บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อ *Streptococcus zooepidemicus* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตและสารเคมี NTG จากการทดลองได้คัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 เพื่อใช้เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นในการกลายพันธุ์เนื่องจากมีประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูงกว่าสายพันธุ์ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 อีกทั้งสายพันธุ์ดังกล่าวยังไม่มีการผลิตเสตรปโตไลซิน ที่เป็นตัวย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

การคัดเลือกสูตรอาหารสำหรับการผลิต พบว่าจากรายงานสูตรอาหารทั้ง 3 สูตร (John, Goh and Oeggerli, 1994; Bracke and Thacker, 1985; Morita and Fujii, 1991) สูตรอาหารของ Bracke and Thacker, 1985 ให้ประสิทธิภาพในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูงกว่าอาหารอีกสองสูตรอย่างชัดเจน ชนิดของน้ำตาลที่ใช้ในสูตรอาหารสำหรับการผลิตนั้นหากเป็นน้ำตาลซูโครสจะให้ผลในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูงกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสและฟรักโตส สาเหตุที่เชื้อมีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูงกว่าเมื่อใช้น้ำตาลซูโครส สันนิษฐานได้จากรายงานของ O'Regan และคณะในปี 1994 ที่กล่าวถึงกลไกการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกในทางชีวภาพ (รูปที่ 1.6) ซึ่งสารตั้งต้นในการสร้างกรดไฮยาลูโรนิก คือ UDP-Glucuronic acid และ UDP-N-Acetyl Glucosamine สร้างจากการเปลี่ยน Glucose-6-P และ Fructose-6-P ตามลำดับ ดังนั้นหากใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งเท่ากับมีทั้งน้ำตาลฟรักโตสและกลูโคสอยู่ในอาหารทำให้ไม่จำเป็นต้องเปลี่ยน Glucose-6-P ไปเป็น Fructose-6-P ทำให้สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้มากกว่าการใช้น้ำตาลฟรักโตสหรือกลูโคส ระดับความเข้มข้นน้ำตาลที่เหมาะสมในระดับขวดเขย่าสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกจะเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตรเนื่องจากให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงเทียบเท่ากับที่ระดับความเข้มข้นน้ำตาลที่สูงขึ้นคือ 5 กรัมต่อลิตร แต่จะมีการหลงเหลือของน้ำตาลภายหลังการหมักต่ำกว่า และหากเปรียบเทียบกับที่ความเข้มข้นน้ำตาลที่สูงขึ้นพบว่า หากความเข้มข้นน้ำตาลสูงจะมีผลให้การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกลดต่ำลง อาหารสำหรับการเตรียมหัวเชื้อตั้งต้นนั้นในการทดลองจำเป็นต้องใช้อาหารเหลว BHI ต่อไปเนื่องจากการใช้อาหารเหลว TSB และอาหารสูตรสำหรับการผลิตที่มีการปรับปรุงโดยการเติมเปปโตนนั้น พบว่าถึงแม้ปริมาณเซลล์ที่ได้จาก

การเตรียมหัวเชื้อตั้งต้นจะมีความใกล้เคียงกันแต่เมื่อพิจารณาถึงการเพิ่มจำนวนของเซลล์ภายหลังการถ่ายเชื้อสู่อาหารสูตรสำหรับการผลิต เมื่อใช้อาหารเหลว BHI เป็นหัวเชื้อตั้งต้นพบว่าจะให้การเพิ่มจำนวนเซลล์ที่ดีกว่าการใช้ TSB หรือสูตรอาหารสำหรับการผลิตที่ได้รับการปรับปรุง ซึ่งอาจเนื่องมาจากในอาหาร BHI ยังมีปัจจัยอื่นๆอีกที่มีความสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์และการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเซลล์ จึงเลือกใช้อาหารเหลว BHI เป็นอาหารสำหรับการเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในอาหารสูตรสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกคือเคซีนที่ผ่านการย่อย (ของบริษัท Fluka) ซึ่งเคซีนดังกล่าวนำเข้าจากต่างประเทศจึงมีราคาสูงไม่เหมาะสมสำหรับนำมาคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีจำนวนมากเนื่องจากทำให้เกิดความสิ้นเปลือง จึงได้นำแลกติกเคซีนมาทดลองใช้โดยใช้ภาวะการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน ที่ปริมาณเอนไซม์ 4000 ยูนิต ควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการย่อย 12 ชั่วโมง ซึ่งสามารถใช้แทนเคซีนที่ผ่านการย่อยของบริษัท Fluka ได้เป็นอย่างดีและให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกและปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้นภายหลังการหมักได้ใกล้เคียงกับการใช้เคซีนที่ผลิตโดยบริษัท Fluka

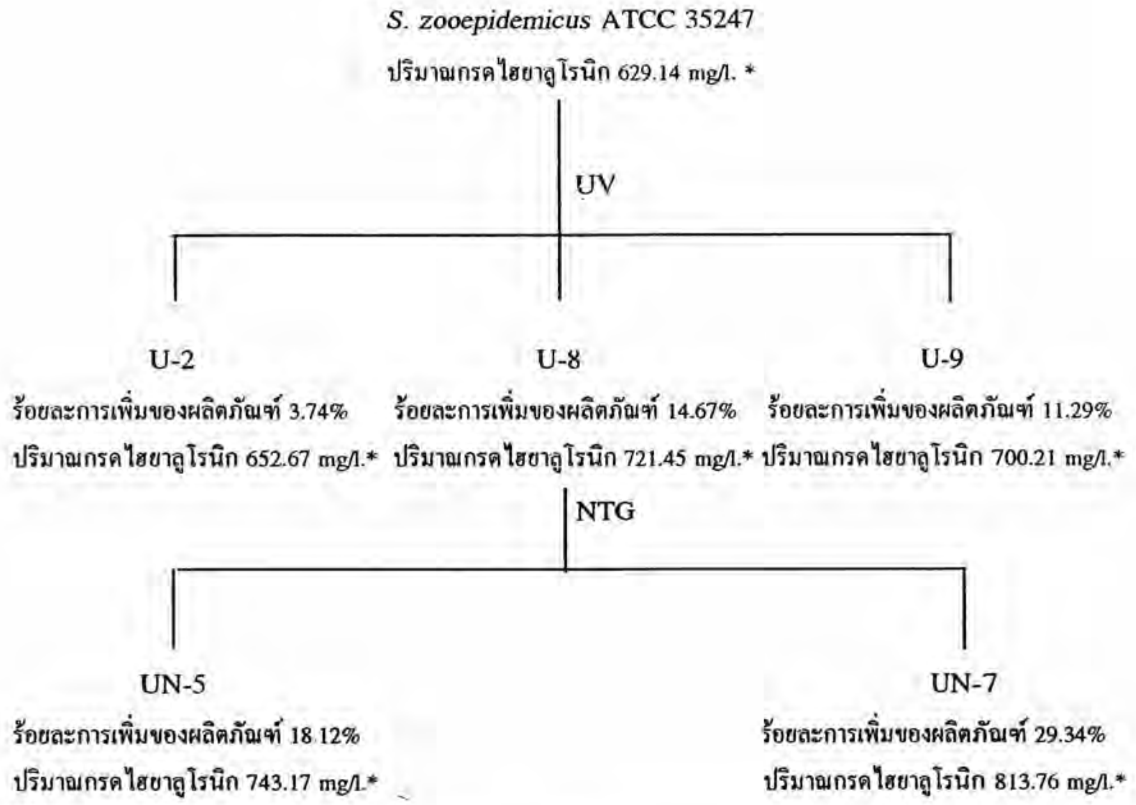
ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์กับเชื้อ *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35247 นั้นในขั้นแรกได้ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตและ NTG โดยเมื่อเปรียบเทียบสายพันธุ์ใหม่ที่ได้จากการคัดเลือกภายหลังการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์จากทั้งสองวิธีการ พบว่า การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการใช้แสงอัลตราไวโอเลตสามารถทำให้เกิดสายพันธุ์ใหม่ที่ให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นมาก ดังเช่น สายพันธุ์ U-8 ที่เมื่อเริ่มต้นการถ่ายเชื้อครั้งแรกสามารถให้ผลผลิตได้สูงถึง 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้นี้สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นถึงประมาณ 2 เท่า แต่เชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวไม่มีความเสถียร เมื่อทำการทดสอบความเสถียรทางสายพันธุ์ พบว่า หลังจากถ่ายเชื้อสายพันธุ์ U-8 ต่อมา 10 ครั้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากสายพันธุ์ดังกล่าวลดลงอย่างมาก กล่าวคือในช่วงการถ่ายเชื้อครั้งแรกเชื้อมีค่าร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์สูงถึง 186.7% และต่อมาเมื่อถ่ายเชื้อครั้งที่ 5 และครั้งที่ 10 เชื้อมีค่าร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 31.8 % และ 24.4 % ตามลำดับ นอกจากเชื้อสายพันธุ์ U-8 แล้วสายพันธุ์ใหม่อื่นๆที่ได้จากการคัดเลือกภายหลังการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต คือ สายพันธุ์ U-2 และ U-9 ก็พบว่าให้ผลเป็นเช่นเดียวกัน ส่วนเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่ได้จากการคัดเลือกภายหลังจากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG พบว่า เชื้อมีการเพิ่มของประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกต่ำกว่าเมื่อเทียบกับการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต และเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่ได้ไม่มีความเสถียร

การชักนำให้สายพันธุ์ U-8 เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG พบว่าได้สายพันธุ์ที่ให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูง คือสายพันธุ์ UN-5 และ UN-7 จึงได้นำสายพันธุ์ UN-5 ไปใช้ใน

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG และ UV ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำครั้งที่สองนี้พบว่าเชื้อที่ได้ไม่มีความเสถียรทางสายพันธุ์และปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ตั้งต้น จึงได้คัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ UN-7 ไปใช้ศึกษาลักษณะการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก เนื่องจากถึงแม้ในช่วงการถ่ายเชื้อครั้งแรก ค่าการเพิ่มของผลิตภัณฑ์ของสายพันธุ์ UN-7 จะต่ำกว่าสายพันธุ์ UN-5 แต่เมื่อถ่ายเชื้อไป 30 ครั้ง เชื้อ UN-7 เสถียรกว่าสายพันธุ์ UN-5 และสายพันธุ์อื่นๆ อีกทั้งยังให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงกว่าเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น โดยผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้ 800 มิลลิกรัมต่อลิตรในขณะที่สายพันธุ์ ATCC 35247 ผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้ประมาณ 600 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อหมักในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตรโดยใช้อาหารสูตรสำหรับการผลิต เชื้อมีการเจริญสูงกว่าการหมักในระดับขวดเขย่าและมีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกประมาณ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร

การคัดเลือกเชื้อในขั้นปฐมภูมินั้นอาศัยการพิจารณาขนาดของโคโลนีและสมบัติการย่อยเม็ดเลือดแดง ซึ่งการคัดเลือกดังกล่าวมีข้อจำกัดเนื่องจากโดยลักษณะของเชื้อสเตรปโตคอคคัสจะมีการเรียงตัวเป็นสายประมาณ 2-4 เซลล์แม้จะเพาะเลี้ยงในสภาพอาหารเหลวที่มีการกวนอย่างต่อเนื่อง ทำให้เกณฑ์ในการคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายในขั้นปฐมภูมิไม่สามารถระบุได้แน่ชัดว่าการที่โคโลนีมีขนาดต่างกันเนื่องมาจากเซลล์มีการเจริญเร็วกว่าหรือเนื่องจากมีเซลล์เริ่มต้นต่างกันดังนั้นความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของโคโลนีและความสามารถในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในบางโคโลนีอาจไม่มีความสอดคล้องกัน ส่วนคุณสมบัติการย่อยเม็ดเลือดแดงนั้นโคโลนีส่วนใหญ่จะยังคงมีสมบัติเหมือนเชื้อเริ่มต้นคือไม่ย่อยเม็ดเลือดแดง ดังนั้นจึงมีโคโลนีที่ผ่านการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิเป็นจำนวนมากทำให้จำเป็นต้องสุ่มโคโลนีไปคัดเลือกในขั้นทุติยภูมิ

การหมักเพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิก ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร จากการทดลองยังคงให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกต่ำ เมื่อเปรียบเทียบการรายงานเกี่ยวกับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก (Nimrod et al., 1988; John, Goh and Oeggerli; 1994) ดังนั้นในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกจำเป็นต้องปรับปรุงภาวะในการหมักและศึกษาผลของสารบางชนิด เช่น ไลโซไซม์ หรือ Tween 80 เป็นต้น จากงานวิจัยนี้สามารถสรุปขั้นตอนในการกลายพันธุ์เชื้อ *S. zooepidemicus* UN-7 ได้ดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 สายพันธุ์กลายของเชื้อ *S. zooepidemicus* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ซึ่งมีประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูงในระดับขวดเขย่า เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ในอาหารสูตรสำหรับการผลิต PM3

หมายเหตุ * ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกหลังจากการถ่ายเชื้อไป 30 ครั้ง (จากตารางที่ 3.36)