บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 อุปกรณ์

เครื่องเขย่าผสม (vortex mixer) รุ่น K-550-GE ของบริษัท Scientific Industries, Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิแบบหมุน (rotary incubator shaker) รุ่น G-25 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น KR-20000T ของบริษัท Kubota Corporation ประเทศญี่ปุ่น

ตู้อบไมโครเวฟ รุ่น MR-6650 ของบริษัท Hitachi, Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

ถังหมัก (Fermentor) 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 เครื่องควบคุมระบบน้ำหล่อเย็น (Circulation type hardy cooler) รุ่น TRL-108 ของบริษัท Thomas Kagaka ประเทศญี่ปุ่น

มาตรวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น F-13 ของประเทศญี่ปุ่น และมาตรวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH Combination Electrode) สำหรับถังหมักขนาด 5 ลิตร รุ่น D-26 ของบริษัท TOA Electronics, Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (autoclave) รุ่น KT-30 SD ของบริษัท ALP Co., Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

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

ตู้บ่มเชื้อ (program incubator) รุ่น IN 81 ของบริษัท Yamato Scientific Co., Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

หลอดแก้ววัดความหนืด (Canon-Ubbelohde semi-micro viscometer) ของบริษัท เพนนีฟูล (ไทยแลนด์) จำกัด

2.1.2 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	
กรดซัลฟูริก	Merck	ประเทศเยอรมัน
กรดไดไนโตรซาลิไซลิก	Sigma	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดไฮโดรคลอริก	Merck	ประเทศเยอรมัน
คาร์บาโซล	Fluka	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
แคลเซียมคลอไรด์	Merck	ประเทศเยอรมัน
โซเดียมเตตระบอเรท	Merck	ประเทศเยอรมัน
โซเดียมคลอไรด์	Carlo Erba	ประเทศอิตาลี
โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	Carlo Erba	ประเทศอิตาลี
โซเดียมไฮดรอกไซด์	Merck	ประเทศเยอรมัน
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	Merck	ประเทศเยอรมัน
โพแทสเซียมคลอไรด์	Merck	ประเทศเยอรมัน
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	Fluka	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
แลกติกเคซีน	ไวท์กรุ๊ป	ประเทศไทย
ไลโซไซม์	Sigma	ประเทศสหรัฐอเมริกา
เอทานอล 95 %	กรมสรรพสามิต	ประเทศไทย
เอนไซม์ปาเปน	BDH	ประเทศอังกฤษ
เอนไซม์อินเวอร์เทส	Wako Pure Chemical	ประเทศญี่ปุ่น
กรดไฮยาลูโรนิก (*S.zooepidemicus*)	Sigma	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดไฮยาลูโรนิก (human umbilical cord)	Sigma	ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.2 เชื้อจุลินทรีย์

ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 ซึ่งเป็นเชื้อที่กลายพันธุ์มาจาก *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ ATCC 35247 โดย ทรงศักดิ์ พันธุ์วัฒนะสิงห์ (2540)

2.3 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย

เก็บรักษาเชื้อ โดยเขี่ยเชื้อด้วยเข็มเขี่ยเชื้อ (loop) แล้วลาก (streak) เชื้อลงบนผิวหน้าอาหารแข็งลาดเอียง (agar slant) Brain Heart Infusion (BHI) (ภาคผนวก ก-1.2) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บเชื้อในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4 การเลี้ยงเชื้อและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

2.4.1 การเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น

เตรียมหัวเชื้อตั้งต้น (inoculum) ได้โดย เลี้ยงเชื้อบนผิวหน้าอาหารแข็งลาดเอียง BHI เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปิเปตน้ำที่ขจัดไอออนออกแล้ว (deionized water) 2 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร เขี่ยเชื้อให้กระจายในน้ำ โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ จากนั้น ปิเปตเซลล์แขวนลอยที่ได้ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว BHI (ภาคผนวก ก-1.1) 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อในเครื่องเขย่าแบบหมุน ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการหมุน 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 ชั่วโมง ซึ่งเชื้อจะเจริญอยู่ในระยะกึ่งกลางทวีคูณ (mid – log phase) ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ประมาณ 0.2

2.4.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับขวดเขย่า

ปิเปตเซลล์แขวนลอยที่ได้จากขั้นตอนที่ 2.4.1 5 มิลลิลิตร (ปริมาณร้อยละ 20 ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงสู่อาหารเหลวสูตรสำหรับการผลิต (ภาคผนวก ง) 25 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็วรอบในการหมุน 300 รอบต่อนาที

2.4.3 การเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

ถ่ายหัวเชื้อตั้งต้นที่ได้จากขั้นตอนที่ 2.4.1 300 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสูตรสำหรับการผลิต (ภาคผนวก ง) 2,700 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งจะได้น้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้น เท่ากับ 0.03 กรัมต่อลิตร ควบคุมภาวะตลอดการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศเป็น 0.5 vvm ความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที และควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 5 โมลาร์

2.5 วิธีวิเคราะห์

2.5.1 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

วัดโดยใช้มาตรวัดความเป็นกรด-ด่าง

2.5.2 การวัดการเจริญของเซลล์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

ปิเปตน้ำหมัก 10 มิลลิลิตร ที่ได้จากขั้นตอนที่ 2.4.2 และ 2.4.3 ลงในหลอดเซนทริฟิวจ์ นำไปปั่นที่ความเร็วรอบในการหมุน 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์ด้วยน้ำขจัดไอออน 2 ครั้ง 5 มิลลิลิตร ล้างเซลล์ที่ได้ลงสู่กระทงอะลูมินัมฟอยล์

(aluminum foil) อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ (desicator) แล้วชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งละเอียด หักน้ำหนักของกระทงอะลูมินัมฟอยล์ออก จะได้น้ำหนักเซลล์แห้ง หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร ส่วนสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการปั่นแยกเซลล์แล้ว จะนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก และปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก

2.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก (total sugar) โดยใช้เอนไซม์อินเวอร์เทส

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส (ภาคผนวก ข-1.3) 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม นำไปแช่ในอ่างน้ำเย็นควบคุมอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที เติมสารละลายไดไนโตรซาลิไซลิก 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม นำสารละลายที่ได้ไปต้มในอ่างน้ำเดือดที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแช่ในอ่างน้ำเย็นเป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำขจัดไอออน 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ใช้น้ำขจัดไอออน 0.5 มิลลิลิตร ที่ผ่านขั้นตอนเช่นเดียวกับสารละลายตัวอย่างเป็นตัวเปรียบเทียบ คำนวณความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร จากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลซูโครสที่ย่อยด้วยเอนไซม์อินเวอร์เทส ในช่วงความเข้มข้นเท่ากับ 0 ถึง 1.0 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ค-1)

2.5.4 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกโดยวิธีคาร์บาโซล (Bitter และ Muir, 1962)

2.5.4.1 การตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิก

ปิเปตสารละลายที่ได้จากการปั่นแยกเซลล์ ตามขั้นตอนที่ 2.5.2 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดเซนทริฟิวจ์ เติมเอทานอล 95 % 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม จากนั้นปั่นแยกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิก ที่ความเร็วรอบในการหมุน 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิกครั้งที่ 2 โดยเทส่วนของสารละลายลงในหลอดเซนทริฟิวจ์ และเติมเอทานอล 95 % 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม ปั่นแยกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิก ที่ความเร็วรอบในการหมุน 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และเทส่วนของสารละลายทิ้ง นำตะกอนกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้มารวมกัน เพื่อใช้ในการละลายกรดไฮยาลูโรนิกต่อไป

2.5.4.2 การละลายกรดไฮยาลูโรนิก

นำตะกอนกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากขั้นตอนที่ 2.5.4.1 มาละลายด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม เพื่อใช้ในการหาปริมาณและน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกต่อไป

2.5.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกโดยวิธีคาร์บาโซล

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอนที่ 2.5.4.2 ที่ผ่านการเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่แช่อยู่ในอ่างน้ำแข็ง เติมสารละลายบอเรท-ซัลฟูริก (ภาคผนวก ข-2.1) 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปต้มในอ่างน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งให้สารละลายเย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้น เติมสารละลายคาร์บาโซล (ภาคผนวก ข-2.2) 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้สารละลายเย็นที่อุณหภูมิห้อง นำสารละลายที่ได้ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร ใช้น้ำขจัดไอออน 0.5 มิลลิลิตร ที่ผ่านขั้นตอนเช่นเดียวกับสารละลายตัวอย่างเป็นตัวเปรียบเทียบ คำนวณความเข้มข้นของกรดไฮยาลูโรนิก จากกราฟมาตรฐานของกรดไฮยาลูโรนิกที่ความเข้มข้นในช่วง 0 ถึง 200 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ค-2)

2.5.5 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก

2.5.5.1 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกโดยอาศัยความหนืด (Viscometry)

การหาน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกโดยอาศัยความหนืดสามารถทำได้โดยหาค่า relative viscosity (η_r) จากสมการ

$$\eta_r = t / t_0$$

โดย t_0 = เวลาที่ตัวทำละลายใช้ไหลผ่าน viscometer (วินาที)

t = เวลาที่ตัวถูกละลายที่ละลายอยู่ในตัวทำละลายใช้ไหลผ่าน viscometer (วินาที)

จากนั้น หาค่า specific viscosity (η_{sp}) จากสมการ

$$\eta_{sp} = \eta_r - 1$$

จากนั้น หาค่า intrinsic viscosity ($[\eta]$) จากสมการ

$$[\eta] = \lim_{c \to 0} \eta_{sp} / c$$

c = ความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮยาลูโรนิก (กรัมต่อมิลลิลิตร ที่ผ่านการเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม

โดยพลอตกราฟระหว่างค่า η_{sp} / c กับ c และลากเส้นตรงตัดที่ $c = 0$

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จะได้ค่า [η] นำค่า [η] ที่ได้มาคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกโดยอาศัยสมการของ Mark –Houwink คือ

$$[\eta] = KM^{a}$$

โดย [η] = intrinsic viscosity

M = น้ำหนักโมเลกุล

K และ a = ค่าคงที่

ซึ่งจากการศึกษาของ Cleland และ Wang (1970) เกี่ยวกับการหาค่าคงที่ K และ a สามารถหาค่าคงที่ K ได้เท่ากับ 0.0228 และค่าคงที่ a ได้เท่ากับ 0.816 สำหรับกรดไฮยาลูโรนิกที่ใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เป็นตัวทำละลาย

2.5.5.2 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกด้วยเครื่อง Capillary Electrophoresis

การหาน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกด้วยเครื่อง Capillary Electrophoresis ทำโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Shozo และคณะ (1997) โดยใช้ uncoated fused – silica capillary มี naphthalene –1,3,6- trisulfonic acid trisodium salt (NTS) เป็น internal standard และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4.0 เป็น running buffer ฉีดสารตัวอย่างโดยใช้ความดัน 20 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 วินาที อุณหภูมิของ capillary เท่ากับ 25 องศาเซลเซียส ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าเท่ากับ 20 กิโลโวลท์ โดยมีกรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลแน่นอนขนาดต่างๆเป็นสารตัวอย่าง ติดตามกรดไฮยาลูโรนิกจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 200 นาโนเมตร และคำนวณหาค่า relative mobility ของกรดไฮยาลูโรนิก สำหรับการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า relative mobility กับค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก โดยใช้ค่า migration time ของกรดไฮยาลูโรนิกหารด้วยค่า migration time ของ NTS ซึ่งเป็น internal standard