

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- ชี ใจแกนดิค คาร์บอน, บจ. 2545. Product Specification. CGC-16 และ CGC-wood. 67 หมู่2
ถ.ราชสีมา-โชคชัย หนองบัวศาลา เมือง นครราชสีมา 30000.
- ทรงศักดิ์ พันธุ์วัฒนะสิงห์. 2540. การปรับปรุงสายพันธุ์ *Streptococcus zooepidemicus* เพื่อเพิ่ม
ประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย.
- รัตนา จิระรัตนานนท์. 2541. กระบวนการแยกด้วยเยื่อแผ่นสังเคราะห์ : 147-174. ห้างหุ้นส่วนจำกัด
โรงพิมพ์ไทยเส็ง.
- อณูมาศ บัวเขียว, 2544. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตและน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่สร้าง
โดย *Streptococcus zooepidermicus* UN-7. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย.
- อรัญญา มโนสร้อย, รศ.ดร. และ จิระเดช มโนสร้อย, รศ.ดร. สารใหม่และวิทยาการใหม่ทาง
เครื่องสำอาง : 100-103. โอ.เอส.พรีนติ้ง เฮ้าส์.

ภาษาอังกฤษ

- Akasaka, H., Komasaki, H. and Arai, T. 1989. Fermentation Method for Producing Hyaluronic
Acid. United States Patent. No. 4,801,539.
- Balazs, E.A., 1979. Ultrapure Hyaluronic Acid and the Use Thereof. United States Patent. No.
4,141,973.
- Balazs, E.A., and Band, P., 1984. Hyaluronic Acid : Its Structure and Use. Cosmetics and
Toiletries. 99 : 65-72.
- Bitter, T., and Muir, H.M., 1962. A Modified Uronic Acid Carbazole Reaction. Analytical
Biochemistry. 4 : 330-334.
- Bracke, J.W., Thacker, K., and Minneapolis, M., 1985. Hyaluronic Acid from Bacterial Culture.
United States Patent. 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.

- Cheremisinoff, P.N., and Morresi, A.C. 1978. Carbon Adsorption Applications. In P.N. Cheremisinoff, and F. Ellerbusch (eds.) Carbon Adsorption Handbook. pp. 1-53. Michigan : Ann Arbor Science.
- Cifonelli, J.A., and Mayeda, M., 1957. The Purification of Hyaluronic Acid by the Use of Charcoal. Biochemica et Biophysica ACTA. 24 : 397-400.
- Cleland, R.L., and Wang, J.L., 1970. Ionic Polysaccharides. III. Dilute Solution Properties of Hyaluronic Acid Fractions. Biopolymers. 9 : 799-810.
- Crater, D.L., and Van de Rijn, I., 1995. Hyaluronic Acid Synthesis Operon (*has*) Expression in Group A Streptococci. The Journal of Biological Chemistry. 270(31) : 18452-18458.
- Crater, D.L., Dougherty, B.A., and Van de Rijn, I., 1995. Molecular Characterization of *has C* from an Operon Required for Hyaluronic Acid Synthesis in Group A Streptococci. The Journal of Biological Chemistry. 270(48) : 28676-28680.
- De Luca, C., Lansing, M., Martini, I., Crenscenzi, F., Shen, G., O'Regan, M., and Wong, C., 1995. Enzymatic Synthesis of Hyaluronic Acid with Regeneration of Sugar Nucleotides. Journal of American Chemical Society. 117 : 5869-5870.
- Diaz-Teran, J., Nevskaia, D.M., Lopez-Peinado, A.J., and Jerez, A. 2001. Porosity and Adsorption Properties of an Activated Charcoal. Colloids and Surfaces. A : Physicochemical and Engineering Aspects. 187-188 : 167-175.
- Ellwood, C.D., Evan, G.T., Dunn, G.M., McInnes, N., Yeo, R.G., and Smith, K.J., 1995. Production of Hyaluronic Acid. United States Patent. No. 5,411,874.
- Ellwood, C.D., Evan, G.T., Dunn, G.M., McInnes, N., Yeo, R.G., and Smith, K.J., 1996. Production of Hyaluronic Acid. United States Patent. No. 5,563,051.
- Eckenfelder, W.W., Jr. 1981. Application of Adsorption to Wastewater Treatment. Tennessee : Enviro Press.
- Eric, F., Michel, M., and Marguerite, R. 1993. Shear-Rate, Concentration, Molecular Weight, and Temperature Viscosity Dependence of Hyaluronate, a Wormlike Polyelectrolyte. Macromolecules. 26 : 6945 – 6951.
- Faust, S.D., and Aly, O.M. 1987. Adsorption Process for Water Treatment. United states of America : Butterworth Publishers.
- Fujii, K., Kawata, M., Kobayashi, Y., Okamoto, A. and Nishinari, K., 1996. Effect of the Addition of Hyaluronate Segments with Different Chain Lengths on the Viscoelasticity of Hyaluronic Acid Solutions. Biopolymers. 38(5) : 583-591.

- Gergova, K., Petrov, N., Butuzova, L., Minkova, V. and Isaeva, L. 1993. Evolution of the Active Surface of Carbons Produced from Various Raw Materials by Steam Pyrolysis/Activation. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 58 : 321-330.
- Gura, E., Huckel, M., and Muller, P.J. 1998. Specific Degradation of Hyaluronic Acid and Its Rheological Properties. Polymer Degradation and Stability. 59 : 297 – 302.
- Hashimoto, M., Saegusa, H., Chiba, S., Kitagawa, H., and Miyoshi, T. 1990. Method for Producing Sodium Hyaluronate by Fermentation Method. United State Patent. No.4,946,780.
- Holmstrom, B., and Ricica, J., 1967. Production of Hyaluronic Acid by a Streptococcal Strain in Batch Culture. Applied Microbiology. 15 : 1409-1413.
- Homer, K.A., Petel, R., and Beighton, D. 1994. Effect of N-acetylglucosamine on Carbohydrate Fermentation by *Streptococcus mutants* NCTC 10449 and *Streptococcus sobrinus* SL-1. Infection & Immunity. 61(1) : 295-302.
- Karen, M.L., and Ellington, M.B. 1994. Thermal Stability of Sodium Hyaluronate in Aqueous Solution. Journal of Biomedical Materials Research. 28 : 1239 – 1244.
- Kendall, F.E., Heidelberger, M., and Dawson, M.H., 1937. A Serologically Inactive Polysaccharide Elaborated by Mucoid Strains of Group A Hemolytic Streptococcus. The Journal of Biological Chemistry. 118 : 61-69.
- Keng, C.NG., Handley, C.J., Mason, R.M., and Robinson, H.C., 1989. Synthesis of Hyaluronate in Cultured Bovine Articular Cartilage. Biochemical Journal. 263 : 761-767.
- Kimura, S., and S. Nakao. 1984. Filtration Technology. Chemical Engineering Association, Japan. Tokyo : Makinoshoten. อ้างถึงใน สุนีย์ โชตินีรนาถ. การผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากกากมันสำปะหลังโดยการใช้เอนไซม์และอัลตราฟิลเตรชัน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบัณฑิตภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2539. หน้า 23-25.
- Kjems, E., and Lebech, K., 1976. Isolation of Hyaluronic Acid from Cultures of Streptococci in a Chemically Defined Medium. Acta Pathology Microbiology Scand Section B. 84 : 162-164.
- Koen, P.V., Albert, R.L. and Joseph, M.D. 1995. Absolute and Empirical Determination of The Enzymic Activity and Kinetic Investigation of The Action of Hyaluronidase on Hyaluronan Using Viscosimetry. Biochemical Journal. 306 : 153-160.
- Lapcik, L., Smedt, D., Demeester, J. and Chabreck, P. 1998. Hyaluronan : Preparation, Structure, Properties, and Applications. Chemical Reviews. 98(8):2663-2684.

- Laurent, T.C., 1970. Structure of Hyaluronic Acid. in E.A. Balazs. (ed) Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix. London. Academic Press. pp.703-732.
- Laurent, T.C., Ryan, M., and Pietruszkiewicz, A., 1960. Fractionation of Hyaluronic Acid. Biochemica et Biophysica ACTA. 42 : 476-485.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagents. Journal of Biological Chemistry. 193 : 265-275.
- MacLennan, A.P. 1956. The Production of Capsules, Hyaluronic Acid and Hyaluronidase by Group A and Group C Streptococci. Journal of General Microbiology. 14 : 134-142.
- Matsumura, G., De Saegui, M., Herp, A., and Pigman, W., 1963. The Preparation of Hyaluronic Acid from Bovine Synovial Fluid. Biochemica et Biophysica ACTA. 69 : 574-576.
- Menzel, E.J. and Farr, C. 1998. Hyaluronidase and its Substrate Hyaluronan : Biochemistry, Biological Activities and Therapeutic Uses. Cancer Letters. 131 : 3-11.
- Milena, R., Dusan, B., Moros, S., and Katarina, V. 1994. Depolymerization reaction of hyaluronic acid in solution. International Journal of Biological Macromolecule. 16(3) : 121 – 124.
- Millipore. Technical publications [Online]. n.d. Available from : <http://www.millipore.com/publications.nsf/docs/tn067?open&lang=en> [2004, Aug 15]
- Miyamori, T., Numazawa, R., Sakimae, A., and Onishi, H. 1989. Method of Producing Hyaluronic Acid. United State Patent. No.4,885, 244.
- Miyazaki, T., Yomota, C., and Okada, S. 1998. Change in Molecular Weight of Hyaluronic Acid During Measurement with a Cone-Plate Rotational Viscometer. Journal of Applied Polymer Science. 67 : 2199 – 2206.
- Morita, H., and Fujii, M. 1991. Process for Preparing Hyaluronic Acid. United States Patent. No.5,071,751.
- Neely, J.W., and Isacoff, E.G. 1982. Carbonaceous Adsorbents for The Treatment of Ground and Surface Waters. N.Y. and Basel : Marcel Dekker.
- Nimrod, A., Greenman, B., Kanner, D., and Landsberg, M., 1988. High Molecular Weight Sodium Hyaluronate. United States Patent. No. 4,784,990.
- Novozymes. Hyaluronic [Online]. 2002. Available from : [www.novozymes.com/library/Downloads/Investor_presentations/Hyaluronic_acid\(En\)_2.ppt](http://www.novozymes.com/library/Downloads/Investor_presentations/Hyaluronic_acid(En)_2.ppt) [2004, Aug 15]
- O'Regan, M., Martini, I., Crescenzi, F., Luca, C., and Lansing, M. 1994. Molecular Mechanisms and Genetics of Hyaluronan Biosynthesis. International Journal of Biological Macromolecules. 16(6) : 283-286.

- Peter, K. (n.d.) Chemical Kinetics - Rate Laws, Arrhenius Equation – Experiments [Online]. University of Regensburg (Germany). Available from : http://www.uni-regensburg.de/Fakultaeten/nat_Fak_IV/Organische_Chemie/Didaktik/Keusch/kinetics.htm. [2004, July 23]
- Pigman, W., Rizvi, S., and Holley, H. 1961. Preparation and Stability of Hyaluronic Acid. Biochimica et Biophysica Acta. 53: 254-262.
- Pradistsuwana Chidphong. 1991. Study of Microfiltration by Rotating-Cylinder Dynamic Filter. Ph.D. dissertation, Nagoya University. Japan. อ้างถึงใน สุนีย์ โชตินีรนาถ. การผลิตน้ำตาลรีดิซจากกากมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์และอัลตราฟิลเทรชัน. วิทยานิพนธ์ปริญญา มหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2539. หน้า 25-27.
- Radin, L.E., Swann, A.D., and Weisser, A.P., 1970. Preparation of a Hyaluronate-free Lubricating Fraction from Synovial Fluid. Nature. 228 : 377-378.
- Rehakova, M., Bakos, D., Soldan, M., and Vizarova, K. 1994. Depolymerization Reactions of Hyaluronic Acid in Solution. International Journal of Biological Macromolecules. 16(3) : 121-124.
- 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. Ginsberg (ed.), Complex Carbohydrate Part B. Method of Enzymology, 38 vols. pp. 73-141. New York : Academic Press.
- 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. Method 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*. Medical Science Research. 17 : 723-725.
- Sutherland, I.W. 1990. Biotechnology of Microbial Exopolysaccharide. Cambridge University Press.
- Tamaki, M., Chikako, Y. and Satochi, O. 1998. Changer in Molecular Weight of Hyaluronic Acid During Measurement with a Cone-Plate Rotational Viscometer. Journal of Applied Polymer Science. 67 : 2199-2206.

- Tebbutt, T.H.Y., and Bahiah, S.J. 1977. Studies on adsorption with activated carbon. Effluent and Water Treatment Journal. 17(3) : 123-127.
- Thonard, J.C., Migliore, S.A., and Blustein, R. 1964. Isolation of Hyaluronic Acid from Broth Cultures of Streptococci. Journal of Biological Chemistry. 239(3): 726-728.
- Tokita, Y. and Okamoto, A. 1995. Hydrolytic degradation of hyaluronic acid. Polymer Degradation and Stability. 48 : 269-273.
- Valencia, G., and Gloyna, E.F. 1972. On the synthesis of activated carbon column design data. Technical report EHE-72-11 CRWR 90. Civil engineering department. The University of Texas at Austin.
- Voet, D., and Voet, J.G. 1995. Biochemistry. pp. 264-265. 2nd ed. New York : John Wiley and Sons.
- Weber, W.J., Jr. 1972. Physico-chemical Processes for Water Quality Control. Michigan : John Wiley & Sons.
- Woolcock, J.B., 1974. The Capsule of *Streptococcus equi*. Journal of General Microbiology. 85 : 372-375.
- Zu, J., Nishikawa, S., and Kashimura, N. 1997. Depolymerization of Hyaluronic Acid by Low-molecular-weight Amadori-rearrangement Products and Glycated Polylysine. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 61(1) : 188-190.



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

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

1.1 อาหารเหลว BHI

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

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

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

1.2 อาหารวุ้นแข็งลาดเอียง BHI

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

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาโลโรนิกโดยวิธีคาร์บาโซล

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

ชั่งสารไดโซเดียมเตตระบอเรท ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) 3.82 กรัม ละลายในน้ำร้อน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ให้สารละลายเย็น นำไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง แล้วค่อยๆ เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นที่แช่ไว้ในน้ำแข็งลงไป ปริมาตร 390 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเก็บสารละลายในขวดแก้ว

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

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

2. การเตรียมสารละลาย ที่ใช้ในการวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธีลาวรี

2.1 สารละลาย ก. ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 2 กรัม ในสารละลาย 0.1 นอร์มัลของโซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

2.2 สารละลาย ข. ละลายโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต 2.7 กรัม ในน้ำปราศจากไอออนแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

2.3 สารละลาย ค. ละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 1 กรัม ในน้ำปราศจากไอออนแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

2.4 สารละลาย ง. นำสารละลาย ก. 98 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย ข. 1 มิลลิลิตร และสารละลาย ค. 1 มิลลิลิตร (เตรียมเมื่อทำการทดลองเท่านั้น)

2.5 สารละลายโฟลิน (Folin-Ciocalteu reagent) ปิเปตต์สารละลายโฟลิน (2 นอร์มัล) มาทำการเจือจางในน้ำในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 เพื่อให้ได้สารละลายโฟลินความเข้มข้น 1 นอร์มัล (เตรียมเมื่อทำการทดลองเท่านั้น)

3. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.0

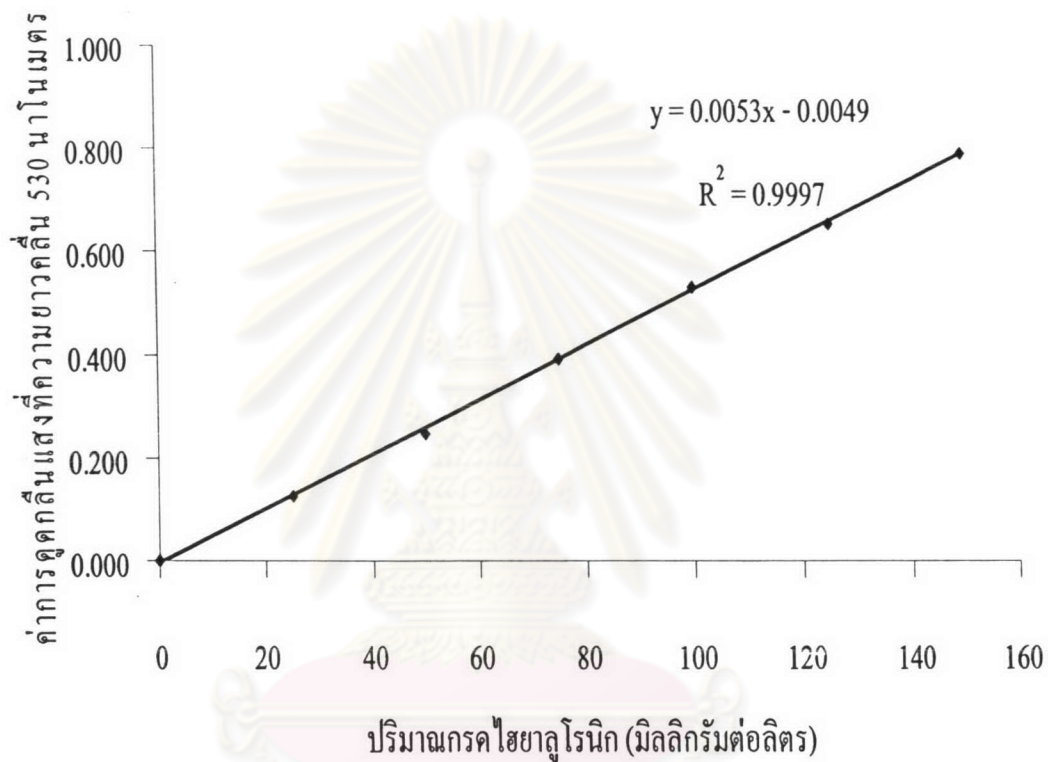
ชั่งสาร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 27.22 กรัม ละลายในน้ำจืดไอออนปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร และชั่งสาร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 34.84 กรัม ละลายในน้ำจืดไอออน ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร จากนั้น นำสารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ค่อยๆเติมลงในสารละลายไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต จนกระทั่งได้สารละลายที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.0 สำหรับใช้เป็นบัฟเฟอร์ของเอนไซม์ปาเปน



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค
กราฟมาตรฐาน

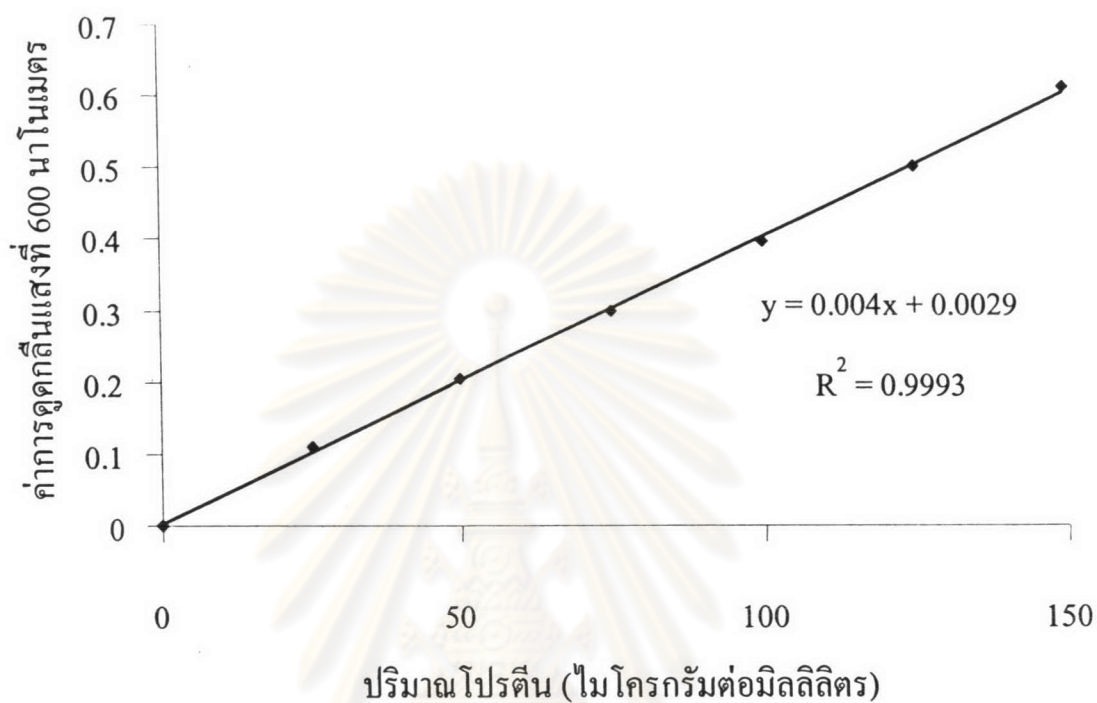
1. กราฟมาตรฐานของกรดไฮยาลูโรนิกโดยวิธีคาร์บาไซล



กราฟมาตรฐานกรดไฮยาลูโรนิกโดยวิธีคาร์บาไซล ในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 150 มิลลิกรัมต่อลิตร

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

2. กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธีลาวรี



กราฟมาตรฐานโปรตีน BSA โดยวิธีลาวรี ในช่วงความเข้มข้น 0 – 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร
x 1 / ความชัน x ความเจือจาง

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง
การย่อยแลกติกเคซินด้วยเอนไซม์

วัตถุดิบและเอนไซม์ที่ใช้

1. แลกติกเคซิน ของบริษัท ไวก์กรุป ประเทศไทย จำกัด
2. เอนไซม์ปาเปน ของบริษัท BDH ประเทศอังกฤษ

ขั้นตอนการย่อยแลกติกเคซินด้วยเอนไซม์

1. ชั่งแลกติกเคซิน 20 กรัม เติมลงในสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร นำไปต้มให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
2. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เท่ากับ 6.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์
3. ปรับปริมาตรของสารละลายให้เป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำจืดไอออน
4. เติมสารละลายเอนไซม์ปาเปน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
5. บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 ชั่วโมง ที่ความเร็วรอบในการกวน 150 รอบต่อนาที
6. ปั่นแยกตะกอนของสารที่เหลือออก โดยเซนทริฟิวจ์ ที่ความเร็วรอบในการกวน 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนสารละลายใสที่ได้ไว้
7. นำไปเตรียมอาหารสูตรสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก (ทรงศักดิ์ พันธุ์วัฒนะสิงห์, 2540) โดยใช้สารละลายที่ได้แทนน้ำจืดไอออนและเคซิน โดยปรับปริมาตรสารละลายที่ได้เป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำจืดไอออน (เพื่อให้ได้เป็น 2 % แลกติกเคซิน)

การเตรียมอาหารสูตรสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

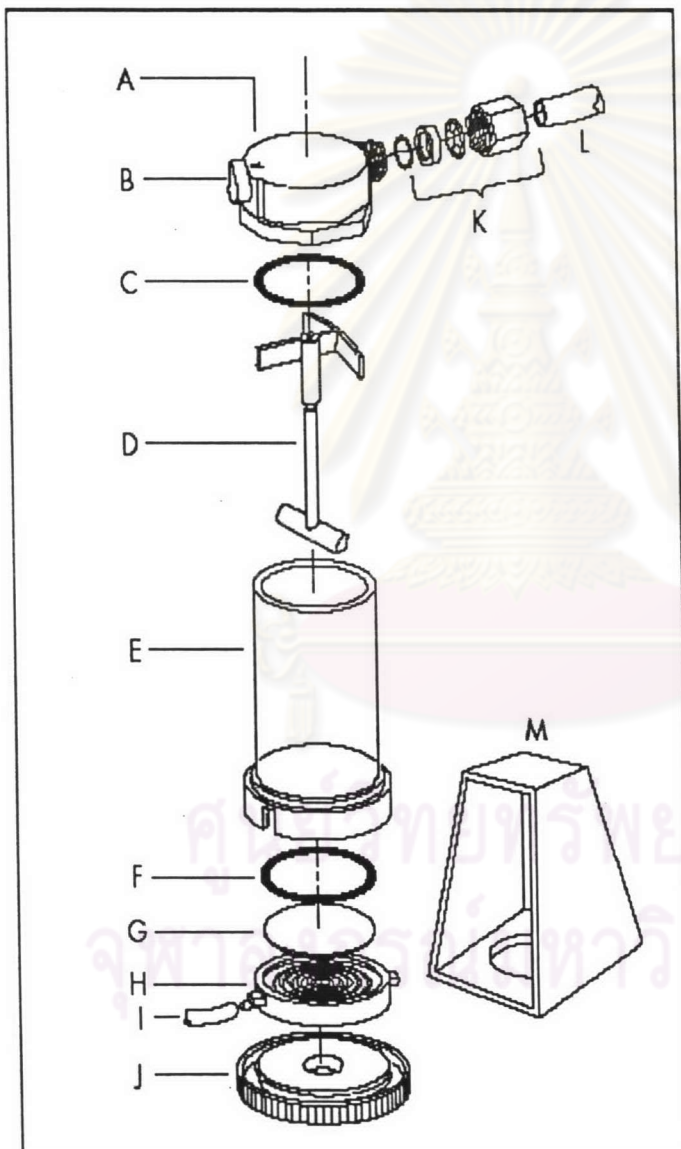
สารละลายแลคติกเคซีน	1,000	มิลลิลิตร
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	15	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	2.8	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.5	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	10	มิลลิกรัม
น้ำตาลซูโครส	15	กรัม

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

แผนภาพโมดูลที่ใช้ในกระบวนการอัลตราฟิลเตรชัน



Item No.	Description
A	Cap Assembly
B	Pressure Relief Valve
C	O-Ring
D	Stirrer Assembly
E	Body
F	O-Ring
G	Membrane
H	Membrane Holder
I	Elastomeric Tubing
J	Base
K	Tube Fitting Assembly
L	Tubing, Plastic
M	Stand Assembly

(Millipore, 2004)

ภาคผนวก ฉ

การคำนวณไอโซเทอร์มแบบแลงมัวร์

จากการทดลองหาปริมาณโปรตีน จะสามารถหาปริมาณโปรตีนที่ถูกดูดซับต่อกรัมคาร์บอนได้จาก

$$\begin{aligned} \text{ปริมาณโปรตีนที่ถูกดูดซับ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)} &= \text{ปริมาณโปรตีน ณ เวลาเริ่มต้น} - \text{ปริมาณ} \\ &\text{โปรตีน ณ เวลาสุดท้าย} \\ &= 306.77 - 161.47 \\ &= 145.3 \text{ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{ปริมาณโปรตีนที่ถูกดูดซับต่อกรัมคาร์บอน} &= \text{ปริมาณโปรตีนที่ถูกดูดซับ (ไมโครกรัม/} \\ \text{(ไมโครกรัม/กรัม ถ่านกัมมันต์)} &\text{มล.)} / \text{ปริมาณคาร์บอนที่ใช้ (กรัม/มล.)} \\ &= 145.3 / 0.01 \\ &= 14,530 \text{ ไมโครกรัม/กรัม ถ่านกัมมันต์} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{ส่วนกลับของโปรตีนที่ถูกดูดซับต่อกรัมถ่านกัมมันต์ (1/X)} & \\ &= 1/14530 \\ &= 0.000069 \text{ กรัม/ไมโครกรัม} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{ส่วนกลับของความเข้มข้นโปรตีน ณ จุดสมดุล (1/C)} & \\ &= 1/161.47 \\ &= 0.0062 \text{ มิลลิลิตร/ไมโครกรัม} \end{aligned}$$

จากสมการ (1.3)

$$1/X = (1/X_m) + (1/C)(1/bX_m) \quad (1.3)$$

เมื่อเขียนกราฟระหว่าง $1/X$ กับ $1/C$ ซึ่งเป็นเส้นตรงจะมีความชัน $1/bX_m$ และจุดตัดแกน y เท่ากับ $1/X_m$

จากรูปที่ 3.8 จะได้สมการ

$$1/X = 0.001558 (1/C_e) + 0.000062$$

เมื่อ	จุดตัดแกน y	=	$1/X_m$	
	0.000062	=	$1/X_m$	
ดังนั้น	X_m	=	16129.03	ไมโครกรัม/กรัม ถ่านกัมมันต์
เมื่อ	ความชัน	=	$1/bX_m$	
	0.001558	=	$1/bX_m$	
	0.001558	=	$1/(b \times 16129.03)$	
ดังนั้น	b	=	0.04	มิลลิลิตร/ไมโครกรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

การคำนวณฟลักซ์ทั้งหมด (total flux)

ฟลักซ์ทั้งหมด คือ ปริมาตรของเพอมีเอต (ลูกบาศก์เซนติเมตร)หารด้วยพื้นที่เชื่อมต่อ (ตารางเซนติเมตร) หารด้วยเวลา (วินาที)

จากการทดลอง

ปริมาตรของเพอมีเอต = 1.8 ลูกบาศก์เซนติเมตร

พื้นที่เชื่อมต่อ = 28.7 ตารางเซนติเมตร

เวลา = 10 นาที

= 600 วินาที

ดังนั้น ฟลักซ์ทั้งหมด = $1.8 / (28.7 \times 600)$

= 1.04×10^{-4} ลบ.ชม./ตาราง ชม. วินาที

ศูนย์วิทยพัทยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ช

การคำนวณค่าความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการลดลงของ
น้ำหนักโมเลกุลกับอุณหภูมิคงที่จากสมการของอาร์เรเนียส

จากการทดลอง

$$\begin{aligned} -\frac{d MW}{dt} \Big|_T &\propto MW \\ &= k_T MW \\ d(MW/MW) &= -k_T dt \\ \ln MW_t &= \ln MW_0 - k_T t \end{aligned} \quad (\text{ช.1})$$

จากสมการ (ช.1) เมื่อเขียนกราฟระหว่าง เวลา กับ $\ln MW$ จะได้ความชันคือค่า k_T
จากสมการของอาร์เรเนียส

$$k_T = A \exp [-(E/RT)] \quad (\text{ช.2})$$

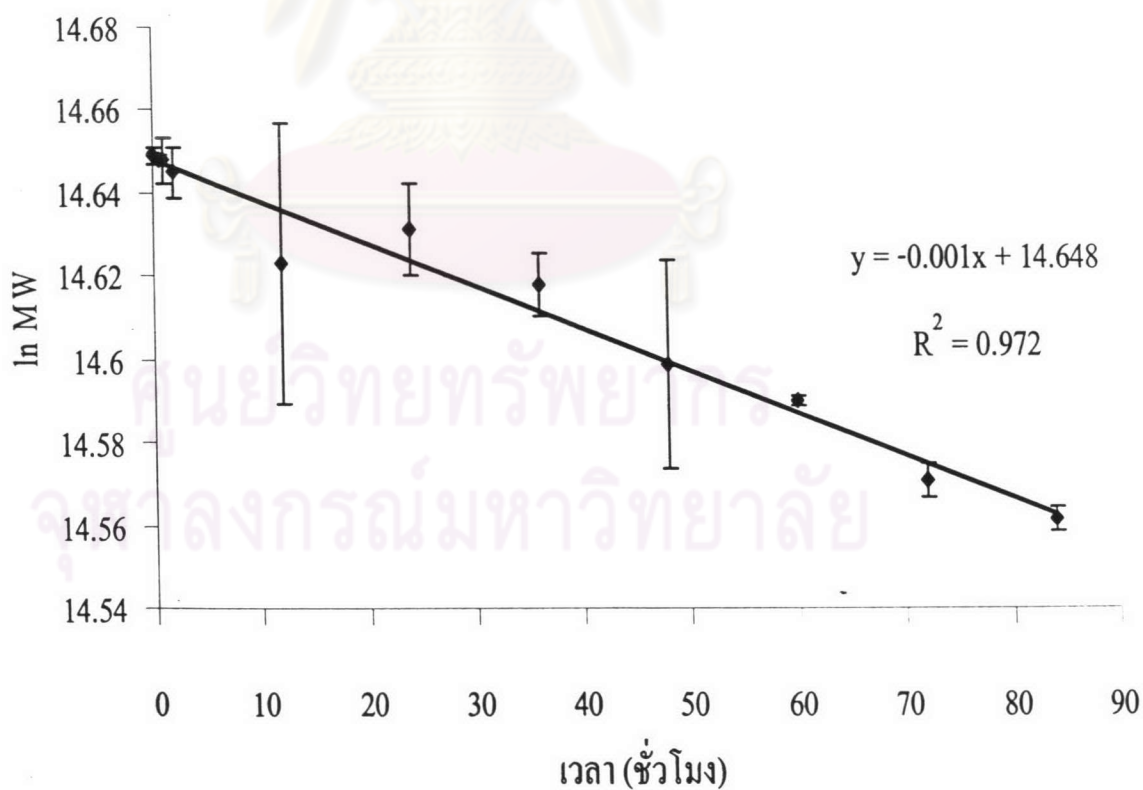
$$\ln k_T = \ln A - E / RT \quad (\text{ช.3})$$

โดยที่	MW	คือ	น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก (ดาลตัน)
	T	คือ	อุณหภูมิ (องศาเซลวิน)
	t	คือ	เวลา (ชั่วโมง)
	k_T	คือ	rate coefficient (ต่อชั่วโมง)
	A	คือ	ค่าคงที่ (ต่อชั่วโมง)
	E	คือ	พลังงานกระตุ้น (กิโลจูล/โมล)
	R	คือ	gas constant หรือมีค่าเท่ากับ 8.314×10^{-3} กิโลจูล/โมล เกลวิน

นำค่า k_T ที่อุณหภูมิต่างๆ มาเขียนกราฟในสมการที่ ช.3 โดยให้แกน x คือ $1/T$ และแกน y คือ $\ln k_T$
จะได้ความชันเท่ากับ E/R และจุดตัดแกน y เท่ากับ $\ln A$ จะหา A และ E ได้

ตารางที่ ซ.1 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับ ln MW ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

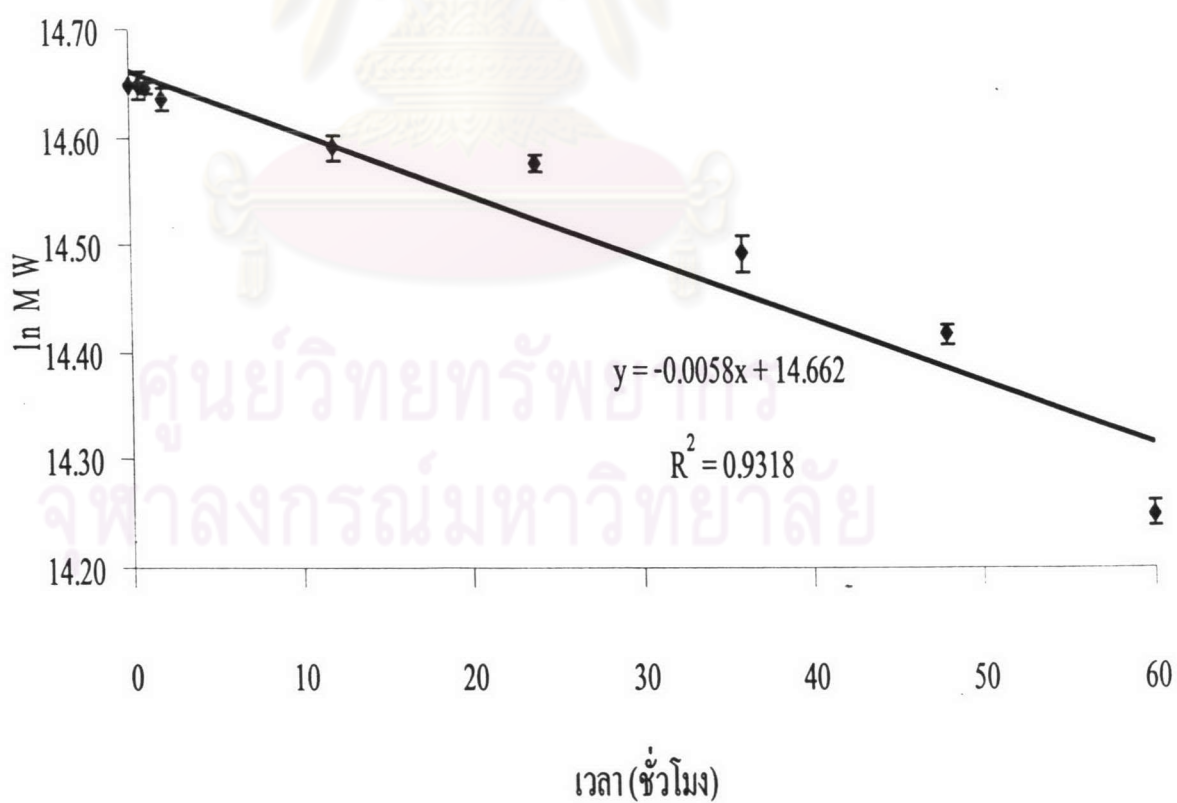
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักโมเลกุล x 10 ⁶ (คาลตัน)	ln MW
0	2.30	14.65 ± 0.00
0.5	2.30	14.65 ± 0.00
1	2.30	14.65 ± 0.01
2	2.29	14.64 ± 0.01
12	2.24	14.62 ± 0.03
24	2.26	14.63 ± 0.01
36	2.23	14.62 ± 0.01
48	2.19	14.60 ± 0.02
60	2.17	14.59 ± 0.00
72	2.13	14.57 ± 0.00
84	2.11	14.56 ± 0.00



รูปที่ ซ.1 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับ ln MW ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ตารางที่ ซ.2 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับ ln MW ณ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

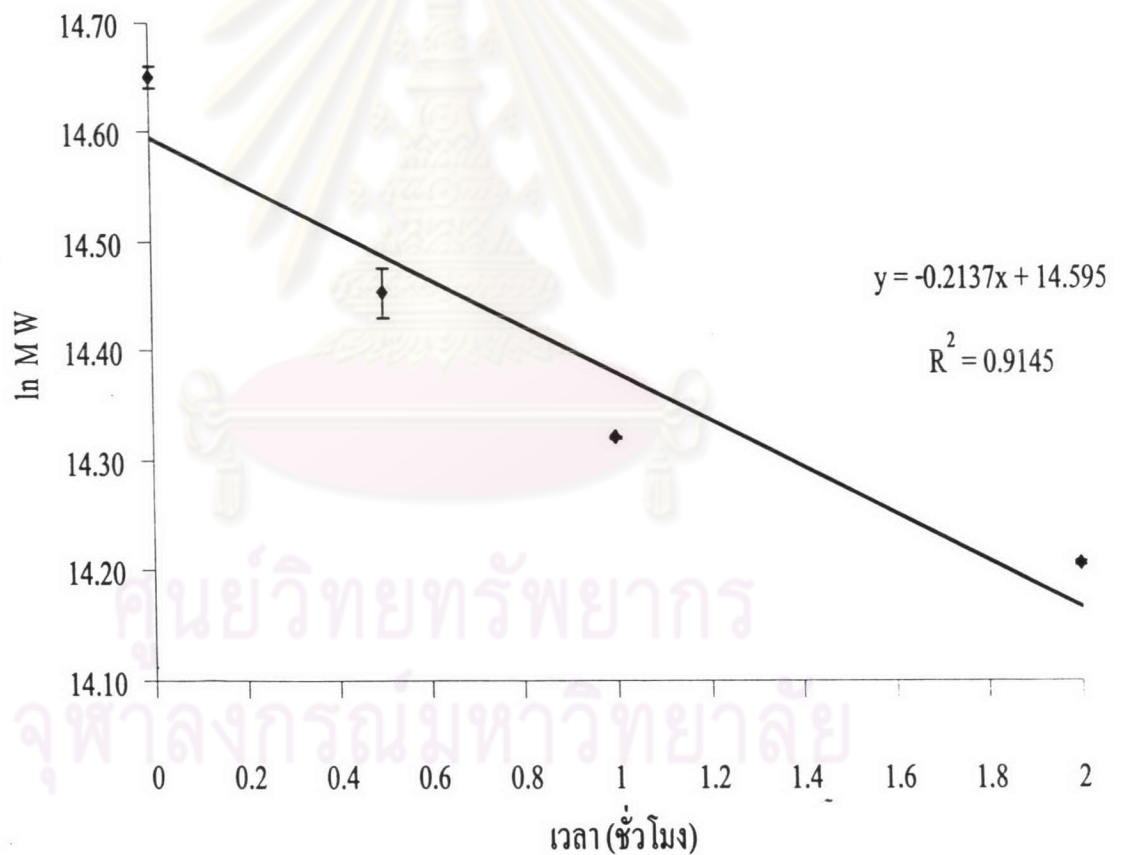
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักโมเลกุล x 10 ⁶ (คาลตัน)	ln MW
0	2.30	14.65 ± 0.00
0.5	2.30	14.65 ± 0.01
1	2.30	14.65 ± 0.01
2	2.27	14.64 ± 0.01
12	2.17	14.59 ± 0.01
24	2.14	14.58 ± 0.01
36	1.97	14.49 ± 0.02
48	1.82	14.42 ± 0.01
60	1.54	14.25 ± 0.01



รูปที่ ซ.2 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับ ln MW ณ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

ตารางที่ ๗.3 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับ ln MW ณ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

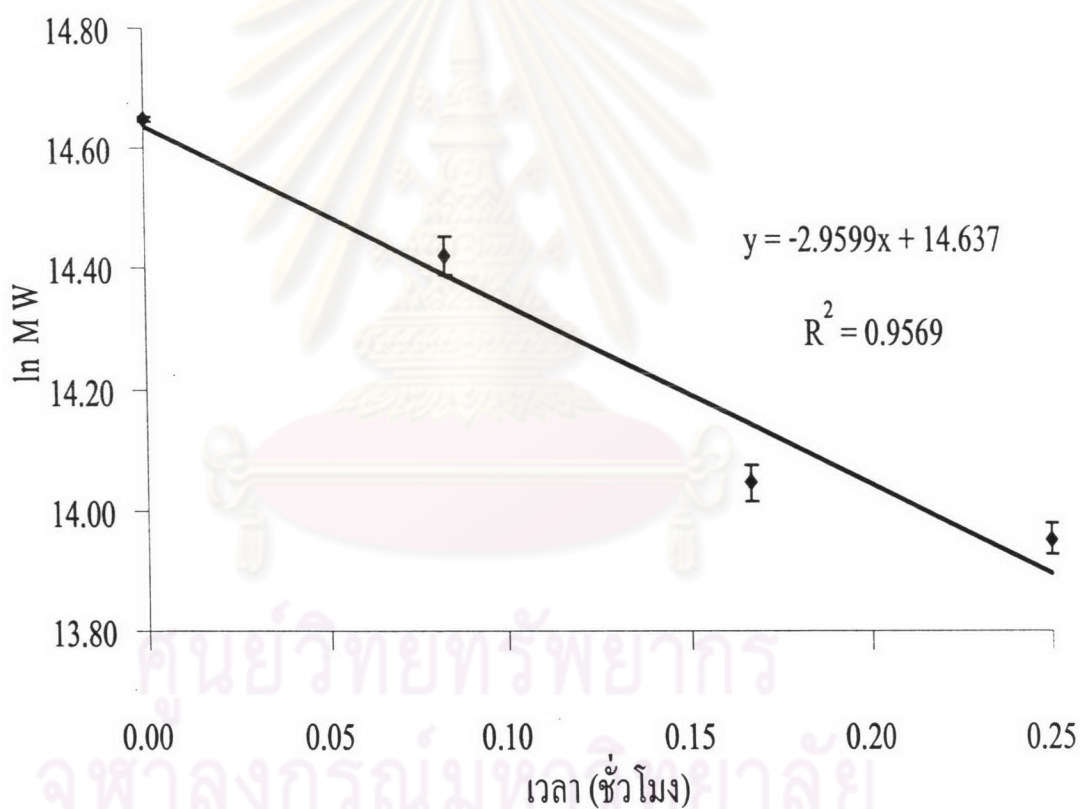
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักโมเลกุล $\times 10^6$ (คาลตัน)	ln MW
0	2.30	14.65 \pm 0.01
0.5	1.89	14.45 \pm 0.02
1	1.66	14.32 \pm 0.00
2	1.48	14.21 \pm 0.00



รูปที่ ๗.3 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับ ln MW ณ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

ตารางที่ ๔.4 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับ ln MW ณ อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส

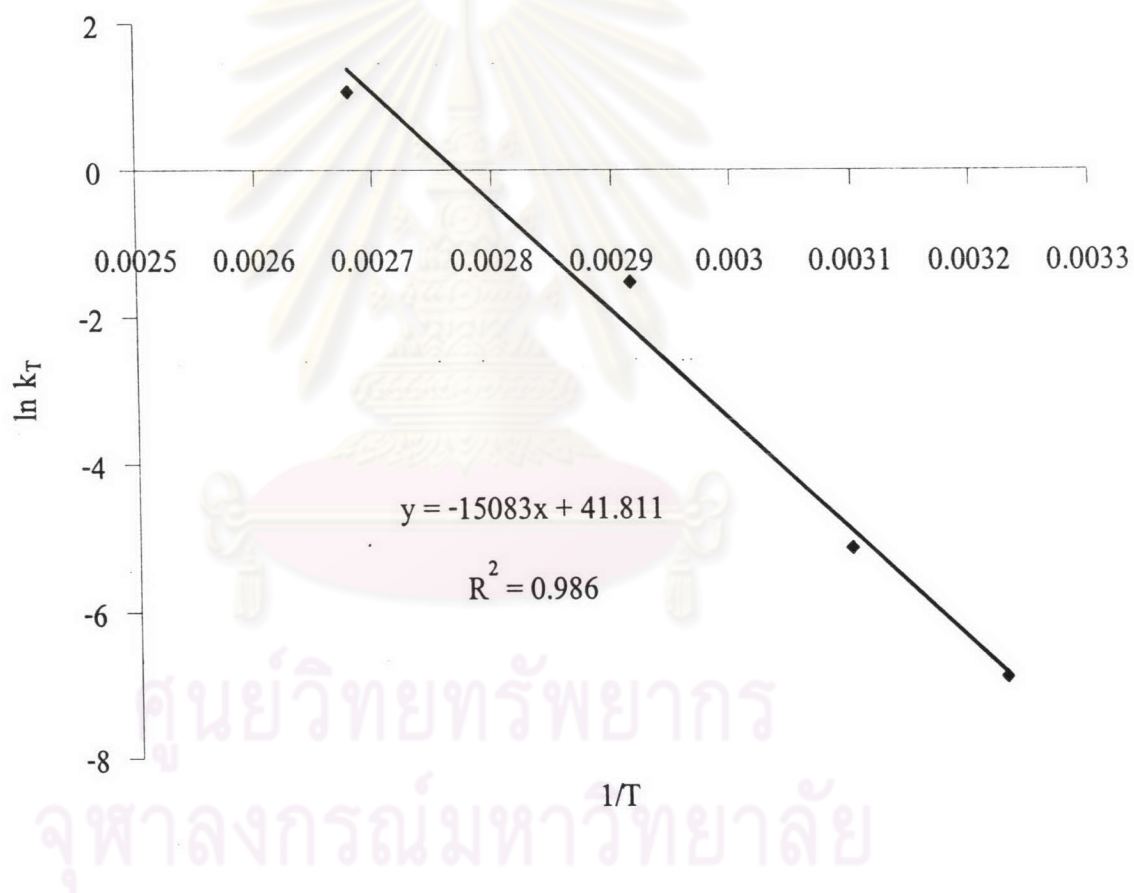
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักโมเลกุล x 10 ⁶ (ดาลตัน)	ln MW
0	2.30	14.65 ± 0.00
0.07 (5 นาที)	1.83	14.42 ± 0.03
0.17 (10 นาที)	1.26	14.05 ± 0.03
0.25 (15 นาที)	1.15	13.95 ± 0.03



รูปที่ ๔.4 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับ ln MW ณ อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส

ตารางที่ ๗.5 ความสัมพันธ์ระหว่างส่วนกลับขององศาสัมบูรณ์กับ $\ln k_T$

T (°C)	T (K)	1/T	$\ln k_T$
37	310	0.0032	-6.91
50	323	0.0031	-5.15
70	343	0.0029	-1.54
100	373	0.0027	1.08



รูปที่ ๗.5 ความสัมพันธ์ระหว่างส่วนกลับขององศาสัมบูรณ์กับ $\ln k_T$

จากรูป ซ.5 $\ln kT = 41.811 - 15083(1/T)$ (ซ.4)

จากสมการ ซ.3 $\ln k_r = \ln A - E/RT$ (ซ.3)

ดังนั้น $\ln A = 41.811$

$A = 1.44 \times 10^{18}$ ต่อชั่วโมง

ดังนั้น $E/R = 15083$

$E = 1.254 \times 10^5$ จูล/โมล

นำค่า A และ E ไปแทนในสมการที่ ซ.2

จะได้ $k_r = 1.44 \times 10^{18} \exp [-(1.254 \times 10^5 / 8.314T)]$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ฅ

Product Specification ของถ่านกัมมันต์ (บจ. ซี ไจแกนติค คาร์บอน, 2545)

CGC-16 : FOR WATER AND DE-CHLORINATION

“CGC-16” activated Carbon is made from coconut shell processed under high temperature steam in strictly controlled conditions. The pore structure has been designed to include a broad spectrum of pore sizes to efficiently absorb from solutions a great varieties of high, Intermediate, and low molecular weight substances from solutions.

RECOMMENDED USES : Application include water purification for both municipal and industrial use; a variety of separation and purification processes in the organic chemical industries.

PHYSICAL PROPERTIES :	Apparent density	8 x 30	Mesh
		0.47-0.54	g/cm ³

SPECIFICATION :	Iodine Number, min.	1,100	mg/g
	CTC%, (min)	60	%
	Hardness number, min	97	%
	(Ball Pan method)		
	Moisture As Packed, max.	5	%
	Ash, max.	5	%
	Oversize, max.	5	%
	Undersize, max.	5	%

PACKING : 25 kgs. Paper bag.

**CGC-WOOD : “Granular” ACTIVATED CARBON FOR DECOLORIZATION AND
PURIFICATION**

“CGC-wood” activated carbon is made from wood and processed under high temperature steam in strictly controlled conditions. The pore structure has been designed to include various pore sizes to efficiently absorb great variety of high and medium molecular weight substances from solutions.

RECOMMENDED USES : Application include decolorization and purification for msg, glucose, fructose syrup, sorbital, etc. and purification process for Petrochemical and waste water treatment.

PHYSICAL PROPERTIES : Surface Area 900-1,000 m²/g
(Nitrogen BET Method)

SPECIFICATION : Iodine Number, range 1,100 mg/g
Moisture range, max 10 %
Methylene Blue range 150-200 ml/g

PARTICLE SIZE 8 x 30 Mesh, min. 85 %

PACKING : 25 kgs. Paper bag.

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวอัจฉรา สุจิตวนิช เกิดวันที่ 26 ตุลาคม พ.ศ. 2519 ที่จังหวัดกรุงเทพฯ สำเร็จ การศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในปีการศึกษา 2541 จากนั้นเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตร มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2544



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย