บทที่ 2

อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น G-10 แบบ rotary ของบริษัท New Brunswick Scientific Co., USA.

เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (UV-VIS spectrophotometer) รุ่น spectronic 21 ของบริษัท Bosch & Lomb, USA.

เครื่องระเหยสารภายใต้สภาวะสูญญากาศ (rotary vacuum evaporator และอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ของบริษัท Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Japan

เครื่องผสมสาร (vortex mixer) รุ่น G 560 E ของบริษัท Scientific Industries, Inc., USA.

เครื่องเก็บสารลำดับส่วน (fraction collector) รุ่น 7000 ultrorae ของบริษัท LKB Bromma, Sweden

หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น HA-36 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Tokyo, Japan

เครื่องแกสโครมาโตกราฟ (gas chromatograph) รุ่น 163 ของบริษัท Hitachi, Japan

เครื่องอินฟราเรดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (infrared spectrophotometer) รุ่น 440 ของบริษัท Shimadzu, Japan

เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์ (nuclear magnetic resonance spectrometer) รุ่น FX-90 Q ของบริษัท Jeol, Japan

เครื่องตรวจหาจุดหลอมเหลว (melting point apparatus) ของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ (mass spectrometer) รุ่น M-80 ของบริษัท Hitachi, Japan

แผ่นโครมาโตกราฟแบบผิวบางที่เคลือบด้วยซิลิกาเจล silica gel G60 F254 ของบริษัท E. Merk Damstadt, Germany

กรวยแยก (separatory funnel) ของบริษัท Witer, W-Germany

เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) รุ่น 70 ของบริษัท Beckman, USA.

เครื่องเป่าแห้ง (dryer) ของบริษัท National, Japan

คอเลสเทอรอล (cholesterol) และไดไพริดิล (α,α'-Dipyridyl) ของบริษัท E. Merck Damstadt, Germany

4-แอนโดรสตีน-ไดโอน (4-Androstene-3,17-dione, AD) 1,4-แอนโดรสตาไดอีน-3,17-ไดโอน (1,4-Androstadiene-3,17-dione, ADD) และสติกมาสเตียรอล (stigmasterol) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

เคมีภัณฑ์ชนิดอื่น ๆ เป็นเคมีภัณฑ์ระดับวิเคราะห์ (analytical reagent grade) จากบริษัทต่าง ๆ ซึ่งนำมาใช้โดยไม่ต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์อีก

2.2 จุลินทรีย์

1. *Mycobacterium* sp. BJ-153
2. *Mycobacterium* sp. BJ-157
3. *Mycobacterium* phlei BJ-158
4. *Mycobacterium fortuitum* BJ-683
5. *Mycobacterium fortuitum* BJ-805
6. *Arthrobacter simplex* BJ-069
7. *Arthrobacter simplex* BJ-154
8. *Nocardia* sp. BJ-070

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.3.1 สูตรอาหารแข็งสำหรับเก็บรักษาเชื้อ (stock culture medium) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

โพลีเปปโตน	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	2.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	1.0	กรัม
วุ้นผง	15.0	กรัม

pH 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที (การนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน)

2.3.2 สูตรอาหารเหลวสำหรับหัวเชื้อ (seed culture medium)

2.3.2.1 สูตรที่ 1 ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

โพลีเปปโตน	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	2.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	1.0	กรัม

pH 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน

2.3.2.2 สูตรที่ 2 ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

เปปโตน	5.0	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	3.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	1.0	กรัม
กลีเซอรอล	5.0	กรัม
ทวีน 80 (tween 80)	1.0	กรัม

pH 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน

2.3.3 สูตรอาหารเหลวสำหรับการแปลงรูปทางชีวภาพ (production medium)

2.3.3.1 สูตรที่ 1 ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

คอร์นสตีพลิเคอร์	10.0	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	2.0	กรัม
กลูโคส	5.0	กรัม
ไดโปตัสเซียม ไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.5	กรัม

pH 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน

2.3.3.2 สูตรที่ 2 ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

คอร์นสตีพลิเคอร์	5.0	กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	2.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.4	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)	3.0	กรัม
ไดแอมโมเนียมซิเตรท [$(NH_4)_2C_6H_6O_7$]	2.3	กรัม
แอมโมเนียมคลอไรด์	2.0	กรัม
ยูเรีย (urea)	0.5	กรัม
ทวีน 80 (tween 80)	2.0	กรัม

pH 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน

2.4 วิธีการเก็บรักษาและการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

2.4.1 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

เขี่ยเชื้อจุลินทรีย์ โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อลาก (streak) ลงบนอาหารแข็งเอียง (slant agar) สำหรับเก็บรักษาเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 7 วัน เมื่อเชื้อเจริญดีแล้วจึงนำไปเก็บในตู้แช่แข็ง (deep freezer) อุณหภูมิ -70°ซ และอีกวิธีหนึ่งคือ เติมพาราฟินเหลว (liquid paraffin) ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วทับบนผิวหน้าอาหารแข็งเอียงที่มีเชื้อเจริญ แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ

2.4.2 การเตรียมหัวเชื้อ

ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ จากเชื้อที่เก็บรักษาไว้ตามข้อ 2.4.1 ลงในอาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อ สูตรที่ 1 หรือ 2 ปริมาตร 50 มล. ที่บรรจุในขวดแก้วทรงกรวย ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30°ซ ด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 16 ชม. นำหัวเชื้อนี้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ให้ได้ค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.7

2.4.3 การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอล

นำหัวเชื้อจากข้อ 2.4.2 ปริมาณ 2.5 มล. ถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับการแปลงรูปทางชีวภาพ (อาหารเหลวสำหรับสร้างผลิตภัณฑ์) สูตรที่ 1 หรือ 2 ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. ที่มีคอเลสเทอรอล 0.5 มก./มล. ละลายในเอทิลอะซิเตท ปริมาณร้อยละ 1 (ปริมาตร/ปริมาตร) บ่มบนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิ 30°ซ ด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 26 ชม. จึงเติมสารละลายไดไพริดิล ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.5 มล. เริ่มเก็บตัวอย่างที่เวลา 24 ชม. ของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากเติมไดไพริดิล แล้วทำการวิเคราะห์สาร ADD ที่ได้ด้วยวิธีแกสโครมาโตกราฟี

2.5 วิธีการสกัดแยกสารผลิตภัณฑ์จากอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.5.1 วิธีการสกัดแยกสารจากอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง

นำตัวอย่างปริมาตร 25 มล. ใส่ลงในกรวยแยกขนาด 200 มล. เติมเอทิลอะซิเตท หรือเมทิลลีนคลอไรด์ (Marsheck และคณะ, 1971) ปริมาตรอย่างละ 25 มล. เขย่านาน 3 นาที วางทิ้งให้แยกชั้น นำชั้นของเอทิลอะซิเตทหรือชั้นของเมทิลลีนคลอไรด์ที่ได้จากการสกัดมาขจัดน้ำโดยใช้โซเดียมซัลเฟต (sodium sulfate, Na_2SO_4) นำชั้นตัวทำละลายที่ขจัดน้ำออกแล้วมา 10 มล. ระเหยให้แห้งที่อุณหภูมิ 50°ซ โดยใช้เครื่องระเหยสารภายใต้สภาวะสุญญากาศ เติมเอทิลอะซิเตท 0.5 มล. ลงในสารที่สกัดได้แล้วนำไปวิเคราะห์หาสารผลิตภัณฑ์โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง

2.5.2 <u>วิธีการสกัดแยกสารผลิตภัณฑ์จากอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อวิเคราะห์โดยวิธีแกส-โครมาโตกราฟี</u>

นำตัวอย่าง 1 มล. มาสกัดแยกสารผลิตภัณฑ์โดยเติมเอทิลอะซิเตท 2 มล. ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันบนเครื่องผสมสาร นาน 1 นาที ตั้งทิ้งให้แยกชั้น นำชั้นของเอทิลอะซิเตทที่ได้นี้มาขจัดน้ำโดยใช้โซเดียมซัลเฟต แล้วนำชั้นของเอทิลอะซิเตทที่ขจัดน้ำออกแล้วไปวิเคราะห์หาปริมาณสารผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีแกสโครมาโตกราฟีต่อไป

2.6 การวิเคราะห์สารที่สกัดแยกจากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง

หยด (spot) สารที่ได้จากการสกัดและสารมาตรฐาน 3 ชนิด ได้แก่ AD ADD และ คอเลสเทอรอลลงบนแผ่นโครมาโตกราฟีแบบผิวบางที่เคลือบด้วยซิลิกาเจล อย่างละ 2 ไมโครลิตร นำไปแยกชนิดของสารผลิตภัณฑ์ โดยเปรียบเทียบระบบตัวทำละลาย (solvent system) 3 ระบบ ได้แก่

1. เอทิลอะซิเตท : ไซโคลเฮกเซน ในอัตราส่วน 2:3 พ่นแผ่นโครมาโตกราฟด้วยโปตัสเซียมเปอร์มังกาเนต (potassium permanganate, $KMnO_4$) ความเข้มข้น 1% ที่ละลายในโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (sodiumhydrogencarbonate, $NaHCO_3$) ความเข้มข้น 10% แล้วเป่าด้วยเครื่องเป่าแห้ง (Wovcha และ Brooks, 1979)

2. เมทานอล : คลอโรฟอร์ม (methanol : chloroform) ในอัตราส่วน 1:19 พ่นแผ่นโครมาโตกราฟด้วยกรดซัลฟุริค (sulfuric acid, H_2SO_4) ความเข้มข้น 50% แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 80^{o}ซ นาน 15 นาที (Wovcha และคณะ, 1978)

3. ไดเอทิล อีเทอร์ : คลอโรฟอร์ม (di-ethyl ether : chloroform) ในอัตราส่วน 1:10 พ่นแผ่นโครมาโตกราฟด้วยกรดซัลฟุริกเข้มข้น แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 115^{o}ซ นาน 15 นาที (Nagasawa และคณะ, 1969)

2.7 การวิเคราะห์ปริมาณสาร ADD ด้วยวิธีแกสโครมาโตกราฟี

ฉีดสารที่ได้จากการสกัดตามข้อ 2.5.2 ปริมาณ 3 ไมโครลิตร เพื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องแกสโครมาโตกราฟี โดยมีสภาวะดังนี้

คอลัมน์แก้ว ขนาด ; 3 มม. x 1 ม.

ตัวดูดซับ ; ซิลิโคน (silicone) ov-17 เคลือบบนยูนิพอร์ท (uniport) H 60/80 เมช

อุณหภูมิของคอลัมน์ ; 240°ซ

อุณหภูมิของตำแหน่งฉีดตัวอย่าง ; 260°ซ

แกสตัวพา ; ไนโตรเจน ความดัน 1.0 กก./ซม^2

เครื่องตรวจวัด ; เฟลมไอออนไนเซชัน ดีเทคเตอร์ (flame ionizationr detector, FID)

ภายใต้สภาวะดังกล่าว เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของสารมาตรฐานจะแตกต่างกันตามลำดับดังนี้คือ

สาร ADD 2.1 นาที

คอเลสเทอรอล 3.6 นาที

หาปริมาณสาร ADD และคอเลสเทอรอลได้จากการคำนวณค่าพื้นที่ใต้พีค (ความสูง x ความกว้าง) แล้วเทียบกับกราฟมาตรฐาน (แสดงไว้ในภาคผนวก) หาปริมาณสารได้เป็น มก./มล. ของตัวอย่าง

2.8 เปรียบเทียบความสามารถในการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอลเป็นสาร ADD โดยจุลินทรีย์ จำนวน 8 สายพันธุ์

นำหัวเชื้อของจุลินทรีย์ จำนวน 8 สายพันธุ์ ซึ่งเตรียมตามวิธีการในข้อ 2.4.2 ปริมาณ 2.5 มล. ถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับการแปลงรูปทางชีวภาพ สูตรที่ 1 หรือ 2 ปริมาตร 50 มล. แล้วทำตามวิธีการข้อ 2.4.3 โดยเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม แบ่งการทดลองเป็น2ชุด คือชุดหนึ่งเติมไดไพริดิล ส่วนอีกชุดหนึ่งไม่เติมไดไพริดิล เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์สารผลิตภัณฑ์โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง และวิเคราะห์ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ด้วยด้วยวิธีแกสโครมาโตกราฟีทุก 24 ชม. เป็นเวลา 10 วัน

2.9 การทำให้สาร ADD บริสุทธิ์ และการวิเคราะห์ทางเคมี

2.9.1 การทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี

คอลัมน์

ชั่งผงซิลิกาเจล C-200 ขนาด 74-149 ไมครอน น้ำหนักประมาณ 20 เท่าของน้ำหนักสารที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์ แล้วนำมาแช่ในสารละลายเอทิลอะซิเตท : ไซโคลเฮกเซน ในอัตราส่วน 2 : 3 กวนให้เข้ากันแล้วค่อย ๆ บรรจุเจลลงในคอลัมน์ ซึ่งมีขนาดความสูง 50 มล. เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.2 ซม. ล้างด้วยสารละลายที่ใช้ปริมาตรอย่างน้อยหนึ่งเท่าของปริมาตรคอลัมน์

การทำให้สาร ADD บริสุทธิ์

นำสารที่สกัดแยกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ (วิธี 2.5.1) ปริมาณ 5 มล. ไประเหยให้แห้งที่อุณหภูมิ 50°ซ โดยใช้เครื่องระเหยสารภายใต้สภาวะสุญญากาศ (บันทึกน้ำหนัก) เติมเอทิลอะซิเตท 1 มล. ผ่านสารละลายนี้ลงในคอลัมน์ซิลิกาเจล แล้วชะด้วยตัวทำละลาย 3 ระบบต่อเนื่องกัน คือ เอทิลอะซิเตท : ไซโคลเฮกเซน อัตราส่วน 2 : 3 1 : 1 และ 3 : 2 ใช้ลงในคอลัมน์อย่างต่อเนื่อง เก็บสารที่ผ่านจากคอลัมน์ลงในหลอดแก้ว หลอดละ 5 มล. ตรวจสอบสาร ADD ในตัวอย่างที่เก็บจากคอลัมน์ ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง โดยเปรียบเทียบค่า Rf กับของสารมาตรฐาน ADD นำหลอดที่พบสาร ADD มารวมกันแล้วระเหยเอาตัวทำละลายออก

นำสารที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟีมาทำให้ตกผลึก โดยนำมาเติมเอทิล อีเทอร์ (ethyl ether) (Marsheck และคณะ, 1972) ปริมาตรน้อยที่สุดที่จะทำให้สารนี้ละลายได้หมด แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ จนกระทั่งเกิดผลึกแล้วนำไปวิเคราะห์ทางเคมีต่อไป

2.9.2 การวิเคราะห์ทางเคมี

นำสารบริสุทธิ์ในรูปผลึกที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ทางเคมี ดังนี้

2.9.2.1 ตรวจหาจุดหลอมเหลว

นำสารตัวอย่างที่บริสุทธิ์มาบดให้ละเอียด วางบนแผ่นกระจก (cover glass) สำหรับใช้หาจุดหลอมเหลว แล้วให้ความร้อน จดบันทึกอุณหภูมิที่สารเริ่มหลอมเหลวและอุณหภูมิที่สารหลอมเหลวหมด

2.9.2.2 <u>ตรวจโครงสร้างของโมเลกุล ADD ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์</u>

ทำการหามวลโมเลกุลและการจัดเรียงตัวของอะตอมต่าง ๆ ในโมเลกุล โดยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ รุ่น M-80 ด้วยวิธี direct ionization อุณหภูมิที่ใช้ในการทำให้สารกลายเป็นไอ คือ 250°ซ บันทึกแมสสเปกตรัมของสารตัวอย่างด้วยวิธี electron impact ใช้พลังงาน 70 อิเลคตรอนโวลต์

2.9.2.3 <u>ตรวจโครงสร้างของโมเลกุลโดยเครื่องอินฟราเรดสเปกโตร-โฟโตมิเตอร์</u>

นำสารตัวอย่างไปวัดการดูดกลืนแสงอินฟราเรด โดยใช้เทคนิคการทำแผ่น KBr

2.9.2.4 <u>ตรวจโครงสร้างของโมเลกุลด้วยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติก-เรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์</u> (NMR)

วัด ^{1}H-NMR (90 MHz) และ ^{13}C-NMR (22.5 MHz) ของสารตัวอย่างในสารละลาย $CDCl_3$ โดยใช้ TMS เป็น internal standard

2.10 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอลเป็นสาร ADD โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157

เพาะเลี้ยงเชื้อตามวิธีการข้อ 2.4.3 แล้วศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแปลงรูปคอเลสเทอรอลเป็นสาร ADD ได้แก่ สภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อ ผลกระทบของคอเลส-เทอรอลต่อความสามารถในการแปลงรูปคอเลสเทอรอลเป็นสาร ADD ผลกระทบของไดไพริดิลต่อการแปลงรูปคอเลสเทอรอลเป็นสาร ADD องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม คือ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน เกลือแร่ และผลของสารบางชนิดต่อการเพิ่มอัตราการแปลงรูปคอเลสเทอรอลเป็นสาร ADD