บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดย *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 ในระดับขวดเขย่า

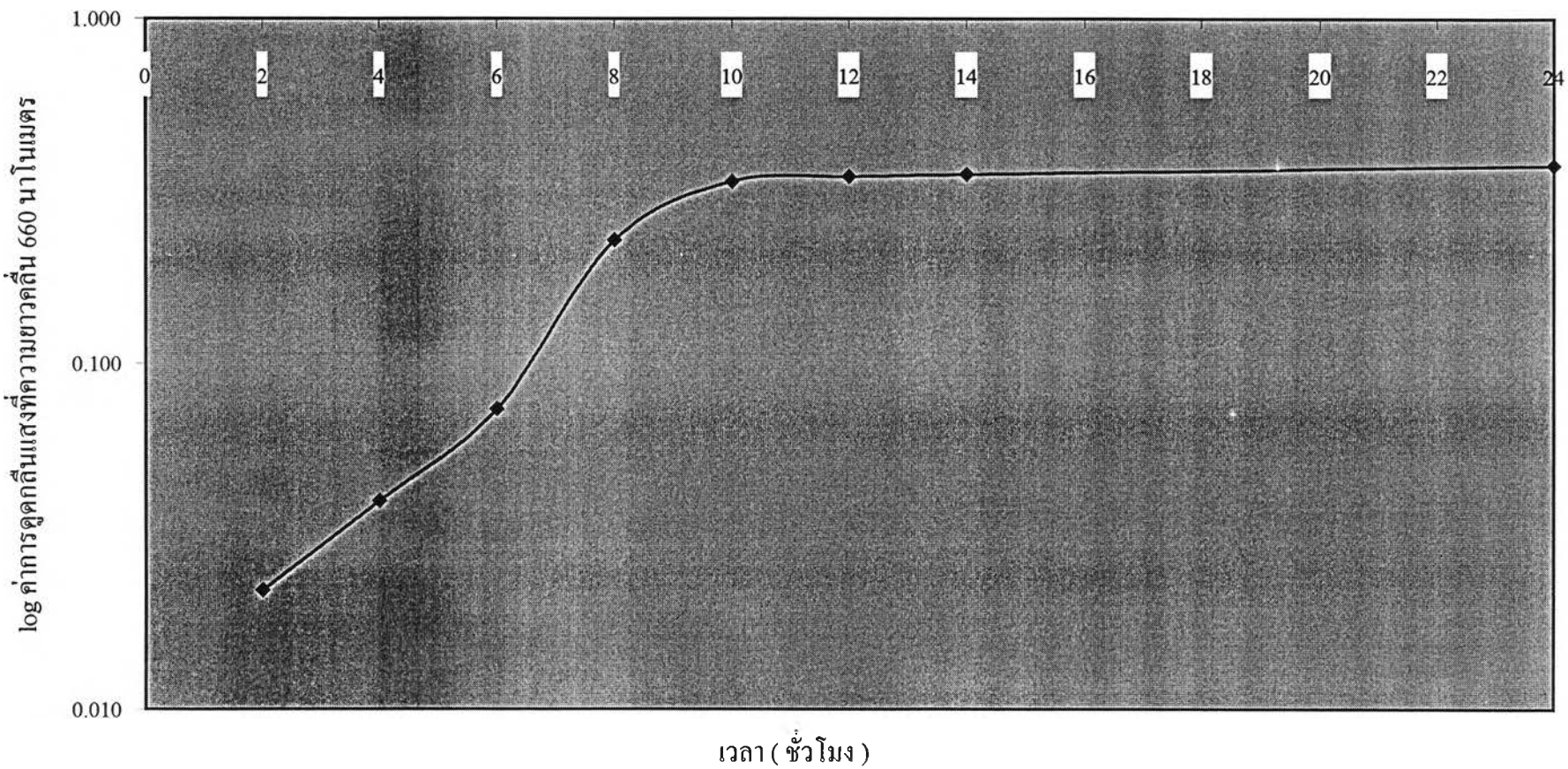
3.1.1 การเจริญของเชื้อ *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 ในอาหารเตรียมหัวเชื้อ

นำ *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 มาเลี้ยงในอาหารเตรียมหัวเชื้อตามวิธีการทดลองในข้อ 2.4.1 และติดตามการเจริญเติบโต โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ที่ระยะเวลาต่างๆ ได้ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3.1 และรูปที่ 3.1 พบว่า การเจริญของ *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 มีระยะทวีคูณ (log phase) อยู่ระหว่างช่วงเวลา 6 ถึง 10 ชั่วโมง ดังนั้น จะทำการทดลองต่อไป โดยแปรอายุของหัวเชื้อตั้งต้นเป็น 7, 8, 9 และ 10 ชั่วโมง เพื่อหาอายุของหัวเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสม สำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับขวดเขย่าและในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ต่อไป

ตารางที่ 3.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ที่ระยะเวลาต่างๆ ของเชื้อ *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7

ชั่วโมง	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร
0	0
2	0.022
4	0.040
6	0.074
8	0.230
10	0.340
12	0.350
14	0.356
24	0.378

รูปที่ 3.1 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อ *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 ในอาหารเหลว BHI ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



3.1.2 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น

จากผลการทดลองในข้อ 3.1.1 ในรูปที่ 3.1 พบว่า การเจริญของเชื้อ *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 มีระยะทวีคูณ (log phase) อยู่ระหว่างช่วงเวลา 6 ถึง 10 ชั่วโมง จึงทำการทดลอง หาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น สำหรับใช้ในการหมักเพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิก โดยทำตามวิธีการทดลองในข้อ 2.4.1 และ 2.4.2 โดยแปรอายุของหัวเชื้อตั้งต้นเป็น 7, 8, 9 และ 10 ชั่วโมง จากนั้นทำการหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บสารละลายตัวอย่าง 2 ครั้ง คือ ที่ระยะเวลาการหมัก 36 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาที่ได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงที่สุด (ทรงศักดิ์ พันธุ์วัฒนะสิงห์, 2540) และที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างมา หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.2 พบว่า อายุของหัวเชื้อตั้งต้นเท่ากับ 7 ชั่วโมง จะได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้สูงที่สุด คือ เท่ากับ 555 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 36 ชั่วโมง และเพิ่มเป็น 630 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง ดังนั้น จึงเลือกใช้อายุของหัวเชื้อตั้งต้นเท่ากับ 7 ชั่วโมง สำหรับใช้ในการหมักเพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับขวดเขย่า และในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ต่อไป

3.1.3 การหาความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นที่เหมาะสม สำหรับการผลิตกรดไฮยาลูนิก

จากผลการทดลองในข้อ 3.1.2 ในตารางที่ 3.2 พบว่า อายุของหัวเชื้อตั้งต้นเท่ากับ 7 ชั่วโมง จะได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้สูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้อายุของหัวเชื้อตั้งต้นเท่ากับ 7 ชั่วโมง สำหรับทำการทดลองหาความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นที่เหมาะสม สำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก เนื่องจาก เมื่อพิจารณาแหล่งคาร์บอนคือ ซูโครส ในสูตรอาหาร สำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกที่ปรับปรุงโดย ทรงศักดิ์ พันธุ์วัฒนะสิงห์ ในปี 2540 ซึ่งใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร พบว่าภายหลังการหมักเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก มีปริมาณน้อย เนื่องจากเชื้อสามารถนำน้ำตาลไปใช้ สำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ และการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้หมด จึงทำการทดลองหาความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นที่เหมาะสม สำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับขวดเขย่า เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยทำการทดลองแปรความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเป็น 3, 5, 10, 15 และ 20 กรัมต่อลิตร ทำการทดลองตามวิธีการในข้อ 2.4.1 และ 2.4.2 หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง ได้ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3.3 พบว่า การใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร จะได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้เท่า

กับ 345 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นที่สูงกว่า คือ 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าเท่ากับ 325 และ 365 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร จะได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้สูงกว่า คือ เท่ากับ 395 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่าใกล้เคียงกับ เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร และเมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก พบว่า การใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร จะมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมักน้อย คือ เท่ากับ 0.34 กรัมต่อลิตร และการใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นที่สูงกว่า คือ 5, 10, 15 และ 20 กรัมต่อลิตร จะมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมักเพิ่มมากขึ้น คือ เท่ากับ 1.81, 6.44, 10.31 และ 15.34 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ต่อปริมาณน้ำตาลที่ใช้ (Yp/s) ซึ่งได้เท่ากับ 129, 102, 102, 84 และ 82 mg/g ตามลำดับ จะเห็นว่าการใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร จะให้ประสิทธิภาพการผลิตสูงที่สุด ดังนั้น จะทำการทดลองต่อไป โดยเลือกใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร สำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ต่อไป

ตารางที่ 3.2 เปรียบเทียบ ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ของ *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 โดยใช้อายุหัวเชื้อตั้งต้นเป็น 7, 8, 9 และ 10 ชั่วโมง ที่ระยะเวลาการหมัก 36 และ 48 ชั่วโมง

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	อายุหัวเชื้อตั้งต้น (ชั่วโมง)	flask	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ค่าเฉลี่ยปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก (กรัมต่อลิตร)
36*	7	1	0.45	555	-
		2	0.44		
	8	1	0.44	405	-
		2	0.42		
	9	1	0.48	295	-
		2	0.46		
	10	1	0.54	290	-
		2	0.55		
48	7	1	0.37	630	0.25
		2	0.40		
	8	1	0.37	410	0.36
		2	0.35		
	9	1	0.39	295	0.25
		2	0.38		
	10	1	0.43	320	0.28
		2	0.43		

* ที่ระยะเวลาการหมัก 36 ชั่วโมง ไม่ได้วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก

ตารางที่ 3.3 เปรียบเทียบ ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ของเชื้อ *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเป็น 3, 5, 10, 15 และ 20 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	flask	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ค่าเฉลี่ยปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก (กรัมต่อลิตร)
3	1	0.41	345	0.34
	2	0.46		
	3	0.43		
5	1	0.41	325	1.81
	2	0.46		
	3	0.48		
10	1	0.48	365	6.44
	2	0.46		
	3	0.48		
15	1	0.43	395	10.31
	2	0.46		
	3	0.47		
20	1	0.47	380	15.34
	2	0.47		
	3	0.44		

3.2 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดย *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก

จากผลการทดลองในข้อ 3.1.3 ในตารางที่ 3.3 พบว่า การใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร จะได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ เท่ากับ 345 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง และมีค่าใกล้เคียงกับ การใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นที่สูงกว่าคือ 5, 10, 15 และ 20 กรัมต่อลิตร และเมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก พบว่า ที่ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 3 กรัมต่อลิตร จะมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมักน้อย คือ เท่ากับ 0.34 กรัมต่อลิตร

ดังนั้น จึงเลือกทำการทดลองการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร เพื่อหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก สำหรับใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก ที่จะทำการทดสอบ ซึ่งได้แก่ ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น ในช่วง 10 ถึง 20 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศในช่วง 1.0 ถึง 1.5 vvm ความเร็วรอบในการกวน ในช่วง 300 ถึง 500 รอบต่อนาที การเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก การเติมซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก และการเติมไลโซไซม์ร่วมกับซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก (Johns และคณะ, 1994; Kim และคณะ, 1996 และ Armstrong และ Johns, 1997) และทำการเก็บสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้ไว้ สำหรับการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกต่อไป

3.2.1 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.5 vvm และความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที

ทำการทดลองตามวิธีการในข้อ 2.4.1 และ 2.4.3 โดยมีระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เก็บสารละลายตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ได้ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3.4 และรูปที่ 3.2 พบว่า การใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร จะได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้เท่ากับ 420 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมักเท่ากับ 0.64 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 12 และปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกไม่เพิ่มขึ้นจนสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง และเมื่อเทียบกับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับขวดเขย่า ซึ่งได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้เท่ากับ 345 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 48 จะเห็นได้ว่า การหมักใน

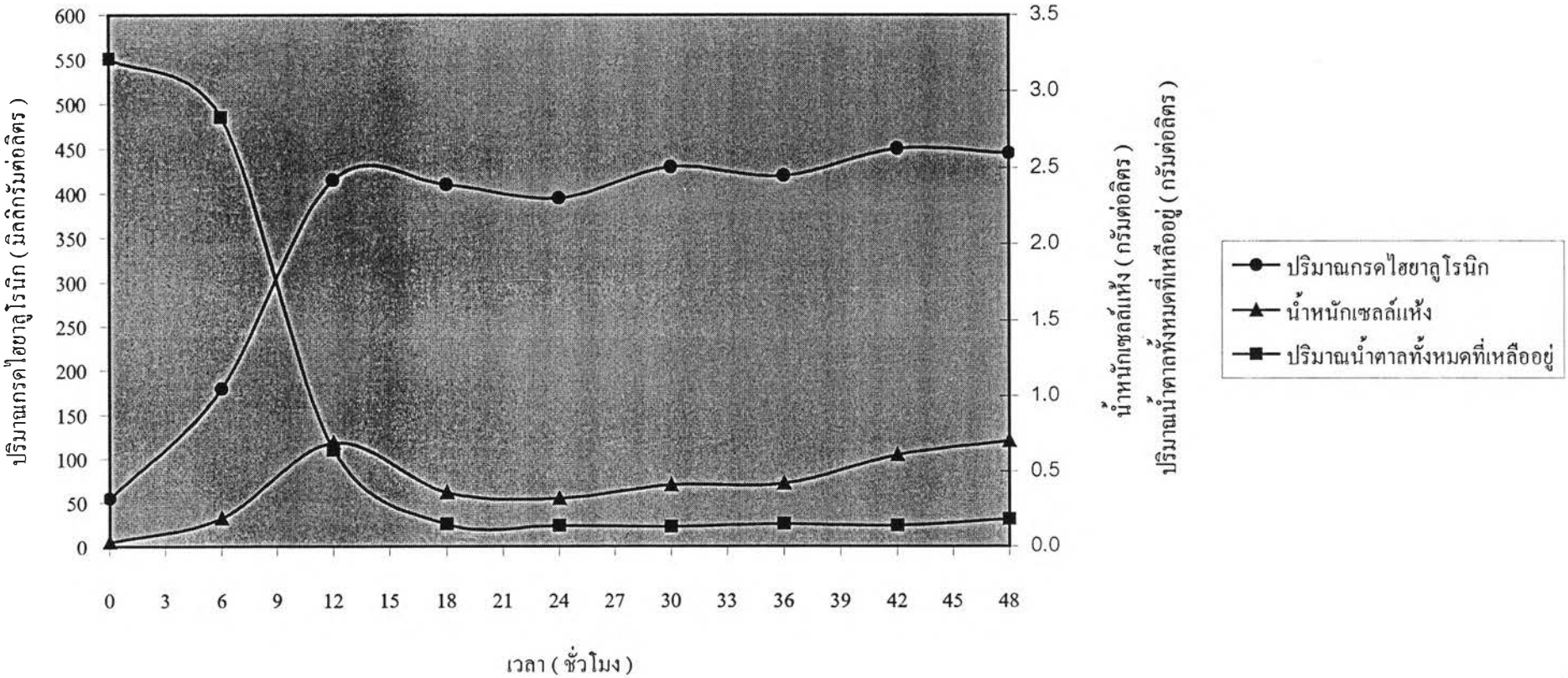
ระดับถังหมักจะได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกมากกว่าการหมักในระดับขวดเขย่า เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 3 กรัมต่อลิตร เท่ากัน เนื่องจากภาวะของการหมักในถังหมักเอื้อต่อการเจริญมากกว่าโดยดูได้จากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่มากกว่าและมีการให้อากาศที่ดีกว่า ทำให้เชื้อสามารถนำน้ำตาลไปใช้ได้หมดเร็วกว่าการหมักในระดับขวดเขย่า และเมื่อพิจารณาประสิทธิภาพในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก (Yp/s) พบว่า การหมักในระดับถังหมัก จุลินทรีย์จะมีประสิทธิภาพในการผลิตสูงกว่าการหมักในระดับขวดเขย่า เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร เท่ากัน โดยจะผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้ 192 mg/g ขณะที่การหมักในระดับขวดเขย่าจะผลิตได้ 129 mg/g เท่านั้น

การทดลองนี้ไม่ได้นำสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้มาหาค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก เนื่องจากกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้มีปริมาณน้อย ดังนั้น ในการทดลองขั้นต่อไป จะทำโดยเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเป็น 10 กรัมต่อลิตร และเพิ่มอัตราการให้อากาศเป็น 1.0 vvm เนื่องจากมีรายงานว่า การเพิ่มอัตราการให้อากาศจะมีผลทำให้ ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกและน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มขึ้น (Johns และคณะ, 1994)

ตารางที่ 3.4 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.5 vvm และความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
0	0.03	55	3.21	6.96
6	0.17	180	2.83	6.96
12	0.70	420	0.64	6.97
18	0.36	410	0.15	6.97
24	0.34	390	0.14	6.97
30	0.41	420	0.13	7.00
36	0.43	420	0.15	7.01
42	0.61	450	0.14	7.07
48	0.69	430	0.18	7.73

รูปที่ 3.2 แสดงการเจริญ และการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อ *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.5 vvm และความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที



3.2.2 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm และความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที

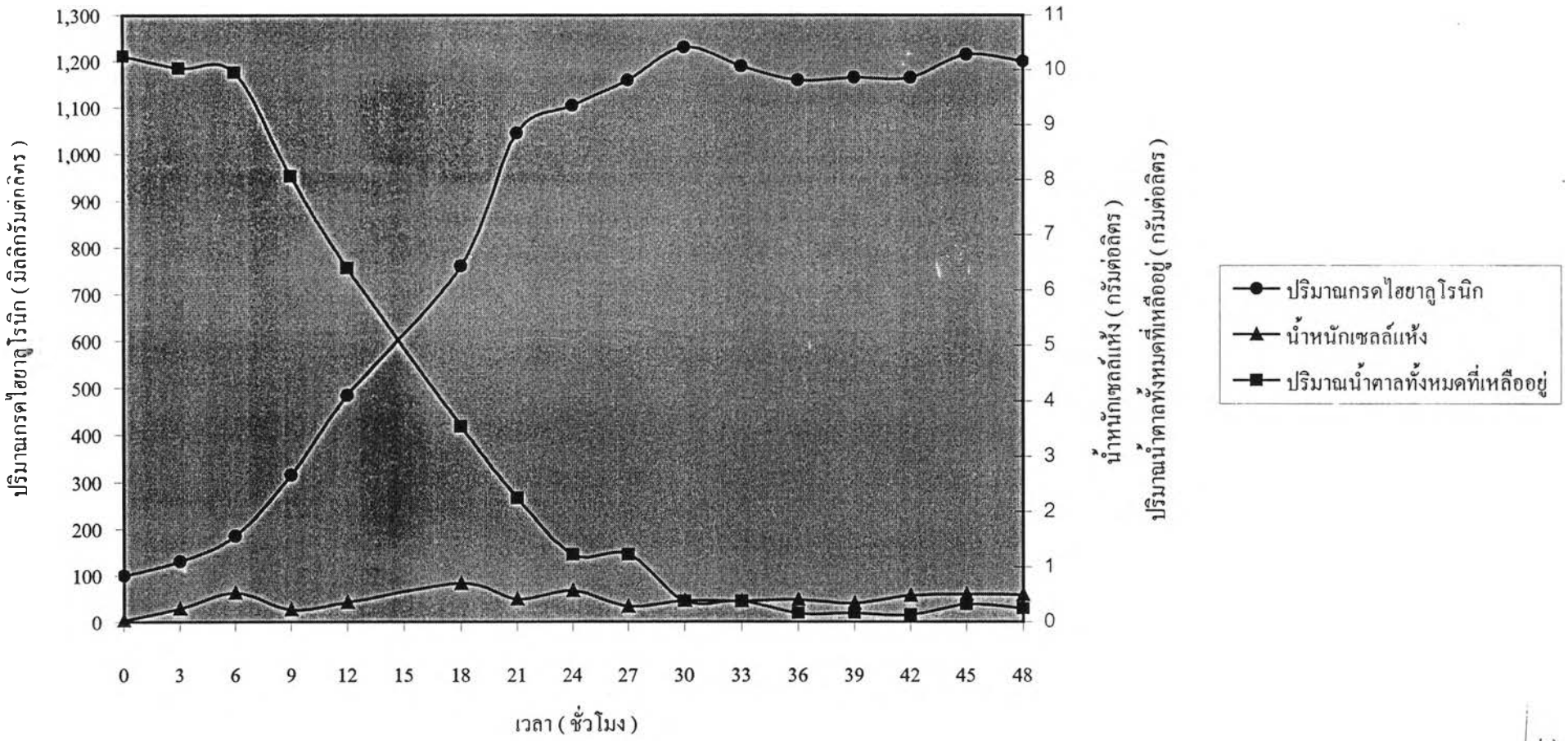
จากผลการทดลองในข้อ 3.2.1 ในรูปที่ 3.2 พบว่า ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตรจะน้อยเกินไป สำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร เนื่องจากสภาวะของการหมักในถังหมักเอื้อต่อการเจริญมากกว่า เชื้อจึงสามารถนำน้ำตาลไปใช้สำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกหมดในช่วงระยะเวลาการหมัก ชั่วโมงที่ 6 ถึง ชั่วโมงที่ 12 ทำให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ ซึ่งเท่ากับ 420 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 12 ไม่เพิ่มขึ้นจนสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง จึงทำการทดลองต่อไป โดยเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นเป็น 10 กรัมต่อลิตร และเพิ่มอัตราการให้อากาศเป็น 1.0 vvm เนื่องจากมีรายงานว่า การเพิ่มอัตราการให้อากาศจะมีผลทำให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มขึ้น (Johns และคณะ, 1994) โดยมีระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เก็บสารละลายตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ได้ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3.5 และรูปที่ 3.3 พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเป็น 10 กรัมต่อลิตร จะได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นเป็น 1,230 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมักเท่ากับ 0.38 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 30 สำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับขวดเขย่าที่ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตรเท่ากัน จะได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกเท่ากับ 365 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 48 และมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก (Yp/s) เท่ากับ 125 และ 102 mg/g ตามลำดับ จะเห็นว่า การหมักในระดับถังหมักจะมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูงกว่าการหมักในระดับขวดเขย่า เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตรเท่ากัน

จากการนำสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้มาหาค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.5.5.1 ได้ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3.6 พบว่า ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จะอยู่ในช่วง 0.72 ถึง 1.55 x 10^6 ดัลตัน

ตารางที่ 3.5 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm และความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
0	0.03	100	10.25	6.96
3	0.25	130	10.03	6.96
6	0.53	185	9.96	6.96
9	0.23	315	8.07	6.96
12	0.36	485	6.40	6.95
18	0.70	760	3.54	6.96
21	0.42	1,045	2.25	6.95
24	0.57	1,105	1.22	6.95
27	0.28	1,160	1.22	6.96
30	0.39	1,230	0.38	6.96
33	0.38	1,190	0.38	6.97
36	0.41	1,160	0.16	6.98
39	0.34	1,165	0.16	6.98
42	0.48	1,165	0.13	6.99
45	0.50	1,215	0.32	6.99
48	0.49	1,200	0.25	7.00

รูปที่ 3.3 แสดงการเจริญ และการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อ *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm และความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที



ตารางที่ 3.6 ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตโดย *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 เมื่อใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm และความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก (ดัลตัน)
18	1.07×10^6
21	1.10×10^6
24	0.72×10^6
27	1.51×10^6
30	0.93×10^6
36	0.93×10^6
42	0.81×10^6
48	1.55×10^6

3.2.3 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm และความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที

จากผลการทดลองในข้อ 3.2.2 ในรูปที่ 3.3 พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเป็น 10 กรัมต่อลิตร จะมีผลทำให้ ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ มีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 1,230 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 30 ในระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง และเชื้อสามารถนำน้ำตาลไปใช้สำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ และการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้หมด ในช่วงระยะเวลาการหมัก ชั่วโมงที่ 27 ถึง ชั่วโมงที่ 30 จึงทำการทดลองต่อไป โดยเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเป็น 15 กรัมต่อลิตร โดยมีระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เก็บสารละลายตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ได้ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3.7 และรูปที่ 3.4 พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเป็น 15 กรัมต่อลิตร จะได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นเป็น 2,225 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมักเท่ากับ 0.06 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 48 และมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก (Yp/s) เท่ากับ 159 mg/g โดยมีค่าสูงกว่าการใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกเท่ากับ 125 mg/g เมื่อนำสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้มาหาค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก

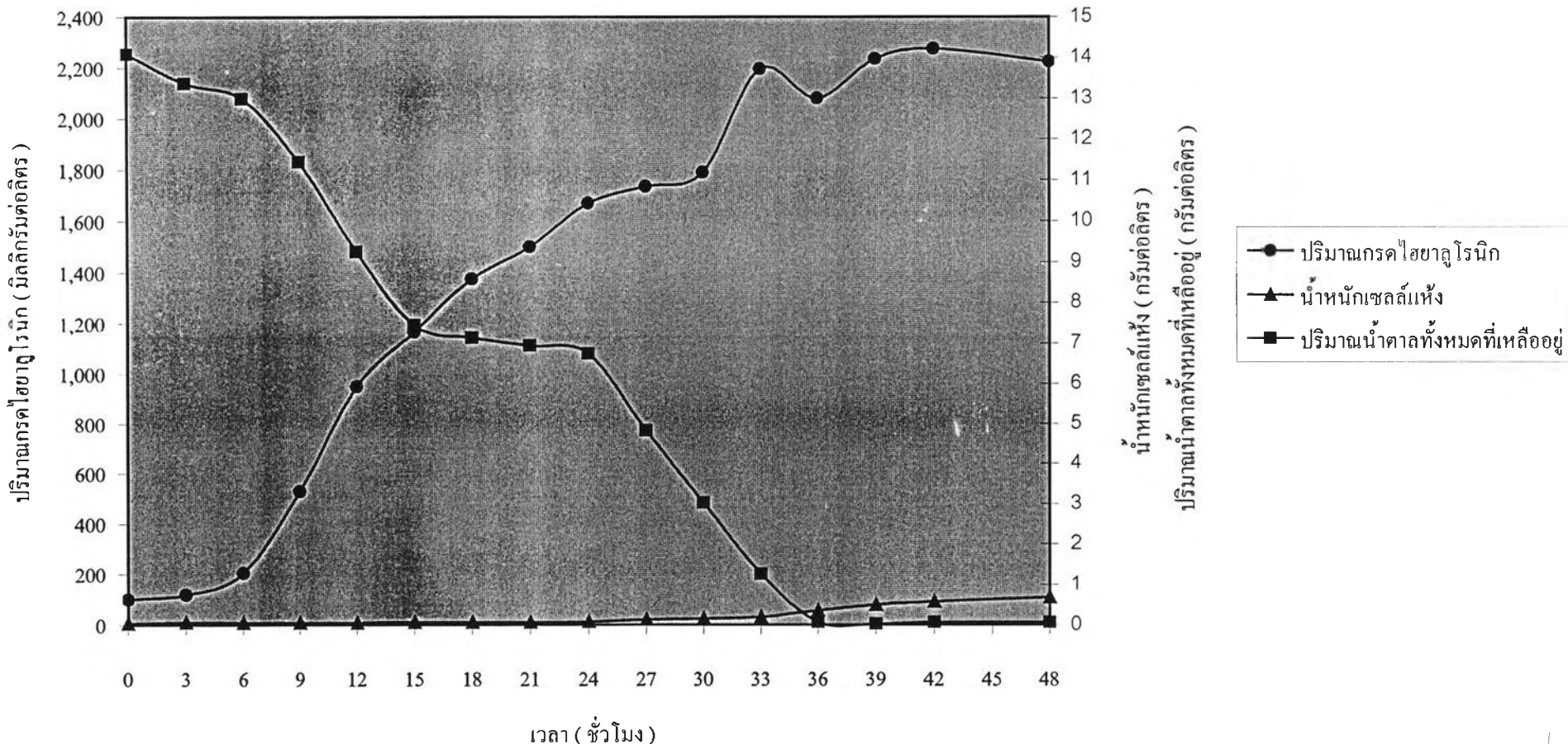
การทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3.8 พบว่า ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จะอยู่ในช่วง 0.78 ถึง 1.44 x 10^6 ดัลตัน

ตารางที่ 3.7 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm และความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
0	0.04	100	14.08	6.98
3	0.06	120	13.37	6.96
6	0.05	205	12.99	6.96
9	0.05	530	11.44	6.96
12	0.05	950	9.26	6.96
15	0.07	1,165	7.46	6.96
18	0.07	1,375	7.14	6.96
21	0.06	1,500	6.94	6.96
24	0.08	1,670	6.75	6.95
27	0.13	1,735	4.82	6.95
30	0.16	1,790	3.02	6.94
33	0.20	2,195	1.25	6.90
36	0.35	2,080	0.06	6.98
39	0.50	2,235	0.03	7.23
42	0.57	2,275	0.06	7.36
48	0.68	2,225	0.06	7.94

I20282679

รูปที่ 3.4 แสดงการเจริญ และการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อ *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm และความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที



ตารางที่ 3.8 ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตโดย *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 เมื่อใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm และความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก (ดัลตัน)
18	0.83×10^6
21	0.81×10^6
24	0.85×10^6
27	1.12×10^6
30	0.87×10^6
36	0.78×10^6
42	0.78×10^6
48	1.44×10^6

3.2.4 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm และความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที

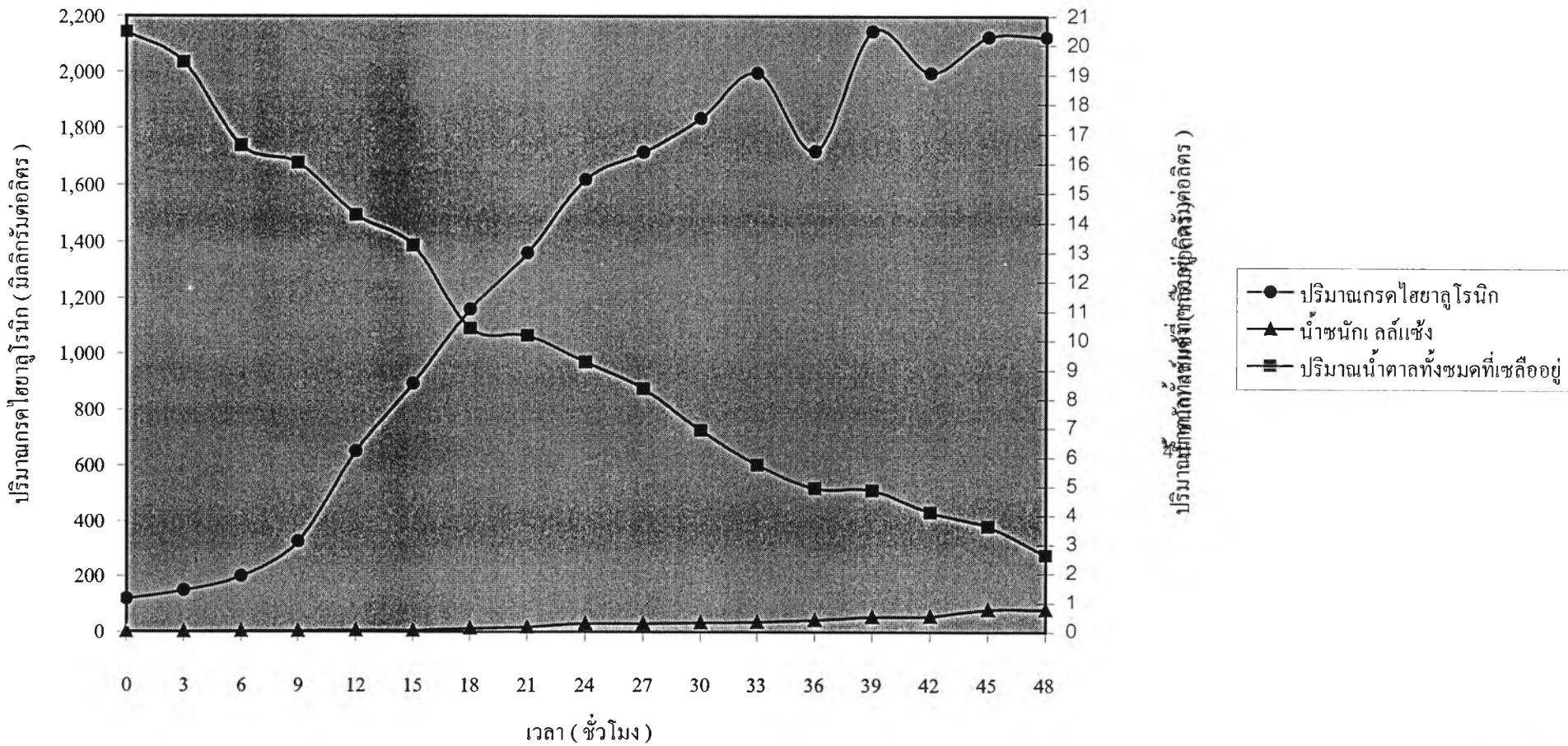
จากผลการทดลองในข้อ 3.2.3 ในรูปที่ 3.4 พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเป็น 15 กรัมต่อลิตร จะมีผลทำให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ มีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 2,225 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 48 ในระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง และเชื้อสามารถนำน้ำตาลไปใช้สำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ และการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้หมด ในช่วงระยะเวลาการหมัก ชั่วโมงที่ 33 ถึง ชั่วโมงที่ 36 จึงทำการทดลองต่อไป โดยเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเป็น 20 กรัมต่อลิตร โดยมีระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เก็บสารละลายตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ได้ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3.9 และรูปที่ 3.5 พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเป็น 20 กรัมต่อลิตร จะได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ ใกล้เคียงกับการใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร คือ มีค่าเท่ากับ 2,125 มิลลิกรัมต่อลิตรและมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมักเท่ากับ 2.64 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 48 และมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก (Yp/s) เท่ากับ 119 mg/g ซึ่งมีค่าต่ำกว่าการใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกเท่ากับ 159 mg/g เมื่อนำสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้ มาหาค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก ได้ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3.10 พบว่า ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกจะอยู่ในช่วง 0.60 ถึง 1.55 x

และจากรูปที่ 3.5 จะเห็นได้ว่า เชื้อไม่สามารถนำน้ำตาลไปใช้ได้หมด โดยมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมักเท่ากับ 2.64 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 48 ดังนั้น จึงทำการทดลองต่อไป โดยเลือกใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร โดยมีความเร็วรอบในการกวนเท่ากับ 300 รอบต่อนาที และเพิ่มอัตราการให้อากาศเป็น 1.5 vvm เนื่องจากมีรายงานว่า การเพิ่มอัตราการให้อากาศจะมีผลทำให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกและน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มขึ้น (Johns และคณะ, 1994)

ตารางที่ 3.9 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm และความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
0	0.02	120	20.44	6.96
3	0.02	150	19.41	6.96
6	0.03	200	16.59	6.96
9	0.03	325	16.01	6.96
12	0.05	650	14.27	6.95
15	0.05	895	13.24	6.95
18	0.12	1,160	10.41	6.95
21	0.17	1,360	10.16	6.95
24	0.28	1,620	9.26	6.95
27	0.29	1,715	8.36	6.95
30	0.33	1,835	6.94	6.95
33	0.35	1,995	5.75	6.96
36	0.42	1,720	4.95	6.96
39	0.53	2,145	4.88	6.96
42	0.54	1,995	4.11	6.96
45	0.77	2,125	3.63	6.95
48	0.77	2,125	2.64	6.96

รูปที่ 3.5 แสดงการเจริญ และการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อ *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm และความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที



ตารางที่ 3.10 ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตโดย *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 เมื่อใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm และความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก (ดัลตัน)
18	0.91×10^6
21	1.00×10^6
24	0.60×10^6
27	0.74×10^6
30	1.07×10^6
36	1.10×10^6
42	0.81×10^6
48	1.55×10^6

จากการเปรียบเทียบผลการทดลองในข้อ 3.2.2, 3.2.3 และ 3.2.4 พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นจาก 10 กรัมต่อลิตร เป็น 15 กรัมต่อลิตร จะมีผลทำให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้มี ปริมาณเพิ่มขึ้นจาก 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น 2,225 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 48 ส่วนการใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร จะได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ใกล้เคียงกับการใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร คือ มีค่าเท่ากับ 2,125 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 48 เนื่องจากการเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น จะเป็นการเพิ่มสารอาหารแหล่งคาร์บอนซึ่งจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ และการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก ดังนั้นเมื่อมีสารอาหารเพิ่มมากขึ้น เชื้อจึงสามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้ในปริมาณที่เพิ่มขึ้น ดังผลการทดลองในข้อ 3.2.2 และ 3.2.3 และจากผลการทดลองในข้อ 3.2.4 จะเห็นว่าการเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นจาก 15 กรัมต่อลิตร เป็น 20 กรัมต่อลิตร จะได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน เนื่องจากการใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นที่สูง คือ เท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร จะทำให้เชื้อเจริญเติบโตได้ช้า เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นที่ต่ำกว่า โดยสังเกตได้จากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ชั่วโมงแรกๆ ของการหมักจะน้อยกว่า และยังมีปริมาณน้ำตาลเหลืออยู่เล็กน้อยเมื่อสิ้นสุดการหมัก และเมื่อเปรียบเทียบค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.2.2 , 3.2.3 และ 3.2.4 พบว่า มีค่าใกล้เคียงกัน คือ มีค่าน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 0.72 ถึง 1.55×10^6,

0.78 ถึง 1.44 x 10^6 และ 0.60 ถึง 1.55 x 10^6 ดัลตัน ดังนั้น การเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นน่าจะไม่มีผลต่อน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก แต่จะมีผลทำให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้มีปริมาณเพิ่มขึ้น เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นที่เหมาะสม

3.2.5 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที

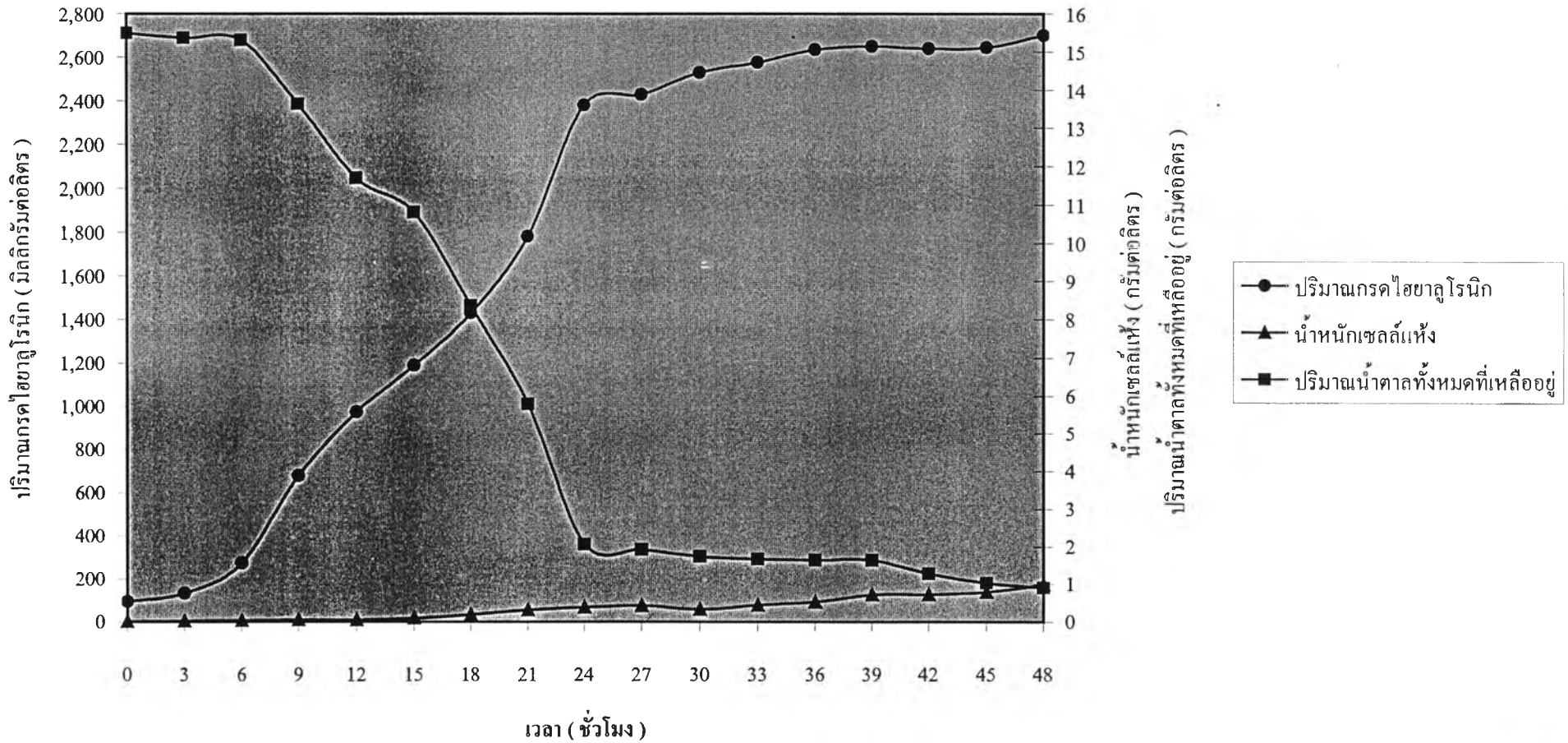
จากผลการทดลองในข้อ 3.2.4 ในรูปที่ 3.5 พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเป็น 20 กรัมต่อลิตร จะไม่มีผลทำให้ ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้มีปริมาณเพิ่มขึ้น แต่จะได้ค่าใกล้เคียงกับ เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเป็น 15 กรัมต่อลิตร และเชื้อไม่สามารถนำน้ำตาลไปใช้ สำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ และการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้หมด ดังนั้น จึงทำการทดลองต่อไป โดยเลือกใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร และเพิ่มอัตราการให้อากาศเป็น 1.5 vvm เนื่องจากมีรายงานว่า การเพิ่มอัตราการให้อากาศ จะมีผลทำให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มขึ้น(Johns และคณะ, 1994) โดยมีระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เก็บสารละลายตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.11 และรูปที่ 3.6 พบว่า การเพิ่มอัตราการให้อากาศเป็น 1.5 vvm จะได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นเป็น 2,700 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมักเท่ากับ 0.90 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 48 และมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก (Yp/s) เท่ากับ 185 mg/g โดยมีค่าสูงกว่าการใช้อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm ซึ่งมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกเท่ากับ 159 mg/g

เมื่อนำสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้มาหาค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก ได้ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3.12 พบว่า ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จะอยู่ในช่วง 0.81 ถึง 1.95 x 10^6 ดัลตัน และจะทำการทดลองต่อไป โดยใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และเพิ่มความเร็วรอบในการกวนเป็น 400 รอบต่อนาที เนื่องจากมีรายงานว่า การเพิ่มความเร็วรอบในการกวน จะมีผลทำให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มขึ้น (Johns และคณะ, 1994)

ตารางที่ 3.11 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
0	0.02	95	15.49	6.97
3	0.03	135	15.36	6.95
6	0.04	275	15.30	6.95
9	0.05	680	13.63	6.95
12	0.05	975	11.70	6.94
15	0.10	1,190	10.80	6.94
18	0.20	1,430	8.36	6.94
21	0.32	1,780	5.78	6.95
24	0.39	2,380	2.06	6.87
27	0.43	2,430	1.93	7.32
30	0.33	2,530	1.74	7.66
33	0.45	2,575	1.67	7.73
36	0.53	2,635	1.64	7.78
39	0.72	2,650	1.64	7.80
42	0.73	2,640	1.28	7.86
45	0.79	2,645	1.03	7.86
48	0.99	2,700	0.90	7.91

รูปที่ 3.6 แสดงการเจริญ และการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อ *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที



ตารางที่ 3.12 ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตโดย *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 เมื่อใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก (ดัลตัน)
15	1.38×10^6
18	1.38×10^6
21	0.91×10^6
27	0.81×10^6
30	1.95×10^6
36	0.85×10^6
42	1.58×10^6
48	1.74×10^6

จากการเปรียบเทียบผลการทดลองในข้อ 3.2.3 และ 3.2.5 พบว่า การเพิ่มอัตราการให้อากาศจาก 1.0 vvm เป็น 1.5 vvm จะมีผลทำให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ มีปริมาณเพิ่มขึ้นจาก 2,225 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น 2,700 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 48 เนื่องจากการเพิ่มอัตราการให้อากาศ จะเป็นการให้ออกซิเจนในปริมาณมากแก่แบคทีเรีย ซึ่งจะทำให้แบคทีเรียมีการสร้างกรดไฮยาลูโรนิกที่เป็นแคปซูลเพิ่มขึ้น เพื่อป้องกันอันตราย และความเป็นพิษจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เซลล์สร้างขึ้นจากออกซิเจน (Cleary และ Larkin, 1979) นอกจากนี้ Johns และคณะ ในปี 1994 ได้รายงานว่า การเพิ่มอัตราการให้อากาศจะมีผลทำให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มขึ้น ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.2.3 และ 3.2.5 พบว่า การใช้อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm จะได้กรดไฮยาลูโรนิกที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 0.78 ถึง 1.44×10^6 ดัลตัน ซึ่งมีค่าต่ำกว่าเล็กน้อย เมื่อเทียบกับการใช้อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm ซึ่งได้กรดไฮยาลูโรนิกที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 0.81 ถึง 1.95×10^6 ดัลตัน ดังนั้น การเพิ่มอัตราการให้อากาศน่าจะมีผลทำให้การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกและน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มขึ้น

3.2.6 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวนเป็น 400 รอบต่อนาที

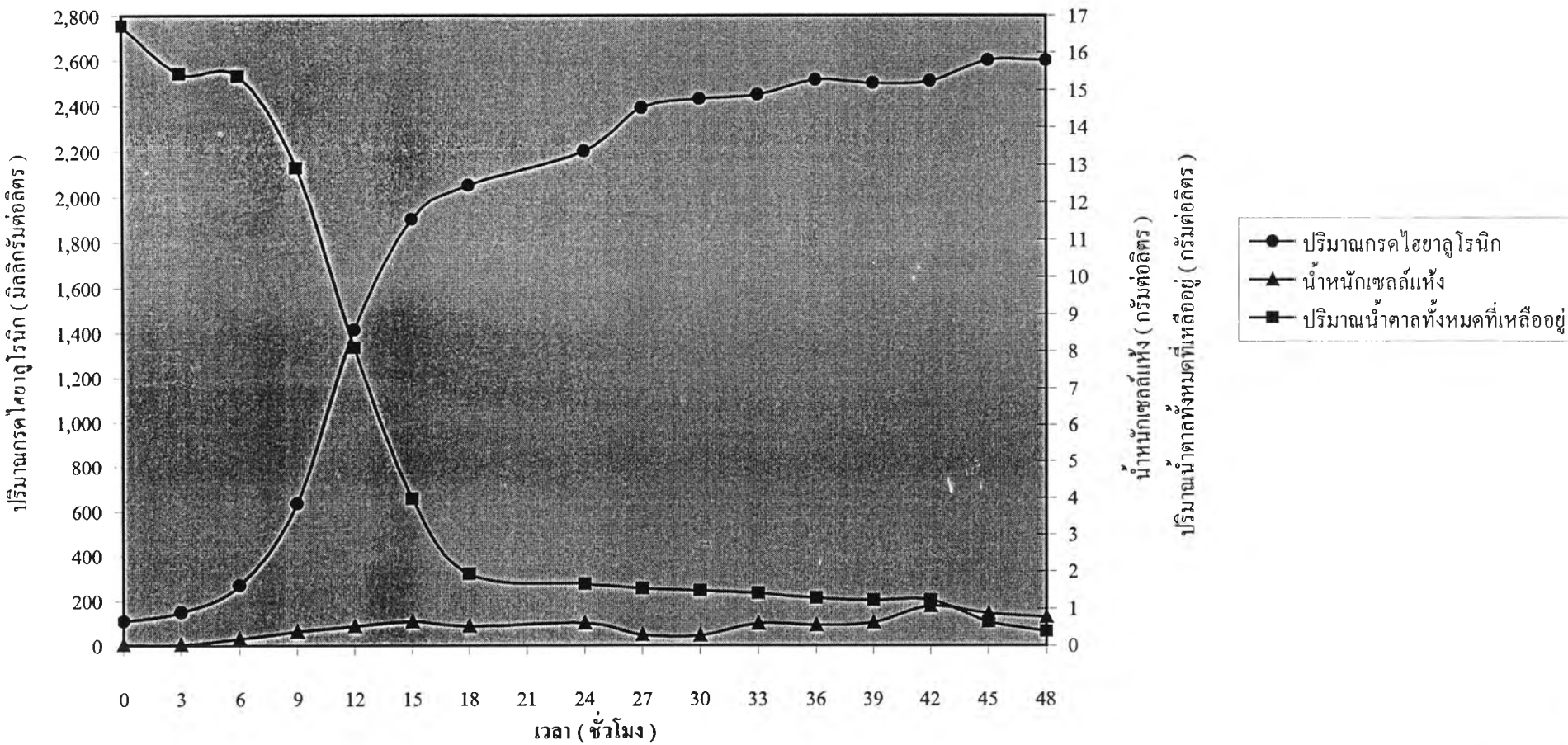
จากผลการทดลองในข้อ 3.2.5 ในรูปที่ 3.6 พบว่า การเพิ่มอัตราการให้อากาศเป็น 1.5 vvm จะมีผลทำให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ มีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 2,700 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 48 ในระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง จึงทำการทดลองต่อไป โดยเลือกใช้ ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร โดยมีอัตราการให้อากาศเป็น 1.5 vvm และเพิ่มความเร็วรอบในการกวนเป็น 400 รอบต่อนาที เนื่องจากมีรายงานว่า การเพิ่มความเร็วรอบในการกวน จะสามารถทำให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มขึ้น (Johns และคณะ, 1994) โดยมีระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เก็บสารละลายตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ได้ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3.13 และรูปที่ 3.7 พบว่า การเพิ่มความเร็วรอบในการกวนเป็น 400 รอบต่อนาที จะได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ ใกล้เคียงกับเมื่อใช้ความเร็วรอบในการกวนเท่ากับ 300 รอบต่อนาที คือ มีค่าเท่ากับ 2,600 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมักเท่ากับ 0.38 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 48 และมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก (Yp/s) เท่ากับ 159 mg/g โดยมีค่าต่ำกว่าการใช้ความเร็วรอบในการกวนเท่ากับ 300 รอบต่อนาที ซึ่งมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกเท่ากับ 185 mg/g

เมื่อนำสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้ มาหาค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก ได้ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3.14 พบว่า ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จะอยู่ในช่วง 1.00 ถึง 2.34 x 10^6 ดัลตัน และจะทำการทดลองต่อไป โดยใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และเพิ่มความเร็วรอบในการกวนเป็น 500 รอบต่อนาที

ตารางที่ 3.13 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวนเป็น 400 รอบต่อนาที

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
0	0.03	110	16.71	6.96
3	0.03	150	15.43	6.96
6	0.18	270	15.36	6.96
9	0.39	635	12.92	6.96
12	0.52	1,415	8.10	6.86
15	0.66	1,900	3.98	6.88
18	0.53	2,050	1.93	6.97
24	0.61	2,200	1.67	8.23
27	0.29	2,390	1.54	8.58
30	0.27	2,430	1.48	8.74
33	0.60	2,450	1.41	8.82
36	0.55	2,515	1.28	8.82
39	0.62	2,500	1.22	8.82
42	1.07	2,510	1.22	8.84
45	0.87	2,600	0.64	8.89
48	0.77	2,600	0.38	8.92

รูปที่ 3.7 แสดงการเจริญ และการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อ *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวนเป็น 400 รอบต่อนาที



ตารางที่ 3.14 ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตโดย *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 เมื่อใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวนเป็น 400 รอบต่อนาที

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก (ดัลตัน)
12	1.20×10^6
15	2.34×10^6
18	1.66×10^6
24	2.34×10^6
30	1.95×10^6
36	1.00×10^6
42	1.44×10^6
48	1.74×10^6

3.2.7 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวนเป็น 500 รอบต่อนาที

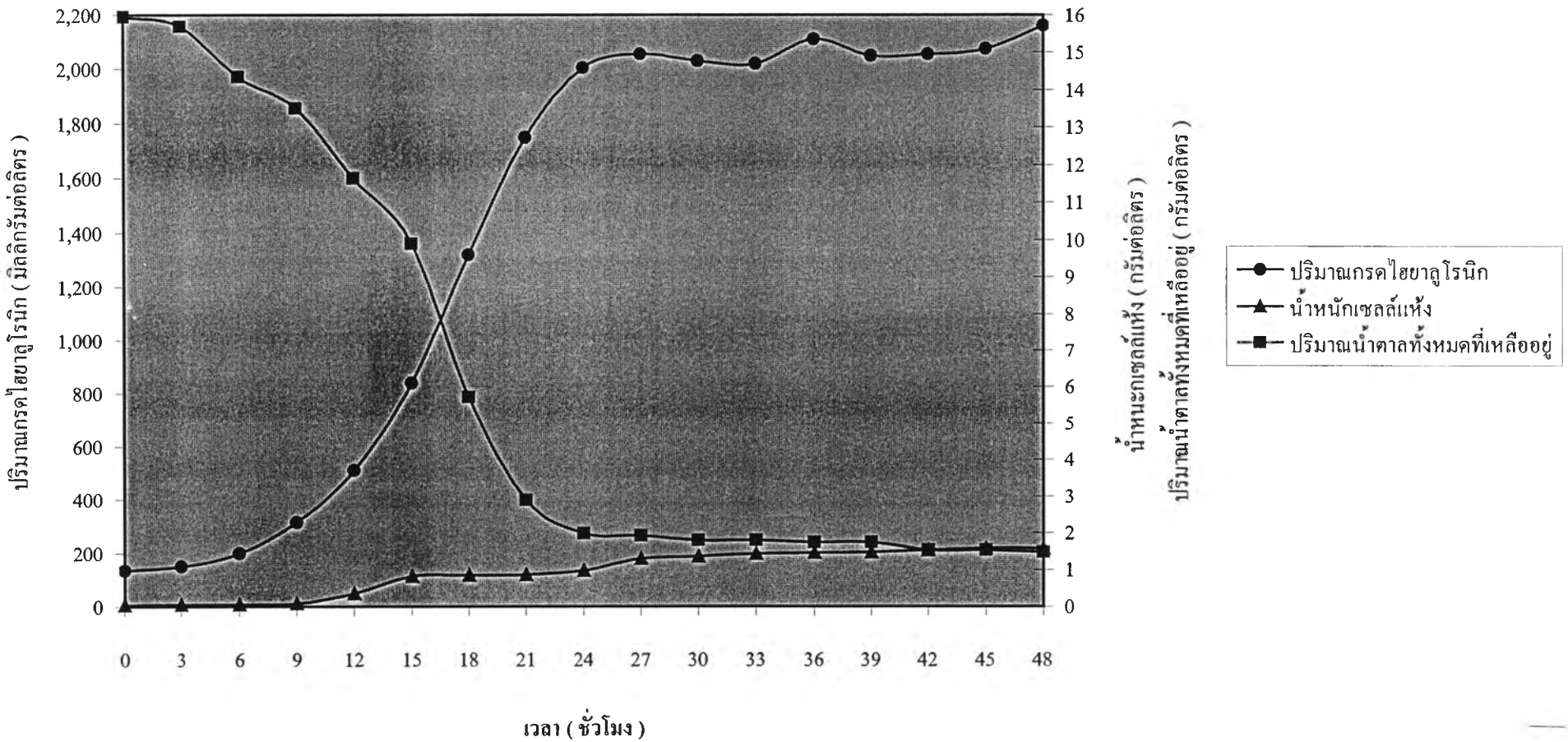
จากผลการทดลองในข้อ 3.2.6 ในรูปที่ 3.7 พบว่า การเพิ่มความเร็วรอบในการกวนเป็น 400 รอบต่อนาที จะไม่มีผลต่อปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ คือ จะได้ค่าใกล้เคียงกับการใช้ความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที แต่จะมีผลทำให้เชื้อมีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้เร็วขึ้น เมื่อเทียบกับการใช้ความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที และเชื้อสามารถนำน้ำตาลไปใช้ สำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ และการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้หมดเร็วกว่า คือ ในช่วงระยะเวลาการหมัก ชั่วโมงที่ 15 ถึง ชั่วโมงที่ 18 เมื่อเปรียบเทียบกับ การใช้ความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที น้ำตาลจะถูกใช้หมด ในช่วงระยะเวลาการหมัก ชั่วโมงที่ 24 ถึง ชั่วโมงที่ 27 จึงทำการทดลองต่อไป โดยเพิ่มความเร็วรอบในการกวนเป็น 500 รอบต่อนาที โดยมีระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เก็บสารละลายตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ได้ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3.15 และรูปที่ 3.8 พบว่า การเพิ่มความเร็วรอบในการกวนเป็น 500 รอบต่อนาที จะไม่มีผลทำให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้มีปริมาณเพิ่มขึ้น คือ มีค่าเท่ากับ 2,160 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมักเท่ากับ 1.48 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 48 และมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก (Yp/s) เท่ากับ 149 mg/g โดยมีค่าต่ำกว่าการใช้ความเร็วรอบในการกวนเท่ากับ 300 และ 400 รอบต่อนาที ซึ่งมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกเท่ากับ 185 และ 159 mg/g

เมื่อนำสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้มาหาค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก ได้ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3.16 พบว่า ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จะอยู่ในช่วง 0.76 ถึง 1.82 x 10^6 ดัลตัน และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ กับการใช้ความเร็วรอบในการกวนที่ต่ำกว่า คือ 300 รอบต่อนาที ซึ่งได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้มากกว่า คือ เท่ากับ 2,700 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้น จึงเลือกใช้สภาวะในการหมัก โดยใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที สำหรับทำการทดสอบผลของไลโซไซม์ต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ต่อไป

ตารางที่ 3.15 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวนเป็น 500 รอบต่อนาที

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
0	0.04	135	15.94	6.96
3	0.05	150	15.69	6.96
6	0.06	200	14.34	6.96
9	0.09	315	13.50	6.96
12	0.36	510	11.64	6.88
15	0.83	840	9.90	6.87
18	0.85	1,320	5.72	6.87
21	0.87	1,750	2.89	6.90
24	0.98	2,005	1.99	6.98
27	1.31	2,055	1.93	7.72
30	1.36	2,030	1.80	8.21
33	1.43	2,020	1.80	8.46
36	1.46	2,110	1.74	8.63
39	1.48	2,050	1.74	8.72
42	1.54	2,055	1.54	8.83
45	1.59	2,075	1.54	8.89
48	1.58	2,160	1.48	8.92

รูปที่ 3.8 แสดงการเจริญ และการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อ *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวนเป็น 500 รอบต่อนาที



ตารางที่ 3.16 ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตโดย *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 เมื่อใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวนเป็น 500 รอบต่อนาที

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก (ดัลตัน)
15	1.35×10^6
18	0.81×10^6
21	0.76×10^6
30	0.87×10^6
36	0.81×10^6
42	1.20×10^6
48	1.82×10^6

จากการเปรียบเทียบผลการทดลองในข้อ 3.2.5, 3.2.6 และ 3.2.7 พบว่า การเพิ่มความเร็วรอบในการกวนจาก 300 รอบต่อนาที เป็น 400 รอบต่อนาที จะได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน คือเท่ากับ 2,700 และ 2,600 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 48 ตามลำดับ และการใช้ความเร็วรอบในการกวนเท่ากับ 500 รอบต่อนาที จะได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ในปริมาณที่ต่ำกว่า คือ มีค่าเท่ากับ 2,160 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 48 เนื่องจากการใช้ความเร็วรอบในการกวนเท่ากับ 500 รอบต่อนาทีอาจจะไม่เหมาะสม คือ มีการกวนที่สูงเกินไปสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดยการหมักด้วยแบคทีเรีย หรืออาจจะมีกรดไฮยาลูโรนิกติดไปกับเซลล์ในขั้นตอนการปั่นเอาเซลล์ออก จึงทำให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงผิดปกติในขณะที่ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกน้อย และเมื่อเปรียบเทียบค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.2.5, 3.2.6 และ 3.2.7 พบว่า ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกจะอยู่ในช่วง 0.81 ถึง 1.95×10^6, 1.00 ถึง 2.34×10^6 และ 0.76 ถึง 1.82×10^6 ดัลตัน ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองที่ได้ไม่สามารถยืนยันได้ว่า ความเร็วรอบในการกวนจะมีผลต่อน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกหรือไม่ ดังนั้น จึงสรุปว่า ความเร็วรอบในการกวนน่าจะไม่มีผลต่อน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก

3.2.8 ผลของไลโซไซม์และซูโครสต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

เนื่องจากมีรายงานว่า การเติมไลโซไซม์ร่วมกับกลูโคสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมักที่ความเข้มข้นของไลโซไซม์และกลูโคสที่เหมาะสม จะมีผลทำให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มขึ้น (Kim และคณะ, 1996) โดยในขั้นแรกจะทำการทดลองโดยเติมเฉพาะไลโซไซม์เพียงอย่างเดียวก่อน เพื่อทดสอบผลของไลโซไซม์ต่อน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก จึงทำการทดลอง โดยมีสภาวะในการหมัก คือ ใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm ความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที และมีการเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก 2 ครั้ง ที่ชั่วโมงที่ 3 และ ชั่วโมงที่ 6 ในระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง

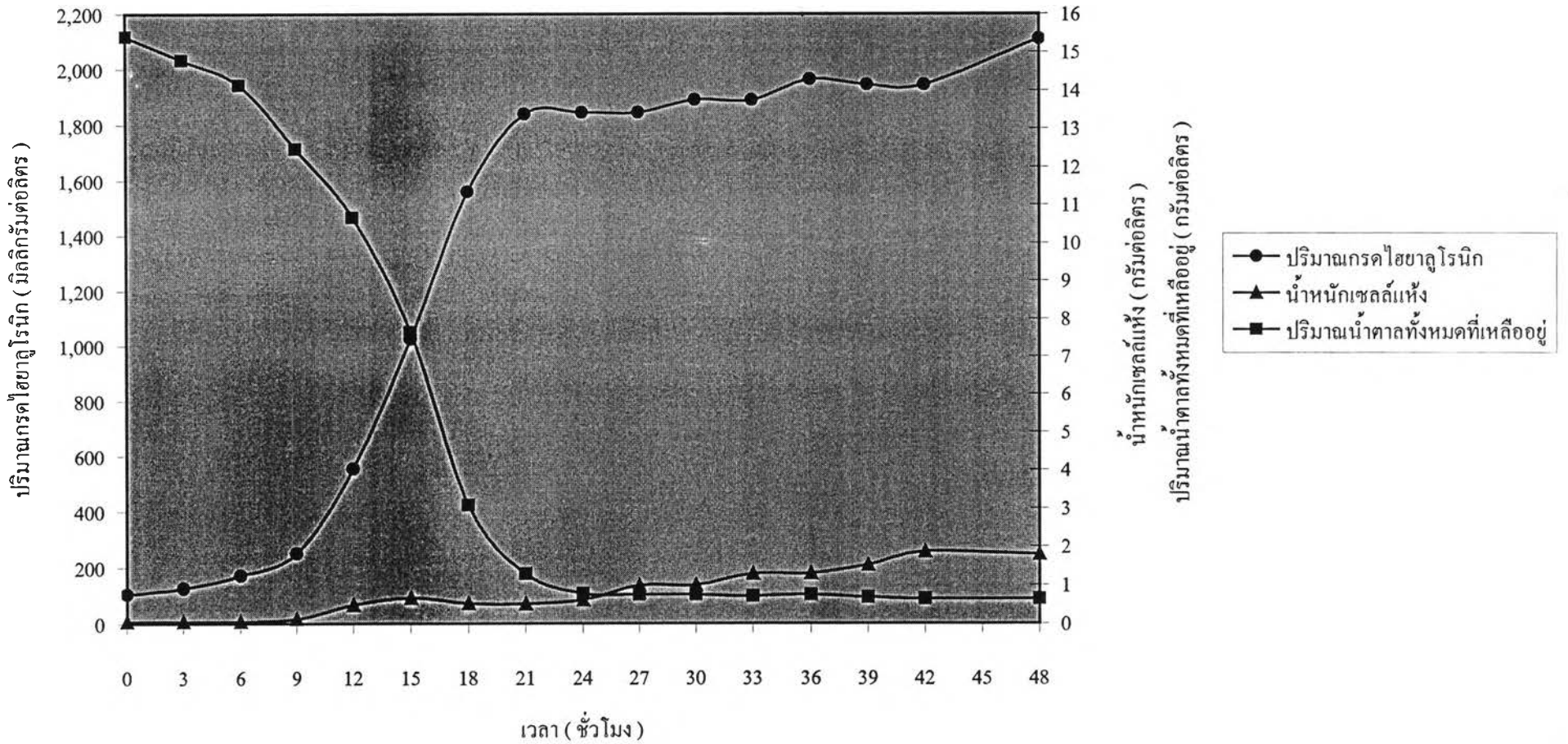
3.2.8.1 การเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 3 และชั่วโมงที่ 6 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 20,000 และ 60,000 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ

ทำการทดลอง โดยมีสภาวะในการหมัก คือ ใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm ความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที และมีการเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 3 และชะชั่วโมงที่ โดยความเข้มข้นของไลโซไซม์ที่เติมนั้นทำตามรายงานของ Kim และคณะ (1996) คือเท่ากับ 20,000 และ 60,000 ยูนิตต่อลิตร (อาหารเลี้ยงเชื้อ) ตามลำดับ มีระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เก็บสารละลายตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ได้ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3.17 และรูปที่ 3.9 พบว่า การเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 3 และชั่วโมงที่ 6 ของระยะเวลาการหมัก โดยใช้ความเข้มข้นของไลโซไซม์ที่เติมเท่ากับ 20,000 และ 60,000 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ จะได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้เท่ากับ 2,110 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมักน้อย คือเท่ากับ 0.64 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 48 โดยปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้มีค่าน้อยกว่าปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการหมักในสภาวะเดียวกันแต่ไม่มีการเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2,700 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก (Yp/s) เท่ากับ 143 mg/g โดยมีค่าต่ำกว่าการหมักในภาวะเดียวกันแต่ไม่มีการเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก ซึ่งมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกเท่ากับ 185 mg/g

ตารางที่ 3.17 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm ความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที และมีการเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 3 และชั่วโมงที่ 6 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 20,000 และ 60,000 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
0	0.05	105	15.41	6.96
3	0.05	125	14.79	6.96
6	0.05	170	14.14	6.96
9	0.12	250	12.47	6.94
12	0.48	555	10.67	6.87
15	0.66	1,025	7.65	6.87
18	0.52	1,560	3.08	6.87
21	0.51	1,840	1.28	7.00
24	0.61	1,845	0.77	7.66
27	0.98	1,845	0.74	7.92
30	0.99	1,890	0.74	8.14
33	1.29	1,890	0.71	8.26
36	1.30	1,965	0.74	832
39	1.52	1,945	0.68	8.36
42	1.87	1,945	0.64	8.43
48	1.79	2,110	0.64	8.45

รูปที่ 3.9 แสดงการเจริญ และการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อ *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 เมื่อมีการเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 3 และชั่วโมงที่ 6 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 20,000 และ 60,000 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ



เมื่อนำสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้ มาหาค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก ได้ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3.18 พบว่า ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จะอยู่ในช่วง 0.83 ถึง 2.04 x 10^6 ดัลตัน โดยมีค่าใกล้เคียงกับ ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการหมักในสภาวะเดียวกันแต่ไม่มีการเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 0.81 ถึง 1.95 x 10^6 ดัลตัน และจากรูปที่ 3.9 จะเห็นได้ว่า การเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะมีผลทำให้เชื้อสามารถใช้น้ำตาลได้เร็วขึ้น โดยน้ำตาลจะเริ่มหมดในช่วงระยะเวลาการหมัก ชั่วโมงที่ 21 ถึง ชั่วโมงที่ 24 และจะทำการทดลองต่อไป โดยเพิ่มความเข้มข้นของไลโซไซม์ที่เติมเป็น 200,000 และ 600,000 ยูนิตต่อลิตร โดยเติมที่ชั่วโมงที่ 3 และชั่วโมงที่ 6 เช่นเดียวกัน เนื่องจาก ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้จากการหมักทั้ง 2 ภาวะ (มีและไม่มีการเติมไลโซไซม์) นั้นมีค่าใกล้เคียงกัน จึงทำการเพิ่มความเข้มข้นของไลโซไซม์เป็น 200,000 และ 600,000 ยูนิตต่อลิตร โดยคาดว่าจะทราบถึงผลของไลโซไซม์ที่มีต่อน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกว่าเป็นอย่างไร

ตารางที่ 3.18 ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตโดย *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm ความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที และมีการเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 3 และชั่วโมงที่ 6 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 20,000 และ 60,000 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก (ดัลตัน)
18	1.74 x 10^6
21	0.83 x 10^6
24	1.20 x 10^6
27	1.12 x 10^6
30	1.66 x 10^6
36	2.04 x 10^6
42	0.93 x 10^6
48	1.58 x 10^6

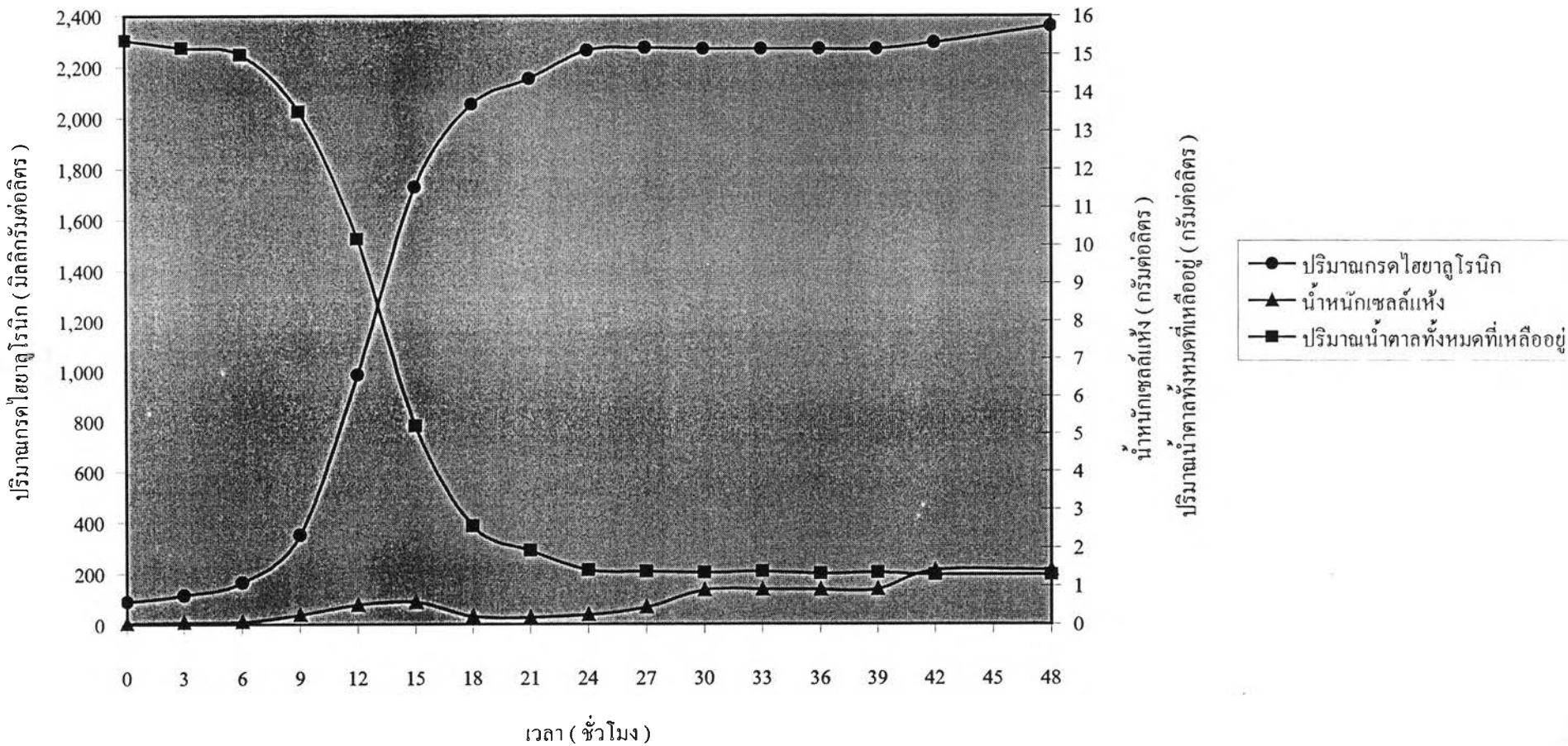
3.2.8.2 การเติมไลโซไซม์ลงในอาหารที่ชั่วโมงที่ 3 และชั่วโมงที่ 6 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 200,000 และ 600,000 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ

จากผลการทดลองในข้อ 3.2.8.1 ในรูปที่ 3.9 พบว่า การเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระยะเวลาการหมัก ชั่วโมงที่ 3 และชั่วโมงที่6 โดยใช้ความเข้มข้นของไลโซไซม์ที่เติมเท่ากับ 20,000 และ 60,000 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ จะมีผลทำให้เชื้อสามารถนำน้ำตาลไปใช้สำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้เร็วขึ้น โดยน้ำตาลจะหมดในช่วงระยะเวลาการหมัก ชั่วโมงที่ 21 ถึง ชั่วโมงที่ 24 เมื่อเทียบกับการหมักในภาวะเดียวกันแต่ไม่มีการเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (การทดลองที่ 3.2.5) แต่ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ จะมีปริมาณน้อยกว่า คือเท่ากับ 2,110 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 48 ของระยะเวลาการหมัก จึงทำการทดลองต่อไป โดยเพิ่มความเข้มข้นของไลโซไซม์ที่เติมเป็น 200,000 และ 600,000 ยูนิตต่อลิตร โดยเติมที่ชั่วโมงที่ 3 และชั่วโมงที่ 6 เช่นเดียวกัน มีระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เก็บสารละลายตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ได้ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3.19 และรูปที่ 3.10 พบว่าการเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 3 และชั่วโมงที่ 6 ของระยะเวลาการหมัก โดยใช้ความเข้มข้นของไลโซไซม์ที่เติมเท่ากับ 200,000 และ 600,000 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ จะได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้เท่ากับ 2,360 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมักเท่ากับ 1.29 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 48 โดยปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้มีค่าน้อยกว่า ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการหมักในสภาวะเดียวกัน แต่ไม่มีการเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2,700 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก (Yp/s) เท่ากับ 168 mg/g โดยมีค่าสูงกว่าการหมักในภาวะเดียวกันแต่มีการเติมไลโซไซม์ที่ชั่วโมงที่ 3 และ 6 (20,000 และ 60,000 ยูนิตต่อลิตร) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 143 mg/g และมีค่าต่ำกว่าการหมักในภาวะเดียวกันแต่ไม่มีการเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก ซึ่งมีค่าเท่ากับ 185 mg/g

ตารางที่ 3.19 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm ความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที และมีการเติมไลโซไซม์ลงในอาหารที่ชั่วโมงที่ 3 และชั่วโมงที่ 6 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 200,000 และ 600,000 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
0	0.03	90	15.36	6.96
3	0.05	115	15.17	6.96
6	0.07	165	14.98	6.96
9	0.25	350	13.50	6.91
12	0.52	985	10.16	6.87
15	0.58	1,730	5.21	6.87
18	0.21	2,055	2.57	6.96
21	0.18	2,155	1.93	7.20
24	0.25	2,265	1.41	7.84
27	0.45	2,275	1.38	8.01
30	0.89	2,270	1.35	8.19
33	0.90	2,270	1.38	8.29
36	0.90	2,270	1.32	8.34
39	0.92	2,270	1.35	8.37
42	1.40	2,295	1.29	8.39
48	1.42	2,360	1.29	8.41

รูปที่ 3.10 แสดงการเจริญ และการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อ *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 เมื่อมีการเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 3 และชั่วโมงที่ 6 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 200,000 และ 600,000 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ



เมื่อนำสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้มาหาค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก ได้ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3.20 พบว่า ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จะอยู่ในช่วง 0.83 ถึง 2.24 x 10^6 ดัลตัน โดยมีค่าสูงกว่า ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการหมักในภาวะเดียวกัน แต่ไม่มีการเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 0.81 ถึง 1.95 x 10^6 ดัลตัน และจากรูปที่ 3.10 จะเห็นได้ว่า การเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะมีผลทำให้เชื้อสามารถใช้น้ำตาลได้เร็วขึ้น และหยุดการใช้น้ำตาลในช่วงระยะเวลาการหมัก ชั่วโมงที่ 18 ถึง ชั่วโมงที่ 21 ดังนั้น จะทำการทดลองต่อไป โดยใช้สภาวะในการหมัก คือ ใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที สำหรับทำการทดสอบการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อมีการเติมซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก เนื่องจาก Kim และคณะ (1996) ได้รายงานว่า การเติมไลโซไซม์ร่วมกับการเติมกลูโคสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก จะมีผลทำให้ปริมาณและน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มขึ้น จึงทำการทดลอง โดยใช้สภาวะในการหมักเดียวกัน แต่มีการเติมซูโครสเพียงอย่างเดียวลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก เพื่อทดสอบผลของการเติมซูโครสเพียงอย่างเดียวที่มีต่อน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก และจะทำการทดลอง โดยใช้สภาวะในการหมักเดียวกัน แต่มีการเติมไลโซไซม์ร่วมกับซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก ในลำดับต่อไป

ตารางที่ 3.20 ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตโดย *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm ความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที และมีการเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 3 และชั่วโมงที่ 6 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 200,000 และ 600,000 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก (ดัลตัน)
15	2.19×10^6
21	1.26×10^6
24	1.44×10^6
27	0.98×10^6
30	2.24×10^6
36	0.83×10^6
42	2.09×10^6
48	2.24×10^6

จากการเปรียบเทียบผลการทดลองในข้อ 3.2.8.1 และ 3.2.8.2 พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของไลโซไซม์ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 3 และชั่วโมงที่ 6 ของระยะเวลาการหมัก จาก 20,000 และ 60,000 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ เป็น 200,000 และ 600,000 ยูนิตต่อลิตร จะได้กรดไฮยาลูโรนิกในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน คือ มีค่าเท่ากับ 2,110 และ 2,360 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 48 และเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักในภาวะเดียวกัน แต่ไม่มีการเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก (การทดลองในข้อ 3.2.5) ซึ่งได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกเท่ากับ 2,700 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 48 พบว่า การเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมักอาจมีผลทำให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ลดลง เนื่องจากไลโซไซม์จะมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์หรือความเข้มข้นของไลโซไซม์ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้ออาจจะไม่เหมาะสม คือ สูงเกินไปจึงทำให้ได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกน้อย และเมื่อพิจารณาค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.2.8.1 และ 3.2.8.2 พบว่า มีค่าใกล้เคียงกัน คือ มีค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกอยู่ในช่วง 0.83 ถึง 2.04×10^6 ดัลตัน และ 0.83 ถึง 2.24×10^6 ดัลตัน ตามลำดับ และมีค่าสูงกว่าค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.2.5 เล็กน้อย ซึ่งมีค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกอยู่ในช่วง 0.81 ถึง 1.95×10^6 ดัลตัน ดังนั้น การเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมักน่าจะมีผลทำให้น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มขึ้น

3.2.8.3 การเติมซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 18 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร

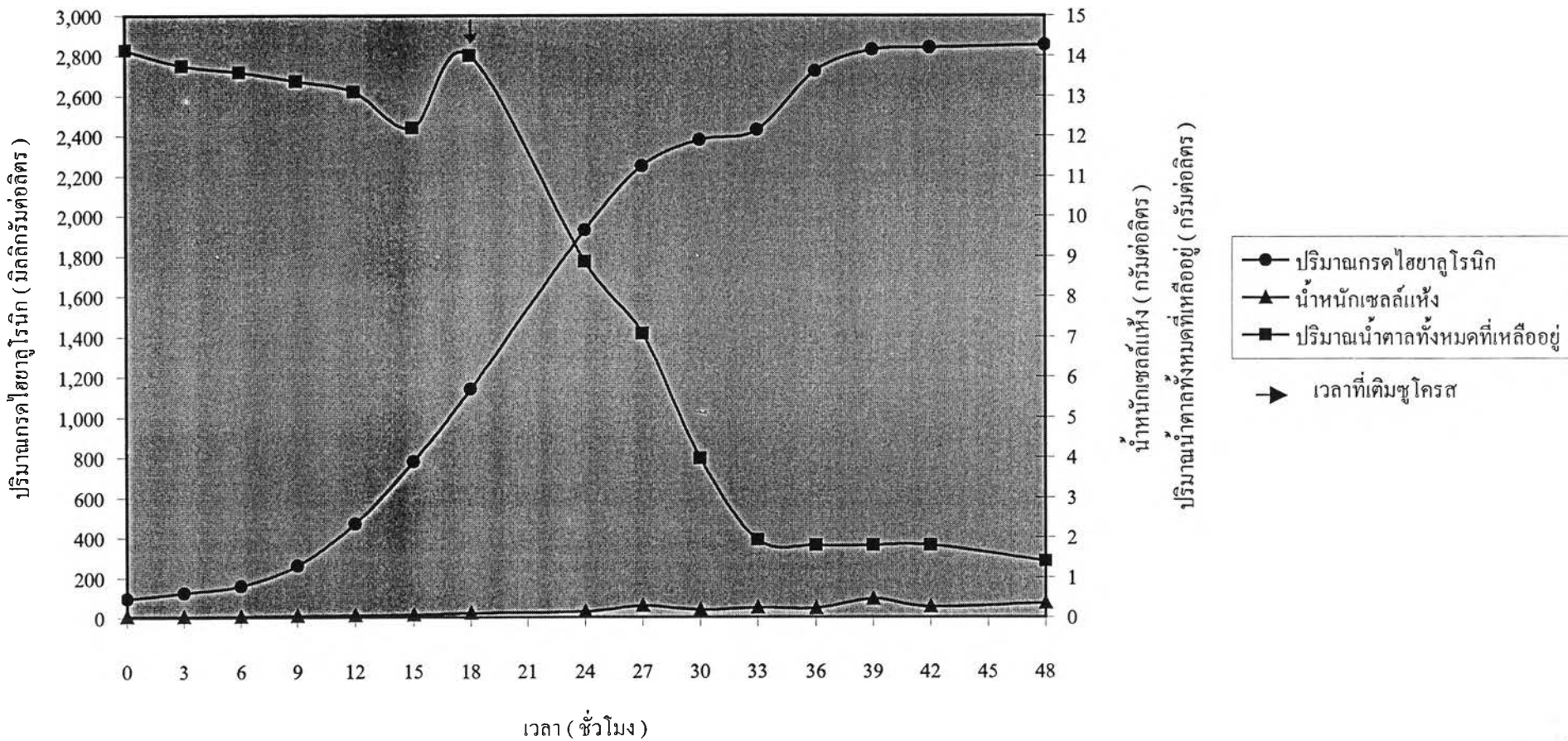
ทำการทดลองโดยมีสภาวะในการหมักคือ ใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm ความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที และมีการเติมซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ชั่วโมงที่ 18 ของระยะเวลาการหมัก เนื่องจากเป็นเวลาที่น้ำตาลเริ่มจะถูกใช้หมด (การทดลองที่ 3.2.8.2) โดยความเข้มข้นของซูโครสที่เติมเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร (อาหารเลี้ยงเชื้อ) มีระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เก็บสารละลายตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ได้ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3.21 และรูปที่ 3.11 พบว่า การเติมซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 18 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร จะได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้เท่ากับ 2,855 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมักเท่ากับ 1.41 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 48 โดยปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้มีค่าใกล้เคียงกับการหมักในภาวะเดียวกัน แต่ไม่มีการเติมซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2,700 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก (Yp/s) เท่ากับ 161 mg/g โดยมีค่าต่ำกว่าการหมักในภาวะเดียวกันแต่ไม่มีการเติมซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก ซึ่งมีค่าเท่ากับ 185 mg/g

เมื่อนำสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้มาหาค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก ได้ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3.22 พบว่า ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จะอยู่ในช่วง 0.83 ถึง 1.58 x 10^6 ดัลตัน โดยมีค่าต่ำกว่า ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการหมักในสภาวะเดียวกัน แต่ไม่มีการเติมซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 0.81 ถึง 1.95 x 10^6 ดัลตัน และจากรูปที่ 3.11 จะเห็นได้ว่า เชื้อมีการใช้น้ำตาลได้ช้า (เปรียบเทียบกับการทดลองที่ 3.2.5) จึงทำการทดสอบความเสถียรของประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 ในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก โดยทำการทดลอง โดยมีสภาวะในการหมักเหมือนกับการทดลองที่ 3.2.5 เพื่อดูว่าการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อยังดีอยู่หรือไม่ และเพื่อยืนยันถึงปริมาณและค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกว่า ได้ค่าใกล้เคียงกับการทดลองที่ 3.2.5 หรือไม่

ตารางที่ 3.21 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm ความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที และมีการเติมซูโครสลงใน อาหารเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 18 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
0	0.03	95	14.14	6.96
3	0.03	125	13.76	6.96
6	0.03	160	13.50	6.96
9	0.04	260	13.37	6.96
12	0.05	470	13.11	6.96
15	0.06	780	12.21	6.96
18	0.10	1,140	14.01	6.87
24	0.14	1,930	8.87	6.87
27	0.29	2,250	7.07	6.87
30	0.18	2,380	3.98	6.87
33	0.24	2,430	1.93	7.02
36	0.22	2,725	1.80	7.37
39	0.47	2,830	1.80	7.77
42	0.26	2,840	1.80	8.03
48	0.36	2,855	1.41	8.39

รูปที่ 3.11 แสดงการเจริญ และการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อ *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 เมื่อมีการเติมซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 18 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร



ตารางที่ 3.22 ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตโดย *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm ความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที และมีการเติมซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 18 ความเข้มข้นเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก (ดัลตัน)
15	0.83×10^6
18	0.96×10^6
24	1.00×10^6
27	1.26×10^6
30	1.20×10^6
36	1.12×10^6
42	1.58×10^6
48	1.20×10^6

3.2.8.4 การทดสอบความเสถียรของประสิทธิภาพของเชื้อ *S. zooepidemicus* UN-7 ในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

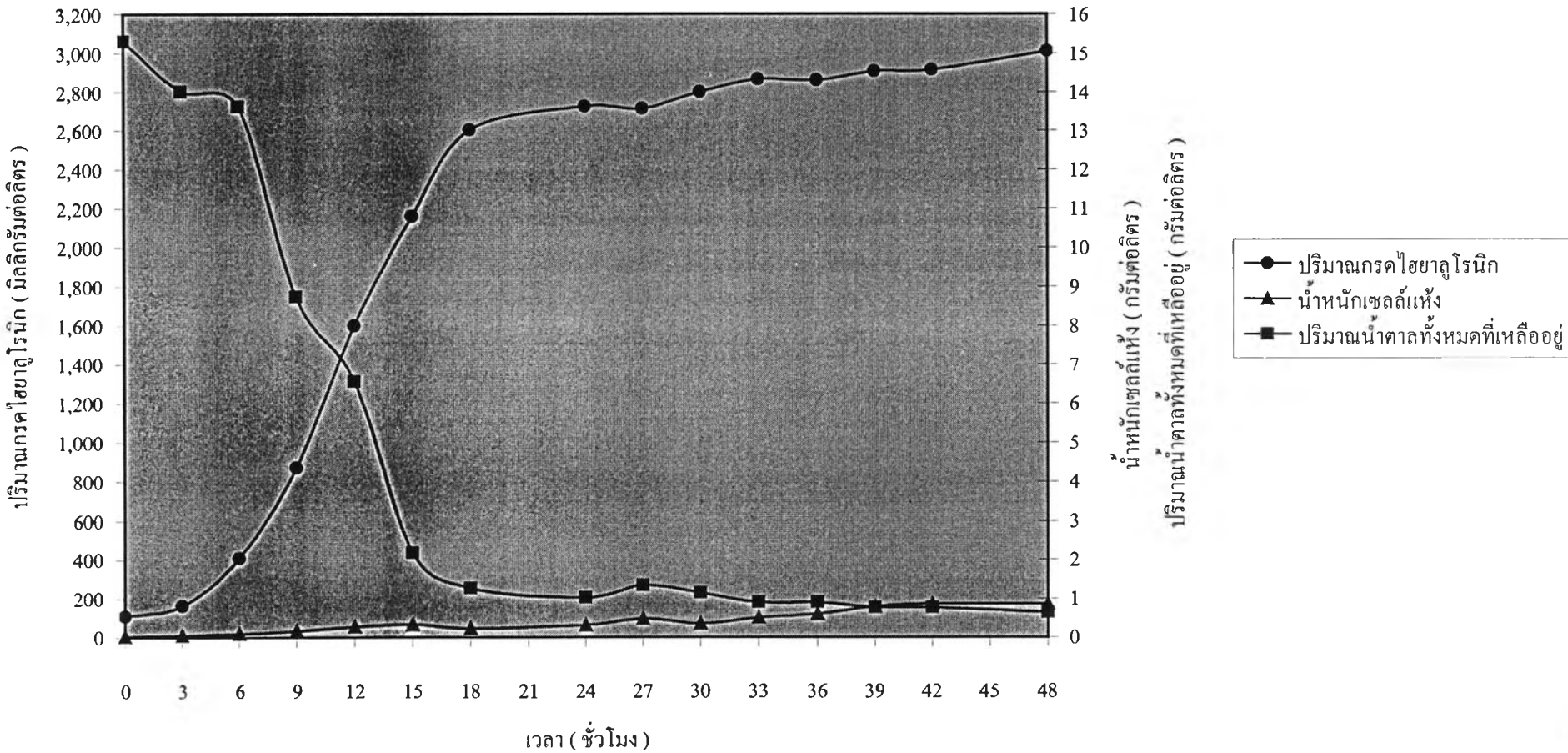
จากผลการทดลองในข้อ 3.2.9.1 ในรูปที่ 3.11 พบว่า การเติมซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 18 ของระยะเวลาการหมัก โดยความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เติมเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร จะมีผลทำให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ มีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 2,855 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 48 ของระยะเวลาการหมัก เมื่อเทียบกับการหมักในสภาวะเดียวกันแต่ไม่มีการเติมซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก แต่เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก พบว่า เชื้อมีการใช้น้ำตาลได้ช้า ดังนั้น จะทำการทดลองต่อไป เพื่อทดสอบความเสถียรของประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 ในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก โดยมีสภาวะในการหมักเหมือนกับการทดลองในข้อ 3.2.5 เพื่อดูว่าการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อยังดีอยู่หรือไม่ และทำการเก็บสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้ไว้ สำหรับการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลต่อไป ได้ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3.23 และรูปที่ 3.12 พบว่า ผลการทดลองที่ได้มีค่าใกล้เคียงกันกับการทดลองในข้อ 3.2.5 คือ จะได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้เท่ากับ 3,010 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมักเท่ากับ 0.64 กรัมต่อลิตร และมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก (Yp/s) เท่ากับ 205 mg/g แสดงว่า ความเสถียรของประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptococcus*

zooepidemicus UN-7 ในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกยังดีอยู่ เมื่อนำสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้มาหาค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก ได้ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3.24 พบว่า ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จะอยู่ในช่วง 1.00 ถึง 1.82×10^6 ดัลตัน และมีค่าใกล้เคียงกับค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.2.5 ซึ่งมีค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกอยู่ในช่วง 0.81 ถึง 1.95×10^6 ดัลตัน และจากรูปที่ 3.12 จะเห็นได้ว่า เชื้อสามารถใช้น้ำตาลได้เร็ว โดยน้ำตาลจะเริ่มหมดในช่วงระยะเวลาการหมัก ชั่วโมงที่ 15 ถึง ชั่วโมงที่ 18 ดังนั้น จะทำการทดลองต่อไปโดยมีการเติมไลโซไซม์ร่วมกับซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก

ตารางที่ 3.23 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก จากการทดสอบความเสถียรของประสิทธิภาพของเชื้อ *S. zooepidemicus* UN-7 ในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดยใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
0	0.03	110	15.30	6.96
3	0.05	165	14.01	6.96
6	0.10	410	13.63	6.96
9	0.17	870	8.74	6.86
12	0.28	1,600	6.56	6.81
15	0.33	2,160	2.18	6.81
18	0.23	2,605	1.28	7.21
24	0.31	2,725	1.03	8.10
27	0.48	2,715	1.35	8.25
30	0.36	2,800	1.16	8.38
33	0.51	2,865	0.90	8.40
36	0.60	2,860	0.90	8.54
39	0.80	2,905	0.77	8.55
42	0.87	2,915	0.77	8.65
48	0.87	3,010	0.64	8.72

รูปที่ 3.12 แสดงการเจริญ และการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก จากการทดสอบความเสถียรของประสิทธิภาพของเชื้อ *S. zooepidemicus* UN-7 โดยใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที



ตารางที่ 3.24 ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก จากการทดสอบความเสถียรของประสิทธิภาพของเชื้อ *S. zooepidemicus* UN-7 ในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก โดยใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก (ดัลตัน)
12	1.82×10^6
15	1.55×10^6
18	1.44×10^6
24	1.17×10^6
27	1.17×10^6
36	1.00×10^6
42	1.17×10^6
48	1.51×10^6

3.2.8.5 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อมีการเติมไลโซไซม์ร่วมกับซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก

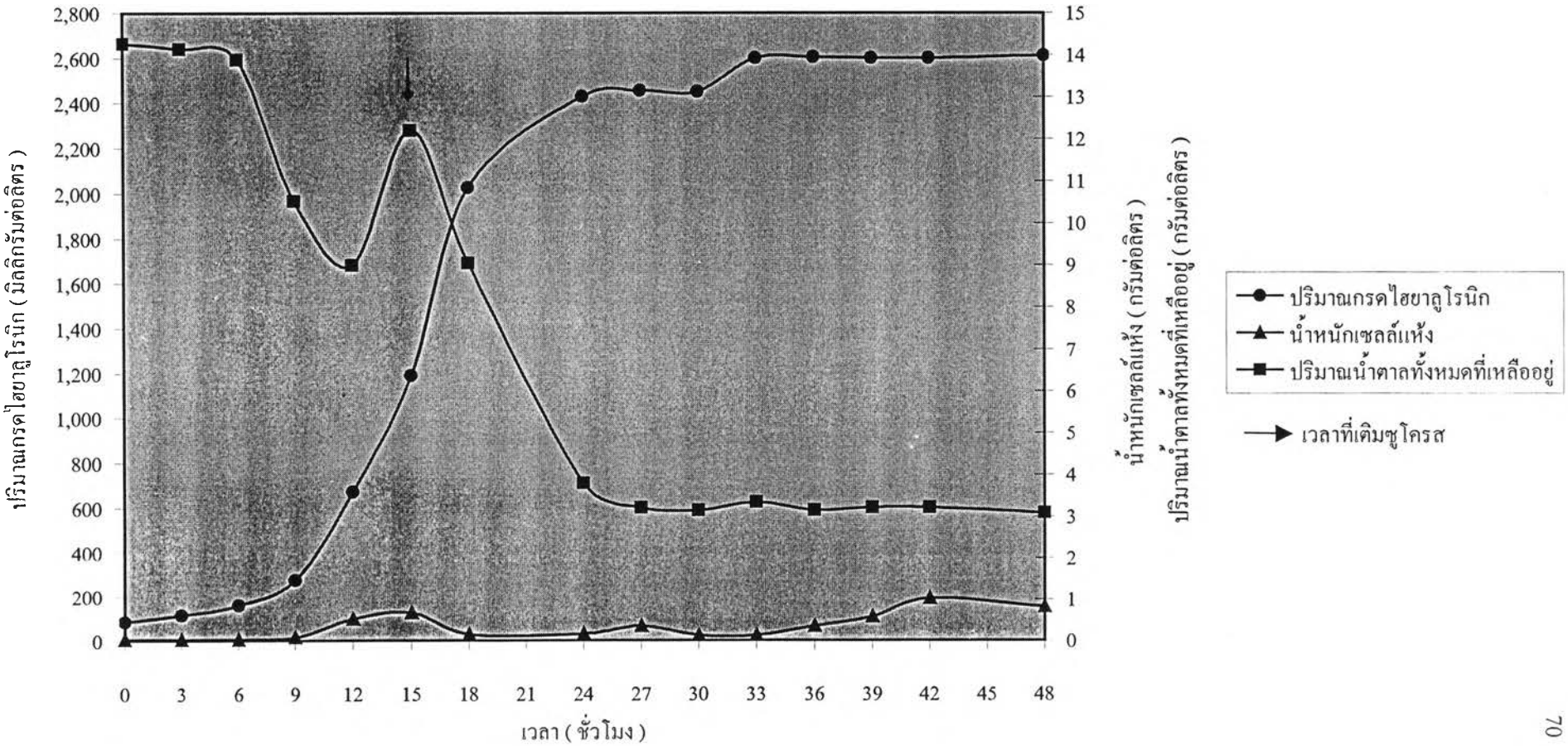
จะทำการทดลองโดยเลือกใช้ การเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 3 และชั่วโมงที่ 6 ของระยะเวลาการหมัก โดยความเข้มข้นของไลโซไซม์ที่เติมเท่ากับ 200,000 และ 600,000 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ (การทดลองที่ 3.2.8.2) และมีการเติมซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 15 ของระยะเวลาการหมัก (การทดลองที่ 3.2.8.4) โดยความเข้มข้นของซูโครสที่เติมเท่ากับ 8 กรัมต่อลิตร มีระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เก็บสารละลายตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ได้ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3.25 และรูปที่ 3.13 พบว่า การเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 3 และชั่วโมงที่ 6 โดยความเข้มข้นของไลโซไซม์ที่เติมเท่ากับ 200,000 และ 600,000 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ และเติมน้ำตาลซูโครสที่ชั่วโมงที่ 15 โดยความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เติมเท่ากับ 8 กรัมต่อลิตร จะได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้ มีปริมาณเท่ากับ 2,610 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมักเท่ากับ 3.08 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 48 โดยปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้มีค่าใกล้เคียงกับการหมักในสภาวะเดียวกัน แต่ไม่มีการเติมไลโซไซม์ร่วมกับซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2,700 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก (Yp/s) เท่ากับ 117 mg/g โดยมีค่าต่ำกว่าการหมักในภาวะเดียวกันแต่ไม่มีการเติมไลโซไซม์ร่วมกับซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการ

หมัก ซึ่งมีค่าเท่ากับ 185 mg/g เมื่อนำสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้มาหาค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก ได้ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3.26 พบว่า ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จะอยู่ในช่วง 1.20 ถึง 2.00 x 10^6 ดัลตัน โดยมีค่าใกล้เคียงกับค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการหมักในสภาวะเดียวกัน แต่ไม่มีการเติมไลโซไซม์ร่วมกับซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 0.81 ถึง 1.95 x 10^6 ดัลตัน

ตารางที่ 3.25 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm ความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที และมีการเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 3 และชั่วโมงที่ 6 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 200,000 และ 600,000 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ และเติมซูโครสที่ชั่วโมงที่ 15 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 8 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
0	0.03	85	14.27	6.96
3	0.03	115	14.14	6.96
6	0.03	160	13.89	6.96
9	0.08	275	10.54	6.96
12	0.53	670	9.00	6.87
15	0.68	1,190	12.21	6.87
18	0.15	2,025	9.06	6.87
24	0.16	2,430	3.79	6.96
27	0.36	2,455	3.21	7.06
30	0.13	2,450	3.15	7.86
33	0.13	2,600	3.34	8.13
36	0.35	2,605	3.15	8.21
39	0.58	2,600	3.21	8.37
42	1.02	2,600	3.21	8.42
48	0.82	2,610	3.08	8.47

รูปที่ 3.13 แสดงการเจริญ และการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อ *S. zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 เมื่อมีการเติมไลโซไซม์ที่ชั่วโมง ที่ 3 และ 6 ที่ความเข้มข้น 200,000 และ 600,000 ยูนิตต่อลิตร และเติมซูโครสที่ชั่วโมงที่ 15 ที่ความเข้มข้น 8 กรัมต่อลิตร



ตารางที่ 3.26 ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตโดย *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm ความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที และมีการเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 3 และชั่วโมงที่ 6 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 200,000 และ 600,000 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ และเติมซูโครสที่ชั่วโมงที่ 15 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 8 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก (ดัลตัน)
15	1.44×10^6
18	1.41×10^6
24	2.00×10^6
27	1.55×10^6
30	1.32×10^6
36	1.58×10^6
42	1.20×10^6
48	1.78×10^6

3.2.9 การเปรียบเทียบค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากทุกการทดลอง

เมื่อทำการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากทุกการทดลอง จะได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3.27 พบว่า

การเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นจาก 10 กรัมต่อลิตร เป็น 15 และ 20 กรัมต่อลิตร (การทดลองที่ 1 – 3) น่าจะไม่มีผลทำให้น้ำหนักโมเลกุลเพิ่มขึ้น เนื่องจากค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จะมีค่าอยู่ในช่วงเดียวกัน คือ มีค่าอยู่ในช่วง 0.60 ถึง 1.55×10^6 ดัลตัน

การเพิ่มอัตราการให้อากาศจาก 1.0 vvm (การทดลองที่ 2) เป็น 1.5 vvm (การทดลองที่ 4) น่าจะมีผลทำให้น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มขึ้น คือเพิ่มจาก 0.78 ถึง 1.44×10^6 ดัลตัน ที่ 1.0 vvm เป็น 0.81 ถึง 1.95×10^6 ดัลตัน ที่ 1.5 vvm และเมื่อเปรียบเทียบการทดลองที่ 4 – 6 (1.5 vvm) กับการทดลองที่ 1 – 3 (1.0 vvm) จะเห็นว่า ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จะมีค่าอยู่ในช่วงที่สูงกว่า ดังนั้น การเพิ่มอัตราการให้อากาศน่าจะมีผลทำให้น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มขึ้น

การเพิ่มความเร็วรอบในการกวนจาก 300 รอบต่อนาที เป็น 400 และ 500 รอบต่อนาที (การทดลองที่ 4 – 6) จะเห็นว่า ค่าน้ำหนักโมเลกุลที่ได้มีค่าไม่สัมพันธ์กัน คือ ที่ความเร็วรอบในการกวนเท่ากับ 400 รอบต่อนาที จะได้ค่าน้ำหนักโมเลกุลสูงที่สุด และที่ความเร็วรอบในการกวนเท่ากับ 300 และ 500 รอบต่อนาที จะได้ค่าน้ำหนักโมเลกุลที่ต่ำกว่าและมีค่าใกล้เคียงกัน จึงคิดว่า การเพิ่มความเร็วรอบในการกวนน่าจะไม่มีผลทำให้น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มขึ้น

การเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก (การทดลองที่ 7 – 8) น่าจะมีผลทำให้น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มขึ้น เนื่องจาก เมื่อเปรียบเทียบค่าน้ำหนักโมเลกุลที่ได้กับการทดลองในสภาวะเดียวกันแต่ไม่มีการเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (การทดลองที่ 4) พบว่า ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกเมื่อมีการเติมไลโซไซม์ จะมีค่าสูงกว่าเล็กน้อย ดังนั้น การเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก น่าจะมีผลทำให้น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มขึ้นได้ เมื่อใช้ความเข้มข้นของไลโซไซม์ที่เหมาะสม

การเติมซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก (การทดลองที่ 9) น่าจะไม่มีผลทำให้น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มขึ้น เนื่องจาก เมื่อเปรียบเทียบค่าน้ำหนักโมเลกุลที่ได้กับการทดลองในภาวะเดียวกัน แต่ไม่มีการเติมซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (การทดลองที่ 4) พบว่า ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้เมื่อมีการเติมซูโครส จะมีค่าต่ำกว่า ดังนั้น การเติมซูโครสลงในอาหารเลี่ยงเชื้อระหว่างการหมัก น่าจะไม่มีผลทำให้น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มขึ้น

การเติมไลโซไซม์ร่วมกับซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก (การทดลองที่ 11) จากค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.20 ถึง 2.00 x 10^6 ดัลตัน จะเห็นว่า ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับการทดลองที่ 7 และ 8 จึงคิดว่า การเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก น่าจะมีผลทำให้น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มขึ้นได้ ส่วนการเติมซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก น่าจะไม่มีผลต่อน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก

ตารางที่ 3.27 เปรียบเทียบค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตโดยกระบวนการหมักด้วย *Streptococcus zooepidemicus* สายพันธุ์ UN-7 ในทุกการทดลอง

การทดลอง	สภาวะในการหมัก	ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก (x 10^6 ดัลตัน)
1	ซูโครส 10 กรัมต่อลิตร , 1.0 vvm , 300 รอบต่อนาที	0.72 ถึง 1.55
2	ซูโครส 15 กรัมต่อลิตร , 1.0 vvm , 300 รอบต่อนาที	0.78 ถึง 1.44
3	ซูโครส 20 กรัมต่อลิตร , 1.0 vvm , 300 รอบต่อนาที	0.60 ถึง 1.55
4	ซูโครส 15 กรัมต่อลิตร , 1.5 vvm , 300 รอบต่อนาที	0.81 ถึง 1.95
5	ซูโครส 15 กรัมต่อลิตร , 1.5 vvm , 400 รอบต่อนาที	1.00 ถึง 2.34
6	ซูโครส 15 กรัมต่อลิตร , 1.5 vvm , 500 รอบต่อนาที	0.76 ถึง 1.82
7	การทดลองที่ 4 + เติมไลโซไซม์ที่ชั่วโมงที่ 3 และ 6 (20,000 และ 60,000 ยูนิตต่อลิตร)	0.83 ถึง 2.04
8	การทดลองที่ 4 + เติมไลโซไซม์ที่ชั่วโมงที่ 3 และ 6 (200,000 และ 600,000 ยูนิตต่อลิตร)	0.83 ถึง 2.24
9	การทดลองที่ 4 + เติมซูโครสที่ชั่วโมงที่ 18 (5 กรัมต่อลิตร)	0.83 ถึง 1.58
10	ทำซ้ำการทดลองที่ 4 เพื่อทดสอบความเสถียรของประสิทธิภาพของเชื้อ *S. zooepidemicus* UN-7 ในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก	1.00 ถึง 1.82
11	การทดลองที่ 8 + เติมซูโครสที่ชั่วโมงที่ 15 (8 กรัมต่อลิตร)	1.20 ถึง 2.00

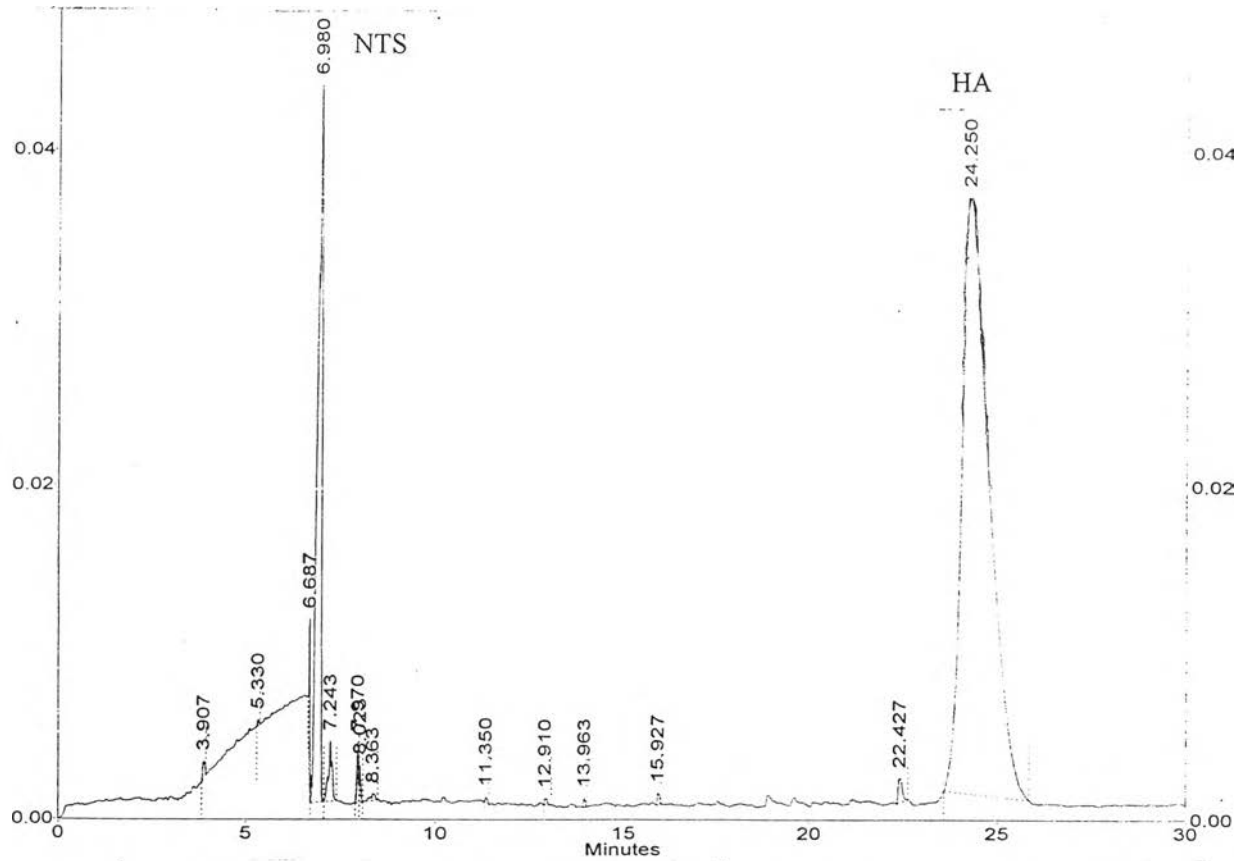
3.2.10 การศึกษาวิธีวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกด้วยเครื่อง Capillary Electrophoresis

นอกจากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก โดยอาศัยความหนืด (viscometry) แล้ว ยังมีผู้รายงานถึง การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกด้วยเครื่อง Capillary Electrophoresis คือ Shozo และคณะ (1997) ได้รายงานว่า สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกได้ จากการทำ High-Performance Capillary Electrophoresis โดยใช้ uncoated fused-silica capillary ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) เป็น running buffer และมี naphthalene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt (NTS) เป็น internal standard โดยใช้กรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐาน ที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลแน่นอนขนาดต่างๆคือ กรดไฮยาลูโรนิกจากหนังหมู (40,000 ถึง 60,000 ดัลตัน) กรดไฮยาลูโรนิกจาก สายสะดือมนุษย์ (800,000 ถึง 1,200,000 ดัลตัน) และกรดไฮยาลูโรนิก ที่ได้จากการสังเคราะห์ที่มีชื่อทางการค้าว่า Opelead (1,500,000 ถึง 2,100,000 ดัลตัน) เป็นสารตัวอย่างและติดตามกรดไฮยาลูโรนิกจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 185 นาโนเมตร

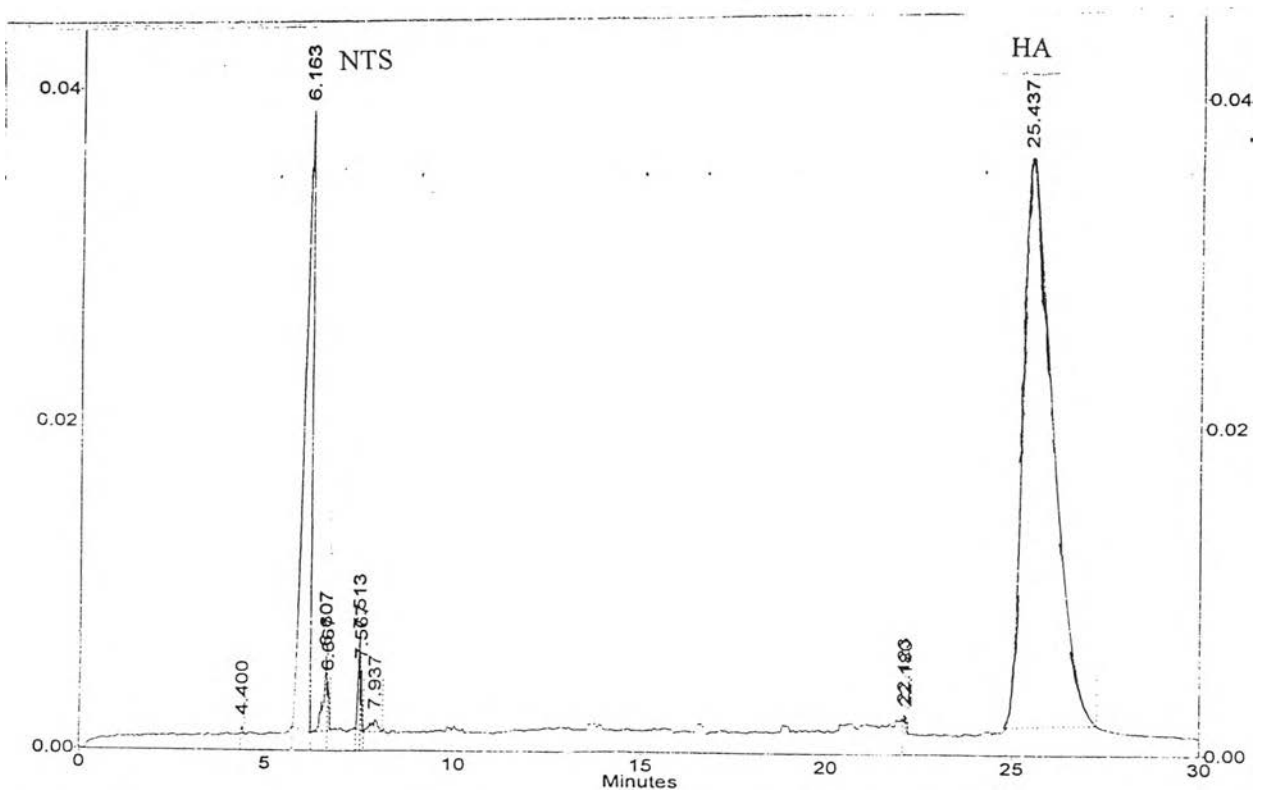
ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้โดยวิธีนี้ ซึ่งในขั้นต้น จะทำการศึกษากับกรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลของบริษัท Sigma คือ กรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จาก *Streptococcus zooepidemicus* และกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากสายสะดือมนุษย์

3.2.10.1 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกด้วยเครื่อง Capillary Electrophoresis โดยใช้ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 25 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) เป็น running buffer

ทำตามวิธีการทดลองในข้อ 2.5.5.2 โดยใช้กรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จาก *Streptococcus zooepidemicus* ของบริษัท Sigma ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 0.85 ถึง 1.60 x 10^6 ดัลตัน (ความเข้มข้นเท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากสายสะดือมนุษย์ ของบริษัท Sigma ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 3.00 ถึง 5.80 x 10^6 ดัลตัน (ความเข้มข้นเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นสารตัวอย่าง โดยใช้ความเข้มข้นของ running buffer เท่ากับ 25 มิลลิโมลาร์ เนื่องจากได้ทำการทดลองตามวิธีการของ Shozo และคณะ (1997) โดยใช้ความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์เท่ากับ 50 มิลลิโมลาร์แล้ว แต่พบว่าไม่สามารถทำได้ เนื่องจากค่ากระแสที่ได้มีค่าสูงเกินไป ทำให้ค่าความต่างศักย์ไม่คงที่ จึงลดความเข้มข้นลงเป็น 25 มิลลิโมลาร์ ได้ผลการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 3.14 และรูปที่ 3.15 ตามลำดับ



รูปที่ 3.14 แสดง electropherogram ของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จาก *Streptococcus zooepidemicus* (Sigma) (Mw = 0.85 ถึง 1.60 x 10^6 ดัลตัน) โดยมี NTS เป็น internal standard

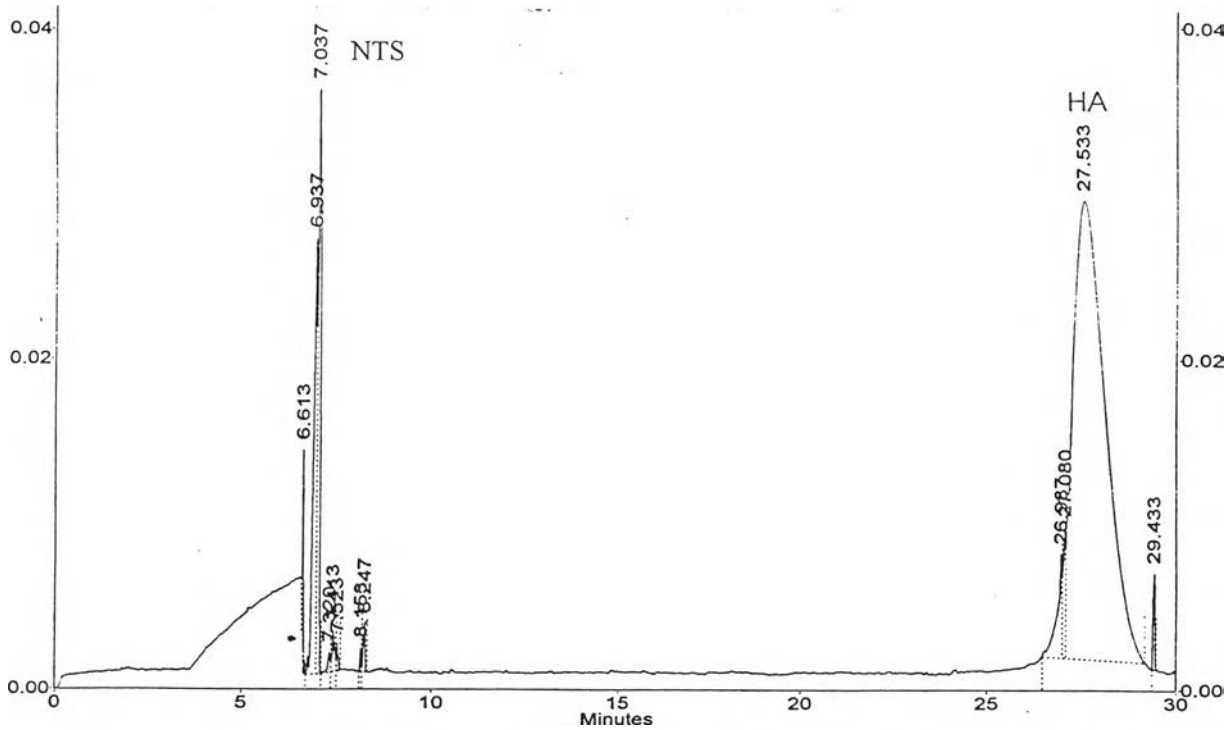


รูปที่ 3.15 แสดง electropherogram ของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากสายสะดือมนุษย์ (Sigma) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 3.00 ถึง 5.80 x 10^6 ดัลตัน โดยมี NTS เป็น internal standard

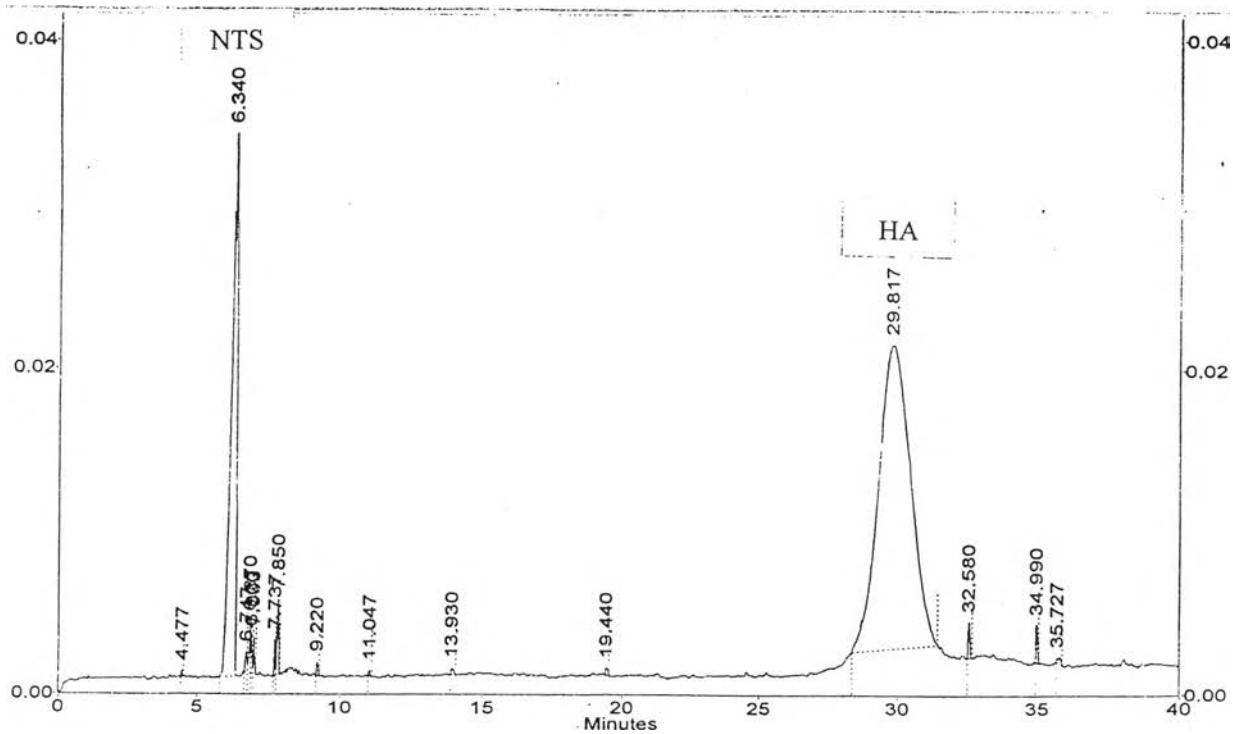
จากรูปที่ 3.14 และรูปที่ 3.15 พบว่า การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกด้วยเครื่อง Capillary Electrophoresis โดยใช้กรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐาน 2 ชนิด ของบริษัท Sigma คือ กรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จาก *Streptococcus zooepidemicus* และกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากสายสะดือมนุษย์ จะได้ค่า migration time ที่ใกล้เคียงกันคือ 24.250 และ 25.437 นาที ตามลำดับ ซึ่งถ้าต้องการให้ค่า migration time ต่างกันมากกว่านี้ ก็น่าจะสามารถทำได้ แต่อาจจะต้องทำการปรับเปลี่ยน สภาวะต่างๆในการทดลอง เช่น อาจจะมีการเติมสารประเภทที่เป็นโพลีเมอร์ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดลอง เช่น pullulan ซึ่งเป็นสารที่มีรูพรุนและทำให้เกิดการแยกของกรดไฮยาลูโรนิกตามขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลได้ จึงทำการทดลองต่อไป โดยมีการเติม pullulan ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดลอง เพื่อทดสอบค่า migration time ของกรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐานทั้ง 2 ตัว ว่าเป็นอย่างไร

3.2.10.2 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกด้วยเครื่อง Capillary Electrophoresis โดยใช้ 0.5 % pullulan ใน ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 25 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) เป็น running buffer

ทำตามวิธีการทดลองในข้อ 2.5.5.2 แต่มีการเติม pullulan ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 % โดยใช้กรดกรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐาน 2 ชนิด ของบริษัท Sigma คือ กรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จาก *Streptococus zooepidemicus* ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 0.85 ถึง 1.60 x 10^6 ดัลตัน และกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จาก สายสะดือมนุษย์ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 3.00 ถึง 5.80 x 10^6 ดัลตัน เป็นสารตัวอย่าง ได้ผลการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 3.16 และรูปที่ 3.17 ตามลำดับ



รูปที่ 3.16 แสดง electropherogram ของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จาก *Streptococcus zooepidemicus* (Sigma) (Mw = 0.85 ถึง 1.60 x 10^6 ดัลตัน) เมื่อมีการเติม pullulan ลงในสารละลาย

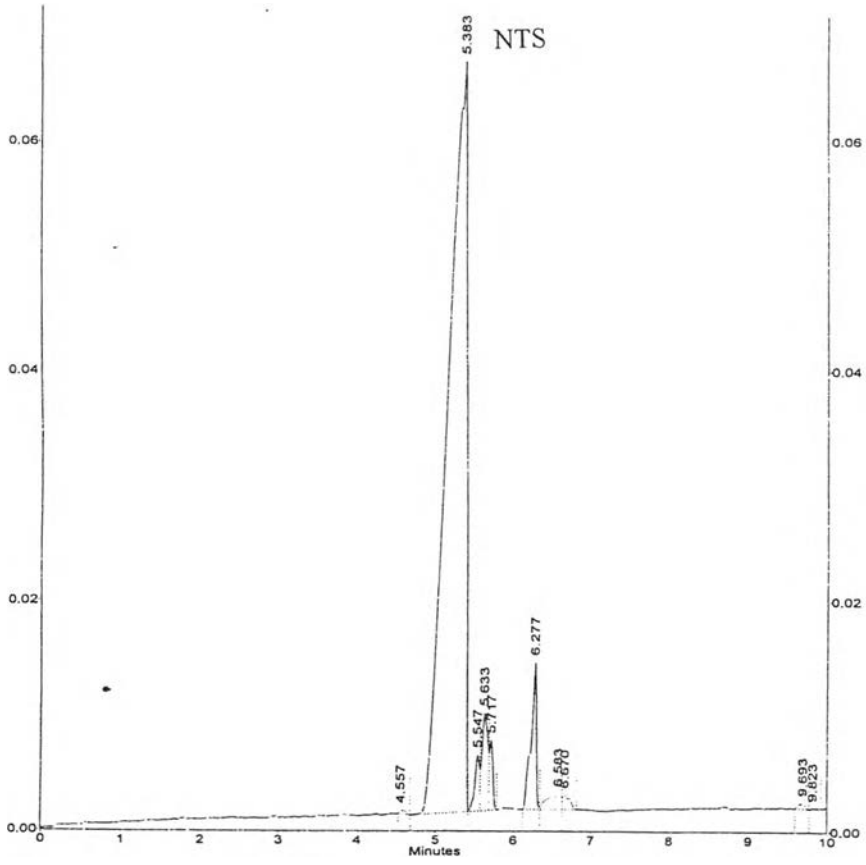


รูปที่ 3.17 แสดง electropherogram ของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากสายสะดือมนุษย์ (Sigma) (Mw = 3.00 ถึง 5.80 x 10^6 ดัลตัน) เมื่อมีการเติม pullulan ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ โดยมี NTS เป็น internal standard

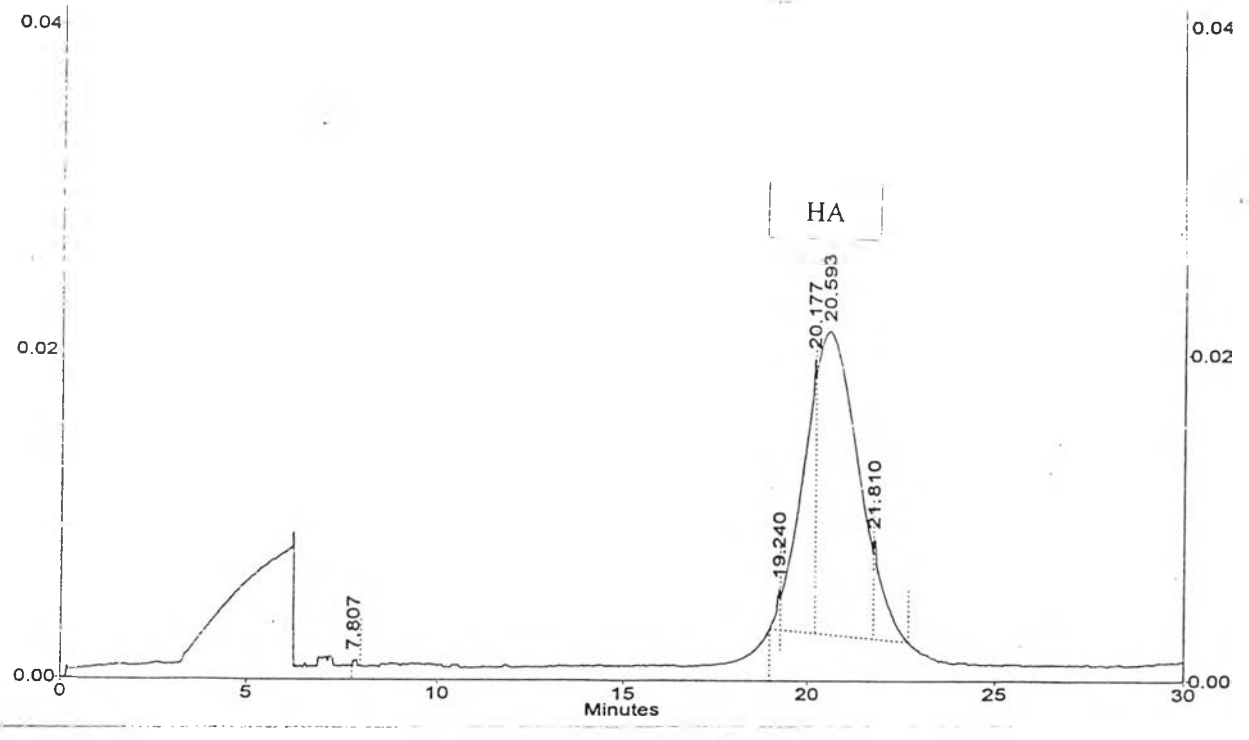
จากรูปที่ 3.16 และ 3.17 พบว่า ค่า migration time ของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จาก *Streptococcus zooepidemicus* และ human umbilical cord มีค่าเท่ากับ 27.533 และ 29.817 นาที ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า ค่า migration time มีค่าต่างกันมากขึ้น แต่เมื่อพิจารณา ค่า migration time ของ NTS ซึ่งเป็น internal standard พบว่า มีค่าต่างกันคือ 7.037 และ 6.340 นาที ตามลำดับ จึงไม่สามารถคำนวณหาค่า relative mobility ของกรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐานแต่ละตัวได้ โดยค่า relative mobility จะใช้สำหรับ การพลอตกราฟเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง ค่า relative mobility กับ ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐาน จึงทำการทดลองต่อไป โดยนำสารตัวอย่าง คือ NTS, กรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จาก *Streptococcus zooepidemicus* และกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากสายสะดือมนุษย์มาทำการทดลอง ครั้งละ 1 ตัวอย่าง เพื่อดูค่า migration time ของสารตัวอย่างแต่ละตัว ว่าเป็นอย่างไร

3.2.10.3 การหาค่า migration time ของ NTS และกรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐานทั้ง 2 ชนิด โดยทำการทดลอง ครั้งละ 1 ตัวอย่าง

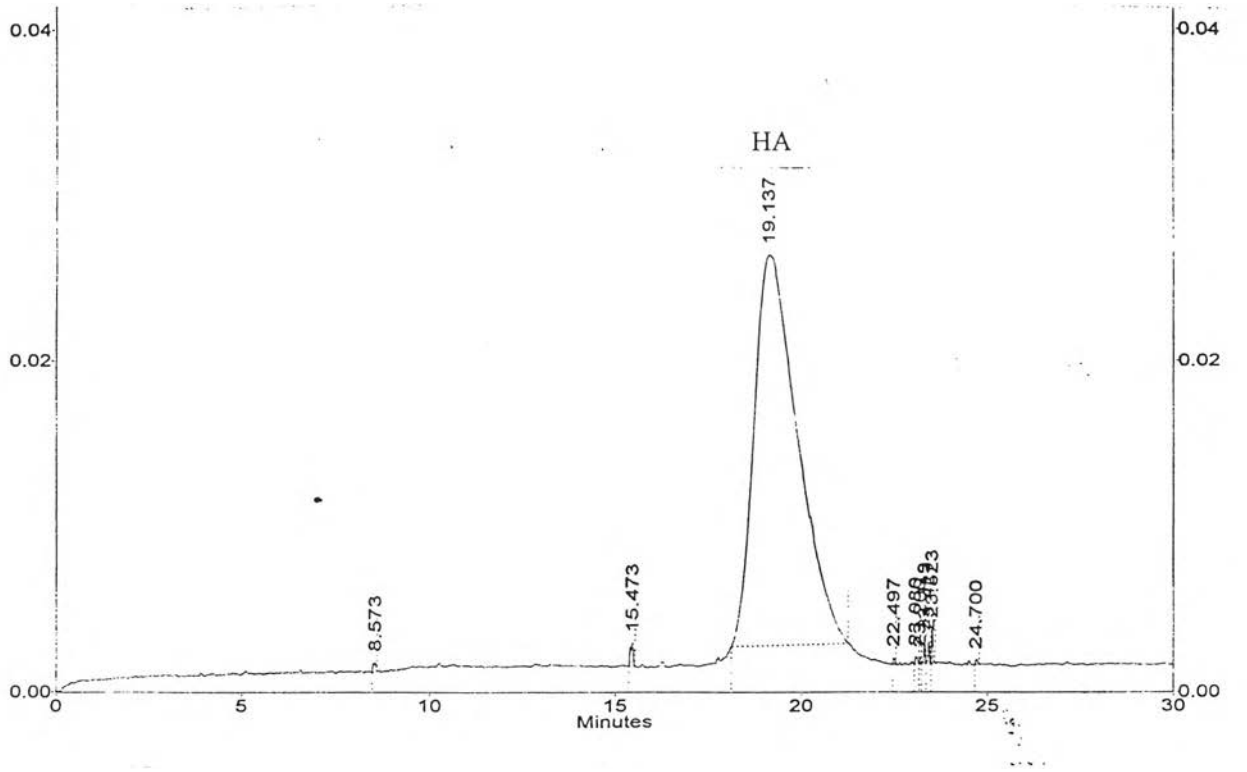
ทำตามวิธีการทดลองในข้อ 2.5.5.2 และมีการเติม pullulan ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 % โดยใช้ NTS และกรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐาน 2 ชนิด ของบริษัท Sigma คือ กรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จาก *Streptococus zooepidemicus* ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 0.85 ถึง 1.60 x 10^6 ดัลตัน และกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จาก สายสะดือมนุษย์ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 3.00 ถึง 5.80 x 10^6 ดัลตัน เป็นสารตัวอย่าง โดยทำการทดลอง ครั้งละ 1 ตัวอย่าง ได้ผลการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 3.18, รูปที่ 3.19 และรูปที่ 3.20 ตามลำดับ



รูปที่ 3.18 แสดง electropherogram ของ NTS (internal standard) เมื่อมีการเติม pullulan ลงใน สารละลายบัฟเฟอร์



รูปที่ 3.19 แสดง electropherogram ของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จาก *Streptococcus zooepidemicus* (Sigma) (Mw = 0.85 ถึง 1.60 x 10^6 ดัลตัน) โดยไม่มี NTS เป็น internal standard



รูปที่ 3.20 แสดง electropherogram ของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากสายสะดือมนุษย์ (Sigma) (Mw = 3.00 ถึง 5.80 x 10^6 ดัลตัน) โดยไม่มี NTS เป็น internal standard

จากรูปที่ 3.18, รูปที่ 3.19 และรูปที่ 3.20 พบว่า ค่า migration time ของ NTS, กรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จาก *Streptococcus zooepidemicus* ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 0.85 ถึง 1.60 x 10^6 ดัลตัน และกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จาก human umbilical cord ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 3.00 ถึง 5.80 x 10^6 ดัลตัน มีค่าเท่ากับ 5.383, 20.593 และ 19.137 นาที ตามลำดับ ซึ่งเมื่อนำมาคำนวณค่า relative mobility ของกรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐานแต่ละตัวจะได้เท่ากับ 3.826 และ 3.555 ตามลำดับ ซึ่งค่า relative mobility ของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้ ไม่สัมพันธ์กับค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก คือ กรดไฮยาลูโรนิกที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกลับมีค่า relative mobility สูงกว่า กรดไฮยาลูโรนิกที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ทำให้ไม่สามารถสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า relative mobility กับค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกได้ จึงคาดว่า ภาวะที่ใช้ในการทดลองยังไม่เหมาะสม คือ อาจจะต้องปรับเปลี่ยนภาวะต่างๆในการทดลอง เช่น ความเข้มข้นของ running buffer ความเข้มข้นของ pullulan ที่จะใช้ ระยะเวลาในการฉีดสารตัวอย่าง อุณหภูมิของ capillary ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ ซึ่งมีผลต่อค่า migration time ทั้งสิ้น และอาจจะต้องเพิ่มชนิดของกรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐานให้มากขึ้น สำหรับการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า relative mobility กับค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐานที่ถูกต้อง สำหรับใช้หาค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก ที่เป็นสารตัวอย่างด้วยเครื่อง Capillary Electrophoresis