บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

Streptococcus zooepidemicus ATCC 35246 เป็นแบคทีเรียที่สั่งซื้อมาจาก American Type Culture Collection , Rockville , Maryland. , USA. ซึ่งแยกได้จากหนูตะเภาตาย มีสมบัติดังนี้ สามารถสร้างกรดไฮยาลูโรนิค สามารถใช้น้ำตาลแลคโตส และไวต่ออิริโทรมัยซิน (HA^+ , Lac^+ , Em^s) (John *et al.* , 1994 ; Armstrong *et al.* , 1997 ; Armstrong and John , 1997) มีรายงานถึงการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคจาก *S. zooepidemicus* ในสูตรอาหารหมักต่างๆ ดังนี้

ตารางที่ 26 ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคจากรายงานวิจัยที่ใช้เชื้อ *S. zooepidemicus* ในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

ผู้วิจัย	สายพันธุ์	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิค (กรัมต่อลิตร)
Park *et al.* , 1996	*S. zooepidemicus* ATCC 35246	4.8
	S. zooepidemicus LBF 707	6
Armstrong *et al.* , 1997	*S. zooepidemicus* ATCC 35246	1.5-1.7
Armstrong and John , 1997	*S. zooepidemicus* ATCC 35246	1.1-4.2
John *et al.* , 1994	*S. zooepidemicus* ATCC 35246	2.1
Nimrod *et al.* , 1988	*S. zooepidemicus* HA 116 ATCC 39920	2-6
Morita *et al.* , 1991	*S. zooepidemicus* FERM BP 878	1
Swann *et al.* , 1990	*S. zooepidemicus* NCTC 7023	2.0-5.1
Akasaka *et al.* , 1989	*S. zooepidemicus* FERM BP 784	3.6

ในส่วนของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จุรารัก ศรีวงษ์ (2540) ศึกษาการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคในอาหารหมักสูตรปรับปรุงจาก Nimrod (1986) (ภาคผนวก ก ข้อ 2) และศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้ 0.54 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 15

ในงานวิจัยนี้ มีจุดมุ่งหมายในการปรับปรุงสายพันธุ์ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 โดยใช้สูตรอาหารปรับปรุงจาก Nimrod (1986) และภาวะการเลี้ยงเชื้อคือ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 6.8 อัตราเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น 20 เปอร์เซ็นต์ ตามรายงานของ จุรารัก ศรีวงษ์ (2540) เป็นภาวะมาตรฐานในการทดลองนี้

ปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการกลายพันธุ์เชื้อคือช่วงอายุเชื้อที่ใช้ในการกลายพันธุ์ควรเลือกเชื้อที่มีการเจริญอยู่ในช่วงกึ่งกลางทวีคูณ (mid log phase) เนื่องจาก เชื้อในช่วงนี้มีอัตราการเจริญเป็นไปอย่างเต็มที่และคงที่ และเป็นระยะที่เซลล์แข็งแรงและมีกิจกรรมของเซลล์ดี (Caldwell , 1995) มีรายงานของ Adelberg และคณะ ในปี 1965 ศึกษาช่วงอายุของ *E.coli* K12 ที่เหมาะสมในการกลายพันธุ์ โดยแปรระยะการเจริญในช่วง logarithmic , early stationary และ late stationary พบว่า เมื่อกลายพันธุ์ *E.coli* K12 ด้วย NTG ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการเจริญช่วง logarithmic จะให้อัตราการกลายพันธุ์ 1.2 $\times 10^{-3}$ ต่อเชื้อที่รอด ซึ่งมากกว่าในช่วงการเจริญ early และ late ที่ให้อัตราการกลายพันธุ์เพียง 0.27 $\times 10^{-3}$ และ 0.12 $\times 10^{-3}$ ต่อเชื้อที่รอด ตามลำดับ

ดังนั้น การทดลองขั้นแรกจึงศึกษาถึงระยะเวลาการเจริญของ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ที่เหมาะสมในการกลายพันธุ์ซึ่งผลที่ได้ คือการเจริญในอาหารเหลว TSB ที่ชั่วโมงที่ 7 เชื้อจะเจริญอยู่ในระยะกึ่งกลางทวีคูณ (mid log phase) ซึ่งเปรียบเทียบกับการเจริญในอาหารเหลว BHI ที่ จุรารัก ศรีวงษ์ (2540) ได้ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในการเตรียมหัวเชื้อเพื่อการผลิต พบว่าเชื้อจะเจริญอยู่ที่ระยะกึ่งกลางทวีคูณ (mid log phase) ในชั่วโมงที่ 9 ความแตกต่างของ TSB และ BHI คือแหล่งไนโตรเจนโดยสูตรอาหาร BHI คือสมองลูกวัว และหัวใจกระบือ ส่วน TSB คือ ทริปโตน (tryptone) และโปรตีนจากถั่ว สาเหตุที่อัตราการเจริญใน TSB เร็วกว่า BHI อาจเป็นเพราะเชื้อสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนใน TSB ได้ดีกว่า ใน BHI ซึ่งมีความซับซ้อนมากกว่า

และจากผลการทดลองที่ใช้ TSB เป็นอาหารเพื่อเตรียมหัวเชื้อในการผลิตเปรียบเทียบกับ BHI นั้น ผลผลิตของกรดที่ได้ไม่ปรากฏแตกต่างกันนัก จึงเป็นการดีในการใช้ TSB ซึ่งมีราคาที่ถูกกว่า BHI

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

เนื่องจากในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายมีจำนวนมากโดยการผลิตในอาหารเหลวในระดับขวดเขย่าทำได้ไม่สะดวกและทำให้ค่าใช้จ่ายในการผลิตกรดเพื่อการคัดเลือกสายพันธุ์สูง จึงทดลองลดระดับการผลิตมาทำในระดับหลอดทดลองพร้อมการเขย่า ผลปรากฏว่า ในระดับหลอดเขย่าให้ปริมาณกรดต่ำกว่าในระดับขวดเขย่า แต่แนวโน้มของการผลิตกรดในระดับหลอดเขย่าและขวดเขย่าเป็นไปในทางเดียวกัน คือให้ปริมาณกรดเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 และที่ชั่วโมงที่ 18 ปริมาณกรดที่ได้ไม่ต่างกันมากนัก ดังนั้น จึงเลือกการผลิตในระดับหลอดเขย่าและชั่วโมงการผลิตที่ 18 ชั่วโมงในการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิของเชื้อสายพันธุ์กลาย

โดยการผลิตเพื่อการคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายในระดับหลอดทดลองขนาด 150 มิลลิลิตร พร้อมการเขย่านั้น เป็นวิธีการผลิตในอาหารเหลวแบบกะ (batch liquid culture) ที่มีความสะดวกแต่ในการผลิตแบบให้อากาศ หลอดทดลองจะมีปริมาณออกซิเจนในระบบน้อยกว่าในระดับ ขวดเขย่า (shake flask) ปัจจัยเรื่องออกซิเจนสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคนั้น มีรายงานของ Cleary และ Larkin (1979) ที่สนับสนุนว่า ปริมาณออกซิเจนที่ละลายลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อมาก จะทำให้เชื้อปรับตัวโดยการสร้างแคปซูลชนิดกรดไฮยาลูโรนิคมากขึ้น ดังนั้นหากต้องการปรับปรุงการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคในระดับหลอดเขย่าโดยให้ปริมาณออกซิเจนละลายสู่อาหารเพิ่มมากขึ้น อาจทำได้โดยการเพิ่มสัดส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการลดปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเอียงหลอด และยึดหลอดไว้บนเครื่องเขย่าแบบหมุน (rotary) เพื่อให้เกิดการกวนแบบสม่ำเสมอ (vortex) นอกจากนี้อาจใช้จุกสำลีที่หลวม หรือแผ่นเมมเบรน ที่ให้อากาศผ่านได้ดีปิดปากหลอดซึ่งทำจาก polycarbonate memebrane บาง ๆ เป็นต้น (Drew , 1981)

การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายในขั้นปฐมภูมินั้นอาศัยการพิจารณาจากลักษณะโคโลนีที่มีขนาดใหญ่และมีเมือกมากบนอาหารแข็ง TSA ซึ่งลักษณะโคโลนีที่เป็นเมือกบนอาหารแข็ง ขึ้นอยู่กับ อายุของเชื้อ ปริมาณความชื้น (moisture content) และความอุดมสมบูรณ์ของอาหารเลี้ยงเชื้อ (DeAngelis and Weigel , 1994) สำหรับการคัดเลือกเชื้อตามลักษณะดังกล่าว ไม่สามารถบ่งชี้ได้แน่ชัดว่า ลักษณะโคโลนีใหญ่และมีเมือกมากจะสามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้สูง ทั้งนี้เพราะปริมาณโคโลนีที่เกิดขึ้นบนจานเลี้ยงเชื้อในแต่ละจานนั้นไม่เท่ากัน หากบนจานเลี้ยงเชื้อมีจำนวนโคโลนีน้อย ขนาดของโคโลนีที่เจริญจะมีขนาดใหญ่กว่าเมื่อเปรียบเทียบกับจานเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีจำนวนมาก และลักษณะเมือกมาก ไม่สามารถแยกได้ชัดเจนด้วยสายตา ดังนั้น การคัดเลือกในขั้นนี้จึงเป็นการคัดเลือกแบบสุ่ม จึงคัดเลือกต่อในขั้นทุติยภูมิ โดยศึกษาการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคโดยวิธีการวิเคราะห์ในขั้นตอนคัดเลือกนั้น ไม่จำเป็นต้องใช้วิธีการวิเคราะห์โดยใช้เอนไซม์ ซึ่งเป็นวิธีที่มีความจำเพาะเจาะจงกับกรดไฮยาลูโรนิค เพราะการคัดเลือกนั้นจะต้องคัดเลือกจากเชื้อจำนวนมาก รีเอเจนต์ที่ใช้มีราคาแพง ดังนั้นจึงใช้วิธีคาร์บาโซล ซึ่งเป็นวิธีหาปริมาณกรดยูโรนิค ซึ่ง

กรดไฮยาลูโรนิค มีกรดกลูคูโรนิคเป็นองค์ประกอบในโครงสร้าง ในการทดลอง ใช้วิธีของ Bitter และ Muir 1962 ซึ่งได้กล่าวถึงข้อดีของวิธีการนี้ คือ มีความไวต่อกรดยูโรนิคสูง , เกิดสีได้รวดเร็ว มีความเสถียรของสีอย่างน้อย 16 ชั่วโมง และลดการรบกวนจากคลอไรด์อิออน และสารออกซิแดนซ์ได้ และจากการทดลองปฏิกิริยาคาร์บาโซล ให้ผลที่ใกล้เคียงกับการใช้วิธีเอนไซม์ จึงเป็นการวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือได้ในระดับหนึ่ง แต่อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการวิเคราะห์กรดยูโรนิค โปรตีน และน้ำตาลนิวทรัล (neutral sugar) จะมีส่วนในการรบกวนปฏิกิริยา ดังรายงานเกี่ยวกับการวิเคราะห์ด้วยวิธีคาร์บาโซลโดยลดการรบกวนจากน้ำตาลนิวทรัล โดยใช้ *m*- hydroxydiphenyl reagent แทน คาร์บาโซล (Filisetti-Cozzi and Carpita , 1991) แต่ทั้งนี้ รีเอเจนต์ดังกล่าวมีราคาแพง จึงใช้วิธีคาร์บาโซลของ Bitter และ Muir (1962) ในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายเช่นเดียวกับรายงานของ Kim และคณะ (1996) โดยทำบริสุทธิ์อาหารหมักด้วยเอธานอลก่อนการวิเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิคด้วยวิธีคาร์บาโซลในการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย

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

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

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

การกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตมักนิยมใช้ในการกลายพันธุ์ครั้งแรกของจุลินทรีย์ เป็นวิธีการที่ง่ายและสะดวกที่สุดในการกลายพันธุ์เชื้อเพื่อให้ได้สายพันธุ์กลายที่มีสมบัติแตกต่าง

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

Clowes and Hays , 1968ได้รายงานปัจจัยที่มีผลต่อการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต นั้นขึ้นกับหลายปัจจัยอย่าง อาทิ เช่น

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

2. เซลล์แขวนลอย อาหารเลี้ยงเชื้อจะสามารถดูดซับแสงอัลตราไวโอเลตได้มากกว่าสารละลายบัฟเฟอร์ จึงทำให้ปริมาณแสงอัลตราไวโอเลตผ่านไปสู่เชื้อที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อมีประสิทธิภาพลดลง อีกทั้งอาจทำให้เกิดสารพิษหรือสารอินทรีย์ เปอร์ออกไซด์ ที่จะรบกวนทำให้ระยะเวลาในการฉายแสงอัลตราไวโอเลตเพิ่มออกไป

3. ลักษณะทางกายภาพของเชื้อ ในเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ ดีเอนเอของแบคทีเรียนั้นนิวเคลียสมักจะน้อยกว่า ในเซลล์ที่มีขนาดเล็ก เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์มวลต่อต่อปริมาตรเซลล์

4. ความเข้มของแสงอัลตราไวโอเลต

5. ระยะห่างของแสงอัลตราไวโอเลต

ดังนั้นในการปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพในการกลายพันธุ์ที่เหมาะสมที่สุด จึงควรหาภาวะที่เหมาะสมต่างๆ ที่เกี่ยวข้องปัจจัยข้างต้น เพื่อเพิ่มโอกาสให้ได้สายพันธุ์กลายมากขึ้น โดยพบว่า ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการกลายพันธุ์ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 คือการฉายแสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ระยะห่างจากแหล่งแสง 30 เซนติเมตร เป็นเวลา 80-120 วินาที ได้ช่วงการรอด 5.38 - 0.07 เปอร์เซ็นต์

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

เชื้อที่ผ่านการกลายพันธุ์มาหลายครั้งจะมีอัตราการรอดต่ำกว่า คือมีความไวต่อแสงอัลตราไวโอเลตเพิ่มขึ้น

นอกจากนี้ยังควรคำนึงถึงกระบวนการซ่อมแซมดีเอนเอที่เกิดขึ้นได้ทั้งในภาวะที่มีแสงและในที่มืด ซึ่งยังส่งผลทำให้ได้สายพันธุ์กลายลดลงหรือมีการกลายพันธุ์กลับเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นได้

ส่วนในการกลายพันธุ์ด้วย NTG นั้น เป็นการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมีการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นจะมีความเจาะจงในการก่อการกลายพันธุ์ คือสาร NTG จะไปทำหน้าที่ในการเติม methyl group ที่เบส ซึ่งแตกต่างจากการใช้แสงอัลตราไวโอเลตที่ทำให้เกิดการผิดพลาดของการกลายพันธุ์โดยก่อให้เกิดไทมีนไดเมอร์

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

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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

S. zooepidemicus ATCC 35246

(ผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ได้ 180.23 มิลลิกรัม/ลิตร)

↓ 1st UV

สายพันธุ์ AU 21

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

↓ 2nd UV

สายพันธุ์ BU 42

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

↓ 3rd UV

สายพันธุ์ CU 47

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

↓ 1st NTG

สายพันธุ์ CUN 20

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

↓ 2nd NTG

สายพันธุ์ CUN2-1

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

↓ 3rd NTG

สายพันธุ์ CUN3-5

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

↓ 4th NTG

สายพันธุ์ CUN4-7

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

↓ 5th NTG

สายพันธุ์ CUN5-10

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

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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

นอกจากนี้ มีรายงานที่กล่าวถึงผลของการเติม bacteriolytic enzyme เช่น ไลโซไซม์ หรือ surface active agent เช่น ทวีน 80 จะมีผลในการเพิ่มปริมาณกรดไฮยาลูโรนิค (Morita *et al* . , 1991 ; Kim *et al* . , 1996) จึงทำการทดลองเพื่อศึกษาถึงผลกระทบดังกล่าวทั้งในสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลายโดยยึดตามการทดลองของ Kim และคณะ (1996) พบว่า เมื่อเติมไลโซไซม์ทั้งในการหมักสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลายในอาหารหมักสูตรปรับปรุงจาก Nimrod (1986) ไลโซไซม์มีผลต่อการกระตุ้นการสะสมกรดไฮยาลูโรนิคสูงขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะไลโซไซม์ จะไปย่อยสลายผนังเซลล์ จึงทำให้เชื้อพยายามสร้างกรดไฮยาลูโรนิคเพิ่มขึ้น เพื่อป้องกันเซลล์ให้อยู่รอดในสภาวะนั้นๆ

สำหรับ ทวีน 80 (โพลีซอร์เบท หรือ โพลีออกซีเอธิลีน ซอร์บิแทน โมโนโอลิเอท) เป็นดีเทอร์เจนชนิดหนึ่งที่ไม่มีประจุ (nonionic detergent) โดยจะมีผลทำลายส่วนเปปติโดไกลแคนของแบคทีเรียแกรมบวก หรือ ส่วนเมมเบรนส่วนนอก (outer membrane) ในแบคทีเรียแกรมลบ จากสมบัติดังกล่าว จึงมีการนำเอาดีเทอร์เจนมาใช้ในการแยก ไซโตพลาสมิก เมมเบรน ออกจากเมมเบรนส่วนนอกของยูแบคทีเรียแกรมลบ (Sprott *et al.* ,1994) สำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค จาก *Streptococcus* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากทวีน 80 ซึ่งมีผลในการทำลายเปปติโดไกลแคน เพื่อเป็นการปกป้องเซลล์ให้อยู่รอด จึงทำให้เชื้อสร้างแคปซูลชนิดกรดไฮยาลูโรนิคเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ทวีน 80 อาจส่งผลในการทำให้กรดไฮยาลูโรนิคที่อาจจะติดอยู่กับเซลล์บางส่วนให้หลุดลงสู่ให้อาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นซึ่ง Sutherland (1990) ได้กล่าวไว้ว่า Group C Streptococcus จะสร้างกรดไฮยาลูโรนิคใน 2 ส่วนคือ กรดไฮยาลูโรนิคที่มวลโมเลกุลสูง (10×10^6)เกาะติดกับเซลล์ และ กรดไฮยาลูโรนิคที่ละลายน้ำที่มีมวลโมเลกุลปานกลางคือ 2×10^6 ดังนั้น ทวีน 80 อาจมีผลทำให้กรดไฮยาลูโรนิคที่เกาะติดกับเซลล์ละลายลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อได้มากขึ้น

จากการทดลอง จะเห็นว่า ทวีน 80 ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากการเจริญ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ไม่ค่อยมีผลต่อการเพิ่มการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคเท่าใดนัก ทั้งนี้อาจเนื่องจากปริมาณทวีน 80 ที่เติมลงในอาหารหมักอาจไม่เหมาะสมที่จะทำให้กรดไฮยาลูโรนิคบางส่วนที่เกาะติดกับเซลล์ละลายสู่อาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เพราะความเข้มข้นที่เหมาะสมของดีเทอร์เจนท์ ณ จุดหนึ่งหรือที่เรียกว่า critial micelle concentration (CMC) ที่ทำให้ดีเทอร์เจนท์อยู่ในรูปไมเซลล์ (micelle) โดยหันส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic regions) ออกสู่ภายนอก และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic regions) หันออกจากน้ำอยู่ภายในส่วนไมเซลล์ ซึ่งจะส่งผลให้กรดไฮยาลูโรนิคที่เกาะติดกับเซลล์หลุดออกจากเซลล์เพิ่มขึ้นโดยการจับของส่วนที่ชอบน้ำของไมเซลล์เพื่อให้กรดไฮยาลูโรนิคที่เกาะติดกับเซลล์บางส่วนละลายสู่อาหารเลี้ยงเชื้อได้มากขึ้น นอกจากนี้กรดไฮยาลูโรนิคที่เกาะติดกับเซลล์อาจถูกย่อยสลายด้วยไฮยาลูโรนิเดสบนเมมเบรน(membrane-bound hyaluronidase) (Sutherland, 1990) ก่อนที่จะเติมทวีน 80 ดังนั้นระยะเวลาการเติมก็อาจเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่จะทำให้การเติมทวีน 80 มีผลให้การเพิ่มการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

งานวิจัยนี้ ศึกษาการกลายพันธุ์ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต และ สาร NTG คัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการกลายพันธุ์ และคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้สูงขึ้น คือ สายพันธุ์ CUN5-10 ซึ่งสามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้ 585.85 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้เพิ่มเป็น 3.25 เท่าของสายพันธุ์ตั้งต้นและมีความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ในการทดสอบจำนวน 5 รุ่น เมื่อนำมาหาภาวะการผลิตที่เหมาะสม พบว่า อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น 7.5 ปริมาณน้ำตาลซูโครส 10 กรัม

ต่อลิตร อัตราเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที สามารถเพิ่มการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้เป็น 829.11 มิลลิกรัมต่อลิตร และยังพบว่า หากมีการเติมไลโซไซม์ จะทำให้ผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้สูงขึ้นทั้งในสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ดั้งต้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย