ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7

นางสาวสุภัชญา ดีมีชัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-53-1259-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

FACTORS AFFECTING HYALURONIC ACID PRODUCTION BY *Streptococcus zooepidemicus* UN-7

Miss Supatchaya Dimichai

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2004

ISBN 974-53-1259-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7
โดย	นางสาวสุภัชญา ดีมีชัย
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ วาสนา โตเลี้ยง

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

…….. รักษาราชการแทนคณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. ธราพงษ์ วิทิตศานต์)
รองคณบดีฝ่ายบริหาร

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

…….. ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

…….. อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

…….. อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล)

…….. อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ วาสนา โตเลี้ยง)

…….. กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุภัชญา ดีมีชัย : ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 (FACTORS AFFECTING HYALURONIC ACID PRODUCTION BY *Streptococcus zooepidemicus* UN-7) อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ.ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: รศ.ดร. นลิน นิลอุบล , อาจารย์ วาสนา โตเลี้ยง จำนวนหน้า 108 หน้า. ISBN 974-53-1259-2.

งานวิจัยนี้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 ปัจจัยที่ศึกษาแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรก คือ อิออนโลหะที่มีประจุ 2^+ และกลุ่มที่สอง คือ สารตั้งต้นหรือสารมัธยันตร์ในวิถีการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก ผลการศึกษาในระดับขวดเขย่าพบว่าเชื้อผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในการทดลองชุดควบคุม ประมาณ 620-700 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเสริมปัจจัยเหล่านั้นแบบเดี่ยวพบว่าปัจจัยที่เพิ่มผลผลิตในเกณฑ์สูงคือ $MnSO_4.H_2O$ (10 มิลลิกรัมต่อลิตร) ให้ผลผลิตประมาณ 880 มิลลิกรัมต่อลิตร ขณะที่กลูตามีน (125 มิลลิกรัมต่อลิตร) และกลูโคส-6-ฟอสเฟต (5 ไมโครโมลาร์) ให้ผลผลิตใกล้เคียงกัน คือ ประมาณ 825-830 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนไพรูเวท (15 มิลลิกรัมต่อลิตร) ให้ผลผลิตประมาณ 800 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเติม $MnSO_4.H_2O$ ร่วมกับสารประกอบเหล่านี้แต่ละชนิดที่ความเข้มข้นข้างต้น พบว่าไพรูเวทให้ผลผลิตสูงสุด คือประมาณ 950 มิลลิกรัมต่อลิตร กลูโคส-6-ฟอสเฟต ให้ผลผลิตดีรองลงมา คือประมาณ 930 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนสารประกอบชนิดอื่น ๆ ไม่มีผลช่วยเพิ่มการผลิตเมื่อเทียบกับการเติม $MnSO_4.H_2O$

การศึกษาในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้อัตราเร็วในการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm พบว่าการทดลองชุดควบคุมให้ผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูงสุด 2,144 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 30 เมื่อมีการเติมปัจจัยเดี่ยวได้แก่ $MnSO_4.H_2O$ (10 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่าผลผลิตเพิ่มขึ้นเป็น 2,215 มิลลิกรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 30 และให้ผลผลิตสูงสุดเป็น 2,572 มิลลิกรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 39 เมื่อเติมไพรูเวท (15 มิลลิกรัมต่อลิตร) ให้ผลผลิตสูงสุด 2,541 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 30 เมื่อทำการเติมร่วมกันระหว่าง $MnSO_4.H_2O$ กับไพรูเวทที่ความเข้มข้นดังกล่าว เชื้อผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้ 2,342 มิลลิกรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 30 และให้ผลผลิตสูงสุด 2,903 มิลลิกรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 48 เมื่อทำการหมักภายใต้ภาวะดังกล่าวแต่เพิ่มอัตราเร็วในการกวนเป็น 400 และ 500 รอบต่อนาทีจะได้ผลผลิตเป็น 2,670 และ 2,624 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับที่ชั่วโมงที่ 30 และให้ผลผลิตสูงสุดประมาณ 2,949 มิลลิกรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 45 สำหรับการกวน 400 รอบต่อนาที และ 2,903 มิลลิกรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 33 สำหรับการกวน 500 รอบต่อนาที

หลักสูตร.....-.....
สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....
ปีการศึกษา…...2547….....

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ทีปรึกษาร่วม.....
ลายมือชื่ออาจารย์ทีปรึกษาร่วม.....

4572549723 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: *Streptococcus zooepidemicus* / HYALURONIC ACID

SUPATCHAYA DIMICHAI : FACTORS AFFECTING HYALURONIC ACID PRODUCTION BY *Streptococcus zooepidemicus* UN-7. THESIS ADVISOR : ASSOC.PROF. PAIROH PINPANICHAKARN, Ph.D., THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF. NALINE NILUBOL, Ph.D., VASANA TOLIENG 108 pp. ISBN 974-53-1259-2.

Factors affecting hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 were studied. Two types of the factors which were divalent cations and the precursors or the intermediates in hyaluronic acid biosynthetic pathway were investigated. Hyaluronic acid production in the control experiment in shaken flask was about 620-700 $mg.l^{-1}$. When single factor was added, $MnSO_4.H_2O$ (10 $mg.l^{-1}$) gave the best yield with the maximum amount of 880 $mg.l^{-1}$ whereas similar yields of about 825-830 $mg.l^{-1}$ were obtained from both glutamine (125 $mg.l^{-1}$) and glucose-6-phosphate (5 μM) and the yield of about 800 $mg.l^{-1}$ was obtained from pyruvate (15 $mg.l^{-1}$). Addition of $MnSO_4.H_2O$ in combination with each fo those compounds at the above concentrations resulted in the best yield of 950 $mg.l^{-1}$ with pyruvate whereas glucose-6-phosphate gave the second best of 930 $mg.l^{-1}$ but the other compounds had no effect in increasing production yield from that of with $MnSO_4.H_2O$ alone.

Cultivation in a 5 L- fermentor at agitation speed of 300 rpm and aeration rate of 1.5 vvm, the maximum yield of 2,144 $mg.l^{-1}$ was obtained at 30 h of cultivation from the control experiment. Addition of $MnSO_4.H_2O$ (10 $mg.l^{-1}$) yielded 2,215 $mg.l^{-1}$ at hour 30 with maximum yield of 2,572 $mg.l^{-1}$ at hour 39. Addition of pyruvate (15 $mg.l^{-1}$) gave maximum yield of 2,541 $mg.l^{-1}$ at hour 30. Addition of $MnSO_4.H_2O$ in combination with pyruvate at the above concentrations yielded 2,342 $mg.l^{-1}$ at hour 30 and gave maximum yield of 2,903 $mg.l^{-1}$ at hour 48. When fermentation was performed under the same conditions except at the agitation speeds of 400 and 500 rpm, the yields of 2,670 and 2,624 $mg.l^{-1}$ were obtained at hour 30, respectively and reached the maximum yields of 2,949 $mg.l^{-1}$ at hour 45 for 400 rpm and 2,903 $mg.l^{-1}$ at hour 33 for 500 rpm.

Department…….....-....…….… Student's signature.....

Field of study….Biotechnology..... Advisor's signature.....

Academic year……..2004…… Co-advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาระดับปริญญามหาบัณฑิต และวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จด้วยความสมบูรณ์ โดยได้รับความกรุณาจาก รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล และอาจารย์วาสนา โตเลี้ยง ที่กรุณารับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่าง ๆ ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการและกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณะบุคลากรทุกท่านในสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ให้ความสะดวกในด้านอุปกรณ์ และสารเคมีในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่ให้การสนับสนุนแหล่งทุนในงานวิจัย

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ ทุกคนที่อยู่ด้วยกันมาอย่างเหนียวแน่น ขอบคุณสำหรับความช่วยเหลือในทุก ๆ เรื่อง และกำลังใจที่ดีอย่างสม่ำเสมอ

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ครอบครัว และญาติพี่น้อง ที่ได้ให้ความช่วยเหลือสนับสนุน และเป็นกำลังใจที่สำคัญยิ่ง ในการทำวิจัยมาโดยตลอดจนเสร็จสมบูรณ์

ความดีของการศึกษา และคุณค่าของวิทยานิพนธ์นี้ ผู้วิจัยขออุทิศแด่ บูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่าน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ฎ
สารบัญภาพ ..... ฒ
คำย่อ ..... ด

บทที่

1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 ประโยชน์ของกรดไฮยาลูโรนิก 2
1.3 วัตถุประสงค์ในการทำวิจัย 2
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 ประวัติความเป็นมา 3
2.2 คุณสมบัติของกรดไฮยาลูโรนิก 4
2.3 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิก 5
2.3.1 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดยการสกัดจากเซลล์ของสิ่งมีชีวิต 5
2.3.2 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดยการสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์จากน้ำตาลที่จับกับนิวคลีโอไทด์ 6
2.3.3 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกจากกระบวนการหมักโดยแบคทีเรีย 8
2.4 กลไกในการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก 9
2.5 วิถีเมตาบอลิซึมใน Streptococci 12
2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกจากกระบวนการหมักโดยแบคทีเรีย 14
2.6.1 ชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อ 14
2.6.2 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิต 14
2.6.2.1 แหล่งคาร์บอน 14
2.6.2.2 แหล่งไนโตรเจน 15
2.6.2.3 ฟอสเฟต 15

บทที่ หน้า

2.6.2.4 แร่ธาตุ 15
2.6.2.5 สารเสริมต่าง ๆ 16
2.6.2.6 ค่าความเป็นกรด-ด่าง 16
2.6.2.7 อุณหภูมิและระยะเวลาในการหมัก 16
2.6.2.8 อัตราการให้อากาศและความเร็วรอบในการกวน 17
3 วิธีการทดลอง 18
3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 18
3.1.1 อุปกรณ์ 18
3.1.2 สารเคมี 19
3.2 เชื้อจุลินทรีย์ 20
3.3 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย 20
3.4 การเลี้ยงเชื้อและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก 20
3.4.1 การเตรียมหัวเชื้อ 20
3.4.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับขวดเขย่า 20
3.4.3 การแปรปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับขวดเขย่า 21
3.4.3.1 อิออนชนิดต่าง ๆ 21
3.4.3.2 สารมัธยันตร์และสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก 21
3.4.4 การเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร 21
3.5 วิธีวิเคราะห์ 22
3.5.1 ค่าความเป็นกรดด่าง 22
3.5.2 การวัดการเจริญของเซลล์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง 22
3.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก 22
3.5.3.1 การตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิก 22
3.5.3.2 การละลายกรดไฮยาลูโรนิก 22
3.5.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกโดยวิธีคาร์บาโซล 23
3.5.4 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก 23

บทที่ หน้า

4 ผลการทดลอง 24
4.1 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 ในระดับขวดเขย่า 24
4.1.1 รูปแบบการเจริญของ *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 ในอาหารเตรียมหัวเชื้อ..... 24
4.1.2 การหาอายุที่เหมาะสมของหัวเชื้อสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก 27
4.1.3 รูปแบบการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 ในขวดเขย่า
4.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 เมื่อเลี้ยงในระดับขวดเขย่า.....
4.2.1 อิออนบางชนิดที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในวิถีเมตาบอลิซึม..... 33
4.2.1.1 ปริมาณของเฟอร์รัสที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก 33
4.2.1.2 ปริมาณของแมงกานีสที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก 35
4.2.1.3 ปริมาณของโคบอลท์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก 37
4.2.1.4 ปริมาณของสังกะสีที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก 39
4.2.2 ชนิดและปริมาณของสารมัธยันตร์ และสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก .....
4.2.2.1 ปริมาณของไพรูเวทที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก 41
4.2.2.2 ปริมาณของกลูโคส-6-ฟอสเฟตที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก..... 43
4.2.2.3 ปริมาณของฟรักโทส-6-ฟอสเฟตที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก..... 45
4.2.2.4 ปริมาณของกลูตามีนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก 47
4.2.2.5 ปริมาณของอาร์จินีนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก 49
4.2.2.6 ปริมาณของยูราซิลที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก 41

บทที่ หน้า

4.2.3 การสรุปเปรียบเทียบปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกเมื่อเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่า..... 53
4.2.4 ผลของ $MnSO_4.H_2O$ ร่วมกับสารมัธยันตร์หรือสารตั้งต้นต่อการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกในระดับขวดเขย่า 55
4.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร .....
4.3.1 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที..... 59
4.3.2 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที โดยมีการเติมแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต 10 มิลลิกรัมต่อลิตร..... 62
4.3.3 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที โดยมีการเติมไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตร..... 65
4.3.4 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที โดยมีการเติมแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต 10 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตร..... 68
4.3.5 การสรุปเปรียบเทียบผลของแมงกานีสโมโนไฮเดรตและไพรูเวทต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 ที่เลี้ยงในระดับถังหมัก 5 ลิตร..... 71
4.3.6 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 400 รอบต่อนาที โดยมีการเติมแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต 10 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตร..... 74

บทที่ หน้า

4.3.7 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 500 รอบต่อนาที โดยมีการเติมแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต 10 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตร..... 77

4.3.8 การสรุปเปรียบเทียบผลของความเร็วรอบในการกวนต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก ในระดับถังหมัก 5 ลิตร โดยมีการเติมแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต 10 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตร 80

5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 81

รายการอ้างอิง 89

ภาคผนวก 94

ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 95

ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย..... 96

ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน..... 98

ภาคผนวก ง การย่อยแลกติกเคซีนด้วยเอนไซม์ 106

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 108

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการบ่มเชื้อ *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 25

4.2 เปรียบเทียบ ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ของ *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 โดยใช้อายุหัวเชื้อตั้งต้นเป็น 5, 6, 7 และ 8 ชั่วโมง ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง..... 28

4.3 ค่าความเป็นกรดด่าง, ปริมาณเซลล์แห้ง และ ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ที่ผลิตโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในอาหารเหลวที่มีซูโครส 3 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน..... 30

4.4 ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ที่ผลิตโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอาหารเหลวที่มีซูโครส 3 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและแปรปริมาณ $FeSO_4.7H_2O$ ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกใน ระดับขวดเขย่า 34

4.5 ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ที่ผลิตโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอาหารเหลวที่มีซูโครส 3 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและแปรปริมาณ $MnSO_4.H_2O$ ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกใน ระดับขวดเขย่า 36

4.6 ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ที่ผลิตโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอาหารเหลวที่มีซูโครส 3 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและแปรปริมาณ $CoCl_2.6H_2O$ ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกใน ระดับขวดเขย่า 38

4.7 ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ที่ผลิตโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอาหารเหลวที่มีซูโครส 3 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและแปรปริมาณ $ZnCl_2$ ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกใน ระดับขวดเขย่า..... 40

4.8 ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ที่ผลิตโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอาหารเหลวที่มีซูโครส 3 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและแปรปริมาณของไพรูเวทที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับขวดเขย่า.... 42

4.9 ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอาหารเหลวที่มีซูโครส 3 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและแปรปริมาณของ กลูโคส-6-ฟอสเฟต ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก..... 44

4.10 ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ที่ผลิตโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอาหารเหลวที่มีซูโครส 3 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและแปรปริมาณของ ฟรักโทส-6-ฟอสเฟต ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก..... 46

ตารางที่ หน้า

4.11 ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ที่ผลิตโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอาหารเหลวที่มีซูโครส 3 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและแปรปริมาณของกลูตามีนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก..... 48

4.12 ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ที่ผลิตโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอาหารเหลวที่มีซูโครส 3 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและแปรปริมาณของอาร์จินีนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก..... 50

4.13 ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ที่ผลิตโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอาหารเหลวที่มีซูโครส 3 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและแปรปริมาณของยูราซิลที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก..... 52

4.14 สรุปเปรียบเทียบปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลเพิ่มการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกเมื่อเลี้ยง *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 ในขวดเขย่า..... 54

4.15 ผลของ $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ ร่วมกับสารมัธยันตร์หรือสารตั้งต้นต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 ที่เลี้ยงในขวดเขย่า..... 56

4.16 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที..... 60

4.17 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที โดยมีการเติม $MnSO_4 . 7H_2O$ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร..... 63

4.18 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที โดยมีการเติมไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตร..... 66

ตารางที่ หน้า

4.19 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที โดยมีการเติม $MnSO_4.H_2O$ 10 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตร..... 69

4.20 สรุปเปรียบเทียบผลของแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรตและไพรูเวทต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 ที่เลี้ยงในระดับถังหมัก 5 ลิตร..... 72

4.21 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 400 รอบต่อนาที โดยมีการเติม $MnSO_4.H_2O$ 10 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตร..... 75

4.22 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 500 รอบต่อนาที โดยมีการเติม $MnSO_4.H_2O$ 10 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตร..... 78

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างของกรดไฮยาลูโรนิกแต่ละหน่วยย่อย…….....	4
2.2	การสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกจากน้ำตาลที่จับกับนิวคลีโอไทด์ด้วยการใช้เอนไซม์	7
2.3	กลไกการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกโดย *Streptococcus zooepidemicus*	10
2.4	วิถีเมตาบอลิซึมในกระบวนการหมักที่เปลี่ยนกลูโคสไปเป็นกรดไฮยาลูโรนิก และผลิตภัณฑ์อื่น ๆ โดย *Streptococcus zooepidemicus*	13
4.1	ลักษณะการเจริญของ *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว BHI ในขวดเขย่าที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....	26
4.2	แสดงปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้จาก *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 โดยใช้อายุหัวเชื้อตั้งต้นที่ 5, 6, 7 และ 8 ชั่วโมง ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง	28
4.3	แสดงค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง โดยเชื้อ *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 ในระดับขวดเขย่า.....	31
4.4	แสดงปริมาณ $FeSO_4.7H_2O$ ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในขวดเขย่า.....	34
4.5	แสดงปริมาณ $MnSO_4.H_2O$ ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกใน ขวดเขย่า.....	36
4.6	แสดงปริมาณ $CoCl_2.6H_2O$ ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในขวดเขย่า.....	38
4.7	แสดงปริมาณ $ZnCl_2$ ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกใน ระดับขวดเขย่า.....	40
4.8	แสดงปริมาณของไพรูเวทที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับขวดเขย่า	42
4.9	แสดงความเข้มข้นของ กลูโคส-6-ฟอสเฟต ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับขวดเขย่า.....	44
4.10	แสดงความเข้มข้นของ ฟรักโทส-6-ฟอสเฟต ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก ในระดับขวดเขย่า.....	46
4.11	แสดงปริมาณของกลูตามีนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับขวดเขย่า	48
4.12	แสดงปริมาณของอาร์จินีนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับขวดเขย่า	50
4.13	แสดงปริมาณของยูราซิลที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับขวดเขย่า	52
4.14	ผลของ $MnSO_4.H_2O$ ร่วมกับสารมัธยันตร์หรือสารตั้งต้นต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 ที่เลี้ยงในขวดเขย่า.....	57
4.15	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นซูโครส 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที	61

รูปที่ หน้า

4.16 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นซูโครส 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที โดยมีการเติม $MnSO_4.H_2O$ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร 64

4.17 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นซูโครส 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที โดยมีการเติมไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตร 67

4.18 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นซูโครส 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที โดยมีการเติม $MnSO_4.H_2O$ 10 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตร 70

4.19 สรุปเปรียบเทียบผลของแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรตและไพรูเวทต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 ที่เลี้ยงในระดับถังหมัก 5 ลิตร 73

4.20 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นซูโครส 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 400 รอบต่อนาที โดยมีการเติม $MnSO_4.H_2O$ 10 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตร 76

4.21 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นซูโครส 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 500 รอบต่อนาที โดยมีการเติม $MnSO_4.H_2O$ 10 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตร 79

4.22 สรุปเปรียบเทียบผลของความเร็วรอบในการกวนต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิ กในระดับถังหมัก 5 ลิตร โดยมีการเติมแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต 10 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตร 81

คำย่อ

คำย่อ	คำอธิบาย
vvm	ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที
%	เปอร์เซ็นต์
mg	มิลลิกรัม
g	กรัม
mol	โมล
M	โมลาร์
μM	ไมโครโมลาร์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กรดไฮยาลูโรนิก (hyaluronic acid, HA) เป็นสารพอลิแซคคาไรด์ในกลุ่มไกลโคอะมิโนไกลแคน (glycoaminoglycan) มีลักษณะเป็นพอลิเมอร์สายตรง มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ประกอบไปด้วยหน่วยย่อยของ D-glucuronic acid และ N-acetyl-D-glucosamine ซึ่งจับกันโดยพันธะ β (1,3) และ β (1,4) glycosidic bond มีสูตรโมเลกุลอย่างง่าย คือ $(C_{14}H_{21}NO_{11})_n$ ซึ่ง n จะมีค่ามากกว่า 1,000 (Brown และคณะ, 1994) พบได้ตามธรรมชาติ ในสัตว์ชั้นสูงจะพบเป็นองค์ประกอบสำคัญของเนื้อเยื่อ เช่น สายรก วุ้นในตา และหงอนไก่ นอกจากนั้นยังพบได้ในแบคทีเรียซึ่งจะพบกรดไฮยาลูโรนิกในรูปของแคปซูลล้อมรอบภายนอกเซลล์ โดยทั่วไปกรดไฮยาลูโรนิกส่วนใหญ่ที่ผลิตขายทางการค้าจะมาจากการสกัดจากเนื้อเยื่อสัตว์ แต่วิธีการผลิตนี้จะมีขั้นตอนที่ซับซ้อน และมีการปนเปื้อนจาก proteoglycans อื่นในเซลล์ ทำให้มีต้นทุนในการผลิตที่สูงขึ้นและทำให้ปริมาณของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้มีปริมาณต่ำ อีกทั้งปัญหาของการนำไปใช้ที่จะเสี่ยงกับการเกิด cross-species หรือเกิดการติดเชื้อขึ้น (Bracke และคณะ, 1985 ; Morita และ Fujii, 1991 ; Brown และคณะ, 1994 ; Ellwood และคณะ, 1996) จึงได้มีการหันมาสนใจการผลิตไฮยาลูโรนิกโดยวิธีการหมักจากจุลินทรีย์แทน ซึ่งกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จะมีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับกรดไฮยาลูโรนิกที่พบในสัตว์ชั้นสูง สำหรับการผลิตด้วยวิธีการนี้มีข้อได้เปรียบวิธีการอื่น ๆ คือ ใช้ระยะเวลาน้อย ให้ผลผลิตสูง มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น และใช้ต้นทุนในการผลิตต่ำ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ Streptococci กลุ่ม A และ C จะมีความเหมาะสมในการผลิตมากที่สุด เนื่องจากสามารถสร้างกรดไฮยาลูโรนิกได้ในปริมาณสูง และสร้างพอลิเมอร์มิวโคพอลิแซคคาไรด์ของกรดไฮยาลูโรนิกเพียงชนิดเดียวเท่านั้น (Rijin, 1983) สำหรับภาวะในการหมักที่เหมาะสมเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกนั้น สามารถทำได้ทั้งในภาวะไร้ออกซิเจน และ ภาวะที่มีออกซิเจน โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกที่นิยมใช้ที่สุด คือ 37 องศาเซลเซียส (Nimrod และคณะ, 1988, Akasaka และคณะ, 1989, Swann และคณะ, 1990, Ellwood และคณะ, 1995) และใช้ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในช่วง 6.7 ± 0.2

1.2 ประโยชน์ของกรดไฮยาลูโรนิก

กรดไฮยาลูโรนิกจัดว่าเป็นสารที่มีความสำคัญอย่างมากโดยเฉพาะทางด้านการแพทย์ เนื่องจากเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ยา เช่น เป็นส่วนผสมในยาหยอดตา เป็นยารักษาโรคข้อต่ออักเสบ และใช้ในการรักษาบาดแผล (Balazs, 1979, Morita และ Fujii, 1991) นอกจากนี้กรดไฮยาลูโรนิกยังมีความสำคัญในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง โดยเป็นองค์ประกอบสำคัญและมีราคาแพงเนื่องจากคุณสมบัติของกรดไฮยาลูโรนิกที่ทำหน้าที่เป็นสารให้ความชุ่มชื้นแก่ผิว (Nimrod และคณะ, 1988) จากมูลค่าการนำไปใช้ทั้งหมดพบว่า ในปี ค.ศ.2002 มูลค่าทางการตลาดทั่วโลกของกรดไฮยาลูโรนิกมีค่าถึงสองหมื่นหนึ่งพันล้านบาท โดยสัดส่วนของสินค้าในทางการแพทย์มีมูลค่าประมาณหนึ่งหมื่นเจ็ดพันล้านบาท และในส่วนของเครื่องสำอางมีมูลค่าสี่พันล้านบาท (Novozymes, 2002)

1.3 วัตถุประสงค์ในการทำวิจัย

เนื่องจากประโยชน์และความสำคัญของกรดไฮยาลูโรนิกตามที่ได้กล่าวมาแล้ว ทำให้งานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะศึกษาถึงปัจจัยที่ช่วยส่งเสริมกระบวนการหมักเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดยแบคทีเรีย *Streptococcus zooepidermicus* UN-7 ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์มาแล้ว และให้ผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้สูงกว่าเดิมร้อยละ 33.33 (ทรงศักดิ์ พันธุ์วัฒนะสิงห์, 2540) โดยจะทำการควบคุมปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกให้มีความเหมาะสม เช่น ส่งเสริมให้มีการสร้างพลังงานอย่างเพียงพอภายในเซลล์ โดยการเติมสารมัธยันตร์ และสารตั้งต้นบางชนิด ตลอดจนส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องในวิถีเมตาบอลิซึมของเซลล์ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกให้ได้ผลผลิตที่สูงขึ้นตามความต้องการ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

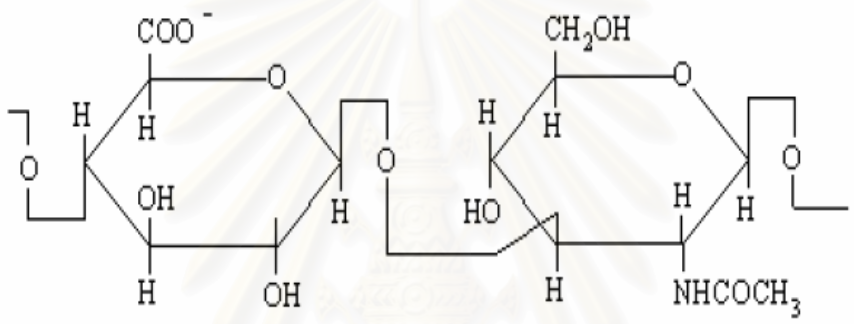
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ประวัติความเป็นมา

กรดไฮยาลูโรนิก (Hyaluronic acid) เป็นสารอินทรีย์ประเภทเฮเทอโรโพลีแซคคาไรด์ (heteropolysaccharides) ในกลุ่มไกลโคอะมิโนไกลแคน (glycoaminoglycan) หรือ มิวโคโพลีแซคคาไรด์ (mucopolysaccharide) ที่ประกอบด้วยโพลิเมอร์ชนิดอื่น เช่น เฮพาริน (heparin), คอนดรอยติน (chondroitin), เดอมาแทน (dermatan) และ เคราแทน (keratan) ซึ่งโพลีแซคคาไรด์ในกลุ่มนี้มีความสำคัญอย่างมากในสิ่งมีชีวิตทั่วไป โดยเฉพาะกรดไฮยาลูโรนิกจะทำหน้าที่เป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อภายในร่างกาย เช่น ผิวหนัง กระดูกอ่อน และอวัยวะบางอย่าง เช่น สายรก วุ้นตา น้ำไขข้อ และ หงอนไก่ ซึ่งคุณสมบัติทางกายภาพของกรดไฮยาลูโรนิกนั้นมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวภาพต่าง ๆ ในสิ่งมีชีวิต เช่น บริเวณผิวหนังและกระดูกอ่อนมีหน้าที่จับน้ำ และโปรตีนหรือมิวโคโพลีแซคคาไรด์อื่น เพื่อความยืดหยุ่นของเนื้อเยื่อ ส่วนในน้ำไขข้อนั้นกรดไฮยาลูโรนิกอาศัยคุณสมบัติที่มีความหนืด ทำหน้าที่เป็นสารหล่อลื่น (Nimrod และคณะ, 1988; Morita และ Fujii, 1991; Meyers และคณะ, 1966; Robert, 1982) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมกรดไฮยาลูโรนิกยังสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของลิมโฟไซด์ และแมคโคฟาจ, ยับยั้งปฏิกริยาการต่อต้านเซลล์ปลูกถ่าย, กระตุ้นการรวมตัวของเซลล์ลิมโฟมาร์ (lymphoma cell) (Balazs, 1979) และเนื่องจากคุณสมบัติของกรดไฮยาลูโรนิกที่เป็นโพลีแซคคาไรด์ ที่มีความหนืดสูง ไม่มีสี มีความยืดหยุ่น เก็บรักษาความชุ่มชื้นได้ดี และ ละลายน้ำได้ (Balazs, 1979) จึงได้มีการนำกรดไฮยาลูโรนิกมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ เช่น ใช้ในการรักษาผ่าตัดดวงตา เป็นส่วนประกอบในยาหยอดตา (ophthalmics) ใช้รักษาโรคเกี่ยวกับข้อต่อกระดูก (orthopaedics), ใช้รักษาบาดแผล (wound healing), ใช้ตรวจหาแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ streptococcal hyaluronidase ในซีรัมมนุษย์ (Balazs, 1979; Morita และ Fujii, 1991; Kjem และ Lebech,1976) และใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางโดยเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในการให้ความชุ่มชื้นแก่ผิวหนังในครีมทาหน้า (Nimrod และคณะ, 1988) ซึ่งกรดไฮยาลูโรนิกที่นำมาใช้จะมีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 5 X 10^6 ดาลตัน ถึง 1.3 X 10^7 ดาลตัน (Nimrod และคณะ, 1988) หรือมากกว่า 1.4 X 10^7 ดาลตัน (Ellwood และคณะ, 1995) ซึ่งจะมีความผันแปรขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น แหล่งที่มา และความแตกต่างของวิธีการในการสกัดแยกกรดไฮยาลูโรนิก

2.2 คุณสมบัติของกรดไฮยาลูโรนิก

กรดไฮยาลูโรนิกเป็นโพลีแซคคาไรด์ในกลุ่มไกลโคอะมิโนไกลแคนที่มีสูตรโครงสร้างทางเคมี คือ $(C_{14}H_{21}NO_{11})n$ โดย n มีค่ามากกว่า 1,000 ขึ้นไป มีรูปร่างโมเลกุลเป็นลักษณะเกลียวแบบสุ่มที่เกี่ยวพันกันเป็นร่างแห ซึ่งมีลักษณะคลายเจล มีความเหนียว หนืด และยืดหยุ่น มีสภาพความเป็นขั้วสูง ละลายน้ำได้ แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ (Balazs, 1979) มีลักษณะเป็นโพลีเมอร์สายตรงที่ประกอบไปด้วยหน่วยย่อยของไดแซคคาไรด์ (disaccharide unit) เป็นน้ำตาล 2 ชนิดคือ เอ็น-อะซิติล-ดี-กลูโคซามีน (N-acetyl-D-glucosamine) และ ดี-กลูโคโรนิก แอซิด (D-glucuronic acid) ดังแสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของกรดไฮยาลูโรนิกแต่ละหน่วยย่อย

จากรูปที่ 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 โดยทั่วไปกรดไฮยาลูโรนิกที่พบได้ในธรรมชาติ และที่แยกได้มักจะอยู่ในรูปของเกลือโซเดียม คือ โซเดียมไฮยาลูโรเนต และพบบ้างในรูปของเกลือโพแทสเซียมไฮยาลูโรเนต (Nimrod และคณะ, 1988; Brown และคณะ, 1994; Ellwood และคณะ, 1995; Fujii และคณะ, 1996)

2.3 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

เนื่องจากกรดไฮยาลูโรนิกมีแหล่งที่พบหลากหลายทั้งในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง และเซลล์แบคทีเรีย จึงได้มีการศึกษาและคิดค้นวิธีการในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกที่เหมาะสมสำหรับแหล่งผลิตนั้น ๆ

2.3.1 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดยการสกัดจากเซลล์ของสิ่งมีชีวิต

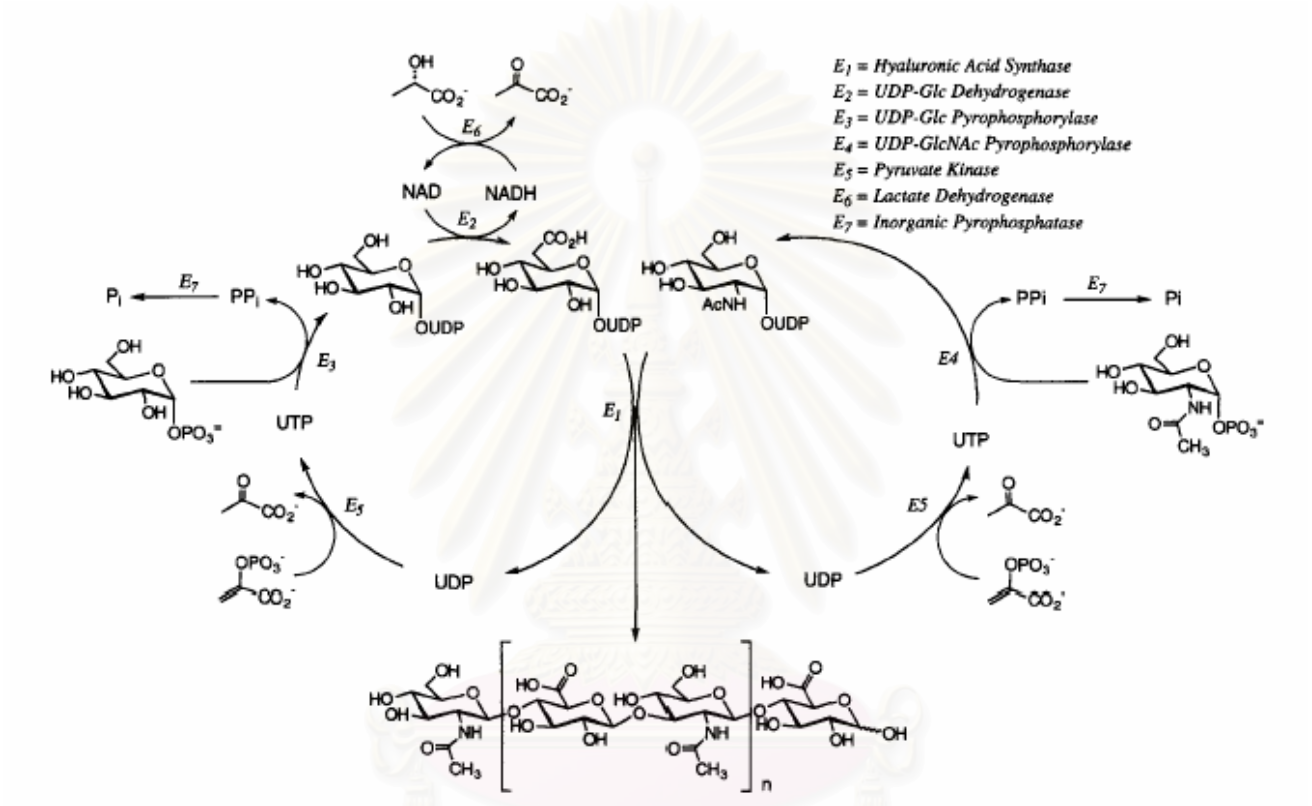
ตัวอย่างการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดยการสกัดจากแหล่งที่มีรายงานว่าตรวจพบกรดไฮยาลูโรนิก เช่น หงอนไก่ (rooster comb), น้ำจากไขกระดูก (synovial fluid), สายสะดือ (umbilical cord), เยื่อเมือกบริเวณดวงตา (vitreous body), เซลล์เยื่อบุผิวหนัง (epithelial cell), น้ำไขข้อวัว (bovine synovial fluid) และ กระดูกอ่อนของวัว (bovine articular cartilages) (Cifonelli และ Mayeda, 1957 ; Laurent และคณะ, 1960 ; Radin และคณะ, 1970 ; Matsumura และคณะ, 1963 ; Keng และคณะ, 1989) เป็นต้น กรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากวิธีการนี้จะมีน้ำหนักโมเลกุลที่สูง และมีสายของน้ำตาลไดแซคคาไรด์ที่ยาวกว่าที่ได้จากวิธีการอื่น ทำให้มีมูลค่าที่สูงกว่ากรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการหมักโดยแบคทีเรีย แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากแหล่งที่มาของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากเซลล์สัตว์ จะประกอบไปด้วยโปรตีน และ โพลีแซคคาไรด์ชนิดอื่นที่ปนเปื้อน ทำให้กรดไฮยาลูโรนิกที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์พอต่อการนำไปใช้ จึงต้องผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ที่มีความซับซ้อนและ ยุ่งยาก นอกจากนั้นยังมีการปนเปื้อนของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (hyaluronidase) ส่งผลให้กรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดแยกได้จะถูกย่อยให้มีขนาดโมเลกุลที่ต่ำลง (O'Regan และคณะ, 1994) จึงทำให้กรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตจากวิธีการนี้มีต้นทุนในการผลิตที่สูง และมีคุณสมบัติที่ไม่เหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์ ถ้าไม่ได้ผ่านขั้นตอนที่เหมาะสมในการทำให้บริสุทธิ์ นอกจากนี้ยังอาจพบปัญหาจากการปนเปื้อนของไวรัสที่พบในเนื้อเยื่อสัตว์ ทำให้ไม่เป็นที่ยอมรับในทางการแพทย์ (Bracke และคณะ,1985 ; Morita และ Fujii, 1991; Brown และคณะ, 1994 ; Ellwood และคณะ, 1996)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3.2 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดยการสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์จากน้ำตาลที่จับกับนิวคลีโอไทด์

De Luca และคณะ (1995) ได้มีการรายงานถึงวิธีการเตรียมกรดไฮยาลูโรนิกจากน้ำตาลที่จับกับนิวคลีโอไทด์ 2 ชนิด คือ UDP-N-acetyl-D-Glucosamine (UDP-GlcNAc) และ UDP-Glucuronic acid (UDP-GlcA) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก โดยใช้เอนไซม์ Hyaluronic acid synthase, และใช้เอนไซม์ UDP-GlcNAc Pyrophosphorylase และ UDP-Glc Pyrophosphorylase ในการสร้าง UDP-N-acetyl glucosamine และ UDP-glucose ตามลำดับ นอกจากนี้ยังใช้เอนไซม์ UDP-glucose dehydrogenase ในการเปลี่ยน UDP-glucose เป็น UDP-glucuronic acid ซึ่งกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้จากวิธีการนี้จะอยู่ในรูปของเกลือโซเดียม และเมื่อเปรียบเทียบกับกรดไฮยาลูโรนิกที่แยกได้จากเซลล์สิ่งมีชีวิต พบว่าให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน ข้อดีของวิธีการผลิตวีธีนี้ คือ สามารถลดการปนเปื้อนของสารโพลิแซคคาไรด์อื่น ๆ และ ลดการปนเปื้อนของไวรัสที่พบในเซลล์สิ่งมีชีวิต รวมถึงลดการปนเปื้อนจากเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ทำให้สามารถควบคุมขนาดของมวลโมเลกุลกรดไฮยาลูโรนิกได้ตามต้องการ สำหรับข้อจำกัดของวิธีการนี้ คือ สารตั้งต้นที่ใช้ในการผลิตได้แก่ Glc-1-P และ GlcNAc-1-P มีราคาแพง และเอนไซม์ไฮยาลูโรแนน ซินเทส (Hyaluronan synthase) ที่ใช้ในการผลิตไม่เสถียร ทำให้การนำไปใช้ในภาคอุตสาหกรรมไม่สามารถพัฒนาต่อไปได้ วิธีการในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดยวิธีการสร้างจากน้ำตาลสายยาว และ กลไกในการสร้างกรดไฮยาลูโรนิกจากเอนไซม์แสดงในรูปที่ 2.2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.2 การสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกจากน้ำตาลที่จับกับนิวคลีโอไทด์ด้วยการใช้เอนไซม์ (De Luca และคณะ, 1995)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3.3 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกจากกระบวนการหมักโดยแบคทีเรีย

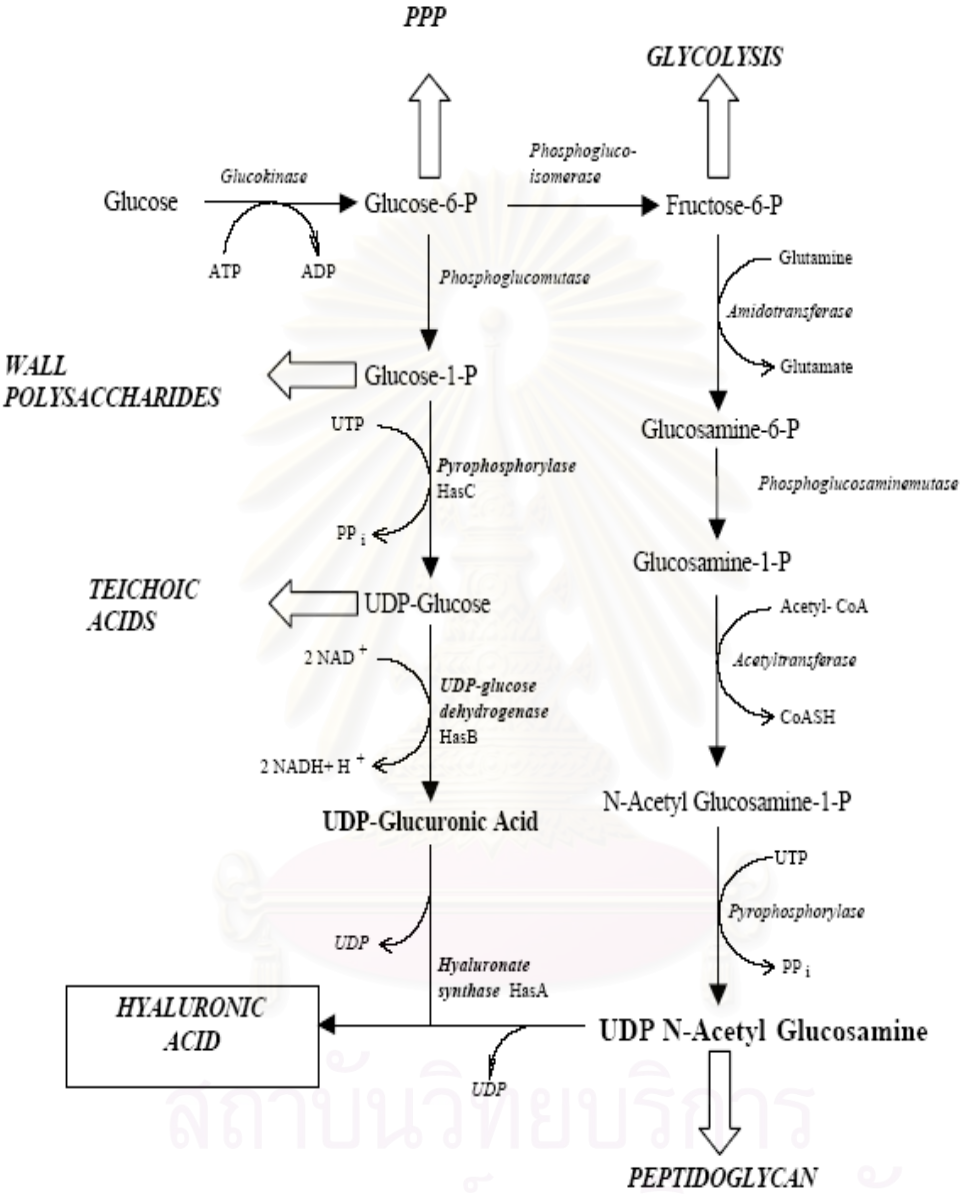
การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกพบได้ในแบคทีเรียกลุ่ม Streptococci โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *S.zooepidemicus* (Swann และคณะ, 1990 ; Nimrod และคณะ, 1988 ; Akasaka, Komasaki และ Arai, 1989 ; Morita และ Fujii, 1991) *S.equi* (Ellwood และคณะ, 1995 ; Brown และคณะ, 1994 ; Morita และ Fujii, 1991) *S.pyogenes* (Bracke และคณะ, 1985) เป็นต้น คุณสมบัติของเชื้อในกลุ่มนี้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างรี (ovoid) หรือกลม (spherical) จัดเรียงตัวกันเป็นสาย บางครั้งพบในลักษณะกลมคู่ หรือรูปร่างคล้ายแท่ง เป็นพวก facultative anaerobes ซึ่งการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกด้วยกระบวนการหมักนี้ได้มีการปรับปรุงและพัฒนาอย่างมาก เนื่องจากเป็นวิธีการที่ให้ผลผลิตสูง ใช้ระยะเวลาในการหมักสั้น ไม่พบปัญหาการปนเปื้อนจากไกลโคอะมิโนไกลแคนชนิดอื่น และใช้ต้นทุนในการผลิตที่ต่ำ อีกทั้งยังสามารถทำการปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในการหมัก และ ควบคุมภาวะที่เหมาะสมในระหว่างการหมักได้ ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดจากเซลล์สิ่งมีชีวิตและการสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์จึงเป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุด แต่ก็ยังมีข้อเสียเนื่องจากเชื้อที่ใช้ในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค และผลิตสารสเตรปโตไลซินซึ่งเป็นสารที่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ ทำให้ต้องทำการปรับปรุงและคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความเหมาะสมสำหรับการผลิตเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ปราศจากการปนเปื้อนสารสเตรปโตไลซิน และไม่ก่อให้เกิดโรคกับสิ่งมีชีวิต

กระบวนการหมักเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกจาก *Streptococcus* sp. สามารถทำได้ทั้งในสภาพไร้ออกซิเจน (anaerobic fermentation) (Bracke และคณะ, 1985) และในสภาพที่มีออกซิเจน (aerobic fermentation) (Morita และ Fujii, 1991 ; Swann และคณะ, 1990 ; Akasaka, Komasaki และ Arai, 1989) วิธีการหมักสามารถทำได้ทั้งการหมักแบบแบทช์ (Batch fermentation) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้มากเนื่องจากสะดวกในการควบคุมสภาวะระหว่างการหมักและป้องกันการปนเปื้อนได้ง่าย (Nimrod และคณะ, 1988 ; Swann และคณะ, 1990 ; Johns, Goh และ Oeggerli, 1994) การหมักแบบแบ่งเติมสาร (Fed-batch fermentation) โดยมากเป็นการแบ่งเติมน้ำตาลในระหว่างการหมัก (Morita และ Fujii, 1991 ; Akasaka, Komasaki และ Arai, 1989) นอกจากนั้นยังมีการศึกษาถึงการเติมไลโซไซม์ร่วมกับกลูโคสในระหว่างการหมักด้วยความเข้มข้นที่เหมาะสม จะมีผลทำให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกและน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มขึ้น (Kim และคณะ, 1996) และกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation) เป็นการหมักที่ให้ผลผลิตและน้ำหนักโมเลกุลที่สูงขึ้น แต่ไม่ค่อยเป็นที่นิยมเนื่องจากความซับซ้อนและปัญหาการปนเปื้อนในระหว่างการหมัก (Ellwood และคณะ, 1995)

2.4 กลไกในการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก

กรดไฮยาลูโรนิก เป็นสารเมแทบอไลท์ปฐมภูมิ (primary metabolite) ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย ในกลุ่ม Streptococci โดยกรดไฮยาลูโรนิก จะผลิตในรูปของแคปซูล เพื่อป้องกันเซลล์จากระบบภูมิคุ้มกันภายในร่างกาย และเป็นส่วนช่วยในการเคลื่อนที่ของเซลล์ผ่านเนื้อเยื่อ นอกจากนั้นแคปซูลยังมีหน้าที่สำคัญที่ช่วยให้เซลล์ของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ สามารถทนอยู่ได้ในสภาพที่มีออกซิเจนสูง เมื่อเซลล์มีการเจริญในภาวะที่มีการให้อากาศ โดยส่วนที่เป็นแคปซูลจะช่วยให้การเจริญของเซลล์มีลักษณะเป็นกลุ่ม ส่งผลให้การนำออกซิเจนเข้าสู่เซลล์ต่ำลง เนื่องจากอัตราส่วนพื้นที่ผิวต่อปริมาตรลดลง ซึ่งจะช่วยจำกัดการแพร่ของออกซิเจน และยังช่วยลดการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์อีกด้วย (Cleary และ Larkin, 1979) สำหรับกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดยแบคทีเรียนั้น พบว่าจะมีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ในช่วงการเจริญ exponential phase และจะสูงที่สุดในช่วง stationary phase หลังจากนั้นเซลล์จะปล่อยกรดไฮยาลูโรนิกลงสู่อาหาร โดยเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (hyaluronidase) นอกจากนั้นยังจะมีผลทำให้ขนาดมวลโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกลดลงด้วย (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 การนำสารตั้งต้น UDP-N-acetyl-D-glucosamine และ UDP-D-glucuronic acid มาสร้างเป็นกรดไฮยาลูโรนิกโพลีเมอร์ (Dougherty และ Van de Rijn, 1994) *hasB* เป็นรหัสของเอนไซม์ยูริดีนไดฟอสเฟต-กลูโคส ดีไฮโดรจีเนส (UDP-glucose dehydrogenase) ซึ่งจะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน UDP-glucose เป็น UDP-glucuronic acid (Dougherty และ Van de Rijn, 1993) และ *hasC* เป็นรหัสของเอนไซม์ยูริดีนไดฟอสเฟต-เอ็น-อะซิทิล-ดี-กลูโคซามีนไพโรฟอสโฟรีเลส (UDP-N-acetyl-D-glucosamine pyrophosphorylase) ซึ่งจะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน กลูโคส-1-ฟอสเฟต และ UTP ไปเป็น UDP-glucose และ PPi (Crater และ Rijn, 1995; Crater และคณะ, 1995) กลไกการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก ดังแสดงในรูปที่ 2.3

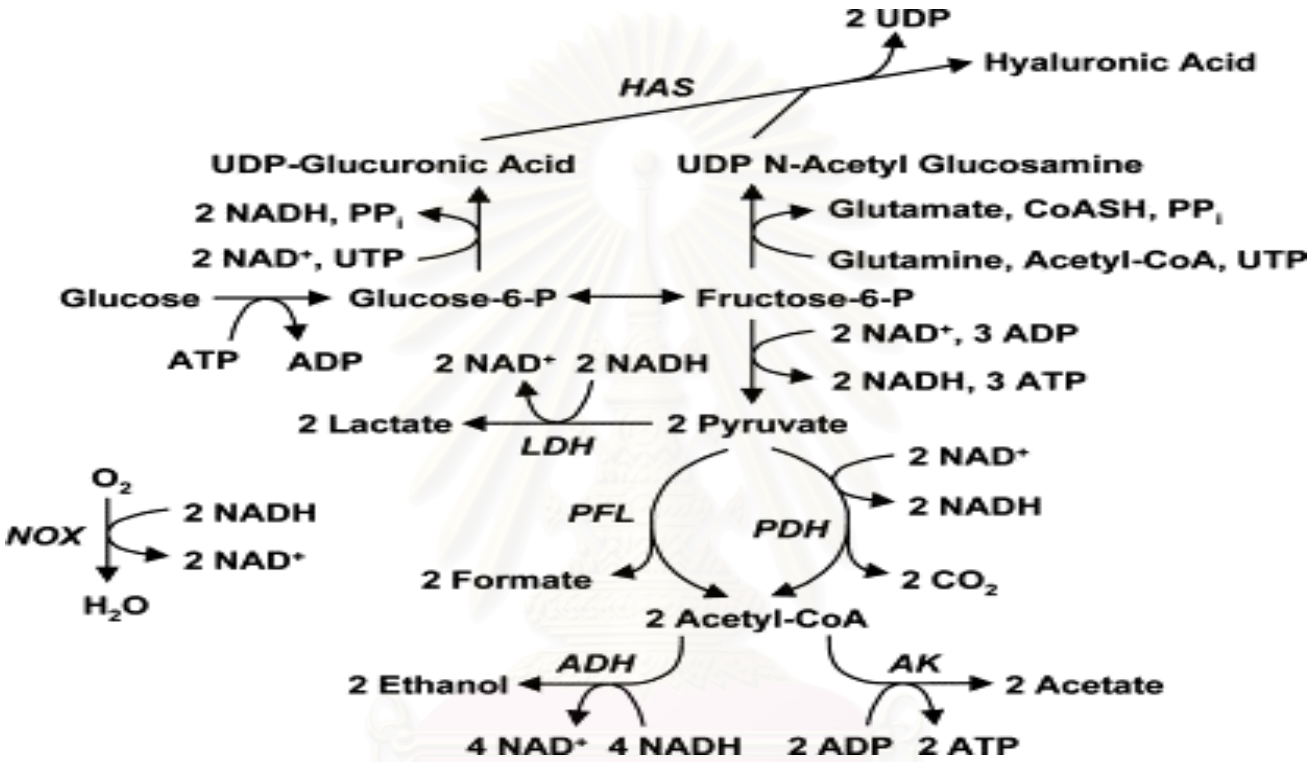


รูปที่ 2.3 แสดงกลไกการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกโดย *S.zooepidemicus*

จากรูปที่ 2.3 แสดงกลไกการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกโดย *S.zooepidemicus* สามารถอธิบายได้ว่า D-glucuronic acid และ N-acetyl glucosamine ได้มาจาก กลูโคส-6-ฟอสเฟต และ ฟรักโทส-6-ฟอสเฟต โดยปฏิกริยาแรกเริ่มจาก กลูโคส-6-ฟอสเฟต ที่เป็นสารตั้งต้นแรก จะถูกเปลี่ยนให้เป็น กลูโคส-1-ฟอสเฟตด้วยเอนไซม์ α- Phosphoglucomutase ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับได้ จากนั้นเอนไซม์ UDP-glucose pyrophosphorylase จะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน UTP และกลูโคส-1-ฟอสเฟตให้ได้ UDP-glucose ต่อจากนั้น UDP-glucose จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น โดยเอนไซม์ UDP-glucose dehydrogenase ที่มีความจำเพาะกับตำแหน่ง primary alcohol group เกิดเป็น UDP-glucuronic acid ในส่วนกลไกการสังเคราะห์น้ำตาลที่มีหมู่อะมิโนนั้นจะผลิตจากฟรักโทส-6-ฟอสเฟต โดยเริ่มจากเอนไซม์ amidotransferase จะเคลื่อนย้ายกรดอะมิโนจากกลูตามีนไปยัง ฟรักโทส-6-ฟอสเฟต เพื่อสร้าง glucosamine-6-phosphate ต่อจากนั้น เอนไซม์ acetyltransferase จะทำการเติมหมู่ acetyl เกิดเป็น N-acetyl glucosamine-6-phosphate ในขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยานี้จะใช้พลังงาน ATP เพื่อสลายพันธะ thioester ใน acetyl-CoA ต่อมา N-acetyl glucosamine-6-phosphate จะเกิดการจัดเรียงตัวใหม่ของหมู่ฟอสเฟตโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ mutase ในการเปลี่ยนเป็น N-acetyl glucosamine-1-phosphate และในขั้นตอนสุดท้ายเอนไซม์ pyrophosphorylase จะเติมหมู่ UDP เพื่อให้ได้เป็น UDP-N-acetyl glucosamine ซึ่งในขั้นตอนนี้ต้องอาศัย UTP เข้าร่วมในปฏิกิริยากระตุ้นการทำงานของหมู่ glycosyl เพื่อทำให้เกิดการต่อสายโพลิแซคคาไรด์ของกรดไฮยาลูโรนิกโดยเอนไซม์ hyaluronic acid synthase และเมื่อสรุปปฏิกริยาทั้งหมดจากกลไกในการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกพบว่า การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกที่ประกอบไปด้วยน้ำตาลไดแซคคาไรด์ 1 โมเลกุล นั้นต้องใช้พลังงานรวมเทียบเท่ากับ ATP ทั้งสิ้น 5 โมเลกุล โดยที่พลังงาน 2 โมเลกุล จะถูกใช้ไปในปฏิกิริยา glucokinase เพื่อการสร้างสารตั้งต้นในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก ส่วนอีก 2 โมเลกุลอยู่ในรูป UTP และอีก 1 โมเลกุลอยู่ในรูป acetyl CoA ที่ได้ในการสังเคราะห์ N-acetyl glucosamine ในส่วนของปฏิกิริยาออกซิเดชั่นที่เกิดขึ้นโดยเอนไซม์ UDP-glucose dehydrogenase จะทำให้เกิด NADH 2 โมเลกุล ต่อการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก 1 โมเลกุล (รูปที่ 2.4) โดยธรรมชาติจุลินทรีย์ชนิด facultative anaerobe ที่ผลิตกรดไฮยาลูโรนิกจะไม่สามารถสร้างพลังงานได้จาก oxidative-respiratory metabolism เนื่องจากภายในเซลล์ไม่พบเอนไซม์สำหรับ TCA cycle และ electron transport chain (Cooney และคณะ,1999) และนอกเหนือไปจากนั้น สารตั้งต้นที่ใช้สำหรับการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก จะถูกนำไปใช้เพื่อการสร้างผนังเซลล์, เปปทิโดไกลแคน และ กรดไทรโคอิค อีกด้วย

2.5 วิถีเมตาบอลิซึมใน Streptococci

Streptococci เป็นแบคทีเรียชนิด fermentative metabolism เมื่ออยู่ในภาวะการเลี้ยงที่ไม่มีอากาศ ผลผลิตหลักที่ได้จากกระบวนการหมักกลูโคส คือ กรดแลกติก จะมีปริมาณ ฟอร์เมท, อะซีเตท และเอธานอลเพียงเล็กน้อย โดยทั่วไปแบคทีเรียชนิดนี้จะมีความต้องการแหล่งไนโตรเจนที่หลากหลาย และมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญ โดยกลูโคสที่ถูกใช้ในกระบวนการหมักจะถูกเปลี่ยนเป็นผลผลิตของการหมักและเป็นส่วนของเซลล์เพียงเล็กน้อย นอกจากนั้นแบคทีเรียในกลุ่มนี้ยังสามารถสร้างสารโพลีแซคคาไรด์ที่เป็นกรดไฮยาลูโรนิกได้อีกด้วย ในการเลี้ยงที่มีแหล่งอาหารอย่างเพียงพอ ผลผลิตหลักที่ได้จากกระบวนการหมักคือ กรดแลกติก การควบคุมปริมาณคาร์บอนที่ใช้ในกระบวนการหมักจึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถเปลี่ยนการทำงานของเมตาบอลิซึมให้เปลี่ยนจากการผลิตกรดแลกติกเพียงอย่างเดียว เป็นการผลิต ฟอร์เมท, อะซีเตท และเอธานอล ในอัตราส่วนโดยโมลเท่ากับ 2:1:1 ซึ่งในขั้นตอนการผลิตนี้จะได้พลังงาน ATP 3 โมเลกุลต่อกลูโคส 1 โมเลกุล สูงกว่าพลังงานที่ได้จากการผลิตกรดแลกติก ที่ได้พลังงาน ATP 2 โมเลกุลต่อกลูโคส 1 โมเลกุล (Thomas และคณะ, 1979) การให้อากาศก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเพิ่มพลังงานให้กับ lactic acid bacteria บางสายพันธุ์ (Sakamoto และ Komagata, 1996) เนื่องจาก Streptococci เป็นแบคทีเรียชนิด facultative anaerobe ที่ไม่สามารถสร้างพลังงานได้จากการหายใจโดยใช้ออกซิเจน เนื่องจากไม่มี heme ทำให้ไม่มีไซโตโครม จึงขาดระบบขนถ่ายอิเลคตรอนทำให้ไม่สร้างพลังงาน ATP จากกระบวนการ oxidative phosphorylation ดังนั้นออกซิเจนจะถูกใช้ไปในการออกซิไดส์ NADH ผ่านเอนไซม์ NADH oxidase แทน เมื่อ NADH ลดลง การผลิตเอธานอลก็จะลดลง และแบคทีเรียมีการผลิต อะซีเตทเพิ่มขึ้นแทน จะทำให้ได้พลังงานตามทฤษฎีเพิ่มขึ้นเป็น พลังงาน ATP 4 โมเลกุลต่อกลูโคส 1 โมเลกุล (รูปที่ 2.4) การเจริญในภาวะที่มีออกซิเจนพบว่าการทำงานของเอนไซม์ pyruvate formate lyase จะถูกยับยั้ง และไม่มีส่วนร่วมในการเพิ่มผลผลิตอะซีเตท (Abbe และคณะ, 1982) แต่ปริมาณอะซีเตทที่เพิ่มขึ้นจะเกิดจากการทำงานของ pyruvate oxidase หรือ pyruvate dehydrogenase ซึ่งจะเปลี่ยนไพรูเวทเป็น acetyl CoA แล้วเป็น acetyl-phosphate ในภาวะที่มีออกซิเจน และขั้นตอนสุดท้าย acetyl-phosphate จะถูกเปลี่ยนให้เป็นอะซีเตท ซึ่งการเกิดปฏิกิริยาในขั้นตอนนี้จะเกิดควบคู่ไปกับการสร้างพลังงาน ATP อีกทางเลือกหนึ่งในการผลิตอะซีเตทควบคู่ไปกับการสร้างพลังงานก็คือ การเกิดปฏิกิริยา reductive decarboxylation ของไพรูเวทโดยเอนไซม์ pyruvate dehydrogenase complex เกิดเป็น acetyl-CoA และ คาร์บอนไดออกไซด์ การเลี้ยงแบบให้อากาศจะทำให้อัตราการใช้กลูโคส, อัตราการเจริญของเซลล์ และการสร้างอะซีเตทเพิ่มขึ้น แต่จะแทบไม่พบการผลิตฟอร์เมท และเอธานอล และยังเป็นผลให้การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มสูงขึ้น วิถีการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกและสารอื่นที่ได้จากกระบวนการหมักโดย *S.zooepidemicus* แสดงในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 วิถีเมตาบอลิซึมในกระบวนการหมักที่เปลี่ยนกลูโคสไปเป็นกรดไฮยาลูโรนิกและผลิตภัณฑ์อื่น ๆ โดย *S.zooepidemicus* : NOX, NADH ออกซิเดส ; LDH, แลกเตทดีไฮโดรจีเนส ; PFL, ไพรูเวทฟอร์เมทไลเอส ; PDH, ไพรูเวทดีไฮโดรจีเนส ; ADH, แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ; AK, อะซีเตทไคเนส (Chong และ Nielson,2003)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกจากกระบวนการหมักโดยแบคทีเรีย

การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดยแบคทีเรียสามารถทำการปรับปรุงกระบวนการผลิตเพื่อให้ได้ผลผลิตที่ดีนั้น ปัจจัยที่มีความสำคัญสำหรับกระบวนการหมักแบ่งออกเป็น 2 ปัจจัย คือ ชนิดของสายพันธุ์เชื้อที่ใช้ในกระบวนการหมัก และการควบคุมภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการหมัก

2.6.1 ชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อ

การคัดเลือกเชื้อสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกจำเป็นต้องคำนึงถึงคุณสมบัติของเชื้อที่มีความเหมาะสม คือ ต้องผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้ปริมาณสูง มีความเสถียรของสายพันธุ์ ไม่ผลิตสารอื่นที่จะมีผลข้างเคียงที่ก่ออันตรายในการนำไปใช้ เช่น สเตรปโตไลซิน และเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคในสิ่งมีชีวิต สามารถใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งอาหารอื่น ๆ ได้หลายชนิด การเก็บรักษาเชื้อทำได้ง่าย และเชื้อสามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมได้ดี ปัจจุบันเชื้อที่นิยมใช้ในการศึกษาวิจัยปั่นแบคทีเรีย Streptococci กลุ่ม C เช่น *S.equi, S.equismilis, S.zooepidemicus* เพราะเชื้อเหล่านี้ไม่ก่อโรคในคน แต่ก่อโรคเฉพาะในสัตว์เท่านั้น ประกอบกับสามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้ในปริมาณมาก ไม่มีสารพิษจากแบคทีเรียปนเปื้อน (Nimrod และคณะ, 1986 ; Swann และคณะ, 1990 ; Regan และคณะ, 1994)

2.6.2 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิต

2.6.2.1 แหล่งคาร์บอน

แบคทีเรียในกลุ่ม Streptococci จัดอยู่ในกลุ่มแลกติกแอซิด แบคทีเรียสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้อย่างหลากหลายในการหมัก เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสร้าง UDP-N-acetyl glucosamine และ UDP-glucuronic acid ที่เป็นสารตั้งต้นของการสร้างกรดไฮยาลูโรนิก และเป็นแหล่งพลังงานสำหรับกิจกรรมของเซลล์ จากการรายงานการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกจากกระบวนการหมักพบว่า แหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้คือ กลูโคส และ ซูโครส เนื่องจากหาได้ง่าย และมีราคาถูก โดยปริมาณที่ใช้จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ และวิธีการหมัก (Akasaka และคณะ, 1989 ; Ellwood และคณะ, 1995 ; Nimrod และคณะ, 1986 ; Swann และคณะ, 1990)

2.6.2.2 แหล่งไนโตรเจน

แบคทีเรียในกลุ่ม Streptococci มีความต้องการอาหารซับซ้อน ต้องการกรดอะมิโนหลายชนิด การหมักจำเป็นต้องควบคุมปริมาณไนโตรเจนให้เพียงพอสำหรับกิจกรรมของเซลล์ โดยแบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนได้หลายชนิดทั้งที่เป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ เช่น สารสกัดจากยีสต์, เปปโตน, เคซีนไฮโดรไลเซท, กรดอะมิโน, แอมโมเนียมซิเตรท, แอมโมเนียมซัลเฟต, ยูเรีย, กลูตามีน เป็นต้น (Akasaka และคณะ, 1989 ; Ellwood และคณะ ,1995 ; Miyamori และคณะ, 1989 ; Nimrod และคณะ, 1986 ; Swann และคณะ, 1990 ; Willoughby และคณะ, 1964) โดยปริมาณความต้องการ และชนิดของกรดอะมิโนจะแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ ทั้งนี้เนื่องจากความสามารถในการสร้างกรดอะมิโนขึ้นอยู่กับสภาวะในการเจริญ จึงทำให้ความต้องการกรดอะมิโนของเชื้อแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกันไป

2.6.2.3 ฟอสเฟต

ฟอสเฟตมีความสำคัญในการเป็นส่วนประกอบของสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก คือ UDP-N-acetyl glucosamine และ UDP-glucuronic acid และในทางชีวเคมีฟอสเฟตจะมีความสำคัญในกระบวนการสร้างพลังงาน และเป็นส่วนประกอบของสารภายในเซลล์ที่สำคัญ เช่น กรดนิวคลีอิก สำหรับแหล่งฟอสเฟตที่ใช้ในกระบวนการหมักจะอยู่ในรูปของเกลือ เช่น โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต, ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต, โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Kjems และ Lebech, 1976 ; Rijn และ Kessler, 1980 ; Bracke และคณะ, 1985)

2.6.2.4 แร่ธาตุ

ธาตุจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญ และการสร้างกรดไฮยาลูโรนิก โดยพบว่าธาตุโลหะที่มีสองประจุ เช่น Mn^{2+} และ Mg^{2+} จะช่วยในการทำงานของเอนไซม์ hyaluronic acid synthase ให้มีความเสถียรในการทำงานมากขึ้น เนื่องจากจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการจับของเอนไซม์กับสารตั้งต้น (DeAngelis, 1996) โดยส่วนมากแมกนีเซียมที่เติมจะอยู่ในรูปของ แมกนีเซียมซัลเฟต นอกจากนี้ยังอาจมีแร่ธาตุชนิดอื่น ๆ ที่ช่วยในการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมต่าง ๆ ของเซลล์ แต่ยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด

2.6.2.5 สารเสริมอื่น ๆ

นอกเหนือจากที่ได้กล่าวมาแล้ว ยังมีสารเสริมบางชนิดที่มีรายงานว่าเมื่อเติมลงในอาหารจะมีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก เช่น ไลโซไซม์, tween 80 (Morita และ Fujii, 1991) หรือมีผลต่อการเจริญของเซลล์ เช่น สารละลายวิตามินพวก ไบโอติน, ไรโบเฟลวิน, กรดโฟลิก, นิโคทินาไมด์ และ ไทเอมีน (Bracke และคณะ, 1985)

2.6.2.6 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

เนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่ม Streptococci จะพบได้ในเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต เจริญได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเป็นกลาง โดยพบว่าในระหว่างการหมัก การสร้างกรดไฮยาลูโรนิกจะทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารต่ำลง เนื่องจากกรดไฮยาลูโรนิกจะถูกปล่อยออกสู่อาหาร ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเติมสารที่เป็นด่างลงไป สำหรับปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม ตัวอย่างสารที่ใช้ เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์, โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Akasaka และคณะ, 1989 ; Swann และคณะ, 1990)

2.6.2.7 อุณหภูมิและระยะเวลาในการหมัก

เนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่ม Streptococci จะพบได้ในเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์จะอยู่ในช่วง 30 – 40 องศาเซลเซียส แต่ที่มีรายงานว่าให้ผลการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้ดีที่สุด และเป็นอุณหภูมิที่นิยมใช้มากที่สุด คือ 37 องศาเซลเซียส (Nimrod และคณะ, 1988, Akasaka และคณะ, 1989, Swann และคณะ, 1990, Ellwood และคณะ, 1995) จากการศึกษาการเจริญของเซลล์ควบคู่ไปกับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก พบว่าการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงระยะการเจริญทวีคูณและสูงที่สุดในระยะการเจริญคงที่ จากนั้นจะลดต่ำลงเมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะที่มีการตาย ดังนั้นระยะเวลาในการหมักที่เหมาะสมในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกควรอยู่ในช่วง 30-48 ชั่วโมง (Akasaka และคณะ, 1989 ; Swann และคณะ, 1990)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.6.2.8 อัตราการให้อากาศและความเร็วรอบในการกวน

เนื่องจากในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกนั้นออกซิเจน เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญ โดยมีแนวความคิดที่แตกต่างกันเกี่ยวกับความสำคัญของออกซิเจน โดยมีแนวความคิดที่ว่ากรดไฮยาลูโรนิกในรูปของแคปซูล จะผลิตขึ้นเพื่อป้องกันอันตราย และลดความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่เซลล์สร้างขึ้นเมื่อได้รับออกซิเจน (Cleary และ Larkin, 1979) นอกจากนั้นยังมีรายงานว่า การเพิ่มอัตราการให้อากาศ สามารถเพิ่มอัตราการเจริญของเซลล์และเพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกให้สูงขึ้นได้ เนื่องจากพลังงานที่ได้รับจากเมตาบอลิซึมของเซลล์สูงขึ้น เมื่อไพรูเวทถูกเปลี่ยนไปเป็นอะซีเตทในสภาวะที่มีอากาศ ซึ่งพลังงานที่ได้จะสูงกว่าการเปลี่ยนไพรูเวทไปเป็นแลกเตทในสภาวะไร้อากาศ (Johns และคณะ, 1994) ดังเช่นการรายงานของ Chong และ Nielson ในปี 2003 ที่ได้สร้าง *S.zooepidemicus* สายพันธุ์ที่สร้าง NADH oxidase สูง ซึ่งจะช่วยลดปฏิกิริยาที่เป็นพิษต่อเซลล์ เนื่องจากการออกซิไดส์ด้วยออกซิเจน โดยการออกซิไดส์ NADH ให้เป็น NAD^+ และน้ำ ออกซิเจนยังมีผลให้การผลิตเอธานอลจาก acetyl CoA ลดลง จึงทำให้สามารถเพิ่มการสร้าง ATP จากการเร่งปฏิกิริยาของ acetate kinase (ดังรูปที่ 2.4) ซึ่งจะมีผลให้พลังงานที่ได้จากเมตาบอลิซึมเพิ่มขึ้น สำหรับความเร็วรอบในการกวน ได้มีรายงานว่าที่ความเร็วรอบในการกวน 600 รอบต่อนาที จะทำให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ดีกว่าที่ความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที (Johns และคณะ, 1994) เนื่องจากการหมักกรดไฮยาลูโรนิกจะมีความหนืดมากทำให้การควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง, ค่าการละลายของออกซิเจน เกิดได้อย่างไม่ทั่วถึง ดังนั้นการกำหนดความเร็วรอบที่เหมาะสมจะช่วยทำให้อัตราการส่งผ่านสารอาหาร และอัตราการส่งผ่านออกซิเจนเกิดได้อย่างทั่วถึง แต่ถ้าความเร็วรอบที่ใช้สูงเกินไปก็จะมีผลต่อการเจริญของเซลล์ที่ลดลง และทำให้ผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกลดลง (Kim และคณะ, 1996)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 อุปกรณ์

เครื่องเขย่าผสม (vortex mixer) รุ่น K-550-GE ของบริษัท Scientific Industries , Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิแบบหมุน (rotary incubator shaker) รุ่น G-25 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co. , Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น KR-20000T ของบริษัท Kubota Corporation ประเทศญี่ปุ่น

ตู้อบไมโครเวฟ รุ่น MR-6650 ของบริษัท Hitachi , Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

ถังหมัก (Fermenter) ขนาด 5 ลิตร รุ่น MD-300-5L ใบพัดแบบกังหัน 6 ใบ (6-blade turbine) เครื่องควบคุมภาวะ (Bioprocess controller) รุ่น MDIAC-SS ของบริษัท Marubishi ประเทศญี่ปุ่น เครื่องอัดอากาศ (Air compressor) ของบริษัท Hitachi ประเทศญี่ปุ่น เครื่องควบคุมระบบน้ำหล่อเย็น (Circulation type hardy cooler) รุ่น TRL-108 ของบริษัท Thomas Kagaka ประเทศญี่ปุ่น

มาตรวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น F-13 ของประเทศญี่ปุ่น และมาตรวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH Combination Electrode) สำหรับถังหมักขนาด 5 ลิตร รุ่น D-26 ของบริษัท TOA Electronics , Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (autoclave) รุ่น KT-30 SD ของบริษัท ALP Co., Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องอบฆ่าเชื้อแบบแห้ง (hot air oven) รุ่น 94789 ของบริษัท Contherm Scientific Ltd. ประเทศนิวซีแลนด์

ตู้บ่มเชื้อ (program incubator) รุ่น IN 81 ของบริษัท Yamato Scientific Co. , Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

3.1.2 สารเคมี

สารเคมี		บริษัทผู้ผลิต
กรดซัลฟูริก	Merck	ประเทศเยอรมัน
กรดไดไนโตรซาลิไซลิก	Sigma	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดไฮโดรคลอริก	Merck	ประเทศเยอรมัน
กรดไฮยาลูโรนิก (*S.zooepidemicus*)	Sigma	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กลูโคส-6-ฟอสเฟตไดโซเดียมซอลท์	Fluka	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
คาร์บาโซล	Fluka	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
แคลเซียมคลอไรด์	Merck	ประเทศเยอรมัน
โคบอลต์ไดคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต	Merck	ประเทศเยอรมัน
โซเดียมเตตระบอเรท	Merck	ประเทศเยอรมัน
โซเดียมคลอไรด์	Carlo Erba	ประเทศอิตาลี
โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	Carlo Erba	ประเทศอิตาลี
โซเดียมไฮดรอกไซด์	Merck	ประเทศเยอรมัน
โซเดียมไพรูเวท	Sigma	ประเทศจีน
ซิงค์คลอไรด์	Merck	ประเทศเยอรมัน
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	Merck	ประเทศเยอรมัน
โพแทสเซียมคลอไรด์	Merck	ประเทศเยอรมัน
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	Merck	ประเทศเยอรมัน
ฟรักโทส-6-ฟอสเฟตไดโซเดียมซอลท์	Fluka	ประเทศสหรัฐอเมริกา
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	Fluka	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต	Mallinckrodt	ประเทศสหรัฐอเมริกา
แลกติกเคซีน	ไวท์กรุ๊ป	ประเทศไทย
ไลโซไซม์	Sigma	ประเทศสหรัฐอเมริกา
เอทานอล 95 %	กรมสรรพสามิต	ประเทศไทย
เอนไซม์ปาเปน	BDH	ประเทศอังกฤษ
เอนไซม์อินเวอร์เทส	Wako Pure Chemical	ประเทศญี่ปุ่น
แอล-กลูตามีน	Sigma	ประเทศสหรัฐอเมริกา
แอล-อาร์จินีน	Fluka	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 เชื้อจุลินทรีย์

ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 ที่กลายพันธุ์มาจาก *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ ATCC 35247 โดย ทรงศักดิ์ พันธุ์วัฒนะสิงห์ (2540)

3.3 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย

การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียจะเก็บรักษาบนอาหารแข็งลาดเอียง Brain Heart Infusion (BHI) (ภาคผนวก ก-1.2) โดยเขี่ยเชื้อลงบนผิวหน้าอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4 การเลี้ยงเชื้อและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

3.4.1 การเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น

เตรียมหัวเชื้อตั้งต้น (inoculum) โดยถ่ายเชื้อจากอาหารแข็งลาดเอียง BHI ที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปิเปตน้ำที่ปราศจากไอออน (deionized water) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร เขี่ยเชื้อให้หลุดจากผิวหน้าอาหารให้กระจายแขวนลอยอยู่ในน้ำโดยเข็มเขี่ยเชื้อ จากนั้นใช้ปิเปตดูดเซลล์แขวนลอยที่ได้ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว BHI (ภาคผนวก ก-1.1) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงในเครื่องเขย่าแบบหมุน ที่ความเร็วรอบในการหมุน 300 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ชั่วโมง ซึ่งเชื้อจะเจริญในระยะกึ่งกลางทวีคูณ (mid-log phase) วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 660 นาโนเมตร ได้ประมาณ 0.2

3.4.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในขวดเขย่า

ทำการปิเปตเซลล์แขวนลอยที่ได้จากขั้นตอน 3.4.1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (ปริมาณร้อยละ 20 ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงสู่อาหารเหลวสูตรสำหรับการผลิต (ภาคผนวก ง-2) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็วรอบในการหมุน 300 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.4.3 การแปรปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับขวดเขย่า

3.4.3.1 อิออนชนิดต่าง ๆ

เลี้ยงเชื้อในขวดเขย่า ตามวิธีการในข้อ 3.4.2 โดยในแต่ละชุดการทดลองเติมอิออนที่ต้องการทดสอบได้แก่ $FeSO_4.7H_2O$, $MnSO_4.H_2O$, $CoCl_2.6H_2O$ และ $ZnCl_2$ โดยแปรปริมาณของอิออนแต่ละชนิดในช่วง 0-50 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.4.3.2 สารมัธยันตร์และสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก

เลี้ยงเชื้อในขวดเขย่า ตามวิธีการในข้อ 3.4.2 โดยแต่ละชุดการทดลองเติมสารที่ต้องการทดสอบ ที่แปรความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ ไพรูเวท 0 - 40 มิลลิกรัมต่อลิตร, กลูโคส-6-ฟอสเฟต 0 – 20 มิลลิกรัมต่อลิตร, ฟรักโทส-6-ฟอสเฟต 0 – 50 มิลลิกรัมต่อลิตร, กลูตามีน 0 – 200 มิลลิกรัมต่อลิตร, อาร์จินีน 0 – 180 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ยูราซิล 0 – 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.4.4 การเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ทำการถ่ายหัวเชื้อตั้งต้นที่ได้จากขั้นตอน 3.4.1 ปริมาตร 300 มิลลิลิตร (ปริมาณร้อยละ 10 ต่อปริมาตร) ลงในอาหารเหลวสูตรสำหรับการผลิต (ภาคผนวก ง-3) ปริมาตร 2,700 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งจะได้น้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้น เท่ากับ 0.03 กรัมต่อลิตร ตลอดการหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมงจะควบคุมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm ความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาทีหรือที่แสดงไว้ในผลการทดลอง และควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 5 โมลาร์

การแปรปัจจัยของอิออน สารตั้งต้น และสารมัธยันตร์บางชนิดที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก ดังแสดงในผลการทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5 วิธีวิเคราะห์

3.5.1 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

วัดค่าความเป็นกรด-ด่างโดยใช้มาตรวัดความเป็นกรด-ด่าง

3.5.2 การวัดการเจริญของเซลล์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

ทำการวิเคราะห์โดยนำตัวอย่างน้ำหมัก ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ได้จากขั้นตอนที่ 3.4.2 ลงในหลอดเซนทริฟิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบในการหมุน 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเซลล์ที่ตกตะกอนได้ไปล้างด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร 2 ครั้ง นำเซลล์ที่ล้างได้ใส่ลงกระทงอะลูมินัมฟอยด์ (aluminum foil) อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง รอจนเย็นและน้ำหนักคงที่ในเดซิเคเตอร์ (desicator) แล้วชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งละเอียด นำน้ำหนักของกระทงอะลูมินัมฟอยด์ที่มีเซลล์รวมอยู่หักลบด้วยน้ำหนักของกระทงอะลูมินัมฟอยด์เปล่า จะได้น้ำหนักของเซลล์แห้งหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

3.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกโดยวิธีคาร์บาโซล (Bitter และ Muir, 1962)

3.5.3.1 การตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิก

นำส่วนสารละลายที่ได้จากการปั่นแยกเซลล์ ตามขั้นตอนที่ 3.5.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดเซนทริฟิวจ์ ไปตกตะกอนโดยการเติมเอทธานอล 95% ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม จากนั้นปั่นแยกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิก ที่ความเร็วรอบในการหมุน 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นตกตะกอนครั้งที่ 2 โดยใช้เอทานอล 95% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยเทส่วนของสารละลายที่ได้ลงในหลอดเซนทริฟิวจ์ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม ปั่นแยกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิก ที่ความเร็วรอบในการหมุน 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทส่วนของสารละลายทิ้ง นำส่วนที่เป็นตะกอนกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้มารวมเข้าด้วยกัน แล้วนำไปละลายเพื่อการวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกต่อไป

3.5.3.2 การละลายตะกอนกรดไฮยาลูโรนิก

นำส่วนตะกอนกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากขั้นตอนที่ 3.5.3.1 ละลายด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ละลายตะกอนในสารละลายด้วยเครื่องผสม เพื่อใช้ในการวิเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกต่อไป

3.5.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกโดยวิธีคาร์บาโซล

นำสารละลายตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอนที่ 3.5.3.2 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาเจือจางให้มีความเข้มข้นที่หมาะสม ใส่ลงในหลอดทดลองที่แช่อยู่ในอ่างน้ำแข็งแล้วเติมสารละลายบอเรท-ซัลฟูริก (ภาคผนวก ข-2.1) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงไป ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม แล้วนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งให้สารละลายเย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมสารละลายคาร์บาโซล (ภาคผนวก ข-2.2) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม แล้วนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้สารละลายเย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร ใช้น้ำที่ปราศจากไอออนปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่ผ่านขั้นตอนเช่นเดียวกับสารละลายตัวอย่างเป็นตัวอย่างที่ใช้ในการเปรียบเทียบ นำค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่วัดได้ คำนวณความเข้มข้นของกรดไฮยาลูโรนิก จากกราฟมาตรฐานของกรดไฮยาลูโรนิกที่มีความเข้มข้นในช่วง 0 ถึง 200 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ค-2)

3.5.4 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก (total sugar) โดยใช้เอนไซม์อินเวอร์เทส

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส (ภาคผนวก ข-1.3) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม นำไปแช่ในอ่างน้ำเย็นควบคุมอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที เติมสารละลายไดไนโตรซาลิไซลิก ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม นำสารละลายที่ได้ไปต้มในอ่างน้ำเดือดที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแช่ในอ่างน้ำเย็น เป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำขจัดไอออนปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ใช้น้ำขจัดไอออนปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เป็นตัวเปรียบเทียบแทนสารละลายตัวอย่าง คำนวณความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร จากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลซูโครสที่ย่อยด้วยเอนไซม์อินเวอร์เทส ในช่วงความเข้มข้นเท่ากับ 0 ถึง 1.0 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ค-1)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดย *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 ในระดับขวดเขย่า

4.1.1 รูปแบบการเจริญของ *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 ในอาหารเตรียมหัวเชื้อ

เนื่องจาก *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 เป็นสายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์มาจาก *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35247 (ทรงศักดิ์ พันธุ์วัฒนะสิงห์, 2540) ดังนั้นในขั้นตอนของงานวิจัยนี้ จึงศึกษารูปแบบการเจริญของเชื้อนี้ เปรียบเทียบกับที่รายงานไว้โดย อณุมาศ บัวเขียว (2544) เพื่อตรวจสอบว่ารูปแบบการเจริญของเชื้อเปลี่ยนแปลงไปหรือไม่

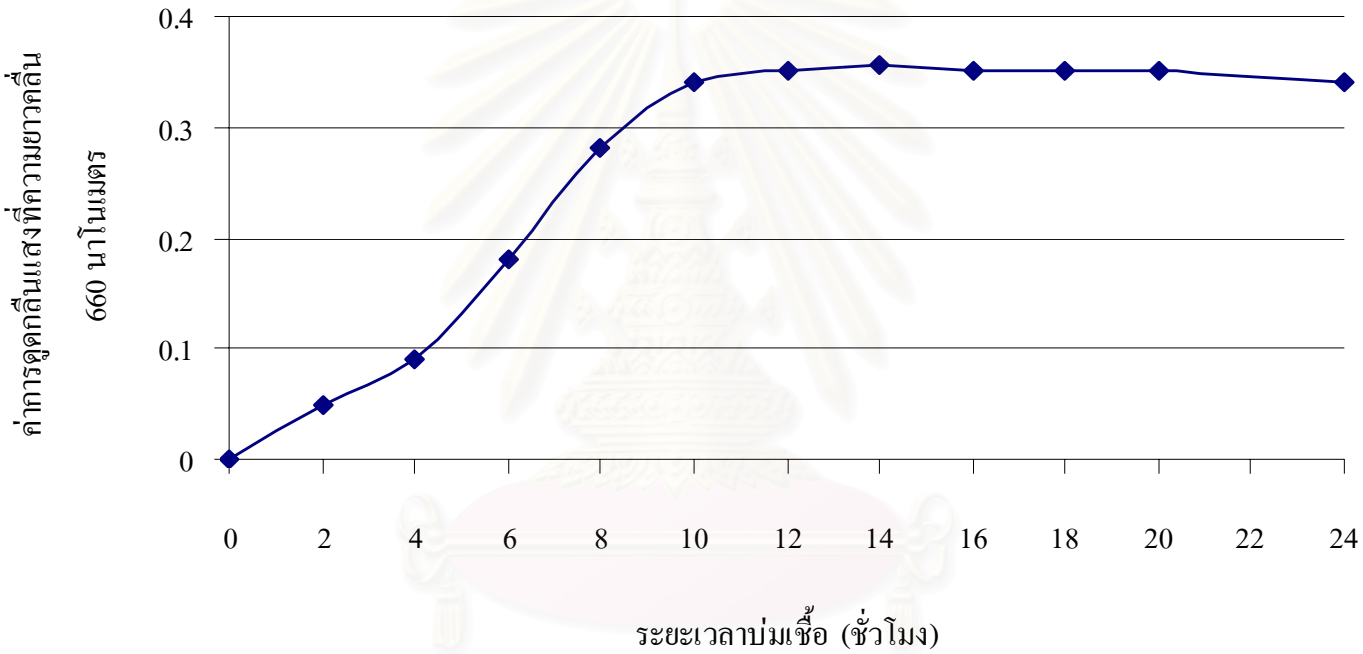
การทดลองนี้ทำโดยเลี้ยง *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อตามวิธีการทดลองในข้อ 3.4.1 และติดตามการเจริญเติบโต โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ทุก ๆ 2 ชั่วโมง ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.1 และ รูปที่ 4.1 พบว่าการเจริญของ *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 มีการเพิ่มจำนวนเซลล์และเข้าสู่ระยะทวีคูณ (log phase) ในช่วงเวลา 6 ถึง 10 ชั่วโมง และการเจริญจะเริ่มคงที่เข้าสู่ระยะคงตัว (stationary phase) ไปจนถึง 24 ชั่วโมง ซึ่งพบว่ารูปแบบการเจริญนี้ไม่แตกต่างจากที่รายงานไว้โดย อณุมาศ บัวเขียว (2544)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการบ่มเชื้อ *Streptococcus zooepidemicus* UN-7

ระยะเวลาการบ่มเชื้อ (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร
0	0.00
2	0.05
4	0.09
6	0.18
8	0.28
10	0.34
12	0.35
14	0.355
16	0.35
18	0.35
20	0.35
24	0.34

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.1 ลักษณะการเจริญของ *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว BHI ในขวดเขย่าที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

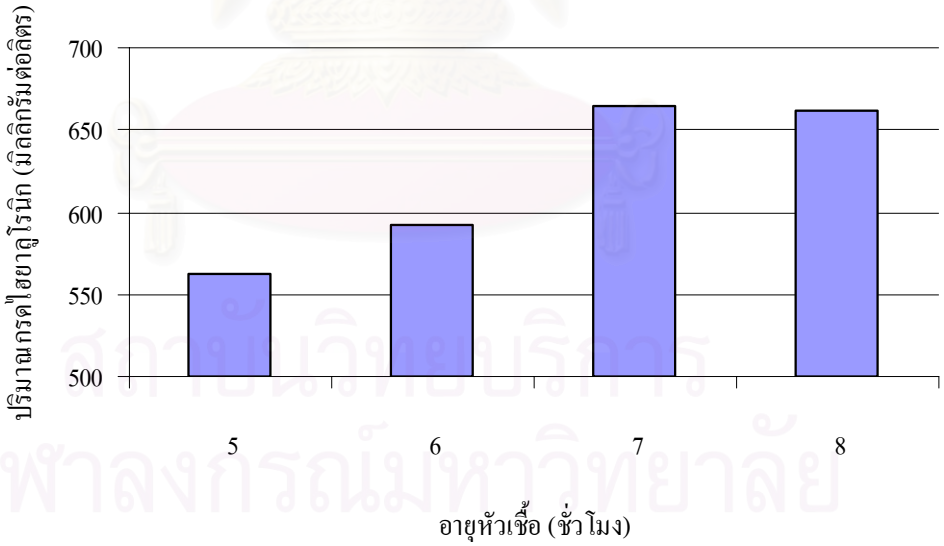
4.1.2 การหาอายุที่เหมาะสมของหัวเชื้อสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

จากผลการทดลองในข้อ 4.1.1 ในรูปที่ 4.1 พบว่าการเจริญของ *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 ในระยะทวีคูณ (log phase) อยู่ระหว่างช่วงเวลา 6 ถึง 8 ชั่วโมง การทดลองนี้จึงทำการหาอายุที่เหมาะสมของหัวเชื้อ สำหรับใช้ในการหมักเพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิก โดยทำตามวิธีการทดลองในข้อ 3.4.1 และ 3.4.2 โดยเปรียบเทียบการใช้หัวเชื้อที่อยู่ในช่วงการเจริญในระยะทวีคูณ (mid log phase) ที่มีอายุ 5, 6, 7 และ 8 ชั่วโมง จากนั้นทำการหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงเก็บตัวอย่างมา หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และ ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.2 พบว่าอายุของหัวเชื้อตั้งต้นเท่ากับ 7 ชั่วโมงเป็นช่วงอายุที่เหมาะสมที่สุดจะให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงที่สุดเท่ากับ 764 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับที่รายงานไว้โดยอณุมาศ บัวเขียว (2544) ดังนั้น จึงเลือกใช้อายุของหัวเชื้อตั้งต้นเท่ากับ 7 ชั่วโมง สำหรับใช้ในการหมักเพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับขวดเขย่าและในระดับถังหมัก 5 ลิตร ต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.2 เปรียบเทียบ ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ของ *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 โดยใช้อายุหัวเชื้อตั้งต้น 5, 6, 7 และ 8 ชั่วโมง ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง

อายุหัวเชื้อตั้งต้น (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)
5	0.12	0.402	663
6	0.18	0.414	692
7	0.26	0.444	764
8	0.32	0.445	762



รูปที่ 4.2 ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้จาก *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 โดยใช้อายุหัวเชื้อตั้งต้นที่ 5, 6, 7 และ 8 ชั่วโมง ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.3 รูปแบบการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 ในขวดเขย่า

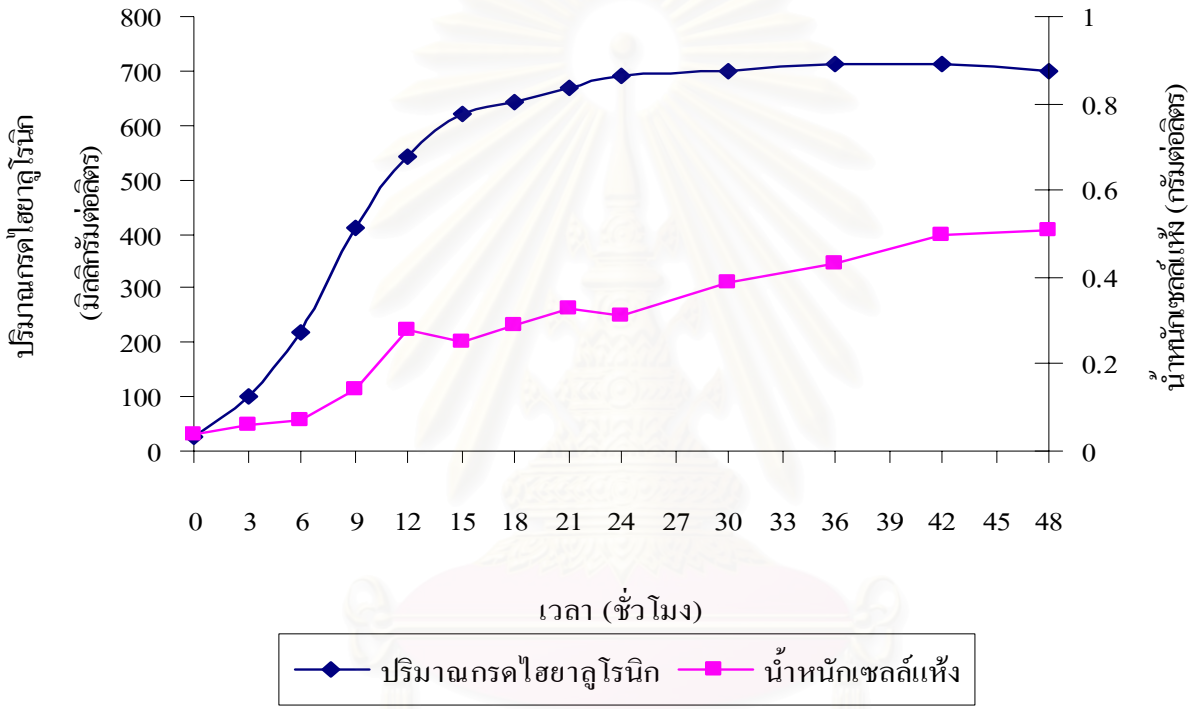
ทำการทดลองตามวิธีการในข้อ 3.4.1 และ 3.4.2 โดยใช้สูตรอาหารเหลวที่รายงานโดย อณุมาศ บัวเขียว (2544) ซึ่งมีซูโครส 3 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและหมักเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง ในช่วงเวลา 24 ชั่วโมงแรก และเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมงในช่วงระยะเวลา 24 ชั่วโมงหลัง จากนั้นทำการวิเคราะห์หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.3 และ รูปที่ 4.2 พบว่า เชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็วในระยะทวีคูณ ช่วง 3-15 ชั่วโมง ของการหมัก หลังจากนั้นการเจริญจะเริ่มคงที่ไปจนกระทั่งสิ้นสุดการหมักที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง และในช่วงที่เซลล์มีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วนั้นจะควบคู่ไปกับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกที่เพิ่มขึ้นตรงกับการเจริญในช่วงทวีคูณ และปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกจะสูงสุดในช่วงที่เซลล์อยู่ในระยะการเจริญคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ซึ่งปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงสุดที่ผลิตได้เท่ากับ 714 มิลลิกรัมต่อลิตรที่ระยะเวลาการหมัก 36 ชั่วโมง โดยน้ำหมักที่ได้จะมีความหนืดมากกว่าที่ระยะเวลาอื่น ๆ จากการทดลองครั้งนี้ทำให้ทราบถึงระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเก็บตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการหมักที่จะทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป โดยเลือกเก็บตัวอย่างจากการหมักที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อความสะดวกและรวดเร็ว และเนื่องจากเป็นช่วงระยะเวลาที่ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกมีการผลิตอย่างคงที่และให้ปริมาณสูงสุดใกล้เคียงกันตั้งแต่ 24 – 48 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.3 ค่าความเป็นกรดด่าง, ปริมาณเซลล์แห้ง และ ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ที่ผลิตโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในอาหารเหลวที่มีซูโครส 3 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)
0	6.9	0.04	27
3	6.9	0.06	100
6	6.8	0.07	220
9	6.7	0.14	410
12	6.1	0.28	540
15	5.9	0.25	619
18	5.5	0.29	643
21	5.6	0.33	669
24	5.4	0.31	690
30	5.6	0.39	700
36	5.4	0.43	714
42	5.5	0.5	712
48	5.5	0.51	700

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.3 แสดงค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง โดยเชื้อ *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 ในระดับขวดเขย่า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 เมื่อเลี้ยงในระดับขวดเขย่า

นอกจากการควบคุมปัจจัยทางกายภาพให้เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อเพื่อการหมักกรดไฮยาลูโรนิกแล้ว การส่งเสริมปัจจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมักให้มีความเหมาะสม เพื่อการสร้างพลังงานอย่างเพียงพอแก่เซลล์ โดยการเติมสารประกอบบางชนิดเพื่อเป็นสารตั้งต้นและสารตัวกลางในวิถีการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก รวมถึงการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องโดยการเติมอิออนบางชนิดที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจในการศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

เมื่อทำการทดลองเลี้ยง *S.zooepidemicus* UN-7 ตามวิธีการในข้อ 3.4.1 และ 3.4.2 ในอาหารเหลวสูตรสำหรับผลิตกรดไฮยาลูโรนิกที่รายงานโดย อณุมาศ บัวเขียว (2544) ซึ่งมีซูโครส 3 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและหมักเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และมีการเติมสารประกอบชนิดต่าง ๆ ที่ต้องการศึกษาลงไป เพื่อแปรชนิด และปริมาณของสารที่เหมาะสม โดยจะแบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ ชนิดของสารมัธยันตร์ และสารตั้งต้นที่เกี่ยวข้องในวิถีการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก เช่น กลูโคส-6-ฟอสเฟต, ฟรักโทส-6-ฟอสเฟต, ไพรูเวท, กลูตามีน, อาร์จินีน และ ยูราซิล และชนิดของอิออนที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมของเอนไซม์ในวิถีเมตาบอลิซึม เช่น แมงกานีส, โคบอลต์, แมกนีเซียมและแคลเซียม เป็นต้น จากนั้นนำตัวอย่างน้ำหมักที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และน้ำหนักเซลล์แห้งเปรียบเทียบกับชุดควบคุมของแต่ละการทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2.1 อิออนบางชนิดที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในวิถีเมตาบอลิซึม

จากการที่วิถีเมตาบอลิซึมของ *S.zooepidemicus* UN-7 ในการเจริญและสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก ประกอบไปด้วยเอนไซม์หลายชนิดทำหน้าที่แตกต่างกันไป ซึ่งการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ให้เป็นไปอย่างเหมาะสม จึงเป็นอีกวิธีการหนึ่งในการส่งเสริมการเจริญและการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก ซึ่งเอนไซม์จำเป็นต้องอาศัยอิออนบางชนิดเพื่อช่วยส่งเสริมกิจกรรมการทำงาน หรือเป็นโคแฟกเตอร์ เช่น การทำงานของเอนไซม์ hyaluronan synthase ในการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก นอกจากสารตั้งต้นที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวแล้ว เอนไซม์ยังต้องการอิออนโลหะที่มีประจุ 2^{+} เพื่อช่วยในการทำงานของเอนไซม์ในการต่อสารกรดไฮยาลูโรนิกอีกด้วย

4.2.1.1 ปริมาณของเฟอร์รัสที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

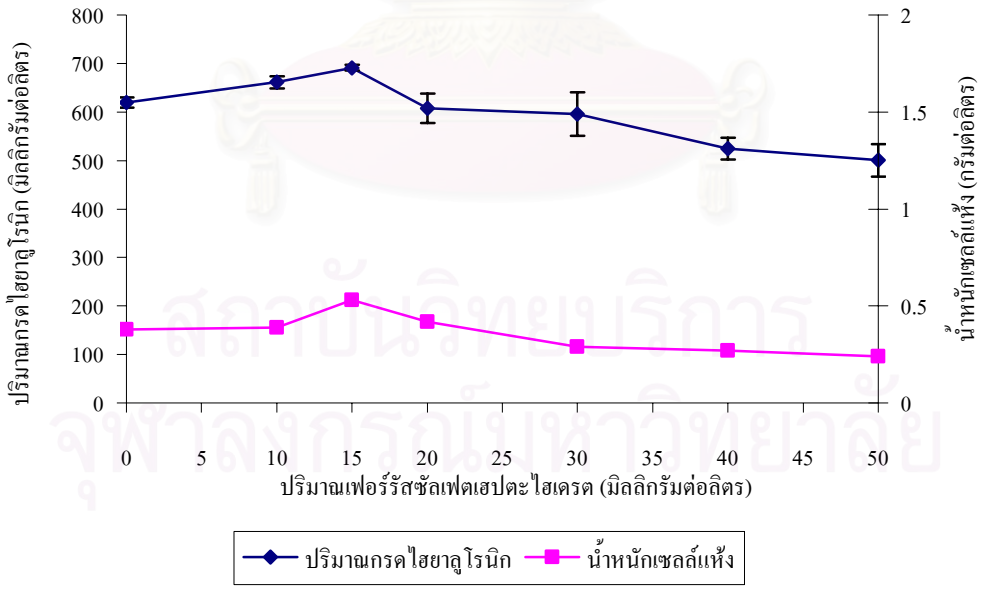
ในการทดลองนี้ศึกษารูปแบบการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก เมื่อมีการเติมเฟอร์รัสอิออน ในรูปของเฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต โดยแปรปริมาณของเฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ในช่วง 10-50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ภาวะในการเลี้ยงเช่นเดียวกับในข้อ 4.1.3 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.4 และ รูปที่ 4.4 พบว่า การเติมเฟอร์รัสอิออนมีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก และเมื่อเติมลงไปในปริมาณที่เหมาะสม คือ เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 15 มิลลิกรัมต่อลิตรจะมีผลต่อการเพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิก โดยให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก เท่ากับ 690 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อเติมลงไปในปริมาณที่มากเกินพอจะมีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก ทำให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.4 ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ที่ผลิตโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอาหารเหลวที่มีซูโครส 3 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและแปรปริมาณ $FeSO_4.7H_2O$ ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกใน ระดับขวดเขย่า

ปริมาณ $FeSO_4.7H_2O$ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก* (มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	619 $\pm$ 10	0.38
10	661 $\pm$ 12	0.39
15	690 $\pm$ 5	0.53
20	607 $\pm$ 30	0.42
30	595 $\pm$ 45	0.29
40	524 $\pm$ 22	0.27
50	500 $\pm$ 33	0.24

หมายเหตุ : * ค่าที่ได้จากการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ



รูปที่ 4.4 แสดงปริมาณ $FeSO_4.7H_2O$ ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกใน ระดับขวดเขย่า

4.2.1.2 ปริมาณของแมงกานีสที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

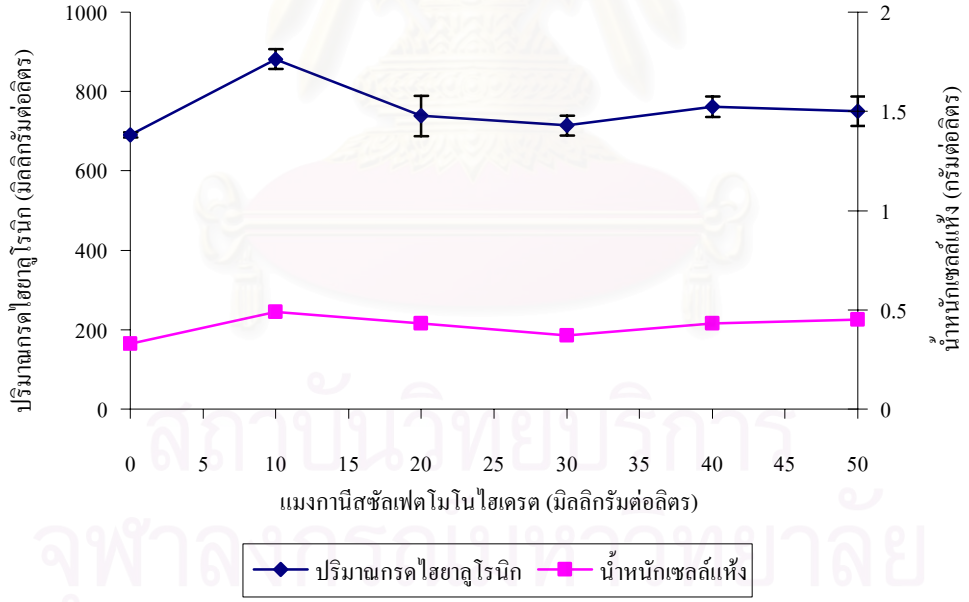
จากผลการทดลองข้อที่ 4.2.1.1 พบว่าอิออนบางชนิดมีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก รวมทั้งได้มีรายงานว่าการเติมโลหะที่มีประจุ 2^+ (divalent cation) เช่น Mn^{2+} หรือ Mg^{2+} จะช่วยทำให้เอนไซม์ hyaluronic acid synthase มีความเสถียร (Stoolmiller และ Dorfman, 1969) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาผลของอิออนชนิดอื่น ๆ ที่มีต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก โดยศึกษารูปแบบการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก เมื่อมีการเติมแมงกานีสอิออนในรูปของแมงกานีส ซัลเฟตโมโนไฮเดรต โดยแปรปริมาณของแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ในช่วง 10-50 มิลลิกรัมต่อลิตร และใช้ภาวะในการเลี้ยงเช่นเดียวกับในข้อ 4.1.3 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง และ ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.5 และ รูปที่ 4.5 พบว่า การเติมแมงกานีสอิออนมีผลต่อการเพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิก โดยในทุกชุดการทดลองที่มีการเติมแมงกานีสอิออนจะให้ผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกที่เพิ่มขึ้น แต่ที่ปริมาณแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต 10 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้สูงที่สุด เท่ากับ 881 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อเพิ่มปริมาณแมงกานีสอิออนเพิ่มขึ้น ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ก็เริ่มคงที่ไม่ผลิตเพิ่มมากขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.5 ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ที่ผลิตโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอาหารเหลวที่มีซูโครส 3 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและแปรปริมาณ $MnSO_4.H_2O$ ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับขวดเขย่า

ปริมาณ $MnSO_4.7H_2O$ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก* (มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	690 ± 6	0.33
10	881 ± 25	0.49
20	738 ± 50	0.43
30	714 ± 24	0.37
40	762 ± 25	0.43
50	750 ± 37	0.45

หมายเหตุ : * ค่าที่ได้จากการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ



รูปที่ 4.5 แสดงปริมาณ $MnSO_4.H_2O$ ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกใน ระดับขวดเขย่า

4.2.1.3 ปริมาณของโคบอลต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

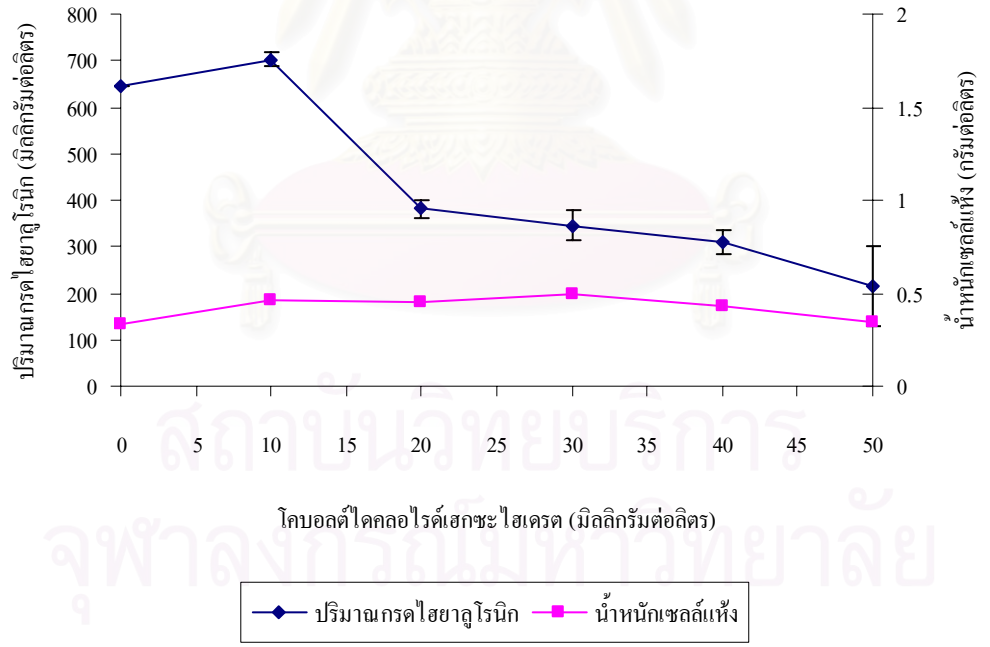
การทดลองนี้เป็นการศึกษาผลของโคบอลต์ต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก โดยศึกษารูปแบบการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก เมื่อมีการเติมโคบอลต์อิออน ในรูปของโคบอลต์ไดคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต โดยแปรปริมาณของโคบอลต์ไดคลอไรด์เฮกซะไฮเดรตในช่วง 10-50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ภาวะในการเลี้ยงเช่นเดียวกับในข้อ 4.1.3 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง และ ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.6 และ รูปที่ 4.6 พบว่า การเติมโคบอลต์อิออนในปริมาณที่เหมาะสมจะสามารถเพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้ ซึ่งปริมาณโคบอลต์ไดคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต 10 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถเพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้ เท่ากับ 702 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่เมื่อมีการเติมโคบอลต์อิออนในปริมาณที่มากเกินพอจะมีผลทำให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ลดลง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.6 ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ที่ผลิตโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอาหารเหลวที่มีซูโครส 3 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและแปรปริมาณ $CoCl_2.6H_2O$ ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับขวดเขย่า

ปริมาณ $CoCl_2.6H_2O$ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก* (มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	643 ± 0	0.33
10	702 ± 14	0.46
20	381 ± 19	0.45
30	345 ± 30	0.49
40	310 ± 25	0.43
50	214 ± 84	0.34

หมายเหตุ : * ค่าที่ได้จากการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ



รูปที่ 4.6 แสดงปริมาณ $CoCl_2.6H_2O$ ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกใน ระดับขวดเขย่า

4.2.1.4 ปริมาณของสังกะสีที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

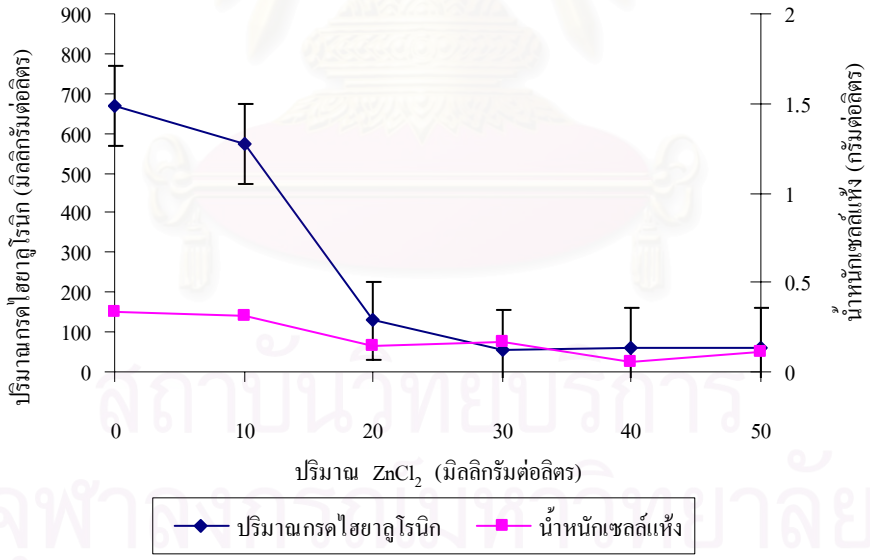
การทดลองนี้เป็นการศึกษาผลของอิออนของสังกะสี โดยศึกษาถึงรูปแบบการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก เมื่อมีการเติมอิออนสังกะสี ในรูปของซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$) โดยแปรปริมาณของซิงค์คลอไรด์ ในช่วง 10-50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ภาวะในการเลี้ยงเช่นเดียวกับในข้อ 4.1.3 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง และ ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.7 และ รูปที่ 4.7 พบว่า การเติมสังกะสีอิออนจะไม่ทำให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้เพิ่มสูงขึ้น แต่จะเป็นพิษต่อเซลล์ และ ทำให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ลดลงอีกด้วย ซึ่งเมื่อเติมซิงค์คลอไรด์ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้จะลดลงเท่ากับ 571 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ เนื่องจากน้ำหนักเซลล์แห้งไม่แตกต่างจากชุดการทดลองควบคุม แต่เมื่อเติมในปริมาณที่เพิ่มขึ้นจะมีผลต่อการเจริญของเซลล์อย่างมาก ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ลดลง สอดคล้องกับปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้จะลดลงอย่างมากเช่นกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.7 ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ที่ผลิตโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอาหารเหลวที่มีซูโครส 3 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและแปรปริมาณ $ZnCl_2$ ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกใน ระดับขวดเขย่า

ปริมาณ $ZnCl_2$ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก* (มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	667 ± 33	0.33
10	571 ± 28	0.31
20	128 ± 6	0.15
30	57 ± 3	0.17
40	59 ± 3	0.06
50	59 ± 3	0.11

หมายเหตุ : * ค่าที่ได้จากการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย 2 ซ้ำ



รูปที่ 4.7 แสดงปริมาณ $ZnCl_2$ ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกใน ระดับขวดเขย่า

4.2.2 ชนิดและปริมาณของสารมัธยันตร์ และสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก

4.2.2.1 ปริมาณของไพรูเวทที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

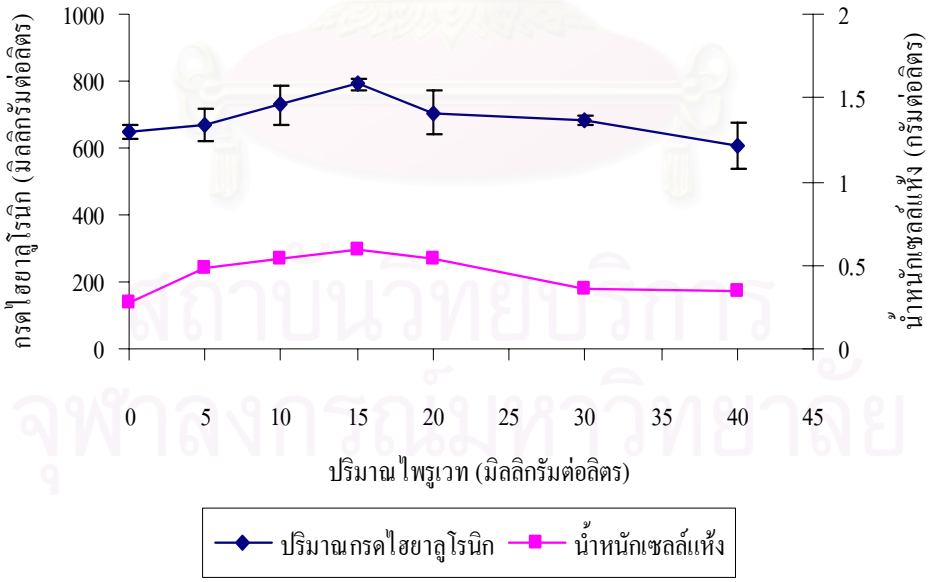
เนื่องจากในวิถีการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกมีปัจจัยที่จำกัดต่อการสังเคราะห์คือพลังงาน ซึ่งมีความสำคัญในการเปลี่ยนกลูโคสให้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก แต่เนื่องจาก *Streptococcus zooepidemicus* เป็นแบคทีเรียชนิด facultative anaerobe ที่ไม่สามารถสร้างพลังงานได้จากกระบวนการหายใจโดยใช้ออกซิเจน เพราะไม่มี heme จึงไม่สามารถสร้าง ATP ได้โดยกระบวนการ electron transport การสร้างพลังงานจึงได้จาก substrate level phosphorylation เท่านั้น (Higuchi, 1984) จึงไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้เพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิก ทำให้การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกถูกจำกัดไปด้วย แนวทางหนึ่งในการเพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิก คือการเพิ่มการสร้าง ATP และจากวิถีการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกพบว่า ไพรูเวทสามารถเปลี่ยนไปเป็น acetyl CoA ที่เป็นตัวกลางสำคัญในการสร้าง ATP โดยวิธี substrate level phosphorylation จากปฏิกิริยาการสร้างอะซีเตทได้ ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาปริมาณของไพรูเวทที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดยเตรียมสารละลายไพรูเวทเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยกรองผ่านแผ่นกรองเซลลูโลสอะซีเตท แล้วแปรปริมาณไพรูเวทตั้งแต่ 0 – 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเก็บตัวอย่างวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง และ ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.8 และ รูปที่ 4.8 พบว่า ไพรูเวทที่เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก ทำให้ผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มขึ้น และให้ผลผลิตสูงสุดที่ปริมาณความเข้มข้นของไพรูเวทเท่ากับ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยให้ผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้สูงที่สุดเท่ากับ 790 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นปริมาณไพรูเวทที่เพิ่มขึ้นจะไม่มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.8 ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ที่ผลิตโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอาหารเหลวที่มีซูโครส 3 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและแปรปริมาณของไพรูเวทที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับขวดเขย่า

ปริมาณไพรูเวท (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก* (มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	645 ± 19	0.27
5	667 ± 47	0.48
10	727 ± 60	0.54
15	790 ± 18	0.59
20	704 ± 66	0.54
30	683 ± 13	0.36
40	607 ± 66	0.35

หมายเหตุ : * ค่าที่ได้จากการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ



รูปที่ 4.8 แสดงปริมาณของไพรูเวทที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับขวดเขย่า

4.2.2.2 ปริมาณของ กลูโคส-6-ฟอสเฟต ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

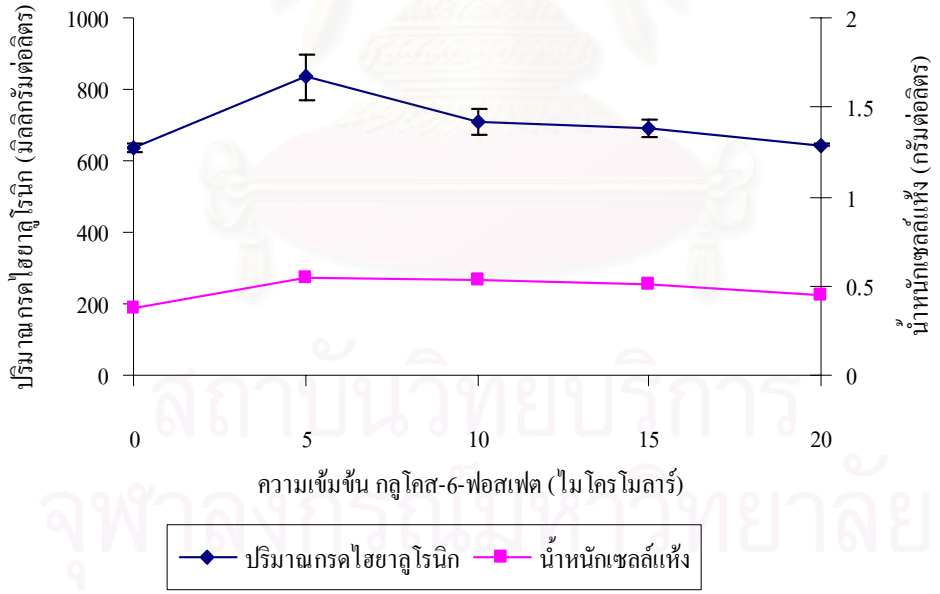
จากรูปที่ 1.3 แสดงวิถีการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก โดย *S.zooepidemicus* พบว่าน้ำตาลกลูโคสที่ได้มาจากภายนอกและจะถูกเปลี่ยนไปเป็น กลูโคส-6-ฟอสเฟต ซึ่งเป็นสารตัวกลางหลักที่สำคัญในการสร้าง กลูโคส-1-ฟอสเฟต และ ฟรักโทส-6-ฟอสเฟต ที่จะเปลี่ยนไปเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก คือ glucuronic acid และ N-acetyl-glucosamine ตามลำดับ นอกจากนั้น กลูโคส-6-ฟอสเฟต ยังได้ถูกนำไปใช้ใน pentose phosphate pathway เพื่อสร้างสารตั้งต้นสำหรับกรดอะมิโนบางชนิด และ นิวคลีโอไทด์ ที่มีความจำเป็นกับเซลล์อีกด้วย ดังนั้นในการทดลองนี้จึงศึกษาผลของ กลูโคส-6-ฟอสเฟต ต่อการสร้างกรดไฮยาลูโรนิกโดยเตรียมสารละลาย กลูโคส-6-ฟอสเฟต ในรูปสารละลายเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ โดยกรองผ่านแผ่นกรองเซลลูโลสอะซีเตท จากนั้นแปรความเข้มข้นของ กลูโคส-6-ฟอสเฟต ตั้งแต่ 0 – 50 ไมโครโมลาร์ ทำการเก็บตัวอย่างวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง และ ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.9 และ รูปที่ 4.9 พบว่าเมื่อเติมกลูโคส-6-ฟอสเฟตที่ความเข้มข้นเหมาะสมจะส่งผลให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้มีปริมาณเพิ่มขึ้น โดยความเข้มข้น กลูโคส-6-ฟอสเฟต 5 ไมโครโมลาร์ จะให้ผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูงที่สุดเท่ากับ 833 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อเติม กลูโคส-6-ฟอสเฟต ลงไปในปริมาณที่มากเกินพอจะให้ผลการผลิตไม่แตกต่างกับชุดควบคุม แต่จะมีน้ำหนักเซลล์แห้งที่เพิ่มสูงขึ้นแทน ซึ่งปริมาณ กลูโคส-6-ฟอสเฟต ที่มากเกินพอ อาจถูกนำไปใช้ในการสร้างผนังเซลล์อีกทางหนึ่งด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.9 ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอาหารเหลวที่มีซูโครส 3 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและแปรปริมาณของ กลูโคส-6-ฟอสเฟต ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

ความเข้มข้น กลูโคส-6-ฟอสเฟต (ไมโครโมลาร์)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก* (มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	635 ± 13	0.38
5	833 ± 63	0.55
10	706 ± 36	0.53
15	690 ± 23	0.51
20	644 ± 2	0.45

หมายเหตุ : * ค่าที่ได้จากการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ



รูปที่ 4.9 แสดงความเข้มข้นของ กลูโคส-6-ฟอสเฟต ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับขวดเขย่า

4.2.2.3 ปริมาณของ ฟรักโทส-6-ฟอสเฟต ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

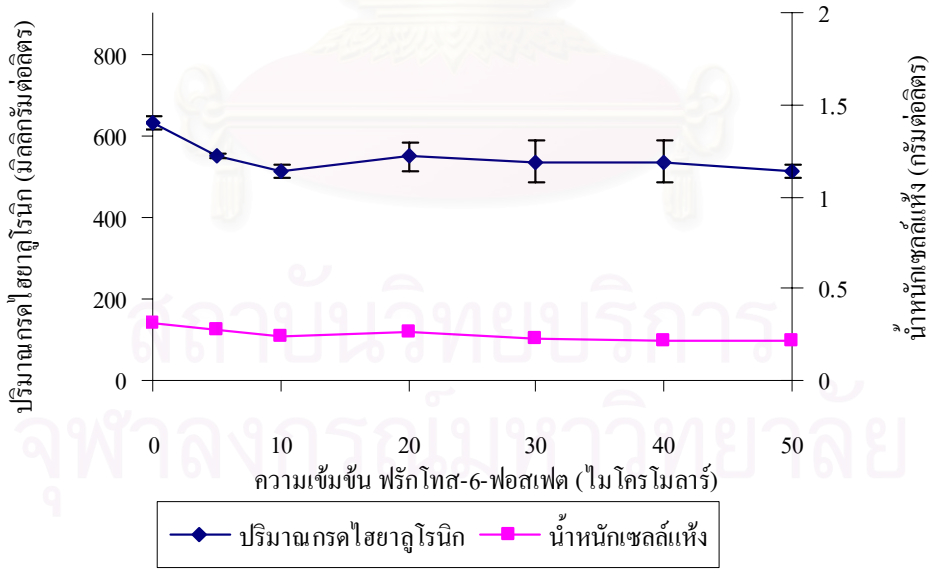
จากผลการทดลองในข้อ 4.2.2.2 พบว่าการเติม กลูโคส-6-ฟอสเฟต ในปริมาณที่เหมาะสม สามารถเพิ่มการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้ เนื่องจาก กลูโคส-6-ฟอสเฟต เป็นสารสารตั้งต้นตัวหนึ่งที่เกี่ยวข้องในวิถีการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกโดย *S.zooepidemicus* สำหรับ ฟรักโทส-6-ฟอสเฟต เป็นผลิตภัณฑ์ไอโซเมอร์ของ กลูโคส-6-ฟอสเฟต และเป็นสารตัวกลางในการสร้าง N-acetyl-glucosamine ที่เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก และนอกจากนั้น ฟรักโทส-6-ฟอสเฟต ยังมีความสำคัญในวิถีเมตาบอลิซึมของเซลล์อีกด้วย ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทดสอบผลของ ฟรักโทส-6-ฟอสเฟต ต่อการสร้างกรดไฮยาลูโรนิกโดยเตรียมสารละลาย ฟรักโทส-6-ฟอสเฟต ในรูปสารละลายเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ โดยกรองผ่านแผ่นกรองเซลลูโลสอะซีเตท จากนั้นแปรความเข้มข้นของ ฟรักโทส-6-ฟอสเฟต ตั้งแต่ 0 – 50 ไมโครโมลาร์ ทำการเก็บตัวอย่างวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง และ ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.10 และ รูปที่ 4.10 พบว่า การเติมฟรักโทส-6-ฟอสเฟต กลับมีผลลดการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.10 ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ที่ผลิตโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอาหารเหลวที่มีซูโครส 3 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและแปรปริมาณของ ฟรักโทส-6-ฟอสเฟต ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

ความเข้มข้น ฟรักโทส-6-ฟอสเฟต (ไมโครโมลาร์)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก* (มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	631 ± 16	0.31
5	552 ± 5	0.27
10	512 ± 16	0.24
20	548 ± 33	0.26
30	536 ± 50	0.23
40	536 ± 50	0.22
50	512 ± 16	0.21

หมายเหตุ : * ค่าที่ได้จากการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ



รูปที่ 4.10 แสดงความเข้มข้นของ ฟรักโทส-6-ฟอสเฟต ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับขวดเขย่า

4.2.2.3 ปริมาณของกลูตามีนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

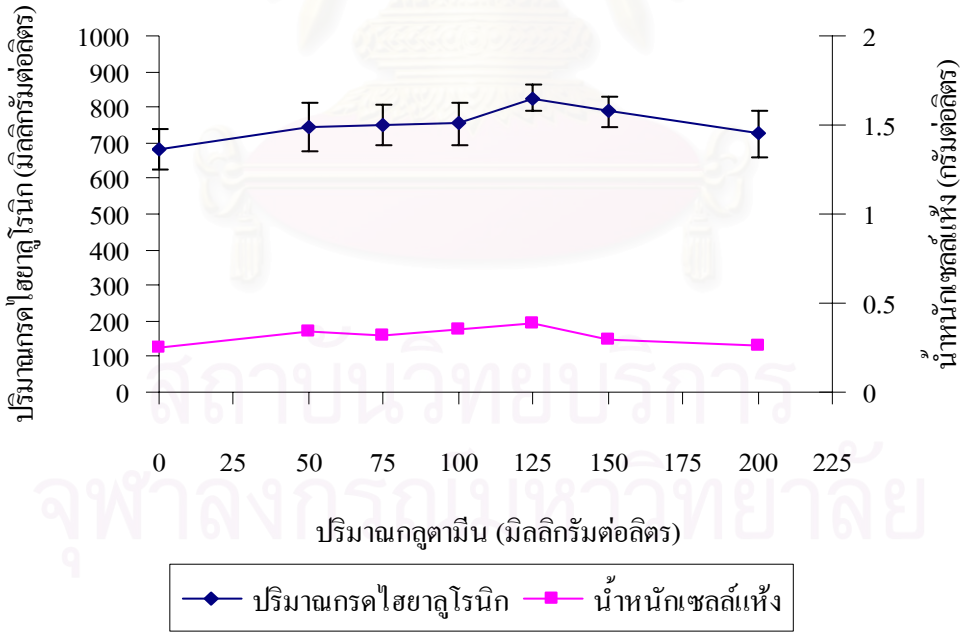
เนื่องจากกลูตามีนเป็นสารมัธยันตร์ชนิดหนึ่งที่เกี่ยวข้องในวิถีเมตาบอลิซึม โดยเป็นส่วนประกอบหนึ่งของ N-acetyl glucosamine ซึ่งเป็นสารตั้งต้นเพื่อการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก โดยหน้าที่ของกลูตามีนในขั้นตอนการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกจะเข้ารวมกับหมู่ acetyl CoA และ UTP ได้เป็น UDP N-acetyl glucosamine นอกจากนั้นยังมีรายงานว่า กลูตามีนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกโดย Streptococci (Lowther และ Rogers, 1956) ซึ่งแบคทีเรียแกรมบวกส่วนใหญ่จำเป็นต้องใช้พลังงานในการขนส่งกลูตามีนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (Gale, 1953) ในการทดลองนี้จึงศึกษาถึงผลของกลูตามีนต่อการสร้างกรดไฮยาลูโรนิก โดยเตรียมสารละลายกลูตามีนเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยกรองผ่านแผ่นกรองเซลลูโลสอะซีเตท จากนั้นแปรปริมาณของ กลูตามีนตั้งแต่ 0 – 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเก็บตัวอย่างวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.11 และรูปที่ 4.11 พบว่า กลูตามีนมีผลต่อการเพิ่มปริมาณการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดยจะเห็นได้ว่าที่ความเข้มข้น 125 มิลลิกรัมต่อลิตรจะให้ผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูงที่สุดเท่ากับ 825 มิลลิกรัมต่อลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.11 ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ที่ผลิตโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอาหารเหลวที่มีซูโครส 3 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน และแปรปริมาณของกลูตามีนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

ปริมาณกลูตามีน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก* (มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	682 ± 55	0.25
50	746 ± 68	0.34
75	750 ± 54	0.32
100	754 ± 60	0.35
125	825 ± 36	0.39
150	787 ± 42	0.29
200	726 ± 66	0.26

หมายเหตุ : * ค่าที่ได้จากการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ



รูปที่ 4.11 แสดงปริมาณของกลูตามีนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับขวดเขย่า

4.2.2.4 ปริมาณของอาร์จินีนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

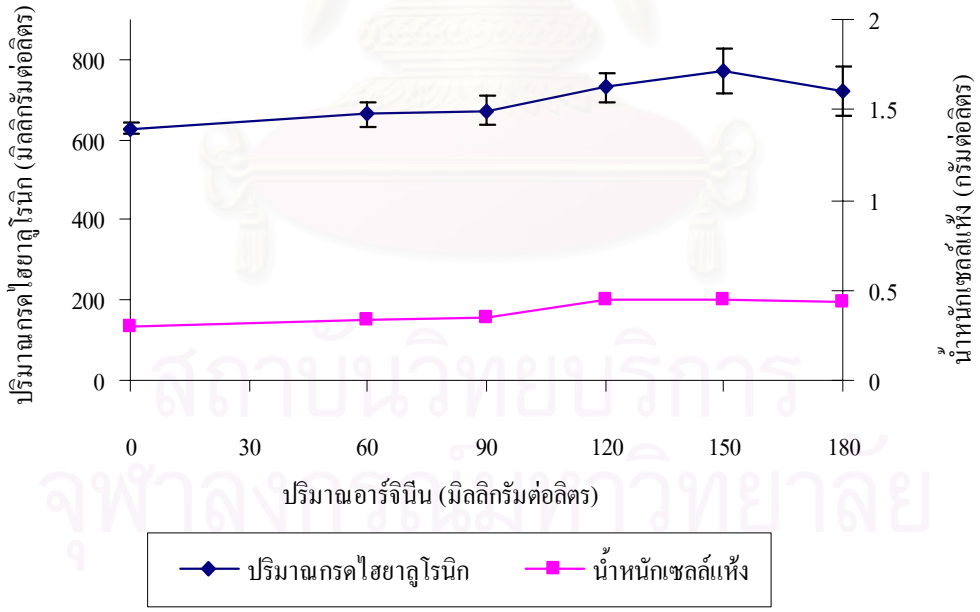
อาร์จินีนเป็นกรดอะมิโนชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก โดยมีรายงานว่าเมื่อมีการเติมอาร์จีนีน 0.06 กรัมต่อลิตรลงไปในอาหารเหลวที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า สามารถเพิ่มอัตราการเจริญของเซลล์และเพิ่มปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ ถึง 32 และ 34 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Gao และคณะ, 2000) ในการทดลองนี้จึงศึกษาผลของอาร์จินีนต่อการสร้างกรดไฮยาลูโรนิก โดยเตรียมสารละลายอาร์จินีน เข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยกรองผ่านแผ่นกรองเซลลูโลสอะซีเตท จากนั้นแปรปริมาณของอาร์จินีนตั้งแต่ 0 – 180 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเก็บตัวอย่างวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง และ ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.12 และ รูปที่ 4.12 พบว่า การเติม อาร์จินีน 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่เหมาะสม มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกจะให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นเท่ากับ 772 มิลลิกรัมต่อลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.12 ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ที่ผลิตโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอาหารเหลวที่มีซูโครส 3 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและแปรปริมาณของอาร์จินีนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

ปริมาณอาร์จินีน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก* (มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	627 ± 13	0.30
60	663 ± 29	0.34
90	673 ± 35	0.35
120	730 ± 36	0.45
150	772 ± 55	0.45
180	722 ± 59	0.43

หมายเหตุ : * ค่าที่ได้จากการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ



รูปที่ 4.12 แสดงปริมาณของอาร์จินีนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับขวดเขย่า

4.2.2.5 ปริมาณของยูราซิลที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

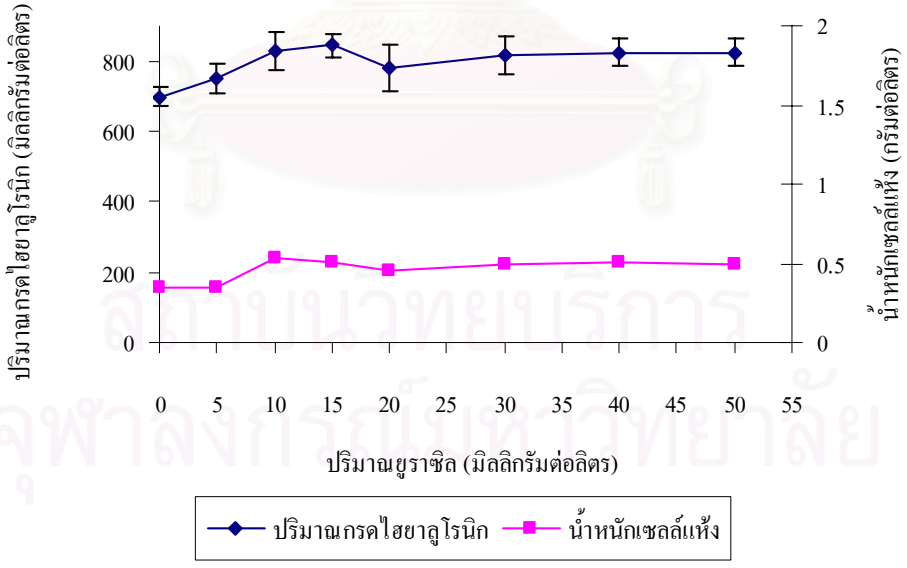
ยูราซิลเป็นสารประกอบที่มีความสำคัญในการทำหน้าที่เป็นส่วนประกอบของสารมัธยันตร์ซึ่งเกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก นั่นคือเป็นส่วนประกอบของ UTP ที่มีความจำเป็นต่อการสร้างสารตั้งต้นทั้งสองชนิดในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก คือ UDP-glucuronic acid และ UDP N-acetyl glucosamine นอกจากนั้นยังมีรายงานว่า ยูราซิลเป็นนิวคลีโอไทด์ชนิดหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องในกระบวนการเจริญเติบโตของเซลล์ และเมื่อมีการเติมยูราซิล 0.005 กรัมต่อลิตรลงไปในอาหารเหลวที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า สามารถเพิ่มอัตราการเจริญของเซลล์และเพิ่มปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ ถึง 32 และ 34 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Gao และคณะ, 2000) ในการทดลองนี้จะทำการเตรียมสารละลายูราซิลเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยกรองผ่านแผ่นกรองเซลลูโลสอะซีเตท จากนั้นแปรปริมาณของยูราซิล ตั้งแต่ 0 – 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเก็บตัวอย่างวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง และ ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.13 และ รูปที่ 4.13 พบว่า ยูราซิลมีผลต่อการเพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิก โดยเมื่อเติมยูราซิล 15 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นเท่ากับ 844 มิลลิกรัมต่อลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.13 ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ที่ผลิตโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอาหารเหลวที่มีซูโครส 3 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและแปรปริมาณของยูราซิลที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

ปริมาณยูราซิล (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก* (มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	698 ± 27	0.35
5	750 ± 42	0.34
10	829 ± 53	0.54
15	844 ± 33	0.51
20	782 ± 65	0.46
30	815 ± 59	0.50
40	825 ± 36	0.51
50	825 ± 36	0.49

หมายเหตุ : * ค่าที่ได้จากการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ



รูปที่ 4.13 แสดงปริมาณของยูราซิลที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับขวดเขย่า

4.2.3 การสรุปเปรียบเทียบปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกเมื่อเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่า

จากการเปรียบเทียบปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลเพิ่มการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการทดลองในข้อ 4.2.1 และ 4.2.2 ดังได้สรุปผลในตารางที่ 4.14 พบว่า กลูโคส-6-ฟอสเฟต ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ สามารถเพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิก เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารชุดควบคุมได้สูงสุด คือ ประมาณ 31 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ $MnSO_4.H_2O$ ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เพิ่มผลผลิตได้ดีรองลงมา คือ ประมาณ 27 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไพรูเวท, กลูตามีน, ยูราซิล และอาร์จินีนเพิ่มผลผลิตได้อยู่ในเกณฑ์ปานกลาง คือ ประมาณ 20 – 23 เปอร์เซนต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.14 สรุปเปรียบเทียบปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลเพิ่มการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกเมื่อเลี้ยง *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 ในขวดเขย่า

ชนิดและปริมาณสารเคมี ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)		ผลการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก ที่เพิ่มขึ้น (เปอร์เซ็นต์)
	ก่อนเติม	หลังเติม	
$FeSO_4 .7H_2O$ (15 มิลลิกรัมต่อลิตร)	619	690	11.53
$MnSO_4 .H_2O$ (10 มิลลิกรัมต่อลิตร)	690	881	27.57
$CoCl_2.6H_2O$ (10 มิลลิกรัมต่อลิตร)	643	702	9.25
ไพรูเวท (15 มิลลิกรัมต่อลิตร)	645	790	22.31
กลูโคส-6-ฟอสเฟต (5 ไมโครโมลาร์)	635	833	31.24
กลูตามีน (125 มิลลิกรัมต่อลิตร)	682	825	20.92
อาร์จินีน (150 มิลลิกรัมต่อลิตร)	627	772	23.07
ยูราซิล (15 มิลลิกรัมต่อลิตร)	698	844	20.78

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2.4 ผลของ $MnSO_4.H_2O$ ร่วมกับสารมัธยันตร์หรือสารตั้งต้นต่อการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกในระดับขวดเขย่า

การทดลองนี้ได้เลือก $MnSO_4.H_2O$ ซึ่งเป็นอิออนที่เพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับอิออนชนิดอื่นที่ทดสอบมาศึกษาร่วมกับสารมัธยันตร์ และสารตั้งต้นที่มีผลต่อการเพิ่มการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก ได้แก่ ไพรูเวท, กลูตามีน, อาร์จินีน, ยูราซิล และกลูโคส-6-ฟอสเฟต โดยแยกเติมสารประกอบเหล่านี้แต่ละชนิดที่ความเข้มข้นที่ได้จากการทดลองในข้อ 4.2.2 ร่วมกับ $MnSO_4.H_2O$ ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.15 และรูปที่ 4.14 พบว่า ไพรูเวทร่วมกับ $MnSO_4.H_2O$ สามารถเพิ่มผลผลิตได้สูงสุด คือ ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่กลูโคส-6-ฟอสเฟต เพิ่มผลผลิตได้ดีรองลงมา คือ ประมาณ 46 เปอร์เซนต์

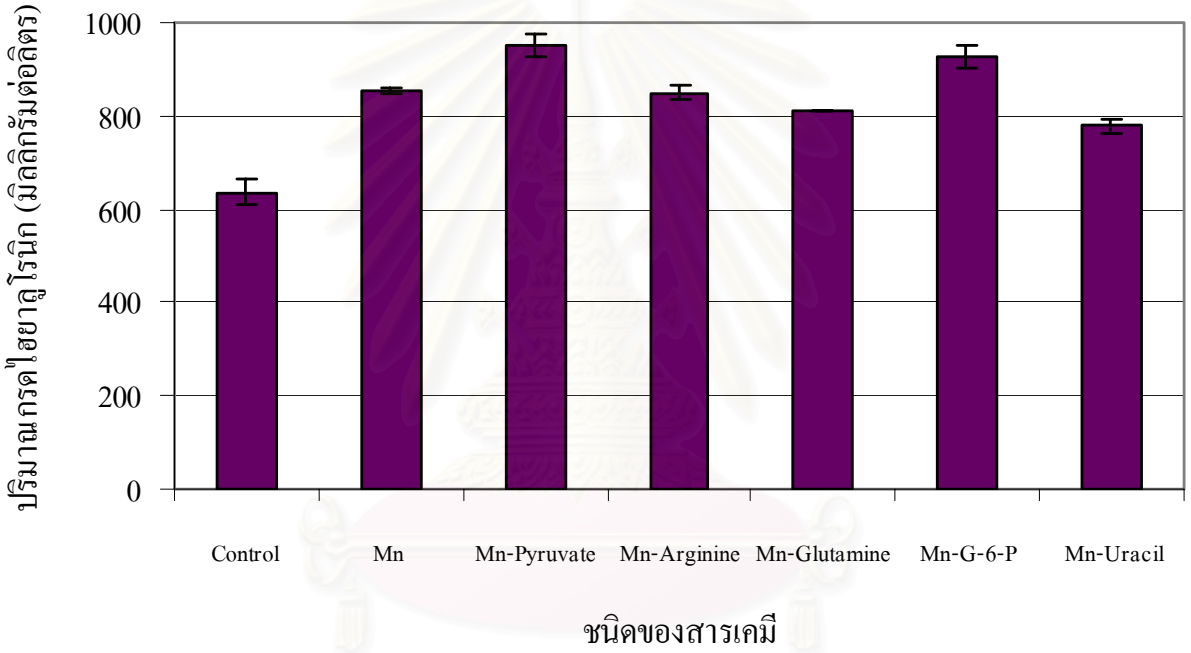
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.15 ผลของ $MnSO_4.H_2O$ ร่วมกับสารมัธยันตร์หรือสารตั้งต้นต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 ที่เลี้ยงในขวดเขย่า

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกที่เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (เปอร์เซ็นต์)
อาหารชุดควบคุม	635 ± 27	-
อาหารชุดควบคุม + แมงกานีส 10 มิลลิกรัมต่อลิตร	853 ± 6	34.35
อาหารชุดควบคุม + แมงกานีส 10 มิลลิกรัมต่อลิตร+ไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตร	952 ± 23	49.96
อาหารชุดควบคุม + แมงกานีส 10 มิลลิกรัมต่อลิตร+ อาร์จินีน 150 มิลลิกรัมต่อลิตร	849 ± 13	33.72
อาหารชุดควบคุม + แมงกานีส 10 มิลลิกรัมต่อลิตร+ กลูตามีน 125 มิลลิกรัมต่อลิตร	810 ± 0	27.48
อาหารชุดควบคุม + แมงกานีส 10 มิลลิกรัมต่อลิตร+ กลูโคส-6-ฟอสเฟต 5 มิลลิโมลาร์	929 ± 13	46.22
อาหารชุดควบคุม + แมงกานีส 10 มิลลิกรัมต่อลิตร+ ยูราซิล 15 มิลลิกรัมต่อลิตร	778 ± 23	22.48

หมายเหตุ : อาหารชุดควบคุม คือ สูตรอาหารเดิมดังแสดงในภาคผนวก ง-2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.14 ผลของ $MnSO_4.H_2O$ ร่วมกับสารมัธยันตร์หรือสารตั้งต้นต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 ที่เลี้ยงในขวดเขย่า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

จากผลการทดลองในข้อ 4.2.1 พบว่า $MnSO_4.H_2O$ เป็นอิออนที่เพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้สูงสุด ขณะที่การทดลองในข้อ 4.2.4 เกี่ยวกับผลการเติมร่วมกันระหว่าง $MnSO_4.H_2O$ กับสารมัธยันตร์ หรือสารตั้งต้น ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก พบว่า ไพรูเวทให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นสูงสุด และรองลงมา คือ กลูโคส-6-ฟอสเฟต แต่เนื่องจากกลูโคส-6-ฟอสเฟตมีราคาที่แพงกว่ามาก ดังนั้นในการศึกษาระดับถังหมักจึงเลือกใช้ $MnSO_4.H_2O$ และไพรูเวทมาศึกษาผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3.1 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที

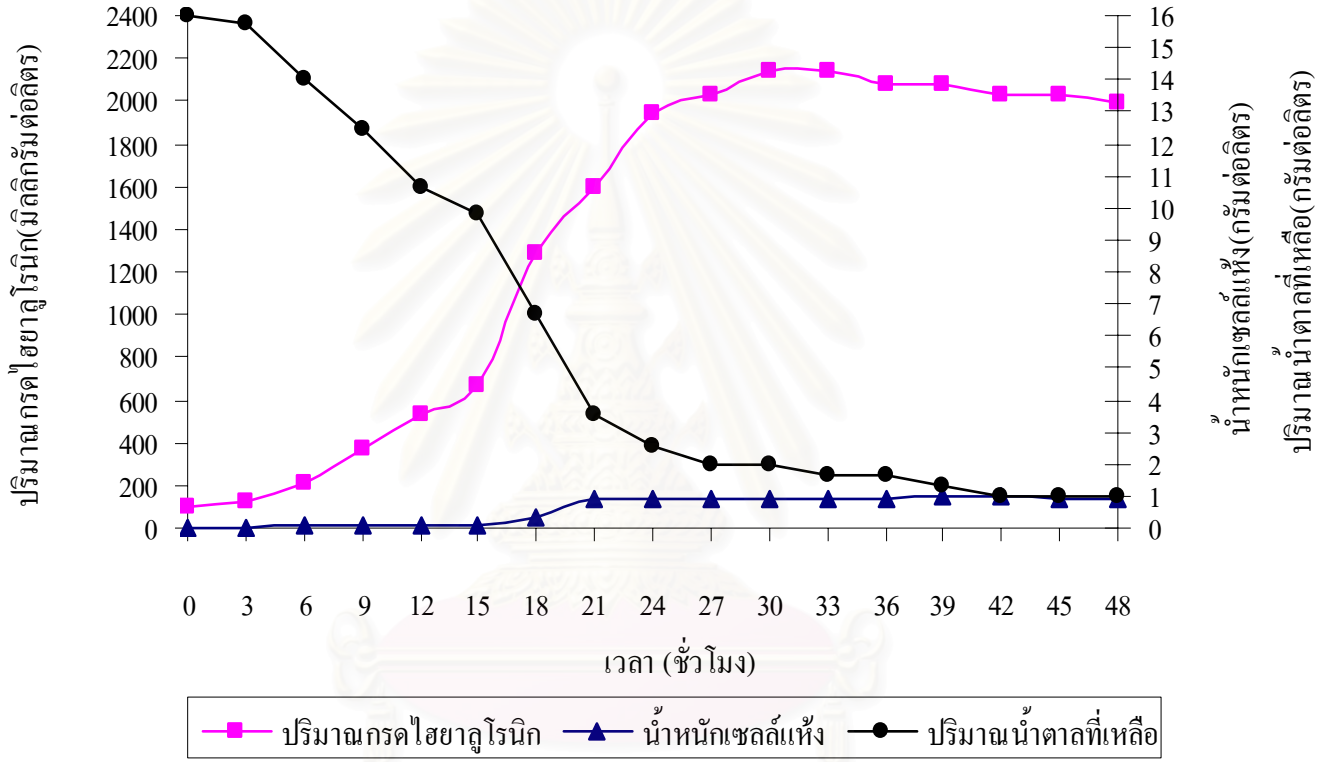
การทดลองนี้จะทำการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้สูตรอาหารเดิมที่รายงานโดย อณุมาศ บัวเขียว (2544) (ภาคผนวก ง-3) รวมทั้งภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ระบุว่าเหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิก เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการเปรียบเทียบกับปัจจัยต่าง ๆ ที่จะทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไปนี้ โดยทำการทดลองตามวิธีการในข้อ 3.4.1 และ 3.4.3 โดยมีระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เก็บสารละลายตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง วิเคราะห์หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ภายในถังหมัก ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.16 และ รูปที่ 4.15 พบว่า เชื้อจะผลิตกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเจริญในระยะทวีคูณ และเมื่อเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกจะเริ่มคงที่ และจะได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงสุดที่เวลา 30 ชั่วโมง เท่ากับ 2,144 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยในช่วงเวลานี้น้ำหมักที่ได้จะมีความหนืดมากกว่าช่วงเวลาอื่น ส่วนปริมาณน้ำตาลในอาหารจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเชื้อเข้าสู่การเจริญทวีคูณและเมื่อเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่น้ำตาลจะถูกใช้น้อยลง เนื่องจากอัตราการเจริญของเซลล์ลดลง และมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก เท่ากับ 1.0 กรัมต่อลิตร ในส่วนของน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงในระดับถังหมัก 5 ลิตรจะให้การเจริญของเซลล์สูงกว่าในระดับขวดเขย่า โดยจะให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุดเท่ากับ 0.96 กรัมต่อลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.16 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
0	0.02	100	15.97	6.97
3	0.03	129	15.72	6.96
6	0.05	208	13.99	6.96
9	0.06	370	12.45	6.96
12	0.07	532	10.65	6.96
15	0.08	667	9.8	6.95
18	0.29	1,281	6.7	6.95
21	0.87	1,600	3.56	6.95
24	0.89	1,939	2.54	6.95
27	0.90	2,025	2.0	6.95
30	0.90	2,144	1.96	6.98
33	0.92	2,144	1.66	6.98
36	0.92	2,084	1.66	6.99
39	0.95	2,084	1.33	7.04
42	0.96	2,025	1.0	7.02
45	0.92	2,025	1.0	7.23
48	0.91	1,995	1.0	7.37

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.15 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมงเมื่อใช้ความเข้มข้น ของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3.2 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที โดยมีการเติมแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

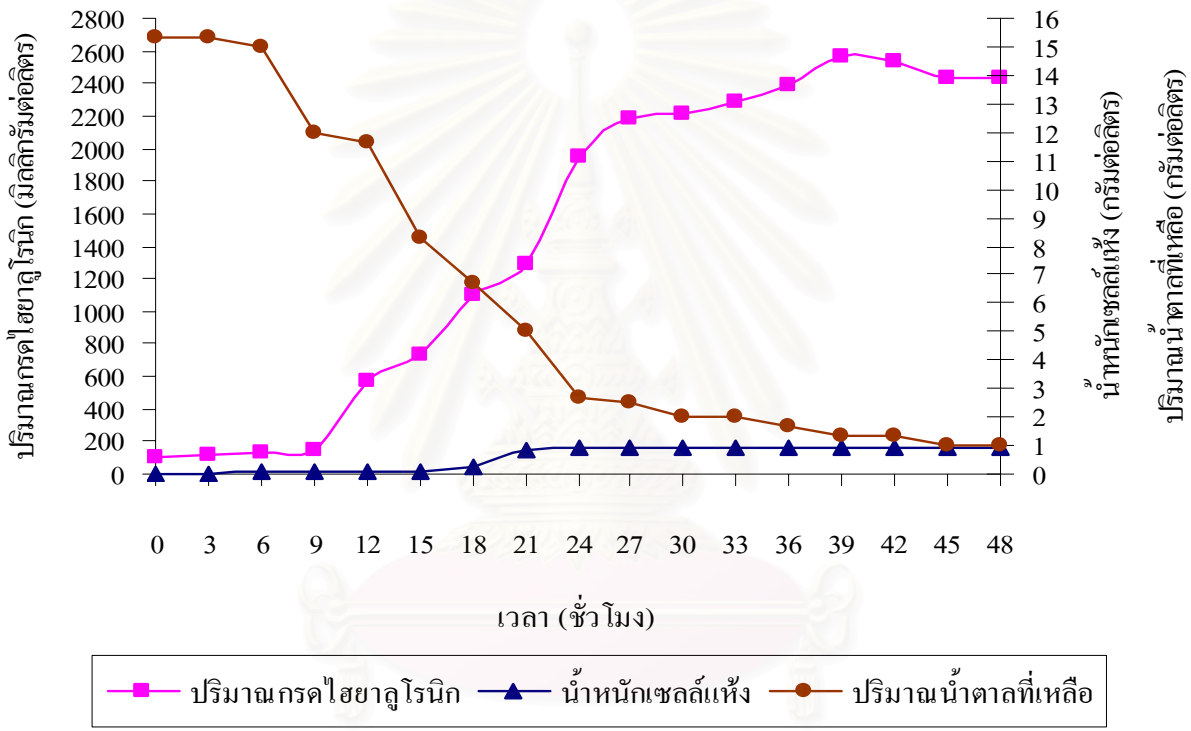
จากผลการทดลองในระดับขวดเขย่าในข้อ 4.2.1.2 ในรูปที่ 4.5 พบว่าเมื่อเติมแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจะสามารถเพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้สูงสุด ในการทดลองนี้จึงเป็นการทดสอบเพื่อยืนยันผลของแมงกานีสที่ความเข้มข้นดังกล่าวต่อการเพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกเมื่อทำการทดลองผลิตในระดับถังหมัก 5 ลิตร จากผลการทดลองพบว่าเมื่อทำการหมักเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง และทำการเก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมักได้ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 4.17 และรูปที่ 4.16 พบว่า การเติมแมงกานีส 10 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้มีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 2,572 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ภายหลังการหมักเท่ากับ 1.0 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 48 และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับการทดลองข้อ 4.3.1 ที่ได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงสุดเท่ากับ 2,144 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าแมงกานีสสามารถเพิ่มผลการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้ในระดับถังหมัก 5 ลิตรสอดคล้องกับการทดลองในระดับขวดเขย่า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.17 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที โดยมีการเติม $MnSO_4.H_2O$ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
0	0.02	100	15.33	6.97
3	0.03	119	15.33	6.95
6	0.05	135	15.0	6.95
9	0.06	150	12.0	6.96
12	0.07	571	11.66	6.96
15	0.08	738	8.33	6.95
18	0.29	1,095	6.66	6.91
21	0.87	1,286	5.0	6.95
24	0.89	1,953	2.67	6.91
27	0.9	2,191	2.5	6.95
30	0.9	2,215	2.0	7.37
33	0.92	2,287	2.0	7.67
36	0.92	2,394	1.66	7.67
39	0.95	2,572	1.33	7.88
42	0.93	2,537	1.33	8.17
45	0.92	2,430	1.0	8.22
48	0.93	2,430	1.0	8.22

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.16 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที โดยมีการเติม $MnSO_4.H_2O$ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3.3 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที โดยมีการเติมไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตร

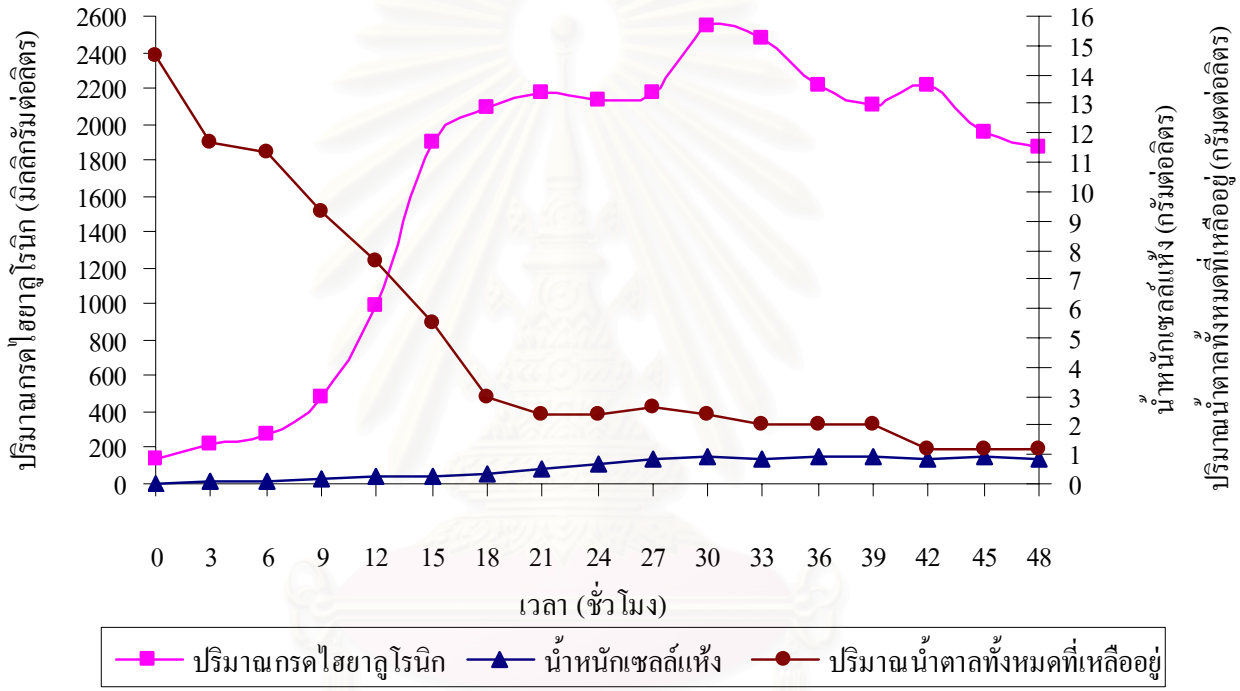
จากผลการทดลองในขวดเขย่าในข้อ 4.2.2.1 ในรูปที่ 4.8 พบว่าเมื่อเติมไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตรลงไปในอาหารสูตรปกติจะสามารถเพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้สูงสุด ในการทดลองนี้จึงเป็นการทดสอบเพื่อยืนยันผลของไพรูเวทต่อการเพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกเมื่อทำการทดลองในระดับถังหมัก 5 ลิตร จากผลการทดลองพบว่าเมื่อทำการหมักเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง และทำการเก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่4.18 และรูปที่ 4.17 พบว่า การเติมไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้มีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 2,541 มิลลิกรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 30 นอกจากนั้นเชื้อยังสามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้เร็วขึ้น และเข้าสู่ระยะการผลิตสูงสุดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 15 เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองชุดควบคุม ในข้อ 4.3.1 ที่เชื้อเข้าสู่ระยะการผลิตสูงสุดที่ชั่วโมง 24 มีปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ภายหลังการหมักเท่ากับ 1.16 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 48 เมื่อทำการเปรียบเทียบกับผลการทดลองในข้อ 4.3.1 ที่ได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงสุดเท่ากับ 2,144 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าไพรูเวทสามารถเพิ่มผลการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้ในระดับถังหมัก 5 ลิตร ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในระดับขวดเขย่าจึงได้ทำการศึกษาต่อไปถึงผลของปัจจัยร่วมระหว่าง $MnSO_4.H_2O$ กับไพรูเวทที่มีต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกเมื่อเลี้ยงในระดับถังหมัก 5 ลิตรต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.18 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที โดยมีการเติมไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
0	0.03	132	14.66	6.99
3	0.05	225	11.66	6.96
6	0.09	272	11.33	6.96
9	0.16	480	9.33	6.95
12	0.22	993	7.66	6.93
15	0.29	1,901	5.5	6.90
18	0.31	2,093	3.0	6.89
21	0.54	2,169	2.33	7.36
24	0.68	2,134	2.33	7.76
27	0.87	2,169	2.66	7.98
30	0.89	2,541	2.33	8.09
33	0.87	2,484	2.0	7.80
36	0.9	2,221	2.0	8.12
39	0.92	2,111	2.0	8.36
42	0.88	2,221	1.16	8.45
45	0.89	1,959	1.16	8.39
48	0.87	1,872	1.16	8.38

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.17 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที โดยมีการเติมไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3.4 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที โดยมีการเติมแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตร

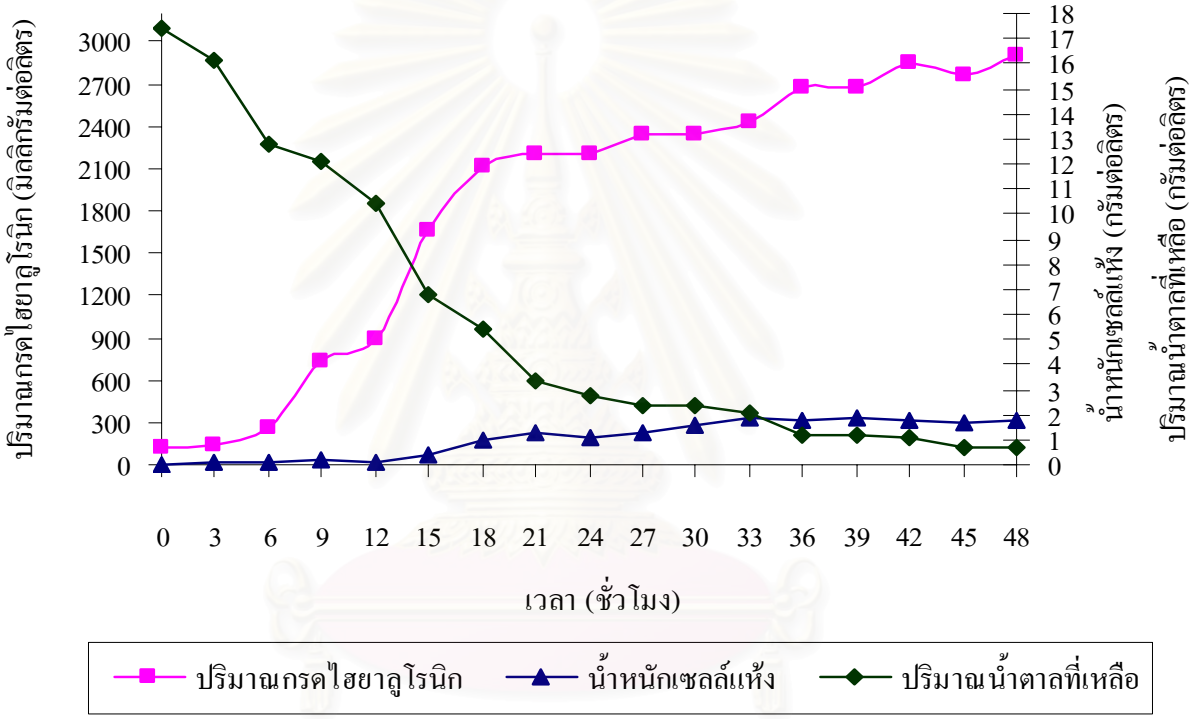
จากผลการทดลองในขวดเขย่าในข้อ 4.2.4 พบว่า การเติมแมงกานีสร่วมกับไพรูเวทในปริมาณที่เหมาะสม จะมีผลทำให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ มีปริมาณเพิ่มขึ้น และเพิ่มมากกว่าการเติมปัจจัยเหล่านั้นเดี่ยว ๆ ดังนั้นการทดลองนี้จึงศึกษาผลของการเติมปัจจัยทั้งสองร่วมกันต่อการเพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิก ในระดับถังหมัก 5 ลิตร จากการทดลองเมื่อทำการหมักเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง และทำการเก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.19 รูปที่ 4.18 พบว่า ที่ชั่วโมงที่ 48 จะได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงสุด เท่ากับ 2,903 มิลลิกรัมต่อลิตร และเชื้อจะเจริญเข้าสู่ระยะการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูงสุดเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 15 สอดคล้องกับผลการทดลองข้อ 4.3.4 ที่เชื้อจะสามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้เร็วขึ้น โดยมีปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ภายหลังการหมักเท่ากับ 0.72 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 48 และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับผลการทดลองในข้อ 4.3.2 และ 4.3.3 พบว่าการเติมแมงกานีส 10 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีผลทำให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้มีปริมาณเพิ่มขึ้นจาก 2,572 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,541 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งเป็นการเติมปัจจัยเหล่านั้นเดี่ยว ๆ ตามลำดับ เป็น 2,903 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 48 ผลของการเติมแมงกานีสร่วมกับไพรูเวทจะเพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้สูงที่สุด สอดคล้องกับการทดลองในข้อ 4.2.4 เมื่อทำการทดลองในภาวะขวดเขย่า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.19 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที โดยมีการเติม $MnSO_4.H_2O$ 10 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
0	0.04	126	17.44	7.22
3	0.08	132	16.11	7.06
6	0.09	256	12.78	6.95
9	0.19	730	12.11	6.96
12	0.11	900	10.44	6.92
15	0.35	1,660	6.78	6.90
18	0.99	2,112	5.44	6.84
21	1.3	2,205	3.39	6.91
24	1.13	2,205	2.72	7.39
27	1.3	2,340	2.39	7.65
30	1.56	2,342	2.39	8.02
33	1.89	2,438	2.05	8.06
36	1.75	2,670	1.22	8.69
39	1.86	2,670	1.22	8.73
42	1.81	2,856	1.05	8.73
45	1.71	2,763	0.72	8.52
48	1.79	2,903	0.72	8.38

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.18 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที โดยมีการเติม $MnSO_4.H_2O$ 10 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3.5 การสรุปเปรียบเทียบผลของแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรตและไพรูเวทต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิ กในระดับถังหมัก 5 ลิตร

จากการเปรียบเทียบปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลเพิ่มการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก จากการทดลองในข้อ 4.3.1, 4.3.2, 4.3.3 และ 4.3.4 ดังสรุปผลในตารางที่ 4.20 พบว่า การเติมไพรูเวทร่วมกับแมงกานีสสามารถเพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมักได้สูงสุด คือ ประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การเติมแมงกานีสเพียงอย่างเดียว เพิ่มผลผลิตได้ดีรองลงมา คือ ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการเติมไพรูเวทเพียงอย่างเดียว เพิ่มผลผลิตได้ประมาณ 19 เปอร์เซ็นต์

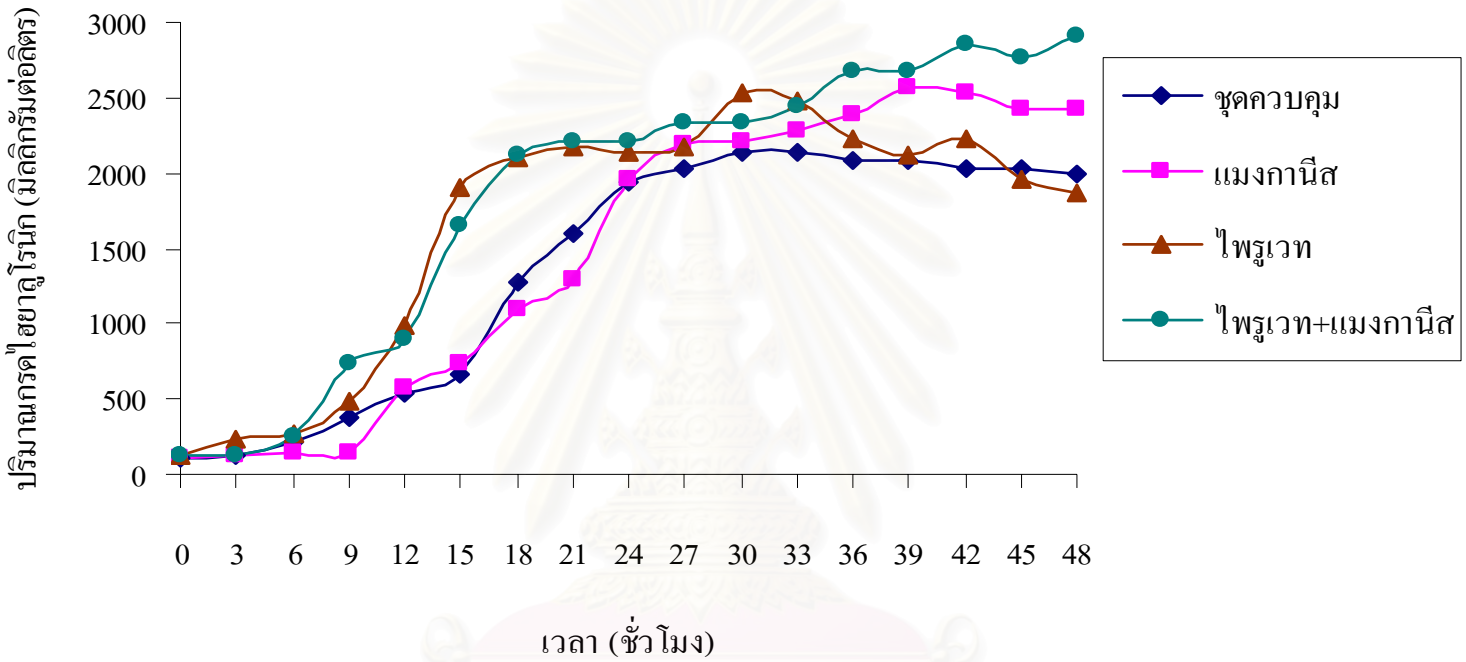
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.20 สรุปเปรียบเทียบผลของแมงกานีสซัลเฟโมโนไฮเดรตและไพรูเวทต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 ที่เลี้ยงในระดับถังหมัก 5 ลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกที่เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (เปอร์เซ็นต์)
อาหารชุดควบคุม	2,144	-
อาหารชุดควบคุม + แมงกานีส 10 มิลลิกรัมต่อลิตร	2,572	19.96
อาหารชุดควบคุม + ไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตร	2,541	18.51
อาหารชุดควบคุม + แมงกานีส 10 มิลลิกรัมต่อลิตร+ ไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตร	2,903	35.40

หมายเหตุ : อาหารชุดควบคุม คือ สูตรอาหารเดิมดังแสดงในภาคผนวก ง-3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.19 สรุปเปรียบเทียบผลของแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรตและไพรูเวทต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 ที่เลี้ยงในระดับถังหมัก 5 ลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

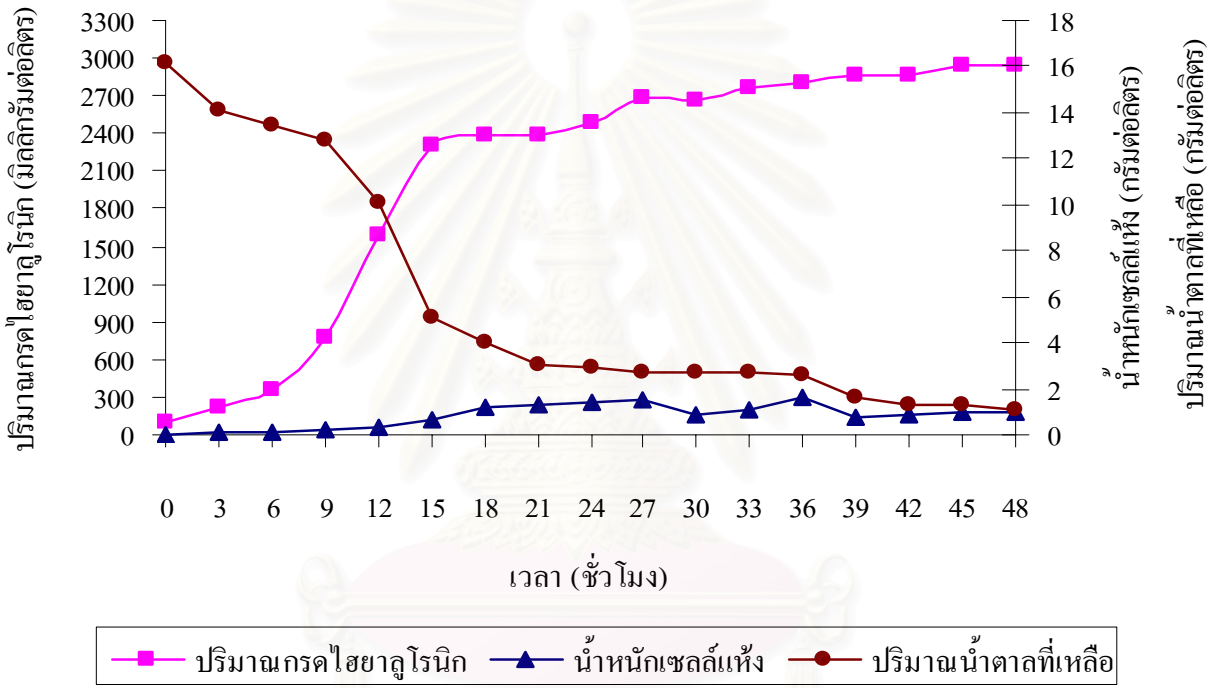
4.3.6 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 400 รอบต่อนาที โดยมีการเติมแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตร

การทดลองนี้จะศึกษาผลของความเร็วรอบในการกวนต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก โดยในผลการทดลองในข้อ 4.3.5 พบว่าการเติมแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตรจะสามารถเพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมัก 5 ลิตร ได้สูงที่สุดเท่ากับ 2,903 มิลลิกรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 48 ซึ่งในการทดลองนี้ใช้อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 300 รอบต่อนาที ซึ่งอณุมาศ บัวเขียว (2544) รายงานว่าเหมาะสมที่สุด แต่เนื่องจากมีการรายงานว่า การเพิ่มอัตราการให้อากาศ และเพิ่มความเร็วรอบในการกวนจะมีผลทำให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกและน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มขึ้น (Johns และคณะ, 1994) แต่เนื่องจากในถังหมักขนาด 5 ลิตรไม่สามารถเพิ่มอัตราการให้อากาศที่สูงกว่า 1.5 vvm ได้ ในการทดลองนี้จึงได้ทำการทดลองแปรความเร็วในการกวนเพิ่มขึ้นเพียงอย่างเดียว คือ 400 รอบต่อนาที โดยทำการหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บสารละลายตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.20 และรูปที่ 4.19 พบว่า การเพิ่มความเร็วในการกวนเป็น 400 รอบต่อนาที จะได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับเมื่อใช้ความเร็วรอบในการกวนเท่ากับ 300 รอบต่อนาที คือ มีค่าสูงสุดเท่ากับ 2,949 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมักเท่ากับ 1.05 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 48 และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับผลการทดลองในข้อ 4.3.5 ที่ใช้ความเร็วในการกวน 300 รอบต่อนาที พบว่าการเพิ่มความเร็วรอบในการกวนจาก 300 เป็น 400 รอบต่อนาที ทำให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าสามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้เร็วขึ้น นั่นอาจเป็นเพราะความเร็วในการกวนที่เพิ่มขึ้น ทำให้การส่งผ่านสารอาหาร และอากาศเกิดได้ดีขึ้น เชื้อจึงเจริญและใช้สารอาหารได้มากขึ้น ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงได้แปรความเร็วรอบในกวนกวนเพิ่มขึ้นเป็น 500 รอบต่อนาที

ตารางที่ 4.21 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 400 รอบต่อนาที โดยมีการเติม $MnSO_4.H_2O$ 10 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
0	0.03	102	16.11	7.02
3	0.07	219	14.11	7.38
6	0.08	358	13.44	7.22
9	0.27	777	12.78	7.23
12	0.36	1,586	10.11	6.86
15	0.69	2,298	5.11	6.91
18	1.18	2,391	4.05	6.95
21	1.28	2,391	3.05	7.30
24	1.39	2,484	2.89	7.65
27	1.54	2,684	2.72	7.65
30	0.84	2,670	2.72	7.83
33	1.11	2,763	2.72	7.73
36	1.60	2,810	2.55	7.94
39	0.72	2,856	1.61	7.99
42	0.92	2,856	1.27	7.97
45	0.99	2,949	1.27	8.02
48	0.94	2,949	1.05	8.03

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.20 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 400 รอบต่อนาที โดยมีการเติม $MnSO_4 .H_2O$10 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.3.7 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 500 รอบต่อนาที โดยมีการเติมแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตร

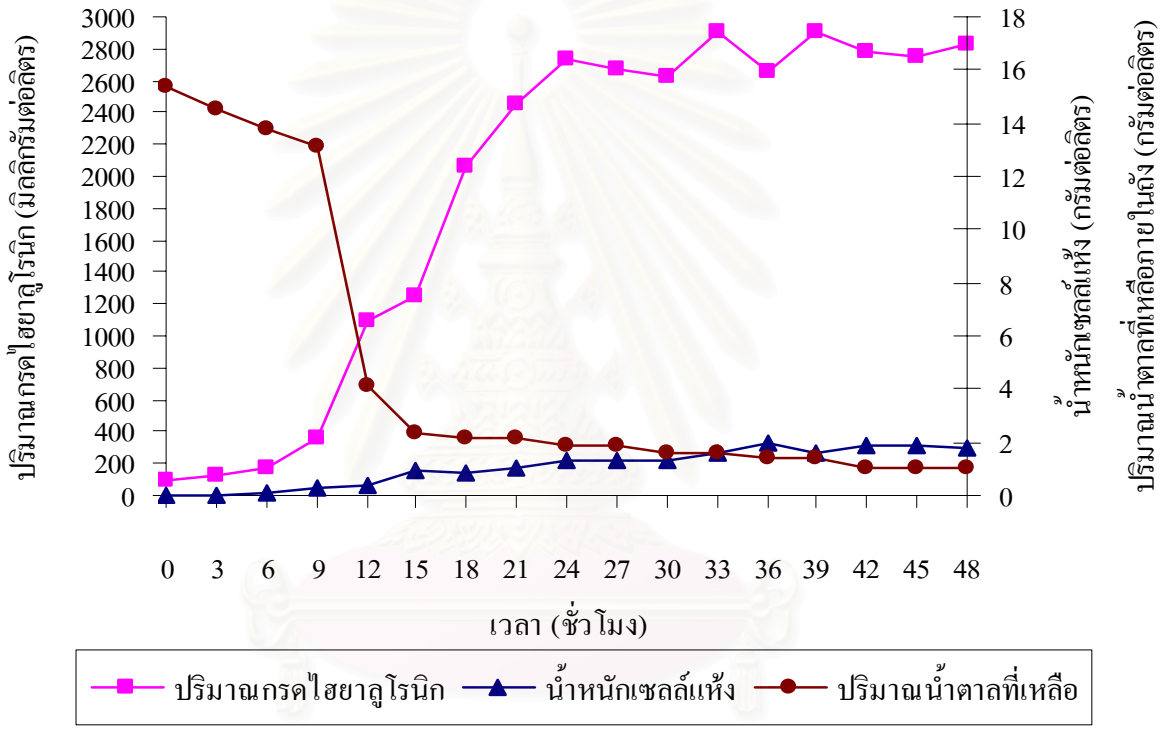
จากผลการทดลองในข้อ 4.3.5 พบว่า การเพิ่มความเร็วรอบในการกวนเป็น 400 รอบต่อนาที จะมีผลต่อปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นเล็กน้อย คือ มีค่าใกล้เคียงกับการใช้ความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที แต่จะมีผลทำให้เชื้อผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้เร็วและเข้าสู่ระยะการผลิตสูงสุดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ซึ่งเร็วขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ความเร็วรอบเป็น 300 รอบต่อนาที จึงได้ทำการทดลองต่อไป โดยเพิ่มความเร็วรอบในการกวนเป็น 500 รอบต่อนาที โดยมีช่วงระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เก็บสารละลายตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.21 และ รูปที่ 4.20 พบว่า การเพิ่มความเร็วรอบในการกวนเป็น 500 รอบต่อนาที จะไม่มีผลทำให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้มีปริมาณเพิ่มขึ้น คือ มีค่าสูงสุดเท่ากับ 2,903 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่ากับการใช้ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที และมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมักเท่ากับ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 48

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.22 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 500 รอบต่อนาที โดยมีการเติม $MnSO_4.H_2O$ 10 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
0	0.02	97	15.33	6.88
3	0.03	132	14.55	6.96
6	0.10	167	13.78	6.96
9	0.29	365	13.11	6.95
12	0.36	1,097	4.11	6.71
15	0.97	1,249	2.39	7.30
18	0.89	2,056	2.11	7.78
21	1.06	2,450	2.11	8.05
24	1.33	2,730	1.89	8.21
27	1.32	2,670	1.89	8.36
30	1.34	2,624	1.55	8.46
33	1.60	2,903	1.55	8.38
36	2.01	2,662	1.44	8.31
39	1.60	2,903	1.39	8.37
42	1.90	2,784	1.00	8.32
45	1.87	2,743	1.00	8.17
48	1.80	2,825	1.00	8.09

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



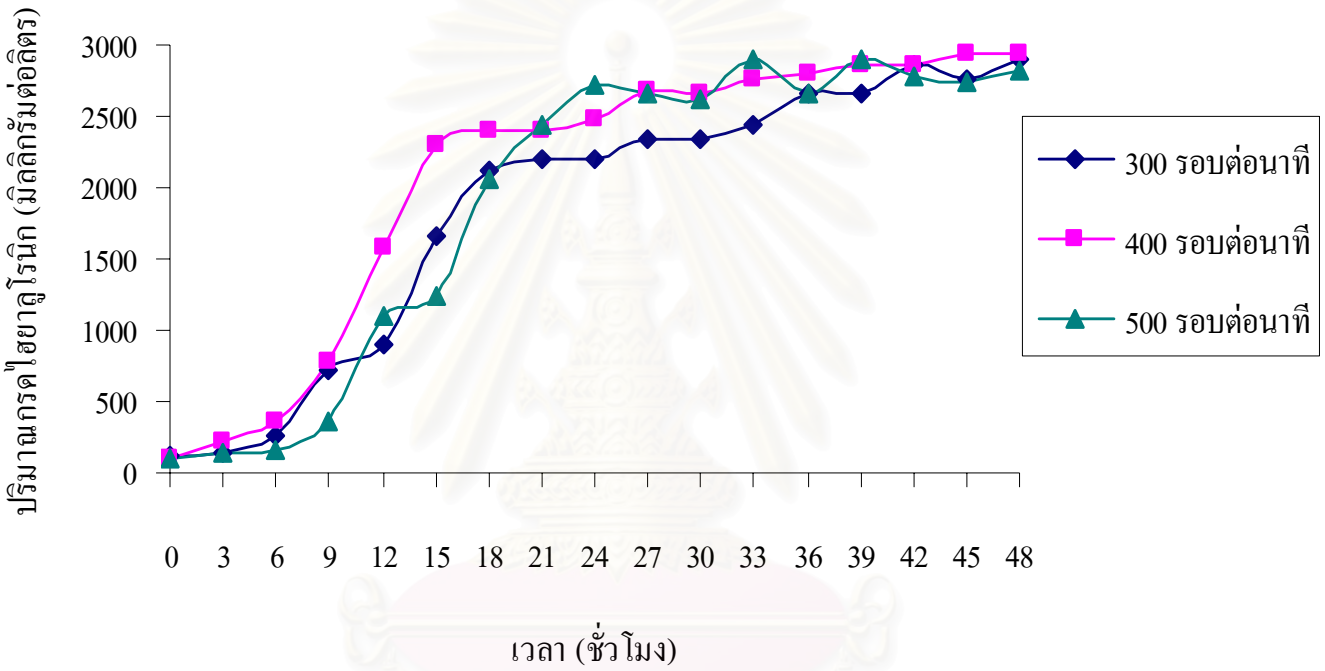
รูปที่ 4.21 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 500 รอบต่อนาที โดยมีการเติม $MnSO_4.H_2O$ 10 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3.8 การสรุปเปรียบเทียบผลของความเร็วรอบในการกวนต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมัก 5 ลิตร โดยมีการเติมแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากการเปรียบเทียบผลของความเร็วรอบในการกวนต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการทดลองในข้อ 4.3.4, 4.3.5 และ 4.3.5 พบว่า การเพิ่มความเร็วรอบในการกวนจาก 300 รอบต่อนาทีเป็น 400 และ 500 รอบต่อนาที จะได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ใกล้เคียงกัน คือเท่ากับ 2,903, 2,949 และ 2,903 ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่าความเร็วรอบในการกวนไม่มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิก แต่จะมีผลต่ออัตราการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก โดยที่ความเร็วรอบในการกวน 400 รอบต่อนาทีจะให้อัตราการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูงที่สุด และที่ความเร็วรอบในการกวน 300 และ 500 รอบต่อนาทีจะให้อัตราการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกที่ใกล้เคียงกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.22 สรุปเปรียบเทียบผลของความเร็วรอบในการกวนต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิ กใน ระดับถังหมัก 5 ลิตร โดยมีการเติมแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก โดย *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์มาจาก *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ ATCC 35247 โดยทรงศักดิ์ พันธุ์วัฒนะสิงห์ (2540) ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้สูง และไม่มีการผลิตเสตรปโตไลซิน ซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง และเนื่องจากการเจริญของเชื้อในกลุ่ม Streptococci ต้องการอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะที่มีความเหมาะสม ดังนั้นก่อนนำเชื้อดังกล่าวมาใช้ในงานวิจัยจึงต้องทดสอบการเจริญของเชื้อในอาหาร Brain heart infusion (BHI) ที่มีรายงานว่ามีความเหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกและสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ดีที่สุด เพื่อใช้ในการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น และจากผลการทดสอบรูปแบบการเจริญของเชื้อ *S.zooepidemicus* UN-7 ในอาหาร BHI พบว่าหัวเชื้อที่มีอายุ 7 ชั่วโมงจะมีความเหมาะสมในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก ทั้งนี้เนื่องจากที่อายุหัวเชื้อ 7 ชั่วโมงเป็นช่วงการเจริญทวีคูณ เซลล์มีกิจกรรมสูงและผ่านช่วงการเจริญเพื่อปรับตัวแล้ว ดังนั้นเมื่อถ่ายเชื้อลงสู่อาหารสูตรสำหรับผลิตกรดไฮยาลูโรนิกแล้วจึงสามารถเจริญและผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้อย่างรวดเร็ว โดยใช้การเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่าเพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิกตามที่รายงานไว้โดย อณุมาศ บัวเขียว (2544) คือ น้ำตาลซูโครส 3 กรัมต่อลิตร ความเร็วรอบในการเขย่า 300 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองพบว่าเชื้อมีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกควบคู่ไปกับการเจริญระยะทวีคูณ โดยที่ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้จะเริ่มคงที่เมื่อการเจริญคงที่ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ไปจนถึงชั่วโมงที่ 48 โดยมีปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงสุดที่ชั่วโมง 36 เท่ากับ 714 มิลลิกรัมต่อลิตร และเพื่อความสะดวกและรวดเร็ว จึงได้เลือกเวลาการเก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 24 ที่มีปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก เท่ากับ 690 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากเป็นช่วงระยะเวลาที่ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกผลิตอย่างคงที่และให้ปริมาณสูงสุดใกล้เคียงกันสำหรับการทดสอบปัจจัยอื่น ๆ ที่มีต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกใน ระดับขวดเขย่าในการทดลองขั้นต่อไป

ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกนอกจากปัจจัยทางกายภาพแล้ว ปัจจัยอื่น ๆ ก็ยังอาจมีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดย *S.zooepidemicus* UN-7 อาทิเช่น อิออน หรือสารประกอบที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์, สารตั้งต้น และสารมัธยันตร์ที่เกี่ยวข้องกับวิถีเมตาบอลิซึมของการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก โดยปัจจัยที่ทำการศึกษาจะแบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ ประเภทแรก ได้แก่ ชนิดของอิออนที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ ในวิถีเมตาบอลิซึม เช่น แมงกานีส, โคบอลต์, สังกะสี, เหล็ก และ ประเภทที่สอง ได้แก่ สารตั้งต้น

หรือ สารมัธยันตร์ที่เกี่ยวข้องในวิถีการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก เช่น กลูโคส-6-ฟอสเฟต, ฟรักโทส-6-ฟอสเฟต, ไพรูเวท, กลูตามีน, อาร์จินีน และยูราซิล

จากการศึกษาผลของอิออนชนิดต่าง ๆ พบว่า แมงกานีส,โคบอลต์ และเหล็ก สามารถเพิ่มการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้ โดยพบว่าแมงกานีสสามารถเพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารชุดควบคุมได้สูงสุด คือ ประมาณ 28 เปอร์เซ็นต์ ส่วนโคบอลต์ และ เหล็ก เพิ่มผลผลิตได้เล็กน้อย คือ ประมาณ 9 และ 11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งผลของแมงกานีสอิออนที่เพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้สอดคล้องกับการรายงานของ DeAngelis ในปี 1996 ที่พบว่าการทำงานของเอนไซม์ hyaluronic acid synthase ในการเร่งปฏิกิริยาการนำ UDP-glucuronic acid และ UDP-N-acetyl glucosamine มาสร้างกรดไฮยาลูโรนิกโพลีเมอร์ จำเป็นต้องใช้แร่ธาตุโลหะที่มีประจุ 2^+ (divalent metal ion) เช่น Mg^{2+} หรือ Mn^{2+} เข้าร่วมด้วยในปฏิกิริยา ซึ่งจะทำให้การจับกันของสารตั้งต้น และเอนไซม์ มีประสิทธิภาพมากขึ้น และช่วยให้การทำงานของเอนไซม์มีความเสถียร และนอกจากนั้น Stoolmiller และ Dorfman ในปี 1969 ยังได้รายงานว่าเอนไซม์ hyaluronic acid synthase จะไม่สามารถทำงานได้ ถ้าไม่มีธาตุโลหะที่มีประจุ 2^+ เช่น Mn^{2+} หรือ Mg^2 โดยพบว่า Mn^{2+} ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ จะสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ได้ดีกว่า Mg^{2+} ที่ความเข้มข้นเดียวกัน แต่ถ้ามีการเติมในปริมาณที่มากเกินพอ แมงกานีสอิออนจะมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้มากกว่าแมกนีเซียมอิออน ดังนั้นการเติมแมงกานีสอิออนจึงต้องใช้ในปริมาณที่เหมาะสม จากผลการทดลองพบว่าแมงกานีสอิออนที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรจะให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม และเมื่อความเข้มข้นของแมงกานีสอิออนเพิ่มขึ้นจะมีผลให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้เริ่มลดลง ในส่วนของโคบอลท์ และเหล็กมีผลต่อการเพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกเล็กน้อย เมื่อเติมในความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นสูงขึ้นอิออนทั้งสองชนิดจะทำให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกลดลง โดยโคบอลท์จะทำให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกลดลงมากกว่าเหล็ก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมีรายงานว่าโคบอลท์เป็นอิออนที่ส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ lactate dehydrogenase (Hardman และ Pritchard, 1987) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า โคบอลท์มีส่วนเร่งกิจกรรมของเอนไซม์บางชนิดในการสร้างกรดไฮยาลูโรนิก ขณะเดียวกันที่ปริมาณหนึ่งยังมีส่วนเร่งการทำงานของ lactate dehydrgenase ในการเปลี่ยนไพรูเวทให้เป็นแลกเตท มีผลให้ พลังงานที่ได้ลดลง การสร้างกรดไฮยาลูโรนิกจึงลดลง ในส่วนของเหล็กมีรายงานของ Asanuma และ Hino ในปี 2002 พบว่าเหล็กจำเป็นต่อการทำงานของ pyruvate formate lyase activating enzyme (PFL-AE) ซึ่งจะทำให้ pyruvate formate lyase เปลี่ยนรูปจาก inactive form ไปเป็น active form ทำหน้าที่ในการสร้าง acetyl CoA และ ฟอร์เมท จากไพรูเวท ซึ่งการสร้าง acetyl CoA ที่เพิ่มขึ้นจะ

ส่งผลให้พลังงานเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเติมในปริมาณมากเกินพอจะไม่เพิ่มการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความจำกัดของปริมาณไพรูเวท

สำหรับการเติมสังกะสีอิออน พบว่ามีผลทำให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกลดลง จากการรายงานของ Phan และคณะ ในปี 2004 พบว่าการทำงานของสังกะสีอิออนจะไปมีส่วนทำให้ความสามารถในการต้านทานกรดของเชื้อ *Streptococcus mutans* ลดลงโดยไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ F_0F_1-ATPase ในเมมเบรนทำให้มีการถ่ายเทโปรตอนเข้าสู่เซลล์เพิ่มขึ้น นอกจากนั้นยังพบว่าปฏิกิริยา Phosphotransferase system (PTS) จะไวต่อการยับยั้งด้วยสังกะสี เนื่องจากสังกะสีอิออนจะเข้าแทนที่การจับของอิออนบวก เช่น แมกนีเซียม ที่มีความจำเป็นกับการทำงานของเอนไซม์นี้รวมทั้ง glycolytic enzyme บางชนิดเช่น pyruvate kinase, aldolase และ glyceraldehydes-3-P dehydrogenase ที่พบใน *S.sorbinus* ก็จะถูกยับยั้งด้วยสังกะสีอิออนเช่นกัน ซึ่งในส่วนของเอนไซม์ pyruvate kinase เมื่อการทำงานถูกยับยั้งจะส่งผลให้ปริมาณไพรูเวทภายในเซลล์ลดลง (Scheie และคณะ, 1988)

จากการศึกษาผลของปัจจัยที่เป็นสารตั้งต้น และ สารมัธยันตร์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องในวิถีเมตาบอลิซึม และกลไกในการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก พบว่า ไพรูเวท, กลูโคส-6-ฟอสเฟต, กลูตามีน, อาร์จินีน และยูราซิล สามารถเพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้ โดยพบว่า กลูโคส-6-ฟอสเฟต ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ สามารถเพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิก เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารชุดควบคุมได้สูงสุดคือ ประมาณ 31 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไพรูเวท, กลูตามีน, ยูราซิล และอาร์จินีน เพิ่มผลผลิตได้อยู่ในเกณฑ์ปานกลาง คือ ประมาณ 20 – 23 เปอร์เซ็นต์ และพบว่า ฟรักโทส-6-ฟอสเฟต จะไม่มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิก แต่จะทำให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองชุดควบคุม

จากการที่ กลูโคส-6-ฟอสเฟต สามารถเพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิก เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ได้ถึงประมาณ 31 เปอร์เซนต์นั้นความสำคัญของกลูโคส-6-ฟอสเฟตต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก แสดงดังรูปที่ 2.3 พบว่ากลูโคส-6-ฟอสเฟต จะเป็นสารตัวกลางสำหรับการผลิตสารหลายชนิดใน pathway ต่าง ๆ ของเซลล์ เช่น การสร้างกรดอะมิโน และนิวคลีโอไทด์จาก Pentose Phosphat Pathway (PPP), การสร้าง ฟรักโทส-6-ฟอสเฟต เข้าสู่ปฏิกิริยาไกลโคไลซิส และสร้างสารมัธยันต์อื่น ๆ ที่มีความสำคัญต่อเซลล์ เช่น การสร้างผนังเซลล์จาก กลูโคส-1-ฟอสเฟต , การสร้าง teichoic acid จาก UDP-glucose และการสร้าง peptidoglycan จาก UDP-N-acetyl glucosamine และเนื่องจากกลูโคส-6-ฟอสเฟต เป็นสารตัวกลางหลักที่จะแยกเข้าสู่กระบวนการไกลโคไลซิส และ กระบวนการสร้างโพลิแซคคาไรด์ (exopolysaccharide) (Guedon และคณะ,2000) จึงได้มีรายงานการปรับปรุงสายพันธุ์ของ *S.zooepidemicus* ให้สร้างเอนไซม์α-Phosphoglucomutase ในปริมาณสูง ซึ่งจะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน กลูโคส-6-ฟอสเฟตไปเป็น กลูโคส-1-ฟอสเฟต ซึ่งจะถูก

นำไปใช้ในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก จึงเป็นผลทำให้การสร้างโพลิแซคคาไรด์ชนิดนี้เพิ่มขึ้น (Kiriazis, 2001)

สำหรับผลของไพรูเวทที่สามารถเพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากไพรูเวทมีความสำคัญสำหรับทุกกระบวนการในเมตาบอลิซึมของเซลล์ และมีความจำเป็นในการเจริญเติบโตของเชื้อ *Streptococcus zooepidemicus* (Armstrong และคณะ, 1997) และยังเป็นสารมัธยันตร์ในการสร้าง acetyl CoA ซึ่งจะนำไปสู่การสร้าง ATP ที่จำเป็นต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

กลูตามีนเป็นส่วนประกอบหนึ่งของ N-acetyl glucosamine ซึ่งเป็นสารตั้งต้นหนึ่งในการสร้างกรดไฮยาลูโรนิก และยังเป็นเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีความสำคัญต่อการเจริญ และการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก ของเชื้อในกลุ่ม Streptococci (Lowther และ Rogers, 1956 ; Neviani และคณะ, 1995) Willoughby และคณะ (1964) พบว่าความต้องการกลูตามีนสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกจะแปรผันแตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ โดยได้ทำการทดลองกับ Streptococci สองสายพันธุ์ คือ type 18 และ type 28 พบว่า type 18 ต้องการกลูตามีน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ขณะที่ type 28 ต้องการกลูตามีนถึง 1 กรัมต่อลิตร ในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกให้ได้ปริมาณสูงสุด

จากการศึกษาผลของอาร์จินีนที่มีต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก พบว่า การเติมอาร์จินีนสามารถเพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมได้ประมาณ 23 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Gao และคณะ ในปี 2000 ที่ว่า อาร์จินีนมีความจำเป็นกับเมตาบอลิซึมของเซลล์ ซึ่งการขาดอาร์จินีนจะทำให้การเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเซลล์ถูกจำกัด และจากการศึกษาเมตาบอลิซึมของอาร์จินีนในเชื้อ Lactic Streptococci พบว่า arginine deiminase pathway สามารถเกิดขึ้นได้เมื่อเซลล์มีภาวะการเจริญใน น้ำตาลกาแลกโตส หรือน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่ำ หรือที่ความเข้มข้นของอาร์จินีนสูง ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากการนำอาร์จินีนไปใช้จะประกอบไปด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด โดยเริ่มจากเอนไซม์ arginine deiminase ย่อยอาร์จีนีนไปเป็น citrulline และแอมโมเนีย จากนั้นเอนไซม์ ornithine transcarbamylase จะเปลี่ยน citrulline ให้เป็น ornithine และ carbamyl phosphate และในขั้นตอนสุดท้ายจะได้พลังงาน ATP, แอมโมเนีย และคาร์บอนไดออกไซด์ จากปฏิกิริยา dephosphorylation ของ carbamyl phosphate โดยเอนไซม์ carbamate kinase ดังนั้นอาร์จินีนที่เติมลงไปจึงมีความสำคัญในการสร้างพลังงาน ATP ให้กับเซลล์ ในภาวะที่ได้พลังงานจากคาร์โบไฮเดรตต่ำ (Angelis และคณะ, 2002 ; Crow และ Thomas, 1982)

สำหรับอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำการศึกษาคือ ยูราซิล ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มไพริมิดีนเบสมีความสำคัญโดยเป็นส่วนประกอบของกรดนิวคลีอิค และเมื่อถูกเติมหมู่ฟอสเฟตจะเกิดเป็นนิวคลีโอไทด์ เช่น uridine diphosphate (UDP), uridine triphosphate (UTP) ซึ่งนิวคลีโอไทด์เหล่านี้จะมีความสำคัญอย่างมากในเมตาบอลิซึมของเซลล์ รวมทั้งการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก โดยเฉพาะ UDP จะทำหน้าที่เข้าจับกับ glucuronic acid และ N-acetyl glucosamine เพื่อเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก นอกจากนั้นยังสามารถทำหน้าที่เป็นตัวให้หมู่ฟอสเฟตกับ adenosine diphosphate (ADP) ในการสร้าง adenosine triphosphate (ATP) และเป็นสารตัวกลางในการถ่ายเทพลังงานเคมีในเซลล์สิ่งมีชีวิตอีกด้วย ดังเช่นการรายงานของ Gao และคณะ ในปี 2000 เกี่ยวกับสารอาหารที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการหมัก โดย *Streptococcus zooepidemicus* พบว่าการเติมนิวคลีโอไทด์ โดยเฉพาะยูราซิลจะมีผลต่อการเจริญและเมตาบอลิซึมของเซลล์ ทำให้เซลล์มีการเจริญเพิ่มขึ้น ควบคู่ไปกับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกที่เพิ่มขึ้น สำหรับงานวิจัยนี้พบว่าการเติมยูราซิลสามารถเพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้เช่นกัน โดยสามารถเพิ่มผลผลิตได้ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองชุดควบคุม

ในส่วนของ ฟรักโทส-6-ฟอสเฟต พบว่าเมื่อมีการเติม ฟรักโทส-6-ฟอสเฟต กลับมีผลลดการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก ทั้งนี้ ฟรักโทส-6-ฟอสเฟต ปริมาณมากเกินพออาจมีผลทางตรงหรือทางอ้อมต่อการทำงานของเอนไซม์บางชนิดในเมตาบอลิซึม ดังรายงานของ Hardman และ Pritchard ในปี 1987 ที่ว่า ฟรักโทส-1,6-ฟอสเฟต จะมีส่วนช่วยส่งเสริมการทำงานของ เอนไซม์ lactate dehydrogenase ที่พบในเชื้อกลุ่ม Streptococcus โดยจะทำหน้าที่ในการเข้าจับกับเอนไซม์และทำให้เอนไซม์เปลี่ยนแปลงรูปร่างไปจากเดิม และอยู่ในรูปที่เหมาะสมกับกิจกรรมของเอนไซม์มากยิ่งขึ้น ดังนั้นเมื่อมีการเติม ฟรักโทส-6-ฟอสเฟต เชื้อก็จะนำเข้าสู่กระบวนการไกลโคไลซิสได้ผลผลิตเป็น ฟรักโทส-1,6-ฟอสเฟต ส่งผลให้ความสามารถในการเปลี่ยนไพรูเวทเป็นแลกเตทโดยเอนไซม์ lactate dehydrogenase เกิดได้ดีขึ้น ดังแสดงในรูป 2.4 จึงทำให้วิถีการสร้างพลังงานจากไพรูเวทลดลง (Yamada และ Carlsson, 1975) เป็นผลให้การสร้างกรดไฮยาลูโรนิกลดลงด้วย

สรุปผลจากการทดลองในระดับขวดเขย่าเกี่ยวกับปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก พบว่า แมงกานีสอิออนจะมีผลต่อการเพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอิออนชนิดอื่น ดังนั้นจึงนำมาทดสอบร่วมกับสารตั้งต้น หรือสารมัธยันตร์ที่มีผลเพิ่มการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก ผลการทดลองที่ได้สรุปไว้ในตารางที่ 4.15 พบว่า เมื่อเติมแมงกานีสอิออนร่วมกับไพรูเวทจะสามารถเพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและชุดการทดลองอื่น ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ แมงกานีส อิออนร่วมกับกลูโคส-6-ฟอสเฟต เพิ่มขึ้นประมาณ 46 เปอร์เซ็นต์ แต่เนื่องจากกลูโคส-6-ฟอสเฟตมีราคา

แพงกว่าไพรูเวทมาก ในการทดลองระดับถังหมักเพื่อยืนยันประสิทธิภาพการเพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกจึงเลือกทำเฉพาะแมงกานีสอิออนร่วมกับไพรูเวท

ผลการทดลองเลี้ยงเชื้อในระดับถังหมัก 5 ลิตรโดยในขั้นแรกใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อตามที่ อณุมาศ บัวเขียว (2544) รายงานว่าให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงสุด เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการเปรียบเทียบกับเมื่อมีการแปรปัจจัยต่าง ๆ ของการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งผลการทดลองพบว่าปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 30 โดยมีความเข้มข้น 2,144 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อมีการเติมปัจจัยเดี่ยว ได้แก่ แมงกานีสที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นเป็น 2,215 มิลลิกรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 30 และสูงสุดเป็น 2,572 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 39 และเมื่อเติมไพรูเวทที่ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้นเป็น 2,541 มิลลิกรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 30 เช่นกัน นอกจากนั้นเชื้อยังสามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้เร็วขึ้น และเข้าสู่ระยะการผลิตสูงสุดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 15 เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองชุดควบคุม ทั้งนี้เนื่องมาจากไพรูเวทที่เติมลงไปจะไปช่วยในกระบวนการเพิ่มการสร้างพลังงานภายในเซลล์ และทำให้เซลล์มีพลังงานมากขึ้นในการนำไปใช้สังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก ส่วนผลการทดลองเติมแมงกานีส 10 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีผลทำให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้เพิ่มสูงกว่าการเติมปัจจัยเดี่ยว ๆ เป็น 2,903 มิลลิกรัมต่อลิตร สอดคล้องกับผลการทดลองในระดับขวดเขย่า ที่ว่าปัจจัยทั้งสองมีผลร่วมกันต่อการสร้างกรดไฮยาลูโรนิก โดยพบว่าในชุดการทดลองที่มีการเติมไพรูเวททั้งในรูปปัจจัยเดี่ยว และเติมร่วมกับแมงกานีส จะให้ค่าอัตราการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มสูงขึ้น (ภาคผนวก ง. 3.1 -3.4) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม และชุดการทดลองการเติมแมงกานีส และจากการรายงานของ Johns และคณะในปี 1994 พบว่า การเพิ่มอัตราการให้อากาศและความเร็วรอบในการกวน จะทำให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้เพิ่มขึ้น โดยการให้อากาศจะทำให้ได้รับพลังงานจากเมตาบอลิซึมของเซลล์สูงขึ้น เมื่อไพรูเวทถูกเปลี่ยนไปเป็นอะซีเตทในสภาวะที่มีอากาศ ซึ่งพลังงานที่ได้จะสูงกว่าการเปลี่ยนไพรูเวทไปเป็นแลกเตทในสภาวะไร้อากาศ แต่เนื่องจากภาวะที่ใช้ในการทดลองมีการให้อากาศ 1.5 vvm ซึ่งเป็นค่าสูงสุดไม่สามารถเพิ่มอัตราการให้อากาศให้สูงขึ้นมากกว่านี้ได้ในระดับถังหมัก 5 ลิตร จึงได้ทำการทดลองแปรความเร็วในการกวนเพิ่มขึ้นเพียงอย่างเดียว คือ ที่ความเร็วรอบ 400 รอบต่อนาที และ 500 รอบต่อนาที ผลการทดลองได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ใกล้เคียงกัน คือ 2,949 และ 2,903 ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่าความเร็วรอบในการกวนไม่มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิก แต่การเพิ่มความเร็วรอบจะทำให้เชื้อผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้เร็วขึ้น เมื่อเปรียบเทียบค่าอัตราการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกที่ความเร็วรอบต่าง ๆ พบว่าที่ความเร็วรอบในการกวน 400 รอบต่อนาที จะให้ค่าอัตราการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูงสุด (ภาคผนวก ง. 3.4 -3.6) นั่นอาจเป็นเพราะความเร็วในการกวนที่เพิ่มขึ้น ทำให้การส่งผ่านสารอาหาร และถ่ายเทอากาศเกิดได้ดีขึ้น เชื้อจึงเจริญและใช้

สารอาหารได้มากขึ้นทำให้การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกเกิดได้เร็วขึ้น รองลงมาคือความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที ส่วนที่ความเร็วรอบในการกวน 500 รอบต่อนาทีจะให้ค่าอัตราการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกต่ำสุด เนื่องมาจากความเร็วรอบที่สูงเกินไปไม่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อในช่วงเริ่มต้น (lag phase) ทำให้ช่วงระยะการเจริญเริ่มต้นใช้ระยะเวลามากกว่าชุดการทดลองอื่น

จากการทดลองทั้งหมดที่กล่าวมา สรุปได้ว่าการเติมปัจจัยต่าง ๆ ที่เป็นสารตั้งต้น และสารมัธยันตร์ในเมตาบอลิซึมการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก จะทำหน้าที่แตกต่างกันไปในกระบวนการสร้างพลังงานให้กับเซลล์ โดยพลังงานที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลให้เซลล์สามารถเพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้ แต่เนื่องจากสารประกอบเหล่านี้ มีราคาที่สูงกว่าวัตถุดิบในกระบวนการหมักทั่วไป ดังนั้นผลของการศึกษาในครั้งนี้ประโยชน์ที่ได้รับจะใช้เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ทรงศักดิ์ พันธุ์วัฒนะสิงห์.2540. การปรับปรุงสายพันธุ์ *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อณุมาศ บัวเขียว. 2544. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตและน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่สร้างโดย *Streptococcus zooepidermicus* UN-7. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อัจฉรา สุจิตวนิช. 2547. การแยกและการทำให้บริสุทธิ์ของกรดไฮยาลูโรนิกจากการหมักด้วยเยื่อแผ่นกรอง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Abbe, K., Takahashi, S., and Yamada, T. 1982. Involvement of oxygen-sensitive pyruvate-formate-lyase in mixed acid fermentation by *Streptococcus mutans* under strictly anaerobic conditions. J. Bacteriol. 152 : 175-182.

Akasaka, H., Komasaki, H. and Arai, T. 1989. Fermentation Method for Producing Hyaluronic Acid. United States Patent. No. 4,801,539.

Angelis, M.D., Mariotti, L., Rossi, J., Servili, M., Fox, P.F., Rollan, G., and Gobbetti, M. 2002. Arginine catabolism by sourdough Lactic Acid Bacteria: Purification and Characterization of the Arginine Deiminase Pathway Enzymes from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. Applied and Environmental Microbiology. 68(12) : 6193-6201.

Armstrong, D.C., and Johns, M.R. 1997. Culture Conditions Affect the Molecular Weight Properties of Hyaluronic Acid Produced by *Streptococcus zooepidemicus*. Applied and Environmental Microbiology. 63(7) : 2759-2764.

Armstrong, D.C., Cooney, M.J., and Johns, M.R. 1997. Growth and Amino Acid Requirement of Hyaluronic Acid-Producing *Streptococcus zooepidemicus*. Applied Microbiology Biotechnology. 47 : 309-312.

Asanuma, N., and Hino, T. 2002. Molecular Characterization and Expression of Pyruvte Formate-Lyase-Activating Enzyme in a Ruminal Bacterium, *Streptococcus bovis*. Applied and Environmental Microbiology. 68(7) : 3352-3357.

Balazs, E.A. 1979. Ultrapure Hyaluronic Acid and the Use Thereof. United States Patent. No. 4,141,973.

Bitter, T., and Muir, H.M. 1962. A Modified Uronic Acid Carbazole Reaction. Analytical Biochemistry. 4 : 330-334.

Bracke, J.W., Thacker, K. and Minneapolis, M., 1985. Hyaluronic Acid from Bacterial Culture. United States Patent. No. 4,517,295.

Brown, K.K., Ruiz, L.C., Rijn, Greene, N.D., Trump, S.L., Wilson, C.D., and Bryant, S.A. 1994. Method for the Microbiological Production of Non-Antigenic Hyaluronic Acid. United States Patent. No. 5,316,926.

Chong, B.F., and Nielsen, L.K. 2003. Amplifying the cellular reduction potential of *Streptococcus zooepidemicus*. Journal of Biotechnology. 100 : 33-41.

Cifonelli, J.A., and Dorfman, A. 1957. The Biosynthesis of Hyaluronic Acid by Group A Streptococcus. V. The Uridine Nucleotides of Group A Streptococcus. The Journal of Biological Chemistry. 228(1) : 547-557.

Cifonelli, J.A., and Mayeda, M. 1957. The Purification of Hyaluronic Acid by the Use of Charcoal. Biochemica et Biophysica ACTA. 24 : 397-400.

Cleary, P.P., and Larkin, A. 1979. Hyaluronic Acid Capsule : Strategy for Oxygen Resistance in Group A Streptococci. Journal of Bacteriology. 140(3) : 1090-1097.

Crater, D.L., and Van de Rijn, I. 1995. Hyaluronic Acid Synthesis Operon (*has*) Expression in Group A Streptococci. The Journal of Biological Chemistry. 270(31) : 18452-18458.

Crater, D.L., Dougherty, B.A., and Van de Rijn, I. 1995. Molecular Characterization of *has* C from an Operon Required for Hyaluronic Acid Synthesis in Group A Streptococci. The Journal of Biological Chemistry. 270(48) : 28676-28680.

Crow, V.L., and Thomas, T.D. 1982. Arginine Metabolism in Lactic Streptococci. Journal of Bactriology. 150(3) : 1024-1032.

DeAngelis, P.L. 1996. Enzymological Characterization of the *Pasteurella multocida* Hyaluronic Acid Synthase. Biochem. 35 : 9768-9771.

De Luca, C., Lansing, M., Martini, I., Crenscenzi, F., Shen, G., O'Regan, M., and Wong, C. 1995. Enzymatic Synthesis of Hyaluronic Acid with Regeneration of Sugar Nucleotides. Journal of American Chemical Society. 117 : 5869-5870.

Dougherty, B.A., and Van de Rijn, I. 1993. Molecular Characterization of *has* B from an Operon Required for Hyaluronic Acid Synthesis in Group A Streptococci. (Demonstration of UDP-Glucose Dehydrogenase Activity). The Journal of Biological Chemistry. 268(10) : 7118-7124.

Ellwood, C.D., Evan, G.T., Dunn, G.M., McInnes, N., Yeo, R.G., and Smith, K.J. 1995. Producion of Hyaluronic Acid. United States Patent. No. 5,411,874.

Fujii, K., Kawata, M., Kobayashi, Y., Okamoto, A. and Nishinari, K. 1996. Effect of the Addition of Hyaluronate Segments with Different Chain Lengths on the Viscoelasticity of Hyaluronic Acid Solutions. Biopolymers. 38(5) : 583-591.

Gale, E.F. 1953. Assimilation of amino acids by gram-positive bacteria and some action of antibiotics thereon. Advan. Protein Chem. 8 : 285-391.

Gao, H.J., Chen, J., Zhang, Y.F., and Du, G.C. 2000. Nutritional condition of hyaluronic acid fermentation with *Streptococcus zooepidemicus*. Journal of Biotechnolgy. 16(3):396-399.

Guedon,, Desvaux, and Petitdemange. 2000. Kinetic analysis of *Clostridium cellulolyticum* carbohydrate metabolism: Importance of G1P and G6P branch points for distribution of carbon fluxs inside and outside cells as revealed by steady state continuous culture. Journal of Bacteriology. 2000 : 2010-2017.

Hardman, M.J., and Pritchard, G.G. 1987. Kinetics of activation of L-lactate dehydrgenase from *Streptococcus faecalis* by fructose 1,6-bisphosphate and by metal ions. Biochemica Biophysica Acta. 912(2) : 185-190.

Higuchi, M. 1984. Effect of oxygen on the growth and mannitol metabolism of *Streptococcus mutans*. J. Gen. Microbiol. 130 : 1819-1826.

Johns, M.R., Goh, L.T., and Oeggerli, A. 1994. Effect of pH Agitation and Aeration on Hyaluronic Acid Production by *Streptococcus zooepidemicus*. Biotechnology Letters. 16(5) : 507-512.

Keng, C.NG., Handley, C.J., Mason, R.M., and Robinson, H.C. 1989. Synthesis of Hyaluronate in Cultured Bovine Articular Cartilage. Biochemical Journal. 263 : 761-767.

Kim, J.H., Yoo, S.J., Oh, D.K., Kweon, Y.G., Park, D.W., Lee, C.H., and Gil, G.H. 1996. Selection of a *Streptococcus equi* Mutant and Optimization of Culture Condition for the Production of High Molecular Weight Hyaluronic Acid. Enzyme and Microbial Technology. 19 : 440-445.

Kiriazis, M. 2001. Investigation of α-Phosphoglucomutase from *Streptococcus zooepidemicus* Role in Regulation of Polysaccharide Production. Individual Inquiry, Department of Chemical Engineering, The University of Queensland.

Kjems, E., and Lebech, K. 1976. Isolation of Hyaluronic Acid from Cultures of Streptococci in a Chemically Defined Medium. Acta Pathology Microbiology Scand Section B. 84 : 162-164.

Laurent, T.C., Ryan, M., and Pietruszkiewicz, A. 1960. Fractionation of Hyaluronic Acid. Biochemica et Biophysica ACTA. 42 : 476-485.

Lowther, D. A., and Rogers, H. J. 1956. The role of glutamine in the biosynthesis of hyaluronate by Streptococcal suspensions. J. Biochem. 62 : 304-314.

Matsumura, G., De Salegui, M., Herp, A., and Pigman, W. 1963. The Preparation of Hyaluronic Acid from Bovine Synovial Fluid. Biochemica et Biophysica ACTA. 69 : 574-576.

Miyamori, T., Numazawa, R., Sakimae, A., and Onishi, H. 1989. Method of Producing Hyaluronic Acid. United State Patent. No.4,885, 244.

Morita, H., and Fujii, M. 1991. Process for Preparing Hyaluronic Acid. United States Patent. No. 5,071,751.

Neviani, E., Giraffa, G., Brizzi, A., and Carminati, D. 1995. Amino acid requirements and peptidase activities of *Streptococcus thermophilus*. Journal of Applied Bacteriology. 79: 302-307.

Nimrod, A., Greenman, B., Kanner, D., and Landsberg, M. 1988. High Molecular Weight Sodium Hyaluronate. United States Patent. No. 4,784,990.

Novozymes. Hyaluronic [Online]. 2002. Available from : www.novozymes.com/library/ Downloads/ Investor_presentations/Hyaluronic_acid(En)_2.ppt [2004, Aug 15]

O'Regan, M., Martini, I., Crescenzi, F., Luca, C., and Lansing, M. 1994. Molecular Mechanisms and Genetics of Hyaluronan Biosynthesis. International Journal of Biological Macromolecules. 16(6) : 283-286.

Phan, T.N., Buckner, T., Sheng, J., Baldeck, J.D., and Marquis, R.E. 2004. Physiological actions of zinc related to inhibition of acid and alkali production by oral streptococci in suspension and biofilms. Oral Microbiology Immunology. 19 : 31-38.

Radin, L.E., Swann, A.D., and Weisser, A.P. 1970. Preparation of a Hyaluronate-free Lubricating Fraction from Synovial Fluid. Nature. 228 : 377-378.

Regan, M., Martini, I., Crescenzi, F., Luca, C., and Lansing, M. 1994. Molecular Mechanism and Genetics of Hyaluronan Biosynthesis. Int. J. Biol. Macromol. 16(6) : 283-286.

Rijn, and Kessler, R.E. 1980. Growth Characteristics of Group A Streptococci in a New Chemically Defined Medium. Infection and Immunity. 27(2) : 444-448.

Robert, M., and Pike, M.D. 1982. Hyaluronidase and Hyaluronic Acid of Group A Streptococci. Southern Society for Clinical Research. 468.

Sakamoto, M., and Komagata, K. 1996. Aerobic growth of and activities of NADH oxidase and NADH peroxidase in lactic acid bacteria. J. Ferment Bioeng. 82 : 210-216.

Scheie, A.A., Assev, S., and Rolla, G. 1988. Combined effects of xylitol, NaF and $ZnCl_2$ on growth and metabolism of *Streptococcus sorbinus* OMZ 176. APMS 96 : 761-767.

Stoolmiller, A.C., and Dorfman, A. 1969. The Biosynthesis of Hyaluronic Acid by Streptococcus. J. Biol. Chem. 244(2) : 236-246.

Swann, D.A., Sullivan, B.P., Jamieson, G., Richardson, K.R., and Singh, T. 1990. Biosynthesis of Hyaluronic Acid. United States Patent. No. 4,897,349.

Thomas, T.D., Ellwood, D.C., Longyear, V.M.C. 1979. Change from homo to heterolactic fermentation by *Streptococcus lactis* resulting from glucose limitation in anaerobic chemostat cultures. J. Bacteriol. 138 : 109-117.

Van de Rijn, I. 1983. Streptococcal Hyaluronic Acid : Proposed Mechanisms of Degradation and Loss of Synthesis During Stationary Phase. Journal of Bacteriology. 156(3) : 1059-1065.

Van de Rijn, I., and Kessler, R.E. 1980. Growth Characterization of Group A Streptococci in New Chemically Defined Medium. Infection and Immunity. 27(2) : 444-448.

Willoughby, D.S., Ginzburg, Y., and Watson, D.W. 1964. Host-parasite Relationships Among group A Streptococci. Proc.Natl. Acad. Sci. 88: 8317-8321.

Yamada, T., and Carlsson, J. 1975. Regulation of lactate dehydrogenase and change of fermentation products in streptococci. Journal of Bactriology. 144 : 55-61.

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารสำหรับการเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น (Brain Heart Infusion : BHI) (Difco)

1.1 อาหารเหลว BHI

ในอาหารเหลว 1 ลิตร ประกอบด้วย

Calf Brains , Infusion from	200	กรัม
Beef Heart , Infusion from	250	กรัม
Proteose Peptone , Difco	10	กรัม
Bacto Dextrose	2	กรัม
Sodium Chloride	5	กรัม
Sodium Phosphate , Dibasic	2.5	กรัม

วิธีการเตรียมละลายอาหาร 37 กรัม ในน้ำขจัดไอออน ปริมาตร 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เท่ากับ 7.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ (M) ใส่อาหารเหลว BHI ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

1.2 อาหารวุ้นแข็งลาดเอียง BHI

เตรียมโดยเติมวุ้นผง 15 กรัม ลงในอาหารเหลว BHI ต้มให้วุ้นละลาย จากนั้น ปิเปตอาหารลงในหลอดทดลองขนาด 16 × 150 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดจุกให้แน่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้น นำหลอดทดลองมาวางเอียงให้ผิวหน้าของอาหาร มีความยาวประมาณ 12 เซนติเมตร เมื่ออาหารแข็งตัว ตั้งทิ้งไว้ 2 วัน ก่อนนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกโดยวิธีคาร์บาโซล

1.1 สารละลายบอเรท – ซัลฟูริก (Borate – Sulfuric acid solution) 10 % (w/v)

ชั่งสารไดโซเดียมเตตระบอเรท ($Na_2B_4O_7.10H_2O$) 3.82 กรัม ละลายในน้ำร้อนปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ให้สารละลายเย็น นำไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง แล้วค่อยๆ เติมกรดซัล-ฟูริกเข้มข้นที่แช่ไว้ในน้ำแข็งลงไป ปริมาตร 390 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเก็บสารละลายในขวดแก้ว

1.2 สารละลายคาร์บาโซล (Carbazole solution) 1 % (w/v)

ชั่งสารคาร์บาโซล 100 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเก็บสารละลายไว้ในขวดสีชา เก็บในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (อายุการใช้งาน 3 เดือน)

2. การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก

2.1 สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5 – dinitrosalicylic = DNSA reagent)

ละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1.0 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเติมน้ำขจัดไอออน ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเติมสารโพแทสเซียมทาเทรต ($KnaC_4H_4O_6.4H_2O$) ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำขจัดไอออน และเก็บสารละลายในขวดสีชา

2.2 สารละลายอะซิเตท บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4.0

ชั่งโซเดียมอะซิเตท ($CH_3COONa.3H_2O$) 11.63 กรัม และปิเปตสารละลายกรดอะซิติก ปริมาตร 0.86 มิลลิลิตร เติมน้ำขจัดไอออน และปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เท่ากับ 4.0 ด้วยสารละลายกรดอะซิติก ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำขจัดไอออน และเก็บสารละลายในขวดแก้ว สำหรับใช้เป็นบัฟเฟอร์ของเอนไซม์อินเวอร์เทส

2.3 สารละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส

ปิเปตสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ ที่ได้จากข้อ 1.2 ปริมาตร 9.75 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเก็บสารละลายในขวดสีชา เก็บในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.0

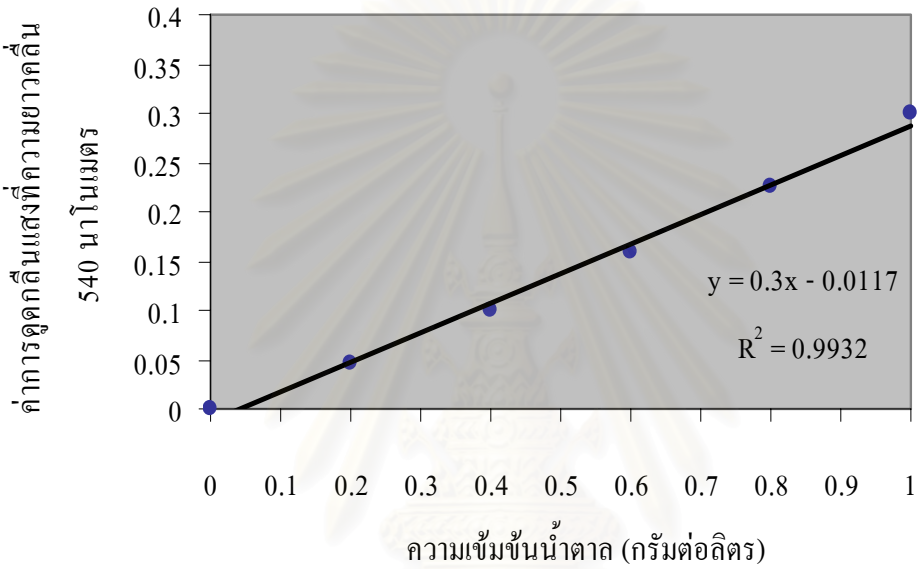
ชั่งสารโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 27.22 กรัม ละลายในน้ำขจัดไอออน ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร และชั่งสารไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 34.84 กรัม ละลายในน้ำขจัดไอออน ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร จากนั้น นำสารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ค่อยๆเติมลงในสารละลายไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต จนกระทั่งได้สารละลายที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.0 สำหรับใช้เป็นบัฟเฟอร์ของเอนไซม์ปาเปน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

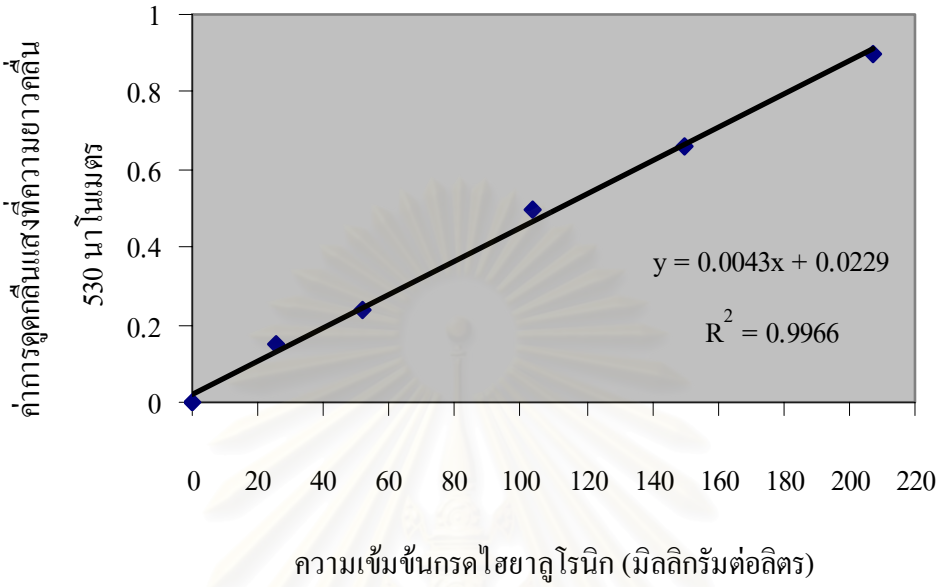
1. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลซูโครสที่ย่อยด้วยเอนไซม์อินเวอร์เทส



กราฟมาตรฐานน้ำตาลซูโครสที่ย่อยด้วยเอนไซม์อินเวอร์เทส ในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 1.0 กรัมต่อลิตร

ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก (total sugar) (กรัมต่อลิตร) = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร x 1 / ความชัน x ความเจือจาง

2. กราฟมาตรฐานของกรดไฮยาลูโรนิกโดยวิธีคาร์บาโซล



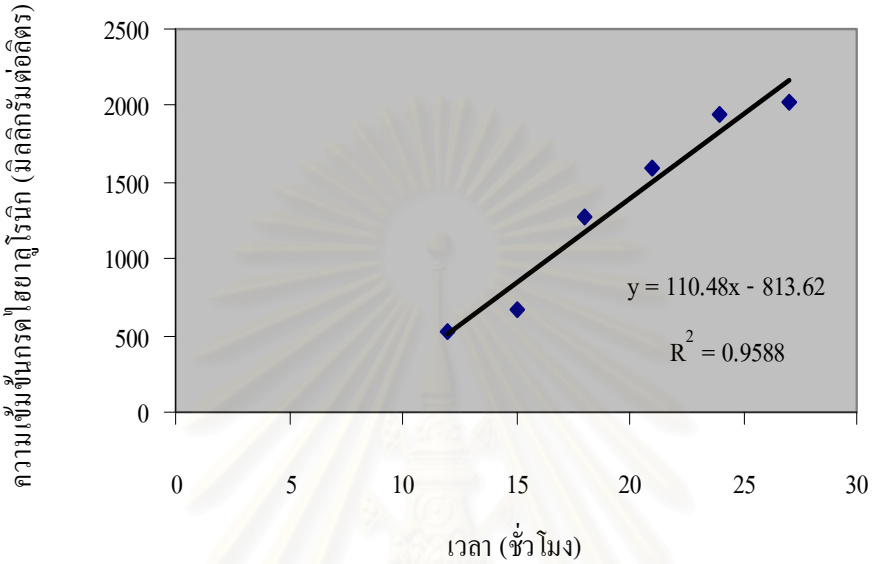
กราฟมาตรฐานกรดไฮยาลูโรนิกโดยวิธีคาร์บาโซล ในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร) = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร x 1 / ความชัน x ความเจือจาง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. กราฟเชิงเส้นอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ , Productivity (P)

3.1 อัตราการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในชุดการทดลองควบคุม

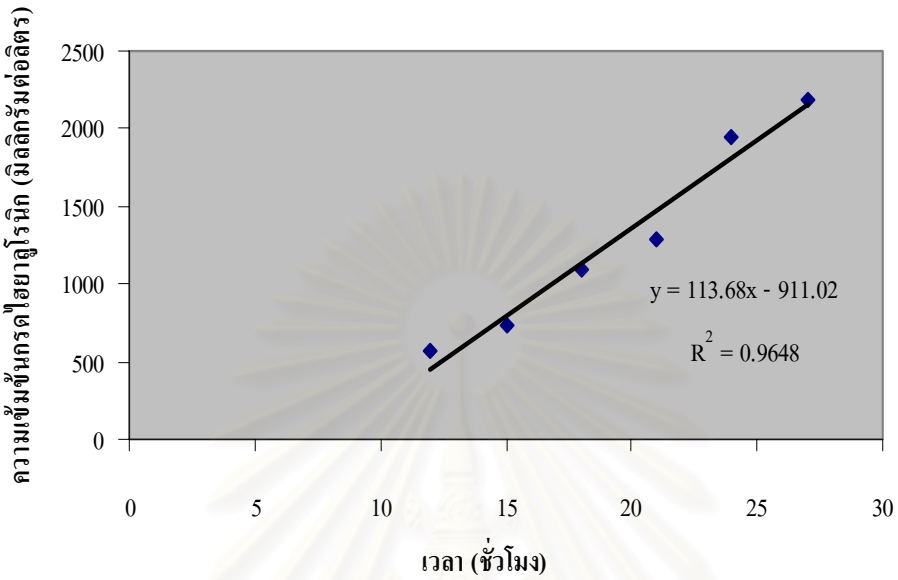


อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ = $(p - p_0)/(t - t_0)$

อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์มีหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 อัตราการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในชุดการเติมแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

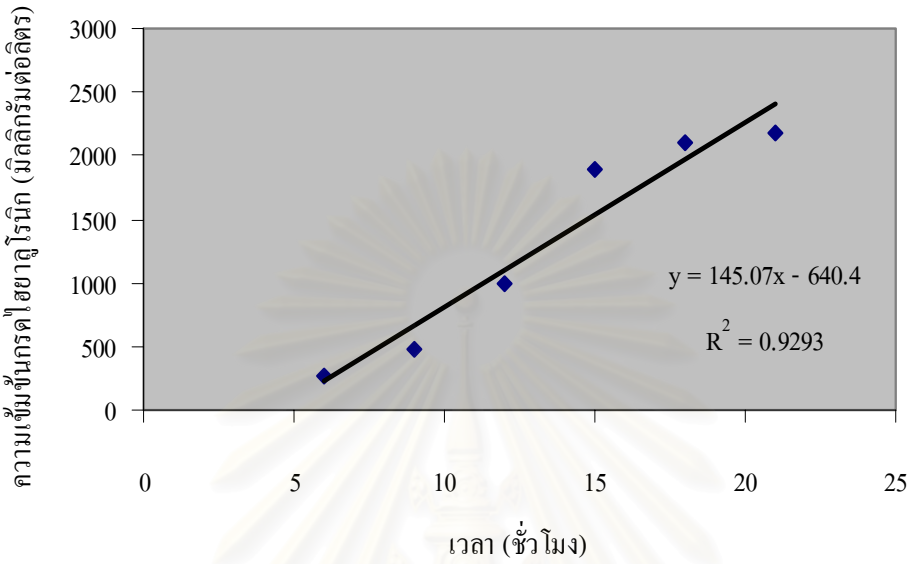


อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ = $(p - p_0)/(t - t_0)$

อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์มีหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 อัตราการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในชุดการเติมไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตร

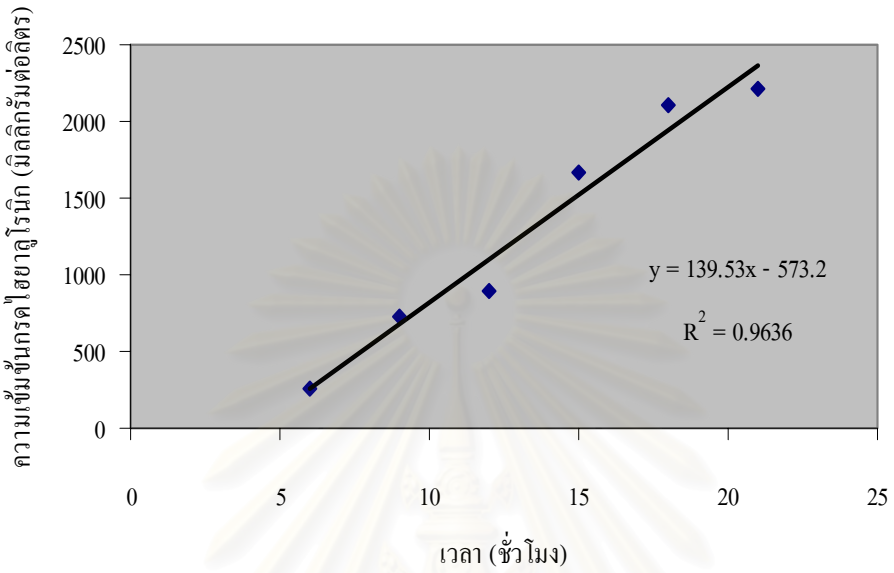


อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ = $(p - p_0)/(t - t_0)$

อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์มีหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4 อัตราการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในชุดการเติมแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต 10 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที

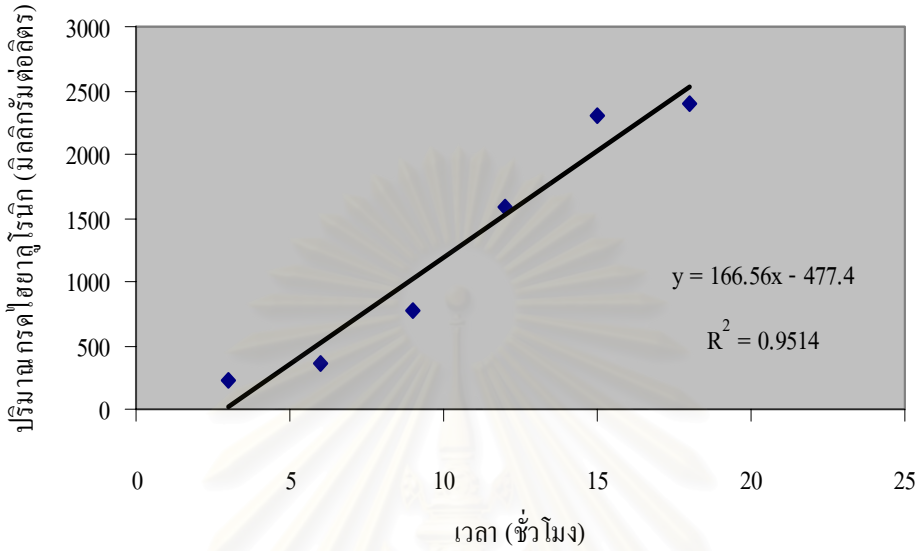


อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ = $(p - p_0)/(t - t_0)$

อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์มีหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5 อัตราการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในชุดการเติมแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต 10 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ความเร็วรอบในการกวน 400 รอบต่อนาที

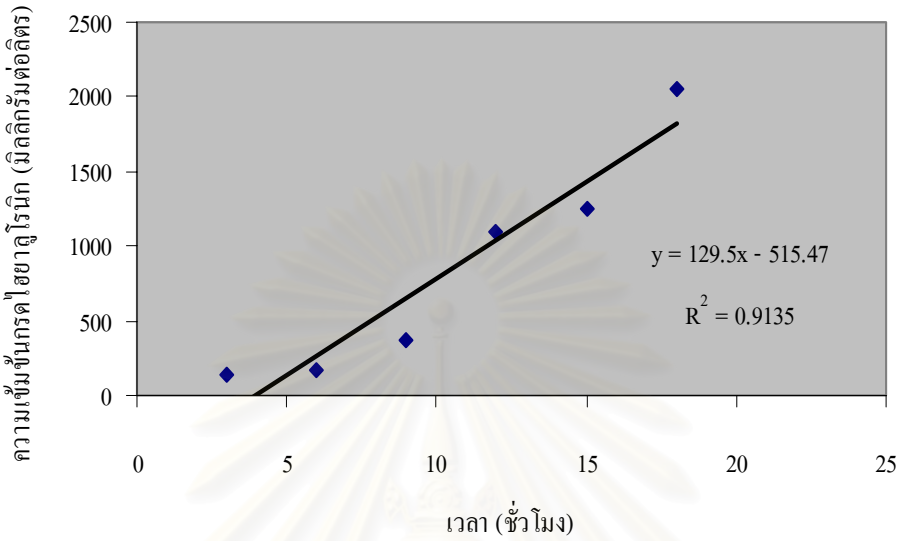


อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ = $(p - p_0)/(t - t_0)$

อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์มีหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.6 อัตราการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในชุดการเติมแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต 10 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับไพรูเวท 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ความเร็วรอบในการกวน 500 รอบต่อนาที



อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ = $(p - p_0)/(t - t_0)$

อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์มีหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

การย่อยแลกติกเคซีนด้วยเอนไซม์

1. การเตรียมแลกติกเคซีนโดยการย่อยด้วยเอนไซม์

วัตถุดิบและเอนไซม์ที่ใช้

1. แลกติกเคซีน ของบริษัทไวท์กรุ๊ป ประเทศไทย จำกัด
2. เอนไซม์ปาเปน ของบริษัท BDH ประเทศอังกฤษ

ขั้นตอนการย่อยแลกติกเคซีนด้วยเอนไซม์

1. ชั่งแลกติกเคซีน 20 กรัม เติมลงในสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร นำไปต้มให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
2. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เท่ากับ 6.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์
3. ปรับปริมาตรของสารละลายให้เป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำขจัดไอออน
4. เติมสารละลายเอนไซม์ปาเปน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
5. บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 ชั่วโมง ที่ความเร็วรอบในการกวน 150 รอบต่อนาที
6. ปั่นแยกตะกอนของสารที่เหลือออก โดยเซนทริฟิวจ์ ที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนสารละลายใสที่ได้ไว้
7. นำไปเตรียมอาหารสูตรสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก (ทรงศักดิ์ พันธุ์วัฒนะสิงห์, 2540) โดยใช้สารละลายที่ได้แทนน้ำขจัดไอออนและเคซีน โดยปรับปริมาตรสารละลายที่ได้เป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำขจัดไอออน (2% แลกติกเคซีน)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การเตรียมอาหารสูตรสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับขวดเขย่า

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

สารละลายแลกติกเคซีน	1,000	มิลลิลิตร
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	3	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	2.8	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.5	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl{\cdot}2H_2O$)	10	มิลลิกรัม
น้ำตาลซูโครส	3	กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เท่ากับ 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

3. การเตรียมอาหารสูตรสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมัก

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

สารละลายแลกติกเคซีน	1,000	มิลลิลิตร
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	3	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	2.8	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.5	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl.2H_2O$)	10	มิลลิกรัม
น้ำตาลซูโครส	15	กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เท่ากับ 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสุภัชญา ดีมีชัย เกิดเมื่อวันที่ 13 สิงหาคม พ.ศ. 2524 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ในปีการศึกษา 2544 และเข้าศึกษาต่อหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2545

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย