

การผลิตและกิจกรรมของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ไฮยาโลโรนเดส
จาก Streptococcus pyogenes ATCC 6550 ใน Escherichia coli JM 109

นายสิทธิศักดิ์ เกาสวรรณ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2555

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

PRODUCTION AND ACTIVITY OF RECOMBINANT HYALURONIDASE
FROM STREPTOCOCCUS PYOGENES ATCC 6550 IN ESCHERICHIA COLI JM 109

Mr. Sittisak Thaosuwan

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Engineering Program in Chemical Engineering

Department of Chemical Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิต และกิจกรรม ของรีคอมบิแนนท์ เอนไซม์ ไฮยาโลโรนิเดส จาก Streptococcus pyogenes ATCC 6550 ใน Escherichia coli JM 109
โดย	นายสิทธิศักดิ์ เกาสวรรณ
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร. ชุติมณฑน์ สติรพิพัฒน์กุล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร. ศรีเมฆ ชาวโพงพาง

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. บุญสม เลิศหิรัญวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มนต์วี วงศ์ศรี)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร. ชุติมณฑน์ สติรพิพัฒน์กุล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ดร. ศรีเมฆ ชาวโพงพาง)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.บรรเจิด จงสมจิตร)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร. กนกวรรณ รมยานนท์)

สิทธิศักดิ์ เกาสวรรณ : การผลิตและกิจกรรม ของรีคอมบิแนนท์ เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส จาก *Streptococcus pyogenes* ATCC 6550 ใน *Escherichia coli* JM 109 (PRODUCTION AND ACTIVITY OF RECOMBINANT HYALURONIDASE FROM STREPTOCOCCUS PYOGENES ATCC 6550 IN ESCHERICHIA COLI JM 109) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. ดร. ชุตินันท์ สิริพิพัฒน์กุล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ. ดร. ศรีเมฆ ชาวโพงพาง, 109 หน้า

การศึกษาการแสดงออกของยีนไฮยาลูโรนิเดส จาก *Streptococcus pyogenes* ATCC 6550 ใน *Escherichia coli* JM109 เมื่อใช้ pQE80-L vector system พบว่า มีขนาดของยีนประมาณ 2,400 คู่เบส โดยรีคอมบิแนนท์โปรตีนทำการตรวจสอบขนาดโมเลกุลด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่า ในสารละลายเซลล์มีขนาดโมเลกุลประมาณ 88 กิโลดาลตัน โดยเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่แยกได้จาก สารละลายตะกอนเซลล์ ถูกตรวจวัดได้ในระดับที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์จาก supernatant เมื่อทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเลี้ยงของการผลิตเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสโดยเชื้อสายพันธุ์นี้ในระดับขวดเขย่า พบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2xYT ที่มีปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรขวดเขย่า 40 เปอร์เซ็นต์ คือ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8 และ 200 รอบการเขย่าต่อนาที สารละลายเอนไซม์ที่ไม่ทำให้บริสุทธิ์ แสดงค่ากิจกรรมสูงสุดในช่วงอุณหภูมิ 35 ถึง 40 องศาเซลเซียส ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 การศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ที่สภาวะค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยวิธี Morgan-Elson colourimetric assay พบว่า K_m และ V_{max} มีค่าเท่ากับ 0.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 9.3 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร จาก Lineweaver-Burk plot

ภาควิชา วิศวกรรมเคมี ลายมือชื่อนิสิต.....
 สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
 ปีการศึกษา 2555 ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5470513921: MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEYWORDS: HYALURONIDASE / ACTIVITY / RECOMBINANT / *Streptococcus*

SITTISAK THAOSUWAN : PRODUCTION AND ACTIVITY OF RECOMBINANT HYALURONIDASE FROM STREPTOCOCCUS PYOGENES ATCC 6550 IN ESCHERICHIA COLI JM 109. ADVISOR: CHUTIMON SATIRAPIPHATKUL, Ph.D., CO-ADVISOR: SRIMEK CHOWPONGPANG, Ph.D., 109 pp.

The expression of hyaluronidase gene from *Streptococcus pyogenes* ATCC 6550 in *Escherichia coli* JM109 by using pQE80-L vector system was encoded at approximately 2,400 bp. The recombinant protein detected by SDS-PAGE had an expressed molecular mass of ~88 kDa size in the soluble cell. Hyaluronidase extracted from the soluble crude cell was detected in higher level, compared to the enzyme from supernatant. The effects of cultivation parameters on the production of hyaluronidase by this strain in shaking-flask level were investigated. The optimum cultivation conditions in 2xYT medium at 40% volume of medium per flask volume ratio were observed at 35 °C, pH = 8 and 200 rpm. The crude enzyme showed maximum activity at the temperature ranging from 35 °C to 40 °C with the pH of 7. The kinetics of enzyme was investigated at pH = 7 and 37°C using the Morgan-Elson colourimetric assay method. K_m and V_{max} values were 0.78 mg/ml and 9.3 mU/ml from the Lineweaver–Burk plot.

Department :Chemical Engineering.....Student's Signature

Field of Study : ...Chemical Engineering.....Advisor's Signature

Academic Year : ...2012.....Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้เพราะได้รับความอนุเคราะห์ช่วยเหลือที่ดี ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ชุตินันท์ สิริพิพัฒน์กุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และอาจารย์ ศรีเมฆ ชาวโพรงพาง ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ แนวทางการวิจัย ข้อคิดเห็นในการแก้ไขปัญหาต่างๆ และความช่วยเหลือในขั้นตอนการทำการวิจัยอย่างใกล้ชิด ตลอดจนช่วยแก้ไขและเพิ่มเติมวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตั้งแต่ต้นจนสำเร็จ

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ซึ่งประกอบด้วย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มนตรี วงศ์ศรี ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.บรรเจิด จงสมจิตร และ ดร.กนกวรรณ รมยานนท์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้ข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช รุ่นที่ 20 ครั้งที่ 1/2556 ที่ให้เงินทุนสนับสนุนในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณเพื่อน และพี่ ทุกคน ทั้งที่ห้องวิจัยชีวเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และที่ห้องวิจัยภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้การดูแล ให้ความช่วยเหลือทั้งขั้นตอนการทำการวิจัย และขั้นตอนการเขียนเล่มวิทยานิพนธ์อย่างอบอุ่น

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่อบรมสั่งสอนให้ผู้วิจัยเป็นคนเข้มแข็ง ไม่ยอมแพ้อุปสรรคใดๆ อีกทั้งสนับสนุนให้กำลังใจมาโดยตลอด จนทำให้ผู้วิจัยสามารถทำงานวิจัยสำเร็จลุล่วง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฐ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ณ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่ว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 กรดไฮยาลูโรนิก.....	4
2.2 โครงสร้างและคุณสมบัติของกรดไฮยาลูโรนิก.....	5
2.3 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิก.....	6
2.3.1 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดยการสกัดจากเซลล์ของสิ่งมีชีวิต.....	6
2.3.2 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกจากกระบวนการหมักโดยเชื้อจุลินทรีย์.....	6
2.4 เอนไซม์ไฮยาลูโรนเดส.....	12
2.4.1 กลุ่มของเอนไซม์ไฮยาลูโรนเดส.....	12
2.4.1.1 Testicular-type hyaluronidase	12
2.4.1.2 Leech hyaluronidase.....	12
2.4.1.3. Bacterial hyaluronidase.....	13
2.5 การปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อการผลิตเอนไซม์ไฮยาลูโรนเดส.....	13
2.6.การวิเคราะห์ขนาดเอนไซม์ไฮยาลูโรนเดสด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส.....	14

2.7 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์.....	14
2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักโดยเชื้อจุลินทรีย์.....	16
2.8.1 ชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้ในกระบวนการหมัก.....	16
2.8.2 สภาพที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสของเชื้อจุลินทรีย์.....	16
2.8.2.1 แหล่งคาร์บอน.....	16
2.8.2.2 แหล่งไนโตรเจน.....	16
2.8.2.3 ฟอสเฟต.....	16
2.8.2.4 แร่ธาตุต่างๆ.....	17
2.8.2.5 ค่าความเป็นกรด-ด่าง.....	17
2.8.2.6 อุณหภูมิและระยะเวลาในการหมัก.....	17
2.8.2.7 ค่า ionic strength.....	17
2.8.2.8 สาร inducer และ inhibitor ชนิดต่างๆ.....	17
2.8.2.9 อากาศ.....	18
2.8.2.10 อัตราการเขย่า.....	18
2.9 ปัจจัยที่มีกิจกรรมของเอนไซม์.....	18
2.9.1 ผลของอุณหภูมิ.....	19
2.9.2 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง.....	18
2.10. จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์.....	21
2.10.1 ปฏิกริยาอันดับต่างๆ.....	21
2.10.1.1. ปฏิกริยาอันดับที่ศูนย์.....	21
2.10.1.2 ปฏิกริยาอันดับที่หนึ่ง.....	22
2.10.1.3. ปฏิกริยาอันดับที่สอง.....	23
2.10.2. การศึกษาอิทธิพลของเอนไซม์โดยการเขียนกราฟจากข้อมูลทาง จลนพลศาสตร์.....	25
2.10.3. การสร้างสมการ และกราฟทางจลนพลศาสตร์.....	27
2.10.3.1. สมการ Michaelis-Menten.....	27
2.10.3.1.ก .ปฏิกริยา Zero order kinetics.....	27
2.10.3.1.ข .ปฏิกริยา first order kinetics.....	28
2.10.3.2. Lineweaver-Burk plot.....	28

2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	30
บทที่ 3 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	35
3.1 อุปกรณ์.....	35
3.2 เคมีภัณฑ์.....	36
3.3 เชื้อจุลินทรีย์.....	37
3.4 พลาสติดดีเอ็นเอ	37
3.5 Primerสำหรับผลิตไฮยาลูโรนิต.....	37
3.6 การโคลนยีนเพื่อผลิตเอนไซม์ไฮยาลูโรนิต (HYALs).....	37
3.6.1 การโคลนยีนเอนไซม์ไฮยาลูโรนิต จาก <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 6550.....	38
3.6.2 การนำพลาสติดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เชื้อจุลินทรีย์.....	38
3.6.3 ตรวจสอบโคลนที่มีขึ้นดีเอ็นเอ และสกัดพลาสติด.....	40
3.7 การเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเอนไซม์ไฮยาลูโรนิต (HAase).....	40
3.7.1 การเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น.....	40
3.7.2 การเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่าเพื่อการผลิตเอนไซม์ไฮยาลูโรนิต (HAase).....	40
3.8 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไฮยาลูโรนิต.....	41
3.8.1 อัตราการเขย่า.....	41
3.8.2 อุณหภูมิ.....	41
3.8.3 ค่าความเป็นกรด-ต่าง	41
3.9 การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิต.....	42
3.9.1 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิตจาก ยีนรีคอมบิแนนท์ด้วยวิธี sodium dodecyl sulfat polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).....	42
3.9.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิต.....	42
3.10 จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิต.....	43

บทที่ 4 ผลการทดลอง วิเคราะห์ผลการทดลอง	45
4.1 การปรับปรุงพันธุกรรมด้วยเทคนิค genetic recombination เพื่อผลิต เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (HYALs).....	45
4.2 การโคลนยีนไฮยาลูโรนิเดสเข้าสู่ในเซลล์เชื้อจุลินทรีย์ <i>Escherichia coli</i>	46
4.3 ทำการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยดูจากแถบโปรตีนของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)	50
4.4 การเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (HAase).....	54
4.4.1 อัตราการขยาย.....	54
4.4.2 อุณหภูมิในการบ่ม	55
4.4.3 ค่าความเป็นกรด-ด่าง.....	56
4.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส.....	60
4.5.1 ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์).....	60
4.5.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์	61
4.6 ศึกษาสมบัติทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์.....	65
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	70
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	70
5.2 ข้อเสนอแนะทางการปรับปรุง	72
รายการอ้างอิง	73

ภาคผนวก.....	82
ภาคผนวก ก.....	83
ภาคผนวก ข.....	90
ภาคผนวก ค.....	91
ภาคผนวก ง.....	94
ภาคผนวก จ.....	98
ภาคผนวก ฉ.....	101
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	109

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	สมบัติและตำแหน่งแอนติเจนของ <i>Streptococcus</i>	10
4.1	ค่าความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮยาลูโรนิก (S), อัตราเร็วปฏิกิริยาเริ่มต้นของ เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (V_0).....	65
4.2	ตารางเปรียบเทียบค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสจากแหล่งต่างๆ	
ก.1	ตารางการเตรียมสารละลายซีเตรท-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์.....	87
ก.2	ตารางการเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer).....	88
ง.1	ตารางการเตรียมสารละลายน้ำตาล NAG (N-Acetyl-D-glucosamine).....	94
ง.2	แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 585 นาโนเมตร ที่น้ำตาล N-acetylglucosamine ความเข้มข้นต่างๆ.....	95

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1	โครงสร้างของกรดไฮยาลูโรนิก..... 5
2.2	กลไกการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกโดย <i>S.zooepidemicus</i> 8
2.3	ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากวิธี Morgan-Elson..... 15
2.4	(ก) อิทธิพลที่มีผลต่อค่าความเป็นกรดต่างต่อหมู่ที่แตกตัวได้ของเอนไซม์ (ข) แสดงอิทธิพลของค่าความเป็นกรดต่างต่ออัตราส่วน $[HE^-]/[E_+]$ ตามสมการของ Henderson-Hasselbach 20
2.5	ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเร็วกับความเข้มข้นของตัวทำปฏิกิริยาในปฏิกิริยา อันดับที่ 0..... 22
2.6	การสลายตัวของสาร A แบบ exponential ที่เวลาต่างๆ ของปฏิกิริยาจลนพลศาสตร์ อันดับที่ 1..... 23
2.7	ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับหนึ่งส่วนความเข้มข้นของตัวทำปฏิกิริยา ในปฏิกิริยา อันดับที่ 2..... 24
2.8	ปฏิกิริยาการย่อยสลายซูโครสด้วยอินเวอร์เทส..... 25
2.9	ความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วเริ่มต้นและปริมาณเอนไซม์..... 25
2.10	ความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วของเอนไซม์ และความเข้มข้นของซับสเตรท..... 26
2.11	ความสัมพันธ์ ระหว่าง $1/V$ และ $1/S$ ของกราฟ Lineweaver-Burk plot 29
3.1.	pQE80-L Expression Vectors..... 39
4.1	ผลการตรวจสอบยีน hyl A ด้วยเทคนิค PCR จากไพรเมอร์ hyA f และ hyA r..... 47
4.2.	pQE80-L Expression Vectors..... 48
4.3	โคลนนิ่งจากเชื้อจุลินทรีย์ <i>E. coli</i> ที่มี plasmid pQE80-L ของยีน <i>hyalA</i> เจริญบน อาหารแข็ง 2xYT ที่มีแอมพิซิลลินเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 48
4.4	ผลการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ <i>E. coli</i> ที่มี plasmid pQE80-L ของยีน <i>hyalA</i> 49

ภาพที่	หน้า	
4.5	ขนาดเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสจาก supernatant ของเชื้อจุลินทรีย์ <i>Escherichia coli</i> JM109 ที่มี พลาสมิด pGE80L- <i>hyalA</i> ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วยเทคนิค SDS-PAGE.....	52
4.6	ขนาดไฮยาลูโรนิเดสจากตะกอนเซลล์ ของเชื้อจุลินทรีย์ <i>E.coli</i> JM109 ที่มีพลาสมิด pGE80L- <i>hyalA</i> ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วยเทคนิค SDS-PAGE.....	53
4.7	ลักษณะการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ <i>E.coli</i> JM109 ที่มีพลาสมิด pGE80L- <i>hyalA</i> โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT ในขวดเซย่า ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 7 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และที่ความเร็วรอบต่างๆ.....	57
4.8	ลักษณะการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ <i>E.coli</i> JM109 ที่มีพลาสมิด pGE80L- <i>hyalA</i> เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT ในขวดเซย่า ที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรด-ต่าง 7 และที่อุณหภูมิต่างๆ.....	58
4.9	ลักษณะการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ <i>E.coli</i> JM109 ที่มีพลาสมิด pGE80L- <i>hyalA</i> เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT ในขวดเซย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรด-ต่างต่างๆ.....	59
4.10	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์กิจกรรมสัมพันธ์ และค่าความเป็นกรด-ต่าง.....	63
4.11	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์กิจกรรมสัมพันธ์ และอุณหภูมิ.....	64
4.12	กราฟ Lineweaver-Burk plot ของส่วนกลับของอัตราการทำงานของสารละลายเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่ไม่ทำให้บริสุทธิ์ และส่วนกลับของความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮยาลูโรนิก.....	67

ภาพที่	หน้า
ง.1 สีของสารละลายที่ได้จากการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล N-acetylglucosamine เพื่อสร้างกราฟน้ำตาล N-acetylglucosamine มาตรฐาน.....	96
ง.2 กราฟน้ำตาล N-acetylglucosamine.....	97
จ.1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเวลาที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่างๆ.....	98
จ.2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเวลาที่อุณหภูมิ ต่างๆ.....	99
จ.3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 585 นาโนเมตร และเวลา ที่เกิดปฏิกิริยาในระดับความเข้มข้นของสับสเตรทต่างๆ.....	100

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

HA	คือ กรดไฮยาลูโรนิก (Hyaluronic acid)
HAase	คือ เอนไซม์ไฮยาลูโรนิกเดส
IPTG	คือ Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
k	คือ ค่าคงที่ของปฏิกิริยา
K_m	คือ ค่าคงที่ของ Michaelis-Menten (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
PCR	คือ ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction)
rpm	คือ รอบต่อนาที (round per minute)
SDS-PAGE	คือ sodiumdodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
t	คือ เวลา (นาที)
T	คือ อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
V	คือ ความเร็วของปฏิกิริยา (ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร นาที)
V_{max}	คือ ความเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา (ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร นาที)
K	คือ สัมประสิทธิ์การกระจายตัวที่ภาวะสมดุล
[E]	คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์
$[E_0]$	คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ทั้งหมด (ผลรวมความเข้มข้นของเอนไซม์ และ ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่จับกับซับสเตรท)
[S]	คือ ความเข้มข้นของซับสเตรท
[ES]	คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่จับกับซับสเตรท
[P]	คือ ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์
$[E_0] - [ES]$	คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันเอนไซม์จากพืช และจุลินทรีย์ ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอย่างแพร่หลาย โดยเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์ จะถูกนำมาสกัดให้บริสุทธิ์ และพัฒนาเพื่อนำมาใช้ในการแพทย์ การเกษตร และเวชสำอาง เช่น ครีม โลชั่นหรือใช้รักษาโรคต่างๆ อย่างไรก็ตามพบว่า ปัจจุบันคนใส่ใจดูแลตัวเองมากขึ้น โดยเฉพาะผิวพรรณ เนื่องจากได้รับผลกระทบจาก มลภาวะจากสิ่งแวดล้อมที่มีปัญหา ส่งผลให้เกิดโรคผิวหนังได้ง่าย เช่น acne หรือเนื้องอก รวมทั้งการเสื่อมของเซลล์ทำให้เกิดริ้วรอย และเปลี่ยนแปลงตามอายุ การเสื่อมของผิวหนังจากปัจจัยภายนอก ได้แก่ แสงแดดหรือการสูบบุหรี่ ส่งผลต่อความยืดหยุ่นลดลง ผิวหนังบางลง สีผิวไม่สม่ำเสมอ ความหยابของผิว และรอยย่นเพิ่มมากขึ้น จากเหตุผลข้างต้น ทำให้ มีการพัฒนาสารหรือเอนไซม์ชนิดใหม่ๆ เพื่อมาทดแทน และตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค โดยในงานวิจัยนี้ได้มุ่งเน้นที่จะศึกษาถึงการผลิตเอนไซม์ไฮยาลูโรนิค ซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อยกรดไฮยาลูโรนิก ให้มีขนาดโมเลกุลเหมาะสม สำหรับใช้เป็นสารเติมเต็มในชั้นผิว เพื่อลดรอยเหี่ยวย่น อีกทั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิคยังมีคุณสมบัติย่อยกรดไฮยาลูโรนิกซึ่งเป็นองค์ประกอบของ เนื้องอก และเซลล์มะเร็ง

กรดไฮยาลูโรนิก (hyaluronic acid) เป็นไกลโคสะมิโนไกลแคน (glycosaminoglycan, GAG) สายตรง มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ประกอบด้วยน้ำตาล 2 ชนิด คือ β (1, 3)-glucuronic acid และ β (1, 4)-N-acetylglucosamine เรียงตัวสลับกัน กรดไฮยาลูโรนิก มีมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ในร่างกายนบริเวณผิวหนังชั้นล่าง (dermis) และกระจายไปถึงผิวหนังชั้นบน (epidermis) ทั่วไปตามร่างกาย โดยเฉพาะบริเวณจุดเชื่อมต่อระหว่างอวัยวะ และเซลล์ เพื่อเพิ่มความต้านทานต่อการเสียดสี และเพิ่มความยืดหยุ่น โดยคุณสมบัติที่น่าสนใจอีกประการ คือ สารนี้มีหมู่ฟังก์ชันจำพวก carboxyl และ N-acetyl ที่มีขั้วอยู่ในปริมาณสูงเมื่อละลายในน้ำ ทำให้สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลของน้ำได้ จึงมีความสามารถดูดเก็บน้ำได้ดี ช่วยให้ผิวหนังสามารถเก็บกักความชุ่มชื้นได้มากกว่าปกติหลายเท่า แต่ร่างกายจะลดปริมาณการผลิตอย่างรวดเร็วเมื่อมีอายุสูงขึ้น จึงต้องรับกรดชนิดนี้เพิ่มเติม แต่อีกกรณีหนึ่งคือปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกจะถูกกระตุ้นให้เพิ่มปริมาณมากกว่ากรณีปกติเมื่อเกิดเนื้องอก (Lokeshwar และ คณะ, 1996; Victor และ คณะ, 1997; Stern, 2004) ซึ่งทำให้เกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenic) เกิดการเรียงตัวใหม่ของชั้นคอลลาเจน (collagen deposition) ได้ชั้นผิวและการสร้างเนื้อเยื่อแกรนูเลชัน (granulation tissue formation) (Rooney และ คณะ, 1989; West และ Kumar, 1989) และส่งผลต่อเนื่องในการกระตุ้นเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งเต้านม

มะเร็งในกระเพาะปัสสาวะ และมะเร็งชนิดอื่นๆ (Hautmann และคณะ, 2000; Setala และคณะ, 1999; Auvinen และคณะ, 2000; Pirinen และคณะ, 2001; Knudson, 1996)

อุตสาหกรรมเครื่องสำอางนิยมนำกรดไฮยาลูโรนิกมาทำเป็นสารเติมร่องลึกบนผิวหนังหรือใช้เป็นสารให้ความชุ่มชื้นในครีมบำรุงผิวต่างๆอย่างแพร่หลาย แต่เนื่องจากกรดไฮยาลูโรนิก มีน้ำหนักโมเลกุลสูง และความหนืดมาก ทำให้การนำมาประยุกต์ใช้ไม่ค่อยมีประสิทธิภาพมากนัก ดังนั้นจึงมีการพัฒนานาโนเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส มาช่วยย่อยกรดไฮยาลูโรนิก ให้มีน้ำหนักโมเลกุล และความหนืดลดลง เพื่อความเหมาะสมกับการใช้งาน อีกทั้งยังนำเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ คือ ช่วยรักษาอาการบาดเจ็บของเซลล์ผิวหนังได้เร็วกว่าเดิม 80% มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้องอกซึ่งเป็นองค์ประกอบของกรดไฮยาลูโรนิก โดยเอนไซม์ชนิดนี้อยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ Lysosomal ที่สามารถย่อยสลายสารพวก acidic mucopolysaccharides เช่น กรดไฮยาลูโรนิก ที่อยู่ในของเหลวในร่างกาย เนื้อเยื่อ และ extracellular matrix ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง โดยจุลินทรีย์ชนิด *Streptococcus pyogenes* มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ในปริมาณสูง มีคุณภาพดีและสามารถควบคุมสภาวะในการเพาะเลี้ยงได้ โดยขับสารสำคัญออกจากตัวเซลล์ แต่เนื่องจาก *Streptococcus* เป็นจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค และผลิตสารพิษสารฮีโมไลซินที่สามารถย่อยเม็ดเลือดแดงในร่างกายคนได้ จึงต้องผ่านกระบวนการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์อย่างเข้มงวด จึงไม่เหมาะสมในการผลิตระดับอุตสาหกรรม

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะพัฒนาการผลิตเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส โดยทำการโคลนยีนที่ผลิตเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส จากเชื้อ *Streptococcus pyogenes* ATCC 6550 ให้กับ pQE80-L expression vector cell JM109 แทรกเข้าไปผสมกับ pQE80-L expression vector cell JM109 และ BL21 สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค เพราะสามารถเพาะเลี้ยงได้ง่ายในสภาวะที่ไม่ซับซ้อน ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้งานวิจัยยังทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ กิจกรรมของเอนไซม์ และค่าจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ที่ผลิตได้ เพื่อเป็นแนวทางสู่การพัฒนากระบวนการผลิตเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ในด้านการแพทย์และเวชสำอางค์ให้แก่ประเทศต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 ศึกษาการผลิตรีคอมบิแนนท์ไฮยาลูโรนิเดส ด้วยวิธีการโคลนยีนที่ผลิตเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสจากเชื้อจุลินทรีย์ *E.coli* JM109 ที่มีพลาสมิด pGE80L-hyalA

1.2.2 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต การทำงาน และค่าทางจลนพลศาสตร์ของสารละลายเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสจากเชื้อจุลินทรีย์ *E.coli* JM109 ที่มีพลาสมิด pGE80L-hyalA ที่ไม่ทำให้บริสุทธิ์

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 ศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์ *Escherichia coli* เพื่อผลิตเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ด้วยวิธีโคลนยีนที่ผลิตเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส จากเชื้อ *Streptococcus pyogenes* เข้าไปใน pQE80-L expression vector cell JM109 และ BL21

1.3.2 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารละลายเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส จากเชื้อจุลินทรีย์ *E.coli* JM109 ที่มีพลาสมิด pGE80L-hyalA เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง อัตราการเขย่า และช่วงเวลาการผลิต

1.3.2.1 ช่วงเวลาในการผลิต 0-24 ชั่วโมง

1.3.2.2 อัตราการเขย่า 0-250 รอบต่อนาที

1.3.2.3 อุณหภูมิในการบ่ม 25-50 องศาเซลเซียส

1.3.2.4 ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ 4-9

1.3.3 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของสารละลายเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่ไม่ทำให้บริสุทธิ์ในสถานะต่างๆ เช่น อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรด-ด่าง

1.3.3.1 ค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายบัฟเฟอร์ 3 ถึง 8

1.3.3.2 อุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยาที่ 25 ถึง 50 องศาเซลเซียส

1.3.4 คำนวณค่าทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้สายพันธุ์ *Escherichia coli* ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส จากการปรับปรุงสายพันธุ์

1.4.2 ได้ข้อมูลสถานะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตและการทำงานของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสจากเชื้อจุลินทรีย์ *E.coli* JM109 ที่มีพลาสมิด pGE80L-hyalA

1.4.3 ได้ข้อมูลที่สามารถใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงสายพันธุ์ *Escherichia coli* โดยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กรดไฮยาลูโรนิก (Hyaluronic acid)

กรดไฮยาลูโรนิก (Hyaluronic acid) ถูกค้นพบครั้งแรกในปี 1934 จากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันบริเวณตาขาว (Meyer และPalmer, 1934; Weigel และคณะ, 1997) มีลักษณะเป็นของเหลวไม่มีสี มีความหนืดสูง เป็นสารอินทรีย์ประเภท เฮเทอโรโพลีแซคคาไรด์ (heteropolysaccharides) ในกลุ่มไกลโคอะมิโนไกลแคน (glycoaminoglycan) หรือมิวโคโพลีแซคคาไรด์ (mucopolysaccharide) ซึ่งโพลีแซคคาไรด์ในกลุ่มนี้มีความสำคัญอย่างมากในสิ่งมีชีวิต (Meyer, 1971)

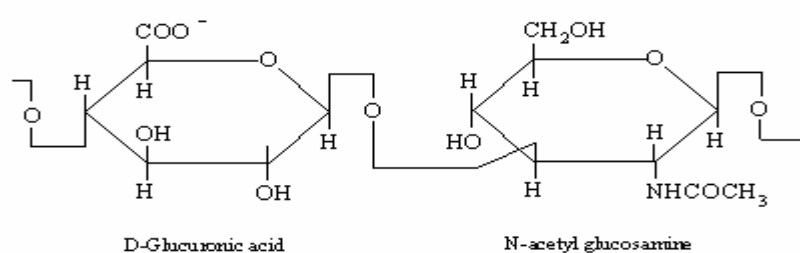
กรดไฮยาลูโรนิกเป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อในร่างกายบริเวณผิวหนังชั้นล่าง และผิวหนังชั้นบน โดยเฉพาะบริเวณจุดเชื่อมต่อระหว่างอวัยวะและเซลล์ เพื่อเพิ่มความต้านทานต่อการเสียดสี เพิ่มความยืดหยุ่น ช่วยดูดซับแรงกด และแรงกระแทก รวมทั้งป้องกันเซลล์จากสิ่งแวดล้อม (Nimrod และคณะ, 1988) ซึ่งนอกจากร่างกายมนุษย์แล้วยังพบ กรดไฮยาลูโรนิกในเนื้อเยื่อชนิดต่างๆของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น สายรก ตา น้ำไขข้อ และหงอนไก่ (Hascall และLaurent, 1997)

โดยบริเวณผิวหนัง และกระดูกอ่อน กรดไฮยาลูโรนิกมีหน้าที่จับน้ำ และโปรตีนหรือมิวโคโพลีแซคคาไรด์อื่น เพื่อความยืดหยุ่นของเนื้อเยื่อ โดยเฉพาะบริเวณน้ำไขข้อนั้นมีหน้าที่เป็นสารหล่อลื่นในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม อีกทั้งยังยับยั้งการเพิ่มจำนวนของลิมโฟไซต์ และแมคโคฟาจ เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาการต่อต้านเซลล์ปลูกถ่าย อีกทั้งยังกระตุ้นการรวมตัวของเซลล์ลิมโฟมา (lymphoma cell) (Main, 1986)

กรดไฮยาลูโรนิกมีหมู่ฟังก์ชันประเภท carboxyl และN-acetyl ที่มีค่าปริมาณสูง ซึ่งเมื่อละลายน้ำจะสร้างพันธะไฮโดรเจน จึงสามารถดูดเก็บน้ำและความชื้นได้ดี อีกทั้งยังมีความยืดหยุ่น จึงมีการนำกรดไฮยาลูโรนิก มาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ และอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เช่น ใช้ในการรักษาผ่าตัดดวงตา เป็นส่วนประกอบในยาหยอดตา (Balazs และ Band, 1984) ใช้รักษาโรคเกี่ยวกับข้อต่อกระดูก ใช้รักษาบาดแผล (wound healing) ใช้ตรวจหาแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ streptococcus hyaluronidase ในซีรัมมนุษย์ และส่วนประกอบที่สำคัญในการให้ความชุ่มชื้นแก่ผิวหนังในครีมบำรุงผิวหน้า โดยกรดไฮยาลูโรนิก ที่นำมาใช้จะมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันตามแหล่งที่มา เช่น น้ำหนักโมเลกุล 55 กิโลดาลตันจากเชื้อจุลินทรีย์ *Streptococcus pyogenes* น้ำหนักโมเลกุล 57 ถึง 1,300 กิโลดาลตัน จากน้ำไขข้อ น้ำหนักโมเลกุล 3,000 ถึง 4,000 กิโลดาลตัน จากรกของทารก (Laurent และGergery, 1955) น้ำหนักโมเลกุล 77 ถึง 1,700 กิโลดาลตัน จากวุ้นของตาขาว (Laurent และคณะ, 1966)

2.2 โครงสร้างและคุณสมบัติของกรดไฮยาลูโรนิก

กรดไฮยาลูโรนิก เป็นโพลีแซคคาไรด์ในกลุ่มไกลโคอะมิโนไกลแคน (glycosaminoglycans) (GAG) ที่มีสูตรโครงสร้างทางเคมีคือ $(C_{14}H_{21}NO_{11})_n$ โดย n มีค่าตั้งแต่ 20 ถึง 25,000 ขึ้นอยู่กับแหล่งของเนื้อเยื่อสกัดได้ วิธีการตรวจวัด และวิธีการสกัด (Brown และคณะ, 1994; Laurent, 1966) โครงสร้างของกรดไฮยาลูโรนิก เป็นโพลิเมอร์สายตรงที่ประกอบไปด้วยหน่วยย่อยของ ไดแซคคาไรด์ คือ เอ็น-อะซีทิล-ดี-กลูโคซามีน (N-acetyl-D-glucosamine) และดี-กลูคูโรนิกแอซิด (D-glucuronic acid) ประกอบไปด้วย กลุ่ม hydroxyl groups กลุ่ม carboxylate (ภาพที่ 2.1)



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของกรดไฮยาลูโรนิก (Chong และBlank, 2012)

จากภาพที่ 2.1 น้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ทั้งสองชนิดภายในหน่วยย่อยไดแซคคาไรด์จะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,4 glycosidic bond ระหว่างคาร์บอนอะตอมที่ 1 ของ N-acetyl-D-glucosamine กับคาร์บอนอะตอมที่ 4 ของ D-glucuronic acid และหน่วยย่อยของน้ำตาลไดแซคคาไรด์จะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,3 glycosidic bond ระหว่างคาร์บอนอะตอมที่ 1 ของ D-glucuronic acid กับคาร์บอนอะตอมที่ 3 ของ N-acetyl-D-glucosamine แตกต่างจากไกลโคอะมิโนไกลแคนตัวอื่นๆ ตรงที่มีพันธะโควาเลนต์ จับกับโปรตีน (Chong และBlank, 2001) โครงสร้างมีลักษณะเกี่ยวพันเป็นร่างแหอย่างเสถียร สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับน้ำได้ ซึ่งเมื่อส่องกล้องจุลทรรศน์พบว่ากรดไฮยาลูโรนิกสามารถจับตัวกับน้ำได้ลักษณะคล้ายรังผึ้ง (Csoka และคณะ, 1997) จึงส่งผลดีในการกักเก็บน้ำ และเพิ่มความยืดหยุ่น โดยพบว่า กรดไฮยาลูโรนิก 1 กรัมสามารถดูดน้ำได้ถึง 1 ลิตร (Laurent, 1970) แต่มีปัญหาเรื่องความหนืด และขนาดโมเลกุลขนาดใหญ่ จึงส่งผลเสียต่อการกระจายตัวของกรดไฮยาลูโรนิก อีกทั้งกรดไฮยาลูโรนิกจะถูกกระตุ้นให้เพิ่มปริมาณมากกว่าการปกติเมื่อ เกิดเนื้องอก (Lokeshwar และ คณะ, 1985; Victor และคณะ, 1997; Stern, 2004) ซึ่งทำให้เกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenic) เกิดการเรียงตัวของชั้นคอลลาเจน (collagen deposition) ได้ชั้นผิวและการสร้างเนื้อเยื่อแกรนูเลชัน (granulation tissue formation) (Rooney และคณะ, 1995; West และKumar, 1989) และส่งผลต่อเนื่องในการกระตุ้นเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งเต้านม มะเร็งในกระเพาะปัสสาวะ และมะเร็งชนิดอื่นๆ

(Hautmann และคณะ, 2000; Setala และคณะ, 1999; Auvinen และคณะ, 2000; Pirinen และคณะ, 2001; Knudson, 1996)

โดยทั่วไปกรดไฮยาลูโรนิก พบได้ในธรรมชาติอยู่ในรูปของเกลือโซเดียม.คือ โซเดียมไฮยาลูโรเนต และพบบ้างในรูปของเกลือโพแทสเซียมไฮยาลูโรเนต (Nimrod และคณะ, 1988; Brown และ คณะ, 1994; Ellwood และคณะ, 1995; Fujii และคณะ, 1996)

2.3 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

กรดไฮยาลูโรนิกเป็นองค์ประกอบภายใต้ชั้นผิวของมนุษย์มากกว่า 50% ในร่างกาย (Hascall และLaurent, 1997) อีกทั้งยังสามารถ ผลิตได้จากทั้งเซลล์ของเนื้อเยื่อสัตว์ และ เชื้อจุลินทรีย์ จึงได้มีการศึกษาคิดค้นวิธีการในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก ที่เหมาะสมกับแต่ละแหล่ง ผลิต

2.3.1 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดยการสกัดจากเซลล์ของสิ่งมีชีวิต

กรดไฮยาลูโรนิก เป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อสัตว์ โดยแหล่งที่มีรายงานว่าตรวจพบสาร สกัดกรดไฮยาลูโรนิก เช่น หงอนไก่ (rooster comb) ปริมาณมากกว่า 7.5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำจาก ไชกระดูก (synovial fluid) เซลล์เยื่อบุผิวหนัง (epithelial cell) น้ำไขข้อวัว (bovine synovial fluid) กระดูกอ่อนของวัว (bovine articular cartilages) สายสะดือ (umbilicalcord) และเยื่อ เมื่อบริเวณดวงตา (vitreous body) ประมาณ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร (Cifonelli และMayeda, 1957; Radin และคณะ, 1970; Hascall และLaurent, 1997) กรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากเนื้อเยื่อของสัตว์ จะมีน้ำหนักโมเลกุลสูง และมีสายของน้ำตาลไคแซคคาไรด์ที่ยาวกว่าจากวิธีการอื่น นอกจากนี้ยัง ประกอบไปด้วยโปรตีน และโพลีแซคคาไรด์ชนิดอื่นปนเปื้อน ทำให้กรดไฮยาลูโรนิกที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์ เพียงพอต่อการนำไปใช้ จึงต้องผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ที่มีความยุ่งยากและซับซ้อน

2.3.2 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกจากกระบวนการหมักโดยเชื้อจุลินทรีย์

กรดไฮยาลูโรนิก และไฮยาลูโรนิเดสผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์แกรมบวก โดยเฉพาะ จากเชื้อ *Streptococcus* ถูกค้นพบครั้งแรกโดย (Kendall และคณะ, 1937) โดยสามารถแบ่งกลุ่มของ เชื้อจุลินทรีย์ *Streptococcus* ตามปฏิกิริยาในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (haemolytic reaction) ได้ 3 กลุ่ม (Collin และคณะ, 1989) คือ

1. Gamma-haemolytic *Streptococci* (γ -haemolytic *Streptococci*)

เมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหาร blood agar (BA) เชื้อที่ขึ้นจะไม่มีวงใสรอบ ๆ โคลินี่ เพราะว่ามี เชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ไม่สามารถทำลายเม็ดเลือดแดงได้

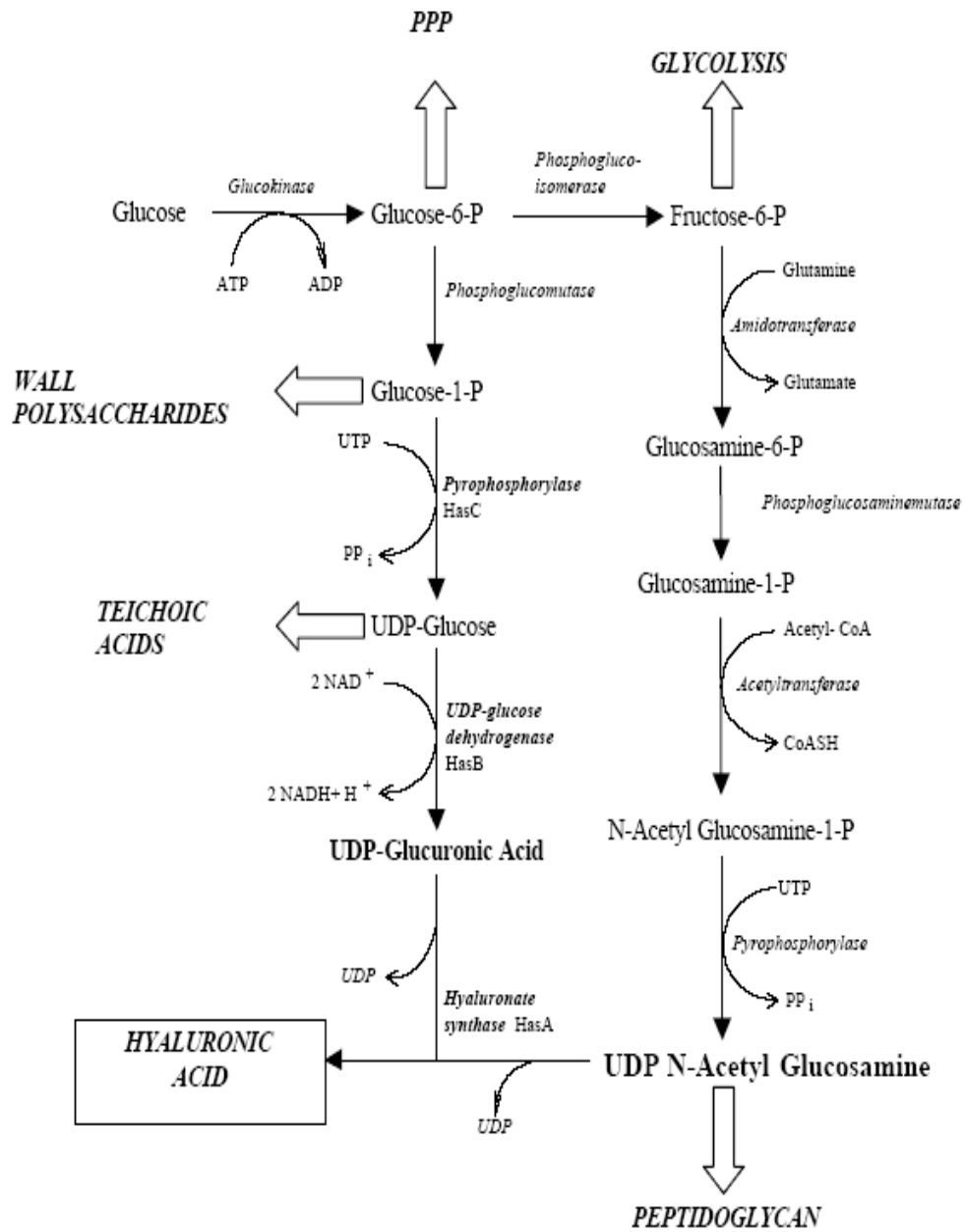
2. Alpha-haemolytic *Streptococci* (α -haemolytic Streptococci)

เชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ สามารถทำลายเม็ดเลือดแดงได้แต่ไม่สมบูรณ์ ดังนั้นเมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหาร blood agar (BA) เชื้อที่ขึ้นจะสังเกตเห็นสีน้ำตาลหรือสีเขียวรอบๆ โคลนินของเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจาก ธาตุเหล็กในฮีโมโกลบินจะ ถูกออกซิไดซ์ เชื้อจุลินทรีย์ ในกลุ่มนี้ ได้แก่ *S. pneumoniae*, *S. salivarius*, *S. viridans* และ *L. garvieae* (Eldar และคณะ, 1999)

3. Beta-haemolytic *Streptococci* (β -haemolytic Streptococci)

เชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้สามารถทำลายเม็ดเลือดแดงได้อย่างสมบูรณ์ โดยรอบ ๆ โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar มีขอบใสอย่างชัดเจน เชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ *S. agalactiae*, *S. equisimilis*, *S. milleri*, *S. pyogenes* (Stokes และ Ridgwar, 1987), *S. iniae* และ *S. dysgalactiae* (Nomoto และคณะ, 2004)

โดยเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ *Streptococcus* มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.6-1.0 ไมครอน เป็นเชื้อจุลินทรีย์ชนิด facultative anaerobes จัดเรียงตัวเป็นคู่ สายสั้นๆ เป็นเชื้อแกรมบวก (Gram positive) ย้อมติดสีม่วง ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ และไม่สร้างสปอร์ (Joklik และคณะ, 1980) ในสายพันธุ์ที่สร้างแคปซูล โคลนินจะมีลักษณะเป็นเมือก เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 20-42 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือผสมอยู่ 6.5 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเป็นกรดต่าง 9.6 ในอาหารที่มีเลือด โดยไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส อีกทั้งเชื้อจุลินทรีย์ *Streptococcus* ยังได้แหล่งพลังงานจากการย่อยน้ำตาล ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้มีสมบัติเหมือนกรดไฮยาลูโรนิกจากเนื้อเยื่อในร่างกาย (Jawetz และคณะ, 1998) กระบวนการหมักที่ได้รับการปรับปรุง และพัฒนาอย่างมาก เนื่องจากเป็นวิธีการที่ให้ผลผลิตสูง ใช้ระยะเวลาในการหมักสั้น ควบคุมสภาวะที่เหมาะสมในระหว่างการหมักได้ และใช้ต้นทุนในการผลิตต่ำ อีกทั้งยังไม่พบปัญหาการปนเปื้อนจากไกลโคอะมิโนไกลแคนชนิดอื่นโดยขั้นตอนการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกเมื่อศึกษาในระดับโมเลกุล พบว่าการสร้างกรดไฮยาลูโรนิก จะถูกควบคุมโดย *has* operon ซึ่งประกอบด้วยยีน (gene) ทั้งหมด 3 ยีน คือ *hasA* (hyaluronic acid synthase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในการนำ UDP-N-acetyl-D-glucosamine และ UDP-D-glucuronic acid มาสร้างกรดไฮยาลูโรนิก *hasB* (UDP-glucose dehydrogenase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในการเปลี่ยน UDP-glucose เป็น UDP-glucuronic acid และ *hasC* (UDP-N-acetyl-D-glucosamine pyrophosphorylase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนกลูโคส-1-ฟอสเฟต และ UTP ไปเป็น UDP-glucose และ PPI (Crater และ Rijn, 1995; Crater และคณะ, 1995; Dougherty และ Van de Rijn, 1993) อีกทั้งกระบวนการผลิตยังมีเอนไซม์ไฮยาลูโรนิตเนสผลิตควบคู่ออกมาด้วยแสดงในภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2 กลไกการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกโดย *S. zooepidemicus*

การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกจากเชื้อจุลินทรีย์จึงมีข้อดีกว่า วิธีการสกัดจากเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิต แต่เนื่องด้วยความหลากหลายของเชื้อ *Streptococcus* จึงต้องเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตกรดไฮยาลูโรนิก และเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสได้ ทนทาน ไม่กลายพันธุ์ง่าย และไม่เป็นพิษต่อมนุษย์อีกด้วย คุณสมบัติของสายพันธุ์ต่างๆแสดงดังตารางที่ 2.1 โดยชนิดที่นิยมนำมาวิจัยเพราะมีคุณสมบัติเหมือนกับกรดไฮยาลูโรนิกที่แยกได้จากเนื้อเยื่อต่างๆของร่างกาย (Kendali และคณะ, 1937) คือ *Streptococcus* กลุ่ม A และ C (Nimrod และคณะ, 1986; Swann และคณะ, 1990; Regan และคณะ, 1994) ที่มีความใกล้เคียงกัน เนื่องจากสามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้ปริมาณมาก แต่เชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม *Streptococcus* กลุ่ม A และ C มีโปรตีนที่ผนังเซลล์สามารถเกาะติดกับเซลล์เจ้าบ้านได้ดี มีแคปซูลห่อหุ้มเซลล์ซึ่งช่วยป้องกันการทำลายจากเม็ดเลือดขาว สร้างความทนทานในสภาพที่มีออกซิเจนจึงไม่มีการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ (Cleary และ Larkin, 1979) และยังผลิตสารสเตปโตไลซิน ซึ่งส่งผลให้เม็ดเลือดแดงแตกตัว

ตารางที่ 2.1 ตารางแสดงสมบัติและตำแหน่งแอนติเจนของ *Streptococcus* (นิภาพร, 2542)

กลุ่ม	กลุ่มแอนติเจน		ประเภทของแอนติเจน		
	โครงสร้างเคมี	ตำแหน่งในเซลล์	โครงสร้างเคมี	ตำแหน่งในเซลล์	สปีชีส์
A	Rhamnose-N-acetyl-glucosamine polysaccharide	ผนังเซลล์	Protein	Envelope	<i>S.pyogene</i>
B	Rhamnoseglucosamine polysaccharide	ผนังเซลล์	Glucose-galactose-N-acetyl-glucosamine polysaccharide	Envelope	<i>S.agalactiae</i>
C	Rhamnose-N-acetyl-glucosamone polysaccharide	ผนังเซลล์	Protein	Envelope	<i>S.equisimilis</i> <i>S.zooepidemicus</i> <i>S.equi</i> <i>S.dysgalactise</i>
D	Glycerol trichoic acid containing D-alanine and glucose	ภายในเซลล์ระหว่างผนังเซลล์ และเมมเบรน	Rhamnose-glucose-amine-glucose polysaccharide	ผนังเซลล์	<i>S.faecalis</i>

กลุ่ม	กลุ่มแอนติเจน		ประเภทของแอนติเจน		
	โครงสร้างเคมี	ตำแหน่งในเซลล์	โครงสร้างเคมี	ตำแหน่งในเซลล์	สปีชีส์
E	Rhamnose polysaccharide	ผนังเซลล์	polysaccharide	-	<i>Streptococcus sp.</i>
F	Rhamnose and a glucopyranosyl-N-actyl-galactosamine	ผนังเซลล์	Carbohydrates-some types contain glucose and rhamnose	-	<i>S.anginosus</i>
G	Rhamnose-glucosamine polysaccharide	ผนังเซลล์	-	-	<i>Streptococcus sp.</i> (large colony)
H	Rhamnose polysaccharide	ผนังเซลล์	-	-	<i>S.sanguis</i>

2.4 เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (Hyaluronidase)

กระบวนการย่อยกรดไฮยาลูโรนิกด้วยเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสค้นพบครั้งแรกในอสุจิมนุษย์ โดย (Gmachl และคณะ, 1993) โดยพิจารณาจากคุณสมบัติการฝังตัว ในชั้นเซลล์ คุมูลัสซึ่งเป็นส่วนของไข่ในมดลูก (Cherr และคณะ, 2001) ไฮยาลูโรนิเดสมีองค์ประกอบของธาตุเหล็ก คอปเปอร์ กลีโอสองอะตอม ฮาปาริน โพลีฟีนอล และฟลาโวนอยด์ (Haas, 1946; Dorfman และคณะ, 1948; Meyer และRapport, 1951) สามารถดองการอักเสบ ยับยั้งเนื้องอก มีคุณสมบัติในการควบคุมปริมาณเซลล์มะเร็ง โดยผ่านการทดสอบกับผู้ป่วยเนื้องอกที่ปอดจากสาเหตุของยาสูบ และใช้เป็น ส่วนผสมของสารเคมีบำบัดโรคมะเร็ง (Noble, 2002) อีกทั้งยังถูกนำไปใช้ทางการแพทย์ เช่นนำไป ศัลยกรรมทางจักษุวิทยา โรคผิวหนังช่วยในการผลิตเซลล์ผิว การสร้างเนื้อเยื่อใหม่ (Poelstra และ คณะ, 1997; Farr และคณะ, 1997; Menzel และFarr, 1998) และเมื่อพิจารณาได้ด้านเวชสำอาง พบว่าสามารถใช้เป็นสารย่อยกรดไฮยาลูโรนิก ในกรณีที่ต้องการแก้ไขรูปร่างหรือสลาย กรดไฮยาลูโรนิกที่ฉีดเข้าไปก่อนหน้านี้ได้ โดยเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่ได้จากสิ่งมีชีวิตเพื่อนำมาใช้ในทาง อุตสาหกรรมเคมีภัณฑ์ และทางการแพทย์ จะมีการตัด N-acetylhexosaminidic ทำให้ได้ สารโอลิโกแซคคาร์ไรด์กับ N-acetylglucosamine หลังจากกระบวนการย่อยเสร็จสิ้นจะได้ เตตระแซคคาร์ไรด์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ตามมาด้วยเฮกซะแซคคาร์ไรด์ และโอลิโกแซคคาร์ไรด์โมเลกุลสูง ปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

2.4.1 กลุ่มของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส

เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส แบ่งเป็นกลุ่มตามหลักกลไกการเกิดปฏิกิริยาย่อยสลาย กรดไฮยาลูโรนิกที่แตกต่างกันได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ (Menzel และFarr, 1998)

2.4.1.1 Testicular-type hyaluronidase (hyaluronoglucosaminidase; hyaluronate 4-glycanohydrolase)

เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่อยู่ในกลุ่มนี้ จะทำการตัดพันธะไกลโคซิดิกของ β -N-acetylglucosamine (1 \rightarrow 4) ในกรดไฮยาลูโรนิกแบบสุ่มไปเรื่อยๆ และพบว่าน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่ได้คือ 61 kDa ซึ่งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสของโลโซไซม์ต้นกำเนิดมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 81-89 kDa

2.4.1.2 Leech hyaluronidase (hyaluronate glycanohydrolase)

เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่อยู่ในกลุ่มนี้ผลิตได้จากสัตว์จำพวกปลิงหรือทาก เมื่อนำไปย่อย กรดไฮยาลูโรนิกจะได้ผลผลิตเฉพาะเป็น tetrasaccharides และhexasaccharides เท่านั้น เนื่องจาก เอนไซม์จะมีความจำเพาะกับสาย glucuronidic ของกรดไฮยาลูโรนิกเท่านั้น และไม่ตัดสายโพลีแซคคาร์ไรด์ชนิดอื่น

2.4.1.3. Bacterial hyaluronidase (hyaluronate lyase)

เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่อยู่ในกลุ่มนี้ผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม *Streptomyces* เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ จะทำการตัดพันธะไกลโคซิดิกของ β -GlcNAc-(1, 4) ทำให้ได้ผลผลิตคือ 4, 5-unsaturated tetrasaccharides และ hexasaccharides จากการศึกษาวิจัยพบว่า เอนไซม์ที่ได้จากเชื้อจุลินทรีย์ *Streptococcus* กลุ่ม A จะทำการตัดห่วงโซ่คอนดรอยตินซัลเฟตออกไปดีที่สุด แต่ปัญหาที่เกิดขึ้นในการผลิตไฮยาลูโรนิเดสจากเชื้อจุลินทรีย์ *Streptococcus* คือสารสเตปโตไลซิน ซึ่งส่งผลให้เม็ดเลือดแดงแตกตัว จึงต้องนำเอาเทคโนโลยีทางด้านพันธุวิศวกรรมมาใช้เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีคุณสมบัติตามต้องการ โดยการโคลนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* ชนิดที่เข้ากับเชื้อ *Streptococcus* ได้ดี และยังคงทนทาน ไม่ก่อโรคต่อคน

2.5 การปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อการผลิตเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส

การปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์มีความสำคัญในการ แก้ไขข้อบกพร่อง เพิ่มผลผลิตและเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ โดยวิธีการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์แบ่งได้ 3 วิธีคือ (Baltz ,1986)

1.การกลายพันธุ์ เป็นเทคนิคที่เกิดการกลายพันธุ์ที่สามารถเลือกเกิดได้ตามธรรมชาติหรือการชักนำให้เกิดอัตราการกลายพันธุ์ที่สูงกว่า เป็นวิธีที่สะดวก และราคาถูก แต่ไม่มีความแน่นอนของสายพันธุ์

2.Gene cloning เป็นเทคนิคที่ซับซ้อนทำโดยการเปลี่ยนแปลงที่บริเวณที่เกาะของไรโบโซมหรือยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ แต่เป็นวิธีที่ซับซ้อนและราคาแพง

3.Genetic recombination เป็นเทคนิคที่อาศัยความรู้พื้นฐานด้านสรีรวิทยาของเชื้อเพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ ให้จุลินทรีย์เกิดยีนใหม่ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น รวมทั้ง ให้ผลผลิตปริมาณสูง ขั้นตอนการปฏิบัติเริ่มต้นโดยกระบวนการที่ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของยีนโดยอาศัยการเพิ่มจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ที่มียีนหรือดีเอ็นเอพาหะนั้นๆ โดยการโคลนต้องทำการตัดโมเลกุลดีเอ็นเอให้มีขนาดตามต้องการและเพิ่มจำนวน โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) โดยปริมาณดีเอ็นเอในแต่ละรอบของปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลักของการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในเครื่อง thermocycle ที่วนรอบประมาณ 40 รอบ คือ ทำการนำสายดีเอ็นเอเข้าเวคเตอร์ที่มียาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันเชื้อโรคอื่นๆเจริญเติบโต และนำเข้าสู่ภายในเซลล์เชื้อจุลินทรีย์ด้วยสารเคมี เช่น K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} หรือ dimethylsulfoxide (DMSO) และกระตุ้นให้เกิดสภาวะการซึมผ่านเข้าออกของเยื่อหุ้มเซลล์ และสายดีเอ็นเอจะแทรกเข้าสู่เซลล์เมื่อถูก (heat shock) ที่อุณหภูมิประมาณ 42 องศาเซลเซียส ทำให้เกิดเป็นโมเลกุลสายผสม โดยเพลาสמידที่นิยมใช้คือ *Escherichia coli* เนื่องจากมีลักษณะเป็นวงกลมเกลียวคู่ สามารถนำเข้าสู่สายดีเอ็นเอได้ง่าย และเชื้อที่นำมาโคลนไม่มีการ

เปลี่ยนแปลงโมเลกุลของ RNA ต่อจากนั้นจึงนำเอาเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านการตัดต่อพันธุกรรมไปเพิ่มจำนวนโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดแข็ง และเลือกเฉพาะกลุ่มของเซลล์ที่มี DNA ที่สนใจไปตรวจสอบขนาดพลาสมิดเทคนิคคือใช้โคโรโทรโฟไลซิสแล้วทำการเปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน เมื่อยืนยันได้แล้วว่าเชื้อที่ทำปรับปรับปรุงสายพันธุ์ไม่มีการกลายพันธุ์ จึงนำมาเพาะเลี้ยงต่อเพื่อเพิ่มปริมาณ และนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต การผลิตเอนไซม์ ขนาดเอนไซม์ที่ผลิตได้ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (SDS PAGE) และหากิจกรรมเอนไซม์ด้วยวิธี Morgan-Elson

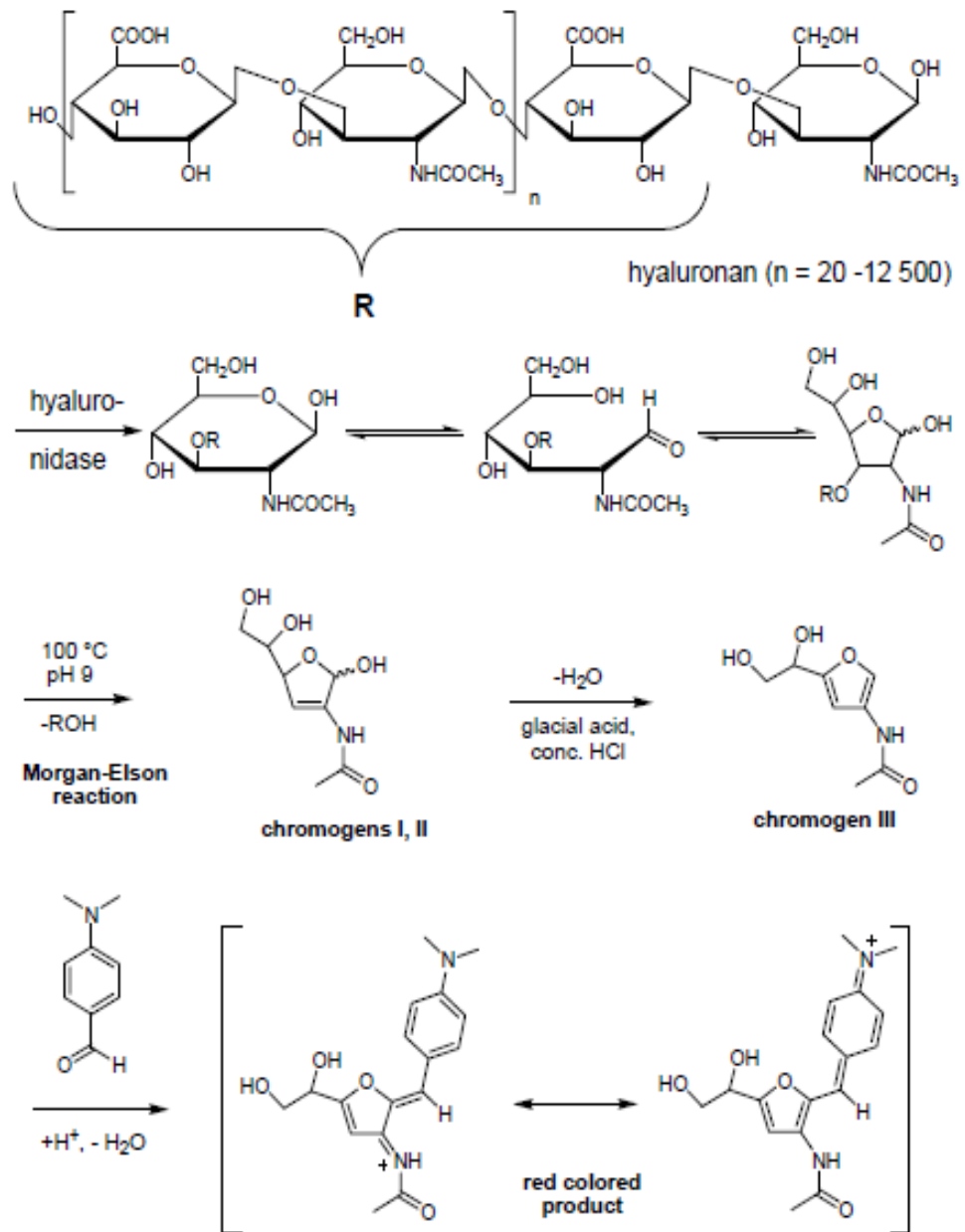
2.6. การวิเคราะห์ขนาดเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis)

วิธีการตรวจสอบขนาดเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสอาศัยสนามไฟฟ้าในการเคลื่อนที่เพื่อแยกเอนไซม์ผ่านเจลที่มีลักษณะเป็นร่างแห ของสาร N, N methylenebisacrylamide และacrylamide ตามน้ำหนักโมเลกุล เนื่องด้วยอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของโมเลกุลขึ้นกับขนาดของโมเลกุล โดยใช้สาร SDS-PAGE (sodiumdodecyl sulfate-polyacrylamide gel eletrophoresis) ซึ่งมีประจุลบสามารถจับกับพันธะไฮโดรเจนของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์เสียสภาพ คลายตัวเป็นเส้นตรง และทำให้เอนไซม์ทั้งหมดมีประจุลบ เมื่อเคลื่อนผ่านสนามไฟฟ้าจึงเคลื่อนที่หาประจุบวก และเมื่อเทียบผลการทดลองกับการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน ทำให้สามารถตรวจสอบขนาดของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสได้ โดยเมื่อพิจารณาขนาดโปรตีนจากเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสพบว่าขนาดมีความสอดคล้องกับค่ามวลโมเลกุลที่ได้จากการคำนวณ (calculated molecular mass) ดังสูตรการคำนวณต่อไปนี้

$$\text{มวลโมเลกุล} = \left(\frac{\text{ขนาดดีเอ็นเอ}}{3} \right) \times 110 \text{ (ขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน)} \quad (3.1)$$

2.7 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์สามารถตรวจสอบผลของการทำงานของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส จากวิธี Morgan-Elson ซึ่งใช้หลักการในการย่อยกรดไฮยาลูโรนิกซึ่งประกอบไปด้วยไกลโคสะมิโนไกลแคน ประกอบด้วยน้ำตาล 2 ชนิด β (1, 3)-glucuronic acid และ β (1, 4)-N-acetylglucosamine เรียงตัวสลับกัน ซึ่งเมื่อถูกเอนไซม์ย่อยจะได้โมเลกุลของน้ำตาล แล้วจึงทำการตรวจวัดปริมาณน้ำตาล NAG (Hynes และFerretti, 1994) ด้วยปฏิกิริยาดังภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.3 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากวิธี Morgan-Elson (Muckenschnabel และคณะ, 1998)

จากภาพที่ 2.3 ปฏิบัติการย่อยกรดไฮยาลูโรนิกด้วยเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส หยุดได้โดยการเติม โฟสเฟสซีเอ็มเตตระบอเรต และให้ความร้อน จากนั้นใส่ reagent colour ที่ประกอบด้วย ไตเมททิลอะมิโนเบนซอลดีไฮด์ กรดไฮโดรคลอริก และกรดน้ำส้ม จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งจะเกิดสีแดงขึ้นโดยความเข้มข้นของสีแสดงถึงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่น้อยได้จากกรดไฮยาลูโรนิกตรวจสอบความเข้มข้นได้โดยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักโดยเชื้อจุลินทรีย์

การผลิตเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสโดยเชื้อจุลินทรีย์ สามารถทำการปรับปรุงกระบวนการผลิตให้ดีขึ้นได้ โดยแปรเปลี่ยนปัจจัยต่างๆ ดังนี้ คือ

2.8.1 ชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้ในกระบวนการหมัก

การคัดเลือกเชื้อสำหรับการผลิตเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส มีคุณสมบัติต่างๆ ที่สำคัญหลายประการ เช่น มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในปริมาณสูง มีความเสถียรของสายพันธุ์ไม่ก่อให้เกิดโรคในสิ่งมีชีวิต และไม่ผลิตสารอื่นที่มีผลข้างเคียงที่ก่ออันตรายในการนำไปใช้ โดยสามารถใช้แหล่งคาร์บอน และแหล่งอาหารอื่น ๆ ได้หลายชนิด ทำการเก็บรักษาเชื้อได้ง่าย และสามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้ดี

2.8.2 สภาพที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสของเชื้อจุลินทรีย์

2.8.2.1 แหล่งคาร์บอน

จุลินทรีย์ในกลุ่ม *Streptococcus* จัดอยู่ในกลุ่ม Lactic acid bacteria จึงสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ โดยแหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้คือ กลูโคส ซูโครส กาแลคโตส และฟรุคโตส (Akasaka และคณะ, 1989)

2.8.2.2 แหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนได้หลายชนิด เช่น สารสกัดจากยีสต์ เปปโตน ทริปโตน แอมโมเนียมซัลเฟต ยูเรีย กลูตามีน เป็นต้น โดยต้องควบคุมชนิด และปริมาณไนโตรเจนให้เพียงพอสำหรับความต้องการของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ (Park และคณะ, 1996)

2.8.2.3 ฟอสเฟต

ฟอสเฟตมีความสำคัญในกระบวนการสร้างพลังงานของเซลล์ แหล่งฟอสเฟตที่ใช้ในกระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์จะอยู่ในรูปของเกลือชนิดต่างๆ เช่น โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ไฮโดรเจนฟอสเฟต และไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เป็นต้น

2.8.2.4 แร่ธาตุต่างๆ

แร่ธาตุชนิดต่างๆ มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญ และการสร้างเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส โดยเฉพาะอย่างยิ่งธาตุโลหะหมู่ 2 เช่น Mn^{2+} และ Mg^{2+} จะช่วยในการทำงานของเอนไซม์ hyaluronic acid synthase ให้มีความเสถียรเพราะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการจับของเอนไซม์กับสารตั้งต้น เช่นจากงานวิจัยของ (จุรารักษ์, 2540) ทำการเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 โดยการปรับสูตรอาหารด้วยการเพิ่มปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตพบว่า เชื้อให้ผลผลิตสูงขึ้นที่ความเข้มข้น 543 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.8.2.5 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

ค่าความเป็นกรด-ด่างเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ และเป็นสภาวะที่ต้องมีการควบคุมเพื่อให้เซลล์สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้ปริมาณมาก เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Streptococcus* จะพบได้ในเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต เจริญเติบโตได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเป็นกลาง และเนื่องด้วยมีการผลิตกรดและปล่อยออกสู่อากาศ จึงต้องเติมสารที่เป็นด่างเพื่อปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมเสมอ จากการศึกษาวิจัยของ (McLennan, 1956) พบว่าเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสของเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Streptococcus* จะมีช่วง pH ที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตอยู่ที่ประมาณ pH 6

2.8.2.6 อุณหภูมิและระยะเวลาในการหมัก

การเจริญเติบโตของเซลล์มีความจำเป็นในการควบคุมอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Streptococcus* หรือเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไป จะอยู่ในช่วง 30 ถึง 40 องศาเซลเซียส จากรายงานพบว่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นช่วงอุณหภูมิที่ส่งผลให้ปริมาณการผลิตสูงที่สุด (Gou และคณะ, 2009)

2.8.2.7 ค่า ionic strength

ค่า ionic strength เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส มีรายงานว่า พฤติกรรมของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่อยู่ภายใต้ค่า ionic strength ต่ำ ส่งผลทำให้เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่เร็วขึ้น

2.8.2.8 สาร inducer และ inhibitor ชนิดต่างๆ

สารเคมีหลายชนิดมีผลต่อโครงสร้างของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส โดยมีผลในการกระตุ้น และยับยั้งการย่อยสลายกรดไฮยาลูโรนิก เช่น sodium azide, sodium fluoride, phosphorylated hesperidin และ rehibin (non-specific inhibitors) (Humphrey และ Jaques, 1953) อีกทั้งยังมีรายงานว่า สามารถใช้วิตามินซี เพื่อเป็น inhibitor ได้อีกด้วย (Li และคณะ, 2001) และมีการนำ 1,3-diacetyl-enzimidazole-2-thione และโมเลกุลที่เกี่ยวข้องมาใช้สำหรับเป็น inhibitor อีกด้วย (Rigden และคณะ, 2006)

2.8.2.9 อากาศ

จุลินทรีย์ในกลุ่ม *Streptococcus* เป็นเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่ไม่ใช้อากาศในการเจริญเติบโต แต่เมื่อพิจารณางานวิจัยของ (Nimrod และคณะ, 1988) พบว่าเชื้อสามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิก และ เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส โดยการให้ออกซิเจนระหว่างการหมัก ส่งผลให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกต่ำกว่า กรณีไม่มีอากาศประมาณ 2-3 กรัมต่อลิตร แต่ส่งผลในด้านขนาดโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้โดยกรณีมีอากาศขนาดโมเลกุลต่ำกว่ากรณีไม่มีอากาศประมาณ 0.7×10^6 กิโลดาลตัน แต่เมื่อพิจารณางานวิจัยของ (Johns และคณะ, 1994) พบว่าอัตราการให้อากาศ สามารถเพิ่มความเข้มข้น กรดไฮยาลูโรนิกได้เพราะว่า เมื่อมีออกซิเจนกระบวนการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก จะสามารถเปลี่ยน ไพรูเวทเป็น อะซิเตท มากกว่าแลคเตท และยังส่งผลต่อการสร้างแคปซูลป้องกันเซลล์เพิ่มมากขึ้น

2.8.2.10 อัตราการเขย่า

การเขย่าระหว่างการหมักเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Streptococcus* เพื่อผลิตเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส นอกจากจะทำให้อาหาร และจุลินทรีย์เข้ากันได้ดีแล้ว ยังพบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการเขย่า จาก 300 รอบต่อนาที เป็นที่ 600 รอบต่อนาที สามารถเพิ่มปริมาณเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสเพิ่มขึ้นอีกด้วย

2.9 ปัจจัยที่มีกิจกรรมของเอนไซม์

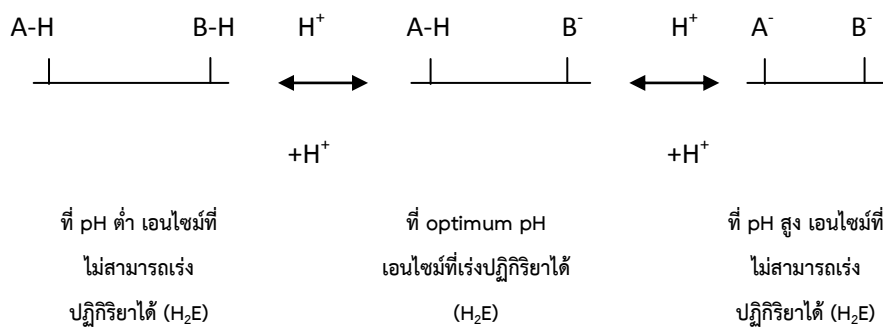
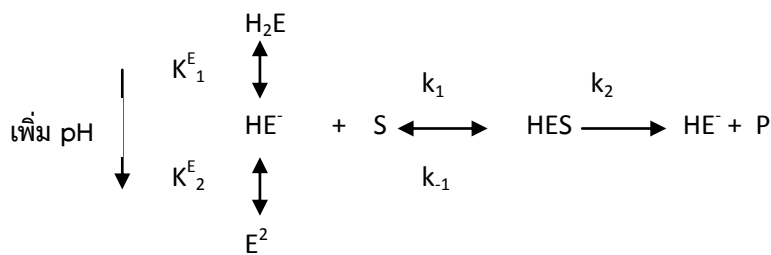
2.9.1 ผลของอุณหภูมิ

เอนไซม์เป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างซับซ้อนสามารถเร่งอัตราการเกิดปฏิกิริยาได้เมื่อหมู่อัลคิลของกรดอะมิโนบนจุดว่องไวของเอนไซม์เข้าจับกับสับสเตรทด้วยพันธะโควาเลนต์อย่างเหมาะสม โดยการเพิ่มอุณหภูมิในปฏิกิริยาทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มมากขึ้นเนื่องจาก การเพิ่มอุณหภูมิส่งผลให้พลังงานสะสมมากพอในการเปลี่ยนสภาพเป็นผลิตภัณฑ์ได้อย่างรวดเร็ว แต่การเร่งอัตราการเกิดปฏิกิริยาก็มีขีดจำกัดเนื่องด้วยเอนไซม์เกาะกับสับสเตรทด้วยพันธะโควาเลนต์เมื่อเพิ่มอุณหภูมิจนถึงจุดๆหนึ่งซึ่งส่งผลให้เกิดค่า optimum temperature พันธะโควาเลนต์ซึ่งเป็นพันธะอ่อน จึงเริ่มหลุดจากกันเมื่ออุณหภูมิเพิ่มมากขึ้นจึงทำให้เอนไซม์เสียสภาพไป ดังนั้นค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาจึงค่อยๆลดลง (พัชรี, 2541)

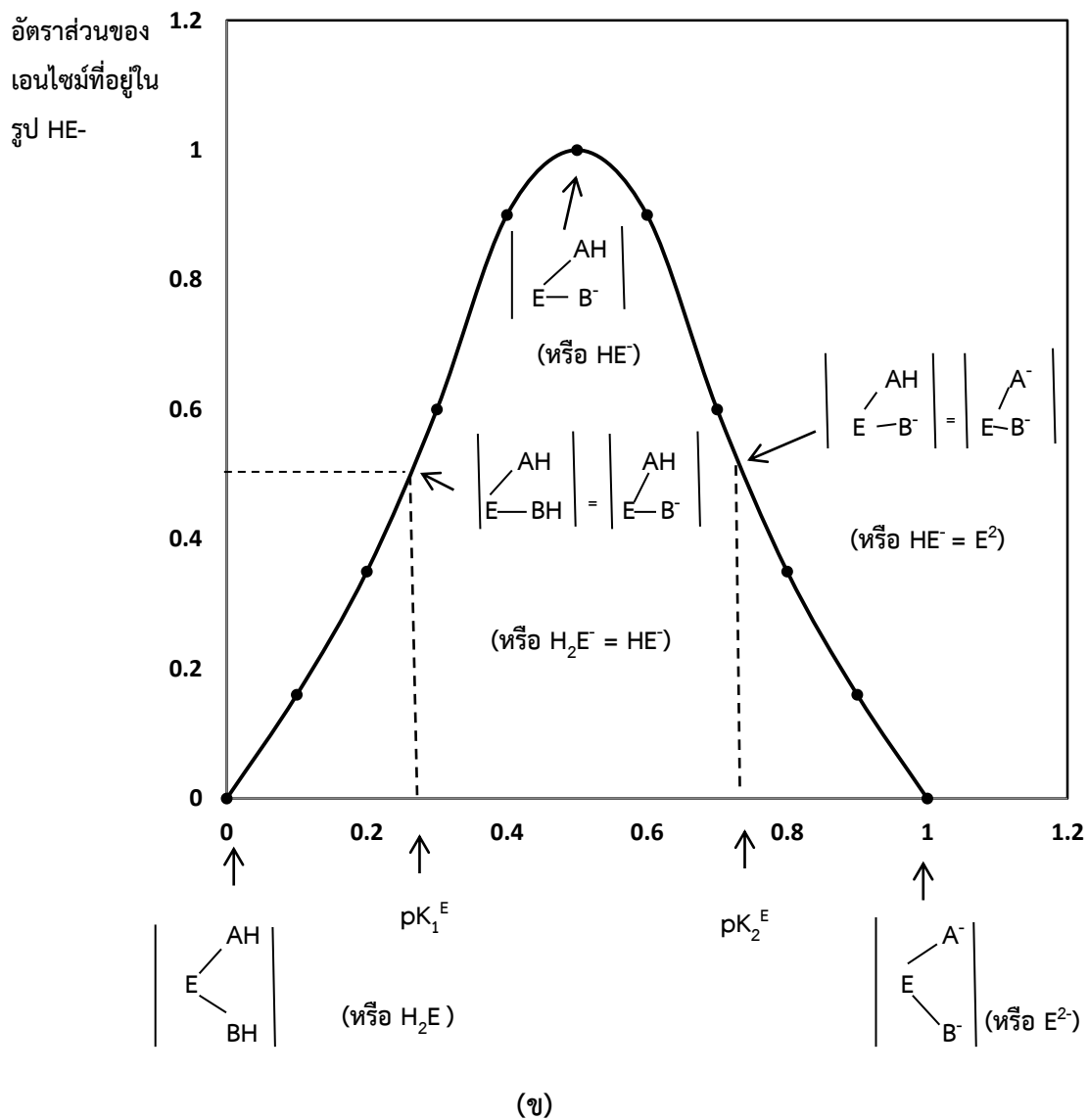
2.9.2 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง

การเร่งการเกิดปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์จะทำงานได้ดีในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างช่วงหนึ่งเท่านั้น เนื่องด้วยหมู่อัลคิลของกรดอะมิโนบนจุดว่องไวของเอนไซม์สามารถแตกตัวได้ดีที่สุดซึ่ง Michaelis-Menten (พัชรี, 2541) ได้นำเสนอแบบจำลองทางจลนพลศาสตร์เกี่ยวกับผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการเกิดปฏิกิริยาโดยกำหนดว่าเอนไซม์เป็นกรดประเภท dibasic acid H_2E ซึ่งสามารถจับกับสับสเตรทเป็นสารประกอบเชิงซ้อนเอนไซม์สับสเตรท แสดงกลไก ดังภาพที่ 2.4

พบว่า การเข้าจับกับโปรตอนของ HE^- และการเข้าจับของ HE^- กับ S โปรตอนของทั้งสองแบบจะทำหน้าที่เป็นตัวยั้งแบบแข่งขัน โดยการเติม E^{2-} จะจับกับ S ทำให้เกิด HE^- ดังนั้นโปรตอนจะทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นของ E^{2-} แต่ OH^- จะทำหน้าที่เปลี่ยน HE ซึ่งสามารถจับกับ S ไปเป็น E^{2-} ที่ไม่สามารถจับกับ S ได้



(ก)



ภาพที่ 2.4 (ก) อิทธิพลที่มีผลต่อค่าความเป็นกรดต่างต่อหมู่ที่แตกตัวได้ของเอนไซม์

(ข) แสดงอิทธิพลของค่าความเป็นกรดต่างต่ออัตราส่วน $[HE^-]/[E_2^-]$ ตามสมการของ Henderson-Hasselbach ที่ว่า $pH = pK_a + \log [A^-]/[HA]$ (พัชรี, 2541)

2.10. จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์

เอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งค้นพบโดยการหมักน้ำตาล ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาซึ่งทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นถึง 10^8 - 10^{14} เท่าโดยในปี ค.ศ.1894 ออสวอลด์ให้คำจำกัดความว่า เอนไซม์คือตัวเร่งปฏิกิริยาที่ทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นและเมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดแล้วตัวเร่งจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีเกิดขึ้น ทำให้สามารถทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาได้ซ้ำแล้วซ้ำอีก โดยเอนไซม์จะมีความจำเพาะในการเร่งของบริเวณแอคทีฟ โดยทำปฏิกิริยากับสับสเตรท (substrate) ด้วยแรงไฮโดรโฟบิกหรือแรงดึงดูดระหว่างประจุหรือแรงระหว่างขั้ว เกิดเป็นสารตัวกลางเชิงซ้อนเอนไซม์-สับสเตรท ด้วยเหตุนี้เอนไซม์จึงมีความสำคัญในการควบคุมอัตราเร็วให้เกิดอย่างเป็นระเบียบซึ่งยังขึ้นกับปัจจัยอื่นๆอีกเช่น อุณหภูมิ ความดัน และความเข้มข้น ดังนั้น จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์หมายถึง การศึกษาเกี่ยวกับความเร็วของปฏิกิริยารวมทั้งกลไกการทำงานของเอนไซม์ซึ่งเมื่อพิจารณาการเกิดปฏิกิริยา พบว่า อัตราเร็วของปฏิกิริยาขึ้นกับความเข้มข้นของตัวทำปฏิกิริยาตามสมการเมื่อ $A \longrightarrow B$ ดังนั้น อัตราเร็ว $\propto [A]^x$ โดย x คือ อันดับของปฏิกิริยา ซึ่งสามารถแบ่งปฏิกิริยาประเภทต่างๆ ดังนี้

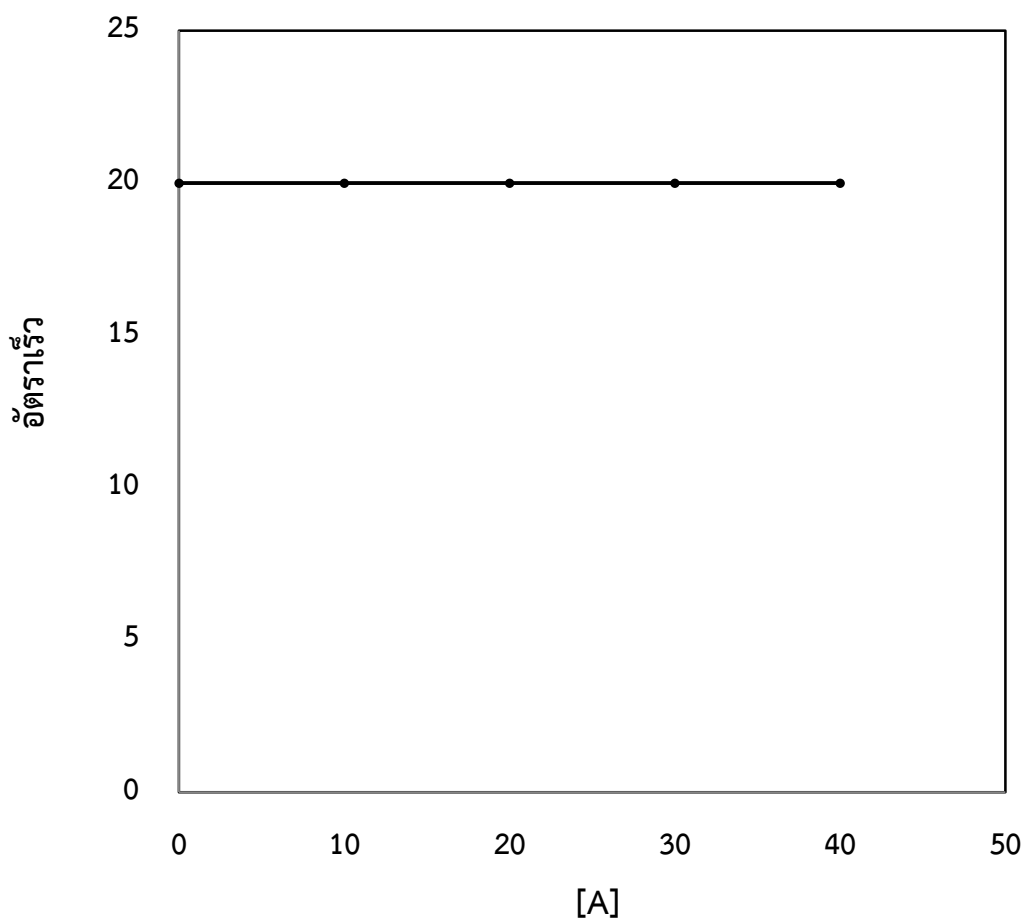
2.10.1 ปฏิกิริยาอันดับต่างๆ

2.10.1.1. ปฏิกิริยาอันดับที่ศูนย์ (Zero-Order Reaction)

ปฏิกิริยาอันดับที่ศูนย์ เป็นปฏิกิริยาที่อัตราเร็วของปฏิกิริยาไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของตัวทำปฏิกิริยาเมื่อพิจารณาจากสามการและภาพที่ 2.5 พบว่า อัตราเร็วคงที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงตามความเข้มข้นของสารตั้งต้น A ที่เพิ่มขึ้น โดย

$$\text{อัตราเร็ว} = \frac{d[A]}{a dt} = k'[A]^0[B]^0$$

$$[A] = [A]^0 - kt$$



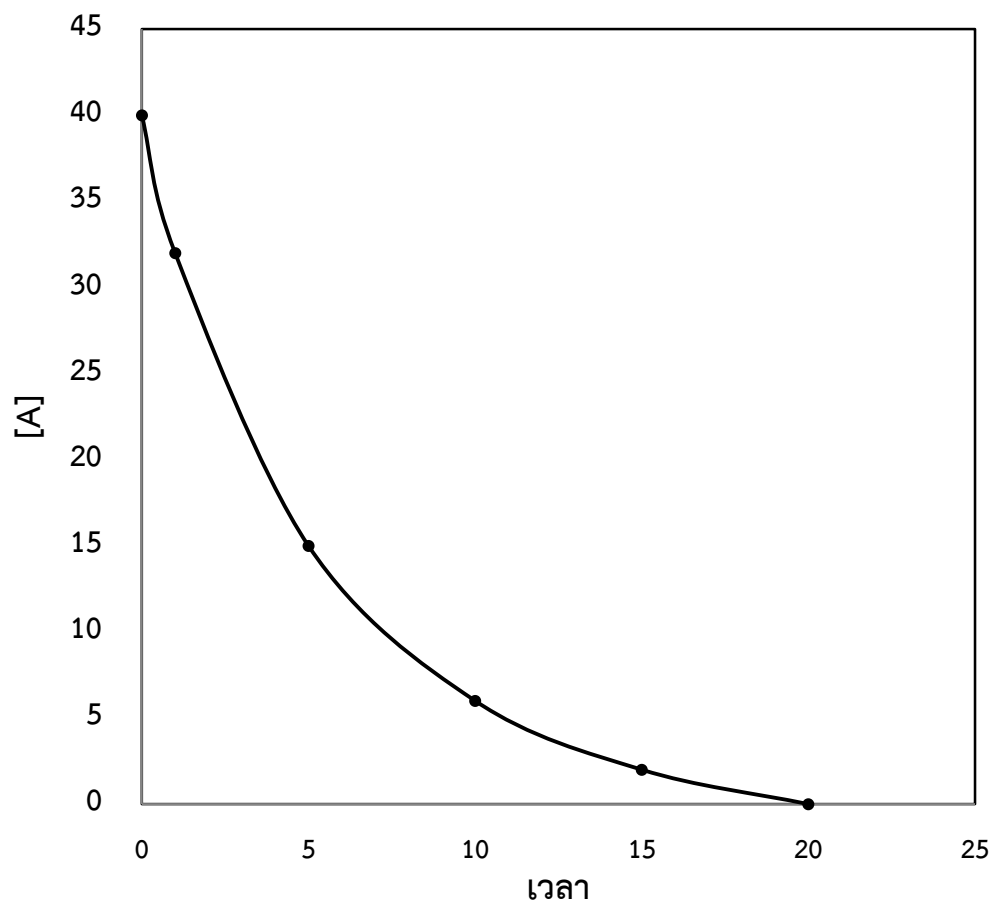
ภาพที่ 2.5 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเร็วกับความเข้มข้นของตัวทำปฏิกิริยาในปฏิกิริยาอันดับที่ 0

2.10.1.2 ปฏิกิริยาอันดับที่หนึ่ง (First-Order Reaction)

ปฏิกิริยาอันดับที่หนึ่ง เป็นปฏิกิริยาที่อัตราเร็วของปฏิกิริยาขึ้นกับความเข้มข้นของตัวทำปฏิกิริยาเมื่อพิจารณาจากสามการและภาพที่ 2.6 พบว่า อัตราเร็วคงที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงตามความเข้มข้นของสารตั้งต้น A ที่เพิ่มขึ้น โดย

$$\text{อัตราเร็ว} = \frac{d[A]}{dt} = k'[A][B]^0$$

$$[A] = [A]_0 e^{-kt}$$



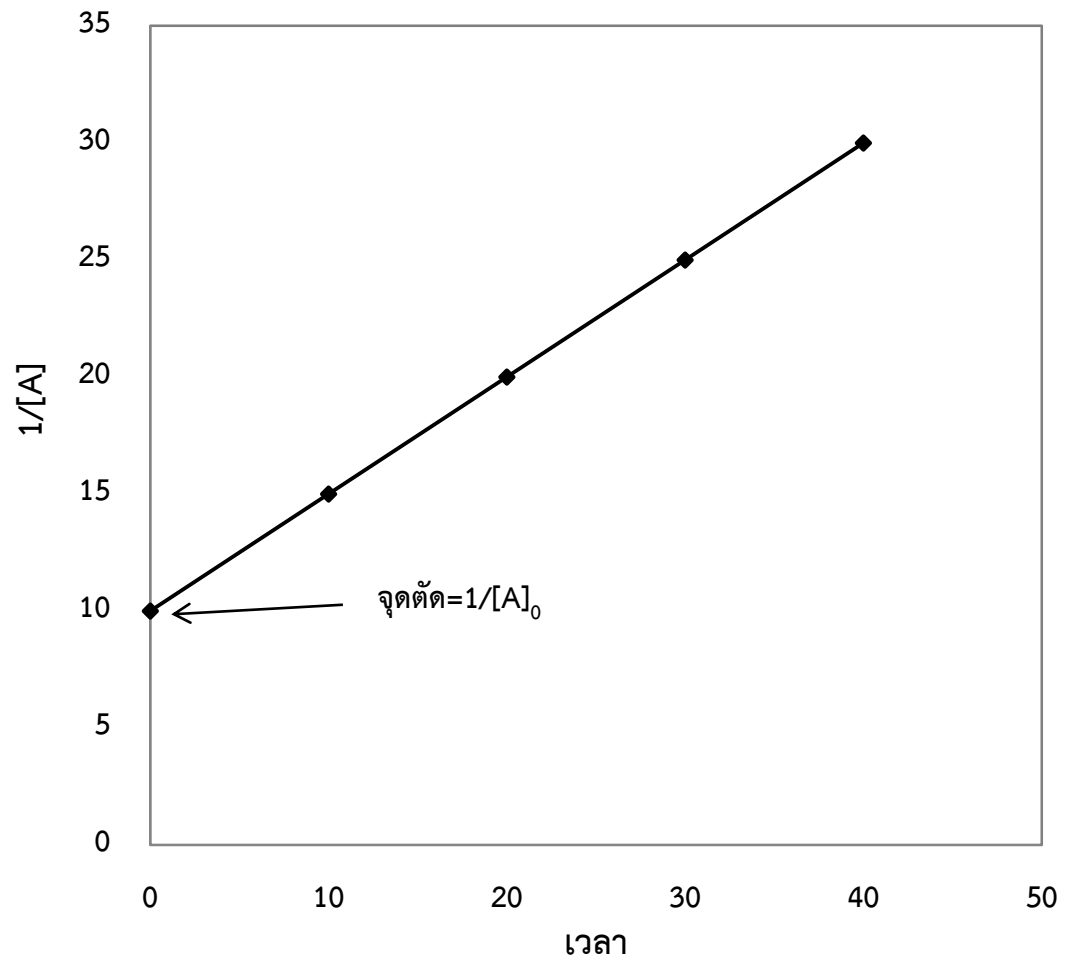
ภาพที่ 2.6 การสลายตัวของสาร A แบบ exponential ที่เวลาต่างๆ ของปฏิกิริยาจลนพลศาสตร์อันดับที่ 1

2.10.1.3. ปฏิกิริยาอันดับที่สอง (Second-Order Reaction)

ปฏิกิริยาอันดับที่สองมีรูปแบบสมการและการเปลี่ยนแปลงในรูปกราฟดังนี้

$$\text{อัตราเร็ว} = \frac{d[B]}{dt} = \frac{1}{2} \frac{d[A]}{dt} = k[A]^2$$

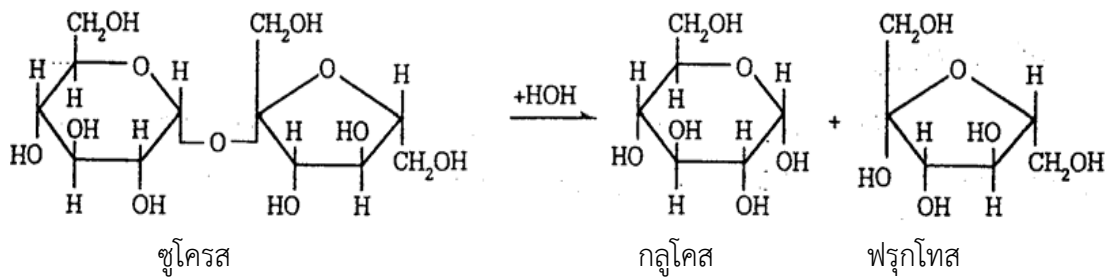
$$\frac{1}{[A]} = 2kt + \frac{1}{[A]_0}$$



ภาพที่ 2.7 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับหนึ่งส่วนความเข้มข้นของตัวทำปฏิกิริยา ในปฏิกิริยาอันดับที่ 2

2.10.2. การศึกษาอิทธิพลของเอนไซม์โดยการเขียนกราฟจากข้อมูลทางจลนพลศาสตร์

ค่าทางจลนพลศาสตร์สามารถประมาณค่าความเข้มข้นของสับสเตรท และทิศทางของปฏิกิริยาภายในเซลล์ได้ และยังนำข้อมูลไปพิจารณาการทำงานของเอนไซม์ในสิ่งมีชีวิต โดยสามารถศึกษาได้หลายวิธีโดยการเขียนกราฟความสัมพันธ์ ซึ่งแรกเริ่มปี ค.ศ. 1902 บราวน์ (Brown, A.J.) ทำการพิจารณาโดยปฏิกิริยาย่อยสลายซูโครสด้วยอินเวอร์เทส ภาพที่ 2.8

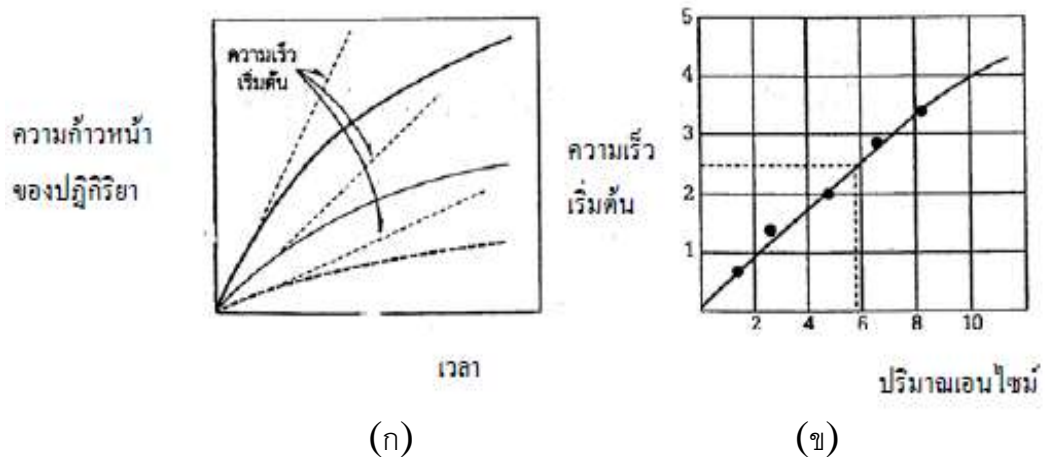


ภาพที่ 2.8 ปฏิกิริยาการย่อยสลายซูโครสด้วยอินเวอร์เทส (อิสลาห์, 2551)

โดยพิจารณาปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้สองลักษณะคือ

1. ปฏิกิริยาลักษณะที่ 1

ทำการวัดความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาในการเกิดผลิตภัณฑ์ต่อหน่วยเวลา ตามภาพที่ 2.9 (ก) และจากการสังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงระหว่างความเร็วเริ่มต้นและปริมาณเอนไซม์ ดังภาพที่ 2.9 (ข) เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์ แต่ปริมาณสับสเตรทเริ่มต้นเท่ากันทุกการทดลอง พบว่าความเร็วเริ่มต้นเพิ่มขึ้นอย่างสม่ำเสมอ แต่ระยะหลังความเร็วในการเกิดผลิตภัณฑ์จะค่อยๆ ลดลง



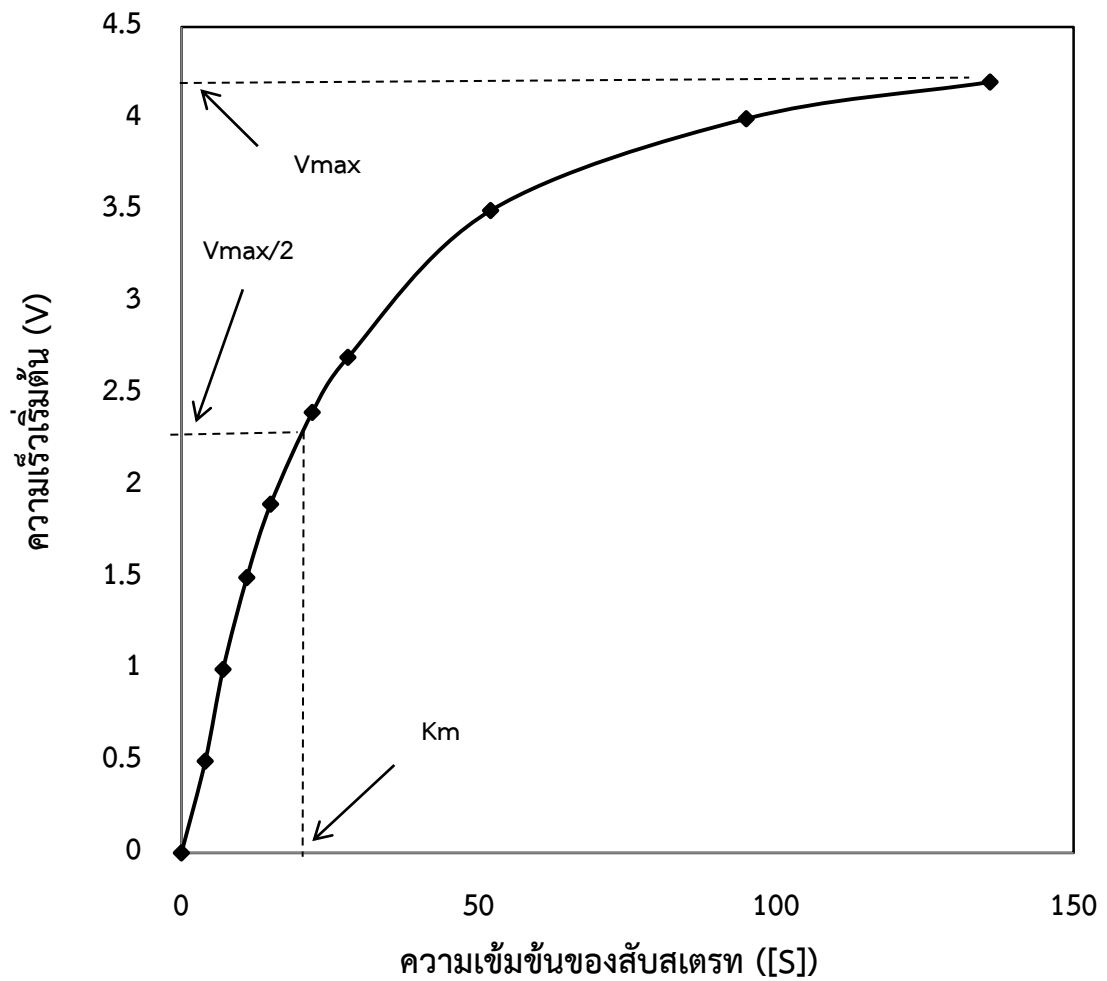
ภาพที่ 2.9 ความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วเริ่มต้นและปริมาณเอนไซม์

(ก) ความก้าวหน้าของปฏิกิริยาและเวลาที่ปริมาณเอนไซม์ต่าง ๆ

(ข) ความเร็วเริ่มต้นและปริมาณเอนไซม์ (พัชรา, 2541)

2.ปฏิกิริยาลักษณะที่ 2

ทำการวัดความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาและความเข้มข้นของสับสเตรท ([S]) ดังภาพที่ 2.10 โดยกำหนดให้เอนไซม์คงที่ แต่เปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสับสเตรท จะได้เส้นโค้งการอิ่มตัวของสับสเตรท

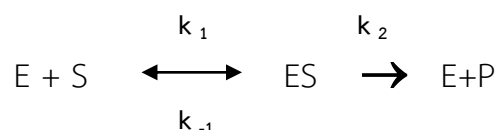


ภาพที่ 2.10 ความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วของเอนไซม์ และความเข้มข้นของสับสเตรท

2.10.3. การสร้างสมการ และกราฟทางจลนพลศาสตร์

2.10.3.1. สมการ Michaelis-Menten

แบบจำลองของกลไกการทำงานของเอนไซม์ที่เสนอโดย Michaelis-Menten สามารถอธิบายได้ทั้งปฏิกิริยาเอนไซม์ที่มีสับสเตรทตัวเดียว และปฏิกิริยาที่มีสับสเตรทสองตัว ซึ่งสมการ Michaelis-Menten ถูกนำมาใช้วิเคราะห์จลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาแทบทุกชนิด เขียนแสดงได้ดังนี้



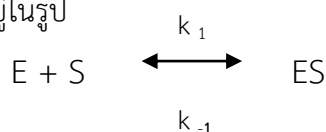
กำหนดให้

- [E] = ความเข้มข้นของเอนไซม์
- [E₀] = ความเข้มข้นของเอนไซม์ทั้งหมด (ผลรวมความเข้มข้นของเอนไซม์ และ ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่จับกับสับสเตรท)
- [S] = ความเข้มข้นของสับสเตรท
- [ES] = ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่จับกับสับสเตรท
- [P] = ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์
- [E₀] - [ES] = ความเข้มข้นของเอนไซม์

จะเรียกสมการนี้ว่า rate-limiting step เนื่องจาก ความเร็วของปฏิกิริยาทั้งหมดขึ้นกับความเข้มข้นของสับสเตรท โดยปฏิกิริยาของ Michaelis-Menten สามารถแบ่งได้ 2 ระยะ

2.10.3.1.ก. ปฏิกิริยา Zero order kinetics, [S] ≥ 100K_m

ปฏิกิริยา Zero order kinetics เกิดขึ้นได้เมื่อความเข้มข้นไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของสับสเตรท โดยถ้าเอนไซม์ทั้งหมดอยู่ในรูป [ES] ความเร็วของปฏิกิริยาก็จะสูงสุด (maximum velocity, V_{max}) และ ถ้าสมการ อยู่ในรูป



จากสมการ Michaelis- Menten

$$V = \frac{V_{ma}[S]}{K_m + [S]}$$

เมื่อ $[S] > 20K_m$

$$V = \frac{V_{max}[S]}{[S]} = V_{max} [S]^0$$

พบว่าเป็น zero order kinetics เมื่อ

$$V \propto [S]^0$$

2.10.3.1.ข .ปฏิกิริยา first order kinetics, $[S] \leq 0.01K_m$

ปฏิกิริยา first order kinetics เกิดขึ้นได้เมื่อความเข้มข้นของสับสเตรทต่ำๆ

จากสมการ Michaelis- Menten

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_m+[S]}$$

เมื่อ $[S] < 0.05K_m$

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_m+0.05K_m} = \frac{V_{max}[S]}{K_m}$$

พบว่าเป็น first order kinetics เมื่อ

$$V \propto [S]$$

เมื่อพิจารณาปฏิกิริยาของ Michaelis-Menten ทั้ง 2 ระยะ จะได้ตัวแปรที่สำคัญ 2 ประเภท คือ V_{max} (ความเร็วปฏิกิริยาสูงสุด) และค่า K_m (Michaelis-Menten constant) ซึ่งเป็นค่าคงที่สำหรับเอนไซม์แต่ละชนิด โดยกำหนดให้ K_m มีค่าเท่ากับ $\left(\frac{V_{max}}{2}\right)$ ความเข้มข้นของสับสเตรทที่ทำให้ความเร็วของปฏิกิริยาเป็นครึ่งหนึ่งของความเร็วสูงสุด แสดงดังภาพที่ 2.10

2.10.3.2. Lineweaver-Burk plot

การสร้างกราฟแบบ Lineweaver-Burk plot ประยุกต์จากสมการ ของสมการอันดับหนึ่ง ของ Michaelis-Menten โดยกลับรูปสมการให้อยู่ในรูปเศษส่วน เพื่อเขียนในรูปสมการเส้นตรง $y = mx + c$ จากสมการ Michaelis- Menten

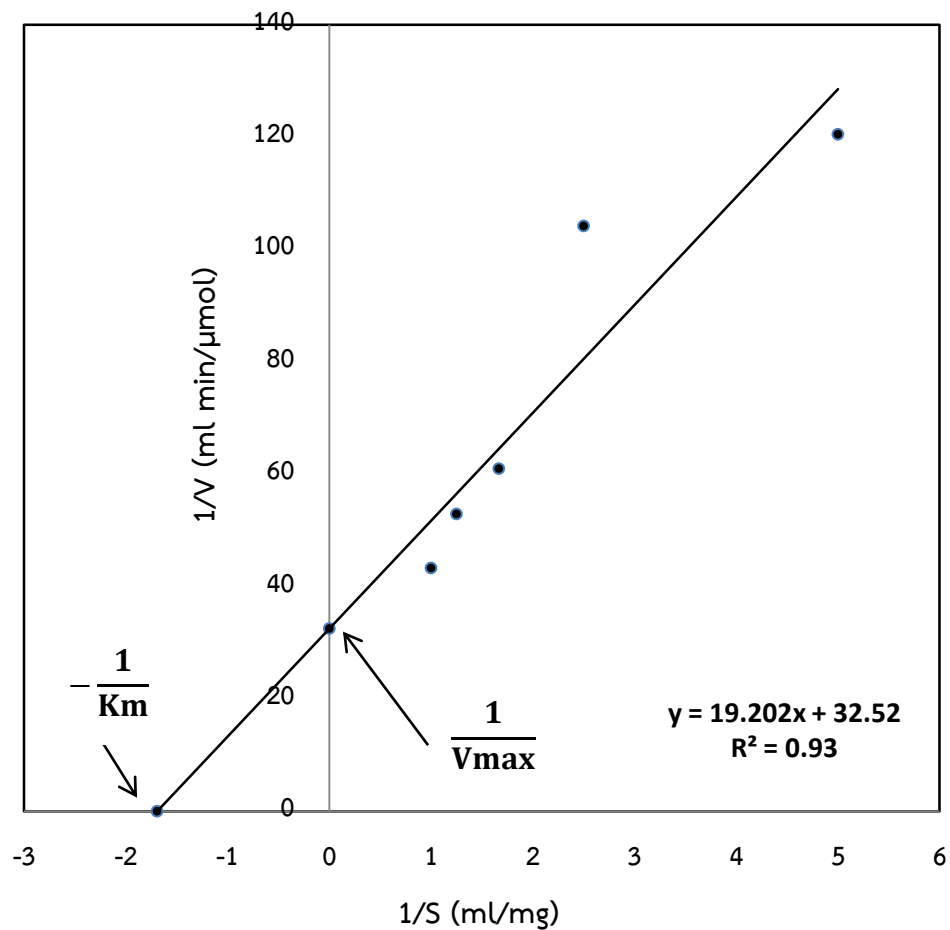
$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m+[S]}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m+[S]}{V_{max}[S]}$$

หรือ

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

เมื่อเขียนกราฟระหว่าง $\frac{1}{v}$ และ $\frac{1}{[S]}$ จะได้จุดตัดแกน y เท่ากับ $\frac{1}{V_{max}}$ และความชันเท่ากับ $\frac{K_m}{V_{max}}$ นอกจากนี้ยังสามารถจุดตัดในแกน $\frac{1}{[S]}$ ยังมีค่าเท่ากับ $\frac{-1}{K_m}$ เนื่องด้วย เมื่อ $\frac{1}{v}$ เท่ากับ 0 จะทำให้ $\left(\frac{K_m}{V_{max}}\right)\left(\frac{1}{[S]}\right)$ มีค่าเท่ากับ $\frac{-1}{V_{max}}$ ดังนั้น $\frac{1}{[S]} = \frac{-1}{K_m}$ แสดงดังภาพที่ 2.11



ภาพที่ 2.11 ความสัมพันธ์ ระหว่าง $1/V$ และ $1/S$ ของกราฟ Lineweaver-Burk plot

2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Pierce และ White (1954) ได้ทำการศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนระหว่างกลูโคส และแลคโตส ใน *S. pyogenes strain S23* พบว่ากรดไฮยาลูโรนิกเกิดขึ้นปริมาณสูงเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนอีกทั้งยังไม่พบการสร้างเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส แต่เมื่อใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อส่งผลให้การเจริญเติบโตเข้าอีกทั้งยังพบไฮยาลูโรนิเดสปนเปื้อนในไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้

Warren และ Gray (1959) ได้ทำการศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อประกอบไปด้วย กลูโคส โรโบฟลาวิน ไฮโดรคลอไรด์ แมกนีเซียมซัลเฟต ไพรดอกซิน เคซีน ไฮโดรไลเซท โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต จากการวิจัยพบว่า ที่เวลาการบ่มที่ 18 ชั่วโมงพบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก สูงสุดคือ 225 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วลดลงจนที่ 64 ชั่วโมง โดยเมื่อพิจารณาพบว่าระหว่างเชื้อเจริญในช่วง log-phase วัตค่าน้ำหนักโมเลกุลมีค่าเท่ากับ 7.3×10^5 และเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงน้ำหนักโมเลกุลมีค่าเท่ากับ 2.6×10^1 . ซึ่งแสดงว่าวิเคราะห์ไม่พบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกเนื่องด้วยการย่อยสลายกรดไฮยาลูโรนิกจากเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ซึ่งเมื่อผู้ทำการวิจัยปรับปรุงสูตรอาหาร โดยการเติมกรดอัลจินิกซัลเฟต พบว่าสามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้สูงสุดถึง 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลาในการบ่ม 18 ชั่วโมง และปริมาณคงที่ตลอดการทดลอง เนื่องด้วย กรดอัลจินิกซัลเฟตส่งผลในการยับยั้งการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส

Akasaka และคณะ (1989) ได้ทำการศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* NH131 ในภาวะที่มีอากาศ พบว่าเชื้อเจริญได้ดีในช่วงเวลา 5-7 ชั่วโมง และช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วง 6.8 ถึง 7.5 ซึ่งเมื่อพิจารณางานวิจัยของ (John และคณะ, 1994) พบว่าอัตราการให้อากาศช่วยเพิ่มปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก เนื่องด้วยออกซิเจนช่วยเปลี่ยนไปเป็นอะซิเตทได้มากกว่าแลคเตท อีกทั้งยังส่งผลในการสร้างแคปซูลซึ่งช่วยป้องกันพิษที่เกิดขึ้นการออกซิเจน

Hynes และคณะ (1989) ได้ทำการศึกษาการโคลนยีนจาก *Streptococcus pyogenes* bacteriophage H4489A โดยทำการเก็บ bacteriophage ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง และแยกดีเอ็นเอด้วยฟีนอลเพื่อใช้ในการแยกโปรตีนของ bacteriophage ซึ่ง bacteriophage DNA ที่ได้จะมีขนาดประมาณ 32 คู่เบส จากนั้นทำการย่อย bacteriophage DNA ด้วย restriction endonuclease *NotI* แล้วทำการ ligation เข้าสู่เซลล์ของ *E. coli* และ transformed ยีนของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส เข้าสู่พลาสมิดเวกเตอร์ pUC8 ที่ตัดด้วย *SmaI* จากผลการทดลอง พบว่า พลาสมิด *hyIP* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์มีขนาดประมาณ 3,000 คู่เบส จากนั้นใช้ restriction enzyme คือ *BamHI* และ *EcoRI* ในการตัดเอนไซม์ แล้วโคลนยีนเข้าสู่ pUC9 พบว่าหลังจากโคลนยีนเข้าไปแล้ว มีการแสดงออกของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่มีขนาดประมาณ 2,000 คู่เบส

Farrell และคณะ (1995) ได้ทำการศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์ยีนเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส และทำการตรวจสอบการเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ รวมทั้งการแสดงออกของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ที่ได้จาก *Streptococcus aureus* ผลการวิจัยพบว่า สามารถทำการโคลนยีนได้สำเร็จ โดยมีการแสดงออกของโปรตีนใน *E. coli* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 94 kDa และเมื่อทำการเปรียบเทียบการเรียงตัวของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่ผลิตได้จาก *Streptococcus aureus* กับเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่ผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์ *Streptococcus* กลุ่ม B และจากเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม Pneumococcal พบว่า มีความเหมือนกันประมาณ 35 และ 36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Kumari และWeigel (1997) ได้ทำการศึกษาการแยกยีนของ เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส จาก *Streptococcus equisimilis* กลุ่ม D ซึ่งเป็นเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่สร้างแคปซูลใน ปริมาณมาก และมีกรดไฮยาลูโรนิคเป็นองค์ประกอบหลักของแคปซูลนำมาถอดรหัสเป็นโปรตีน ให้ชื่อว่า seHAS มีความยาว 417 กรดอะมิโน และน้ำหนักโมเลกุลที่คำนวณได้เท่ากับ 47,778 โดยเมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของยีน seHAS ใน *E. coli* พบว่าสามารถสร้างเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส อีกทั้งสามารถสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิคที่มีขนาดใหญ่ได้ ถ้ามีสารตั้งต้นคือ UDP-N-acetyl-glucosamine กับ UDP-glucuronic acid

Cameron และคณะ (1998) ได้ทำการศึกษากลไกการสังเคราะห์แคปซูลกรดไฮยาลูโรนิคของเชื้อสเตรปโตคอคคัสกลุ่ม A โดยทำการหยุดปฏิบัติการของยีน *hasC* สำหรับสร้าง UDP-glucose pyrophosphorylase ในเชื้อสเตรปโตคอคคัสกลุ่ม A ที่สร้างแคปซูลในปริมาณมากสายพันธุ์ดั้งเดิมพบว่า ไม่มีผลต่อการสังเคราะห์แคปซูล ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีน *has C* ไม่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิค

DeAngelis และคณะ (1998) ได้ทำการศึกษาการแยกยีน เอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์ *Pasteurella multocida* Type A แทรกเข้าไปในเชื้อจุลินทรีย์ *E. coli* K5 จากการทดลองพบว่า *E.coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิต UDP-Glucuronic acid ที่เป็นสารตั้งต้นที่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิคได้ ซึ่งไม่สามารถพบได้ใน *E. coli* สายพันธุ์ทั่วไปในห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีนเปรียบเทียบกันระหว่าง *E. coli* K5 กับ *E. coli* EV5 ซึ่งมีกลไกการควบคุมการขนส่ง capsular polysaccharide ทั่วไปเหมือนกันหมด แต่ *E. coli* EV5 ไม่มีเอนไซม์ UDP-Glucose dehydrogenase ที่ใช้ในการสังเคราะห์ UDP-Glucuronic acid ผลปรากฏว่า *E. coli* EV5 ไม่สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้ถึงแม้ว่าจะมียีนที่ผลิต hyaluronan synthase

Jedrzejak และคณะ (1998) ได้ทำการศึกษาการแสดงออก และทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่ได้จาก *S. pneumonia* ที่ได้ทำการโคลนเข้าไปใน *E. coli* พบว่า เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส สามารถแสดงออกใน *E. coli* โดยใช้ T7 promoter เป็นตัวชักนำให้เกิดการแสดงออก โดยเชื้อที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ง่าย

Muckenschnabel และคณะ (1998) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสจาก พลาสมา จากผู้ป่วยโรคเนื้องอก และคนสุขภาพแข็งแรง ทำปฏิกิริยากับกรดไฮยาลูนิคบริสุทธิ์สกัดจากหองนไก่ ด้วยเทคนิค Morgan-Elson จากการทดลองโดยเปรียบเทียบกับเอนไซม์จาก bovine testicular มาตรฐาน พบว่าประสิทธิภาพของเอนไซม์มีมากในช่วงแรกของการทำปฏิกิริยา และมีค่ามากที่สุดที่ เวลาประมาณ 1-2 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรด-ด่างของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดจากพลาสมา ของผู้ป่วยโรคเนื้องอก และคนสุขภาพแข็งแรง พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ส่งผลให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์มีค่าสูงสุดคือที่ 3.9

Li และคณะ (2001) ได้ทำการศึกษาการนำวิตามินซีมาใช้เป็น inhibitor ของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่ได้จาก *Streptococcus pneumoniae* จากการทดลองพบว่า วิตามินซีสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสต่อกรดไฮยาลูโรนิคได้ เนื่องจากวิตามินซีเป็นคาร์บอกซิลที่มีขั้วเป็นลบสูง จึงสามารถที่จะดึงเอาขั้วบวกของเอนไซม์ออกมาได้ ทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเกิดช้าขึ้น

Oettl และคณะ (2003) ได้ศึกษาเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสจาก bovine testicular และจากเชื้อจุลินทรีย์ *Streptococcus agalactiae* stain 4755 เพื่อนำไปใช้ทดแทนกัน เนื่องจากมีปริมาณไม่เพียงพอ และเป็นที่ต้องการในวงการผลิตยา จากผลการทดลองพบว่า เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสจาก bovine testicular ที่ผ่านกระบวนการ gel filtration มีขนาดโมเลกุลโปรตีนเท่ากับ 58 กิโลดาลตัน โดยเมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรด-ด่างที่ส่งผลให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีค่าสูงสุดคือ 3.6 ของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสจาก bovine testicular และ 6.2 ของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสจากเชื้อจุลินทรีย์ *Streptococcus agalactiae* stain 4755

Takahashi และคณะ (2003) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส จาก human serum โดยวัดค่าการส่องผ่านแสงตามวิธี Morgan-Elson โดยใช้เตตระบอเรทเป็นสารละลายบัฟเฟอร์ และได้ผลสรุปว่า การวัดค่าการเรืองแสงของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสไม่จำเป็นต้องใช้สารละลายที่จำเพาะ และใช้เวลาไม่นาน แต่มีข้อจำกัดคือ มีความไวแสงสูง และจะมีความไวต่อแสงเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อวัดเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่ได้จากสิ่งมีชีวิต โดยเมื่อพิจารณาจากผลการวิจัยพบว่าค่าความยาวคลื่นที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Morgan-Elson คือที่ความยาวคลื่น 585 นาโนเมตร ค่ากรด-ด่างของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม

คือ 3.9 อีกทั้งสามารถนำผลการทดลองไปวิเคราะห์ค่าทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ได้ คือ มีค่า K_m เท่ากับ 0.114 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ V_{max} เท่ากับ 5.1 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร

Rigden และคณะ (2006) ศึกษาถึงการใช้ 1, 3-diacetyl-2xYTenzimidazole-2-thione ที่มีหลากหลายโครงสร้าง มาเป็น inhibitor ของเอนไซม์ไฮยาโลโรนิเดส พบว่า 1,3-diacetyl Tenzimi-dazole-2-thione นั้นสามารถที่จะยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ไฮยาโลโรนิเดสต่อกรดไฮยาโลโรนิกได้สูงสุด

Asteriou และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาการยับยั้งและการเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายกรดไฮยาโลโรนิก ด้วยเอนไซม์ไฮยาโลโรนิเดสที่ความเข้มข้นของสับสเตรทสูง และค่า ionic strength ต่ำ โดยทำการทดลองที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยทำการวัดความเข้มข้นของ N-acetyl-D-glucosamine ที่ผ่านการทำปฏิกิริยาให้เกิดสีโดยสีสามารถบ่งบอกปริมาณน้ำตาลที่เอนไซม์ย่อยได้ จากนั้นหาค่า ionic strength โดยกำหนดค่าความเข้มข้นของสับสเตรท กรดไฮยาโลโรนิก 0.15 โมลต่อลิตร แสดงผลการทดลองด้วย Michaelis-Menten จากนั้นสังเกตผลจากการใช้ค่า ionic strength ต่ำ พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดไฮยาโลโรนิก จะมีผลให้เพิ่มอัตราการเกิดปฏิกิริยาขึ้นด้วย และจะเพิ่มขึ้นจนถึงจุดสูงสุด แล้วลดลงจนอัตราการเกิดปฏิกิริยาดำลงจนเกือบเป็นศูนย์ เมื่อความเข้มข้นของกรดไฮยาโลโรนิกลดลงหลังเกิดปฏิกิริยาแล้ว

Yang และคณะ (2007) ได้ทำการศึกษาการผลิตและทำให้เอนไซม์ไฮยาโลโรนิเดสจาก *E.coli* ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ และนำมาตรึงเอนไซม์ด้วยวิธี immobilized metal affinity magnetite (IMAM) จากนั้นนำไปย่อยสลายกรดไฮยาโลโรนิก ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เพื่อให้ได้โอลิโกไฮยาโลโรนิก ซึ่งผลที่ได้พบว่า กิจกรรมเอนไซม์ของเอนไซม์ไฮยาโลโรนิเดส จะลดลงประมาณ 10% ของกิจกรรมเอนไซม์อิสระ แต่กิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จากการทำ IMAM นั้นลดลงเพียง 40% หลังจากทำปฏิกิริยาไปแล้ว 3 ครั้ง และขนาดของโอลิโกไฮยาโลโรนิกที่ได้มีขนาดประมาณ 1660 ดาลตัน โดยการวัดโอลิโกไฮยาโลโรนิกที่ไม่อิ่มตัวที่ OD 232 อย่างไรก็ตามมวลโมเลกุลของโอลิโกไฮยาโลโรนิกเฉลี่ยอาจจะหาได้จาก MALDI-TOF-MS ซึ่งมีค่าประมาณ 1400 ดาลตัน

Guo และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาการโคลนยีนเอนไซม์ไฮยาโลโรนิเดสจาก *Streptococcus zooepidemicus* ส่งเข้าไปสู่เซลล์ของ *E.coli* JM 109 ด้วยเวกเตอร์ pBV220 จากผลการวิจัยพบว่า สายดีเอ็นเอที่ปรับปรุงสายพันธุ์มีขนาด 2,700 คู่เบส ทำให้มีการผลิตเอนไซม์ที่มี specific activity ของสารละลายเอนไซม์มีขนาดโมเลกุลของโปรตีนประมาณขนาดประมาณ 96 กิโลดาลตัน อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 37 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 6 และมีกิจกรรมเอนไซม์ประมาณ 3,800 ยูนิตต่อมิลลิกรัม เมื่อทำการย่อยสลายกรดไฮยาโลโรนิก จะได้ผลิตภัณฑ์ คือ ไคแซคคาไรด์ 46 เปอร์เซ็นต์ และกรดไฮยาโลโรนิกเตตระแซคคาไรด์ 31% ซึ่งกรดไฮยาโลโรนิกโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้

จะแยกได้ง่ายด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่ต่อเนื่องกันบน Bio-gel P6 และสามารถพิสูจน์ได้ด้วย HPLC-MS เนื่องจากเอนไซม์ไฮยาโลโรนิเดสที่ถูกนำไปทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับกรดไฮยาโลโรนิก เพื่อให้กรดไฮยาโลโรนิก มีความหนืดน้อยลง ทำให้มีคุณสมบัติในการแพร่เข้าสู่ผิวหนังได้ดีขึ้น จึงมีการนำกรดไฮยาโลโรนิกที่ย่อยด้วยเอนไซม์ไฮยาโลโรนิเดสไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์เพิ่มขึ้น เช่น ใช้ในยา เพื่อเพิ่มความเร็วในการแพร่ การนำส่งยา และการผ่าตัดนัยน์ตา รวมทั้งนำไปใช้ในการรักษาโรค ทั้งนี้จะใช้เฉพาะเอนไซม์-ไฮยาโลโรนิเดสที่มีความบริสุทธิ์สูงมากเท่านั้น

Long และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของการเพิ่มปริมาณออกซิเจนระหว่างการหมัก และความเข้มข้นของไฮยาโลโรนิเดสต่อการย่อยกรดไฮยาโลโรนิก โดยกรดไฮยาโลโรนิกผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์ *Streptococcus zooepidemicus* จากงานวิจัยทำการเพิ่มปริมาณออกซิเจนระหว่างการหมัก ที่เวลา 8 ถึง 16 ชั่วโมง และความเข้มข้นเอนไซม์ไฮยาโลโรนิเดส (0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 กรัมต่อลิตร) ผลการทดลองจากงานวิจัยพบว่า ปริมาณกรดไฮยาโลโรนิก เพิ่มจาก 5.0 กรัมต่อลิตร เป็น 6 กรัมต่อลิตร เมื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนในการหมัก และขนาดโมเลกุลกรดไฮยาโลโรนิก มีขนาดลดลงจาก 1,300 กิโลดาลตัน เป็น 21 กิโลดาลตัน เมื่อใช้ไฮยาโลโรนิเดสความเข้มข้น 0.25 กรัมต่อลิตร แต่พบว่าเอนไซม์ไฮยาโลโรนิเดสไม่ส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณกรดไฮยาโลโรนิก

ในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะทำการปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ *Streptococcus pyogenes* ATCC 6550 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต การทำงานของเอนไซม์ และสามารถนำไปวิเคราะห์ค่าทางจลนพลศาสตร์ได้ โดยคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไฮยาโลโรนิเดส โดยมีความเสถียรทางพันธุกรรม เพื่อนำไปพัฒนาในการผลิตเอนไซม์ไฮยาโลโรนิเดส ในระดับใหญ่ต่อไป

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 เครื่องเขย่าผสม (vortex mixer) รุ่น U 320 บริษัท Biotec ประเทศเยอรมนี

3.1.2 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) รุ่น Innova 4000 บริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.3 เครื่องควบคุมปฏิกิริยาอัตโนมัติ PCR รุ่น EPPENDORF AG 22331 บริษัท Hamburg ประเทศเยอรมนี

3.1.4 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า รุ่น EC3000P บริษัท E-C APPARATUS Corporation ประเทศสหราชอาณาจักร

3.1.5 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น BA 210S SARTORIUS BASIC บริษัท SCIENTIFIC PROMOTION CO., LTD ประเทศเยอรมนี

3.1.6 เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนขนาดเล็ก รุ่น CFM100 บริษัท IWAKI GLASS CO., LTD. ประเทศญี่ปุ่น

3.1.7 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Senesys ของบริษัท Thermo Spectronic ประเทศสหราชอาณาจักร

3.1.8 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) MP220 บริษัท Mettler Toledo ประเทศ-สวิตเซอร์แลนด์

3.1.9 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Kubota 5100 บริษัท Kubota Corporation ประเทศญี่ปุ่น

3.1.10 เตาอบสูญญากาศ (Vacuum Oven) รุ่น VD 23 บริษัท Binder ประเทศ-สหรัฐอเมริกา

3.1.11 ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส บริษัท SONGSERM INTERCOOL PUBLIC CO.,LTD. ประเทศไทย

3.1.12 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อโรคความดันไอน้ำ (autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท TOMY ประเทศ-ญี่ปุ่น

3.1.13 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น XY-80 บริษัท Taitec ประเทศ ญี่ปุ่น

3.1.14 Vertical Laminar flow รุ่น VS-124 บริษัท ISSCO ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2 เคมีภัณฑ์

- 3.2.1 กรดซัลฟูริก บริษัท QRec ประเทศนิวซีแลนด์
- 3.2.2 กรดไดโนโตรซาลีไซลิก บริษัท QRec ประเทศนิวซีแลนด์
- 3.2.3 กรดน้ำส้ม บริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.4 กรดไฮโดรคลอริก บริษัท QRec ประเทศนิวซีแลนด์
- 3.2.5 กรดไฮยาลูโรนิก *S.pyogenes* บริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.6 กลูโคส-6-ฟอสเฟตไดโซเดียมซอลท์ บริษัท Fluka ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- 3.2.7 คาร์บาโซล บริษัท Fluka ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- 3.2.8 โคบอลต์ไดคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
- 3.2.9 แคลเซียมคลอไรด์ บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
- 3.2.10 โซเดียมเตตระบอเรต บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
- 3.2.11 โซเดียมคลอไรด์ บริษัท Carlo Erba ประเทศอิตาลี
- 3.2.12 โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต บริษัท Carlo Erba ประเทศอิตาลี
- 3.2.13 โซเดียมไฮดรอกไซด์ บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
- 3.2.14 โซเดียมไพรวูเวท บริษัท Sigma ประเทศจีน
- 3.2.15 ซิงค์คลอไรด์ บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
- 3.2.16 ซิงค์ซัลไฟด์ บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
- 3.2.17 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
- 3.2.18 ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต บริษัท Ajax Chemical ประเทศเยอรมัน
- 3.2.19 ไดเมททิลอะมิโนเบนซอลดีไฮด์ บริษัท Fluka ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- 3.2.20 ทริบโทน บริษัท DIFCO LABORATORIES ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.21 ทริส-(ไฮดรอกซีเมทิล)-อะมิโนมีเทน บริษัท PROMEGA CORPORATION ประเทศ-
สหรัฐอเมริกา
- 3.2.22 น้ำตาลเอ็นอะซีดีวดีกลูโคซามีน บริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.23 โพแทสเซียมคลอไรด์ บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
- 3.2.24 โพแทสเซียมเตตระบอเรต บริษัท Ajax Chemical ประเทศเยอรมัน
- 3.2.25 โพแทสเซียมฟอสเฟต บริษัท Ajax Chemical ประเทศเยอรมัน
- 3.2.26 แมกนีเซียมคลอไรด์ บริษัท Fluka ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- 3.2.27 แมกนีเซียมซัลเฟต บริษัท Fluka ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- 3.2.28 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต บริษัท Fluka ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- 3.2.29 แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต บริษัท Mallinckrodt ประเทศสหรัฐอเมริกา

- 3.2.30 แลกติกเคซิน บริษัท ไวท์กรุ๊ป ประเทศไทย
- 3.2.31 โลโซไซม์ บริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.32 สารสกัดจากยีสต์ บริษัท Himedia ประเทศอินเดีย
- 3.2.33 อากาโรส บริษัท Promega corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.34 ไอรอนซัลเฟต บริษัท Fluka ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- 3.2.35 เอทานอล 95 % สรรพสามิต ประเทศไทย
- 3.2.36 แอมพิซิลลิน องค์การเภสัชกรรม ประเทศไทย
- 3.2.37 แอมโมเนียมคลอไรด์ บริษัท Fluka ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- 3.2.38 Acrylamide บริษัท Fluka ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- 3.2.39 Agar บริษัท Himedia ประเทศอินเดีย
- 3.2.40 Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) บริษัท Amersham Pharmacia Biotech ประเทศสวีเดน
- 3.2.41 N,N,N',N'-tetramethylethylene-diamine (TEMED) บริษัท Promega corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3 เชื้อจุลินทรีย์

- 3.3.1 เชื้อจุลินทรีย์ *Streptococcus pyogenes* ATCC 6550
- 3.3.2 เชื้อจุลินทรีย์ *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM109
- 3.3.3 เชื้อจุลินทรีย์ *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21

3.4 พลาสมิดดีเอ็นเอ pQE80-L Expression Vectors

3.5 Primer สำหรับผลิตไฮยาลูโรนิค

- 3.5.1 Primer hyAf (GGT TAG GCT AGC GAT ACA GTG ACT TCA AAT TCA GAA AGAG)
- 3.5.2 Primer hyAr (ATC GTT GAG CTC CTA AAT CCT TAA GTC TTT CTT ACG AGAG)

3.6 การโคลนยีนเพื่อผลิตเอนไซม์ไฮยาลูโรนิค (HYALs)

จุลินทรีย์และพลาสมิดที่ใช้ในการศึกษาคือ *Streptococcus pyogenes* ATCC 6550 ส่วนจุลินทรีย์ *Escherichia coli* JM109 ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับพลาสมิด pQE80-L vector (Invitrogen, USA) อาหารเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus pyogenes* ได้แก่ SOC medium ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ *E. coli* คือ 2xYT medium

3.6.1 การโคลนยีนไฮยาลูโรนิเตส จาก *Streptococcus pyogenes* ATCC 6550 (Fiszer, 1984)

ทำการเพิ่มปริมาณยีนของเชื้อ *Streptococcus pyogenes* ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) (จรรยา และคณะ, 2540) โดยนำดีเอ็นเอที่ได้มาทำการเพิ่มปริมาณยีน โดยผสม 10x Buffer (100 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl 500 มิลลิโมลาร์ และ KCl pH 8.3) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร dNTP เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ 4 มิลลิลิตร *Taq DNA Polymerase* (4 ยูนิตต่อไมโครโมลาร์) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และเติมคู่ไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีน ไพรเมอร์ hyAf และ hyAr ด้วยความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ชนิดละ 1 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำปริมาตร 39 ไมโครลิตร นำไปใส่เครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

Initial PCR activation step เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส

3 step cycling (number of cycle :35 cycles)

Denaturation เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส

Annealing เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

Extension เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส

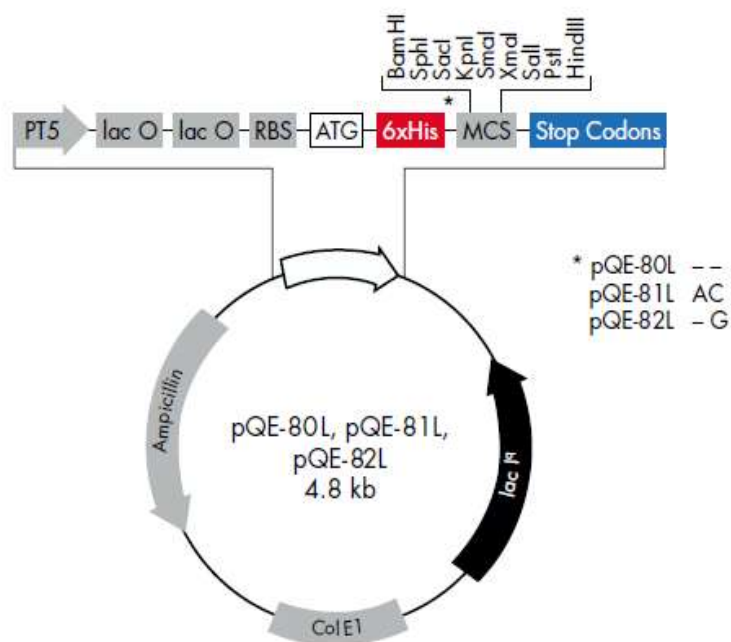
Extension เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส

เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุด ตรวจสอบขนาด และปริมาณของ PCR product ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ 0.8% agarose gel ใน 1x TAE buffer แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์เป็นเวลา 25 นาที จากนั้นนำ agarose gel มาย้อมด้วย ethidium bromide และนำไปดูแถบของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator (Vilber)

3.6.2 การนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เชื้อจุลินทรีย์ JM 109 และ BL 21

ทำการนำ PCR product จากข้อ 3.6.1 มาเชื่อมต่อ (ligate) กับ pQE80-L expression vector ที่ตำแหน่ง *HindIII* และ *PstI* (ภาพที่ 3.1) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง และถ่ายโอนเข้า competent cell JM 109 โดยวิธี Calcium Chloride ผสมพลาสมิดสายผสมที่ได้ เข้ากับ competent cell แช่น้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ถ่ายทอดพลาสมิด ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้วนำกลับมาวางบนน้ำแข็งทันทีต่ออีกเป็นเวลา 3 ถึง 5 นาที ก่อนเติมอาหาร SOC broth ปริมาตร 350 ไมโครลิตร เขย่าด้วยความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที

ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาตกตะกอนเซลล์โดยการหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที และดูดส่วนใสทิ้งให้เหลือปริมาณ ในหลอดประมาณ 70 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้ตะกอนกระจาย และนำมา spread บนอาหารแข็ง 2xYT ที่เติม แอมพิซิลลิน เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มเชื้อต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ถึง 18 ชั่วโมง



ภาพที่ 3.1. pQE80-L Expression Vectors

3.6.3 ตรวจสอบโคลนที่มีขึ้นดีเอ็นเอ และสกัดพลาสมิด

นำโคลนที่เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหารแข็ง 2xYT มาเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่เติมแอมพิซิลลินเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ถึง 18 ชั่วโมง แล้วนำมาสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline analysis (Sambrook และคณะ, 1989) จากนั้นทำการวิเคราะห์ขนาด และปริมาณของพลาสมิดที่สกัดได้ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ 0.8% agarose gel ใน 1x TAE buffer แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที เมื่อสิ้นสุดการทดลองนำ agarose gel มาย้อมด้วย ethidium bromide และนำไปดูแถบของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator (Vilber)

ทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน โดยส่งตัวอย่างดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ที่บริษัท มาโครเจน (Macrogen) ประเทศเกาหลี

3.7 การเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเอนไซม์ไฮยาโลโรนิเดส (HAase)

3.7.1 การเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น

ทำการถ่ายเชื้อที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์บนอาหารแข็ง 2xYT agar ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin) ที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเปิดน้ำปราศจากไอออนผ่านการฆ่าเชื้อ 2 มิลลิลิตร หยดลงบนผิวหน้าอาหาร และเชื้อให้หลุดจากผิวหน้าอาหารให้กระจายแขวนลอยอยู่ในน้ำด้วยไม้จิ้มฟันฆ่าเชื้อ จากนั้นใช้ปิเปตดูดเซลล์แขวนลอยที่ได้ 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลว 2xYT ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin) ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 เป็นเวลา 7 ชั่วโมง ซึ่งเชื้อเจริญในระยะ Mid-log phase และวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 660 นาโนเมตรจนได้ค่าการส่องผ่านแสงที่ 0.15 ± 0.005 เพื่อจำกัดปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นให้มีค่าใกล้เคียงกัน

3.7.2 การเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่าเพื่อชักนำการผลิตเอนไซม์ไฮยาโลโรนิเดส (HAase)

ทำการปิเปตเซลล์แขวนลอยที่ได้จากขั้นตอน 3.7.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (1% v/v) ลงสู่อาหารเหลว 2xYT ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และเติมสารชักนำ isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 1 มิลลิโมลาร์ เพื่อให้เกิดการแสดงออกของยีน บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และทำการทดลองในเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็วรอบในการหมุน ที่กำหนด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์การเจริญเติบโตโดยวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 660 นาโนเมตร และแบ่งอีกส่วนมาปั่นแยก

ตะกอนเซลล์ ในเครื่องปั่นควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มาวิเคราะห์สถานะที่เหมาะสมกับกิจกรรมของเอนไซม์ไฮยาโลโรนิเดส ทุก 2 ชั่วโมง ทั้งสองการทดลอง

3.8 การศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไฮยาโลโรนิเดส

ทำการเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ในอาหารเหลว 2xYT ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin) ตามวิธีในข้อ 3.7.2 โดยแปรผันปัจจัยต่างๆ ดังนี้

3.8.1 อัตราการเขย่า

ทำการศึกษาอัตราการเขย่าที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ โดยควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 และอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ปรับความเร็วรอบ ในช่วง 0 ถึง 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ค่าความขุ่นของสารแขวนตะกอนของเชื้อจุลินทรีย์ทุก 2 ชั่วโมง โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวช่วงคลื่น 660 นาโนเมตร เพื่อวิเคราะห์ช่วงเวลา และอัตราการเขย่าที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ดีที่สุด

3.8.2 อุณหภูมิ

ทำการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ โดยควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 ปรับอัตราการเขย่าในการเพาะเลี้ยงตามผลการทดลองที่ดีที่สุดจากข้อ 3.8.1 และนำมาบ่มที่อุณหภูมิในช่วง 30 ถึง 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ค่าความขุ่นของสารแขวนตะกอนของเชื้อจุลินทรีย์ทุก 2 ชั่วโมง โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวช่วงคลื่น 660 นาโนเมตร เพื่อวิเคราะห์ช่วงเวลา และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ดีที่สุด

3.8.3 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

ทำการศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ โดยควบคุมอัตราการเขย่า และอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง ที่ดีที่สุดในการเจริญเติบโตของเชื้อ ตามข้อที่ 3.8.1, 3.8.2 จากนั้นบ่มที่ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารในช่วง 5 ถึง 9 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ค่าความขุ่นของสารแขวนตะกอนของเชื้อจุลินทรีย์ทุก 2 ชั่วโมง โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวช่วงคลื่น 660 นาโนเมตร เพื่อวิเคราะห์ช่วงเวลา และค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ดีที่สุด

3.9 การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส

3.9.1 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสจากยีนรีคอมบิแนนท์ด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โดยดัดแปลงวิธีของ (Laemmli, 1970)

ทำการเตรียม 12% separation gel 2 ส่วน ใน 3 ส่วน ของกล่อง ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที เมื่อเจลแข็งตัวจึงเตรียม 4.5 % stacking gel 1 ส่วนใน 3 ส่วน ของกล่อง พร้อมกับเสียบไม้คั้นไว้สำหรับหยอดทดสอบสารตัวอย่าง ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที จนเจลแข็งตัว แล้วนำตะกอนเซลล์จากข้อ 3.7.2 ที่ผ่านการแช่แข็ง ที่อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส เพื่อให้ผนังเซลล์แตก ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมสีย้อม 2x loading dye ความเข้มข้น 8.3 ไมโครลิตร ให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แช่น้ำแข็งทันที จากนั้นหยอดสารตัวอย่างที่ผ่านการย่อยสรีและโปรตีนมาตรฐานพร้อมกับเติม TE buffer และจ่ายไฟที่ 50 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที 80 โวลต์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จนสารตัวอย่างตกจากเจลจนหมด แล้วจึงนำผลที่ได้ไปย้อมด้วยโครมาซีบลูเป็นเวลา 4 ชั่วโมง และล้างสีย้อมออก ด้วย destaining solution

3.9.2 การศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส

ทำการศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของสารละลายเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่ไม่ทำให้บริสุทธิ์ต่อสารละลายกรดไฮยาลูโรนิก โดยเทคนิค Morgan-Elson ซึ่งดัดแปลงจาก (Chaplin, 1986; Leaback และ Walker, 1963) จากการนำกรดไฮยาลูโรนิกบริสุทธิ์จากหงอนไก่ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาทำปฏิกิริยาด้วยสารละลายเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่ไม่ทำให้บริสุทธิ์ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสถูกผลิตจากโคลนนิ่งของเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านการโคลนนิ่ง มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT ที่เติมแอมพิซิลลินเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 และที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยทำการวัดการเจริญเติบโตด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ช่วงความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จนได้ค่าการส่องผ่านแสงที่ 0.15 ± 0.005 ที่เวลาเพาะเลี้ยงประมาณ 7-8 ชั่วโมงเพื่อจำกัดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นให้มีปริมาณใกล้เคียงกัน จากนั้นเปิดเซลล์แขวนลอยปริมาณ 1 มิลลิลิตร ไปเลี้ยงต่อในอาหารเหลว 2xYT ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีแอมพิซิลลินเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และสาร IPTG เพื่อชักนำการผลิตโปรตีน ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ, ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอัตราการเขย่า จากผลการทดลองการเจริญเติบโตที่ดีที่สุดของเชื้อจุลินทรีย์ *E. coli* JM109 ที่มีพลาสมิด pGE80L-hyala หัวข้อ 3.8 โดยเก็บตัวอย่างที่เวลาการเจริญเติบโตที่ดีที่สุด นำมาทำการปั่นแยกตะกอนเซลล์ออกจากสารละลาย ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่อัตราการหมุน 3,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

แยกสารละลายส่วนใสออกจากตะกอน และนำตะกอนเซลล์ มาปรับความเข้มข้นที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และนำเอนไซม์ที่ได้ไปแช่แข็ง ที่อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำปราศจากประจุผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และสารละลายบัฟเฟอร์ที่ความเป็นกรด-ด่างในช่วง 4 ถึง 9 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในช่วงอุณหภูมิ 25-50 องศาเซลเซียสเพื่อเริ่มกิจกรรมเอนไซม์ และศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่าง รวมถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ โดยเก็บตัวอย่างที่เกิดปฏิกิริยาแล้วปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาหยุดกิจกรรมเอนไซม์ด้วย Reagent A ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 3 นาที นำไปแช่น้ำเย็นจนเท่าอุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงใส่ Reagent B ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 585 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีอยู่ในสารตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาพที่ ง.2)

สร้างกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลายน้ำตาลเอ็น-อะซีทิล-ดี-กลูโคซามีน (N-acetyl-D-glucosamine) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของกรดไฮยาลูโรนิก มาตรฐานเข้มข้น 0-1.0 โมล ต่อมิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์ดังข้างต้นแล้วเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลเอ็น-อะซีทิล-ดี-กลูโคซามีน (N-acetyl-D-glucosamine) กับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้

3.10 จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส

การศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสโดยวิเคราะห์จากค่า K_m (Michaelis-Menten constant) และ V_{max} (maximum velocity) ด้วยสมการของ Michaelis-Menten plots และ Lineweaver-Burk plot ประยุกต์กับการหากิจกรรมของเอนไซม์โดยเทคนิค Morgan-Elson ซึ่งดัดแปลงจาก (Chaplin, 1986; Leaback และ Walker, 1963) จากสารละลายตะกอนเซลล์ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของเชื้อจุลินทรีย์ *E.coli* JM109 ที่มีพลาสมิด pGE80L-*hyaLA* โดยการชักนำด้วย IPTG ระหว่างเพาะเลี้ยง ในสภาวะการเจริญเติบโตที่ดีที่สุดจากข้อที่ 3.8 นำสารละลายเอนไซม์ที่ไม่ทำให้บริสุทธิ์ปริมาตร 200 ไมโครลิตร มาทำปฏิกิริยากับสับสเตรทกรดไฮยาลูโรนิกในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำมาผสม กับน้ำปราศจากประจุผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และสารละลายบัฟเฟอร์ที่ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมจากข้อ 3.9 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มในที่อุณหภูมิที่ดีที่สุดในการทำงานของเอนไซม์จากข้อ 3.9 เพื่อเริ่มกิจกรรมเอนไซม์ จากนั้นทำการเก็บตัวอย่าง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาหยุดกิจกรรมเอนไซม์ด้วย Reagent A ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 3 นาที นำไปแช่น้ำเย็นจนเท่าอุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงใส่ Reagent B ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 585 นาโนเมตร และคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีอยู่ในสารตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับ กราฟมาตรฐาน (ภาพที่ ง.2) เพื่อนำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของสับสเตรทกรดไฮยาลูโรนิก (s) ที่เวลาต่างๆ โดยค่าความชันของกราฟคือ ค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยา (V_0) จากนั้นนำค่า V_0 ของแต่ละความเข้มข้นสับสเตรทไปเขียนกราฟ Lineweaver-Burk plot ความสัมพันธ์ระหว่าง $1/V_0$ กับ $1/S$ และ Michaelis-Menten plots ความสัมพันธ์ระหว่าง V_0 กับ S ผลการวิเคราะห์จะสามารถคำนวณหาค่า V_{max} และ K_m จะมีค่าเท่ากับ V_{max}

บทที่ 4

ผลการทดลอง วิเคราะห์ผลการทดลอง

ในบทนี้แสดงผลการทดลองการปรับปรุงสายพันธุ์ เชื้อ *Streptococcus pyogenes* ATCC 6550 เพื่อการผลิตเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส โดยในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงทำการศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ ได้แก่ อัตราการเขย่า อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และเวลาในการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นนำสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากกระบวนการเพาะเลี้ยงไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส โดยเทคนิค Morgan-elson method ที่สภาวะต่างๆ ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายบัฟเฟอร์ และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ รวมถึงวิเคราะห์ค่าทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์

4.1 การปรับปรุงพันธุ์กรรมด้วยเทคนิค recombinant gene expression เพื่อผลิตเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (HYALs)

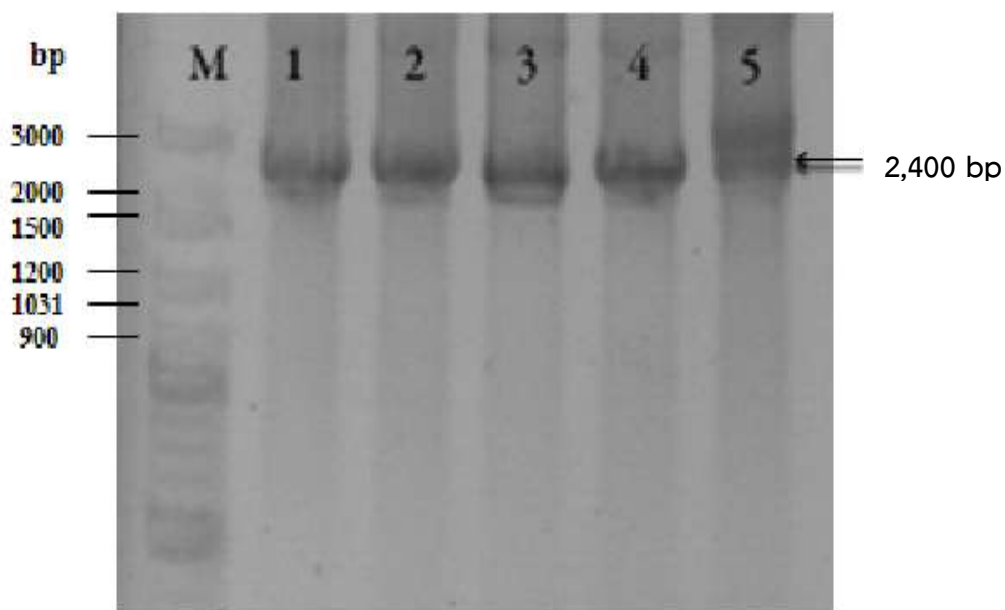
การปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อ *Streptococcus pyogenes* ATCC 6550 เพื่อการผลิตไฮยาลูโรนิเดส ด้วยเทคนิค genetic recombination โดยใช้ไพรเมอร์ hyAf และ hyAr ที่จำเพาะกับยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ไฮยาลูโรนิเดส จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์โดยใช้กระบวนการ ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) พบว่าสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอของยีนไฮยาลูโรนิเดสจากเชื้อ *Streptococcus pyogenes* ATCC 6550 และตรวจสอบขนาดของ PCR product ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ 0.8% agarose gel

4.1.1 จากการศึกษาขนาดดีเอ็นเอที่ผ่านการโคลนยีน พบว่า ขนาดของแถบดีเอ็นเอประมาณ 2,400 คู่เบส เมื่อเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus Fermentas ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับดีเอ็นเอ ต้นแบบที่มีขนาด 2,700 คู่เบส แต่ดีเอ็นเอที่ทำการทดลองมีขนาดสั้นกว่าเนื่องด้วย ดีเอ็นเอที่ทำการทดลองผ่านการตัดสาย signal peptide ออกเพื่อประสิทธิภาพในการส่งสารสำคัญออกภายนอกเซลล์ ดังภาพที่ 4.1 ซึ่งมีสีเข้ม และขนาดใหญ่กว่าแถบดีเอ็นเอแถบอื่นหรือกล่าวได้ว่ามีแถบไม่จำเพาะเกิดขึ้นน้อยมาก เนื่องด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ มีความเหมาะสม

4.2 การโคลนยีนไฮยาลูโรนิเดสเข้าสู่ในเซลล์เชื้อจุลินทรีย์ *Escherichia coli*

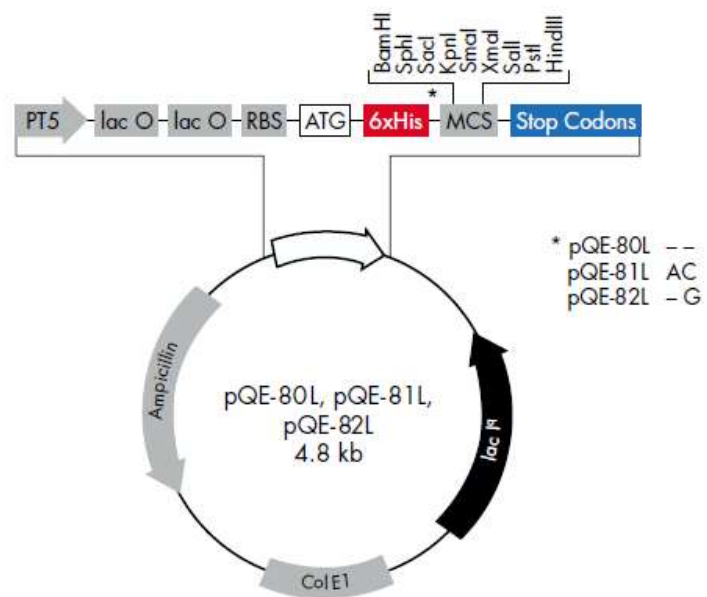
ทำการนำแถบดีเอ็นเอที่ผ่านการแทรกยีนที่ต้องการให้กับ pQE80-L expression vector cell JM109 และ BL21 (ภาพที่ 4.2) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง 2xYT ที่มีแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM109 เท่านั้น ที่มียีนไฮยาลูโรนิเดส แสดงดังภาพที่ 4.3 เนื่องจาก competent cell ของ *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21 อาจมีการสร้างสารพิษที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ และไม่มีความจำเพาะต่อ pQE80-L expression vector ซึ่งควรมี P7 promoter ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีน เช่นเดียวกับงานวิจัยของ (พรศรี, 2547) ที่ทำการตัดต่อดีเอ็นเอของเชื้อ *Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus* โดยใช้เวกเตอร์ pGEM-T และ transform เข้าไปใน competent cell ของเชื้อ *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS, *Escherichia coli* BL21 codon plus, *Escherichia coli* HMS174 (DE3) pLysS, *Escherichia coli* JM 109 ซึ่งพบว่าสามารถถ่ายถอดยีน เข้า competent cell ของเชื้อ *Escherichia coli* JM 109 ได้ดี และแสดงออกได้อย่างสมบูรณ์ แต่เวกเตอร์ชนิดอื่นมีการแสดงออกของยีนเพียงเล็กน้อยหรือไม่สามารถ transform เข้าได้เลย จากนั้นทำการวิเคราะห์ขนาดของพลาสมิด โดยการคัดเลือกโคโลนีที่เกิดขึ้นไปจำนวน 5 โคโลนี เพื่อนำไปสกัด พลาสมิดด้วยวิธี alkaline analysis (Sambrook และคณะ, 1989) และนำไปตรวจสอบวิเคราะห์ขนาดของพลาสมิดที่สกัดได้ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ 0.8% agarose gel

4.2.1 จากการศึกษาพบว่ามียีนแถบดีเอ็นเอของทั้ง 5 โคโลนี ที่พบมีขนาดประมาณมากกว่า 3,000 คู่เบส โดยโคโลนีที่มีขนาดแถบเด่นชัดที่สุดคือโคโลนีที่ 3 ดังภาพที่ 4.4 เนื่องจาก plasmid มีลักษณะ Sypercoil ที่เคลื่อนที่เร็วกว่าขนาดจริงมีขนาดประมาณ 2,400 คู่เบส ดังนั้นเมื่อนำพลาสมิดจากโคโลนีที่ 3 ไปวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮยาลูโรนิเดส จากเชื้อ *Streptococcus pyogenes* ATCC 6550TM ให้กับเวกเตอร์ pQE80-L expression vector cell JM109 พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮยาลูโรนิเดส มีความคล้ายคลึงกับข้อมูลยีนจากเชื้อ *Streptococcus pyogenes* ATCC 6550TM ที่รายงานไว้ใน GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) แสดงดังภาคผนวก ฉ.1 ถึง ฉ.3 จึงนำโคโลนีที่ 3 ไปทำการทดลองเพื่อวิเคราะห์ในด้านอื่นๆต่อไป



ภาพที่ 4.1 ผลการตรวจสอบยีน *hyl A* ด้วยเทคนิค PCR จากไพรเมอร์ *hyA f* และ *hyA r*

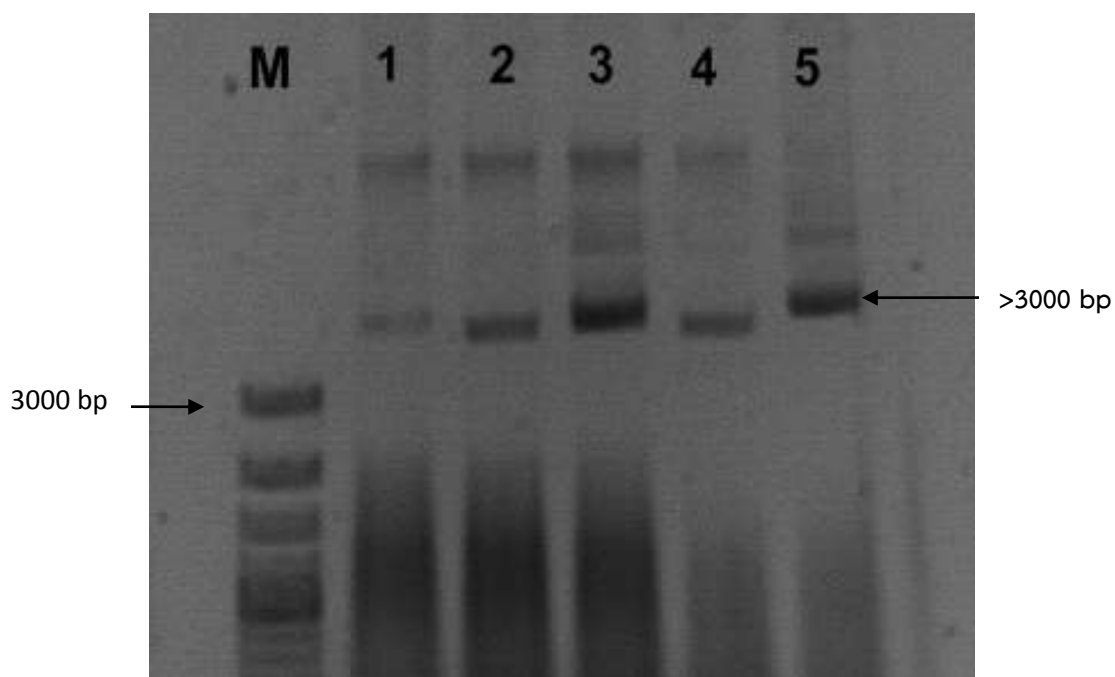
- ช่องที่ M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus (Fermentas)
- ช่องที่ 1 : ผลิตภัณฑ์ PCR colony ที่ 1
- ช่องที่ 2 : ผลิตภัณฑ์ PCR colony ที่ 2
- ช่องที่ 3 : ผลิตภัณฑ์ PCR colony ที่ 3
- ช่องที่ 4 : ผลิตภัณฑ์ PCR colony ที่ 4
- ช่องที่ 5 : ผลิตภัณฑ์ PCR colony ที่ 5



ภาพที่ 4.2. pQE80-L Expression Vectors



ภาพที่.4.3 โคลนิจากเชื้อจุลินทรีย์ *E. coli* ที่มี plasmid pQE80-L ของยีน *hyalA* เจริญบนอาหารแข็ง 2xYT ที่มีแอมพิซิลลินเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.4 ผลการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ *E. coli* ที่มี plasmid pQE80-L ของยีน *hyalA*

- ช่องที่ M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน
- ช่องที่ 1 : พลาสมิดของโคโลนีที่ 1
- ช่องที่ 2 : พลาสมิดของโคโลนีที่ 2
- ช่องที่ 3 : พลาสมิดของโคโลนีที่ 3
- ช่องที่ 4 : พลาสมิดของโคโลนีที่ 4
- ช่องที่ 5 : พลาสมิดของโคโลนีที่ 5

4.3 ทำการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮยาลูโรนิคด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โดยตัดแปลงวิธีของ Laemmli (1970)

การตรวจสอบโปรตีนหรือเอนไซม์จาก supernatant และตะกอนเซลล์ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากเชื้อจุลินทรีย์ *Escherichia coli* ที่ผ่านการโคลนนิ่ง และการชักนำการผลิตโปรตีนระหว่างการเพาะเลี้ยงด้วย IPTG ในอาหารเหลว 2xYT

จากผลการทดลองพบว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้จาก supernatant และสารละลายตะกอนเซลล์ปรากฏแถบโปรตีนไม่ชัดเจนหรือสามารถสรุปได้ว่าปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้น้อยมาก แต่เมื่อทำการวิเคราะห์ พบว่าในเชื้อจุลินทรีย์ชนิด *Escherichia coli* ไม่มีระบบหลั่งสารออกจากเซลล์ ทำให้เอนไซม์ไม่ถูกปล่อยออกมาจากเซลล์ จึงไม่พบแถบโปรตีนในการทดลอง ดังนั้นจึงแก้ไขปัญหาโดยการนำ supernatant และสารละลายตะกอนเซลล์ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อให้เซลล์ของ *Escherichia coli* แตก และทำให้ไฮยาลูโรนิคเริ่มการทำงาน ผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับขนาดโปรตีนมาตรฐานพบว่า supernatant และสารละลายตะกอนเซลล์ พบโปรตีนที่ตำแหน่งเดียวกัน คือที่ขนาดประมาณ 88 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 4.6 และภาพที่ 4.7) แต่เมื่อพิจารณาความเข้มของแถบโปรตีนที่เกิดจาก supernatant พบว่ามีความหนาแน่นของเซลล์ปริมาณน้อยทำให้เมื่อแช่แข็งให้เซลล์แตกแล้ว เอนไซม์ภายในที่ปล่อยออกมายังมีปริมาณน้อยอยู่ ทำให้แถบโปรตีนที่เกิดจาก supernatant มีสีจาง และขนาดของแถบโปรตีนเล็ก

จากการศึกษาขนาดโปรตีนจากไฮยาลูโรนิคพบว่าขนาดมีความสอดคล้องกับค่ามวลโมเลกุลที่ได้จากการคำนวณ (calculated molecular mass) ดังสูตรการคำนวณต่อไปนี้

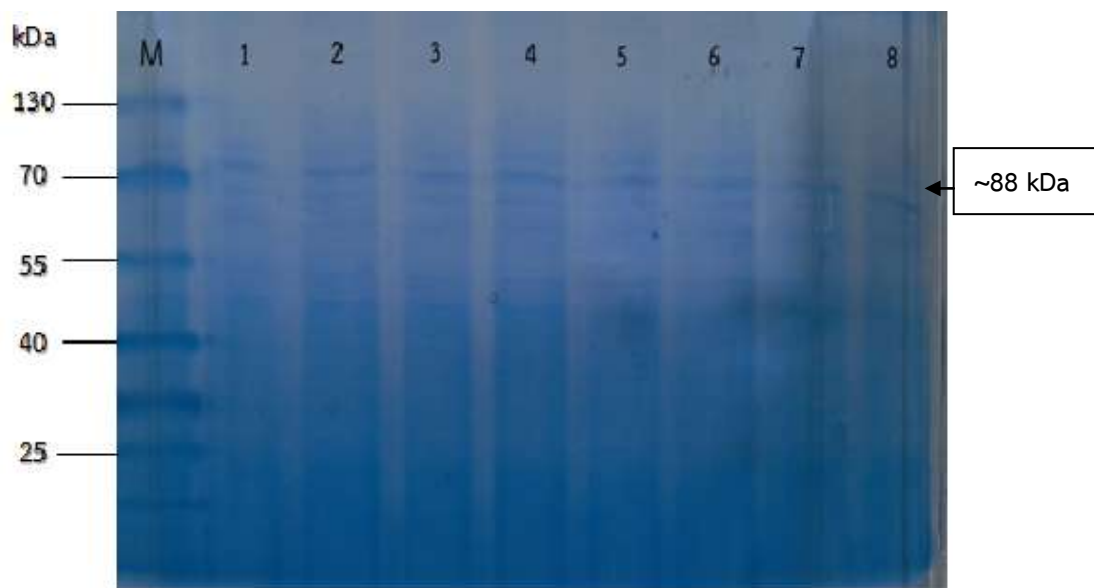
$$\text{มวลโมเลกุล} = \left(\frac{\text{ขนาดดีเอ็นเอ}}{3} \right) \times 110 \text{ (โมเลกุลเฉลี่ยของกรดอะมิโน)} \quad (3.1)$$

ค่ามวลโมเลกุลจากการคำนวณคือ

$$\left(\frac{2,400}{3} \right) \times 110 = 88 \text{ กิโลดาลตัน}$$

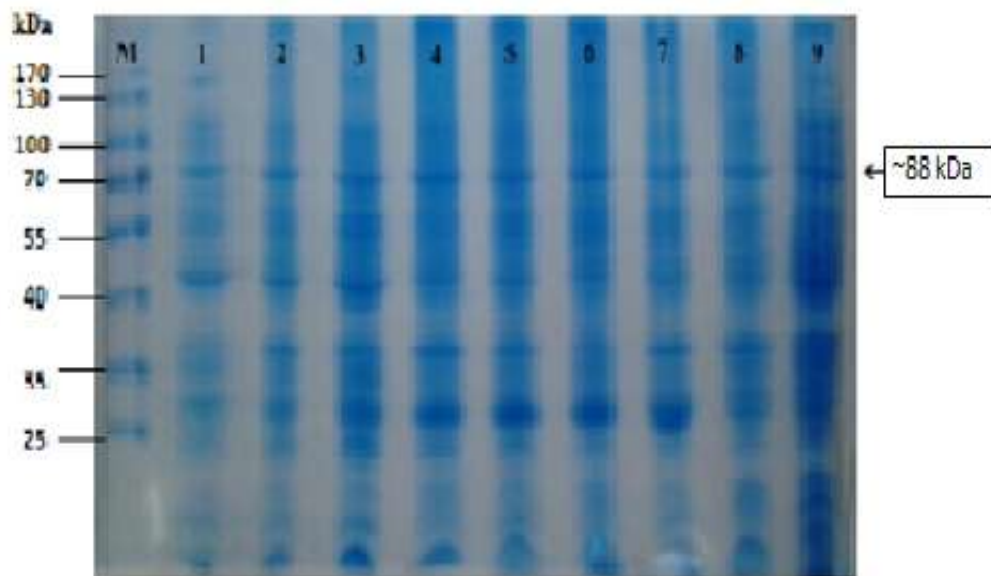
พบว่าค่ามวลโมเลกุลของโปรตีนที่ได้จากการทดลอง และค่ามวลโมเลกุลของโปรตีนที่ได้จากการคำนวณมีค่าใกล้เคียงกัน ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้เป็นของ เชื้อจุลินทรีย์ *E. coli* JM109 ที่มีพลาสมิด pGE80L-hyaA อีกทั้งเมื่อทำการศึกษาค่ามวลโมเลกุลของโปรตีนของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิค จากงานวิจัยอื่นๆพบว่า เอนไซม์ไฮยาลูโรนิคจากเยื่อหุ้มเซลล์ *Streptococcus*

ที่ผ่านการปรับปรุงโดยใช้ Triton X-114 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 52 กิโลดาลตัน (Prehm และ Mausolf, 1986) , จากเชื้อ *Streptococcus sp.* ที่ผ่านการออกแบบกลุ่มยีน has และทำ southern blot มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 56 กิโลดาลตัน (Lansing และคณะ, 1993) , จากเชื้อ *Streptococcus zooepidemicus* cvcc 2336 ใน plasmid pBV220 และเชื้อ *Escherichia coli* JM109 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 96 กิโลดาลตัน (Guo และคณะ, 2009) , จากเชื้อ *Streptococcus agalactiae* มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 121 กิโลดาลตัน, จากเชื้อ *Streptococcus Pneumonia* น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 107 กิโลดาลตัน, จากเชื้อ *Streptococcus aureus* น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 92 กิโลดาลตัน, จากเชื้อ *Streptomyces sp* น้ำหนักโมเลกุลประมาณ. 77 และ 84 กิโลดาลตัน (Hynes และWalton, 2000) โดยจาก (Farrell และคณะ, 1995) พบว่าเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงประมาณ 50 ถึง160 กิโลดาลตัน (Linhardt, Galliher และ Cooney, 1986) ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส จากเชื้อจุลินทรีย์ *E.coli* JM109 ที่มี พลาสมิด pGE80L-*hyalA* กับเอนไซม์จากแหล่ง-อื่นๆ ดังรายงานวิจัยข้างต้นพบว่า โพรตีนที่ผลิตได้มีเล็กกว่างานวิจัยของ (Guo และคณะ, 2009; Hynes และWalton, 2000) แต่มีขนาดใหญ่กว่างานอื่นๆ ซึ่งขนาดโมเลกุลของเอนไซม์มีผลต่อการทำปฏิกิริยาหรือกิจกรรมของเอนไซม์ โดยถ้าเอนไซม์มีขนาดเล็กประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยากับสับสเตรทก็จะมีค่าสูง โดยความสามารถของเอนไซม์สามารถยืนยันได้เมื่อวิเคราะห์ ค่ากิจกรรมเอนไซม์ ซึ่งแสดงผลในการทดลองขั้นต่อไป



ภาพที่ 4.5 ขนาดเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสจาก supernatant ของเชื้อจุลินทรีย์ *E.coli* JM109 ที่มี พลาสมิด pGE80L-*hyalA* ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วยเทคนิค SDS-PAGE

ช่องที่ M	:	โปรตีนมาตรฐาน (Fermentas)	
ช่องที่ 1, 2, 3	:	โปรตีนจาก supernatant ของเซลล์ที่เวลา	2 ชั่วโมง
ช่องที่ 4, 5	:	โปรตีนจาก supernatant ของเซลล์ที่เวลา	4 ชั่วโมง
ช่องที่ 5, 6	:	โปรตีนจาก supernatant ของเซลล์ที่เวลา	6 ชั่วโมง
ช่องที่ 6, 7	:	โปรตีนจาก supernatant ของเซลล์ที่เวลา	8 ชั่วโมง
ช่องที่ 8	:	โปรตีนจาก supernatant ของเซลล์ที่เวลา	24 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.6 ขนาดไฮยาลูโรนิเดสจากตะกอนเซลล์ ของเชื้อจุลินทรีย์ *E.coli* JM109 ที่มีพลาสมิด pGE80L-*hyaA* ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วยเทคนิค SDS-PAGE

ช่องที่ M	:	โปรตีนมาตรฐาน (Fermentas)	
ช่องที่ 1, 2, 3	:	โปรตีนจาก สารละลายตะกอนเซลล์ที่เวลา 2 ชั่วโมง	
ช่องที่ 4, 5	:	โปรตีนจาก สารละลายตะกอนเซลล์ที่เวลา 4 ชั่วโมง	
ช่องที่ 5, 6	:	โปรตีนจาก สารละลายตะกอนเซลล์ที่เวลา 6 ชั่วโมง	
ช่องที่ 6, 7	:	โปรตีนจาก สารละลายตะกอนเซลล์ที่เวลา 8 ชั่วโมง	
ช่องที่ 8, 9	:	โปรตีนจาก สารละลายตะกอนเซลล์ที่เวลา 24 ชั่วโมง	

4.4 การเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (HAase)

ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านการโคลนยีน โดยแปรผันปัจจัยดังนี้ คือ อัตราการเขย่า อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากนั้นนำช่วงเวลา และสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ดีที่สุด ไปทำการวิเคราะห์ ในขั้นตอนการหากิจกรรมเอนไซม์ และค่าจลนพลศาสตร์ของ เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสต่อไป

4.4.1 อัตราการเขย่า

ทำการศึกษากระบวนการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *E.coli* JM109 ที่มีพลาสมิด pGE80L-*hyalA* เพื่อผลิตเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด 2xYT ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 โดย แปรผันค่าอัตราการเขย่าเป็น 150, 200 , 250 รอบต่อนาที และที่ไม่มีการเขย่า ได้ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.7

เมื่อพิจารณารูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อในทุกสภาวะจะมีแนวโน้มตามกัน คือ เชื้อจุลินทรีย์มีการเพิ่มจำนวนน้อยมากใน 2 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง ซึ่งถือเป็นระยะการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมใหม่ หลังจากนั้นจึงมีการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็วแบบทวีคูณ (log phase) จนถึงชั่วโมงที่ 10 สำหรับอัตราการเขย่าที่ 200 และ 250 รอบต่อนาทีหรือจนถึงชั่วโมงที่ 12 สำหรับอัตราการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที และที่ไม่มีการเขย่า หลังจากนั้นอัตราการเพิ่มเซลล์มีการลดลง และคงที่ตามลำดับ จัดเป็นการเข้าสู่ภาวะ stationary phase ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณสารอาหารมีค่าลดลง รวมทั้งมีการสะสมของเสียของเซลล์ในระบบ ทำให้อัตราการตายสูงขึ้น ดังนั้นความเข้มข้นของเซลล์จึงค่อนข้างคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 24

เมื่อเปรียบเทียบผลการเจริญเติบโตที่ได้จากการแปรผันอัตราการเขย่า พบว่า การเพิ่มอัตราการเขย่ามีส่วนส่งเสริมให้เชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญขึ้นตามลำดับ โดยที่อัตราการเขย่า 200 และ 250 รอบต่อนาที จะให้ปริมาณเซลล์สูงสุดใกล้เคียงกัน ส่วนสภาวะที่ไม่มีการเขย่า และอัตราการเขย่าต่ำที่ 150 รอบต่อนาที จะให้การเจริญเติบโตที่ไม่ดี และมีความเข้มข้นเซลล์น้อย เนื่องจากสภาวะที่มีอากาศ เชื้อ *E.coli* สามารถเปลี่ยนไพรูเวตไปเป็นอะซิเตตได้ ซึ่งส่งผลให้พลังงานที่ได้รับจากการเมตาบอลิซึมของเซลล์สูงขึ้นกว่าสภาวะที่ไร้อากาศ (Johns และคณะ, 1994) อีกทั้งอัตราการเขย่าที่เหมาะสม จะช่วยให้อัตราการส่งผ่านสารอาหาร และอากาศเป็นไปอย่างทั่วถึงอีกด้วย ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า อัตราการเขย่าที่เหมาะสมคือ 200 รอบต่อนาที เนื่องจากการเพิ่มอัตราการเขย่ามากกว่านี้ มีผลให้การเจริญเติบโตเพิ่มมวลเซลล์ไม่แตกต่างกัน

4.4.2 อุณหภูมิในการบ่ม

ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *E.coli* JM109 ที่มีพลาสมิด pGE80L-*hyalA* เพื่อผลิตเฮนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด 2xYT ที่อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที และที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 โดยแปรผันอุณหภูมิที่ 25, 30, 35, 40 และ 50 องศาเซลเซียส ได้ผลการทดลอง แสดงดังภาพที่ 4.8

เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ พบว่า เชื้อ *E.coli* จะมีการเจริญเติบโตได้ดี ตามการเพิ่มของอุณหภูมิตั้งแต่ 25 ถึง 35 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นการเพิ่มอุณหภูมิเป็น 40 องศาเซลเซียส จะมีผลทำให้การเจริญเติบโตลดลงอย่างเห็นได้ชัด แต่อย่างไรก็ดี ลักษณะการเจริญเติบโตจะมีแนวโน้มเดียวกัน คือเชื้อจุลินทรีย์มีการเพิ่มจำนวนน้อยมากใน 2 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นการระยะการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมใหม่ หลังจากนั้นจึงมีการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็วแบบทวีคูณ (log phase) จนถึงชั่วโมงที่ 10 หลังจากนั้นพบว่าความเข้มข้นของเซลล์มีการลดลง และคงที่ตามลำดับ (stationary phase) ทั้งนี้เนื่องจาก ปริมาณสารอาหารมีค่าลดลง รวมทั้งการสะสมของเสียของเซลล์ในระบบ ทำให้อัตราการตายสูงขึ้น ดังนั้นความเข้มข้นของเซลล์จึงค่อนข้างคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 24 ส่วนการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จะไม่พบการเจริญเติบโต

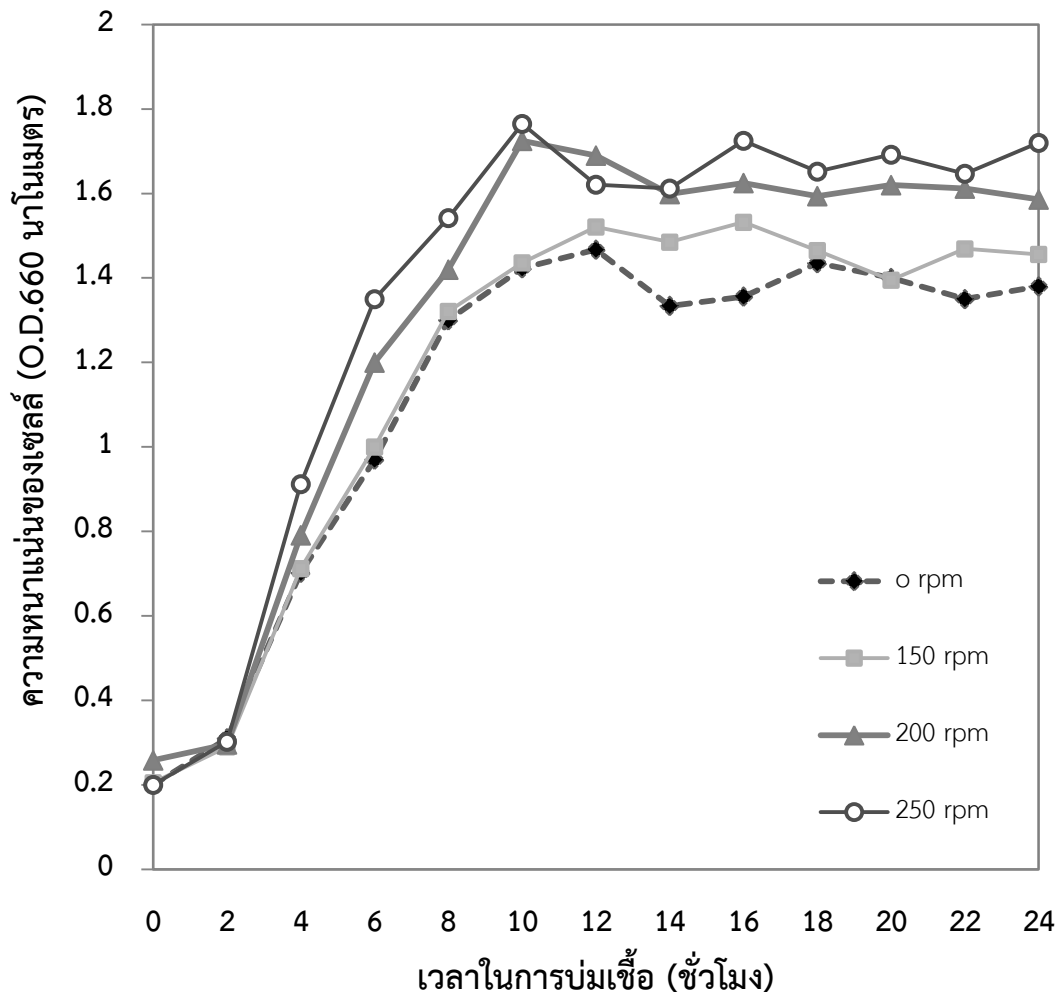
การเพิ่มอุณหภูมิมิมีผลให้กระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์มีค่าเพิ่มมากขึ้น ทำให้เชื้อเจริญเติบโตได้ดี และจะมีค่าการเจริญเติบโตได้สูงสุดในช่วงอุณหภูมิหนึ่งเท่านั้น การเพิ่มอุณหภูมิที่สูงเกินไป เชื้อจะไม่สามารถทนต่ออุณหภูมิได้ ทำให้เกิดการชะลอการเจริญเติบโต และก่อให้เกิดการตายของเชื้อในที่สุด อีกทั้งเชื้อ *Escherichia coli* เป็นจุลินทรีย์ซึ่งมักพบในเนื้อเยื่อและลำไส้ของสิ่งมีชีวิตของคน และสัตว์เลือดอุ่น ทำให้สามารถเจริญเติบโตได้ดีอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 30 ถึง 40 องศาเซลเซียส มีรายงานว่า เชื้อชนิดนี้ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า 42 องศาเซลเซียส แต่สามารถเติบโตในอุณหภูมิที่ต่ำได้โดยมีอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่ต่ำลง เนื่องจากมีการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์ต่ำ (Akasaka และคณะ, 1989; Ellwood และคณะ, 1995; Nimrod และคณะ, 1988; Swam และคณะ, 1990)

4.4.3 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

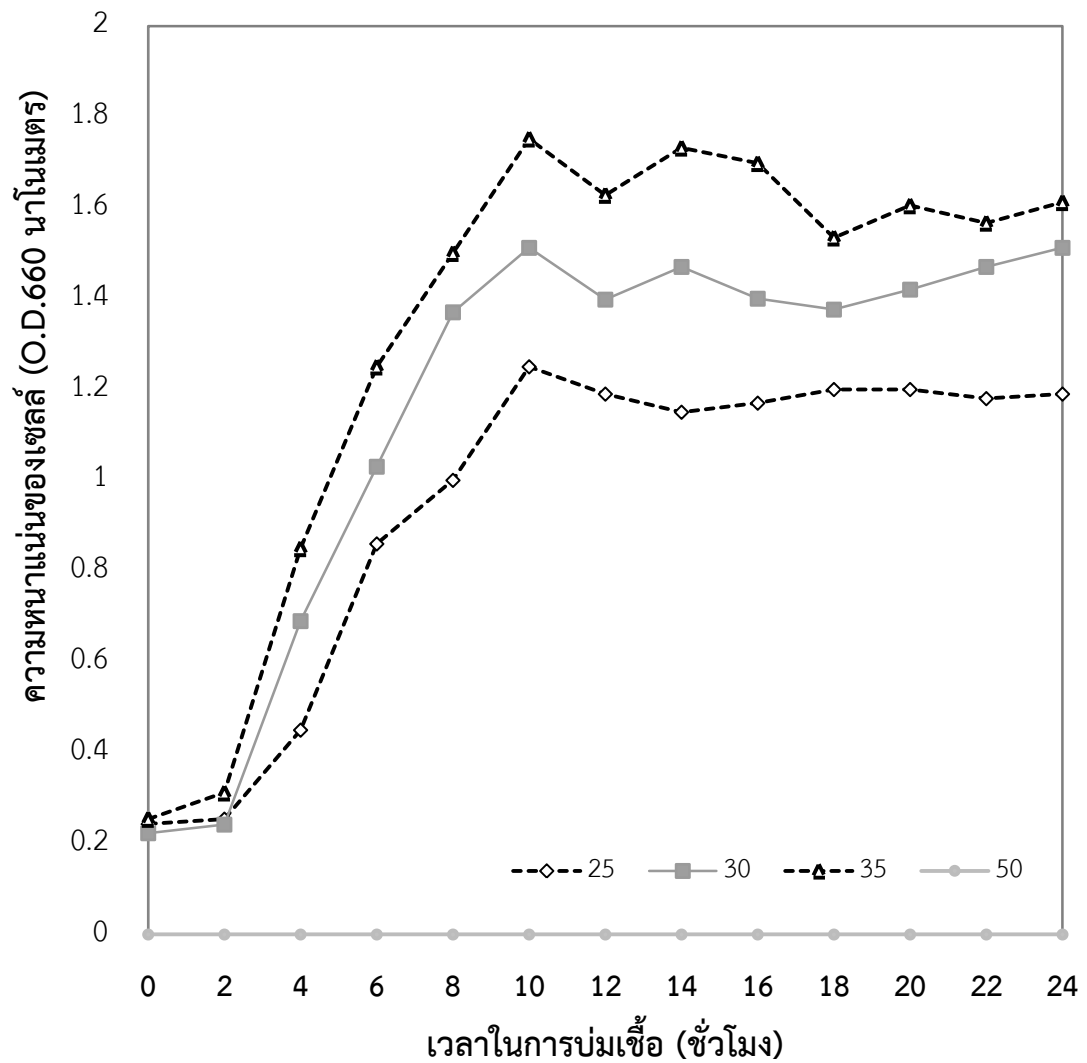
ทำการศึกษาผลกระทบของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ เชื้อจุลินทรีย์ *E.coli* JM109 ที่มีพลาสมิด pGE80L-*hyaA* เพื่อผลิตเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด 2xYT ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที โดยแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 ได้ผลการทดลอง แสดงดังภาพที่ 4.9

เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ *E.coli* JM109 ที่มีพลาสมิด pGE80L-*hyaA* จะมีการเจริญเติบโต แปรผันตามการเพิ่มของค่าความเป็นกรด-ด่าง ตั้งแต่ 5 จนถึง 8 หลังจากนั้นการเพิ่มค่าความเป็น กรด-ด่างเป็น 9 จะมีผลทำให้การเจริญเติบโต ลดลงอย่างเห็นได้ชัด แต่อย่างก็ดี ลักษณะการเจริญเติบโตจะมีแนวโน้มเดียวกัน คือ เชื้อจุลินทรีย์มีการเพิ่มจำนวนน้อยมากใน 2 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นการระยะการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมใหม่ หลังจากนั้นจึงมีการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็วแบบทวีคูณ (log phase) จนถึงชั่วโมงที่ 10 หลังจากนั้นพบว่าความเข้มข้นของเซลล์มีการลดลง และคงที่ตามลำดับ (stationary phase) ทั้งนี้เนื่องจาก ปริมาณสารอาหารมีค่าลดลง รวมทั้งการสะสมของเสียของเซลล์ในระบบ ทำให้อัตราการตายสูงขึ้น ดังนั้นความเข้มข้นของเซลล์จึงค่อนข้างคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 24 ส่วนการเพาะเลี้ยงที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4 จะไม่พบการเจริญเติบโต

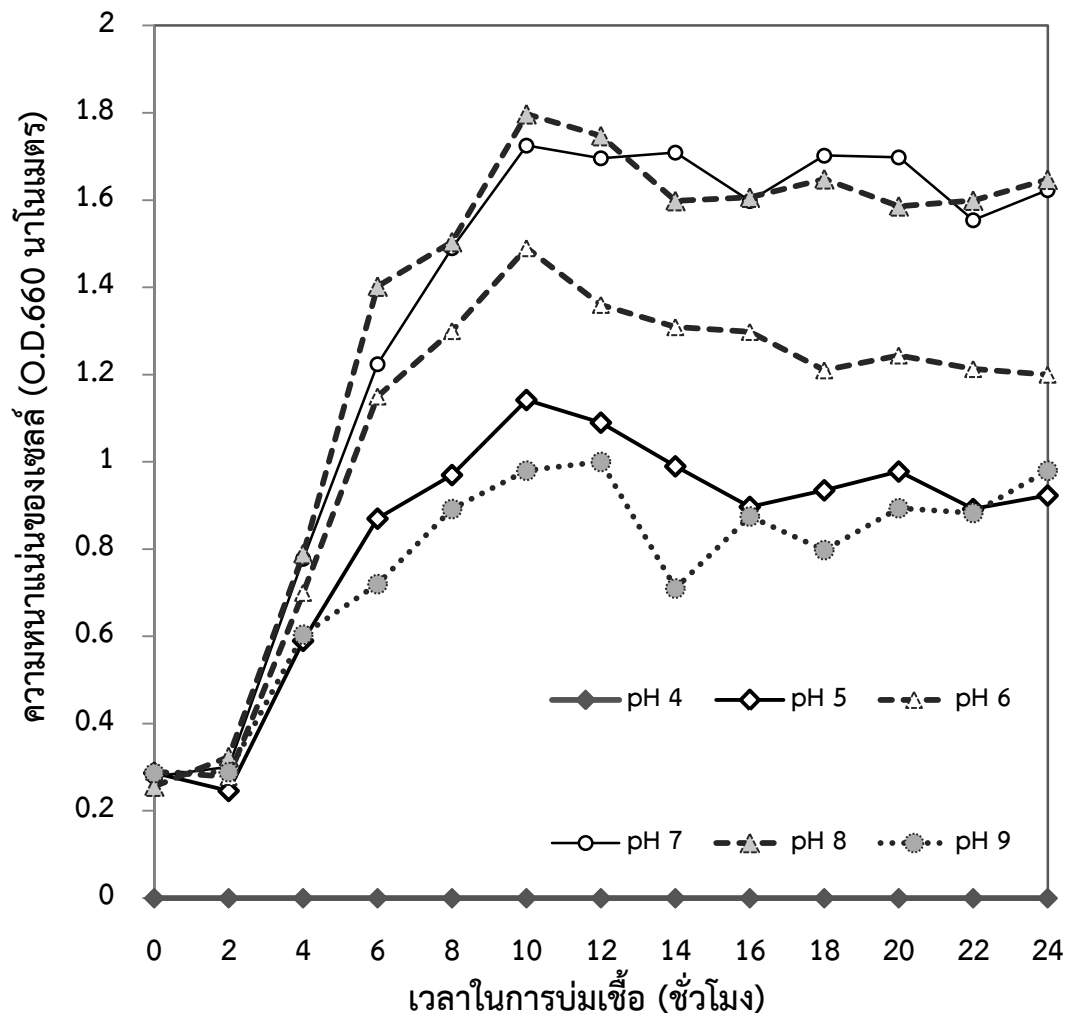
เมื่อเปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ พบว่า เชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างที่กว้าง ตั้งแต่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 5 ถึง 9 โดยถือว่า เชื้อเจริญได้ดีที่ค่าความเป็น กรด-ด่างที่เป็นกลาง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยต่างๆที่ได้รายงานถึงค่าความเป็นกรด-ด่างสำหรับอัตราการเติบโตของ *E. coli* พบว่า การเจริญเติบโตที่ดีที่สุด จะอยู่ในช่วง pH 5.5 ถึง 8.5 โดยมีช่วงต่ำสุด และช่วงสูงสุดที่เชื้อเจริญเติบโตคือที่ 4.4 และ 9.0 ตามลำดับ โดยความเป็นจริงแล้ว เซลล์ *E.coli* จะทนต่อสภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำ ดีกว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างสูง (Akasaka และคณะ, 1989; Ellwood และคณะ, 1995)



ภาพที่ 4.7 ลักษณะการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ *E.coli* JM109 ที่มีพลาสมิด pGE80L-*hyalA* โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT ในขวดเซย่า ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 7 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และที่ความเร็วรอบต่างๆ



ภาพที่ 4.8 ลักษณะการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ *E.coli* JM109 ที่มีพลาสมิด pGE80L-*hyalA* เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT ในขวดเซย่า ที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 และที่อุณหภูมิต่างๆ



ภาพที่ 4.9 ลักษณะการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ *E.coli* JM109 ที่มีพลาสมิด pGE80L-hyalA เเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT ในขวดเซย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่างๆ

4.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของไฮยาลูโรนิเนส

ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของสารละลายเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเนสที่ไม่ทำให้บริสุทธิ์ จากเชื้อจุลินทรีย์ *E.coli* JM109 ที่มีพลาสมิด pGE80L-*hyalA* โดยแปรผันปัจจัยดังนี้ คือ ค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายบัฟเฟอร์ และอุณหภูมิ ที่ส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยเทคนิค Morgan-elson method

4.5.1 ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์

ทำการศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการทำงานของสารละลายเอนไซม์ที่ไม่ทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเนส 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ความเข้มข้นกรดไฮยาลูโรนิก 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายบัฟเฟอร์ ที่ 3, 4, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5 และ 8 ได้ผลการทดลอง แสดงดังภาพที่ 4.10

จากผลการทดลองพบว่า การย่อยสลายกรดไฮยาลูโรนิกให้ได้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์จะเกิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ และมีค่าเปอร์เซ็นต์กิจกรรมสัมพัทธ์เพิ่มมากขึ้นตามลำดับ เมื่อเพิ่มค่าความเป็นกรดต่างจาก 5 ถึง 7 หลังจากนั้นค่าเปอร์เซ็นต์กิจกรรมสัมพัทธ์จะมีค่าลดลงอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเพิ่มค่าความเป็นกรดต่างเป็น 7.5 และ 8 โดยกิจกรรมของไฮยาลูโรนิเนสมีค่าสูงสุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 ประมาณ 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.5, 6, 7.5, 5 และ 8 ให้ค่าเปอร์เซ็นต์กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ 82.66, 77.01, 69.15, 68.59, 63.81 และ 60.22 ตามลำดับ แต่ที่สภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีค่าเท่ากับ 3 และ 4 จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์น้อยมาก

ทั้งนี้เนื่องมาจากค่าความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อการแตกไอออนของ prototropic group (หมู่เคมีในบริเวณพื้นที่ผิวตัวเร่งที่สามารถปล่อยไอออนหรือหมู่อัลคิลของกรดอะมิโนบน active site ของเอนไซม์ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนโครงสร้างสามมิติ ทำให้เกิดการเบี่ยงเบนในการจับกับสับสเตรท หรือการเร่งปฏิกิริยา นอกจากนี้ค่าความเป็นกรด-ด่างยังมีผลต่อการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท (ES) และการแตกไอออนของสับสเตรทโคแฟกเตอร์ ซึ่งจะนำไปสู่การจับตัวกับเอนไซม์ที่เปลี่ยนไปด้วย โดยสภาวะที่เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดนั้น เป็นผลจากการแตกตัวได้ดีที่สุดของหมู่อะมิโนบน active site ทำให้เกิดการจับโครงสร้างกันระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทได้อย่างลงตัว ดังนั้นในปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์จึงต้องควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เหมาะสม เพื่อให้เกิดการทำงานของเอนไซม์อย่างมีประสิทธิภาพ และไม่ทำให้เกิดการยับยั้งหรือขัดขวางกิจกรรมของเอนไซม์ (ปราณี, 2547)

เมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์จากแหล่งอื่นๆ ได้แก่ เอนไซม์จากเชื้อ *Streptococcus. zooepidemicus* cvcc 2336 ใน pQE80-L expression vector cell JM109 ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6 (Guo และคณะ, 2009) , จากเชื้อ *Escherichia coli jreundii* ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.8 (Brunish และ Mozersky, 2009) โดยเมื่อพิจารณารายงานการวิจัย ค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์จากแหล่งอื่นๆข้างต้นพบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่มีแหล่งที่มาจากการเชื้อจุลินทรีย์ จะอยู่ในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างที่เป็นกลางเท่านั้นตรงตามผลการวิจัยที่ทำการทดลอง

4.5.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์

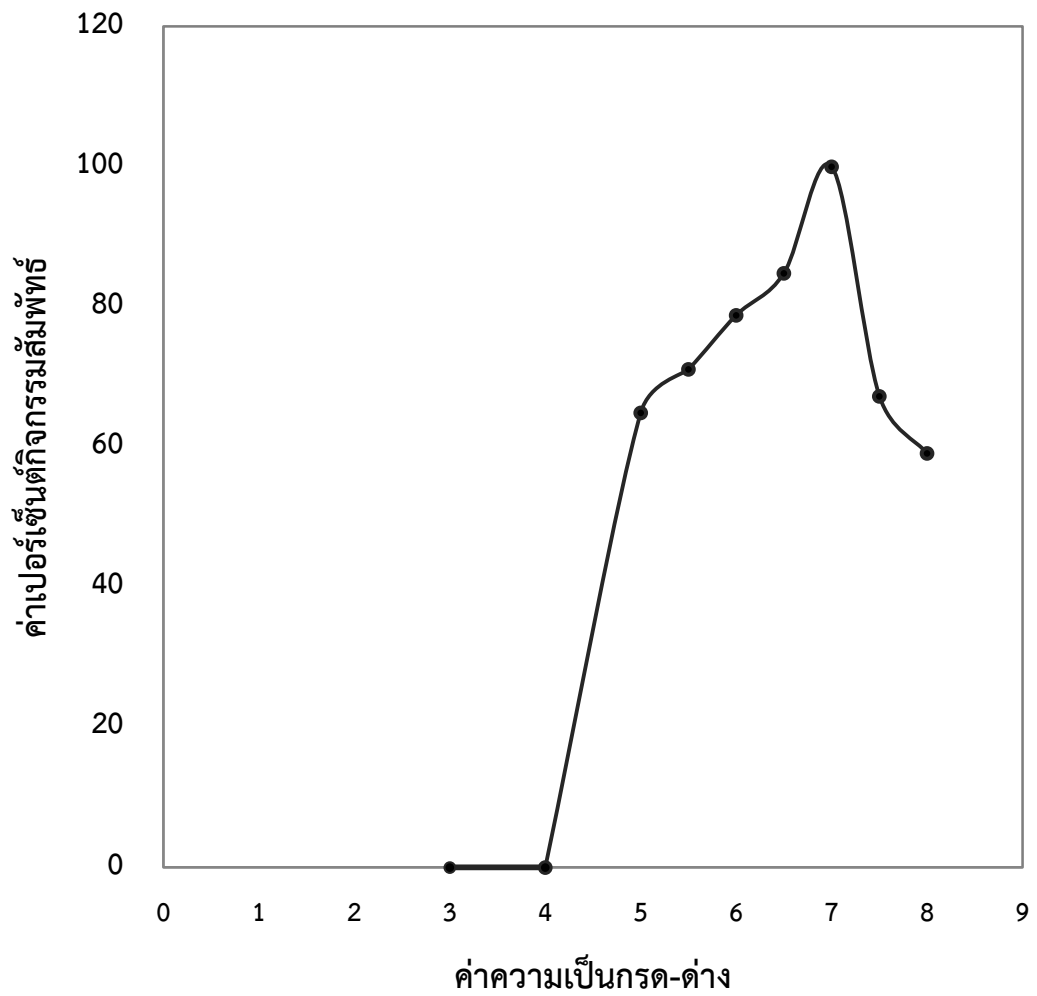
ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของสารละลายเอนไซม์ที่ไม่ทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ความเข้มข้นกรดไฮยาลูโรนิก 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ที่สภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายบัฟเฟอร์ 7 และระยะเวลา 1 ชั่วโมง โดยแปรผันอุณหภูมิที่ 25, 30, 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ได้ผลการทดลอง แสดงดังภาพที่ 4.11

จากผลการทดลองพบว่า การย่อยสลายกรดไฮยาลูโรนิกให้ได้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์จะเกิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ และมีค่าเปอร์เซ็นต์กิจกรรมสัมพัทธ์เพิ่มมากขึ้นตามลำดับ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 25 ถึง 40 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นค่าเปอร์เซ็นต์กิจกรรมสัมพัทธ์จะมีค่าลดลงอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 45 และ 50 องศาเซลเซียส โดยกิจกรรมของไฮยาลูโรนิเดสมีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ประมาณ 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 40, 30, 45, 25 และ 50 องศาเซลเซียส ที่ค่าเปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ 99.86, 93.05, 57.38 และ 56.67 ตามลำดับ ส่วนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จะให้ค่าเปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ต่ำที่สุดเพียง 18.87 เปอร์เซ็นต์

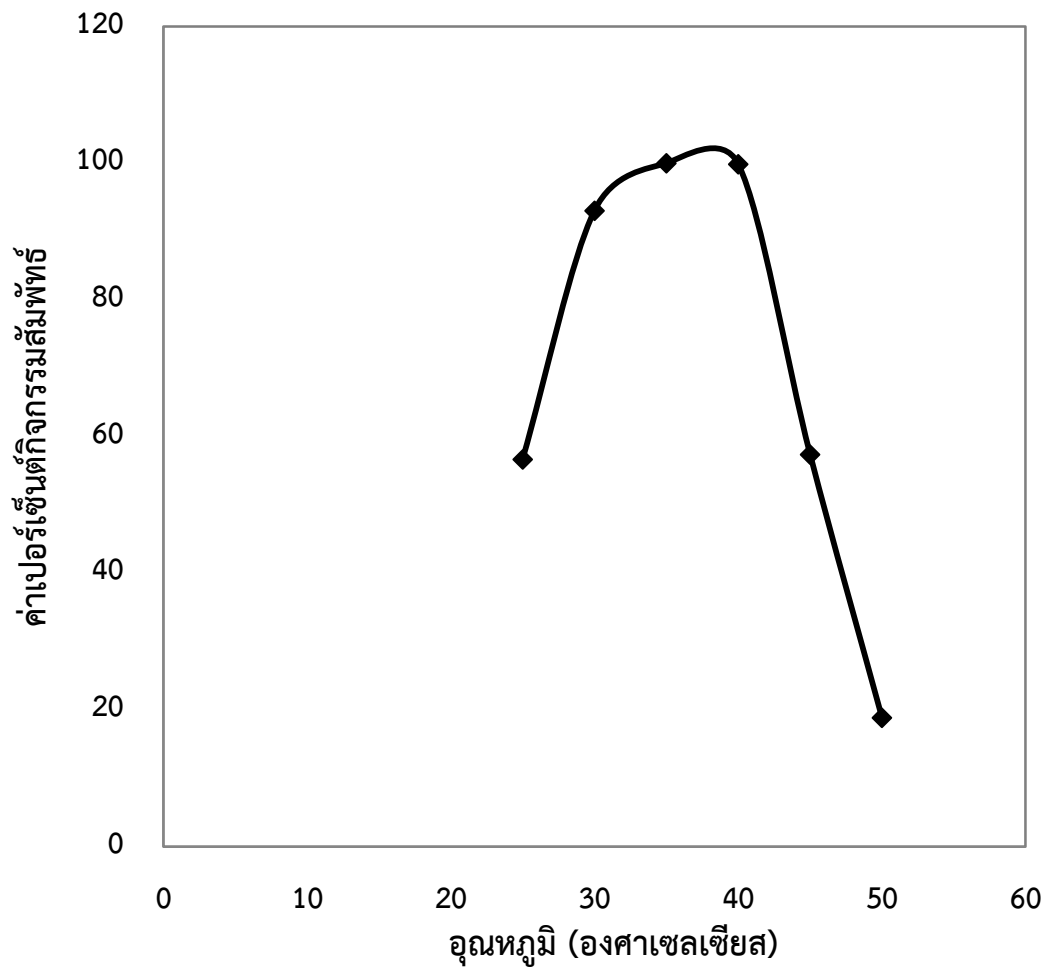
เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างสามมิติที่สลับซับซ้อน ดังนั้นเอนไซม์สามารถจะเร่งปฏิกิริยาได้ตั้นั้น จำเป็นต้องมีโครงสร้างสามมิติที่เหมาะสมต่อการทำงาน โดยเฉพาะเมื่อหมู่อัลคิลของกรดอะมิโนบน active site ต้องอยู่ในตำแหน่งที่พอเหมาะต่อการเข้าจับของสับสเตรทด้วยพันธะโควาเลนต์ เพื่อเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในระบบ จึงส่งผลให้พลังงานจลน์ของโมเลกุลเพิ่มมากขึ้น และอัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน ทำให้เกิดการสร้างพันธะและเกิดพลังงานสะสมมากพอ ในการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ได้อย่างรวดเร็ว โดยการเพิ่มอุณหภูมิจะทำให้ได้อุณหภูมิที่มากที่สุด 1 ช่วงเท่านั้น ถ้าอุณหภูมิสูงเกินจากจุด optimum จะทำให้เอนไซม์เกิดการเสียสภาพไปอย่างถาวร เนื่องจากพันธะโควาเลนต์ ซึ่งเป็นพันธะอ่อนเริ่มหลุดจากกัน

จึงส่งผลให้บริเวณ active site ของเอนไซม์มีลักษณะผิดไปจนไม่สามารถทำงานได้เหมือนเดิม (วัลลีย์, 2532) ดังนั้นอัตราเร็วของปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ค่อยๆ ลดลง

จากสาเหตุข้างต้นที่กล่าวมา ปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์จึงต้องมีการควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ เพื่อให้สามารถเกิดปฏิกิริยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ และไม่ไปยับยั้งหรือทำลายกิจกรรมของเอนไซม์ ซึ่งจากการทดลองมีแนวโน้มในทิศทางเดียวกันกับกิจกรรมของไฮยาลูโรนิเดสจากเชื้อ *Streptococcus. zooepidemicus* cvcc 2336 ใน plasmid pBV220 และเชื้อ *E. coli* JM109 ที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Guo และคณะ, 2009) ในสภาวะการทดลองเดียวกันกับผลการทดลองในงานวิจัย



ภาพที่ 4.10 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์กิจกรรมสัมพันธ์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง



ภาพที่ 4.11 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์กิจกรรมสัมพัทธ์ และอุณหภูมิ

4.6 ศึกษาสมบัติทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์

การศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสโดยวิเคราะห์จากค่า K_m (Michaelis-Menten constant) และ V_{max} (maximum velocity) ด้วยวิธี Lineweaver-Burk plot โดยใช้สารละลายเอนไซม์ที่ไม่ทำให้บริสุทธิ์เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกที่ความเข้มข้น 0 ถึง 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสถานะค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 และอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ได้อัตราการย่อยกรดไฮยาลูโรนิกเป็นน้ำตาล NAG ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.2

ตารางที่ 4.1 ค่าความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮยาลูโรนิก (S) และอัตราเร็วปฏิกิริยาเริ่มต้นของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (V_0)

S (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	V_0 (ไมโครโมลต่อ มิลลิลิตรต่อนาที)	1/S (มิลลิลิตรต่อ มิลลิกรัม)	1/ V_0 (มิลลิลิตรนาที่ต่อ ไมล)
0.2	0	5	555.56
0.4	0.0018	2.5	400.00
0.6	0.0025	1.67	232.56
0.8	0.0043	1.25	200.00
1	0.005	1	163.93

เมื่อทำการพิจารณาผลการทดลอง โดยการสร้างกราฟเส้นตรงความสัมพันธ์ระหว่าง $1/V$ (หรือ $1/V_0$) กับ $1/S$ จะสามารถคำนวณค่า K_m และ V_{max} ได้

จากรูปแบบสมการของ Lineweaver-Burk plot ภาพที่ 4.12

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \left(\frac{1}{S}\right) + \frac{1}{V_{max}}$$

จุดตัดแกน y คือ $\frac{1}{V_{max}} = 107.35$

ดังนั้น $V_{max} = 0.0093 \mu\text{mol/ml min}$

ค่าความชัน (slope) คือ

$$\frac{K_m}{V_{max}} = 84.064$$

ดังนั้น

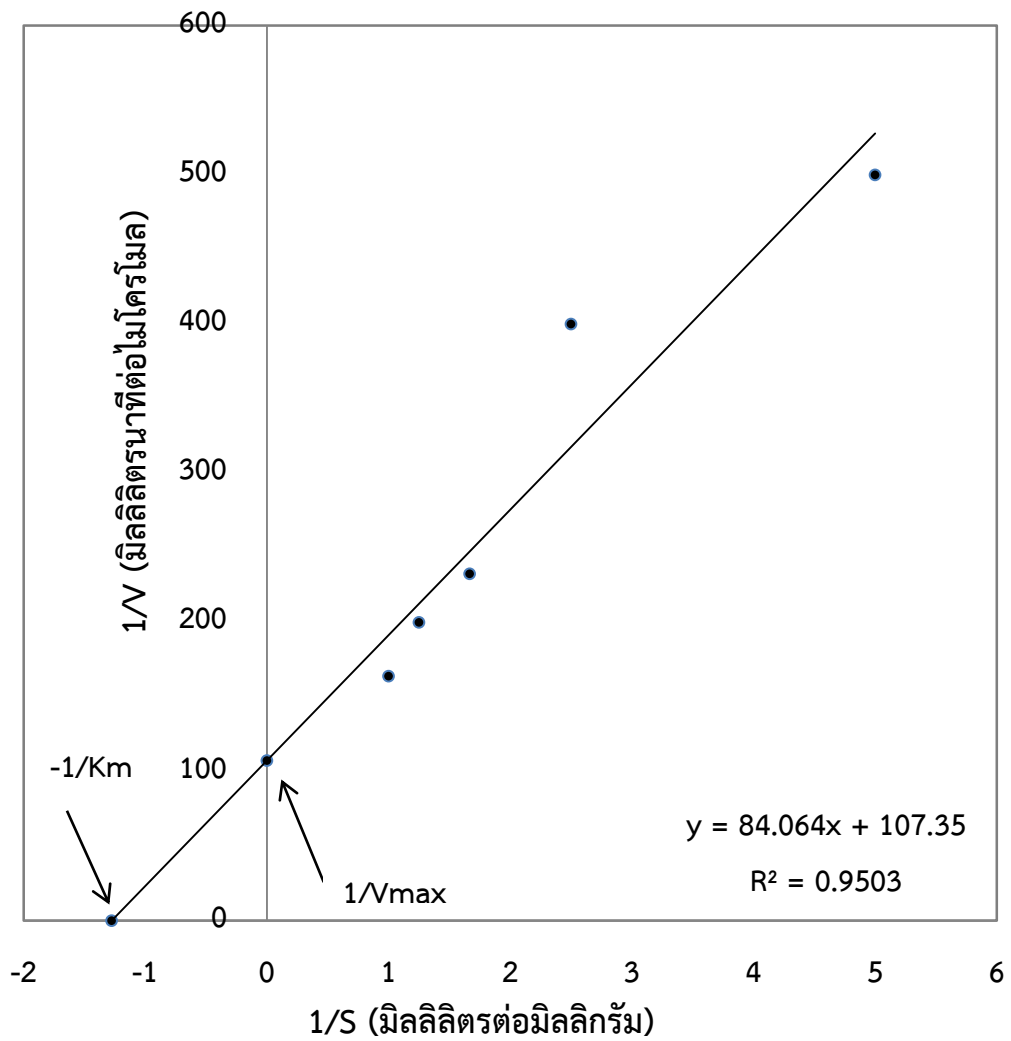
$$K_m = 0.78$$

หรือ คำนวณ ค่า K_m จากจุดตัดแกน x ซึ่งเท่ากับ

$$\frac{-1}{K_m} = -1.27$$

ดังนั้นจะได้ค่าที่เท่ากัน คือ

$$K_m = 0.78$$



ภาพที่ 4.12 กราฟ Lineweaver-Burk plot ของส่วนกลับของอัตราการทำงานของสารละลายเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่ไม่ทำให้บริสุทธิ์ และส่วนกลับของความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮยาลูโรนิก

จากผลการทดลองจากตารางที่ 4.1 พบว่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาของการทำงานของเอนไซม์ จะแปรผันตรงตามความเข้มข้นกรดไฮยาลูโรนิกที่เพิ่มขึ้นตั้งแต่ 0.2 จนถึง 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยความเข้มข้นของกรดไฮยาลูโรนิกที่เพิ่มขึ้น จะส่งผลให้มีการจับตัวกับเอนไซม์ไฮยาลูโรนิตส เพิ่มขึ้น ทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยา และกิจกรรมของเอนไซม์มีค่าสูงตามลำดับ

เนื่องจากค่า K_m (Michaelis-Menten constant) เป็นค่าที่แสดงประสิทธิภาพของเอนไซม์ แต่ละชนิด บ่งบอกถึงความจำเพาะในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท (ES) โดยอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาทั้งหมดขึ้นกับปริมาณสารประกอบเชิงซ้อน (ES) ดังนั้นถ้าค่า K_m ต่ำ จะแสดงว่า เอนไซม์ชนิดนั้นสามารถสร้างสารประกอบเชิงซ้อน (ES) ได้มาก ส่งผลให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงขึ้นด้วย และค่า V_{max} (maximum velocity) เป็นค่าอัตราเร็วสูงสุดของเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยา ซึ่งเป็นอีกตัวแปรที่แสดงประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์

ในงานวิจัยนี้สารละลายเอนไซม์ไฮยาลูโรนิตสที่ไม่ทำให้บริสุทธิ์จากเชื้อจุลินทรีย์ *E. coli* ที่มี plasmid pQE80-L ของยีน *hyalA* มีค่า K_m 0.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า V_{max} 9.3 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากงานวิจัยที่ผ่านมา (ตารางที่ 4.2) พบว่า ค่า K_m มีค่าสูงกว่าค่าของเอนไซม์ที่ได้จาก human serum (Bonner และCantey, 1966) แต่มีค่าต่ำกว่างานวิจัยอื่นๆ เนื่องจากเป็นสารละลายเอนไซม์ที่ได้ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ จึงทำให้ประสิทธิภาพการจับตัวของเอนไซม์กับสับสเตรทเกิดขึ้นไม่ดี

เมื่อพิจารณาค่า V_{max} พบว่า อัตราเร็วในการทำปฏิกิริยาสูงสุดของเอนไซม์ มีค่าสูงกว่าค่าของเอนไซม์บริสุทธิ์จากงานวิจัยแสดงว่า เอนไซม์ที่ผลิตได้มีประสิทธิภาพสูง ซึ่งหากเพิ่มขึ้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ จะยิ่งเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ให้มีประสิทธิภาพสูง และเป็นที่น่าสนใจในการนำไปพัฒนาเพื่อผลิตเอนไซม์ไฮยาลูโรนิตส ในระดับสเกลใหญ่ต่อไปในอนาคต

ตารางที่ 4.2 ตารางเปรียบเทียบค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสจากแหล่งต่างๆ

แหล่งของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส	K_m (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	V_{max} (มิลลิวินิตต่อมิลลิลิตร)	เอกสารอ้างอิง
<i>Streptococcus. zooepidemicus</i> cvcc 2336			
ใน plasmid pBV220 และเชื้อ <i>E. coli</i> JM109	0.087	6.9	Guo และคณะ (2009)
serumหรือplasma	14	5.1	(Natowicz และWang, 1996)
human serum	0.88	7	(Bonner และCantey, 1966)
human serum	0.087	6.9	(Takahashi และคณะ, 2003)
จากเชื้อจุลินทรีย์ <i>E.coli</i> JM109 ที่มีพลาสมิด pGE80L-hyalA	0.78	9.3	งานวิจัยนี้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 ทำการโคลนยีนเชื้อ *Streptococcus pyogenes* ATCC 6550 เพื่อการผลิตเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ด้วยเทคนิค genetic recombination โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะในการปรับปรุงสายพันธุ์ hyAf และhyAr โดยผ่านการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ซึ่งสามารถยืนยันผลการทดลองด้วยการวิเคราะห์ขนาดด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis พบว่ามีขนาดประมาณ 2,400 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดที่ถูกต้องตามดีเอ็นเอต้นแบบ

5.1.2 ทำการโคลนยีนที่ผลิตไฮยาลูโรนิเดสจากเชื้อจุลินทรีย์ *Streptococcus pyogenes* ATCC 6550 โดยแทรกยีนให้กับ pQE80-L expression vector cell JM109 และ BL21 เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง 2xYT ที่มีแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์จากยีนไฮยาลูโรนิเดสเจริญเฉพาะที่ทำการนำเข้าสู่ vector cell JM109 เท่านั้น และเมื่อนำไปตรวจสอบวิเคราะห์ขนาดของพลาสมิดที่สกัดได้ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis พบว่ามีขนาดใหญ่มากกว่า 3,000 คู่เบส เนื่องจากพลาสมิดมีลักษณะ Supercoil ที่เคลื่อนที่เร็วกว่าขนาดจริง และผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีการรายงานไว้ใน GenBank มีความคล้ายคลึงกับ *Streptococcus pyogenes* ถึง 99% ซึ่งยืนยันได้ว่าเชื้อที่ผ่านการโคลนยีนสามารถผลิตไฮยาลูโรนิเดสได้

5.1.3 เมื่อนำ supernatant กับ สารละลายตะกอนเซลล์จากโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ *E. coli* JM109 ที่มีพลาสมิด pGE80L-hyalA มาเพาะเลี้ยง และชักนำการสร้างโปรตีนด้วยสาร IPTG มาทดสอบด้วยวิธีอีเล็กโตรโพลีซิสด้วย สาร SDS พบว่าไม่มีการแสดงออกของโปรตีนเนื่องด้วยเชื้อจุลินทรีย์ชนิด *Escherichia coli* ไม่มีระบบหลั่งสารออกจากเซลล์ ดังนั้นจึงทำการแก้ไขโดยการไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส เพื่อให้เซลล์ของ *Escherichia coli* แตก จึงทำให้ทราบขนาดของโปรตีนที่ผลิตได้จากทั้ง supernatant และตะกอนเซลล์มีขนาดประมาณ 88 กิโลดาลตัน โดยพบว่าเอนไซม์จากตะกอนเซลล์มีความหนาแน่นมากกว่าจาก supernatant สังเกตได้จากแถบที่ทำการตรวจวัด ซึ่งเมื่อนำค่าที่ได้ไปคำนวณพบว่าเป็นโปรตีนที่ผลิตได้จากยีนต้นแบบที่ทำการโคลนยีน

5.1.4 สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของจากเชื้อจุลินทรีย์ *E. coli* ที่มี plasmid pQE80-L ของยีน *hyalA* ได้แก่ ที่เวลาในการเจริญเติบโตในช่วง 2 ถึง 10 ชั่วโมง, อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที, ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และที่ความเป็นกรด-ด่างที่ 8

5.1.5 สภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์จากจากเชื้อจุลินทรีย์ *E. coli* ที่มี plasmid pQE80-L ของยีน *hyalA* ต่อสับสเตรทกรดไฮยาลูโรนิก ที่ตรวจสอบค่ากิจกรรมเอนไซม์ด้วยเทคนิค Morgan-elson method ได้แก่ ที่เวลา 1 ชั่วโมง, ที่อุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียส และที่ความเป็นกรด-ด่างของสารละลายบัฟเฟอร์ 7

5.1.6 สามารถวิเคราะห์ค่าทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์ไม่ทำให้บริสุทธิ์ ต่อสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า อัตราเร็วปฏิกิริยาของเอนไซม์ จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นสับสเตรทที่เพิ่มขึ้น โดยมีค่าสูงที่สุดที่สารละลายกรดไฮยาลูโรนิกความเข้มข้น 1mg/ml รองลงมาคือที่ความเข้มข้น 0.8, 0.6, 0.4 และ 0.2 mg/ml พบว่าค่า K_m มีค่าเท่ากับ 0.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า V_{max} มีค่าเท่ากับ 9.3 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร จากLineweaver-Burk plot

5.2 ข้อเสนอแนะทางการปรับปรุง

5.2.1 ในการทดลองนี้ได้ทำการโคลนยีน จากเชื้อจุลินทรีย์ *Streptococcus pyogenes* ATCC 6550 โดยแทรกยีนให้กับ pQE80-L expression vector cell JM109 และผลิตเอนไซม์โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร 2xYT ที่มีการชักนำด้วย IPTG โดยเอนไซม์ที่ผลิตได้ในการทดลองยังไม่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ทำให้ค่าที่ได้จากการทดลองเช่น ค่ากิจกรรมเอนไซม์ และค่าทางจลนพลศาสตร์ยังมีค่าน้อย เนื่องจากอาจจะมีการปนเปื้อน contaminating salt, detergent และสารปนเปื้อนอื่นๆจากเอนไซม์ที่ผลิตได้ ระหว่างการเพาะเลี้ยง และอาจเป็นอันตรายเมื่อนำไปพัฒนาในการผลิตปริมาณมาก ดังนั้นควรเพิ่มกระบวนการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ เช่น วิธีโครมาโตกราฟี, และ วิธีBiogel P-4 column เป็นต้น

5.2.2. ควรหาเทคนิคเพิ่มเติมในการนำเอนไซม์ออกจากเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ *E.coli* JM109 ที่มีพลาสมิด pGE80L-*hyalA* แทนที่การแช่แข็งเนื่องจากเสียเวลาในขั้นตอนการทำละลายอีกทั้งเสี่ยงต่อการปนเปื้อนอีกด้วย เช่นการใช้คลื่นอัลตราโซนิก เป็นต้น

5.2.3 จากขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *E.coli* JM109 ที่มีพลาสมิด pGE80L-*hyalA* พบว่าอาหารที่ใช้เลี้ยงยังไม่มีการปรับปรุงสูตรดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในด้านสภาพแวดล้อม หรือสารที่เหมาะสมในการกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสให้มากขึ้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- จรรยาภรณ์ ศรีวงษ์. การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดย Streptococcus zooepidemicus ATCC35246. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2540.
- จริยา ชมวารินทร์. ชาญวิทยาลึลายวัฒน และเต็มดวง ลิมไพบูลย. PCR Technology and Applications. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2532.
- นิภาพร ศิริเพ็ญ. การปรับปรุงสายพันธุ์ Streptococcus zooepidemicus ATCC 35246 เพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก (STRAIN IMPROVEMENT OF Streptococcus zooepidemicus ATCC 35246 FOR HYALURONIC ACID PRODUCTION). วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2542.
- ปราณี อานเปลื้อง. เอนไซม์ทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่4. กรุงเทพมหานคร: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2547.
- พัชรา วีระกะลัส. เอนไซม์. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2543
- อิสลาห์ ตือราแม. การตรึงเอนไซม์ไลเปสบนพอลิฟิโนลซัลโฟนด้วยพันธะโควาเลนต์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร, 2551.

ภาษาอังกฤษ

- Akasaka, H., H. Komasaki and T. Arai. Fermentation method for producing hyaluronic acid. United states patent, No.4801539 [Online]. (1989) : Available from <http://patft.uspto.gov>. [2012, Feb 2]
- Asteriou, T., Deschrevel, B., Delpech B., Bertrand, P., Bultelle, F. C., Merai, J.C. and Vincent, K. An improved assay for the N-acetyl-D-glucosamine reducing ends of polysaccharides in the presence of proteins, Anal. Biochem. 293 (2001) : 53-59.

- Auvinen, P., Tammi, R., Parkkinen, J., Tammi, M., Agren, U., Johansson, R., Hirvikoski, P., Eskelinen, M., Kosma, V.M. Hyaluronan in peritumoral stroma and malignant cells associates with breast cancer spreading and predicts survival. Am. J. Pathol. 156 (2000) : 529-536.
- Balazs. E. A. and Band, P. Hyaluronic acid: Its structure and use. COS. (1984) : 99, 65-71
- Baltz, R.H. Strain Improvement. In A.L.Demain and N.A. Solomon. (eds) Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Washinton, D.C. American Society For Microbiology. (1986) : 154-169.
- Bitter, T., H.M. Muir. A modified uronic acid carbazole reaction. Analytical Biochemistry Volume 4, Issue 4 Anal. Biochem. 4 (1962) : 330–334.
- Brunish R., Mozersky S. M. The Characterization of hyaluronidase isolation from *Escherichia freund II*, R R BRUNISH and S M SM MOZERSKY, J Biol Chem 231 (1958) : 291-301.
- Brown, K.K. et al. Method for the microbiological production of non-antigenic hyaluronic acid. United states patent, No.5316926[Online] (1994) : Available from <http://patft.uspto.gov> [2012, Jan 18]
- Cameron, D.A., A. Sebastian, and R.W. Michael. Molecular analysis of the capsule gene region of group A *Streptococcus*: the *hasAB* genes are sufficient for capsule expression. J.bacteriol. 180 (1998) : 4955-4959.
- Chaplin, M. F. In Carbohydrate Analysis. A Practical Approach (Chaplin, M. F. and Kennedy, J. F., eds.) Oxford and Washington DC (1986) : 1-6
- Cherr, G.N., Yudin, A.I. and Overstreet, J. W. The dual functions of GPI anchored PH-20: hyaluronidase and intracellular signaling. Matrix. Biol. (2001) : 20,515-525.
- Chong F.B., and Lars M. Blank. Metabolic engineering of hyaluronic acid production [Online]. (2001) : Available from <http://www.uq.edu.au> [2012, Feb 23]
- CIFONELLI JA. and MAYEDA, M. The purification of hyaluronic acid by the use of charcoal. Biochim. Biophys. Acta. (1957) : 397–400.
- Cleary, P.P. and Larkin, A. Hyaluronic acid capsule: strategy for oxygen resistance in group A *streptococci*. J. Bacteriol. 140 (1979) : 1090–1097.

- Crater, D.L., and I. van de Rijn. Hyaluronic acid synthesis operon (*has*) expression in group A *Streptococci*. J. Biol. Chem. 270 (1995) : 18452- 18458.
- Crater, D.L., B.A. Dougherty, and I. van de Rijn. Molecular characterization of *hasC* from an operon required for hyaluronic acid synthesis in group A *Streptococci*. J. Biol. Chem 270 (1995) : 28676-28680.
- Csoka, T. B., Frost, G. I., Stern, R. Hyaluronidases in tissue invasion. Invasion Metastasis 17 (1997) : 297-311
- C.R. Wilkinson, L.M. Bower, C. Warren, Measurement of hyaluronidase activity in normal human serum, J. Pharm. Biomed. Anal 14 (1996) : 707-712.
- Daniel, J., Rigden, James, Littlejohn, E., Harshad, Joshi, V., Bert, L., Groot, de, Groot and Mark, J. Jedrzejewski. Alternate Structural Conformations of *Streptococcus pneumoniae* Hyaluronan Lyase: Insights into Enzyme Flexibility and Underlying Mechanism of Action. J. Mol. Biol. 358 (2006) : 1165-1178. Molecular
- DeAngelis, P.L., Papaconstantinou, J. and Weigel, P.H. Molecular cloning, identification , and sequence of the hyaluronan synthase gene from group A *Streptococcus pyogenes*. J. Biol. Chem. 268 (1993) : 19181-19184.
- DeAngelis, P.L. et al. Identification and molecular cloning of a unique hyaluronan synthase from *Pasteurella multocida*. J. Biol. Chem. 272 (1998) : 8454-8458.
- Deibel, R.H. and Seeley, H.W. Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed. (Baltimore: The William & Wilkins Co.,) (1971) : 490-509.
- Dorfman, A., Ott, M. L., Whitney, R. The hyaluronidase inhibitor of human blood. J. Biol. Chem. 174 (1948) : 621-629.
- Dougherty, B.A., and I. van de Rijn. Molecular characterization of *hasB* from an operon required for hyaluronic acid synthesis in group A *Streptococci*. J. Biol. Chem. 268 (1993) : 7118-7124.
- Ellwood, D.C. and others. Production of hyaluronic acid. United states patent, No.5411874 [Online] (1995) : Available from <http://patft.uspto.gov>. [2012, Feb 13]
- Eldar, A., Perl, S., Frelief, P.F. and Bercovier, H. Red drum, *Sciaenops ocellatus* mortalities associated with *Streptococcus iniae* infection. Dis. Aquat. Org. 36 (1999) : 121-127.

- Farr, C., Menzel, J., Seeberger, J. and Schweigle, B. Clinical pharmacology and possible Applications. of hyaluronidase with reference to Hylase "Dessau". Wien. Med. Wochenschr. 147 (1997) : 347-355.
- Farrell, A.M., Taylor, D. and Holland, K.T. Cloning, nucleotide sequence determination and expression of the *Staphylococcus aureus* hyaluronate lyase gene. FEMS. Microbiol. Lett. 130 (1995) : 81-85.
- Fischer-Szafarz, B. Hyaluronidase polymorphism detected by polyacrylamide gel electrophoresis. Application to hyaluronidases from bacteria, slime molds, bee and snake venoms, bovine testes, rat liver lysosomes, and human serum. Anal. Biochem. 143(1984) : 76-81.
- Fujii, K., Kawate, M., Kobayashi, Y. and Okamoto, A. Effects of the addition of hyaluronate segments with different chain lengths on the viscoelasticity of hyaluronic acid solutions. Biopolymers. 38 (1996) : 583-591.
- Gmachl, M., Sagan, S., Ketter, S., Kreil, G. The human sperm protein PH-20 has hyaluronidase activity. FEBS. Lett. 336 (1993) : 545-548.
- Gregory, I., Stern, R. A microtiter-based assay for hyaluronidase activity not requiring specialized reagents, Anal. J. Biol. Chem. 251 (1997) : 263-269.
- Guo, Xueping., Liu, Fei., Zhu, Xiqiang., Su, Yishan and Ling, Peixue. Expression of a novel hyaluronidase from *Streptococcus zooepidemicus* in *Escherichia coli* and its application for the preparation of HA oligosaccharides. Carbohydrate Polymers. vol. 77 issue 2 June 10 (2009) : 254-260.
- Haas, E. Invasion. I. Antinvasin I, an enzyme in plasma. J. Biol. Chem. 163 (1946): 63-88.
- Hascall, V.C., Laurent, T.C. Hyaluronan: Structure and physical properties.[Online]. (1997) : Available from <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan>
- Hautmann, S.H., Lokeshwar, V.B., Schroeder, G.L., Civantos, F., Duncan, R.C., Friedrich, M.G., Soloway, M.S. Elevated tissue expression of hyaluronic acid and hyaluronidase validate HA-HAase urine test for bladder cancer. J. Urol 165 (2000) : 2068-2074.
- Hynes, W. L., and Ferretti, J. J. Sequence analysis and expression in *Escherichia coli* of the hyaluronidase gene of *Streptococcus pyogenes* bacteriophage. Infect. Immun. 57 (1989) : 533-539

- Hynes, WL, Ferretti, JJ. Assays for hyaluronidase activity. Methods Enzymol. 235 (1994) 606-616.
- Humphrey, J. H. and Jaques R. Hyaluronidase : correlation between biological assay and other methods of assay. Biochem J. 53(1) (1953) : 59-62.
- Jawetz, G., Joseph, L.M. and Edward A.A. The *Streptococci*. Rev. Med. Microbiol. (1998) : 203-230.
- Johns, MR., Goh, LT. and Oeggerli A. Effect of pH, agitation and aeration on hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. Biotechnol. Lett. 16 (1994) : 507-51.
- Joklik, W.L., Wilett, H.P, and Amos, D.B. Group A *Streptococci* (*Streptococcus pyogenes*) Zinsser. Microbiol. (1980) : 555-571.
- Kendall, F.E., Heidelberger, M., and Dawson, M.H.. A serologically inactive polysaccharide elaborated by mucoid strains of group A hemolytic *Streptococcus*. J. Biol. Chem. 118 (1937) : 61-69.
- Kerstin, W. Bioinformatics [Online]. (2002) : Available from http://www.imbjena.de/~rake/Bioinformatics_WEB/proteins_purification.html [2012, Feb 25]
- Knudson, W. Tumor associated hyaluronan : providing an extracellular matrix that facilitates invasion. Am. J. Pathol 148 (1996) : 1721-1726.
- Kresse, H. Proteoglycan-structure and function. Glycoscience (1997) : 201-222.
- Kumari, K., and P.H. Weigel. Molecular cloning, expression, and characterization of the authentic hyaluronan synthase from group C *Streptococcus equisimilis*. J. Biol. Chem. 72 (1997) : 32539-32546.
- Laemmli, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature. 227 (1970) : 680-685.
- Laurent, TC. and Fraser, JRE. Hyaluronan, FASEB. J. 6 (1992) : 2397-2404.
- Lansing, M. et al. Hyaluronate synthase: cloning and sequencing of the gene from *Streptococcus sp.* J. Bio. Chem. 289 (1993) : 179-184.
- Laurent, TC. and GERGELY, J. Light scattering studies on hyaluronic acid. J. Bio. Chem. (1955) : 325-333
- Laurent, TC. In vitro studies on the transport of macromolecules through the connective tissue. Fed. Proc. 25(3) (1966) : 1128-1134.

- Laurent, T.C. The structure of hyaluronic acid. In Balazs, E.A. (ed.), *Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix*, Vol. 2. Academic Press, New York (1970) : 703–732.
- Laurent, T.C. Biochemistry of hyaluronan. *Acta Otolaryngol. Suppl. (Stockh)* 442, (1987) : 7–24.
- Linhardt, R.J., Cooney, C.L. and Galliher, P.M. Polysaccharide lyases. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 12 (1986) : 135-177
- Li, S., Taylor, K. B., Kelly, S. J. and Jedrzejewski, M. J. Vitamin C inhibits the enzymatic activity of *Streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase. *J. Biol. Chem* 276 (2001) : 15125–15130.
- Lokeshwar, V.B., Young, M.J., Goudarzi, G., Iida, N., Yudin, A.I., West, D.C., Hampson, I.N., Arnold, F. and Kumar, S. Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science*. 228 (1985) : 1324-1326.
- Long Liu, Guocheng Du, Jian Chen, Miao Wang and Jun Sun. Comparative study on the influence of dissolved oxygen control approaches on the microbial hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus*. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* Volume 32, Number 6 (2009) : 755-763.
- Luca, C.D. et al. Enzymatic synthesis of hyaluronic acid with regeneration of sugar nucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) : 5869-5870.
- MacLennan, A.P. The production of capsules hyaluronic acid and hyaluronidase by group A and group C Streptococci. *J. Gen. Microbiol.* 14 (1956) : 134-142.
- Main, N. Characterization of a high-Mr plasma-membrane-bound protein and assessment of its role as a constituent of hyaluronate synthase complex. *J. Bio. chem.* 237 (1986) : 343-357.
- Menzel, E.J. and Farr, C. Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: biochemistry, biological activities and therapeutic uses. *Cancer. Lett.* 131 (1998) : 3-11.
- Meyer, K. and Palmer, J.W. The polysaccharide of the vitreous humor. *J. Biol. Chem.* 107 (1934) : 629-634.
- Meyer, K. Hyaluronidases. *The Enzymes*; 3rd ed.; Academic Press: New York (1971) : 307-320.

- Meyer, K. and Rapport, M.M. The inhibition of testicular hyaluronidase by heavy metals. J. Biol. Chem. 188 (1951) : 485-490.
- Muckenschnabel, I., Bernhardt, G., Spruss, T., Dietl, B. and Buschauer, A. Quantitation of hyaluronidases by the Morgan-Elson reaction: comparison of the enzyme activities in the plasma of tumor patients and healthy volunteers. Cancer. Lett. 131 (1998) : 13-20.
- Natowicz, M.R., Wang, Y. Human serum hyaluronidase: characterization of a clinical assay Clin. Chim. Acta. 245 (1996) : 1-6.
- Nimrod, A. et al. High molecular weight sodium hyaluronate. United states patent, No.4784990 [Online]. (1988) : Available from <http://patft.uspto.gov> [2012,Jan 23]
- Noble, P.W.. Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. Matrix. Biol. 21 (2002) : 25-29
- Nomoto, R., Munasinghe, L. I., Jin, D. H., Shimahara, Y., Yasuda, H., Nakamura, A., Misawa, N., Itami, T. and Yoshida, T. Lancefield group C 87 *Streptococcus dysgalactiae* infection responsible for fish mortalities in Japan. J. Fish. Dis. 27 (2004) : 679-686
- Oettl M, Hoehstetter J, Asen I, Bernhardt G, Buschauer A. Comparative characterization of bovine testicular hyaluronidase and a hyaluronate lyase from *Streptococcus agalactiae* in pharmaceutical preparations. Eur. J. Pharm. Sci. (2003) : 267-77.
- Park, DC., Smith, AD., Lautenschlager, G., Earles, JL., Frieske, .D, Zwahr, M., Gaines, CL. Mediators of long-term memory performance across the life span. Psychol. Aging. 11 (1996) : 621-637.
- Pierce, WA, White, Jr., AGC. The role of certain sugars in the production of capsular polysaccharide and lactic acid by *Streptococcus pyogenes*. J. Bacteriol. (1954) :301-307.

- Pirinen, R., Tammi, R., Tammi, M., Hirvikoski, P., Parkkinen, J.J., Johansson, R. Prognostic value of hyaluronan expression in non-small-lung cancer: increased stromal expression indicates unfavorable outcome in patients with adenocarcinoma. Int. J. Cancer. 95 (2001) : 12-27.
- Poelstra, K., Bakker, WW., Klok PA., Kamps, JA., Hardonk, MJ. and Mijer, DK. Dephosphorylation of endotoxin by alkaline phosphatase in vivo. Am. J. Pathol. 151 (4) (1997) : 1163–1169.
- Prehm, P., and Mausolf, A. Isolation of streptococcal hyaluronate synthase. J. Biochem. 235 (1986) : 887-889.
- Radin, L.E., Swann, A.D., and Weisser, A.P. Preparation of a Hyaluronate-free Lubricating Fraction from Synovial Fluid. Nature. 228 (1970) : 377-378.
- Regan, O.M. et al. Molecular mechanisms and genetics of hyaluronan biosynthesis. Int. J. Biol. Macromol 16 (1994) : 283-286.
- Reissig, J. L., Strominger, J. L. and Leloir, L. F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. J. Biol. Chem. 217(1955) : 959–966.
- Rigden, D. J., Jedrzejewski, M. J. and Galperin, M.Y. Amidase domains from bacterial and phage autolysins define a family of gamma-D,L-glutamate-specific amidohydroamidohydrolases. Trends Biochem Sci 28 (2003) : 230–234
- Rooney, P., Kumar, S., Ponting, J. and Wang, M. The role of hyaluronan in tumour neovascularization Int. J. Cancer. 60 (1995): 632–636.
- Sambrook, J., Fritsch, E.T. and Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. (1989)
- Setälä, L.P., Tammi, M.I., Tammi, R.H., Eskelin, M.J., Lipponen, P.R., Argen, U.M., Parkkinen, J., Alhava, E.M. and Kosma, V.M., Hyaluronan expression in gastric cancer cells is associated with local and nodal spread and reduced survival rate. Br. J. Cancer. 79 (1999) : 1133– 1138.
- Stern, R. Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. Eur. J. Cell. Biol. 83 (2004) : 317–325.

- Stokes, E. J. and Ridgwar, G. L. Clinical Microbiology. London: Butler & Tanner Ltd. (1987)
- Swann, D.A. et al. Biosynthesis of hyaluronic acid. United states patent No.4897349 [Online] (1990) : Available from <http://patft.uspto.gov/>[2011, Aug 2]
- Takashi, Y., and Takeru, K. Microbial synthesis of hyaluronan and chitin : new approaches, J.Biosci. Bioeng. 99, 6 (2012) : 521-528
- Victor, R., Maingonnat, C., Chauzy, C., Bertrand, P., Olivier, A., Maunoury, R., Gioanni, J., Delpech, B. Production of hyaluronidase by cultured human tumor cells. C.R. Acad. Sci. III 320 (1997) : 805–810
- Vierstraete, A. PCR: Polymerase Chain Reaction. (Retrieved June 1, 2005) : from <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>.
- W.M. Bonner Jr., Cantey, E.Y. Colorimetric method for determination of serum hyaluronidase activity, Clin. Chim. Acta 13 (1966) : 746–752.
- WARREN, GH. and GRAY, J. Isolation and purification of streptococcal hyaluronic acid. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1959) : 125–127
- Weigel, P.H., Hascall, V.C and Tammi, M. Hyaluronan synthase. J. Biol. Chem. 272 (1997) : 13997-14000.
- West, D.C. and Kumar, S. Hyaluronan and angiogenesis. In: Evered, D., Whelan, J. (Eds.), Biol. Hyal. vol. 143. John Wiley and Sons, Chichester, (1989) : 187–207
- Yang, J., Nie, H., Chen, L., Zhang, X., Yang, F., Xu, X., Zhu, Y., Yu, J., and Jin, Q. Revisiting the molecular evolutionary history of *Shigella* spp. J. Mol. Evol. 64 (2007) : 71-91.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีการเตรียมสารเคมี

1. วิธีการเตรียมสารละลายสำหรับตรวจขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Agarose Gel Electrophoresis)

1.1 สารละลาย 50X TAE buffer

Tris	242	กรัม
Glacial acetic acid 5	7.1	กรัม
0.5 M EDTA, pH 8.0	100	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นจนครบ	1	ลิตร

2. วิธีการเตรียมสารละลายสำหรับการสกัดพลาสมิด

2.1 Alkaline lysis solution I

50 mM glucose
25 mM Tris-Cl (pH 8.0)
10 mM EDTA (pH 8.0)

2.2 Alkaline lysis solution II

0.2 N NaOH
1% (w/v) SDS

2.3 Alkaline lysis solution III

5 M potassium acetate	6	มิลลิลิตร
glacial acetic acid	11.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	28.5	มิลลิลิตร

2.4 สารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์ม

Phenol:Chloroform (1:1) แล้วเติม 0.1 M Tris-Cl (pH 7.6) ทำการเขย่าแรงๆ ให้ผสมกันแล้วปล่อยให้แยกชั้น

-

3.การเตรียมสารสำหรับแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

3.1. Separating buffer (1.5 M Tris-HCl, pH 8.6)

Tris-base	36.30	กรัม
ละลายในน้ำ	175	มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วย 6 N HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	200	มิลลิลิตร

3.2. Stacking buffer (1.0 M Tris-HCl, pH 6.8)

Tris-base	6.04	กรัม
ละลายในน้ำ	90	มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วย 6N HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	100	มิลลิลิตร

3.3. Acrylamide solution (30% Acrylamide, 0.8 Bis-acrylamide)

Acrylamide	60.00	กรัม
Bis-acrylamide	1.60	กรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	200	มิลลิลิตร

3.4. Ammonium persulfate (10%)

APS	1	กรัม
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

3.5. SDS 10%

Electrophoresis-grads SDS	1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

3.6. สารละลาย A

สารละลาย Separating buffer	18.17	กรัม
สารละลาย 10 % SDS	0.4	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ	100	มิลลิลิตร

3.7. สารละลาย B

สารละลาย Stacking buffer	18.17	กรัม
สารละลาย 10 % SDS	0.4	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ	100	มิลลิลิตร

3.8. 12.5% Separating gel (ปริมาตร 7 มิลลิลิตร)

น้ำกลั่น(dH ₂ O)	1.60	มิลลิลิตร
สารละลาย A	1.2	มิลลิลิตร
Acrylamide solution	2	มิลลิลิตร
10% ammonium persulfate	75	ไมโครลิตร
TEMED 7.5		ไมโครลิตร

3.9. 4.5% Stacking gel (ปริมาตร 3 มิลลิลิตร)

น้ำกลั่น(dH ₂ O)	1.20	มิลลิลิตร
Acrylamide solution	0.30	มิลลิลิตร
สารละลาย B	0.5	มิลลิลิตร
10% ammonium persulfate	25	ไมโครลิตร
TEMED	3	ไมโครลิตร

3.10. Loading buffer 2 เท่า

2-mercaptonethanol	0.20	มิลลิลิตร
Glycerol	2.00	มิลลิลิตร
2% SDS	2.00	มิลลิลิตร
Bromophenol blue	0.25	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วย 0.1 M Tris-HCl ให้ครบ 10 มิลลิลิตร เก็บในที่มืด

3.11. Running buffer 10 เท่า, pH 8.3

Tris-base	30.00	กรัม
Glycine	144.00	กรัม
10% SDS	100.00	กรัม

ปรับ pH ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

3.12. Staining solution

0.25% commissie brilliant blue-R 250

45.0% methanol

10.0% acetic acid

ปรับปริมาตรด้วยน้ำ ผสมสีที่กรองแล้ว 1 ส่วน กับสารละลาย methanol:acetic acid: น้ำกลั่น 9 ส่วน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้

3.13. Destaining solution

25.0% methanol

7.0% acetic acid

ปรับปริมาตรด้วยน้ำ

3.14. Transfer buffer, pH 8.3

25 mM Tris-base

150 mM glycine

ปรับ pH ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 0.02% SDS

4.การเตรียมสารเคมีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล N-acety D-glucosamine ด้วยวิธี

Morgan-Elson method

4.1.Reagent A (Potassium tetraborate solution)

Potassium tetraborate solution	6.1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

4.2. Reagent B (DAB solution)

4-Dimethylamino bezaldehyde	10	กรัม
HCl (concentrated)	11	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1.5	มิลลิลิตร
glacial acetic acid	87.50	มิลลิลิตร

นำสารทั้งหมดผสมให้เข้ากัน ก่อนนำไปใช้ผสมอัตราส่วน 1:10 กับ glacial acetic acid

5.การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

5.1 การเตรียมสารละลายซิเตรท-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ตามวิธีของ (McIlvaine, 1921)

5.1.1 สารละลาย A 0.1 M citric acid

5.1.2 สารละลาย B 0.2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ หรือ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

5.1.3 ทำการเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) โดยผสมสารละลาย A และ B ตามค่าความเป็นกรดต่างที่ต้องการตามตารางที่ ก.1 และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร โดย ** ปรับค่าความเป็นกรดต่าง ด้วย 1 N NaOH และ 1 N HCl

ตารางที่ ก.1 ตารางการเตรียมสารละลายซิเตรท-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

ค่าความเป็นกรด-ต่าง	ปริมาตรสารละลาย (มิลลิลิตร)	
	A	B
2.6	44.6	5.4
2.8	42.2	7.8
3	39.8	10.2
3.2	37.7	12.3
3.4	35.9	14.1
3.6	33.9	16.1
3.8	32.3	17.7
4	30.7	19.3
4.2	29.4	20.6
4.4	27.8	22.2
4.6	26.7	23.3
4.8	25.2	24.8
5	24.3	25.7
5.2	23.3	26.7
5.4	22.2	27.8
5.6	21	29

5.2. การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) ตามวิธีของ (Gomori, 1955)

5.2.1 สารละลาย A 0.05 M dibasic sodium phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7.80	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนครบ	1	ลิตร

5.2.2 สารละลาย B 0.05 M monobasic sodium phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

Na_2HPO_4 น้ำหนัก	8.90	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนครบ	1	ลิตร

5.2.3 ทำการเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) โดยผสมสารละลาย A และ B ตามค่าความเป็นกรดต่างที่ต้องการตามตารางที่ ก.2 และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร โดย ปรับค่าความเป็นกรดต่าง ด้วย 1 N NaOH และ 1N HCl

ตารางที่ ก.2 ตารางการเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer)

ค่าความเป็นกรด-ต่าง	ปริมาตรสารละลาย (มิลลิลิตร)	
	A	B
5.8	4.00	46.00
6	5.15	43.85
6.2	9.25	40.75
6.4	13.25	36.75
6.6	18.75	31.25
6.8	24.50	25.50
7	30.50	19.50
7.2	36.00	14.00
7.4	40.50	9.50
7.6	43.50	6.50
7.8	45.75	4.25
8	47.35	2.65

5.3. การเตรียมสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์-แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) ตามวิธีของ (Clark และLubs, 1917)

ทำการผสมสารละลาย 0.1 M NH_4Cl ปริมาตร 17.50 มิลลิลิตร และสารละลาย 0.1 M NH_4OH ปริมาตร 13.42 มิลลิลิตร จนได้ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 9 และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร โดย ** ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วย 1 N NaOH และ 1N HCl

ภาคผนวก ข
วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. วิธีเตรียม SOC medium

SOB medium	800	ไมโครลิตร
2 M MgCl ₂	4	ไมโครลิตร
2 M glucose	8	ไมโครลิตร

นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 psi เวลา 15 นาที

2. วิธีเตรียมอาหารเหลว 2xYT

Yeast extract	10	กรัม
Thyophone	16	กรัม
NaCl	5	กรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ	1	ลิตร

นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 psi เวลา 15 นาที ที่งไว้ให้อุ่น (ประมาณ 60 องศาเซลเซียส)

3. วิธีการเตรียมอาหารแข็ง 2xYT

Yeast extract	10	กรัม
Thyophone	16	กรัม
NaCl	5	กรัม
Agar	15	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 1 ลิตรที่งไว้ให้อุ่น (ประมาณ 60 องศาเซลเซียส) จากนั้นเทลงใน plate ในสภาพปลอดเชื้อ ที่งไว้ให้แข็งตัว และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ค

วิธีพื้นฐานที่ใช้ในงานด้านพันธุวิศวกรรมศาสตร์

1. การตรวจขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Agarose Gel Electrophoresis)

- 1.1 เตรียม agarose gel 1% ใน 1X TAE buffer
- 1.2 อุณหภูมิให้เจลละลาย รอให้เย็นพอที่มือจับได้ และเทลงในถาดสำหรับเตรียมเจล แล้ววาง comb
- 1.3 รอให้เจลแข็ง ใช้เวลาประมาณครึ่งชั่วโมง
- 1.4 วางถาดเจลลงใน chamber เท 0.5xTAE ให้ท่วมเจล แล้วจึงดึง comb ออก
- 1.5 load ดีเอ็นเอตัวอย่างที่ผสม *dy*n ในอัตราส่วน 1:5 เปรียบเทียบกับ DNA marker ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
- 1.6 แยกแถบดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ตั้งเวลา 25 นาที
- 1.7 แกะเจลออกจากถาดนำไปแช่ในสารละลาย ethidium bromide 0.5 M เป็นเวลา 5 นาที เพื่อย้อมสีแถบดีเอ็นเอ
- 1.8 นำเจลลงแช่ในน้ำกลั่นเพื่อล้างสีส่วนเกินออก เป็นเวลา 10 นาที
- 1.9 ตรวจการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอบนเจลโดยใช้เครื่อง Gel Document (Transuminator)

2 การสกัดพลาสมิดโดยวิธีการ Alkaline lysis ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Birnboim

และ Doly (1979) และ Ish-Horowicz และ Burke (1981)

โดยเลี้ยงเชื้อ *Escherichia coli JM109* ที่มีพลาสมิด pQE80-L vector (Invitrogen, USA) ในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 5 มิลลิตร ในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง และปั่นเพื่อเก็บเซลล์ที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 นาที และทำการสกัดพลาสมิดโดยเติม Alkaline lysis solution I เพื่อละลายตะกอน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วแช่ในอ่างน้ำแข็ง เติม Alkaline lysis solution II ที่เตรียมใหม่ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วแช่ในอ่างน้ำแข็ง เพื่อช่วยตกตะกอนสารที่ไม่ต้องการ (โปรตีน, โพลีแซคาไรด์) อีกทั้งยังทำให้เซลล์แตก และผนังเซลล์หลุด เติม Alkaline lysis solution III ที่เย็น ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ 6-8 ครั้ง แล้วแช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 3-5 นาที แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 นาที ถ่ายส่วนใสลงในหลอดใหม่ แล้วเติมสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรสารละลาย ตั้งต้น และผสมให้เข้ากัน ปั่นในน้ำแข็งนาน 10 นาที ก่อนนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 12000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

ดูดสารละลายชั้นบนลงในหลอดใหม่ เติม ไอโซโพรเพน ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรสารละลายตั้งต้น ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที นำไปปั่น ตกตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตะกอนของพลาสมิดจะอยู่ที่ก้นหลอดทดลอง ดูดเอาของเหลวออกให้หมด เติม 70% เอทานอล ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปเพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ 2 ครั้ง และดูดเอาของเหลวออก ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงละลายพลาสมิดด้วยสารละลาย TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บพลาสมิดที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำมา run gel เพื่อวิเคราะห์ขนาดพลาสมิด

3. การแยกโปรตีนโดยวิธีการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis : SDS-PAGE)

3.1. การเตรียมเจล

3.1.1 ประกอบชุดแผ่นแก้วเข้าด้วยกันคั่นด้วย spacers แล้วล็อกให้แนบติดกันด้วย clamp ชั้นสกรูให้แน่นวางลงใน casting stand

3.1.2 เตรียมสารละลายเจล 12.5% Separating gel (ปริมาตร 7 มิลลิลิตร) ระหว่างการเตรียมขั้นตอนสุดท้ายที่เติม TEMED กับ ammonium persulfate ให้รีบเติมแล้วเขย่าวนเบาๆ ระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ

3.1.3 ใช้ปิเปตดูดสารละลายเจลใส่ลงในมุมแผ่นแก้ว จากนั้นค่อยๆหยดน้ำกลั่น ให้คลุมผิวเจล ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว ใช้เวลาประมาณ 60 นาที

3.1.4 เตรียม 4.5% Stacking gel (ปริมาตร 3 มิลลิลิตร)

3.1.5 เทน้ำที่ปิดหน้าเจลออก ซับให้แห้งด้วยกระดาษ

3.1.6 ดูดสารละลายเจลใส่ลงระหว่างแผ่นแก้ว เสียบ comb เพื่อให้เกิดช่อง (well)

3.1.7 ทิ้งไว้จนกว่าเจลจะแข็ง ใช้เวลาประมาณ 45-60 นาที

3.1.8 เอา comb ออก ระวังอย่าให้เจลขาด เติม buffer 1x ลงใน chamber

3.2 การทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

3.2.1 ใส่สารตัวอย่างที่ผ่านการย่อยสรี และต้ม 5 นาที ลงในแต่ละช่อง

3.2.2 ต่อชุดอิเล็กโตรโฟรีซิสทั้งหมดเข้าด้วยกัน เสียบปลั๊กต่อกับเครื่องจ่าย กระแสไฟฟ้า โดยตั้งกระแสไว้ที่ 50 มิลลิแอมแปร์ ใช้เวลาประมาณ 30 นาที และตั้งกระแสที่ 80 มิลลิแอมแปร์ ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง เมื่อ tracking dye ลงมาถึงด้านล่าง แล้วจึงปิดเครื่อง

3.2.3. นำแผ่นแก้วออกจาก chamber เอา spacers ออก แล้วใช้ spatula กดแผ่นแก้วเบาๆ แล้ว ค่อยๆ เทเจลลงในถาดย้อม เดิมสีย้อม Staining solution ให้ท่วมเจล ทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง หรือจนกว่าสีจะติดเจล

3.2.4. ล้างสีออกด้วยน้ำสะอาด และนำมาแช่ Destaining solution เพื่อล้างสีออก เมื่อสีส่วนเกินถูกล้างออกหมดจะเห็นเจลใส และแถบโปรตีนติดสี

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ปริมาณ N-acety D-glucosamine ด้วยวิธี Morgan-Elson method

1. การสร้างกราฟน้ำตาล N-acety D-glucosamine มาตรฐาน

1.1 การเตรียมสารละลายน้ำตาล NAG (N-Acetyl-D-glucosamine)

1.1.1 ทำการละลายน้ำตาล NAG (N-Acetyl-D-glucosamine) น้ำหนักโมเลกุล 221.21 กรัมต่อโมล น้ำหนัก 0.0250 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

1.1.2 ทำการเตรียมสารละลายน้ำตาล NAG (N-Acetyl-D-glucosamine) โดยผสมสารละลาย จากข้อ 1.1.1 และน้ำ กลั่นตามค่าความเข้มข้นที่ต้องการ

ตารางที่ ง.1 ตารางการเตรียมสารละลายน้ำตาล NAG (N-Acetyl-D-glucosamine)

ปริมาณสารละลายน้ำตาลความเข้มข้น [1.13×10^{-7} โมลต่อลิตร] (มิลลิลิตร)	ปริมาตรน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นน้ำตาล $\times 10^{-5}$ (โมลต่อลิตร)
0	10	0
1	9	0.1
2	8	0.2
3	7	0.3
4	6	0.4
5	5	0.5
6	4	0.6
7	3	0.7
8	2	0.8
9	1	0.9
10	0	1

1.2.การวิเคราะห์ปริมาณ N-acetylglucosamine ด้วยวิธี Morgan-Elson method

1.2.1 นำสารละลายตะกอนเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส 20 ไมโครลิตร มาทำปฏิกิริยากับน้ำปราศจากเชื้อ 100 ไมโครลิตร กรดไฮยาลูโรนิก 50 ไมโครลิตร และสารละลาย buffer 100 ไมโครลิตร ในอุณหภูมิที่กำหนด

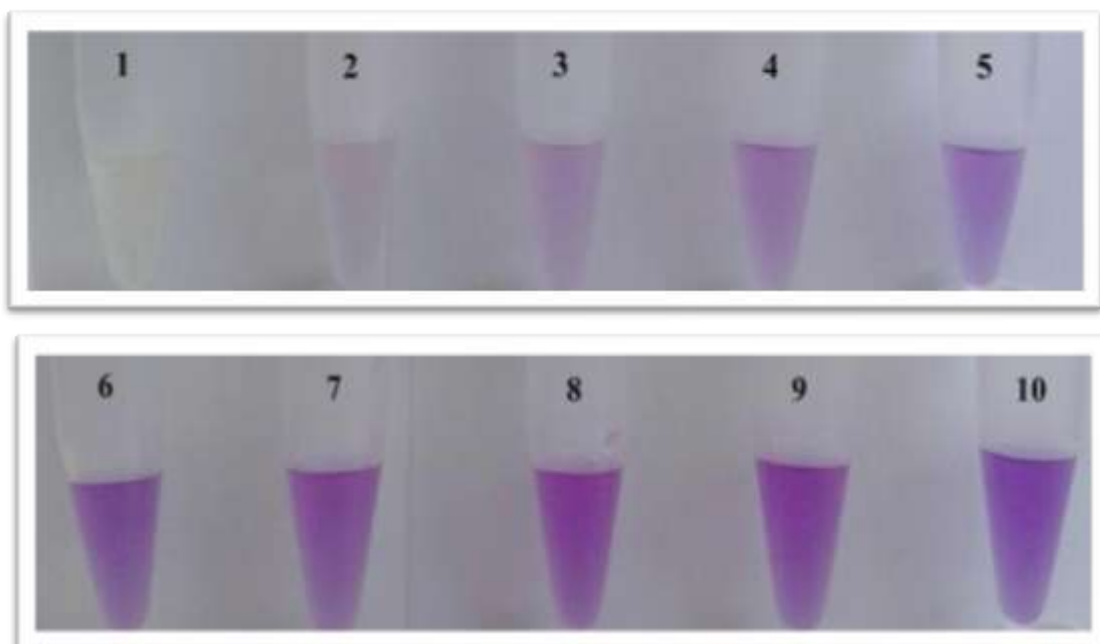
1.2.2 นำสารตัวอย่างจากข้อ 2.1.1 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร มาหยุดปฏิกิริยาด้วย reagent A ปริมาตร 10 ไมโครลิตร (สามารถนำสารละลายน้ำตาลที่ต้องการหารกราฟน้ำตาลมาตรฐานมาทดสอบในขั้นตอนนี้ได้เลย)

1.2.3 นำไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และปรับอุณหภูมิจนเท่ากับอุณหภูมิห้อง

1.2.4 เติม reagent B (reagent colour) ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร นำผลการทดลองที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 586 นาโนเมตร

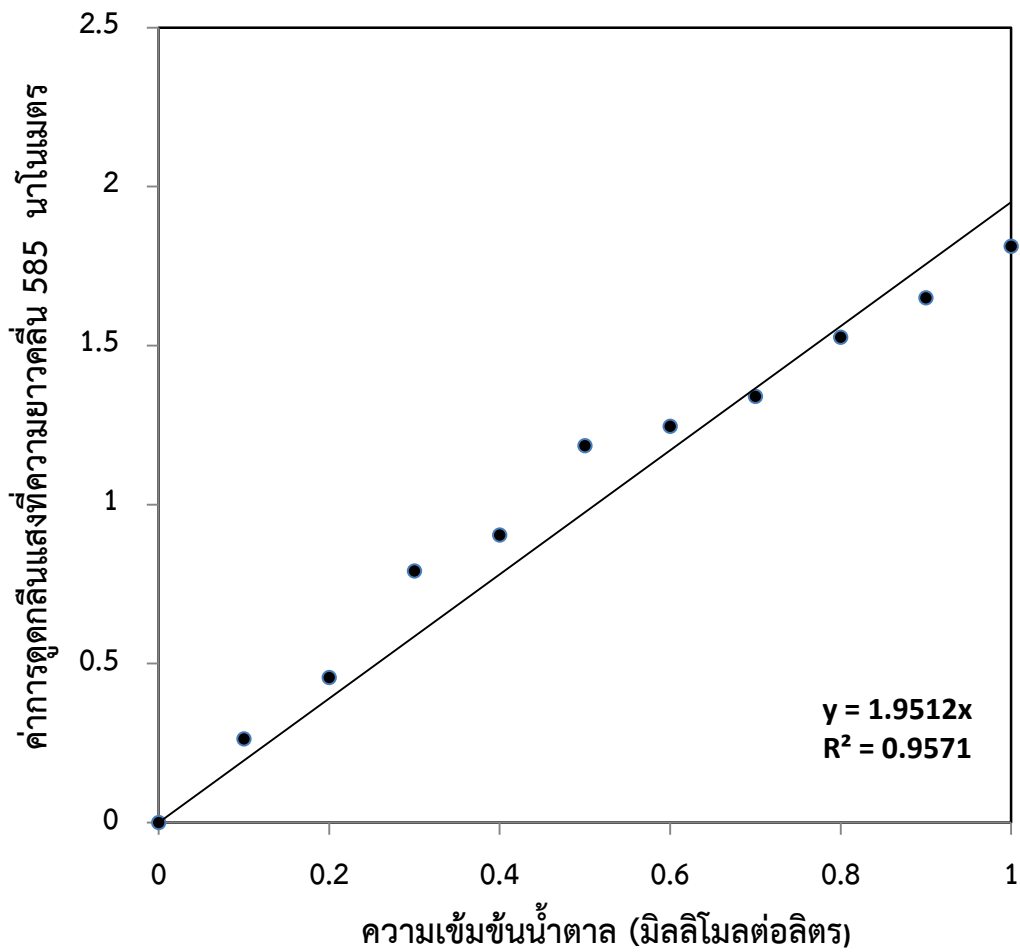
ตารางที่ ง.2 ตารางค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 585 นาโนเมตร ที่น้ำตาล N-acetyl-D-glucosamine ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นน้ำตาล $\times 10^{-5}$ (โมลต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 585 นาโนเมตร
0	0
0.1	0.263
0.2	0.456
0.3	0.791
0.4	0.904
0.5	1.185
0.6	1.246
0.7	1.34
0.8	1.526
0.9	1.65
1	1.812



ภาพที่ ง.1 สีของสารละลายที่ได้จากการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล N-acetylglucosamine เพื่อสร้างกราฟน้ำตาล N-acetylglucosamine มาตรฐาน

หลอดที่ 1	สารละลายน้ำตาล N-acetylglucosamine ความเข้มข้น 0.1×10^{-5}	(โมลต่อลิตร)
หลอดที่ 2	สารละลายน้ำตาล N-acetylglucosamine ความเข้มข้น 0.2×10^{-5}	(โมลต่อลิตร)
หลอดที่ 3	สารละลายน้ำตาล N-acetylglucosamine ความเข้มข้น 0.3×10^{-5}	(โมลต่อลิตร)
หลอดที่ 4	สารละลายน้ำตาล N-acetylglucosamine ความเข้มข้น 0.4×10^{-5}	(โมลต่อลิตร)
หลอดที่ 5	สารละลายน้ำตาล N-acetylglucosamine ความเข้มข้น 0.5×10^{-5}	(โมลต่อลิตร)
หลอดที่ 6	สารละลายน้ำตาล N-acetylglucosamine ความเข้มข้น 0.6×10^{-5}	(โมลต่อลิตร)
หลอดที่ 7	สารละลายน้ำตาล N-acetylglucosamine ความเข้มข้น 0.7×10^{-5}	(โมลต่อลิตร)
หลอดที่ 8	สารละลายน้ำตาล N-acetylglucosamine ความเข้มข้น 0.8×10^{-5}	(โมลต่อลิตร)
หลอดที่ 9	สารละลายน้ำตาล N-acetylglucosamine ความเข้มข้น 0.9×10^{-5}	(โมลต่อลิตร)
หลอดที่ 10	สารละลายน้ำตาล N-acetylglucosamine ความเข้มข้น 1.0×10^{-5}	(โมลต่อลิตร)



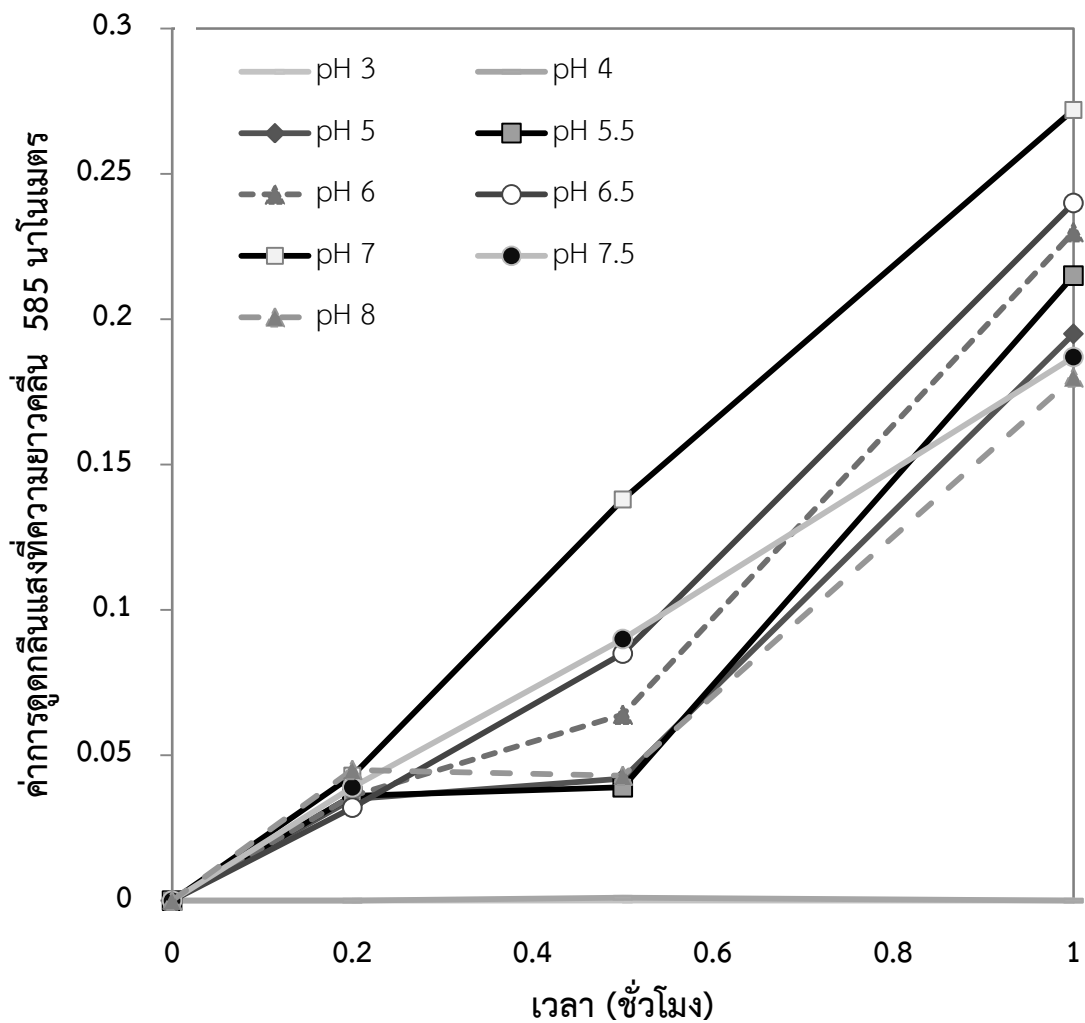
ภาพที่ ง.2 กราฟน้ำตาล N-acetylglucosamine

ภาคผนวก จ
ข้อมูลทางการทดลอง

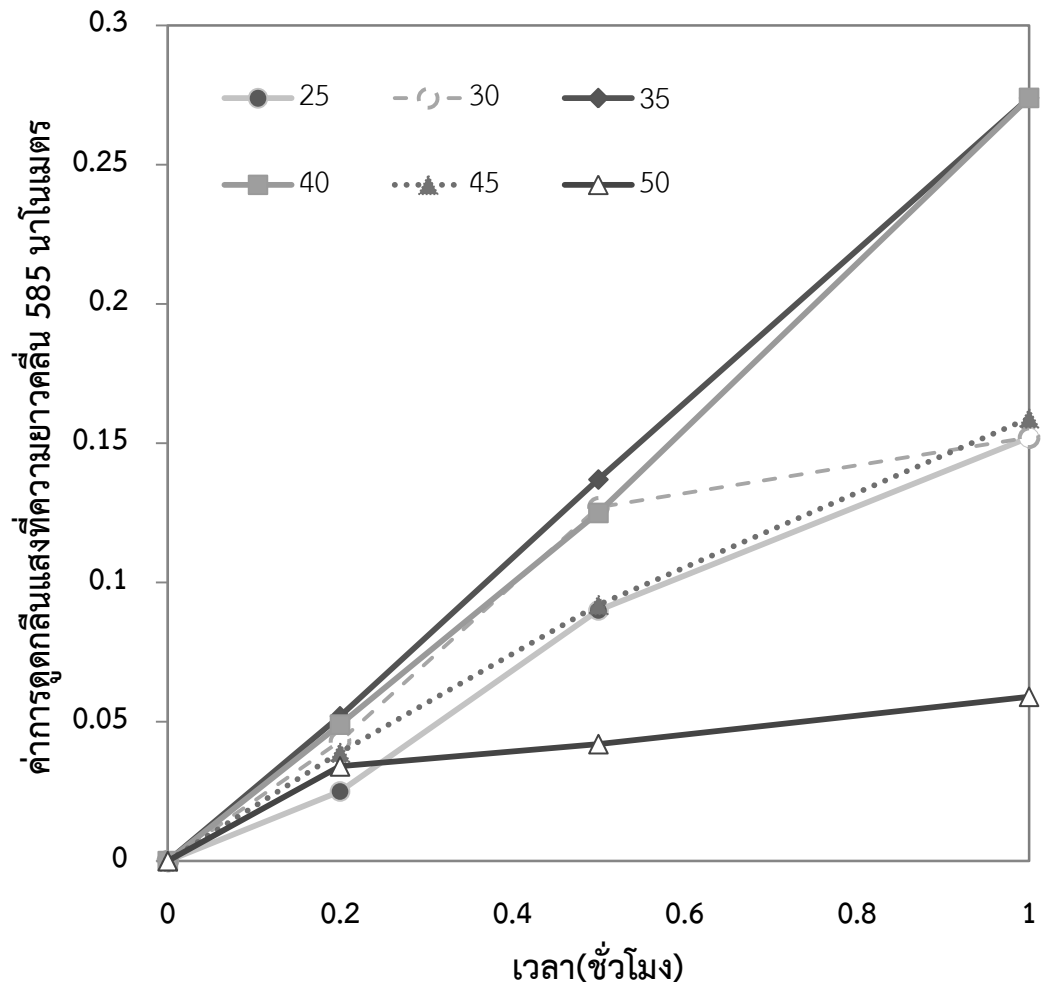
1. ผลการทดลองการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส

1.1 ผลการทดลองค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายบัฟเฟอร์ (ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์)

ผลการทดลองค่าการดูดกลืนแสงทำการทดสอบเพื่อนำค่าที่ได้ไปเปลี่ยนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์เพื่อพิจารณาประสิทธิภาพของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสต่อสับสเตรทกรดไฮยาลูโรนิกที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่างๆ



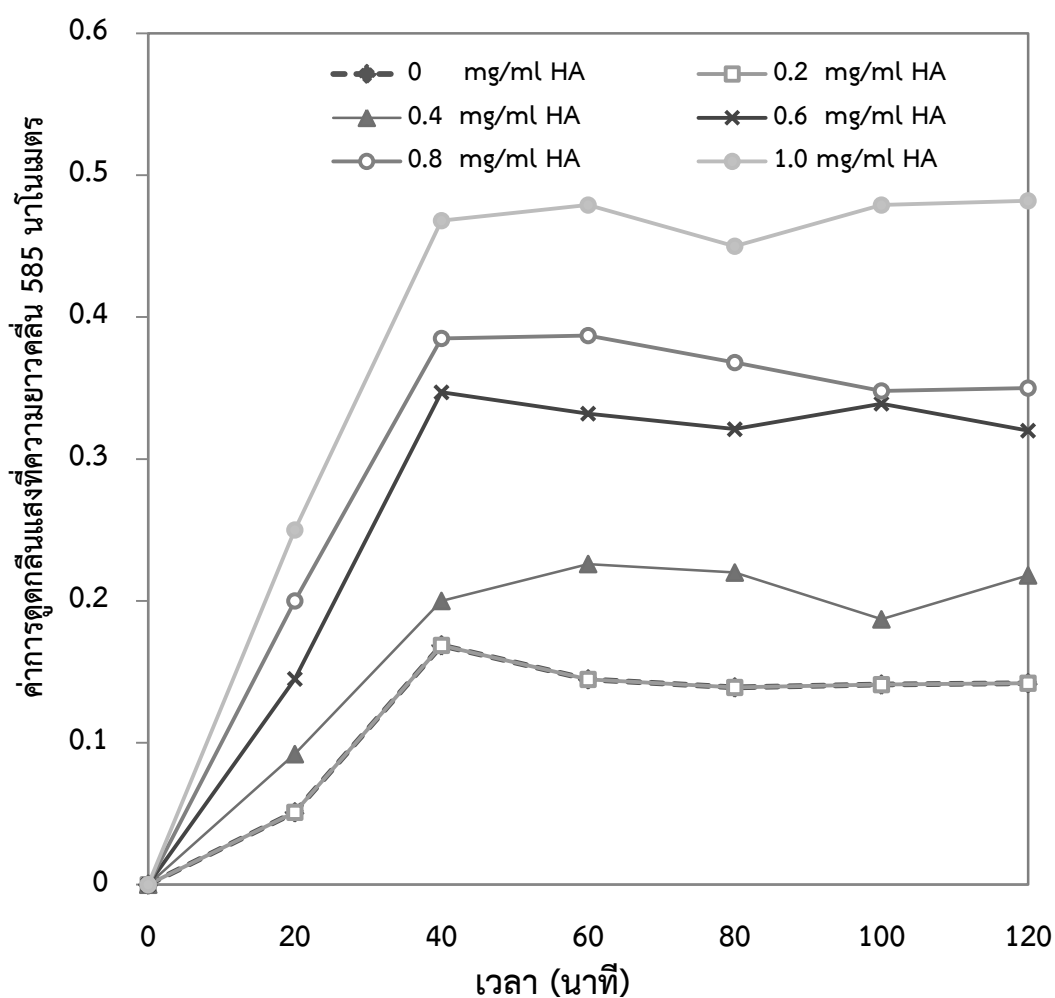
ภาพที่ จ.1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 585 นาโนเมตร และเวลาที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่างๆ



ภาพที่ จ.2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 585 นาโนเมตร และเวลาที่อุณหภูมิต่างๆ

2. ผลการศึกษาสมบัติทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์

2.1 ผลการศึกษาสมบัติทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสต่อสับสเตรทกรดไฮยาลูโรนิกที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยนำค่าที่ได้ไปเปลี่ยนเป็นน้ำตาโลรีดิวซ์ และนำค่าในช่วงที่มีประสิทธิภาพการย่อยเป็นแบบ log-phase ไปวิเคราะห์หาค่าการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ เพื่อนำค่าไปสร้างกราฟสำหรับหาค่าทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์



ภาพที่ จ.3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 585 นาโนเมตร และเวลาที่เกิดปฏิกิริยาในระดับความเข้มข้นของสับสเตรทต่างๆ

ภาคผนวก ฉ

ลำดับนิวคลีโอไทด์

ฉ.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hyaluronan synthase gene ATCC 6550 (*Streptococcus pyogenes*)

นิวคลีโอไทด์ต้นแบบที่ต้องการทำการโคลนโดยในงานวิจัยจะทำการตัดบริเวณ แลบที่มีการไฮไลต์หรือsignal peptide ออกก่อนทำการโคลน เพื่อให้ได้พลาสมิดที่สามารถแสดงออกของโปรตีนออกนอกเซลล์หรือเพื่อให้่ายในการผลิตเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส

```

V N T Y F C T H H K Q L L L Y S N L F L
1  GTGAATACTTATTTTTGCACACACCATAAACAATTACTACTTTATTCAAACCTATTCCTT
S F A M M G Q G T A I Y A D T L T S N S
61  AGCTTTGCTATGATGGGCCAAGGAAGTCCATTATGCCGATACTGACTTCAAATTCA
E P N N T Y F Q T Q T L T T T D S E K K
121 GAACCTAATAATACTTACTTTCAAACGCAACGCTCACTACTACAGATAGCGAAAAAAG
V V Q P Q Q K D Y Y T E L L D Q W N S I
181 GTAGTACAGCCACAACAAAAAGACTACTATACTGAATTGTTAGACCAATGGAACAGTATT
I A G N D A Y D K T N P D M V T F H N K
241 ATCGCAGGCAACGATGCTTATGATAAAACCAATCCTGACATGGTCACCTTTCATAATAAA
A E K D A Q N I I K S Y Q G L D H E N R
301 GCTGAAAAGGACGCTCAAAACATTATTTAAAAGCTATCAAGGGCTTGACCACGAAAATAGA
T Y L W E H A K D Y S A S A N I T K T Y
361 ACTTACCTTTGGGAGCATGCAAAGGATTTATCCGCTTCTGCTAATATCAGAAAACCTTAC
R N I E K I A K Q I T N P E S C Y Y Q D
421 CGCAATATTGAAAAAATAGCAAAACAGATCACTAATCCTGAATCATGCTATTATCAAGAT
S K A I A I V K D G M A F M Y E H A Y N
481 AGTAAAGCTATTGCTATTGTTAAAAGACGGTATGGCCTTCATGTATGAACACGCTTATAAT
L D R E N H Q T T G K E N K E N W W D Y
541 CTAGATCGTGAAAATCATCAAACAACTGGAAAAGAAAACAAAAGAAAATTGGTGGGATTAT
E I G T P R A I N N T L S L M Y P Y F T
601 GAAATGGAACTCCTCGTCTATTAATAATACCTTATCCTTGATGTATCCTTATTTTACT
Q E E I L K Y T A P I E K F V P D P T R
661 CAAGAAGAAATTTCTAAATACACAGCTCCAATCGAAAAATTTGTGCCTGACCCCTACTCGT
F R V R A A N F P P F E A N S G N L I D
721 TTTAGGGTTCGCGCTGCCAATTTTCCACCTTTTGAAGCCAATAGCGGAAATTTAATTGAT
M G R V K L I S G I L R K D D L E I S D
781 ATGGGACGTGTTAAACTCATTTCCGGTATCTTCGTAAGATGATCTCGAAATTAGTGAT
T I K A I E K V F T L V D E G N G F Y Q
841 ACAATCAAAGCAATTGAGAAAGTTTTTCACGCTAGTTGATGAAGGAAATGGTTTTTACCAA
D G S L I D H V V T N A Q S P L Y K K G
901 GACGGTCTTTAATTGATCACGTGGTTACTAATGCTCAAAGTCCACTTTATAAAAAAGGC
I A Y T G A Y G N V L I D G L S Q L I P
961 ATTGCTTACACTGGAGCTTACGGTAATGTGCTTATAGATGGCTTATCGCAATTAATTCCT
I I Q K T K S P I E A D K M A T I Y H W
1021 ATTATTCAAAAACAAAATCTCCTATAGAACGCGATAAAATGGCTACTATTATCATTGG
I N H S F F P I I V R G E M M D M T R G
1081 ATTAACCATCTTTTTTCCCTATCATCGTTCGTGGAGAAATGATGGATATGACTCGAGGG
R S I S R F N A Q S H V A G I E A L R A
1141 CGTTCATCAGTCGTTTTAATGCTCAATCTCATGTTGCTGGCATTGAAGCACTTTCGTGCT
I L R I A D M S E E P H R L A L K T R I
1201 ATTTTACGTATTGCTGACATGTCTGAAGAGCCTCACCGTTTGGCACTTAAACACAGTATA
K T L V T Q G N V F Y N V Y D N L K T Y
1261 AAAACACTCGTCACACAAGGAATGTTTTTTACAATGTCTATGATAATTTGAAAACCTAT
H D I K L M K E L L S D T S V P V Q K L
1321 CACGATACAACTTATGAAAAGAGCTACTAAGTGATACCTCTGTTCCAGTCCAAAACTT
D S Y V A S F N S M D K L A L Y N N K H
1381 GATAGTTACGTAGCTAGTTTCAATAGTATGGATAAATTGGCACTATATAATAATAAACAC

```

D F A F G L S M F S N R T Q N Y E A M N
1441 GATTTTGCCTTTTGGCCTATCCATGTTTTCGAATCGAACTCAAATTATGAAGCTATGAAT
N E N L H G W F T S D G M F Y L Y N N D
1501 AATGAAAATCTTCATGGCTGGTTTACTTCTGATGGAATGTTTTACCTATAACAATAACGAT
L G H Y S E N Y W A T V N P Y R L P G T
1561 TTAGGACACTACAGTGAAAACCTATTGGGCAACGGTAAATCCCTACCGCTTACCTGGAACC
T E T E Q K P L E G T P E N I K T N Y Q
1621 ACAGAACTGAGCAAAAACCACTAGAGGGAACCTCTGAGAATATTTAAAACGAACTATCAA
Q V G M T S L S D D A F V A S K K L N N
1681 CAAGTTGGCATGACTAGCCTCTCTGATGATGCTTTTGTGCAAGTAAAAAACTTAATAAT
T S A L A A M T F T N W N K S L T L N K
1741 ACAAGTGTCTAGCTGCTATGACCTTCACTAATTGGAATAAAAGTCTCACCTCAATAAA
G W F I L R N K I I F V G S N I K N Q S
1801 GGGTGGTTTATCTTAAGAAACAAAATAATCTTTGTTGGTAGCAATATCAAAAACCACTCA
S H K A Y T T I E Q R K E N Q K H P Y C
1861 TCTCACAAGGCGTATACAACCTATTGAGCAACGAAAAGAAAATCAAAGCACCCTTACTGT
S Y V N N Q P V D L N N Q L V D F T N T
1921 TCTTATGTTAACAATCAACCGTTGACTTGAATAATCAGCTAGTTGATTTACAAAACCT
K S I F L E S D D P A Q N I G Y Y F F K
1981 AAAAGTATTTTCTTGAAGTGATGATCCCGCTCAAATATTTGGTTACTACTTCTTCAAG
P T T L S I S K A L Q T G K W Q N I K A
2041 CCAACAACACTTAGCATAAGTAAGGCGCTTCAAACAGGGAATGGCAAAACATAAAAGCT
D D K S P E A I K E V S N T F I T I M Q
2101 GATGACAAATCACCAGAAGCCATCAAAGAAGTTTCAAATACCTTTACTACTATCATGCAA
N H T Q D G D R Y A Y M M L P N M T R Q
2161 AACCATACTCAAGATGGCGATCGTTATGCCTATATGATGCTTCCAAATATGACTCGTCAA
E F E T Y I S K L D I D L L E N N D K L
2221 GAATTTGAAACCTATATTAGCAAGCTTGATATCGACTTGTAGAAAACAATGACAAACTG
A A V Y D H D S Q Q M H V I H Y E K K A
2281 GCCGCTGTCTACGATCATGATAGTCAACAGATGCACGTCATTCACTATGAAAAAAGCA
T T F S N H N L S H Q G F Y S F P H P V
2341 ACGACGTTTTCAAATCATAATCTTTCTCATCAAGGCTTTTATAGTTTTCTCATCCTGTC
K Q N Q Q Q K F A H Q G I A A K N N A L
2401 AAGCAAAATCAGCAACAAAAGTTTGCTCATCAAGGAATGCAGCTAAAAACAATGCTCTT
N S H K I P H K R Q R R L P R T G Y Q S
2461 AACTCTCATAAAATCCCCACAAAAGACAACGACGCTTACCGGTACTGGGTATCAGTCC
S S L E F L G G A L V A S F N H I T K P
2521 TCCTCATAGAGTTCTTAGGTGGAGCTTTAGTTGCTTCTTTTAACCATATCACAAAACCC
F R K K D L R I *
2581 TTTTCGTAAGAAAGACTTAAGGATTTAG

ฉ.2. ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hyaluronan synthase gene จากเชื้อ *Streptococcus pyogenes* ATCC 6550TM ใ้กับ pQE80-L expression vector cell JM109 ที่ทำการโคลนยีน ในด้านforward เปรียบเทียบ กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hyaluronan synthase gene ต้นแบบที่ทำการปรับปรุงสายพันธ์

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธ์กับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานพบว่าความคล้ายคลึงกันถึง 99 % เมื่อเปรียบเทียบด้วยโปรแกรมใน

		1		100
3_HyAf	(1)	-----	-----	
EU078696_Hy1A	(1)	GTGAATACTTATTTTGCACACACCATAAACAATTACTACTTTATTCAAACCTATTCCTTAGCTTTGCTATGATGGGCCAAGGAAGTCCATTTATGCCG		200
		101		
3_HyAf	(1)	-----AATTATA--CATATACT--TTACTTTCAAACGCAAACGCTCACTACTACAGATAGCGAAAAAAGGTAGTACAGCCACAACAAA		
EU078696_Hy1A	(101)	ATACACTGACTTCAAAATCAGAACCTAATAATACTTACTTTCAAACGCAAACGCTCACTACTACAGATAGCGAAAAAAGGTAGTACAGCCACAACAAA		200
		201		300
3_HyAf	(83)	AGACTACTATACTGAATTGTTAGACCAATGGAACAGTATTATCGCAGGCAACGATGCTTATGATAAAACCAATCCTGACATGGTCACTTTTCATAATAAA		
EU078696_Hy1A	(201)	AGACTACTATACTGAATTGTTAGACCAATGGAACAGTATTATCGCAGGCAACGATGCTTATGATAAAACCAATCCTGACATGGTCACTTTTCATAATAAA		400
		301		
3_HyAf	(183)	GCTGAAAAGGATGCTCAAAACATTATTTAAAAGCTATCAAGGGCTTGACCACGAAAATAGAACTTACCTTTGGGAGCATGCAAAGGATTATTCCGCTTCTG		
EU078696_Hy1A	(301)	GCTGAAAAGGACGCTCAAAACATTATTTAAAAGCTATCAAGGGCTTGACCACGAAAATAGAACTTACCTTTGGGAGCATGCAAAGGATTATTCCGCTTCTG		500
		401		
3_HyAf	(283)	CTAATATCACGAAAACCTTACC GCAATATTGAAAAATAGCAAAACAGATCACTAATCCTGAATCATGCTATTATCAAGATAGTAAAGCTATTGCTATTGT		
EU078696_Hy1A	(401)	CTAATATCACGAAAACCTTACC GCAATATTGAAAAATAGCAAAACAGATCACTAATCCTGAATCATGCTATTATCAAGATAGTAAAGCTATTGCTATTGT		600
		501		
3_HyAf	(383)	AAAAGGCGGTATGGCCTTCATGTATGAACACGCTTATAATCTAGATCGTGAAAATCATCAAACAACCTGAAAAGAAAACAAAGAAAATTGGTGGGATTAT		
EU078696_Hy1A	(501)	AAAAGACGGTATGGCCTTCATGTATGAACACGCTTATAATCTAGATCGTGAAAATCATCAAACAACCTGAAAAGAAAACAAAGAAAATTGGTGGGATTAT		700
		601		
3_HyAf	(483)	GAAATTGGAACCTCTCGTGCTATTAATAATACCTTATCCTTGATGTATCCTTATTTTACTCAAGAAGAAATCTTAAATACACAGCTCCAATCGAAAAAT		
EU078696_Hy1A	(601)	GAAATTGGAACCTCTCGTGCTATTAATAATACCTTATCCTTGATGTATCCTTATTTTACTCAAGAAGAAATCTTAAATACACAGCTCCAATCGAAAAAT		800
		701		
3_HyAf	(583)	TTGTGCCTGACCCTACTCGTTTTAGGGTTCGCGCTGCCAATTTTCCACCTTTTGAAGCCAATAGCGGAAATTTAATTGATATGGGACGTGTTAAACTCAT		
EU078696_Hy1A	(701)	TTGTGCCTGACCCTACTCGTTTTAGGGTTCGCGCTGCCAATTTTCCACCTTTTGAAGCCAATAGCGGAAATTTAATTGATATGGGACGTGTTAAACTCAT		900
		801		

3_HyAf	(683)	TTCCGGTATTCTTCGTAAAGATGATCTCGAAATTAGTGATAACAATCAAAGCAATTGAGAAAGTTTTCACGCTAGTTGATGAAGGAAATGGTTTTTACCAA	
EU078696_Hy1A	(801)	TTCCGGTATTCTTCGTAAAGATGATCTCGAAATTAGTGATAACAATCAAAGCAATTGAGAAAGTTTTCACGCTAGTTGATGAAGGAAATGGTTTTTACCAA	1000
		901	
3_HyAf	(783)	GACGGTCTTTAATTGATCACGTGGTTACTAATGCTCAAAGTCCACTTTATAAAAAAGGCATTGCTTACACTGGAAGTTACGGGAAAGTGCTTATAGAT	
EU078696_Hy1A	(901)	GACGGTCTTTAATTGATCACGTGGTTACTAATGCTCAAAGTCCACTTTATAAAAAAGGCATTGCTTACACTGGAAGTTACGGTAAATG-TGCTTATAGAT	1100
		1001	
3_HyAf	(883)	GGCTTATCGCAATTAATTCCCCATTATTGAAAAAGC-----	
EU078696_Hy1A	(1000)	GGCTTATCGCAATTAATTCC-TATTATTCAAAAAACAAAATCTCCTATAGAAGCGGATAAAAATGGCTACTATTTATCATTTGATTAACCATTCCTTTTTTC	1200
		1101	
3_HyAf	(919)	-----	
EU078696_Hy1A	(1099)	CCTATCATCGTTCGTGGAGAAATGATGGATATGACTCGAGGGCGTTCTATCAGTCGTTTTAATGCTCAATCTCATGTTGCTGGCATTGAAGCACTTCGTG	1300
		1201	
3_HyAf	(919)	-----	
EU078696_Hy1A	(1199)	CTATTTTACGTATTGCTGACATGTCTGAAGAGCCTCACCGTTTGGCACTTAAAAACAGTATAAAAAACACTCGTCACACAAGGGAATGTTTTTTACAATGT	1400
		1301	
3_HyAf	(919)	-----	
EU078696_Hy1A	(1299)	CTATGATAAATTTGAAAACCTATCACGATATCAAACCTATGAAAGAGCTACTAAGTGATACTTCTGTTCCAGTCCAAAAACTTGATAGTTACGTAGCTAGT	1500
		1401	
3_HyAf	(919)	-----	
EU078696_Hy1A	(1399)	TTCAATAGTATGGATAAATTGGCACTATATAATAATAAACACGATTTTGCTTTTGGCCTATCCATGTTTTCGAATCGAACTCAAATATGAAGCTATGA	1600
		1501	
3_HyAf	(919)	-----	
EU078696_Hy1A	(1499)	ATAATGAAAATCTTCATGGCTGGTTTACTTCTGATGGAATGTTTTACCTATACAATAACGATTTAGGACACTACAGTGAAAATATTGGGCAACGGTAAA	1700
		1601	
3_HyAf	(919)	-----	
EU078696_Hy1A	(1599)	TCCCTACCGCTTACCTGGAACCACAGAACTGAGCAAAAACCACTAGAGGGAACCTCTGAGAATATTAACGAACCTATCAACAAGTTGGCATGACTAGC	1800
		1701	
3_HyAf	(919)	-----	
EU078696_Hy1A	(1699)	CTCTCTGATGATGCTTTTGTGCAAGTAAAAACTTAATAATAACAAGTGCTCTAGCTGCTATGACCTTCACTAATTGGAATAAAAAGTCTCACCCCTCAATA	1900
		1801	
3_HyAf	(919)	-----	
EU078696_Hy1A	(1799)	AAGGGTGGTTTATCTTAAGAAACAAAATAATCTTTGTTGGTAGCAATATCAAAAACAGTCATCTCACAAGGCGTATACAACCTATTGAGCAACGAAAAGA	2000
		1901	
3_HyAf	(919)	-----	
EU078696_Hy1A	(1899)	AAATCAAAGCACCCCTTACTGTTCTTATGTTAAACAATCAACCCGTTGACTTGAATAATCAGCTAGTTGATTTTACAAACACTAAAAGTATTTTCTTGA	2100
		2001	
3_HyAf	(919)	-----	
EU078696_Hy1A	(1999)	AGTGATGATCCCGCTCAAAATATTGGTTACTACTTCTTCAAGCCAACAACACTTAGCATAAGTAAGGCGCTTCAAACAGGGAAATGGCAAAAACATAAAA	2200
		2101	
3_HyAf	(919)	-----	


```

EU078696_Hy1A (2099) CTGATGACAAATCACCAGAAGCCATCAAAGAAGTTTCAAATACCTTTATCACTATCATGCAAAACCATACTCAAGATGGCGATCGTTATGCCTATATGAT
2201 2300
3_HyAf (919) -----
EU078696_Hy1A (2199) GCTTCCAAATATGACTCGTCAAGAATTTGAAACCTATATTAGCAAGCTTGATATCGACTTGTTAGAAAACAATGACAAACTGGCCGCTGTCTACGATCAT
2301 2400
3_HyAf (919) -----
EU078696_Hy1A (2299) GATAGTCAACAGATGCACGTCATTCACATGAAAAAAGCAACGACGTTTCAAATCATAATCTTTCTCATCAAGGCTTTTATAGTTTTCTCATCCTG
2401 2500
3_HyAf (919) -----
EU078696_Hy1A (2399) TCAAGCAAATCAGCAACAAAAGTTTGCTCATCAAGGAATTGCAGCTAAAAACAATGCTCTTAACTCTCATAAAATTCCCCACAAAAGACAACGACGCTT
2501 2600
3_HyAf (919) -----
EU078696_Hy1A (2499) ACCGCGTACTGGGTATCAGTCCTCCTCATTAGAGTTCTTAGGTGGAGCTTTAGTTGCTTCTTTAACCATATCACAAAACCTTTTCGTAAGAAAGACTTA
2601
3_HyAf (919) -----
EU078696_Hy1A (2599) AGGATTTAG

```

ฉ.2. ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hyaluronan synthase gene จากเชื้อ *Streptococcus pyogenes* ATCC 6550TM ให้กับ pQE80-L expression vector cell JM109 ที่ทำการโคลนยีนในด้าน reward เปรียบเทียบ กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hyaluronan synthase gene ต้นแบบที่ทำการปรับปรุงสายพันธุ์

```

1
3_HyAr (1) ----- 100
EU078696_Hy1A (1) GTGAATACTTATTTTTGCACACACCATAAACAATTACTACTTTATTCAAACCTATTCCCTTAGCTTTGCTATGATGGGCCAAGGAACTGCCATTTATGCCG
101
3_HyAr (1) -----
EU078696_Hy1A (101) ATACACTGACTTCAAATTCAGAACCTAATAATACTTACTTTCAAACGCAAACGCTCACTACTACAGATAGCGAAAAAAGGTAGTACAGCCACAACAAAA
201
3_HyAr (1) -----
EU078696_Hy1A (201) AGACTACTATACTGAATTGTTAGACCAATGGAACAGTATTATCGCAGGCAACGATGCTTATGATAAAACCAATCCTGACATGGTCACTTTTCATAATAAAA
301
3_HyAr (1) -----
EU078696_Hy1A (301) GCTGAAAAGGACGCTCAAAACATTATTTAAAAGCTATCAAGGGCTTGACCACGAAAATAGAACTTACCTTTGGGAGCATGCAAAGGATTATTCCGCTTCTG
401
3_HyAr (1) -----
EU078696_Hy1A (401) CTAATATCACGAAAACCTTACCGCAATATTGAAAAATAGCAAAACAGATCACTAATCCTGAATCATGCTATTATCAAGATAGTAAAGCTATTGCTATTGT
501
3_HyAr (1) -----
EU078696_Hy1A (501) AAAAGACGGTATGGCCTTCATGTATGAACACGCTTATAATCTAGATCGTGAAAATCATCAAACAACCTGGAAAAGAAAACAAAGAAAATTGGTGGGATTAT
601
3_HyAr (1) -----
EU078696_Hy1A (601) GAAATTGGAACCTCTCGTGCTATTAATAATACCTTATCCTTGATGTATCCTTATTTTACTCAAGAAGAAATCTTAAATACACAGCTCCAATCGAAAAAT
701
3_HyAr (1) -----
EU078696_Hy1A (701) TTGTGCCTGACCCTACTCGTTTATAGGGTTCGCGCTGCCAATTTCCACCTTTTGAAGCCAATAGCGGAAATTTAATTGATATGGGACGTGTTAAACTCAT
801
3_HyAr (1) -----
EU078696_Hy1A (801) TTCCGGTATCTTCGTAAAGATGATCTCGAAATTAGTGATACAATCAAAGCAATTGAGAAAGTTTTACGCTAGTTGATGAAGGAAATGGTTTTTACCAA
901
3_HyAr (1) -----
EU078696_Hy1A (901) GACGGTCTTTAATTGATCACGTGGTTACTAATGCTCAAAGTCCACTTTATAAAAAAGGCATTGCTTACACTGGAGCTTACGGTAATGTGCTTATAGATG
1001
3_HyAr (1) -----
EU078696_Hy1A (1001) GCTTATCGCAATTAATTCCTATTATTCAAAAAACAAAATCTCCTATAGAAGCGGATAAAAATGGCTACTATTTATCATTGGATTAACCATTCTTTTTTCCC

```

```

1101
3_HyAr (1) -----
EU078696_Hy1A (1101) TATCATCGTTTCGTGGAGAAATGATGGATATGACTCGAGGGCGTTCTATCAGTCGTTTTAATGCTCAATCTCATGTTGCTGGCATTGAAGCACTTCGTGCT
1201
3_HyAr (1) -----GGGGTGGAAAGTTTTTGAATATGG
EU078696_Hy1A (1201) ATTTTACGTATTGCTGACATGTCTGAAGAGCCTCACCGTTTGGCACTTAAAAACCGTATAAAAAACTCGTCACACAAGGGAAAGTTTTTACAATGCT
1301
3_HyAr (27) ATTAAAGAAGCAACTAAAGCTCACCTAAGAAGCTTAATGAGGAGG-ACTGATACCCCCTTCTCGGTAAGCGTCGTTGTCTTTGTGGGAATTTTATG
EU078696_Hy1A (1301) ATGATAAATTTGAAAACCTATCAGATATCA-AACT-TATGAAAGAGCTACTAAGTGATACTTCT--GTTCAGTCCAAAACTTGATAGTTACGTAGCT-
1401
3_HyAr (126) AGAGTTAAGAGCATGTTTT-TAGCTGCAATTCCTTGATGAGCAACTTTTGTTGCTGATT-----TGCTTGACAGGCATGAGGAAAACTATAAGCCT
EU078696_Hy1A (1396) AGTTTCAATAGTATGGATAAAATGGCACTATAATAATAACAAGATTTTGTCTTTTGCCATCCAATGTTTCGAATCGAACTCAAAAATATGAAGCTA
1501
3_HyAr (220) TGT---ATGAGAAAGATTATGATTTGAAAACGTC--GTTGCTTTTTTTTCAATGTAATGACGTGCACTCTGTTGACTATCATGA----TCGTAGACAGCG
EU078696_Hy1A (1496) TGAATAATGAAAATCTTCATGCTGTTTTACTTCTGATGGAATTTTTTACCTATACAATACGAT--TTAGGACACTACAGTGAAAACTATTTGGCACC
1601
3_HyAr (311) GCCCGTTTGTTCATGTTTTCTGACAAAGTCGATATCAAGCTTGC AATA--AATCTTATTATTCCCGACTATCCAAAAAGGCAGAATCCTAAGGCTTA
EU078696_Hy1A (1594) GTAAATCCCCTACCGCTTACCTGAA--CCACAGAACTGAGCAAAAACCTAGAGGGAATCCTCGAATATTAAAAAGCA-ACTATCAACAGTTGGC
1701
3_HyAr (409) ACTATCACCGGTTGTGTGATGTGTTGCAAGAGATAAAGGCACCTCCAACTAACCTGATGGAGTCGACATGA--TTTGTCATCACGCTTTTATGT
EU078696_Hy1A (1690) ATGACTAGCCTCTCTGATGCTTTTGTGCAAGTAAAAA----CTTAATAATACAAGTCTCTAGCTGCTATGACCCTCACTAATTGGAAATAAAGT
1801
3_HyAr (507) TTCTGCCATCTCCCGGGTGTGAATCTGCCCAAAATATGCTAAACATGTTGTTGGACCTGCACCTACTAGTGAAACCAGAAATCTTGAGCTGGGATCTTCAATG
EU078696_Hy1A (1786) CTCACCTCAATAAAAGGGTGGTTATCTTAAGAAACAAAATAATCT-TTGTGGTA--GCAATAACA--AACCAGTCACTC-ACAAGGCGTATACAC
1901
3_HyAr (607) CTT----CACGAAAAACGATATATAG-----TCCTG--CAATGTGACTAGCGAGAA-TAGATCT-AGTACACCG-TGTTGACTTTGTTAA-CAC-
EU078696_Hy1A (1881) TATTGAGCAACGAAAAGAAAATCAAAAGCACCCCTACTGTTCTTATGTTAACAATCAACCCGTTGACTTGAAATAATCAGCTAGTTGATTTTACAAACACT
2001
3_HyAr (690) -AAAGTAG---C-ATGTAAGGG-TGCTCTG--TTGAACTACCAAGTTA--ACTTGC TCAAGG-AGAAGTATTACGCCATGGAATACGAGCCGAGCTTAA
EU078696_Hy1A (1981) AAAAGTATTTTTCTTGAAAGTATGATCCCGTCAAAATAATGGTTACTACTTCTCAAGCCAACACACTTAGCATAGTAAAGG-CGCTTCAAC--AG
2101
3_HyAr (779) TGATATATGCGTATGATGC AAAAGGTCATCAAAAGTCTCCGAAAGAGTTAACTGCGCTATAACTGAAAGTAAAGTACTTCTGCGC----CCCGCGTC-
EU078696_Hy1A (2078) GAAATG-GCAAAACAT--AAAAGC-TGATGACAAATCACCAGAAAGCCAATCAAGAAAGTTCAAT--ACCTTTATCCTATCATGCAAAACCATAC
2201
3_HyAr (874) -GGTCATAGCTGAATAC-TACCTTATTCTTCATTTGTAAGAAGTGTGCATAGGATACCTAGACGGGCAATAC-GTTA-----
EU078696_Hy1A (2172) AGATGCGATCGTTATGCCATATGATGCTTCAATATGACTCGTCAAGAAATTTGAAACCTATATTAGCAAGCTTGATACTGACTTGTAGAAAACAAT
2301
2400

```

```

3_HyAr (951) -----
EU078696_Hy1A (2272) GACAAACTGGCCGCTGTCTACGATCATGATAGTCAACAGATGCACGTCATTCACATATGAAAAAAGCAACGACGTTTTCAAATCATAATCTTTCTCATC
2401 2500
3_HyAr (951) -----
EU078696_Hy1A (2372) AAGGCTTTTATAGTTTTCCCTCATCCTGTCAAGCAAATCAGCAACAAAAGTTGCTCATCAAGGAATTGCAGCTAAAAACAATGCTCTTAACTCTCATAA
2501 2600
3_HyAr (951) -----
EU078696_Hy1A (2472) AATCCCCACAAAAGACAACGACGCTTACCGCGTACTGGGTATCAGTCCTCCTCATTAGAGTTCTTAGGTGGAGCTTTAGTTGCTTCTTTAACCATATC
2601 2636
3_HyAr (951) -----
EU078696_Hy1A (2572) ACAAACCCTTTCGTAAGAAAGACTTAAGGATTTAG

```

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล	นาย สิทธิศักดิ์ เกาสุวรรณ
วัน เดือน ปี ที่เกิด	2 ธันวาคม 2531
สถานที่เกิด	จังหวัดกรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	โรงเรียนพระโขนงพิทยาลัย ในปี พ.ศ.2549 วศ.บ. (วิศวกรรมเคมี) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ในปี พ.ศ. 2553
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	ศึกษาในระดับปริญญาโท สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2554

บทความที่ได้รับการตีพิมพ์

Sitiisak Thaosuwan, Chutimon Satirapipathkul and Srimek Chaowpongpan. Recombinant Hyaluronate Lyase Production from *Streptococcus pyogenes* in *Escherichia coli*. JM109. International Conference on Microbial Taxonomy, Basic and Applied Microbiology.; วันที่ 4-6 ตุลาคม 2555 ณ โรงแรมโฆษะ จังหวัดขอนแก่น ประเทศไทย

Sitiisak Thaosuwan, Chutimon Satirapipathkul and Srimek Chaowpongpan. Production and Activity of hyaluronate lyase from *Streptococcus pyogenes* in *Escherichia coli*. JM109. The 5th AUN/SEED-Net Regional Conference on Chemical Engineering. วันที่ 7-8 กุมภาพันธ์ 2556 ณ โรงแรม Zign Hotel พัทยา จังหวัดชลบุรี ประเทศไทย