บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการศึกษา

วัสดุและอุปกรณ์

1. วัสดุ

1.1 สาหร่าย *Chlorosarcinopsis* sp. (PSU/CHL20)

เป็นเชื้อที่แยกจากดิน บริเวณเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าโตนงาช้าง ซึ่งเก็บรวบรวมหัวเชื้อ (stock culture) ที่ห้องปฏิบัติการสาหร่าย ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

1.2 อาหารเลี้ยงสาหร่าย

อาหารเหลวสังเคราะห์สูตร NSIII (ภาคผนวก ก)

1.3 สารเคมีที่ใช้ในการสกัด และวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุ

acetone 90%, $MgCO_3$, acetonitrile, methanol, dichloromethane

1.4 แผ่นกรอง cellulose acetate เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร ขนาดรูเปิด (pore size) 0.45 ไมโครเมตร

1.5 แผ่นกรองสำหรับกรองเซลล์ GF/C

2. อุปกรณ์

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย

- ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร
- หลอดฟลูออเรสเซนต์แบบ Day Light ขนาด 40 วัตต์ จำนวน 16 หลอด
- ท่อแก้วกรองอากาศ
- จุกยางพร้อมท่อแก้ว
- เครื่องควบคุมเวลา Model TM-24H ของบริษัท Kawamura Electric Ind. Co., Ltd.
- เครื่องปั๊มอากาศ Model LP-60 ของบริษัท Guangdong Risheng Group Co., Ltd.

- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Air Flow) Model HT-124 ของบริษัท International Scientific Supply Co., Ltd.
- เครื่องปั่นเหวี่ยง Model H–103.N series ของบริษัท Kokusan Enshinki Ltd.

2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ศึกษาการเติบโตของสาหร่าย

- เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ควบคุมอุณหภูมิ Multi-Tier Environmental Innova 4900 ของบริษัท New Brunswick Scientific Edison, N.J., U.S.A.
- เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ Jascol Model 7800
- เครื่องวัดค่ากรด-เบส Orion Model SA520
- กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (Compound Microscope) Olympus Model CH30
- ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer)

2.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัด และวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุ

- หลอดปั่นขนาด 15 มิลลิลิตรพร้อมฝาเกลียว
- คิวเวต (Cuvettes)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)Model H–103.N series ของบริษัท Kokusan Enshinki Ltd.
- เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ Jasco Model 7800
- เครื่องบด (Tissue Grinder)
- ชุดกรองมิลลิพอร์
- เครื่องกรองสูญญากาศ (Suction Pump)
- เครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography)
- Column รุ่น Alltima C18 5 µm. (Lot NO.2713 Part NO.88056), Length 250 mm (Serial NO.01011159):ID 4.6 mm
- เครื่อง Detector รุ่น Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector
- Pump รุ่น Solvent Delivery System Varian 9012

วิธีการศึกษา

1. การเตรียมเชื้อสาหร่ายเบื้องต้น

นำ stock ของสาหร่ายสีเขียว Chlorosarcinopsis sp. (PSU/CHL20) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร NSIII ปริมาตร 200 มิลลิลิตร นำฟลาสก์ไปเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ให้ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงสว่างต่อมืด เท่ากับ 16:8 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน ถ่ายเชื้อสาหร่ายจากแต่ละฟลาสก์ลงในขวดแก้วก้นแบน (conical flask) เจือจางด้วยอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร NSIII เลี้ยงในสภาวะเดิม เป็นเวลา 7-10 วัน เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น

2. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโต ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ปริมาณแคโรทีนอยด์ และปริมาณเบต้าแคโรทีน

เลี้ยง *Chlorosarcinopsis* sp. (PSU/CHL20) ในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร NSIII ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ความหนาแน่นเริ่มต้นของสาหร่าย $2x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ช่วงสว่างต่อมืด เท่ากับ 16:8 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยทำการทดลองผลของความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มแสงและปริมาณโปแตสเซียมไนเตรท ในชุดการทดลอง 9 ชุด แต่ละชุดทำการทดลอง 3 ซ้ำ ดังต่อไปนี้

ปริมาณโปแตสเซียมไนเตรท(กรัม/ลิตร) / ความเข้มแสง (ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที)	0	0.1	0.2
60	60 , 0	60 ,0.1	60 ,0.2 (ชุดควบคุม)
120	120 ,0	120 ,0.1	120 ,0.2
180	180 ,0	180 ,0.1	180 ,0.2

ใช้เวลาในการทดลองชุดละ 24 วัน บันทึกผลทุก 2 วัน โดยวัดการเติบโตด้วยวิธีนับจำนวนเซลล์โดยใช้ haemacytometer และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (Borowitzka, 1991) วิเคราะห์หาปริมาณ

คลอโรฟิลล์ เอ, แคโรทีนอยด์ และฉีดเบต้าแคโรทีน เข้าเครื่อง HPLC (Borowitzka, 1991) รวมทั้งวัดค่าความเป็นกรด-เบส

อัตราการเติบโตจำเพาะ (specific growth rate : μ) จากการเติบโตของสาหร่ายในช่วง exponential growth phase คำนวณได้จากสมการ (Vonshak, 1986)

$$\mu = (\ln X_2 - \ln X_1) / (t_2 - t_1)$$

โดย X_1 = ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นในการทดลอง (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

X_2 = ความหนาแน่นของเซลล์ที่ระยะเวลา t (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

t_1 = ระยะเวลาศึกษาเริ่มต้น (วัน)

t_2 = ระยะเวลาศึกษาที่เวลา t (วัน)

ระยะเวลาการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นสองเท่า (doubling time) , t_d คำนวณได้จากสมการ (Vonshak,1986) $t_d = \ln 2 / \mu = 0.693 / \mu$

3. วิธีวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และแคโรทีนอยด์ (Borowitzka,1991)

1. นำสาหร่าย 10-20 มิลลิลิตร มากรองผ่านแผ่นกรอง Cellulose acetate ขนาด 4.5 เซนติเมตร โดยใช้ชุดกรองมิลลิพอร์ เติมสารละลายแมกนีเซียมคาร์บอเนต ($MgCO_3$) ลงไปเล็กน้อยก่อนกรองเพื่อเคลือบกระดาษกรอง และป้องกันการสลายตัวของคลอโรฟิลล์

2. ม้วนแผ่นกรองให้สาหร่ายอยู่ด้านใน ใส่ในหลอดแก้วฝาเกลียวที่หุ้มด้วยกระดาษฟอยล์เติมสารละลายอะซีโตน 90%ลงไป 10 มิลลิลิตร นำไปเก็บในตู้เย็นเป็นเวลา 24 ชั่วโมงตั้งทิ้งไว้ในที่มืด แล้วนำหลอดแก้วออกจากตู้เย็นจนมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง

3. เทสารละลายลงในหลอดปั่น นำมาเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นำสารละลายใสที่ได้ไปวัดด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750, 664, 647 และ 452 นาโนเมตร โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 เป็นค่าความขุ่น นำค่านี้ไปลบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 664, 647 และ 452 นาโนเมตร

4. คำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และแคโรทีนอยด์ จากสูตรต่อไปนี้

คลอโรฟิลล์ เอ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) $= (11.93 \times E_{664}) - (1.93 \times E_{647})$

แคโรทีนอยด์ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) $= E_{452} \times 3.86 \times \frac{\text{ปริมาตรอะซิโตนที่สกัดได้}}{\text{ปริมาตรอะซิโตนที่นำมาสกัด}}$

E = ค่าการดูดกลืนแสง

4. วิธีวิเคราะห์หาปริมาณเบต้าแคโรทีน (Borowitzka,1991)

- นำสาหร่าย 10-20 มิลลิลิตร มากรองผ่านแผ่นกรอง Cellulose acetate ขนาด 4.5 เซนติเมตร โดยใช้ชุดกรองมิลลิพอร์ สกัดด้วยสารละลายอะซีโตน 90% แล้วนำตัวอย่างสาหร่ายไปวิเคราะห์ด้วย reverse phase HPLC ซึ่งใช้คอลัมน์ชนิด Alltima C18 ขนาด 5 ไมโครเมตรใช้ Pump รุ่น Solvent Delivery System Varian 9012 และ Detector รุ่น Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector ที่ความยาวคลื่น 452 นาโนเมตร มีอัตราส่วนของ mobile phase ดังนี้ acetonitrile : methanol : dichloromethane เท่ากับ 60 : 20 : 20 มีอัตราการไหล (flow rate) เท่ากับ 1.3 มิลลิลิตรต่อนาที

- วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 452 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีน

คำนวณอัตราการผลิตเบต้าแคโรทีน (Productivity) (เพ็ญแข วันไชยธนวงศ์, 2541) จากสูตร

$$\text{Productivity} = \frac{dP}{dt}$$

โดย dP = เบต้าแคโรทีนที่สาหร่ายผลิตได้ต่อหน่วยเวลา (กรัมต่อลิตร)

dt = ช่วงเวลา (วัน)

การทดลองต่อไปจะนำผลที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 ไปทำการศึกษาต่อโดยทำการทดลองที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างอาหารสังเคราะห์และความเข้มแสงด้วยวิธีTwo-Way ANOVA โดยใช้โปรแกรม SPSS Version 10.0 for Windows

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ คลอโรฟิลล์ เอ แคโรทีนอยด์ และเบต้าแคโรทีนด้วยวิธี DMRT (Duncan's new multiple range test) โดยใช้โปรแกรม SPSS Version 10.0 for Windows