รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ทิพวรรณ ว่องวิวิธกุล. 2539. การสกัดเฮพารินจากปอดสุกร. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ. 2539. การกลายพันธุ์และการคัดเลือกสายพันธุ์ *Candida oleophila* NNU-48 สำหรับการผลิตกรดมะนาวที่อุณหภูมิสูง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Akasaka, H., Komasaki, H. and Arai, T.1989. Fermentation Method for Producing Hyaluronic Acid. US Patent 4,801,539.

Akiyama, S., Suzuki, T., Sumino, Y., Nakao, Y., and Fukuda, H. 1973. Induction and Citric Acid Productivity of Fluoroacetate-sensitive Mutant Strains of *Candida lipolytica*. Agricultural and Biological Chemistry. 37(4): 879-884.

Akiyama, H., Shidawara, S., Mada, A., Toyoda, H., Toida, T. and Imanari, T. 1992. Chemiluminescence High-performance Liquid Chromatography for the Determination of Hyaluronic Acid, Chondroitin Sulphate and Dermatan Sulphate. Journal of Chromatography. 579 : 203-207.

Balaz, E. A. 1981. Hyaluronate Based Compositions and Cosmetic Formulations Containing same. US Patent 4,303,676.

Bernfeld, P. 1955. Amylase, α and β. In S.P. Colowick, and O.N. Kaplan (eds.), Method in Enzymology , Vol. 3, pp. 149-150. New York: Academic Press.

Bitter, T. and Muir, H. M., 1962. A Modified Uronic Acid Carbazole Reaction. Analytical Biochemistry. 4:330-334.

Bracke, W.J. and Thacker, K. 1985. Hyaluronic Acid from Bacterial Culture. US Patent 4,517,295.

Bridges, A. B., 1966. A Note on the Mechanism of UV Mutagenesis in *Escherichia coli* Mutation Research. 3:273-279.

Brown, K. K., Ruiz, L. C., Van de Rijn, I., Greene, N. D., Trump, S. L., Wilson, C. D. and Bryant, S. A. 1994. Method for the Microbiological Production of Non-antigenic Hyaluronic Acid. US Patent 5,316,926

Brown, K. K., Greene, N. D., Trump, S. L. and Bryant, S. A. 1992. Low Viscosity High Molecular Weight Filter Sterilizable Hyaluronic Acid. US Patent 5,093,487.

Brun, P., De Galateo, A., Camporese, A., Cortivo, R. and Abatangelo, G. 1990. Analysis of Hyaluronic Acid in Synovial Fluid by Reversed-phase Liquid Chromatography. Journal of Chromatography. 526:530-534.

Cifonelli, J. A. and Mayeda, M., 1957. The Purification of Hyaluronic Acid by the Use of Charcoal. Biochemica et Biophysica ACTA. 24:397-400.

Cleary, P. and Larkin, A. 1979. Hyaluronic acid Capsule : Strategy for Oxygen Resistance in Group A Streptococci. Journal of Bacteriology. 140 (3): 1090-1097.

Crater, L. D. 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.

Crueger, A. 1992. Mutagenesis. In H.J. Rehm, G. Reed, A. Puhler, and P. Stadler (eds.), A Multi-volume Comprehensive Treatise Biotechnology , Vol. 2, pp. 7-45. Weinheim: Verlag Chemie.

Deangelis, P. L., Papaconstantinou, J. and Weigel, P. H. 1993. Isolation of *Streptococcus pyogenes* Gene Locus that Direct Hyaluronan Biosynthesis in Acapsular Mutants and in Heterologous Bacteria. The Journal of Biological Chemistry. 268 (20): 14568-14571.

Dougherty, B. A. and Van de Rijn, I. 1993. Molecular Characterization of *has*B from an Operon Required for Hyaluronic Acid Synthesis in Group A Streptococci. Journal of Biological Chemistry. 268 (10): 7118-7124.

_____. 1994. Molecular Characterization of *has*A from an Operon Required for Hyaluronic Acid Synthesis in Group A Streptococci. Journal of Biological Chemistry. 269 (1): 169-175.

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.

Ellwood, C.D., Evan, C., Dunn, M.G., McInnes, N., Yeo, G.R. and Smith, J.K., 1995. Production of Hyaluronic Acid. US Patent 5,411,874.

Fantini, A. A., 1975. Strain Development.. Method in Enzymology. 43:24-41.

Galambos, T. J.,1967. The Reaction of Carbazole with Carbohydrates :Effect of Borate and Sulfamate on the Carbazole Color of Sugars. Analytical Biochemistry. 19:119-132.

Hamissa, F.A., Abou-Zied, A.A.,and Radwan, A.A. 1982. Induction and Selection of Improved Yeast Mutants for Citric Acid Production. Agricultural Waste. 4(1): 17-23.

Hassid, Z. W., 1992. Hyaluronic Acid and Hyaluronidase: McGraw-Hill Enzyclopedia of Science & Technology. vol 3. 7th eds.McGraw-Hill, Inc. New York. 555-556.

Hill F. R., 1965. Ultraviolet-induced Lethality and Reversion to Prototrophy in *Escherichia coli* Strains with Normal and Reduce Dark Repair Ability. Photochemistry and Photobiology. 4:563-568.

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

John, R. M., Goh, L. T. and Oeggerli, A., 1994. Effect of pH , Agitation and Aeration on Hyaluronic Acid Production by *Streptococcus zooepidemicus*. Biotechnology Letters. 16 (5): 507-512.

Kjems, E. and Lebech, K. 1976. Isolation of Hyaluronic Acid From Cultures of Streptococci in A Chemical Defined Medium. Acta Phatological of Microbiology Scandinavian Section B. 84:162-164.

Krause, R. M., 1972. In Streptococci and Streptococcal Diseases(Wannamaker, L. W., and Matsen, J. M. eds.) Academic Press. New York. 3-18.

Laurent, T. C., Ryan, M. and Pietruszkiewicz, A., 1960. Fractionation of Hyaluronic Acid : The Polydispersity of Hyaluronic Acid from the Bovine Vitrious Body. Biochemica et Biophysica Acta. 42:476-485.

Loprieno, N., Zetterberg, G., Guglielminetti, R. and Michel, E., 1964. The Lethal and Mutagenic Effect of *N*-nitroso-*N*-methylurethane and *N*-nitroso-*N*-ethylurethane in *Colletotrichum coccodes*. Mutation Research. 1:37-44.

Maclennan, A. P. 1956. The Production of Capsules, Hyaluronic Acid and Hyaluronidase by 25 Strains of Group C Streptococci. Journal of General Microbiology. 15: 485-491.

_____. 1956. The Production of Capsules, Hyaluronic Acid and Hyaluronidase by 25 Strains of Group A and Group C Streptococci. Journal of General Microbiology. 14: 134-142.

Mandell, D. J. and Greenberg, J., 1960. A New Chemical Mutagen for Bacteria, 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine. Biochemical and Biophysical Research Communications. 3 (6): 575-577.

Matsuoka, M., Veda, Y., and Aiba, S. 1980. Role and Control of Isocitrate Lyase in *Candida lipolytica*. Journal of Bacteriology. 144(2): 692-697.

Mickelson, M. N. 1964. Chemically Defined Medium for Growth of *Streptococcus pyogenes*. Journal of Bacteriology. 88 (1) : 158-164.

Miller, G.L. 1958. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry. 30: 426-428.

Morita, H. and Fujii, M., 1991. Process for Preparing Hyaluronic Acid. US Patent 5,071,751.

Nimrod, A., Greenman, B., Kannar, D., Lansberg, M. and Beck, Y., 1988. Method of Producing High Molecular Weight Sodium Hyaluronate by Fermentation of Streptococcus. US Patent 4,780,414.

Nimrod, A., Greenman, B., Kanner, D. and Lansberg, M., 1988. High Molecular Weight Sodium Hyaluronate. US Patent 4,784,990.

Noack, W., Fischer, M., Forster, K., Rovati, L. and Setnikar, I. 1994. Glucosamine Sulfate in Osteoarthritis of the Knee. Osteoarthritis and Cartilage. 2(1): 1-8.

O' Regan, M., Matini, I., Crescenzi, F., De luca, C. and Lansing, M. 1994. Molecular Mechanism and Genetic of Hyaluronan Biosynthesis. International Journal Biological Macromolecule. 16(6): 283-286.

Payan, E., Jouzeau, J. Y., Lapicque, F. and Muller, N. 1991. Assay of Synovial Fluid Hyaluronic Acid Using High-performance Liquid Chromatography of Hyaluronidase Digests. Journal of Chromatography. 566 : 9-18.

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.

Roseman, S., Moses, F. E., Ludowieg, J. and Dorfman, A. 1953. The Biosynthesis of Hyaluronic Acid by Group A Streptococcus. Journal of Biochemistry. 213-225.

Stoolmiller, A. C. and Dorfman, A. 1969. The Biosynthesis of Hyaluronic Acid by Streptococcus. The Journal of Biological Chemistry. 244 (2): 236-246.

Swann, A.D., Sullivan, P.B., Jamieson, G. Richardson, R.K. and Singh, T. 1990. Biosynthesis of Hyaluronic Acid. US Patent 4,897,349.

Stanbury, P.F., and Whitaker, A. 1984. Principle of Fermentation Technology. Oxford: Pergamon Press.

Suzuki, T., Sumino, Y., Akiyama, S., and Fukuda, H. 1974. Method for Producing Citric Acid. US Patent 3801.455

Thoma, R.W. 1971. Use of Mutagens in the Improvement of Production Strains of Microorganisms. Folia Microbiologica. 16 : 197-204.

Thonard, J. C., Migliore, S. A. and Blustein, R. 1964. Isolation of Hyaluronic Acid from Broth Culture of Streptococci. The Journal of Biological Chemistry. 239 (3): 726-728.

Toyoda, H., Motoki, K., Tanikawa, M., Akiyama, H. and Imanari, T. 1991. Determination of Human Urinary Hyaluronic Acid, Chondroitin Sulphate and Dermatan Sulphate as their Unsaturated Disaccharides by High-performance Liquid Chromatography. Journal of Chromatography. 565 : 141-148.

Van de Rijn, I. 1983. Streptococcal Hyaluronic acid : Proposed Mechanism of Degradation and Loss of Synthesis During Stationary Phase. Journal of Bacteriology. 156 (3): 1059-1056.

Van de Rijn, I. and Kessler, R. E. 1980. Growth Characteristics of Group A Streptococci in New Chemically Defined Medium. Infection and Immunity. 27 (2) :444-448

Wacker, A., 1963. Molecular Mechanism of Radiation Effect .Progress in Nucleic Acids Research. 1 : 369-399.

Witkin, M. E., 1969. Ultraviolet-induced Mutation and DNA-repair. Mutation Research. 6 : 525-552.

Woolcock, J.B. 1974. The Capsule of *Streptococcus equi*. Journal of General Microbiology. 85 : 372-375.

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

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

1.1 อาหารเหลว BHI

ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

Calf Brains, Infusion from	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
p-Aminobenzoic Acid	0.05	กรัม

วิธีการเตรียม ละลายอาหาร 37 กรัมในน้ำ 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์ ใส่อาหารเหลว BHI ปริมาตร 50 มิลลิลิตรลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

1.2 อาหารวุ้นแข็งลาดเอียง BHI

เตรียมโดยเติมวุ้นผง ปริมาณ 15 กรัม ลงในสูตรอาหารเหลวข้อ 1.1 ต้มให้วุ้นละลาย ปิเปตต์อาหารลงในหลอดทดลองขนาด 16x150 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดจุกให้แน่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำหลอดทดลองมาวางเอียงให้ผิวหน้าของอาหารมีความยาวประมาณ 12 เซนติเมตร เมื่ออาหารแข็งตัว ตั้งทิ้งไว้ 2 วันก่อนนำไปใช้

2. อาหารสูตรสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก

2.1 อาหารสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสูตร PM1 (Morita and Fujii., 1991)

ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

glucose	20	กรัม
yeast extract	5	กรัม
peptone	15	กรัม
potassium dihydrogenphosphate	3	กรัม
potassium monohydrogenphosphate	2	กรัม
sodium Thiosulfate	0.11	กรัม
magnesium sulfate heptahydrate	0.1	กรัม
sodium sulfite	0.02	กรัม
cobalt (II) chloride	0.01	กรัม
manganese (II) chloride	0.01	กรัม

2.2 อาหารสูตรสำหรับกรดไฮยาลูโรนิกสูตร PM2 (John, Goh and Oeggerli, 1994)

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

glucose	20	กรัม
yeast extract	10	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
$Na_2HPO_4.12H_2O$	2.5	กรัม

2.3 อาหารเหลวสูตรสำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก PM3 (Bracke and Thacker, 1985)

ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

casein hydrolysate, enzymatic	20	กรัม
potassium chloride	3	กรัม
sodium phosphate	2.8	กรัม
magnesium sulfate. 7 H_2O	0.5	กรัม
calcium chloride.$2H_2O$	10	กรัม
glucose	20	กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปิเปตต์อาหารเหลว 25 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส

3. สูตรอาหารสำหรับการคัดเลือกเชื้อ

3.1 สูตรอาหารสำหรับการคัดเลือกเชื้อ (tryptic soy broth)(Difco)

ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

Bacto soytone	17	กรัม
pancreatic digestion of casein		
Bacto soytone	3	กรัม
papaic Digest of Soybean meal		
Bacto Dextrose	2.5	กรัม
Sodium Chloride	5	กรัม
Dipotassium Phosphate	2.5	กรัม

วิธีการเตรียมละลายอาหาร 30 กรัมในน้ำ 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 7.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

หากต้องการเติมเลือดแกะ สำหรับใช้ดูการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงให้ปรับอุณหภูมิของอาหารก่อนการเทลงสู่จานเพาะเลี้ยงเท่ากับ 45-50 องศาเซลเซียส เติมเลือดแกะปริมาตร 5% (V/V) เขย่าให้เลือดและอาหารเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปเทลงจานเพาะเลี้ยง บ่มอาหารไว้ที่ 37 องศาเซลเซียสก่อนนำไปใช้งาน 24 ชั่วโมง

4. องค์ประกอบแลกเดิกเคซีน

	Specification	Typical
Protein (N x 6.38)	-	85.6%
Ash	2.2% max	1.7%
Moisture	12.0% max	11.4%
Fat	2.0% max	1.2%
Lactose	0.2% max	0.1%
Sediment/ 10 g	Disc B	-
Free acidity	0.15 ml. max	0.1 ml.
pH	-	4.6

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5-dinitrosalicylic acid: DNSA reagent)

ละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1.0 กรัมในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ ปริมาตร 20.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเติมน้ำขจัดไอออน ปริมาตร 50.0 มิลลิลิตร แล้วเติมโพแทสเซี่ยมทาเทรต ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$) ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100.0 มิลลิลิตรด้วยน้ำขจัดไอออนแล้วเก็บในขวดสีชา

2. สารละลายทริส-มาเลอิก บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 และ 8.0

ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1 ลิตรประกอบด้วย

ทริส (ไฮดรอกซีเมทิล)- อะมิโนมีเทน ($C_4H_{11}NO_3$)	12.1	กรัม
กรดมาเลอิก	11.6	กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 6.0 หรือ 8.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

3. สารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์

ชั่ง KH_2PO_4 27.22 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร และชั่ง K_2HPO_4 34.84 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

3.1 สารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.5 (Buffer A)

นำสารละลาย KH_2PO_4 ค่อยๆเติมลงในสารละลาย K_2HPO_4 จนกระทั่งได้สารละลายที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.5 ใช้สำหรับการเตรียม บัฟเฟอร์ของเอนไซม์นิวเทรส

3.2 สารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 (Buffer B)

นำสารละลาย KH_2PO_4 ค่อยๆเติมลงในสารละลาย K_2HPO_4 จนกระทั่งได้สารละลายที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ใช้สำหรับการเตรียมบัฟเฟอร์ของเอนไซม์ปาเปน

4. การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์โดยวิธีคาร์บาโซล

4.1 สารละลายโบเรท-ซัลฟูริก (Borate-Sulfuric acid solution) 10% (w/v)

ชั่งสารไดโซเดียมเตตระบอเรท ($Na_2B_4O_7 \cdot H_2O$) 3.82 กรัม ละลายในน้ำร้อน 10 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้สารละลายเย็น นำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งแล้วค่อยๆเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นที่แช่ไว้ในน้ำแข็งลงไป ปริมาตร 390 มิลลิลิตร

4.2 สารละลายคาร์บาโซล (Carbazole solution) 0.2% (w/v)

ชั่งสารคาร์บาโซล 100 มิลลิกรัม ละลายในเอธานอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บสารละลายไว้ในขวดสีชา ป้องกันแสงและเก็บในตู้เย็น (อายุการใช้งาน 6 เดือน)

5. การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์น้ำตาลซูโครส

5.1 สารละลายอะซิเตต บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.0

ชั่งโซเดียมอะซิเตต ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$) 11.628 กรัม และปิเปตต์สารละลายกรดอะซิติก ปริมาตร 0.86 มิลลิลิตร เติมน้ำขจัดไอออนปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 4.0 ด้วยสารละลายกรดอะซิติก

5.2 สารละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส

ปิเปตต์สารละลายอะซิเตต บัฟเฟอร์ จากข้อ 5.1 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. สารละลาย 5% ไตรคลอโรอะซิติก (5% TCA)

ชั่งกรดไตรคลอโรอะซิติก(TCA) 5 กรัม ละลายในน้ำขจัดไอออนปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดสีชา ป้องกันแสงแดด

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์

1. การเตรียมสารละลาย

1.1 สารละลายเอนไซม์นิวเทรส

ชั่งเอนไซม์นิวเทรส 1 มิลลิกรัม ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

1.2 สารละลายเอนไซม์ปาเปน

ชั่งเอนไซม์ปาเปน 1 มิลลิกรัม ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

1.3 สารละลาย 1% เคซีน

ชั่งเคซีน 1 กรัม ละลายใน 0.05 M Na_2HPO_4 50 มิลลิลิตร นำไปต้มจนเดือด จากนั้นรอให้อุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 40 องศาเซลเซียส ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 6.5 (สำหรับเอนไซม์นิวเทรส) และ 6.0 (สำหรับเอนไซม์ปาเปน) เติม deionize water ให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2. การคำนวนค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์

หน่วยเป็น CDU (Casine Digestion Unit)

1 หน่วยของแอคติวิตีเอนไซม์ CDU คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยเคซีนแล้วทำให้เกิดไทโรซีน 1ไมโครกรัมต่อนาที ในภาวะที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ชนิดนั้น

$$\text{คำนวนจากสูตร CDU/มิลลิกรัม enz.} = \frac{(A_1 - A_0) \times D}{(K_s \times V_e \times t \times M_{tyr})}$$

เมื่อ A_1 = คือค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ที่วัดจากสารละลายปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์และสารละลายเคซีน 1% ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม

A_0 = คือค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ที่วัดสารละลายปฏิกิริยาจากหลอด control

K_s = ค่าคงที่ที่ได้จากความชันของกราฟไทโรซีน (μg of tyrosine/ml^{-1})

V_e = ปริมาตรของสารละลายเอนไซม์ที่ใช้

D = จำนวนการเจือจางสารละลาย

t = เวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับเคซีน 1%

M_{tyr} = มวลโมเลกุลของไทโรซีน 1 ไมโครโมล คือ 0.18 μg/ml.

แอคติวิตีของเอนไซม์นิวเทรส

หลอดทดลอง	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร	ค่าแอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)
control	0.013	-
หลอดที่มีเอนไซม์	0.061	28.95

แอคติวิตีของเอนไซม์ปาเปน

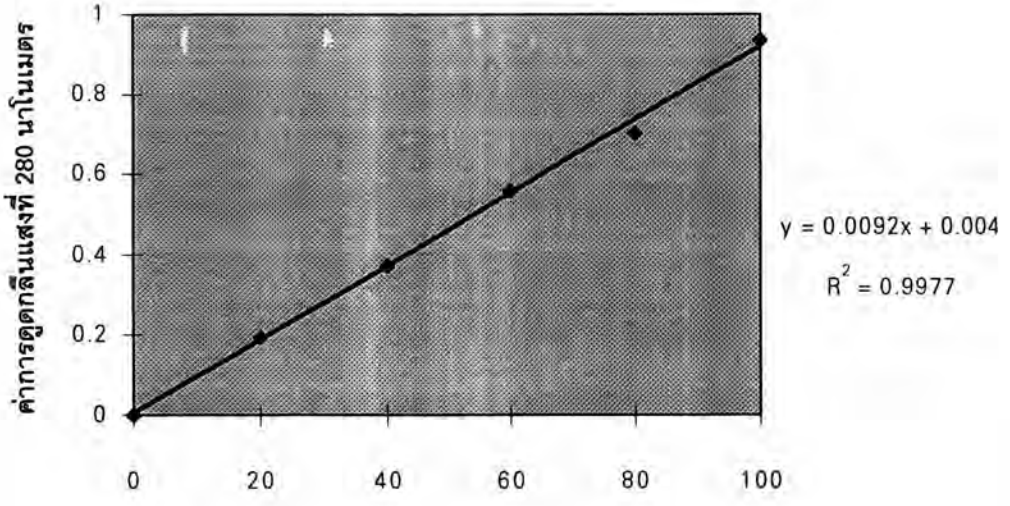
หลอดทดลอง	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร	ค่าแอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)
control	0.013	-
หลอดที่มีเอนไซม์	0.673	405.94

3. การเตรียมกราฟมาตรฐานของไทโรซีน (ทิพวรรณ ว่องวิวิธกุล, 2539)

3.1 เตรียมสารละลายไทโรซีนใน 0.1 N HCl ที่ความเข้มข้น 0 20 40 60 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.2 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารละลาย 0.1 N HCl นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไทโรซีนกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร จากผลได้กราฟดังนี้

กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไทโรซีนกับ
ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร

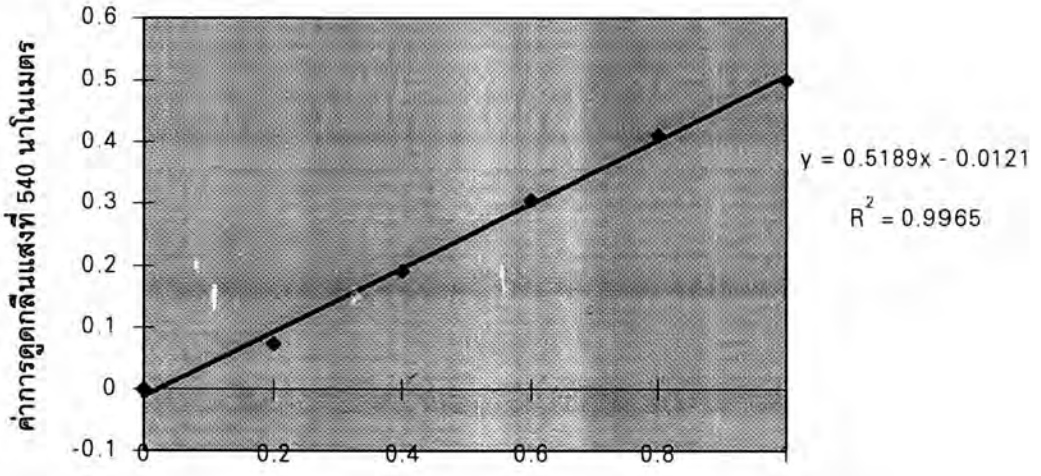


ความเข้มข้นของไทโรซีนใน 0.1 N HCl (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร
20	0.195
40	0.372
60	0.559
80	0.706
100	0.937

ภาคผนวก ง

กราฟมาตรฐาน

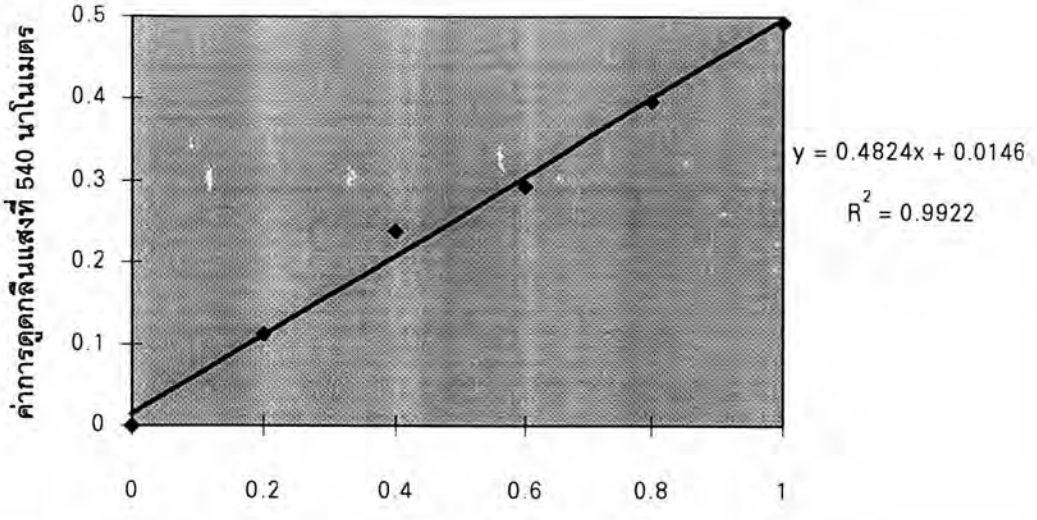
1. กราฟมาตรฐานน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้กรดไดไนโตรซาลิไซลิก



กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสในช่วงความเข้มข้น 0-1.0 กรัมต่อลิตร

น้ำตาลรีดิวซ์ = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร x 1/ความชัน x ความเจือจาง (กรัมต่อลิตร)

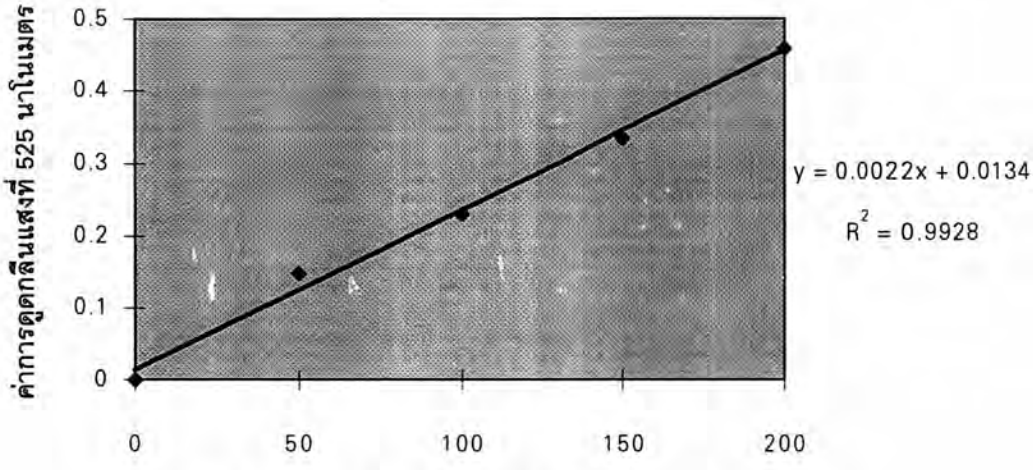
2. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลซูโครสโดยใช้เอนไซม์อินเวอร์เทส



กราฟมาตรฐานน้ำตาลซูโครสโดยใช้เอนไซม์อินเวอร์เทสในช่วงความเข้มข้น 0-1.0 กรัมต่อลิตร

น้ำตาลซูโครส = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 425 นาโนเมตร x 1/ความชัน x ความเจือจาง (กรัมต่อลิตร)

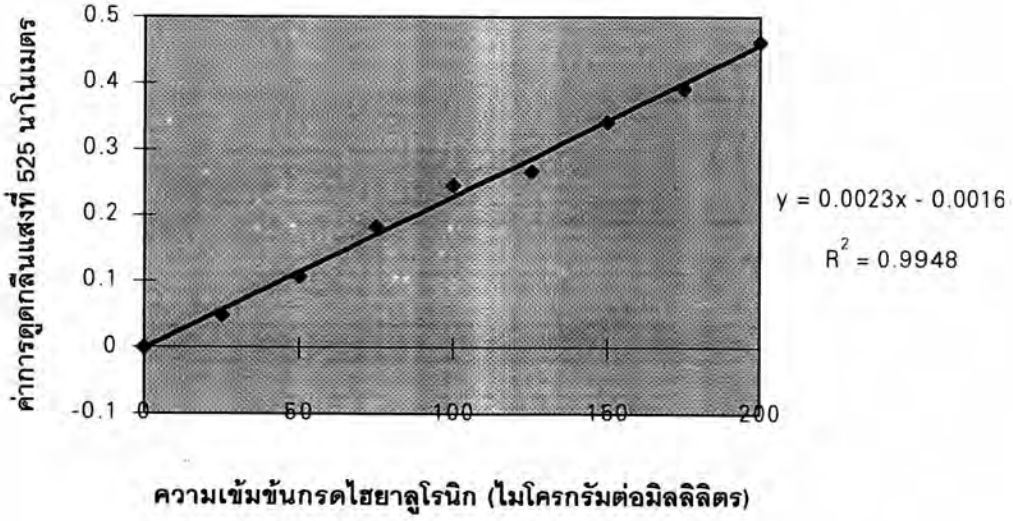
3. กราฟมาตรฐานกรดไฮยาลูโรนิก โดยวิธีคาร์บาโซล (ไม่มีการเติมซัลฟาเมต)



กราฟมาตรฐานกรดไฮยาลูโรนิกในช่วงความเข้มข้น 0-200 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรดไฮยาลูโรนิก = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 525 นาโนเมตร x 1/ความชัน x ความเจือจาง (มิลลิกรัมต่อลิตร)

4. กราฟมาตรฐานกรดไฮยาลูโรนิก โดยวิธีคาร์บาโซล (มีการเติมซัลฟาเมต)



กราฟมาตรฐานกรดไฮยาลูโรนิกในช่วงความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

กรดไฮยาลูโรนิก = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 525 นาโนเมตร x 1/ความชัน x ความเจือจาง (มิลลิกรัมต่อลิตร)

ภาคผนวก จ

การย่อยแลกติกเคซีนด้วยเอนไซม์

<u>วัตถุดิบและเอนไซม์ที่ใช้</u>

1. แลกติกเคซีน ของบริษัท ไวท์กรุ๊ป ประเทศไทย จำกัด
2. เอนไซม์ปาเปน ของบริษัท BDH ประเทศอังกฤษ

<u>ขั้นตอนการย่อยแลกติกเคซีนด้วยเอนไซม์</u>

1. ชั่งแลกติกเคซีน 20 กรัม เติมลงในสารละลาย 0.05 M Na_2HPO_4 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร นำไปต้มให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
2. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เป็น 6.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์
3. ปรับปริมาตรให้เป็น 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำขจัดไอออน
4. เติมสารละลายเอนไซม์ปาเปน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
5. บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที
6. ปั่นแยกตะกอนของสารที่เหลือออกโดยใช้ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนสารละลายที่ได้ไว้
7. นำไปเตรียมอาหารสูตรสำหรับการผลิต PM3 โดยใช้สารละลายที่ได้แทนน้ำขจัดไอออนและเคซีน โดยปรับปริมาตรสารละลายที่ได้ให้เป็น 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำขจัดไอออน (เพื่อให้ได้เป็น 2% แลกติกเคซีน)

การเตรียมอาหารนั้นในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

สารละลายแลกติกเคซีน	1000	มิลลิลิตร
potassium chloride	3	กรัม
sodium phosphate	2.8	กรัม
magnesium sulfate. 7 H_2O	0.5	กรัม
calcium chloride.$2H_2O$	10	มิลลิกรัม
sucrose	3	กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 N และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ประวัติผู้เขียน

นายทรงศักดิ์ พันธุ์วัฒนะสิงห์ เกิดวันที่ 1 กรกฎาคม พ.ศ. 2516 ที่อำเภอปากน้ำโพ จังหวัดนครสวรรค์ สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ วิทยาเขตประสานมิตร ในปีการศึกษา 2537 และได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2538