

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. ทรอสโทคิทริดที่ใช้ในการทดลอง

ทรอสโทคิทริดที่ใช้ในการทดลองได้จากการคัดแยกเชื้อจากใบไม้ป่าชายเลนบริเวณ
อ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี จำนวน 3 สายพันธุ์ได้แก่

1.1 *Schizochytrium mangrovei* BUCARA 021

1.2 *Schizochytrium limacinum* BUCACD 032

1.3 *Schizochytrium* sp.1 BUCAA 093

BU หมายถึง Burapha University

CA หมายถึง Chanthaburi

RA หมายถึง *Rhizophora apiculata* (ใบ โกงกางใบเล็ก)

CD หมายถึง *Ceriops decandra* (ใบ โปรงขาว)

AA หมายถึง *Avicennia alba* (ใบ แสมขาว)

021 หมายถึง ใบที่ 2 ช้ำที่ 1

032 หมายถึง ใบที่ 3 ช้ำที่ 3

093 หมายถึง ใบที่ 9 ช้ำที่ 3

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ (วิธีการเตรียม แสดงในภาคผนวก ก)

2.1 กลูโคส (glucose) HIMEDIA

2.2 ยีสต์สกัด (yeast extract) HIMEDIA

2.3 น้ำทะเลเทียม (q-sea)

3. สารเคมี

3.1 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) UNIVAR

3.2 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) UNIVAR

3.3 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) UNIVAR

3.4 เมทานอล (methanol) UNIVAR

3.5 เฮกเซน (hexane) FISHER SCIENTIFICRCK

3.6 กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) MARCK

3.7 โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) UNIVAR

3.8 BHT (butylated hydroxy-toluene) FLUKA

3.9 กรดไขมันมาตรฐาน 19 : 0 Nonadecanoic acid (internal standard) FLUKA

4. ยาปฏิชีวนะ (วิธีการเตรียม แสดงในภาคผนวก ก)

4.1 Penicillin G Sodium (m&h manufacturing co.,ltd.)

4.2 Streptomycin sulfate (m&h manufacturing co.,ltd.)

5. อุปกรณ์และเครื่องมือ

5.1 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (gas chromatography) HP-INNOWax

5.2 เครื่องเขย่า (incubator shaker) GALLENKAMP

5.3 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง METTELER TOLEDO AG-285

5.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) SANYO HARRIER 18/80 (refrigerated)

5.5 ตู้เป่าเชื้อ (laminar flow) UNIFLOW UVUB 1200 BIOHAZARA

5.6 เครื่องอบแห้งระบบทำความเย็น (freezer dryer) LABCONCO

5.7 หม้อนึ่งความดัน (autoclave) TOMY SS-325

5.8 เครื่องให้ความร้อน (hot plate) FRAMO-GERATETECHNIK M21/1

5.9 แท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer)

5.10 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (ph meter) METROHM 713

5.11 เครื่องวัดความเค็ม (refractometer) PORTABLE

5.12 ตู้บ่มเชื้อ (incubator) LEEC

วิธีการวิจัย

1. การเก็บรักษาหัวเชื้อ

1.1 ขีดเชื้อบนอาหาร GYP agar slant (ภาคผนวก ก) จากนั้นเทน้ำทะเลปราศจากเชื้อ (ความเค็ม 15 ส่วนในพันส่วน) ให้ท่วมผิวหน้าอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

1.2 เก็บเชื้อที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

1.3 ถ่ายเชื้อเป็นประจำทุก 2 เดือน

2. การเตรียมหัวเชื้อทรอสโทคิทริด

นำเชื้อทรอสโทคิทริดในแต่ละสายพันธุ์มาทำการเลี้ยงเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ โดยนำมาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่และมีสูตรอาหารคือ GY broth (ภาคผนวก ก) หลังจากนั้นนำไปวางบนเครื่องเขย่าที่

ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที โดยบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3. ศึกษาอุณหภูมิและความเค็มที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมันดีเอชเอของ *Thros* โทลิทรีด

ศึกษาผลของอุณหภูมิและความเค็มที่มีต่อการเจริญและการผลิตกรดไขมันดีเอชเอของ *Schizochytrium* spp. 3 สายพันธุ์ โดยอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองคือ 15, 25 และ 35 องศาเซลเซียสและในแต่ละอุณหภูมิจะทำการเลี้ยงเชื้อ *Thros* โทลิทรีดที่ความเค็ม 3 ระดับคือ 5, 15 และ 25 ส่วนในพันส่วน

3.1 การทดลองเลี้ยง *Thros* โทลิทรีด ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

นำเชื้อที่ได้จากข้อ 1 ทดลองเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ความเค็ม 3 ระดับคือ 5, 15 และ 25 ส่วนในพันส่วน ใช้สูตรอาหารคือ กลูโคสต่อยีสต์สกัด จากนั้นใส่หัวเชื้อลงไป (5 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตรอาหาร) ทดลองเลี้ยงในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที โดยบ่มที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 วัน ในแต่ละความเค็มทำการทดลอง 3 ซ้ำ และเก็บเซลล์ทุก 2 วัน เพื่อมาวิเคราะห์กรดไขมันต่อไป

3.2 การทดลองเลี้ยง *Thros* โทลิทรีด ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ทดลองเลี้ยงที่ความเค็ม 3 ระดับคือ 5, 15 และ 25 ส่วนในพันส่วน โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1 แต่เปลี่ยนอุณหภูมิเป็น 25 องศาเซลเซียส

3.3 การทดลองเลี้ยง *Thros* โทลิทรีด ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

ทดลองเลี้ยงที่ความเค็ม 3 ระดับคือ 5, 15 และ 25 ส่วนในพันส่วน โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1 แต่เปลี่ยนอุณหภูมิเป็น 35 องศาเซลเซียส

4. การเก็บเซลล์ (การปั่นแยก)

ตัวอย่างเซลล์ของ *Thros* โทลิทรีดที่เก็บในแต่ละครั้งนำมาปั่น โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เมื่อตกตะกอนเหวี่ยงอาหารเหลวที่อยู่ด้านบนออกจากนั้นใส่สารละลาย PBS (phosphate buffered saline) ลงในขวดพลาสติกที่มีตัวอย่างทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้ง เมื่อตกตะกอนเหวี่ยงสารละลายด้านบนออกเช่นกัน นำตัวอย่างที่ได้ไปเข้าเครื่องอบแห้งระบบทำความเย็น (freeze dryer) จากนั้นชั่งน้ำหนักแห้งของเซลล์

5. การวิเคราะห์น้ำหนักแห้ง

หลังจากทำให้เซลล์แห้ง นำตัวอย่างมาชั่งหาน้ำหนักเซลล์ ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง แล้วคำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง} = (\text{น้ำหนักถุง+เซลล์}) - (\text{น้ำหนักถุง})$$

6. การวิเคราะห์กรดไขมัน (ดัดแปลงจาก Shimizu et al., 1988)

6.1 ชั่งตัวอย่างเซลล์ของทรอสโททริตปริมาณ 0.1-0.2 กรัมน้ำหนักแห้ง ใส่ในขวดปากเกลียวที่มีฝาปิดขนาด 20 มิลลิลิตร

6.2 เติม 2 % ซัลฟูริก (H_2SO_4) ในเมทานอล (methanol) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Internal Standard (ภาคผนวก ก) 200 ไมโครลิตร ผ่านด้วยก๊าซไนโตรเจน แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

6.3 ทิ้งให้เย็นเติมเฮกเซน (ที่มี 10 ppm BHT) 1.5 มิลลิลิตรและน้ำกลั่น 1.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งให้แยกชั้น

6.4 ดูดของเหลวที่อยู่ชั้นบน ใส่ในหลอดทดลองกรองผ่านสาร โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) เพื่อดูดความชื้นออก

6.5 ของเหลวที่ได้ใส่ในขวดปากเกลียวที่มีฝาปิดและผ่านด้วยก๊าซไนโตรเจนจนแห้ง เก็บใส่ตู้เย็น เพื่อรอการวัดด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

6.6 นำตัวอย่างจากข้อ 5.5 เติมเฮกเซน 200 ไมโครลิตร แล้วฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

6.7 คำนวณหาปริมาณกรดไขมัน โดยเปรียบเทียบกับกรดไขมันมาตรฐาน (standard fatty acid) (วิธีคำนวณแสดงในภาคผนวก ข)

สถานะเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี ใช้ Flame Ionization Detector เป็นเครื่องตรวจวัดสัญญาณ และคอลัมน์ ใช้ Capillary Column HP-INNOWax polyethylene glycol (30 m x 250 μm x 0.25 μm) อุณหภูมิของคอลัมน์เริ่มต้นที่ 175 องศาเซลเซียส คงไว้เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ 210 องศาเซลเซียส คงไว้เป็นเวลา 1 นาที แล้วค่อย ๆ เพิ่มขึ้น 2 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ 230 องศาเซลเซียส คงไว้เป็นเวลา 1 นาที (ใช้ระยะเวลาทั้งหมด 16.50 นาที) โดยใช้ฮีเลียมเป็นแก๊สพา ส่วนอุณหภูมิของ Injector และ Detector คือ 250 องศาเซลเซียส

