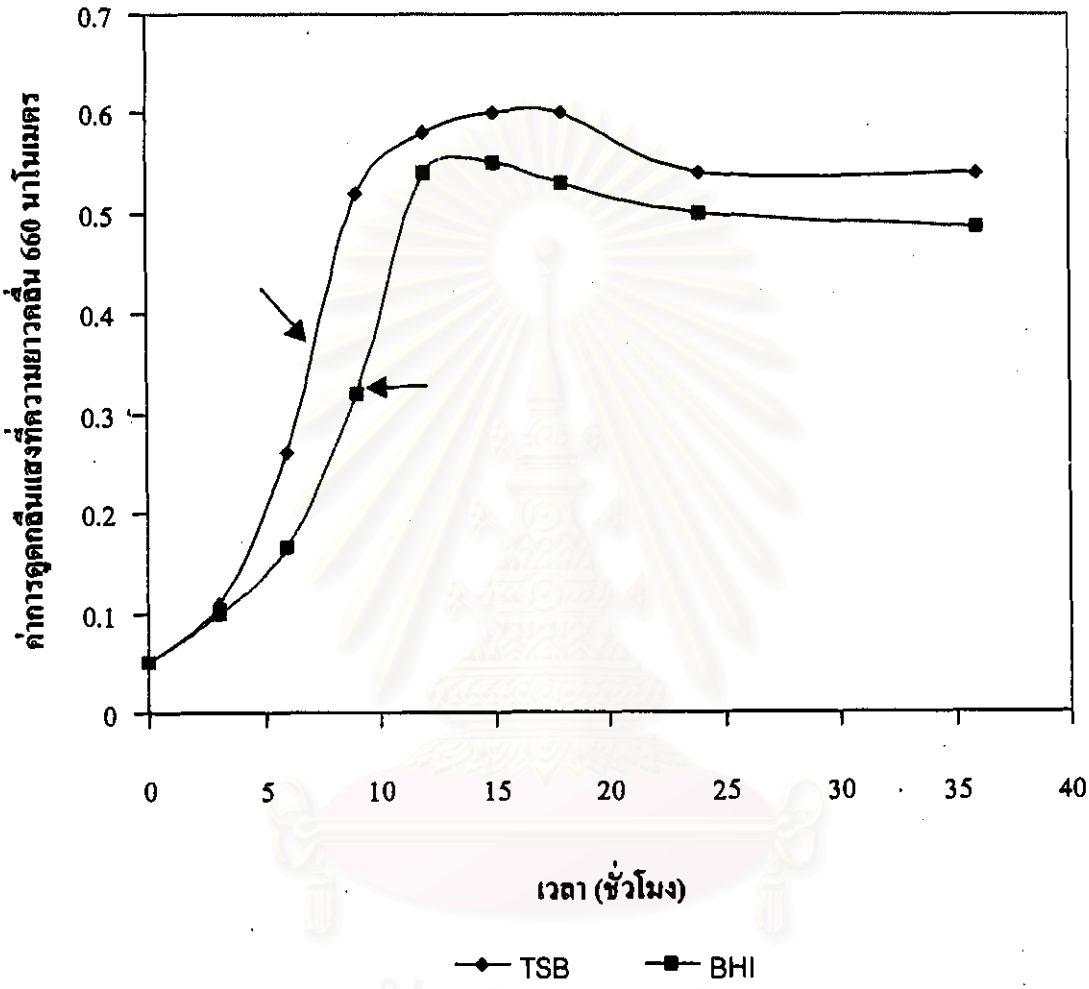
บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเจริญเพื่อเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Brain Heart Infusion (BHI) และ Tryptic Soy Broth (TSB)

เลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อการเจริญ 2 ชนิด คือ BHI และ TSB (ภาคผนวก ก ข้อ 1) ในระดับขวดเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0 ไม่มีการเขย่า วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรที่ระยะเวลาต่างๆ ได้ผลดังรูปที่ 16 พบว่า การเจริญของ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB ให้การเจริญของ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 สูงกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI โดยการเจริญสูงสุดทั้งใน TSB และ BHI ในชั่วโมงที่ 15 และระยะเวลาคึ่งกลางทวีคูณ (mid log phase)ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB อยู่ที่ชั่วโมงที่ 7 และในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI อยู่ที่ชั่วโมงที่ 9

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 16 รูปแบบการเจริญของ *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI และ TSB สำหรับเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ ไม่มีการเขย่า

(ลูกศร ⟶ : แสดงเวลากึ่งกลางทวีคูณของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ)

3.2 การเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคโดย *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อการผลิตโดยเปรียบเทียบระหว่างเชื้อตั้งต้นที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB และ BHI

เลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อการเจริญ 2 ชนิดคือ BHI และ TSB ในภาวะที่ไม่มีการเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเชื้อเจริญถึงช่วงกึ่งกลางทวีคูณ (mid log phase) ปีเปตต์เชื้อตั้งต้นปริมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรปรับปรุงจาก Nimrod (1986) (ภาคผนวก ก ข้อ 2) โดยมีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.8 ตามรายงานของ อุรารัก ศรีวงษ์ (2540) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) พร้อมให้อากาศโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พบว่าการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของเชื้อตั้งต้นที่เจริญใน BHI และ TSB ให้การเจริญและปริมาณกรดไม่แตกต่างกันนักโดยให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 เป็น 192.21 และ 189.16 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

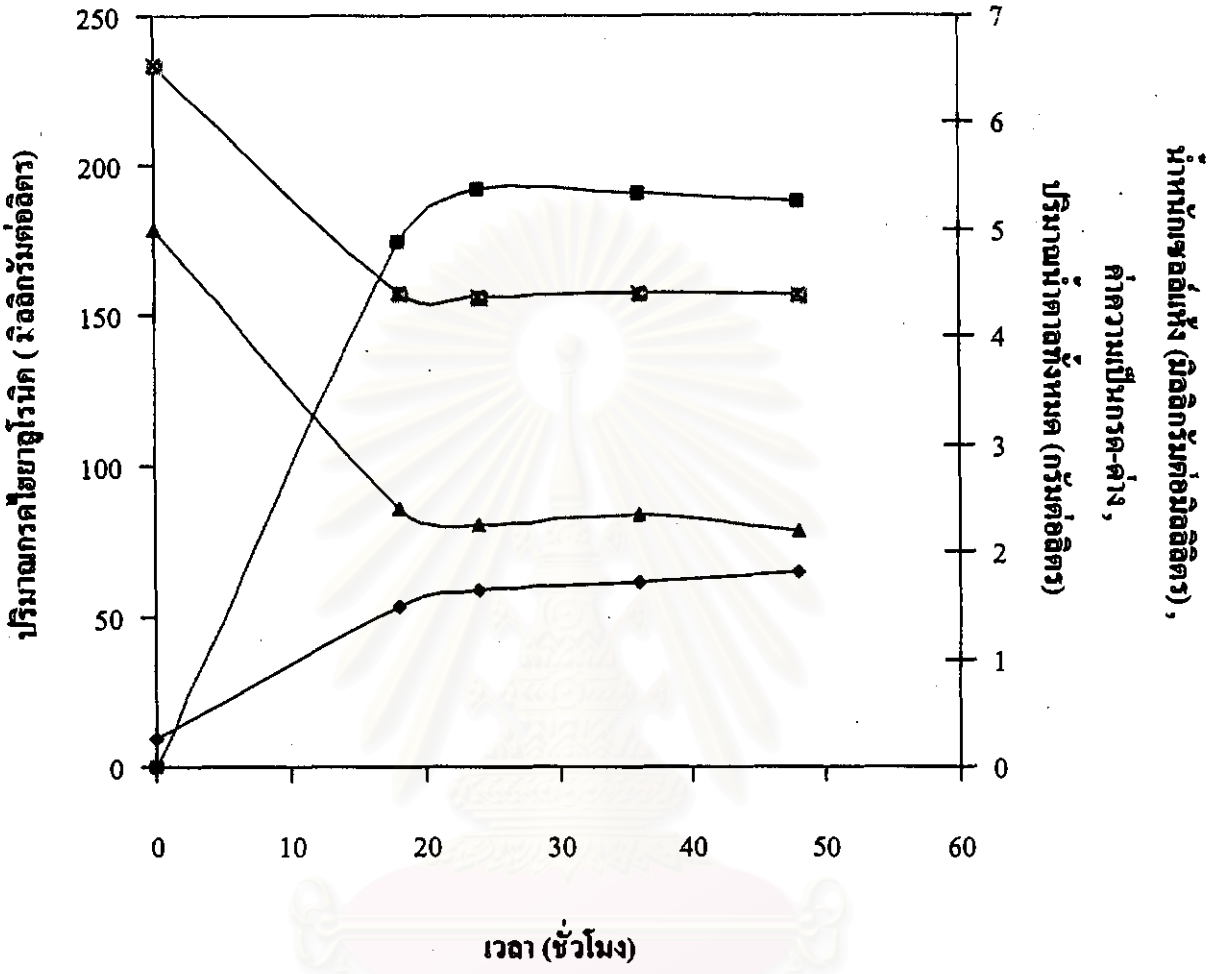
ดังนั้นจึงเลือกใช้อาหารเหลว TSB ในการเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น เนื่องจากให้อัตราการเจริญของ *S.zooepidemicus* ATCC 35246 สูงกว่าในอาหารเหลว BHI และ อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ยังเป็นอาหารที่มีราคาถูกกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI อีกด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

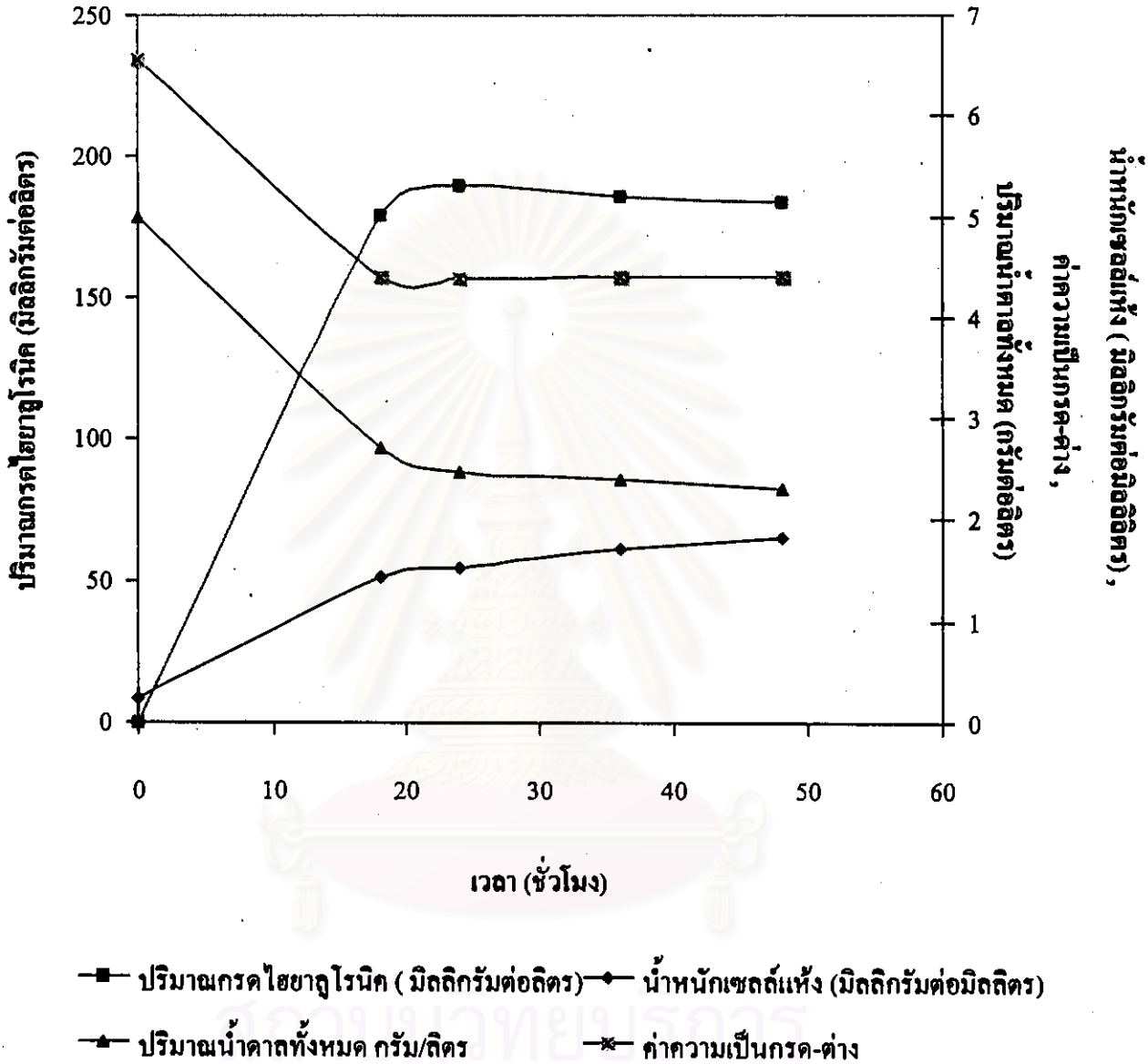
ตารางที่ 3 การเจริญ ,กรดไฮยาลูโรนิคที่ปลดปล่อยออกในอาหารเลี้ยงเชื้อ , ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และ ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อการผลิตโดยใช้เชื้อตั้งต้น *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ที่เจริญใน BHI และ TSB , ที่อุณหภูมิห้อง , อัตราเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที

เวลา	หัวเชื้อที่เจริญในอาหารเหลว BHI			
	น้ำหนักเซลล์แห้ง (มก./มล.)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิค มิลลิกรัม/ลิตร	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด กรัม/ลิตร	pH
0	0.267	0	5.00	6.55
18	1.487	174.38	2.40	4.40
24	1.633	192.21	2.26	4.37
36	1.720	190.62	2.35	4.40
48	1.813	187.81	2.20	4.38

เวลา	หัวเชื้อที่เจริญในอาหารเหลว TSB			
	น้ำหนักเซลล์แห้ง (มก./มล.)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิค มิลลิกรัม/ลิตร	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด กรัม/ลิตร	pH
0	0.243	0	5.00	6.55
18	1.441	178.82	2.70	4.41
24	1.538	189.16	2.46	4.38
36	1.711	185.20	2.40	4.40
48	1.815	183.51	2.30	4.41



รูปที่ 17 การเจริญ , การผลิตกรดไฮยาลูโรนิค , ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อการผลิตโดยใช้เชื้อตั้งต้น *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ที่เจริญใน BHI , ที่อุณหภูมิห้อง , อัตราเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที

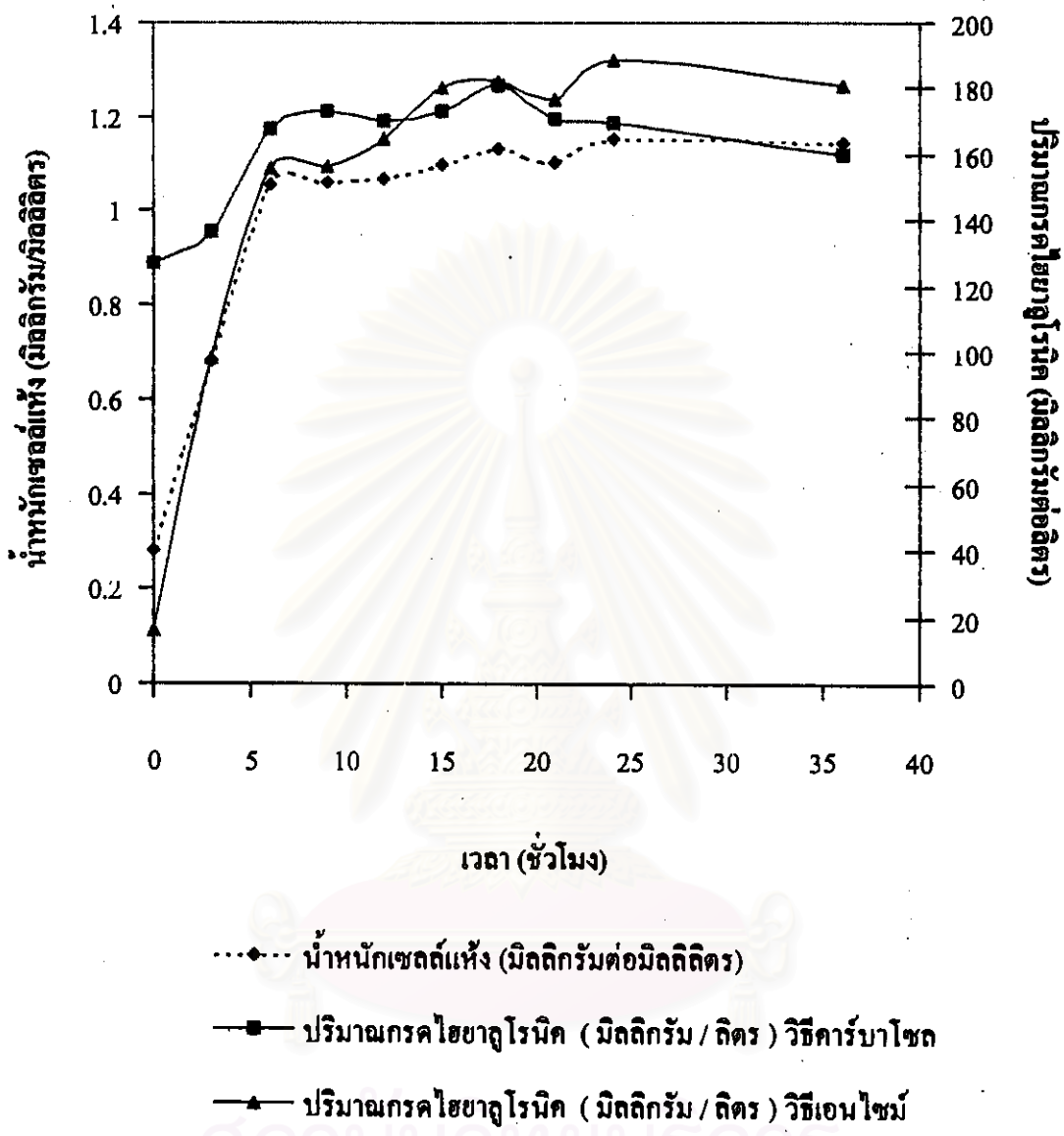


รูปที่ 18 การเจริญ , การผลิตกรดไฮยาลูโรนิค , ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อการผลิตโดยใช้เชื้อตั้งต้น *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ที่เจริญใน TSB , ที่อุณหภูมิห้อง , อัตราเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที

3.3 การเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคโดย *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตที่ระยะเวลาต่างๆและเปรียบเทียบประสิทธิภาพการวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกระหว่างวิธีคาร์บาโซลและวิธีเอนไซม์

เลี้ยงเชื้อตั้งต้น *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเหลว TSB (ภาคผนวก ก ข้อ 1.2) เป็นเวลา 7 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตสูตรปรับปรุงจาก Nimrod (1986) (ภาคผนวก ก ข้อ 2) ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.8 ที่อุณหภูมิห้อง อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ซึ่งเป็นภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคที่รายงานโดยจุรารัก ศรีวงษ์ (2540) โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) วิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคด้วยวิธีคาร์บาโซลและวิธีเอนไซม์ตามวิธีข้อ 2.5.3 และ 2.5.4 ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 19 พบว่า ในช่วงเริ่มต้นของการผลิต ซึ่งปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคที่ผลิตได้ค่อนข้างต่ำ การวิเคราะห์โดยวิธีคาร์บาโซลและวิธีเอนไซม์ไม่ค่อยสัมพันธ์กัน แต่เมื่อเชื้อผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้ปริมาณระดับหนึ่งแล้ว การวิเคราะห์ทั้ง 2 วิธีค่อนข้างไปในทิศทางเดียวกัน และเมื่อพิจารณาปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคที่ผลิตได้โดยวิธีเอนไซม์พบว่า เชื้อสามารถผลิตกรดได้ในปริมาณสูงสุดเท่ากับ 188.85 มิลลิกรัมต่อลิตรที่ 24 ชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบกับที่เวลาการผลิตที่ชั่วโมงที่ 18 แล้วพบว่าให้ปริมาณการผลิตไม่แตกต่างจากที่ชั่วโมงที่ 24 คือ 181.95 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงเลือกเวลาการผลิตที่ชั่วโมงที่ 18 ในการทดลองเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์กลาย เพื่อลดระยะเวลาให้การคัดเลือกสายพันธุ์กลาย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 19 รูปแบบการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคโดย *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตที่อุณหภูมิห้อง ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.8 อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที

3.4 เปรียบเทียบการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคโดย *S.zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตในระดับขวดเขย่าและในระดับหลอดเขย่า

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

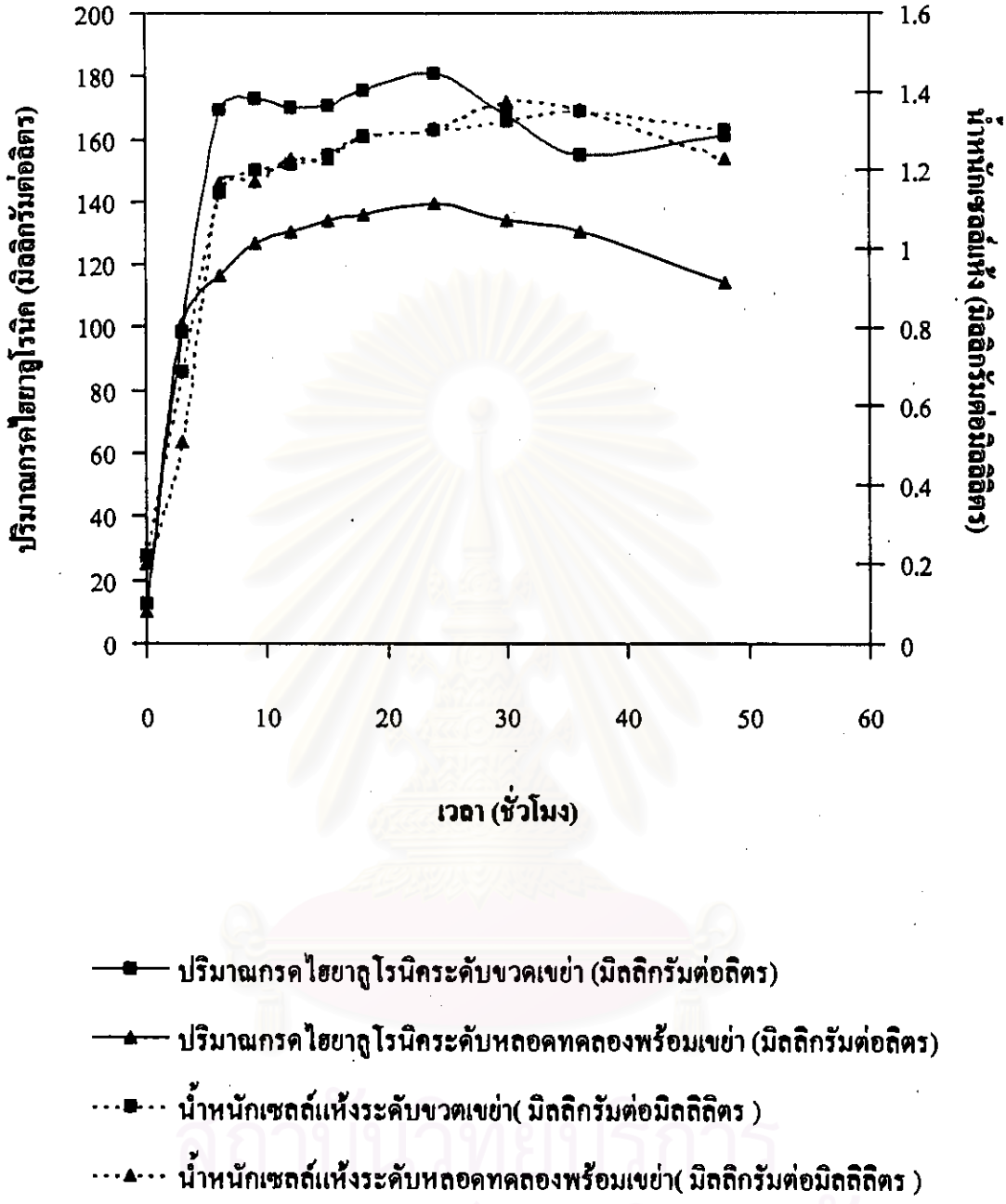
ดังนั้น จึงเลือกใช้การคัดเลือกในระดับหลอดเขย่าในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายเพื่อเป็นการลดต้นทุนในการศึกษาทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 การเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคโดย *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อการผลิตในระดับขวดเขย่าและในระดับหลอดทดลองพร้อมเขย่า อัตราเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง วิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคด้วยวิธีเอนไซม์

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 20 การเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคโดย *S.zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อการผลิตในระดับขวดเขย่าและระดับหลอดทดลองพร้อมเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง ,ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.8 ,อัตราเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที วิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคด้วยวิธีเอนไซม์

3.5 <u>เปรียบเทียบการหาปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคโดยวิธีคาร์บาโซลภายหลังการตกตะกอนด้วย 95 เปอร์เซ็นต์ เอธานอล และ 1 เปอร์เซ็นต์ CPC</u>

เนื่องจากในการวิเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิคจากน้ำหมักเพื่อการคัดเลือกสายพันธุ์กลายซึ่งมีจำนวนมาก การใช้วิธีเอนไซม์ในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮยาลูโรนิค ต้องใช้รีเอเจนต์จำนวนมากและมีราคาแพง เพื่อเป็นการประหยัดจึงทำการทดสอบหาปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคโดยวิธีของ Bitter และ Muir (1962) ซึ่งใช้ปฏิกิริยาการวิเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิคด้วยคาร์บาโซล

อย่างไรก็ตามเนื่องจากน้ำหมักที่ได้มีการรบกวนจากสีของปฏิกิริยานี้ ทำให้ไม่สามารถนำมาเป็นตัวอย่างในการวิเคราะห์ได้โดยตรงจึงต้องทำบริสุทธิ์กรดไฮยาลูโรนิคในระดับหนึ่งด้วยวิธีตกตะกอนด้วย 95 เปอร์เซ็นต์ เอธานอล (Kim *et al.* , 1996) อัตราส่วน95 เปอร์เซ็นต์ เอธานอล : น้ำหมัก เป็น 2 :1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เปรียบเทียบกับการตกตะกอนด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ ซีทิวไพริดีเนียมคลอไรด์ (CPC) (ดัดแปลงจาก Holmstrom และ Ricica , 1967) ในอัตราส่วน 1 เปอร์เซ็นต์ CPC : น้ำหมัก เป็น 1 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ให้ผลดังตารางที่ 5

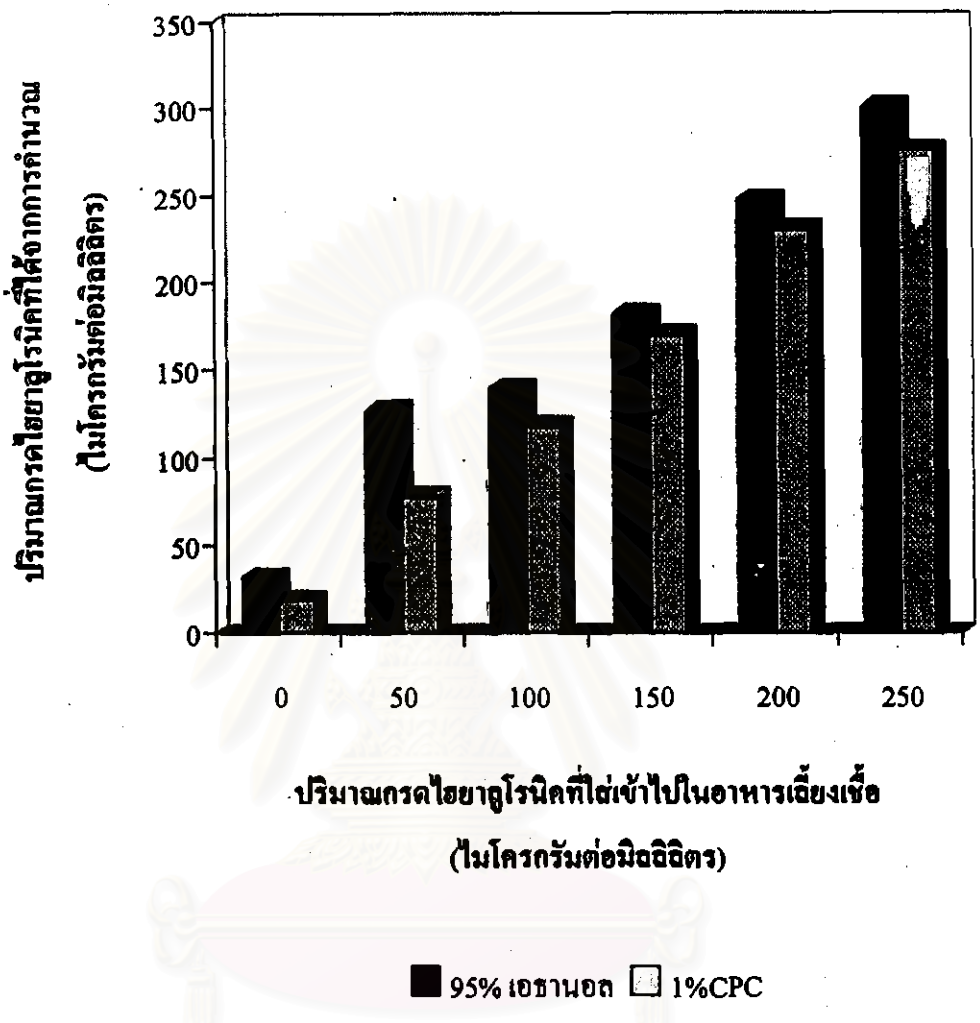
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคที่ตกตะกอนด้วย95% เอธานอล และ 1% CPC โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีคาร์บาโซล

ความเข้มข้นของHA บริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณ HA หลังตกตะกอนด้วย 95 % เอธานอล (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณ HA หลังตกตะกอนด้วย 1 % CPC (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
0	32.23	19.04
50	127.33	77.60
100	139.73	117.98
150	181.88	169.81
200	247.15	230.00
250	300.94	275.96

จากผลการทดลองพบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตที่ไม่มีการเติมกรดไฮยาลูโรนิคเมื่อตรวจหาโดยวิธีนี้ได้ค่าบวกเทียมเกิดขึ้นซึ่งอาจถือได้ว่าเป็นค่า background ดังนั้นในการปรับค่าที่แท้จริงจากค่าที่วัดได้จึงนำปริมาณกรดที่ได้จาก 2 วิธีนั้น หักค่ากรดยูโรนิค background แล้วจึงเปรียบเทียบประสิทธิภาพพบว่าการตกตะกอนด้วย 1%CPC ให้ค่าที่ใกล้เคียงกว่าวิธีการตกตะกอนด้วย 95%เอธานอลแต่อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่าง 2 วิธี ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธีการตกตะกอนด้วย 95% เอธานอลเพื่อลดต้นทุนในการทดลอง (รูปที่ 21)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 21 ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วจึงตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิคด้วย 95% เอธานอล และ 1% CPC โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีคาร์บาโซล

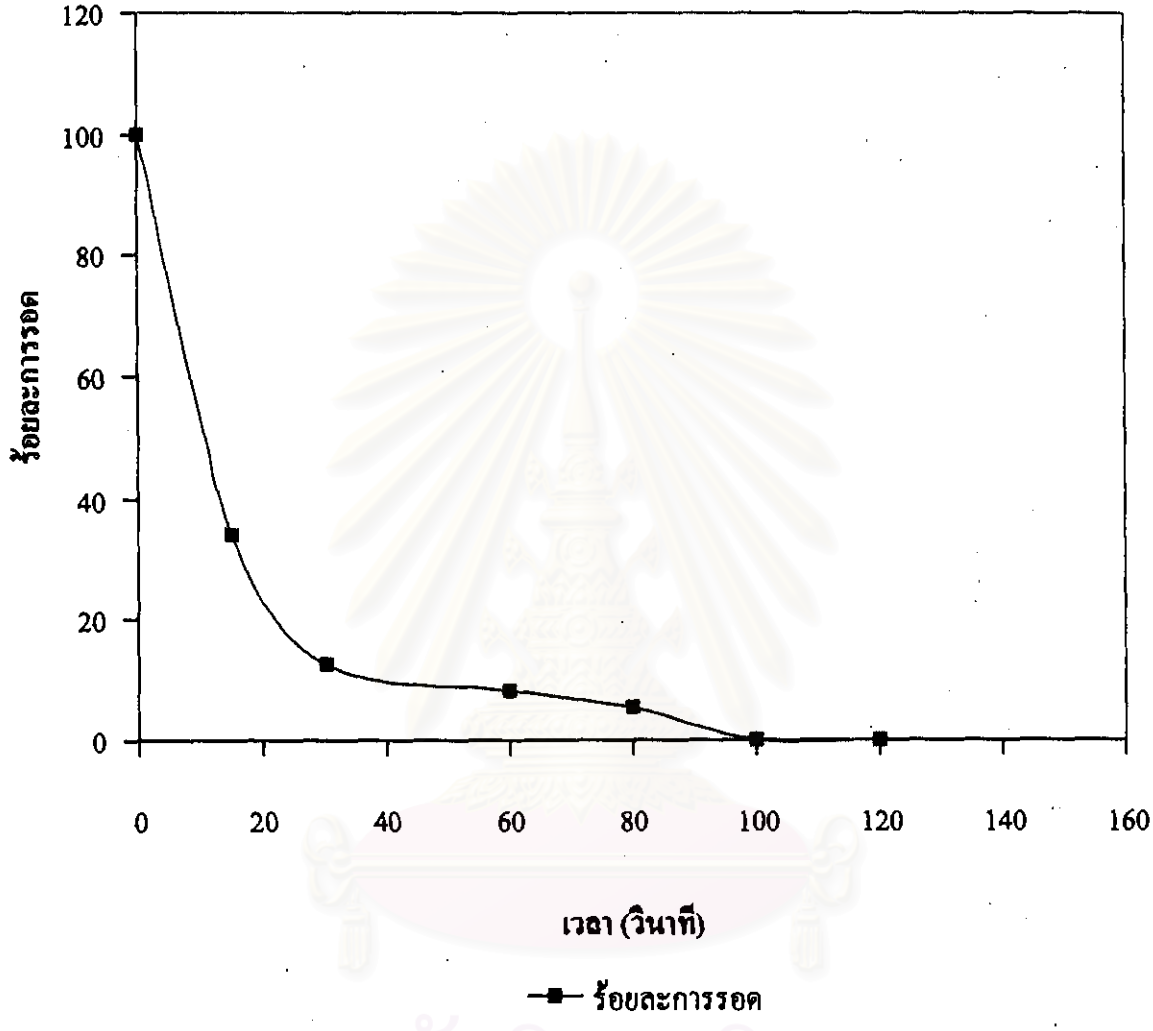
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

ทำการชักนำการกลายพันธุ์ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยใช้หัวเชื้อตั้งต้นอายุ 7 ชั่วโมง ซึ่งอยู่ในช่วงกึ่งกลางการเจริญทวีคูณ (mid log phase) และดำเนินการกลายพันธุ์ตามวิธีในบทที่ 2 ข้อ 3 จากนั้นนำเชื้อที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต มาบ่มเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญ (โคโลนีที่รอด) และคำนวณร้อยละการรอด ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 6 และรูปที่ 22 ทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีขนาดใหญ่ ที่มีลักษณะเมือกมาก ในช่วงที่มีร้อยละการรอด 0.1-5.0 ซึ่งเป็นช่วงที่เกิดการกลายพันธุ์ที่เหมาะสม (Miller , 1972 ; Fantini , 1975 ; Carlton and Brown , 1981) ซึ่งตรงกับผลที่ได้จาก การฉายแสงอัลตราไวโอเลตนาน 80-120 วินาที โดยให้ร้อยละการรอด 5.38-0.07

ตารางที่ 6 จำนวนโคโลนีที่เจริญ(โคโลนีที่รอด) และร้อยละการรอดของ *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 ภายหลังจากการฉายแสงอัลตราไวโอเลต ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ที่เวลาต่างๆ

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



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 22 ร้อยละการรอดของ *S.zooepidemicus* ATCC 35246 ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ที่เวลาต่างๆ

3.6.1 <u>การคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ของ *S.zooepidemicus* ATCC 35246 ที่สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้สูง</u>

การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคเพิ่มขึ้นในขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิ

เมื่อนำเชื้อที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตในช่วงเวลา 80-120 วินาที มาทำการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิโดยการดูลักษณะโคโลนีที่มีขนาดใหญ่ และมีเมือกมาก หลังจากบ่มเป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง ได้เชื้อที่ผ่านการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิทั้งหมด 244 โคโลนี สุ่มเลือกโคโลนี จำนวน 60 โคโลนี มาคัดเลือกในขั้นทุติยภูมิต่อไป โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (ภาคผนวก ก ข้อ 2) ได้เชื้อสายพันธุ์กลาย 3 สายพันธุ์ที่มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในอาหารเหลวเพื่อการผลิตของสายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* ATCC 35246 กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 1 รอบ

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

3.6.2 <u>การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์กลาย</u>

เมื่อนำสายพันธุ์กลายทั้ง 3 ที่ผ่านการทดสอบขั้นทุติยภูมิ ตามการทดลองในข้อ 4.2 มาเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อการผลิตอีกครั้ง หลังจากมีการถ่ายเชื้อไป 5 ครั้ง โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดสอบขั้นทุติยภูมิ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคที่ผลิตได้แสดงไว้ในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์ กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 1 รอบ

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

* หมายถึง ค่าที่ได้จากปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในขั้นต้น

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

ดังนั้น จึงเลือกสายพันธุ์ AU 21 ไปทำการกลายพันธุ์ต่อไป เพื่อให้ได้สายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้มากขึ้น

3.7 <u>การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต รอบที่ 2</u>

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

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

การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคเพิ่มขึ้นในขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิ

หลังการฉายแสงอัลตราไวโอเลตต่อเชื้อ *S.zooepidemicus* สายพันธุ์ AU21 ที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตรอบแรก เป็นเวลา 60-120 วินาที ก็ทำการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิโดยการดูลักษณะโคโลนีที่มีขนาดใหญ่ และมีเมือกมาก หลังจากบ่มเป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง ได้เชื้อที่ผ่านการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิทั้งหมด 470 โคโลนี โดยยึดหลักตามลักษณะโคโลนีที่มีขนาดใหญ่และมีเมือกมากและสุ่มเลือกโคโลนีมา 60 โคโลนี เพื่อคัดเลือกในขั้นทุติยภูมิ ซึ่งทำโดยการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (ภาคผนวก ก) ได้เชื้อสายพันธุ์กลาย 11 สายพันธุ์ที่มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคมากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในอาหารเหลวเพื่อการผลิตของสายพันธุ์ตั้งต้น *S.zooepidemicus* AU 21 กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 2 รอบ

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

หมายเหตุ : สายพันธุ์ตั้งต้น คือสายพันธุ์ AU 21

3.7.2 การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์กลาย

เมื่อนำสายพันธุ์กลายทั้ง 4 ที่ผ่านการทดสอบขั้นทุติยภูมิ ตามการทดลองในข้อ 4.2 มาเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อตรวจการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค หลังการถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งต้น แสดงดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์ กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 2 รอบ

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

* หมายถึง ค่าที่ได้จากปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในขั้นต้น

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

ดังนั้น จึงเลือกสายพันธุ์ BU42 ไปทำการกลายพันธุ์ต่อไป เพื่อให้ได้สายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้มากขึ้น

3.8 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต รอบที่ 3

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

3.8.1 การคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ของ *S.zooepidemicus* BU42 ที่สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้สูงหลังการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตรอบที่ 3

การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคเพิ่มขึ้นในขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิ

หลังการกลายพันธุ์สายพันธุ์ BU42ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตมาสองครั้ง เพิ่มด้วยแสงอัลตราไวโอเลตครั้งที่สามเป็นเวลา 15-120 วินาที ก็ทำการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิซึ่งคัดเลือกเชื้อได้ทั้งสิ้น 187 ไคโลนี และสุ่มเอา 60 ไคโลนีมาทำการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิต่อไปตามวิธี หลังการคัดเลือกปรากฏสายพันธุ์กลาย 4 สายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิคสูง ดังตารางที่11

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในอาหารเหลวเพื่อการผลิตของสายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* BU42 กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบ

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

หมายเหตุ : สายพันธุ์ตั้งต้น คือสายพันธุ์ BU42

3.8.2 การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์กลาย

นำสายพันธุ์กลายทั้ง 4 สายพันธุ์มาทดสอบความเสถียร ทำการทดลองตามวิธีการในบทที่2 ข้อ 4.2 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวเพื่อวิเคราะห์การผลิตกรดไฮยาลูโรนิคเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น ตารางที่ 12

ตารางที่ 12 การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบ

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

* หมายถึง ค่าที่ได้จากปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในขั้นต้น

พบว่า *S.zooepidemicus* สายพันธุ์กลายที่ได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคลดน้อยลงทั้ง 4 สายพันธุ์ เมื่อเทียบกับผลผลิตตอนแรกในตารางที่ 11 สายพันธุ์กลายทั้ง 4 สายพันธุ์ หลังจากถ่ายเชื้อจำนวน 5 ครั้งแล้ว มีสายพันธุ์ CU 47 และ CU 69 ที่ยังสามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น BU42 คิดเป็นร้อยละ 9.13 และ 5.42 ขณะที่ CU75 และ CU 86 หลังจากถ่ายเชื้อจำนวน 5 ครั้งแล้วพบว่าสามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคต่ำกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นBU42

และเมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคก่อนการถ่ายเชื้อจำนวน 5 ครั้งของสายพันธุ์กลายทั้ง 4 พบว่า ผลิตกรดไฮยาลูโรนิคลดลงจากก่อนการถ่ายเชื้อ คิดเป็นร้อยละ 20.84 , 17.69 , 29.78 และ 14.34 ตามลำดับของสายพันธุ์ CU 47 , CU 69 , CU 75 และ CU86 ตามลำดับ

ดังนั้นจึงนำ CU47 ไปทำการกลายพันธุ์ต่อไป เพื่อให้ได้สายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้มากขึ้น

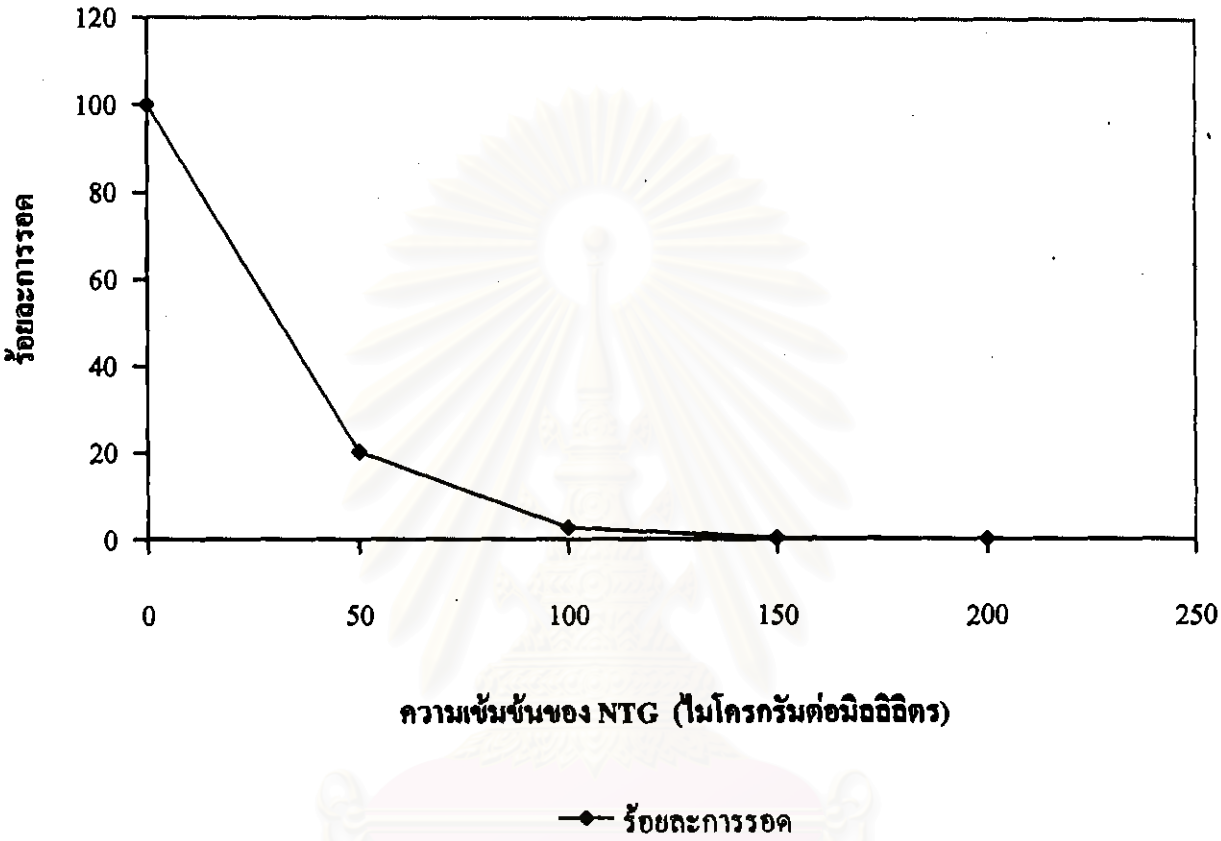
3.9 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NTG ในการกลายพันธุ์ *S.zooepidemicus* CU 47

สืบเนื่องจากผลที่พบว่าการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตในทั้งสามรอบที่ผ่านมา สายพันธุ์กลายให้ผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิคในปริมาณที่ไม่คงที่ ซึ่งมักพบในการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต การทดลองต่อไปจึงทำการกลายพันธุ์เชื้อที่คัดเลือกโดยใช้สาร NTG แล้วคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ให้ผลผลิตกรดสูงซึ่งทำโดย นำเชื้อ *S. zooepidemicus* CU47 ที่ผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้สูงสุด คือ 292.99 มิลลิกรัมต่อลิตร มากลายพันธุ์ต่อด้วยสารเคมี NTG โดยแปรผันความเข้มข้นตั้งแต่ 50 - 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในทริส มาลิอิก บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากการกลายพันธุ์ นำเชื้อบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญ (โคโลนีที่รอด) และคำนวณร้อยละการรอดได้ผลดังตารางที่ 13 และรูปที่ 23

ตารางที่ 13 จำนวนโคโลนีที่เจริญ (โคโลนีที่รอด) และร้อยละการรอดของ *S.zooepidemicus* CU 47 ภายหลังการกลายพันธุ์ด้วย NTG 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

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

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



รูปที่ 23 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการรอดของเชื้อ *S.zooepidemicus* CU47 หลังการบ่มร่วมกับสาร NTG ที่ความเข้มข้นระหว่าง 50 - 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

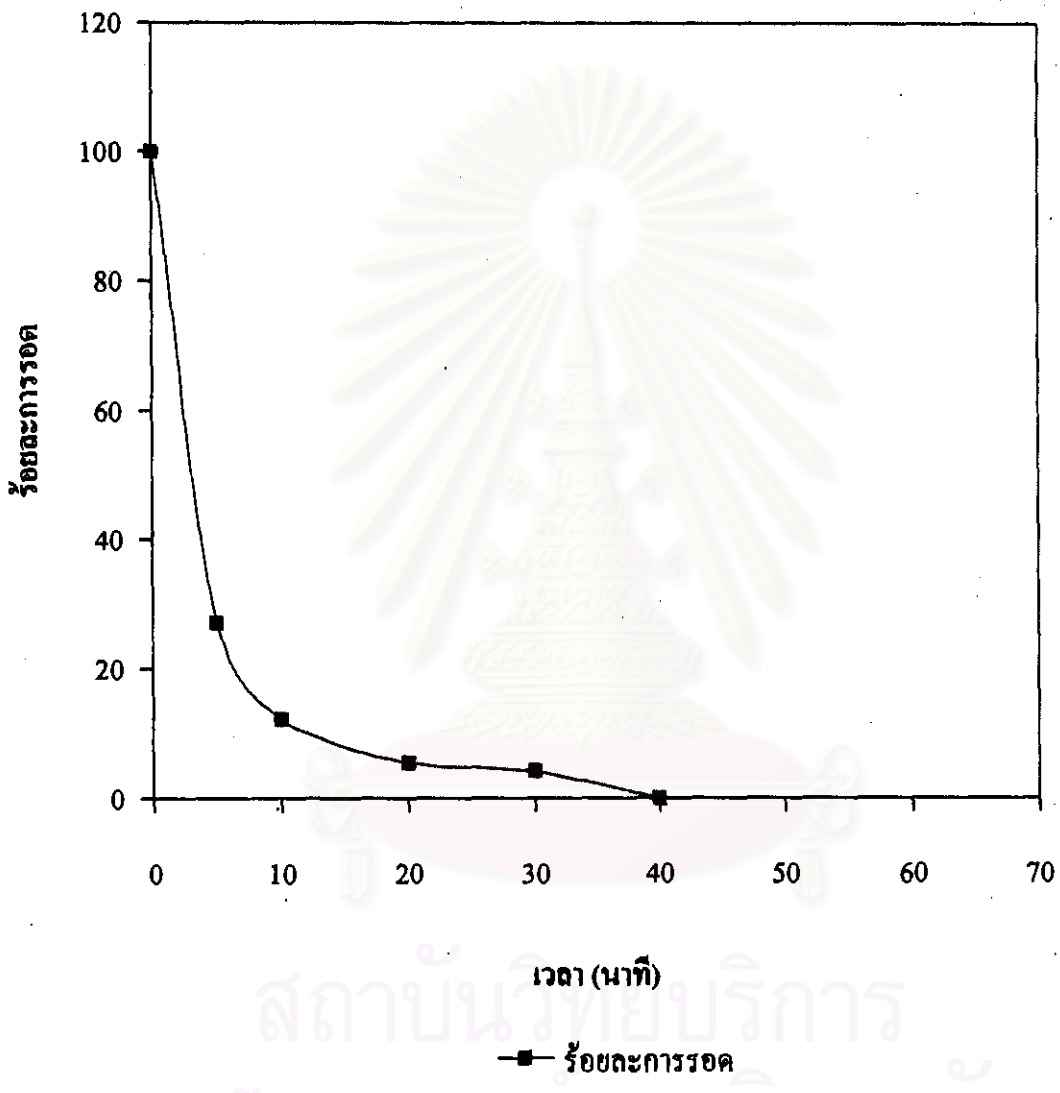
3.10 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการกลายพันธุ์ *S. zooepidemicus* CU 47 ด้วย NTG รอบที่ 1

ในการคัดเลือกภาวะการกลายพันธุ์ *S. zooepidemicus* CU 47 ด้วย NTG เพื่อให้อัตราการรอดชีวิตอยู่ในช่วงระหว่าง 0 - 50 เปอร์เซ็นต์นั้น พบว่าหากใช้ NTG คงที่ที่ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วบ่มเชื้อในช่วง 5 - 40 นาที ที่ 37 องศาเซลเซียส จะให้อัตราการรอดของเชื้ออยู่ในช่วง 27.05-0.025 ซึ่งอยู่ในขอบเขตที่ต้องการ ดังผลที่แสดงในตารางที่ 14 และรูปที่ 24

ตารางที่ 14 จำนวนโคโลนีที่เจริญ(โคโลนีที่รอด) และร้อยละการรอดของ *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 ภายหลังการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลาต่างๆ

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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 24 ร้อยละการรอดของ *Streptococcus zooepidemicus* CU 47 ที่กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลาต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.10.1 <u>การคัดเลือกเชื้อที่สร้างกรดไฮยาลูโรนิคหลังการกลายพันธุ์ *S.zooepidemicus* CU47 ด้วย NTG</u>

การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคเพิ่มขึ้นในขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิ

หลังการกลายพันธุ์ด้วยสาร NTG ต่อ *S. zooepidemicus* สายพันธุ์ CU47 ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบ หลังจากคัดเลือกขั้นปฐมภูมิโดยการดูลักษณะโคโลนีที่มีขนาดใหญ่ และมีเมือกมาก หลังจากบ่มเป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง ได้เชื้อที่ผ่านการคัดเลือกดังกล่าวทั้งหมด 120 โคโลนี จากนั้นคัดเลือกต่อในขั้นทุติยภูมิ โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (ภาคผนวก ก ข้อ 2) ได้เชื้อสายพันธุ์กลาย มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคมากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นCU47 ดังแสดงในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในอาหารเหลวเพื่อการผลิตของสายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* CU 47 กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบ และชักนำด้วย NTG 1 รอบ

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

หมายเหตุ : สายพันธุ์ตั้งต้นคือ สายพันธุ์ CU 47

3.10.2 <u>การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์กลาย</u>

นำสายพันธุ์กลายทั้ง 4 ที่ผ่านการทดสอบขั้นทุติยภูมิ ตามการทดลองในข้อ 4.2 มาเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อการผลิตอีกครั้ง หลังจากมีการถ่ายเชื้อไป 5 ครั้ง โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดสอบขั้นทุติยภูมิ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น วัดปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคที่ผลิตได้ ดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ได้หลังการชักนำโดย NTG

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

* หมายถึง ค่าที่ได้จากปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในขั้นต้น , + หมายถึง เพิ่มขึ้น , - หมายถึง ลดลง

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

ดังนั้น จึงเลือกสายพันธุ์ CUN20 ไปทำการกลายพันธุ์ต่อด้วย NTG โดยใช้ภาวะการกลายพันธุ์ เช่นเดียวกันกับการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ในรอบแรก เพื่อกระตุ้นความสามารถในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคเพิ่มมากขึ้น

3.11 <u>การคัดเลือกเชื้อที่สร้างกรดไฮยาลูโรนิคหลังการกลายพันธุ์ *S. zooepidemicus* CUN 20 ด้วย NTGรอบที่ 2</u>

การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคเพิ่มขึ้นในขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิ

เมื่อนำเชื้อที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG รอบที่ 2 มาทำการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิและขั้นทุติยภูมิเช่นเดียวกันกับการทดลองที่ผ่านมาโดยคัดเลือกจากเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ 65 โคโลนี และหลังจากการผ่านการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิแล้วโดยได้เชื้อสายพันธุ์กลายที่ผลิตกรดไฮยาลูโรนิคมากกว่าสายพันธุ์ดั้งต้น CUN 20 ดังแสดงในตารางที่ 17

ตารางที่ 17 เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในอาหารเหลวเพื่อการผลิตของสายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* CUN 20 กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบ และ ชักนำด้วย NTG 2 รอบ

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

หมายเหตุ : สายพันธุ์ตั้งต้น คือ สายพันธุ์ CUN 20

3.11.1 <u>การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์กลาย</u>

เมื่อนำสายพันธุ์กลายทั้ง 4 สายพันธุ์ มาเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อการผลิต หลังจากมีการถ่ายเชื้อไป 5 ครั้งเพื่อทดสอบความเสถียร โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดสอบขั้นทุติยภูมิ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น วัดปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคที่ผลิตได้ดังตารางที่ 18

ตารางที่ 18 การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์กลายต่าง ๆ ที่ได้หลังการชักนำโดย NTG 2 รอบ

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

* หมายถึง ค่าที่ได้จากปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในขั้นต้น , + หมายถึง เพิ่มขึ้น , - หมายถึง ลดลง

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

ดังนั้นจึงนำสายพันธุ์กลาย CUN 2-10 กลายพันธุ์ต่ออีกครั้งด้วย NTG โดยใช้ภาวะเดียวกันกับการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมีในรอบแรก เพื่อกระตุ้นความสามารถในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคเพิ่มมากขึ้น

3.12 การคัดเลือกเชื้อที่สร้างกรดไฮยาลูโรนิคหลังการกลายพันธุ์ *S.zooepidemicus* CUN 2-1 ด้วย NTGรอบที่ 3

การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคเพิ่มขึ้นในขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิ

ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับการกลายพันธุ์ด้วยสาร NTG ดังที่ผ่านมา จากโคโลนีที่ผ่านการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ 45 โคโลนี และเมื่อผ่านการคัดเลือกในขั้นทุติยภูมิได้สายพันธุ์กลายที่ผลิตกรดไฮยาลูโรนิคสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น CUN 2-1 ดังแสดงในตารางที่ 19

ตารางที่ 19 เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในอาหารเหลวเพื่อการผลิตของสายพันธุ์ตั้งต้น *S.zooepidemicus* CUN2-1 กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบและชักนำด้วย NTG 3 รอบ

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

หมายเหตุ : สายพันธุ์ตั้งต้น คือ สายพันธุ์ CUN 2-1

3.12.1 การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์กลาย

ทดสอบหาปริมาณการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคด้วยวิธีคาร์บาโซลจากเชื้อสายพันธุ์กลาย CUN 3-5 และ CUN 3-13 หลังการทดสอบความเสถียรโดยการเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อการผลิตหลังการถ่ายเชื้อไป 5 ครั้ง แสดงผลดังตารางที่ 20

ตารางที่ 20 การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์กลายต่าง ๆ หลังการชักนำด้วย NTG 3 รอบ

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

* หมายถึง ค่าที่ได้จากปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในขั้นต้น , + หมายถึง เพิ่มขึ้น , - หมายถึง ลดลง

จากผลการทดลองสายพันธุ์กลาย CUN 3-5 สามารถสร้างกรดไฮยาลูโรนิคภายหลังจากมีการถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง ได้เพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์ตั้งต้น CUN 2-1 เพียงเล็กน้อย คือ 314.62 มิลลิกรัมต่อลิตร

ดังนั้นจึงนำสายพันธุ์กลาย CUN 3-5 มากลายพันธุ์ซ้ำด้วยสาร NTG อีกครั้ง เพื่อกระตุ้นความสามารถในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคให้สูงขึ้น โดยใช้วิธีการและภาวะการกลายพันธุ์เช่นเดียวกับการทดลองที่ผ่านมา

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

การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคเพิ่มขึ้นในขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิ

จากเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ 180 โคโลนี และเมื่อผ่านการคัดเลือกในขั้นทุติยภูมิโดยวิธีการเดียวกับการทดลองที่ผ่านมาได้สายพันธุ์กลายที่สร้างกรดไฮยาลูโรนิคเพิ่มขึ้น ดังตารางที่ 21

ตารางที่ 21 เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในอาหารเหลวเพื่อการผลิตของสายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* CUN3-5 กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบและชักนำด้วย NTG 4 รอบ

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

หมายเหตุ สายพันธุ์ตั้งต้น คือ : สายพันธุ์ CUN 3-5

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

เลือกสายพันธุ์กลาย 4 สายพันธุ์ที่ให้การผลิตกรดไฮยาลูโรนิคสูงในการคัดเลือกจาก 180 โคโลนี มาทดสอบขั้นทุติยภูมิเพื่อวิเคราะห์การผลิตกรดของเชื้อสายพันธุ์กลาย หลังจากถ่ายเชื้อไป 5 ครั้ง ให้ผลการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ดังตารางที่ 22

ตารางที่ 22 การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบและชักนำด้วย NTG 4 รอบ

สายพันธุ์	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคก่อนการถ่ายเชื้อ* (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคหลังจากการถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละของกรดไฮยาลูโรนิคเมื่อเทียบกับก่อนการถ่ายเชื้อ
CUN4-7	472.17	465.57	-1.40
CUN4-12	466.04	404.23	-13.26
CUN4-25	438.21	372.17	-15.07
CUN4-10	434.74	402.83	-7.34
CUN3-5	350.94		

* หมายถึง ค่าที่ได้จากปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในขั้นต้น , + หมายถึง เพิ่มขึ้น , - หมายถึง ลดลง

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

ดังนั้นจึงนำ CUN 4-7 ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายที่ให้การผลิตกรดไฮยาลูโรนิคสูงสุดในการทดลองนี้ไปทำการกลายพันธุ์ต่อด้วย NTG อีกครั้งเพื่อเพิ่มความสามารถในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้มากขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.14 การคัดเลือกเชื้อที่สร้างกรดไฮยาลูโรนิคหลังการกลายพันธุ์ *S. zooepidemicus* CUN 4-7 ด้วย NTG รอบที่ 5

การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคเพิ่มขึ้นในขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิ

ในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายหลังการกลายพันธ์ด้วย NTG รอบที่ 5 กับเชื้อสายพันธุ์ CUN 4-7 ได้เชื้อที่ผ่านการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิทั้งหมด 60 ไดโลนี และนำมาทดสอบขั้นทุติยภูมิต่อไปได้สายพันธุ์กลายที่ให้การผลิตกรดไฮยาลูโรนิค สูงมากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น CUN 4-7 ดังแสดงในตารางที่ 23

ตารางที่ 23 เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในอาหารเหลวเพื่อการผลิตของสายพันธุ์ตั้งต้น *S.zooepidemicus* CUN4-7 กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบและชักนำด้วย NTG 5 รอบ

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

หมายเหตุ : สายพันธุ์ตั้งต้น คือ สายพันธุ์ CUN 4-7

3.14.1 การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์กลาย

เมื่อนำสายพันธุ์กลายทั้ง 4 ที่ผ่านการทดสอบขั้นทุติยภูมิ ตามการทดลองในข้อ มาเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อการผลิตอีกครั้ง หลังจากมีการถ่ายเชื้อไป 5 ครั้ง โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดสอบขั้นทุติยภูมิ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น วัดปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคที่ผลิตได้ดังตารางที่ 24

ตารางที่ 24 การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์กลายต่าง ๆ ที่ผ่านการชักนำโดยสาร NTG 5 รอบ

สายพันธุ์	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคก่อนการถ่ายเชื้อ* (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคหลังจากการถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละของกรดไฮยาลูโรนิคเมื่อเทียบกับก่อนการถ่ายเชื้อ
CUN5-10	585.85	567.85	-3.07
CUN5-32	534.91	518.34	-3.10
CUN5-19	519.81	498.30	-4.14
CUN5-15	499.06	502.18	+0.63
CUN4-7	472.53		

* หมายถึง ค่าที่ได้จากปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในขั้นต้น , + หมายถึง เพิ่มขึ้น , - หมายถึง ลดลง

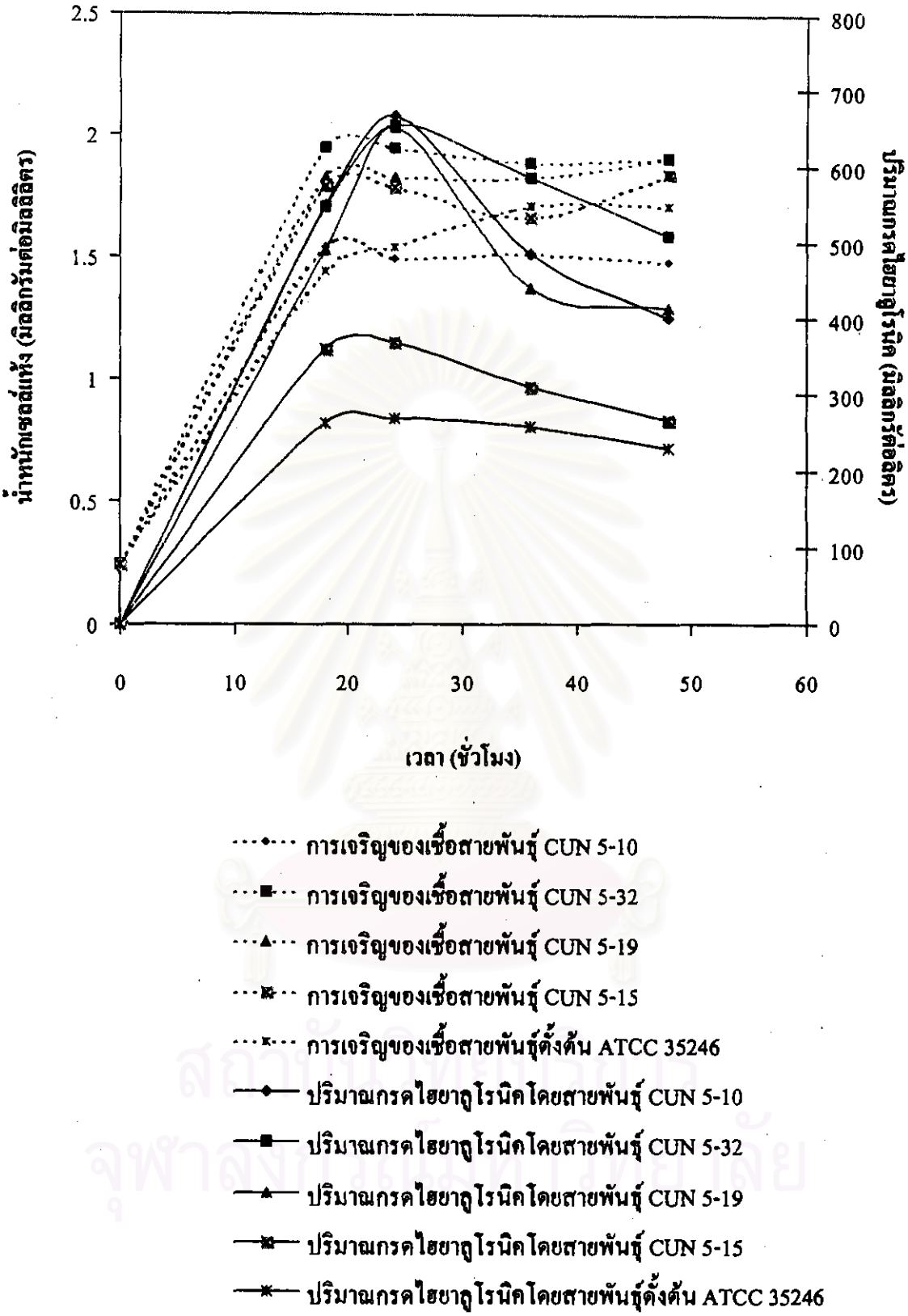
S. zooepidemicus สายพันธุ์กลายทั้ง 4 สายพันธุ์ มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคลดลงโดยสายพันธุ์ CUN 5-10 , CUN 5-32 , CUN 5-19 และ CUN 5-15 หลังจากถ่ายเชื้อจำนวน 5 ครั้งแล้ว ยังคงสามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นคิดเป็นร้อยละ 20.17 , 9.69 , 5.45 และ 6.27 ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

เลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 และ สายพันธุ์กลายทั้ง 4 อันได้แก่ CUN 5-10 , CUN5-15 ,CUN5-19 และ CUN 5-32 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อการผลิตในระดับขวดเขย่า ที่อุณหภูมิห้องโดยปรับ ค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 ความรอบเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที พบว่าการเจริญของสายพันธุ์กลายทั้ง 4 สายพันธุ์และสายพันธุ์ตั้งต้นให้การเจริญในรูปแบบเดียวกัน โดยสายพันธุ์ CUN 5-32 ให้การเจริญสูงสุด และ CUN 5-15 ,CUN 5-19 ,ATCC 35246 และ CUN5-10 ให้การเจริญลดลงตามลำดับ สำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคพบว่า สายพันธุ์ CUN 5-10 ให้ปริมาณกรดสูงสุดคือ 666.67 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 24 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น ATCC 35246 ให้การผลิตกรดสูงสุดที่เวลาเดียวกัน เท่ากับ 267.59 มิลลิกรัมต่อลิตร สายพันธุ์กลายให้การผลิตที่สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น คิดเป็นร้อยละ 149.137 (รูปที่ 25)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 25 การเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของเชื้อสายพันธุ์กลาย *S.zooepidemicus* CUN5-10 , CUN5-32 , CUN5-19 , CUN5-15 และ สายพันธุ์ดั้งเดิม *S.zooepidemicus* ATCC 35246 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อการผลิตค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 ที่อุณหภูมิห้อง , 200 รอบต่อนาที

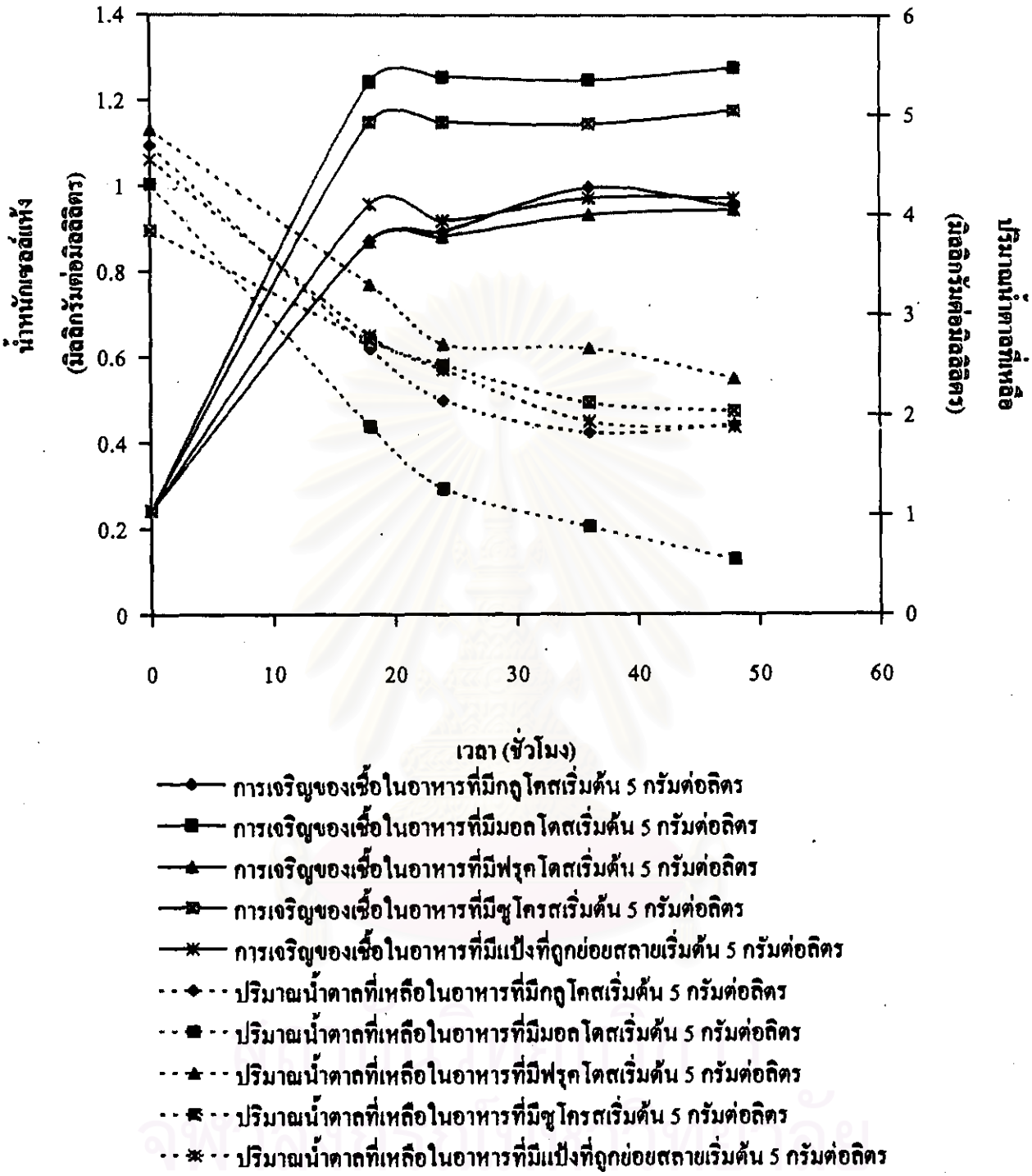
3.16 การศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนหลักบางชนิดในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์กลาย *S. zooepidemicus* สายพันธุ์กลาย CUN 5-10

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

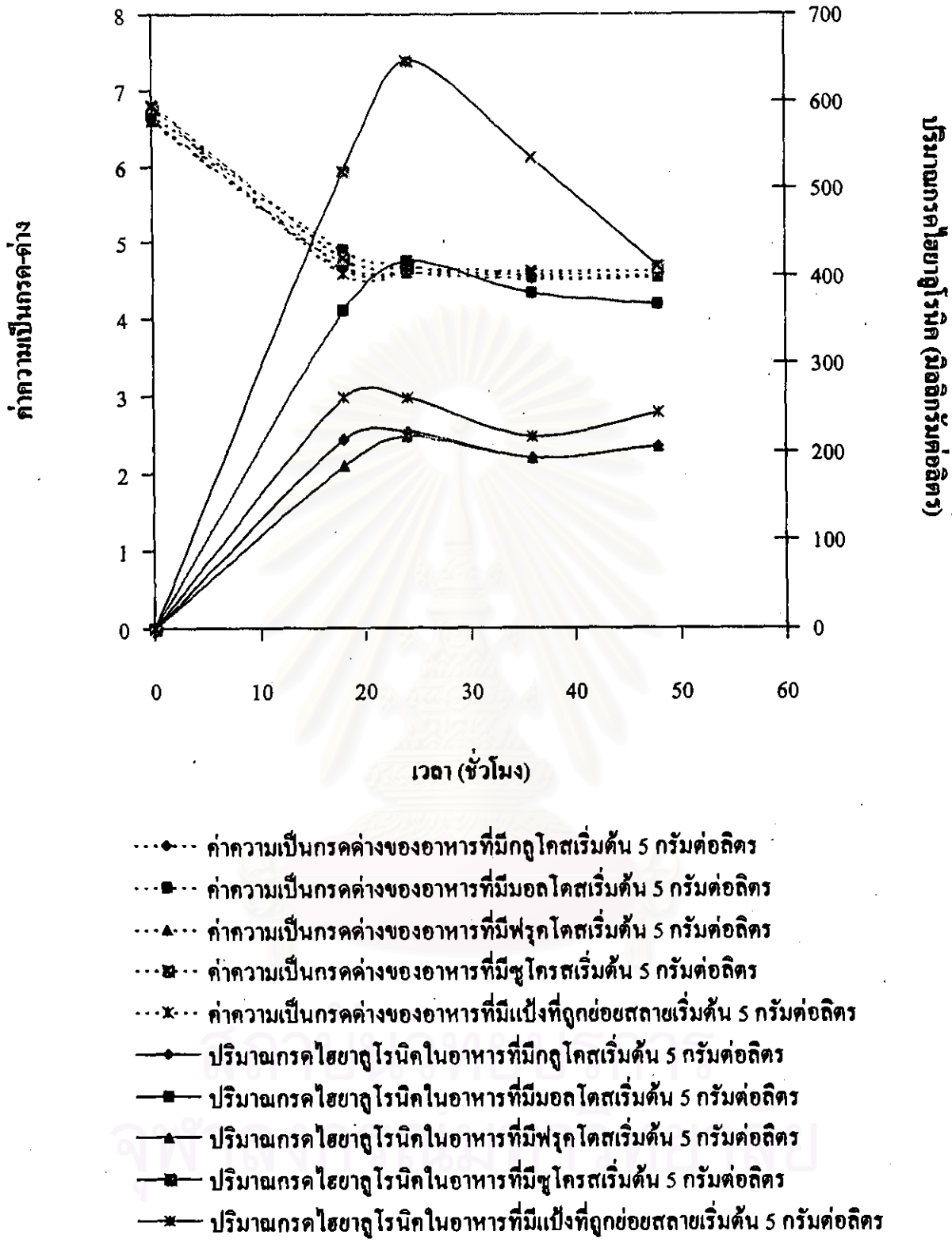
ดังนั้นจึงศึกษาถึงชนิดของน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์กลายเช่นกัน โดยแปรผันชนิดน้ำตาล 5 ชนิด คือ กลูโคส , ซูโครส , มอลโตส , ฟรุกโตส และ แป้งที่ย่อยสลายแล้ว ที่อุณหภูมิห้อง , ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8 อัตราเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที พบว่าสายพันธุ์กลาย CUN5-10 แต่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีมอลโตสเป็นแหล่งคาร์บอนได้สูงสุด แต่การผลิตกรดไฮยาลูโรนิค เมื่อมีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิค 647.44 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 26ก, 26ข)

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

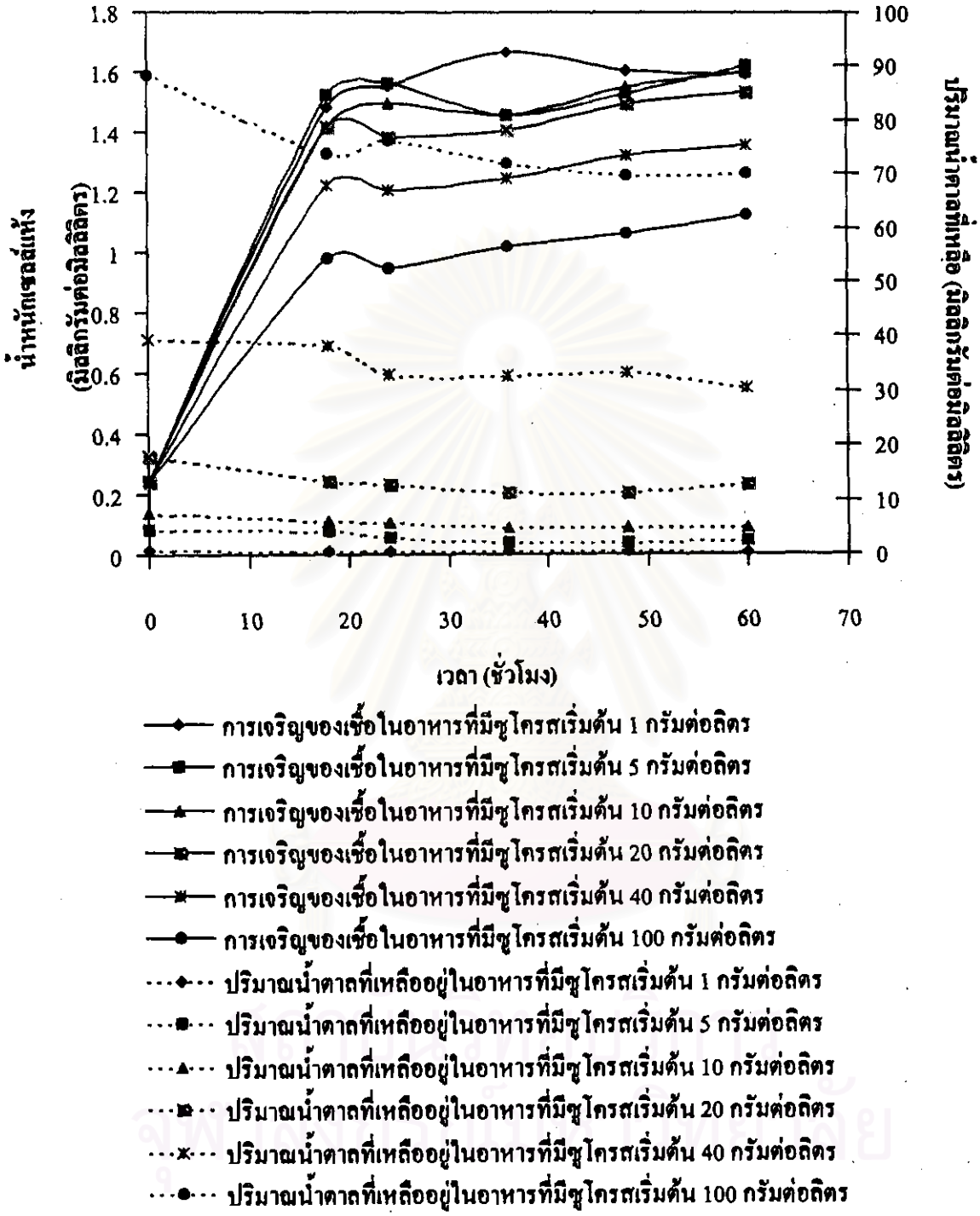
จากการศึกษาพบว่า *S.zooepidemicus* สายพันธุ์ CUN 5-10 ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ดังนั้นจึงศึกษาถึงปริมาณซูโครสที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคโดยใช้ภาวะการเลี้ยงที่ อุณหภูมิห้อง ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ 6.8 และความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อเจริญสูงในอาหารที่มีปริมาณซูโครสเป็น 0.5 , 0.1 , 1.0 , 2.0 , 4.0 และ 10.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคพบว่า ที่ปริมาณน้ำตาลซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ ให้การผลิตกรดสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 เท่ากับ 726.59 มิลลิกรัมต่อลิตรและที่ปริมาณซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ ให้การผลิตกรดต่ำที่สุด คือ 404.65 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 18 (รูปที่ 27ก, 27ข)



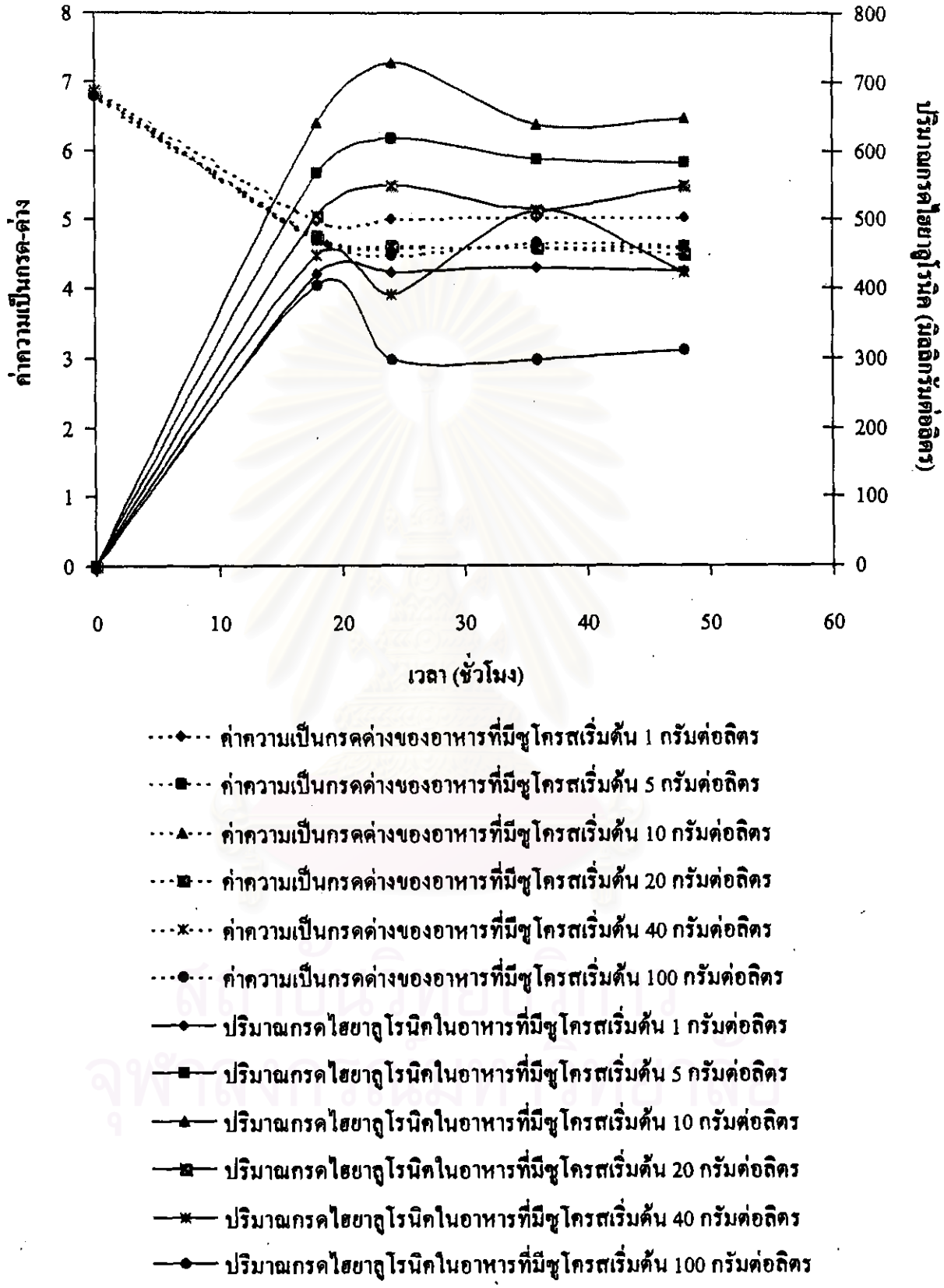
รูปที่ 26ก การเจริญและปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อการผลิตโดย *S.zooepidemicus* สายพันธุ์กลาย CUN 5-10 โดยแปรผันแหล่งคาร์บอน ค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที



รูปที่ 26ข ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของ *S.zooepidemicus* สายพันธุ์กลาย CUN 5-10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อการผลิตโดยแปรผันแหล่งคาร์บอน ค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที



รูปที่ 27ก การเจริญและปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อการผลิตโดย *S.zooepidemicus* สายพันธุ์กลาย CUN 5-10 โดยแปรผันปริมาณซูโครส 0.1 – 10 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 ที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที



รูปที่ 27ข ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของ *S.zooepidemicus* สายพันธุ์กลาย CUN 5-10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อการผลิตโดยแปรผันปริมาณซูโครส 0.1 – 10 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 ที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที

3.18 ปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

3.18.1 ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

ทำการแปรผันค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อการผลิตเป็น 6.0 , 6.5 , 6.8 , 7.0 และ 7.5 โดยเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ CUN5-10 ที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที พบว่า ค่าความเป็นกรดด่างที่ 7.5 จะให้การเจริญที่ดีกว่า 7.0 , 6.8 , 6.5 และ 6.0 ตามลำดับ ส่วนการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคพบว่า ที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.5 จะให้การผลิตกรดสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 เท่ากับ 824.28 มิลลิกรัมต่อลิตร ขณะที่เปรียบเทียบกับรายงานของจุรารัก ศรีวงษ์ (2540) พบว่า เชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น ATCC 35246 ให้การผลิตที่สูงสุดเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 โดยให้การผลิตสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อเช่นกัน (รูปที่ 28)

3.19.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

ทำการเลี้ยง *S.zooepidemicus* สายพันธุ์กลาย CUN 5-10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตโดยมีปริมาณซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเป็นกรดด่าง 7.5 ความเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที และแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยง 25 , 30 , 37 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) พบว่า ที่อุณหภูมิห้องให้การเจริญสูงสุด และที่อุณหภูมิ 37, 30 , 25 องศาเซลเซียสให้การเจริญสูง ตามลำดับ ส่วนการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคพบว่า ที่ชั่วโมงที่ 24 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้การผลิตกรดไฮยาลูโรนิคสูงสุด 954.04 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับทุกๆ อุณหภูมิโดย ที่อุณหภูมิห้องให้ปริมาณกรดสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 เท่ากับ 841.39 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสให้ปริมาณกรดสูงที่สุด 779.78 มิลลิกรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 18 (รูปที่ 29)

3.19.3 <u>ความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค</u>

จากผลการทดลองเปรียบเทียบระหว่างการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคโดยเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในระดับขวดเขย่า และในระดับหลอดเขย่า พบว่า ในระดับหลอดเขย่าให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคต่ำกว่าในระดับขวดเขย่า ซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยของปริมาณออกซิเจนที่มีผลต่อการผลิต ประกอบกับรายงานที่แสดงให้เห็นอิทธิพลของปริมาณออกซิเจนที่มีต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค (Cleary and Larkin , 1979 ; John *et al.* , 1994) จึงทำการแปรผันความเร็วรอบในการเขย่าเป็น 200 , 250 และ 300 รอบต่อนาที ภาวะอุณหภูมิห้อง ค่าความเป็นกรดด่าง 7.5 โดยมี ซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต พบว่า การเจริญของสายพันธุ์กลาย CUN 5-10 ที่ความเร็วรอบ ทั้ง 3 ไม่มีความแตกต่างกัน แต่การผลิตกรดไฮยาลูโรนิคที่ ภาวะความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที ให้การผลิตกรดสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 เท่ากับ 829.11 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 30)

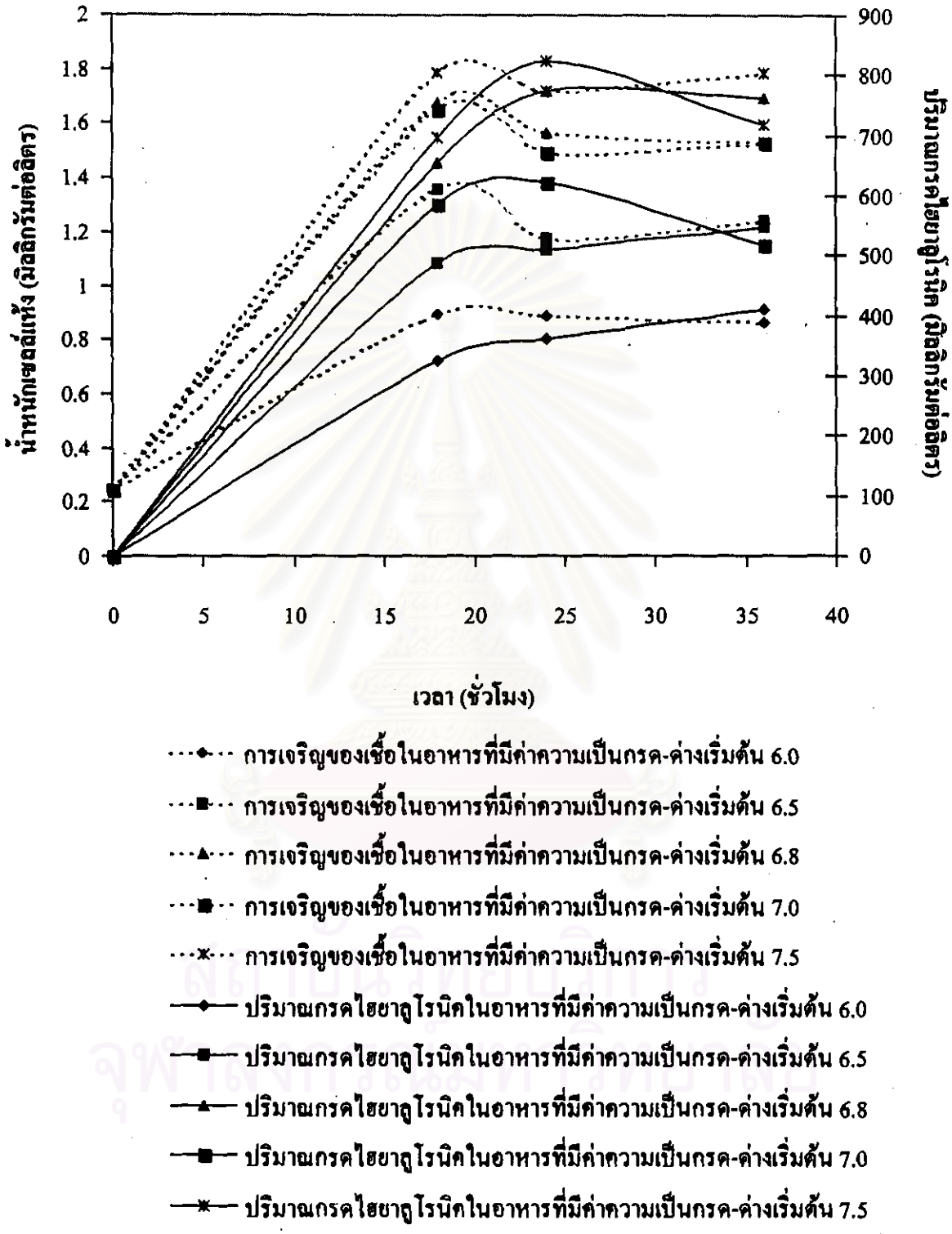
3.19.4. <u>ปริมาณไลโซไซม์ที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค</u>

รายงานของ Kim และคณะ ในปี 1996 เกี่ยวกับการเติมไลโซไซม์และสารดีเทอร์เจนที่จะกระตุ้นการสร้างกรดไฮยาลูโรนิคเพิ่มขึ้นได้ ดังนั้นจึงเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคที่ค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 ที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) ความเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที และที่ ค่าความเป็นกรดด่าง 7.5 อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) ความเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที สำหรับเชื้อสายพันธุ์กลาย CUN5-10 โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น 20 เปอร์เซ็นต์ อายุหัวเชื้อตั้งต้น 7 ชั่วโมง เลี้ยงเชื้อจนถึงช่วงการเจริญที่วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรได้ 0.6 จึงทำการเติมไลโซไซมที่ความเข้มข้น 0 - 50,000 ยูนิต/มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ วิเคราะห์ดูผลการเจริญและปริมาณการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค พบว่า สำหรับสายพันธุ์ตั้งต้น ATCC 35246 การเติมไลโซไซม์ มีผลทำให้การสร้างกรดไฮยาลูโรนิคเพิ่มขึ้น แต่ปริมาณไลโซไซม์ต่างๆกัน ให้ปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกันนัก ขณะที่สายพันธุ์กลาย CUN5-10 เมื่อเติมไลโซไซม์ปริมาณ 40,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตรมีผลกระตุ้นการสร้างกรดไฮยาลูโรนิคได้สูงถึง 2.50 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 31 , 32)

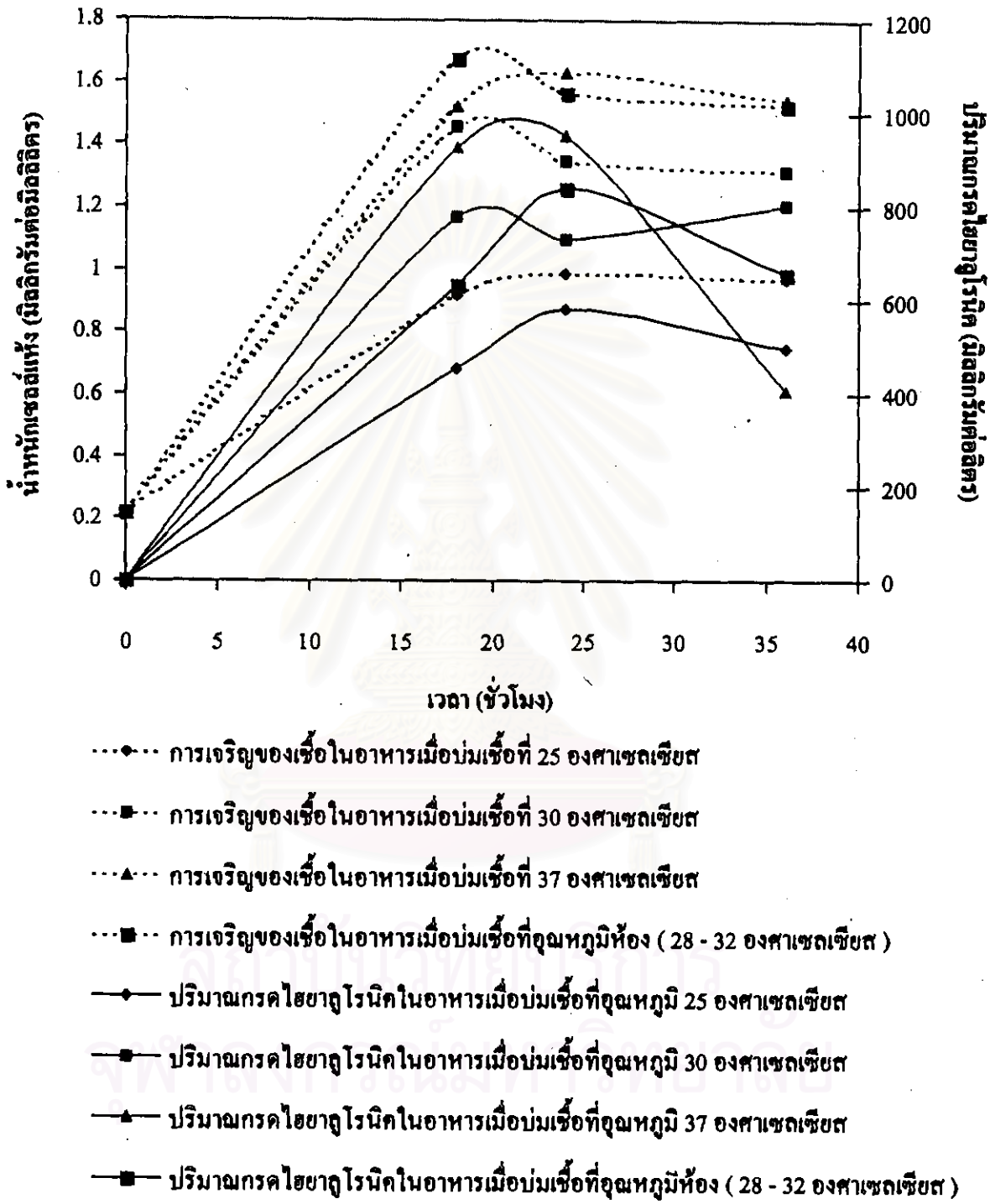
3.19.5 ปริมาณทวีน 80 ที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

เลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ดั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกที่ค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 ที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) ความเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที และเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต ค่าความเป็นกรดด่าง 7.5 ที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) ความเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น 20 เปอร์เซ็นต์ อายุหัวเชื้อตั้งต้น 7 ชั่วโมง เลี้ยงเชื้อจนถึงช่วงการเจริญที่วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรได้ 0.6 จึงทำการเติมทวีน 80 ที่ความเข้มข้น 0 – 2 เปอร์เซ็นต์ เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ วิเคราะห์ดูผลการเจริญและปริมาณการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก พบว่าทวีน 80 ที่เติมลงในอาหารหมักมีผลในการกระตุ้นการสร้างกรดไฮยาลูโรนิกทั้งในสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลายไม่สูงขึ้นเท่าใดนัก โดยที่สายพันธุ์ตั้งต้นเมื่อเติม 2.0 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ทวีน 80 มีผลให้สร้างกรดไฮยาลูโรนิกได้สูงถึง 297.61 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 24 ขณะที่สายพันธุ์กลายปริมาณทวีน 80 ต่างๆ ที่เติมในอาหารหมักให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน โดย ที่ปริมาณ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ทวีน 80 ที่เติมลงในอาหารหมักสำหรับสายพันธุ์ตั้งต้น สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้สูง 775.18 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 33 , 34)

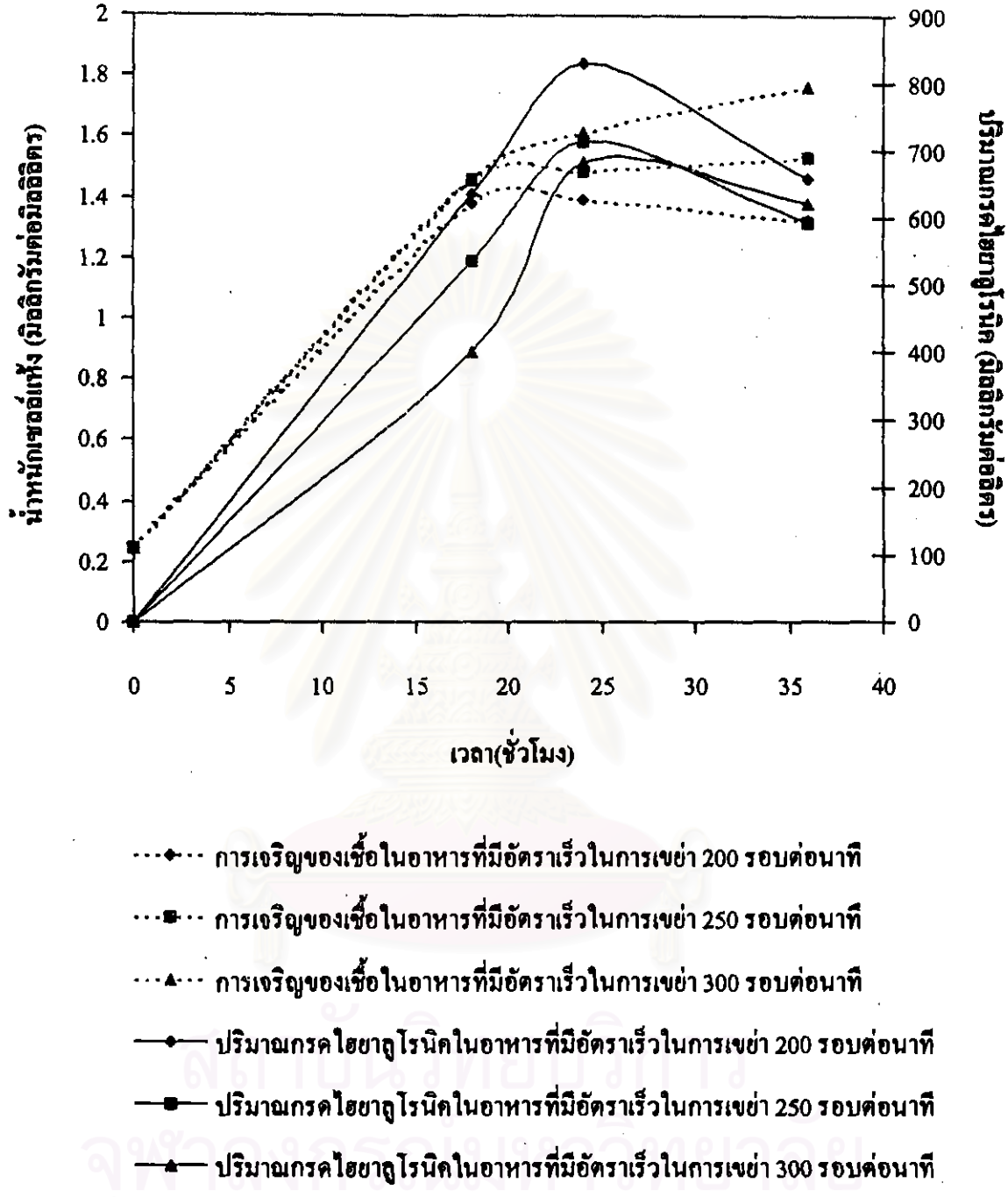
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



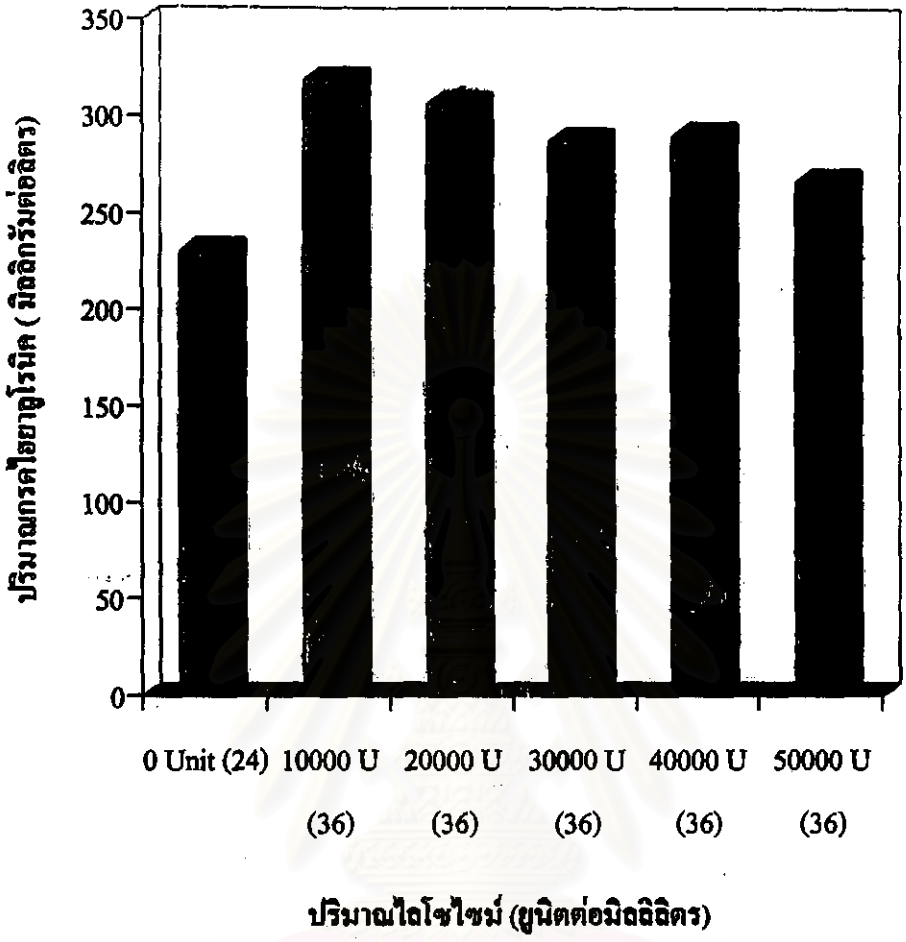
รูปที่ 28 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของ *S.zooepidemicus* CUN5-10 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อการผลิตที่ อุณหภูมิห้อง , อัตราเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที



รูปที่ 29 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของ *S. zooepidemicus* CUN5-10 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อการผลิต ค่าความเป็นกรดด่าง 7.5 และอัตราเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที

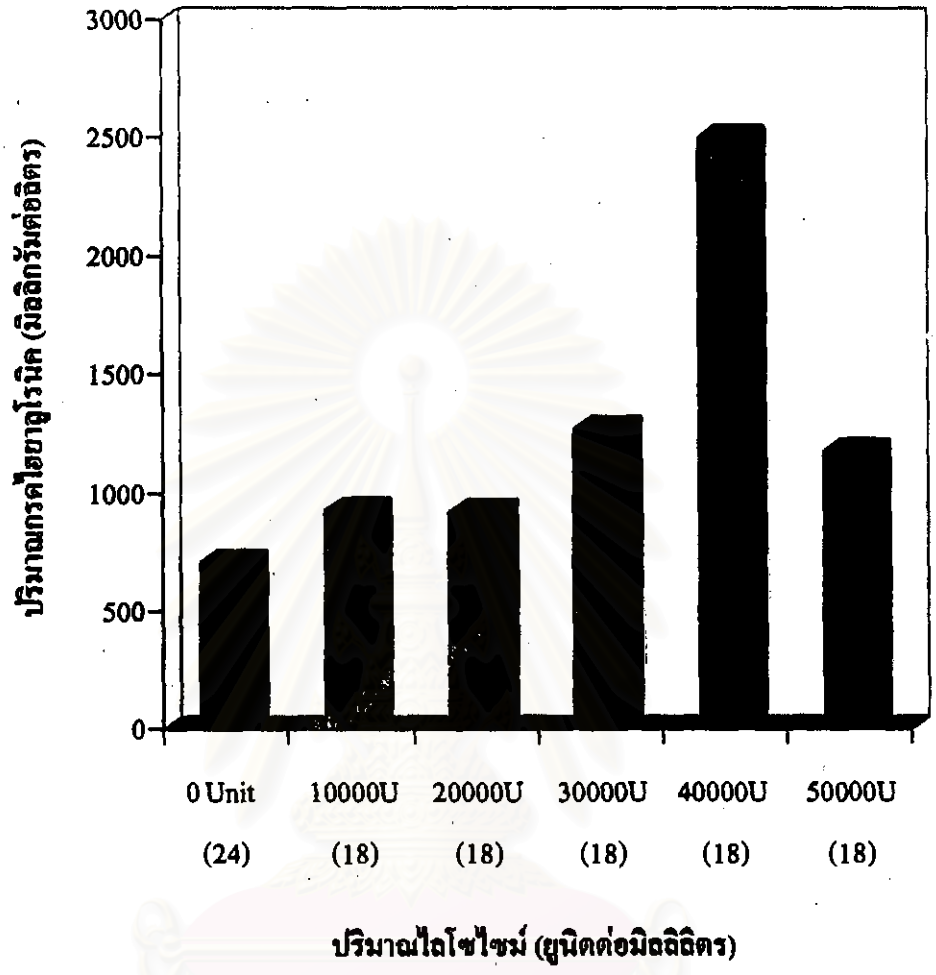


รูปที่ 30 ผลของอัตราเร็วในการเขย่าที่มีต่อการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของ *S. zooepidemicus* CUN5-10 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อการผลิต ที่อุณหภูมิห้อง และค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ 7.5



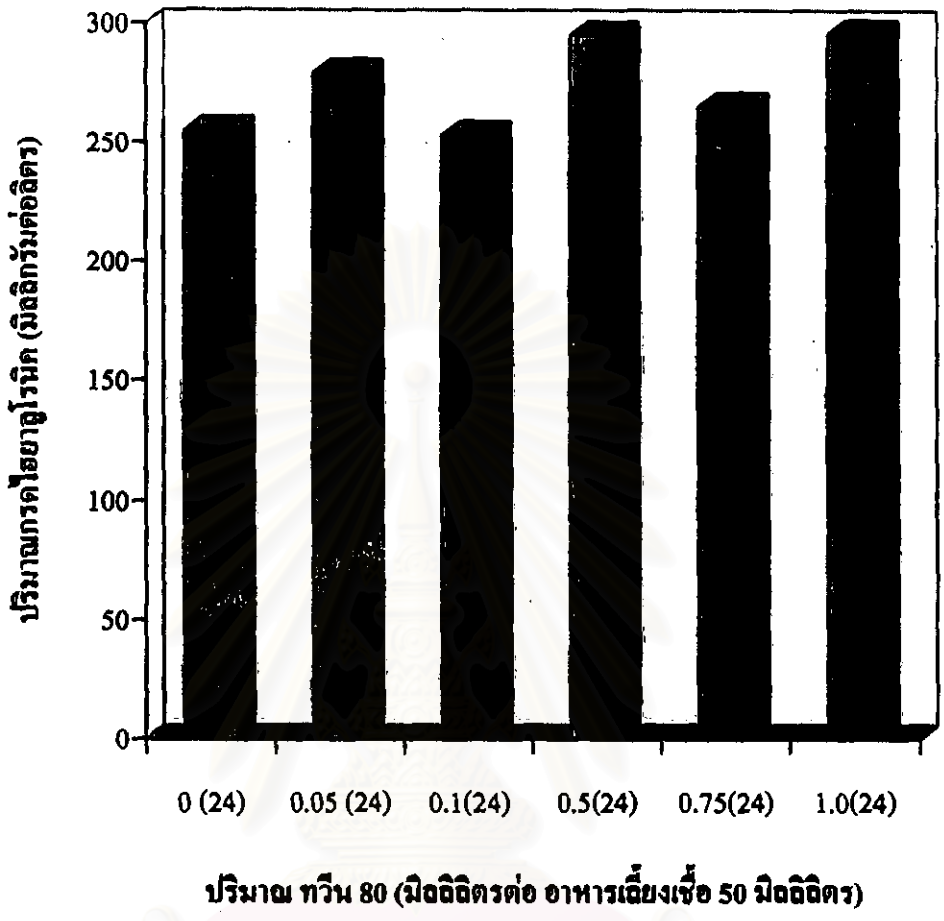
รูปที่ 31 ผลของไลโซไซม์ที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตสูตรปรับปรุงจาก Nimrod (1986) ที่มีปริมาณซูโครส 5 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.8 ที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) อัตราเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 20% (ปริมาตรต่อปริมาตร) อายุหัวเชื้อ 7 ชั่วโมง

หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บหมายถึงเวลาการเลี้ยงเชื้อ (ชั่วโมง)



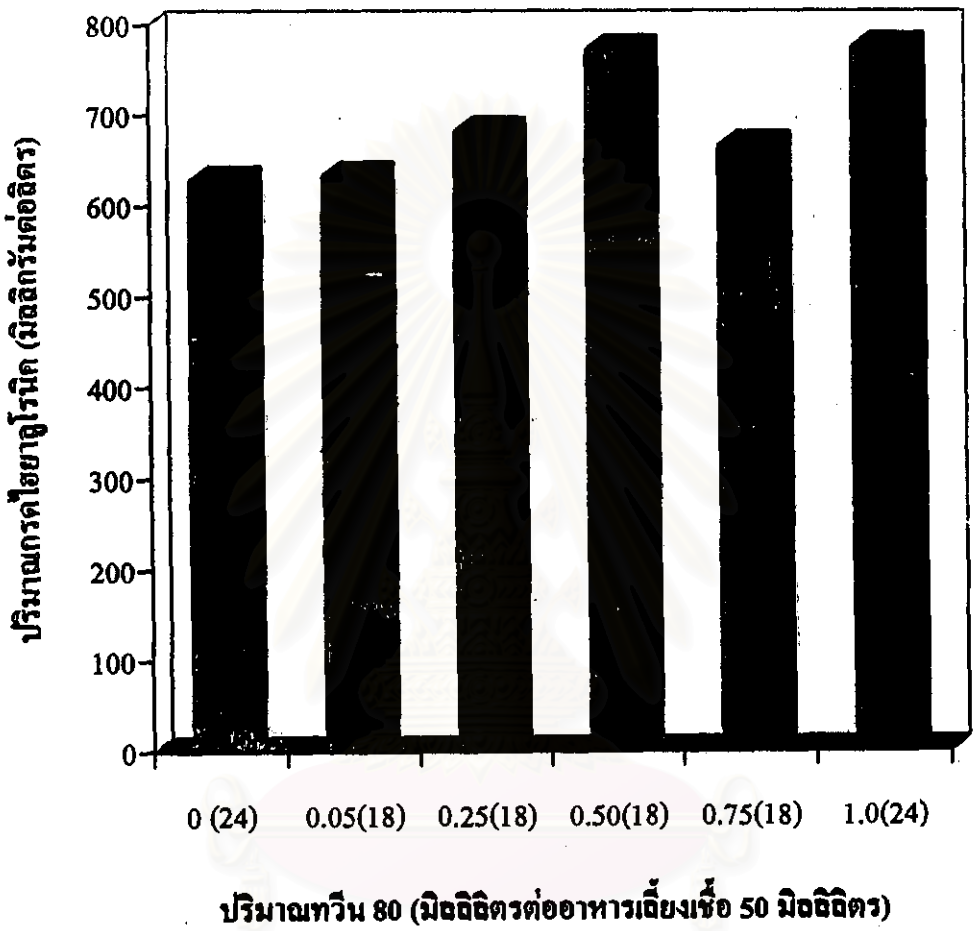
รูปที่ 32 ผลของไลโซไซม์ที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของ *S. zooepidemicus* CUN5-10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตสูตรปรับปรุงจาก Nimrod (1986) ที่มีปริมาณซูโครส 10 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.5 ที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) อัตราเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 20% (ปริมาตรต่อปริมาตร) อายุหัวเชื้อ 7 ชั่วโมง

หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บหมายถึงเวลาการเลี้ยงเชื้อ (ชั่วโมง)



รูปที่ 33 ผลของทวีน 80ที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตสูตรปรับปรุงจาก Nimrod (1986) ที่มีปริมาณซูโครส 5 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.8 ที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) อัตราเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 20% (ปริมาตรต่อปริมาตร) อายุหัวเชื้อ 7 ชั่วโมง

หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บหมายถึงเวลาการเลี้ยงเชื้อ (ชั่วโมง)



รูปที่ 34 ผลของทวีน 80ที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของ *S. zooepidemicus* CUN 5-10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตสูตรปรับปรุงจาก Nimrod (1986) ที่มีปริมาณซูโครส 10 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.5 ที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) อัตราเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 20% (ปริมาตรต่อปริมาตร) อายุหัวเชื้อ 7 ชั่วโมง

หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บหมายถึงเวลาการเลี้ยงเชื้อ (ชั่วโมง)

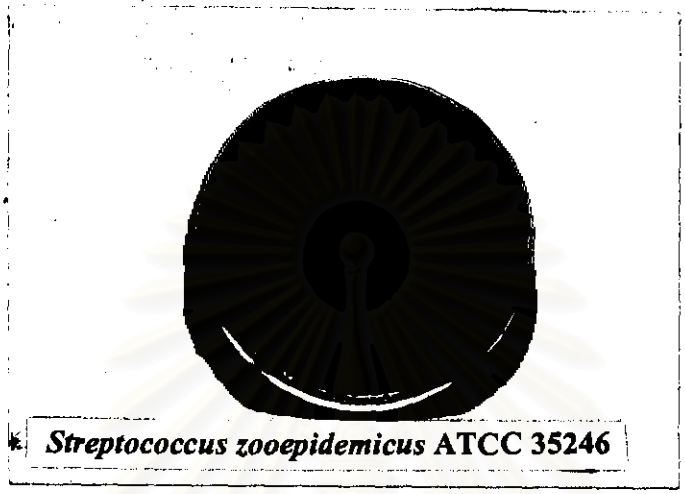
3.20 เปรียบเทียบสมบัติบางประการของเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น *S.zooepidemicus* ATCC 35246 และสายพันธุ์กลาย *S.zooepidemicus* CUN5-10

ตามลักษณะของแบคทีเรีย (bacteriological characteristic) ในกลุ่มของ *Streptococci* ที่รายงานโดย Deibei และ Seeley ในปี 1974 ที่กล่าวไว้ว่า เป็นแบคทีเรียติดสีแกรมบวก สามารถย่อยหรือไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ไม่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 9.6 และไม่เจริญในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ 9.6 เปอร์เซ็นต์ และจากรายงานของ Kim และคณะ ในปี 1996 ที่ศึกษาลักษณะของแบคทีเรียสายพันธุ์กลาย *S.equi* KFCC 10830 ซึ่งกลายพันธุ์จาก *S.equi* ATCC 6580 ดังนั้นในงานวิจัย จึงศึกษาเปรียบเทียบลักษณะของแบคทีเรียสายพันธุ์ตั้งต้น *S.zooepidemicus* ATCC 35246 และสายพันธุ์กลาย *S.zooepidemicus* CUN5-10 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 25 และรูปที่ 35

ตารางที่ 25 สมบัติบางประการของเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น *S.zooepidemicus* ATCC 35246 และสายพันธุ์กลาย *S.zooepidemicus* CUN5-10

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

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



Streptococcus zooepidemicus ATCC 35246

Streptococcus zooepidemicus CUN 5-10

รูปที่ 35 ลักษณะโคโลนีและสมบัติการไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของ *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 (สายพันธุ์ดั้งต้น) และ *Streptococcus zooepidemicus* CUN5-10 (สายพันธุ์กลาย) บนอาหารแข็ง Tryptic Soy Agar ที่เติมเลือด 5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย