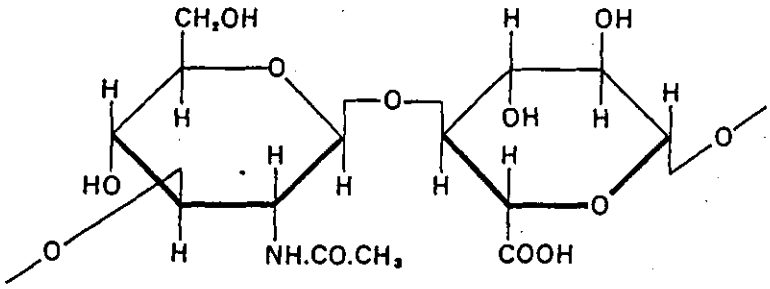
บทที่ 1

บทนำ

กรดไฮยาลูโรนิค (hyaluronic acid) เป็นพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide) ที่สามารถพบได้ในธรรมชาติ ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ได้ ตัวอย่างเช่นแทนวุ้นน้ำตาในการผ่าตัดตา (ophthalmic surgery) เป็นส่วนประกอบในยาหยอดตา ใช้รักษาการอักเสบของข้อต่อ (orthopedic surgery) (Balazs, 1979) ใช้ในการรักษาบาดแผล (wound treatment) (Morita และคณะ, 1991) ตลอดจนใช้สำหรับการตรวจหาแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ streptococcal hyaluronidase ในซีรัมคน (Kjem และคณะ, 1976) และในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์ใช้เป็นสารให้ความชุ่มชื้นในครีมทาหน้า (Nimrod และคณะ, 1988; Hideo , 1991)

กรดไฮยาลูโรนิคเป็นมิวโคพอลิแซคคาไรด์ที่ปลอดหมู่ซัลเฟต มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 50 ถึง 13,000 กิโลดาลตัน (Nimrod และคณะ, 1988) หรือมากกว่า 14,000 กิโลดาลตัน (Ellwood และคณะ, 1995) ไม่มีสี มีความหนืด ละลายน้ำได้เนื่องจากการที่มีความเป็นขั้วสูง (Balazs, 1979) ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เอทานอล, อะซิโตน มีความยืดหยุ่นและสามารถเก็บรักษาความชุ่มชื้นได้ดี โครงสร้างเคมีของกรดไฮยาลูโรนิคเป็นพอลิเมอร์สายตรงของน้ำตาลสองชนิดคือ บีตา-(1,4)-กลูคูโรนิคแอซิด (β-(1,4)-glucuronic acid, GlcA) และบีตา-(1,3)-เอน-แอซิทิลกลูโคแซมีน (β-(1,3)-N-acetyl glucosamine, GlcNAc) (รูปที่ 1) มีสูตรโมเลกุลอย่างง่ายคือ $(C_{14}H_{21}NO_{11})_n$ โดย n มีค่ามากกว่า 1,000 ขึ้นไป (Brown และคณะ, 1994) และแปรผันโดยขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น แหล่งที่พบ (Laurent, 1955) พบว่ากรดไฮยาลูโรนิคที่แยกได้จากน้ำไขข้อจะมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่าที่แยกได้จากแหล่งอื่น(ตารางที่ 1) ความแตกต่างของวิธีการคัดแยกและวิธีการตรวจ (Ellwood และคณะ, 1995) โดยทั่วไปกรดไฮยาลูโรนิคที่พบในธรรมชาติและที่แยกได้มักอยู่ในรูปของเกลือโซเดียมคือ โซเดียมไฮยาลูโรเนต และพบบ้างในรูปของเกลือโพแทสเซียมคือ โพแทสเซียมไฮยาลูโรเนต (Nimrod และคณะ, 1988; Brown และคณะ, 1994; Ellwood และคณะ, 1995; Fujii และคณะ, 1996)



รูปที่ 1 โครงสร้างของกรดไฮยาลูโรนิค (Regan และคณะ, 1994)

ตารางที่ 1 น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิคจากแหล่งต่างๆ

แหล่งที่ได้	น้ำหนักยแลกุล(กิโลดาลตัน)	เอกสารอ้างอิง
รกของทารก	3,000 - 4,000	Laurent, 1955
วุ้นตา	77 - 1,700	Laurent และคณะ, 1960
น้ำไขข้อ	57 - 1,300	Rowen และคณะ, 1956
S. pyogenes	55	Bracke และคณะ, 1985

กรดไฮยาลูโรนิคพบได้ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของคนและสัตว์ เช่น ผิวหนัง กระดูกอ่อน และในอวัยวะบางอย่าง เช่น สายรก, วุ้นตา, น้ำไขข้อ และในหงอนไก่ตัวผู้ มีกรดดังกล่าวในปริมาณสูง (Nimrod และคณะ, 1986) โดยมีความเกี่ยวข้องกับโครงสร้างและกระบวนการทางชีวภาพ (Morita และคณะ, 1991; Regan และคณะ, 1994; Kim และคณะ, 1996; Romeo และคณะ, 1996) ตามธรรมชาติกรดไฮยาลูโรนิคบริเวณผิวหนังและกระดูกอ่อนมีหน้าที่จับน้ำและโปรตีนหรือมิวโคพอลิแซคคาไรด์อื่นๆ เพื่อรักษากำลังและความยืดหยุ่นของเนื่อเยื่อ (Nimrod และคณะ, 1988) ส่วนในน้ำไขข้อความหนืดของกรดดังกล่าวจะทำหน้าที่เป็นสารหล่อลื่น (Meyers และคณะ, 1966; Robert, 1982) เพื่อป้องกันเซลล์จากสิ่งแวดล้อมต่างๆและการรุกรานของแบคทีเรีย (Nimrod และคณะ, 1988) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมกรดไฮยาลูโรนิคสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของลิมโฟไซต์และแมคโคฟาจ, ยับยั้งปฏิกิริยาการต้านเซลล์ปลูกถ่ายของคนแบบ graft-versus-host reaction (Balazs, 1979) กระตุ้นการรวมตัวของเซลล์ลิมโฟมาร์ (lymphoma cell), การรวมกันของ epithelial cell ในระหว่างการเจริญ และการลดการเคลื่อนที่แบบ chemotactic ของเม็ดเลือดขาวซึ่งมีหน่วยรับของกรดไฮยาลูโรนิคอยู่บนลิมโฟไซต์และแมคโครฟาจในปอด และยังมีบทบาทเกี่ยวกับการซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่บาดเจ็บอีกด้วย พบว่าการสร้างกรดไฮยาลูโรนิคที่ผิดปกติไปจะเป็นสาเหตุของการเกิดโรค Marfan's syndrome (Romeo และคณะ, 1996)

นอกจากสร้างโดยคนและสัตว์แล้วกรดนี้ยังสามารถสร้างโดยจุลินทรีย์ได้ โดยพบว่าแบคทีเรียสกุล Streptococcus Lancefield หมู่ A และ C อาทิเช่น *S. pyogenes, S. equisimilis, S. equi, S. dusgalactiae, S. faecalis S. zooepidemicus* (Holmstrom, 1967; Woolcock, 1974; Kjem, 1976) และ *Peptostreptococcus* sp. รวมทั้งเชื้อ *Pasteurella multocida* (Miyamori และคณะ, 1989) เชื้อในกลุ่มสเตรปโตคอกคัสจัดเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีความเหมาะสมสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค เพราะสามารถสร้างกรดนี้ได้ในปริมาณสูงและที่สำคัญกว่านั้นคือ สร้างพอลิเมอร์มิวโคพอลิแซคคาไรด์ของกรดไฮยาลูโรนิคเพียงชนิดเดียวเท่านั้น (Rijn, 1983) โดยสร้างในรูปของแคปซูลที่อยู่ล้อมรอบเซลล์ (Regan และคณะ, 1994) ทั้งนี้พบว่าการสร้างกรดนี้มีปริมาณและรูปแบบการสร้างที่แตกต่างกัน เชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างกรดไฮยาลูโรนิคได้เกือบทุกสายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสได้ เมื่อเชื้อเจริญเข้าสู่ระยะคงตัว (stationary phase) (Rijn, 1983) โดยเอนไซม์ดังกล่าวจะย่อยสลายกรดไฮยาลูโรนิคแบบจำเพาะเจาะจงได้หน่วยย่อยของเอน-แอซิทิลกลูโคแซมีน และทำให้กรดดังกล่าวมีน้ำหนักโมเลกุลและความหนืดต่ำลง (Morita และคณะ, 1991) กลุ่มของเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสได้แก่ *S. pyogenes, S. equisimilis, S. salivarius, S. dysgalactiae, Propionibacterium acnes, Staphylococcus aureus* เป็นต้น (Sting และคณะ, 1989)

การสูญเสียสมบัติของกรดไฮยาลูโรนิค

กรดไฮยาลูโรนิคสามารถถูกทำลายได้โดยปัจจัยทั้งทางด้านกายภาพและเคมี อาทิเช่น ความร้อน, อัตราการเฉือน (shear rate), ความดัน, รังสี, การเกิดออกซิเดชั่น (oxidation) โดยมีไอออนของโลหะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และการย่อยสลายโดยเอนไซม์ เป็นต้น (Pigman และคณะ, 1961; Balazs, 1979; Rehakova และคณะ, 1994; Zu และคณะ, 1997) ทำให้กรดดังกล่าวมีน้ำหนักโมเลกุล ความหนืดและสมบัติในการเก็บรักษาน้ำลดต่ำลง (Morita และคณะ, 1991) โดยมีรายงานต่างๆดังนี้

Brown และคณะ (1994) พบว่าการนำกรดไฮยาลูโรนิคผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดของรูกรองน้อยกว่าหรือเท่ากับ 1 ไมครอน หรือการใช้อุณหภูมิสูง รวมถึงระยะเวลาในการให้ความร้อนมีผลทำให้ความหนืดของกรดไฮยาลูโรนิคลดต่ำลง

Homer และคณะ (1994) ได้รายงานว่าผลผลิตส่วนใหญ่ที่ได้จากการย่อยสลายกรดไฮยาลูโรนิคที่ปลายรีดิวซ์ของ N-acetylglucosamine ด้วยเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสจากแบคทีเรียคือน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่มีพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 4,5 ของ glucuronosyl residue

Rehakova และคณะ (1994) พบว่าโซเดียมไฮยาลูโรเนตสามารถถูกทำลายได้โดยคลื่นเสียงความถี่สูงที่กระบวนการตัดสายมีความสัมพันธ์กันเป็นเส้นตรง ขณะที่ความร้อนและแสงอุตตราไวโอเลตมีกระบวนการตัดสายโดยความสัมพันธ์นั้นไม่ได้เป็นแบบเส้นตรง และการย่อยสลายโดยเอนไซม์ทำให้ได้โมเลกุลน้ำตาลสายสั้นๆ

ในขณะที่ Zu และคณะ (1997) พบว่าการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของกรดไฮยาลูโรนิคถูกยับยั้งโดยเอนไซม์แคตาเลส, hydroxyl redical scavengers และสารคีเลทไอออนโลหะ (metal ion chelators) เช่นเดียวกับที่ Pigman และคณะ (1961) พบว่าการเติมแอลกอฮอล์ 5-10 เปอร์เซนต์ในสารละลายระหว่างการเตรียม lyophilization สามารถยับยั้งการทำลายกรดไฮยาลูโรนิคได้ และการมีแอลกอฮอล์อยู่ในผลผลิตสุดท้ายจะช่วยทำให้กรดดังกล่าวมีความคงตัวในระหว่างการเก็บอีกด้วย

เชื้อสเตรปโตคอกคัสกับการสร้างกรดไฮยาลูโรนิค

เชื้อสเตรปโตคอกคัส

เชื้อสเตรปโตคอกคัส (streptococcus) เป็นเชื้อที่ย้อมติดสีแกรมบวก มีรูปร่างรี (ovoid) หรือกลม (spherical) จัดเรียงตัวเป็นสาย (chain) บางครั้งเรียงตัวในลักษณะกลมคู่ (diplococcus) หรือรูปร่างคล้ายแท่ง (Rod-like) ความยาวของสายขึ้นกับปัจจัยของสิ่งแวดล้อม เช่น ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น การเจริญของเชื้อต้องการอาหารที่มีเลือดหรือน้ำจากเนื่อเยื่อเป็นส่วนประกอบ สารอาหารที่ต้องการจะมีความแตกต่างกันไปในระหว่างสายพันธุ์ เชื้อส่วนใหญ่เป็นพวก facultative anaerobes แต่บางสายพันธุ์จัดเป็นชนิด obligate anaerobes ลักษณะของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจะมีลักษณะกลมนูน (convex) มันวาว มีขนาดเล็กน้อยกว่า 1-2 มิลลิเมตร ใส ไม่มีสี พบในธรรมชาติทั่วไป บางชนิดเป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) ในคน ในขณะที่บางชนิดเป็นเชื้อก่อโรคได้

การจำแนกกลุ่มของเชื้อสเตรปโตคอกคัส สามารถทำได้โดยอาศัยพื้นฐานการจำแนกของ Brown และLancefield ร่วมกับลักษณะโคโลนี การทดสอบทางชีวเคมี สมบัติทางภูมิคุ้มกัน และลักษณะทางชีววิทยา

การจำแนกตามวิธีของ Brown เป็นการแบ่งกลุ่มตามชนิดของการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง โดยแบ่งได้เป็น บีตา-ฮีโมไลซิส, อัลฟ่า-ฮีโมไลซิส และแกมม่า-ฮีโมไลซิส

การจำแนกตามวิธีของ Lancefield เป็นการแบ่งตามชนิดของโพลิแซคคาไรด์บนผนังเซลล์ของเชื้อ แบ่งได้เป็น 19 กลุ่ม คือ A-H และ K-U

ทำให้สามารถจำแนกกลุ่มของเชื้อสเตรปโตคอกคัสออกเป็น 3 ชนิดใหญ่ๆ ได้แก่

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. <u>กลุ่มของเชื้อสเตรปโตคอกคัสที่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงอย่างสมบูรณ์หรือการย่อยสลายแบบบีต้า</u> (Beta-Hemolytic Streptococcus)

เป็นกลุ่มที่สร้างฮีโมไลซินที่ละลายน้ำได้ (Soluble hemolysins) โดยจัดเป็นกลุ่มที่จำเพาะเจาะจงกับคาร์โบไฮเดรท (Group-specific carbohydrates) ประกอบด้วย C carbohydrates ที่ให้ปฏิกิริยาตกตะกอน (Precipitin reaction) กับแอนติซีรัมที่จำเพาะเจาะจง ได้แก่ เชื้อกลุ่ม A-H และ K-U

กลุ่ม A ได้แก่ *Streptococcus pyogenes* ที่ไวต่อเบซิทราซิน เป็นเชื้อก่อโรคในคนที่รุกรานบริเวณเฉพาะที่ (local invasion) หรือทั้งระบบ (systemic invasion) และทำให้เกิดโรคภายหลังการติดเชื้อนี้ เนื่องจากปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกัน ในบางสายพันธุ์มีการสร้างกรดไฮยาลูโรนิคเป็นส่วนประกอบของแคปซูลและส่วนใหญ่มีการผลิตเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสด้วย กลไกการทำงานของเซลล์เป็นกระบวนการหมักซึ่งผลผลิตหลักคือ กรดแลคติก (lactic acid) เป็นกลุ่มที่มีความรุนแรงในการก่อโรคมาก

กลุ่ม B ได้แก่ *Streptococcus agalactiae* เป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) ในระบบสืบพันธุ์ของผู้หญิง เป็นสาเหตุสำคัญของโลหิตเป็นพิษในเด็กแรกเกิดและเยื่อหุ้มสมองอักเสบ เชื้อกลุ่มนี้สามารถย่อยสลายโซเดียมฮิปโปเรต มีปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคคือ คาร์โบไฮเดรตชนิดจำเพาะต่อกลุ่มและแคปซูลที่เป็นพอลิแซคคาไรด์

กลุ่ม C ได้แก่ *S. equisimilis, S. equi, S. dysgalactiae* (2 ชนิดแรกย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ ชนิดที่ 3 ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบไม่สมบูรณ์) และ *S. zooepidemicus* มีรูปร่างคล้ายกับกลุ่ม A ส่วนใหญ่เป็นสาเหตุของโรคในสัตว์ยกเว้น *S. equisimilis* ที่มีการติดเชื้อในคนด้วย มีปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรคคือ คาร์โบไฮเดรตที่จำเพาะต่อกลุ่มโปรตีนบริเวณผิวเซลล์ซึ่งคล้ายกับโปรตีน M และแคปซูล

กลุ่ม D ได้แก่ *S. faecalis, S. faecium, S. dyrans, S. bovis* และ *S. equinus* เป็นเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ ผิวหนัง ทางเดินหายใจส่วนบน และทางเดินปัสสาวะ การก่อโรคส่วนใหญ่เกิดจากการรุกรานของเชื้อประจำถิ่นเหล่านี้

กลุ่ม G ได้แก่ *S. anginosus* และ *Streptococcus* sp.

กลุ่ม E, F, H และ K-U ก่อให้เกิดโรคขึ้นในคน

2. <u>กลุ่มของสเตรปโตรคอกคัสที่ไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงอย่างสมบูรณ์</u> (Non-beta-hemolytic Streptococci)

โดยทั่วไปเป็นการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบไม่สมบูรณ์หรือการย่อยสลายแบบอัลฟ่า (alpha hemolytic) หรือไม่มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ได้แก่

S. pneumoniae (pneumococci) มีบทบาทในโรคที่เกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ

Viridans streptococci รวมถึง *S. salivarius, S. mitis*, และ *S. mutans* ส่วนใหญ่เป็นเชื้อประจำถิ่นในช่องปากของคน

กลุ่ม D เป็นสายพันธุ์ที่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบไม่สมบูรณ์

กลุ่ม N มีความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้หลากหลาย พบในคนที่เป็นโรคโดยทำให้เกิดการจับตัวเป็นก้อน (coagulation) ของนม จึงนิยมเรียกว่า lactic streptococci

3. Peptostreptococci เจริญในภาวะไร้อากาศ หรือภาวะที่มีอากาศเพียงเล็กน้อย มักก่อโรคร่วมกับเชื้อที่ไม่ใช้อากาศอื่นๆ ในสมอง ปอด กระดูกเชิงกราน หรือท้อง

เชื้อสเตรปโตคอกคัสในกลุ่ม A, B, C และ Peptostreptococci จะสร้างแคปซูลที่มีกรดไฮยาลูโรนิคเป็นส่วนประกอบ ซึ่งสังเกตุเห็นได้ตั้งแต่เชื้อยังเล็กในเฉพาะกลุ่ม A และ C เท่านั้นที่สร้างแคปซูลของกรดไฮยาลูโรนิคแล้วมีโครงสร้างเหมือนกับกรดไฮยาลูโรนิคที่พบในแหล่งอื่นๆ (Seastone, 1939; MaClean, 1941) โดยแคปซูลดังกล่าวทำให้เกิดการหลบเลี่ยงการจับกินของเม็ดเลือดขาว (phagocytosis) แต่อย่างไรก็ตามเชื้อสเตปโตคอกคัสในกลุ่ม A และ C ยังคงมีความสามารถในการก่อโรคอยู่ ในการนำเชื้อเหล่านี้มาใช้งานจึงต้องคำนึงถึงปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคตลอดจนในด้านความปลอดภัยของผู้ใช้ จึงควรคัดเลือกเชื้อที่มีสมบัติดังต่อไปนี้

1.ไม่สร้างเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส

2.สร้างกรดไฮยาลูโรนิคในปริมาณสูง

3.ปลอดสารพิษ

4.ไม่ทำลายเม็ดเลือดแดง (Hideo และคณะ, 1991; Brown และคณะ, 1994; Ellwood และคณะ, 1996)

โดยทั่วไปการที่จะให้ได้เชื้อที่มีสมบัติทั้งสี่ข้อครบถ้วนจากเชื้อตามธรรมชาตินั้น อาจหาได้ยากจึงอาจใช้วิธีการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยการกลายพันธุ์ (mutation) เพื่อให้เชื้อมีสมบัติตามที่ต้องการ ตัวอย่างเช่นการกลายพันธุ์โดยแสงอุลตราไวโอเลตที่มีความยาวคลื่น 242 นาโนเมตรหรือสารเคมี เช่น เอน-เมทิล-เอน-ไนโตร-เอน-ไนโตรโซกัวนิดีน (NTG) (Kim, 1996)

ปัจจุบันเชื้อที่นิยมใช้ในการศึกษาวิจัยเป็นพวกสเตรปโตคอกคัสกลุ่ม C เช่น *S. equi, S.equisimilis S. zooepidemicus* เพราะเชื้อเหล่านี้ไม่ก่อโรคในคน แต่ก่อโรคเฉพาะในสัตว์เท่านั้น อีกทั้งสามารถสร้างกรดไฮยาลูโรนิคในปริมาณมาก และไม่มีสารพิษจากแบคทีเรียปนเปื้อน (Nimrod และคณะ, 1986; Swann และคณะ, 1990; Regan และคณะ, 1994) มีรายงานถึงการสร้างกรดไฮยาลูโรนิคโดยกลุ่มผู้วิจัยต่างๆ ดังนี้

Kendall และคณะ (1937) ได้รายงานว่าแคปซูลของสเตรปโตคอกคัสกลุ่ม A มีโครงสร้างเป็นกรดไฮยาลูโรนิค ซึ่งมีสมบัติเหมือนกับกรดไฮยาลูโรนิคที่แยกได้จากเนื้อเยื่อต่างๆของร่างกาย

Seastone (1939) พบว่าในแคปซูลของสเตรปโตคอกคัสกลุ่ม C มีกรดไฮยาลูโรนิคเป็นส่วนประกอบ โดยการสร้างจะเกิดขึ้นในเชื้อที่มีอายุน้อย

McClean (1941) พบว่าสเตรปโตคอกคัสบางสายพันธุ์ที่มีการสร้างแคปซูลจะสร้างแคปซูลในขณะที่เชื้อยังมีอายุน้อย และในสายพันธุ์ทั้งที่สร้างและไม่สร้างแคปซูลจะมีการสร้างเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสออกมาด้วย

Bernheimer และคณะ (1942) ปรับปรุงสูตรอาหารสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ซึ่งประกอบด้วยกลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และเคซีนไฮโดรไลเซท 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับเกลือ กรดอะมิโน และสารสนับสนุนการเจริญ

Pike (1948) รายงานว่าการสร้างกรดไฮยาลูโรนิคในสเตรปโตคอกคัสกลุ่ม A นั้น แบคทีเรียดังกล่าวยังสร้างสารที่ถูกทำลายโดยความร้อนออกมาทำลายกรดนี้ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อได้

Faber และ Rosendal (1954) ได้รายงานว่าความสามารถในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสเตรปโตคอกคัสกลุ่ม A เป็นความสามารถของเชื้อในแต่ละสายพันธุ์ไม่เกี่ยวข้องกับชนิดของแอนติเจนในระหว่างกลุ่มของเชื้อสเตรปโตคอกคัส โดยในบางสายพันธุ์พบการลดลงของความเข้มข้นของกรดดังกล่าวร่วมด้วย

Maclennan (1956) พบว่ารูปแบบการสร้างกรดไฮยาลูโรนิคของสเตรปโตคอกคัสกลุ่ม A และ C มีความคล้ายคลึงกันทั้งในภาวะที่มีและไม่มีการเขย่าคือ มีการผลิตกรดนี้สูงสุดในระยะการเจริญแบบลอกาลิทิมิก โดยในภาวะที่มีการเขย่าจะให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคที่สูงกว่าภาวะที่ไม่มีการเขย่าและพบการสร้างเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสร่วมด้วย รูปแบบการสร้างมีความคล้ายคลึงกันในเชื้อทุกสายพันธุ์และการสร้างจะไม่ถูกกระตุ้นโดยกรดไฮยาลูโรนิค โดยในภาวะไร้อากาศมีการสร้างเอนไซม์มากกว่าภาวะที่มีอากาศ จึงเป็นไปได้ว่ากรดไฮยาลูโรนิคที่สร้างขึ้นถูกทำลายโดยเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่มีปริมาณมากกว่าทำให้ไม่สามารถตรวจพบกรดไฮยาลูโรนิคในอาหารเลี้ยงเชื้อได้

Mortimer และ Vastine (1967) พบว่า L form ของสเตรปโตคอกคัสกลุ่ม A สามารถสร้างกรดไฮยาลูโรนิคได้ และเมื่อนำ L form มาเลี้ยงบนอาหารที่มีเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสพบว่า โคโลนีที่เกิดขึ้นไม่มีการสร้างกรดดังกล่าวขึ้น

Rijn และคณะ (1980) พบสูตรอาหารเชิงซ้อนสำหรับสเตรปโตคอกคัสกลุ่ม A ที่สามารถเพิ่มอัตราการเจริญและปริมาณการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้ นอกจากนี้หัวเชื้อสามารถถูกใช้ได้ทันทีโดยไม่ต้องผ่านการปรับตัวก่อน

Miyamori และคณะ (1989) ศึกษาการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค โดยการเติมกรดแทนนิก (tannic acid) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณการผลิตและน้ำหนักโมเลกุลของกรดนี้ได้

Ellwood และคณะ (1996) รายงานว่าการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคโดยกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous Fermentation) จะให้ผลผลิตและน้ำหนักโมเลกุลสูงขึ้น รวมทั้งไม่มีการปนเปื้อนจากสารพิษ

<u>กลไกการสร้างกรดไฮยาลูโรนิค</u>

สำหรับกลไกการสร้างกรดไฮยาลูโรนิคในระยะแรกยังไม่เป็นที่เข้าใจ แต่ได้มีผู้ศึกษาและรายงานการสร้างกรดชนิดนี้ในเชื้อสเตรปโตคอกคัสกลุ่ม A และ C

Roseman และคณะ (1952) พบว่า 50% ของกลูโคซามีนได้จากกลูโคสที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงโมเลกุล ข้อมูลนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Dorfman (1955) ที่พบว่า 50%ของทั้งกลูโคซามีนและกรดกลูคูโรนิคเกิดขึ้นจากการใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้น แต่เฉพาะกลูโคซามีนเท่านั้นที่สามารถถูกนำไปใช้สำหรับการสร้างกลูโคสได้ นอกจากนี้ Regan และคณะ (1994) พบว่ากลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อเพียง 5 - 7 เปอร์เซนต์เท่านั้นที่เปลี่ยนเป็นกรดไฮยาลูโรนิค

Cifonelli และ Dorfman (1957) รายงานถึงการพบยูริดีนนิวคลีโอไทด์หลายชนิดในส่วนสกัดที่ได้จากการสกัดสเตรปโตคอกคัสกลุ่ม A โดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง เช่น UDP-glucose, UDP-N-Acetylglucosamine และ UDP-glucuronic acid

Markovitz และคณะ (1958) สามารถสกัดเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสร้างกรดไฮยาลูโรนิคจาก UDP-glucuronic acid และ UDP-N-Acetylglucosamine จากสเตรปโตคอกคัสกลุ่ม A ที่สร้างแคปซูลได้ การสร้างกรดดังกล่าวนี้ต้องการ Mg^{++}, Mn^{++} และ Co^{++} โดยข้อมูลนี้สอดคล้องกับรายงานของ Stoolmiller และ Dorfman (1969) ที่พบว่าการทำงานของ HA synthase จะถูกกระตุ้นโดยไอออนของธาตุที่มีสองประจุ เช่น Mn^{2+}, Mg^{2+} และไม่พบว่ามีส่วนของไขมันที่ทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมในระหว่างการสร้างกรดนี้ การต่อของสายของกรดไฮยาลูโรนิคนั้นเกิดจากการย้ายหน่วยของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ต่ออยู่กับยูริดีนนิวคลีโอไซด์ไดฟอสเฟตไปยังปลายรีดิวซ์ของสายพอลิเมอร์ของกรดไฮยาลูโรนิค ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมสำหรับการสร้างพอลิแซคคาไรด์เป็น 7.4 โดยช่วงความเป็นกรดด่างที่มีค่าค่อนไปในทางกรดทำให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ ดังกล่าวมากกว่าช่วงที่มีค่าค่อนไปทางเบส

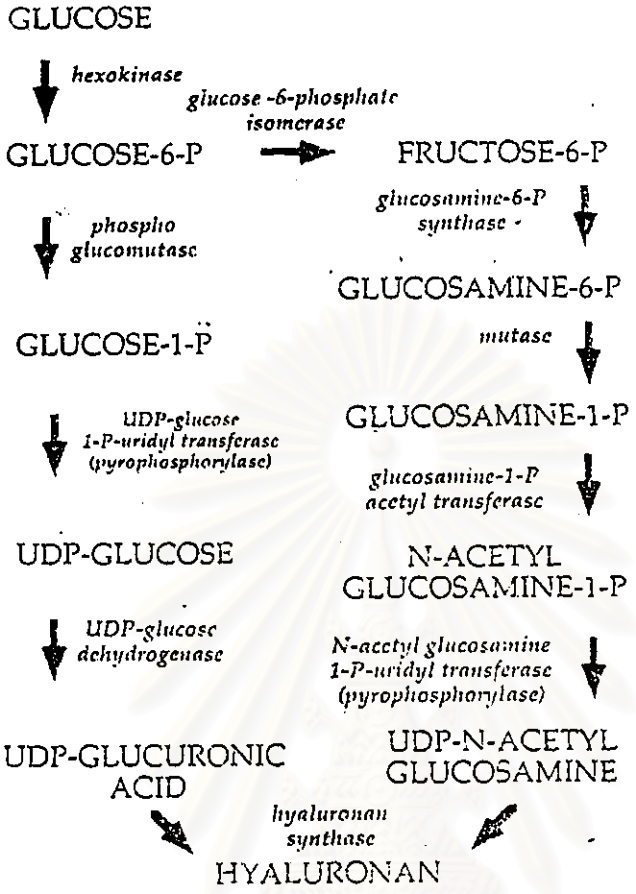
Sugahara และคณะ (1979) พบว่าการต่อสายของกรดไฮยาลูโรนิคเกิดขึ้นโดยการต่อของโมโนแซคคาไรด์ตัวใหม่ในสายเดิมโดยไม่ผ่าน lipid intermidiate จากนั้นจึงปล่อยสายของกรดไฮยาลูโรนิคที่สมบูรณ์ออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ

Prehm (1983) พบว่าการต่อสายของกรดไฮยาลูโรนิคเกิดขึ้นภายนอกเซลล์ไม่เหมือนไกลโคสะมิโนไกลแคนชนิดอื่นๆ ที่สร้างในกอจิแอพาราทัส (golgi apparatus)

DeAngelis (1996) กล่าวว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของ HA synthase ในเชื้อ *Pasteurella multocida* คือ 7.1 และช่วงของค่าความเป็นกรดด่างที่ค่อนไปทางเบสมีความเหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวมากกว่าช่วงที่เป็นกรด นอกจากนี้ยังพบว่าการมีสารตั้งต้นมากเกินไปจะยับยั้งการสร้างกรดไฮยาลูโรนิคได้ การทำงานของเอนไซม์นี้ถูกกระตุ้นโดยไอออนของ Mn ได้มากกว่า Mg

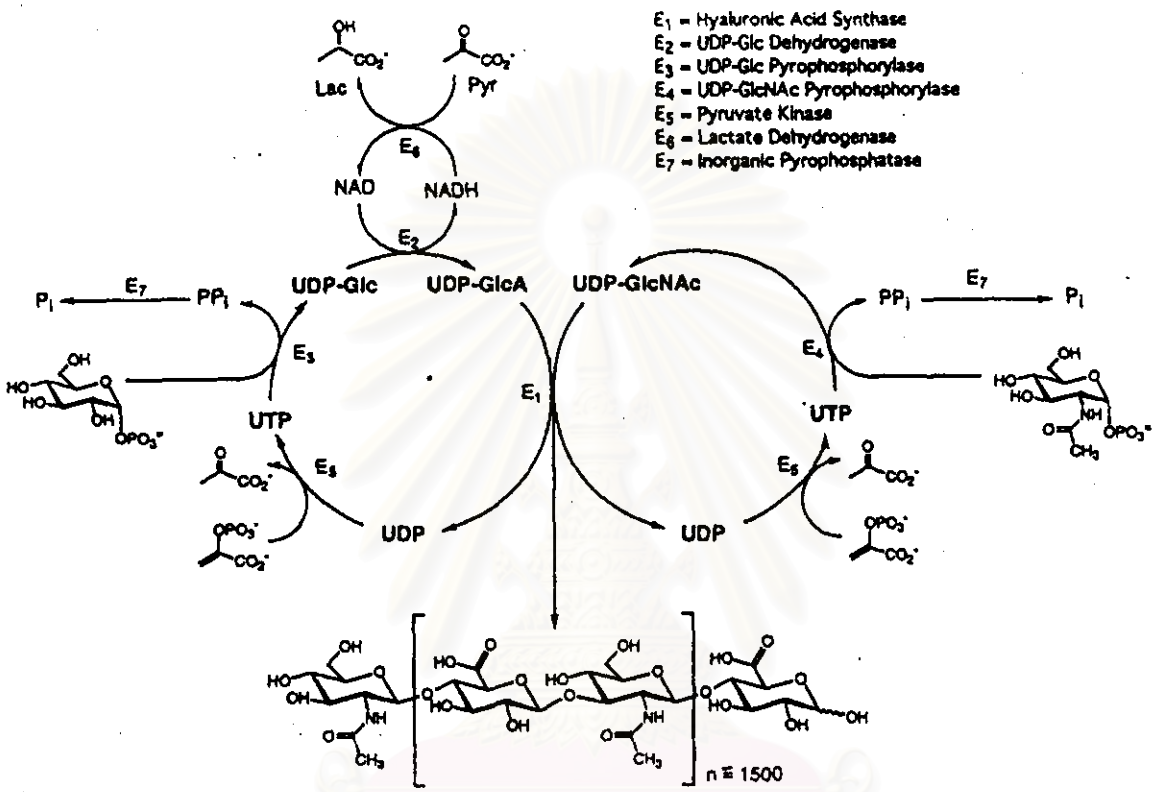
เมื่อมีการศึกษาโดยอาศัยวิธีการทางด้านพันธุวิศวกรรม ทำให้ทราบถึงยีนที่ควบคุมการสร้างกรดไฮยาลูโรนิคว่าประกอบด้วยยีน *has*A, *has*B และ *has*C โดยยีนทั้งสามเชื่อมต่อกันและมีโปรโมเตอร์ (promotor) ร่วมกัน ยีน *has*A, *has*B และ *has*C จะถอดรหัสสำหรับการสร้างเอนไซม์ hyaluronan synthase, UDP-glucose dehydrogenase และ UDP-glucose pyrophosphorylase ตามลำดับ (Dougherty and Rijn, 1993; DeAngelis et al, 1993; Dougherty and Rijn, 1994) ทำให้สามารถเขียนถึงกลไกการสร้างกรดไฮยาลูโรนิคได้ ตามรูปที่ 2 โดยพบว่าสารตั้งต้น 2 ชนิดคือ UDP-GlcNAc และ UDP-GlcA ถูกสร้างขึ้นจาก glucose-6-PO_4 และ fructose-6-PO_4 ตามลำดับ ซึ่งสารทั้งสองชนิดดังกล่าวเป็นสารที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการไกลโคไลซิส โดยมีเอนไซม์ Hyaluronan synthase เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการสร้างกรดไฮยาลูโรนิค (Regan และคณะ, 1994)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2 กลไกการสร้างกรดไฮยาลูโรนิค (Regan et al., 1994)

ต่อมา De Luca และคณะ (1995) ได้พยายามเตรียมกรดไฮยาลูโรนิคที่ปลอดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์โดยศึกษาการสร้างกรดไฮยาลูโรนิคโดยใช้เอนไซม์สร้าง UDP-GlcNAc และ UDP-GlcA จาก UDP ตามรูปที่ 3 โดยอาศัยเอนไซม์ Pyruvate Kinase ในการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับยูริดีนนิวคลีโอไซด์ไดฟอสเฟต เอนไซม์ UDP-GlcNAc Pyrophosphorylase และ UDP-Glc Pyrophosphorylase ในการสร้าง UDP-N-Acetylglucosamine และ UDP-glucose ตามลำดับ โดยเติมยูริดีนนิวคลีโอไซด์ไดฟอสเฟตตรงตำแหน่งคาร์บอนตัวที่หนึ่ง นอกจากนี้ยังอาศัยเอนไซม์ UDP-Glc Dehydrogenase ในการเปลี่ยน UDP-glucose เป็น UDP-glucuronic acid ทั้งนี้เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาการปนเปื้อนของไวรัส การมีส่วนของกรดไฮยาลูโรนิคที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดเล็กมาก และสารตั้งต้นที่มีราคาแพงคือ Glc-1-P และ GlcNAc-1-P แต่วิธีดังกล่าวมีข้อเสียคือ ความไม่คงตัวของเอนไซม์ Hyaluronan synthase ที่มีครึ่งชีวิต 24 ชั่วโมงที่ 25 °ซ



<u>รูปที่ 3</u> การสร้างยูริดีนนิวคลีโอไทด์ไดฟอสเฟตด้วยวิธีทางเอนไซม์ (De Luca et al., 1995)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างกรดไฮยาลูโรนิคโดยเชื้อสเตรปโตคอกคัส

ประกอบด้วย (Swann และคณะ, 1990)

1. ลักษณะทางพันธุกรรม

จากการที่เชื้อสเตรปโตคอกคัสมีการสร้างกรดไฮยาลูโรนิคได้ช่วงระยะเวลาหนึ่งของการเจริญ หลังจากนั้นจะปล่อยเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่สร้างขึ้นใน 2 - 3 ชั่วโมงแรกของการเจริญ และมีการสร้างสูงสุดเมื่อการเจริญมาถึงระยะคงตัวออกมาทำลายกรดไฮยาลูโรนิคได้ (Rijn, 1983) ดังนั้นจุลินทรีย์ที่นำมาใช้จึงไม่ควรมีการสร้างเอนไซม์นี้หรือสร้างได้ในปริมาณต่ำ

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

มีผู้รายงานอาหารสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างกรดไฮยาลูโรนิคไว้ดังนี้

Woolcock (1974) สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคจาก *S. equi* ในปริมาณ 52 มก./100 มล. โดยปราศจากเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ประกอบด้วยแบคโตเปปโตน 20 กรัมต่อลิตร, กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร, โซเดียมไบคาร์บอเนต 2 กรัมต่อลิตร, โซเดียมคลอไรด์ 2 กรัมต่อลิตร และไดโซเดียมฟอสเฟต 0.4 กรัมต่อลิตร

Nimrod และคณะ (1986) สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคน้ำหนักโมเลกุล 1,000-4,000 กิโลดาลตัน จาก *S. zooepidemicus* HA-116 ATCC 39920 ภายใต้ภาวะที่มีอากาศในปริมาณ 4-6 กรัมต่อลิตร และในภาวะที่ไม่มีอากาศในปริมาณ 2 กรัมต่อลิตรเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยเคซีนไฮโดรไลเซท 20 กรัมต่อลิตร, สารสกัดจากยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร, โซเดียมคลอไรด์ 2 กรัมต่อลิตร, แมกนีเซียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร, ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.5 กรัมต่อลิตร และกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่างเป็น 7.0 จากนั้นในปี 1988 Nimrod และคณะ ได้ศึกษาการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของเชื้อ *S. zooepidemicus* HA-116 ATCC 39920 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเดิมที่มีปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตมากกว่า 1.5 กรัมต่อลิตร และปริมาณกลูโคสเพียง 5 กรัมต่อลิตร พบว่าภายใต้ภาวะที่มีอากาศมีการผลิตกรดนี้ในปริมาณ 4-6 กรัมต่อลิตร น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 2,200-3,300 กิโลดาลตัน และภายใต้ภาวะที่ไม่มีอากาศในปริมาณ 2-3 กรัมต่อลิตร น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 1,500-2,000 กิโลดาลตัน

Akasaka และคณะ (1989) สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคจาก *S. zooepidemicus* NH-131 ภายใต้ภาวะที่มีอากาศ ในปริมาณ 3.6 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน สารสกัดจากยีสต์และโพลิเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยใส่กลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเพียง 2 กรัมต่อลิตร แล้วเติมอีก 58 กรัมต่อลิตร เมื่อการเจริญของเซลล์เข้าสู่ช่วงเริ่มต้นของลอคเฟส คือประมาณ 5-7 ชั่วโมงหลังการปลูกเชื้อ

2.1 แหล่งคาร์บอน

มีบทบาทสำคัญต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค โดยใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสร้าง UDP-N-acetylglucosamine และ UDP-glucuronic acid ที่เป็นหน่วยย่อยของกรดไฮยาลูโรนิค และยังใช้เป็นแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญได้ด้วย

แหล่งคาร์บอนที่สำคัญ ได้แก่ กลูโคส ฟรุกโตส กาแลคโตส ซูโครส และกรดอินทรีย์ เช่น กรดฟูมาริก (Akasaka และคณะ, 1989; Miyamori และคณะ, 1989; Swann และคณะ, 1990; Ellwood และคณะ, 1996) โดยมีผู้ทำการศึกษาไว้ดังนี้

Prierce และคณะ (1954) พบว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีกว่ากาแลกโตสโดยในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนมีการเจริญและการลดลงของค่าพีเอชอย่างรวดเร็ว กรดไฮยาลูโรนิคถูกสร้างในปริมาณมากโดยเกิดขึ้นควบคู่กับการเจริญโดยปราศจากเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ขณะที่การเจริญของเชื้อดังกล่าวในอาหารที่มีกาแลกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนเกิดขึ้นช้ากว่า และการสร้างกรดดังกล่าวนี้จะเกิดขึ้นในระหว่าง 2-3 ชั่วโมงแรกของการเจริญเท่านั้น ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงอย่างช้าๆ และพบเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสจำนวนหนึ่ง

Karush และคณะ (1956) กล่าวว่าการจำกัดปริมาณกลูโคสสามารถกระตุ้นการเจริญของเชื้อสเตรปโตคอกคัสกลุ่ม A ได้

Willoughby และคณะ (1964) ศึกษาผลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคในเชื้อสเตรปโตคอกคัสกลุ่ม A พบว่ากลูโคสเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างกรดนี้ได้มากกว่าที่ความเข้มข้นอื่นๆ เช่นเดียวกับ Holmstrom และ Ricica (1967) ที่พบว่าเปอร์เซนต์การเปลี่ยนกลูโคสเป็นกรดไฮยาลูโรนิคจะลดลงเมื่อปริมาณกลูโคสเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าสูงขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณเซลล์ไม่มีผลต่อปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคด้วย

Akasaka และคณะ (1989) พบว่าการแบ่งเติมกลูโคสในช่วงการเจริญแบบลอกาลิทิมิกเป็นการเพิ่มการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

Swann และคณะ (1990) ได้รายงานว่าทั้งกลูโคส และซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีเท่ากันสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

2.2 แหล่งไนโตรเจน

ในสเตรปโตคอกคัสกลุ่ม A และ C ต้องการแหล่งไนโตรเจนทั้งชนิดที่เป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์สำหรับการเจริญ ตัวอย่างเช่น สารสกัดจากยีสต์, เปปโตน, เคซีนไฮโดรไลเซรท, กรดอะมิโน, แอมโมเนียมซิเตรท, แอมโมเนียมซัลเฟต, ยูเรีย, กลูตามีน และน้ำย่อยกากถั่วเหลือง เป็นต้น (Akasaka และคณะ, 1989; Miyamori และคณะ, 1989; Swann และคณะ, 1990; Ellwood และคณะ, 1996) โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ต้องการปริมาณและชนิด

ของกรดอะมิโนแตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากความสามารถในการสร้างกรดอะมิโนขึ้นอยู่กับสภาวะการเจริญ จึงทำให้ความต้องการกรดอะมิโนของเชื้อแต่ละสายพันธุ์สำหรับการเจริญแตกต่างกันไป ดังได้มีผู้ศึกษาไว้ดังนี้

Slade และ Knox (1950) พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญของสเตรปโตคอกคัสกลุ่ม A สามารถแทนที่เคซีนไฮโดรไลเซรทได้ด้วยของผสมของกรดอะมิโนหลายๆชนิด

Slade และคณะ (1951) พบว่ากรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับการเจริญของ *S. pyogenes* คือ อาร์จินีน, ซีสทีน, ไกลซีน, ฮีสติดีน, ไอโซลูซีน, ลูซีน, ไลซีน, เมไทโอนีน, ฟีนิวอะลานีน, โพรลีน, เซอลีน, ทรีโอนีน, ทริปโตรเฟน, ไทโรซีน และวาลีน นอกจากนี้ยังพบว่าการแทนที่ซีสทีนด้วยกลูทาไทโอจะทำให้มีการเจริญมากกว่าเดิม 25 เท่า

Willoughby และคณะ (1964) พบว่ากลูตามีนจำเป็นสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค โดยปริมาณจะแปรผันตามสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ขณะที่ Holmstrom และ Ricica (1967) พบว่าการเติมกลูตามีนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะยับยั้งการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

Davies และคณะ (1965) ศึกษาการใช้กรดอะมิโนโดยสเตรปโตคอกคัสกลุ่ม A ภายใต้ภาวะที่คงที่ในภาวะการเลี้ยงแบบต่อเนื่องในอาหารเลี้ยงเชื้อที่สร้างขึ้นอย่างสมบูรณ์ พบว่าความขุ่นของแบคทีเรียขึ้นกับความเข้มข้นของกรดอะมิโนหนึ่งตัวในอาหารเลี้ยงเชื้อ

Armstrong และคณะ (1997) พบว่าการเลี้ยง *S. zooepidemicus* ในสภาวะไร้อากาศต้องการกรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับการเจริญ 11 ตัว รวมทั้งกลูตามีนด้วยเพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน

2.3 เกลืออนินทรีย์

มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญ และการสร้างกรดไฮยาลูโรนิค ตัวอย่างเช่น เกลือซัลเฟต, เกลือไฮโดรคลอไรด์, เกลือคาร์บอเนต, เกลือไนเตรต, เกลือฟอสเฟต และเกลืออะซิเ ตรทของแคลเซียม, โพแทสเซียม, โซเดียม, แมงกานีส, แมกนีเซียม, เหล็ก และทองแดง (Akasaka และคณะ, 1989; Miyamori และคณะ, 1989; Hashimoto และคณะ, 1990; Ellwood และคณะ, 1996) โดยมีผู้ศึกษาไว้ดังนี้ คือ

Markovitz และคณะ (1959) รายงานว่า Hyaluronic acid synthase เป็นเอนไซม์ที่พบบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ โดยใช้ UDP-sugar เป็นสารตั้งต้น และต้องการ Mg^{2+} ในการทำงาน

Sting และคณะ (1989) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส จะถูกยับยั้งโดยไอออนของแมกนีเซียมได้มากกว่าไอออนของแคลเซียม และโพแทสเซียมตามลำดับ

DeAngelis (1996) พบว่าในเชื้อ *Pasteurella multocida* เอนไซม์ Hyaluronic acid synthase จะใช้ UDP-sugar เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสร้างกรดไฮยาลูโรนิคเมื่อมี Mg^{2+} หรือ Mn^{2+} ที่ความเป็นกรดด่างเป็นกลาง นอกจากนี้ยังพบว่า Mn^{2+} ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ จะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์มากกว่า Mg^{2+} เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ประมาณ 2 เท่า ขณะที่เอนไซม์จากยีน HasA ของเชื้อสเตรปโตคอกคัสกลุ่ม A จะถูกกระตุ้นโดย Mg^{2+} มากกว่า Mn^{2+} โดยในที่มี Mg^{2+} การจับกันของ Hyaluronic acid synthase กับสารตั้งต้นมีประสิทธิภาพดีขึ้นกว่าเดิม 2-3 เท่า

2.4 วิตามิน

โดยทั่วไปจะใช้ในปริมาณเพียงเล็กน้อย (Miyamori และคณะ, 1989)

3. <u>สภาวะที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค</u>

ในการเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ อันได้แก่

3.1 อุณหภูมิ

3.2 ค่าความเป็นกรดด่าง

3.3 อัตราการให้อากาศ

3.4 อัตราการกวน

ได้มีผู้รายงานถึงบทบาทของปัจจัยต่างๆ เหล่านี้ต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ดังนี้

Bracke และคณะ (1985) ได้ศึกษาพบว่าการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคจากเชื้อ *S. pyogenes* type 18 ภายใต้ภาวะที่ไม่ใช้อากาศสูงสุด ที่อุณหภูมิ 36-38°ซ ค่าความเป็นกรดด่าง 6.5-7.5 อย่างไรก็ตาม Swann และคณะ (1990) พบว่าการลดความเข้มข้นของอากาศลงจากเดิมที่มีการให้อากาศ เมื่อเชื้อ *S. zooepidemicus* NCTC 7023 เจริญมาถึงในช่วงลอกาลิทามิกจะให้ผลการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคในปริมาณที่สูงกว่า

Akasaka และคณะ (1989) พบว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างเป็น 7.4 จะให้การผลิตกรดไฮยา- ลูโรนิคที่มีความหนืดสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับที่ค่าความเป็นกรดด่างที่ 6.0 และ 7.9 นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการกวนที่สูงจะให้การผลิตกรดไฮยาลูโรนิคที่สูงกว่าด้วยเช่นกัน

Johns และคณะ (1994) พบว่าช่วงความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคจากเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้ภาวะที่ไม่มีการให้อากาศคือ 6.5-6.9 และเมื่อใช้อัตราการกวนที่สูงขึ้นทำให้ได้อัตราการผลิตและปริมาณกรดดังกล่าวสูงขึ้นด้วย โดยอัตราการกวนที่สูงขึ้นนี้ไม่มีผลต่อการเจริญ

ของเชื้อ เช่นเดียวกันกับการใช้อัตราการให้อากาศที่เพิ่มขึ้นทำให้ได้อัตราการผลิตและปริมาณกรดมากขึ้นด้วย แต่อาจมีการผลิตอะซิเตทและคาร์บอนไดออกไซด์ปะปนออกมาด้วย

ตารางที่ 2 ภาวะการใช้อากาศที่มีผลต่อปริมาณกรดไฮยาลูโรนิค และน้ำหนักโมเลกุลของเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ

สายพันธุ์ของเชื้อ	สภาวะการใช้อากาศ	ปริมาณกรดไฮ-ยาลูโรนิค (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน)	เอกสารอ้างอิง
1. Streptococcus group A	ไม่ใช้	0.4-1.0	<700	Thonard และคณะ, 1964
2. *S. faecalis*	ใช้	0.3-0.4	-*	Holmstrom และคณะ, 1967
3. *S. pyogenes* type 18	ไม่ใช้	2.0 (ค่าต่ำสุด)	-*	Bracke และคณะ, 1985
4. *S. zooepidemicus* HA-116 ATCC 39920	ใช้ ไม่ใช้	4-6 2-3	2,200-3,300 1,500-2,000	Nimrod และคณะ, 1988
5. *S. zooepidemicus* NH-131	ใช้	3.6	-*	Akasaka และคณะ, 1989
6. *S. equi* ATCC 39527	ไม่ใช้	4.2	-*	Miyamori และคณะ, 1989
7. *S. zooepidemicus* ATCC 35246	ใช้	2.1	-*	Johns และคณะ, 1994

หมายเหตุ * หมายถึง ไม่ได้รายงาน

การนำกรดไฮยาลูโรนิคมาใช้ประโยชน์

กรดไฮยาลูโรนิคที่นำมาใช้ในวงการแพทย์และในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์ มีมาตรฐานความบริสุทธิ์ที่แตกต่างกัน ทางการแพทย์มีความต้องการความบริสุทธิ์ของกรดที่สูง (Ellwood et al, 1996) เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดปฏิกิริยาต่อภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Brown et al, 1994) โดยความบริสุทธิ์ของกรดจะขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลของกรดดังกล่าว (Swann et al, 1972; Brown et al, 1994) กรดที่ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์ (cosmatic grade) มีทั้งส่วนน้ำหนักโมเลกุลสูง (700-1,500 กิโลดาลตัน) และส่วนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (10 ดาลตัน-50 กิโลดาลตัน) (Balazs, 1974) ขณะที่การนำกรดไปใช้ในทางคลีนิค (clinical grade) จะมีน้ำหนักโมเลกุลที่สูงกว่าคือ มากกว่า 700 กิโลดาลตัน

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบสมบัติของกรดไฮยาลูโรนิคที่ใช้ทางการแพทย์กับที่ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์ (Nimrod และคณะ, 1986)

สมบัติ	ทางการแพทย์	ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์
1. ปริมาณกรด	88-92%	87-91%
2. อัตราส่วน A/B	1/1	1/1
3. ปริมาณน้ำ	8-12%	8-12%
4. ปริมาณโปรตีน	<0.01%*	<0.1%
5. ปริมาณโซเดียมไอออน	4-6%	4-6%
6. ปริมาณซัลเฟต	<0.001%-	<0.05%
7. ปริมาณกรดนิวคลีอิก	<0.02%*	<0.5%
8. การระคายเคืองของผิวหนัง	ไม่ได้ทดสอบ	ไม่เกิด
9. ปริมาณน้ำตาลที่เป็นกลาง	<0.2%*	ไม่ได้ทดสอบ
10.การทำให้เกิดความร้อน	ไม่เกิด	ไม่ได้ทดสอบ
11.การทำให้เกิดการอักเสบ	ไม่เกิด	ไม่ได้ทดสอบ

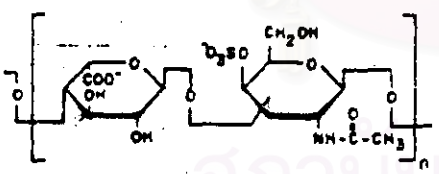
หมายเหตุ * หมายถึง ไม่สามารถวัดได้

A หมายถึง กลูโคโรนิค

B หมายถึง เอน-แอซิทิลกลูโคแซมีน

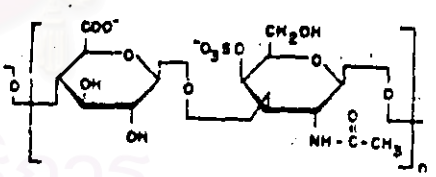
ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ของกรดไฮยาลูโรนิคที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ สกัดแยกจากหงอนไก่ตัวผู้ ในรูปของเกลือโซเดียม ได้แก่ HYLARTILB® ของบริษัท Pharmacia, Inc. Hyalovet® ของบริษัท Trans Bussan และ HEALON TM® ของบริษัท Pharmacia, Inc. ใช้เป็นยาหยอดตาในผู้ป่วยที่มีอาการ Keratitis sicca เป็นต้น

ในอดีตการผลิตสารนี้ใช้วิธีการสกัดจากเนื้อเยื่อของคนและสัตว์ เป็นวิธีที่ทำได้ยาก ขั้นตอนที่ซับซ้อน และจำเป็นต้องผ่านขั้นตอนการแยกโปรตีนออกโดยใช้วิธี Electro-deposition หรือใช้ Fuller's earth เป็นต้น (Billek และคณะ, 1968) ทำให้ต้นทุนการผลิตมีราคาสูง (Bracke และคณะ, 1985) นอกจากนั้นในระหว่างขั้นตอนต่างๆ มักเกิดการย่อยสลายของกรดไฮยาลูโรนิคควบคู่ไปด้วย ทำให้กรดนี้มีน้ำหนักโมเลกุลที่ต่ำลงและมีคุณสมบัติที่ไม่เหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์ เช่น ความหนืดต่ำ ความชื้นต่ำ เป็นต้น (Morita และคณะ, 1991) ภายหลังได้ใช้วิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Tissue culture) จากเซลล์ของสัตว์ เช่น ตัวอ่อนของไก่ (chick embryo cell) เพื่อนำมาทำการสกัด จึงทำให้มีวิธีการผลิตที่ง่ายขึ้นและราคาถูกลง แต่พบว่ากรดไฮยาลูโรนิคที่ได้จากวิธีการสกัดโดยวิธีนี้จะปนเปื้อนด้วยโปรตีโอไกลแคนชนิดอื่นอยู่เสมอ เช่น คอนดรอยทิน-4-ซัลเฟต, คอนดรอยทิน-6-ซัลเฟต หรือเคอราแทนซัลเฟต ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4 และรูปที่ 4 สารเหล่านี้มีโครงสร้างและสมบัติใกล้เคียงกับกรดไฮยาลูโรนิค จึงมีผลต่อวิธีการทำให้บริสุทธิ์ของกรดกระทำได้ยาก



Dermatan Sulfate

[L-Iduronic acid(β1→3)N-Acetyl galactosamine-4-Sulfate(β1→4)]$_n$



Chondrotin Sulfate

[D-Glucuronic acid(β1→3)N-Acetyl D-galactosamine-4-sulfate(β1→4)]$_n$

<u>รูปที่ 4</u> โครงสร้างของโปรตีโอไกลแคนชนิดต่างๆ (Taylor, 1974)

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบของพอลิแซคคาไรด์ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Roden และคณะ, 1972)

พอลิแซคคาไรด์	องค์ประกอบของหน่วยไดแซคคาไรด์	หมู่ *N*-Acetyl	หมู่ *O*-Sulfate	หมู่ *N*-Sulfate
Hyaluronic acid	D-Glucosamine, D-glucuronic acid	+	-	-
Chondroitin	D-Galactosamine, D-glucuronic acid	+	-	-
Chondroitin 4-sulfate	D-Galactosamine, D-glucuronic acid	+	+	-
Chondroitin 6-sulfate	D-Galactosamine, D-glucuronic acid	+	+	-
Dermatan sulfate	D-Galactosamine, D-glucuronic acid or L-iduronic acid	+	+	-
Heparan sulfate	D-Glucosamine, D-glucuronic acid or L-iduronic acid	+	+	+
Heparin	D-Glucosamine, D-glucuronic acid or L-iduronic acid	+*	+	+
Corneal keratan sulfate	D-Glucosamine, D-galactose	+	+	-
Skeletal keratan sulfate	D-Glucosamine, D-Galactose	+	+	-

หมายเหตุ * หมายถึง กลุ่มอะมิโนส่วนใหญ่เป็นหมู่ซัลเฟต ส่วนน้อยเป็นหมู่อะซิทิล

ภายหลังเมื่อพบว่าเชื้อในกลุ่มสเตรปโตคอกคัสสามารถสร้างกรดดังกล่าวได้ จึงทำให้การผลิตกรดนี้ได้สะดวกและมีต้นทุนการผลิตที่ต่ำลงมาก เนื่องจากแบคทีเรียเจริญได้อย่างรวดเร็ว ค่าใช้จ่ายในการเพาะเลี้ยงต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ ผลิตได้ในปริมาณสูง ไม่พบปัญหาการปนเปื้อนของโปรตีโอไกลแคนและไกลโคสะมิโนไกลแคนชนิดอื่นๆ (Swann และคณะ, 1990; Brown และคณะ, 1994) เนื่องจากสามารถเลือกใช้ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ และที่สำคัญกว่านี้คือสามารถควบคุมน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยตามที่ต้องการได้

<u>การเก็บเกี่ยวกรดไฮยาลูโรนิค</u>

การเก็บเกี่ยว (Recovery) หรือการแยก (Isolate) กรดไฮยาลูโรนิคออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ กระทำได้หลายวิธีโดยอาศัยพื้นฐานของคุณสมบัติทางเคมี ฟิสิกส์ และชีวภาพของกรดไฮยาลูโรนิค (Balazs, 1979) เช่น การทำโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน, อิเลคโทรโฟไลซิส เช่น moving-boundary eletrophoresis, zone electrophoresis, electro-deposition เป็นต้น และการตกตะกอนด้วยสารละลายอินทรีย์หรือควอนเทอนารีเอมีน (Quarternary amine) เป็นต้น แต่วิธีที่นิยมและง่ายต่อการกระทำคือ วิธีการตกตะกอนซึ่งใช้สำหรับการเก็บเกี่ยวกรดไฮยาลูโรนิคที่มาจากแหล่งต่างๆ เช่น เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของคนและสัตว์ จุลินทรีย์ เป็นต้น โดยแต่ละแหล่งจะมีรายละเอียดในการเก็บเกี่ยวแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของแหล่งของกรดไฮยาลูโรนิค เช่น กรดไฮยาลูโรนิคจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของคนและสัตว์ มักมีโปรตีนล้อมรอบอยู่หรือปนเปื้อนจากมิวโคพอลิแซคคาไรด์อื่นๆจากเนื้อเยื่อ จึงจำเป็นต้องมีขั้นตอนการกำจัดโปรตีนหรือมิวโคพอลิแซคคาไรด์เพิ่มเติมด้วย วิธีการแยกโปรตีนอาจใช้คอลัมน์ เช่น Micro-cel E Fuller's earth หรือการใช้ Proteolytic enzyme เป็นต้น ขณะที่การแยกกรดไฮยาลูโรนิคจากแบคทีเรียกระทำได้ง่าย เพราะสามารถเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากโปรตีนได้ ดังนั้นในการเก็บเกี่ยวกรดดังกล่าวต้องคำนึงถึงความยากง่ายในการเตรียม, เปอร์เซนต์การเก็บเกี่ยว, ความบริสุทธิ์, ปริมาณกรดที่ได้ (yield) และการเสียสภาพ เพราะมักพบการลดลงของปริมาณและน้ำหนักโมเลกุลของกรดดังกล่าวหลังจากการเก็บเกี่ยว และยังพบเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสปนเปื้อนมาอีกด้วย โดยมีผู้ศึกษาไว้ดังนี้

Thonard และคณะ (1964) เพิ่มขั้นตอนการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ได้ปริมาณกรด 0.5-1 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้ขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้

Holmstrom และ Ricica (1967) ศึกษาการสกัดแยกกรดไฮยาลูโรนิคที่ได้จากสเตรปโตคอกคัสกลุ่ม A Cobum R18 Strain 32369 ด้วยซีทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ ร่วมกับการขจัดโปรตีนที่ปนเปื้อนโดยใช้ Micro-Cel E โดยตัวอย่างจะถูกลดปริมาตรลง 1 ใน 10 ของปริมาตรเดิม เพื่อขจัดสารที่รบกวนส่วนใหญ่ในการวิเคราะห์ ได้ปริมาณกรด 300-400 มก.ต่อลิตร

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Woolcock (1974) ศึกษาการตกตะกอนกรดดังกล่าวโดยใช้ Quaternary ammonium salt ในการตกตะกอนคือ ซีทิลไตรเมทิวแอมโมเนียมโบรไมด์ (CTAB) เข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ ที่ละลายในโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.3 โมลาร์ ร่วมกับการใช้ Filter Aid และ Cationic exchange พบว่าได้เปอร์เซนต์การเก็บเกี่ยวกรดนี้ 80 เปอร์เซนต์ โดยต้องเจือจางอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงครึ่งหนึ่งด้วยน้ำกลั่นก่อนการตกด้วย CTAB แต่ถ้าไม่มีการเจือจางอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนการเก็บเกี่ยวจะลดลงเหลือ 65 เปอร์เซนต์เท่านั้น

Kjems และ Lebech (1976) แยกกรดนี้ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ chemically defined medium จากเชื้อ Streptococci gr. A type 12 strain K56 โดยอาศัยการตกตะกอนด้วย CPC พบว่าได้ปริมาณกรดชนิดนี้ประมาณ 0.3 กรัมต่อลิตร

Brache และคณะ (1985) แยกเชื้อจุลินทรีย์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้กรดไตรคลอโรอะซิติกฆ่าเชื้อก่อนการขจัดเซลล์ออก จากนั้นทำให้น้ำเลี้ยงเชื้อเข้มข้นขึ้นโดยใช้เอทานอล แล้วทำการแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วย CTAB หรือของผสมระหว่าง CTAB กับแอลกอฮอล์อื่นๆ อะซิโตน หรือคลอโรฟอร์ม พบว่าการกวนในระหว่างการใช้แอลกอฮอล์ หรือการตกตะกอนจะทำให้ผลผลิตของกรดดังกล่าวลดลง และควรเก็บกรดนี้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Nimrod และคณะ (1986) ศึกษาการแยกและการทำบริสุทธิ์ของกรดไฮยาลูโรนิคจาก *S. zooepidemicus* HA-116 ATCC 39920 เพื่อให้ได้ความบริสุทธิ์ในระดับอุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์และในทางคลีนิค โดยอาศัยวิธีการตะกอน การละลายกลับ และการตกตะกอนซ้ำ

Akasaka และคณะ (1989) เก็บเกี่ยวกรดไฮยาลูโรนิคโดยการปั่นแยกส่วนประกอบที่ไม่ละลายออกจากตัวอย่าง แล้วจึงขจัดโปรตีนออกด้วยคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ในอัตราส่วน 5:1 จากนั้นทำอัลตราฟิวเตรชั่น (ultrafiltration) เพื่อขจัดสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กๆออก แล้วนำไปทำให้แห้ง

Morita และคณะ (1991) รายงานการทำบริสุทธิ์กรดไฮยาลูโรนิคโดยการตกตะกอนร่วมกับการทำ ion exchange chromatography หรือ gel permeation chromatography เพื่อให้กรดดังกล่าวมีความบริสุทธิ์สูงขึ้น

Brown และคณะ (1994) ใช้วิธีการตกตะกอนแบบลำดับส่วนด้วย anionic surfactant และ cationic surfactant แล้วจึงละลายกลับในสารละลายที่มีไอออนของแคลเซียมอยู่ ได้ปริมาณกรด อย่างน้อย 10 กรัมต่อลิตร

Ellwood และคณะ (1995) ตกตะกอนกรดนี้ด้วย anionic surfactant และใช้ ultra filtration membrane เพื่อกำจัดกรดไฮยาลูโรนิคที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำออกคือ ตั้งแต่ 10 ถึง 25 กิโลดาลตัน

จากประโยชน์ของกรดไฮยาลูโรนิคดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น และข้อดีของการใช้เชื้อจุลินทรีย์สำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค จึงมีความสนใจที่จะศึกษาการผลิตกรดนี้ในเชื้อจุลินทรีย์ โดยในงานวิจัยจะมุ่งเน้นการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคจากสายพันธุ์ของ *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์แล้ว ซึ่งพบว่ามีการผลิตกรดดังกล่าวในปริมาณที่น่าพอใจ โดยการพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมกับการผลิตกรด ศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดดังกล่าวของเชื้อนี้ รวมทั้งหาวิธีการแยกสารนี้ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อและศึกษาสมบัติทางกายภาพและเคมีบางอย่างของกรดที่สกัดได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย