บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ วิธีและขั้นตอนดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น G-10 บริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc., U.S.A และ รุ่น innova 2100 บริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc., U.S.A

2. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 401 บริษัท Milton Roy, U.S.A. และ รุ่น Spectronic 21 บริษัท Bausch & Lomb, U.S.A

3. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น Cyberscan 2000 บริษัท Eutech Cybernetics , Singapore

4. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท Tomy Seico Co,Ltd., Japan และ รุ่น HA-3D บริษัท Hirayama Manufacturing Corperation , Japan

5. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ Laminar flow รุ่น BV-124 บริษัท ISSCO , U.S.A

6. เครื่องผสมสาร (Vortex-Genie 2) รุ่น G560E บริษัท Scientific Industries Inc.,U.S.A

7. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น Temppet บริษัท T-80 Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan และ รุ่น W 760 Memmert , Germany

8. เครื่องชั่ง รุ่น PB3002 และ รุ่น L2000P บริษัท Sartorius , U.S.A

9. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น KS-3000P บริษัท Kubota, Japan

10. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (Bench-top centrifuge) รุ่น H-103N บริษัท Kokusan , Japan

11. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดทำความเย็น (Refrigerate centrifuge) รุ่น 1920 บริษัท Kubota , Japan

12. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Controlled environment incubator shaker) รุ่น G-27 บริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc., U.S.A

13. เครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) รุ่น 502P-2 บริษัท PMC , U.S.A

14. หลอดแสงอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet lamp) ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร G30T8 30W บริษัท Sankyo Denki , Japan

เคมีภัณฑ์

1. ไฮยาลูโรเนตจากแบคทีเรียเกรดอุตสาหกรรม (Bacterial Hyaluronate) บริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A

2. เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (Hyaluronidase) บริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A

3. กลูโคส (Glucose) เกรดสำหรับการวิเคราะห์ บริษัท Merck, Germany

4. ซูโครส (Sucrose) เกรดอุตสาหกรรมอาหาร บริษัท มิตรผล , ประเทศไทย

5. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) บริษัท Merck, Germany

6. โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท Merck, Germany

7. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Carlo Erba Rergenti, Italy

8. กรดเปอร์คลอริก ($HClO_4$) บริษัท Ajax Chemicals, Australia

9. พารา-ไดเมทิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ ($C_9H_{11}NO$) บริษัท Merck, Germany

10. กรดน้ำส้ม (CH_3COOH) บริษัท Merck, Germany

11. กรดเกลือ (HCl) บริษัท J.T. Baker, U.S.A

12. กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) บริษัท Merck, Germany

13. แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) บริษัท Carlo Erba Rergenti, Italy

14. สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Deutsche Hefewerke GmbH & Co oHG, Germany

15. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท Carlo Erba Rergenti, Italy

16. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท Merck, Germany

17. ทริส-(ไฮดรอกซีเมทิล)-อะมิโนมีเทน ($C_7H_{11}NO_3$) บริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A

18. ซีทิวไพริดิเนียมคลอไรด์ (Cetylpyridinium chloride) บริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A

19. กรดมาลิอิก ($C_4H_4O_4$) บริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A

20. โซเดียมเททระบอเรท ($Na_2B_4O_7.10H_2O$) บริษัท May & Baker Ltd.,England

21. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck , Germany

22. คาร์บาโซล (Carbazole , C_2H_9N) บริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A

23. เอธานอล (Ethanol) กรมสรรพสามิต, ประเทศไทย

24. เอน-เมทิล-เอน-ไนโตร-เอน-ไนโตรโซกัวนิดีน (N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine, $C_2H_5N_5O_3$) บริษัท Nacalai Tesque Inc., Japan

เคมีภัณฑ์ชนิดอื่นๆ เป็นเคมีภัณฑ์เกรดวิเคราะห์ (analytical reagent grade) จากบริษัท ต่างๆ ซึ่งนำมาใช้โดยไม่ต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์อีก

วิธีดำเนินการทดลอง

1. <u>จุลินทรีย์ การเก็บ และการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง</u>

1.1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรีย *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 ได้จาก American Type Culture Collection, Rockville, Maryland , U.S.A

1.2. อาหารสำหรับการเลี้ยงเชื้อตั้งต้น

เลี้ยง *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 ที่ได้จาก ATCC โดยใช้อาหาร Brain heart infusion (BHI) และ อาหาร Tryptic soy broth (TSB)

1.3. การเก็บรักษาแบคทีเรีย

ขีดแบคทีเรีย ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (slant agar) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนเชื้อเจริญเต็มที่แล้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

1.4. การเลี้ยงแบคทีเรียในขวดแก้วรูปกรวย

1.4.1 การเตรียมเชื้อตั้งต้น

ปลูกเชื้อจากข้อ 1.3 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB ปริมาตร 50 มิลลิลิตรซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ชั่วโมงซึ่งเชื้อจะเจริญอยู่ในระยะกึ่งกลางทวีคูณ (mid-log phase) โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรเป็น 0.260 แล้วใช้เป็นกล้าเชื้อในการทดลองต่อไป

1.4.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคในระดับขวดเขย่า

ปลูกเชื้อตั้งต้นจากข้อ 1.4.1 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตสูตรปรับปรุงจาก Nimrod (1986) (ภาคผนวก ก) ปริมาณ 20 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) ค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 ตามรายงานของ จุรารัก. ศรีวงษ์ (2540) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 28-32 องศาเซลเซียส) พร้อมการให้อากาศโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และเก็บตัวอย่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ

2. วิธีการวิเคราะห์

2.1 การวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ (Growth)

โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปิเปตต์น้ำหมักปริมาตร 20 มิลลิลิตรที่ได้จากข้อ 1.4.2 นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง เซลล์ที่ได้ใส่ลงกระทงอะลูมินั่มฟอยล์ (aluminium foil) นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จนน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักแห้ง แล้วคำนวณหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ ส่วนสารละลายที่ผ่านการปั่นแยกเซลล์ นำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขยาลูโรนิค

2.2 การหาค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ

โดยวัดความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น 2000 บริษัท Cyberbean

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (Reducing Sugar) โดยวิธีของ Bernfeld (1955)

ทำโดยการเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1 มิลลิลิตร ลงในสารตัวอย่างที่เจือจางจนมีความเข้มข้นเหมาะสมปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีอยู่ในสารตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

สร้างกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลายกลูโคสมาตรฐานเข้มข้น0 - 1.0มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร ซึ่งเจือจางจากสารละลายสต็อคที่มีความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์ดังข้างต้น แล้วเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total Sugar) โดยวิธีของ Hanson และ Phillips (1981)

ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางให้มีความเข้มข้นเหมาะสม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายฟีนอลเข้มข้น 5 เปอร์เซนต์ จำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที และแช่ในอ่างน้ำเย็น 5 นาที นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตรมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 488 นาโนเมตร สำหรับชุดเปรียบเทียบใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง คำนวณหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่มีอยู่ในสารตัวอย่าง โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

สร้างกราฟมาตรฐาน ทำโดยใช้สารละลายซูโครสมาตรฐานเข้มข้น 0 - 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเจือจางจากสารละลายสต็อคที่มีความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์ดังข้างต้น แล้วเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของซูโครสกับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้

2.5 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคโดยวิธีคาร์บาโซลโดยวิธีของ Bitter และ Muir (1962)

2.5.1 การตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิค

นำสารละลายที่ได้จากการปั่นแยกเซลล์ตามขั้นตอนที่ 2.1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมเอธานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม นำไปปั่นแยกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิคที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนสารละลายทิ้ง

2.5.2 การละลายกรดไฮยาลูโรนิค

นำส่วนตะกอนที่ได้จากข้อ 2.5.1 มาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม

2.5.3 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคโดยวิธีคาร์บาโซล

นำสารละลายตัวอย่างจากข้อ 2.5.2 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายบอเรท-ซัลฟูริก (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที นำไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง เมื่อสารละลายเย็น จึงเติมสารละลายคาร์บาโซล (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นทำให้เย็นถึงที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร ชุดเปรียบเทียบใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง คำนวณความเข้มข้นของกรดไฮยาลูโรนิคจากกราฟมาตรฐานของกรดไฮยาลูโรนิคที่ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค)

2.5.4 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคโดยเอนไซม์ โดยวิธีของ Greiling (1963)

นำสารละลายที่ได้หลังจากการปั่นแยกเซลล์ตามข้อ 2.1 มาใช้เป็นสารละลายตัวอย่างโดยมีขั้นตอนดังนี้

2.5.4.1 เตรียมของผสมจำนวน 4 หลอดต่อสารตัวอย่าง 1 ชนิด ให้มีส่วนประกอบดังนี้

ของผสม (หลอดที่)	ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.4 (ภาคผนวก ข) (มล.)	โซเดียมคลอไรด์ (0.15 M) (มล.)	โซเดียมไฮยาลูโรเนต มาตรฐาน ความเข้มข้น 0.2 mg/ml. (มล.)	สารตัวอย่าง (มล.)
1	2.0	0.5	-	0.5
2	1.5	0.5	0.5	0.5
3	1.0	0.5	1.0	0.5
4	2.0	0.5	-	0.5

2.5.4.2 นำของผสมทั้ง 4 หลอด ทำให้ร้อนที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น

2.5.4.3 เติมเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่ 1 ถึง 3 ยกเว้นหลอดที่ 4 ที่เป็น Blank เติม 0.1 มิลลิลิตร โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.15 โมลาร์ แล้วผสมให้เข้ากัน

2.5.4.4 นำมาบ่มให้เกิดปฏิกิริยาในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

2.5.4.5 เติมกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 20%(w/v) 0.5 มิลลิลิตร ทั้ง 4 หลอด ผสมให้เข้ากันเป็นอย่างดี

2.5.4.6 ปั่นแยกตะกอนที่ 5,000 g 20 นาที

2.5.4.7 นำส่วนน้ำใสในแต่ละหลอดจำนวน 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารละลายโพแทสเซียมเททระ-บอเรต (Potassium tetraborate solution) ความเข้มข้น 0.8 โมลาร์ ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร

2.5.4.8 นำมาต้มน้ำเดือด 3 นาที ทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำแข็ง (ice bath)

2.5.4.9 นำส่วนน้ำใสในแต่ละหลอด 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายพารา-ไดเมทิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ (para-dimethylaminobenzaldehyde solution) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร

2.5.4.10 นำมาบ่มที่อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) 37 องศาเซลเซียส 20 นาที

2.5.4.11 นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 585 นาโนเมตร (OD_{585})

2.5.4.12 นำค่าการดูดกลืนแสงของของผสมทั้ง 4 หลอด มาแทนค่าในสมการที่ 1 เพื่อหาค่าการดูดกลืนแสงของกรดไฮยาลูโรนิคที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม และมาแทนค่าในสมการที่ 2 เพื่อหาค่าความเข้มข้นของกรดไฮยาลูโรนิคโดย

$$E_{100\ \mu g} = \frac{(E2-E1)+(E3-E2)}{2} \qquad (1)$$

โดยที่ $E_{100\ \mu g}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของกรดไฮยาลูโรนิคที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม

E1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของของผสมหลอดที่ 1

E2 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของของผสมหลอดที่ 2

E3 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของของผสมหลอดที่ 3

$$\text{ซึ่ง } \mu g \text{ of hyaluronate/ml. of Sample} = \frac{E1 \times 100 \times 2}{E_{100\ \mu g}} \qquad (2)$$

3. <u>การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์</u>

3.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (UV)

3.1.1 เลี้ยงเชื้อ *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 ตามวิธีข้อ 1.4.1 เมื่อเชื้อเจริญอยู่ในช่วงกึ่งกลางทวีคูณ ที่เวลา 7 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้มาปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นทำให้เซลล์แขวนลอยอยู่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 ปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้อยู่ในช่วง 10^6-10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3.1.2 ปิเปตต์เซลล์แขวนลอย 10 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีแท่งกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) กวนตลอด

3.1.3 นำเซลล์แขวนลอยไปฉายแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร กำลังงาน 30 วัตต์ จำนวน 1 หลอด ระยะห่างจากแสง 20 เซนติเมตร โดยมีการกวนตลอดเวลาที่ระยะเวลาให้การฉายแสงต่าง ๆ กัน

3.1.4 กระจาย 0.1 มิลลิลิตร ของเซลล์แขวนลอยที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA (ภาคผนวก ก ข้อ 3) ที่อยู่ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง

3.1.5 นับจำนวนโคโลนีที่เจริญ (โคโลนีที่รอด) คำนวนร้อยละการรอด

3.1.6 นำโคโลนีที่เจริญไปทำการคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ตามวิธีในข้อ 4

3.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG

3.2.1 เลี้ยงเชื้อ *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 ตามวิธีข้อ 1.4.1 เมื่อเชื้อเจริญอยู่ในช่วงกึ่งกลางทวีคูณ ที่เวลา 7 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้มาปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์ด้วย จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นทำให้เซลล์แขวนลอยอยู่ในทริส-มาลิอิก บัฟเฟอร์ ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.0 ปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้อยู่ในช่วง 10^6-10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3.2.2 นำสารละลาย NTG ใน ทริส-มาลิอิก บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.0 เติมลงในหลอดที่มีเซลล์แขวนลอยอยู่ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของ NTG เท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0-60 นาทีเก็บตัวอย่างเซลล์ทุกๆ 10 นาที

3.2.3 นำเซลล์ที่ได้มาปั่นด้วยความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และค่าความเป็นกรดด่าง เท่ากับ 7.0

3.2.4 กระจาย 0.1 มิลลิลิตร ของเซลล์แขวนลอยที่ได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA (ภาคผนวก ก ข้อ 3) ที่อยู่ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง

3.2.5 นับจำนวนโคโลนีที่เจริญ (โคโลนีที่รอด) คำนวนร้อยละการรอด

3.2.5 นำโคโลนีที่เจริญไปทำการคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ตามวิธีในข้อ 4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การคัดเลือกเชื้อที่ได้จากการกลายพันธุ์

4.1 การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ (primary screening)

คัดเลือกเชื้อจากจานเพาะเลี้ยงเชื้อในข้อ 3.1.4 และ 3.2.4 ที่มีค่าร้อยละการรอดในช่วง 0-0.1 เปอร์เซ็นต์สำหรับการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต และ 0-50 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการกลายพันธุด้วยสาร NTG โดยคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะใหญ่และมีเมือกมาก

4.2 การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ (seconary screening)

4.2.1 นำเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB (ภาคผนวก ก ข้อ 1.2) เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อตั้งต้น บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ชั่วโมง

4.2.2 ปิเปตต์หัวเชื้อตั้งต้น 20% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคในหลอดทดลองปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18-36 ชั่วโมง

4.2.3 นำน้ำหมักที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคโดยวิธีคาร์บาโซล ตามข้อ 2.5.3 , การเจริญของเซลล์ และค่าความเป็นกรดด่าง

4.2.4 คัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ที่ให้ปริมาณการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น

5. การทดสอบความเสถียรในการสร้างกรดไฮยาลูโรนิคของเชื้อสายพันธุ์กลาย

นำเชื้อสายพันธุ์กลายที่ได้จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคตามข้อ 1.4.1 และ 1.4.2 วิเคราะห์การปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคด้วยวิธีคาร์บาโซลและวิธีเอนไซม์ตามข้อ 2.4.3 และ 2.4.4 โดยใช้สายพันธุ์กลายที่ผ่านการถ่ายเชื้อมาแล้ว 5 ครั้ง คัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ยังสามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคอย่างสม่ำเสมอ และมีปริมาณมากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น

6. การศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนหลักบางชนิดในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของ *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์กลาย

จากรายงานของผู้วิจัยกลุ่มต่างๆ พบว่าน้ำตาลหลายชนิดสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้ ดังนั้นจึงศึกษาแหล่งของน้ำตาลที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค โดยเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* สายพันธุ์กลาย ใน

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เหมาะสมที่มีการแปรผันแหล่งของน้ำตาลเป็นกลูโคส ซูโครส ฟรุกโตส มอลโตส และแป้งที่ย่อยสลาย ที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) ความเร็วรอบของการเขย่าเป็น 200 รอบต่อนาที อายุหัวเชื้อ 7 ชั่วโมง ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 20 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) แล้วติดตามวิเคราะห์การเจริญ ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ และปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคที่เวลาการเลี้ยงเชื้อต่าง ๆ โดยวิธีเอนไซม์ ตามข้อ 2.5.4

7. <u>ศึกษาปริมาณซูโครสที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ เพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค</u>

เมื่อได้ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 6 แล้ว ทำการผันแปรปริมาณซูโครสเริ่มต้นในอาหารสำหรับการผลิตกรดเป็น 1 - 100 กรัมต่อลิตร

โดยเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* สายพันธุ์กลาย ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เหมาะสมที่มีการแปรผันปริมาณของแหล่งคาร์บอน 1-100 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) ความเร็วรอบของการเขย่าเป็น 200 รอบต่อนาที อายุหัวเชื้อ 7 ชั่วโมง ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ แล้วติดตามวิเคราะห์การเจริญ ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ และปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคที่เวลาการเลี้ยงเชื้อต่างๆ โดยวิธีเอนไซม์ ตามข้อ 2.5.4

8. <u>การศึกษาปัจจัยทางกายภาพบางประการต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย</u>

8.1 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

โดยเลี้ยง *S. zooepidemicus* สายพันธุ์กลายในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่แปรผันความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.0 - 7.5 ภายใต้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมดังเช่นในข้อ 6 เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ นำมาวิเคราะห์การเจริญ ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณน้ำตาล และความเข้มข้นของโซเดียมไฮยาลูโรเนต

8.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

เมื่อทราบภาวะการเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* สายพันธุ์กลาย ที่เหมาะสมจากข้อ 8.1 ทำการแปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อเป็น 25 องศาเซลเซียส 30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิห้อง (28 – 32 องศาเซลเซียส) และ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมดังข้อ 8.1 วิเคราะห์ดูผลการเจริญ ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณน้ำตาล และความเข้มข้นของโซเดียมไฮยาลูโรเนต

8.3 ความเร็วรอบที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

เลี้ยง *S. zooepidemicus* สายพันธุ์กลายในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เหมาะสม หลังจากได้ภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 8.2 ทำการแปรผันความเร็วรอบของการเขย่าเป็น 200 ,250 และ 300 รอบต่อนาที ภายใต้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมดังข้อ 8.2 ติดตามการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค เวลาการเลี้ยงเชื้อต่าง ๆ โดยวิธีเอนไซม์ ตามข้อ 2.5.4

8.4 ปริมาณไลโซไซม์ที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

เลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ดั้งต้นและเชื้อสายพันธุ์กลาย ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคที่ค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 ที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) ความเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที สำหรับเชื้อสายพันธุ์ดั้งต้นและในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต ค่าความเป็นกรดด่าง 7.5 ที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) ความเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที สำหรับเชื้อสายพันธุ์กลาย โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น 20 เปอร์เซ็นต์ อายุหัวเชื้อตั้งต้น 7 ชั่วโมง เลี้ยงเชื้อจนถึงช่วงการเจริญที่วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรได้ 0.6 จึงทำการเติมไลโซไซม์ที่ความเข้มข้น 0 - 50,000 ยูนิต เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ วิเคราะห์ดูผลการเจริญและปริมาณการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคโดยวิธีเอนไซม์ ตามข้อ 2.5.4

8.5 ปริมาณทวีน 80 ที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

เลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ดั้งต้นและเชื้อสายพันธุ์กลาย ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคที่ค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 ที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) ความเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที สำหรับเชื้อสายพันธุ์ดั้งต้นและในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต ค่าความเป็นกรดด่าง 7.5 ที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) ความเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที สำหรับเชื้อสายพันธุ์กลาย โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น 20 เปอร์เซ็นต์ อายุหัวเชื้อตั้งต้น 7 ชั่วโมง เลี้ยงเชื้อจนถึงช่วงการเจริญที่วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรได้ 0.6 จึงทำการเติมทวีน 80 ที่ความเข้มข้น 0 – 2 เปอร์เซ็นต์ เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ วิเคราะห์ดูผลการเจริญและปริมาณการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคโดยวิธีเอนไซม์ ตามข้อ 2.5.4