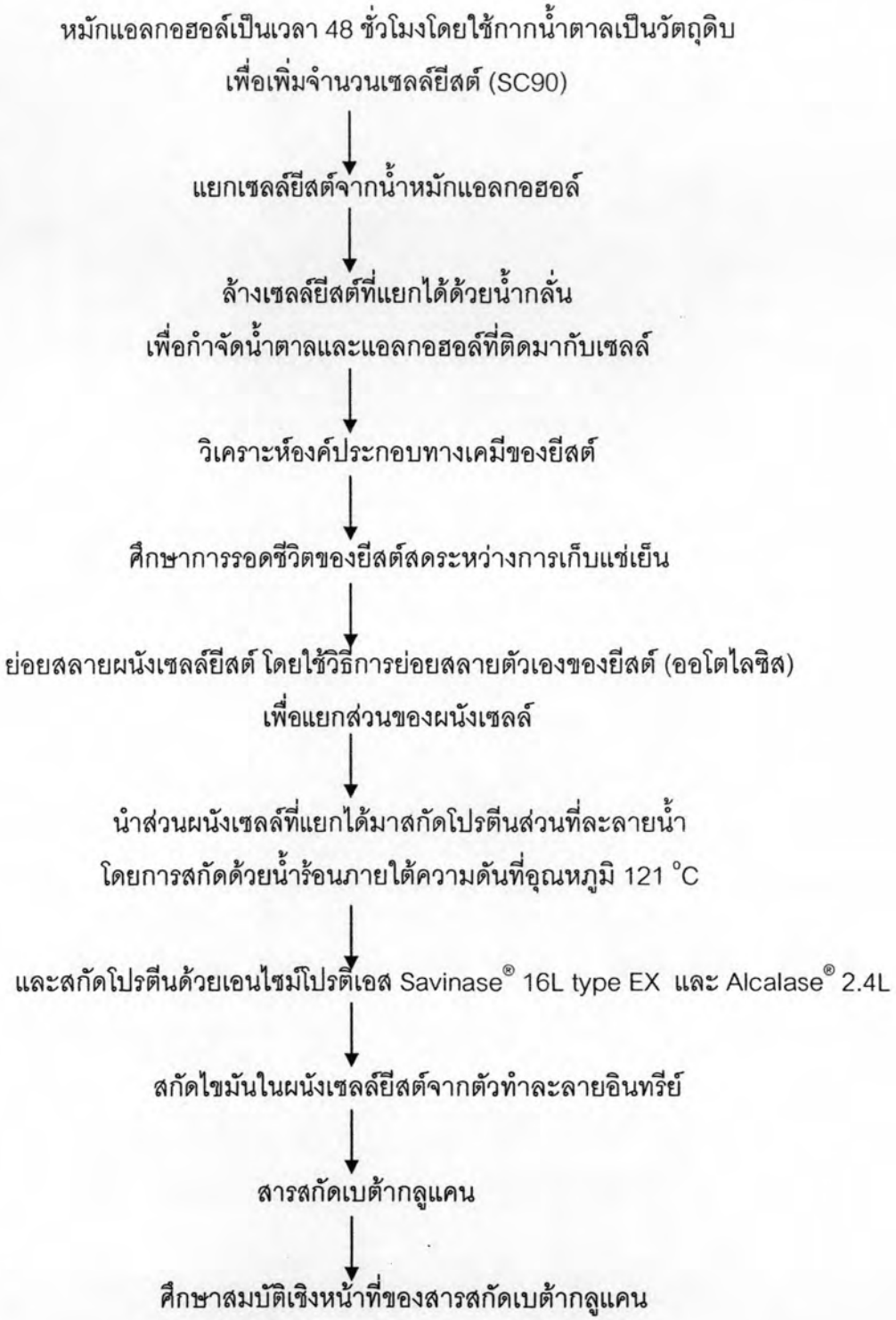
นาน 25 นาที ใช้ Pasteur pipette ดูดส่วนน้ำมันใสออก และชั่งน้ำหนักหลอดที่มีตัวอย่างค้างอยู่ (W_2) คำนวณค่าความสามารถในการดูดซับน้ำมันตามสูตร

$$\text{ความสามารถในการดูดซับน้ำมัน (g/g)} = \frac{(W_2 - W_1)}{\text{น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง (g)}}$$

3.8.2 ความสามารถในการทำให้อิมัลชันคงตัว (Emulsion stabilizing capacity) (ตามวิธีของ Smiles และคณะ, 1989)

ชั่งตัวอย่างส่วนของผนังเซลล์ สารสกัดเบต้ากลูแคนที่สกัดได้และเบต้ากลูแคนที่จำหน่ายเชิงการค้าอย่างละ 2.5 กรัม ผสมกับ Whey protein powder 2.5 กรัม และเทลงในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เติมน้ำมันถั่วเหลือง 150 มิลลิลิตร ลงไปอย่างช้า ๆ และกวนผสมโดยใช้โฮโมจิไนเซอร์ ความเร็วรอบ กวนรอบแรกนานประมาณ 30 วินาที และรอบที่ 2 นานประมาณ 90 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดอิมัลชันปริมาตร 12 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดเซ็นตริฟิวจ์ ขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงแยกที่ความเร็วรอบ 1,300 xg นาน 5 นาที และนำไปให้ความร้อนในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 85 °C นาน 15 นาที แล้วทำให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง และนำไปเหวี่ยงแยกที่ความเร็วรอบ 1,300 xg นาน 5 นาที คำนวณค่าความสามารถในการทำให้อิมัลชันมีความคงตัว

$$\text{ค่าความคงตัวของอิมัลชัน (\%)} = \frac{\text{ปริมาตรของชั้นอิมัลชันที่เหลือหลังจากให้ความร้อน} \times 100}{\text{ปริมาตรของอิมัลชันก่อนทำการปั่นเหวี่ยง}}$$



รูปที่ 3.1 **สรุปขั้นตอนการสกัดเบต้ากลูแคนจากยีสต์** *Saccharomyces cerevisiae*, SC 90