# บทที่ 1

# บทนำ

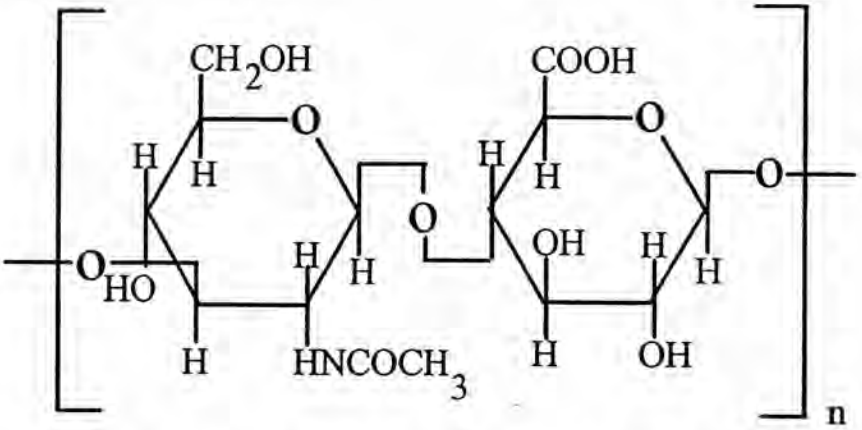
## 1.1 ประวัติความเป็นมา

กรดไฮยาลูโรนิก (Hyaluronic acid) เป็นสารอินทรีย์พวกเฮเทอโรพอลิแซคคาไรด์ในกลุ่มไกลโคอะมิโนไกลแคน (glycoaminoglycan) ที่มีความหนืดสูงสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั่วไป โดยกรดไฮยาลูโรนิกเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆทางชีววิทยาในสิ่งมีชีวิตเช่นการสร้างโลหิต (haemopoiesis), การเจริญของหลอดเลือด(angiogenesis), การยึดติดกันของเซลล์ (cell adhesion) (Bracke and Thacker, 1985; Brun et al., 1990; Morita and Fujii, 1991; De Luca et al., 1995) การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในครั้งแรกได้มีการสกัดแยกมาจากหงอนไก่ (rooster comp) , เยื่อเมือกบริเวณลูกตา (vitreous body) , สายสะดือ (umbilical cord) น้ำจากไขกระดูก (synovial fluid) และเซลล์เยื่อบุผิวหนัง (epithelial cell) (Cifonelli and Mayeda, 1957; Laurent, Ryan and Pietruszkiewicz, 1960; Radin, Swann and Weisser, 1970) การผลิตโดยการสกัดจากสิ่งมีชีวิตนี้ เนื่องจากมีข้อจำกัดในเรื่องของปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้ ต้นทุนในการผลิต และปัญหาด้านการปนเปื้อนของพอลิแซคคาไรด์อื่นๆ เช่น เดอมาแทนซัลเฟต (dermatan sulfate) คอนดรอยตินซัลเฟต (chondroitin sulfate) และการปนเปื้อนของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ทำให้ขนาดโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้มีขนาดเล็กลง เพื่อแก้ปัญหาเหล่านี้จึงมีการพัฒนาวิธีการผลิตอื่นๆ ตามมา คือ การผลิตโดยการสร้างกรดไฮยาลูโรนิกจากน้ำตาลที่ต่อเป็นสายยาว (sugar nucleotide) โดยอาศัยเอนไซม์ที่ได้จากแบคทีเรีย ซึ่งช่วยลดการปนเปื้อนจากพอลิแซคคาไรด์อื่นๆและลดการปนเปื้อนจากแบคเทอรีโอเฟจ (bacteriophage) ที่มักพบในการผลิตจากเซลล์สัตว์และแบคทีเรีย อีกทั้งยังสามารถกำหนดขนาดโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกได้ตามต้องการ แต่วิธีการดังกล่าวยังมีข้อจำกัดในเรื่องของความเสถียร และกิจกรรมของเอนไซม์ที่ใช้ (De Luca et al., 1995) ส่วนการผลิตจากกระบวนการหมักโดยแบคทีเรียนั้นเริ่มจาก Kendall และคณะ, 1937 ได้พบว่ากรดไฮยาลูโรนิกสามารถแยกสกัดได้จากอาหารที่เลี้ยงแบคทีเรียโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่ม haemolytic Streptococci group A,C และเริ่มศึกษามากขึ้นเมื่อฉีดกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จาก *Streptococcus pyogenes* ให้กับสัตว์ทดลองพบว่าไม่มีผลกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Krause,

1972; Crater and Van de Rejn, 1995) แสดงให้เห็นว่ากรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากแบคทีเรียมีความคล้ายคลึงกับกรดไฮยาลูโรนิกที่มีในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง อีกทั้งการผลิตจากกระบวนการหมักใช้ระยะเวลาสั้น ให้ผลผลิตสูง และต้นทุนต่ำกว่าการสกัดจากเนื้อเยื่อ ดังนั้นจึงจัดเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการพัฒนาเพื่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

## 1.2 คุณสมบัติของกรดไฮยาลูโรนิก

กรดไฮยาลูโรนิกเป็นพอลิแซคคาไรด์ในกลุ่มไกลโคอะมิโนไกลแคนที่มีสูตรทางเคมีคือ $(C_{14}\ H_{21}\ NO_{11})_n$ โดย $n > 1000$ จากการย่อยสลายพอลิแซคคาไรด์ชนิดนี้ด้วยเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส แล้วตามด้วยการไฮโดรไลซ์ด้วยกรด พบว่าพอลิแซคคาไรด์ชนิดนี้ประกอบด้วยหน่วยย่อยของไดแซคคาไรด์ คือ N-acetyl-D-glucosamine และ D-glucuronic acid ต่อเป็นสายยาวดังแสดงในรูปที่ 1.1




รูปที่ 1.1 แสดงโครงสร้างไดแซคคาไรด์ที่เป็นหน่วยย่อยของกรดไฮยาลูโรนิก (Hassid, 1992)

จากรูปที่ 1.1 พันธะที่เชื่อมระหว่างโมโนแซคคาไรด์ 2 หน่วย ในไดแซคคาไรด์เป็นชนิด β-type (β-1,4-glycosamidic bond) เกิดจากคาร์บอนอะตอมที่ 1 (Glycosidic hydroxyl) ของ N-acetyl-D-glucosamine) และ คาร์บอนอะตอมที่ 4 ของ D-glucuronic acid ส่วนพันธะที่เชื่อมระหว่างไดแซคคาไรด์เป็นชนิด β-type (β-1,3-glycosidic bond) เกิดจากคาร์บอนอะตอมที่ 1 ของ D-glucuronic acid และคาร์บอนอะตอมที่ 3 ของ N-acetyl-D-glucosamine ดังนั้นกรดไฮยาลูโรนิกจึงเป็นสายตรงที่เชื่อมต่อกันโดยพันธะ β-1,3 glycosidic และ β-1,4 -glycosamidic ขนาด

โมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกจากรายงานอยู่ภายในช่วง 50,000-8x10$^6$ ดาลตันขึ้นกับแหล่งและวิธีการในการเตรียม (Hassid, 1992) กรดไฮยาลูโรนิกโดยมากผลิตออกมาในรูปของเกลือโซเดียมไฮยาลูโรเนต ซึ่งมีสูตรทั่วไปทางเคมีว่า $(C_{14}\ H_{20}\ NNaO_{11})_n$ โดย n > 1000 (Brown et al., 1994) นอกจากกรดไฮยาลูโรนิกแล้วสารพอลิแซคคาไรด์ในกลุ่มไกลโคอะมิโนไกลแคนนี้ ยังมีสารประเภทอื่นอีก ดังนี้

1. เฮพาริน (Heparin) พบทั่วไปในเบโซฟิลิกกรานูล (basophillic granules) ของแมสท์เซลล์ ในเนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบมากที่ตับ ปอด ประกอบด้วย uronic acid residues และ 2-amino-deoxy-D-glucose residue ต่อกันด้วยพันธะ $\alpha$ -1,4 glycosidic

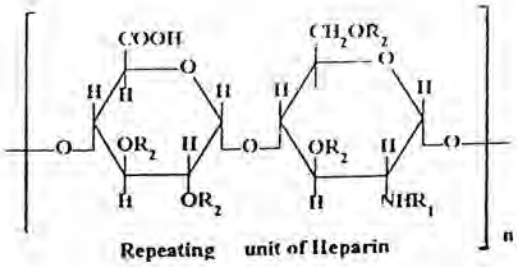
2. เฮพาแรนซัลเฟต (Heparan sulfate) คล้ายคลึงกับเฮพาริน จะแตกต่างกันตรงที่ปริมาณของ N-sulfate โดยเฮพารินมีปริมาณ N-sulfate มากกว่าเฮพาแรนซัลเฟต

3. เคอราแตนซัลเฟต (Keratan sulfate) โครงสร้างประกอบด้วยไดแซคคาไรด์ของ N-acetyl-D-glucosamine sulfate ต่อกับ galactose โดยไม่มีกรดยูโรนิกอยู่ซึ่งต่างกับไกลโคอะมิโนไกลแคนชนิดอื่นๆ

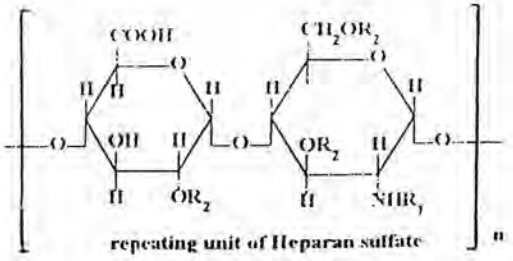
4. คอนดรอยติน (Chondroitin) โครงสร้างไดแซคคาไรด์ประกอบด้วยหน่วยย่อยของไดแซคคาไรด์ คือ D-glucuronic acid และ N-acetyl-D-galactosamine ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ $\beta$-1,3 เป็นสารที่คล้ายคลึงกับกรดไฮยาลูโรนิกต่างกันที่เป็นหมู่กาแลคโตซามีน

5. เดอมาแตนซัลเฟต (dermatan sulfate) พบในเนื้อเยื่อยึดต่อ มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับคอนดรอยตินต่างกันที่ เป็น L-iduronic acid แทน D-glucuronic acid

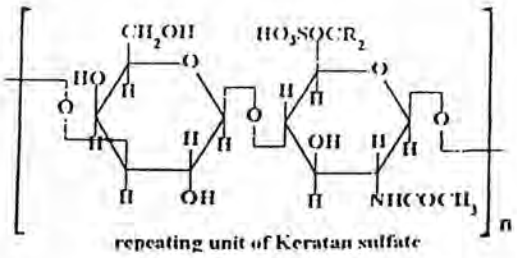
โครงสร้างของสารประกอบทั้งหมดแสดงในรูปที่ 1.2



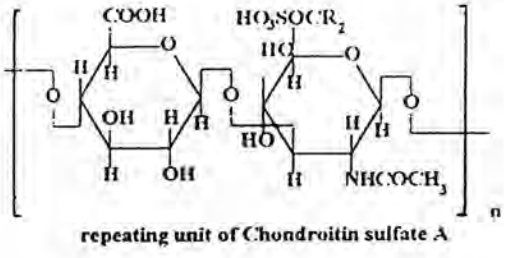

1)



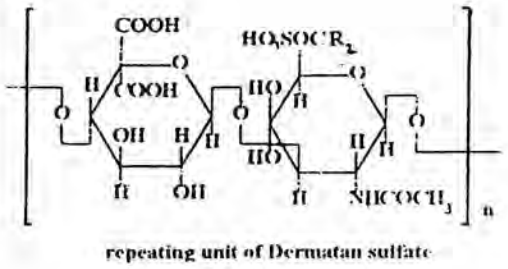

2)



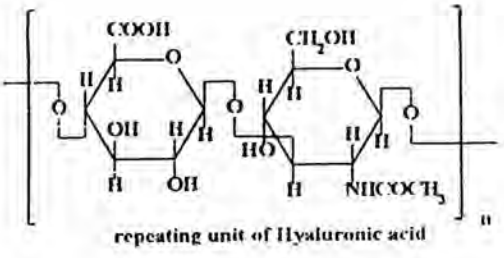

3)




4)




5)




6)

รูปที่ 1.2 แสดงโครงสร้างของสารในกลุ่มไกลโคอะมิโนไกลแคน

1) เฮพาริน 2) เฮพาแรนซัลเฟต

3) เดอราแตนซัลเฟต 4) คอนดรอยติน

5) เดอมาแตนซัลเฟต 6) กรดไฮยาลูโรนิก

ที่มา : ทิพวรรณ ว่องวิวิธกุล, 2539

1.3 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

ปัจจุบันการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสามารถจัดแบ่งได้เป็น 3 วิธีการดังนี้

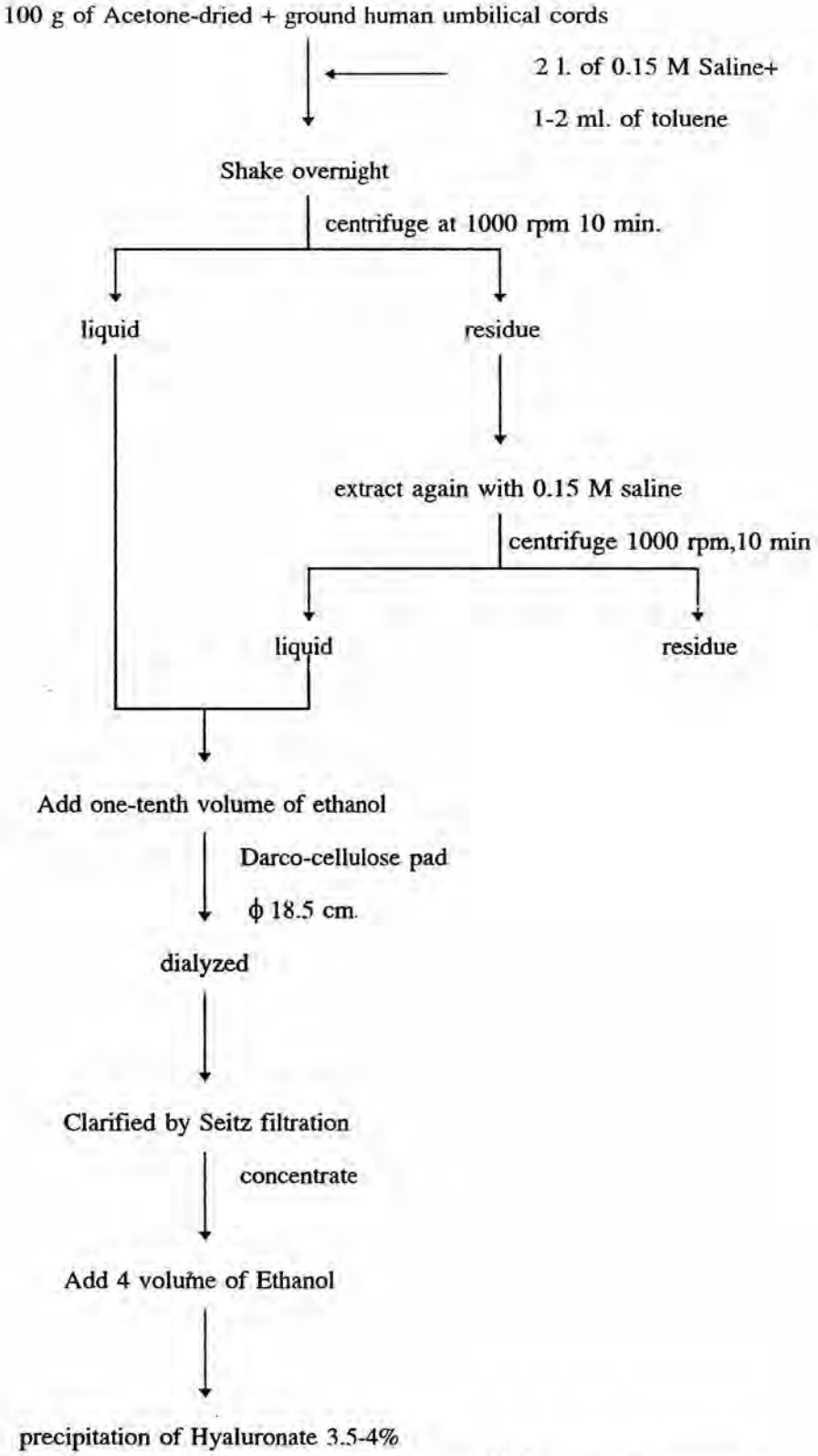
1.3.1 การผลิตโดยการสกัดจากเซลล์ของสิ่งมีชีวิต

1.3.2 การผลิตโดยการสังเคราะห์จากน้ำตาลสายยาว

1.3.3 การผลิตโดยกระบวนการหมักจากแบคทีเรีย

1.3.1 การผลิตโดยการสกัดจากเซลล์ของสิ่งมีชีวิต

เป็นวิธีการที่ใช้ในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในปัจจุบัน ตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตออกมาจำหน่ายคือ HYLARTILB® ซึ่งเป็นเกลือโซเดียมไฮยาลูโรเนต สกัดจากหงอนไก่ (rooster comb) โดยบริษัท Phamacia, Inc. (Brown et al., 1994) การสกัดกรดไฮยาลูโรนิกนอกจากสกัดจากหงอนไก่ยังสามารถสกัดจากแหล่งอื่นๆได้อีก อาทิเช่น น้ำจากไขกระดูก, สายสะดือ, เยื่อเมือกบริเวณลูกตา, หลอดลม และเซลล์เยื่อบุผิว โดยเป็นแหล่งที่ได้มีรายงานว่าเป็นแหล่งที่ตรวจพบกรดไฮยาลูโรนิก (Laurent, Ryan and Pietruszkiewicz, 1960; Cifonelli and Mayeda, 1957) แต่วิธีการนี้มีข้อเสียในเรื่องการปนเปื้อนของพอลิแซคคาไรด์ชนิดอื่น, การปนเปื้อนของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส, การปนเปื้อนจากแบคเทอริโอเฟจหรือไวรัสที่มีในเนื้อเยื่อสัตว์ อีกทั้งมีต้นทุนในการผลิตสูงเนื่องจากได้จากเซลล์สิ่งมีชีวิต ตัวอย่างของกรรมวิธีในการสกัดกรดไฮยาลูโรนิกแสดงดังแผนผังรูปที่ 1.3




รูปที่ 1.3 แผนผังแสดงขั้นตอนการสกัดกรดไฮยาลูโรนิกจากเนื้อเยื่อสายสะดือของมนุษย์ (Cifonelli and Mayeda, 1957)

1.3.2 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดยการสังเคราะห์จากน้ำตาลที่จับกับนิวคลีโอไทด์

De Luca et al.,1995 ได้รายงานถึงการเตรียมกรดไฮยาลูโรนิกจาก UDP-N-acetyl-D-glucosamine (UDP-GlcNAc) และ UDP-glucuronic acid (UDP-GlcA) โดยการใช้เอนไซม์ HA synthase ที่ได้จาก *Streptococcus equisimilis* strain D181, UDP-GlcNAc pyrophosphorylase จาก *Escherichia coli* และ UDP-glucose dehydrogenase จากผลการทดลองได้กรดไฮยาลูโรนิกในรูปของเกลือโซเดียมถึง 90% กรดไฮยาลูโรนิกที่ได้เมื่อเปรียบเทียบกับกรดไฮยาลูโรนิกที่แยกได้จากสิ่งมีชีวิต โดย $^{1}$H-NMR, Enzymatic digestion โดยเอนไซม์ hyaluronate lyase และ hyaluroglucoronidase พบว่าให้ผลเหมือนกันและกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้มีมวลโมเลกุลประมาณ $5.5 \times 10^{5}$ ดาลตัน ใกล้เคียงกับที่รายงานใน Deangelis et al., 1993 ที่ศึกษาการสร้างกรดไฮยาลูโรนิกจาก UDP-GlcNAc และ UDP-GlcA โดยอาศัยเอนไซม์ HA synthase ของ *S. pyogenes* ที่ผลิตจาก *E. coli* การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดยวิธีการนี้มีข้อได้เปรียบที่สามารถลดการปนเปื้อนของสารพอลิแซคคาไรด์อื่นๆและไวรัสที่มักจะพบในการสกัดจากสิ่งมีชีวิต อีกทั้งลดการปนเปื้อนจากเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส และสามารถควบคุมขนาดมวลโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกได้ แต่วิธีการดังกล่าวก็ยังคงมีปัญหาในเรื่องความเสถียรของเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตทำให้พัฒนาการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ยาก วิธีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดยวิธีการสร้างจากน้ำตาลสายยาว และกลไกการสร้างกรดไฮยาลูโรนิกจากเอนไซม์แสดงในรูปที่ 1.4 และ 1.5

recombinant UDP-GlcNAc pyrophosphorylase(10 unit),
UDP-Glc pyrophosphorylase(20 unit), UDP-Glc dehydrogenase(10 unit),
pyruvate kinase(200 unit), lactate dehydrogenase(200 unit),
inorganic pyrophosphatase(50 unit) and membrane-bound HA synthase(0.4 unit)

↓

substrates in 0.1 M HEPES buffer pH 7.5 10 ml
(containing Glc-1-P 0.1 mmol, GlcNAc-1-P 0.1 mmol, PEP 0.2 mmol, NAD 5 μmol,
UTP 10 μmol, $MgCl_2.6H_2O$ 0.1 mmol, dithiothreitol 40 μmol and KCl 0.5 mmol)

↓ gently stirred under argon
↓ 25 °C 48 hr.

stopped reaction by proteinase-K digestion(500 μg) at 37 °C 60 min

← add trichroloacetic acid
to final concentration of 5%

↓

centrifuge at 14000G, 30 min to remove protein precipitate

↓ supernatant

Sepharose CL-4B column

↓

eluted with PBS buffer(0.01 M phosphate, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl)

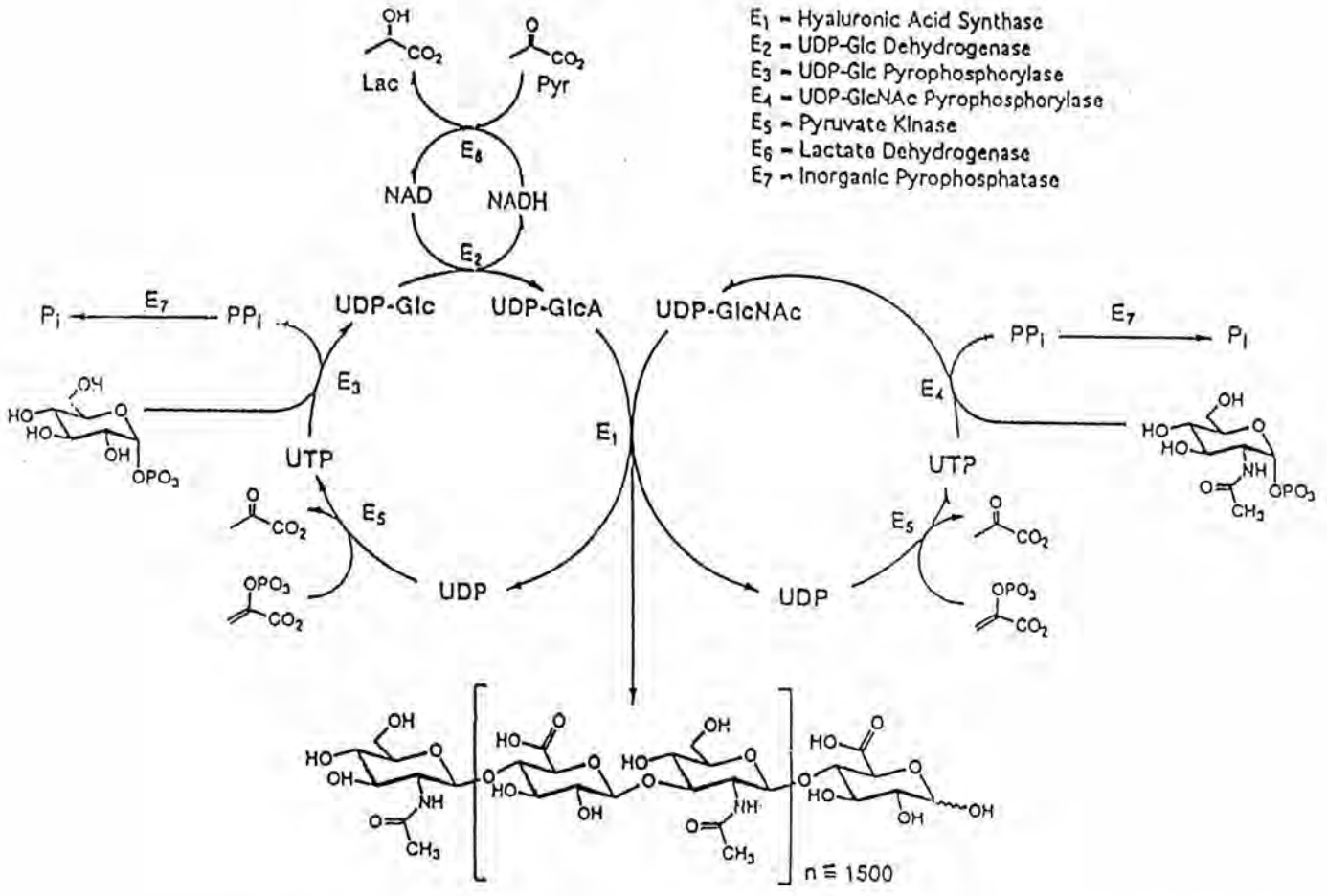
↓ HA fraction

dialysis against 5 L of distilled water

↓

lyophilized (31 mg of HA sodium salt)

รูปที่ 1.4 แสดงวิธีการสร้างกรดไฮยาลูโรนิกโดยการสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์ (De Luca et al.,1995)




รูปที่ 1.5 แสดงกลไกการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกจากน้ำตาลที่จับกับนิวคลีโอไทด์ด้วยการใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ (De Luca et al., 1995)

1.3.3 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกจากกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์

1.3.3.1 ชนิดและลักษณะของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

*Streptococcus* sp. เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้ดีโดยกรดไฮยาลูโรนิกจะอยู่ในส่วนของแคปซูล *Streptococcus* sp. สามารถพบได้ทั่วไปทั้งในดิน น้ำ อากาศ รวมทั้งในผักและผลไม้ แล้วยังสามารถพบได้ในร่างกายคนหรือสัตว์ ลักษณะของเชื้อในกลุ่มนี้คือ เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ติดสีแกรมบวก (ในกรณีเป็นเซลล์ที่มีอายุมากการติดสีจะไม่แน่นอน) ขนาดของเซลล์ประมาณ 0.5-1 ไมโครเมตร หากเลี้ยงในอาหารเหลว เซลล์จะเรียงตัวเป็นสาย ส่วนใหญ่เชื้อในกลุ่มนี้ไม่เคลื่อนที่ ลักษณะโคโลนีไม่แน่นอนอาจเป็นเมือก (mucoid) เรียบมัน (smooth) หรือด้าน (matte) โคโลนีที่มีลักษณะเป็นเมือกหรือด้าน มักจะมีสาร M-protein อยู่ในเซลล์

การจัดจำแนกเชื้อในกลุ่ม Streptococcus ตาม Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (8 th ed.) อาศัยการจัดจำแนกตาม Brown's Classification และ Lancefield's system.

Brown's Classification แบคทีเรียในกลุ่ม Streptococcus ที่สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้สูงจะอยู่ในกลุ่ม β-haemolytic Streptococci โดยเชื้อในกลุ่มนี้จะย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้อย่างสมบูรณ์โดยไม่เหลือฮีโมโกลบิน ดังนั้นรอบโคโลนีจะเห็นเป็นโซนใส เมื่อเพาะเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงที่มีเลือดผสมอยู่ ในบางกรณีที่เห็นโซนใสไม่ชัดเจน อาจเปลี่ยนมาทำการเพาะเลี้ยงเชื้อภายใต้พื้นผิวหน้าอาหาร เนื่องจากเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของ β-haemolytic Streptococci มี 2 ชนิด คือ Streptolysin O (เป็นเอนไซม์ที่ถูกทำลายแอคติวิตีได้ด้วยออกซิเจน) และ Streptolysin S (เป็นเอนไซม์ที่มีแอคติวิตีได้ในบรรยากาศที่มีออกซิเจน) ดังนั้นถ้าเชื้อมี Streptolysin O เพียงอย่างเดียวจะทำให้โซนใสรอบโคโลนีไม่ชัดเจนหากโคโลนีเจริญบนผิวหน้าอาหาร ดังนั้นจึงต้องเลี้ยงเชื้อใต้ผิวหน้าอาหาร

Lancefield's system เป็นการจัดจำแนกโดยอาศัยคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนบนผิวเซลล์ เนื่องจากบนผิวเซลล์ของเชื้อกลุ่ม Streptococcus มีสารที่เรียกว่า group specific substance ที่ประกอบด้วยสารพอลิแซคคาไรด์ชนิดต่างๆ ซึ่งการเรียงตัวของพอลิแซคคาไรด์ต่างๆในโมเลกุล จะมีความแตกต่างกัน ทำให้คุณสมบัติความเป็นแอนติเจนต่างกัน โดยจากการตรวจหาแอนติเจนบนผนังเซลล์กลุ่ม β-haemolytic Streptococci พบว่าอยู่ในกลุ่ม A, B, C, D, E, F, G, H, K, L, M, O และอื่นๆ ซึ่งจากรายงานการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกที่ผ่านมาพบว่า เชื้อที่สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้ดีจัดอยู่ในกลุ่ม A และC (Thonard, Migliore and Blustein, 1964;

Maclennan, 1956; Holmstrom and Ricica, 1967; Roseman, Moses, Ludowieg and Dorfman, 1953; Van de rijin and Kessler, 1980; Woolcock, 1974)

β-haemolytic Streptococci group A,C ส่วนมากเป็นเชื้อที่สามารถก่อให้เกิดโรคได้ในหลายระบบ เช่น ระบบทางเดินหายใจ ระบบขับถ่าย และ ระบบสืบพันธุ์ ตัวอย่างของเชื้อที่ใช้ในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก ได้แก่ *Streptococcus zooepidemicus, S. pyogenes, S. equisimilis, S. dysgalactiae* และ *S. faecalis*

1.3.3.2 กระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

แบคทีเรียในกลุ่ม Streptococcus เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *S. zooepidemicus* (John, Goh and Oeggerli, 1994; Swann et al., 1990; Nimrod et al.,1988; Akasaka, Komasaki and Arai, 1989; Morita and Fujii, 1991) *S. equi* (Ellwood et al., 1995; Brown et al., 1994; Morita and Fujii, 1991) *S. pyogenes* (Bracke and Thacker, 1985; Mickelson, 1964) เป็นต้น การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกด้วยกระบวนการหมักจากแบคทีเรียนี้ในปัจจุบันได้รับความสนใจมาก เนื่องจากเป็นวิธีการที่ให้ผลผลิตสูง ใช้ระยะเวลาในการหมักสั้น ต้นทุนต่ำเนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้สามารถหาได้ง่าย อีกทั้งสามารถที่จะทำการปรับปรุงและควบคุมกระบวนการผลิตได้ง่าย โดยการปรับปรุงสูตรอาหาร คัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อ และควบคุมภาวะในการหมักให้เหมาะสม ดังนั้นวิธีการนี้จึงนับเป็นวิธีการที่ดีที่สุดในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตจากสิ่งมีชีวิตและการสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์ แต่วิธีการนี้ก็ยังมีข้อเสียเนื่องจากเชื้อที่ ใช้ในการผลิตและสามารถให้ผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกที่สูงนั้นอยู่ในกลุ่ม β-haemolytic Streptococci group A, C ซึ่งจากที่กล่าวมาแล้วว่าส่วนมากมักก่อให้เกิดโรค และยังสามารถผลิตสเตรปโตไลซินซึ่งเป็นสารที่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ที่หากปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์จะมีผลทำให้เกิดการระคายเคืองหากเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ภายนอกและหากเป็นผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ก็จะเป็นอันตรายมากขึ้น จึงเป็นความจำเป็นที่จะต้องปรับปรุงและคัดเลือกสายพันธุ์ รวมถึงการหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีการผลิตสารสเตรปโตไลซินและเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคกับสิ่งมีชีวิต

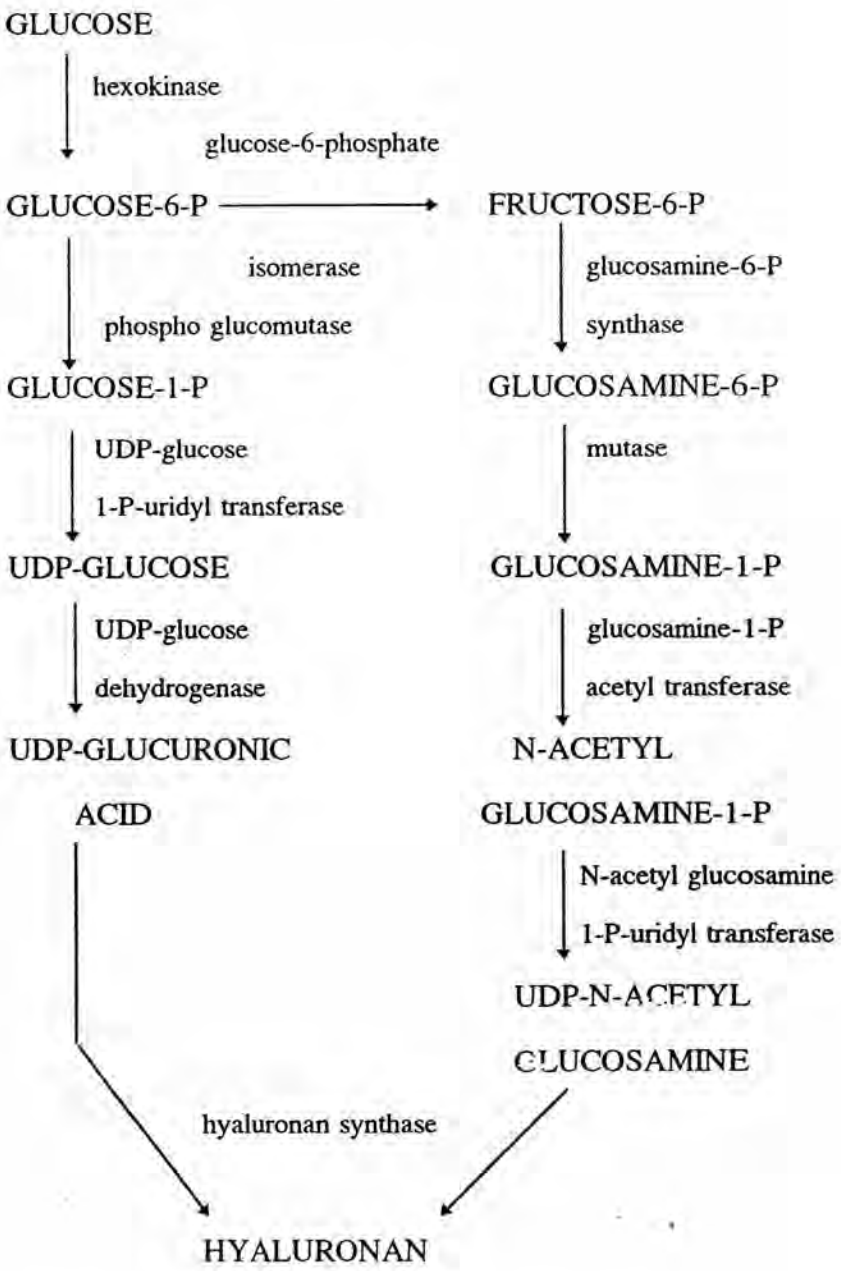
การศึกษาการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกจากกระบวนการหมักจาก *Streptococcus* sp. เป็นการหมักในสภาพอาหารเหลวซึ่งเป็นวิธีการที่นิยมใช้กันโดยทั่วไป เพราะเป็นวิธีการที่สะดวกในการควบคุมภาวะในระหว่างกระบวนการหมัก ซึ่งกระบวนการสามารถทำได้ทั้งในสภาพไร้ออกซิเจน (anaerobic fermentation) (Bracke and Thacker, 1985) และในสภาพที่มีออกซิเจน (aerobic fermentation) (Morita and Fujii, 1991; Swann et al.,1990; Akasaka, Komasaki and Arai, 1989) ซึ่งกระบวนการทั้ง 2 วิธีให้ผลผลิตสูง และสามารถใช้แหล่งคาร์บอน

ได้หลายชนิด (Akasaka, Komasaki and Arai, 1989) เช่นกลูโคสรวมทั้งแป้งที่ผ่านการย่อยโดยใช้เอนไซม์ ซูโครส กาแลคโตส ฟรักโตส ลักษณะของกระบวนการหมักที่ใช้ในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกมีทั้งกระบวนการหมักแบบแบทช์ (Batch fermentation) ซึ่งเป็นวิธีการที่นิยมใช้กันมากเนื่องจากสะดวกในการควบคุมและป้องกันการปนเปื้อนได้ง่าย (Nimrod et al., 1988; Swann et al., 1990; John, Goh and Oeggerli, 1994) กระบวนการหมักแบบแบ่งเติมสาร (Fed-batch fermentation) โดยมากเป็นการแบ่งเติมน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนในระหว่างกระบวนการหมัก (Akasaka, Komasaki and Arai, 1989; Morita and Fujii, 1991) และกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation) เป็นวิธีการที่มีรายงานน้อยเนื่องจากความซับซ้อนของระบบ (Ellwood et al., 1995)

1.4 <u>ชีวเคมีของการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก</u>

กรดไฮยาลูโรนิกเป็นสารเมแทบอไลท์ปฐมภูมิที่ผลิตโดยแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. โดยกรดไฮยาลูโรนิกจะพบอยู่ในส่วนแคปซูลซึ่งเป็นส่วนที่ช่วยให้เซลล์ของแบคทีเรียในกลุ่ม Streptococcus สามารถทนอยู่ได้ในสภาพที่มีออกซิเจนสูง โดยเมื่อเซลล์เจริญในอาหารเหลวที่มีการให้อากาศ แคปซูลจะมีส่วนช่วยให้การเจริญของเซลล์มีในลักษณะเป็นกลุ่มเป็นผลทำให้การนำเข้าของออกซิเจนต่ำลง หรืออาจกล่าวได้ว่าแคปซูลเป็นตัวป้องกันทำให้การนำเข้าออกซิเจนช้าลง และการที่เซลล์มีการเจริญเป็นกลุ่มเพื่อลดอัตราส่วนพื้นที่ผิวต่อปริมาตร ซึ่งจะช่วยจำกัดการแพร่ของออกซิเจน อีกทั้งยังช่วยลดการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ (Cleary and Larkin, 1979) นอกจากนี้ในทางการแพทย์แคปซูลมีผลต่อความรุนแรงของเชื้อในการทำให้เกิดโรคโดย Streptococcus สายพันธุ์ที่มีการสร้างกรดไฮยาลูโรนิกสูงจะไม่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการฟาโกไซโตซีส (Dougherty and Van de Rijn, 1994; Krause, 1972; Crater and Van de Rijn, 1995; Woolcock, 1974) ซึ่งสิ่งนี้เป็นสิ่งที่ช่วยในการยืนยันได้ว่ากรดไฮยาลูโรนิกที่มีอยู่ในส่วนแคปซูลของเชื้อในกลุ่ม Streptococcus นั้นมีความคล้ายคลึงกับกรดไฮยาลูโรนิกในสิ่งมีชีวิต ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิกนั้นกรดไฮยาลูโรนิกจะมีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตามการเจริญในช่วง exponential phase และจะสูงที่สุดในช่วง stationary phase เนื่องจากเซลล์มีการปลดปล่อยกรดไฮยาลูโรนิกสู่อาหารโดยกิจกรรมของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส แต่การทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวก็จะมีผลทำให้ขนาดมวลโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกมีขนาดลดลง (Brown et al., 1994; Van de rijn., 1983) จากการศึกษากลไกการสร้างกรดไฮยาลูโรนิกในระดับโมเลกุลปัจจุบัน พบว่าถูกควบคุมโดยเอนไซม์ที่สำคัญ ได้แก่ ไฮยาลูโร

นิกซินเทส (Hyaluronic acid Synthase) , ยูริดีนไดฟอสเฟต-กลูโคสดีไฮโดรจีเนส (UDP-glucose dehydrogenase) และยูริดีนไดฟอสเฟตอะซิทิลกลูโคซามีน ไพโรฟอสโฟไรเลส (UDP-N-acetyl-D-glucosamine pyrophosphorylase โดยเอนไซม์ทั้งสามชนิดจะต้องมีประสิทธิภาพสูง โดยเอนไซม์ไฮยาลูโรนิกซินเทสจะทำหน้าที่เปลี่ยน UDP-GlcA และ UDP-GlcNAc ให้เป็นกรดไฮยาลูโรนิก ส่วนเอนไซม์ที่เหลืออีกสองชนิดจะทำหน้าที่ในการสร้างสารตั้งต้นในการสร้างกรดไฮยาลูโรนิกซึ่งก็คือ UDP-GlcA และ UDP-GlcNAc ดังที่แสดงในรูปที่ 1.5 สำหรับการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์สามารถทำได้ด้วยการเติมโลหะที่มี 2 ประจุ เช่น $Mn^{++}$ หรือ $Mg^{++}$ แต่หากเป็น $Mg^{++}$ จะให้ผลดีกว่าโดยแมกนีเซียมจะช่วยทำให้การทำงานของเอนไซม์มีเสถียรภาพ (Stoolmiller and Dorfman, 1969) ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิกนั้นนอกจากจะต้องอาศัยกลไกการสร้างดังข้างต้นแล้วยังต้องอาศัยกลไกอื่นๆอีกเพื่อสลายสารอาหาร โดยการเปลี่ยนกลูโคส หรือซูโครสที่เป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการหมักไปเป็นไพรูเวท ในวิถีไกลคอไลซิส (glycolysis) เข้าสู่วัฏจักรเครบส์เพื่อสร้างพลังงาน และในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนต่ำไพรูเวทจะถูกเปลี่ยนเป็นแลกเตท โดยแลกเตท ดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase) และได้มีรายงานว่าแหล่งคาร์บอนในกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิกเช่น กลูโคสจะถูกเปลี่ยนไปเป็น glucuronic และ glucosamine โดยไม่มีการแตกพันธะที่เชื่อมระหว่างคาร์บอนในโมเลกุลของกลูโคสดังแสดงในรูปที่ 1.6 ( Roseman, Moses, Ludowieg and Dorfman, 1953; Swann et al., 1990; O'Regan et al.,1994) จากการศึกษาในระดับของยีน พบว่า การสร้างกรดไฮยาลูโรนิกโดยเชื้อในกลุ่ม Streptococcus group A เกี่ยวข้องกับยีน 3 ยีนบน *has* operon คือ *has*A, *has*B และ *has*C โดยใช้สำหรับการสร้างเอนไซม์ไฮยาลูโรนิก ซินเทส ยูริดีนไดฟอสเฟต-กลูโคสดีไฮโดรจีเนส และยูริดีนไดฟอสเฟตอะซิทิลกลูโคซามีน ไพโรฟอสโฟไรเลส ตามลำดับ ซึ่งจากการทดลองพบว่าการที่เชื้อสายพันธุ์ที่สร้างแคปซูลเมื่อเจริญอยู่ในระยะกึ่งกลางถึงปลายการเจริญทวีคูณ *has* operon จะมีการถอดรหัสเพื่อสร้าง mRNA แต่เมื่อการเจริญมาถึงระยะการเจริญคงที่เชื้อจะสูญเสียการถอดรหัสเพื่อสร้าง mRNA ของ *has* operon ทำให้กลายเป็นแบคทีเรียที่ไม่มีแคปซูลห่อหุ้ม ซึ่งเป็นข้อเสนอแนะที่ว่าการสร้างกรดไฮยาลูโรนิกที่เป็นส่วนของแคปซูลนั้นถูกควบคุมโดยกลไกการทรานสคริบชั่น (Dougherty and Van de Rijn, 1993; Deangelis, Papaconstantinou and Weigel, 1993; Dougherty and Van de Rijn, 1994; Crater and Van de Rijn, 1995)




รูปที่ 1.6 แสดงกลไกการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกในทางชีวภาพ

(O'Regan et al., 1994)

1.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกเพื่อให้ได้ผลผลิตที่ดี จำเป็นต้องคำนึงถึงปัจจัย 2 ประการคือ ชนิดของสายพันธุ์เชื้อที่ใช้ในกระบวนการหมัก และ ภาวะที่เหมาะสมในการผลิต ดังนั้นในการปรับปรุงกระบวนการผลิตจึงมุ่งเน้นในเรื่องชนิดสายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้และภาวะแวดล้อมที่ใช้ในการหมักควบคู่กันไป

1.5.1 ชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อ

การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกให้ได้ผลผลิตที่สูงจำเป็นจะต้องคัดเลือกเชื้อ โดยลักษณะของเชื้อที่มีความเหมาะสมคือ ต้องให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงในระยะเวลาสั้น มีความเสถียรทางสายพันธุ์ ไม่ผลิตสารอื่นเป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียงรวมถึงไม่ผลิตสเตรปโตไลซินที่ก่ออันตรายต่อผู้ใช้ผลิตภัณฑ์ เป็นสายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคในสิ่งมีชีวิต สามารถใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งอาหารอื่นๆได้หลายชนิด เชื้อต้องมีกิจกรรมของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิกซินเทส ยูริดีนไดฟอสเฟต-กลูโคสดีไฮโดรจีเนส และยูริดีนไดฟอสเฟตอะซิทิลกลูโคซามีน ไพโรฟอสโฟไรเลสสูง การเก็บรักษาเชื้อทำได้ง่ายและเชื้อสามารถทนต่อสภาพการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมได้ดี

1.5.2 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิต

1.5.2.1 สารแหล่งคาร์บอน

เชื้อในกลุ่ม Streptococcus สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด จากรายงานการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกพบว่าสามารถใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เช่น กลูโคส รวมทั้งแป้งที่ผ่านการย่อยสลายโดยเอนไซม์ (Van de Rijn and Kessler, 1980; Mickelson, 1964; MacLennan, 1956; Kjems and Lebech, 1976) ซูโครส กาแลคโตส และ ฟรักโตส (Akasaka, Komasaki and Arai, 1989; Ellwood et al., 1995) ปัจจุบันแหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้คือ กลูโคส และ ซูโครส เนื่องจากสามารถหาได้ง่ายและมีราคาถูก โดยปริมาณที่ใช้มีความหลากหลายกันขึ้นกับชนิดของเชื้อและวิธีการหมัก ซึ่งมีตั้งแต่ 2-20 กรัมต่อลิตร

1.5.2.2 สารแหล่งไนโตรเจน

การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดยเชื้อกลุ่ม Streptococcus นั้น ต้องควบคุมปริมาณไนโตรเจนให้เพียงพอโดยไนโตรเจนจะใช้สำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ ปริมาณไนโตรเจนที่มากเกินพอจะมีผลลดการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก เชื้อ Streptococcus สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนได้หลายชนิดทั้งที่เป็นสารอินทรีย์ เช่น สารสกัดจากยีสต์ เปปโตน โปรตีนจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยแล้ว สารสกัดจากเนื้อ กรดอะมิโน (Akasaka, Komasaki and Arai, 1989; Ellwood et al., 1995; Swann et al., 1990; John, Goh and Oeggerli, 1994) และที่อยู่ในรูปสารอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมฟอสเฟต แอมโมเนียม

ไฮดรอกไซด์ ยูเรีย โซเดียมไนเตรท และไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Mickelson, 1964; Kjems and Lebech, 1976; Van de Rijn and Kessler, 1980; Akasaka, Komasaki and Arai, 1989; Ellwood et al., 1995; Swann et al., 1990) โดยในการใช้อาจใช้เพียงชนิดเดียวหรือสองชนิดก็ได้

1.5.2.3 ฟอสเฟต

ยังไม่ทราบความจำเป็นแน่ชัดต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก แต่พบว่าฟอสเฟตเป็นส่วนประกอบของสารที่เป็นสารตั้งต้นในการสร้างกรดไฮยาลูโรนิก คือ UDP-GlcNAc และ UDP-GlcA ในทางชีวเคมีฟอสเฟตมีส่วนสำคัญในกระบวนการสร้างพลังงาน และฟอสเฟตยังเป็นส่วนประกอบของสารภายในเซลล์ที่สำคัญ เช่น กรดนิวคลีอิก ฟอสโฟลิพิด แหล่งฟอสเฟตที่นิยมใช้ในกระบวนการหมักโดยมากอยู่ในรูปของเกลือ เช่นโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Van de Rijn and Kessler, 1980; MacLennan, 1956; Kjems and Lebech, 1976; Bracke and Thacker, 1985)

1.5.2.4 แร่ธาตุ

แร่ธาตุที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดยเชื้อในกลุ่ม Streptococcus คือ ธาตุโลหะที่มี 2 ประจุ คือ $Mn^{++}$ และ $Mg^{++}$ โดยหากเป็น $Mg^{++}$ จะให้ผลดีกว่า หน้าที่ของแมกนีเซียมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกคือ แมกนีเซียมจะช่วยให้การทำงานของเอนไซม์มีเสถียรภาพมากขึ้นและแมกนีเซียมยังเป็นโคแฟกเตอร์ในการเปลี่ยนไพรูเวทไปเป็นแลคเตทโดยเอนไซม์แลคเตทดีไฮโดรจีเนส ปกติในการหมักเพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิกจะควบคุมความเข้มข้นของแมกนีเซียมอยู่ที่ 0.05 กรัมต่อลิตร (Stoolmiller and Dorfman, 1969; Nimrod et al.,1988)โดยส่วนมากจะเติมอยู่ในรูปของ แมกนีเซียมซัลเฟต ในปริมาณ 0.5-1 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังมีแร่ธาตุอื่นๆอีกที่จำเป็นในการหมักแต่ยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด เช่น เหล็ก สังกะสี ซึ่งคาดว่าเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์

1.5.2.5 สารเสริมอื่นๆ

ได้แก่สารอื่นนอกเหนือจากที่กล่าวมาแล้วซึ่งเมื่อเติมลงในอาหารแล้วมีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก หรืออาจมีผลต่อการเจริญของเซลล์ เช่น วิตามินพวกไบโอติน ไรโบเฟลวิน, ไทเอมีน, กรดโฟลิก, แคลเซียมแพนโททีเนต (Bracke and Thacker, 1985) ซีรัมไลโซไซม์, tween 80 (Morita and Fujii, 1991)

1.5.2.6 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดยเชื้อในกลุ่ม Streptococcus นั้นเมื่อเชื้อสร้างกรดไฮยาลูโรนิกและปลดปล่อยออกสู่อาหารเพาะเลี้ยงจะมีผลทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารต่ำลง ซึ่งจะมีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก เนื่องจากเชื้อในกลุ่มนี้เป็นเชื้อที่พบในเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิต ดังนั้นจะเจริญได้ดีก็ต่อเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารอยู่ในช่วงที่เป็นกลาง โดยพบว่าความสามารถในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดย *S. zooepidemicus* ATCC 35246 จะดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.7 ± 0.2 (John, Goh and Oeggerli, 1994; Ellwood et al., 1995) ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องเติมสารที่ใช้ในการปรับความเป็นกรด-ด่างลงไป โดยปกติค่าความเป็นกรด-ด่างในระหว่างการหมักมีแนวโน้มที่จะลดลง ดังนั้นจึงต้องเติมสารที่เป็นด่างลงไป ตัวอย่างของสารที่ใช้ เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Akasaka, Komasaki and Arai, 1989; Swann et al., 1990)

1.5.2.7 อุณหภูมิและระยะเวลาในการหมัก

อุณหภูมิโดยทั่วไปที่เหมาะสมสำหรับเชื้อ Streptococcus ซึ่งปกติเป็นเชื้อที่อยู่ในร่างกายสิ่งมีชีวิตนั้น โดยทั่วไปอยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส แต่จะให้ผลดีที่สุดที่ 37 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นอุณหภูมิที่นิยมใช้กันมากที่สุด (Swann et al, 1990; Nimrod et al., 1988; Ellwood et al., 1995; Akasaka, Komasaki and Arai, 1989) หากอุณหภูมิสูงขึ้นหรือต่ำกว่า 37 องศาเซลเซียสจะมีผลทำให้ได้กรดไฮยาลูโรนิกในปริมาณต่ำ เนื่องจากการเจริญของเซลล์มีในปริมาณต่ำเพราะว่ากรดไฮยาลูโรนิกที่ปลดปล่อยลงสู่อาหารมาจากส่วนแคปซูลของเชื้อ ระยะเวลาในการหมักเมื่อศึกษาการเจริญเปรียบเทียบกับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก พบว่าการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงระยะการเจริญทวีคูณและสูงที่สุดในระยะการเจริญคงที่เนื่องมาจากเซลล์มีการปลดปล่อยไฮยาลูโรนิกออกสู่อาหารสูง ต่อมาเมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะที่มีการตายปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกจะลดต่ำลง เนื่องจากการย่อยสลายของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสและยังมีผลทำให้ขนาดมวลโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้ลดต่ำลงอีกด้วย ดังนั้นระยะเวลาในการหมักที่เหมาะสมในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกอยู่ในช่วง 48 ชั่วโมง โดยที่ประมาณ 30 ชั่วโมงจะให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงที่สุด (Akasaka, Komasaki and Arai, 1989; Swann et al., 1990)

1.5.2.8 การให้อากาศและอัตราการกวน

ในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกนั้นออกซิเจน จัดเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญอย่างมากและมีแนวคิดที่แตกต่างกัน โดยมีความคิดว่าการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกน่าจะมีผลมาจากออกซิเจน โดยกรดจะทำหน้าที่ในการป้องกันและลดความเป็นพิษที่เซลล์สร้างขึ้นเนื่องจากการนำเข้าออกซิเจนปริมาณมาก (Cleary and Larkin, 1979) จากแนวคิดดังกล่าวการผลิตกรดไฮยาลู

โรนิก น่าจะให้ผลดีในสภาพการหมักที่มีการให้อากาศ เพื่อกระตุ้นให้เซลล์สร้างกรดไฮยาลูโรนิก แต่ก็ได้มีแนวคิดโต้แย้งขึ้นเมื่อมีรายงานว่าการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสามารถปรับปรุงให้มีผลผลิตสูงได้โดยกระบวนการหมักในสภาพไร้ออกซิเจนภายใต้สภาพที่มีคาร์บอนไดออกไซด์สูง (Bracke and Thacker, 1985) ดังนั้นจึงได้มีแนวคิดใหม่เกิดขึ้นจากแนวคิดทั้งสองโดยในกระบวนการหมักจะทำในสภาพที่มีความเข้มข้นออกซิเจนสูงจนเซลล์อยู่ในระยะการเจริญทวีคูณต่อมาจึงจำกัดปริมาณออกซิเจนเพื่อกระตุ้นให้เซลล์มีการสร้างและปลดปล่อยกรดไฮยาลูโรนิกสู่อาหารมากขึ้น (Swann et al., 1990) โดยปกติอัตราการให้อากาศในระหว่างการหมักจะอยู่ในช่วง 0.1-1.0 vvm ขึ้นกับชนิดของอาหารและชนิดของเชื้อตลอดจนสภาพของการหมัก อัตราการกวนจากการศึกษาเปรียบเทียบผลของอัตราการกวนพบว่าการกวนที่อัตราสูง (600 rpm) จะให้ผลที่ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการกวนที่ต่ำ (300 rpm) (John, Goh and Oeggerli, 1994)

1.6 <u>ประโยชน์ของกรดไฮยาลูโรนิก</u>

กรดไฮยาลูโรนิกเป็นสารที่มีความสำคัญอย่างมากโดยเฉพาะทางด้านการแพทย์ เนื่องจากเป็นส่วนประกอบในการผลิตยาหรือสารที่ใช้ในหล่อลื่นการผ่าตัดควงตา หรือเป็นส่วนผสมในยาหยอดตา และกรดไฮยาลูโรนิกภายหลังการดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีสามารถที่จะใช้เป็นยารักษาโรคทางข้อต่อ เช่นโรคข้อต่ออักเสบ (Noack, Fischer, Forster, Rovati and Setnikar, 1994) นอกจากนี้ทางด้านการผลิตเครื่องสำอางกรดไฮยาลูโรนิกจัดเป็นองค์ประกอบสำคัญและมีราคาแพงโดยกรดไฮยาลูโรนิกจะทำหน้าที่เป็นสารให้ความชุ่มชื้นกับผิว โดยทั่วไปในส่วนผสมของเครื่องสำอางจะมีกรดไฮยาลูโรนิกในรูปเกลือโซเดียม ประกอบอยู่ประมาณ 0.05-5.0% (Balaz, 1981; Brown et al., 1992; Brown et al., 1994)

1.7 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ และสิ่งก่อการกลายพันธุ์

จุลินทรีย์ที่แยกได้จากธรรมชาติ ตามปกติจะสร้างผลผลิตที่มีความสำคัญทางการค้าในปริมาณค่อนข้างต่ำ ดังนั้นก่อนที่จะนำไปใช้ในทางอุตสาหกรรมจึงต้องปรับปรุงเพื่อให้ได้ผลผลิตที่สูงขึ้น โดยทั่วไปทำได้โดยการเลือกอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์ แต่การเพิ่มผลผลิตโดยวิธีการนี้ถูกจำกัดโดยความสามารถสูงสุดในการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์ซึ่งจะถูกควบคุมโดยยีน ดังนั้นหากต้องการปรับปรุงให้ได้ผลผลิตที่สูงขึ้นไปจำต้องปรับปรุงยีนให้มีการเปลี่ยนไปจึงจะสามารถเพิ่มผลผลิตได้ จากนั้นจึงคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่ให้ผลผลิตสูงขึ้นและศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างผลผลิตอีกครั้ง แต่โดยทั่วไปการปรับปรุงพันธุกรรมจะต้องเป็นไปอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้ได้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นตลอดเวลา ( Fantini, 1975; Stanbury and Whitaker, 1984) การเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของจุลินทรีย์อาจเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติได้ (spontaneous mutation) ซึ่งอาจเกิดจากความผิดพลาดในการแบ่งเซลล์หรือเกิดจากปัจจัยในสภาพแวดล้อม อัตราการเกิดการกลายพันธุ์โดยวิธีนี้ต่ำมากเพียง $10^{-6}$-$10^{-10}$ หรือเป็นการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (induced mutation) โดยสารก่อกลายพันธุ์ ซึ่งวิธีนี้ให้ผลดีกว่าการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ $10^{3}$-$10^{5}$ เท่า สิ่งก่อการกลายพันธุ์สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด (Crueger, 1992)

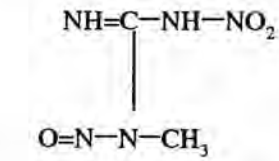
1.7.1 สิ่งก่อการกลายพันธุ์ทางกายภาพ (physical mutagens) ได้แก่ความร้อน การแช่แข็งและการละลาย (freezing and thawing) รังสีชนิดต่าง เช่น รังสีอัลตราไวโอเลตซึ่งเป็นรังสีที่ไม่สามารถแตกตัวเป็นไอออนได้ (non-ionizing radiation) และรังสีเอ็กซ์ รังสีบีตา และรังสีแกมมาที่สามารถแตกเป็นไอออนได้ (ionizing radiation)

1.7.2 สิ่งก่อการกลายพันธุ์ที่เป็นสารเคมี (chemical mutagens) สามารถแบ่งออกได้เป็นหลายชนิดตามชนิดของสารและตำแหน่งการทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอ ตัวอย่างของสารในกลุ่มนี้ ได้แก่ ethylmethanesulfonate, methylmethanesulfonate และ *N*-methyl-*N*-nitrosourea แต่ที่นิยมใช้มากที่สุดคือ *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine ซึ่งเป็นสารในกลุ่มอัลคิลเลติง เอเจนท์ การกลายพันธุ์ซ้ำๆกันด้วยสิ่งก่อการกลายพันธุ์ชนิดเดียว จะก่อให้เกิดการผิดปกติในดีเอ็นเอแบบเดียวกัน ทำให้โอกาสในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายเพื่อให้ได้สายพันธุ์กลายที่ให้ผลผลิตสูงมีน้อย ดังนั้นจึงชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบสลับ เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพในการกลายพันธุ์ที่สูงกว่าการใช้สิ่งก่อการกลายพันธุ์ชนิดเดียว (Thoma, 1971)

การกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรจะชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้โดยทำให้เกิดการแตกหักของสายดีเอ็นเอ และเกิดไดเมอร์ของเบสไพริมิดีน

(pyrimidine dimer) ซึ่งส่วนมากจะเกิดระหว่าง ไธมีน-ไธมีน (thymine-thymine) มากกว่าไซโตซีน-ไธมีน (cytosine-thymine) หรือไซโตซีน-ไซโตซีน (cytosine-cytosine) (Wacker, 1963; Witkin, 1969) ทำให้เกิดการบิดเบี้ยวของสายดีเอ็นเอ เมื่อมีการถอดแบบและแปลรหัสเพื่อสร้างอาร์เอ็นเอ (replication and transcription) ก็จะส่งผลให้เกิดความผิดพลาด จากการศึกษาพบว่าปริมาณไดเมอร์ที่เกิดขึ้นจะแตกต่างตามชนิดของแบคทีเรียและความเข้มของรังสี (Witkin, 1969) การซ่อมแซมความผิดพลาดเนื่องจากการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต สามารถทำให้คืนสู่สภาพเดิมโดยการใช้แสงช่วง visible light คือประมาณ 300-500 นาโนเมตร ซึ่งแสงไปกระตุ้น photoreactivating enzyme ทำให้เกิดปรากฏการณ์ photoreactivation ดังนั้นจึงต้องป้องกันการถูกแสง visible light ทันทีภายหลังการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต (Hill, 1965; Bridges, 1966; Fantini, 1975)

ส่วนการกลายพันธุ์ด้วย *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (NTG หรือ MNNG) ซึ่งเป็นสารอัลคิลเลติง (alkylating agent) ที่สามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ ลักษณะของสารเป็นผลึกสีเหลือง มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 147.1 มีจุดหลอมเหลวและจุดเดือดเท่ากับ 118 และ 123.5 องศาเซลเซียสตามลำดับ โครงสร้างของ NTG แสดงดังรูปที่ 1.7 พบว่าเมื่ออยู่ในสภาวะกรดจะให้กรดไนตรัส (nitrous acid) และเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นด่างจะให้ไดอะโซมีเทน (diazomethane) ซึ่งไดอะโซมีเทนจะทำปฏิกริยาแบบเติมหมู่อัลคิล(alkylation) ให้กับเบสพิวรีน (purine base) ในตำแหน่งที่ 7 โดยผลิตภัณฑ์ที่สำคัญที่ได้คือ 7- methylguanine (Mandell and Greenberg, 1960; Loprieno et al., 1964) มีผลทำให้เกิดความผิดปกติของดีเอ็นเอ ทำให้เกิดการจับคู่ผิด (misspairing) และเกิดการเปลี่ยนแปลงของเบสที่เชื่อมกับน้ำตาลโดยเกิดได้ทั้งแบบ transition และ transversion โดยปกติความสามารถในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์จะขึ้นกับชนิดของแบคทีเรีย และชนิดของสารชักนำที่ใช้ จากการศึกษาพบว่าสารที่เป็น methylating agent จะก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ดีกว่า ethylating agent ( Loprieno et al., 1964) สำหรับในงานวิจัยนี้จะเป็นการกลายพันธุ์เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรีย *Streptococcus zooepidemicus* ให้มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูงขึ้นและลดการสร้างสเตรปโตไลซิน โดยวิธีใช้รังสีอัลตราไวโอเลตและ *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (NTG) เพื่อที่จะนำไปพัฒนาใช้ในการผลิตขั้นอุตสาหกรรมต่อไป



รูปที่ 1.7 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ NTG

1.8 การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลาย

การคัดเลือกเชื้อเป็นไปแบบสุ่ม เพื่อคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารผลิตภัณฑ์ โดยจะต้องพิจารณาถึงประสิทธิภาพการผลิตสารและค่าใช้จ่ายหรือต้นทุนในกระบวนการผลิต คุณสมบัติของเชื้อที่ใช้คัดเลือกเพื่อนำไปผลิตในระดับอุตสาหกรรม มีดังนี้

ก. เป็นเชื้อที่มีความเสถียรทางสายพันธุ์ ให้ปริมาณผลผลิตสูงคงที่

ข. สามารถใช้แหล่งอาหารได้หลายชนิด และเป็นแหล่งอาหารที่หาได้ง่าย มีราคาถูก

ค. ไม่ผลิตสารอื่นที่ไม่ต้องการ หรือผลิตสารที่เป็นพิษ และผลผลิตที่ได้ต้องง่ายในการเก็บเกี่ยว

ง. สามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมได้ดี เพื่อลดค่าใช้จ่ายในการรักษาระบบ

สำหรับในการคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายเพื่อใช้สำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกนั้น เชื้อที่ได้ต้องมีลักษณะดังนี้ คือ มีความเสถียรทางสายพันธุ์ สามารถให้ผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้สูง ไม่ผลิตสเตรปโตไลซิน โดยในการคัดเลือกแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน (Nimrod et al., 1988)

1.8.1 การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ พิจารณาจากลักษณะรูปร่างของโคโลนี โดยคัดเลือกโคโลนีที่มีเมือกมาก และเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีเลือด ไม่ให้ผลการย่อยเม็ดเลือดแดง

1.8.2 การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ ทำโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรสำหรับการผลิต ในภาวะที่เหมาะสม แล้ววิเคราะห์หาปริมาณผลผลิตที่ได้โดยวิธีคาร์บาโซล (Bitter and Muir, 1962; Galambos, 1967) หรือวิเคราะห์โดยการใช้โครมาโตกราฟีแบบต่างๆ (Toyoda et al., 1991; Akiyama, 1992; Payan, Jouzeau, Lapicque and Muller, 1991; Brun et al., 1990; John, Goh and Oeggerli,1994)

1.9 การกลายพันธุ์และการคัดเลือกสายพันธุ์ *Streptococcus* sp. เพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

รายงานเกี่ยวกับเรื่องการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์กับเชื้อ Streptococcus ในปัจจุบันมีอยู่น้อยมาก มีรายงานการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์กับเชื้อ *S. zooepidemicus* โดยการใช้สารเคมี NTG ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายใน ทริส-มาเลอิกบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0 เป็นเวลา 40 นาที ได้สายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูง และไม่มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงคือ สายพันธุ์ *S. zooepidemicus* HA-116 ATCC 39920 โดยให้ผลผลิต 2-3 กรัมต่อลิตรในสภาพที่ไม่มีการให้อากาศ และ 4-6 กรัมต่อลิตรในสภาพที่มีการให้อากาศ

(Nimrod et al., 1988) และรายงานการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการใช้ UV สลับกับการใช้ NTG ทำให้ได้สายพันธุ์ใหม่คือ *S. zooepidemicus* NH-131 FERM BP-784 ที่ให้ผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิก 3.6 กรัมต่อลิตร และไม่มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Akasaka, Komasaki and Arai, 1989)

1.10 มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย

กรดไฮยาลูโรนิกเป็นสารพอลิแซคคาไรด์ที่มีความหนืดสูง ในธรรมชาติพบเป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อในหลายส่วนของร่างกาย มีการนำไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์หลายอย่าง เช่น ใช้เป็นสารหล่อเลี้ยงในการผ่าตัดตา ผ่าตัดเส้นโลหิต ผ่าตัดอวัยวะและใช้ในการรักษาโรคทางกระดูกข้อต่อ นอกจากนี้กรดไฮยาลูโรนิกยังเป็นองค์ประกอบของเครื่องสำอางที่มีราคาแพงอีกด้วย การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสามารถผลิตได้หลายวิธี คือ การผลิตโดยการสกัดแยกจากสิ่งมีชีวิต การผลิตด้วยวิธีการสังเคราะห์ขึ้นจากโมเลกุลของน้ำตาลโดยอาศัยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ และการผลิตจากกระบวนการหมักโดยแบคทีเรียโดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่มสเตรปโตคอคคัส เนื่องจากปริมาณที่ผลิตได้จากแต่ละวิธีค่อนข้างต่ำ กรดนี้จึงมีราคาแพง แต่วิธีการผลิตจากกระบวนการหมักนั้นสามารถปรับปรุงให้มีผลผลิตสูงได้โดยการปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อ งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ที่จะปรับปรุงสายพันธุ์ *S. zooepidemicus* ที่ผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้โดยวิธีชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต และ *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine แล้วคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงสำหรับนำไปพัฒนาใช้ในการผลิตขั้นอุตสาหกรรมต่อไป

1.11 ขั้นตอนการวิจัย

1.11.1. คัดเลือกสายพันธุ์ *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 และ 35247 เพื่อใช้เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

1.11.2. ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต และชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดย *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (NTG) พร้อมทั้งคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้สูงสุด

1.11.3. ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำโดยการใช้รังสีอัลตราไวโอเลตสลับกับการใช้ *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (NTG) ตามข้อ 1.11.2

1.11.4. ทดสอบความเสถียรของสายพันธุ์ที่ได้จากการกลายพันธุ์

1.11.5.เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดย *S. zooepidemicus* ที่ได้จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์กับสายพันธุ์เดิม