บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะศึกษากระบวนการแยกกรดไฮยาลูโรนิกจากน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus zooepidermicus* UN-7 โดยใช้ภาวะในการเลี้ยงเชื้อที่ให้น้ำหนักโมเลกุลสูงสุด (อณุมาศ บัวเขียว, 2544) คือ น้ำตาลซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร ความเร็วรอบในการกวน 400 รอบต่อนาที และให้อากาศที่ 1.5 vvm จากการทดลองพบว่าปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกเริ่มคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36 โดยมีปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก 1,995 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีน้ำหนักโมเลกุลในชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 2.34 x 10^6 ดาลตัน และปริมาณเซลล์แห้ง ณ ชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 0.59 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้อาจมีความคลาดเคลื่อน เนื่องจากยังคงมีกรดไฮยาลูโรนิกซึ่งเป็นองค์ประกอบของแคปซูลของเซลล์ส่วนหนึ่งยังคงติดอยู่

ในขั้นตอนการสกัดกรดไฮยาลูโรนิก มีรายงานดังนี้คือ ในปี ค.ศ. 1994 Brown และคณะ ใช้โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตร่วมกับไดออกทิลโซเดียมซัลโฟซักซิเนต โดยใช้ปริมาณต่ำสุดที่ร้อยละ 0.01 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทั้งนี้ปริมาณการใช้จะขึ้นอยู่กับปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกในน้ำหมักและในเชื้อ *Streptococcus* กลุ่ม C มีรายงานว่าเมื่อใช้โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตร้อยละ 0.01 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นาน 15 นาที สามารถแยกกรดไฮยาลูโรนิกออกจากน้ำหมักได้มากที่สุด และในน้ำหมักที่มีผลิตภัณฑ์มาก ปริมาณสารลดแรงตึงผิวที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วงร้อยละ 0.05 ถึง 0.25 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นอกจากนี้ยังพบปริมาณการใช้สารลดแรงตึงผิวร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเหมาะสมสำหรับน้ำหมักที่มีปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก 1 ถึง 2.5 กรัมต่อ น้ำหมัก 10 ลิตร และในปี ค.ศ. 1995 Ellwood และคณะ รายงานว่าสารลดแรงตึงผิวที่เหมาะสมต่อกระบวนการสกัดกรดไฮยาลูโรนิกจากเซลล์คือโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต โดยปริมาณที่ใช้อยู่ในช่วงร้อยละ 0.01 ถึง 0.05 และปริมาณที่เหมาะสมคือร้อยละ 0.02 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เช่นเดียวกับการทดลองพบว่าสามารถใช้โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเพื่อเพิ่มปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และได้สูงสุดเมื่อใช้โซเดียม-โดเดซิลซัลเฟตร้อยละ 0.02 โดยสามารถเพิ่มปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกจาก 2,003.31 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็น 2,122.66 มิลลิกรัมต่อลิตร การที่ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มขึ้นเนื่องจากสารลดแรงตึงผิวมีผลทำลายส่วนเปปติโดไกลแคนของเชื้อ *Streptococcus zooepidermicus* UN-7 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก และเมื่อพิจารณาความเข้มข้นพบว่าเมื่อใช้โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต ร้อยละ 0.02 จะสามารถสกัดกรดไฮยาลูโรนิกได้สูงสุด และถึงแม้ว่าจะเพิ่มปริมาณสารลดแรงตึงผิวขึ้นก็ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อสารลดแรงตึงผิวความเข้มข้นเหมาะสม ณ จุดหนึ่ง

หรือที่เรียกว่า critical micelle concentration (CMC) ที่ทำให้สารลดแรงตึงผิว อยู่ในรูปไมเซลล์ โดยหันส่วนที่ชอบน้ำออกสู่ภายนอก และส่วนที่ไม่ชอบน้ำหันออกจากน้ำอยู่ภายในส่วนไมเซลล์ ซึ่งจะส่งผลให้กรดไฮยาลูโรนิกที่เกาะติดกับเซลล์หลุดออกจากเซลล์เพิ่มขึ้นโดยการจับของส่วนที่ชอบน้ำของไมเซลล์เพื่อให้กรดไฮยาลูโรนิกที่เกาะติดกับเซลล์บางส่วนละลายสู่อาหารเลี้ยงเชื้อได้มากขึ้น (Sutherland, 1990) อย่างไรก็ตามแม้ว่าปริมาณกรดที่ได้จะมากขึ้น แต่เมื่อเปรียบเทียบกับเมื่อไม่ได้เติมโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตแล้ว พบว่ามีความแตกต่างกันน้อยมาก นอกจากนี้เมื่อพิจารณาน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ผ่านการสกัดพบว่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดมีแนวโน้มลดต่ำลง นอกจากนี้โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตยังส่งผลให้เซลล์แตก ซึ่งจะทำให้ขั้นตอนการทำกรดไฮยาลูโรนิกให้บริสุทธิ์มีการปนเปื้อนของสารที่ไม่ต้องการสูงขึ้น ดังนั้นวิธีการสกัดด้วยโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตจึงไม่ได้นำมาใช้ในกระบวนการทำกรดไฮยาลูโรนิก ให้บริสุทธิ์ในการทดลองนี้

มีรายงานการตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิกด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ (Cifonelli และ Mayeda, 1957; Bracke และคณะ, 1985; Hashimoto และคณะ,1990) จากงานวิจัยนี้พบว่าเมื่อความเข้มข้นของเอทิลแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้น ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกจะตกตะกอนเพิ่มขึ้น เมื่อใช้เอทิลแอลกอฮอล์ที่ 65 75 85 และ 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยอัตราส่วน 1 : 2 โดยปริมาตรน้ำหมักต่อปริมาตรเอทิลแอลกอฮอล์ ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้มีค่าเท่ากับ 8.10 13.66 18.22 และ 19.80 มิลลิกรัม ตามลำดับ โดยเอทิลแอลกอฮอล์จะมีผลไปลดความสามารถในการเป็นตัวทำละลายของน้ำ

ในขั้นตอนการกำจัดโปรตีน Akasaka และคณะ, 1989 รายงานการแยกโปรตีนออกโดยใช้กรดไทรคลอโรอะซิติก หรือใช้การดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์ นอกจากนี้ยังมีรายงานกล่าวถึงการใช้กรดไทรคลอโรอะซิติกสามารถหยุดการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยทำให้เซลล์ตาย และทำให้เกิดการแยกของเซลล์จากน้ำหมักได้ง่ายขึ้น (Bracke และคณะ, 1985 ; Brown และคณะ, 1994) ในการทดลองนี้ได้เปรียบเทียบการใช้กรดไทรคลอโรอะซิติกและถ่านกัมมันต์ จากการทดลองพบว่าการใช้ถ่านกัมมันต์สามารถลดปริมาณโปรตีนที่ปนเปื้อนมาในสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกได้ดีกว่าการใช้กรดไทรคลอโรอะซิติก โดยเมื่อใช้ถ่านกัมมันต์ร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรสารละลายกรดไฮยาลูโรนิก สามารถลดปริมาณโปรตีนจาก 309.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงเหลือ 13.87 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือคิดเป็นร้อยละ 95.52 และเมื่อพิจารณาปริมาณของกรดไฮยาลูโรนิกที่เหลือ และน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกพบว่าการใช้กรดไทรคลอโรอะซิติกและการใช้ถ่านกัมมันต์ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของกรดไฮยาลูโรนิก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Cifonelli และ Mayeda (1957) ซึ่งรายงานว่าถ่านกัมมันต์มีความสามารถในการดูดซับโปรตีนเปปไทด์ นิวคลีอิก และนิวคลีโอไทด์ ได้ดีมาก แต่ดูดซับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงได้ต่ำ ในส่วนของน้ำหนักโมเลกุลพบว่าการใช้กรดไทรคลอโรอะซิติกส่งผลให้น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลู-

โรนิกลดต่ำลง ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อเติมกรดไทรคลอโรอะซิติกจะทำให้ค่าความเป็นกรดด่างลดลง ในขณะที่การใช้ถ่านกัมมันต์ไม่ส่งผลต่อน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก นอกจากนี้การใช้ถ่านกัมมันต์ยังเป็นวิธีการที่ค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานต่ำ (Diaz-Teran และคณะ, 2001) และเนื่องจากวิธีการแยกถ่านกัมมันต์ออกเป็นการแยกทางกายภาพดังนั้นจึงสามารถแยกออกจากน้ำหมักได้ง่ายและรวดเร็วอีกด้วย ดังนั้นในขั้นตอนการกำจัดโปรตีนจึงควรใช้ถ่านกัมมันต์เพื่อดูดซับโปรตีนทิ้งไป แต่เนื่องจากในการดูดซับจะต้องคำนึงเวลาที่ใช้ในการดูดซับ เพื่อให้ขั้นตอนนี้มีประสิทธิภาพมากที่สุด จึงจำเป็นต้องหาเวลาที่ใช้ในการดูดซับของถ่านกัมมันต์ต่อไป

การหาเวลาที่ใช้ในการดูดซับ จะต้องหาเวลาที่ระบบเข้าสู่ภาวะสมดุล จากการทดลองหา equilibrium time ของถ่านกัมมันต์ 2 ชนิด คือ CGC-16 และ CGC-wood พบว่าปริมาณการดูดซับโปรตีนของถ่านกัมมันต์ทั้ง 2 ชนิดจะไม่เพิ่มขึ้นตั้งแต่นาทีที่ 30 ซึ่งแต่เมื่อเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่ถูกดูดซับพบว่า ถ่านกัมมันต์ชนิด CGC-wood สามารถดูดซับโปรตีนได้ดีกว่าถ่านกัมมันต์ชนิด CGC-16 อย่างไรก็ตามถ่านทั้งสองจะใช้วิธีการกระตุ้นด้วยไอน้ำเหมือนกัน ค่า iodine number เท่ากันคือ 1,100 มิลลิกรัมต่อกรัม และขนาดของถ่านกัมมันต์เท่ากันคือ 8 x 30 mesh แต่ผลของการดูดซับแตกต่างกัน เนื่องจากว่าวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตถ่านกัมมันต์แตกต่างกัน โดย CGC-16 ผลิตจากกะลามะพร้าว ส่วน CGC-wood ผลิตจากไม้ (ภาคผนวก ฌ) วัตถุดิบที่แตกต่างกันจะส่งผลให้หมู่ฟังก์ชันนัลของออกซิเจนบนผิวของถ่านกัมมันต์มีความแตกต่างกัน (Gergova และคณะ, 1993) โดยปริมาณการดูดซับโปรตีนด้วยถ่านกัมมันต์ในนาทีที่ 30 ของ CGC-16 และ CGC-wood คือ 37.27 และ 265.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คิดได้เป็นร้อยละ 12.04 และ 85.74 ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกถ่านกัมมันต์ชนิด CGC-wood มาหาไอโซเทอร์มของการดูดซับ

จากการทดลองหาไอโซเทอร์มของการดูดซับโดยถ่านกัมมันต์ชนิด CGC-wood พบว่าปริมาณการดูดซับโปรตีนแปรตามปริมาณของถ่านกัมมันต์ กล่าวคือ เมื่อใช้ถ่านกัมมันต์มากขึ้นปริมาณการดูดซับก็จะมากขึ้นด้วย เมื่อหาไอโซเทอร์มของการดูดซับพบว่าเป็นไอโซเทอร์มแบบแลงมัวร์ โดยค่า X_m หรือ adsorption capacity เท่ากับ 16,129.03 ไมโครกรัมต่อกรัม ถ่านกัมมันต์ และค่าคงที่ของพลังงานในการดูดติดผิวหรือ b มีค่าเท่ากับ 0.04 มิลลิลิตรต่อไมโครกรัม ดังนั้นจะได้ไอโซเทอร์มการดูดซับแบบแลงมัวร์ดังสมการ $X = (645.16C_e) / (1 + 0.04C_e)$ จากสมการไอโซ-เทอร์มที่ได้ หากรู้ความเข้มข้นตั้งต้น และความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ จะสามารถคำนวณหาปริมาณถ่านกัมมันต์ที่ต้องใช้ในการกำจัดโปรตีน จากนั้นเมื่อนำถ่านกัมมันต์มาศึกษาการดูดซับในระบบ single stage เปรียบเทียบกับ multi stage จากการทดลองพบว่าเมื่อปริมาณของถ่านกัมมันต์ที่ใช้ในการดูดซับเท่ากัน ปริมาณโปรตีนที่ถูกดูดซับออกไปมีค่าไม่แตกต่างกัน เนื่องมาจากถ่านกัม-มันต์ชนิดนี้มีไอโซเทอร์มการดูดซับแบบแลงมัวร์ ซึ่งมีสมมติฐานว่า แต่ละบริเวณสามารถดูดติดได้เพียงโมเลกุลเดียว พื้นที่ของบริเวณที่ดูดติดผิวมีจำนวนที่แน่นอน (Valancia และ Gloyna, 1972)

ดังนั้นแม้ว่าจะเพิ่มขั้นตอนของการดูดซับอย่างไรก็ตาม หากว่าปริมาณถ่านกัมมันต์ที่ใช้เท่ากัน ก็จะไม่ทำให้การดูดซับเพิ่มขึ้นแต่อย่างใด

เมื่อนำถ่านกัมมันต์มาหา breakthrough curve พบว่าในลำดับส่วนต้นๆ ปริมาณโปรตีนที่ในสารละลายมีค่าน้อย และเมื่อเก็บลำดับส่วนต่อเนื่องกันไป ปริมาณโปรตีนมีค่าเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงรูปแบบของการดูดซับพบว่ากราฟไม่ได้มีลักษณะเป็นรูปตัวเอสตามทฤษฎี ซึ่งตามปกติขั้นตอนในการดูดติดผิวของสารจากสารละลายโดยสารดูดซับที่มีรูพรุนจะมี 3 ขั้นตอน คือการขนส่งทั้งก้อน การขนส่งชั้นฟิล์ม และการขนส่งภายในอนุภาค โดยทั่วไปจะพบว่า การขนส่งชั้นฟิล์มจัดเป็นขั้นตอนที่จำกัดอัตราการดูดติดผิว อย่างไรก็ตามหากว่าภายในระบบมีสภาพความปั่นป่วนเพียงพอ ขั้นตอนการขนส่งภายในอนุภาคจะเป็นขั้นตอนที่ควบคุมอัตราการดูดติดผิว ในการทดลองนี้ซึ่งการไหลของสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกเป็นแบบลาร์มินาร์ (larminar flow) ดังนั้นขั้นตอนที่น่าจะเป็นขั้นตอนที่กำหนดอัตราการดูดซับจึงได้แก่ขั้นตอนการขนส่งชั้นฟิล์ม

เมื่อนำสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกที่ผ่านการดูดซับโปรตีนด้วยถ่านกัมมันต์มาผ่านกระบวนการอัลทราฟิลเทรชัน เพื่อแยกเอาสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำทิ้งไป (Bracke และคณะ, 1985; Akasaka และคณะ, 1989; Ellwood และคณะ, 1995) โดยใช้เยื่อแผ่นที่มี molecular weight cut off 300,000 ดาลตัน และใช้ความดัน 0.5 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร จากการทดลอง ความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกในส่วนของรีเทนเทตมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เนื่องจากปริมาตรน้ำหายไปกับส่วนของเพอร์มิเอต โดยพบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมงความเข้มข้นของกรดเพิ่มขึ้นจาก 1,974.09 เป็น 2,132.32 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ไม่พบว่ามีกรดไฮยาลูโรนิกหลุดมาในส่วนเพอร์-มิเอต ทั้งนี้มีความเป็นไปได้ 3 ประการ คือ น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่เตรียมไว้ไม่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำปะปนมา หรืออาจมีปริมาณน้อยมากจนวัดค่าไม่ได้ นอกจากนี้อาจเป็นไปได้ว่าโครงสร้างของกรดซึ่งจับกันแบบสุ่ม (Lapcik และคณะ, 1998) มีแรงยึดเหนี่ยวต่อกันมากพอที่จะทำให้กรดไฮยาลูโรนิกไม่หลุดออกไป เมื่อพิจารณาฟลักซ์ทั้งหมด (total flux) พบว่าฟลักซ์มีค่าค่อนข้างคงที่จนกระทั่งนาทีที่ 25 ฟลักซ์มีค่าลดลงอย่างรวดเร็วจนกระทั่งนาทีที่ 37.5 และหลังจากนาทีที่ 37.5 ฟลักซ์จะลดลงอย่างช้าๆ จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง จากแบบจำลองเจลโพลาไรเซชันอธิบายไว้ว่าการลดลงของฟลักซ์เกิดขึ้นเนื่องจากการเกิดเจลที่ผิวหน้าเยื่อแผ่น โดยหากความเข้มข้นของตัวถูกละลายที่บริเวณใกล้ผิวเยื่อแผ่นมีค่าสูงถึงขีดจำกัดการละลายของสารนั้น ตัวถูกละลายอาจเกิดลักษณะคล้ายเจลที่บริเวณผิวเยื่อแผ่น โดยชั้นเจลจะเกิดขึ้นครอบคลุมผิวเยื่อแผ่นมีลักษณะคล้ายเยื่อแผ่นอีกแผ่นหนึ่งต่ออนุกรมอยู่กับเยื่อแผ่นเดิม ทำให้ความต้านทานการไหลสูงขึ้น ฟลักซ์ของสารละลายจึงมีค่าลดลง (รัตนา จิระรัตนานนท์, 2541)

จากการทดลองทั้งหมดที่กล่าวมา สามารถสรุปขั้นตอนการทำกรดไฮยาลูโรนิกให้บริสุทธิ์ โดยนำน้ำหมักที่ผ่านการเหวี่ยงแยกเซลล์แล้ว มาตกตะกอนด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ โดยให้มีปริมาตร 2 เท่าของน้ำหมักที่ปราศจากเซลล์ นำตะกอนที่

ได้มาละลายน้ำ ซึ่งในขั้นตอนนี้อาจจะมีสารปนเปื้อนอื่นๆ เช่น โปรตีนปะปนมาในสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกที่เตรียมได้ การปนเปื้อนของโปรตีน เช่น ไฮยาลูโรนิเดส หรือโปรตีนชนิดอื่นหรือสารก่อไข้ ซึ่งอาจส่งผลต่อน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก ดังนั้นจึงต้องผ่านขั้นตอนการกำจัดโปรตีนออก ในที่นี้ใช้กลไกการดูดซับโดยถ่านกัมมันต์โดยใช้ระบบการดูดซับแบบ single stage จากนั้นกรองเพื่อแยกเอาถ่านกัมมันต์ออก แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ไปผ่านกระบวนการอัลทราฟิลเทรชันที่มี molecular weight cut off 300,000 ดาลตัน เพื่อแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่ปะปนมาทิ้งไป ซึ่งในการทดลองดังกล่าว จะได้สารละลายกรดไฮยาลูโรนิกที่มีความเข้มข้นประมาณ 2,100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีความบริสุทธิ์ร้อยละ 83.79 และผลผลิตร้อยละ 65.24 ของปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกในน้ำหมักเริ่มต้น นอกจากนี้ยังไม่พบการปนเปื้อนจากโปรตีนเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีลาวรี การที่ผลผลิตได้เพียงร้อยละ 65.24 เนื่องจากในกระบวนการดูดซับโปรตีนด้วยถ่านกัมมันต์ ยังคงมีกรดไฮยาลูโรนิกติดกับถ่านกัมมันต์อยู่ จึงทำให้สูญเสียผลผลิตที่ได้ในขั้นตอนนี้มาก อย่างไรก็ตาม หากต้องการให้ได้ผลผลิตมากขึ้นอาจใช้น้ำในการชะสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกออกจากถ่านกัมมันต์ ซึ่งจะทำให้ผลผลิตกลับคืนมาเพิ่มขึ้น แต่ทั้งนี้จะต้องคำนึงถึงโปรตีนที่อาจหลุดออกมาด้วยเช่นกัน

กรดไฮยาลูโรนิกเป็นพอลิเมอร์ชนิดหนึ่ง ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลมีผลต่อคุณสมบัติในด้านความเหนียว หนืด ความยืดหยุ่น ดังนั้นหากในกระบวนการแยกกรดไฮยาลูโรนิกให้บริสุทธิ์และภาวะในการเก็บรักษาไม่เหมาะสม จะทำให้น้ำหนักโมเลกุลของกรดลดลง ทำให้ประสิทธิภาพในการนำไปใช้งานต่ำลง ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก โดยปัจจัยทางกายภาพคือ ผลของอุณหภูมิ และความเร็วรอบที่ใช้ในการกวน ส่วนปัจจัยทางเคมีที่ทำการศึกษาได้แก่ ค่าความเป็นกรดด่าง และเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่เตรียมได้ พบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น น้ำหนักโมเลกุลของกรดลดต่ำลง โดยมีรายงานว่าความยาวพอลิเมอร์ของกรดไฮยาลูโรนิกลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 25 องศาเซลเซียส และในการลดลงของน้ำหนักโมเลกุลจะมีปัจจัยเรื่องเวลามาเกี่ยวข้อง กล่าวคือ ณ อุณหภูมิใดๆ เมื่อใช้เวลา ณ ภาวะนั้นนานขึ้น จะส่งผลให้น้ำหนักโมเลกุลลดต่ำลงมากขึ้น (Karen และ Ellington, 1994) โดยเมื่อเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการบ่มสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกนาน 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 37 50 และ 70 องศาเซลเซียส น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกมีค่าเท่ากับ 2.24×10^6 2.24×10^6 2.17×10^6 และ 1.48×10^6 ดาลตัน ตามลำดับ และพบว่าเมื่ออุณหภูมิเท่ากับ 100 องศาเซลเซียส น้ำหนักโมเลกุลจะลดลงอย่างรวดเร็วโดยน้ำหนักโมเลกุลจะลดลงจาก 2.30×10^6 ดาลตัน เป็น 1.15×10^6 ดาลตัน โดยใช้เวลาเพียง 15 นาทีเท่านั้น จากผลการทดลองข้างต้นจะสามารถหาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกกับอุณหภูมิได้โดยใช้สมการของอาร์รีเนียส (Arrhenius equation) โดยจะได้สมการดังนี้ $k_T = 1.44 \times 10^{18} \exp$

[-(1.254 x 10^5 / RT)] โดยสามารถทำนายน้ำหนักโมเลกุล ณ อุณหภูมิและเวลาใดๆ ได้จากสมการที่กล่าวมา เช่น ณ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อน้ำหนักโมเลกุลเริ่มต้น 2.30 x 10^6 ดาลตัน ลดลงเหลือ 2.07 x 10^6 ดาลตัน หรือร้อยละ 10 จะใช้เวลาประมาณ 713 ชั่วโมง

ความเร็วรอบของการกวนส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่เตรียมได้ เมื่อความเร็วรอบของการกวนสูงขึ้น ส่งผลให้แรงเฉือนที่กระทำต่อโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกมีค่ามากขึ้น (Eric และคณะ, 1993; Tamaki และคณะ, 1998) น้ำหนักโมเลกุลของกรดจะลดลงมากขึ้น ทั้งนี้อัตราการลดลงจะขึ้นอยู่กับเวลาอีกด้วย เมื่อเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการกวนสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกนาน 4 ชั่วโมง ที่ความเร็วรอบ 100 200 และ 400 รอบต่อนาที น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกมีค่าเท่ากับ 2.24 x 10^6 1.82 x 10^6 และ 1.16 x 10^6 ดาลตัน ตามลำดับ โดยมีรายงานว่าแรงเฉือนมีผลต่อการลดลงของน้ำหนักโมเลกุลได้ 3 แบบคือ ตัดกลางโมเลกุล ตัดอย่างอิสระ และ ตัดที่ปลาย (Tamaki และคณะ, 1998)

จากการทดลองพบว่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกมีค่าคงที่ที่ค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วง 5 ถึง 11 และเมื่อใช้ภาวะที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 1 3 และ 13 น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกจะมีค่าลดต่ำลงเรื่อยๆ ตามเวลาที่ผ่านไป ในชั่วโมงที่ 2 น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกมีค่าเท่ากับ 1.04 x 10^6 1.36 x 10^6 และ 1.04 x 10^6 ดาลตัน ตามลำดับ มีรายงานว่าค่าความเป็นกรดด่างมีผลอย่างมากต่ออัตราการลดลงของน้ำหนักโมเลกุล โดยน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกมีค่าคงที่เมื่อค่าความเป็นกรดด่างเป็นกลาง และน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกในภาวะที่เป็นกรดจะลดลงมากกว่าเมื่อสารละลายอยู่ในภาวะที่เป็นด่าง โดยเมื่อกรดไฮยาลูโรนิกอยู่ในภาวะที่เป็นกรด การไฮโดรไลซิสจะขึ้นอยู่กับพันธะไกลโคซิดิกของ 1, 4- กลูคูโรนิกแอซิด (glucuronic acid) ในขณะที่เมื่อกรดไฮยาลูโรนิกอยู่ในภาวะที่เป็นด่าง การไฮโดรไลซิสจะขึ้นอยู่กับพันธะไกลโคซิดิกของ 1, 3-เอ็น-อะซิทิล-กลูโคซามีน (N-acetyl-glucosamine) (Tokita และ Okamoto, 1995)

ปัจจัยที่มีผลต่อน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสอีกปัจจัยหนึ่ง คือ ไฮยาลูโรนิเดส ตามปกติเอนไซม์ชนิดนี้จะพบตามเนื้อเยื่อของสัตว์ สารพิษจากแมลง และแบคทีเรีย (Sting และคณะ, 1989; Voet and Voet, 1995) สำหรับในมนุษย์จะพบเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสทั้งในส่วนของอวัยวะ เช่น ม้าม ผิวหนัง ตา ตับ และ ไต เป็นต้น และในส่วนของของเหลวในร่างกาย เช่น น้ำตา และ เลือด เป็นต้น (Menzel และ Farr, 1998) นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงการเลี้ยงเชื้อสเตรปโตคอกคัสกลุ่ม A และ C ซึ่งพบการสร้างไฮยาลูโรนิเดส โดยในภาวะไร้อากาศมีการสร้างเอนไซม์มากกว่าภาวะที่มีอากาศ ทำให้ไม่สามารถตรวจพบกรดไฮยาลูโรนิกในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ (MacLennan, 1956) จากการทดลองพบว่าอัตราการลดลงของน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของไฮยาลูโรนิเดสสูงขึ้น เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของไฮยาลูโรนิเดสที่ความเข้มข้น 0 0.5 1 3 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เวลาชั่วโมงที่ 2 พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล

ของกรดไฮยาลูโรนิกมีค่าเท่ากับ 2.17×10^6 0.42×10^6 0.28×10^6 0.08×10^6 และ 0.02×10^6 ดาลตัน ตามลำดับ ซึ่งไฮยาลูโรนิเดสจะย่อยสลายกรดไฮยาลูโรนิก โดยตัดพันธะไกลโคซิดิกของเอ็น-อะซิทิล-กลูโคซามีนแบบสุ่ม (N-acetyl-glucosamine) (Koen และคณะ, 1995 ; Menzel และ Farr, 1998)

น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกมีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติในด้านความเหนียวหนืด และยืดหยุ่น ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ดังนั้นในขั้นตอนการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์จึงต้องคำนึงถึงค่าความเป็นกรดด่าง และอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ยังต้องปราศจากการปนเปื้อนจากเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส เพื่อให้ผลิตภัณฑ์มีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้งานจริง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย