รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เงินทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2542

เรื่อง

การปรับปรุงสายพันธุ์ของ

Streptococcus zooepidemicus ATCC 35246

เพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

โดย

ผศ.ดร.สุเทพ ธนียวัน

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

579.355
ส781ก

TH
01-05-49

การปรับปรุงสายพันธุ์ *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 เพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

Streptococcus zooepidemicus ATCC 35246 เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นที่ได้จาก American Type Culture Collection สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้ 180.23 มิลลิกรัมต่อลิตรภายใต้ภาวะที่ทดสอบ เมื่อกลายพันธุ์สายพันธุ์นี้โดยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตนาน 80-120 วินาที จำนวน 3 รอบ สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ CU47 ซึ่งผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้ 370.13 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อกลายพันธุ์ต่อด้วย NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 5-40 นาที 37 องศาเซลเซียสจะได้สายพันธุ์กลายที่ผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้สูงจำนวนหนึ่ง หลังการคัดเลือกและกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG อีก 4 รอบ ได้สายพันธุ์ CUN 5-10 ซึ่งผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้ 585.85 มิลลิกรัมต่อลิตร

เมื่อทำการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคโดยสายพันธุ์ CUN5-10 พบว่า การเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของของอาหารเลี้ยงเชื้อ 7.5 ปริมาณซูโครสเริ่มต้นที่ 10 กรัมต่อลิตร อัตราเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที จุลินทรีย์ผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้ 829.11 มิลลิกรัมต่อลิตร

STRAIN IMPROVEMENT OF *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 FOR HYALURONIC ACID PRODUCTION.

Streptococcus zooepidemicus ATCC 35246, an organism acquired from American Type Culture Collection was capable of producing hyaluronic acid at 180.23 mg/ml. Upon exposing to UV-light for 80-120 seconds for 3 rounds, a mutant designated CU 47 capable of producing hyaluronic acid at 370.13 mg/l was obtained. Further mutation via NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) at 50 μg/ml, 5-40 minutes, 37 °C yielded a number of mutants producing hyaluronic acid in higher yield. Subsequent isolation and mutation via NTG for 4 additional rounds, a mutant namely CUN5-10 was obtained with ability of producing hyaluronic acid at 585.85 mg/l.

Optimal conditions for hyaluronic acid production by CUN5-10 were : cultivation at room temperature (28-32 °C) , initial pH of 7.5, initial concentration of sucrose at 10 g/l with agitation rate of 200 rpm. Under such conditions CUN 5-10 could produce hyaluronic acid at 829.11 mg/l.

บทที่ 1

บทนำ

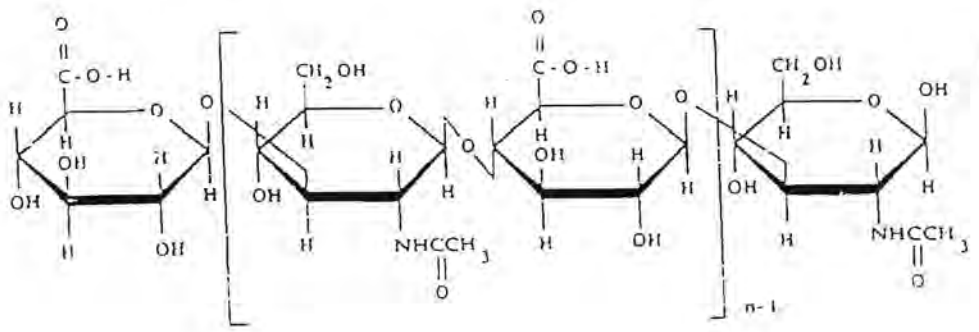
กรดไฮยาลูโรนิค (Hyaluronic acid) จัดอยู่ในกลุ่มพอลิเมอร์ที่เรียกว่า ไกลโคสะมิโนไกลแคน (glycosaminoglycan) ที่พบได้ในธรรมชาติ นอกจากกรดไฮยาลูโรนิคแล้ว ยังมีพอลิเมอร์อื่นในกลุ่มของไกลโคสะมิโนไกลแคนได้แก่ คอนดรอยติน-4-ซัลเฟต คอนดรอยติน-6-ซัลเฟต เดอมาแทน ซัลเฟต เคอราติน ซัลเฟต และ เฮพปาริน (ตารางที่ 1)

กรดไฮยาลูโรนิคถูกสกัดแยกเป็นครั้งแรกจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันโดย Meyer และ Palmer ในปี 1934 (Meyer and Palmer , 1934, cited in Pigman *et al.* ,1961 ; Thonard *et al.* , 1964) นอกจากจะพบได้ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันแล้วยังอาจพบจากแหล่งอื่นๆได้ เช่น ผิวหนัง (skin) เอ็น (tendons) กล้ามเนื้อ (muscles) กระดูกอ่อน (cartilage) สายสะดือ (umbilical cord) น้ำไขข้อ (synovial fluid) วุ้นตา (vistreous humor) และ หงอนไก่ตัวผู้ (rooster combs) นอกจากนี้ยังพบกรดไฮยาลูโรนิคในจุลินทรีย์กลุ่ม Streptococcus Lancefield A และ C อีกด้วย

กรดไฮยาลูโรนิคเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของสารที่อยู่ในระหว่างเซลล์ มีรูปร่างโมเลกุลเป็นพอลิเมอร์สายตรงยาว ในผิวหนังและกระดูกอ่อน กรดไฮยาลูโรนิคจะมีบทบาทในการโอบอุ้มน้ำ รักษาความยืดหยุ่นของเนื้อเยื่อ ในน้ำไขข้อ ด้วยสมบัติที่เหนียวและหนืดของกรดไฮยาลูโรนิค จึงทำหน้าที่เป็นสารหล่อลื่นและป้องกันเซลล์จากสิ่งแวดล้อม (Roden *et al.* , 1972 ; Robert and Pike , 1982 ; Balazs and Band , 1984 ; Nimrod *et al.* , 1988 ; Fujii *et al.* , 1996)

<u>คุณสมบัติของกรดไฮยาลูโรนิค</u>

กรดไฮยาลูโรนิคเป็นไกลโคสะมิโนไกลแคนชนิดหนึ่ง มีลักษณะเป็นสายพอลิเมอร์สายยาวตรง ที่ประกอบไปด้วยน้ำตาลสองชนิด คือ บีตา - (1,4) กลูคูโรนิคแอซิด (β-(1,4) glucuronic acid, Glc A) และ บีตา - (1,3) เอน-แอซิทิลกลูโคแซมีน (β-(1,3) N-acetyl glucosamine, Glc NAc) (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 โครงสร้างของกรดไฮยาลูโรนิค (O'Regan *et al.* , 1994)

มีสูตรโมเลกุลคือ $(C_{14}H_{20}NNaO_{11})_n$ โดย n >1000 ความยาวของสายพอลิแซคคาไรด์ขึ้นอยู่กับแหล่งที่แยกได้ , วิธีการสกัดแยก และวิธีการตรวจวัด (Laurent , 1966 ; Brown *et al.* , 1994 ; Ellwood *et al.* , 1996) น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิคสามารถพบได้ ตั้งแต่ $10^6 - 10^7$ ดาลตัน (Laurent , 1966 ; Smith *et al.* , 1983 ; Kresse , 1997) และจากการที่ส่วนของกลูคูโรนิคที่มีประจุลบ (anionic) จึงทำให้กรดไฮยาลูโรนิคจับตัวกับอิออนที่ประจุบวก เช่น K^+ Na^+ และ Ca^{2+} ได้

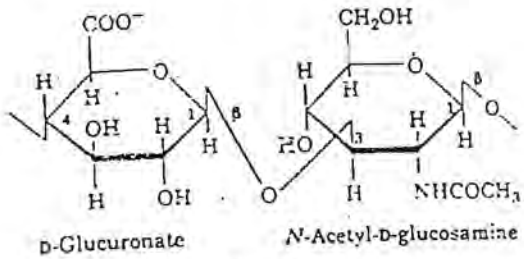
โครงสร้างหรือรูปร่างโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิคมีลักษณะเป็นเกลียวแบบสุ่ม (random coil structure) ที่เกี่ยาพันกันเป็นร่างแห ซึ่งมีลักษณะคล้ายเจล มีความเหนียว หนืด และยืดหยุ่น หน้าที่สำคัญประการหนึ่งของกรดไฮยาลูโรนิคคือช่วยกักเก็บน้ำ โดยพบว่า กรดไฮยาลูโรนิคสามารถเก็บน้ำได้มากกว่าพอลิเมอร์ตามธรรมชาติและพอลิเมอร์ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น ตัวอย่างเช่น สารละลายกรดไฮยาลูโรนิค 2 % จะเก็บน้ำได้ถึง 98 % (Balazs and Band , 1984) หรือ น้ำปริมาตร 1 ลิตร จะถูกตรึงอยู่ในโครงสร้างเกลียวของกรดไฮยาลูโรนิคน้ำหนัก 1 กรัม (Laurent , 1970)

กรดไฮยาลูโรนิคถูกย่อยได้โดยเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (hyaluronidase) ที่พันธะ บีตา-(1,4) ไกลโคซิดิค ไฮยาลูโรนิเดส นี้สามารถแยกได้จากเนื้อเยื่อของสัตว์ สารพิษจากแมลง และแบคทีเรีย เช่น *S. pyogenes* , *S. equisimilis* , *S. agalactiae* , *S. equi* , *Staphylococcus aureus* , *Treponema pallidum* และ *Propionibacterium acnes* เป็นต้น (Sting *et al.* , 1989 ; Voet and Voet , 1995)

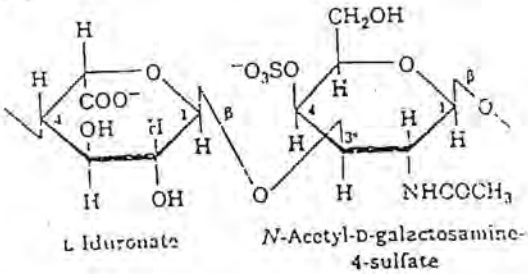
ตารางที่ 1 ชนิดและสมบัติบางประการของไกลโคอะมิโนไกลแคนชนิดต่างๆ (Smith *et al.*, 1983 ; Voet and Voet , 1995)

ไกลโคอะมิโนไกลแคน	น้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน)	หน่วยย่อยของน้ำตาล	แหล่งที่พบในเนื้อเยื่อสัตว์
กรดไฮยาลูโรนิค (hyaluroncic acid)	4 ถึง 80 × 10^6	ดี-กลูคูโรนิค แอซิด เอน-แอซิทิล-ดี-กลูโคแซมีน	เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน , ผิวหนัง , น้ำไขข้อ , วุ้นตา ,สายสะดือ , กระดูกอ่อน
คอนดรอยติน-4-ซัลเฟต (chondroitin-4-sulfate)	5,000 ถึง 50,000	ดี-กลูคูโรนิค แอซิด เอน-แอซิทิล-ดี-กาแลคโตแซมีน-4-ซัลเฟต	กระดูกอ่อน , กระดูก , เยื่อบุนัยน์ตา , ผิวหนัง , ผนังหลอดเลือดแดง
คอนดรอยติน-6-ซัลเฟต (chondroitin–6-sulfate)	5,000 ถึง 50,000	ดี-กลูคูโรนิค แอซิด เอน-แอซิทิล-ดี-กาแลคโตแซมีน-6-ซัลเฟต	กระดูกอ่อน , กระดูก , เยื่อบุนัยน์ตา , ผิวหนัง , ผนังหลอดเลือดแดง
เดอมาแทนซัลเฟต (dermatan sulfate)	15,000 ถึง 40,000	แอล-ไอดูโรนิค แอซิด เอน-แอซิทิล-ดี-กาแลคโตแซมีน-4-ซัลเฟต	ผิวหนัง , หลอดเลือดหัวใจ , เอ็น , ผนังหลอดเลือดแดง
เคอราตินซัลเฟต (keratin sulfate)	4,000 ถึง 19,000	ดี-กาแลคโตส เอน-แอซิทิล-ดี-กาแลคโตแซมีน-6-ซัลเฟต	เยื่อบุนัยน์ตา , กระดูกอ่อน , หมอนรองกระดูกสันหลัง
เฮพาริน (heparin)	10^3 ถึง 10^6	ดี-ไอดูโรเนท-2-ซัลเฟต เอน-ซัลโฟ-ดี-กลูโคแซมีน-6-ซัลเฟต	ปอด , ตับ , ผิวหนัง, เยื่อบุผนังลำไส้, ผนังหลอดเลือด

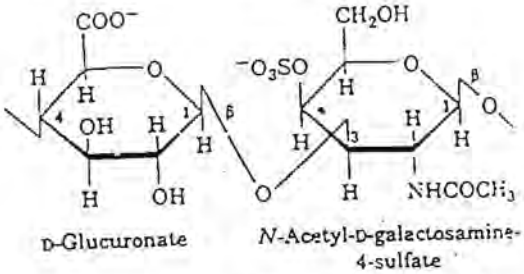
รูปที่ 2 โครงสร้างของไกลโคสะมิโนไกลแคนชนิดต่าง ๆ



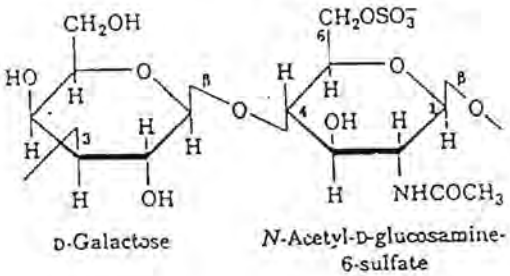
ไฮยาลูโรเนต



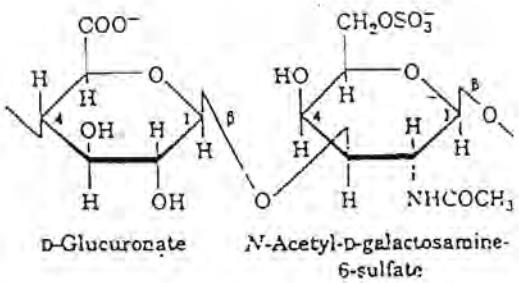
เดอมาแทนซัลเฟต



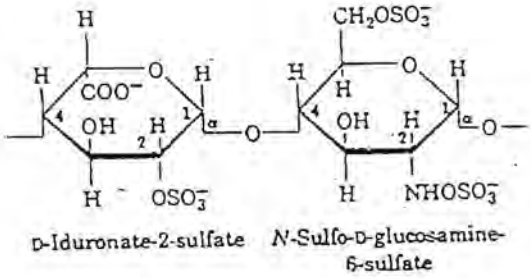
คอนดรอยติน-4-ซัลเฟต



เคอราแทนซัลเฟต



คอนดรอยติน-6-ซัลเฟต



เฮพาริน

<u>ประโยชน์ของกรดไฮยาลูโรนิค</u>

มีการนำกรดไฮยาลูโรนิคมาใช้ประโยชน์ทั้งในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและด้านการแพทย์ โดยในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ได้นำกรดไฮยาลูโรนิคมาเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางบำรุงผิวเพื่อช่วยรักษาความชุ่มชื้น (Balazs and Band , 1984) ส่วนในทางการแพทย์ มีการนำกรดไฮยาลูโรนิคมาใช้รักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคเกี่ยวกับตา (Balazs , 1981 ; Pape , 1982) ซึ่งมีการใช้กรดไฮยาลูโรนิคที่ผลิตในเชิงการค้าภายใต้ชื่อ HEALON® โดยบริษัท Pharmacia Inc. มาใช้เป็นน้ำตาสำหรับผู้ป่วยโรคเยื่อบุตาอักเสบ (Balazs , 1979 ; Bracke *et al.* , 1985 ; Romeo and Lorenzi , 1996) นอกจากนี้ ยังใช้ร่วมในการรักษาโรคที่เกี่ยวกับไขข้ออักเสบด้วย (Balazs , 1981)

พ...การ ...ธรรม ...ศาสตร์ ...
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

กรดไฮยาลูโรนิคเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในเนื้อเยื่อสัตว์มีกระดูกสันหลัง จึงมีการเตรียมโดยการสกัดแยกจากเนื้อเยื่อดังกล่าว เช่น สายสะดือของคน (human umbilical cords) (Weissmann and Meyer , 1953 ; Cifonelli and Mayeda , 1957) หงอนไก่ (rooster combs) (Balazs , 1979 ; Longas and Meyer , 1981) วุ้นตา (vitreous bodies) (Laurent , 1955 ; Laurent *et al.* , 1960 ; Schmut and Hofmann , 1981) น้ำไขข้อของวัว (bovine synovial fluid) (Matsumura *et al.* , 1963) และกระดูกอ่อนของวัว (bovine articular cartilages) (Keng *et al.* , 1989) เป็นต้น ซึ่งวิธีการสกัดแยกดังกล่าวมีข้อเสียจากการปนเปื้อนของไกลโคสะมิโนไกลแคนอื่นๆ ในเซลล์เช่น คอนดรอยตินซัลเฟต เป็นต้น ทำให้ขั้นตอนการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์มีความยุ่งยากและซับซ้อน ต้นทุนในการผลิตสูง และปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคที่ได้มีปริมาณต่ำ (Hamerman and Sandson , 1960 ; Billek and Schenefeld , 1968 ; Bracke *et al.* , 1985 ; Morita and Fujii , 1991 ; Brown *et al.* , 1994 ; Ellwood *et al.* , 1996)

นอกจากจะพบกรดไฮยาลูโรนิคในเนื้อเยื่อของสัตว์แล้ว ยังพบกรดไฮยาลูโรนิคในแบคทีเรียสกุล *Streptococcus* sp.ที่สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้ เช่น *S. pyogenes* , *S. equi* , *S. equisimilis* , *S. dysgalactiae* และ *S. zooepidemicus* (Nimrod *et al.* , 1988 ; Akasaka *et al.* , 1989 ; Miyamori *et al.* , 1989) และยังพบว่า *Pasteurella multocida* สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคที่มีสมบัติเหมือนกับกรดไฮยาลูโรนิคที่ผลิตจากเชื้อ Streptococcus ด้วย (Cifonelli , 1970) สำหรับการผลิตจากการหมักจากจุลินทรีย์นี้ จุลินทรียที่ใช้คือ จุลินทรีย์ในสกุล Streptococcus Kendall และคณะ (1937) สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคเป็นครั้งแรกจากการหมักในอาหารเหลวโดยเชื้อ group A hemolytic Streptococci หลังการตกตะกอนน้ำหมักด้วยอะซิเตท และ เอธานอล ได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิค 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

Seastone (1939) สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคจากการหมักในอาหารเหลวด้วยเชื้อ group C hemolytic Streptococci Cifoneili และ Dorfman (1957) รายงานถึงการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคโดยการหมัก group A Streptococcus โดยหลังการตกตะกอนน้ำหมักด้วยเอธานอลและกรองผ่านแผ่นเซลลูโลส Darco G-60 ได้กรดในปริมาณ 300-400 มิลลิกรัมต่อลิตร

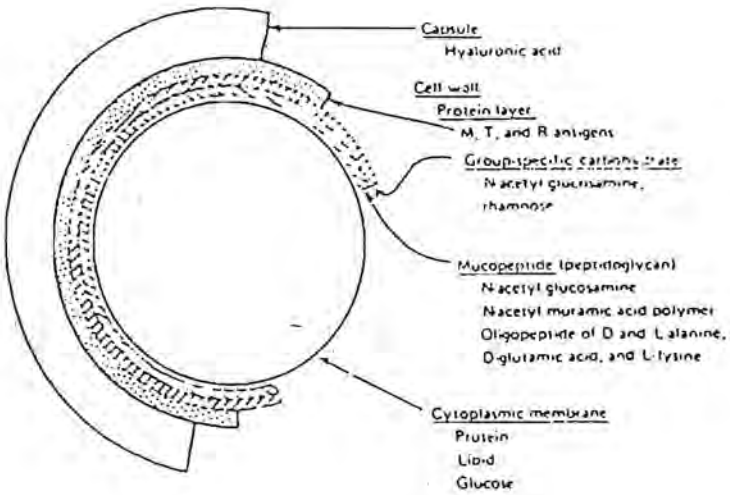
Thonard และคณะ (1964) ผลิตกรดไฮยาลูโรนิคจากเชื้อ Streptococcus สายพันธุ์ 32369 และ Coburn R 18 หลังตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ได้ปริมาณกรด 500-1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

Holmstrom และ Ricica (1967) ผลิตและคัดแยกกรดไฮยาลูโรนิคจากอาหารหมักได้ในปริมาณ 300 –400 มิลลิกรัมต่อลิตร

<u>จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักเพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิค</u>

Streptococcus sp. เป็นจุลินทรีย์ แกรมบวก รูปกลมหรือรี เส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 2 ไมโครเมตร จัดอยู่ใน Family Streptococcaceae พบเชื้อนี้ได้ในปาก ลำคอ ลำไส้ อวัยวะสืบพันธุ์ของคน นอกจากนี้ยังพบในน้ำ ฝุ่น นม และพืชผักต่างๆ เชื้อจะแบ่งตัวในแนวเดียวจึงมีลักษณะการเรียงตัวเป็นคู่ๆหรือต่อกันเป็นสาย ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ และไม่สร้างรงควัตถุ

Streptococcus สร้างแคปซูลซึ่งประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์หรือกรดไฮยาลูโรนิคโดยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อ ผนังเซลล์มีส่วนประกอบส่วนใหญ่เป็นโปรตีนซึ่งมีสมบัติเป็นแอนติเจนมีชื่อเรียกต่าง ๆ กัน เช่น แอนติเจน M , T , R รองลงมาเป็นสารคาร์โบไฮเดรตซึ่งมีสมบัติเฉพาะกลุ่ม (group specific) (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 แผนผังแสดงแคปซูล ผนังเซลล์ เมมแบรน ของ group A hemolytic Streptococci (Krause , 1963 ; McCarty , 1980)

Streptococcus เจริญได้ไม่ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา แต่เจริญได้ดีหากเติมเลือดหรือซีรั่มผสมอยู่ด้วย เชื้อพวกที่ก่อโรคเจริญได้ดีที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์สูงกว่าปกติ ในขณะที่บางชนิดเจริญได้ในสภาวะไร้ออกซิเจน โคโลนีขนาดเล็ก ประมาณ 1-2 มิลลิเมตร กลม

ใสไม่มีสี โดยอาศัยลักษณะโคโลนีและการทำลายเม็ดเลือดแดงบน Blood agar plate สามารถจำแนกออกเป็นกลุ่มๆคือ

1. α hemolytic Streptococci ทำลายเม็ดเลือดแดงได้บางส่วน ลักษณะรอบๆโคโลนีของเชื้อจะมีสีน้ำตาลหรือเขียวอ่อน
2. β hemolytic Streptococci ทำลายเม็ดเลือดแดงได้อย่างสมบูรณ์ ลักษณะรอบโคโลนีมีขอบใส
3. γ hemolytic Streptococci ไม่ทำลายเม็ดเลือดแดง จึงไม่มีการเปลี่ยนแปลงรอบโคโลนี

Streptococcus sp. Group A และ C จะสร้างแคปซูลชนิดกรดไฮยาลูโรนิค ซึ่งแคปซูลนี้ไม่กระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกัน (nonimmunogenic) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสมบัติทางเคมีของกรดไฮยาลูโรนิคในแคปซูลนั้นไม่มีความแตกต่างจากกรดไฮยาลูโรนิคที่พบในเนื้อเยื่อของสัตว์ก็ได้ (McCarty , 1980)

แคปซูลชนิดกรดไฮยาลูโรนิคจึงทำหน้าที่ป้องกันและเลี่ยงการจับกินโดยเซลล์เม็ดเลือดขาว (phagocytosis) ดังนั้น แคปซูลชนิดกรดไฮยาลูโรนิค จึงเป็นปัจจัยหนึ่งในการก่อโรค (virulence factor) ของ Streptococci group A ดังรายงานของ Wessel และ คณะ (1991) และ Wessel และ คณะ (1994) ที่พบว่า หากมีการสูญเสียความสามารถในการสร้างแคปซูลของ Streptococci group A แล้วความรุนแรงในการก่อโรคจะลดลง

อย่างไรก็ตาม Streptococci group A และ C ก็ยังคงมีความสามารถในการก่อโรคได้ เพราะนอกเหนือจากแคปซูลที่ช่วยป้องกันเซลล์แล้ว M protein ที่อยู่ที่ผนังเซลล์ มีหน้าที่ช่วยป้องกันการจับกินของเซลล์เม็ดเลือดขาวด้วยเช่นกันและช่วยให้สามารถยึดเกาะกับเยื่อบุของเซลล์เจ้าบ้านได้ดี นอกจากนี้ ยังพบว่าเชื้อนี้สามารถผลิต สเตรปโตไลซิน (streptolysin) ซึ่งสามารถสลายเม็ดเลือดแดงให้แตกและเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่ย่อยสลายกรดไฮยาลูโรนิคด้วย ดังนั้นในการนำเชื้อมาใช้เพื่อการผลิต จึงจำเป็นต้องคำนึงถึงสายพันธุ์เชื้อที่นอกจากจะสามารถให้ปริมาณกรดสูงแล้ว ยังควรที่จะไม่สร้างสารพิษ เช่น สเตรปโตไลซิน ซึ่งจะทำลายเม็ดเลือดแดง หรือ hyaluronidase ซึ่งจะย่อยสลายกรดไฮยาลูโรนิคที่ผลิตได้

นอกเหนือจากการปรับปรุงสูตรอาหารและภาวะการผลิตเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตในอุตสาหกรรมแล้ว สิ่งที่จำเป็นและมีความสำคัญต่อการเพิ่มผลผลิตอีกประการหนึ่ง คือสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ โดยวิธีการกลายพันธุ์เป็นวิธีการหนึ่งในการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ ง่ายและสะดวก และสามารถเพิ่มปริมาณผลผลิตได้สูงขึ้น ดังรายงานต่างๆ ดังนี้

Kim และ คณะ (1996) ได้ทำการคัดเลือก *S. equi* สายพันธุ์กลายและหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคโดยนำ *S. equi* ATCC 6580 มาทำการกลายพันธุ์ด้วยสาร NTG ความเข้มข้น 100 mg/ml เป็นเวลา 40 นาที พบว่าสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ *S. equi* KFSS 10830 ที่มีสมบัติไม่ทำลายเม็ดเลือดแดง ไม่สร้างเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส สามารถทนต่อยาปฏิชีวนะ kanamycin และสามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้สูงขึ้น

Park และ คณะ (1996) ได้ทำการกลายพันธุ์ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ด้วย NTG 3 รอบ ได้สายพันธุ์กลาย *S. zooepidemicus* LBF 707 ซึ่งมีสมบัติไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ไม่ผลิตไฮยาลูโรนิเดส และสามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้สูงกว่าสายพันธ์ตั้งต้น 20 % โดยที่ระยะเวลาการผลิตที่ 11 ชั่วโมง เชื้อสายพันธุ์กลายผลิตกรดปริมาณ 3.5 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ ณ เวลาการผลิต 11 ชั่วโมงเช่นกัน เชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้ 2 กรัมต่อลิตร

จุรารัก ศรีวงษ์ (2540) ได้เลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรของ Nimrod (1986) ได้กรดไฮยาลูโรนิค 252 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากปรับปรุงสูตรอาหารของ Nimrod (1986) โดยเสริมด้วยซูโครส 5 กรัมต่อลิตรและ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.65 กรัมต่อลิตร และศึกษาภาวะการผลิตที่เหมาะสม พบว่า เชื้อให้ผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิค 543 มิลลิกรัมต่อลิตร

ในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะทำการปรับปรุงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตและสารเคมี NTG คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคเพิ่มมากขึ้น โดยมีความเสถียรทางพันธุกรรม เพื่อพัฒนาไปใช้ในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคในระดับขยายส่วนต่อไป

บทที่ 2

วิธีดำเนินการทดลอง

1. จุลินทรีย์ การเก็บ และการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

1.1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

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

1.2. อาหารสำหรับการเลี้ยงเชื้อตั้งต้น

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

1.3. การเก็บรักษาแบคทีเรีย

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

1.4. การเลี้ยงแบคทีเรียในขวดแก้วรูปกรวย

1.4.1 การเตรียมเชื้อตั้งต้น

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

1.4.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคในระดับขวดเขย่า

ปลูกเชื้อตั้งต้นจากข้อ 1.4.1 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตสูตรปรับปรุงจาก Nimrod (1986) (ภาคผนวก ก) ปริมาณ 20 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) ค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 ตามรายงานของ จุรารัก ศรีวงษ์ (2540) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 28-

32 องศาเซลเซียส) พร้อมการให้อากาศโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และเก็บตัวอย่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ

2. วิธีการวิเคราะห์

2.1 การวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ (Growth)

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

2.2 การหาค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ

โดยวัดความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น 2000 บริษัท Cyberbean

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (Reducing Sugar) โดยวิธีของ Bernfeld (1955)

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

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

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

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

สร้างกราฟมาตรฐาน ทำโดยใช้สารละลายซูโครสมาตรฐานเข้มข้น 0 - 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเจือจางจากสารละลายสต็อคที่มีความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์ดังข้างต้น แล้วเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของซูโครสกับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้

2.5 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคโดยวิธีคาร์บาโซลโดยวิธีของ Bitter และ Muir (1962)

2.5.1 การตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิค

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

2.5.2 การละลายกรดไฮยาลูโรนิค

นำส่วนตะกอนที่ได้จากข้อ 2.5.1 มาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม

2.5.3 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคโดยวิธีคาร์บาโซล

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

2.5.4 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคโดยเอนไซม์ โดยวิธีของ Greiling (1963)

นำสารละลายที่ได้หลังจากการปั่นแยกเซลล์ตามข้อ 2.1 มาใช้เป็นสารละลายตัวอย่าง โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.5.4.1 เตรียมของผสมจำนวน 4 หลอดต่อสารตัวอย่าง 1 ชนิด ให้มีส่วนประกอบดังนี้

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

2.5.4.2 นำของผสมทั้ง 4 หลอด ทำให้ร้อนที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น

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

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

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

2.5.4.6 ปั่นแยกตะกอนที่ 5,000 g 20 นาที

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

2.5.4.8 นำมาต้มน้ำเดือด 3 นาที ทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำแข็ง (ice bath)

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

2.5.4.10 นำมาบ่มที่อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) 37 องศาเซลเซียส 20 นาที

2.5.4.11 นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 585 นาโนเมตร (OD_{585})

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

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

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

E1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของของผสมหลอดที่ 1

E2 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของของผสมหลอดที่ 2

E3 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของของผสมหลอดที่ 3

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

3. <u>การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์</u>

3.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (UV)

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

3.1.2 ปิเปตต์เซลล์แขวนลอย 10 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีแท่งกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) กวนตลอด

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

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

3.1.5 นับจำนวนโคโลนีที่เจริญ (โคโลนีที่รอด) คำนวนร้อยละการรอด

3.1.6 นำโคโลนีที่เจริญไปทำการคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ตามวิธีในข้อ 4

3.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG

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

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

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

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

3.2.5 นับจำนวนโคโลนีที่เจริญ (โคโลนีที่รอด) คำนวนร้อยละการรอด

3.2.5 นำโคโลนีที่เจริญไปทำการคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ตามวิธีในข้อ 4

4. <u>การคัดเลือกเชื้อที่ได้จากการกลายพันธุ์</u>

4.1 การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ (primary screening)

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

4.2 การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ (seconary screening)

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

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

4.2.3 นำน้ำหมักที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคโดยวิธีคาร์บาโซล ตามข้อ 2.5.3 , การเจริญของเซลล์ และค่าความเป็นกรดด่าง

4.2.4 คัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ที่ให้ปริมาณการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น

5. <u>การทดสอบความเสถียรในการสร้างกรดไฮยาลูโรนิคของเชื้อสายพันธุ์กลาย</u>

นำเชื้อสายพันธุ์กลายที่ได้จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคตามข้อ 1.4.1 และ 1.4.2 วิเคราะห์การปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคด้วยวิธีคาร์บาโซลและวิธีเอนไซม์ตามข้อ 2.5.3 และ 2.5.4 โดยใช้สายพันธุ์กลายที่ผ่านการถ่ายเชื้อมาแล้ว 5 ครั้ง คัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ยังสามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคอย่างสม่ำเสมอ และมีปริมาณมากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น

6. <u>การศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนหลักบางชนิดในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของ *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์กลาย</u>

เลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* สายพันธุ์กลาย ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เหมาะสมที่มีการแปรผันแหล่งของน้ำตาลเป็นกลูโคส ซูโครส ฟรุกโตส มอลโตส และแป้งที่ย่อยสลาย ที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) ความเร็วรอบของการเขย่าเป็น 200 รอบต่อนาที อายุหัวเชื้อ 7 ชั่วโมง ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 20 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) แล้วติดตามวิเคราะห์การเจริญ ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ และปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคที่เวลาการเลี้ยงเชื้อต่าง ๆ โดยวิธีเอนไซม์ ตามข้อ 2.5.4

7. ศึกษาปริมาณซูโครสที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ เพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

เมื่อได้ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 6 แล้ว ทำการผันแปรปริมาณซูโครสเริ่มต้นในอาหารสำหรับการผลิตกรดเป็น 1 - 100 กรัมต่อลิตร

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

8. การศึกษาปัจจัยทางกายภาพบางประการต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย

8.1 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

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

8.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

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

8.3 ความเร็วรอบที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

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

บทที่ 3

ผลการทดลอง

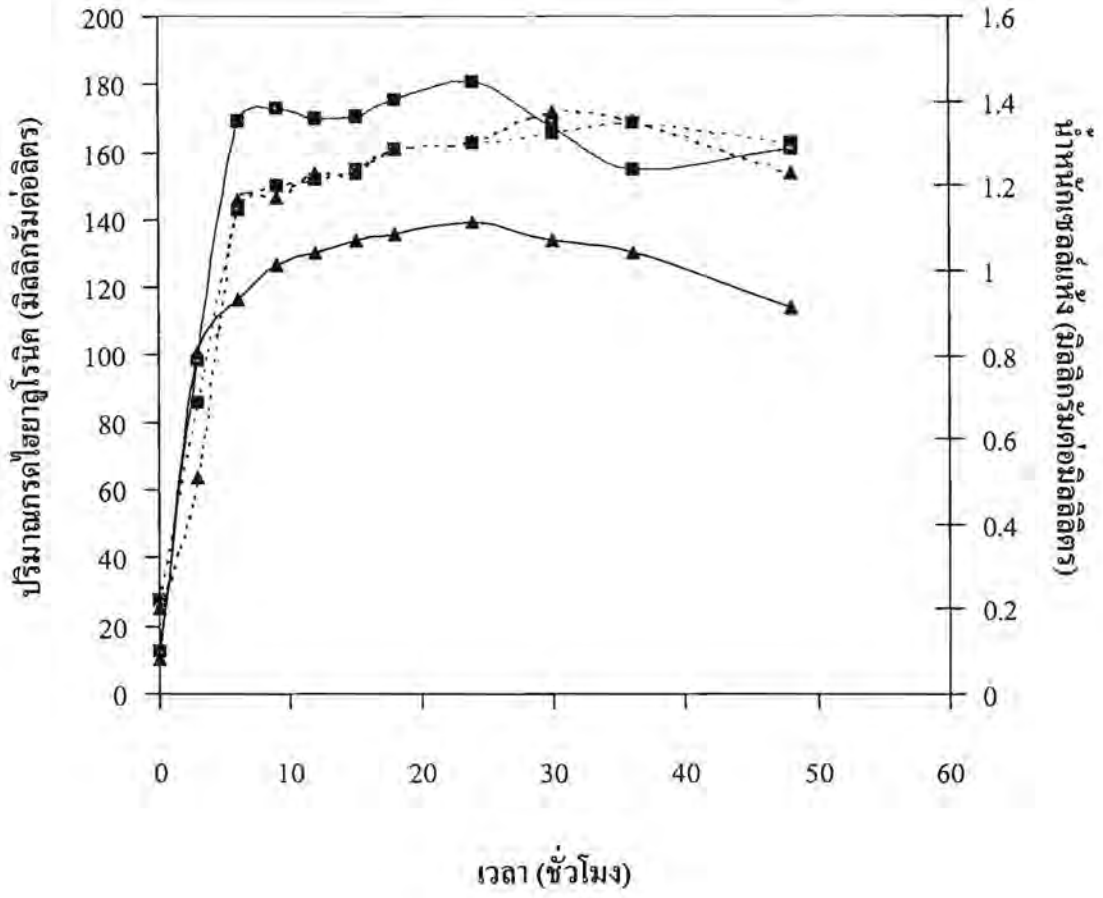
3.1 เปรียบเทียบการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคโดย *S.zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตในระดับขวดเขย่าและในระดับหลอดเขย่า

เนื่องจากการคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายหลังการกลายพันธุ์จะมีจำนวนเชื้อที่ต้องทดสอบจำนวนมาก ดังนั้นจึงเปรียบเทียบการคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายในระดับหลอดทดลองพร้อมการเขย่าและในระดับขวดเขย่า โดยเลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อการผลิต สูตรปรับปรุงจาก Nimrod (1986) (ภาคผนวก ก ข้อ 2) ปริมาตร 5 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง เชื้อตั้งต้นที่เจริญในอาหาร TSB (ภาคผนวก ก ข้อ 1.2) อายุ 7 ชั่วโมง ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ที่รายงานโดย จุรารัก ศรีวงษ์ (2540) ความเป็นกรด-ด่าง 6.8 ที่อุณหภูมิห้อง บ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เทียบกับการใช้ขวดเขย่าซึ่งใช้เชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ปริมาณหัวเชื้อ 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ)ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตร วิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคด้วยวิธีเอนไซม์ตามวิธี 2.5.4 พบว่า การเจริญของ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ทั้งในระดับขวดเขย่า และหลอดที่มีการเขย่า มีการเจริญใกล้เคียงกัน โดยที่การผลิตกรดไฮยาลูโรนิคจะเพิ่มขึ้นไปพร้อมกับการเจริญโดยการเจริญในระดับขวดเขย่าจะให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคสูงกว่าในระดับหลอดเขย่า แต่ระดับหลอดเขย่าให้แนวโน้มการผลิตไปในทางเดียวกันกับในระดับขวดเขย่า โดยให้การผลิตกรดไฮยาลูโรนิคสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 เช่นกัน (ตารางที่ 4 , รูปที่ 20)

ดังนั้น จึงเลือกใช้การคัดเลือกในระดับหลอดเขย่าในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายเพื่อเป็นการลดต้นทุนในการศึกษาทดลอง

ตารางที่ 2 การเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคโดย *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อการผลิตในระดับขวดเขย่าและในระดับหลอดทดลองพร้อมเขย่า อัตราเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง วิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคด้วยวิธีเอนไซม์

เวลา (ชั่วโมง)	การผลิตระดับขวดเขย่า		การผลิตระดับหลอดทดลองพร้อมการเขย่า	
	น้ำหนักเซลล์แห้ง (มก./มล)	ปริมาณ HA (มก./ล.)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (มก./มล.)	ปริมาณ HA (มก./ล.)
0	0.219	12.67	0.203	10.22
3	0.685	98.63	0.510	101.05
6	1.142	169.47	1.167	116.465
9	1.203	172.91	1.174	126.51
12	1.215	170.13	1.232	130.258
15	1.239	170.47	1.230	133.84
18	1.288	175.22	1.288	135.99
24	1.300	180.83	1.305	139.205
30	1.324	167.60	1.373	133.86
36	1.349	154.96	1.354	130.38
48	1.300	161.26	1.232	113.92



รูปที่ 4 การเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคโดย *S.zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อการผลิตในระดับขวดเขย่าและระดับหลอดทดลองพร้อมเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง ,ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.8 ,อัตราเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที วิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคด้วยวิธีเอนไซม์

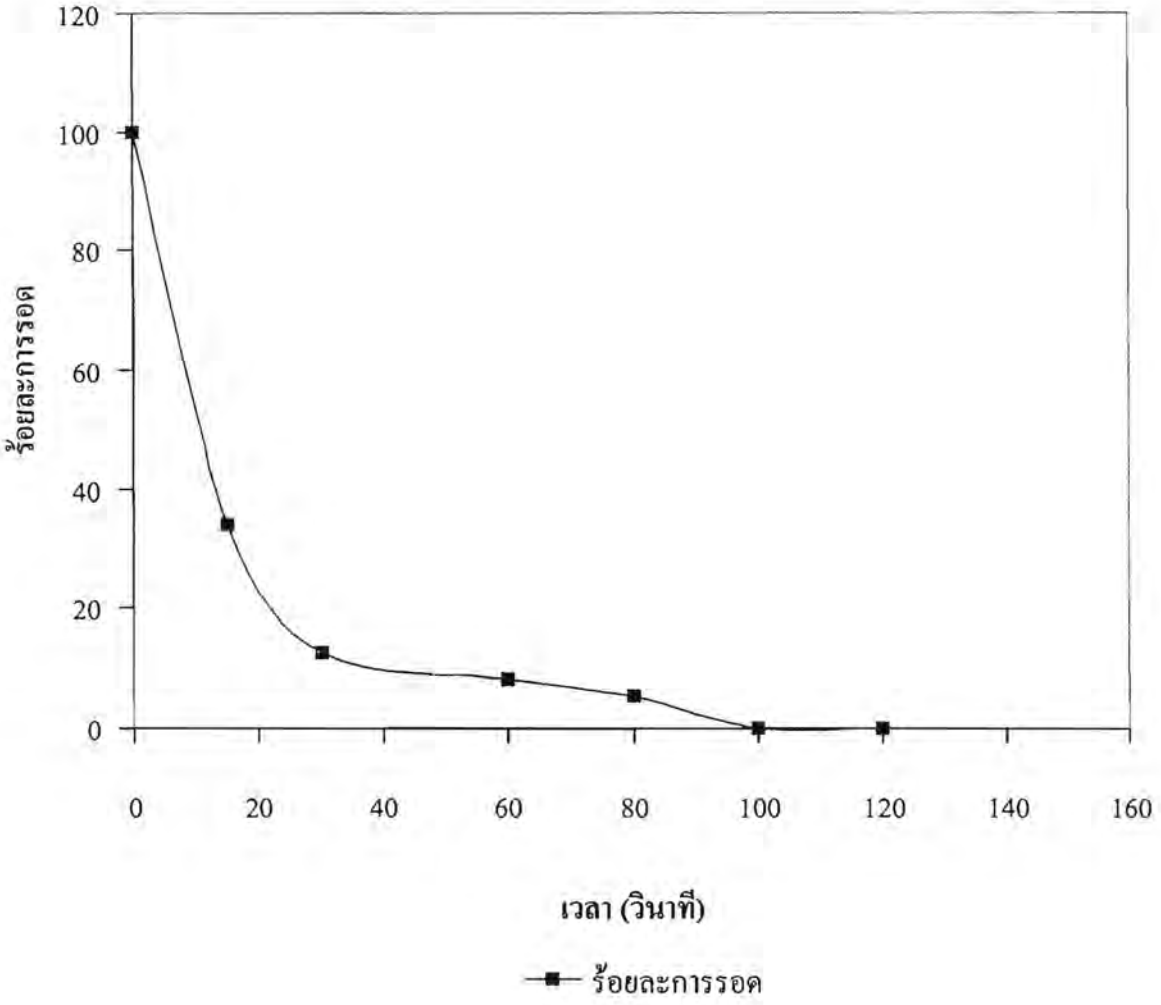
3.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต รอบที่ 1

ทำการชักนำการกลายพันธุ์ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยใช้หัวเชื้อตั้งต้นอายุ 7 ชั่วโมง ซึ่งอยู่ในช่วงกึ่งกลางการเจริญทวีคูณ (mid log phase) และดำเนินการกลายพันธุ์ตามวิธีในบทที่ 2 ข้อ 3 จากนั้นนำเชื้อที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต มาบ่มเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญ (โคโลนีที่รอด) และคำนวณร้อยละการรอด ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3 และรูปที่ 5 ทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีขนาดใหญ่ ที่มีลักษณะเมือกมาก ในช่วงที่มีร้อยละการรอด 0.1-5.0 ซึ่งเป็นช่วงที่เกิดการกลายพันธุ์ที่เหมาะสม (Miller , 1972 ; Fantini , 1975 ; Carlton and Brown , 1981) ซึ่งตรงกับผลที่ได้จาก การฉายแสงอัลตราไวโอเลตนาน 80-120 วินาที โดยให้ร้อยละการรอด 5.38-0.07

ตารางที่ 3 จำนวนโคโลนีที่เจริญ(โคโลนีที่รอด) และร้อยละการรอดของ *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 ภายหลังจากการฉายแสงอัลตราไวโอเลต ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ที่เวลาต่างๆ

เวลา (วินาที)	จำนวนโคโลนีเฉลี่ยจากจานเพาะเลี้ยงเชื้อ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละการรอด
0	1.60×10^{8}	100
15	5.45×10^{7}	34.06
30	2.02×10^{7}	12.63
60	1.29×10^{6}	8.06
80	8.60×10^{6}	5.38
100	2.70×10^{5}	0.17
120	1.10×10^{5}	0.07

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5 ร้อยละการรอดของ *S.zooepidemicus* ATCC 35246 ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ที่เวลาต่างๆ

3.2.1 การคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ของ *S.zooepidemicus* ATCC 35246 ที่สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้สูง

การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคเพิ่มขึ้นในขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิ

เมื่อนำเชื้อที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตในช่วงเวลา 80-120 วินาที มาทำการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิโดยการดูลักษณะโคโลนีที่มีขนาดใหญ่ และมีเมือกมาก หลังจากบ่มเป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง ได้เชื้อที่ผ่านการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิทั้งหมด 244 โคโลนี สุ่มเลือกโคโลนี จำนวน 60 โคโลนี มาคัดเลือกในขั้นทุติยภูมิต่อไป โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (ภาคผนวก ก ข้อ 2) ได้เชื้อสายพันธุ์กลาย 3 สายพันธุ์ที่มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในอาหารเหลวเพื่อการผลิตของสายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* ATCC 35246 กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 1 รอบ

สายพันธุ์	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิค (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการเพิ่มขึ้นของกรดไฮยาลูโรนิค
AU21	275.32	52.76
AU72	248.50	37.88
AU7	242.16	34.36
ATCC35246	180.23	

3.2.2 การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์กลาย

เมื่อนำสายพันธุ์กลายทั้ง 3 ที่ผ่านการทดสอบขั้นทุติยภูมิ ตามการทดลองในข้อ 4.2 มาเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อการผลิตอีกครั้ง หลังจากมีการถ่ายเชื้อไป 5 ครั้ง โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดสอบขั้นทุติยภูมิ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคที่ผลิตได้แสดงไว้ในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์ กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 1 รอบ

สายพันธุ์	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคก่อนการถ่ายเชื้อ* (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคหลังจากการถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง (มิลลิลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละของกรดไฮยาลูโรนิคที่ลดลงเมื่อเทียบกับก่อนการถ่ายเชื้อ
AU21	275.32	203.13	26.22
AU72	248.50	202.31	18.59
AU7	242.16	184.84	23.67
ATCC 35246	180.23		

* หมายถึง ค่าที่ได้จากปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในขั้นต้น

พบว่า *S. zooepidemicus* สายพันธุ์กลายที่ได้ทั้ง 3 สายพันธุ์ มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ลดลงจากก่อนการถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง โดยสายพันธุ์ AU 21 หลังจากถ่ายเชื้อจำนวน 5 ครั้งแล้ว ผลิตกรดไฮยาลูโรนิคลดลงจากก่อนการถ่ายเชื้อคิดเป็นร้อยละ 26.22 ขณะที่ AU 72 หลังจากถ่ายเชื้อจำนวน 5 ครั้งแล้ว ผลิตกรดไฮยาลูโรนิคลดลงร้อยละ 18.59 และสายพันธุ์ AU 7 ผลิตกรดไฮยาลูโรนิคลดลงร้อยละ 23.67 และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคหลังการถ่ายเชื้อ 5 ครั้งของสายพันธุ์กลาย 3 สายพันธุ์ยังคงสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ATCC 35246 โดย สายพันธุ์ AU 21 , AU 72 และ AU 7 หลังจากถ่ายเชื้อจำนวน 5 ครั้งแล้วยังสามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นคิดเป็นร้อยละ 12.71 12.25 และ 2.56 ตามลำดับ

ดังนั้น จึงเลือกสายพันธุ์ AU 21 ไปทำการกลายพันธุ์ต่อไป เพื่อให้ได้สายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้มากขึ้น

3.3 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต รอบที่ 2

นำ *S. zooepidemicus* AU21 ซึ่งกลายพันธุ์มาจาก *S. zooepidemicus* ATCC 35246 โดยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตและผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้สูงสุด 203.13 มิลิลิกรัมต่อลิตร มากลายพันธุ์ซ้ำด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตนาน 60-120 วินาที ซึ่งให้อัตราการรอดร้อยละ 4.0-0.02 (ภาคผนวก ค) นำเชื้อที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA (ภาคผนวก ก ข้อ 3) บ่มในที่มืดเป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง และทำการคัดเลือกสายพันธุ์กลายขั้นปฐมภูมิและขั้นทุติยภูมิเช่นเดียวกันกับการกลายพันธุ์สายพันธุ์ตั้งต้น

3.3.1 การคัดเลือกเชื้อที่ได้จากการกลายพันธุ์ *S. zooepidemicus* AU21 ที่สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้สูง โดยการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต รอบที่ 2

การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคเพิ่มขึ้นในขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิ

หลังการฉายแสงอัลตราไวโอเลตต่อเชื้อ *S.zooepidemicus* สายพันธุ์ AU21 ที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตรอบแรก เป็นเวลา 60-120 วินาที ก็ทำการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิโดยการดูลักษณะโคโลนีที่มีขนาดใหญ่ และมีเมือกมาก หลังจากบ่มเป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง ได้เชื้อที่ผ่านการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิทั้งหมด 470 โคโลนี โดยยึดหลักตามลักษณะโคโลนีที่มีขนาดใหญ่และมีเมือกมากและสุ่มเลือกโคโลนีมา 60 โคโลนี เพื่อคัดเลือกในขั้นทุติยภูมิ ซึ่งทำโดยการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (ภาคผนวก ก) ได้เชื้อสายพันธุ์กลาย 11 สายพันธุ์ที่มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคมากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในอาหารเหลวเพื่อการผลิตของสายพันธุ์ตั้งต้น *S.zooepidemicus* AU 21 กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 2 รอบ

สายพันธุ์	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิค (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการเพิ่มขึ้นของกรดไฮยาลูโรนิค
BU42	312.04	59.43
BU38	299.88	53.22
BU125	284.03	45.12
BU11	281.37	43.76
BU56	277.38	41.72
BU94	274.88	40.45
BU3	272.34	39.15
BU62	268.63	37.25
BU14	243.06	24.19
BU25	225.69	15.31
BU87	212.96	8.81
AU21	195.72	

หมายเหตุ : สายพันธุ์ตั้งต้น คือสายพันธุ์ AU 21

3.3.2 การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์กลาย

เมื่อนำสายพันธุ์กลายทั้ง 4 ที่ผ่านการทดสอบขั้นทุติยภูมิ ตามการทดลองในข้อ 4.2 มาเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อตรวจการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค หลังการถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น แสดงดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์ กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 2 รอบ

สายพันธุ์	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคก่อนการถ่ายเชื้อ* (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคหลังจากการถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง (มิลลิลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละของกรดไฮยาลูโรนิคที่ลดลงเมื่อเทียบกับก่อนการถ่ายเชื้อ
BU42	312.04	277.94	10.93
BU38	299.88	246.64	17.75
BU125	284.03	199.99	10.42
BU11	281.37	207.90	26.11
AU21	195.72		

* หมายถึง ค่าที่ได้จากปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในขั้นต้น

พบว่า *S.zooepidemicus* สายพันธุ์กลายที่ได้ทั้ง 4 สายพันธุ์มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคลดลงจากก่อนการถ่ายเชื้อจำนวน 5 ครั้ง โดยสายพันธุ์ BU 42 , BU 38 , BU 125 และ BU11 หลังจากการถ่ายเชื้อ 5 ครั้งผลิตกรดไฮยาลูโรนิคลดลงจากก่อนการถ่ายเชื้อ คิดเป็นร้อยละ 10.93 , 17.75 ,10.42 และ 26.11 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามหลังจากถ่ายเชื้อจำนวน 5 ครั้ง *S.zooepidemicus* สายพันธุ์กลายที่ได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ คือ BU 42 , BU 38 , BU 125 และ BU11 ยังสามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น AU21 คิดเป็นร้อยละ 42.01 , 26.02 , 2.18 และ 6.22 ตามลำดับ

ดังนั้น จึงเลือกสายพันธุ์ BU42 ไปทำการกลายพันธุ์ต่อไป เพื่อให้ได้สายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้มากขึ้น

3.4 <u>การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต รอบที่ 3</u>

นำ *S. zooepidemicus* BU 42 ซึ่งกลายพันธุ์มาจาก *S. zooepidemicus* AU 21 โดยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตและผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้สูงสุด 312.04 มิลลิกรัมต่อลิตร มากลายพันธุ์ซ้ำด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตนาน 15-120 วินาทีซึ่งให้อัตราการรอดร้อยละ 2.81-0.06 (ภาคผนวก ค) นำเชื้อที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA บ่มในที่มืดเป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง และทำการคัดเลือกสายพันธุ์กลายขั้นปฐมภูมิและขั้นทุติยภูมิเช่นเดียวกันกับการกลายพันธุ์สายพันธุ์ตั้งต้น

3.4.1 การคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ของ *S.zooepidemicus* BU42 ที่สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้สูงหลังการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตรอบที่ 3

การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคเพิ่มขึ้นในขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิ

หลังการกลายพันธุ์สายพันธุ์ BU42ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตมาสองครั้ง เพิ่มด้วยแสงอัลตราไวโอเลตครั้งที่สามเป็นเวลา 15-120 วินาที ก็ทำการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิซึ่งคัดเลือกเชื้อได้ทั้งสิ้น 187 โคโลนี และสุ่มเอา 60 โคโลนีมาทำการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิต่อไปตามวิธี หลังการคัดเลือกปรากฏสายพันธุ์กลาย 4 สายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิคสูง ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในอาหารเหลวเพื่อการผลิตของสายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* BU42 กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบ

สายพันธุ์	ปริมาณการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการเพิ่มขึ้นของกรดไฮยาลูโรนิค
CU47	370.13	37.86
CU69	343.83	28.07
CU75	327.81	22.10
CU86	307.81	14.65
BU42	268.48	

หมายเหตุ : สายพันธุ์ตั้งต้น คือสายพันธุ์ BU42

3.4.2 การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์กลาย

นำสายพันธุ์กลายทั้ง 4 สายพันธุ์มาทดสอบความเสถียร ทำการทดลองตามวิธีการในบทที่2 ข้อ 4.2 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวเพื่อวิเคราะห์การผลิตกรดไฮยาลูโรนิคเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น ตารางที่ 9

ตารางที่ 9 การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบ

สายพันธุ์	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคก่อนการถ่ายเชื้อ* (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคหลังจากการถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละของกรดไฮยาลูโรนิคที่ลดลงเมื่อเทียบกับก่อนการถ่ายเชื้อ
CU47	370.13	292.99	20.84
CU69	343.83	283.02	17.69
CU75	327.81	230.19	29.78
CU86	307.81	263.68	14.34
BU42	268.48		

* หมายถึง ค่าที่ได้จากปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในขั้นต้น

พบว่า *S.zooepidemicus* สายพันธุ์กลายที่ได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคลดน้อยลงทั้ง 4 สายพันธุ์ เมื่อเทียบกับผลผลิตตอนแรกในตารางที่ 8 สายพันธุ์กลายทั้ง 4 สายพันธุ์ หลังจากถ่ายเชื้อจำนวน 5 ครั้งแล้ว มีสายพันธุ์ CU 47 และ CU 69 ที่ยังสามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งต้น BU42 คิดเป็นร้อยละ 9.13 และ 5.42 ขณะที่ CU75 และ CU 86 หลังจากถ่ายเชื้อจำนวน 5 ครั้งแล้วพบว่าสามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคต่ำกว่าสายพันธุ์ดั้งต้นBU42 และเมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคก่อนการถ่ายเชื้อจำนวน 5 ครั้งของสายพันธุ์กลายทั้ง 4 พบว่า ผลิตกรดไฮยาลูโรนิคลดลงจากก่อนการถ่ายเชื้อ คิดเป็นร้อยละ 20.84 , 17.69 , 29.78 และ 14.34 ตามลำดับของสายพันธุ์ CU 47 , CU 69 , CU 75 และ CU86 ตามลำดับ

ดังนั้นจึงนำ CU47 ไปทำการกลายพันธุ์ต่อไป เพื่อให้ได้สายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้มากขึ้น

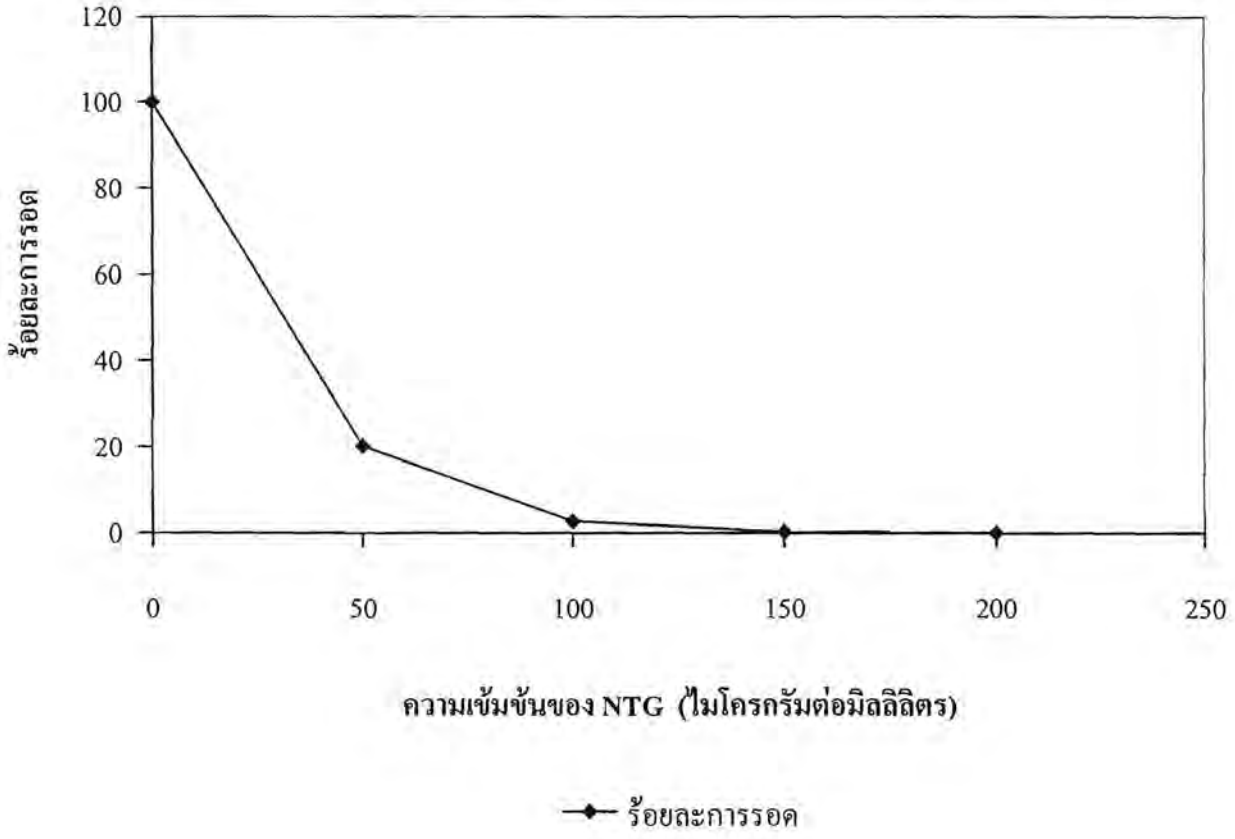
3.5 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NTG ในการกลายพันธุ์ *S.zooepidemicus* CU 47

สืบเนื่องจากผลที่พบว่าการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตในทั้งสามรอบที่ผ่านมา สายพันธุ์กลายให้ผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิคในปริมาณที่ไม่คงที่ ซึ่งมักพบในการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต การทดลองต่อไปจึงทำการกลายพันธุ์เชื้อที่คัดเลือกโดยใช้สาร NTG แล้วคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ให้ผลผลิตกรดสูงซึ่งทำโดย นำเชื้อ *S. zooepidemicus* CU47 ที่ผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้สูงสุด คือ 292.99 มิลลิกรัมต่อลิตร มากลายพันธุ์ต่อด้วยสารเคมี NTG โดยแปรผันความเข้มข้นตั้งแต่ 50 - 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในทริส มาลิอิก บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากการกลายพันธุ์ นำเชื้อบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญ (โคโลนีที่รอด) และคำนวณร้อยละการรอดได้ผล
ดังตารางที่ 10 และรูปที่ 6

ตารางที่ 10 จำนวนโคโลนีที่เจริญ (โคโลนีที่รอด) และร้อยละการรอดของ *S.zooepidemicus* CU 47 ภายหลังการกลายพันธุ์ด้วย NTG 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ความเข้มข้น NTG (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	จำนวนโคโลนีเฉลี่ยจากจานเพาะเลี้ยงเชื้อ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละการรอด
0	56.50×10^7	100
50	11.40×10^7	20.18
100	15.30×10^6	2.71
150	17.50×10^5	0.31
200	22.60×10^4	0.04

พบว่า เมื่อความเข้มข้นของ NTG เพิ่มขึ้น ทำให้ร้อยละการรอดลดลงตามลำดับ และเนื่องจากการกลายพันธุ์ด้วย NTG นั้น ภาวะที่การกลายพันธุ์ที่ให้ร้อยละการรอดอยู่ในช่วงร้อยละ 0 - 50 เป็นช่วงที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่ดีที่สุด (Miller , 1972) ดังนั้น จึงเลือกใช้ความเข้มข้น NTG 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วจึงแปรผันเวลาในการที่เชื้อสัมผัสกับ NTG ที่จะให้ประสิทธิภาพการกลายพันธุ์ที่ดีที่สุดต่อไป



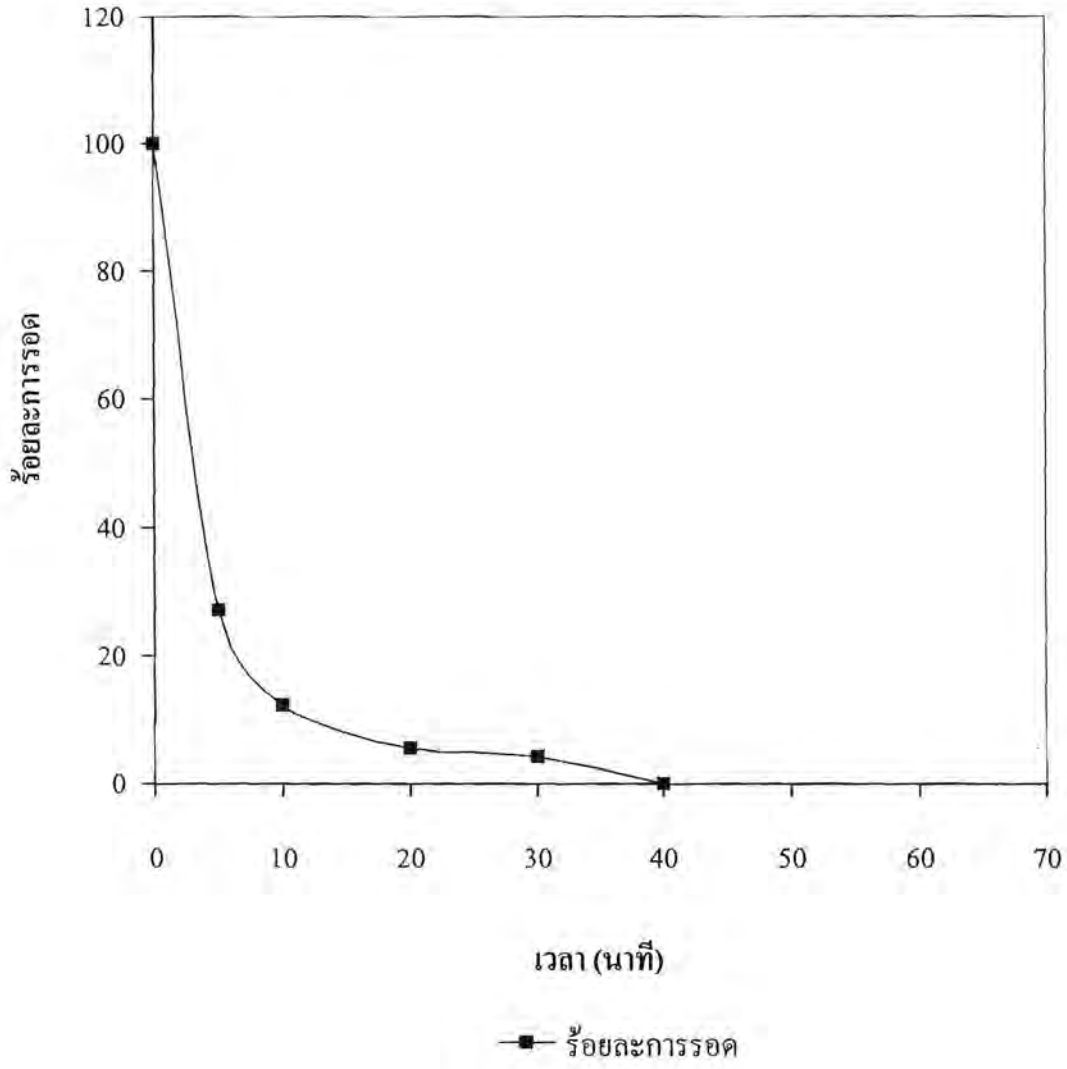
รูปที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการรอดของเชื้อ *S.zooepidemicus* CU47 หลังการบ่มร่วมกับ สาร NTG ที่ความเข้มข้นระหว่าง 50 - 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3.6 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการกลายพันธุ์ *S. zooepidemicus* CU 47 ด้วย NTG รอบที่ 1

ในการคัดเลือกภาวะการกลายพันธุ์ *S. zooepidemicus* CU 47 ด้วย NTG เพื่อให้อัตราการรอดชีวิตอยู่ในช่วงระหว่าง 0 - 50 เปอร์เซ็นต์นั้น พบว่าหากใช้ NTG คงที่ที่ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วบ่มเชื้อในช่วง 5 - 40 นาที ที่ 37 องศาเซลเซียส จะให้อัตราการรอดของเชื้ออยู่ในช่วง 27.05-0.025 ซึ่งอยู่ในขอบเขตที่ต้องการ ดังผลที่แสดงในตารางที่ 11 และรูปที่ 7

ตารางที่ 11 จำนวนโคโลนีที่เจริญ(โคโลนีที่รอด) และร้อยละการรอดของ *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 ภายหลังการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลาต่างๆ

เวลา (นาที)	จำนวนโคโลนีเฉลี่ยจากจานเพาะเลี้ยงเชื้อ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละการรอด
0	6.10×10^7	100
5	1.65×10^7	27.05
10	7.50×10^6	12.30
20	3.38×10^6	5.54
30	2.47×10^6	4.05
40	1.50×10^4	0.025



รูปที่ 7 ร้อยละการรอดของ *Streptococcus zooepidemicus* CU 47 ที่กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลาต่างๆ

3.6.1 การคัดเลือกเชื้อที่สร้างกรดไฮยาลูโรนิคหลังการกลายพันธุ์ *S.zooepidemicus* CU47 ด้วย NTG

การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคเพิ่มขึ้นในขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิ

หลังการกลายพันธุ์ด้วยสาร NTG ต่อ *S. zooepidemicus* สายพันธุ์ CU47 ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบ หลังจากคัดเลือกขั้นปฐมภูมิโดยการดูลักษณะโคโลนีที่มีขนาดใหญ่และมีเมือกมาก หลังจากบ่มเป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง ได้เชื้อที่ผ่านการคัดเลือกดังกล่าวทั้งหมด 120 โคโลนี จากนั้นคัดเลือกต่อในขั้นทุติยภูมิ โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (ภาคผนวก ก ข้อ 2) ได้เชื้อสายพันธุ์กลาย มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคมากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นCU47 ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในอาหารเหลวเพื่อการผลิตของสายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* CU 47 กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบ และชักนำด้วย NTG 1 รอบ

สายพันธุ์	ปริมาณการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการเพิ่มของกรดไฮยาลูโรนิค
CUN 20	351.42	32.37
CUN 37	320.40	20.68
CUN 16	318.39	19.93
CUN 83	311.32	17.26
CU47	265.49	

หมายเหตุ : สายพันธุ์ตั้งต้นคือ สายพันธุ์ CU 47

3.6.2 การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์กลาย

นำสายพันธุ์กลายทั้ง 4 ที่ผ่านการทดสอบขั้นทุติยภูมิ ตามการทดลองในข้อ 4.2 มาเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อการผลิตอีกครั้ง หลังจากมีการถ่ายเชื้อไป 5 ครั้ง โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดสอบขั้นทุติยภูมิ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น วัดปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคที่ผลิตได้ ดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ได้หลังการชักนำโดย NTG

สายพันธุ์	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคก่อนการถ่ายเชื้อ* (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคหลังจากการถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง (มิลลิลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละของกรดไฮยาลูโรนิคเมื่อเทียบกับก่อนการถ่ายเชื้อ
CUN 20	351.42	300.32	-14.54
CUN 37	320.40	323.09	+0.84
CUN 16	318.39	304.99	-4.21
CUN 83	311.32	261.32	-16.06
CU47	292.99		

* หมายถึง ค่าที่ได้จากปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในขั้นต้น , + หมายถึง เพิ่มขึ้น , - หมายถึง ลดลง

พบว่า เชื้อ *S. zooepidemicus* สายพันธุ์กลายที่ได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคลดลงทั้ง 4 สายพันธุ์ แต่ยังคงให้ผลผลิตที่สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น CU47 คือ 300.32 , 323.09 และ 304.99 มิลลิกรัมต่อลิตรสำหรับสายพันธุ์ CUN 20 , CUN 37 และ CUN 16 ตามลำดับ

ดังนั้น จึงเลือกสายพันธุ์ CUN20 ไปทำการกลายพันธุ์ต่อด้วย NTG โดยใช้ภาวะการกลายพันธุ์เช่นเดียวกันกับการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ในรอบแรก เพื่อกระตุ้นความสามารถในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคเพิ่มมากขึ้น

3.7.1 การคัดเลือกเชื้อที่สร้างกรดไฮยาลูโรนิคหลังการกลายพันธุ์ *S. zooepidemicus* CUN 20 ด้วย NTGรอบที่ 2

การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคเพิ่มขึ้นในขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิ

เมื่อนำเชื้อที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG รอบที่ 2 มาทำการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิและขั้นทุติยภูมิเช่นเดียวกันกับการทดลองที่ผ่านมาโดยคัดเลือกจากเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ 65 โคโลนี และหลังจากการผ่านการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิแล้วโดยได้เชื้อสายพันธุ์กลายที่ผลิตกรดไฮยาลูโรนิคมากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น CUN 20 ดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในอาหารเหลวเพื่อการผลิตของสายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* CUN 20 กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบ และ ชักนำด้วย NTG 2 รอบ

สายพันธุ์	ปริมาณการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการเพิ่มขึ้นของกรดไฮยาลูโรนิค
CUN2-1	318.87	6.82
CUN2-5	282.08	-5.50
CUN2-9	277.36	-7.09
CUN2-16	268.40	-10.09
CUN 20	298.51	

หมายเหตุ : สายพันธุ์ตั้งต้น คือ สายพันธุ์ CUN 20

3.7.2 การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์กลาย

เมื่อนำสายพันธุ์กลายทั้ง 4 สายพันธุ์ มาเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อการผลิต หลังจากมีการถ่ายเชื้อไป 5 ครั้งเพื่อทดสอบความเสถียร โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดสอบขั้นทุติยภูมิ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น วัดปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคที่ผลิตได้ดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์กลายต่าง ๆ ที่ได้หลังการชักนำโดย NTG 2 รอบ

สายพันธุ์	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิค ก่อนการถ่ายเชื้อ* (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิค หลังจากการถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละของกรดไฮยาลูโรนิค เมื่อเทียบกับก่อนการถ่ายเชื้อ
CUN2-1	318.87	310.08	-2.76
CUN2-5	282.08	273.11	-3.78
CUN2-9	277.36	283.49	+2.21
CUN2-16	268.40	257.75	-3.97
CUN20	298.51		

* หมายถึง ค่าที่ได้จากปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในขั้นต้น , + หมายถึง เพิ่มขึ้น , - หมายถึง ลดลง

พบว่าเชื้อ *S.zooepidemicus* สายพันธุ์กลายที่ได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ลดลงทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ CUN 2-1 ยังคงให้ผลผลิตสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น CUN 20 คือ 310.08 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ สายพันธุ์ CUN 2-5 , CUN 2-9 ให้ผลผลิตลดลงต่ำกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น

ดังนั้นจึงนำสายพันธุ์กลาย CUN 2-10 กลายพันธุ์ต่ออีกครั้งด้วย NTG โดยใช้ภาวะเดียวกันกับการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมีในรอบแรก เพื่อกระตุ้นความสามารถในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคเพิ่มมากขึ้น

3.8.1 <u>การคัดเลือกเชื้อที่สร้างกรดไฮยาลูโรนิคหลังการกลายพันธุ์ *S.zooepidemicus* CUN 2-1 ด้วย NTGรอบที่ 3</u>

การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคเพิ่มขึ้นในขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิ

ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับการกลายพันธุ์ด้วยสาร NTG ดังที่ผ่านมา จากโคโลนีที่ผ่านการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ 45 โคโลนี และเมื่อผ่านการคัดเลือกในขั้นทุติยภูมิได้สายพันธุ์กลายที่ผลิตกรดไฮยาลูโรนิคสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น CUN 2-1 ดังแสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในอาหารเหลวเพื่อการผลิตของสายพันธุ์ตั้งต้น *S.zooepidemicus* CUN2-1 กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบและชักนำด้วย NTG 3 รอบ

สายพันธุ์	ปริมาณการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการเพิ่มขึ้นของกรดไฮยาลูโรนิค
CUN3-5	325.92	4.71
CUN3-13	285.38	-8.31
CUN2-1	311.25	

หมายเหตุ : สายพันธุ์ตั้งต้น คือ สายพันธุ์ CUN 2-1

3.8.2 การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์กลาย

ทดสอบหาปริมาณการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคด้วยวิธีคาร์บาโซลจากเชื้อสายพันธุ์กลาย CUN 3-5 และ CUN 3-13 หลังการทดสอบความเสถียรโดยการเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อการผลิตหลังการถ่ายเชื้อไป 5 ครั้ง แสดงผลดังตารางที่ 17

ตารางที่ 17 การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์กลายต่าง ๆ หลังการชักนำด้วย NTG 3 รอบ

สายพันธุ์	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคก่อนการถ่ายเชื้อ* (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคหลังจากการถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละของกรดไฮยาลูโรนิคเมื่อเทียบกับก่อนการถ่ายเชื้อ
CUN3-5	325.92	314.62	-3.47
CUN3-13	285.58	288.68	+1.16
CUN2-1	311.25		

* หมายถึง ค่าที่ได้จากปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในขั้นต้น , + หมายถึง เพิ่มขึ้น , - หมายถึง ลดลง

จากผลการทดลองสายพันธุ์กลาย CUN 3-5 สามารถสร้างกรดไฮยาลูโรนิคภายหลังจากมีการถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง ได้เพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์ตั้งต้น CUN 2-1 เพียงเล็กน้อย คือ 314.62 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงนำสายพันธุ์กลาย CUN 3-5 มากลายพันธุ์ซ้ำด้วยสาร NTG อีกครั้ง เพื่อกระตุ้นความสามารถในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคให้สูงขึ้น โดยใช้วิธีการและภาวะการกลายพันธุ์เช่นเดียวกับการทดลองที่ผ่านมา

3.9.1 การคัดเลือกเชื้อที่สร้างกรดไฮยาลูโรนิคหลังการกลายพันธุ์ *S.zooepidemicus* CUN 3-5 ด้วย NTG รอบที่ 4

การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคเพิ่มขึ้นในขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิ

จากเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ 180 โคโลนี และเมื่อผ่านการคัดเลือกในขั้นทุติยภูมิ โดยวิธีการเดียวกับการทดลองที่ผ่านมาได้สายพันธุ์กลายที่สร้างกรดไฮยาลูโรนิคเพิ่มขึ้น ดังตารางที่ 18

ตารางที่ 18 เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในอาหารเหลวเพื่อการผลิตของสายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* CUN3-5 กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบและชักนำด้วย NTG 4 รอบ

สายพันธุ์	ปริมาณการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการเพิ่มขึ้นของกรดไฮยาลูโรนิค
CUN4-7	472.17	34.54
CUN4-12	466.04	32.80
CUN4-25	438.21	24.87
CUN4-10	434.74	23.88
CUN4-32	428.77	22.04
CUN4-9	417.45	18.95
CUN4-41	406.60	15.85
CUN4-65	391.51	11.56
CUN4-92	385.34	9.80
CUN4-16	383.02	9.14
CUN3-5	350.94	

หมายเหตุ สายพันธุ์ตั้งต้น คือ : สายพันธุ์ CUN 3-5

3.9.2 <u>การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์กลายต่าง ๆ หลังการชักนำด้วย NTG 4 รอบ</u>

เลือกสายพันธุ์กลาย 4 สายพันธุ์ที่ให้การผลิตกรดไฮยาลูโรนิคสูงในการคัดเลือกจาก 180 โคโลนี มาทดสอบขั้นทุติยภูมิเพื่อวิเคราะห์การผลิตกรดของเชื้อสายพันธุ์กลาย หลังจากถ่ายเชื้อไป 5 ครั้ง ให้ผลการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ดังตารางที่ 19

ตารางที่ 19 การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบและชักนำด้วย NTG 4 รอบ

สายพันธุ์	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิค ก่อนการถ่ายเชื้อ* (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิค หลังจากการถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละของกรดไฮยาลูโรนิค เมื่อเทียบกับก่อนการถ่ายเชื้อ
CUN4-7	472.17	465.57	-1.40
CUN4-12	466.04	404.23	-13.26
CUN4-25	438.21	372.17	-15.07
CUN4-10	434.74	402.83	-7.34
CUN3-5	350.94		

* หมายถึง ค่าที่ได้จากปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในขั้นต้น , + หมายถึง เพิ่มขึ้น , - หมายถึง ลดลง

พบว่าเชื้อ *S.zooepidemicus* สายพันธุ์กลายที่ได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคลดลงทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยที่สายพันธุ์กลาย CUN 4-7 , CUN4-12 ,CUN4-25 ,CUN 4-10 หลังจากถ่ายเชื้อจำนวน 5 ครั้งแล้ว ยังสามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น CUN3-5 คิดเป็นร้อยละ 32.66 , 15.18 , 6.05 และ 14.79 ตามลำดับ

ดังนั้นจึงนำ CUN 4-7 ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายที่ให้การผลิตกรดไฮยาลูโรนิคสูงสุดในการทดลองนี้ไปทำการกลายพันธุ์ต่อด้วย NTG อีกครั้งเพื่อเพิ่มความสามารถในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้มากขึ้น

3.10.1 <u>การคัดเลือกเชื้อที่สร้างกรดไฮยาลูโรนิคหลังการกลายพันธุ์ *S. zooepidemicus* CUN 4-7 ด้วย NTG รอบที่ 5</u>

การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคเพิ่มขึ้นในขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิ

ในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายหลังการกลายพันธ์ด้วย NTG รอบที่ 5 กับเชื้อสายพันธุ์ CUN 4-7 ได้เชื้อที่ผ่านการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิทั้งหมด 60 โคโลนี และนำมาทดสอบขั้นทุติยภูมิต่อไปได้สายพันธุ์กลายที่ให้การผลิตกรดไฮยาลูโรนิค สูงมากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น CUN 4-7 ดังแสดงในตารางที่ 20

ตารางที่ 20 เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในอาหารเหลวเพื่อการผลิตของสายพันธุ์ตั้งต้น *S.zooepidemicus* CUN4-7 กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบและชักนำด้วย NTG 5 รอบ

สายพันธุ์	ปริมาณการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการเพิ่มขึ้นของกรดไฮยาลูโรนิค
CUN5-10	585.85	23.98
CUN5-32	534.91	13.20
CUN5-19	519.81	10.01
CUN5-15	499.06	5.61
CUN4-7	472.53	

หมายเหตุ : สายพันธุ์ตั้งต้น คือ สายพันธุ์ CUN 4-7

3.10.2 <u>การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์กลาย</u>

เมื่อนำสายพันธุ์กลายทั้ง 4 ที่ผ่านการทดสอบขั้นทุติยภูมิ ตามการทดลองในข้อ มาเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อการผลิตอีกครั้ง หลังจากมีการถ่ายเชื้อไป 5 ครั้ง โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดสอบขั้นทุติยภูมิ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น วัดปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคที่ผลิตได้ดัง ตารางที่ 21

ตารางที่ 21 การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์กลายต่าง ๆ ที่ผ่านการชักนำโดยสาร NTG 5 รอบ

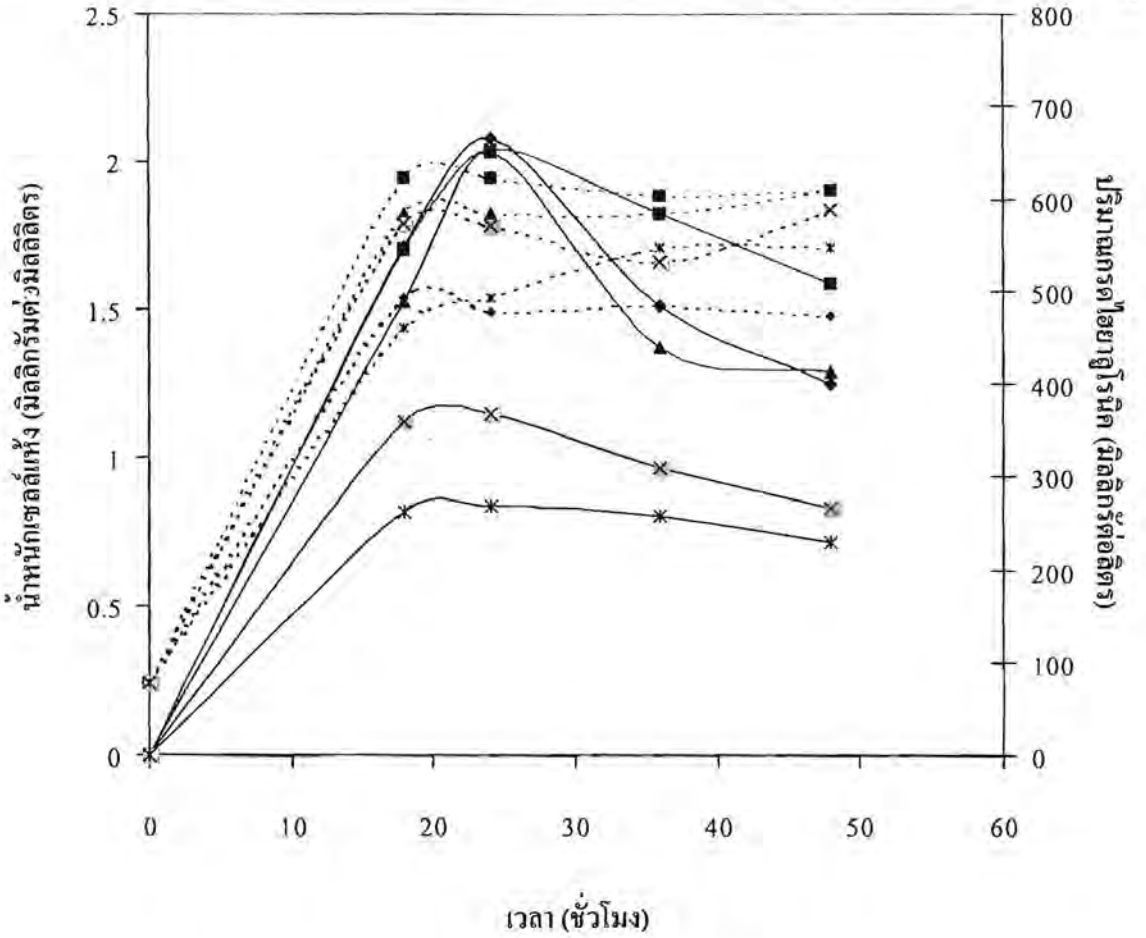
สายพันธุ์	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิค ก่อนการถ่ายเชื้อ* (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิค หลังจากการถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร)	<u>ร้อยละของกรดไฮยาลูโรนิคเมื่อเทียบกับก่อนการถ่ายเชื้อ</u>
CUN5-10	585.85	567.85	-3.07
CUN5-32	534.91	518.34	-3.10
CUN5-19	519.81	498.30	-4.14
CUN5-15	499.06	502.18	+0.63
CUN4-7	472.53		

* หมายถึง ค่าที่ได้จากปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในขั้นต้น , + หมายถึง เพิ่มขึ้น , - หมายถึง ลดลง

S. zooepidemicus สายพันธุ์กลายทั้ง 4 สายพันธุ์ มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคลดลงโดยสายพันธุ์ CUN 5-10 , CUN 5-32 , CUN 5-19 และ CUN 5-15 หลังจากถ่ายเชื้อจำนวน 5 ครั้งแล้ว ยังคงสามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นคิดเป็นร้อยละ 20.17 , 9.69 , 5.45 และ 6.27 ตามลำดับ

3.11 การศึกษาการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของ *S.zooepidemicus* ATCC 35246 และสายพันธุ์กลาย ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบ และ NTG 5 รอบ

เลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 และ สายพันธุ์กลายทั้ง 4 อันได้แก่ CUN 5-10 , CUN5-15 ,CUN5-19 และ CUN 5-32 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อการผลิตในระดับขวดเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง โดยปรับ ค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 ความรอบเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที พบว่า การเจริญของสายพันธุ์กลายทั้ง 4 สายพันธุ์และสายพันธุ์ตั้งต้นให้การเจริญในรูปแบบเดียวกัน โดยสายพันธุ์ CUN 5-32 ให้การเจริญสูงสุด และ CUN 5-15 ,CUN 5-19 ,ATCC 35246 และ CUN5-10 ให้การเจริญลดลงตามลำดับ สำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคพบว่า สายพันธุ์ CUN 5-10 ให้ปริมาณกรดสูงสุดคือ 666.67 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 24 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น ATCC 35246 ให้การผลิตกรดสูงสุดที่เวลาเดียวกัน เท่ากับ 267.59 มิลลิกรัมต่อลิตร สายพันธุ์กลายให้การผลิตที่สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นคิดเป็นร้อยละ 149.137 (รูปที่ 8)



รูปที่ 8 การเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของเชื้อสายพันธุ์กลาย *S.zooepidemicus* CUN5-10 , CUN5-32 , CUN5-19 , CUN5-15 และ สายพันธุ์ตั้งต้น *S.zooepidemicus* ATCC 35246 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อการผลิตค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 ที่อุณหภูมิห้อง , 200 รอบต่อนาที

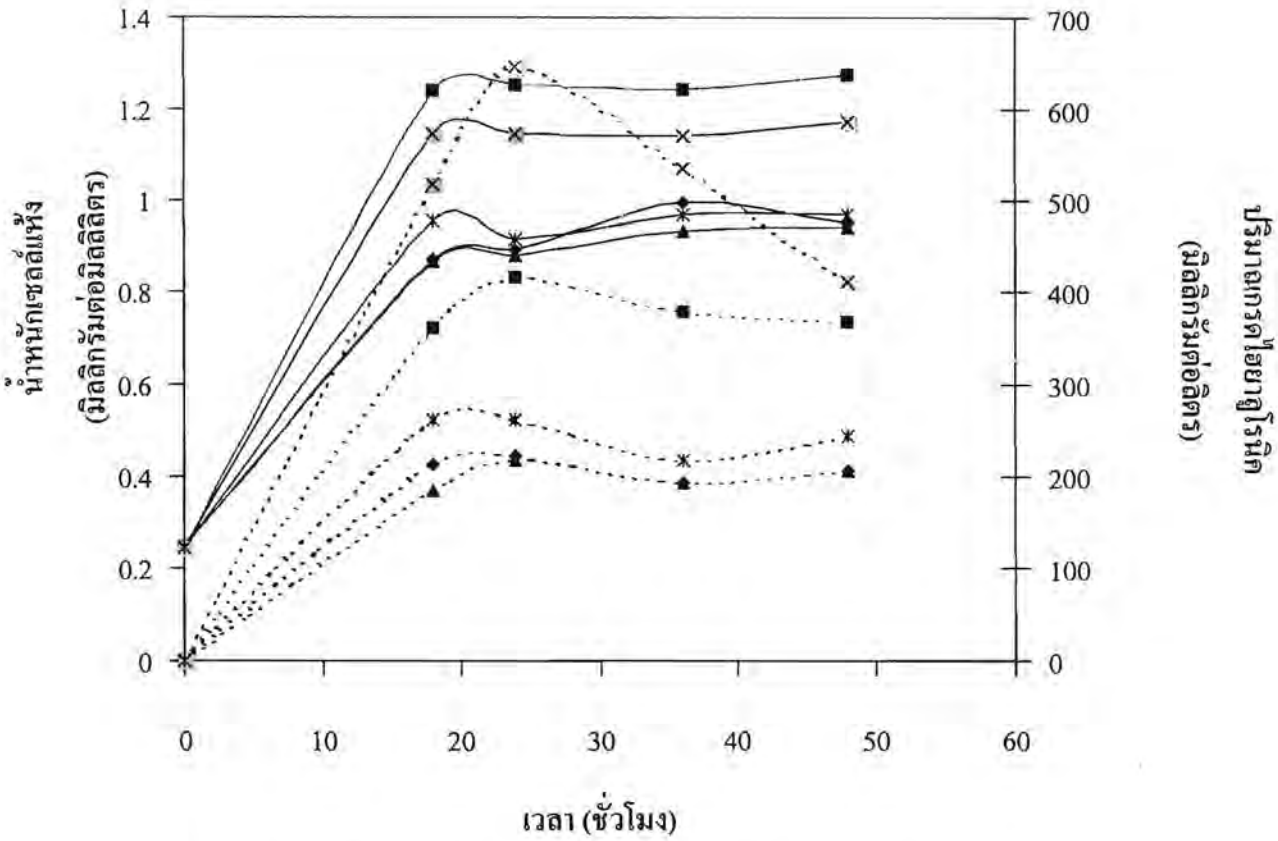
3.12 การศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนหลักบางชนิดในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์กลาย *S. zooepidemicus* สายพันธุ์กลาย CUN 5-10

จากการศึกษาถึงแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ต่อการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของจุลินทรีย์พบว่าจากรายงานของจุรารัก ศรีวงษ์ (2540) ที่ทำการศึกษาชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคโดย *S.zooepidemicus* ATCC 35246 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นในงานวิจัยนี้ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้การเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคสูงสุด

ดังนั้นจึงศึกษาถึงชนิดของน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์กลายเช่นกัน โดยแปรผันชนิดน้ำตาล 5 ชนิด คือ กลูโคส , ซูโครส , มอลโตส , ฟรุกโตส และ แป้งที่ย่อยสลายแล้ว ที่อุณหภูมิห้อง , ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8 อัตราเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที พบว่าสายพันธุ์กลาย CUN5-10 แต่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มี มอลโตสเป็นแหล่งคาร์บอนได้สูงสุด แต่การผลิตกรดไฮยาลูโรนิค เมื่อมีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิค 647.44 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 9)

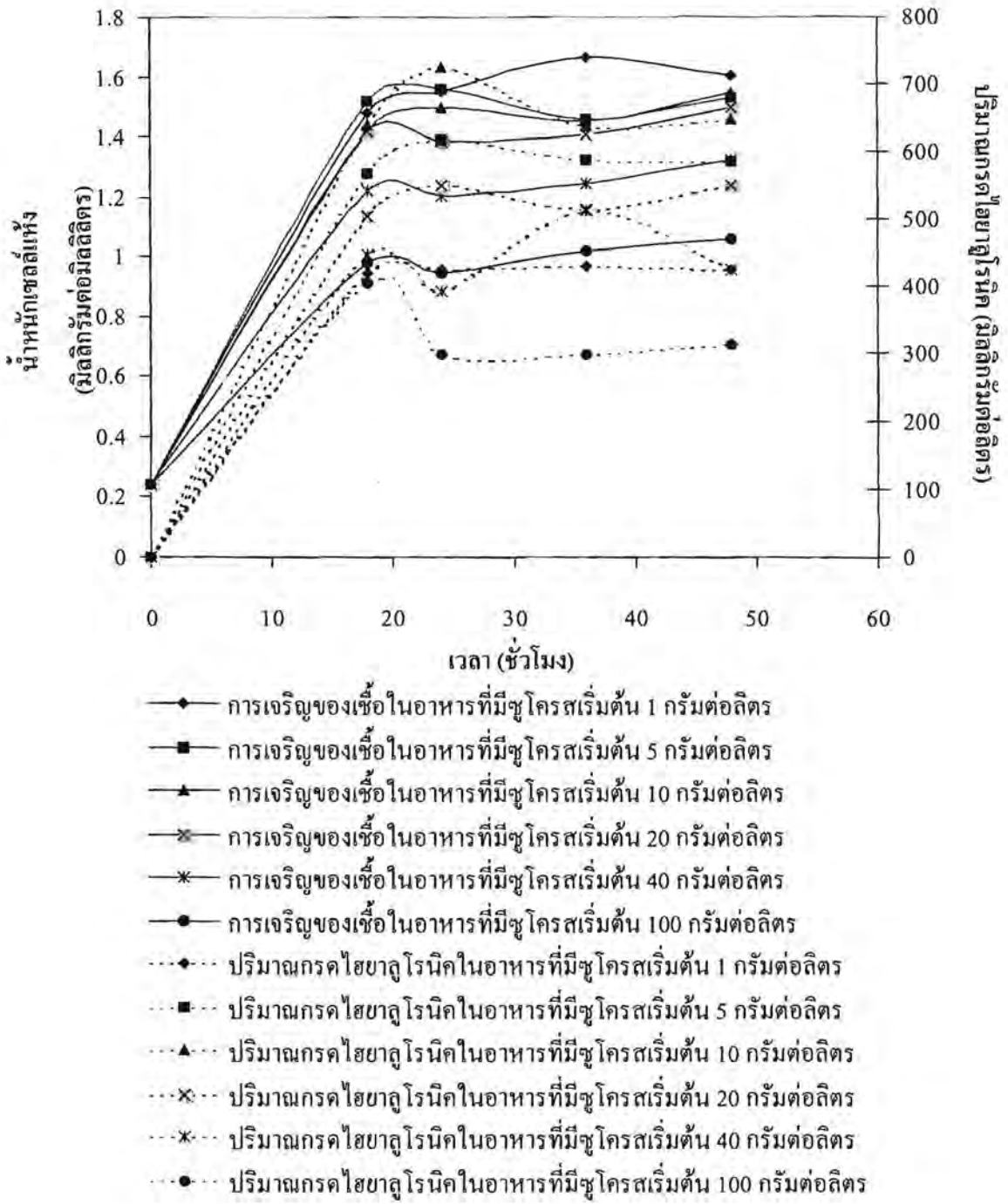
3.13 การศึกษาปริมาณของน้ำตาลซูโครสที่มีผลต่อรูปแบบการเจริญ ค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคที่มีผลิตโดย *S.zooepidemicus* สายพันธุ์ CUN 5-10

จากการศึกษาพบว่า *S.zooepidemicus* สายพันธุ์ CUN 5-10 ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ดังนั้นจึงศึกษาถึงปริมาณซูโครสที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคโดยใช้ภาวะการเลี้ยงที่ อุณหภูมิห้อง ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ 6.8 และความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อเจริญสูงในอาหารที่มีปริมาณซูโครสเป็น 0.5 , 0.1 , 1.0 , 2.0 , 4.0 และ 10.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคพบว่า ที่ปริมาณน้ำตาลซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ ให้การผลิตกรดสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 เท่ากับ 726.59 มิลลิกรัมต่อลิตรและที่ปริมาณซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ ให้การผลิตกรดต่ำที่สุด คือ 404.65 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 18 (รูปที่ 10)



- การเจริญของเชื้อในอาหารที่มีกลูโคสเริ่มต้น 5 กรัมต่อลิตร
- การเจริญของเชื้อในอาหารที่มีมอลโตสเริ่มต้น 5 กรัมต่อลิตร
- การเจริญของเชื้อในอาหารที่มีฟรุคโตสเริ่มต้น 5 กรัมต่อลิตร
- การเจริญของเชื้อในอาหารที่มีซูโครสเริ่มต้น 5 กรัมต่อลิตร
- การเจริญของเชื้อในอาหารที่มีแป้งที่ถูกย่อยสลายเริ่มต้น 5 กรัมต่อลิตร
- ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในอาหารที่มีกลูโคสเริ่มต้น 5 กรัมต่อลิตร
- ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในอาหารที่มีมอลโตสเริ่มต้น 5 กรัมต่อลิตร
- ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในอาหารที่มีฟรุคโตสเริ่มต้น 5 กรัมต่อลิตร
- ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในอาหารที่มีซูโครสเริ่มต้น 5 กรัมต่อลิตร
- ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในอาหารที่มีแป้งที่ถูกย่อยสลายเริ่มต้น 5 กรัมต่อลิตร

รูปที่ 9 การเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของ *S.zooepidemicus* สายพันธุ์กลาย CUN 5-10 โดยแปรผันแหล่งคาร์บอน ค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที



รูปที่ 10 การเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของ *S.zooepidemicus* สายพันธุ์กลาย CUN 5-10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อการผลิตโดยแปรผันปริมาณซูโครส 0.1 – 10 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 ที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที

3.14 ปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

3.14.1 ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

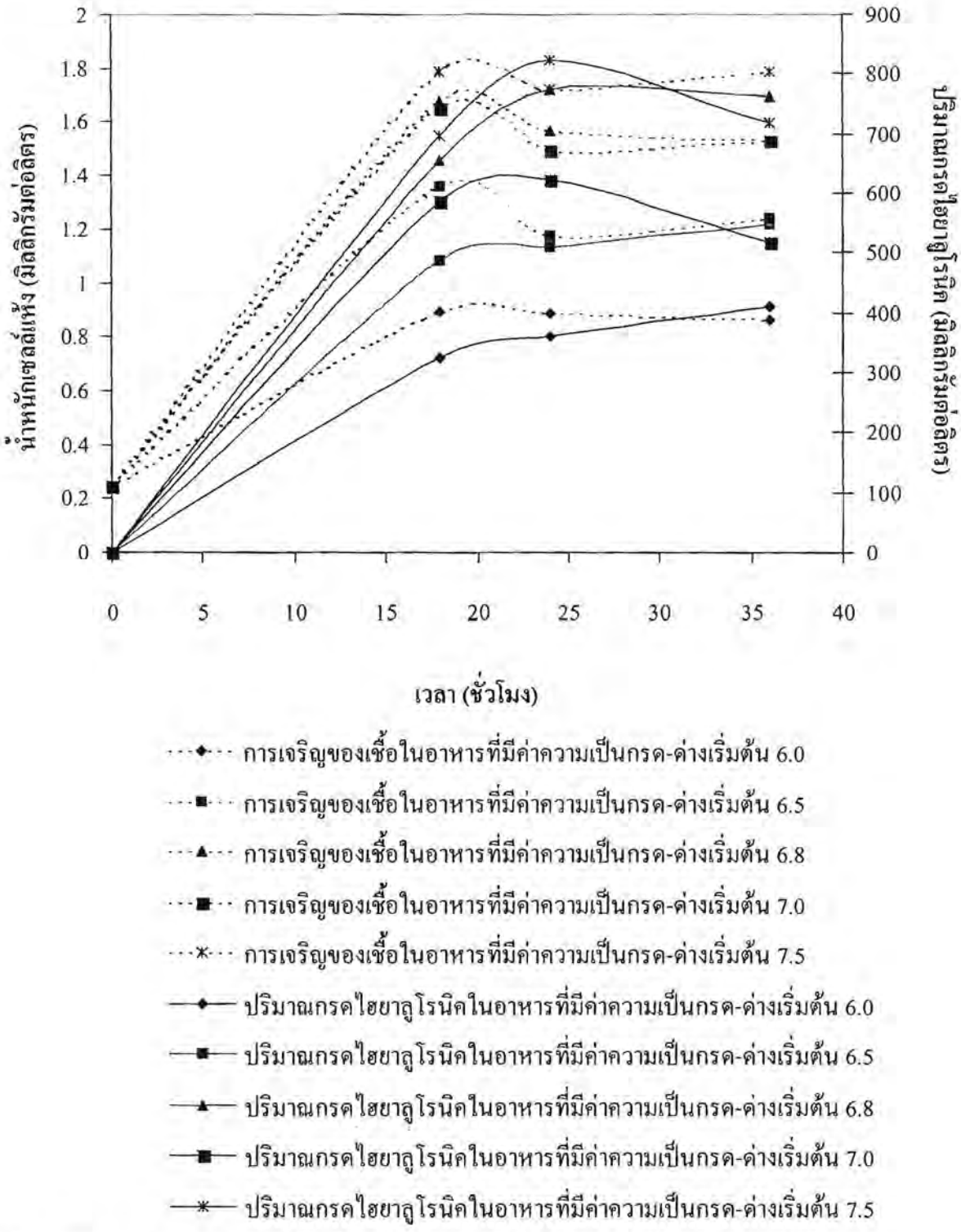
ทำการแปรผันค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อการผลิตเป็น 6.0 , 6.5 , 6.8 , 7.0 และ 7.5 โดยเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ CUN5-10 ที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที พบว่า ค่าความเป็นกรดด่างที่ 7.5 จะให้การเจริญที่ดีกว่า 7.0 , 6.8 , 6.5 และ 6.0 ตามลำดับ ส่วนการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคพบว่า ที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.5 จะให้การผลิตกรดสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 เท่ากับ 824.28 มิลลิกรัมต่อลิตร ขณะที่เปรียบเทียบกับรายงานของจุรารัก ศรีวงษ์ (2540) พบว่า เชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น ATCC 35246 ให้การผลิตที่สูงสุดเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 โดยให้การผลิตสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อเช่นกัน (รูปที่ 11)

3.14.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

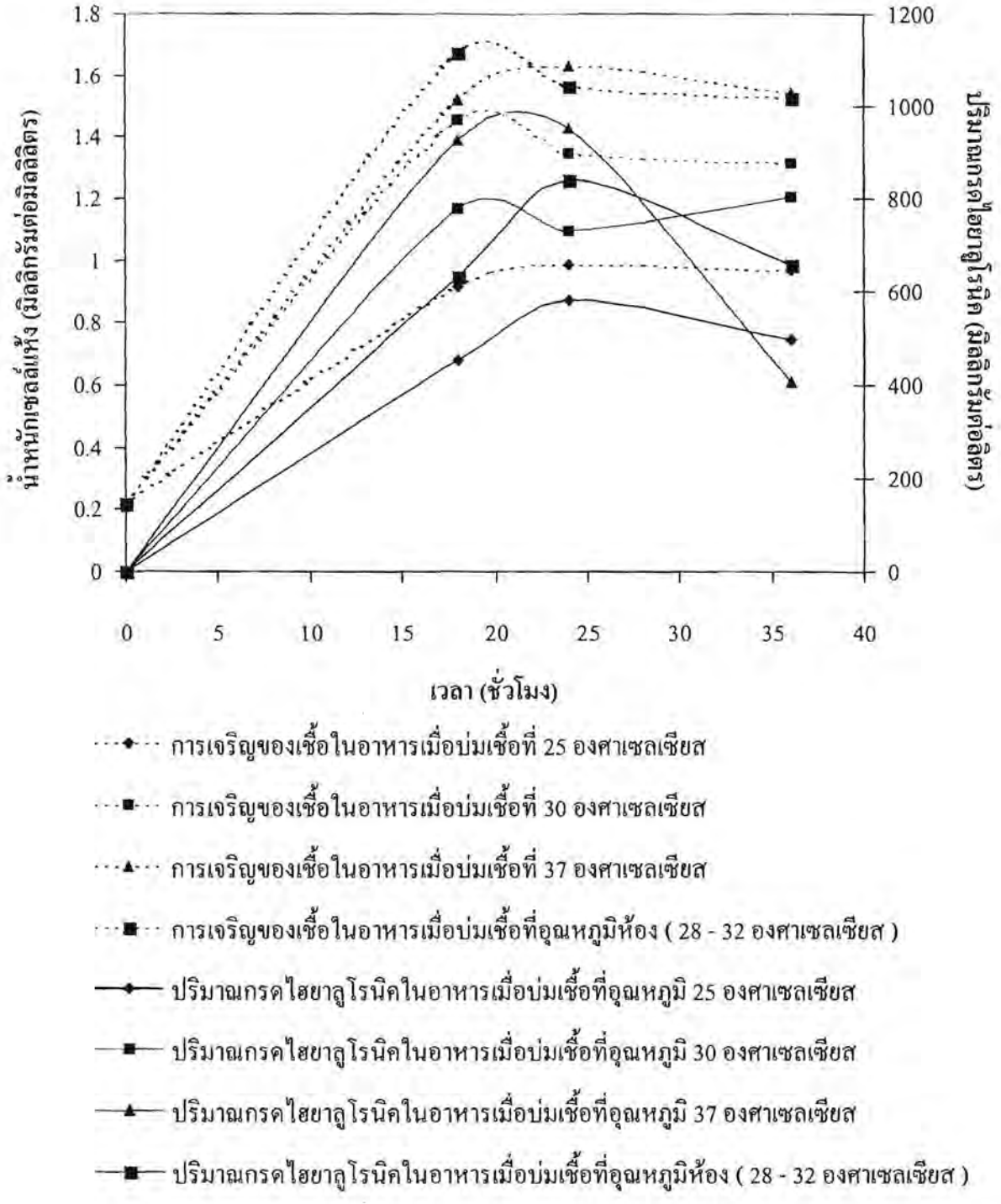
ทำการเลี้ยง *S.zooepidemicus* สายพันธุ์กลาย CUN 5-10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตโดยมีปริมาณซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเป็นกรดด่าง 7.5 ความเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที และแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยง 25 , 30 , 37 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) พบว่า ที่อุณหภูมิห้องให้การเจริญสูงสุด และที่อุณหภูมิ 37, 30 , 25 องศาเซลเซียสให้การเจริญสูง ตามลำดับ ส่วนการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคพบว่า ที่ชั่วโมงที่ 24 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้การผลิตกรดไฮยาลูโรนิคสูงสุด 954.04 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับทุกๆอุณหภูมิโดย ที่อุณหภูมิห้องให้ปริมาณกรดสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 เท่ากับ 841.39 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสให้ปริมาณกรดสูงที่สุด 779.78 มิลลิกรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 18
(รูปที่ 12)

3.14.3 ความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

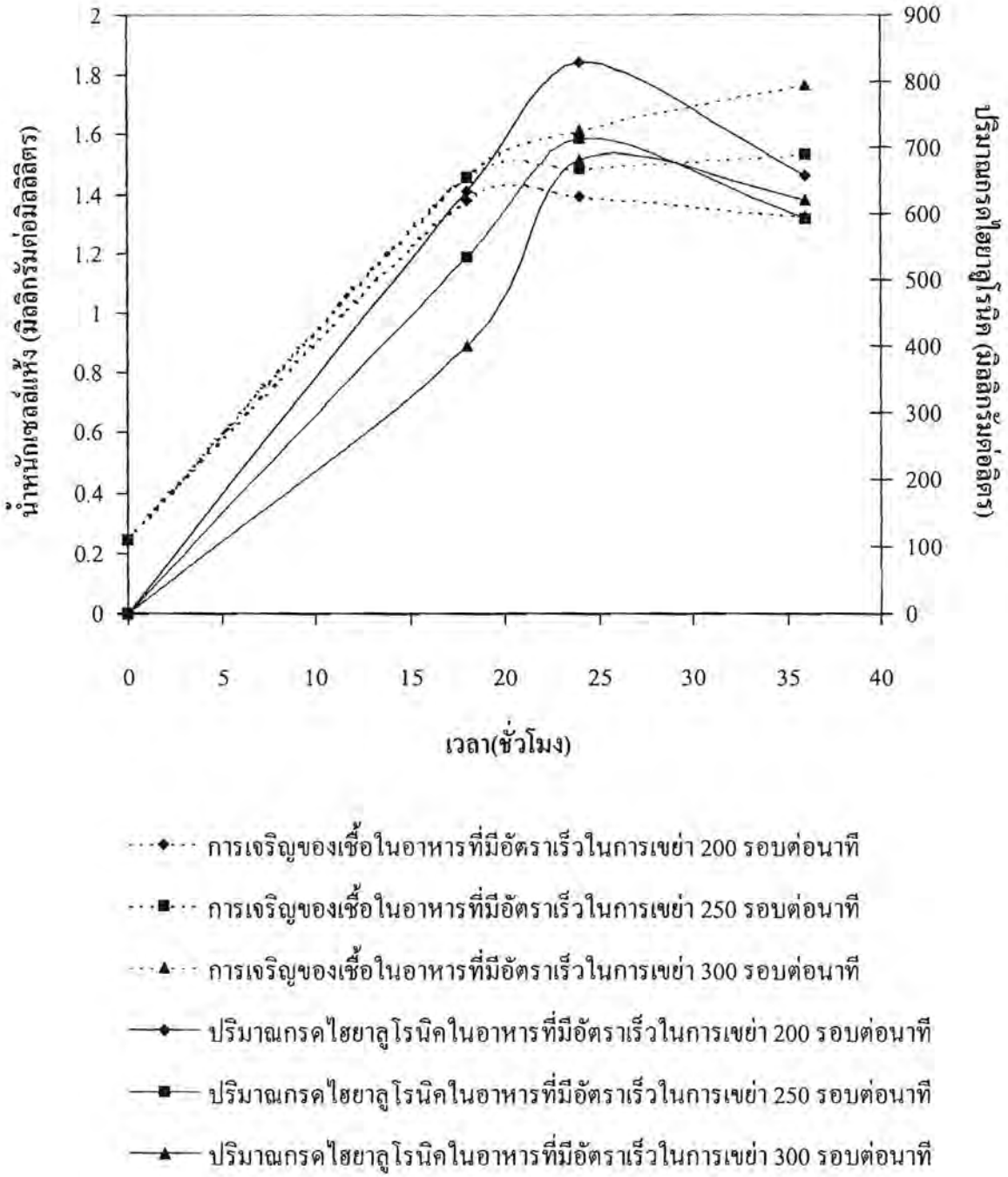
จากผลการทดลองเปรียบเทียบระหว่างการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคโดยเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในระดับขวดเขย่า และในระดับหลอดเขย่า พบว่า ในระดับหลอดเขย่าให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคต่ำกว่าในระดับขวดเขย่า ซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยของปริมาณออกซิเจนที่มีผลต่อการผลิต ประกอบกับรายงานที่แสดงให้เห็นอิทธิพลของปริมาณออกซิเจนที่มีต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค (Cleary and Larkin , 1979 ; John *et al.* , 1994) จึงทำการแปรผันความเร็วรอบในการเขย่าเป็น 200 , 250 และ 300 รอบต่อนาที ภาวะอุณหภูมิห้อง ค่าความเป็นกรดด่าง 7.5 โดยมี ซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต พบว่า การเจริญของสายพันธุ์กลาย CUN 5-10 ที่ความเร็วรอบ ทั้ง 3 ไม่มีความแตกต่างกัน แต่การผลิตกรดไฮยาลูโรนิคที่ ภาวะความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที ให้การผลิตกรดสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 เท่ากับ 829.11 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่13)



รูปที่ 11 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของ *S.zooepidemicus* CUN5-10 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อการผลิตที่ อุณหภูมิห้อง , อัตราเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที



รูปที่ 12 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของ *S. zooepidemicus* CUN5-10 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อการผลิต ค่าความเป็นกรดด่าง 7.5 และอัตราเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที



รูปที่ 13 ผลของอัตราเร็วในการเขย่าที่มีต่อการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของ *S. zooepidemicus* CUN5-10 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อการผลิต ที่อุณหภูมิห้อง และค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ 7.5

3.15 เปรียบเทียบสมบัติบางประการของเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น *S.zooepidemicus* ATCC 35246 และสายพันธุ์กลาย *S.zooepidemicus* CUN5-10

ตามลักษณะของแบคทีเรีย (bacteriological characteristic) ในกลุ่มของ Streptococci ที่รายงานโดย Deibei และ Seeley ในปี 1974 ที่กล่าวไว้ว่า เป็นแบคทีเรียติดสีแกรมบวก สามารถย่อยหรือไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ไม่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 9.6 และไม่เจริญในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ 9.6 เปอร์เซ็นต์ และจากรายงานของ Kim และคณะ ในปี 1996 ที่ศึกษาลักษณะของแบคทีเรียสายพันธุ์กลาย *S. equi* KFCC 10830 ซึ่งกลายพันธุ์จาก *S. equi* ATCC 6580 ดังนั้นในงายวิจัย จึงศึกษาเปรียบเทียบลักษณะของแบคทีเรียสายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* ATCC 35246 และสายพันธุ์กลาย *S. zooepidemicus* CUN5-10 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 22

ตารางที่ 22 สมบัติบางประการของเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* ATCC 35246 และสายพันธุ์กลาย *S. zooepidemicus* CUN5-10

สมบัติ	*S. zooepidemicus* ATCC 35246	*S. zooepidemicus* CUN 5-10
การย้อมติดสีแกรม	บวก (น้ำเงิน)	บวก (น้ำเงิน)
การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง	-	-
เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส	-	-
เจริญที่ค่าความเป็นกรดด่าง 9.6	-	-
เจริญที่ 6.5% NaCl	-	-

พบว่า เชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* ATCC 35246 และสายพันธุ์กลาย *S. zooepidemicus* CUN5-10 เป็นแบคทีเรียติดสีแกรมบวก ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ไม่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 9.6 และไม่เจริญในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ 9.6 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคโดยสายพันธุ์กลาย CUN 5-10 พบว่า ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีความเหมาะสมในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคเช่นเดียวกับสายพันธุ์ตั้งต้น ATCC 35246 ที่ทำการศึกษาโดย จุรารัก ศรีวงษ์ (2540) ซึ่งสาเหตุดังกล่าวอาจเป็นเพราะ ซูโครส ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดียว 2 ชนิด คือ กลูโคส และ ฟรุคโตส ซึ่งน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถเปลี่ยนเป็น glucose-6-phosphate และ fructose-6-phosphate ได้โดยตรงไม่ต้องสร้าง fructose-6-phosphate จาก glucose-6-phosphate ซึ่งทั้ง glucose-6-phosphate และ fructose-6-phosphate ที่ได้จะถูกเปลี่ยนเป็นสารตั้งต้นในการสร้างกรดไฮยาลูโรนิค คือ UDP-glucuronic acid และ UDP-N-acetylglucosamine ต่อไป จึงทำให้สามารถสร้างกรดไฮยาลูโรนิคจากแหล่งคาร์บอนที่เป็นซูโครสได้มากกว่า และจากการศึกษาปริมาณซูโครสที่เหมาะสม พบว่า ที่ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาถึงปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์กลาย *S.zooepidemicus* CUN5-10 พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม คือ 7.5 , อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) และอัตราเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าวมีความแตกต่างกับรายงานของจุรารัก (2540) ที่ศึกษาถึงภาวะที่เหมาะสมสำหรับสายพันธุ์ ATCC 35246 ภาวะดังกล่าวคือค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.8 , อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส , อัตราเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที ทั้งนี้ความแตกต่างที่พบเนื่องจาก เชื้อสายพันธุ์กลายมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมไปซึ่งอาจทำให้ลักษณะพันธุกรรมที่เปลี่ยนไปนั้นมีผลต่อลักษณะทางสรีรวิทยาของเชื้อตลอดจนภาวะที่เหมาะสมของแต่ละสายพันธุ์จึงต่างกัน

โดยสรุปงานวิจัยนี้กลายพันธุ์ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต และสาร NTG คัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการกลายพันธุ์ และคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้สูงขึ้น คือ สายพันธุ์ CUN5-10 ซึ่งสามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้ 585.85 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้เพิ่มเป็น 3.25 เท่าของสายพันธุ์ตั้งต้นและมีความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ในการทดสอบจำนวน 5 รุ่น เมื่อนำมาหาภาวะการผลิตที่เหมาะสม พบว่า อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น 7.5 ปริมาณน้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร อัตราเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที สามารถเพิ่มการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้เป็น 829.11 มิลลิกรัมต่อลิตร

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

Streptococcus zooepidemicus ATCC 35246 เป็นแบคทีเรียที่สั่งซื้อมาจาก American Type Culture Collection , Rockville , Maryland. , USA. ในขั้นต้นคณะผู้วิจัยหลังจากใช้ภาวะที่เหมาะสม ๆ ที่ศึกษามาทำการเลี้ยงเชื้อให้ผลิตกรดไฮยาลูโรนิค พบว่าเชื้อนี้สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้ 0.54 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 15 ซึ่งยังไม่อยู่ในเกณฑ์ที่ต้องการ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายในการปรับปรุงสายพันธุ์ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ให้เพิ่มผลผลิตมากขึ้น

การทดลองขั้นแรกจึงศึกษาถึงระยะเวลาถารเจริญของ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ที่เหมาะสมในการกลายพันธุ์ซึ่งพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อนี้ในอาหารเหลว TSB ที่ชั่วโมงที่ 7 เชื้อจะเจริญอยู่ในระยะกึ่งกลางทวีคูณ (mid log phase) ซึ่งเปรียบเทียบกับการเจริญในอาหารเหลว BHI ที่ จุรารักศรีวงษ์ (2540) ได้ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในการเตรียมหัวเชื้อเพื่อการผลิต พบว่าเชื้อจะเจริญอยู่ที่ระยะกึ่งกลางทวีคูณ (mid log phase) ในชั่วโมงที่ 9 สาเหตุที่อัตราการเจริญใน TSB เร็วกว่า BHI อาจเป็นเพราะเชื้อสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนใน TSB ได้ดีกว่า ใน BHI ซึ่งมีความซับซ้อนมากกว่า และผลผลิตของกรดที่ได้นั้นไม่แตกต่างกันนัก จึงเลือกใช้ TSB ซึ่งมีราคาที่ถูกกว่า BHI ในการเลี้ยงเชื้อต่อ ๆ ไป

การศึกษาการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค โดย *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับปรุงจาก Nimrod (1986) เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเพื่อการคัดเลือกสายพันธุ์กลายในขั้นทุติยภูมิ พบว่า ปริมาณกรดที่ผลิตขึ้นค่อยๆเพิ่มปริมาณจนถึงปริมาณสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ คือ 188.85 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อพิจารณาที่ชั่วโมงที่ 18 พบว่าปริมาณกรดที่ได้ไม่แตกต่างจากปริมาณกรดที่สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 เท่าใดนัก

การปรับปรุงสายพันธุ์ในงานวิจัยครั้งนี้ ใช้สิ่งชักนำการเกิดการกลายพันธุ์ 2 ชนิด คือ แสงอัลตราไวโอเลตและ สาร NTG เพราะการใช้สารชักนำการกลายพันธ์หลายๆชนิดร่วมกัน จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมได้หลายรูปแบบ ได้สายพันธุ์กลายที่มีสารพันธุกรรมแตกต่างไปจากสายพันธุ์ตั้งต้นมากขึ้น ทำให้โอกาสเกิดการกลายพันธุ์กลับ (reverse mutation) ไปมีสารพันธุกรรมเหมือนสายพันธุ์ตั้งต้นน้อยลง (Fantini , 1975)

จากการทำการกลายพันธุ์ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบ และ NTG 5 รอบ ทำให้ได้สายพันธุ์กลาย CUN 5-10 ซึ่งสามารถสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิค 585.85 มิลลิกรัมต่อลิตร มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ATCC 35246 ซึ่งสามารถสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิค 180.23 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีลำดับการกลายพันธุ์ดังรูปที่ 36

การที่สายพันธุ์กลาย CUN 5-10 สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้เพิ่มมากขึ้น เป็นผลเนื่องจากแสงอัลตราไวโอเลตและสาร NTG ไปทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงบนสารพันธุกรรมหรือยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิค จึงมีผลให้เกิดการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิคได้มากขึ้น โดยการเปลี่ยนแปลงนี้อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยในแต่ละขั้นตอนของการกลายพันธุ์ เมื่อทำการกลายพันธุ์ต่อไปอีกหลายๆรอบ อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในสารพันธุกรรมเพิ่มมากขึ้น ทำให้การสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิคได้มากขึ้นตามลำดับในสายพันธุ์กลายรุ่นต่อๆมา

การกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตมักนิยมใช้ในการกลายพันธุ์ครั้งแรกของจุลินทรีย์ เป็นวิธีการที่ง่ายและสะดวกที่สุดในการกลายพันธุ์เชื้อเพื่อให้ได้สายพันธุ์กลายที่มีสมบัติแตกต่างกัน มีรายงานถึงอัตราการรอดที่จะให้ได้เชื้อกลายพันธุ์ที่ดี คือช่วง 0.1-1.0 เปอร์เซ็นต์ (Miller, 1972 ; Carlton and Brown, 1981) และ 1-5 เปอร์เซ็นต์ (Fantini, 1975) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่อัตราการรอด 0.1-5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้มีโอกาสได้เชื้อสายพันธุ์กลายที่ดี

Clowes and Hays , 1968ได้รายงานปัจจัยที่มีผลต่อการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตนั้นขึ้นกับหลายปัจจัยอย่าง อาทิ เช่น

1. ความหนาแน่นของเชื้อในการกลายพันธุ์ เนื่องจากแสงอัลตราไวโอเลตผ่านทะลุเนื้อเยื่อต่างๆได้ไม่ดี ดังนั้น หากเซลล์แขวนลอยมีความหนาแน่นมาก ก็จะทำให้โอกาสที่แสงอัลตราไวโอเลตจะสัมผัสกับเซลล์ได้น้อยลง ในทางปฏิบัติ ปริมาณเซลล์แขวนลอยที่เหมาะสม คือ น้อยกว่า 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

2. เซลล์แขวนลอย อาหารเลี้ยงเชื้อจะสามารถดูดซับแสงอัลตราไวโอเลตได้มากกว่าสารละลายบัฟเฟอร์ จึงทำให้ปริมาณแสงอัลตราไวโอเลตผ่านไปสู่เชื้อที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อมีประสิทธิภาพลดลง อีกทั้งอาจทำให้เกิดสารพิษหรือสารอินทรีย์ เปอร์ออกไซด์ ที่จะรบกวนทำให้ระยะเวลาในการฉายแสงอัลตราไวโอเลตเพิ่มออกไป

3. ลักษณะทางกายภาพของเชื้อ ในเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ ดีเอนเอของแบคทีเรียนั้นนิวเคลียสมักจะน้อยกว่า ในเซลล์ที่มีขนาดเล็ก เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์มวลต่อต่อปริมาตรเซลล์

4. ความเข้มของแสงอัลตราไวโอเลต

5. ระยะห่างของแสงอัลตราไวโอเลต

ดังนั้นในการปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพในการกลายพันธุ์ที่เหมาะสมที่สุด จึงควรหาภาวะที่เหมาะสมต่างๆ ที่เกี่ยวข้องปัจจัยข้างต้น เพื่อเพิ่มโอกาสให้ได้สายพันธุ์กลายมากขึ้น โดยพบว่า ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการกลายพันธุ์

S. zooepidemicus ATCC 35246 คือการฉายแสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ระยะห่างจากแหล่งแสง 30 เซนติเมตร เป็นเวลา 80-120 วินาที ได้ช่วงการรอด 5.38 - 0.07 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพิจารณาเวลาการฉายแสงที่เหมาะสมในแต่ละครั้งของการทดลองจะเปลี่ยนแปลงไป ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของจุลชีพด้วย โดยจากการทดลองนี้ หลังจากการกลายพันธุ์ *S.zooepidimecus* ATCC 35246 และได้สายพันธุ์กลาย AU 21 และ BU 42 ตามลำดับ นำมาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการฉายแสงอัลตราไวโอเลต พบว่า 60 - 120 วินาที และ 15 - 120 วินาที ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าเชื้อที่ผ่านการกลายพันธุ์มาหลายครั้งจะมีอัตราการรอดต่ำกว่า คือมีความไวต่อแสงอัลตราไวโอเลตเพิ่มขึ้น

นอกจากนี้ยังควรคำนึงถึงกระบวนการซ่อมแซมดีเอนเอที่เกิดขึ้นได้ทั้งในภาวะที่มีแสงและในที่มืด ซึ่งยังส่งผลทำให้ได้สายพันธุ์กลายลดลงหรือมีการกลายพันธุ์กลับเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นได้

ส่วนในการกลายพันธุ์ด้วย NTG นั้น เป็นการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมีการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นจะมีความเจาะจงในการก่อการกลายพันธุ์ คือสาร NTG จะไปทำหน้าที่ในการเติม methyl group ที่เบส ซึ่งแตกต่างจากการใช้แสงอัลตราไวโอเลตที่ทำให้เกิดการผิดพลาดของการกลายพันธุ์โดยก่อให้เกิดไทมีนไดเมอร์

ในการทดลองจะพบว่าในการกลายพันธุ์แต่ละครั้ง survival curve แต่ละครั้งจะแตกต่างกัน (ผลการทดลองแสดงในภาคผนวก ค) ซึ่งเป็นเพราะ เชื้อที่นำมาเป็นเชื้อในการกลายพันธุ์แต่ละครั้งมีลักษณะทางสรีรวิทยาแตกต่างกัน ปริมาณเซลล์เริ่มต้นไม่เท่ากัน ระยะเวลาในการก่อให้เกิดการกลายพันธุ์จึงแตกต่างกันและจะเห็นว่า เชื้อที่ผ่านการกลายพันธุ์มาแล้วหลายครั้งจะไวต่อการกลายพันธุ์เพิ่มขึ้น

การเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์กลายที่ได้หลังการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบ และ สาร NTG 5 รอบ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในการผลิตระดับขวดเขย่า และวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคด้วยวิธีเอนไซม์ จากผลที่ได้สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคโดยสายพันธุ์กลาย CUN 5-10 สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ATCC 35246 คิดเป็นร้อยละ 149.14

S. zooepidemicus ATCC 35246

(ผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ได้ 180.23 มิลลิกรัม/ลิตร)

↓ 1st UV

สายพันธุ์ AU 21

(ผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ได้ 275.32 มิลลิกรัม/ลิตร มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ATCC 35246 1.53 เท่า)

↓ 2nd UV

สายพันธุ์ BU 42

(ผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ได้ 312.04 มิลลิกรัม/ลิตร มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ATCC 35246 1.73 เท่า)

↓ 3rd UV

สายพันธุ์ CU 47

(ผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ได้ 370.13 มิลลิกรัม/ลิตร มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ATCC 35246 2.05 เท่า)

↓ 1st NTG

สายพันธุ์ CUN 20

(ผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ได้ 351.42 มิลลิกรัม/ลิตร มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ATCC 35246 1.95 เท่า)

↓ 2nd NTG

สายพันธุ์ CUN2-1

(ผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ได้ 318.87 มิลลิกรัม/ลิตร มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ATCC 35246 1.77 เท่า)

↓ 3rd NTG

สายพันธุ์ CUN3-5

(ผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ได้ 325.92 มิลลิกรัม/ลิตร มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ATCC 35246 1.81 เท่า)

↓ 4th NTG

สายพันธุ์ CUN4-7

(ผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ได้ 472.17 มิลลิกรัม/ลิตร มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ATCC 35246 2.62 เท่า)

↓ 5th NTG

สายพันธุ์ CUN5-10

(ผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ได้ 585.85 มิลลิกรัม/ลิตร มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ATCC 35246 3.25 เท่า)

รูปที่ 36 ลำดับขั้นตอนการกลายพันธุ์ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต และ สาร NTG ได้สายพันธุ์กลาย CUN 5-10

การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคโดยสายพันธุ์กลาย CUN 5-10 พบว่า ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีความเหมาะสมในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค เช่นเดียวกับสายพันธุ์ตั้งต้น ATCC 35246 ที่ทำการศึกษาโดย จุรารัก ศรีวงษ์ (2540) ซึ่งสาเหตุดังกล่าว อาจเป็นเพราะ ซูโครส ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดียว 2 ชนิด คือ กลูโคส และ ฟรุคโตส ซึ่งน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถเปลี่ยนเป็น glucose-6-phosphate และ fructose-6-phosphate ได้โดยตรงไม่ต้องสร้าง fructose-6-phosphate จาก glucose-6-phosphate ซึ่งทั้ง glucose-6-phosphate และ fructose-6-phosphate ที่ได้จะถูกเปลี่ยนเป็นสารตั้งต้นในการสร้างกรดไฮยาลูโรนิค คือ UDP-glucuronic acid และ UDP-N-acetylglucosamine ต่อไป จึงทำให้สามารถสร้างกรดไฮยาลูโรนิคจากแหล่งคาร์บอนที่เป็นซูโครสได้มากกว่า และจากการศึกษาปริมาณซูโครสที่เหมาะสม พบว่า ที่ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาถึงปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์กลาย *S.zooepidemicus* CUN5-10 พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม คือ 7.5 , อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) และอัตราเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าวมีความแตกต่างกับรายงานของจุรารัก (2540) ที่ศึกษาถึงภาวะที่เหมาะสมสำหรับสายพันธุ์ ATCC 35246 ภาวะดังกล่าวคือค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.8 , อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส , อัตราเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที ทั้งนี้ความแตกต่างที่พบเนื่องจาก เชื้อสายพันธุ์กลายมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมไปซึ่งอาจทำให้ลักษณะพันธุกรรมที่เปลี่ยนไปนั้นมีผลต่อลักษณะทางสรีรวิทยาของเชื้อตลอดจนภาวะที่เหมาะสมของแต่ละสายพันธุ์จึงต่างกัน

โดยสรุปงานวิจัยนี้ได้กลายพันธุ์ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต และ สาร NTG คัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการกลายพันธุ์ และคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้สูงขึ้น คือ สายพันธุ์ CUN5-10 ซึ่งสามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้ 585.85 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้เพิ่มเป็น 3.25 เท่าของสายพันธุ์ตั้งต้นและมีความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ในการทดสอบจำนวน 5 รุ่น เมื่อนำมาหาภาวะการผลิตที่เหมาะสม พบว่า อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น 7.5 ปริมาณน้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร อัตราเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที สามารถเพิ่มการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้เป็น 829.11 มิลลิกรัมต่อลิตร และยังพบว่า หากมีการเติมไลโซไซม์ จะทำให้ผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้สูงขึ้นทั้งในสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ตั้งต้น

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

จุรารัก ศรีวงษ์. 2540. การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดไฮยาโรนิคโดย *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

Akasaka, H., Komasaki, H., and Arai,T. 1989. Fermentation Method for Producing Hyaluronic Acid. United States Patent. No. 4,801,539.

Balazs, E.A., and Band, P. 1984. Hyaluronic acid : Its Structure and Use. Cosmetics & Toiletries. 99 : 65-72.

Balazs, E.A, 1979. Ultrapure Hyaluronic Acid and the Use Thereof. United States Patent. No. 4,141,973.

Balazs, E.A, 1981. Hyaluronate Based Compositions and Cosmetic Formulations Containing Same. United States Patent. No. 4,303,676.

Bernfeld,P. 1955. Amylase, α and β. In S.P. Colowick and N.O. Kapian(eds.), Methods in Enzymology. 149. New York: Academic Press.

Billek, G., and Schenefeld, H., 1968. Hyaluronic Acid Preparation and Method of Producing Same. United States Patent. No. 3,396,081.

Bitter, T., and Muir, H.M. 1962. A Modified Uronic Acid Carbazole Reaction. Anal. Biochem. 4 : 330-334.

Bracke, J.W., Thacker, K.., and Minneapolis, M. 1985. Hyaluronic Acid from Bacterial Culture. United States Patent. No. 4,517,295.

Brown, K.K., Ruiz, L.C., Rijn, Greene, N.D., Trump, S.L., Wilson, C.D., and Bryant, S.A. 1994. Method for The Microbiological Production of Non-antigenic Hyaluronic Acid. United States Patent. No. 5,316,926.

Carlton, B.C., and Brown, B.J. 1981. Gene Mutation. In E.W. Nester (ed.) , Manual of Methods for General Bacteriology, pp. 221-227. Washington, D.C. : American Society for Microbiology.

Cifonelli, J.A., 1970. The Isolation and Characlerization of Hyaluronic Acid from *Pasteurella*

multocida. Carbohydr. Research. 14 : 272-276.

Cifonelli, J.A., and Dorfman, A. 1957. The Biosynthesis of Hyaluronic Acid by Group A Streptococcus. J. Biol. Chem. 228 : 547-557.

Cifonelli, J.A., and Mayeda, M. 1957. The Purification of Hyaluronic Acid by the Use of Charcoal. Biochim. Biophys. Acta. 24 : 397-400.

Ellwood, D.C., Evans, G.T., Dunn, G.M., McInnes, N., Yeo, R.G., and Smith, K.J.1996. Production of Hyaluronic Acid. United States Patent. No. 5,563,051.

Fantini, A.A. 1975. Strain Development. In H.H. John (ed.) , Methods in Enzymology , 43 vols. pp. 24-41. New York : Academic Press.

Fujii, K., Kawata, M., Kobayashi, Y., Okamoto, A., and Nishinari, K. 1996. Effect of the Addition of Hyaluronate Segments with Different Chain Lengths on the Viscoelasticity of Hyaluronic Acid Solutions. Biopolymer. 38(5) : 583-591.

Greiling, H. 1963. Hyaluronic Acid. In H.U. Bergmeyer (ed.) , Method of Enzymatic Analysis, pp. 87-92. New York : Academic Press.

Hamerman, D., and Sandson, J. 1960. Isolation of Hyaluronate from Human Synovial Fluid by Zone Electrophoresis. Nature. 188 : 1194-1195.

Hanson, R.S., and Phillips, J.A. 1981. Chemical Composition. In P. Gerhardt , R.G.E. Murray , R.N. Costilow , E.W. Nester , W.A. Wood, N.R. Krieg , G.B.Phillips (eds.), Manual of Methods for General Bacteriology. 328-336. Washington: American Society for Microbiology.

Holmstrom, B., and Ricica, J. 1967. Production of Hyaluronic Acid by a Streptococcal Strain in Batch Culture. Appl. Microbiol. 15(6) : 1409-1413.

Kendall, F.E., Heidelberger, M., and Dawson, M.H. 1937. A Serologically Inactive Polysaccharide Elaborated by Mucoid Strains of Group A Hemolytic Streptococcus. J. Biol.Chem. 118 : 61-69.

Keng, C. NG ., Handley, C.J., Mason, R.M., and Robinson, H.C. 1989. Synthesis of Hyaluronate in Cultured Bovine Articular Cartilage. Biochem. J. 263 : 761-767.

Kim, J.H., Yoo, S.J., Oh, D.K., Kweon, Y.G., Park, D.W., Lee, C.H., and Gil, G.H. 1996. Selection of a *Streptococcus equi* mutant and Optimization of Culture Condition for the Production of High Molecular Weight Hyaluronic Acid. Enz. Microbiol. Tech. 19 : 440-445.

Krause, R.M. 1963. Antigenic and Biochemical Composition of Hemolytic Streptococcal Cell Walls. Bacteriol. Rev. 27 : 369-380.

Kresse, H. 1997. Proteoglycan-Structure and Function. Glycoscience, pp.201-222. Chapman & Hall.

Laurent, T.C., 1955. Studies on Hyaluronic Acid in the Vitreous Body. J.Biol.Chem. 216 : 263-271.

Laurent, T.C., 1966. Physicochemical Characteristics of the Acid Glycosaminoglycans. Federation Proc. 25(3) : 1037-1038.

Laurent, T.C. , 1970. Structure of Hyaluronate Acid. In E.A. Balazs. (ed) Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix. London. Academic Press. pp.703-732.

Laurent, T.C., Ryan, M., and Pietruszkiewicz, A. 1960. Fractionation of Hyaluronic Acid. Biochim.Biophys. Acta. 42 : 476-485.

Longas, M.O., and Meyer, K. 1981. Sequential Hydrolysis of Hyaluronate by β-glucuronidase and β-N-acetylhexosaminidase. Biochem. J. 197 : 275-282.

McCarty, M. 1980. Streptococci. In B.D. Davis ; R. Dulbecco; H.N. Eisen; and H.S. Ginsberg (eds.), Microbiology Including Immunology and Molecular Genetic , pp. 607-692. 3rd ed. New York : Harper & Row.

Matsumura, G., De Salegui, M., Herp, A., and Pigman, W. 1963. The Preparation of Hyaluronic Acid from Bovine Synovial Fluid. Biochim. Biophys. Acta. 69 : 574-576.

Miller, J.H. 1972. Experiments in Molecular Genetics , pp. 113-143. USA. : Cold Spring Harbour Lab.

Miyamori, T., Numazawa, R., Sakimae, A., and Onishi, H. 1989. Method of Producing Hyaluronic Acid. United States Patent. No. 4,885,244.

Morita, H., and Fujii, M. 1991. Process for Preparing Hyaluronic Acid. United States Patent. No. 5,071,751.

Nimrod, A., Greenman, B., Kanner, D., and Landsberg, M. 1986. Method of Producing High Molecular Weight Sodium Hyaluronate by Fermentation of Streptococcus. International Application Published under The Patent Cooperation Treaty. WO 86/04355.

Nimrod, A., Greenman, B., Kanner, D., and Landsberg, M. 1988. High Molecular Weight Sodium Hyaluronate. United States Patent. No. 4,784,990.

O'Regan, M., Martini, I., Crescenzi, F., Luca, C., and Lansing, M. 1994. Molecular Mechanisms and Genetics of Hyaluronan Biosynthesis. Int. J. Biol.Macromol. 16(6) : 283-286.

Orten, J. M., and Neuhaus. O.W. 1982. Biochemistry. 10th ed. USA. : The C.V. Mosby.

Pape, L.G. 1982. Ophthalmological Procedures. United States Patent. No. 4,328,803.

Park, M.G., Jang, J.D., and Kang, W.K. 1996. *Streptococcus zooepidemicus* Medium and Process for Prepartion Hyaluronic Acid. United States Patent. No. 5,496,726.

Pigman, W., Rizvi, S., and Holley, H. 1961. Preparation and Stability of Hyaluronic Acid. Biochim. Biophys. Acta. 53 : 254-262.

Hyaluronic Acid Capsule Operon. Dev. Biol. Stand. 85 : 219-223.

Robert, M., and Pike, M.D. 1982. Hyaluronidase and Hyaluronic Acid of Group A Streptococci. Southern Society for Clinical Research. 468.

Roden, L., Baker, J.R., Cifonelli, J.A., and Mathews, M.B. 1972. Isolation and Characterization of Connective Tissue Polysaccharides. In V. Ginsgerg (ed.), Complex Carbohydrate Part B. Methods of Enzymology , 38 vols. pp.73-141. New York : Academic Press.

Romeo, A., and Lorenzi , S.1996. Procedure for The Purification of Hyaluronic Acid and Fraction of Pure Hyaluronic Acid for Ophthalmic Use. United States Patent. No 5,559,104.

Schmut, O., and Hofmann, H. 1981. A Method for the Purification of Bovine Vistreous Body Hyaluronic Acid. Biochim.Biophy.Acta. 673 : 192-196.

Seastone,C.V. 1939. The Virulence of Group C Hemolytic Streptococci of Animal Origin. J.Expt.Med. 70 : 361-378.

Smith, E.L. , Hill,R .L ., Lehman, I.R. , Lefkowitz, R. J. , Handeler, P. , and White,A. 1983. Principles of Biochemistry:Mamamlian Biochemistry. 7 th ed. New York : McGraw-Hill.

Sting, P., Schaufub, P., and Blobel, H. 1989. Isolation and Characterization of Hyaluronidase from *Streptococcus equisimilis*. Med. Sci. Res. 17 : 723-725.

Thonard, J.C., Migliore, S.A., and Blustein, R. 1964. Isolation of Hyaluronic Acid from Broth Cultures of Streptococci. J. Biol. Chem. 239(3) : 726-728.

Voet, D. , and Voet , J.G. 1995. Biochemistry , pp. 264-265. 2nd ed. New York : John Wiley and Sons.

Weissmann, B., and Meyer, K. 1953. The Structure of Hyalobiuronic Acid and of Hyaluronic Acid from Umbilical Cord. J.Am.Chem.Soc. 76 : 1753-1757.

Wessels, M.R., Goldberg, J.B., Mobes, A.E., and DiCesare, M.J. 1994. Effects on Virulence of Mutations in a Locus Essential for Hyaluronic Acid Capsule Expression in Group A Streptococci. Infection and Immunity. 62(2) : 433-441.

Wessels, M.R., Moses, A.E., Goldberg, J.B., and DiCesare, T.J. 1991. Hyaluronic Acid Capsule is a Virulence Factor for Mucoid Group A Streptococci. Proc. Natl. Acad. Sci. 88 : 8317-8321.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ

1. สูตรอาหารสำหรับการเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น

1.1 อาหารเหลว Brain Heart Infusion : BHI (Difco)

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Calf Brains, Infusion from	200	กรัม
Beef Heart, Infusion from	250	กรัม
Bacto Proteose Peptone	10	กรัม
Bacto Dextrose	2	กรัม
Sodium Chloride (NaCl)	5	กรัม
Disodium Phosphate (Na_2HPO_4)	2.5	กรัม

ชั่ง Brain heart Infusion 37 กรัม ละลายในน้ำกลั่น (Distilled water) 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ภาวะมาตรฐาน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 อาหารเหลว Tryptic Soy Broth : TSB (Difco)

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Bacto Tryptone	17	กรัม
(Pancreatic Digest of Casein)		
Bacto Soy tone	3	กรัม
(Papaic Digest of Soybean Meal)		
Bacto Dextrose	2.5	กรัม
Sodium Chloride (NaCl)	5	กรัม
Dipotassium Phosphate (K_2HPO_4)	2.5	กรัม

ชั่ง Tryptic Soy Broth 30 กรัม ละลายในน้ำกลั่น (Distilled water) 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ภาวะมาตรฐาน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. สูตรอาหารสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคตามวิธีของ Nimrod และคณะ (1986) ซึ่งปรับปรุงโดย จุรารัก ศรีวงษ์ (2540)

Ammonium sulfate ($(NH_4)_2SO_4$)	0.65	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	10.0	กรัมต่อลิตร
Sodium Chloride (NaCl)	2.0	กรัมต่อลิตร
Magnesium Sulphate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	1.0	กรัมต่อลิตร
Dipotassium Phosphate (K_2HPO_4)	2.5	กรัมต่อลิตร
Sucrose	5.0	กรัมต่อลิตร

ปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 6.8 นึ่งฆ่าเชื้อที่ภาวะมาตรฐาน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. สูตรอาหารสำหรับการคัดเลือกเชื้อ Tryptic Soy Agar : TSA (Difco)

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Bacto Tryptone (Pancreatic Digest of Casein)	17	กรัม
Bacto Soy tone (Papaic Digest of Soybean Meal)	3	กรัม
Bacto Dextrose	2.5	กรัม
Sodium Chloride (NaCl)	5	กรัม
Dipotassium Phosphate (K_2HPO_4)	2.5	กรัม

ชั่ง Tryptic Soy Broth 30 กรัม และวุ้น(agar) 18 กรัม ละลายในน้ำกลั่น (Distilled water) 1 ลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ภาวะมาตรฐาน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

หากต้องการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อผสมเลือด สำหรับการศึกษาการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ให้ปรับอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนเทลงจานเพาะเลี้ยงเท่ากับ 45-50 องศาเซลเซียส เติมเลือดปริมาตร 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ผสมให้เลือดเข้ากันเป็นเนื้อเดียวกับอาหาร เทลงสู่จานเพาะเลี้ยง

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายทริส-มาลิอิก บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.0

ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1 ลิตร ประกอบด้วย

ทริส (ไฮดรอกซีเมทิล) – อะมิโนมีเทน ($C_4H_{11}NO_3$)	12.1	กรัม
กรดมาลิอิก	11.6	กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 6.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

2. สารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.0

ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1 ลิตร ประกอบด้วย

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	5.4	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	10.5	กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

3. การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิคโดยวิธีคาร์บาโซล

3.1 สารละลายโซเดียมเททระบอเรทในกรดซัลฟูริกเข้มข้น ความเข้มข้น 0.025 โมลาร์

ชั่งสารละลายโซเดียมเททระบอเรท ($Na_2B_4O_7.10H_2O$) 4.86 กรัม ละลายในน้ำร้อน 10 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายเย็น ปรับปริมาตรด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้นจนได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

3.2 สารละลายคาร์บาโซล (Carbazole solution) 0.125 % (w/v)

ชั่งสารคาร์บาโซล 125 มิลลิลิตร ละลายใน 95 % เอธานอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดสีชา และเก็บในตู้เย็น (อายุการใช้งาน 3 เดือน)

4. รีเอเจนต์สำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นของโซเดียมไฮยาลูโรเนต โดยวิธีของ Greiling (1963)

4.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) (pH6.4)

เตรียมไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) เข้มข้น 11.876 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) เข้มข้น 9.078 กรัมต่อลิตร แล้วเจือจางไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 66 มิลลิลิตรด้วยโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ในขวดวัดปริมาตร 250 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชา

4.2 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride solution) (0.15 M)

ละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.9 กรัม ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร

4.3 สารละลายกรดเปอร์คลอริก (Perchloric acid solution) (20% W/V)

เจือจางกรดเปอร์คลอริก ($HClO_4$) ปริมาตร 13 มิลลิลิตรให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 75 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชา

4.4 สารละลายโพแทสเซียมเตตระบอเรต (Potassium tetraborate solution) (0.8 M)

ละลายกรดบอริก (H_3BO_3) 24.7 กรัม และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 43.87 กรัมในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 500 มิลลิลิตร

4.5 สารละลายโพแทสเซียมไฮยาลูโรเนต (Potassium hyaluronate solution) (200 μg/ml.)

ละลายโพแทสเซียมไฮยาลูโรเนต (Potassium hyaluronate) 20 มิลลิกรัมในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer solution) 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0 ถึง 4 องศาเซลเซียส

4.6 สารละลายเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (Bacterial hyaluronidase solution) (1 mg. Protein/ml.)

ละลายสารละลายเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (Bacterial hyaluronidase) ที่สกัดจากแบคทีเรีย 7 มิลลิกรัมในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl solution) 7 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

หมายเหตุ แอคติวิตีของเอนไซม์จะสูญเสียภายใน 3 เดือนหลังจากการเตรียม

4.7 สารละลายพารา-ไดเมทิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ (ρ-dimetylaminobenzaldehyde solution)

ละลายพารา-ไดเมทิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ (ρ-dimetylaminobenzaldehyde) 10 กรัม ในสารละลายผสมของกรดน้ำส้ม (CH_3COOH) 100 มิลลิลิตร และกรดเกลือเข้มข้น (HCl) 12.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชา

หมายเหตุ ก่อนใช้เจือจาง 10 เท่าด้วยกรดน้ำส้ม(CH_3COOH) และเตรียมใหม่ ทุกๆ สัปดาห์

5. รีเอเจนต์สำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวส์ (Reducing sugar) โดยวิธีของ Bernfeld และคณะ (1955)

สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (Dinitrosalicylic acid solution)

ละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก ($C_7H_4N_2O_7$) 5 กรัม ในสารละลายโซเดียม ไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 2 โมลาร์ 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเติมน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมโซเดียมโพแทสเซียมตาเตรต 150 กรัมผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 500 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

6. รีเอเจนต์สำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) โดยวิธีของ Hanson and Phillips, 1981

6.1 สารละลายฟีนอล (5% phenol solution)

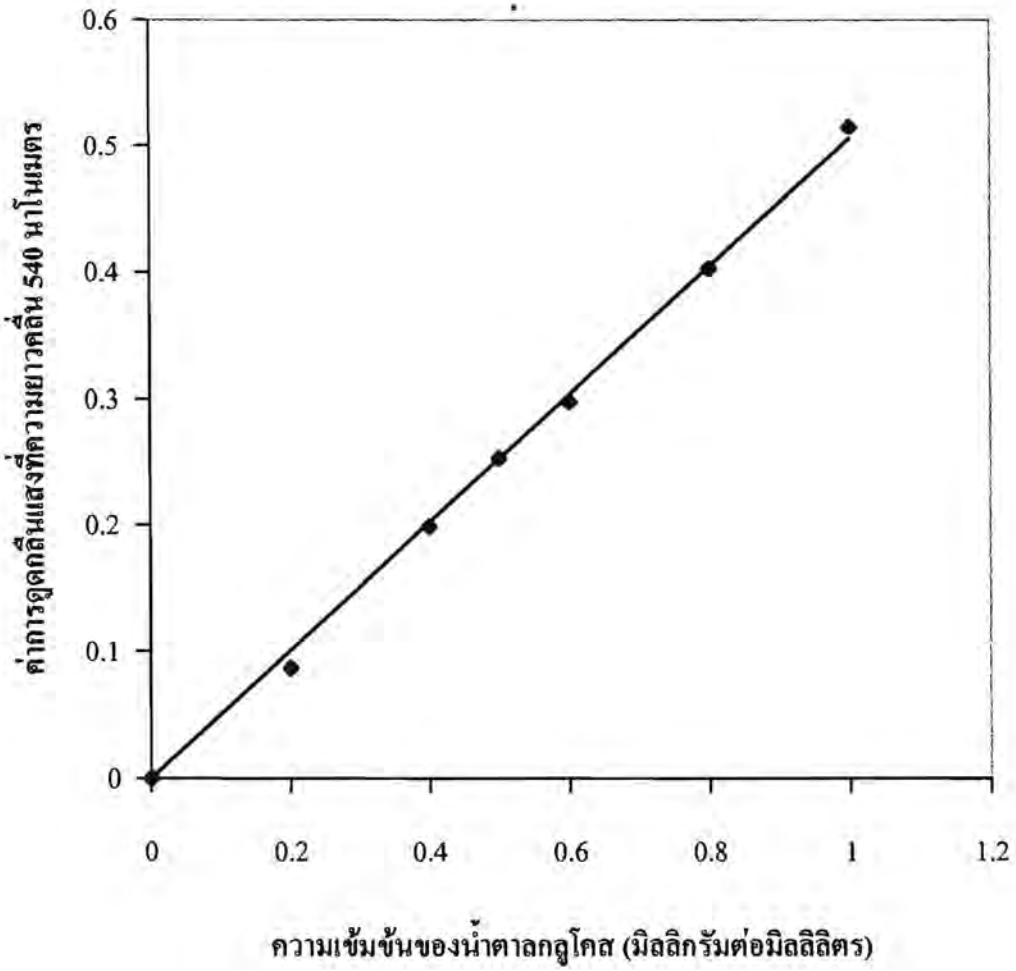
ฟีนอล (C_6H_5OH)	5.0	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	100.0	กรัม

6.2 กรดซัลฟูริกเข้มข้น (Concentrated H_2SO_4)

ภาคผนวก ค

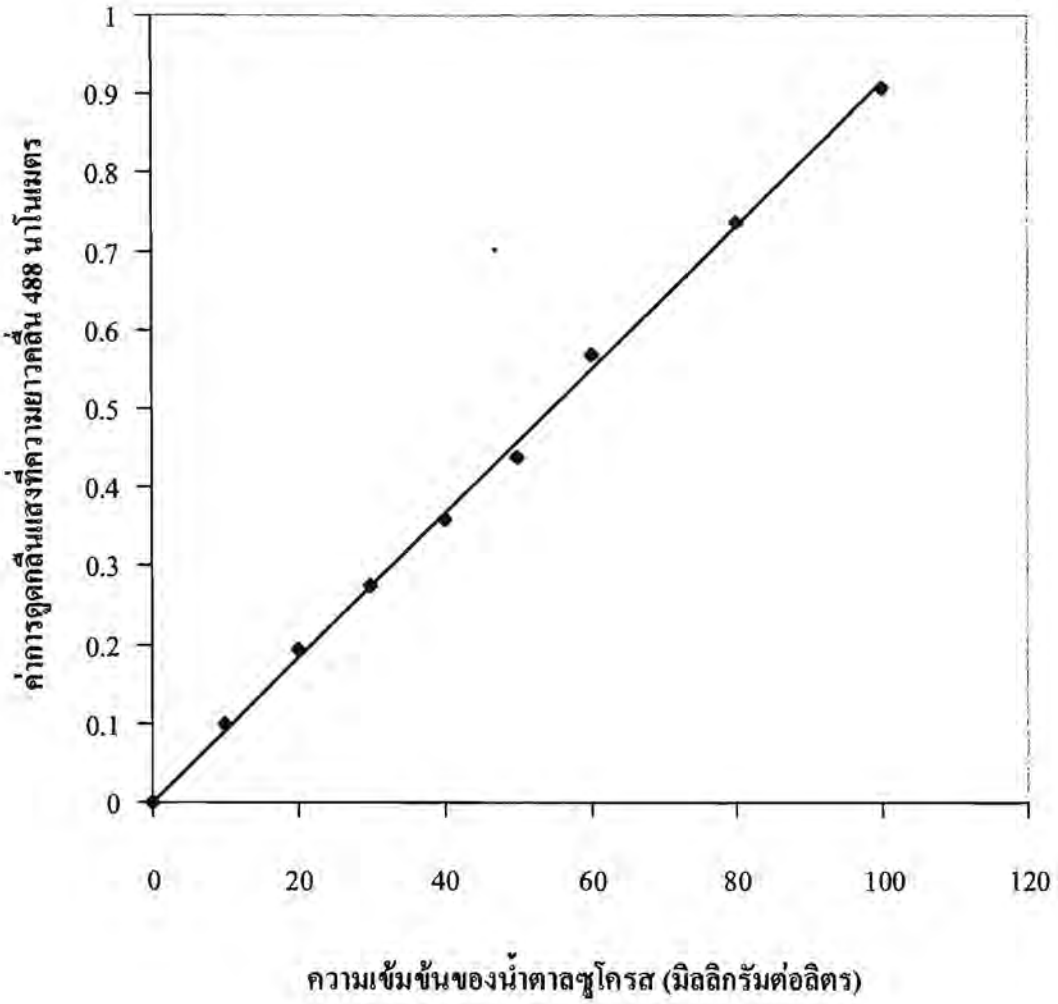
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานน้ำตาลรีดิวส์ โดยใช้กรดซาลิไซลิก

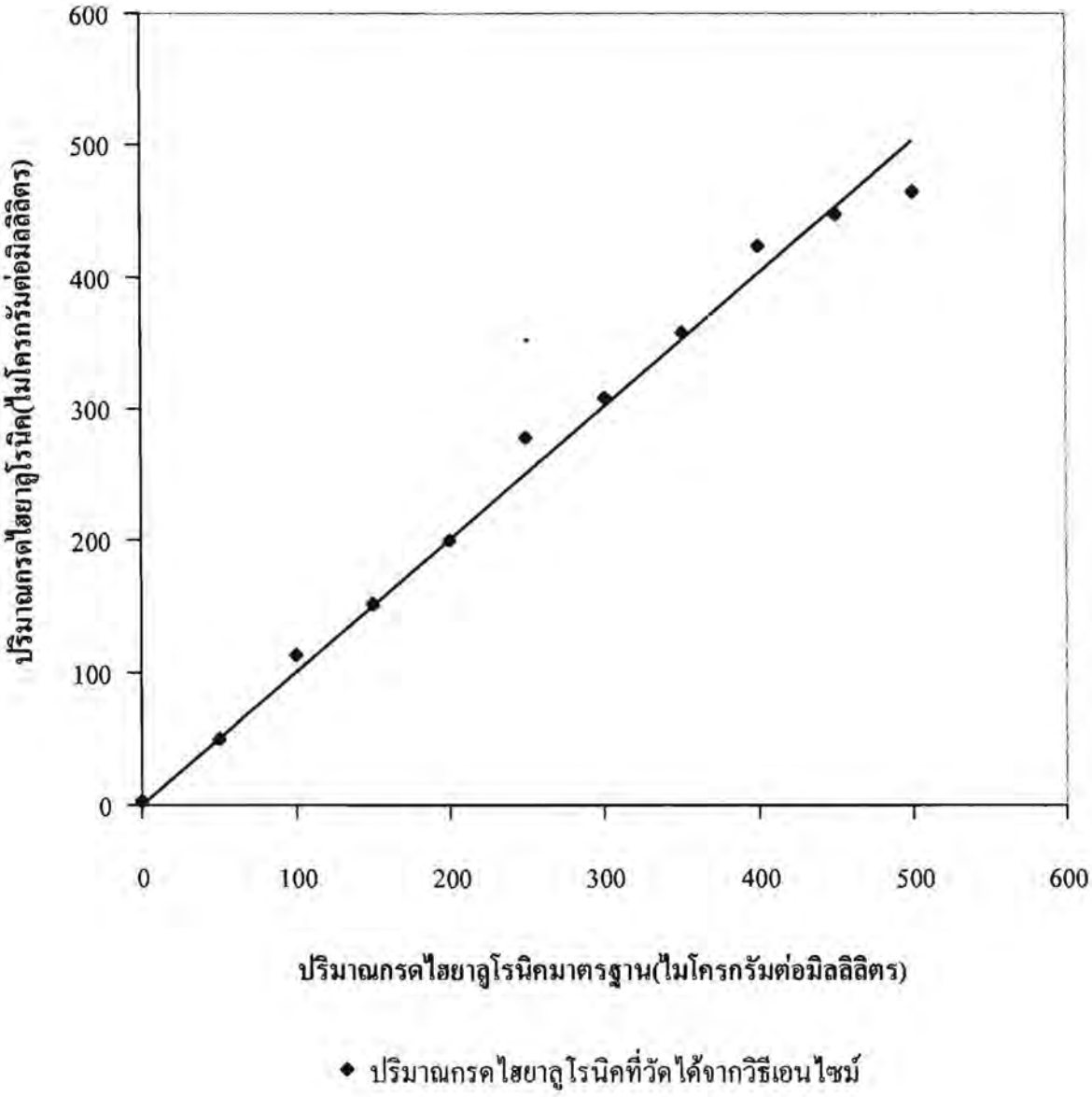


รูปที่ 37 กราฟมาตราฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร กับ น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

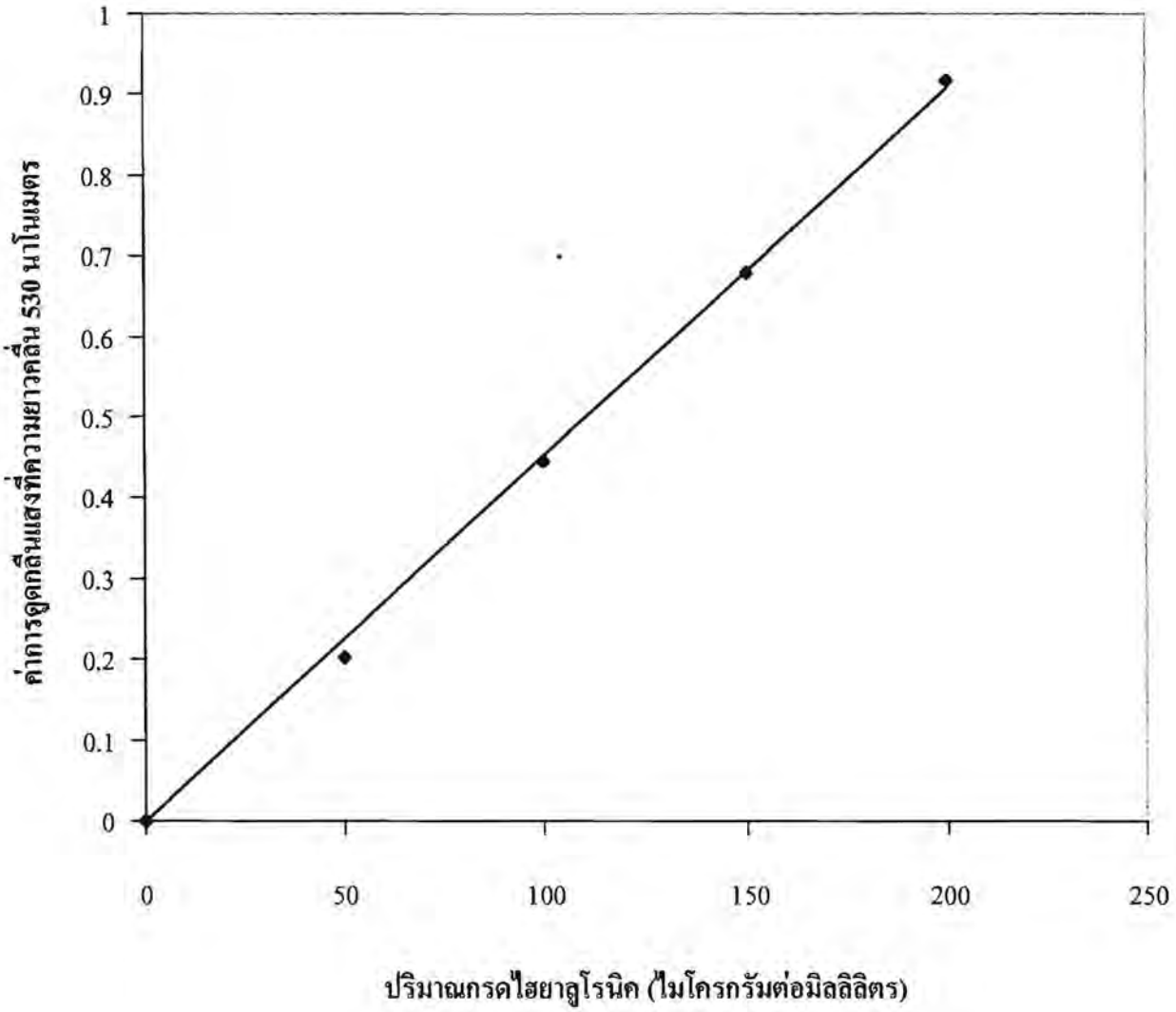
2. กราฟมาตราฐานน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้วิธีฟีนอล-ซัลฟูริก



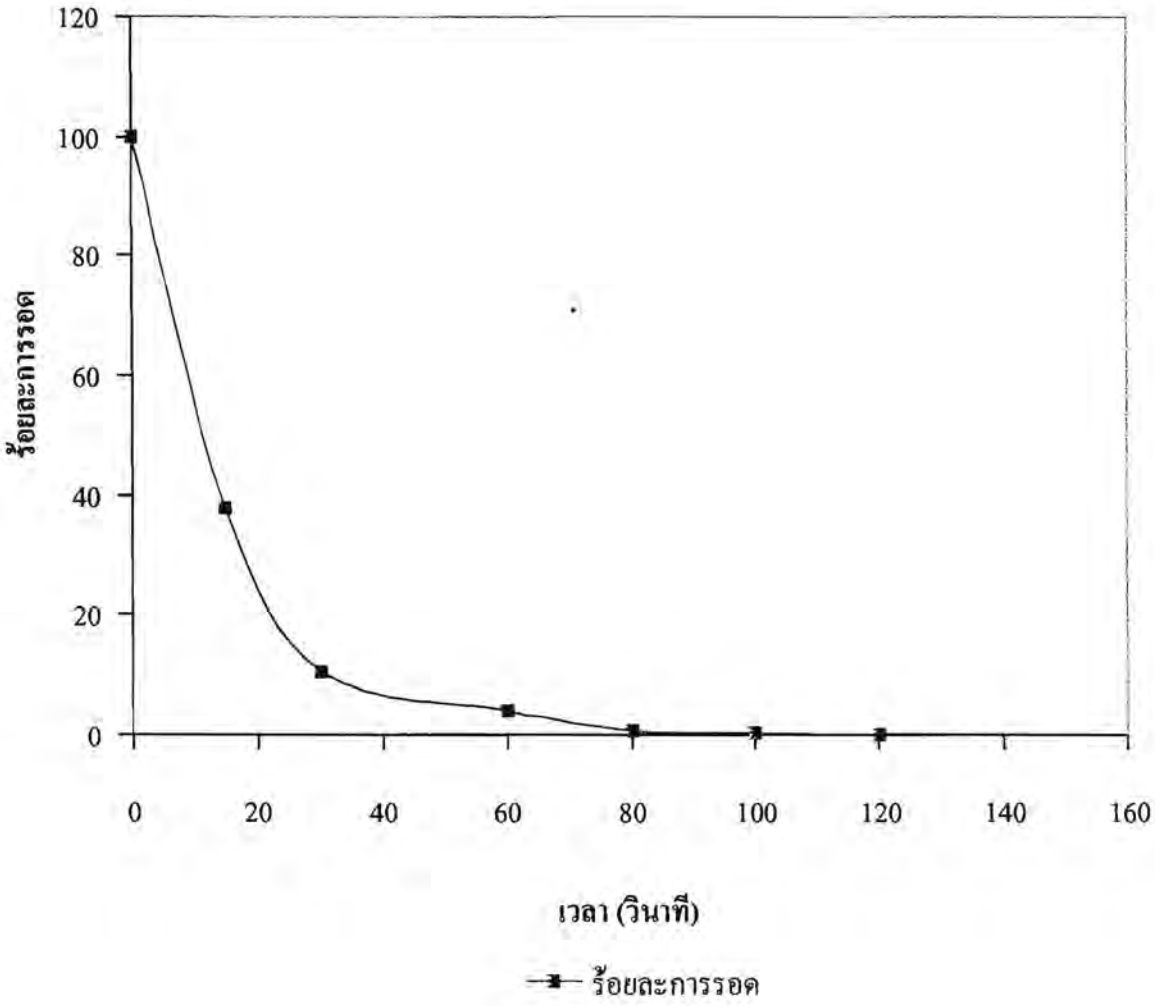
รูปที่ 38 กราฟมาตรฐานแสดงค่าระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 488 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 0-100 มิลลิกรัมต่อลิตร



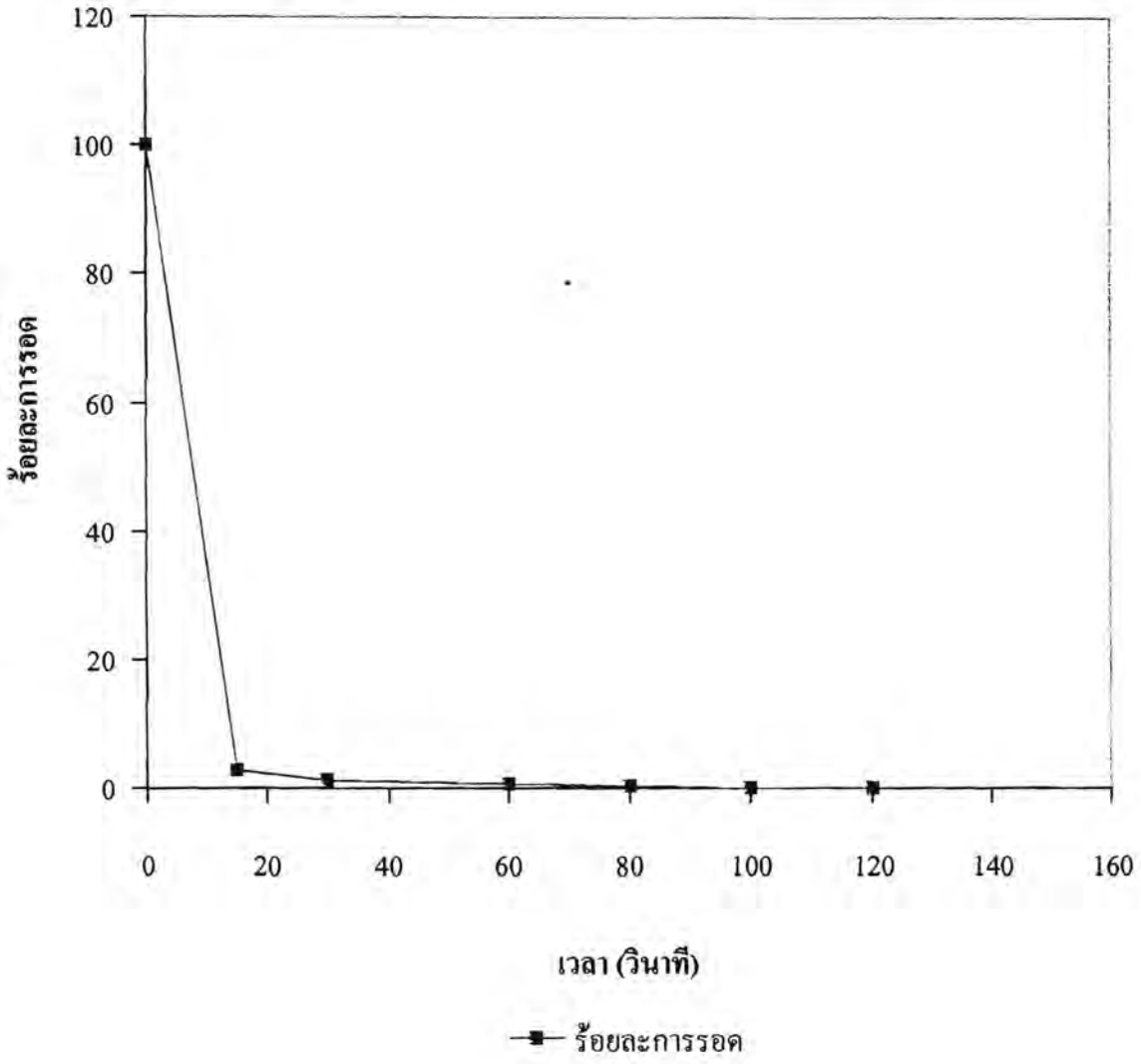
รูปที่ 39 กราฟมาตรฐานของกรดไฮยาลูโรนิค โดยแสดงค่าระหว่างปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคที่ได้จากการคำนวณเปรียบเทียบกับปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน



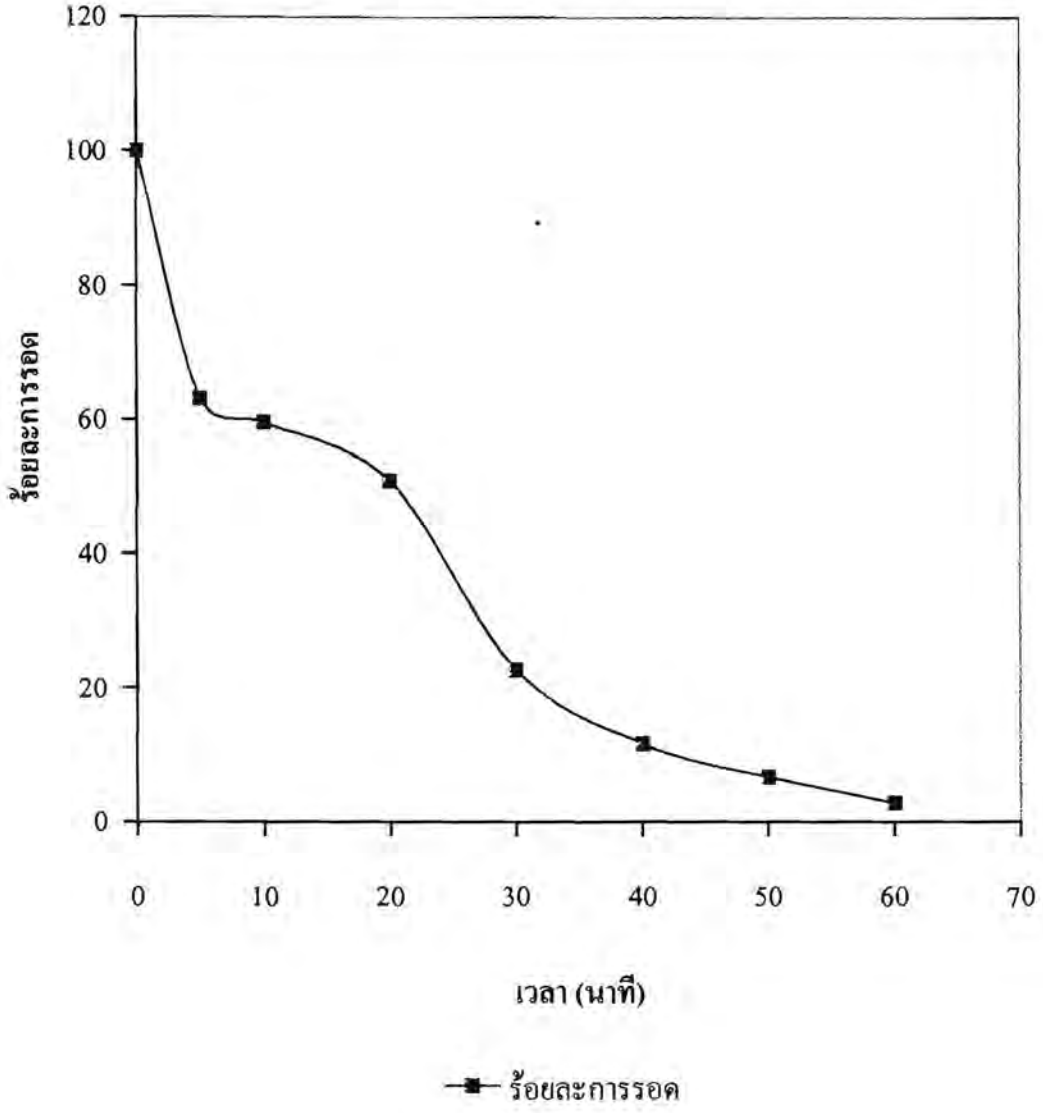
รูปที่ 40 กราฟมาตรฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของกรดไฮยาลูโรนิคบริสุทธิ์ความเข้มข้น 0 –200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



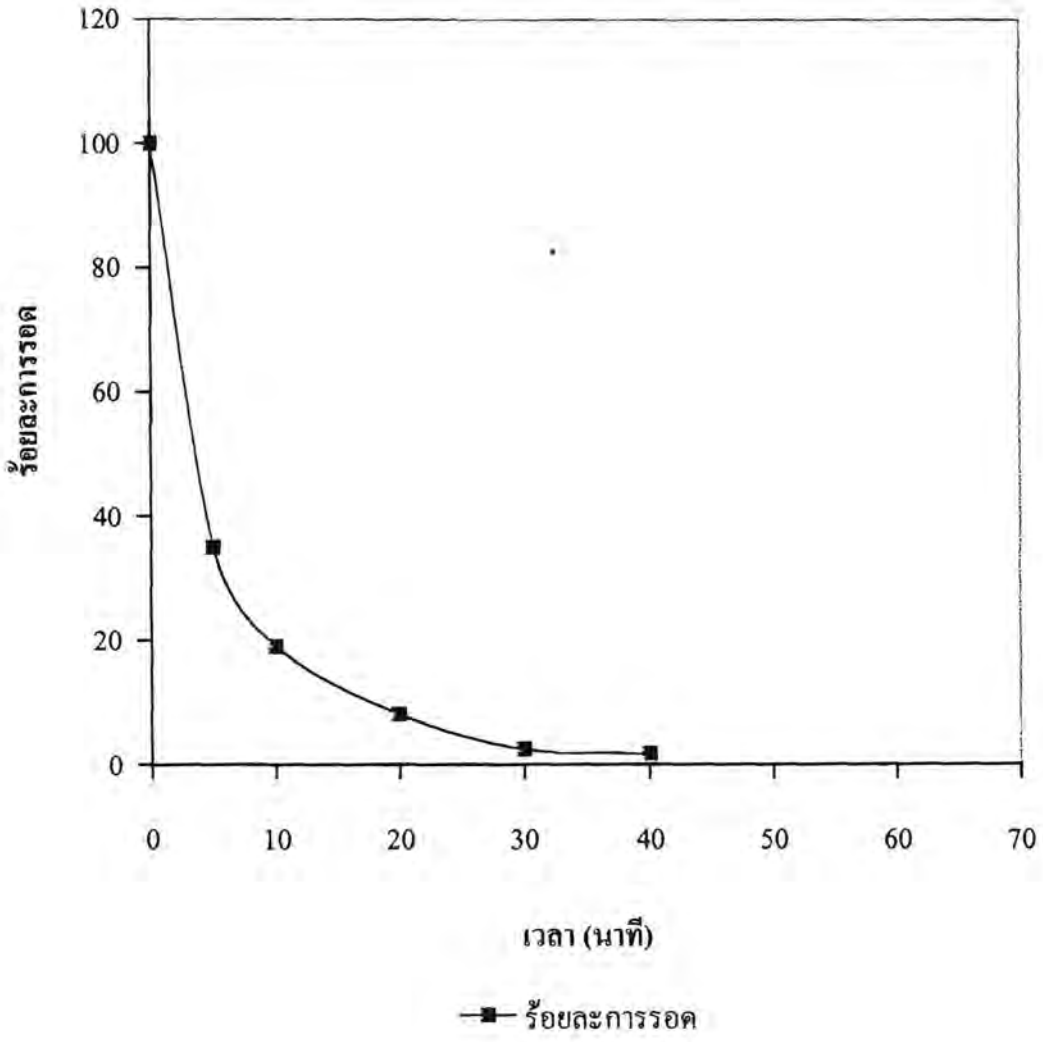
รูปที่ 41 ร้อยละการรอดของ *S. zooepidemicus* AU 21ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ที่เวลาต่างๆ



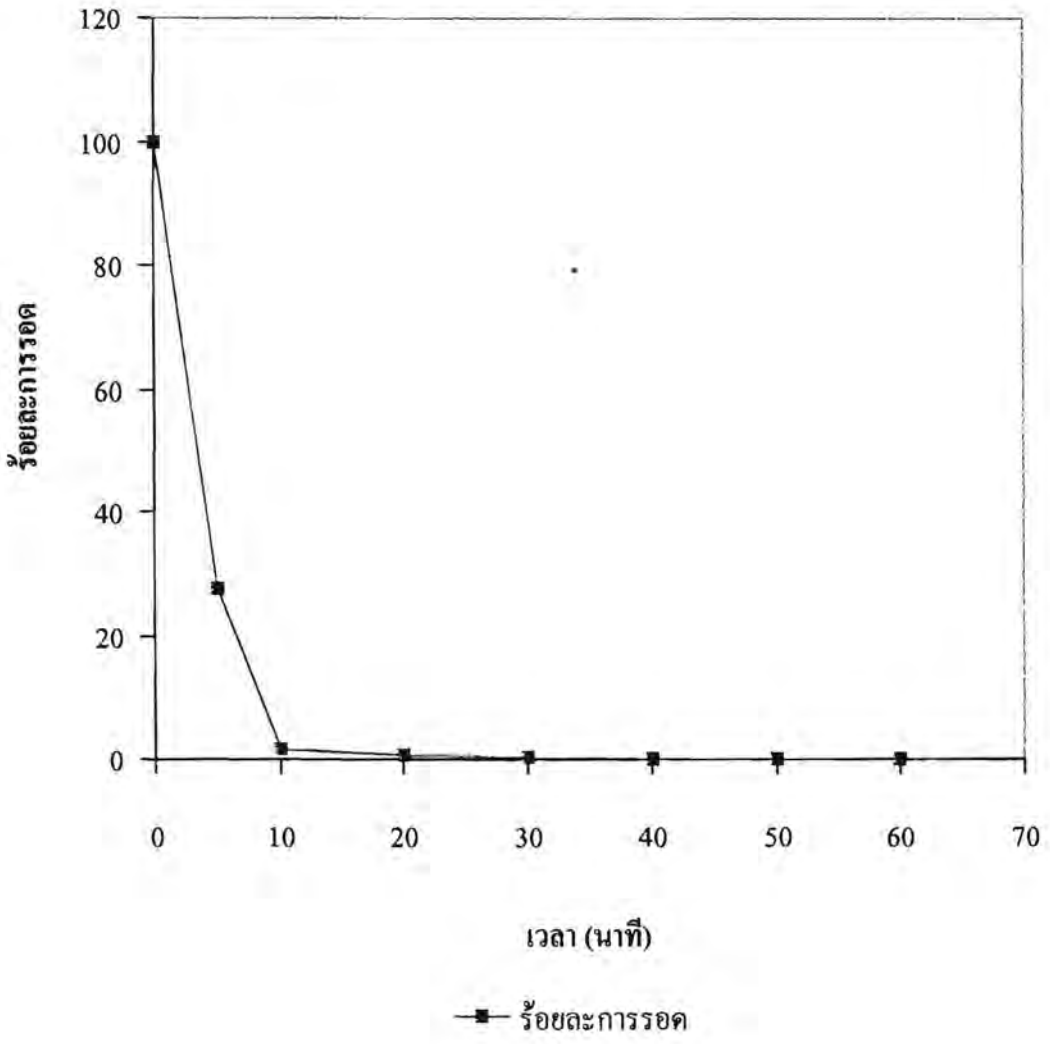
รูปที่ 42 ร้อยละการรอดของ *S. zooepidemicus* BU42 ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ที่เวลาต่างๆ



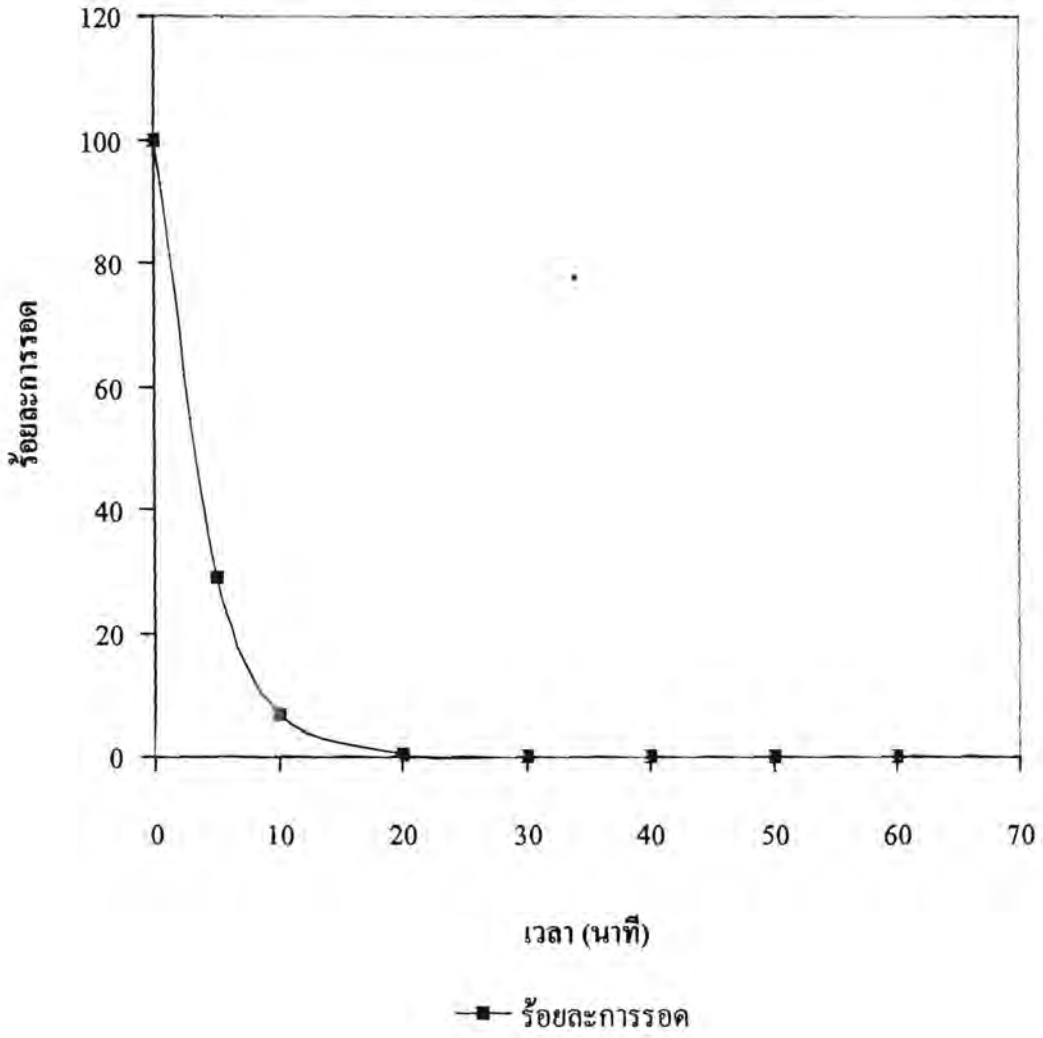
รูปที่ 43 ร้อยละการรอดของ *S. zooepidemicus* CUN 20 ที่กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลาต่างๆ



รูปที่ 44 ร้อยละการรอดของ *S. zooepidemicus* CUN 2-1 ที่กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลาต่างๆ



รูปที่ 45 ร้อยละการรอดของ *Streptococcus zooepidemicus* CUN 3-5 ที่กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลาต่างๆ



รูปที่ 46 ร้อยละการรอดของ *Streptococcus zooepidemicus* CUN4-7 ที่กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลาต่างๆ

ภาคผนวก ง

การเตรียมการและการป้องกันอันตรายจากการกลายพันธุ์

<u>แสงอัลตราไวโอเลต</u>

เป็นรังสีที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในจุลินทรีย์ อาจทำให้เกิดมะเร็งผิวหนังได้ การปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องกับแสงอัลตราไวโอเลต ควรมีการสวมแว่นป้องกัน ห้ามมองหลอด UV โดยตรง เพราะเป็นแสงที่เป็นอันตรายต่อตา ควรมีการสวมแว่นป้องกันหรือใช้แสงอัลตราไวโอเลตที่อยู่ภายในตู้เขี่ยเชื้อที่มีการจกกั้น ควรสวมถุงมือเมื่อต้องทำงานภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เนื่องจากแสงอัลตราไวโอเลตนี้ผ่านกระจกได้ไม่ดี เชื้อที่ต้องการฉายแสงเพื่อกลายพันธุ์จึงต้องเปิดฝาจานเพาะเลี้ยงเชื้อไว้

<u>สารเคมี NTG (N-methyl-N' – nitro –N – nitrosoguanidine)</u>

สาร NTG เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต และอาจเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) ด้วย ดังนั้นในการทดลองจึงต้องทำด้วยความระมัดระวัง สาร NTG เป็นสารที่อันรายต่อการสัมผัส การสูดดม การทดลองเกี่ยวกับสาร NTG ทั้งในลักษณะผลึกของแข็ง หรือสารละลาย ควรสวมถุงมือยางตลอดเวลา ควรสวมผ้าปิดปากเพื่อป้องกันละอองหรือไอระเหย ห้ามใช้ปากในการดูดปิเปตสารชนิดนี้เด็ดขาด การชั่งสาร NTG ควรทำในที่ไม่มีลมพัด ไม่ควรชั่งบนกระดาษชั่งสารเพราะอาจปลิวไปทำให้เกิดอันตรายต่อผู้ทำการทดลองและผู้ที่อยู่ในบริเวณใกล้เคียง อย่าเปิดขวดที่ใส่ NTG ทิ้งไว้ ควรใช้หลอดปลอดเชื้อที่แห้งสนิทและมีฝาปิด ชั่งน้ำหนักหลอดเปล่าก่อน แล้วจึงใช้ช้อนตักสาร NTG เติมลงในหลอด ปิดฝาแล้วชั่งน้ำหนักอีกครั้ง คำนวณน้ำหนักของสารและนำไปเตรียมเป็น stock ซึ่งควรเตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อต้องการใช้

อุปกรณ์ที่สัมผัสกับสาร NTG นำไปแช่ใน 1 N NaOH ในตู้ควัน เปิดเครื่องให้ดูดควันออกทิ้งไว้ประมาณ 24 ชั่วโมง จึงนำมาล้าง และควรสวมถุงมือยางในการล้างด้วย