บทที่ 4

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

4.1 <u>อุปกรณ์</u>

1. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) รุ่น G-FS ของบริษัท Gasells chaftfur Labortechnik, Germany.

2. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Kubota 5100 ของบริษัท Kubota corporation, Japan.

3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

    3.1 รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Spectronic Instruments, USA.

    3.2 รุ่น Beckman DU® 6 Spectrophotometer ของบริษัท Beckman, USA.

4. ตู้ถ่ายเชื้อแบบไหลราบเรียบ (Laminar flow) รุ่น VS-124 ของบริษัท ISSCO, USA.

5. หม้อฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HL24ADY ของบริษัท Hirayama Manufacturing corporation, Tokyo, Japan.

6. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น Julabo HC-2/8 ของบริษัท Labortechnik GMBH, Germany.

7. ถังหมัก (Fermenter)

    7.1 รุ่น MINI-JAR-FERMENTER KMJ ของบริษัท Mituwa, Japan.

    7.2 รุ่น Biostat® ED ของบริษัท B.Braun Biotech Internation, Germany.

8. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น MP220 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland.

9. ปั๊มรีด (Peristatic pump)

9.1 รุ่น Watson-Marlow 505U ของบริษัท Watson-Marlow Limited, England.

9.2 รุ่น MasterFlex 7518-10 ของบริษัท Cole Parmer Instrument. Co, USA.

9.3 รุ่น EYELA Micro tube pump MP-3 ของบริษัท Tokyo Rikakikai Co., LTD, Japan.

10. ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (Hot air oven) รุ่น ULM 500 ของบริษัท Memmert, Germany.

4.2 สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริก [H_2SO_4] ของบริษัท Merck, Germany.

2. กรดไดไนโตรซาลิไซลิก [$C_7H_4N_2O_7$] ของบริษัท Fluka, Switareland.

3. กรดไฮโดรคลอริค [HCl] ของบริษัท Merck, Germany.

4. กลูโคส [$C_6H_{12}O_6$] ของบริษัท AJAX CHEMICAL, Australia.

5. คลอโรฟอร์ม [$CHCl_3$] ของบริษัท AJAX CHEMICAL, Australia.

6. คอปเปอร์ซัลเฟต [$CuSO_4.5H_2O$] ของบริษัท Carloerba. Italy.

7. แคลเซียมคลอไรด์ [$CaCl_2.H_2O$] ของบริษัท Merck, Germany.

8. ซิงค์ซัลเฟต [$ZnSO_4.7H_2O$] ของบริษัท AJAX CHEMICAL, Australia.

9. โซเดียมเตตราบอเรต [$Na_2B_4O_7.7H_2O$] ของบริษัท AJAX CHEMICAL, Australia.

10. โซเดียมไนโตรพรัสไซด์ [Sodium nitroprusside] ของบริษัท Fluka, Switzerland.

11. โซเดียมโปแตสเซียมตาร์เตรท [$KNaC_4H_4O_6.4H_2O$] ของบริษัทAJAX CHEMICAL, Australia.

12. โซเดียมไฮดรอกไซด์ [NaOH] ของบริษัท Merck, Germany.

I 19282410

13. โซเดียมไฮโปคลอไรด์ [NaOCl] ของบริษัท Carloerba. Italy.

14. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต [$Na_2HPO_4.12H_2O$] ของบริษัทAJAX CHEMICAL, Australia.

15. โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต [KH_2PO_4] ของบริษัท AJAX CHEMICAL, Australia.

16. ฟีนอล [Phenol] ของบริษัท Merck, Germany.

17. เฟอรัสซัลเฟต [$FeSO_4.7H_2O$] ของบริษัท AJAX CHEMICAL, Australia.

18. แมงกานีสซัลเฟต [$MnSO_4.5H_2O$] ของบริษัท AJAX CHEMICAL, Australia.

19. แมกนีเซียมซัลเฟต [$MgSO_4.7H_2O$] ของบริษัท AJAX CHEMICAL, Australia.

20. อะซิโตน ของบริษัท AJAX CHEMICAL, Australia.

21. เอทานอล 99.8%[C_2H_6O] ของบริษัท Carloerba. Italy.

22. แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] ของบริษัท AJAX CHEMICAL, Australia.

23. แอมโมเนียมโมลิบเดต [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$] ของบริษัท AJAX CHEMICAL, Australia.

4.3 <u>เชื้อจุลินทรีย์</u>

ในการทดลองใช้เชื้อ *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 สั่งซื้อจาก The National Collections of Industrial and Marine Bacteria LTD. ประเทศอังกฤษ

4.4 <u>อาหารเลี้ยงเชื้อ</u>

4.4.1 อาหารสำหรับเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ ใช้อาหารนิวเทรียนเอการ์แบบแข็งเอียง (nutrient agar slant)

4.4.2 อาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ ใช้อาหารนิวเทรียนบรอทแบบเหลว (nutrient broth)

4.4.3 อาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ (Kim, B. S. และ คณะ, 1994)

ใช้อาหารสูตรเกลือแร่ (mineral salts medium : MSM) ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

- กลูโคส 10 กรัม
- ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต [$Na_2HPO_4.12H_2O$] 9 กรัม
- โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต [KH_2PO_4] 1.5 กรัม
- แมกนีเซียมซัลเฟต [$MgSO_4.7H_2O$] 0.2 กรัม
- แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] 1 กรัม
- สารละลายเกลือ (salt solution) ประกอบด้วย

กรดไฮโดรคลอริค 35 % [HCl]	10	มิลลิลิตร
คอปเปอร์ซัลเฟต [$CuSO_4.5H_2O$]	1	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ [$CaCl_2.H_2O$]	2	กรัม
ซิงค์ซัลเฟต [$ZnSO_4.7H_2O$]	2.25	กรัม
โซเดียมเตตราบอเรต [$Na_2B_4O_7.7H_2O$]	0.23	กรัม
เฟอรัสซัลเฟต [$FeSO_4.7H_2O$]	10	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต [$MnSO_4.5H_2O$]	0.5	กรัม
แอมโมเนียมโมลิบเดต [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$]	0.1	กรัม

ในการเตรียมอาหารสูตรเกลือแร่นี้ ต้องทำการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนจากไอน้ำที่ความดัน 1.5 บาร์ เป็นเวลา 20 นาที โดยต้องแยกกลูโคสและแมกนีเซียมซัลเฟตออกจากกันก่อนทำการฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นจึงนำสารทั้งหมดมาผสมกันด้วยวิธีแบบปลอดเชื้อ แล้วปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 6.8

4.5 วิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

4.5.1 วิธีการเก็บรักษาแบบระยะยาว

เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีการแช่เยื่อแข็ง (lyophilization) ซึ่งเป็นการทำให้เซลล์แข็งตัวในสภาพสูญญากาศ เมื่อต้องการนำออกมาใช้จึงนำออกมาถ่ายเชื้อลงในอาหารนิวเทรียนบรอทแบบเหลว เพื่อเพิ่มปริมาณและบำรุงเซลล์ให้แข็งแรง ระหว่างการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีนี้เชื้อจะไม่มีการเจริญเติบโตแบ่งตัว ดังนั้นจึงไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์อย่างแน่นอน

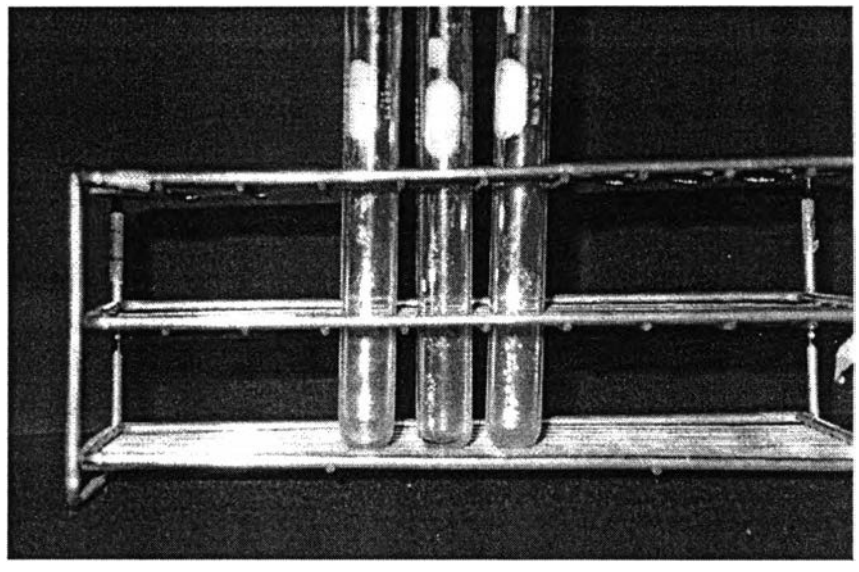
4.5.2 วิธีการเก็บรักษาแบบระยะสั้น

เขี่ยเชื้อจุลินทรีย์ลงบนอาหารนิวเทรียนเอการ์แบบแข็งเอียง (agar slant) สำหรับเก็บรักษาเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญดีแล้ว นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส วิธีนี้สามารถเก็บรักษาเชื้อได้นานประมาณ 1 เดือน

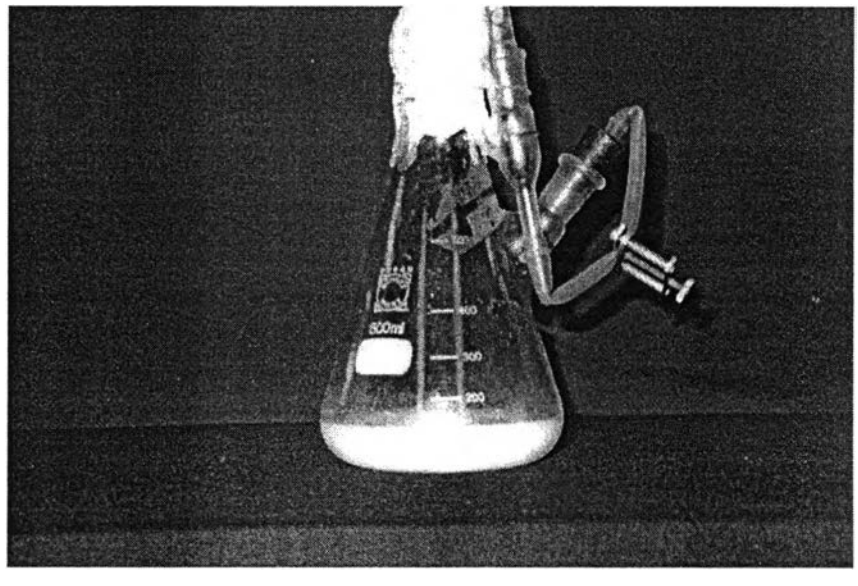
4.6 ขั้นตอนการทดลอง

4.6.1 การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ตั้งต้น

ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บรักษาอาหารนิวเทรียนเอการ์แบบแข็งเอียง (ดังรูปที่ 4.1) ลงในอาหารอุดมนิวเทรียนบรอทแบบเหลวที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 500 มิลลิลิตร (ดังรูปที่ 4.2) ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ จากนั้นนำไปเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ปริมาณหัวเชื้อจุลินทรีย์ตั้งต้นที่ใช้สำหรับการทดลองแต่ละครั้งคือ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร



รูปที่ 4.1 แสดงเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารนิวเทรียนเอการ์แบบแข็งเอียง



รูปที่ 4.2 แสดงหัวเชื้อตั้งต้น ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 500 มิลลิลิตร

4.6.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมัก

ในการเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมักแบบสองขั้นตอน (ดังรูปที่ 4.3 - 4.5) เริ่มจากทำการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในถังหมักแรก จนกระทั่งมีความเข้มข้นของเซลล์คงที่ จึงเริ่มการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องในถังหมักที่สอง

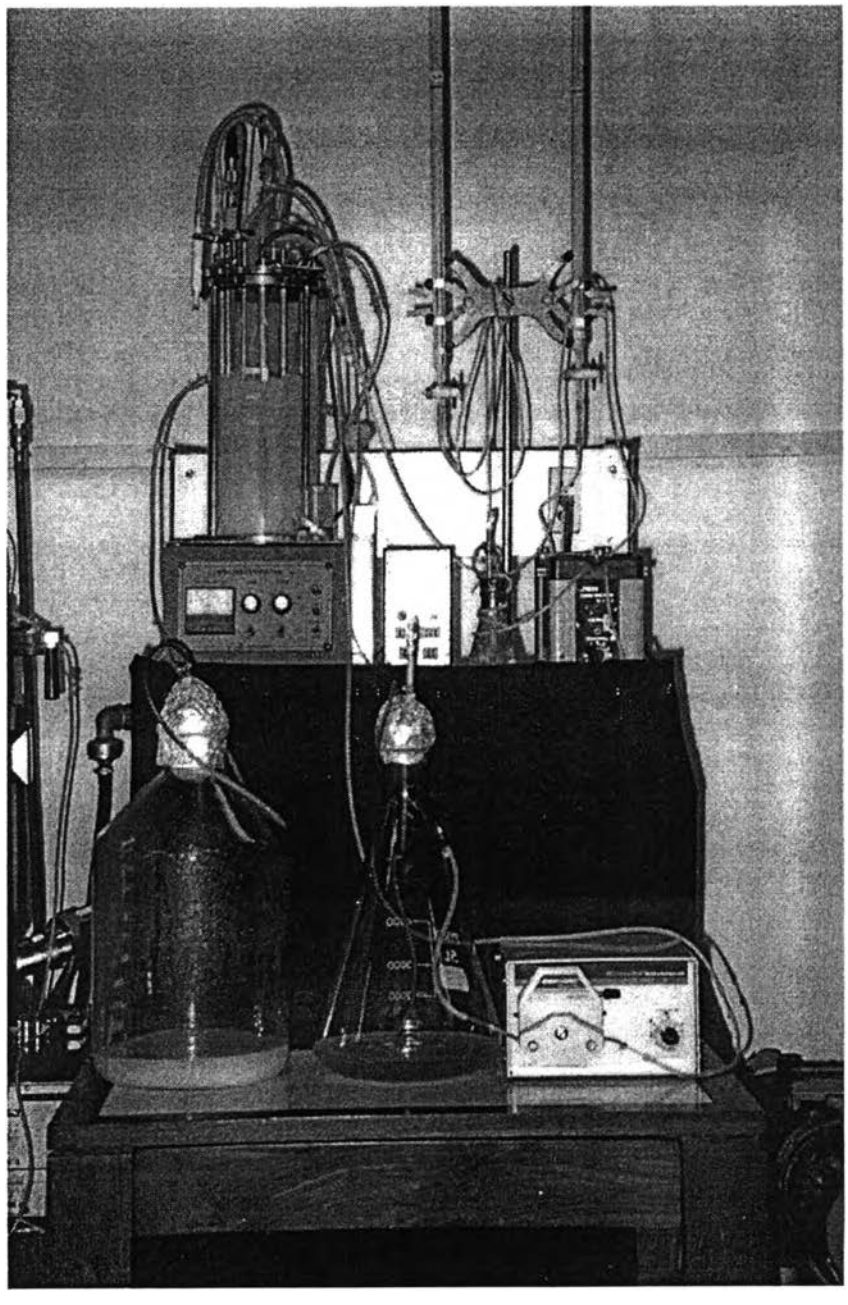
4.6.2.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมักแบบต่อเนื่องในถังหมักแรก

ถ่ายเชื้อตั้งต้น (จากข้อ 4.6.1) ปริมาณ 300 มิลลิลิตร ลงในถังหมักที่มีอาหารเหลว 2,700 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ในขั้นตอนนี้ต้องควบคุมค่าความเป็นกรดด่างให้อยู่ระหว่าง 6.7 – 6.9 ด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมลาร์

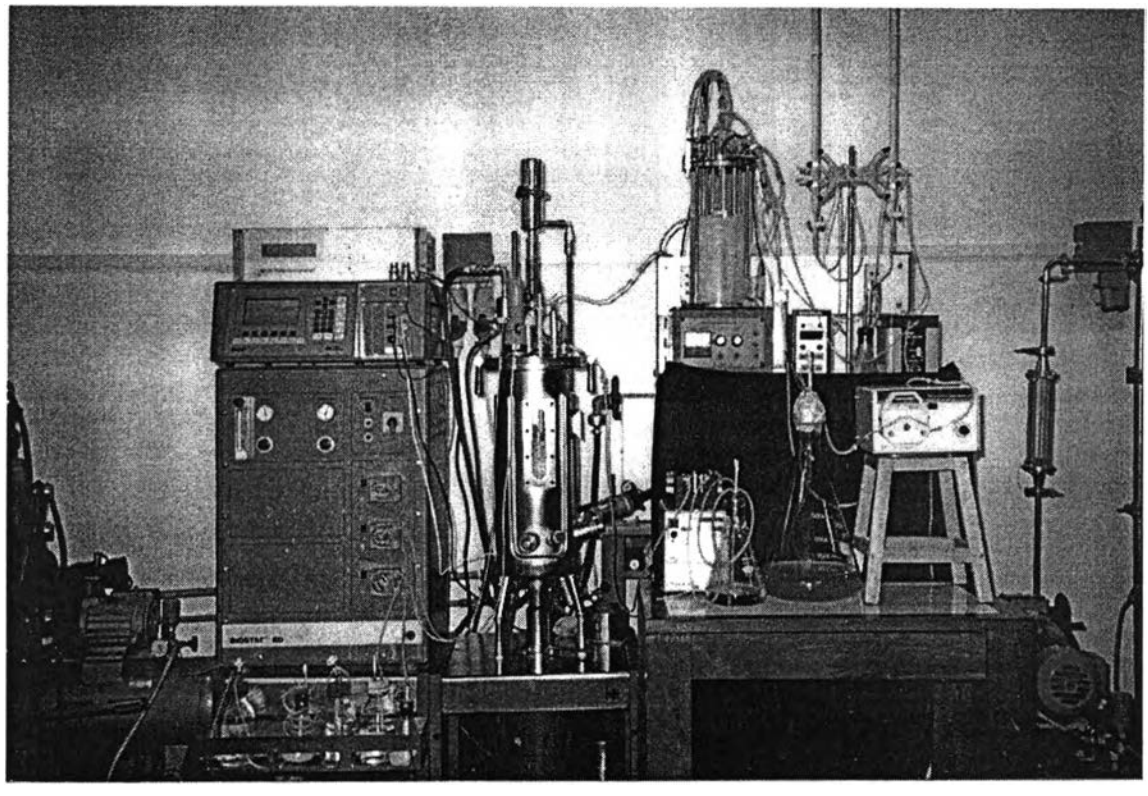
หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ 17 ชั่วโมงแล้ว จะทำการป้อนสารอาหารเข้าสู่ถังหมักด้วยปั๊มรีดและควบคุมระดับในถังหมักด้วยระบบไหลล้น (overflow) โดยปรับอัตราการป้อนสารอาหารให้สอดคล้องกับอัตราการเจือจาง (D) [อัตราการเจือจาง (dilution rate : D = F / V) คือ อัตราการป้อนสารอาหาร (F) ต่อปริมาตรของเหลวในถังหมัก (V)] ปรับอัตราการเจือจาง และความเข้มข้นของสารอาหารที่ป้อนจนกระทั่งได้ความเข้มข้นของเซลล์คงที่ ตรวจวัดปริมาณเซลล์ (กรัมต่อลิตร) ปริมาณกลูโคส (กรัมต่อลิตร) , ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร) ปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร)

4.6.2.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมักแบบกึ่งต่อเนื่องในถังที่สอง

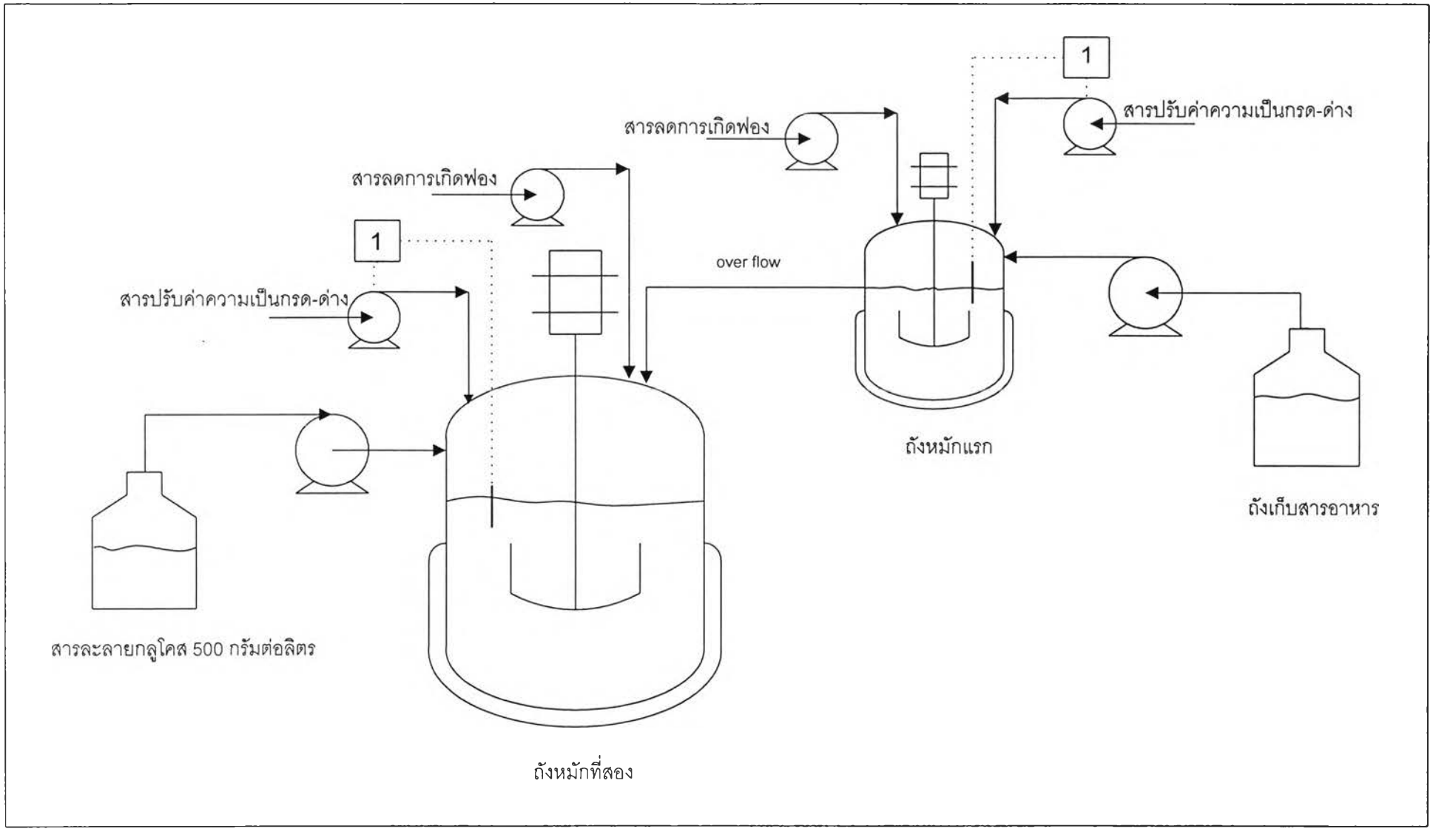
จากข้อ 4.6.2.1 หลังจากได้อัตราการเจือจางและความเข้มข้นของสารอาหารป้อนที่เหมาะสมแล้ว เพาะเลี้ยงเซลล์จนกระทั่งได้ความเข้มข้นเซลล์คงที่ จึงป้อนน้ำหมักเข้าสู่ถังหมักที่ 2 เปลี่ยนให้เชื้อจุลินทรีย์เข้าสู่ภาวะการสร้าง PHB โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมลาร์ ปรับค่าความเป็นกรดด่างแทนแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ ควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงอื่นๆ เหมือนในถังหมักแรก ควบคุมความเข้มข้นของกลูโคสให้อยู่ระหว่าง 10-20 กรัมต่อลิตร ด้วยสาร



รูปที่ 4.3 ภาพถ่ายแสดงการหมักแบบต่อเนื่องขั้นตอนเดียว



รูปที่ 4.4 ภาพถ่ายแสดงการผลิตพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตในการหมักแบบสองขั้นตอน



รูปที่ 4.5 แผนภาพแสดงการผลิต PHB ในการหมักแบบสองขั้นตอน (1. ระบบควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง)

ละลายกลูโคสความเข้มข้น 500 กรัม/ลิตร โดยปั๊มรีดเมื่อปริมาตรของน้ำหมักครบ 7 ลิตร จะหยุดการป้อนน้ำหมักจากถังหมักแรก ทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบกึ่งต่อเนื่องอีก 20 ชั่วโมง ยังคงควบคุมความเข้มข้นของกลูโคสให้อยู่ระหว่าง 10-20 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างทุก 2-4 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์, กลูโคส, ไนโตรเจนและ PHB

4.7 <u>การวัดการเจริญของเชื้อ</u>

4.7.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

ปิเปตน้ำหมัก 5 มิลลิลิตร มาทำการปั่นแยกและล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ถ่ายเซลล์ลงในถ้วยอะลูมิเนียมที่อบแห้งและทราบน้ำหนักแล้ว จากนั้นนำไปอบที่ 80 องศาเซลเซียส จนเซลล์แห้งแล้วนำมาใส่ในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักอีกครั้ง ทำซ้ำจนกระทั่งได้น้ำหนักเซลล์คงที่

4.7.2 การวัดค่าความขุ่น

ปั่นแยกเซลล์จากน้ำหมัก 5 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที จากนั้นกระจายเซลล์ที่ได้ในน้ำกลั่น วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ นำค่าที่ได้หาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งจากกราฟมาตรฐาน

4.8 <u>การหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส</u> (Ashwell, 1966)

ปิเปตน้ำหมักที่ได้จากการปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายกรดไนโตรซาลิไซลิกรีเอเจนต์ (Dinitrosalicylic acid reagent : DNSA Reagent) ลงไป 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นในน้ำแข็ง 5 นาที เติมน้ำกลั่น

10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร แล้วหาปริมาณน้ำตาลจากกราฟมาตรฐาน

หมายเหตุ วิธีเตรียมสารละลายกรดไนโตรซาลิไซลิกรีเอเจนต์

เตรียมโดยละลายกรดไนโตรซาลิไซลิก 1 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาณ 20 มิลลิลิตร เติมโซเดียมโปแตสเซียมตาร์เตรท 30 กรัม แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน บรรจุในขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4.9 การหาปริมาณไนโตรเจน (Weatherburn, 1967)

ปิเปตน้ำหมักที่ได้จากการปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว 1 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายเอ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารละลาย บี 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตร แล้วหาปริมาณไนโตรเจนจากกราฟมาตรฐานของสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต

หมายเหตุ วิธีเตรียมสารละลายเอ และบี

สารละลายเอ ประกอบด้วยฟีนอล 10 กรัมต่อลิตร และโซเดียมไนโตรพรัสไซด์ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร บรรจุในขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

สารละลายบี ประกอบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 กรัมต่อลิตร และโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 8.4 มิลลิลิตรต่อลิตร บรรจุในขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4.10 วิธีหาปริมาณ PHB (ส่งศรี กุลปรีชา, 2536)

4.10.1 วิธีการสกัดแยก PHB

ปั่นแยกเซลล์จากน้ำหมัก 5 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที เก็บส่วนของเซลล์ไว้ แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮโปรคลอไรด์ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่นลงไป 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที 15 นาที เก็บส่วนที่เป็นตะกอนมาล้างด้วยอะซีโตน 5 มิลลิลิตร ปั่นที่ความเร็วเท่าเดิม ล้างตะกอนอีกครั้งด้วยเอทธานอลบริสุทธิ์ 99.80% 5 มิลลิลิตร ปั่นที่ความเร็วเท่าเดิม เก็บส่วนของตะกอนไว้ เติมคลอโรฟอร์ม 5 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 30 วินาที ทิ้งไว้ให้เย็น นำไปปั่นเก็บส่วนใสไว้ นำส่วนที่เป็นตะกอนไปสกัด PHB อีกครั้ง รวมส่วนใสที่ได้ กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 โดยมีหลอดที่มีขีดบอกปริมาตร 10 มิลลิลิตรรองรับ เติมคลอโรฟอร์มจนครบปริมาตร 10 มิลลิลิตร PHB จะอยู่ในคลอโรฟอร์ม เก็บส่วนนี้ไว้วิเคราะห์ปริมาณ PHB ต่อไป

4.10.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ PHB ที่สกัดแยกได้

นำสารละลาย PHB ที่สกัดได้จากข้อ 4.10.1 มา 1 มิลลิลิตร อบให้แห้งที่ 80 องศาเซลเซียส เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 3 มิลลิลิตร ต้มในอ่างน้ำเดือด 10 นาที ทิ้งให้เย็น จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 235 นาโนเมตร แล้วหาปริมาณ PHB จากกราฟมาตรฐาน