บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 <u>อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง</u>

2.1.1 อุปกรณ์

เครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) Laboratory Hot Plate PC-101, Corning Glass Works, Corning, NY ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องเขย่าผสม (vortex mixer) รุ่น Vortex-Genie No.2 ของบริษัท Scientific Industries,Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic-21 ของบริษัท Baush & Lomb ประเทศสหรัฐอเมริกา และ UV-160 ของบริษัท Shimadzu Corperation, Kyoto ประเทศญี่ปุ่น

หัวตรวจวัดออกซิเจนที่ละลาย (Dissolved Oxygen Electrode) รุ่น OE-8270G ของบริษัท TOA Electronics Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิแบบหมุน (phycrotherm rotary incubator shaker) รุ่น Innova ™ 4330 ของบริษัท New Brunwick Scientific Co.,Inc. Edison, New Jersey ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น KR-20000T ของบริษัท Kubota Corporation ประเทศญี่ปุ่น และรุ่น MTX-150 ของบริษัท Tomy Seiko., Ltd., Tokyo, ประเทศญี่ปุ่น

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น TE-80 ยี่ห้อ Tempette ของบริษัท Techne ประเทศอังกฤษ

ตู้อบไมโครเวฟ รุ่น NE-7670 ยี่ห้อ National ของบริษัท Matsushita Electric Industrial Co., Ltd., ประเทศญี่ปุ่น

ถังหมัก (Fermenter) ขนาด 5 ลิตร รุ่น MD-300-5L ใบพัดแบบกังหัน 6 ใบ (6-blade turbine) เครื่องควบคุมภาวะ (Bioprocess controller) รุ่น MDIAC-SS ของบริษัท Marubishi ประเทศญี่ปุ่น เครื่องอัดอากาศ (Air compressor) ของบริษัท Hitachi ประเทศญี่ปุ่น เครื่องควบคุม

ระบบน้ำหล่อเย็น (Circulation type hardy cooler) รุ่น TRL-108 ของบริษัท Thomas Kagaka ประเทศญี่ปุ่น

มาตรวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 501 ของบริษัท Sentron ประเทศญี่ปุ่น และมาตรวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH Combination Electrode) สำหรับถังหมักขนาด 5 ลิตร รุ่น D-26 ของบริษัท TOA Electronics Ltd., ประเทศญี่ปุ่น

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (autoclave) รุ่น HA-26 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation ประเทศญี่ปุ่น และรุ่น KT -30SD ของบริษัท ALP Co., Ltd, Tokyo ประเทศญี่ปุ่น

หลอดแสงอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet lamp) ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร TUV 15W/G15 T8 ของบริษัท Philips ประเทศฮอลแลนด์

เครื่องอบฆ่าเชื้อแบบแห้ง (Hot air oven) รุ่น 94789 ของบริษัท Contherm Scientific Ltd., ประเทศนิวซีแลนด์

ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น MTR 152 ของบริษัท Sanyo Electric Co., Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

2.1.2 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	
กรดซัลฟิวริก	MERCK	ประเทศเยอรมัน
กรดไดไนโตรซาลิไซลิก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดมาเลอิก	MERCK	ประเทศเยอรมัน
กรดไฮโดรคลอลิก	MERCK	ประเทศเยอรมัน
กรดไฮยาลูโรนิก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
คาร์บาโซล	FLUKA	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
เคซีน	BDH	ประเทศอังกฤษ
แคลเซียมคลอไรด์	MERCK	ประเทศเยอรมัน
โซเดียมเตตระบอเรท	MERCK	ประเทศเยอรมัน
โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	CARLO ERRA	ประเทศอิตาลี
โซเดียมไฮดรอกไซด์	MERCK	ประเทศเยอรมัน

โซเดียมคลอไรด์	CARLO ERRA	ประเทศอิตาลี
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
ทริส(ไฮดรอกซีเมทิล)-อะมิโนมีเทน	MERCK	ประเทศเยอรมัน
โพแทสเซียมคลอไรด์	MERCK	ประเทศเยอรมัน
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	FLUKA	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
แลกติก เคซีน	New Zealand Diary Board	ประเทศนิวซีแลนด์
เอธานอล	กรมสรรพสามิต	ประเทศไทย
เอนไซม์นิวเทรส	NOVO NORDISK	ประเทศเดนมาร์ก
เอนไซม์ปาเปน	BDH	ประเทศอังกฤษ
เอนไซม์อินเวอร์เทส	Wako Pure Chemical	ประเทศญี่ปุ่น

2.2 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อสายพันธุ์ตั้งต้นสำหรับการคัดเลือกเพื่อใช้ในการชักนำให้ เกิดการกลายพันธุ์ *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 และ 35247 และเชื้อสายพันธุ์ที่ใช้ในการเปรียบเทียบสายพันธุ์กลายที่ได้ใหม่กับสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์แล้ว *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920

2.3 การเก็บรักษาและการเลี้ยงเชื้อ

2.3.1 การเก็บรักษาเชื้อ

เขี่ยเชื้อโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (loop) แล้วลาก (streak) เชื้อลงบนผิวหน้าอาหารแข็งลาดเอียง (agar slant) Brain Herat infusion (BHI) (ภาคผนวก ก-1.2) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บเชื้อในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

2.3.2 การเลี้ยงเชื้อและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

2.3.2.1 การเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น

เลี้ยงเชื้อบนผิวหน้าอาหารแข็งลาดเอียง BHI เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปิเปตต์น้ำที่ขจัดไอออนออกแล้ว (deionized water) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร เขี่ยเชื้อให้กระจายในน้ำโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ จากนั้นปิเปตต์เซลล์แขวนลอยที่ได้

ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว BHI (ภาคผนวก ก-1.1) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อในตู้เขย่าแบบหมุน ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 ชั่วโมง ซึ่งเชื้อจะเจริญอยู่ในระยะกึ่งกลางทวีคูณ (mid-log phase) ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ประมาณ 0.2

2.3.2.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับขวดเขย่า

ปิเปตต์เซลล์แขวนลอยที่ได้จากขั้นตอนที่ 2.3.2.1 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร (ปริมาณร้อยละ 10 ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงสู่อาหารเหลวสูตรสำหรับการผลิต PM3 ที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก จ) ปริมาตร 25 มิลลิลิตรที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยเริ่มต้น 0.08-0.1 กรัมต่อลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที

2.3.2.3 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ถ่ายหัวเชื้อตั้งต้นที่ได้จากขั้นตอนที่ 2.3.2.1 ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสูตรสำหรับการผลิต PM3 ที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก จ) ปริมาตร 3 ลิตร ซึ่งบรรจุในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งจะได้น้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้นเฉลี่ย 0.08-0.1 กรัมต่อลิตร ควบคุมภาวะตลอดการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ 7.0 ด้วย 5 M NaOH

2.4 <u>วิธีวิเคราะห์</u>

2.4.1 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

วัดโดยใช้มาตรวัดความเป็นกรด-ด่าง

2.4.2 การวัดการเจริญของเซลล์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

ปิเปตต์น้ำหมักปริมาตร 25 มิลลิลิตรที่ได้จากขั้นตอนที่ 2.3.2.2 และ 2.3.2.3 นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์ด้วยน้ำขจัดไอออน 2 ครั้งปริมาตร 20 มิลลิลิตร ล้างเซลล์ที่ได้ลงสู่กระทงอะลูมินัมฟอยล์ (aluminum foil) อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ (desicator) แล้วชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งละเอียดหักน้ำหนักของกระทงอะลูมินัมฟอยล์ออก จะได้น้ำหนักเซลล์แห้ง หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร ส่วนสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการปั่นแยกเซลล์แล้วจะนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก

2.4.3 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้กรดไดไนโตรซาลิไซลิก (ดัดแปลงจาก Bernfeld, 1955; Miller, 1958)

ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (ภาคผนวก ข-1.) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม ปิดปากหลอดทดลองนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแช่ในอ่างน้ำเย็น นานประมาณ 3 นาที เติมน้ำขจัดไอออนปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้น้ำขจัดไอออนแทนสารละลายตัวอย่างเพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบ คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร จากกราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลกลูโคสในช่วงความเข้มข้น 0-1.0 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ง-1.)

2.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครส โดยใช้เอนไซม์อินเวอร์เทส

ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส (ภาคผนวก ข-5.) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม นำไปแช่ในอ่างน้ำเย็นควบคุมอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลายไดไนโตรซาลิไซลิกปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม นำสารละลายที่ได้ไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแช่ในอ่างน้ำเย็นประมาณ 3 นาที เติมน้ำขจัดไอออนปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ตัวเปรียบเทียบใช้น้ำขจัดไอออนแทนสารละลายตัวอย่าง คำนวณความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสหน่วยเป็นกรัมต่อลิตรจากกราฟมาตรฐานซูโครสที่ย่อยด้วยเอนไซม์ ในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1.0 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ง-2.) ส่วนปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหลือภายหลังการหมักหาได้จาก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยน้ำตาลซูโครสหักลบด้วยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ดังวิธีการข้อ 2.4.3

2.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกโดยวิธีคาร์บาโซล (ดัดแปลงจาก Bitter and Muir, 1962; Galambos, 1967)

2.4.5.1 การตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิก

นำสารละลายที่ได้จากการปั่นแยกเซลล์ตามขั้นตอนที่ 2.4.2 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ เติมเอธานอล 95% ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม จากนั้นปั่นแยกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิก ที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนของสารละลายทิ้ง

2.4.5.2 การละลายกรดไฮยาลูโรนิก

นำตะกอนของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากข้อ 2.4.5.1 มาละลายด้วยสารละลาย 9% NaCl ปริมาตร 800 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม

2.4.5.3 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกโดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสง

นำสารละลายที่ได้จากข้อ 2.4.5.2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายบอเรท-ซัลฟิวริก (ภาคผนวก ข-4.1) ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปต้มในอ่างน้ำเดือดที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที นำไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง เมื่อสารละลายเย็นให้เติมสารละลายคาร์บาโซล (ภาคผนวก ข-4.2) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที ทิ้งให้สารละลายเย็นที่อุณหภูมิห้อง นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตร ตัวเปรียบเทียบใช้น้ำขจัดไอออน 100 ไมโครลิตรแทนสารละลายตัวอย่าง คำนวณความเข้มข้นของกรดไฮยาลูโรนิกจากกราฟมาตรฐานของกรดไฮยาลูโรนิกที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ง-3)

2.4.6 การวิเคราะห์แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์นิวเทรสและเอนไซม์ปาเปน

เตรียมสารละลายเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ชนิดนั้นๆเป็นตัวทำละลาย จากนั้นดำเนินการวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

2.4.6.1 เติมสารละลายเคซีน (ภาคผนวก ค-1.3) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตรและสารละลายบัฟเฟอร์ A สำหรับเอนไซม์นิวเทรสหรือบัฟเฟอร์ B สำหรับเอนไซม์ปาเปน (ภาคผนวก ข-3) ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

2.4.6.2 ผสมสารละลายข้างต้นให้เข้ากันและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสสำหรับเอนไซม์นิวเทรสหรือ 40 องศาเซลเซียสสำหรับเอนไซม์ปาเปน เป็นเวลา 10 นาที

2.4.6.3 เติมสารละลายเอนไซม์นิวเทรส (ภาคผนวก ค-1.1) และเอนไซม์ปาเปน (ภาคผนวก ค-1.2) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมและนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม เป็นเวลา 10 นาที

2.4.6.4 เติมสารละลาย TCA (ภาคผนวก ข-6) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม

2.4.6.5 ปั่นเพื่อแยกตะกอนออก ที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที และนำส่วนสารละลายใสที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับตัวเปรียบเทียบ (สารละลายบัฟเฟอร์+สารละลายเคซีน+สารละลาย TCA) และหลอดควบคุม (เติมสารละลาย TCA ก่อนการเติมเอนไซม์)

การคำนวณค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์คิดจากปริมาณไทโรซีนที่ได้จากการย่อยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของไทโรซีนที่ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค-3) โดยให้หน่วยเป็น CDU (Casine`digestion unit) (ภาคผนวก ค-2)

2.4.7 การหาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมและระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

ในการวิเคราะห์นี้สารตั้งต้นในการย่อยคือ 4% แลกติก เคซีน (ภาคผนวก จ) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับขั้นตอน 2.4.6 โดยนำสับสเตรทไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ เติมสารละลายเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน เก็บตัวอย่างสารทุกๆ 2 ชั่วโมง นำไปตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลาย TCA ส่วนสารละลายที่ใสนำไปเจือจางให้เหมาะสม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เปรียบเทียบปริมาณไทโรซีนที่ได้กับกราฟมาตรฐานไทโรซีน เพื่อหาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมและระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

2.5 <u>การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์กับ *Streptococcus zooepidemicus* ด้วยสิ่งก่อการกลายพันธุ์</u>

มีวิธีการขั้นตอนดังต่อไปนี้ (ดัดแปลงจากวิธีการของสมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ, 2539; Nimrod et al., 1988; Akasaka, Komasaki and Arai, 1989)

2.5.1 การเตรียมเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น

2.5.1.1 เขี่ยเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 ลงบนผิวหน้าอาหารแข็งลาดเอียง BHI บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.5.1.2 ปิเปตต์น้ำขจัดไอออนที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารแข็งลาดเอียงในข้อ 2.5.1.1 เขี่ยเชื้อให้เข้ากัน จากนั้นใช้ปิเปตต์ดูดเซลล์แขวนลอยของเชื้อ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เติมลงในอาหารเหลว BHI บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 ชั่วโมง (mid-log phase)

2.5.1.3 ปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์ด้วย 0.1 M Tris-maleic buffer pH 8.0 2 ครั้ง

2.5.1.4 ทำให้เซลล์แขวนลอยใน 0.1 M Tris-maleic buffer pH 8.0 ปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้อยู่ในช่วง 10^7-10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

2.5.1.5 ปั่นแยกเซลล์อีกครั้งที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.5.2. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดย NTG

2.5.2.1 เตรียมสารละลาย NTG (ใน 0.1 M Tris-maleic buffer pH 8.0) ให้มีความเข้มข้น 0-0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมลงในเซลล์ที่ได้จากข้อ 2.5.1.5

2.5.2.2 บ่มเซลล์ในสารละลาย NTG ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที

2.5.2.3 ปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์ด้วย 0.85% NaCl 2 ครั้ง

2.5.2.4 ทำให้เซลล์แขวนลอยใน 0.85% NaCl ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2.5.2.5 เจือจางเซลล์แขวนลอยที่ได้จากข้อ 2.5.2.4 ตั้งแต่ 10^{-1}-10^{-6} ด้วย 0.85% NaCl

2.5.2.6 ปิเปตต์เซลล์แขวนลอยที่ความเจือจางต่างๆ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง tryptic soy agar ในจานเพาะเลี้ยง กระจายเซลล์ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร

2.5.2.7 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร และคำนวณหาร้อยละของการรอดของเชื้อที่ความเข้มข้นของ NTG ต่างๆ

2.5.3 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยรังสี UV

ทำการเตรียมเซลล์ตามวิธีในข้อ 2.5.1-2.5.2 จากนั้นเจือจางเซลล์ให้ได้ 10^{7}-10^{9} เซลล์ต่อมิลลิลิตรด้วย 0.85% NaCl นำไปฉายรังสี UV โดยใช้หลอด UV ขนาด 15 วัตต์ จำนวน 3 หลอดและระยะห่างระหว่างแหล่งกำเนิดรังสีกับเชื้อประมาณ 30 เซนติเมตร เวลาในการฉายรังสีตั้งแต่ 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 และ 120 วินาที ทำการเจือจางเซลล์และกระจายเซลล์ที่ได้จากการฉายรังสีที่ระยะเวลาต่างๆบนอาหารแข็ง tryptic soy agar แล้วนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy agar คำนวณหาร้อยละของการรอดที่ระยะเวลาต่างๆ เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการฉายรังสีและร้อยละของการรอด

2.5.4 การคัดเลือกเชื้อที่ได้จากการกลายพันธุ์

2.5.4.1 การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ (primary screening)

2.5.4.1.1 คัดเลือกเชื้อจากจานเพาะเลี้ยงในข้อ 2.5.2.7 และ 2.5.3 ที่มีค่าร้อยละของการรอดต่ำกว่า 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะใหญ่ มีเมือกมาก

2.5.4.1.2 นำโคโลนีที่คัดเลือกได้ไปเลี้ยงบนผิวหน้าอาหารแข็ง tryptic soy agar+ 5% sheep blood เพื่อดูการย่อยเม็ดเลือดแดง คัดเลือกเชื้อที่ไม่มีการย่อยเม็ดเลือดแดง (ไม่ให้ β-hemolysis zone)

2.5.4.2 การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ (secondary screening)

2.5.4.2.1 นำเชื้อสายพันธุ์กลายที่ได้จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ มาเลี้ยงบนอาหารแข็งลาดเอียง BHI บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตต์น้ำขจัดไอออนที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร เขี่ยเชื้อให้เข้ากัน

2.5.4.2.2 เตรียมหัวเชื้อตั้งต้น โดยปิเปตต์เซลล์แขวนลอยของเชื้อ ใส่ลงในอาหารเหลว BHI ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วในการเขย่า 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 ชั่วโมง

2.5.4.2.3 ปิเปตต์หัวเชื้อตั้งต้น 10% (v/v) ลงในอาหารสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วในการเขย่า 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

2.5.4.2.4 นำน้ำหมักที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก, ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่, ปริมาณเซลล์แห้ง และ ค่าความเป็นกรด-ด่าง

2.5.4.2.5 คัดเลือกหาสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น