รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

จุรารัก ศรีวงษ์. 2540. การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดไฮยาโรนิคโดย *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

สุวรรณา นพพรพันธุ์. 2538. การปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

Adelberg, E. A., Mandel, M., and Chen, G.C.C. 1965. Optimal conditions for mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in *Escherichia coli* K12. Biochem.Biophys. Res.Commun. 18 : 788-795.

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

Annous, B.A., and Blaschek, H.P. 1991. Isolation and Characterization of *Clostridium acetobutylicum* Mutants with Enhanced Amylolytic Activity. Appl. Environ. Microbiol. 57(9) : 2544-2548.

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

Armstrong, D.C., and John, M.R. 1997. Culture Conditions Affect the Molecular Weight Properties of Hyaluronic Acid Produced by *Streptococcus zooepidemicus*. Appl.Environ.Microb. 63 : 2759-2764.

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

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.

Baltz, R.H. 1986. Strain Improvement. In A.L.Demain and N.A. Solomon. (eds.) Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Washington, D.C. American Society for Microbiology. pp. 154-169.

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

Billek, G., and Schenefeld, H., 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., 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. 1995. Microbial Physiology and Metabolism. USA : Wm. C. Brown Communications.

Carlton, B.C., and Brown, B.J. 1981. Gene Mutation. In E.W. Nester (ed.) , Manual of Methods for General Bacteriology. pp. 221-227. Washington, D.C. : American Society for Microbiology.

Cifonelli, J.A., 1970. The Isolation and Characlerization of Hyaluronic Acid from *Pasteurella multocida*. Carbohydr. Research. 14 : 272-276.

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

Cifonelli, J.A., and Mayeda, M. 1957. The Purification of Hyaluronic Acid by the Use of Charcoal. Biochim. Biophys. Acta. 24 : 397-400.

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

Clowes, R.C., and Hayes, W. 1968. Mutation. Experiments in Microbial Genetics , pp. 13-21. Oxford and Edinburgh : Blackwell Scientific.

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

Crater, D.L., Dougherty, B.A. ,and Rijn, I. 1995. Molecular Characterization of *hasC* from an Operon Required for Hyaluronic Acid Synthesis in Group A Streptococci. J.Biol.Chem. 270(480) : 28676-28680.

Cruickshank, R., Dugvid, J.P.,Marimion, B. P., and Swain, R.H.A. 1973. Medical Microbiology. 12th ed. London : Churchill Livingstone.

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. 1993a. Isolation of a *Streptococcus pyogenes* Gene Locus that Directs Hyaluronan Biosynthesis in Acapsular Mutants and in Heterologous Bacteria. J.Biol. Chem. 268(20) : 14568-14571.

DeAngelis, P.L., Papaconstantinou, J., and Weigel, P.H. 1993b. Molecular Cloning, Identification,and Sequence of the Hyaluronan Synthase Gene from Group A *Streptococus pyogenes.* J. Biol. Chem. 268(26) : 19181-19184.

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

DeAngelis, P. L., Weigel, P. H. 1995. Characterization of the Recombinant Hyaluronic Acid Synthase from *Streptococus pyogenes.* Dev. Biol. Stand. 85 : 225-229

Deibel,R.H.,and Seeley, H.W. 1974. In R.E. Buchanan and N.E. Gibbons (eds.) , Bergey's manual of Determinative Bacteriology. 8 th ed. Baltimore : The William & Wilkins.

Dougherty, B.A., Rijn, I. 1993. Molecular Characterzation of *hasB* from an Operon Required for Hyaluronic Acid Synthesis in Group A Streptococci. J. Biol. Chem. 268(10) : 7118-7124.

Dougherty, B.A., Rijn, I. 1994. Molecular Characterization of *hasA* from an Operon Required for Hyaluronic Acid Synthesis in Group A Streptococci. J. Biol. Chem. 269 (1) : 169-175.

Drew, S.W. 1981. Liquid culture. In R.N.Costilow (ed.) Manual of Methods for General Bacteriology, pp. 154-155. Washington, D.C. : American Society for Microbiology.

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.

Fantini, A.A. 1975. Strain Development. In H.H. John (ed.) , Methods in Enzymology , 43 vols. pp. 24-41. New York : Academic Press.

Filisetti-Cozzi, T.M.C.C., and Carpita, N.C. 1991. Measurement of Uronic Acid without Interfere from Neutral Sugars. Anal. Biochem.. 197 : 157-162.

Fishbein,L., Flamm, W.G., and Falk, H.L. 1970. Chemical Mutagens. Environmental Effects on Biological System , pp. 169-170. New York and London : Academic Press.

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.

Greiling, H. 1963. Hyaluronic Acid. In H.U. Bergmeyer (ed.) , Method of Enzymatic Analysis, pp. 87-92. 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 , R.G.E. Murray , R.N. Costilow , E.W. Nester , W.A. Wood, N.R. Krieg , G.B.Phillips (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.

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

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. 1984. Pyogenic Cocci. Review of Medical Microbiology , pp. 197-209. 16th ed. Maruzen Asian.

Johns, M.R., Goh, L.T., and Oeggerli, A. 1995. 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. 1992. Streptococcus. Zinsser Microbiology, pp. 555-571. 20th ed. Appleton-Century-Crofts.

Kalra, M.S., Kuila, R.K., and Ranganathan, B. 1973. Activation of Nisin Production by UV-Irradiation in a Nisin-Producing Strain of *Streptococcus lactis*. Experientia. 29(5) : 624-625.

Kendall, F.E., Heidelberger, M., and Dawson, M.H. 1937. A Serologically Inactive Polysaccharide Elaborated by Mucoid Strains of Group A Hemolytic Streptococcus. J. Biol.Chem. 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. Biochem. J. 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. 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.

Krause, R.M. 1963. Antigenic and Biochemical Composition of Hemolytic Streptococcal Cell Walls. Bacteriol. Rev. 27 : 369-380.

Kresse, H. 1997. Proteoglycan-Structure and Function. Glycoscience, pp.201-222. Chapman & Hall.

Kumaresan, K.R., Springhorn, S.S., and lacks, S.A. 1995. Lethal and Mutagenic Actions of N-Methyl-*N'*-Nitro-*N*-Nitrosoguanidine Potentiated by Oxidized Glutathione, a Seemingly Harmless Substance in the Cellular Environment. J. Bacteriol. 177(13) : 3641-3646.

Laurent, T.C. , 1955. Studies on Hyaluronic Acid in the Vitreous Body. J.Biol.Chem. 216 : 263-271.

Laurent, T.C. , 1966. Physicochemical Characteristics of the Acid Glycosaminoglycans. Federation Proc. 25(3) : 1037-1038.

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

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

Lee, S.H., and Rho ,Y.T. 1999. Improvement of Tylosin Fermentation by Mutation and Medium Optimization. Lett. in Appl. Microbiol. 28(2) : 142-144.

Longas, M.O., and Meyer, K. 1981. Sequential Hydrolysis of Hyaluronate by β-glucuronidase and β-N-acetylhexosaminidase. Biochem. J. 197 : 275-282.

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

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

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

Martens, T.R., and Hammersmith, R.L. 1998. Genetics Laboratory Investigations, pp. 207-212. 11th ed. New Jersey : Prentice-Hall.

McCarty, M. 1980. Streptococci. In B.D. Davis ; R. Dulbecco; H.N. Eisen; and H.S. Ginsberg (eds.), Microbiology Including Immunology and Molecular Genetic , pp. 607-692. 3rd ed. New York : Harper & Row.

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 Pigman, W. 1963. The Preparation of Hyaluronic Acid from Bovine Synovial Fluid. Biochim. Biophys. Acta. 69 : 574-576.

Mendell, J.D., and Greenberg, J. 1960. A New Chemical Mutagen for Bacteria, 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine. Biochem.Biophys.Res.Commun. 3(6) : 575-577.

Miller, J.H. 1972. Experiments in Molecular Genetics , pp. 113-143. USA. : Cold Spring Harbour Lab.

Miller, J.H. 1992. Mutagenesis. A Short Course in Bacterial Genetics : A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria , pp. 143-156. USA. :Cold Spring Harbour Lab.

Mitra, S. 1994. Genetics a Blue Print of life , pp. 233-286. New Delhi : Tata McGraw-Hill.

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

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

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.

O'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.

Orten, J. M., and Neuhaus. O.W. 1982. Biochemistry. 10th ed. USA. : The C.V. Mosby.

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.

Philipson,L.H. , Westley, J. , and Schwartz, N.B. 1985. Effect of Hyaluronidase Treatment of Intact Cells on Hyaluronate Synthetase Activity. Biochem. 24 : 7899-7906.

Pierce, W.A., Jr., and White, A.G.C. 1954. Hyaluronic Acid Formation by *Streptococcus pyogenes*. Biochim. Biophys. Acta. 87 : 50-54.

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

Ray, R.R., and Nanda, G. 1996. Isolation and Application of a Hyper β - amylolytic Mutant of *Bacillus megaterium*. Acta Microbiol. Pol. 45(3-4) : 241-248.

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

Rijn, I., rater, D., and Dougherty, B. 1995. Molecular Analysis of the Group A Streptococcal Hyaluronic Acid Capsule Operon. Dev. Biol. Stand. 85 : 219-223.

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.

Robert, M., and Pike, M.D. 1982. 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 V. Ginsgerg (ed.), Complex Carbohydrate Part B. Methods of Enzymology , 38 vols. pp.73-141. New York : Academic Press.

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

Roseman, S., Moses, F.E., Ludowieg, J. and Dorfman, A., 1952. The Biosynthesis of Hyaluronic Acid by group A Streptococcus. Federation Proc. 11 : 213-225 .

Rowland, R.T. 1984. Industrial Strain Improvement : Mutagenesis and Random Screening Procedures. Enz. Microb.Tech. 6(1) : 3-10.

Russel, P. J. 1996. Genetics. 4th ed. New York : Harper Collins College.

Schmut, O., and Hofmann, H. 1981. A Method for the Purification of Bovine Vistreous Body Hyaluronic Acid. Biochim.Biophy.Acta. 673 : 192-196.

Scott, R.M. 1980. Introduction to Organic and Biological Chemistry. San Francisco : Harper & Rows.

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

Setlow, J.K., and Setlow, R.B. 1963. Nature of the Photoreactivable Ultra-violet Lesion in Deoxyribonucleic Acid. Nature. 197(4867) : 560-562.

Shah, D.N., Shah, V.D., Nehete, P.N.,and Kothari, R.M. 1986. Isolation of *Bacillus licheniformis* Mutants for Stable Production Profiles of Alkaline Protease. Biotech.Lett. 8(2) : 103-106.

Smith, E.L. , Hill,R .L ., Lehman, I.R. , Lefkowitz, R. J. , Handeler, P. , and White,A. 1983. Principles of Biochemistry:Mamamlian Biochemistry. 7 th ed. New York : McGraw-Hill.

Snustad, D. P. , Simmons, M.J. and Jerkins, J. B. 1997. Principles of Genetics, pp. 311-348. New York : John Wiley & Sons.

Sprott, G.D. , Koval, S.F. , and Schnaitman, C.A. 1994. Cell Fractionation. In P. Gerhardt. , R.G.E. Murray, W.A. Wood, N.R. Krieg. Methods for General and Molecular Biotechnology , pp. 72-103. Washington, D.C. : American Society for Microbiology.

Sting, P., Schaufub, P., and Blobel, 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.

Sutherland, I.W. 1990. Biotechnology of microbial exopolysaccharide. Cambridge University Press.

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.

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.

Voet, D. , and Voet , J.G. 1995. Biochemistry , pp. 264-265. 2nd ed. New York : John Wiley and Sons.

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

Weissmann, B., and Meyer, K. 1953. The Structure of Hyalobiuronic Acid and of Hyaluronic Acid from Umbilical Cord. J.Am.Chem.Soc. 76 : 1753-1757.

Wessels, M.R., Goldberg, J.B., Mobes, A.E., and DiCesare, M.J. 1994. Effects on Virulence of Mutations in a Locus Essential for Hyaluronic Acid Capsule Expression in Group A Streptococci. Infection and Immunity. 62(2) : 433-441.

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.

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

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ

1. สูตรอาหารสำหรับการเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น

1.1 อาหารเหลว Brain Heart Infusion : BHI (Difco)

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Calf Brains, Infusion from	200	กรัม
Beef Heart, Infusion from	250	กรัม
Bacto Proteose Peptone	10	กรัม
Bacto Dextrose	2	กรัม
Sodium Chloride (NaCl)	5	กรัม
Disodium Phosphate (Na_2HPO_4)	2.5	กรัม

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

1.2 อาหารเหลว Tryptic Soy Broth : TSB (Difco)

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Bacto Tryptone (Pancreatic Digest of Casein)	17	กรัม
Bacto Soy tone (Papaic Digest of Soybean Meal)	3	กรัม
Bacto Dextrose	2.5	กรัม
Sodium Chloride (NaCl)	5	กรัม
Dipotassium Phosphate (K_2HPO_4)	2.5	กรัม

ชั่ง Tryptic Soy Broth 30 กรัม ละลายในน้ำกลั่น (Distilled water) 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ภาวะมาตรฐาน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. สูตรอาหารสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคตามวิธีของ Nimrod และคณะ (1986) ซึ่งปรับปรุงโดย จุรารัก ศรีวงษ์ (2540)

Ammonium sulfate ($(NH_4)_2SO_4$)	0.65	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	10.0	กรัมต่อลิตร
Sodium Chloride (NaCl)	2.0	กรัมต่อลิตร
Magnesium Sulphate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	1.0	กรัมต่อลิตร
Dipotassium Phosphate (K_2HPO_4)	2.5	กรัมต่อลิตร
Sucrose	5.0	กรัมต่อลิตร

ปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 6.8 นึ่งฆ่าเชื้อที่ภาวะมาตรฐาน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. สูตรอาหารสำหรับการคัดเลือกเชื้อ Tryptic Soy Agar : TSA (Difco)

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Bacto Tryptone (Pancreatic Digest of Casein)	17	กรัม
Bacto Soy tone (Papaic Digest of Soybean Meal)	3	กรัม
Bacto Dextrose	2.5	กรัม
Sodium Chloride (NaCl)	5	กรัม
Dipotassium Phosphate (K_2HPO_4)	2.5	กรัม

ชั่ง Tryptic Soy Broth 30 กรัม และวุ้น(agar) 18 กรัม ละลายในน้ำกลั่น (Distilled water) 1 ลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ภาวะมาตรฐาน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

หากต้องการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อผสมเลือด สำหรับการศึกษาการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ให้ปรับอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนเทลงจานเพาะเลี้ยงเท่ากับ 45-50 องศาเซลเซียส เติมเลือดปริมาตร 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ผสมให้เลือดเข้ากันเป็นเนื้อเดียวกับอาหาร เทลงสู่จานเพาะเลี้ยง

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายทริส-มาลิอิก บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.0

ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1 ลิตร ประกอบด้วย

ทริส (ไฮดรอกซีเมทิล) – อะมิโนมีเทน ($C_4H_{11}NO_3$)	12.1	กรัม
กรดมาลิอิก	11.6	กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 6.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

2. สารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.0

ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1 ลิตร ประกอบด้วย

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	5.4	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	10.5	กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

3. การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์กรดไขยาลูโรนิคโดยวิธีคาร์บาโซล

3.1 สารละลายโซเดียมเททระบอเรทในกรดซัลฟูริกเข้มข้น ความเข้มข้น 0.025 โมลาร์

ชั่งสารละลายโซเดียมเททระบอเรท ($Na_2B_4O_7.10H_2O$) 4.86 กรัม ละลายในน้ำร้อน 10 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายเย็น ปรับปริมาตรด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้นจนได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

3.2 สารละลายคาร์บาโซล (Carbazole solution) 0.125 % (w/v)

ชั่งสารคาร์บาโซล 125 มิลลิลิตร ละลายใน 95 % เอธานอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดสีชา และเก็บในตู้เย็น (อายุการใช้งาน 3 เดือน)

4. รีเอเจนต์สำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นของโซเดียมไฮยาลูโรเนต โดยวิธีของ Greiling (1963)

4.1 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

4.2 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride solution) (0.15 M)

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

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

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

4.4 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

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

ละลายโพแทสเซียมไฮยาลูโรเนต (Potassium hyaluronate) 20 มิลลิกรัมในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer solution) 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0 ถึง 4 องศาเซลเซียส

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

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

หมายเหตุ แอคติวิตีของเอนไซม์จะสูญเสียภายใน 3 เดือนหลังจากการเตรียม

4.7 สารละลายพารา-ไดเมทิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ (p-dimetylaminobenzaldehyde solution)

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

หมายเหตุ ก่อนใช้เจือจาง 10 เท่าด้วยกรดน้ำส้ม(CH_3COOH) และเตรียมใหม่ ทุกๆ สัปดาห์

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

สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (Dinitrosalicylic acid solution)

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

6. <u>รีเอเจนต์สำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) โดยวิธีของ Hanson and Phillips, 1981</u>

6.1 <u>สารละลายฟีนอล (5% phenol solution)</u>

ฟีนอล (C_6H_5OH)	5.0	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	100.0	กรัม

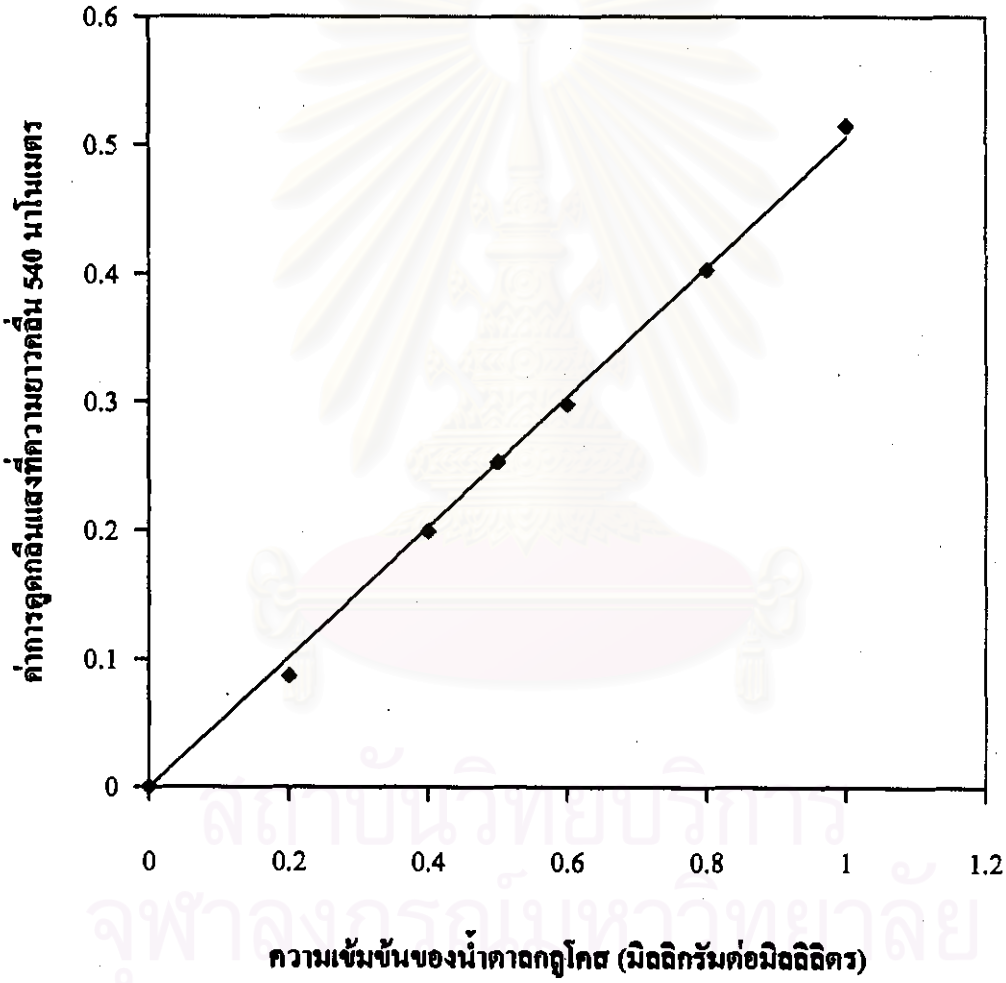
6.2 <u>กรดซัลฟูริกเข้มข้น (Concentrated H_2SO_4)</u>

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

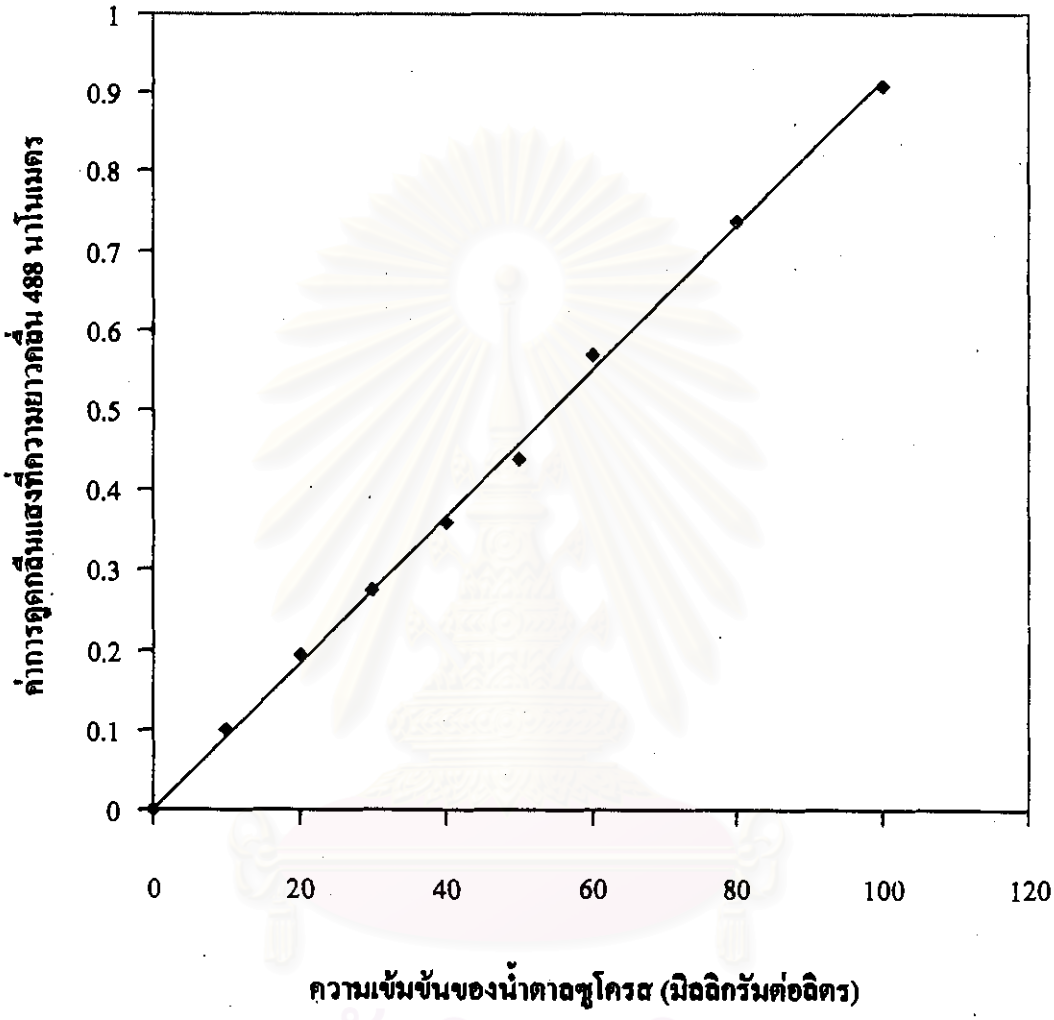
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานน้ำตาลรีดิวส์ โดยใช้กรดซาลิไซลิก



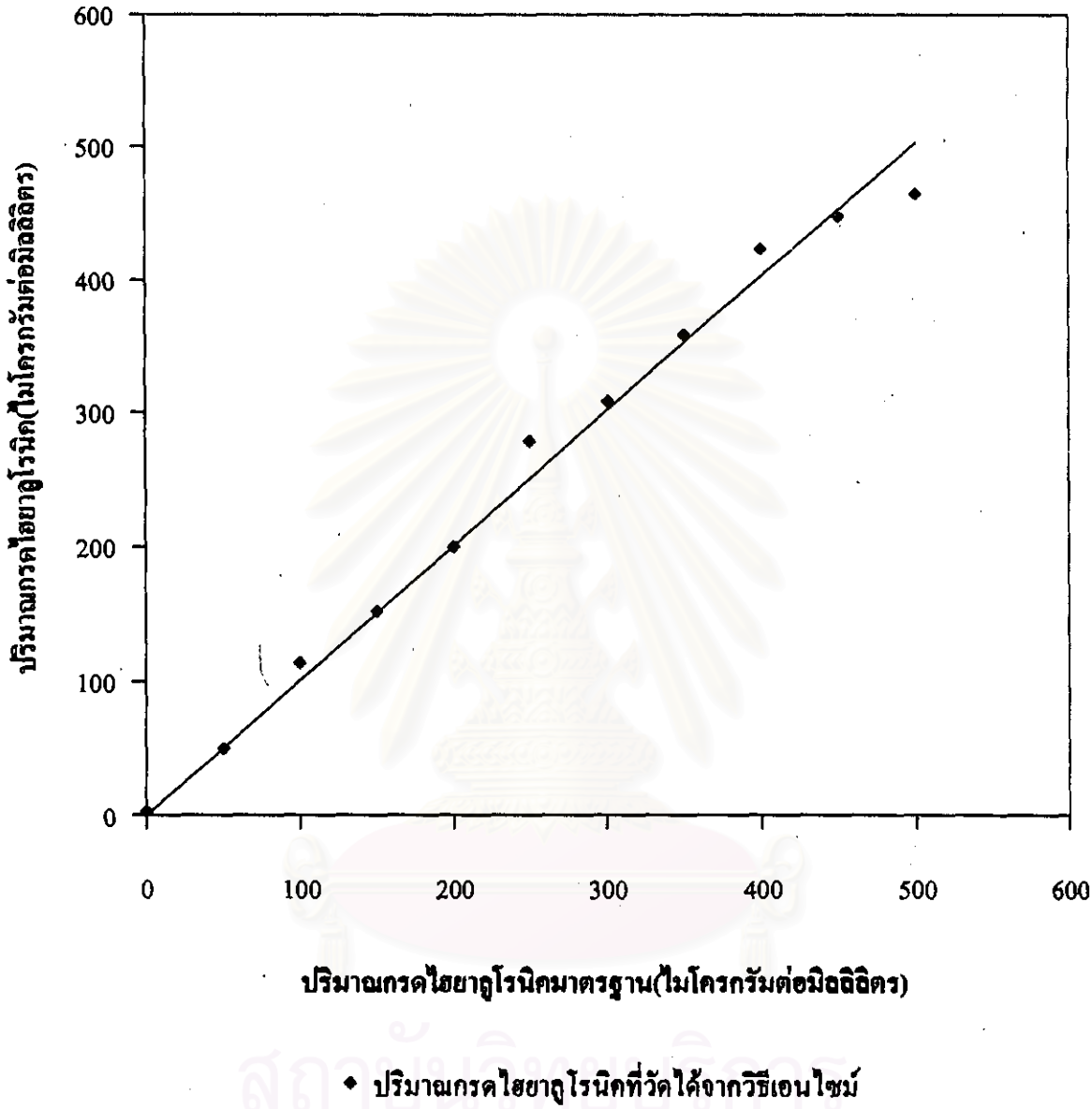
รูปที่ 37 กราฟมาตราฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร กับ น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. กราฟมาตราฐานน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้วิธีฟีนอล-ซัลฟูริก



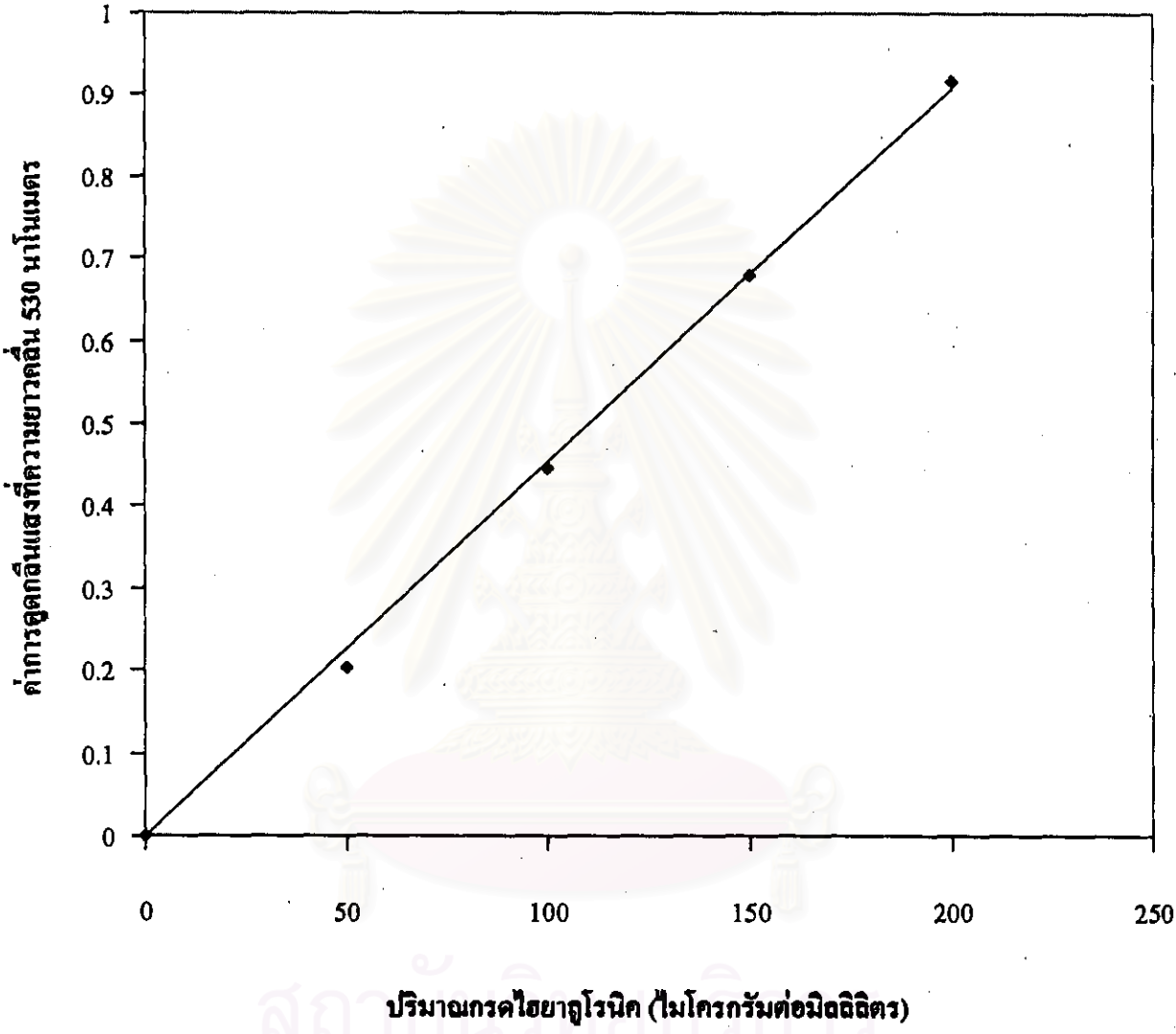
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 38 กราฟมาตรฐานแสดงค่าระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 488 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 0-100 มิลลิกรัมต่อลิตร

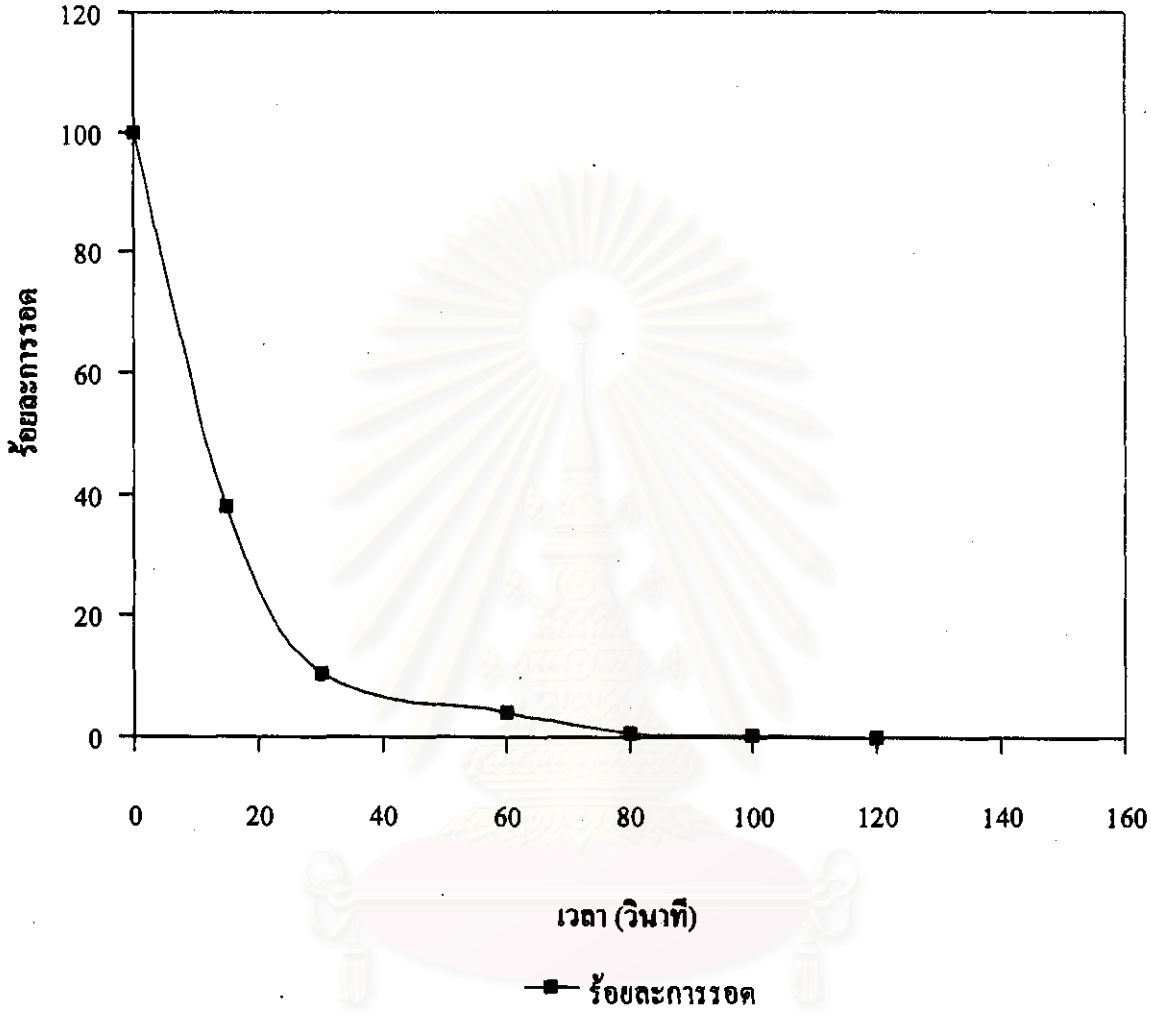


รูปที่ 39 กราฟมาตรฐานของกรดไฮยาลูโรนิค โดยแสดงค่าระหว่างปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคที่ได้จากการคำนวณเปรียบเทียบกับปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

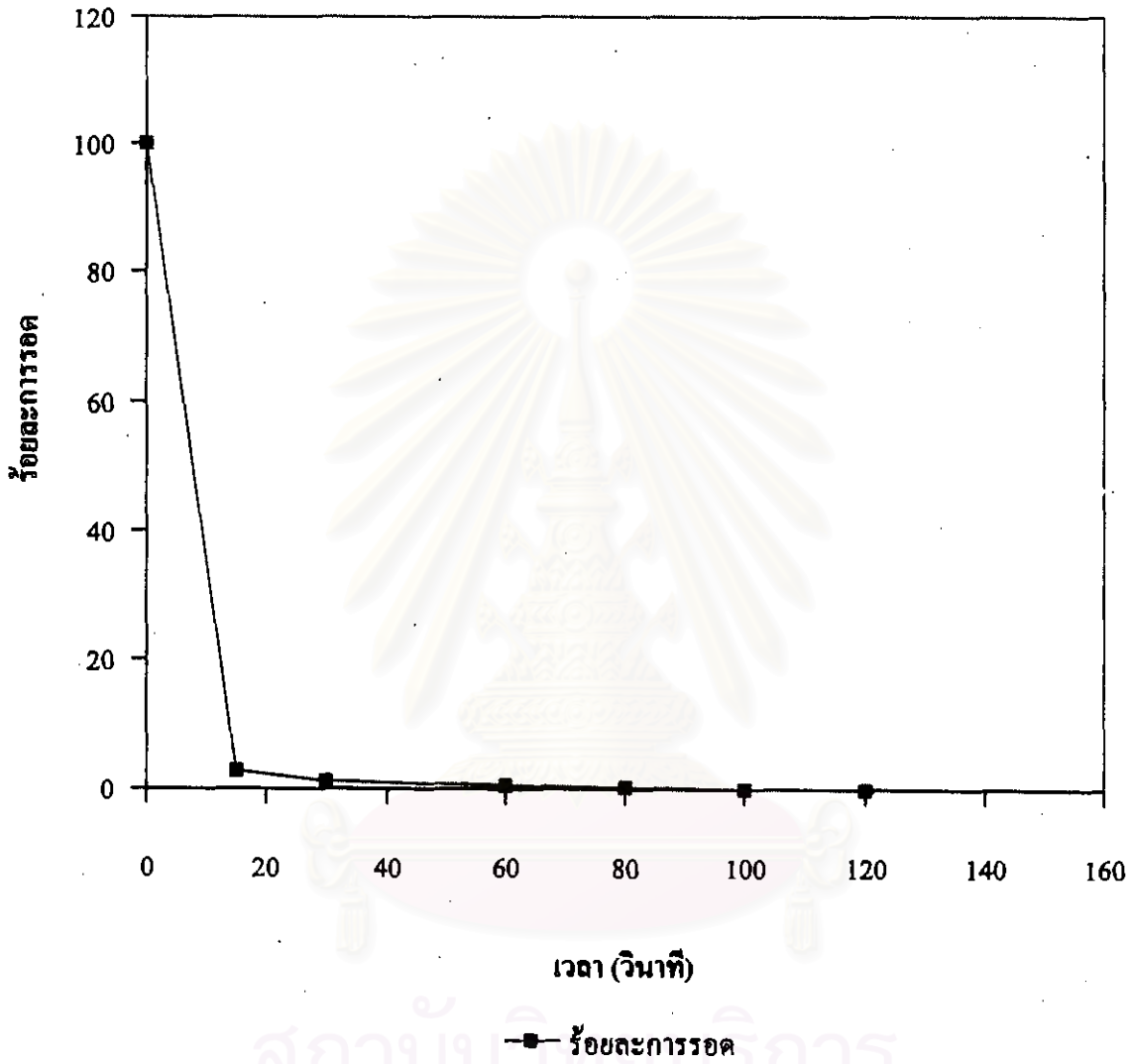


รูปที่ 40 กราฟมาตรฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของกรดไฮยาลูโรนิคบริสุทธิ์ความเข้มข้น 0 –200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



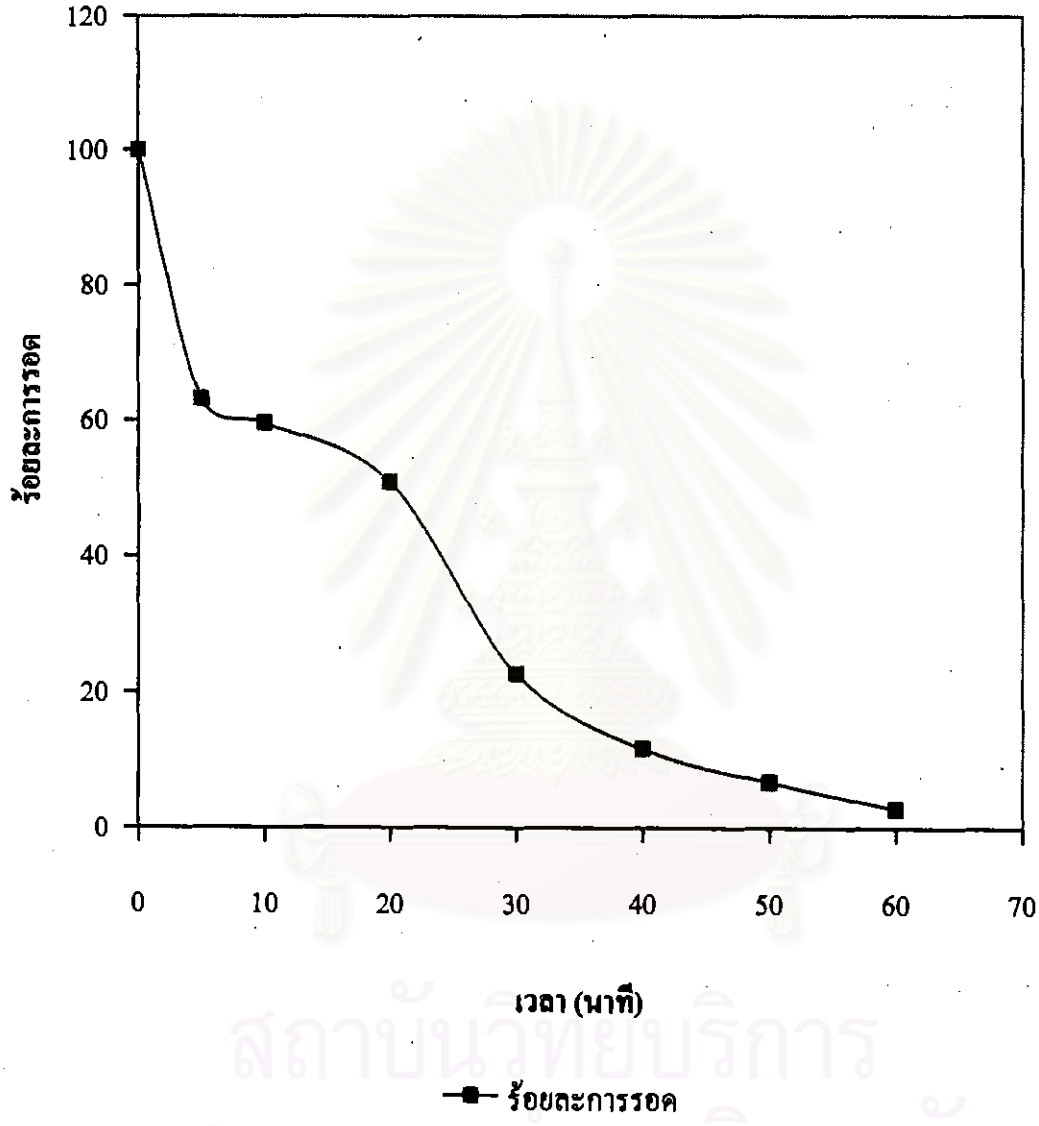
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 41 ร้อยละการรอดของ *S. zooepidemicus* AU 21ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ที่เวลาต่างๆ



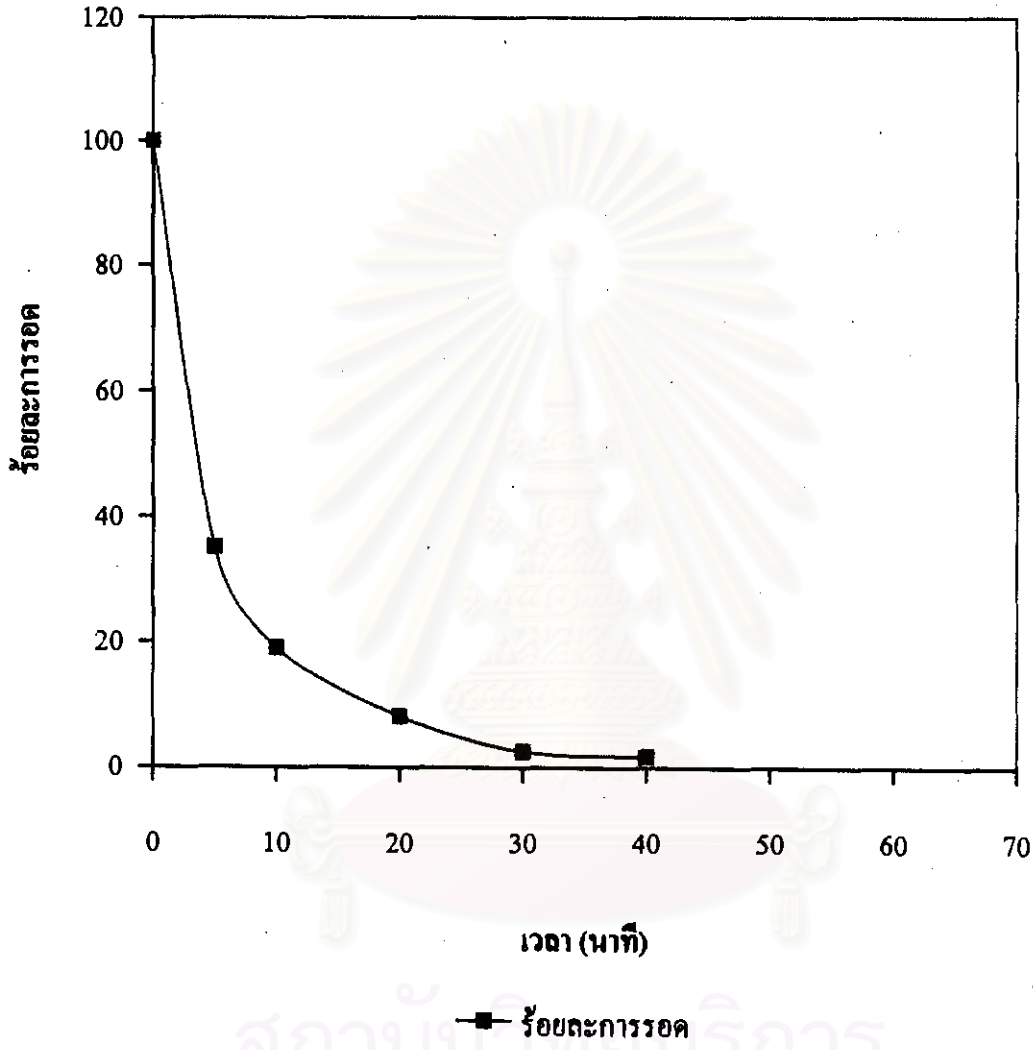
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 42 ร้อยละการรอดของ *S. zooepidemicus* BU42 ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ที่เวลาต่างๆ



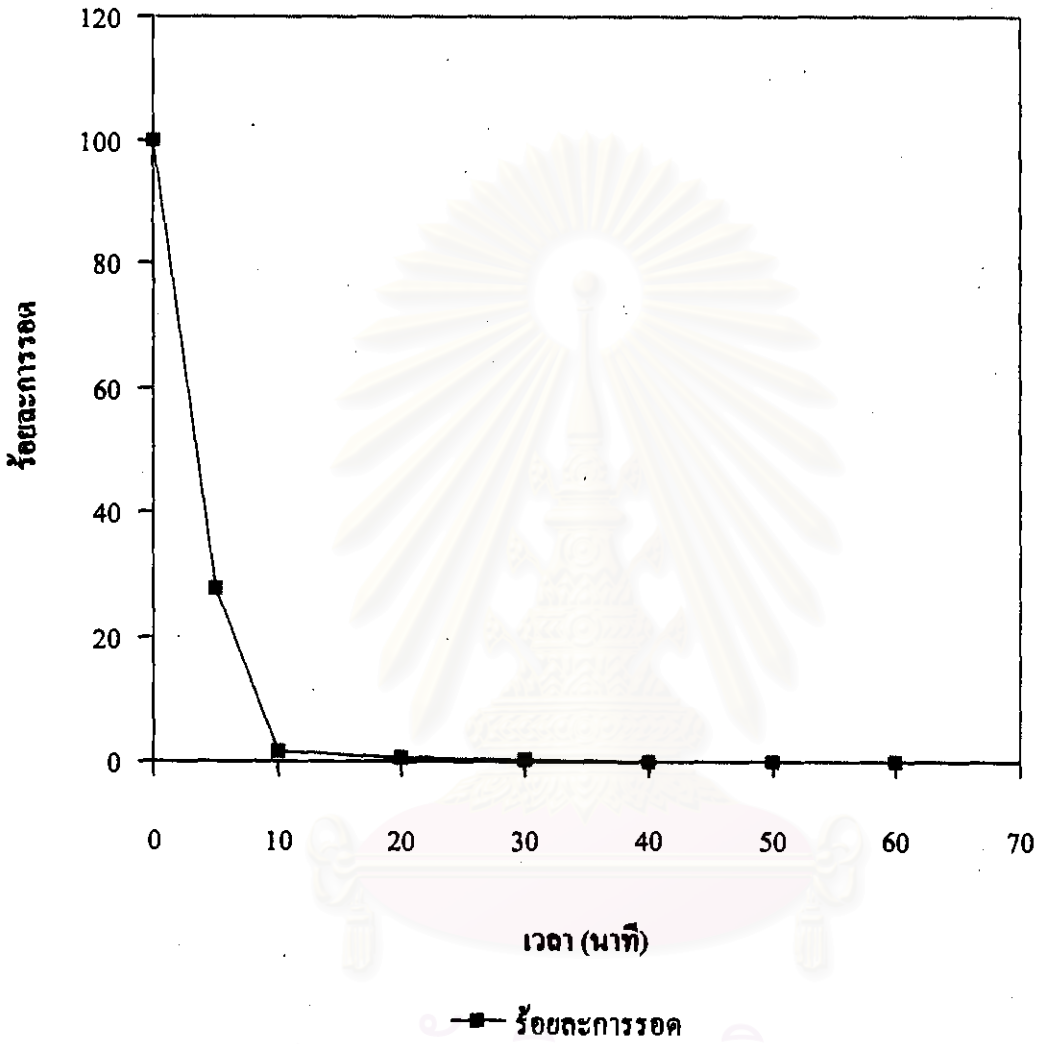
รูปที่ 43 ร้อยละการรอดของ *S. zooepidemicus* CUN 20 ที่กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลาต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



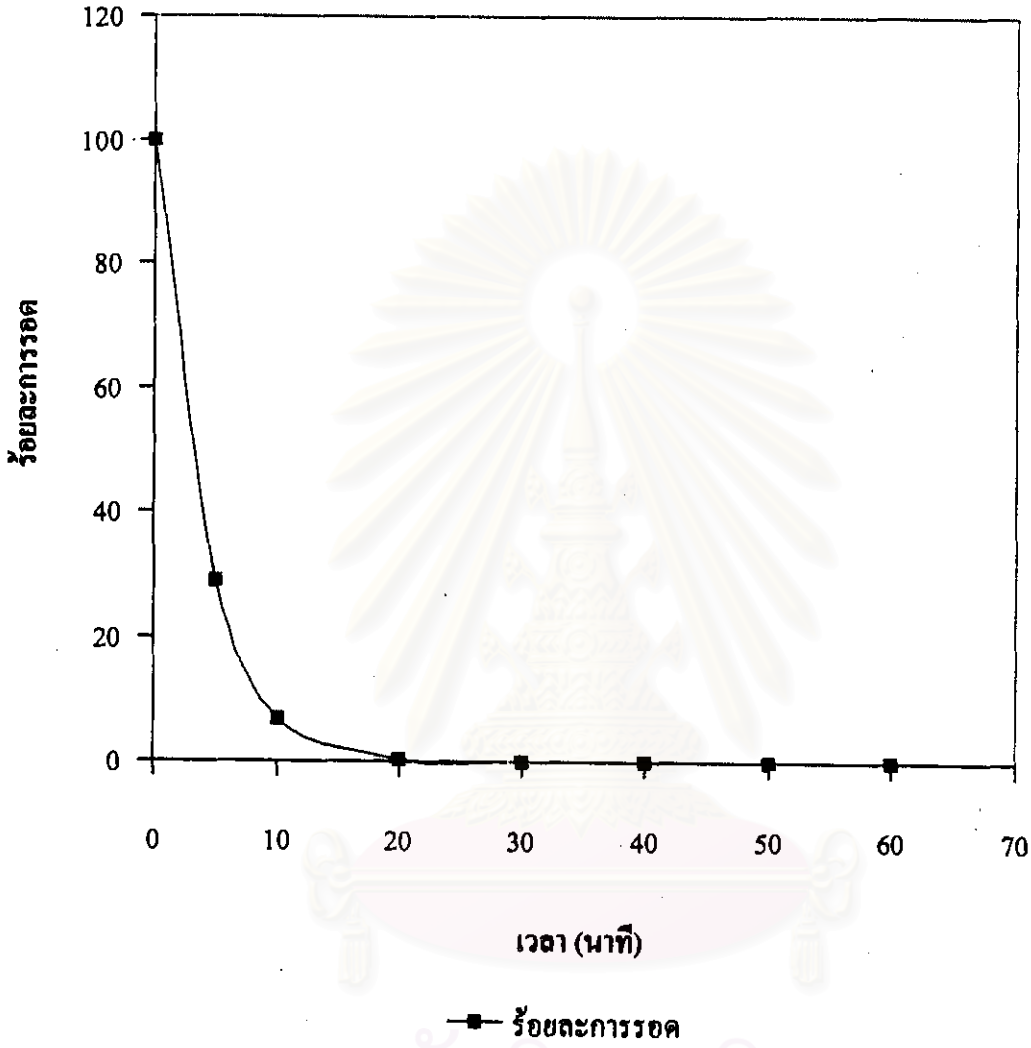
รูปที่ 44 ร้อยละการรอดของ *S. zooepidemicus* CUN 2-1 ที่กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลาต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 45 ร้อยละการรอดของ *Streptococcus zooepidemicus* CUN 3-5 ที่กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลาต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 46 **ร้อยละการรอดของ** *Streptococcus zooepidemicus* CUN4-7 **ที่กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี** NTG **ความเข้มข้น** 50 **ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลาต่างๆ**

ภาคผนวก ง

การเตรียมการและการป้องกันอันตรายจากการกลายพันธุ์

แสงอัลตราไวโอเลต

เป็นรังสีที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในจุลินทรีย์ อาจทำให้เกิดมะเร็งผิวหนังได้ การปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องกับแสงอัลตราไวโอเลต ควรมีการสวมแว่นป้องกัน ห้ามมองหลอด UV โดยตรง เพราะเป็นแสงที่เป็นอันตรายต่อตา ควรมีการสวมแว่นป้องกันหรือใช้แสงอัลตราไวโอเลตที่อยู่ภายในตู้เขี่ยเชื้อที่มีการจกกั้น ควรสวมถุงมือเมื่อต้องทำงานภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เนื่องจากแสงอัลตราไวโอเลตนี้ผ่านกระจกได้ไม่ดี เชื้อที่ต้องการฉายแสงเพื่อกลายพันธุ์จึงต้องเปิดฝาจานเพาะเลี้ยงเชื้อไว้

สารเคมี NTG (N-methyl-N' – nitro –N – nitrosoguanidine)

สาร NTG เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต และอาจเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) ด้วย ดังนั้นในการทดลองจึงต้องทำด้วยความระมัดระวัง สาร NTG เป็นสารที่อันรายต่อการสัมผัส การสูดดม การทดลองเกี่ยวกับสาร NTG ทั้งในลักษณะผลึกของแข็ง หรือสารละลาย ควรสวมถุงมือยางตลอดเวลา ควรสวมผ้าปิดปากเพื่อป้องกันละอองหรือไอระเหย ห้ามใช้ปากในการดูดปิเปตสารชนิดนี้เด็ดขาด การชั่งสาร NTG ควรทำในที่ไม่มีลมพัด ไม่ควรชั่งบนกระดาษชั่งสารเพราะอาจปลิวไปทำให้เกิดอันตรายต่อผู้ทำการทดลองและผู้ที่อยู่ในบริเวณใกล้เคียง อย่าเปิดขวดที่ใส่ NTG ทิ้งไว้ ควรใช้หลอดปลอดเชื้อที่แห้งสนิทและมีฝาปิด ชั่งน้ำหนักหลอดเปล่าก่อน แล้วจึงใช้ช้อนตักสาร NTG เติมลงในหลอด ปิดฝาแล้วชั่งน้ำหนักอีกครั้ง คำนวณน้ำหนักของสารและนำไปเตรียมเป็น stock ซึ่งควรเตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อต้องการใช้

อุปกรณ์ที่สัมผัสกับสาร NTG นำไปแช่ใน 1 N NaOH ในตู้ดูดควัน เปิดเครื่องให้ดูดควันออกทิ้งไว้ประมาณ 24 ชั่วโมง จึงนำมาล้าง และควรสวมถุงมือยางในการล้างด้วย

ประวัติผู้เขียน

นางสาว นิภาพร ศิริเพ็ญ เกิดวันที่ 21 สิงหาคม พ.ศ. 2518 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2538 และเข้ารับการศึกษาต่อในชั้นปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2539 ที่อยู่ปัจจุบัน 71/1 หมู่ที่ 8 ซ. ลาดพร้าว 71 แขวงลาดพร้าว เขต ลาดพร้าว กรุงเทพมหานคร 10310

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย