TM
ฯ-11-03

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
เงินอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน
รายงานผลการวิจัย

ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตคานามัยซินโดย *Streptomyces kanamyceticus* สายพันธุ์ใหม่ที่ได้จากการกลายพันธุ์

Optimal Conditions for Kanamycin Production by Mutant Strain of *Streptomyces kanamyceticus*

ปีงบประมาณ 2541

โดย

รศ. ดร. สุรีนา ชวนิชย์
น.ส. อรอนงค์ พริ้งศุลกะ

15 พฤษภาคม 2542

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2541

ชื่อโครงการวิจัย ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตคานามัยซินโดย *Streptomyces kanamyceticus* สายพันธุ์ใหม่ที่ได้จากการกลายพันธุ์

ชื่อผู้วิจัย รศ. ดร. สุรีนา ชวนิชย์ และ น.ส. อรอนงค์ พริ้งศุลกะ

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ 15 พฤษภาคม 2542

บทคัดย่อ

การผลิตคานามัยซินโดยสายพันธุ์กลาย 2 สายพันธุ์ของ *Streptomyces kanamyceticus* คือ UUNNK1 และ UUNNK25 พบว่าสายพันธุ์ UUNNK1 สามารถผลิตคานามัยซินได้เป็น 70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สูงกว่าสายพันธุ์ UUNNK 25 ถึง 2 เท่า ดังนั้นจึงนำสายพันธุ์ดังกล่าวมาศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตคานามัยซินในระดับขวดเขย่าโดยเลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี พบว่าแป้ง 15 กรัมต่อลิตร และซอยโทน 12 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่ 8.0-8.6 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม ทำให้สายพันธุ์ UUNNK1 สามารถผลิตคานามัยซินได้ 190 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเวลา 3 วัน เมื่อเปรียบเทียบการเลี้ยงสายพันธุ์ UUNNK1 ในสูตรอาหารเดิมชนิดเดียวกับที่ใช้เลี้ยงสายพันธุ์ตั้งต้น K1 แล้ว สายพันธุ์ UUNNK1 สามารถผลิตคานามัยซินได้มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นถึง 13.6 เท่า

Project Title	Optimal Conditions for Kanamycin Production by Mutant Strain of *Streptomyces kanamyceticus*
Name of the Investigators	Assoc. Prof. Surina Chavanich and Ms. Onanong Pringsulaka
Year	May, 15 1999

Abstract

Productions of kanamycin by 2 mutants of *Streptomyces kanamyceticus* K1, UUNNK1 and UUNNK25 were investigated. The mutant UUNNK1 , produced 70 μg/ml of kanamycin, which was 2 folds higher than the amount produced by UUNNK25. The optimal conditions for the production of kanamycin in KPMB medium of this mutant in shaking cultures were studied. The suitable carbon and nitrogen sources were 15 g/l of starch and 12 g/l of soytone, respectively. With pH ranging from 8.0 to 8.6 , temperature at 30°C on a rotary shaker were other optimal conditions in KPMB medium. At these conditions UUNNK1 could produce 190 μg/ml within 3 days of cultivation. In comparison to the wild type strain, the UUNNK1 produced higher amounts of kanamycin for 13.6 folds.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญตาราง	vi
สารบัญรูป	vii
บทที่	
1. บทนำ และการสำรวจแนวความคิด งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	1
2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	6
3. ผลการวิจัย	10
4. สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	32
รายการอ้างอิง	43
ภาคผนวก	47

เลขหมู่ ดพ
ดท15
เลขทะเบียน 009879
วัน.เดือน.ปี 21 ม.ค 43

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณโปรตีนและปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี เป็นเวลา 7 วัน	10
2. แสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณโปรตีนและปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK25 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี เป็นเวลา 7 วัน	12
3. แสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณโปรตีนและปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ K1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี เป็นเวลา 7 วัน	13
4. แสดงปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 ที่มีชนิดของแหล่งคาร์บอนหลักแตกต่างกัน	15
5. แสดงปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 ที่มีปริมาณแป้งแตกต่างกัน	17
6.แสดงปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1เมื่อทำการแปรผันชนิดแหล่งไนโตรเจน	20
7.แสดงปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 เมื่อทำการแปรผันปริมาณซอยโทน	23
8. แสดงปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นในอาหารเหลวเคพีเอ็มบีต่างกัน	26
9. แสดงปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 เมื่อทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างๆ	29

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1. กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณโปรตีน ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์กลาย UUNNK1	11
2. กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณโปรตีน ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์กลาย UUNNK25	12
3. กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณโปรตีน ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ ตั้งต้น K1	14
4. กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง (ก) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ข) ปริมาณโปรตีน (ค) ปริมาณคานามัยซิน (ง) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (จ) เมื่อมีแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ	16
5. กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง (ก) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ข) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ค) ปริมาณโปรตีน (ง) ปริมาณคานามัยซิน (จ) และค่าความเป็นกรด-ด่าง (ฉ) เมื่อทำการแปรผันปริมาณแป้ง	18
6. กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง (ก) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (ข) และปริมาณคานามัยซิน (ค) เมื่อมีแหล่งไนโตรเจนหลักชนิดต่างๆ	21
7. กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง (ก) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ข) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ค) ปริมาณโปรตีน (ง) ปริมาณคานามัยซิน (จ) และค่าความเป็นกรด-ด่าง (ฉ) เมื่อแปรผันปริมาณของซอยโทน	24
8. กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง (ก) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ข) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ค) ปริมาณโปรตีน (ง) ปริมาณคานามัยซิน (จ) และค่าความเป็นกรด-ด่าง (ฉ) เมื่อทำการแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่าง	27
9. กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง (ก) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ข) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ค) ปริมาณโปรตีน (ง) ปริมาณคานามัยซิน (จ) และค่าความเป็นกรด-ด่าง (ฉ) เมื่อทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างๆ	30

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
10. กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้งและปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ K1 UUNNK1 และ UUNNK25	33
11. กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง และปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK 1 เมื่อมีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน	34
12. กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง และปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 เมื่อมีปริมาณแป้งต่างกัน	36
13. กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง และปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนหลักชนิดต่าง ๆ	37
14. กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง และปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 เมื่อแปรผันปริมาณของซอยโทน	38
15. กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง และปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 เมื่อแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่าง	39
16. กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง และปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิต่าง ๆ	40
17. โครงสร้างหลักของคานามัยซิน	49
18. กราฟมาตรฐานน้ำตาลทั้งหมด เมื่อวัดปริมาณด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก	50
19. กราฟมาตรฐานคานามัยซินเอ ซัลเฟต โดยวิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา	51
20. กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธีของ Lowry และคณะ	53
21. กราฟมาตรฐานการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีดีเอ็นเอสเอ	54

บทที่ 1

บทนำ และการสำรวจแนวความคิด งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

คานามัยซิน (Kanamycin)

คานามัยซินเป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ (aminoglycoside) ผลิตจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Streptomyces kanamyceticus* พบครั้งแรกโดยนักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่นชื่อ Umezawa (Umezawa, 1957) ซึ่งแยกเชื้อจากดินตัวอย่างที่เก็บในเขต Nagano คานามัยซินเป็นยาที่มีประสิทธิภาพสูงในการรักษาโรคที่เกิดจากแบคทีเรียทั้งชนิดแกรมบวก แกรมลบ และแอซิดฟาส์ท (acid fast) โดยการออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของจุลินทรีย์ สามารถออกฤทธิ์กับแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่กลุ่มเพนนิซิลินใช้ไม่ได้ผล ออกฤทธิ์ได้ดีกับพวก *Staphylococcus* spp., *Proteus* spp., *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. และ *Mycobacterium tuberculosis* เป็นต้น (มาลิน, 2532 ; Kucer and Mc. Bennet, 1975 ; Edward, 1980)

คานามัยซินมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{18}\ H_{36}\ N_4\ O_{11}$ ประกอบด้วยโครงสร้างหลัก 3 ส่วน คือ 3-อะมิโน-3-ดีออกซี-ดี-กลูโคส (3-amino-3-deoxy-D-glucose (3AG)) 2-ดีออกซีสเตรปทามีน (2-deoxystreptamine (2DS)) และอะมิโนซูการ์ ซึ่งส่วนที่เป็นอะมิโนซูการ์จะแตกต่างกันในแต่ละอนุพันธ์ของคานามัยซิน (Umezawa, 1986) โครงสร้างหลักของคานามัยซินแสดงในภาคผนวกรูปที่ 17 (Korzybski et al., 1967)

คานามัยซินมี 3 อนุพันธ์ คือ คานามัยซินเอ (kanamycin A) มีอะมิโนซูการ์ เป็น 6-อะมิโน -6-ดีออกซี-ดี-กลูโคส (6-amino-6-deoxy-D-glucose (6AG)) (R_1= NH_2 , R_2= OH) คานามัยซินบี (kanamycin B) มีอะมิโนซูการ์เป็น 2 ; 6-ไดอะมิโน -2, 6-ไดดีออกซี-ดี-กลูโคส (2 , 6-diamino-2, 6-dideoxy-D-glucose) (R_1= NH_2 , R_2= NH_2) และคานามัยซินซี (kanamycin C) มีอะมิโนซูการ์เป็น 2-อะมิโน-2-ดีออกซี-ดี-กลูโคส (2-amino-2-deoxy-D-glucose) (glucosamine) (R_1= OH , R_2= NH_2)

การผลิตคานามัยซิน

การผลิตคานามัยซินของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์ต่าง ๆ มีรายงานโดย Umezawa และคณะ (Umezawa, 1958 ; Umezawa et al., 1960) ได้ทำการเพาะเลี้ยง

S. kanamyceticus K-2J ในถังหมักขนาด 400 ลิตร มีอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย แป้ง กลูโคส กากถั่วเหลือง และอื่นๆ เป็นเวลา 78 ชั่วโมง จะให้ปริมาณคานามัยซิน 273 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปี 1976 Satoh และคณะ ได้ทำการเพาะเลี้ยง *S. kanamyceticus* 133-28 สามารถผลิตคานามัยซิน ได้ 110 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปี 1975 Basak และ Majumdar ได้ทำการเพาะเลี้ยง *S. kanamyceticus* ATCC 12853 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย กาแลคโตส โซเดียมไนเตรท และอื่นๆ พบว่าสามารถให้คานามัยซิน 195 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

<u>การสังเคราะห์สารปฏิชีวนะและปัจจัยที่มีผลต่อการสร้าง</u>

สารปฏิชีวนะจัดเป็นสารเมตาโบไลต์ ขั้นที่ 2 (secondary metabolites) โดยบางครั้งจะถูกเรียกว่า ไอดิโอไลท์ (idiolites) (Walker, 1974) เนื่องจากเกิดในระยะไอดิโอเฟส (idiophase) หรือระยะสร้างผลผลิต (production phase) ของการเลี้ยงเชื้อแบบงวดเดียว (batch culture) สารพวกนี้ไม่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ แต่จะทำให้สามารถรอดชีวิตในธรรมชาติได้ การสร้างสารปฏิชีวนะจะเกิดในกรณีที่มีสารอาหารต่อการเจริญจำกัด ดังนั้นจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้จะมีความได้เปรียบและสามารถรอดชีวิตในสิ่งแวดล้อมได้ดีกว่า (Walker, 1974 ; Martin and Demain, 1980)

ระยะ 20 ปีที่ผ่านมา มีงานวิจัยที่เกี่ยวกับการหาภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารปฏิชีวนะด้วยวิธีการเลี้ยงแบบงวดเดียว (batch) และวิธีการเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่อง (fed-batch cultures) (Bajpai and Reuss , 1981 ; Modak and Lim , 1989) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นงานวิจัยที่นำวิธีทางคณิตศาสตร์มาสร้างแบบจำลอง ซึ่งใช้เวลานานมากและไม่สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรม ดังนั้น จึงได้มีการทดลองที่เน้นไปทางภาวะการเลี้ยง เช่น Mou และ Cooney ในปี 1983 ได้ทำการศึกษาปริมาณการเติมสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะในการหมักเพนนิซิลลิน ซึ่งการควบคุมดังกล่าวทำโดยค่อยๆ เติมกลูโคสและคอร์นสตีพลิเคอร์ (corn steep liquor) ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดซับซ้อน (complex medium) เมื่อช่วงระยะของการเจริญผ่านไปครึ่งหนึ่ง มีการสร้างเพนนิซิลลินสูงขึ้น ดังนั้นเทคโนโลยีทางการหมักจึงพัฒนาต่อมาเรื่อยๆ ' การสร้างสารปฏิชีวนะนั้นเกิดจากการที่จุลินทรีย์ขาดสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญหนึ่งชนิดหรือมากกว่า ซึ่งจะทำให้การเจริญคงที่และจะเข้าสู่ระยะผลิตผลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ มีสารอาหารที่จำกัดต่อการเจริญ พบว่า เชื้อจะเริ่มมีการผลิตสารปฏิชีวนะในขณะที่การเจริญเกิดขึ้นช้าๆ (Martin and Demain , 1980) แม้ว่าอัตราการสร้างสารปฏิชีวนะจะไม่เกี่ยวข้องกับอัตราการเจริญในระยะสร้างผล

ผลิต แต่ปริมาณเซลล์ในระยะการเจริญจะเกี่ยวข้องกับการสร้างสารปฏิชีวนะในระยะสร้างผลผลิต ดังนั้นภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อเพื่อให้มีการสร้างสารปฏิชีวนะมากที่สุดนั้นจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องควบคุมเซลล์ในระยะการเจริญ (Yang et al., 1995)

ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารปฏิชีวนะมีดังนี้คือ

<u>แหล่งคาร์บอน</u> โดยปกติกลูโคสจะเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญแต่จะขัดขวางการสร้างสารปฏิชีวนะหลายชนิด มีรายงานการศึกษาว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการสร้างสารปฏิชีวนะมักจะเป็นโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) หรือโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) (Soltero and Johnson, 1953) อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกลูโคสและแหล่งคาร์บอนอื่นที่ใช้ได้ยากกว่า พบว่ากลูโคสจะถูกใช้ก่อนในช่วงที่ไม่มีการสร้างสารปฏิชีวนะหลังจากกลูโคสถูกใช้หมด แหล่งคาร์บอนที่สองที่ใช้ได้ยากกว่าจะถูกใช้ในการสร้างสารปฏิชีวนะ (Audhya and Russell, 1975 ; Demain, 1963 ; Gallo and Katz , 1972) สาเหตุสำคัญที่กลูโคสไม่เหมาะสมในการสร้างสารปฏิชีวนะ เนื่องจากกลูโคสจะทำให้เกิดการคาตาโบไลท์รีเพรสชั่นของคาร์บอน ซึ่งเกี่ยวข้องทั้งอัตราการเจริญและการควบคุมการสร้างสารปฏิชีวนะด้วย (Bu' Lock , 1974 ; Martin and Demain , 1980) การสร้างเพนนิซิลลิน พบว่าถ้าเติมกลูโคสอย่างช้า ๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะทำให้เกิดการเจริญอย่างช้าพร้อมทั้งกำจัดการยับยั้งของกลูโคส และ ในบางกรณีกลูโคสจะกดการทำงานของเอนไซม์ในวิถีการสร้างสารปฏิชีวนะ เช่น กลูโคสจะยับยั้งการสร้างนีโอมัยซิน ใน *Streptomyces fradiae* โดยกดการทำงานของเอนไซม์ฟอสฟาเทส (phosphatase) (Majumdar and Majumdar , 1981)

สำหรับแหล่งคาร์บอนสำคัญที่ใช้ในการผลิตคานามัยซิน มีรายงานของ Umezawa และคณะในปี 1957 ว่า เมื่อเลี้ยง *Streptomyces kanamyceticus* K2-J ในอาหาร Czapak salt basal พบว่าเชื้อสามารถใช้อะราบิโนส เดกซ์ทริน ฟรุคโตส กาแลคโตส กลูโคส กลีเซอรอล มอลโตส แมนนิทอล ราฟฟิโนส (raffinose) แป้ง ซูโครส และซัคซิเนต แต่ไม่ใช้อินโนซิทอล (inositol) อินนูลิน (innulin) แลคโตส แรมโนส (rhamnose) ซอร์โบส (sorbose)ไซโลส และอะซิเตต นอกจากนี้ยังพบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบ จะให้ค่า yield ของคานามัยซินสูงสุด (Umezawa et al., 1957) ปี 1973 มีรายงานของ Basak และ Majumdar ซึ่งศึกษาแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตคานามัยซินของ *S. kanamyceticus* ATCC 12853 โดยใช้ basal mineral salts พบว่ากาแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด โดยเดกซ์ตริน แป้งละลาย แป้งมันฝรั่ง และมอลโตส ให้ผลในการเจริญ

มากกว่าการผลิตคานามัยซิน ส่วนกลูโคส แมนโนส อะราบิโนส เป็นแหล่งคาร์บอนที่ไม่เหมาะสมต่อการสร้างคานามัยซิน สำหรับกลูโคสนั้น Satoh และคณะ (Satoh et al., 1976) รายงานว่ากลูโคสจะกดการทำงานของเอนไซม์ เอ็น-อะเซทิลคานามัยซิน อะมิโนไฮโดรเลส (N-acetylaminohydrolase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวสุดท้ายในการสร้างคานามัยซิน

<u>แหล่งไนโตรเจน</u> แหล่งไนโตรเจนที่ถูกใช้ได้ง่าย เช่นแอมโมเนีย ซึ่งเป็นสารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจน จะทำให้เกิดการกดการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นซับสเตรท เพื่อหลีกเลี่ยงปรากฏการณ์ดังกล่าว จึงใช้แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ยาก เช่นการผลิตสเตรปโตมัยซิน จะใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน (Aharonowitz, 1980) สำหรับสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนนั้น โพรลีน (proline) จะให้ผลดีที่สุดในการผลิตสเตรปโตมัยซิน ทั้งนี้เนื่องจาก โพรลีนจะถูกใช้อย่างช้า ๆ ในขณะที่เกลือแอมโมเนียอื่น ๆไม่ให้ผลดีเท่ากับโพรลีน ส่วน ไอโซลิวซีน (isoleucine) นั้น เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ใช้สร้างคลอแรมเฟนิคอลที่ดีที่สุด (Chatterjee and Vining , 1981) ดังนั้นการเลือกแหล่งไนโตรเจนที่สังเคราะห์จะต้องเป็นกรดอะมิโนที่จุลินทรีย์ใช้ได้อย่างช้า ๆ สำหรับแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างสารปฏิชีวนะในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ พบว่าวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น กากถั่วเหลือง คอร์นสตีพลิเคอร์ และสารสกัดจากยีสต์ จะเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในบางกรณีอาจเติมแอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโนเนียมไนเตรทลงไปด้วย (Okachi และ Nara , 1980)

มีรายงานการใช้แหล่งไนโตรเจนในการผลิตคานามัยซิน โดย Umezawa และคณะ พบว่าคานามัยซินจะถูกสร้างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกากถั่วเหลือง กากถั่วลิสง กากเมล็ดฝ้าย คอร์นสตีพลิเคอร์ เปปโตน สารสกัดจากยีสต์ หรือสารสกัดจากเนื้อ โดยแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดคือ กากถั่วเหลือง การเติมคอร์นสตีพลิเคอร์ เปปโตน สารสกัดจากยีสต์ หรือไนเตรทในอัตราส่วนต่าง ๆ จะทำให้มีการสร้างคานามัยซินเพิ่มขึ้น ปี 1973 Basak และ Majumdar ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนในอาหาร basal mineral salts พบว่า โซเดียมไนเตรท 5.1 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณคานามัยซินสูงสุด และการเติมไกลซีน อาร์จินีน แอสปาราจีน ในปริมาณน้อยจะทำให้ผลผลิตของคานามัยซินสูงขึ้น

<u>อุณหภูมิ</u> อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการผลิตสารปฏิชีวนะไม่แพ้ปัจจัยอื่น เช่น ถ้าอุณหภูมิสูงเกินไปผลผลิตที่ได้ก็จะต่ำ ดังนั้นในการผลิตสารปฏิชีวนะจึงต้องควบคุมให้อยู่ในช่วงที่พอเหมาะโดยการมีท่อน้ำเย็นขดที่ฐานของถังหมัก อุณหภูมิที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ *S. kanamyceticus* เพื่อการผลิตคานามัยซินนั้น พบว่าจะอยู่ในช่วงกว้างคือ 25-35

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

องศาเซลเซียส ซึ่งจุลินทรีย์เจริญได้ แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 27-32 องศาเซลเซียส (Umezawa, 1957)

ค่าความเป็นกรด-ด่าง ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญต่อการผลิตสารปฏิชีวนะมาก ได้มีการศึกษาสารปฏิชีวนะประเภทเปปไทด์ที่ผลิตออกมาในช่วงหลังของการเจริญนั้นว่าขึ้นอยู่กับความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสำคัญ จากความสำคัญของค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว สามารถทำให้เกิดการผลิตในช่วงของการเจริญได้ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเหมาะสม (Haavik, 1974) สำหรับการผลิตคานามัยซินนั้น *S. kanamyceticus* จะสร้างคานามัยซินในช่วงที่เป็นด่าง (Umezawa, 1957 ; Basak and Majumdar, 1973)

จากความสำคัญของคานามัยซิน ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะที่นำมาใช้ในการรักษาโรคในคนและสัตว์ โดยมีแนวโน้มในการใช้เพิ่มมากขึ้น อีกทั้งวิธีการศึกษาการกลายพันธุ์ของ *Streptomyces kanamyceticus* เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการผลิตคานามัยซินยังไม่สำเร็จเท่าที่ควร (Ihao et al., 1980) ประกอบกับคณะของผู้วิจัย สามารถทำการพัฒนาและคัดเลือกสายพันธุ์กลายของ *S. kanamyceticus* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตคานามัยซิน ได้สายพันธุ์กลาย 3 สายพันธุ์ ซึ่งผลิตคานามัยซินสูงกว่าสายพันธุ์เดิม เนื่องจากสายพันธุ์กลายนี้มีคุณสมบัติที่เปลี่ยนไปจากสายพันธุ์เดิมหรือสายพันธุ์ตั้งต้น จึงต้องมีการปรับภาวะในการเลี้ยงใหม่เพื่อให้ผลิตคานามัยซินสูงขึ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะคัดเลือกสายพันธุ์กลายของ *S. kanamyceticus* ที่มีความเสถียรและสามารถผลิตคานามัยซินสูงขึ้น มาหาภาวะที่เหมาะสมเพื่อการผลิตคานามัยซินได้สูงสุดและนำข้อมูลที่ได้ ไปใช้ในการผลิตคานามัยซินในระดับขยายส่วนต่อไป

บทที่ 2

อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. อุปกรณ์

1.1 ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) บริษัท International Scientific Supply Co.Ltd.,Thailand

1.2 ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (incubator) รุ่น D 0601 model 500 บริษัท Memmert , U.S.A.

1.3 เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อ (shaker)รุ่น Gyrotory G10 บริษัท New Brunswick Scientific , U.S.A.

1.4 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectophotometer) รุ่น Novaspec II บริษัท Pharmacia Biotech , England

1.5 ถาดกระจก ขนาดกว้าง 19 เซนติเมตร ยาว 31 เซนติเมตร สูง 1.5 เซนติเมตร

1.6 ฮีมาซัยโตมิเตอร์ (haemacytometeer) ขนาด bright line deep 1/10 มิลลิเมตร บริษัท Boeco,West Germany

1.7 กล้องจุลทรรศน์ (microscope) รุ่น CHS บริษัท Olympus Optical Co.Ltd., Japan

1.8 เครื่องผสมสาร (vortex) รุ่น Vortex-2 Genie model G-560E บริษัท Scientific Industries , U.S.A.

1.9 ตู้ดูดอากาศ

1.10 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น KM-15200 บริษัท Kubota, Japan

1.11 เครื่องชั่งน้ำหนัก รุ่น A200S บริษัท Sartorius , Germany

1.12 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น Cyberscan 1000 บริษัท Eutech Cyberscan , Singapore

2. สารเคมี

2.1 คานามัยซินเอซัลเฟต (kanamycin A sulfate) บริษัท Sigma Chemical ,U.S.A.

2.2 อะซิโตไนไตรด์ (acetonitrile) บริษัท Sigma Chemical , U.S.A.

วิธีดำเนินการวิจัย

1. คัดเลือกสายพันธุ์กลายของ *S. kanamyceticus*

1.1 การเตรียมสปอร์แขวนลอยของ *S. kanamyceticus*

นำ *S. kanamyceticus* อายุ 7-10 วัน ซึ่งมีสปอร์เจริญเต็มที่ เพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นเอียงวายเอส (YS agar) (ภาคผนวก) และเติม Tween-80 เขี่ยสปอร์ให้หลุด แล้วนำมากรองด้วยสำลีโดยวิธีการแบบปลอดเชื้อ

1.2 การเตรียมหัวเชื้อ *S. kanamyceticus*

นำสปอร์แขวนลอยของ *S. kanamyceticus* ที่เตรียมจากข้อ 1.1 ใส่ลงในอาหารเหลวจีพีวาย (GPY medium) (ภาคผนวก) ซึ่งปรรจุใน Erlenmeyer flask เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้สปอร์งอกเป็นหัวเชื้อในการทดลองต่อไป

1.3 การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อผลิตคานามัยซิน

นำ *S. kanamyceticus* จากข้อ 1.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี (KPMB medium) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (ภาคผนวก) บรรจุใน Erlenmeyer flask เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

1.4 วิเคราะห์ปริมาณคานามัยซินทางจุลชีววิทยา (Microbiological assay)

วัดความสามารถในการผลิตคานามัยซินในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี โดยวิธีการแพร่ (Agar diffusion method) ใช้เซลล์แขวนลอยของเชื้อทดสอบ *Staphylococcus aureus* ATCC6538P ใส่ลงอาหารเอ็มไฟว์ (M5 agar) (ภาคผนวก) แล้วเทลงบนถาดกระจก ทำให้อาหารวุ้นกระจายทั่วถาด ตั้งทิ้งให้วุ้นแข็งตัว เจาะวุ้นด้วย cock borer หยดตัวอย่างที่เตรียมจากข้อ 1.3 และคานามัยซินซัลเฟตมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงหลุมที่เจาะ วัดความกว้างเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้งการเจริญต่อเชื้อทดสอบ เปรียบเทียบหาปริมาณคานามัยซิน

1.5 การวิเคราะห์น้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณโปรตีน และค่าความเป็นกรด-ด่าง

นำตัวอย่างที่ได้จากข้อ 1.3 ไปปั่นแยกเส้นใยออกจากส่วนน้ำใส ล้างเส้นใยที่ปนเปื้อนแคลเซียมคาร์บอเนตออก ด้วยกรดซัลฟูริคเข้มข้น 1 นอร์มอล อบให้แห้งที่ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักแห้งเพื่อวัดอัตราการเจริญ ส่วนน้ำใสที่แยกได้นำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริค (Phenol-sulfuric method) (Ashwell, 1966) วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอสเอ (DNSA method) (Bernfeld, 1955) วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีลาวรี (Lowry method) (Lowry et al., 1951) วัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter)

2. การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตคานามัยซินของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

2.1 คัดเลือกแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

นำเส้นใยของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้ เลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี โดยเปลี่ยนสูตรอาหารให้มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆกัน 6 ชนิด คือ แป้ง มอลโตส แลคโตส กลูโคส กาแลคโตส และซูโครส นำมาวิเคราะห์ตามวิธีการทดลองข้อ 1.5 และวิเคราะห์ปริมาณคานามัยซินตามวิธีทดลองข้อ 1.4

2.1.1 การแปรผันปริมาณแหล่งคาร์บอนที่คัดเลือกได้เพื่อการผลิตคานามัยซิน

นำเส้นใยของสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี โดยเปลี่ยนสูตรอาหารให้มีการแปรผันปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่คัดเลือกได้เป็น 5 , 10 , 15 , 20 , 25 และ 30 กรัมต่อลิตร นำมาวิเคราะห์ด้วยวิธีการทดลองข้อ 1.5 และหาปริมาณคานามัยซินตามวิธีทดลองข้อ 1.5 และหาปริมาณคานามัยซินตามวิธีการทดลองข้อ 1.4 นำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่สายพันธุ์กลายนำไปใช้ในการผลิตคานามัยซินให้ได้สูงสุด

2.2 การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ

นำเส้นใยของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้ มาเลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี โดยเปลี่ยนสูตรอาหารให้มีแหล่งไนโตรเจนหลักต่างกัน 5 ชนิด คือ อะลานีน กลูโคซามีน โซเดียมไนเตรท ซอยโทน สารสกัดจากยีสต์ และกากถั่วเหลืองที่ถูกย่อยด้วยกรด นำมาวิเคราะห์ตามวิธีทดลองข้อ 1.5 และปริมาณคานามัยซินด้วยวิธีทดลองข้อ 1.4

2.2.1 การแปรผันปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่คัดเลือกได้ เพื่อการผลิตคานามัยซิน

นำเส้นใยของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี โดยเปลี่ยนสูตรอาหารให้มีการแปรผันปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่คัดเลือกได้เป็น 12 และ 14 กรัมต่อลิตร นำมาวิเคราะห์ตามวิธีทดลองข้อ 1.5 และหาปริมาณคานามัยซินตามวิธีทดลองข้อ 1.4 นำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่สายพันธุ์กลายนำไปใช้ในการผลิตคานามัยซินได้สูงสุด

2.3 การทดสอบการแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตคานามัยซิน

นำเส้นใยของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว เคพีเอ็มบี ตามวิธีการทดลองข้อ 4.2 โดยเปลี่ยนสูตรอาหารให้มีการแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เป็น 7-8.6 นำมาวิเคราะห์ตามวิธีทดลองข้อ 1.5 และหาปริมาณคานามัยซินตามวิธีทดลองข้อ 1.4 นำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมที่สายพันธุ์กลายสามารถนำไปใช้ในการผลิตคานามัยซินได้สูงสุด

2.4 การทดสอบการแปรผันอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตคานามัยซิน

นำเส้นใยของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์กลาย ที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองข้อ 4.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี โดยแยกเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 30 35 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง นำมาวิเคราะห์ตามวิธีทดลองข้อ 1.5 และหาปริมาณคานามัยซินตามวิธีทดลองข้อ 1.4 นำผลที่ได้มาวิเคราะห์อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สายพันธุ์กลายสามารถนำไปใช้ในการผลิตคานามัยซินได้สูงสุด

บทที่ 3

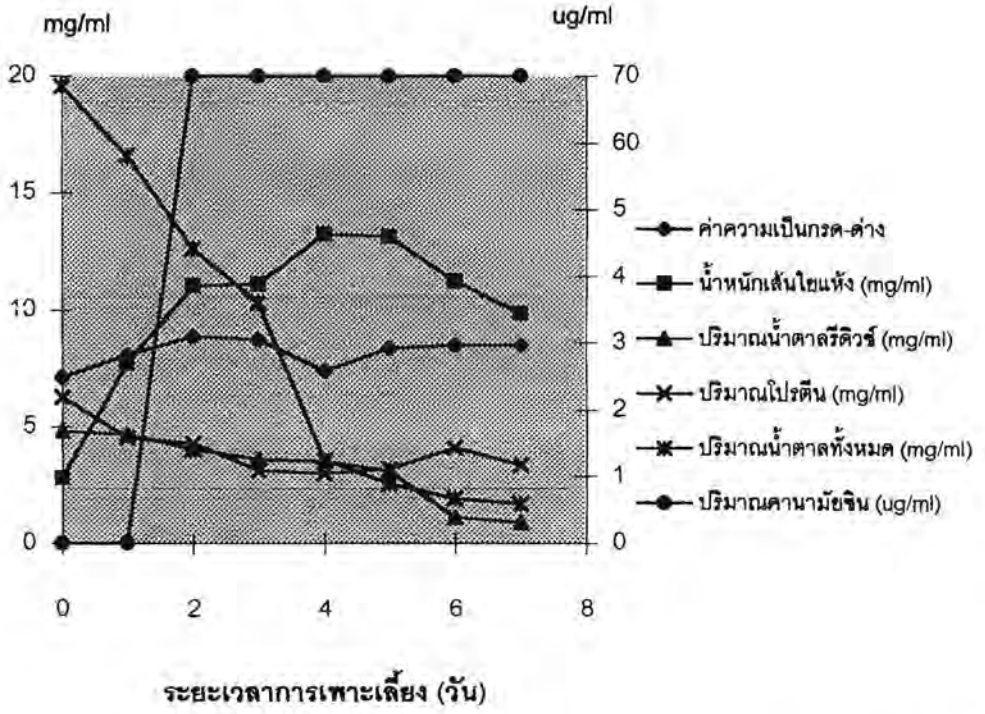
ผลการวิจัย

1. การคัดเลือกสายพันธุ์กลายของ *S. kanamyceticus*

จากการนำสายพันธุ์กลายจำนวน 2 สายพันธุ์ ที่คณะของผู้วิจัยได้พัฒนาและคัดเลือกได้คือ UUNNK1 และ UUNNK25 ซึ่งสามารถผลิตคานามัยซินได้สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ดังนั้นจึงนำสายพันธุ์กลายดังกล่าวมาทำการคัดเลือกให้ได้สายพันธุ์กลายที่ดีที่สุดในการผลิตคานามัยซิน เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น K1 ซึ่งให้ผลดังตารางที่ 1 รูปที่ 1 , ตารางที่ 2 รูปที่ 2 และตารางที่ 3 รูปที่ 3 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 แสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณโปรตีนและปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี เป็นเวลา 7 วัน

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเส้นใยแห้ง (mg/ml)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (mg/ml)	ปริมาณคานามัยซิน (µg/ml)
0	7.10	2.80	4.79	6.25	19.57	0
1	8.05	7.70	4.65	4.54	16.60	0
2	8.85	11.00	4.02	4.27	12.60	70
3	8.73	11.10	3.57	3.13	10.30	70
4	7.37	13.24	3.52	2.99	3.57	70
5	8.34	13.14	3.09	3.17	2.53	70
6	8.48	11.21	1.09	4.08	1.89	70
7	8.46	9.86	0.89	3.34	1.69	70

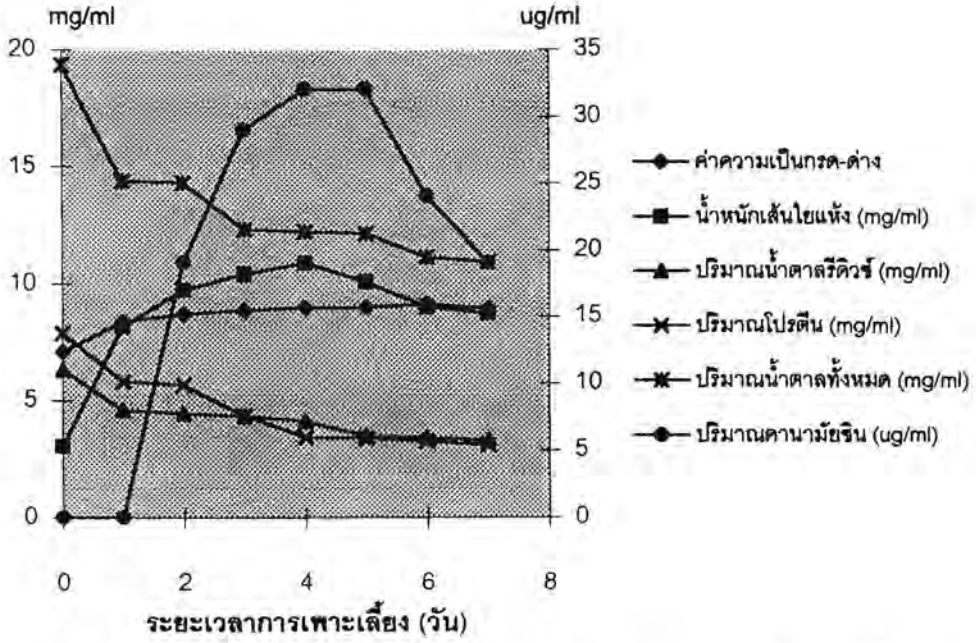


รูปที่ 1 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณโปรตีน ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์กลาย UUNNK1

จากตารางที่ 1 และรูปที่ 1 พบว่าน้ำหนักเส้นใยแห้งของสายพันธุ์ UUNNK1 สูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง เป็น 13.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ อยู่ในช่วง 7.10-8.46 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เริ่มต้นจาก 19.57 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ถูกใช้ไปจนเหลือเพียง 1.69 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะค่อย ๆลดลงจาก 4.79 มาเป็น 0.89 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณโปรตีนจะลดลงเช่นกันจากปริมาณ 6.25 เป็น 3.34 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้สายพันธุ์ UUNNK1 สามารถผลิตคานามัยซินได้สูงสุดถึง 70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตั้งแต่วันที่ 2 จนถึงวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 2 แสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณโปรตีนและปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK25 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี เป็นเวลา 7 วัน

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเส้นใยแห้ง (mg/ml)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (mg/ml)	ปริมาณคานามัยซิน (µg/ml)
0	7.08	3.03	6.31	7.88	19.35	0
1	8.35	8.15	4.60	5.80	14.35	0
2	8.67	9.72	4.43	5.65	14.28	19
3	8.84	10.38	4.32	4.34	12.30	29
4	8.93	10.85	4.11	3.41	12.20	32
5	8.97	10.05	3.47	3.39	12.10	32
6	9.09	8.96	3.38	3.21	11.10	24
7	8.90	8.68	3.28	3.07	10.90	19

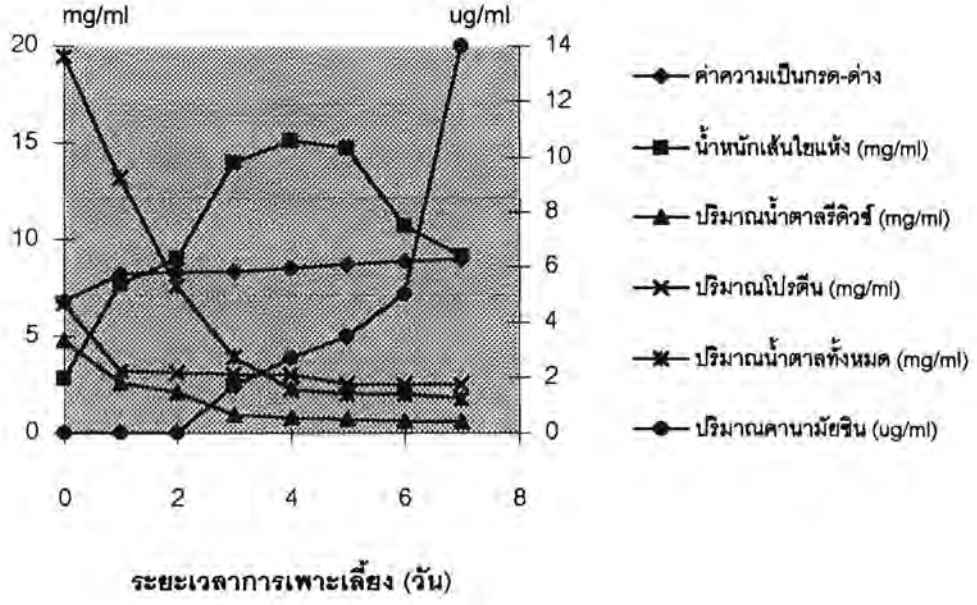


รูปที่ 2 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณโปรตีน ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณคานามัยซิน ของสายพันธุ์กลาย UUNNK25

จากตารางที่ 2 รูปที่ 2 พบว่าน้ำหนักเส้นใยแห้งของสายพันธุ์ UUNNK25 จะเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง มีค่าเท่ากับ 10.85 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วจะลดลงเหลือน้ำหนัก 8.68 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 7 ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจะอยู่ช่วง 7.08-8.90 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้นจาก 19.35 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ถูกนำไปใช้จนเหลือ 10.90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะค่อย ๆลดลงจาก 6.31 มาเป็น 3.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณโปรตีนก็จะลดลงเช่นกันจาก 7.88 เป็น 3.07 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้สายพันธุ์ UUNNK25 สามารถผลิตคานามัยซินได้สูงสุด 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 3 แสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณโปรตีนและปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ K1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี เป็นเวลา 7 วัน

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเส้นใยแห้ง (mg/ml)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (mg/ml)	ปริมาณคานามัยซิน (µg/ml)
0	6.75	2.78	4.77	6.65	19.44	0
1	8.17	7.66	2.55	3.21	13.21	0
2	8.29	8.97	2.11	3.11	7.55	0
3	8.31	14.02	0.93	3.02	3.92	2
4	8.49	15.14	0.78	2.99	2.24	3
5	8.70	14.78	0.71	2.54	2.01	4
6	8.85	10.68	0.61	2.51	2.00	5
7	8.94	9.14	0.55	2.48	1.77	14



รูปที่ 3 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณโปรตีน ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณคานามัยซิน ของสายพันธุ์ตั้งต้น K1

จากตารางที่ 3 รูปที่ 3 พบว่าน้ำหนักเส้นใยแห้งของสายพันธุ์ตั้งต้น K1 จะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจาก 2.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 0 จนถึง 15.14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นจะค่อย ๆลดลงจนถึงวันที่ 7 ได้น้ำหนักเส้นใยแห้ง 9.14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 6.75-8.94 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เริ่มต้นจาก 19.44 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ถูกนำไปใช้จนเหลือ 1.77 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะค่อย ๆลดลงจาก 4.77 มาเป็น 0.55 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณโปรตีนจะลดลงเช่นกันจาก 6.64 เป็น 2.48 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ สายพันธุ์ K1 สามารถผลิตคานามัยซินได้สูงสุด 14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 7 ซึ่งน้อยกว่าสายพันธุ์กลาย UUNNK1 และ UUNNK25 เป็น 5 เท่าและ 2.3 เท่า ตามลำดับ

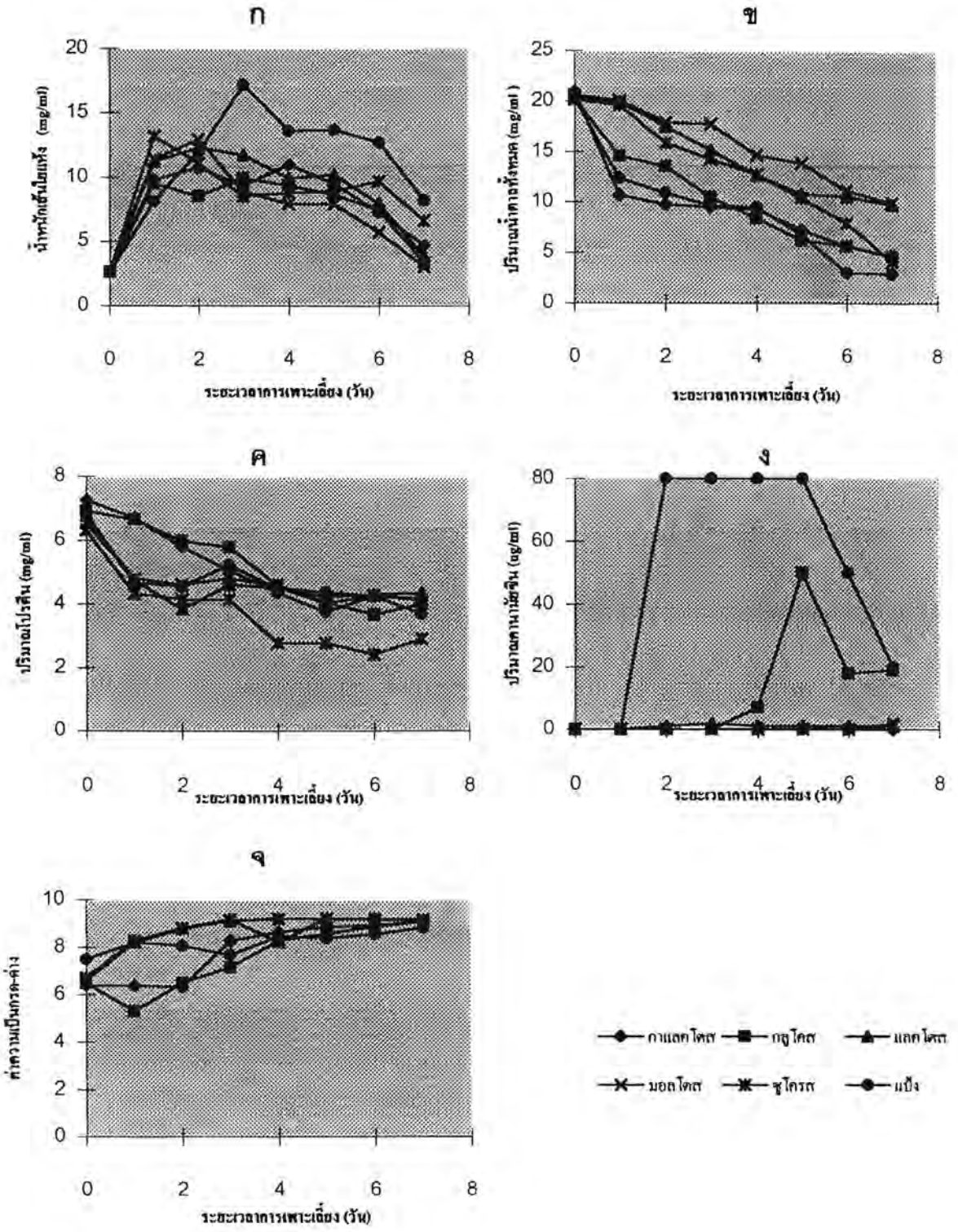
2. การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1

2.1 การคัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตคานามัยซิน

จากการศึกษาข้อ 1 พบว่าสายพันธุ์ UUNNK1 ซึ่งมีความเสถียรทางพันธุกรรมและสามารถผลิตคานามัยซินได้ 70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี ที่มีสูตรอาหารชนิดแหล่งคาร์บอนหลักแตกต่างกัน 6 ชนิด ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร คือ แป้ง มอลโตส แลคโตส กลูโคส กาแลคโตส และซูโครส เมื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณโปรตีน ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณคานามัยซินให้ผลดังแสดงในตารางที่ 4 รูปที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 ที่มีชนิดของแหล่งคาร์บอนหลักแตกต่างกัน

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง(วัน)	ปริมาณคานามัยซิน (μg/ml)					
	แหล่งคาร์บอน					
	กาแลคโตส	กลูโคส	แลคโตส	มอลโตส	ซูโครส	แป้ง
0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	1	0	เล็กน้อย	80
3	0	0	2	0	เล็กน้อย	80
4	เล็กน้อย	7	1	เล็กน้อย	เล็กน้อย	80
5	เล็กน้อย	50	1	เล็กน้อย	เล็กน้อย	80
6	เล็กน้อย	19	1	เล็กน้อย	เล็กน้อย	50
7	เล็กน้อย	19	1	2	1	20



รูปที่ 4 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง (ก) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ข) ปริมาณโปรตีน (ค) ปริมาณคานามัยซิน (ง) และค่าความเป็นกรด-ด่าง (จ) เมื่อมีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

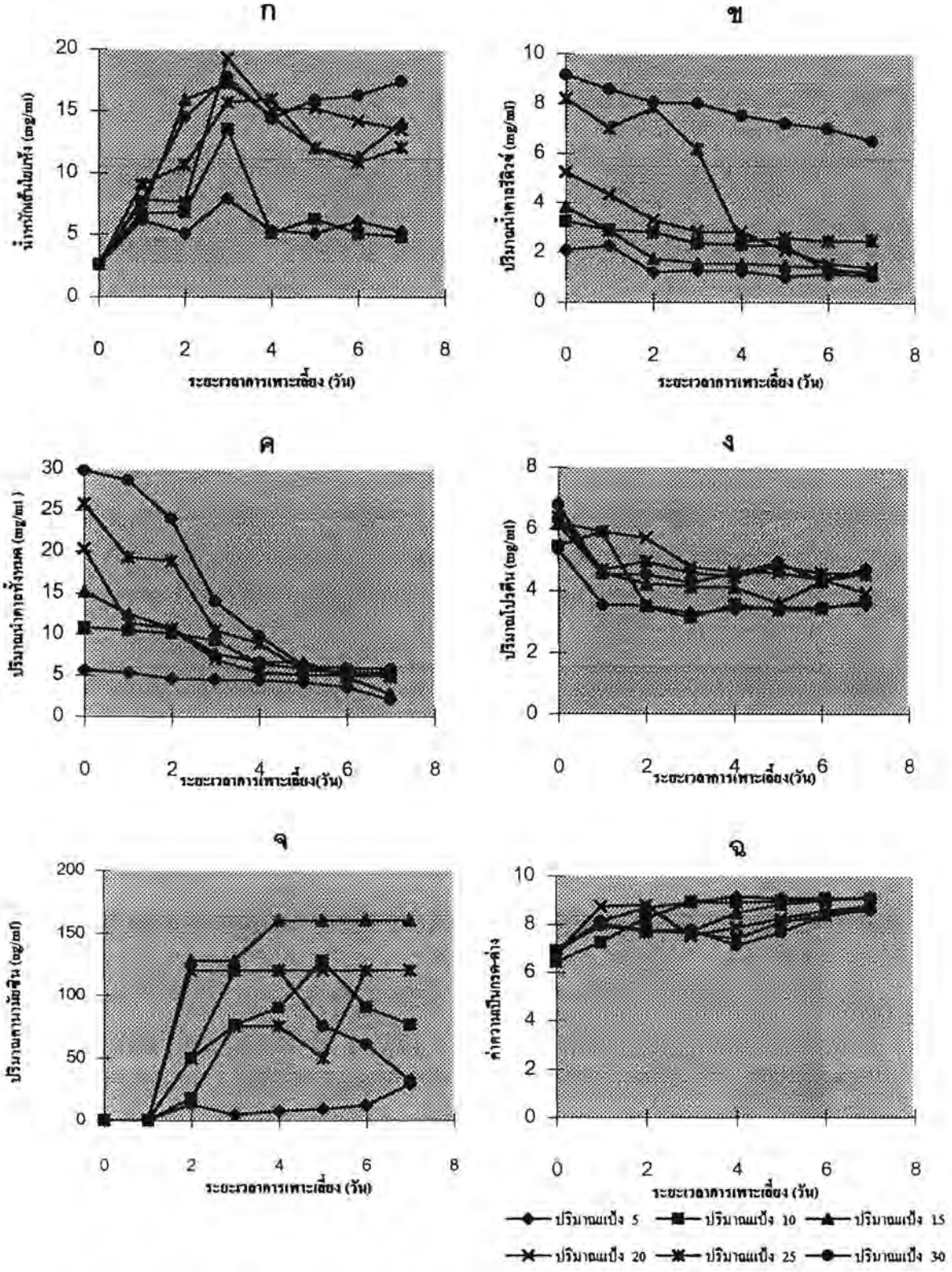
พบว่าแป้งจะให้น้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุดเป็น 17.18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง รองลงมาคือ ซูโครส ให้น้ำหนักเส้นใยแห้ง 13.22 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 2 มอลโตส และแลคโตสให้น้ำหนักเส้นใยแห้งใกล้เคียงกัน เป็น 12.98 และ 12.33 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในวันที่ 3 กาแลคโตสให้น้ำหนักเส้นใยแห้ง 10.96 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กลูโคสให้น้ำหนักเส้นใยแห้งน้อยที่สุดเป็น 9.88 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 4 ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกันอยู่ในช่วง 6.41-9.17 ส่วนปริมาณน้ำตาลทั้งหมด พบว่าเมื่อใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหาร จะมีการใช้น้ำตาลมากที่สุด นอกจากนี้สายพันธุ์ UUNNK1 สามารถผลิตคานามัยซินได้สูงสุด 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 2 จนถึงวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน

2.1.1 การแปรผันปริมาณแป้งที่เหมาะสม

จากข้อ 2.1 พบว่าแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตคานามัยซิน เมื่อเปลี่ยนสูตรอาหารให้มีการแปรผันปริมาณแป้งเป็น 5,10,15,20,25 และ 30 กรัมต่อลิตร แล้ววิเคราะห์หาปริมาณน้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณโปรตีน และค่าความเป็นกรด-ด่าง วิเคราะห์ปริมาณคานามัยซินให้ผลดังแสดงในตารางที่ 5 รูปที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 ที่มีปริมาณแป้งแตกต่างกัน

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	ปริมาณคานามัยซิน (μg/ml) ปริมาณแป้ง (g/l)					
	5	10	15	20	25	30
0.00	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0
2	13	18	128	120	50	50
3	4	76	128	120	75	120
4	8	90	160	120	75	120
5	9	128	160	120	50	75
6	12	90	160	120	120	60
7	29	76	160	120	120	32



รูปที่ 5 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง (ก) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ข) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ค) ปริมาณโปรตีน (ง) ปริมาณคานามัยซิน (จ) และค่าความเป็นกรด-ด่าง (ฉ) เมื่อทำการแปรผันปริมาณเบ้ง

เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีปริมาณแป้งแตกต่างกัน พบว่า ถ้าใช้แป้ง 20 กรัมต่อลิตร จะให้น้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุดเป็น 19.27 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง น้ำหนักเส้นใยแห้งจะหนักรองลงมาเป็น 17.74 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ถ้าใช้แป้ง 30 กรัมต่อลิตร แต่ถ้าใช้แป้งปริมาณ 25 กรัมต่อลิตร และ 15 กรัมต่อลิตร จะได้น้ำหนักเส้นใยแห้งเป็น 15.98 และ 15.88 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณแป้งที่ 10 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักเส้นใยแห้ง 13.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนแป้งที่ 5 กรัมต่อลิตร จะไม่เหมาะสมต่อการสร้างเส้นใย ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแป้งต่างกันอยู่ในช่วง 6.76-9.13 ส่วนปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเมื่อใช้แป้งที่ปริมาณต่าง ๆกัน พบว่า แป้งที่ 30 กรัมต่อลิตร จะมีการใช้น้ำตาลมากที่สุด แป้งที่ 25 กรัมต่อลิตร จะมีการใช้น้ำตาลรองลงมา แป้งที่ 20 15 10 และ 5 กรัมต่อลิตร มีการใช้น้ำตาลลดลง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า ถ้าใช้แป้ง 15 กรัมต่อลิตร จะสามารถผลิตคานามัยซินได้สูงสุดเป็น 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตั้งแต่วันที่ 4 จนถึงวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อใช้แป้ง 10 กรัมต่อลิตร จะผลิตคานามัยซินได้ 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนปริมาณแป้งที่ 20 25 และ 30 กรัมต่อลิตร จะให้คานามัยซินเท่ากันคือ 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 2 6 และ 3 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ ดังนั้นปริมาณแป้งที่ 15 กรัมต่อลิตร จึงน่าจะเหมาะสมที่สุดที่ใช้ในการผลิตคานามัยซิน

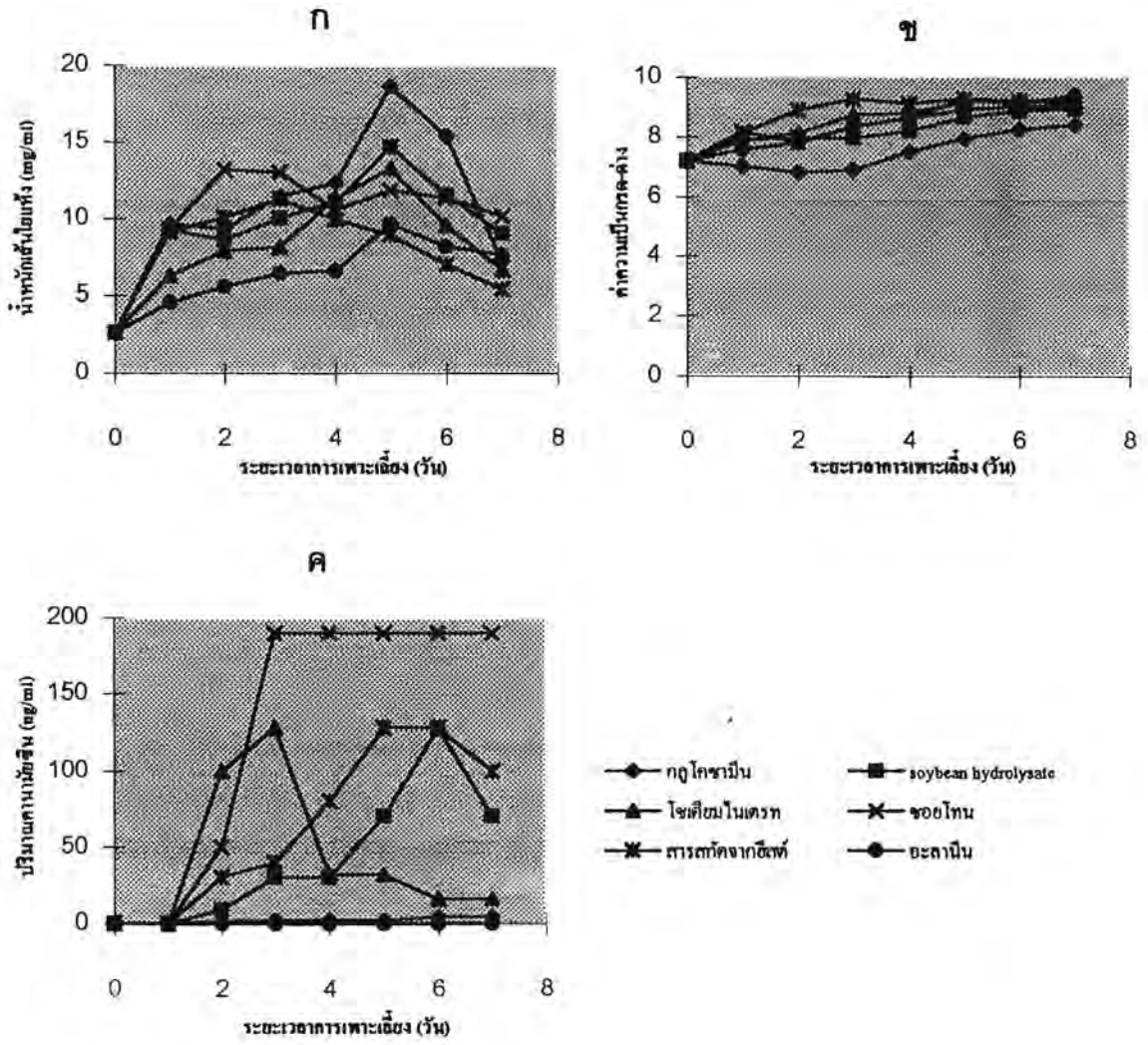
2.2 การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนหลักที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากข้อ 2.1 พบว่า แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมคือ แป้งความเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร เพื่อทำการหาแหล่งไนโตรเจนหลักที่เหมาะสมในการผลิต จึงได้นำหัวเชื้อของสายพันธุ์ UUNNK1 มาเลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี ตามวิธีทดลองข้อ 1.3 ที่มีแหล่งไนโตรเจนหลักที่ต่างกันคือ อะลานีน กลูโคซามีน โซเดียมไนเตรท ซอยโทน สารสกัดจากยีสต์ และกากถั่วเหลืองที่ถูกย่อยด้วยกรด (SBH) โดยปรับปริมาณของไนโตรเจนหลักในอาหารเป็น 1.104 กรัมไนโตรเจนต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ นำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักเส้นใยแห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และวิเคราะห์ปริมาณคานามัยซิน ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา ผลการคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนแสดงในตารางที่ 6 และรูปที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK 1 เมื่อทำการแปรผันชนิดแหล่งไนโตรเจน

ระยะเวลา	ปริมาณคานามัยซิน (μg/ml)					
การเพาะเลี้ยง	ชนิดของแหล่งไนโตรเจน					
(วัน)	อะลานีน	กลูโคซามีน	โซเดียมไนเตรท	ซอยโทน	สารสกัดจากยีสต์	กากถั่วเหลืองย่อยด้วยกรด
0.00	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0
2	0	1	100	50	30	9
3	0	2	128	190	40	30
4	0	2	32	190	80	30
5	0	4	32	190	128	70
6	0	4	16	190	128	128
7	0	4	16	190	100	70

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 6 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง (ก) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (ข) และปริมาณคานามัยซิน (ค) เมื่อมีแหล่งไนโตรเจนหลักชนิดต่างๆ

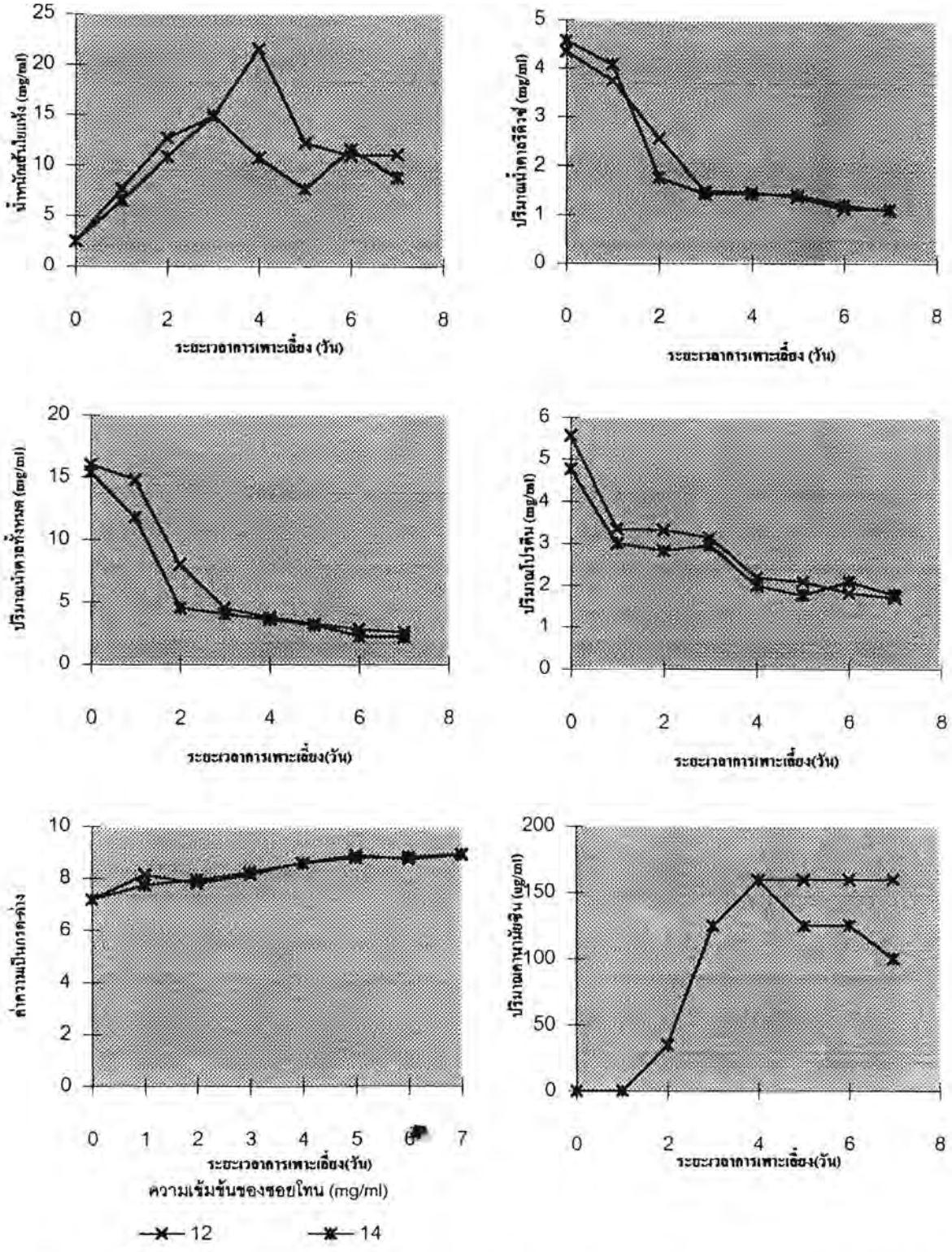
จากรูปที่ 6 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน พบว่า กลูโคซามีนจะให้น้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุดเป็น 18.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง กากถั่วเหลืองย่อยด้วยกรด (SBH) จะให้น้ำหนักเส้นใยแห้งรองลงมาเป็น 14.68 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง โซเดียมไนเตรทและซอยโทนให้ผลใกล้เคียงกันกล่าวจะให้น้ำหนักเส้นใยแห้งเป็น 13.32 และ 13.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 5 และวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากยีสต์ให้น้ำหนักเส้นใยแห้งเป็น 11.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง และอะลานีนให้น้ำหนักเส้นใยแห้งน้อยที่สุดเป็น 9.66 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนหลักต่างกัน จะอยู่ในช่วง 7.19 -9.39 นอกจากนี้สายพันธุ์ UUNNK1 สามารถผลิตคานามัยซินได้สูงสุดเป็น 190 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อใช้ซอยโทนเป็นแหล่งไนโตรเจนหลัก รองลงมาคือโซเดียมไนเตรท สารสกัดจากยีสต์และกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรด โดยสามารถผลิตคานามัยซินได้ 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 วันที่ 5 และวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ แต่เมื่อใช้กลูโคซามีนจะผลิตคานามัยซินได้เพียงเล็กน้อย ส่วนอะลานีนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไม่เหมาะสมต่อการผลิตคานามัยซิน ในการทดลองนี้ไม่สามารถวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณโปรตีนเนื่องจากแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดมีสีต่างกัน ผลที่ได้จึงมีความคลาดเคลื่อน

2.2.1 การแปรผันปริมาณซอยโทนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากข้อ 2.1-2.2 พบว่า แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมคือ แป้งความเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร และแหล่งไนโตรเจนรองที่เหมาะสมคือ แบคโต-เปปโทน 1 กรัมต่อลิตร โดยปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในช่วง 8.0-8.6 อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 องศาเซลเซียส แหล่งไนโตรเจนหลักที่เหมาะสมในการผลิตได้แก่ซอยโทน ดังนั้นจึงนำหัวเชื้อเส้นใยของสายพันธุ์ UUNNK 1 มาเลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี ตามวิธีทดลองข้อ 1.3 โดยเปลี่ยนสูตรอาหารให้มีการแปรผันปริมาณของซอยโทน เป็น 12 และ 14 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 1.104 และ 1.288 กรัมไนโตรเจนต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามลำดับ นำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณโปรตีน และค่าความเป็นกรด-ด่าง และวิเคราะห์ปริมาณคานามัยซิน ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา ผลของการแปรผันปริมาณซอยโทนแสดงในตารางที่ 7 และรูปที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK 1 เมื่อทำการแปรผันปริมาณซอยโทน

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	ปริมาณคานามัยซิน (µg/ml) ปริมาณซอยโทน (g/l)	
	12	14
0	0	0
1	0	0
2	35	35
3	125	125
4	160	160
5	160	125
6	160	125
7	160	100



รูปที่ 7 กราฟเปรียบเทียบผลของการแปรผันความเข้มข้นของซอยโทนต่อน้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณโปรตีน ปริมาณคานามัยซิน และค่าความเป็นกรด-ด่าง เมื่อทำการแปรผัน ปริมาณซอยโทน

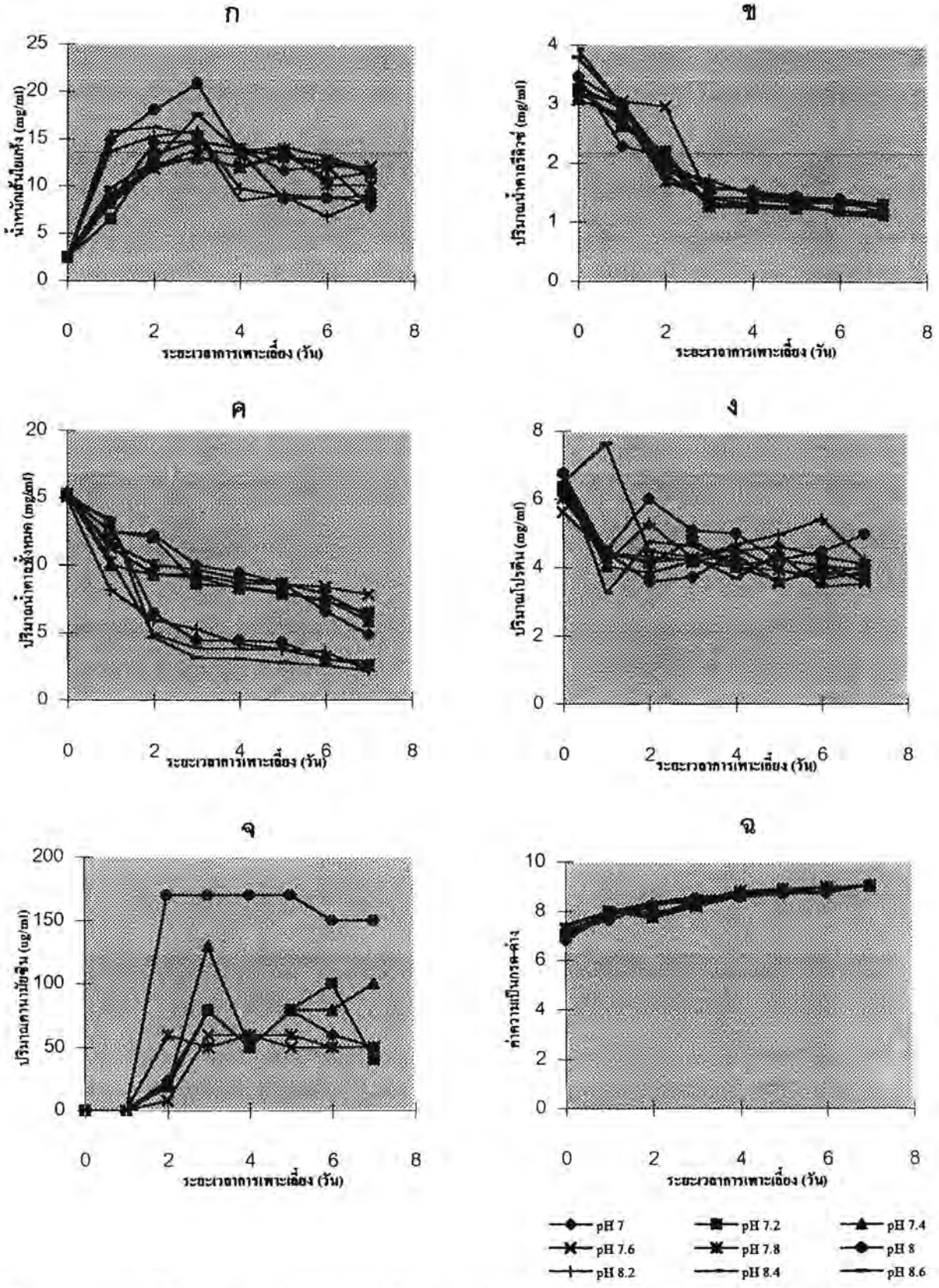
จากรูปที่ 7 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีปริมาณซอยโทนแตกต่างกัน พบว่าซอยโทน 12 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักเส้นใยแห้งเป็น 21.54 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง สูงกว่าซอยโทนที่ 14 กรัมต่อลิตร คือ 11.52 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซอยโทนต่างกันจะอยู่ในช่วง 6.99-8.93 สำหรับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดพบว่าเมื่อใช้ซอยโทน 12 กรัมต่อลิตร จะมีการใช้น้ำตาลมากกว่าที่ 14 กรัมต่อลิตร การใช้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะใกล้เคียงกัน ในส่วนของปริมาณโปรตีน เมื่อมีปริมาณซอยโทนแตกต่างกัน พบว่า ที่ความเข้มข้น 12 กรัมต่อลิตรจะมีการลดลงมากกว่าที่ 14 นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อปริมาณของซอยโทนเป็น 12 กรัมต่อลิตรและ 14 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตคานามัยซินได้เท่ากันคือ 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.3 การหาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบเหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.1-2.2

จากข้อ 2.1-2.2 พบว่า แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมคือ แป้งความเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร และแหล่งไนโตรเจนหลักที่เหมาะสมคือ ซอยโทน 12 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงนำหัวเชื้อของเส้นใยของ สายพันธุ์ UUNNK 1 มาเลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี ตามวิธีทดลองข้อ 1.3 โดยเปลี่ยนสูตรอาหารที่มีแหล่งและปริมาณของคาร์บอนและไนโตรเจนดังกล่าว ให้มีการแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น ที่ 7.0 7.2 7.4 7.6 7.8 8.0 8.2 8.4 และ 8.6 นำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณโปรตีน และค่าความเป็นกรด-ด่าง และวิเคราะห์ปริมาณคานามัยซินด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา ผลของการแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างแสดงในตารางที่ 8 และรูปที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK 1 ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง ในอาหารเหลวเคพีเอ็มบีต่างกัน

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	ปริมาณคานามัยซิน (μg/ml) ค่าความเป็นกรด-ด่าง								
	7.0	7.2	7.4	7.6	7.8	8.0	8.2	8.4	8.6
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	24	19	20	8	60	170	170	170	170
3	79	79	130	60	50	170	170	170	170
4	50	50	50	60	60	170	170	170	170
5	79	79	79	60	60	170	170	170	170
6	60	100	79	50	50	150	150	150	150
7	50	40	100	50	50	150	150	150	150



รูปที่ 8 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง (ก) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ข) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ค) ปริมาณโปรตีน (ง) ปริมาณคานามัยซิน (จ) และค่าความเป็นกรด-ด่าง (ฉ) เมื่อทำการแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่าง

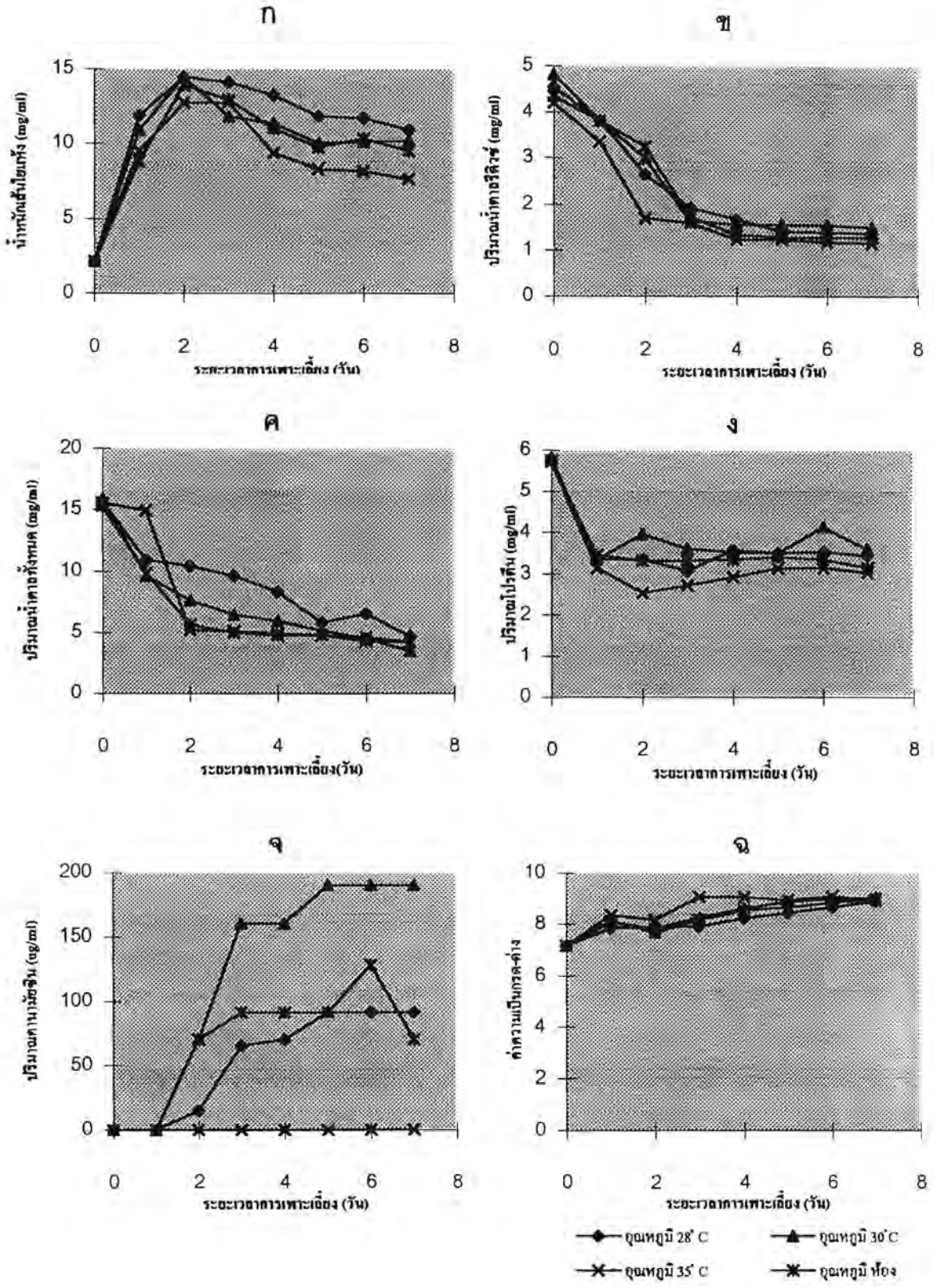
จากรูปที่ 8 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างแตกต่างกัน พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0 มีน้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุดเป็น 20.86 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรใน วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.6 8.4 และ 8.2 จะให้น้ำหนักเส้นใย แห้งใกล้เคียงกันคือ 17.64 16.26 และ 15.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนที่ค่า ความเป็นกรด-ด่าง 7.2 7.0 7.8 7.6 และ 7.4 จะให้น้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเป็น 14.87 14.84 14.06 13.16 และ 12.96 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนแปลงในระหว่าง 7 วันของการเพาะเลี้ยง จะอยู่ในช่วง 6.9-9.11 และจากปริมาณน้ำตาลทั้งหมดพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 8.0-8.6 มีการลดลงของน้ำตาลใกล้เคียงกัน โดยที่ 8.6 มีการลดลงมากที่สุด ส่วนค่าความเป็น กรด-ด่าง ที่ต่ำกว่า 7.8 จะมีการลดลงจนเหลือปริมาณน้ำตาลอยู่ในช่วง 4.9-6.2 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร ในส่วนของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่แปรผันทั้ง 9 ชนิด จะ มีอัตราการลดลงใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ยังพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง ตั้งแต่ 8.0 -8.6 มี การผลิตคานามัยซินมากที่สุด เป็น 170 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือค่าความเป็น กรด-ด่าง 7.4 ผลิตได้ 130 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนค่า ความเป็นกรด-ด่าง 7.2 7.0 7.6 และ 7.8 มีการผลิตคานามัยซิน เป็น 100 79 60 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

2.4 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมโดยใช้ภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.1-2.5

จากข้อ 2.1-2.3 พบว่า แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมคือ แป้งความเข้มข้น 15 กรัม ต่อลิตร และแหล่งไนโตรเจนหลักที่เหมาะสมคือ ซอยโทน 12 กรัมต่อลิตร โดยปรับค่า ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในช่วง 8.0-8.6 ดังนั้นจึงนำหัวเชื้อของเส้นใย ของสายพันธุ์ UUNNK 1 เลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี ตามวิธีทดลองข้อ 1.3 โดยแยก เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 30 35 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง นำมาวิเคราะห์ปริมาณ น้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณโปรตีน และค่าความ เป็นกรด-ด่าง และวิเคราะห์ปริมาณคานามัยซินด้วยวิธีการทางจุลชีววิทยา แล้วนำมาแปรผัน อุณหภูมิต่างๆ กันคือ 28 30 35 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (30 ± 3) ผลของ อุณหภูมิต่อการผลิตคานามัยซิน แสดงในตารางที่ 9 และรูปที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK 1 เมื่อทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	ปริมาณคานามัยซิน (μg/ml) อุณหภูมิ (°C)			
	28	30	35	อุณหภูมิห้อง
0	0	0	0	0
1	0	0	0	0
2	15	70	0	70
3	65	160	0	91
4	70	160	0	91
5	91	190	0	91
6	91	190	0	128
7	91	190	0	70



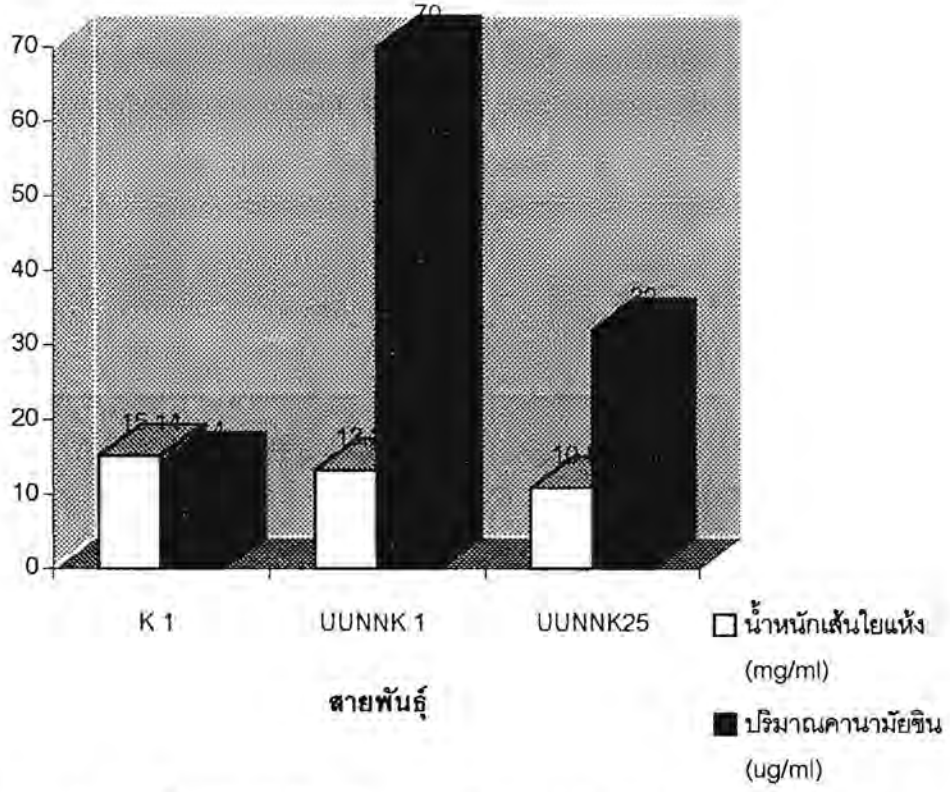
รูปที่ 9 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง (ก) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ข) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ค) ปริมาณโปรตีน (ง) ปริมาณคานามัยซิน (จ) และค่าความเป็นกรด-ด่าง (ฉ) เมื่อทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างๆ

จากรูปที่ 9 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าที่อุณหภูมิ 28 และ 30 องศาเซลเซียส ให้น้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุดใกล้เคียงกันเป็น 14.45 และ 14.44 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จะมีน้ำหนักเส้นใยแห้งเป็น 14.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง โดยที่อุณหภูมิห้องมีน้ำหนักเส้นใยแห้งน้อยที่สุด เป็น 12.93 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง ค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอุณหภูมิต่างกัน จะอยู่ในช่วง 7.18-9.05 สำหรับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดพบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีการลดลงของน้ำตาลมากที่สุด ส่วนที่อุณหภูมิอื่นๆ จะมีการลดลงของน้ำตาลทั้งหมดใกล้เคียงกัน ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะคล้ายคลึงกับปริมาณน้ำตาลทั้งหมด กล่าวคือที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะมีการลดลงมากที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีการผลิตคานามัยซินมากที่สุด เป็น 190 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง รองลงมาคือที่อุณหภูมิห้องผลิตได้ 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส มีการผลิตคานามัยซิน เป็น 91 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสไม่มีการผลิตคานามัยซิน

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อที่จะหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตคานามัยซินโดยสายพันธุ์กลายของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์กลายที่นำมาคัดเลือกได้แก่ UUNNK1 และ UUNNK25 เมื่อนำสายพันธุ์กลายทั้งสองดังกล่าวมาเลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบีในระดับขวดเขย่า พบว่า สายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตคานามัยซินได้สูงสุดคือ UUNNK1 ซึ่งสามารถผลิตคานามัยซินได้ 70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีน้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุดเป็น 13.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สายพันธุ์ UUNNK25 สามารถผลิตคานามัยซินได้ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีน้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุด 10.85 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น K1 ซึ่งผลจาการทดลองนี้สามารถผลิตคานามัยซินได้ 14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีน้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุดเป็น 15.14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงได้นำสายพันธุ์ UUNNK1 มาทำการศึกษาต่อไป ดังผลในรูปที่ 10



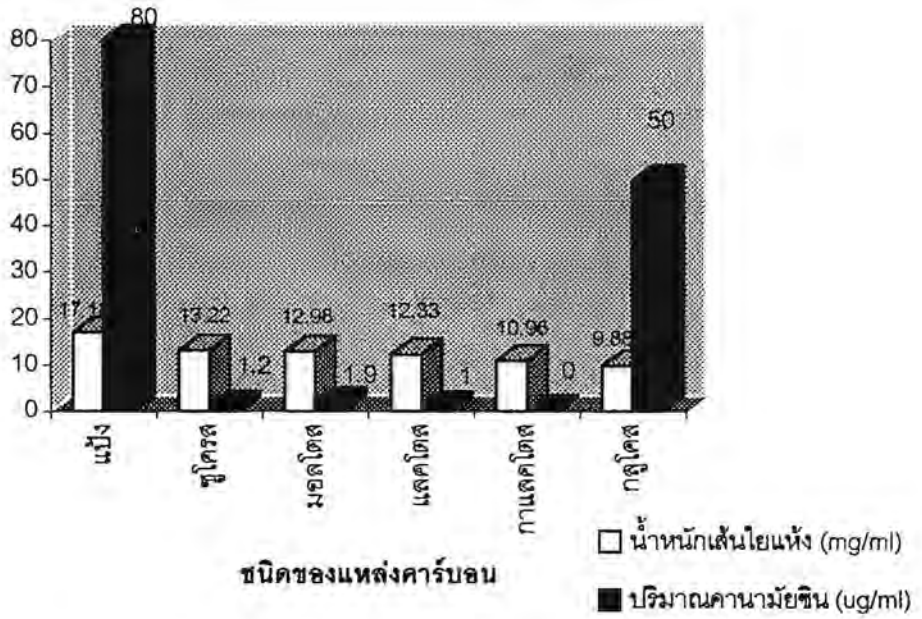
รูปที่ 10 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง และปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ K1 UUNNK1 และ UUNNK25

การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะในระดับขวดเขย่า ได้ทำการเลี้ยงเชื้อ UUNNK1 ที่คัดเลือกได้ในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี ซึ่งดัดแปลงโดย Umezawa และคณะ (1960)ทำการคัดเลือกแหล่งคาร์บอนหลักชนิดต่าง ๆเช่น แป้ง ซูโครส แลคโตส และกลูโคส ให้ผลการทดลอง (รูปที่ 11) สรุปได้ดังนี้

1. แป้ง เป็นชนิดของแหล่งคาร์บอนหลักที่ควรนำมาใช้ในการผลิตคานามัยซินเพื่อให้ได้ปริมาณสูงสุด โดยสามารถผลิตคานามัยซินได้ 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กลูโคสจะให้ผลผลิตรองลงมา คือ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนแหล่งคาร์บอนอื่นนั้นจะให้การผลิตคานามัยซินที่น้อยมาก

2. แป้ง เป็นชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่จะใช้ในการเจริญ สร้างเส้นใยได้มากที่สุดเช่นกัน รองลงมาคือ ซูโครส แลคโตส มอลโตส กาแลคโตส และกลูโคส โดยมีน้ำหนักเส้นใยแห้งเป็น 13.22 12.98 12.33 10.96 และ 9.88 ตามลำดับ

การที่สายพันธุ์ UUNNK1 สามารถใช้แป้งในการผลิตคานามัยซินได้ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ดีกว่าแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ดังนั้นการทดลองนี้จึงใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนหลักที่ใช้ในการผลิตคานามัยซินต่อไป



รูปที่ 11 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง และปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 เมื่อมีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน

การที่สายพันธุ์ UUNNK1 สามารถใช้แป้งในการผลิตคานามัยซินได้ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ดีกว่าแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นนั้นสอดคล้องกับการทดลองของ Umezawa และคณะ (1960) ที่รายงานว่า แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตคานามัยซินของ *S. kanamyceticus* K-2J และการทดลองของ Satoh และคณะ (1976) ซึ่งรายงานว่า แหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นมากกว่า 1% เช่น กลูโคส ฟรุคโตส แมนโนส มอลโตส และแลคโตส จะมีผลในการกดการทำงานของเอนไซม์ คือ เอ็น-อะเซติล-คานามัยซินอะมิโดไฮโดรเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวสุดท้ายที่ใช้ในการผลิตคานามัยซิน ส่วนแป้งจะให้ผลในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว นอกจากนี้รายงานของ Okachi และ Nara (1980) พบว่าจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Streptomyces* จะสร้างสารปฏิชีวนะในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ เมื่อใช้แหล่งคาร์บอน เช่น แป้ง และเดกซ์ทริน Drew และ Demain (1977) รายงานว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ถูกใช้ได้อย่างรวดเร็วจึงไม่เหมาะสมต่อการ

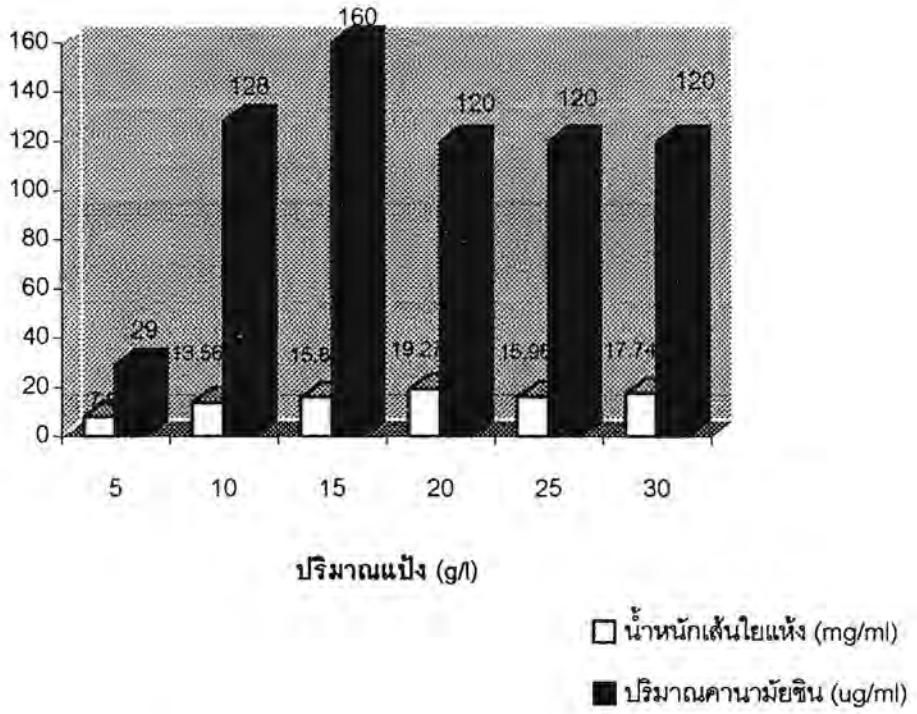
ผลิตสารปฏิชีวนะบางชนิด เช่น นีโอมัยซิน มิโตมัยซิน ซิโอมัยซิน อินโดลมัยซิน ซฟาโลสปอริน และเพนนิซิลลิน เนื่องจากกลูโคสจะทำให้เกิดการคาตาโบไลต์รีเพรสชันของคาร์บอน ดังนั้นการทดลองนี้จึงใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนหลักที่ใช้ในการผลิตคานามัยซินต่อไป

เนื่องจากแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตคานามัยซิน ดังนั้นจึงได้ทำการแปรผันปริมาณแป้งในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี เป็น 5 10 15 20 25 และ 30 กรัมต่อลิตร โดยปริมาณแป้งในสูตรอาหารเหลวเคพีเอ็มบีเดิมเป็น 20 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 12) พบว่า

1. เมื่อใช้แป้งปริมาณ 15 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณคานามัยซินสูงสุดเป็น 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อใช้แป้งปริมาณ 10 กรัมต่อลิตรจะให้ผลผลิตเป็น 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนแป้งปริมาณ 20 25 30 กรัมต่อลิตร จะให้การผลิตคานามัยซินสูงสุดเป็น 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ถ้าใช้แป้ง 5 กรัมต่อลิตรก็จะการผลิตคานามัยซินน้อยที่สุดเป็น 29 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. เมื่อใช้แป้งปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุดเป็น 19.27 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำหนักจะรองลงมาเมื่อใช้ปริมาณ 30 25 15 10 5 กรัมต่อลิตร โดยให้น้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุดเป็น 17.74 15.98 15.88 13.56 7.93 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ผลจากการทดลองพบว่า เมื่อใช้แป้งที่ 15 กรัมต่อลิตร จะเป็นปริมาณที่เหมาะสมที่จะใช้ในการผลิตคานามัยซินต่อไป ผลของการทดลองนี้ช่วยให้ลดปริมาณแป้งจากเดิมที่ใช้ในอาหารเหลว 20 กรัมต่อลิตรให้เหลือเพียง 15 กรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถนำไปลดต้นทุนการผลิตได้ จากการทดลองนี้จึงใช้แป้งที่มีปริมาณ 15 กรัมต่อลิตร ในการผลิตทดลองคานามัยซินต่อไป

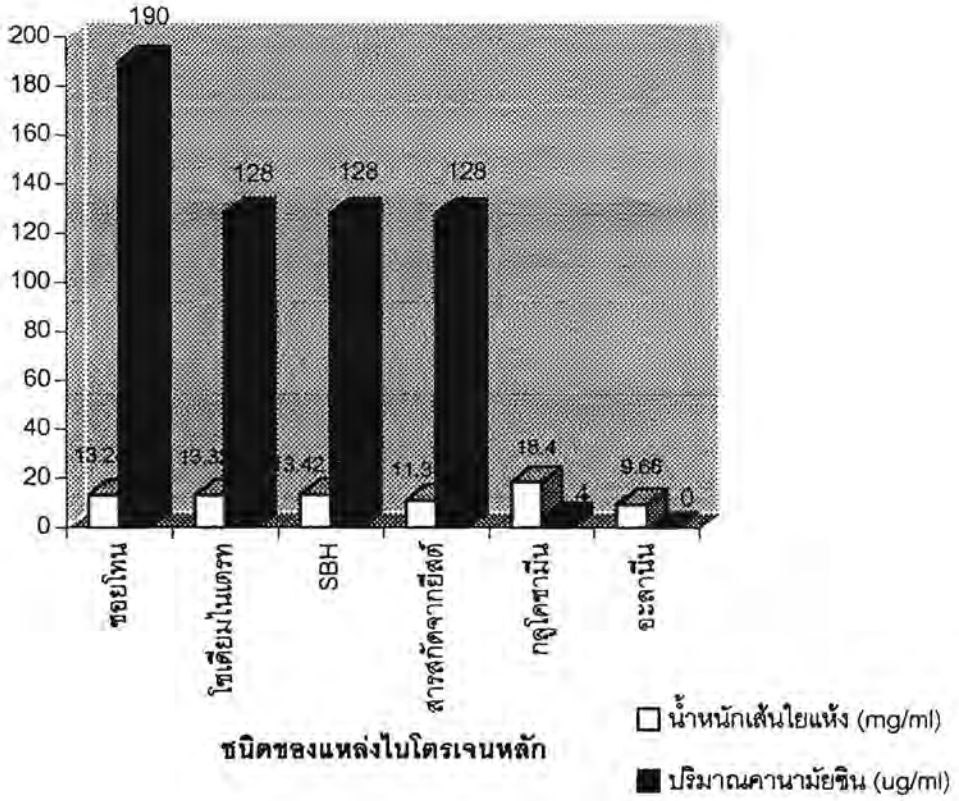


รูปที่ 12 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง และปริมาณคานามัยซิน ของสายพันธุ์ UUNNK1 เมื่อมีปริมาณแป้งต่างกัน

จากการศึกษาการหาแหล่งไนโตรเจนหลักในอาหารเหลว งานทดลองนี้ใช้ ซอยโทน 12 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนหลักในอาหารเหลว ในการศึกษาเพื่อที่จะคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนหลักตัวอื่น ได้ทดลองใช้ อะลานีน กลูโคซามีน โซเดียมไนเตรท สารสกัดจากยีสต์ และกากถั่วเหลืองย่อยด้วยกรด พบว่า (รูปที่ 13)

1. ซอยโทน เป็นแหล่งไนโตรเจนหลักที่ให้ปริมาณคานามัยซินสูงสุดเป็น 190 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ทั้งโซเดียมไนเตรท สารสกัดจากยีสต์ และกากถั่วเหลืองย่อยด้วยกรด จะให้ปริมาณคานามัยซินสูงถึง 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กลูโคซามีนให้ปริมาณ คานามัยซิน 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อใช้อะลานีนจะไม่มีการผลิตคานามัยซิน

2. กลูโคซามีนเป็นแหล่งไนโตรเจนหลักที่ให้น้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงคือ 18.40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ กากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรด โซเดียม ไนเตรท ซอยโทน สารสกัดจากยีสต์ อะลานีน โดยให้น้ำหนักเส้นใยแห้งเป็น 13.42 13.32 13.04 11.3 และ 9.66 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

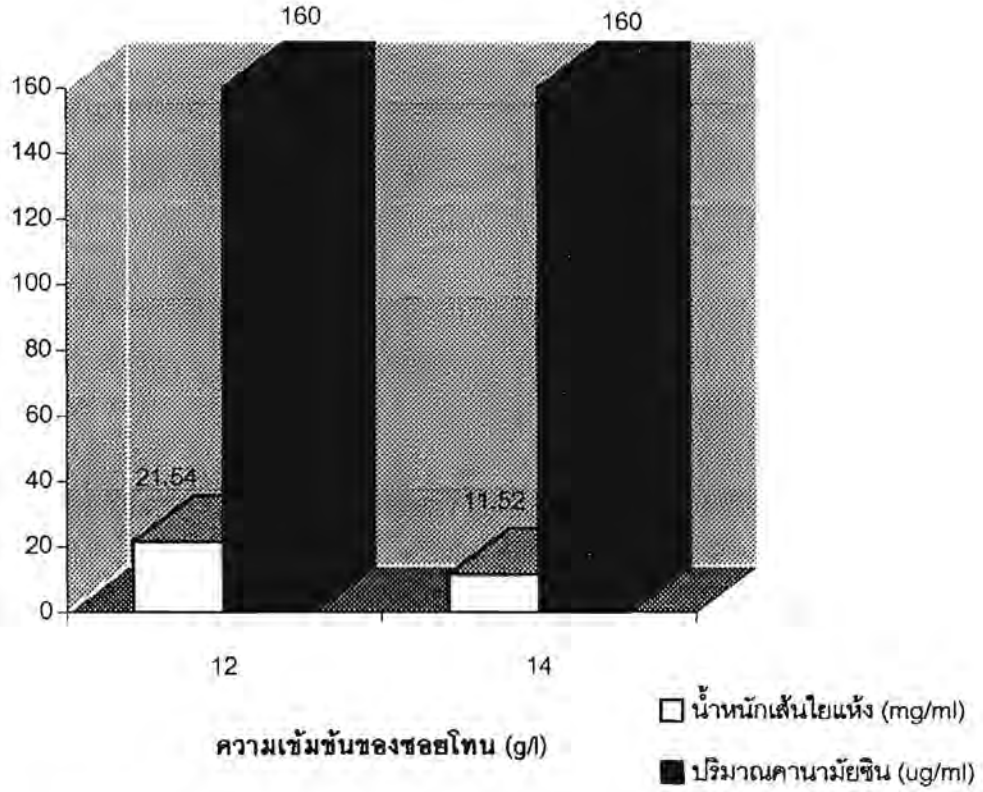


รูปที่ 13 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง และปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนหลักชนิดต่าง ๆ

สำหรับการศึกษานี้ใช้กากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรดกำมะถัน และซอยโทนซึ่งเป็นกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยเอนไซม์ของ Difco ที่ใช้ในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีคุณภาพและได้มาตรฐานมากกว่ากากถั่วเหลืองที่หาได้ในท้องถิ่น สามารถเพิ่มผลผลิตของคานามัยซินได้มากกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่น มีรายงานถึงการใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนใช้ในการผลิตสารปฏิชีวนะ เพราะนอกจากจะหาง่าย ราคาถูกแล้ว ยังให้ผลผลิตสูงกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งไนโตรเจนอื่นที่เป็นสารอนินทรีย์ ทั้งนี้จุลินทรีย์สามารถนำกากถั่วเหลืองไปใช้ได้อย่างช้า ๆ (ดารารัตน์ รอดพยาธิ , 2525 ; Aharonuwitz, , 1980) นอกจากนี้ Drew และ Demain (1977) รายงานว่าการใช้กากถั่วเหลืองจะสามารถหลีกเลี่ยงการเกิดคาตาโบไลต์รีเพรสชันของไนโตรเจน ซึ่งเกิดจากการกดการทำงานของเอนไซม์ เช่น โปรติเอส (protease) ไนเตรทรีดักเทส (nitrate reductase) อะมิเดส (amidase) ฮีสทิเดส (histidase) และ ยูรีเอส ดังนั้นจึงนำซอยโทนซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนหลักที่มีความเหมาะสมมาทำการแปรผันปริมาณในอาหารเหลวตั้งแต่ 12 และ14 กรัมต่อลิตรให้ผลดังนี้ (รูปที่ 14) คือ

1. ปริมาณซอยโทน 12 และ 14 กรัมต่อลิตรให้คานามัยซินสูงสุดเป็น 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง

2. ปริมาณซอยโทน 12 กรัมต่อลิตรให้น้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุดเป็น 21.54 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง และปริมาณ 14 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณน้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุด 11.52 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



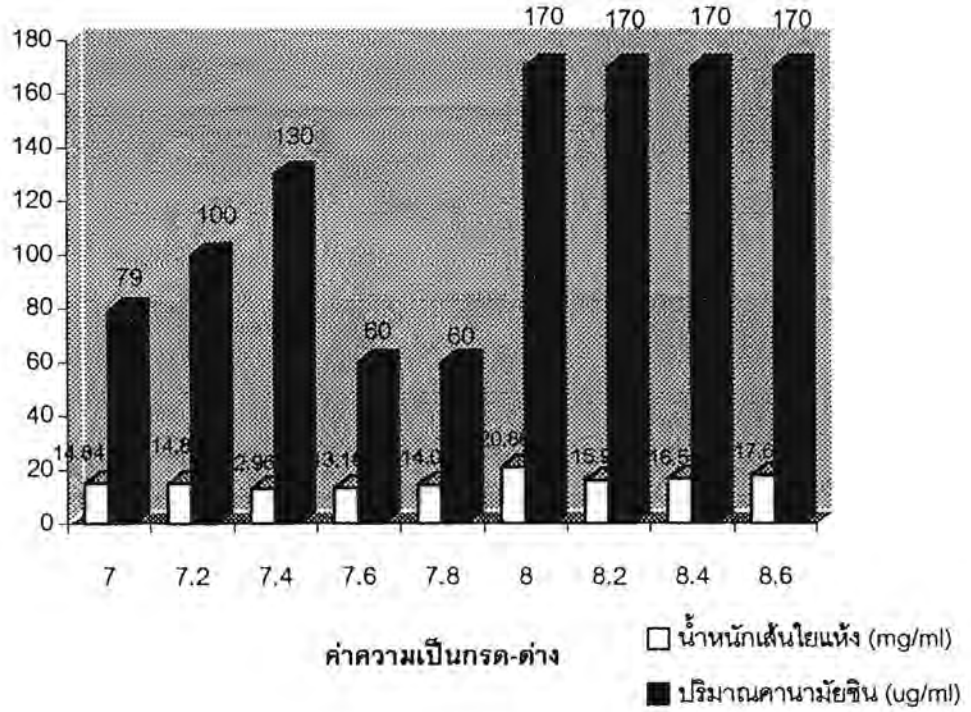
รูปที่ 14 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง และปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 เมื่อแปรผันปริมาณของซอยโทน

จากการศึกษา ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในสูตรอาหารเหลว ซึ่งได้แปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างก่อนการนึ่งฆ่าเชื้อ ตั้งแต่ 7.0-8.6 (รูปที่ 15) โดยค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นในอาหารเหลวเคพีเอ็มบีเดิม คือ 7.0 พบว่า

1. ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมในสูตรอาหารคือ 8.0-8.6 โดยเชื้อสามารถผลิตคานามัยซินได้ 170 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงทำการปรับค่าให้อยู่ในช่วงดังกล่าว ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.4 จะให้คานามัยซินรองลงมาคือ 130 ไมโครกรัมต่อ

มิลลิลิตร ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.2 7.0 7.6 และ 7.8 สามารถให้คานามัยซินได้ 100 79 60 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

2. ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 8.0 จะให้น้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุดเป็น 20.86 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 8.6 8.4 และ 8.2 ให้น้ำหนักเส้นใยแห้งใกล้เคียงกันเป็น 17.64 16.26 และ 15.90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.2 7.0 7.8 7.6 และ 7.4 จะให้น้ำหนักเส้นใยแห้งเป็น 14.87 14.84 14.06 13.16 และ 12.96 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของสูตรอาหารให้ต่ำกว่า 8.0 ก่อนการนึ่งฆ่าเชื้อจะทำให้การผลิตคานามัยซินไม่ดีเท่าการปรับให้สูง ทั้งนี้หลังจากอบฆ่าเชื้อ ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารจะลดลง เพราะอยู่ในช่วงที่เป็นกรดอ่อน ซึ่งจากรายงานของ Umezawa และคณะ (1957) และ Basak และ Majumdar (1973) พบว่าคานามัยซินจะผลิตในช่วงที่อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นด่างคือ ประมาณ 7.8-8.2 ดังนั้นจึงเพิ่มค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้ใกล้เคียงกับค่าดังกล่าวมากขึ้น

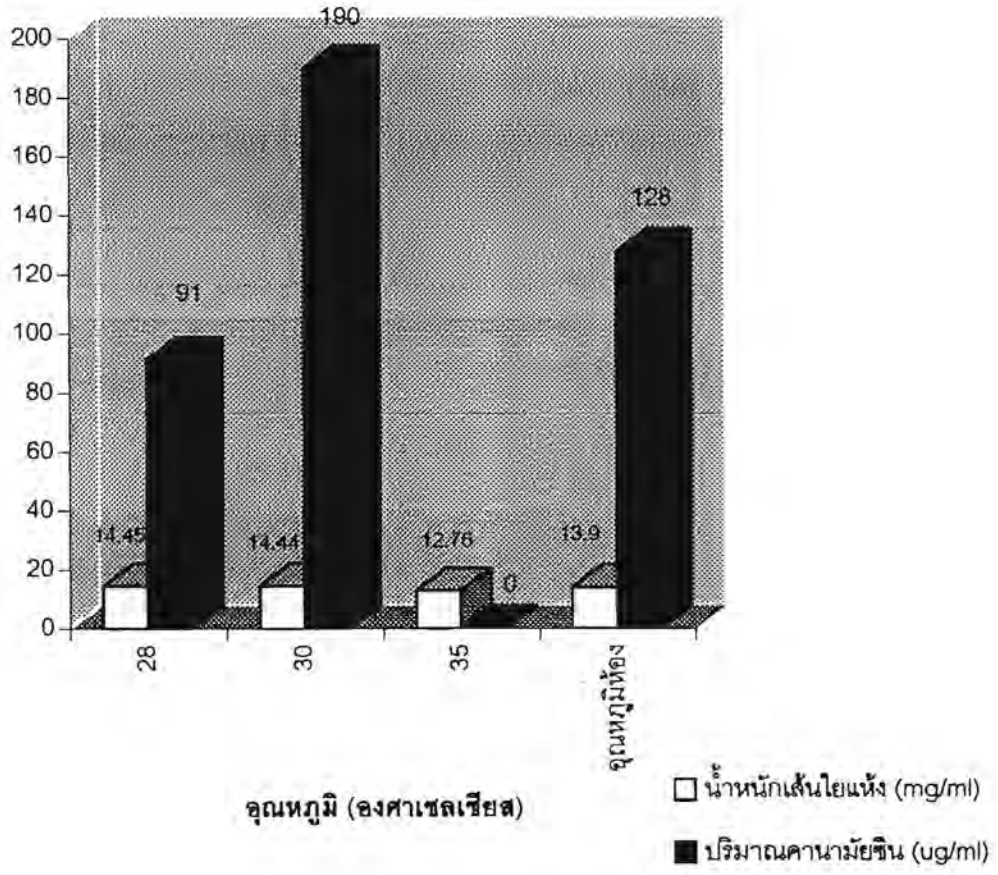


รูปที่ 15 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง และปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 เมื่อแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่าง

จากการแปรผันปัจจัยทางกายภาพอีกชนิดหนึ่งคือ อุณหภูมิ โดยทำการแปรผันในช่วง 28-35 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3) ให้ผลดังนี้ (รูปที่ 16)

1. ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสให้ปริมาณคานามัยซินสูงสุดได้ 190 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง รองลงมาคือที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งอยู่ในช่วง 30 ± 3 และอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยเชื้อสามารถให้คานามัยซินได้สูงสุด 128 และ 91 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสไม่มีการผลิตคานามัยซิน

2. ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จะให้น้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุดโดยเส้นใยแห้งจะถูกสร้างสูงสุดในวันที่ 2 เป็น 14.45 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 30 อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยให้น้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุดเป็น 14.44 13.9 และ 12.76 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 16 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง และปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิต่าง ๆ

จากผลการทดลองพบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตคานามัยซินคือ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Umezawa และคณะ (1960) ที่พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตจะอยู่ในช่วง 28-32 องศาเซลเซียส

ดังนั้นสูตรอาหารใหม่ของอาหารเหลวเคพีเอ็มบีสำหรับสายพันธุ์กลาย UUNNK1 คือ

แป้ง (starch)	15.0	กรัม
ถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ (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 8.0-8.6

งานวิจัยนี้ได้บรรลุวัตถุประสงค์ คือสามารถหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตคานามัยซินของสายพันธุ์กลาย UUNNK1 ซึ่งผลิตคานามัยซินได้สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น K1 ถึง 13.6 เท่า อันเป็นผลที่น่าพอใจระดับหนึ่ง และข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้ในการผลิตคานามัยซินในระดับขยายส่วนต่อไป

งานวิจัยนี้ได้เผยแพร่ด้วยการไปเสนอผลงานในรูปของโปสเตอร์ ในการประชุมวิชาการ ดังนี้คือ

1. The 8th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and the 1996 Annual Meeting of National Center for Genetic Engineering and Biotechnology. ในหัวข้อ " Production of kanamycin by *Streptomyces kanamyceticus* mutants" เมื่อวันที่ 14-15 พฤศจิกายน 2539. ณ. โรงแรมเมเลีย จังหวัดประจวบคีรีขันธ์, p. 92, 1996.

2. The 9th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and the 2nd JSPS-NRCT-DOST-LIPI-VCC Seminar. ในหัวข้อ "Optimal conditions for the production of kanamycin by *Streptomyces kanamyceticus* UUNNK1" เมื่อวันที่ 19-22 พฤศจิกายน 2540. ณ. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา, p.178.

3. การประชุมวิชาการประจำปี 2540 คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในหัวข้อ "การคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตคานามัยซินในปริมาณสูงจาก *Streptomyces kanamyceticus* K1" เมื่อวันที่ 27-28 มีนาคม 2540. ณ. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นอกจากนี้ได้ส่งบทความไปตีพิมพ์ที่วารสารวิจัย Scientific Research of Chulalongkorn University ซึ่งกำลังอยู่ในขั้นตอนการพิจารณา

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

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

มาลิน จุลศิริ. 2532. ยาต้านจุลชีพ ความรู้พื้นฐานและประยุกต์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์อักษรบัณฑิต. หน้า 21-26.

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

ภาษาอังกฤษ

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

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.

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.

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.

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.

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.

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

Edward, D.I. 1980. Antimicrobial Drug Action. The Macmillan Press Ltd., London

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.

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

Ihao, J.P., Li, C.Y., Chen, Y.H., and Tu, J.P. 1980. Mutagenic Breeding of *Streptomyces kanamyceticus* with NTG. I Ch'uan. 2 : 17-19.

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.

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

Kucers, A., and Mc. Bennet, N. 1975. The Use of Antibiotics. A Comprehensive Review with Clinical Emphasis. William Heinemann Med. Books Ltd., London.

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.

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

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.

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.

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.

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

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

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

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

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.

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.

ภาคผนวก

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. จีพีวาย มีเดียม (GPY medium) สำหรับเพิ่มจำนวนเซลล์ของ *S. kanamyceticus* (Umezawa 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

3. เคพีเอ็มบี มีเดียม (KPMB medium) สำหรับเลี้ยงเชื้อ *S. kanamyceticus* เพื่อผลิตคานามัยซิน (Umezawa 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

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

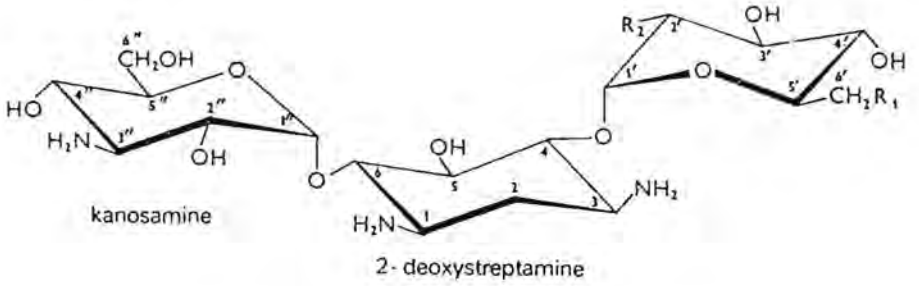
แบคโต-เปปโทน (bacto-peptone) 6.0 กรัม

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 อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

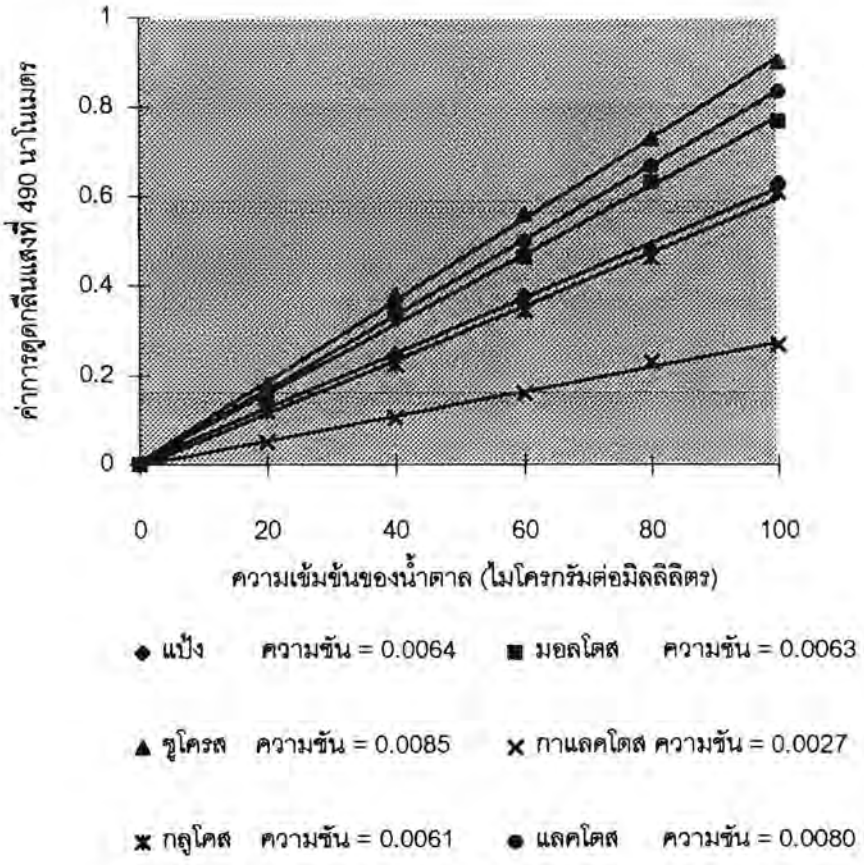


(Ia)	Kanamycin A	$R_1 = NH_2$	$R_2 = OH$
(Ib)	Kanamycin B	$R_1 = NH_2$	$R_2 = NH_2$
(Ic)	Kanamycin C	$R_1 = OH$,	$R_2 = NH_2$

รูปที่ 17 โครงสร้างหลักของคานามัยซิน

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

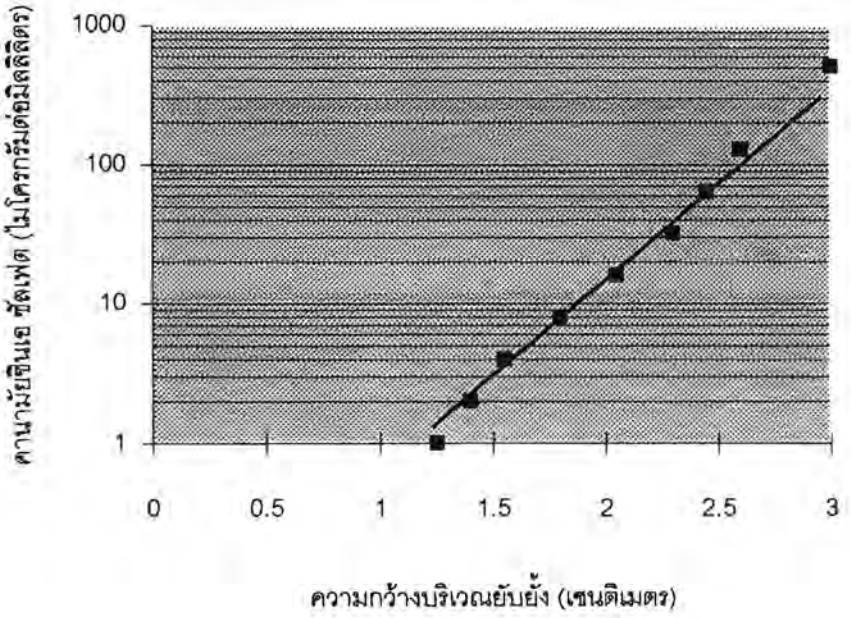
นำตัวอย่างที่ต้องการจะวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่อยู่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายฟีนอล 5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเติมกรดกำมะถัน (sulfuric acid) เข้มข้น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้ว เขย่าให้ผสมเข้ากัน ตั้งทิ้งต่อไปอีกประมาณ 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร นำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลบริสุทธิ์ ชนิดเดียวกับน้ำตาลที่ต้องการวัดปริมาณ เข้มข้น 0 20 40 60 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่วัดปริมาณด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริค เช่นเดียวกัน ดังรูปที่ 18



รูปที่ 18 กราฟมาตรฐานน้ำตาลทั้งหมด เมื่อวัดปริมาณด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริค

กราฟมาตรฐานคานามัยซิน เอ ซัลเฟตโดยวิธีจุลชีววิทยา

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 19



ความชัน =15.00

รูปที่ 19 กราฟมาตรฐานคานามัยซินเอ ซัลเฟต โดยวิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

รีเอเจนท์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry (1951)

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

สารละลาย Lowry B ประกอบด้วย

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

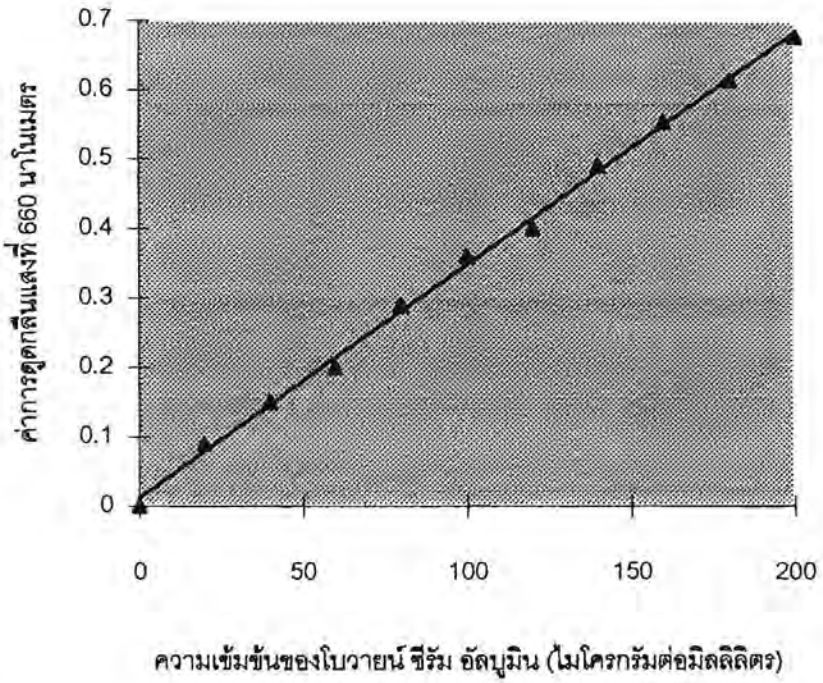
สารละลาย Lowry C ประกอบด้วย

สารละลาย Lowry A	50	ส่วน
สารละลาย Lowry B	1	ส่วน

สารละลายผสม D ประกอบด้วย

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

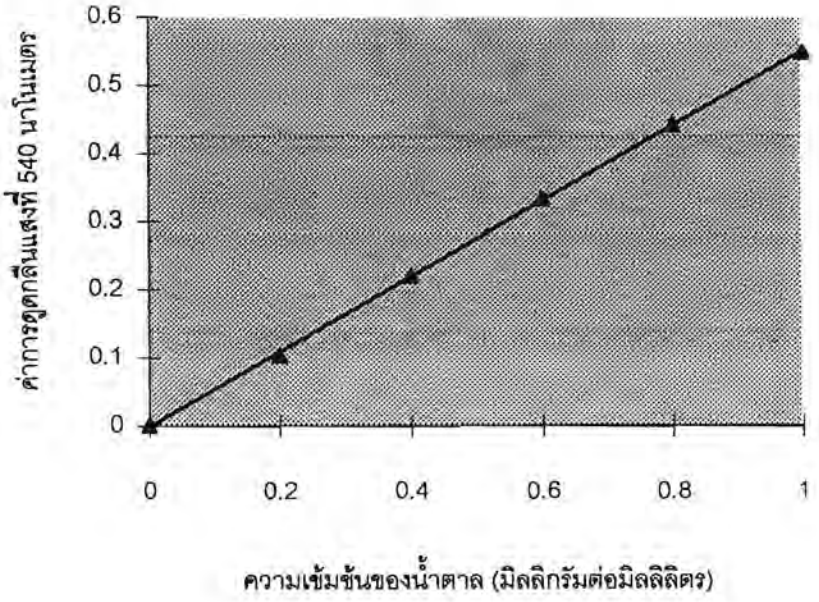
นำสารละลายที่ต้องการวิเคราะห์ที่มีปริมาณโปรตีนความเข้มข้นเหมาะสม ปริมาตร 1 มล. ใส่ลงในหลอดทดสอบ เติมสารละลาย C ปริมาตร 5 มล. ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที จึงเติมสารละลายผสม D ปริมาตร 0.5 มล. ลงไปผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้อีก 30 นาที จึงนำส่วนผสมนี้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร กราฟมาตรฐานใช้โบวายน์ ซีรัม อัลบูมิน (Bovine Serum Albumin) ที่ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมล.



รูปที่ 20 กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธีของ Lowry และคณะ

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Bernfeld (1955) โดยนำสารละลายที่ต้องการวิเคราะห์ที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ความเข้มข้นเหมาะสมปริมาตร 1 มล. ใส่ลงในหลอดทดสอบ เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก ซึ่งเตรียมโดยละลาย 1.0 กรัมของกรดไดไนโตรซาลิไซลิก ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ ปริมาตร 20.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เติมโซเดียมโปแตสเซียมตาร์เตรท 30.0 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บในขวดสีชา นำสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก ปริมาตร 1 มล. ผสมให้เข้ากัน ไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นในอ่างน้ำเย็น เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มล. ลงไปผสมให้เข้ากันนำส่วนผสมนี้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร กราฟมาตรฐานใช้น้ำตาลกลูโคส ที่ความเข้มข้น 0-100 มิลลิกรัมต่อมล.



รูปที่ 21 กราฟมาตรฐานการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีดีเอ็นเอสเอ