บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ วิธีและขั้นตอนดำเนินงานวิจัย

<u>อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย</u>

1. เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น G-10 บริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc., U.S.A
2. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-visible spectrophotometer) รุ่น UV-160A บริษัท Shimadzu Corporation
3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 บริษัท Bausch & Lomb, U.S.A
4. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 1000 บริษัท Cyberbean
5. เครื่องนึ่งฆ่าจุลินทรีย์ (Autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท Thai victory company Limited
6. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ Laminar flow รุ่น BV-124 บริษัท International Scientific Supply Co., Ltd.
7. เครื่องผสมสาร (Vortex-Genie2) รุ่น G560E บริษัท Scientific Industries Inc.,U.S.A
8. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น Temppet บริษัท T-80 Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan
9. เครื่องชั่ง รุ่น A200S และ รุ่น L2000P บริษัท Scientific Promotion Co., Thailand
10. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น KS-3000P บริษัท Kubota, Japan
11. เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น Inn@va 2100 บริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc., U.S.A
12. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Controlled environment incubator shaker) รุ่น G-27 บริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc., U.S.A
13. เครื่องวัดความหนืด (Ubbelhode dilution viscometer) รุ่น ASTM-IP บริษัท Poulten Selfe&Lee Co., England
14. เครื่องหาปริมาณไนโตรเจน (Kjeldatherm) ของ Gerhardt, Germany

<u>เคมีภัณฑ์</u>

1. แบคทีเรียลไฮยาลูโรเนตเกรดอุตสาหกรรม (Bacterial Hyaluronate) บริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A
2. เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (Hyaluronidase) บริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A
3. กลูโคส (Glucose) เกรดสำหรับการวิเคราะห์ บริษัท Merck, Germany
4. ซูโครส (Sucrose) เกรดสำหรับการวิเคราะห์ บริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A
5. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) บริษัท Merck, Germany
6. โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท Merck, Germany
7. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Carlo Erba Rergenti,
8. กรดเปอร์คลอริก ($HClO_4$) บริษัท Ajax Chemicals, Australia
9. พารา-ไดเมทิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ ($C_9H_{11}NO$) บริษัท Merck, Germany
10. กรดน้ำส้ม (CH_3COOH) บริษัท Merck, Germany
11. กรดเกลือ (HCl) บริษัท J.T. Baker, U.S.A
12. แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) เกรดอุตสาหกรรม
13. แอมโมเนียมซิเตรท (NH_4Cl) บริษัท Merck, Germany
14. สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Difco Laboratories, U.S.A
15. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท Merck, Germany
16. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท Merck, Germany
17. เคซีนไฮโดรไลเซท (Casein hydrolysate) บริษัท Merck, Germany
18. ซีทิวไพริดิเนียมคลอไรด์ (Cetylpyridinium chloride) บริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A
19. เฮกซะดีซิวไตรเมทิวแอมโมเนียมโบรไมด์ (Hexadecyl trimetyl ammonium bromide) บริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A
20. กลูโคส (Glucose) เกรดอุตสาหกรรมอาหาร บริษัทป. ประสิทธิ์
21. ซูโครส (Sucrose) เกรดอุตสาหกรรมอาหาร บริษัทมิตรผล, นครเพชร และสระบุรี

เคมีภัณฑ์ชนิดอื่นๆ เป็นเคมีภัณฑ์เกรดวิเคราะห์ (analytical reagent grade) จากบริษัทต่างๆ ซึ่งนำมาใช้โดยไม่ต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์อีก

วิธีดำเนินการทดลอง

1. จุลินทรีย์ การเก็บ และการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

1.1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรีย *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 ได้จาก American Type Culture Collection, Bethesda, Maryland, U.S.A

1.2. อาหารสำหรับการเลี้ยงเชื้อตั้งต้น

เชื้อ *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 ที่ได้จาก ATCC ให้เจริญโดยใช้อาหาร Brain heart infusion (BHI)

1.3. การเก็บรักษาแบคทีเรีย

ขีดแบคทีเรียจากข้อ 1.2 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (slant agar) บ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ จนเชื้อเจริญเต็มที่แล้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4° ซ จนกว่าจะนำมาใช้

1.4. การเลี้ยงแบคทีเรียในขวดแก้วรูปกรวย

1.4.1 การเตรียมเชื้อตั้งต้น

ปลูกเชื้อจากข้อ 1.3 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ปริมาตร 10 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ จากนั้นถ่ายเชื้อดังกล่าวลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI สำหรับใช้เป็นเชื้อตั้งต้นสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคต่อไป นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 9 ชั่วโมง ในภาวะที่มีอากาศ ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรเป็น 0.7 แล้วใช้เป็นกล้าเชื้อในการทดลองต่อไป

1.4.2 การเลี้ยงเชื้อ

ปลูกเชื้อตั้งต้นจากข้อ 1.4.1 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดในปริมาณ 10 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) ค่าความเป็นกรดด่าง 7.0 ตามรายงานของ Nimrod และคณะ (1986) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 28-32°ซ) พร้อมการ

ให้อากาศโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และเก็บตัวอย่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ

2. <u>การวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ (Growth)</u>

โดยวิธีหาน้ำหนักแห้ง (dry weight) ของเซลล์ซึ่งทำโดยการนำเซลล์ที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อ ที่ทราบปริมาตรแน่นอน มากรองผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 ที่ทราบน้ำหนักคงที่ ล้างเซลล์ อบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมงจนน้ำหนักคงที่ ชั่งหาน้ำหนักแห้ง แล้วคำนวณหาน้ำหนักแห้งของเซลล์

3. <u>การหาค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ</u>

โดยวัดความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น 1000 บริษัท Cyberbean

4. <u>การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (Reducing Sugar) โดยวิธีของ Bernfeld (1955)</u>

ทำโดยการเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1 มล. ลงในสารตัวอย่างที่เจือจางจนมีความเข้มข้นเหมาะสมปริมาตร 1 มล. ต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มล. เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีอยู่ในสารตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

การทำกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลายกลูโคสมาตรฐานเข้มข้น 0 - 1.0 มก./มล. ซึ่งเจือจางจากสารละลายสะต็อคที่มีความเข้มข้น 1.0 มก./มล. ทำการวิเคราะห์ดังข้างต้น แล้วเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้

5. <u>การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total Sugar) โดยวิธีของ Hanson และ Phillips (1981)</u>

เติมสารละลายฟีนอลเข้มข้น 5 เปอร์เซนต์ จำนวน 1 มล. เติมลงในตัวอย่างที่เจือจางจนมีความเข้มข้นเหมาะสมปริมาตร 1 มล. ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มล. ลงไปอย่างรวดเร็ว ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที และแช่ในอ่างน้ำเย็น 5 นาที นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตรมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร โดยวัดเทียบกับ Blank ซึ่งใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง คำนวณหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่มีอยู่ในสารตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

การทำกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลายซูโครสมาตรฐานเข้มข้น 0 - 200 ไมโครกรัมต่อ มล. ซึ่งเจือจางจากสารละลายสะต๊อคที่มีความเข้มข้น 0.2 มก./มล. ทำการวิเคราะห์ดังข้างต้น แล้วเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของซูโครสกับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้

6. <u>การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Total Nitrogen) โดยวิธีของ Stayermark (1951)</u>

6.1. การตรวจวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Total Nitrogen)

นำตัวอย่างสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถัน (H_2SO_4) ของกากถั่วเหลือง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดกลั่นขนาด 300 มล. เติมเกลือผสมช่วยเร่งปฏิกิริยา (Catalyst, ประกอบด้วยโปแตสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) 95 กรัม และคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) 5 กรัม) 7 กรัม เติมกรดกำมะถันเข้มข้น 15 มล. แล้วนำไปย่อยบนเตาหลุม (Digester) จนได้สารละลายใส ทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มล. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 37 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก ปริมาตร 50 มล. ทำการกลั่นจับแอมโมเนียที่เกิดขึ้นด้วยกรดบอริก (H_3BO_3) เข้มข้น 4 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก ปริมาตร 100 มล. ใช้อินดิเคเตอร์ผสม (Indicator, ประกอบด้วยเมทิลเรด (methyl red) และเมทิลีนบลู (methylene blue) อย่างละ 0.1 กรัม ละลายในเอทานอล (ethanol) 95 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 150 มล.) 3 หยด กลั่นจนสารละลายกรดบอริกมีปริมาตรเป็น 250 มล. นำสารละลายที่ได้มาไตเตรทกับสารละลายมาตราฐานกรดเกลือที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนแล้ว โดยที่

$$\% \text{ ไนโตรเจนทั้งหมด} = \frac{\text{ปริมาตรกรดเกลือ (มล.)} \times \text{ความเข้มข้นของกรดเกลือ (โมลาร์)} \times 1.4}{\text{ปริมาตรของสารตัวอย่าง (มล.)}}$$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. การวิเคราะห์ความเข้มข้นของ Sodium hyaluronate โดยวิธีของ Greiling (1963)

7.1. เตรียมของผสมจำนวน 4 หลอดต่อสารตัวอย่าง 1 ชนิด ให้มีส่วนประกอบดังนี้

ของผสม (หลอดที่)	ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.4 (ภาคผนวก ข) (มล.)	โซเดียมคลอไรด์ (0.15 M) (มล.)	โซเดียมไฮยาลูโรเนตมาตรฐาน ความเข้มข้น 0.2 mg/ml. (มล.)	สารตัวอย่าง (มล.)
1	2.0	0.5	-	0.5
2	1.5	0.5	0.5	0.5
3	1.0	0.5	1.0	0.5
4	2.0	0.6	-	0.5

7.2. นำของผสมทั้ง 4 หลอด ทำให้ร้อนที่ 70° ซ เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น

7.3. เติมเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสความเข้มข้น 1 มก./มล. 0.1 มล. ลงในหลอดที่ 1 ถึง 3 ยกเว้นหลอดที่ 4 ที่เป็น Blank ผสมให้เข้ากัน

7.4. นำมาบ่มให้เกิดปฏิกิริยาในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

7.5. เติมกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 20%(w/v) 0.5 มล. ทั้ง 4 หลอด ผสมให้เข้ากันเป็นอย่างดี

7.6. ปั่นแยกตะกอนที่ 5,000g 20 นาที

7.7. นำส่วนน้ำใสในแต่ละหลอดจำนวน 2 มล. ใส่ลงในสารละลายโพแทสเซียมเตตระบอเรต (Potassium tetraborate solution) ความเข้มข้น 0.8 โมลาร์ ปริมาตร 0.6 มล.

7.8. นำมาต้มน้ำเดือด 3 นาที ทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำแข็ง (ice bath)

7.9. นำส่วนน้ำใสในแต่ละหลอด 1 มล. ผสมกับสารละลายพารา-ไดเมทิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ (para-dimethylaminobenzaldehyde solution) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 3 มล.

7.10. นำมาบ่มที่อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) 37°ซ 20 นาที

7.11. นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 585 นาโนเมตร (OD_{585})

7.12. นำค่าการดูดกลืนแสงของของผสมทั้ง 4 หลอด มาแทนค่าในสมการที่ 1 และ 2 เพื่อหาค่าความเข้มข้นของกรดไฮยาลูโรนิคโดย

$$E_{100\ \mu g} = \frac{(E2-E1) + (E3-E2)}{2} \qquad (1)$$

โดยที่ E1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของของผสมหลอดที่ 1
E2 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของของผสมหลอดที่ 2
E3 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของของผสมหลอดที่ 3

$E_{100\ \mu g}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของกรดไฮยาลูโรนิค 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่วิเคราะห์ได้จากการทดลอง

ซึ่ง μg of hyaluronate/ml. of Sample $= \frac{E1 \times 100 \times 2}{E_{100\ \mu g}}$ (2)

8. <u>การวัดความหนืด และการหาน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิคโดยวิธีของ Laurent และคณะ (1960)</u>

8.1. การหาความหนืดเปรียบเทียบ (Relative viscosity, ηr) ของกรดไฮยาลูโรนิค

8.1.1 นำอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค (Production medium) (ตัวเปรียบเทียบ) ใส่ลงในมาตรวัดความหนืดแบบอับบีลอร์ด (Ubbelhode viscometer) รูปที่ 5 ประมาณ 3/4 ของกะเปาะ ยึดหลอดให้อยู่ในแนวดิ่งด้วยตัวจับ (Clamp) และแท่น (Stand)

8.1.2 ใช้ลูกยางดูดสารขึ้นไปที่หลอดอีกด้านหนึ่งที่มีหลอด Capillary อยู่ดูดให้สารมีความสูงกว่าขีดด้านบนสุดของมาตรวัดความหนืดนั้น

8.1.3 ปล่อยลูกยางและจับเวลาที่สารไหลผ่านขีดบนของมาตรวัด และหยุดจับเวลาเมื่อผ่านขีดด้านล่างของมาตรวัด บันทึกเวลาเป็นวินาที (sec)

8.1.4 ทำซ้ำข้อ 2 และ 3 อีก 4 ครั้ง จนได้เวลาในการไหลที่ใกล้เคียงกัน

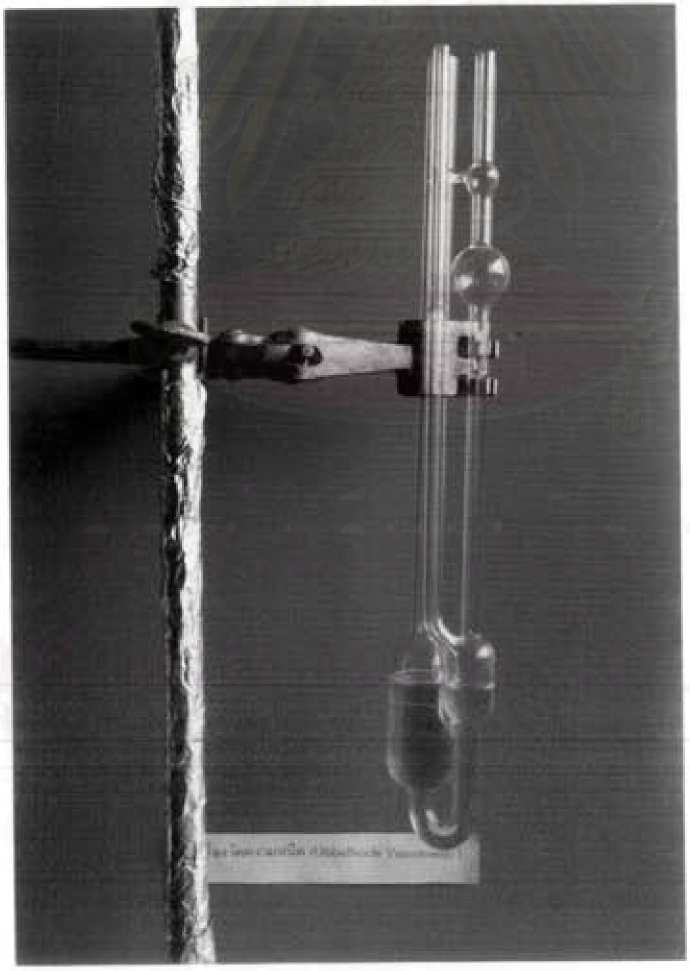
8.1.5 ทำซ้ำตั้งแต่ข้อ 1 แต่เปลี่ยนจากอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นน้ำเลี้ยงเชื้อที่ต้องการหาน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิค (สารตัวอย่าง) ที่เจือจางให้มีความเข้มข้นต่างๆกัน 5 ความเข้มข้นโดยการวัดจะวัดน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นต่ำไปหาความเข้มข้นสูง

นำเวลาที่ได้จากการวัดตัวเปรียบเทียบ และสารตัวอย่างแทนค่าในสมการ 3 เพื่อหาค่าความหนืดสัมพัทธ์ (Relative viscosity, ηr) ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบกับความหนืดของของเหลวมาตรฐาน (เช่น น้ำ ตัวทำละลายบริสุทธิ์หรืออาหารเลี้ยงเชื้อ)

$$\eta r = t / t0 \qquad (3)$$

เมื่อ t = เวลาการไหลของสารตัวอย่าง

t_0 = เวลาการไหลของตัวเปรียบเทียบ



รูปที่ 5 แสดงเครื่องมือวัดความหนืดแบบอับบีลอร์ด (Ubbelhode viscometer)

8.2. การหาน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิค

นำค่าความหนืดสัมพัทธ์ (Relative viscosity, ηr) ที่ได้จากสมการมาหาค่าความหนืดจำเพาะต่อเวลาการไหลของสารตัวอย่าง (Specific viscosity, ηsp; (sec)) โดยแทนค่าในสมการ 4

$$\eta sp = \eta r - 1 \qquad (4)$$

จากนั้นนำค่าความหนืดเฉพาะ (Specific viscosity, ηsp) มาแทนค่าในสมการ 5 เพื่อหาค่าความหนืดของสารละลายที่มีความเจือจางมากๆ (Intrinsic viscosity, η) (ความเข้มข้นสูงสุดไม่เกิน 1 g/100 ml.)

$$\eta sp/C = \eta \qquad (5)$$

โดย C คือ ความเข้มข้นของสารละลาย (กรัมต่อมิลลิลิตร)

โดยค่าความหนืดของสารละลายที่มีความเจือจางมากๆ (Intrinsic viscosity, η) มีความสัมพันธ์กับน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยแบบความหนืด ดังสมการของ Mark-Houwink-Sakurada คือ

$$(\eta) = 0.0403 \times M^{0.775}$$

เมื่อ M คือ น้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน)

<u>ขั้นตอนดำเนินการทดลอง</u>

9. <u>ศึกษารูปแบบการเจริญของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI</u> (Johns และคณะ., 1994; Armstrong และคณะ., 1997)

9.1 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI ในภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการเขย่าและไม่มีการเขย่า

เลี้ยงเชื้อ *S. zooepidermicus* ATCC 35246 ในอาหารสำหรับการเตรียมหัวเชื้อ (BHI) ในภาวะที่มีการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และในภาวะที่ไม่มีการเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 28 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ นำมาวิเคราะห์การเจริญที่ค่าการดูดกลืนแสง

ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากนั้นนำหัวเชื้อที่เตรียมได้ทั้งสองภาวะดังกล่าวที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ มาศึกษาเปรียบเทียบการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคในอาหารสูตรสำหรับการผลิต โดยเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับในข้อ 1.4.2. เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ นำมาวิเคราะห์การเจริญและปริมาณกรดไฮยาลูโรนิค

9.2 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI ในภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเขย่าทั้งแบบที่มีอากาศและไม่มีอากาศ

ทำการเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidermicus* ATCC 35246 ในอาหารสำหรับการเตรียมหัวเชื้อดังกล่าวทั้งในภาวะที่ไม่มีการเขย่าทั้งแบบที่มีอากาศและในภาวะที่ไม่มีอากาศ (วางไว้ใน candle jar) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 28 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ นำมาวิเคราะห์การเจริญที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากนั้นนำหัวเชื้อที่เตรียมได้ทั้งสองภาวะดังกล่าวที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ มาศึกษาเปรียบเทียบการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคในสูตรอาหารสำหรับการผลิตของ Nimrod และคณะ (ภาคผนวก ก) โดยเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับในข้อ 1.4.2 เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ นำมาวิเคราะห์การเจริญและปริมาณกรดไฮยาลูโรนิค

9.2.1 ช่วงการเจริญของหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ เพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

ทำการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดที่ 2 ของ Nimrod และคณะ (ภาคผนวก ก) เช่นเดียวกับข้อ 1.4.2 ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 7.0 โดยแปรผันช่วงการเจริญของหัวเชื้อเป็นแลคเฟส (lag phase), ระยะกึ่งกลางลอกาลิทิมิก (mid log phase), ระยะสเตชั่นนารีช่วงต้น (early stationary phase) และระยะสเตชั่นนารีช่วงปลาย (late stationary phase) จากรูปแบบการเจริญของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI ในภาวะที่ไม่มีการเขย่าในสภาพที่มีอากาศ (ตั้งทิ้งไว้) ในข้อที่ 9.2 ติดตามการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของเชื้อดังกล่าวเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

10. <u>สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ เพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค</u>

ทำการเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidermicus* ATCC 35246 ตามวิธีในข้อ 1.4 ในสูตรอาหารต่างๆ ดังนี้

สูตรอาหารชนิดที่ 1 ของ Akasaka และคณะ (ภาคผนวก ก)
สูตรอาหารชนิดที่ 2 ของ Nimrod และคณะ (ภาคผนวก ก)
สูตรอาหารชนิดที่ 3 ของ Woolcock (ภาคผนวก ก)
สูตรอาหารชนิดที่ 4 ของ Johns และคณะ (ภาคผนวก ก)

ที่มีการปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นให้เท่ากันคือ 7.0 นำมาวิเคราะห์การเจริญของเชื้อ ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ และความเข้มข้นของโซเดียมไฮยาลูโรเนต ตามวิธีที่กล่าวมาข้างต้น เพื่อคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

11. <u>การศึกษารูปแบบการเจริญและการสร้างกรดไฮยาลูโรนิคของ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม</u>

เลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ตามวิธีในข้อ 1.4.2. โดยติดตามการเจริญ ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ และความเข้มข้นของโซเดียมไฮยาลูโรเนตในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ 2 (ภาคผนวก ก) ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 7.0 ที่เวลาต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

12. <u>การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค</u>

การศึกษาทำโดยการแบ่งศึกษาออกเป็น 3 ส่วน คือ ปริมาณหัวเชื้อ ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ดังนี้

12.1 <u>ปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค</u>

เลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดที่ 2 ของ Nimrod และคณะ (ภาคผนวก ก) ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 6.8 ที่อุณหภูมิห้อง (28-32°ซ) ความเร็วรอบของการเขย่าเป็น 200 รอบต่อนาที อายุหัวเชื้อ 9 ชั่วโมง โดยแปรผันปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นตั้งแต่ 5 - 25 เปอร์เซนต์(ปริมาตรต่อปริมาตร) (Johns และคณะ(1994) ; Armstrong และคณะ(1997) ตามที่ได้มีผู้รายงานไว้ ในการทำงานจะใช้หัวเชื้อที่มีปริมาณต่างๆในรูปของกลุ่มเซลล์เพื่อลดความคาดเคลื่อนจากการใช้หัวเชื้อในรูปสารละลาย เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ นำมาวิเคราะห์ดูผลการเจริญ และความเข้มข้นของโซเดียมไฮยาลูโรเนต

12.2 <u>ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค</u>

12.2.1 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ เพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

เลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เหมาะสมดังเช่นในข้อที่ 12.1 ที่มีการแปรผันแหล่งของน้ำตาลเป็นกลูโคส, ซูโครส ฟรุกโตส และกาแลคโตส ในปริมาณที่เท่ากันคือ 5 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 ที่อุณหภูมิห้อง (28-32°ซ) ความเร็วรอบของการเขย่าเป็น 200 รอบต่อนาที อายุหัวเชื้อ 9 ชั่วโมง ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 20 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) แล้วติดตามวิเคราะห์การเจริญ และปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคที่เวลาการเลี้ยงเชื้อต่างๆ

12.2.2 รูปแบบการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค เมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน

ทำการศึกษาโดยเลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเช่นเดียวกับข้อ 12.2.1 โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส ปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 6.8 ภายใต้ภาวะการเลี้ยง ที่อุณหภูมิห้อง (28-32°ซ) ความเร็วรอบของการเขย่าเป็น 200 รอบต่อนาที อายุหัวเชื้อ 9 ชั่วโมง ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 20 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) แล้วติดตามการเจริญ ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณน้ำตาล และปริมาณกรดไฮยาลูโรนิค ที่เวลาการเลี้ยงเชื้อต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

12.2.3 แหล่งของซูโครสที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

เมื่อทราบว่าซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมแล้ว จึงศึกษาความเป็นไปได้ในการนำน้ำตาลทรายมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลซูโครสเกรดวิเคราะห์เพื่อลดต้นทุน โดยเลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 12.2.2 ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 6.8 ที่อุณหภูมิห้อง (28-32°ซ) ความเร็วรอบของการเขย่าเป็น 200 รอบต่อนาที ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลซูโครส 5 กรัมต่อลิตร ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 20 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) อายุหัวเชื้อ 9 ชั่วโมง ที่แปรผันแหล่งของซูโครสเป็นเกรดสำหรับการวิเคราะห์ และเกรดสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมซึ่งเป็นของบริษัทมิตรผล, บริษัทสระบุรี และบริษัทนครเพชร แล้ววิเคราะห์ดูผลการเจริญ และการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของเชื้อที่เวลาต่างๆ

12.2.4 ปริมาณซูโครสที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ เพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

เมื่อได้ชนิดของแหล่งซูโครสที่เหมาะสมจากข้อ 12.2.3 แล้วทำการผันแปรปริมาณซูโครสเริ่มต้นในอาหารสำหรับการผลิตกรดที่ได้จากข้อ 12.2.3 เป็น 2 - 15 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ แล้วติดตามการเจริญ และการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

12.2.5 การแบ่งเติมน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ เพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

จากที่มีรายงานของกลุ่มผู้วิจัยต่างๆ กล่าวว่าการแบ่งเติมน้ำตาลสามารถเพิ่มการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคได้ ในการศึกษานี้จึงศึกษาถึงผลการแบ่งเติมน้ำตาลต่อการผลิตกรดดังกล่าว โดยเลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากข้อ 12.2.4 ที่ใช้ซูโครสเริ่มต้นเพียง 0.15 เปอร์เซนต์ แล้วเติมน้ำตาลซูโครสอีก 0.35 เปอร์เซนต์ที่เวลาต่างๆ (Akasaka และคณะ,1989) เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครสเริ่มต้น 0.5 เปอร์เซนต์ (ไม่มีการแบ่งเติมซูโครส) ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมเช่นเดียวกับข้อ 12.2.4 เก็บตัวอย่างเป็นระยะๆ เพื่อติดตามการเจริญ ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณน้ำตาล และการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของเชื้อดังกล่าว

12.2.6 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ เพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

จากการที่เชื้อในกลุ่มสเตรปโตคอกคัสสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนได้ทั้งสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ จึงศึกษาหาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 12.2.5 ที่มีซูโครส 5 กรัมต่อลิตร โดยแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ สารสกัดจากยีสต์, พอลิเพพโตน, ซอยล์บีนไฮโดรไลเซท, แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมซิเตรท เปรียบเทียบกับการใช้เคซีนไฮโดรไลเซท เมื่อใช้ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่เท่ากันคือ 0.138 เปอร์เซนต์ ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.8 เมื่อเลี้ยงเชื้อดังกล่าวที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 28 - 32°ซ) ความเร็วรอบของการเขย่า 200 รอบต่อนาที ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 20 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) อายุหัวเชื้อ 9 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

12.2.7 ปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ เพื่อการผลิตกรดไฮยา-ลูโรนิค

เมื่อเลือกใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคแล้ว จึงศึกษาหาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสม โดยเลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ได้จากข้อ 12.2.6 ที่แปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเป็น 0.4 - 1.25 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.8 แล้วเลี้ยงเชื้อดังกล่าวที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 28 - 32°ซ) ความเร็วรอบของการเขย่า 200 รอบต่อนาที ความเข้มข้นเริ่มต้นของซูโครส 5 กรัมต่อลิตร ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 20 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) อายุหัวเชื้อ 9 ชั่วโมง แล้วเก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ นำมาวิเคราะห์ดูผลการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคเช่นเดียวกับข้อ 12.2.6 เพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนต่อไป

12.2.8 ชนิดของเกลือแร่ที่มีผลต่อการเลี้ยงเชื้อ เพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

ทำการเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเช่นเดียวกับข้อ 12.2.7 ที่พร่องโซเดียมคลอไรด์, แมกนีเซียมซัลเฟต หรือไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.8 ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 28 - 32°ซ) ความเร็วรอบของการเขย่า 200 รอบต่อนาที ความเข้มข้นเริ่มต้นของซูโครส 5 กรัมต่อลิตร ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 20 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) อายุหัวเชื้อ 9 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ นำมาวิเคราะห์การเจริญ ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณน้ำตาลและความเข้มข้นของโซเดียมไฮยาลูโรเนต

12.2.8.1 ผลของไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่มีผลต่อการเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

หลังจากพบว่าไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต มีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคมากที่สุด ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงศึกษาถึงบทบาทของไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเช่นเดียวกับในข้อ 12.2.8 ที่เติมโพแทสเซียมไนเตรตหรือโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตแทนไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ภายใต้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเช่นเดียวกับในข้อ 12.2.8 แล้ววิเคราะห์เพื่อดูผลการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคที่เวลาการเลี้ยงเชื้อต่างๆ

12.2.8.2 ชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ เพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

หลังจากทราบว่าไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตน่าจะทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว จึงศึกษาชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม โดยใช้ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต, โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต, ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต หรือโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตสำหรับเป็นสารที่ควบคุมความเป็นกรดด่างในอาหารที่ใช้เลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 โดยเลี้ยงในสูตรอาหารชนิดที่ 2 (*ภาคผนวก ก*) ที่มีปริมาณซูโครสเริ่มต้น 5 กรัมต่อลิตร ภายใต้ภาวะการเลี้ยงเชื้อจากข้อ 12.2.8.1 แล้วติดตามการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของเชื้อดังกล่าว

12.2.8.3 ปริมาณของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ เพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

ทำการเลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 12.2.8.2 ที่มีปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร มาแปรผันปริมาณโซเดียมคลอไรด์ลงในอาหาร 0 - 5 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.8 แล้วเลี้ยงเชื้อดังกล่าวที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 28 - 32°ซ) ความเร็วรอบของการเขย่า 200 รอบต่อนาที ความเข้มข้นเริ่มต้นของซูโครส 5 กรัมต่อลิตร ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 20 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) อายุหัวเชื้อ 9 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พร้อมการเก็บตัวอย่างเป็นระยะๆเพื่อติดตามการสร้างกรดไฮยาลูโรนิคในส่วนน้ำใส

12.2.8.4 ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

เลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 12.2.8.3 ที่แปรผันปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเริ่มต้นเป็น 0 - 3 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.8 ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 28 - 32°ซ) ความเร็วรอบของการเขย่า 200 รอบต่อนาที ความเข้มข้นเริ่มต้นของซูโครส 5 กรัมต่อลิตร ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 20 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) อายุหัวเชื้อ 9 ชั่วโมง แล้ววิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคของเชื้อที่เวลาการเลี้ยงเชื้อต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

12.3 <u>ปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค</u>

12.3.1 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ เพื่อการผลิตกรดไฮยา-ลูโรนิค

โดยเลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรปรับปรุง (ภาคผนวก ก) โดยแปรผันความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.2 - 7.4 ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ28-32°ซ) ความเร็วรอบของการเขย่า 200 รอบต่อนาที ความเข้มข้นเริ่มต้นของซูโครส 5 กรัมต่อลิตร ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 20 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) อายุหัวเชื้อ 9 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆนำมาวิเคราะห์การเจริญ และความเข้มข้นของโซเดียมไฮยาลูโรเนต

12.3.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ เพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

เลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารสูตรปรับปรุง (ภาคผนวก) ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 ทำการแปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อเป็น 25°ซ, 30°ซ, อุณหภูมิห้อง (28 - 32°ซ) และ 40°ซ ภายใต้ภาวะการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ความเข้มข้นเริ่มต้นของซูโครส 5 กรัมต่อลิตร ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 20 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) อายุหัวเชื้อ 9 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ วิเคราะห์ดูผลการเจริญ และความเข้มข้นของโซเดียมไฮยาลูโรเนต

12.3.3 ความเร็วรอบของการเขย่าที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

เลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในอาหารสูตรปรับปรุง (ภาคผนวก) ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 ที่อุณหภูมิห้อง (28-32°ซ) โดยการแปรผันความเร็วรอบของการเขย่าเป็น 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที ติดตามการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคที่เวลาการเลี้ยงเชื้อต่างๆ

12.3.4 การลดความเร็วรอบของการเขย่าที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ เพื่อผลิตการกรดไฮยาลูโรนิค

จากที่มีรายงานได้กล่าวว่าการลดความเข้มข้นของอากาศลงมีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค ในการทดลองนี้จึงศึกษารูปแบบการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับปรุงเช่นเดียวกับข้อ 12.3.3 ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 ที่อุณหภูมิห้อง (28-32°ซ) ปริมาณหัวเชื้อ 20%(ปริมาตรต่อปริมาตร) อายุ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9 ชั่วโมง ที่มีการลดความเร็วรอบของการเขย่าลงจาก 250 รอบต่อนาทีเป็น 200 รอบต่อนาทีที่ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการลดความเร็วรอบของการเขย่า คือ 200 และ 250 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ นำมาวิเคราะห์ความเข้มข้นของโซเดียมไฮยาลูโรเนต

13. <u>การผลิตกรดไฮยาลูโรนิคจากเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในภาวะที่เหมาะสม</u>

เลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 0.65 กรัม, สารสกัดจากยีสต์ 10 กรัม, โซเดียมคลอไรด์ 2 กรัม, แมกนีเซียมคลอไรด์ 1 กรัม, ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.5 กรัม, และน้ำตาลซูโครส 5 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร โดยใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อดังนี้คือ ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 6.8 ปริมาณหัวเชื้อ 25 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) อายุหัวเชื้อ 9 ชั่วโมง อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ 30 องศาเซลเซียส ให้อากาศโดยการเขย่า ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที จนกระทั่งถึงชั่วโมงการเลี้ยงเชื้อที่ 12 ชั่วโมงจึงลดความเร็วรอบเป็น 200 รอบต่อนาที เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆกัน นำมาวิเคราะห์การเจริญ ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณน้ำตาล และความเข้มข้นของโซเดียมไฮยาลูโรเนต

14. <u>รูปแบบของน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย และปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคที่เวลาการเลี้ยงเชื้อต่างๆ</u>

ทำการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยกับปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคที่ผลิตจาก *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เหมาะสม ภายใต้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเช่นเดียวกับข้อ 12.3.3 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ ดังนี้คือ 0, 10, 15, 24, 36, และ 48 ชั่วโมง มาปั่นแยกเซลล์ออก นำส่วนน้ำใสที่ได้ดังกล่าวมาหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยและปริมาณกรดไฮยาลูโรนิค

15. <u>การตรวจหาการปนเปื้อนของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสในอาหารเลี้ยงเชื้อ</u>

ทำการตรวจสอบการปนเปื้อนของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสในน้ำเลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว และในภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ดังเช่นในข้อ 14 เป็นเวลา 24 และ 36 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมาปั่นแยกเซลล์ออก นำส่วนน้ำใสที่ได้มาแบ่งเป็นสองส่วน ส่วนแรกนำมาต้มที่ 100°ซ เป็นเวลา 20 นาที ส่วนที่สองไม่ผ่านการต้ม จากนั้นเติมส่วนน้ำใสทั้งสองส่วนดังกล่าวลงในส่วนผสมทั้งสี่หลอดแทนเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสมาตรฐาน แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 585 นาโนเมตร ตามวิธีการวิเคราะห์ความเข้มข้นของโซเดียมไฮยาลูโรเนตในข้อ 7

16. <u>ศึกษาความคงตัวของกรดไฮยาลูโรนิคที่ผลิตโดยเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ</u>

ทดลองศึกษาความคงตัวของกรดไฮยาลูโรนิคที่อุณหภูมิต่างๆ โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม เช่นเดียวกับข้อ 15 ที่เวลา 24 ชั่วโมงซึ่งเป็นเวลาที่มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคสูงสุด มาปั่นแยกเซลล์ออก จากนั้นแบ่งส่วนน้ำใสออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกนำมาต้มที่ 100°ซ เป็นเวลา 20 นาที ส่วนที่สองไม่ผ่านการต้ม นำส่วนน้ำใสทั้งสองส่วนที่เตรียมได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆกันคือ -15°ซ, 4°ซ และ 10°ซ ตามลำดับ นำมาวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคทุกสัปดาห์

17. <u>ศึกษาอุณหภูมิ และระยะเวลาที่ใช้ในการให้ความร้อนต่อน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของกรดไฮยาลูโรนิค</u>

เลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เหมาะสม ภายใต้ภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมเช่นเดียวกับข้อ 14 จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงการเลี้ยง ที่ 24 ชั่วโมง มาปั่นแยกเซลล์ออกเป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้มาแบ่งต้มที่อุณหภูมิ 70°ซ เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที และที่อุณหภูมิ 100°ซ เป็นเวลา 30, 45 และ 60 นาที นำส่วนน้ำใสดังกล่าวมาหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยตามวิธีข้างต้น เปรียบเทียบกับส่วนน้ำใสที่ไม่ผ่านการต้ม

18. <u>วิธีเก็บเกี่ยวกรดไฮยาลูโรนิคจากน้ำเลี้ยงเชื้อ</u>

ศึกษาการเก็บเกี่ยวกรดไฮยาลูโรนิคตามวิธีของ Laurent และคณะ (1969), Holmstrom และ Ricica (1967), Brown และคณะ (1994), Rijn (1983), และ Kjems และ Lebech (1976) แล้วเปรียบเทียบปริมาณและความบริสุทธิ์ของกรดไฮยาลูโรนิคที่ได้

18.1.1. วิธีของ Laurent และคณะ (1969)

นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาปั่นแยกเซลล์ที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนน้ำใสมาลดปริมาตรลงครึ่งหนึ่งด้วยตัวระเหยแบบหมุน (Rotating evaporator) จากนั้นนำมาตกตะกอนด้วยเอทานอลเข้มข้น 95 เปอร์เซนต์ ในอัตราส่วน 1:2 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 30 นาที ปั่นแยกตะกอนที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนตะกอนที่ได้มาละลายในน้ำกลั่น ตกตะกอนส่วนน้ำใสอีกครั้งด้วยสารละลายซีทิวไพริดิเนียมคลอไรด์ (Cetylpyridinium chloride solution) เข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ ในอัตราส่วน 1:1 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำมาปั่นแยกตะกอนที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วละลายตะกอนที่ได้ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5 โมลาร์ที่ละลายในเอทานอลเข้มข้น 4 เปอร์เซนต์ นำสารละลายดังกล่าวมาตกตะกอนอีกครั้งด้วยเอทานอล (Ethanol) เข้มข้น 95 เปอร์เซนต์ ในอัตราส่วน 1:2 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำมาปั่นแยกตะกอน ละลายตะกอนที่ได้ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2 โมลาร์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ

18.1.2 วิธีของ Holmstrom และ Ricica (1967)

นำอาหารเลี้ยงเชื้อกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 2 แล้วนำส่วนน้ำใสมาลดปริมาตรลง 10 เท่าจากปริมาตรเดิมด้วยตัวระเหยแบบหมุน จากนั้นนำมาตกตะกอนด้วยเอทานอลเข้มข้น 95 เปอร์เซนต์ ในอัตราส่วน 1:3 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 30 นาที ปั่นแยกตะกอนที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนตะกอนที่ได้มาละลายในน้ำกลั่น แล้วนำมาปั่นแยกตะกอนที่เหลืออยู่ที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ตกตะกอนส่วนน้ำใสอีกครั้งด้วยสารละลายซีทิวไพริดิเนียมคลอไรด์เข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ ในอัตราส่วน 1:1 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำมาปั่นแยกตะกอนที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วละลายตะกอนที่ได้ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5 โมลาร์ที่ละลายในเอทานอลเข้มข้น 4 เปอร์เซนต์ นำสารละลายดังกล่าวมาตกตะกอนอีกครั้งด้วยเอทานอลเข้มข้น 95 เปอร์เซนต์ ในอัตราส่วน 1:3 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำมาปั่นแยกตะกอน ละลายตะกอนที่ได้ในน้ำกลั่น

18.1.3 วิธีของ Brown และคณะ (1994)

นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาปั่นแยกเซลล์ที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ตกตะกอนด้วยเอทานอลสัมบูรณ์ (Absoluted ethanol) ในอัตราส่วน 2:3 เก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 30 นาที ปั่นแยกตะกอนที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนตะกอนที่ได้มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ นำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 2 แล้วตกตะกอนส่วนน้ำใสอีกครั้งด้วยสารละลายซีทิวไพริดิเนียมคลอไรด์เข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ ในอัตราส่วน 1:1 เก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำมาปั่นแยกตะกอนที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วละลายตะกอนที่ได้ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ นำสารละลายดังกล่าวมาตกตะกอนอีกครั้งด้วยเอทานอลสัมบูรณ์ในอัตราส่วน 1:2 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำมาปั่นแยกตะกอนละลายตะกอนที่ได้ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ที่ละลายในเอทานอลเข้มข้น 15 เปอร์เซนต์ แล้วเติมเอทานอลสัมบูรณ์ ในอัตราส่วน 2:3 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำมาปั่นแยกตะกอนที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนที่ได้มาทำให้แห้งที่ 50°ซ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

18.1.4 วิธีเก็บเกี่ยวตามวิธีของ Rijn (1983)

ปั่นแยกเซลล์จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 13,680 g เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนน้ำใสเก็บไว้ นำส่วนตะกอนมาล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1 โมลาร์ แล้วเติมโซเดียมโดดิซิลซัลเฟต (Sodium dodecylsulfate, $C_{12}H_{25}OSO_3 \cdot Na$) จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.01 เปอร์เซนต์ บ่มที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งแคปซูลหมด โดยการดูจากการย้อมเซลล์ด้วย India ink จากนั้นนำมาปั่นแยกตะกอนที่ 13,680 g เป็นเวลา 15 นาที ผสมส่วนน้ำใสที่ได้เข้าด้วยกัน กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 2 ตกตะกอนส่วนน้ำใสที่ได้ด้วยสารละลายเฮกซะดีซิวไตรเมทิวแอมโมเนียมโบรไมด์ (Hexadecyltrimetyl ammonium bromide) เข้มข้น 3 เปอร์เซนต์ ในอัตราส่วน 1:1 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำมาปั่นแยกตะกอนที่ 13,680 g เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว แล้วจึงละลายตะกอนที่ได้ด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 2 โมลาร์ที่ 4°ซ ปั่นแยกตะกอนที่เหลือทิ้งไป นำเฉพาะส่วนน้ำใสมาตกตะกอนด้วยเอทานอลเข้มข้น 95 เปอร์เซนต์ ในอัตราส่วน 1:2 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำมาปั่นแยกตะกอนที่ 13,680 g เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนมาล้างด้วยสารละลายที่ประกอบด้วยเอทานอล 2 ส่วนกับน้ำเกลือ 1 ส่วนที่เย็น นำตะกอนมาละลายด้วยน้ำกลั่นจากนั้นเติมโซเดียมคลอไรด์จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.9 เปอร์เซนต์ของปริมาตร

สารละลาย นำสารละลายดังกล่าวมาปั่นแยกส่วนที่ไม่ละลายน้ำออกไป แล้วจึงนำส่วนน้ำใสที่ได้มาตกตะกอนด้วยเอทานอลเข้มข้น 95 เปอร์เซนต์ ในอัตราส่วน 1:2 แล้วทำซ้ำขั้นตอนดังข้างบนอีก 5 ครั้ง จนกระทั่งครั้งสุดท้ายจึงหยุดที่ขั้นละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น

18.1.5 วิธีของ Kjems และ Lebech (1976)

ต้มอาหารเลี้ยงเชื้อให้เดือดที่ 100° ซ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 2 ตกตะกอนส่วนน้ำใสด้วยเอทานอลสัมบูรณ์ ในอัตราส่วน 1:2 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำมาปั่นแยกตะกอนที่ 2,100 g เป็นเวลา 30 นาที นำตะกอนมาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.15 โมลาร์ ที่ละลายในอะซิเตทบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ค่าความเป็นกรดด่าง 6.0 ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 80-100°ซ หลังจากนั้นตกตะกอนสารละลายด้วยสารละลายซีทิวไพริดิเนียมคลอไรด์เข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ ในอัตราส่วน 1:2 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำมาปั่นแยกตะกอนที่ 2,100 g เป็นเวลา 30 นาที แล้วละลายตะกอนในสารละลายที่ประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์และเอทานอลเข้มข้น 4 เปอร์เซนต์ ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 100°ซ จากนั้นปั่นแยกส่วนที่ไม่ละลายน้ำออกไป นำส่วนน้ำใสมาตกตะกอนอีกครั้งด้วยเอทานอลสัมบูรณ์ในอัตราส่วน 1:2 ทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นเติมอีเทอร์ลงไปแทนเอทานอล ทิ้งไว้อย่างน้อย 2 ชั่วโมง แล้วปั่นแยกตะกอนที่ 2,100 g เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำตะกอนดังกล่าววางลงบนจานเลี้ยงเชื้อ เปิดฝาทิ้งไว้ข้ามคืน

18.2. วิธีวัดความบริสุทธิ์ของกรดไฮยาลูโรนิคที่ได้หลังจากการเก็บเกี่ยว

นำกรดไฮยาลูโรนิคที่เตรียมจากข้อ 18.1.1-18.1.5 มาอบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียส ชั่งหาน้ำหนักแห้ง(Dry weight) จากนั้นนำของแข็งทั้งห้าวิธีมาชั่งให้มีน้ำหนักที่เท่ากันที่ 0.057 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของกรดไฮยาลูโรนิคตามวิธีดังกล่าวข้างต้น แล้วคำนวณหาเปอร์เซนต์ความบริสุทธิ์ดังสมการ

$$\%\text{ความบริสุทธิ์} = \frac{\text{ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคที่วัดได้(กรัม)}\times 100}{\text{น้ำหนักกรดไฮยาลูโรนิคที่เตรียม(กรัม)}}$$