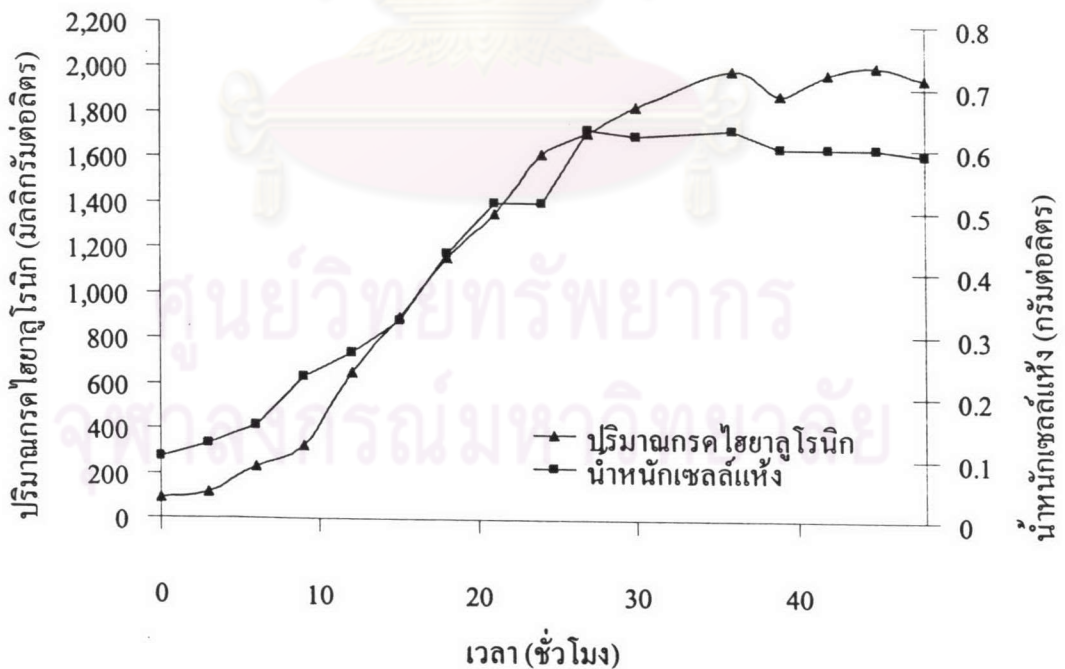


### บทที่ 3

#### ผลการทดลอง

#### 3.1 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดย *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 ในถังหมักระดับ 5 ลิตร

นำ *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 มาเลี้ยงในอาหารเตรียมหัวเชื้อและอาหารเหลวสำหรับการผลิต ซึ่งรายงานโดย อณูมาศ บัวเขียว (2544) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.4.2 โดยมีระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง ติดตามการเจริญของเชื้อโดยวัดค่าน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ได้ผลการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 3.1 และตารางที่ 3.1 พบว่าปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกเริ่มคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36 ของการหมัก โดยมีปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก 1,995 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 27 ของการหมัก โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 0.63 กรัมต่อลิตร และมีน้ำหนักโมเลกุลในชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ  $2.34 \times 10^6$  ดาลตัน



รูปที่ 3.1 การเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อ *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm และความเร็วยรอบในการกวน 400 รอบต่อนาที

ตารางที่ 3.1 การเจริญและการผลิตกรดไฮyalูโรนิกของเชื้อ *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 400 รอบต่อนาที

ชั่วโมงที่	ปริมาณกรดไฮyalูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง* (กรัมต่อลิตร)
0	90.28	0.10
3	116.67	0.12
6	229.17	0.15
9	325.56	0.23
12	650.11	0.27
15	895.44	0.32
18	1,160.67	0.43
21	1,360.33	0.51
24	1,620.17	0.51
27	1,715.22	0.63
30	1,835.67	0.62
36	1,995.11	0.63
39	1,889.33	0.60
42	1,983.28	0.60
45	2,015.26	0.60
48	1,961.23	0.59

หมายเหตุ : \* คำนำน้ำหนักเซลล์แห้งอาจคลาดเคลื่อนจากความเป็นจริงเนื่องจากกรดไฮyalูโรนิก ซึ่งเป็นองค์ประกอบของแคปซูลของจุลินทรีย์ปะปนมา

### 3.2 การทำกรดไฮyalูโรนิกให้บริสุทธิ์

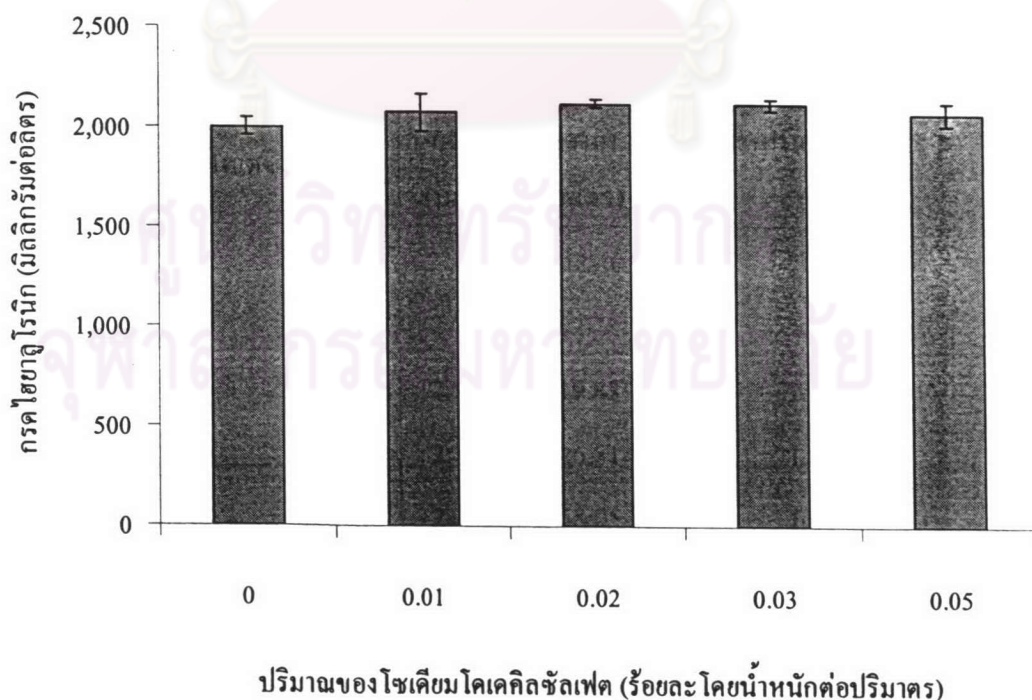
#### 3.2.1 การสกัดกรดไฮyalูโรนิก

ในปี ค.ศ. 1995 Ellwood รายงานว่าสารลดแรงตึงผิวที่เหมาะสมต่อกระบวนการแยกกรดไฮyalูโรนิกจากเซลล์โดยใช้โซเดียมโคเคซิลซัลเฟต ดังนั้นจึงทดลองสกัดกรดไฮyalูโรนิก โดยการเติมโซเดียมโคเคซิลซัลเฟตในน้ำเลี้ยงเชื้อโดยแปรให้มีความเข้มข้นสุดท้าย

เท่ากับร้อยละ 0.01 0.02 0.03 และ 0.05 คิดเป็นน้ำหนักต่อปริมาณน้ำหมัก พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกได้ ดังแสดงในตารางที่ 3.2 และรูปที่ 3.2 โดยสามารถเพิ่มปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกได้สูงสุดเมื่อใช้โซเดียมโคเคซิลซัลเฟตร้อยละ 0.02 นำมาเปรียบเทียบกับเมื่อไม่ได้เติมพบว่าปริมาณกรดเพิ่มขึ้นจาก 2,003.31 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็น 2,122.66 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่เมื่อพิจารณาน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ผ่านการสกัดพบว่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดมีแนวโน้มลดต่ำลง ดังแสดงในตารางที่ 3.2 และรูปที่ 3.3

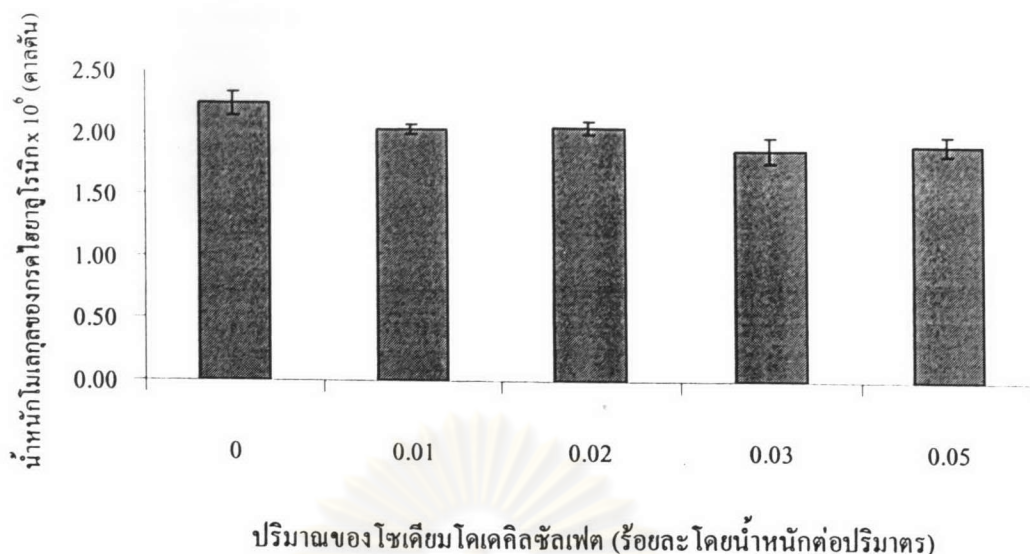
ตารางที่ 3.2 ปริมาณและน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกเมื่อผ่านการสกัดด้วยโซเดียมโคเคซิลซัลเฟต

ร้อยละของโซเดียมโคเคซิลซัลเฟต	กรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักโมเลกุล $\times 10^6$ (คาลตัน)
0	2,003.31 $\pm$ 42.46	2.25 $\pm$ 0.10
0.01	2,079.19 $\pm$ 92.28	2.04 $\pm$ 0.04
0.02	2,122.66 $\pm$ 19.82	2.05 $\pm$ 0.05
0.03	2,119.52 $\pm$ 26.81	1.87 $\pm$ 0.11
0.05	2,074.38 $\pm$ 58.05	1.91 $\pm$ 0.08



รูปที่ 3.2 ปริมาณของกรดไฮยาลูโรนิกเมื่อผ่านการสกัดด้วยโซเดียมโคเคซิลซัลเฟต





รูปที่ 3.3 น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกเมื่อผ่านการสกัดด้วย โซเดียมโคเคิลซัลเฟต

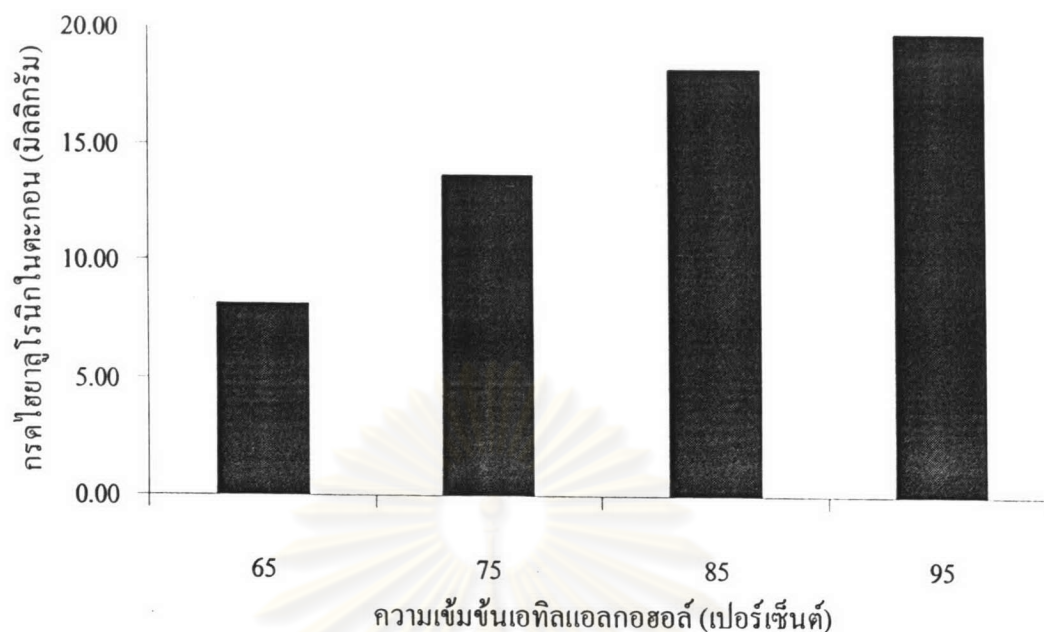
### 3.2.2 การตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิก

ได้มีรายงานกล่าวถึงการตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิกด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ (Cifonelli และ Mayeda, 1957; Bracke และคณะ, 1985; Hashimoto และคณะ, 1990) ดังนั้นจึงทดลองตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิกโดยการเติมเอทิลแอลกอฮอล์ในน้ำเลี้ยงเชื้อโดยแปรความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ 65 75 85 และ 95 เปอร์เซ็นต์ และเติมลงไปด้วยอัตราส่วน 1 : 2 โดยปริมาตรน้ำหนักต่อปริมาตรเอทิลแอลกอฮอล์ พบว่าเมื่อความเข้มข้นของเอทิลแอลกอฮอล์ลดลง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ตกตะกอนได้ลดลงเช่นกัน ดังแสดงในตารางที่ 3.3 และรูปที่ 3.4 เมื่อใช้เอทิลแอลกอฮอล์ที่ 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้มีค่าเท่ากับ 19.80 มิลลิกรัม คิดเป็นผลผลิต 99.25 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3.3 ปริมาณและผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกเมื่อผ่านการตกตะกอนด้วยเอทิลแอลกอฮอล์

ความเข้มข้นเอทานอล (เปอร์เซ็นต์)	กรดไฮยาลูโรนิกในตะกอน (มิลลิกรัม)	ผลผลิต* (เปอร์เซ็นต์)
65	8.10	40.60
75	13.66	68.47
85	18.22	91.33
95	19.80	99.25

\* กำหนดให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกในน้ำหมัก (19.95 มิลลิกรัม) เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์



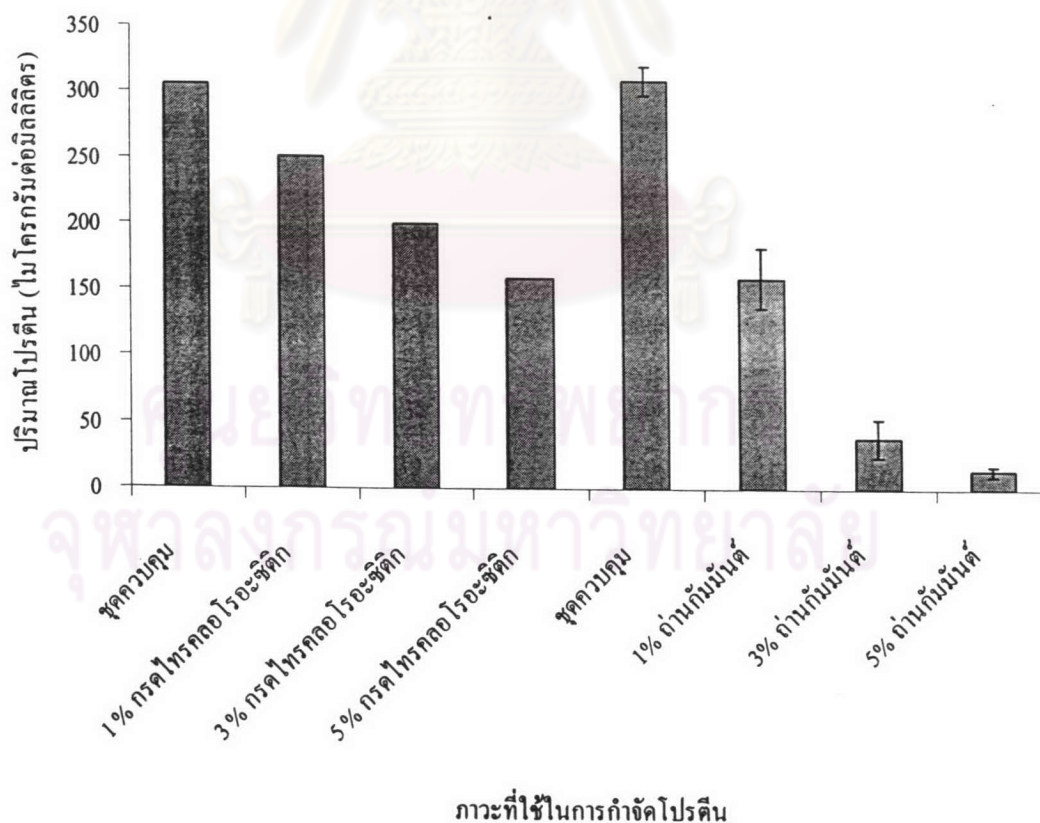
รูปที่ 3.4 ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกเมื่อผ่านการตกตะกอนด้วยเอทิลแอลกอฮอล์

### 3.2.3 การกำจัดโปรตีน

ในกระบวนการทำกรดไฮยาลูโรนิกให้บริสุทธิ์จะต้องคำนึงถึงโปรตีนที่ปนเปื้อนเนื่องจากโปรตีนที่ปะปนมาอาจมีผลทำให้เกิดการแพ้ได้ ดังนั้นจึงต้องมีขั้นตอนการกำจัดโปรตีน โดยได้มีรายงานการใช้กรดไตรคลอโรอะซิติกตกตะกอนหรือใช้ถ่านกัมมันต์ในการดูดซับโปรตีน (Akasaka และคณะ, 1989) ดังนั้นจึงทดลองเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่หายไประหว่างการใช้กรดไตรคลอโรอะซิติกร้อยละ 1 3 และ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรสารละลายกรดไฮยาลูโรนิก กับการใช้ถ่านกัมมันต์ร้อยละ 1 3 และ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรสารละลายกรดไฮยาลูโรนิก นำไปหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีลาร์วี ดังวิธีการทดลองในข้อ 2.5.3.1 และ 2.5.3.2 จากการทดลองพบว่าการใช้ถ่านกัมมันต์สามารถลดปริมาณโปรตีนที่ปนเปื้อนมาในสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกได้ดีกว่าการใช้กรดไตรคลอโรอะซิติก โดยเมื่อใช้ถ่านกัมมันต์ร้อยละ 5 สามารถลดปริมาณโปรตีนจาก 309.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงเหลือ 13.87 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือคิดเป็นร้อยละ 95.52 ดังแสดงในตารางที่ 3.4 และรูปที่ 3.5 และเมื่อพิจารณาปริมาณและน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกจะพบว่าการใช้กรดไตรคลอโรอะซิติกและการใช้ถ่านกัมมันต์จะไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารละลายกรดไฮยาลูโรนิก แต่การใช้กรดไตรคลอโรอะซิติกส่งผลให้น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกลดต่ำลง ในขณะที่การใช้ถ่านกัมมันต์ไม่ส่งผลต่อน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก ดังแสดงในตารางที่ 3.4 และรูปที่ 3.6 และ 3.7

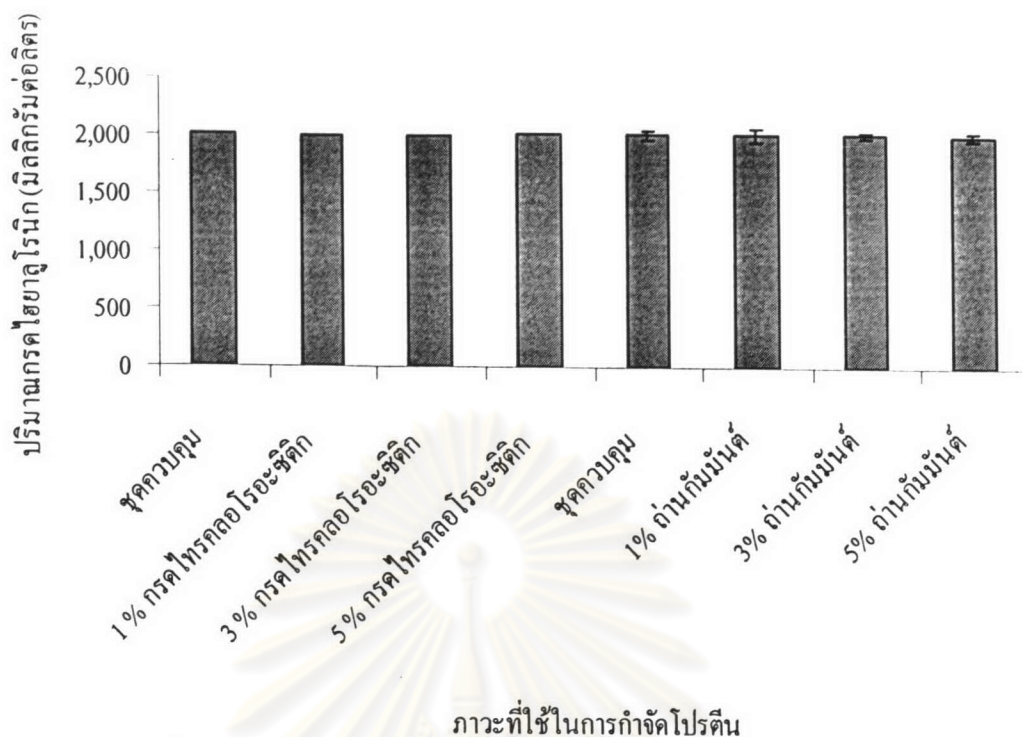
ตารางที่ 3.4 เปรียบเทียบปริมาณโปรตีน ปริมาณและน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาโลโรนิกในสารละลายกรดไฮยาโลโรนิก หลังจากผ่านการกำจัดโปรตีนโดยใช้กรดไทรโคลอโรอะซิดิก และถ่านกัมมันต์

ภาวะที่ใช้	โปรตีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	กรดไฮยาโลโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักโมเลกุล $\times 10^6$ (คาลตัน)
ชุดควบคุม	305.85	2,023.57	2.21
1% กรดไทรโคลอโรอะซิดิก	250.82	2,002.86	2.07
3% กรดไทรโคลอโรอะซิดิก	199.54	1,995.79	2.18
5% กรดไทรโคลอโรอะซิดิก	158.51	2,011.86	1.79
ชุดควบคุม	$309.33 \pm 11.38$	$2,010.18 \pm 40.66$	$2.22 \pm 0.14$
1% ถ่านกัมมันต์	$159.38 \pm 22.96$	$2,009.51 \pm 57.16$	$2.21 \pm 0.17$
3% ถ่านกัมมันต์	$38.39 \pm 14.10$	$2,009.65 \pm 21.23$	$2.27 \pm 0.27$
5% ถ่านกัมมันต์	$13.87 \pm 3.43$	$2,003.07 \pm 32.63$	$2.19 \pm 0.16$

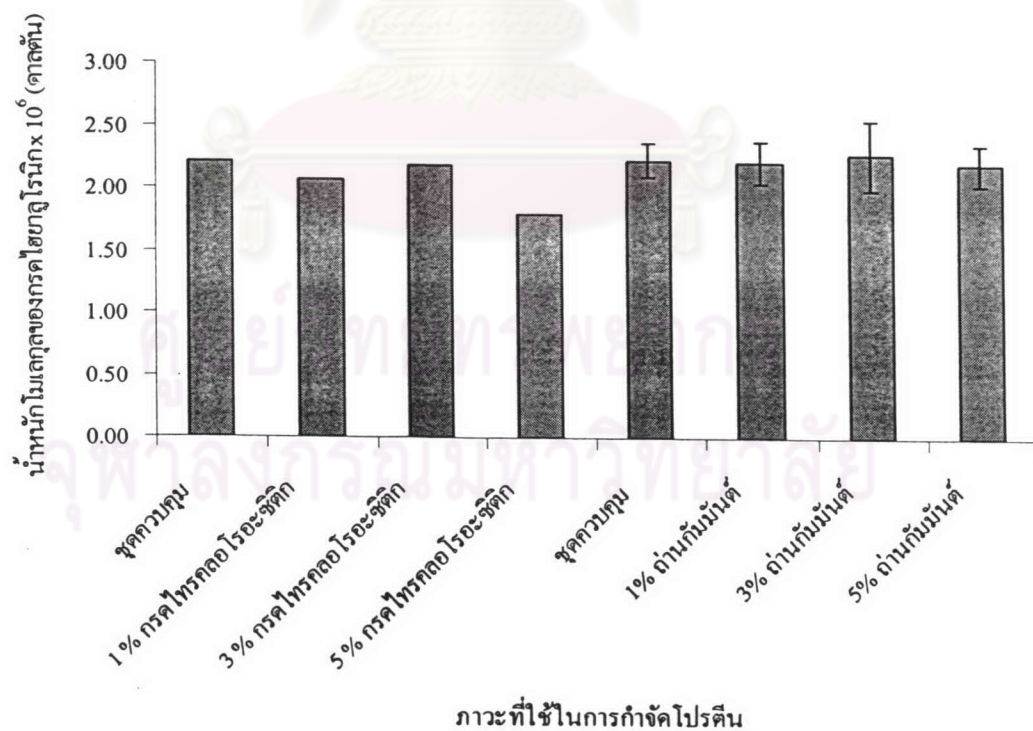


รูปที่ 3.5 เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนหลังจากผ่านการกำจัดโปรตีนโดยใช้กรดไทรโคลอโรอะซิดิก และถ่านกัมมันต์





รูปที่ 3.6 เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกหลังจากผ่านการกำจัดโปรตีน โดยการใช้กรดไทรคโลโรอะซิดิก และถ่านกัมมันต์



รูปที่ 3.7 เปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกหลังจากผ่านการกำจัดโปรตีน โดยการใช้กรดไทรคโลโรอะซิดิก และถ่านกัมมันต์

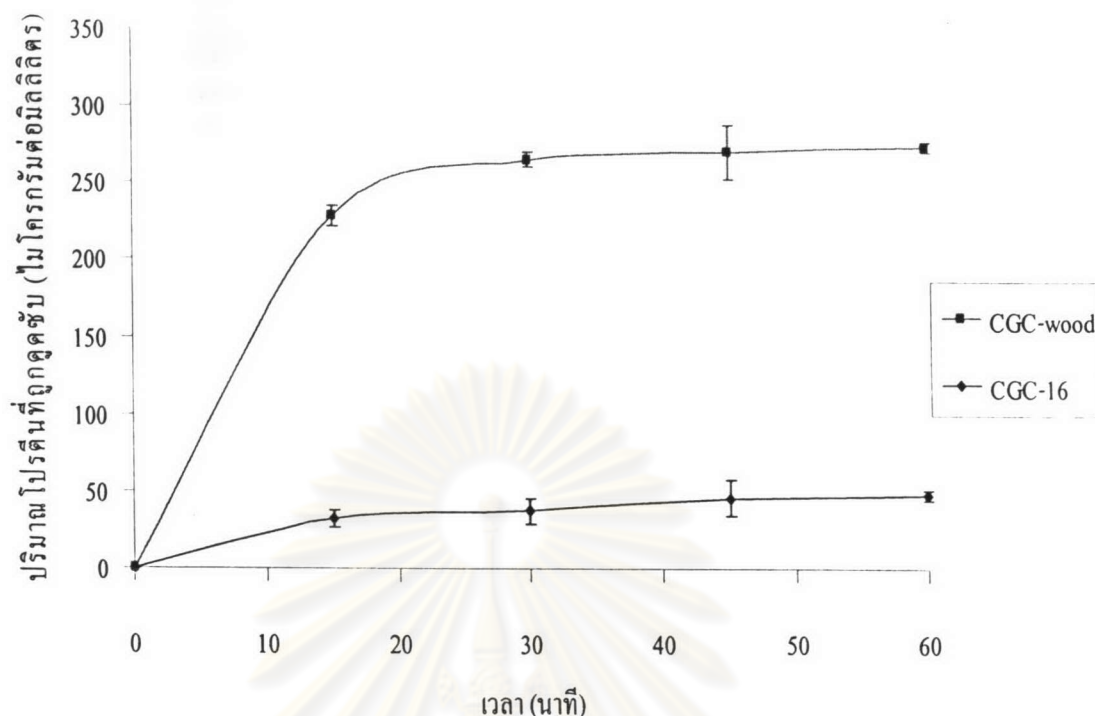
### 3.2.3.1 การหา equilibrium time ของการดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์

จากผลการทดลองในข้อ 3.2.3 จะพบว่าถ่านกัมมันต์สามารถดูดซับโปรตีนได้ดีกว่าการใช้กรดไทรออลโรอะซิดิก และไม่ส่งผลกระทบต่อหน้าผิวโมเลกุลของกรดไฮยาโลโรนิก นอกจากนี้ยังสามารถแยกออกจากสารละลายกรดไฮยาโลโรนิกได้ง่ายเนื่องจากใช้วิธีการแยกทางกายภาพโดยใช้การกรอง ดังนั้นในการกำจัดโปรตีนจึงควรเลือกใช้ถ่านกัมมันต์ โดยในขั้นตอนการดูดซับโปรตีนจะต้องคำนึงถึงเวลาที่ใช้ในการดูดซับในการทดลองนี้ใช้ถ่านกัมมันต์ 2 ชนิดคือ CGC-16 และ CGC-wood เมื่อเติมถ่านกัมมันต์ในปริมาณ 0.4 กรัม แล้วนำไปเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที และเก็บตัวอย่างทุก 15 นาที พบว่าปริมาณการดูดซับโปรตีนของถ่านกัมมันต์ทั้ง 2 ชนิดจะไม่เพิ่มขึ้นตั้งแต่เวลาที่ 30 แต่เมื่อเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่ถูกดูดซับพบว่า ถ่านกัมมันต์ชนิด CGC-wood สามารถดูดซับโปรตีนได้ดีกว่าถ่านกัมมันต์ชนิด CGC-16 โดยปริมาณการดูดซับโปรตีนด้วยถ่านกัมมันต์ในเวลาที่ 30 ของ CGC-16 และ CGC-wood คือ 37.27 และ 265.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คิดได้เป็นร้อยละ 12.04 และ 85.74 ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.5 และรูปที่ 3.8

ตารางที่ 3.5 equilibrium time ของการดูดซับโปรตีนด้วยถ่านกัมมันต์ชนิด CGC-16 และ CGC-wood และปริมาณกรดไฮยาโลโรนิกหลังผ่านการดูดซับโปรตีน

เวลา (นาที)	โปรตีนที่ถูกดูดซับ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		กรดไฮยาโลโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	CGC-16	CGC-wood	CGC-16	CGC-wood
0	0	0	1,966.91 ± 112.12	1,966.91 ± 112.12
15	32.34 ± 5.48	227.83 ± 6.64	1,906.30 ± 17.76	1,952.52 ± 28.03
30	37.27 ± 7.97	265.21 ± 5.28	1,938.58 ± 68.64	1,959.33 ± 25.76
45	45.88 ± 11.89	270.47 ± 17.47	1,929.03 ± 28.79	1,951.76 ± 43.94
60	47.47 ± 3.38	273.24 ± 3.28	1,945.70 ± 96.97	1,960.70 ± 21.06





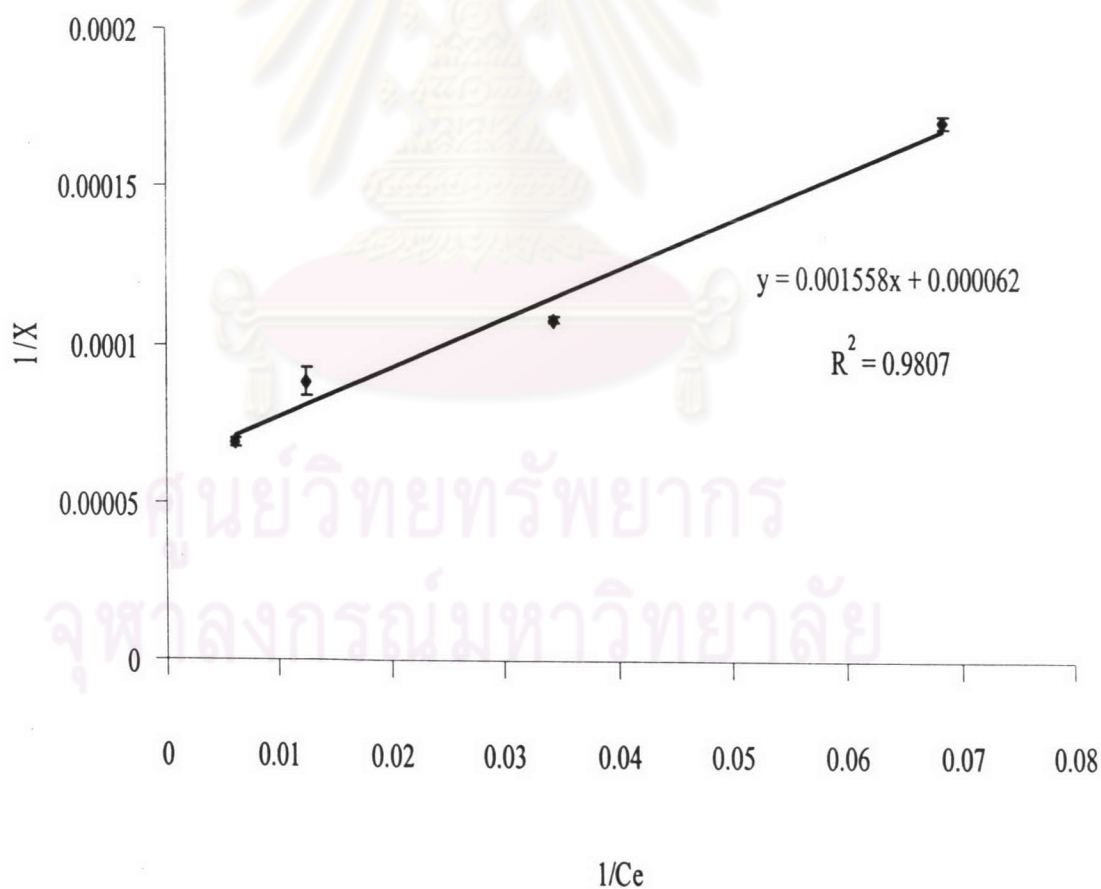
รูปที่ 3.8 equilibrium time ของการดูดซับโปรตีนด้วยถ่านกัมมันต์ชนิด CGC-16 และ CGC-wood

### 3.2.3.2 การหา adsorption isotherm ของการดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์

จากการทดลองในข้อ 3.2.3.1 พบว่าถ่านกัมมันต์ชนิด CGC-wood สามารถดูดซับโปรตีนได้ดีกว่า CGC-16 มาก จึงได้นำถ่านกัมมันต์ชนิด CGC-wood มาทำการทดลองเพื่อหาไอโซเทอร์มของการดูดซับ พบว่าปริมาณการดูดซับโปรตีนแปรตามปริมาณของถ่านกัมมันต์ กล่าวคือ เมื่อใช้ถ่านกัมมันต์มากขึ้น ปริมาณการดูดซับก็จะมากขึ้นด้วย ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.6 และเมื่อเขียนกราฟระหว่างส่วนกลับของความเข้มข้นโปรตีน ณ จุดสมดุล ( $1/C_e$ ) และ ส่วนกลับของโปรตีนที่ถูกดูดซับต่อกรัมถ่านกัมมันต์ ( $1/X$ ) พบว่าจะได้กราฟเส้นตรง แสดงว่าเป็นไอโซเทอร์มการดูดซับแบบแลงมัวร์ (Valancia และ Gloyna, 1972) ดังแสดงในรูป 3.9 และได้สมการ  $1/X = 0.001558 (1/C_e) + 0.000062$  จากกราฟสามารถคำนวณค่า  $X_m$  หรือ adsorption capacity และ b หรือ ค่าคงที่ของพลังงานในการดูดซับได้เท่ากับ 16,129.03 ไมโครกรัมต่อกรัมคาร์บอน และ 0.04 มิลลิลิตรต่อไมโครกรัม ตามลำดับ (ภาคผนวก ฉ) จากสมการไอโซเทอร์มที่ได้ หากรู้ความเข้มข้นตั้งต้น และความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ จะสามารถคำนวณหาถ่านกัมมันต์ที่ต้องใช้ในการกำจัดโปรตีนได้

ตารางที่ 3.6 ปริมาณโปรตีนในสารละลายกรดไฮยาโลโรนิกหลังการดูดซับ  
เมื่อแปรปริมาณถ่านกัมมันต์ที่ใช้ในการดูดซับ

ร้อยละของ ถ่านกัมมันต์	ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	ส่วนกลับของความเข้มข้น โปรตีน ณ จุดสมดุล ( $1/C_e$ )	ส่วนกลับของโปรตีนที่ถูกดูดซับ ต่อกรัมถ่านกัมมันต์ ( $1/X$ )
0	$306.77 \pm 5.13$	-	-
1	$161.47 \pm 2.96$	$0.0062 \pm 0.000095$	$0.000069 \pm 0.0000014$
2	$79.73 \pm 6.10$	$0.0126 \pm 0.00075$	$0.000088 \pm 0.0000043$
3	$29.26 \pm 3.39$	$0.0345 \pm 0.0035$	$0.000108 \pm 0.0000009$
5	$14.73 \pm 1.96$	$0.0688 \pm 0.0078$	$0.000171 \pm 0.0000019$



รูปที่ 3.9 ไอโซเทอร์มของการดูดซับของถ่านกัมมันต์ชนิด CGC-wood

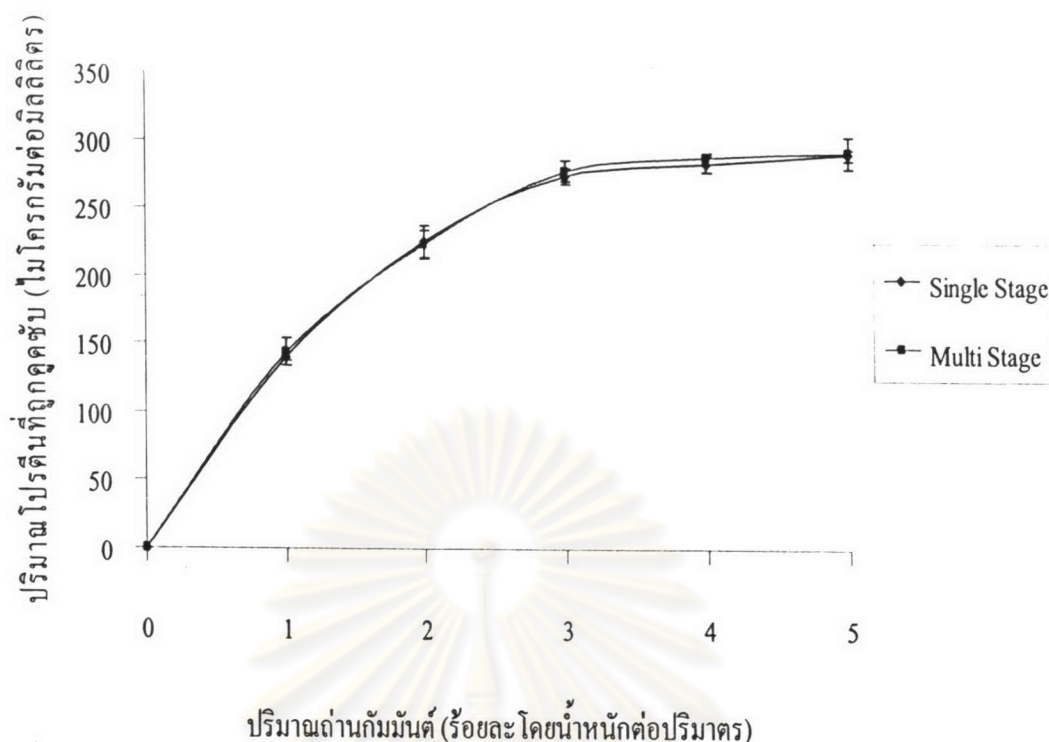
### 3.2.3.3 การดูดซับโปรตีนด้วยถ่านกัมมันต์แบบ single stage และ multi stage

การทดลองนี้เพื่อหาประสิทธิภาพในการดูดซับโปรตีนของถ่านกัมมันต์ เมื่อใช้ระบบ single stage กับ multi stage ดังวิธีการทดลองในข้อ 2.5.3.2.3 โดยแปรปริมาณถ่านกัมมันต์ที่ร้อยละ 1 2 3 4 และ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของสารละลายกรดไฮยาโลโรนิก จากการทดลองพบว่าเมื่อมีปริมาณถ่านกัมมันต์มากขึ้น จะดูดซับโปรตีนได้มากขึ้น เช่นเดียวกับผลการทดลองในข้อ 3.2.3.2 และเมื่อพิจารณาปริมาณการดูดซับโปรตีนในระบบ single stage และ multi stage พบว่าเมื่อปริมาณถ่านกัมมันต์ที่ใช้เท่ากัน ปริมาณโปรตีนที่ถูกดูดซับมีค่าไม่แตกต่างกัน ดังจะเห็นได้จากผลการทดลองตามตารางที่ 3.7 และรูปที่ 3.10 จากตารางที่ 3.7 เมื่อใช้ถ่านกัมมันต์ร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของสารละลายกรดไฮยาโลโรนิก พบว่าปริมาณโปรตีนที่ถูกดูดซับในระบบ single stage และ multi stage มีค่าเท่ากับ 289.91 และ 291.62 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นในกระบวนการกำจัดโปรตีนโดยการดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์จึงควรเลือกใช้ระบบ single stage เนื่องจากใช้เวลาและค่าใช้จ่ายในการดำเนินการน้อยกว่าการดูดซับโปรตีนในระบบ multi stage

ตารางที่ 3.7 เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่ถูกดูดซับในระบบการดูดซับแบบ single stage และ multi stage

ปริมาณถ่านกัมมันต์ (ร้อยละ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)	ปริมาณโปรตีนที่ถูกดูดซับ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	Single stage	Multi Stage
0	0	0
1	140.17 ± 2.96	143.59 ± 10.26
2	225.18 ± 11.75	223.47 ± 10.36
3	273.24 ± 5.78	277.51 ± 7.80
4	283.07 ± 5.34	287.34 ± 3.92
5	289.91 ± 3.92	291.62 ± 11.75





รูปที่ 3.10 เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่ถูกดูดซับในระบบการดูดซับแบบ Single stage และ Multi stage

#### 3.2.3.4 การหา breakthrough curve ของถ่านกัมมันต์

ทำการทดลองเพื่อศึกษา breakthrough curve ของการดูดซับโปรตีนด้วยถ่านกัมมันต์ โดยนำถ่านกัมมันต์ 1 กรัม บรรจุในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร ผ่านสารละลายกรดไฮยาโรนิกซึ่งมีปริมาณโปรตีนเริ่มต้น 299.93 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร โดยมีอัตราการไหล 10.5 มิลลิเมตรต่อชั่วโมง ซึ่งเป็นอัตราการไหลที่ต่ำที่สุดที่ได้ทำการทดลอง เมื่อพิจารณาค่า adsorption capacity จากผลการทดลองในข้อ 3.2.3.2 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 16,129.03 ไมโครกรัมต่อกรัมคาร์บอน ซึ่งก็คือคาร์บอนหรือถ่านกัมมันต์ 1 กรัมสามารถดูดซับโปรตีนได้สูงสุดเท่ากับ 16,129.03 ไมโครกรัม แสดงว่าหากถ่านกัมมันต์สามารถดูดซับโปรตีนในสารละลายกรดไฮยาโรนิกได้ทั้งหมด ภายใต้ภาวะดังกล่าว คอลัมน์นี้จะรองรับการกำจัดโปรตีนของสารละลายกรดไฮยาโรนิกได้ประมาณ 53 มิลลิเมตร แต่จากการทดลองพบว่าในลำดับส่วนที่ 1 ยังคงพบการปนเปื้อนของโปรตีนแม้ว่าจะมีความเข้มข้นต่ำก็ตาม และเมื่อเก็บสารละลายลำดับส่วนต่อเนื่องกันไป ปริมาณโปรตีนที่ปนเปื้อนในสารละลายกรดไฮยาโรนิกมีค่าเพิ่มมากขึ้น เมื่อพิจารณาถึงรูปแบบของการดูดซับพบว่ากราฟไม่ได้มี

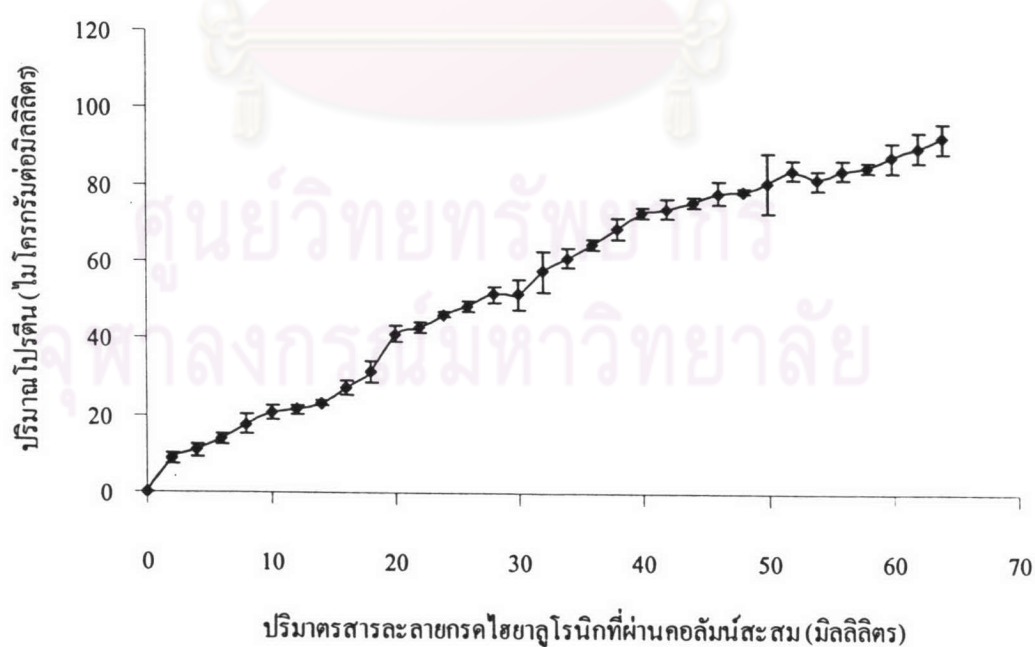
ลักษณะเป็นรูปตัวเอสตามทฤษฎี คือในลำดับส่วนต้นๆ ปริมาณโปรตีนควรมีค่าน้อยมากหรือแทบไม่มีเลย จนเก็บลำดับส่วนได้ปริมาณหนึ่ง จึงจะพบว่าปริมาณโปรตีนจะเพิ่มอย่างรวดเร็ว จนกระทั่งคอลัมน์ไม่สามารถดูดซับโปรตีนได้อีก แต่ผลการทดลองหา breakthrough curve ตามตารางที่ 3.8 และรูปที่ 3.11 กลับไม่เป็นไปตามทฤษฎี ดังนั้นวิธีการดูดซับโดยใช้สารละลายกรดไฮยาโลโรนิกผ่านคอลัมน์ในการทดลองนี้ จึงไม่สามารถใช้ข้อมูลที่ได้ไปคำนวณเพื่อหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสมต่อปริมาณน้ำหมัก เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการทำบริสุทธิ์ได้

ตารางที่ 3.8 ปริมาณโปรตีนในสารละลายกรดไฮยาโลโรนิกที่ผ่านการดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์ในคอลัมน์

ปริมาณสารละลายกรดไฮยาโลโรนิกผ่านคอลัมน์สะสม (มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีนในสารละลายกรดไฮยาโลโรนิกที่ผ่านคอลัมน์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
0	0
2	8.74 ± 1.28
4	10.88 ± 1.48
6	13.87 ± 1.28
8	17.72 ± 2.56
10	20.71 ± 1.96
12	21.56 ± 1.28
14	23.27 ± 0.74
16	27.12 ± 1.96
18	31.39 ± 2.67
20	41.22 ± 1.96
22	42.93 ± 1.48
24	46.35 ± 0.74
26	48.49 ± 1.28
28	51.48 ± 1.96
30	51.68 ± 3.92
32	57.66 ± 5.34
34	61.08 ± 2.56
36	64.50 ± 1.48
38	68.77 ± 2.56

ตารางที่ 3.7 ปริมาณโปรตีนในสารละลายกรดไฮยาโลโรนิกที่ผ่านการดูดซับด้วย  
ถ่านกัมมันต์ในคอลัมน์ (ต่อ)

ปริมาณสารละลายกรดไฮยาโลโรนิก ผ่านคอลัมน์สะสม (มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีนในสารละลายกรด ไฮยาโลโรนิกที่ผ่านคอลัมน์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
40	73.04 ± 1.48
42	73.90 ± 2.56
44	75.61 ± 1.48
46	78.17 ± 2.96
48	78.68 ± 0.59
50	80.74 ± 7.83
52	84.15 ± 2.56
54	81.59 ± 2.56
56	84.15 ± 2.56
58	85.01 ± 1.48
60	87.57 ± 3.92
62	90.14 ± 3.92
64	92.70 ± 3.92



รูปที่ 3.11 ปริมาณโปรตีนในสารละลายกรดไฮยาโลโรนิกที่ผ่านการดูดซับด้วย  
ถ่านกัมมันต์ในคอลัมน์



### 3.2.4 การเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮยาโลโรนิกและการกำจัดสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำด้วยเครื่องอัลตราฟิลเทรชัน

นำสารละลายกรดไฮยาโลโรนิกที่ผ่านการดูดซับโปรตีนด้วยถ่านกัมมันต์มาผ่านกระบวนการอัลตราฟิลเทรชัน เนื่องจากมีงานวิจัยรายงานไว้ว่ากระบวนการนี้สามารถใช้เพื่อแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำได้ โดยเฉพาะสารจำพวกสารก่อไข้ (pyrogen) (Bracke และคณะ, 1985 ; Akasaka และคณะ, 1989 ; Ellwood และคณะ, 1995) จึงทดลองใช้เยื่อแผ่นที่มี molecular weight cut off 300,000 คาลตัน และใช้ความดัน 0.5 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮยาโลโรนิกในส่วนของรีเทนเทตมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นโดยเมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมงความเข้มข้นของกรดเพิ่มขึ้นจาก 1,974.09 เป็น 2,132.32 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ไม่พบว่ามีกรดไฮยาโลโรนิกหลุดมาในส่วนเพอร์มิเอต ดังแสดงในตารางที่ 3.9 และ 3.10 และรูปที่ 3.12

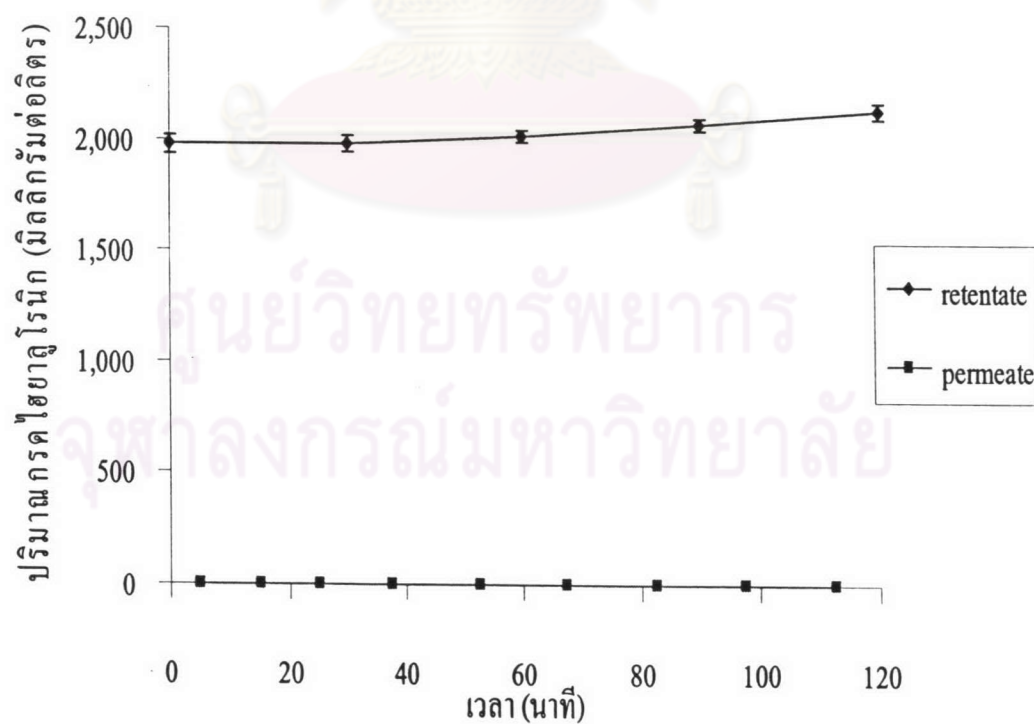
เมื่อพิจารณาฟลักซ์ทั้งหมด (total flux) (ภาคผนวก ข) พบว่าฟลักซ์มีค่าค่อนข้างคงที่จนกระทั่งนาที่ที่ 25 ฟลักซ์มีค่าลดลงอย่างรวดเร็วจนกระทั่งนาที่ที่ 37.5 และหลังจากนาที่ที่ 37.5 ฟลักซ์จะลดลงอย่างช้าๆ จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ค่าฟลักซ์แสดงดังตารางที่ 3.11 และรูปที่ 3.13 การที่ฟลักซ์มีค่าลดลงมากเนื่องจากเกิดเจลที่ผิวหน้าเยื่อแผ่น ส่งผลให้การต้านทานการไหลสูงขึ้น (รัตนจิระรัตนานนท์, 2541)

ตารางที่ 3.9 ปริมาณกรดไฮยาโลโรนิกในส่วนของรีเทนเทตหลังจากผ่านกระบวนการอัลตราฟิลเทรชัน

เวลา (นาที่)	ปริมาณกรดไฮยาโลโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)
0	1,974.09 ± 39.28
30	1,980.38 ± 37.74
60	2,011.82 ± 28.82
90	2,068.43 ± 28.82
120	2,132.32 ± 37.74

ตารางที่ 3.10 ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกในส่วนของเพอร์มิเอตหลังจากผ่านกระบวนการอัลตราฟิลเตรชัน

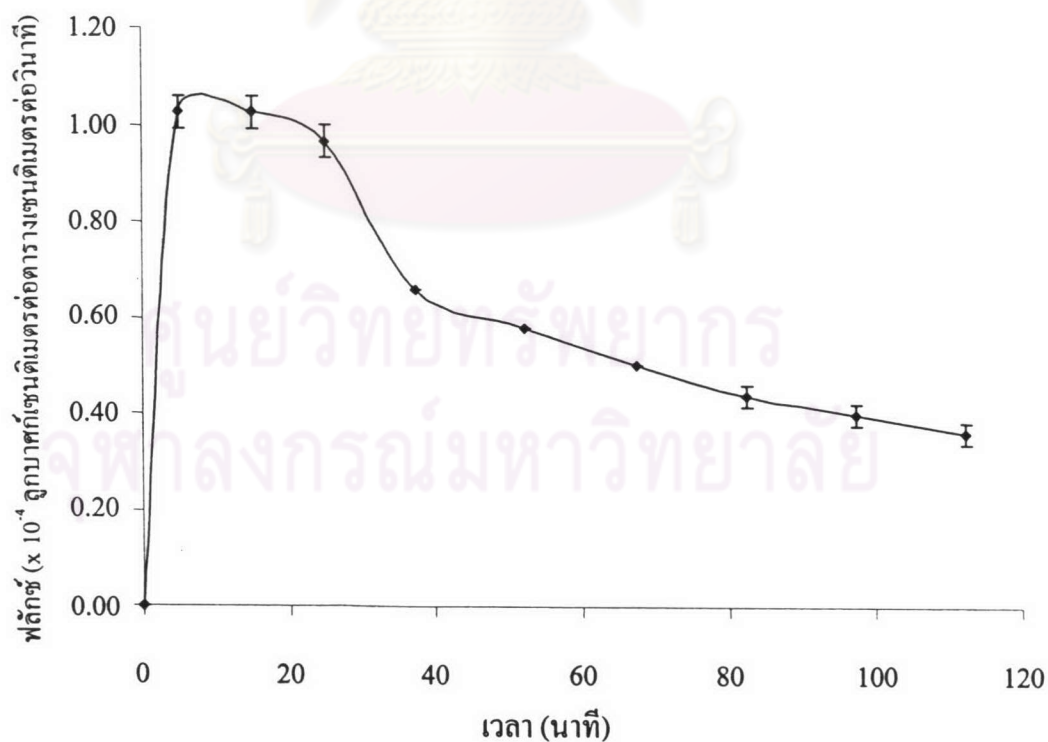
เวลา (นาที)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)
5	0
15	0
25	0
37.5	0
52.5	0
67.5	0
82.5	0
97.5	0
112.5	0



รูปที่ 3.12 ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกในส่วนของรีเทนเตตและเพอร์มิเอตหลังจากผ่านกระบวนการอัลตราฟิลเตรชัน

ตารางที่ 3.11 ฟลักซ์ทั้งหมด (Total flux) ของสารละลายกรดไฮยาโลโรนิกที่ผ่านกระบวนการอัลตราฟิลเทรชัน

นาทีที่	ฟลักซ์ทั้งหมด ( $\times 10^{-4}$ ลูกบาศก์เซนติเมตร/ตารางเซนติเมตร . วินาที)
0	0
5.0	$1.03 \pm 0.03$
15.0	$1.03 \pm 0.03$
25.0	$0.97 \pm 0.03$
37.5	$0.66 \pm 0.00$
52.5	$0.58 \pm 0.00$
67.5	$0.50 \pm 0.00$
82.5	$0.44 \pm 0.02$
97.5	$0.40 \pm 0.02$
112.5	$0.36 \pm 0.02$



รูปที่ 3.13 ฟลักซ์ทั้งหมด (Total flux) ของสารละลายกรดไฮยาโลโรนิกที่ผ่านกระบวนการอัลตราฟิลเทรชัน



จากการทดลองในข้อ 3.2 สามารถสรุปขั้นตอนการทำกรดไฮยาโลโรนิกได้บริสุทธิ์ได้ดังนี้ คือนำน้ำหมักที่ผ่านการเหวี่ยงแยกเซลล์แล้ว มาตกตะกอนด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ ซึ่งเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ โดยใช้ปริมาตรเป็น 2 เท่าของน้ำหมัก นำตะกอนที่ได้มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.2 โมลาร์ โดยในขั้นตอนนี้พบว่าสารละลายกรดไฮยาโลโรนิกที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์เท่ากับร้อยละ 65.41 จากนั้นใช้ถ่านกัมมันต์เพื่อดูดซับโดยใช้ระบบ single stage ในขั้นตอนนี้ สารละลายกรดไฮยาโลโรนิกที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 79.51 แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ไปผ่านกระบวนการอัลตราฟิลเทรชัน ซึ่งในการทดลองดังกล่าว จะได้สารละลายกรดไฮยาโลโรนิกที่มีความเข้มข้นประมาณ 2,100 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารละลายกรดไฮยาโลโรนิกที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 83.79 และมีผลผลิตร้อยละ 65.24 ของปริมาณกรดไฮยาโลโรนิกในน้ำหมักเริ่มต้น ดังแสดงในตารางที่ 3.12 และยังไม่พบการปนเปื้อนจากโปรตีนเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีลิวรี

ตารางที่ 3.12 ความบริสุทธิ์ของกรดไฮยาโลโรนิกและปริมาณผลผลิตที่ได้หลังจากผ่านการทำบริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอน

ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์	ความบริสุทธิ์ <sup>1</sup> (เปอร์เซ็นต์)	recovery <sup>2</sup> (เปอร์เซ็นต์)
ตกตะกอนด้วยเอทิลแอลกอฮอล์	65.41 ± 7.91	99.21
ดูดซับโปรตีนด้วยถ่านกัมมันต์	79.51 ± 9.88	72.75
กระบวนการอัลตราฟิลเทรชัน	83.79 ± 9.26	65.24

หมายเหตุ <sup>1</sup> เปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์หลังหักลบปริมาณเกลือ = [ปริมาณกรดไฮยาโลโรนิก (กรัม/ลิตร)\*100]/[ปริมาณน้ำหมักของแข็งของสารทั้งหมด (กรัม/ลิตร) - ปริมาณเกลือที่ใช้ในการเตรียมสารละลาย (กรัม/ลิตร)]

<sup>2</sup> เปรียบเทียบกับปริมาณกรดไฮยาโลโรนิกในน้ำหมักเริ่มต้น

### 3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่เตรียมได้

#### 3.3.1 ปัจจัยทางกายภาพ

##### 3.3.1.1 อุณหภูมิ

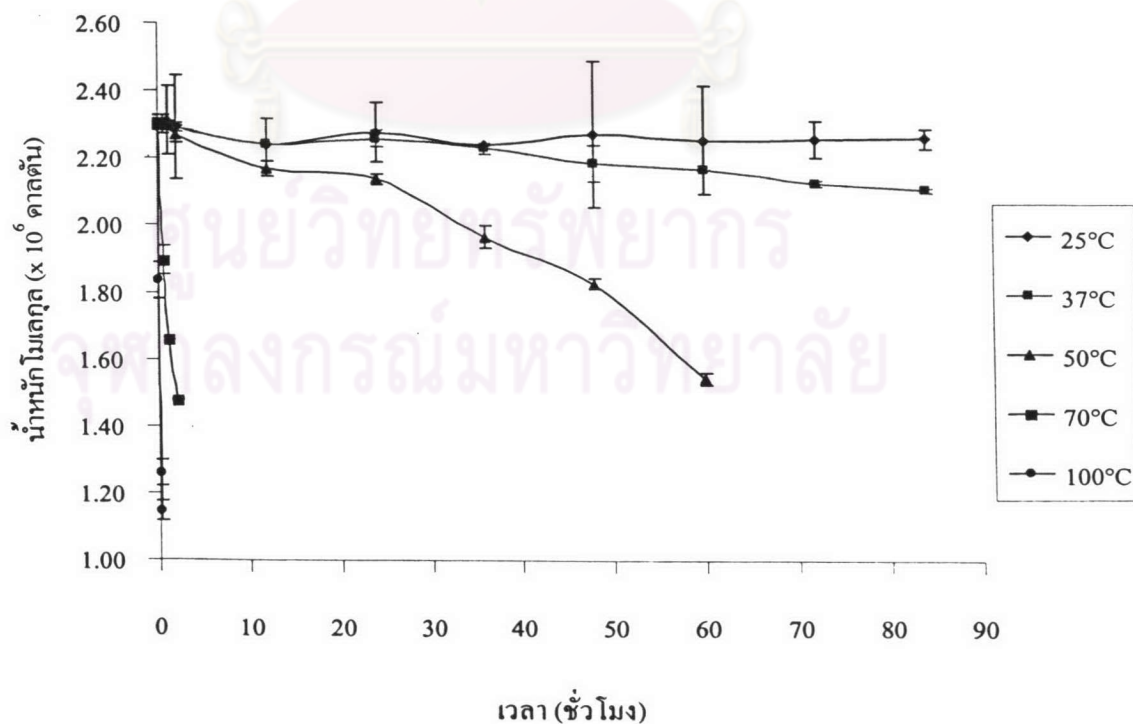
อุณหภูมิส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น น้ำหนักโมเลกุลของกรดจะลดลงเร็วขึ้น (Karen และ Ellington, 1994) ดังนั้นจึงทำการทดลองผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่เตรียมได้ โดยนำสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกที่ผ่านกระบวนการอัลตราฟิльтраชันจากข้อ 3.2.4 มาบ่มที่อุณหภูมิ 25 37 50 70 และ 100 องศาเซลเซียส ที่ช่วงเวลาต่างๆ นำไปหาน้ำหนักโมเลกุล พบว่าเมื่อเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการบ่มสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกนาน 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 37 50 และ 70 องศาเซลเซียส น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกมีค่าเท่ากับ  $2.24 \times 10^6$   $2.24 \times 10^6$   $2.17 \times 10^6$  และ  $1.48 \times 10^6$  คาลตัน ตามลำดับ และพบว่าเมื่ออุณหภูมิเท่ากับ 100 องศาเซลเซียส น้ำหนักโมเลกุลจะลดลงอย่างรวดเร็วโดยน้ำหนักโมเลกุลจะลดลงจาก  $2.30 \times 10^6$  คาลตัน เป็น  $1.15 \times 10^6$  คาลตัน โดยใช้เวลาเพียง 15 นาทีเท่านั้น ดังแสดงในตารางที่ 3.13 และรูปที่ 3.14

ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกกับอุณหภูมิ สามารถหาได้จากสมการของอาร์เรเนียส (Arrhenius equation) โดยเมื่อเขียนกราฟระหว่าง เวลา กับ ค่า  $\ln$  ของน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก ณ อุณหภูมิ 37 50 70 และ 100 องศาเซลเซียส (ภาคผนวก ซ) โดยค่าความชันของกราฟคือค่า  $k_T$  เมื่อเขียนกราฟระหว่าง ส่วนกลับขององศาสัมบูรณ์กับ  $\ln k_T$  จะได้ความชันคือ  $E/R$  และจุดตัดแกน  $y$  จะเป็นค่า  $\ln A$  จะได้สมการ  $\ln k_T = -15083(1/T) + 41.811$  ดังนั้นจะหาค่า  $A$  และค่า  $E$  ได้เท่ากับ  $1.44 \times 10^{18} \text{ h}^{-1}$  และ  $1.254 \times 10^5$  กิโลจูลต่อโมล ตามลำดับ เพราะฉะนั้นจะได้สมการของอาร์เรเนียสเท่ากับ  $k_T = 1.44 \times 10^{18} \exp [-(1.254 \times 10^5 / RT)]$  (ภาคผนวก ซ) โดยสามารถทำนายน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกเมื่อเก็บ ณ อุณหภูมิและเวลาใดๆ ได้จากสมการของอาร์เรเนียส ซึ่งภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษากรดไฮยาลูโรนิกที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว คือควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ เพื่อยืดระยะเวลาในการเก็บรักษาสารละลายกรดไฮยาลูโรนิก

ตารางที่ 3.13 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก ( $\times 10^6$ คาลตัน) ณ อุณหภูมิ				
	25°C	37°C	50°C	70°C	100°C
0	2.30 $\pm$ 0.005	2.30 $\pm$ 0.005	2.30 $\pm$ 0.002	2.30 $\pm$ 0.02	2.30 $\pm$ 0.007
0.08	-	-	-	-	1.83 $\pm$ 0.06
0.17	-	-	-	-	1.26 $\pm$ 0.04
0.25	-	-	-	-	1.15 $\pm$ 0.03
0.50	2.30 $\pm$ 0.008	2.30 $\pm$ 0.003	2.30 $\pm$ 0.03	1.89 $\pm$ 0.04	-
1	2.31 $\pm$ 0.10	2.30 $\pm$ 0.13	2.29 $\pm$ 0.01	1.66 $\pm$ 0.001	-
2	2.29 $\pm$ 0.16	2.29 $\pm$ 0.014	2.27 $\pm$ 0.02	1.48 $\pm$ 0.003	-
12	2.24 $\pm$ 0.07	2.24 $\pm$ 0.075	2.17 $\pm$ 0.02	-	-
24	2.28 $\pm$ 0.09	2.26 $\pm$ 0.025	2.14 $\pm$ 0.02	-	-
36	2.24 $\pm$ 0.001	2.23 $\pm$ 0.02	1.97 $\pm$ 0.03	-	-
48	2.27 $\pm$ 0.22	2.19 $\pm$ 0.05	1.82 $\pm$ 0.02	-	-
60	2.26 $\pm$ 0.16	2.17 $\pm$ 0.002	1.54 $\pm$ 0.02	-	-
72	2.26 $\pm$ 0.06	2.13 $\pm$ 0.008	-	-	-
84	2.26 $\pm$ 0.03	2.11 $\pm$ 0.006	-	-	-

หมายเหตุ : - คือไม่ได้ทำการทดลอง



รูปที่ 3.14 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก

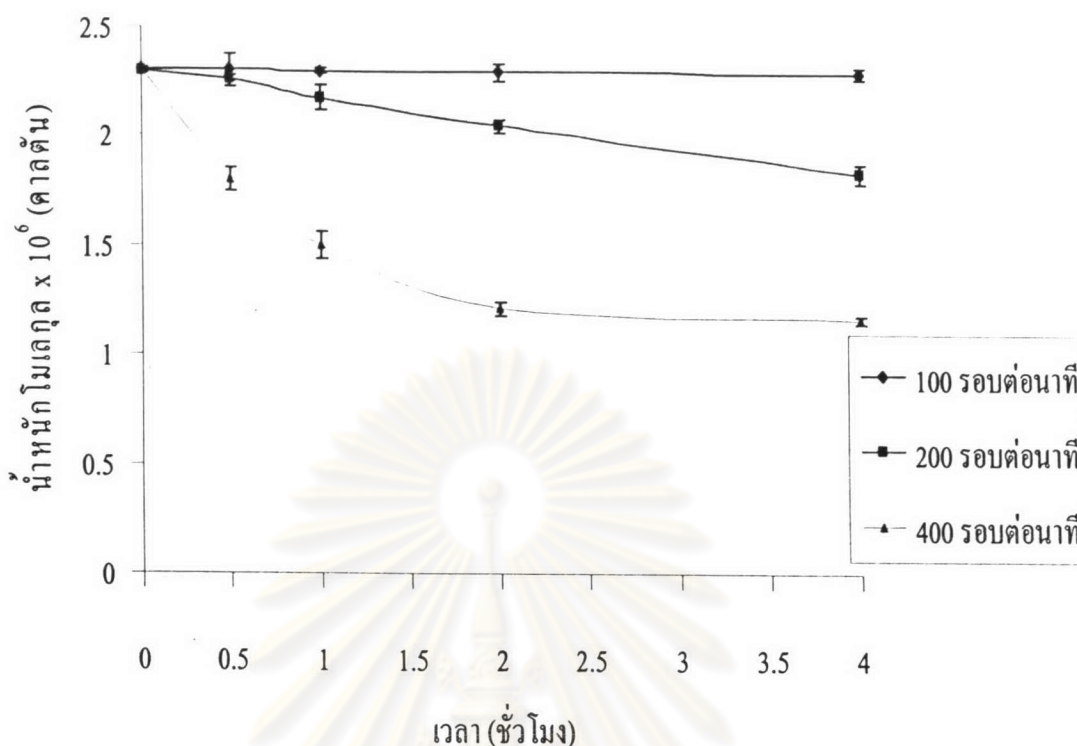


## 3.3.1.2 ความเร็วรอบของการกวน

ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิกมีการใช้การกวนเพื่อให้อากาศกับจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงทำการทดลองความเร็วรอบของการกวนที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่เตรียมได้ จากการทดลองพบว่าเมื่อความเร็วรอบสูงขึ้น น้ำหนักโมเลกุลของกรดจะลดลงมากขึ้น ซึ่งผลการทดลองนี้มีแนวโน้ม เช่นเดียวกับ Eric และคณะ (1993) และ Tamaki และคณะ (1998) เมื่อเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการกวนสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกนาน 4 ชั่วโมง ที่ความเร็วรอบของการกวน 100 200 และ 400 รอบต่อนาที น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกมีค่าเท่ากับ  $2.24 \times 10^6$   $1.82 \times 10^6$  และ  $1.16 \times 10^6$  คาลตัน ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3.14 และรูปที่ 3.15 โดยพบว่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกจะลดลงเมื่อความเร็วรอบของการกวนมากกว่า 100 รอบต่อนาที ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในระหว่างกระบวนการหมักซึ่งใช้ความเร็วรอบในการกวน 400 รอบต่อนาที จะทำให้น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกต่ำลง แต่อย่างไรก็ตามหากลดความเร็วรอบของการกวนลงก็จะส่งผลต่อการถ่ายโอนมวลของสารอาหารและอากาศกับเซลล์จุลินทรีย์เช่นกัน

ตารางที่ 3.14 ความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วรอบของการกวนและน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก $\times 10^6$ คาลตัน		
	100 รอบต่อนาที	200 รอบต่อนาที	400 รอบต่อนาที
0	$2.30 \pm 0.01$	$2.30 \pm 0.01$	$2.30 \pm 0.01$
0.5	$2.30 \pm 0.08$	$2.26 \pm 0.02$	$1.80 \pm 0.05$
1	$2.29 \pm 0.01$	$2.17 \pm 0.06$	$1.50 \pm 0.06$
2	$2.26 \pm 0.04$	$2.04 \pm 0.03$	$1.21 \pm 0.03$
4	$2.24 \pm 0.02$	$1.82 \pm 0.04$	$1.16 \pm 0.02$



รูปที่ 3.15 ความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วรอบของการกวาดและน้ำหนักรีดน้ำของกรดไฮยาโลโรนิก

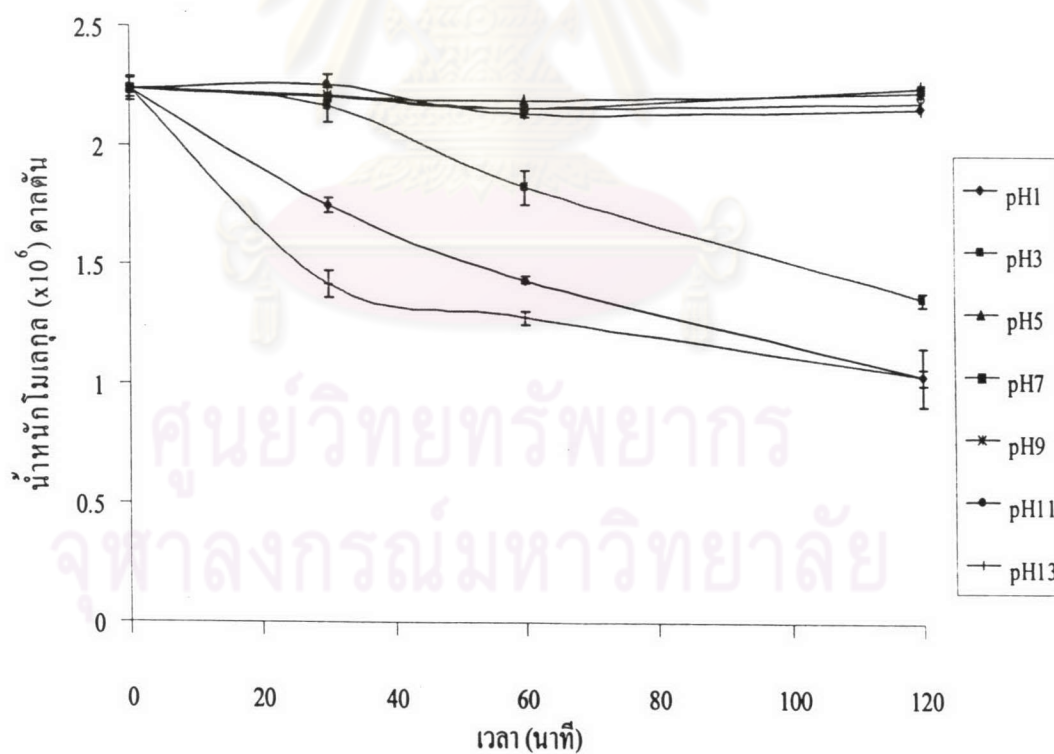
### 3.3.2 ปัจจัยทางเคมี

#### 3.3.2.1 ค่าความเป็นกรดต่าง

ในการนำกรดไฮยาโลโรนิกไปใช้ในทางการแพทย์ หรือในอุตสาหกรรม เครื่องสำอาง ภาวะที่นำกรดไฮยาโลโรนิกไปใช้โดยเฉพาะค่าความเป็นกรดต่างอาจมีความแตกต่างกัน ซึ่งค่าความเป็นกรดต่างมีผลต่อน้ำหนักรีดน้ำของกรดไฮยาโลโรนิก (Tokita และ Okamoto, 1995) จึงได้ทดลองแปรค่าความเป็นกรดต่างที่ 1 3 5 7 9 11 และ 13 และเก็บตัวอย่าง ณ นาทีที่ 30 60 และ 120 จากการทดลองพบว่าน้ำหนักรีดน้ำของกรดไฮยาโลโรนิกคงที่เมื่อค่าความเป็นกรดต่างอยู่ในช่วง 5 ถึง 11 และเมื่อใช้ภาวะที่ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 1 3 และ 13 น้ำหนักรีดน้ำของกรดไฮยาโลโรนิกจะมีค่าลดลงเรื่อยๆ ตามเวลาที่ผ่านมา โดยพบว่าในชั่วโมงที่ 2 น้ำหนักรีดน้ำของกรดไฮยาโลโรนิกมีค่าเท่ากับ  $1.04 \times 10^6$   $1.36 \times 10^6$  และ  $1.04 \times 10^6$  ดาลตัน ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3.15 และรูปที่ 3.16

ตารางที่ 3.15 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรดค่าและน้ำหนักรีดของกรดไฮยาโรนิก

ค่าความเป็นกรดค่า	น้ำหนักรีดของกรดไฮยาโรนิก ( $\times 10^6$ )			
	0 นาที	30 นาที	60 นาที	120 นาที
1	$2.24 \pm 0.04$	$1.75 \pm 0.03$	$1.44 \pm 0.01$	$1.035 \pm 0.4$
3	$2.24 \pm 0.04$	$2.17 \pm 0.07$	$1.83 \pm 0.07$	$1.36 \pm 0.03$
5	$2.24 \pm 0.04$	$2.20 \pm 0.04$	$2.19 \pm 0.02$	$2.23 \pm 0.03$
7	$2.24 \pm 0.04$	$2.20 \pm 0.04$	$2.16 \pm 0.04$	$2.25 \pm 0.03$
9	$2.24 \pm 0.04$	$2.21 \pm 0.03$	$2.16 \pm 0.04$	$2.18 \pm 0.05$
11	$2.24 \pm 0.04$	$2.26 \pm 0.05$	$2.14 \pm 0.04$	$2.16 \pm 0.01$
13	$2.24 \pm 0.04$	$1.42 \pm 0.06$	$1.28 \pm 0.03$	$1.04 \pm 0.12$



รูปที่ 3.16 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรดค่าและน้ำหนักรีดของกรดไฮยาโรนิก



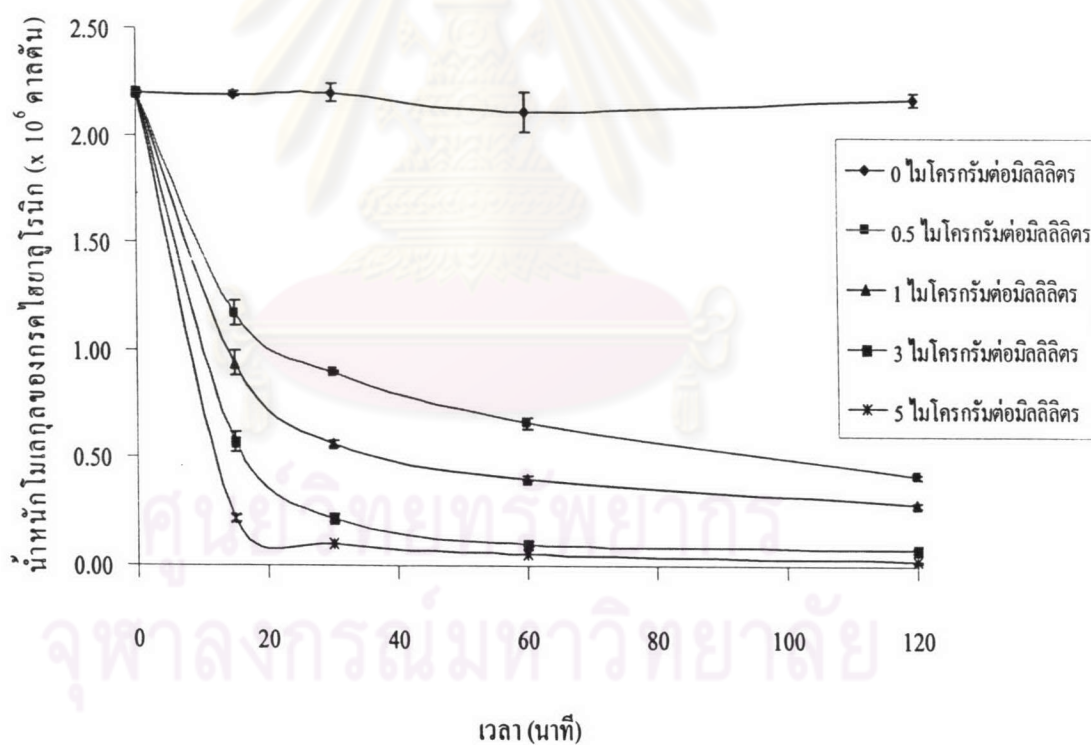
### 3.3.2.2 เอนไซม์ไฮyaluronidase

ไฮyaluronidase พบได้ทั่วไปตามเนื้อเยื่อของสัตว์ สारพิษจากแมลง และแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงการเลี้ยงเชื้อสเตรปโตคอคคัสกลุ่ม A และ C ซึ่งพบการสร้างไฮyaluronidase โดยในภาวะไร้อากาศมีการสร้างเอนไซม์มากกว่าภาวะที่มีอากาศ ทำให้ไม่สามารถตรวจพบกรดไฮyaluronic ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ (MacLennan, 1956) ดังนั้นหากเกิดการปนเปื้อนของเอนไซม์ดังกล่าวในระหว่างกระบวนการหมักและการทำกรดไฮyaluronic ให้บริสุทธิ์ จะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุลและปริมาณของกรดไฮyaluronic แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานกล่าวถึงการใช้เอนไซม์ชนิดนี้เพื่อลดความดันภายในนัยน์ตา หลังจากผ่าตัดตาเช่นกัน (Menzel และ Farr, 1998) จึงได้ทำการทดลองศึกษาผลของไฮyaluronidase ต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮyaluronic โดยพบว่าอัตราการลดลงของน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮyaluronic มากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของไฮyaluronidase สูงขึ้น เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของไฮyaluronidase ที่ความเข้มข้น 0 0.5 1 3 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือคิดเป็น 0 0.5 1 3 และ 5 ยูนิตของเอนไซม์ต่อมิลลิลิตร ณ ชั่วโมงที่ 2 พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮyaluronic มีค่าเท่ากับ  $2.17 \times 10^6$   $0.42 \times 10^6$   $0.28 \times 10^6$   $0.08 \times 10^6$  และ  $0.02 \times 10^6$  คาลตัน ตามลำดับ และเมื่อความเข้มข้นเอนไซม์เท่ากัน ที่เวลาต่างกัน พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮyaluronic ลดต่ำลงมากขึ้น เมื่อเวลาผ่านไปนานขึ้น โดยที่ความเข้มข้นของเอนไซม์มีค่า 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮyaluronic ของนาที่ที่ 0 15 30 60 และ 120 มีค่าเท่ากับ  $2.20 \times 10^6$   $1.17 \times 10^6$   $0.90 \times 10^6$   $0.66 \times 10^6$  และ  $0.42 \times 10^6$  คาลตัน ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3.16 และรูปที่ 3.17

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.16 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไฮยาลูโรนิคและน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิค

เวลา (นาที)	น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิค ( $\times 10^6$ ) ที่ความเข้มข้นของไฮยาลูโรนิค (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)				
	0	0.5	1	3	5
0	$2.20 \pm 0.01$	$2.20 \pm 0.01$	$2.20 \pm 0.01$	$2.20 \pm 0.01$	$2.20 \pm 0.01$
15	$2.19 \pm 0.01$	$1.17 \pm 0.06$	$0.94 \pm 0.06$	$0.57 \pm 0.05$	$0.22 \pm 0.02$
30	$2.20 \pm 0.04$	$0.90 \pm 0.01$	$0.56 \pm 0.02$	$0.22 \pm 0.02$	$0.10 \pm 0.00$
60	$2.12 \pm 0.09$	$0.66 \pm 0.03$	$0.40 \pm 0.01$	$0.10 \pm 0.01$	$0.05 \pm 0.00$
120	$2.17 \pm 0.03$	$0.42 \pm 0.01$	$0.28 \pm 0.01$	$0.08 \pm 0.01$	$0.02 \pm 0.00$



รูปที่ 3.17 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไฮยาลูโรนิคและน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิค