

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตและน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่สร้างโดย
Streptococcus zooepidemicus UN-7



นายอนุมาศ บัวเขียว

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-17-0765-7

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

FACTORS AFFECT THE PRODUCTION AND MOLECULAR WEIGHT OF
HYALURONIC ACID SYNTHESIZED BY *Streptococcus zooepidemicus* UN-7

Mr. Anumart Buakeaw

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Biotechnology

Program of Biotechnology

Faculty of Science


Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-17-0765-7


หัวข้อวิทยานิพนธ์	ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตและนำหน้าักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่สร้าง โดย <i>Streptococcus zooepidemicus</i> UN-7
โดย	นายอนุมาศ บัวเขียว
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ วาสนา โตเลี้ยง


คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

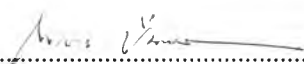

..... รองคณบดีฝ่ายบริหาร


(รองศาสตราจารย์ ดร. พิพัฒน์ การเที่ยง) รักษาราชการแทนคณบดีคณะวิทยาศาสตร์


คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(อาจารย์ ดร. สุวัฒน์ เจริญพรวัฒนา)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ วาสนา โตเลี้ยง)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์)

อณูมาศ บัวเขียว : ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตและน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่สร้างโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 (FACTORS AFFECT THE PRODUCTION AND MOLECULAR WEIGHT OF HYALURONIC ACID SYNTHESIZED BY *Streptococcus zooepidemicus* UN-7) อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ.ดร. นลิน นิลอุบล , อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ , อาจารย์ วาสนา โทเลี้ยง , 100 หน้า.ISBN 974-17-0765-7

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตและน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่สร้างโดย *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 ในระดับถึงหมักขนาด 5 ลิตร ปัจจัยที่ทำการศึกษา ได้แก่ ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น ในช่วง 10 ถึง 20 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ ในช่วง 1.0 ถึง 1.5 vvm ความเร็วรอบในการกวน ในช่วง 300 ถึง 500 รอบต่อนาที การเติมไลโซไซม์ ซูโครส และการเติมไลโซไซม์ร่วมกับซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก จากการศึกษา พบว่า ภาวะในการหมักที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถึงหมักขนาด 5 ลิตร คือ ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm และความเร็วยรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที จะได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกเท่ากับ 2,700 มิลลิกรัมต่อลิตร และปัจจัยที่น่าจะมีผลต่อน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก คือ อัตราการให้อากาศ โดยภาวะที่มีอัตราการให้อากาศสูงจะได้ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่สูงกว่าภาวะที่มีอัตราการให้อากาศต่ำ และการเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก จะได้ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกสูงกว่าเมื่อเทียบกับการหมักในภาวะเดียวกันแต่ไม่มีการเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนปัจจัยที่น่าจะไม่มีผลต่อน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก ได้แก่ ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น ความเร็วรอบในการกวน และการเติมซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมัก

หลักสูตร.....เทคโนโลยีทางชีวภาพ.....
สาขาวิชา.....-.....
ปีการศึกษา.....2544.....

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

นลิน นิลอุบล

4172569923 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD : *Streptococcus zooepidemicus* / HYALURONIC ACID / MOLECULAR WEIGHT
ANUMART BUAKEAW : FACTORS AFFECT THE PRODUCTION AND
MOLECULAR WEIGHT OF HYALURONIC ACID SYNTHESIZED BY
Streptococcus zooepidemicus UN-7. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF.
NALINE NILUBOL , Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. PAIROH
PINPHANICHAKARN , Ph.D. , VASANA TOLIENG , M.Sc. 100 pp. ISBN
974-17-0765-7

Factors affecting the production and molecular weight of hyaluronic acid synthesized by *Streptococcus zooepidemicus* UN-7 cultivating in a 5L-fermentor were investigated. Those factors included initial sucrose concentrations of 10 – 20 g/l, aeration rates of 1.0 – 1.5 vvm, agitation speed of 300 – 500 rpm and additions of lysozyme, sucrose or lysozyme together with sucrose to the culture during fermentation. It was found that the optimal conditions for hyaluronic acid production in a 5L-fermentor were initial sucrose concentration of 15 g/l, aeration rate at 1.5 vvm and agitation speed at 300 rpm in which under these conditions 2,700 mg/l of hyaluronic acid was produced. The factors having the effects on the molecular weight of hyaluronic acid were aeration rate and addition of lysozyme to the culture whereas the other tested factors showed no effect. Higher aeration rate or addition of lysozyme to the culture gave hyaluronic acid with higher molecular weight.


Program.....Biotechnology.....

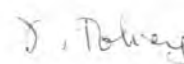
Student's signature.....

Field of study.....-.....

Advisor's signature.....

Academic year.....2001.....

Co-advisor's signature.....





กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาระดับปริญญาโท และวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จด้วยความสมบูรณ์ โดยได้รับความกรุณาจาก รองศาสตราจารย์ ดร. นลินี นิลอุบล รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชกร และอาจารย์ วาสนา โดเลียง ที่กรุณาได้รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ตลอดจนให้คำแนะนำแนวทางการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ซึ่งกระผมขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้อย่างสูงยิ่ง

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา ที่กรุณาได้รับเป็นกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรพงษ์ นวังคสัตถุศาสน์ ที่กรุณาได้รับเป็นกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์และให้คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ คณะบุคลากรทุกท่านในสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความสะดวกในด้าน อุปกรณ์ และสารเคมีในการทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่สำคัญ สำหรับการวิจัยตลอดเวลา

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณ เพื่อนๆ และพี่ๆ น้องๆ Biotech ทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจด้วยดีมาตลอด

ความดีของการศึกษา และคุณค่าของวิทยานิพนธ์นี้ ข้าพเจ้าขออุทิศแด่ บुरพจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่าน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูป.....	ค
คำย่อ.....	ท
บทที่	
1 บทนำ	
1.1 ประวัติความเป็นมา.....	1
1.2 คุณสมบัติของกรดไฮยาลูโรนิก.....	2
1.3 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิก.....	3
1.4 กระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดย แบคทีเรียในกลุ่ม Streptococcus.....	4
1.5 กลไกการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก.....	7
1.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกจากกระบวนการหมักโดย แบคทีเรียในกลุ่ม Streptococcus	
1.6.1 ชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ใช้ในกระบวนการหมัก.....	9
1.6.2 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิต	
1.6.2.1 สารแหล่งคาร์บอน.....	9
1.6.2.2 สารแหล่งไนโตรเจน.....	9
1.6.2.3 ฟอสเฟต.....	10
1.6.2.4 แร่ธาตุ.....	10
1.6.2.5 สารเสริมอื่นๆ.....	10
1.6.2.6 ค่าความเป็นกรด-ด่าง.....	10
1.6.2.7 อุณหภูมิ.....	11
1.6.2.8 ระยะเวลาในการหมัก.....	11
1.6.2.9 อัตราการให้อากาศ.....	11
1.6.2.10 ความเร็วรอบในการกวน.....	11

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
1.7 การศึกษาเกี่ยวกับน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก.....	12
1.8 ประโยชน์ของกรดไฮยาลูโรนิก.....	14
1.9 มุลเหตุจูงใจในการทำวิจัย.....	15
2 วิธีการทดลอง	
2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	
2.1.1 อุปกรณ์.....	16
2.1.2 สารเคมี.....	17
2.2 เชื้อจุลินทรีย์.....	17
2.3 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย.....	17
2.4 การเลี้ยงเชื้อและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก	
2.4.1 การเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น.....	18
2.4.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับขวดเขย่า.....	18
2.4.3 การเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถังหมัก ขนาด 5 ลิตร.....	18
2.5 วิธีวิเคราะห์	
2.5.1 ค่าความเป็นกรดต่าง.....	18
2.5.2 การวัดการเจริญของเซลล์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง.....	18
2.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก.....	19
2.5.4 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกโดยวิธีคาร์บาโซล	
2.5.4.1 การตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิก.....	19
2.5.4.2 การละลายกรดไฮยาลูโรนิก.....	20
2.5.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกโดยวิธี คาร์บาโซล.....	20
2.5.5 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก	
2.5.5.1 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก โดยอาศัยความหนืด.....	20
2.5.5.2 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกด้วย เครื่อง Capillary Electrophoresis.....	21

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3 ผลการทดลอง	
3.1 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดย <i>Streptococcus zooepidemicus</i> สายพันธุ์ UN-7 ในระดับขวดเขย่า	
3.1.1 การเจริญของเชื้อ <i>Streptococcus zooepidemicus</i> สายพันธุ์ UN-7 ในอาหารเตรียมหัวเชื้อ.....	22
3.1.2 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น.....	24
3.1.3 การหาความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการ การผลิตกรดไฮยาลูโรนิก.....	24
3.2 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดย <i>Streptococcus zooepidemicus</i> สายพันธุ์ UN-7 ในระดับถึงหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อ น้ำหนักรีดของกรดไฮยาลูโรนิก	
3.2.1 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถึงหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ ความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น 3 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm และความเร็วยรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที.....	28
3.2.2 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถึงหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ ความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm และความเร็วยรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที.....	31
3.2.3 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถึงหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ ความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm และความเร็วยรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที.....	34
3.2.4 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถึงหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ ความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm และความเร็วยรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที.....	37
3.2.5 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถึงหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ ความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm และความเร็วยรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที.....	41
3.2.6 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับถึงหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ ความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm และความเร็วยรอบในการกวน 400 รอบต่อนาที.....	45

สารบัญญ (ต่อ)	หน้า
บทที่	
3.2.7 การผลิตกรดไฮยาโลโรนิกในระดับถึงหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ ความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 500 รอบต่อนาที.....	49
3.2.8 ผลของไลโซไซม์และซูโครสต่อการผลิตกรดไฮยาโลโรนิก ในระดับถึงหมักขนาด 5 ลิตร	
3.2.8.1 การเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 3 และชั่วโมงที่ 6 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 20,000 และ 60,000 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ.....	53
3.2.8.2 การเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 3 และชั่วโมงที่ 6 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 200,000 และ 600,000 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ.....	57
3.2.8.3 การเติมซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 18 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร.....	62
3.2.8.4 การทดสอบความเสถียรของประสิทธิภาพของเชื้อ <i>S. zooepidemicus</i> UN-7 ในการผลิตกรด ไฮยาโลโรนิก.....	65
3.2.8.5 การผลิตกรดไฮยาโลโรนิกในระดับถึงหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อมีการเติมไลโซไซม์ร่วมกับซูโครสลงในอาหารเลี้ยง เชื้อระหว่างการหมัก.....	68
3.2.9 การเปรียบเทียบค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาโลโรนิก ที่ได้จากการทดลอง.....	71
3.2.10 การศึกษาวิธีวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาโลโรนิกด้วย เครื่อง Capillary Electrophoresis	
3.2.10.1 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาโลโรนิก ด้วยเครื่อง Capillary Electrophoresis โดยใช้ 25 มิลลิ โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 4.0) เป็น running buffer.....	74

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3.2.10.2 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก ด้วยเครื่อง Capillary Electrophoresis โดยใช้ 0.5 % pullulan ใน 25 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 4.0) เป็น running buffer.....	76
3.2.10.3 การหาค่า migration time ของ NTS และกรด ไฮยาลูโรนิก ทั้ง 2 ชนิด โดยทำการทดลองครั้งละ 1 ตัวอย่าง.....	78
4 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	81
รายการอ้างอิง.....	87
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	93
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	94
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน.....	96
ภาคผนวก ง การย่อยแลคติกเคซินด้วยเอนไซม์.....	98
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	100

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ที่ระยะเวลาต่างๆ ของเชื้อ <i>Streptococcus zooepidemicus</i> สายพันธุ์ UN-7.....	22
3.2 เปรียบเทียบ ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาโลโรนิก และ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมักของ <i>Streptococcus zooepidemicus</i> สายพันธุ์ UN-7 โดยใช้อายุหัวเชื้อตั้งต้นเป็น 7, 8, 9 และ 10 ชั่วโมง ที่ระยะเวลาการหมัก 36 และ 48 ชั่วโมง.....	26
3.3 เปรียบเทียบ ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาโลโรนิก และ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมักของ <i>Streptococcus zooepidemicus</i> สายพันธุ์ UN-7 เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น เป็น 3, 5, 10, 15 และ 20 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง.....	27
3.4 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาโลโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 3 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที.....	29
3.5 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาโลโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที.....	32
3.6 ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาโลโรนิกที่ผลิตโดย <i>Streptococcus zooepidemicus</i> สายพันธุ์ UN-7 เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที.....	34
3.7 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาโลโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที.....	35

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า	
3.8	ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาโลโรนิกที่ผลิตโดย <i>Streptococcus zooepidemicus</i> สายพันธุ์ UN-7 เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที.....	37
3.9	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาโลโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที.....	38
3.10	ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาโลโรนิกที่ผลิตโดย <i>Streptococcus zooepidemicus</i> สายพันธุ์ UN-7 เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที.....	40
3.11	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาโลโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที.....	42
3.12	ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาโลโรนิกที่ผลิตโดย <i>Streptococcus zooepidemicus</i> สายพันธุ์ UN-7 เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที.....	44
3.13	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาโลโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 400 รอบต่อนาที.....	46
3.14	ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาโลโรนิกที่ผลิตโดย <i>Streptococcus zooepidemicus</i> สายพันธุ์ UN-7 เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 400 รอบต่อนาที.....	48

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
3.15	50
คำนำหน้าเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้น ของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm และความเร็ว รอบในการกวน 500 รอบต่อนาที.....	
3.16	52
คำนำหน้าโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตโดย <i>Streptococcus</i> <i>zooepidemicus</i> สายพันธุ์ UN-7 เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 500 รอบต่อนาที.....	
3.17	54
คำนำหน้าเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้น ของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm ความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที และมีการเติมไลโซไซม์ลงใน อาหารเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 3 และชั่วโมงที่ 6 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 20,000 และ 60,000 ยูนิต์ต่อลิตร ตามลำดับ.....	
3.18	56
คำนำหน้าโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตโดย <i>Streptococcus</i> <i>zooepidemicus</i> สายพันธุ์ UN-7 เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm ความเร็วรอบในการกวน เป็น 300 รอบต่อนาที และมีการเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 3 และชั่วโมงที่ 6 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 20,000 และ 60,000 ยูนิต์ต่อลิตร ตามลำดับ.....	
3.19	58
คำนำหน้าเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้น ของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm ความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที และมีการเติมไลโซไซม์ลงใน อาหารเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 3 และชั่วโมงที่ 6 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 200,000 และ 600,000 ยูนิต์ต่อลิตร ตามลำดับ.....	

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
<p>3.20 คำนำน้าหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตโดย <i>Streptococcus zooepidemicus</i> สายพันธุ์ UN-7 เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm ความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที และมีการเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 3 และชั่วโมงที่ 6 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 200,000 และ 600,000 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ.....</p>	61
<p>3.21 คำนำน้าหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm ความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที และมีการเติมซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 18 ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร.....</p>	63
<p>3.22 คำนำน้าหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตโดย <i>Streptococcus zooepidemicus</i> สายพันธุ์ UN-7 เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm ความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที และมีการเติมซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 18 ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร.....</p>	65
<p>3.23 คำนำน้าหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก จากการทดสอบความเสถียรของประสิทธิภาพของเชื้อ <i>S. zooepidemicus</i> UN-7 ในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดยใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที.....</p>	66
<p>3.24 คำนำน้าหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก จากการทดสอบความเสถียรของประสิทธิภาพของเชื้อ <i>S. zooepidemicus</i> UN-7 ในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดยใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที.....</p>	68

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า	
3.25	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ที่เหลืออยู่ภายหลังการหมักที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้น ของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm ความเร็วรอบในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที และมีการเติมไลโซไซม์ลงใน อาหารเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 3 และชั่วโมงที่ 6 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 200,000 และ 600,000 ยูนิต์ต่อลิตร ตามลำดับ และมีการเติมซูโครสที่ชั่วโมงที่ 15 ที่ความเข้มข้น เท่ากับ 8 กรัมต่อลิตร.....	69
3.26	ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตโดย <i>Streptococcus</i> <i>zooepidemicus</i> สายพันธุ์ UN-7 เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm ความเร็วรอบในการกวน เป็น 300 รอบต่อนาที และมีการเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 3 และชั่วโมงที่ 6 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 200,000 และ 600,000 ยูนิต์ต่อลิตร ตามลำดับ และเติมซูโครสที่ชั่วโมงที่ 15 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 8 กรัมต่อลิตร.....	71
3.27	เปรียบเทียบค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตโดยกระบวนการหมัก ด้วย <i>Streptococcus zooepidemicus</i> สายพันธุ์ UN-7 ในทุกการทดลอง.....	82

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	แสดงโครงสร้างของกรดไฮยาโลโรนิก.....	2
1.2	แสดงกลไกการสังเคราะห์กรดไฮยาโลโรนิก.....	8
3.1	แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อ <i>Streptococcus zooepidemicus</i> สายพันธุ์ UN-7 ในอาหารเหลว BHI ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....	23
3.2	แสดงการเจริญ และการผลิตกรดไฮยาโลโรนิกของเชื้อ <i>Streptococcus zooepidemicus</i> สายพันธุ์ UN-7 เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 3 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที.....	31
3.3	แสดงการเจริญ และการผลิตกรดไฮยาโลโรนิกของเชื้อ <i>Streptococcus zooepidemicus</i> สายพันธุ์ UN-7 เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที.....	33
3.4	แสดงการเจริญ และการผลิตกรดไฮยาโลโรนิกของเชื้อ <i>Streptococcus zooepidemicus</i> สายพันธุ์ UN-7 เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที.....	38
3.5	แสดงการเจริญ และการผลิตกรดไฮยาโลโรนิกของเชื้อ <i>Streptococcus zooepidemicus</i> สายพันธุ์ UN-7 เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที.....	42
3.6	แสดงการเจริญ และการผลิตกรดไฮยาโลโรนิกของเชื้อ <i>Streptococcus zooepidemicus</i> สายพันธุ์ UN-7 เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที.....	47
3.7	แสดงการเจริญ และการผลิตกรดไฮยาโลโรนิกของเชื้อ <i>Streptococcus zooepidemicus</i> สายพันธุ์ UN-7 เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm และความเร็วรอบในการกวน 400 รอบต่อนาที.....	52

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
3.8 แสดงการเจริญ และการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อ <i>Streptococcus zooepidemicus</i> สายพันธุ์ UN-7 เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm และความเร็รรอบในการกวน 500 รอบต่อนาที.....	56
3.9 แสดงการเจริญ และการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อ <i>Streptococcus zooepidemicus</i> สายพันธุ์ UN-7 เมื่อมีการเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ชั่วโมงที่ 3 และชั่วโมงที่ 6 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 20,000 และ 60,000 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ.....	61
3.10 แสดงการเจริญ และการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อ <i>Streptococcus zooepidemicus</i> สายพันธุ์ UN-7 เมื่อมีการเติมไลโซไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ชั่วโมงที่ 3 และชั่วโมงที่ 6 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 200,000 และ 600,000 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ.....	65
3.11 แสดงการเจริญ และการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อ <i>Streptococcus zooepidemicus</i> สายพันธุ์ UN-7 เมื่อมีการเติมซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ชั่วโมงที่ 18 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร.....	70
3.12 แสดงการเจริญ และการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก จากการทดสอบความเสถียรของประสิทธิภาพของเชื้อ <i>S. zooepidemicus</i> UN-7 ในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก โดยมีภาวะในการหมักเหมือนกับการทดลองในข้อ 3.2.5.....	74
3.13 แสดงการเจริญ และการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อ <i>Streptococcus zooepidemicus</i> สายพันธุ์ UN-7 เมื่อมีการเติมไลโซไซม์ที่ชั่วโมงที่ 3 และ 6 ที่ความเข้มข้น 200,000 และ 600,000 ยูนิตต่อลิตร และเติมซูโครสที่ชั่วโมงที่ 15 ที่ความเข้มข้น 8 กรัมต่อลิตร.....	78
3.14 แสดง electropherogram ของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จาก <i>Streptococcus zooepidemicus</i> (Sigma) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 0.85 ถึง 1.60×10^6 ดัลตัน โดยมี NTS เป็น internal standard.....	75
3.15 แสดง electropherogram ของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากสายสะดือมนุษย์ (Sigma) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 3.00 ถึง 5.80×10^6 ดัลตัน โดยมี NTS เป็น internal standard.....	75

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.16	แสดง electropherogram ของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จาก <i>Streptococcus zooepidemicus</i> (Sigma)(Mw = 0.85 ถึง 1.60×10^6 คัลตัน) เมื่อมีการเติม pullulan ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ โดยมี NTS เป็น internal standard.....	77
3.17	แสดง electropherogram ของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากสายสะดือมนุษย์ cord (Sigma)(Mw = 3.00 ถึง 5.80×10^6 คัลตัน) เมื่อมีการเติม pullulan ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ โดยมี NTS เป็น internal standard.....	77
3.18	แสดง electropherogram ของ NTS (internal standard) เมื่อมีการเติม pullulan ลงในสารละลายบัฟเฟอร์.....	79
3.19	แสดง electropherogram ของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จาก <i>Streptococcus zooepidemicus</i> (Sigma)(Mw = 3.00 ถึง 5.80×10^6 คัลตัน) โดยไม่มี NTS เป็น internal standard.....	79
3.20	แสดง electropherogram ของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากสายสะดือมนุษย์ cord (Sigma)(Mw = 3.00 ถึง 5.80×10^6 คัลตัน) โดยไม่มี NTS เป็น internal standard.....	80

คำย่อ

คำย่อ	คำอธิบาย
vvm	ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อหน้าที่
%	เปอร์เซ็นต์
rpm	รอบต่อนาที
Yp/s	ประสิทธิภาพในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก
mg	มิลลิกรัม
g	กรัม