เอกสารอ้างอิง

1. Dolman, C.D., " Reflections on Sir Alexander Fleming ", Chemistry, Vol. 51(7), pp. 6-10, 1978.

2. Crueger, W. and A.Crueger, " Antibiotics ", Biotechnology, (Brock, D., ed.), Chap. 13, pp. 197-206, Scinece Tech., Inc., U.S.A. 1984.

3. Hersbach, G.J.M., C.P. Van Der Beck and W.M. Vandijek, " The Penicillin : Properties, Biosynthesis and Fermentation ", Biotechnology of Industrial Antibiotics, (Vandamme, J., ed.), Vol. 22, pp. 46-103, Mercel Dekker, U.S.A., 1984.

4. Swartz, R.W., " Penicillins ", Comprehensive Biotechnology, (Moo-Young, ed.), Vol. 2, pp. 7-34, Pergamon Press, New York, 1985.

5. Wilson, D., Penicillin in Perspective, pp. 3-192, Faber & Faber, London, 1976.

6. Raper, K.B., " The Development of Improved Penicillin Production Molds ", Ann. N.Y. Acad. Sci., 48, 41-52, 1946.

7. Clutterbuck, P.W., R. Lovell and H. Raistrick, " The Formation from Glucose by Members of the *Penicillium chrysogenum* series of a Pigment, an Alkali-soluble Protein and Penicillin. The Antibactrial Substance of Fleming ", Biochem. J., 26, 1907-1918, 1932.

8. Chain, E., H.W. Florey, A.D. Gardner, N.G. Heatley, M.A. Jennings, J.O.M. Ewing and A.G. Sanders, " Penicillin as a Chemotherapeutic Agent ", Lancet, Vol. 2, pp. 226-228, 1940.

9. Raper, K.B. and C. Thom, " A Manual of the Penicillia ", pp. 875 Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1949.

10. Raper, K.B. and D.F. Alexander, " Penicillin V Mycological Aspects of Penicillin Production ", J. Elisha Mitch. Sci. Soc., 61, 74-113, 1945.

11. Backus, M.P. and J.F. Stauffer, " The Production and Selection of a Family of Strains in *Penicillium chrysogenum* ", Mycologia, 47(4), 429-463, 1955.

12. Perguin, L.H.C., " Bijdkage tot de Kennis dek Oxydatieve Dissimilative van *Aspergillus niger* van Tieghem ", Ph.D. thesis, Delft University of Technology, delft, The Netherlands. (cites in Biotechnology of Industrial Antibiotics).

13. Demain, L., " Penicillin and Cephalosporins ", Biosynthesis of Antibiotic (Snell, J.f., ed.), Vol. 1, pp. 30-35, Academic Press, London, 1966.

14. Queener, S. and R. Swartz, " Penicillins : Biosynthetic and Semisynthetic " , Economic Microbiology, (Rose, A.H., ed.), Vol. 3, pp. 35-74, Academic Press, London, 1979.

15. Collee, J.G., " Applied Medical Microbiology ", Basic Microbiology, (Wilkinson, J.F., ed.), Vol. 3, pp. 107-125, John Wiley & Sons, New York, 1981.

16. Gailey, F.B., J.J. Stefaniak, B.H. Olson and M.J. Johnson, " A Comparison of Penicillin-producing Strains of *Penicillium notatum-chrysogenum* ", J. Bacteriol., 52, 129-140, 1946.

17. Knight, S.G. and W.C. Frazier, " The Effect of Corn Steep Liquor Ash on Penicillin Production ", Science, 102, 617-618, 1945.

18. Koffler, H.,R.L. Emerson, D. Perlman and R.H. Burris ", Chemical Changes in Submerged Penicillin Fermentations ", J.Bacteriol., 50, 517-548, 1945.

19. Bowden, J.P. and W.H. Peterson, " The Role of Corn Steep Liquor in the Production of Penicillin ", Arch. Biochem., 9, 387-399, 1946.

20. Johnson, M.J., " Metabolism of Penicillin Producing Molds ", Ann. N.Y. Acad. Sci., 48, 57-66, 1946.

21. Koffler, H., S.G. Knight and W.C. Fraizer , " The Effect of Certain Mineral Elements on the Production of Penicillin in Shake Flasks ", J. Bacteriol., 53, 115-123, 1947.

22. Koffler, H., S.G. Knight, W.C. Fraizer and R.H. Burris, " Metabolic Changes in Submerged Penicillin Fermentations on Synthetic Media ", J. Bacteriol., 51, 385-392, 1946.

23. Stefaniak, J.J., F.B. Gailey, C.S. Brown and M.J. Johnson, " Pilot Plant Equipment for Submerged Production of Penicillin ", Ind.Eng.Chem., 38, 666-671, 1946.

24. Stefaniak, J.J., F.B. Gailey, F.G. Jarvis and M.J. Johnson, " The Effect of Environmental Conditionson Penicillin Fermentations with *Penicillium chrysogenum* X-1612 ", J. Bacteriol., 52, 119-127, 1946.

25. Backus, M.P., J.F. Stauffer and M.J. Johnson, " Penicillin Yields From New Mold Strains ", J. An. Chem. Soc., 68, 152-153, 1946.

26. Anderson, R.F., L.M. Whitmore, Jr., W.E. Brown, W.H. Peterson, B.W. Churchill, F.R. Roegner, J.H. Campbell, M.P. Backus, and J.F. Stauffer, " Production of Penicillin by some Pigmentless Mutants of the Mold, *Penicillium chrysogenum* Q176 ", Ind. and Eng. Chem., 45, 768-773, 1953.

27. Backus, M.P., J.F. Stauffer et.al., " Penicillin Production by Pigment- Free Molds ", Ind. and Eng. Chem., 45, 768-773, 1953.

28. Brown, W.E. and W.H.Peterson, " Factors Affecting Production of Penicillin in Semi-pilot-plant Equipment ", Ind. and Eng. Chem., 42, 1769-1774, 1950.

29. Brown, W.E., " Penicillin Fermentation in Laboratory Type Waldhof Fermenter ", Ind. and Eng. Chem., 42, 1823-1826, 1950.

30. Higuchi, K., F.G. Jarvis, W.H. Peterson and M.J. Johnson, " Effect of Phenylacetic Acid Derivativeson the Types of Penicillin Produced by *Penicillium chrysogenum* Q176 ", J. Am. Chem. Soc., 68, 1669, 1946.

31. Crueger, W. and A. Crueger, " Strain Development ", Biotechnology, (Brock,D., ed.), Chap. 3, pp. 9-15, Science Tech., Inc., U.S.A. 1984.

32. Calam, C.T. , " Improvement of Microorganisms by Mutation, Hybridization and Selection ", Method in Microbiology, (Norris, J. R. and N.W. Ribbon, eds.), Vol. 3A, pp. 435-459, Academic Press, New York, 1970.

33. Baltz, R., " Strain Improvement ", Manual of Industrial Microbiology and Biotechnolgy, (Demain, A.L. and N.A. Solomon, eds.), pp.154- 169, 1986.

34. Davies, O.L., " Screening for Improved Mutants in Antibiotic Research ", Biometrics, 20, 576-591, 1964.

35. Hopwood, D.A., " The Isolation of Mutants ", Method in Microbiology, (Norris, J.R. and D.W. Ribbons, eds.), Chap. 6, Vol. 3A, pp. 363- 430, Academic Press, Inc., New York, 1970.

36. Sikyta, B., " Genetics of Industrial Microorganisms ", Method in Industrial Microbiology, Chap. 7, pp. 214-239, 1983.

37. Fantini, A.A., " Strain Development ", Method in Enzymology, (Hash, J.H. ed.), Vol. 43, pp. 24-41, Academic Press, New York, 1975.

38. Jacobson, G.K., " Mutations ", Biotechnology, (A Comprehensive Treatisen 8 Volumes (Rehm, H.J. and G. Reed, eds.), Chap.5b, Vol.1, pp.280-304, Science Tech., Inc., U.S.A., 1984.

39. Adelberg, E.A., M. Mandeland C.C.G. Chen, " Optimal Conditions for Mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguadinine in *Escherichia coli K12* ", Biochem. Biophys. Res. Commun., 18, 788-795 ,1965.

40. Mandell, J.D. and J. Greenberg, " A New Chemical Mutagen for Bacteria, 1-Methyl-3-Nitro-1-Nitrosoguanidine ", Biochem. Biophy. Res. Com., 3(6), 575-577, 1960.

41. Luengo, J.M. and M.A. Moreno., " Separation by High-Performance Liquid Chromatography of Penicillins with C_4 to C_{10} Aliphatics Side Chains ", Analytical Biochemistry, 164, 559-562, 1987.

42. วนิดา เรืองศรี, " สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเพนนิซิลิน จี โดย เพนนิซิเลียม ไคลโซจีนัม เอ 88 ", วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2532.

43. Tien, W., " Isolation of *Penicillium chrysogenum* Mutants by Mutation and Selection Technique ", Proc. Natl. Sci. Counc. ROC (A), 5(4), 256-261, 1981.

44. Rapers, S.D. and G. Holt, " Isolation and Characterization of DNA Repair Deficient Mutants from *Penicillium chrysogenum* ", Appl. Microbiol. Biotechnol. , 20, 251-255, 1984.

45. Ball, C. and M.P. McGonagle, " Development and Evaluation of a Potency Index Screen for Detecting Mutants of *Penicillium chrysogenum* Having Increased Penicillin Yields " , J. Appl. Bact. , 45, 67-74, 1978.

46. อภิญญา วงศ์กิดาการ และคณะ, สถิติ พื้นฐาน , มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2523.

ภาคผนวก

1. สูตรอาหารที่ใช้ในการวิจัย (42)

1.1 สูตรอาหารที่ใช้สำหรับการเก็บรักษาเชื้อราและเพิ่มปริมาณสปอร์ โพเตโตเด็กซ์โตรสอาการ์ (potato dextrose agar, PDA) ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

มันฝรั่ง (ต้มในน้ำเดือดแล้วกรองเฉพาะน้ำใส)	300	กรัม
เดกซ์โตรส	20	กรัม
วุ้นผง	20	กรัม

อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ. ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 สูตรอาหารสูตรอุดมสำหรับเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ทดสอบ (test microorganism) และหาปริมาณเพนิซิลลิน จี โดยวิธีทางชีววิทยา (bioassay) ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

แบคโตเปปโตน	10	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม
แบคโตอาการ์	15	กรัม

ปรับพีเอชเป็น 7.2 ก่อนอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ. ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3 สูตรอาหารเหลวที่ใช้ในการหมักเพื่อผลิตเพนิซิลลิน จี ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

แลคโตส	30	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว	347	มล.
แอมโมเนียมซัลเฟต	5	กรัม
โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.6	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.6	กรัม
แคลเซียมไฮดรอกไซด์	0.5	กรัม
น้ำมันถั่วเหลือง	4	มล.
วุ้นผง	2	กรัม

ปรับพีเอชเป็น 6.1 ก่อนอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110°ซ. ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที

2. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (42)

2.1 การเตรียมสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง

ชั่งกากถั่วเหลืองขนาด 20 เมช (0.84 มม.) 12 กรัม เติมกรดกำมะถันเข้มข้น1 นอร์มอล (normal) 40 มล. นำไปใส่หม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 40 นาที สกัด 2 ครั้งด้วยน้ำปริมาตร 50 และ 30 มล. ตามลำดับ ทำให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 10 โมลาร์ ใช้ส่วนใสเตรียมอาหาร

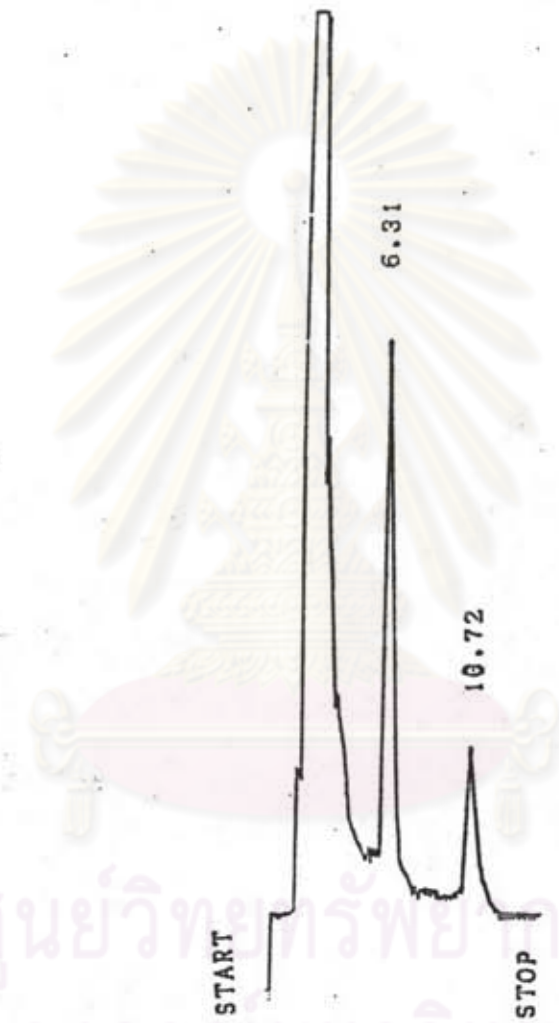
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การเตรียมจานเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Staphylococcus aureus (42)

เตรียมจานเพาะเลี้ยงเชื้อ (petridish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม. สูง 1.5 ซม. ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เจือจางเชื้อที่เตรียมตามข้อ 2.3.2 ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 25% ของการคายแสง (transmittance) โดยการวัดที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร แล้วเจือจางอีก 20 เท่าด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว นำเชื้อที่เตรียมได้นี้ ปริมาตร 0.4 มล. มาผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวกที่ 1.2) ปริมาตร 20 มล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. ลักษณะโครมาโตแกรมของเพนิซิลลิน จี ที่ได้จากการสังเคราะห์ของ Penicillium chrysogenum A 88 โดยใช้เพนิซิลลิน วี เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC



#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		6.31	64.3005		79779
0		10.72	35.6994		44292
	TOTAL		99.9999		124071

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. ลักษณะโครมาโตแกรมของเพนิซิลลิน จี มาตรฐาน โดยใช้เพนิซิลลิน วี เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

peak ที่ 1 ได้แก่ เพนิซิลลิน จี นาทีที่ 6.41

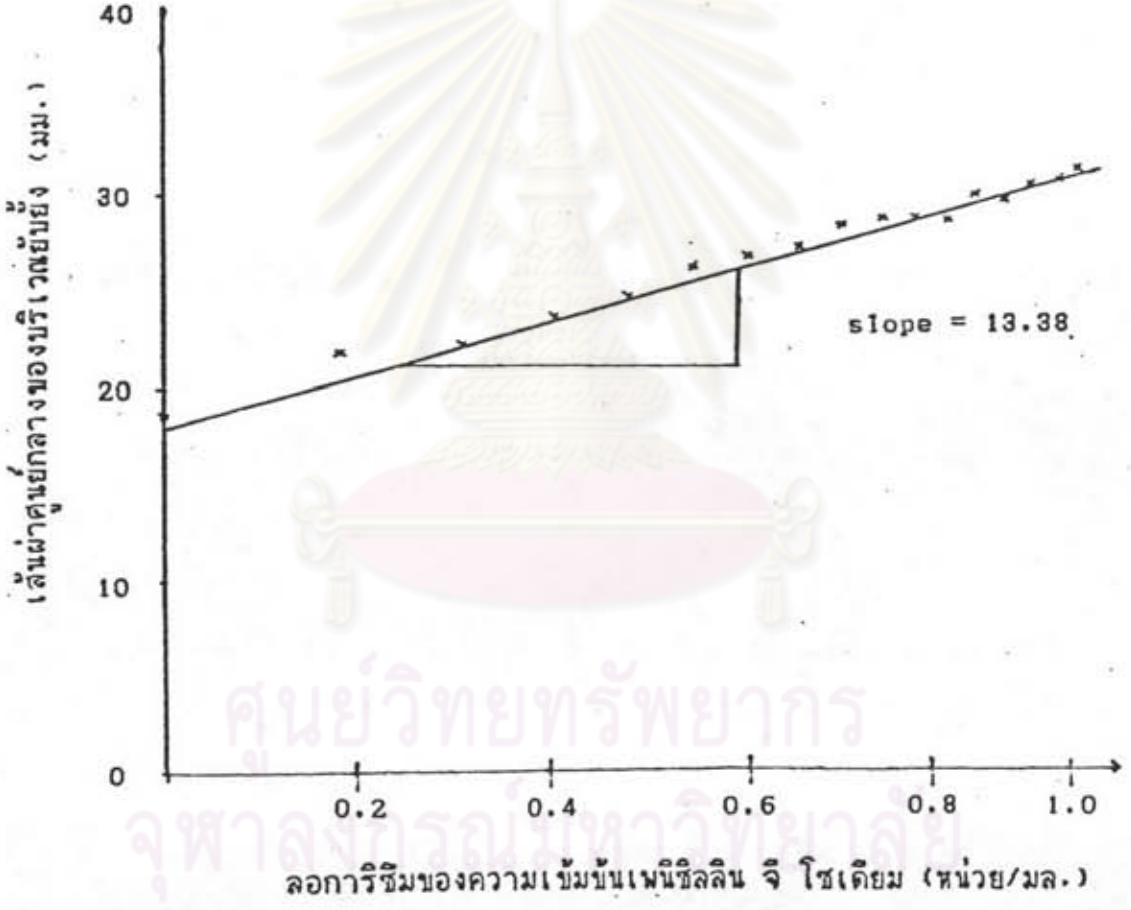
peak ที่ 2 ได้แก่ เพนิซิลลิน วี นาทีที่ 10.58

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. การคำนวณหาปริมาณเพนิซิลลิน จี โดยวิธีทางชีววิทยา (bioassay)

6.1 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณเพนิซิลลิน จี

ใช้เพนิซิลลิน จี โซเดียม มาหาปริมาณเพนิซิลลิน จี ตามวิธีข้อ 3.1 โดยทำ 3 ซ้ำ (triplicate) 2 ครั้ง เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าลอการิธึม (logarithm) ของความเข้มข้นเพนิซิลลิน จี กับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณเพนิซิลลิน จี โดยวิธีทางชีววิทยา

กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรง ฉนั้นสามารถคำนวณจากสูตรสมการเส้นตรงได้ดังนี้

$$y = ax + b$$ *

แทนค่าจากสูตร

เส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (ϕ) = slope . ลอการิธึมของความเข้มข้นเพนิซิลลิน จี + 18

ค่าลอการิธึมของเพนิซิลลิน จี = (ϕ - 18) / 13.38

* y = ค่าบนแกน y (ความกว้างของบริเวณยับยั้ง)

x = ค่าบนแกน x (ลอการิธึมของความเข้มข้นเพนิซิลลิน จี)

a = ค่า slpoe (= 13.38)

b = จุดตัดบนแกน y (= 18)

5.2 <u>การหาปริมาณเพนิซิลลิน จี ในน้ำหมัก</u>

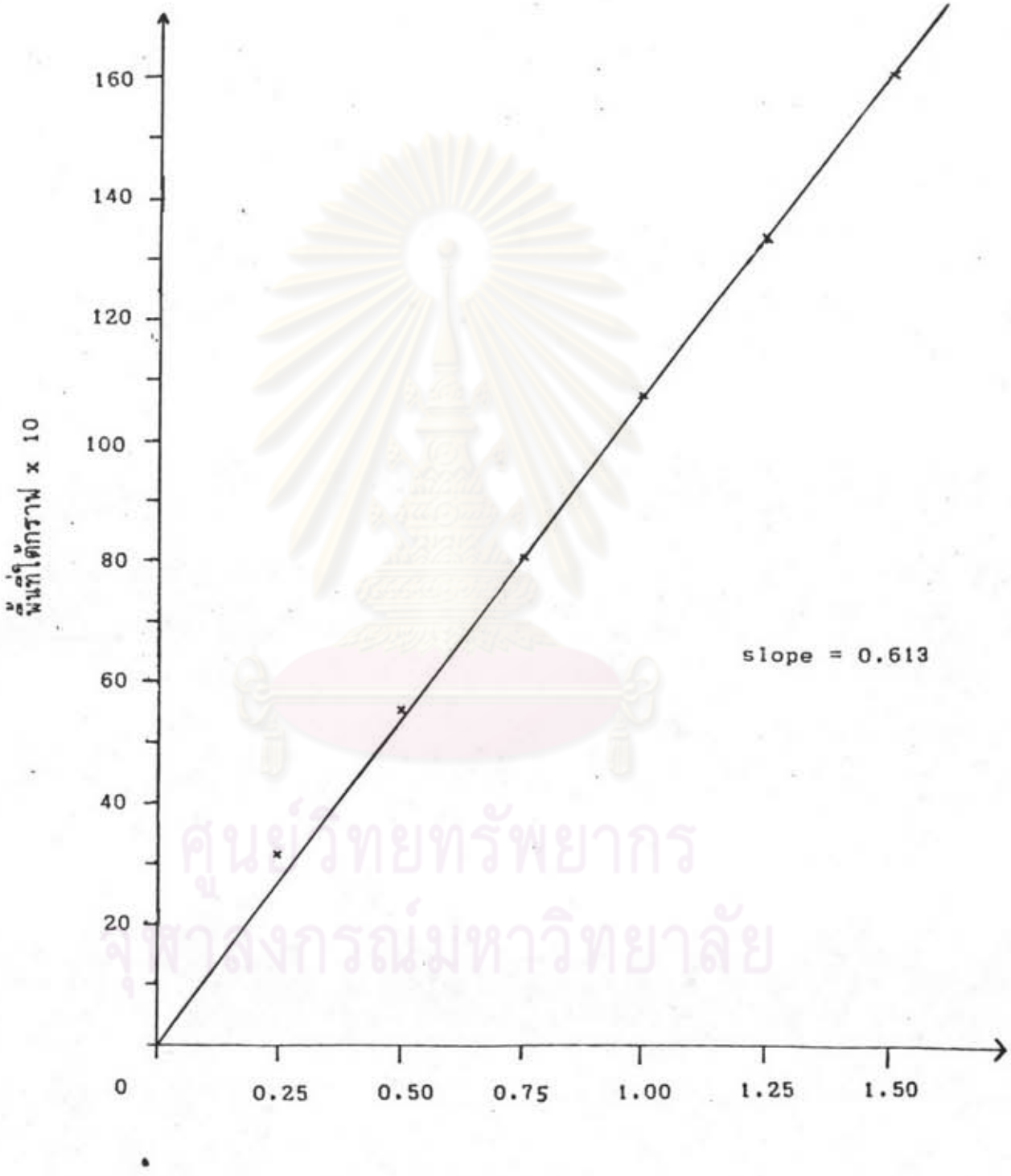
นำน้ำหมักมาทำการเจือจางแล้วหาปริมาณเพนิซิลลิน จี ตามวิธีข้อ 3.1 โดยทำ 2 ซ้ำ (duplicate) หาค่าเฉลี่ยของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น แล้วคำนวณหาปริมาณเพนิซิลลิน จี ตามข้อ 5.1 ดังนี้

$$\text{ค่าลอการิธึม} = \frac{\text{(ความกว้างของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น - 18)}}{\text{(ค่า slope)}}$$

เมื่อได้ปริมาณเพนิซิลลิน จี แล้ว คูณด้วยค่า dilution factor ค่าที่ได้มีหน่วยเป็น หน่วยต่อมิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณเพนิซิลลิน จี โดยใช้เพนิซิลลิน วี เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8. การวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design : CRD) (46)

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้านความสามารถในการผลิตเพนิซิลลิน จิ ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ใหม่ ที่ให้ผลผลิตเพนิซิลลิน จิ สูงกว่าเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 ซึ่งเป็นเชื้อราสายพันธุ์ดั้งต้น เชื้อราสายพันธุ์ใหม่ได้จากการชักนำให้สปอร์ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 เกิดการกลายพันธุ์ โดยใช้แสงอุลตราไวโอเลตเป็นสารชักนำ (จากตารางที่ 7 บทที่ 3)

แหล่งความแปรผัน (Source of Variation)	ระดับความอิสระ (degree of freedom) (df)	ผลรวมกำลังสองของค่าเบี่ยงเบนไปจากค่าเฉลี่ย (SS)	ผลเฉลี่ยของผลรวม (MS)
ความแปรผัน (variation)	7	0.2560	0.2850**
ความคลาดเคลื่อน (error)	40	0.0056	0.0002
ผลรวม	47	0.2616	

critical value = 4.97% $LSD_{0.05}$ = 22%

** มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9. การวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์
(Completely Randomized Design : CRD) (46)

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้านความสามารถในการผลิตเพนิซิลลิน จี ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ใหม่ ที่ให้ผลผลิตเพนิซิลลิน จี สูงกว่าเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 ซึ่งเป็นเชื้อรา สายพันธุ์ดั้งต้น เชื้อราสายพันธุ์ใหม่ได้จากการชักนำให้สปอร์ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 เกิดการกลายพันธุ์ โดยใช้สารเคมี NTG เป็นสารชักนำ (จากตารางที่ 14 บทที่ 3)

แหล่งความแปรผัน (Source of Variation)	ระดับความอิสระ (degree of freedom) (df)	ผลรวมกำลังสองของค่าเบี่ยงเบนไปจากค่าเฉลี่ย (SS)	ผลเฉลี่ยของผลรวม (MS)
ความแปรผัน (variation)	27	18.1234	0.1342**
ความคลาดเคลื่อน (error)	112	0.0541	0.0005
ผลรวม	139	18.1775	

critical value = 2.40% $LSD_{0.05}$ = 1.86%

** มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

10. การวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design : CRD) (46)

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้านความสามารถในการผลิตเพนิซิลลิน จี ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ใหม่ ที่ให้ผลผลิตเพนิซิลลิน จี สูงกว่าเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CN 1 ซึ่งเป็นเชื้อรา สายพันธุ์ดั้งต้น เชื้อราสายพันธุ์ใหม่ได้จากการชักนำให้สปอร์ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CN 1 เกิดการกลายพันธุ์ โดยใช้สารเคมี NTG เป็นสารชักนำ (จากตารางที่ 19 บทที่ 3)

แหล่งความแปรผัน (Source of Variation)	ระดับความอิสระ (degree of freedom) (df)	ผลรวมกำลังสองของค่าเบี่ยงเบนไปจากค่าเฉลี่ย (SS)	ผลเฉลี่ยของผลรวม (MS)
ความแปรผัน (variation)	18	21.3366	1.1854**
ความคลาดเคลื่อน (error)	76	0.2597	0.0034
ผลรวม	94	21.5963	

critical value = 4.40% $LSD_{0.05}$ = 2.01%

** มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติ

นางสาว โชตนา ประมวลวัลลิกุล เกิดวันที่ 17 พฤกษภาคม พ.ศ. 2508 ในจังหวัดกรุงเทพ ได้รับปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ทั่วไป จาก คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ในปีการศึกษา 2529

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย