บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 อุปกรณ์

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิได้ Psycrotherm incubator shaker model 6-27 New Brunswick Scientific Co.Inc., N.J., U.S.A.

ถังหมักขนาด 5 ลิตร model MD-300 และชุดควบคุมสภาวะ บริษัท L.E. Marubishi, Tokyo, Japan.

เครื่องอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Autoclave) model HA-26 บริษัท Hirayama Manufacturing Cooporation, Tokyo, Japan.

เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) Laboratory Hot Plate PC-101 Corning Glass Works, Corning, N.Y. 14880, U.S.A.

เครื่องเขย่าสำหรับสกัดแยกสาร (Extracting machine) model V-ON บริษัท Iwaki, Japan.

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

เครื่องไฮเฟอร์ฟอแม็นซ์ลิควิดโครมาโตกราฟ (High Performance Liquid Chromatograph) model LC-3A บริษัท Shimadzu, Japan.

2.1.2 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
1 เพนิซิลลิน จี (penicillin G Sodium)	Merk sharp & Dohme (Thailand) Ltd.
2 กรดฟินิลอะซิติก (phenylacetic acid)	E. Merck Damstadt, Germany.
3 เอมิลอะซิเตต (amylacetate)	BDH Limited, England.
4 โซเดียมไบคาร์บอเนต (sodium bicarbonate)	E. Merck Damstadt, Germany.
5 บิวทานอล (butanol)	E. Merck Damstadt, Germany.

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

2.2 การเลี้ยงเชื้อ Penicillium chrysogenum A 88

2.2.1 การเก็บรักษาเชื้อ Penicillium chrysogenum A 88

เขี่ยสปอร์ (spore) ของเชื้อ Penicillium chrysogenum A 88 โดยใช้เข็มเขี่ยลากเชื้อ (streak) ลงบนอาหารแข็งเอียง (slant agar) โพเตโตเด็กซ์โตรสอาการ์ (potato dextrose agar,PDA)(ภาคผนวกที่ 1.1) บ่มที่อุณหภูมิ 25 ° ซ. เป็นเวลา 7-10 วัน เมื่อสร้างสปอร์เต็มที่แล้วจึงนำไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง (deep freeze) อุณหภูมิ -70 ° ซ.

2.2.2 การเลี้ยงเชื้อ Penicillium chrysogenum A 88

2.2.2.1 การเตรียมสปอร์

เขี่ยสปอร์ของเชื้อ Penicillium chrysogenum A 88 จากเชื้อที่เก็บรักษาไว้ตามข้อ 2.2.1 ลงในสารละลาย 0.1% โพลิเปปโตน เพื่อทำให้เป็นสารแขวนลอย (spore suspension) ปริมาตร 2 มล. เขย่าให้เข้ากันนำไปกระจายลงบนผิวหน้าของอาหารแข็งโพเตโตเด็กซ์โตรสอาการ์ในขวดแก้ว ขนาด 10 x15 x 4 ซม.^{3} บ่มที่อุณหภูมิ 25 $^\circ$ ซ. นาน 7 วัน หลังจากนั้นถ่ายสปอร์ออกจากขวดด้วยการล้างด้วยสารละลาย 0.1% โพลิเปปโตน ปริมาตร 30 มล. แล้วกรองผ่านผ้าขาวบาง นับจำนวนสปอร์โดยใช้ haemacytometer

2.2.2.2 การเลี้ยงเชื้อ Penicillium chrysogenum A 88 เพื่อเป็นหัวเชื้อสำหรับผลิตเพนิซิลลิน จี ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ถ่าย 1 มล.ของสารละลายแขวนลอยของสปอร์ที่มีความเข้มข้น 2.5 x 10^7 สปอร์ต่อมล. ที่เตรียมได้ตามข้อ 2.2.1 ลงใน 50 มล. ของอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวกที่ 1.2) ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มล. นำไปเขย่าบนเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบ psycrotherm incubater shaker ที่อุณหภูมิ 25 $^\circ$ ซ. ด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชม.

2.2.2.3 การเลี้ยงเชื้อ Penicillium chrysogenum A 88 เพื่อผลิตเพนิซิลลิน จี ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เตรียมหัวเชื้อตามวิธีข้อ 2.2.2 ให้ได้ปริมาตรรวม 300 มล. ถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับผลิตเพนิซิลลิน จี (ภาคผนวกที่ 1.3) ปริมาตร 2.7 ลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวแล้วจึงเริ่มต้นการหมัก โดยใช้อัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อ 1 ลิตรของปริมาตรอาหารต่อนาที ใช้น้ำมันซิลิโคนอะดีคานอล (silicone adecanol) เป็นสารกำจัดฟอง (antifoamer) ควบคุมอุณหภูมิ 25 $^\circ$ ซ. ตลอดการหมัก ควบคุมระดับความเป็นกรดด่างให้อยู่ระหว่าง 5.8-7.1 โดยใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้น 10% (ปริมาตรต่อปริมาตร) เมื่อเชื้อมีอายุ 24 ชม. เติมสารละลายกรดฟีนิลอะซิติกที่ละลายในน้ำ เข้มข้น 1.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มล. หมักเป็นเวลา 144 ชม.

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณเพนิซิลลิน จี โดยใช้ HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

นำตัวอย่างมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการกลั่น 2 ครั้ง (double distilled water) ฉีดสารละลายตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง HPLC Shimadzu APLC, LC-3A) โดยมีสภาวะดังนี้

คอลัมน์	: Sorbex C-18 25 x 0.46 เซนติเมตร ID.
สารละลายตัวพา	: 13% เมทานอล
อัตราการไหล	: 1 มิลลิลตรต่อนาที
ความดัน	: 120-180 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร
อุณหภูมิ	: 25 ° ซ.
เครื่องตรวจวัด	: ความยาวคลื่นช่วงอุลตราไวโอเลต 240 นาโนเมตร

ด้วยสภาวะดังกล่าว เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของเพนิซิลลิน จี เท่ากับ 4 นาที ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้เพนิซิลลิน จี โซเดียม เข้มข้น 0.5-3.0 ไมโครกรัม แล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC ตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างอัตราส่วน พื้นที่ใต้กราฟของเพนิซิลลิน จี ต่อ เพนิซิลลิน วี กับความเข้มข้นของเพนิซิลลิน จี (ภาคผนวกที่ 3) โดยใช้เพนิซิลลิน วี เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบลักษณะโครมาโตแกรมที่ได้ ดังภาคผนวกที่ 2

2.4 การสกัดแยกและการทำให้เพนิซิลลิน จี บริสุทธิ์

2.4.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแยกเพนิซิลลิน จี ออกจากน้ำหมัก

นำน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ Penicillium chyrsogenum A 88 ตามวิธีในข้อ 2.2.3 แช่เย็นที่อุณหภูมิ 0-1 ° ซ. เติมซิติลไตรเมตทิลแอมโมเนียมโบรไมด์(cetyl trimethyl ammonium bromide) ปรับความเป็นกรดด่างตามต้องการด้วยกรดฟอสฟอริค ความเข้มข้น 10% (ปริมาตรต่อปริมาตร) สกัดแยกด้วยเอมิลอะซิเตตด้วยเครื่องเขย่าสำหรับสกัดแยกสาร แยกชั้นเอมิลอะซิเตตออกจากชั้นน้ำ นำชั้นเอมิลอะซิเตตมากำจัดน้ำออกด้วยการเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส แล้วระเหยเอมิลอะซิเตตออกจนแห้งโดยใช้เครื่องระเหยภายใต้สูญญากาศแบบหมุน นำไปวิ-

เคราะห์หาปริมาณเพนิซิลลิน จี ตามวิธีข้อ 2.3

2.4.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการขจัดสิ่งปนเปื้อนด้วยผงถ่านก่อนการตกผลึก

นำน้ำหมักที่ได้ตามวิธีในข้อ 2.2.3 สกัดแยกเพนิซิลลิน จี ออกจากน้ำหมักด้วยเอมิลอะซิเตตตามวิธีในข้อ 4.1 นำชั้นของเอมิลอะซิเตตมาเติมผงถ่าน (activated charcoal) ในปริมาณที่เหมาะสม กวนด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) ที่อุณหภูมิ 30 ° ซ. กรองผงถ่านออก นำสารซึ่งละลายในเอมิลอะซิเตตมาระเหยเอาเอมิลอะซิเตตออกจนแห้ง โดยใช้เครื่องระเหยภายใต้สูญญากาศแบบหมุน นำไปวิเคราะห์หาปริมาณเพนิซิลลิน จี ตามวิธีข้อ 2.3

2.4.3 การหาชนิดและปริมาณของเกลือโซเดียมที่เหมาะสมในการตกผลึก

นำชั้นเอมิลอะซิเตตที่ผ่านการขจัดสิ่งปนเปื้อนด้วยผงถ่านตามวิธีในข้อ 2.4.2 มาระเหยเอมิลอะซิเตตออกด้วยเครื่องระเหยภายใต้สูญญากาศแบบหมุนที่อุณหภูมิ 30 ° ซ. ให้ปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่อยู่ในเอมิลอะซิเตตมีความเข้มข้นสูง นำมาแช่ในอ่างน้ำแข็งให้มีอุณหภูมิ 0-1 ° ซ.

หยดสารละลายที่มีโซเดียมเป็นองค์ประกอบอย่างช้าๆ เช่น สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) สารละลายโซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa) และสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) ในปริมาณที่เหมาะสมลงไปพร้อมกับการกวนด้วยแท่งแม่เหล็กอย่างสม่ำเสมอ จนกระทั่ง pH ภายหลังจากเติมสารละลายที่มีโซเดียมเป็นองค์ประกอบเท่ากับ 7.0 แยกชั้นซึ่งมีเกลือโซเดียมของเพนิซิลลิน จี อยู่ออกจากเอมิลอะซิเตต นำมาระเหยน้ำออกจากเพนิซิลลิน จี โซเดียม ให้มีความเข้มข้นประมาณ 1.2 กรัมต่อ 1 มิลลิลิตร เพื่อตกผลึก ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 ° ซ. ประมาณ 24 ชั่วโมง หากยังไม่เกิดการตกผลึกก็เติมบิวทิวแอลกอฮอล (butyl alcohol) ทีละหยดเขย่าให้เข้ากันจนกระทั่งสารละลายเริ่มขุ่น นำไปตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 ° ซ. ต่ออีก 24 ชั่วโมง เมื่อได้ผลึกแล้วนำมากรองและล้างด้วยบิวทิวแอลกอฮอลจนผลึกขาว