บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 เครื่องมือและเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 เครื่องมือที่ใช้

เครื่องบันทึกการดูดแสง (Spectrophotometer) Shimadzu UV-20 บริษัท Shimadzu, Japan

เครื่องวัดการดูดแสง (Spectrophotometer) Spectronic 20 บริษัท Baush Lomb, U.S.A.

เครื่องปั่นแบบตั้งโต๊ะ (Bench top centrifuge) International Equipment, U.S.A.

เครื่องปั่นความเร็วสูงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Refrigerated centrifuge) Beckman Model J 21 C บริษัท Beckman Instrument Inc., U.S.A.

เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) บริษัท Heraeus, U.S.A.

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิได้ (Shaking water bath)

Gyrotary water bath shaker model G-76 New Brunswick Scientific Edison, N.J., U.S.A.

Heto lab Equipment บริษัท Heto lab Equipment, Denmark

เครื่องทำลายเซลล์ Sonicator model W 375 บริษัท Heat systems Ultrasonics, Inc., U.S.A.

เครื่องทำลายเซลล์ French pressure press บริษัท American Instrument company, U.S.A.

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) PHM 33 Autocal pH meter บริษัท Radiometer Copenhagen, Denmark

เครื่องอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Autoclave) Model HA-30 บริษัท Hirayama Manufacturing Coperation, Japan

เครื่องมือนับโคโลนี (Colony counter), Darkfield Quebec Model 3325 บริษัท American optical corporative U.S.A.

ตู้แสงอุลตราไวโอเลตสำหรับการกลายพันธุ์ ออกแบบโดยภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.2 เคมีภัณฑ์

สารเคมี (ชื่อทางการค้า)	บริษัทผู้ผลิต
เพนนิซิลิน จี โซเดียม (คริสตาแพน) (Sodium Penicillin G; Crystapan)	แกล็กโซ วิทยาศรม จำกัด สมุทรปราการ ประเทศไทย
กรดฟีนิลอะซีติก (Phenylacetic acid)	Fluka A.G., Bucks S.G., Switzerland
ฟีนิลอะซีทิลคลอไรด์ (Phenylacetyl chloride)	Fluka A.G., Bucks S.G., Switzerland.
กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก (6-Aminopenicillanic acid)	Fluka A.G. Bucks S.G., Switzerland.
พารา-ไดเมทธิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ (p-Dimethylaminobenzaldehyde)	Reidel-dehaenag Sulfe-hannover, Germany.
กรด พารา อะมิโนเบนโซอิก (p-Aminobenzoic acid)	E. Merck, Germany.
กรด 1-อะมิโน-8-ไฮดรอกซีแนพธาลีน-3, 6-ไดซัลโฟนิก (1-Amino-8-hydroxynapthalene-3, 6-disulfonic acid, H-acid)	Fluka A.G., Bucks S.G., Switzerland.
ผลึกไอโอดีน	B.D.H Chemical Ltd., England.
โพแทสเซียมไอโอไดด์ (Potassium iodide)	B.D.H. Chemical Ltd., England.
แป้ง (Hydrolyzed Starch)	Sigma Chemical Co., U.S.A.

กลูโคส (D(+)-Glucose monohydrate)	Reidel-dehaenag Sulfe-hannover, Germany.
กรด แอสปาร์ติก (L-Aspartic acid)	Sigma Chemical Co., U.S.A.
เคซีน	E. Merck, Germany.
สารกลายพันธุ์ NTG (N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitro soguanidine)	Sigma Chemical Co., U.S.A.
เปอร์ออกซิเดส (Peroxidase)	Sigma Chemical Co., U.S.A.
กลูโคสออกซิเดส (Glucose oxidase)	Sigma Chemical Co., U.S.A.
โครโมเจน (Chromogen)	Sigma Chemical Co., U.S.A.
กรด เปอร์คลอริก (Perchloric acid)	Reidel-dehaenag Sulfe-hannover, Germany.
โปรตีนมาตรฐาน (Bovine serum albumin)	Sigma Chemical Co., U.S.A.
ทริพโตน (Bacto-tryptone)	Difco Laboratories, U.S.A.
ผงสกัดยีสต์ (Yeast extract)	Difco Laboratories, U.S.A.

และสารเคมีทั่วไปชนิดอื่นๆ ทุกชนิดเป็นผลิตภัณฑ์ analytical สั่งซื้อมาจากบริษัท Sigma Chemical Co., ประเทศสหรัฐอเมริกา บริษัท B.D.H., ประเทศอังกฤษ เป็นต้น

2.2 <u>แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง</u>

Proteus rettgeri ATCC 9250 ซื้อจากบริษัท American Type Culture Collection ประเทศสหรัฐอเมริกา เป็นสายพันธุ์ซึ่งมีรายงานว่า สามารถผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในระดับสูง (U.S. Pat. 3,905,868 และ U.S. Pat. 4,113,566)

Serratia marcescens ATCC 27117 ซื้อจากบริษัท American Type Culture Collection ใช้เป็นตัวทดสอบและคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส โดยอาศัยคุณสมบัติของการถูกยับยั้งการเจริญได้ด้วยกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก

Klebsiella pneumoniae M5a1 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ เบต้า-แลคแตมเมสในระดับสูง (Oostendrop, 1972)

2.3 อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย

2.3.1 อาหารสูตรอุดม

ใช้สูตรอาหารของ Luria-Bertani (Luria และคณะ, 1960) ใช้สารละลาย 1ลิตร ประกอบด้วย

Bacto-tryptone	10 กรัม
Yeast extract	5 กรัม
Sodium chloride	10 กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 7.0 ด้วยสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์

ถ้าเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง เติม Bacto-Agar 15 กรัมต่อลิตร

2.3.2 อาหารสูตรปรับต่ำ

ปรับปรุงโดยใช้สูตรอาหารของ Self (Self และคณะ, 1969) สารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	3 กรัม
ไดโพแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	7 กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	1 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.1 กรัม
เฟอรัสซัลเฟต	10 มิลลิกรัม
วิตามิน บี 1	5 มิลลิกรัม

ปรับ pH ให้เป็น 7.0 ด้วยสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์

ถ้าเป็นอาหารเลี้ยงแบคทีเรียชนิดแข็ง เติม Bacto-Agar 15 กรัมต่อลิตร

2.4 การเก็บรักษาแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

2.4.1 การเก็บรักษาระยะสั้น

Slant LB-Agar ใช้สำหรับเก็บแบคทีเรียทั่วไป โดยบรรจุอาหารเลี้ยงแบคทีเรียสูตรอุดมชนิดแข็ง ในหลอดแก้วขนาด 4 มิลลิลิตร ในลักษณะลาดเอียง เขี่ยแบคทีเรียน 1 โคโลนี ลงบนอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย บ่มที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งแบคทีเรียเจริญเต็มที่ ปิดจุกด้วยพาราฟินเหลว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 2-3 เดือน

จานเพาะ LB-Agar ใช้เก็บแบคทีเรียที่ใช้เป็น Master plate ในระหว่างการทดลองที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 เดือน

2.4.2 การเก็บรักษาระยะยาว

เจริญแบคทีเรียในอาหารสูตรอุดมชนิดเหลวแล้วผสมกับกลีเซอรอล 50 เปอร์เซนต์ ในหลอดขนาด 4 มิลลิตร มีฝาเกลียวปิดทับด้วยพาราฟินเหลว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นานประมาณ 1 ปี

2.5 การศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย

2.5.1 การเตรียมเชื้อตั้งต้น (Starter inoculum)

เขี่ยแบคทีเรีย 1 โคโลนีจากจานแม่ (master plate) ลงในอาหารชนิดเหลว ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลอง ขนาด 125 มิลลิลิตร บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2.5.2 การปลูกและติดตามการเจริญของแบคทีเรีย

ใส่เชื้อตั้งต้น 15 มิลลิลิตร ลงในอาหารสูตรที่ต้องการชนิดเหลว 300 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลอง ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลีที่ห่อด้วยผ้าขาง บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เขย่าด้วยความเร็ว 150-200 รอบต่อนาที เมื่อแบคทีเรียเจริญถึงระยะการเจริญที่ต้องการ นำไปบันทึกผลการทดลองดังนี้

ก. วัดความขุ่นด้วยเครื่องวัดการดูดแสง Spectronic 20 ที่ 540 นาโนเมตร

ข. นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Viable cell count) โดยการเจือจางเซลล์ให้อยู่ในช่วง 10^2- 10^7 เท่าด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ เรียกว่านอร์มอลซาลีน กระจายแบคทีเรียบนเพลทที่มีอาหารสูตรอุดม บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น

2.6 <u>การเตรียมกรด ฟีนิลอะซีทิล-4-อะมิโนเบนโซอิก</u> (Phenylacetyl-4aminobenzoic acid; PAAB) ดัดแปลงจากวิธีของ Szewczuk (Szewczuk และคณะ, 1980)

ผสมกรด พารา-อะมิโนเบนโซอิก 6.85 กรัม ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ 25 มิลลิลิตร แล้วค่อยๆ เติมฟีนิลอะซีทิลคลอไรด์ จำนวน 6.4 มิลลิลิตร ทีละหยด ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 0 องศาเซลเซียส โดยปรับ pH ให้สูงกว่า 8 ตลอดเวลา

หลังจากนั้นเติมกรด ไฮโดรคลอริก 2 โมลาร์ จำนวน 200 มิลลิลิตร กรองตะกอนเก็บไว้ นำส่วนน้ำใสมาตกตะกอนซ้ำอีก 2 ครั้ง อบตะกอนให้แห้งที่ 50 องศาเซลเซียส

นำตะกอนแห้งมาละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ จำนวน 30 มิลลิลิตร กับเอธิลอัลกอฮอล์ 20 เปอร์เซนต์ จำนวน 100 มิลลิลิตร แล้วตกตะกอนใหม่ด้วย กรดไฮโดรคลอริก 2 โมลาร์ จำนวน 50 มิลลิลิตร กรอง แล้วตกตะกอนซ้ำอีก 2 ครั้ง ด้วยวิธีการเดียวกัน อบตะกอนให้แห้งที่ 50 องศาเซลเซียส

นำสารที่ได้ไปหาจุดหลอมเหลวด้วยเครื่อง Fisher-Johns melting point apparatus ซึ่งควรอยู่ในช่วง 256-259 องศาเซลเซียส เก็บในภาชนะทึบแสงที่ 4 องศาเซลเซียส

2.7 <u>การเตรียมสารละลาย</u>

2.7.1 <u>สารละลายกรด ฟีนิลอะซีทิล-4-อะมิโนเบนโซอิก</u>

ละลาย PAAB 25.5 มิลลิกรัม ในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.1 โมลาร์ 1 มิลลิลิตร เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.08 โมลาร์ pH 7.8 จนได้ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เก็บได้นาน 1 เดือน ที่ 4 องศาเซลเซียส

2.7.2 <u>สารละลายสำหรับหาปริมาณโปรตีน</u> โดยวิธีของ ลอรี (Lowry และคณะ, 1951)

2.7.2.1 สารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ ประกอบด้วยสารละลาย ก. สารละลาย ข. และสารละลาย ค.

สารละลาย ก. ได้จากการละลายโซเดียมคาร์บอเนต 2 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ 100 มิลลิลิตร

สารละลาย ข. ได้จากการละลายคอปเปอร์ (II) ซัลเฟต 1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

สารละลาย ค. ได้จากการละลายโพแตสเซียมทาร์เทต 1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

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

2.7.2.2 สารละลายฟีนอลรี เอเจนต์ (Phenol reagent)

ผสมโซเดียมทังสเตท 50 กรัม โซเดียมโมลิบเดท 12.5 กรัม น้ำกลั่น 350 มิลลิลิตร กรดฟอสฟอริก 85 เปอร์เซนต์ 25 มิลลิลิตร และกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 50 มิลลิลิตร ต้มกลั่น (reflux) ด้วยความร้อนต่ำๆ 10 ชั่วโมง เติมลิเธียมซัลเฟต 75 กรัม น้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร และน้ำโบรมีน 2-3 หยด ต้มไล่โบรมีนที่มากเกินพอ 15 นาที ทิ้งให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่น จนปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา ในตู้เย็นก่อนการใช้เติมน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร

2.7.2.3 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน

ละลาย Bovine serum albumin (BSA) เกรด A 100 มิลลิกรัม ด้วยสารละลายอะซีเตทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 5.0 ให้มีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

2.7.3 <u>สารละลายที่ใช้ในการวัดปริมาณกลูโคส</u> (Bergmeyer และคณะ, 1965)

2.7.3.1 สารละลายผสมบัฟเฟอร์และเอนไซม์ (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ 7.0 เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

ละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4 .2H_2O$) 2.07 กรัม โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NaH_2PO_4 .2H_2O$) 1.09 กรัม เปอร์ออกซิเดส 6 มิลลิกรัมและกลูโคสออกซิเดส 38 มิลลิกรัม ด้วยน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็นได้นาน 2-3 วัน

2.7.3.2 โครโมเจน

ละลายออโธไดอะนิซีดินไดไฮโดรคลอไรด์ (orthodianicidine dihydrochloride) 10 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 2-3 วัน

2.7.3.3 สารละลายกลูโคส รีเอเจนต์ (Glucose reagent)

ผสมสารละลายในข้อ 2.7.3.1 50 มิลลิลิตร กับสารละลายในข้อ 2.7.3.2 0.5 มิลลิลิตร เตรียมขึ้นใหม่ทุกครั้งที่ใช้

2.7.3.4 สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

ละลายกลูโคส 25 มิลลิกรัม ด้วยน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เติมกรด เปอร์คลอริก 70 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 0.625 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 25 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส

2.7.3.5 สารละลายกรด เปอร์คลอริก

ละลายกรด เปอร์คลอริก เข้มข้น 2.9 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

2.7.4 สารละลายน้ำแป้ง-ไอโอดีน

2.7.4.1 สารละลายแป้ง

ละลายแป้ง 0.2 กรัม ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยการค่อยๆ อุ่นให้ร้อนจนละลายหมด

2.7.4.2 สารละลายไอโอดีน

ละลายโพแตสเซียมไอโอไดด์ 53.25 กรัม ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมผลึกไอโอดีน 2 กรัม เขย่าให้ละลายจนหมด

ผสมสารละลายไอโอดีน 0.15 มิลลิลิตร กับสารละลายแป้ง 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ในภาชนะทึบแสง

2.8 การเตรียมเซลล์เพื่อวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส

นำเซลล์มาปั่นแยกออกจากอาหาร ถ้ามีปริมาณน้อย (5 มิลลิลิตร) ใช้เครื่องปั่นแบบตั้งโต๊ะ ความเร็ว 3,000 x g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ถ้ามีปริมาณมาก (เกิน 100 มิลลิลิตร) ใช้เครื่องปั่นแบบควบคุมอุณหภูมิได้ของ Beckman centrifuge J-21G โดยใช้ rotor JA-10 ที่ความเร็ว 5,000 x g เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์ 1 ครั้ง ด้วยสารละลายนอร์มอลซาลีน แล้วกระจายเซลล์ในสารละลายนอร์มอลซาลีน ปริมาตรเท่าเดิม เพื่อใช้เป็นเอนไซม์และ/หรือแหล่งของเอนไซม์ หากไม่ใช้ทันทีสามารถเก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 45 วัน โดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงแอคติวิตีของเอนไซม์เลย

2.9 การทดสอบแอคติวิตีเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส โดยวิธี Microbiological test (Meevootisom และคณะ, 1983; Oostendrop และคณะ, 1972)

นำสายพันธุ์ที่ต้องการจะทดสอบมาปลูกบนอาหารชนิดแข็ง โดยการกรีดด้วยไม้จิ้มฟันบ่มที่ 28 องศาเซลเซียส ใช้ *S. marcescens* ATCC 27117 (เจริญในอาหารสูตรอุดม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง) ที่เจือจาง 10 เปอร์เซนต์ใน nutrient soff agar (0.6 เปอร์เซนต์) ที่เสริมด้วยเพนนิซิลิน จี 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 5 มิลลิลิตร มาเทราดให้ทั่ว บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะสังเกตเห็นบริเวณใสรอบโคโลนี วิธีการนี้อาจใช้ขนาดของบริเวณใสซึ่งเกิดจากกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส สามารถบ่งบอกการเจริญของ *S. marcescens* ATCC 27117 มาเปรียบเทียบเป็นปริมาณแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสได้ โดยกำหนดให้ค่า Inhibition zone indicies คืออัตราส่วนของเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสกับเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี

2.10 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส

ทำได้ 2 วิธี แตกต่างกันตามชนิดของสับสเตรท

2.10.1 ใช้กรด พีนิลอะซีทิล-4-อะมิโนเบนโซอิก เป็นสับสเตรท (Szewczuk และคณะ, 1980)

นำเซลล์ 0.1 มิลลิลิตร รวมกับกรด พีนิลอะซีทิล-4-อะมิโนเบนโซอิก (Phenylacetyl-4-aminobenzoic acid; PAAB) 1.25 มิลลิโมลาร์ 0.4 มิลลิลิตร บ่มที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมโซเดียมไนไตรท์ 10 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายอยู่ในกรด อะซีติก 0.25 โมลาร์ ลงไป 0.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที เติม 0.1 เปอร์เซนต์ กรด 1-อะมิโน-8-ไฮดรอกซีแนพธาลีน-3,6-ไดซัลโฟนิก (1-Amino-8-hydroxy-naphthalene-3,6-disulfonic acid) ซึ่งละลายอยู่ในโซเดียมคาร์บอเนต 0.66 โมลาร์ 1.5 มิลลิลิตร นำสารละลายสีชมพูที่ได้ไปวัดการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดแสง Spectronic 20 เปรียบเทียบปริมาณกับเส้นกราฟมาตรฐานของกรด พารา-อะมิโนเบนโซอิก (p-Aminobenzoic acid)

กำหนดให้เอนไซม์ 1 หน่วย (1 unit) คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้เร่งปฏิกิริยาการเกิดกรด พารา-อะมิโนเบนโซอิก 1 นาโนโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

2.10.2 ใช้เพนนิซิลิน จี เป็นสับสเตรท ดัดแปลงจากวิธีของ Balasingham (Balasingham และคณะ, 1972)

ใช้เซลล์ 1 มิลลิลิตร ในสารละลายเพนนิซิลิน จี 14 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ปิเปตสารละลายนี้ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารละลายผสมที่ประกอบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.05 โมลาร์ 1 มิลลิลิตร กับกรดอะซีติก 2 เปอร์เซนต์ 2 มิลลิลิตร และพารา-ไดเมธิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ (p-Dimethylaminobenzaldehyde) 0.5 เปอร์เซนต์ 0.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำสารละลายใสสีเขียวที่ได้ไปวัดการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดแสง Spectronic 20 เปรียบเทียบปริมาณกับเส้นกราฟมาตรฐานของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก

กำหนดให้ เอนไซม์ 1 หน่วย (1 unit) คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้เร่งปฏิกิริยาการเกิดกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

2.11 การตรวจสอบและวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เบต้า-แลคแตมเมส (Skyes และ Nordstrom, 1972)

อาศัยหลักการ ไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน จี ด้วยเอนไซม์เบต้า-แลคแตมเมส ได้กรดเพนนิซิโลอิก ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับสารละลายน้ำแป้ง-ไอโอดีน โดยดึงโมเลกุลของไอโอดีนออกจากน้ำแป้ง ทำให้สีน้ำเงินของสารละลายน้ำแป้ง-ไอโอดีน จางลงโดยวิธีการปฏิบัติดังนี้

2.11.1 การทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์เบต้า-แลคแตมเมสเบื้องต้น

ปลูกสายพันธุ์ที่ต้องการทดสอบโดยการเขี่ย 1 โคโลนี ลงในจานเพาะที่มีอาหารแข็งสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูโคส 0.4 เปอร์เซนต์ และแป้ง 1.0 เปอร์เซนต์ บ่มเชื้อที่ 28 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

เทสารละลายสีน้ำตาล ซึ่งประกอบด้วยเพนนิซิลิน จี 20 มิลลิกรัม ใน 3 มิลลิลิตร ของสารละลายไอโอดีน (ไอโอดีน 0.1 โมลาร์และโพแตสเซียมไอโอไดด์ 0.4 โมลาร์) ลงในจานเพาะทิ้งไว้ 10 วินาที หลังจากนั้นรินสารละลายส่วนที่เกินออก ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที สังเกตการฟอกจางสีน้ำเงินบริเวณรอบๆ โคโลนี

2.11.2 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เบต้า-แลคแตมเมส

2.11.2.1 วิธีเตรียมเอนไซม์สำหรับวัดแอคติวิตี

ล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยโพแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.0 แล้วกระจายเซลล์ในบัฟเฟอร์เดิม จากนั้นนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องทำลายเซลล์ French pressure cell press แล้วปั่นที่ 14,000 x g เป็นเวลา 30 นาที แยกเอาส่วนน้ำใสซึ่งเป็นสารละลายเอนไซม์ (crude enzyme) นำมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เบต้า-แลคแตมเมส

2.11.2.2 วิธีวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เบต้า-แลคแตมเมส

ก. Enzyme control

ผสมสารละลายน้ำแป้ง-ไอโอดีน 1 มิลลิลิตร กับ 1.9 มิลลิลิตรของสารละลายโพแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.0 และสารละลายเอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส วัดการจางลงของสีที่สัมพันธ์กับเวลา ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ด้วยเครื่องบันทึกการดูดกลืนแสง Shimadzu UV-240

ข. Substrate control

ผสมสารละลายน้ำแป้ง-ไอโอดีน 1 มิลลิลิตร กับเพนนิซิลิน จี 0.2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ 0.9 มิลลิลิตร ของโพแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.0 และสารละลายเอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ วัดการจางลงของสีน้ำเงินเช่นเดียวกับข้อ ก.

ค. Test

ผสมสารละลายแป้ง-ไอโอดีน 1 มิลลิลิตร กับเพนนิซิลิน จี 0.2 มิลลิโมลาร์ 1 มิลลิลิตร กับโพแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.0 0.9 มิลลิลิตร และสารละลายเอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ วัดการจางของสีน้ำเงิน เช่นเดียวกับข้อ ก.

คำนวณแอคติวิตีของเอนไซม์ เบต้า-แลคแตมเมส ตามวิธีรายละเอียดซึ่งแสดงในภาคผนวก

กำหนดให้ เอนไซม์ 1 หน่วย (1 unit) คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้เร่งปฏิกิริยาการเกิดกรดเพนนิซิโลอิก 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

2.12 การวัดปริมาณโปรตีน (Lowry และคณะ, 1951)

ปริมาณโปรตีนสุทธิของเซลล์วัดได้โดยการไฮโดรไลซ์เซลล์ในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ ปริมาตรเท่ากับปริมาตรของเซลล์ที่ใช้สารละลายที่ได้เรียกว่า ไฮโดรไลเซท (hydrolysate) ปิเปตไฮโดรไลเซท 0.1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายอัลคาร์ไลน์คอปเปอร์ (ข้อ 2.7.2.1) 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลายฟีนอลรีเอเจน (ข้อ2.7.2.2) 0.3 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องต่อไปอีก 30 นาที วัดการดูดกลืนแสงของสารละลายสีน้ำเงินที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดแสง Spectronic 20 เปรียบเทียบปริมาณกับกราฟมาตรฐาน ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (ข้อ 2.72.3)

2.13 การวัดปริมาณกลูโคส (Bergmeyer และ Bent, 1965)

นำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณกลูโคส 0.1 มิลลิลิตร มาผสมกับกรดเปอร์คลอริก (ข้อ 2.7.3.5) 1.0 มิลลิลิตร (เพื่อตกตะกอนโปรตีน) เขย่าแรงๆ แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นแบบตั้งโต๊ะ ที่ความเร็ว 5,000 x g 15 นาที นำส่วนน้ำใส 0.2 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลายกลูโคส รีเอเจนต์ (ข้อ 2.7.3.3) 5 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง บ่มที่ 25°ซ 30 นาที วัดความเข้มข้นของสีชมพูซึ่งเกิดขึ้นที่ 410 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดแสง Spectronic 20 เปรียบเทียบปริมาณกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส (ข้อ 2.7.3.4)

2.14 การแยกมิวแตนท์ที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งต้นคาร์บอน

2.14.1 การกลายพันธุ์ด้วยรังสีอุลตราไวโอเลต

นำแบคทีเรียที่ปลูกจนได้ระยะการแบ่งตัวแบบทวีคูณมาเจือจางด้วยสารละลายนอร์มอลซาลีนให้ได้เซลล์ประมาณ 1 x 10^8 เซลล์ ต่อ 0.1 มิลลิลิตร กระจาย 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารชนิดแข็ง สูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูโคส 0.2% จากนั้นนำไปฉายรังสีอุลตราไวโอเลตซึ่งมีขนาดกำลังส่องสว่าง 15 วัตต์ ในระยะห่าง 30 ซม. โดยใช้เวลาต่างๆ กันแล้วนำไปบ่มที่ 28°ซ ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีด้วยเครื่องนับจำนวนโคโลนี

นำโคโลนีที่ได้ไปกริดลงบนอาหารชนิดแข็งสูตรปรับต่ำ ที่เสริมด้วยกลูโคส 0.2% เพื่อเลือกหาสายพันธุ์ที่ต้องการ โดยการทดสอบด้วยวิธี Microbiological test ตามวิธีในข้อ 2.9

2.14.2 การกลายพันธุ์ด้วย NTG

นำแบคทีเรียที่เจริญจนถึงช่วงการเจริญทวีคูณ มาล้างเอาอาหารออกด้วยซิเตรทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 5.5 1 ครั้ง กระจายเซลล์ในบัฟเฟอร์เดิมด้วยปริมาตรเท่าเดิม

เติมสารกลายพันธุ์ NTG (N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine) ให้มีความเข้มข้นเป็น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37°ซ 30 นาที ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยสารละลายนอร์มอลซาลีน กระจายเซลล์ในอาหารชนิดเหลวสูตรอุดมจำนวนเท่าของปริมาตรเริ่มต้น เขย่าด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 28°ซ 18 ชั่วโมง เติมเพนนิซิลิน จี ให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าต่อที่ 28°ซ 3 ชั่วโมง ล้างเซลล์ ครั้งด้วยสารละลายนอร์มอลซาลีน กระจายเซลล์ในสารละลายนอร์มอลซาลีนด้วยปริมาตรเท่าเดิม

ปิเปตเซลล์ 0.1 มิลลิลิตร ที่ได้มาเกลี่ยบนอาหารชนิดแข็งสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูโคส 0.2% และเพนนิซิลิน จี 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 28°ซ 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องนับโคโลนี

เลือกโคโลนีที่สามารถผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส โดยนำไปเจริญในอาหารชนิดเหลวสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วย กลูโคส 0.2% วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลส ตามวิธีในข้อ 2.10.1