การปรับปรุงสายพันธุ์ *Streptococcus zooepidemicus* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

นายทรงศักดิ์ พันธุ์วัฒนะสิงห์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2540

ISBN 974-638-895-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

STRAIN IMPROVEMENT OF *Streptococcus zooepidemicus* FOR HYALURONIC ACID PRODUCTION

Mr. Songsak Punwattanasing

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Biotechnology

Program of Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1997

ISBN 974-638-895-9

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การปรับปรุงสายพันธุ์ *Streptococcus zooepidemicus* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก
โดย	นาย ทรงศักดิ์ พันธุ์วัฒนะสิงห์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ วาสนา โตเลี้ยง

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์)

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

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

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

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ วาสนา โตเลี้ยง)

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

ทรงศักดิ์ พันธุ์วัฒนะสิงห์ : การปรับปรุงสายพันธุ์ *Streptococcus zooepidemicus* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก (STRAIN IMPROVEMENT OF *Streptococcus zooepidemicus* FOR HYALURONIC ACID PRODUCTION) อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ.ดร. นลิน นิลอุบล, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ, อาจารย์วาสนา โตเลี้ยง, 138 หน้า. ISBN 974-638-895-9

การปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อ *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35247 ให้มีประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูงและไม่มีการผลิตสเตรปโตไลซิน โดยการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตในขั้นตอนแรกและตามด้วย NTG ในขั้นตอนต่อมา การคัดเลือกสายพันธุ์กลายในขั้นปฐมภูมิอาศัยลักษณะของโคโลนีในการคัดเลือกโดยคัดเลือกโคโลนีที่มีขนาดใหญ่ มีเมือกมาก และเมื่อเพาะเลี้ยงบนผิวหน้าอาหารแข็งที่มีเลือดผสมอยู่ไม่มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ส่วนการคัดเลือกในขั้นทุติยภูมิใช้ค่าปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกในน้ำหมักซึ่งวิเคราะห์ได้โดยการหาปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกด้วยปฏิกิริยาคาร์บาโซล พบว่า สายพันธุ์ ATCC 35247 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นในการกลายพันธุ์ตามงานวิจัยนี้ผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้ ประมาณ 600 มิลลิกรัมต่อลิตรในช่วง 36 ชั่วโมงของการหมัก หลังจากการกลายพันธุ์สามารถคัดเลือกได้สายพันธุ์ UN-7 ซึ่งผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้ประมาณ 800 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 36 ชั่วโมง โดยสายพันธุ์ UN-7 สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นร้อยละ 33.33 เมื่อทำการหมักในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร สายพันธุ์ UN-7 สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้เพิ่มขึ้นจากการหมักในระดับขวดเขย่า โดยให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงถึง 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 36 ชั่วโมง ความสามารถในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของสายพันธุ์ UN-7 นี้จะไม่คงที่ในช่วง 1 ถึง 10 ครั้งของการถ่ายเชื้อแต่จะเริ่มคงที่ในช่วง 10 ถึง 30 ครั้งของการถ่ายเชื้อโดยให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกประมาณ 800 มิลลิกรัมต่อลิตรเมื่อทดสอบในการหมักระดับขวดเขย่าที่ระยะเวลาการหมัก 36 ชั่วโมง เชื้อสายพันธุ์ UN-7 ไม่สร้างสเตรปโตไลซินเมื่อเจริญบนอาหารแข็งที่มีเลือดผสมอยู่ ดังนั้นกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตได้จึงไม่มีการปนเปื้อนของสเตรปโตไลซิน

ภาควิชา ..... ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2540 ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

C827239 MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: *Streptococcus zooepidemicus*/ HYALURONIC ACID/ MUTATION/ PRODUCTION

SONGSAK PUNWATTANASING : STRAIN IMPROVEMENT OF *Streptococcus zooepidemicus* FOR HYALURONIC ACID PRODUCTION. THESIS ADVISOR: ASSO. PROF. NALINE NILUBOL, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR: ASSO. PROF. PAIROH PINPHANICHAKARN, Ph.D., VASANA TOLEING, M.Sc. 138 pp. ISBN 974-638-895-9

Strain improvement of *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35247 to have high ability to produce hyaluronic acid and free from streptolysin was performed by mutating with ultraviolet in the first step and NTG for the sub-sequence step. Primary screening for the mutants was by selectiny for large mucoid colonies which were unable to hydrolyze red blood cells when cultivated on blood agar plate. Secondary screening was by determining hyaluronic acid concentration in the culture broth by carbazole reaction. *S. zooepidemicus* ATCC 35247 capable to produce hyaluronic acid about 600 milligrams per liter of culture broth at 36 hours of fermentation was used as a parental strain for this investigation. After mutation, strain UN-7 capable to produce hyaluronic acid of about 800 mg/l at the same cultivation time as that of the parental strain was selected. The level of hyaluronic acid produced by this mutant was 33.33 percent higher than that of the parental strain. Cultivation of UN-7 in a 5 l-fermentor yielded hyaluronic acid of about 1000 mg/l at 36 hours which was higher than that of the shaken flask, However, the ability for hyaluronic acid production by this mutant was unstable when subculturing between 1-10 times, but it seemed to be stable during 10-30 times of subculturing with production ability of about 800 mg/l. Furthermore, there was no streptolysin activity detected from blood agar plate culture of UN-7. This confirmed that the hyaluronic acid produced by this mutant was free from streptolysin.

ภาควิชา..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2540 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาระดับปริญญามหาบัณฑิต และวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จด้วยความสมบูรณ์ โดยได้รับความกรุณาจาก รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และอาจารย์วาสนา โตเลี้ยง ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ตลอดจนให้คำแนะนำแนวทางการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ซึ่งกระผมขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้อย่างสูงยิ่ง

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คณะบุคลากรทุกท่านในสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความสะดวกในด้าน อุปกรณ์ สารเคมีในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือด้านเงินทุนอุดหนุนเพื่อทำการวิจัยในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่ ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่สำคัญสำหรับการทำวิจัยตลอดเวลา

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณ เพื่อนกลุ่มชีววิทยา รุ่น 16 มศว. ประสานมิตร และเพื่อนๆและพี่ๆทุกคน ตลอดจนถึงน้องทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ ให้กำลังใจด้วยดีมาตลอด

ความดีของการศึกษาและคุณค่าของวิทยานิพนธ์นี้ข้าพเจ้าขออุทิศแด่บูรพาจารย์และผู้มีพระคุณทุกท่าน

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญรูป..... ธ

คำย่อ..... ผ

บทที่

1 บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมา..... 1

1.2 คุณสมบัติของกรดไฮยาลูโรนิก..... 2

1.3 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิก.....

1.3.1 การผลิตโดยการสกัดจากเซลล์ของสิ่งมีชีวิต..... 5

1.3.2 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกโดยการสังเคราะห์จากโมเลกุลน้ำตาลที่จับกับนิวคลีโอไทด์..... 7

1.3.3 การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกจากกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์..... 10

1.4 ชีวเคมีของการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก..... 12

1.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก..... 15

1.6 ประโยชน์ของกรดไฮยาลูโรนิก..... 18

1.7 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ และสิ่งก่อการกลายพันธุ์..... 19

1.8 การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลาย..... 21

1.9 การกลายพันธุ์และการคัดเลือกสายพันธุ์ *Streptococcus* sp. เพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิก..... 21

1.10 มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย..... 22

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	1.11 ขั้นตอนการวิจัย	23
2	วิธีการทดลอง	
	2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	24
	2.2 เชื้อจุลินทรีย์	26
	2.3 การเก็บรักษาและการเลี้ยงเชื้อ	26
	2.4 วิธีวิเคราะห์	27
	2.5 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์กับ *Streptococcus zooepidemicus* ด้วยสิ่งก่อการกลายพันธุ์	30
3	ผลการทดลอง	
	3.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 และ 35247 เพื่อใช้เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์	
	3.1.1 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น	33
	3.1.2 การคัดเลือกสูตรอาหารสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก	36
	3.1.3 ผลของความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก	39
	3.1.4 ผลของสารสกัดจากยีสต์ต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก	44
	3.1.5 ผลของชนิดของน้ำตาลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก	44
	3.1.6 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นอาหารในการเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น	51
	3.1.7 การเปรียบเทียบการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกเมื่อใช้เคซีนจากการย่อยสลายโดยเอนไซม์ปาเปนเป็นแหล่งอาหาร	60
	3.1.8 การพัฒนาการวิเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกจากน้ำหมัก	66
	3.1.9 ลักษณะการเจริญ การผลิตกรดไฮยาลูโรนิก และการใช้น้ำตาลของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการทดลอง	68

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	3.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์กับเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 ด้วยสารเคมี NTG และการคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูง.....	
	3.2.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 ด้วยสารเคมี NTG.....	
	3.2.1.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG ที่ละลายในทริส-มาเลอิก บัฟเฟอร์ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0.....	71
	3.2.1.2 การเปรียบเทียบร้อยละการรอดของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 เมื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG ในสภาพค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 และ 8.0.....	72
	3.2.1.3 การหาความเข้มข้นของ NTG ที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ที่ภาวะค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0.....	75
	3.2.2 การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูงหลังจากผ่านการกลายพันธุ์ด้วย NTG.....	77
	3.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่ได้จากการกลายพันธุ์เชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 ด้วย NTG หลังจากถ่ายเชื้อบนอาหารวุ้นแข็ง BHI เป็นจำนวน 5 ครั้ง.....	80
	3.3 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์กับเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตและการคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูง.....	
	3.3.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต.....	82
	3.3.2 การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูงหลังจากผ่านการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต.	84

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	3.3.3 การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้จากการกลายพันธุ์เชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตหลังจากถ่ายเชื้อบนอาหารวุ้นแข็งลาดเอียง BHI	85
	3.4 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำกับเชื้อ *S. zooepidemicus* U-8 ด้วยสารเคมี NTG และการคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูง.	
	3.4.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำกับ *S. zooepidemicus* U-8 ด้วยสารเคมี NTG	87
	3.4.2 การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ใหม่ซึ่งมีประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูงที่ได้จากการกลายพันธุ์เชื้อ *S. zooepidemicus* U-8 ซ้ำด้วย NTG	89
	3.4.3 การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้จากการกลายพันธุ์เชื้อ *S. zooepidemicus* U-8 ด้วย NTG หลังจากการถ่ายเชื้อบนอาหารวุ้นแข็ง BHI เป็นจำนวน 5 ครั้ง	89
	3.5 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำกับเชื้อ *S. zooepidemicus* UN-5 ด้วย NTG และการคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูง.....	
	3.5.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำกับเชื้อ *S. zooepidemicus* UN-5 ด้วย NTG	91
	3.5.2 การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ใหม่ซึ่งมีประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูง ที่ได้จากการกลายพันธุ์ *S. zooepidemicus* UN-5 ซ้ำด้วย NTG	93
	3.5.3 การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้จากการกลายพันธุ์เชื้อ *S. zooepidemicus* UN-5 ด้วย NTG ภายหลังจากการถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง	93

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	3.6 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำกับเชื้อ *S. zooepidemicus* UN-5 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตและการคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูง	
	3.6.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำกับเชื้อ *S. zooepidemicus* UN-5 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต	96
	3.6.2 การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ซึ่งมีประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูง	97
	3.6.3 การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อสายพันธุ์ UNU-2, UNU-5, UNU-11, UNU-6 และ UNU-29 ที่คัดเลือกได้จากการกลายพันธุ์เชื้อ *S. zooepidemicus* UN-5 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต หลังการถ่ายเชื้อบนอาหารวุ้นแข็งสูตรดัดแปลง BHI จำนวน 5 ครั้ง	99
	3.7 ความเสถียรของเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* ATCC 35247 และเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่ได้ในแต่ละขั้นของการกลายพันธุ์	101
	3.8 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* ATCC 35247, เชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้ในแต่ละขั้นตอนของการกลายพันธุ์และสายพันธุ์ *S. zooepidemicus* ATCC 39920 หลังการถ่ายเชื้อไป 30 ครั้ง	104
	3.9 ลักษณะการเจริญ การผลิตกรดไฮยาลูโรนิก และการใช้น้ำตาลของเชื้อ *S. zooepidemicus* UN-7 ในอาหารเหลวสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก (PM3) ในระดับขวดเขย่า	105
	3.10 ประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อ *S. zooepidemicus* UN-7 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อใช้อาหารเหลวสูตรสำหรับการผลิต PM3	108

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	3.11 ประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อ *S. zooepidemicus* UN-7 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อใช้อาหารสูตรสำหรับการผลิต (PM3) ที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร และควบคุมภาวะในการหมักตามรายงานของ John, Goh และ Oeggerli (1994)	111
4	สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	114
รายการอ้างอิง		118
ภาคผนวก		
	ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	124
	ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	127
	ภาคผนวก ค การวิเคราะห์แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์	129
	ภาคผนวก ง กราฟมาตรฐาน	132
	ภาคผนวก จ การย่อยแลกติกเคซีนด้วยเอนไซม์	136
ประวัติผู้เขียน		138

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

3.1 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *S. zooepidemicus* สายพันธุ์ ATCC 35246 และ 35247 ในอาหารเหลว BHI 34

3.2 เปรียบเทียบการเจริญและการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อ *S. zooepidemicus* สายพันธุ์ ATCC 35247 และสายพันธุ์ ATCC 35246 เมื่อเลี้ยงในอาหาร PM1, PM2 และ PM3 ที่ระยะเวลาการหมัก 0, 24 และ 48 ชั่วโมง 37

3.3 เปรียบเทียบการเจริญและปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตโดยเชื้อ *S. zooepidemicus* สายพันธุ์ ATCC 35247 เมื่อหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 2-20 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 0, 24 และ 48 ชั่วโมง 40

3.4 เปรียบเทียบการเจริญและปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตโดยเชื้อ *S. zooepidemicus* สายพันธุ์ ATCC 35247 เมื่อหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 2-5 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 0, 24 และ 48 ชั่วโมง 42

3.5 เปรียบเทียบการเจริญและปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตโดยเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 เมื่อหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ต่างกัน ที่ระยะเวลาการหมัก 0, 24 และ 48 ชั่วโมง 45

3.6 เปรียบเทียบการเจริญและปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตโดยเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 เมื่อหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆกันความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 0, 24 และ 48 ชั่วโมง 47

3.7 เปรียบเทียบการเจริญและปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตโดยเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 เมื่อหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นต่างกัน ที่ระยะเวลาการหมัก 0, 24 และ 48 ชั่วโมง 49

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
3.8	เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 ในอาหาร BHI และอาหารสูตรสำหรับการผลิต (production medium, PM3) ที่มีความเข้มข้นของเปปโตนในระดับต่างๆ	52
3.9	เปรียบเทียบปริมาณเซลล์และกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการหมักโดยใช้หัวเชื้อที่เลี้ยงด้วย BHI และอาหารสูตร PM3 + 2.0%peptone	54
3.10	เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 ในอาหารเหลว BHI และอาหารเหลว TSB	56
3.11	เปรียบเทียบปริมาณเซลล์และกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการหมักโดยใช้หัวเชื้อตั้งต้นที่เลี้ยงในอาหารเหลว BHI และอาหารเหลว TSB	58
3.12	แสดงปริมาณไทโรซีนที่ได้จากการย่อยเคซีนด้วยเอนไซม์ปาเปนความเข้มข้น 400-2000 ยูนิต	61
3.13	แสดงปริมาณไทโรซีนที่ได้จากการย่อยเคซีนด้วยเอนไซม์ปาเปนความเข้มข้น 2000-4000 ยูนิต	61
3.14	เปรียบเทียบการเจริญและปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตโดยเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้เคซีนที่ย่อยแล้วของบริษัท Fluka และแลกติกเคซีนที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน ที่ระยะเวลาการหมัก 0, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง	64
3.15	เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่ได้จากการตกตะกอนน้ำหมักด้วย 4% CPC และเอธานอล 95%	67
3.16	แสดงค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือหลังการหมักและปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 เป็นเวลา 48 ชั่วโมงในอาหารสูตรสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก (PM3 ที่ได้จากการปรับปรุงตาม 3.1.2-3.1.7)	69
3.17	จำนวนเซลล์ที่อยู่รอดในแต่ละช่วงความเข้มข้นของ NTG ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0 เพื่อชักนำให้เชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 เกิดการกลายพันธุ์	72

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
3.18	เปรียบเทียบผลของค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 และ 8.0 ต่อจำนวนเซลล์ที่อยู่รอดในแต่ละช่วงความเข้มข้นต่างๆของ NTG	74
3.19	แสดงจำนวนเซลล์ที่อยู่รอดในแต่ละช่วงความเข้มข้นของ NTG ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0 เพื่อชักนำให้เชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 เกิดการกลายพันธุ์	76
3.20	แสดงค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือหลังการหมักและปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น และเชื้อที่ได้จากการกลายพันธุ์เมื่อทำการหมักเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง ในอาหารสูตร PM3	78
3.21	แสดงค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือภายหลังการหมักและปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้ เมื่อทำการหมักเพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิกเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมงโดยเชื้อสายพันธุ์กลายที่ถ่ายเชื้อบนอาหารแข็งลาดเอียง BHI เป็นจำนวน 5 ครั้ง	81
3.22	เปรียบเทียบค่าร้อยละการรอดของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 ที่ระยะเวลาต่างๆกันในการฉายแสงอัลตราไวโอเลต	83
3.23	เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณน้ำตาลที่เหลือ เมื่อเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 และเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้ในอาหารสูตร PM3 ที่ระยะเวลาการหมัก 36 ชั่วโมง	85
3.24	เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ของเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* ATCC 35247 และเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้เมื่อถ่ายเชื้อไป 5 ครั้ง ที่ระยะเวลาการหมัก 36 ชั่วโมง	86
3.25	เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ของเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* ATCC 35247 และเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้เมื่อถ่ายเชื้อไป 10 ครั้ง ที่ระยะเวลาการหมัก 36 ชั่วโมง	87

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
3.26	แสดงจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตในแต่ละค่าความเข้มข้นของ NTG ที่ใช้ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์กับเชื้อ *S. zooepidemicus* U-8	88
3.27	เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกและร้อยละการเพิ่มขึ้นของผลิตภัณฑ์ของเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่ได้และสายพันธุ์ตั้งต้น U-8 ที่ระยะเวลาการหมัก 36 ชั่วโมง	90
3.28	แสดงค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกและร้อยละการเพิ่มขึ้นของผลิตภัณฑ์ของเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่ได้ภายหลังการถ่ายเชื้อไป 5 ครั้ง ที่ระยะเวลาการหมัก 36 ชั่วโมง	91
3.29	แสดงจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตและร้อยละการอยู่รอดของเชื้อสายพันธุ์ UN-5 ในแต่ละความเข้มข้นของ NTG	92
3.30	แสดงค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกและค่าร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์ เมื่อหมักโดยเชื้อสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ *S. zooepidemicus* UN-5 ด้วย NTG	94
3.31	แสดงค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกและค่าร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์ เมื่อหมักโดยเชื้อสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ *S. zooepidemicus* UN-5 ด้วย NTG ที่ถ่ายเชื้อมาแล้ว BHI เป็นจำนวน 5 ครั้ง	95
3.32	แสดงจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตและค่าร้อยละการอยู่รอดของเชื้อ *S. zooepidemicus* UN-5 ที่ระยะเวลาของการฉายแสงอัลตราไวโอเลตต่างๆ	96
3.33	แสดงค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกและค่าร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์ เมื่อหมักโดยเชื้อสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ *S. zooepidemicus* UN-5 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต.	98
3.34	แสดงค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกและค่าร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์ เมื่อหมักโดยเชื้อสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ *S. zooepidemicus* UN-5 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่มีการถ่ายเชื้อไปแล้ว 5 ครั้ง	100

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
3.35	เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* ATCC 35247 และเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่ได้ในแต่ละขั้นของการกลายพันธุ์ ในอาหารเหลวสูตร PM3 หลังการถ่ายเชื้อไป 1, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 ครั้ง ตามลำดับ	102
3.36	เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือและปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการหมักเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่ได้จากการทดลองกับเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น ATCC 35247 และเชื้อ ATCC 39920 ภายหลังการถ่ายเชื้อไป 30 ครั้ง เมื่อหมักเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง	104
3.37	เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือและปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก เมื่อทำการหมักเพื่อผลิตกรดไฮยาลูโรนิกด้วยเชื้อ *S. zooepidemicus* UN-7 ในระดับขวดเขย่าเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บผลทุกๆ 4 ชั่วโมง	106
3.38	เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือหลังการหมักและปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการหมักของ *S. zooepidemicus* UN-7 ที่ระยะเวลาต่างๆในการหมัก ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อใช้อาหารสูตรสำหรับการผลิต PM3	109
3.39	เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือและปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการหมักของ *S. zooepidemicus* UN-7 ที่ระยะเวลาต่างๆในการหมัก ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อใช้อาหารสูตร PM3 ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร และควบคุมภาวะการหมักตาม John, Goh และ Oeggerli (1994)	112

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	แสดงโครงสร้างไดแซคคาไรด์ที่เป็นหน่วยย่อยของกรดไฮยาลูโรนิก.....	2
1.2	แสดงโครงสร้างของสารในกลุ่มไกลโคอะมิโนไกลแคน.....	4
1.3	แผนผังแสดงขั้นตอนการสกัดกรดไฮยาลูโรนิกจากเนื้อเยื่อสายสะดือของมนุษย์.	6
1.4	แสดงวิธีการสร้างกรดไฮยาลูโรนิกโดยการสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์.....	8
1.5	แสดงกลไกการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกจากน้ำตาลที่จับกับนิวคลีโอไทด์ด้วยการใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์.....	9
1.6	แสดงกลไกการสังเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกในทางชีวภาพ.....	14
1.7	แสดงโครงสร้างทางเคมีของ NTG.....	20
3.1	แสดงการเจริญของเชื้อ *S. zooepidemicus* สายพันธุ์ ATCC 35246 และสายพันธุ์ ATCC 35247 ในอาหารเหลว BHI ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....	35
3.2	แสดงปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการหมักโดยเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35246 และ 35247 ที่ระยะเวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง.....	38
3.3	แสดงผลของความเข้มข้นน้ำตาลที่ความเข้มข้น 2-20 กรัมต่อลิตรที่มีต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกจากเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 โดยใช้อาหารเหลว PM3 ที่ระยะเวลาการหมัก 0, 24 และ 48 ชั่วโมง.....	41
3.4	แสดงปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้เมื่อเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* สายพันธุ์ ATCC 35247 ในอาหารที่มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 2-5 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 0, 24 และ 48 ชั่วโมง.....	43
3.5	แสดงปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้เมื่อเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 ในอาหารที่มีความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ ที่ระยะเวลาในการหมัก 0, 24 และ 48 ชั่วโมง.....	46
3.6	แสดงปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 ในอาหารที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ ที่ระยะเวลาในการหมัก 0, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง.....	48

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.7	แสดงปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 ในอาหารที่มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสต่างๆ กัน ที่ระยะเวลาการหมัก 0, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง	50
3.8	เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 ในอาหารเหลว BHI และ PM3 ที่มีการเติมเปปโตนที่ความเข้มข้นต่างๆ	53
3.9	เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการใช้หัวเชื้อตั้งต้นที่เลี้ยงใน BHI และในอาหารสูตร PM3 + 2.0%peptone ต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก ที่ระยะเวลาในการหมัก 0, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง	55
3.10	เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 ในอาหารเหลว TSB และ BHI	57
3.11	เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการใช้หัวเชื้อตั้งต้นที่เลี้ยงในอาหารเหลว BHI และในอาหารเหลว TSB ที่ระยะเวลาการหมัก 0, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง	59
3.12	ความเข้มข้นของไทโรซีนที่ได้ในระหว่างการย่อยแลกติกเคซีนด้วยเอนไซม์ปาเปนความเข้มข้น 400-2000 ยูนิต	62
3.13	ความเข้มข้นของไทโรซีนที่ได้ในระหว่างการย่อยแลกติกเคซีนด้วยเอนไซม์ปาเปนความเข้มข้น 2000-4000 ยูนิต	63
3.14	เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ผลิตโดยเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้เคซีนที่ย่อยแล้วสำเร็จรูปของ Fluka และแลกติกเคซีนที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน ที่ระยะเวลาการหมัก 0, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง	65
3.15	เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากการตกตะกอนน้ำหมักด้วย 4% CPC และ 95% EtOH	67
3.16	ลักษณะการเจริญ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และน้ำตาลที่เหลือหลังการหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 ในอาหารสูตร PM3 ในระดับขวดเขย่า	70

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.17	ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการอยู่รอดของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 และความเข้มข้นของ NTG ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0	73
3.18	ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการอยู่รอดของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 และความเข้มข้นของ NTG ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0 และ 8.0	75
3.19	ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการรอดของเซลล์ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 และความเข้มข้นของ NTG ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0	76
3.20	ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการรอดของเชื้อ *S. zooepidemicus* ATCC 35247 และช่วงเวลาการฉายแสงอัลตราไวโอเลต	84
3.21	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ NTG และค่าร้อยละการอยู่รอดของเชื้อ *S. zooepidemicus* U-8	88
3.22	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ NTG และร้อยละการรอดของเชื้อ *S. zooepidemicus* UN-5	92
3.23	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการรอดของเชื้อ *S. zooepidemicus* UN-5 กับระยะเวลาในการฉายแสงอัลตราไวโอเลต	97
3.24	แสดงขั้นตอนของเชื้อที่ได้จากการกลายพันธุ์ในขั้นตอนต่างๆ และค่าร้อยละการเพิ่มของผลิตภัณฑ์ จากการถ่ายเชื้อครั้งแรก	102
3.25	เปรียบเทียบปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกของเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่ได้จากการกลายพันธุ์และเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น *S. zooepidemicus* ATCC 35247 ในแต่ละช่วงของการถ่ายเชื้อ	103
3.26	แสดงค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือและปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อทำการหมักด้วยเชื้อ *S. zooepidemicus* UN-7 โดยใช้อาหารสูตรสำหรับการผลิต PM3 ในระดับขวดเขย่า	107
3.27	แสดงค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือและปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อทำการหมักด้วยเชื้อ *S. zooepidemicus* UN-7 โดยใช้อาหารสูตรสำหรับการผลิต PM3 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร	110

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.28	แสดงค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลและปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อทำการหมักด้วยเชื้อ *S. zooepidemicus* UN-7 โดยใช้อาหารสูตรสำหรับการผลิต PM3 ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร และควบคุมภาวะการหมักตามรายงานของ John, Goh และ Oeggerli (1994)	113
4.1	สายพันธุ์กลายของเชื้อ *S. zooepidemicus* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ ซึ่งมีประสิทธิภาพการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูงในระดับขวดเขย่า เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ในอาหารสูตรสำหรับการผลิต PM3	117

คำย่อ

คำย่อ	คำอธิบาย
vvm	ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที
%	เปอร์เซ็นต์
w/v	น้ำหนักต่อปริมาตร
v/v	ปริมาตรต่อปริมาตร
μmol	ไมโครโมล
mmol	มิลลิโมล
μg	ไมโครกรัม
g	กรัม
mg	มิลลิกรัม
ϕ	เส้นผ่านศูนย์กลาง
rpm	รอบต่อนาที