บทที่ 3

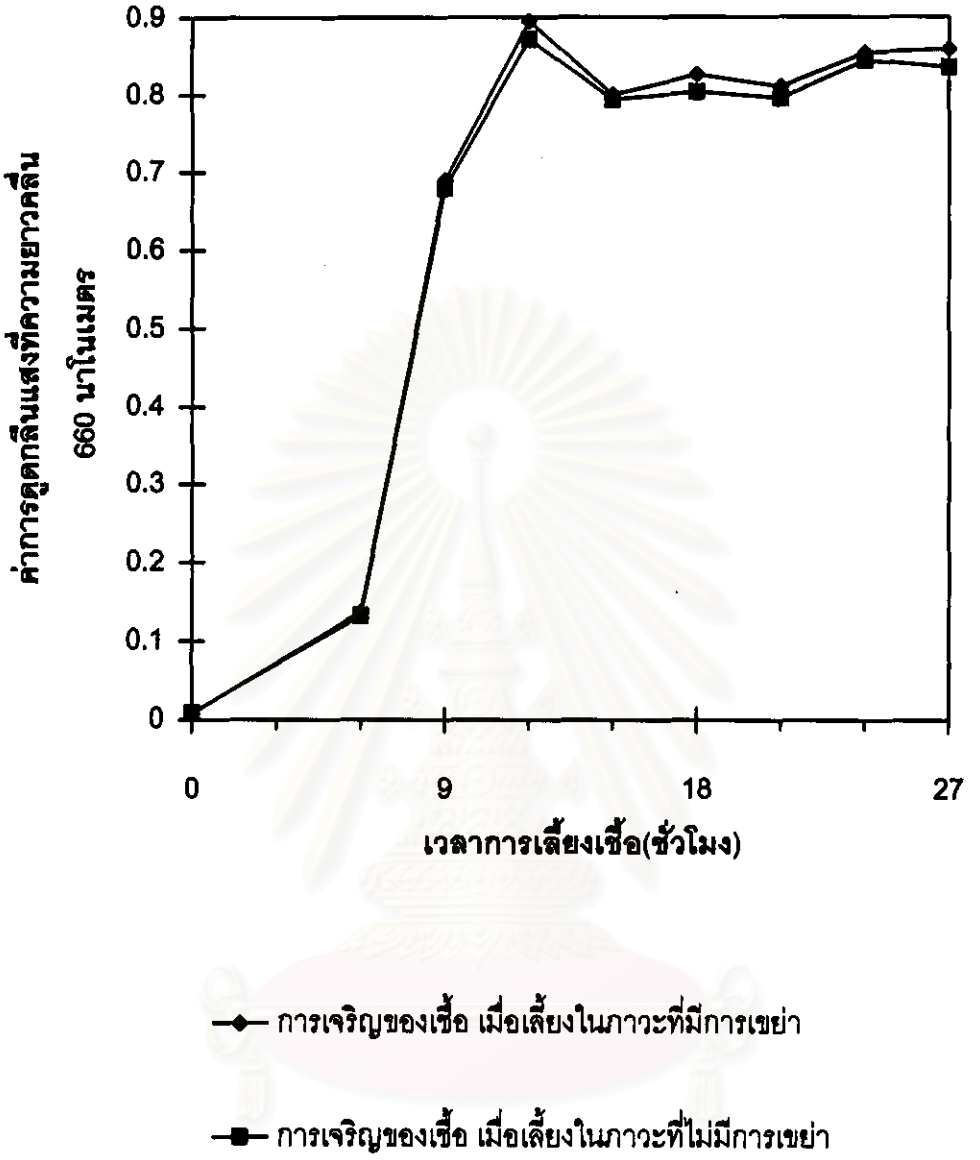
ผลการทดลอง

3.1 รูปแบบการเจริญของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI

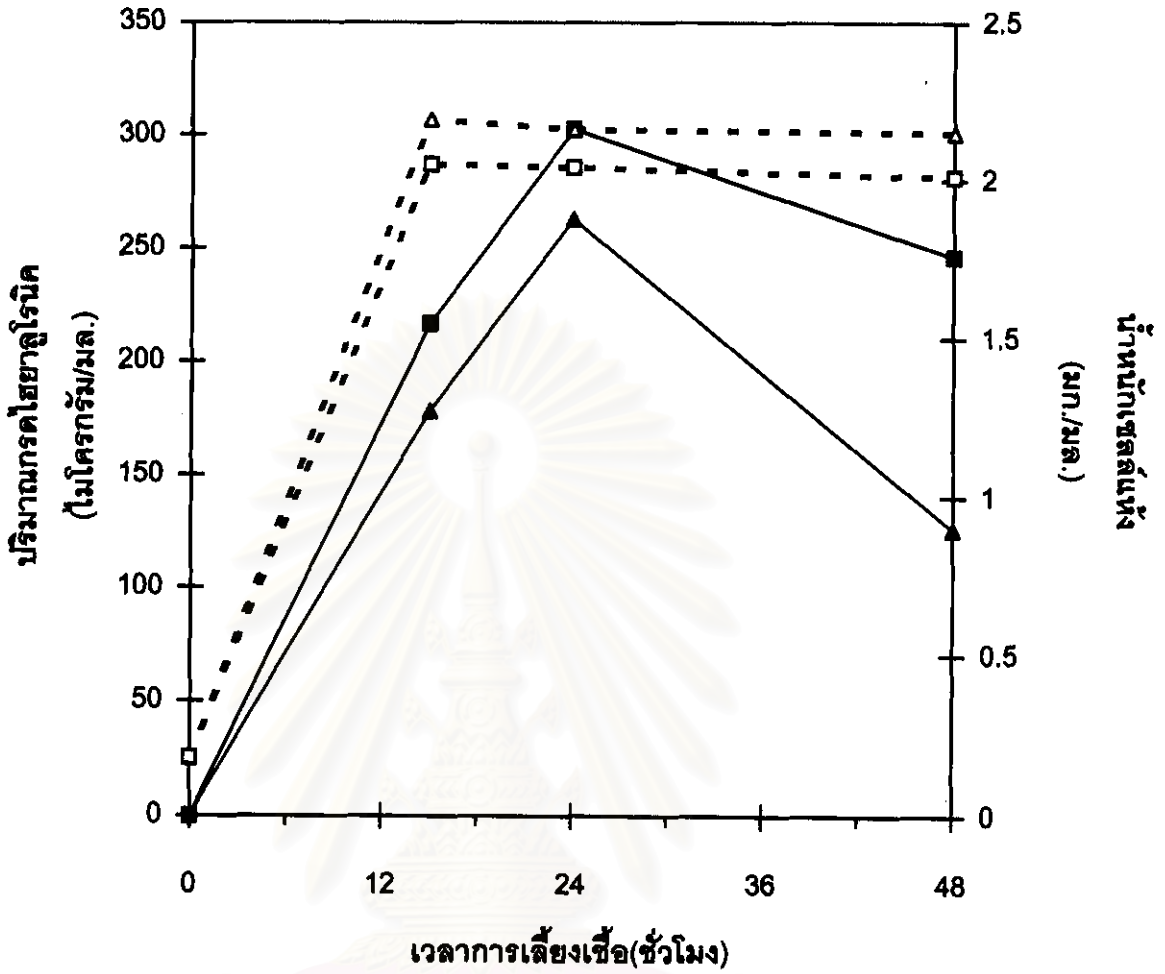
3.1.1 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหาร BHI เมื่อเตรียมหัวเชื้อในภาวะที่มีการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และที่ไม่มีการเขย่า

จากที่มีรายงานกล่าวถึงภาวะการเตรียมหัวเชื้อทั้งที่มีและไม่มีการเขย่า (Swann และคณะ(1990); Armstrong และคณะ(1997) จึงทดลองศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบการเจริญของ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 โดยใช้อาหารสูตรอุดมคือ BHI เป็นอาหารสำหรับการเตรียมหัวเชื้อ ภายใต้ภาวะที่มีและไม่มีการเขย่า ที่อุณหภูมิ 37°ซ พบว่าการเลี้ยงเชื้อในภาวะที่ไม่มีการเขย่าทั้งสองแบบมีการเจริญและรูปแบบการเจริญที่คล้ายคลึงกัน คือมีช่วงการเจริญแบบคือมีช่วงการเจริญแบบแลคในช่วง 6 ชั่วโมงแรกของการเจริญ หลังจากนั้นจึงเป็นการเจริญแบบลอกาลิทิมิกจนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ จึงเข้าสู่ช่วงการเจริญแบบสเตชั่นนารี (รูปที่ 6ก) และเมื่อนำหัวเชื้อที่เตรียมได้ทั้งสองแบบดังกล่าวที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีการเจริญอยู่ในช่วงกึ่งกลางลอกาลิทิมิกมาศึกษาเปรียบเทียบการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคในอาหารสำหรับการผลิต พบว่าการใช้หัวเชื้อที่เลี้ยงในสภาพที่ไม่มีการเขย่าจะให้การผลิตกรดนี้สูงกว่าเมื่อใช้หัวเชื้อในภาวะที่มีการเขย่า ในขณะที่การเจริญของเชื้อทั้งสองภาวะดังกล่าวแทบไม่มีความแตกต่างกันเลย ดังแสดงในรูปที่ 6ข จึงเลือกภาวะที่ไม่มีการเขย่าสำหรับการเตรียมหัวเชื้อในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 6ก รูปแบบการเจริญของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำหรับการเตรียมหัวเชื้อ (BHI) ในภาวะที่มีการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และไม่มีการเขย่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

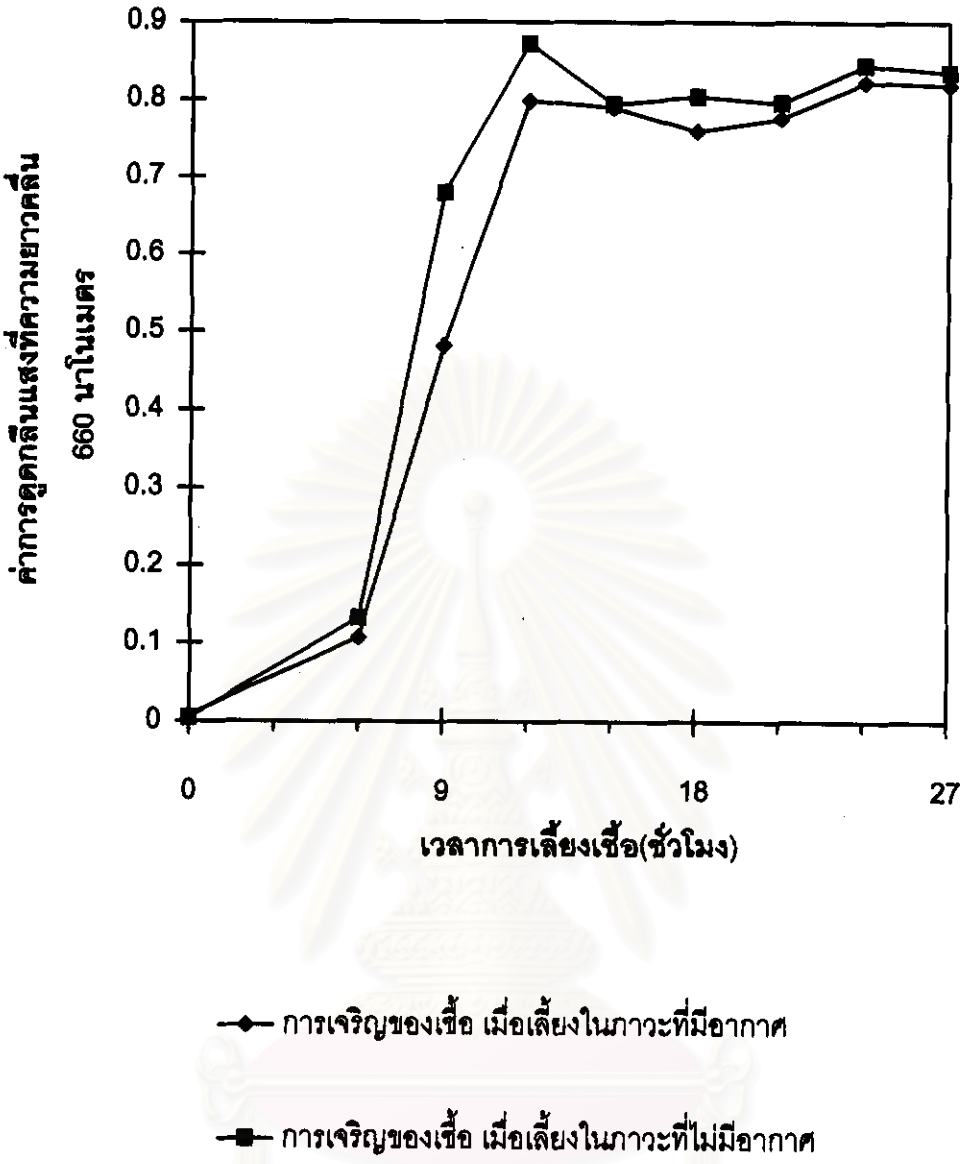


รูปที่ 6ข การเจริญและการสร้างกรดไฮยาลูโรนิคของ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับการผลิตสูตรที่ 2 ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 7.0 ที่อุณหภูมิห้อง (28-32°ซ) ความเร็วรอบของการเขย่า 200 รอบต่อนาที โดยใช้หัวเชื้อที่ได้จากรูป 6ก อายุหัวเชื้อ 9 ชั่วโมง ในปริมาณ 10 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร)

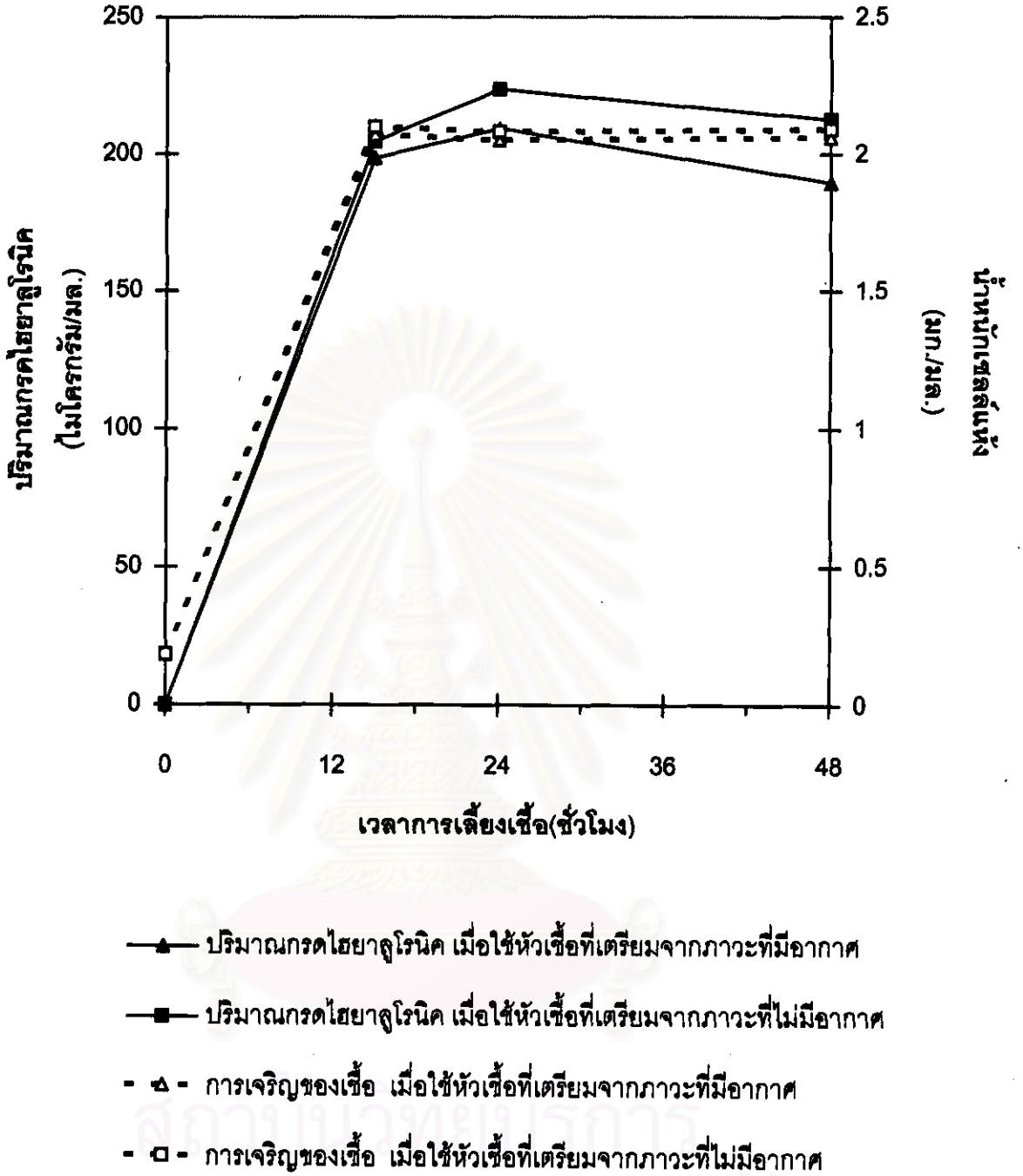
3.1.2 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหาร BHI เมื่อเตรียมหัวเชื้อในภาวะที่ไม่มีการเขย่าแบบที่มีอากาศและที่ไม่มีอากาศ

เมื่อได้ข้อมูลจากข้อ 3.1.1 แล้วทำการศึกษาต่อโดยเปรียบเทียบรูปแบบการเจริญของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 โดยใช้อาหารสูตรอุดมคือ BHI เป็นอาหารสำหรับการเตรียมหัวเชื้อ ภายใต้ภาวะที่ไม่มีการเขย่าทั้งที่มีอากาศกับที่ไม่มีอากาศ (candle jar) ที่อุณหภูมิ 37°ซ พบว่าการเลี้ยงเชื้อในภาวะที่ไม่มีการเขย่าทั้งสองแบบมีรูปแบบการเจริญที่คล้ายคลึงกัน คือ มีช่วงการเจริญแบบแลค (lag phase) ในช่วง 6 ชั่วโมงแรกของการเจริญ หลังจากนั้นจึงเป็นการเจริญแบบลอกาลิทิมิก (log phase) จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ จึงเข้าสู่ช่วงการเจริญแบบสเตชั่นนารี (stationary phase) โดยการเจริญของเชื้อใน candle jar มีการเจริญใกล้เคียงกับการเจริญของเชื้อที่เลี้ยงแบบตั้งทิ้งไว้ (รูปที่ 7ก) และเมื่อนำหัวเชื้อที่เตรียมได้ทั้งสองแบบดังกล่าวที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีการเจริญอยู่ในช่วงกึ่งกลางลอกาลิทิมิกมาศึกษาเปรียบเทียบการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคในอาหารสำหรับการผลิต พบว่าการใช้หัวเชื้อที่เลี้ยงในสภาพที่มีอากาศเพียงเล็กน้อยให้การผลิตกรดนี้สูงกว่าเมื่อใช้หัวเชื้อในภาวะที่มีอากาศ ในขณะที่การเจริญของเชื้อทั้งสองภาวะดังกล่าวแทบไม่มีความแตกต่างกันเลย ดังแสดงในรูปที่ 7ข ดังนั้นเมื่อพิจารณาถึงความสะดวกจึงเลือกใช้หัวเชื้ออายุ 9 ชั่วโมงที่เตรียมจากภาวะที่ไม่มีการเขย่าในสภาพที่มีอากาศสำหรับการเตรียมหัวเชื้อเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7ก รูปแบบการเจริญของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำหรับการเตรียมหัวเชื้อ (BHI) ในภาวะที่ไม่มีการเขย่า ทั้งแบบที่มีอากาศและที่ไม่มีอากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

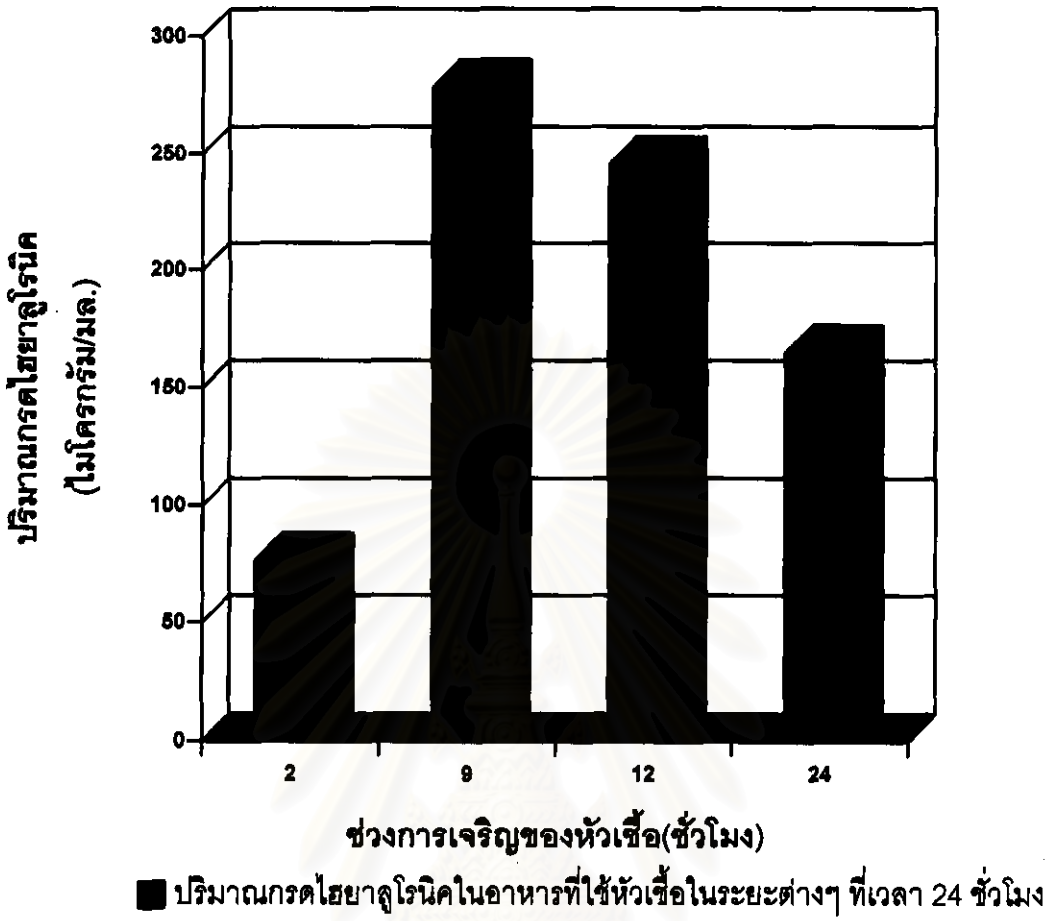


รูปที่ 7ข การเจริญและการสร้างกรดไฮยาลูโรนิคของ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับการผลิตสูตรที่ 2 ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 7.0 ที่อุณหภูมิห้อง (28-32°ซ) ความเร็วรอบของการเขย่า 200 รอบต่อนาที โดยใช้หัวเชื้อที่ได้จากรูป 7ก อายุหัวเชื้อ 9 ชั่วโมง ในปริมาณ 10 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร)

3.1.3 ช่วงการเจริญของหัวเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ เพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

จากการที่ช่วงอายุของเชื้อมีผลต่อการเจริญ และการสร้างกรดไฮยาลูโรนิค การทดลองนี้จึงทำเพื่อหาระยะการเจริญ (อายุของกล้าเชื้อ) ที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 7.0 ปริมาณกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้อง(28-32° ซ) ความเร็วรอบของการเขย่า 200 รอบต่อนาที ปริมาณหัวเชื้อ 10 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) และติดตามการเจริญของเชื้อในช่วงเวลาต่างๆอันได้แก่ แลคเฟส (2 ชั่วโมง), ระยะกึ่งกลางของ ลอกาลิทิมิก (9 ชั่วโมง), ระยะสเตชั่นนารีช่วงต้น (12 ชั่วโมง) และระยะสเตชั่นนารีช่วงปลาย (24 ชั่วโมง) พบว่าหัวเชื้อในช่วงกึ่งกลางลอกาลิทิมิกจะให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคสูงสุดคือ 278 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่ชั่วโมง 24 ของการเลี้ยงเชื้อ รองลงมาคือระยะสเตชั่นนารีช่วงต้น, ระยะสเตชั่นนารีช่วงปลาย และแลคเฟส ตามลำดับ ทั้งนี้เป็นเพราะที่ช่วงระยะการเจริญของหัวเชื้อต่างๆเชื้อมีกิจกรรมของเซลล์ที่แตกต่างกัน ดังนั้นเมื่อนำหัวเชื้อดังกล่าวมาถ่ายเชื้อลงในอาหารสำหรับการผลิตกรด จึงทำให้มีความแตกต่างกันของการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ดังแสดงในรูปที่ 8 ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้หัวเชื้อในช่วงกึ่งกลางลอกาลิทิมิก (9 ชั่วโมง) เป็นช่วงการเจริญของหัวเชื้อที่เหมาะสมในเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

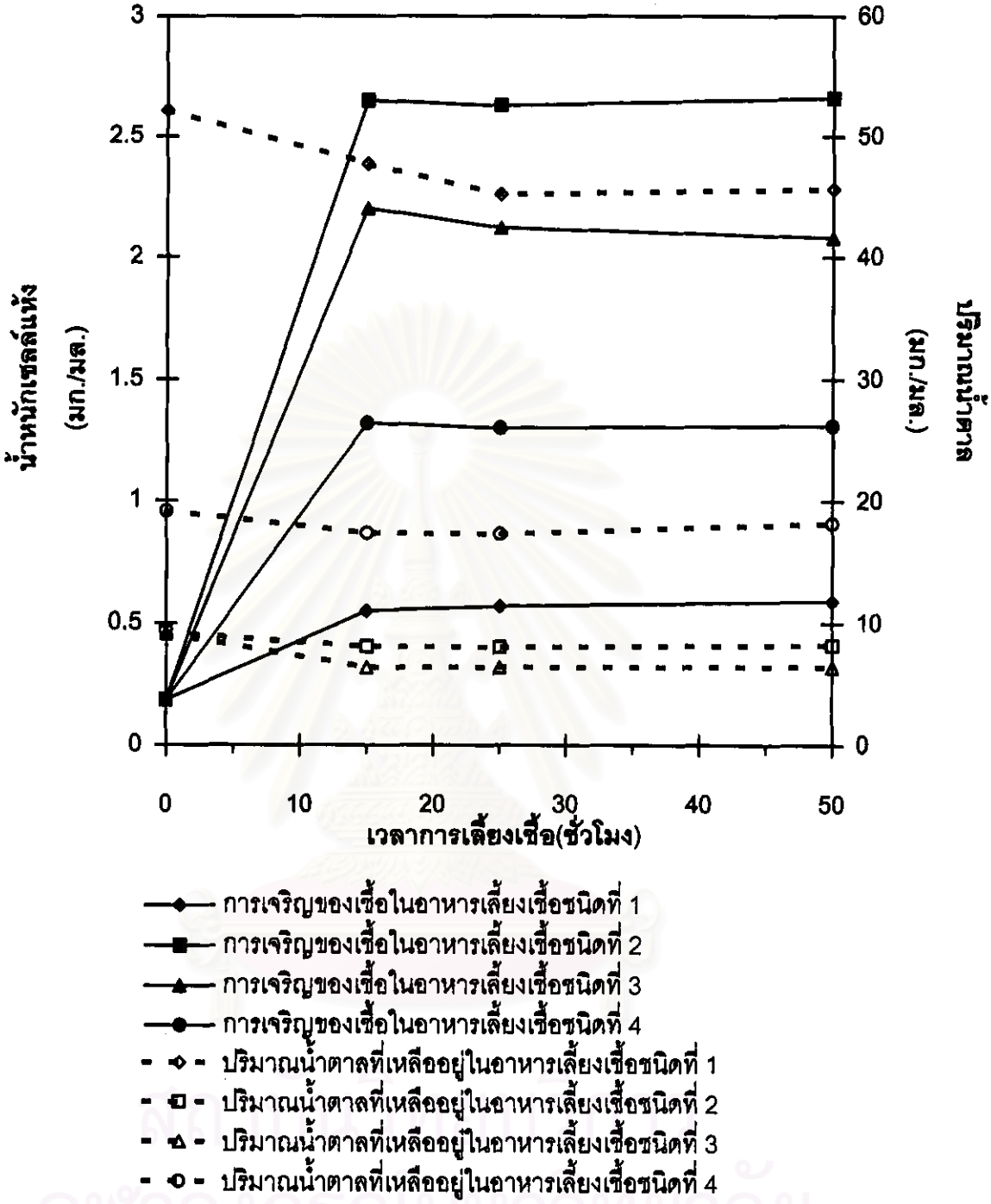


รูปที่ 8 ช่วงการเจริญของหัวเชื้อในระยะต่างๆที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค โดยทดลองเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 7.0 ปริมาณกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้อง (28-32°ซ) ความเร็วรอบของการเขย่า 200 รอบต่อนาที ปริมาณหัวเชื้อ 10 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร)

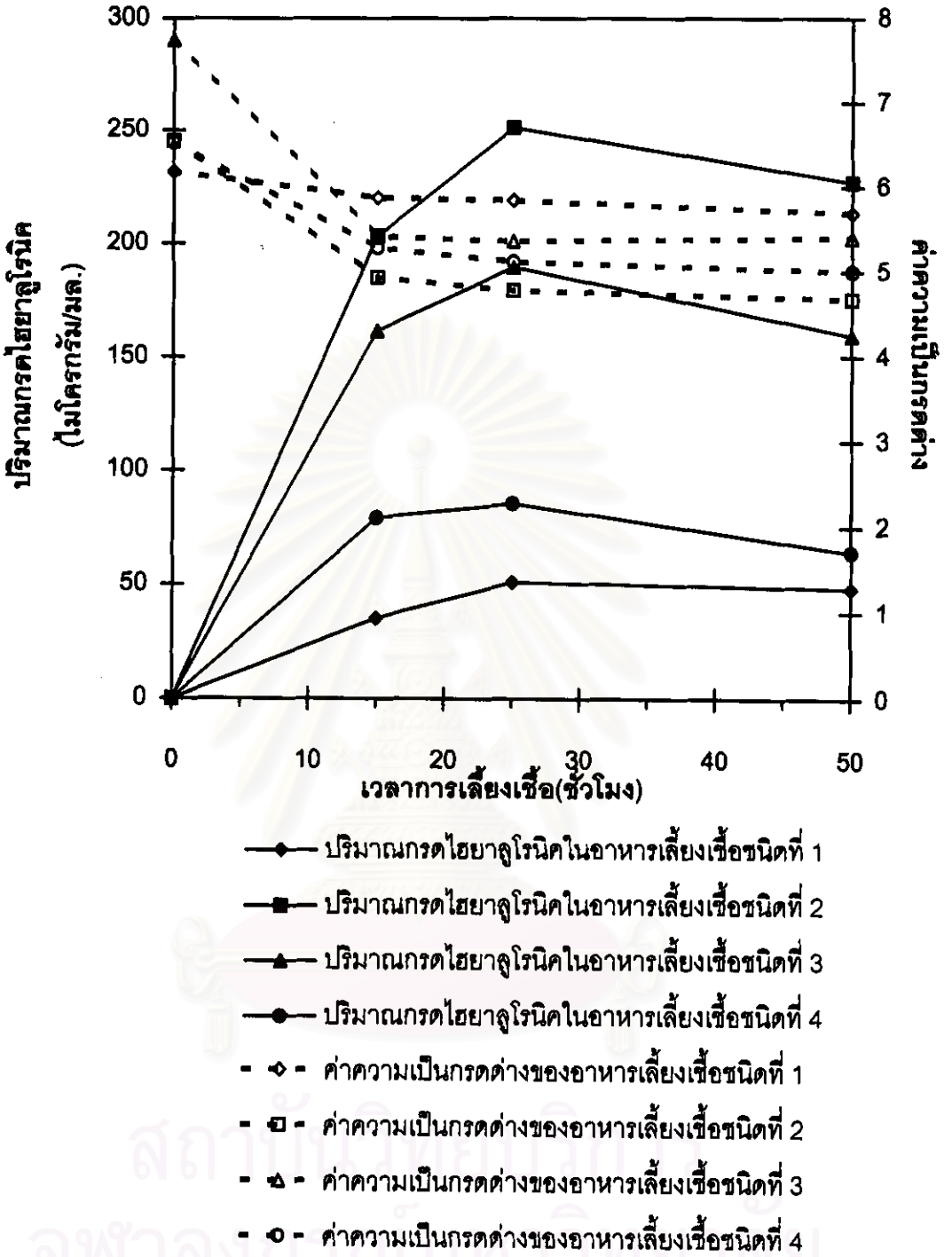
3.2 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ และการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคโดย *S. zooepidemicus* ATCC 35246

3.2.1 การคัดเลือกสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

เมื่อทดลองเลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรต่างๆ 4 สูตร ตามรายงานของ Akasaka (Akasaka และคณะ, 1989), Nimrod (Nimrod และคณะ, 1986), Woolcock (Woolcock, 1974) และ Johns (Johns และคณะ, 1994) ที่ต่างมีปริมาณกลูโคสเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต่างกันของ 6%, 1%, 1% และ 2% ตามลำดับ (ภาคผนวก ก.) และเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32°ซ) ความเร็วรอบของการเขย่า 200 รอบต่อนาที โดยใช้หัวเชื้ออายุ 9 ชั่วโมง ในปริมาณ 10 เปอร์เซนต์(ปริมาตรต่อปริมาตร) พบว่า *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ที่เลี้ยงในสูตรอาหารทั้ง 4 มีการเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 15 ของการเลี้ยงเชื้อแล้วจึงคงที่ โดยในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ 2 ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุดคือ 2.65 มก./มล. ติดตามด้วยสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ 3, 4 และ 1 ตามลำดับ ปริมาณกลูโคสเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกสูตรมีการลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 15 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ แล้วจึงคงที่ ดังแสดงในรูปที่ 9ก ในด้านการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคนั้น พบว่าในทุกสูตรมีการผลิตกรดดังกล่าวควบคู่กับการเจริญโดยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 ให้การผลิตกรดสูงที่สุดโดยให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิค 252 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 25 ของการเลี้ยงเชื้อ ติดตามด้วยสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ 3, 4 และ 1 ตามลำดับ ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสี่สูตรจะลดลงมากที่สุดในช่วง 15 ชั่วโมงแรกของการเจริญ แล้วคงที่อยู่ในช่วงความเป็นกรดด่าง 4-6 โดยสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ 1 มีการลดลงของค่าความเป็นกรดด่างน้อยที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นในอาหารสูตรที่ 1 หลังการนึ่งฆ่าเชื้อมีค่าสูงกว่าอาหารสูตรอื่นๆ ดังแสดงในรูปที่ 9ข จึงเป็นไปได้ว่าปริมาณกลูโคสและค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อน่าเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค จึงศึกษาผลของปัจจัยดังกล่าวในการทดลองต่อไป เมื่อพิจารณาถึงปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคที่ผลิตขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสี่สูตร พบว่าสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ 2 ให้การผลิตกรดดังกล่าวสูงสุด จึงมีความเหมาะสมในการนำไปใช้เป็นสูตรอาหารเบื้องต้นสำหรับการผลิต กรดไฮยาลูโรนิคต่อไป



รูปที่ 9ก การเจริญและการใช้น้ำตาลของ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารสูตรที่ 1, 2, 3 และ 4 ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ 7.0 ที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32°ซ) ความเร็วรอบของการเขย่า 200 รอบต่อนาที โดยใช้หัวเชื้ออายุ 9 ชั่วโมง ในปริมาณ 10 เปอร์เซนต์(ปริมาตรต่อปริมาตร)

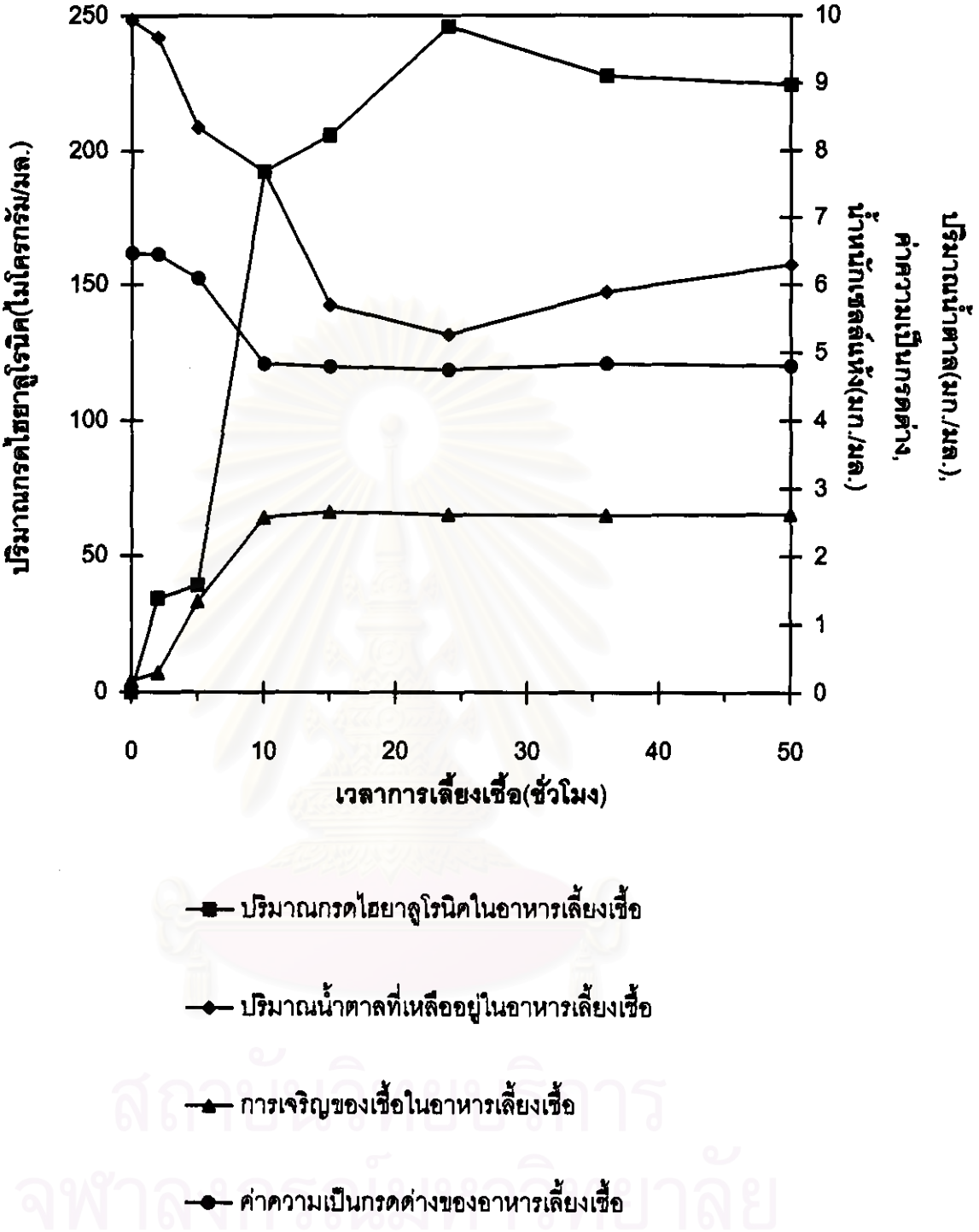


รูปที่ 9ข การสร้างกรดไฮยาลูโรนิค และความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารสูตร 1 , 2, 3 และ 4 ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 7.0 ภายใต้ภาวะการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับในรูปที่ 9ก

3.2.2 การเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารชนิดที่ 2

ศึกษารูปแบบการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคโดย *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรที่ 2 ที่คัดเลือกจากข้อ 3.2.1 โดยเพิ่มเวลาการเก็บตัวอย่างในช่วง 15 ชั่วโมงแรกให้ละเอียดขึ้น แต่ยังคงใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับในข้อ 3.2.1 รูปที่ 10 แสดงให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นของเซลล์หลังชั่วโมงที่สองและเข้าสู่ช่วงคงที่ในชั่วโมงที่ 10 โดยเชื้อจะสร้างกรดไฮยาลูโรนิคควบคู่กับการเจริญอย่างรวดเร็ว โดยให้การผลิตกรดสูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ (247 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) แล้วลดลง ซึ่งคาดว่าน่าจะเกิดจากเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่ปลดปล่อยโดยเชื้อนี้สู่อาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะได้ทำการศึกษาในเรื่องนี้ต่อไป ในแง่ของระดับกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบมีการลดลงของกลูโคสในอาหารอย่างรวดเร็วในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการเจริญ แล้วจึงมีค่าสูงขึ้นเพียงเล็กน้อย ในขณะที่ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงจากประมาณ 6.5 อย่างรวดเร็วในช่วง 10 ชั่วโมงแรกของการเจริญ แล้วคงระดับอยู่ในช่วงความเป็นกรดด่าง 4.7 - 4.9

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

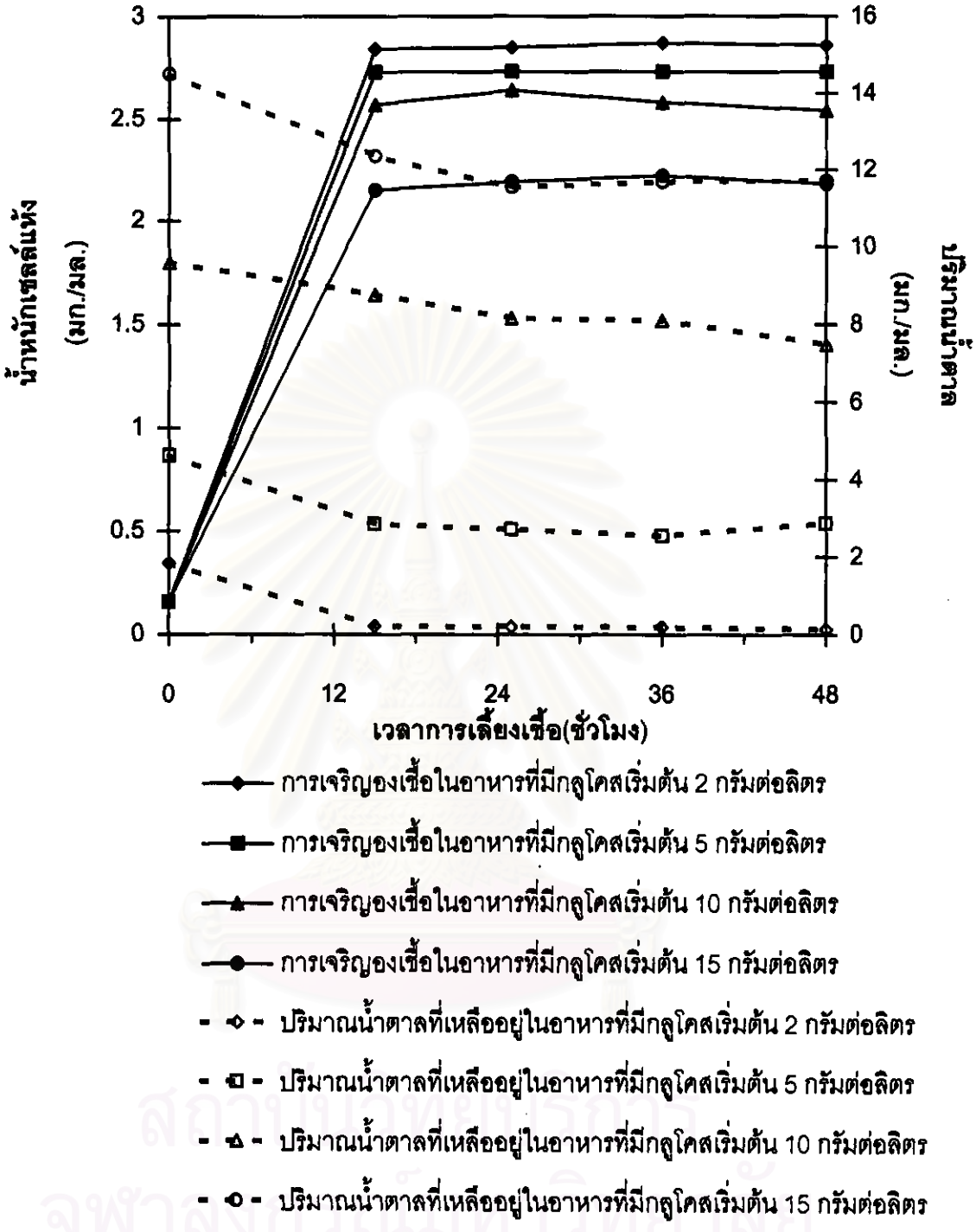


รูปที่ 10 รูปแบบการเจริญ ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคที่สร้างโดย *S. zooepidemicus* ATCC 35246 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 2 ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 7.0 ที่อุณหภูมิห้อง (28-32°ซ) ความเร็วรอบของการเขย่า 200 รอบต่อนาที โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อ 10 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) อายุหัวเชื้อ 9 ชั่วโมง

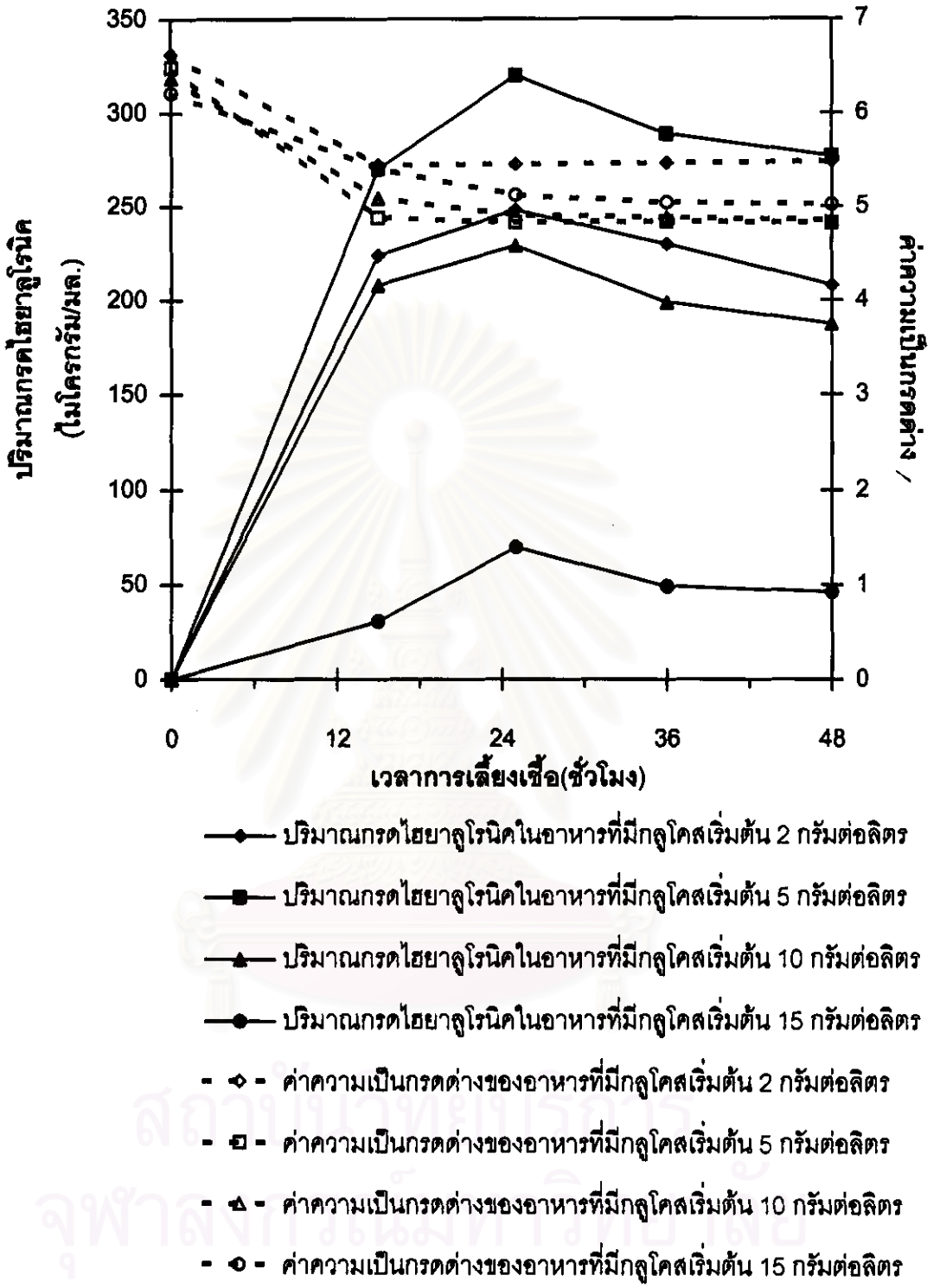
3.2.3 ปริมาณกลูโคสเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ เพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

จากผลการศึกษาในข้อที่ 3.2.1 ที่คาดว่าปริมาณกลูโคสเริ่มต้นน่าจะมีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ดังนั้นจึงศึกษาหาปริมาณกลูโคสที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค โดยเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรที่ 2 แล้วทำการแปรผันปริมาณกลูโคสเริ่มต้นเป็น 2, 5, 10 และ 15 กรัมต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Nimrod และคณะ, 1988) ที่อุณหภูมิห้อง (28-32^{o}ซ) โดยปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 7.0 ความเร็วรอบของการเขย่า 200 รอบต่อนาที พบว่าที่ปริมาณกลูโคสเริ่มต้นต่างๆมีการเจริญที่ใกล้เคียงกัน ยกเว้นที่ปริมาณกลูโคส 15 กรัมต่อลิตร ที่มีการเจริญต่ำที่สุด ปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 15 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ แล้วจึงคงที่ในทุกภาวะการทดสอบ โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณกลูโคส 2 กรัมต่อลิตร พบว่ามีปริมาณน้ำตาลเหลืออยู่น้อยมาก ดังแสดงในรูปที่ 11ก ส่วนการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคนั้น ปริมาณกลูโคส 5 กรัมต่อลิตรจะให้การผลิตกรดชนิดนี้สูงที่สุด โดยให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิค 321 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่ 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ จากนั้นจึงมีปริมาณลดลง ขณะที่กลูโคสที่ 2, 10 และ 15 กรัมต่อลิตร จะมีการผลิตกรดรองลงมาตามลำดับ เมื่อดูค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดพบว่าค่านี้จะลดลงอย่างรวดเร็วใน 15 ชั่วโมงแรกของการเจริญแล้วจึงคงระดับ (รูปที่ 11ข) จากการทดลองนี้จึงเลือกใช้ปริมาณกลูโคสเริ่มต้นที่ 5 กรัมต่อลิตร สำหรับเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 11ก ศึกษาเปรียบเทียบความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการเจริญและปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ โดยเลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารสูตรที่ 2 ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 7.0 ที่อุณหภูมิห้อง (28-32°ซ) ความเร็วรอบของการเขย่า 200 รอบต่อนาที โดยใช้หัวเชื้อที่เลี้ยงในภาวะที่มีอากาศที่ได้จากรูป 7ก ที่มีอายุ 9 ชั่วโมง ปริมาณ 10 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร)

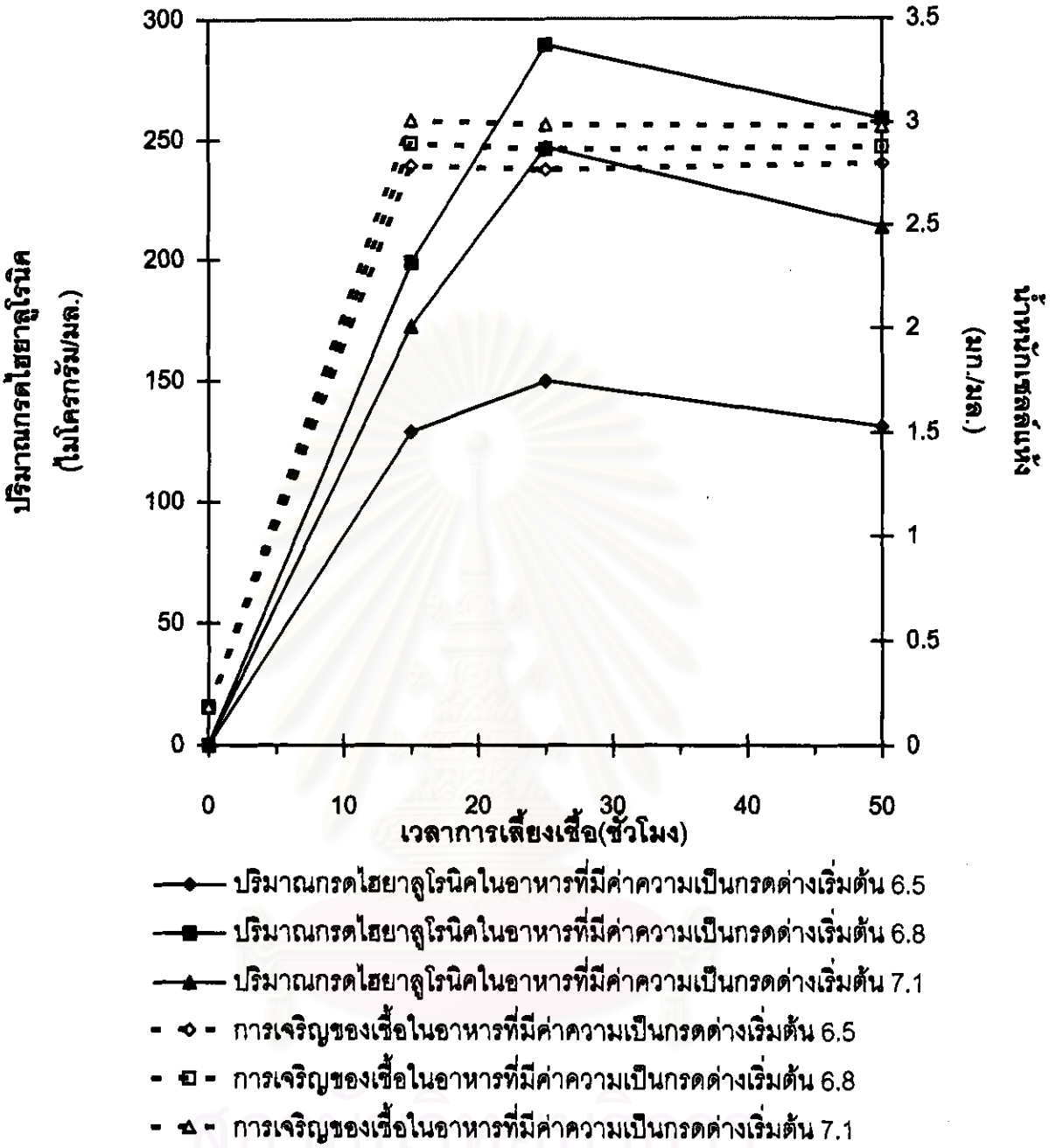


รูปที่ 11ข ศึกษาเปรียบเทียบความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคและค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารสูตรที่ 2 มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 7.0 โดยใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับรูปที่ 11ก

3.2.4 ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ เพื่อการผลิตไฮยาลูโรนิค

จากผลการศึกษาในข้อที่ 3.2.1 ที่คาดว่าค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นน่าจะมีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ดังนั้นจึงทำการทดลองแปรผันค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.5, 6.8 และ 7.1 (Johns และคณะ, 1994) แล้วติดตามการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคโดย *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรที่ 2 โดยใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับในข้อที่ 3.2.3 พบว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ 6.8 เชื้อจะมีอัตราการเจริญที่ดีกว่า 7.1 และ 6.5 ตามลำดับ ในขณะที่การผลิตกรดไฮยาลูโรนิคนั้น พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดด่างเป็น 6.8 เชื้อจะมีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้ดีที่สุดคือให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิค 286 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ ตามด้วยที่ค่าความเป็นกรดด่างที่ 7.1 และ 6.5 ให้การผลิตกรดรองลงมาตามลำดับ นอกจากนี้จากผลการทดลองดังกล่าวยังจะสังเกตุได้ว่าทั้งการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 และ 7.1 มีความเหมาะสมมากกว่าค่าความเป็นกรดด่างที่ 6.5 ทั้งนี้อาจเกิดเนื่องจากการปรับตัวของเชื้อเพื่อหลีกเลี่ยงภาวะการเป็นกรดสูงในระหว่างการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ดังแสดงในรูปที่ 12 ดังนั้นในการทดลองขั้นตอนต่อๆไป จึงเลือกใช้ค่าความเป็นกรดด่างที่ 6.8 สำหรับการเลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 เพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



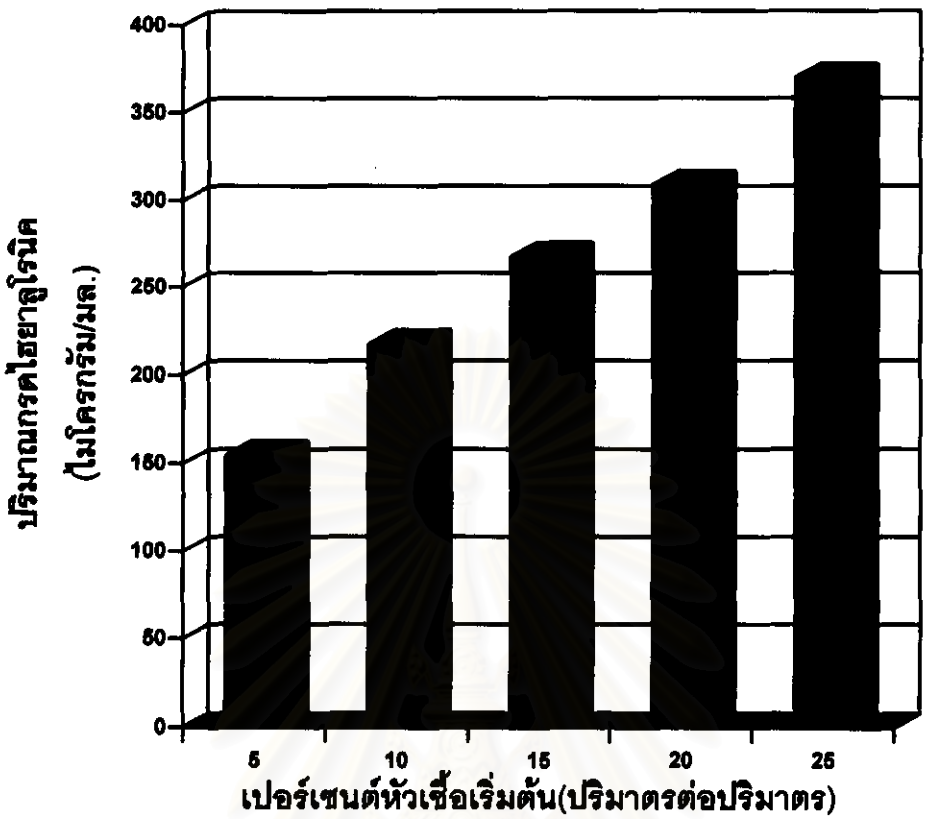
รูปที่ 12 ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารสูตรที่ 2 ที่อุณหภูมิห้อง (28-32°ซ) ความเร็วรอบของการเขย่า 200 รอบต่อนาที ปริมาณกลูโคส 5 กรัมต่อลิตร โดยใช้หัวเชื้อในภาวะที่มีอากาศที่ได้จากรูป 7ก อายุหัวเชื้อ 9 ชั่วโมง เป็นเวลา 50 ชั่วโมง แล้วติดตามการเจริญและวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคที่สร้างในช่วงเวลาต่างๆ

3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246

3.3.1 ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

ทำการแปรผันปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค โดยเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดที่ 2 ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 6.8 ที่อุณหภูมิห้อง (28-32°ซ) ความเร็วรอบของการเขย่า 200 รอบต่อนาที ปริมาณกลูโคส 5 กรัมต่อลิตร โดยแปรผันปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเป็น 5, 10, 15, 20, และ 25 เปอร์เซนต์(ปริมาตรต่อปริมาตร) พบว่าปริมาณหัวเชื้อ 25 เปอร์เซนต์ จะให้การผลิตกรดไฮยาลูโรนิคสูงที่สุด โดยมีปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคเป็น 370 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่ 24 ชั่วโมงของการเจริญ รองลงมาคือ ปริมาณหัวเชื้อ 20 เปอร์เซนต์ที่ให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคเป็น 309 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างจากปริมาณหัวเชื้อที่ 25 เปอร์เซนต์มากนัก ดังแสดงในรูปที่ 13 ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้ปริมาณหัวเชื้อ 20 เปอร์เซนต์ ในการเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 เพื่อความสะดวกในการทำงาน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 13 เปรียบเทียบผลของปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของ S. *zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารสูตรที่ 2 ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 6.8 และปริมาณกลูโคส 5 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้อง (28-32°ซ) ความเร็วรอบของการเขย่า 200 รอบต่อนาที อายุหัวเชื้อ 9 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.2 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

3.3.2.1 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ เพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

จากการที่จุลินทรีย์สามารถใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆสำหรับการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ได้ด้วยประสิทธิภาพที่ต่างกัน จึงเป็นที่น่าสนใจสำหรับการหาชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค จึงทำการเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรที่ 2 ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเป็น 6.8 ที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบของการเขย่าเป็น 200 รอบต่อนาที ปริมาณหัวเชื้อ 20%(ปริมาตรต่อปริมาตร) อายุหัวเชื้อ 9 ชั่วโมง แล้วแปรผันแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อจากกลูโคสเป็นซูโครส, ฟรุกโทส, และกาแลกโตส (โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลที่เท่ากันคือ 0.5%) พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้การเจริญของเชื้อและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคสูงที่สุด โดยให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิค 490 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนประมาณ 2 เท่า ในขณะที่การใช้ฟรุกโตสและ กาแลกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการเจริญและการผลิตกรดดังกล่าวแทบไม่มีความแตกต่างกับเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (ตารางที่ 5) ดังนั้นจึงเลือกใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค โดยทดลองเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในสูตรอาหารชนิดที่ 2 ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 6.8 ปริมาณน้ำตาล 5 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้อง(28-32°ซ) ความเร็วรอบของการเขย่า 200 รอบต่อนาที ปริมาณหัวเชื้อ 20%(ปริมาตรต่อปริมาตร) อายุหัวเชื้อ 9 ชั่วโมง

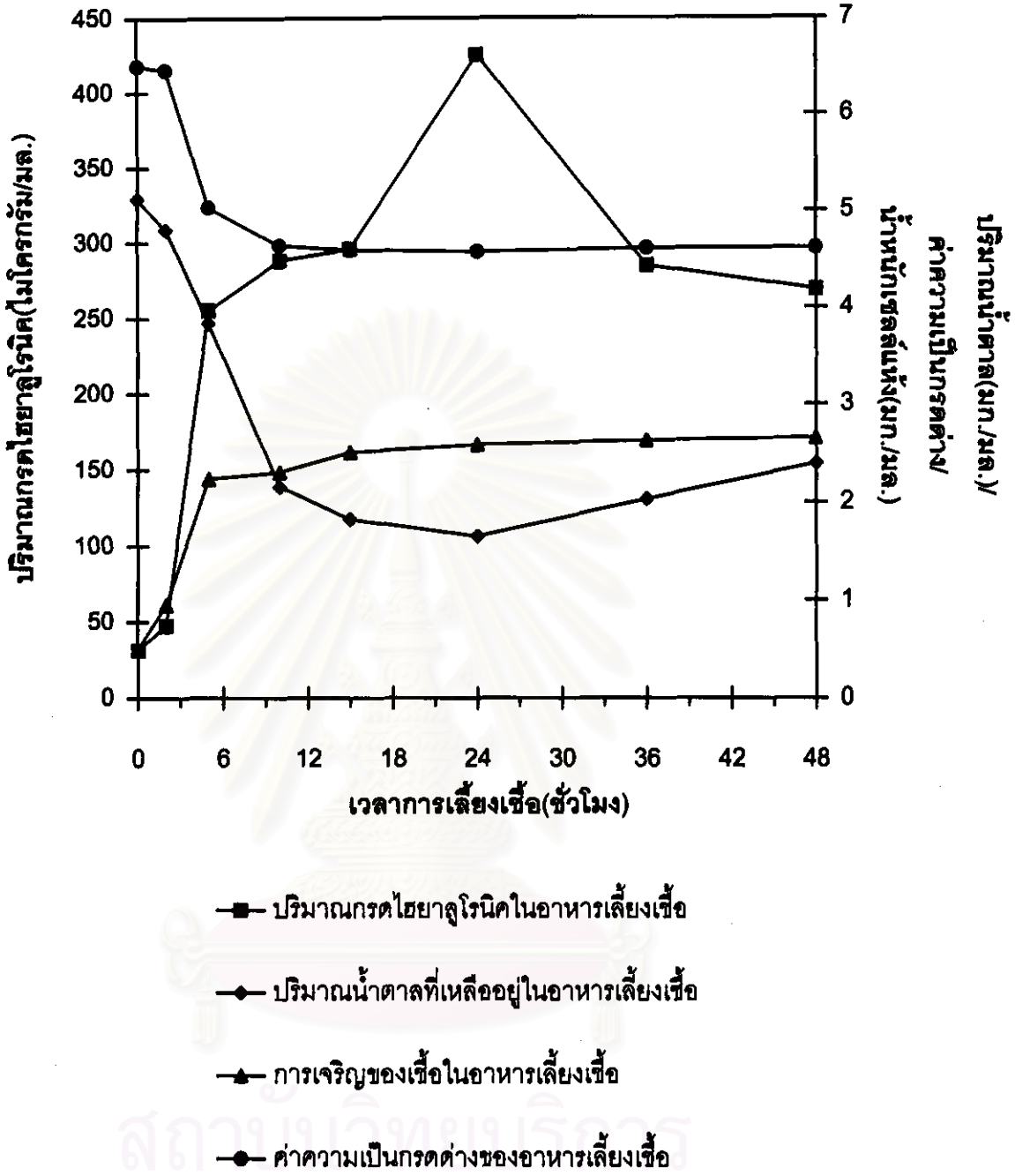
ชนิดของแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิค (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)				น้ำหนักเซลล์แห้ง (มก./มล.)			
	ชั่วโมงการเลี้ยงเชื้อ				ชั่วโมงการเลี้ยงเชื้อ			
	0	15	24	36	0	15	24	36
กลูโคส	0	166.5	205.2	145.1	0.323	2.68	2.75	2.76
ซูโครส	0	425.9	490.4	462.9	0.323	3.36	3.38	3.59
ฟรุกโทส	0	95.5	109.4	103.6	0.323	2.78	2.75	2.89
กาแลกโตส	0	51.6	133.8	106.0	0.323	2.31	2.94	2.89

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.2.2 รูปแบบการเจริญ ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณน้ำตาลและปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคที่ผลิตโดยเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 เมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการทดลองที่ 3.3.2.1 พบว่าซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค การทดลองนี้จึงจะศึกษารูปแบบการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค เมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ 2 ปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน แล้วเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 โดยใช้ภาวะการเลี้ยงเช่นเดียวกับในข้อที่ 3.3.2.1 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่าเชื้อเจริญอย่างรวดเร็วภายใน 10 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ และสูงสุดในชั่วโมงที่ 15 โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้งเป็น 2.51 มก./มล. แล้วจึงคงที่ สำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค พบว่าเชื้อจะมีการผลิตกรดนี้อย่างรวดเร็วหลังจากการเลี้ยงเชื้อในชั่วโมงที่ 2 ของการเลี้ยงเชื้อ และมีการผลิตกรดดังกล่าวสูงที่สุดที่ชั่วโมงที่ 24 โดยให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิค 425 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงค่อยๆลดต่ำลงในเวลาต่อมา น้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อจะถูกใช้อย่างรวดเร็วในช่วง 10 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ แล้วค่อยลดระดับลงในการเจริญช่วงต่อมา ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 10 ชั่วโมงแรกของการเจริญ แล้วจึงมีค่าคงที่อยู่ในช่วงกรดด่างประมาณ 4.5-4.6 ซึ่งผลดังกล่าวมีรูปแบบที่คล้ายคลึงกับเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 10)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



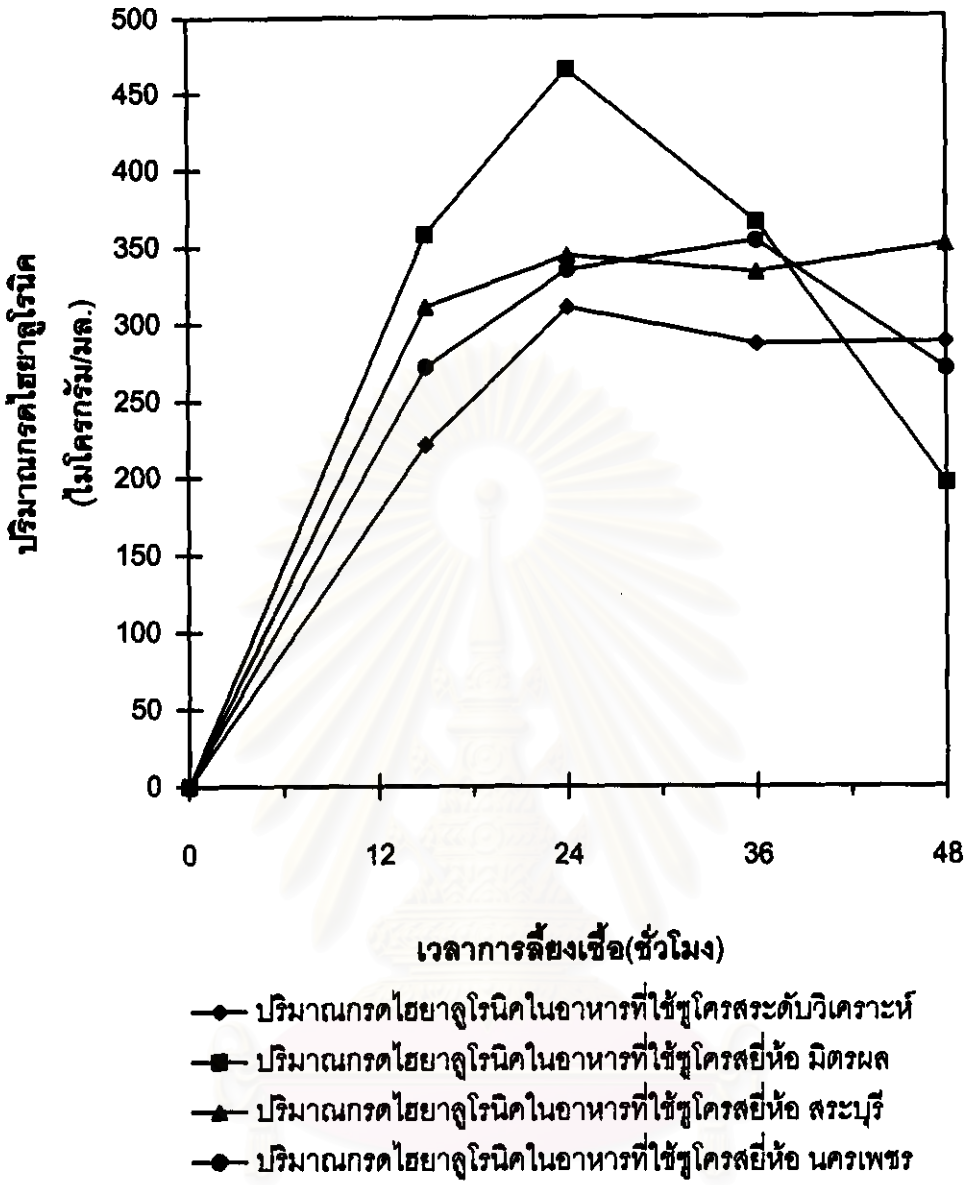
รูปที่ 14 การเจริญ ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณน้ำตาล และปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคที่ผลิตของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารสูตรที่ 2 ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 6.8 ปริมาณซูโครส 5 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้อง(28-32°ซ) ความเร็วรอบของการเขย่า 200 รอบต่อนาที ปริมาณหัวเชื้อ 20% (ปริมาตรต่อปริมาตร) อายุหัวเชื้อ 9 ชั่วโมง

3.3.2.3. การใช้น้ำตาลทรายเกรดอาหารสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

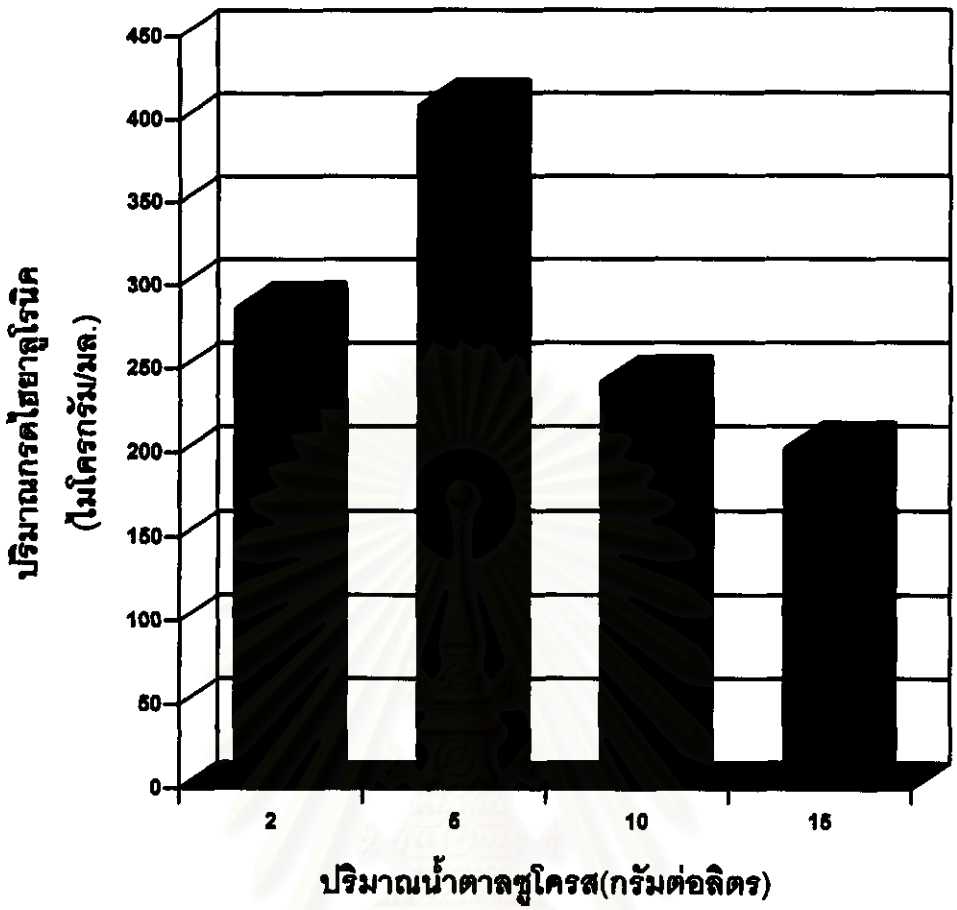
จากผลการทดลองในข้อที่ 3.3.2.2 ทำให้ทราบว่าซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคนั้น เมื่อคำนึงถึงในทางปฏิบัติจริงควรต้องใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูก จึงทดลองหาความเป็นไปได้สำหรับการใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนแทนการใช้ซูโครส (เกรดวิเคราะห์) ในอาหารสูตรที่ 2 โดยเปรียบเทียบการเลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ที่ใช้แหล่งของซูโครส (เกรดวิเคราะห์) เทียบกับน้ำตาลทรายของบริษัทมิตรผล, บริษัทสระบุรี และบริษัทนครเพชร (5 กรัมต่อลิตร) ภายใต้ภาวะการเลี้ยงเชื้อเหมือนกับข้อ 3.3.2.2 พบว่าซูโครสจากบริษัทมิตรผลให้ปริมาณการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคมากที่สุดคือ 465 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ยังพบว่าแหล่งของซูโครสที่เป็นเกรดอาหารจะให้การผลิตกรดชนิดนี้มากกว่าเกรดวิเคราะห์ ดังแสดงในรูปที่ 15 ดังนั้นในการทดลองขั้นตอนต่อไปจึงเลือกใช้น้ำตาลทรายของบริษัทมิตรผลเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ต่อไป

3.3.2.4 ปริมาณน้ำตาลทรายที่เหมาะสมต่อการเจริญ เพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

จากผลการทดลองในข้อที่ 3.2.3 ทำให้ทราบว่าปริมาณกลูโคสเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ดังนั้นเมื่อเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนมาเป็นซูโครสบริษัทมิตรผลจึงทำการหาปริมาณซูโครสที่เหมาะสมอีกครั้ง เพราะน้ำตาลมิตรผลมีความบริสุทธิ์ต่ำ ดังนั้นสารที่ปนเปื้อนมาอาจจะมีผลต่อกิจกรรมของเซลล์ทำให้ปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคเปลี่ยนแปลงไป จึงทำการเลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 ที่มีการแปรผันปริมาณน้ำตาลมิตรผลเป็น 2, 5, 10 และ 15 กรัมต่อลิตร (Nimrod และคณะ, 1986) จากผลการทดลองในรูปที่ 16 พบว่าปริมาณน้ำตาลมิตรผลที่ 5 กรัมต่อลิตร ให้การผลิตกรดไฮยาลูโรนิคดีที่สุด รองลงมาคือที่ 2, 10 และ 15 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งผลดังกล่าวนี้เหมือนกับเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นจึงยังคงใช้ปริมาณน้ำตาลมิตรผล 5 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคต่อไป



รูปที่ 15 ผลของแหล่งซูโครสที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค โดยทดลองเลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารสูตรที่ 2 ที่มีปริมาณซูโครส 5 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 ที่อุณหภูมิห้อง(28-32°ซ) ความเร็วรอบของการเขย่าเป็น 200 รอบต่อนาที ปริมาณหัวเชื้อ 20 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) อายุหัวเชื้อ 9 ชั่วโมง

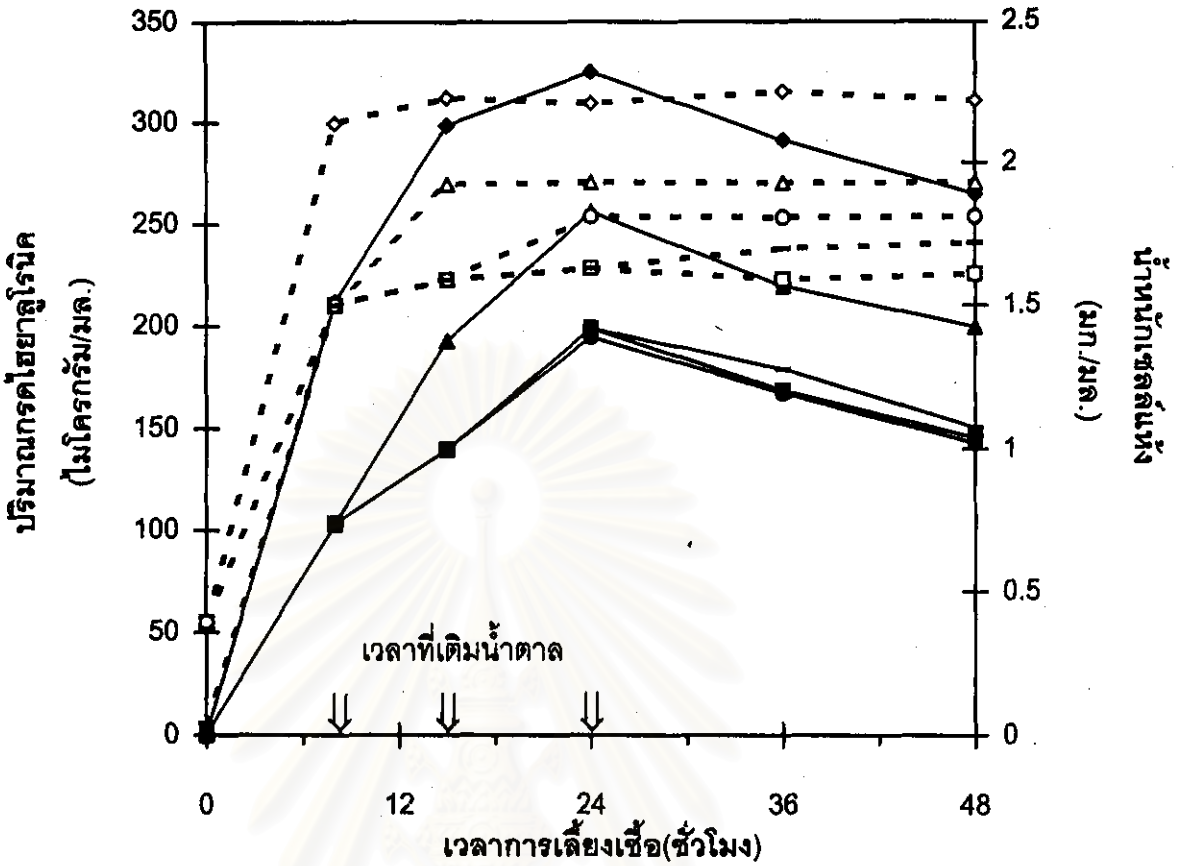


รูปที่ 16 ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค โดยเลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารสูตรที่ 2 ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 ที่อุณหภูมิห้อง (28-32°ซ) ความเร็วรอบของการเขย่าเป็น 200 รอบต่อนาที ปริมาณหัวเชื้อ 20 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) อายุหัวเชื้อ 9 ชั่วโมง

3.3.2.5 การแบ่งเติมน้ำตาลซูโครสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญ เพื่อการผลิต กรดไฮยาลูโรนิค

จากการศึกษาของ Nimrod และคณะ(1986) พบว่าการแบ่งเติมน้ำตาลเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเข้าสู่การเจริญแบบลอกาลิทิมิก สามารถเพิ่มการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงศึกษาผลของการแบ่งเติมน้ำตาลที่เวลาต่างๆของการเลี้ยงเชื้อ โดยเลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารสูตรที่ 2 (มีซูโครส 0.5%) ทั้งที่มีการแบ่งเติมน้ำตาลและไม่แบ่งเติมน้ำตาลซูโครส ในกรณีแบ่งเติมจะให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 0.15% แล้วเติมอีก 0.35% ที่เวลา 8 หรือ 15 หรือ 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ พบว่าการแบ่งเติมน้ำตาลซูโครสที่เวลาการเลี้ยงเชื้อต่างๆ ไม่สามารถเพิ่มการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้ เมื่อเทียบกับอาหารที่ไม่มีการแบ่งเติมน้ำตาล ดังแสดงในรูปที่ 17

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

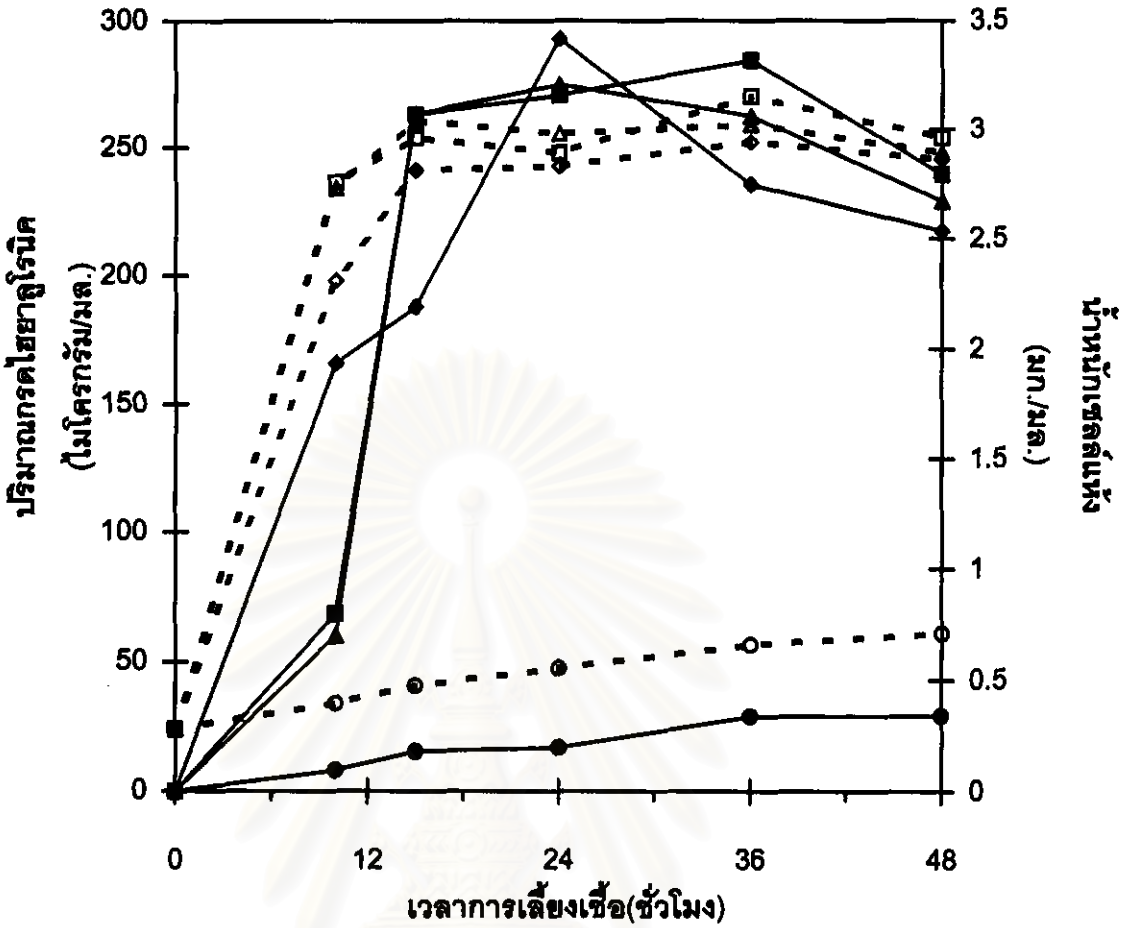


รูปที่ 17 ผลการแบ่งเติมน้ำตาลที่มีต่อการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 ที่อุณหภูมิห้อง(28-32°ซ) ความเร็วรอบของการเขย่าเป็น 200 รอบต่อนาที ปริมาณหัวเชื้อ 20 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) อายุหัวเชื้อ 9 ชั่วโมง

3.3.2.6 เกลือแร่ที่จำเป็นสำหรับการเลี้ยงเชื้อ เพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

เนื่องจากอาหารที่ใช้สำหรับศึกษาการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคมีสารประกอบเชิงซ้อนเป็นส่วนประกอบ ตัวอย่างเช่น เคซีนไฮโดรไลเซท และสารสกัดจากยีสต์ การทดลองจึงจะศึกษาว่าถ้าไม่เสริมเกลือแร่ต่างๆ ได้แก่ โซเดียมคลอไรด์ แมกนีเซียมซัลเฟต หรือไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต จะมีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคหรือไม่ และจากผลการทดลองพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ขาดไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตมีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคมากที่สุด โดยทำให้มีอัตราการเจริญและการผลิตกรดดังกล่าวต่ำที่สุด รองลงมาคืออาหารเหลวที่ขาดแมกนีเซียมซัลเฟตและโซเดียมคลอไรด์ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 18 และเมื่อพิจารณาถึงค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อร่วมด้วย(ตารางที่ 6) พบว่าค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นหลังการนึ่งฆ่าเชื้อของอาหารที่ขาดไดโพแทสเซียสไฮโดรเจนฟอสเฟตจะมีค่าลดต่ำลงมากที่สุด จากข้อมูลดังกล่าวจึงเป็นไปได้ว่าไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตมีความสำคัญในการควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง เป็นแหล่งไอออนของฟอสเฟตหรือไอออนของโพแทสเซียม ดังนั้นเพื่อพิสูจน์หน้าที่ของไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงแทนที่ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตด้วยโพแทสเซียมไนเตรท หรือโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการแทนที่ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตด้วยโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต โพแทสเซียมไนเตรท และในอาหารที่ไม่มีไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต จะมีการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคต่ำกว่าอาหารเหลวที่มีไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ดังแสดงในรูปที่ 19 แสดงให้เห็นว่าไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตน่าจะทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

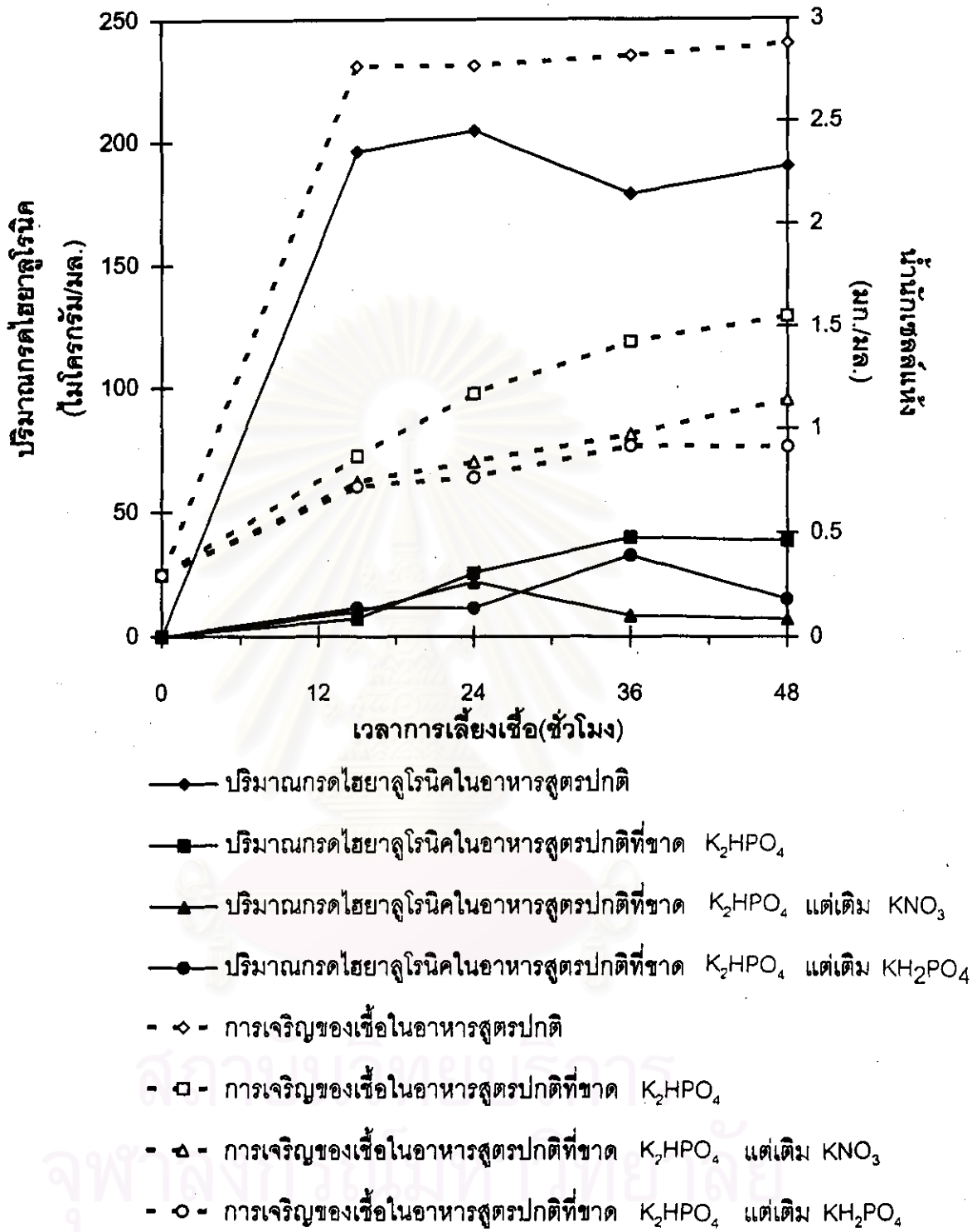


รูปที่ 18 ผลของแร่ธาตุในอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเป็นสำหรับการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ของ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้อง(28-30°ซ) ความเร็วรอบของการเขย่าเป็น 200 รอบต่อนาที ปริมาณหัวเชื้อ 20 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) อายุหัวเชื้อ 9 ชั่วโมง

ตารางที่ 6 ผลของเกลือแร่ชนิดต่างๆที่มีผลต่อค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทดลองเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารสูตรที่ 2 ปริมาณซูโครส 5 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 ภายใต้ภาวะการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับรูปที่ 18 ปริมาณหัวเชื้อ 20%(ปริมาตรต่อปริมาตร) อายุหัวเชื้อ 9 ชั่วโมง

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	ค่าความเป็นกรดด่าง				
	ชั่วโมงการเลี้ยงเชื้อ				
	0	15	24	36	48
อาหารชนิดที่ 2	6.60	4.78	4.63	4.57	4.56
อาหารชนิดที่ 2 (-NaCl)	6.64	4.71	4.66	4.59	4.57
อาหารชนิดที่ 2 (-$MgSO_4$)	6.62	4.74	4.64	4.61	4.60
อาหารชนิดที่ 2 (-K_2HPO_4)	5.95	5.38	5.35	5.46	5.47

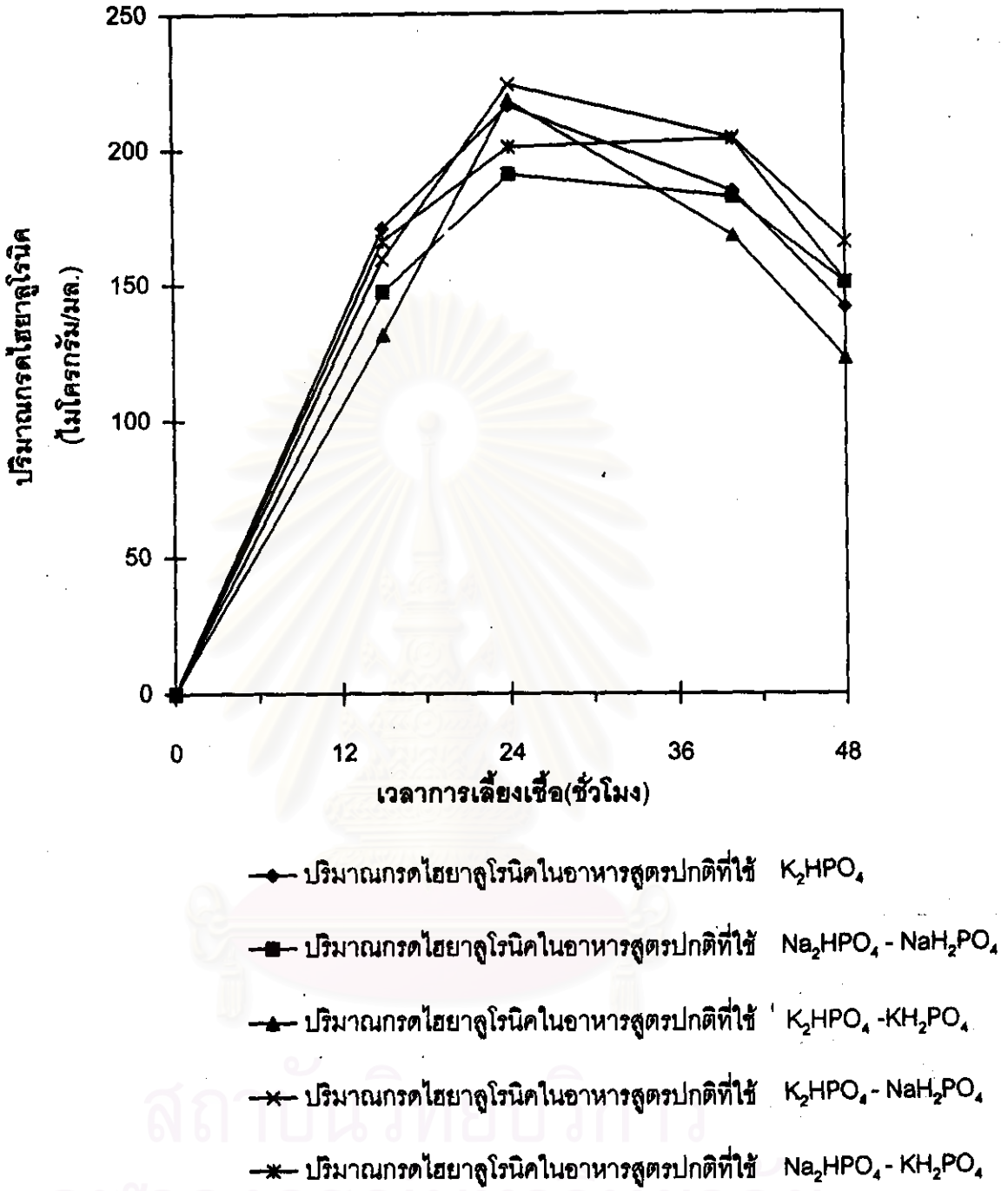
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 19 เปรียบเทียบการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของ *S. zooepidemicus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 ที่มีปริมาณซูโครส 5 กรัมต่อลิตร ที่เติมหรือขาด K_2HPO_4 หรือเติมแทนด้วย KNO_3 หรือ KH_2PO_4 โดยเลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ที่อุณหภูมิห้อง (28-30°ซ) ความเร็วรอบของการเขย่าเป็น 200 รอบต่อนาที ปริมาณหัวเชื้อ 20 เปอร์เซนต์(ปริมาตรต่อปริมาตร) อายุหัวเชื้อ 9 ชั่วโมง

จากนั้นศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการเป็นบัฟเฟอร์ระหว่างการใช้สารเพียงตัวเดียวกับสารสองตัวที่เป็นคู่กรดเบสกันในการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทดลองเติมสารที่เป็นคู่กรดเบสกันลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแทนที่ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต พบว่าในทุกภาวะที่ทดสอบแทบไม่มีความแตกต่างกันของการเจริญ ขณะที่ค่าความเป็นกรดด่างไม่มีความแตกต่างกันเลย ดังแสดงในตารางที่ 7 ส่วนการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคนั้นพบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันมากในแต่ละภาวะที่ใช้ในการทดสอบ ดังแสดงในรูปที่ 20 ดังนั้นในการทดลองขั้นตอนต่อไปเพื่อความสะดวกจึงเลือกใช้ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็นบัฟเฟอร์ที่ใช้สำหรับการเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ต่อไป จากทำการศึกษาถึงโซเดียมคลอไรด์และแมกนีเซียมซัลเฟตที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค โดยแปรผันปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 0 - 5 กรัมต่อลิตร และปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต 0 - 3 กรัมต่อลิตร พบว่าโซเดียมคลอไรด์ 2 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร จะให้การผลิตกรดไฮยาลูโรนิคสูงสุด โดยให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคเป็น 407 และ 324 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 21, และ 22 ตามลำดับ จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าปริมาณเกลือแร่ที่มากหรือน้อยเกินไปมีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

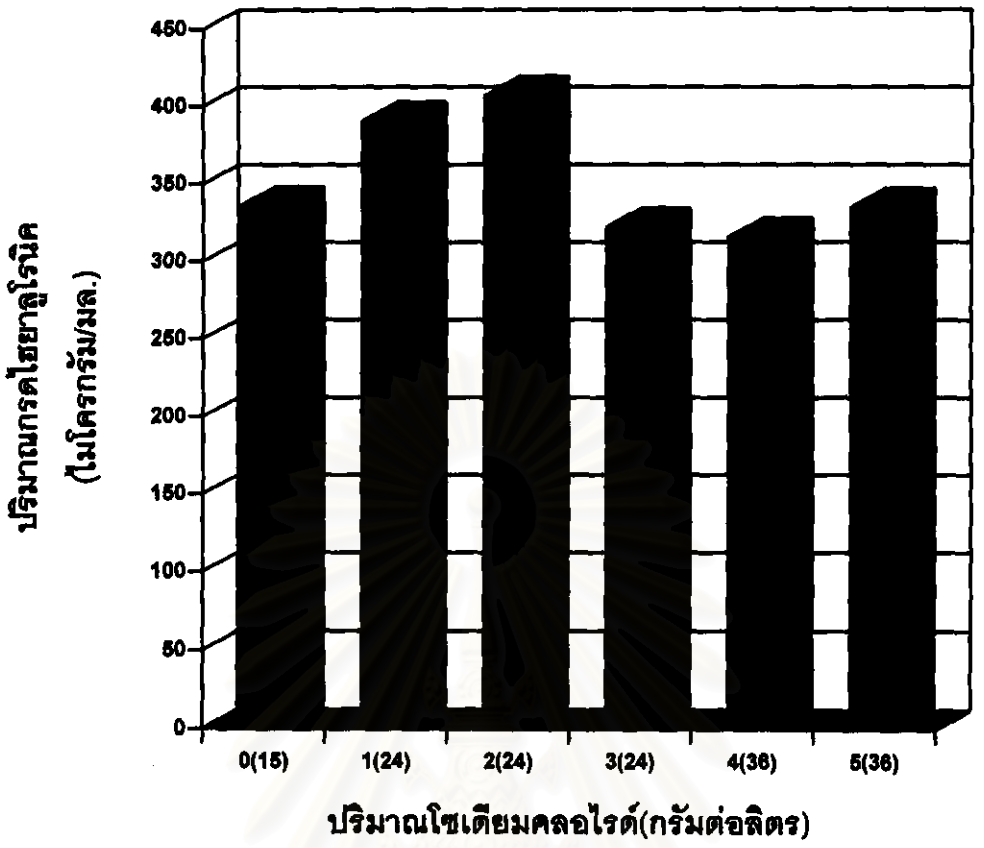
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 20 เปรียบเทียบชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม (มีปริมาณไอออนของฟอสเฟตที่เท่ากัน คือ 1.363 กรัมต่อลิตร) สำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค โดยเลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารสูตรที่ 2 ที่มีปริมาณซูโครส 5 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 ภายใต้ภาวะการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับรูปที่ 19

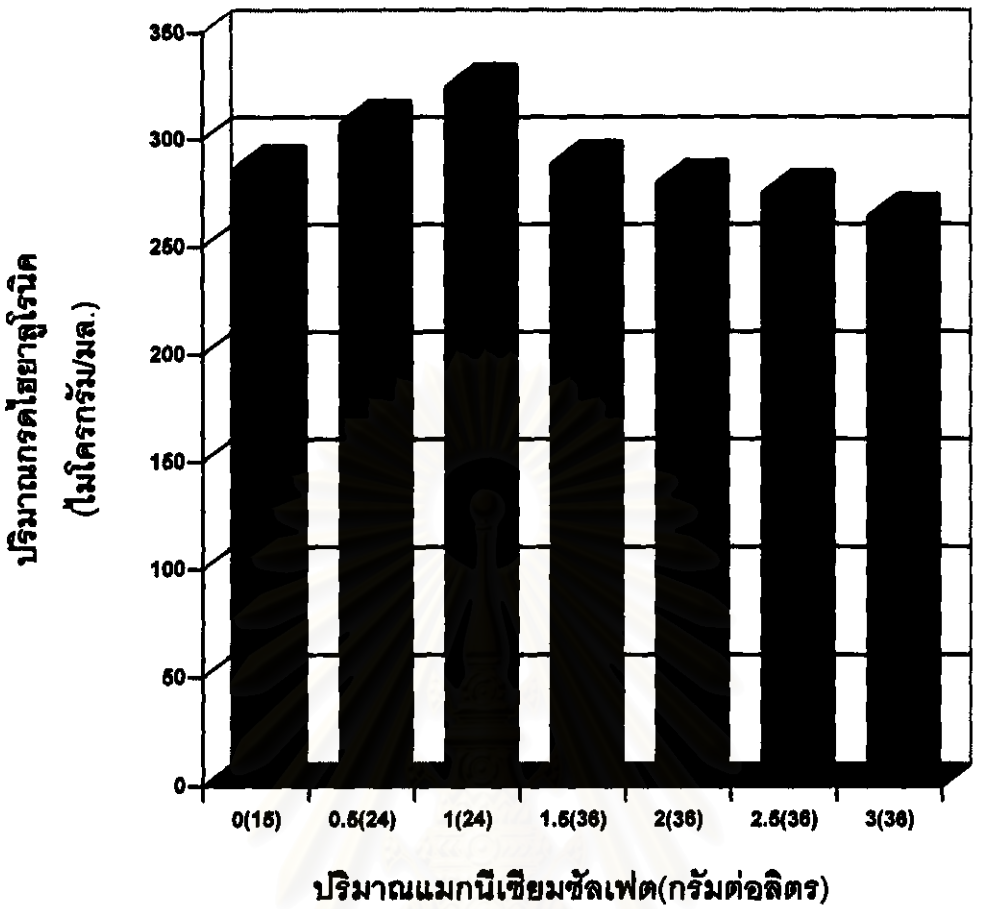
ตารางที่ 7 ผลของบัฟเฟอร์ต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค เมื่อใช้ปริมาณไอออนของฟอสเฟตที่เท่ากันคือ 1.363 กรัมต่อลิตร โดยทดลองเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารสูตรที่ 2 ที่มีปริมาณซูโครส 5 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 ภายใต้ภาวะการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับในรูปที่ 20 ปริมาณหัวเชื้อ 20%(ปริมาตรต่อปริมาตร) อายุหัวเชื้อ 9 ชั่วโมง

ชนิดของบัฟเฟอร์	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิค (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)				ค่าความเป็นกรดด่าง				น้ำหนักเซลล์แห้ง (มก./มล.)			
	ชั่วโมงการเลี้ยงเชื้อ				ชั่วโมงการเลี้ยงเชื้อ				ชั่วโมงการเลี้ยงเชื้อ			
	0	15	24	36	0	15	24	36	0	15	24	36
K_2HPO_4	0	170.8	215.9	184.1	6.60	4.82	4.67	4.68	0.32	2.10	2.13	2.23
Na_2HPO_4 -NaH_2PO_4	0	147.1	190.5	181.9	6.59	4.80	4.68	4.69	0.32	2.07	2.10	2.15
K_2HPO_4 -KH_2PO_4	0	131.2	217.7	167.5	6.60	4.81	4.69	4.70	0.32	2.07	2.10	2.15
K_2HPO_4 -NaH_2PO_4	0	159.2	223.7	203.6	6.60	4.82	4.70	4.70	0.32	2.05	2.07	2.15
Na_2HPO_4 -KH_2PO_4	0	165.9	200.7	203.3	6.60	4.80	4.70	4.71	0.32	2.05	2.10	2.15



รูปที่ 21 ผลของปริมาณโซเดียมคลอไรด์ที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค เมื่อเลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 ที่มีปริมาณซูโครส 5 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 6.8 ที่อุณหภูมิห้อง(28-32°ซ) ความเร็วรอบของการเขย่า 200 รอบต่อนาที ปริมาณหัวเชื้อ 20% (ปริมาตรต่อปริมาตร) อายุหัวเชื้อ 9 ชั่วโมง โดยแปรผันปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 0 - 5 กรัมต่อลิตร

หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บหมายถึง เวลาการเลี้ยงเชื้อ(ชั่วโมง)



รูปที่ 22 ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค เมื่อเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารสูตรที่ 2 ภายใต้ภาวะการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับในรูปที่ 21 โดยแปรผันปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต 0 - 3 กรัมต่อลิตร

หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บหมายถึง เวลาการเลี้ยงเชื้อ(ชั่วโมง)

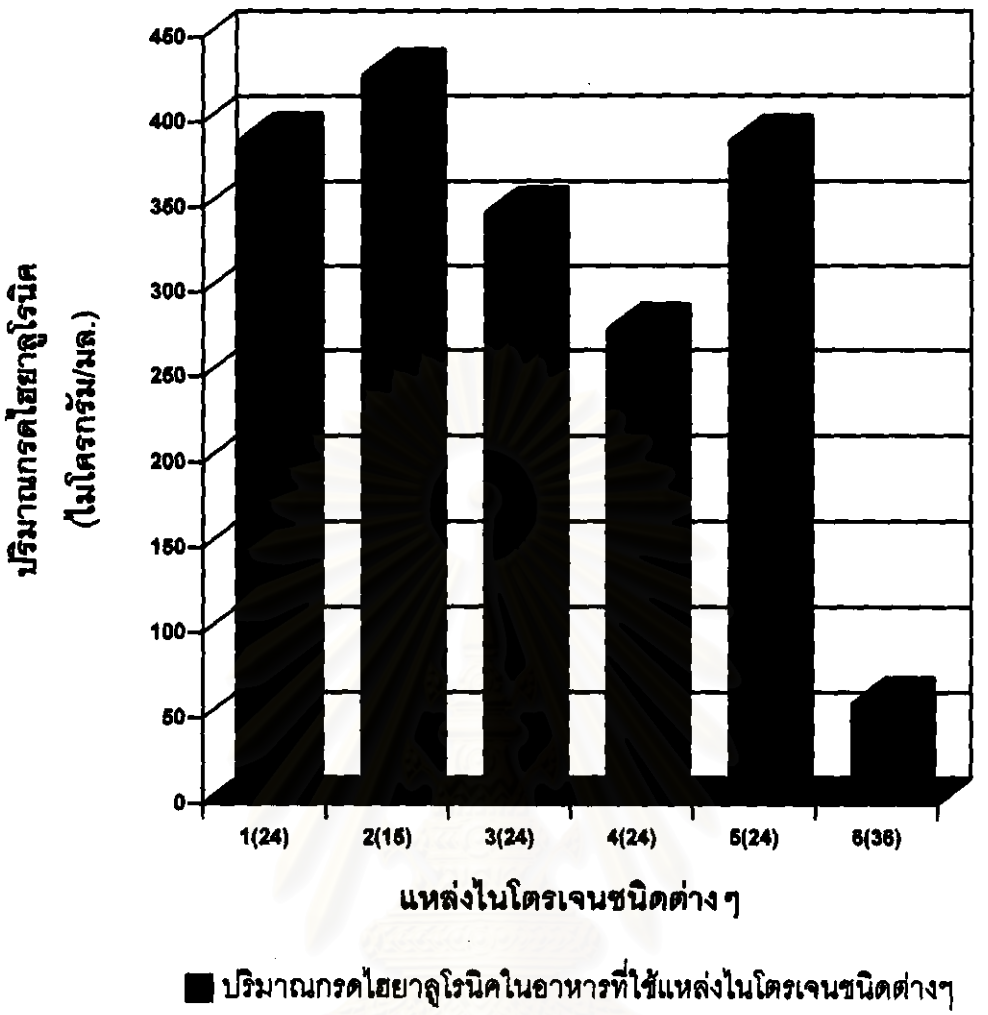
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.2.7 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

เมื่อทดลองแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในอาหารที่ใช้เลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 โดยการใช้พอลิเพพโตน, สารสกัดจากยีสต์, แอมโมเนียมซัลเฟต, แอมโมเนียม ซิเตรท และซอยล์บีนไฮโดรไลเซทแทนที่เคซีนไฮโดรไลเซท โดยปรับให้มีปริมาณของแต่ละตัวให้มีไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) เท่ากันคือ 0.138 เปอร์เซนต์ แล้วติดตามการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค พบว่าพอลิเพพโตน และแอมโมเนียมซิเตรทให้การผลิตกรดไฮยาลูโรนิคที่ใกล้เคียงกันเมื่อเทียบกับเคซีนไฮโดรไลเซท โดยอยู่ในช่วง 390 - 420 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาเป็นสารสกัดจากยีสต์ และแอมโมเนียมซัลเฟต (347 และ 278 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) ขณะที่ซอยล์บีนไฮโดรไลเซทมีการผลิตกรดดังกล่าวต่ำที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 23 แต่การนำไปใช้งานต้องคำนึงถึงความคุ้มทุนดังนั้นจึงเลือกใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ต่อไป เพราะราคาต่อหน่วยและปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าต่ำมากเมื่อเทียบกับไนโตรเจนแหล่งอื่นๆ คือ 18 บาท/กก. และ 0.65 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

3.3.2.8 ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการเจริญเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

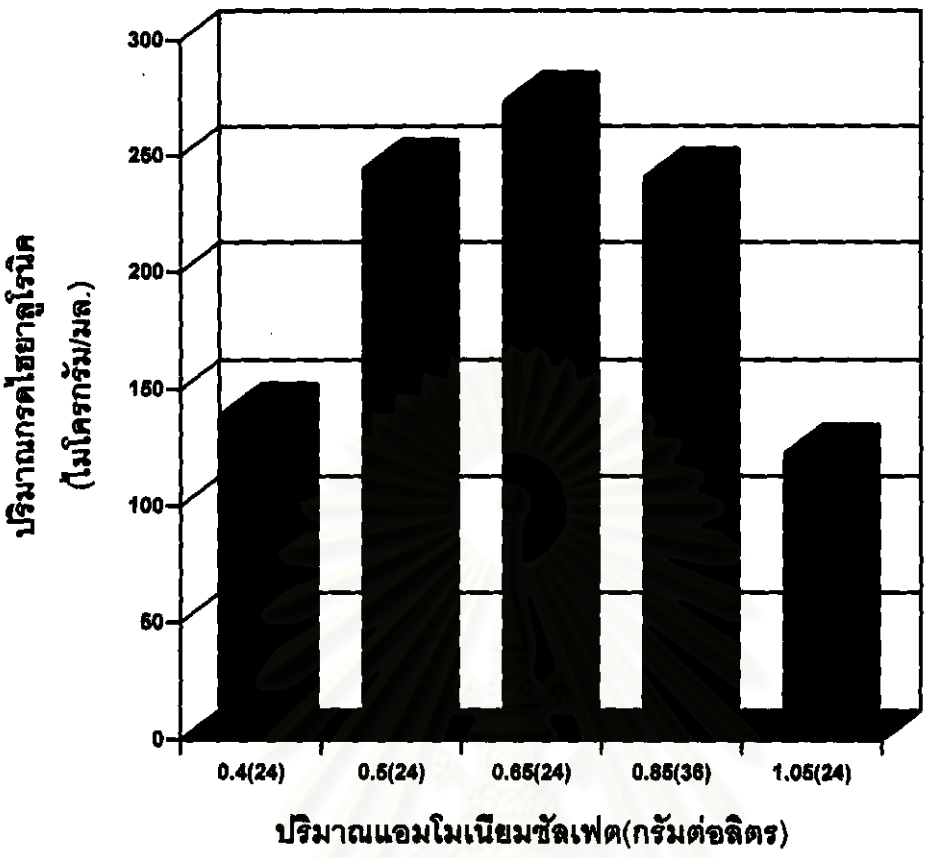
ทำการแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่คัดเลือกเป็นแหล่งไนโตรเจนต่อที่เป็น 0.4, 0.5, 0.65, 0.85 และ 1.05 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 พบว่าในทุกปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตแทบไม่มีความแตกต่างกันทั้งในรูปแบบของการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ดังแสดงในตารางที่ 8 ขณะที่ปริมาณ 0.65 กรัมต่อลิตร ให้การผลิตกรดไฮยาลูโรนิคสูงสุดที่ชั่วโมงการเลี้ยงเชื้อที่ 24 ชั่วโมง รองลงมาคือ 0.5, 0.85, 1.05 และ 0.4 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 24 ทั้งนี้จึงเป็นไปได้ว่า การมีปริมาณไนโตรเจนที่มากหรือน้อยเกินไปจะมีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค



1 เคซีนไฮโดรไลเซท
2 พอลิเปปโทน
3 สารสกัดจากยีสต์
4 แอมโมเนียมซัลเฟต
5 แอมโมเนียมซิเตรท
6 ซอล์ยบีนไฮโดรไลเซท

รูปที่ 23 เปรียบเทียบการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 เมื่อทำการแปรผันแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่มีเปอร์เซนต์ไนโตรเจนทั้งหมดที่เท่ากันคือ 0.138 โดยมีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 6.8 ที่อุณหภูมิห้อง (28-32°ซ) ความเร็วรอบของการเขย่า 200 รอบต่อนาที ปริมาณหัวเชื้อ 20% (ปริมาตรต่อปริมาตร) อายุหัวเชื้อ 9 ชั่วโมง

<u>หมายเหตุ</u> ตัวเลขในวงเล็บหมายถึง เวลาการเลี้ยงเชื้อ(ชั่วโมง)



รูปที่ 24 รูปแบบการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 เมื่อแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 ภายใต้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเช่นเดียวกับรูปที่ 23 และใช้หัวเชื้ออายุ 9 ชั่วโมง ในปริมาณ 20 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร)

หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บหมายถึง เวลาการเลี้ยงเชื้อ(ชั่วโมง)

ตารางที่ 8 ผลของปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค โดยทดลองเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารสูตรที่ 2 ปริมาณซูโครส 5 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 ภายใต้ภาวะการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับรูปที่ 24 ปริมาณหัวเชื้อ 20%(ปริมาตรต่อปริมาตร) อายุหัวเชื้อ 9 ชั่วโมง

ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิค (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)				น้ำหนักเซลล์แห้ง (มก./มล.)			
	ชั่วโมงการเลี้ยงเชื้อ				ชั่วโมงการเลี้ยงเชื้อ			
	0	15	24	36	0	15	24	36
0.40	0	131.1	139.9	84.2	0.34	2.18	2.18	2.31
0.50	0	190.4	244.2	159.8	0.32	2.20	2.18	2.26
0.65	0	180.5	273.2	166.4	0.37	2.18	2.23	2.26
0.85	0	159.3	192.2	240.2	0.34	2.07	2.13	2.20
1.05	0	63.61	149.4	122.2	0.37	2.07	2.07	2.18

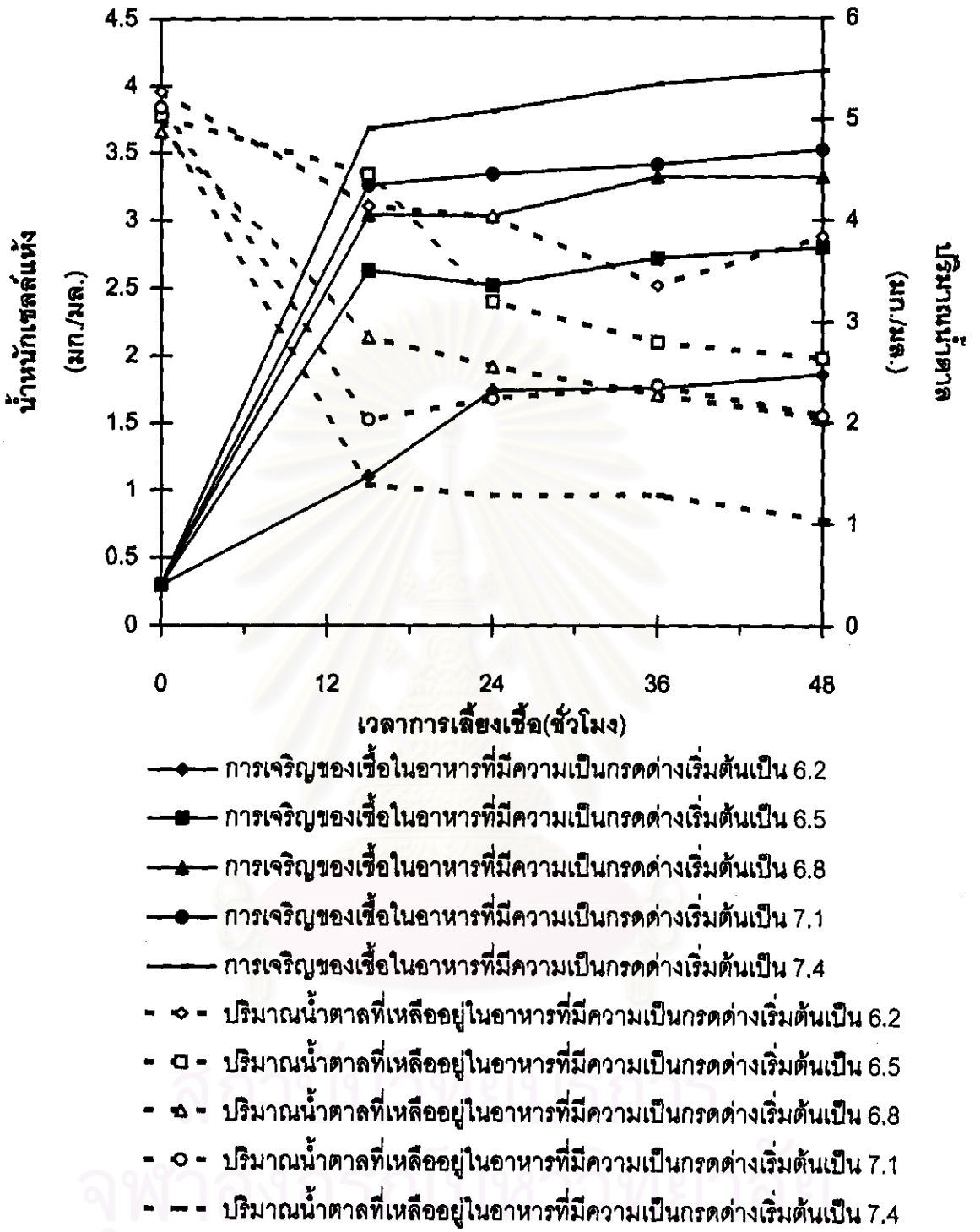
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.3 ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

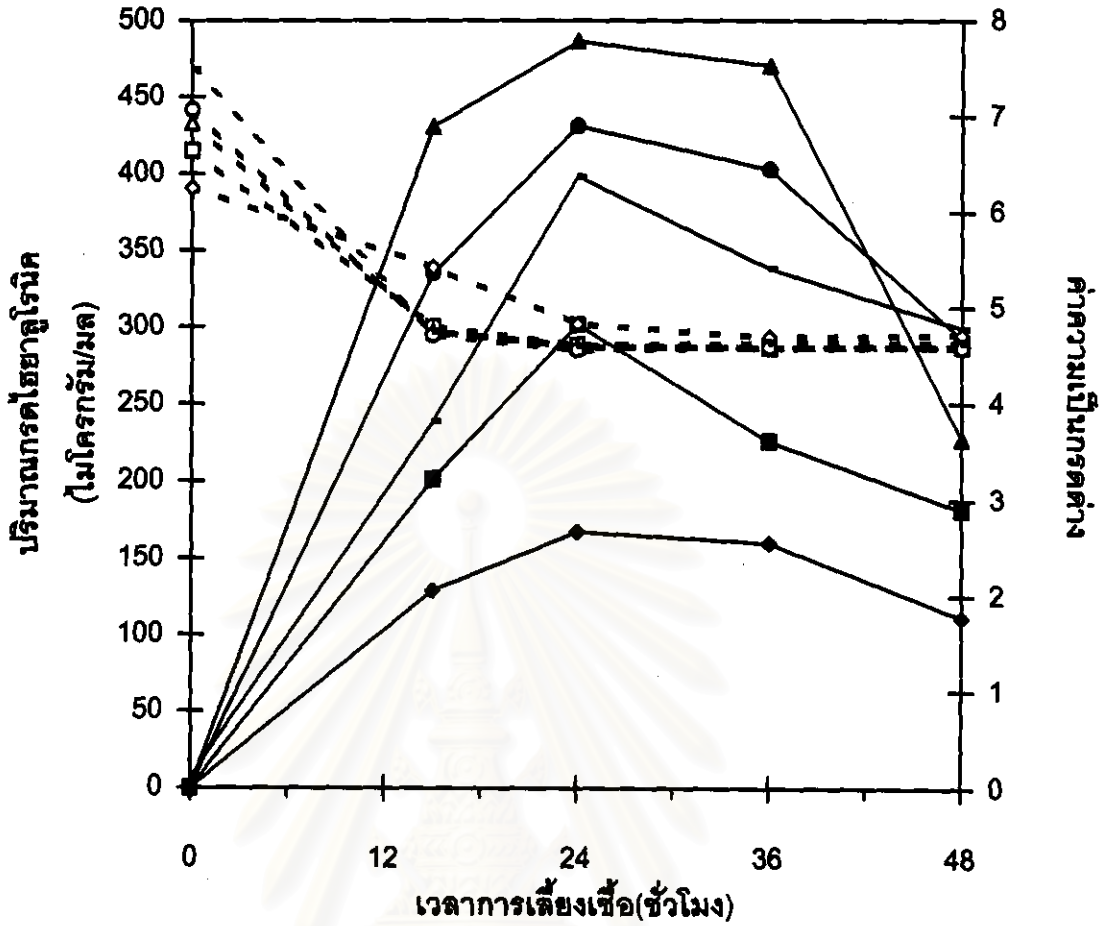
3.3.3.1 ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

จากผลการทดลองในข้อ 3.2.4 ทำให้ทราบว่าค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค โดยที่ความเป็นกรดด่างที่มีค่าค่อนไปทางเบสหรือกลางจะมีการเจริญและการผลิตกรดสูงกว่าค่าที่ค่อนไปทางกรด ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันข้อมูลดังกล่าวจึงศึกษาผลของความเป็นกรดด่างอีกครั้งโดยเพิ่มค่าความเป็นกรดด่างที่ 6.2 และ 7.4 ขึ้นมา โดยทำการเลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารสูตรที่ 2 ที่แปรผันค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.2, 6.5, 6.8, 7.1 และ 7.4 พบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่ 7.1 จะให้อัตราการเจริญดีกว่า 6.8, 7.4, 6.5 และ 6.2 ตามลำดับ (ดังในรูปที่ 25ก) ส่วนการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคนั้นพบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดด่างเป็น 6.8 เชื้อมีการผลิตกรดนี้ได้ดีที่สุดที่ชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ ได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคเป็น 486 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามด้วยค่าความเป็นกรดด่างที่ 7.1, 7.4, 6.5 และ 6.2 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 25ข ซึ่งผลดังกล่าวนี้สนับสนุนกับผลที่ได้เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 12)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 25ก การเจริญและปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 ที่มีปริมาณซูโครส 5 กรัมต่อลิตร ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 0.65 กรัมต่อลิตร ที่ใช้เลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ที่อุณหภูมิห้อง(28-32°ซ) ความเร็วรอบของการเขย่าเป็น 200 รอบต่อนาที ปริมาณหัวเชื้อ 20 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) อายุหัวเชื้อ 9 ชั่วโมง เมื่อแปรผันค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 25ข การผลิตกรดไฮยาลูโรนิค และค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 ที่มีปริมาณซูโครส 5 กรัมต่อลิตร ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 0.65 กรัมต่อลิตร ที่ใช้เลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 เมื่อแปรผันค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเช่นเดียวกับในรูปที่ 25ก

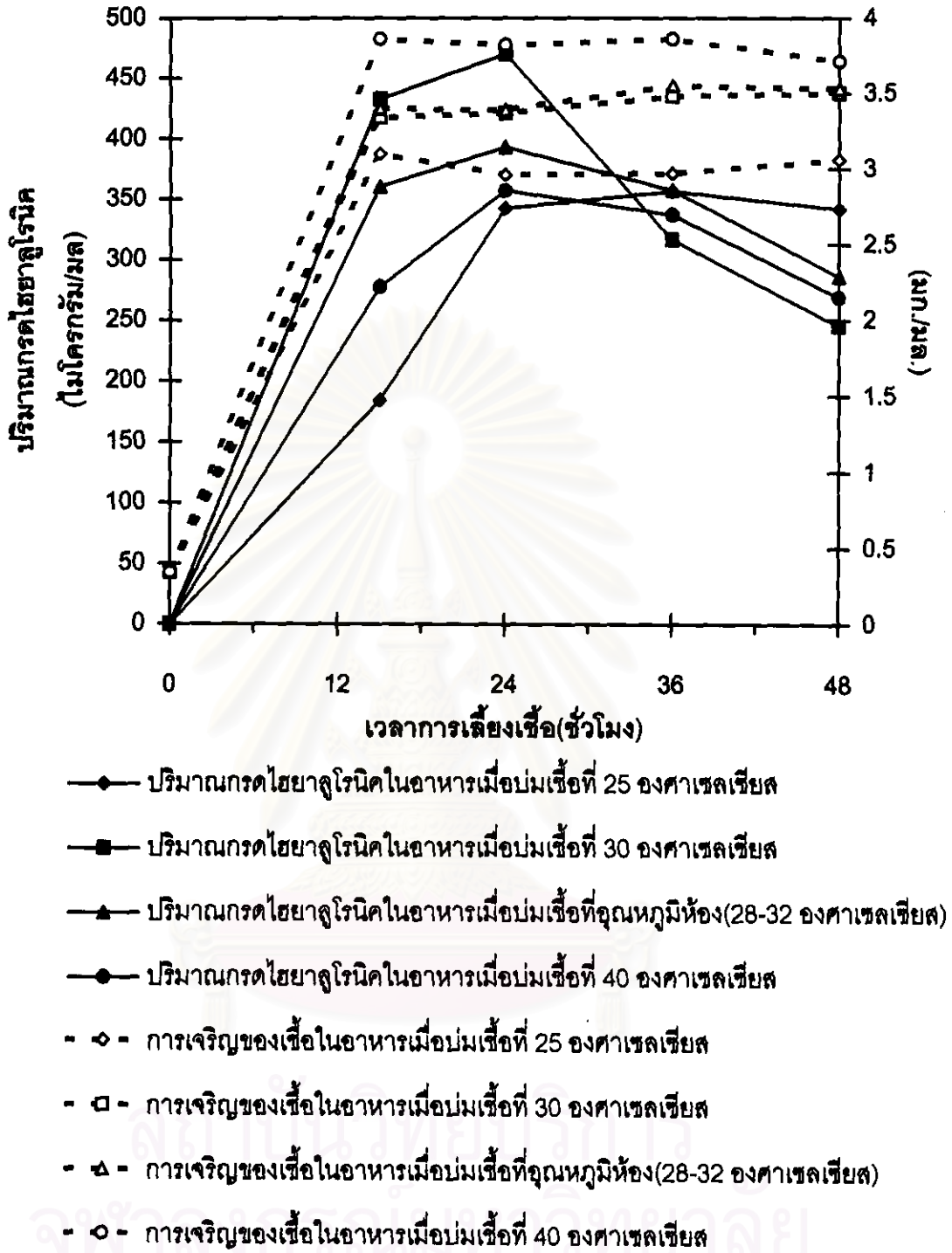
3.3.3.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ เพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

ทำการเลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารและภาวะที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 แต่ผันแปรอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเป็น 25°ซ, 30°ซ, อุณหภูมิห้อง (28-32°ซ) และ 40°ซ พบว่าที่อุณหภูมิ 40°ซ จะให้การเจริญสูงที่สุด รองลงมาคือ 30°ซ, อุณหภูมิห้อง(28-32°ซ) และ 25°ซ ตามลำดับ สำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคนั้น พบว่าที่อุณหภูมิ 30°ซ จะให้การผลิตกรดดังกล่าวสูงที่สุด (470 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ รองลงมาคือที่ อุณหภูมิห้อง (28-32°ซ), 40°ซ และ 25°ซ ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 26

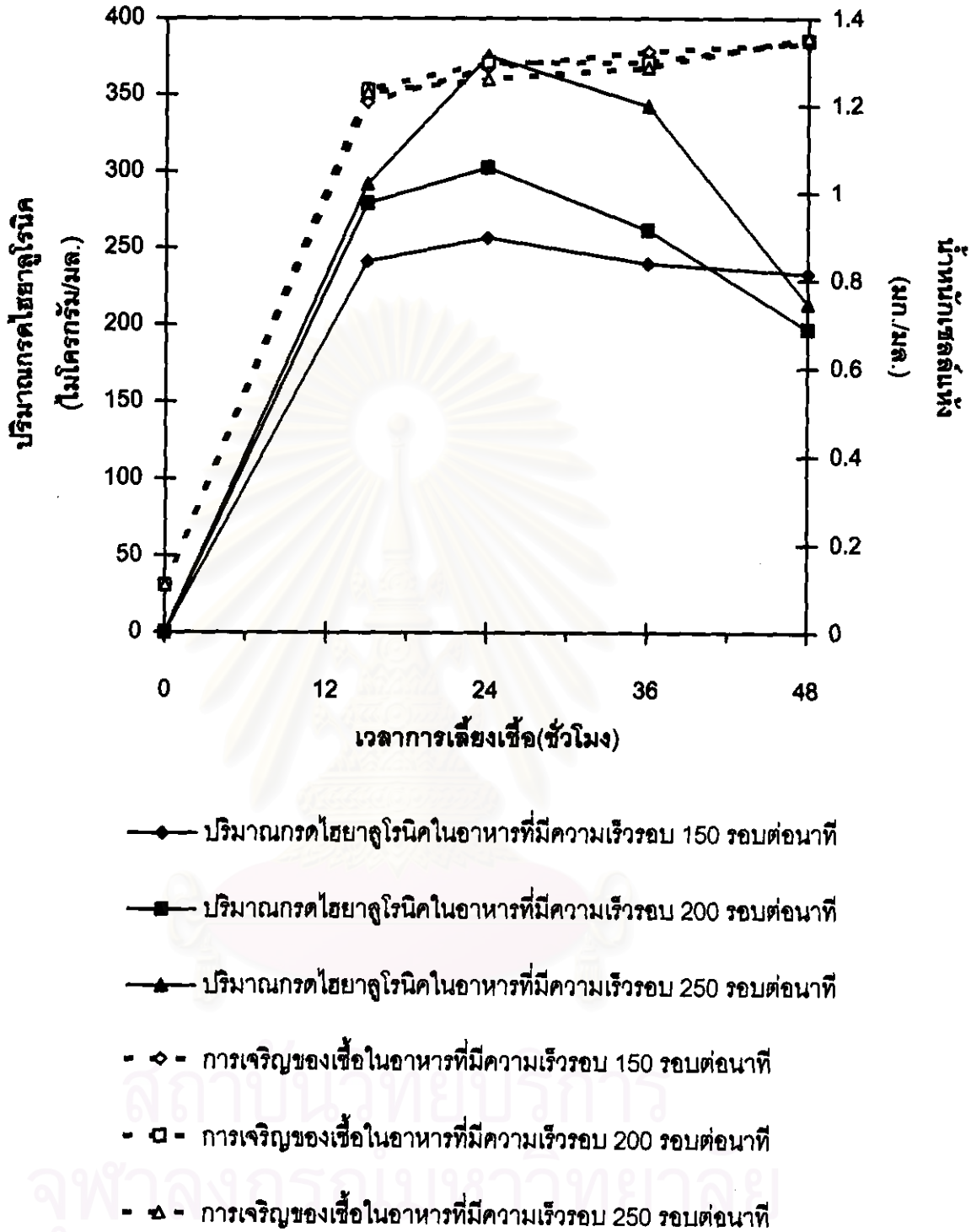
3.3.3.3 ความเร็วรอบของการเขย่าที่เหมาะสมต่อการเจริญ เพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

จากที่มีรายงานที่ค่อนข้างสับสนถึงบทบาทของออกซิเจนต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค โดยมีรายงานในเรื่องนี้ทั้งผลบวกและผลลบ (Johns และคณะ, 1994; Swann และคณะ, 1990) จึงทำการศึกษาผลของออกซิเจนโดยการแปรผันความเร็วรอบของการเขย่าในการเลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารสูตรที่ 2 ที่มีปริมาณน้ำตาล 5 กรัมต่อลิตร ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 0.65 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 เป็น 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที พบว่าที่ความเร็วรอบทั้งหมดดังกล่าวมีอัตราการเจริญใกล้เคียงกัน ส่วนการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคนั้นพบว่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที จะให้การผลิตกรดนี้สูงกว่าที่ความเร็วรอบ 200 และ 150 รอบต่อนาที ตามลำดับ โดยให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคสูงสุดคือ 375 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ชั่วโมงการเลี้ยงเชื้อที่ 24 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 27

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 26 ผลของอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารสูตรที่ 2 ที่มีซูโครส 5 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 0.65 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 ความเร็วรอบของการเขย่า 200 รอบต่อนาที และใช้ปริมาณหัวเชื้อ 20 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) อายุหัวเชื้อ 9 ชั่วโมง



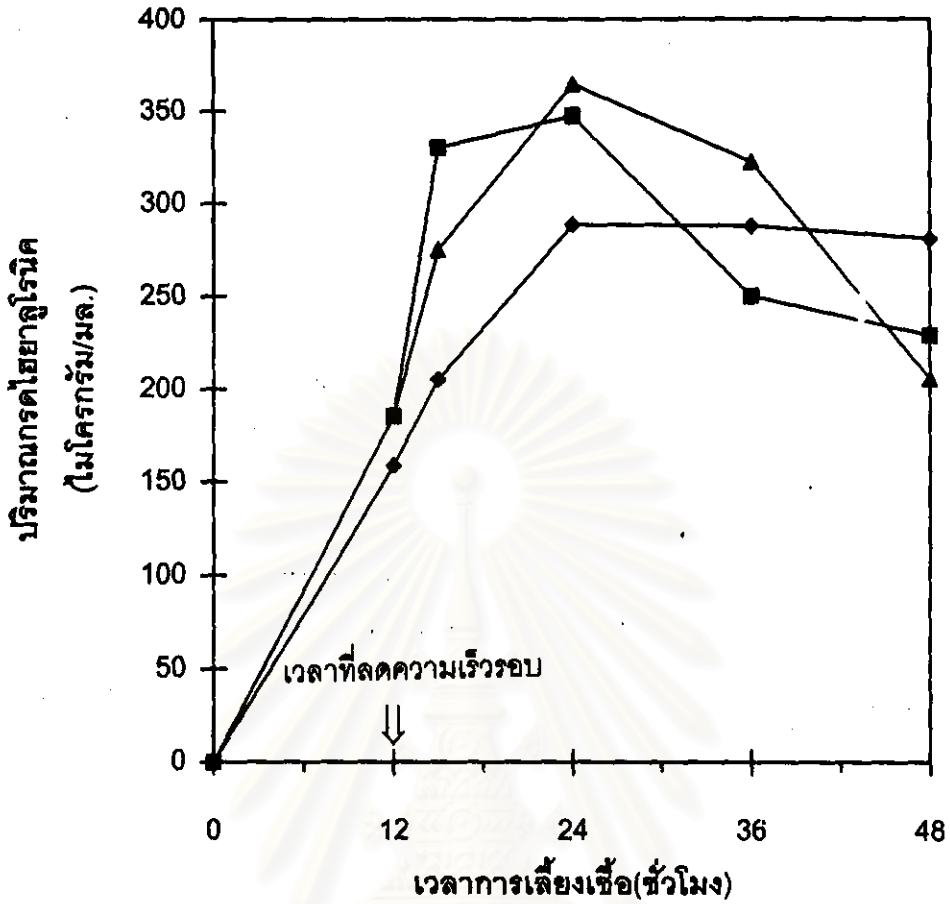
รูปที่ 27 การเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 เมื่อเลี้ยงภายใต้ภาวะดังเช่นในรูปที่ 26 ที่มีการแปรผันความเร็วรอบของการเขย่า เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.3.3.4 การลดลงของความเร็วรอบการเขย่าในช่วงการเจริญ เพื่อเพิ่มผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

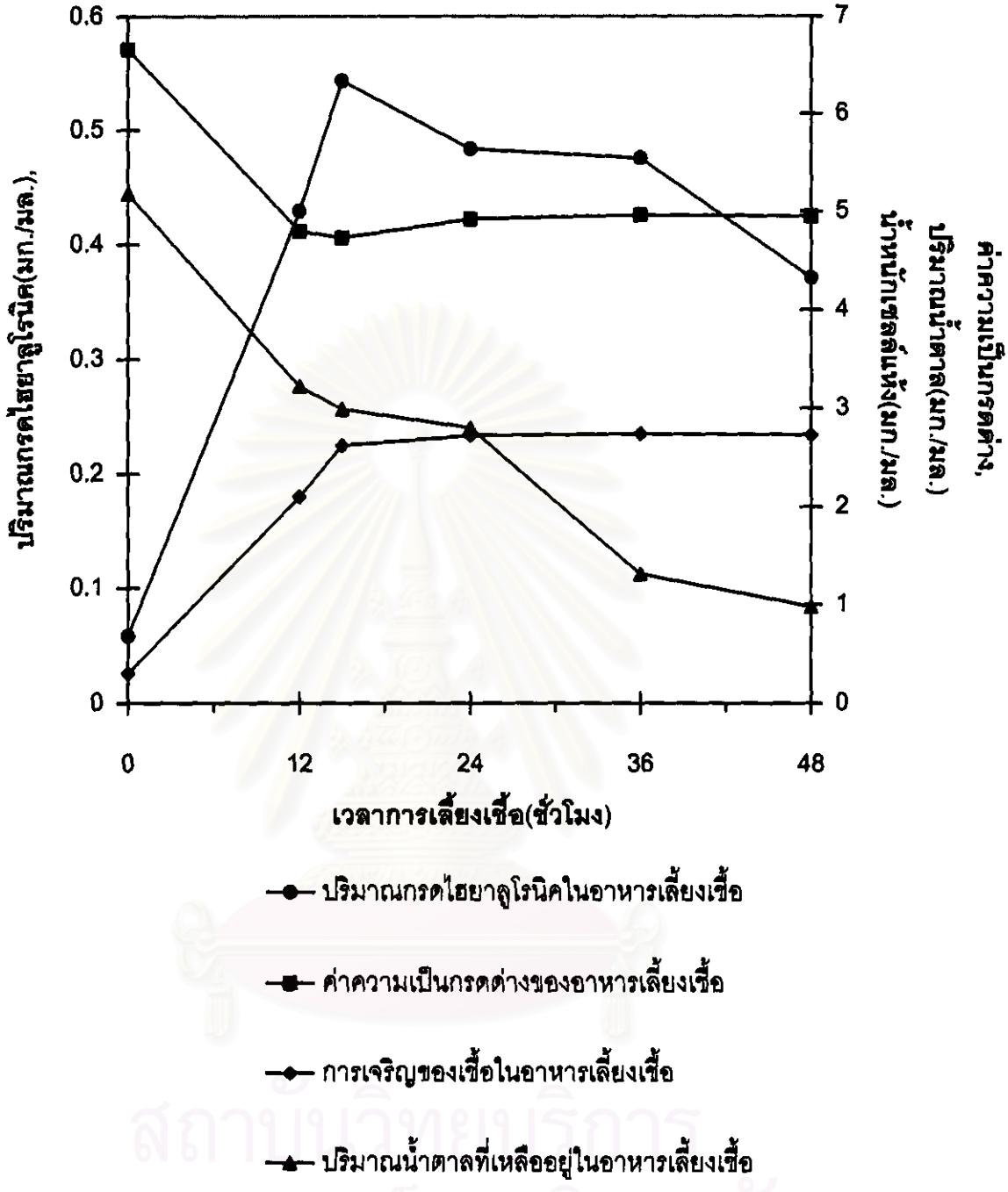
จากผลการทดลองในข้อ 3.3.3.3 พบว่าการเพิ่มความเร็วรอบของการเขย่าสามารถเพิ่มการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ซึ่งข้อมูลดังกล่าวนี้สนับสนุนรายงานของMaclennan (1956) นอกจากนี้ยังอาจสามารถเพิ่มการผลิตกรดดังกล่าวได้ โดยการลดความเร็วรอบของการเขย่าเมื่อเชื้อเจริญเข้าสู่ระยะกึ่งกลางลอกาลิทิมิกดังที่ได้รายงานไว้โดย Swann และคณะ (1990) ดังนั้นจึงทำการศึกษาการลดความเร็วรอบของการเขย่าจาก 250 รอบต่อนาทีมาเป็น 200 รอบต่อนาทีที่ชั่วโมงการเลี้ยงเชื้อที่ 12 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้อมีการเจริญอยู่ในระยะลอกาลิทิมิกที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค โดยเลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรที่ 2 ที่มีปริมาณน้ำตาล 5 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 0.65 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 ที่อุณหภูมิห้อง(28-32 $^{\circ}$ซ) ปริมาณหัวเชื้อ 20% (ปริมาตรต่อปริมาตร) อายุหัวเชื้อ 9 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการลดลงของความเร็วรอบที่ 200 และ 250 รอบต่อนาที พบว่าการลดความเร็วรอบของการเขย่าสามารถลดระยะเวลาการเก็บกรดไฮยาลูโรนิคได้เท่านั้น แต่ไม่สามารถเพิ่มการผลิตกรดได้โดยสังเกตุได้จากปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคที่ชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีค่าต่ำกว่าปริมาณกรดที่ผลิตได้เมื่อใช้ความเร็วรอบของการเขย่าเป็น 250 รอบต่อนาที ดังแสดงในรูปที่ 28

3.4 <u>ผลการเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ที่เวลาต่างๆ</u>

เนื่องจากในการปฏิบัติงานจริงต้องคำนึงถึงความสะดวก จึงไม่สามารถใช้ภาวะที่เหมาะสมบางประการในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงใช้สูตรอาหารและภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคโดย *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ดังสรุปไว้ในตารางที่ 11 ทำการเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรปรับปรุง (ภาคผนวก ก) ในภาวะดังในตารางที่ 11 เทียบกับสูตรที่ไม่ได้ผ่านการปรับปรุงของสูตรอาหารชนิดที่ 2 พบว่าเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิคสูงสุดในปริมาณ 543 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 15 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 29 ขณะที่สูตรไม่ได้ปรับปรุงของสูตรอาหารชนิดที่ 2 ให้การผลิตกรดนี้ที่ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 10



รูปที่ 28 ผลของการลดความเร็วรอบต่อปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในอาหารเลี้ยงเชื้อของ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ที่เวลาต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรที่ 2 ที่มีปริมาณน้ำตาล 5 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 0.65 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 ที่อุณหภูมิห้อง (28-32°ซ) เมื่อใช้ปริมาณหัวเชื้อ 20 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่มีอายุหัวเชื้อ 9 ชั่วโมง

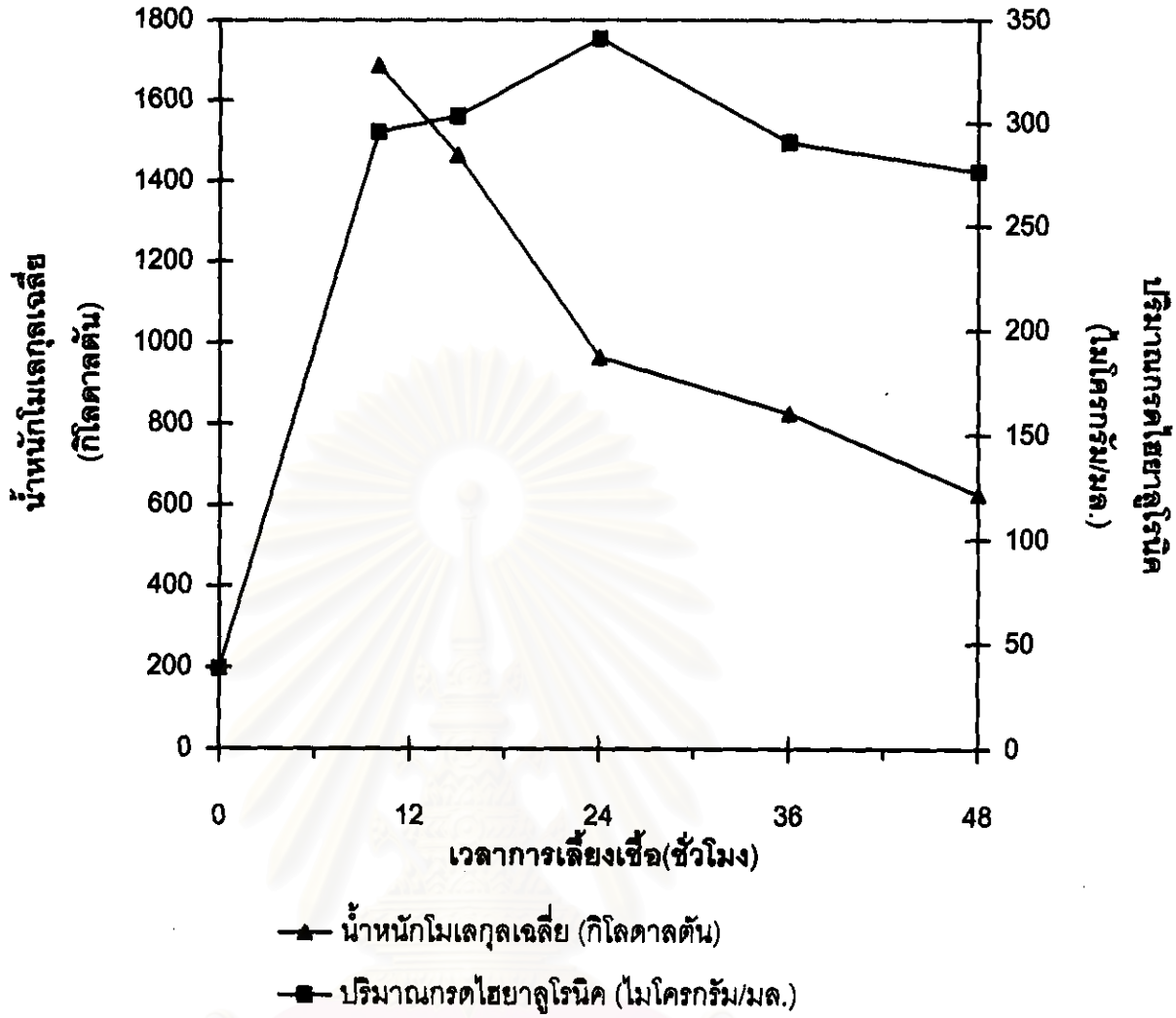


รูปที่ 29 ผลการเจริญ ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณน้ำตาล และปริมาณกรดไฮยาลูโรนิค เมื่อเลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรที่ 2 ที่มีปริมาณน้ำตาล 5 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 0.65 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 ที่อุณหภูมิ 30°ซ และเลี้ยงโดยการลดความเร็วรอบ เมื่อใช้ปริมาณหัวเชื้อ 25 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่มีอายุหัวเชื้อ 9 ชั่วโมง

3.5 น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย และความเข้มข้นของกรดไฮยาลูโรนิคที่ผลิตโดยเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ที่เวลาการเลี้ยงเชื้อต่างๆ

จากการที่มีรายงานของผู้วิจัยกลุ่มต่างๆ กล่าวว่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิคมีค่าแตกต่างกันไป ดังนั้นจึงทำการศึกษาหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของกรดไฮยาลูโรนิคที่ผลิตได้โดย *S. zooepidemicus* ATCC 35246 จากงานวิจัยนี้ ตลอดจนหาความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยกับปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคที่สร้างขึ้น โดยนำส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารสูตรปรับปรุง (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิห้อง (28-32°ซ) ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เมื่อใช้ปริมาณหัวเชื้อ 20 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่มีอายุหัวเชื้อ 9 ชั่วโมง ที่เวลา 0, 10, 15, 24, 36 และ 48 ชั่วโมงมาหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยวิธีของ Laurent และคณะ(1960) และปริมาณกรดไฮยาลูโรนิค ซึ่งพบว่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของกรดไฮยาลูโรนิคมีค่าสูงที่สุดที่เวลาการเลี้ยงเชื้อ 10 ชั่วโมงคือมีน้ำหนักโมเลกุล 1,687 กิโลดาลตัน จากนั้นจึงมีค่าลดลงเรื่อยๆ โดยชั่วโมงการเลี้ยงเชื้อที่ 0 ชั่วโมงไม่สามารถวัดน้ำหนักโมเลกุลได้ เนื่องจากไม่สามารถวัดความหนืดของน้ำเลี้ยงเชื้อได้ เนื่องจากการหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยวิธีนี้จะอาศัยความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดกับน้ำหนักโมเลกุล ส่วนความเข้มข้นของกรดดังกล่าวนั้นพบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่เริ่มต้นการเลี้ยงเชื้อ และมีค่าสูงสุดที่ชั่วโมงการเลี้ยงที่ 24 ชั่วโมงโดยมีค่าเป็น 341 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงมีค่าลดลง ดังแสดงในรูปที่ 30

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 30 น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยและปริมาณกรดไฮยาลูโรนิค ที่ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อต่างๆ โดยเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรที่ 2 ที่มีปริมาณน้ำตาล 5 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 0.65 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 ที่อุณหภูมิห้อง (28-32°ซ) เมื่อใช้ปริมาณหัวเชื้อ 20 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่มีอายุหัวเชื้อ 9 ชั่วโมง

3.6 การตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสโดยเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246

จากผลการทดลองในข้อ 3.5 ที่พบการลดลงของน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยและปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคนั้น สมมติฐานหนึ่งของการลดลงนี้คาดว่าอาจเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ดังนั้นจึงทำการตรวจสอบว่าเชื้อนี้มีการสร้างเอนไซม์ดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อหรือไม่ โดยติดตามปริมาณของน้ำตาลหน่วยย่อยของกรดไฮยาลูโรนิคที่ถูกย่อยในส่วนน้ำใสที่ผ่านการต้มทำลายเอนไซม์และที่ไม่ได้ต้มที่เวลาต่างๆ โดยหากเชื้อนี้ปล่อยเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสออกมาจริง การทดลองส่วนหลังจะสามารถวัดปริมาณน้ำตาลหน่วยย่อยของกรดไฮยาลูโรนิคโดยกิจกรรมของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสได้ ปรากฏว่าสามารถวัดปริมาณน้ำตาลหน่วยย่อยของกรดไฮยาลูโรนิคได้ปริมาณกรด 1600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในปฏิกิริยาที่เติมส่วนน้ำใสที่ไม่ผ่านการต้ม ทั้งในชั่วโมงที่ 24 และ 36 ชั่วโมง ขณะที่ในปฏิกิริยาที่เติมส่วนน้ำใสที่ผ่านการต้มจะไม่สามารถวัดปริมาณน้ำตาลหน่วยย่อยของกรดไฮยาลูโรนิคได้ ดังแสดงในตารางที่ 9 แสดงว่าเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 มีการสร้างเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสในอาหารเลี้ยงเชื้อได้จริง

3.7 ความคงตัวของกรดไฮยาลูโรนิคที่ผลิตโดยเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ

เมื่อทราบว่าเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 สามารถสร้างเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงมีความจำเป็นที่ต้องหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อเพื่อลดการย่อยสลายของกรดไฮยาลูโรนิคโดยเอนไซม์นี้ การศึกษาทำโดยนำส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาทดสอบความคงตัวของกรดไฮยาลูโรนิคเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆกัน เปรียบเทียบระหว่างส่วนน้ำใสที่ผ่านและไม่ผ่านการต้มที่ 100°ซ เป็นเวลา 20 นาที พบว่าการเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการต้มสามารถป้องกันการถูกทำลายของกรดไฮยาลูโรนิคได้ดีกว่าตัวอย่างที่ไม่ผ่านการต้ม โดยพบว่าปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคของตัวอย่างที่ผ่านการต้มหลังจากการเก็บเป็นเวลา 6 สัปดาห์มีค่าเป็น 368, 419 และ 392 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 10°ซ, 4°ซ และ -15°ซ ตามลำดับ และปริมาณกรดของตัวอย่างที่ไม่ผ่านการต้มเป็น 177, 273 และ 231 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 10°ซ, 4°ซ และ -15°ซ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4°ซ กรดไฮยาลูโรนิคมีความคงตัวสูงที่สุด รองลงมาคือที่ช่องทำแช่แข็ง (-15°ซ) และ 10°ซ ตามลำดับ เมื่อพิจารณาที่ระยะเวลาในการเก็บเดียวกัน ทั้งในตัวอย่างที่ผ่านและไม่ผ่านการต้ม ดังแสดงในรูปที่ 31

3.8 ผลของอุณหภูมิ และระยะเวลาการต้มต่อน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของกรดไฮยาลูโรนิคที่ผลิตโดย เชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ที่เวลาการเลี้ยงเชื้อต่างๆ

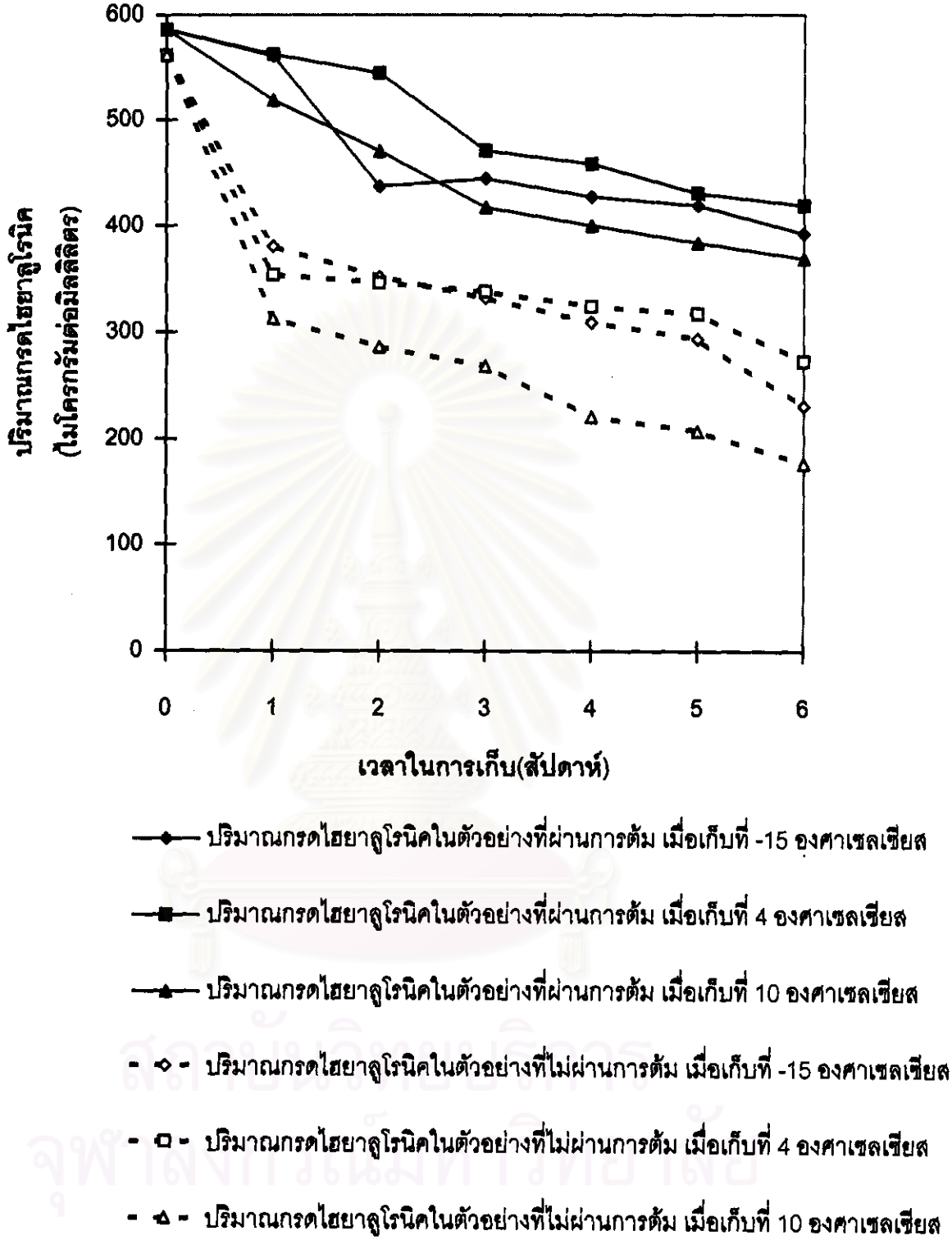
จากวิธีดำเนินการทดลองในข้อ 3.7 จำเป็นต้องนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาต้มเพื่อทำลายเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสก่อน แต่ในการต้มต้องคำนึงถึงอุณหภูมิและระยะเวลาในการต้มด้วย เพราะจากรายงานของผู้วิจัยกลุ่มต่างๆ พบว่ากรดไฮยาลูโรนิคสามารถถูกทำลายได้โดยความร้อนเช่นกัน (Pigman และคณะ, 1961) ดังนั้นจึงศึกษาผลของอุณหภูมิ และระยะเวลาในการต้มต่อน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของกรดไฮยาลูโรนิคโดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงการเลี้ยงเชื้อที่ 24 ชั่วโมงมาแบ่งต้มที่อุณหภูมิ 70°ซ และ 100°ซ เป็นเวลา 30, 45 และ 60 นาทีตามลำดับ พบว่าการใช้อุณหภูมิ 70°ซ มีผลต่อการลดลงของน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของกรดไฮยาลูโรนิคน้อยกว่าการใช้อุณหภูมิ 100°ซ เมื่อเปรียบเทียบที่เวลาการต้มเท่ากัน ตัวอย่างเช่นการต้มที่อุณหภูมิ 70°ซ และ 100°ซ ที่ระยะเวลาการต้ม 30 นาที จะให้กรดไฮยาลูโรนิคที่มีน้ำหนักโมเลกุล 2,130 และ 964 กิโลดาลตันตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการต้มน้ำเลี้ยงเชื้อมีความสัมพันธ์กับน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของกรดไฮยาลูโรนิค คือ หากใช้เวลาในการต้มที่นาน น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยมีค่าต่ำ และหากใช้ระยะเวลาการต้มสั้น ก็จะทำให้น้ำหนักโมเลกุลดังกล่าวมีค่าสูง (ตัวอย่างเช่นที่ 70°ซ เวลา 30 และ 45 นาที จะให้น้ำหนักโมเลกุลของกรดดังกล่าวเป็น 2,130 และ 2,101 กิโลดาลตัน ตามลำดับ) ดังแสดงในตารางที่ 10

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.9 <u>ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิค เปอร์เซนต์การเก็บเกี่ยว และความบริสุทธิ์ของกรดที่ได้หลังจากการตกตะกอนโดย 5 วิธี</u>

จากที่มีผู้รายงานถึงวิธีการเก็บเกี่ยวกรดไฮยาลูโรนิคหลายๆวิธี จึงศึกษาวิธีการเก็บเกี่ยวกรดไฮยาลูโรนิค ตามวิธีของ Laurent และคณะ, Holmstrom และ Ricica, Brown และคณะ, Rijn และ Kjems และ Lebech จากรูปที่ 32ก พบว่าการตกตะกอนโดยวิธีของ Holmstrom สามารถเก็บเกี่ยวกรดไฮยาลูโรนิค มากที่สุด ตามมาด้วยวิธี Laurent, Brown, Kjems และ Rijn ตามลำดับ ขณะที่ความบริสุทธิ์จะให้ผลที่ตรงกันข้าม ดังนั้นจึงศึกษาเพิ่มเติมโดยรวมวิธีที่มีเปอร์เซนต์การเก็บเกี่ยวกรดไฮยาลูโรนิคสูงกับวิธีที่มีความบริสุทธิ์สูงเข้าด้วยกัน เพื่อให้ได้วิธีที่มีเปอร์เซนต์การเก็บเกี่ยวและความบริสุทธิ์ของกรดไฮยาลูโรนิคที่เหมาะสม ได้แก่การรวมกันของวิธีของ Rijn ที่ลดขั้นตอนการกระทำซ้ำ 5 ครั้งกับวิธีของ Laurent และการรวมกันของวิธี Kjems กับ Laurent พบว่าการตกตะกอนโดยใช้วิธีของ Rijn ที่ลดขั้นตอนการกระทำซ้ำ 5 ครั้ง ร่วมกับวิธีของ Laurent พบว่าสามารถเพิ่มการเก็บเกี่ยวกรดชนิดนี้ได้ และการรวมกันของวิธี Kjems และ Laurent ทำให้การเก็บเกี่ยวกรดดังกล่าวนี้ทำได้น้อยลง ขณะที่ความบริสุทธิ์ของกรดที่ได้จะให้ผลที่ตรงกันข้ามเช่นเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 32ข

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



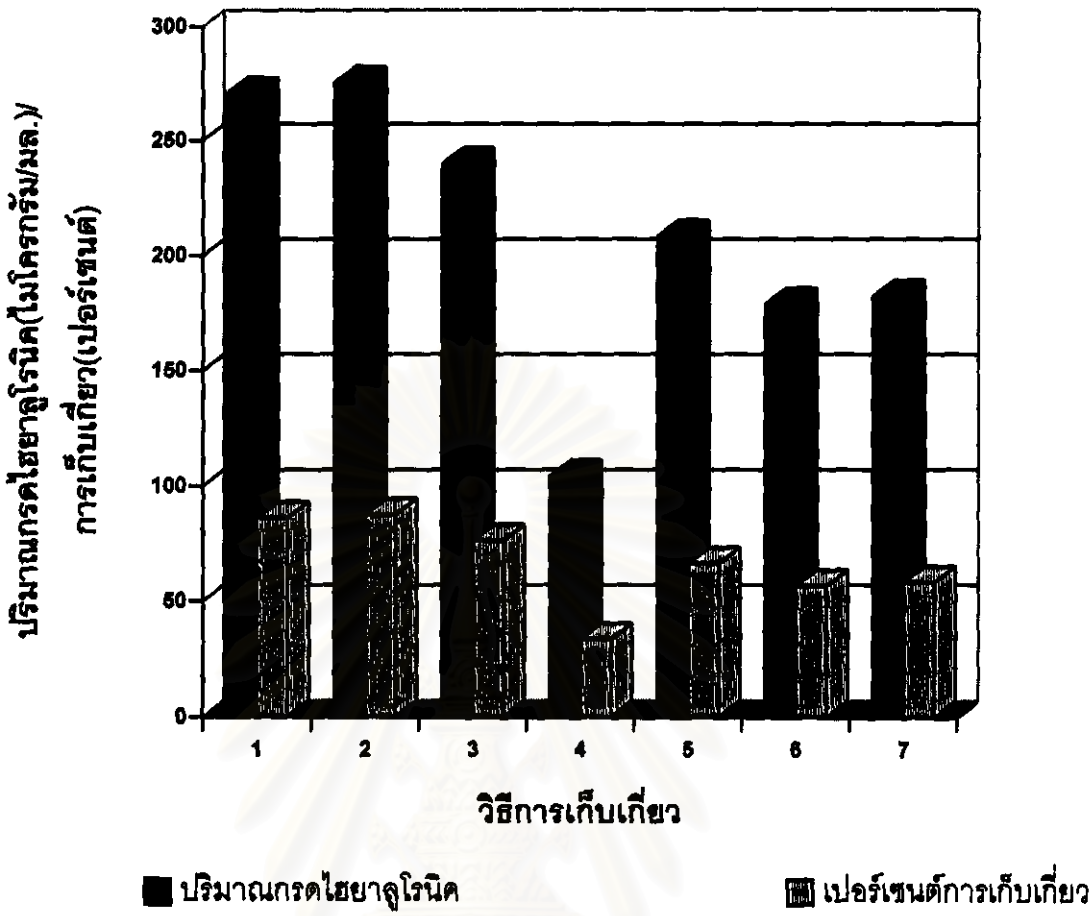
รูปที่ 31 เปรียบเทียบผลของอุณหภูมิในการเก็บตัวอย่างที่ผ่านและไม่ผ่านการต้มที่อุณหภูมิ 100°ซ 20 นาที ต่อความคงตัวของกรดไฮยาลูโรนิคที่ผลิตโดยเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ภายใต้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ดังที่ได้กล่าวมาแล้วในข้อที่ 16

ตารางที่ 9 การทดสอบการมีอยู่ของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสในระหว่างการเลี้ยงเชื้อของ *S. zooepidemicus* ATCC 35246

สภาวะที่ใช้ในการทดสอบกับกรดไฮยาลูโรนิคมาตรฐาน	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคที่ปลดปล่อยออก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
1. หลอดควบคุม ไม่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อ	0.00
2. เติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ 24 ชั่วโมงที่ไม่ผ่านการต้ม	1600
3. เติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ 24 ชั่วโมงที่ผ่านการต้ม	0.00
4. เติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ 36 ชั่วโมงที่ไม่ผ่านการต้ม	1600

ตารางที่ 10 ผลของอุณหภูมิ และระยะเวลาในการให้ความร้อนที่มีผลต่อน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของกรดไฮยาลูโรนิค

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) และเวลา(นาที) ที่ใช้ในการต้มอาหารเลี้ยงเชื้อ	น้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน)
1. ไม่ผ่านการต้ม	2,446
2. 70°ซ, 30 นาที	2,130
3. 70°ซ, 45 นาที	2,101
4. 70°ซ, 60 นาที	908
5. 100°ซ, 30 นาที	964
6. 100°ซ, 45 นาที	929
7. 100°ซ, 60 นาที	438



หมายเหตุ 1 วิธีของ Laurent และคณะ, 1969

2 วิธีของ Holmstrom and Ricica, 1967

3 วิธีของ Brown และคณะ, 1994

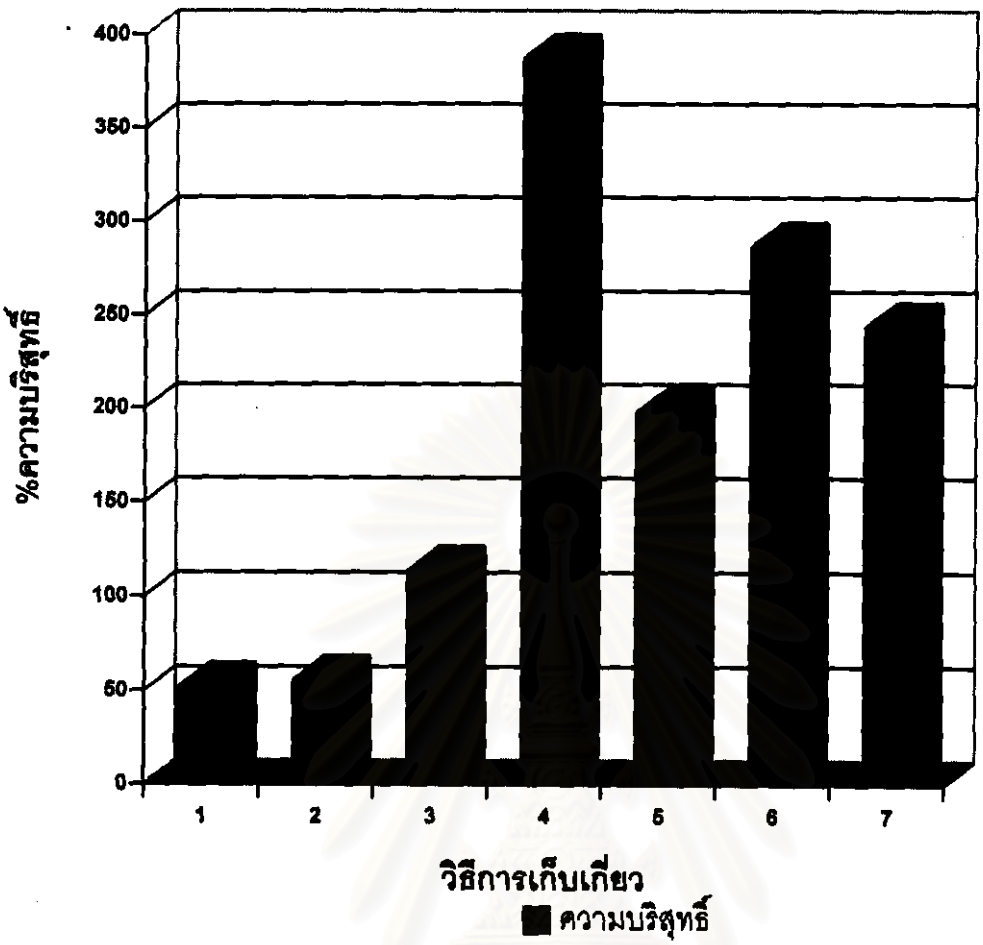
4 วิธีของ Rijn,1983

5 วิธีของ Kjems and Lebech, 1976

6 วิธีของ Rijn,1983 และ Laurent และคณะ, 1969

7 วิธีของ Kjems and Lebech, 1976 และ Laurent และคณะ, 1969

รูปที่ 32ก ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิค และและเปอร์เซนต์การเก็บเกี่ยวเฉลี่ยที่ได้จากการตกตะกอนด้วยวิธีต่างๆ 5 วิธีตามที่ได้กล่าวมาแล้วในข้อ 18



หมายเหตุ 1 วิธีของ Laurent และคณะ, 1969

2 วิธีของ Holmstrom and Ricica, 1967

3 วิธีของ Brown และคณะ, 1994

4 วิธีของ Rijn,1983

5 วิธีของ Kjems and Lebech, 1976

6 วิธีของ Rijn,1983 และ Laurent และคณะ, 1969

7 วิธีของ Kjems and Lebech, 1976 และ Laurent และคณะ, 1969

รูปที่ 32ข ความบริสุทธิ์ของกรดไฮยาลูโรนิคที่ได้จากการตกตะกอนด้วยวิธีต่างๆ 5 วิธีตามที่ได้กล่าวมาแล้วในข้อ 18