หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสสูงจาก 3 สายพันธุ์

ในการคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส สูงสุดจาก 3 สายพันธุ์คือ E.coli ATCC 9637, E.coli ATCC 11105 และ S.rubidaea ATCC 181 ซึ่งได้จากศูนย์เก็บรวบรวมเชื้อ American type culture collection ได้ทำการทดลองเพื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

3.1.1 ความสามารถในการต้านยาเพนนิซิลิน จี ของแบคทีเรีย

โดยการบ่มเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ บนจานเพาะเชื้ออาหารสูตรอุดม และสูตรปรับต่ำ ซึ่งเสริมด้วยเพนนิซิลิน จี ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

ผลปรากฏดังตารางที่ 8 คือ ในอาหารสูตรอุดมชนิดที่เสริมด้วย 0.2 เปอร์เซนต์กรดฟีนิลอะซีติก กับชนิดที่เสริมด้วย 0.2 เปอร์เซนต์กรดฟีนิลอะซีติก และ 0.5 เปอร์เซนต์กลูโคส บ่มที่ 30 หรือ 37 องศาเซลเซียส E.coli ATCC 9637 สามารถต้านเพนนิซิลิน จี ที่ความเข้มข้น 200 หน่วยเพนนิซิลิน·จี* ต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ขณะที่ในอาหารสูตรปรับต่ำ ซึ่งบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสจะต้านเพนนิซิลิน จี ที่ความเข้มข้นเพียง 100 หน่วยเพนนิซิลิน จี ต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับ E.coli ATCC 11105 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรอุดมชนิดที่เสริมด้วย 0.2 เปอร์เซนต์กรดฟีนิลอะซีติก และชนิดที่เสริมด้วย 0.2 เปอร์เซนต์กรดฟีนิลอะซีติกกับ 0.5 เปอร์เซนต์กลูโคส ทั้งที่ 30 และ 37 องศาเซลเซียส สามารถต้านเพนนิซิลิน จี ได้สูง 200 หน่วยเพนนิซิลิน จี ต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นกัน แต่ไม่สามารถเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำ ไม่ว่าจะบ่มที่ 30 หรือ 37 องศาเซลเซียสก็ตาม ส่วน S.rubidaea ATCC 181 นั้น ให้ผลคล้ายกับ E.coli ATCC 11105 คือไม่สามารถเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำ ทั้งที่ 30 และ 37 องศาเซลเซียส แต่ในอาหารสูตรอุดมชนิดที่เสริมด้วย

*1 หน่วยเพนนิซิลิน จี คือปริมาณของเพนนิซิลิน จี ที่ออกฤทธิ์ได้เท่ากับการออกฤทธิ์ของเพนนิซิลิน จี หนัก 0.6 ไมโครกรัม

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบความสามารถในการต้านยาเพนนิซิลิน จี ของ E.coli ATCC 9637, ATCC 11105 และ S.rubidaea ATCC 181 เมื่อเลี้ยงบนจานเพาะเชื้ออาหารสูตรอุดม และสูตรปรับต่ำ ที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส

ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์	ความสามารถในการต้านยาเพนนิซิลิน จี (หน่วยเพนนิซิลิน จี/มิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ)					
	E.coli ATCC 9637		E.coli ATCC 11105		S.rubiolaea ATCC 181	
	30°ซ	37°ซ	30°ซ	37°ซ	30°ซ	37°ซ
อาหารสูตรอุดมชนิดเสริมด้วย 0.2 % กรดฟีนิลอะซีติก	200	200	200	200	200	100
อาหารสูตรอุดมชนิดเสริมด้วย 0.2 % กรดฟีนิลอะซีติกกับ 0.5 % กลูโคส	200	200	200	200	200	200
อาหารสูตรปรับต่ำ	200	100	0	0	0	0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

0.2 เปอร์เซนต์ฟีนิลอะซีติก ซึ่งบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส จะต้านเพนนิซิลิน จี ได้เพียง 100 หน่วย เพนนิซิลิน จี ต่อมิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น

3.1.2 เปรียบเทียบความสามารถในการเจริญ และการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของแบคทีเรีย

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการศึกษาการเจริญ และการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส คือ อาหารสูตรอุดม, อาหารสูตรอุดมชนิดที่เสริมด้วย 0.2 เปอร์เซนต์ กรดฟีนิลอะซีติก กับชนิดที่เสริมด้วย 0.2 เปอร์เซนต์ กรดฟีนิลอะซีติก และ 0.5 เปอร์เซนต์กลูโคส และอาหารสูตรปรับต่ำ โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

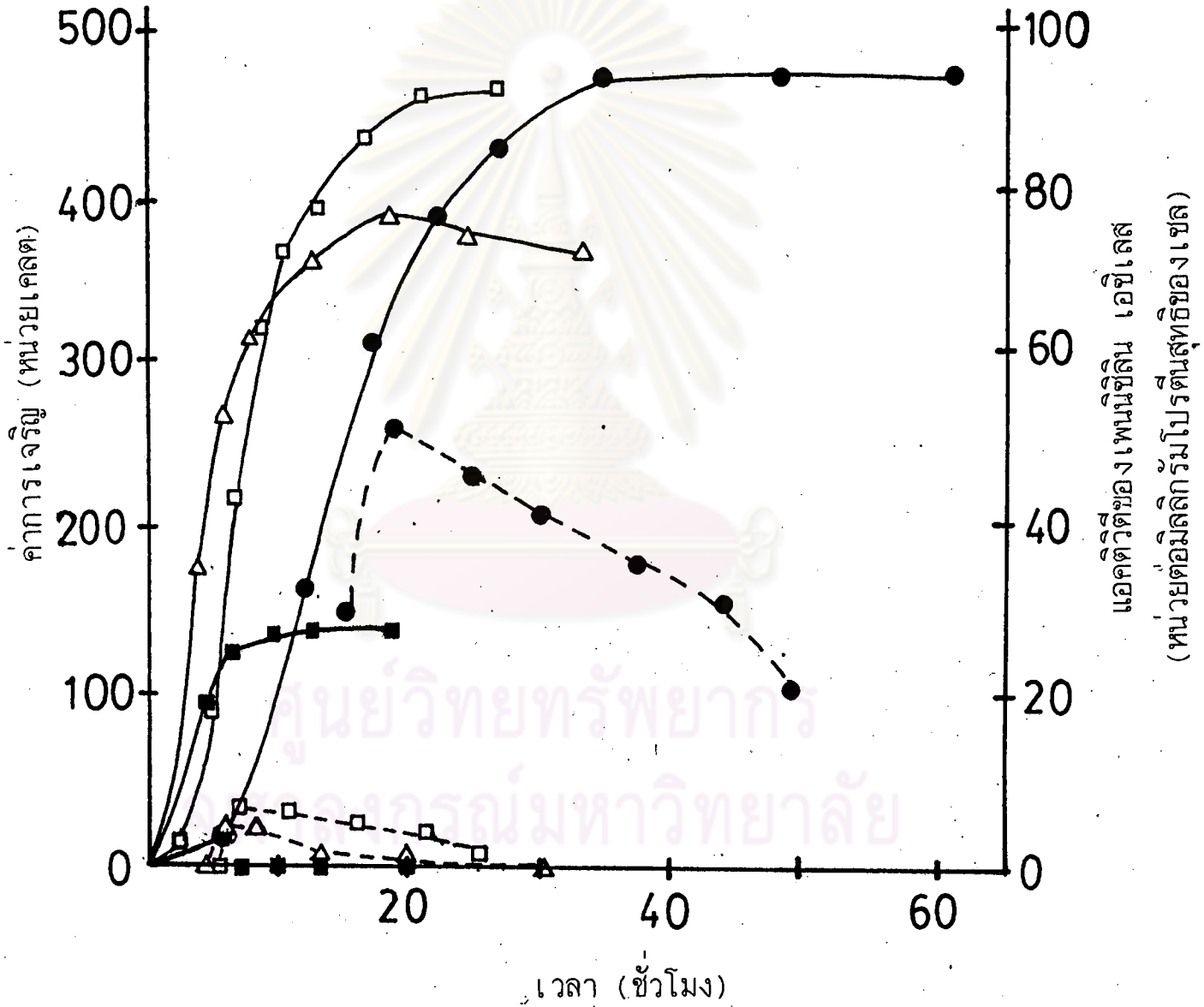
จากรูปที่ 9,10 และ11 ซึ่งแสดงถึงรูปแบบการเจริญและการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส ของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ และผลสรุปในตารางที่ 9 ซึ่งแสดงข้อมูลเปรียบเทียบความสามารถในการเจริญและการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส โดยใช้ค่าการเจริญสูงสุด และการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส สูงสุดของทั้ง 3 สายพันธุ์เป็นเกณฑ์ คือ E.coli ATCC 9637 เจริญได้ดีที่ 30 องศาเซลเซียส เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรอุดมชนิดที่เสริมด้วย 0.2 เปอร์เซนต์ กรดฟีนิลอะซีติกและอาหารสูตรปรับต่ำ ได้ค่าการเจริญสูงสุดถึง 460 หน่วยเคลต ขณะที่เลี้ยงในอาหารสูตรอุดมอย่างเดียว จะมีการเจริญสูงสุดเพียง 390 หน่วยเคลต และเมื่อเสริมด้วยกลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์ ค่าการเจริญสูงสุดลดลงเหลือเพียง 138 หน่วยเคลต ผลการศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลสสูงสุด พบว่าแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลสสูงสุด จะมีค่าถึง 53.2 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนสุทธิของเซล เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำเปรียบเทียบกับเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรอุดม และอาหารสูตรอุดมชนิดเสริมด้วย 0.2 เปอร์เซนต์ฟีนิลอะซีติก จะมีค่าเพียง 5.8 และ 7.8 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนสุทธิของเซล และจะไม่พบแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ถ้าเลี้ยงในอาหารสูตรอุดมชนิดที่เสริมด้วย 0.2 เปอร์เซนต์ กรดฟีนิลอะซีติก กับ 0.5 เปอร์เซนต์กลูโคส

สำหรับ E.coli ATCC 11105 เจริญดีที่สุดในอาหารสูตรอุดมชนิดเสริมด้วย 0.2 เปอร์เซนต์ กรดฟีนิลอะซีติก คือ ให้ค่าการเจริญสูงสุด 400 หน่วยเคลต และรองลงไปเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรอุดมอย่างเดียว ค่าการเจริญสูงสุดเป็น 360 หน่วยเคลต ส่วนในอาหารสูตรอุดมชนิดเสริมด้วย 0.2 เปอร์เซนต์ กรดฟีนิลอะซีติก และ 0.5 เปอร์เซนต์ กลูโคส จะมีการเจริญสูงสุดน้อยกว่า (170 หน่วยเคลต) และไม่สามารถเจริญได้ในอาหารสูตรปรับต่ำ เมื่อเปรียบเทียบการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส พบว่าแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลสสูงสุดของ E.coli

รูปที่ 9 รูปแบบการเจริญ (——) และการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส (----) ของ E.coli ATCC 9637 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรอุดม (△), อาหารสูตรอุดมชนิดที่เสริมด้วย 0.2% กรดฟีนิลอะซิติก (□), อาหารสูตรอุดมชนิดที่เสริมด้วย 0.2% กรดฟีนิลอะซีติก กับ 0.5% กลูโคส (■) และอาหารสูตรปรับต่ำ (●) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

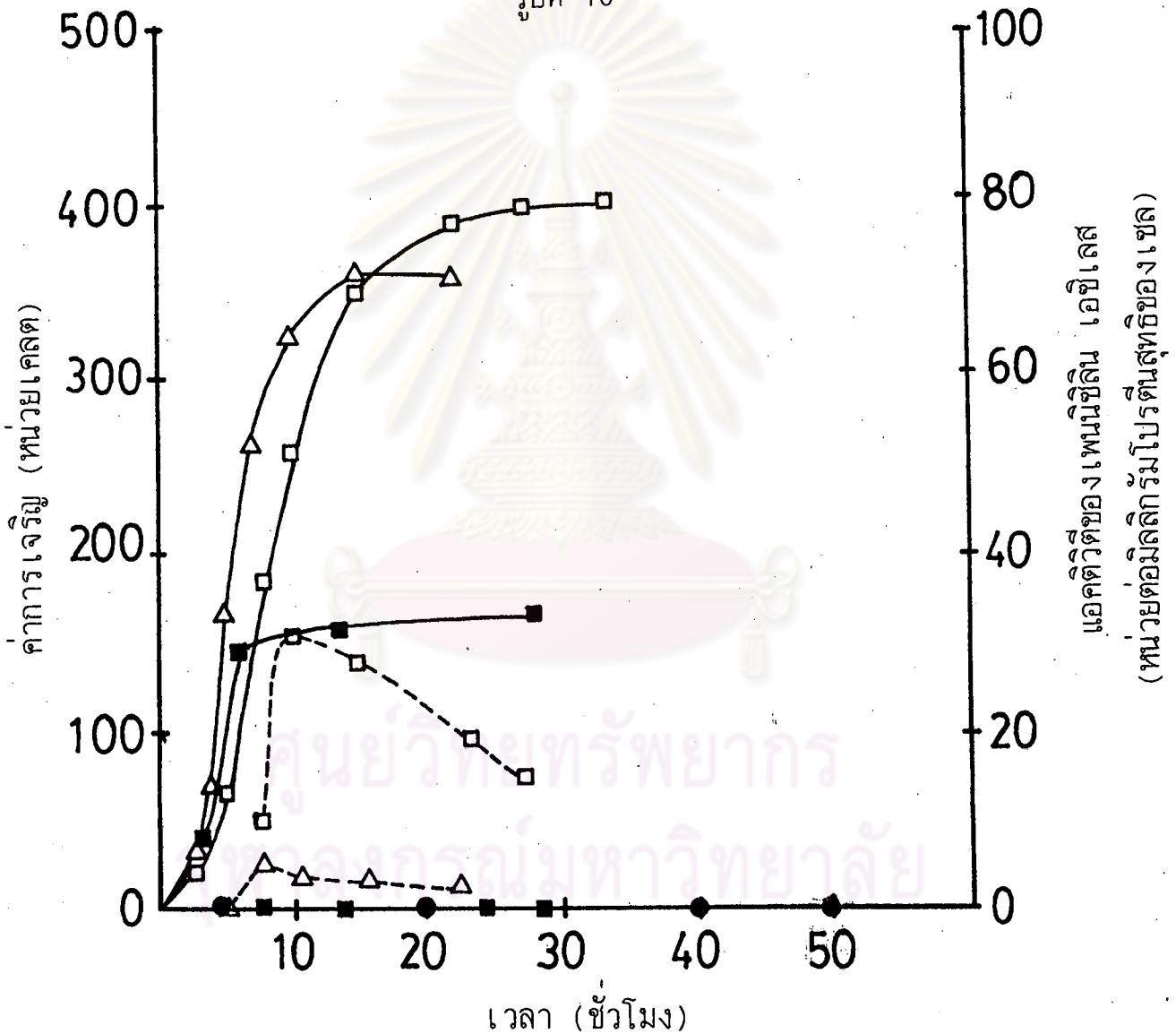
รูปที่ 9


500
400
300
200
100
0
100
80
60
40
20
0
20
40
60
เวลา (ชั่วโมง)
ความเข้มข้นของยาในเลือด (มคก./มล.)
ปริมาณยาที่ถูกขับออกทางปัสสาวะสะสม (ร้อยละของขนาดยาที่ให้)

รูปที่ 10 รูปแบบการเจริญ (——) และการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส (----) ของ E.coli ATCC 11105 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรอุดม (△), อาหารสูตรอุดมชนิดที่เสริมด้วย 0.2% กรดฟีนิลอะซีติก (□), อาหารสูตรอุดมชนิดที่เสริมด้วย 0.2% กรดฟีนิลอะซีติกกับ 0.5% กลูโคส (■) และอาหารสูตรปรับต่ำ (●) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 10



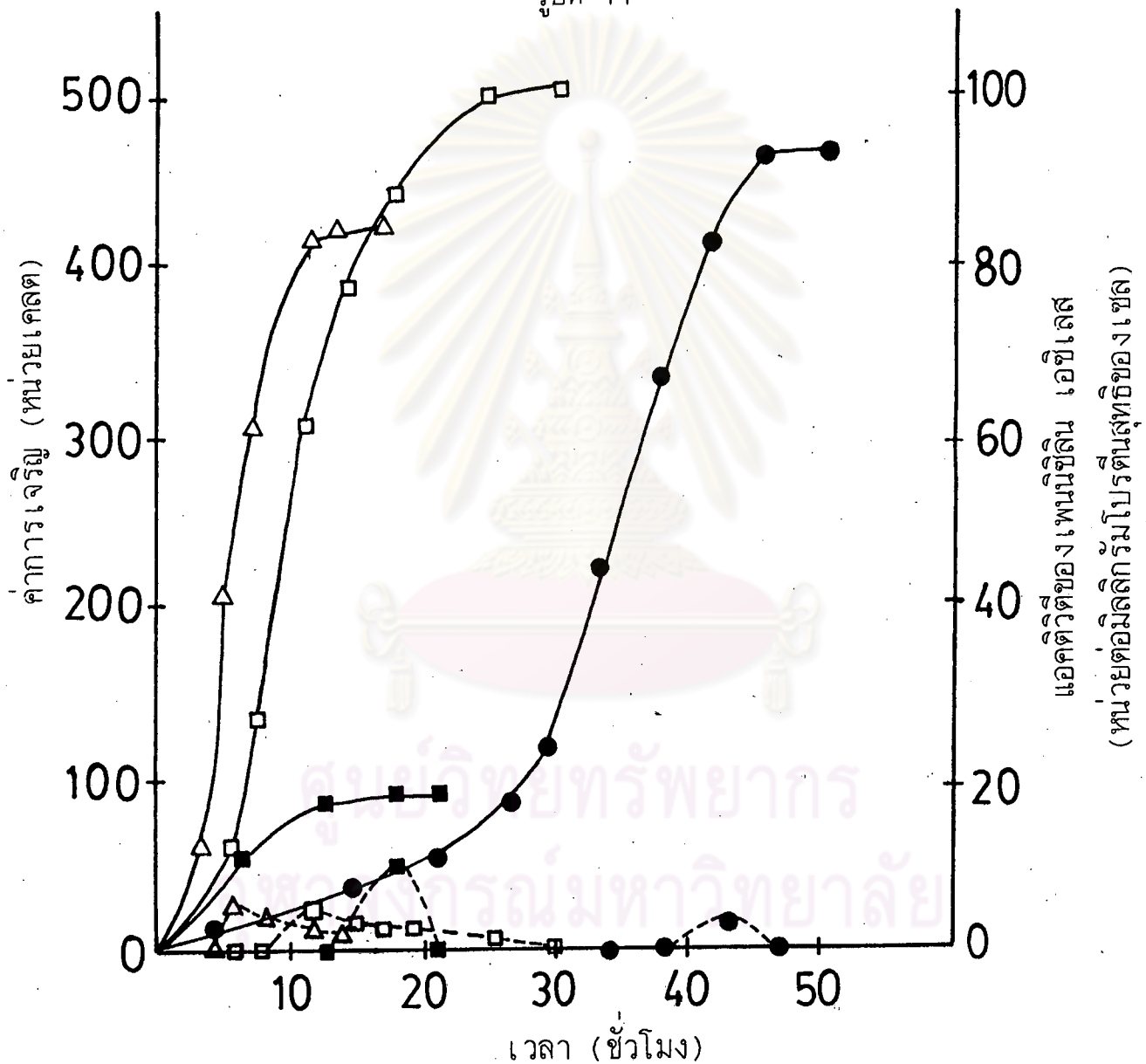
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

56

รูปที่ 11 รูปแบบการเจริญ (——) และการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส (----) ของ S.rubidaea ATCC 181 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรอุดม (Δ), อาหารสูตรอุดมชนิดที่เสริมด้วย 0.2% กรดฟีนิลอะซิติก (□), อาหารสูตรอุดมชนิดที่เสริมด้วย 0.2% กรดฟีนิลอะซิติกกับ 0.5% กลูโคส (■) และอาหารสูตรปรับต่ำ (●) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 11



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบค่าการเจริญสูงสุดและความสามารถในการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส สูงสุดของ E.coli ATCC 9637, ATCC 11105 และ S.rubidaea ATCC 181 ในอาหารสูตรอุดมและสูตรปรับต่ำ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

	ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์	ค่าการเจริญสูงสุด (หน่วยเคลต)	ค่าการเจริญสูงสุดสัมพัทธ์ (ร้อยละ)	แอคติวิตีของเพนนิซิลินเอซิเลส สูงสุด (หน่วย/มก.โปรตีนสุทธิของเซล)	แอคติวิตีของเพนนิซิลินเอซิเลส สูงสุดสัมพัทธ์ (ร้อยละ)
E.coli ATCC 9637	อาหารสูตรอุดม	390	78.0	5.8	10.9
	อาหารสูตรอุดมชนิดเสริม 0.2 % กรดฟีนิลอะซีติก	460	92.0	7.8	14.7
	อาหารสูตรอุดมชนิดเสริม 0.2 % กรดฟีนิลอะซีติก กับ 0.5 % กลูโคส	138	27.6	0	0
	อาหารสูตรปรับต่ำ	460	92.0	53.2	100
E.coli ATCC 11105	อาหารสูตรอุดม	360	72.0	5.5	10.4
	อาหารสูตรอุดมชนิดเสริม 0.2% กรดฟีนิลอะซีติก	400	80.0	31.4	59.1
	อาหารสูตรอุดมชนิดเสริม 0.2 % กรดฟีนิลอะซีติก กับ 0.5 % กลูโคส	170	34.0	0	0
	อาหารสูตรปรับต่ำ	0	0	0	0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

	อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์	ค่าการเจริญสูงสุด (หน่วยเคลต)	ค่าการเจริญสูงสุดสัมพัทธ์ (ร้อยละ)	แอคติวิตีของเพนนิซิลินเอซิเลส สูงสุด (หน่วย/มก.โปรตีนสุทธิของเซล)	แอคติวิตีของเพนนิซิลินเอซิเลส สูงสุดสัมพัทธ์ (ร้อยละ)
S.rubidaea ATCC 181	อาหารสูตรอุดม	425	85.0	6.1	11.5
	อาหารสูตรอุดมชนิดเสริม 0.2 % กรดฟีนิลอะซีติก	500	100.0	4.9	9.2
	อาหารสูตรอุดมชนิดเสริม 0.2 % กรดฟีนิลอะซีติก กับ 0.5 % กลูโคส	90	18.0	10.5	19.8
	อาหารสูตรปรับต่ำ	460	92.0	3.9	7.6

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ATCC 11105 จะมีค่าสูงสุดเท่ากับ 31.4 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนสุทธิของเซล เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรอุดมชนิดเสริมด้วย 0.2 เปอร์เซนต์กรดฟีนิลอะซีติก และเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรอุดมอย่างเดียวจะผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส สูงสุดได้เพียง 5.5 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนสุทธิของเซล เท่านั้น เช่นเดียวกันกับ E.coli ATCC 9637จะไม่สามารถตรวจพบแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ในสายพันธุ์ ATCC 11105 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรอุดมชนิดเสริมด้วย 0.2 เปอร์เซนต์ กรดฟีนิล-อะซีติกและ 0.5 เปอร์เซนต์กลูโคสเลย

ส่วน S.rubidaea ATCC 181 มีการเจริญได้ดีในอาหารสูตรอุดมชนิดเสริมด้วย 0.2 เปอร์เซนต์ กรดฟีนิลอะซีติก ให้ค่าการเจริญสูงสุดถึง 500 หน่วยเคลต ในอาหารสูตรปรับต่ำได้ค่าการเจริญสูงสุด 460 หน่วยเคลต และได้ 425 หน่วยเคลต เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรอุดมอย่างเดียว ในทำนองเดียวกันอาหารสูตรอุดมชนิดที่เสริมด้วย 0.2 เปอร์เซนต์ กรดฟีนิลอะซีติกกับ 0.5 เปอร์เซนต์กลูโคส จะให้ค่าการเจริญของเชื้อ S.rubidaea ต่ำ พบค่าการเจริญสูงสุดเพียง 90 หน่วยเคลต และให้ค่าแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส สูงสุดเพียง 10.5 หน่วยต่อมิลลิกรัม โปรตีนสุทธิของเซล ขณะที่เลี้ยงในอาหารสูตรอื่น ๆ ข้างต้น ก็จะให้ค่าแอคติวิตีของเพน-นิซิลิน เอซิเลส ในระดับต่ำเช่นกัน (4-6 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนสุทธิของเซล)

3.2 ผลการศึกษาสภาวะเหมาะสมในการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ E.coli ATCC 9637

3.2.1 ชนิดของสารต้นตอคาร์บอน

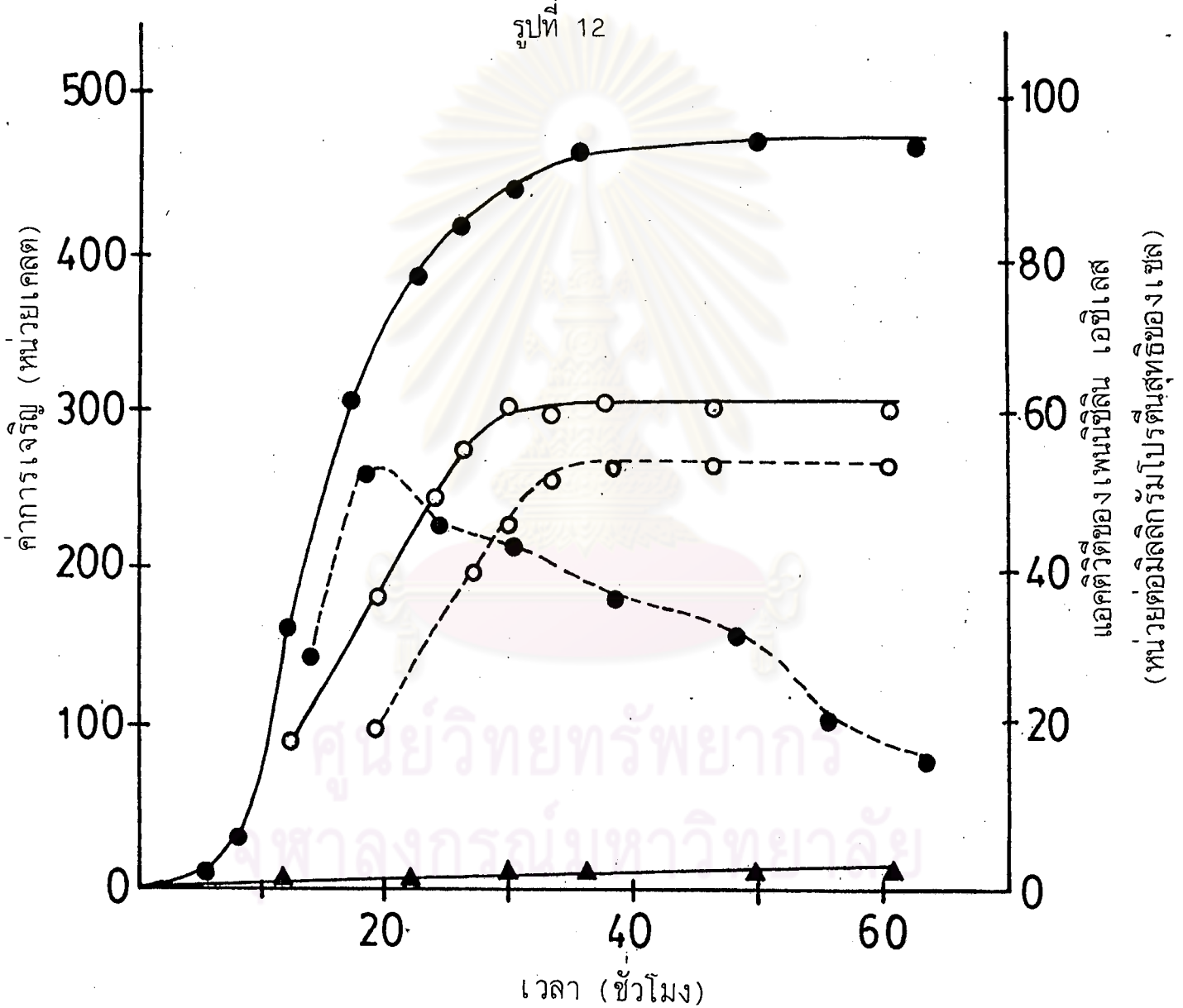
จากการทดลองเพาะเลี้ยง E.coli ATCC 9637 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด คือ อาหารสูตรปรับต่ำชนิดที่มี 0.5 เปอร์เซนต์ โซเดียมกลูตาเมตเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว ไม่มี 0.2 เปอร์เซนต์กรดฟีนิลอะซีติก ชนิดที่มีเพียง 0.2 เปอร์เซนต์กรดฟีนิลอะซีติก แต่ไม่มี 0.5 เปอร์เซนต์โซเดียมกลูตาเมต และชนิดที่มีทั้ง 0.5 เปอร์เซนต์โซเดียมกลูตาเมต กับ 0.2 เปอร์เซนต์กรดฟีนิลอะซีติก เป็นสารต้นตอคาร์บอน (รูปที่12) จะเห็นว่า E.coli ATCC 9637 สามารถเจริญได้ดีที่สุด ได้ค่าเคลตสูงถึง 500 หน่วยเคลต เมื่อมีสารต้นตอคาร์บอน 2 ชนิด และเกือบไม่มีการเจริญเลยเมื่อใช้โซเดียมกลูตาเมตเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว ในขณะที่ใช้กรดฟีนิลอะซีติกอย่างเดียวจะให้การเจริญได้สูงพอประมาณ (300 หน่วยเคลต)

สำหรับการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยง E.coli

รูปที่ 12 รูปแบบการเจริญ (——) และการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส (----) ของ E.coli ATCC 9637 ในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีแหล่งต้นตอคาร์บอนเป็น 0.5% โซเดียมกลูตาเมตอย่างเดียว (▲), 0.2% กรดฟีนิลอะซีติกอย่างเดียว (O) และ 0.5% โซเดียมกลูตาเมตกับ 0.2% กรดฟีนิลอะซีติก (●) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 12



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ATCC 9637 ในอาหารสูตรปรับต่ำชนิดที่มีสารต้นตอคาร์บอนทั้ง 2 ชนิดได้ค่าแอคติวิตีสูงสุดของเพนนิซิลิน เอซิเลส 53.2 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนสุทธิของเซล และเมื่อใช้ 0.2 เปอร์เซนต์ กรดฟีนิลอะซีติกเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนเพียงอย่างเดียว ได้ค่าแอคติวิตีสูงสุดของเพนนิซิลิน เอซิเลส 55.4 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนสุทธิของเซล

3.2.2 ผลกระทบของอุณหภูมิ

เมื่อทำการทดลองเพื่อเปรียบเทียบผลกระทบของอุณหภูมิต่อการเจริญ และการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส ของ E.coli ATCC 9637 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ ที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส ผลจากรูปที่ 13 แสดงให้เห็นว่า E.coli ATCC 9637 สามารถเจริญได้ดี ให้ค่าการเจริญสูงสุดประมาณ 400 หน่วยเคลต เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดียิ่งขึ้นเมื่อเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส ให้ค่าการเจริญสูงสุดถึง 460 หน่วยเคลต ในขณะที่การผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส ที่ 37 องศาเซลเซียส จะมีค่าต่ำกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส อย่างเห็นได้ชัด (แอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลสสูงสุด 11.7 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนสุทธของเซล เทียบกับ เลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งจะได้ค่าแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลสสูงสุดถึง 53.2 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนสุทธิของเซล)

3.2.3 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมกลูตาเมต

ผลการทดลองในรูปที่ 14 แสดงถึง ปริมาณของโซเดียมกลูตาเมต ต่อการเจริญและการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส คือ

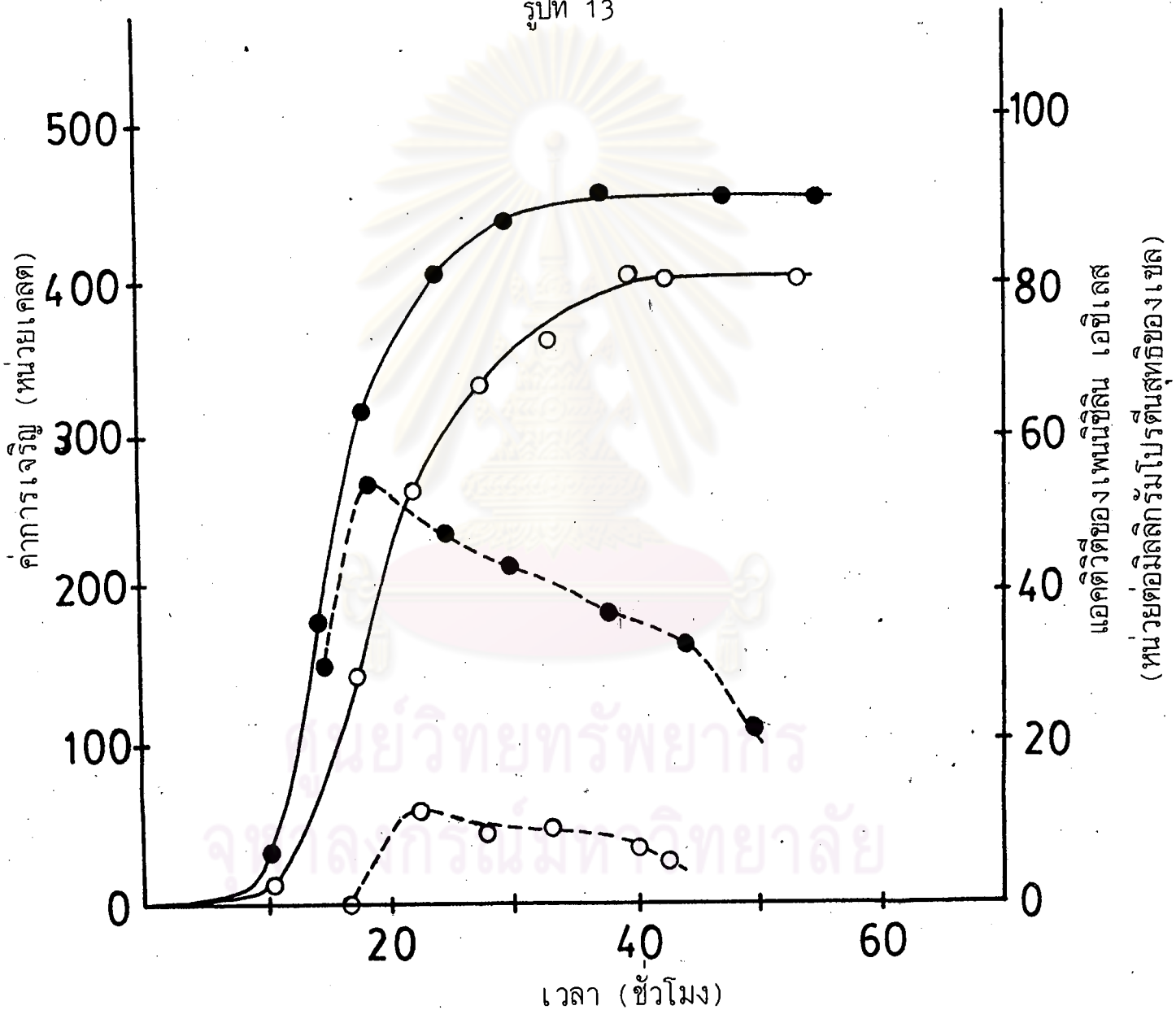
การเพิ่มปริมาณโซเดียมกลูตาเมต จะช่วยเพิ่มปริมาณเซลด้วย ที่ความเข้มข้นโซเดียมกลูตาเมต 0.2 เปอร์เซนต์ จะได้ค่าการเจริญสูงสุด 380 หน่วยเคลต และที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 เปอร์เซนต์ ค่าการเจริญสูงสุดเป็น 460 และ 480 หน่วยเคลต ตามลำดับ และเมื่อไม่มีโซเดียมกลูตาเมตในอาหรเลี้ยงเชื้อ จะได้ค่าการเจริญสูงสุดเพียง 310 หน่วยเคลต เท่านั้น

สำหรับผลของปริมาณโซเดียมกลูตาเมตต่อการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส เป็นดังนี้ ค่าแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลสสูงสุด จะได้ 55.4, 51.4, 53.2 และ 62.1 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนสุทธิของเซล เมื่อเลี้ยง E.coli ATCC 9637 ในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีปริมาณโซเดียมกลูตาเมต 0, 0.2, 0.5 และ 1.0 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ

รูปที่ 13 รูปแบบการเจริญ (——) และการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส (----) ของ E.coli ATCC 9637 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (●) และ 37 องศาเซลเซียส (O)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 13

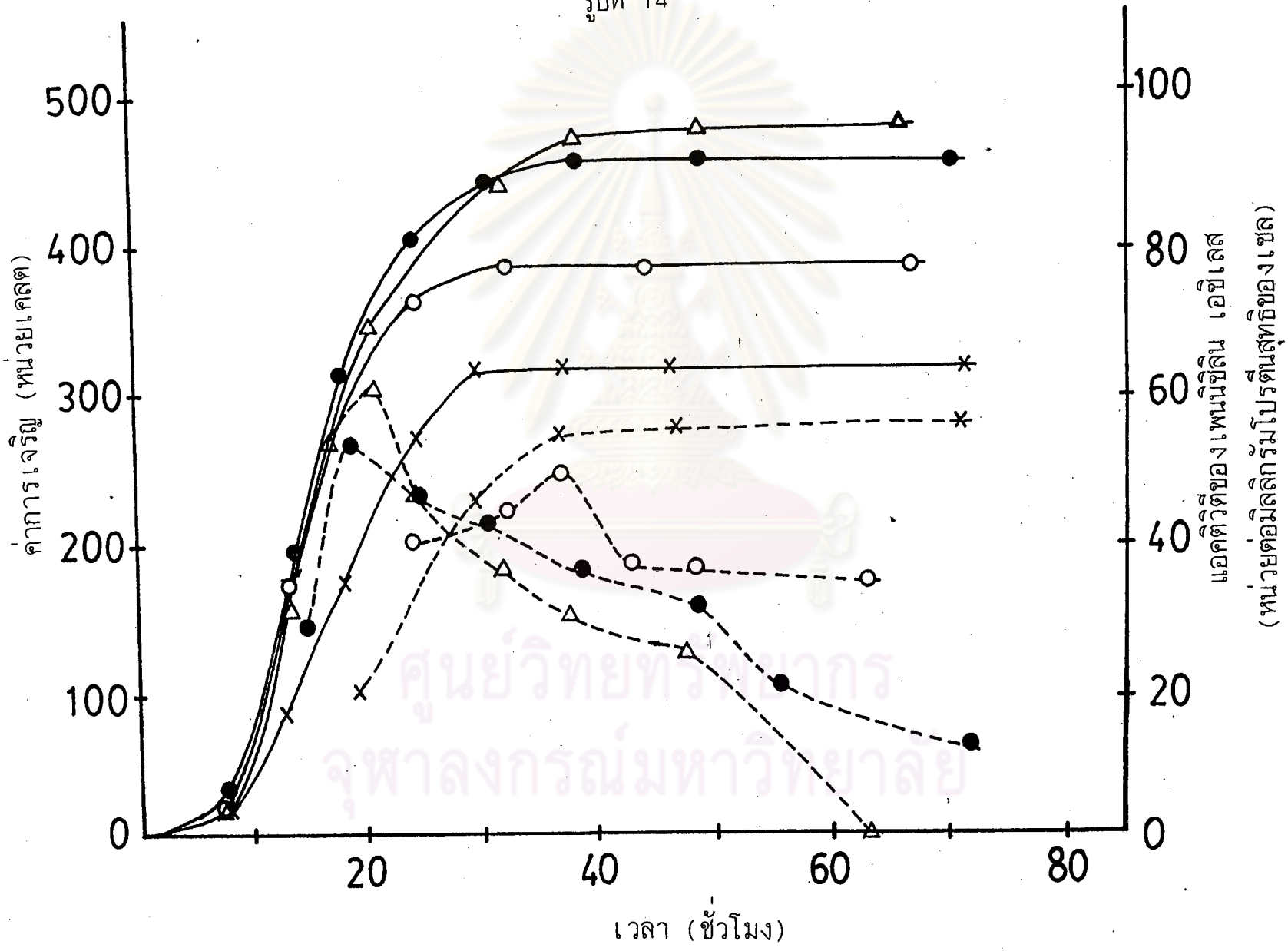


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 14 รูปแบบการเจริญ (——) และการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส (----) ของ E.coli ATCC 9637 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำ โดยแปรค่าความเข้มข้นของโซเดียมกลูตาเมต 0% (×), 0.2% (○), 0.5% (●) และ 1.0% (△) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 14



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.4 ผลของความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซีติก

เมื่อทำการทดลองแปรค่าความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซีติก ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ โดยติดตามการเจริญและการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส ผลแสดงดังรูปที่ 15 คือ เมื่อไม่มีกรดฟีนิลอะซีติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ E.coli ATCC 9637 ไม่สามารถเจริญได้ แต่ถ้าหากเพิ่มปริมาณกรดฟีนิลอะซีติก จะมีผลทำให้รูปแบบของการเจริญของ E.coli ATCC 9637 เปลี่ยนไป คือ เมื่อมีกรดฟีนิลอะซีติก 0.1 กับ 0.2 เปอร์เซนต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเซลจะเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ ในระยะเวลาใกล้เคียงกัน คือ เมื่อเลี้ยงนานประมาณ 30 ชั่วโมง แต่จะใช้เวลาเข้าสู่ช่วงระยะการเจริญคงที่นี้ยาวนานขึ้นเป็น 50 ชั่วโมง ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะ-ซีติกขึ้นเป็น 0.5 เปอร์เซนต์

แต่ทว่าการเพิ่มปริมาณกรดฟีนิลอะซีติกจะมีส่วนช่วยในการเพิ่มปริมาณเซลด้วย คือ เมื่อใช้ความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซีติก 0.1, 0.2 และ 0.5 เปอร์เซนต์ จะได้ค่าการเจริญสูงสุดเป็น 400, 460 และ 475 หน่วยเคลต ตามลำดับ

สำหรับการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส พบว่าการเพิ่มปริมาณกรดฟีนิลอะซีติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลต่อการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส ดังนี้ (รูปที่15) เมื่อใช้กรดฟีนีลอะซีติกเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.5 เปอร์เซนต์ จะได้ค่าแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซีเลส สูงสุดเป็น 44.8, 53.2 และ 45.4 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนสุทธิของเซล ตามลำดับ

3.2.5 ผลของช่วงเวลาการเติมกรดฟีนิลอะซีติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เมื่อเลี้ยง E.coli ATCC 9637 ในอาหารสูตรปรับต่ำ โดยมีการเติมกรดฟีนิลอะซีติก ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 เปอร์เซนต์ ที่ช่วงระยะการเจริญกึ่งทวีคูณ (mid log), ปลายทวีคูณ (late log) และระยะการเจริญคงที่ (stationary phase) เปรียบเทียบรูปแบบการเจริญ และการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส กับเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำ ซึ่งมี 0.2 เปอร์เซนต์ กรดฟีนิลอะซีติกตั้งแต่เริ่มต้น พบว่า (รูปที่ 16) ไม่มีความแตกต่างทั้งในแง่การเจริญ (ค่าการเจริญสูงสุด 460 หน่วยเคลต) และแง่การผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส (ได้ค่าแอค-ติวิตีของ เพนนิซิลิน เอซิเลส สูงสุดประมาณ 53 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนสุทธิของเซล)

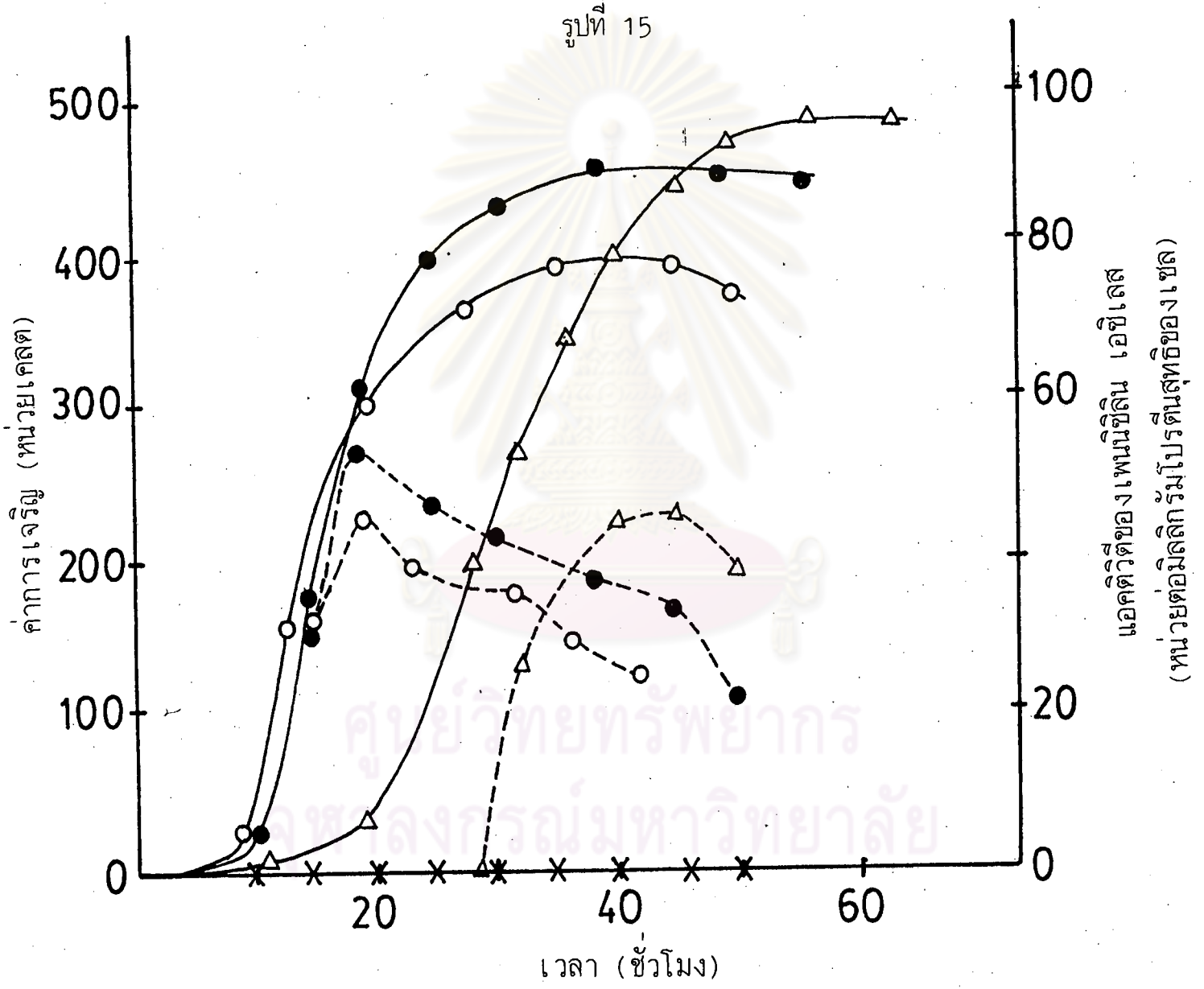
3.2.6 ผลกระทบของกลูโคส

จากรูปที่ 17 แสดงให้เห็นถึงผลของปริมาณกลูโคสต่อการเจริญและการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลสของ E.coli ATCC 9637 ในอาหารสูตรปรับต่ำ ดังนี้

รูปที่ 15 รูปแบบการเจริญ (——) และการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส (-----) ของ E.coli ATCC 9637 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำ โดยแปรค่าความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซีติก 0% (×), 0.1% (○), 0.2% (●) และ 0.5% (△) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 15

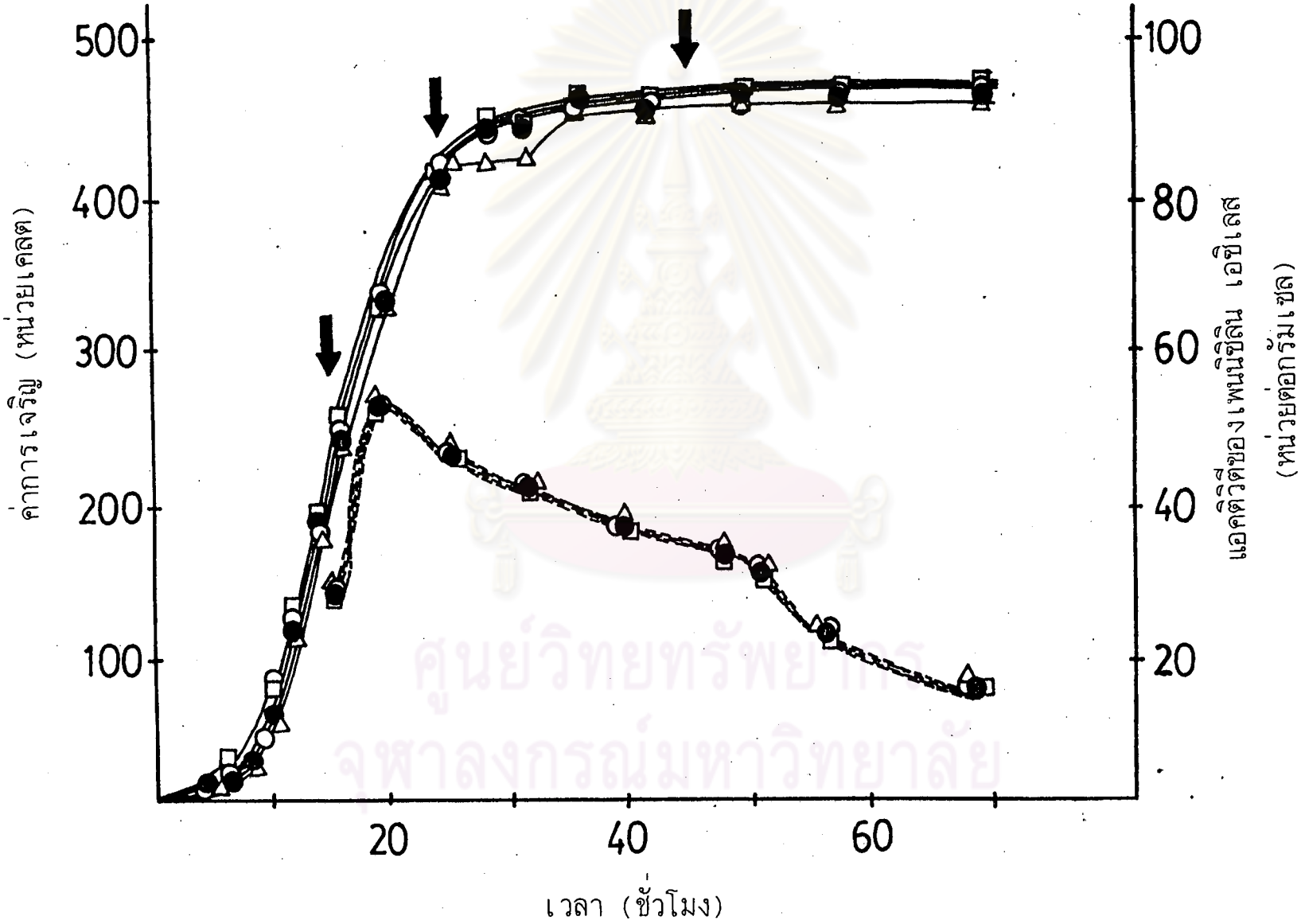


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 16 รูปแบบการเจริญ (——) และการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส (----) ของ E.coli ATCC 9637 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำ (●), อาหารสูตรปรับต่ำที่เติมกรดฟีนิลอะซีติก 0.1% ที่การเจริญระยะกึ่งทวีคูณ (O), ระยะปลายทวีคูณ (Δ) และระยะการเจริญคงที่ (□) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

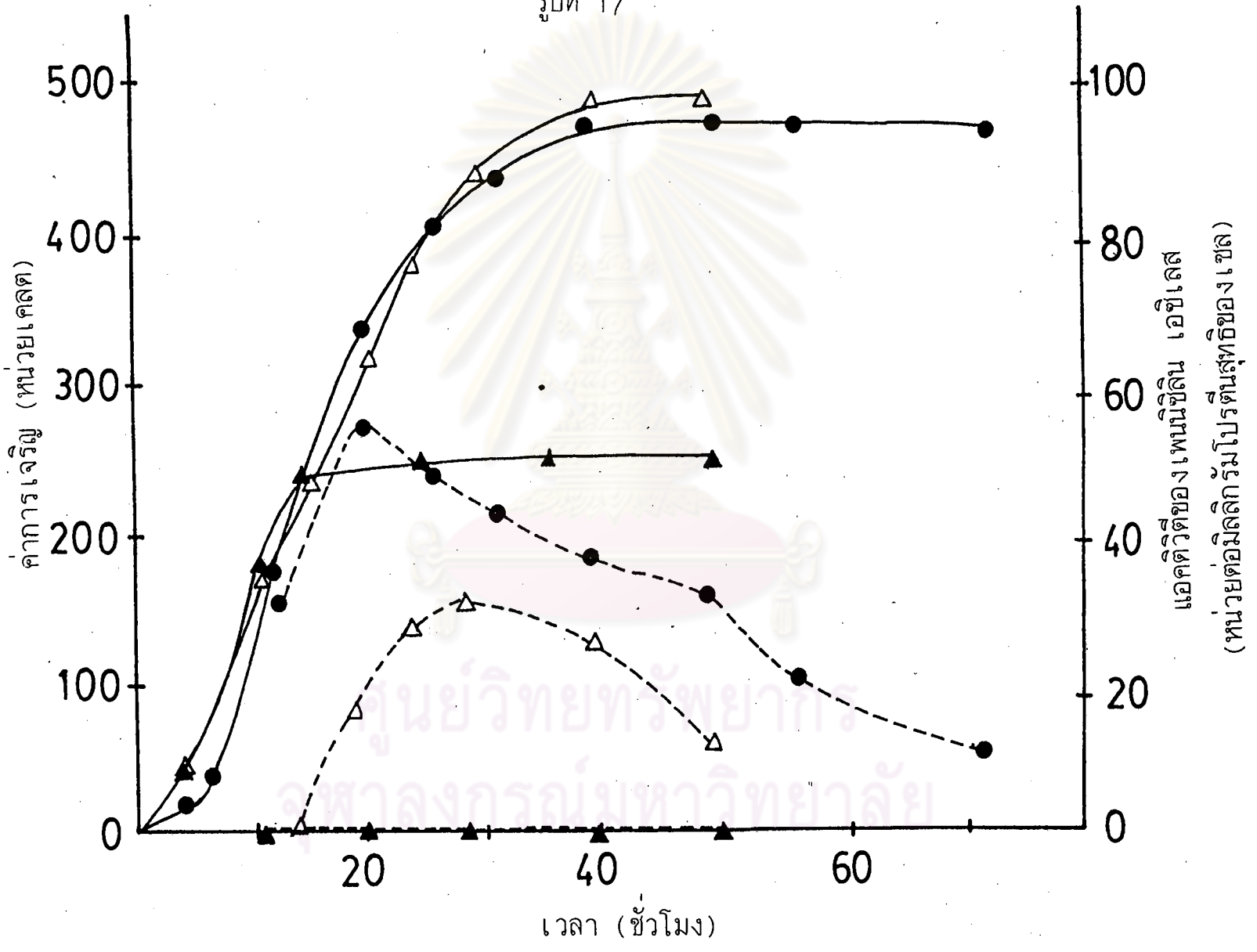
รูปที่ 16



รูปที่ 17 รูปแบบการเจริญ (——) และการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส (----) ของ E.coli ATCC 9637 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำธรรมดา (●) กับชนิดที่เสริมด้วยกลูโคส 0.1% (Δ) และ 0.2% (▲) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 17



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การมีกลูโคส 0.1 เปอร์เซนต์ ในอาหารสูตรปรับต่ำ ไม่มีผลต่อรูปแบบการเจริญของ E.coli ATCC 9637 (ได้ค่าการเจริญสูงสุด 470 หน่วยเคลต) แต่จะมีผลในการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส ค่าแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส สูงสุดลดลงเหลือ 31.8 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนสุทธิของเซล ขณะที่เลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำธรรมดา ได้ค่าแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลสสูง 53.2 หน่วยมิลลิกรัมโปรตีนสุทธิของเซล)

และเมื่อเพิ่มกลูโคสขึ้นเป็น 0.2 เปอร์เซนต์ ในอาหารสูตรปรับต่ำ ค่าการเจริญจะลดลงเหลือเพียง 250 หน่วยเคลต เปรียบเทียบกับการเจริญ E.coli ATCC 9637 ในอาหารสูตรปรับต่ำธรรมดามีค่า 460 หน่วยเคลต และจะไม่สามารถตรวจพบแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส เมื่อเลี้ยง E.coli ATCC 9637 ในอาหารสูตรปรับต่ำที่มี 0.2 เปอร์เซนต์กลูโคสนี้เลย

3.2.7 ผลของการแปรเปลี่ยนชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ

โดยการเลี้ยง E.coli ATCC 9637 ในอาหารสูตรอุดมเป็นเวลา 10-15 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนชนิดของอาหาร ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 18 เมื่อเปลี่ยนอาหารเป็นสารละลายกรดฟีนิลอะซีติก 1.0 เปอร์เซนต์ E.coli ATCC 9637 ไม่สามารถเจริญ และผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส ได้เลย หากเปลี่ยนเป็นอาหารสูตรปรับต่ำชนิดที่มีแต่ 0.2 เปอร์เซนต์ กรดฟีนิลอะซิติก เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน พบว่าเซลต้องการเวลาประมาณ 15 ชั่วโมง เพื่อปรับตัวสู่การเจริญต่อ ได้ค่าการเจริญสูงสุด 450 หน่วยเคลต และในแง่การผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส จะให้ค่าแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลสสูงสุด 28 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนสุทธิของเซล

เมื่อเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นอาหารสูตรปรับต่ำ E.coli ATCC 9637 ใช้เวลาเพียง 3 ชั่วโมง เพื่อปรับตัวเข้าสู่การเจริญต่อ ให้ค่าการเจริญสูงสุดถึง 600 หน่วยเคลต และได้แอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส สูงสุด 45 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนสุทธิของเซล

3.3 การเปลี่ยนแปลงของ pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ระหว่างการเจริญของ E.coli ATCC 9637

โดยการวัด pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเจริญ E.coli ATCC 9637 ในช่วงระยะการเจริญที่เวลาต่าง ๆ กัน พบว่าเมื่อเลี้ยง E.coli ATCC 9637 ในอาหารสูตรปรับต่ำชนิดที่มี 0.2 เปอร์เซนต์ กรดฟีนิลอะซีติกเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนเท่านั้น ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเป็น 7.0 ตลอดระยะการเจริญ (รูปที่ 19) ในขณะที่เลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำธรรมดาซึ่งมีทั้ง 0.2 เปอร์เซนต์ กรดฟีนิลอะซีติก และ 0.5 เปอร์เซนต์โซเดียมกลูตาเมต เป็นแหล่งต้นตอ

รูปที่ 18 รูปแบบการเจริญ (——) และการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส (-----) ของ E.coli ATCC 9637 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรอุดมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนไปเลี้ยงในอาหารต่อไปนี้

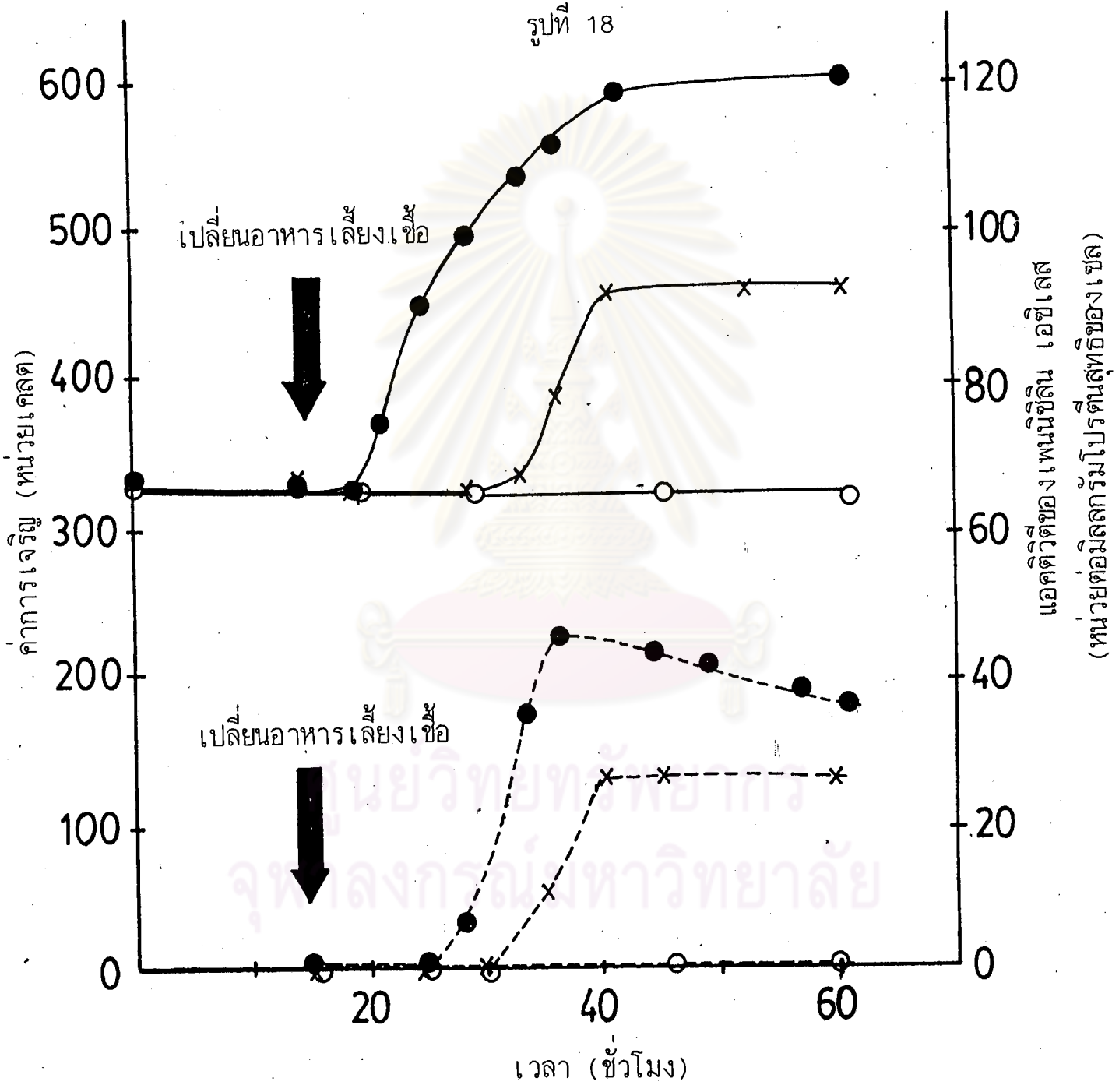
(1) 1% กรดฟีนิลอะซีติก (O)

(2) อาหารสูตรปรับต่ำชนิดที่มี 0.2% กรดฟีนิลอะซีติกเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนอย่างเดียว (X)

(3) อาหารสูตรปรับต่ำชนิดที่มี 0.2% กรดฟีนิลอะซีติกกับ 0.5% โซเดียมกลูตาเมตเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน (●)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 18



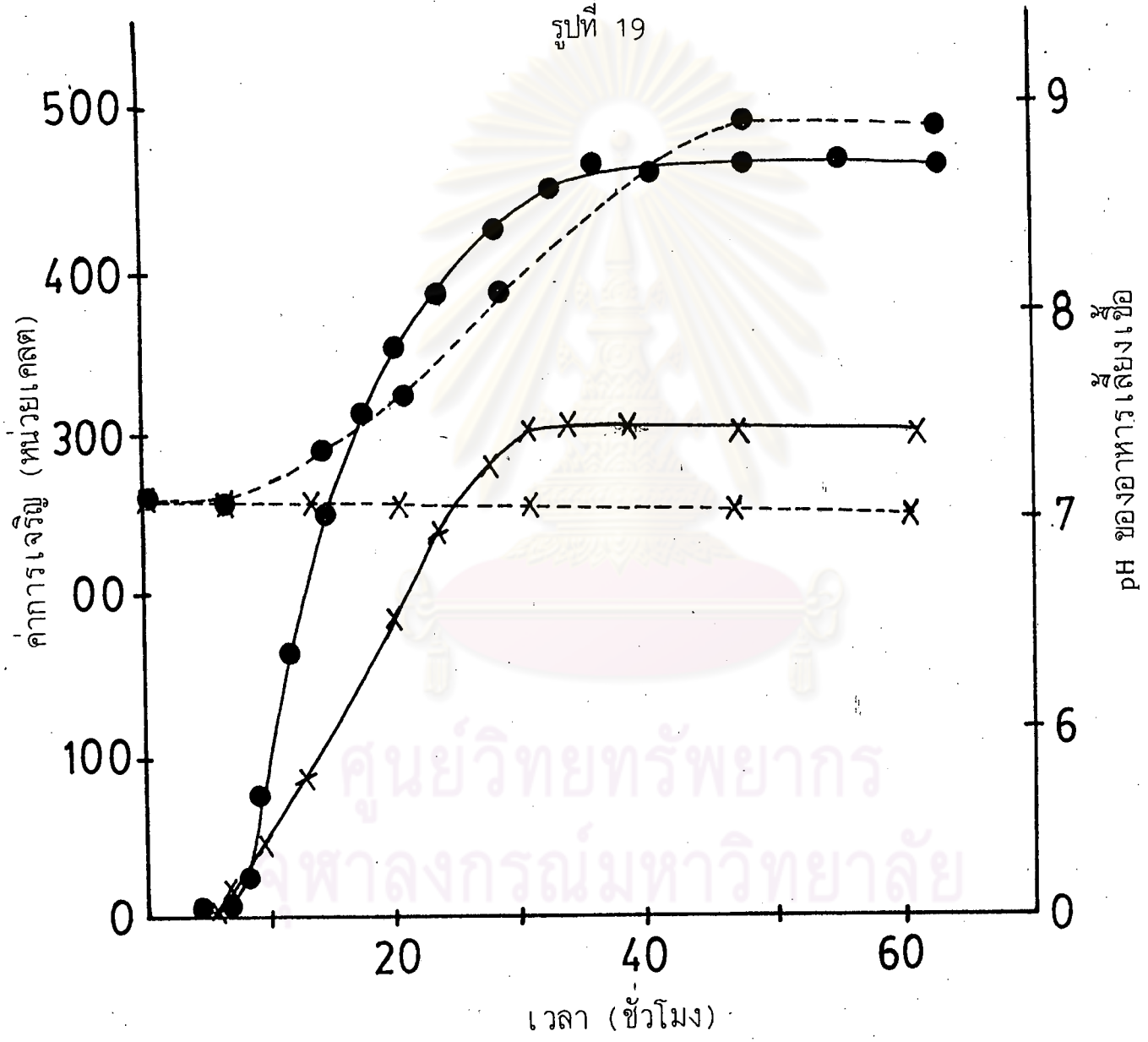
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

70

รูปที่ 19 รูปแบบการเจริญ (——) และ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำชนิดธรรมดา (●--●) กับชนิดที่มี 0.2% กรดฟีนิลอะซีติกเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนอย่างเดียว(✕--✕) เมื่อเลี้ยง E.coli ATCC 9637 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 19



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

71

คาร์บอน เมื่อเริ่มเข้าสู่การเจริญระยะกึ่งทวีคูณ ค่า pH จะเพิ่มจาก 7.0 ขึ้นเรื่อย ๆ จนสูงสุดที่ 8.9 เมื่อเซลเจริญที่ระยะการเจริญคงที่ไปแล้ว 10 ชั่วโมง

3.4 การผลิตเอนไซม์เบตา-แลคแตมเมส ของ E.coli ATCC 9637

3.4.1 การผลิตเอนไซม์เบตา-แลคแตมเมสของ E.coli ATCC 9637 บนจานเพาะเชื้อ

โดยการเปรียบเทียบการเจริญและการฟอกจางสีน้ำเงินของสารละลายน้ำแป้ง-ไอโอดีน ของ E.coli ATCC 9637 กับ K.pneumoniae M5al ผลแสดงในตารางที่ 10 เมื่อบ่มเชื้อทั้ง 2 ชนิดที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส ในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารสูตรอุดมชนิดเสริมด้วย 0.2 เปอร์เซนต์ กรดพีนิลอะซีติก และอาหารสูตรปรับต่ำ พบว่าการเจริญดีมากในทั้ง 2 สายพันธุ์ แต่ K.pneumoniae M5al ในอาหารสูตรปรับต่ำไม่สามารถเจริญได้ไม่ว่าจะที่อุณหภูมิ 30 หรือ 37 องศาเซลเซียส

เมื่อติดตามเปรียบเทียบการฟอกจางสีของสารละลายน้ำแป้ง-ไอโอดีนตามวิธีข้อ 2.10.1 พบว่า K.pneumoniae M5alสามารถฟอกจางสีน้ำแป้ง-ไอโอดีนได้ดีที่สุดทั้งที่ 30 และ 37 องศาเซลเซียส ในขณะที่ E.coli ATCC 9637 ซึ่งมีการเจริญได้ดี แต่ไม่สามารถฟอกจางสีน้ำแป้ง-ไอโอดีนได้เลย ไม่ว่าจะบ่มที่อุณหภูมิ 30 หรือ 37 องศาเซลเซียสก็ตาม

3.4.2 การผลิตเอนไซม์เบตา-แลคแตมเมสของ E.coli ATCC 9637 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

จากผลการทดลองในตารางที่ 11 จะเห็นว่า เมื่อเลี้ยง E.coli ATCC 9637 ในอาหารสูตรปรับต่ำ และสูตรอุดม ให้ได้ปริมาณของเซลมาก จนความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดสูงถึง 10.0 และ 8.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตามลำดับ) ก็ยังไม่สามารถตรวจพบแอค-ติวิตีของเอนไซม์เบตา-แลคแตมเมสได้เลย ในขณะที่ความเข้มข้นของโปรตีนจาก K.pneumoniae M5al ซึ่งเลี้ยงในอาหารสูตรอุดม มีโปรตีนเพียง 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ก็สามารถตรวจพบแอคติวิตีของเอนไซม์เบตา-แลคแตมเมสได้แล้ว

3.5 การศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นของสารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนน กับอุณหภูมิแข็งตัวของเจลแคปปา-คาร์ราจีแนน

เมื่อทำการศึกษาอุณหภูมิแข็งตัวของสารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนน โดยสังเกตการลดอุณหภูมิของสารละลาย (ซึ่งไม่มีเซลแบคทีเรีย) ลงทีละน้อย และบันทึกค่าอุณหภูมิตลอดเวลา จน

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบการเจริญและการฟอกจางสีน้ำเงินของสารละลายน้ำแป้ง-ไอโอดีน บนจานเพาะเชื้ออาหารสูตรอุดมและอาหารสูตรปรับต่ำ ของ E.coli ATCC 9637 กับ K.pneumoniae M5al บ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส

ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์	เวลาที่ใช้บ่มเชื้อ (ชั่วโมง)	E.coli ATCC 9637				K.pneumoniae M5al			
		การเจริญ		การฟอกจางสี		การเจริญ		การฟอกจางสี	
		30°ซ	37°ซ	30°ซ	37°ซ	30°ซ	37°ซ	30°ซ	37°ซ
อาหารสูตรอุดมที่เสริมด้วย 0.2% กรดฟีนิลอะซีติก	17	ดี	ดี	ไม่ฟอกสี	ไม่ฟอกสี	ดี	ดี	ฟอกสีดีมาก	ฟอกสีดีมาก
	24	ดี	ดี	ไม่ฟอกสี	ไม่ฟอกสี	ดี	ดี	ฟอกสีดีมาก	ฟอกสีดีมาก
	32	ดี	ดี	ไม่ฟอกสี	ไม่ฟอกสี	ดี	ดี	ฟอกสีดีมาก	ฟอกสีดีมาก
อาหารสูตรปรับต่ำ	28	ดี	ดี	ไม่ฟอกสี	ไม่ฟอกสี	ไม่ดี	ไม่ดี	ฟอกสีดี	ฟอกสีดี
	37	ดี	ดี	ไม่ฟอกสี	ไม่ฟอกสี	ไม่ดี	ไม่ดี	ฟอกสีดี	ฟอกสีดี
	45	ดี	ดี	ไม่ฟอกสี	ไม่ฟอกสี	ไม่ดี	ไม่ดี	ฟอกสีบ้าง	ฟอกสีบ้าง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 การผลิตเบตา-แลคแตมเมสของ E.coli ATCC 9637 ในอาหารสูตรอุดมและสูตรปรับต่ำ และของ K.pneumoniae M5al ในอาหารสูตรปรับต่ำ วัดแอคติวิตีของเบตา-แลคแตมเมส ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสตามวิธีข้อ 2.10.2

ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์	ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มิลลิกรัมโปรตีน)
E.coli ATCC 9637	สูตรอุดม	8.5	0.0
	สูตรปรับต่ำ	10.0	0.0
K.pneumoniae M5al	สูตรอุดม	2.0	0.89

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กระทั่งแท่งแม่เหล็กที่ใช้กวนหยุดหมุน พบว่าอุณหภูมิแข็งตัวของแคปปา-คาร์ราจีแนน (แสดงในตารางที่ 12) จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนน เมื่อใช้แคปปา-คาร์ราจีแนนความเข้มข้นสูง 4.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) อุณหภูมิแข็งตัวคือ 43 องศาเซลเซียส ซึ่งแตกต่างจากค่าที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้คือ 2.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) อุณหภูมิแข็งตัวเพียง 33 องศาเซลเซียสเท่านั้น

3.6 ผลกระทบของความเร็วของแท่งแม่เหล็กที่ใช้ในการกวนด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก ต่อขนาดและรูปร่างลักษณะของเม็ดเจลเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน

ตารางที่ 13 แสดงถึงความสัมพันธ์ของความเร็วในการกวนด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็กกับเปอร์เซนต์ผลผลิตของเม็ดเจลเซลตรึงด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนน ความเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ 2.0-3.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยแยกตามขนาดของเม็ดเจล ดังนี้

เมื่อใช้ความเข้มข้นของเซล E.coli ATCC 9637 เป็น 3.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ตรึงด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนน 2.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยใช้ความเร็วในการกวน #3 ตามตัวเลขบนเครื่องกวน เป็นเวลา 3 นาที และความเร็ว #3 เป็นเวลา 2 นาที แล้วเปลี่ยนเป็นความเร็ว #2.5 เป็นเวลาอีก 1 นาที จะได้เปอร์เซนต์ผลผลิตส่วนใหญ่เป็นเม็ดเจลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร (65.4 และ 53.5 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ) และเมื่อใช้ 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของแคปปา-คาร์ราจีแนน จะได้เปอร์เซนต์ผลผลิตส่วนใหญ่เป็นเม็ดเจลเซลตรึงที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร คือ 54.7 เปอร์เซนต์ เมื่อใช้ความเร็วในการกวน #3 และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 1 มิลลิเมตรกับระหว่าง 1-2 มิลลิเมตร คือ 46.4 และ 43.2 เปอร์เซนต์ เมื่อใช้ความเร็วในการกวน #3 เป็นเวลา 2 นาที แล้วเปลี่ยนเป็น #2.5 อีก 1 นาที สำหรับแคปปา-คาร์ราจีแนน 3.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เปอร์เซนต์ผลผลิตส่วนใหญ่จะเป็นเม็ดเจลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร และระหว่าง 1-2 มิลลิเมตร (36.1 และ 39.7 เปอร์เซนต์ เมื่อใช้ความเร็วในการกวน #3 เป็นเวลา 3 นาที และเปอร์เซนต์ผลผลิตเป็น 37.6 กับ 38.8 เปอร์เซนต์ เมื่อกวนด้วยความเร็ว #3 เป็นเวลา 3 นาที แล้วเปลี่ยนเป็นความเร็ว #2.5 เป็นเวลาอีก 1 นาที) ส่วนความเข้มข้น 4.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของแคปปา-คาร์ราจีแนน เมื่อตรึงเซล E.coli ATCC 9736 นั้น จะได้เปอร์เซนต์ผลผลิตส่วนใหญ่

ตารางที่ 12 ผลกระทบของความเข้มข้นสารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนน ต่ออุณหภูมิแข็งตัวของเจล (gelling temperature)

ความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนน (% น้ำหนักต่อปริมาตร)	อุณหภูมิแข็งตัว (°ซ)
2.0	33.0
2.5	35.5
3.0	37.5
3.5	40.0
4.0	43.0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วในการกวนด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก กับเปอร์เซนต์ผลผลิต และรูปร่างลักษณะของเม็ดเจล โดยตรึงเซล E.coli ATCC 9637 ความเข้มข้น 3.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนน ความเข้มข้น 2.0, 2.5,3.0 และ 3.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) รายละเอียดตามวิธีทดลองข้อ 2.17.2

ความเข้มข้นของคาร์ราจีแนน (% น้ำหนักต่อปริมาตร)	ความเร็ว (ตัวเลขบนหน้าปัทม์เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก)	ผลผลิตตามขนาดของเม็ดเจลเซลตรึง (% โดยน้ำหนัก)			รูปร่างลักษณะของเม็ดเจล
		d < 1	1 < d ≤ 2	2 < d ≤ 3	
2.0	3	65.4	28.8	1.0	เม็ดกลม
	3 ⟶ 2.5*	53.3	34.3	8.6	เม็ดกลม
2.5	3	54.7	35.2	2.8	เม็ดกลม
	3 ⟶ 2.5*	46.4	43.2	0.9	เม็ดกลม
3.0	3	36.1	39.7	14.4	เม็ดกลมและเม็ดค่อนข้างกลม
	3 ⟶ 2.5*	37.6	38.8	13.9	เม็ดกลมและเม็ดค่อนข้างกลม
3.5	3	26.3	41.6	17.0	เม็ดรีและเม็ดกลม
	3 ⟶ 2.5*	18.1	41.1	25.3	เม็ดรีและเม็ดกลม

หมายเหตุ 3 ⟶ 2.5* หมายถึง กวนด้วยความเร็ว # 3 เป็นเวลา 2 นาที แล้วเปลี่ยนเป็นความเร็ว # 2.5 เป็นเวลาอีก 1 นาที

d หมายถึง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเม็ดเจล (มิลลิเมตร)

เป็นเม็ดเจลเซลตรึงที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางระหว่าง 1-2 มิลลิเมตร (41.6 และ 41.1 เปอร์-เซนต์ เมื่อใช้ความเร็วในการกวน #3 เมื่อเปลี่ยนความเร็วเป็น #2.5 เป็นเวลา 1 นาที หลังจากกวนด้วยความเร็ว #3 เป็นเวลา 2 นาที) พบว่าเม็ดเจลเซลตรึงที่ได้จากแคปปา-คาร์ราจีแนน ความเข้มข้นระหว่าง 2.0-2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ส่วนใหญ่เกือบทั้งหมดจะมีสัณฐานกลม แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนนในการตรึง E.coli ATCC 9637 เป็น 3.0-3.5 เปอร์เซนต์ จะมีผลทำให้เม็ดเจลเซลตรึงที่ได้มีสัณฐานรีมากขึ้น เมื่อใช้ความเร็วและปริมาตรของสารละลายคาร์ราจีแนนคงที่

3.7 ผลกระทบของขนาดเม็ดเจลต่อแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน

เมื่อตรึงเซล E.coli ATCC 9637 ความเข้มข้น 3.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำ-หนัก) ด้วย 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของแคปปา-คาร์ราจีแนน แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส พบว่า (ตารางที่ 14) เมื่อใช้เม็ดเจลที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางต่ำกว่า 1 มิลลิเมตรทั้งหมด หรือใช้อัตราส่วนของเม็ดเจลที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางต่ำกว่า 1 มิลลิเมตร ต่อเม็ดเจลที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-3 มิลลิเมตรเป็น 3:1 วัดได้แอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสได้ไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อใช้อัตราส่วนเป็น 1:1 หรือ 1:3 พบว่าวัดแอคติวิตีได้ต่ำลงเล็กน้อย (ได้ค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์เป็น 96.6 และ 98.6 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ) และแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ที่วัดได้จะต่ำลงเหลือ 0.135 หน่วยต่อกรัมเซลตรึง (แอคติวิตีสัม-พัทธ์เป็น 90 เปอร์เซนต์) ถ้าใช้เม็ดเจลที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-3 มิลลิเมตรทั้งหมด

3.8 ผลกระทบของความเข้มข้นแคปปา-คาร์ราจีแนนต่อ strength และแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลสของเม็ดเจลเซลตรึง

เมื่อตรึงเซล E.coli ATCC 9637 ความเข้มข้น 3.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนนความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่า (รูปที่ 20) เมื่อใช้แคปปา-คาร์ราจีแนนเข้มข้น 2.0, 2.5, 3.0 และ 3.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) แอคติวิตีของเอนไซม์จะมีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก คือ 0.50, 0.57, 0.52 และ 0.51 หน่วยต่อกรัมเซลตรึง ตามลำดับ ในขณะที่ strength ของเม็ดเจลเซลตรึงจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนนเพิ่มขึ้น สำหรับเปอร์เซนต์ผลผลิตจะอยู่ในช่วง 85-96 เปอร์เซนต์ เมื่อใช้แคปปา-คาร์ราจีแนน

ตารางที่ 14 ผลกระทบของขนาดเม็ดเจลเซลตรึงต่อแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส โดยตรึงเซล E.coli ATCC 9637 ความเข้มข้น 3.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ด้วย 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของแคปปา-คาร์ราจีแนน รายละเอียดตามวิธีทดลองข้อ 2.17.3

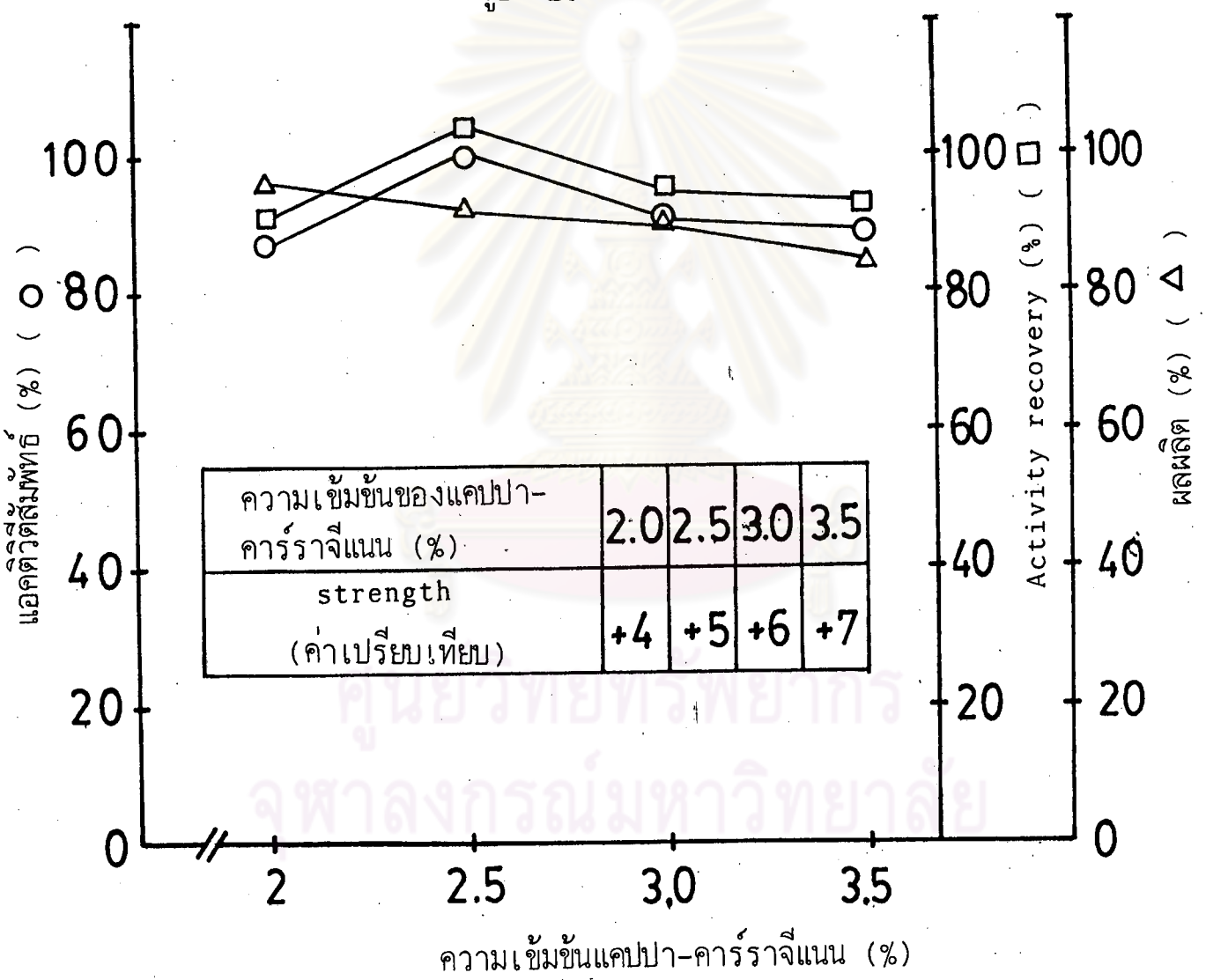
อัตราส่วนของเม็ดเจลเซลตรึง (d < 1) : (1 < d < 3) (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)	แอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส (หน่วยต่อกรัมเซลตรึง)	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%)
1 : 0	0.150	100
3 : 1	0.150	100
1 : 1	0.145	96.6
1 : 3	0.148	98.6
0 : 1	0.135	90.0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 20 ผลกระทบของความเข้มข้นแคปปา-คาร์ราจีแนน 2.0, 2.5, 3.0 และ 3.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ต่อแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส, Strength และเปอร์เซนต์ผลผลิตของเม็ดเจลเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน เมื่อตรึง E.coli ATCC 9637 ความเข้มข้น 3.6 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) รายละเอียดตามวิธีทดลองข้อ 2.17.4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 20



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.0-3.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ดังนั้น ค่าที่เหมาะสมกับการตรึงเซล E.coli ATCC 9637 ให้ได้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด และ strength ดีพอควรจะอยู่ที่ความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนน 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

3.9 ผลกระทบของความเข้มข้นของเซล E.coli ATCC 9637 ในเม็ดเจลเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน ต่อ strength และแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ของเซลตรึง

เมื่อเลือกใช้แคปปา-คาร์ราจีแนน 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในการตรึงเซล (จากข้อ 3.8) และทำการทดลองแปรค่าความเข้มข้นของเซล E.coli ATCC 9637 (รูปที่ 21) พบว่าความสัมพันธ์ของความเข้มข้นเซลกับแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสในเม็ดเจลเซลตรึง มีลักษณะเป็นเส้นตรง เมื่อใช้เซลต่ำกว่า 30 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) สำหรับ strength ของเม็ดเจลเซลตรึง จะมีค่าใกล้เคียงกัน (+5) เมื่อใช้ความเข้มข้นเซลช่วง 3.6-14 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และเม็ดเจลที่ได้มี strength ลดลง (+4,+3 และ +2) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเซลเป็น 20.6, 27.3 และ 35.3 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ตามลำดับ ส่วนเปอร์เซนต์ผลผลิต(90-95 เปอร์เซนต์) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญตลอดช่วงความเข้มข้นของเซลที่ใช้

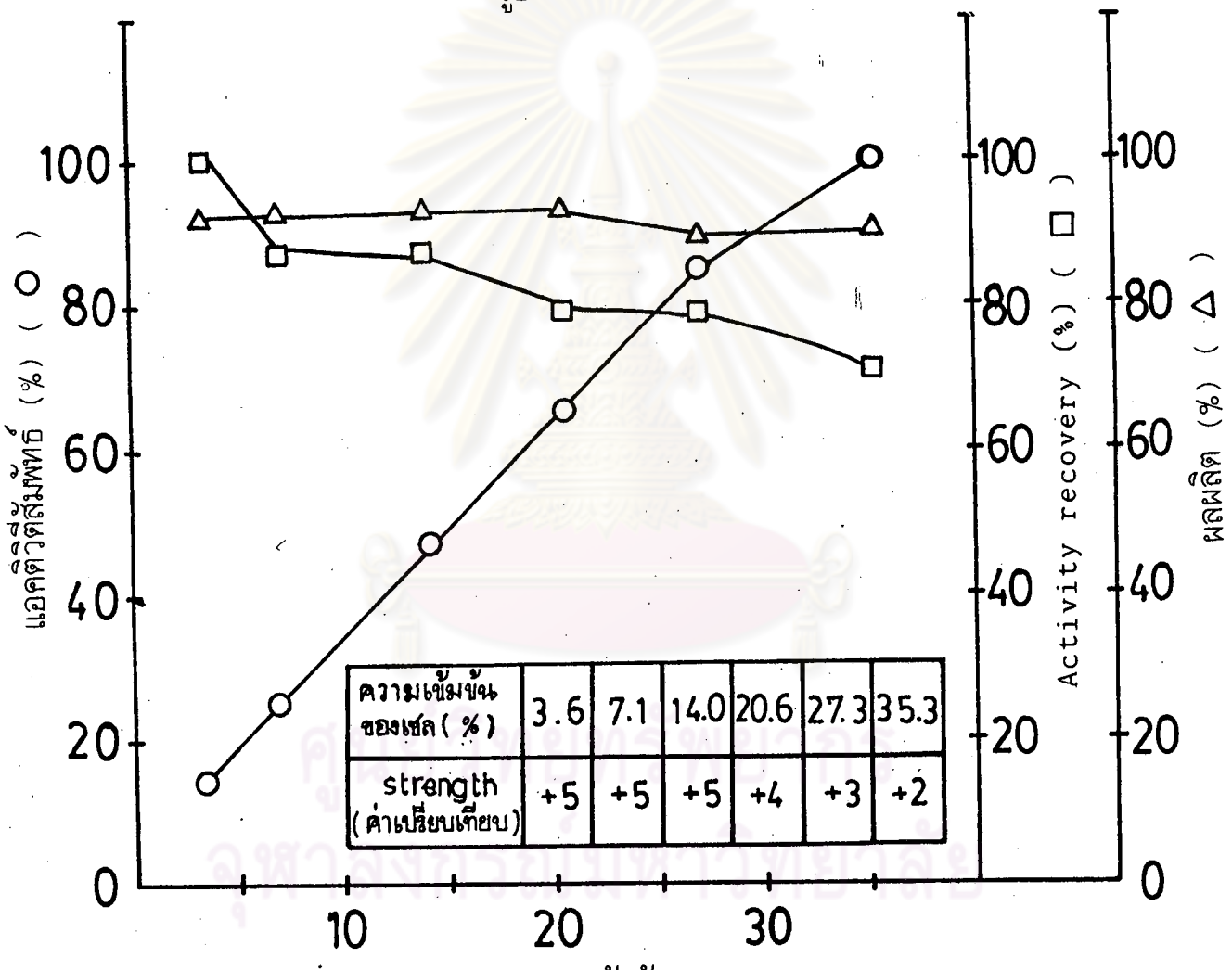
3.10 ผลกระทบของโพแตสเซียมคลอไรด์ต่อ strength และแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ของเม็ดเจลเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน

เมื่อศึกษาผลกระทบของโพแตสเซียมคลอไรด์ต่อเม็ดเจลเซลตรึงของ E.coli ATCC 9637 ความเข้มข้น 3.6 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ซึ่งตรึงด้วย 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของแคปปา-คาร์ราจีแนน แล้วนำมาศึกษาถึงผลกระทบของโพแตสเซียมคลอไรด์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส และ strength ของเม็ดเจล พบว่าเมื่อเก็บแช่เม็ดเจลเซลตรึงเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส แอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซลตรึงจะมีค่าเป็น 0.38, 0.42, 0.43 , 0.45 และ 0.40 หน่วยต่อกรัมเซลตรึง เมื่อใช้ความเข้มข้นโพแตสเซียมคลอไรด์ 0.04, 0.07, 0.15, 0.30 และ 0.40 โมลาร์ตามลำดับ (รูปที่ 22) และจะมีค่าเป็น 0.38, 0.42, 0.43, 0.45 และ 0.40 หน่วยต่อกรัมเซลตรึง ที่ความเข้มข้นโพแตสเซียมคลอไรด์ชุดเดียวกัน (ตามลำดับ) เป็นเวลานาน 136 ชั่วโมง

รูปที่ 21 ผลกระทบของความเข้มข้นเซล E.coli ATCC 9637 ที่ตรึงด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนนความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ต่อแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส,strength และเปอร์เซนต์ผลผลิตของเม็ดเจลเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน รายละเอียดตามวิธีการทดลองข้อ 2.17.5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 21


แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%) (○)
Activity recovery (%) (□)
ผลผลิต (%) (△)
100
80
60
40
20
0
10
20
30
ความเข้มข้นของเซล
ความเข้มข้นของเซล (%) | 3.6 | 7.1 | 14.0 | 20.6 | 27.3 | 35.3
strength (ค่าเปรียบเทียบ) | +5 | +5 | +5 | +4 | +3 | +2

รูปที่ 22 ผลกระทบของความเข้มข้นโพแตสเซียมคลอไรด์ต่อแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส และ strength ของเม็ดเจลเซลตริงแคปปา-คาร์ราจีแนน เมื่อตริง E.coli ATCC 9637 ความเข้มข้น 3.6 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ด้วย 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของแคปปา-คาร์ราจีแนน แล้วแช่เก็บไว้ในโพแตสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นแตกต่างกัน (0.04-0.40 โมลาร์) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

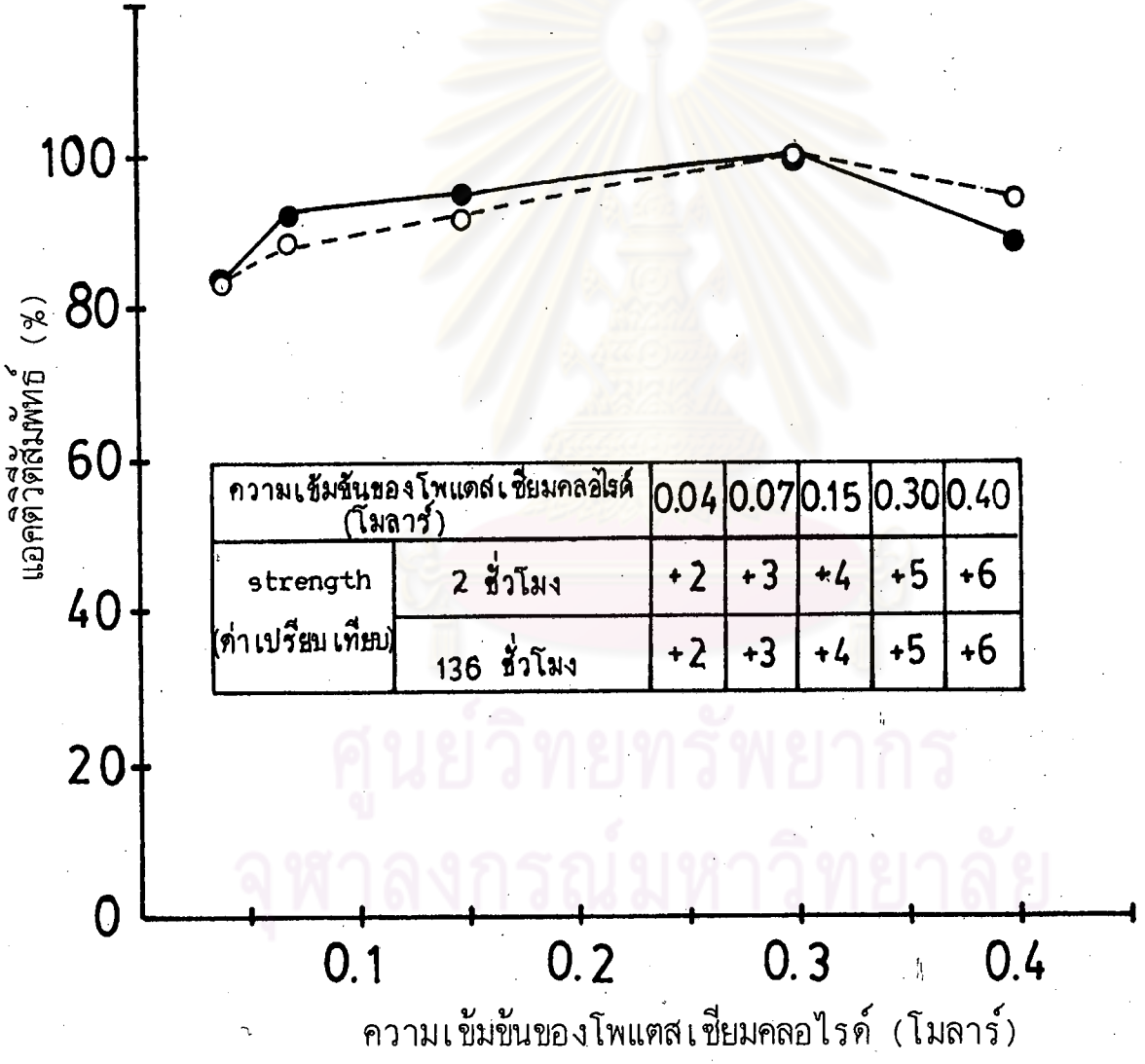
ก. 2 ชั่วโมง (●)

ข. 136 ชั่วโมง (○)

รายละเอียดตามวิธีทดลองข้อ 2.18

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 22



ความเข้มข้นของโพแตสเซียมคลอไรด์ (โมลาร์)		0.04	0.07	0.15	0.30	0.40
strength (ค่าเปรียบเทียบ)	2 ชั่วโมง	+2	+3	+4	+5	+6
	136 ชั่วโมง	+2	+3	+4	+5	+6

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

83

สำหรับค่า strength ของเม็ดเจลซึ่งแช่ในสารละลายโพแตสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ดังกล่าวข้างต้น พบว่าไม่ว่าจะแช่นาน 2 ชั่วโมง หรือ 136 ชั่วโมง ให้ค่าเปรียบเทียบโดยใช้มือจับเป็น +2, +3, +4, +5 และ +6 ตามลำดับ

3.11 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของวุ้นกับอุณหภูมิแข็งตัวของเจลวุ้น

เมื่อทำการสังเกตค่าอุณหภูมิแข็งตัวของสารละลายวุ้น ซึ่งกวนด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็กโดยการลดอุณหภูมิของสารละลายลงทีละน้อย และบันทึกอุณหภูมิตลอดเวลา จนกระทั่ง แท่งกวนแม่เหล็กหยุดหมุน ตารางที่ 15 แสดงถึงค่าอุณหภูมิแข็งตัว เมื่อใช้สารละลายวุ้นเข้มข้น 3.0,4.0, 5.0 และ 6.0 จะมีอุณหภูมิแข็งตัวเป็น 37, 40, 41.5 และ 42.5 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

3.12 ผลกระทบของความเร็วของแท่งแม่เหล็กในการกวนสารละลายวุ้นด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็กต่อขนาดและรูปร่างลักษณะของเม็ดเจลวุ้น

เมื่อทำให้สารละลายวุ้นเป็นเม็ดเจล โดยไม่มีเซล E.coli ATCC 9637 ด้วยการกวนที่ความเร็วต่าง ๆ ของแท่งแม่เหล็ก บนเครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก ผลแสดงในตารางที่ 16 ดังนี้ เมื่อใช้ความเร็วในการกวน #3 เม็ดเจลวุ้นที่เตรียมได้จากสารละลายวุ้นเข้มข้น 3.0 และ 4.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 3 มิลลิเมตร มีลักษณะเป็นเม็ดกลม เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของวุ้นเป็น 5.0 และ 6.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ไม่สามารถเกิดเป็นเม็ดเจลได้ ต้องใช้ความเร็วในการกวน #4 จึงจะได้เม็ดเจลที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเพิ่มขึ้น (ขนาด 1-5 มิลลิเมตร) ลักษณะของเม็ดเจลส่วนใหญ่กลมและเม็ดรีบ้างเล็กน้อย และจะได้เม็ดเจลที่มีรูปร่างไม่แน่นอน เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายวุ้นสูงไปกว่านี้ หากทดลองปรับความเร็วในการกวนด้วยแท่งแม่เหล็กเป็น #3.5 เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลายวุ้นเข้มข้น 4.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะได้เม็ดเจลลักษณะเม็ดกลม ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 2 มิลลิเมตร เป็นส่วนใหญ่

3.13 ผลกระทบของขนาดเม็ดเจลต่อแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ของเม็ดเจลเซลตรึงวุ้น

เมื่อตรึงเซล E.coli ATCC 9637 เข้มข้น 3.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ด้วย 5.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของวุ้น แล้วแยกขนาดของเม็ดเจลเซลตรึงที่ได้นำไปวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส โดยการแปรค่าอัตราส่วนของเซลตรึงวุ้น 2 ขนาด คือ ขนาดที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางต่ำกว่า 1 มิลลิเมตร และระหว่าง 1 ถึง 5 มิลลิเมตร ค่า

ตารางที่ 15 ผลกระทบของความเข้มข้นสารละลายวุ้น ต่ออุณหภูมิแข็งตัวของเจล (gelling temperature)

ความเข้มข้นของวุ้น (% น้ำหนักต่อปริมาตร)	อุณหภูมิแข็งตัว (^{o}ซ)
3.0	37
4.0	40
5.0	41.5
6.0	42.5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 16 ผลกระทบของความเร็วแท่งแม่เหล็กในการกวนสารละลายวุ้น ด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็กต่อขนาดรูปร่างลักษณะของเม็ดเจลที่ได้เมื่อเตรียมโดยวิธี 2.14.2 โดยการตรึงเจลวุ้น ซึ่งไม่มีเซลแบคทีเรีย ที่ความเข้มข้น 3.0, 4.0, 5.0 และ 6.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) รายละเอียดตามวิธีทดลองข้อ 2.19.2

ความเข้มข้นของวุ้น (% น้ำหนักต่อน้ำหนัก)	ความเร็ว (ตัวเลขบนหน้าปัทม์เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก)	ขนาดเม็ดเจล (เส้นผ่าศูนย์กลาง,d) (มิลลิเมตร)	รูปร่างลักษณะของเม็ดเจล
3.0	3	0<d<3	เม็ดกลม
4.0	3	0<d<3	เม็ดกลม
	3.5	0<d<2	เม็ดกลม
5.0	3	———	ไม่เกิดเป็นเม็ด
	4	1<d<5	เม็ดกลมและเม็ดรีเล็กน้อย
6.0	3	———	ไม่เกิดเป็นเม็ด
	4	1<d<5	รูปร่างไม่แน่นอน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ต่าง ๆ กัน คือ 1:0, 3:1, 1:1, 1:3 และ 0:1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ผลในตารางที่ 17 แสดงว่าขนาดของเม็ดเจลวุ้น ตั้งแต่ 1-5 มิลลิเมตร ไม่น่ามีผลกระทบต่อแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ในเม็ดเจลเซลตรึง

3.14 ผลกระทบของความเข้มข้นวุ้นต่อ strength และแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลสของเม็ดเจลเซลตรึงวุ้น

เมื่อตรึงเซล E.coli ATCC 9637 ที่มีความเข้มข้น 3.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ด้วยวุ้นความเข้มข้นต่างกันตั้งแต่ 3.0-6.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ติดตามวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซลตรึงวุ้น ผลการทดลองในรูปที่ 23 แสดงว่าแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซลตรึงเมื่อใช้สารละลายวุ้นเข้มข้น 3.0, 4.0, 5.0 และ 6.0 เปอร์เซนต์ มีค่าเป็น 0.49, 0.50, 0.57 และ 0.54 หน่วยต่อกรัมเซลตรึงตามลำดับ และเมื่อวัด strength ของเม็ดเจลเซลตรึงโดยเปรียบเทียบด้วยมือจับ พบว่าเมื่อใช้สารละลายวุ้นเข้มข้น 3.0 และ 4.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ค่า strength จะมีค่าใกล้เคียงกัน (+2) และเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลายวุ้นเพิ่มขึ้นเป็น 5.0 และ 6.0 เปอร์เซนต์ พบว่า strength ของเม็ดเจลเซลตรึงจะเพิ่มขึ้น (+3 และ +4 ตามลำดับ) ส่วนเปอร์เซนต์ผลผลิตจะเป็น 92.1, 93.0, 87.7 และ 83.8 เมื่อใช้สารละลายวุ้นเข้มข้น 3.0, 4.0, 5.0 และ 6.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ

3.15 ผลกระทบของความเข้มข้นเซล E.coli ATCC 9637 ในเม็ดเจลเซลตรึงวุ้นต่อ strength และแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลสของเซลตรึง

จากผลการทดลองรูปที่ 24 เมื่อตรึงเซล E.coli ATCC 9637 ด้วยวุ้น 5.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยแปรค่าความเข้มข้นของเซล E.coli ATCC 9637 แตกต่างกันไป จะเห็นว่าความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ใน 1 ช่วงตั้งแต่ 3.6 ถึง 43.6 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) กับความเข้มข้นเซล E.coli ATCC 9637 มีลักษณะกราฟเป็นเส้นตรงเมื่อใช้เซลที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า 32 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ค่า strength ที่วัดได้โดยการเปรียบเทียบด้วยมือจับจะมีค่าใกล้เคียงกันคือ +3 เมื่อใช้เซลเข้มข้นระหว่าง 3.6-11.2 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และมีค่าลดลงเป็น +2 เมื่อใช้เซลเข้มข้น 43.6 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ค่า sterngth ของเม็ดเจลเซลตรึงเป็น +1 สำหรับ

ตารางที่ 17 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของเม็ดเจลเซลตรึงกับแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส โดยตรึงเซล E.coli ATCC 9637 ความเข้มข้น 3.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ด้วย 5.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของวุ้น รายละเอียดตามวิธีการทดลองในข้อ 2.19.3

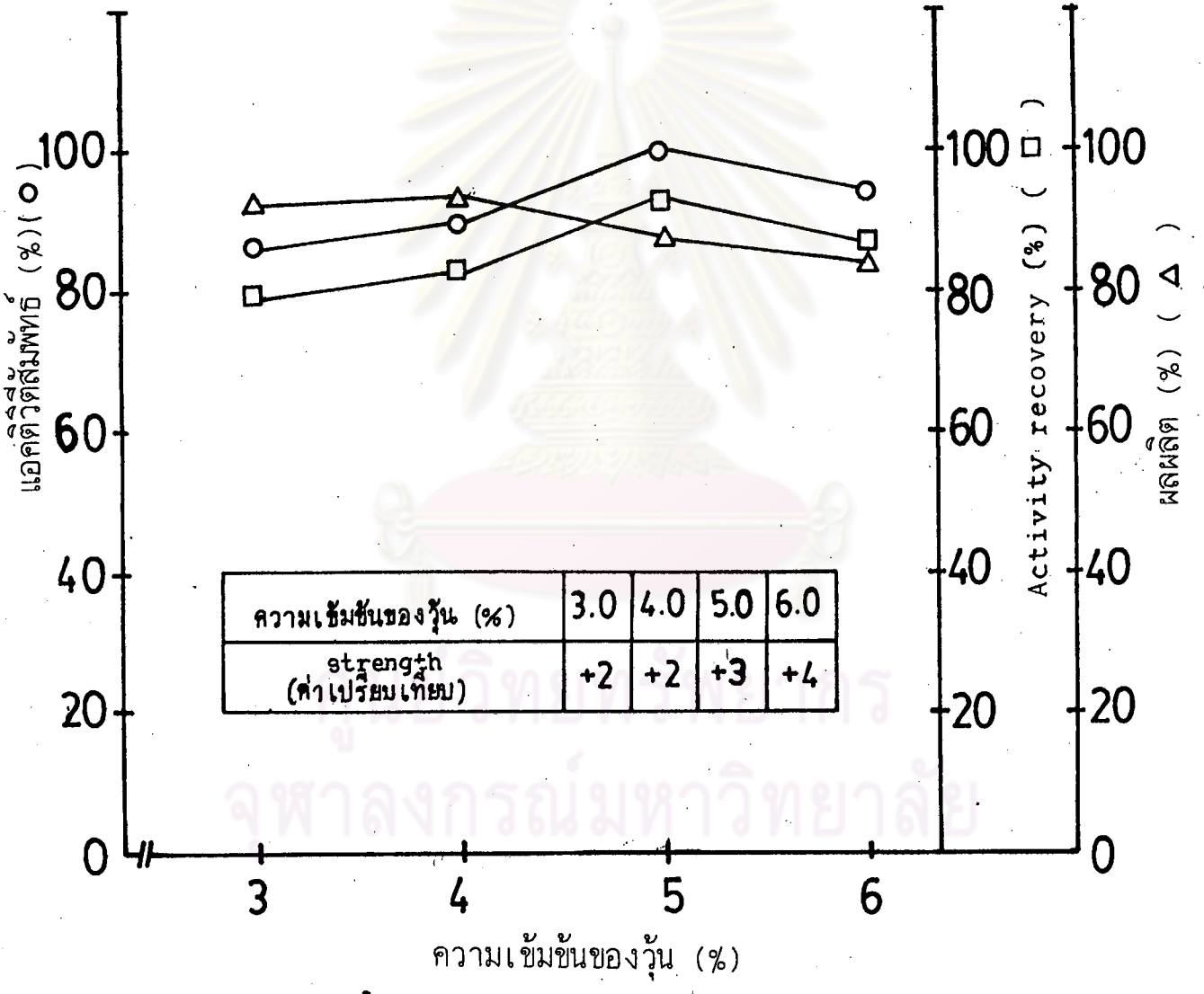
อัตราส่วนของเม็ดเจลเซลตรึง (d<1) : 1<d<5 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)	แอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิ-ซิลิน เอซิเลส (หน่วยต่อกรัมเซลตรึง)	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%)
1 : 0	0.300	96.8
3 : 1	0.310	100
1 : 1	0.300	96.8
1 : 3	0.295	95.2
0 : 1	0.300	96.8

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 23 ผลกระทบของความเข้มข้นวุ้น 3.0, 4.0, 5.0 และ 6.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ต่อแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส, strength และเปอร์เซนต์ผลผลิตของเม็ดเจลเซลตรึงวุ้น เมื่อตรึง E.coli ATCC 9637 ความเข้มข้น 3.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) รายละเอียดตามวิธีทดลองข้อ 2.19.4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

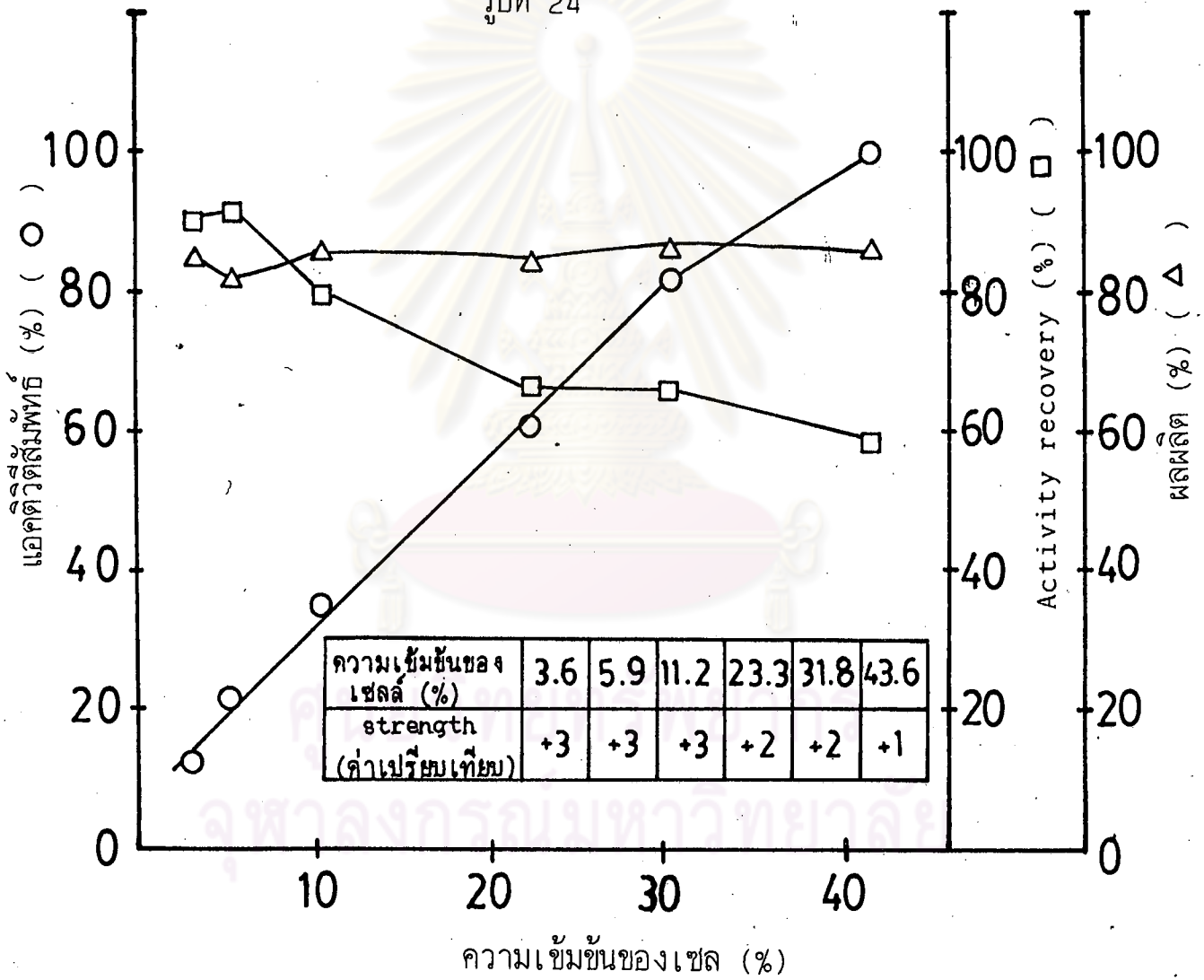
รูปที่ 23


แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%)(○)
Activity recovery (%) (□)
ผลผลิต (%) (△)
100
80
60
40
20
0
3
4
5
6
ความเข้มข้นของวุ้น (%)
ความเข้มข้นของวุ้น (%) | 3.0 | 4.0 | 5.0 | 6.0
strength (ค่าเปรียบเทียบ) | +2 | +2 | +3 | +4

รูปที่ 24 ผลกระทบของความเข้มข้นเซล E.coli ATCC 9637 ที่ตรึงด้วย 5.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของวุ้น ต่อแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส, strength และเปอร์เซนต์ผลผลิต รายละเอียดตามวิธีทดลองข้อ 2.19.5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 24


แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%) (○)
Activity recovery (%) (□)
ผลผลิต (%) (△)
100
80
60
40
20
0
10
20
30
40
ความเข้มข้นของเซล (%)
ความเข้มข้นของเซลล์ (%) | 3.6 | 5.9 | 11.2 | 23.3 | 31.8 | 43.6
strength (ค่าเปรียบเทียบ) | +3 | +3 | +3 | +2 | +2 | +1

เปอร์เซนต์ผลผลิต พบว่า จะให้เปอร์เซนต์ผลผลิตอยู่ในช่วงตั้งแต่ 81-86 เปอร์เซนต์ เมื่อใช้เซลเข้มข้นช่วง 3.6-43.6 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ในขณะที่ค่าActivity recovery จะลดลงจาก 90 เปอร์เซนต์เป็น 60 เปอร์เซนต์ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเซล E.coli ATCC 9637 จาก 3.6 เป็น 43.6 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

3.16 ผลกระทบของกลูตารัลดีไฮด์ต่อ strength และแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ของเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน และเซลตรึงวุ้น

โดยใช้เซล E.coli ATCC 9637 เข้มข้น 11.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ซึ่งตรึงด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนน 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และเซลตรึงของ E.coli ATCC 9637 เข้มข้น 11.1 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ตรึงด้วยวุ้น 5.0 เปอร์เซนต์ มาศึกษาถึงผลกระทบของกลูตารัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน (รูปที่ 25) พบว่า เมื่อใช้กลูตารัลดีไฮด์ 0, 0.01, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 และ 0.30 โมลาร์ แอคติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนจะเป็น 100, 85.5, 85.5, 83.9, 83.6, 83.0 และ 77.8 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ส่วนในเซลตรึงวุ้นจะมีค่าลดลงอย่างชัดเจน คือมีค่า 100, 83.6, 75.6, 68.9, 65.5, 59.6 และ 52.7 เปอร์เซนต์ (ตามลำดับ)

สำหรับค่า strength ของเม็ดเจลเซลตรึงวุ้น และเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน หลังจากทำปฏิกริยากับกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน จะมีค่าไม่แตกต่างจากค่าซึ่งวัดโดยการเปรียบเทียบด้วยมือจับ กับเมื่อเจลซึ่งไม่ได้ทำปฏิกิริยากับกลูตารัลดีไฮด์อย่างมีนัยสำคัญ

3.17 ผลกระทบของกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน ต่อ strength และแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ของเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนและเซลตรึงวุ้น

เมื่อใช้เซล E.coli ATCC 9637เข้มข้น 11.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ตรึงด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนน 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และเซลE.coli ATCC 9637 เข้มข้น 11.1 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ตรึงด้วยวุ้น 5.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) มาศึกษาถึงผลกระทบรวมของกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน โดยให้เซลตรึงทำปฏิกิริยากับกลูตารัลดีไฮด์ 0.10 โมลาร์ ก่อนแล้วแปรค่าความเข้มข้นของเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีนอีกครั้งหนึ่ง รูปที่ 26 แสดงให้เห็นว่า เมื่อใช้กลูตารัลดีไฮด์ 0.10 โมลาร์ และเฮกซาเมทธิลลีน

รูปที่ 25 ผลกระทบของความเข้มข้นกลูตารัลดีไฮด์ต่อแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส และ strength ของเม็ดเจลเซลตรึง โดย

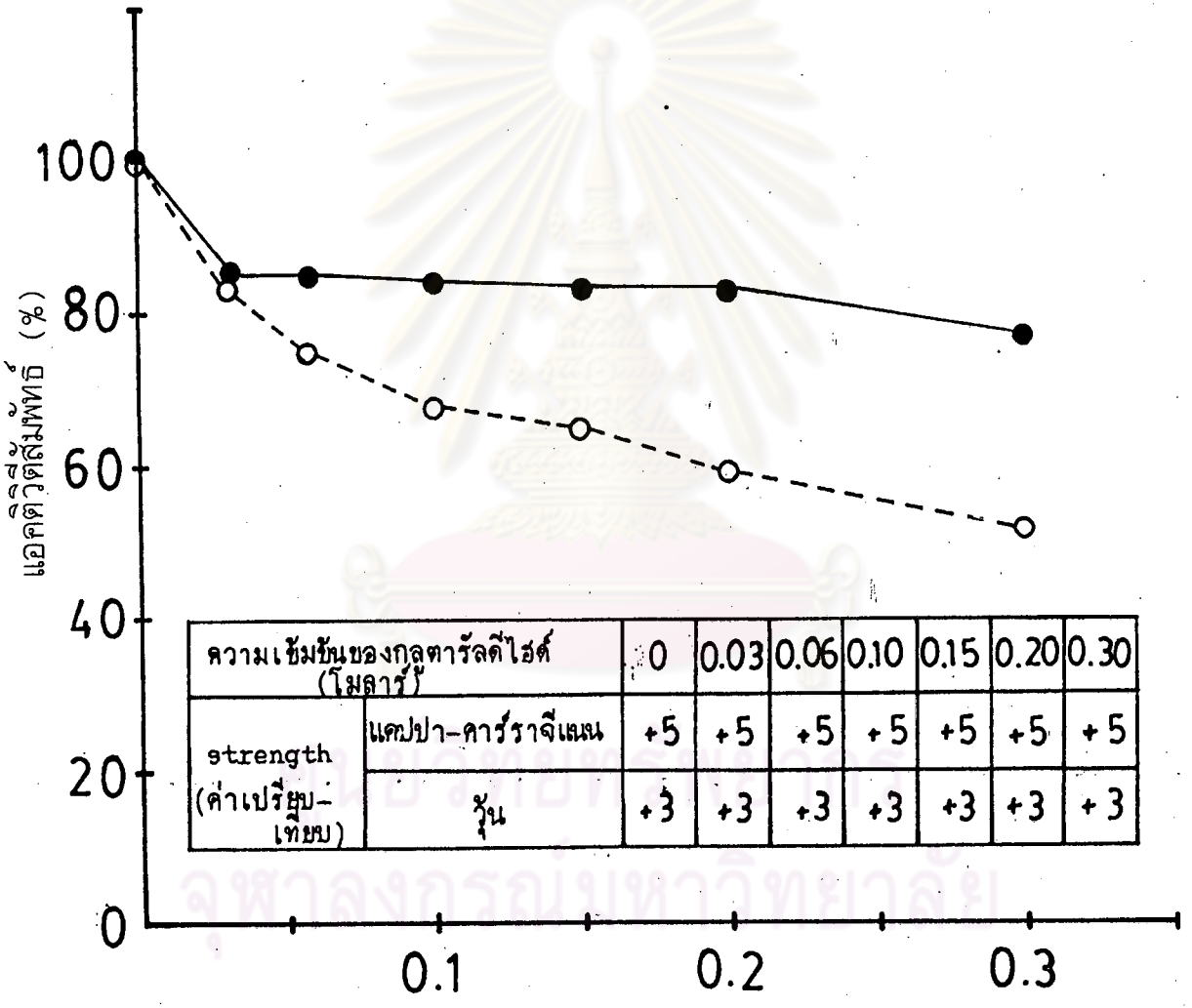
ก. ตรึง E.coli ATCC 9637 ความเข้มข้น 11.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ด้วย 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของแคปปา-คาร์ราจีแนน (●)

ข. ตรึง E.coli ATCC 9637 ความเข้มข้น 11.1 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ด้วย 5.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของวุ้น (O)

รายละเอียดตามวิธีทดลองข้อ 2.20

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 25



ความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ (โมลาร์)		0	0.03	0.06	0.10	0.15	0.20	0.30
strength (ค่าเปรียบเทียบ)	แคปปา-คาร์ราจีแนน	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5
	รุ้น	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 26 ผลกระทบรวมของกลูตารัลดีไฮด์ 0.1 โมลาร์กับความเข้มข้นเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีนต่อแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส และ strength ของเม็ดเจลเซลตริงโดย

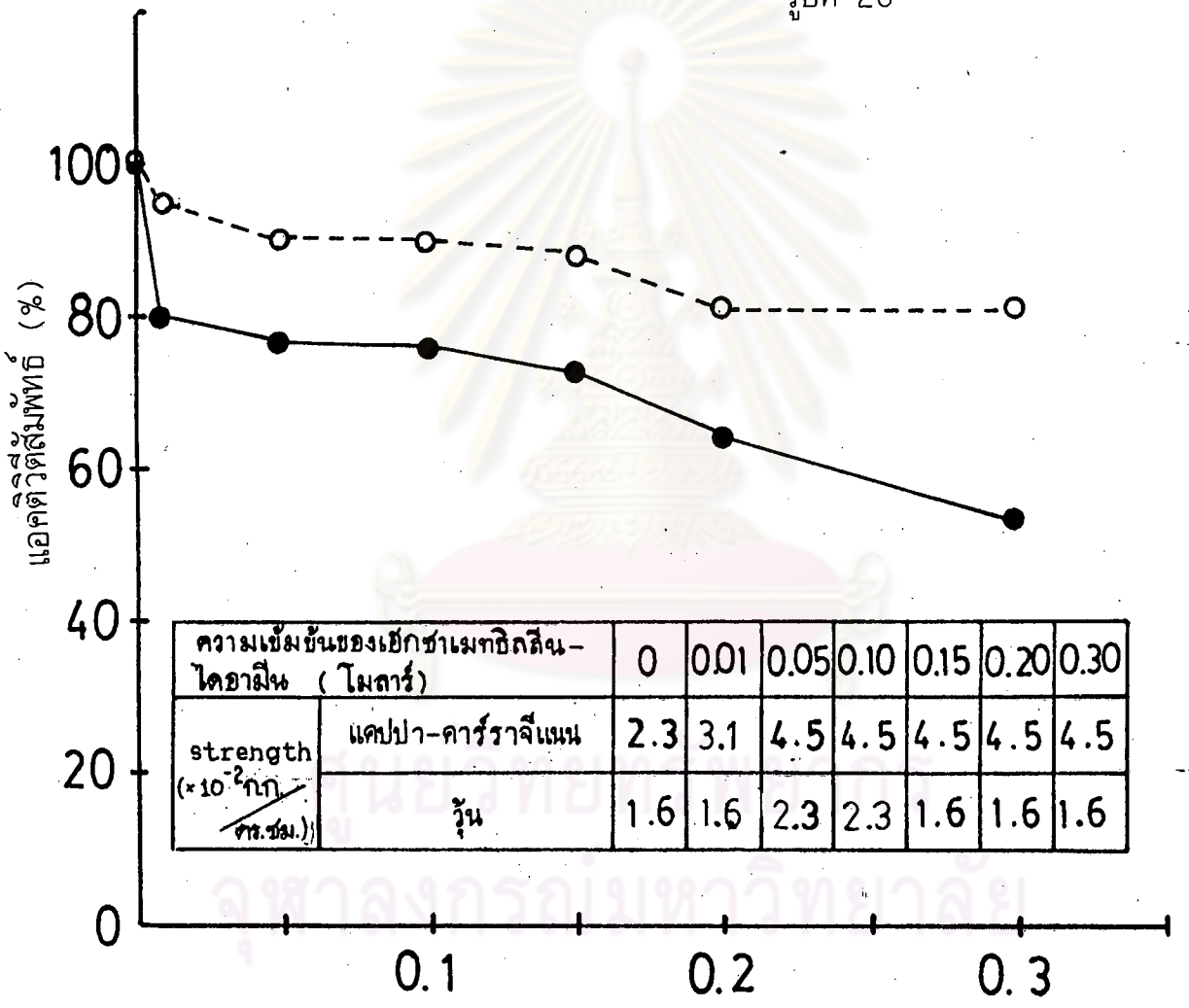
ก. ตริง E.coli ATCC 9637 ความเข้มข้น 11.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ด้วย 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของแคปปา-คาร์ราจีแนน แล้วเสริม 0.1 โมลาร์กลูตารัลดีไฮด์ (●)

ข. ตริง E.coli ATCC 9637 ความเข้มข้น 11.1 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ด้วย 5.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของวุ้น แล้วเสริม 0.1 โมลาร์กลูตารัลดีไฮด์ (O)

รายละเอียดตามวิธีทดลองข้อ 2.21

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 26



ความเข้มข้นของเฮกซาเมทธิลลีน-ไดอามีน (โมลาร์)		0	0.01	0.05	0.10	0.15	0.20	0.30
strength ($\times 10^{-2}$ กก./ตร.ซม.)	แคปปา-คาร์ราจีแนน	2.3	3.1	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
	วุ้น	1.6	1.6	2.3	2.3	1.6	1.6	1.6

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

93

ไดอามีน 0, 0.01, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 และ 0.30 โมลาร์ แอคติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนมีค่าเป็น 100, 80.6, 77.4, 76.3, 73.1, 64.5 และ 53.8 เปอร์เซนต์ (ตามลำดับ) ส่วนในเซลตรึงวุ้น จะมีค่าเป็น 100, 95.2, 90.5, 90.5, 88.1, 81.0 และ 81.0 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ

สำหรับค่า strength ของเม็ดเจลเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน เมื่อวัดด้วยเครื่องมือที่ประดิษฐ์ขึ้นเองตามวิธีข้อ 2.16.2 จะเห็นว่ามีค่าสูงขึ้น คือมีค่าเพิ่มจาก 2.3×10^{-2} เป็น 4.5×10^{-2} กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เมื่อใช้เฮกซาเมทธิลลีนไดอามีนความเข้มข้นเพิ่มจาก 0-0.05 โมลาร์ แล้วค่า strength ของเม็ดเจลเซลตรึงจะคงที่ตลอดที่ 4.5×10^{-2} กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร จนถึงความเข้มข้นของเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน 0.3 โมลาร์ ที่ใช้ทำปฏิกิริยากับเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน

ส่วน sterngth ของเม็ดเจลเซลตรึงวุ้น ซึ่งวัดโดยวิธีเดียวกับข้างต้น (ข้อ 2.16.2) จะมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 1.6 เป็น 2.3×10^{-2} กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีนจาก 0 เป็น 0.05 โมลาร์ แล้วค่า strength จะลดลงเป็น 0.16×10^{-2} กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร และคงที่ตลอดสำหรับความเข้มข้นของเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน ในช่วงตั้งแต่ 0.15-0.3 โมลาร์

รูปร่างลักษณะและขนาดของเม็ดเจลเซล E.coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน และเม็ดเจลเซล E.coli ATCC 9637 ตรึงวุ้น แสดงดังรูปที่ 27 และ 28

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 27 เม็ดเจลเซลตริงแคปปา-คาร์ราจีแนน

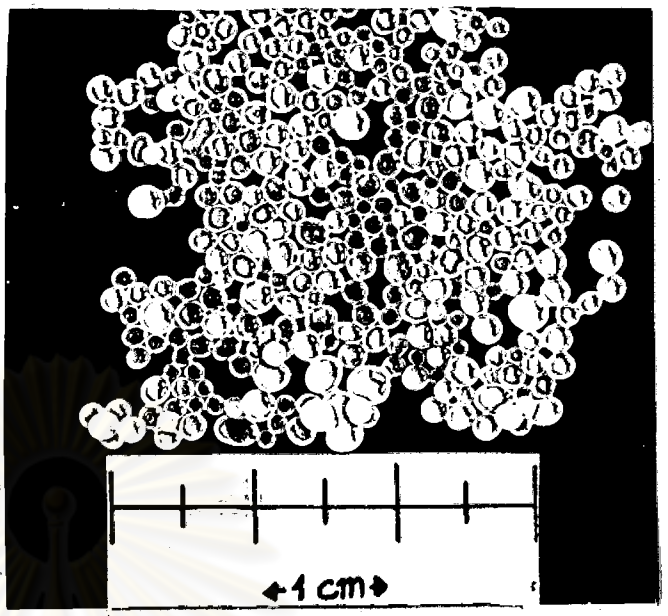
ก. เม็ดเจลเซลตริงแคปปา-คาร์ราจีแนนธรรมดา

ข. เม็ดเจลเซลตริงแคปปา-คาร์ราจีแนนเสริมกลูตารัลดีไฮด์

ค. เม็ดเจลเซลตริงแคปปา-คาร์ราจีแนนเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน

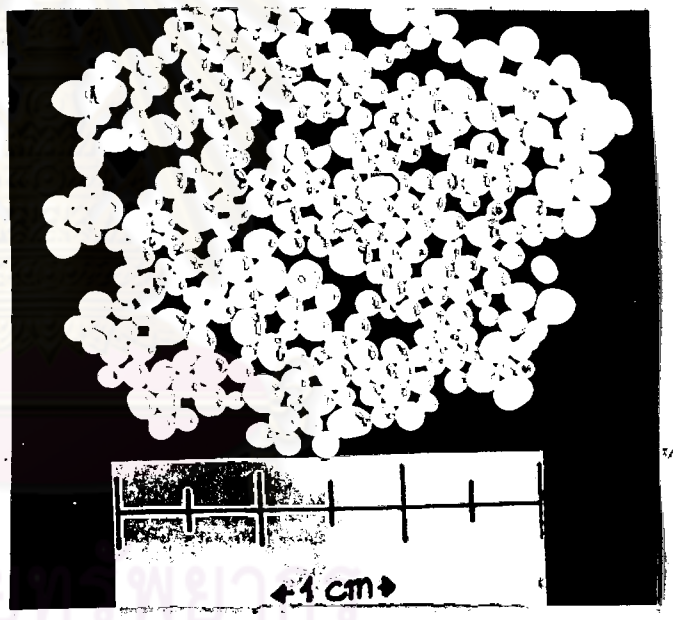
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 27

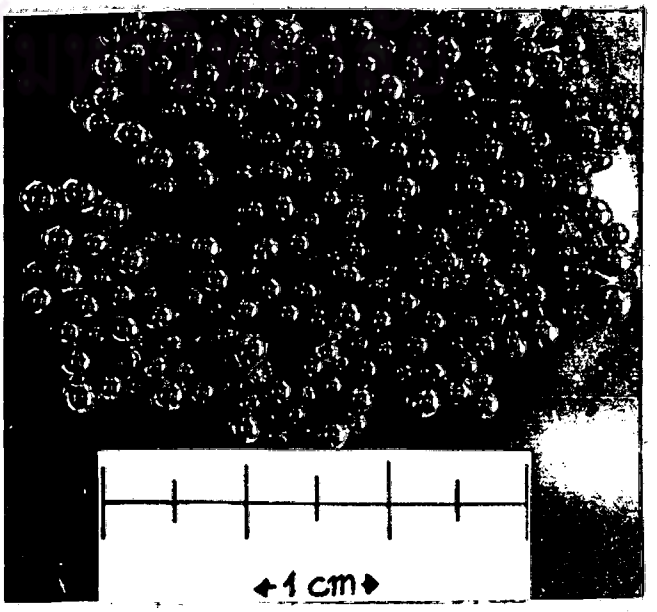


รูปที่ 27 ก.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 27 ข.



รูปที่ 27 ค.

รูปที่ 28 เม็ดเจลเซลตรึงวุ้น

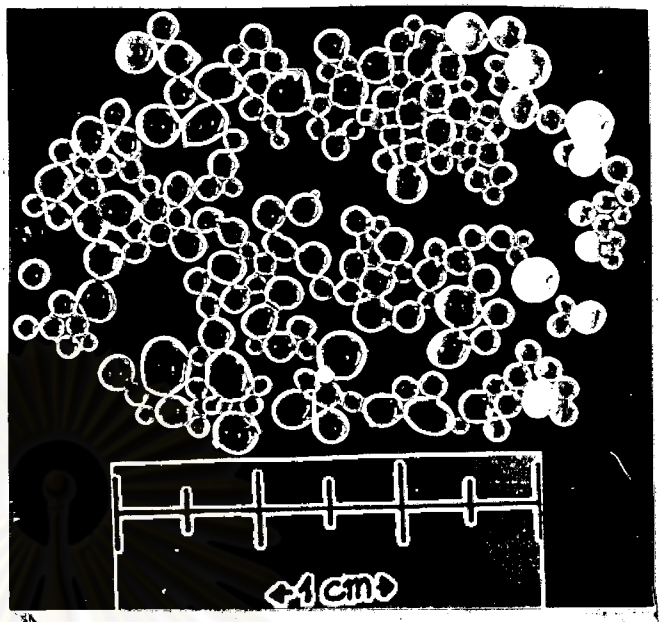
ก. เม็ดเจลเซลตรึงวุ้นธรรมดา

ข. เม็ดเจลเซลตรึงวุ้นเสริมกลูตารัลดีไฮด์

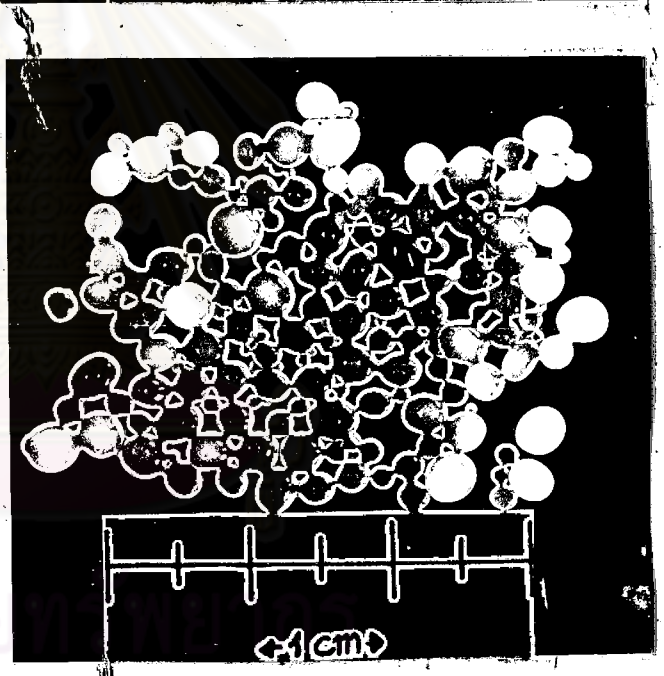
ค. เม็ดเจลเซลตรึงวุ้นเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

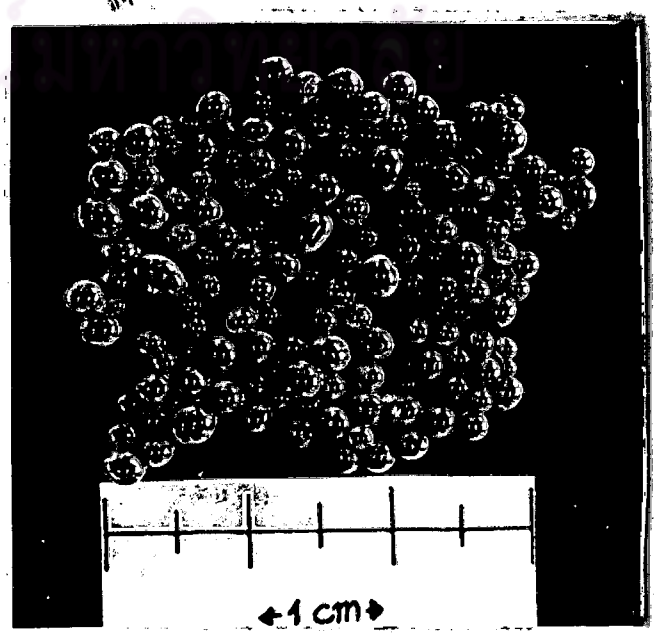
รูปที่ 28



รูปที่ 28 ก.



รูปที่ 28 ข.



รูปที่ 28 ค.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.18 ผลการเปรียบเทียบคุณสมบัติของเพนนิซิลิน เอซิเลส ของเซล E.coli ATCC 9637 อิสระ, เซล E.coli ATCC 9637 ตรึงวุ้นและเซล E.coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน

โดยการศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซลE.coli ATCC 9637 อิสระ, เซลตรึงวุ้น (โดยตรึง E.coli ATCC 9637 เข้มข้น 11.1 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก))ด้วย 5.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของวุ้น แล้วทำปฏิกิริยากับ 0.1 โมลาร์ กลูตารัลดีไฮด์ และ 0.1 โมลาร์ เฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน ตามวิธีทดลองข้อ 2.21 และเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน (โดยตรึง E.coli ATCC 9637 เข้มข้น 11.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก))ด้วย 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของแคปปา-คาร์ราจีแนน แล้วทำปฏิกิริยากับ 0.1 โมลาร์กลูตารัลดีไฮด์ และ 0.1 โมลาร์ เฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน ตามวิธีทดลองข้อ 2.21) ได้ผลการศึกษาดังต่อไปนี้

3.18.1 ผลการเปรียบเทียบ pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเพนนิซิลิน เอซิเลส (Optimum pH)

ความสัมพันธ์ระหว่าง pH กับแอคติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส แสดงในรูปที่ 29 ก., ข. และ ค. พบว่าเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซล E.coli ATCC 9637 อิสระ จะเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน จี ได้ดีที่ช่วง pH ระหว่าง 7.5-8.5 และในเซลตรึงวุ้นซึ่งเสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน จะเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ pH ประมาณ 6.5 ส่วนในเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน ซึ่งเสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิล-ลีนไดอามีน เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส จะเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ช่วง pH 7-7.5

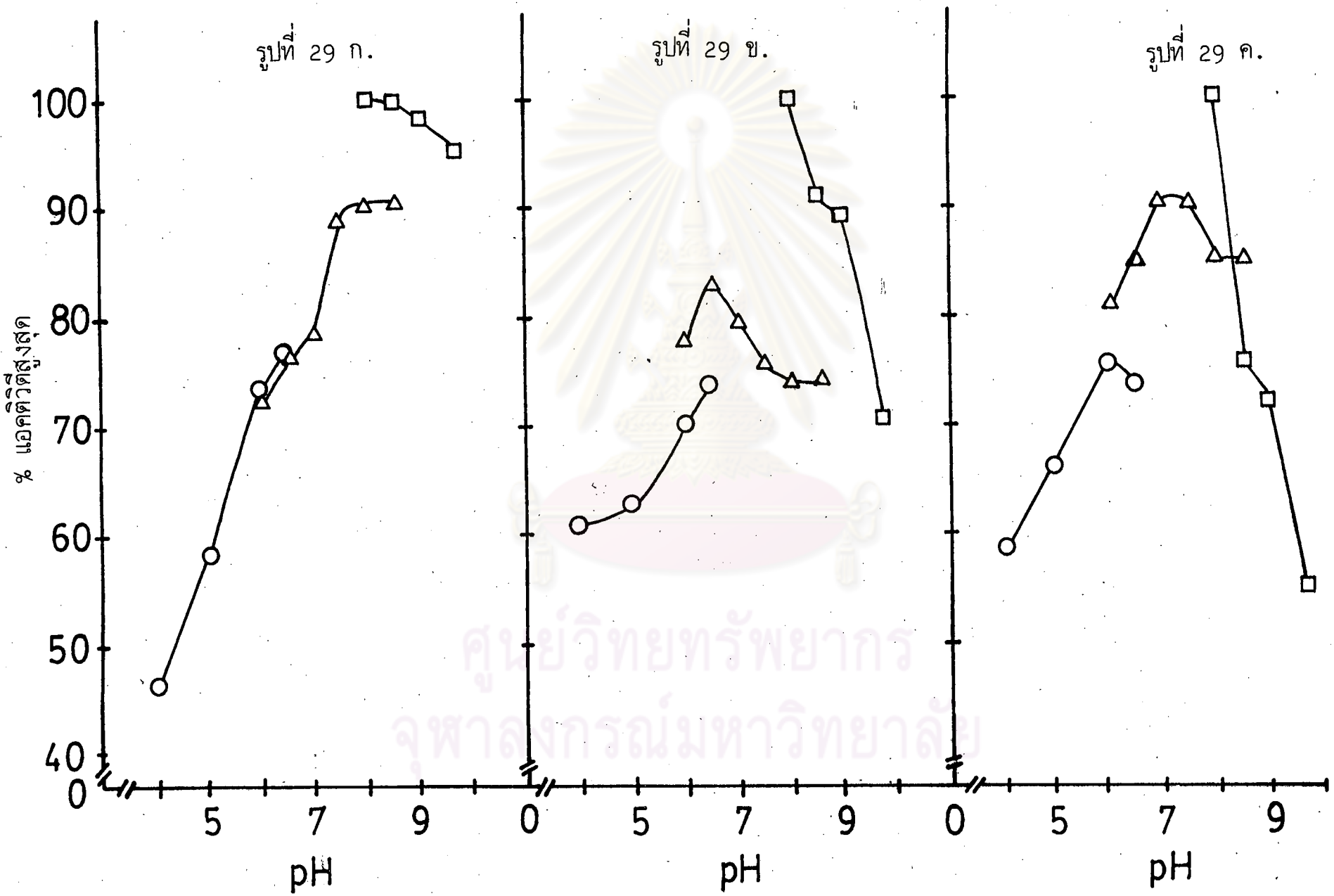
3.18.2 ผลการเปรียบเทียบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเพนนิซิลิน เอซิเลส (Optimum temperature)

ผลการทดลองรูปที่ 30 ชี้ให้เห็นว่า เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซล E.coli ATCC 9637 อิสระ สามารถเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน จี ได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และในเซลตรึงวุ้น ซึ่งเสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ 55 องศาเซลเซียส ขณะที่เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสในเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน ซึ่งเสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิช่วง 50-55 องศาเซลเซียส

รูปที่ 29 ผลกระทบของ pH ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส วัดแอคติวิตีตามวิธีทดลองข้อ 2.9.2 ที่ 37 องศาเซลเซียส เมื่อใช้เซล E.coli ATCC 9637 อิสระ (รูปที่ 29 ก.), เซลตรึงวุ้นซึ่งเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน (รูปที่ 29 ข.) และเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนซึ่งเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน (รูปที่ 29 ค.) ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH ต่าง ๆ คือ pH 4.0-6.5 (อะซีเตตบัฟเฟอร์,○), pH 6.0-8.5 (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์, △) และ pH 8.0-9.7 (ทริส-กรดไฮโดรคลอริก, □)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 29



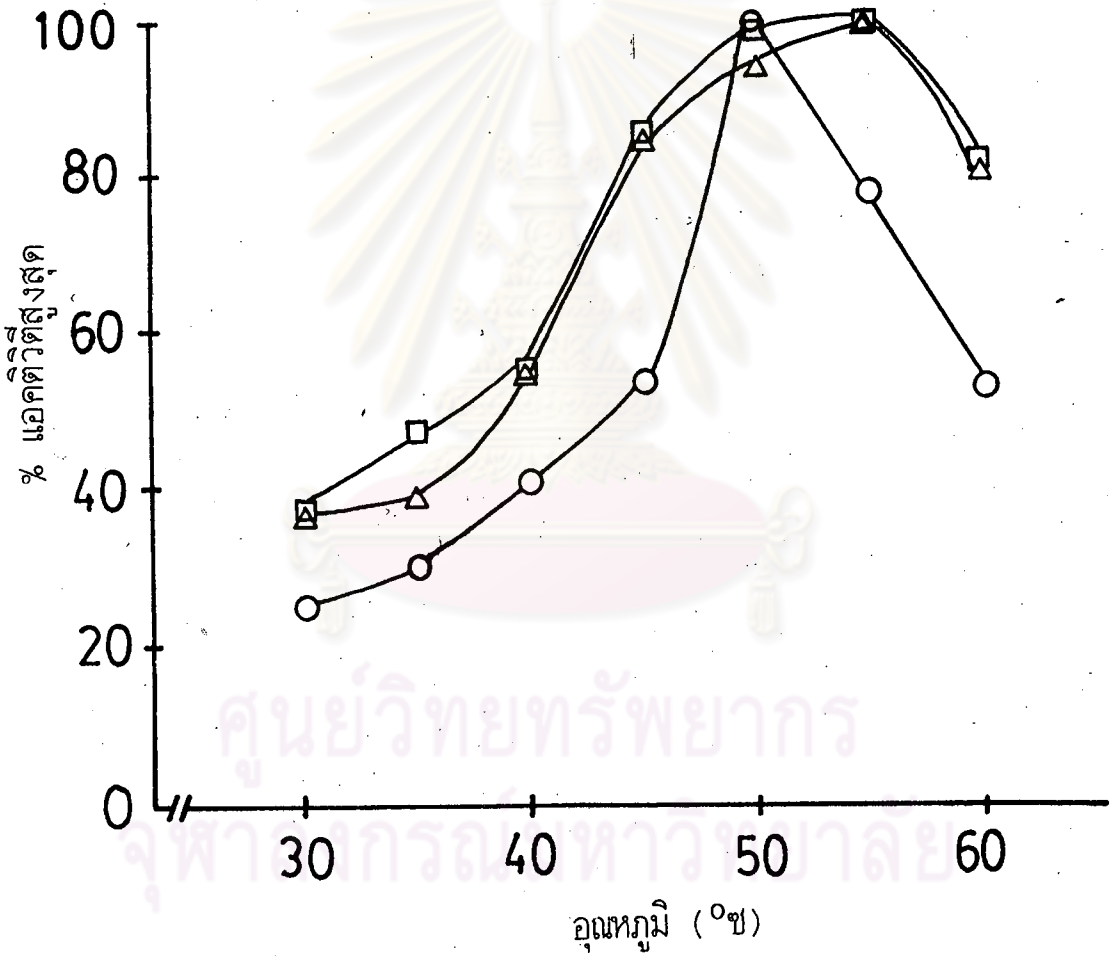
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 30 เปรียบเทียบผลกระทบของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส วัดแอคติวิตีตามวิธีทดลองข้อ 2.9.2 ที่ pH 7.5 เมื่อใช้เซล E.coli ATCC 9637 อิสระ (○), เซลตรึงวุ้นเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน (△) และเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน (□)

ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากผลการทดลอง 3 ครั้ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 30



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.18.3 เปรียบเทียบผลกระทบของ pH ต่อความเสถียรของเพนนิซิลิน เอซิเลส

เมื่ออินคิวเบตเซล E.coli ATCC 9637 อิสระ, เซลตรึงวุ้นและเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน ซึ่งเสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH ต่าง ๆ ตั้งแต่ 4.0-9.7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดแอคติวิตี ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ผลแสดงในรูปที่ 31 ก., ข. และ ค. จะเห็นได้ว่าเอน-ไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซล E.coli ATCC 9637 จะมีความเสถียรที่สุด เมื่ออินคิวเบตด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ที่มี pH ช่วง 6.5-7.0 สำหรับเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซล E.coli ATCC 9637 ตรึงวุ้น ซึ่งเสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน จะมีความเสถียรดีที่ช่วง pH ระหว่าง 5.0-8.0 และความเสถียรของเอนไซม์นี้ในเซล E.coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน ซึ่งเสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน จะดีในช่วง pH ระหว่าง 5.0-9.0

3.18.4 เปรียบเทียบผลกระทบของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเพนนิซิลิน เอซิเลส

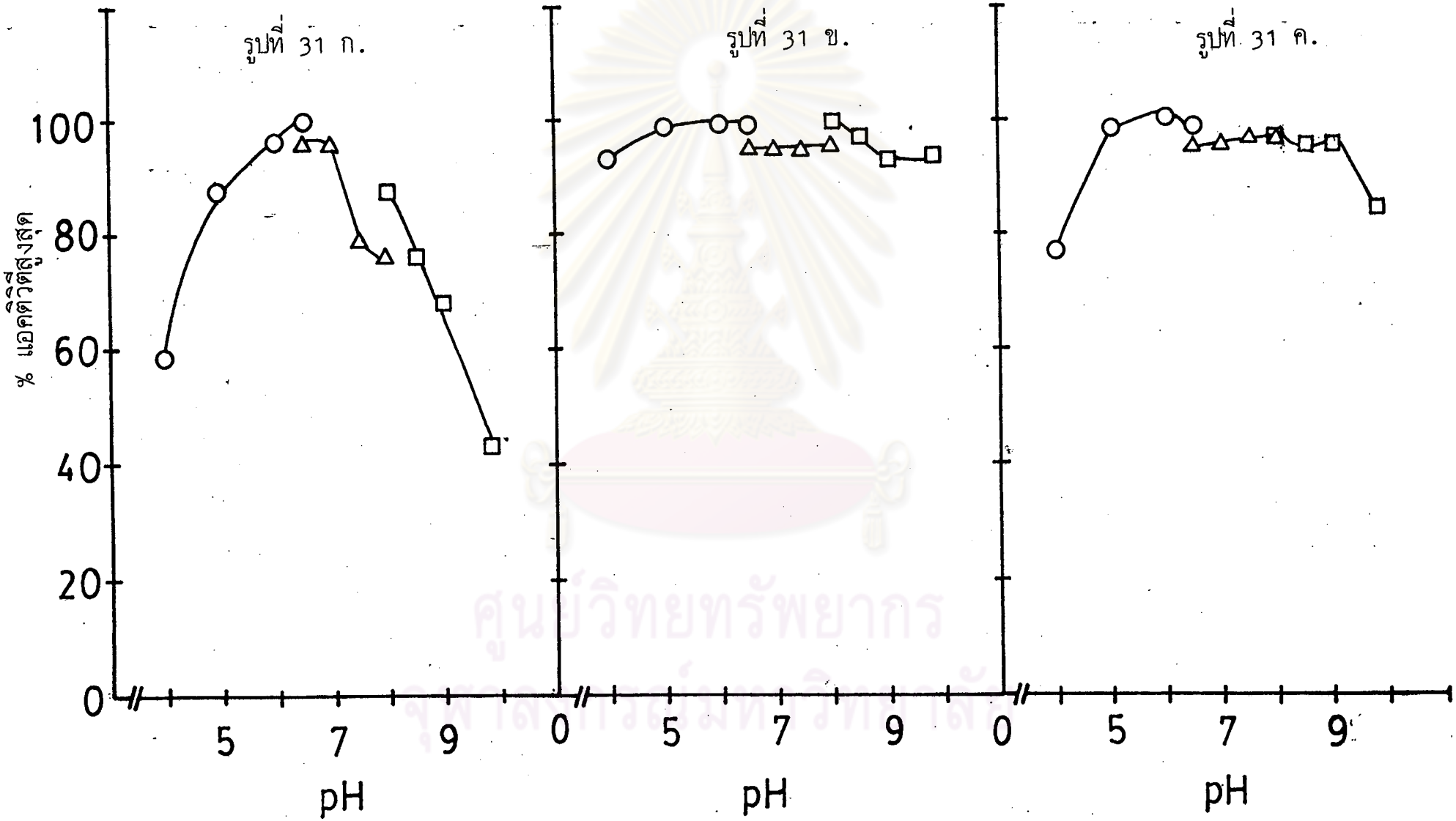
เมื่อวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสในเซล E.coli ATCC 9637 อิสระ, เซลตรึงวุ้น และเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน ซึ่งเสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน หลังจากอินคิวเบตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซล E.coli ATCC 9637 อิสระ และในเซลตรึงทั้ง 2 ชนิด มีความเสถียรคงที่ตลอดช่วงเวลา 1-5 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส (รูปที่ 32)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 31 ผลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส เมื่อใช้เซล E.coli ATCC 9637 อิสระ (รูปที่ 31 ก.), เซลตรึงวุ้นเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน (รูปที่ 31 ข.) และเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน เสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน (รูปที่ 31 ค.) แช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ชนิดต่าง ๆ ; อะซีแตตบัฟเฟอร์ (○), ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (△) และทริส-กรดไฮโดรคลอริก (□) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 ชั่วโมง แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีทดลองข้อ 2.9.2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 31



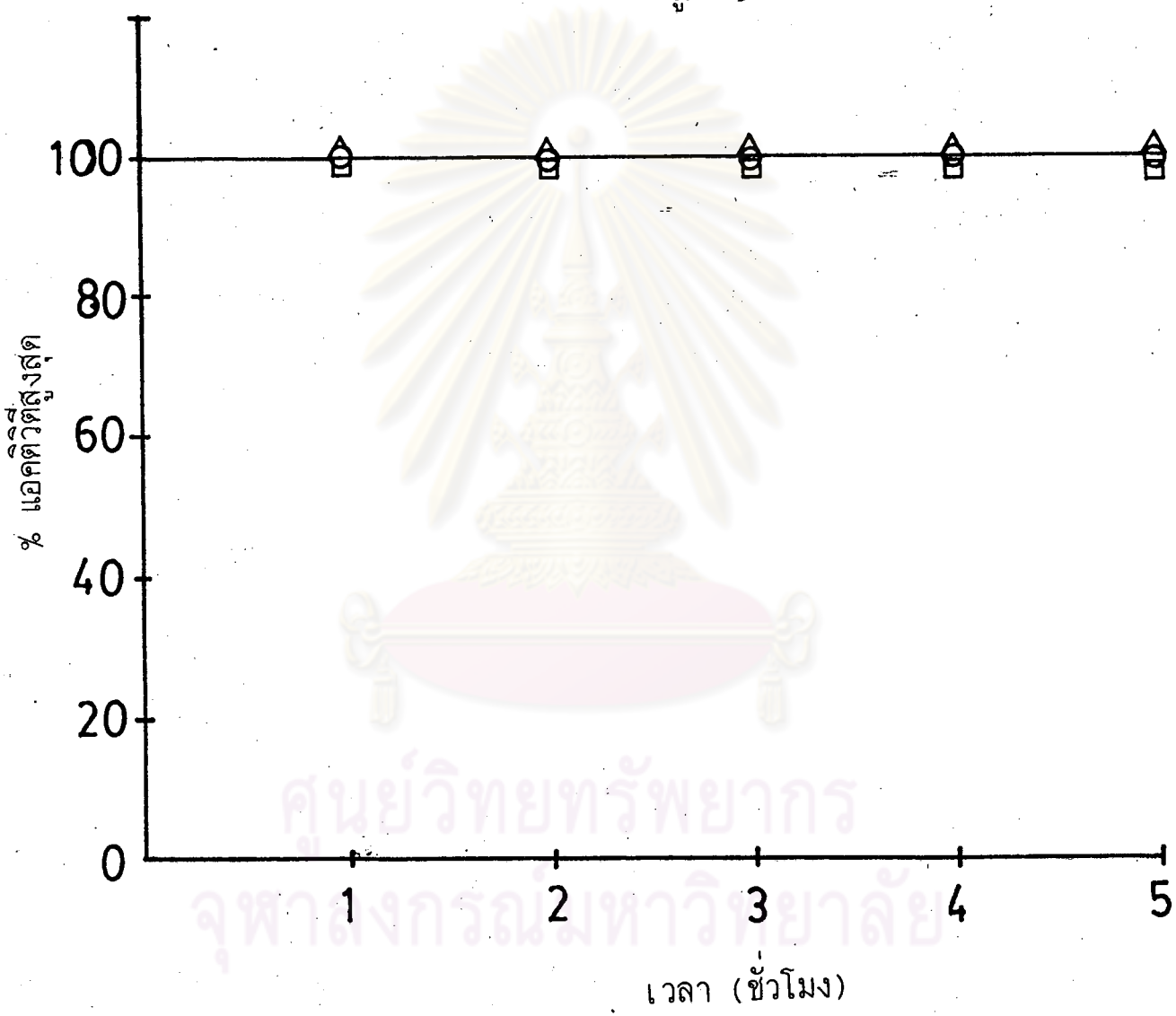
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

101

รูปที่ 32 เปรียบเทียบผลกระทบของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส เมื่อใช้เซล E.coli ATCC 9637 อิสระ (○), เซล E.coli ATCC 9637ตรึงวุ้นเสริมกลูตารัลดีไฮด์ และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน (△) และเซล E.coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน เสริมกลูตารัลดีไฮด์ และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน (□) โดยอินคิวเบตในสารละลายฟอสเฟต-บัฟเฟอร์ 0.5 โมลาร์ pH 7.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1,2,3,4 และ 5 – ชั่วโมง วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ 37 องศาเซลเซียส ตามวิธีทดลองข้อ 2.9.2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 32



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

102

3.18.5 เปรียบเทียบผลกระทบของความเข้มข้นสับสเตรตต่อแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส

เมื่อวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของเพนนิซิลิน จี ตั้งแต่ 0.6-14.0 มิลลิโมลาร์ พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างส่วนกลับของความเข้มข้นเพนนิซิลิน จี ต่อส่วนกลับแอคติวิตีของเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซล E.coli ATCC 9637 อิสระ, เซลตรึงวุ้น และเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน ซึ่งเสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ และเฮกซาเมทธิลีนไดอามีน โดย Lineweaver-Burk plot มีลักษณะดังรูปที่ 33 เมื่อคำนวณค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส จะได้ค่า K_m ของเอนไซม์ในเซล E.coli ATCC 9637, เซลตรึงวุ้นและเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนซึ่งเสริมด้วยกลูตา-รัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีนเป็น 6.7, 5.5 และ 3.1 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และได้ค่า V_{max} 16.7, 6.7 และ 5.3 หน่วยต่อกรัมเซลอิสระ (ตามลำดับ)

3.18.6 ผลการศึกษาค่า K_i ของกรดฟีนิลอะซีติกต่อเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส

รูปที่ 34, 35 และ 36 แสดง Dixon Plot ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส เมื่ออยู่ในสภาวะของเซล E.coli ATCC 9637 อิสระ, เซล E.coli ATCC 9637 ตรึงวุ้นเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน และเซล E.coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนเสริมกลูตารัลดีไฮด์ และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน โดยแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซีติกตั้งแต่ 5-40 มิลลิโมลาร์ ที่ความเข้มข้นของเพนนิซิลินจี คงที่ 7, 14 และ 21 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าค่าของการยับยั้งเพนนิซิลิน เอ-ซิเลสด้วยกรดฟีนิลอะซีติกแสดงด้วยค่า K_i มีค่า 4.0, 8.0 และ 7.0 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ รูปแบบของการยับยั้งเป็นแบบแข่งขัน (competitive inhibition)

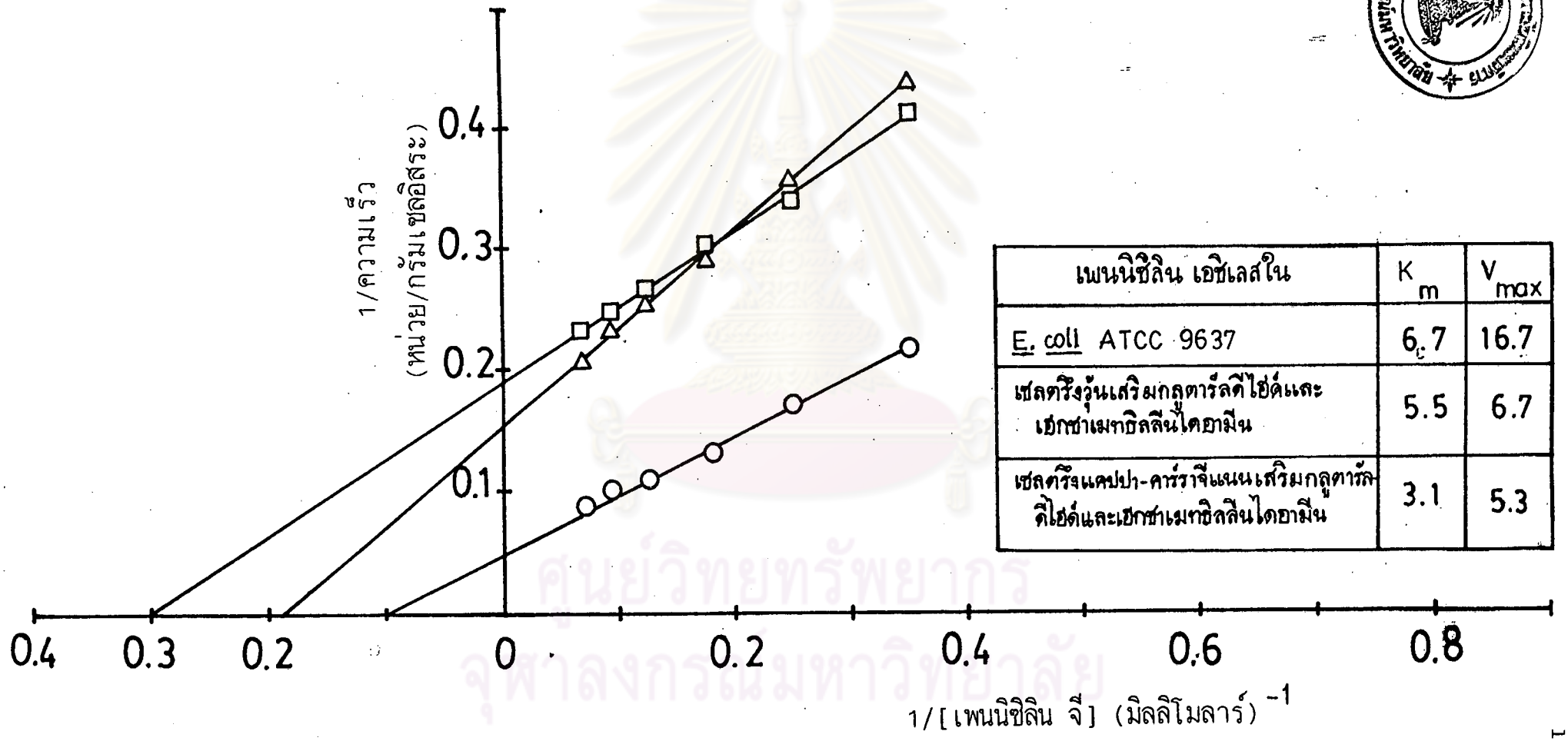
3.18.7 ผลการศึกษาค่า K_i ของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกต่อเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส

รูปที่ 37, 38 และ 39 ซึ่งแสดง Dixon Plot ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส เมื่ออยู่ในสภาวะของเซล E.coli ATCC 9637 อิสระ, เซล E.coli ATCC 9637 ตรึงวุ้นเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน และเซล E.coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน โดยการแปรเปลี่ยนความ

รูปที่ 33 Lineweaver-Burk Plot ของเพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซล E.coli ATCC 9637 อิสระ (○), เซล E.coli ATCC 9637 ตรึงวุ้นเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน (△) และเซล E.coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน เสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีน-ไดอามีน (□) กับสับสเตรตเพนนิซิลิน จี วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีทดลองข้อ 2.9.2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้สับสเตรตความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 3-14 มิลลิโมลาร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 33



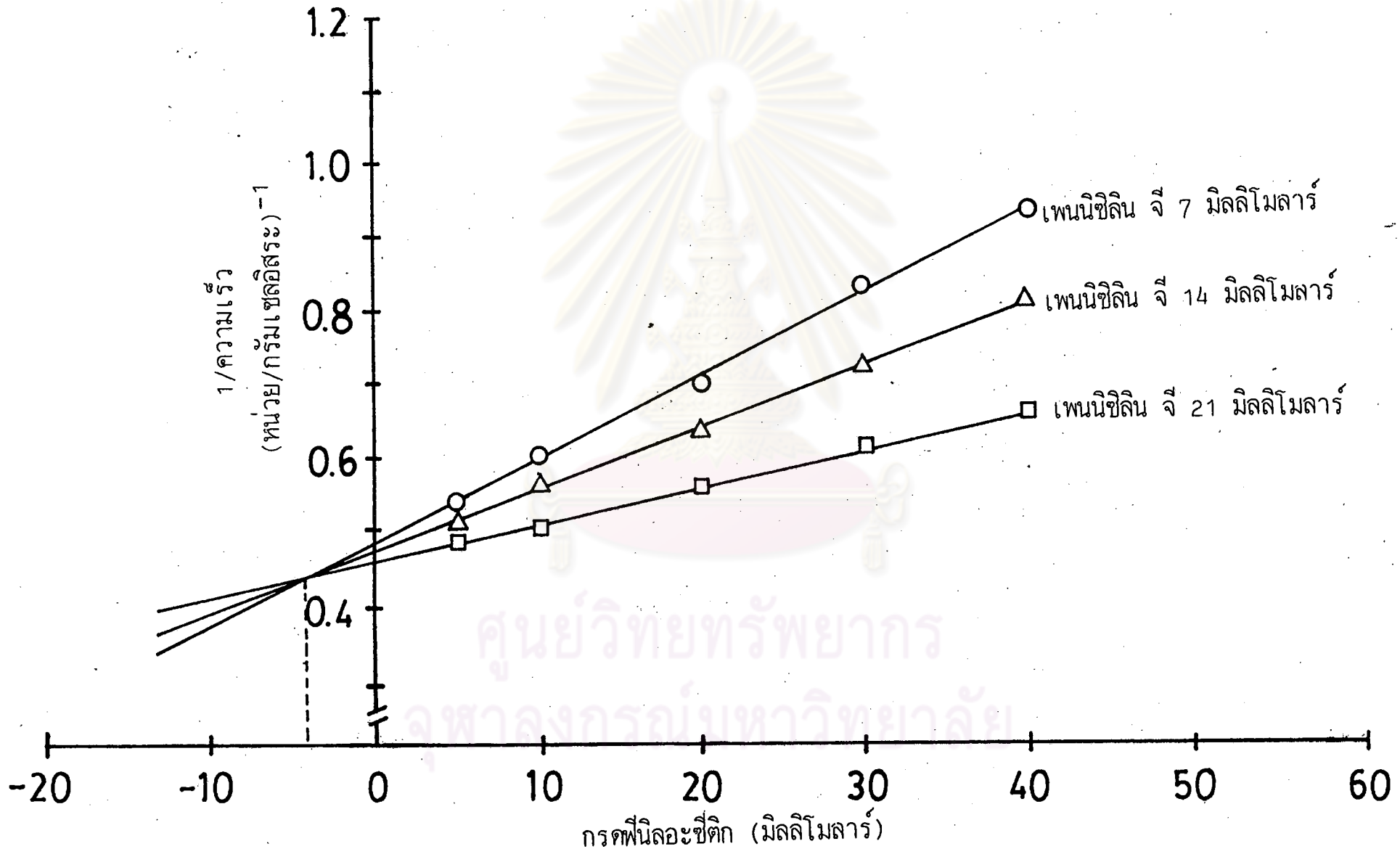
เพนนิซิลิน เอซิเลสใน	K_m	V_{max}
E. coli ATCC 9637	6.7	16.7
เซลตริงวุ้นเสริมกลูตาร์ลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน	5.5	6.7
เซลตริงแคปปา-คาร์ราจีแนนเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน	3.1	5.3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 34 Dixon Plot ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซล E.coli ATCC 9637 อิสระ เมื่อแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของสารยับยั้งปฏิกิริยาคือ กรดฟีนิลอะซีติก (5-40 มิลลิโมลาร์) วัดแอคติวิตีตามวิธีทดลองข้อ 2.9.2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อใช้เพนนิซิลิน จี ความเข้มข้นคงที่ 7, 14 และ 21 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 34

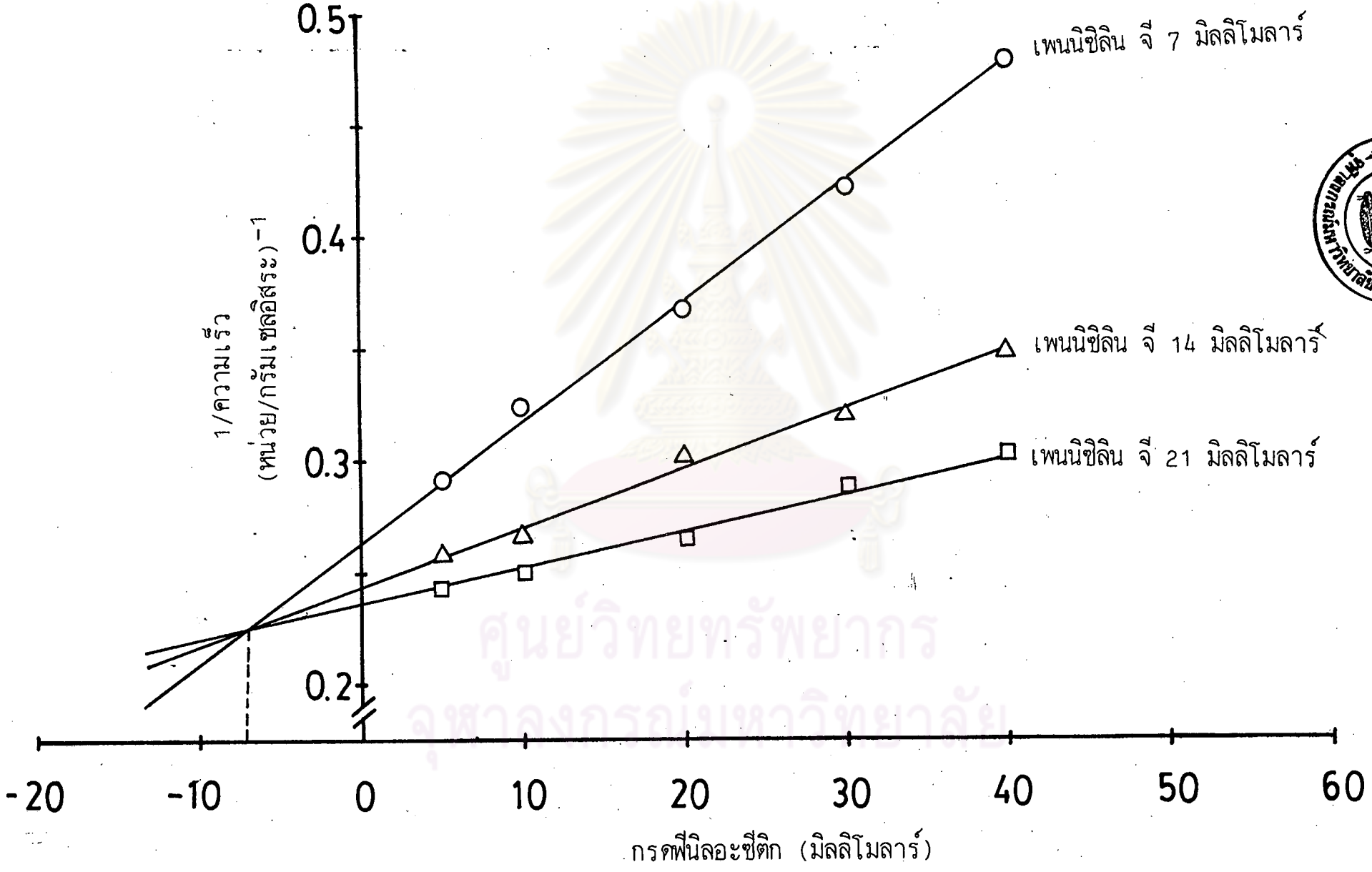


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 35 Dixon Plot ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซล E.coli ATCC 9637 ตรึงวุ้น เมื่อแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของสารยับยั้งปฏิกิริยาคือ กรดฟีนิลอะซีติก (5-40 มิลลิโมลาร์) วัดแอคติวิตีตามวิธีทดลองข้อ 2.9.2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อใช้เพนนิซิลิน จี ความเข้มข้นคงที่ 7, 14 และ 21 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 35



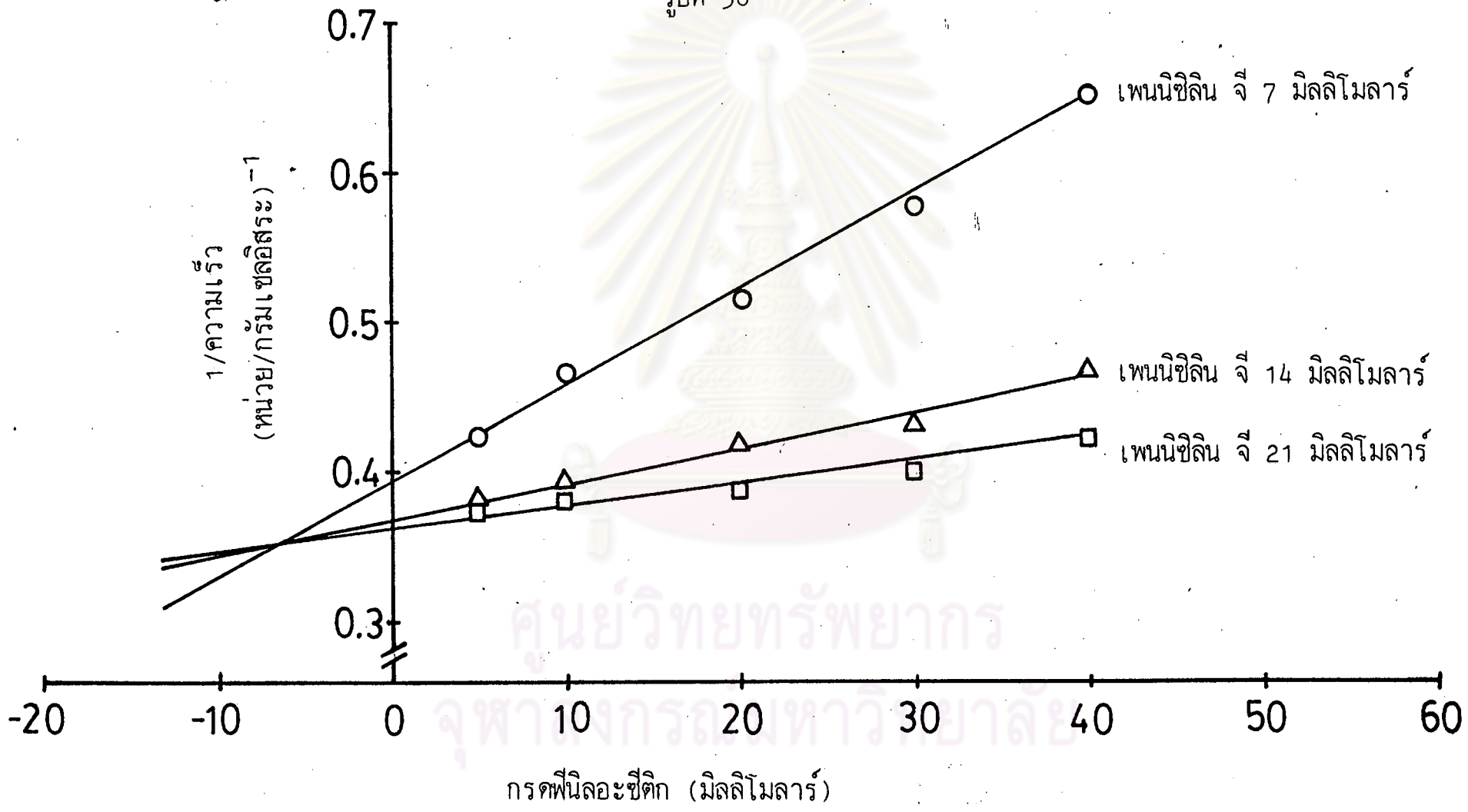
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

106

รูปที่ 36 Dixon Plot ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซล E.coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน เมื่อแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของสารยับยั้งปฏิกิริยาคือ กรดฟีนิลอะซีติก (5-40 มิลลิโมลาร์) วัดแอคติวิตีตามวิธีทดลองข้อ 2.9.2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อใช้เพนนิซิลิน จี ความเข้มข้นคงที่ 7, 14 และ 21 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 36



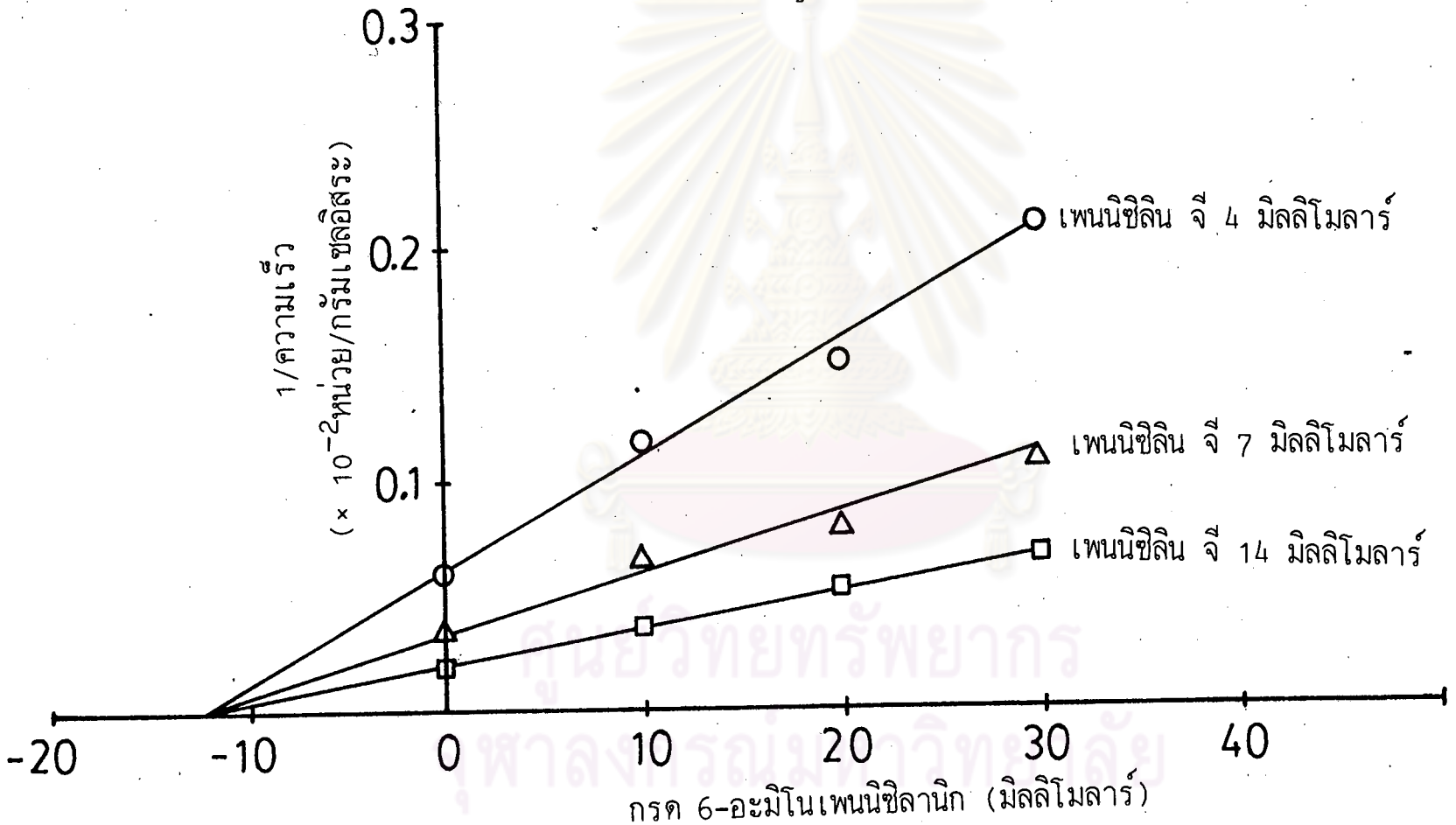
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

107

รูปที่ 37 Dixon Plot ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซล E.coli ATCC 9637 อิสระ เมื่อแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของสารยับยั้งคือ กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก (10-30 มิลลิโมลาร์) วัดแอคติวิตีตามวิธีทดลองข้อ 2.9.2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อใช้เพนนิซิลิน จี ความเข้มข้น 7, 14 และ 21 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 37

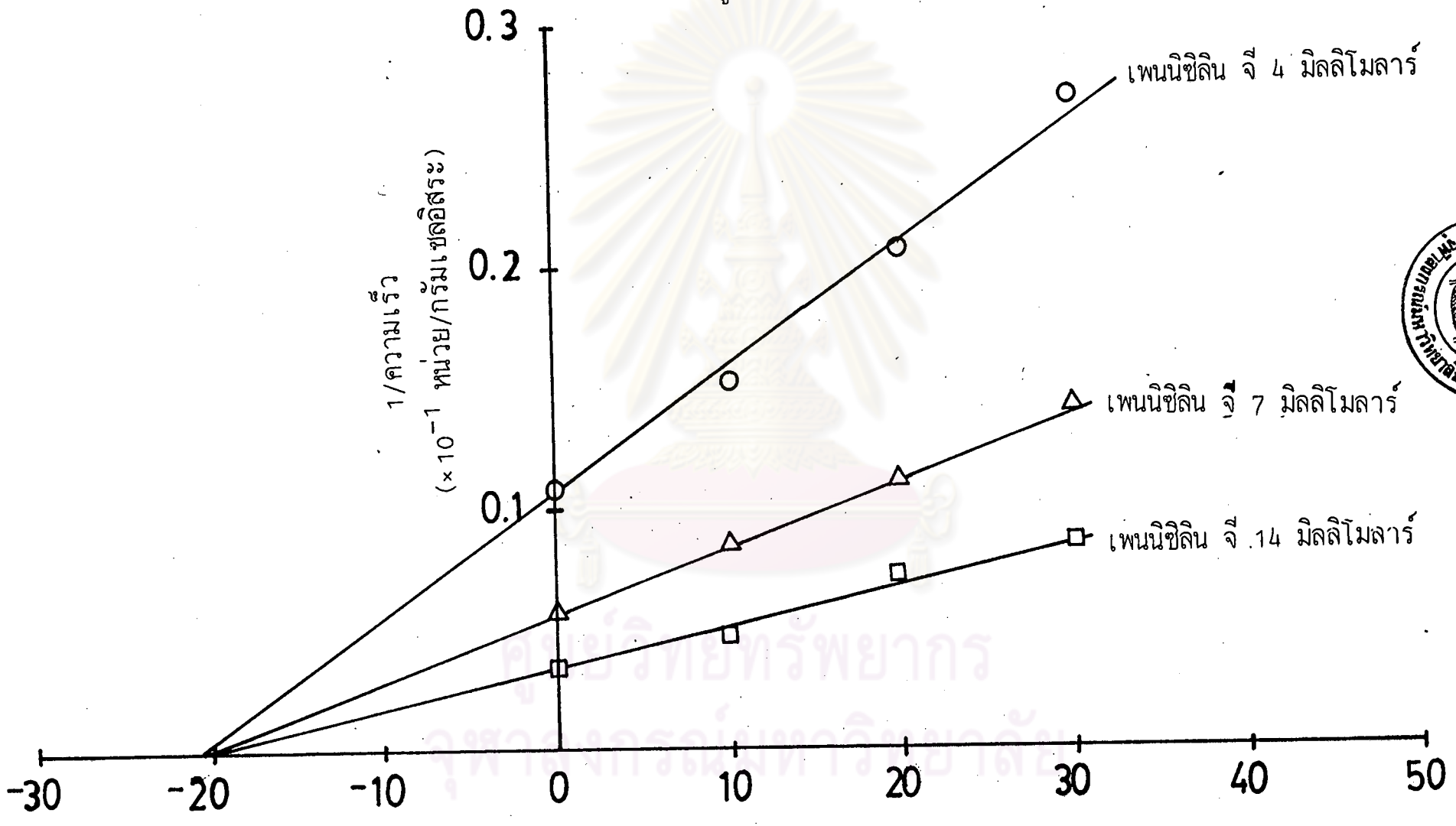


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 38 Dixon Plot ของเพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซล E.coli ATCC 9637 ตรึงวุ้นเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน เมื่อแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของสารยับยั้งปฏิกิริยาคือ กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก (10-30 มิลลิโมลาร์) วัดแอคติวิตีตามวิธีทดลองข้อ 2.9.2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อใช้เพนนิซิลิน จี ความเข้มข้น 7, 14 และ 21 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 38



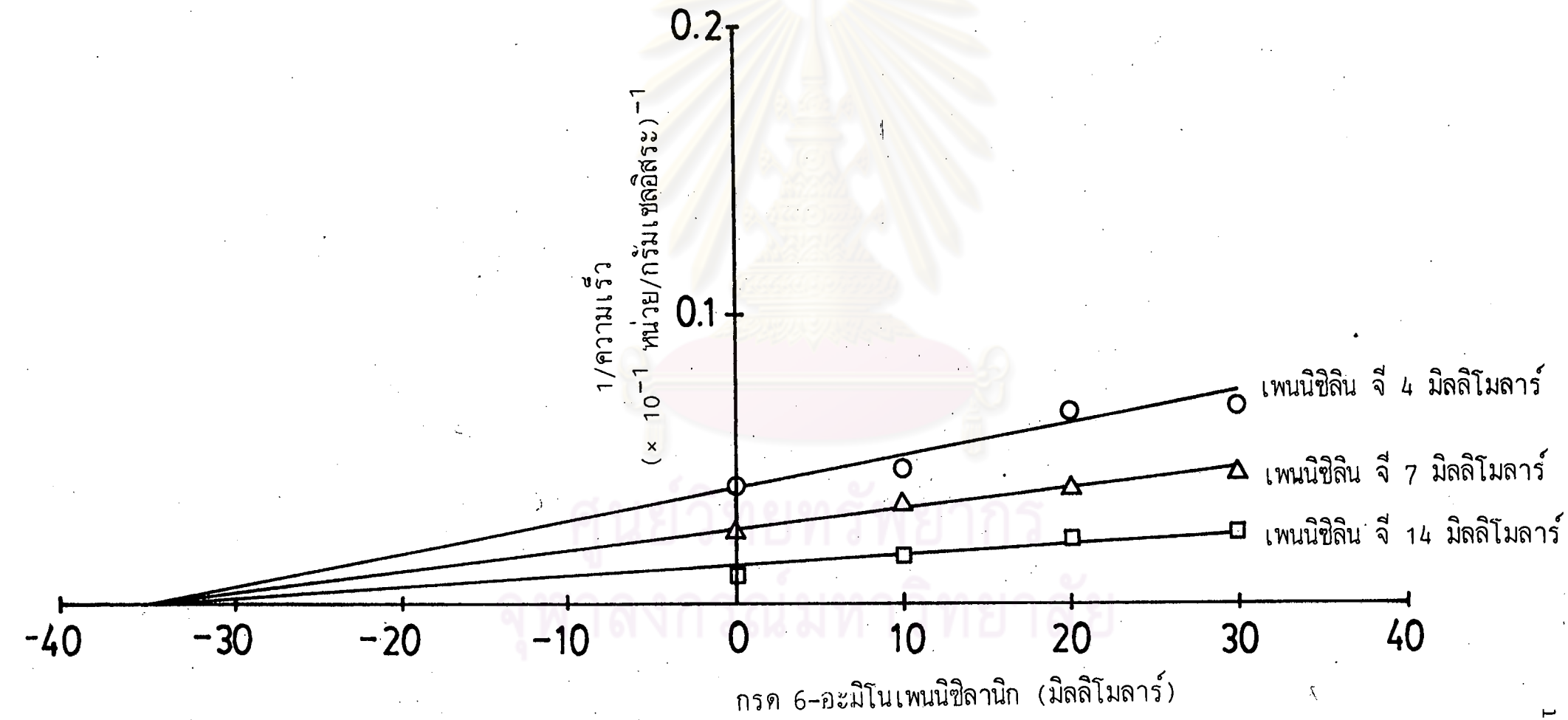
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

109

รูปที่ 39 Dixon Plot ของเพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซล E.coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน เสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน เมื่อแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของสารยับยั้งปฏิกิริยาคือ กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก (10-30 มิลลิโมลาร์) วัดแอคติวิตีตามวิธีทดลองข้อ 2.9.2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อใช้เพนนิซิลิน จี ความเข้มข้น 7, 14 และ 21 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 39


0.2
0.1
1/ความเร็ว
(× 10^{-1} หน่วย/กรัมเซลล์เรย)$^{-1}$
เพนนิซิลิน จี 4 มิลลิโมลาร์
เพนนิซิลิน จี 7 มิลลิโมลาร์
เพนนิซิลิน จี 14 มิลลิโมลาร์
-40
-30
-20
-10
0
10
20
30
40
กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก (มิลลิโมลาร์)

110

ความเข้มข้นของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ตั้งแต่ 10-30 มิลลิโมลาร์ ที่ความเข้มข้นของเพนนิซิลิน จี คงที่ 4, 7 และ 14 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส K_i 12.3, 20.3 และ 35.3 มิลลิโมลาร์ พบว่าค่าคงที่ของการยับยั้งปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน จี ด้วยกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก แสดงด้วยค่า K_i มีค่า 12.3, 20.3 และ 35.3 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ รูปแบบของการยับยั้งเป็นแบบไม่แข่งขัน (noncompetitive inhibition)

ผลการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสในเซล E.coli ATCC 9637 เซล E.coli ATCC 9637 ตรึงวุ้นเสริมกลูตารัลดีไฮด์กับเฮกซาเมท-ฮิลลีนไดอามีน และเซล E.coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนเสริมกลูตารัลดีไฮด์กับเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน ที่ทำการทดลองทั้งหมดแสดงในตารางที่ 18

3.19 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเก็บรักษาเซล E.coli ATCC 9637

ผลการทดลองรูปที่ 40 แสดงค่าแอคติวิตีที่เหลืออยู่ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสในเซล E.coli ATCC 9637 เมื่อกระจายเซลในสารละลายนอร์มอลซาลีน แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงเหลือ 75 เปอร์เซนต์ เมื่อเก็บไว้นาน 15 วัน แล้วคงที่ไม่เปลี่ยนแปลงเลยตลอดเวลาที่เก็บไว้นาน 80 วัน แต่ถ้าเก็บไว้ที่ 26 องศาเซลเซียส แอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสในเซล E.coli ATCC 9637 จะลดลงเรื่อย ๆ โดยลดลงเหลือ 52 เปอร์เซนต์ เมื่อเก็บไว้นาน 21 วัน และลดลงตลอดจนไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์เลยเมื่อเก็บนาน 80 วัน สำหรับเซล E.coli ATCC 9637 ซึ่งกระจายในสารละลายนอร์มอลซาลีนที่มี 50% กลีเซอรอลอยู่ด้วยเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส แอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส จะลดลงเหลือ 50 เปอร์เซนต์ เมื่อเก็บนาน 11 วัน แล้วคงที่ตลอดจนถึงเวลาที่เก็บไว้นาน 80 วัน

ส่วนแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซล E.coli ATCC 9637 ซึ่งเก็บไว้ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะลดลงเหลือ 60 เปอร์เซนต์ เมื่อเก็บนาน 30 วัน แล้วคงที่ตลอดถึงวันที่เก็บไว้นาน 80 วัน แต่เมื่อเติม 50 เปอร์เซนต์ กลีเซอรอลด้วย แล้วเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส แอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส จะลดลงเหลือ 40 เปอร์เซนต์ เมื่อเก็บนาน 7 วัน แล้วคงที่ตลอด จนถึงวันที่เก็บไว้นาน 80 วัน

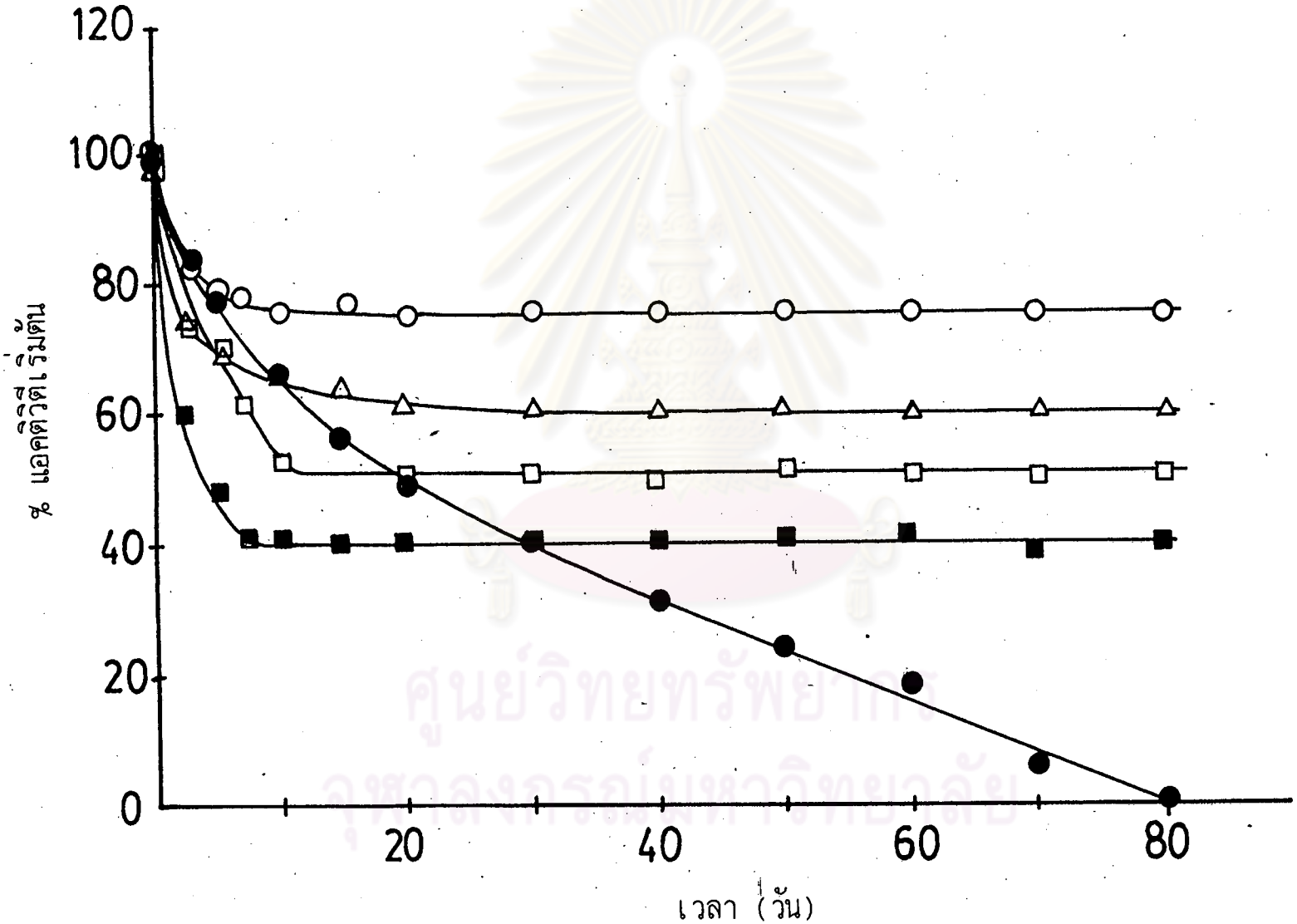
ตารางที่ 18 สรุปผลการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของเพนนิซิลิน เอซิเลสในเซล E.coli ATCC 9637 อิสระ, เซล E.coli ATCC 9637 ตรึงวุ้นเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน และเซล E.coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน

คุณสมบัติของเพนนิซิลิน เอซิเลส	เซล E.coli ATCC 9637 อิสระ	เซล E.coli ATCC 9637 ตรึงวุ้นเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิล-ลีนไดอามีน	เซล E.coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน
Michaelis-Menten constant			
K_m (มิลลิโมลาร์)	6.7	5.5	3.1
K_i,กรดฟีนิลอะซีติก (มิลลิโมลาร์)	4.0	8.0	7.0
K_i,กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก (มิลลิโมลาร์)	12.3	20.3	35.3
Optimum pH	7.5-8.5	6.5	7.0-7.5
pH Stability ที่ 37°ซ, 15 ชั่วโมง	6.5-7.0	5.0-8.0	5.0-9.0
Optimum temperature (°ซ)	50	55	50-55
Thermal Stability ที่ 5 ชั่วโมง (°ซ)	37	37	37
Storage Stability ที่ 4°ซ, 30 วัน	สูญเสียแอคติ-วิตี 25%	ไม่มีการสูญเสียแอคติวิตี	ไม่มีการสูญเสียแอคติวิตี

รูปที่ 40 เปรียบเทียบแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลสของเซล E.coli ATCC 9637 เมื่อเก็บเซลไว้ในสารละลายนอร์มอลซาลีนที่อุณหภูมิ 4 (○), 26 (●) องศาเซลเซียส, ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (△), ในสารละลายนอร์มอลซาลีนที่มี 50% กลีเซอรอล ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (□) และในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 7.0 ที่มี 50% กลีเซอรอล ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (■) ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ กันนาน 80 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 40



3.20 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเก็บรักษาเซล E.coli ATCC 9637 ตรึงวุ้น และเซล E.coli ATCC 9637ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน

เมื่อเก็บรักษาเซลตรึงวุ้น(E.coli ATCC 9637 เข้มข้น 11.1 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ซึ่งตรึงด้วย 5.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของวุ้น)และทำปฏิกิริยากับ 0.1 โมลาร์ของกลูตารัลดีไฮด์ และ 0.1 โมลาร์เฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน ในนอร์มอลซาลีนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 37 องศาเซลเซียส ผลของการติดตามวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ที่เหลืออยู่ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ กัน แสดงในรูปที่ 41 จะเห็นได้ว่าเมื่อเก็บเซลตรึงวุ้นนี้ไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส แอคติวิตีของเอนไซม์จะเริ่มลดลงเมื่อเก็บไว้นานกว่า 10 วัน และลดลงเรื่อย ๆ จนเหลือ 60 เปอร์เซนต์เมื่อเก็บไว้นาน 30 วัน ส่วนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บไว้ได้นาน 30 วัน โดยไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์เลย

เมื่อเปรียบเทียบกับการเก็บเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน (E.coli ATCC 9637 เข้มข้น 11.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ตรึงด้วย 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของแคปปา-คาร์ราจีแนน)และทำปฏิกิริยากับ 0.1 โมลาร์ กลูตารัลดีไฮด์ และ 0.1 โมลาร์ เฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน ไว้ใน 0.3 โมลาร์ โพแตสเซียมคลอไรด์ ที่ 4 องศาเซลเซียส จะไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส เลยเมื่อเก็บไว้นาน 30 วัน ในขณะที่แอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงเหลือเพียง 90 เปอร์เซนต์ เมื่อเก็บเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน และแอคติวิตีจะลดลงเรื่อย ๆ จนเหลือเพียง 45 เปอร์เซนต์ เมื่อเก็บไว้นาน 30 วัน

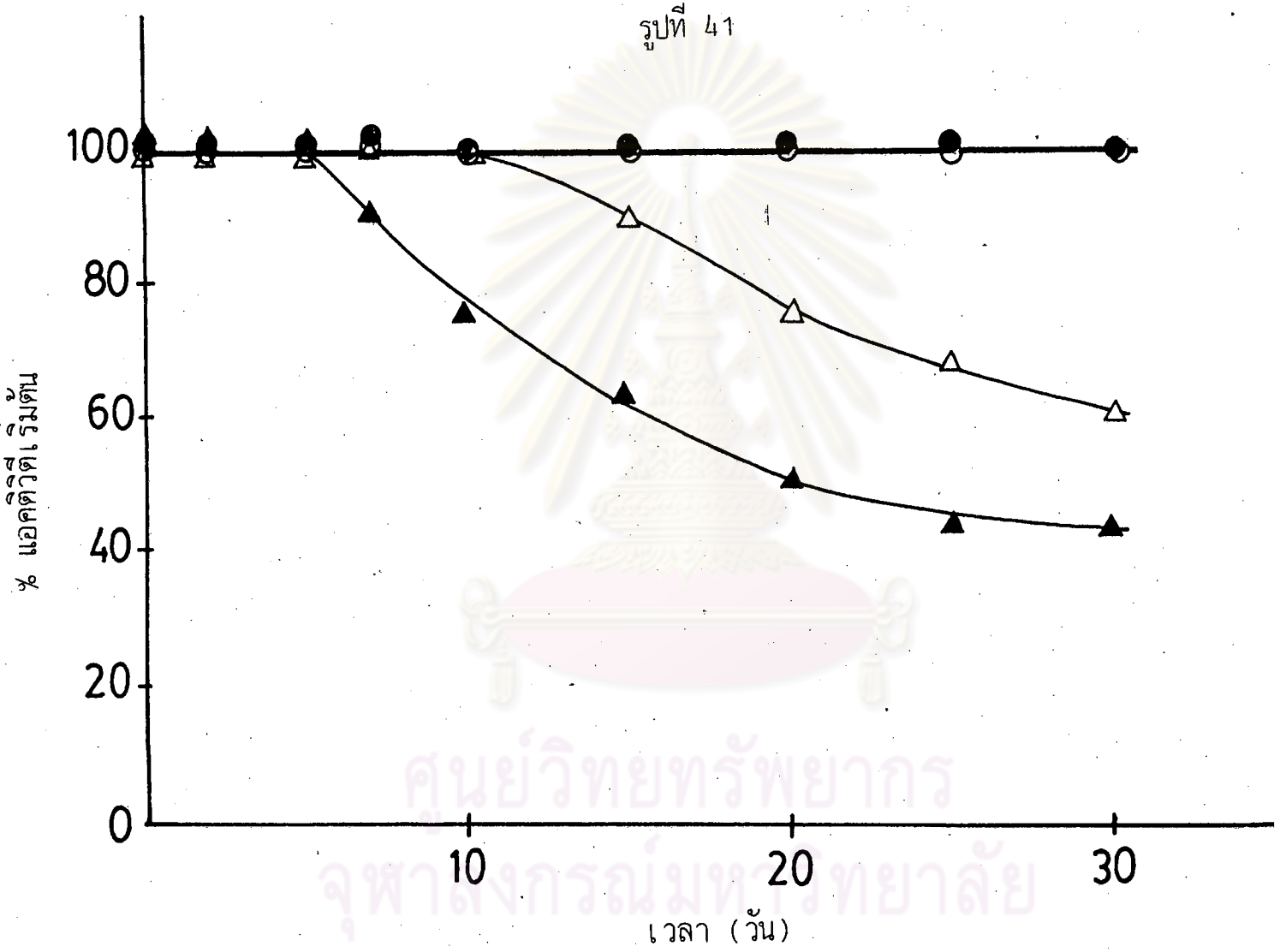
3.21 ผลการศึกษาความเป็นไปได้ของการนำเซล E.coli ATCC 9637 ตรึงวุ้น และเซล E.coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนมาใช้ซ้ำ

จากการนำเซล E.coli ATCC 9637 ตรึงวุ้น 3 สภาวะคือ เซลตรึงวุ้นธรรมดา, เซลตรึงวุ้นที่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ และเซลตรึงวุ้นที่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน ซึ่งวัดแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส แล้วนำไปเขย่าที่ 25 องศาเซลเซียส นำมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ซ้ำทุก 5 วัน ผลการทดลองพบว่า (รูปที่ 42) แอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซลตรึงวุ้นธรรมดา จะมีค่าลดลงเหลือเพียง 50 เปอร์เซนต์ หลังจากเขย่าทิ้งไว้นาน 5 วัน และลดลงเหลือ 20 เปอร์เซนต์ เมื่อนำมาวัดแอคติวิตีซ้ำครั้งที่ 2 (10 วัน)

รูปที่ 41 เปรียบเทียบแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ของเซล E.coli ATCC 9637 ตรึงวุ้นเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน เมื่อเก็บไว้ในสารละลายนอร์มอลซาลีนที่อุณหภูมิ 4 (O) และ 37 (Δ) องศาเซลเซียส และเซล E.coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน เมื่อเก็บไว้ใน 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ ที่อุณหภูมิ 4 (●) และ 37 (▲) องศาเซลเซียส ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ กันนาน 30 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 41



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

115

รูปที่ 42 เปรียบเทียบแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ของเซล E.coli ATCC 9637 ตรึงวุ้น และแคปปา-คาร์ราจีแนน 3 สภาวะ

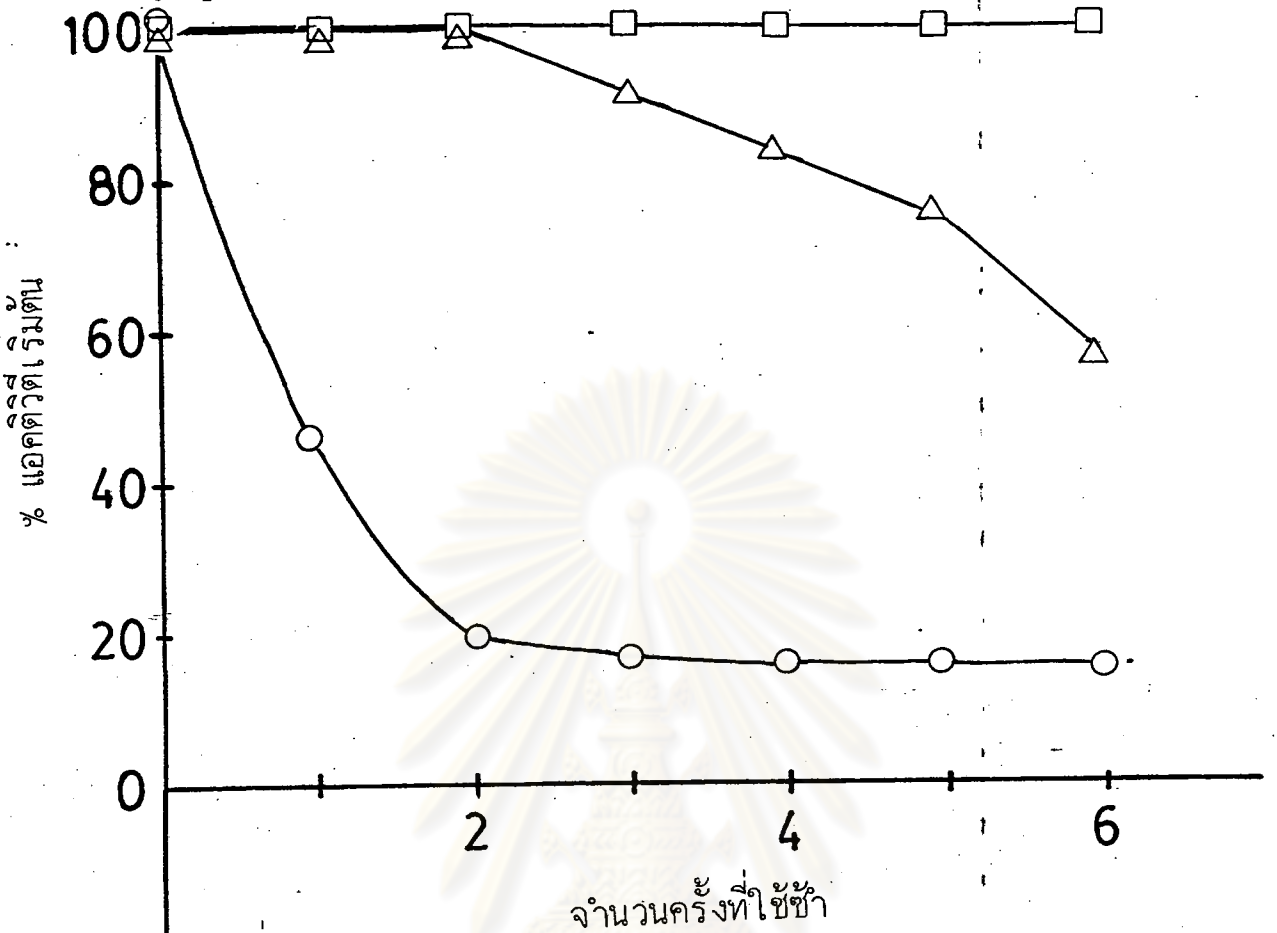
รูป 42 ก. เซลตรึงวุ้นธรรมดา (○), เซลตรึงวุ้นเสริมกลูตารัลดีไฮด์ (△) และเซลตรึงวุ้นเสริมกลูตารัลดีไฮด์กับเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน (□)

รูป 42 ข. เซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนธรรมดา (●), เซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน เสริมกลูตารัลดีไฮด์ (▲) และเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน เสริมกลูตารัลดีไฮด์กับเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน (■) เมื่อนำเซลตรึงเหล่านี้แช่ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสและนำมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ซ้ำทุก 5 วัน นาน 30 วัน รายละเอียดตามวิธีทดลองข้อ 2.25

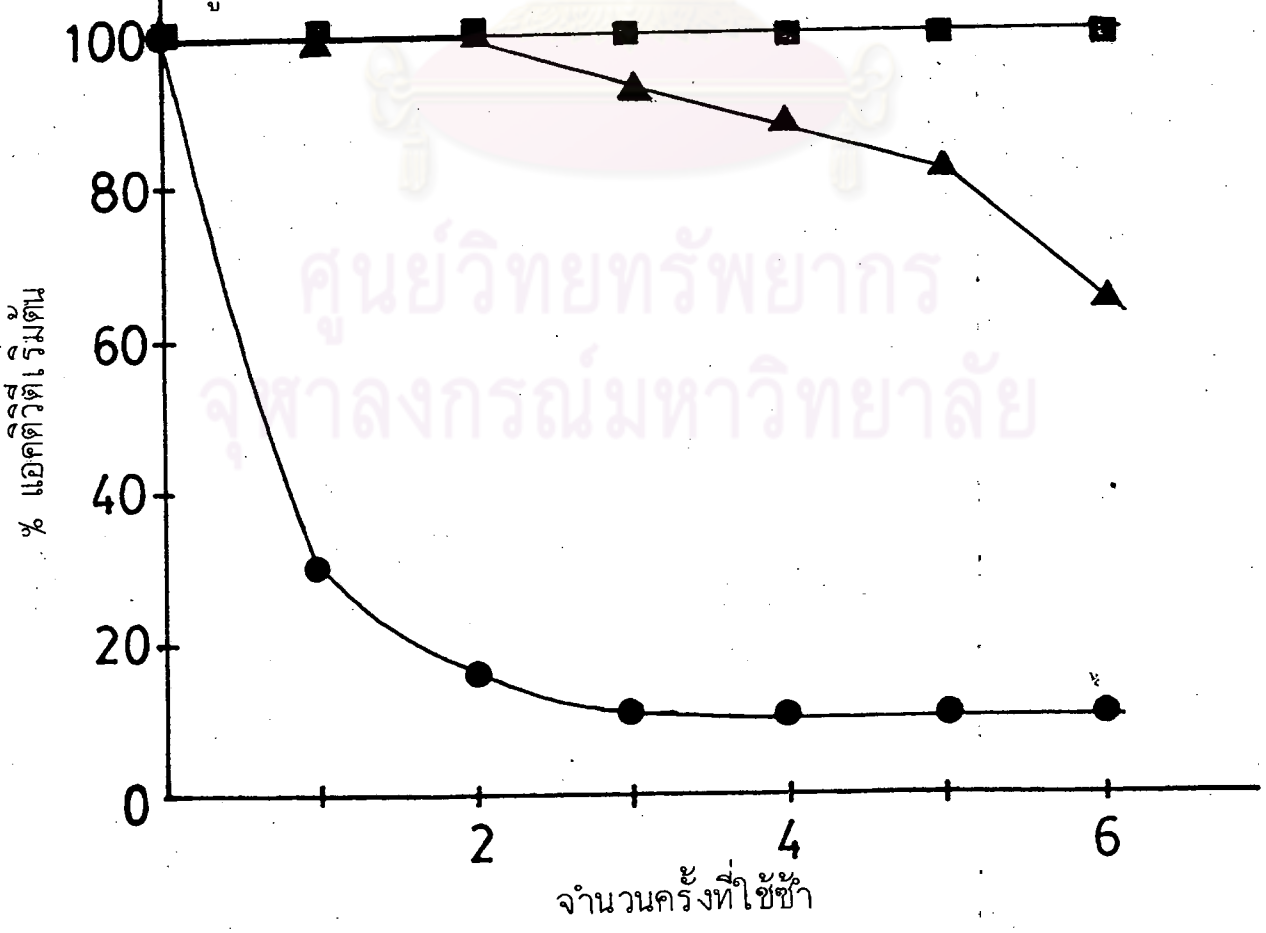
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 42

รูปที่ 42 ก.



รูปที่ 42 ข.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หลังจากนั้นจะมีค่าคงที่ คือมีแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลสเหลือเพียง 16 เปอร์เซนต์ จนถึงการนำมาใช้ซ้ำครั้งที่ 6 (30 วัน) สำหรับเซลตรึงวุ้นที่เสริมกลูตารัลดีไฮด์ จะนำมาวัดแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ซ้ำได้ 2 ครั้ง (10 วัน) โดยไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์เลย หลังจากนั้นแอคติวิตีของเอนไซม์เริ่มลดลงเรื่อย ๆ จนนำมาใช้ซ้ำครั้งที่ 6 (30 วัน) เหลือแอคติวิตีของเอนไซม์อยู่ 55 เปอร์เซนต์ ในขณะที่เซลตรึงวุ้นเสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน สามารถนำมาใช้ซ้ำได้ 6 ครั้ง (30 วัน) โดยไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสเลย

สำหรับเซล E.coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนทั้ง 3 สภาวะ (เช่นเดียวกับเซลตรึงวุ้น 3 สภาวะ) จะให้ผลการทดลองคล้ายกับเซลตรึงวุ้นข้างต้น เพียงแต่เซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนธรรดาหลังจากใช้เพียงหนึ่งครั้งแอคติวิตีเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสลดลงรวดเร็วกว่า คือเหลือแอคติวิตีเพียง 30 เปอร์เซนต์ จากเริ่มต้นเพื่อนำกลับมาวัดแอคติวิตีใหม่หลังจากเก็บไว้นาน 5 วัน และลดลงเหลือ 10 เปอร์เซนต์ เมื่อใช้ซ้ำครั้งที่ 3 แล้วคงที่ตลอดจนถึงการนำไปใช้ครั้งที่ 6 (30 วัน) ส่วนเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนที่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ ใช้ซ้ำได้ 2 ครั้ง (10 วัน) โดยไม่สูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส จากนั้นเมื่อนำมาใช้ซ้ำอีกแอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงเรื่อย ๆ จนเหลือ 65 เปอร์เซนต์ในการใช้ซ้ำครั้งที่ 6 (30 วัน) สำหรับเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนที่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน สามารถนำมาใช้ซ้ำ 6 ครั้ง (30 วัน) โดยไม่สูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสเลย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย