บทที่ 3

วิธีการทดลอง

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

การทดลองนี้ใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิต PHB มากที่สุด คือ S13 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์จากทะเลสายพันธุ์ที่ได้รับคัดเลือกแล้ว (จากโครงการวิจัยเรื่องการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สะสมพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตจากทะเล มหาวิทยาลัยศิลปากร)

การผลิต PHB

1. การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้เพื่อการสะสม PHB

นำเชื้อจุลินทรีย์ S13 ที่เก็บรักษาไว้บนอาหาร MB agar slant มาเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลว MB medium ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อตั้งต้นลงในอาหารเหลว MB medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตรด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบที่ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อที่กระจาย (cell suspensions) ในสารละลายที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปรับค่าการดูดกลืนแสงให้อยู่ในช่วง 0.2–0.3 ถ่ายเชื้อตั้งต้นที่ผ่านการปรับค่าการดูดกลืนแสงแล้วลงในอาหารเหลว MB medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส กำหนดความเร็วรอบที่ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง นำน้ำหมักที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ (กรัมต่อลิตร), ปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร) และ % PHB content ต่อไป

2. การหาปริมาณเซลล์

ปั่นแยกเซลล์จากน้ำหมัก 5 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนของตะกอนเซลล์ไว้ ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่น โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิม จากนั้นเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ทำการกระจายเซลล์ให้เข้ากัน นำสารละลายเซลล์ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แล้วหาปริมาณเซลล์จากกราฟมาตรฐาน

3. การวิเคราะห์หาปริมาณ PHB

วิธีการสกัดแยก PHB

ปั่นแยกเซลล์จากน้ำหมัก 5 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนของตะกอนเซลล์ไว้ แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่นลงไป 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติมคลอโรฟอร์ม 5 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 30 วินาที ทิ้งไว้ให้เย็น ดูดสารละลายในชั้นของคลอโรฟอร์มใส่หลอดแก้วฝาเกลียวที่มีขีดบอกปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมคลอโรฟอร์มจนครบปริมาตร 10 มิลลิลิตร PHB จะอยู่ในคลอโรฟอร์ม เก็บส่วนนี้ไว้วิเคราะห์ปริมาณ PHB ต่อไป

การวิเคราะห์หาปริมาณ PHB

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

4. การวิเคราะห์หาปริมาณ PHB content

การหาปริมาณ PHB content ทำได้โดยการเทียบอัตราส่วนระหว่างปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร) ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ในหน่วยของเปอร์เซนต์

การศึกษาผลของปริมาณสารอาหารต่อการผลิต PHB

1. การศึกษาผลของปริมาณกลีเซอรอล

ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ตั้งต้นที่ผ่านการเจือจางแล้ว (ค่าการดูดกลืนแสง 0.2-0.3) ลงในอาหารเหลวสูตร MB medium ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยบรรจุในขวดทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ด้วยวิธีปลอดเชื้อแล้วนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง หลังจากการเพาะเลี้ยง นำเซลล์ไปวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์, ปริมาณ PHB ที่สะสมอยู่ภายในเซลล์ และ %PHB content ต่อไป (ปริมาณหัวเชื้อจุลินทรีย์ตั้งต้นที่ใช้สำหรับการทดลองแต่ละครั้ง คือ 10% โดยปริมาตร)

หมายเหตุ ในแต่ละชุดการทดลองจะเปลี่ยนความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่ใช้ให้อยู่ในช่วง 0.0 - 12.0% (v/v)

2. การศึกษาผลของปริมาณเกลือ

ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ตั้งต้นที่ผ่านการเจือจางแล้ว (ค่าการดูดกลืนแสง 0.2-0.3) ลงในอาหารเหลวสูตร MB medium ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยบรรจุในขวดทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ด้วยวิธีปลอดเชื้อแล้วนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง หลังจากการเพาะเลี้ยง นำเซลล์ไปวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์, ปริมาณ PHB ที่สะสมอยู่ภายในเซลล์ และ %PHB content ต่อไป (ปริมาณหัวเชื้อจุลินทรีย์ตั้งต้นที่ใช้สำหรับการทดลองแต่ละครั้ง คือ 10% โดยปริมาตร)

<u>หมายเหตุ</u> ในแต่ละชุดการทดลองจะใช้กลีเซอรอลในปริมาณที่เหมาะสม (จากการทดลองผลของปริมาณกลีเซอรอล) โดยเปลี่ยนความเข้มข้นของเกลือให้อยู่ในช่วง 0.0-5.0% (w/v)