บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 ครุภัณฑ์

ชนิดเครื่องมือ	แบบ	บริษัทผู้ผลิต
เครื่องวัดการดูดกลืนแสง	1. Shimadzu UV-visible UV-240	Shimadzu, Japan
	2. Spectronic 20	Bausch and Lomb, U.S.A.
	3. Klett-Summerson photoelectric colorimeter	Arthur H. Thomas U.S.A.
เครื่องเซนติฟิวจ์	1. Beckman centrifuge J-21C	Beckman Instrument Inc., U.S.A.
	2. Top bench centrifuge Minor 35	MSE Ltd. England
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ	1. Gyrotary water bath Shaker modle G-75	New Brunswick Scientific Edison, N.J., U.S.A.
	2. Shaker bath model 2563	Forma Scientific Marietta, Ohio, U.S.A.
เครื่องควบคุมอุณหภูมิ	Incubator	Laboratory Electrical Engineering Co. England
เครื่องวัด pH	PHM 83 Autocal pH meter	Radiometer Copenhagen, Denmark
เครื่องทำลายเซลล์	1. French pressure press	American Instrument, U.S.A.

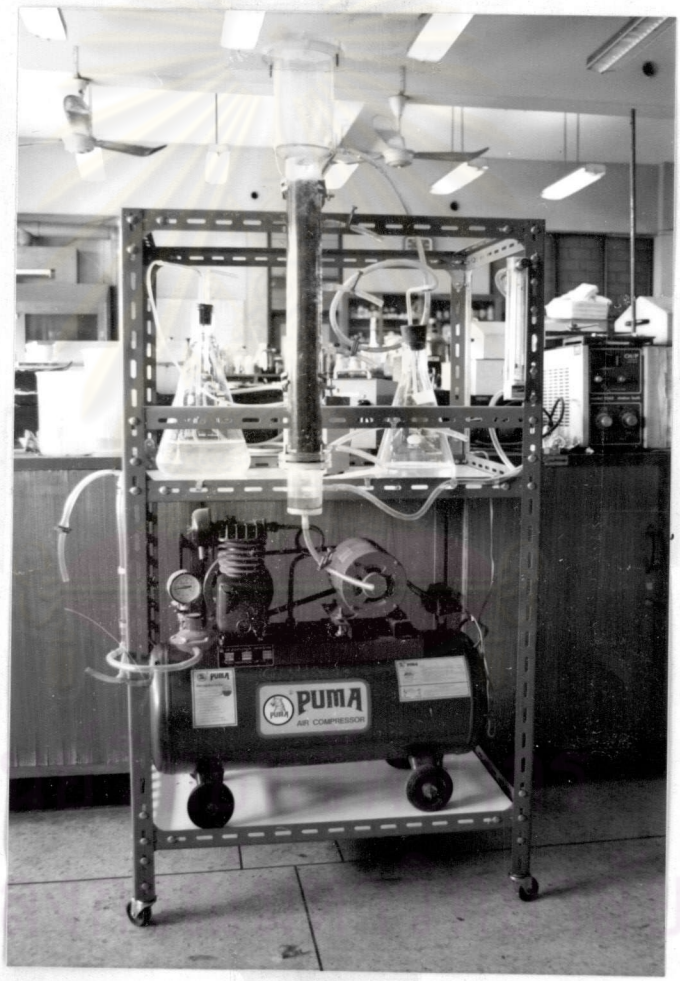
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชนิดเครื่องมือ	แบบ	บริษัทผู้ผลิต
	2. Sonicator model W 375	Heat Systems Ultrasonics, Inc., U.S.A.
เครื่องหาจุดหลอมเหลว	Fisher-Johns melting point apparatus	Fisher Scientific Co., U.S.A.
เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก	Nuova 7 stir-plate	Sybron/Thermo-Lyne, U.S.A.
เครื่องอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์	Autoclave model HA-3D	Hirayama Manufacturing Corperation, Japan
ถังหมักขนาด 5 ลิตร พร้อมใบพัดเทอร์โบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8.5 เซนติเมตร และชุดควบคุมสภาวะ	5-Litre fermentor and controller-MD 300	L.E. Marubishi, Tokyo, Japan

