# บทที่ 1

# บทนำ

พลเอกกรณ์ สภาหนังวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

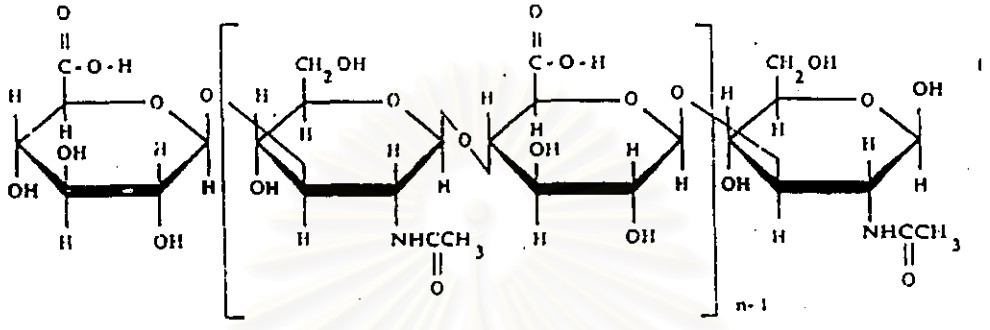
กรดไฮยาลูโรนิคถูกสกัดแยกเป็นครั้งแรกจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันโดย Meyer และ Palmer ในปี 1934 (Meyer and Palmer , 1934, cited in Pigman *et al.* ,1961 ; Thonard *et al.* , 1964) นอกจากจะพบได้ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันแล้วยังอาจพบจากแหล่งอื่นๆได้ เช่น ผิวหนัง (skin) เอ็น (tendons) กล้ามเนื้อ (muscles) กระดูกอ่อน (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)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## คุณสมบัติของกรดไฮยาลูโรนิค

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) และจากการที่ส่วนของกลูลูโรนิคที่มีประจุลบ (anionic) จึงทำให้กรดไฮยาลูโรนิคจับตัวกับอิออนที่ประจุบวก เช่น $K^+$ $Na^+$ และ $Ca^{2+}$ ได้

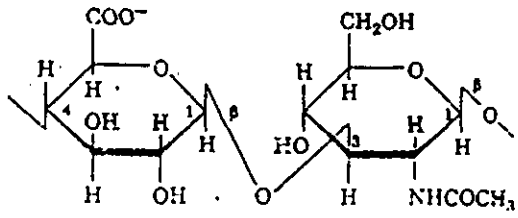
โครงสร้างหรือรูปร่างโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิคมีลักษณะเป็นเกลียวแบบสุ่ม (random coil structure) ที่เกี่ยวพันกันเป็นร่างแห ซึ่งมีลักษณะคล้ายเจล มีความเหนียว หนืด และยืดหยุ่น หน้าที่สำคัญประการหนึ่งของกรดไฮยาลูโรนิคคือช่วยกักเก็บน้ำ โดยพบว่า กรดไฮยาลูโรนิคสามารถเก็บน้ำได้มากกว่าพอลิเมอร์ตามธรรมชาติและพอลิเมอร์ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น 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)

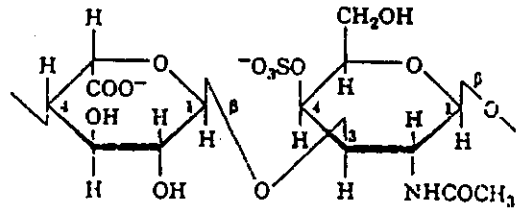
ตารางที่ 1 ชนิดและสมบัติบางประการของไกลโคอะมิโนไกลแคนชนิดต่างๆ (Smith *et al.*, 1983 ; Voet and Voet , 1995)

| 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 |

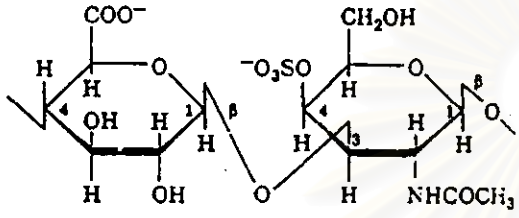
รูปที่ 2 โครงสร้างของไกลโคสะมิโนไกลแคนชนิดต่าง ๆ



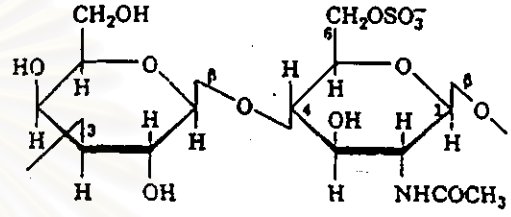

ไฮยาลูโรเนต



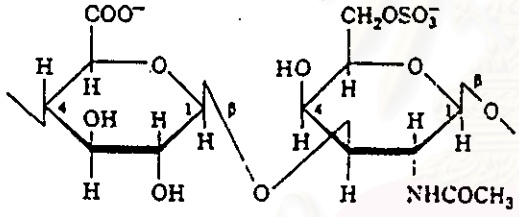

เดอมาแทนซัลเฟต



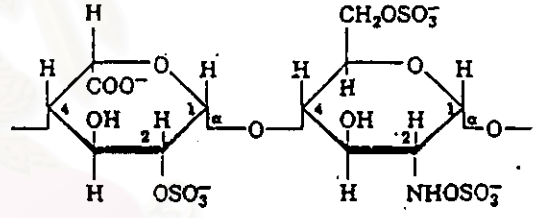

คอนดรอยติน-4-ซัลเฟต




เคอราแทนซัลเฟต




คอนดรอยติน-6-ซัลเฟต




เฮพปาริน

<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)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
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

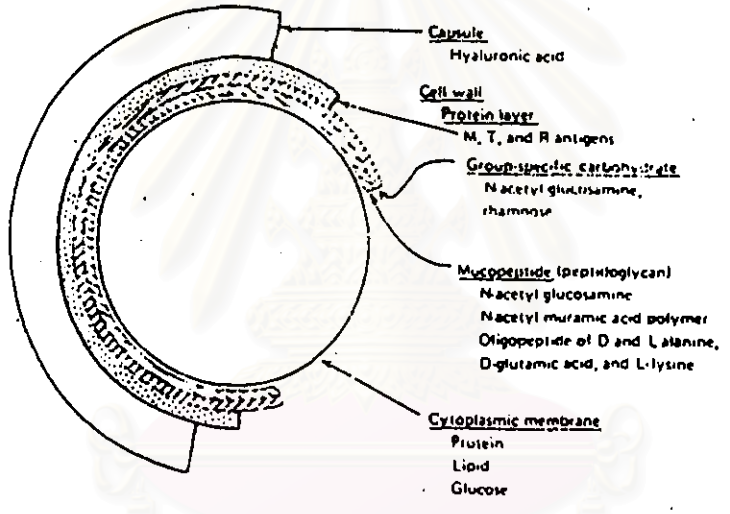
Thonard และคณะ (1964) ผลิตกรดไฮยาลูโรนิคจากเชื้อ Streptococcus สายพันธุ์ 32369 และ Coburn R 18 หลังตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ได้ปริมาณกรด 500-1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

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 เมมเบรน 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

นอกจากจะจำแนกเชื้อ Streptococcus จากลักษณะโคโลนีและการทำลายเม็ดเลือดแดงแล้ว Rebecca Lancefield ได้จัดจำแนกเชื้อ Streptococcus โดยอาศัยลักษณะแอนติเจนของเชื้อจากส่วนคาร์โบไฮเดรตบนผนังเซลล์ ออกเป็น serogroup A ถึง H และ K ถึง V ทั้งนี้พบว่า group A,B,C,D และ G มักเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคของคน (Jawetz *et al.* , 1984 ; Joklik *et al.* , 1992 ; Cruickshank *et al.* , 1973) (ตารางที่ 2)

*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

ตารางที่ 2 สมบัติทางเคมีและตำแหน่งของแอนติเจนของ Streptococcus ในกลุ่มต่างๆ

| กลุ่มแอนติเจน | | | ประเภทของแอนติเจน | | | สปีชีส์ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| กลุ่ม | โครงสร้างเคมี | ตำแหน่งในเซลล์ | กลุ่ม | โครงสร้างเคมี | ตำแหน่งในเซลล์ | |
| A | Rhamnose-N-acetyl-glucosamine polysaccharide | ผนังเซลล์ | M,R,T | Protein | เปลือกนอก (Envelope) | *S. pyogenes* |
| B | Rhamnoseglucosamine polysaccharide | ผนังเซลล์ | S (5 types) | Glucose-galactose-N-acetyl-glucosamine polysaccharide | เปลือกนอก (Envelope) | *S. agalactiae* |
| C | Rhamnose-N-acetyl-galactosamone polysaccharide | ผนังเซลล์ | (8 types described)<br><br>(8 types)<br>(Only 1 type described)<br>(3 types) | Protein<br><br>Protein<br>Protein<br>Protein | เปลือกนอก (Envelope) | *S. equisimilis*<br><br>*S. zooepidemicus*<br>*S. equi*<br>*S. dysgalactiae* |
| D | Glycerol teichoic acid containing D-alanine and glucose | ภายในเซลล์ระหว่างผนังเซลล์และเมมเบรน | (11 types established) | Rhamnose-glucose-amine-glucose polysaccharide | ผนังเซลล์ | *S. faecalis* |
| E | Rhamnose polysaccharide | ผนังเซลล์ | I to V | Polysaccharide | | *Streptococcus sp.* |
| | | | | | | |
| F | Rhamnose and a glucopyranosyl-N-acetyl-galactosamine tetrasccharide | ผนังเซลล์ | I to V | Carbohydrates-some types contain glucose,galactose and rhamnose | | *S.anginosus* |
| G | Rhamnose-galactosamine polysaccharide | ผนังเซลล์ | ( 3 types described) | | | *Streptococcus sp. (large colony)* |
| H | Rhamnose polysaccharide | ผนังเซลล์ | ( 5 types described) | | | *S. sanguis* |

ที่มา : (R.H. Deibel and H.W. Seeley , Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed. ( Baltimore: The Williams & Wilkins Co., 1974 ) p. 493

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กระบวนการหมักเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคจาก Streptococcus

ในปัจจุบันการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคจะผลิตจากการหมักของเชื้อ Streptococcus ทั้งนี้เนื่องจากเป็นวิธีการที่ให้ปริมาณกรดสูง ต้นทุนในการผลิตต่ำ ระยะเวลาในการผลิตสั้น ทั้งยังสามารถควบคุมและปรับปรุงขั้นตอนและกระบวนการผลิตให้เหมาะสมได้ง่าย จึงเป็นวิธีการผลิตที่ใช้กันในปัจจุบัน

กระบวนการหมักเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคจาก Streptococcus นั้นสามารถทำทั้งในแบบระบบกะ (batch fermentation) และแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation) ซึ่งพบว่าการหมักแบบต่อเนื่องจะให้ ปริมาณกรดสูงและกรดที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลสูงด้วย อีกทั้งไม่มีการปนเปื้อนจากสารพิษต่างๆ ที่เกิดจากการย่อยสลายผนังเซลล์ เมื่อมีการเจริญในช่วงปลายของ stationary phase (Ellwood *et al.*, 1996)

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค นอกเหนือจากสายพันธุ์ของ Streptococcus ที่ใช้แล้วสูตรอาหารและภาวะการเลี้ยงเชื้อก็มีความสำคัญต่อปริมาณผลผลิตเช่นกัน โดยทั่วไปอาหารสำหรับการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม Streptococcus จะประกอบด้วย แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุที่จำเป็น เช่น เกลืออนินทรีย์ เป็นต้น สำหรับแหล่งคาร์บอนนั้น สามารถใช้ แป้ง กลูโคส ซูโครส กาแลคโตส และฟรุคโตส โดยพบว่า กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

ในขณะที่แหล่งไนโตรเจน สามารถใช้ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท โซเดียมไนเตรท คาซามิโน แอซิด สารสกัดจากยีสต์ เปปโตน ทริปโตน เป็นต้น สำหรับแร่ธาตุเสริมนั้นอาจใช้ โซเดียมคลอไรด์ โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เฟอร์รัสซัลเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต ได้ (Akasaka *et al.*, 1989 ; Ellwood *et al.*, 1996 ; Park *et al.*, 1996)

Pierce และ White (1954) ได้ศึกษาเปรียบเทียบการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคโดย *S. pyogenes* strain S23 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแหล่งคาร์บอนระหว่างกลูโคสและกาแลคโตส พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส จะให้กรดไฮยาลูโรนิคในปริมาณสูงตลอดช่วงการเจริญและมีผลให้ค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อลดต่ำลง ในขณะที่เมื่อใช้กาแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า เชื้อมีการเจริญช้า การสร้างกรดมีขึ้นในช่วง 2-3 ชั่วโมงแรกของการเจริญและค่าความเป็นกรดด่างไม่ค่อยลดต่ำลง นอกจากนี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนไม่พบการสร้าง hyaluronidase ขณะที่ในอาหารที่มีกาแลคโตสสามารถตรวจพบ hyaluronidase ได้เล็กน้อย

Warren และ Gray (1959) เลี้ยง *S. pyogenes* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย เคซีนไฮโดรไลเซท โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต แคลเซียม-ดี-แพนโทธีเนท ไพริดอกซีน ไฮโดรคลอไรด์ ไรโบฟลาวิน และกลูโคส สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 18

เป็น 225 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ปริมาณกรดค่อย ๆ ลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 64 ไม่พบกรดไฮยาลูโรนิค ทั้งนี้เนื่องจากเกิดการย่อยสลายโดยไฮยาลูโรนิเดส จึงปรับปรุงสูตรอาหารโดยเติม กรดอัลจินิค ซัลเฟต เพื่อยับยั้งการย่อยสลายโดยไฮยาลูโรนิเดส พบว่า สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้สูงสุด 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 18 และปริมาณคงที่ตลอดการทดลอง

Woolcock (1974) เลี้ยง *S. equi* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย แบคโตเปปโตน 20 กรัมต่อลิตร กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร โซเดียมไบคาร์บอเนต 2 กรัมต่อลิตร และไดโซเดียมฟอสเฟต 0.4 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิค 52 มิลลิกรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร

Rijn และ Kessler (1980) ได้รายงานถึงอาหารกำหนดสูตรทางเคมี (chemically defined medium) ที่ประกอบด้วย แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน นิวคลีโอไทด์ วิตามิน และกรดอะมิโน โดยพบว่า อัตราการเจริญและความหนาแน่นของเซลล์จะสูงกว่าสูตรอาหารทั่วไป อีกทั้งกรดไฮยาลูโรนิคที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง เนื่องจากไม่มีสารอาหารประเภทโปรตีนในสูตรอาหารทำให้การแยกและการทำบริสุทธิ์ทำได้ดีว่าสูตรอาหารทั่วไป

Akasaka และ คณะ (1989) สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคจาก *S. zooepidemicus* NH 131 ภายใต้ภาวะที่มีอากาศ ได้ปริมาณกรด 3.6 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วย กลูโคส สารสกัดจากยีสต์ และโพลีเปปโตน โดยปริมาณกลูโคสเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 กรัมต่อลิตร และเติมอีก 58 กรัมต่อลิตร เมื่อการเจริญเข้าสู่ช่วงเริ่มต้นของลอคเฟสประมาณ 5-7 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ

สำหรับภาวะการเลี้ยงเชื้อ ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดอยู่ในช่วง 5-8 โดยพบว่าช่วงความเป็นกรดด่างที่ดีที่สุดคือ 6.8-7.5 และในขณะที่มีเชื้อมีการผลิตกรดและปลดปล่อยสู่อาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลทำให้ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง ดังนั้นในระหว่างการผลิตจึงมีการรักษาระดับค่าความเป็นกรดด่างไว้โดยการเติมด่าง เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ ลงไป ( Akasaka *et al.*, 1989 ; Swann *et al.*, 1990 )

การให้อากาศพบว่าเชื้อสามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้ทั้งในภาวะที่มีการให้ออกซิเจนและไร้ออกซิเจน อัตราการให้อากาศที่ดีที่สุด คือ 1-2 vvm เมื่ออยู่ในถังหมักที่มีการให้ออกซิเจนพบว่าสามารถผลิตกรดได้ปริมาณ 2-3 กรัมต่อลิตร และมีน้ำหนักโมเลกุล $1.5\text{-}2.0 \times 10^6$ ในขณะที่เมื่อไม่มีการให้ออกซิเจนได้ปริมาณกรด 4-6 กรัมต่อลิตร น้ำหนักโมเลกุล $2.2\text{-}3.3 \times 10^6$ (Nimrod *et al.*, 1988)

John และคณะ (1994) รายงานว่าอัตราการให้อากาศช่วยเพิ่มปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคได้เนื่องจากพลังงานที่ได้รับจากโมเลกุลออกซิเจนและการเปลี่ยนไพรูเวทไปเป็นอะซิเตทได้มากกว่าแลคเตท ส่งผลให้มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อมีการให้ออกซิเจนในปริมาณมากเชื้อจะมีการสร้างแคปซูลชนิดกรดไฮยาลูโรนิคเพิ่มขึ้นเพื่อป้องกันอันตรายและความเป็นพิษที่เซลล์สร้างขึ้นเนื่องจากออกซิเจน (Cleary and Larkin , 1979) แต่อย่างไรก็ตาม Bracke และ Thacker ใน

ปี 1985 ได้รายงานถึงการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคโดย *S. pyogenes* ในกระบวนการหมักไร้ออกซิเจนภายใต้ภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์สูง

สำหรับอัตราการกวนที่เหมาะสม มีการศึกษาเปรียบเทียบอัตราการกวนที่สูง 600 รอบต่อนาที ให้ปริมาณการผลิตกรดได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับอัตราการกวนต่ำ (300 รอบต่อนาที) (John *et al.* , 1994) แต่มีบางรายงานกล่าวว่า เมื่อเพิ่มอัตราการกวนจาก 400 รอบต่อนาที จนถึง 1,200 รอบต่อนาที มีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดลดลงแต่ส่งผลให้น้ำหนักโมเลกุลเพิ่มขึ้น (Kim *et al.* , 1996)

อุณหภูมิที่เหมาะสมนั้นเนื่องจาก เชื้อ Streptococcus เป็นเชื้อที่อาศัยอยู่ในสิ่งมีชีวิตเช่น คนและสัตว์ ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมจึงอยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่นิยมและให้ผลดีที่สุดคือ 37 องศาเซลเซียส (Nimrod *et al.* , 1988 ; Swann *et al.* , 1988 ; Akasaka *et al.* , 1989)

สำหรับการเก็บเกี่ยวกรดไฮยาลูโรนิคนั้น มีรายงานถึงวิธีการเก็บเกี่ยว กรดไฮยาลูโรนิคโดยวิธีต่างๆซึ่งมีความแตกต่างตามลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อและความบริสุทธ์ของกรดที่ต้องการนำไปใช้ประโยชน์เช่น ในอุตสาหกรรมทั่วไป หรือในระดับการแพทย์

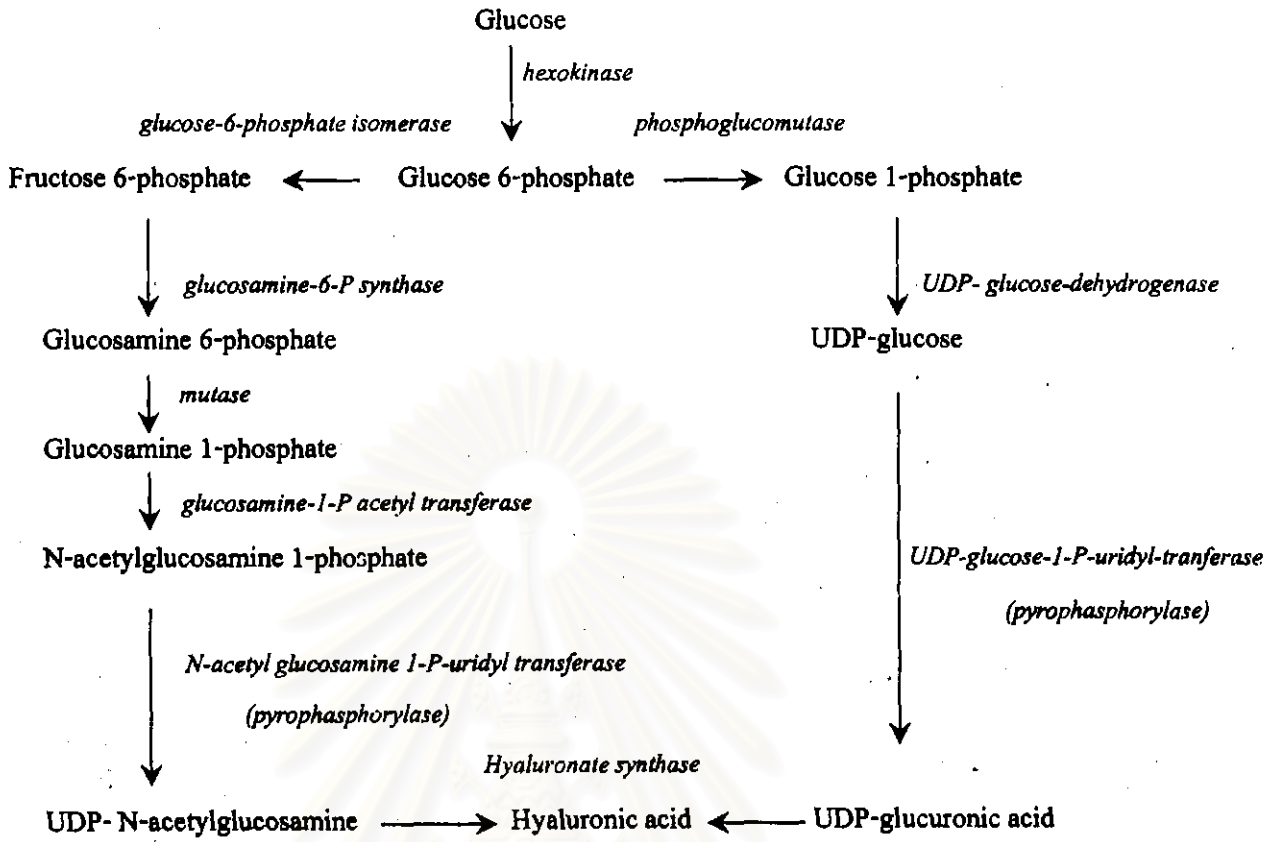
หลักการโดยทั่วไปสำหรับการแยกและการทำให้กรดบริสุทธิ์นั้น คือหลังจากกระบวนการหมักจะฆ่าหรือทำลายเชื้อและแยกกรดไฮยาลูโรนิคออกจากน้ำหมัก โดยการฆ่าเชื้อนั้นทำได้ทั้งโดยการใช้ความร้อนหรือโดยสารเคมี แต่พบว่า การฆ่าเชื้อด้วยความร้อน จะมีผลเสียจากการปนเปื้อนของโปรตีน , กรดนิวคลีอิก , และส่วนประกอบภายในเซลล์อื่นๆ ซึ่งทำให้ยากต่อการแยกกรดและยังทำให้เกิดการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ ส่วนการฆ่าเชื้อโดยใช้สารเคมี เช่น formalin หรือ trichloroacetic acid (TCA) ซึ่งนอกจากฆ่าเชื้อได้แล้วยังช่วยให้สามารถแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักได้ง่ายเนื่องจากทำให้เซลล์ตกตะกอนลง หลังจากนั้น นิยมใช้สารลดแรงตึงผิวแยกกรดไฮยาลูโรนิคออกจากเซลล์ เช่น โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต จากนั้นทำการกรองและกำจัดสารปนเปื้อนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น เมตาโบไลท์ของเชื้อที่เกิดระหว่างการผลิต , สารอาหารที่เหลืออยู่ , สารเคมีที่ใช้ฆ่าเซลล์ และ สารลดแรงตึงผิวที่ใช้แยกกรด เป็นต้น โดยใช้วิธีการกรอง โดยมีแผ่นเมมเบรนที่มีการคัดแยกโมเลกุล (molecular weight cut off) ช่วง 10,000-25,000 ดาลตัน จากนั้นทำการปรับความเข้มข้นของกรดไฮยาลูโรนิคให้เหมาะสมอยู่ในช่วง 0.18 – 0.24 โมลาร์ ด้วยโซเดียมคลอไรด์ และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้อยู่ในช่วง 7.0-7.5 โดยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นต้น สำหรับการใช้ในทางการแพทย์จะมีขั้นตอนในการทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็นพิเศษ เช่น มีการตกตะกอนกรดนิวคลีอิกด้วยการเติมสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุลบ เช่น ซีทิลไพริมิเดียมคลอไรด์ จากนั้นจึงตกตะกอนด้วย ไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ อีกครั้งเพื่อความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น (Kjem and Lebech , 1976 ; Bracke and Thacker , 1985 ; Akasaka *et al.* , 1989 ; Ellwood *et al.* , 1996)

<u>กลไกการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิค</u>

กลไกการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิคนั้นเป็นข้อมูลที่สำคัญในการนำไปปรับปรุงการผลิตด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม กลไกการผลิตกรดดังแสดงใน รูปที่ 4 นั้นจะใช้ UDP-GlcA และ UDP-GlcNAc เป็นสารตั้งต้น กรดไฮยาลูโรนิคถูกสังเคราะห์ขึ้นจากปฏิกิริยาข้างเคียงของกระบวนการ glycolytic โดยเริ่มจาก glucose-6-phosphate และ fructose-6-phosphate เอนไซม์ที่สำคัญในกลไกการผลิตคือ hyaluronate synthase ซึ่งเป็นเอนไซม์บนเมมเบรน (membrane associated enzyme) โดยมี $Mg^{2+}$ เป็นแร่ธาตุที่จำเป็นในการสังเคราะห์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0 (Markovitz and Dorfman , 1962 ; O'Regan *et al.* , 1994 ; DeAngellis and Weigel , 1995)

ตั้งแต่ปี 1950 เป็นต้นมา ได้มีการศึกษาถึงกลไกการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิคใน group A Streptococcus พอลิเมอร์ของกรดนี้ถูกสังเคราะห์บน plasma membrane ของ procaryotic และ eucaryotic cells โดยมีการเติม uridine nucleotide sugar ในการต่อสายพอลิเมอร์ (Ishimoto and Strominger , 1967 ; Sugahara *et al.* , 1979 ; Philipson *et al.* , 1985)

DeAngellis (1996) พบว่าภาวะที่เหมาะสมของการทำงานของ hyaluronate synthase ใน *Pasteurella multocida* แตกต่างจาก Streptococcus group A โดยการทำงานของ *has* ยีนใน *P. multocida* จะทำงานได้ดีที่ภาวะเป็นเบส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.6 ขณะที่ *S. pyogenes has* ยีนจะแสดงออกได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่างค่อนข้างเป็นกรดและไม่สามารถทำงานได้หากค่าความเป็นกรด-ด่างสูงกว่า 7.4 (Stoolmiller and Dorfman , 1969) นอกจากนั้นใน *P. multocida* $Mn^{2+}$ จะกระตุ้นการทำงานของ hyaluronate synthase ได้ดีกว่าเมื่อมี $Mg^{2+}$ ในขณะที่ hyaluronate synthase จาก Streptococci จะถูกกระตุ้นให้ทำงานได้ดีเมื่อมี $Mg^{2+}$ มากกว่าถูกกระตุ้นโดย $Mn^{2+}$ และพบว่า hyaluronate synthase ของ *P. multocida* จะจับกับ UDP-glucuronate และ UDP-N-acetylglucosamine ได้ดีกว่า hyaluronate synthase ของ Streptococci group A (Markovitz *et al.* , 1959 ; Stoolmiller and Dorfman , 1969)

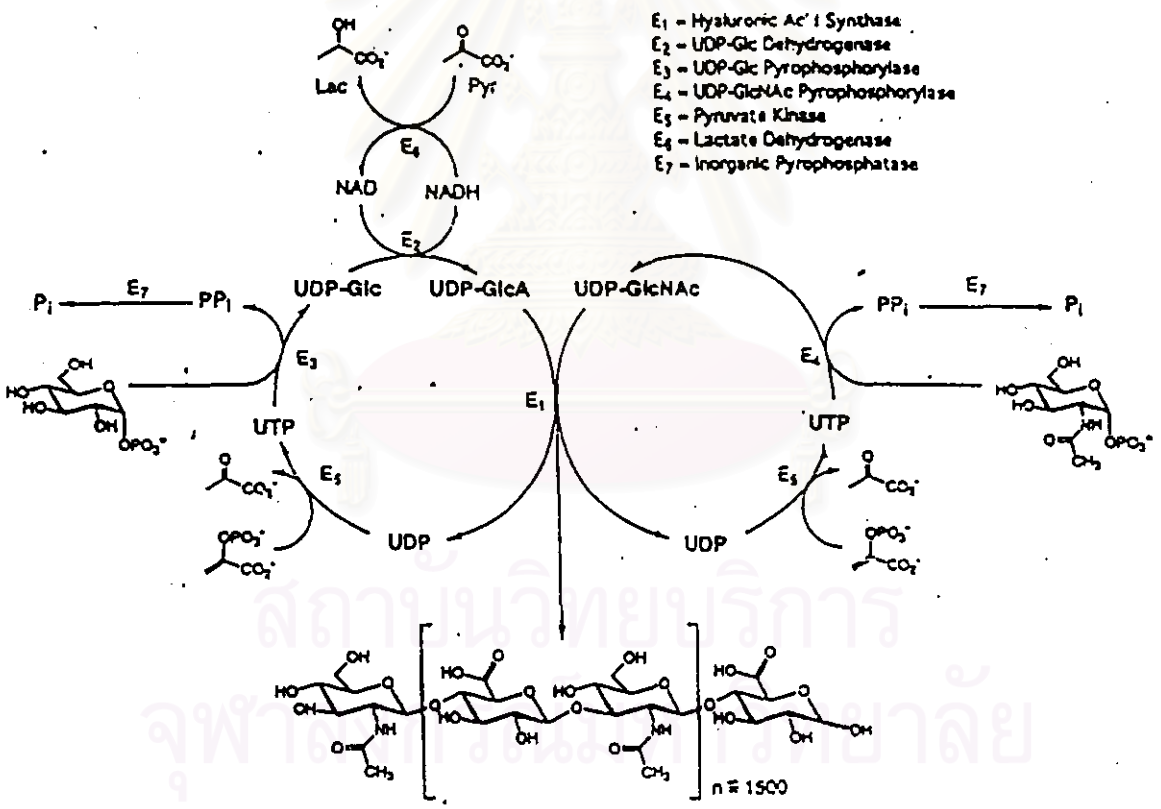



รูปที่ 4 กลไกการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิค (Orten and Neuhaus , 1982 ; O'Regan *et al* . , 1994)

Stoolmiller และ Dorfman (1969) รายงานว่า น้ำตาลไมเลกุลเดี่ยวจะถูกเติมที่ปลาย non-reducing ของการต่อสายพอลิเมอร์ใน Streptococcus แคปซูลชนิดกรดไฮยาลูโรนิคจะถูกสร้างโดยผ่านองค์ประกอบบนเมมเบรนและปลดปล่อยออกสู่ภายนอกเซลล์อย่างรวดเร็วโดยอาศัยสารเคมี 0.01% SDS และ Chloroform (Rijn ; 1983) แต่ตามปกติ แคปซูลชนิดกรดไฮยาลูโรนิคจะถูกปลดปล่อยออกจากเชื้อในช่วง stationary ซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากมีการสูญเสียแอคติวิตีการสังเคราะห์จากเมมเบรน (Rijn ; 1983) นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างแคปซูลชนิดกรดไฮยาลูโรนิคที่ลดลงในช่วง stationary

จากการทราบข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับกลไกการสังเคราะห์กรดจึงได้มีการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิคโดยอาศัยเอนไซม์ในการเร่งการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์ระหว่างกลูคูโรนิค แอซิด และ เอน-แอซิทิล-ดี-กลูโคแซมีนโดย Luca และคณะ (1995) ได้สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคโดยการสังเคราะห์จาก UDP-N-acetyl-D-glucosamine (UDP-GlcNAc) และ UDP-glucuronic acid (UDP-GlcA) ด้วยเอนไซม์ HA synthase ควบคู่กับการสร้างน้ำตาลนิวคลีโอไทด์ (รูปที่ 5) กระบวนการสังเคราะห์กรด

ไฮยาลูโรนิคโดยใช้เอนไซม์ดังกล่าว สอดคล้องกันกับการทดลองของ DeAngelis และ Weigel (1994) ที่ศึกษาการสร้างกรดไฮยาลูโรนิคจาก UDP-GlcNAc และ UDP-GlcA โดยอาศัยการรวมกันของยีน HA synthase จาก *S. pyogenes* ที่มีการแสดงออกใน *E. coli* และเมื่อศึกษาสมบัติของกรดนี้โดย 1H-NMR และการย่อยสลายโดยเอนไซม์ไฮยาลูโรนิดไลเอส และไฮยาลูโรนิเดสแล้ว พบว่า กรดไฮยาลูโรนิคที่สังเคราะห์ขึ้นมีสมบัติเหมือนกันกับกรดไฮยาลูโรนิคที่ได้จากวิธีการสกัดแยก ข้อดีของวิธีการสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์นี้ คือ สามารถลดปัญหาการปนเปื้อนจากไวรัส และสามารถควบคุมขนาดมวลโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิคได้ แต่ยังมีข้อเสียคือ สารตั้งต้น คือ Glc-1-P และ GlcNAc-1-P มีราคาแพง อีกทั้งเอนไซม์ HA synthase ไม่ค่อยเสถียร โดยมีครึ่งชีวิตเพียง 24 ชั่วโมง ที่ 25 องศาเซลเซียส




รูปที่ 5 กลไกการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิคโดยปฏิกิริยาเคมีอาศัยเอนไซม์เป็นตัวเร่ง (Luca *et al.*, 1995)

เมื่อศึกษาถึงระดับโมเลกุลพบว่า การสร้างกรดไฮยาลูโรนิค นั้นถูกควบคุมโดย *has* operon โดยยีนแรกใน operon คือ *hasA* มีรหัสสำหรับการสร้าง Hyaluronate synthase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญต่อการเร่งปฏิกิริยาการนำ UDP-N-acetylglucosamine และ UDP-glucuronic acid มาสร้างเป็นไฮยาลูโรนิค พอลิเมอร์ (DeAngelis *et al.*, 1993a ; DeAngelis *et al.*, 1993b ; Dougherty and Rijn , 1994 ; Rijn *et al.* , 1995) *hasB* เป็นรหัสสำหรับการสร้าง UDP-glucose dehydrogenase ซึ่งจะเร่งการเปลี่ยน UDP-glucose เป็น UDP-glucuronic acid (Dougherty and Rijn , 1993) และ *hasC* มีรหัสสำหรับการสร้าง UDP-glucose pyrophosphorylase ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน glucose 1-phosphate + UTP ไปเป็น UDP-glucose และ PPi (Crater and Rijn , 1995 ; Crater *et al.* , 1995) การแปลรหัสของ operon นี้ถูกควบคุมโดยโปรโมเตอร์ที่บริเวณ upstream ของ *hasA* ( Crater *et al.* , 1995) ดังนั้นความแตกต่างของความสามารถในการสร้างแคปซูลของ Streptococcus สายพันธุ์ต่างๆ มีสาเหตุจากกลไกการแปลรหัส โดย Crater *et al.* , 1995 รายงานว่า Streptococcus group A สายพันธุ์ที่ไม่สร้างแคปซูลนั้น ไม่สามารถตรวจพบ mRNA จาก *has* operon

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

ในการพัฒนาหรือปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตในอุตสาหกรรมนั้น นอกเหนือจากการปรับปรุงสูตรอาหารและภาวะการผลิตแล้ว สิ่งที่จำเป็นและมีความสำคัญต่อการเพิ่มผลผลิตคือสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ หากจุลินทรีย์ที่ใช้มีลักษณะพันธุกรรมตามที่ต้องการก็จะทำให้กระบวนการผลิตและผลผลิตเป็นไปตามที่วางไว้ อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์ในธรรมชาติมักต้องมีการปรับปรุงเพื่อให้บรรลุถึงวัตถุประสงค์ดังกล่าว วิธีการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์นั้นแบ่งเป็นวิธีการหลัก 3 วิธี คือ (Baltz , 1986)

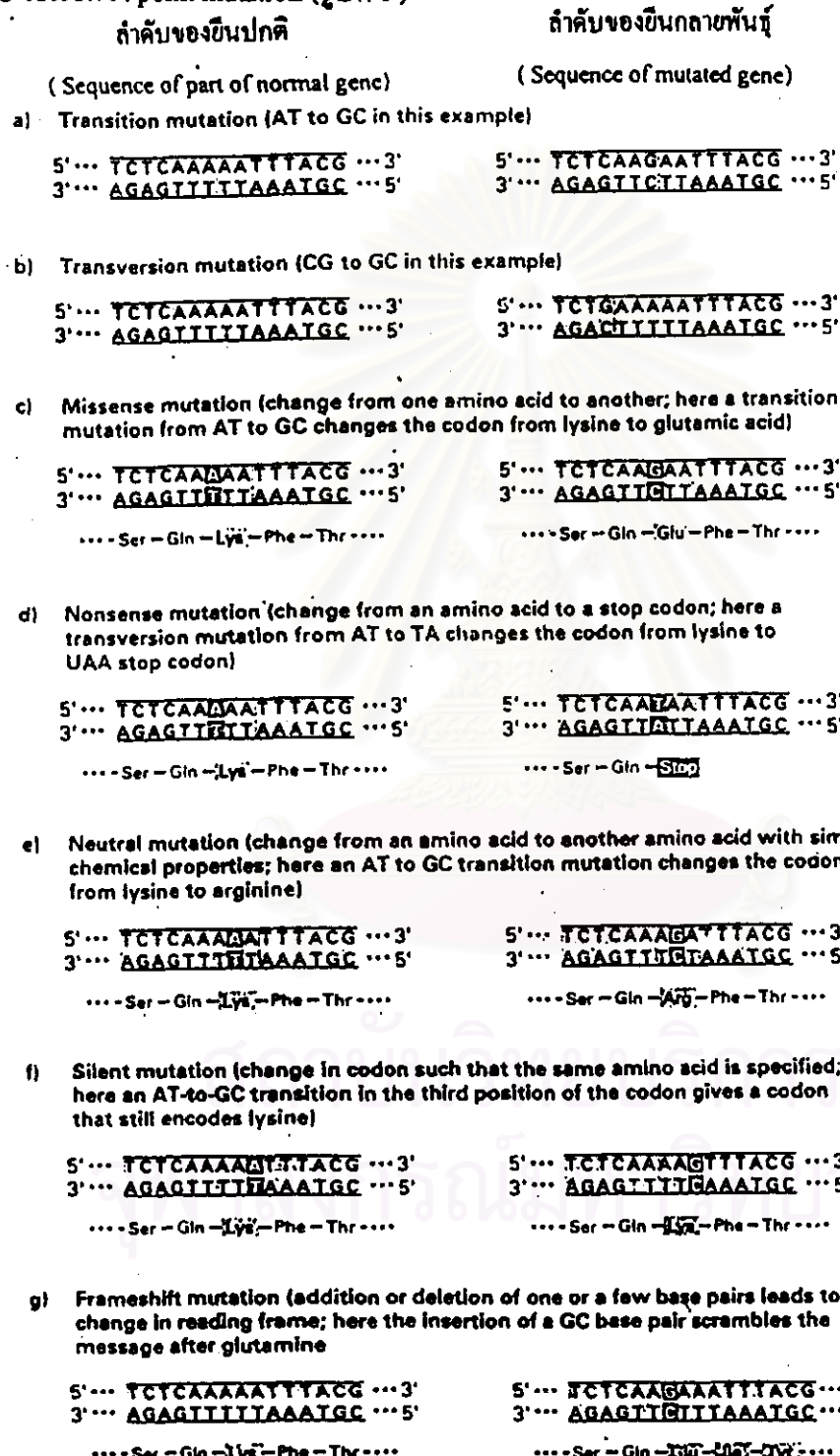
1. การกลายพันธุ์ เป็นวิธีการที่ง่าย สะดวก ใช้ความรู้ทางพันธุกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการปรับปรุงน้อย อาศัยเทคนิคง่าย ราคาถูก ประสิทธิภาพของการกลายพันธุ์ขึ้นอยู่กับสิ่งที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และความถูกต้องในการคัดเลือกเชื้อ ซึ่งเป็นวิธีการสุ่มเลือกจากจุลินทรีย์เป็นจำนวนมาก

2. Genetic recombination เป็นอีกวิธีการหนึ่งในการสร้างสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถให้ผลผลิตในปริมาณสูง โดยอาศัยความรู้พื้นฐานทั้งด้านชีวเคมีและสรีรวิทยาของเชื้อ เช่นวิธีการรวมกันของยีนเพื่อให้เกิดยีนใหม่ที่มีประสิทธิภาพดีขึ้น หรือในแบคทีเรีย เช่นวิธี transformation , conjugation และ transduction

3. Gene cloning เป็นวิธีการที่นิยมในปัจจุบัน อาศัยความรู้ทางพันธุกรรมของเชื้ออย่างลึกซึ้ง โดยอาจทำการเปลี่ยนแปลงที่บริเวณโปรโมเตอร์ , บริเวณที่เกาะของไรโบโซม หรือการลดหรือจำกัดเอนไซม์ที่มีส่วนในการยับยั้งหรือขัดขวางการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ ซึ่งเทคนิคต่าง ๆ มีความซับซ้อนและมีราคาแพง

การกลายพันธุ์ คือการเปลี่ยนแปลงของลักษณะอันสืบเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของยีน การกลายพันธุ์สามารถเกิดได้เองตามธรรมชาติ (Spontaneous mutations) ยกตัวอย่างในแมลงหวี่ (*Drosophila* sp.) จะมีอัตราการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ $10^{-4}$-$10^{-6}$ ต่อยีนต่อรุ่น ในคน มีอัตราการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติเป็น $10^{-4}$-$10^{-6}$ ต่อยีนต่อรุ่น และในแบคทีเรียและฝาจ มีอัตราการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ เท่ากับ $10^{-5}$-$10^{-7}$ ต่อยีน ต่อรุ่น (Russel , 1996) นอกจากจะเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติแล้ว การกลายพันธุ์อาจจะทำได้โดยใช้วิธีการชักนำ (Induced mutations) ซึ่งให้อัตราการกลายพันธุ์ที่สูงกว่าการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ ปัจจุบันมีสิ่งก่อกลายพันธุ์มากมาย มีทั้งสิ่งก่อกลายพันธุ์ทางกายภาพ (physical agent) และ สารเคมี (chemical agent) ทั้งนี้การกลายพันธุ์จะเกิดขึ้นเนื่องจาก 2 ปัจจัย คือ การกลายพันธุ์เนื่องจากดีเอนเอถูกทำลายหรือสูญเสียสภาพอันเนื่องจากสิ่งก่อกลายพันธุ์ และอีกประการหนึ่งคือ การกลายพันธุ์เนื่องจากกระบวนการซ่อมแซมดีเอนเอที่ถูกทำลายหรือเสียสภาพ โดยเซลล์เอง (Rowlands , 1984)

รูปแบบการกลายพันธุ์มีหลายระดับ เช่น การกลายพันธุ์ในระดับโครโมโซม (chromosomal mutation , chromosomal aberration) , การกลายพันธุ์ในระดับของยีน (gene mutation) ซึ่งรวมถึงการแทนที่กันของคู่เบส และการเพิ่มหรือขาดไปของคู่เบสซึ่งการกลายพันธุ์ของลำดับยีนในคู่เบสเดียวของดีเอนเอ จะเรียกว่า point mutation (รูปที่ 6 )




รูปที่ 6 รูปแบบการกลายพันธุ์ที่เกิดจากการแทนที่คู่เบส (Russel , 1996 )

a) Transition mutaion คือ การเปลี่ยนแปลงระหว่างคู่เบส พิวรีน-ไพริมิดีน ไปเป็นคู่เบส พิวรีน-ไพริมิดีน อีกคู่หนึ่ง มี 4 แบบ คือ A-T เป็น G-C , G-C เป็น A-T , T-A เป็น C-G และ C-G เป็น T-A (ตัวอย่าง A-T เป็น G-C)

b) Transversion mutaion คือ การเปลี่ยนแปลงระหว่างคู่เบส พิวรีน-ไพริมิดีน ไปเป็นคู่เบส ไพริมิดีน- พิวรีนหรือในมุมกลับ ไพริมิดีน-พิวรีน เป็น พิวรีน-ไพริมิดีน มี 4 แบบ คือ A-T เป็น T-A , G-C เป็น C-G , A-T เป็น C-G และ G-C เป็น T-A (ตัวอย่าง C-G เป็น G-C)

c) Missense mutation คือ การเปลี่ยนแปลงคู่เบสที่มีผลในการเปลี่ยนรหัสของ mRNA สำหรับกรดอะมิโนที่แตกต่างจากเดิม (ตัวอย่าง transition mutation จาก A-T เป็น G-C ทำให้รหัสการแปลจากไลซีน เปลี่ยนไปเป็นรหัสสำหรับกลูตามิกแอซิด)

d) Nonsense mutation คือ การเปลี่ยนแปลงคู่เบสที่มีผลในการเปลี่ยนรหัสของ mRNA สำหรับกรดอะมิโนไปเป็นรหัสสำหรับการหยุด (ตัวอย่าง transversion mutation จาก A-T เป็น T-A ทำให้รหัสสำหรับไลซีน เปลี่ยนไปเป็นรหัสหยุด)

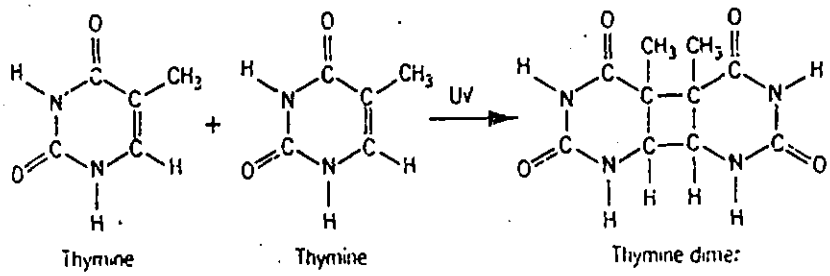
e) Neutral mutation คือ การเปลี่ยนแปลงคู่เบสที่มีผลในการเปลี่ยนรหัสของ mRNA สำหรับกรดอะมิโนที่แตกต่างจากเดิม แต่กรดอะมิโนที่เกิดขึ้นหลังการแปลรหัสแล้วอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับกรดอะมิโนเดิม ซึ่งไม่ทำให้หน้าที่ของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป (ตัวอย่าง transition mutation จาก A-T เป็น G-C เมื่อถอดรหัสโดย mRNA แล้วจากเดิมคือ ไลซีน เปลี่ยนไปเป็น อาร์จินีน)

f) Silent mutation คือ การเปลี่ยนแปลงคู่เบสที่มีผลในการเปลี่ยนรหัสของ mRNA สำหรับกรดอะมิโนที่แตกต่างจากเดิม แต่รหัสสำหรับ mRNA ที่แตกต่างกันให้กรดอะมิโนตัวเดิม (ตัวอย่าง transition mutation จาก A-T เป็น G-C ทำให้ AAA เปลี่ยนเป็น AAG ซึ่งก็ต่างเป็นรหัสสำหรับไลซีน)

g) Frameshift mutation คือ การเปลี่ยนแปลงคู่เบสที่เกิดจากการเพิ่มหรือขาดของคู่เบส 1 คู่ หรือมากกว่า 1 คู่ ทำให้การถอดรหัสโดย mRNA เปลี่ยนแปลงไป ทำให้ได้กรดอะมิโนในสายโพลีเปปไทด์เปลี่ยนแปลงไป (ตัวอย่าง การสอดแทรกของ GC ทำให้มีการเลื่อนการถอดรหัส ทำให้ จากไลซีน มีการเปลี่ยนแปลงเป็น กลูตามิกแอซิด , ไอโซลิวซีน ไทโรซีน ตามลำดับ)

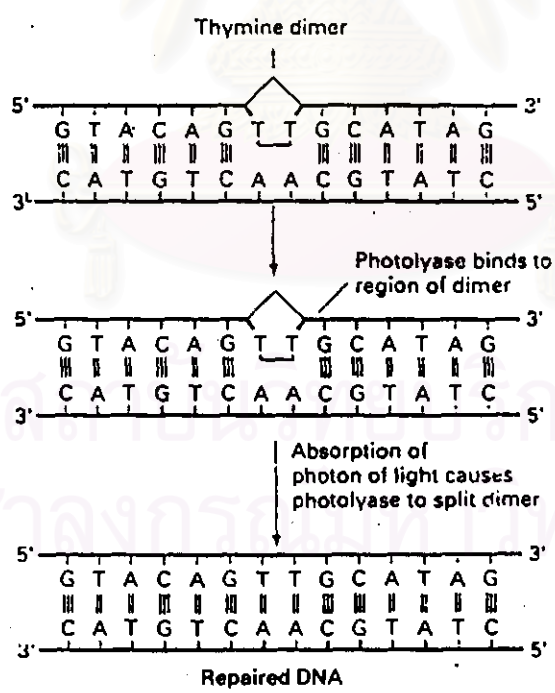
<u>สิ่งก่อการกลายพันธุ์ทางกายภาพ (physical mutagen)</u>

นอกจากสารเคมี แล้วยังสามารถก่อการกลายพันธุ์โดยใช้แหล่งทางกายภาพได้ แหล่งดังกล่าวได้แก่ ความร้อน และ รังสี สำหรับรังสีนั้นสามารถแบ่งได้เป็น ionizing radiation เช่น X rays gamma rays และ cosmic rays รังสีพวกนี้ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้โดยการทำให้เกิดอิออน (ion) การเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่เกิดกับอิออนนั้นก็จะทำให้ยีนเปลี่ยนสภาพไป รังสีอีกประเภทหนึ่งคือ nonionizing radiation ตัวอย่างเช่น แสงอัลตราไวโอเลต (UV) ซึ่งเป็นสิ่งก่อกลายพันธุ์ที่นิยมใช้ และหากปริมาณของแสงมากพอก็สามารถฆ่าเซลล์ได้ กลไกการกลายพันธุ์โดยแสงอัลตราไวโอเลตนั้นเกิดโดย ดีเอนเอดูดซับแสงเข้าไปโดยตรง ที่ช่วงความยาวคลื่นที่ 254-260 นาโนเมตรซึ่งเป็นช่วงที่มีการดูดซับแสงสูงสุดของดีเอนเอ และก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นกับเบสในดีเอนเอได้ (light induced chemicals) โดยเฉพาะกับเบสไพริมิดีน (pyrimidine) ผลจากการดูดซับแสงอัลตราไวโอเลตโดยไพริมิดีน จะทำให้เกิดไพริมิดีนไฮเดรท ยังผลให้เกิดการจับคู่เบสผิดพลาดระหว่างการแบ่งสายดีเอนเอ และ ไพริมิดีนไดเมอร์ เมื่อเบสกระทบกับแสงอัลตราไวโอเลตจะทำให้การจับเกาะเปลี่ยนแปลงไป คือ ทำให้มีการจับกันระหว่างเบสที่อยู่ข้างเคียงกันเกิดเป็น ไดเมอร์ (dimer) โดยส่วนมากจะเกิดการจับเกาะระหว่าง Thymine (T) กลายเป็น Thymine dimer เป็นสาเหตุนำไปสู่การกลายพันธุ์เนื่องจาก การเกิดไดเมอร์ดังกล่าวจะขัดขวางการแบ่งตัวดีเอนเอ และทำให้สายดีเอนเอบิดเสียรูปไป และ/หรือมีการผิดพลาดขณะมีการซ่อมแซมสายดีเอนเอ ส่วนไดเมอร์ชนิดอื่นที่พบคือ C-C (cytosine dimer) เกิดน้อยกว่าพวกแรก ไดเมอร์ชนิดนี้ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการที่ $NH_2$ ถูกขับออกไปจึงทำให้ได้ U-U (uracil dimer) แต่ U จะมีสมบัติเช่น T ดังนั้นจึงทำให้ G-C เปลี่ยนเป็น A-T (Mitra , 1994 ; Russel , 1996 ; Snustad *et al.* , 1997) อย่างไรก็ตามในระบบของสิ่งมีชีวิตจะมีกลไกการซ่อมแซมดีเอนเอที่เสียหายนี้ได้




รูปที่ 7 การเกิด Thymine dimer จากการฉายแสงอัลตราไวโอเลต (Snustad *et al.*, 1996)

กลไกที่ทำให้เกิดไดเมอร์กลับคืนสู่สภาพปกติได้ คือ Light dependent repair หรือ Photoreactivation โดย อาศัย ดีเอนเอ โฟโตไลเอส (DNA photolyase) ซึ่งทำงานได้เมื่อมีแสง visible light ( ช่วงความยาวคลื่น 320-370 นาโนเมตร) ดีเอนเอ โฟโตไลเอส จะไปตัดที่พันธะโควาเลนท์ระหว่างไดเมอร์ให้ขาดออกจากกัน ดังนั้น ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในแบคทีเรียด้วยแสงอัลตราไวโอเลต จึงควรเลี้ยงเซลล์ในที่มืดเพื่อป้องกันการซ่อมแซมแบบ photoreactivation และเพื่อให้มีความถี่ในการกลายพันธุ์ได้สูงสุด (Snustad *et al.*, 1997) (รูปที่ 8)




รูปที่ 8 ปรากฏการณ์ Photoreactivation ซ่อมแซมการเกิดไดเมอร์ที่เกิดจากการฉายแสงอัลตราไวโอเลต (Russel, 1996)

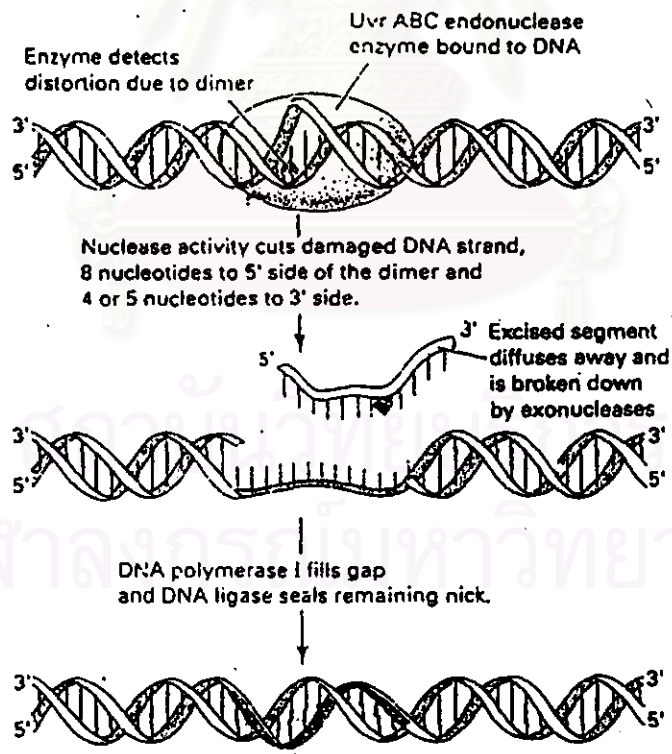
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



การซ่อมแซมซึ่งยังผลให้เกิดการกลายพันธุ์ลดลงอีกวิธีหนึ่ง คือ การซ่อมแซมแบบ Excision repair หรือ dark repair เนื่องจากการซ่อมแซมสามารถเกิดได้ในที่มืดโดย thymine dimer ที่เกิดขึ้นถูกจดจำโดย UvrABC endonuclease ซึ่งเอนไซม์จะเข้าไปตัดสายดีเอนเอที่เกิดไดเมอร์ โดยจะตัดจากปลาย 5' มาจำนวน 8 นิวคลีโอไทด์ และจากปลาย 3' มาอีก 4 นิวคลีโอไทด์ เกิดเป็นช่องว่าง 12 นิวคลีโอไทด์เกิดขึ้น หลังจากนั้น DNA polymerase I จะเติมเบสในช่องว่างที่ขาดหายไป และ DNA ligase มาเชื่อมต่อสาย (Russel , 1996) (รูปที่ 9)

ด้วยกลไกการซ่อมแซมหลังการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตอาจทำให้เกิดการซ่อมแซมให้ได้สายดีเอนเอที่เป็นปกติและการกลายพันธุ์จะลดจำนวนลง ดังนั้น เชื้อที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตมีโอกาสเกิดการย้อนกลับ (reverse) เป็นสายพันธุ์เดิม หรือมีประสิทธิภาพในการผลิตสารที่ต้องการต่ำลงได้ เมื่อผ่านการเลี้ยงเป็นเวลานานๆ

ประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ขึ้นอยู่กับ ความเข้มแสง ระยะเวลาที่ได้รับแสง ระยะห่างระหว่างแหล่งแสงกับจุลินทรีย์ ชนิดและจำนวนของจุลินทรีย์ รวมทั้งสภาพการเจริญของจุลินทรีย์ เป็นต้น




รูปที่ 9 การซ่อมแซมแบบ Excision หรือ dark repair ในจุลินทรีย์ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต (Russel , 1996)

ได้มีการใช้แสงอัลตราไวโอเลตและสารก่อกลายพันธุ์อันมาชักนำให้จุลินทรีย์กลายพันธุ์ในวัตถุประสงค์ต่างๆ อาทิ เช่น

Kalra และคณะ (1973) ปรับปรุงสายพันธุ์ *Streptococcus lactis* โดยให้แสงอัลตราไวโอเลตเพื่อสร้าง nisin เพิ่มขึ้น ซึ่ง nisin เป็นสารที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งใช้เป็นสารกันเสียในการผลิตชีส จากการทดลองพบว่า เมื่อฉายแสงอัลตราไวโอเลต ปริมาณ 9000 ergs/mm3 ให้อัตราการรอดน้อยกว่า 1% และพบว่าการสร้าง nisin เพิ่มขึ้นถึง 50 และ 100% หลังจากผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 2 ครั้ง

Akasaka และ คณะ (1989) ได้ทำการศึกษาการกลายพันธุ์ *Streptococcus zooepidemicus* NH-131 ซึ่งมีสารสเตรปโตไลซินสามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ โดยใช้แสง UV และสาร N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) ตามลำดับพบว่าได้สายพันธุ์กลาย *Streptococcus zooepidemicus* BP-784 ที่ได้นั้นไม่สร้างสารสเตรปโตไลซิน จึงไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงและเมื่อทำการหมักในภาวะที่เหมาะสมให้กรดไฮยาลูโรนิก 3.6 กรัม/ลิตร

Shah และคณะ (1986) ได้ทำการศึกษาการกลายพันธุ์ของ *Bacillus licheniformis* โดยใช้แสง UV พบว่ามีสายพันธุ์กลาย 1 สายพันธุ์ที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสได้มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม 100-110 %

Ray และ Nanda (1996) ศึกษาการกลายพันธุ์ *Bacillus megaterium* B6 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตและ NTG ได้สายพันธุ์กลาย UN12 ที่สามารถผลิต บีตา อะไมเลส ได้ปริมาณสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งต้น 4.5 เท่า

Lee และ Rho (1999) ได้กลายพันธุ์ *Streptomyces fradiae* NRRL 2702 ด้วย NTG และ แสงอัลตราไวโอเลต ได้สายพันธุ์กลาย MUN20 และศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไทโรซิน พบว่าสายพันธุ์กลายที่ได้สามารถผลิตไทโรซินได้สูงขึ้นเป็น 349 มิลลิกรัมต่อกรัมมวลเซลล์ ในขณะที่สายพันธุ์ดั้งต้นสามารถผลิตได้เพียง 15 มิลลิกรัมต่อกรัมมวลเซลล์

สิ่งก่อกลายพันธุ์ที่เป็นสารเคมี (chemical mutagen) แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ( Russel, 1996)

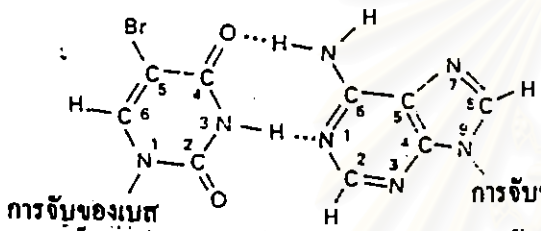
1. เบสอะนาล็อค (Base analogs) เป็นสารเคมีที่มีโครงสร้างโมเลกุลใกล้เคียงหรือคล้ายคลึงกันกับเบสในดีเอนเอที่พบในธรรมชาติ ตัวอย่าง base analogs ที่นิยมกัน คือ 5-bromouracil ( 5BU) และ 2-aminopurine ( 2AP) โดย 5BU และ 2AP จะอยู่ในรูปแบบ 2 ภาวะ(state)คือ ภาวะปกติ (normal state) และ ภาวะที่เกิดน้อย (rare state) โดยทั้ง 5BU และ 2AP เมื่ออยู่

ใน ภาวะปกติ จะมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับ thymine และเมื่ออยู่ใน ภาวะที่เกิดน้อย จะมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับ guanine เมื่อสารเหล่านี้อยู่ในขณะการจำลองตัว จะทำให้เกิดการจำลองตัวผิด โดยนำสารเหล่านี้เข้าไปแทนที่เบส ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในสายดีเอนเอ (รูปที่ 10)

a) ภาวะปกติ (normal state)

b) ภาวะที่เกิดน้อย (rare state)

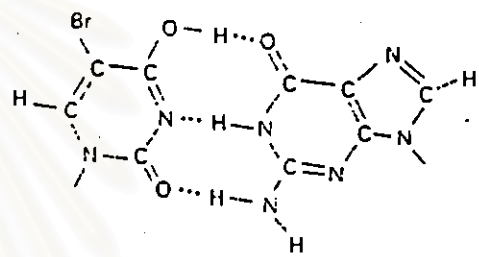
a) การจับคู่ของ 5-โบรโมยูราซิว ในภาวะปกติ




5-โบรโมยูราซิว ทำงานคล้าย ไธมีน ; ภาวะปกติ

Adenine (ภาวะปกติ)

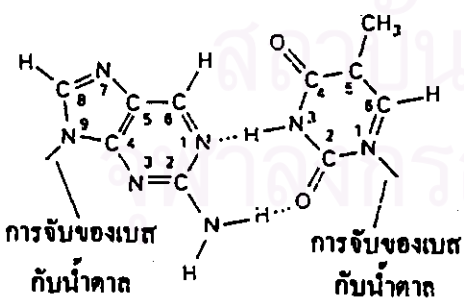
b) การจับคู่ของ 5-โบรโมยูราซิว ในภาวะที่เกิดน้อย




5-โบรโมยูราซิว ทำงานคล้าย ไซโตซีน ; ภาวะที่เกิดน้อย

Guanine (ภาวะปกติ)

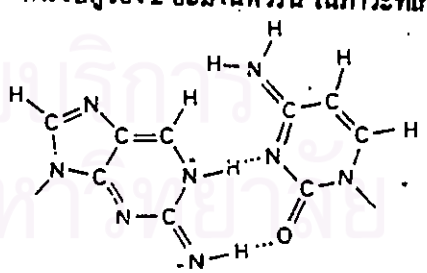
การจับคู่ของ 2-อะมิโนพิวรีน ในภาวะปกติ




2-Aminopurine Thymine

ภาวะปกติ ( Normal state)

การจับคู่ของ 2-อะมิโนพิวรีน ในภาวะที่เกิดน้อย

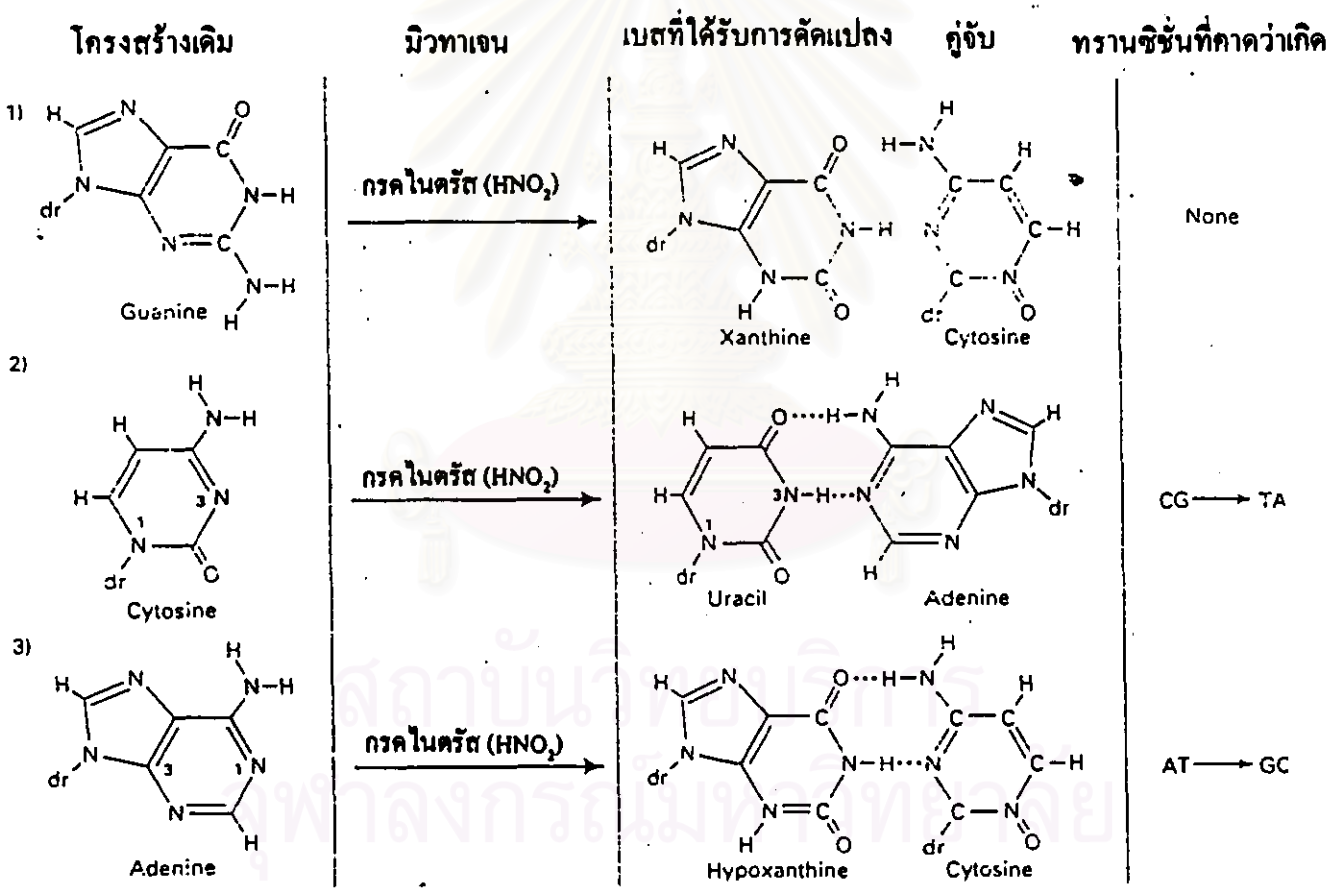



2-Aminopurine Cytosine

ภาวะที่เกิดน้อย (rare state)

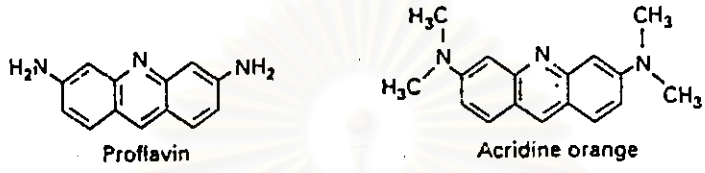
รูปที่ 10 การกลายพันธุ์เนื่องจากเบสอะนาล็อค 5BU และ 2AP (Russel , 1996)

2. สารที่แปรเปลี่ยนโครงสร้างของเบส (Base-modifying agents) เป็นสารเคมีที่จะเข้าไปทำการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและสมบัติทางเคมีของเบสเปลี่ยนแปลงไป ตัวอย่างสารเคมีในกลุ่มนี้ ได้แก่ Nitrous acid ($HNO_2$) เป็นสารเคมีที่จะไปกำจัดหมู่อะมิโน ($-NH_2$) ออกจาก guanine , cytosine และ adenine hydroxylamine ($NH_2OH$) จะเติมหมู่ไฮดรอกซีให้แก่ cytosine โดยเฉพาะ และ Ethylmethane sulfonate (EMS) จะเติมหมู่เอคิลให้แก่ เบส ซึ่งสารที่แปรเปลี่ยนโครงสร้างของเบส จะทำให้เกิดการจำลองตัวที่ผิดพลาด เกิดการเปลี่ยนแปลงที่สายดีเอนเอ (รูปที่11)

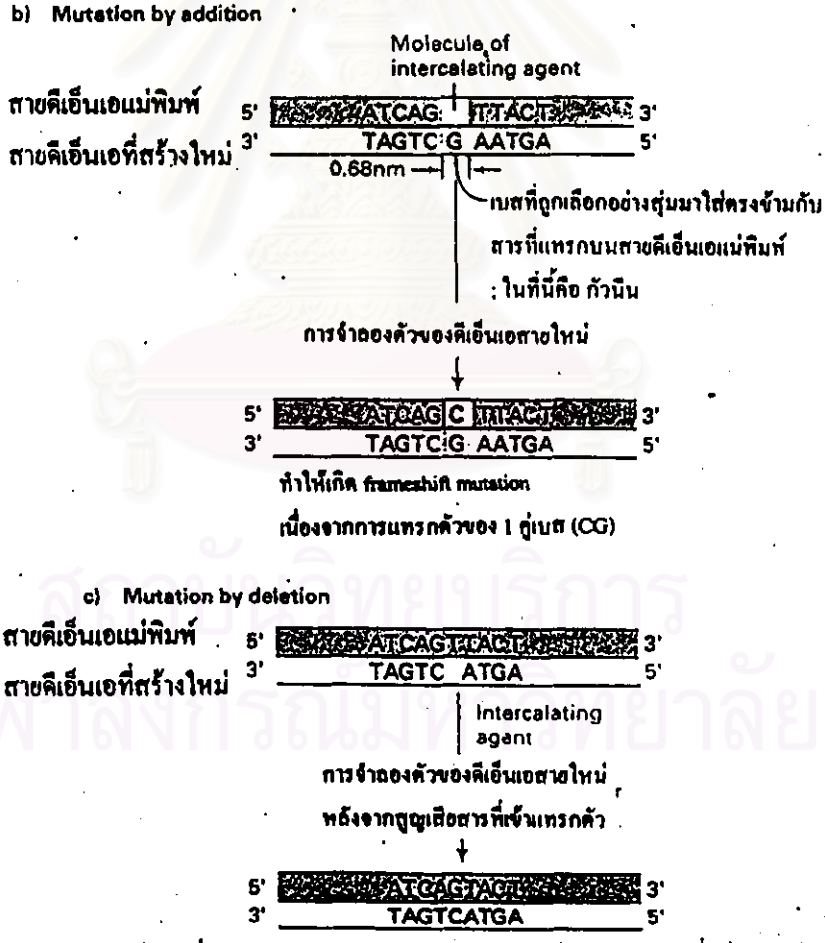



รูปที่ 11 ตัวอย่างการกลายพันธุ์ เนื่องจาก $HNO_2$ ซึ่งเป็นสารเคมีในกลุ่มสารที่แปรเปลี่ยนโครงสร้างของเบส (Base-modifying agent) (Russel , 1996)

3. สารที่เข้าแทรกตัว (Intercalating agent) ได้แก่ proflavin , acridine ,ethidium bromide และ ICR-170 โดยสารเคมีเหล่านี้จะเข้าไปแทรกตัว (intercalating) ระหว่างเบสในสายของดีเอนเอทำให้มีการเพิ่มหรือหายไปของเบสในระหว่างการจำลองตัวหรือซ่อมแซมดีเอนเอ ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่เรียกว่า frameshift mutation (รูปที่12)

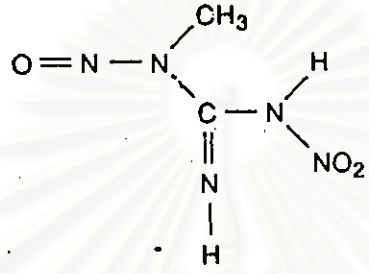



รูปที่ 12 โครงสร้างของ Proflavin และ Acridine orange (Russel , 1996)



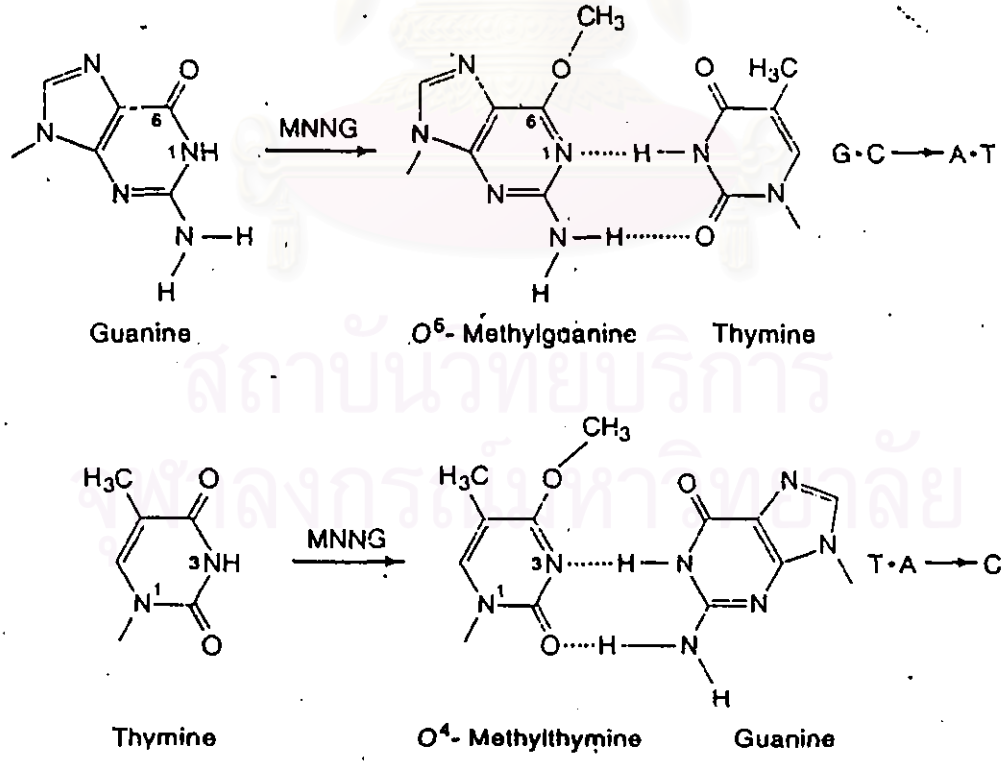

รูปที่ 13 การกลายพันธุ์อันเนื่องจากการแทรกตัวของสารเคมีในกลุ่มสารที่เข้าแทรกตัว (Intercalating agent) (Russel , 1996)

สารเคมีที่นิยมใช้ในการก่อกลายพันธุ์ คือ N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine ( NTG , MNNG , NG) เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการกลายพันธุ์สูง เป็นสารเคมีที่สังเคราะห์ขึ้นมาจากปฏิกิริยา nitrosation ของ methylnitroguanidine มีสูตรโมเลกุล $C_2H_5N_5O_3$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 147.10 ประกอบด้วย C 16.33 % , H 3.43 % , N 47.61% และ O 32.63 % ลักษณะเป็นผลึกสีเหลือง มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 118 องศาเซลเซียส จุดเดือดที่อุณหภูมิ 123.5 องศาเซลเซียส โครงสร้างของ NTG แสดงดังรูปที่ 14 NTG จะแตกตัวเป็น nitrous acid ในสภาวะที่เป็นกรดและแตกตัวเป็น diazomethane ($CH_2N_2$) ในสภาวะที่เป็นด่าง (Mendel and Greenberg, 1960 ; Fishbein *et al.* , 1970)



รูปที่ 14 โครงสร้างของสารเคมี NTG (Miller, 1992)

NTG เป็นสารเคมีที่ก่อกลายพันธุ์ในกลุ่ม Base-modifying agent โดยจะไปเติมหมู่อัลคิลกับตำแหน่งไนโตรเจนหรือออกซิเจนของเบสแต่ละชนิด เช่น ตำแหน่ง $O^6$ ของเบสกัวนีน และตำแหน่ง $O^4$ ของเบสไธมีน เป็นสาเหตุให้เกิดการกลายพันธุ์ (รูปที่ 15)




รูปที่ 15 การเติมหมู่อัลคิลที่ตำแหน่ง $O^6$ ของเบสกัวนีน และที่ตำแหน่ง $O^4$ของเบสไธมีน โดยสาร NTG (Miller , 1992)

ตัวอย่างการกลายพันธุ์จุลินทรีย์โดยใช้สารเคมี

Annous และ Blaschek (1991) ได้ทำการกลายพันธุ์ *Clostridium acetobulyticum* ATCC 824 ด้วย NTG ได้สายพันธุ์กลาย 101 และ BA 105 ที่สามารถผลิต amylolytic enzyme สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 1.8 และ 2.5 เท่าตามลำดับ

Nimrod (1986) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคจากการหมักด้วยเชื้อ Streptococcus โดยได้มีการกลายพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการผลิตโดยใช้สาร NTG 100 mg/ml เป็นเวลา 40 นาทีและคัดเลือกบน Todd-Hewitt agar และเลือกโคโลนีที่ลักษณะเหนียวหนืดมาทดสอบบนอาหารที่มีเลือดและเลือกโคโลนีที่ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง มาใช้ในการหมักเพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิคในอุตสาหกรรมต่อไป

Hashimoto และคณะ (1990) ได้กลายพันธุ์ *S. equi* ATCC 9527 ด้วย NTG 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.0 ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที คัดเลือกสายพันธุ์กลายในอาหารแข็งสูตรกำหนดทางเคมี (chemically defined medium) ได้สายพันธุ์กลาย FM 100 และ FM 300 เมื่อนำมาผลิตกรดไฮยาลูโรนิคแบบระบบต่อเนื่องในสูตรอาหารที่ประกอบด้วย กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร, ไดโพแทสเซียม ไฮโดรเจนฟอสเฟต 2 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร โซเดียมไธโอซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร โพลีเปปโทน 10 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร พบว่า สายพันธุ์ FM 100 ผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้ 7.2 กรัมต่อลิตร และสายพันธุ์ FM 300 ผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้ 6.9 กรัมต่อลิตร ในขณะที่สายพันธุ์ตั้งต้น ATCC 9527 ผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้เพียง 3.1 กรัมต่อลิตร

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 นอกจากนี้น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิคที่ผลิตจากสายพันธุ์กลายเมื่อเทียบกับกรดไฮยาลูโรนิคที่ผลิตจากสายพันธุ์ตั้งต้น และกรดไฮยาลูโรนิคเชิงการค้า HEALON® และ ARTZ® พบว่ากรดไฮยาลูโรนิคจากสายพันธุ์กลายให้กรดไฮยาลูโรนิคที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่สูงกว่า คือ 3,800 กิโลดาลตัน

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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย