เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

นตพร ศุภณัฐเศรษฐกุล. 2536. สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเพนนิซิลินจีโดย *Penicillium chrysogenum* ที่กลายพันธุ์. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มาลินี ลิ้มโภคา. 2525. การใช้ยาต้านจุลชีพในสัตว์. ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์จรัลสนิทวงศ์. กรุงเทพมหานคร. 442 หน้า.

วิบูลย์ลักษณ์ วิสุทธิศักดิ์. 2536. การผลิตและลักษณะสมบัติของทอกซินจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F 2. 2. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. หลักสูตรจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษายังกฤษ

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

Allgarier, H. , Jung, G. , Werner, G. , Schneider, U. , and Zarner, H. 1986. Epidermin sequencing of a heterodet tetracyclic 21 - peptide amide antibiotic. Eur. J. Biochem. 160 : 9-22

Anderson, L. E. ,Coffey, G. L. , Senos, G. D. ,Underhill, M. A. , Voglier , D. L. and Ehrlish, J. 1972. Butrirosin , a new aminoglycoside antibiotic complex. Antimicro. Agent. Chemo. 2 : 79-83.

Antanio, G. , Mercesdes, M. , Manuel, M. , Marium ., L. and Eva, V. 1993. Isolation and characterization of antifungal and antibacterial peptide produced by *Bacillus licheniformis* A12. Appl. Microbiol. Biotechnol. 39 : 438-442.

Asenjo, A. J. 1990. Separation Process in Biotechnology. Mancel Dekken Inc, New York. p. 143-176, 447-494.

Beneke, F. S. and Roger, A. L. 1980. Medical Mycology Manual. Fourth edition. Burgess Publishing Company, Mineota. p. 152-153.

Berdy, J. 1977. Recent development of antibiotic research and classification of

antibiotic according to chemical structure. Adv. Appl. Microbiol. 18 : 309-406 .

Besson , F. , and Michel , G. 1987. Bacillomycin Fb and Fc : isolation and characterization. J. Antibiotics 41: no.3: 2282-2288.

_____, and Michel , G. 1987. Isolation and characterization of a new iturins : iturin D and iturin E. J. Antibiotics 40 : 437-442.

_____, and Hourdou , M. L. 1987. Effect of amino acid on the biosynthesis of β -amino acid constituents of Bacillomycin F. J. Antibiotic 40 : 221-223.

Bodansky , M. , and Perlman , D . 1961 . Peptide antibiotic . Science . 163 : 352 - 358 .

_____, and Perlman , D., 1964. Are peptide antibiotic small protein ? Nature. 204 : 840-844.

Boheim , G. , Irmscher , G. , and Jung , G. 1978. Trichotoxin A - 40 , a new membrane exciting peptide. Biochem. Biophy. ACTA. 507 : 485-506.

Bower , C. , Mccguire , J. , and Daeshel , M. 1995. Suppression of *Listeria monocytogenes* colonization following adsorption of nisin onto silica surface . Appl. Env. Micro. 61 no. : 992-997.

Brock, D. , Medigan , T. 1991. Biology of Microbiology. Six edition. Prentice-Hall Inc. , USA. p. 361-370.

Brotz , H. , Bierbaum , G. , Marcus , A. , Molitar , E. , and Sahl , H. 1995. Mode of action of the lantibiotic Mercacidin : inhibition peptidoglycan Biosynthesis via a Novel Mechanism? Antimicro. Agent and Chemo. 39 no. 3 : 714- 719.

Cowan , S. T. , Halt , J. G. , Liston , J. , Murray , R. , Nivan , C. , F. , Rawin , A . W. and Stanier , R. Y. 1970 . Burgey's Manual of Determinative Bacteriology. vol .2 Williums and Wilkin , Bultimore .

Cundliffe , E. 1989. How antibiotic- producing organisms avoid suicide. Annu . Rev. Microbiol. 43 : 207- 233.

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

Driessen , A. , Hooven , H. , Kuiper , W. , Kamp , M. , Sahl , H. , Koning , R. ,and Koning, W. 1995. Mechanistic studies of lantibiotic - induced permeabilization of

phospholipid vesicles. Biochemistry. 34 : 1606-1614.

Edward , P. , Tyler , E. and Brady , L. R. , 1981. Pharmacognosy. Sixth edition. Henry Publisher , London p. 362-398.

Fiddaman , P . J. and Rossall , S . 1994. Effect of substrate on the production of antifungal volatile from *Bacillus subtilis* . Bacterio . Rev. 41 : 449-474.

_____ .and Rossall , S. 1993 . The production of antifungal volatile from *Bacillus subtilis*. J. Appl Bact. 74: 119-126.

Foye , O. W. 1976. Principles of medicinal chemistry. Henry Kimpton Publisher, London. p. 715-751.

Froyshov , O. , 1974. Bacitracin biosynthesis by three complementary fraction from *Bacillus licheniformis*. FEBB. lett. 44 no.1 : 75-78.

Franklin , T. , J. , Snow , G. A. 1981. Biochemistry of antimicrobial action. Third edition. Chapman and Hall , London. p 53-64.

Galvez , A. , Labbadi , M. , Maqueda , M. , Martinez - Bueno , M. , and Valdivia , E. 1994. Fungicin M4 : a narrow spectrum peptide antibiotic from *Bacillus Licheniformis* M-4. J. Appl. Bact. 77 : 49-53.

Gottlieb , D. , 1976. The production and role of antibioitcs in soil. J. Antibioitcs 29 : 987- 1000.

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

Hugo , W. B. , and Russal , A. D. 1984. Pharmaceutical Microbiology. Third edition. P. G. Publishing Pte , Ltd. , Singapore. p. 14-15, 279-280.

Hutter , R. , Leisinger , T. , and Niiesch , J. 1978. Antibiotics and other secondary metabolite. , Academic Press , New York .

Irmscher , G. , Boverman , G. , and Jung , G. 1978. Trichotoxin A-40 , a new membrane exciting peptide. Biochem. Biophy. ACTA. 507 :470-478.

Ishihara , H. , Shimura , K. 1974. Biosynthsis of bacitracin. Biochem. Biophy. ACTA. 338 : 588-600.

Jack , R. W. ,Tagg , J. R. and Ray , B . 1995. Bacteriocins of Gram - Positive bacteria . Microbiol. Rev. 59 no. 2:171-200.

John , H. 1975. Method in Enzymology. 43 . Academic Press , New York. p 549-602.

Kaletta , C. , Entian , K. D. , and Jung , G. 1991. Prepeptide sequence of Cinnamycin (Ro 09- 0198) : the first structural gene of a duramycin - type lantibiotic. Eur.J. Biochem. 199 :411-415.

_____ , and Entian , K. D. 1989. Nisin , a peptide antibiotic : cloning and sequencing of the *nis* A gene and posttranslational processing of its peptide product. J. Bact. 171 no. 3 :1597-1601.

Katz , E. , and Demain , L . 1977. The peptide antibiotic of Bacillus : chemistry , biogenesis and possible role function. Bacterio. Rev. 41 : 449-474.

Kellner , R. , Jung , G. , Hore , T. , Zarner , H. , Entian , K. , and Gotz , F. 1988. Gallidermin : a new lantionine containing polypeptide antibiotic. Eur. J. Biochem . 177 no. 3 : 1597-1601.

Klein , C. , Kalletta , C. , Schnell , N. , and Entian , K. 1992. Analysis of gene involve in Biosynthesis of lantibiotic subtilin. Appl. Env. Micro. 58 no. 1 : 132-142.

Kleinkauf , H. , and Dohren , V. 1990. Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotic. Eur. J. Biochem. 192 :1-15.

_____ , and Dohren , V. 1987. Biosynthesis of peptide antibiotics. Annu. Rev. Microbiol. 41 : 259- 289.

Klier , A. , and Rapoport , G. 1988. Genetics and regulation of carbohydrate catabolism in Bacillus. Annu. Rev. Microbiol. 42 : 65-95.

Kluge , B. , Vater , J. , Salnikow , J. , and Eckart , K . 1988. Studies on the biosynthesis of surfactin , a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* ATCC 21232. FEBB. Lett 231 no.1 : 107-110.

Kolter , R. , and Moreno , F. 1992. Genetic and ribosomally synthesized peptide antibiotics. Annu. Rev. Microbiol. 46 :141-163.

Konishi , M. , Maki , N. , Kyochiro , S. ,Tekeo , M. ,Toshikazu , O. , and Hiroshi , K. 1989. Cispentacin , a new antifungal antibiotic : production , isolation, physicochemical properties and structure. J. Antibiotics. 42 no.12 : 1749-1755.

Kurusa , K. , and Ohba , K. 1987. New peptide antibiotics LI-F03 , F04 , F05 , F07 and F08 , produced by *Bacillus polymyxa* , Isolation and characterization. J. Antibiotics 40 : 1506-1514.

Lebbadi , M., Galvez , A ., Marqueda , M. ,Martinez , M. ,and Valdivia ,E. 1994. Fungicin

M4 : a narrow spectrum peptide antibiotic from *Bacillus licheniformis* M4. J. Appl. Bact. 77 : 49-53.

Lichstein , H. C. 1983. Benchmark Paper in Microbiology V.19 : Bacterial Nutrition . Hutchison Ross , Pensylvania. p. 290-299.

Marahiel , M. , Zuber , P. , Czekay , G. , and Losick , R. 1987. Identification of the promotor for peptide antibiotic biosynthesis gene from *Bacillus brevis* and it regulation in *Bacillus subtilis*. J. Bact 169 no.5 : 2215-2222.

_____ , Zuber , P. , and Nakano , M. 1993. Regulation of peptide antibiotic production in Bacillus. Mol. Micro. 7(5) : 631-636.

Martin , F. , and Demain , L. 1980. Control of the antibiotic biosynthesis. Microbio. Rev. 44 no.2 : 230-251.

_____ , and Liras , P. 1989. Organization and expression of gene involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. Annu. Rev. Microbiol. 43 : 173-206.

Meyer , H. E. , Heber , M. , Eisermann , B. , Korte , H. , Metzer , J. K. , and Jung ,G. 1994. Sequence analysis of lantibiotic : chemical derivatization procedures allow a fast access to complete Edman degradation. Anal. Biochem. 223 : 185-190.

Mhammedi , A. , Peypoux , F. , Besson , F. , and Michel , G. 1982. Bacillomycin F , a new antibiotic of iturin group , isolation & characterization. , J. Antibiotics 35. : 306-311.

Miller , B. M. , and Lisky , W. 1976. Industrial Microbiology. J & R Service, Inc. , USA . p. 60-78.

Minami ,Y. ,Yoshida , K. , Azuma,R. , Urakawa , A. , Kawaushi , T. , and Otani,T. 1994 . Structure of cypemycin , a new peptide antibiotic. Tetrahedron. Lett. 35 : 8001-8004.

Morrison , R. T. , and Boyd , R. N. 1991. Organic Chemistry. Fifth edition. Allyn and Bacon Inc. , Massachasettes. p. 574-578 , 1345-1368.

Murrey , T. , Leigton , F. , Seddon , b. 1986. Inhibition of fungal spore germination by Gramicidin S and its potential use as biocontrol against fungal plant pathogen Lett. Appl. Micro. 3 : 5-7.

Naclerio , G. , Ricca , E. , Sacco , M. , and Felice , M. 1993. Antimicrobial activity of a

newly identified bacteriocin of *Bacillus cereus*. Appl. Env. Micro. 59 no. 12 : 4313-4316.

Neway , J. O. 1989. Fermentation process development of industrial organisms. Maral Dekker , Inc., New York. p. 73-132.

Okazaki , H. , Kishi , T. , Beppu , T. , Arima , K. 1975. A new antibiotic , Baciphemycin. J. Antibiotics 28 : 717-719.

O'leary , W. 1989. Practical Handbook of Microbiology. CRC Press. ,Inc. ,USA. p. 109-126, 563-573, 603-630.

Paryski , E. 1967. Antibiotics : Origin,Nature and Properties V.1 Paragon Press , London p. 48-148.

Peypoux , F. , Guinaud , M. , Michel , G. , Delcambe , L. , and Das , B. C. 1978. Structure of iturin A , a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. Biochemistry. 17 no.19 : 3992-3996.

_____ , Michel , G. , Besson , F. , and Delcambe , L. 1981. Structure of Baciilomycin D , a new antibiotic of iturin group. Eur. J. Biochem 118 : 323-327.

_____ , Marion , D. , Dana , R. , Ptak , M. , Das , B. , and Michel , G. 1985. Structure of Bacillomycin F : a new peptidolipid antibiotic of the iturin group. Eur. J. Biochem. 153 : 335-340.

_____ , Pommier , M. , Marion , D. , Ptak , M. , Das,B. , and Michel , G. 1986. Revised structure of mycosubtilin , a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. J. Antibiotics 39 : 636-641.

Phae , C. G. , Sasaki , M. , Shoda , M. , and Kubota , H. 1990. Characteristics of *Bacillus subtilis* isolated composts suppressing phytopathogenic microorganisms. Soil. Sci. plant. Nutr. 36 (4) : 575-586.

Preechaborisutkul , J. 1994. Isolation and Characterization of Peptide Antibiotics Produce by *Bacillus Subtilis*. Master' s Thesis , Mahidol University.

Research and Development , Applied Industrial Chemical Co. Ltd . 1986 . Norderstedt . (Unpublished Menuscript)

Sakaguchi , K. , Uemaru , T. , and Kinoshita , S. 1971. Biochemical and Industrial aspect of Fermentation. Kodansha Ltd , Japan. p. 119-151.

Sandrin , C. , Michel , G. , and Peypoux , F . 1990. Coproduction of surfactin and iturin

A , a lipopeptide with surfactant and antifungal properties , by *Bacillus subtilis*. Biotech. Appl. Biochem. 12 : 370-375.

Schnell , N. , Entian , K. D. , Schnieder, U. , Gotz , F. , Zarhner , H. , Kellner , R. ,and Jung, G. 1988. Prepeptide sequence of epidermin , a ribosomally synthesized antibiotic with four sulphide-rings. Nature 333 : 276-278.

Shoji , J. , Hinoo , H. ,Wakisaka , Y. , Koizumi , K. , and Mayama , M. 1976. Isolation of a new peptide antibiotic complex , B-43. J. Antibiotics 29 no.8 : 813-817.

_____. Hinoo , H. ,Wakisaka , Y. , Koizumi , K. , Mayama , M. , and Matzura , S. 1977. Isolation of two new polymyxin antibiotics. J. Antibiotics 30 no. 12 :1029-1034.

_____. Hinoo , H. , Wakisaka , Y. , Koizumi , K. , Mayama , M. , and Matzura , S. 1977. The structure of polymyxin S1. J. Antibiotics 30 no. 12 : 1035-1041.

_____. Hinoo , H. , Wakisaka , Y. , Koizumi , K . , Mayama , M. , and Matzura , S. 1977. The structure of polymyxin T1. J. Antibiotics 30 no. 12 : 1042-1048.

Tangney , M. , Smith , P. , Priest , F. G. , and Mitchell , W. J. 1992. Maltose transport in *Bacillus licheniformis* NCIB 6346 J. Gen. Micro 138 : 1821-1827.

Thoma , R . 1977. Industrial Microbiology . Dower Hutchison and Ross , Inc , Pensylvania. p. 9-13 , 108-140.

Ullrich , C. , Kluge , B. , Palacz , Z. , and Vater , J. 1991 . Cell - free biosynthesis of surfactin , a cyclic lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*. Biochemistry 30 : 6503-6508.

Umezawa , H. ,Takita , T. , and Shiba , T. 1978. Bioactive peptides produced by micro-organisms. Kodansha Ltd , Japan. pp.270.

Vandamme , E. 1984. Biotechnology of industrial antibioitcs. Marcel Dekken , Inc. , New York. p. 3-42.

Versall , M. S. 1985. Discovery and Isolation of Microbial Products. Ellis Horwood Limted, England. p. 12-14.

Voet , D. and Voet , J. G. 1995. Biochemistry. Secend edition. Jonh wiley & Son Inc , USA. p. 71-97.

Wakamiya ,T. , Ueki , Y. , Shiba , T. , Kido , Y. , Motoki ,Y. 1985. The structure of anco-vinin, a new peptide inhibitor of angiotensin I converting enzyme. Tetrahedron Lett. 26 no. 5 : 665-668.

Walker , J. K. , and Abraham , E. P. 1970. The structure of bacilysin and other products. of *Bacillus subtilis* Biochem. J. 118 : 563-570.

Waksmans , S. A. 1961. The role of antibiotic in nature. Perspet. Biol. Med. 4 : 271-278.

Weil , H. , Beck-Sickinger , A. , Metzger , J. , Stevannovic , S. , Jung , G. , Josten , M. , and Sahl , H. 1990. Biosynthesis of The Lantibiotic Pep 5. Eur. J. Biochem. 194 : 217-223.

Weinberg , E. D. 1970. Biosynthesis of Secondary Metabolites : Role of Trace Elements. Adv. Microbiol. Physio. 4 : 1-44.

Wilson , A. , and Schild , H. 1968. Applied Pharmacology. Tenth edition. Little, Brown & Company, Boston. p. 114-128.

Winkelmann , G. 1983. Iturin Al - a new long chain a possessing an unusual high content of C_{18} - amino acids. J. Antibiotics 36 no.11 : 1451-1457.

ภาคผนวก ก

1. <u>สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ</u>

1.1 อาหารเหลวนิวเตรียน (NB ; Nutrient Broth)

แบคโตเปปโตน	5 กรัม
เนื้อสกัด	3 กรัม
น้ำ	1000 มล.

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ° ซ. ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที.

1.2 อาหารแข็งนิวเตรียน (NA ; Nutrient Agar)

แบคโตเปปโตน	5 กรัม
เนื้อสกัด	3 กรัม
ผงวุ้น	15 กรัม
น้ำ	1000 มล.

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ° ซ. ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที.

1.3 อาหารวุ้นพีดีเอ (Potato Dextrose Agar)

มันฝรั่งหั่นชิ้นเล็กๆ	200 กรัม
กลูโคส	20 กรัม
ผงวุ้น	15 กรัม
น้ำ	1000 มล.

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ° ซ. ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที.

1.4 อาหารแซบบรอด (Saboroud Agar)

นีโอเปปโทน	10 กรัม
กลูโคส	10 กรัม
ผงวุ้น	15 กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ° ซ. ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที.

1.5 อาหารวายเอ็ม (Yeast Malt Extract Agar)

สารสกัดจากยีสต์	3 กรัม
สารสกัดจากมอล์ต	3 กรัม

เปปโตน	5 กรัม
กลูโคส	10 กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ^{0} ซ. ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที.

1. 6 อาหารเหลว วี-พี (Voges-Proskaver Broth)

โปรติโอสเปปโทน	7 กรัม
กลูโคส	5 กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5 กรัม
น้ำ	1000 มล.

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 6. 5

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ^{0} ซ. ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที.

1. 7 อาหารวุ้นสตาร์ช (Starch Agar)

แป้งมันฝรั่ง	1 กรัม
น้ำกลั่น	10 มล.
อาหารแข็งนิว เตรียน	100 มล

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ^{0} ซ. ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที.

1. 8 อาหารอินโดลโปรดักชั่น (Indole production)

ทริปโตน	10 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มล.

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ^{0} ซ. ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที.

1. 9 อาหารซอล์ทโทเลอแรนซ์ (Salt torelance medium)

อาหารเหลวนิวเตรียน	100 มล
โซเดียมคลอไรด์	2-10% น้ำหนัก/ปริมาตร
น้ำกลั่น	1000 มล.

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ^{0} ซ. ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที.

1. 10 อาหารนิวเตรียนเจลาติน (Nutrient Gelatin)

เจลาติน	100 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มล.

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ^{0} ซ. ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที.

1. 11 อาหารฟีนอลเรดบรอทเบส (Phenol Red Broth Base)

โปรติโอสเปปโตน	10 กรัม
เนื้อสกัด	1 กรัม

โซเดียมคลอไรด์	5 กรัม
ฟีนอลเรด	0. 018 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มล.

ปรับค่าความเป็นกรด - ด่างให้ได้ 7. 4 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน น้ำตาลที่ใช้เติมในการทดสอบได้แก่ ดี-กลูโคส ดี-แมนนิทอล ดี-ไซโลส และ ดี- อาราบิโนส

1. 12 อาหารสูตรปรับปรุง R-1 (R-1 Medium)

อาหารเหลวนิวเตรียน	1000 มล
มอลโตส	10 กรัม
สารสกัดจากยีสต์	2. 5 กรัม
แมงกานีสคลอไรด์	0. 5 x 10^{-5} โมลาร์

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ^{0} ซ. ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที.

1. 13 อาหารแข็งไทโรซีน (Tyrosine Agar)

ไทโรซีน	0. 5 กรัม
น้ำกลั่น	10 มล.

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ^{0} ซ. ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที. จากนั้นนำมาผสมกับอาหารแข็งนิวเตรียนปริมาตร 100 มล. ผสมให้เข้ากันก่อนใช้

1. 14 อาหารแข็งฟีนิลอาลานิน (Phenylalanine Agar)

สารสกัดจากยีสต์	3 กรัม
ฟีนิลอาลานิน	2 กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	1 กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5 กรัม
ผงวุ้น	15 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มล.

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ^{0} ซ. ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที.

2. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2. 1 สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3% (Hydrogen peroxide)

สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30%	10 มล.
น้ำกลั่น	90 มล.

2. 2 สารละลายโคแวค (Kovac's Solution)

พาราไดเมทิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์	5	กรัม
บิวทิวแอลกอฮอล์	75	มล.
กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น	25	มล.

ผสมให้เข้ากันแล้วเก็บไว้ในขวดสีชา

3. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์แบบปรับปรุง

ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.5 ที่มีองค์ประกอบร่วมดังต่อไปนี้

อีดีทีเอ (EDTA) ความเข้มข้น	75	มิลลิโมลาร์
แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ความเข้มข้น	1	มิลลิโมลาร์
2-เมอแคปโตเอทานอล (2-mercaptoethanol)ความเข้มข้น	10	มิลลิโมลาร์

4. สีย้อมและสารเคมีที่ใช้ในการย้อมแกรมและเอ็นโดสปอร์

4.1 สีสำหรับการย้อมแกรม (Gram Stain)

4.1.1 แกรมคริสตอล ไวโอเลต (Gram Crystal Violet)

แบคโตแกรมคริสตอลไวโอเลต	1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.

4.1.2 แกรมไอโอดีน (Gram Iodine)

ไอโอดีนคริสตอล	1	กรัม
โปแตสเซียมไอโอไดด์	1	กรัม
น้ำกลั่น	300	มล.

4.1.3 ดีคัลเลอร์ไรซ์เซอร์ (Decolorizer)

95 % แอลกอฮอล์

4.1.4 ซาฟรานินโอ (Safranin O)

ซาฟรานินโอพาวเดอร์	8	กรัม
แอนไฮดรัสแอลกอฮอล์	200	มล.

ผสมส่วนทั้งสองให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 มล.

วิธีย้อม.

-กระจายเชื้อบนสไลด์ ทำให้แห้งในอากาศแล้วผ่านเปลวไฟเพื่อฟิก (fix) เซล

-ย้อมด้วยสีแกรมคริสตอลไวโอเลต 1 นาที

-ล้างด้วยน้ำ

-ย้อมด้วยแกรมไอโอดีน 1 นาที

-ล้างด้วยน้ำ

-ล้างสีออกโดยใช้ 95% แอลกอฮอล์ สังเกตสีแกรมคริสตอลไวโอเลตที่ถูกชะออกมาพอเริ่มจางหยุดปฏิกริยาโดยการจุ่มลงในน้ำ

-ย้อมด้วยสีซาฟรานินโอ 30 วินาที ล้างน้ำแล้วซับให้แห้ง

-ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์หัวน้ำมัน

4. 2 สีสำหรับย้อมดูเอนโดสปอร์ (Endospore stain)

4. 2. 1 สีมาลาไคท์กรีน (Malacrite Green)

มาลาไคล์กรีน	5 กรัม
น้ำกลั่น	100 มล.

4. 2. 2 ซาฟรานินโอ

<u>วิธีย้อม</u>

-กระจายเชื้อบนสไลด์ ทำให้แห้งในอากาศ แต่ไม่ต้องผ่านเปลวไฟ

-หยดสีมาลาไคท์กรีนลงบนบริเวณที่กระจายเชื้อไว้ แล้วใช้ไม้ติดไฟลนใต้สไลด์ให้เกิดไอประมาณ 3-5 นาที คอยเติมสีลงไปอย่าให้แห้ง

-ล้างด้วยน้ำก๊อก 30 วินาที

-ย้อมทับด้วยสีซาฟรานินโอ 1 นาที

-ล้างน้ำ ซับให้แห้งแล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์หัวน้ำมัน ถ้าเป็นเซลที่มีสปอร์จะเห็นสปอร์ที่อยู่ภายในเซลซึ่งสีเขียว ส่วนที่เหลือของเซลจะติดสีแดง

5. <u>สารละลายที่ใช้ในการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น (Slab Gel Electrophoresis)</u>

5. 1 10 x สารละลายทริส-ไกลซีนอิเลคโตรดบัฟเฟอร์

(0. 25 โมลาร์ ทริส 1. 92 โมลาร์ไกลซีน)

ทริส	30 กรัม
ไกลซีน	144 กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 8. 8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 มล.

5. 2 1x สารละลายทริส-ไกลซีนอิเลคโตรดบัฟเฟอร์

(0. 025 โมลาร์ทริส 0. 192 โมลาร์ไกลซีน)

10% สารละลายทริส-ไกลซีนอิเลคโตรดบัฟเฟอร์	100 มล.
20% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	5 มล.

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 มล.

5. 3 20% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต(SDS)

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	100 มล.

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 500 มล.

5. 4 4x สารละลายทริส-โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต pH 6.8 (0.5 โมลาร์ทริส)

ทริส	30. 275 กรัม
20%โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	10 มล.
TEMED	1 มล.

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 6. 8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 มล.

5. 5 4 x สารละลายทริส-โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต pH 8 .8 (0.5 โมลาร์ทริส)

ทริส	30.275 กรัม
20%โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	10 มล.
TEMED	1 มล.

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 8. 8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 มล.

5. 6 2 x บัฟเฟอร์ที่จะใช้กับโปรตีนที่จะวิเคราะห์ (Sample Buffer)

กลีเซอรอล	10 มล.
2-เมอเคปโตเอทานอล	5 มล.
20% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	10 มล.
0. 5 โมลาร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ pH 6. 8	12. 5 มล.
สารละลาย 1% บรอมฟีนอลบลู	0.1 มล
น้ำกลั่น	12. 5 มล.

5. 7 สารละลายอะคริลาไมด์ (Acrylamide stock)

อะคริลาไมด์	30 กรัม
BIS	0. 8 กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มล.

5. 8 1% สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (เตรียมก่อนใช้)

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0. 1 กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 10 มล.

5. 9 สารละลายผสมของเซพาเรติงเจล (Separating Gel Solution)

สารละลายอะคริลาไมด์	1	กรัม
4x สารละลายทริส-โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต pH 8.8	5	มล.
1% สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0. 25	มล.
น้ำกลั่น	0. 50	มล.

5. 10 สารละลายผสมของสแตกกิงเจล (Stacking Gel Solution)

สารละลายอะคริลาไมด์	1	กรัม
4x สารละลายทริส-โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต pH 6.8	2. 5	มล.
1% สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0. 25	มล.
น้ำกลั่น	6. 25	มล.

5. 11 สารละลายสำหรับย้อมสี (Staining Solution)

โคแมสซีบริลเลียนบลู จี-250	2	กรัม
เมทานอล	500	มล.
กรดอะซิติก	100	มล.

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 มล.

5. 12 สารละลายสำหรับล้างสี(Destaining Solution)

เมทานอล	50	มล.
กรดอะซิติก	70	มล.

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 มล.

ภาคผนวก ข

1. <u>สารละลายสำหรับวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธีลาวรี่ (Lowry Method)</u>

1.1 ลาวรี่ เอ (Lowry A)

โซเดียมคาร์บอเนต	60	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	12	กรัม
โซเดียมโปแทสเซียมทาร์เทต	0.6	กรัม
น้ำกลั่น	3000	มล.

1.2 ลาวรี่ บี (Lowry B)

คอปเปอร์ซัลเฟต	50	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล.

1.3 ลาวรี่ ซี (Lowry C). ได้จากผสมลาวรี่เอและลาวรี่บี (50: 1)

1.4 สารละลายโฟลินฟีนอลรีเอเจนต์ (Folin Phenol Reagent)

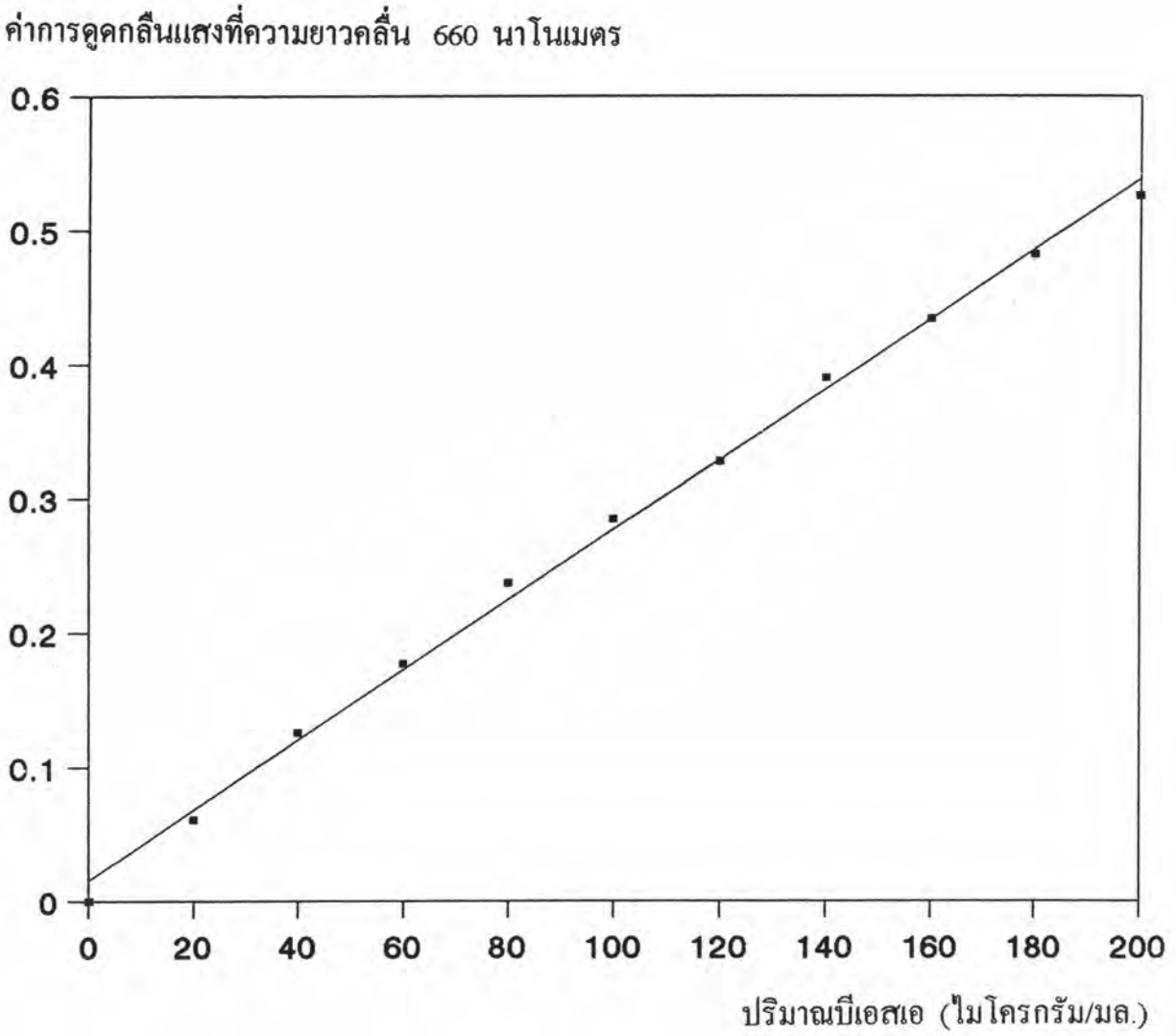
ผสมสารละลายโฟลินฟีนอล และน้ำ (1:1)

<u>วิธีวิเคราะห์</u>

-นำตัวอย่างที่ต้องการหาโปรตีน 1.0 มล ผสมกับลาวรี่ซี 5.0 มล. ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที

-เติมโฟลินฟีนอลรีเอเจนต์ 0.5 มล ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 30 นาที

-นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร เทียบปริมาณโปรตีนกับกราฟมาตรฐานบีเอสเอ (BSA) ที่แสดงไว้ดังกราฟรูปที่ 34



รูปที่ 34 กราฟมาตรฐานบีเอสเอ.

2. สารละลายสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNSA

สารเคมีที่ใช้

น้ำกลั่น	1416 มล.
3 , 5-ไดไนโตรซาลิไซลิก แอซิด	10 กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	19 กรัม
ละลายทั้งหมดให้เข้ากันแล้วเติม	
โซเดียมโปแทสเซียมทาร์เทต	306 กรัม
ฟีนอล	7. 6 กรัม
โซเดียมเมทาไบซัลไฟต์	8. 3 กรัม

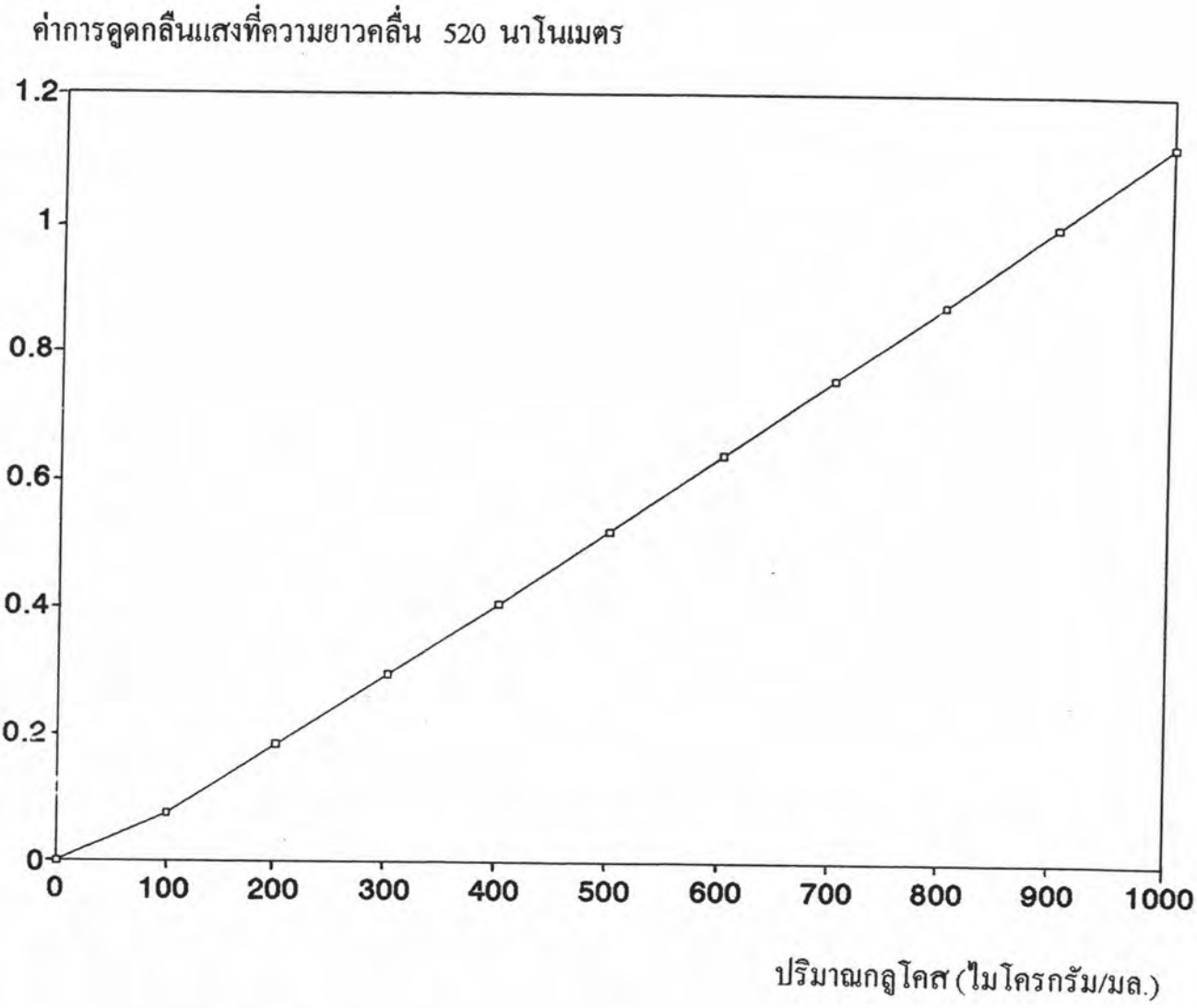
วิธีวิเคราะห์

-นำตัวอย่างที่ต้องการทดสอบมา 1.0 มล.

-เติมสารละลาย DNSA 1.0 มล. ผสมให้เข้ากัน

-นำไปต้มในน้ำเดือด 10 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

- เติมน้ำกลั่น 10 มล. แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสที่แสดงไว้ดังกราฟรูปที่ 35



รูปที่ 35 กราฟมาตรฐานกลูโคส

ประวัติผู้เขียน

นางสาวรุ่งอรุณ วาดิถี เกิดเมื่อวันที่ 11 มิถุนายน พศ. 2514 ได้รับปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2536 และเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโทในหลักสูตรจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ในปีการศึกษา 2537 ขณะศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ได้เสนอผลงานวิจัยดังนี้

Rungaroon Waditee , Sumalee Pichyangura and Suwimon Keeratipibul. 1994. The production of antimicrobial substance from *Bacillus* sp. SR-1. The 9th NRCT , NUS, DOST-JSPS Joint Seminar on Biotechnology and the 6th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology : Biotechnology for Economy and Pollution Control apprroaches October 12-15 , Khon Kean , Thailand.