เอกสารอ้างอิง

1. ดวงพร คันธโชติ. 2530. ยาปฏิชีวนะ. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ , หน้า 104-143.กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.
2. มาลิน จุลศิริ. 2529. ยาต้านเชื้อแบคทีเรีย. ยาต้านจุลชีพ ความรู้พื้นฐานและประยุกต์ , หน้า 18-160. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล: สำนักพิมพ์อักษรบัณฑิต.
3. Crueger, W. and Crueger, A. 1984. Antibiotics:β-lactam antibiotics, In. Brock T.D.(ed.), A Textbook of Industrial Microbiology, 209-214. USA : Science Tech Inc.
4. Swartz, R.W. 1985. Penicillins. In. Moo-Young (ed.), Comprehensive Biotechnology 3: 7-46. New York: Pergamon Press.
5. Hersbach, G.J.M., Beck, C.P. and P.W.M. Dijek. 1984 . The Penicillins : Properties , Biosynthesis and fermentation. In Vandamme , E.J. (ed.) , Biotechnology of Industrial Antibiotic. : 46-119. USA : Marcel Dekker.
6. Alcano, I.E. 1983 . Chemotherapeutic Agents and Antibiotics. Fundamentals of Microbiology : 669-702. USA : Addison - Wesley Publishing Company Inc.
7. Wiseman, A.1983.Secondary metabolites in biotechnology.In Wiseman, A. (ed.), Principles of Biotechnology : 34-49. USA: Surrey University Press.
8. Casida, L.E. 1968. Antibiotic Fermentation.Industrial Microbiology : 221-249 : New York : John Wiley and Sons Inc.
9. Rowley, D.,Cooper, P.D. and P.W. Roberts. 1950. The Site of Action of Penicillin. Biochemical Journal 46 : 157-161.
10. Maass, E.A. and M.J. Johnson. 1949. Penicillin Uptake by Bacterial

cells. J. of Bacteriol. 57 : 415-423.

11. Chiang, S.J.D. and R.P. Elander. 1991. The Application of Genetic Engineering to Strain Improvement of β-lactam - Producing filamentous fungi. In Elander, R.P. and K.G. Mukerji(eds.) Handbook of Applied Mycology 4 : 197-211. New York:Dekker.

12. Holt,G.,Rogers, M.E. and G. Saunders.1985. Genetics of *Penicillium chrysogenum* and Biosynthesis of β-lactam Antibiotic. In Kleinkauf, H., Pohren, H.S.V., Dornquer, H. and Nesemann G. (eds.). Regulation of secondary Metabolite formation : 103-114.

13. Jaklitsch, W.M., Hampel, W., Rohr, M. and C.P. Kubicek. 1986. α-Aminoadipate pool concentration and Penicillin biosynthesis in strains of *Penicillium chrysogenum* . Canadian Journal of Microbioligy 32 : 473-480.

14. Luengo, J.M., Revilla, G., Villanueva, J.R. and J.F. Martin. 1979. Lysine regulation of Penicillin Biosynthesis in Low-producing and Industrial strains of *Penicillium chrysogenum* Journal of General Microbiology 115 : 207-211.

15. Bladwin, J.E. 1988. The Biosynthesis of Penicillins and Cephalo sporins. Natural product report 5 : 129-145.

16. Mead, T.H. and M.V. stack.1948.Penicillin Precursors in Corn-steep Liquor. Biochemical Journal 42 : 18.

17. Luengo, J.M. , Iriso, J.L and M.J. Lopez-Nieto . 1986. Direct Evaluation of Phenylacetyl-Co A, 6-Aminopenicillanic acid acyl transferase of *Penicillium chrysogenum* by bioassay. The Journal of Antibiotics 36.No.11 : 1565-1573.

18. Jaklitch, W.M. and R.M.C.P. Kubicek. 1985 . Glutamate Pools and Glutamate Dehydrogenase Regulation in Relation to

Penicillin Biosynthesis in Strains of *Penicillium chrysogenum* . Experimental Mycology 9 : 310-317.

19. Mateos, R.C., Vazquez, G. and S. Sanchez. 1984.Effect of Glutamine on Penicillin formation in *Penicillium chrysogenum* . Biotechnology Letter 6.No.2 : 109-144.

20. Erickson, R.C. and Dean, L.D.1966.Acylation of 6-Aminopenicillanic acid by *Penicillium chrysogenum* . Appl. Microbiol.14. no.6 : 1047-1048.

21. Kurylowicz, W. 1977. The Site of Antibiotic Accumulation in *Streptomycetes sp.* and *Penicillium chrysogenum*. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 24 : 263-271.

22. Martin, J.F. ,Lopez-Neito, M.J. and J.M. Castro. 1985. β - lactam Biosynthesis Controlled by Carbon and Nitrogen Regulation. In Kleinkeuf H. ,Dohre H.V. ,Dorneuer H. and G. Nesemenn (eds.), Regulation of Secondary Metabolite Formation:41-76 Germany: VCH Vrelegesellscheft MBH.

23. Pirt, S.J. and R.C. Righetato. 1967. Effect of Growth Rate on the Synthesis of Penicillin by *Penicillium chrysogenum* in Batch and Chemostat culture. Appl. Microbiol. 15. No.6 : 1284-1290.

24. Martin, J.F. and A.L. Demain. 1980 . Control of Antibiotic Biosynthesis. Microbiological Reviews 44 : 230-251.

25. Koffler, H., Emerson, R.L., Perlman D. and R.H. Burris . 1945 . Chemical changes in submerges Penicillin fermentations . J. Bac. 50 : 517-548.

26. Sih, C.J. and S.G. Knight. 1956 . Carbohydrate Metabolism of *Penicillium chrysogenum* . J. of Bacteriol. 72 : 694-699.

27. Trinci, A.P.J. and R.C. Righeiato. 1970. Changes in Constituents

and Ultrastructure of Hyphal Compartments during Autolysis of Glucose starvered *Penicillium chrysogenum* . J. Gen. Microbiol. 60 : 239-249.

28. Fiebre, C.W. and S.G. Knight. 1953. The Oxidation of Glucose by *Penicillium chrysogenum* . J. of Bac. 66 : 170-172.

29. Righelato, R.C. ,Trinci, A.P.S. and S.J. Pirt. 1968. The Influence of Maintenance Energy and Growth Rate on the Metabolic Activity, Morphology and Conidiation of *Penicillium chrysogenum* . J. Gen, Microbiol. 50 : 399-412.

30. Chang, L.T., McGrory, E.L. and R.P. Elander. 1990. Penicillin Production by Glucose-derepressed mutants of *Penicillium chrysogenum* . J. of Industrial Microbiol. 6 : 165-169.

31. Gailey, F.B. ,Stefaniak, J.J. ,Olson B.H. and M.J. Johnson. 1946. A Comparison of Penicillin - Production strains of *Penicillium notatum-Penicillium chrysogenum*. J. Bac. 52 : 129-140.

32. Sheehan, et.al. Etanol As the Major Source of Carbon and Energy in Penicillin Production . United States Patent 4,164,445 , August 14 ,1979.

33. Norris, J.R. and M.H. Richmond. 1981. Pencillin. Essay in Applied Microbiol. : 4/5-4/27. John Wiley & Son Ltd.

34. Sastry, M.L.N. and M.R.S. Iyengar. 1959 . Repetetive Mutagenic Treatment and Mass - Culturing of Microorganisms , Observations on *Penicillium chrysogenum* . Appl. Microbiol. 7 : 334-337.

35. Haas, F.L., Puglisi, T.A., Moses A.J. and J. Lein. 1956. Hetero karyosis as a cause of Culture Rundow in *Penicillium chrysogenum*. Appl Microbiol. 4 : 187-195.

36. Keshavarz, T., Walker, E., Eglin, R., Lilley, G., Holt G.,Bull A.T. and M.D. Lilly. 1989 . Immobilization of *Penicillium chrysogenum* : Spore growth on celite. Appl. Microbiol. Biotechnol. 30 : 487-491.

37. Oh, D.K., Chang, K. and J.H. Kim. 1988. Production of Penicillin in Fluidized-Bed Bioreaction Control of Cell Growth and Penicillin Production by Phosphate Limitation . Biotech. and Bioen. 32 : 569-573.

38. Kim, J.H., Oh, D.K., Park, S.K. and Y.H. Park. 1986. Production of Penicillin in a Fluidized-Bed Bioreactor Using a Carrier-Supported Mycelial Growth. Biotech. and Bioen.28 : 1838-1844.

39. Deo, Y.M. and G.M. Gaucher. 1984. Semicontinuous and Continuous Production G by *Penicillium chrysogenum* Cells Immobilized in K-Carrageenan Beads. Biotech. and Bioen. 26 : 285-295.

40. Muller, B., Schlichting, E., Bischoff L. and K. Schugerl . 1987 . Reactive extraction of Penicillin G in a Pilot Plant Karr-column Fermentation Broth.Appl. Microbiol. Biotechnol. 26 : 206-210.

41. Morikawa, Y., Karube, I. and Suzuki S. 1979 . Penicillin G Production by Immobilized Whole Cells of *Penicillium chrysogenum*. Biotech. and Bioen. 21 : 261-270.

42. El - Sayed , A.H.M.M. and H.J. Rehm. 1986 . Morphology of *Penicillium chrysogenum* strains Immobilized in Calcium alginate beads and used in Penicillin Fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24 : 89-94.

43. El - Sayed , A.H.M.M. and H.J. Rehm. 1987. Continuous Penicillin Production by *Penicillium chrysogenum* Immobilized in

Calcium alginate beads. Appl. Microbiol. Biotechol. 26 : 215-218.

44. Koniq, B., Seewald, Ch. and K. Schiigerl. 1981.Process Engineering Investigation of Penicillin Production. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 12 : 205-211.

45. Moyer, A.J. and R.D. Coghill. 1945. Penicillin : The Laboratory Scale Production of Penicillin in Submerged Culture by *Penicillium notatum* Westling (NRRL 832). J. Bac. 51:79-93.

46. Soltero, F.V. and M.J. Johnson. 1953. The effect of the Carbohydrate Nutrition on Penicillin Production by *Penicillium chrysogenum* Q-176. Appl.Microbiol. 1 : 42-57.

47. Jarvis, F.G. and M.J. Johnson. 1947. The Role of the Constituents of Synthetic Media for Penicillin Production. J. of the American Chemical Society. 69 : 3010-3017.

48. Calam , C.T. and D.J.D. Hockenhull . 1948 . The Production of Penicillin in Surface Culture using Chemically Defined Media. J. Gen. Microbiol. 3 : 19-31.

49. Pan, S.C., Bonanno, S. and G.H. Wagman. 1959.Efficient Utilization of fatty oils as Energy Source in Penicillin Fermentation. Appl. Microbiol. 7 : 176-180.

50. Tan, I.K.P. and C.C. Ho. 1991. Growth and the Production of Penicillins in *Penicillium chrysogenum* with Palm oil and its Various Fractions as Carbon Source. Appl. Microbiol. and Biotechnol. 36 : 163-166.

51. Rolinson, G.N. and M. Lumb. 1953. The Effect of Aeration on the Utilization of Respiratory Substrate by *Penicillium chrysogenum* in Submerged Culture. J. Gen. Microbiol. 8 : 265-272.

52. Tornqvist, E.G.M and W.H. Peterson. 1956. Penicillin Production by high-yielding strains of *Penicillium chrysogenum* . Appl. Microbiol. 4 : 277-283.

53. Davey, V.F. and M.J. Johnson. 1953. Penicillin Production in Corn steep Media with Continuoud Carbohydrate Addition. Appl. Microbiol. 1 : 208-211.

54. Tilly, G. ,Mou, D.G. and C.L. Cooney.Optimization and Economics of Antibiotic Production. The Filamentous Fungi.1: 110-209.

55. Soltero, F.V. and M.J. Johnson.1954.Continuous Addition of Glucose for Evaluation of Penicillin Producing Cultures. Appl. Microbiol, 2 : 41-44.

56. Moyer, A.J. and R.D. Coghill. 1945. Penicillin : The Laboratory Scale Production of Penicillin in Submerged Culture by *Penicillium notatum* Westling (NRRL 832). J. Bac. 51:57-78.

57. Liggett, R.W. and H. Koffler. 1948. Corn steep liquor in Microbio logy. Bacteriol. Review. 12 : 297-311.

58. Kluge, M., Siegmund, D., Diekmann, H. and M. Thoma. 1992. A Model for Penicillin Production with and without temperature shift after the growth phase. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36 : 446-451.

59. Foster, J.W. and H.B. Woodruff. 1944. Microbiological Aspects of Penicillin : Procedure for the Cup Assay for Penicillin. J. of Bacteriology. 47 : 43-59.

60. Ghosh, D. and B.N. Ganguli. 1961. Production of Penicillin with waste Mycelium of *Penicillium chrysogenum* as the sole source of Nitrogen. Appl. Microbiol. 9 : 252-255.

61. Moyer, A.J. and R.D. Coghill. 1947. Penicillin : The Effect of Phenylacetic acid on Penicillin Production. J. Bac. 53 :

329-341.

62. Singh, K. and M.J.Johnson. 1948 . Evaluation of precursor for Pencillin G. J. Bac. 56 : 339-355.

63. The Editorial Board of the Monograph on the Chemistry of Penicillin Biosynthesis. 1947. Science. 106: 503-505.

64. Higuchi, K. , Jarvis, F.G., Peterson, W.H. and M.J.Johnson. 1946 . Effect of Phenylacetic acid Derivatives on the types of Penicillin Produced by *Penicillium chrysogenum* Q-176 . J.Am.Chem.Soc. 68 : 1669-1670.

65. Tabenkin, B. ,Lehr, H. ,Wayman, A.C. and M.W. Goldberg.1951. Evaluation of Esters of Phenylacetic acid as Precursors of Penicillin G . Arch. Biochem, Biophys. 38 : 43-48.

66. Jarvis, F.G. and M.J. Johnson. 1950. The Mineral nutrition of *Penicillium chrysogenum* Q-176. J. of Bacteriology 59 : 51-60.

67. Pan, C.H., Hepler, L. and R.P. Elander. 1975. The Effect of Iron on a High-Yielding Industrial Strain of *Penicillium chrysogenum* and Production Level of Penicillin G . J. of fermentation technology 53 ,No.12 : 854-861.

68. Stefaniak, J.J. ,Gailey, F.B., Jarvis, F.G. and M.J. Johnson.1946. The Effect of Environmental Conditions on Penicillin Fermentations with *Penicillium chrysogenum* X-1612. J. Bac. 52 : 119-127.

69. Deindoerfer, F.H. and E.L. Gaden. 1955. Effects of Liquid Physical Properties on Oxygen Transfer in Penicillin Fermentation. J. Gen. Microbiol. 3 : 1253-1256.

70. Vandar, F. and M.D. Lilly. 1982.Effect of Cycling Dissolved Oxygen Concentrations on Product Formation in Penicillin

Fermentation. European J. Appl Microbiol. Biotechnol. 14 : 203-211.

71. Owan, S.P. and M.J. Johnson.1955.The Effect of Temperature Changes on the Production of Penicillin by *Penicillium chrysogenum* W 49-133. Appl. Microbiol. 3 : 375-379.

72. Pirt, S.J. and D.S. Callow. 1959. Continuous - flow culture of the filamentous mould *Penicillium chrysogenum* and the Control of its Morphology. Nature 184. no. 4683 : 307-310.

73. Whitaker, A. and P.A. Long.1973. Fungal Pelleting.Process Biochem. 27-31.

74. Smith, J.J. and M.D. Lilly. 1990. The Effect of Agitation on the Morphology and Penicillin Production of *Penicillium chrysogenum* . Biotech. & Bioen. 35 : 1011-1023.

75. Nyirl, L. and Z.L. Lengyel. 1965. Studies on Automatically Aerated Biosynthetic Process. Biotech. & Bioen. 7 : 343-354.

76. Edward, A.G. and C.S. Ho. 1988. Effects of Carbon Dioxide on *Penicillium chrysogenum* : An Autoradiographic study . Biotech. & Bioen. 32 : 1-7.

77. Ho, C.S. and M.D. Smith. 1986. Morphological Alteration of *Penicillium chrysogenum* Caused by Carbon Dioxide . J. of Gen. Microbiol. 132 : 3479-3484.

78. Tornqvist, E.G.M. and W.H. Peterson.1956. Penicillin Production by High-Yielding Strains of *Penicillium chrysogenum* . Appl. Microbiol. 4 : 277-283.

79. Bhuyan, B.K., Ganguli, B.N and D. Ghosh. 1961.Comparative study of Penicillin Production with Vegetative and spore Inoculum of *Penicillium chrysogenum*. Appl Microbiol. 9 : 85-90.

80. Scudi, J.V. and H.B. Woodruff. 1949. Assay of Penicillins . In

Clarke, H.T. ,Johnson, J.R. and R. Robinson (eds.), The chemistry of Penicillin : 1025-1042. New Jersey: Princeton University Press .

81. Luengo, J.M. 1985. Precipitation of Phenyl and Phenoxypenicillin from Solution Using Ammonium sulfate . Analytical Biochemistry. 149 : 446-470.

82. Bundgaard, H. and K. Ilver. 1972. A new spectrophotometric method for the determination of Penicillins . J.Pharm. Pharmac. 24 : 790-794.

83. Blaha, J.M., Knevel, A.M. and S.L. Hem. 1975. High-Pressure Liquid Chromatographic Analysis of Penicillin G Potassium and Its Degradation Productions. J. of Pharmaceutical Sciences 64 No. 8 : 1384-1386.

84. Luengo, J.M. and M.A. Moreno. 1987. Separation by High-Performance Liquid Chromatography of Penicillins with C_4 to C_{10} Aliphatic side chains . Analytical Biochemistry 64 : 559-562.

85. วนิดา เรืองศรี. 2532. สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเพนิซิลลิน จี โดย เพนิซิเลียม ไคลโซจีนัม เอ 88. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

86. โชตนา ประมวลวัลลิกุล. 2534. การกลายพันธุ์ *Penicillium chrysogenum* เพื่อเพิ่มผลผลิต เพนิซิลลิน จี. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

87. บัณฑูร พลอยสุวรรณ.2536. การปรับปรุงสายพันธุ์ *Penicillium chrysogenum* N-151 เพื่อเพิ่มผลผลิตเพนิซิลลิน จี โดยวิธีการกลายพันธุ์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

88. Bernfeld, P.1955.Amylase α and β. Method in Enzymology.In Colowick P.S. and O.N. Kaplan (ed.). 1 : 149 . Academic Press Inc.

Publishers, NY.

89. Steyermark, Al.1951.Microdetermination of Nitrogen by the Kjeldahl Method. Quantitaive Organic Microanalysis : 135-153. The Blakiston Company,NY.

90. Goodwin, B.L. ,Ruthven, C.R.J. and M. Sandler. 1975 . Gas Chromatograhic assay of Phenylacetic acid in Biological Fluids. Clinica. Chimica, Acta, 62 : 443-446.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

1. สูตรอาหารที่ใช้ในการวิจัย

1.1 สูตรอาหารที่ใช้สำหรับเก็บรักษาเชื้อรา และเตรียมสปอร์

โพเตโตเดกซ์โตรสอาการ์ (potato dextrose agar,PDA)ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

มันฝรั่ง (ต้มในน้ำให้เดือด เอาเฉพาะน้ำใส)	300 กรัม
กลูโคส	20 กรัม
วุ้นผง	20 กรัม

อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ.ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 สูตรอาหารสำหรับเก็บรักษาเชื้อทดสอบ (tested microorganism) และหาปริมาณเพนิซิลลิน จี โดยวิธีทางชีววิทยา (bioassay)

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

แบคโตเปปโตน	100 กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	5 กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5 กรัม
วุ้นผง	15 กรัม

ปรับ pH เป็น 7.2 ก่อนการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ. ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.3 สูตรอาหารที่ใช้ในการคัดเลือกเชื้อ *Penicillium chrysogenum* ที่กลายพันธุ์

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

แลคโตส	30 กรัม
กลูโคส	10 กรัม

สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง 1.5 กรัมไนโตรเจน

(เตรียมตามวิธีในภาคผนวกที่ 2.1 ใช้ปริมาตรประมาณ 347 มล.)

แอมโมเนียมซัลเฟต	5 กรัม
โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.6 กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.6 กรัม
แคลเซียมไฮดรอกไซด์	0.5 กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	5 กรัม
น้ำมันถั่วเหลือง	4 มล.

ปรับ pH เป็น 6.1 ก่อนอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ. ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที่

1.4 สูตรอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อในการผลิตเพนิซิลลิน จี

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

ซูโครส	18 กรัม
สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง	1.5 กรัมไนโตรเจน

(เตรียมตามวิธีในภาคผนวกที่ 2.1 ใช้ปริมาตรประมาณ 347 มล.)

แอมโมเนียมซัลเฟต	5 กรัม
โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.6 กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.6 กรัม
แคลเซียมไฮดรอกไซด์	0.5 กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	5 กรัม
น้ำมันถั่วเหลือง	4 มล.

ปรับ pH เป็น 6.1 ก่อนการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ. ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.5 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตเพนิซิลลิน จี

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

แลคโตส	40 กรัม
กลูโคส	10 กรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง 1.5 กรัมไนโตรเจน
(เตรียมตามวิธีในภาคผนวกที่ 2.1 ใช้ปริมาตรประมาณ 347 มล.)

แอมโมเนียมซัลเฟต	5 กรัม
โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.6 กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.6 กรัม
แคลเซียมไฮดรอกไซด์	0.5 กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	5 กรัม
น้ำมันถั่วเหลือง	4 มล.

ปรับ pH เป็น 6.1 ก่อนอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ช.ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สำหรับการเตรียมในถังหมัก แยกกลูโคสและแลคโตส อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 °ช. เป็นเวลา 30 นาที

2. วิธีเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

2.1 การเตรียมสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง

ชั่งกากถั่วเหลือง ที่สกัดไขมันออกแล้ว ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทอุตสาหกรรมวิวัฒน์ ปริมาณ 200 กรัม เติมสารละลายกรดกำมะถันเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 600 มล. นำไปย่อยในตู้อบฆ่าเชื้อ อุณหภูมิ 121 °ช. ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 40 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น นำมาเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1200 มล. กรองผ่านผ้าขาวบาง แล้วนำมาปรับให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 35 % พบว่ามีปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมด ประมาณ 0.40-0.43 % (น้ำหนัก/ปริมาตร)

2.2 การเตรียมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิกไซลิก (dinitrosalicylic acid : DNSA reagent)

ละลาย 1 กรัมของกรดไดไนโตรซาลิไซลิก ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 20 มล. เติมน้ำกลั่นลงไป 50 มล. เติมโปตัสเซียมตาเตรต ($C_4H_4KNaO_6.4H_2O$) 30 กรัม ทำปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น

2.3 <u>การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการหาปริมาณไนโตรเจน</u>

2.3.1 เกลือผสม (salt mixture) ประกอบด้วย โปตัสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) 95 กรัม และคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) 5 กรัม

2.3.2 อินดิเคเตอร์ผสม (mixed indicator) ละลายเมทธิลเรด (methyl red) และเมทธิลลีนบูล (methylene blue) 0.1 กรัม ในเอธานอล (ethanol) เข้มข้น 95 % ปริมาตร 150 มล.

2.4 <u>การเตรียมสารละลาย propanolic-HCL</u>

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 30 กรัม ใส่ในขวดซักชั่น (suction flask) ค่อยๆ หยดกรดกำมะถันเข้มข้น 16 มล. ลงไป โดยให้ความร้อนเล็กน้อยกับโซเดียมคลอไรด์ จับกาซ HCL ที่เกิดขึ้นด้วย โปรปานอล (propanol) 100 มล. นำ propanolic-HCL ที่ได้มาหาความเข้มข้น โดยการติเตรตกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ลักษณะโครมาโตแกรมของเพนิซิลลิน จี ที่วิเคราะห์โดยวิธี HPLC ใช้เพนิซิลลิน วี เป็นสารเปรียบเทียบ

peak 1 ได้แก่ เพนิซิลลิน จี

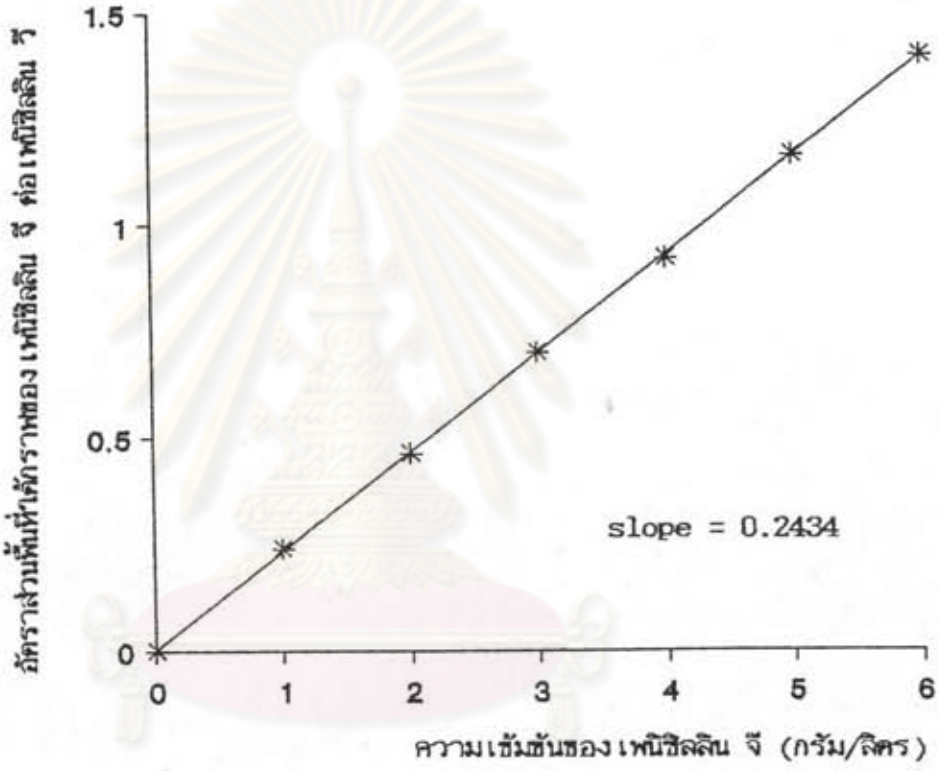
peak 2 ได้แก่ เพนิซิลลิน วี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การคำนวณหาปริมาณเพนิซิลลิน จี โดยใช้เครื่อง HPLC

4.1 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณเพนิซิลลิน จี

นำเพนิซิลลิน จี โซเดียม มาหาปริมาณเพนิซิลลิน จี ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.2 โดยทำ 3 ซ้ำ(triplicate) เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของเพนิซิลลิน จี และเพนิซิลลิน วี กับความเข้มข้นของเพนิซิลลิน จี โซเดียม



4.2 การคำนวณปริมาณเพนิซิลลิน จี

หาอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของเพนิซิลลิน จี และเพนิซิลลิน วี ที่ได้จากการฉีดน้ำหมัก ที่ได้ทำการเจือจางจนมีความเข้มข้นเหมาะสมแล้ว เข้าเครื่อง HPLC เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ในข้อ 4.1 แล้วคำนวณหาปริมาณเพนิซิลลิน จี ตามสมการ

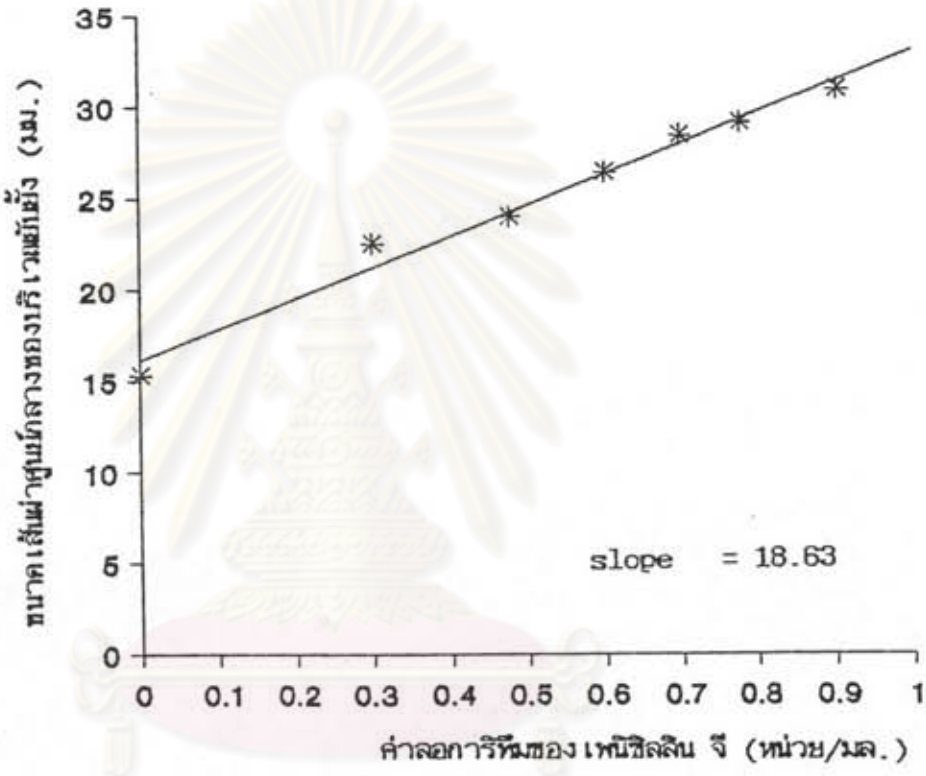
$$\text{ปริมาณเพนิซิลลิน จี} = \frac{\text{อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของเพนิซิลลิน จี และเพนิซิลลิน วี}}{\text{ค่า slope}}$$

เมื่อได้ปริมาณเพนิซิลลิน จี แล้วคูณด้วยค่าที่เจือจาง (dilution factor) ค่าที่ได้มีหน่วยเป็น กรัม/ลิตร

5. การคำนวณหาปริมาณเพนิซิลลิน จี โดยวิธีทางชีววิทยา (bioassay)

5.1 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณเพนิซิลลิน จี

ใช้เพนิซิลลิน จี โซเดียม มาหาปริมาณเพนิซิลลิน จี ตามวิธีในข้อ 3.1 ทำ 3 ซ้ำ (triplicate) 2 ครั้ง หาค่าเฉลี่ย เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าลอการิทึม (logarithm) ของความเข้มข้นของเพนิซิลลิน จี กับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น



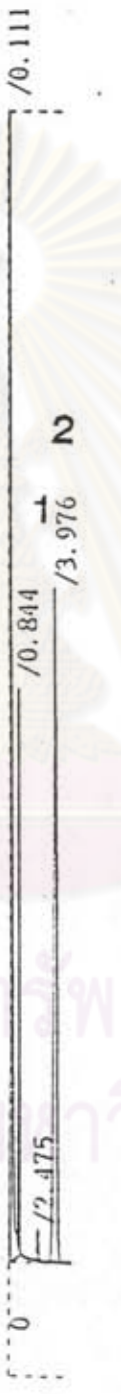
5.2 การคำนวณปริมาณเพนิซิลลิน จี

เอาน้ำหมักมาเจือจาง แล้วหาปริมาณเพนิซิลลิน จี ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.1 ทำ 2 ซ้ำ (duplicate) หาค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น แล้วคำนวณหาปริมาณเพนิซิลลิน จี ตามสมการ

$$\text{ค่าลอการิทึมของเพนิซิลลิน จี} = \frac{(\text{ความกว้างของบริเวณยับยั้ง} - \text{จุดตัดแกน y})}{\text{ค่า slope}}$$

เมื่อได้ปริมาณเพนิซิลลิน จี แล้วคูณด้วยค่าเจือจาง (dilution factor) ค่าที่ได้มีหน่วยเป็น หน่วย/มล.

6. ลักษณะโครมาโตแกรมของกรดฟีนิลอะซิติก วิเคราะห์โดยใช้เครื่องแกสโครมาโตกราฟฟี ใช้เฮกซาดีเคน (Hexadecane) เป็นสารเปรียบเทียบ

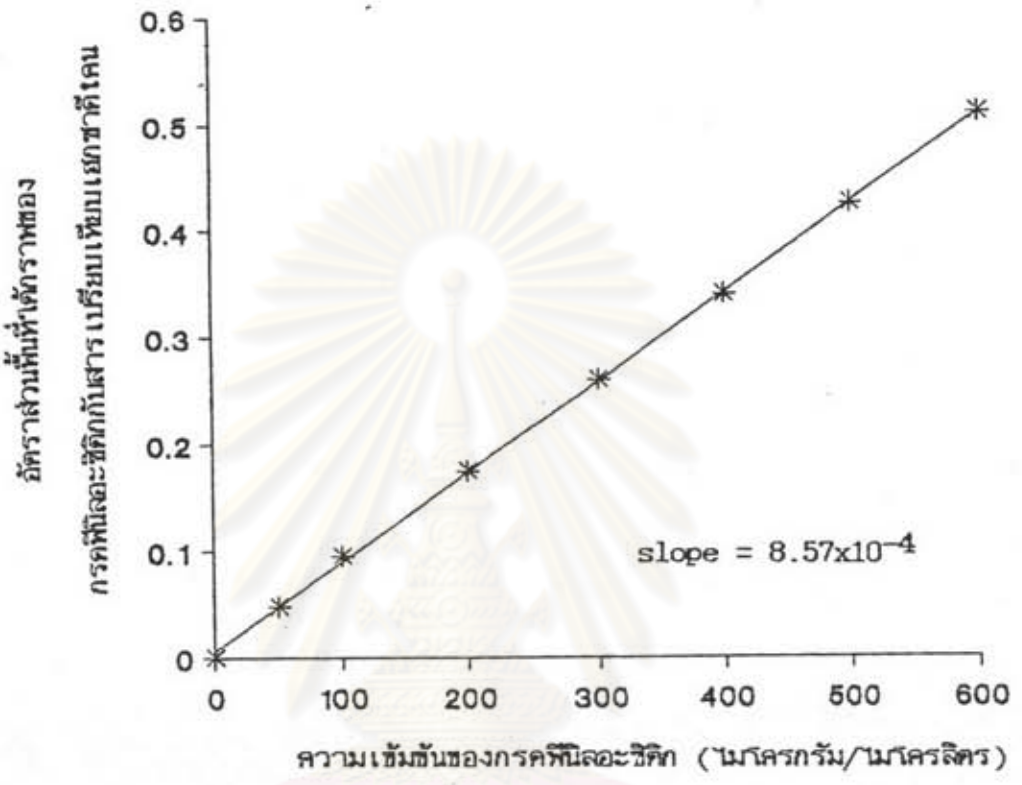


peak 1 ได้แก่ กรดฟีนิลอะซิติก

peak 2 ได้แก่ เฮกซาดีเคน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณกรดฟีนิลอะซิติก วิเคราะห์โดยใช้เครื่องแกสโครมาโตกราฟฟี



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นางสาว นตพร ศุภณัฐเศรษฐกุล เกิดวันที่ 18 พฤศจิกายน พ.ศ. 2511 ในจังหวัดกรุงเทพมหานคร ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีวเคมี จาก คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2532 และเข้าศึกษาในระดับปริญญาโท หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ ในปีการศึกษา 2533

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย