บทที่ 2

วิธีการทดลอง

1. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1.1 อุปกรณ์

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิได้ (Psycrotherm incubator shaker) รุ่น G-27 บริษัท New Brunswick Scientific Co. Inc., N.J., U.S.A.

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิได้ (Incubator shaker) รุ่น G-25 บริษัท New Brunswick Scientific Co. Inc., N.J., U.S.A.

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิได้ Aquatherm water bath shaker รุ่น G-86 บริษัท New Brunswick Scientific Co. Inc., U.S.A.

หลอดแสงอุลตราไวโอเลต (Ultraviolet lamp) ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร TL20W/08 F20 T12 BLB บริษัท Philips, Holland.

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Minor 35-MSE บริษัท MSE England.

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 บริษัท Bausch & Lomb., U.S.A.

เครื่องอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Autoclave) รุ่น HA-26 บริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Tokyo, Japan.

เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) Laboratory Hot Plate PC-101 Corning Glass Works, Corning, N.Y. 14830, U.S.A.

เครื่องเขย่า (Vortex) Vortex-Genie No. 16824 บริษัท Scientific Industries, Inc., Bohemia, N.Y. 11716, U.S.A.

กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) รุ่น CHA บริษัท Olympia Optical Co.Ltd., Japan.

เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) PHM 82 Standard pH meter บริษัท Radiometer Copenhagen, Denmark.

เครื่องระเหยภายใต้สูญญากาศแบบหมุน (Rotary vacuum evaporator) รุ่น N บริษัท Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Japan.

เครื่องไฮเพอร์ฟอแมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (High Performance Liquid Chromotography, HPLC) รุ่น LC-3A บริษัท Shimadzu Co.Ltd., Japan.

1.2 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
1.คอร์นสตีปลิเคอร์ (corn steep liquor)	Sigma Chemical Co., U.S.A.
2.เพนิซิลลิน จี (penicillin G Sodium)	Merck Sharp & Dohme (Thailand) Ltd.
3.กรดฟีนิลอะซิติก (phenylacetic acid)	E.Merck Damstadt , Germany.
4.เมทธานอล (Methanol)	E.Merck Damstadt , Germany.
5.ไนโตรกวานิดีน (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine,NTG)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
6.กรดมาลิอิก (maleic acid)	E.Merck Damstadt , Germany.
7.เอทธานอล (ethanol)	E.Merck Damstadt , Germany.

สารเคมีอื่นๆ ที่ใช้นอกจากที่กล่าวนี้ สั่งซื้อจากบริษัท B.D.H. ประเทศอังกฤษ บริษัท Fluka ประเทศสวิสเซอร์แลนด์ ส่วนกลูโคส และน้ำมันถั่วเหลืองที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อใช้เกรดทางการค้า (commercial grade)

2. เชื้อจุลินทรีย์ การเก็บ และการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง (42)

2.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 เป็นเชื้อราสายพันธุ์ดั้งต้น

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ (test microorganism) คือ เชื้อแบคทีเรีย Staphylococcus aureus สายพันธุ์ ATCC 6538 P. ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท Merck Sharp & Dohme (ประเทศไทย) จำกัด

2.2 การเก็บจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

2.2.1 การเก็บรักษาเชื้อรา Penicillium chrysogenum

เขี่ยสปอร์ (spore) ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum โดยใช้เข็มเขี่ยลาก (streak) ลงบนอาหารแข็งเอียง (slant agar) โพเตโตเด็กซ์โตรส (potato dextroseagar, PDA ภาคผนวกที่ 1.1) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25°ซ. เป็นเวลา 7-10วัน เมื่อเชื้อสร้างสปอร์เต็มที่แล้วจึงนำไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง (deep freezer) อุณหภูมิ -70°ซ.

2.2.2 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย Staphylococcus aureus สายพันธุ์ ATCC 6538 P.

เขี่ยเชื้อแบคทีเรีย Staphylococcus aureus สายพันธุ์ ATCC 6538 P. โดยใช้ลูป (loop) เขี่ยเชื้อลาก (streak) ลงบนอาหารแข็งเอียง (slant agar) (ภาคผนวกที่ 1.2) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 18-24 ชม. เมื่อเชื้อเจริญดีแล้วจึงนำไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง (deep freezer) อุณหภูมิ -70°ซ.

2.3 การเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

2.3.1 การเตรียมสปอร์

เขี่ยสปอร์ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum จากเชื้อที่เก็บรักษาไว้ตามข้อ 2.2.1 ลงในสารละลาย 0.1% โพลีเปปโตน เพื่อทำให้เป็นสปอร์แขวนลอย (spore suspension) ปริมาตร 2 มล. เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปกระจายลงบนผิวหน้าของอาหารแข็งโพเตโตเด็กซ์โตรสในขวดแก้วขนาด 10x15x4 ซม.^{3} บ่มที่อุณหภูมิ 25°ซ. นาน 7-10 วัน หลังจากนั้นถ่ายสปอร์ออกจากขวดโดยการล้างด้วยสารละลาย 0.1% โพลีเปปโตน ปริมาตร 20 มล. แล้วกรองผ่านผ้าขาวบาง นับจำนวนสปอร์โดยใช้ Haemacytometer

2.3.2 การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ (test organism)

เขี่ยเชื้อแบคทีเรีย Staphylococcus aureus สายพันธุ์ ATCC 6538 P. จากเชื้อที่เก็บรักษาไว้ตามข้อ 2.2.2 ลงในอาหารเหลว (ภาคผนวกที่ 1.2) ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37°ซ. ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18-24 ชม.

2.3.3 การเลี้ยงเชื้อรา Penicillium chrysogenum เพื่อให้ผลิตเพนิซิลลิน จี ในขวดรูปชมพู่

ถ่าย 1 มล. ของสารละลายแขวนลอยของสปอร์ที่มีความหนาแน่น 5x10^6 สปอร์ต่อมล. ที่เตรียมได้ตามวิธีข้อ 2.3.1 ลงใน 50 มล. ของอาหารสำหรับผลิตเพนิซิลลิน จี (ภาคผนวกที่ 1.3) ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. นำไปเขย่าบนเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบ psycrotherm incubator shaker ที่อุณหภูมิ 25°ซ. ด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เมื่อเชื้อมีอายุ 48 ชม. เติมสารละลายกรดฟีนิลอะซิติกที่ละลายในน้ำเข้มข้น 1.25% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 2 มล. เพาะเลี้ยงต่อจนครบ 120 ชม.

3. การกลายพันธุ์เชื้อรา Penicillium chrysogenum ด้วยสารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

3.1 การกลายพันธุ์เชื้อรา Penicillium chrysogenum ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต (UV) (32,35)

3.1.1 นำสารละลายแขวนลอยของสปอร์ใน 0.1% Tween 80 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว มีความหนาแน่น 1×10^7 สปอร์ต่อมล. ในจานเลี้ยงเชื้อ มาผ่านการฉายแสงอุลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร กำลังงาน 20 วัตต์ ระยะห่างจากแสง 30 ซม. โดยมีการกวนตลอดเวลา เป็นเวลา 0,30,60,90,105,120,135, 150,165 และ 180 วินาที

3.1.2 กระจาย 0.1 มล. ของสปอร์ที่ผ่านการฉายแสงแล้วลงบนอาหารแข็งโพเตโตเด็กซ์โตรส (ภาคผนวกที่ 1.1) บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 25°ซ.

3.1.3 นับจำนวนโคโลนีที่เจริญ (สปอร์ที่รอด) และคำนวณเปอร์เซนต์การรอด

3.1.4 ตรวจหาโคโลนีที่เกิดการกลายพันธุ์เบื้องต้น โดยดูลักษณะรูปร่าง ขนาด และสีของโคโลนีที่เปลี่ยนแปลงไปจากสายพันธุ์เดิม

3.1.5 ทำการคัดเลือกตามวิธีในข้อ 4

3.2 การกลายพันธุ์เชื้อรา Penicillium chrysogenum ด้วยสารเคมี NTG (43)

3.2.1 บ่มสารละลายแขวนลอยของสปอร์ (จากสายพันธุ์ที่ได้รับการคัดเลือกแล้วจากข้อ 3.1) ใน 0.1% โพลีเปปโตน ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ที่อุณหภูมิ 25°ซ. เป็นเวลา 6 ชม. โดยมีการกวนตลอดเวลา นำมาปั่นและทำให้แขวนลอยอีกครั้งใน 0.5 M. Tris-maleic acid พีเอช 8.0 ให้มีความหนาแน่น 1×10^8 สปอร์ต่อมล.

3.2.2 เติมสารละลาย NTG ลงใน 0.1 มล. สารละลายแขวนลอยของสปอร์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของ NTG เท่ากับ $1x10^{-8}$, $5x10^{-8}$, $1x10^{-7}$, $5x10^{-7}$, $1x10^{-6}$, $5x10^{-6}$, $1x10^{-5}$, $5x10^{-5}$, $1x10^{-4}$, $5x10^{-4}$, $1x10^{-3}$, $5x10^{-3}$ และ $1x10^{-2}$ โมลาร์ โดยปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 มล. ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 25°ซ. เป็นเวลา 30 นาที

3.2.3 นำสปอร์ที่ได้มาปั่นและล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง

3.2.4 กระจาย 0.1 มล. ของสปอร์ที่ได้ลงบนอาหารแข็งโพเตโตเด็กซ์โตรส (ภาคผนวกที่ 1.1) บ่มที่อุณหภูมิ 25°ซ.

3.2.5 นับจำนวนโคโลนีที่เจริญ (สปอร์ที่รอด) และคำนวณเปอร์เซนต์การรอด

3.2.6 ตรวจหาโคโลนีที่เกิดการกลายพันธุ์เบื้องต้น โดยดูลักษณะรูปร่าง ขนาด และสีของโคโลนีที่เปลี่ยนแปลงไปจากสายพันธุ์เดิม

3.2.7 ทำการคัดเลือกตามวิธีในข้อ 4

4 <u>การคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตเพนิซิลลิน จี สูงขึ้น</u>

4.1 <u>การคัดเลือกแบบปฐมภูมิ</u> (primary screening)

4.1.1 เพาะเชื้อราลงบนอาหารแข็งสูตรสำหรับการผลิตเพนิซิลลิน จี (ภาคผนวกที่ 1.3) บ่มที่อุณหภูมิ 25°ซ. เป็นเวลา 120 ชม.

4.1.2 ใช้ steel cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 5 มม กดลงกลางโคโลนีของเชื้อราที่เลี้ยง นำแผ่นวุ้นที่กดได้ไปวางลงบนจานเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย <u>Staphylococcus aureus</u> สายพันธุ์ ATCC 6538 P. (ภาคผนวกที่ 3) บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 24 ชม. วัดความกว้างของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้น

4.1.3 คัดเลือกเชื้อราที่ให้บริเวณยับยั้งกว้างกว่าสายพันธุ์เดิมมาทำการคัดเลือกต่อตามวิธีในข้อ 4.2

4.2 การคัดเลือกแบบทุติยภูมิ (secondary screening)

เลี้ยงเชื้อราที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.1 ตามวิธีข้อ 2.3.3 แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณเพนิซิลลิน จี ตามวิธีการวิเคราะห์ในข้อ 4.2.1

4.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณเพนิซิลลิน จี โดยวิธีทางชีววิทยา (42)

ใช้ไมโครปิเปตหยอดสารตัวอย่างที่เจือจางในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 8 มม. บนจานเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Staphylococcus aureus สายพันธุ์ ATCC 6538 P. (ภาคผนวกที่ 3) จานละ 4 หลุม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชม. เพื่อให้สารตัวอย่างแพร่กระจาย (diffuse) ไปในอาหารก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 18-24 ชม. วัดความกว้างของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้น นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณเพนิซิลลิน จี โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้เพนิซิลลิน จี โซเดียม เจือจางลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ให้มีความเข้มข้น 1-7 หน่วยต่อมล. แล้วนำไปหาปริมาณเพนิซิลลิน จี โดยวิธีทางชีววิทยาดังที่กล่าวมาแล้ว เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าลอกการิธึม (logarithm) ของความเข้มข้นของเพนิซิลลิน จี กับ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น (ภาคผนวกที่ 6)

4.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณเพนิซิลลิน จี โดยวิธีไฮเพอร์ฟอแมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) (41)

ฉีดตัวอย่างปริมาตร 5 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง HPLC (Shimadzu HPLC, LC-3A) โดยมีสภาวะดังนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คอลัมน์ : Zorbax C-8 ขนาด (I.D.) 4.6 มม. ยาว 25 ซม.

สารละลายตัวพา : 50 mM KH_2PO_4 พีเอช 5.0 : Methanol (75:25) v/v

อัตราการไหล : 1 มิลลิลิตรต่อนาที

ความดัน : 120-180 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

อุณหภูมิ : 25°ซ.

เครื่องตรวจวัด : ความยาวช่วงคลื่นอุลตราไวโอเลต 240 นาโนเมตร

โดยใช้สภาวะดังกล่าว เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของเพนิซิลลิน จี โซเดียม ประมาณ 6-7 นาที ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้เพนิซิลลิน จี โซเดียม เข้มข้น 0.5-3.0 ไมโครกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC ตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของเพนิซิลลิน จี กับความเข้มข้นของเพนิซิลลิน จี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย