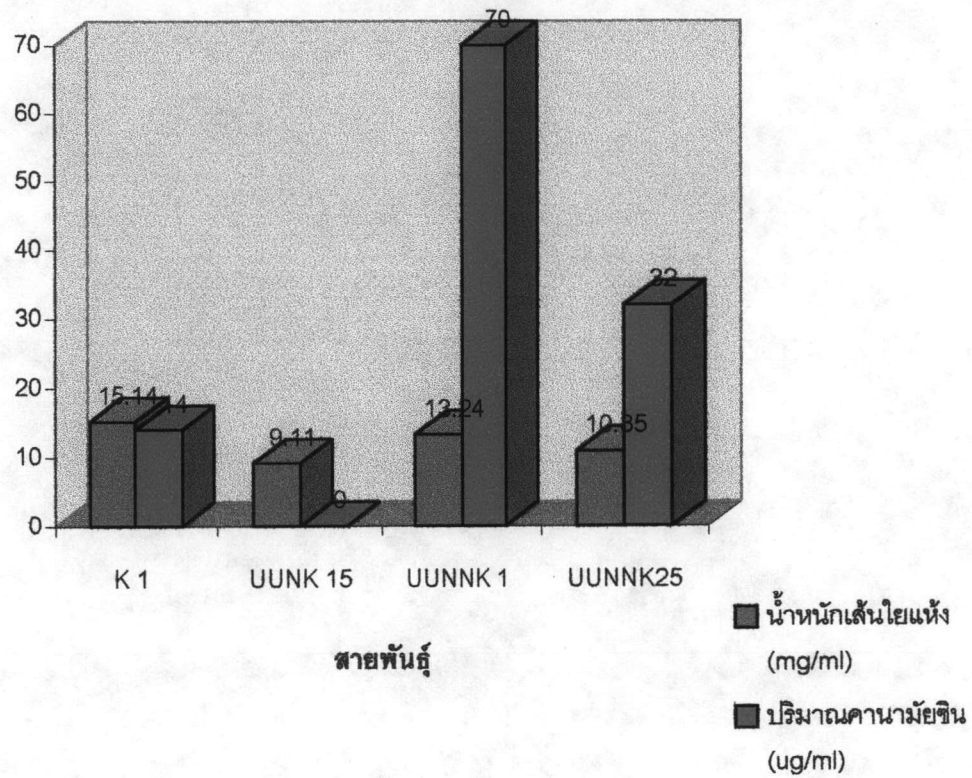


บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อที่จะหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตคานามัยซินโดยสายพันธุ์กลายของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์กลายที่นำมาคัดเลือกได้แก่ UUNK15 UUNNK1 และ UUNNK25 สามารถผลิตคานามัยซินได้ 130 160 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น K1 ซึ่งสามารถผลิตคานามัยซินได้ 13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ครสดมภ์ , 2539) เมื่อนำสายพันธุ์กลายทั้งสามดังกล่าวมาเลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบีในระดับขวดเขย่า พบว่า สายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตคานามัยซินได้สูงสุดคือ UUNNK1 ซึ่งสามารถผลิตคานามัยซินได้ 70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีน้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุดเป็น 13.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สายพันธุ์ UUNNK25 สามารถผลิตคานามัยซินได้ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีน้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุด 10.85 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสายพันธุ์ UUNK15 ไม่สามารถผลิตคานามัยซินได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสายพันธุ์ดังกล่าวได้สูญเสียแอกติวิตีในการผลิต แต่มีน้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุด 12.38 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมากกว่าสายพันธุ์ UUNNK25 เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น K1 ซึ่งผลจากการทดลองนี้สามารถผลิตคานามัยซินได้ 14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีน้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุดเป็น 15.14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงได้นำสายพันธุ์ UUNNK1 มาทำการศึกษาต่อไป ดังผลในรูปที่ 29



รูปที่ 29 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง และปริมาณคาเฟอีนของสายพันธุ์ K1 UUNK15 UUNNK1 และ UUNNK25

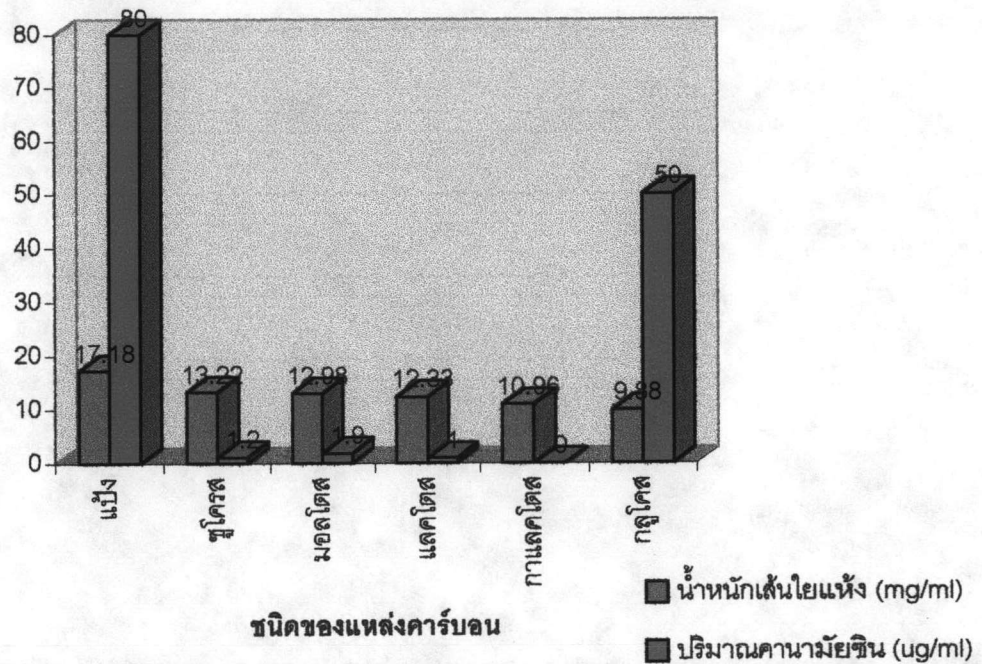
มีรายงานว่าถ้าปริมาณเซลล์ในระยะการเจริญสูง เชื่อจะสร้างสารปฏิชีวนะได้เร็วและมากขึ้น (Yang et al .,1996) จากการศึกษาช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมของการหมักเพื่อให้สายพันธุ์กลายมีอัตราการเจริญสูงสุดในอาหารเหลวจีพีวาย ซึ่งเป็นอาหารเริ่มต้นที่ใช้ในการเตรียมหัวเชื้อ พบว่าปริมาณเซลล์วัดจากน้ำหนักเส้นใยแห้งจะสูงสุดเป็น 2.84 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 48 (ตารางที่ 8 , รูปที่ 11) ค่าความเป็นกรด-ด่างจะค่อย ๆ ลดลงจาก 6.95 ไปเป็น 4.33 ในชั่วโมงที่ 120 ดังนั้นจึงได้ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวจีพีวายเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนที่จะย้ายไปลงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบีที่ใช้ในการผลิตคาเฟอีน เพื่อทำการทดลองขั้นต่อไป

การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะในระดับขวดเขย่า ได้ทำการเลี้ยงเชื้อ UUNNK1 ที่คัดเลือกได้ในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี ซึ่งดัดแปลงโดย Umezawa และคณะ (1960) ทำการคัดเลือกแหล่งคาร์บอนหลักชนิดต่างๆ เช่น แป้ง ซูโครส แลคโตส และกลูโคส ให้ผลการทดลอง (รูปที่ 30) สรุปได้ดังนี้

1. แป้ง เป็นชนิดของแหล่งคาร์บอนหลักที่ควรนำมาใช้ในการผลิตคานามัยซินเพื่อให้ได้ปริมาณสูงสุด โดยสามารถผลิตคานามัยซินได้ 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กลูโคสจะให้ผลผลิตรองลงมา คือ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนแหล่งคาร์บอนอื่นนั้น จะให้การผลิตคานามัยซินที่น้อยมาก

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 ได้ดีกว่าแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นนั้นสอดคล้องกับการทดลองของ Umezawa และคณะ (1960) ที่รายงานว่า แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตคานามัยซินของ *S. kanamyceticus* K-2J และการทดลองของ Satoh และคณะ (1976) ซึ่งรายงานว่า แหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นมากกว่า 1% เช่น กลูโคส ฟรุคโตส แมนโนส มอลโตส และแลคโตส จะมีผลในการกวดการทำงานของเอนไซม์ คือ เอ็น-อะเซทิล-คานามัยซินอะมิโดไฮโดรเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวสุดท้ายที่ใช้ในการผลิตคานามัยซิน ส่วนแป้งจะให้ผลในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว นอกจากนี้รายงานของ Okachi และ Nara (1980) พบว่าจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Streptomyces* จะสร้างสารปฏิชีวนะในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ เมื่อใช้แหล่งคาร์บอน เช่น แป้ง และเดกซ์ทริน Drew และ Demain (1977) รายงานว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ถูกต้องได้อย่างรวดเร็วจึงไม่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะบางชนิด เช่น นิโอมัยซิน มิโตมัยซิน ชิโอมัยซิน อินโดลมัซิน เซฟาโลสปอริน และเพนนิซิลลิน เนื่องจากกลูโคสจะทำให้เกิดการคาตาโบไลต์รีเพรสชันของคาร์บอน ดังนั้นการทดลองนี้จึงใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนหลักที่ใช้ในการผลิตคานามัยซินต่อไป



รูปที่ 30 กราฟแสดงน้ำหนักรงเส้นใยแห้ง และปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 เมื่อมีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน

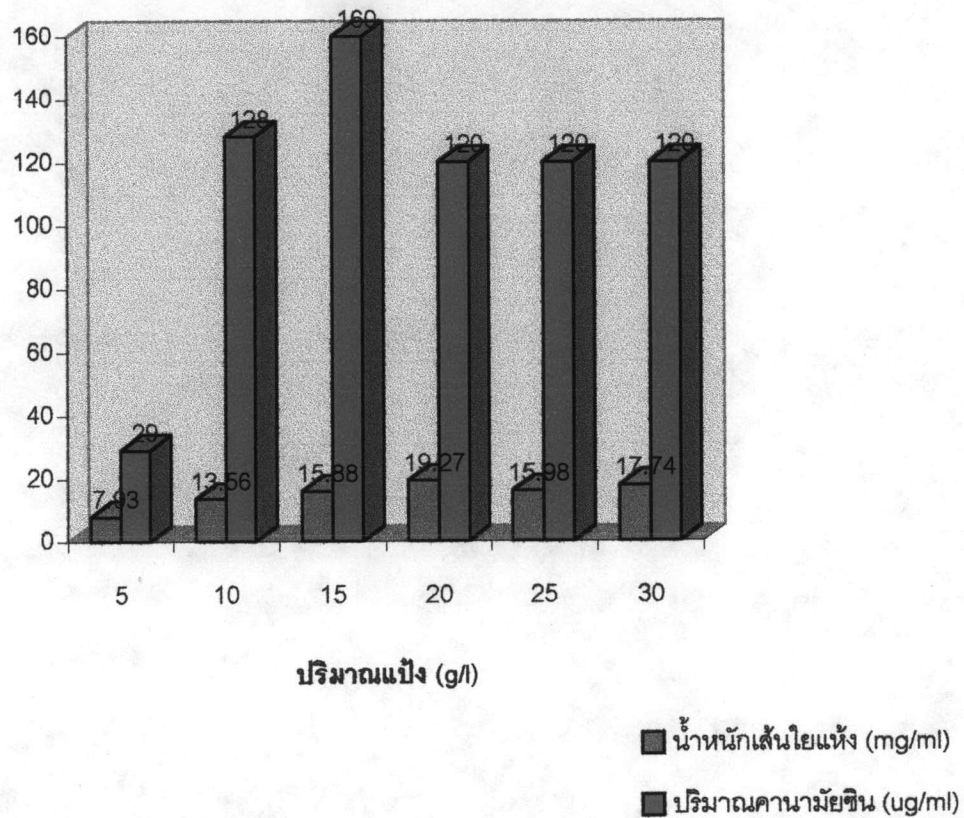
เนื่องจากแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตคานามัยซิน ดังนั้นจึงได้ทำการแปรผันปริมาณแป้งในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี เป็น 5 10 15 20 25 และ 30 กรัมต่อลิตร โดยปริมาณแป้งในสูตรอาหารเหลวเคพีเอ็มบีเดิมเป็น 20 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 31) พบว่า

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 กรัมต่อลิตรให้น้ำหนักรงเส้นใยแห้งสูงสุดเป็น 19.27 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำหนักจะลดลงมาเมื่อใช้ปริมาณ 30 25 15 10 5 กรัมต่อลิตร โดยให้น้ำหนักรงเส้นใยแห้งสูงสุดเป็น 17.74 15.98 15.88 13.56 7.93 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ผลจากการทดลองพบว่า เมื่อใช้แป้งที่ 15 กรัมต่อลิตร จะเป็นปริมาณที่เหมาะสมที่จะใช้ในการผลิตคานามัยซินต่อไป ผลของการทดลองนี้ช่วยให้ลดปริมาณแป้งจากเดิมที่ใช้ในอาหาร

เหลว 20 กรัมต่อลิตรให้เหลือเพียง 15 กรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถนำไปลดต้นทุนการผลิตได้ จากการทดลองนี้จึงใช้แป้งที่มีปริมาณ 15 กรัมต่อลิตร ในการผลิตทดลองคานามัยซินต่อไป



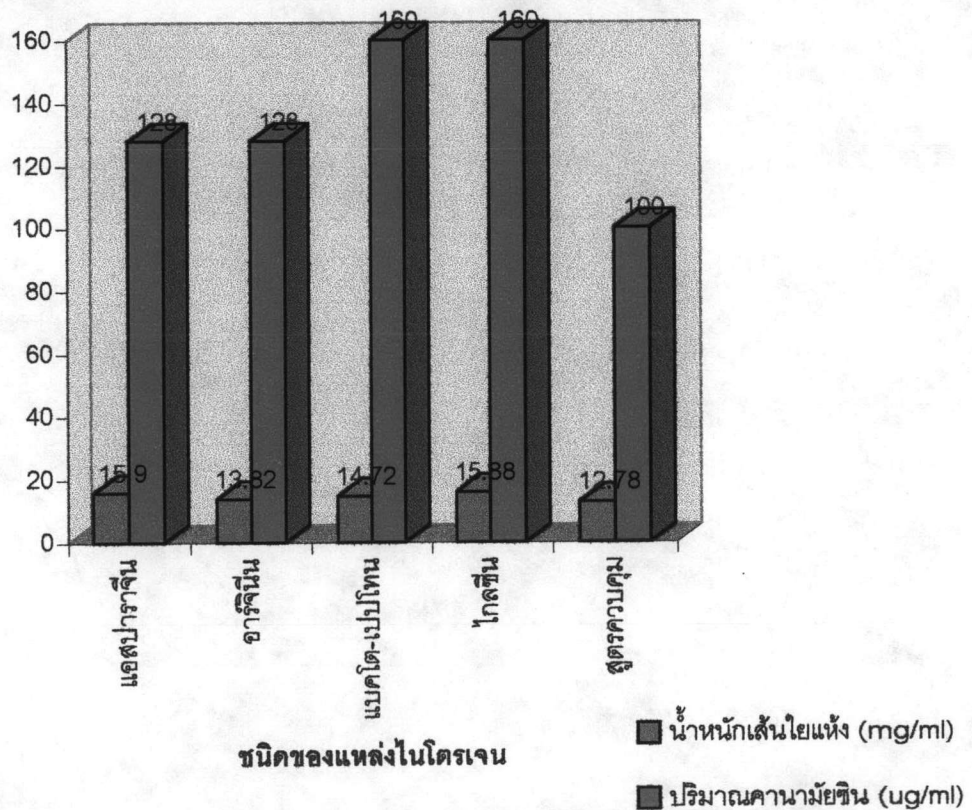
รูปที่ 31 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง และปริมาณคานามัยซิน ของสายพันธุ์ UUNNK1 เมื่อมีปริมาณแป้งต่างกัน

เนื่องจากในสูตรอาหารเคพีเอ็มบีมีแหล่งไนโตรเจน 2 ชนิดคือ ขอยโทนเป็นแหล่งไนโตรเจนหลักและแบคโต-เปปโทนเป็นแหล่งไนโตรเจนรอง จึงทำการคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนรองตัวอื่นมาใช้ในสูตรอาหารเต็ม เช่น อาร์จินิน แอสปาราจिन โกลซีน และใช้ปริมาณของแหล่งไนโตรเจนรองเท่ากับของแบคโต-เปปโทน คือ 3 กรัมต่อลิตร (ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี Kjeldahl) ที่ใช้ในอาหารสูตรเต็ม ผลของการทดลอง(รูปที่ 32)พบว่า

1. แบคโต-เปปโทน เป็นแหล่งไนโตรเจนรองที่เหมาะสมที่สุดที่ใช้ในการผลิตคานามัยซิน โดยให้คานามัยซิน 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง โกลซีนจะให้ผลเช่นเดียวกันกับแบคโต-เปปโทน แต่จะให้คานามัยซินสูงสุดในวันที่ 5 หลังจากนั้นก็จะค่อยๆลดลง

รองลงมาคือ อาร์จินีน และแอสปาราจีน ซึ่งให้คานามัยซินได้ 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ อาร์จินีนให้คานามัยซินนี้ได้ในวันที่ 4 จนถึงวันที่ 7 ขณะที่แอสปาราจีนให้ปริมาณนี้ได้ในวันที่ 4 เพียงวันเดียวแล้วลดลงเหลือ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 5-7 และผลของงานนี้พบว่า แหล่งไนโตรเจนรองทุกชนิดให้ปริมาณคานามัยซินมากกว่าสูตรอาหารควบคุมที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจนรอง (รูปที่ 14 จ)

2. แอสปาราจีน เป็นแหล่งไนโตรเจนรองที่ให้น้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุด เป็น 15.90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ โกลซีน แบคโต-เปปโทน อาร์จินีน โดยจะให้น้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุดเป็น 15.88 14.72 13.82 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และแหล่งไนโตรเจนรองทุกชนิดจะให้น้ำหนักเส้นใยแห้งสูงกว่าสูตรอาหารควบคุมที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจนรอง



รูปที่ 32 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง และปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 เมื่อมีแหล่งไนโตรเจนรองแตกต่างกัน

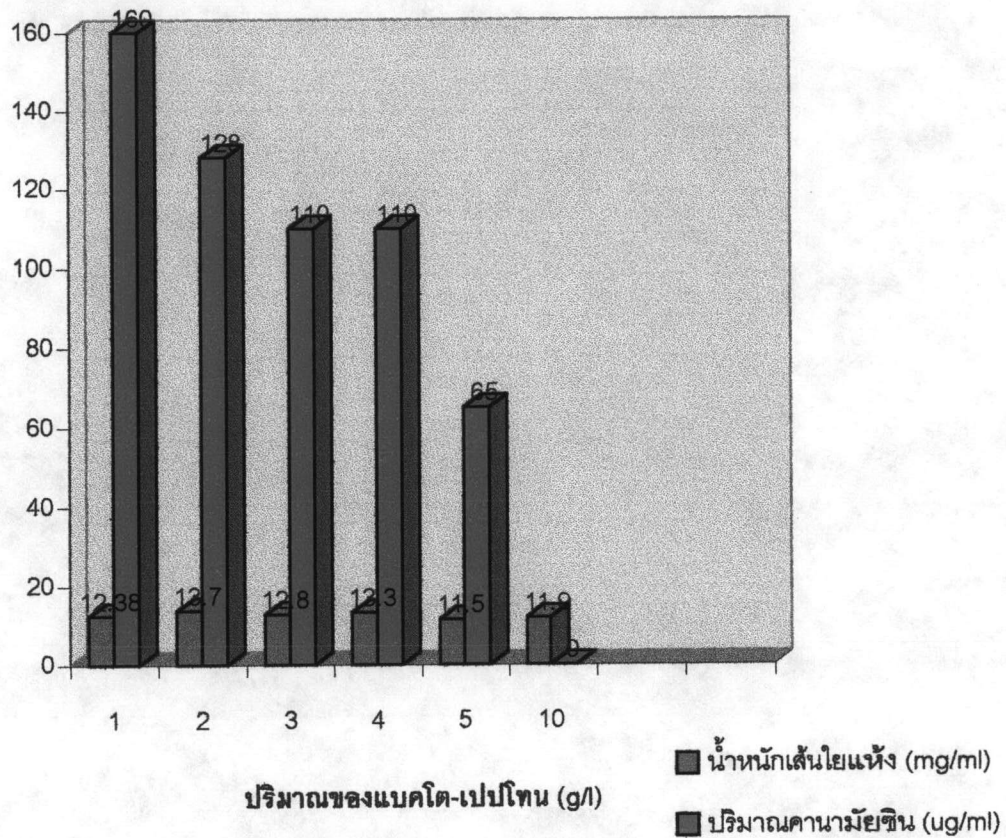
ผลการทดลองนี้แสดงว่า ไม่มีความจำเป็นที่จะเปลี่ยนแปลงแหล่งไนโตรเจนรองที่ใช้ในสูตรอาหารเหลวเคพีเอ็มบี การที่ใช้แหล่งไนโตรเจนรองชนิดต่างๆ ดังกล่าวข้างต้น เนื่องมาจากการทดลองของ Basak และ Majumdar (1973) ที่รายงานว่า ไกลซีน อาร์จินีน แอสปาราจีน เหมาะสมเป็นแหล่งไนโตรเจนรองหรือใช้ในปริมาณน้อย และประกอบกับการทดลองของ Umezawa และคณะ (1986) พบว่าเมื่อเติมแบคโต-เปปโทน ลงไปในอาหารเหลวในปริมาณน้อย สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตคานามัยซิน จากผลของงานวิจัยนี้จะสอดคล้องกับของนักวิจัยทั้งสองกลุ่มดังกล่าว สำหรับงานวิจัยนี้แบคโต-เปปโทนน่าจะมีความเหมาะสมมากกว่า ดังนั้นจึงได้นำแบคโต-เปปโทนมาใช้ในการทดลองต่อไป

จากการศึกษา การแปรผันปริมาณแบคโต-เปปโทนในอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงได้ทำการแปรผันปริมาณของแบคโต-เปปโทนเป็น 1 2 3 4 5 และ 10 กรัมต่อลิตร โดยปริมาณแบคโต-เปปโทนในสูตรอาหารเหลวเคพีเอ็มบีเดิมคือ 3 กรัมต่อลิตร ให้ผลดังต่อไปนี้ (รูปที่ 33)

1. แบคโต-เปปโทนที่ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร จะเป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุดที่ใช้ในการผลิตคานามัยซิน ได้ถึง 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ แบคโต-เปปโทน ปริมาณ 2 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตคานามัยซินได้ 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนแบคโต-เปปโทนที่ปริมาณ 3 และ 4 กรัมต่อลิตรให้ปริมาณคานามัยซินได้สูงสุดเป็น 110 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแบคโต-เปปโทน 5 กรัมต่อลิตร จะผลิตได้ 65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่แบคโต-เปปโทนที่ปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร ไม่มีการผลิตคานามัยซิน

2. แบคโต-เปปโทนที่ปริมาณ 2 4 3 1 10 และ 5 จะให้น้ำหนักเส้นใยแห้งใกล้เคียงกันคือ 13.70 13.30 12.80 12.38 11.90 และ 11.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ดังนั้นถ้าใช้แบคโต-เปปโทน ที่ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร จะช่วยลดปริมาณที่ใช้ให้น้อยลง จากเดิมที่เคยใช้แบคโต-เปปโทน 3 กรัมต่อลิตร ในอาหารเหลวสูตรเดิม ซึ่งสามารถลดต้นทุนการผลิตได้



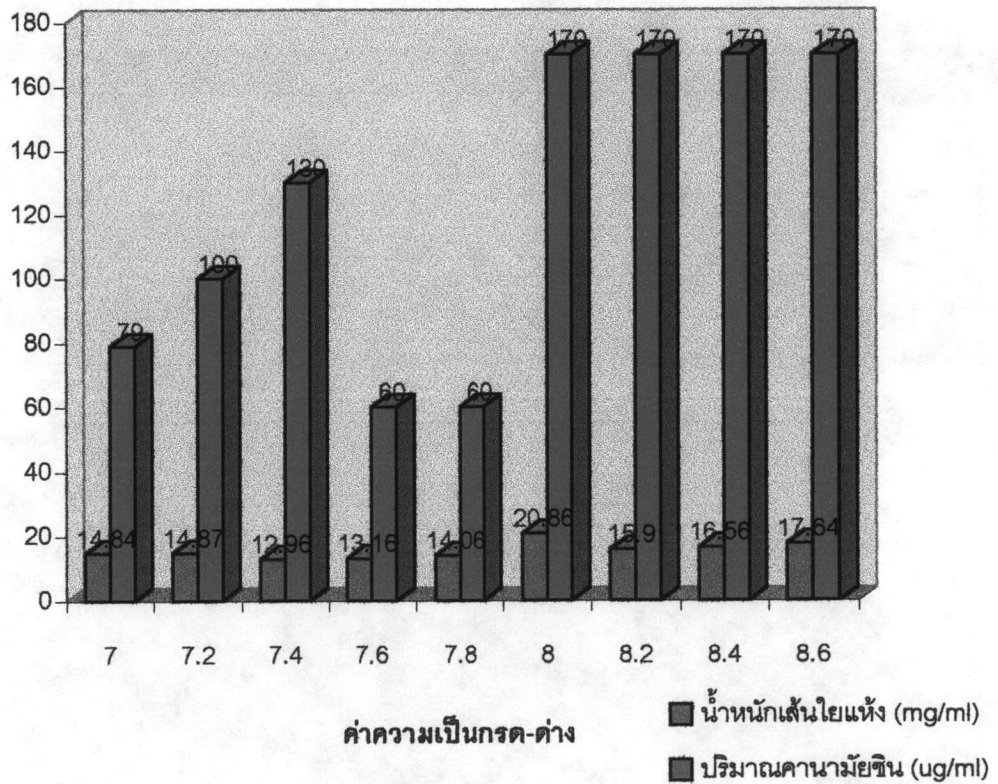
รูปที่ 33 กราฟแสดงน้ำหนักรีดละลายน้ำ และปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 เมื่อมีปริมาณของแบคทีโอ-เปปไทด์ต่างกัน

จากการศึกษา ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในสูตรอาหารเหลว ซึ่งได้แปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างก่อนการนึ่งฆ่าเชื้อ ตั้งแต่ 7.0-8.6 (รูปที่ 34) โดยค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นในอาหารเหลวเคพีเอ็มบีเดิม คือ 7.0 พบว่า

1. ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมในสูตรอาหารคือ 8.0-8.6 โดยเชื่อสามารถผลิตคานามัยซินได้ 170 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงทำการปรับค่าให้อยู่ในช่วงดังกล่าว ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.4 จะให้คานามัยซินรองลงมาคือ 130 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.2 7.0 7.6 และ 7.8 สามารถให้คานามัยซินได้ 100 79 60 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

2. ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 8.0 จะให้น้ำหนักรีดละลายน้ำสูงสุดเป็น 20.86 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 8.6 8.4 และ 8.2 ให้น้ำหนักรีดละลายน้ำใกล้เคียง

กันเป็น 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 นอกจากนี้ยังพบว่า การปรับค่าความเป็นกรด-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 ซึ่งทำให้มีการผลิตมากขึ้นด้วย

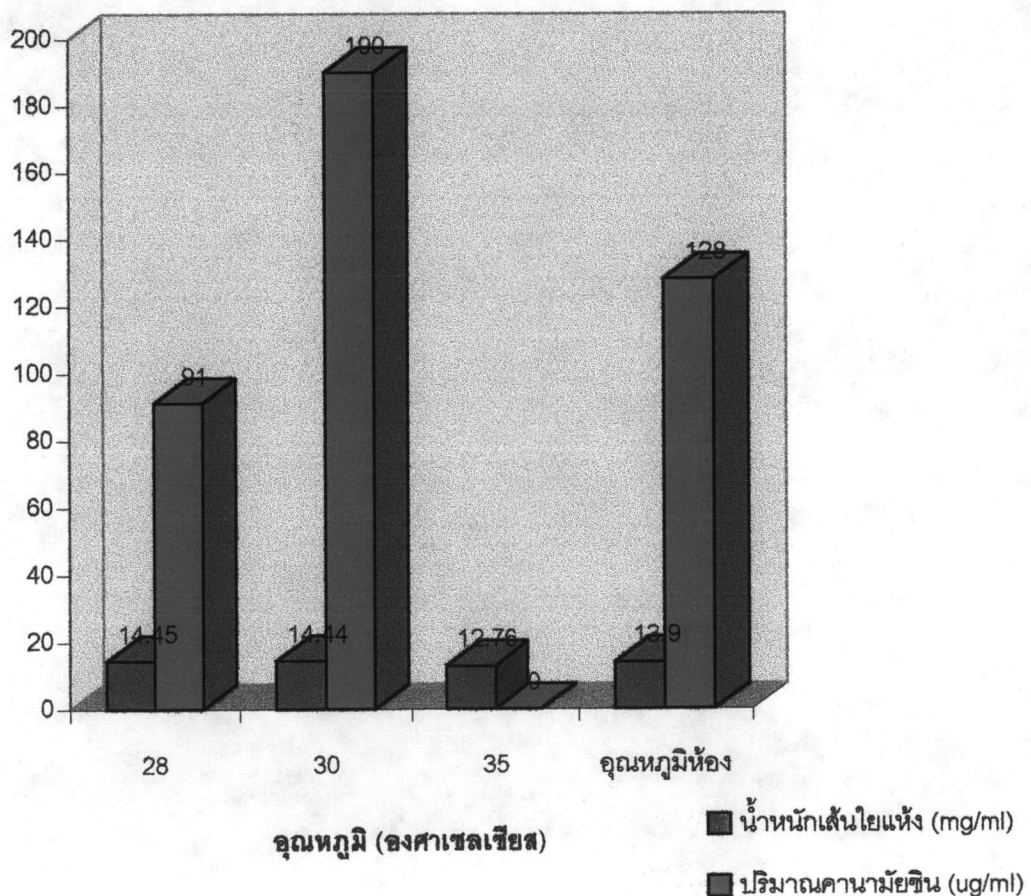


รูปที่ 34 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง และปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 เมื่อแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่าง

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

1. ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสให้ปริมาณคานามัยซินสูงสุดได้ 190 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง รองลงมาคือที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งอยู่ในช่วง 30 ± 3 และอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยเชื่อสามารถให้คานามัยซินได้สูงสุด 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



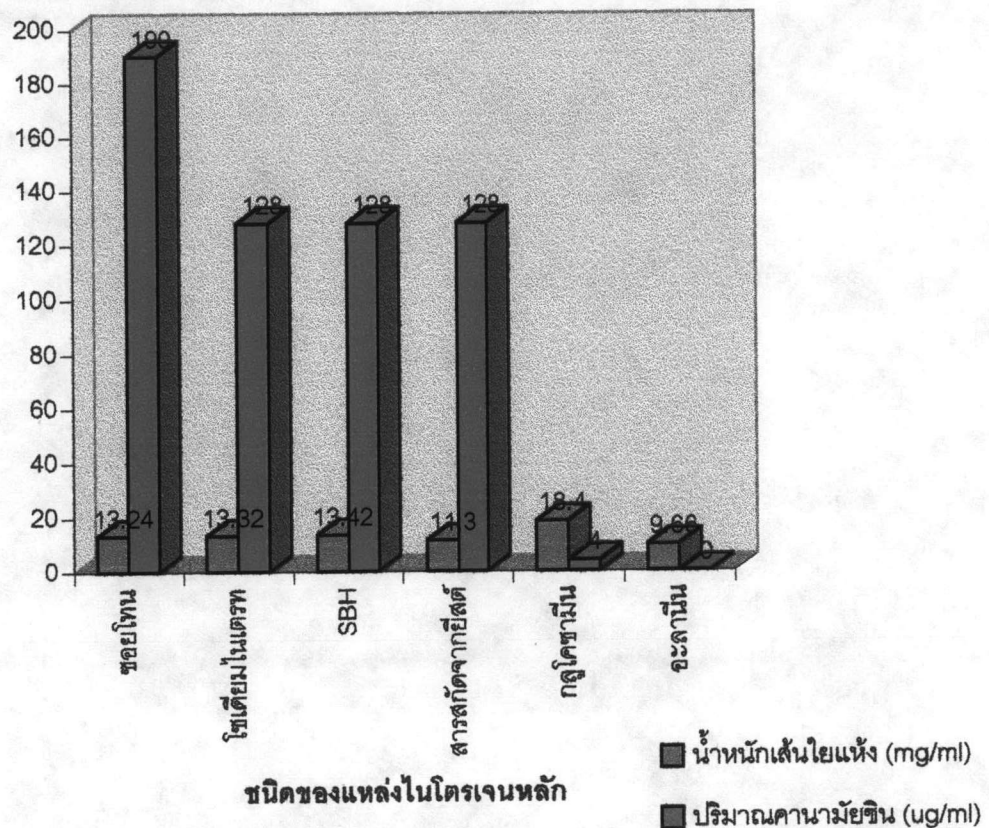
รูปที่ 35 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง และปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิต่าง ๆ

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

จากการศึกษาการหาแหล่งไนโตรเจนหลักในอาหารเหลว งานทดลองนี้ใช้ชอยโทน 12 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนหลักในอาหารเหลว ในการศึกษาเพื่อที่จะคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนหลักตัวอื่น ได้ทดลองใช้ อะลานีน กลูโคซามีน โซเดียมไนเตรท สารสกัดจากยีสต์ และกากถั่วเหลืองย่อยด้วยกรด พบว่า (รูปที่ 36)

1. ชอยโทน 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 โซเดียมไนเตรท ชอยโทน สารสกัดจากยีสต์ อะลานีน โดยให้น้ำหนักเส้นใยแห้งเป็น 13.42 13.32 13.04 11.3 และ 9.66 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 36 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง และปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนหลักชนิดต่าง ๆ

มีรายงานถึงการใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนใช้ในการผลิตสารปฏิชีวนะ เพราะนอกจากจะหาง่าย ราคาถูกแล้ว ยังให้ผลผลิตสูงกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งไนโตรเจนอื่นที่เป็นสารอนินทรีย์ ทั้งนี้จุลินทรีย์สามารถนำกากถั่วเหลืองไปใช้ได้อย่างซ้ำ ๆ (ดาร์รัตน์ รอดพยาธิ , 2525 ; Aharonowitz, , 1980)

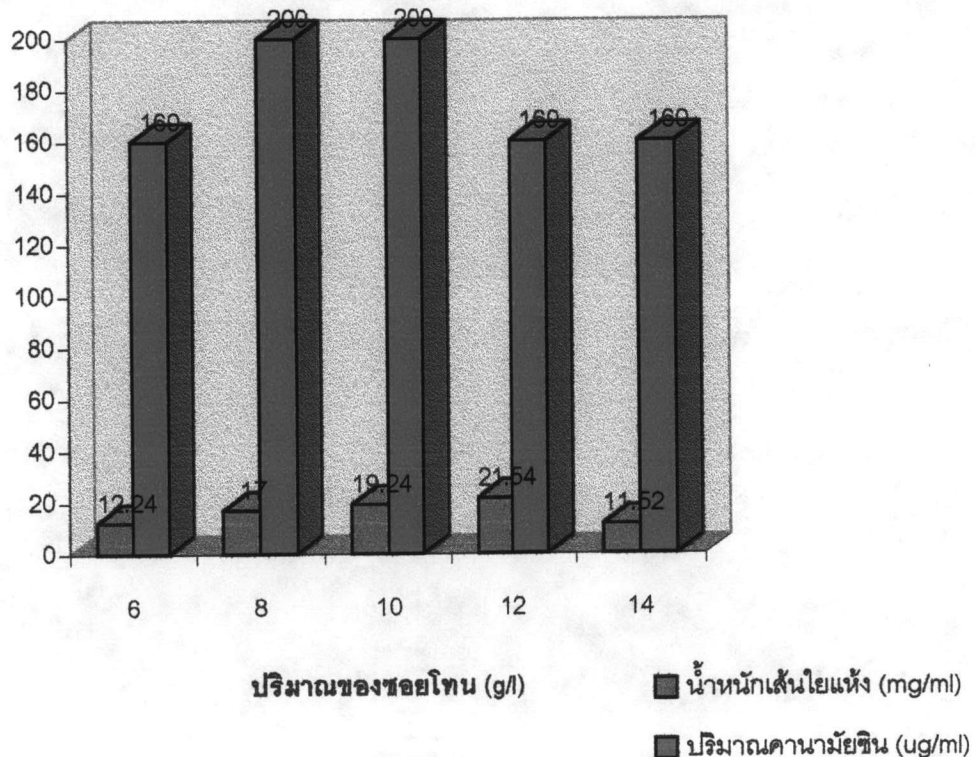
สำหรับการศึกษานี้ใช้กากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรดกำมะถัน และชอยโทนซึ่งเป็นกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยเอนไซม์ของ Difco ที่ใช้ในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีคุณภาพและได้มาตรฐานมากกว่ากากถั่วเหลืองที่ทำได้ในท้องถิ่น สามารถเพิ่มผลผลิตของคานามัยซินได้มากกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่น นอกจากนี้ Drew และ Demain (1977) รายงานว่าการใช้กากถั่วเหลืองจะสามารถหลีกเลี่ยงการเกิดคาตาโพลีตรีเพอร์สอันของไนโตรเจน ซึ่งเกิดจากการกวดการทำงานของเอนไซม์

เช่น โปรติเอส (protease) ไนเตรทรีดักเทส (nitrate reductase) อะมิเดส (amidase) ฮีสทีเดส (histidase) และ ยูรีเอส

ดังนั้นจึงนำขอยโทนซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนหลักที่มีความเหมาะสมมาทำการแปรผันปริมาณในอาหารเหลวตั้งแต่ 6-14 กรัมต่อลิตรให้ผลดังนี้ (รูปที่ 37) คือ

1. ปริมาณขอยโทน 8 และ 10 กรัมต่อลิตร ให้การผลิตคานามัยซินสูงสุดเป็น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนที่ปริมาณ 6 12 14 กรัมต่อลิตรให้คานามัยซินสูงสุดเป็น 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง

2. ปริมาณขอยโทน 12 กรัมต่อลิตรให้น้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุดเป็น 21.54 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง รองลงมาคือ 10 8 6 14 กรัมต่อลิตร โดยให้ปริมาณน้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุดเป็น 19.24 17.00 12.24 และ 11.52 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ



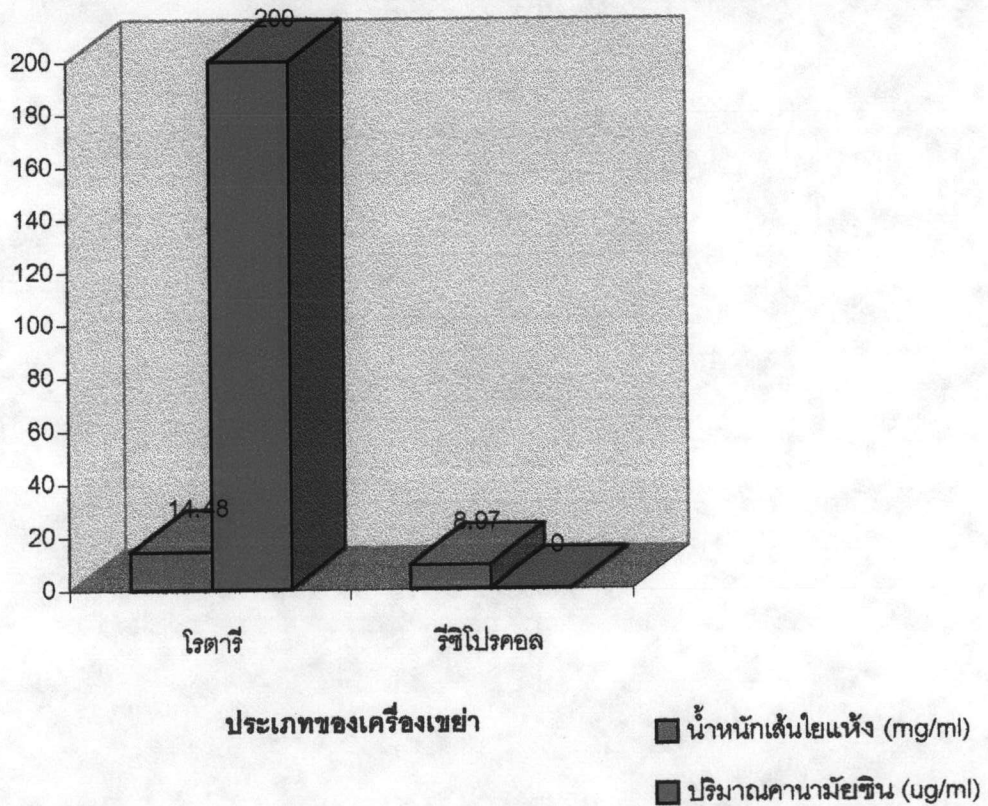
รูปที่ 37 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง และปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 เมื่อแปรผันปริมาณของขอยโทน

เนื่องจากไม่มีการเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนหลักในอาหารเหลว แต่สามารถลดปริมาณที่ใช้ในสูตรอาหารเดิมจาก 12 กรัมต่อลิตร เป็น 8 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนการผลิตลงเช่นเดียวกับแหล่งคาร์บอนหลักและแหล่งไนโตรเจนรองดังกล่าวข้างต้น

จากการรายงานการใช้เครื่องเขย่าชนิดรีซีโพรคอลลในการผลิตคานามัยซิน จึงได้ทำการเปรียบเทียบเครื่องเขย่า 2 ประเภท คือ แบบโรตารี และแบบรีซีโพรคอลลให้ผลดังนี้ (รูปที่ 38)

1. มีการผลิตคานามัยซินเมื่อใช้เครื่องเขย่าประเภทโรตารีเท่านั้น เนื่องจากแบบรีซีโพรคอลลอาจมีการเขย่าที่แรงเกินไป โดยเชื่อจะสร้างคานามัยซินได้สูงสุด 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. เครื่องเขย่าแบบโรตารีจะให้น้ำหนักเส้นใยแห้งเป็น 14.48 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สูงกว่าแบบรีซีโพรคอลล ซึ่งให้น้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุดเป็น 8.97 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 38 กราฟเปรียบเทียบน้ำหนักเส้นใยแห้ง และปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 เมื่อใช้เครื่องเขย่า 2 ชนิด

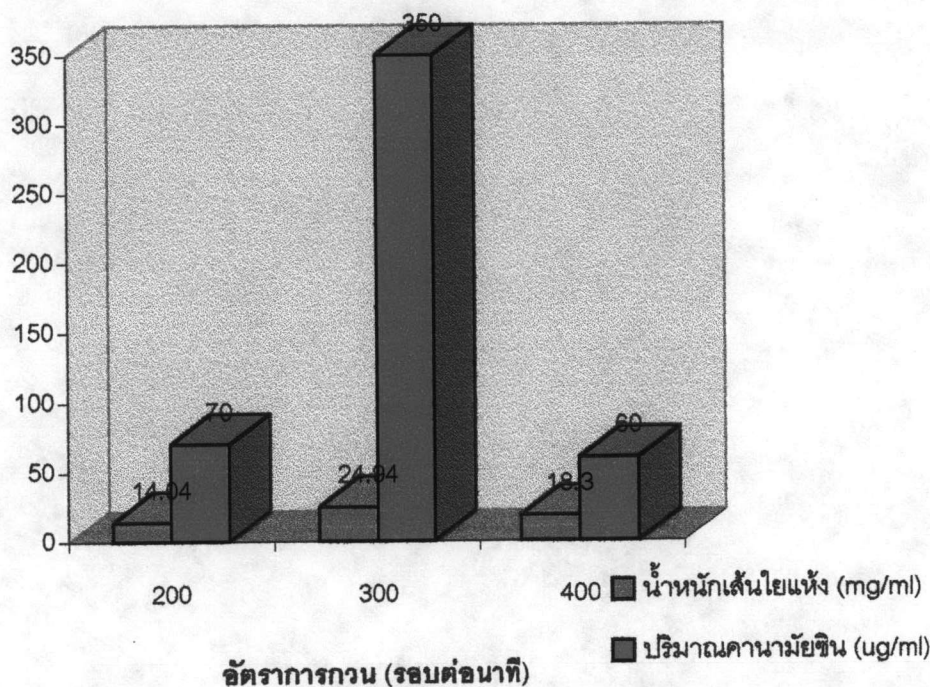
ดังนั้นสูตรอาหารใหม่ของอาหารเหลวเคพีเอ็มบีสำหรับสายพันธุ์กลาย UUNNK1 คือ

แป้ง (starch)	15.0	กรัม
ถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ (soytone)	8.0	กรัม
โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.5	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	3.0	กรัม
แบคโต-เปปโตน (bacto-peptone)	1.0	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)	5.0	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 8.0-8.6

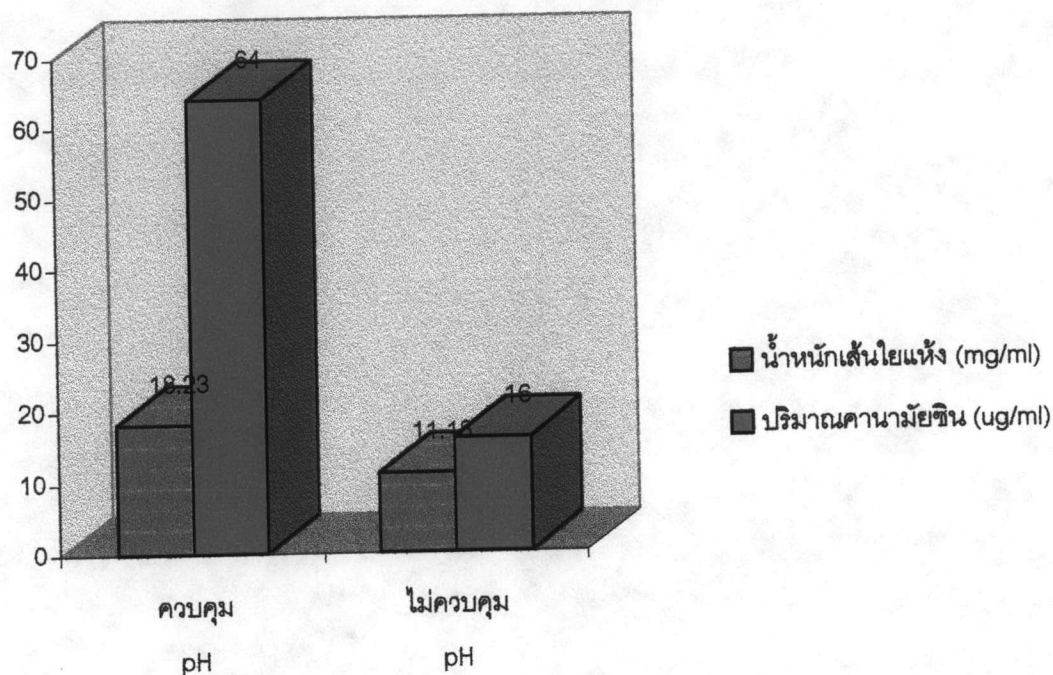
ผลจากภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตคานามัยซินในระดับขวดเขย่าของสายพันธุ์กลาย UUNNK1 ดังกล่าวได้นำมาทดลองผลิตในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ให้ผลการทดลองสรุปได้ดังนี้

1. ระยะเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการผลิตคานามัยซินคือ 4 วัน โดยให้ปริมาณคานามัยซินสูงสุดเพียง 70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณน้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุดในวันที่ 7 เป็น 17.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยที่ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะลดลงมากในช่วงวันที่ 2-3 (รูปที่ 21)
2. อัตราการกวนที่เหมาะสมคือ 300 รอบต่อนาที ให้ปริมาณคานามัยซินสูงสุดถึง 350 ไมโครกรัมมิลลิลิตร แต่ที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และ 400 รอบต่อนาที จะให้ปริมาณคานามัยซินเป็น 70 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 39)



รูปที่ 39 กราฟแสดงน้ำหนักร่งเส้นใยแห้ง และปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยแปรผันอัตราการ灌水

เนื่องจากขอยโทนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาแพงจึงได้เปลี่ยนมาใช้กากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรดแทนโดยเทียบปริมาณไนโตรเจนเท่ากับขอยโทน 8 กรัมต่อลิตร ทำการศึกษาเปรียบเทียบภาวะการควบคุมและไม่ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง พบว่าเมื่อควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างที่อัตราการ灌水 300 รอบต่อนาฬิกา จะให้ปริมาณคานามัยซิน เพียง 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 2 และเมื่อไม่ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างจะให้ปริมาณคานามัยซินเพียงเล็กน้อย นอกจากนี้เมื่อควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างจะให้น้ำหนักร่งเส้นใยแห้งสูงกว่าคือ 18.23 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในขณะที่ไม่ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างจะให้น้ำหนักร่งเส้นใยแห้งสูงสุดเพียง 11.18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และในการทดลองนี้ไม่ได้แสดงผลการวัดการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลและโปรตีน เนื่องจากกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรดมีสีเข้มทำให้ค่าดังกล่าวคลาดเคลื่อนไม่สามารถวัดได้ (รูปที่ 40)



รูปที่ 40 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง และปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อใช้กากถั่วเหลืองย่อยด้วยกรดแทนซอโยทอน และ มีอัตราการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที

แม้ว่ารายงานการผลิตคานามัยซินในระดับขยายส่วนนั้นยังเป็นที่ปกปิด แต่ผลของการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการผลิตคานามัยซินจากสายพันธุ์กลาย UUNNK1 ในระดับขยายส่วนนั้นเป็นไปได้ แต่ต้องมีข้อมูลการศึกษาภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการหมักในระดับดังกล่าวให้ได้ผลที่น่าพอใจก่อน ซึ่งย่อมแตกต่างจากข้อมูลระดับขวดเชย่า อย่างไรก็ตามผลของการทดลองนี้สามารถนำข้อมูลที่ได้ไปใช้เป็นแนวทางในการศึกษาขั้นต่อไป

จากผลการวิเคราะห์คานามัยซินที่ผลิตได้ด้วยวิธี HPLC โดยใช้เครื่องตรวจวัดชนิดดรรชนีหักเห ในข้อ 5.2 สามารถใช้วิเคราะห์คานามัยซิน ซึ่งจะไม่ดูดกลืนแสงในช่วงคลื่นที่มองเห็นได้และช่วงแสงอัลตราไวโอเล็ต พบว่าคานามัยซินเอ ซัลเฟต มาตรฐาน เข้มข้น 2,000 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 26) จะให้พีคของสารออกมาที่เวลาเดียวกัน โดยคานามัยซินเอ ซัลเฟต มาตรฐาน เข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะให้พีคเด่นชัด ณ เวลา 2.28 นาที ซึ่งมีพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 148,604 หน่วย คานามัยซินเอ ซัลเฟต มาตรฐาน เข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะให้พีค ณ เวลา 2.28 นาที เช่นกัน ซึ่งมีพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 114,393 หน่วย ส่วนคานามัยซินเอ ซัลเฟต มาตรฐาน เข้มข้น 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะไม่

ให้พีคดังกล่าว จะเห็นได้ว่า พีค ณ เวลา 2.28 นาที ของคานามัยซินเอ ซัลเฟตมาตรฐานที่ ปริมาณความเข้มข้นทั้งสองดังกล่าว จะให้พื้นที่ใต้กราฟต่างกันอย่างชัดเจน ดังนั้นสารที่ออกมาที่ เวลาดังกล่าวน่าจะเป็นคานามัยซินเอ ซัลเฟต มาตรฐาน

การวิเคราะห์คานามัยซินของสายพันธุ์กลาย UUNNK 1 ในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี (รูปที่ 27) พบว่าจะให้พีค ณ เวลา 2.86 นาที โดยมีพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 370,990 หน่วย สารชนิดนี้ น่าจะเป็นคานามัยซิน แต่เนื่องจากพีคของคานามัยซินเอ ซัลเฟต มาตรฐาน จะออกมาที่เวลา ประมาณ 2.28 นาที แต่น้ำหมักจะปรากฏพีคที่เวลา 2.86 นาทีจึงไม่อาจกล่าวได้ว่าสารในน้ำ หมักเป็นคานามัยซินเอ ดังนั้นจึงได้ทดลองฉีดตัวอย่างผสมระหว่างคานามัยซินเอ ซัลเฟต มาตรฐาน 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร กับน้ำหมัก ปริมาตร 10 ไมโครลิตร (รูปที่ 28) พบว่าจะปรากฏพีค ณ เวลา 3.03 นาที โดยมีพื้นที่ใต้กราฟเป็น 241,662 หน่วย จะเห็นได้ว่าพีคของสารที่เวลา 3.03 นาที เมื่อคำนวณแล้วพบว่า มีพื้นที่ใต้ กราฟใกล้เคียงกับผลรวมระหว่างครึ่งหนึ่งของพื้นที่ใต้กราฟพีคของคานามัยซินเอ ซัลเฟต มาตรฐาน 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่เวลา 2.38 นาทีกับครึ่งหนึ่งของพีคน้ำหมักที่เวลา 2.86 นาที จากผลการทดลองนี้อาจจะสรุปได้ 2 ประการ คือสารในตัวอย่างน้ำหมักเป็นคานามัย ซินเอ หรืออีกกรณีหนึ่ง คือ คานามัยซินเอ ซัลเฟต มาตรฐาน และน้ำหมักมีโครงสร้างใกล้เคียง กัน จนไม่สามารถแยกสารทั้งสองชนิดออกจากกันได้ โดยเห็นได้จากพีคของสองตัวอย่างดังกล่าว ออกมาที่เวลาใกล้เคียงกันมาก จนพีครวมเป็นแท่งเดียวกัน

ถึงแม้ว่าการวิเคราะห์ด้วย HPLC ไม่อาจกล่าวได้อย่างแน่ชัดลงไปว่า สารในน้ำหมักเป็น คานามัยซินเอ แต่การพิสูจน์โครงสร้างของสารดังกล่าวยังคงดำเนินการต่อไปโดยผู้วิจัยอีกท่าน หนึ่ง อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้ได้บรรลุวัตถุประสงค์ คือสามารถหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตคา นามัยซินของสายพันธุ์กลาย UUNNK1 ซึ่งผลิตคานามัยซินได้สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น K1 ถึง 25 เท่า และข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้ในการผลิตคานามัยซินในระดับขยายส่วนต่อไป