รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กองควบคุมอาหารและยา.2535. บริษัทที่ผลิต และนำเข้ายาปฏิชีวนะในประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร :กองควบคุมอาหารและยา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข . (อัดสำเนา)

ดารารัตน์ รอดพยาธิ์. 2525. สารต่อต้านเชื้อราที่ผลิตโดย *Streptomyces* sp. CU279 จากดินในประเทศไทย.วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

บริษัทไทยเมจิฟาร์มาซูติคอล. 2538. คานามัยซิน เมจิ. เอกสารกำกับยา. กรุงเทพมหานคร : ไทยเมจิ ฟาร์มาซูติคอล จำกัด

บริษัทลิวินเนอร์ฟาร์มาซูติคอล. 2538. คานามัยซิน. เอกสารกำกับยา.กรุงเทพมหานคร : ลิวินเนอร์ฟาร์มาซูติคอล จำกัด

มาลินี ลิ้มโภคา . 2525. การใช้ยาต้านจุลชีพในสัตว์ (ยาปฏิชีวนะ ยาซัลฟา และสารปฏิชีวนะ). กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์จรัลสนิทวงศ์.

วนิดา เรืองศรี. 2532. สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเพนนิซิลินจี โดยเพนนิซิเลียมไคลโซจีนัม A88. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศรสดมภ์ ขัติยะวรา.2539. การปรับปรุงสายพันธุ์ *Streptomyces kanamyceticus* K1 โดยวิธีการกลายพันธุ์ เพื่อเพิ่มผลผลิตคานามัยซิน. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สดใส อัศววิไล , ศิริพร ฟุ้งวิทยา และ วิทยา จันทสูตร . 2520. เคมีบำบัด. กรุงเทพมหานคร : แผนกเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สายสมร ลำยอง. 2524. สารปฏิชีวนะและปฏิกิริยาต่อต้านจุลินทรีย์ .เชียงใหม่ : ภาควิชาชีววิทยา คณะ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ภาษาอังกฤษ

Abou-Zeid , A.A., and Issa, A.E. 1972. Amino acids produced in the course of fermentative production of kanamycin by *Streptomyces canus* . Indian. J. Exp. Biol. 10 : 76.

Abou-Zeid, A.A., Salem , H.M. , and Essa , A.I. 1971. Factors influencing of the production of kanamycin by *Streptomyces canus* . Zeitschrift Fur Allg. Mikrobiologie. 11(6):469-473.

Agathos , S.N.,and Demain ,A.L. 1986. Dissolved oxygen levels and the in vivo stability of gramicidin S synthetase. Appl. Microbiol.Biotechnol. 24:319-322

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

Aharonowitz , Y., and Demain , A. L. 1978. Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus* . Antimicrob. agents Chemother. 14 : 159-164.

Ashwell , G. 1966. New colorimetric methods of sugar analysis. Methods in enzymology. 8 . New York: Academic Press.

Audhya , T.K., and Russell , D.W. 1975. Enniantin production by *Fusarium sambucinum* . Primary , secondary and unitary metabolism. J. Gen. Microbiol. 86 : 327-332.

Bajpai , R. K., and Reuss , M. 1981. Evaluation of feeding strategies in carbon-regulated secondary metabolite production through mathematical modelling. Biotechnol. Bioeng. 23 : 717-738.

Basak , K., and Majumdar , S.K. 1973. Utilization of carbon and nitrogen sources by *Streptomyces kanamyceticus* for kanamycin production. Antimicrob. Agents Chemother.4 : 6-10.

Basak ,K., and Majumdar ,S.K. 1975. Mineral nutrition of *Streptomyces kanamyceticus* for kanamycin production. Antimicrob. Agents Chemother. 8(4) : 391-395.

Basak , K., and Majumdar , S.K. 1977. Enzymatic studies on kanamycin biosynthesis. Indian. J. Exp. Biol. 16 : 57-61.

Bernfeld , F. 1955. Amylase α and β. In S.P.Colowich and N.O. Kcpain(eds). Methods in Enzymology. 149. New York : Academic Press Inc.

Brainbery , S.L.,Grabovskaya , O.Z., Smirnova , L.V.,Papatsenka , V. P., and Kalmykoya, G.V. 1970. Respiration of kanamycin - production organism during biosynthesis. Antibiotiki. 15 (6) : 500-505 (USSR).

Bruchl , G.W. , Millar , R. L. , and Cunfer , B. 1969. Significance of antibiotic production by *Cephalosporium gramineum* to its saprophytic survival. Can .J. Plant Sci . 49 : 235-246.

Bu'Lock , J.D. 1965. Aspects of secondary metabolism in fungi .In Biogenesis of Antibiotic Substances . Z. Vanek and Z . Hostalek(Eds.). Czechoslovak academy of Sciences ,Prague : 61-72.

Bu'Lock , J.D. 1974. Secondary metabolism of microorganisms. In B. Spencer (ed.) , Industrial aspects of biochemistry , vol. 1 . North Holland Publishing Co., Amsterdam : 335-346.

Budavari , S. 1989. The merck index 11th ed.(centennial edition). New Jersey: Merck & Co.,Inc, Rahway.

Chatterjee , S., and Vining ., L.C. 1981. Catabolite repression in *Streptomyces venezuelae*. Induction of β-galactosidase, chloramphenicol production, and intracellular cyclic adenosine 3',5'-monophosphate concentrations. Can. J. Microbiol. 28: 311-317.

Chen , H.C., and Wilde , F. 1990. The effect of oxygen and aeration rate on antibiotic production of *Streptomyces fradiae* . Biotechnol. Bioeng. 37: 591-595.

Cron , M.J., Fardig , O.B. Johnson , D.J. , Palermiti , F.M., Schmitz ,H., and Hooper, I.R. 1958. The chemistry of kanamycin .Ann. NY.Acad. Sci. 76: 21-25.

Code of federal regulation. 1987. Title 21 , Microbiology assay methods. Part 436.100. Food and drug , FAD. Printing Office, Washington, DC :269-286.

Demain , A.L . 1963. Synthesis of cephalosporin C by resting cells of *Cephalosporium* sp. Clin. Med. 70 : 2045-2051.

Demain , A.L., and Inamine , E. 1970. Biochemistry and regulation of streptomycin and mannosidostreptomycinase (α-D-mannosidase) formation .Bacteriol . Rev. 34 : 1-19.

Demain , A.L. 1973. Mutation and the production of secondary metabolites . Adv . Appl. Microbiol . 16 : 177-202.

Demain , A.L. , and Piret , J. 1979. Relationship between antibiotic biosynthesis and sporulation. In M. Luckner and K. Schreiber (ed.). Regulation of secondary product and plant hormone metabolism . Pergamon Press . New York : 183-188.

DeMoss , R.D . 1967. Violacein. In D. Gottlieb and P.D. Shaw (ed.) , Antibiotics , vol.2 Springer-Verlag , Berlin.

Deutscher , M.P. 1990. Methods in Enzymology. 182. New York : Academic Press Inc.

Drew , S.W., and Demain , A.L. 1975. Production of cephalosporin C by single and double sulfur auxotrophic mutants of *Cephalosporium acremonium*. Antimicrob. Agents Chemother. 8 : 5-10.

Drew , S.W., and Demain , A.L. 1977. Effect of primary metabolites on secondary metabolism. Ann.Rev. Microbiol. 31 :343-356.

Dunlaney , E.L. 1948. Observations on *Streptomyces griseus* II. Nitrogen sources for growth and streptomycin production. J. Bacteriol . 56. 305-313.

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 licheniformis* 28 KA. Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya. 22 :107-111.

Franklin , T.J., and Snow , G.A. 1981. Biochemistry of antimicrobial action. New York : Chapman and Hall.

Gale , E.F. , Cundliffe , F.R.S., and Waving , M.J. 1981. The Molecular Basis of Antibiotic Action : 434.

Gallo , M.and Katz,E. 1972. Regulation of secondary metabolite biosynthesis. Catabolite repression of phenoxazinone synthase and actinomycin formation by glucose . J. Bacteriol.109: 659-667.

Gambardella , P., Punziano , M., Gionti , M., Guadalupi , C., and Mancini , G. 1985. Quantitative determination and separation of analogues of aminoglycoside antibiotics by High - Performance Liquid Chromatography. J. Chromatography. 348 : 229-240.

Golets , L.M. , Basiliis , L. I., and Fedorenko ,V.A. 1995. Isolation and study of the properties of *Streptomyces kanamyceticus* mutants with disorders of kanamycin biosynthesis. Antibiotiki I Khimioterrapila . 40(1) :3-7.

Goodman, L.S. , and Gilman , A. 1970. The pharmacological basis of therapeutics. Macmillan Publishing Co,Inc. U.S.A.

Gourevitch , A.I.,Tynda , J.M. , Puglisi ,T.A. and Lein , J. 1958-59. Studies on the mechanism of action of kanamycin. Antibiotics Annual: 784.

Haavik , H. I . 1974. Studies on the formation of bacitracin by *Bacillus licheniformis.* Role of catabolite repression and organic acids. J. Gen. Microbiol. 84: 321-326.

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

Hersbach , G.J.M. , Vander Beek , C. P. , Van Dijck , P.W.M. 1984. The penicillin : Properties , biosynthesis and fermentation . In E. J. Vandamme (ed.), Biotechnology of industrial antibiotics , Vol. 22 . Drugs and pharmaceutical sciences. Marcel Dekkar , New York.

Hilgendorf , P. , Heiser , V.,Diekmann , H.,and Thoma , M. 1987. Constant dissolved oxygen concentrations in cephalosporin fermentation: Applicability of different controllers and effect on fermentation parameters. Appl. Microbiol. Biotechnol. 27 : 247-251.

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

Howell , J.D. , Anderson , L.E. , Coffey , G.E., Senos ,G.D. , Underhill , D.L.V., and Erlich , J. 1972.Butiromycin , a new aminoglycoside antibiotic complex : bacterial origin and some microbiological studies. Antimicrob.Agents. Chemother.2: 79-83.

Hugo , W.B. ,and Russel , A. D. 1983. Pharmaceutical Microbiology. Blackwell Scientific Publication. Osney Mead , Oxford.

Hurley , L.H., and Bialek , D. 1974. Regulation of antibiotic production : catabolite inhibition and the dualistic effect of glucose on indolmycin production. J. Antibiot. 27:49-56.

Inamine , E.,Lago, B.D., and Demain , A.L. 1969. Regulation of mannosidase , an enzyme of streptomycin biosynthesis. In D. Perlman (ed.),Fermentation advances. Academic Press Inc.,New York :199-221.

Jawetz , E., Meinick , J.L., and Adelberg , E.A. 1984. Review of medical microbiology. Los Altos ,California .

Johdo , O., Ishikura , T., and Yoshimoto , A. 1991. Anthracycline metabolism from *Streptomyces violaceus* A262: I. Isolation of antibiotic-blocked mutant from *Streptomyces violaceus* A262. J. Antibiotics. 44(10): 1110-1120.

Khokhlor , A.S., and Tovarova , II. 1979. Autoregulator from *Streptomyces griseus*. In Regulation of Secondary Product and Plant Hormone Metabolism . M. Luckner and K. Schreiber (eds). Perkamon , Oxford : 133-145.

Kimura , A. 1967. Biochemical studies on *Streptomyces sioyanensis* II. Mechanism of the inhibitory effect of glucose on siomycin formation. Agr.Biol. Chem. 31: 845-852.

Kirsch , E. J. 1967. Mitomycins. In D.Gottlieb and P.D. Shaw (ed.) .Antibiotics, vol 2, Biosynthesis. Springer-Verlag , Berlin : 66-76.

Kominek , L.A. 1973. Biosynthesis of novobiocin by *Streptomyces niveus*.Antimicrob. Agents. Chemother:123-134.

Korzybski,T., Kowszyk, Z., and KuryLowiczw , W. 1967. Antibiotics : Origin , Nature and Properties. vol 1 .American Society for microbiology.Washington, D.C.

Lim , H. C., Tayeb ,Y. J. , Modak , J. M., and Bonte ,P. 1986.Computational algorithms for optimal feed rate for a class of fed-batch fermentation : Numerical results for penicillin and cell mass production.Biotechnol . Biooeng. 28 : 1408-1420.

Lowry , O.H., Rosebrough , N.J.,Farr , A.L. , and Randall , R.J. 1951. Protein Measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem.193: 265-272.

Maeda , K. , Murase , M., Mawatari , H., and Umezawa , H. 1958. Degradation studies on kanamycin. J. Antibiotics.11:73.

Majumdar , M.K., and Majumdar , S.K. 1981. Synthesis of neomycin by washed mycelium of *Streptomyces fradiae* and some physiological considerations. Folia Microbiol.16:285-292.

Martin , J.F., and McDaniel , L. E. 1974. Kinetics of biosynthesis polyene macrolide antibiotics in batch cultures : cell maturation time. Biotechnol. Bioeng .17: 925-938.

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

Matsumura ,M., Imanaka ,T.,Yoshida , T.,and Tagushi ,H. 1981. Modelling of cephalosporinC production and its application to fed-batch culture . J. Ferment. Technol. 59 : 115-123

McKane , L., and Kandel , J. 1996. Microbiology .Essential and Application. McGraw-Hill, Inc . U.S.A.

Modak , J.M., Lim , H.C. 1989. Simple non-singular control approach to fed-batch fermentation optimization. Biotechnol.Bioeng. 33 : 11-15.

Mou ,D.G.,and Cooney ,C.L. 1983. Growth monitoring and control in complex medium : A case study employing fed-batch penicillin fermentation and computer-aided on-line mass balancing .Biotechnol.Bioeng.25:257-269.

Mou ,D.G.,and Cooney ,C.L. 1983. Growth monitoring and control through computer-aided on-line mass balancing in a fed-batch penicillin fermentation. Biotechnol. Bioeng.25: 225-255.

Okachi , R., and Nara , T. 1980. Current trends in antibiotic fermentation research in Japan. Biotechnol. Bioeng. Suppl. 1:65-81.

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

Ramsey , H.H., Hussain S.M., and Williams , R.P. 1973. Inhibition by glucose of prodigiosin biosynthesis in *Serratia marcescens* .Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol: P239 : 180.

Reeves , D.S. , Phillips , I., Williams , J.D. and Wise , R. (Eds.). 1980. Laboratory Methods in Antimicrobial Chemotherapy. Edinburgh, Churchil Livingstone.

Reeves ,D.S. , and White ,L.O. 1983. Principles of methods of assaying antibiotics. Pharmaceutical Microbiology : 140-160

Rothrock , J.W. , Goegelman , R.T. and Holf , F.J. 1958-59. A resin chromatographic analysis for kanamycin mixtures. Antibiotics Annual. 796.

Sadoff , H.L. 1972. Sporulation antibiotics of *Bacillus* species. In H.O.Halvorson , R. Hansen , and L.L. Campbell (ed.) . Spores V. American Society for Microbiology. Washington, D.C. :157-166.

San , K.Y., and Stephanopoulos , G. 1989. Optimization of fed-batch penicillin fermentation: A case of singular optimal control with state constraints. Biotechnol. Bioeng.34: 72-78.

Sankaran , L., and Pogell ,B.M. 1975. Biosynthesis of puromycin in *Streptomyces alboniger* : regulation and properties of O-methylpuromycin O-methyltranferase. Antimicrob.Agents.Chemother.8: 721-732.

Sarker , N., and Paulus , H. 1972. Function of peptide antibiotics in sporulation. Nature (London) New Biol. 239 : 228-230.

Satoh , A. , Ogawa , H., and Satomura , Y.1976. Regulation of N-acetylkanamycin amidohydrolase in the idiophase in kanamycin fermentation . Agr. Biol. Chem.40 : 191-196.

Schmitz , H., Fardig , O.B., O' Herron , F.A. , Rousche , M.A., and Hooper , I.R. 1958. Kanamycin III. Kanamycin B. J. Am. Chem. Soc. 80. 2911-2912.

Shier , W. T. , Rinehart , K. L., and Gottlieb , D. 1969. Preparation of four new antibiotics from a mutant of *Streptomyces fradiae* . Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 63 : 198-204.

Smith , C.G., and Hinman , J.W. 1963. Chloramphenicol. Prog. Ind. Microbiol . 4 : 137.

Soltero , F.V., and Johnson , M.J. 1953. Effect of the carbohydrate nutrition on penicillin production by *Penicillium chrysogenum* Q-176. Appl. Microbiol. 1 : 52-57.

Soltero , F.V. and Johnson , M.J. 1954. Continuous addition of glucose for evaluation of penicillin -producing cultures. Appl.Microbiol. 2:1-44.

Stayermark , A.L. 1951. Quantitative Organic Microanalysis ; Microdetermination of nitrogen by the Kjeldahl method.The Blakiston comp.N.O. :134-153.

Tanaka ,N . 1975. Antibiotic III Mechanism of Antimicrobial and Antitumor Agents : 340-353.

Tortora , G.J.,Funke , B.R. , and Case , C.L. 1992. Microbiology : An Introduction. The Benjamin Cummings Publishing Company , Inc., California

Umezawa , H., Ueda , M., Maeda, K., Yagishita , K., Kondo , S., Okami , Y., Utahara , R., Osato , Y., Nitta , K., Takeuchi , T. 1957. Production and isolation of a new antibiotic kanamycin. J. of Antibiotic. Ser .A.10(5): 181-188.

Umezawa . H.,.1958. Kanamycin: Its discovery. Ann. NY. Acad. Sci. 76:20-26.

Umezawa . H., Maeda , K., and Ueda , M.1960. Kanamycin and process for the preparation thereof. US. Patent Office. 2,931,798 :935-948.

Umezawa , S., and Tsuchiya , T. 1962. (α-D-6-Amino-6-deoxyglucopyranosyl)-deoxystreptamine , an antibacterial degradation product of kanamycin. J. Antibiotics. 15:51.

Umezawa , H. 1968. J.Asian Med. 11(2):66-77.

Umezawa , H.,Kojima, M., and Yamada , Y. 1968. Studies on the biosynthesis of kanamycins.Part I.Incorporation of ^{14}C-glucose or ^{14}C-glucosamine in to kanamycin and kanamycin-related compounds. J. Agr. Biol. Chem. 32(4):467-473

Umezawa, S ., Koto , S., Tatsuta , K., and Tsumura , T. 1968. The total synthesis of kanamycin C . Bull. Chem. Soc. Jap. 41:533.

Umezawa, H., Kojima, M., and Yamada , Y. 1969. Studies on the biosynthesis of kanamycins. Part II. Incorporation of the radioactive degradation products of kanamycin A or related metabolites in kanamycin A. J. Agr. Biol. Chem. 33(8): 1181-1185.

Umezawa, S ., Koto , S., and Tatsuta , K.1969. Studies of aminosugars. XXII. The total synthesis of kanamycin A. Bull. Chem. Soc. Jap. 42:533-537.

Umezawa , H., Hotta , K., and Okami , Y. 1977. Elimination of the ability of a kanamycin-production strain to biosynthesize deoxystreptamine moiety by acriflavine. J. of antibiotics. 30(12):1146-1149.

Umezawa . H. 1986. Minimum requirements of antibiotic products of Japan. Japan: Japan Antibiotic Research Association.

Umezawa . H., Koyama , G., Litaka, Y., and Maeda , K. 1986. Tetrahedron Lett. 15: 1875-1879.

Vandamme , E.J. 1984. Biotechnology of industrial antibiotics. (Drugs and the pharmaceutical science :v. 22) New York :Marcel Dekker INC.

Vardar , F. 1982. Problems of mass and momentum transfer in large fermentors. Process. Biochem. 18 : 21-23

Vardar , F., and Lilly , M.D. 1982. Effect of cycling dissolved oxygen concentrations of production formation in penicillin fermemtation . Eur. J. Apply. Microbiol. Biotechnol. 14 : 302-311.

Voet , D., and Voet , J.G. 1990. Biochemistry. New York : John Wiley & Sons, Inc.

Walker , J.E. 1974. Biosynthesis of the monoguanidinated inositol moiety of bluensomycin , a possible evolutionary precursor of streptomycin.J. Biol. Chem.249: 2397-2404 .

Yang , Y.K.,Shimizu , H.,Shioya , S., Suga , K., Nihira , T.,and Yamada , Y. 1995. Optimum autoregulator addition strategy for maximum virginiamycin production in batch cultivation of *Streptomyces virginiae* . Biotechnol. Bioeng. 46 : 437-442.

Yang ,Y.K. , Morikawa , M. ,Shimizu , H.,Shioya , S.,Suga ,K., Nihhira , T., and Yamada ,Y. 1996. Maximum virginiamycin production by optimization of cultivation conditions in batch culture with autoregulator addition . Biotechnol . Bioeng .Vol 49 : 437-444.

Yegneswaran , P. K. , and Gray , M. R. 1991(1). Effect of dissolved oxygen control on growth and antibiotic production in *Streptomyces clavuligerus* fermentation. Biotechnol. Prog. 7 : 246-250.

Yegneswaran , P. K. ,and Gray , M. R. 1991(2). Experimental stimulation of dissolved oxygen fluctuation in large fermentors : Effect on *Streptomyces clavuligerus* . Biotechnol. Bioeng . 38 :1203-1209.

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. วายเอส อการ์ (YS agar) สำหรับเก็บรักษา *Streptomyces kanamyceticus* (Johdo et al., 1991)

แป้ง (starch)	10.0 กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	3.0 กรัม
วุ้นผง (agar)	15.0 กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 7.2 อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที)

2. เอ็มวัน อการ์ (M1 agar) สำหรับเก็บรักษา *S. kanamyceticus* ATCC 6538P (Code of federal regulation, title 21, 1987)

แบคโต-เปปโทน (bacto-peptone)	6.0 กรัม
เคซีน (casein)	4.0 กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	3.0 กรัม
สารสกัดจากเนื้อ (beef extract)	1.5 กรัม
เดกซ์โตรส (dextrose)	1.0 กรัม
วุ้นผง (agar)	15.0 กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 6.5-6.6 อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

3. จีพีวาย มีเดียม (GPY medium) สำหรับเพิ่มจำนวนเซลล์ของ *S. kanamyceticus* (Umeazwa et al., 1977)

กลูโคส (glucose)	10.0	กรัม
แบคโต-เปปโทน (bacto-peptone)	4.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	3.0	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	4.0	กรัม
โปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2HPO_4)	2.0	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 7.0 อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

4. เคพีเอ็มบี มีเดียม (KPMB medium) สำหรับเลี้ยงเชื้อ *S. kanamyceticus* เพื่อผลิตคานามัยซิน (Umeazwa et al., 1960)

แป้ง (starch)	20.0	กรัม
ถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยแล้วด้วยเอ็นไซม์ (soytone)	12.0	กรัม
โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.5	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	3.0	กรัม
แบคโต-เปปโทน (bacto-peptone)	3.0	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)	5.0	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 7.0 อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

6. เอ็มไฟว์ อการ์ (M5 agar) สำหรับทดสอบปริมาณคานามัยซิน (Code of federal regulation, title 21, 1987)

แบคโต-เปปโทน (bacto-peptone)	6.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	3.0	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ (beef extract)	1.5	กรัม
วุ้นผง (agar)	15.0	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 7.8-8.0 อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

7. เอ็มเอส อการ์ (MS agar) สำหรับเลี้ยงเชื้อ *S. kanamyceicus*

ถั่วเหลืองบดละเอียด	20.0	กรัม
น้ำตาล ดี-แมนนิทอล (D-manitol)	20.0	กรัม
วุ้นผง (agar)	18.0	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร และน้ำประปา 500 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 7.0 อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

8. การเตรียมกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรดกำมะถัน

นำกากถั่วเหลืองปริมาณ 200 กรัมมาย่อยด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 600 มล. แล้วนึ่งที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 40 นาที นำมาเติมน้ำกลั่น 1200 มล. ผสมให้เข้ากันและกรองด้วยผ้าขาวบาง เอาส่วนน้ำใส มาปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 นอร์มอล จากนั้นกรองอีกครั้งด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 นำไปหาปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธี Kjeldahl (ภาคผนวก ค. หมายเลข 4)และแบ่งบางส่วนไปหาน้ำหนักแห้ง เพื่อเทียบเป็นน้ำหนักต่อปริมาตร

ภาคผนวก ข

สารเคมีและวิธีเตรียม

1. วิธีเตรียม โปแตสเซียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 8.0 (potassium-phosphate buffer) เข้มข้น 0.1 โมลาร์ เพื่อใช้เตรียมสารละลายมาตรฐานคานามัยซินเอ ซัลเฟต (Code of federal regulation, title 21, 1987)

ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	16.73	กรัม
โปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2HPO_4)	0.523	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ปรับ pH ให้เป็น 8.0 ด้วย โปแตสเซียมไดไฮดรอกไซด์ (KOH) เข้มข้น 1 โมลาร์ ก่อนนำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

2. วิธีเตรียม โปแตสเซียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.5 (potassium-phosphate buffer) เข้มข้น 0.02 โมลาร์ เพื่อใช้เป็นส่วนผสมในสารละลายตัวพา (mobile phase) ในการวิเคราะห์คานามัยซิน ด้วย HPLC (Deutscher, 1990)

ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.22	กรัม
โปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2HPO_4)	1.46	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ปรับ pH ให้เป็น 7.5 ด้วย โปแตสเซียมไดไฮดรอกไซด์ (KOH) เข้มข้น 1 โมลาร์ ก่อนนำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

3. รีเอเจนท์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry (1951)

3.4 สารละลาย Lowry A ประกอบด้วย

โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	20.0	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	4.0	กรัม
โซเดียมโปแทสเซียมตราเตรท (Sodium Potassium Tartrate)	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

3.2 สารละลาย Lowry B ประกอบด้วย

คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$)	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

3.3 สารละลาย Lowry C ประกอบด้วย

สารละลาย Lowry A	50	ส่วน
สารละลาย Lowry B	1	ส่วน

3.4 สารละลายผสม D ประกอบด้วย

โฟลิน-ฟีนอล รีเอเจนท์ (Folin-Phenol Reagent)	1	ส่วน
น้ำกลั่น	1	ส่วน

4. อินดิเคเตอร์สำหรับหาปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธี Kjeldahl ประกอบด้วย

เมทธิลลีนบลู (methylene blue)	0.1	กรัม
เมทธิลเรด (methyl red)	0.1	กรัม
เอทธานอล 95%	150	มิลลิลิตร

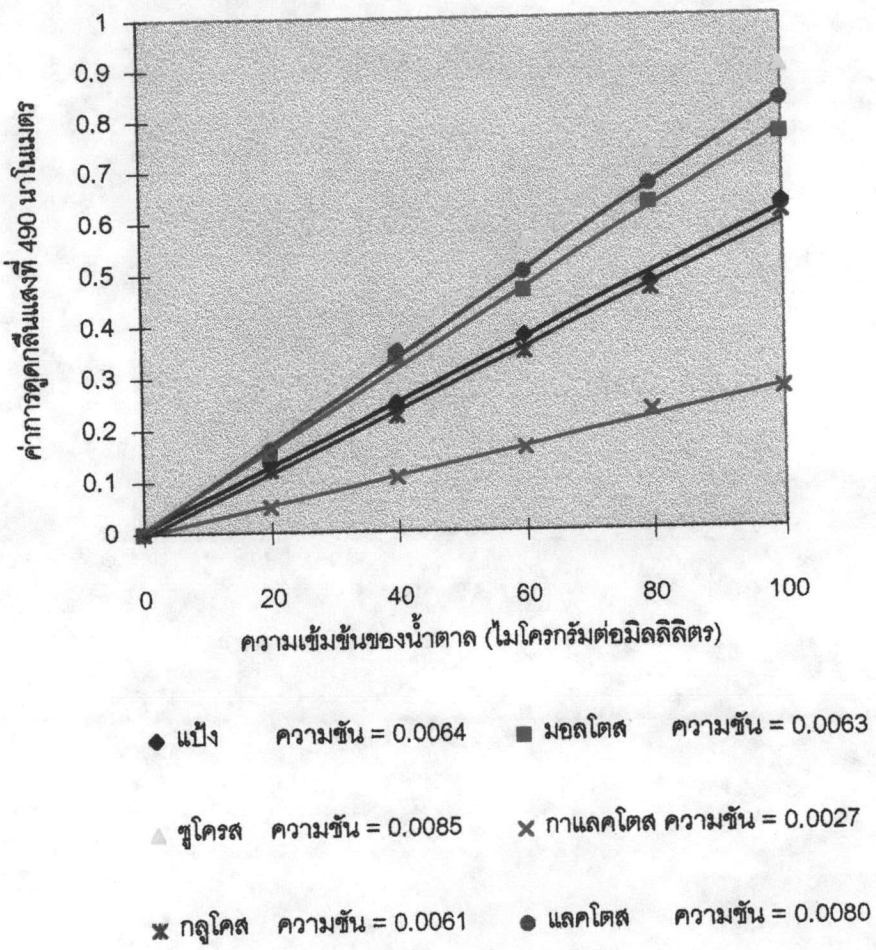
5. รีเอเจนท์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอสเอ (DNSA, Bernfeld , 1955) ประกอบด้วย

เตรียมโดยละลาย 1.0 กรัมของกรดไดไนโตรซาลิไซลิก ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ ปริมาตร 20.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เติมโซเดียมโปแตสเซียมตาร์เตรท 30.0 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บในขวดสีชา

ภาคผนวก ค

1. การวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี ฟีนอล-ซัลฟูริค (phenol-sulfuric method) (Ashwell, 1966)

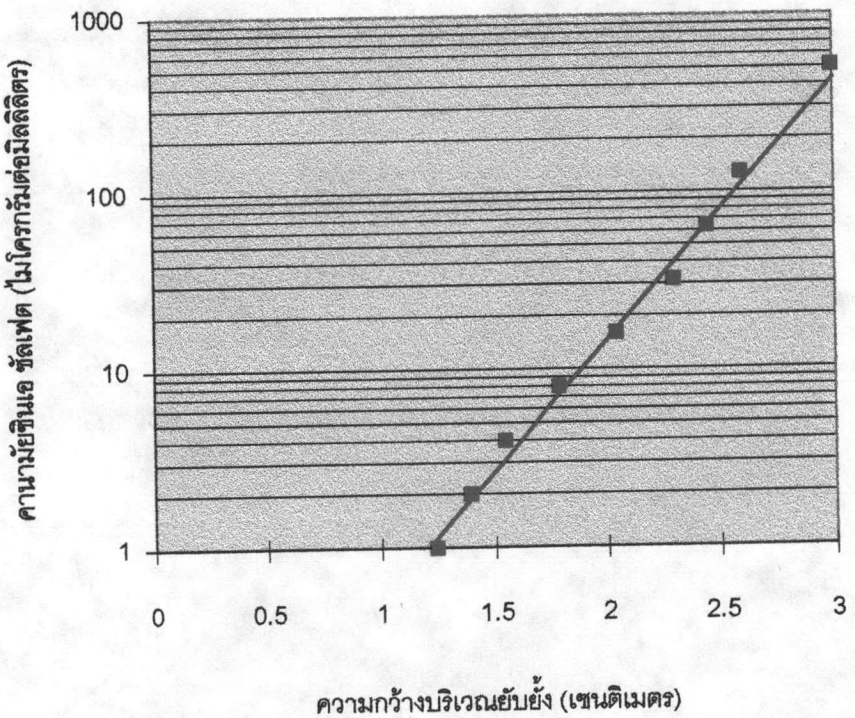
นำตัวอย่างที่ต้องการจะวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่อยู่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายฟีนอล 5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมกรดกำมะถัน (sulfuric acid) เข้มข้น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วเขย่าให้ผสมเข้ากัน ตั้งทิ้งต่อไปอีกประมาณ 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร นำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลบริสุทธิ์ ชนิดเดียวกับน้ำตาลที่ต้องการวัดปริมาณ เข้มข้น 0 20 40 60 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่วัดปริมาณด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริค เช่นเดียวกัน ดังรูปที่ 41



รูปที่ 41 กราฟมาตรฐานน้ำตาลทั้งหมด เมื่อวัดปริมาณด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริค

2. กราฟมาตรฐานคานามัยซิน เอ ซัลเฟตโดยวิธีจุลชีววิทยา (Reeves et al., 1980)

นำสารละลายคานามัยซินเอ ซัลเฟต เข้มข้น 1 2 4 8 16 32 64 128 และ 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายในโปแตสเซียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 8.0 (potassium phosphate buffer) เข้มข้น 0.1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) นำไปหยอดให้เต็มหลุมที่เจาะ ในอาหารวุ้นทดสอบที่มี *S. aureus* ซึ่งเตรียมได้จากวิธีการทดลองที่ 5.1.1.1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง วัดความกว้างเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้งการเจริญรอบหลุมเจาะ ที่บรรจุสารละลายคานามัยซินเอ ซัลเฟต แต่ละความเข้มข้น นำค่าที่วัดได้ไปเขียนกราฟมาตรฐาน โดยกำหนดให้แกน X เป็นความกว้างเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง แกน Y เป็นค่า log ของความเข้มข้นของสารละลายคานามัยซินเอ ซัลเฟต ได้ผลดังรูปที่ 42

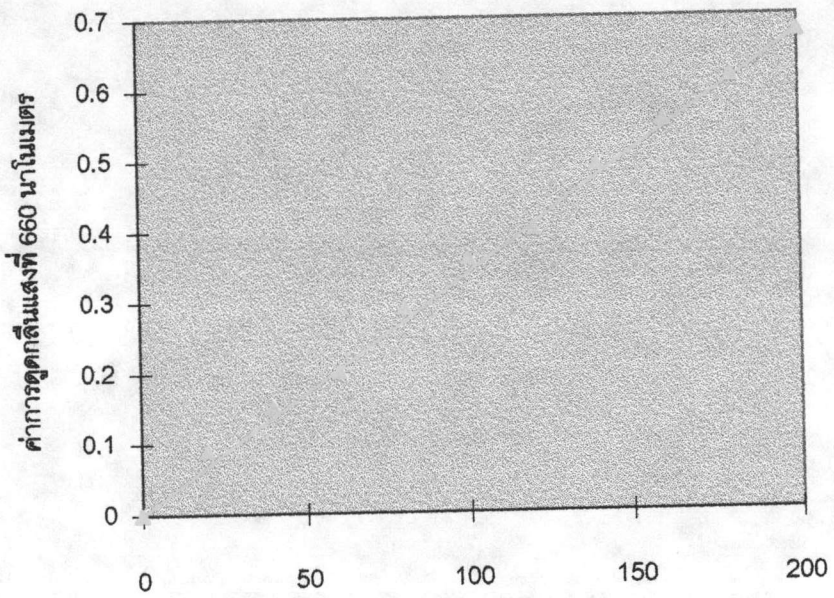


ความชัน =15.00

รูปที่ 42 กราฟมาตรฐานคานามัยซินเอ ซัลเฟต โดยวิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951) โดยนำสารละลายที่ต้องการวิเคราะห์ที่มีปริมาณโปรตีนความเข้มข้นเหมาะสมปริมาตร 1 มล. ใส่ลงในหลอดทดสอบ เติมสารละลาย C (ภาคผนวก ข. หมายเลข 3.3) ปริมาตร 5 มล. ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที จึงเติมสารละลายผสม D (ภาคผนวก ข. หมายเลข 3.4) ปริมาตร 0.5 มล. ลงไปผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้อีก 30 นาที จึงนำส่วนผสมนี้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร กราฟมาตรฐานใช้โบวายน์ ซีรัม อัลบูมิน (Bovine Serum Albumin) ที่ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมล.



รูปที่ 43 กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธีของ Lowry และคณะ

4. การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนโดยวิธี Kjeldahl

วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน (nitrogen content) ตามวิธีของ Stayermark (1951) โดยนำตัวอย่างปริมาตร 1-3 มล. ใส่ในขวดน้ำกลั่นขนาด 300 มล. เติมซอลท์มิกเจอร์ (salt mixture) 7 กรัม (ซึ่งประกอบด้วยไดโปแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) และคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) ในอัตราส่วน 19: 1) ค่อย ๆเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 15 มล. ลงไป

จากนั้นนำไปย่อยบนเตาหลุม (digester) ในตู้ควันจนได้สารละลายใส นำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นก่อน จึงค่อย ๆเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มล. และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 37 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 50 มล. ลงไป จากนั้นนำไปกลั่นบนเตากลั่นโดยดักจับแอมโมเนีย (NH_3) ที่เกิดขึ้นด้วยกรดบอริก (H_3BO_3) เข้มข้น 4 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มล. ซึ่งมีอินดิเคเตอร์ (ภาคผนวก ข. หมายเลข 4) ผสมอยู่ 3 หยด กลั่นจนสารละลายบอริกมีปริมาตร 200 มล. จึงนำสารละลายที่ได้มาไตเตรตกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) มาตรฐาน ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนแล้วคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดจากสูตร

$$\text{เปอร์เซนต์ไนโตรเจนทั้งหมด} = \frac{A \times B \times 1.4}{C}$$

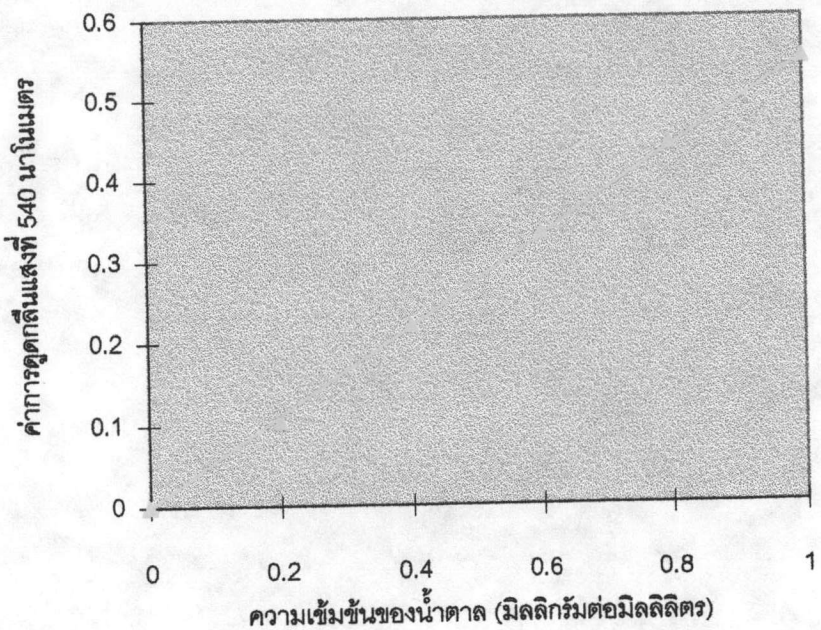
A = ปริมาตรกรด HCl (มล.)

B= ความเข้มข้นของกรด HCl (M)

C= ปริมาตรสารตัวอย่าง (มล.)

5. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Bernfeld (1955) โดยนำสารละลายที่ต้องการวิเคราะห์ที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ความเข้มข้นเหมาะสมปริมาตร 1 มล. ใส่ลงในหลอดทดสอบ เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (ภาคผนวก ข. หมายเลข 5) ปริมาตร 1 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นในอ่างน้ำเย็น เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มล. ลงไปผสมให้เข้ากันนำส่วนผสมนี้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร กราฟมาตรฐานใช้น้ำตาลกลูโคส ที่ความเข้มข้น 0-100 มิลลิกรัมต่อมล.



รูปที่ 44 กราฟมาตรฐานการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีดีเอ็นเอสเอ

ประวัติผู้เขียน

นางสาวอรอนงค์ พริ้งศุลกะ เกิดวันที่ 10 มีนาคม พ.ศ. 2517 ที่จังหวัดกรุงเทพฯ สำเร็จการศึกษา ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปีการศึกษา 2537 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ. 2538 ที่อยู่ปัจจุบัน 1775/44 ซอยวัดรวกบางบำหรุ ถนนจรัญสนิทวงศ์ 57 แขวงบางบำหรุ เขตบางพลัด กรุงเทพ ฯ