รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ทรงศักดิ์ พันธุ์วัฒนะสิงห์. 2540. การปรับปรุงสายพันธุ์ *Streptococcus zooepidemicus* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Akasaka, H., Komasaki, H. and Arai, T. 1989. Fermentation Method for Producing Hyaluronic Acid. United States Patent. : 4,801,539.

Armstrong, D.C., and Johns, M.R., 1997. Culture Conditions Affect the Molecular Weight Properties of Hyaluronic Acid Produced by *Streptococcus zooepidemicus*. Applied and Environmental Microbiology. 63(7) : 2759-2764.

Armstrong, D.C., Cooney, M.J., and Johns, M.R., 1997. Growth and Amino Acid Requirements of Hyaluronic-Acid-Producing *Streptococcus zooepidemicus*. Applied Microbiology Biotechnology. 47 : 309-312.

Balazs, E.A., 1979. Ultrapure Hyaluronic Acid and the Use Thereof. United States Patent. : 4,141,973.

Balazs, E.A., and Band, P., 1984. Hyaluronic Acid : Its Structure and Use. Cosmetics and Toiletries. 99 : 65-72.

Beaty, N.B., Tew, W.P., and Mello, R.J., 1985. Relative Molecular Weight and Concentration Determination of Sodium Hyaluronate Solutions by Gel-Exclusion High-Performance Liquid Chromatography. Analytical Biochemistry. 147 : 387-395.

Bitter, T., and Muir, H.M., 1962. A Modified Uronic Acid Carbazole Reaction. Analytical Biochemistry. 4 : 330-334.

Bracke, J.W., Thacker, K., and Minneapolis, M., 1985. Hyaluronic Acid from Bacterial Culture. United States Patent. : 4,517,295.

Brown, K.K., Ruiz, L.C., Rijn, Greene, N.D., Trump, S.L., Wilson, C.D., and Bryant, S.A., 1994. Method for the Microbiological Production of Non-Antigenic Hyaluronic Acid. United States Patent. : 5,316,926.

Cifonelli, J.A., and Dorfman, A., 1957. The Biosynthesis of Hyaluronic Acid by Group A Streptococcus. V. The Uridine Nucleotides of Group A Streptococcus. The Journal of Biological Chemistry. 228(1) : 547-557.

Cifonelli, J.A., and Mayeda, M., 1957. The Purification of Hyaluronic Acid by the Use of Charcoal. Biochemica et Biophysica ACTA. 24 : 397-400.

Cleland, R.L., and Wang, J.L., 1970. Ionic Polysaccharides. III. Dilute Solution Properties of Hyaluronic Acid Fractions. Biopolymers. 9 : 799-810.

Cleary, P.P., and Larkin, A., 1979. Hyaluronic Acid Capsule : Strategy for Oxygen Resistance in Group A Streptococci. Journal of Bacteriology. 140(3) : 1090-1097.

Crater, D.L., and Van de Rijn, I., 1995. Hyaluronic Acid Synthesis Operon (*has*) Expression in Group A Streptococci. The Journal of Biological Chemistry. 270(31) : 18452-18458.

Crater, D.L., Dougherty, B.A., and Van de Rijn, I., 1995. Molecular Characterization of *has* C from an Operon Required for Hyaluronic Acid Synthesis in Group A Streptococci. The Journal of Biological Chemistry. 270(48) : 28676-28680.

DeAngelis, P.L., 1996. Enzymological Characterization of the *Pasteurella multocida* Hyaluronic Acid Synthase. Biochem. 35 : 9768-9771.

DeAngelis, P.L., Papaconstantinou, J., and Weigel, P.H., 1993. Isolation of a *Streptococcus pyogenes* Gene Locus that Directs Hyaluronan Biosynthesis in Acapsular Mutants and in Heterologous Bacteria. The Journal of Biological Chemistry. 268(20) : 14568-14571.

De Luca, C., Lansing, M., Martini, I., Crenscenzi, F., Shen, G., O'Regan, M., and Wong, C., 1995. Enzymatic Synthesis of Hyaluronic Acid with Regeneration of Sugar Nucleotides. Journal of American Chemical Society. 117 : 5869-5870.

Dougherty, B.A., and Van de Rijn, I., 1993. Molecular Characterization of *has* B from an Operon Required for Hyaluronic Acid Synthesis in Group A Streptococci. (Demonstration of UDP-Glucose Dehydrogenase Activity). The Journal of Biological Chemistry. 268(10) : 7118-7124.

Dougherty, B.A., and Van de Rijn, I., 1994. Molecular Characterization of *has* A from an Operon Required for Hyaluronic Acid Synthesis in Group A Streptococci. The Journal of Biological Chemistry. 269(1) : 169-175.

Ellwood, C.D., Evan, G.T., Dunn, G.M., McInnes, N., Yeo, R.G., and Smith, K.J., 1995. Production of Hyaluronic Acid. United States Patent. : 5,411,874.

Ellwood, C.D., Evan, G.T., Dunn, G.M., McInnes, N., Yeo, R.G., and Smith, K.J., 1996. Production of Hyaluronic Acid. United States Patent. : 5,563,051.

Fujii, K., Kawata, M., Kobayashi, Y., Okamoto, A. and Nishinari, K., 1996. Effect of the Addition of Hyaluronate Segments with Different Chain Lengths on the Viscoelasticity of Hyaluronic Acid Solutions. Biopolymers. 38(5) : 583-591.

Holmstrom, B., and Ricica, J., 1967. Producion of Hyaluronic Acid by a Streptococcal Strain in Batch Culture. Applied Microbiology. 15 : 1409-1413.

Johns, M.R., Goh, L.T., and Oeggerli, A., 1994. Effect of pH Agitation and Aeration on Hyaluronic Acid Production by *Streptococcus zooepidemicus*. Biotechnology Letters. 16(5) : 507-512.

Kendall, F.E., Heidelberger, M., and Dawson, M.H., 1937. A Serologically Inactive Polysaccharide Elaborated by Mucoid Strains of Group A Hemolytic Streptococcus. The Journal of Biological Chemistry. 118 : 61-69.

Keng, C.NG., Handley, C.J., Mason, R.M., and Robinson, H.C., 1989. Synthesis of Hyaluronate in Cultured Bovine Articular Cartilage. Biochemical Journal. 263 : 761-767.

Kim, J.H., Yoo, S.J., Oh, D.K., Kweon, Y.G., Park, D.W., Lee, C.H., and Gil, G.H., 1996. Selection of a *Streptococcus equi* Mutant and Optimization of Culture Condition for the Production of High Molecular Weight Hyaluronic Acid. Enzyme and Microbial Technology. 19 : 440-445.

Kjems, E., and Lebech, K., 1976. Isolation of Hyaluronic Acid from Cultures of Streptococci in a Chemically Defined Medium. Acta Pathology Microbiology Scand Section B. 84 : 162-164.

Laurent, T.C., 1955. Studies on Hyaluronic Acid in The Vitreous Body. The Journal of Biological Chemistry. 216 : 263-271.

Laurent, T.C., 1970. Structure of Hyaluronic Acid. In E.A. Balazs. (ed) Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix. London. Academic Press. pp.703-732.

Laurent, T.C., and Gergely, J., 1955. Light Scattering Studies on Hyaluronic Acid. The Journal of Biological Chemistry. 212 : 325-333.

Laurent, B.G., and Granath, K.A., 1983. The Molecular Weight of Hyaluronate in the Aqueous Humour and Vitreous Body of Rabbit and Cattle Eyes. Experimental Eye Research. 36 : 481-492.

Laurent, T.C., Ryan, M., and Pietruszkiewicz, A., 1960. Fractionation of Hyaluronic Acid. Biochemica et Biophysica ACTA. 42 : 476-485.

Lee, H.G., and Cowman, M.K., 1994. An Agarose Gel Electrophoretic Method for Analysis of Hyaluronan Molecular Weight Distribution. Analytical Biochemistry. 219 : 278-287.

Matsumura, G., De Salegui, M., Herp, A., and Pigman, W., 1963. The Preparation of Hyaluronic Acid from Bovine Synovial Fluid. Biochemica et Biophysica ACTA. 69 : 574-576.

Morita, H., and Fujii, M., 1991. Process for Preparing Hyaluronic Acid. United States Patent. : 5,071,751.

Motohashi, N., Mori, I., 1984. Molecular Weight Determination of Hyaluronic Acid and Its Separation from Mouse Skin Extract by High-Performance Gel Permeation Chromatography Using a Precision Differential Refractometer. Journal of Chromatography. 299 : 508-512.

Nimrod, A., Greenman, B., Kanner, D., and Landsberg, M., 1986. Method of Producing High Molecular Weight Sodium Hyaluronate by Fermentation of Streptococcus. International Application Published under The Patent Cooperation Treaty. WO 86/04355.

Nimrod, A., Greenman, B., Kanner, D., and Landsberg, M., 1988. High Molecular Weight Sodium Hyaluronate. United States Patent. : 4,784,990.

O'Ragan, M., Martini, I., Crescenzi, F., De Luca, C., and Lansing, M., 1994. Molecular Mechanism and Genetics of Hyaluronan Biosynthesis. International Journal of Biological Macromolecule. 16(6) : 283-286.

Park, M.G., Jang, J.D., and Kang, W.K., 1996. *Streptococcus zooepidemicus* Medium and Process for Preparation Hyaluronic Acid. United States Patent. : 5,496,726.

Pierce, W.A., Jr., and White, A.G.C., 1954. Hyaluronic Acid Formation by *Streptococcus pyogenes*. Biochemica et Biophysica ACTA. 87 : 50-54.

Radin, L.E., Swann, A.D., and Weisser, A.P., 1970. Preparation of a Hyaluronate-free Lubricating Fraction from Synovial Fluid. Nature. 228 : 377-378.

Seastone, C.V., 1939. The Virulence of Group C Hemolytic Streptococci of Animal Origin. J.Expt.Med. 70 : 361-378.

Shimada, E., and Matsumura, G., 1975. Viscosity and Molecular Weight of Hyaluronic Acids. Journal of Biochemistry. 78 : 513-517.

Shozo, H., Yasuo, O., Susumu, H., and Kasuaki, K., 1997. High-Performance Capillary Electrophoresis of Hyaluronic Acid : Determination of Its Amount and Molecular Mass. Journal of Chromatography A. 768 : 295-305.

Silver, F.H., and Swann, D.A., 1982. Laser Light Scattering Measurements on Vitreous and Rooster Comb Hyaluronic Acid. International Journal of Biological Macromolecule. 4 : 425-429.

Swann, D.A., Sullivan, B.P., Jamieson, G., Richardson, K.R., and Singh, T., 1990. Biosynthesis of Hyaluronic Acid. United States Patent. : 4,897,349.

Thonard, J.C., Migliore, S.A., and Blustein, R. 1964. Isolation of Hyaluronic Acid from Broth Cultures of Streptococci. The Journal of Biological Chemistry. 239(3) : 726-728.

Van de Rijn, I., 1983. Streptococcal Hyaluronic Acid : Proposed Mechanisms of Degradation and Loss of Synthesis During Stationary Phase. Journal of Bacteriology. 156(3) : 1059-1065.

Van de Rijn, I., and Kessler, R.E., 1980. Growth Characterization of Group A Streptococci in New Chemically Defined Medium. Infection and Immunity. 27(2) : 444-448.

Woolcock, J.B., 1974. The Capsule of *Streptococcus equi*. Journal of General Microbiology. 85 : 372-375.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารสำหรับการเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น (Brain Heart Infusion : BHI) (Difco)

1.1 อาหารเหลว BHI

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Calf Brains, Infusion form	200	กรัม
Beef Heart, Infusion from	250	กรัม
Proteose Peptone, Difco	10	กรัม
Bacto Dextrose	2	กรัม
Sodium Chloride	5	กรัม
Sodium Phosphate, Dibasic	2.5	กรัม

วิธีการเตรียมละลายอาหาร 37 กรัม ในน้ำขจัดไอออน ปริมาตร 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรด –ด่าง ให้เท่ากับ 7.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ (M) ใส่อาหารเหลว BHI ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

1.2 อาหารวุ้นแข็งลาดเอียง BHI

เตรียมโดย เติมวุ้นผง 15 กรัม ลงในอาหารเหลว BHI ต้มให้วุ้นละลาย จากนั้น ปิเปตอาหารลงในหลอดทดลองขนาด 16 x 150 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดจุกให้แน่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้น นำหลอดทดลองมาวางเอียงให้ผิวหน้าของอาหาร มีความยาวประมาณ 12 เซนติเมตร เมื่ออาหารแข็งตัว ตั้งทิ้งไว้ 2 วัน ก่อนนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก

1.1 สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5 – dinitrosalicylic = DNSA reagent)

ละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1.0 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเติมน้ำขจัดไอออน 50 มิลลิลิตร แล้วเติมสารโพแทสเซียมทาเทรต ($KNaC_4H_4O_6.4H_2O$) ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำขจัดไอออน และเก็บสารละลายในขวดสีชา

1.2 สารละลายอะซิเตท บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4.0

ชั่งโซเดียมอะซิเตท ($CH_3COONa.3H_2O$) 11.63 กรัม และปิเปตสารละลายกรดอะซิติก 0.86 มิลลิลิตร เติมน้ำขจัดไอออน และปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เท่ากับ 4.0 ด้วยสารละลายกรดอะซิติก ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำขจัดไอออน และเก็บสารละลายในขวดแก้ว สำหรับใช้เป็นบัฟเฟอร์ของเอนไซม์อินเวอร์เทส

1.3 สารละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส

ปิเปตสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ ที่ได้จากข้อ 1.2 9.75 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส 0.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเก็บสารละลายในขวดสีชา เก็บในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกโดยวิธีคาร์บาโซล

2.1 สารละลายบอเรท – ซัลฟูริก (Borate – Sulfuric acid solution) 10 % (w/v)

ชั่งสารไดโซเดียมเตตระบอเรท ($Na_2B_4O_7.10H_2O$) 3.82 กรัม ละลายในน้ำร้อน 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ให้สารละลายเย็น นำไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง แล้วค่อยๆ เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นที่แช่ไว้ในน้ำแข็งลงไป 390 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเก็บสารละลายในขวดแก้ว

2.2 สารละลายคาร์บาโซล (Carbazole solution) 1 % (w/v)

ชั่งสารคาร์บาโซล 1.00 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอล 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเก็บสารละลายไว้ในขวดสีชา เก็บในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (อายุการใช้งาน 3 เดือน)

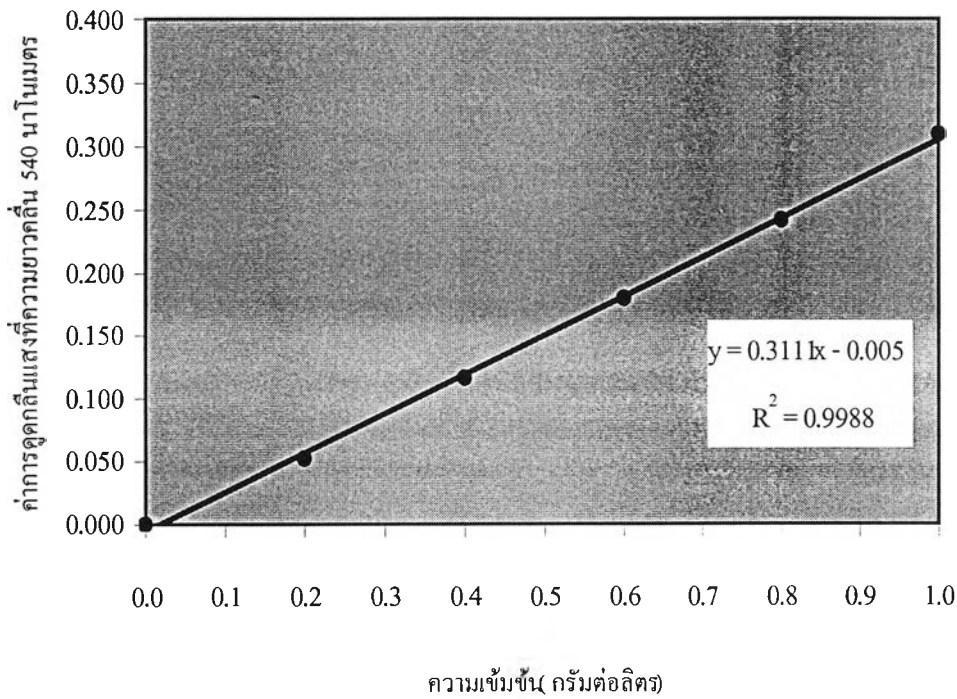
3. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.0

ชั่งสารโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 27.22 กรัม ละลายในน้ำขจัดไอออน ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร และชั่งสารไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 34.84 กรัม ละลายในน้ำขจัดไอออน ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร จากนั้น นำสารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ค่อยๆเติมลงในสารละลายไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต จนกระทั่งได้สารละลายที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.0 สำหรับใช้เป็นบัฟเฟอร์ของเอนไซม์ปาเปน

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

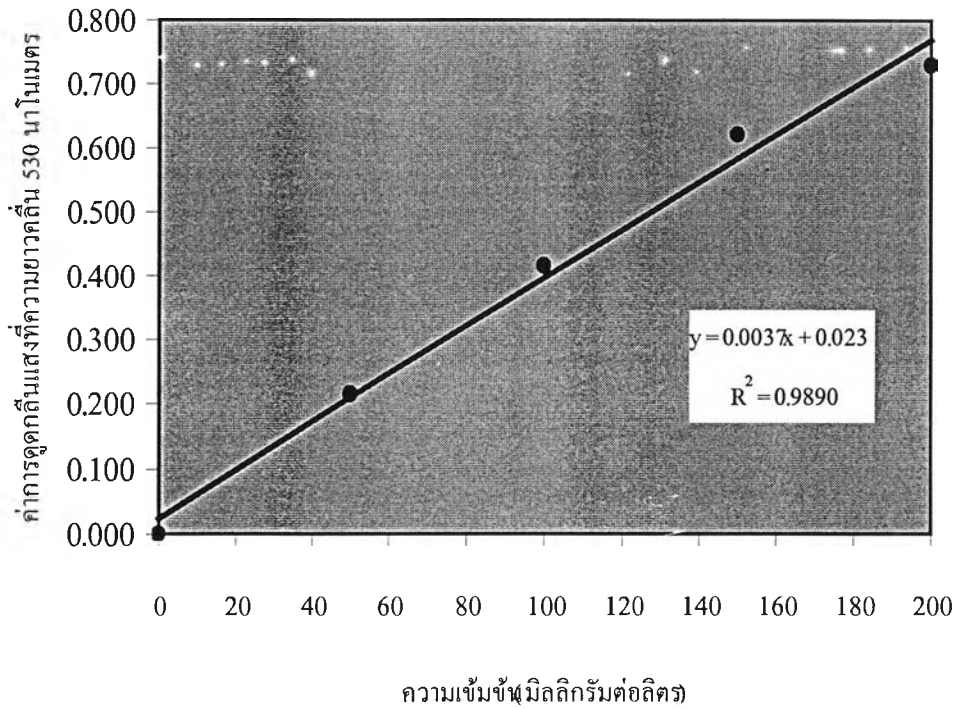
1. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลซูโครสที่ย่อยด้วยเอนไซม์อินเวอร์เทส



กราฟมาตรฐานน้ำตาลซูโครสที่ย่อยด้วยเอนไซม์อินเวอร์เทส ในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 1.0 กรัมต่อลิตร

ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก (total sugar) (กรัมต่อลิตร) = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร x 1 / ความชัน x ความเจือจาง

2. กราฟมาตรฐานของกรดไฮยาลูโรนิกโดยวิธีคาร์บาโซล



กราฟมาตรฐานกรดไฮยาลูโรนิกโดยวิธีคาร์บาโซล ในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร) = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร x 1 / ความชัน x ความเจือจาง

ภาคผนวก ง

การย่อยแลกติกเคซีนด้วยเอนไซม์

วัตถุดิบและเอนไซม์ที่ใช้

1. แลกติกเคซีน ของบริษัทไวท์กรุ๊ป ประเทศไทย จำกัด
2. เอนไซม์ปาเปน ของบริษัท BDH ประเทศอังกฤษ

ขั้นตอนการย่อยแลกติกเคซีนด้วยเอนไซม์

1. ชั่งแลกติกเคซีน 20 กรัม เติมลงในสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ 250 มิลลิลิตร นำไปต้มให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

2. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เท่ากับ 6.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์

3. ปรับปริมาตรของสารละลายให้เป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำขจัดไอออน

4. เติมสารละลายเอนไซม์ปาเปน 5 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

5. บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 ชั่วโมง ที่ความเร็วรอบในการกวน 150 รอบต่อนาที

6. ปั่นแยกตะกอนของสารที่เหลือออก โดยเซนทริฟิวจ์ ที่ความเร็วรอบในการกวน 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนสารละลายใสที่ได้ไว้

7. นำไปเตรียมอาหารสูตรสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก (ทรงศักดิ์ พันธุ์วัฒนะสิงห์, 2540) โดยใช้สารละลายที่ได้แทนน้ำขจัดไอออนและเคซีน โดยปรับปริมาตรสารละลายที่ได้เป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำขจัดไอออน (เพื่อให้ได้เป็น 2 % แลกติกเคซีน)

การเตรียมอาหารสูตรสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

สารละลายแลกติกเคซีน	1000	มิลลิลิตร
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	3	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	2.8	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.5	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl.2H_2O$)	10	มิลลิกรัม
น้ำตาลซูโครส	3	กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เท่ากับ 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นาย อณุมาศ บัวเขียว เกิดวันที่ 8 มกราคม พ.ศ. 2519 ที่อำเภอเมือง จังหวัดนครศรีธรรมราช สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีวเคมี) คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2540 และได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2541