# รายการอ้างอิง


ภาษาไทย

มนตรี จุฬาวัฒนทล, ยงยุทธ ยุทธวงศ์, ชิษณุสรร สวัสดิวัฒน์, ประหยัด โกมารทัต, ประพนธ์ วิไลรัตน์, สกล พันธุ์ยิ้ม, และภิญโญ พานิชพันธ์. 2530. คาร์โบไฮเดรท. ชีวเคมี: 39-61.

แม้น อมรสิทธิ์ และอมร เพชรสม. 2535. นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี. หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ: 206-321.

ภาษาอังกฤษ

Akasaka, H., and Komasaki, T.A. 1989. Fermentation Method for Producing Hyaluronic Acid. United States Patent. No. 4,801,539.

Anderson, J.S., Matsuhashi, M., Haskin, M.A., and Strominger, J.L. 1965. Lipid-phosphoacetylmuramyl-pentapeptides and Lipid-phosphodisaccharide-pentapepetide: Presumed Membrane Transport Intermediates in Cell Wall Synthesis. Biochemistry. 53: 881-889.

Armstrong, D.C., Cooney, M.J., and Johns, M.R. 1997. Growth and Amino Acid Requirements of Hyaluronic-acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. Appl. Microbilo. Biotechnol. 47: 309-312.

Balazs, E.A., Berntsen, K.O., Karossa, J., and Swann, D.A. 1965. An Automated Method for the Determination of Hexuronic Acids. Analytical Biochemistry. 12: 547-558.

Balazs, E.A, 1979. Ultrapure Hyaluronic Acid and the Use Thereof. United States Patent. No. 4,141,973.

Balazs, E.A, 1981. Hyaluronate Based Compositions and Cosmetic Formulations Containing Same. United States Patent. No. 4,303,676.

Bernfeld,P. 1955. Amylase, $\alpha$ and $\beta$. In S.P. Colowick and N.O. Kapian(eds.), Methods in Enzymology. 149. New York: Academic Press.

Billek, G., and H.S., 1968. Hyaluronic Acid Preparation and Method of Producing Same. United States Patent. No. 3,396,081.

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

Bracke, J.W., Thacker, K.., and Minneapolis, M. 1985. Hyaluronic Acid from Bacterial Culture. United States Patent. No. 4,517,295.

Brown, K.K., Greene, N.D., Trump, S.L., and Bryant, S.A. 1992. Low Viscosity High Molecular Weight Filter Sterilizable Hyaluronic Acid. United States Patent. No. 5,093,487.

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. No. 5,316,926.

Caldwell, D.R. Microbial Physiology and Metabolism. 104-107. Wm. C. Brown Publishers.

Cifonelli, J.A., and Dorfman, A. 1957. The Biosynthesis of Hyaluronic Acid by Group A Streptococcus. J. Biol. Chem. 228: 547-557.

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

Crater, D.L., and Rijn, I. 1995. Hyaluronic Acid Synthesis Operon (*has*) Expression in Group A Streptococci. J. Bacteriol. Chem. 270(31): 18452-18458.

Davies, H.C., Karush, F., and Rudd, J.H. 1965. Effect of Amino Acid on Steady-State Growth of a Group A Hemolytic Streptococcus. J. Bacteriol. 89(2): 421-427.

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

DeAngelis, P.L., and Weigel, P.H. 1994. Rapid Detection of Hyaluronic Acid Capsule on Group A Streptococci by Buoyant Desity Centrifugation. Diagn Microbiol. Infect. Dis. 20: 77-80.

Dedyukhina, E.G., and Eroshin, V.K. 1991. Essential Metal Ion in the Control of Microbial Metabolism. Proc. Biochem. 26: 31-37.

Ellwood, D.C., Evans, G.T., Dunn, G.M., McInnes, N., Yeo, R.G., and Smith, K.J. 1995. Production of Hyaluronic Acid. United States Patent. No. 5,411,874.

Ellwood, D.C., Evans, G.T., Dunn, G.M., McInnes, N., Yeo, R.G., and Smith, K.J.1996. Production of Hyaluronic Acid. United States Patent. No. 5,563,051.

Esgalhado, M.E., Roseiro, J.C., and Amaral Collaco, M.T. 1995. Interactive Effects of pH and Temperature on Cell Growth and Polymer Production by *Xanthomonas campestris*. Process Biochemistry. 30(7): 667-671.

Fridovich, I. 1972. Superoxide Radical and Superoxide Dismutase. Accounts of Chemical Research. 5(10): 321-326.

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. Biopolymer. 38(5): 583-591.

Goldberg, R.L. 1995. Method for Measuring Hyaluronic Acid. United States Patent. No. 5,378,637.

Gottschalk, G. Bacterial Metabolism. 2-207. Second Edition, Springer-Verlag., New York.

Greiling, H. 1963. Hyaluronic Acid. In Method of Enzymatic Analysis. 87-92. Edited by H.U. Bergmeyer. New York: Academic Press.

Hamerman, D., and Sandson, J. 1960. Isolation of Hyaluronate from Human Synovial Fluid by Zone Electrophoresis. Nature. 188: 1194-1195.

Hanson, R.S., and Phillips, J.A. 1981. Chemical composition. In P. Gerhardt et al. (eds.), Manual of Methods for General Bacteriology. 328-336. Washington: American Society for Microbiology.

Hashimoto, M., Saegusa, H., Chiba, S., Kitagawa, H., and Miyoshi, T. 1990. Method for Producing Sodium Hyaluronate by Fermentation Method. United States Patent. No. 4,946,780.

Herd, J.K., Tschida, J., and Motycka, L. 1974. The Detection of Hyaluronidase on Electrophoresis Membrane. Anal. Biochem. 61: 133-143.

Holmstrom, B., and Ricica, J. 1967. Production of Hyaluronic Acid by a Streptococcal Strain in Batch Culture. Appl. Microbiol. 15(6): 1409-1413.

Homer, K.A., Patel, R., and Beighton, D. 1994. Effect of N-acetylglucosamine on Carbohydrate Fermentation by *Streptococcus mutants* NCTC 10449 and *Streptococcus sobrinus* SL-1. Infect. Immunity. 61(1): 295-302.

Ishimoto, N., and Strominger, J.L. 1967. Uridine Diphosphate as the Sole Uridine Nucleotide Product of Hyaluronic Acid Synthase in Group A Streptococci. Biochim. Biophys. Acta. 148: 296-297

Jawetz, E., Melnick, J.L., and Adelberg, E.A. Pyogenic Cocci. Review of Medical Microbiology. 197-209. Sixteeth Edition, Maruzen Asian.

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

Joklik, W.K., Willett, H.P., and Amos, D.B. Streptococcus. Zinsser Microbiology. 555-571. Seventeeth Edition, Appleton-Century-Crofts.

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. Enz. Microbiol. Tech. 19: 440-445.

Kjems, E., and Lebech, K. 1976. Isolation of Hyaluronic Acid from Cultures of Streptococci in A Chemically Defined Medium. Acta. Path. Microbiol.Scand. 84: 162-164.

Kresse, H. Proteoglycan-Structure and Function. Glycoscience. 201-222. Chapman&Hall.

Laurent, T.C. 1955. Studies on Hyaluronic Acid in the Vitreous Body. 263-271.

Laurent, T.C., Barany, E., Carlsson, B., and Tidare, E. 1969. Determination of Hyaluronic Acid in the Microgram Range. Anal. Biochem. 31: 133-145.

Laurent, T.C., Ryan, M., and Pietruszkiewicz, A. 1960. Fractionation of Hyaluronic Acid. Biochim.Biophys. Acta. 42: 476-485.

Linker, A., Meyer, K., and Hoffman, P. 1955. The Production of Unsaturated Uronides by Bacterial Hyaluronidase. 13-25.

Luca, C.D., Manfred, L., Irene, M., Regan, M., and Chi-Huey Wong. 1995. Enzymatic Synthesis of Hyaluronic Acid with Regeneration of Sugar Nucleotides. J. Am. Chem. Soc. 117: 5869-5870.

MacLennan, A.P. 1956. The Production of Capsules, Hyaluronic Acid and Hyaluronidase by Group A and Group C Streptococci. J. Gen. Microbiol. 14: 134-142.

MacLennan, A.P. 1956. The Production of Capsules, Hyaluronic Acid and Hyaluronidase by 25 Strains of Group C Streptococci. J. Gen. Microbiol. 15: 485-491.

Markovitz, A., Cifonelli, J.A., and Dorfman, A. 1959. The Biosynthesis of Hyaluronic Acid by Group A Streptococcus. J. Biol. Chem. 234(9): 2343-2350.

Markovitz, A., and Dorfman, A. 1962. Synthesis of Capsular Polysaccharide (Hyaluronic Acid) by Protoplast Membrane Preparation of Group A Streptococcus. J. Biol. Chem. 273-279.

Matsumura, G., De Salegui, M., Herp, A., and Ward Pigman. 1963. The Preparation of Hyaluronic Acid from Bovine Synovial Fluid. Biochim. Biophys. Acta. 69: 574-576.

McCORD, J.M., Keele, B.B., JR., and Fridovich, I. 1971. An Enzyme-Based Theory of Anaerobiosis: The Physiological Function of Superoxide Dismutase. Proc. Nat. Aci. 68(5): 1024-1027.

Miyamori, T., Numazawa, R., Sakimae, A., and Onishi, H. 1989. Method of Producing Hyaluronic Acid. United States Patent. No. 4,885,244.

Moat, A.G. Microbial Physiology. 127-493. A Wiley-Interscience Publication. John Wiley&Sons., New York.

Morita, H., and Fujii, M. 1991. Process for Preparing Hyaluronic Acid. United States Patent. No. 5,071,751.

Mortimer, E.A., and Vastine, E.L. 1967. Production of Capsular Polysaccharide (Hyaluronic Acid) by L Colonies of Group A Streptococci. J. Bacteriol. 94(1): 268-271.

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. No. 4,784,990.

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

Otsuji, K., Honda, Y., Sugimura, Y., and Takei, A. 1994. Production of Polysaccharides in Liquid Cultures of *Polianthes tuberosa* Cells. Biotech. Letters. 16(9): 943-948.

Pape, L.G. 1982. Ophthalmological Procedures. United States Patent. No. 4,328,803.

Park, M.G., Jang, J.D., and Kang, W.K. 1996. *Streptococcus zooepidemicus* Medium and Process for Prepartion Hyaluronic Acid. United States Patent. No. 5,496,726.

Persson, K.M., and Gekas, V. 1994. Factors Influencing Aggregation of Macromolecules in Solution. Process Biochem. 29: 89-98.

Pigman, W., Rizvi, S., and Holley, H. 1961. Preparation and Stability of Hyaluronic Acid. Biochim. Biophys. Acta. 53: 254-262.

Prehm, P. 1990. Release of Hyaluronate from Eukaryotic Cells. Biochem. J. 267: 185-189.

Regan, M., Martini, I., Crescenzi, F., Luca, C., and Lansing, M. 1994. Molecular Mechanisms and Genetics of Hyaluronan Biosynthesis. Int. J. Biol.Macromol. 16(6): 283-286.

Rehakova, M., Bakos, D., Soldan, M., and Vizarova, K. 1994. Depolymerization Reactions of Hyaluronic Acid in Solution. Int. J. Biol. Macromol. 16(3): 121-124.

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

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

Robbins, P.W., Bray, D., Dankert, M., and Wright, A. 1967. Direction of Chain Growth in Polysaccharide Synthesis. Science. 158:1536-1542.

Robert, M., and Pike, M.D. Hyaluronidase and Hyaluronic Acid of Group A Streptococci. Southern Society for Clinical Research. 468.

Roden, L., Baker, J.R., Cifonelli, J.A., and Mathews, M.B. 1972. Isolation and Characterization of Connective Tissue Polysaccharides. In Methods of Enzymology vol xxviii Complex Carbohydrate Part B. Edited by Victor Ginsburg. 28: 73-141.

Romeo, A., Silvana, Lorenzi, and Padua. 1996. Procedure for The Purification of Hyaluronic Acid and Fraction of Pure Hyaluronic Acid for Ophthalmic Use. United States Patent. No 5,559,104.

Roseiro, J.C., Girio, F.M., Kara, A., and Amaral Collaco, M.T. 1993. Kinetic and Metabolic Effects of Nitrogen, Magnesium and Sulphur Restriction in *Xanthomonas campestris* Batch Cultures. J. Appli Bacteriol. 75: 381-386.

Scragg, A.H. 1988. Cell Chemistry. Biotechnology for Engineers Biological Systems in Technological Processes. 43-70.

Shu, C.H., and Yang, S.T. 1990. Effects of Temperature on Cell Growth and Xanthan Production in Batch Cultures of *Xanthomonas campestris*. Biotech. and Bioengin. 35:454-468.

Smith, E.B., Mills, G.T., and Bernheimer, H.P. 1961. Biosynthesis of Pneumococcal Capsular Polysaccharides. J. Biol. Chem. 236(8): 2179-2182.

Stayermark, A.L. 1951. Quantitative Organic Microanalysis; Microdetermination of nitrogen by the Kjeldahl method. The Blakiston comp. N.O.: 134-153.

Sting, P., Schaufub, P., and Biobel, H. 1989. Isolation and Characterization of Hyaluronidase from *Streptococcus equisimilis*. Med. Sci. Res. 17: 723-725.

Stoolmiller, A.C., and Dorfman, A. 1969. The Biosynthesis of Hyaluronic Acid by Streptococcus. J. Biol. Chem. 244(2): 236-246.

Sugahara, K., Schwartz, N.B., and Dorfman, A. 1979. Biosynthesis of Hyaluronic Acid by Streptococcus. J. Biol. Chem. 254(14): 6252-6261.

Swann, D.A., Sullivan, B.P., Jamieson, G., Richardson, K.R., and Singh, T. 1990. Biosynthesis of Hyaluronic Acid. United States Patent. No. 4,897,349.

Taylor, R.J. Carbohydrates. Tenth Edition, A Unilever Educational Booklet.

Telser, A., Robinson, H.C., and Dorfman, A. 1966. The Biosynthesis of Chondroitin Sulfate. Arch. Biochem. Biophys. 116: 458-465.

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

Toto, P.D., Santangelo, M.V., and Madonia, J.V. 1968. Use of Hyaluronic Acid and Chondroitin Sulfate by Bacterial Isolates from Carious Dentin. J.Dent.Res. 47(6): 1056-1061.

Warren, G.H. and Gray, J. 1959. Isolation and Purification of Streptococcal Hyaluronic Acid. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 102: 125-127.

Wessels, M.R., Moses, A.E., Goldberg, J.B., and DiCesare, T.J. 1991. Hyaluronic Acid Capsule is a Virulence Factor for Mucoid Group A Streptococci. Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 8317-8321.

Willoughby, D.S., Ginzburg, Y., and Watson, D.W. 1964. Host-parasite Relationships Among group A Streptococci. J. Bacteriol. 87(6): 1452-1456.

Wilson, A.T. Nucleic Acid Derivatives as Growth Factor for Certain Group A Hemolytic Streptococci. 249-254.

Woolcock, J.B. 1974. The Capsule of *Streptococcus equi*. J. Gen. Microbiol. 85: 372-375.

Yuki, H., and Fishman, W.H. 1963. A Carbazole Method for the Differential Analysis of Glucuronate, Glucosiduronate and Hyaluronate. Biochim. Biophys. Acta. 69: 579-578.

Zu, J., Nishikawa, S., and Kashimura, N. 1997. Depolymerization of Hyaluronic Acid by Low-molecular-weight Amadori-rearrangement Products and Glycated Polylysine. Biosci. Biotech. Biochem. 61(1): 188-190.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก

## สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ

1. สูตรอาหารสำหรับผลิตกรดไฮยาลูโรนิคตามวิธีของ Akasaka และคณะ (1989)

| | | |
|---|---|---|
| กลูโคส (glucose) | 60.0 | กรัมต่อลิตร |
| สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) | 5.0 | กรัมต่อลิตร |
| โพลิเปปโตน (polypeptone) | 10.0 | กรัมต่อลิตร |

ปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ภาวะมาตรฐาน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. สูตรอาหารสำหรับผลิตกรดไฮยาลูโรนิคตามวิธีของ Nimrod และคณะ (1986)

| | | |
|---|---|---|
| เคซีนไฮโดรไลเซท (casein hydrolysate) | 20.0 | กรัมต่อลิตร |
| สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) | 10.0 | กรัมต่อลิตร |
| โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) | 2.0 | กรัมต่อลิตร |
| แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) | 1.0 | กรัมต่อลิตร |
| ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($K_2HPO_4$) | 2.5 | กรัมต่อลิตร |
| กลูโคส (glucose) | 10.0 | กรัมต่อลิตร |

ปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ภาวะมาตรฐาน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. สูตรอาหารสำหรับผลิตกรดไฮยาลูโรนิคตามวิธีของ Woolcock (1974)

| | | |
|---|---|---|
| แบคโท-เปปโทน (polypeptone) | 20.0 | กรัมต่อลิตร |
| กลูโคส (glucose) | 10.0 | กรัมต่อลิตร |
| ไดโซเดียมคาร์บอเนต ($Na_2CO_3$) | 2.0 | กรัมต่อลิตร |
| โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) | 2.0 | กรัมต่อลิตร |
| ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4$) | 0.4 | กรัมต่อลิตร |

ปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ภาวะมาตรฐาน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. สูตรอาหารสำหรับผลิตกรดไฮยาลูโรนิคตามวิธีของ Johns และคณะ (1994)

| | | |
|---|---|---|
| กลูโคส (glucose) | 20.0 | กรัมต่อลิตร |
| สารสกัดจากยีสต์(yeast extract) | 10.0 | กรัมต่อลิตร |
| แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) | 0.5 | กรัมต่อลิตร |
| ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) | 2.5 | กรัมต่อลิตร |
| กัวนีน (guanine) | 0.1 | มิลลิกรัมต่อลิตร |
| อะดีนีน (adenine) | 0.1 | มิลลิกรัมต่อลิตร |
| ยูราซิว (urasil) | 0.1 | มิลลิกรัมต่อลิตร |

ปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ภาวะมาตรฐาน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. Brain heart Infusion (BHI)

ชั่ง Brain heart Infusion 37 กรัม ละลายในน้ำกลั่น (Distilled water) 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ภาวะมาตรฐาน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. สูตรอาหารสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคตามวิธีของ Nimrod ที่ผ่านการปรับปรุงแล้ว

| | | |
|---|---|---|
| แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) | 0.65 | กรัมต่อลิตร |
| สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) | 10.0 | กรัมต่อลิตร |
| โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) | 2.0 | กรัมต่อลิตร |
| แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) | 1.0 | กรัมต่อลิตร |
| ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($K_2HPO_4$) | 2.5 | กรัมต่อลิตร |
| กลูโคส (glucose) | 5.0 | กรัมต่อลิตร |

ปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ภาวะมาตรฐาน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ภาคผนวก ข

## สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. รีเอเจนต์สำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นของโซเดียมไฮยาลูโรเนต โดยวิธีของ Greiling (1963)

1.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) (pH6.4)

เตรียมไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4$) เข้มข้น 11.876 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($K_2HPO_4$) เข้มข้น 9.078 กรัมต่อลิตร แล้วเจือจางไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4$) 66 มิลลิลิตรด้วยโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($K_2HPO_4$) ในขวดวัดปริมาตร 250 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชา จนกระทั่งมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์

1.2 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride solution) (0.15 M)

ละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.9 กรัม ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร

1.3 สารละลายกรดเปอร์คลอริก (Perchloric acid solution) (20% W/V)

เจือจางกรดเปอร์คลอริก ($HClO_4$) ปริมาตร 13 มิลลิลิตรให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 75 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชา

1.4 สารละลายโพแทสเซียมเตตระบอเรต (Potassium tetraborate solution) (0.8 M)

ละลายกรดบอริก ($H_3BO_3$) 24.7 กรัม และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 43.87 กรัมในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 500 มิลลิลิตร

1.5 สารละลายโพแทสเซียมไฮยาลูโรเนต (Potassium hyaluronate solution) (200 µg/ml.)

ละลายโพแทสเซียมไฮยาลูโรเนต (Potassium hyaluronate) 20 มิลลิกรัมในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0 ถึง 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์

1.6 สารละลายเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (Bacterial hyaluronidase solution) (1 mg. Protein/ml.)

ละลายสารละลายเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (Bacterial hyaluronidase) ที่สกัดจากแบคทีเรีย 7 มิลลิกรัมในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl solution) 7 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

หมายเหตุ กิจกรรมของเอนไซม์จะสูญเสียภายใน 3 เดือนหลังจากการเตรียม

1.7 สารละลายพารา-ไดเมทิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ (ρ-dimetylaminobenzaldehyde solution)

ละลายพารา-ไดเมทิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ (ρ-dimetylaminobenzaldehyde) 10 กรัม ในสารละลายผสมของกรดน้ำส้ม ($CH_3COOH$) 100 มิลลิลิตร และกรดเกลือเข้มข้น (HCl) 12.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชา

หมายเหตุ ก่อนใช้เจือจาง 10 เท่าด้วยกรดน้ำส้ม($CH_3COOH$) และเตรียมใหม่ ทุกๆ สัปดาห์

2. รีเอเจนต์สำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวส์ (Reducing sugar) โดยวิธีของ Bernfeld และคณะ (1955)

2.1 สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (Dinitrosalicylic acid solution)

ละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก ($C_7H_4N_2O_7$) 5 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 2 โมลาร์ 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเติมน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมโซเดียมโพแทสเซียมตาเตรต 150 กรัมผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 500 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

3. รีเอเจนต์สำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) โดยวิธีของ Hanson and Phillips, 1981

3.1 สารละลายฟีนอล ( 5% phenol solution)

| | | |
|---|---|---|
| ฟีนอล ($C_6H_5OH$) | 5.0 | กรัม |
| น้ำกลั่น (Distilled water) | 100.0 | กรัม |

3.2 กรดซัลฟูริกเข้มข้น (Concentrated $H_2SO_4$)

4. รีเอเจนต์สำหรับสกัดแยกกรดไฮยาลูโรนิคออกจากอาหารเลี้ยง

4.1 ซีทิวไพริดิเนียมคลอไรด์เข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ (1.0% W/V)

ละลายซีทิวไพริดิเนียมคลอไรด์ 1 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

4.2 เฮกซะดีซิวไตรเมทิวแอมโมเนียมโบไมด์เข้มข้น 0.3 เปอร์เซนต์ (0.3% W/V)

ละลายเฮกซะดีซิวไตรเมทิวแอมโมเนียมโบไมด์0 . 3 กรัมในน้ำปริมาตร 1 00 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

4.3 สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ (0.1 M)

ละลายโซเดียมคลอไรด์ 5.8443 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน

4.4 สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซนต์ (0.85% W/V)

ละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

4.5 สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ในเอทานอลเข้มข้น 4 เปอร์เซนต์

นำเอทานอลเข้มข้น 95 เปอร์เซนต์ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น จนได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 950 มิลลิลิตร เติมโซเดียมคลอไรด์ 29.222 กรัม ผสมให้เข้ากัน

4.6 สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ในเอทานอลเข้มข้น 15 เปอร์เซนต์

นำเอทานอลเข้มข้น 95 เปอร์เซนต์ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น จนได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 950 มิลลิลิตร เติมโซเดียมคลอไรด์ 29.222 กรัม ผสมให้เข้ากัน

4.7 สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.15 โมลาร์ในอะซีเตทบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ (pH 6.0)

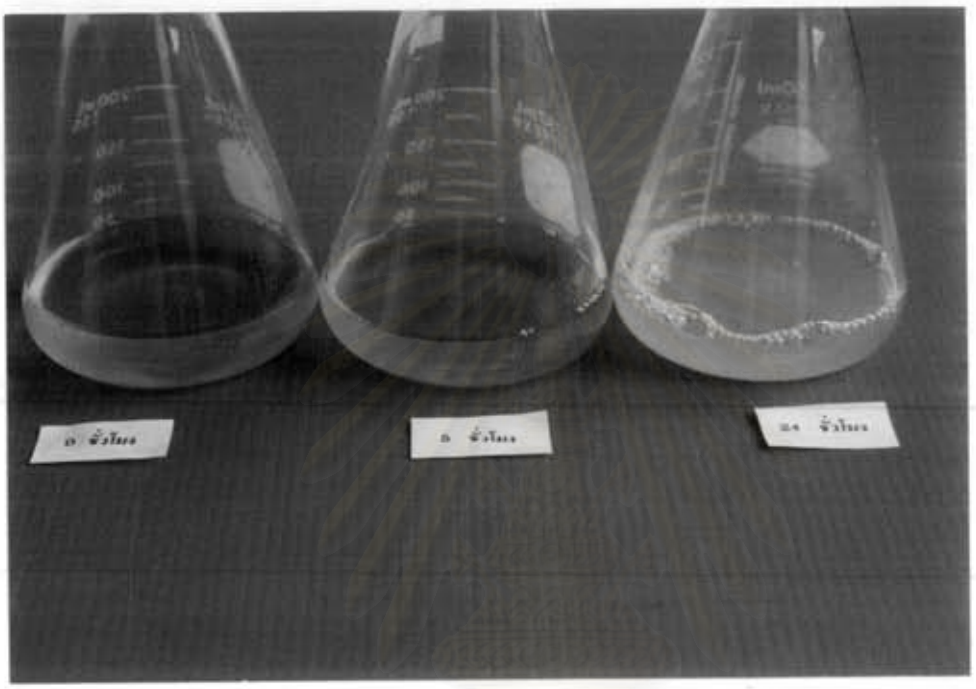
ชั่งโซเดียมอะซีเตท 13.638 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 6.0 ด้วยกรดอะซีติก เติมโซเดียมคลอไรด์ 8.7665 กรัม ผสมให้เข้ากัน

# ภาคผนวก ค

1. ลักษณะโคโลนีของ Streptococcus zooepidemicus ATCC 35246 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง BHI

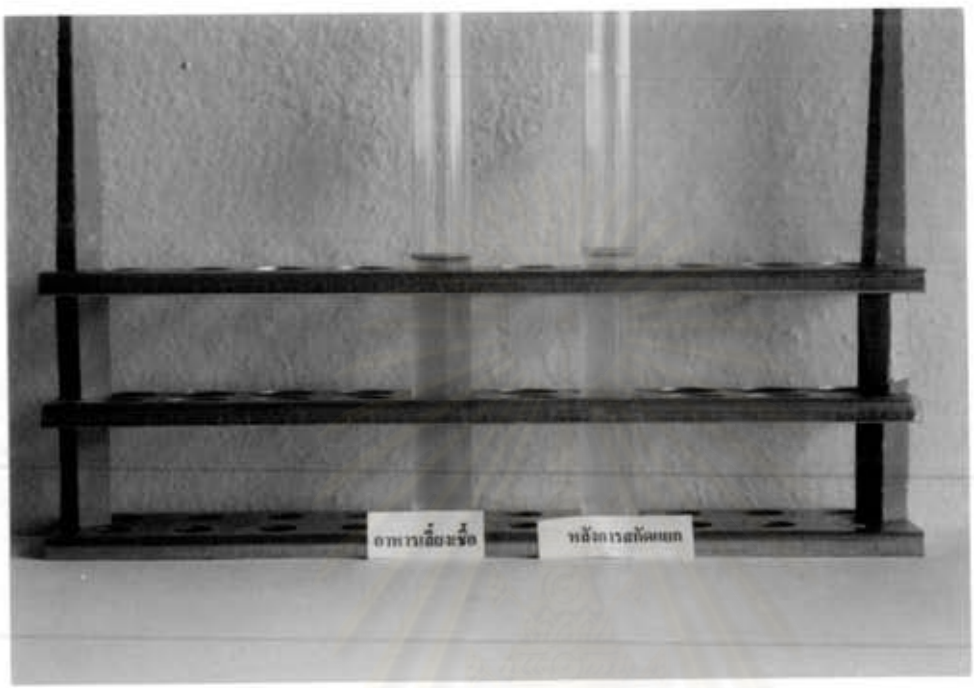
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ลักษณะอาหารสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค เมื่อเลี้ยงที่เวลาต่างๆ

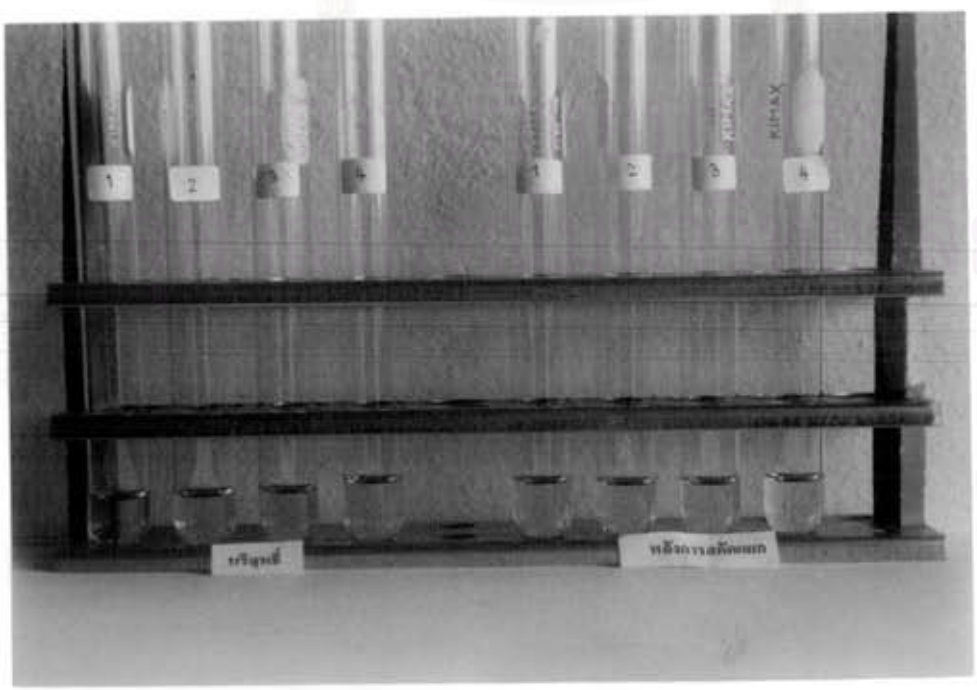


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

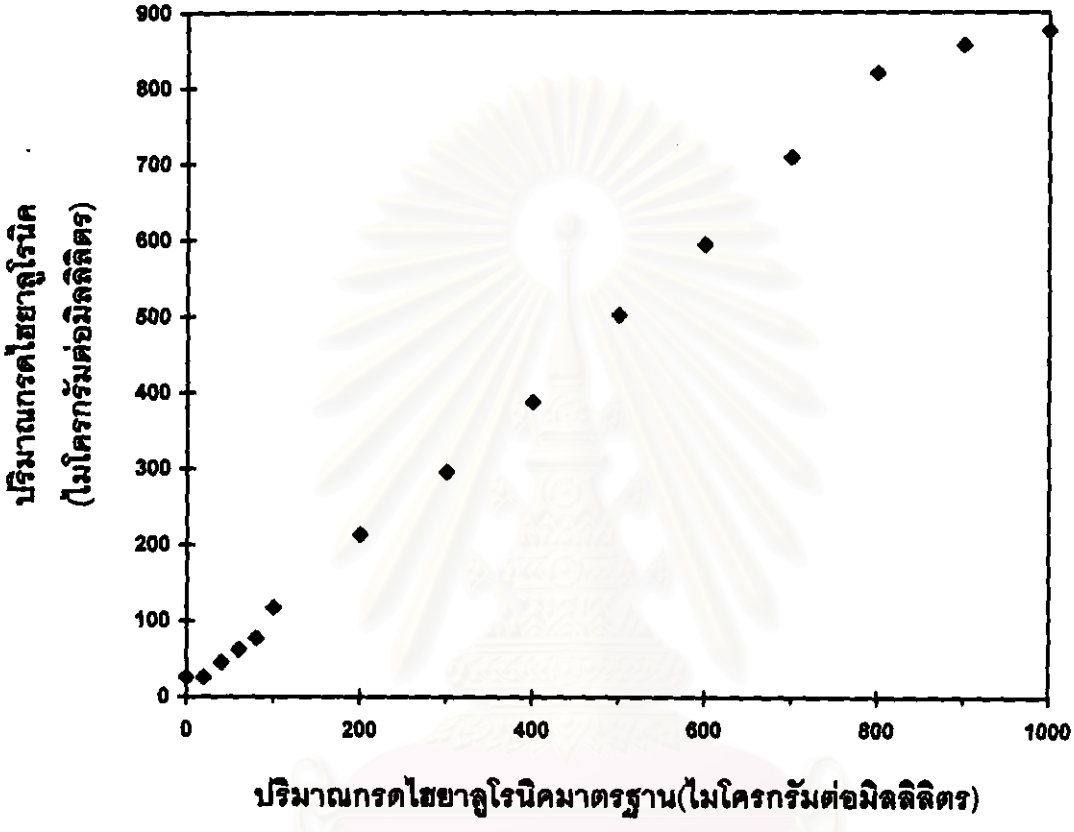
3. ส่วนน้ำใสที่ได้ก่อนและหลังตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิคออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ




4. ปฏิกิริยาในการเกิดสีของวิธีการวัดปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคด้วยวิธีทางเอนไซม์ เปรียบเทียบระหว่างกรดไฮยาลูโรนิคมาตรฐานกับกรดไฮยาลูโรนิคที่ตกได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ



## ภาคผนวก ง




**รูปที่** 33 กราฟมาตรฐานของกรดไฮยาลูโรนิค โดยแสดงค่าระหว่างปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคที่ได้จากการคำนวณเปรียบเทียบกับปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน

# ประวัติผู้เขียน

นางสาว จุรารัก ศรีวงษ์ เกิดวันที่ 30 มิถุนายน พ.ศ. 2517 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร ได้รับปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2537 และเข้ารับการศึกษาต่อในชั้นปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2538 ที่อยู่ปัจจุบัน 200/62 ถ. บำรุงเมือง ต. สำราญราษฎร์ เขตพระนคร กรุงเทพมหานคร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย