บทที่ 3

ผลการทดลอง

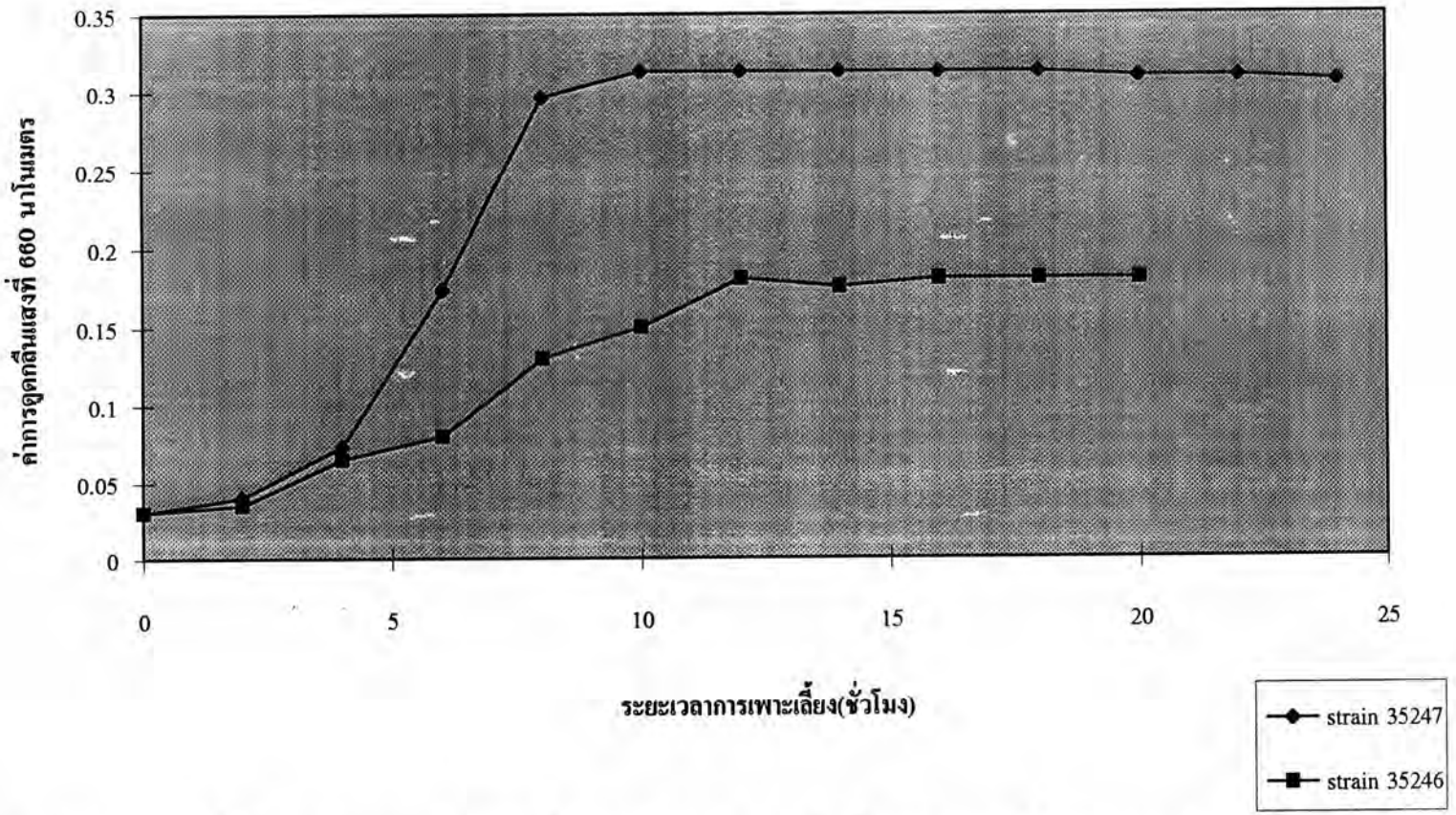
3.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 และ 35247 เพื่อใช้เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

3.1.1 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น

นำ *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ATCC 35246 และ 35247 ที่จะคัดเลือกเพื่อใช้เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ มาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเตรียมหัวเชื้อตั้งต้นสำหรับใช้ในการหมักเพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิก โดยทำตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.2.1 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรที่ระยะเวลาต่างๆ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3.1 และรูปที่ 3.1 พบว่าการเจริญของเชื้อ *S. zooepidemicus* สายพันธุ์ ATCC 35247 สูงกว่าสายพันธุ์ ATCC 35246 และระยะกึ่งกลางทวีคูณ (mid-log phase) ของเชื้อทั้งสองอยู่ระหว่างเวลา 6-8 ชั่วโมง

ตารางที่ 3.1 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *S. zooepidemicus* สายพันธุ์ ATCC 35246 กับ 35247 ในอาหารเหลว BHI

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (hr.)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร						
	สายพันธุ์ ATCC 35247				สายพันธุ์ ATCC 35246		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย
0	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.03	0.03
2	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04
4	0.07	0.07	0.08	0.07	0.06	0.07	0.07
6	0.13	0.14	0.35	0.17	0.07	0.09	0.08
8	0.31	0.23	0.33	0.30	0.10	0.16	0.13
10	0.30	0.31	0.33	0.31	0.13	0.17	0.15
12	0.30	0.31	0.33	0.31	0.18	0.18	0.18
14	0.30	0.31	0.33	0.31	0.17	0.18	0.18
16	0.30	0.31	0.33	0.31	0.18	0.18	0.18
18	0.30	0.31	0.33	0.31	0.18	0.18	0.18
20	0.30	0.31	0.32	0.31	0.18	0.18	0.18
22	0.30	0.31	0.32	0.31	0.18	0.18	0.18
24	0.30	0.31	0.32	031	0.18	0.17	0.18



รูปที่ 3.1 แสดงการเจริญของเชื้อ *S. zooepidemicus* สายพันธุ์ ATCC 35246 และสายพันธุ์ ATCC 35247 ในอาหารเหลว BHI ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.1.2 การคัดเลือกสูตรอาหารสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

สูตรอาหารสำหรับการหมักเพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิกที่มีผู้รายงานไว้มีความหลากหลาย ในงานวิจัยนี้ได้คัดเลือกสูตรอาหาร 3 ชนิดจากรายงานของ Morita and Fujii (1991), John, Goh and Oeggerli (1994) และ Bracke and Thacker (1985) (Morita and Fujii, 1991; John, Goh and Oeggerli, 1994; Bracke and Thacker, 1985) โดยกำหนดสัญลักษณ์เป็น PM1, PM2 และ PM3 ตามลำดับ สูตรอาหารทั้ง 3 ชนิดแสดงในภาคผนวก ก-2 ทดสอบการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดยเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 และ 35247 เมื่อเลี้ยงในอาหารทั้ง 3 ชนิด ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.2.2 โดยนำเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 และ 35247 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว BHI จนเซลล์อยู่ในระยะกึ่งกลางทวีคูณปริมาตร 10% เติมลงในอาหารสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกทั้ง 3 สูตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างหลังการหมักที่เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง มาวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลที่เหลือภายหลังจากการหมักตามวิธีการในข้อ 2.4 เปรียบเทียบผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากอาหารทั้ง 3 สูตร พบว่าที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง อาหารสูตร PM3 มีประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ PM1 และ PM2 รองลงมาคือ PM1 และ PM2 ตามลำดับ โดย PM3 จะให้ผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกที่ 24 ชั่วโมงเท่ากับ 155.67 และ 224.81 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับสำหรับเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 และ 35247 ส่วนที่เวลา 48 ชั่วโมงอาหารสูตร PM3 ก็ยังคงให้ผลผลิตสูงที่สุดเช่นเดียวกับที่ 24 ชั่วโมง โดยปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้เท่ากับ 162.63 และ 258.72 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับสำหรับเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 และ 35247 ดังนั้นจากข้อมูลแสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ 35247 ให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงกว่าสายพันธุ์ 35246 ในทุกๆ ช่วงเวลาของการเก็บตัวอย่าง ซึ่งผลที่ได้นี้เป็นไปในแนวทางเดียวกันในสูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองทั้ง 3 สูตร ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.2 และรูปที่ 3.2 จึงได้คัดเลือกเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นที่ใช้ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์และสูตรอาหารสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกคือสูตร PM3

ตารางที่ 3.2 เปรียบเทียบการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อ *S. zooepidemicus* สายพันธุ์ ATCC 35247 และสายพันธุ์ ATCC 35246 เมื่อเลี้ยงในอาหาร PM1, PM2 และ PM3 ที่ระยะเวลาการหมัก 0, 24 และ 48 ชั่วโมง

PM 1 medium (Morita and Fujii,1991)

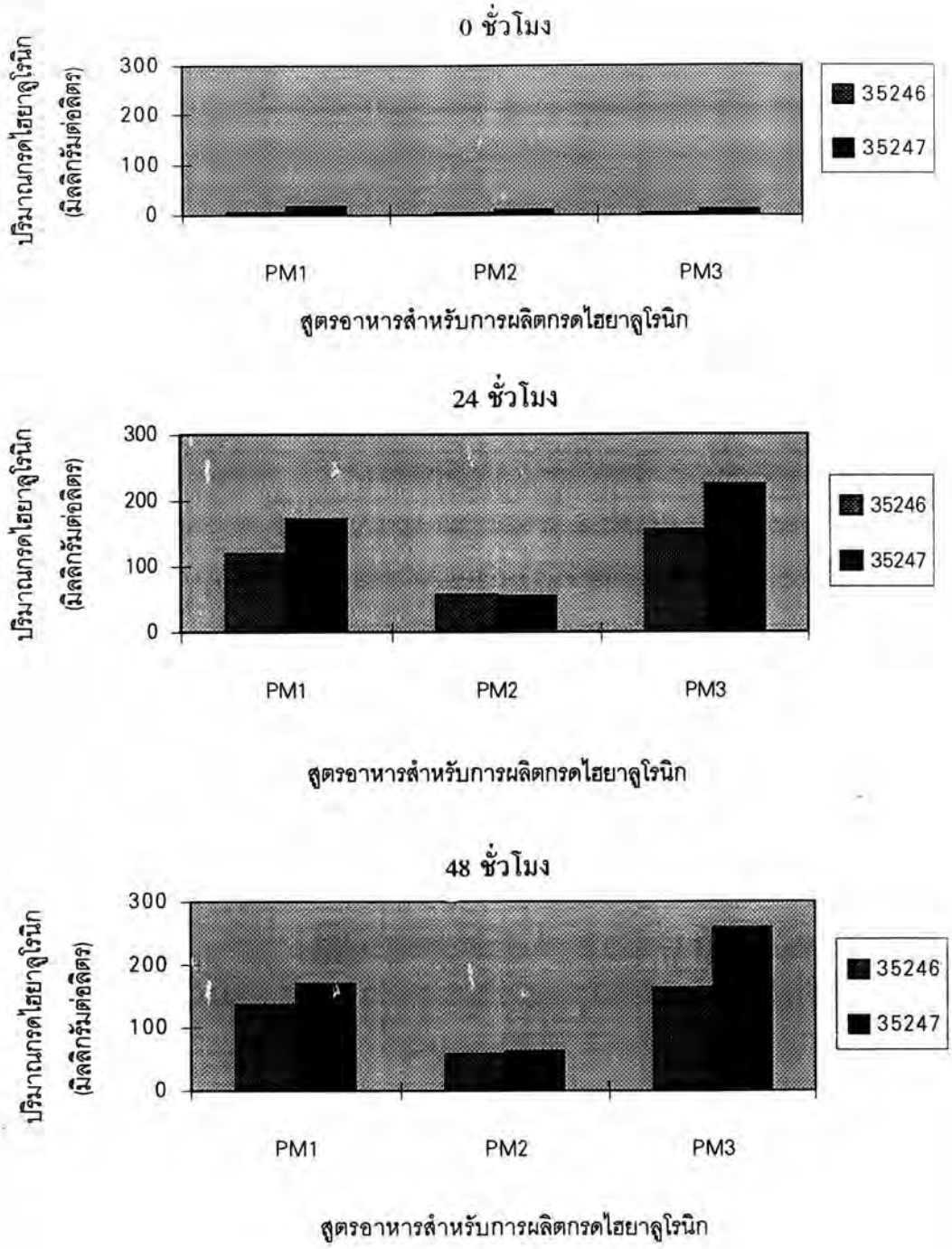
สายพันธุ์	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ HA (มิลลิกรัมต่อลิตร)
35246	0	6.5	0.11	16.93	5.65
	24	5.1	0.16	15.19	119.58
	48	5.1	0.10	15.35	136.54
35247	0	6.5	0.16	16.62	17.83
	24	5.1	0.26	15.76	171.76
	48	5.1	0.30	16.82	171.32

PM2 medium (John, Goh and Oeggerli, 1994)

สายพันธุ์	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ HA (มิลลิกรัมต่อลิตร)
35246	0	6.4	0.10	15.94	0.00
	24	5.2	0.26	16.12	56.96
	48	5.2	0.28	17.32	59.13
35247	0	6.4	0.08	15.83	10.31
	24	4.9	0.12	16.12	54.79
	48	4.9	0.30	16.67	63.49

PM3 medium (Bracke and Thacker,1985)

สายพันธุ์	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ HA (มิลลิกรัมต่อลิตร)
35246	0	6.5	0.10	15.62	4.35
	24	4.9	0.24	15.30	155.67
	48	4.9	0.54	15.90	162.63
35247	0	6.5	0.36	15.56	11.31
	24	4.7	0.57	14.36	224.80
	48	4.4	0.52	15.26	258.72



รูปที่ 3.2 แสดงปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการหมักโดยเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 และ 35247 ที่ระยะเวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง

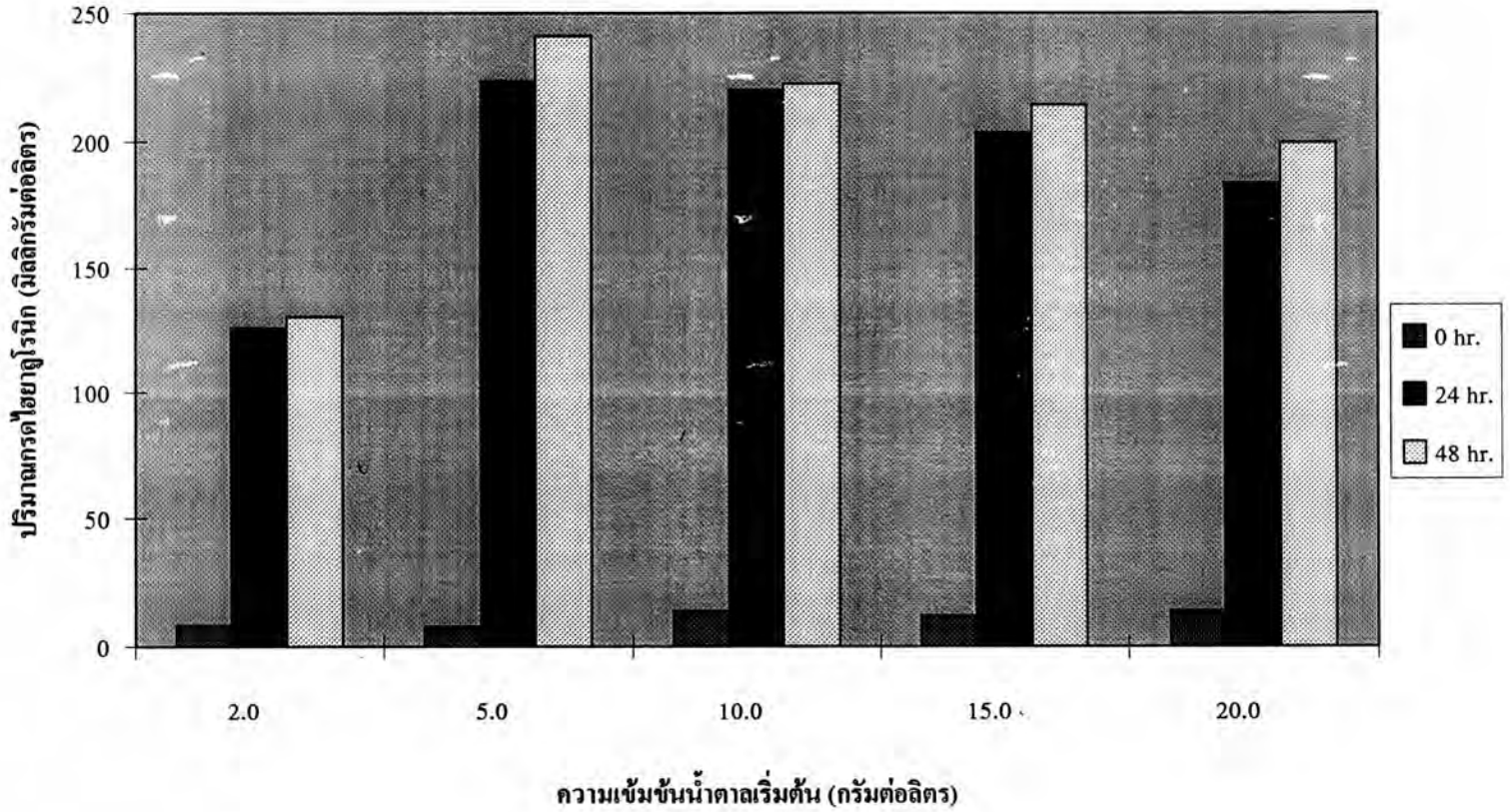
3.1.3 ผลของความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

จากผลการทดลองในข้อ 3.1.2 ในตารางที่ 3.2 สูตรอาหาร PM3 (Bracke and Thacker, 1985) ที่ได้คัดเลือกสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกนั้น เมื่อพิจารณาแหล่งคาร์บอน คือ กลูโคส พบว่าภายหลังการหมักเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมงน้ำตาลกลูโคสที่เหลือภายหลังการหมักมีปริมาณสูง กล่าวคือ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 ใช้น้ำตาลเพียงประมาณ 3 กรัมจากน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัม เพื่อเป็นการลดต้นทุนเรื่องอาหารสำหรับการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย จึงได้แปรผันปริมาณแหล่งคาร์บอนให้ลดลง โดยในครั้งแรกแปรผันช่วงระหว่าง 2-20 กรัมต่อลิตร การทดลองเป็นไปตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.2.1-2.3.2.2 แต่มีการแปรผันปริมาณแหล่งคาร์บอน พบว่าที่ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 5 กรัมต่อลิตรให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่สูงที่สุดแต่ก็ยังมีน้ำตาลกลูโคสคงเหลือภายหลังการหมักอยู่ 1.62 กรัม (ผลแสดงดังตารางที่ 3.3 และรูปที่ 3.3) จากผลที่ได้พบว่าหากความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นสูงจะมีผลลดการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก และเมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 2 กรัมต่อลิตรจะพบว่าปริมาณเซลล์มีการเพิ่มจำนวนต่ำกว่าที่น้ำตาลเริ่มต้น 5 กรัมต่อลิตร ซึ่งอาจเกิดเนื่องมาจากแหล่งคาร์บอนไม่เพียงพอต่อการเจริญและส่งผลทำให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้ต่ำลงด้วย เพื่อยืนยันผลการทดลองจึงทำการทดลองซ้ำโดยแปรผันความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นตั้งแต่ 2-5 กรัมต่อลิตร (ผลแสดงดังตารางที่ 3.4 และรูปที่ 3.4) พบว่าที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 3 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นที่ 2, 4 และ 5 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสที่ 3 กรัมต่อลิตรเพื่อใช้ในอาหารสูตรสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก เนื่องจากให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงและมีน้ำตาลเหลืออยู่ภายหลังการหมักน้อย

ตารางที่ 3.3 เปรียบเทียบการเจริญและปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตโดยเชื้อ *S. zooepidemicus* สายพันธุ์ ATCC 35247 เมื่อหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 2-20 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 0, 24 และ 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)
2.0	0	6.8	0.22	1.90	8.51
	24	6.2	0.34	0.36	125.70
	48	6.2	0.35	0.31	130.20
5.0	0	6.8	0.26	4.67	7.95
	24	4.7	0.39	1.73	223.97
	48	4.7	0.35	1.62	241.13
10.0	0	6.7	0.22	9.66	14.09
	24	4.6	0.39	8.58	220.06
	48	4.6	0.44	8.35	222.57
15.0	0	6.7	0.20	17.29	12.28
	24	4.6	0.39	14.04	203.31
	48	4.6	0.38	13.83	214.20
20.0	0	6.6	0.22	20.67	14.09
	24	4.6	0.38	19.51	183.78
	48	4.6	0.33	18.91	199.69

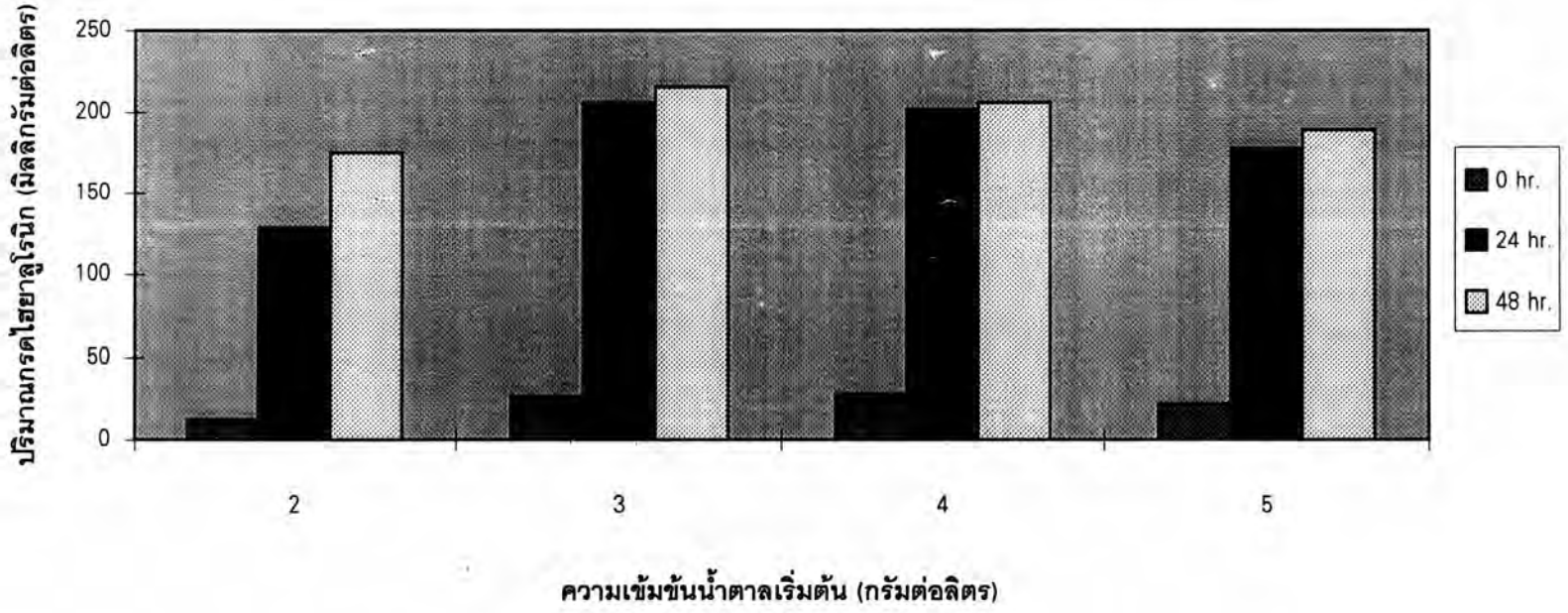
รูปที่ 3.3 แสดงผลของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 2-20 กรัมต่อลิตรที่มีต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกจากเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 โดยใช้อาหารเหลว PM3 ที่ระยะเวลาในการหมัก 0, 24 และ 48 ชั่วโมง



ตารางที่ 3.4 เปรียบเทียบการเจริญและปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตโดยเชื้อ *S. zooepidemicus* สายพันธุ์ ATCC 35247 เมื่อหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 2-5 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 0, 24 และ 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)
2.0	0	7.0	0.18	2.53	12.38
	24	6.4	0.33	0.61	128.69
	48	5.6	0.35	0.69	174.81
3.0	0	7.0	0.14	3.43	26.89
	24	5.7	0.41	0.73	205.52
	48	5.7	0.37	0.72	215.21
4.0	0	6.9	0.17	4.56	28.29
	24	4.8	0.39	1.10	201.88
	48	4.9	0.38	1.31	205.52
5.0	0	6.9	0.17	5.46	22.15
	24	4.9	0.37	2.23	177.60
	48	4.9	0.34	2.37	188.77

รูปที่3.4 แสดงปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้เมื่อเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* สายพันธุ์ ATCC 35247 ในอาหารที่มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 2-5 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 0, 24 และ 48 ชั่วโมง



3.1.4 ผลของสารสกัดจากยีสต์ต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

จากรายงานของ Nimrod และคณะ (1988) ซึ่งสูตรอาหารที่ใช้ใกล้เคียงกับสูตร PM3 แต่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์เพิ่มเติมลงไปเป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร แล้วสามารถให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก 2-6 กรัมต่อลิตรเมื่อหมักในระดับถังหมัก ดังนั้นการทดลองนี้เพื่อจะศึกษาผลของสารสกัดจากยีสต์ที่มีในอาหารสูตร PM3 ต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก วิธีการทดลองทำตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.2.1-2.3.2.2 โดยแปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์ตั้งแต่ 0-20 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองที่ได้ (แสดงในตารางที่ 3.5 และรูปที่ 3.5) พบว่าการเติมสารสกัดจากยีสต์มีผลต่อการเจริญของเซลล์โดยหากเพิ่มปริมาณสารสกัดจากยีสต์จะมีผลเพิ่มปริมาณเซลล์ และที่ระดับการเติมสารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม (ที่ไม่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ให้สูงขึ้นประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกจะลดลง ดังนั้นในสูตรอาหารสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกจึงไม่จำเป็นต้องเติมสารสกัดจากยีสต์ซึ่งจะเป็นการลดต้นทุนและช่วยลดการปนเปื้อนของโปรตีนในผลิตภัณฑ์

3.1.5 ผลของชนิดของน้ำตาลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

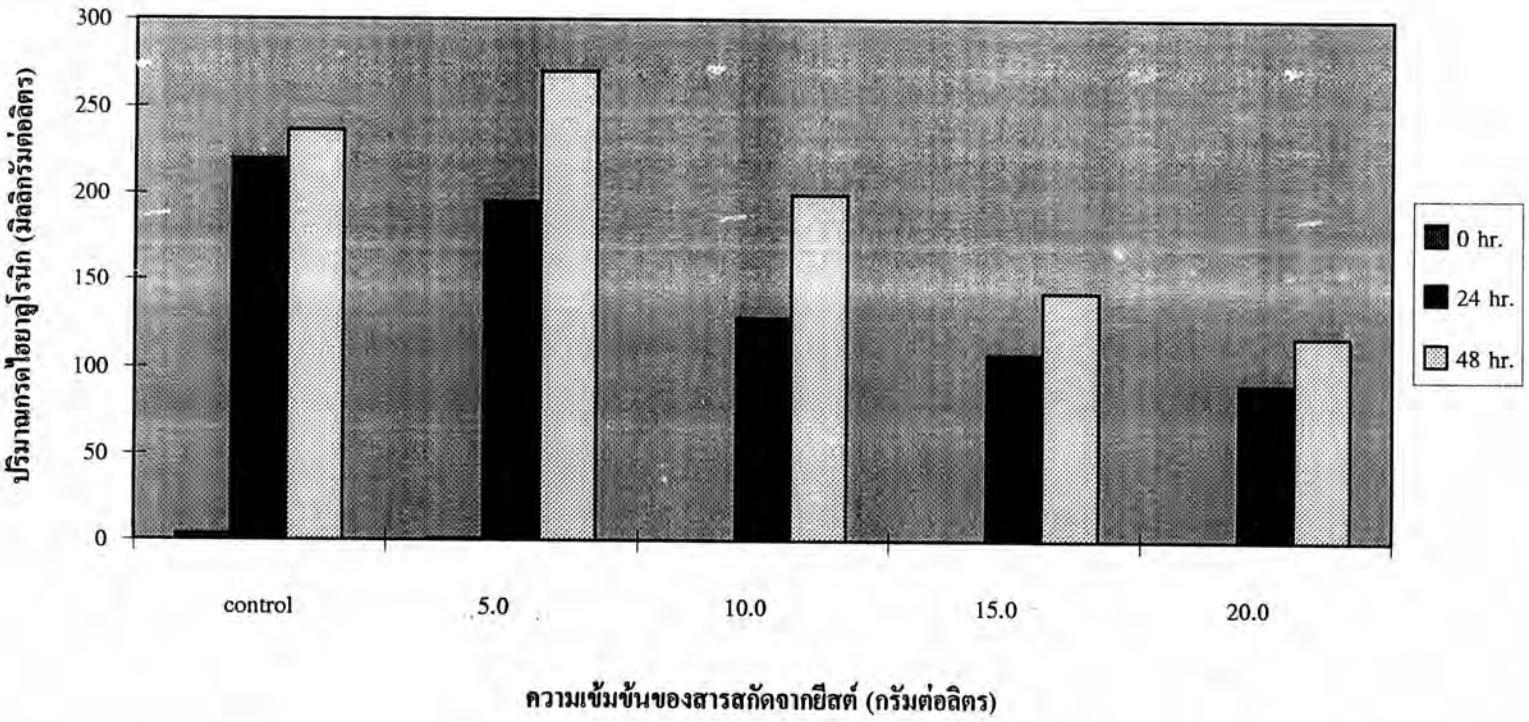
จากรายงานของ Akasaka, Komasaki และ Arai (1989) ได้กล่าวถึงชนิดของแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกว่าสามารถใช้น้ำตาลได้หลายชนิด เช่น กลูโคส ซูโครส ฟรักโตส และกาแลกโตส แต่ที่นิยมใช้กันมากคือ กลูโคส ความสามารถในการใช้น้ำตาลจะขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้ในการหมัก ดังนั้นจึงได้ทดลองหมักโดยใช้น้ำตาล 3 ชนิดคือ กลูโคส ซูโครส และ ฟรักโตสที่ระดับความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 3 กรัมต่อลิตร (ผลแสดงดังตารางที่ 3.6 และรูปที่ 3.6) พบว่า น้ำตาลที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกด้วยเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 คือน้ำตาลซูโครส โดยให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสถึง 69.9% ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง และ 91.4% ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาลฟรักโตส พบว่าการใช้ซูโครสให้ผลดีกว่าการใช้ฟรักโตสถึง 87.9% ที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง และ 100% ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง ส่วนเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการใช้กลูโคสกับการใช้ฟรักโตส พบว่า น้ำตาลทั้งสองชนิดให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงได้คัดเลือกน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการหมักเพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิก โดยการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำตาลซูโครสนั้นทำตามการทดลองเช่นเดียวกับการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำตาลกลูโคส (ผลแสดงในตารางที่ 3.7 และรูปที่ 3.7) ซึ่งผลที่ได้เป็นไปในแนวเดียวกัน กล่าวคือ ที่ระดับความเข้มข้นน้ำตาล

เริ่มต้นสูงขึ้นปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จะลดลง ดังนั้นจึงได้คัดเลือกน้ำตาลซูโครสที่ 3 กรัมต่อลิตรเพื่อใช้ในการเตรียมอาหารสูตรสำหรับการผลิต

ตารางที่ 3.5 เปรียบเทียบการเจริญและปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตโดยเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 เมื่อหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ต่างกัน ที่ระยะเวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ (กรัมต่อลิตร)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)
0	0	6.9	0.09	3.29	3.71
	24	6.0	0.42	0.78	219.75
	48	5.9	0.33	0.68	236.20
5	0	6.9	0.09	3.35	1.07
	24	5.8	0.62	0.83	195.39
	48	5.9	0.59	0.78	269.97
10	0	6.9	0.09	3.34	0.00
	24	6.0	0.67	1.01	128.05
	48	6.1	0.61	0.91	199.57
15	0	6.8	0.10	3.43	0.00
	24	6.1	0.72	1.08	107.67
	48	6.2	0.66	1.03	142.53
20	0	6.8	0.10	3.44	0.00
	24	6.2	0.81	1.16	90.33
	48	6.3	0.72	1.10	117.53

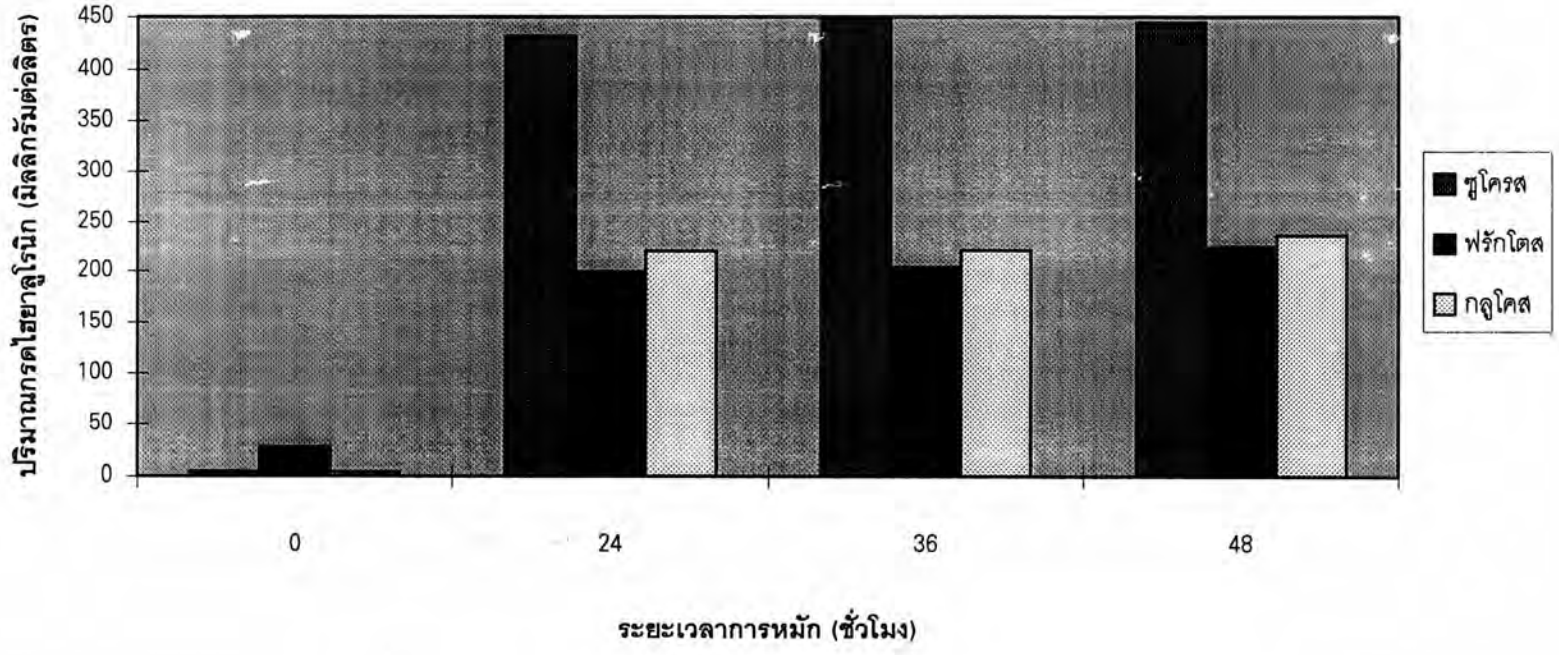
รูปที่ 3.5 แสดงปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้เมื่อเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 ในอาหารที่มีความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ ที่ระยะเวลาในการหมัก 0, 24 และ 48



ตารางที่ 3.6 เปรียบเทียบการเจริญและปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตโดยเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 เมื่อหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆกันความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 0, 24 และ48 ชั่วโมง

ชนิดน้ำตาล	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)
ซูโครส	0	6.5	0.10	3.30	4.15
	24	5.5	0.38	0.78	431.86
	36	5.1	0.41	0.62	448.52
	48	5.1	0.41	0.63	444.14
ฟรุกโตส	0	6.5	0.13	3.23	27.15
	24	5.5	0.43	1.00	198.69
	36	5.5	0.43	0.89	203.29
	48	5.5	0.40	0.87	224.57
กลูโคส	0	6.9	0.09	3.29	3.71
	24	6.0	0.42	0.78	219.75
	36	6.0	0.42	0.75	220.54
	48	5.9	0.33	0.68	236.20

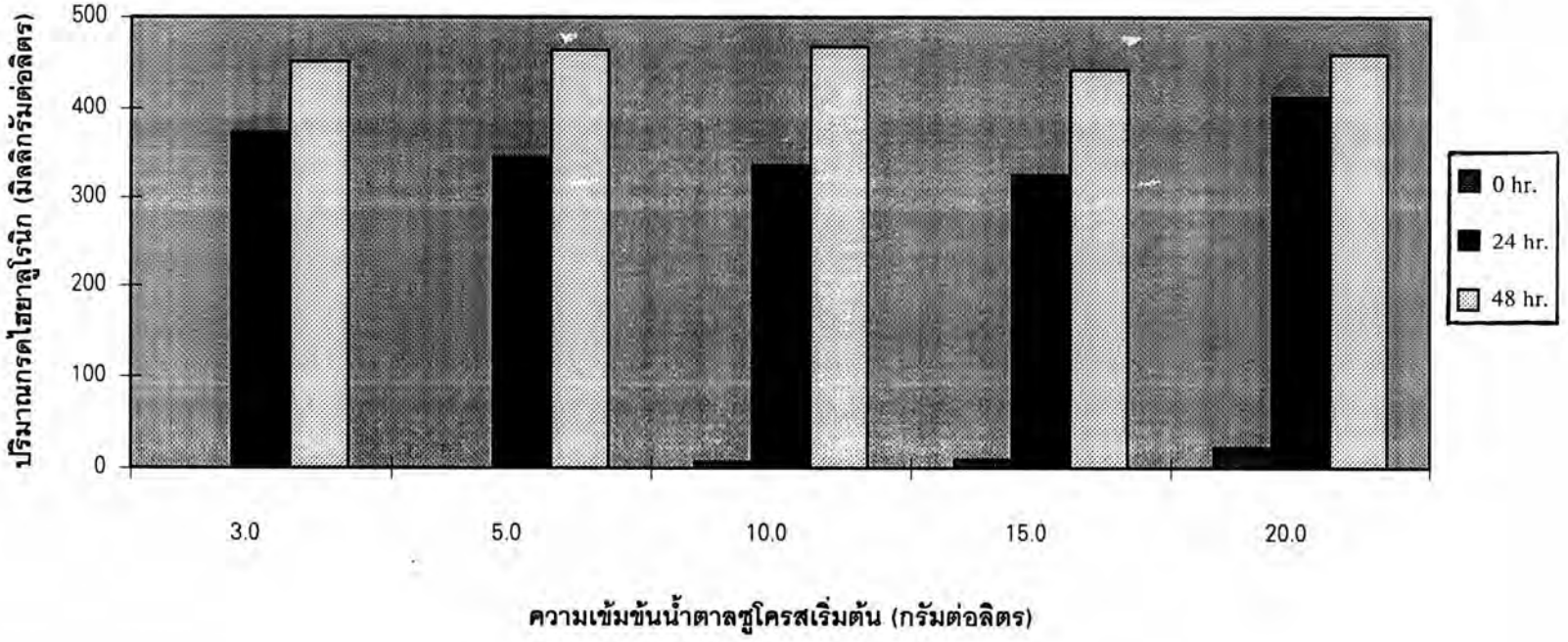
รูปที่ 3.6 แสดงปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 ในอาหารที่มีน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ระยะเวลาในการหมัก 0, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง



ตารางที่ 3.7 เปรียบเทียบการเจริญและปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตโดยเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 เมื่อหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นต่างกัน ที่ระยะเวลาการหมัก 0, 24 และ 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)
3	0	6.9	0.09	2.28	0.00
	24	5.2	0.42	0.66	373.29
	48	5.1	0.44	0.46	452.03
5	0	6.9	0.08	3.65	0.00
	24	5.0	0.43	0.82	345.43
	48	4.9	0.45	1.04	465.20
10	0	6.9	0.10	7.32	6.34
	24	5.0	0.41	4.57	335.34
	48	4.9	0.41	5.29	468.82
15	0	6.9	0.10	10.83	8.97
	24	4.95	0.42	8.399	324.59
	48	4.9	0.42	10.77	442.60
20	0	6.9	0.12	14.29	21.67
	24	5.0	0.39	12.13	412.10
	48	5.0	0.39	14.42	459.71

รูปที่ 3.7 แสดงปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 ในอาหารที่มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสต่าง ๆกัน ที่ระยะเวลาการหมัก 0, 24 และ 48 ชั่วโมง



3.1.6 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นอาหารในการเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น

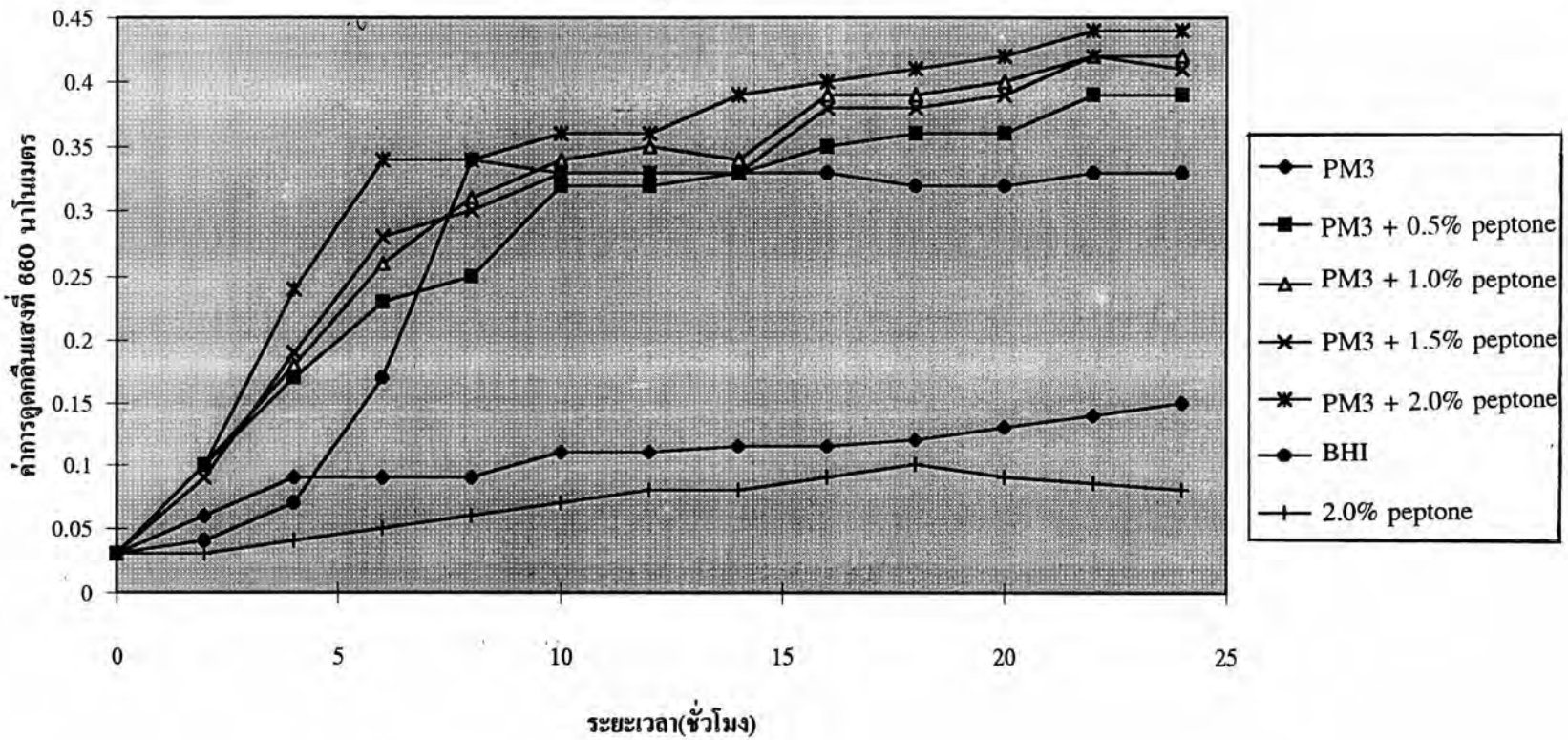
ในการคัดเลือกเชื้อขั้นทุติยภูมินั้น หากว่ามีปริมาณเชื้อที่คัดเลือกได้จากขั้นปฐมภูมิมาก จะทำให้เกิดปัญหาในเรื่องต้นทุนในการเตรียมหัวเชื้อตั้งต้นเนื่องจากอาหารเหลว BHI ที่ใช้เป็นอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อตั้งต้นมีราคาแพง ดังนั้นจึงได้ทดลองนำอาหารสูตร PM3 และอาหารเหลว tryptic soy broth ที่มีราคาถูกกว่ามาใช้ในการเตรียมหัวเชื้อตั้งต้นแทน เมื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบหลักในอาหารสูตรสำหรับการผลิตและอาหารเหลว TSB(ภาคผนวก ก-3) กับอาหารเหลว BHI (ภาคผนวก ก-1) พบว่ามีความแตกต่างกันมากในแหล่งไนโตรเจนจึงได้ปรับปรุงสูตรอาหาร PM3 โดยการเติมเปปโตนเพื่อเพิ่มไนโตรเจน (ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.8 และ รูปที่ 3.8) พบว่ามีความเป็นไปได้ในการใช้อาหารสูตร PM3 ที่มีการเติมเปปโตนเป็นอาหารสำหรับการเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น โดยความเข้มข้นของเปปโตนที่ทำให้เซลล์มีการเจริญมากที่สุดภายหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง คือ 2.0% เปปโตน แต่เมื่อนำไปใช้เป็นอาหารในการเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น พบว่า ถึงแม้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นในการหมักในหัวเชื้อตั้งต้นที่เตรียมจากอาหารสูตร PM3 จะมีมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเหลว BHI แต่เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญภายหลังการถ่ายเชื้อสู่อาหารสูตร PM3 มีอัตราการเจริญต่ำกว่าเมื่อใช้อาหารเหลว BHI มาก ซึ่งปริมาณเซลล์ที่ต่างกันมากนี้จะส่งผลถึงปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกภายหลังการหมักด้วย สำหรับสาเหตุของการเจริญต่ำนั้นอาจเนื่องมาจากยังมีปัจจัยอื่นๆอีกใน BHI ที่มีต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ (ผลแสดงในตารางที่ 3.9 และรูปที่ 3.9) ส่วนการเตรียมหัวเชื้อตั้งต้นจากอาหารเหลว TSB (ผลแสดงในตารางที่ 3.10 และรูปที่ 3.10) พบว่าให้ผลเช่นเดียวกับการนำอาหารสูตร PM3 ไปเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น คือ แม้ว่าการเจริญของเซลล์มีสูงกว่าในอาหาร BHI แต่เมื่อนำไปทดสอบโดยการเตรียมหัวเชื้อตั้งต้นสำหรับถ่ายสู่อาหารสูตร PM3 อาหารเหลว BHI จะมีการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่ดีกว่าและปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้สูงกว่าเมื่อใช้อาหารเหลว TSB (ผลแสดงในตารางที่ 3.11 รูปที่ 3.11) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องใช้อาหารเหลว BHI ในการเตรียมหัวเชื้อตั้งต้นต่อไปเนื่องจากยังไม่สามารถหาอาหารอื่นที่มีราคาถูกกว่ามาใช้ทดแทนได้

ตารางที่ 3.8 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 ในอาหาร BHI และอาหารสูตรสำหรับการผลิต (production medium, PM3) ที่มีความเข้มข้นของเปปโตนในระดับต่างๆ

	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร						
เวลา (hr.)	BHI	2.0% peptone	PM3	PM3 + 0.5% peptone	PM3 +1.0% peptone	PM3 +1.5% peptone	PM3 +2.0% peptone
0	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
2	0.04	0.03	0.06	0.10	0.10	0.09	0.10
4	0.07	0.04	0.09	0.17	0.18	0.19	0.24
6	0.17	0.05	0.09	0.23	0.26	0.28	0.34
8	0.34	0.06	0.09	0.25	0.31	0.30	0.34
10	0.33	0.07	0.11	0.32	0.34	0.33	0.36
12	0.33	0.08	0.11	0.32	0.35	0.33	0.36
14	0.33	0.08	0.12	0.33	0.34	0.33	0.39
16	0.33	0.09	0.12	0.35	0.39	0.38	0.40
18	0.32	0.10	0.12	0.36	0.39	0.38	0.41
20	0.32	0.09	0.13	0.36	0.40	0.39	0.42
22	0.33	0.09	0.14	0.37	0.42	0.42	0.44
24	0.33	0.08	0.15	0.39	0.42	0.41	0.45

* PM3 = production medium

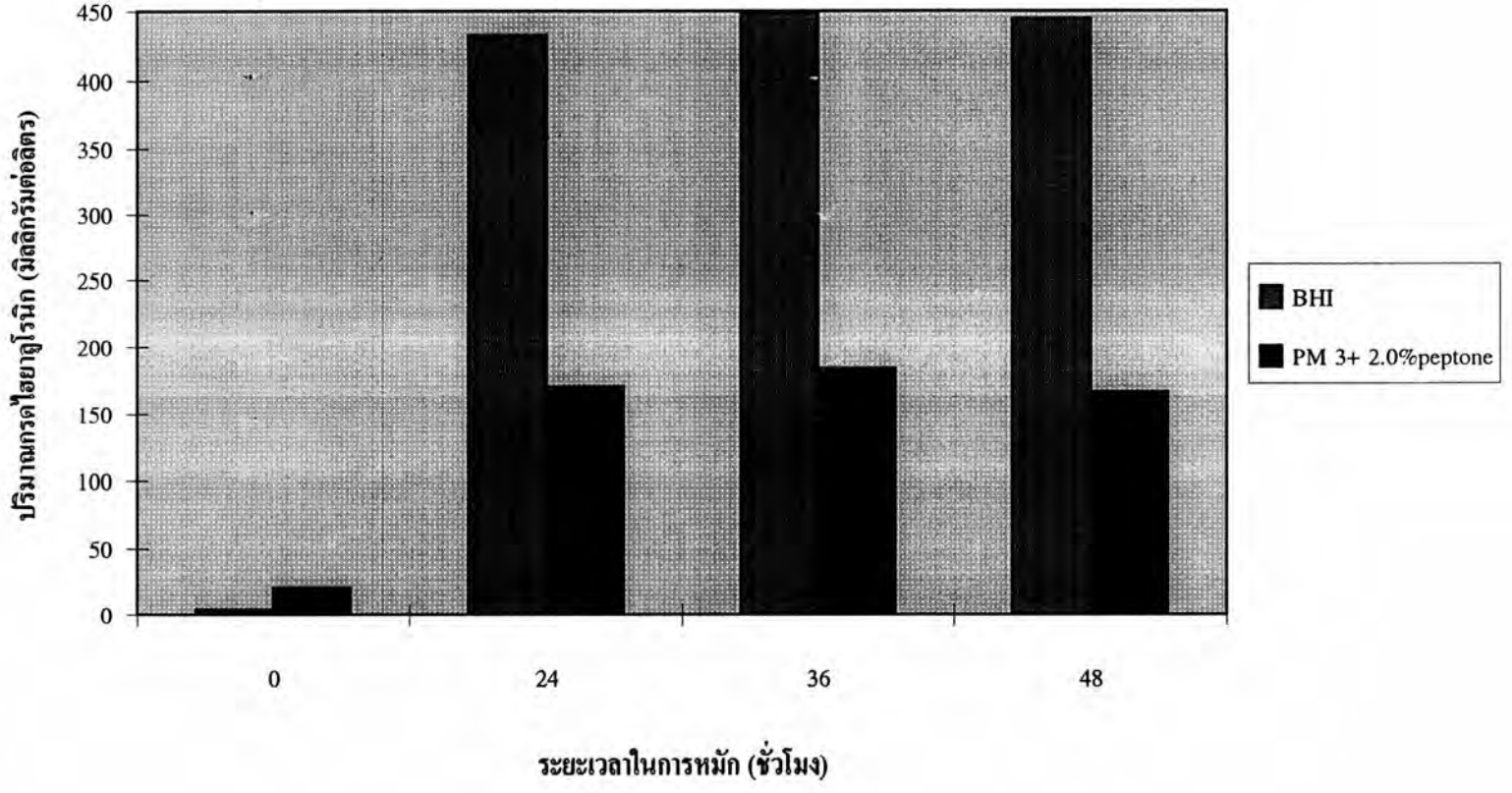
รูปที่ 3.8 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 ในอาหาร BHI และ PM3 ที่มีการเติมเปปโตนที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ



ตารางที่ 3.9 เปรียบเทียบปริมาณเซลล์และกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการหมักโดยใช้หัวเชื้อที่เลี้ยงด้วย BHI และอาหารสูตร PM3 + 2.0% peptone

ชนิดของหัวเชื้อตั้งต้น	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)
BHI	0	6.5	0.10	3.30	4.15
	24	5.2	0.38	0.76	431.86
	36	5.1	0.41	0.43	448.52
	48	5.1	0.41	0.32	444.14
PM3 + 2.0% peptone	0	6.5	0.14	3.33	20.79
	24	5.6	0.23	1.00	170.39
	36	5.3	0.27	0.26	183.33
	48	5.2	0.22	0.09	266.16

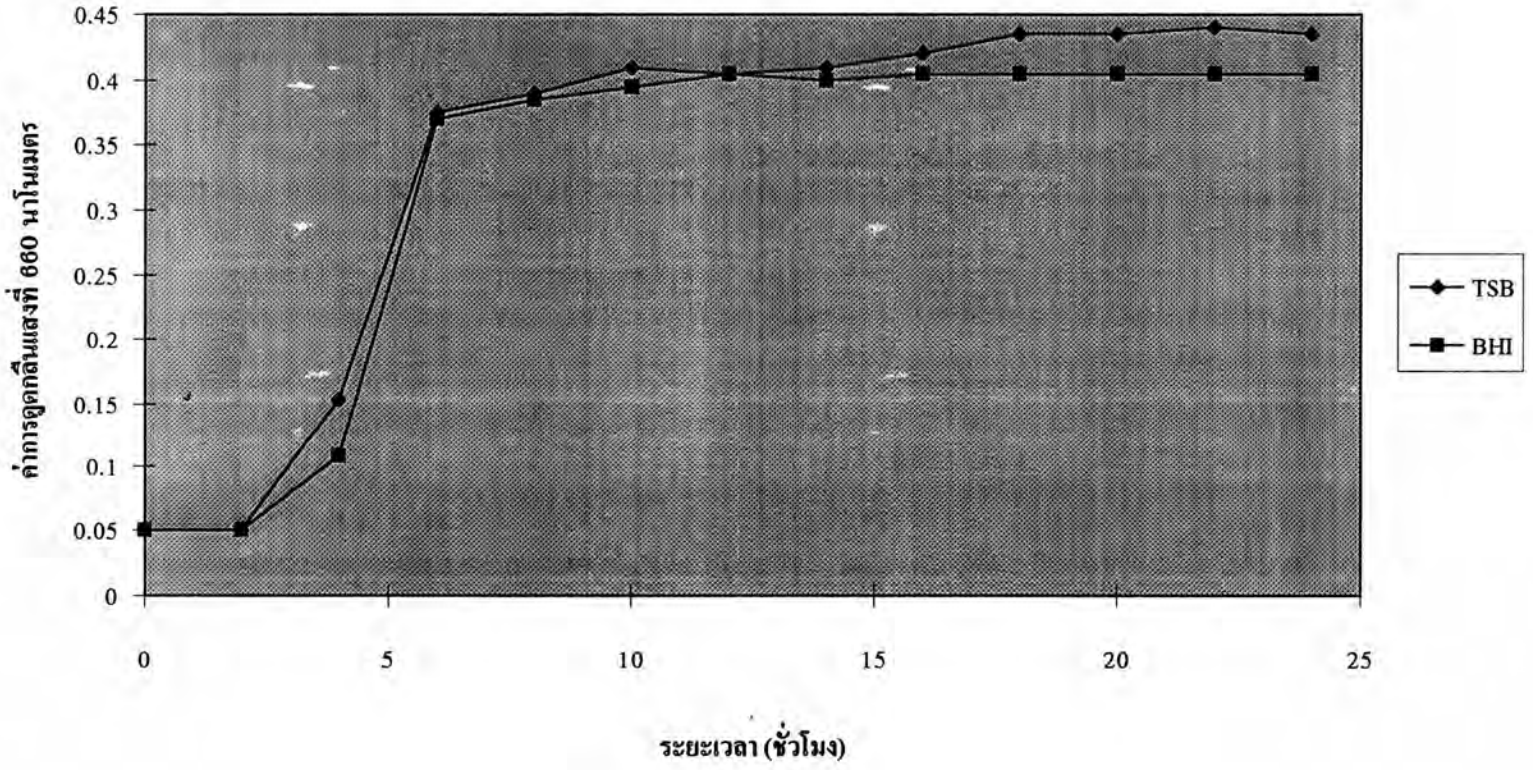
รูปที่ 3.9 เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการใช้หัวเชื้อตั้งต้นที่เลี้ยงใน BHI และในอาหารสูตร PM3 + 2.0% peptone ที่ระยะเวลาในการหมัก 0, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง



ตารางที่ 3.10 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 ในอาหารเหลว BHI และอาหารเหลว TSB

	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร	
ระยะเวลา (hr)	TSB	BHI
0	0.05	0.05
2	0.15	0.11
4	0.38	0.37
6	0.39	0.39
8	0.41	0.40
10	0.41	0.41
12	0.41	0.40
14	0.42	0.41
16	0.44	0.41
18	0.44	0.41
20	0.44	0.41
22	0.43	0.41
24	0.44	0.41

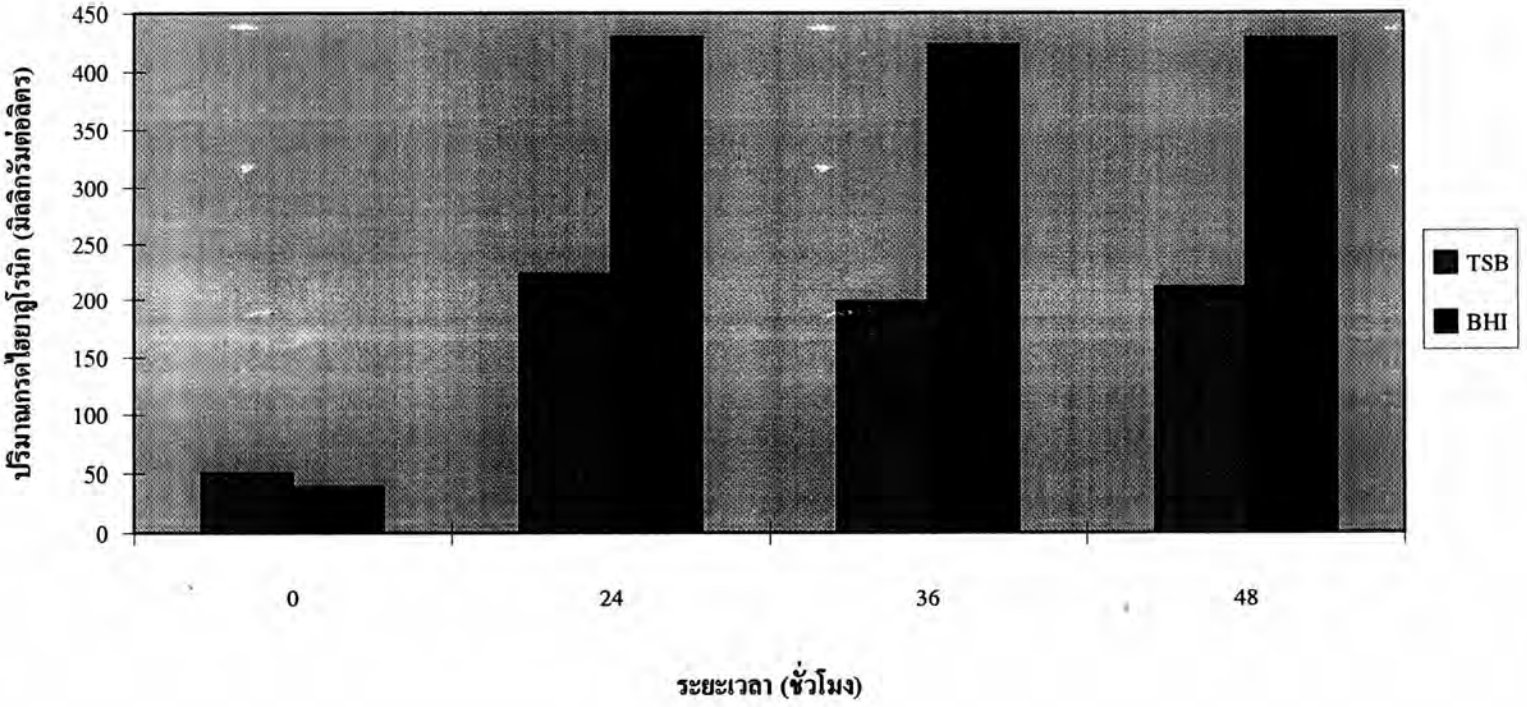
รูปที่ 3.10 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 ในอาหารเหลว TSB และ BHI



ตารางที่ 3.11 เปรียบเทียบปริมาณเซลล์และกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการหมักโดยใช้หัวเชื้อตั้งต้นที่เลี้ยงในอาหารเหลว BHI และอาหารเหลว TSB

ชนิดของหัวเชื้อตั้งต้น	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)
BHI	0	6.6	0.07	3.03	38.08
	24	5.8	0.30	0.82	429.82
	36	5.8	0.30	0.69	421.69
	48	5.8	0.31	0.52	428.50
TSB	0	6.6	0.07	3.13	49.48
	24	5.6	0.24	0.76	223.65
	36	5.5	0.22	0.65	197.76
	48	5.5	0.21	0.48	210.48

รูปที่ 3.11 เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการใช้หัวเชื้อตั้งต้นที่เลี้ยงในอาหารเหลว BHI และในอาหารเหลว TSB ที่ระยะเวลาการหมัก 0, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง



3.1.7 การเปรียบเทียบการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกเมื่อใช้เคซีนจากการย่อยสลายโดยเอนไซม์ปาเปนเป็นแหล่งอาหาร

จากสูตรอาหารสำหรับการผลิต PM3 แหล่งไนโตรเจนที่ใช้เป็นส่วนประกอบคือเคซีนที่ผ่านการย่อยแล้ว ของบริษัท Fluka ซึ่งมีราคาแพงดังนั้นจึงไม่เหมาะสมในการนำไปใช้คัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลาย ทำให้จำเป็นต้องหาแหล่งเคซีนอื่นที่มีต้นทุนต่ำกว่ามาทดแทน จึงได้ทดลองนำแลกติกเคซีน ใช้ในอุตสาหกรรมการทำกระดาษ การผลิตกาว, คอนกรีต และปูนพลาสเตอร์, การสังเคราะห์ไฟเบอร์, การผลิตสี , การฟอกหนัง และการผลิตยาง มาใช้เนื่องจากมีราคาถูกกว่า องค์ประกอบของแลกติกเคซีนที่ใช้แสดงอยู่ในภาคผนวก ก-4 ในขั้นแรกของการทดลองได้นำเอนไซม์ 2 ชนิดมาหาค่าแอคติวิตีจำเพาะเพื่อคัดเลือกเอนไซม์ที่มีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุดไปใช้ในการย่อยแลกติกเคซีน เอนไซม์ที่ใช้ได้แก่ เอนไซม์นิวเทรส และเอนไซม์ปาเปน การหาค่าแอคติวิตีจำเพาะทำตามการทดลองในข้อ 2.4.6 เอนไซม์ที่ให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุดคือ เอนไซม์ปาเปน รองลงมาคือ เอนไซม์นิวเทรส โดยมีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 405.94 และ 28.95 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ (ผลการทดลองแสดงใน ภาคผนวก ค-2) จึงได้คัดเลือกเอนไซม์ปาเปนไปใช้สำหรับการย่อยแลกติกเคซีน การหาระยะเวลาที่เหมาะสมและปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการย่อยแลกติกเคซีนนั้น ทำตามวิธีการทดลองในข้อ 2.4.7 โดยการเตรียมสับสเตรทคือ 4% แลกติกเคซีน (วิธีการเตรียมแสดงในภาคผนวก จ) และแปรผันปริมาณยูนิตของเอนไซม์ ควบคุมภาวะในการย่อย อยู่ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมของเอนไซม์อยู่ที่ 6.0 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.12 และรูปที่ 3.12 ซึ่งพบว่าที่ปริมาณเอนไซม์สูงสุดคือ 2000 ยูนิตให้ผลดีที่สุดแต่ผลการทดลองนี้ยังไม่สามารถบอกได้ว่าปริมาณเอนไซม์ดังกล่าวสามารถย่อยแลกติกเคซีนได้สมบูรณ์ จึงทำการทดลองโดยแปรผันปริมาณเอนไซม์ตั้งแต่ 2000-4000 ยูนิต ผลแสดงในตารางที่ 3.13 และรูปที่ 3.13 พบว่าการย่อยจะสมบูรณ์เมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์ 3600 ยูนิต ที่ระยะเวลาการย่อยในช่วง 12-14 ชั่วโมง หรือหากใช้ปริมาณเอนไซม์ 4000 ยูนิต จะใช้เวลา 12 ชั่วโมง ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงเลือกปริมาณเอนไซม์ 4000 ยูนิต ระยะเวลาในการย่อย 12 ชั่วโมงไปใช้ในการย่อยแลกติกเคซีนเพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป จากนั้นนำแลกติกเคซีนที่ย่อยได้ไปทดสอบความสามารถในการใช้ทดแทนเคซีนของบริษัท Fluka โดยทำการทดลองตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.2.1-2.3.2.2 โดยเปลี่ยนแหล่งเคซีนที่ใช้เดิมเป็นแลกติกเคซีน โดยนำแลกติกเคซีนที่ย่อยแล้วไปปั่นแยกตะกอนออก จากนั้นเจือจางด้วยน้ำขจัดไอออนเพื่อให้ได้สารละลาย 2% แลกติกเคซีน แล้วนำไปเตรียมอาหารสูตร PM3 โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน (ตามวิธีการในภาคผนวก จ) ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 3.14 และรูปที่ 3.14 จากผลแสดงให้เห็นว่าแลกติกเคซีนที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนสามารถใช้ทดแทนเคซีนเดิม

ได้เป็นอย่างดีโดยให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกภายหลังการหมัก และปริมาณเซลล์ภายหลังการหมักใกล้เคียงกัน ดังนั้นในการคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายจึงได้เปลี่ยนมาใช้แลกติกเคซีนแทนการใช้เคซีนเดิมของบริษัท Fluka ซึ่งเป็นการลดต้นทุนในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกและลดต้นทุนสำหรับค่าอาหารในการคัดเลือกเชื้อในขั้นทุติยภูมิ

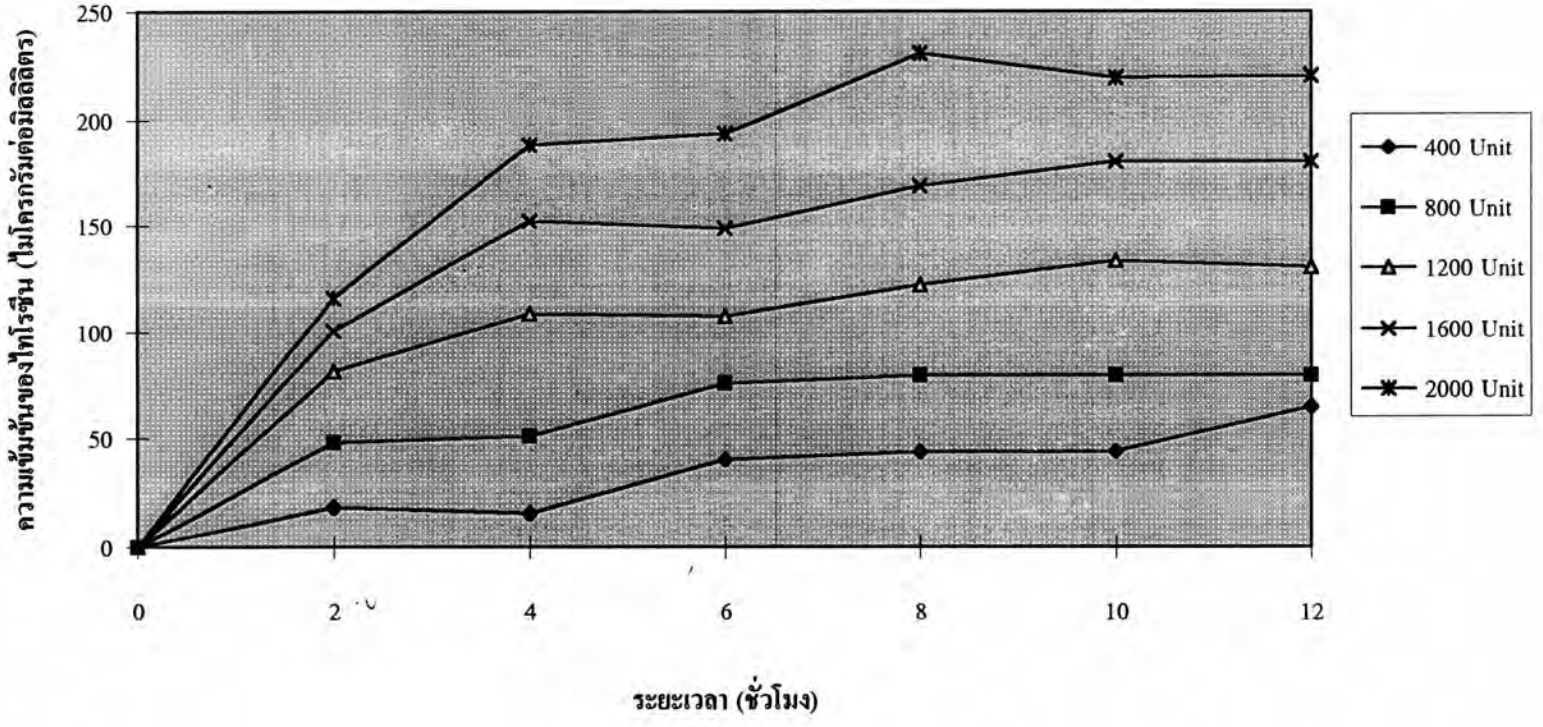
ตารางที่ 3.12 แสดงปริมาณไทโรซีนที่ได้จากการย่อยเคซีนด้วยเอนไซม์ปาเปนความเข้มข้น 400-2000 ยูนิต

	ปริมาณไทโรซีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ได้จากการย่อยแลกติกเคซีนด้วยเอนไซม์ความเข้มข้นต่างๆ (ยูนิต)				
เวลา(ชั่วโมง)	400	800	1200	1600	2000
0	0	0	0	0	0
2	18.5	48	81	100	116
4	15.7	50.7	109	152	188
6	39.8	75.1	108	149	194
8	43.3	78.7	122	169	230
10	43.5	78.9	133	180	219
12	64.3	78.9	130	180	220

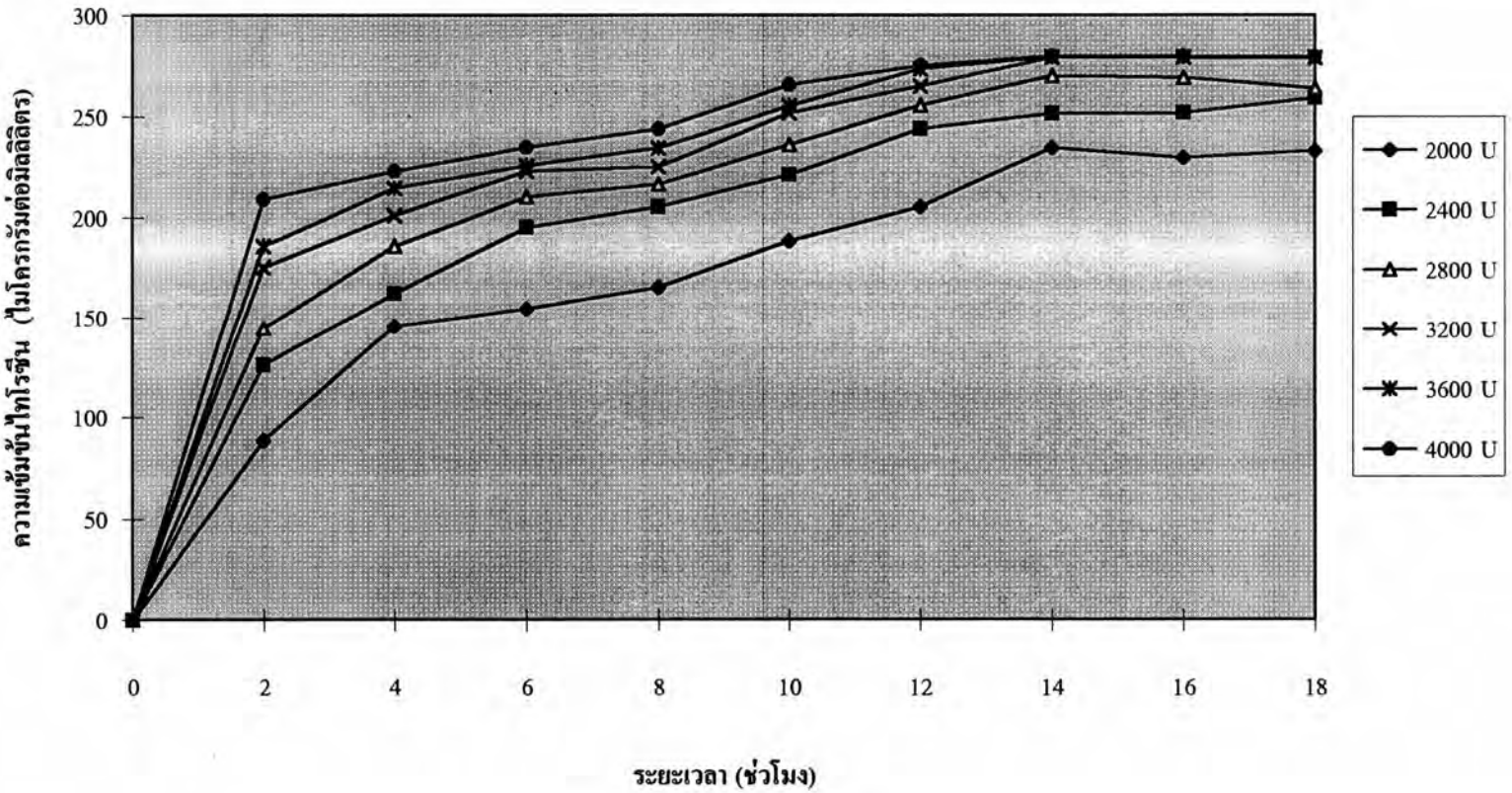
ตารางที่ 3.13 แสดงปริมาณไทโรซีนที่ได้จากการย่อยเคซีนด้วยเอนไซม์ปาเปนความเข้มข้น 2000-4000 ยูนิต

	ปริมาณไทโรซีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ได้จากการย่อยแลกติกเคซีนด้วยเอนไซม์ความเข้มข้นต่างๆ (ยูนิต)					
เวลา(ชั่วโมง)	2000	2400	2800	3200	3600	4000
0	0	0	0	0	0	0
2	88.52	125.68	144.26	174.64	185.36	208.74
4	145.14	161.97	185.36	200.87	214.21	222.95
6	154.32	194.97	209.83	222.95	225.57	234.75
8	165.03	204.81	216.17	225.14	234.32	243.72
10	187.98	220.98	235.85	251.58	255.08	265.57
12	204.81	243.72	255.3	264.7	273.22	274.97
14	234.32	251.37	269.95	279.13	279.34	279.56
16	229.51	251.58	268.85	279.13	279.34	279.56
18	232.78	258.79	263.61	278.69	278.91	279.34

รูปที่ 3.12 ความเข้มข้นของไทโรซีนที่ได้ในระหว่างการย่อยแลกติกเคซีน ด้วยเอนไซม์ปาเปน ความเข้มข้น 400-2000 ยูนิต



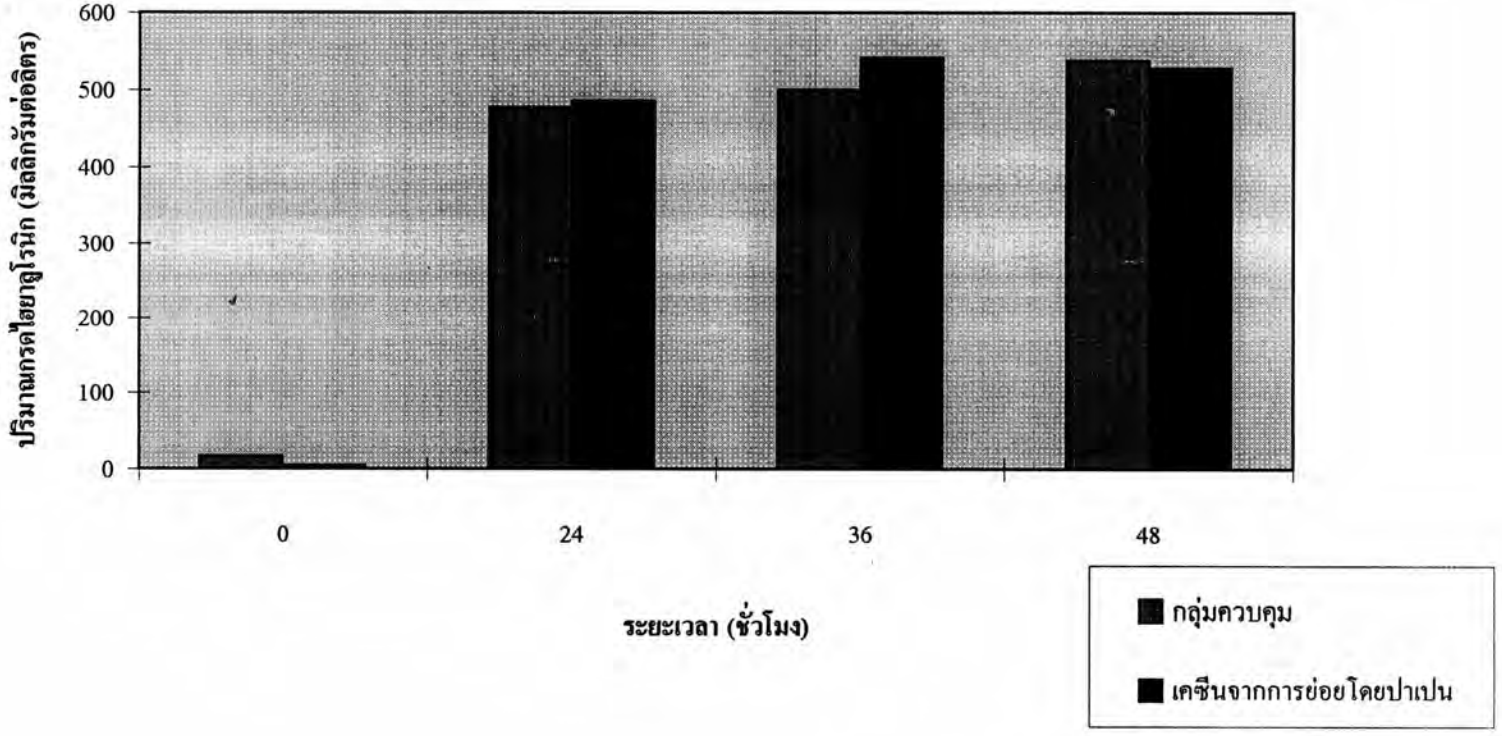
รูปที่ 3.13 ความเข้มข้นของไทโรซีนที่ได้ในระหว่างการย่อยแลกติกเคซีน
ด้วยเอนไซม์ปาเปนที่ความเข้มข้น 2000-4000 ยูนิต



ตารางที่ 3.14 เปรียบเทียบการเจริญและปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตโดยเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้เคซีนที่ย่อยแล้วของบริษัท Fluka และแลกติกเคซีนที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน ที่ระยะเวลาการหมัก 0, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง

ชนิดของเคซีนที่ย่อยแล้ว	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)
กลุ่มควบคุม (Fluka)	0	6.9	0.07	3.33	16.19
	24	5.2	0.26	0.81	477.03
	36	5.2	0.35	0.59	500.29
	48	5.2	0.38	0.29	538.46
เคซีนที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน	0	7.1	0.09	3.20	4.56
	24	5.7	0.34	0.72	485.81
	36	5.7	0.35	0.43	542.18
	48	5.7	0.38	0.18	528.59

รูปที่ 3.14 เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตโดยเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้เคซีนที่ย่อยแล้วสำเร็จรูปของ Fluka และแลกติกเคซีนที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน ที่ระยะเวลาการหมัก 0, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง



3.1.8 การพัฒนาการวิเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกจากน้ำหมัก

ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกจากน้ำหมักที่ได้แยกเซลล์จุลินทรีย์ออกแล้วนั้นทำโดยวิธีคาร์บาโซลซึ่งวิธีดังกล่าวไวต่อกลูโคสและฟรักโตส (Galambos, 1967) ดังนั้นเพื่อป้องกันการรบกวนจากกลูโคสและฟรักโตสในอาหารเลี้ยงเชื้อได้มีรายงานถึงการตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิกจากน้ำหมักก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์ปริมาณซึ่งวิธีการดังกล่าวจะต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์นานเนื่องจากกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้มีการละลายช้าในสารละลาย 9% NaCl และสารที่ใช้สำหรับตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิกก็เป็นสารที่มีราคาสูง โดยสารที่ใช้กันมากได้แก่ N-Cetyl-N,N,N-trimethyl-ammonium bromide (CETAB) และ cetylpyridinium chloride (CPC) ทำให้วิธีนี้ไม่เหมาะสมสำหรับใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีจำนวนมาก งานวิจัยนี้จึงได้หาวิธีในการตรวจหากรดไฮยาลูโรนิกจากน้ำหมักโดยตรง โดยใช้สารซัลฟาเมต (sulfamate) ช่วยในการลดการรบกวนการเกิดสีของคาร์บาโซลกับน้ำตาลซึ่งวิธีการใช้ซัลฟาเมตลดการรบกวนการเกิดสี (ดัดแปลงจาก Galambos, 1967) โดยได้ทดลองการวิเคราะห์ผลการเกิดสีของคาร์บาโซลจากกราฟมาตรฐานของวิธีการที่ไม่มีการเติมซัลฟาเมตและที่มีการเติมซัลฟาเมต (กราฟมาตรฐานแสดงในภาคผนวก ง-3 และ ง-4) จากกราฟมาตรฐานของทั้งสองวิธีการที่ได้มีความใกล้เคียงกันมาก จากนั้นได้นำอาหารสูตร PM3 มาทดสอบผลการเกิดสีกับคาร์บาโซลโดยเจือจางอาหารสูตร PM3 ตั้งแต่ 1:10-1:1000 (ข้อมูลไม่ได้แสดงไว้) จากผลที่ได้พบว่าที่ลำดับการเจือจาง 1:1000 ซัลฟาเมตสามารถลดการเกิดสีเนื่องจากการรบกวนของน้ำตาลในอาหารได้โดยสมบูรณ์ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 525 นาโนเมตรมีค่าเท่ากับศูนย์ แต่ในทางปฏิบัติไม่สามารถนำวิธีการดังกล่าวมาใช้วิเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกจากน้ำหมักได้เนื่องจากปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่มีอยู่ในน้ำหมักมีปริมาณน้อยมาก คือ ประมาณ 450-550 มิลลิกรัมต่อลิตร และหากเจือจางน้ำหมักมากจะทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกได้ และเพื่อยืนยันว่าการรบกวนการเกิดสีนั้นมาจากน้ำตาลที่มีในอาหารจึงได้เปรียบเทียบผลของการเกิดสีของสารละลายคาร์บาโซลกับน้ำหมักและสารละลายน้ำตาลกลูโคสพบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ 525 นาโนเมตรของอาหารจะสูงกว่าซึ่งอาจเกิดจากองค์ประกอบอื่นๆของอาหาร ดังนั้นจึงจำเป็นต้องตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิกก่อนนำมาวิเคราะห์ปริมาณโดยวิธีการที่ไม่มีการเติมซัลฟาเมต

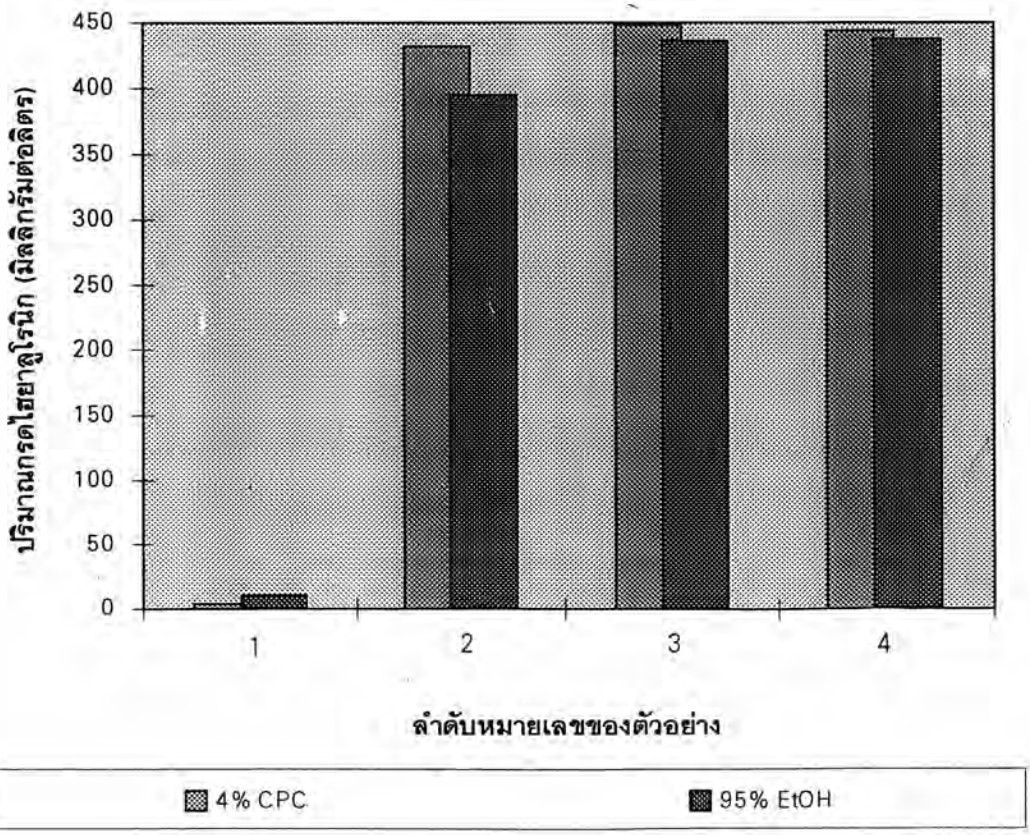
ส่วนการใช้ CPC ในการตกตะกอนเนื่องจากเป็นสารที่มีราคาสูงจึงได้เปลี่ยนมาใช้เอธานอล 95% (ของกรมสรรพสามิต) ที่มีราคาต่ำกว่ามาตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิกแทน CPC โดยจากการเปรียบเทียบการใช้เอธานอล 95% และ CPC พบว่าสามารถให้ผลในการตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิกได้ใกล้เคียงกัน ซึ่งผลแสดงในตารางที่ 3.15 และรูปที่ 3.15

ตารางที่ 3.15 เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)ที่ได้จากการตกตะกอนน้ำหมักด้วย 4%CPC และเอธานอล 95%

	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่ได้จากการตกตะกอนด้วย 4% CPC และ 95% EtOH	
สารตัวอย่าง*	4% CPC	95% EtOH
1	4.15	10.79
2	431.86	394.78
3	448.52	435.78
4	444.14	437.78

*สารตัวอย่าง 1-4 คือ ตัวอย่างที่ได้จากการหมัก

รูปที่ 3.15 เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการตกตะกอนน้ำหมักด้วย 4% CPC และ 95% EtOH



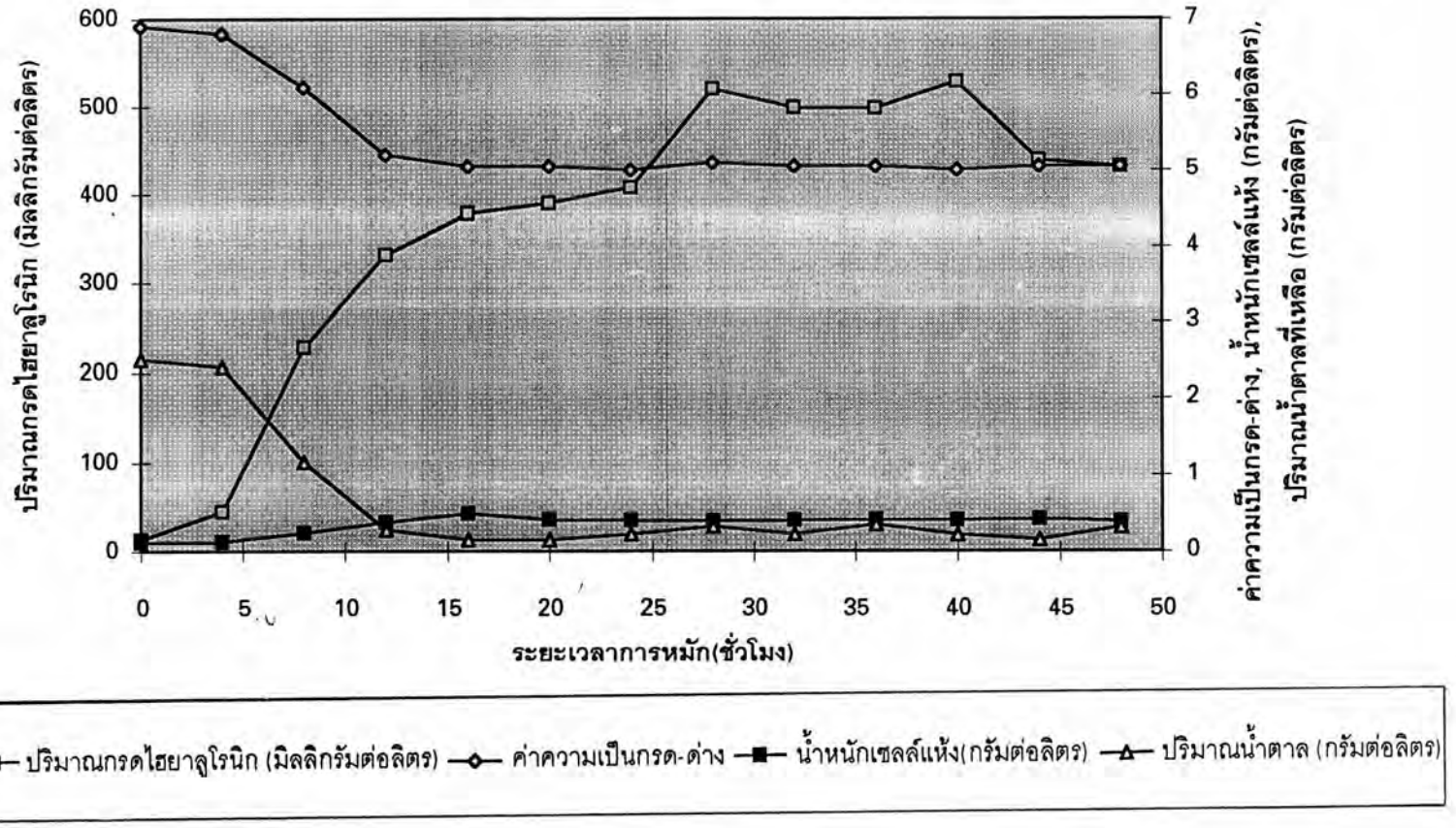
3.1.9 ลักษณะการเจริญ การผลิตกรดไฮยาลูโรนิก และการใช้น้ำตาลของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการทดลอง

หลังจากการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ให้ผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูงและมีราคาถูกดังข้อ 3.1.2-3.1.7 ในการทดลองนี้จะศึกษาการเจริญและประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 โดยอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น (ภาคผนวก ก-1) ตามวิธีการเตรียมหัวเชื้อตั้งต้นในวิธีการทดลองข้อ 2.3.2.1 โดยใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที นำหัวเชื้อตั้งต้นอายุ 7 ชั่วโมง ปริมาตร 10% ถ่ายลงในอาหารสูตร PM3 (ภาคผนวก จ) ตามวิธีการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในขั้นตอน 2.3.2.2 เก็บตัวอย่างทุกๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และน้ำตาลที่เหลือภายหลังการหมักตามวิธีวิเคราะห์ในขั้นตอน 2.4.1-2.4.5 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.16 และรูปที่ 3.16 พบว่าในช่วง 4-16 ชั่วโมงแรกของการหมักเชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นการเจริญจะเริ่มคงที่ไปจนกระทั่งสิ้นสุดการหมักที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ในช่วงที่เซลล์มีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วนั้นจะควบคู่ไปกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณของกรดไฮยาลูโรนิก โดยกรดไฮยาลูโรนิกจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 4-24 ชั่วโมง ซึ่งตรงกับการเจริญในช่วงทวีคูณ (log phase) และปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกจะมีปริมาณสูงสุดในช่วงที่เซลล์อยู่ในระยะการเจริญคงที่ โดยอยู่ในช่วงประมาณ 36 ชั่วโมง โดยน้ำหมักที่ได้จะมีความหนืดมากกว่าที่ระยะเวลาอื่นๆ ซึ่งจะได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกประมาณ 520-530 มิลลิกรัมต่อลิตร และจากนั้นปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จะเริ่มลดลงเนื่องจากมีการย่อยสลายโดยเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ (Akasaka, Komasaki and Arai, 1989; Swann et al., 1990) ปริมาณน้ำตาลที่วิเคราะห์ได้สอดคล้องต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกกล่าวคือ เมื่อการเจริญอยู่ในช่วงทวีคูณเชื้อมีการใช้น้ำตาลไปอย่างรวดเร็วเพื่อใช้ในการเจริญและสร้างกรดไฮยาลูโรนิก ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการหมัก จะลดลงอย่างรวดเร็วพร้อมกับการเพิ่มขึ้นของกรดไฮยาลูโรนิก และจะคงที่ภายหลังจากที่การเจริญเริ่มคงที่โดยมีค่า ประมาณ 5.1 ซึ่งจากรายงานของ John, Goh และ Oeggerli (1994) ได้รายงานว่าการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกจะให้ผลดีที่สุดในช่วง 6.7 $\pm$ 0.2 นอกจากนี้ เชื้อดังกล่าวเป็นเชื้อที่แยกได้จากสิ่งมีชีวิตปกติอาศัยอยู่ในค่าความเป็นกรด-ด่างที่เป็นกลางดังนั้นหากว่าค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงก็จะมีผลต่อการเจริญของเชื้อด้วย จากการทดลองครั้งนี้ทำให้ทราบถึงระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อสายพันธุ์กลายซึ่งจะได้จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในขั้นตอนต่อไป โดยเลือกเก็บตัวอย่างภายหลังจากการหมักเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง

ตารางที่ 3.16 แสดงค่าความเป็นกรด-ด่าง, ปริมาณเซลล์แห้ง, ปริมาณน้ำตาลที่เหลือหลังการหมัก และปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในอาหารสูตรสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก (PM3 ที่ได้จากการปรับปรุงตาม 3.1.2-3.1.7)

สายพันธุ์	เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)
ATCC 35247	0	6.9	0.12	2.50	12.90
	4	6.8	0.12	2.40	44.26
	8	6.1	0.24	1.17	227.88
	12	5.2	0.37	0.28	332.88
	16	5.1	0.49	0.15	379.43
	20	5.1	0.41	0.15	390.17
	24	5.0	0.40	0.22	407.94
	28	5.1	0.39	0.32	520.25
	32	5.1	0.40	0.22	498.75
	36	5.1	0.41	0.35	498.31
	40	5.0	0.40	0.21	529.02
	44	5.1	0.42	0.15	439.31
	48	5.1	0.39	0.31	432.72

รูปที่ 3.16 ลักษณะการเจริญ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และน้ำตาลที่เหลือหลังการหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 ในอาหารสูตร PM3 ในระดับขวดเขย่า



3.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์กับเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 ด้วยสารเคมี NTG และการคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูง

3.2.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 ด้วยสารเคมี NTG

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้ในการทำให้เชื้อเกิดการกลายพันธุ์เพื่อให้มีคุณสมบัติตามต้องการ ซึ่งประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์จะขึ้นกับภาวะที่ใช้ในการกลายพันธุ์ ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เพื่อเพิ่มความสามารถในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก จากรายงานของ Nimrod และคณะ (1988) ได้รายงานถึงการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ของเชื้อ *S. zooepidemicus* ได้สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูงขึ้นและมีความเสถียร (Nimrod et al., 1988) โดยได้ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (1.0 โมลาร์) ละลายในสารละลายทริส-มาเลอิกบัฟเฟอร์ซึ่งมี ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 ภาวะในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ดังกล่าวมีความแตกต่างกันมากเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการกลายพันธุ์เพื่อผลิตกรดมะนาวจากยีสต์ซึ่งส่วนใหญ่กระทำที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 8.0 โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลาย NTG 0.68-2.72 มิลลิโมลาร์ ซึ่งจะให้ค่าการอยู่รอดเท่ากับ 10-30% (Akiyama et al., 1973; Matsuoka et al., 1980) และที่ความเข้มข้น NTG สูงกว่า 0.170 มิลลิโมลาร์ สำหรับการกลายพันธุ์ยีสต์ *Candida oleophila* NNU-48 ซึ่งให้ค่าการอยู่รอดต่ำกว่าร้อยละ 5 (สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ, 2539) ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันผลการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ตามรายงานของ Nimrod และคณะ (1988) ที่กระทำที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 และการศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อค่าร้อยละการรอดของเซลล์ จึงได้ทำการทดลองดังนี้

3.2.1.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG ที่ละลายในทริส-มาเลอิกบัฟเฟอร์ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0

ทำการทดลองตามขั้นตอนวิธีการทดลองข้อ 2.5.2 ที่ละลาย NTG ในทริส-มาเลอิก บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0 โดยเตรียมสารละลาย NTG ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือเท่ากับ 0-1.02 โมลาร์ ทำการเตรียมเซลล์ที่ใช้ในการกลายพันธุ์ตามการทดลองข้อ 2.5.1 บ่มเซลล์ในสารละลาย NTG ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที ล้างเซลล์และกระจายเซลล์ที่ได้บนอาหารวุ้นแข็ง tryptic soy agar บ่มจานเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่รอดชีวิต และนำไปเขียน

กราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการอยู่รอดและความเข้มข้นของ NTG ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 3.17 และรูปที่ 3.17

ตารางที่ 3.17 จำนวนเซลล์ที่อยู่รอดในแต่ละช่วงความเข้มข้นของ NTG ที่ความเข้มข้นต่างๆที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0 เพื่อชักนำให้เชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 เกิดการกลายพันธุ์

ความเข้มข้น NTG (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์/มิลลิลิตร)	ร้อยละการรอด
0	$2.25x10^{9}$	100
50	$2.03x10^{7}$	0.902
75	$2.54x10^{5}$	0.0113
100	$2.70x10^{4}$	0.0012
125	$1.31x10^{4}$	0.000582
150	$7.40x10^{3}$	0.000329

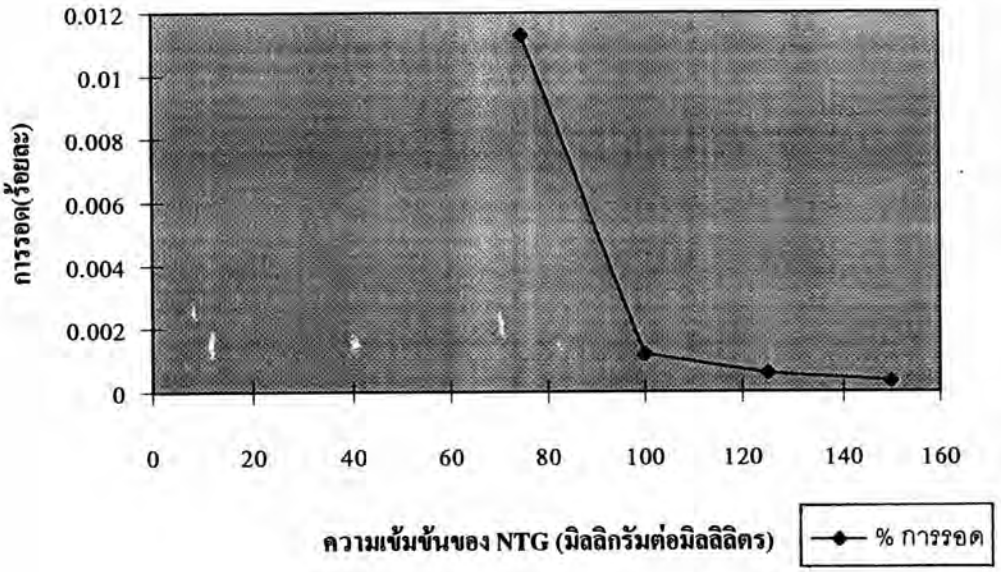
จากตารางข้างต้นความเข้มข้นของ NTG ที่มีผลทำให้เซลล์มีร้อยละการอยู่รอดต่ำกว่า 0.1% คือ ความเข้มข้นของ NTG ตั้งแต่ 75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับรายงาน Nimrod และคณะ (1988)

3.2.1.2 การเปรียบเทียบร้อยละการรอดของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 เมื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG ในสภาพค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 และ 8.0

จากการทดลองข้างต้นในขั้นตอน 3.2.1.1 พบว่าต้องใช้ความเข้มข้นของ NTG ที่สูงถึง 75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อให้ได้ค่าร้อยละการรอดต่ำกว่า 0.1% แสดงให้เห็นว่าที่ภาวะความเป็นกรด-ด่าง 6.0 ประสิทธิภาพของ NTG ค่อนข้างต่ำ เพราะในภาวะที่เป็นกรด NTG จะไม่แตกตัวหรือแตกตัวให้ไดอะโซมีเทนน้อย ซึ่งไดอะโซมีเทนเป็นสารที่จะเข้าทำปฏิกิริยากับเบสพิวรีนและทำให้เกิดความผิดปกติของดีเอ็นเอ ดังนั้นหากใช้ภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 8.0 จึงน่าจะเป็นผลให้ประสิทธิภาพของ NTG ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ดีขึ้น ในการทดลองได้ทำตามขั้นตอนการทดลองในข้อ 2.5.2 โดยใช้ความเข้มข้นของ NTG ตั้งแต่ 0-150

มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบกับรายงานของ Nimrod และคณะ (1988) เซลล์ที่ใช้ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เตรียมตามขั้นตอนที่ 2.5.1 ซึ่งเป็นเซลล์ที่อยู่ในระยะกึ่งกลางการเจริญทวีคูณ ควบคุมภาวะตามวิธีการทดลองข้อ 2.5.2 จากนั้นนับจำนวนโคโลนีที่รอดชีวิต และนำไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการรอดและความเข้มข้นของ NTG เปรียบเทียบกันระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 และ 8.0 ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.18 และรูปที่ 3.18

รูปที่ 3.17 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการอยู่รอดของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 และความเข้มข้นของ NTG ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0

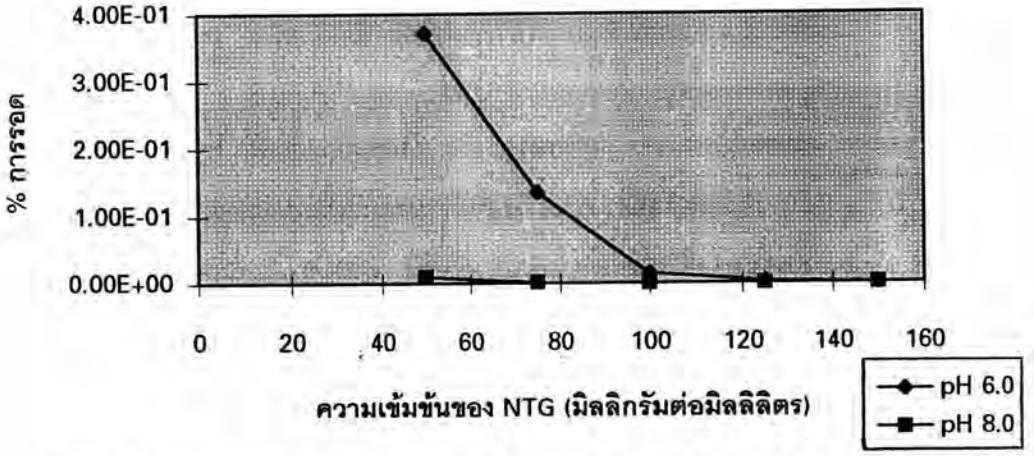


ตารางที่ 3.18 เปรียบเทียบผลของค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 และ 8.0 ต่อจำนวนเซลล์ที่อยู่รอดในแต่ละช่วงของความเข้มข้นต่างๆของ NTG

	pH 6.0		pH 8.0	
ความเข้มข้นของ NTG (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละการรอด	จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละการรอด
0	2.49×10^{9}	100.00	2.77×10^{9}	100
25	7.10×10^{7}	2.85	1.34×10^{6}	0.0484
50	9.24×10^{6}	0.371	2.55×10^{5}	0.00919
75	3.35×10^{6}	0.135	1.70×10^{4}	0.000614
100	3.57×10^{6}	0.0143	3.55×10^{3}	0.000128
125	6.65×10^{4}	0.00267	1.00×10^{2}	0.00000361
150	1.18×10^{4}	0.000473	2.75×10^{2}	0.00000993

จากผลการทดลอง พบว่า ที่ภาวะค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 8.0 สารละลาย NTG มีประสิทธิภาพในการทำให้เซลล์ตายมากกว่าที่ 6.0 โดยเมื่อพิจารณาจากค่าร้อยละการรอดจะพบว่ามีความแตกต่างกันมาก คือที่ความเข้มข้นแรกของสาร NTG (25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 0.17 โมลาร์) ที่ภาวะค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0 มีค่าร้อยละของการอยู่รอดเพียง 0.0484 ซึ่งเมื่อเทียบกับที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0 มีสูงถึง 2.85 ดังนั้นหากต้องการภาวะในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0 ต้องหาภาวะความเข้มข้นของ NTG ที่ให้ร้อยละการอยู่รอดเท่ากับ 0.1% ต้องลดความเข้มข้นของ NTG ลงไปต่ำกว่า 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

รูปที่ 3.18 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการอยู่รอดของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 และความเข้มข้นของ NTG ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0 และ 8.0



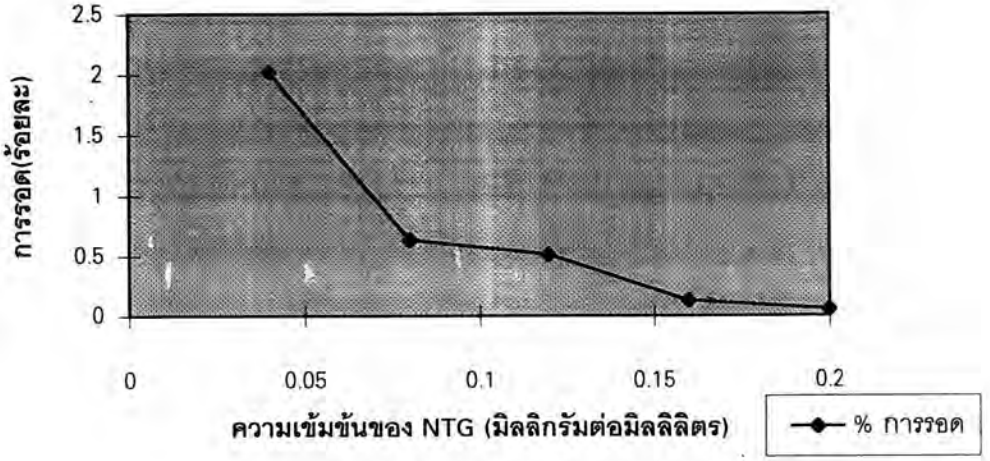
3.2.1.3 การหาความเข้มข้นของ NTG ที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่ภาวะค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0

ในการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดย NTG ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 8.0 นั้นจากการทดลองข้อ 3.2.1.2 พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 0-25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จึงได้แปรผันความเข้มข้นของ NTG โดยครั้งแรกแปรผันที่ 5, 10, 15, 20 และ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ข้อมูลไม่ได้แสดงไว้) พบว่าที่ความเข้มข้นต่ำสุดคือ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่าร้อยละการอยู่รอดต่ำมาก จึงได้แปรผันความเข้มข้นของ NTG ใหม่ที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ข้อมูลไม่ได้แสดงไว้) พบว่าผลการทดลองที่ได้เหมือนกับครั้งแรกคือที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรให้ค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ต่ำกว่า 0.1% มากเช่นกัน จึงได้ลดความเข้มข้นลงมาที่ 0-1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ข้อมูลไม่ได้แสดงไว้) พบว่าที่ความเข้มข้น NTG 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่าร้อยละการอยู่รอดใกล้เคียง 0.1% จึงได้ลดความเข้มข้นลงมาที่ 0-0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งผลที่ได้แสดงในตารางที่ 3.19 และรูปที่ 3.19 จากผลแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของ NTG ที่ให้ค่าร้อยละการรอดต่ำกว่า 0.1% เมื่อใช้ภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 8.0 อยู่ในช่วง 0.16-0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรหรือเท่ากับ 1.0877-1.3597 มิลลิโมลาร์ ซึ่งผลนี้ใกล้เคียงกับผลที่ได้จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์กับเชื้อ *Candida Oleophila* U33-13 (สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ, 2539) ที่ทำการคัดเลือกเชื้อที่ 5% การรอด

ตารางที่ 3.19 แสดงจำนวนเซลล์ที่อยู่รอดในแต่ละช่วงความเข้มข้นของ NTG ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0 เพื่อชักนำให้เชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 เกิดการกลายพันธุ์

ความเข้มข้นของ NTG (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละการรอด
0	3.44×10^{9}	100
0.04	6.95×10^{7}	2.02
0.08	2.18×10^{7}	0.634
0.12	1.75×10^{7}	0.509
0.16	4.45×10^{6}	0.129
0.20	1.79×10^{6}	0.052

รูปที่ 3.19 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 และความเข้มข้นของ NTG ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0



3.2.2 การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูงหลังจากผ่านการกลายพันธุ์ด้วย NTG

หลังจากทำการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์กับเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 ด้วย NTG และเก็บเชื้อที่ผ่านการกลายพันธุ์และมีร้อยละการอยู่รอดต่ำกว่า 0.1% ที่มีโคโลนีขนาดใหญ่และมีเมือกมาก มาเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีเลือดแกะผสมอยู่ (tryptic soy agar + 5% sheep blood) เพื่อตรวจสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง จากนั้นคัดเลือกโคโลนีแบบสุ่มจำนวน 50 โคโลนีที่ไม่ย่อยเม็ดเลือดแดง จากโคโลนีที่มีขนาดใหญ่ทั้งหมด 645 โคโลนี ไปทำการคัดเลือกในขั้นทุติยภูมิต่อไป โดยทำตามวิธีการทดลองในข้อ 2.5.4.2 ทำการหมักเป็นเวลา 36 ชั่วโมง แล้วนำน้ำหมักที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณน้ำตาลที่เหลือภายหลังการหมัก ดังที่แสดงในตารางที่ 3.20 จากผลครั้งนี้ได้คัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่ให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นจำนวน 11 สายพันธุ์ คือ N-4, N-6, N-10, N-11, N-13, N-16, N-20, N-25, N-26, N-32 และ N-33 โดยให้ค่าร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 29.06, 33.26, 39.99, 18.66, 11.64, 15.22, 39.18, 13.69, 5.83, 47.21 และ 45.83% ตามลำดับ จากผลพบว่าเมื่อนำโคโลนีที่มีขนาดใหญ่เหมือนกันไปทดสอบความสามารถในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก จะมีบางสายพันธุ์เช่น N-15, N-30 และ N-42 ที่ให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกต่ำกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น และจะมีบางสายพันธุ์เช่น N-6, N-20, N-32 และ N-33 ที่ให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่ขนาดของโคโลนีและความสามารถในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกไม่มีความสอดคล้องกัน จากผลดังกล่าวเมื่อพิจารณาสาเหตุพบว่ามีความเป็นไปได้ที่ว่า เซลล์ของเชื้อในจีนัส *Streptococcus* sp. เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งหรือในอาหารเหลว เซลล์จะมีการเรียงตัวต่อกันเป็นสายยาว และถึงแม้ว่าจะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีการกวน เมื่อทำการนับจำนวนเซลล์ก่อนการนำไปชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ จะพบว่าเซลล์บางส่วนมีการต่อเป็นสายสั้นๆ ประมาณ 2-4 เซลล์ ดังนั้นการที่โคโลนีมีขนาดใหญ่อาจจะเกิดจากเซลล์เริ่มต้น 3-4 เซลล์ที่ต่อกัน ขณะที่โคโลนีที่มีขนาดเล็กอาจจะเกิดจากเซลล์เริ่มต้น 1-2 เซลล์ที่ต่อกัน ซึ่งผลของขนาดโคโลนีนี้สามารถพบได้ทั้งในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยแสงอัลตราไวโอเลตและสารเคมี NTG และเมื่อพิจารณาถึงร้อยละของการเกิดโคโลนีขนาดใหญ่ (มากกว่า 0.4 มิลลิเมตร) ขนาดกลาง (0.2-0.4 มิลลิเมตร) และขนาดเล็ก (น้อยกว่า 0.2 มิลลิเมตร) พบว่าในแต่ละการทดลองไม่มีความสอดคล้องกัน ซึ่งอาจเกิดเนื่องมาจากสาเหตุเดียวกัน

ตารางที่ 3.20 แสดง ค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือหลังการหมัก และปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้นและเชื้อที่ได้จากการกลายพันธุ์เมื่อทำการหมัก เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง ในอาหารสูตร PM3

สายพันธุ์	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์ (%)
ATCC 35247	5.5	0.12	0.79	182.67	
N-1	5.5	0.18	0.63	202.85	11.04
N-2	5.5	0.14	0.43	195.61	7.08
N-3	5.5	0.15	0.64	190.79	4.35
N-4	5.5	0.13	0.62	235.75	29.06
N-5	5.5	0.12	0.72	202.63	10.93
N-6	5.5	0.14	0.87	243.43	33.26
N-7	5.5	0.13	0.66	190.36	4.21
N-8	5.5	0.12	0.59	193.42	5.88
N-9	5.5	0.13	0.72	202.41	10.81
N-10	5.5	0.14	0.50	255.72	39.99
ATCC 35247	5.2	0.31	0.66	293.89	
N-11	5.2	0.31	0.53	348.72	18.66
N-12	5.2	0.29	0.67	262.08	-10.82
N-13	5.2	0.26	0.63	328.10	11.64
N-14	5.2	0.28	0.84	263.62	-10.30
N-15	5.2	0.28	0.73	225.88	-12.93
N-16	5.2	0.27	0.72	338.63	15.22
N-17	5.2	0.28	0.67	253.73	-13.66
N-18	5.2	0.28	0.54	281.38	-4.26

หมายเหตุ สายพันธุ์ ATCC 35247 เป็นตัวควบคุมในแต่ละครั้งของการทดลอง

สายพันธุ์	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์ (%)
N-19	5.2	0.30	0.63	289.93	-1.35
N-20	5.2	0.28	0.68	409.04	39.18
ATCC 35247	5.7	0.41	0.63	421.32	
N-21	5.2	0.41	0.72	427.68	1.51
N-22	5.6	0.42	0.79	400.48	-4.95
N-23	5.6	0.50	0.61	412.11	-2.19
N-24	5.6	0.47	0.61	390.62	-7.29
N-25	5.6	0.43	0.64	479.01	13.69
N-26	5.6	0.46	0.66	445.89	5.83
N-27	5.6	0.44	0.59	389.74	-7.50
N-28	5.6	0.42	0.60	384.26	-8.80
N-29	5.6	0.42	0.61	363.63	-13.69
N-30	5.6	0.43	0.63	338.63	-19.63
ATCC 35247	4.9	0.43	0.62	352.22	
N-31	5.0	0.45	0.61	400.48	13.70
N-32	5.0	0.46	0.53	518.50	47.21
N-33	5.0	0.49	0.62	513.66	45.83
N-34	5.0	0.45	0.59	446.54	26.78
N-35	5.0	0.45	0.60	429.00	21.79
N-36	5.0	0.44	0.56	428.56	21.67
N-37	5.0	0.47	0.58	403.11	14.45
N-38	5.0	0.45	0.58	461.90	31.14
N-39	5.0	0.42	0.62	469.58	33.32
N-40	5.0	0.44	0.58	408.59	16.00

หมายเหตุ สายพันธุ์ ATCC 35247 เป็นตัวควบคุมในแต่ละครั้งของการทดลอง

สายพันธุ์	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์ (%)
N-41	5.0	0.46	0.57	368.02	4.48
N-42	5.0	0.43	0.59	311.42	-11.58
N-43	5.0	0.42	0.58	308.58	-12.39
N-44	5.0	0.48	0.58	407.28	15.63
N-45	5.0	0.47	0.66	392.81	11.52
N-46	5.0	0.46	0.61	393.46	11.71
N-47	5.0	0.45	0.62	359.90	2.18
N-48	5.0	0.50	0.54	365.83	3.86
N-49	5.0	0.49	0.53	440.63	25.10
N-50	5.0	0.44	0.61	436.68	23.98

หมายเหตุ สายพันธุ์ ATCC 35247 เป็นตัวควบคุมในแต่ละครั้งของการทดลอง

3.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่ได้จากการกลายพันธุ์เชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 ด้วย NTG หลังจากถ่ายเชื้อบนอาหารวุ้นแข็ง BHI เป็นจำนวน 5 ครั้ง

จากการทดลองในข้อ 3.2.2 พบว่าเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ได้แก่ N-4, N-6, N-10, N-11, N-13, N-16, N-20, N-25, N-26, N-32 และ N-33 ดังนั้นเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่เสถียรและให้ผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูงเพื่อนำไปใช้ในการกลายพันธุ์ซ้ำ จึงทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อภายหลังการถ่ายเชื้อบนอาหารแข็ง BHI เป็นจำนวน 5 ครั้ง โดยเลี้ยงเชื้อครั้งละ 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และนำไปเลี้ยงในอาหารสูตรสำหรับการผลิตเป็นเวลา 36 ชั่วโมง นำน้ำหมักที่ได้วิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำตาลที่เหลือภายหลังการหมักและปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 3.21 พบว่า เมื่อเปรียบเทียบผลที่ได้ในการทดลองนี้กับผลที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.2.2 พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์ให้ค่าร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์ลดลง ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์กลายที่ได้จากการชักนำโดย NTG ที่ได้ทั้งหมด 11 สายพันธุ์นั้นไม่มีความเสถียรและ

ประมาณครึ่งหนึ่งของทั้งหมดมีประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกต่ำกว่าหรือเท่ากับสายพันธุ์ตั้งต้น

ตารางที่ 3.21 แสดงค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือภายหลังการหมักและปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้ เมื่อทำการหมักเพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิกเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมงโดยเชื้อสายพันธุ์กลาย ที่ถ่ายเชื้อบนอาหารแข็งลาดเอียง BHI เป็นจำนวน 5 ครั้ง

สายพันธุ์	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์ (%)
ATCC 35247	5.5	0.36	0.65	434.04	
N-4	5.5	0.35	0.56	402.78	-7.20
N-6	5.5	0.36	0.54	414.08	-4.60
N-10	5.5	0.34	0.65	422.20	-2.70
N-11	5.5	0.39	0.60	446.10	2.80
N-13	5.5	0.38	0.59	453.34	4.40
N-16	5.5	0.39	0.50	432.95	-0.30
N-20	5.5	0.34	0.56	424.40	-2.20
N-25	5.5	0.36	0.62	434.26	0.05
N-26	5.5	0.38	0.63	445.02	2.50
ATCC 35247	5.1	0.29	0.58	593.92	
N-32	5.1	0.32	0.59	560.12	-5.70
N-33	5.2	0.32	0.54	609.42	2.60

หมายเหตุ สายพันธุ์ ATCC 35247 เป็นตัวควบคุมในแต่ละครั้งของการทดลอง

3.3 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์กับเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตและการคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูง

3.3.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

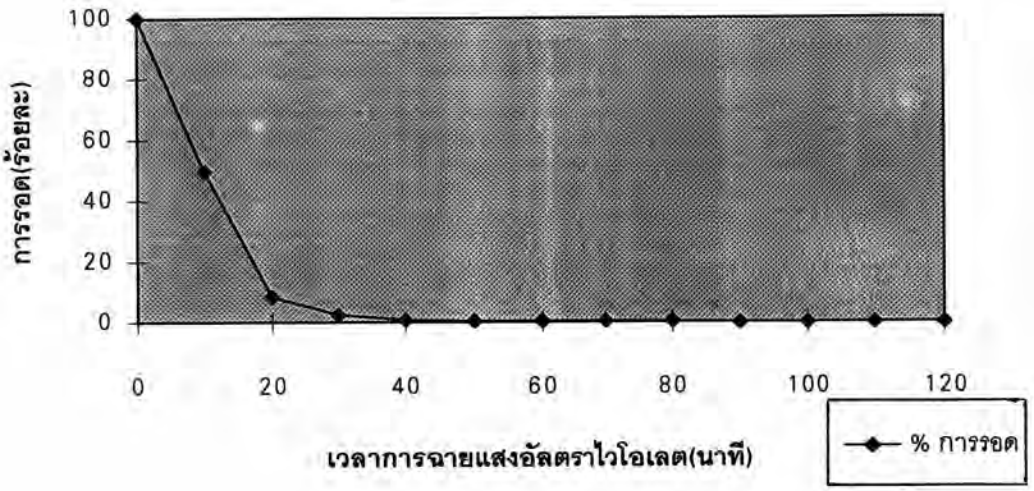
จากการทดลองในข้อ 3.2 เนื่องจากไม่สามารถหาสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูงได้จึงได้เปลี่ยนมาใช้การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์กับจุลินทรีย์ด้วยการใช้แสงอัลตราไวโอเลต ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมกันมากและในการปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์มักนิยมเริ่มต้นการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยวิธีนี้ เนื่องจากเป็นวิธีการที่ง่าย สะดวก เสียค่าใช้จ่ายต่ำ และมีอันตรายในการทำน้อย แหล่งกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลตโดยส่วนใหญ่ใช้หลอดฆ่าเชื้อ (germicidal lamp) ซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดไอปรอท (mercury vapor tube) ที่ปล่อยแสงความยาวคลื่น 2537 Å ซึ่งใกล้เคียงกับสเปกตรัมดูดกลืนของดีเอ็นเอ (2600 Å) จึงสามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ แต่การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยวิธีนี้ยังต้องขึ้นกับปัจจัยอื่นๆ หลายอย่าง เช่น ระยะห่างระหว่างแหล่งกำเนิดแสงกับเซลล์ ระยะเวลาในการฉายแสง ความหนาแน่นของเซลล์ที่ใช้ อายุและภาวะการเจริญของเซลล์ เป็นต้น (Fantini, 1975) การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกที่มีรายงานนั้นไม่สามารถระบุได้อย่างชัดเจนในเรื่อง ขนาดกำลังของหลอดฆ่าเชื้อ และระยะห่างระหว่างแหล่งกำเนิดแสงและเซลล์ ดังนั้นการทดลองนี้จึงได้ทำตามรายงานวิธีการชักนำยีสต์ เพื่อให้เกิดการกลายพันธุ์สำหรับการผลิตกรดมะนาว ซึ่งใช้หลอดฆ่าเชื้อที่มีกำลัง 15 วัตต์ จำนวน 3 หลอด และระยะห่างระหว่างเซลล์และแหล่งกำเนิดแสงเท่ากับ 30 เซนติเมตร (สมเกียรติ พรสุทธิมาศ, 2539; Hamissa et al., 1982; Suzuki et al., 1974) โดยทำตามวิธีการในข้อ 2.5 คือใช้หัวเชื้อตั้งต้นอายุ 7 ชั่วโมง ซึ่งอยู่ในช่วงกึ่งกลางการเจริญทวีคูณ ใช้หลอดฆ่าเชื้อขนาดกำลัง 15 วัตต์จำนวน 3 หลอด ระยะห่างระหว่างแหล่งกำเนิดแสงและเซลล์เท่ากับ 30 เซนติเมตร ระยะเวลาการฉายแสงอยู่ในช่วง 0-120 นาที สาเหตุที่ระยะเวลาการฉายแสงนานกว่าที่มีรายงานในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตกับจุลินทรีย์อื่นๆ เนื่องมาจากการกำหนดตัวแปรในเรื่องร้อยละการรอดของเชื้อซึ่งปกติโดยทั่วไปในการกลายพันธุ์กับจุลินทรีย์อื่นๆใช้ค่าร้อยละการรอดที่ 5% ในการคัดเลือก แต่จากรายงานเกี่ยวกับการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกทำการคัดเลือกโคโลนีที่รอดชีวิตจากจานเพาะเลี้ยงที่มีค่าร้อยละการรอดต่ำกว่า 0.1% ทำให้ต้องใช้ระยะเวลาในการฉายรังสีนานขึ้น (Nimrod et al., 1988) หลังจากการฉายแสงอัลตราไวโอเลต บ่มเชื้อในที่มืด ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานเพาะเลี้ยงแล้ว

คำนวณหาค่าร้อยละการรอดและเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการรอดและช่วงระยะเวลาการฉายแสงอัลตราไวโอเลต ผลแสดงดังตารางที่ 3.22 และ รูปที่ 3.20 โดยในช่วง 0-10 นาทีแรกเซลล์มีการตายอย่างรวดเร็วและต่อมาจะค่อยๆลดลงจนกระทั่งช่วงเวลาการฉายรังสีประมาณ 80-90 นาที ค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์จะลดลงจนถึง 0.1 % ทำการเก็บโคโลนีที่มีขนาดใหญ่และมีเมือกมากจากจานเพาะเลี้ยงในช่วง 80 นาทีขึ้นไปที่มีค่าร้อยละการรอดต่ำกว่า 0.1% ไปทำการคัดเลือกในขั้นปฐมภูมิบนอาหารแข็งที่มีเลือดผสมอยู่ตามวิธีการคัดเลือกในข้อ 2.5.4.1

ตารางที่ 3.22 เปรียบเทียบค่าร้อยละการรอดของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 ที่ระยะเวลาต่างๆกันในการฉายแสงอัลตราไวโอเลต

ระยะเวลาในการฉายรังสี (นาที)	จำนวนเซลล์จากจานเพาะเลี้ยง (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละการรอด
0	1.73×10^{9}	100
10	8.61×10^{8}	49.8
20	1.44×10^{8}	8.32
30	4.55×10^{7}	2.63
40	9.67×10^{6}	0.56
50	7.1×10^{6}	0.41
60	3.9×10^{6}	0.23
70	3.45×10^{6}	0.19
80	3.27×10^{6}	0.18
90	8.23×10^{5}	0.05
100	4.85×10^{5}	0.03
110	5.66×10^{5}	0.033
120	3.4×10^{5}	0.02

รูปที่ 3.20 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการรอดของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 และช่วงเวลาการฉายแสงอัลตราไวโอเลต



3.3.2 การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูงหลังจากผ่านการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

จากรายงานของ Nimrod และคณะ (1988) และ Akasaka, Komasaki and Arai (1989) ได้คัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่ไม่สร้างสารสเตรปโตไลซินซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อยเม็ดเลือดแดง ในขั้นปฐมภูมิบนอาหารวุ้นแข็งสำหรับการคัดเลือกเชื้อ (TSA + 5% sheep blood) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้คัดเลือกเชื้อจากโคโลนีที่เจริญบนจานเพาะเลี้ยงจากขั้นตอน 3.3.1 ที่มีโคโลนีขนาดใหญ่และมีเมือกมาก ไปคัดเลือกในขั้นปฐมภูมิบนอาหารวุ้นแข็งที่ผสมเลือดแกะและได้สุ่มคัดเลือกโคโลนีจำนวน 10 โคโลนีจากโคโลนีทั้งหมด 524 โคโลนีที่ไม่มีคุณสมบัติการย่อยเม็ดเลือดแดง ไปทำการคัดเลือกเชื้อในขั้นทุติยภูมิต่อโดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรสำหรับการผลิตตามวิธีการข้อ 2.5.4.2 วิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้ด้วยวิธีคาร์บาโซล ค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือจากการหมัก ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.23 โดยเปรียบเทียบสายพันธุ์ใหม่ที่ได้กับสายพันธุ์ตั้งต้นคือ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 ที่ให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ระยะเวลา 36 ชั่วโมงเท่ากับ 352.22 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเห็นว่ามี 3 สายพันธุ์ที่ให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นมาก คือ สายพันธุ์ U-8, U-9 และ U-2

ซึ่งจากผลจะพบว่าสายพันธุ์ที่ให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงที่สุดคือสายพันธุ์ U-8 ให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกมากที่สุดคือ 1009.76 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 186.68%

ตารางที่ 3.23 เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณน้ำตาลที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* ATCC 35247 และเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้ในอาหารสูตร PM3 ที่ระยะเวลาการหมัก 36 ชั่วโมง

สายพันธุ์	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์ (%)
ATCC 35247	4.9	0.41	0.54	352.22	
U-1	4.9	0.42	0.53	315.82	-10.33
U-2	5.1	0.50	0.47	480.32	36.33
U-3	4.9	0.47	0.43	440.18	24.97
U-4	4.9	0.44	0.45	411.46	16.82
U-5	4.9	0.43	0.56	368.46	4.61
U-6	4.9	0.42	0.54	432.29	22.73
U-7	4.9	0.46	0.50	459.06	30.33
U-8	7.1	0.45	0.43	1009.76	186.68
U-9	4.9	0.44	0.54	486.69	38.18
U-10	4.9	0.43	0.58	408.82	16.07

3.3.3 การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้จากการกลายพันธุ์เชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต หลังจากถ่ายเชื้อบนอาหารวุ้นแข็งลาคเอียง BHI

จากการทดลองในข้อ 3.3.2 พบว่ามีเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่ให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* ATCC 35247 ดังนั้นเพื่อคัดเลือกให้ได้สายพันธุ์ใหม่ที่มีความเสถียรเพื่อใช้เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นในการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG จึงต้องทดสอบประสิทธิภาพ

การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์อีกครั้ง โดยทดสอบประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่ได้ หลังจากการถ่ายเชื้อจำนวน 5 ครั้งบนอาหารแข็งลาดเอียง BHI ทุกๆ 24 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.24 พบว่า เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก มีเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตสูงตามลำดับดังนี้ U-8, U-9 และ U-2 และเชื้อทุกสายพันธุ์ให้ค่าร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์ต่ำลง โดยค่าร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 31.83, 20.38 และ 7.6% เมื่อตรวจสอบความเสถียรของสายพันธุ์ที่ได้ใหม่อีกครั้งที่การถ่ายเชื้อ 10 ครั้งบนอาหารวุ้นแข็ง BHI ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 3.25 พบว่าสายพันธุ์ U-8 และ U-2 มีแนวโน้มในการลดลงของปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ส่วนสายพันธุ์ U-9 ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้ใกล้เคียงกับผลที่ได้จากตารางที่ 3.24 ถึงแม้ว่าเชื้อที่ได้จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์แสงอัลตราไวโอเลตนี้จะไม่มีความเสถียรแต่ก็ยังคงมีประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ดังนั้นจึงคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ U-8 เพื่อใช้เป็นสายพันธุ์ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG ต่อไป

ตารางที่ 3.24 เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ของเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* ATCC 35247 และเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้ เมื่อถ่ายเชื้อไป 5 ครั้ง ที่ระยะเวลาการหมัก 36 ชั่วโมง

สายพันธุ์	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์ (%)
ATCC 35247	5.2	0.28	0.43	593.92	
U-2	5.2	0.27	0.44	639.08	7.60
U-8	6.9	0.35	0.48	783.00	31.83
U-9	5.2	0.26	0.49	714.98	20.38

ตารางที่ 3.25 เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ของเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* ATCC 35247 และเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้ เมื่อถ่ายเชื้อไป 10 ครั้งที่ระยะเวลาการหมัก 36 ชั่วโมง

สายพันธุ์	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์ (%)
ATCC 35247	5.2	0.24	0.44	573.72	
U-2	5.2	0.29	0.48	612.34	6.73
U-8	5.2	0.25	0.47	713.50	24.36
U-9	5.2	0.28	0.45	709.12	23.60

3.4 <u>การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำกับเชื้อ *S. zooepidemicus* U-8 ด้วยสารเคมี NTG และการคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูง</u>

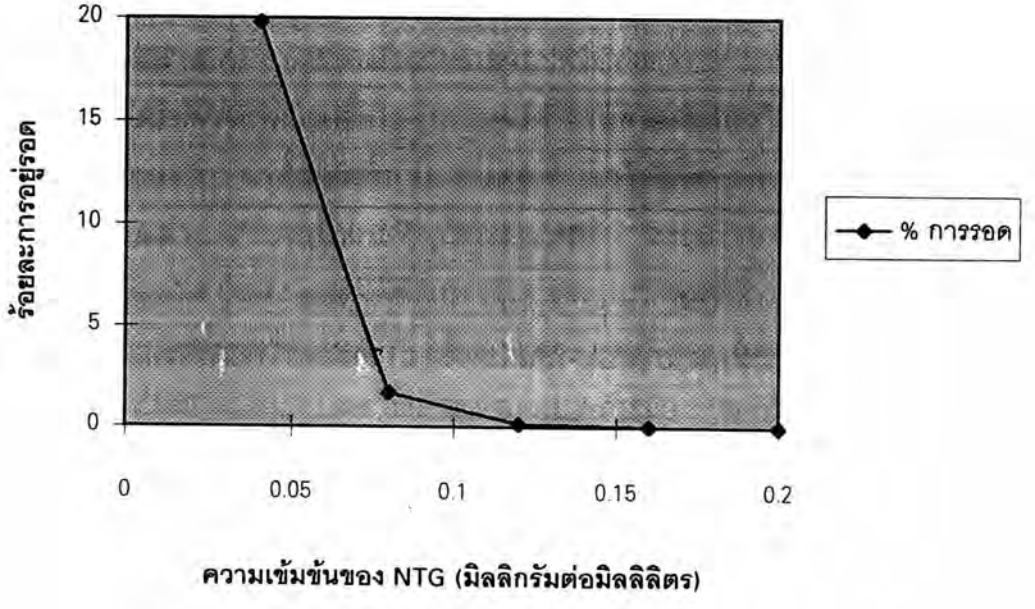
3.4.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำกับ *S. zooepidemicus* U-8 ด้วยสารเคมี NTG

การทดลองนี้ได้นำสายพันธุ์ U-8 ที่มีประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูงไปทำการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG ตามวิธีการในข้อ 2.5.2 นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนผิวหน้าอาหารแข็ง (tryptic soy agar) ภายหลังการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการอยู่รอดของเชื้อ *S. zooepidemicus* U-8 และความเข้มข้นของ NTG ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.26 และรูปที่ 3.21 พบว่า ความเข้มข้นของ NTG ที่ให้ค่าร้อยละการอยู่รอดต่ำกว่า 0.1% คือช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 0.12-0.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (0.82-1.087 มิลลิโมลาร์) ซึ่งใกล้เคียงกับผลที่ได้จากการทดลองที่ 3.2.1.3 ที่ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์กับเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 จากนั้นเก็บเชื้อจากจานเพาะเลี้ยงที่มีโคโลนีขนาดใหญ่ มีเมือกมาก ซึ่งเจริญในจานเพาะเลี้ยงที่ให้ค่าร้อยละการรอดต่ำกว่า 0.1% ไปคัดเลือกในขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิต่อไป

ตารางที่ 3.26 แสดงจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตในแต่ละค่าความเข้มข้นของ NTG ที่ใช้ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์กับเชื้อ *S. zooepidemicus* U-8

ความเข้มข้นของ NTG (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละการรอด
0	2.56×10^{9}	100
0.04	5.08×10^{8}	19.8
0.08	4.37×10^{7}	1.71
0.12	3.63×10^{6}	0.142
0.16	7.22×10^{5}	0.0282
0.20	3.73×10^{5}	0.0146

รูปที่ 3.21 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ NTG และค่าร้อยละการอยู่รอดของเชื้อ *S. zooepidemicus* U-8



3.4.2 การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ใหม่ ซึ่งมีประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูงที่ได้จากการกลายพันธุ์เชื้อ *S. zooepidemicus* U-8 ซ้ำด้วย NTG

หลังจากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำกับเชื้อสายพันธุ์ใหม่ด้วย NTG และเก็บเชื้อที่ผ่านการชักนำให้กลายพันธุ์จากจานเพาะเลี้ยงที่ให้ค่าร้อยละการอยู่รอดต่ำกว่า 0.1% ไปตรวจสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงโดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งผสมเลือด (tryptic soy agar + 5% sheep blood) คัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่ไม่ ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงไปทำการคัดเลือกในขั้นทุติยภูมิต่อไปด้วยการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.5.4.2 นำน้ำหมักที่ระยะเวลา 36 ชั่วโมงไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือหลังการหมัก และปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.4.1-2.4.5 ผลที่ได้ดังแสดงในตาราง 3.27 พบว่าสายพันธุ์ใหม่ที่ให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น U-8 ได้แก่ UN-5, UN-7 และ UN-9 ซึ่งมีค่าร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 47.5%, 31.4% และ 28.2% ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ U-8

3.4.3 การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้จากการกลายพันธุ์เชื้อ *S. zooepidemicus* U-8 ด้วย NTG หลังจากการถ่ายเชื้อบนอาหารวุ้นแข็ง BHI เป็นจำนวน 5 ครั้ง

จากการทดลองในข้อ 3.4.2 พบว่า มีเชื้อจำนวน 3 สายพันธุ์ที่ให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ได้แก่ UN-5, UN-7 และ UN-9 ดังนั้นเพื่อคัดเลือกหาสายพันธุ์ใหม่ ที่มีความเสถียรสำหรับใช้เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นในการกลายพันธุ์ต่อไปด้วย NTG และแสงอัลตราไวโอเลต จึงทดสอบประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ เมื่อถ่ายเชื้อลงบนอาหารแข็ง BHI เป็นจำนวน 5 ครั้ง ครั้งละ 24 ชั่วโมงและนำไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรสำหรับการผลิต วิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือหลังการหมัก ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกและร้อยละการเพิ่มขึ้นของผลิตภัณฑ์ ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 3.28 พบว่าเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ไม่มีความเสถียรโดยพิจารณาได้จากค่าร้อยละการเพิ่มขึ้นของผลิตภัณฑ์ในตารางที่ 3.28 ที่ลดลงเมื่อเทียบกับตารางที่ 3.27 แต่เชื้อสายพันธุ์ UN-5 ยังคงมีประสิทธิภาพสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น U-8 จึงได้คัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ UN-5 เพื่อใช้เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นในการกลายพันธุ์ด้วย NTG และแสงอัลตราไวโอเลตต่อไป

ตารางที่ 3.27 เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกและร้อยละการเพิ่มขึ้นของผลิตภัณฑ์ของเชื้อสายพันธุ์ ใหม่ที่ได้ และสายพันธุ์ตั้งต้น U-8 ที่ระยะเวลาการหมัก 36 ชั่วโมง

สายพันธุ์	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์ (%)
U-8	6.3	0.30	0.48	373.24	
UN-1	6.3	0.35	0.51	390.80	4.70
UN-2	6.3	0.32	0.50	376.75	0.90
UN-3	6.3	0.35	0.45	454.54	21.80
UN-4	6.3	0.35	0.50	414.04	10.90
UN-5	6.3	0.31	0.42	550.46	47.50
UN-6	6.3	0.34	0.48	430.26	15.30
UN-7	6.3	0.34	0.45	490.36	31.40
UN-8	6.3	0.36	0.48	421.50	12.90
UN-9	6.3	0.33	0.51	478.54	28.20
UN-10	6.3	0.29	0.48	404.83	8.50

ตารางที่ 3.28 แสดงค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกและร้อยละการเพิ่มขึ้นของผลิตภัณฑ์ของเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่ได้ภายหลังการถ่ายเชื้อจำนวน 5 ครั้ง ที่ระยะเวลาการหมัก 36 ชั่วโมง

สายพันธุ์	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์
U-8	5.2	0.38	0.52	425.52	
UN-5	5.2	0.38	0.50	433.66	1.90
UN-7	5.2	0.37	0.50	430.05	1.10
UN-9	5.2	0.36	0.49	421.50	-0.94

3.5 <u>การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำกับเชื้อ *S. zooepidemicus* UN-5 ด้วย NTGและการคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูง</u>

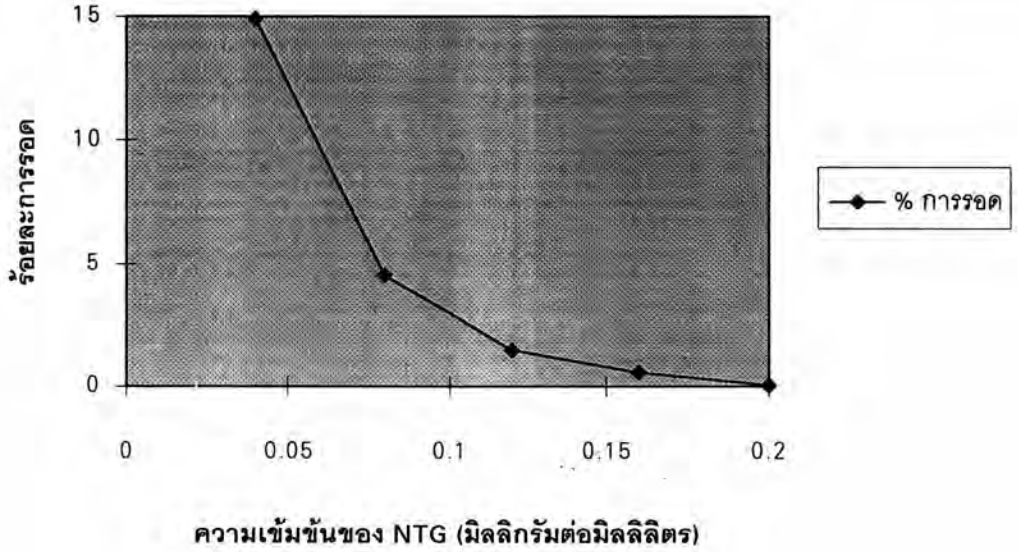
3.5.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำกับเชื้อ *S. zooepidemicus* UN-5 ด้วย NTG

เมื่อนำเชื้อ *S. zooepidemicus* UN-5 มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG ตามวิธีการทดลองข้อ 2.5.2 โดยใช้ความเข้มข้นของ NTG ในช่วง 0-0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นับจำนวนโคโลนีและคำนวนค่าร้อยละของการรอดของเชื้อที่แต่ละความเข้มข้นของ NTG ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.29 และรูปที่ 3.22 พบว่าความเข้มข้นของ NTG ที่ให้ค่าร้อยละการอยู่รอดต่ำกว่า 0.1% อยู่ในช่วง 0.16-0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำโคโลนีที่เจริญบนจานเพาะเลี้ยงที่มีค่าร้อยละการอยู่รอดต่ำกว่า 0.1% ไปคัดเลือกในขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิ

ตารางที่ 3.29 แสดงจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตและร้อยละการอยู่รอดของเชื้อสายพันธุ์ UN-5 ในแต่ละความเข้มข้นของ NTG

ความเข้มข้นของ NTG (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละการรอด
0	$1.69x10^{9}$	100
0.04	$2.52x10^{8}$	14.9
0.08	$7.68x10^{7}$	4.54
0.12	$2.50x10^{7}$	1.48
0.16	$9.73x10^{6}$	0.576
0.20	$7.1x10^{5}$	0.042

รูปที่ 3.22 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ NTG และร้อยละการรอดของเชื้อ *S. zooepidemicus* UN-5



3.5.2 การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ใหม่ซึ่งมีประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูง ที่ได้จากการกลายพันธุ์ *S. zooepidemicus* UN-5 ซ้ำด้วย NTG

การกลายพันธุ์เชื้อสายพันธุ์ UN-5 ซ้ำด้วย NTG และเก็บเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีใหญ่มีเมือกมาก ไปเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีเลือดผสมอยู่ เพื่อดูการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง จากนั้นคัดเลือกเชื้อแบบสุ่มจากโคโลนีที่ไม่มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง จำนวน 30 โคโลนีจาก 326 โคโลนี ไปคัดเลือกต่อในขั้นทุติยภูมิในอาหารเหลวสูตรสำหรับการผลิตตามวิธีการทดลองในข้อ 2.5.4.2 เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมงนำน้ำหมักที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือหลังการหมัก ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้ และค่าร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.30 พบว่า มีเชื้อทั้งหมด 4 สายพันธุ์ ที่ให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ได้แก่ UNN-14, UNN-18, UNN-16 และ UNN-19 ตามลำดับ โดยมีค่าร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 24.5%, 21.7%, 20.5% และ 8.2% ตามลำดับ

3.5.3 การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้จากการกลายพันธุ์เชื้อ *S. zooepidemicus* UN-5 ด้วย NTG ภายหลังจากการถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง

จากการทดลองในข้อ 3.5.2 มีเชื้อสายพันธุ์ใหม่จำนวน 4 สายพันธุ์ที่ให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ได้แก่ UNN-14, UNN-18, UNN-16 และ UNN-19 ตามลำดับ ดังนั้นเพื่อคัดเลือกหาเชื้อที่เสถียรและมีประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูงสุด จึงทดสอบเชื้อทั้งหมด 4 สายพันธุ์อีกครั้งในอาหารเหลวสูตรสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก ภายหลังจากการถ่ายเชื้อทั้งหมด 5 ครั้ง โดยใช้ระยะเวลาการหมัก 36 ชั่วโมง นำน้ำหมักที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือหลังการหมัก ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และค่าร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์ ดังที่แสดงในตารางที่ 3.31 พบว่า เชื้อทั้งหมด 4 สายพันธุ์ไม่มีความเสถียรทำให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้ลดลง ซึ่งพิจารณาได้จากค่าร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์ที่มีค่าเท่ากับ -0.14%, 5.7%, -2.4% และ -1.7%ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่ามีเพียงสายพันธุ์ UNN-18 เท่านั้นที่ยังคงให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น แต่เมื่อทดสอบความเสถียรของเชื้อต่อไปในการถ่ายเชื้อครั้งที่ 10 พบว่า เชื้อสายพันธุ์ UNN-18 มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกลดลง โดยให้ค่าร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์เท่ากับ -0.12% (ข้อมูลไม่ได้แสดงไว้) ดังนั้นจึงไม่มีการนำสายพันธุ์ใหม่ที่ได้ทั้ง 4 สายพันธุ์นี้ไปศึกษาการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก และจะคัดเลือกจากสายพันธุ์อื่นๆที่ได้คัดเลือกเก็บไว้ก่อนแล้วในการทดลองที่ผ่านมา

ตารางที่ 3.30 แสดงค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และค่าร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์ เมื่อหมักโดยเชื้อสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ *S. zooepidemicus* UN-5 ด้วย NTG

สายพันธุ์	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์ (%)
UN-5	5.3	0.36	0.48	623.72	
UNN-1	5.3	0.38	0.47	576.78	-7.53
UNN-2	5.3	0.35	0.41	493.46	-20.90
UNN-3	5.3	0.37	0.44	562.32	-9.84
UNN-4	5.3	0.42	0.44	565.38	-9.35
UNN-5	5.3	0.36	0.48	564.52	-9.49
UNN-6	5.3	0.40	0.43	520.19	-16.6
UNN-7	5.3	0.38	0.47	604.86	-3.02
UNN-8	5.3	0.40	0.48	626.80	0.49
UNN-9	5.3	0.37	0.43	614.32	-1.51
UNN-10	5.3	0.38	0.44	548.70	-12.03
UN-5	5.2	0.47	0.43	564.06	
UNN-11	5.5	0.48	0.42	553.54	-1.87
UNN-12	5.2	0.49	0.44	500.46	-11.28
UNN-13	5.2	0.49	0.46	559.68	-0.78
UNN-14	5.2	0.45	0.43	702.26	24.50
UNN-15	5.2	0.49	0.51	454.84	-19.40
UNN-16	5.2	0.50	0.49	679.88	20.53
UNN-17	5.2	0.47	0.49	536.00	-4.97
UNN-18	5.2	0.48	0.51	686.46	27.70
UNN-19	5.2	0.49	0.48	610.56	8.24

หมายเหตุ สายพันธุ์ UN-5 เป็นตัวควบคุมในแต่ละครั้งของการทดลอง

สายพันธุ์	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์ (%)
UNN-20	5.2	0.47	0.43	564.06	0.00
UN-5	5.2	0.38	0.44	659.72	
UNN-21	5.2	0.39	0.41	621.98	-5.72
UNN-22	5.2	0.42	0.42	609.26	-7.65
UNN-23	5.2	0.40	0.43	547.40	-17.03
UNN-24	5.2	0.41	0.47	606.20	-8.11
UNN-25	5.2	0.41	0.42	536.00	-18.75
UNN-26	5.2	0.43	0.48	578.12	-12.37
UNN-27	5.2	0.50	0.42	638.22	-3.26
UNN-28	5.2	0.42	0.42	553.10	-16.20
UNN-29	5.2	0.42	0.44	547.72	-16.98
UNN-30	5.2	0.39	0.43	566.26	-14.17

หมายเหตุ สายพันธุ์ UN-5 เป็นตัวควบคุมในแต่ละครั้งของการทดลอง

ตารางที่ 3.31 แสดงค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และค่าร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์ เมื่อหมักโดยเชื้อสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ *S. zooepidemicus* UN-5 ด้วย NTG ที่ถ่ายเชื้อมาแล้ว 5 ครั้ง

สายพันธุ์	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์ (%)
UN-5	5.2	0.40	0.43	630.05	
UNN-14	5.2	0.42	0.44	629.14	-0.14
UNN-18	5.2	0.40	0.44	666.24	5.70
UNN-16	5.2	0.35	0.47	614.66	-2.40
UNN-19	5.2	0.40	0.43	619.19	-1.70

3.6 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำกับเชื้อ *S. zooepidemicus* UN-5 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต และการคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูง

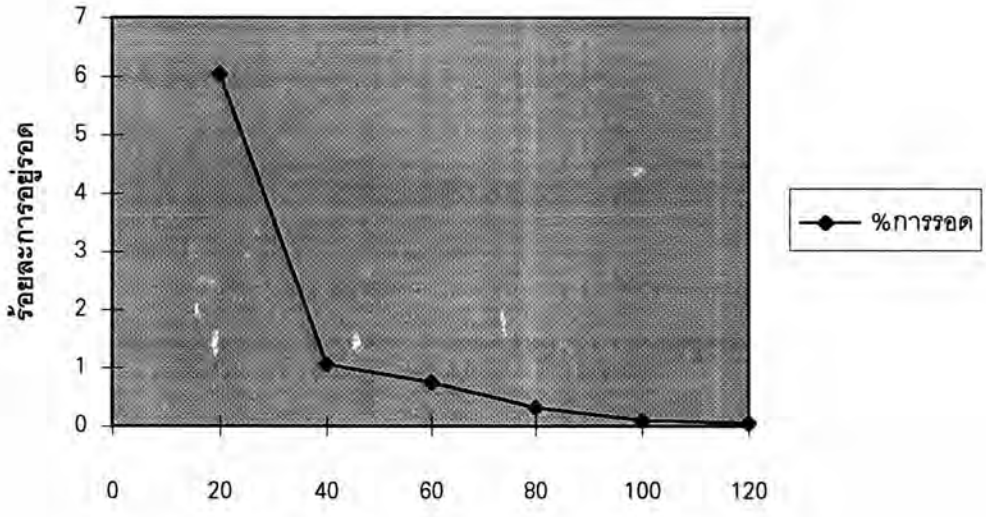
3.6.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำกับเชื้อ *S. zooepidemicus* UN-5 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

จากผลการทดลองในข้อ 3.5.3 ไม่สามารถคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่เสถียรและมีประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูง จึงได้นำเชื้อ *S. zooepidemicus* UN-5 มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยแสงอัลตราไวโอเลตตามวิธีการทดลองในข้อ 2.5.3 นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็งที่แต่ละเวลาในการฉายแสง และเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการอยู่รอดและระยะเวลาในการฉายแสง ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 3.32 และรูปที่ 3.23 พบว่าระยะเวลาในการฉายแสงที่ทำให้เชื้อ *S. zooepidemicus* UN-5 ได้ค่าร้อยละการอยู่รอดต่ำกว่า 0.1% คือช่วงระยะเวลาตั้งแต่ 100-120 นาที ซึ่งมากกว่าที่ใช้กับสายพันธุ์ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 เพื่อให้ได้ร้อยละการอยู่รอดต่ำกว่า 0.1%

ตารางที่ 3.32 แสดงจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต และค่าร้อยละการอยู่รอดของเชื้อ *S. zooepidemicus* UN-5 ที่ระยะเวลาของการฉายแสงอัลตราไวโอเลตต่างๆ

เวลาในการฉายแสงอัลตราไวโอเลต (นาที)	จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละการรอด
0	4.02×10^{9}	100
20	2.43×10^{8}	6.04
40	4.26×10^{7}	1.06
60	3.00×10^{7}	0.746
80	1.28×10^{7}	0.318
100	4.09×10^{6}	0.102
120	2.34×10^{6}	0.0582

รูปที่ 3.23 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการรอด ของเชื้อ *S. zooepidemicus* UN-5 กับระยะเวลาในการฉายแสงอัลตราไวโอเลต



3.6.2 การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ซึ่งมีประสิทธิ ภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูง

หลังจากการกลายพันธุ์เชื้อ *S. zooepidemicus* UN-5 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต และเก็บเชื้อที่มีโคโลนีขนาดใหญ่ มีเมือกมากจากจานเพาะเลี้ยงที่มีค่าร้อยละการอยู่รอดต่ำกว่า 0.1% ไปเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีเลือดผสมอยู่เพื่อดูการย่อยเม็ดเลือดแดง ได้สุ่มคัดเลือกเชื้อ 30 โคโลนีจาก 224 โคโลนี ที่ไม่ให้ผลการย่อยเม็ดเลือดแดงไปคัดเลือกในขั้นทุติยภูมิในอาหารเหลวสูตรสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก ตามวิธีการทดลองข้อ 2.5.4.2 ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 3.33 พบว่าสายพันธุ์ที่ให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ได้แก่ UNU-2, UNU-5, UNU-11, UNU-6 และ UNU-29 ซึ่งมีค่าร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 14.6%, 13.3%, 9.9%, 9.95% และ 7.3% ตามลำดับ

ตารางที่ 3.33 แสดงค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และค่าร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์ เมื่อหมักเชื้อสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ *S. zooepidemicus* UN-5 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

สายพันธุ์	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์ (%)
UN-5	5.3	0.29	0.39	677.26	
UNU-1	5.3	0.34	0.39	649.18	-4.15
UNU-2	5.3	0.30	0.44	775.96	14.6
UNU-3	5.3	0.29	0.40	640.84	-5.70
UNU-4	5.3	0.50	0.41	689.10	1.75
UNU-5	5.3	0.52	0.48	767.20	13.30
UNU-6	5.3	0.47	0.43	744.38	9.91
UNU-7	5.3	0.53	0.44	650.94	-3.89
UNU-8	5.3	0.55	0.42	633.38	-6.48
UNU-9	5.3	0.46	0.45	616.70	-8.94
UNU-10	5.3	0.41	0.47	634.70	-6.28
UN-5	5.2	0.50	0.42	564.06	
UNU-11	5.2	0.47	0.40	620.24	9.96
UNU-12	5.2	0.46	0.41	602.68	6.85
UNU-13	5.2	0.49	0.42	608.80	7.93
UNU-14	5.2	0.49	0.46	591.26	4.82
UNU-15	5.2	0.49	0.42	583.38	3.43
UNU-16	5.2	0.50	0.40	559.24	-0.85
UNU-17	5.2	0.44	0.43	614.52	8.95
UNU-18	5.2	0.44	0.44	593.90	5.29

หมายเหตุ สายพันธุ์ UN-5 เป็นตัวควบคุมในแต่ละครั้งของการทดลอง

สายพันธุ์	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์ (%)
UNU-19	5.2	0.44	0.49	561.88	-0.39
UNU-20	5.2	0.48	0.40	520.64	-7.70
UN-5	5.2	0.38	0.44	659.72	
UNU-21	5.2	0.40	0.40	664.52	0.73
UNU-22	5.2	0.42	0.44	639.52	-3.06
UNU-23	5.2	0.36	0.46	647.84	-1.80
UNU-24	5.2	0.41	0.46	590.40	-10.51
UNU-25	5.2	0.42	0.40	683.40	3.59
UNU-26	5.2	0.40	0.46	624.60	-5.32
UNU-27	5.2	0.42	0.47	643.04	-2.53
UNU-28	5.2	0.41	0.46	607.06	-7.98
UNU-29	5.2	0.39	0.48	707.98	7.32
UNU-30	5.2	0.38	0.42	610.56	-7.45

หมายเหตุ สายพันธุ์ UN-5 เป็นตัวควบคุมในแต่ละครั้งของการทดลอง

3.6.3 **การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อสายพันธุ์ UNU-2, UNU-5, UNU-11, UNU-6 และ UNU-29 ที่คัดเลือกได้จากการกลายพันธุ์เชื้อ *S. zooepidemicus* UN-5 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต หลังการถ่ายเชื้อบนอาหารแข็งลาดเอียง BHI จำนวน 5 ครั้ง**

จากการทดลองในข้อ 3.6.2 พบว่ามีเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่ให้ประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ได้แก่ UNU-2, UNU-5, UNU-11, UNU-6 และ UNU-29 ซึ่งมีค่าร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 14.6%, 13.3%, 9.9%, 9.95% และ 7.3% ตามลำดับ ดังนั้นเพื่อทดสอบความเสถียรของเชื้อจึงได้ถ่ายเชื้อบนอาหารแข็งลาดเอียงไป 5 ครั้ง ครั้งละ 24 ชั่วโมง แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกตามวิธีการทดลองในข้อ 2.5.4.2 เป็นเวลา 36 ชั่วโมง นำน้ำหมักที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนัก

เซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์ ผลแสดงในตารางที่ 3.34

ตารางที่ 3.34 แสดงค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และค่าร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์ เมื่อหมักเชื้อสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ *S. zooepidemicus* UN-5 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ที่มีการถ่ายเชื้อไปแล้ว 5 ครั้ง

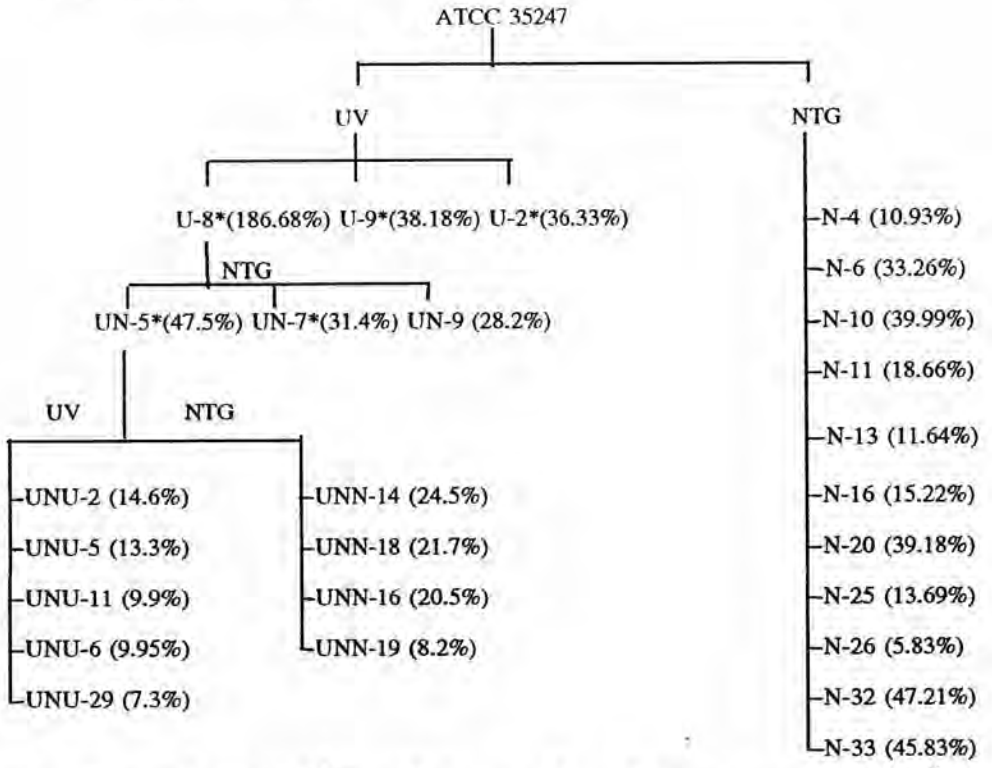
สายพันธุ์	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์ (%)
UN-5	5.2	0.38	0.38	645.66	
UNU-2	5.2	0.39	0.35	663.66	2.79
UNU-5	5.2	0.37	0.37	657.96	1.91
UNU-11	5.2	0.32	0.37	639.52	-0.95
UNU-6	5.2	0.39	0.39	696.12	7.81
UNU-29	5.2	0.37	0.39	590.40	-8.56

จากผลที่ได้พบว่าสายพันธุ์ UNU-11 และ UNU-29 ไม่มีความเสถียร โดยให้ค่าร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์ภายหลังการถ่ายเชื้อ 5 ครั้งเท่ากับ -0.95% และ -8.56% ส่วนสายพันธุ์ UNU-2, UNU-5 และ UNU-6 เมื่อทดสอบต่อไปในการถ่ายเชื้อครั้งที่ 10 (ข้อมูลไม่ได้แสดงไว้) พบว่าเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกใกล้เคียงกับสายพันธุ์ตั้งต้นและมีค่าร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์เท่ากับ -0.39%, -3.89% และ -1.51% ดังนั้นจึงมุ่งไปที่การทดสอบความเสถียรของเชื้อที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต 1 ครั้งและ เชื้อสายพันธุ์ตั้งต้นที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต 1 ครั้งกับ NTG อีก 1 ครั้ง

3.7 ความเสถียรของเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* ATCC 35247 และเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่ได้ในแต่ละขั้นของการกลายพันธุ์

การคัดเลือกเชื้อเพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่อไปนั้น ความเสถียรทางสายพันธุ์เป็นสิ่งที่มีความจำเป็นอย่างมาก ดังนั้นในการปรับปรุงสายพันธุ์จึงมุ่งเน้นหาสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงและให้ผลผลิตในปริมาณที่คงที่ ในการทดลองได้ทดสอบความเสถียรของเชื้อ 5 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้คือ U-2, U-8 U-9, UN-5 และ UN-7 (แสดงในรูปที่ 3.24) ซึ่งยังคงให้ผลผลิตสูงเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น ATCC 35247 ส่วนสายพันธุ์อื่นๆที่ได้จากการกลายพันธุ์นั้นไม่นำมาทดสอบ เนื่องจากเชื้อไม่มีความเสถียรทำให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้ลดลงใกล้เคียงสายพันธุ์ตั้งต้น ในการทดสอบความเสถียรจะถ่ายเชื้อลงบนอาหารแข็งลาดเอียง BHI ทุกๆ 24 ชั่วโมง ไป 1, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 ครั้ง แต่ละช่วงดังกล่าวเมื่อเชื้อเจริญนำเชื้อไปเลี้ยงเพื่อเตรียมหัวเชื้อตั้งต้นและถ่ายสู่อาหารสูตร PM3 นำน้ำหมักที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้ ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.4.1-2.4.5 เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อในแต่ละครั้งที่มีการถ่ายเชื้อ พบว่า สายพันธุ์กลายที่ได้จากการทดลองสามารถให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น โดยเชื้อที่ให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกภายหลังจากการถ่ายเชื้อ 30 ครั้งสูงที่สุดคือ UN-7 รองลงมาคือ U-8, UN-5, U-9 และ U-2 ตามลำดับ ซึ่งเชื้อสายพันธุ์ที่ได้ใหม่นี้มีความเสถียรทางสายพันธุ์เนื่องจากปริมาณผลผลิตที่ได้ในช่วง 10-30 ครั้งของการถ่ายเชื้อค่อนข้างคงที่ ผลแสดงในตารางที่ 3.35 จะเป็นที่สังเกตได้ว่าเชื้อทุกสายพันธุ์รวมถึงสายพันธุ์ตั้งต้นจะมีความแตกต่างในปริมาณผลผลิตในช่วงแรก คือประมาณช่วงการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-10 แต่หลังจากนั้นปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้ก็จะเริ่มคงที่ ซึ่งหากเราพิจารณาเมื่อเชื้อเริ่มมีความคงที่ของปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก พบว่าสายพันธุ์ที่เหมาะสมในการนำไปพัฒนาต่อไปคือ สายพันธุ์ UN-7 เนื่องจากให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงที่สุดในช่วงการถ่ายเชื้อครั้งที่ 10-30 ดังนั้นจึงได้คัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ UN-7 ไปใช้ในการศึกษาการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกและการศึกษาการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตรต่อไป

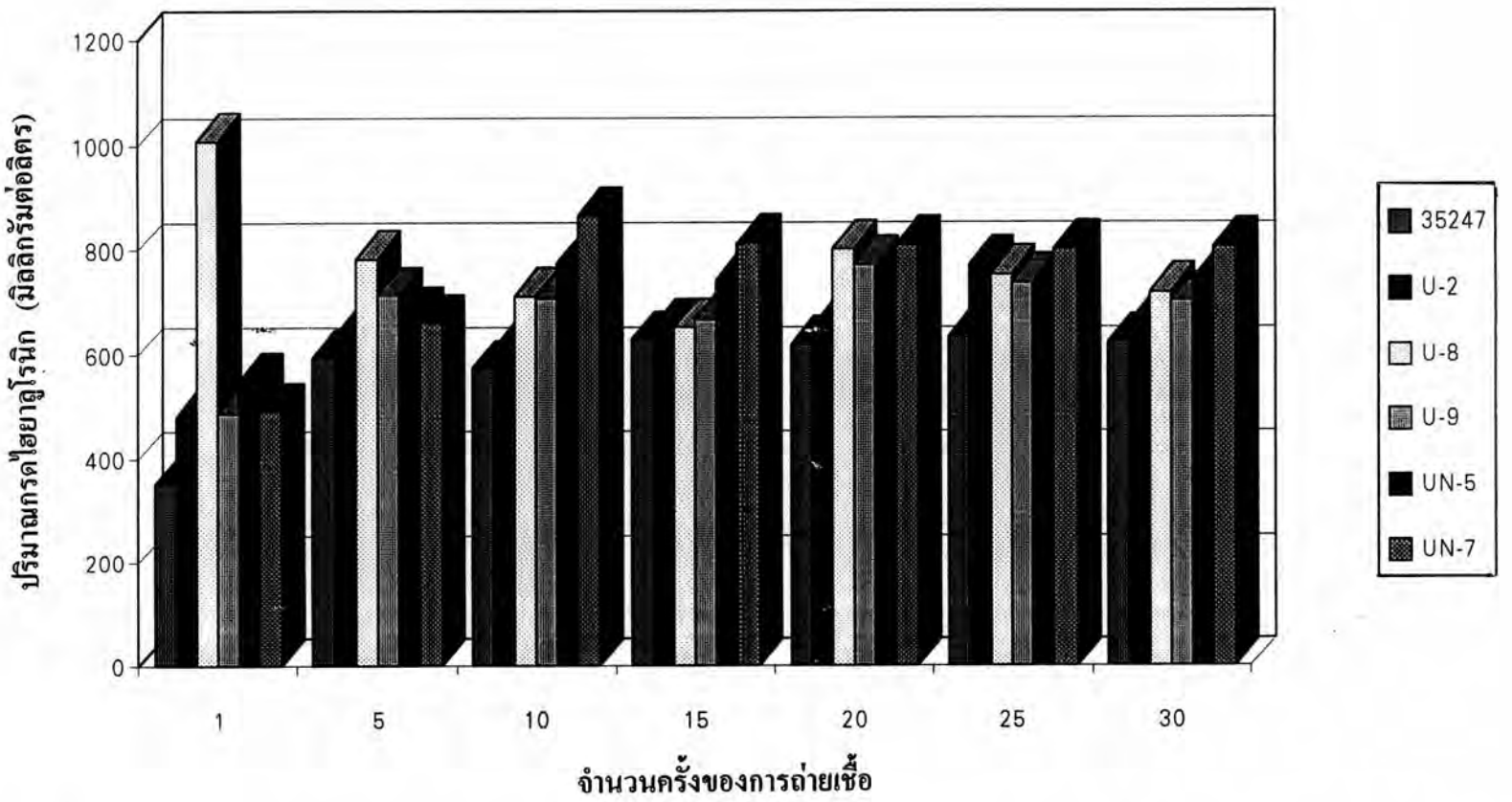
รูปที่ 3.24 แสดงขั้นตอนของเชื้อที่ได้จากการกลายพันธุ์ในขั้นตอนต่างๆและค่าร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์ จากการถ่ายเชื้อครั้งแรก



หมายเหตุ * แสดงถึงสายพันธุ์ที่ยังคงให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูง นอกเหนือจากนั้นเป็นเชื้อที่ไม่เสถียรให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกน้อยกว่าหรือเท่ากับสายพันธุ์ตั้งต้น เมื่อถ่ายเชื้อไป 5-10 ครั้ง

ตารางที่ 3.35 เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* ATCC 35247 และเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่ได้ในแต่ละขั้นของการกลายพันธุ์ ในอาหารเหลวสูตร PM3 หลังการถ่ายเชื้อไป 1, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 ครั้งตามลำดับ

จำนวนครั้งในการถ่ายเชื้อ	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)					
	35247	U-2	U-8	U-9	UN-5	UN-7
1	352.22	480.32	1009.76	486.69	550.46	490.36
5	593.92	639.08	783.00	714.98	677.26	659.91
10	573.72	612.34	713.50	709.12	773.94	863.53
15	630.05	652.67	652.67	667.15	743.17	813.76
20	619.19	653.57	800.90	771.22	752.14	808.33
25	634.28	771.22	752.22	737.52	732.16	800.90
30	625.24	659.72	721.45	703.45	742.04	804.71



รูปที่ 3.25 เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่ได้จากการกลายพันธุ์และเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* ATCC 35247 ในแต่ละช่วงของการถ่ายเชื้อ

3.8 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* ATCC 35247 เชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้ในแต่ละขั้นตอนของการกลายพันธุ์และสายพันธุ์ *S. zooepidemicus* ATCC 39920 หลังการถ่ายเชื้อไป 30 ครั้ง

จากรายงานของ Nimrod และคณะในปี 1988 ได้ปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อ *S. zooepidemicus* ได้สายพันธุ์ใหม่คือ ATCC 39920 ที่ให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูง (3-6 กรัมต่อลิตร ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร) เมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของสายพันธุ์ ATCC 39920 กับสายพันธุ์ตั้งต้น ATCC 35247 และสายพันธุ์ใหม่ที่ได้ U-2, U-8, U-9, UN-5 และ UN-7 ในระดับขวดเขย่า ตามขั้นตอนการทดลองข้อ 2.3.2.1-2.3.2.2 พบว่าเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่ได้จากการทดลองทุกสายพันธุ์ ให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* ATCC 35247 และสายพันธุ์ ATCC 39920 โดยสายพันธุ์ที่ให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงที่สุดคือ สายพันธุ์ UN-7 รองลงมาคือสายพันธุ์ UN-5, U-8, U-9 และ U-2 ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.36

ตารางที่ 3.36 เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือและปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการหมักเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่ได้จากการทดลองกับเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น ATCC 35247 และเชื้อ ATCC 39920 ภายหลังการถ่ายเชื้อไป 30 ครั้ง เมื่อหมักเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง

สายพันธุ์	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)
ATCC 35247	5.2	0.31	0.41	629.14
ATCC 39920	5.2	0.44	0.36	528.69
U-2	5.2	0.39	0.37	652.67
U-8	5.2	0.31	0.38	721.45
U-9	5.2	0.35	0.37	700.21
UN-5	5.2	0.43	0.38	743.17
UN-7	5.2	0.34	0.37	813.76

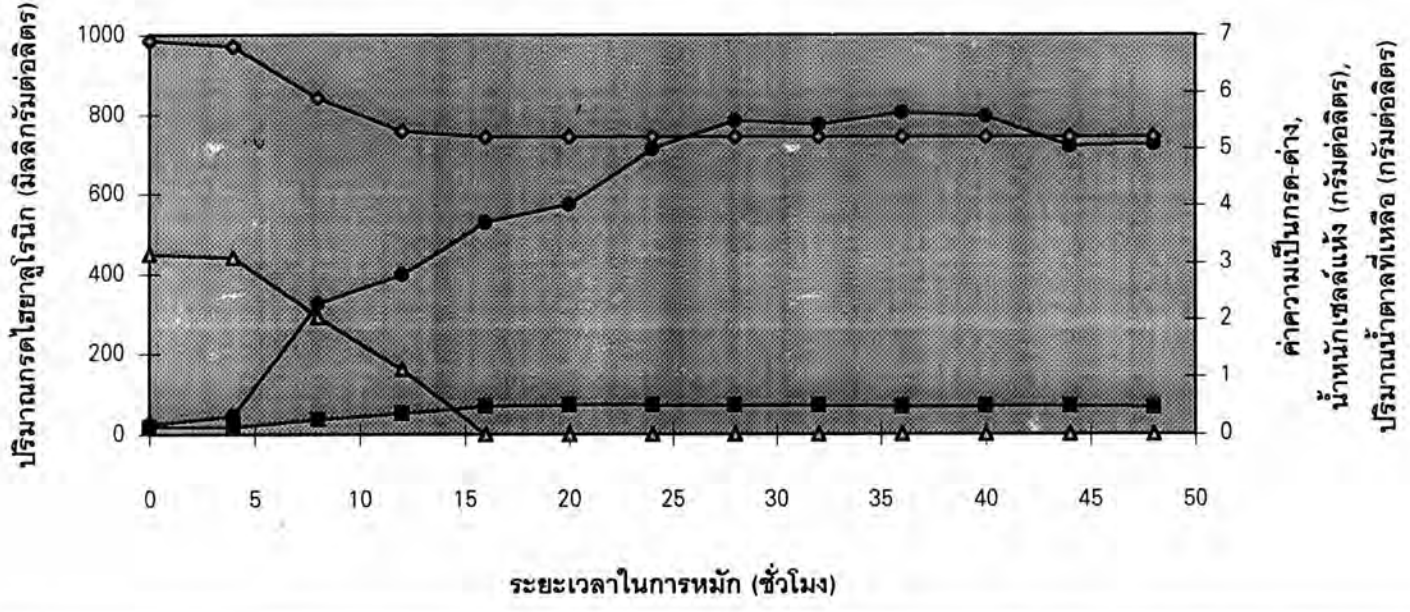
3.9 ลักษณะการเจริญ การผลิตกรดไฮยาลูโรนิก และการใช้น้ำตาลของเชื้อ *S. zooepidemicus* UN-7 ในอาหารเหลวสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก (PM3) ในระดับขวดเขย่า

จากผลการทดลองที่ 3.8 พบว่า เชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่ได้จากการกลายพันธุ์ที่ให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งต้น ATCC 35247 คือ สายพันธุ์ UN-7 ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จะทดสอบประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อ UN-7 โดยศึกษาลักษณะการเจริญ การผลิตกรดไฮยาลูโรนิก และการใช้น้ำตาลในระหว่างการหมักในอาหารเหลวสูตร PM3 เก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกๆ 4 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง นำน้ำหมักที่ได้ไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือภายหลังการหมัก และปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้ผลแสดงในตารางที่ 3.37 และรูปที่ 3.26 พบว่าการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อสายพันธุ์ UN-7 จะมีการผลิตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงที่เชื้อมีการเจริญในระยะทวีคูณ ช่วง 4-16 ชั่วโมง และปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงสุดอยู่ที่ประมาณ 804.42 มิลลิกรัมต่อลิตรที่ระยะเวลาการหมัก 36 ชั่วโมง การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกนี้จะควบคู่ไปกับการเจริญของเซลล์ แต่เมื่อมาถึงช่วง 20-32 ชั่วโมง น้ำหนักเซลล์ที่ได้คงที่แต่ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกยังคงเพิ่มขึ้น เป็นไปได้ว่าปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่เพิ่มขึ้นเกิดจากการปลดปล่อยกรดไฮยาลูโรนิกที่เป็นส่วนประกอบของแคปซูลของเชื้อออกสู่อาหารเพาะเลี้ยง การใช้น้ำตาลของเชื้อสายพันธุ์ใหม่ UN-7 นั้นปริมาณน้ำตาลที่มีในอาหารลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงที่เซลล์มีการเจริญในระยะการเจริญทวีคูณ จนน้ำตาลที่มีในอาหารลดลงต่ำสุดหลังจากเซลล์เริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ (16-30 ชั่วโมง) ค่าความเป็นกรด-ด่างจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงแรกของการหมัก ซึ่งเป็นช่วงที่การเจริญของเชื้ออยู่ในระยะทวีคูณและมีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่เมื่อเชื้อเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ค่าความเป็นกรด-ด่างจะคงที่ที่ 5.2 ตลอดการหมัก

ตารางที่ 3.37 เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก เมื่อทำการหมักเพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิกด้วยเชื้อ *S. zooepidemicus* UN-7 ในระดับขวดเขย่า เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บผลทุกๆ 4 ชั่วโมง

สายพันธุ์	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)
UN-7	0	6.9	0.12	3.15	24.87
	4	6.7	0.13	3.09	44.68
	8	5.9	0.25	2.05	324.02
	12	5.3	0.36	1.12	397.41
	16	5.2	0.48	0.99	528.36
	20	5.2	0.51	0.68	572.40
	24	5.2	0.50	0.43	714.68
	28	5.2	0.49	0.35	783.54
	32	5.2	0.49	0.40	773.75
	36	5.2	0.48	0.33	804.42
	40	5.2	0.48	0.30	794.24
	44	5.2	0.48	0.37	721.45
	48	5.2	0.46	0.32	725.13

รูปที่ 3.26 แสดงค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือและปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อทำการหมักด้วยเชื้อ *S. zooepidemicus* UN-7 ในระดับขวดเขย่า



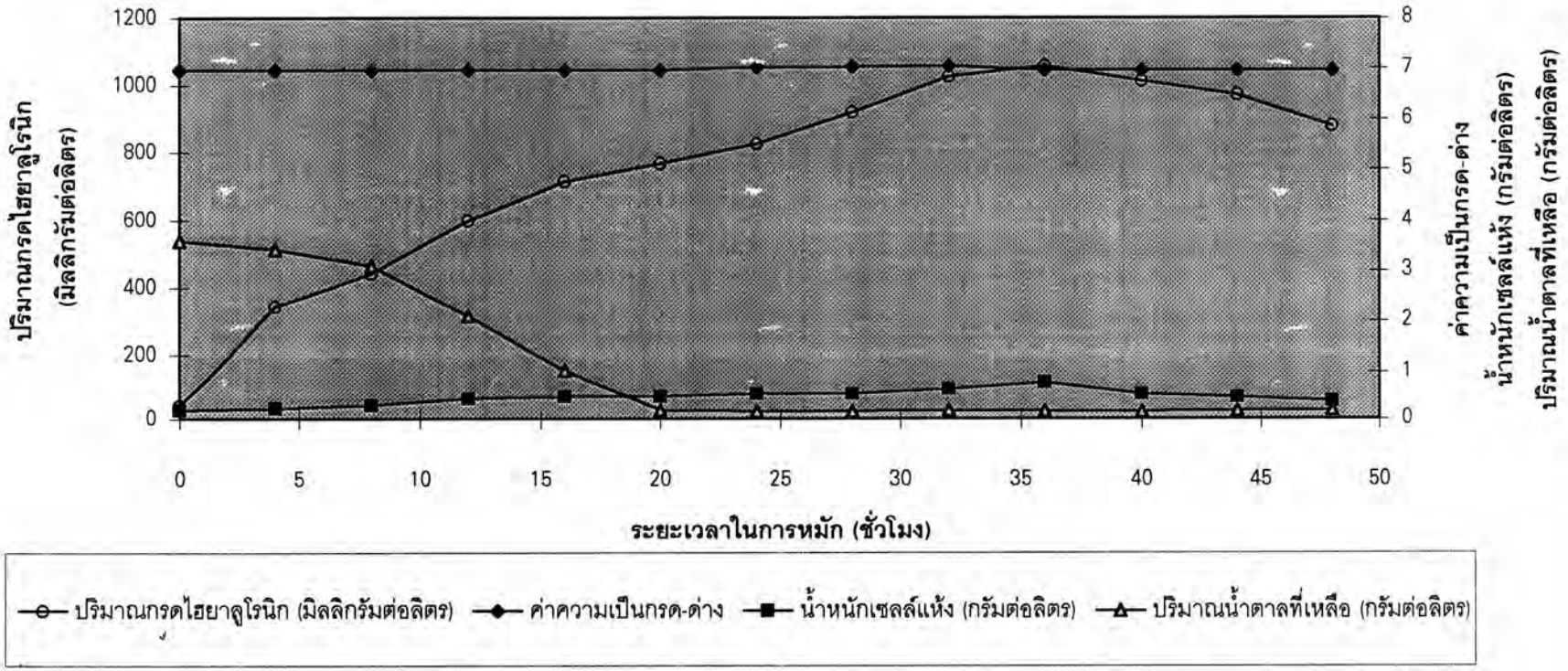
3.10 ประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อ *S. zooepidemicus* UN-7 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อใช้อาหารเหลวสูตรสำหรับการผลิต PM3

จากผลการทดลองข้อ 3.9 เชื้อสายพันธุ์ *S. zooepidemicus* UN-7 ให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงที่สุด เมื่อทำการผลิตในอาหารสูตร PM3 ที่ระยะเวลาการหมัก 36 ชั่วโมง โดยให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกเท่ากับ 804.42 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นในการทดลองต่อไปนี้จะเป็นการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ภาวะในการผลิตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7.0 อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm และอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที (ผลแสดงดังตารางที่ 3.38 และรูปที่ 3.27) พบว่าการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตรภายใต้ภาวะดังกล่าวให้ผลใกล้เคียงกับการผลิตในระดับขวดเขย่า การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกจะสูงที่สุดในช่วง 30-36 ชั่วโมง โดยให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงสุดเท่ากับ 1056 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งระยะเวลาดังกล่าวเป็นช่วงที่เชื้อเจริญเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ ปริมาณน้ำตาลที่มีในอาหารจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 4-16 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้อมีการเจริญอยู่ในระยะการเจริญทวีคูณ ในช่วงนี้ปริมาณออกซิเจนที่มีอยู่ในอาหารจะลดลงเหลืออยู่ประมาณ 40-50% (ข้อมูลไม่ได้แสดงไว้) และต่อมาเมื่อเชื้อเจริญจนถึงช่วงปลายระยะการเจริญทวีคูณ ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำจะค่อยๆเพิ่มขึ้นแสดงว่าเชื้อลดอัตราการเจริญ ส่วนน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่า เชื้อมีการเจริญสูงกว่าในระดับขวดเขย่าเล็กน้อย โดยน้ำหนักเซลล์แห้งจะสูงสุดประมาณ 32-36 ชั่วโมง เท่ากับ 0.772 กรัมต่อลิตร และจะค่อยๆลดลงในช่วง 40-48 ชั่วโมง เนื่องจากการตายของเซลล์ซึ่งเป็นช่วงเดียวกับที่มีการลดลงของปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกในน้ำหมัก

ตารางที่ 3.38 เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการหมักของ *S. zooepidemicus* UN-7 ที่ระยะเวลาต่างๆในการหมัก ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อใช้อาหารสูตรสำหรับการผลิต PM3

สายพันธุ์	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)
UN-7	0	6.96	0.18	3.57	40.37
	4	6.96	0.21	3.41	342.54
	๘	6.96	0.28	3.10	440.21
	12	6.96	0.42	2.10	598.12
	16	6.96	0.46	1.02	714.68
	20	6.96	0.47	0.18	765.23
	24	7.02	0.53	0.16	824.32
	28	7.03	0.52	0.16	918.76
	32	7.04	0.63	0.18	1024.42
	36	6.96	0.77	0.16	1056.12
	40	6.96	0.52	0.16	1012.06
	44	6.96	0.46	0.18	972.08
	48	6.96	0.38	0.18	879.02

รูปที่ 3.27 แสดงค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือและปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อทำการหมักด้วยเชื้อ *S. zooepidemicus* UN-7 โดยใช้อาหารสูตรสำหรับการผลิต PM3 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร



3.11 ประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อ *S. zooepidemicus* UN-7 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อใช้อาหารสูตรสำหรับการผลิต (PM3) ที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตรและควบคุมภาวะในการหมักตามรายงานของ John, Goh and Oeggerli, 1994

จากผลการทดลองข้อ 3.10 เชื้อสายพันธุ์ *S. zooepidemicus* UN-7 ให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงที่สุด เมื่อทำการผลิตในอาหารสูตรสำหรับการผลิตที่ระยะเวลาการหมัก 36 ชั่วโมง โดยให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกเท่ากับ 1056.12 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่จากรายงานเกี่ยวกับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมัก 5 ลิตร (John, Goh and Oeggerli, 1994 ; Bracke and Thacker, 1985) อาหารที่ใช้ในการหมักนั้นมีแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นสูงถึง 20 กรัมต่อลิตร ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 vvm และอัตราการกวน 600 รอบต่อนาที จึงได้ทำการทดลองเพื่อเปรียบเทียบกับภาวะที่ใช้ในการทดลองที่ 3.10 โดยทำการหมักเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 4 ชั่วโมง นำน้ำหมักที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกตามวิธีการวิเคราะห์ในวิธีการทดลองข้อ 2.4.1-2.4.5 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.39 และรูปที่ 3.28 พบว่าในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตรเมื่อควบคุมภาวะตามรายงานของ John, Goh and Oeggerli, 1994 นั้นการเจริญของเชื้อจะใกล้เคียงกับในการทดลองที่ 3.10 โดยปริมาณเซลล์สูงสุดอยู่ที่ 0.808 กรัมต่อลิตร การเจริญของเชื้อจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 0-20 ชั่วโมง และเริ่มมีการเจริญช้าลงจนเชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ 28-36 ชั่วโมง และหลังจากนั้นปริมาณเซลล์ที่ได้ก็เริ่มลดลง โดยตลอดระยะเวลาการหมักค่าออกซิเจนที่มีในอาหารคงที่อยู่ที่ประมาณ 90 % (ข้อมูลไม่ได้แสดงไว้) ตลอดการทดลองแสดงให้เห็นว่าที่ปริมาณการให้อากาศที่ 1 vvm นั้นให้ปริมาณออกซิเจนที่มากเกินพอต่อการเจริญของเชื้ออย่างมาก ปริมาณน้ำตาลพบว่า ตลอดการหมักเชื้อมีการใช้น้ำตาลไปเพียง 3-5 กรัมเท่านั้น โดยการใช้น้ำตาลจะมีมากในช่วงที่เซลล์มีการเจริญในระยะการเจริญทวีคูณ 0-20 ชั่วโมง และหลังจากนั้นความเข้มข้นน้ำตาลที่ตรวจพบจะมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก เช่นเดียวกับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกที่การผลิตกรดจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงการเจริญทวีคูณ และมีปริมาณสูงที่สุดเมื่อเชื้อเจริญอยู่ในระยะการเจริญคงที่ โดยปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงสุดเท่ากับ 1076.02 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นหากเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตรในการทดลองที่ 3.10 และระดับถังหมักขนาด 5 ลิตรของการทดลองนี้ พบว่ามีความใกล้เคียงกัน แต่การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในถังหมักระดับ 5 ลิตรของการทดลองนี้ยังคงมีปัญหาในเรื่องปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่เป็นปริมาณมาก และเมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้กับรายงานของ John, Goh and Oeggerli, 1994 พบว่า มีข้อ

แตกต่างอย่างมากในเรื่องของน้ำหนักเซลล์ ซึ่ง John, Goh and Oeggerli, 1994 ได้รายงานไว้สูงถึง 3-4 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ในการทดลองครั้งนี้น้ำหนักของเซลล์มีอยู่เพียง 0.808 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 3.39 เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือและปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการหมักของ *S. zooepidemicus* UN-7 ที่ระยะเวลาต่างๆในการหมัก ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อใช้อาหารสูตร PM3 ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร และควบคุมภาวะการหมักตาม John, Goh และ Oeggerli (1994)

สายพันธุ์	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)
UN-7	0	7.05	0.14	25.02	81.35
	4	6.96	0.32	24.40	376.75
	8	6.96	0.50	23.40	422.82
	12	6.96	0.50	23.00	609.26
	16	6.96	0.57	22.80	736.48
	20	6.96	0.62	22.00	774.22
	24	6.96	0.63	21.88	857.12
	28	6.96	0.78	21.38	932.14
	32	6.96	0.81	21.37	1076.02
	36	6.96	0.74	20.34	1032.60
	40	6.96	0.69	21.52	1001.90
	44	6.96	0.64	21.42	1049.70
	48	6.96	0.58	20.58	959.76
	50	6.96	0.49	21.24	883.44

รูปที่ 3.28 แสดงค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาล และปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อทำการหมักด้วยเชื้อ *S. zooepidemicus* UN-7 โดยใช้อาหารสูตรสำหรับการผลิต PM3 ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตรและควบคุมภาวะการหมักตามรายงานของ John, Goh และ Oeggerli (1994)