ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. องค์ประกอบของสูตรอาหารที่ 1 (DSMZ catalogue, 1993)

Fructose	20.0	กรัมต่อลิตร
NH_4Cl	0.5	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	2.3	กรัมต่อลิตร
Na_2HPO_4	2.3	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	กรัมต่อลิตร
$NaHCO_3$	0.5	กรัมต่อลิตร
$CaCl_2$	0.01	กรัมต่อลิตร
Ferric citrate	0.5	กรัมต่อลิตร
Trace element	5.0	มิลลิลิตรต่อลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (ยกเว้นน้ำตาลฟรุคโตสที่แยกนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำมาเติมผสม)

ส่วนประกอบของ Trace element

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01	กรัมต่อลิตร
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.003	กรัมต่อลิตร
H_3BO_4	0.003	กรัมต่อลิตร
$CoCl_2 \cdot 7H_2O$	0.02	กรัมต่อลิตร
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0.001	กรัมต่อลิตร
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	0.002	กรัมต่อลิตร
$NaMO_4 \cdot 2H_2O$	0.003	กรัมต่อลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แช่เย็นจนกว่าจะใช้ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ

2. องค์ประกอบของสูตรอาหารที่ 2 (El-Sayed et al., 2009)

Sucrose	20.0	กรัมต่อลิตร
$(NH_4)_2SO_4$	2.0	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	1.5	กรัมต่อลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	9.0	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	กรัมต่อลิตร
$FeCl_2 \cdot H_2O$	60.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	10.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
Trace element	1.0	มิลลิลิตรต่อลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (ยกเว้นน้ำตาลซูโครสที่แยกนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำมาเติมผสม)

ส่วนประกอบของ Trace element

H_3BO_3	0.3	กรัมต่อลิตร
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.2	กรัมต่อลิตร
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	กรัมต่อลิตร
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	30	มิลลิกรัมต่อลิตร
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	30	มิลลิกรัมต่อลิตร
$NiSO_4 \cdot 7H_2O$	28	มิลลิกรัมต่อลิตร
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	10	มิลลิกรัมต่อลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แช่เย็นจนกว่าจะใช้ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ

3. องค์ประกอบของสูตรอาหารที่ 3 (Savenkova et al., 1999)

Sucrose	20.0	กรัมต่อลิตร
NH_4NO_3	3.0	กรัมต่อลิตร
K_2HPO_4	0.64	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	0.2	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.41	กรัมต่อลิตร
$CaCl_2$	0.1	กรัมต่อลิตร
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	10.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
Na-citrare	0.5	กรัมต่อลิตร
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	6.0	มิลลิกรัมต่อลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (ยกเว้นน้ำตาลซูโครสที่แยกนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำมาเติมผสม)

4. Nutrient Broth (NB)

Peptone	5	กรัมต่อลิตร
Beef extract	3	กรัมต่อลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารและการวิเคราะห์

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

การเตรียมสารและการวิเคราะห์

การเตรียมสารละลาย

1. การเตรียมสารละลายโซเดียมโดดิซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate, SDS)

ชั่ง SDS 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น คนให้เข้ากันจนสารละลายใส ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้ SDS ความเข้มข้นร้อยละ 1 เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะใช้งาน

2. การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดย DNS (Miller, 1995)

การเตรียมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิซาลิก (Dinitrosaliccylid acid : DNS)

ชั่ง DNS (3,5 dinitrosalicylid acid) 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 16 กรัม ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) ทีละน้อย คนให้เข้ากันจนสารละลายใสโดยให้ความร้อน จากนั้นเติมโพแทสเซียมทาร์เทรต (NA-K tartrate) 300 กรัม ตามลำดับ รอให้เย็นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บใส่ขวดสีชาที่อุณหภูมิทิ้งไว้ข้ามคืนก่อนใช้งาน

การวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์มวลเซลล์แห้ง (Dry cell weight, DCW)

1.1 นำตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดปั่นเหวี่ยงที่ผ่านการอบแห้งและชั่งน้ำหนักแล้ว

1.2 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง (resuspension)

1.3 นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก

1.4 นำค่าน้ำหนักที่ได้ มาคำนวณมวลเซลล์แห้งตามสูตรดังต่อไปนี้

มวลเซลล์แห้ง (มก./มล.) = (เซลล์ + น้ำหนักหลอด) - น้ำหนักหลอด

2. การวิเคราะห์ปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตด้วยวิธี Gravimetric method

2.1 นำตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ผ่านการอบแห้งและชั่งน้ำหนักแล้ว

2.2 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ แล้วนำตะกอนที่ได้มาล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง

2.3 เติมสารละลายโซเดียมโดดิซิลซัลเฟต (SDS) ความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.4 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

2.5 ส่วนที่เป็นตะกอนมาล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ (ทางการค้ามีส่วนผสมของคลอรีนร้อยละ 6) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

2.6 ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ตะกอนที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24ชั่วโมง จากนั้นทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นและนำมาชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักที่แท้จริงของพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยคำนวณตามสูตรดังต่อไปนี้

ปริมาณ PHB (มก./มล.) = (PHB + น้ำหนักหลอด) - น้ำหนักหลอด

$$\text{ร้อยละการสะสม PHB (\% PHB)} = \frac{\text{ปริมาณ PHB}}{\text{ค่ามวลเซลล์แห้ง}} \times 100$$

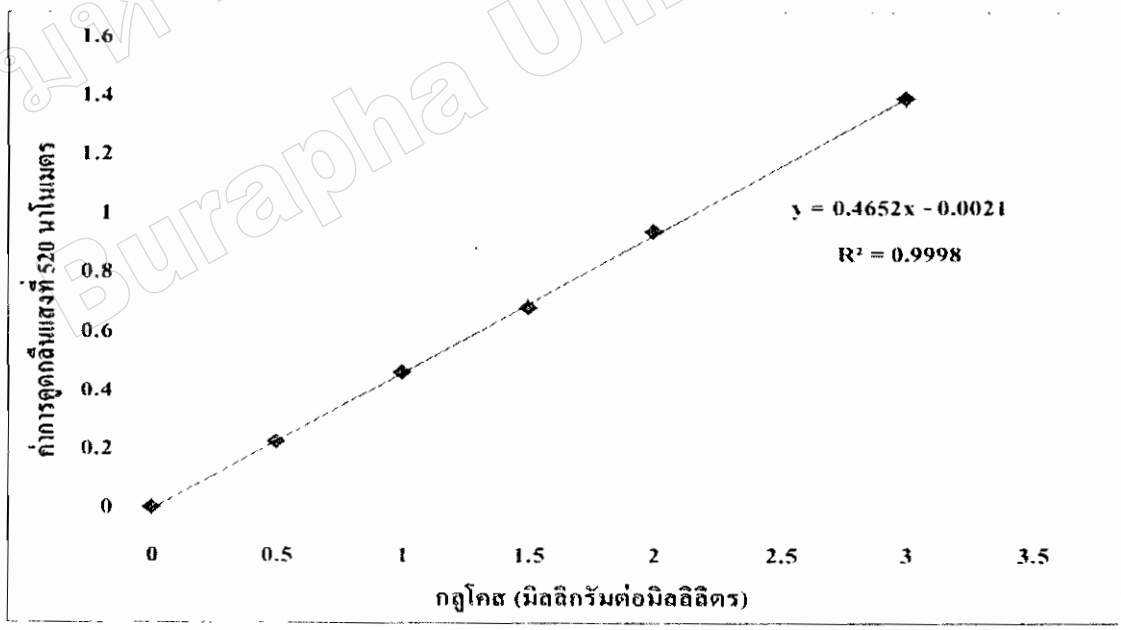
3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีการ DNS assay (Miller, 1959)

3.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส

เตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งกลูโคส 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เจือจางสารละลายกลูโคสให้ได้ความเข้มข้นดังตารางต่อไปนี้

หลอดที่	สารละลายกลูโคสมาตรฐาน	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)	สารละลายกลูโคส (ไมโครลิตร)
1	0.0	500	0
2	0.5	475	25
3	1.0	450	50
4	1.5	425	75
5	2.0	400	100
6	3.0	350	150

จากนั้นนำสารละลายทั้ง 6 หลอด ตามปริมาตรข้างต้น เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่ในน้ำเย็นเป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร และนำไปสร้างกราฟมาตรฐาน



ภาพภาคผนวก ข-1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.2 การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของตัวอย่างด้วยวิธี DNS

นำส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง มาทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นเติมสารละลายดีเอ็นเอส (3,5 dinitrosalicylid acid) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแช่น้ำเย็น เป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยคำนวณเทียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงกับสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ซึ่งคำนวณจากสูตรต่อไปนี้

$$\text{ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง} \times \text{อัตรการการเจือจาง}}{\text{ค่าความชันของกราฟมาตรฐานกลูโคส}}$$

4. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

1. ปั่นเหวี่ยงตัวอย่างน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงปริมาตร ที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

2. เติมกรดซัลฟูริค (Sulfuric) ลงในส่วนใสจากการปั่นเหวี่ยงให้มีความเข้มข้นเหลือสุดท้ายเท่ากับร้อยละ 0.5

3. นำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

4. ปรับให้มีค่าความเป็นกรดด่าง เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

5. ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนซ้ำอีกครั้งเพื่อนำตะกอนต่าง ๆ ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาในการย่อยสลายออก

6. วัดปริมาณน้ำตาลที่ได้ด้วยวิธี DNS (ข้อ 3)

5. การวิเคราะห์ปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยใช้เครื่อง gas chromatography-mass spectrophotometry

การเตรียมสารมาตรฐาน Poly[(R)-3-hydroxybutyric acid], natural origin จาก Aldrich Product number 363502 ดังนี้

1. ชั่งสารมาตรฐาน PHB 10 มิลลิกรัม ละลายในคลอโรฟอร์ม 1 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนสารละลายหมด

2. ทิ้งให้สารละลายเย็นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยคลอโรฟอร์ม จะได้สารละลายมาตรฐาน PHB เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อ 0.1 มิลลิลิตร

3. ดูดสารมาตรฐาน PHB ปริมาตร 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9 และ 1.00 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีฝาปิด ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 มิลลิลิตรด้วยคลอโรฟอร์ม

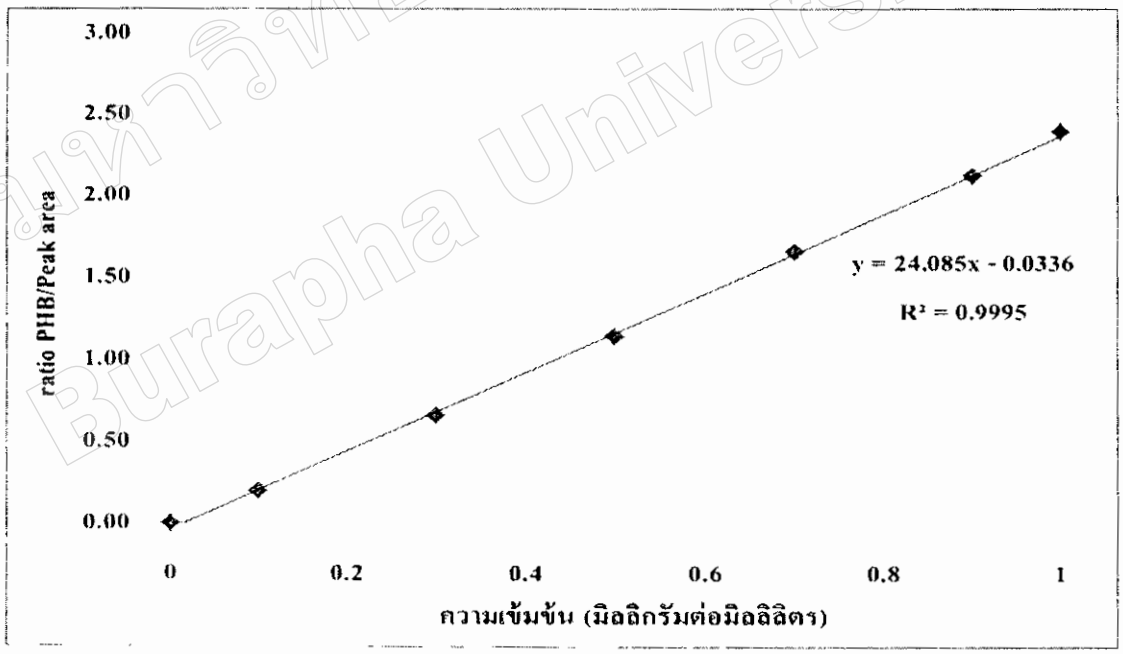
4. เติมสาร esterification fluid 1 มิลลิลิตร (กรดเบนโซอิก 0.025 กรัม เมทานอล ปริมาตร 242 มิลลิลิตร และกรดซัลฟุริก เข้มข้นร้อยละ 95-98 ปริมาตร 8 มิลลิลิตร)

5. นำไปบ่มในตู้บ่มควบคุมที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3.5 ชั่วโมง

6. ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

7. เก็บตัวอย่างที่เกิดจากการแยกชั้น โดยนำส่วนของคลอโรฟอร์มที่มี β-hydroxymethyl ester ละลายอยู่

8. วิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรมิตรี (gas chromatography-mass spectrophotometry, GC-MS)



ภาพภาคผนวก ข-2 กราฟมาตรฐานจากสารมาตรฐาน PHB จาก Aldrich

วิธีการคำนวณ

ความเข้มข้น PHB (มก./มล.) = $\frac{\text{สัดส่วนพื้นที่ของสารมาตรฐาน (peak area of standard)}}{\text{สัดส่วนพื้นที่ของสาร internal standard (peak area of internal standard)}}$

การคำนวณ

1. การคำนวณอัตราการเติมอาหารในการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ

สูตร

$$F_0 = \frac{\mu V_0 X_0}{S_{F0} Y_{x/s}}$$

โดย

อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) = 0.12 ต่อชั่วโมง

ปริมาตรสารอาหารเริ่มต้น (V) = 1 ลิตร

ปริมาณมวลเซลล์ (X_0) = 4.9 กรัมต่อลิตร

ปริมาณการใช้น้ำตาล (S_{F0}) = 150 กรัมต่อลิตร

สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร ($Y_{x/s}$) = 0.43 กรัมต่อกรัม

ดังนั้น $F_0 = \frac{0.12 \times 1 \times 4.9}{150 \times 0.43}$

= 0.0091 ลิตรต่อชั่วโมง

นำค่าที่ได้มาคำนวณอัตราการเติมอาหารตามสูตรดังนี้

$F = F_0 e^{\mu t}$

$= 0.0091 \times 2.72^{0.12(18)}$

= 0.0790 ลิตรต่อชั่วโมง

= 79 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University