หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 ครุภัณฑ์

ชนิดเครื่องมือ	แบบ	บริษัทผู้ผลิต
เครื่องสเปคโตร-โฟโตมิเตอร์	1. Shimadzu UV-visible UV-240 2. Spectronic 20 3. Klett-Summerson photoelectric colorimeter	Shimadzu, Japan Bausch and Lomb,U.S.A. Arthur H. Thomas,U.S.A.
เครื่องเซนตริฟิวจ์	1. Beckman centrifuge J-21 C 2. Top bench centrifuge Minor35	Beckman Instrument Inc., U.S.A. MSE Ltd. England
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ	1. Gyrotary water bath Shaker modle G-76 2. Shaker bath model 2563	New Brunswick Scientific Edison, N.J., U.S.A. Forma Scientific Marietta,Ohio,U.S.A.
เครื่องควบคุมอุณหภูมิ	Incubator	Laboratory Electrical Engineering Co.,England
เครื่องวัดpH	PHM 83 Autocal pH meter	Radiometer Copenhagen, Denmark
เครื่องทำลายเซล	1. French pressure press 2. Sonicator model W 375	American Instrument,U.S.A. 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

2.2 วัสดุและเคมีภัณฑ์

2.2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

Escherichia coli ATCC 9637

Escherichia coli ATCC 11105

Serratia rubidaea ATCC 181

จุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธ์ สั่งซื้อจากบริษัท American type culture collection ประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งได้รับการรับรองว่าสามารถผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอ-ซิเลส ในระดับสูง (Waksman, U.S. Pat, 3,905,868, 3,945,888; Burkholder และ Davis, 1951; Breed และKral;U.S. Pat. 3,239, 427)

Klebsiella pneumoniae M5al

2.2.2 เคมีภัณฑ์

สารเคมี (ชื่อทางการค้า)	บริษัทผู้ผลิต
1. เพนนิซิลิน จี โซเดียม (คริสตาแพน) (Sodium Penicillin G;Crystapen)	บริษัทแกล็กโซ-วิทยาศรม จำกัด สมุทรปราการ ประเทศไทย
2. กรดฟีนิลอะซีติก (Phenylacetic acid)	Fluka A.G., Buchs S.G. Switzerland
3. ฟีนิลอะซีทิลคลอไรด์ (Phenylacetyl chloride)	Fluka A.G., Buchs S.G. Switzerland
4. กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก (6-Aminopenicillanic acid)	Fluka A.G., Buchs S.G. Switzerland
5. พารา-ไดเมทธิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ (P-Dimethylaminobenzaldehyde)	Riedel-dehaënag Seelfe-hannover,Germany
6. กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก (P-Aminobenzoic acid)	E.Merck, Germany
7. กรด 1-อะมิโน-8-ไฮดรอกซี-แนพธาลีน-3, 6-ไดซัลโฟนิก (กรดเอช)	Fluka A.G. Buchs S.G. Switzerland

(1-Amino-8-hydroxy-naphthalene-3,
6-disulfonic acid; H-acid)

8. โซเดียมกลูตาเมต (Sodium Glutamate) — อายิโนะโมะโต๊ะ (ประเทศไทย)

9. ผลึกไอโอดีน (Iodine resublimed) — BDH Chemicals Ltd., England.

10. โพแตสเซียม ไอโอไดด์ (Potassium iodide) — BDH Chemicals Ltd., England

11. แป้ง (Hydrolysed-starch) — Sigma Chemicals Co., U.S.A.

12. แคปปา-คาร์ราจีแนน (Genugel ชนิด 57319 # 417800) (Kappa-carraqeenan; Genugel type 57319 # 417800) — Kobenhavns pektinfabrik, Denmark

13. วุ้นผงสำเร็จตรามด (ชนิดเข้มข้น) — เสรีวัฒน์และบุตร

14. นอร์มอล-บิวทิลอะซีเตต (N-Butylacetate) — BDH Chemicals Ltd., England

15. สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde; 25% aqueous) — Sigma Chemicals Co., U.S.A.

16. เฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน (Hexamethylenediamine) — Sigma Chemicals Co., U.S.A.

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

2.3.1 อาหารสูตรอุดม

ใช้สูตรอาหารของ Luria-Bertani (Luria และคณะ, 1960) ในสารละลาย 1 ลิตรประกอบด้วย

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

ใช้สูตรอาหารของ Self และคณะ (Self และคณะ, 1969) ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	3	กรัม
ไดโพแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	7	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	1	กรัม
โซเดียมกลูตาเมต	5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.2	กรัม
เฟอริกคลอไรด์	5	มิลลิกรัม
กรดฟีนิลอะซีติก	2	กรัม

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

2.4 การเตรียมสารละลาย

2.4.1 สารละลายกรดฟีนิลอะซีทิล-4-อะมิโนเบนโซอิก (PAAB)

ละลาย PAAB 25.5 มิลลิกรัม ในโซเดียมคาร์บอเนต 0.1 โมลาร์ 0.5 มิลลิลิตร เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.8 0.08 โมลาร์ จนได้ปริมาตรสุดท้าย 40 มิลลิลิตร เก็บได้นาน 1 เดือนที่ 4 องศาเซลเซียส

2.4.2 สารละลายพารา-ไดเมธิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ (PDAB)

ละลาย PDAB 0.5 กรัม ในเมทธานอล 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ได้นานตามต้องการ เพราะเป็นสารละลายเสถียร

2.4.3 สารละลายน้ำแป้ง-ไอโอดีน

ก. สารละลายแป้ง ละลายแป้ง 2 กรัม ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 0.1 โมลาร์ 100 มิลลิลิตร

ข. สารละลายไอโอดีน ละลายโพแตสเซียมไอโอไดด์ 53.25 กรัม ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 0.1 โมลาร์ 100 มิลลิลิตร เติมไอโอดีน 2 กรัม

ผสมสารละลายไอโอดีน 0.15 มิลลิลิตร กับสารละลายน้ำแป้ง 100 มิลลิลิตร ในภาชนะกันแสง เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

2.4.4 สารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์

ก. สารละลาย ก. ละลายโซเดียมคาร์บอนเนต 2 กรัม ในสารละลายโซเดียมดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ 100 มิลลิลิตร

ข. สารละลาย ข. ละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ค. สารละลาย ค. ละลายโพแตสเซียมโซเดียมทาร์เทต 1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย ก. 100 มิลลิลิตร สารละลาย ข. 1 มิลลิลิตร และสารละลาย ค. 1 มิลลิลิตร ก่อนใช้

2.5 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

แบ่งเป็น 2 แบบ คือ

2.5.1 การเก็บระยะสั้นเป็นเดือน

เก็บบนจานเพาะเชื้ออาหารสูตรอุดมที่ 4 องศาเซลเซียส

2.5.2 การเก็บระยะยาวเป็นปี

ผสมเซลที่เลี้ยงในอาหารเหลวกับกลีเซอรอลที่ฆ่าเชื้อแล้ว ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 30 เปอร์เซนต์กลีเซอรอล ในขวดจุกเกลียว เก็บที่ -70 องศาเซลเซียส

2.6 การเลี้ยงเชื้อและวัดการเจริญของเชื้อ

2.6.1 การเตรียมอินนอคคิวลัม

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

2.6.2 การเพาะเลี้ยง

เริ่มด้วยอินนอคคิวลัม 5 เปอร์เซนต์ ในอาหารที่ต้องการ ใส่ในขวดรูปชมพู่หรือขวดรูปชมพู่แบบมีแขนข้าง ในอัตราส่วนปริมาตรอาหารต่อปริมาตรขวด 1:5 บ่ม ณ อุณหภูมิตามต้องการ ด้วยความเร็ว 150-200 รอบต่อนาที

2.6.3 การติดตามการเจริญของเชื้อ

แยกทำ 2 แบบ คือ

ก. การวัดความขุ่น ซึ่งแบ่งย่อยเป็นสองแบบ ได้แก่ การวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ Spectronic 20 และวัดการกระจายแสงด้วยเครื่อง Klett-Summerson photoelectric colorimeter โดยใช้ blue filter ซึ่งระบุปริมาณการเจริญเป็นหน่วยเคลต (Klett unit)

ข. การนับจำนวนเซลที่มีชีวิต (viable cell count) หลักการคือ นับจำนวนโคโลนีที่ได้จากการเจือทางอินนอคคิวลัมในช่วง 10^{-2}- 10^{-7} เท่า บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง

2.7 การเตรียมสับสเตรตกรดฟีนิลอะซีติก-4-อะมิโนเบนโซอิก (Phenylacety-4-amino-benzoic acid; PAAB)

ดัดแปลงจากวิธีของ Szewczuk และคณะ (1980) โดยผสมกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก 6.85 กรัม ใน 2 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ จำนวน 25 มิลลิลิตร และอะซีโตน จำนวน 25 มิลลิลิตร แล้วค่อย ๆ เติมฟีนิลอะซีทิลคลอไรด์ จำนวน 6.4 มิลลิลิตร ทีละหยดในขณะที่ควบคุมอุณหภูมิให้เป็น 0 องศาเซลเซียส และปรับ pH ให้มากกว่า 8 ตลอดเวลา

จากนั้นตกตะกอนโดยการเติม กรดไฮโดรคลอริก 2 นอร์มอลจำนวน 200 มิลลิลิตร แล้วกรองตะกอนเก็บไว้ นำส่วนน้ำใสมาตกตะกอนซ้ำอีก 2 ครั้ง อบตะกอนให้แห้งที่ 50 องศาเซลเซียส

นำตะกอนแห้งมาละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 นอร์มอลกับเอธิลอัลกอฮอล์ 20 เปอร์เซนต์ จำนวน 30 มิลลิลิตร แล้วตกตะกอนใหม่ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 2 นอร์มอล จำนวน 50 มิลลิลิตร กรองตะกอนแล้วทำซ้ำเดิมอีก 2 ครั้ง อบตะกอนให้แห้งที่ 50 องศาเซลเซียส

นำไปหาจุดหลอมเหลวด้วยเครื่อง Fisher-Johns melting point apparatus จะอยู่ในช่วง 256-259 องศาเซลเซียส มีน้ำหนักโมเลกุล 255 เก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จะใช้ได้ตลอดนานกว่า 3 ปี

2.8 การเตรียมเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส

นำเซลที่มีสมบัติตามต้องการมาปั่นแยกอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้ามีปริมาตรน้อย (5 มิลลิลิตร) ใช้เครื่องเซนตริฟิวจ์แบบตั้งโต๊ะ ความเร็ว 3,000 × g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ถ้ามีปริมาตรมาก (มากกว่า 100 มิลลิลิตร) ใช้เครื่อง Beckman centrifuge J-21C ใช้ rotor JA-10ที่ความเร็ว 5,000 × g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างเซล 1 ครั้ง ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ (นอร์มอลซาลีน) กระจายเซลในสารละลายที่เหมาะสม เพื่อใช้เป็นเอนไซม์และแหล่งของเอนไซม์ เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ในกรณีที่ต้องการสกัดแยกเอนไซม์ออกจากเซล จะทำเซลให้แตกโดยวิธีใดวิธีหนึ่ง ดังนี้

ก. เมื่อปริมาณเซลมาก(มากกว่า 1.5 กรัม) กระจายเซลให้มีความเข้มข้น 30 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในนอร์มอลซาลีน ทำลายเซลด้วยเครื่อง French Pressure Press ที่ความดัน 1100 psi

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

นำสารละลายที่ได้หลังจากทำให้เซลแตกไปปั่นด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์แบบตั้งโต๊ะที่ความเร็ว 6,000 × g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนของน้ำใสที่ได้คือ สารละลายเอนไซม์ (crude enzyme) เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.9 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส

ทำได้ 2 วิธี ขึ้นกับชนิดของสับสเตรตที่ใช้

2.9.1 ใช้กรดฟีนิลอะซีทิล-4-อะมิโนเบนโซอิก เป็นสับสเตรต

ดัดแปลงจากวิธีของ Szewczuk และคณะ (Szewczuk และคณะ,1980)

ใช้เซลหรือเอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตร รวมกับ PAAB 2.5 มิลลิโมลาร์ 0.4 มิลลิลิตร อินคิวเบตที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติม 0.5 มิลลิลิตรของ 10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมไนไตรท์ที่ละลายในกรดอะซีติก 0.25 โมลาร์ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติม 1.5 มิลลิลิตรของ 0.01 เปอร์เซนต์ กรด 1-อะมิโน-8-ไฮดรอกซี-แนพธาลีน-3, 6-ไดซัลโฟนิก (H-acid) ซึ่งละลายในโซเดียมคาร์บอเนต 0.66 โมลาร์ สารละลายสีชมพูที่ได้

นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ชนิด Spectronic 20 เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก

กำหนดให้เอนไซม์ 1 หน่วย (unit) คือปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดกรดพาราอะมิโนเบนโซอิก 1 นาโนโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

2.9.2 ใช้เพนนิซิลิน จี เป็นสับสเตรต

ดัดแปลงจากวิธีของ Balasingham และคณะ (Balasingham และคณะ, 1972)

ใส่เซลหรือเอนไซม์ 1 มิลลิลิตรในสารละลายเพนนิซิลิน จี 14 มิลลิ-โมลาร์ 4 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปิเปต 0.5 มิลลิลิตรของสารละลายนี้ลงในสารละลายผสมที่ประกอบด้วยโซเดียมไฮดรอก-ไซด์ 0.05 โมลาร์ 1 มิลลิลิตร กับกรดอะซีติก 20 เปอร์เซนต์ 1 มิลลิลิตร และพารา-ไดเมท-ธิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ 0.5 เปอร์เซนต์ 0.5 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที สารละลายใสสีเขียวที่ได้นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ชนิด spectronic 20 เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก

กำหนดให้เอนไซม์ 1 หน่วย (unit) คือปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

ในกรณีที่มาใช้กับเซลตรึง แอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส วัดได้โดยใช้เซลตรึงหนัก 1 กรัม เติมสารละลายเพนนิซิลิน จี 14 มิลลิโมลาร์ 4 มิลลิลิตร ลงไปแล้วเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ดูดส่วนน้ำใส 0.5 มิลลิลิตร ลงในสารละลายปฏิกิริยาซึ่งทำให้เกิดสารละลายสีเขียว และวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร เช่นเดียวกับข้างต้น

กำหนดให้เอนไซม์ 1 หน่วย (unit) คือปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

2.10 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ เบตา-แลคแตมเมส

ดัดแปลงจากวิธีไมโครไอโอโดเมตริกของ Sykes และ Nordstrom (Sykes และ Nordstrom, 1972)

อาศัยหลักการไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน จี ด้วยเบตา-แลคแตมเมส ได้กรดเพนนิซิโลอิก ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับสารละลายน้ำแป้ง-ไอโอดีน โดยดึงโมเลกุลของไอโอดีนออกจากน้ำแป้ง ทำให้สีน้ำเงินของสารละลายน้ำแป้ง-ไอโอดีน จางลง โดยมีวิธีปฏิบัติดังนี้

2.10.1 การทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์เบตา-แลคแตมเมสเบื้องต้น (Sykes และ Nordstrom, 1972)

เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบ โดยการเขี่ยเชื้อลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็งสูตรอุดม ซึ่งเสริมด้วยกรดฟีนิลอะซีติก 0.2 เปอร์เซนต์ และสารละลายแป้ง 1 เปอร์เซนต์ หรืออาหารแข็งสูตรปรับต่ำซึ่งมีสารละลายแป้ง 1 เปอร์เซนต์อยู่ด้วย บ่มเชื้อที่อุณหภูมิและเวลาตามที่ต้องการ

เทสารละลายสีน้ำตาลซึ่งประกอบด้วย เพนนิซิลินจี 20 มิลลิกรัม ใน 3 มิลลิลิตร ของสารละลายไอโอดีน (ไอโอดีน 0.1 โมลาร์ และโพแตสเซียมไอโอไดด์ 0.4 โมลาร์) ลงในจานเพาะเชื้อนั้นเป็นเวลา 10 วินาที แล้วรินสารละลายส่วนที่เกินออกตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที สังเกตการฟอกจางสีน้ำเงินบริเวณรอบโคโลนี

2.10.2 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ เบตา-แลคแตมเมส (Sykes และ Nordstrom, 1972)

สารละลายปฏิกิริยาเตรียมได้โดย (ก) เติม 0.1 มิลลิลิตรของสารละลายเอนไซม์ลงใน 1 มิลลิลิตรของสารละลายน้ำแป้งไอโอดีน กับ 1 มิลลิลิตร 0.2 มิลลิโมลาร์ของเพนนิซิลิน จี แล้วเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.0 ให้มีปริมาตรทั้งหมดเป็น 3 มิลลิลิตร อินคิวเบตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และวัดการจางลงของสีน้ำเงินที่แสงความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร สัมพัทธ์กับเวลาด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ชนิด Shimadzu UV-visible UV-240

ในการทดลองจำเป็นต้องเปรียบเทียบอัตราความเร็วของการจางลงของสีน้ำเงิน กับสารละลายปฏิกิริยาควบคุม 2 อย่าง คือ Enzyme control (ข) ซึ่งมีองค์ประกอบทุกชนิดเหมือนกับสารละลายปฏิกิริยายกเว้น เพนนิซิลิน จี และ Sub-strate control (ค)

ซึ่งมีองค์ประกอบทุกชนิดเหมือนกับสารละลายปฏิกิริยายกเว้นสารละลายเอนไซม์

คำนวณแอคติวิตีของเอนไซม์เบตา-แลคแตมเมส ตามวิธีรายละเอียด ซึ่งแสดงในภาคผนวกที่

กำหนดให้เอนไซม์ 1 หน่วย (unit) คือ ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดกรดเพนนิซิโลอิก 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

2.11 การวัดปริมาณโปรตีน

ใช้วิธีของ Lowry และคณะ (Lowry และคณะ, 1951)

ปริมาณโปรตีนสุทธิของเซลวัดได้โดยการไฮโดรไลซ์เซลในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาทีด้วย 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาตรเท่ากับปริมาตรของเซลที่ใช้ สารละลายที่ได้เรียกไฮโดร-ไลเซต (hydrolysate) เติม 0.1 มิลลิลิตรของไฮโดรไลเซต ลงในสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ 3 มิลลิลิตร อินคิวเบตที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลายฟีนอลรีเอเจนต์ 0.3 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอีก 30 นาที วัดการดูดกลืนแสงของสารละลายสีน้ำเงินที่ความยาวคลื่น 650 นา-โนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ชนิด spectronic 20 เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย Bovine serum albumin

2.12 การคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสสูงสุด

2.12.1 การทดสอบการต้านเพนนิซิลิน จี

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบลงบนจานเพาะเชื้ออาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีเพนนิซิลิน จี ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1,000 หน่วยต่อมิลลิลิตรของอาหาร บ่มเชื้อตามอุณหภูมิที่ต้องการ สังเกตการเจริญของเชื้อเทียบกับในจานเพาะเชื้อที่ไม่มีเพนนิซิลิน จี

2.12.2 การหารูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลวชนิดต่าง ๆ ที่สภาวะต่าง ๆ ตามต้องการ ติดตามการเจริญตามวิธีข้อ 2.6.3 วัดแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ตามวิธีข้อ 2.9.1 รวมทั้งวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีข้อ 2.11 ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน

2.13 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ E.coli ATCC 9637

2.13.1 ผลของอุณหภูมิ

เพาะเลี้ยง E.coli ATCC 9637 ในอาหารเหลวสูตรปรับต่ำ ที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส ติดตามการเจริญและการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส ตลอดจนวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ทุกช่วงเวลา 2 ชั่วโมง ตามวิธีข้อ 2.6.3 , 2.9.1 และ 2.11

2.13.2 ผลของโซเดียมกลูตาเมต

เพาะเลี้ยง E.coli ATCC 9637 ณ อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 2.13.1 โดยใช้อาหารสูตรปรับต่ำ ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมกลูตาเมตตั้งแต่ 0-10 กรัมต่อลิตร ติดตามการเจริญและการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส ตลอดจนวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ทุกช่วงเวลา 2 ชั่วโมง ตามวิธีข้อ 2.6.3, 2.9.1 และ 2.11

2.13.3 ผลของกรดฟีนิลอะซีติก

ทำได้ 2 วิธี คือ

ก. เติมกรดฟีนิลอะซีติกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่เริ่มต้น

เพาะเลี้ยง E.coli ATCC 9637 ในอุณหภูมิที่เหมาะสม ซึ่งได้จากข้อ 2.13.1 โดยใช้อาหารสูตรปรับต่ำชนิดเหลว ซึ่งมีปริมาณโซเดียมกลูตาเมตที่เหมาะสมจากข้อ 2.13.2 และมีปริมาณของกรดฟีนิลอะซีติก ตั้งแต่ 0-5 กรัมต่อลิตร ติดตามการเจริญและการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส ตลอดจนวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทุกช่วงเวลา 2 ชั่วโมง ตามวิธีข้อ 2.6.3, 2.9.1 และ 2.11

ข. เติมกรดฟีนิลอะซีติกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อในระหว่างการเจริญ

เพาะเลี้ยง E.coli ATCC 9637 ในอุณหภูมิที่เหมาะสม ซึ่งได้จากข้อ 2.13.1 โดยใช้อาหารสูตรปรับต่ำชนิดเหลว ซึ่งมีปริมาณโซเดียมกลูตาเมตที่เหมาะสมจากข้อ 2.13.2 เมื่อเจริญถึงระยะกึ่งทวีคูณ (mid log phase), ปลายทวีคูณ (late log phase) และระยะเจริญคงที่ (stationary phase) เติม 1 เปอร์เซนต์ กรดฟีนิลอะซีติก ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยให้มีความเข้มข้นเป็น 0.1 เปอร์เซนต์ ติดตามการเจริญและการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส ตลอดจนวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ทุกช่วงเวลา 2 ชั่วโมง ตามวิธีข้อ 2.6.3, 2.9.1 และ 2.11

2.13.4 ผลของกลูโคส

เพาะเลี้ยง E.coli ATCC 9637 ณ อุณหภูมิที่เหมาะสม ซึ่งได้จากข้อ 2.13.1 โดยใช้อาหารสูตรปรับต่ำชนิดเหลว ซึ่งมีปริมาณโซเดียมกลูตาเมต และกรดฟีนิลอะซีติกที่เหมาะสมจากข้อ 2.13.2 และ 2.13.3 ตามลำดับ แล้วเติมกลูโคสความเข้มข้นตั้งแต่ 0-10 กรัมต่อลิตร ติดตามการเจริญและการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส ตลอดจนวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทุกช่วงเวลา 2 ชั่วโมง ตามวิธีข้อ 2.6.3, 2.9.1 และ 2.11

2.13.5 การแปรเปลี่ยนชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เพาะเลี้ยง E.coli ATCC 9637 ในอาหารสูตรอุดม ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 ชั่วโมง นำไปปั่นด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ Beckman J-21C ที่ความเร็ว 6,000 × g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ล้างเซล 1 ครั้งด้วยนอร์มอลซาลีน กระจายเซลในสารละลายกรดฟีนิลอะซีติกหรืออาหารเลี้ยงเชื้อชนิดใหม่ ที่ต้องการแปรเปลี่ยนทำการเลี้ยงเชื้อต่อไปในสภาวะควบคุมเช่นเดิมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 60 ชั่วโมง ติดตามการเจริญ และการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส ตลอดจนวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ทุกช่วงเวลา 2 ชั่วโมง ตามวิธีข้อ 2.6.3, 2.9.1 และ 2.11

2.13.6 การเปลี่ยนแปลงของ pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการเจริญของ E.coli ATCC 9637

เพาะเลี้ยง E.coli ATCC 9637 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำชนิดที่มี 0.2 เปอร์เซนต์ กรดฟีนิลอะซีติก และ 0.5 เปอร์เซนต์ โซเดียมกลูตาเมตเป็นแหล่งของคาร์บอน กับชนิดที่มีเพียง 0.2 เปอร์เซนต์ กรดฟีนิลอะซีติกอย่างเดียวเป็นแหล่งของคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ติดตามการเจริญของ E.coli ATCC 9637 ตามวิธีข้อ 2.6.3 ควบคู่ไปกับการวัดค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดย ณ ทุก ๆ ช่วงเวลา 2 ชั่วโมง ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 มิลลิตร นำไปวัดค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ด้วยเครื่องวัด pH PHM 83 Autocal

2.14 การตรึงเซล E.coli ATCC 9637 โดยใช้แคปปา-คาร์ราจีแนน (K-carrageenan)

2.14.1 การเตรียมสารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนน

ละลายผงแคปปา-คาร์ราจีแนนในนอร์มอลซาลีน โดยใช้เครื่องอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ความดัน 8.5 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร อุณหภูมิ 116 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 5 นาที แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

2.14.2 วิธีการตรึงเซล (cell immobilization)

ดัดแปลงจากวิธีของ Nilsson และคณะ (Nilsson และคณะ, 1983) ผสมเซล E.coli ATCC 9637 (เตรียมได้ตามวิธีข้อ 2.8 หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 24-28 ชั่วโมง) กับสารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนนในบีกเกอร์ให้ได้เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)ตามที่ต้องการ โดยมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 มิลลิลิตร นำไปกวนในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 45-50 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer)ที่ความเร็วซึ่งเหมาะสม นาน 1 นาที จนส่วนผสมเข้ากันดี ผสมนอร์มอล-บิวทิลอะซีเตต (n-Butyl acetate) ปริมาตรเท่ากัน (20 มิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แล้วกวนบนเครื่องกวนแท่งแม่เหล็กต่อไปด้วยความเร็วที่เหมาะสม (ได้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเม็ดเจลระหว่าง 1-3 มิลลิเมตร) จนกระทั่งมองเห็นการเกิดเม็ดอย่างสม่ำเสมอ (ใช้เวลาไม่เกิน 3 นาที) รีบเทนอร์มอล-บิวทิลอะซีเตตที่เย็น (0-4 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรเดิม (40 มิลลิลิตร) กวนต่อไปอีก 30 วินาที จะได้เซลตรึง (immobilized cells) ที่เป็นเม็ดเจล ซึ่งส่วนใหญ่มีลักษณะรูปทรงกลม นำไปกรองด้วยตะแกรงไนลอน เลือกเม็ดเจลที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 1 มิลลิเมตร แล้วล้างด้วย 0.3 โมลาร์ โพแตสเซียมคลอไรด์ที่เย็น (0-10 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร 3 ครั้ง เซลตรึงที่ได้เก็บแช่ไว้ใน 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.15 การตรึงเซล E.coli ATCC 9637 โดยใช้วุ้น (Agar)

2.15.1 การเตรียมสารละลายวุ้น

ละลายผงวุ้นในน้ำกลั่น โดยใช้เครื่องอบฆ่าเชื้อที่ความดัน 8.5 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร อุณหภูมิ 116 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วเก็บรักษาไว้ในลักษณะปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

2.15.2 วิธีการตรึงเซล (Cell immobilization)

ทำตามวิธีข้อ 2.14.2 หลังจากได้เม็ดเจลเซลตรึงแล้ว ล้างเม็ดเจลด้วยน้ำกลั่นที่เย็น (0-10 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร 3 ครั้ง เซลตรึงที่ได้เก็บแช่ไว้ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.16 วิธีวัด strength ของเม็ดเจลเซลตรึง

Strength ของเม็ดเจลเซลตรึงที่เตรียมได้ตามวิธีข้อ 2.14 และ 2.15 สามารถวัดได้ 2 วิธีคือ

2.16.1 วิธีใช้มือจับ

ทุกครั้งจะใช้ความเห็นของผู้ทดลองอย่างน้อย 3 คน เปรียบเทียบกันโดยกำหนด strengthเม็ดเจลมาตรฐาน ดังนี้ :-

strength เม็ดเจลที่เตรียมจากแคปปา-คาร์ราจีแนนความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เมื่อไม่มีเซลแบคทีเรียอยู่ด้วย มีค่าเป็น +5

strength เม็ดเจลที่เตรียมจากวุ้นความเข้มข้น 5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เมื่อไม่มีเซลแบคทีเรียอยู่ด้วย มีค่าเป็น +3

2.16.2 วิธีใช้เครื่องมือที่ประดิษฐ์ขึ้นวัด strength ของเม็ดเจล (ตามรูปที่ 8)

2.16.2.1 ลักษณะและส่วนประกอบของเครื่องมือ

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

2.16.2.2 วิธีวัดและเปรียบเทียบ strength ของเม็ดเจล

วางเม็ดเจลบนพื้นเรียบให้อยู่ที่ศูนย์กลางของแก้วทรงกระบอกกลวงซึ่งครอบอยู่ เลื่อนแท่งโลหะทรงกระบอกตันลงมาแตะกับผิวเม็ดเจล ใส่น้ำหนักบนจานชั่ง จับเวลาแต่ละครั้งเท่า ๆ กัน (นาน 30 วินาที) แล้วสังเกตการแตกของเม็ดเจล บันทึกน้ำหนักบนจานชั่งในการทดลองนี้ จะสุ่มตัวอย่างของเม็ดเจล ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร อย่างน้อย 10 เม็ด ต่อค่าน้ำหนักที่อ่านแต่ละค่า

2.16.2.3 วิธีรายงาน strength ของเม็ดเจล

รายงานเป็นน้ำหนักต่ำสุดที่กดทับแล้วทำให้เม็ดเจลแตกปริ โดยคำนวณค่าน้ำหนักที่เติมบนจานชั่งรวมกับน้ำหนักแท่งโลหะ ต่อพื้นที่หน้าตัดแท่งโลหะในหน่วยของกิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

รูปที่ 8 เครื่องมือวัด strength ของเม็ดเจลเซลตริง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.17 การศึกษาสภาวะเหมาะสมในการตรึงเซล E.coli ATCC 9637 ด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนน

2.17.1 ผลกระทบของความเข้มข้นแคปปา-คาร์ราจีแนน ต่ออุณหภูมิแข็งตัวของแคปปา-คาร์ราจีแนน

ทำได้โดยแปรค่าความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนนตั้งแต่ 2.0, 2.5, 3.0 และ 3.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตรทั้งหมดของสารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนน 20 มิลลิลิตร เมื่อไม่มีเซลแบคทีเรีย แล้วทดสอบหาอุณหภูมิที่สารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนนเริ่มแข็งตัวโดยการกวนด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็กชนิด Nuova 7 stir-plate ใช้แท่งแม่เหล็กขนาดยาว 4 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.9 เซนติเมตร ตั้งความเร็วที่เลข 3 สังเกตอุณหภูมิบนเทอร์โมมิเตอร์ที่ลดลง จนกระทั่งแท่งแม่เหล็กไม่สามารถหมุนต่อไปได้อีก อุณหภูมิที่วัดได้เป็นอุณหภูมิแข็งตัวของเจล (gelling temperature)

2.17.2 ผลกระทบของความเร็วแท่งแม่เหล็กที่ใช้กวนสารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนนต่อขนาดและรูปร่างลักษณะของเม็ดเจลเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน (immobilized cell)

ผสมเซล E.coli ATCC 9637 ความเข้มข้น 3.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) กับสารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนนที่ความเข้มข้นตั้งแต่2.0,2.5,3.0และ 3.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ใช้ปริมาตรทั้งหมด 20 มิลลิลิตร ทำให้เกิดเม็ดเจลตามวิธีข้อ 2.14.2 โดยแปรเปลี่ยนความเร็วของแท่งแม่เหล็กที่ใช้กวนสารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ด้วยตัวเลขบนหน้าปัทม์ของเครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก 2 ค่าคือ 2.5 กับ3.0โดยใช้แท่งแม่เหล็กยาว 4 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.9 เซนติเมตร หลังจากทำให้เกิดเม็ดเจลด้วยนอร์มอล-บิวทิลอะซีเตต (0-4 องศาเซลเซียส) สังเกตรูปร่างลักษณะของเม็ดเจลที่ได้ แล้วนำไปแยกกลุ่มตามขนาดที่แตกต่างกัน 3 กลุ่ม คือ เส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร ระหว่าง 1-2 มิลลิเมตร และระหว่าง 2-3 มิลลิเมตร โดยใช้ตะแกรงไนลอน ชั่งน้ำหนักเม็ดเจลเซลตรึงในแต่ละกลุ่ม รายงานผลผลิตที่ได้เป็นเปอร์เซนต์ของผลผลิตทั้งหมด

2.17.3 ผลกระทบของขนาดเม็ดเจลเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนต่อแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลสในเซลตรึง

ทำได้โดยตรึงเซล E.coli ATCC 9637 ความเข้มข้น 3.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนนความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ตามวิธีข้อ 2.14.2 แยกขนาดของเม็ดเจลเซลตรึงเป็น 2 ขนาด โดยใช้ตะแกรงไนลอนคือ ขนาดที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร กับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-3 มิลลิเมตร วัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสในเซลตรึงตามวิธีข้อ 2.9.2 โดยแปรค่าอัตราส่วนของน้ำหนักเม็ดเจลเซลตรึงทั้ง 2 ขนาด เป็น 1:0, 3:1, 1:3 และ 0:1 แล้วเปรียบเทียบค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ที่วัดได้ โดยคำนวณแอคติวิตีเป็นหน่วยต่อกรัมเซลตรึง เมื่อใช้เม็ดเจลเซลตรึงในการทดลองแต่ละครั้งคงที่ 1.00 กรัม

$$\text{แอคติวิตีสัมพัทธ์} = \frac{\text{แอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลสของเซลตรึง}}{\text{แอคติวิตีสูงสุดของเพนนิซิลิน เอซิเลสของเซลตรึง}} \times 100$$

2.17.4 <u>ผลกระทบของความเข้มข้นแคปปา-คาร์ราจีแนน ที่ใช้ตรึงเซล E.coli ATCC 9637 ต่อ strength และแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลสของเม็ดเจลเซลตรึง</u>

เตรียมสารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนนตามวิธีข้อ 2.14.1 ให้มีความเข้มข้น 2.0, 2.5, 3.0 และ 3.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำมาตรึงเซล E.coli ATCC 9637 ด้วยวิธีตรึงเซลข้อ 2.14.2 โดยใช้ความเข้มข้นของเซล 3.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) เม็ดเจลเซลตรึงที่ได้นำไปชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณเปอร์เซนต์ผลผลิต (% yield) และวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสตามวิธีข้อ 2.9.2 วัด strength ของเม็ดเจลเซลตรึง ตามวิธีข้อ 2.16.1 กำหนดให้

$$\text{เปอร์เซนต์ผลผลิต} = \frac{\text{น้ำหนักของเม็ดเจลเซลตรึง}}{\text{น้ำหนักเซลอิสระที่ใช้+น้ำหนักสารละลายเจลที่ใช้ตรึง}} \times 100$$

$$\text{Activity recovery (\%)} = \frac{\text{แอคติวิตีเพนนิซิลิน เอซิเลสในเซลตรึง}}{\text{แอคติวิตีเพนนิซิลิน เอซิเลสในเซลอิสระที่ใช้}} \times 100$$

2.17.5 <u>ผลกระทบของความเข้มข้นของเซล E.coli ATCC 9637 ในเม็ดเจลเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนต่อ strength และแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลสของเม็ดเจลเซลตรึง</u>

เตรียมสารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนน ตามวิธีข้อ 2.14.1 โดยใช้ความเข้มข้นเหมาะสม ซึ่งได้จากข้อ 2.17.4 นำมาตรึงเซล E.coli ATCC 9637 ด้วยวิธีข้อ 2.14.2 โดยแปรค่าความเข้มข้นของเซลในช่วง 3-35 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) เม็ดเจลเซลตรึงที่ได้นำไปชั่งน้ำหนัก วัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสตามวิธีข้อ 2.9.2 วัด strength ของเม็ดเจลเซลตรึงด้วยวิธีข้อ 2.16.1

แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสและ strength ของเม็ดเจลตามวิธีข้อ 2.9.2 และ 2.16.1 ตามลำดับ

2.18 การศึกษาผลกระทบของโพแตสเซียมคลอไรด์ต่อ strength และแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลสในเม็ดเจลเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน

เตรียมเซลตรึงตามวิธีข้อ 2.14.2 โดยใช้เซล E.coli ATCC 9637 เข้มข้น 3.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ใน 2.5 เปอร์เซนต์แคปปา-คาร์ราจีแนน (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำเซลตรึงที่ได้ไปศึกษาผลกระทบของโพแตสเซียมคลอไรด์ โดยแช่เม็ดเจลเซลตรึงในสารละลายโพแตสเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน ตั้งแต่ 0.04-0.40 โมลาร์ นาน 2 และ 136 ชั่วโมง กรองแล้วล้างด้วย 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ ชั่งน้ำหนักเม็ดเจลเซลตรึงที่ได้ แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส วัด strength ของเม็ดเจลตามวิธีข้อ 2.9.2 และ 2.16.1 ตามลำดับ

2.19 การศึกษาสภาวะเหมาะสมในการตรึงเซล E.coli ATCC 9637 ด้วยวุ้น

2.19.1 ผลกระทบของความเข้มข้นวุ้นต่ออุณหภูมิแข็งตัวของเจลวุ้น

ทำได้โดยแปรค่าความเข้มข้นของวุ้นตั้งแต่ 3.0, 4.0, 5.0 และ 6.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตรทั้งหมด 20 มิลลิลิตร เมื่อไม่มีเซลแบคทีเรีย แล้วทดสอบหาอุณหภูมิแข็งตัวของเจล โดยใช้วิธีเช่นเดียวกับข้อ 2.17.1

2.19.2 ผลกระทบของความเร็วแท่งแม่เหล็กที่ใช้กวนสารละลายวุ้นต่อขนาดและรูปร่างของเม็ดเจลวุ้น

โดยใช้สารละลายวุ้นเข้มข้น 3.0, 4.0, 5.0 และ 6.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำให้เกิดเม็ดเจลตามวิธีข้อ 2.14.2 โดยแปรเปลี่ยนความเร็วของแท่งแม่เหล็กขนาดยาว 4 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.9 เซนติเมตร ความเร็วของเครื่องกวนแท่งแม่เหล็กชนิด Nuova 7 stir-plate ตั้งไว้ที่ 3.0, 3.5 และ 4.0 หลังจากทำให้เกิดเม็ดเจลวุ้นโดยการเติมนอร์มอล-บิวทิลอะซิเตท (0-4 องศาเซลเซียส) ผลิตผลที่ได้ล้างด้วยน้ำ 3 ครั้ง สังเกตรูปร่างลักษณะของเม็ดเจลวุ้น แล้วนำไปวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง โดยใช้ค่าเฉลี่ยของเม็ดเจลที่สุ่มตัวอย่างมาอย่างน้อยครั้งละ 20 เม็ด

2.19.3 ผลกระทบของขนาดเม็ดเจลต่อแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซลตรึงวุ้น

ทำวิธีเดียวกับข้อ 2.17.3 โดยใช้เซล E.coli ATCC 9637 ความเข้มข้น 3.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ที่ตรึงด้วยวุ้น 5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ผลผลิตที่ได้นำไปแยกเป็นเม็ดเจลเซลตรึงวุ้น 2 กลุ่มคือ ขนาดที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 1 มิล-ลิเมตร และน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร แปรเปลี่ยนอัตราส่วนของเม็ดเจลทั้งสองกลุ่มแล้วชั่งน้ำหนัก วัดเอนไซม์แอคติวิตี รายละเอียดการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.17.3

2.19.4 ผลกระทบของความเข้มข้นวุ้น ต่อ strength และแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ของเม็ดเจลเซลตรึงวุ้น

เตรียมสารละลายวุ้นตามวิธีข้อ 2.15.1 ที่มีความเข้มข้น 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 และ 6.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำมาตรึงเซล E.coli ATCC 9637 ด้วยวิธีข้อ 2.15.2 โดยใช้ความเข้มข้นเซล 3.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) วิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส และวัด strength ของเม็ดเจลเซลตรึงตามวิธีข้อ 2.9.2 และ 2.16.1 ตามลำดับ และคำนวณเปอร์เซนต์ผลผลิต (% yield) โดยการชั่งน้ำ-หนักเม็ดเจลเซลตรึง

2.19.5 ผลกระทบของความเข้มข้นเซล E.coli ATCC 9637 ต่อแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลสของเม็ดเจลเซลตรึงวุ้น

เตรียมสารละลายวุ้นตามข้อ 2.15.1 โดยใช้ความเข้มข้นเหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.19.4 นำมาตรึงเซล E.coli ATCC 9637 ตามวิธีข้อ 2.15.2 โดยแปรค่าความเข้มข้นของเซลในช่วง 3.6-43.6 เปอร์เซนต์ วัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ตามวิธีข้อ 2.9.2 วัด strength ของเม็ดเจลเซลตรึงด้วยวิธีข้อ 2.16.1 และคำนวณเปอร์เซนต์ผลผลิต (% yield) โดยการชั่งน้ำหนักเม็ดเจลเซลตรึงวุ้น

2.20 การศึกษาผลกระทบของกลูตารัลดีไฮด์ต่อ strength และแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลสในเม็ดเจลเซลตรึง

เตรียมเซลตรึงวุ้น และเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน ตามวิธีข้อ 2.15.2 และ 2.14.2 โดยใช้ความเข้มข้นของเซล E.coli ATCC 9637 ที่เหมาะสม ซึ่งได้จากข้อ 2.19.5 และ 2.17.5 ตามลำดับ ตรึงด้วย 5.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของสารละลายวุ้นและ 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของสารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนน เมื่อล้างเซลตรึงวุ้นด้วยน้ำกลั่น และล้างเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนด้วย 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ แล้วใส่ 1 กรัมของเซลตรึงแต่ละชนิดใน 10 มิลลิลิตร กลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-0.3 โมลาร์

เขย่าด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วล้างเซลตรึงวุ้นด้วยน้ำกลั่น และล้างเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนด้วย 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ 3 ครั้ง ๆ ละ 100 มิลลิลิตร วัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส และ strength ของเม็ดเจลเซลตรึงตามวิธีข้อ 2.9.2 และ 2.16.1 ตามลำดับ

2.21 <u>การศึกษาผลกระทบของกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีนต่อ strength และแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลสในเม็ดเจลเซลตรึง</u>

ใส่ 1 กรัมของเซลตรึงแต่ละชนิด คือ เซลตรึงวุ้น และเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน ใน 10 มิลลิลิตร กลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เขย่าด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที แล้วเติมเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีนให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายแตกต่างกัน ตั้งแต่0-0.3โมลาร์ เขย่าต่อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้างเม็ดเจลเซลตรึงวุ้นด้วยน้ำกลั่นและล้างเม็ดเจลเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน ด้วย 0.3 โมลาร์ของโพแตสเซียมคลอไรด์ 3 ครั้ง ๆ ละ 100 มิลลิลิตร นำเซลตรึงที่ได้ไปวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส และ strength ของเม็ดเจลเซลตรึงตามวิธีข้อ 2.9.2 และ 2.16.2 ตามลำดับ

2.22 <u>การศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของเพนนิซิลิน เอซิเลส ของเซล E.coli ATCC 9637 เซล E.coli ATCC 9637 ตรึงวุ้น และเซล E.coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน</u>

ทำการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของเซล E.coli ATCC 9637 หลังจากเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส รายละเอียดตามวิธีข้อ 2.6.2 นาน 28 ชั่วโมง ในสภาพอิสระ กับเซลตรึงวุ้นซึ่งประกอบด้วย E.coli ATCC 9637 เข้มข้น 11.1 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ตรึงด้วย 5.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของวุ้น แล้วทำปฏิกิริยากับ 0.1 โมลาร์กลูตารัลดีไฮด์ และ 0.1 โมลาร์เฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน ตามวิธีข้อ 2.21 และเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน ซึ่งประกอบด้วย E.coli ATCC 9637 เข้มข้น 11.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ตรึงด้วย 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของแคปปา-คาร์ราจีแนน แล้วทำปฏิกิริยากับ 0.1 โมลาร์กลูตารัลดีไฮด์ และ 0.1 โมลาร์เฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน ตามวิธีทดลองข้อ 2.21 เช่นเดียวกัน โดยศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ดังนี้

2.22.1 เปรียบเทียบ pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเพนนิซิลิน เอซิเลส (Optimum pH)

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซล E.coli ATCC 9637 อิสระ, เซลตรึงวุ้น และเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน ซึ่งเสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน (วิธีทดลองข้อ 2.21) ตามวิธีทดลองข้อ 2.9.2 โดยอินคิวเบตในสารละลายบัฟเฟอร์ต่างชนิดที่มีค่า pH อยู่ในช่วงต่าง ๆ กัน คือ 4.0-6.5 (0.1 โมลาร์ อะซีเตตบัฟเฟอร์), 6.0-8.5 (0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์) และ 8.0-9.7 (0.1 โมลาร์ ทริส-กรดไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์)

2.22.2 เปรียบเทียบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเพนนิซิลิน เอซิเลส (Optimum temperature)

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซล E.coli ATCC 9637 อิสระ, เซลตรึงวุ้น และเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน ซึ่งเสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน (วิธีทดลองข้อ 2.21) ตามวิธีข้อ 9.2 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตั้งแต่ 30-60 องศาเซลเซียส

2.22.3 เปรียบเทียบผลกระทบของ pH ต่อความเสถียรของเพนนิซิลิน เอซิเลส (pH stability)

นำเซล E.coli ATCC 9637 อิสระ, เซลตรึงวุ้น และเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน ซึ่งเสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน (วิธีทดลองข้อ 2.21) มาอินคิวเบตกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH แตกต่างกัน ตั้งแต่ 4.0-9.7 โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ดังกล่าวในข้อ 2.22.1 ให้อัตราส่วนของเซลต่อบัฟเฟอร์เป็น 1:5 โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีข้อ 2.9.2

2.22.4 เปรียบเทียบผลกระทบของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเพนนิซิลิน เอซิเลส (thermal stability)

นำเซล E.coli ATCC 9637 อิสระ, เซลตรึงวุ้นและเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน ซึ่งเสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน (วิธีทดลองข้อ 2.21) มาอินคิวเบตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ตามวิธีข้อ 2.9.2

2.22.5 การศึกษาเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นสับสเตรตต่อแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซล E.coli ATCC 9637 อิสระ, เซลตรึงวุ้น และเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน ซึ่งเสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน(วิธีทดลองข้อ 2.21) ตามวิธีในข้อ 2.9.2 โดยใช้สับสเตรตเพนนิซิลิน จี ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน ตั้งแต่ 0.6-14 มิลลิโมลาร์ และหาค่า K_m, V_{max} โดยอาศัยวิธีของ Lineweaver-Burk ซึ่งทำได้โดยการสร้างเส้นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างส่วนกลับของอัตราเร็วของการเกิดปฏิกริยากับส่วนกลับของความเข้มข้นของสับสเตรต

2.22.6 การศึกษาค่า K_i ของกรดฟีนิลอะซีติกต่อเพนนิซิลิน เอซิเลส

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซล E.coli ATCC 9637 อิสระ เซลตรึงวุ้น และเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน ซึ่งเสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีน-ไดอามีน (วิธีทดลองข้อ 2.21) ตามวิธีข้อ 2.9.2 เมื่อใช้ความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซีติกแตกต่างกัน ตั้งแต่ 0-40 มิลลิโมลาร์ ที่แต่ละความเข้มข้นคงที่ของสับสเตรตเพนนิซิลิน จี (7,14, และ 21 มิลลิโมลาร์) และหาค่า K_i ของกรดฟีนิลอะซีติก โดยอาศัย Dixon Plot (Segel,1975)

2.22.7 การศึกษาค่า K_i ของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกต่อเพนนิซิลิน เอซิเลส

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซล E.coli ATCC 9637 อิสระ เซลตรึงวุ้น และเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน ซึ่งเสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน (วิธีทดลองข้อ 2.21) ตามวิธีข้อ 2.9.2 เมื่อใช้ความเข้มข้นของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก แตกต่างกันตั้งแต่ 10-30 มิลลิโมลาร์ ที่แต่ละความเข้มข้นคงที่ของสับสเตรตเพนนิซิลิน จี (4,7,14 มิลลิโมลาร์) และหาค่า K_i ของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก โดยอาศัย Dixon Plot

2.23 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเก็บรักษาเซล E.coli ATCC 9637

ทำการเพาะเลี้ยง E.coli ATCC 9637 ในสภาวะเหมาะสมตามวิธีทดลองข้อ 2.6.2 หลังจาก 28 ชั่วโมง เก็บเซลโดยการปั่น และล้าง 2 ครั้ง ด้วยนอร์มอลซาลีน แล้วชั่งน้ำหนัก แบ่งเซลที่ได้ออกเป็น 4 ส่วน นำแต่ละส่วนไปกระจายในสารละลายนอร์มอลซาลีน, 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0, นอร์มอลซาลีนที่มี 50 เปอร์เซนต์กลีเซอรอล และ 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มี 50 เปอร์เซนต์กลีเซอรอล ให้ได้ความเข้มข้นของเซลประมาณ 0.05 กรัมต่อมิลลิลิตร

เก็บเซล E.coli ATCC 9637 ที่แช่ในนอร์มอลซาลีนและฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.5 โมลาร์ pH 7.0 ไว้ที่อุณหภูมิ 4 และ 26 องศาเซลเซียส ส่วนเซล E.coli ATCC 9637 ที่แช่ในนอร์-มอลซาลีนที่มี 50 เปอร์เซนต์กลีเซอรอล และแช่ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.5 โมลาร์ pH 7.0 ที่มี 50 เปอร์เซนต์กลีเซอรอลเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสตามวิธีข้อ 2.9.1 ของเซลหล่านี้ในช่วงเวลาต่าง ๆ กันนาน 80 วัน

2.24 การศึกษาสภาวะเหมาะสมของการเก็บรักษาเซล E.coli ATCC 9637 ตรึงวุ้นและเซล E.coli ATCC 9637ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน

ตรึงเซล E.coli ATCC 9637 ซึ่งเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม โดยวิธีการทดลองข้อ 2.6.2 นาน 28 ชั่วโมง ด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนน และวุ้น ตามรายละเอียด วิธีทดลองข้อ 2.14.2 และ 2.15.2 ตามลำดับ แล้วเสริมเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน และเซลตรึงวุ้นด้วยกลูตารัลดีไฮด์กับเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน (วิธีทดลองข้อ 2.21) ล้างเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนด้วย 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ และเซลตรึงวุ้นด้วยน้ำกลั่น แล้วแช่เซลตรึงแคปปา-คาร์-ราจีแนนในสารละลายเดิม ส่วนเซลตรึงวุ้นแช่ในนอร์มอลซาลีน โดยใช้เซลตรึง 20 กรัม แช่ในสารละลาย 100 มิลลิลิตร

เก็บเซลตรึงทั้ง 2 ชนิดไว้ที่ 4 และ 37 องศาเซลเซียส ทำการวัดแอคติวิตีของเอน-ไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ตามวิธีข้อ 2.9.2 ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน นาน 30 วัน

2.25 การศึกษาเปรียบเทียบความเป็นไปได้ของการนำเซล E.coli ATCC 9637 ตรึงวุ้นและเซล E.coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนมาใช้ซ้ำ (reuse of immobilized cells)

เตรียมเซล E.coli ATCC 9637 ตรึงวุ้น 3 สภาวะ คือ

ก. เซลตรึงวุ้นธรรมดา โดยตรึง E.coli ATCC 9637 ความเข้มข้น 11.1 เปอร์-เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ด้วย 5.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของวุ้นตามวิธีข้อ 2.15.2

ข. เซลตรึงวุ้นชนิด ก. ที่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ ตามวิธีทดลองข้อ 2.20

ค. เซลตรึงวุ้นชนิด ก. ที่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน ตามวิธีทดลองข้อ 2.21

ในทำนองเดียวกันเตรียมเซล E.coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน 3 สภาวะเช่นกัน คือ

ก. เซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนธรรมดา โดยตรึง E.coli ATCC 9637 ความเข้มข้น 11.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนน 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามวิธีทดลองข้อ 2.14.2

ข. เซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนชนิด ก. ที่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ ตามวิธีทดลองข้อ 2.20

ค. เซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนชนิด ก. ที่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ และเฮกซาเมท-ธิลลีนไดอามีน ตามวิธีทดลองข้อ 2.21

นำเซลตรึงดังกล่าวทุกสภาวะไปวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ตามวิธีทดลองข้อ 2.9.2 แล้วล้างเซลตรึงวุ้นและเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร 3 ครั้ง และเก็บแช่เซลตรึงวุ้นไว้ในนอร์มอลซาลีน ส่วนเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนล้างเก็บแช่ใน 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศา-เซลเซียส ใช้ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ตลอดเวลาทุก ๆ 5 วัน นำเซลตรึงทั้ง 2 ชนิด มาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ตามวิธีข้อ 2.9.2 เช่นเดิม แล้วล้างและเก็บเซลตรึงไว้ด้วยสภาวะดังกล่าวแล้วข้างต้น ทำเช่นนี้เป็นเวลาทั้งหมด 30 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย