บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 กล้องจุลทรรศน์

3.1.2 ขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

3.1.3 ขวดปรับปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร

3.1.4 ขวดปรับปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร

3.1.5 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 มิลลิลิตร

3.1.6 เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง

3.1.7 เครื่องปั่นเหวี่ยง

3.1.8 เครื่องเขย่าผสมสาร

3.1.9 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง

3.1.10 ตู้แช่เย็น

3.1.11 ดูดควัน

3.1.12 ตู้ถ่ายเชื้อ

3.1.13 ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า

3.1.14 ตู้อบแห้ง

3.1.15 ถังหมัก ขนาด 5 ลิตร พร้อมอุปกรณ์ประกอบ

3.1.16 ไมโครปิเปต ขนาด 1,000 ไมโครลิตร

3.1.17 ไมโครปิเปต ขนาด 5,000 ไมโครลิตร

3.1.18 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ

3.1.19 หลอดทดลอง

3.1.20 ห่วงถ่ายเชื้อ

3.1.21 แฮนด์รีแฟรกโตมิเตอร์

3.1.22 3,5-dinitrosalicylic acid ($C_7H_4N_2O_7$)

3.1.23 Agar

3.1.24 Ammonium sulphate ($(NH_4)_2SO_4$)

3.1.25 Ammonium molybdate tratahydrate ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}\cdot 4H_2O$)

3.1.26 Borax ($Na_2B_4O_7\cdot 10H_2O$)

3.1.27 Calcium chloride dihydrate ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)

3.1.28 Chloroform ($CHCl_3$)

3.1.29 Citric acid ($C_6H_8O_7$)

3.1.30 Copper sulphate (Cupric Sulfate) pentahydrate ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)

3.1.31 Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)

3.1.32 Ferrous sulfate heptahydrate ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)

3.2.33 Glucose ($C_6H_{12}O_6$)

3.1.34 Hydrochloric acid conc. (HCl)

3.1.35 Manganese sulphate monohydrate ($MnSO_4 \cdot H_2O$)

3.1.36 Magnesium Sulfate heptahydrate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)

3.1.37 Monopotassium phosphate (KH_2PO_4)

3.1.38 Nutrient broth

3.1.39 Paraffin solution

3.1.40 Phenol (C_6H_6O)

3.1.41 Poly-β-hydroxybutyrate $(C_4H_8O_3)_n$

3.1.42 Potassium sodium tartrate ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$)

3.1.43 Sodium chloride (NaCl)

3.1.44 Sodium hydroxide (NaOH)

3.1.45 Sodium hypochlorite (NaClO)

3.1.46 Sulfuric acid conc. (H_2SO_4)

3.1.47 Zinc sulfate heptahydrate ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาคือ *Alcaligenes eutrophus* TISTR 1095 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)โดยมาทำการขีด (streak) ลงบนอาหาร nutrient agar (NA)ในหลอดทดลองแบบอาหารเอียง (slant) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเททับด้วยสารละลายพาราฟีน ที่นึ่งฆ่าเชื้อและไล่ความชื้นแล้วลงไปให้สูงกว่าระดับของอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 1 เซนติเมตร นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็น stock culture โดยทำการ subculture ทุก ๆ 1 เดือน

3.2.2 การเตรียมอาหารสูตรผลิตPHB

อาหารสูตรผลิต PHB 1 ลิตรประกอบด้วย KH_2PO_4 13.3 กรัม $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.2 กรัม citric acid 1.7 กรัม และ trace element solution 10 มิลลิลิตร การเตรียม trace element solution 500 มิลลิลิตร ประกอบไปด้วย $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 5 กรัม $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.125 กรัม $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.5 กรัม $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.17 กรัม $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1 กรัม $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ 0.115 กรัม $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 0.05 กรัม, HCl 36% 5 ml (ดัดแปลงจาก Lee *et al*., 1994) โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต และ กลูโคสเป็นแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ

3.2.3 การเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อ

ถ่ายกล้าเชื้อ *A. eutrophus* TISTR 1095 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร NA อายุ 24 ชั่วโมงจำนวน 2 ลูป ลงในอาหาร Nutrient broth (NB) ปริมาตร 150 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 ชั่วโมง นำไปใช้เป็นกล้าเชื้อในการศึกษาต่อไป

3.2.4 การศึกษาผลของความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสต่อการผลิต PHB ในอาหารสังเคราะห์ ด้วยการหมักแบบกะในระดับฟลาสก์

ถ่ายกล้าเชื้อ *A. eutrophus* TISTR 1095 จากข้อ 3.2.3 ปริมาตร 15 มิลลิลิตรลงในอาหารสูตรผลิต PHB ที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 10 30 หรือ 50 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 150 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง ตลอดการหมัก นำมาวิเคราะห์ความขุ่นของเซลล์ น้ำตาลกลูโคส ความเป็นกรดด่าง ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด และความเข้มข้นของ PHB

3.2.5 การศึกษา แหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ และอัตราการเขย่า ที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB จากไฮโดรไลเซตของมันสำปะหลัง

ถ่ายกล้าเชื้อ *A. eutrophus* TISTR 1095 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในอาหารสูตรผลิต PHB ซึ่งใช้ไฮโดรไลเซตของมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) หรือสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) เป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ทำการหมักที่อุณหภูมิ 25 30 หรือ 35 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 100 150 หรือ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง ตลอดการหมัก นำมาวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อที่ 3.2.4

3.2.6 การศึกษาการผลิต PHB จากไฮโดรไลเซตของมันสำปะหลังด้วยการหมักแบบกะในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ถ่ายกล้าเชื้อ *A. eutrophus* จากข้อ 3.2.3 ปริมาตร 150 มิลลิลิตรลงในอาหารสูตรผลิต PHB ซึ่งใช้ไฮโดรไลเซตของมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนปริมาตร 3,000 มิลลิลิตร ที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม จากการทดลอง 3.2.5 ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิและอัตราการกวนที่

เหมาะสมจากการทดลอง 3.2.5 เก็บตัวอย่างเป็นช่วงๆ ตลอดการหมัก นำมาวิเคราะห์เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.2.4

3.2.7 การศึกษาการผลิต PHB จากไฮโดรไลเซตของมันสำปะหลังด้วยการหมักแบบกึ่งกะในระดับฟลาสก์

ถ่ายกล้าเชื้อ *A. eutrophus* จากข้อ 3.2.3 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในอาหารสูตรผลิต PHB เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.2.6 โดยแปรผันปริมาตรอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 25 50 หรือ 75 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรทำงาน (1/4 2/4 หรือ 3/4) ทำการหมักในสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลอง 3.2.5 เมื่อน้ำตาลทั้งหมดใกล้จะหมด ทำการเติมอาหารสูตรผลิต PHB (เช่นเดียวกับการเติมอาหารเริ่มต้น) ลงไปใน ฟลาสก์ ครั้งละ 25 เปอร์เซ็นต์ (1/4) จนครบปริมาตรทำงาน (working volume) ทำการหมักที่อุณหภูมิและอัตราการกวนที่เหมาะสมตลอดการทดลอง เก็บตัวอย่างเป็นช่วงๆตลอดการหมัก นำมาวิเคราะห์เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.2.4

3.2.8 การศึกษาการผลิต PHB จากไฮโดรไลเซตของมันสำปะหลังด้วยการหมักแบบกึ่งกะในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เพาะเลี้ยง *A. eutrophus* TISTR 1095 ในอาหารสูตรผลิต PHB ซึ่งใช้ไฮโดรไลเซตของมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนเช่นเดียวกับสภาวะที่เหมาะสมในการทดลอง 3.2.7 โดยปริมาตรทำงานเท่ากับ 3,000 มิลลิลิตร ทำการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร เก็บตัวอย่างเป็นช่วงๆ ตลอดการหมัก นำมาวิเคราะห์เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.2.4

3.3 การวิเคราะห์

3.3.1 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส (DNS method)

3.3.1.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่าง (ที่ผ่านการแยกเซลล์ออกแล้ว) หรือสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (แต่ละความเข้มข้น) ที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

3.3.1.2 เติมสารละลาย DNS ลงไป 0.5 มิลลิลิตร

3.3.1.3 นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที และแช่หลอดทดลองในน้ำเย็นจนกระทั่งตัวอย่างเย็น

3.3.1.4 เติมน้ำกลั่นลงไป 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตรโดยใช้น้ำกลั่นเป็นblank

3.3.1.5 นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลาย หรือคำนวณจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

3.3.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟีนอลซัลฟูริก (phenol-sulfuric acid method)

3.3.2.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (แต่ละความเข้มข้น) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองค่อย ๆ เติมสารละลายฟีนอลความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (%w/v) 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เท่ากัน

3.3.2.2 เติมกรดซัลฟูริกปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงไปอย่างช้า โดยค่อย ๆ ปล่อยกรดซัลฟูริกลงด้านข้างหลอด เขย่าให้เข้ากันระวังความร้อนที่เกิดขึ้น

3.3.2.3 ตั้งหลอดทดลองทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นเขย่าอีกครั้ง ตั้งทิ้งไว้อีก 20 นาที

3.3.2.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น Blank

3.3.2.5 นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดในสารละลาย หรือคำนวณจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

3.3.3 การวัดค่าความขุ่นของเซลล์ (optical density)

ปิเปตสารละลายเซลล์ลงในคิวเวท (cuvette) นำไปวัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ 650 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank

3.3.4 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของ PHB

3.3.4.1 ปิเปตสารละลายเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

3.3.4.2 เติมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ความเข้มข้น 6.25 เปอร์เซนต์โดยปริมาตรลงไป 1 มิลลิลิตร

3.3.4.1 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.3.4.2 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นค่อยๆ รินส่วนใสทิ้ง

3.3.4.3 ปิเปตน้ำกลั่นลงไปและนำไปปั่นเหวี่ยงเช่นเดียวกับการทดลองที่ 4.4.4 อีกครั้ง

3.3.4.4 ละลายตะกอนลงในน้ำกลั่นปริมาตร 3 มิลลิลิตรแล้วถ่ายลงในหลอดทดลอง

3.3.4.5 เติมสารละลายคลอโรฟอร์มร้อนปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที

3.3.4.6 ปิเปตสารละลายชั้นของคลอโรฟอร์ม (ชั้นล่างสุดในหลอดทดลอง) นำไปแช่ในอ่างน้ำร้อน

3.3.4.7 เมื่อสังเกตเห็นตะกอนเป็นสีขาวที่ก้นของหลอดทดลอง ให้เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 10 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลอง นำไปแช่ในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.3.4.8 ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 235 นาโนเมตร โดยใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้นเป็น blank

3.3.5 กราฟมาตรฐานของ PHB

3.3.5.1 ละลาย PHB 0.5 กรัมลงในกรดซัลฟูริกเข้มข้น ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย PHB ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.3.5.2 ดูดสารละลายจากข้อ 4.5.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในกรดซัลฟูริกเข้มข้น ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย PHB ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.3.5.3 นำสารละลายจากข้อ 4.5.2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 18 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.3.5.4 นำสารละลายจากข้อ 4.5.3 มาเจือจางกับกรดซัลฟูริกเข้มข้น ให้ได้ความเข้มข้น 1 2 4 6 8 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.3.5.5 นำสารละลาย PHB แต่ละความเข้มข้นมาแช่ในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.3.5.6 ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 235 นาโนเมตร

3.3.5.7 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของ PHB กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 235 นาโนเมตร

3.3.6 การคำนวณ

3.3.6.1 ผลได้ของPHB (yield of PHB; $Y_{P/S}$)

$$Y_{P/S} = \frac{[P]}{[S]}$$

[P] = ความเข้มข้นของ PHB ที่ถูกผลิตขึ้น (กรัมต่อลิตร)

[S] = ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดที่ถูกใช้ไป (กรัมต่อลิตร)

3.3.6.2 ผลได้ของPHB ต่อหน่วยของเซลล์ ($Y_{P/X}$)

$$Y_{P/X} = \frac{[P]}{[X]}$$

[P] = ความเข้มข้นของ PHB ที่ถูกผลิตขึ้น (กรัมต่อลิตร)

[x] = ความเข้มข้นของมวลเซลล์ที่เจริญเติบโตขึ้น (กรัมต่อลิตร)

3.3.6.3 เปอร์เซ็นต์การสะสม PHB ภายในเซลล์ (%PHB content)

$$\% \text{ PHB content} = \frac{[P]}{[X]} \times 100$$

[P] = ความเข้มข้นของ PHB ที่ถูกผลิตขึ้น (กรัมต่อลิตร)

[x] = ความเข้มข้นของมวลเซลล์ที่เจริญเติบโตขึ้น (กรัมต่อลิตร)

3.3.6.4 อัตราการผลิต PHB ทั้งหมด Total PHB productivity; Q_P

$$Q_P \text{ (g/h)} = \frac{[P_{max}]}{h} \times v$$

$[P_{max}]$ = ความเข้มข้นของ PHB ที่ถูกสร้างขึ้นสูงสุด (กรัมต่อลิตร)

h = เวลาที่จุลินทรีย์ใช้ในการผลิต PHB ได้สูงสุด (ชั่วโมง)

v = ปริมาตรทำงาน (ลิตร) (working volume)

3.4 สถานที่ทำการทดลอง

สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี