การปรับปรุงสายพันธุ์ *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 เพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค

นางสาว นิภาพร ศิริเพ็ญ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-333-059-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I18574263

STRAIN IMPROVEMENT OF *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 FOR HYALURONIC ACID PRODUCTION

Miss Nipaporn Siriphen

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology
Department of Microbiology
Graduate School
Chulalongkorn University
Acedemic Year 1999

ISBN 974-333-059-3

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การปรับปรุงสายพันธุ์ *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 เพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค
โดย	นางสาว นิภาพร ศิริเพ็ญ
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา กีระนันทน์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล)

.....ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

นิภาพร ศิริเพ็ญ : การปรับปรุงสายพันธุ์ *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 เพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก (STRAIN IMPROVEMENT OF *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 FOR HYALURONIC ACID PRODUCTION) อ. ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. สุเทพ ธนียวัน ; 131 หน้า. ISBN 974-333-059-3

Streptococcus zooepidemicus ATCC 35246 เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นที่ได้จาก American Type Culture Collection สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้ 180.23 มิลลิกรัมต่อลิตรภายใต้ภาวะที่ทดสอบ เมื่อกลายพันธุ์สายพันธุ์นี้โดยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตนาน 80-120 วินาที จำนวน 3 รอบ สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ CU47 ซึ่งผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้ 370.13 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อกลายพันธุ์ต่อด้วย NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 5-40 นาที 37 องศาเซลเซียสจะได้สายพันธุ์กลายที่ผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้สูงจำนวนหนึ่ง หลังการคัดเลือกและกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG อีก 4 รอบ ได้สายพันธุ์ CUN 5-10 ซึ่งผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้ 585.85 มิลลิกรัมต่อลิตร

เมื่อทำการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดยสายพันธุ์ CUN5-10 พบว่า การเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของของอาหารเลี้ยงเชื้อ 7.5 ปริมาณซูโครสเริ่มต้นที่ 10 กรัมต่อลิตร อัตราเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที จุลินทรีย์ผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้ 829.11 มิลลิกรัมต่อลิตร และการเติมไลโซไซม์ที่ 40,000 ยูนิต ลงในเซลล์เพาะเลี้ยงสามารถเพิ่มปริมาณการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้สูงเพิ่มเป็น 2.50 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การเติมทวีน 80 ที่ความเข้มข้น 0-2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ไม่มีผลต่อการเพิ่มการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกแต่อย่างใด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต นิภาพร ศิริเพ็ญ
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ปีการศึกษา 2542	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม -

3970835923 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
KEY WORD: HYALURONIC ACID / UV-LIGHT / NITROSOGUANIDINE / *Streptococcus zooepidemicus*

NIPAPORN SIRIPHEN : STRAIN IMPROVEMENT OF *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 FOR HYALURONIC ACID PRODUCTION.
THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SUTHEP THANIYAVARN , Ph.D. , 131 pp.
ISBN 974-333-059-3

Streptococcus zooepidemicus ATCC 35246, an organism acquired from American Type Culture Collection was capable of producing hyaluronic acid at 180.23 mg/ml. Upon exposing to UV-light for 80-120 seconds for 3 rounds, a mutant designated CU 47 capable of producing hyaluronic acid at 370.13 mg/l was obtained. Further mutation via NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) at 50 μg/ml, 5-40 minutes, 37 °C yielded a number of mutants producing hyaluronic acid in higher yield. Subsequent isolation and mutation via NTG for 4 additional rounds, a mutant namely CUN5-10 was obtained with ability of producing hyaluronic acid at 585.85 mg/l

Optimal conditions for hyaluronic acid production by CUN5-10 were : cultivation at room temperature (28-32 °C) , initial pH of 7.5 , initial concentration of sucrose at 10 g/l with agitation rate of 200 rpm. Under such conditions CUN 5-10 could produce hyaluronic acid at 829.11 mg/l. The addition of lysozyme at 40,000 units to the culture medium could raise hyaluronic acid yield up to 2.50 g/l while the addition of tween-80 at 0-2 %(v/v) did not show any significantly increase in hyaluronic acid production.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต นิภาพร ศิริเพ็ญ
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ปีการศึกษา 2542 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และอาจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ที่กรุณาเป็นคณะกรรมการในการสอบ และให้คำแนะนำต่างๆ รวมทั้งแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกๆท่าน ตลอดจนเพื่อนๆพี่ๆ และน้องๆ ทุกคนที่มีส่วนในการช่วยเหลือ และให้กำลังใจด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติที่ให้การสนับสนุนทุนสำหรับงานวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้องทุกคน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือสนับสนุน และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอดจนเสร็จสมบูรณ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ซ
สารบัญรูป.....ฌ
สัญลักษณ์และคำย่อ..... ฌ
บทที่
1.บทนำ.....1
2.อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย.....29
3.ผลการทดลอง.....40
4.สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....94
รายการอ้างอิง.....104
ภาคผนวก.....113
ประวัติผู้เขียน.....131

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชนิดและสมบัติบางประการของไกลโคสะมิโนไกลแคนชนิดต่างๆ.....	3
2	สมบัติทางเคมีและตำแหน่งของแอนติเจนของ Streptococcus ในกลุ่มต่างๆ.....	8
3	การเจริญ , กรดไฮยาลูโรนิคที่ปลดปล่อยออกในอาหารเลี้ยงเชื้อ , ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของเชื้อตั้งต้น *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ที่เจริญใน อาหารเหลว BHI , TSB	43
4	การเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคโดย *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อการผลิตในระดับขวดเขย่า.....	49
5	การหาปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการตกตะกอนด้วย 95 เปอร์เซนต์เอธานอลและวิเคราะห์โดยวิธีคาร์บาโซล.....	52
6	จำนวนโคโลนีที่เจริญ (โคโลนีที่รอด) และร้อยละการรอดของ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ภายหลังการฉายแสงอัลตราไวโอเลต ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ที่เวลาต่างๆ.....	54
7	เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในอาหารเหลวเพื่อการผลิตของสายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* ATCC 35246 กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 1 รอบ.....	56
8	การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 1 รอบ.....	57
9	เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในอาหารเหลวเพื่อการผลิตของสายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* AU21 กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 2 รอบ.....	58
10	การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 2 รอบ.....	59
11	เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในอาหารเหลวเพื่อการผลิตของ สายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* BU42 กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบ.....	60

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
12	การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบ	61
13	จำนวนโคโลนีที่เจริญ (โคโลนีที่รอด) และร้อยละการรอดของ *S. zooepidemicus* CU47 ภายหลังการกลายพันธุ์ด้วย NTG 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	62
14	จำนวนโคโลนีที่เจริญ (โคโลนีที่รอด) และร้อยละการรอดของ *S. zooepidemicus* CU47 ภายหลังการกลายพันธุ์ด้วย NTG ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลาต่างๆ	64
15	เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในอาหารเหลวเพื่อการผลิตของ สายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* CU42 กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบ และชักนำด้วย NTG 1 รอบ	66
16	การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์ต่างๆที่ได้หลังการชักนำโดย NTG	67
17	เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในอาหารเหลวเพื่อการผลิตของ สายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* CUN2-1 กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบและชักนำด้วย NTG 2 รอบ	68
18	การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์ต่างๆที่ได้หลังการชักนำโดย NTG 2 รอบ	68
19	เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในอาหารเหลวเพื่อการผลิตของ สายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* CUN3-5 กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบและชักนำด้วย NTG 3 รอบ	69
20	การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์ต่างๆที่ได้หลังการชักนำโดย NTG 3 รอบ	70
21	เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในอาหารเหลวเพื่อการผลิตของสายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* CUN4-7 กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบละชักนำด้วย NTG 4 รอบ	71

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
22	การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์ต่างๆที่ได้หลังการชักนำโดย NTG 4 รอบ	72
23	เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคในอาหารเหลวเพื่อการผลิตของสายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* CUN 5-10 กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบและชักนำด้วย NTG 5 รอบ	73
24	การทดสอบความเสถียรในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของสายพันธุ์ต่างๆที่ได้หลังการชักนำโดย NTG 5 รอบ	74
25	สมบัติบางประการของเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* ATCC 35246 และสายพันธุ์กลาย *S. zooepidemicus* CUN510	92
26	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคจากรายงานวิจัยอื่นๆที่ใช้เชื้อ *S. zooepidemicus* ในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค	94

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	โครงสร้างของกรดไฮยาลูโรนิค	2
2	โครงสร้างของไกลโคสะมิโนไกลแคนชนิดต่างๆ	4
3	แผนผังแสดงแคปซูล , ผนังเซลล์ , เมมเบรนของ group A hemolytic Streptococci	6
4	กลไกการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิค	13
5	กลไกการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิคโดยปฏิกิริยาเคมีที่อาศัยเอนไซม์เป็นตัวเร่ง	14
6	รูปแบบการกลายพันธุ์ที่เกิดจากการแทนที่คู่เบส	17
7	กลไกการเกิด thymine dimer จากการฉายแสงอัลตราไวโอเลต	20
8	ปรากฏการณ์ Photoreactivation ซ่อมแซมการเกิดไดเมอร์ที่เกิดจากการฉายแสงอัลตราไวโอเลต	20
9	การซ่อมแซมแบบ Excision หรือ dark repair ในจุลินทรีย์ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต	21
10	การกลายพันธุ์เนื่องจากเบสอะนาล็อค (Base analog) , 5BU และ 2AP	23
11	ตัวอย่าง การกลายพันธุ์เนื่องจาก HNO_2 ในกลุ่ม Base modifying agent	24
12	โครงสร้างของ Proflavin และ Acridine orange	25
13	การกลายพันธุ์อันเนื่องจากการแทรกตัวของ Intercalating agent	25
14	โครงสร้างเคมีของ NTG	26
15	การเติมหมู่อัลคิลที่ตำแหน่ง O^6 ของเบสกัวนีน และที่ตำแหน่ง O^4 ของเบสไธมีนโดย NTG	26
16	รูปแบบการเจริญของ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI และ TSB สำหรับเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และไม่มีการเขย่า	41

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
17	การเจริญ , การผลิตกรดไฮยาลูโรนิค , ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าความเป็นกรด-ด่างของเชื้อตั้งต้น *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ที่เจริญใน อาหารเหลวBHI.....	44
18	การเจริญ , การผลิตกรดไฮยาลูโรนิค , ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าความเป็นกรด-ด่างของเชื้อตั้งต้น *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ที่เจริญใน อาหารเหลว TSB.....	45
19	รูปแบบการเจริญและกรดผลิตกรดไฮยาลูโรนิคโดย *S. zooepidemicus* ATCC 35246 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต	47
20	การเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคโดย *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตในระดับขวดเขย่าและหลอดทดลองพร้อมเขย่า	50
21	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคที่วัดได้จากวิธีคาร์บาโซลโดยทำบริสุทธิ์อาหารเลี้ยงเชื้อที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนของกรดไฮยาลูโรนิคด้วยวิธีตกตะกอนด้วย 95% เอธานอล และ 1 % CPC.....	53
22	อัตราการรอดของ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ที่เวลาต่างๆ.....	55
23	ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการรอดของเชื้อ *S. zooepidemicus* CU47 หลังกับการบ่มร่วมกับ สาร NTG ที่ความเข้มข้น 50 – 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	63
24	ร้อยละการรอดของ *S. zooepidemicus* CU47 ที่กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลาต่างๆ.....	65
25	การเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของเชื้อสายพันธุ์กลาย *S. zooepidemicus* CUN5-10 , CUN5-32 , CUN5-19 , CUN5-15 และสายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* ATCC 35246 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อการผลิตในระดับขวดเขย่า	76
26ก	การเจริญและปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อการผลิตในระดับขวดเขย่า ของ *S. zooepidemicus* สายพันธุ์กลาย CUN5-10 โดยแปรผันแหล่งคาร์บอน.....	78

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
26ข	ค่าความเป็นกรดด่างและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของ *S. zooepidemicus* สายพันธุ์กลาย CUN5-10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อการผลิตในระดับขวดเขย่า โดยแปรผันแหล่งคาร์บอน	79
27ก	การเจริญและปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อการผลิตในระดับขวดเขย่า ของ *S. zooepidemicus* สายพันธุ์กลาย CUN5-10 และแปรผันปริมาณซูโครสเริ่มต้น	80
27ข	ค่าความเป็นกรดด่างและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของ *S. zooepidemicus* สายพันธุ์กลาย CUN5-10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อการผลิตในระดับขวดเขย่า และแปรผันปริมาณซูโครสเริ่มต้น	81
28	การเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของ *S. zooepidemicus* สายพันธุ์กลาย CUN5-10 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อการผลิตในระดับขวดเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง และแปรค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น	85
29	การเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของ *S. zooepidemicus* สายพันธุ์กลาย CUN5-10 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อการผลิตในระดับขวดเขย่า โดยแปรผันอุณหภูมิเป็น 25 , 30 , 37 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส)	86
30	การเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของ *S. zooepidemicus* สายพันธุ์กลาย CUN5-10 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อการผลิตในระดับขวดเขย่า โดยแปรผันอัตราเร็วในการเขย่า	87
31	ปริมาณไลโซไซม์ที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคของ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตสูตรปรับปรุงจาก Nimrod (1986)	88
32	ปริมาณไลโซไซม์ที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคเมื่อเลี้ยง *S. zooepidemicus* CUN5 -10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตสูตรปรับปรุงจาก Nimrod (1986) ที่มีปริมาณซูโครส 10 กรัมต่อลิตร	89

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
33	ผลของปริมาณทวีน 80ที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคเมื่อเลี้ยง *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตสูตรปรับปรุงจาก Nimrod (1986) ที่เสริมด้วยซูโครส 5 กรัมต่อลิตร	90
34	ผลของปริมาณทวีน 80ที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิคเมื่อเลี้ยง *S. zooepidemicus* CUN 5-10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตสูตรปรับปรุงจาก Nimrod (1986) ที่มีปริมาณซูโครส 10 กรัมต่อลิตร	91
35	ลักษณะโคโลนีของ *Streptococcus zooepidemicus* (สายพันธุ์ดั้งต้น) *Streptococcus zooepidemicus* CUN5-10 (สายพันธุ์กลาย) บนอาหารแข็ง Tryptic Soy Agar	93
36	ลำดับขั้นตอนการกลายพันธุ์ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต และสาร NTG ได้สายพันธุ์กลาย CUN5-10	100
37	กราฟมาตรฐานแสดงค่าความดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรกับน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 0-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	120
38	กราฟมาตรฐานแสดงค่าความดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 448 นาโนเมตรกับน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 0-100 มิลลิกรัมต่อลิตร	121
39	กราฟมาตรฐานของกรดไฮยาลูโรนิค โดยแสดงค่าระหว่างปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคที่ได้จากการคำนวณ เปรียบเทียบกับปริมาณกรดไฮยาลูโรนิคที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน	122
40	กราฟมาตรฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของกรดไฮยาลูโรนิคบริสุทธิ์ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	123
41	ร้อยละการรอดของ *S. zooepidemicus* AU 21 ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรที่เวลาต่างๆ	124
42	ร้อยละการรอดของ *S. zooepidemicus* BU 42 ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรที่เวลาต่างๆ	125

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
43	ร้อยละการรอดของ *S. zooepidemicus* CUN 20 ที่กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลาต่างๆ.....	126
44	ร้อยละการรอดของ *S. zooepidemicus* CUN 2-1 ที่กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลาต่างๆ.....	127
45	ร้อยละการรอดของ *S. zooepidemicus* CUN 3-5 ที่กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลาต่างๆ.....	128
46	ร้อยละการรอดของ *S. zooepidemicus* CUN 4-7 ที่กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลาต่างๆ.....	129

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สัญลักษณ์และคำย่อ

มก. = มิลลิกรัม

มล. = มิลลิลิตร

μg = ไมโครกรัม

% = เปอร์เซนต์

°ซ = องศาเซลเซียส

M = โมลาร์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย