229118

อัจฉรา สุจิตวนิช : การแยกและการทำให้บริสุทธิ์ของกรดไฮยาลูโรนิกจากการหมักด้วยเยื่อแผ่นกรอง (ISOLATION AND PURIFICATION OF HYALURONIC ACID FROM FERMENTATION BY MEMBRANE FILTRATION) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร. นลิน นิลอุบล, รศ.ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ, 94 หน้า. ISBN 974-17-6106-6.

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการแยกกรดไฮยาลูโรนิกเพื่อให้มีความบริสุทธิ์เหมาะสมกับการนำไปใช้งานจากน้ำหมัก โดยเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus zooepidermicus* UN-7 เพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งได้ความเข้มข้นของกรดไฮยาลูโรนิกในน้ำหมัก 1,995 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อนำน้ำหมักก่อนแยกเซลล์มาสกัดกรดไฮยาลูโรนิกที่ติดอยู่กับเซลล์โดยใช้โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต พบว่าปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มขึ้นเป็น 2,122 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่อย่างไรก็ตามขั้นตอนนี้ส่งผลต่อให้น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกลดลง และอาจเพิ่มส่วนประกอบของเซลล์ปนเปื้อนในน้ำหมัก จึงไม่นำวิธีการสกัดกรดไฮยาลูโรนิกด้วยโดเดซิลซัลเฟตมาใช้ ดังนั้นจึงแยกกรดไฮยาลูโรนิกโดยนำน้ำหมักที่แยกเซลล์ออกแล้ว มาตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิกด้วย 95 เปอร์เซ็นต์เอทิลแอลกอฮอล์ โดยใช้เอทิลแอลกอฮอล์ 2 ส่วนต่อน้ำหมัก 1 ส่วน นำตะกอนที่ได้มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.2 โมลาร์ และดูดซับโปรตีนที่ปนเปื้อนด้วยด่างทับทิม จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการอัลทราฟิลเทรชัน โดยใช้เยื่อแผ่นที่มี molecular weight cut off 300,000 ดาลตัน เพื่อกำจัดสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลเล็ก เมื่อผ่านกระบวนการข้างต้นพบว่าได้สารละลายกรดไฮยาลูโรนิกที่มีความเข้มข้น 2,100 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 2.1 ถึง 2.3 x 10^6 ดาลตัน มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 83.79 และมีผลผลิตร้อยละ 65.24 ของปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกในน้ำหมักเริ่มต้น นอกจากนี้ยังไม่พบการปนเปื้อนโปรตีนจากการวิเคราะห์โดยวิธีลาวรี เมื่อศึกษาปัจจัยทางกายภาพ คือ อุณหภูมิ และ ความเร็วรอบของการกวน และปัจจัยเคมี คือ ค่าความเป็นกรดด่าง และ เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่เตรียมได้ พบว่า น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกลดลงประมาณร้อยละ 20 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 50 70 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 0.5 และ 0.08 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อความเร็วรอบของการกวน 200 และ 400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 และ 0.5 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อค่าความเป็นกรดด่างเป็น 1 3 และ 13 เป็นเวลา 0.5 1 และ 0.25 ชั่วโมง ตามลำดับ และเมื่อมีการปนเปื้อนของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสเพียง 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือคิดเป็น 0.5 ยูนิตของเอนไซม์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 0.10 ชั่วโมง

229118

4472497623 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD : *Streptococcus zooepidemicus* / HYALURONIC ACID / MOLECULAR WEIGHT

ATCHARA SUJITAWANICH : ISOLATION AND PURIFICATION OF HYALURONIC ACID FROM FERMENTATION BY MEMBRANE FILTRATION. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SURAPONG NAVANKASATTUSAS, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. NALINE NILUBOL, Ph.D., ASSOC. PROF. PAIROH PINPHANICHAKARN, Ph.D. 94 pp. ISBN 974-17-6106-6.

The purpose of this research was to study the purification of hyaluronic acid for further application. Hyaluronic acid was produced by *Streptococcus zooepidermicus* UN-7 in a 5-liter fermentor and the product concentration was 1,995 mg/l. Culture cells in fermentation broth was treated with sodium dodecyl sulfate to remove membrane bound hyaluronic acid. The hyaluronic acid concentration was raised to 2,122 mg/l. However its molecular weight was decreased and this step may increase contamination of fermentation broth with intracellular components, therefore, this step was not used in the purifying process. Hyaluronic acid was precipitated from cell free broth using 95% ethyl alcohol at the ratio of ethyl alcohol to culture broth of 2 : 1. The precipitate was redissolved in 0.2 M sodium chloride solution. The protein was adsorbed by activated carbon and the low molecular weight contaminants were removed by ultrafiltration using 300,000 dalton molecular weight cut off membrane. The final concentration of hyaluronic acid solution was 2,100 mg/l with molecular weight in the range of 2.1-2.3 x 10^6 dalton. The purity was 83.79 percent The yield was 65.24 percent of the initial hyaluronic acid content. The contaminated protein was undetectable by Lowry method. The effects of variables on the molecular weight of the prepared hyaluronic acid were studied. The physical factors were temperature and stirring speed. The chemical factors were pH and enzyme hyaluronidase. It was found that, the molecular weight decreased approximately 20 percent at temperature 50, 70 and 100 $^{\circ}$C for 48, 0.5 and 0.08 hours respectively or stirring speed of 200 and 400 rpm for 4 and 0.5 hours respectively or maintain at pH 1, 3 and 13 for 0.5, 1 and 0.25 hour respectively or in the presence of enzyme hyaluronidase only 0.5 μg/ml or 0.5 unit enzyme activity/ml for 0.10 hour.