บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้มุ่งศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค จุลินทรีย์ที่เลือกใช้ในงานวิจัยนี้คือ *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 ที่สั่งซื้อมาจาก American Type Culture Collection, Bethesda, Maryland, U.S.A. แบคทีเรียดังกล่าวแยกได้จากสัตว์ มีคุณสมบัติดังนี้คือ สามารถสร้างกรดไฮยาลูโรนิคได้, สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสได้ และไวต่ออิริโทรมัยซิน (HA^+, Lac^+, Em^S) (Johns และคณะ ,1994) ไม่ก่อโรคในคน ปรกติแล้วการเจริญของเชื้อในกลุ่มสเตรปโตรคอกคัสต้องการอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเลือดหรือน้ำจากเนื้อเยื่อเป็นส่วนประกอบ ดังนั้นก่อนนำเชื้อดังกล่าวมาใช้ในงานวิจัยจึงต้องทดสอบการเจริญของเชื้อบนอาหารที่มีความอุดมสมบูรณ์ที่ปราศจากเลือดและน้ำจากเนื้อเยื่อ โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรอุดม Brain heart infusion (BHI) เพื่อใช้ในการเตรียมหัวเชื้อ พบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถเจริญบนอาหาร BHI ได้ ดังนั้นจึงใช้อาหาร BHI เป็นอาหารสำหรับการเตรียมหัวเชื้อต่อไป จากการที่มีผู้รายงานถึงภาวะการเตรียมหัวเชื้อทั้งในภาวะที่มีและไม่มีการเขย่า จึงศึกษาการเจริญของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหาร BHI ในภาวะที่มีและไม่มีการเขย่า ที่อุณหภูมิ 37°ซ พบว่าการเลี้ยงเชื้อในภาวะทั้งสองแบบมีการเจริญและรูปแบบการเจริญที่คล้ายคลึงกัน คือมีช่วงการเจริญแบบแลคในช่วง 6 ชั่วโมงแรกของการเจริญ หลังจากนั้นจึงเป็นการเจริญแบบลอกาลิทิมิกจนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ จึงเข้าสู่ช่วงการเจริญแบบสเตชั่นนารี และเมื่อพิจารณาถึงปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคที่ผลิตโดยใช้หัวเชื้อทั้งสองแบบ พบว่าการใช้หัวเชื้อในภาวะที่ไม่มีการเขย่าจะให้การผลิตกรดที่สูงกว่าในภาวะที่มีการเขย่า จึงเลือกใช้หัวเชื้อที่เตรียมในภาวะที่ไม่มีการเขย่าสำหรับใช้ในการศึกษาต่อไป แต่การเตรียมหัวเชื้อในภาวะที่ไม่มีการเขย่านั้น อาจทำได้ทั้งในแบบที่มีอากาศและไม่มีอากาศ จึงศึกษาเพิ่มเติมโดยติดตามการเจริญของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหาร BHI ในภาวะที่ไม่มีการเขย่าทั้งที่เลี้ยงในสภาพที่มีอากาศและสภาพที่ไม่มีอากาศ ที่อุณหภูมิ 37°ซ พบว่าการเลี้ยงเชื้อในภาวะที่ไม่มีการเขย่าทั้งสองแบบมีการเจริญและรูปแบบการเจริญที่คล้ายคลึงกัน คือมีช่วงการเจริญแบบแลคในช่วง 6 ชั่วโมงแรกของการเจริญ หลังจากนั้นจึงเป็นการเจริญแบบลอกาลิทิมิกจนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ จึงเข้าสู่ช่วงการเจริญแบบสเตชั่นนารี และสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคในภาวะการเลี้ยงเชื้อทั้งสองแบบนั้นก็พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน ดังนั้นเพื่อให้การปฏิบัติงานเป็นไปได้อย่างสะดวก จึงเลือกใช้การเตรียมหัวเชื้อในภาวะที่ไม่มีการเขย่าแบบที่มีอากาศ จากนั้นทำการศึกษาช่วงการเจริญของหัวเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิต กรดไฮยาลูโรนิค โดยกำหนดระยะการเจริญของหัว

เชื้อที่ใช้ในการทดลอง จากรูปแบบการเจริญของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI ในภาวะที่ไม่มีการเขย่าแบบที่มีอากาศ ดังแสดงในรูปที่ 7ก จากผลการทดลองพบว่าหัวเชื้อที่มีอายุในช่วงกึ่งกลางของการเจริญแบบลอกาลิทิมิก (9 ชั่วโมง) มีความเหมาะสมในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ทั้งนี้เป็นเพราะช่วงการเจริญแบบลอกาลิทิมิกเซลล์ผ่านการปรับตัวพร้อมที่จะมีกิจกรรมต่างๆแล้ว ดังนั้นเมื่อถ่ายเชื้อลงสู่อาหารสำหรับการผลิตกรดแล้วจึงสามารถเจริญและผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้อย่างรวดเร็ว จึงเลือกใช้หัวเชื้อที่มีอายุ 9 ชั่วโมงสำหรับใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคต่อไป

จากนั้นทำการคัดเลือกสูตรอาหารสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค โดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อของ Akasaka และคณะ (1989), Nimrod และคณะ (1986), Wollcock (1974), Johns และคณะ (1994) (ภาคผนวก ก) ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 7.0 บ่มเขย่าที่อุณหภูมิห้อง อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที พบว่าสูตรอาหารของ Nimrod และคณะ(1986) ให้การเจริญและการผลิตกรดสูงสุด ขณะที่สูตรอาหารของ Akasaka และคณะ (1989) ให้การเจริญและการผลิตกรดต่ำที่สุด พบว่าสูตรอาหารของ Akasaka และคณะ (1989) นั้นมีปริมาณกลูโคสเริ่มต้นถึง 6% ในขณะที่สูตรของ Nimrod และคณะ(1986) มีปริมาณกลูโคสเริ่มต้นเพียง 1% เท่านั้น ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าปริมาณกลูโคสเริ่มต้นที่สูงเกินไป อาจมีผลยับยั้งได้ทั้งการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้ (Bernheirmer และคณะ, 1942; Nimrod และคณะ, 1988; Akasaka และคณะ, 1989) นอกจากนี้ยังพบว่าค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของสูตรอาหารแต่ละชนิดมีค่าแตกต่างกันจึงอาจเป็นไปได้ว่าค่าความเป็นกรดด่างอาจเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ดังนั้นจึงทำการศึกษาถึงปริมาณกลูโคสเริ่มต้นและค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อไป

จากการศึกษารูปแบบการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรของ Nimrod และคณะ (1986) พบว่าการเจริญของเชื้อมีอัตราการเจริญสูงสุดในช่วง 10 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ การผลิตกรดไฮยาลูโรนิคเกิดขึ้นควบคู่กับการเจริญ โดยให้การผลิตกรดสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ คือ 247 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงมีค่าลดลงซึ่งคาดว่าอาจเกิดมาจากการสลายตัวของกรดไฮยาลูโรนิคได้ ทั้งนี้เพราะเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างกรดไฮยาลูโรนิคได้เกือบทุกสายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสขึ้นเมื่อเชื้อเจริญเข้าสู่ระยะคงตัว (Rijn, 1983; Maclenan, 1956) และเมื่อทำการตรวจหาการสร้างเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสในอาหารเลี้ยงเชื้อจากการทดสอบในหัวข้อ 15 พบว่าเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 มีการสร้างเอนไซม์ดังกล่าวได้จริง สำหรับการลดลงของปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อ โดยมีค่าลดลงจนกระทั่งที่เวลาการ

เลี้ยงเชื้อที่ 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงมีค่าสูงขึ้น (รูปที่ 10) ปริมาณกลูโคสที่สูงขึ้นนี้อาจเป็นเพราะที่ช่วงเวลาดังกล่าวเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสขึ้น ทำให้ได้หน่วยย่อยของเอน-แอซิทิลกลูโค-แซมีนในอาหารเลี้ยงเชื้อมากขึ้น(Rijn, 1983) นอกจากนี้การพบว่าช่วงที่มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคสูงสุดในน้ำเลี้ยงเชื้อเป็นช่วงหลังการเจริญเติบโต อาจเป็นเพราะกรดไฮยาลูโรนิคที่เชื้อสร้างขึ้นจะสะสมอยู่ในรูปของแคปซูลที่ละลายลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อได้ ดังนั้นถึงแม้เชื้อเจริญเข้าสู่ช่วงการเจริญแบบระยะคงตัวแล้วก็ตาม แต่กรดไฮยาลูโรนิค ที่อยู่ในรูปของแคปซูลยังสามารถละลายลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อได้ จึงทำให้เวลาที่มีปริมาณกรดสูงสุดไม่ตรงกับเวลาที่มีการเจริญสูงสุดหรือเชื้อสามารถสร้างกรดไฮยาลูโรนิคได้แม้ไม่มีการเพิ่มขึ้นของเซลล์ ซึ่งสังเกตุได้จากปริมาณกลูโคสที่ยังคงลดลงจนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ามีค่าลดลงจาก 6.4 จนถึงเวลาการเลี้ยงเชื้อที่ 10 ชั่วโมง แล้วจึงมีค่าคงที่ คาดว่าการลดลงของค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นอาจเกิดจากความเป็นกรดของกรดไฮยาลูโรนิคที่ผลิตออกมาเพราะเป็นช่วงที่เชื้อมีอัตราการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคสูงสุด หรืออาจเกิดจากกรดชนิดอื่นที่เชื้อสามารถสร้างขึ้น เช่น กรดแลคติก เป็นต้น (Johns et al, 1994)

จากผลการคัดเลือกสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมและรายงานของผู้วิจัยกลุ่มต่างๆ พบว่าปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อน่าจะมีความสำคัญต่อการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ดังนั้นจึงศึกษาปริมาณกลูโคสเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค จากผลการทดลองพบว่าที่ปริมาณกลูโคส 5 กรัมต่อลิตรมีความเหมาะสมในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิครองลงมาเป็น 2, 10 และ 15 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว พบว่าที่ปริมาณกลูโคสเริ่มต้น 2 กรัมต่อลิตร แทบไม่มีน้ำตาลเหลืออยู่เลยหลังจากชั่วโมงที่ 15 ของการเลี้ยงเชื้อ ขณะที่น้ำตาลปริมาณอื่นๆยังมีปริมาณน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลืออยู่มาก จึงไปได้ว่าปริมาณกลูโคสเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อมีบทบาทต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคคือ หากใช้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นน้อยเกินไปการสร้างกรดไฮยาลูโรนิคจะต่ำและหากใช้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นมากเกินไป ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Willoughby และคณะ (1964),Holmstrom และ Ricica (1967), Nimrod และคณะ (1988), และ Otsuji และคณะ (1994) และจากการที่ค่าความเป็นกรดด่างอาจเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญสำหรับการเลี้ยงเชื้อและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ดังนั้นจึงศึกษาค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค จากผลการทดลองพบว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างเป็น 6.8 มีความเหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคมากกว่าที่ค่าความเป็นกรดด่าง เป็น 7.1 และ 6.5 ตามลำดับ ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Akasaka และคณะ (1989), Johns และคณะ (1994), DeAngelis (1996), Kim และคณะ (1996) นอกจากนี้ยัง

พบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่มีค่าค่อนไปทางเบสจะให้การเจริญและการผลิตกรดสูงกว่าค่าที่ค่อนไปทางกรด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการปรับตัวเพื่อความอยู่รอดของเชื้อเอง เพราะเชื้อดังกล่าวมีการผลิตกรดออกมาในระหว่างการเจริญ ดังนั้นหากเชื้อดังกล่าวนี้อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดด่างค่อนไปทางกรด เชื้อจึงปรับตัวให้มีการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคที่น้อยลงเพื่อหลีกเลี่ยงภาวะที่เป็นกรดสูง

จากรายงานของ Holmstrom และ Ricica (1967) ที่กล่าวว่าปริมาณเซลล์ไม่มีผลต่อการสร้างกรดไฮยาลูโรนิค ดังนั้นในการศึกษาต่อไปนี้จึงแปรผันปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค จากผลการทดลองพบว่าที่ปริมาณหัวเชื้อ 25% มีความเหมาะสมในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค โดยการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคมีความสัมพันธ์กับปริมาณของหัวเชื้อเริ่มต้น แต่ในทางปฏิบัติเพื่อความสะดวกและการลดความผิดพลาดจึงเลือกใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเป็น 20% สำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค จากผลการทดลองพบว่า ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีความเหมาะสมในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค โดยให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคมากกว่าเมื่อใช้กลูโคสประมาณ 2 เท่า ทั้งนี้อาจเป็นเพราะซูโครสประกอบด้วยน้ำตาล 2 ชนิดคือ กลูโคสและฟรุกโตสเชื่อมต่อกัน โดยน้ำตาลทั้งสองชนิดนี้สามารถเปลี่ยนไปเป็น glucose-6-PO_4 และ fructose-6-PO_4 ได้โดยตรง โดยไม่จำเป็นต้องสร้าง fructose-6-PO_4 จาก glucose-6-PO_4 เหมือนกับเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ตามรูปที่ 2 ดังนั้นในการทดลองขั้นตอนต่อไปจึงใช้ซูโครสแทนกลูโคสในการเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 จากนั้นศึกษารูปแบบการเจริญของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคเกิดขึ้นควบคู่กับการเจริญ โดยมีอัตราการเจริญสูงสุดในช่วง 10 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ ขณะที่การผลิตกรดไฮยาลูโรนิคมีค่าสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ จากนั้นจึงมีค่าลดลง การลดลงของปริมาณน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสัมพันธ์กับการเจริญโดยมีค่าลดลงจนกระทั่งที่เวลาการเลี้ยงเชื้อที่ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงมีปริมาณน้ำตาลสูงขึ้น ส่วนค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ามีค่าลดลงจาก 6.5 จนถึงเวลาการเลี้ยงเชื้อที่ 15 ชั่วโมง แล้วจึงคงที่

เมื่อทราบว่าซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคแล้วเพื่อลดต้นทุนการผลิต จึงศึกษาแหล่งของซูโครสที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค จากผลการทดลองพบว่าซูโครสของบริษัทมิตรผลมีความเหมาะสมในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้น้ำตาลเกรดอุตสาหกรรมอาหารสามารถให้การผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับซูโครสเกรดวิเคราะห์ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะน้ำตาลเกรดอุตสาหกรรมอาหารมีความบริสุทธิ์ต่ำกว่าเกรดสำหรับการวิเคราะห์ จึงเป็นไปได้ว่าสารที่ปนเปื้อนมากับน้ำตาลเกรดอุตสาหกรรมอาหารสามารถเพิ่มการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้

จากรายงานของผู้วิจัยกลุ่มต่างๆ พบว่าปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ดังนั้นจึงศึกษาปริมาณซูโครสเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค จากผลการทดลองพบว่าปริมาณซูโครส 5 กรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคโดยที่ปริมาณน้ำตาล 15 กรัมต่อลิตรให้การผลิตกรดไฮยาลูโรนิคต่ำสุด ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลของปริมาณน้ำตาลเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

จากงานวิจัยของ Akasaka และคณะ (1989) ที่กล่าวว่าการแบ่งเติมน้ำตาลในช่วงการเจริญแบบลอกาลิทิมิกสามารถเพิ่มการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้ ดังนั้นจึงศึกษาการแบ่งเติมน้ำตาลซูโครสที่ชั่วโมงการเลี้ยงเชื้อต่างๆ จากผลการทดลองพบว่า การแบ่งเติมน้ำตาลที่ช่วงเวลาต่างๆ ไม่มีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคนั่นอาจเป็นเพราะที่ปริมาณน้ำตาล 5 กรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคแล้วนอกจากนี้ยังพบว่าการแบ่งเติมน้ำตาลในการเจริญช่วงลอคเฟส จะให้การผลิตกรดดังกล่าวนี้มากกว่าการแบ่งเติมน้ำตาลในการเจริญช่วงสเตชั่นนารีเฟส

จากการศึกษาถึงชนิดของเกลือแร่ที่จำเป็นสำหรับการเจริญเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค จากผลการทดลองพบว่าการขาดไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตมีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคมากที่สุด รองลงมาเป็นแมกนีเซียมซัลเฟตและโซเดียมคลอไรด์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเกลืออนินทรีย์ทั้งสามชนิดมีความสำคัญต่อการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค โดยไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตอาจทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์หรือเป็นแหล่งของโพแทสเซียมและฟอสเฟต แมกนีเซียมซัลเฟตอาจเป็นแหล่งไอออนของ Mg^{2+} และโซเดียมคลอไรด์เป็นแหล่งของ Na^{+} ซึ่งจะถูกศึกษาต่อไป ดังนั้นเพื่อเป็นการพิสูจน์สมมติฐานที่ว่าการขาดไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตมีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคมากที่สุด เนื่องจากความเป็นบัฟเฟอร์ หรือเป็นแหล่งของโพแทสเซียมและฟอสเฟต จึงศึกษาชนิดของไอออนที่มีผลต่อการผลิต

กรดไฮยาลูโรนิค จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตมีบทบาทสำคัญในการเป็นบัฟเฟอร์ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เพราะไม่สามารถทดแทนการขาดไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตด้วยโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตหรือโพแทสเซียมไนเตรทได้ การทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ของไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเกิดขึ้นเนื่องจากไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตสามารถแตกตัวอยู่ในรูปกรดและเกลือได้คือ $KHPO_4^-$ และ K_2HPO_4 ตามลำดับ แต่มีข้อน่าสังเกตุอีกว่าถ้าใช้บัฟเฟอร์ที่เป็นเกลือของธาตุชนิดอื่นๆ จะมีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคอย่างไร จึงทำการศึกษาชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค จากผลการทดลองพบว่าการใช้ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตร่วมกับโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตจะให้การผลิตกรดสูงสุด แต่ไม่มีความแตกต่างจากเมื่อใช้ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเพียงตัวเดียวมากนัก ดังนั้นเพื่อความสะดวกในการเตรียมอาหารและลดค่าใช้จ่ายจึงเลือกใช้ไดโพแทส-เซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเพียงตัวเดียวเป็นบัฟเฟอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ผลจากการศึกษาการขาดเกลือแร่แสดงให้เห็นว่าแมกนีเซียมซัลเฟตและโซเดียมคลอไรด์มีผลต่อการผลิตกรดไฮยา-ลูโรนิค ดังนั้นจึงศึกษาปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตและโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค จากผลการทดลองพบว่าปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค บทบาทของแมกนีเซียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส, เป็นโคเอนไซม์สำหรับ Hyaluronic acid synthase และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการจับระหว่าง HA synthase กับสารตั้งต้น (Markovitz et al, 1959; Sting et al, 1989; DeAngelis, 1996) และปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 2 กรัมต่อลิตรมีความเหมาะสมในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ทั้งนี้อาจเป็นเพราะโซเดียมคลอไรด์ในสารละลายจะทำหน้าที่ในการรักษาแรงดันระหว่างภายนอกและภายในเซลล์ให้มีค่าใกล้เคียงกัน เพื่อให้เซลล์สามารถดำเนินกิจกรรมและการดำรงชีวิตอยู่ได้ ดังนั้นการมีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ที่มากหรือน้อยเกินไปจึงมีผลกระทบต่อเซลล์

จากการทราบว่าเชื้อในกลุ่มสเตรปโตรคอกคัสต้องการแหล่งไนโตรเจนทั้งชนิดที่เป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์สำหรับการเจริญ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค จากผลการทดลองพบว่าพอลิเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค เพราะให้การผลิตกรดในปริมาณสูงที่ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อที่สั้น ขณะที่ซอล์ยบีนไฮโดรไลเซทให้การเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคต่ำที่สุด นั่นอาจเป็นไปได้ว่าเชื้อใช้สารอาหารในซอล์ยบีนไฮโดรไลเซทได้น้อย หรืออาจถูกยับยั้งโดยสารที่ปนเปื้อนมากับซอล์ยบีนไฮโดรไลเซท ในทางปฏิบัติเพื่อลดต้นทุนการผลิตจึงเลือกใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ต่อไป จากนั้นศึกษา

ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค จากผลการทดลองพบว่าปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 0.65 กรัมต่อลิตรมีความเหมาะสมในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค การเจริญของเชื้อในแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณต่างๆมีค่าใกล้เคียงกัน ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อนำไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อไปใช้สร้างส่วนประกอบของเซลล์ที่เป็นไนโตรเจน เช่น กรดอะมิโนชนิดต่างๆ, เกลือแอมโมเนีย หรือเกลือไนเตรทเป็นต้น ดังนั้นการมีปริมาณไนโตรเจนมากเกินไปอาจทำให้เกิดการยับยั้งกลไกดังกล่าว ทำให้มีการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคต่ำลง

จากการเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ อาจทำให้ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นจึงศึกษาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค พบว่าผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนคือ ค่าความเป็นกรดด่างที่ 6.8 มีความเหมาะสมในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค และค่าความเป็นกรดด่างที่ค่อนไปทางเบสมีการผลิตกรดในปริมาณที่สูงกว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างที่ค่อนไปทางกรด สิ่งที่แตกต่างไปจากเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนคือ การเจริญพบว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างที่มีค่าค่อนไปทางเบสมีการเจริญสูงกว่าค่าความเป็นกรดด่างที่มีค่าค่อนไปทางกรด

จากการที่มีรายงานของคณะผู้วิจัยต่างๆ พบว่าช่วงของอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคนั้นมีค่าแตกต่างกันไป ดังนั้นจึงศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค จากผลการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 30°ซ มีความเหมาะสมในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคสูงสุด รองลงมาคือที่อุณหภูมิห้อง (28-32°ซ) ขณะที่การเจริญของเชื้อที่อุณหภูมิ 40°ซ มีค่าสูงสุด รองลงมาคือที่อุณหภูมิห้อง (28-32°ซ) นั่นอาจเป็นเพราะว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคเป็นคนละอุณหภูมิกัน ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Smith และคณะ (1961) ที่พบว่าการทำงานของ Hyaluronan synthase มีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 30°ซ ขณะที่ Bracke และคณะ (1985) พบว่าการเจริญของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 มีการเจริญสูงสุดที่อุณหภูมิ 37°ซ แต่เพื่อความสะดวกในการปฏิบัติงานจึงเลือกใช้อุณหภูมิห้อง (28-32°ซ) สำหรับเลี้ยงเชื้อต่อไป

จากการที่มีรายงานที่ค่อนข้างสับสนถึงบทบาทของออกซิเจนต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค โดยมีรายงานในเรื่องนี้ทั้งผลบวกและลบ (Johns และคณะ (1994); Swann และคณะ (1990) การศึกษานี้จึงทดลองแปรผันความเร็วรอบที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค จากผลการทดลองพบว่าที่ความเร็วรอบเป็น 250 รอบต่อนาทีมีความเหมาะสมในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค โดยที่ความเร็วรอบ 200 และ 150 รอบต่อนาทีให้การผลิตกรดรองลงมาตามลำดับ ซึ่งผลดังกล่าวนี้สอดคล้องกับรายงานของ Maclennan (1956) ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 จัดเป็นพวก facultative anaerobe คือเจริญได้ดีในภาวะที่ปราศจากออกซิเจน แต่สามารถเจริญในภาวะที่มีออกซิเจนได้ (Wolfgang และ Phil; Jawetz และคณะ) เชื้อสามารถป้องกันเซลล์จากออกซิเจนได้โดยกรดไฮยาลูโรนิคที่สร้างอยู่ในรูปของแคปซูล ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเชื้อเป็นการลดอัตราส่วนระหว่างพื้นผิวกับปริมาตรและจำกัดการแพร่ของออกซิเจนเข้าสู่ภายในกลุ่มของเชื้อดังกล่าว (Cleary and Larkin, 1979) ดังนั้นการเพิ่มอัตราการเขย่าจึงทำให้มีปริมาณออกซิเจนละลายลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อมากขึ้น ทำให้เชื้อต้องปรับตัวโดยการสร้างกรดไฮยาลูโรนิคในปริมาณที่สูงขึ้นด้วย ส่วนการเจริญพบว่าในทุกภาวะที่ทดลองมีค่าไม่แตกต่างกันมากจึงเป็นไปได้ว่าปริมาณเซลล์ไม่มีผลต่อปริมาณกรดไฮยาลูโรนิค เช่นเดียวกับรายงานของ Willoughby และคณะ (1964)

จากรายงานของ Swann และคณะ (1990) กล่าวว่าการลดความเข้มข้นของออกซิเจนลงจากเดิมเมื่อการเจริญมาถึงในช่วงลอกาลิทิมิก จะให้ผลการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคในปริมาณสูงขึ้น ดังนั้นในการศึกษาผลของการลดความเร็วรอบของการเขย่าต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค พบว่าการลดความเร็วรอบของการเขย่าสามารถลดระยะเวลาการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้ แต่ปริมาณกรดที่ผลิตขึ้นมีค่าต่ำกว่าเมื่อใช้ความเร็วรอบของการเขย่าเป็น 250 รอบต่อนาทีเพียงเล็กน้อย การลดความเร็วรอบของการเขย่าสามารถลดระยะเวลาการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้นั้น อาจเป็นเพราะเมื่อใช้ความเร็วรอบที่สูงเป็นการกระตุ้นให้เชื้อสร้างแคปซูลที่หนาขึ้น แต่เมื่อลดความเร็วรอบของการเขย่าลงเชื้อไม่จำเป็นต้องมีแคปซูลที่หนาอีกต่อไป ดังนั้นจึงสามารถตรวจวัดปริมาณกรดไฮยาลูโรนิค ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ก่อนเวลาปกติ

จากการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญ เพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค จากข้อมูลข้างต้นทั้งหมด สามารถสรุปภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 เพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 เพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

ภาวะที่ทดสอบ	ภาวะที่เหมาะสม
1. ช่วงอายุของหัวเชื้อ	9 ชั่วโมง
2. เปอร์เซนต์หัวเชื้อเริ่มต้น	25 เปอร์เซนต์
3. ความเร็วรอบของการเขย่า	250 รอบต่อนาที จนกระทั่งถึงเวลาการเลี้ยงเชื้อที่ 12 ชั่วโมงจึงลดความเร็วรอบเหลือ 200 รอบต่อนาที
4. อุณหภูมิ	30 องศาเซลเซียส
5. ค่าความเป็นกรดด่าง	6.8
6. ปริมาณโซเดียมคลอไรด์	2.0 กรัมต่อลิตร
7. ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต	1.0 กรัมต่อลิตร
8. แร่ธาตุที่จำเป็น	K_2HPO_4
9. แหล่งคาร์บอน	ซูโครส (มิตรผล)
10. ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น	5 กรัมต่อลิตร
11. การแบ่งเติมน้ำตาลหลังการเลี้ยงเชื้อ	ไม่มีผล
12. แหล่งไนโตรเจน	$(NH_4)_2SO_4$
13. ปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้น	0.65 กรัมต่อลิตร

จากภาวะที่แสดงในตารางที่ 11 เมื่อนำมาศึกษาการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค พบว่าเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้สูงสุดที่ชั่วโมงการเลี้ยงเชื้อที่ 15 ชั่วโมง โดยผลิตกรดชนิดนี้ได้ 543 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มากกว่าปริมาณที่ผลิตได้ก่อนการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมประมาณ 2 เท่า

จากการรายงานของผู้วิจัยกลุ่มต่างๆ พบว่ากรดไฮยาลูโรนิคมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของกรดไฮยาลูโรนิคที่ผลิตได้กับปริมาณกรดไฮยาลูโรนิค จากผลการทดลองพบว่ากรดไฮยาลูโรนิคที่ผลิตได้มีน้ำหนักโมเลกุลสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อคือ 1,687 กิโลดาลตัน จากนั้นจึงมีค่าลดต่ำลงเรื่อยๆ อาจเนื่องจากการมีเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส นั่นอาจกล่าวได้ว่าสามารถพบเอนไซม์ดังกล่าวได้ตั้งแต่หลังชั่วโมงที่ 10 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคไม่มีความสัมพันธ์กับน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของกรดไฮยาลูโรนิค และเมื่อศึกษาการมีเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 สามารถสร้างเอนไซม์ดังกล่าวได้จริงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ McClean (1941)

จากการค้นพบว่าเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 สามารถสร้างเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสได้ จึงมีความจำเป็นที่ต้องหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อ เพื่อลดการย่อยสลายของกรดไฮยาลูโรนิคโดยเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส พบว่าการเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 4°ซ โดยผ่านการต้มสามารถชลอการย่อยสลายของกรดดังกล่าวได้มากที่สุด รองลงมาคือ ที่ -15°ซ และ 10°ซ ตามลำดับ ทั้งในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านและไม่ผ่านการต้ม โดยในภาวะที่น้ำเลี้ยงเชื้อผ่านการต้มสามารถชลอการย่อยสลายของกรดไฮยาลูโรนิคได้มากกว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่ผ่านการต้ม ทั้งนี้เป็นเพราะการต้มน้ำเลี้ยงเชื้อเป็นการทำลายเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสในน้ำเลี้ยงเชื้อ และการเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิสูงจะเกิดการย่อยสลายของกรดนี้อย่างรวดเร็วกว่าการเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิต่ำ (Pigman et al, 1961) ยกเว้นที่อุณหภูมิ -15°ซ ซึ่งมีผลของการละลายของน้ำแข็งเข้ามาเกี่ยวข้องด้วยจึงทำให้มีการย่อยสลายของกรดไฮยาลูโรนิคมากกว่าที่อุณหภูมิ 4°ซ ดังนั้นในการเก็บกรดไฮยาลูโรนิคจึงควรนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปต้มเพื่อทำลายเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสก่อนการเก็บแล้วจึงนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากการทดลองข้างต้นพบว่าการเก็บกรดไฮยาลูโรนิคจำเป็นต้องนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาต้มเพื่อทำลายเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสก่อน แต่ในการต้มต้องคำนึงถึงอุณหภูมิและระยะเวลาในการต้มด้วย เพราะจากรายงานของผู้วิจัยกลุ่มต่างๆ พบว่ากรดไฮยาลูโรนิคสามารถถูกทำลายโดยความร้อนได้เช่นกัน ดังนั้นจึงศึกษาผลของอุณหภูมิและระยะเวลาในการต้มต่อน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของกรดไฮยาลูโรนิค จากผลการทดลองพบว่าการใช้อุณหภูมิ 70°ซ มีผลต่อการลดลงของน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของกรดไฮยาลูโรนิคน้อยกว่าที่อุณหภูมิ 100°ซ เมื่อเปรียบเทียบที่เวลาการต้มเท่ากัน นอกจากนี้ยังพบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการต้มน้ำเลี้ยงเชื้อมีความสัมพันธ์กับน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของกรดไฮยาลูโรนิคคือ หากใช้ระยะเวลาการต้มที่นาน ทำให้น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยมีค่าต่ำ และหากใช้ระยะเวลาในการต้มเร็ว ทำให้น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยมีค่าสูง ดังนั้นก่อนการเลือกใช้อุณหภูมิและระยะเวลาในการต้มน้ำเลี้ยงเชื้อควรคำนึงถึงการนำกรดไฮยาลูโรนิคไปใช้ประโยชน์ด้วย เพราะในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์และทางคลีนิกต้องการกรดไฮยาลูโรนิคที่มีคุณสมบัติแตกต่างกัน

เมื่อทำการตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิคจากน้ำเลี้ยงเชื้อ 5 วิธี พบว่าขั้นตอนการตกตะกอนมีความสัมพันธ์กับเปอร์เซนต์การเก็บเกี่ยวและความบริสุทธิ์ของกรดไฮยาลูโรนิคที่ได้คือ หากใช้ขั้นตอนการตกตะกอนหลายขั้นตอนกรดที่ได้จะมีความบริสุทธิ์สูง แต่มีเปอร์เซนต์การเก็บเกี่ยวต่ำทั้งนี้เพราะมีการสูญเสียกรดไฮยาลูโรนิคในระหว่างขั้นตอนการตกตะกอน ดังนั้นในการเลือกวิธีการแยกกรดไฮยาลูโรนิคจึงขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ของการใช้งานของกรดดังกล่าว ตัวอย่างเช่นในทางการแพทย์ต้องการความบริสุทธิ์ของกรดไฮยาลูโรนิคสูง วิธีการตกตะกอนที่เหมาะสมควรเป็นของ Rijn(1983) และในทางอุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์ต้องการความบริสุทธิ์ของกรดไฮยาลูโรนิคที่ต่ำก็อาจเลือกใช้วิธีของ Rijn(1983) กับ Laurent และคณะ(1969) หรือวิธีของ Kjems and Lebech กับ Laurent และคณะ(1969) เป็นต้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย