เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

กำเนิด สุภัณวงษ์. จุลชีวอุตสาหกรรม. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, 2534.

ขจีนาฏ จรรยาอุดม. การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนและการศึกษาคุณสมบัติของกลูโคสไอโซเมอเรส จากสเตรพโตมัยซิสสายพันธุ์ 190-1 วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2528.

ดารารัตน์ รอดพยาธิ์. สารต่อต้านเชื้อราที่ผลิตโดย Streptomyces sp. CU279 จากดินในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2525.

ดวงพร คันธโชติ. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, 2530.

วนิดา เรืองศรี. สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเพนนิซิลิน จี โดยเพนนิซิเลียมไคลโซจีนัม A88. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2532.

อำไพทิพย์ สุขหอม. ลักษณะบางประการของสารปฏิชีวนะจาก *Bacillus* sp. ที่มีฤทธิ์ต้านโรคหูดของมันฝรั่ง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2534.

ภาษาอังกฤษ

Aharonowitz, Y. 1980. Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis. Ann.Rev. Microbiol. 34:209-233.

Anderson, L.E., Coffey, G.L., Senos, G.D., Underhill, M.A., Vogler, D.L. and Ehrlich, J. 1972. Butirosin, a new aminoglycoside antibiotic complex. Antimicrob. Agents Chemother. 2:79-83.

Anker, H.S., Johnson, B.A., Goldberg, J. and meleney, F.L. 1948. Bacitracin : Methods of production, concentration and patial purification with a summary of the chemical properties of crude bacitracin. J. Bact. 55:249-255.

Banerjee, A.B. and Bose, S.K. 1964. Biosynthesis of mycobacillin, a new antifungal peptide. I. Role of nucleic acid. J. Bacteriol. 87:1397-1406.

_____., Majumdar, S.K. and Bose, S.K. 1967. Mycobacillin. Antibiotics. 2:271-275.

Ben-Gurion, R. and Hertman, I. 1958. Bacteriocin-like material produced by *Pasteurella pestis*. J. Gen. Microbiol. 19:289.

Bernlohr, R.W. and Novelli, G.D. 1959. Antibiotic production as a function of spore formation in *Bacillus licheniformis*. Nature. 184:1256-1257.

_____. 1963. Bacitracin biosynthesis and spore formation : the physiological role of an antibiotic. Arch. Biochem. Biophys. 103:94-104.

Bevan, E.A. and Makower, M. 1963. The physical basis of the killer character in yeast. Genetics Today 11th Inst. Congr. Genet. Oxford : Pregammon Press.

Bhunia, A.K., Johnson, M.C. and Ray, B. 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactili*. J. Appl. Bacteriol. 65:261-268.

Bodanszky, M. and Perlman, D. 1964. Are peptide antibiotics small proteins? Nature. 204:840-844.

_____. 1969. Peptide antibiotics. Sciences. 163:352-358.

Bulock, J.D. 1961. intermediary metabolism and antibiotic synthesis. Adv. Appl. Microbiol. 3:293-342.

Callow, R.K. and Work, T.S. 1952. Antibiotic peptides from *Bacillus licheniformis* licheneformin A, B and C. Biochem J. 51:558-567.

Casida, L. G. 1968. Antibiotic Fermentation in Industrial Microbiology. New York : John Wiley & Sons.

Cornell, N. and Snoke, J.E. 1964. Biosynthesis of bacitracin and protein. Biochem. Biophys. Acta. 91:533-536.

Demain, A.L. 1963. Synthesis of cepharosporin C by resting cells of *Cepharosporium* sp. Clinical Medicine. 70:2045-2051.

_____. 1972. Cellular and environmental factors affecting the biosynthesis and excretion of metabolites. J. Appl. Chem. Biotechnol. 22:345-362.

_____., Piret, J.M., Friebel, T.E., Vandamme, E.J. and Matteo, C.C. 1976. Studies on *Bacillus brevis* directed towards the cell free synthesis of gramicidine S. In. D. Schlessinger (ed.) Microbiology. American Society for Microbiology. Washington. D.C.

Drew, S.W. 1977. Effect of primary metabolite on secondary metabolism. Ann. Rev. Microbiol. 81:383-390.

Egorov, N.S., Loriya, Zh.K., Vybornykh, S.N. and Khamrun, R. 1986. Effect of the composition of the medium on bacitracin synthesis and spore formation by *Bacillus licheneformis* 28 KA. Prikladnaya Biokhimiya J Mikrobiologiya. 22:107-111.

Freaney, T.E. and Allen, L.P. Production of bacitracin. U.S. Pat., 2,828, 246, Mar. 25, 1973.

Fridlender, B., Kerenzur, M., Brown, S., Bar, E., Keyman, A., Sandler, N. and Hofstein, R., 1989. The development of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* as biocontrol agents : from research to industrial production. Mem. Inst. Oswadso. Cruz. 8:138.

Grayson, M. 1982. Antibiotics, chemotherapeutics and antibacterial agents for disease control. New York : John-Wiley & Sons.

Haavik, H.I, 1974 (a). Studies on the formation of bacitracin by *Bacillus licheniformis* : effect of glucose. J. Gen. Microbiol. 81:383-390.

_____., 1974 (b). Studies on the formation of bacitracin by *Bacillus licheniformis* : role of catabolite repression and organic acids. J. Gen. Microbiol. 84:321-326.

Hamilton-Miller, J.M.T. 1973. Chemistry and biology of the polyene macrolide antibiotics. Bacteriol. Rev. 37:166-196.

Hendlin, D. 1949. The nutritional requirements of a bracitracin-producing strain of *Bacillus subtilis*. Arch. Biochem. Biophys. 24:435-446.

Hettinger, T. P. and Craig, L.C. 1968. Ediene II. The composition of the antibiotic peptide ediene A. Biochemistry. 7:4147-4152.

_____. 1970. Ediene IV. structure of the antibiotic peptides edienes A_1 and B_1. Biochemistry. 9:1224-1232.

Hiitter, R., Leisinger, T., Niiesch, J. and Wehrli, W. 1978. Antibiotics and other secondary metabolites. Academic press.

Hodgson, B. 1970. Possible roles for antibiotics and other biological active peptides at specific stages during sporulation of *Bacillaceae*. J. Theor. Biol. 30:111-119.

Holland, I. B. 1962. Further observations of the properties of megacin, a bacteriocin formed by *Bacillus megaterium*. J. Gen. Microbiol. 29:603.

Isenberg, H.D. and BAlows, A., 1981. Bacterial pathogenicity in man and animals. The Prokasyotes. New York : Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Javis, F. G. and Johnson, M. J. 1947. The role of the constituents of synthetic medium for penicillin production. J. Am. Chem. Soc. 69:3010-3017.

Jiraporn Thaniyavarn, Morikawa, K., Hamuro, T. and Imanaka, T. 1992. Exploitation of transformation system in *Bacillus subtilis* 3/38 and its surfactin production. Microbial utilization of renewable resourses Vol.8 JSPS-NRTC seminar, Oct. 28-31,Bangkok ,Thailand. (in print.)

Katz, E., Wise, M. and Weisebach. H. 1965. Actinomycon biosynthesis. Differential effect of chloramphenicol on protein and peptide antibiotic synthesis. J. Biol. Chem. 240:3071-3078.

_____. and Demain, A. L. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus* : Chemistry, biogenesis and possible functions. Bacteriol. Rev. 41:449-474.

Kurusu, K., Ohba, K., Arai, T. and Fukushima, K. 1987. New peptide antibiotics LI-F03, F04, F05, F06, F07 and F08 produced by *Bacillus polymyxa*. J. Antibiot. 40:1506-1514.

Kurylo-Borowska, Z. 1967. Edeine. Antibiotics. 2:342-352.

Laemmli, U.K. 1970. Clevage of structural proteins during the assemble of the head of bacteriophage T-4. Nature. 227:680-685.

Landy, M., Warren, G.H., Roseman, S.B. and Colio. L. G. 1948. Bacillomycin : an antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 67:539-541.

Lee, S. G., Littau, V. and Lipmann, F. 1975. The relation between sporulation and the induction of antibiotic synthesis and of amino acid uptake in *Bacillus brevis*. J. Cell Biol. 66:233-242.

Lipmann, F. 1973. Nonribosomal polypeptide synthesis on polyenzyme templates. Acta Chem. Res. 6:361-367.

Mach, B., Reich, E. and Tatum, E. L. 1963. Separation of the biosynthesis of the antibiotic polypeptide tyrocidine from protein biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 50:175-181.

Mark, H.F., Othman, D.E., Overburger, C.G. and Seaborg, G.T. 1978. Encyclopaedia of Chemical Technology. 3rd ed. Vol.2 New York: Wiley Interscience Publication, John Wiley & Sons.

Martin, J. F. and Demain, A. L. 1980. Control of antibiotic biosynthesis. Microbiol Rev. 44:230-251.

Meyers, E., Pansy, F. E., Principe, P. A., Rathnum, M. L. and Parker, W. L. 1973. J. Antibiol. 26:437-443.

Nesemann, G., Praeve, P., Sukatsch, D. and Vertesy, L. 1972. Polyene antibiotic from bacteria Naturwissenschaften. 59:81-82.

Palfree, G. E. and Bussey, H. 1979. Yeast killer toxin : purification and characterization of the protein toxin from *Saccharomyces cerevisiae*. Eur. J. Biochem. 93:487-493.

Paulus, H. and Gray, E. 1964. The biosynthesis of polymyxin B by growing cultures of *Bacillus polymyxa*. J. Biol. Chem. 239:865-871.

_____. 1967. Polymyxins. Antibiotics. 2:254-267.

Phamacia Fine Chemicals., 1987. Don exchange chromatography : principles and methods. In R. I. Lund (ed.), Phamacia. Sweden.

Qadeer, M. A., Younus, O., Ashfaq, S. R. and Khan, F. Z. 1988. Production of bacitracin by *Bacillus licheniformis*. prakistan J. Sci. Ind. Res. 31:30-34.

Roscoe, J. and Abraham, E. P. 1966. Experiments relating to the biosynthesis of bacilysin. Biochem. J. 99:793:800.

Sadoff, H.L. 1972. Sporulation antibiotics of *Bacillus* species. In H. O. Halvorson, R. Hansen and 1.L. campbell (ed.), Spores V. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Sandrin, C., Peypoux, F. and Michel, G. 1990. Coproduction of surfactin and iturin A, lipopeptides with surfactant and antifungal properties, by *Bacillus subtilis*. Biotechnol. Appl. Biochem. 12:370-375.

Shoji, J. 1978. Recent chemical studies on peptide antibiotics from from the genus *Bacillus*. Adv. Appl. Microbiol. 24:187-214.

_____., Hinoo, H., Wakisaka, Y., Koizumi, K., Mayama, M. and Matruma, S. 1977. Isolation of two new polymyxin group antibiotics. J. Antibiot. 30:1029-1034.

Simlot, M. M., Pfaender, P. and Specht, D. 1973. Synthesis of antibiotics by enzymes from altered growth conditions by *Bacillus licheniformis*. FEBS Letters. 35:231-235.

Smith, R. L., Bungay, H. R. and Pittenger, R. C. 1962. Growth-biosynthesis relationship in erythromycin fermentation. Appl. Microbiol. 10:293-296.

Sneath, P.H.A. 1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore/London : Williums & Wilkins.

Snoke, J. E. 1961. Formation of bacitracin by protoplasts of *Bacillus licheniformis*. J. Bacteriol. 81:983-989.

Soltero, F. V. and Johnson, M. J. 1953. Effect of the carbohydrate nutrition on penicillin production by *Penicillium chrysogenum* Q 126. Appl. Microbiol. 1:52-57.

Tomino, S., Yamada, M., Itoh, H. and Kenhashi, K. 1967. Cell-free synthesis of gramicidine S. Biochemistry. 6:2552-2560.

Vogler, K. and Studer, R. O. 1966. The chemistry of the polymyxin antibiotics. Experience. 23:345-354.

Waksman, S. A. 1961. The role of antibiotics in nature. Perspect. Biol. Med. 4:271-278.

Weinberg, E. D. 1970. Bioxynthesis of secondary metabolites : roles of trace metals. Adv. Microbial. Physiol. 4:1-44.

_____., 1971. Secondary metabolisms raison d'etre. Perspect. Biol. Med. 14:565-577.

Winnick, R. E., Lis, H. and Winnick, T. 1961. Biosynthesis of gramicidine S. I. General characterisitcs of the process in growing cultures of *Bacillus brevis*. Biochem. Biophys. Acta. 49:451-462.

Wood, D. R. 1966. Studies of the nature of the killer factor in yeast. D. Phil. Thesis. Oxford University.

_____. and Bevan, E. A. 1968. Studies of the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol. 51:115-126.

Woodruff, H. B. 1966. The physiological of antibiotic production : the role of the producing organisms. p.22-46 In B. A. Newton and P. B. Reynolds (ed.) 16 th Symposium of the Society of General Microbiologists. Cambridge University Press, Cambridge.

Yoshida, T. and Katagiri, K. 1969. Biosynthesis of the quenoxatine antibiotic, triostin by *Streptomyces* S-2-210L. Biochem. 8:2645-2651.

Young, T. W. and Yagin, M. 1978. A comparison of the killer character in different yeasts and its classification. Antonie Van Leeuwenhock. 44:59-77.

ภาคผนวก

1. สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 อาหารวายเอ็ม (YM medium)

ผงสกัดยีสต์	3.0	กรัม
เนื้อสกัด	3.0	กรัม
เปปโตน	5.0	กรัม
กลูโคส	10.0	กรัม
ผงวุ้น	20.0	กรัม
น้ำ	1,000.0	มล.

นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันและอุณหภูมิมาตรฐาน (15 ปอนด์/ตารางนิ้ว, 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที)

1.2 บลูมีเดียม (YEPD-MB medium)

ผงสกัดยีสต์	10.0	กรัม
แบคโตเปปโตน	10.0	กรัม
กลูโคส	20.0	กรัม
ผงวุ้น	20.0	กรัม
น้ำ	900.0	มล.
ฟอสเฟต-ซิเตรทบัฟเฟอร์	100.0	มล.

นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันและอุณหภูมิมาตรฐาน เมื่ออุณหภูมิลดลงจนถึง 45°ซ. จึงเติมเมทธิลลีนบลู (1% น้ำหนัก/ปริมาตร) 40.0 มล.

1.3 อาหารเหลวนิวเตรียนท์ (Nutrient broth)

เนื้อสกัด	3.0	กรัม
แบคโตเปปโตน	5.0	กรัม
น้ำ	1,000.0	มล.

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

1.4 อาหารพีดีเอ (PDA medium)

มันฝรั่งหั่น	200.0	กรัม
กลูโคส	20.0	กรัม
ผงวุ้น	20.0	กรัม

นำมันฝรั่งหั่นมาต้ม และคั้นเอาเฉพาะส่วนน้ำมาใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มล.ด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

1.5 อาหารวายอีพีดี (Complete medium or YEPD medium)

ผงสกัดยีสต์	10.0	กรัม
แบคโตเปปโตน	10.0	กรัม
กลูโคส	20.0	กรัม
น้ำ	900.0	มล.
ฟอสเฟต-ซิเตรทบัฟเฟอร์	100.0	มล.

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

1.6 อาหารวุ้นนิวเตรียนท์ (Nutrient agar)

เนื้อสกัด	3.0	กรัม
แบคโตเปปโตน	5.0	กรัม
ผงวุ้น	15.0	กรัม
น้ำ	1,000.0	มล.

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

1.7 อาหารโอ-เอฟ เบซัล (OF Basal medium)

ทริปโตน	2.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
ไดโปแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.3	กรัม
ผงวุ้น	2.0-3.0	กรัม
บรอมไธมอลบลู	0.03-0.08	กรัม
น้ำ	1,000.0	มล.

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

1.8 อาหารซิมมอน ซิเตรท (Simmon-citrate medium)

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$)	0.2	กรัม
แอมโมเนียมไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต ($NH_4H_2PO_4$)	1.0	กรัม
ไดโปแทสเซียม ฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1.0	กรัม
โซเดียมซิเตรท	2.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม
ผงวุ้น	20.0	กรัม

บรอมไธมอลบลู	0.08	กรัม
น้ำ	1,000.0	มล.

ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 6.9 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

1.9 อาหารเหลววี-พี (Voges-Proskaver broth)

โปรติโอส เปปโตน	7.0	กรัม
กลูโคส	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม
น้ำ	1,000.0	มล.

ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 6.5 ใส่หลอดทดลองขนาด 20.0 มม. หลอดละ 5.0 มล. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

1.10 อาหารเหลวแซบอรอด เดกซ์โทรส (Sabouraud Dextrose broth)

นีโอเปปโตน	10.0	กรัม
เดกซ์โตรส	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มล.

ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 5.7 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

1.11 อาหารวุ้นสตาร์ช (Starch agar)

แป้งมันฝรั่ง	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	10.0	มล.
อาหารวุ้นนิวเตรียนท์ (ภาคผนวกหมายเลข 1.6)	100.0	มล.

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

1.12 อาหารอินโดล โปรดักชัน (Indole production medium)

ทริปโตน	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มล.

แบ่งใส่หลอด ๆ ละ 5.0 มล. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

1.13 อาหารซอล์ททโทเลอแรนซ์ (Salt tolerance medium)

อาหารเหลวนิวเตรียนท์ (ภาคผนวกหมายเลข 1.3) 100.0 มล.
โซเดียมคลอไรด์ 2.0%, 5.0%, 7.0% และ 10.0% น้ำหนัก/ปริมาตร
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

1.14 นิวเตรียนท์ เจลาติน (Nutrient gelatin)

เจลาติน	120.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มล.

ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

1.15 อาหารเหลวฟีนอล เรด เบส (Phenol red broth base)

โปรติโอสเปปโตน	10.0	กรัม
เนื้อสกัด	1.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม
ฟีนอล เรด	0.018	กรัม
น้ำ	1,000.0	มล.

ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.4 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

น้ำตาลที่ใช้ได้แก่ ดี-กลูโคส, ดี-ฟรุกโตส, ดี-แมนนิทอล, ดี-ไซโลส และแอล-อะราบิโนส

2. สีย้อมและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1 สารละลายคริสตอลไวโอเล็ต (Crystal violet solution)

คริสตอลไวโอเล็ต	4.0	กรัม
น้ำกลั่น	400.0	มล.

2.2 สารละลายแกรมไอโอดีน (Gram's iodine solution)

ไอโอดีนคริสตอล	10.0	กรัม
โปแทสเซียมไอโอไดด์ (KI)	0.5	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	50.0	มล.

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในน้ำกลั่นช้าๆ แล้วจึงเติมไอโอดีนคริสตอลลงไป และเติมโปแทสเซียมไอโอไดด์เป็นลำดับสุดท้าย

2.3 สารละลายซาฟรานิน (Safranin staining solution)

ซาฟรานิน	4.0	กรัม
น้ำกลั่น	200.0	มล.

2.4 สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide solution) ความเข้มข้น 3 เปอร์เซนต์

สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (ที่มีความเข้มข้น 30 เปอร์เซนต์)	10.0	มล.
น้ำกลั่น	90.0	มล.

2.5 สารละลายโคแวค (Kovac's solution)

พาราไดเมทิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ (P-dinethylamenobenzaldehyde)	5.0	กรัม
เอมิล หรือ บิวธิลแอลกอฮอล์ (Amyl or butyl alcohol)	75.0	มล.
กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Conc. HCl)	25.0	มล.

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกันใส่ในขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ.

2.6 สารละลายเมธิลเรด (Methyl red)

เมธิลเรด (Methyl red)	1.0	กรัม
95 เปอร์เซนต์ เอทานอล	300.0	มล.
น้ำกลั่น	200.0	มล.

2.7 สารละลายทดสอบโวค โพรคาเวอร์ (Voges-Prokaver test reagent)

สารละลาย ก.

แอลฟาแนฟทอล (Alpha-naphthol)	5.0	มล.
95 เปอร์เซนต์ เอธานอล	100.0	มล.

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา

สารละลาย ข.

โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH)	40.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มล.

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา

3. สารละลายสำหรับวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธีลอรี (Lowry's method)

3.1 ลอรี เอ (Lowry A)

โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	60	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	12	กรัม
โซเดียมโปแทสเซียมทาร์เทรต	0.6	กรัม
น้ำกลั่น	3,000	มล.

3.2 ลอรี บี (Lowry B)

คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$)	50	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มล.

3.3 ลอรี ซี (Lowry C)

ผสมลอรี เอ	50	ส่วน
ผสมลอรี บี	1	ส่วน

3.4 สารละลายฟีนอลรีเอเจนท์ (Phenol reagent; Lowry D)

สารละลายโฟลินฟีนอลรีเอเจนท์ (Folin phenol reagent)	1	ส่วน
น้ำกลั่น	1	ส่วน

4. สารละลายที่ใช้ในการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น (Slab gel electrophoresis)

4.1 10x สารละลายทริส-ไกลซีนอิเลคโตรดบัฟเฟอร์
(0.25 โมลาร์ ทริส , 1.92 โมลาร์ ไกลซีน)

ทริส	30	กรัม
ไกลซีน	144	กรัม
ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 8.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก		
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	1,000	มล.

4.2 1x สารละลายทริส-ไกลซีนอิเลคโตรดบัฟเฟอร์
(0.025 โมลาร์ ทริส , 0.192 โมลาร์ ไกลซีน)

10x สารละลายทริส-ไกลซีนอิเลคโตรดบัฟเฟอร์	100	มล.
20% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	5	มล.
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	1,000	มล.

4.3 20% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS)

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	100	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	500	มล.

4.4 4x สารละลายทริส-โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต pH 6.8 (0.5 โมลาร์ทริส)

ทริส	30.275	กรัม
20% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	10	มล.
TEMED	1	มล.
ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็น 6.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก		
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	300	มล.
เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิห้อง		

4.5 4x สารละลายทริส-โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต pH 8.8 (1.5 โมลาร์ทริส)

ทริส	90.825	กรัม
20% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	10	มล.
TEMED	0.5	มล.
ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็น 8.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก		
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	500	มล.
เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิห้อง		

4.6 2x บัฟเฟอร์ที่ใช้กับโปรตีนที่จะวิเคราะห์ (Sample buffer)(0.125 โมลาร์ทริส)

กลีเซอรอล	10	มล.
2-เมอแคพโตเอธานอล	5	มล.

20% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	10	มล.
0.5 โมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ pH 6.8	12.5	มล.
สารละลาย 1% บรอมฟินอลบลู	0.1	มล.
น้ำกลั่น	12.5	มล.

4.7 สารละลายอะคริลาไมด์ (Acrylamide stock)

อะคริลาไมด์	30	กรัม
BIS	0.8	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	100	มล.

กรอง เก็บในขวดสีชาที่ 4°ซ

4.8 1% สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	10	มล.

สารละลายนี้ต้องเตรียมใหม่ก่อนใช้

4.9 สารละลายผสมของเซพาเรตติงเจล (Separating gel solution)

สารละลายอะคริลาไมด์	14	กรัม
4x สารละลายทริส-โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต pH 8.8	5	กรัม
1% สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	0.5	กรัม

4.10 สารละลายผสมของสแตกกิงเจล (Stacking gel solution)

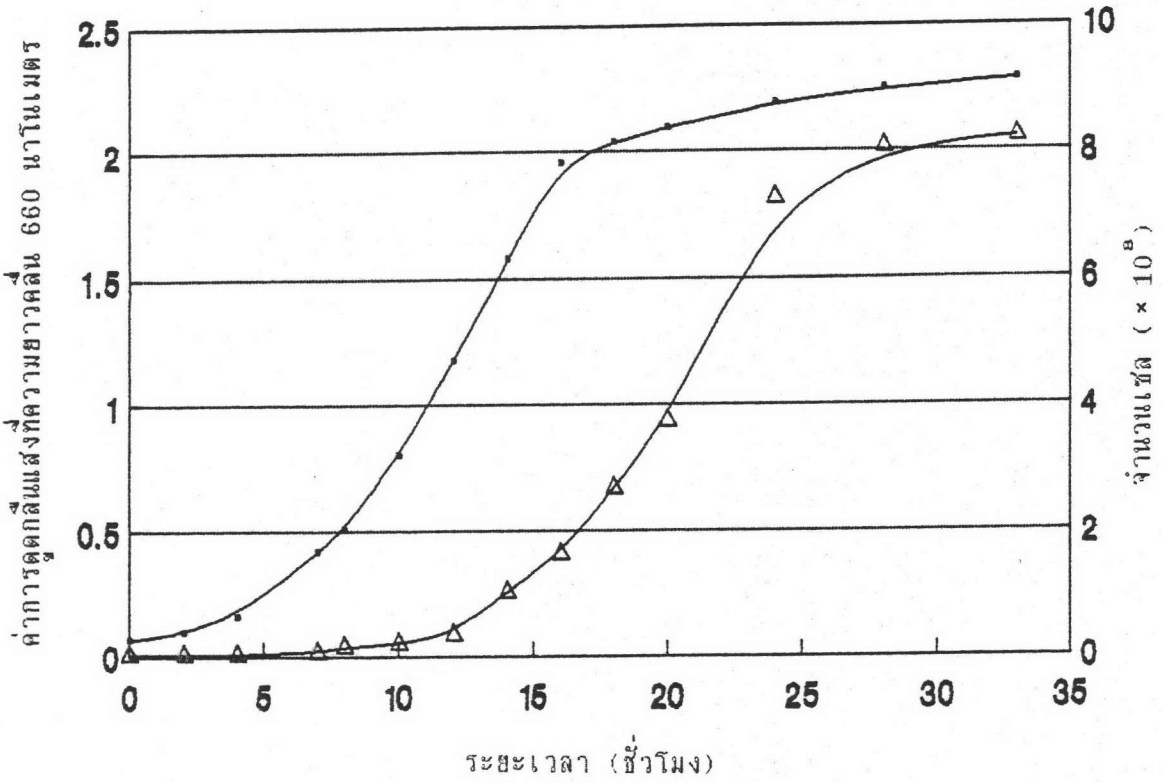
สารละลายอะคริลาไมด์	1	กรัม
4x สารละลายทริส-โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต pH 6.8	2.5	กรัม
1% สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.25	กรัม
น้ำกลั่น	6.25	กรัม

4.11 สารละลายสำหรับย้อมสี (Staining solution)

โคแมสซี บริลเลียนท์ บลู จี-250	2	กรัม
เมธานอล	500	มล.
กรดอะซิติก	100	มล.
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	1,000	มล.

4.12 สารละลายสำหรับล้างสี (Destaining solution)

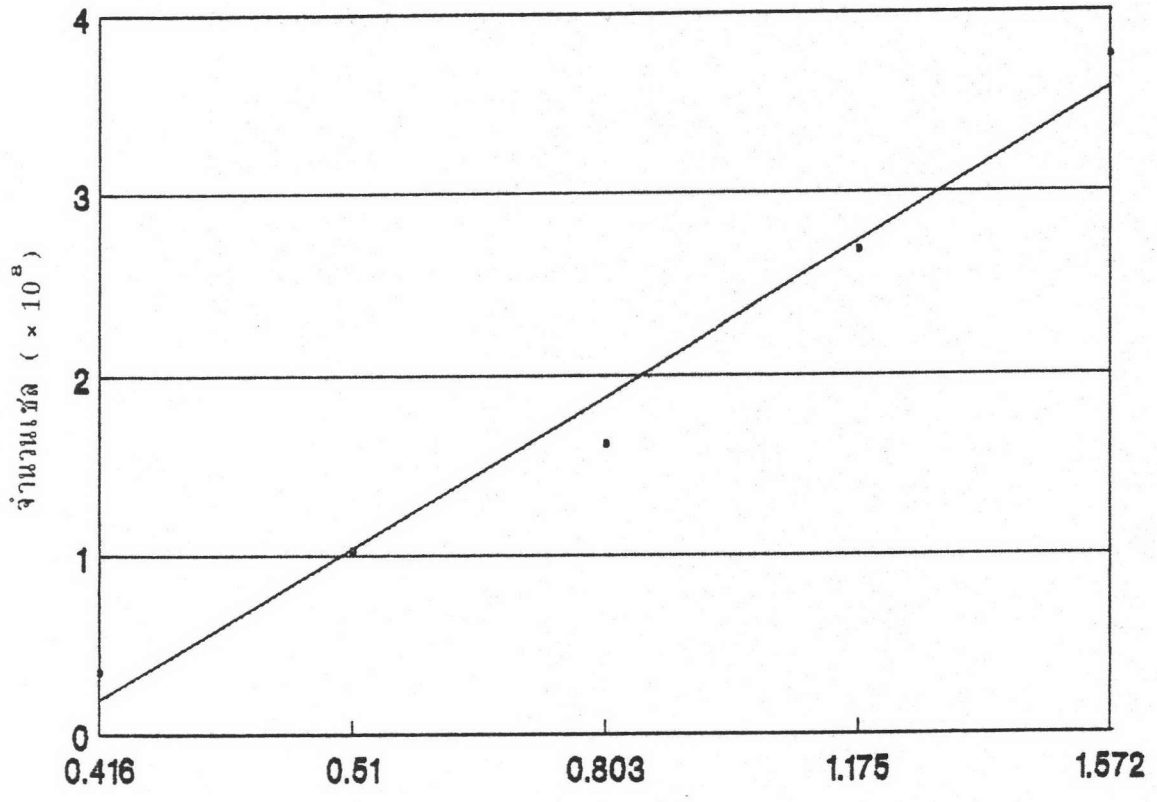
เมธานอล	50	มล.
กรดอะซิติก	70	มล.
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	1,000	มล.



ภาคผนวกที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญ และจำนวนเซลของ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ทดสอบที่เวลาต่างๆ เมื่อเลี้ยงในขวดเขย่า ติดตามอัตราการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และนับจำนวนเซลโดยการทำ Plate count

—•— หมายถึง อัตราการเจริญ

—△— หมายถึง จำนวนเซล



ภาคผนวกที่ 2 กราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญ และจำนวนเซล ในช่วงระยะการเจริญแบบลอกาลิธึมของ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ทดสอบ เมื่อเลี้ยงในขวดเขย่า ติดตามอัตราการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และนับจำนวนเซลโดยการทำ Plate count

ประวัติผู้เขียน

นางสาววิบูลย์ลักษณ์ วิสุทธิศักดิ์ เกิดเมื่อวันที่ 27 มีนาคม 2511 ที่กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2532 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ. 2533