บทที่ 1

บทนำ

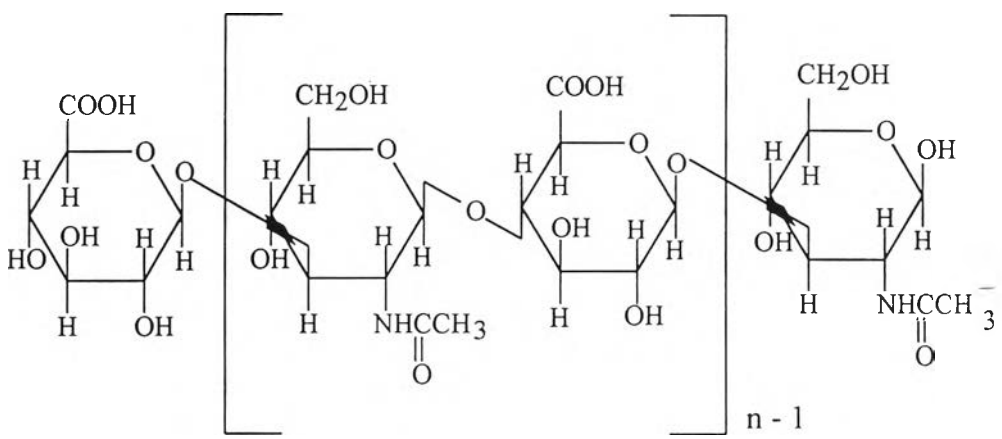
1.1 ประวัติความเป็นมา

กรดไฮยาลูโรนิก (hyaluronic acid) เป็นสารอินทรีย์ประเภทเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (heteropolysaccharides) ที่สามารถพบได้ในธรรมชาติคือ เป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อหลายๆ ส่วน ในร่างกายของสิ่งมีชีวิตทั่วไป เช่น ผิวหนัง กระดูกอ่อน และอวัยวะบางอย่าง เช่น สายรก วุ้นตา น้ำไขข้อ และในหงอนไก่ตัวผู้ (Nimrod และคณะ, 1986) ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวภาพต่างๆในสิ่งมีชีวิต เช่น การสร้างโลหิต (haemopoiesis) การเจริญของหลอดเลือด (angiogenesis) และการยึดติดกันของเซลล์ (cell adhesion) (Morita และ Fujii, 1991) ได้มีการนำกรดไฮยาลูโรนิก มาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ เช่น แทนวุ้นน้ำตาในการผ่าตัดตา (ophthalmic surgery) ใช้เป็นส่วนประกอบในยาหยอดตา ใช้รักษาการอักเสบของข้อต่อ (orthopedic surgery) (Balazs, 1979) ใช้ในการรักษาบาดแผล (wound treatment) (Morita และ Fujii, 1991) ตลอดจนใช้ตรวจหาแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ streptococcal hyaluronidase ในซีรัมคน (Kjems และ Lebech, 1976) และใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์ โดยใช้เป็นสารให้ความชุ่มชื้นในครีมทาหน้า (Nimrod และคณะ, 1988) น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกจะอยู่ในช่วง 5×10^4 ดัลตัน ถึง 1.3×10^7 ดัลตัน (Nimrod และคณะ, 1988) หรือมากกว่า 1.4×10^7 ดัลตัน (Ellwood และคณะ, 1995) โดยน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกจะมีความแปรผันและขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ คือ แหล่งที่มา เช่น รกของทารก จะมีน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกอยู่ในช่วง 3×10^6 ดัลตัน ถึง 4×10^6 ดัลตัน (Laurent, 1955) ส่วนกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากแบคทีเรียชนิด *Streptococcus pyogenes* จะมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 5.5×10^4 ดัลตัน , ความแตกต่างของวิธีการแยกสกัดกรดไฮยาลูโรนิก คือ ถ้าแยกสกัดโดยวิธีต่างกันจะมีผลทำให้น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกมีค่าแตกต่างกัน (Ellwood และคณะ, 1995) และวิธีที่ใช้วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก คือ การหาน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกโดยอาศัยความหนืด (viscometry) ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้ จะมีค่าต่างจากการหาน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกโดยวิธีวัดการกระเจิงของแสง (light scattering)

1.2 คุณสมบัติของกรดไฮยาลูโรนิก

กรดไฮยาลูโรนิก เป็นเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ในกลุ่มไกลโคอะมิโนไกลแคน (glycoaminoglycan) ที่มีความหนืดสูง ไม่มีสี มีความยืดหยุ่น และสามารถเก็บรักษาความชุ่มชื้นได้ดี ละลายน้ำได้ เนื่องจากมีสภาพความเป็นขั้วสูง (Balazs, 1979) ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เอทานอล โครงสร้างหรือรูปร่างโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก มีลักษณะเป็นเกลียวแบบสุ่ม (random coil structure) ที่เกี่ยวพันกันเป็นร่างแห ซึ่งมีลักษณะคล้ายเจล มีความเหนียว หนืด และยืดหยุ่น หน้าที่สำคัญประการหนึ่งของกรดไฮยาลูโรนิก คือ ช่วยกักเก็บน้ำ โดยพบว่า สารละลายกรดไฮยาลูโรนิก 2 % จะเก็บน้ำได้ถึง 98 % (Balazs และ Band, 1984) หรือน้ำปริมาตร 1 ลิตร จะถูกตรึงอยู่ในโครงสร้างเกลียวของกรดไฮยาลูโรนิกน้ำหนัก 1 กรัม (Laurent, 1970)

โครงสร้างทางเคมีของกรดไฮยาลูโรนิกเป็นโพลีเมอร์สายตรงที่มีหน่วยย่อยไดแซคคาไรด์ (disaccharides unit) เป็นน้ำตาล 2 ชนิดคือ เอ็น-อะซิทิล-ดี-กลูโคซามีน (N-acetyl-D-glucosamine) และ ดี-กลูคูโรนิก แอซิด (D-glucuronic acid) ดังแสดงในรูปที่ 1.1 มีสูตรโมเลกุลอย่างง่าย คือ $(C_{14}H_{21}NO_{11})_n$ ซึ่ง n จะมีค่ามากกว่า 1,000 (Brown และคณะ, 1994) โดยทั่วไปกรดไฮยาลูโรนิกที่พบในธรรมชาติ และที่แยกได้มักจะอยู่ในรูปของเกลือโซเดียม คือ โซเดียมไฮยาลูโรเนต และพบบ้างในรูปของเกลือโพแทสเซียม คือ โพแทสเซียมไฮยาลูโรเนต (Nimrod และคณะ, 1988; Brown และคณะ, 1994; Ellwood และคณะ, 1995; Fujii และคณะ, 1996)



รูปที่ 1.1 แสดงโครงสร้างของกรดไฮยาลูโรนิก (O'Ragan และคณะ, 1994)

1.3 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

การผลิตกรดไฮยาลูโรนิก ในครั้งแรกได้จากการสกัดแยกจากเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เช่น หงอนไก่ (rooster comb) เยื่อเมือกบริเวณลูกตา (vitreous body) สายสะดือ (umbilical cord) น้ำจากไขกระดูก (synovial fluid) เซลล์เยื่อบุผิวหนัง (epithelial cell) (Cifonelli และ Mayeda, 1957; Laurent และคณะ, 1960; Radin และคณะ, 1970) น้ำไขข้อของวัว (bovine synovial fluid) (Matsumura และคณะ, 1963) และกระดูกอ่อนของวัว (bovine articular cartilages) (Keng และคณะ, 1989) เป็นต้น ซึ่งวิธีการสกัดแยกจากเซลล์ของสิ่งมีชีวิตจะมีข้อเสียจากการปนเปื้อนของไกลโคอะมิโนไกลแคนอื่นๆในเซลล์ เช่น เดอมาแทนซัลเฟต (dermatan sulfate) และการปนเปื้อนของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (hyaluronidase) ทำให้ขั้นตอนการสกัดแยกและการทำให้บริสุทธิ์มีความยุ่งยาก และซับซ้อนมากขึ้น ทำให้มีต้นทุนในการผลิตสูงขึ้น และปริมาณของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้มีปริมาณต่ำ (Bracke และคณะ, 1985; Morita และ Fujii, 1991; Brown และคณะ, 1994; Ellwood และคณะ, 1996)

เพื่อแก้ปัญหาเหล่านี้ จึงมีการพัฒนาวิธีการผลิตอื่นๆตามมา คือ การผลิตกรดไฮยาลูโรนิก โดยการสังเคราะห์จากน้ำตาลที่จับกับนิวคลีโอไทด์ (UDP-sugar) โดย De Luca และคณะ ในปี 1995 ได้รายงานถึงการเตรียมกรดไฮยาลูโรนิกจากน้ำตาลที่จับกับนิวคลีโอไทด์ 2 ชนิด คือ ยูริดีนไดฟอสเฟต-เอ็น-อะซิทิล-ดี-กลูโคซามีน (UDP-N-acetyl-D-glucosamine) และ ยูริดีนไดฟอสเฟต-ดี-กลูคูโรนิก แอซิด (UDP-D-glucuronic acid) โดยใช้เอนไซม์ ไฮยาลูโรนิก แอซิด ซินเทส (hyaluronic acid synthase) ที่ได้จากแบคทีเรีย *Streptococcus equisimilis* สายพันธุ์ D181 , เอนไซม์ ยูริดีนไดฟอสเฟต-เอ็น-อะซิทิล-ดี-กลูโคซามีน ไพโรฟอสโฟรีเลส (UDP-N-acetyl-D-glucosamine pyrophosphorylase) จากแบคทีเรีย *Escherichia coli* และเอนไซม์ ยูริดีนไดฟอสเฟต-กลูโคส ดีไฮโดรจีเนส (UDP-glucose dehydrogenase) ซึ่งจะได้กรดไฮยาลูโรนิกในรูปของเกลือโซเดียมถึง 90 % วิธีการนี้มีข้อดี คือ จะช่วยลดการปนเปื้อนของกรดไฮยาลูโรนิกจากไกลโคอะมิโนไกลแคนอื่นๆ และยังสามารถกำหนดขนาดโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกได้ตามต้องการ แต่วิธีการนี้ ยังมีข้อจำกัดเกี่ยวกับเรื่อง ความเสถียรของเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิต (De Luca และคณะ, 1995) ทำให้ไม่สามารถพัฒนาการผลิตได้ในระดับอุตสาหกรรม

ส่วนการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกจากกระบวนการหมักโดยแบคทีเรียนั้น เริ่มจาก Kendall และคณะ ในปี 1937 สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้เป็นครั้งแรก จากการหมักในอาหารเหลว โดยเชื้อ group A hemolytic Streptococci หลังการตกตะกอนน้ำหมักด้วยเอทานอล ได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก 60 ถึง 140 มิลลิกรัมต่อลิตร และได้ทำการศึกษาต่อไป โดยฉีดกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้นี้ให้กับสัตว์ทดลอง พบว่า ไม่มีผลกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Crater และ Van de Rijn, 1995) แสดงให้เห็นว่า กรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการหมักโดยแบคทีเรียนี้ มีความ

คล้ายคลึงกับกรดไฮยาลูโรนิกที่มีในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ซึ่งวิธีการนี้มีข้อได้เปรียบวิธีการอื่นๆ คือ ใช้ระยะเวลาน้อย ให้ผลผลิตสูง และใช้ต้นทุนต่ำ ดังนั้น จึงเป็นวิธีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกที่เหมาะสม สำหรับการพัฒนาเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

1.4 กระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดยแบคทีเรียในกลุ่ม Streptococcus

มีผู้รายงานถึง กระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดยแบคทีเรียในกลุ่ม Streptococcus ดังนี้

Kendall และคณะ ในปี 1937 รายงานว่า สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิก จากกระบวนการหมัก ได้เป็นครั้งแรก โดยทำการเลี้ยงแบคทีเรีย group A hemolytic Streptococcus สายพันธุ์ C-203 จำนวน 3 ชนิด ในอาหารเหลว พบว่า ได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกใน ชนิดที่ 1 60 ถึง 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ชนิดที่ 2 เท่ากับ 60 ถึง 140 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ในชนิดที่ 3

Seastone ในปี 1939 รายงานว่า สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิก จากกระบวนการหมัก ในอาหารเหลว ด้วยแบคทีเรีย group C hemolytic Streptococcus

Pierce และ White ในปี 1954 ได้ทำการศึกษา การผลิตกรดไฮยาลูโรนิก จากกระบวนการหมัก ด้วยแบคทีเรีย *Streptococcus pyogenes* สายพันธุ์ S23 โดยเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอน คือ กลูโคส และกาแลกโตส ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า อาหารที่มีกลูโคส จะให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูง ตลอดช่วงของการเจริญ ซึ่งทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง ในอาหารต่ำลง แต่ในอาหารที่มี กาแลกโตส เชื้อจะมีการเจริญช้า และมีการสร้างกรดไฮยาลูโรนิก ในช่วง 2 ถึง 3 ชั่วโมงแรกของการเจริญ ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง ไม่ลดต่ำลง

Cifonelli และ Dorfman ในปี 1957 รายงานว่า สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิก จากกระบวนการหมัก ด้วยแบคทีเรีย group A Streptococcus โดยหลังจาก ตกตะกอนน้ำหมักด้วยเอทานอล และกรองผ่านแผ่นเซลลูโลส Darco G-60 จะได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกเท่ากับ 300 ถึง 400 มิลลิกรัมต่อลิตร

Thonard และคณะ ในปี 1964 อธิบายถึง วิธีการแยก และการทำให้บริสุทธิ์ของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากกระบวนการหมัก ด้วยแบคทีเรีย group A hemolytic Streptococcus จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ 32369, Coburn R18 และ Cook B โดยการเติม แอมโมเนียมซัลเฟตลงในอาหารเหลว ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 65 % เพื่อตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิก โดยจะได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก เท่ากับ 0.5 ถึง 1.0 กรัมต่อลิตร ซึ่งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ใช้

Holmstrom และ Ricica ในปี 1967 ได้ทำการทดสอบอาหารเหลว 3 ชนิด คือ Veal Infusion Broth (VIB) Todd Hewitt Broth (TH) และ modified Christensen medium เพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิก โดย group A hemolytic Streptococcus 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ 32369 และ Coburn

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

R18 พบว่า VIB-broth จะได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงที่สุด คือ 250 ถึง 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ อาหารเหลวอีก 2 ชนิด จะได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกเพียง 20 ถึง 60 มิลลิกรัมต่อลิตร

Woolcock ในปี 1974 รายงานว่า สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิก จากกระบวนการหมัก ด้วยแบคทีเรีย *Streptococcus equi* ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร แบคโตเปปโตน 20 กรัมต่อลิตร โซเดียมไบคาร์บอเนต 2 กรัมต่อลิตร และไดโซเดียมฟอสเฟต 0.4 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก เท่ากับ 52 มิลลิกรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร

Kjems และ Lebech ในปี 1976 รายงานถึง การผลิตกรดไฮยาลูโรนิก จากกระบวนการหมัก ในอาหารเหลว chemically defined medium โดย group A hemolytic Streptococcus สายพันธุ์ K56 ได้กรดไฮยาลูโรนิก ที่มีความบริสุทธิ์สูง ในปริมาณ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร

Van de Rijn และ Kessler ในปี 1980 รายงานถึง การคิดสูตรอาหารเหลว chemically defined medium ชนิดใหม่ ที่ประกอบด้วย แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน นิวคลีโอไทด์ กรดอะมิโน และวิตามิน โดยทำการทดสอบเปรียบเทียบกับ complex medium (Todd-Hewitt broth) โดยใช้ group A Streptococci จำนวน 20 สายพันธุ์ พบว่า แต่ละสายพันธุ์ที่ทำการทดสอบ จะมีอัตราการเจริญ และความเข้มข้นของเซลล์ที่สูงกว่า เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว chemically defined medium ชนิดใหม่นี้

Bracke และคณะ ในปี 1985 รายงานถึง การผลิตกรดไฮยาลูโรนิก จากกระบวนการหมัก แบบไม่ให้อากาศ และภายใต้ภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์สูง ด้วยแบคทีเรีย Streptococcus ที่อุณหภูมิ 36 ถึง 38 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5 ถึง 7.5 จะได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก เท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร

Nimrod และคณะ ในปี 1988 รายงานถึง การใช้แบคทีเรีย *Streptococcus zooepidemicus* HA-116 ATCC 39920 มาทำให้กลายพันธุ์ เพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิก โดยใช้น้ำตาล 0.2 ถึง 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และควบคุมความเป็นกรด-ด่าง ในช่วง 6.0 ถึง 7.5 และควบคุมความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออน ให้สูงกว่า 0.05 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ในภาวะที่ไม่ให้อากาศ เท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร และในภาวะที่มีอากาศ เท่ากับ 4 ถึง 6 กรัมต่อลิตร

Akasaka และคณะ ในปี 1989 รายงานว่า สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิก จากกระบวนการหมัก ด้วยแบคทีเรีย *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ NH 131 ในอาหารเหลว ที่ประกอบด้วย กลูโคส สารสกัดจากยีสต์ และโพลีเปปโตน โดยใช้กลูโคสเริ่มต้นในอาหาร 2 กรัมต่อลิตร และเติมอีก 58 กรัมต่อลิตร เมื่อการเจริญเข้าสู่ช่วงเริ่มต้นของ exponential phase จะได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก เท่ากับ 3.6 กรัมต่อลิตร

Swann และคณะ ในปี 1990 รายงานถึง การปรับปรุงผลผลิต ของกรดไฮยาลูโรนิก ที่ผลิตจากกระบวนการหมัก ด้วยแบคทีเรีย *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ NCTC 7023 ในภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนสูง ในช่วงระยะเริ่มต้นของการเจริญในระยะ exponential phase ได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก เท่ากับ 3 ถึง 6 กรัมต่อลิตร

Morita และ Fujii ในปี 1991 ได้ศึกษาวิธีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก จากกระบวนการหมัก ด้วยแบคทีเรีย *Streptococcus equi* สายพันธุ์ Ferm BP-878 และ 879 เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก โดยการเติม bacteriolytic enzyme ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก เท่ากับ 5.2 กรัมต่อลิตร

Ellwood และคณะ ในปี 1995 ทำการศึกษาเกี่ยวกับ วิธีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก จากกระบวนการหมัก แบบต่อเนื่อง ด้วยแบคทีเรีย *Streptococcus equi* สายพันธุ์ NCIMB 40237 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.2 อัตราการให้อากาศเป็น 0.2 vvm จะได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก เท่ากับ 2.5 กรัมต่อลิตร

Park และคณะ ในปี 1996 ได้รายงานเกี่ยวกับ แบคทีเรีย *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์กลายพันธุ์ LBF 707 โดยเลี้ยงในอาหารเหลว ที่ประกอบด้วย กลูโคส 60 กรัม, แมกนีเซียมซัลเฟต 1 กรัม, โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 2 กรัม, สารสกัดจากยีสต์ 5 กรัม, ยีสต์เปปโตน 15 กรัม และยูริดีน 0.75 กรัม ต่ออาหาร 1 ลิตร และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 ถึง 38 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7.1 ถึง 7.3 อัตราการให้อากาศเป็น 0.1 ถึง 1.0 vvm จะได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงถึง 6 กรัมต่อลิตร

Johns และคณะ ในปี 1994 รายงานว่า ค่าความเป็นกรด-ด่าง ความเร็วรอบในการกวน และอัตราการให้อากาศ จะเป็นปัจจัยหลัก ที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก จากกระบวนการหมัก ด้วยแบคทีเรีย *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ ATCC 35246 คือ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก มีค่าเท่ากับ 6.7 (+,-) 0.2 ความเร็วรอบในการกวนที่มากกว่าหรือเท่ากับ 600 รอบต่อนาที จะให้ผลที่ดีกว่า ความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที และการให้อากาศ จะช่วยปรับปรุงผลผลิต (yield) ของกรดไฮยาลูโรนิกได้ เนื่องจากได้รับพลังงานจากออกซิเจนเพิ่มขึ้น

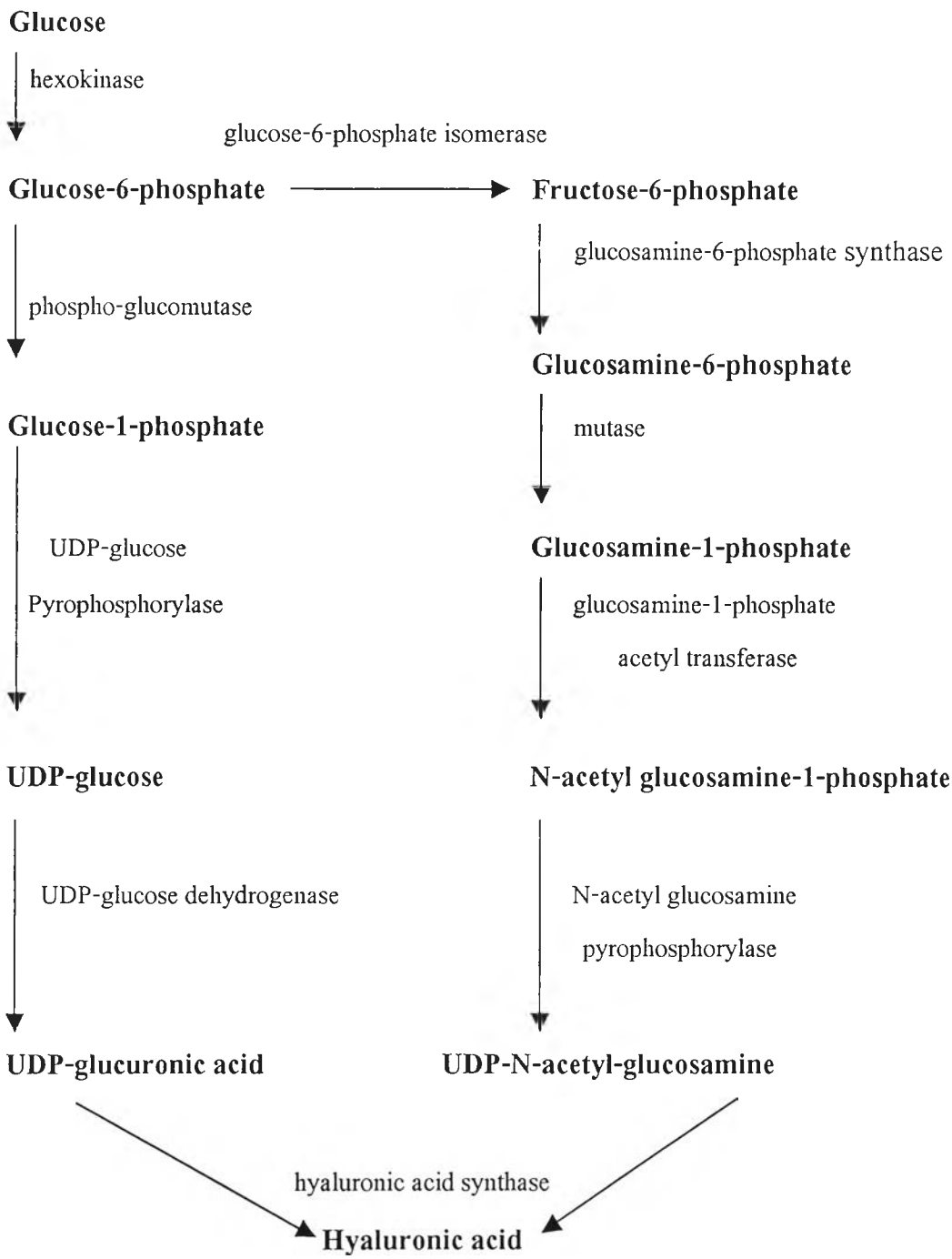
Armstrong และคณะ ในปี 1997 รายงานถึง การพัฒนาสูตรอาหาร chemically defined medium สำหรับ *Streptococcus zooepidemicus* ซึ่งประกอบด้วย กรดอะมิโน 11 ชนิด ที่จำเป็นต่อการเจริญของเซลล์ และกลูตามีน เป็นแหล่งไนโตรเจนหลัก โดยทำการทดสอบ ความเข้มข้นสุดท้ายของกรดไฮยาลูโรนิก และอัตราการผลิตจำเพาะของกรดไฮยาลูโรนิก เปรียบเทียบกับเมื่อเลี้ยงใน complex medium

1.5 กลไกการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก

กรดไฮยาลูโรนิก เป็นสารแมแทบอไลท์ปฐมภูมิ (primary metabolite) ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย ในกลุ่ม Streptococcus โดยกรดไฮยาลูโรนิก จะอยู่ในส่วนของแคปซูล ซึ่งเป็นส่วนที่ช่วยให้เซลล์ของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ สามารถทนอยู่ได้ ในสภาพที่มีออกซิเจนสูง โดยเมื่อเซลล์มีการเจริญในอาหารเหลวที่มีการให้อากาศ ส่วนที่เป็นแคปซูล จะช่วยให้การเจริญของเซลล์ มีลักษณะเป็นกลุ่ม ทำให้การนำออกซิเจนเข้าสู่เซลล์ต่ำลง เนื่องจากการที่เซลล์มีการเจริญเป็นกลุ่ม จะทำให้อัตราส่วนพื้นที่ผิวต่อปริมาตรลดลง ซึ่งจะช่วยจำกัดการแพร่ของออกซิเจน และยังช่วยลดการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์อีกด้วย (Cleary และ Larkin, 1979) ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดยแบคทีเรียนั้น กรดไฮยาลูโรนิก จะมีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ตามการเจริญในช่วง exponential phase และจะสูงที่สุดในช่วง stationary phase เนื่องจากเซลล์จะปล่อยกรดไฮยาลูโรนิก ลงสู่อาหาร โดยเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ ไฮยาลูโรนิเดส (hyaluronidase) ซึ่งจะมีผลทำให้ขนาดมวลโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกลดลงด้วย (Van de Rijn, 1983; Brown และคณะ, 1994)

จากการศึกษาในระดับโมเลกุล พบว่าการสร้างกรดไฮยาลูโรนิก จะถูกควบคุมโดย *has* operon ซึ่งประกอบด้วยยีน (gene) ทั้งหมด 3 ยีน คือ *hasA* , *hasB* และ *hasC* โดยที่ *hasA* เป็นรหัสของเอนไซม์ ไฮยาลูโรนิก แอซิด ซินเทส (hyaluronic acid synthase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญต่อการเร่งปฏิกิริยา การนำ UDP-N-acetyl-D-glucosamine และ UDP-D-glucuronic acid มาสร้างเป็นกรดไฮยาลูโรนิกโพลีเมอร์ (Dougherty และ Van de Rijn, 1994) *hasB* เป็นรหัสของเอนไซม์ ยูริดีนไดฟอสเฟต-กลูโคส ดีไฮโดรจีเนส (UDP-glucose dehydrogenase) ซึ่งจะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน UDP-glucose เป็น UDP-glucuronic acid (Dougherty และ Van de Rijn, 1993) และ *hasC* เป็นรหัสของเอนไซม์ ยูริดีนไดฟอสเฟต-เอ็น-อะซิทิล-ดี-กลูโคซามีน ไพโรฟอสโฟรีเลส (UDP-N-acetyl-D-glucosamine pyrophosphorylase) ซึ่งจะเร่งปฏิกิริยา การเปลี่ยน glucose-1-phosphate + UTP ไปเป็น UDP-glucose และ PPi (Crater และ Rijn, 1995; Crater และคณะ, 1995) กลไกการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก แสดงในรูปที่ 1.2

จากการศึกษาต่อมาของ Crater และคณะ ในปี 1995 พบว่า การแปลรหัสของ *has* operon นี้จะถูกควบคุม โดยโปรโมเตอร์ (promoter) ที่บริเวณ upstream ของ ยีน *hasA* ทำให้ความแตกต่างของความสามารถในการสร้างแคปซูลของแบคทีเรีย ในกลุ่ม Streptococcus สายพันธุ์ต่างๆ มีสาเหตุมาจาก กลไกการถอดรหัส (transcription) คือ แบคทีเรีย Streptococcus สายพันธุ์ที่ไม่สร้างแคปซูลนั้น จะไม่สามารถตรวจพบ mRNA จาก *has* operon หรือกล่าวได้ว่า การสร้างกรดไฮยาลูโรนิก ที่เป็นส่วนของแคปซูลนั้น ถูกควบคุมโดยกลไกการ transcription (Dougherty และ Van de Rijn, 1993; DeAngelis และคณะ, 1993; Dougherty และ Van de Rijn, 1994; Crater และ Van de Rijn, 1995)



รูปที่ 1.2 แสดงกลไกการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก (O'Ragan และคณะ, 1994)

1.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกจากกระบวนการหมักโดยแบคทีเรียในกลุ่ม Streptococcus

1.6.1 ชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ใช้ในกระบวนการหมัก

การผลิตกรดไฮยาลูโรนิก จากกระบวนการหมักโดยแบคทีเรีย ให้ได้ผลผลิตที่ดี จำเป็นจะต้องคัดเลือก ชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ใช้ ให้มีลักษณะที่เหมาะสม คือ สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้ในปริมาณสูง ในระยะเวลาสั้น มีความเสถียรทางสายพันธุ์ ไม่ผลิตสารอื่นเป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียง ไม่ผลิตสเตรปโตไลซิน (streptolysin) ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้ใช้ผลิตภัณฑ์ เป็นสายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคในสิ่งมีชีวิต สามารถใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งอาหารอื่นๆได้หลายชนิด การเก็บรักษาเชื้อทำได้ง่าย และเชื้อสามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมได้ดี

1.6.2 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิต

1.6.2.1 สารแหล่งคาร์บอน

แบคทีเรียในกลุ่ม Streptococcus สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด เช่น กลูโคส และแป้งที่ผ่านการย่อยสลายโดยเอนไซม์ (Kjems และ Lebech, 1976; Van de Rijn และ Kessler, 1980) ซูโครส กาแลกโตส และฟรุกโตส (Akasaka และคณะ, 1989; Ellwood และคณะ, 1995) ซึ่งในปัจจุบัน แหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้กันมาก คือ กลูโคส และซูโครส เนื่องจากหาได้ง่าย และมีราคาถูก โดยปริมาณที่ใช้มีความหลากหลายขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ใช้ และวิธีการหมัก

1.6.2.2 สารแหล่งไนโตรเจน

แบคทีเรียในกลุ่ม Streptococcus สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนได้หลายชนิด ทั้งที่เป็นสารอินทรีย์ เช่น เปปโตน สารสกัดจากยีสต์ โปรตีนจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยแล้ว สารสกัดจากเนื้อ และกรดอะมิโน (Akasaka และคณะ, 1989; Swann และคณะ, 1990; Johns และคณะ, 1994; Ellwood และคณะ, 1995) และที่เป็นสารอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมฟอสเฟต แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ยูเรีย โซเดียมไนเตรท และไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนซัลเฟต (Kjems และ Lebech, 1976; Van de Rijn และ Kessler, 1980; Akasaka และคณะ, 1989; Swann และคณะ, 1990; Ellwood และคณะ, 1995) โดยในการใช้จะใช้เพียงชนิดเดียวหรือสองชนิดก็ได้ แต่จะต้องควบคุมปริมาณไนโตรเจนให้เพียงพอ สำหรับใช้ในการเจริญเติบโตของเซลล์

1.6.2.3 ฟอสเฟต

ฟอสเฟต เป็นส่วนประกอบของสารที่เป็นสารตั้งต้น ในการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก คือ UDP-N-acetyl-D-glucosamine และ UDP-D-glucuronic acid และในทางชีวเคมี ฟอสเฟตมีส่วนสำคัญในกระบวนการสร้างพลังงาน และยังเป็นส่วนประกอบของสารภายในเซลล์ที่สำคัญ เช่น กรดนิวคลีอิก อีกด้วย แหล่งฟอสเฟตที่นิยมใช้ ในกระบวนการหมัก ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของเกลือ เช่น โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Kjems และ Lebech, 1976; Van de Rijn และ Kessler, 1980; Bracke และคณะ, 1985)

1.6.2.4 แร่ธาตุ

แร่ธาตุที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก จากกระบวนการหมักโดยแบคทีเรียในกลุ่ม Streptococcus คือ ธาตุโลหะที่มีสองประจุ คือ Mn^{2+} และ Mg^{2+} โดยที่ Mg^{2+} จะให้ผลดีกว่า หน้าที่ของแมกนีเซียม ที่มีต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก คือ จะช่วยให้การทำงานของเอนไซม์ hyaluronic acid synthase มีเสถียรภาพมากขึ้น คือ แมกนีเซียม จะทำให้ การจับกันของเอนไซม์ กับสารตั้งต้นมีประสิทธิภาพดีขึ้นกว่าเดิม 2 ถึง 3 เท่า (DeAngelis, 1996) โดยส่วนมาก การเติมแมกนีเซียม จะเติมในรูปของ แมกนีเซียมซัลเฟต ในปริมาณ 0.5 ถึง 1.0 กรัมต่อลิตร

1.6.2.5 สารเสริมอื่นๆ

ได้แก่ สารอื่นๆ นอกเหนือจากที่กล่าวมา ซึ่งเมื่อเติมลงในอาหารจะมีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก เช่น ซีรัมไลโซไซม์ , tween 80 (Morita และ Fujii, 1991) หรือมีผลต่อการเจริญของเซลล์ เช่น สารละลายวิตามิน ที่ประกอบด้วย ไบโอติน โฟลิกแอซิด นิโคทินาไมด์ ไรโบเฟลวิน และไทเอมีน (Bracke และคณะ, 1985)

1.6.2.6 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

เนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่ม Streptococcus เป็นแบคทีเรีย ที่พบในเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นจะเจริญได้ดี ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร อยู่ในช่วงที่เป็นกลาง คือ 7.0 แต่เมื่อเชื้อมีการสร้างกรดไฮยาลูโรนิก และปลดปล่อยออกสู่อาหาร จะมีผลทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารต่ำลง คือ มีสภาพความเป็นกรด ดังนั้น จึงจำเป็นที่จะต้องเติมสารที่เป็นด่างลงไป เพื่อใช้ในการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ตัวอย่างของสารที่เป็นด่างที่นิยมใช้กัน คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Akasaka และคณะ, 1989; Swann และคณะ, 1990)

1.6.2.7 อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสม สำหรับแบคทีเรียในกลุ่ม Streptococcus โดยทั่วไปจะอยู่ในช่วง 30 ถึง 40 องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นเชื้อที่พบในเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต แต่อุณหภูมิที่ให้ผลดี และ เป็นอุณหภูมิที่นิยมใช้กันมากที่สุด คือ 37 องศาเซลเซียส (Nimrod และคณะ, 1988; Akasaka และคณะ, 1989; Swann และคณะ, 1990; Ellwood และคณะ, 1995)

1.6.2.8 ระยะเวลาในการหมัก

ระยะเวลาในการหมัก จากการศึกษา การเจริญของเซลล์เปรียบเทียบกับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก พบว่า การผลิตกรดไฮยาลูโรนิก จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงระยะ exponential phase และสูงที่สุดในระยะ stationary phase และปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก จะลดต่ำลงเมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะที่มีการตาย ดังนั้น ระยะเวลาในการหมักที่เหมาะสมในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก จะอยู่ในช่วง 30 ถึง 48 ชั่วโมง (Akasaka และคณะ, 1989; Swann และคณะ, 1990)

1.6.2.9 อัตราการให้อากาศ

การให้อากาศ พบว่า แบคทีเรียในกลุ่ม Streptococcus สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้ ทั้งในภาวะที่มีการให้ออกซิเจน และไร้ออกซิเจน โดย Cleary และ Larkin ในปี 1979 พบว่า การให้ออกซิเจนในปริมาณมาก จะทำให้แบคทีเรีย มีการสร้างกรดไฮยาลูโรนิกที่เป็นแคปซูลเพิ่มขึ้น เพื่อป้องกันอันตราย และความเป็นพิษจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่เซลล์สร้างขึ้นจากออกซิเจน แต่ก็มีรายงานเกี่ยวกับ การผลิตกรดไฮยาลูโรนิก จากกระบวนการหมักแบบไร้ออกซิเจน คือ Bracke และคณะ ในปี 1985 รายงานว่า สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิก ด้วย *Streptococcus pyogenes* ภายใต้ภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์สูง นอกจากนี้ Johns และคณะ ในปี 1994 รายงานว่า การเพิ่มอัตราการให้อากาศ จะช่วยเพิ่มปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกให้สูงขึ้นได้ เนื่องจากพลังงานที่ได้รับจากการเปลี่ยนไพรูเวทไปเป็นอะซิเตทและเข้าสู่กระบวนการหายใจโดยมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลกตรอน จะสูงกว่าพลังงานที่ได้จากการเปลี่ยนไพรูเวทไปเป็นแลกเตทในสภาวะไร้อากาศ จึงทำให้มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มขึ้น

1.6.2.10 ความเร็วรอบในการกวน

สำหรับความเร็วรอบในการกวน Johns และคณะ ในปี 1994 รายงานว่า ความเร็วรอบในการกวนที่มีค่าสูง คือ 600 รอบต่อนาที จะทำให้ปริมาณของกรดไฮยาลูโรนิกดีกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับ ความเร็วรอบในการกวนที่ต่ำ คือ 300 รอบต่อนาที ในระดับถังหมักขนาด 3 ลิตร แต่ Kim และคณะ ในปี 1996 พบว่า เมื่อเพิ่มความเร็วรอบในการกวนจาก 400 รอบต่อนาที ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร เป็น 1,200 รอบต่อนาที จะทำ

ให้การเจริญของเซลล์ลดลง และทำให้การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกลดลงด้วย แต่จะมีผลทำให้น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มสูงขึ้น

1.7 <u>การศึกษาเกี่ยวกับน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก</u>

มีผู้รายงานเกี่ยวกับน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก ดังนี้

Laurent และ Gergely ในปี 1955 รายงานถึง การหาน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก ที่ได้จาก สายสะดือ โดยวิธี light scattering ได้น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกประมาณ 2.8×10^6 ดัลตัน ถึง 4.3×10^6 ดัลตัน ซึ่งวิธีการนี้ จะมีข้อดี ตรงที่สามารถใช้กับกรดไฮยาลูโรนิกที่มีความเข้มข้นต่ำๆได้

Laurent ในปี 1955 รายงานว่า น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก จะขึ้นอยู่กับแหล่งที่มา คือ กรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จาก เยื่อเมือกบริเวณลูกตา จะมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากสายสะดือ โดยจะมีค่าเท่ากับ 3.4×10^5 ดัลตัน ถึง 5.0×10^5 ดัลตัน ซึ่งวัดโดยวิธี light scattering

Laurent และคณะ ในปี 1960 ทำการศึกษาเกี่ยวกับ การหาน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก ที่ได้จากเยื่อเมือกบริเวณลูกตาของวัว ที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 7.7×10^4 ดัลตัน ถึง 1.7×10^6 ดัลตัน ซึ่งวัดโดยวิธี light scattering พบว่า สามารถหา ความสัมพันธ์ระหว่าง ค่า intrinsic viscosity ($[\eta]$) กับค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก (M) ได้เป็น $[\eta] = 0.036 \times M^{0.78}$

Cleland และ Wang ในปี 1970 ทำการศึกษาเกี่ยวกับ การหาน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก ที่ได้จากเยื่อเมือกบริเวณลูกตาของวัว และกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากหงอนไก่ โดยวิธีอาศัยความหนืด (viscometry) โดยใช้กรดไฮยาลูโรนิกที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 3×10^4 ดัลตัน ถึง 1.7×10^6 ดัลตัน ซึ่งวัดโดยวิธี light scattering มาทำการหาค่าคงที่ K และ a ในความสัมพันธ์ระหว่างค่า intrinsic viscosity ($[\eta]$) กับค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก (M)
($[\eta] = K \times M^a$) พบว่า สำหรับกรดไฮยาลูโรนิก ที่ใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เป็นตัวทำละลาย จะได้ค่า K และ a เท่ากับ 0.0228 และ 0.816 ตามลำดับ เพื่อนำค่า K และ a ไปแทนในสมการข้างต้น สำหรับการหาน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกโดยอาศัยความหนืด

Shimada และ Matsumura ในปี 1975 ทำการศึกษาถึง การหาความสัมพันธ์ระหว่างค่า intrinsic viscosity กับค่าน้ำหนักโมเลกุล โดยใช้กรดไฮยาลูโรนิก จาก 2 แหล่งที่มา คือ กรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากผิวหนังของกระต่าย ซึ่งมีค่าน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (1.0×10^4 ดัลตัน ถึง 7.2×10^4 ดัลตัน) และกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากสายสะดือของมนุษย์ ซึ่งมีค่าน้ำหนักโมเลกุลสูง (3.1×10^5 ดัลตัน ถึง 1.5×10^6 ดัลตัน) พบว่า ได้ความสัมพันธ์ระหว่างค่า intrinsic viscosity กับค่าน้ำหนัก

โมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกเป็น $[\eta] = (3.0 \times 10^{-6}) \times M^{1.20}$ สำหรับกรดไฮยาลูโรนิกที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ และ $[\eta] = (5.7 \times 10^{-4}) \times M^{0.76}$ สำหรับกรดไฮยาลูโรนิกที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง

Silver และ Swann ในปี 1982 ได้ศึกษา การหาน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก จากแหล่งที่มา 2 แหล่ง คือ กรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จาก หงอนไก่ และกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากเยื่อเมือกบริเวณลูกตาของวัว โดยวิธี light scattering พบว่า น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากหงอนไก่ มีค่าเท่ากับ 4.4×10^6 ดัลตัน แต่กรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากเยื่อเมือกบริเวณลูกตาของวัว จะมีน้ำหนักโมเลกุลที่ต่ำกว่ามาก คือ มีค่าเท่ากับ 1.5×10^5 ดัลตัน เท่านั้น

Laurent และ Granath ในปี 1983 ศึกษาเกี่ยวกับ การหาน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก ที่ได้จากเยื่อเมือกบริเวณลูกตาของกระต่าย และกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากเยื่อเมือกบริเวณลูกตาของวัว โดยวิธี Gel Filtration Chromatography พบว่า กรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากเยื่อเมือกบริเวณลูกตาของกระต่าย จะมีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 2×10^6 ดัลตัน ถึง 3×10^6 ดัลตัน และกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากเยื่อเมือกบริเวณลูกตาของวัว จะมีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 5×10^5 ดัลตัน แต่เมื่อทำการทดสอบ หาน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก ที่ได้จากลูกวัวเกิดใหม่ อายุ 3 เดือน จะมีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 3×10^6 ดัลตัน แสดงว่า กรดไฮยาลูโรนิกจะมีน้ำหนักโมเลกุลลดลง ในวัวที่มีอายุมากขึ้น

Motohashi และ Mori ในปี 1984 รายงานว่า สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก โดยอาศัยความหนืด (viscometry) โดยใช้ความสัมพันธ์ ระหว่างค่า intrinsic viscosity ($[\eta]$) และค่าน้ำหนักโมเลกุล คือ $[\eta] = (3.6 \times 10^{-4}) \times M^{0.78}$ และใช้กรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากสายสะดือของมนุษย์ และกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากหนังหมู สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลได้ เท่ากับ 9.8×10^5 ดัลตัน และ 1.1×10^5 ดัลตัน ตามลำดับ

Beaty และคณะ ในปี 1985 รายงานว่า สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก ที่ได้จากหงอนไก่ โดยใช้วิธี High-Performance Liquid Chromatography ร่วมกับ Gel-Exclusion จะได้น้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 1.7×10^6 ดัลตัน ซึ่งวิธีนี้ มีข้อได้เปรียบกว่าวิธี light scattering และ viscometry คือ ใช้เวลาน้อย มีความแม่นยำ และสามารถทำซ้ำได้

Lee และ Cowman ในปี 1994 ได้ศึกษาเกี่ยวกับ การหาน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า relative mobility กับค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก จากการทำ agarose gel electrophoresis โดยใช้กรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐาน จากแหล่งต่างๆ คือ กรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากหงอนไก่ นำมาทำให้มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดต่างๆโดยใช้ความร้อน จะได้กรดไฮยาลูโรนิกที่มีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 0.68 , 1.1 , 1.9 , 2.5 และ 4.3×10^6 ดัลตัน (วัดโดยการทำ light scattering) และใช้กรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จาก *Streptococcus zooepidemicus* (2.2×10^6 ดัลตัน) กรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จาก *Streptococcus pyogenes* (1.1×10^6 ดัลตัน) กรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากสายสะดือของมนุษย์ (0.33×10^6 ดัลตัน) และกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากเยื่อเมือก

บริเวณลูกตาของวัว (0.25 x 10^6 ดัลตัน) ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกเหล่านี้ วัดโดยอาศัยความหนืด (viscometry)

Kim และคณะ ในปี 1996 ได้ศึกษาถึงการปรับปรุงแบคทีเรีย *Streptococcus equi* สายพันธุ์ ATCC 6580 ให้เป็นสายพันธุ์ KFCC 10830 ซึ่งให้ผลผลิตสูง และพบว่า การเติมไลโซไซม์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะมีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก คือ การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกจะเพิ่มขึ้นจาก 3.65 กรัมต่อลิตร เป็น 4.60 กรัมต่อลิตร และมีผลทำให้น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก เพิ่มขึ้นอีกด้วย คือ จาก 2.9 x 10^6 ดัลตัน เป็น 3.8 x 10^6 ดัลตัน

Armstrong และ Johns ในปี 1997 ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับ ปัจจัยที่มีผลต่อน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิต จากกระบวนการหมัก ด้วยแบคทีเรีย *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ ATCC 35246 พบว่า อัตราการให้อากาศที่สูงกว่า คือ เท่ากับ 1.0 vvm จะมีผลทำให้การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกมีมากกว่า เมื่อเทียบกับ อัตราการให้อากาศ 0.2 vvm และ การเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นจาก 20 กรัมต่อลิตร เป็น 40 กรัมต่อลิตร จะทำให้การผลิตกรดไฮยาลูโรนิก เพิ่มขึ้นจาก 1.65 กรัมต่อลิตร เป็น 2.70 กรัมต่อลิตร และทำให้น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก เพิ่มขึ้นจาก 2.65 x 10^6 ดัลตัน เป็น 3.20 x 10^6 ดัลตัน

Shozo และคณะ ในปี 1997 รายงานว่า สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกได้ จากการทำ High-Performance Capillary Electrophoresis โดยใช้ uncoated fused-silica capillary ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) เป็น running buffer และมี naphthalene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt (NTS) เป็น internal standard โดยใช้กรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐาน ที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลแน่นอน ขนาดต่างๆ คือ กรดไฮยาลูโรนิกจาก หนังหมู (40,000 ถึง 60,000 ดัลตัน) กรดไฮยาลูโรนิกจาก สายสะดือมนุษย์ (800,000 ถึง 1,200,000 ดัลตัน) และกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการสังเคราะห์ที่มีชื่อทางการค้าว่า Opelead (1,500,000 ถึง 2,100,000 ดัลตัน) เป็นสารตัวอย่างและติดตามกรดไฮยาลูโรนิกจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 185 นาโนเมตร

1.8 <u>ประโยชน์ของกรดไฮยาลูโรนิก</u>

กรดไฮยาลูโรนิกนำมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ได้ เช่น ใช้ตรวจหาแอนติบอดี ที่มีความจำเพาะต่อ streptococcal hyaluronidase ในซีรัมคน (Kjems และ Lebech, 1976) ใช้แทนวุ้นน้ำตาในการผ่าตัดตา ใช้เป็นส่วนประกอบในยาหยอดตา ใช้รักษาการอักเสบของข้อต่อ (Balazs, 1979) ใช้ในการรักษาบาดแผล (Morita และ Fujii, 1991) และใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางค์บำรุงผิว เพื่อช่วยรักษาความชุ่มชื้นของผิว (Nimrod และคณะ, 1988)

1.9 มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย

ในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะทำการศึกษาเกี่ยวกับ ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตและน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก ที่ผลิตจากกระบวนการหมัก โดยแบคทีเรีย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 ซึ่งเป็น แบคทีเรียที่ได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์มาจากเชื้อ *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ ATCC 35247 โดย ทรงศักดิ์ พันธุ์วัฒนะสิงห์ (2540) ซึ่งสามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยปัจจัยที่จะทำการศึกษาได้แก่ ความเข้มข้นของซูโครสในอาหารเลี้ยงเชื้อ อัตราการให้อากาศ ความเร็วรอบในการกวน และผลของไลโซไซม์ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกให้ได้น้ำหนักโมเลกุลตามที่ต้องการ