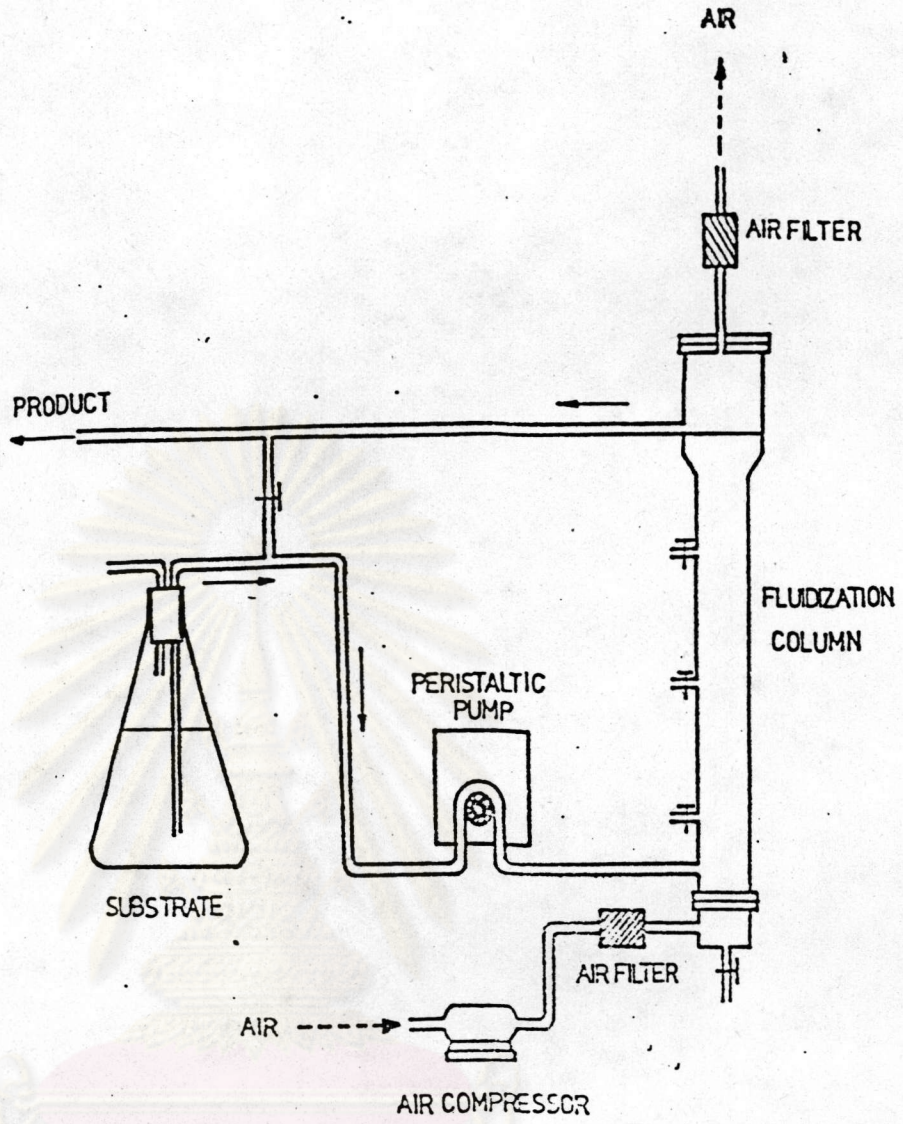
<u>หอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบด</u>

หอปฏิกิริยามีรูปทรงกระบอก ออกแบบโดย ศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ ทำด้วยพลาสติกโปร่งใส (plexiglass) แบ่งเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนบนเป็นส่วนที่ให้ผลิตภัณฑ์หลังจากการเกิดปฏิกิริยาแล้วไหลออกจากหอปฏิกิริยา มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9.9 เซนติเมตร สูง 15 เซนติเมตร และช่องสำหรับให้อากาศออก (Air outlet) ส่วนกลางเป็นส่วนที่เกิดปฏิกิริยา จะมีช่องสำหรับให้สับสเตรตผ่านเข้าทางด้านล่าง มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.2 เซนติเมตร สูง 60 เซนติเมตร และส่วนล่างถอดออกได้เป็นส่วนที่ให้อากาศผ่านเข้า พร้อมกับมีช่องสำหรับนำผลิตภัณฑ์ทั้งหมดออกจากหอปฏิกิริยา ระหว่างส่วนกลางกับส่วนล่างจะกั้นด้วยแผ่นตะแกรงโลหะทองแดงกลม เส้นผ่าศูนย์กลาง 5.2 เซนติเมตร มีลักษณะพรุน เพื่อให้อากาศผ่านได้ และคอยกันไม่ให้เม็ดเจลตกลงมา อากาศที่ผ่านหอปฏิกิริยาได้จากคอมเพรสเซอร์ (PUMA, 1/4HP) ผ่านเข้าเครื่องคุมอัตราการไหลของอากาศ (Rotameter Tokyo Keiso, 2.5-25 l/min) แล้วเข้าสู่หอปฏิกิริยาอากาศจะกระจายออกเป็นฟองเล็ก ๆ เมื่อผ่านตะแกรง

โลหะทองแดง อากาศที่ผ่านหอปฏิกิริยาแล้วก็จะออกทางส่วนบนสู่บรรยากาศภายนอก สับสเตรตจะถูกนำเข้าสู่หอปฏิกิริยาจากถังสำรองสับสเตรตทางตอนล่างของส่วนกลาง โดยเครื่องปั๊มแบบเพอร์สตอลติก (Peristaltic pump. SJ-1211 Perista) หลังจากเกิดปฏิกิริยาแล้ว ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะไหลออกทางส่วนบนสู่ภาชนะรองรับ นอกจากนี้ทางด้านของปฏิกิริยาส่วนกลางจะมีช่วงเปิด 3 ช่อง ใช้เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่ได้ ณ ความสูงต่าง ๆ ของหอปฏิกิริยา (ตามรูปที่ 4, 5)



รูปที่ 4 แสดงภาพถ่ายของหอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบด ที่บรรจุเซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น ในระหว่างกระบวนการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก



รูปที่ 5 แผนภาพแสดงส่วนประกอบของหอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบด ทิศทางการไหลของเพนนิซิลิน จี เป็นสับสเตรต, ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น และอากาศที่ไหลเข้าออก

——— เพนนิซิลิน จี, ผลิตภัณฑ์

------ อากาศ

2.2 วัสดุและเคมีภัณฑ์

2.2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

Escherichia coli ATCC 9637 สั่งซื้อจากบริษัท American type culture collection ประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งได้รับการรับรองว่าสามารถผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในระดับสูง (Waksman, 1950, 1951, 1963; U.S. Pat 3,905,868, 3,945,888; Burkholder และ Davis 1951; Breed และคณะ U.S. Pat. 3,239,427)

2.2.2 เคมีภัณฑ์

สารเคมี (ชื่อทางการค้า)	บริษัทผู้ผลิต
1. เพนนิซิลิน จี โซเดียม (คริสตาแพน) (sodium Penicillin G; Crystapen)	บริษัท แกล็กโซ-วิทยาศรม จำกัด สมุทรปราการ ประเทศไทย
2. กรดฟีนิลอะซิติก (Phenyl acetic aicd)	Fluka A.G. Buchs S.G. Switzerland
3. กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก (6-Aminopenicillanic acid)	" "
4. ฟีนิลอะซิทิลคลอไรด์ (Phenylacetyl chloride)	" "
5. กรด 1-อะมิโน-8-ไฮดรอกซี-แนพธาลีน-3, 6-ไดซัลโฟนิก (กรดเอช) (1-Amino-8-hydroxy-naphthalene-3, 6-disulfonic; H-acid)	" "
6. เฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน (Hexamethylenediamine)	" "
7. พารา-ไดเมทธิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ (Para-Dimethylamindsenzaldehyde)	Riedel-dehaenag Seelfe-hannover Germany

014446

ชื่อสารเคมี (ชื่อทางการค้า)	บริษัทผู้ผลิต
8. กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก (P-Aminobenzoic acid)	E. Merch, Germany
9. โซเดียมกลูตาเมต (Sodium Glutamate)	อายิโนะโมะโต๊ะ (ประเทศไทย)
10. ผลึกไอโอดีน (Iodine resublimed)	BDH chemicals Ltd., England
11. โพแตสเซียม ไอโอไดด์ (Potassium iodine)	" "
12. นอร์มอล-บิวทิลอะซิเตต (N-Butyl acetate)	" "
13. แป้ง (Hydrolysed-starch)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
14. สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (Glutal dehyde; 25% aqueous)	Sigma Chemcials Co., U.S.A.
15. วุ้นผงสำเร็จตรามด (ชนิดเข้มข้น)	เสรีวัฒน์และบุตร
16. แคปปา-คาร์ราจีแนน (Genugel ชนิด 57319 # 417800) (Kappa-carrageenan; Genugel type 57319 # 417800)	Denmark
17. Adecanol	Japan

สารเคมีที่ใช้และกล่าวมาทั้งหมดเป็นเกรดวิเคราะห์ ส่วนสารเคมีพื้นฐานที่มีใช้กันประจำในห้องปฏิบัติการ ก็เป็นเกรดวิเคราะห์เช่นกันทั้งหมด โดยสั่งซื้อจากบริษัท ซิกมา ประเทศสหรัฐอเมริกา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

2.3.1 อาหารสูตรอุดม

ใช้อาหารของ Luria-Bertani (Luria และคณะ, 1960) ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

Bacto-tryptone	10 กรัม
Yeast extract	5 กรัม
โซเดียมคลอไรด์	10 กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ ถ้าเป็นอาหารชนิดแข็งเติม Bacto-agar 15 กรัมต่อลิตร

2.3.2 อาหารสูตรปรับต่ำ

ใช้อาหารของ Self และคณะ (1969) ในสารละลายประกอบด้วย

โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	3 กรัม
ไดโพแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	7 กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	1 กรัม
โซเดียมกลูตาเมต	5 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.2 กรัม
เฟอริคลอไรด์	5 มิลลิกรัม
กรดฟีนิลอะซิติก	2 กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ ถ้าเป็นอาหารชนิดแข็งเติม Bacto-agar

2.4 การเตรียมสารละลาย

2.4.1 สารละลายกรดฟีนิลอะซิทิล-4-อะมิโนเบนโซอิก (PAAB) 2.5 มิลลิโมลาร์

ละลาย 25.5 มิลลิกรัม PAAB ใน 0.5 มิลลิลิตร 0.1 โมลาร์ของโซเดียมคาร์บอเนต แล้วเจือจางด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.08 โมลาร์ pH 7.8 ให้ปริมาณสุดท้ายเป็น 40 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ใช้ได้นานประมาณ 1 เดือน

2.4.2 สารละลายพารา-ไดเมทธิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ (PAAB) 0.5 เปอร์เซนต์

ละลาย 0.5 กรัม PAAB ใน 100 มิลลิลิตร เมทานอล เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ใช้ได้อย่างน้อย 1 ปี

2.4.3 สารละลายน้ำแห้ง-ไอโอดีน

ก. สารละลายน้ำแป้ง

ละลาย 2 กรัม แป้งใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0

ข. สารละลายไอโอดีน

ละลาย 53.25 กรัม โพแตสเซียมไอโอดีนใน 100 มิลลิลิตร 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 แล้วเติมไอโอดีน 2 กรัม ผสม 0.15 มิลลิลิตร สารละลายไอโอดีนใน 100 มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย ก 100 มิลลิลิตร กับสารละลาย ข 1 มิลลิลิตร และสารละลาย ค 1 มิลลิลิตร ได้เป็นสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์

2.5 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

แบ่งเป็น 2 แบบคือ

2.5.1 การเก็บระยะสั้นเป็นเดือน

เก็บบนจานเพาะเชื้ออาหารสูตรอุดมที่ 4 องศาเซลเซียส

2.5.2 การเก็บระยะยาว

ผสมเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวกับกลีเซอรอลที่ฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ความเข้มข้น 30 เปอร์เซนต์ในขวดจุกเกลียว พันให้แน่นด้วยแผ่นพาราฟิล์ม เก็บที่ -70 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาได้นานอย่างน้อย 1 ปี หรือนานกว่า

2.6 การเลี้ยงเชื้อและวัดการเจริญของเชื้อ

2.6.1 การเตรียมอินนอคคิวลัม

เขี่ยเชื้อหนึ่ง 1 โคโลนี ลงในอาหารสูตรอุดม 10 มิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 12-18 ชั่วโมง

2.6.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่ารูปชมพู่

เริ่มด้วยอินนอคคิวลัม 5 เปอร์เซนต์ ในอาหารที่ต้องการใส่ในขวดรูปชมพู่หรือขวดรูปชมพู่แบบมีแขนข้าง ในอัตราส่วนปริมาตรอาหารต่อปริมาตรขวด 1:5 บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150-200 รอบต่อนาที

2.6.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เตรียมหัวเชื้อตามหัวข้อ 2.6.2 โดยให้มีปริมาตรเป็น 10 เปอร์เซนต์ของปริมาตรของอาหารเหลวทั้งหมดในถังหมักขยาด 5 ลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150-200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24-30 ชั่วโมง ถ่ายหัวเชื้อทั้งหมดลงในอาหารสูตรปรับต้ำปริมาตร 2.5 ลิตร ซึ่งบรรจุในถังหมักขนาด 5 ลิตร ใช้อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ใช้น้ำมันซิลิโคนอะดีคานอลซึ่งทำให้เจือจางด้วยน้ำในอัตราส่วน 1:5 เป็นสารกำจัดฟองควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสตลอดการทดลอง

2.6.4 การติดตามการเจริญของเชื้อ

ใช้วิธีการวัดความขุ่น ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 แบบคือ

ก. การวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ Spectronic 20

ข. การวัดการกระจายแสงด้วยเครื่อง Klett-Summerson photoelectric colorimeter โดยใช้ blue filter ซึ่งระบุปริมาตรการเจริญเป็นหน่วยเคลต (Klett Unit)

2.7 การเตรียมเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส

นำเซลล์ Escherichia coli ATCC 9637 ที่เลี้ยงโดยใช้อาหารสูตรปรับต้ำในถังหมักขนาด 5 ลิตร มาปั่นแยกอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้เครื่อง Beckman centrifuge ที่ความเร็ว 6500xg เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์เครื่องด้วยโซเดียม-คลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ (นอร์มอลซาลีน) กระจายเซลล์ในสารละลายที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นเอนไซม์และแหล่งของเอนไซม์ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ในกรณีที่ต้องการสกัดแยกเอนไซม์ออกจากเซลล์จะทำเซลล์ให้แตกได้ 2 วิธีคือ

ก. เมื่อปริมาณเซลล์มาก (มากกว่า 1.5 กรัม) กระจายเซลล์ให้มีความเข้มข้น 30 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาณ) ในนอร์มอลซาลีน ทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง French Pressure Press ที่ความดัน psi

ข. เมื่อมีปริมาณเซลล์น้อย (น้อยกว่า 1.5 กรัม) กระจายเซลล์ในนอร์มอลซาลีนอย่างน้อย 10 มิลลิลิตร ทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องใช้เสียงความถี่สูง (sonicator) ซึ่งตั้งรอบการทำงานไว้ที่ 50 เปอร์เซนต์ probe ชนิด microtip # 5 เป็นเวลา 2 นาทีต่อครั้ง จำนวน 3 ครั้ง

นำสารละลายที่ได้หลังจากทำให้เซลล์แตกไปปั่นด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ Beckman ที่ความเร็ว 6500xg เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนของน้ำใสที่ได้คือสารละลายเอนไซม์ (crude enzyme) เก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

2.8 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส

ทำได้ 2 วิธี ขึ้นกับชนิดของสับสเตรตที่ใช้

2.8.1 ใช้กรดฟีนิลอะซิทิล-4-อะมิโนเบนโซอิก เป็นสับสเตรต

ดัดแปลงจากวิธีของ Szewczuk และคณะ (Szewczuk และคณะ, 1980) ใช้เซลล์หรือเอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตร รวมกับ PAAB 2.5 มิลลิโมลาร์ 0.4 มิลลิลิตร อินคิวเบต ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติม 0.5 มิลลิลิตร ของ 10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมไนไตร์ทที่ละลายในกรดอะซิตก 0.25 โมลาร์ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติม 1.5 มิลลิลิตรของ 0.01 เปอร์เซนต์ กรด 1-อะมิโน-8 ไฮดรอกซีแนพธาลีน-3, 6-ไดซัลโฟนิก (H-aicd) ละลายในโซเดียมคาร์บอเนต 0.66 โมลาร์ สารละลายสีชมพูที่ได้นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ชนิด Spectronic 20 เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก

กำหนดให้เอนไซม์ 1 หน่วย (unit) คือปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดกรดพาราอะมิโนเบนโซอิก 1 นาโนโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

2.8.2 ใช้เพนนิซิลิน จี เป็นสับสเตรต

ดัดแปลงมาจากวิธีของ Balasingham และคณะ (Balasingham และคณะ, 1972)

ใส่เซลล์หรือเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร ในสารละลายเพนนิซิลิน จี 14 มิลลิโมลาร์ ใน 0.05 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 4 มิลลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปิเปต 0.5 มิลลิลิตรของสารละลายนี้ลงในสารละลายผสมที่ประกอบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.05 โมลาร์ 1 มิลลิลิตร กับกรดอะซิติก 20 เปอร์เซนต์ 2 มิลลิลิตร และพารา-ไดเมธิลอะมิโนเบนซิลดีไฮด์ 0.5 เปอร์เซนต์ 0.5 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที สารละลายใสสีเหลืองอมเขียวที่ได้นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ชนิด Spectronic 20 เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก

กำหนดให้เอนไซม์ 1 หน่วย (unit) คือปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดกรด 6-อะมิโน เพนนิซิลานิก 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

ในกรณีที่ใช้กับเซลล์ตรึง แอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส วัดได้โดยใช้เซลล์ตรึงหนัก 1 กรัม เติมสารละลายเพนนิซิลิน จี 14 มิลลิโมลาร์ 4 มิลลิลิตร ลงไปแล้วเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ดูดส่วนน้ำใส 0.5 มิลลิลิตรลงในสารละลายปฏิกิริยาซึ่งทำให้เกิดสารละลายสีเหลืองอมเขียว และวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร เช่นเดียวกับข้างต้น

กำหนดให้เอนไซม์ 1 หน่วย (unit) คือ ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

2.9 การวัดปริมาณโปรตีน

ใช้วิธีของ Lowry และคณะ (Lowry และคณะ, 1951) ปริมาณโปรตีนสุทธิของเซลล์วัดได้โดยการไฮโดรไลซ์เซลล์ในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ด้วย 1 โมลาร์โซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาตรเท่ากับปริมาตรของเซลล์ที่ใช้ สารละลายที่ได้เรียก ไฮโดรไลเซต (hydrolysate) เติม 0.1 มิลลิลิตรของไฮโดรไลเซต ลงในสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ 3 มิลลิลิตร อินคิวเบตที่อุณหภูมิห้องเย็น เวลา 10 นาที เติมสารละลายฟีนอลรีนอลรีเจนต์ 0.3 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ-

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ห้องอีก 30 นาที วัดการดูดกลืนแสงของสารละลายสีน้ำเงินที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ชนิด Spectronic 20 เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย Serum Albumin

2.10 การตรึงเซลล์ E. coli ATCC 9637 โดยใช้สารผสมระหว่างแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น

2.10.1 การเตรียมสารละลายผสมของแคปปา-คาร์ราจีแนน-วุ้น

ละลายแคปปา-คาร์ราจีแนนกับวุ้นผงในนอร์มอลซาลีน โดยใช้เครื่องอบฆ่าเชื้อที่ความดัน 8.5 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร อุณหภูมิ 116 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

2.10.2 วิธีตรึงเซลล์ (Cell immobilization)

ดัดแปลงมาจากวิธีของ Nilsson และคณะ (Nilsson และคณะ, 1983) ผสมเซลล์ E. coli ATCC 9637 (เตรียมได้ตามวิธีข้อ 2.6 หลังจากเพาะเลี้ยงได้นาน 13-15 ชั่วโมง) กับสารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้นในบีกเกอร์ให้ได้เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)ตามต้องการ โดยให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 มิลลิลิตร นำไปกวนในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 45-50 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) ที่ความเร็วเหมาะสมนาน 1 นาที จนส่วนผสมเข้ากันดี ผสมนอร์มอล-บิวทิลอะซิเตต (n-butylacetate) ปริมาตรเท่ากัน (20 มิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แล้วกวนบนเครื่องกวนแท่งแม่เหล็กต่อไปด้วยความเร็วที่เหมาะสม (ได้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเม็ดเจลระหว่าง 1-3 มิลลิเมตร) จนกระทั่งมองเห็นการเกิดเม็ดอย่างสม่ำเสมอ (ใช้เวลาไม่เกิน 3 นาที) รีบเทนอร์มอล-บิวทิลอะซิเตตที่เย็น (0-4 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรเดิม (40 มิลลิลิตร) กวนต่อไปอีก 30 นาที จะได้เซลล์ตรึง (immobilized cells) ที่เป็นเม็ดเจล ซึ่งส่วนใหญ่มีลักษณะรูปทรงกลม นำไปกรองด้วยตะแกรงไนล่อน เลือกเอาเฉพาะเม็ดเจลที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 1 มิลลิเมตร แล้วล้างด้วย 0.3 โมลาร์ โพแตสเซียมคลอไรด์ที่เย็น (0-10 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร 3 ครั้ง เม็ดเซลล์ตรึงที่ได้เก็บแช่ไว้ใน 0.3 โมลาร์ โพแตสเซียมคลอไรด์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.11 การวัด strength ของเม็ดเจลเซลล์ตรึงโดยเครื่องมือที่ประดิษฐ์ขึ้น (ตามรูปที่ 6)

2.11.1 ลักษณะและส่วนประกอบของเครื่องมือ

มีลักษณะคล้ายตาชั่งแขนเดี่ยวแบบสปริง ประกอบด้วยโลหะ 2 ส่วนที่สำคัญ คือ จานชั่งซึ่งเชื่อมต่อกับแท่งทรงกระบอกตัน (เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.3 เซนติเมตร และความสูง 1.7 เซนติเมตร) ด้วยแกนโลหะ แท่งโลหะดังกล่าวสวมอยู่กับกระบอกแก้วกลวง (เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.8 เซนติเมตร และความสูง 10.0 เซนติเมตร) ขนาดโตกว่าแท่งโลหะเล็กน้อย ทำให้สามารถขยับแท่งโลหะขึ้นลงได้สะดวกโดยไม่มีความฝืด

2.11.2 วิธีวัดและเปรียบเทียบ strength ของเม็ดเจล

วางเม็ดเจลบนพื้นเรียบให้อยู่ที่ศูนย์กลางของแก้วทรงกระบอกกลวงซึ่งครอบอยู่ เลื่อนแท่งโลหะทรงกระบอกตันลงมาแตะที่เม็ดเจลใส่น้ำหนักบนจานชั่ง ทิ้งไว้นาน 30 วินาที แล้วยกเครื่องวัด strength ออก สังเกตการแตกปริของเม็ดเจล บันทึกน้ำหนักบนจานชั่ง

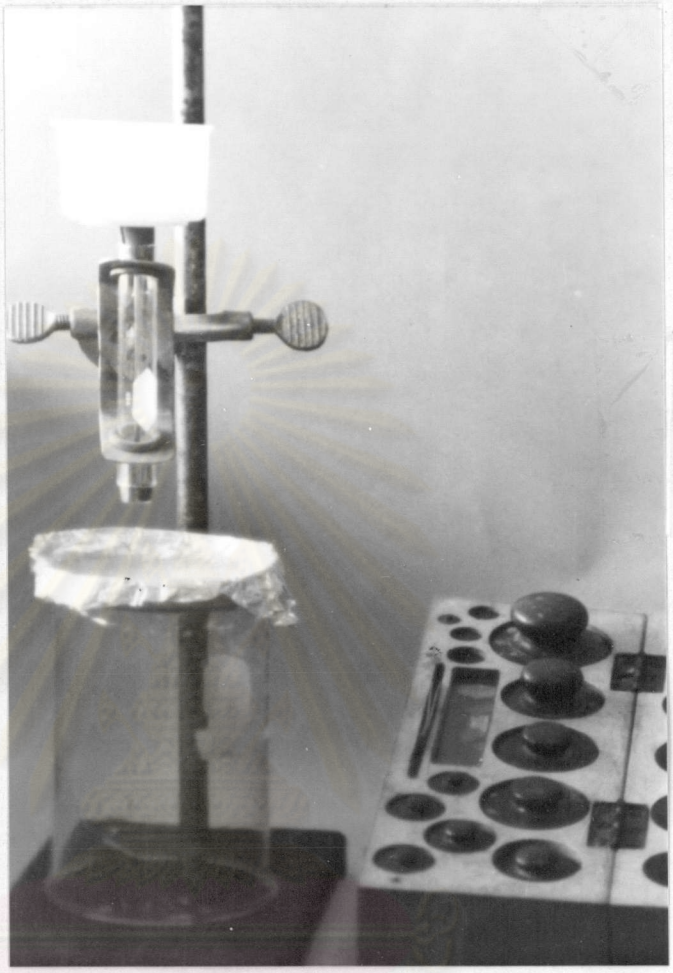
ในการทดลองนี้จะสุ่มตัวอย่างของเม็ดเจล ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร อย่างน้อย 10 เม็ด ต่อค่าน้ำหนักที่อ่านได้แต่ละค่า

2.11.3 วิธีรายงาน strength ของเม็ดเจล

รายงานเป็นน้ำหนักต่ำสุดที่กดทับทำให้เม็ดเจลแตกปริ โดยคำนวณค่าน้ำหนักที่เติมบนจานชั่งรวมกับน้ำหนักแท่งโลหะ ต่อพื้นที่หน้าตัดแท่งโลหะในหน่วยกิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

2.12 วิธีวัดอุณหภูมิแข็งตัว (gelling temperature) ของสารละลายเจล

เตรียมสารละลายเจลความเข้มข้นต่าง ๆ ให้ปริมาณทั้งหมดของสารละลายเท่ากับ 20 มิลลิลิตร ทดสอบหาอุณหภูมิที่สารละลายเจล เริ่มแข็งตัวโดยการกวนด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็กชนิด Nuova-7 stir plate ใช้แท่งแม่เหล็กขนาด 4 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.9 เซนติเมตร ตั้งความเร็วที่เลข 3 สังเกตอุณหภูมิบนเทอร์โมมิเตอร์ที่ลดลงจนกระทั่งแท่งแม่เหล็กไม่สามารถหมุนต่อไปอีก อุณหภูมิที่วัดได้เป็นอุณหภูมิแข็งตัวของเจล



รูปที่ 6 เครื่องมือวัด strength ของเม็ดเจลเซลล์ตรึง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.13 วิธีการศึกษาผลกระทบของกลูตารัลดีไฮด์ต่อ strength และแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ในเม็ดเซลล์ตรึง

เตรียมเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น ตามวิธีทดลองข้อ 2.10.2 โดยใช้ความเข้มข้นของเซลล์ E. coli ATCC 9637 เท่ากับ 10 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตรึงด้วย 4.0 เปอร์เซนต์ (2.5 : 1.5 เปอร์เซนต์น้ำหนักต่อปริมาตร) ของสารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น ล้างเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้นด้วยน้ำกลั่น แล้วใส่ 10 กรัมของเม็ดเซลล์ตรึงใน 100 มิลลิลิตรกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-0.3 โมลาร์ เขย่าด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วล้างเม็ดเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น ด้วยน้ำกลั่น ทำการล้าง 3 ครั้ง ๆ ละ 1 ลิตร วัดแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส และ strength ของเม็ดเจลเซลล์ตรึง ตามวิธีทดลองข้อ 2.8 และ 2.11 ตามลำดับ

2.14 วิธีการศึกษาผลกระทบของกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน ต่อ strength และแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลสในเม็ดเซลล์ตรึง

ใส่ 10 กรัมของเม็ดเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น ตามหัวข้อที่ 2.13 ใน 100 มิลลิลิตร กลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เขย่าด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที แล้วเติมเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีนให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลาย ตั้งแต่ 0-0.3 โมลาร์ เขย่าต่อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้างเม็ดเซลล์ตรึงตามหัวข้อ 2.13 นำเม็ดเซลล์ตรึงไปวัดแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส และ strength ของเม็ดเจลเซลล์ตรึงตามวิธีข้อ 2.8 และ 2.11 ตามลำดับ

2.15 การทดลองผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก แบบต่อเนื่องในหอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบด

ตรึงเซลล์ E. coli ATCC 9637 เข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งได้จากการเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม โดยวิธีการทดลอข้อ 2.5.3 นาน 15 ชั่วโมง ด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนนกับวุ้นในอัตราส่วน 2.5 : 1.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามรายละเอียดในวิธีทดลองข้อ 2.10.2 แล้วเสริมด้วย 0.1 โมลาร์กลูตารัลดีไฮด์กับ 0.1 โมลาร์เอกซาเมทธิลลีนไดอามีน ตามวิธีทดลองข้อ 2.14 นำเซลล์ตรึงที่ได้มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกแบบต่อเนื่องในหอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบดที่สร้างขึ้นเอง

2.15.1 ผลกระทบของปริมาณเม็ดเจลเซลล์ตรึงต่อการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก แบบต่อเนื่องในหอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบด

ทำได้โดยการแปรค่าน้ำหนักของเม็ดเซลล์ตรึงจากการทดลองข้อ 2.14.2 ตั้งแต่ 100, 135, 175 และ 250 กรัม ใส่ลงในหอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เซชัน ใช้ความเข้มข้นของเพนนิซิลิน จี ซึ่งเป็นสับสเตรตเท่ากับ 0.625 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) อัตราการป้อนสับสเตรตเข้าสู่หอปฏิกิริยาเท่ากับ 120 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการป้อนอากาศประมาณ 3-4 ลิตรต่อนาที ปล่อยให้ทำปฏิกิริยากันที่อุณหภูมิห้อง วัดปริมาณของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกที่เกิดขึ้นในหอปฏิกิริยาโดยวิธีการทดลองข้อ 2.8 ที่เวลาต่าง ๆ จนกว่าจะเข้าสู่สภาวะที่คงที่ (steady state)

2.15.2 ผลกระทบของความเข้มข้นของเพนนิซิลิน จี ต่อการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกแบบต่อเนื่องในหอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบด

โดยการแปรค่าความเข้มข้นของเพนนิซิลิน จี ตั้งแต่ 0.15, 0.31, 0.47, 0.625 และ 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ผ่านเข้าสู่หอปฏิกิริยาที่มีเม็ดเซลล์ตรึงอยู่เท่ากับ 135 กรัม อัตราป้อนเพนนิซิลิน จี เข้าสู่หอปฏิกิริยาเท่ากับ 120 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการป้อนอากาศประมาณ 3-4 ลิตรต่อนาที ให้ทำปฏิกิริยากันที่อุณหภูมิห้อง วัดปริมาณของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกที่เกิดขึ้นในหอปฏิกิริยา โดยวิธีการทดลองข้อ 2.8 ที่เวลาต่าง ๆ จนกว่าจะเข้าสู่สภาวะคงที่ (steady state)

2.15.3 ผลกระทบของอัตราการป้อนเพนนิซิลิน จี เข้าสู่หอปฏิกิริยาต่อการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก แบบต่อเนื่องในหอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบด

ใช้ปริมาณเม็ดเซลล์ตรึงในหอปฏิกิริยาเท่ากับ 135 กรัม ความเข้มข้นของเพนนิซิลิน จี เท่ากับ 0.47 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และอัตราการป้อนอากาศประมาณ 3-4 ลิตรต่อนาที ให้ทำปฏิกิริยากันที่อุณหภูมิห้อง โดยแปรค่าอัตราการไหลของเพนนิซิลิน จี เข้าสู่หอปฏิกิริยา ตั้งแต่ 40, 80, 120, 160 และ 200 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง วัดปริมาณการเกิดของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกในหอปฏิกิริยา โดยวิธีการทดลองข้อ 2.8 ที่เวลาต่าง ๆ จนกว่าจะเข้าสู่สภาวะคงที่

2.15.4 ผลกระทบของอัตราการป้อนอากาศเข้าสู่หอปฏิกิริยาต่อการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกแบบต่อเนื่องในหอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบด

ใช้ปริมาณเม็ดเซลล์ตรึงในหอปฏิกิริยาเท่ากับ 153 กรัม ความเข้มข้นของเพนนิซิลิน จี เท่ากับ 0.47 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และอัตราการป้อนเพนนิซิลิน จี เข้าสู่หอปฏิกิริยาเท่ากับ 80 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ โดยแปรค่าอัตราการไหลของอากาศเข้าสู่หอปฏิกิริยาตั้งแต่ 2.5-3, 3-4 ลิตรต่อนาที วัดปริมาณการเกิดของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกในหอปฏิกิริยา โดยวิธีการทดลองข้อ 2.8 ที่เวลาต่าง ๆ จนกว่าเข้าสู่สภาวะคงที่

2.16 การศึกษาความเสถียรของเซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น โดยใช้เพนนิซิลิน จี เป็นสับสเตรตเมื่อทำการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกแบบต่อเนื่องในหอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบด

ตรึงเซลล์ E. coli ATCC 9637 เข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งได้จากการเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม โดยวิธีการทดลองข้อ 2.6.3 นาน 15 ชั่วโมง ด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น ในอัตราส่วน 2.5 1.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามรายละเอียดวิธีทดลองข้อ 2.10.2 แล้วเสริมด้วย 0.1 โมลาร์กลูตารัลดีไฮด์กับ 0.1 โมลาร์เฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน ตามวิธีการทดลองข้อ 2.14 นำเซลล์ตรึงที่ได้มาศึกษาความเสถียรของการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกแบบต่อเนื่องในหอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบด โดยใช้ปริมาณเม็ดเซลล์ตรึงเท่ากับ 135 กรัม ความเข้มข้นของเพนนิซิลิน จี เท่ากับ 0.47 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) อัตราการป้อนเพนนิซิลิน จี เข้าสู่หอปฏิกิริยาเท่ากับ 80 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการป้อนอากาศประมาณ 2-2.5 ลิตรต่อนาที ให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง วัดปริมาณของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกที่เกิดขึ้นในหอปฏิกิริยา โดยวิธีการทดลองข้อ 2.8 ที่เวลาต่าง ๆ จนกว่าการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกจะลดลง