# <u>รายงานการวิจัย</u>

การปรับปรุงกระบวนการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดยวิธีการทางชีวภาพ

เพื่อการนำไปใช้ในงานศัลยกรรมตกแต่ง

Improved hyaluronic acid production via bioprocess

for correction surgery

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รศ.ดร. ณัฏฐา ทองจุล

อ. วาสนา โตเลี้ยง

ดร. สิตานัน ธิติประเสริฐ

น.ส. จิราภรณ์ พิลึก

น.ส. ปภัสรา แสงธนู

# กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2560 การสนับสนุนดังกล่าวทำให้การดำเนินการวิจัยสำเร็จและข้อมูลที่ได้จากการวิจัยเป็นประโยชน์ในการนำไปต่อยอดงานวิจัยในอนาคต คณะผู้วิจัยขอขอบคุณการสนับสนุนทุนวิจัย มา ณ ที่นี้

**บทคัดย่อ**

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการปรับปรุงกระบวนการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดยวิธีทางชีวภาพ สำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านศัลยกรรมตกแต่งเพื่อแก้ไขความพิการหรือบกพร่องบนใบหน้า เป็นการปรับปรุงกระบวนการรักษาให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น รวมถึงการขยายโอกาสและทางเลือกในการรักษา กรดไฮยาลูโรนิกเป็นส่วนประกอบหลักที่พบได้ในเนื้อเยื่อของร่างกาย ดังนั้นจึงมีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการนำมาประยุกต์ใช้กับงานด้านศัลกรรมแตกแต่ง และเป็นสารพอลิเมอร์ชีวภาพที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิตชั้นสูงและการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ เนื่องด้วยความซับซ้อนของเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตชั้นสูงจึงทำให้มีข้อจำกัดและต้นทุนสูงในการสกัดกรดไฮยาลูโรนิกให้ได้ปริมาณมาก ดังนั้นเพื่อให้ได้กรดไฮยาลูโรนิกในปริมาณมาก รวมถึงต้นทุนที่ใช้ในการผลิตต่ำ การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกผ่านกระบวนการหมักจึงเป็นที่สนใจ ในงานวิจัยนี้ มุ่งศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดยจุลินทรีย์ *Streptococcus zooepidermicus* UN-7 ในการทดลองทำการแปรปริมาณอาหารแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจนและความเร็วรอบที่ใช้ในระดับขวดเขย่า โดยเปรียบเทียบปริมาณของกรดไฮยาลูโรนิกที่ภาวะต่างๆ จากการวิจัยพบว่าภาวะการหมักในระดับขวดเขย่าที่สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้สูงคือ ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนซูโครสที่ 3 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนแลกติกเคซีนที่ 10 กรัมต่อลิตรและความเร็วรอบที่ใช้ในการเขย่าเท่ากับ 300 รอบต่อนาที เมื่อได้ภาวะที่เหมาะในระดับขวดเขย่าจึงทำการวิจัยเพื่อเพิ่มปริมาณของกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร โดยแปรปัจจัยทางกายภาพ เคมีและชีวภาพ ได้แก่ อัตราการปั่นกวน อัตราการให้อากาศ การเติมสารตั้งต้นและติดตามค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจน และพบว่าอัตราการปั่นกวนส่งผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกเช่นกัน

**สารบัญ**


| | หน้า |
|---|---|
| กิตติกรรมประกาศ | 1 |
| บทคัดย่อ | 2 |
| สารบัญ | 3 |
| สารบัญรูป | 4 |
| บทนำ | 6 |
| วัตถุประสงค์ | 8 |
| วิธีการดำเนินงาน | 8 |
| จุลินทรีย์และการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ | 8 |
| การเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น | 8 |
| การศึกษาการแปรสภาวะที่มีอิทธิพลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับขวดเขย่า | 8 |
| การแปรปริมาณความเข้มข้นของแลกติกเคซีนและน้ำตาลซูโคส | 8 |
| การแปรความเร็วรอบในการกวนผสมในระดับขวดเขย่า | 9 |
| การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร | 9 |
| การแปรความเร็วรอบที่ใช้ในการปั่นกวนระหว่างการหมัก | 9 |
| ผลของการเติม Uridine 5´-diphospho-N-acetylglucosamine sodium salt และ Uridine 5´-triphosphate tris salt ในอาหารเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก | 9 |
| การวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก | 9 |
| การสกัดกรดไฮยาลูโรนิก | 9 |
| การตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิก | 9 |
| การวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกและปริมาณน้ำตาลซูโคสด้วยกระบวนการ HPLC | 10 |
| การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนด้วยโดยวิธีเจลดาห์ล (Kjeldahl) | 10 |
| ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง | 10 |
| การแปรปริมาณของแลกติกเคซีนและน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก | 10 |
| ผลของความเร็วรอบของการเขย่าต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของ *S. zooepidermicus* UN-7 ในระดับขวดเขย่า | 15 |
| ผลของอัตราการปั่นกวนต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกด้วย *S. zooepidermicus* UN-7 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดกวนขนาด 5 ลิตร | 17 |
| ผลของการเติม Uridine 5´-diphospho-N-acetylglucosamine sodium salt และ Uridine 5´-triphosphate tris salt ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก | 20 |
| สรุปผลการทดลอง | 24 |
| เอกสารอ้างอิง | 25 |
| ภาคผนวก | 27 |

# สารบัญรูป


หน้า

รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของกรดไฮยาลูโรนิก 6

รูปที่ 2 แสดงกลไกการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกใน Streptococci 7

รูปที่ 3 การเจริญของของ S. zooepidermicus UN-7 ในอาหารเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการแปรความเข้มข้นแลกติกเคซีน 10 20 และ 40 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลซูโครสที่ 3 กรัมต่อลิตร 11

รูปที่ 4 เปรียบเทียบค่า pH เมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 3 กรัมต่อลิตร 12

รูปที่ 5 เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ เมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 3 กรัมต่อลิตร 12

รูปที่ 6 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหลือ เมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 3 กรัมต่อลิตร 13

รูปที่ 7 เปรียบเทียบปริมาณการเจริญของเซลล์ เมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 0 กรัมต่อลิตร 13

รูปที่ 8 เปรียบเทียบค่า pH เมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 0 กรัมต่อลิตร 14

รูปที่ 9 เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ เมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 0 กรัมต่อลิตร 14

รูปที่ 10 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหลือ เมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 0 กรัมต่อลิตร 15

รูปที่ 11 เปรียบเทียบปริมาณการเจริญของเซลล์ เมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 3 กรัมต่อลิตร ความเร็วในการหมุนระหว่างการหมัก 200 250 และ 300 รอบต่อนาที 16

รูปที่ 12 เปรียบเทียบค่า pH เมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 3 กรัมต่อลิตร ความเร็วในการหมุนระหว่างการหมัก 200 250 และ 300 รอบต่อนาที 16

รูปที่ 13 เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ เมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 3 กรัมต่อลิตร ความเร็วในการหมุนระหว่างการหมัก 200 250 และ 300 รอบต่อนาที 17

รูปที่ 14 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหลือ เมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 3 กรัมต่อลิตร ความเร็วในการหมุนระหว่างการหมัก 200 250 และ 300 รอบต่อนาที 17

รูปที่ 15 เปรียบเทียบปริมาณการเจริญของเซลล์ เมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 3 กรัมต่อลิตร อัตราเร็วการปั่นกวนระหว่างการหมัก 300 500 และ 700 รอบต่อนาที ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร 18

รูปที่ 16 เปรียบเทียบค่า pH เมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลซูโครส 3 กรัมต่อลิตร อัตราเร็วการปั่นกวนระหว่างการหมัก 300 500 และ 700 รอบต่อนาที ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร 19

# สารบัญรูป


หน้า

รูปที่ 17 เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ เมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลซูโครส 3 กรัมต่อลิตร อัตราเร็วในการปั่นกวนระหว่างการหมัก 300 500 และ 700 รอบต่อนาที ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร 19

รูปที่ 18 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหลือ เมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลซูโครส 3 กรัมต่อลิตร อัตราเร็วการปั่นกวนระหว่างการหมัก 300 500 และ 700 รอบต่อนาที ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร 20

รูปที่ 19 เปรียบเทียบปริมาณการเจริญของเซลล์ เมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลซูโครส 3 กรัมต่อลิตร อัตราเร็วการปั่นกวนระหว่างการหมัก 300 รอบต่อนาที โดยเติมสารตั้งต้น Uridine 5′-diphospho-N-acetylglucosamine sodium salt และ Uridine 5′-triphosphate tris salt ที่ความเข้มข้น 0.01 mM และ 0.05 mM ตามลำดับ และเปรียบเทียบกับชุดควมคุมที่ไม่เติมสารตั้งต้น ระหว่างการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร 21

รูปที่ 20 เปรียบเทียบค่า pH เมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลซูโครส 3 กรัมต่อลิตร อัตราเร็วการปั่นกวนระหว่างการหมัก 300 รอบต่อนาที โดยโดยเติมสารตั้งต้น Uridine 5′-diphospho-N-acetylglucosamine sodium salt และ Uridine 5′-triphosphate tris salt ที่ความเข้มข้น 0.01 mM และ 0.05 mM ตามลำดับ และเปรียบเทียบกับชุดควมคุมที่ไม่เติมสารตั้งต้น ระหว่างการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร 22

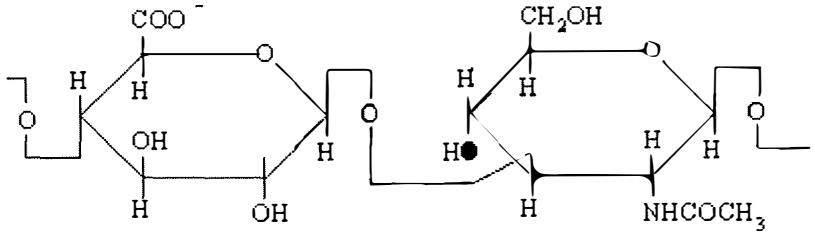
รูปที่ 21 เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ เมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 3 กรัมต่อลิตร อัตราเร็วในการปั่นกวนระหว่างการหมัก 300 รอบต่อนาที โดยโดยเติมสารตั้งต้น Uridine 5′-diphospho-N-acetylglucosamine sodium salt และ Uridine 5′-triphosphate tris salt ที่ความเข้มข้น 0.01 mM และ 0.05 mM และเปรียบเทียบกับชุดควมคุมที่ไม่เติมสารตั้งต้น ระหว่างการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร 22

รูปที่ 22 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหลือ เมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 3 กรัมต่อลิตร อัตราเร็วการปั่นกวนระหว่างการหมัก 300 รอบต่อนาที โดยเติมสารตั้งต้น Uridine 5′-diphospho-N-acetylglucosamine sodium salt และ Uridine 5′-triphosphate tris salt ที่ความเข้มข้น 0.01 mM และ 0.05 mM และเปรียบเทียบกับชุดควมคุมที่ไม่เติมสารตั้งต้น ระหว่างการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร 23

รูปที่ 23 เปรียบเทียบปริมาณไนโตรเจนที่เหลือเมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 3 กรัมต่อลิตร อัตราเร็วการปั่นกวนระหว่างการหมัก 300 รอบต่อนาที โดยเติมสารตั้งต้น Uridine 5′-diphospho-N-acetylglucosamine sodium salt และ Uridine 5′-triphosphate tris salt ที่ความเข้มข้น 0.01 mM และ 0.05 mM และเปรียบเทียบกับชุดควมคุมที่ไม่เติมสารตั้งต้น ระหว่างการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร 23

**บทนำ**

กรดไฮยาลูโรนิก (Hyaluronic acid; HA) เป็นเฮเทอโรพอลิแซคคาไรด์ในกลุ่ม glycosaminoglycan (GAGs) ประกอบไปด้วยหน่วยของน้ำตาล D-glucoronic acid (GlcUA ) และ N-acetylglucosamine (GlcNAc) ดังแสดงในรูปที่ 1 เรียงต่อกันเป็นสายโซ่ขนาดยาว มีคุณสมบัติหนืด ยืดหยุ่น และละลายน้ำได้ดี มีน้ำหนักโมเลกุลสูง สามารถพบได้ตั้งแต่ขนาดโมเลกุล $10^6$-$10^7$ ดาลตัน มีสูตรโมเลกุล คือ $(C_{14}H_{21}NO_{11})n$ โดย n มีค่ามากกว่า 1000 ขึ้นไป โดยกรดไฮยาลูโรนิกแตกต่างจากไกลโคสะมิโนไกลแคนตัวอื่นๆ ตรงที่มีพันธะโควาเลนต์จับกับโปรตีนและไม่มีหมู่ฟอตเฟต กรดไฮยาลูโรนิกมีโครงสร้างทางเคมีที่สามารถจับกับประจุบวกได้ดี เช่น $K^+$, $Na^+$ และ $Ca^+$ นอกจากนี้ยังมีหมู่ฟังก์ชั่นพวก carboxyl และ N-acetyl ที่มีขั้วอยู่ในปริมาณสูงเมื่อละลายในน้ำหมู่ฟังชั่นเหล่านี้สามารถสร้างพันธะไฮโรเจนกับโมเลกุลของน้ำได้ ดังนั้นกรดไฮยาลูโรนิกจึงสามารถดูดเก็บน้ำได้ดี (Chong และคณะ, 2005)



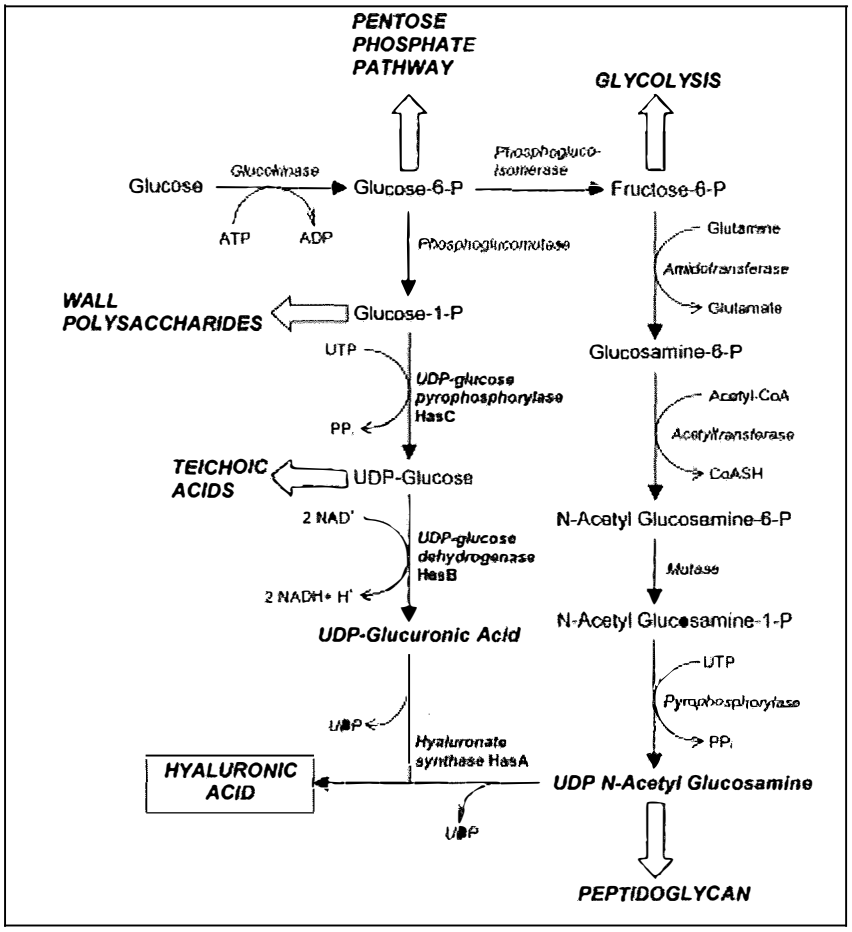

D-Glucuronic acid N-acetylglucosamine

**รูปที่ 1** โครงสร้างทางเคมีของกรดไฮยาลูโรนิก (Necas และคณะ, 2008)

กรดไฮยาลูโรนิกมีความสำคัญต่อโครงสร้างทางชีวภาพของเซลล์สัตว์และเป็นสารปฐมภูมิที่แบคทีเรียบางชนิดสร้างขึ้นในเซลล์สัตว์ (Necas และคณะ, 2008) โดยทำหน้าที่เป็นส่วนประกอบของเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ มีลักษณะเป็นวุ้นอยู่ระหว่างคอลลาเจนและอีลาสตินไฟเบอร์ ช่วยลำเลียงสารอาหารต่างๆ ที่จำเป็นจากกระแสเลือดไปยังเซลล์ต่างๆ เช่น น้ำเลี้ยงตา น้ำหล่อลื่นบริเวณส่วนข้อต่อของร่างกาย เป็นต้น สำหรับเซลล์จุลินทรีย์ กรดไฮยาลูโรนิกถูกพบอยู่ในลักษณะเป็นแคปซูล ซึ่งเป็นสารปฐมภูมิที่ถูกสร้างขึ้นโดยแบคทีเรีย 2 กลุ่ม คือ *Strepphylococci* และ *Streptococci* Group A และ C (Main, 1986) ด้วยคุณสมบัติของกรดไฮยาลูโรนิกที่มีความหนืด ยืดหยุ่น มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพและไม่เป็นพิษกับระบบภูมิคุ้มกันภายในเซลล์ จึงถูกนำมาประยุกต์ใช้กันอย่างแพร่หลายทางด้านการแพทย์ เภสัชกรรมและเครื่องสำอาง เช่น ใช้เป็นสารเสริมหล่อลื่นในโรคไขข้อ (Neo และคณะ, 1997) ช่วยฟื้นฟูการรักษาแผลหลังการผ่าตัดตา (Brown และ Jones, 2005) นอกจากนี้กรดไฮยาลูโรนิกมีคุณสมบัติของการเป็นสารทดแทนคอลลาเจนในผิวหนังที่มีการลดปริมาณลงเมื่อมนุษย์มีอายุที่เพิ่มสูงขึ้น โดยกรดไฮยาลูโรนิกช่วยเติมเต็มให้ผิวที่หย่อนคล้อยเป็นผิวที่มีความเต่งตึงและลดการเกิดริ้วรอยได้ (ณัฏฐา และคณะ, 2559)

การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในทางการค้าในระยะแรกส่วนใหญ่ผลิตได้ด้วยการสกัดแยกจากเนื้อเยื่อของสัตว์โดยสกัดจากหงอนไก่ ข้อต่อวัว หรือกระดูกอ่อนของปลาวาฬ แต่พบว่ากรรมวิธีดังกล่าวมีข้อเสียเนื่องจากกรดไฮยาลูโรนิกจะอยู่รวมกับโปรตีน และมิวโคพอลิแซคคาไรด์ (mucopolysaccharide) ในเนื้อเยื่อ ทำให้กระบวนการทำให้บริสุทธิ์ยุ่งยากซับซ้อนในการแยกเอาโปรตีน และมิวโคพอลิแซคคาไรด์ออกไป และยังพบว่ามีการปนเปื้อนของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส จึงมีการย่อยสลายพอลิเมอร์ของกรดไฮยาลูโรนิกทำให้กรดไฮยาลูโรนิกที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ และสูญเสียคุณสมบัติในการดูดน้ำรวมทั้งมีความยืดหยุ่นต่ำด้วย ปัจจุบันจึงสนใจ

ในการใช้จุลินทรีย์ในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก เนื่องจากให้ผลผลิตในปริมาณมาก และมีคุณภาพสูง และยังสามารถปรับปรุงด้านพันธุกรรมได้ และสามารถควบคุมสภาวะในการเพาะเลี้ยงได้ ซึ่งจุลินทรีย์ที่นิยมใช้ในการผลิต คือ *Streptococcus* Group A และ C (Armstrong และ Michael, 1997)




**รูปที่ 2** แสดงกลไกการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกใน Streptococci (Chong, 2005)

จากวิถีสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกด้วยแบคทีเรียสกุล *Streptococci* นั้นพบว่า การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกจะถูกกำหนดด้วย 2 วิถีสังเคราะห์ด้วยกัน กล่าวคือ ปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของ UDP-glucose โดยการทำงานของ UDP-glucose dehydrogenase และถูกผลิตขึ้นเป็น UDP-glucuronic acid ซึ่งเป็นสารตั้งต้นแรกของการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก ในขณะเดียวกันปฏิกิริยาที่เกิดควบคู่กับปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของ UDP-glucose คือ ปฏิกิริยาการเกิด UDP N-acytyl glucosamine ซึ่งเป็นสารตั้งต้นอีกชนิดหนึ่งที่ทำหน้าที่รวมปฏิกิริยากับสารตั้งต้น UDP-glucoronic acid เพื่อสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก (รูปที่ 2) ซึ่งจากวิถีสังเคราะห์ดังกล่าว พบข้อจำกัดของการให้ผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิก เนื่องจากการใช้สารตั้งต้นเพื่อสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกและการผลิตเซลล์ของ *Streoptococci* เป็นสารตั้งต้นชนิดเดียวกัน นั่นเป็นเหตุให้ผลผลิตของกรดไฮยาลูโรนิกที่ลดน้อยลง (Liu และคณะ, 2011) ซึ่งในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกด้วยจุลินทรีย์นั้น มีงานวิจัยก่อนหน้าที่ทำการศึกษาเพื่อพัฒนากระบวนการผลิตและเพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิก ซึ่งมีงานวิจัยหลากหลายที่ได้รายงานถึงผลของปัจจัยต่างๆ ได้แก่ สายพันธุ์จุลินทรีย์ ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ ค่าพีเอช สภาวะในการ

ควบคุมระหว่างการหมัก รวมถึงอัตราการกวนและการให้อากาศ ที่ส่งผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก ( Pierce และ White, 1954; Nimrod และคณะ, 1988; Akasaka และคณะ, 1989; Liu และคณะ, 2008; Chen และคณะ, 2009; Patil และคณะ, 2011)

อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์ผลงานวิจัยก่อนหน้าพบว่าจากวิถีสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกด้วยแบคทีเรียนั้นยังพบข้อจำกัดของผลผลิตที่เกิดขึ้น ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจศึกษาปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ปัจจัยทางกายภาพ เคมี และชีวภาพที่ส่งผลต่อปริมาณการผลิตและน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกด้วย *Streptococcus zooepidermicus* UN-7 ที่ถูกปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสียูวีและสาร NTG ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พบว่ามีความสามารถเพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้จากการใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้น

**วัตถุประสงค์ของงานวิจัย**

ศึกษาปัจจัยทางกายภาพ เคมี และชีวภาพที่มีผลต่อปริมาณการผลิตและน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮ-ยาลูโรนิกจากกระบวนการหมักโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์โดย รศ.ดร. นลิน นิลอุบล และคณะ ในระดับขวดเขย่า และถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ศึกษาผลของปัจจัยทางวิศวกรรม และข้อมูลเชิงเศรษฐศาสตร์กระบวนการที่มีต่อปริมาณการผลิตและน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก เพื่อเก็บเป็นข้อมูลพื้นฐานในการขยายสเกลการผลิต

**วิธีการดำเนินงาน**

**จุลินทรีย์และการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์**

จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus zooepidermicus* UN-7 ที่ถูกทำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยทรงศักดิ์ พันธุ์วัฒนะสิงห์ (2540) ในการเพาะเลี้ยง *S. zooepidermicus* UN-7 เริ่มจากการเขี่ยเชื้อและลากเชื้อลงบนผิวหน้าอาหารแข็งลาดเอียง Brain Heart Infusion (BHI) และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และในการเก็บรักษาจุลินทรีย์ทำได้โดยการนำจุลินทรีย์เก็บรักษาที่อุณภูมิ 4 องศาเซลเซียส

**การเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น**

ทำการเตรียมสารละลายเชื้อ UN-7 โดยการเติมน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารแข็งลาดเอียงที่มีการเจริญของ UN-7 จากนั้นทำการผสมเชื้อและน้ำปราศจากไอออนให้มีลักษณะเป็นสารละลายเชื้อที่เข้ากันดี ต่อด้วยปิเปตสารละลายเชื้อที่ได้ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว BHI ปริมาตร 48.5 มิลลิลิตร (3% หัวเชื้อ) ที่บรรจุอยู่ในขวดเขย่าปริมาตร 250 มิลลิลิตร ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งเชื้อจะเจริญอยู่ในระยะกึ่งกลางทวีคูณ (mid-log phase) ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ประมาณ 20

**การศึกษาการแปรสภาวะที่มีอิทธิพลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับขวดเขย่า**

**การแปรปริมาณความเข้มข้นของแลกติกเคซีนและน้ำตาลซูโคส**

ในการศึกษาผลของการแปรความเข้มข้นของแลกติกเคซีนและน้ำตาลซูโครส ทำได้โดยการใช้สูตรอาหารเหลวเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก (ภาคผนวก) ที่มีการแปรความเข้มข้นของสารละลายแลกติกเคซีนที่ 10 20 และ 40 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 0 และ 3 กรัมต่อลิตร โดยเริ่มจากการถ่ายหัวเชื้อที่ได้จากการเตรียมหัวเชื้อตั้งต้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในสูตรอาหารเหลวสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกปริมาตร 45 มิลลิลิตร (10% หัวเชื้อ) ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดเขย่าขนาด 250 มิลลิลิตร ควบคุมสภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง วิเคราะห์การเจริญของเซลล์ ค่า pH ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกและปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหลือ

**การแปรความเร็วรอบในการกวนผสมในระดับขวดเขย่า**

ถ่ายหัวเชื้อตั้งต้นที่ได้จากขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสูตรสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก (ภาคผนวก) ที่มีแลกติกเคซีน 10 กรัมต่อลิตรและน้ำตาลซูโครส 3 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 45 มิลลิลิตร (10% หัวเชื้อ) ที่บรรจุในขวดเขย่าปริมาตร 250 มิลลิลิตร ควบคุมสภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แปรความเร็วรอบในกวนผสมที่ 200 250 และ 300 รอบต่อนาที ทำการหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง วิเคราะห์การเจริญของเซลล์ ค่า pH ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกและปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหลือ

**การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร**

**การแปรความเร็วรอบที่ใช้ในการปั่นกวนระหว่างการหมัก**

ถ่ายหัวเชื้อตั้งต้นที่ได้จากขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสูตรสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก (ภาคผนวก) ที่มีแลกติกเคซีน 10 กรัมต่อลิตรและน้ำตาลซูโครส 3 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 2,700 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ควบคุมสภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยแปรความเร็วรอบในการปั่นกวนที่ 300 500 และ 700 รอบต่อนาที ทำการหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง วิเคราะห์การเจริญของเซลล์ ค่า pH ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกและปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหลือ

**ผลของการเติม Uridine 5′-diphospho-N-acetylglucosamine sodium salt และ Uridine 5′-triphosphate tris salt ในอาหารเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก**

ถ่ายหัวเชื้อตั้งต้นที่ได้จากขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสูตรสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก (ภาคผนวก) ที่มีแลกติกเคซีน 10 กรัมต่อลิตรและน้ำตาลซูโครส 3 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 2,700 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ในการทดลองนี้ทำการแปรการเติม Uridine 5´-diphospho-N-acetylglucosamine sodium salt และ Uridine 5´-triphosphate tris salt ที่ความเข้มข้น 0.01 และ 0.05 mM ลงในอาหารเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก ทำการควบคุมสภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปั่นกวนที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง วิเคราะห์การเจริญของเซลล์ ค่า pH ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกและปริมาณน้ำตาลซูโครสและปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ

**การวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก**

**การสกัดกรดไฮยาลูโรนิก**

นำน้ำหมักที่ถูกเก็บตัวอย่างไว้มาทำการปั่นแยกส่วนใสและเซลล์ออกจากกันที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำส่วนใสมาตกตะกอนด้วยเอทานอลเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

**การตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิก**

นำส่วนใสที่แยกได้มาตกตะกอนด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 100% ในปริมาตรของเอทานอลที่ใช้เป็น 1.5 เท่าของส่วนใสเริ่มต้น จากนั้นนำส่วนผสมข้างต้นแช่เย็นที่อุณภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามด้วยทำการปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนไฮยาลูโรนิกที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำตะกอนที่ได้มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.15 โมลาร์ เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกต่อไป (Ogrodowskic และคณะ, 2005)

**การวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกและปริมาณน้ำตาลซูโคสด้วยกระบวนการ HPLC**

ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ถูกผลิตขึ้นจะถูกวิเคราะห์ด้วยการนำสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกในโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.15 โมลาร์กรองผ่านเมมเบรนเซลลูโลสอะซีเตท ขนาด 0.45 µm จากนั้นทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ภายใต้สภาวะการวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ Shodex OHpak SB-806 HQ ขนาด 8.0x300 mm.x2 ที่ใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.15 โมลาร์ เป็นสารตัวนำที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 45 องศาเซลเซียส ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่แสดงผลจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC ถูกนำมาเปรียบเทียบเพื่อหาปริมาณการผลิตจากกราฟสารละลายไฮยาลูโลนิกมาตรฐานสำหรับผลผลิตข้างเคียงและปริมาณการใช้น้ำตาลซูโครส ทำการวิเคราะห์ด้วยการนำตัวอย่างน้ำหมักที่ผ่านการแยกนำเอาส่วนเซลล์ออกมากรองผ่านเมมเบรนเซลลูโลสอะซีเตทขนาด 0.45 µm และเจือจางให้อยู่ในช่วงของความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (0.25 – 2 กรัมต่อลิตร) จากนั้นทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ภายใต้สภาวะการวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ Biorad Aminex HPX-87H ion exclusion organic acid column

ขนาด 300 มิลลิเมตร x 7.8 มิลลิเมตร โดยใช้กรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 0.005 โมลาร์ เป็นสารละลายตัวพา และใช้อัตราการไหลที่ 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ทำการควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 40 องศาเซลเซียสและใช้เครื่องตรวจวัดชนิด refractive index (RI) ปริมาณการใช้น้ำตาลซูโครสและผลิตภัณฑ์ข้างเคียงอื่นจะถูกเปรียบเทียบโดยการใช้กราฟสารละลายมาตรฐาน

**การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนด้วยโดยวิธีเจลดาห์ล (Kjeldahl)**

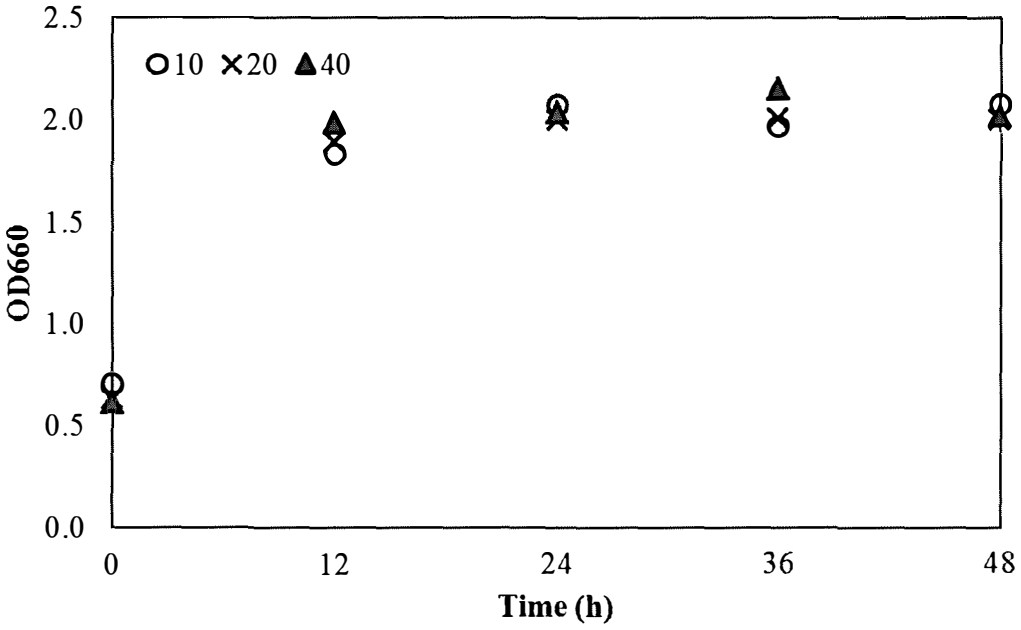
นำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดกลั่นขนาด 300 มิลลิลิตร เติม Catalyst (ตัวเร่งปฏิกิริยา) ที่ประกอบด้วย ประกอบด้วย $K_2SO_4$ 98% และ $CuSO_4$ 2% จำนวน 7 กรัม และเติมกรดกำมะถันเข้มข้นปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปย่อยบนเตาหลุม (digestor) ด้วยเครื่องทำการย่อยสารละลายในขวดจนกระทั่งสีดำหรือน้ำตาลในขวดหายไปและสารละลายใส เมื่อสารตัวอย่างถูกเปลี่ยนสภาพมาเป็นเกลือของแอมโมเนียมทั้งหมดแล้วด้วยการย่อย ให้ตั้งสารละลายในขวดเจลดาห์ลที่ย่อยเสร็จแล้วไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร. แล้วทำสารละลายให้มีฤทธิ์เป็นเบสด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร)จำนวน 20 มิลลิตร สารละลายจะเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำเงินเข้มและมีตะกอนสีดำ ทำการกลั่นสารละลายในขวดเจลดาห์ลโดยให้เดือดเพียงเบาๆ เตรียมขวดสำหรับเก็บแอมโมเนีย (Receiving flask) โดยใช้ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุสารละลายกรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งเมื่อเติมสารละลายอินดิเคเตอร์ผสม ลงไป 2-3 หยด จะได้สารละลายเป็นสีส้ม แอมโมเนียจะทำปฏิกิริยากับกรดบอริกได้แอมโมเนียมบอเรต เก็บแอมโมเนียที่ได้จากการกลั่นจนสารละลายกรดบอริกมีปริมาตรเพิ่มขึ้นเป็น 200 มิลลิลิตร สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวอ่อน จากนั้นนำไปไทเทรตหาปริมาณแอมโมเนียที่ถูกกลั่นออกมาในสารละลายกรดบอริกด้วยสาระลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จนกระทั่งสารละลายเป็นสีน้ำเงินที่จุดยุติที่หนึ่งและเปลี่ยนเป็นสีได้สีส้มที่จุดยุติที่สอง

**ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง**

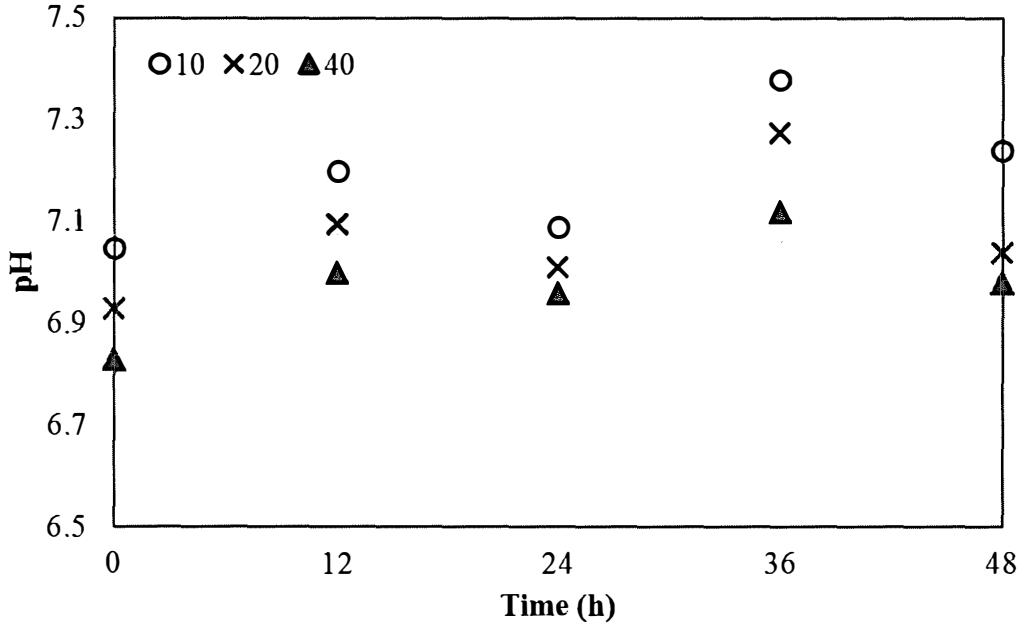
**การแปรปริมาณแลกติกเคซีนและน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก**

ในการศึกษาผลของการแปรปริมาณแลกติกเคซีนที่ความเข้มข้น 10 20 และ 40 กรัมต่อลิตรในอาหารเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกและใช้น้ำตาลซูโครสเริ่มต้นที่ 3 กรัมต่อลิตร พบว่า ความเข้มข้นของแลกติกเคซีนทั้ง 3 ความเข้มข้นนั้นไม่ส่งผลต่อการเจริญของ *S. zooepidermicus* UN-7 โดยเซลล์สามารถเจริญเข้าสู่ช่วง exponential ได้ตั้งแต่ 12 ชั่วโมงของการหมัก จากนั้นเซลล์เข้าสู่สภาวะ stationary ที่ชั่วโมงการหมักหลังจาก 24 ชั่วโมง สำหรับการเจริญของ UN-7 ทั้ง 3 สภาวะ พบว่า ค่าความเข้มข้นของเซลล์อยู่ในช่วงความขุ่นของเซลล์ เท่ากับ 2 (OD ~2) (รูปที่ 3) ส่วนการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการใช้ความเข้มข้นของแลกติกเคซีนที่แตกต่างกัน พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของแลกติกเคซีนไม่ส่งผลให้เพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิก และจากความเข้มข้นของแลกติกเคซีนทั้ง 3 ความเข้มข้น พบว่า แลกติกเคซีนที่ 10 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูงสุดที่ 24 – 36 ชั่วโมงของการหมัก โดยให้ความเข้มข้นของกรดไฮยาลูโรนิกที่ 1.36 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 5) และเมื่อพิจารณาผลของค่าพีเอช พบว่าในชั่วโมงการหมักที่มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูง ส่งผลให้ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง และเมื่อเซลล์ลดอัตราการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก ส่งผลให้ค่า

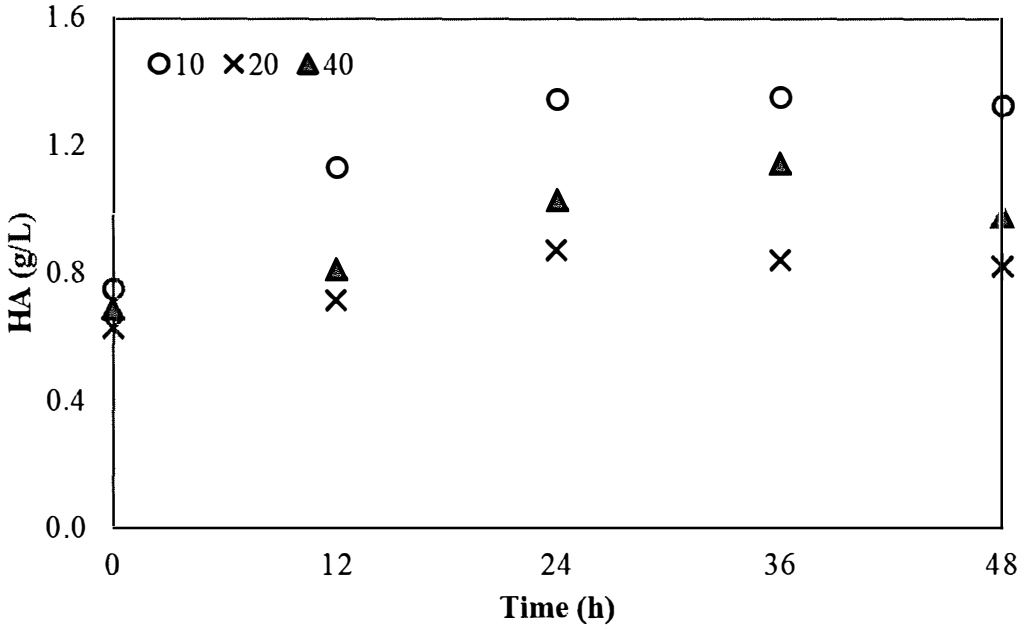
พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าเพิ่มสูงขึ้น (รูปที่ 4) และจากการวิเคราะห์การใช้น้ำตาลซูโครส พบว่า การนำซูโครสไปใช้เพื่อการผลิตเซลล์และกรดไฮยาลูโรนิกของ *S. zooepidermicus* UN-7 แสดงออกในปริมาณน้อย (รูปที่ 7) อีกทั้งเมื่อเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของ *S. zooepidermicus* UN-7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมน้ำตาลซูโครสของทุกสภาวะที่ทำการแปรความเข้มข้นของแลกติกเคซีน พบว่าการไม่เติมน้ำตาลซูโครสในอาหารส่งผลให้ลดการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกแต่ในทางกลับกันการเจริญของ *S. zooepidermicus* UN-7 มีค่าเพิ่มสูงขึ้น นั่นแสดงให้เห็นว่าการใช้เฉพาะแหล่งไนโตรเจนและสารอาหารอื่น (แร่ธาตุ และ วิตามิน) เพื่อเป็นอาหารเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกนั้นส่งเสริมเฉพาะการเจริญของเซลล์ (รูปที่ 7) ทั้งนี้เนื่องมาจากเคซีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์นั้นส่งผลให้อาหารเลี้ยงเชื้อนั้นมีองค์ประกอบของเปปไทด์ขนาดต่างๆ และวิตามินที่มีความจำเป็นต่อการเจริญของเซลล์ จึงส่งผลดีต่อการเจริญของเซลล์ (Armstrong และคณะ, 1997; Barbosa และคณะ, 2004) นอกจากนี้จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าเมื่ออัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนไม่เหมาะสมส่งผลให้การนำสารตัวกลางของการผลิตเซลล์และกรดไฮยาลูโรนิกเกิดความไม่สมดุล จึงเป็นเหตุให้เมื่อมีสัดส่วนของแหล่งไนโตรเจนมากเกินไปส่งเสริมให้เซลล์เจริญมากขึ้นแต่ลดการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกลง (Chen และคณะ, 2008; Liu และคณะ, 2011) สำหรับในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้สูตรอาหารเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกที่มีความเข้มข้นของแลกติกเคซีน 10 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลซูโครสที่ 3 กรัมต่อลิตร



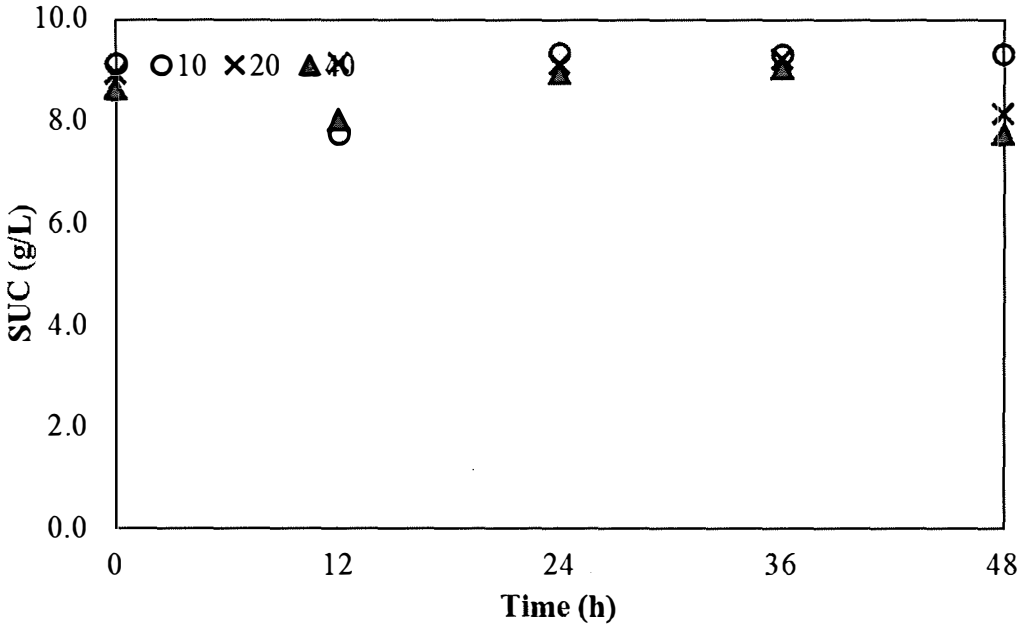

**รูปที่ 3** การเจริญของของ *S. zooepidermicus* UN-7 ในอาหารเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการแปรความเข้มข้นแลกติกเคซีน 10 20 และ 40 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลซูโครสที่ 3 กรัมต่อลิตร



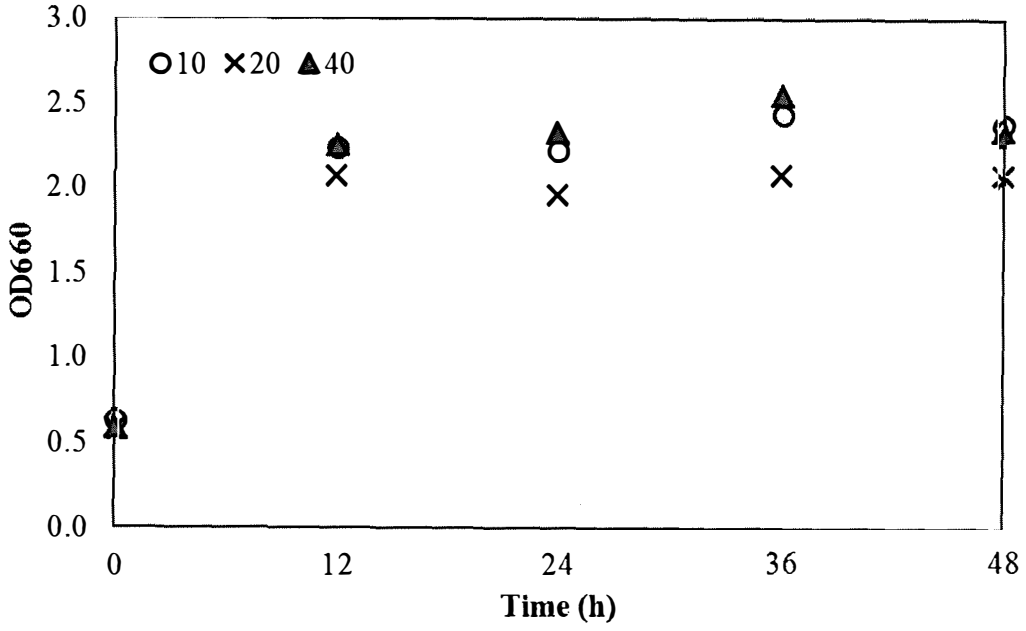

**รูปที่ 4** เปรียบเทียบค่า pH เมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 3 กรัมต่อลิตร



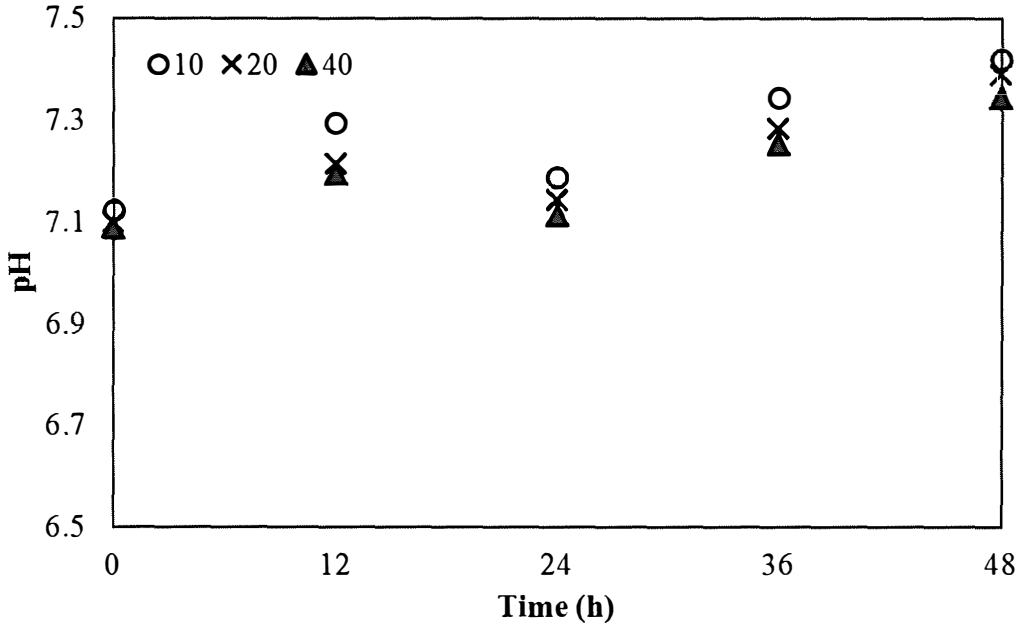

**รูปที่ 5** เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ เมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 3 กรัมต่อลิตร



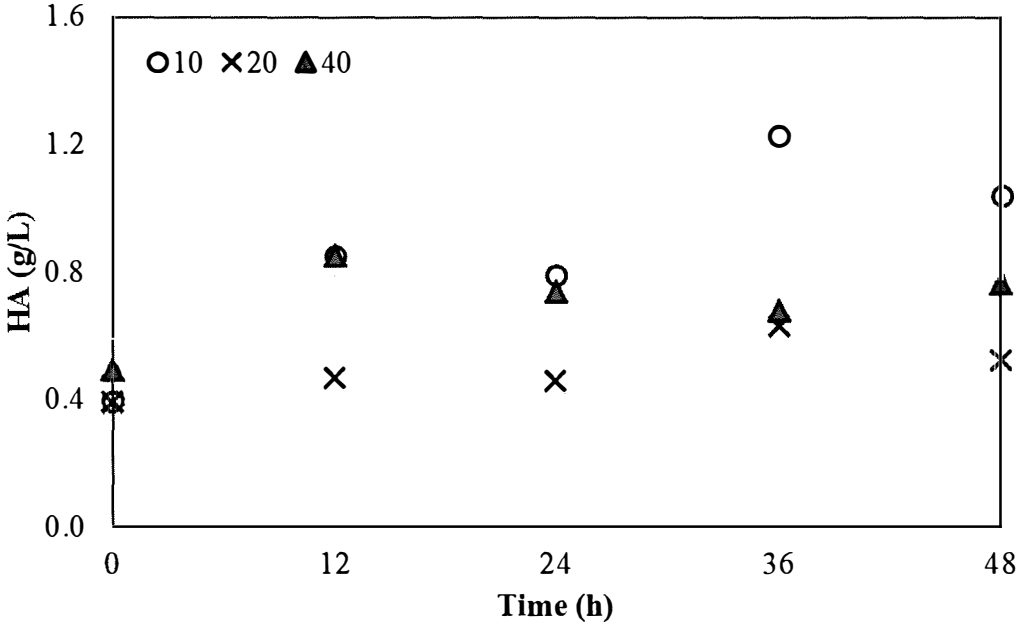

**รูปที่ 6** เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหลือ เมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 3 กรัมต่อลิตร



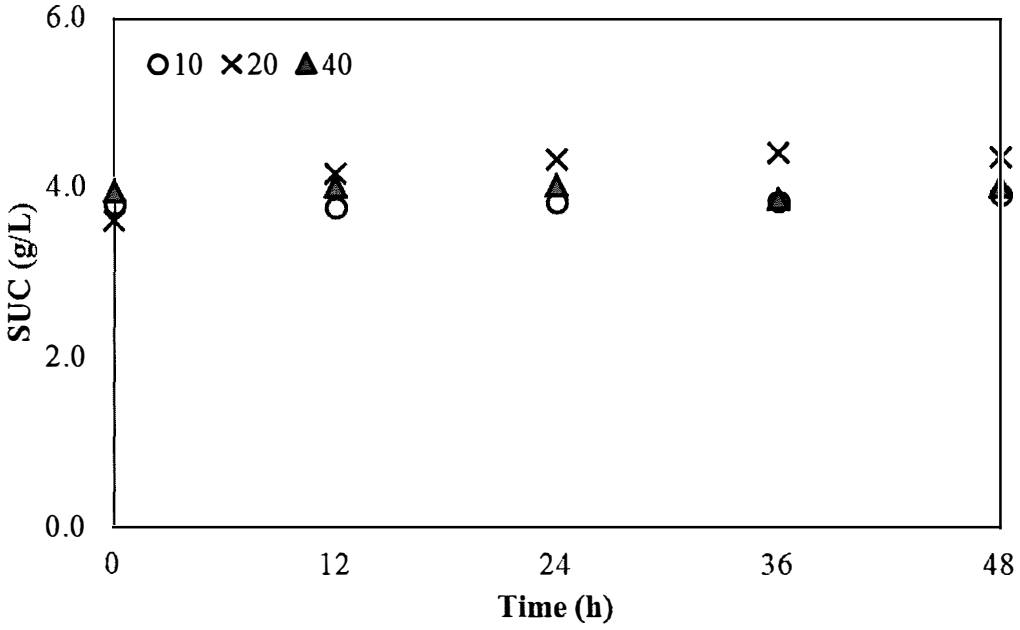

**รูปที่ 7** เปรียบเทียบปริมาณการเจริญของเซลล์ เมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 0 กรัมต่อลิตร




**รูปที่ 8** เปรียบเทียบค่า pH เมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 0 กรัมต่อลิตร




**รูปที่ 9** เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ เมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 0 กรัมต่อลิตร

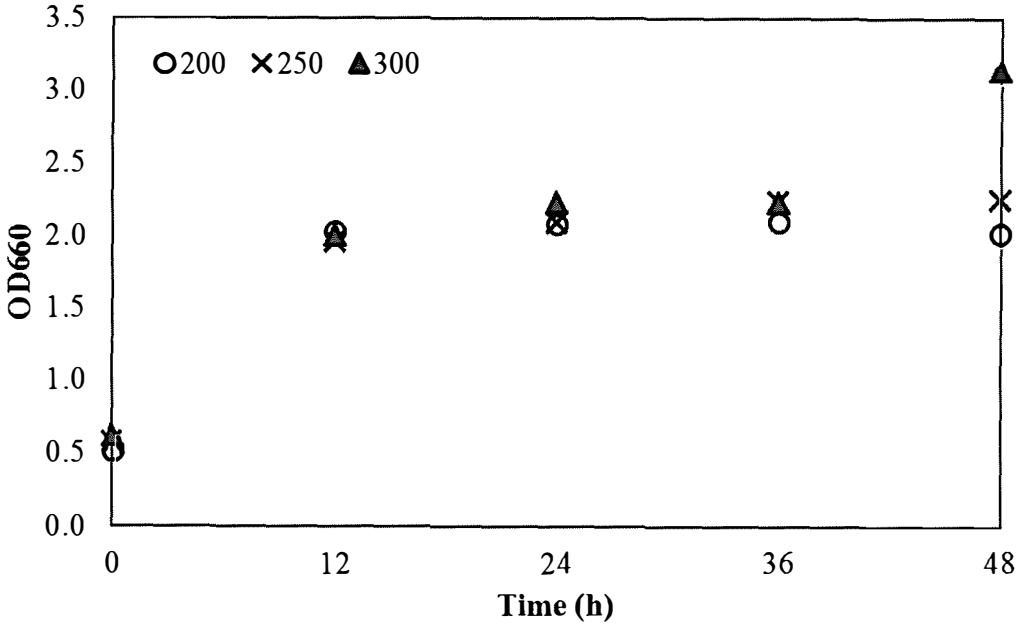



**รูปที่ 10** เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหลือ เมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 0 กรัมต่อลิตร

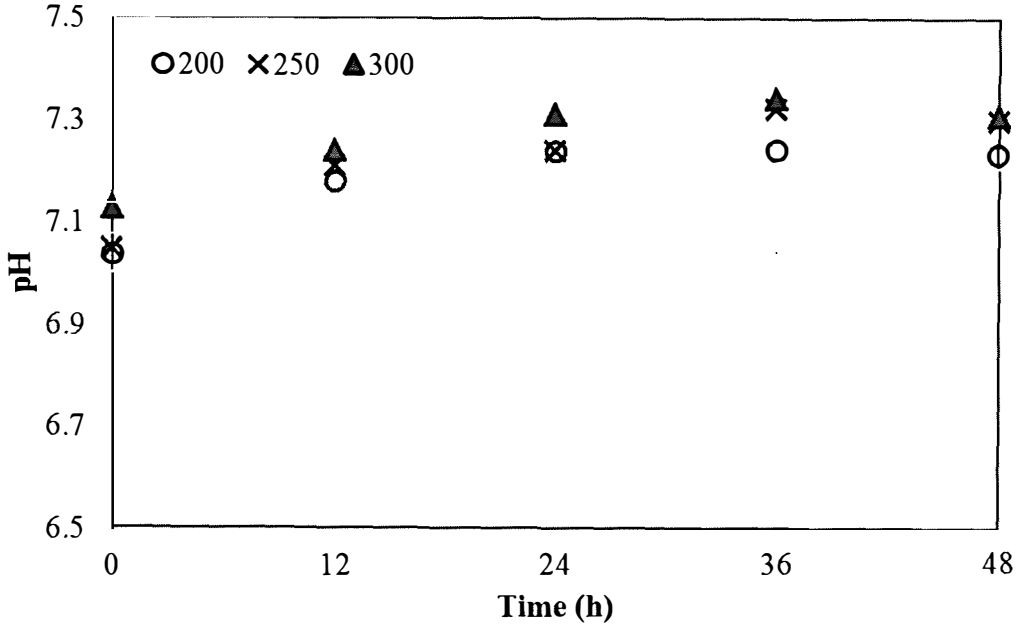
**ผลของความเร็วรอบของการเขย่าต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของ *S. zooepidermicus* UN-7 ในระดับขวดเขย่า**

ปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของจุลินทรีย์คือการกวนผสม เนื่องจากเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการถ่ายเทออกซิเจนระหว่างการหมัก อีกทั้งทำให้เกิดสภาวะที่เข้ากันดีระหว่างเซลล์ อาหารเลี้ยงเชื้อและออกซิเจน ในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาผลของการแปรอัตราการเขย่าของเครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่าโดยแบ่งออกเป็นอัตราการเขย่าที่ 200 250 และ 300 รอบต่อนาที พบว่า การใช้อัตราการเขย่าที่สูงขึ้นทำให้เพิ่มการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกแต่ไม่ส่งผลต่อความแตกต่างของการผลิตเซลล์และค่าพีเอชของ *S. zooepidermicus* UN-7 (รูปที่ 11 – 13) โดยผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูงสุด (2.29 กรัมต่อลิตร) พบในสภาวะการควบคุมอัตราการเขย่าที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของความเร็วรอบในการเขย่าที่ส่งผลต่อผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิก โดยเชื้อแบคทีเรียสกุล *Streptococcus* sp. เป็นแบคทีเรียชนิด facultative anaerobe ดังนั้นจึงเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ ซึ่งจากงานวิจัยก่อนหน้าได้มีรายงานการศึกษาเปรียบเทียบผลของการควบคุมการให้อากาศและไม่ให้อากาศต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกด้วย *S. zooepidermicus* พบว่า ในสภาวะที่มีการให้อากาศทำให้เพิ่มการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของแบคทีเรียสกุลนี้ได้ (Liu และคณะ, 2011) นอกจากนี้มีงานวิจัยก่อนหน้าทำการศึกษาผลของการแปรความเร็วรอบในการเขย่า ได้แก่ 100 150 และ 200 รอบต่อนาที พบว่าที่การเขย่า 200 รอบต่อนาทีคือสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกด้วย *S. equisimilis* ยิ่งไปกว่านั้นจากการศึกษาความสัมพันธ์ของปัจจัยอื่น ได้แก่ ค่าพีเอช อุณหภูมิ ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และอัตราการเขย่าขวดเขย่านั้น งานวิจัยดังกล่าว

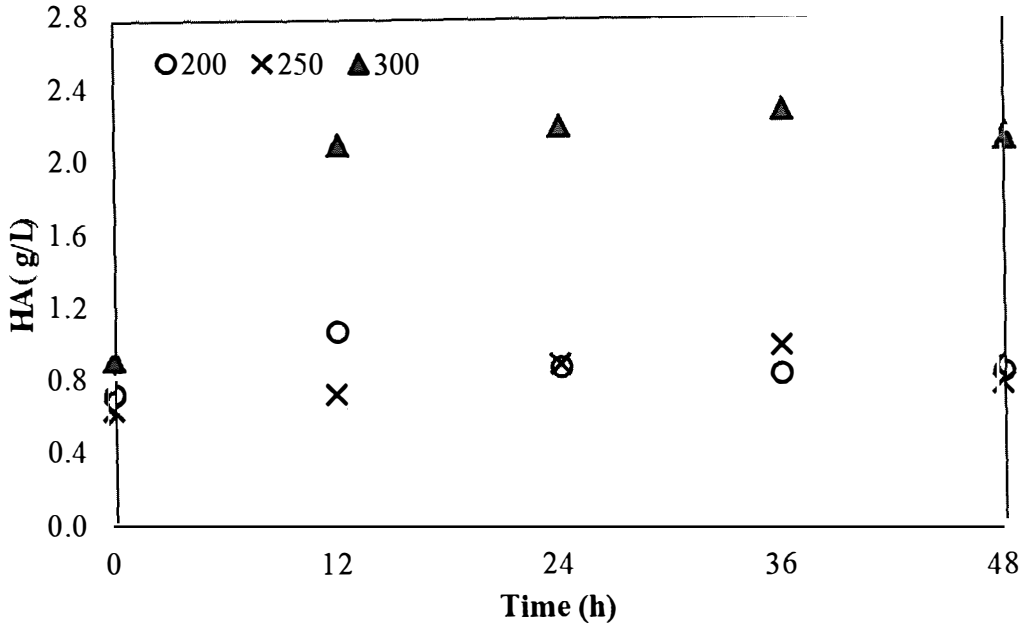
รายงานว่า ปัจจัยที่ส่งอิทธิพลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกจากมากไปหาน้อยคือ ค่าพีเอช > ปริมาตรอาหาร > อุณหภูมิ > อัตราการเขย่า (Chen และคณะ, 2012)



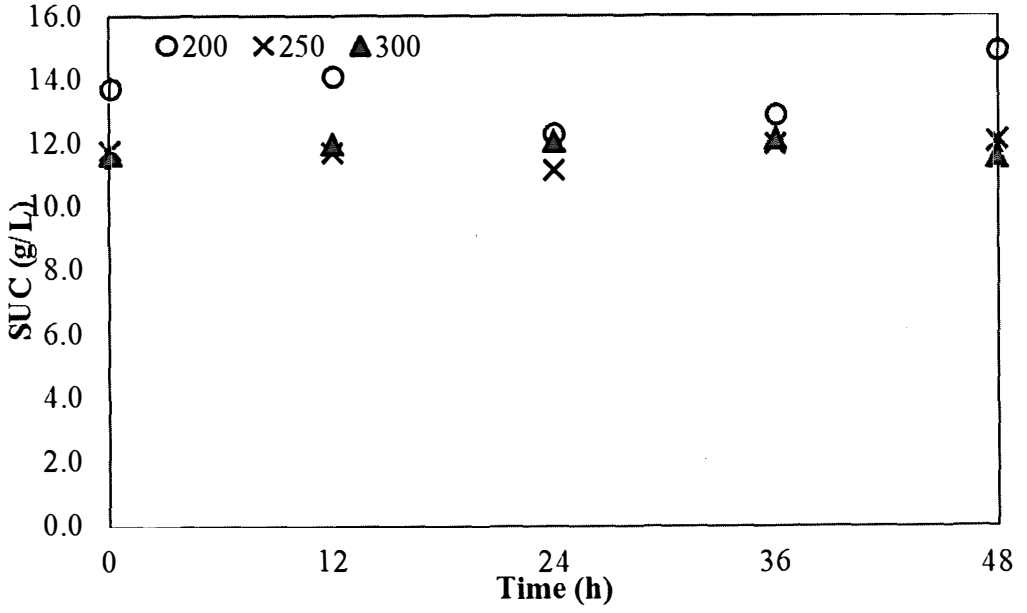

**รูปที่ 11** เปรียบเทียบปริมาณการเจริญของเซลล์ เมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 3 กรัมต่อลิตร ความเร็วในการหมุนระหว่างการหมัก 200 250 และ 300 รอบต่อนาที




**รูปที่ 12** เปรียบเทียบค่า pH เมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 3 กรัมต่อลิตร ความเร็วในการหมุนระหว่างการหมัก 200 250 และ 300 รอบต่อนาที



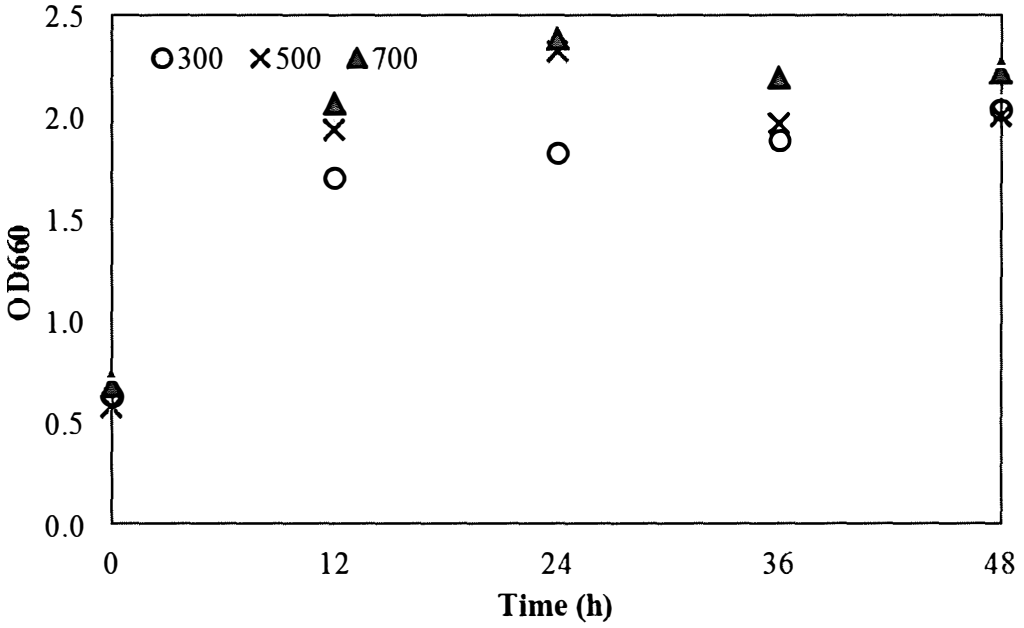

**รูปที่ 13** เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ เมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 3 กรัมต่อลิตร ความเร็วในการหมุนระหว่างการหมัก 200 250 และ 300 รอบต่อนาที



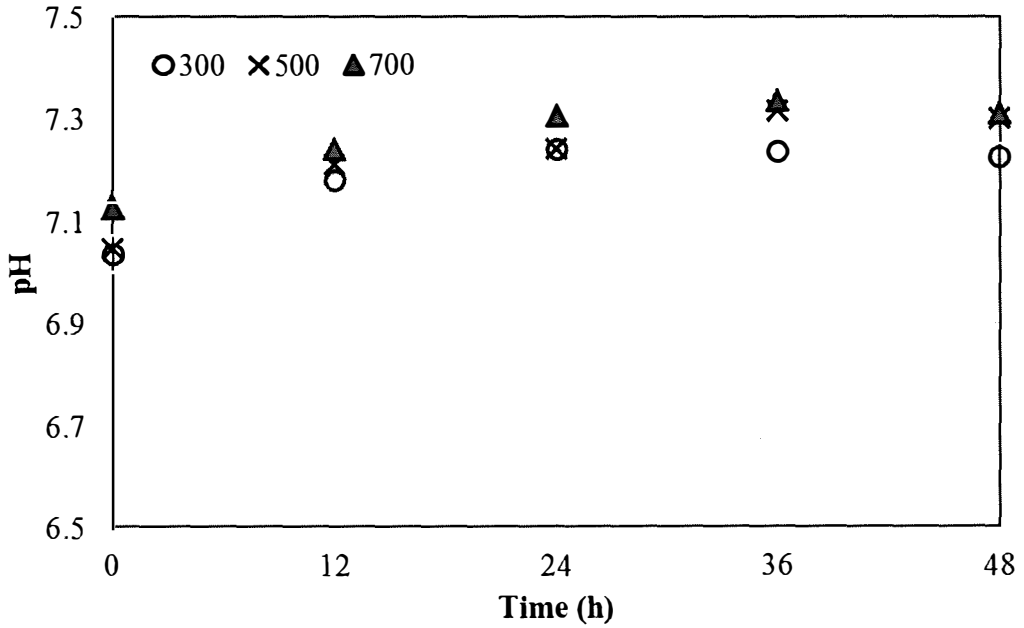

**รูปที่ 14** เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหลือ เมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 3 กรัมต่อลิตร ความเร็วในการหมุนระหว่างการหมัก 200 250 และ 300 รอบต่อนาที

**ผลของอัตราการปั่นกวนต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกด้วย *S. zooepidermicus* UN-7 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดกวนขนาด 5 ลิตร**

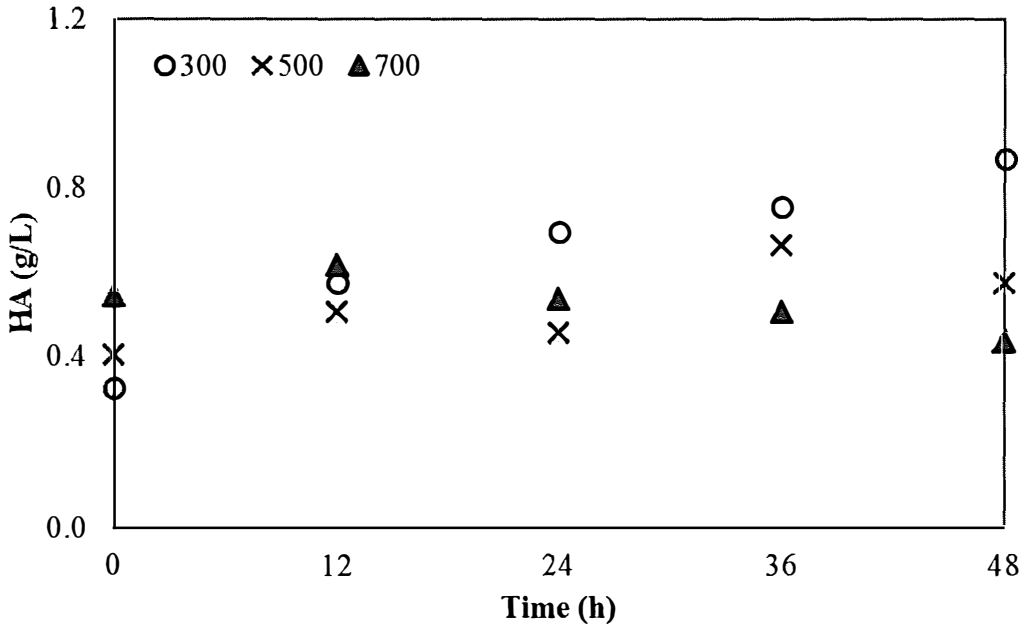
จากผลการศึกษาการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับขวดเขย่า พบว่า อัตราการกวนผสมส่งผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการเพิ่มปริมาณการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกด้วย *S. zooepidermicus* UN-7 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดกวนขนาด 5 ลิตร โดยทำการศึกษาผลของอัตราการปั่นกวนที่ความเร็วรอบ 300 500 และ 700 รอบต่อนาที ซึ่งพบว่า การเพิ่มอัตราการกวนของใบพัดทำให้การเจริญของ *S. zooepidermicus* UN-7 มีค่าความขุ่นของเซลล์ที่เพิ่มสูงขึ้น โดยเซลล์เจริญสูงสุดที่ความเร็วรอบ 700 รอบต่อนาที ค่าความขุ่นของเซลล์ เท่ากับ2.4 ที่ 24 ชั่วโมงของการหมัก (รูปที่ 15) ในทางกลับกันเมื่อพิจารณาการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก พบว่าที่อัตราการกวนผสมจากน้อยไปหามากส่งผลดีต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกด้วย *S. zooepidermicus* UN-7 กล่าวคือ กรดไฮยาลูโรนิกผลิตได้สูงสุดที่ความเข้มข้น 0.87 กรัมต่อลิตร ที่ 48 ชั่วโมงของการหมัก ในสภาวะที่ควบคุมอัตราการกวนผสมของใบพัดที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที (รูปที่ 17) ซึ่งสำหรับการใช้อัตราการกวนของใบพัดในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยอัตราเร็วที่สูงขึ้น ได้มีงานวิจัยก่อนหน้ามากมายได้ทำการพิสูจน์แล้วพบว่า การให้อัตราการกวนผสมที่สูงจะช่วยเพิ่มปริมาณออกซิเจนในระบบการหมัก ซึ่งการเพิ่มปริมาณออกซิเจนนี้ช่วยส่งเสริมให้เซลล์มีการผลิตแหล่งพลังงาน (ATP และ NADH) ที่มากเกินพอทำให้เกิดการผลิตเซลล์ใน TCA cycle เกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ และเมื่อมีการสร้าง ATP และ NADH ที่มากเกินพอ ปริมาณออกซิเจนจะถูกควบคุมของการนำไปใช้ภายในเซลล์ โดยเซลล์จะมีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกซึ่งทำหน้าที่เป็นกำบังไม่เกิดออกซิเจนเกิดผลเสียต่อเซลล์ นอกจากนี้การมีปริมาณออกซิเจนที่มากเกินพอจากการให้อัตราการกวนและอัตราการให้อากาศที่สูงนั้น ช่วยให้ไม่มีการผลิตผลิตภัณฑ์ข้างเคียง เช่น กรดแลกติก และกรดอะซีติก ซึ่งส่งผลให้ลดปริมาณผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของ *Streptococci* sp. อีกด้วย (Liu และคณะ, 2011) อย่างไรก็ตามการใช้อัตราการกวนของใบพัดที่สูงเกินไป จะส่งผลต่อการลดปริมาณการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้ โดยการใช้อัตราการกวนของใบพัดที่สูงขึ้นนั้นส่งผลให้เซลล์แบคทีเรียเกิดความเสียหายหรือถูกทำลายด้วยแรงเฉือนของใบพัดที่เกิดขึ้น จึงเป็นเหตุให้ลดผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกใน *Streptococci* sp. ลง (Liu และคณะ 2011; Huang และคณะ, 2006; Kim และคณะ, 1996)



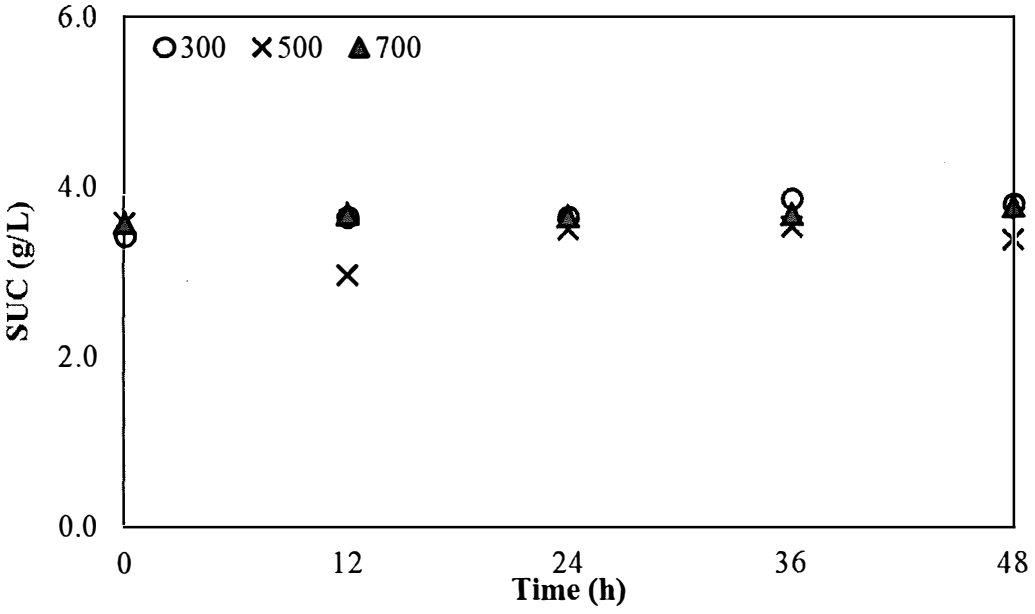

**รูปที่ 15** เปรียบเทียบปริมาณการเจริญของเซลล์ เมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 3 กรัมต่อลิตร อัตราเร็วการปั่นกวนระหว่างการหมัก 300 500 และ 700 รอบต่อนาที ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร




**รูปที่ 16** เปรียบเทียบค่า pH เมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 3 กรัมต่อลิตร อัตราเร็วการปั่นกวนระหว่างการหมัก 300 500 และ 700 รอบต่อนาที ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร



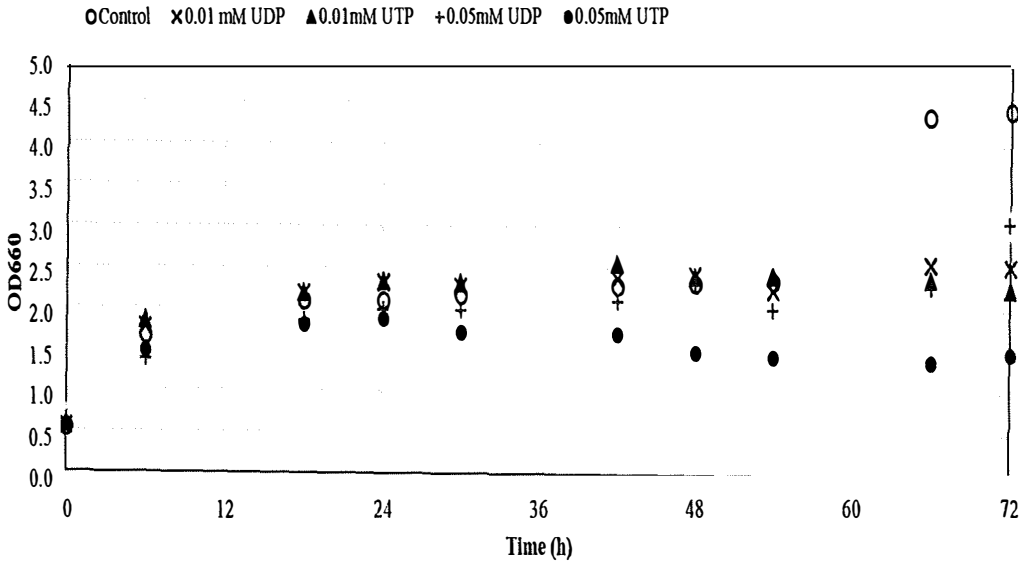

**รูปที่ 17** เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ เมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 3 กรัมต่อลิตร อัตราเร็วในการปั่นกวนระหว่างการหมัก 300 500 และ 700 รอบต่อนาที ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร



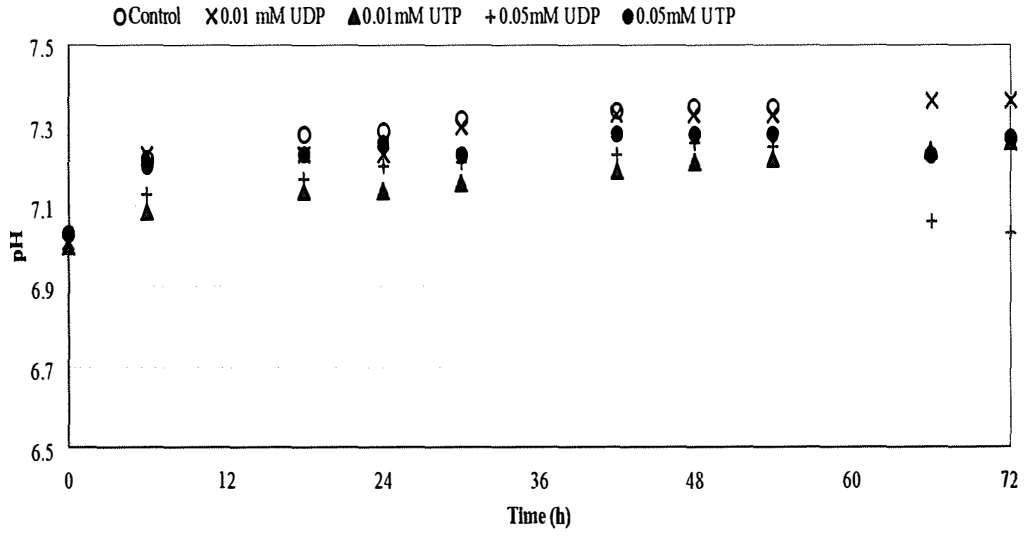

**รูปที่ 18** เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหลือ เมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 3 กรัมต่อลิตร อัตราเร็วการปั่นกวนระหว่างการหมัก 300 500 และ 700 รอบต่อนาที ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

**ผลของการเติม Uridine 5′-diphospho-N-acetylglucosamine sodium salt และ Uridine 5′-triphosphate tris salt ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก**

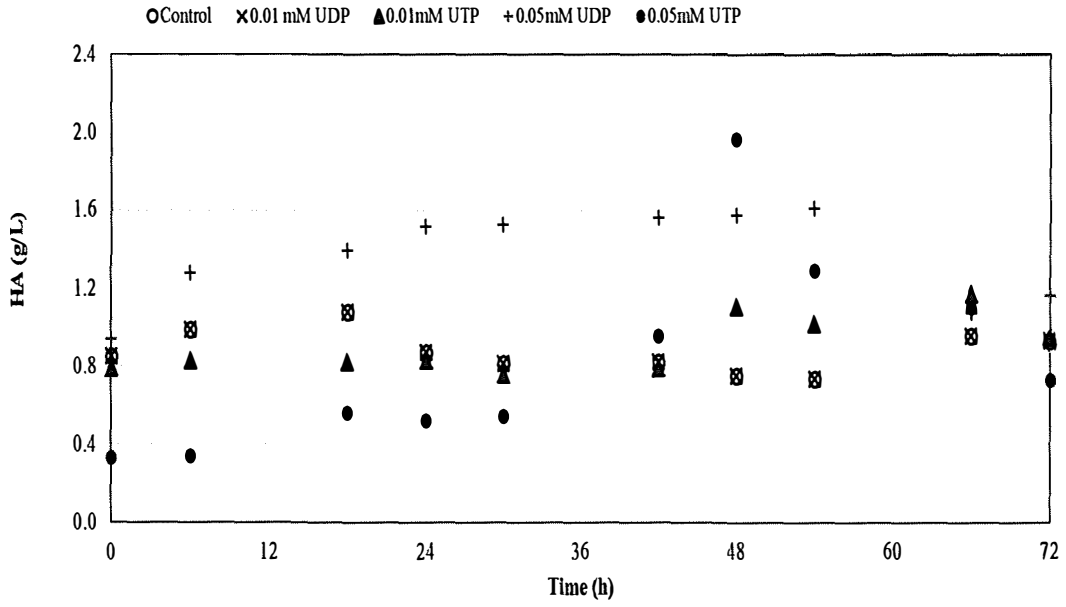
ในการศึกษานี้ทำการเปรียบเทียบผลของการเติมสารตัวกลาง UDP N-acetylglucosmine และ UTP ที่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อต้องการให้เกิดการกระตุ้นการเพิ่มการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกใน *S. zooepidermicus* UN-7 โดยทำการแปรความเข้มข้นของสารทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ 0.01 และ 0.05 มิลลิโมลาร์ จากการเปรียบเทียบผลของการเจริญของ *S.zooepidermicus* UN-7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมสารกระตุ้น (การทดลองควบคุม) พบว่า เมื่อทำการขยายเวลาในการหมัก เซลล์มีการเจริญเพิ่มสูงกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารกระตุ้นการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก (รูปที่ 19) ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการเติมสารกระตุ้นทั้ง 2 ชนิด ที่ความเข้มข้น 0.01 และ 0.05 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้การแบ่งสัดส่วนของสารตัวกลาง Fructose-6-phosphate ในวิถีไกลโคไลซิสเพื่อการนำไปสร้างเซลล์นั้นลดน้อยลง และเมื่อพิจารณาถึงการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก (รูปที่ 21) พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของ UDP N-acetylglucosamine ส่งผลให้เพิ่มการผลิตและอัตราการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกใน *S. zooepidermicus* UN-7 เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่มีการเติมสารกระตุ้นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งอัตราการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูงสุด เท่ากับ 0.063 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในการศึกษาวิถีเมแทบอลิซึมของการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกด้วย *S. zooepidermicus* นั้นพบว่ามีตัวกลาง 2 ชนิด ที่เป็นตัวกลางหลักของการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก ได้แก่ UDP-gluconic acid และ UDP N-acetylglucosamine ซึ่งในขบวนการการสร้างเซลล์ UDP N-acetylglucosamine จะถูกแบ่งสัดส่วนโดยในสภาวะที่เอื้อต่อการสร้างเซลล์ เช่น ปริมาณออกซิเจน อาหารเลี้ยงเชื้อ พีเอช เป็นต้น จากสารตัวกลาง Fructose-6-phosphate จะถูกเปลี่ยนไปเป็น Acetyl-CoA เพื่อเข้าสู่ TCA cycle เพื่อผลิตเซลล์ต่อไป ดังนั้นในสภาวะที่ส่งเสริมให้เซลล์มีการเจริญที่ดีจะส่งผลต่อการลดผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิก เนื่องจากการใช้สารตัวกลางเดียวกันเพื่อการผลิตเซลล์และกรดไฮยาลูโรนิกนี้เป็นเหตุให้เกิดการแข่งขันกันในวิถีไกลโคไลซิสของการใช้สารตัวกลาง fructose-6-phosphate เพื่อการผลิตสารตัวกลาง UDP N-acetylglucosamine สำหรับการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกใน *S. zooepidermicus* (Liu และคณะ, 2011) ดังนั้นในการเติม UDP N-acetylglucosamine ด้วยปริมาณที่เหมาะสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้ รวมถึงการเติม UTP ซึ่งเป็นโคแฟคเตอร์ของเอนไซม์ pyrophosphorylase ที่ทำหน้าที่ในการจัดเรียงหมู่ฟอสเฟตให้แก่ N-acetylglucosamine-1-phosphate และเปลี่ยนมาเป็น UDP N-acetylglucosamine (Chong และคณะ, 2005) ซึ่งการเติม UTP ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นแสดงให้เห็นถึงการส่งเสริมการเพิ่มการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก ถึงแม้การให้ผลผลิตที่น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองที่มีการเติม UDP N-acetylglucosamine ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ให้ผลการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกที่ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมสารกระตุ้น ดังนั้นการเติม UTP จะต้องมีการปรับสัดส่วนปริมาณให้เหมาะสมเพื่อการส่งเสริมการเพิ่มการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกด้วย *S. zooepidermicus* UN-7 นี้ได้



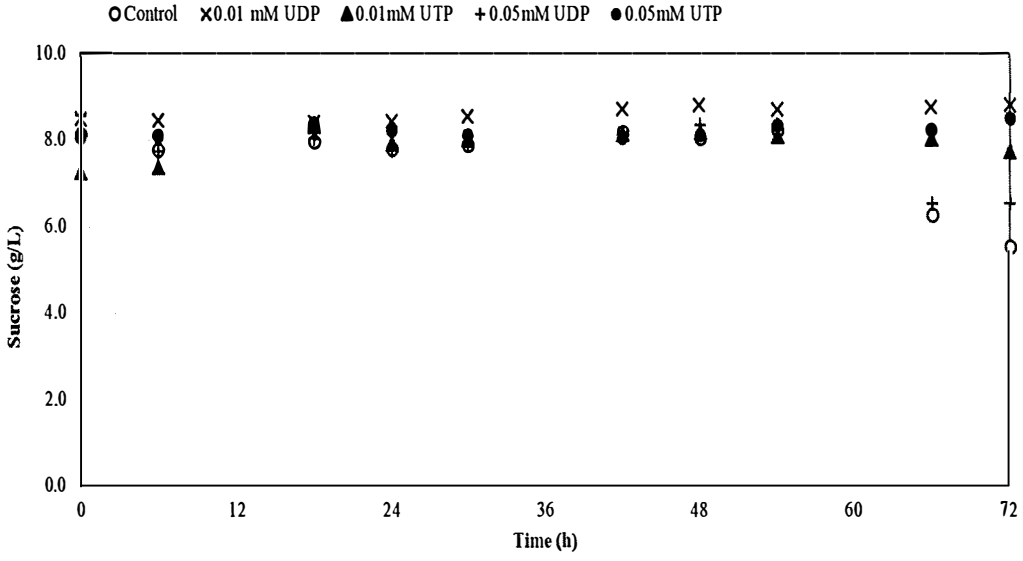

**รูปที่ 19** เปรียบเทียบปริมาณการเจริญของเซลล์ เมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 3 กรัมต่อลิตร อัตราเร็วการปั่นกวนระหว่างการหมัก 300 รอบต่อนาที โดยเติมสารตั้งต้น Uridine 5´-diphospho-N-acetylglucosamine sodium salt และ Uridine 5´-triphosphate tris salt ที่ความเข้มข้น 0.01 mM และ 0.05 mM ตามลำดับ และเปรียบเทียบกับชุดควมคุมที่ไม่เติมสารตั้งต้น ระหว่างการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร



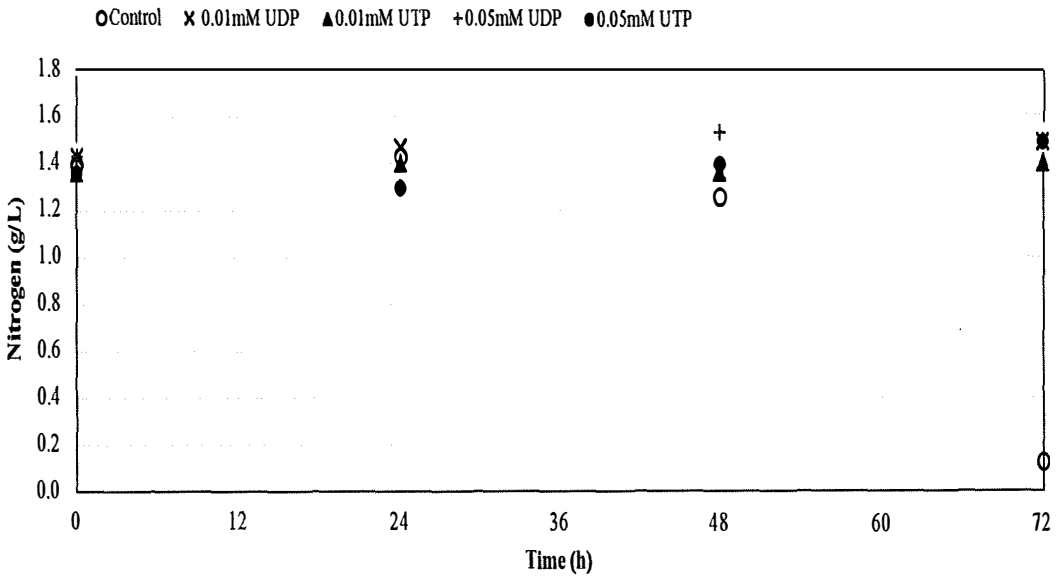

**รูปที่ 20** เปรียบเทียบค่า pH เมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 3 กรัมต่อลิตร อัตราเร็วการปั่นกวนระหว่างการหมัก 300 รอบต่อนาที โดยโดยเติมสารตั้งต้น Uridine 5´-diphospho-N-acetylglucosamine sodium salt และ Uridine 5´-triphosphate tris salt ที่ความเข้มข้น 0.01 mM และ 0.05 mM ตามลำดับ และเปรียบเทียบกับชุดควมคุมที่ไม่เติมสารตั้งต้น ระหว่างการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร




**รูปที่ 21** เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ เมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 3 กรัมต่อลิตร อัตราเร็วในการปั่นกวนระหว่างการหมัก 300 รอบต่อนาที โดยโดยเติมสารตั้งต้น Uridine 5′-diphospho-N-acetylglucosamine sodium salt และ Uridine 5′-triphosphate tris salt ที่ความเข้มข้น 0.01 mM และ 0.05 mM และเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมสารตั้งต้น ระหว่างการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร




**รูปที่ 22** เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหลือ เมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 3 กรัมต่อลิตร อัตราเร็วการปั่นกวนระหว่างการหมัก 300 รอบต่อนาที โดยโดยเติมสารตั้งต้น Uridine 5′-diphospho-N-acetylglucosamine sodium salt และ Uridine 5′-triphosphate tris salt ที่ความเข้มข้น 0.01 mM และ 0.05 mM และเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมสารตั้งต้น ระหว่างการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร




**รูปที่ 23** เปรียบเทียบปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ เมื่อใช้สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 3 กรัมต่อลิตร อัตราเร็วการปั่นกวนระหว่างการหมัก 300 รอบต่อนาที โดยโดยเติมสารตั้งต้น Uridine 5´-diphospho-N-acetylglucosamine sodium salt และ Uridine 5´-triphosphate tris salt ที่ความเข้มข้น 0.01 mM และ 0.05 mM และเปรียบเทียบกับชุดควมคุมที่ไม่เติมสารตั้งต้น ระหว่างการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

**สรุปผลการทดลอง**

แบคทีเรีย *S. zooepidermicus* UN-7 เป็นแบคทีเรียที่ได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสียูวีและสารเคมี NTG ซึ่งเป็นแบคทีเรียดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้สูง และไม่ผลิตสเตรปโตไลซิน จากการศึกษาวิจัยพัฒนาปรับปรุงกระบวนการหมักโดยแปรสูตรอาหารเหลวและความเร็วในการหมุนระหว่างการหมักในระดับขวดเขย่าเพื่อให้เชื้อแบคทีเรีย *S. zooepidermicus* UN-7 สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้สูงนั้น พบว่าสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของแลกติกเคซีนและน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมคือ สูตรอาหารเหลวแลกติกเคซีน 10 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น 3 กรัมต่อลิตร และความเร็วที่เหมาะสมในการหมุนระหว่างการหมักคือ 300 รอบต่อนาที จากนั้นจึงได้ขยายขนาดการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร โดยใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกจากระดับขวดเขย่าและแปรอัตราการปั่นกวน 300, 500 และ 700 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm เมื่อเปรียบเทียบอัตราการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกที่ความเร็วรอบต่างๆ พบว่าการปั่นกวนที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที ให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงกว่าการปั่นกวนที่ความเร็วรอบ 500 และ 700 รอบต่อนาที โดยได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก 870 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ 48 ชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเซลล์พบว่าที่ความเร็วรอบสูงเชื้อจะเจริญได้ดี นั่นอาจเป็นเพราะความเร็วในการกวนที่เพิ่มขึ้นและมีการให้อากาศ 1.0 vvm ทำให้การส่งผ่านสารอาหารและถ่ายเทอากาศได้ดีขึ้น แต่หากใช้ความเร็วรอบที่สูงเกินจะส่งผลให้มีอัตราการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกที่ต่ำ อย่างไรก็ตาม ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ยังมีปริมาณต่ำกว่าในระดับขวดเขย่า ดังนั้นทีมวิจัยจึงพิจารณาถึงปัจจัยที่จะกระตุ้นให้ *S. zooepidermicus* UN-7 สามารถผลิตกรดไฮ

ยาลูโรนิกได้เพิ่มมากขึ้นในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร นั่นคือการเติมสารตั้งต้นลงไปในกระบวนการหมัก โดยแปรปริมาณของสารตั้งต้น Uridine 5´-diphospho-N-acetylglucosamine sodium salt (UDP) และ Uridine 5´-triphosphate tris salt (UTP) ความเข้มข้นที่ใช้คือ 0.01mM และ 0.05mM โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมสารตั้งต้น จากการวิจัยดังกล่าว พบว่าการเติมสารตั้งต้นในปริมาณที่เหมาะสมในกระบวนการหมัก สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แสดงผลในรูปที่ 22 โดยชั่วโมงที่ 48 สารตั้งต้น Uridine 5´-triphosphate tris salt (UTP) ที่ความเข้มข้น 0.05mM มีผลต่อการเพิ่มปริมาณการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้สูงที่สุดเท่ากับ 1.96 กรัมต่อลิตร และ Uridine 5´-diphospho-N-acetylglucosamine sodium salt (UDP) ที่ความเข้มข้น 0.05mM ให้ผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกรองลงมาเท่ากับ 1.57 กรัมต่อลิตร เมื่อตรวจดูค่าปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ใน 24 ชั่วโมง จะพบว่าสารตั้งต้น Uridine 5´-diphospho-N-acetylglucosamine sodium salt (UDP N-acetylglucosamine) ที่ความเข้มข้น 0.05mM มีอัตราการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกที่สูงที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 0.063 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากการวิจัยพบว่าการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกจะควบคู่ไปกับการเจริญของเชื้อ โดยปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้จะเริ่มคงที่เมื่อการเจริญของเชื้อคงที่ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 จนถึงชั่วโมงที่ 54 และเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อต่อไปจนถึง 72 ชั่วโมง อัตราการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกไม่ได้เพิ่มขึ้น จากการศึกษากระบวนการหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง แหล่งอาหารคาร์บอนคือน้ำตาลซูโครสและแหล่งอาหารไนโตรเจนคือแลกติกเคซีนถูกใช้เพียงปริมาณเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งแหล่งอาหารคาร์บอนและไนโตรเจนเป็นปัจจัยสำคัญในเมตบอลิซึมของเซลล์ นอกจากใช้ในการเจริญของเซลล์แล้วยังถูกเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์คือกรดไฮยาลูโรนิก จากผลดังกล่าวทำให้พิจารณาได้ว่าปัจจัยที่น่าศึกษาเพิ่มเติมคือการแปรปริมาณหรือชนิดของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน และค่า pH ที่เหมาะสมในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกอยู่ในช่วง 7.2-7.3

การศึกษาปัจจัยที่เป็นสารตั้งต้นในเมแทบอลิซึมการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก เป็นการเติมปัจจัยเดี่ยวคือเติมสารตั้งต้นเพียงชนิดเดียวในกระบวกการหมักเท่านั้น ซึ่งการเติมสารตั้งต้น 2 ชนิดลงไปในกระบวนการหมัก โดยแปรสัดส่วนความเข้มข้นของสารตั้งต้น จึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่น่าสนใจในการศึกษาว่าจะส่งผลอย่างไรต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก ซึ่งสารตั้งต้นแต่ละชนิดทำหน้าที่แตกต่างกันไปและเป็นส่วนเสริมซึ่งกันและกันในกระบวนการสร้างพลังงานให้กับเซลล์ โดยพลังงานที่เพิ่มมากขึ้นจะส่งผลให้เซลล์สังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกได้เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ดี จากการวิจัยดังกล่าวทำให้ทราบถึงปัจจัยทางกายภาพและชีวภาพที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก ซึ่งเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้เป็นแนวทางการพัฒนาปรับปรุงกระบวนการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกเพื่อให้ได้ปริมาณเพิ่มมากขึ้นได้ในอนาคต

**เอกสารอ้างอิง**


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

ทรงศักดิ์ พันธุ์วัฒนะสิงห์. 2540. การปรับปรุงสายพันธุ์ *Streptococcus zooepidermicus* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโลนิก. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ณัฏฐา และคณะ. 2559. การปรับปรุงกระบวนการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดยวิธีการทางชีวภาพเพื่อการนำไปใช้ในงานศัลยกรรมตกแต่ง. โครงการวิจัยเสนอสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

Akasaka, H., Komasaki, H., and Arai, T. 1989. Fermentation method for producing hyaluronic acid. *United States Patent*, 4,801,539.

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*, 63:2759-2764.

Armstrong, D.C., Cooney, M.J., and Johns, M.R. 1997. Growth and amino acid requirements of hyaluronic-acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. *Applied Microbiology and Biotechnolonogy*, 47:3,309–312.

Barbosa, C.M.S., Morais, H.A., Delvivo, F.M., Mansur, H.S., Oliveira, M.C.D., and Silvestre, M.P.C. 2004. Papain hydrolysates of casein: molecular weight profile and encapsulation in lipospheres. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84:1891–1900.

Brown, M.B. and Jones, S.A. 2005. Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *European Academy of Dermatology and Venereology*, 19:308–318.

Chen, S.J., Chen, J.L., Huang, W.C., and Chen, H.L. 2009. Fermentation process development for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 26:428-432.

Chen, Y.H., Li, J., Liu, L., Liu, H.Z., and Wang, Q. 2012. Optimization of flask culture medium and conditions for hyaluronic acid production by a *Streptococcus equisimilis* mutant nc2168. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4):1553-1561.

Chong, F.B.., Blank, L.M., Mclaughlin, R. and Nielsen, L.K. 2005. Microbial hyaluronic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66:341-351.

Huang, W.C., Chen, S.J. and Chen, T.L. 2008. Production of hyaluronic acid by repeated batch fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 40:460-464.

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 conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 19:440-445.

Liu, L., Wang, M., Du, G. and Chen, J. 2008. Enhanced hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus* by an intermittent alkaline-stress strategy. *Applied Microbiology*, 46:383-388.

Liu et al. 2011. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microbial Cell Factories*, 10:99.

Main, N. 1986. Characterization of a high-plasma-membrane-bound protein and assessment of its role as a constituent of hyaluronate synthase complex. *Biochemical Journal*, 237:343-357.

Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P., and Kolar, J. 2008. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina*, 53:397-411.

Neo, H., Ishimaru, J.I., Kurita, K., and Goss, A.N. 1997. The effect of hyaluronic acid on experimental temporomandibular joint osteoarthrosis in the sheep. *Journal Oral and Maxillofacial Surgery*, 55:1114-1119.

Nimrod, A., Greenmam, B., Kanner, D., Moshe, B., and Landsberg, Y. 1988. High molecular weight sodium hyaluronate. *United States Patent*, 4,784,990.

Ogrodowski, C.S., Hokka, C.O., and Santana, M.H.A. 2005. Production of hyaluronic acid by streptococcus: the effects of the addition of lysozyme and aeration on the formation and the rheological properties of the product. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121-124:753-61.

Patil, K.P., Kamalja, K.K. and Chaudhari, B.L. 2011. Optimization of medium component for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* MTCC3523 using a statistical approach. *Carbohydrate Polymer*, 86:1573-1577.

Pierce, W.A. Jr. and White, A.G. 1954. Hyaluronic acid formation by *Streptococcus pyogenes*. *Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 87(1):50-4.

**การย่อยแลกติกเคซีนด้วยเอนไซม์**

1. แลกติกเคซีน ของบริษัทซิกม่า
2. เอนไซม์ปาเปน ของบริษัท Merk

ขั้นตอนการย่อยแลกติกเคซีนด้วยเอนไซม์

1. ชั่ง Lactic casein ดังนี้

1.1 Lactic casein 10 g เติมลงในสารละลาย 0.05 M Na2HPO4 ปริมาตร 250 mL แล้วนำไปต้มให้สารเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

1.2 Lactic casein 20 g เติมลงในสารละลาย 0.05 M Na2HPO4 ปริมาตร 250 mL แล้วนำไปต้มให้สารเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

1.3 Lactic casein 40 g เติมลงในสารละลาย 0.05 M Na2HPO4 ปริมาตร 250 mL แล้วนำไปต้มให้สารเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

2. ปรับ pH แต่ละสูตรให้เท่ากับ 6 ด้วย 1 M HCl
3. ปรับปริมาตรแต่ละสูตรให้เป็น 500 mL ด้วยน้ำกลั่น
4. เติมสารละลายเอนไซม์ปาเปน จากความเข้มข้น 10 mg/mL (0.2 g/20 mL) โดยเติมเอนไซม์ดังนี้

| | Papain (g) | Stock Papain solution |
|---|---|---|
| 4.1 เติมเอนไซม์ปาเปน (สำหรับสูตร Lactic casein 10 g/L) | 0.025 | 2.5 mL |
| 4.2 เติมเอนไซม์ปาเปน (สำหรับสูตร Lactic casein 20 g/L) | 0.05 | 5 mL |
| 4.3 เติมเอนไซม์ปาเปน (สำหรับสูตร Lactic casein 40 g/L) | 0.1 | 10 mL |

5. บ่มที่ 40 C เป็นเวลา 14 h ที่ความเร็วรอบ 150 rpm
6. นำสารละลายในข้อ 5 ไปปั่นแยกตะกอนที่ความเร็วรอบ 4000 rpm เป็นเวลา 20 นาที
7. นำส่วนของเหลวที่ได้จากการตกตะกอนข้อ 6 มาปรับปริมาตรให้เป็น 1 L ด้วยน้ำขจัดไอออน (เพื่อให้ได้เป็น 1%, 2% และ 4% แลกติกเคซีน)

8. นำไปเตรียมอาหารสูตรสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโลนิก (ทรงศักดิ์ พันธุ์วัฒนะสิงห์, 2540) โดยใช้สารละลายที่ได้แทนน้ำขจัดไอออนและเคซีน

**การเตรียมสูตรอาหารเหลวสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโลนิก**

| ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย | | |
|---|---|---|
| สารละลายแลกติกเคซีน | 1000 | 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 | 3 | กรัม |

**นำผลการไทเทรตมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของไนโตรเจนในสารตัวอย่าง**

$$\textit{เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน} = \frac{14 \times (v1 - v2) \times Normality\ of\ HCL\ (mol/L) \times 100}{Volumn\ of\ Sample\ (ml) \times 1000}$$

เมื่อ v1 = ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ไตเตรทตัวอย่าง

v2 = ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ไตเตรท blank

*เปอร์เซ็นต์โปรตีน* = เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน ×conversion factor

เมื่อ Conversion factor = 6.25