บทที่ 3

ผลการวิจัย

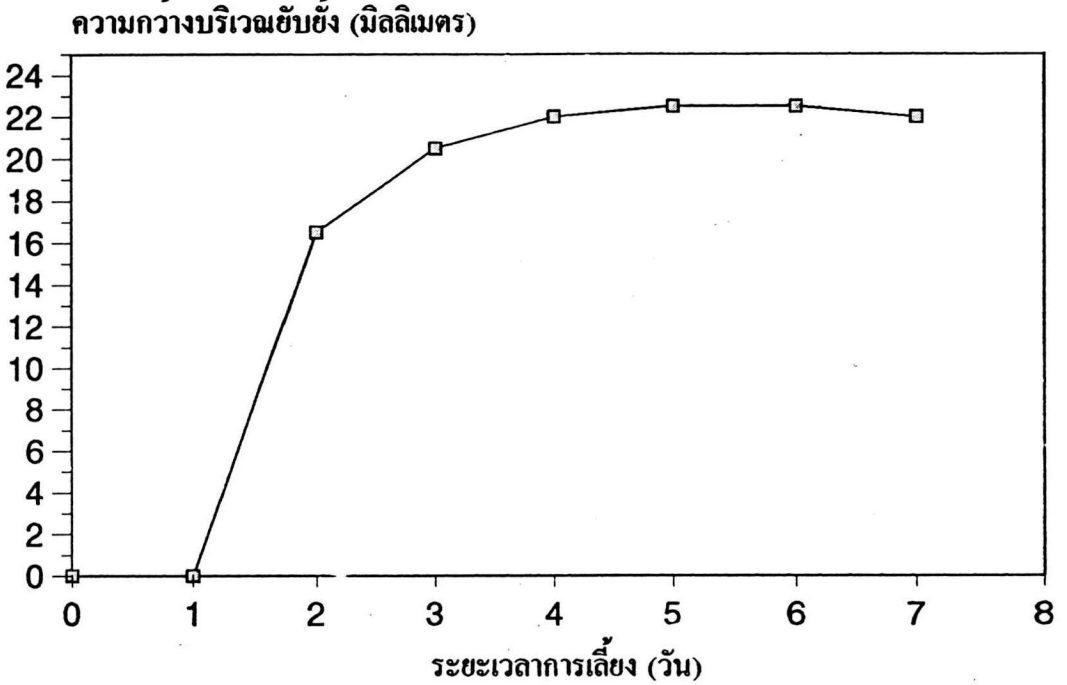
1. การสังเคราะห์คานามัยซินของ *S. kanamyceticus* K1

1.1 การสังเคราะห์คานามัยซินของ *S. kanamyceticus* K1 บนอาหารวุ้น เคพีเอ็มเอ

เมื่อนำสปอร์แขวนลอยของ *S. kanamyceticus* K1 จำนวน $1x10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตรที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองในข้อ 4.1 มาทำการเพาะเลี้ยงเพื่อให้สังเคราะห์คานามัยซินบนอาหารวุ้น เคพีเอ็มเอ (KPMA agar) ตามวิธีการทดลองในข้อ 4.2 เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างทุก 1 วัน นำตัวอย่างที่ได้ไปทดสอบหาความสามารถในการสังเคราะห์คานามัยซิน ด้วยวิธีการทางจุลชีววิทยา ตามวิธีการทดลองในข้อ 5.1.1 ให้ผลดังตารางที่ 1 และ รูปที่ i4

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบความกว้างบริเวณยับยั้งต่อการเจริญของเชื้อทดสอบรอบอาหารวุ้น เคพีเอ็ม เอ ที่เพาะเลี้ยง *S. kanamyceticus* K1 ในระยะเวลาต่าง ๆ กัน

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง *S. kanamyceticus* K1 บนอาหารวุ้น เคพีเอ็มเอ (วัน)	ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)
0	0
1	0
2	16.5
3	20.5
4	22.0
5	22.5
6	22.5
7	22.0



รูปที่ 14 กราฟแสดงความกว้างบริเวณยับยั้งการเจริญต่อเชื้อทดสอบ รอบอาหารวุ้น เคพีเอ็มเอ ที่เพาะเลี้ยง *S. kanamyceticus* K1 ในระยะเวลาต่าง ๆ กัน

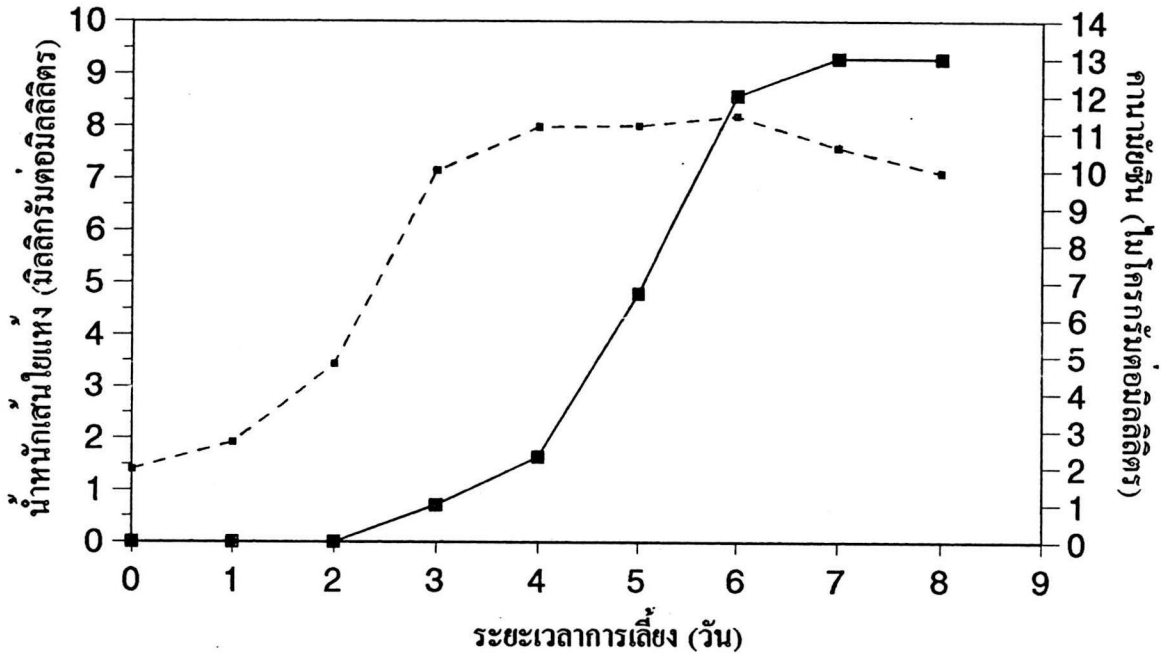
จากตารางที่ 1 และรูปที่ 14 พบว่า *S. kanamyceticus* K1 จะเริ่มสังเคราะห์คานามัยซินในอาหารวุ้นเคพีเอ็มเอ หลังจากบ่มเชื้อเป็นเวลา 1 วัน อัตราการสังเคราะห์คานามัยซินจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 หลังจากนั้นการสังเคราะห์จะค่อย ๆ เพิ่มขึ้น จนมีค่าสูงสุดในวันที่ 5 และคงที่ไปจนถึงวันสิ้นสุดการทดลอง

1.2 การสังเคราะห์คานามัยซินของ *S. kanamyceticus* K1 ในอาหารเหลว เคพีเอ็มบี

นำสปอร์แขวนลอยของ *S. kanamyceticus* K1 จำนวน $1x10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตรที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองในข้อ 4.1 มาทำการเพาะเลี้ยงเพื่อให้สังเคราะห์คานามัยซินในอาหารเหลว เคพีเอ็มบี (KPMB medium) ตามวิธีการทดลองในข้อ 4.3 เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างทุก 1 วัน ปั่นแยกเส้นใย และส่วนน้ำใสออกจากกัน โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง นำเส้นใยไปหาน้ำหนักแห้งเพื่อวัดอัตราการเจริญ ส่วนน้ำใสนำไปวิเคราะห์หาปริมาณคานามัยซินด้วยวิธีการทางจุลชีววิทยา ตามวิธีการทดลองในข้อ 5.1.2 โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานคานามัยซิน เอ ซัลเฟต (ภาคผนวก ค) ได้ผลดังตารางที่ 2 และ รูปที่ 15

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบ น้ำหนักเส้นใยแห้ง และ ปริมาณคานามัยซิน ในอาหารเหลว เคพีเอ็มบี ที่เพาะเลี้ยง *S. kanamyceticus* K1 ในระยะเวลาต่าง ๆ กัน

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง *S. kanamyceticus* K1 ในอาหารเหลว เคพีเอ็มบี (วัน)	น้ำหนักเส้นใยแห้ง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณคานามัยซิน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
0	1.40	0
1	1.92	0
2	3.43	0
3	7.14	1
4	7.98	2.3
5	6.70	6.7
6	8.00	12.0
7	7.58	13.0
8	7.10	13.0



รูปที่ 15 กราฟแสดง น้ำหนักเส้นใยแห้ง และปริมาณคานามัยซิน ในอาหารเหลว เคพีเอ็มบี ที่เพาะเลี้ยง *S. kanamyceticus* K1 ในระยะเวลาต่าง ๆ กัน

- น้ำหนักเส้นใยแห้ง
- คานามัยซิน

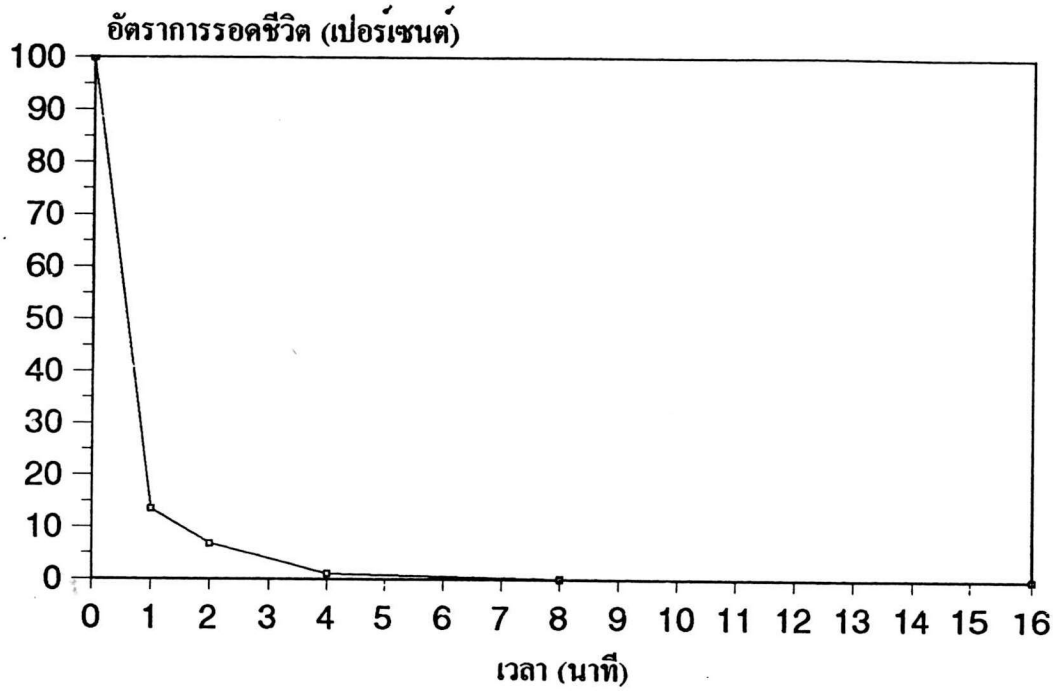
จากผลการทดลองดัง ตารางที่ 2 และ รูปที่ 15 พบว่า *S. kanamyceticus* K1 สามารถสังเคราะห์คานามัยซินได้ หลังจากวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง และอัตราการสังเคราะห์คานามัยซินจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จนถึงวันที่ 7 การสังเคราะห์จึงจะมีค่าสูงสุด คือ 13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. การหาอัตราการรอดชีวิตของ *S. kanamyceticus* K1 เมื่อถูกฉายแสงอัลตราไวโอเลต

เมื่อนำสปอร์แขวนลอยของ *S. kanamyceticus* K1 จำนวน $1x10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ไปฉายแสงอัลตราไวโอเลต เป็นเวลา 0, 2, 4, 8 และ 16 นาที นำสปอร์ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต มาเลี้ยงในอาหารวุ้น วายเอส (YS agar) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) ที่ไม่มีแสงสว่าง เป็นเวลา 3-4 วัน ตามวิธีการทดลองในข้อ 6.1 นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น จากนั้นคำนวณหาอัตราการรอดชีวิต ได้ผลดังตารางที่ 3 และ รูปที่ 16

ตารางที่ 3 อัตราการรอดชีวิตของ *S. kanamyceticus* K1 เมื่อถูกฉายแสงอัลตราไวโอเลต ด้วยระยะเวลาต่าง ๆ

ระยะเวลาการฉายแสง (นาที)	จำนวนสปอร์ *S. kanamyceticus* K1 ที่รอดชีวิต (สปอร์ต่อมิลลิลิตร)	อัตราการรอดชีวิต (เปอร์เซนต์)
0	$4.40x10^6$	100
1	$6.00x10^5$	13.64
2	$3.00x10^5$	6.82
4	$4.70x10^4$	1.07
8	$9.00x10^2$	0.02
16	0	0



รูปที่ 16 กราฟแสดง อัตราการรอดชีวิต *S. kanamyceticus* K1 เมื่อถูกฉายแสงอัลตราไวโอเลต ด้วยระยะเวลาต่าง ๆ

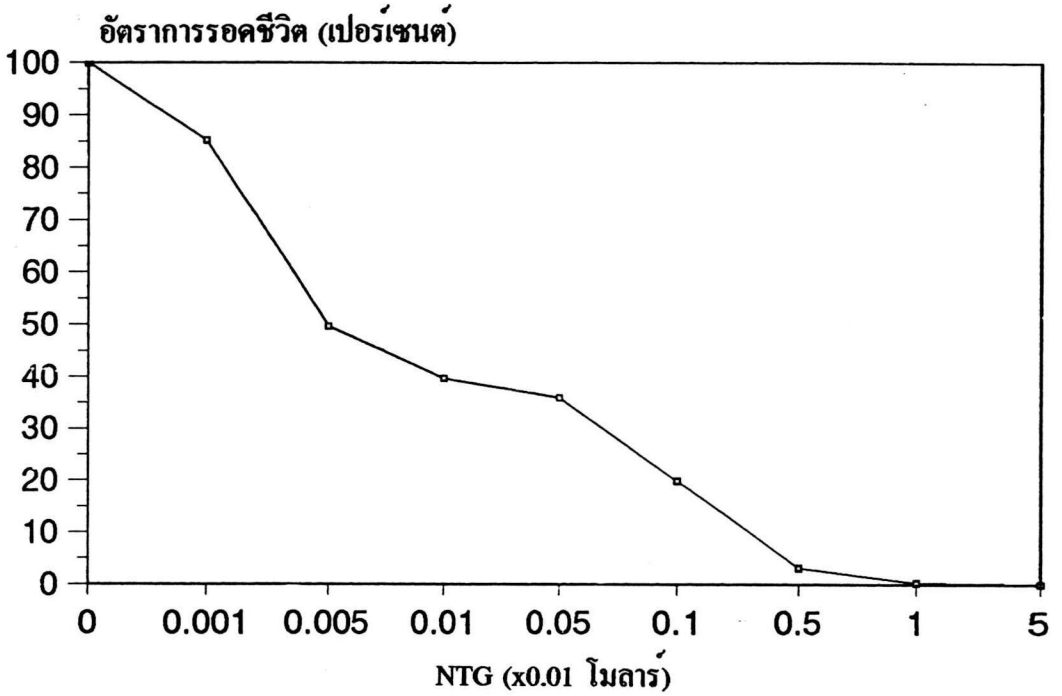
จากตารางที่ 3 และรูปที่ 16 พบว่าระยะเวลาในการฉายแสงอัลตราไวโอเลตนานขึ้น อัตราการรอดชีวิตของเชื้อจะลดลง จนเหลืออัตราการรอดชีวิต 1.07 เปอร์เซนต์ เมื่อฉายแสงอัลตราไวโอเลตนาน 4 นาที ดังนั้นจึงเลือกใช้ระยะเวลาในการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 4 นาที เป็นระยะเวลาในการทำการกลายพันธุ์ *S. kanamyceticus* K1 เนื่องจากในการทำการกลายพันธุ์ Streptomyces ด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเลต นิยมใช้ระยะเวลาที่ทำให้เชื้อมีอัตราการรอดชีวิตต่ำกว่า 5 เปอร์เซนต์ (Johdo, et al., 1991)

3. การหาอัตราการรอดชีวิตของ *S. kanamyceticus* K1 เมื่อถูกชักนำด้วย NTG

นำสปอร์แขวนลอยของ *S. kanamyceticus* K1 จำนวน $1x10^{7}$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ไปชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารละลาย NTG เข้มข้น 0, $1x10^{-5}$, $5x10^{-5}$, $1x10^{-4}$, $5x10^{-4}$, $1x10^{-3}$, $5x10^{-3}$, $1x10^{-2}$ และ $5x10^{-2}$ โมลาร์ ใน 0.05 โมลาร์ ทริสมาลีอิค บัฟเฟอร์ pH 9.0 (ภาคผนวก ข) ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 45 นาที นำสปอร์ที่ผ่านการชักนำด้วย NTG มาเลี้ยงในอาหารวุ้น วายเอส บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3-4 วัน ตามวิธีการทดลองในข้อ 6.2 นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น จากนั้นคำนวณหาอัตราการรอดชีวิต ได้ผลดังตารางที่ 4 และ รูปที่ 17

ตารางที่ 4 อัตราการรอดชีวิตของ *S. kanamyceticus* K1 เมื่อทำถูกชักนำด้วย NTG ที่ปริมาณความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ใน 0.05 โมลาร์ ทริสมาลีอิค บัฟเฟอร์ pH 9.0

ปริมาณความเข้มข้นของ NTG (โมลาร์)	จำนวนสปอร์ *S. kanamyceticus* K1 ที่รอดชีวิต (สปอร์ต่อมิลลิลิตร)	อัตราการรอดชีวิต (เปอร์เซนต์)
0	$5.15x10^{7}$	100
$1x10^{-5}$	$4.39x10^{7}$	85.18
$5x10^{-5}$	$2.56x10^{7}$	49.66
$1x10^{-4}$	$2.26x10^{7}$	43.81
$5x10^{-4}$	$2.03x10^{7}$	39.48
$1x10^{-3}$	$1.02x10^{7}$	19.85
$5x10^{-3}$	$1.61x10^{6}$	3.13
$1x10^{-2}$	$1.55x10^{5}$	0.30
$5x10^{-2}$	$2.06x10^{3}$	0



รูปที่ 17 กราฟแสดง อัตราการรอดชีวิตของ *S. kanamyceticus* K1 เมื่อถูกชักนำด้วย NTG ที่ปริมาณความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ใน 0.05 โมลาร์ ทริสมาลีอิค บัฟเฟอร์ pH 9.0

จากตารางที่ 4 และ รูปที่ 17 พบว่า เมื่อความเข้มข้นของ NTG เพิ่มขึ้น อัตราการรอดชีวิตของเชื้อจะลดลง ที่ความเข้มข้นของ NTG $5x10^{-3}$ โมลาร์ จะให้อัตราการรอดชีวิต เท่ากับ 3.13 เปอร์เซนต์ เนื่องจากในการทำการกลายพันธุ์ Streptomyces ด้วย NTG นิยมใช้ความเข้มข้นที่ทำให้เชื้อมีอัตราการรอดชีวิตต่ำกว่า 20 เปอร์เซนต์ (Delic, et al., 1970; Johdo, et al., 1991) ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของ NTG เท่ากับ $5x10^{-3}$ โมลาร์ ในการทำการกลายพันธุ์ต่อไป

4. การกลายพันธุ์ *S. kanamyceticus* K1 เพื่อเพิ่มผลผลิตคานามัยซิน

4.1 การกลายพันธุ์ *S. kanamyceticus* K1 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (UV)

เมื่อนำสปอร์แขวนลอยของ *S. kanamyceticus* K1 จำนวน $1x10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ไปฉายแสง UV นาน 4 นาที นำสปอร์ที่ผ่านการฉายแสง มาเลี้ยงบนอาหารวุ้น วายเอส บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3-4 วัน ตาม วิธีการทดลองในข้อ 6.1 แล้วนำไปคัดเลือกสายพันธุ์กลายดังต่อไปนี้

4.1.1 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายขั้นปฐมภูมิ

จากการสุ่มตัวอย่างสายพันธุ์กลายที่รอดชีวิตบนอาหารวุ้น วายเอส แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว จีพีวาย บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามวิธีการทดลองในข้อ 4.1 แล้วนำเชื้อปริมาณ 1 ลูป มาเลี้ยงบนผิวหน้าอาหารวุ้น เคพีเอ็มเอ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 วัน ตามวิธีการทดลองในข้อ 4.2 หลังจากนั้น นำอาหารวุ้น เคพีเอ็มเอ ที่มีสายพันธุ์กลายเจริญอยู่บนผิวหน้าไปทดสอบปริมาณคานามัยซินที่เชื้อสังเคราะห์ขึ้น เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น K1 ด้วยวิธีการทางจุลชีววิทยา ตามวิธีการทดลองในข้อ 5.1.1 จากการทดลองซ้ำจำนวน 12 ครั้ง ได้สายพันธุ์กลาย 296 สายพันธุ์ ในจำนวนนี้ มี 9 สายพันธุ์ คือ UK7-2, UK8-1, UK8-10, UK9-15, UK10-16, UK10-22, UK10-26, UK10-27 และ UK12-12 สามารถให้บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้กว้างกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น K1 ดังตารางที่ 5 นำสายพันธุ์กลาย ทั้ง 9 สายพันธุ์ ที่ได้ไปทำการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิต่อไป

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบ ความกว้างบริเวณยับยั้งการเจริญต่อเชื้อทดสอบ รอบ อาหารวุ้นเคพีเอ็มเอของสายพันธุ์ตั้งต้น K1 กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 1 รอบ เพื่อการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ

สายพันธุ์กลาย	ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ความกว้างบริเวณยับยั้งของสายพันธุ์ตั้งต้น K1 (มิลลิเมตร)	ความกว้างบริเวณยับยั้ง ที่เพิ่มขึ้น (มิลลิเมตร)	ความกว้างบริเวณยับยั้ง ที่เพิ่มขึ้น (เปอร์เซนต์)
UK7-2	25.0	21.5	3.5	16.28
UK8-1	20.0	18.5	1.5	8.11
UK8-10	21.0	18.5	2.5	13.51
UK9-15	25.5	24.0	1.5	6.25
UK10-16	21.5	19.5	2.0	10.25
UK10-22	18.0	16.5	1.5	7.27
UK10-26	19.0	16.5	2.5	15.15
UK10-27	20.0	16.5	3.5	21.12
UK12-12	29.0	23.5	3.5	23.00

4.1.2 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายขั้นทุติยภูมิ

เมื่อนำสปอร์แขวนลอยของสายพันธุ์ตั้งต้น K1 และสายพันธุ์กลายทั้ง 9 สายพันธุ์ที่ได้จากผลการทดลองในข้อ 4.1.1 มาเลี้ยงในอาหารเหลว จีพีวาย บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามวิธีการทดลองในข้อ 4.1 หลังจากนั้น นำหัวเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตรของเชื้อแต่ละสายพันธุ์มาเลี้ยงต่อในอาหารเหลว เคพีเอ็มบี บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน ตามวิธีการทดลองในข้อ 4.3 เก็บตัวอย่างแยกส่วนน้ำใสมาทดสอบหาปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์กลายทั้ง 9 สายพันธุ์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น K1 ด้วยวิธีการทางจุลชีววิทยา ตามวิธีการทดลองในข้อ 5.1.2 โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน คานามัยซิน เอ ซัลเฟต (ภาคผนวก ค) ได้ผลดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบปริมาณคานามัยซินในอาหารเหลว เคพีเอ็มบี ของสายพันธุ์ตั้งต้น K1 กับ สายพันธุ์กลาย ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 1 รอบ เพื่อการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ

สายพันธุ์	ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ปริมาณคานามัยซิน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
K1	**24.0**	**15**
UK7-2	24.0	15
UK8-1	22.0	8
UK8-10	24.5	18
UK9-15	25.5	23
UK10-16	23.0	10
UK10-22	23.5	12
UK10-26	24.0	15
UK10-27	27.0	33
UK12-12	27.5	43

จากตารางที่ 6 พบว่า ในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายขั้นทุติยภูมิ สายพันธุ์กลายที่สามารถสังเคราะห์คานามัยซินมากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น K1 มีทั้งหมด 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ UK8-10, UK9-15, UK10-27 และ UK12-12 สามารถสังเคราะห์คานามัยซินได้ 18, 23, 33 และ 43 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 1.2, 1.5, 2.2 และ 2.9 เท่าของสายพันธุ์ตั้งต้น K1 ตามลำดับ นำสายพันธุ์กลายทั้ง 4 สายพันธุ์ ไปทดสอบความเสถียรในการสังเคราะห์คานามัยซินต่อไป

4.1.3 การทดสอบความเสถียรในการสังเคราะห์คานามัยซินของสายพันธุ์กลาย

เมื่อนำสายพันธุ์กลายทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ผ่านการทดสอบขั้นทุติยภูมิ ตามผลการทดลองในข้อ 4.1.2 มาเลี้ยงในอาหารเหลว เคพีเอ็มบี หลังจากถ่ายเชื้อไป 1 และ 2 ครั้ง โดยทำการทดลองเช่นเดียวกันกับการทดสอบขั้นทุติยภูมิ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น K1 วัดปริมาณคานามัยซินที่สังเคราะห์ได้ ได้ผลดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 การทดสอบความเสถียร ในการสังเคราะห์คานามัยซิน ของสายพันธุ์กลาย ที่ได้จากการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 1 รอบ

สายพันธุ์กลาย	ปริมาณคานามัยซิน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	การทดสอบ ความเสถียร ครั้งที่ 1	การทดสอบ ความเสถียร ครั้งที่ 2
K1	13	15
UK8-10	12	6
UK9-15	27	28
UK10-27	30	24
UK12-12	38	35

จากตารางที่ 7 พบว่า สายพันธุ์กลายที่มีความเสถียร ยังคงสามารถสังเคราะห์คานามัยซินได้มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น K1 ซึ่งสังเคราะห์คานามัยซินได้ 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มี 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ UK9-15, UK10-27 และ UK12-12 ซึ่งสังเคราะห์คานามัยซินได้ 28, 24 และ 35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 1.9, 1.6 และ 2.3 เท่าของสายพันธุ์ตั้งต้น K1 ตามลำดับ

นำสายพันธุ์กลายทั้ง 3 สายพันธุ์ ไปทำการกลายพันธุ์ต่อไปเพื่อให้ได้สายพันธุ์กลาย ที่มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์คานามัยซินได้มากขึ้น

4.2 การกลายพันธุ์ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์ UK9-15, UK10-27 และ UK12-12 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (UV)

จากการนำสปอร์แขวนลอยของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์ UK9-15, UK10-27 และ UK12-12 ที่ได้จากผลการทดลองในข้อ 4.1.3 แต่ละสายพันธุ์จำนวน $1x10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาทำการกลายพันธุ์ด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเลต นาน 4 นาที นำเชื้อที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต มาเลี้ยงบนอาหารวุ้นวายเอส บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3-4 วัน ตามวิธีการทดลองในข้อ 6.1 และทำการคัดเลือกสายพันธุ์กลายขั้นปฐมภูมิ และทุติยภูมิ เช่นเดียวกับการกลายพันธุ์สายพันธุ์ตั้งต้น K1

4.2.1 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายขั้นปฐมภูมิ

จากการสุ่มคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่รอดชีวิตบนอาหารวุ้น วายเอส ที่ได้จากการทดลองในข้อ 4.2 แล้วนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อสังเคราะห์คานามัยซินในอาหารวุ้น เคพีเอ็มเอ ตามวิธีการทดลองในข้อ 4.1 และ 4.2 เป็นเวลา 5 วัน แล้วนำไปทดสอบหาปริมาณคานามัยซินที่สายพันธุ์กลายสังเคราะห์ขึ้น เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้นด้วยวิธีการทางจุลชีววิทยาตามวิธีการทดลองในข้อ 5.1.1 ปรากฏผลว่า

จากการสุ่มตัวอย่างสายพันธุ์กลาย 38 สายพันธุ์ จากสายพันธุ์ทั้งหมดที่ได้จากการกลายพันธุ์ UK9-15 สามารถคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่ให้ความกว้างบริเวณยับยั้งต่อเชื้อทดสอบ มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ UUK2-5 และ UUK2-10 (ตารางที่ 8)

ในทำนองเดียวกันในการกลายพันธุ์ UK12-12 สามารถคัดเลือกสายพันธุ์กลายได้จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ UUK3-30 และ UUK3-36 (ตารางที่ 8)

แต่ในการกลายพันธุ์ UK10-27 ไม่พบสายพันธุ์กลายที่ให้บริเวณยับยั้งต่อเชื้อทดสอบ มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นดังกล่าว

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบ ความกว้างบริเวณยับยั้งต่อเชื้อทดสอบ รอบอาหารวุ้นเคพีเอ็มเอ ของ สายพันธุ์ตั้งต้น UK9-15 และ UK12-12 กับสายพันธุ์กลายที่ได้จากการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 2 รอบ เพื่อคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ

สายพันธุ์	ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ความกว้างบริเวณยับยั้งที่เพิ่มขึ้น (มิลลิเมตร)	ความกว้างบริเวณยับยั้ง ที่เพิ่มขึ้น (เปอร์เซนต์)
UK9-15	**30.5**	-	-
UUK2-5	34.0	3.5	11.48
UUK2-10	34.0	3.5	11.48
UK12-12	**21.5**	-	-
UUK3-30	26.5	5.0	23.60
UUK3-36	26.5	5.0	23.60

4.2.2 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายขั้นทุติยภูมิ

เมื่อนำสปอร์แขวนลอยของสายพันธุ์กลาย UUK2-5, UUK2-10, UUK3-30 และ UUK3-36 ที่ได้จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ และสายพันธุ์ตั้งต้น UK9-15, UK12-12 มาเพาะเลี้ยงเพื่อสังเคราะห์คานามัยซินในอาหารเหลว เคพีเอ็มบี ตามวิธีการทดลองที่ 4.1 และ 4.3 บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างแยกส่วนน้ำใส มาทดสอบหาปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์กลายที่สามารถสังเคราะห์ขึ้น เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้นด้วยวิธีการทางจุลชีววิทยา ตามวิธีการทดลองในข้อ 5.1.2 โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน คานามัยซิน เอ ซัลเฟต (ภาคผนวก ค) ได้ผลดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบปริมาณคานามัยซินในอาหารเหลว เคพีเอ็มบี ของสายพันธุ์ตั้งต้น UK9-15 และ UK12-12 กับ สายพันธุ์กลาย ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 2 รอบ เพื่อการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ

สายพันธุ์	ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ปริมาณคานามัยซิน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
UK9-15	**19.0**	**20**
UUK2-5	22.5	50
UUK2-10	18.0	17
UK12-12	**20.5**	**30**
UUK3-30	19.5	23
UUK3-36	22.5	50

จากตารางที่ 9 พบว่า ในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายขั้นทุติยภูมิ สามารถคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่สามารถสังเคราะห์คานามัยซินได้มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นจำนวน 2 สายพันธุ์ คือ

สายพันธุ์กลาย UUK2-5 สามารถสังเคราะห์คานามัยซินได้ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น UK9-15 และ K1 ซึ่งสังเคราะห์คานามัยซินได้ 20 และ 13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 2.5 และ 4 เท่าตามลำดับ และ

สายพันธุ์กลาย UUK3-36 สามารถสังเคราะห์คานามัยซินได้ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น UK12-12 และ K1 ซึ่งสังเคราะห์คานามัยซินได้ 30 และ 13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 1.7 และ 3.9 เท่าตามลำดับ

นำสายพันธุ์กลายทั้ง 2 สายพันธุ์ ไปทดสอบความเสถียรในการสังเคราะห์คานามัยซินต่อไป

4.2.3 การทดสอบความเสถียรในการสังเคราะห์คานามัยซินของสายพันธุ์กลาย

จากการนำสายพันธุ์กลายทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ UUK2-5 และ UUK3-36 ที่ได้จากการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 และ 2 มาเลี้ยงในอาหารเหลว เคพีเอ็มบี โดยทำการทดลองเช่นเดียวกันกับ

การทดสอบขั้นทุติยภูมิ พร้อมทั้งการวัดปริมาณคานามัยซินที่สังเคราะห์ได้ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น K1, UK9-15 และ UK12-12 ได้ผลดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 การทดสอบความเสถียร ในการสังเคราะห์คานามัยซิน ของสายพันธุ์กลาย ที่ได้จากการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 2 รอบ

สายพันธุ์กลาย	ปริมาณคานามัยซิน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	การทดสอบ ความเสถียร ครั้งที่ 1	การทดสอบ ความเสถียร ครั้งที่ 2
K1	13	13
UK9-15	18	20
UK12-12	25	30
UUK2-5	50	52
UUK3-36	55	46

พบว่าสายพันธุ์กลาย UUK2-5 มีความเสถียรทางพันธุกรรม สามารถสังเคราะห์คานามัยซินได้ 52 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 2.6 และ 4 เท่าของสายพันธุ์ตั้งต้น UK9-15 และ K1 ซึ่งสังเคราะห์คานามัยซินได้ 20 และ 13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่สายพันธุ์กลาย UUK3-36 ในการทดสอบความเสถียรในครั้งที่ 2 การสังเคราะห์คานามัยซินลดลง คือสังเคราะห์ได้ 46 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ยังมากกว่า สายพันธุ์ตั้งต้น UK12-12 และ K1 ซึ่งสังเคราะห์คานามัยซินได้ 30 และ 13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จึงนำสายพันธุ์กลาย ทั้ง 2 สายพันธุ์ ไปทำการกลายพันธุ์ต่อไป เพื่อให้ได้สายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์คานามัยซินได้มากขึ้น

4.3 การกลายพันธุ์ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์ UUK2-5 และ UUK3-36 ด้วย NTG

จากการนำสปอร์แขวนลอยของสายพันธุ์ตั้งต้น UUK2-5 และ UUK3-36 ที่ได้จากการทดลองในข้อ 4.2.3 แต่ละสายพันธุ์จำนวน $1x10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปทำการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ด้วยสารละลาย NTG เข้มข้น 0.005 โมลาร์ใน 0.05 โมลาร์ ทริส-มาอีอิก บัฟเฟอร์ pH 9.0 ที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 45 นาที นำสปอร์ที่ผ่านการชักนำ มาเลี้ยงในอาหารวุ้น วายเอส บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3-4 วัน ตามวิธีการทดลองในข้อ 6.2 แล้วนำไปคัดเลือกสายพันธุ์กลายดังต่อไปนี้

4.3.1 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายขั้นปฐมภูมิ

จากการสุ่มคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่รอดชีวิตบนอาหารวุ้น วายเอส แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว จีพีวาย บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามวิธีการทดลองในข้อ 4.1 แล้วนำเชื้อปริมาณ 1 ลูป มาเลี้ยงบนผิวหน้าอาหารวุ้น เคพีเอ็มเอ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 วัน ตามวิธีการทดลองในข้อ 4.2 หลังจากนั้นนำอาหารวุ้น เคพีเอ็มเอ ที่มีสายพันธุ์กลายเจริญอยู่บนผิวหน้าไปทดสอบปริมาณคานามัยซินที่สายพันธุ์กลายสังเคราะห์ขึ้น เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น ด้วยวิธีการทาง จุลชีววิทยา ตามวิธีการทดลองในข้อ 5.1.1

จากการสุ่มตัวอย่างสายพันธุ์กลาย 38 สายพันธุ์ จากสายพันธุ์ทั้งหมดที่ได้จากการกลายพันธุ์ UUK2-5 สามารถคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่ให้ความกว้างบริเวณยับยั้งต่อเชื้อทดสอบ มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ UUNK1, UUNK21 และ UUNK25 (ตารางที่ 11)

ในทำนองเดียวกันในการกลายพันธุ์ UUK3-36 สามารถคัดเลือกสายพันธุ์กลายได้จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ UUNK15 และ UUNK24 (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบความกว้างบริเวณยับยั้งต่อเชื้อทดสอบ รอบอาหารวุ้นเคพีเอ็มเอของสายพันธุ์ตั้งต้น UUK2-5, UUK3-36 กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 2 รอบ และชักนำด้วย NTG 1 รอบ เพื่อการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ

สายพันธุ์	ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ความกว้างบริเวณยับยั้งที่เพิ่มขึ้น (มิลลิเมตร)	ความกว้างบริเวณยับยั้ง ที่เพิ่มขึ้น (เปอร์เซนต์)
UUK2-5	**25.0**	-	-
UUNK1	27.5	2.0	8.00
UUNK21	25.5	0.5	2.00
UUNK25	29.5	4.5	18.00
UUK3-36	**27.5**	-	-
UUNK15	30.0	2.5	9.09
UUNK24	29.5	2.0	7.27

4.3.2 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายขั้นทุติยภูมิ

เมื่อนำสปอร์แขวนลอยของสายพันธุ์ตั้งต้น UUK2-5, UUK3-36 และสายพันธุ์กลาย UUNK1, UUNK21, UUNK25, UUNK15 และ UUNK24 ที่ได้จากการทดลองในข้อ 4.3.1 มาเลี้ยงในอาหารเหลว จีพีวาย บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามวิธีการทดลองในข้อ 4.1 หลังจากนั้นนำหัวเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ มาเลี้ยงต่อในอาหารเหลว เคพีเอ็มบี บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน ตามวิธีการทดลองในข้อ 4.3 เก็บตัวอย่างแยกส่วนน้ำใสมาทดสอบหาปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์กลาย เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้นด้วยวิธีการทางจุลชีววิทยา ตามวิธีการทดลองในข้อ 5.1.2 โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานคานามัยซิน เอ ซัลเฟต (ภาคผนวก ค) ได้ผลดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบ ปริมาณคานามัยซินในอาหารเหลว เคพีเอ็มบี ของสายพันธุ์ตั้งต้น UUK2-5, UUK3-36 กับสายพันธุ์กลาย ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 2 รอบ และชักนำด้วย NTG 1 รอบ เพื่อการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ

สายพันธุ์	ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ปริมาณคานามัยซิน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
UUK2-5	**25.0**	**45**
UUNK1	23.0	28
UUNK21	23.0	28
UUNK25	25.5	50
UUK3-36	**24.5**	**40**
UUNK15	29.0	130
UUNK24	22.5	50

จากการคัดเลือกสายพันธุ์กลายขั้นทุติยภูมิพบว่า สามารถคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่สามารถสังเคราะห์คานามัยซินได้มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ

สายพันธุ์กลาย UUNK25 สามารถสังเคราะห์คานามัยซินได้ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น UUK2-5 และ K1 ซึ่งสังเคราะห์คานามัยซินได้ 45 และ 13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 1.1 และ 3.9 เท่าตามลำดับ

สายพันธุ์กลาย UUNK15 สามารถสังเคราะห์คานามัยซินได้ 130 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น UUK3-36 และ K1 ซึ่งสังเคราะห์คานามัยซินได้ 40 และ 13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 3.3 และ 10 เท่าตามลำดับ

สายพันธุ์กลาย UUNK24 สามารถสังเคราะห์คานามัยซินได้ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น UUK3-36 และ K1 ซึ่งสังเคราะห์คานามัยซินได้ 40 และ 13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 1.3 และ 3.9 เท่าตามลำดับ

นำสายพันธุ์กลายทั้ง 3 สายพันธุ์ ไปทดสอบความเสถียรในการสังเคราะห์คานามัยซินต่อไป

4.3.3 การทดสอบความเสถียรในการสังเคราะห์คานามัยซินของสายพันธุ์กลาย

เมื่อนำสายพันธุ์กลายทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ UUNK25, UUNK15 และ UUNK24 ที่ได้จากการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 และ 2 มาเลี้ยงในอาหารเหลว เคพีเอ็มบี โดยทำการทดลองเช่นเดียวกันกับการทดสอบขั้นทุติยภูมิ วัดปริมาณคานามัยซินที่สายพันธุ์กลายสังเคราะห์ได้ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น K1, UUK2-5 และ UUK3-36 ได้ผลดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 การทดสอบความเสถียร ในการสังเคราะห์คานามัยซิน ของสายพันธุ์กลาย ที่ได้จากการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 2 รอบ และชักนำด้วย NTG 1 รอบ

สายพันธุ์กลาย	ปริมาณคานามัยซิน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	การทดสอบ ความเสถียร ครั้งที่ 1	การทดสอบ ความเสถียร ครั้งที่ 2
K1	12	13
UUK2-5	50	45
UUK3-36	50	46
UUNK25	40	40
UUNK15	150	130
UUNK24	25	40

พบว่าสายพันธุ์กลายที่มีความเสถียรในการสังเคราะห์คานามัยซิน และสังเคราะห์ได้มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น มากที่สุด คือ สายพันธุ์กลาย UUNK15 จึงนำไปทำการกลายพันธุ์ต่อไปเพื่อให้ได้สายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์คานามัยซินได้มากขึ้น

4.4 การกลายพันธุ์ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์ UUNK15 ด้วย NTG

เมื่อนำสปอร์แขวนลอยของสายพันธุ์ตั้งต้น UUNK15 ที่ได้จากการทดลองในข้อ 4.3.3จำนวน $1x10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย สารละลาย NTG เข้มข้น 0.005 โมลาร์ ที่ละลายใน 0.05 โมลาร์ ทริส-มาลีอิค บัฟเฟอร์ pH 9.0 ที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 45 นาที นำสปอร์ที่ผ่านการชักนำ มาเลี้ยงในอาหารวุ้น วายเอส บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3-4 วัน ตามวิธีการทดลองในข้อ 6.2 แล้วนำมาคัดเลือกสายพันธุ์กลายต่อไป

4.4.1 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายขั้นปฐมภูมิ

จากการสุ่มคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่รอดชีวิตบนอาหารวุ้น วายเอส ที่ได้จากการทดลองในข้อ 4.4 แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนผิวหน้าอาหารวุ้น เคพีเอ็มเอ เพื่อให้สังเคราะห์คานามัยซิน ตามวิธีการทดลองในข้อ 4.1 และ 4.2 เป็นเวลา 5 วัน หลังจากนั้นนำไปทดสอบปริมาณคานามัยซินที่สายพันธุ์กลายสังเคราะห์ขึ้น เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้นด้วยวิธีการทางจุลชีววิทยา ตามวิธีการทดลองในข้อ 5.1.1 ปรากฏผลว่า

จากการสุ่มตัวอย่างสายพันธุ์กลาย 38 สายพันธุ์ จากสายพันธุ์ทั้งหมดที่ได้จากการกลายพันธุ์ UUNK15 สามารถคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่ให้ความกว้างบริเวณยับยั้งต่อเชื้อทดสอบ มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น จำนวน 5 สายพันธุ์ คือ UUNNK1, UUNNK14, UUNNK22, UUNNK25 และ UUNNK28 ดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบความกว้างบริเวณยับยั้งต่อเชื้อทดสอบ รอบอาหารวุ้นเคพีเอ็มเอ ของสายพันธุ์ตั้งต้น UUNK15 กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลค 2 รอบ และชักนำด้วย NTG 2 รอบ เพื่อการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ

สายพันธุ์	ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ความกว้างบริเวณยับยั้งที่เพิ่มขึ้น (มิลลิเมตร)	ความกว้างบริเวณยับยั้ง ที่เพิ่มขึ้น (เปอร์เซนต์)
UUNK15	**26.0**	-	-
UUNNK1	27.0	1.0	3.85
UUNNK14	26.5	0.5	1.92
UUNNK22	28.0	2.0	7.69
UUNNK25	27.5	1.5	5.77
UUNNK28	27.0	1.0	3.85

4.3.2 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายขั้นทุติยภูมิ

เมื่อนำสปอร์แขวนลอยของสายพันธุ์ตั้งต้น UUNK15 และสายพันธุ์กลาย UUNNK1, UUNNK14, UUNNK22, UUNNK25 และ UUNNK28 ที่ได้จากผลการทดลองในข้อ 4.3.1 มาเพาะเลี้ยงเพื่อให้สังเคราะห์คานามัยซินในอาหารเหลว เคพีเอ็มบี ตามวิธีการทดลองในข้อ 4.3 เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างแยกส่วนน้ำใส มาทดสอบหาปริมาณคานามัยซิน ที่สายพันธุ์กลายสามารถสังเคราะห์ขึ้นเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้นด้วยวิธีการทางจุลชีววิทยา ตามวิธีการทดลองในข้อ 5.1.2 โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานคานามัยซิน เอ ซัลเฟต (ภาคผนวก ค) ได้ผลดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 เปรียบเทียบปริมาณคานามัยซินในอาหารเหลว เคพีเอ็มบี ของสายพันธุ์ตั้งต้น UUNK15 กับสายพันธุ์กลาย ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 2 รอบ และชักนำด้วย NTG 2 รอบ เพื่อการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ

สายพันธุ์	ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ปริมาณคานามัยซิน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
UUNK15	**24.0**	**130**
UUNNK1	26.0	180
UUNNK14	24.5	120
UUNNK22	24.5	120
UUNNK25	25.5	160
UUNNK28	25.5	160

จากตารางที่ 15 พบว่าในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายขั้นทุติยภูมิ สามารถคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่สามารถสังเคราะห์คานามัยซินได้มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นจำนวน 3 สายพันธุ์คือ

สายพันธุ์กลาย UUNNK1 สามารถสังเคราะห์คานามัยซินได้ 180 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น UUNK15 และ K1 ซึ่งสังเคราะห์คานามัยซินได้ 130 และ 13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 1.4 และ 13.9 เท่าตามลำดับ

สายพันธุ์กลาย UUNNK25 สามารถสังเคราะห์คานามัยซินได้ 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น UUNK15 และ K1 ซึ่งสังเคราะห์คานามัยซินได้ 130 และ 13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 1.2 และ 12.3 เท่าตามลำดับ และ

สายพันธุ์กลาย UUNNK28 สามารถสังเคราะห์คานามัยซินได้ 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น UUNK15 และ K1 ซึ่งสังเคราะห์คานามัยซินได้ 130 และ 13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 1.2 และ 12.3 เท่าตามลำดับ

4.4.3 การทดสอบความเสถียรในการสังเคราะห์คานามัยซินของสายพันธุ์กลาย

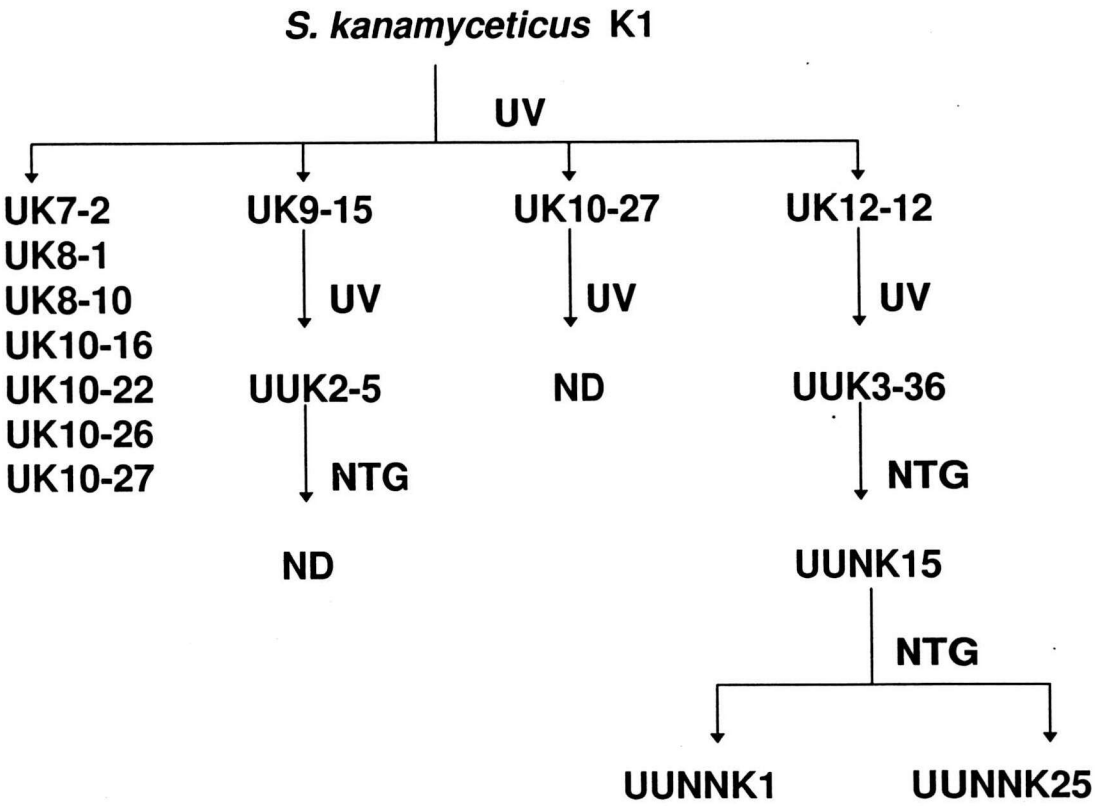
จากการนำสายพันธุ์กลายทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ UUNNK1, UUNNK25 และ UUNNK28 ที่ได้จากการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-5 มาเลี้ยงในอาหารเหลว เคพีเอ็มบี โดยทำการทดลองเช่นเดียวกันกับการทดสอบขั้นทุติยภูมิ พร้อมทั้งการวัดปริมาณคานามัยซินที่สายพันธุ์กลายสังเคราะห์ได้ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น K1 และ UUNK15 ได้ผลดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 การทดสอบความเสถียรของสายพันธุ์กลาย UUNNK1, UUNNK25 และ UUNNK28 ในการสังเคราะห์ คานามัยซิน

สายพันธุ์กลาย	ปริมาณคานามัยซิน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)				
	การทดสอบความเสถียร ครั้งที่ 1	การทดสอบความเสถียร ครั้งที่ 2	การทดสอบความเสถียร ครั้งที่ 3	การทดสอบความเสถียร ครั้งที่ 4	การทดสอบความเสถียร ครั้งที่ 5
K1	15	13	13	15	13
UUNK15	130	120	120	130	130
UUNNK1	160	160	180	170	160
UUNNK25	160	130	140	170	150
UUNNK28	160	100	130	75	100

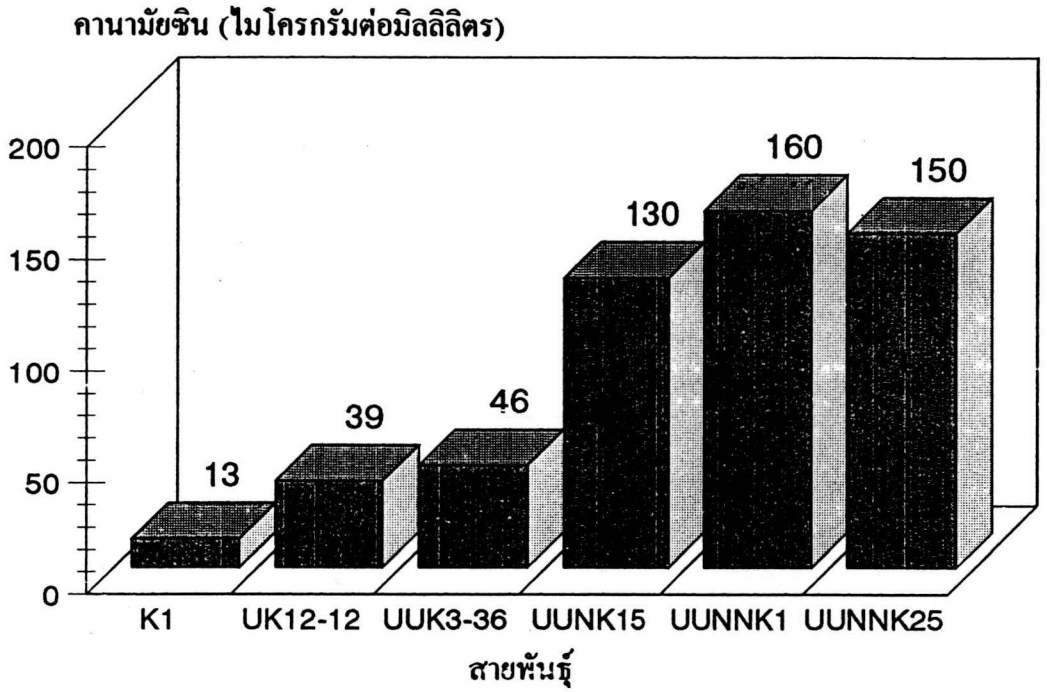
พบว่าสายพันธุ์กลายที่มีความเสถียรและสังเคราะห์คานามัยซินได้มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น K1 และ UUNK15 ซึ่งสังเคราะห์คานามัยซินได้ 13 และ 130 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์กลาย UUNNK1 ซึ่งสังเคราะห์คานามัยซินได้ 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 12.3 และ 1.2 เท่าตามลำดับ และ สายพันธุ์กลาย UUNNK25 ซึ่งสังเคราะห์คานามัยซินได้ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 11.5 และ 1.2 เท่าตามลำดับ

สายพันธุ์กลายทั้ง 2 สายพันธุ์ข้างต้น คือ UUNNK1 และ UUNNK25 ได้มาจากการทำการกลายพันธุ์ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์ตั้งต้น K1 โดยการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 2 รอบ และ NTG 2 รอบ จนสามารถสังเคราะห์คานามัยซินได้ 160 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งสามารถสรุปขั้นตอนของการทำการกลายพันธุ์ และปริมาณคานามัยซินที่เพิ่มขึ้นของสายพันธุ์กลาย แต่ละขั้น ดังรูปที่ 18 และ 19



รูปที่ 18 ภาพแสดงขั้นตอนของการทำการกลายพันธุ์จากสายพันธุ์ตั้งต้น K1 จนได้สายพันธุ์กลาย UUNNK1 และ UUNNK25

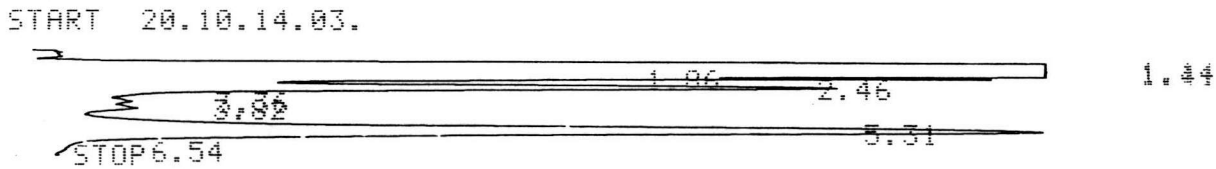
หมายเหตุ ND = ไม่ได้สายพันธุ์กลายที่ให้ปริมาณคานามัยซินมากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น



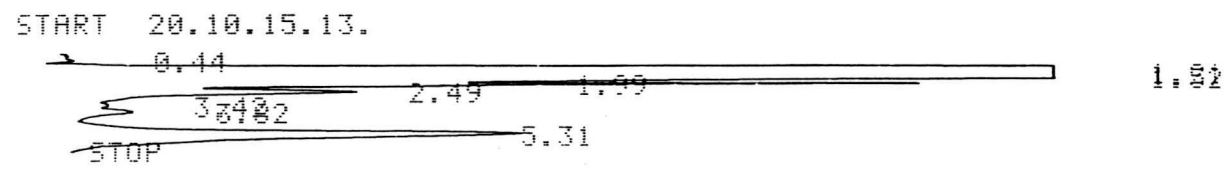
รูปที่ 19 แผนภูมิของปริมาณคานามัยซินที่สังเคราะห์ได้จาก *S. kanamyceticus* สายพันธุ์ตั้งต้น และสายพันธุ์กลาย

5. <u>การหาปริมาณคานามัยซิน ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (HPLC) ของสายพันธุ์ตั้งต้น K1 และสายพันธุ์กลาย UUNNK1, UUNNK25</u>

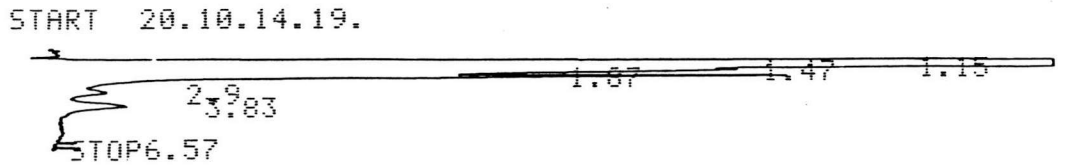
จากการนำตัวอย่างสายพันธุ์ตั้งต้น K1 และสายพันธุ์กลาย UUNNK1, UUNNK25 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว เคพีเอ็มบี เป็นเวลานาน 7 วัน ตามวิธีการทดลองในข้อ 4.3 มาแยกส่วนน้ำใส ออกจากเส้นใยด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง นำส่วนน้ำใส 100 ไมโครลิตรมาเตรียมตัวอย่าง ตามวิธีการทดลองในข้อ 5.2.1 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณคานามัยซิน ด้วยเครื่อง HPLC เปรียบเทียบกับคานามัยซิน เอ ซัลเฟต มาตรฐานความเข้มข้น 0, 512 และ 1500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามภาวะในวิธีการทดลองในข้อ 5.2 ได้ผลดังรูปที่ 20-25



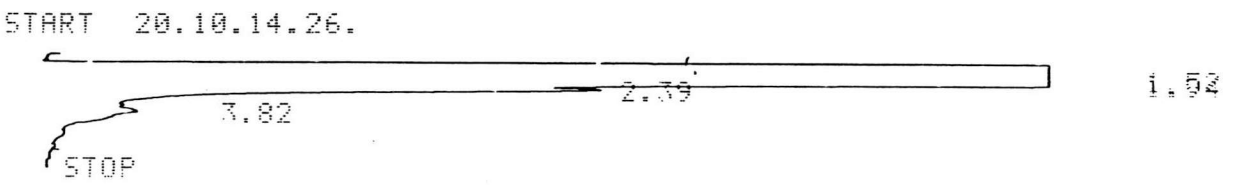
รูปที่ 20 ลักษณะโครมาโตแกรมของ คานามัยซิน เอ ซัลเฟต ปริมาณ 1500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



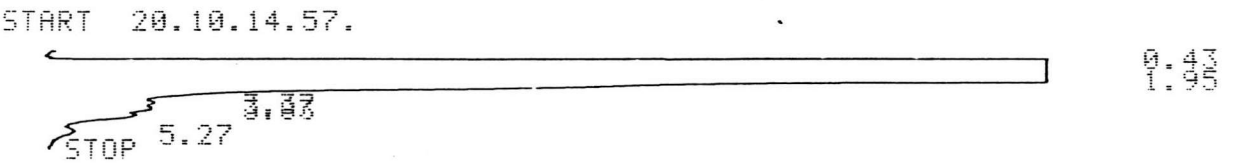
รูปที่ 21 ลักษณะโครมาโตแกรมของ คานามัยซิน เอ ซัลเฟต ปริมาณ 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



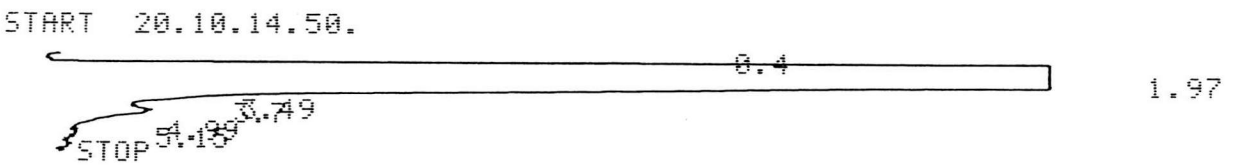
รูปที่ 22 ลักษณะโครมาโตแกรมของ คานามัยซิน เอ ซัลเฟต ปริมาณ 0 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 23 ลักษณะโครมาโตแกรมของ ปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ตั้งต้น K1



รูปที่ 24 ลักษณะโครมาโตแกรมของ ปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์กลาย UUNNK1

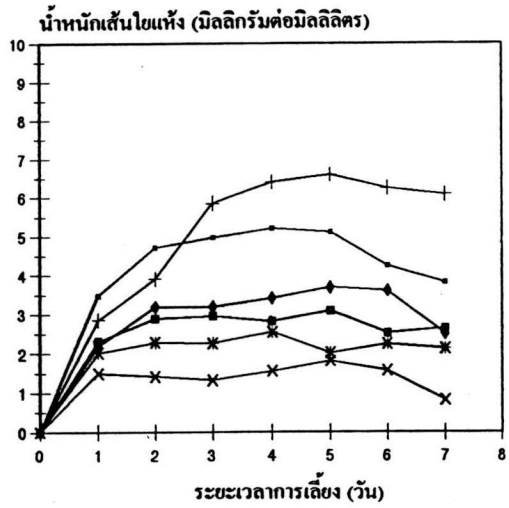


รูปที่ 25 ลักษณะโครมาโตแกรมของ ปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์กลาย UUNNK25

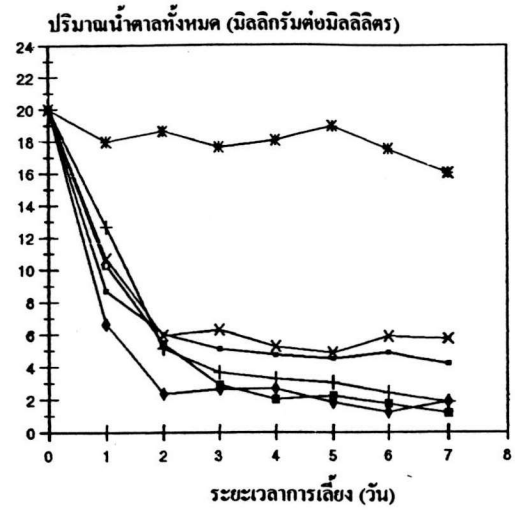
จากการหาปริมาณคานามัยซินที่สังเคราะห์โดยสายพันธุ์ตั้งต้น K1 และสายพันธุ์กลาย UUNNK1, UUNNK25 ด้วยวิธี HPLC ตามสภาวะในวิธีการทดลองในข้อ 5.2 นำโครมาโตรแกรมของสายพันธุ์ดังกล่าวทั้ง 3 (รูปที่ 23-25) มาเปรียบเทียบกับโครมาโตรแกรมของคานามัยซิน เอ ซัลเฟต มาตรฐาน เข้มข้น 1,500, 512 และ 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 20-22) ตามลำดับ พบว่าโครมาโตรแกรมของคานามัยซิน เอ ซัลเฟต มาตรฐาน เข้มข้น 1,500 และ 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าจะให้ส่วนประกอบ 2 ส่วนที่เหมือนกัน กล่าวคือ คานามัยซิน เอ ซัลเฟต มาตรฐาน เข้มข้น 1,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะให้แท่งกราฟ (peak)เด่นชัด ณ เวลา 2.46 และ 5.31 นาที โดยมีพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 89,974 และ 174,730 หน่วยตามลำดับ และคานามัยซิน เอ ซัลเฟต มาตรฐาน เข้มข้น 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะให้แท่งกราฟเด่นชัด ณ เวลาที่ใกล้เคียงกันคือ 2.49 และ 5.31 นาที โดยมีพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 36,453 และ 74,696 หน่วย ตามลำดับ ในขณะที่โครมาโตรแกรมของคานามัยซิน เอ ซัลเฟต มาตรฐาน ที่มีปริมาณ 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่พบแท่งกราฟปรากฏให้เห็น ณ เวลาดังกล่าวข้างต้น เช่นเดียวกับโครมาโครแกรมของสายพันธุ์ตั้งต้น K1 ไม่ปรากฏพื้นที่ใต้กราฟ ณ เวลา ดังกล่าวทั้ง 2 (รูปที่ 22) เนื่องจากปริมาณของคานามัยซินที่สายพันธุ์ตั้งต้น K1 สังเคราะห์ได้มีปริมาณน้อยมากคือ 13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งน้อยเกินกว่าที่ HPLC จะตรวจวัดได้ ส่วนปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์กลาย UUNNK1 ที่วิเคราะห์ได้ 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (จากวิธีการทางจุลชีววิทยา) เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC จะมีพื้นที่ใต้กราฟปรากฏให้เห็น ณ เวลาที่ 5.27 นาที โดยมีพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 1,697 หน่วย (รูปที่ 24) และทำนองเดียวกันปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์กลาย UUNNK25 ที่สังเคราะห์ได้ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (จากวิธีการทางจุลชีววิทยา) จะมีพื้นที่ใต้กราฟปรากฏให้เห็น ณ เวลา 5.15 นาที โดยมีพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 957 หน่วย (รูปที่ 25)

6. <u>การศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนหลักบางชนิดในการสังเคราะห์คานามัยซิน ของสายพันธุ์ตั้งต้น K1 และสายพันธุ์กลาย UUNNK1, UUNNK25</u>

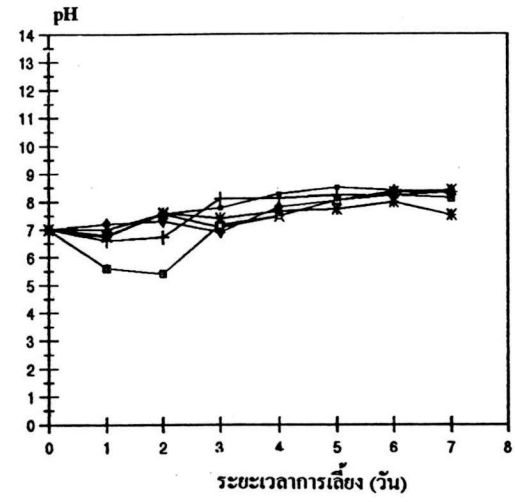
จากการศึกษาการสังเคราะห์คานามัยซิน เมื่อใช้ชนิดของแหล่งคาร์บอนหลักที่แตกต่างกันโดยได้นำสปอร์แขวนลอยของสายพันธุ์ตั้งต้น K1 และสายพันธุ์กลาย UUNNK1, UUNNK25 จำนวน $1x10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ที่เตรียมโดยวิธีการทดลองในข้อ 3.1 มาเลี้ยงในอาหารเหลวจีพีวาย ตามวิธีการทดลองในข้อ 4.1 แล้วนำหัวเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาเลี้ยงต่อในอาหารเหลว เคพีเอ็มบี ที่เปลี่ยนสูตรอาหารให้มีชนิดของแหล่งคาร์บอนหลัก แตกต่างกัน 6 ชนิด คือ แป้ง, มอลโตส, แลคโตส, กลูโคส, กาแลคโตส และกากน้ำตาล เข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน ตามวิธีการทดลองในข้อ 4.3 เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง ปั่นแยกเส้นใย และส่วนน้ำใสออกจากกัน โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง นำเส้นใยไปหาน้ำหนักแห้งเพื่อวัดอัตราการเจริญ ส่วนน้ำใสนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลทั้งหมด (ภาคผนวก ค) วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้เครื่องตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง และ วิเคราะห์หาปริมาณคานามัยซินด้วยวิธีการทางจุลชีววิทยาตามวิธีการทดลองในข้อ 5.1.2โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานคานามัยซิน เอ ซัลเฟต (ภาคผนวก ค) ได้ผลดังรูปที่ 26-32



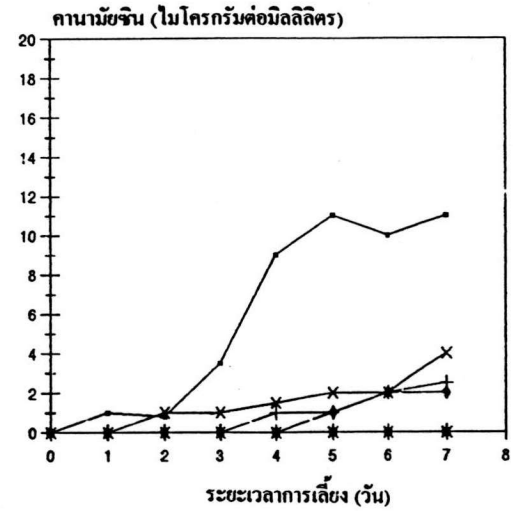
รูป ก



รูป ข



รูป ค



รูป ง

รูปที่ 26 กราฟแสดง น้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ตั้งต้น K1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว เคพีเอ็มบี ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ กัน

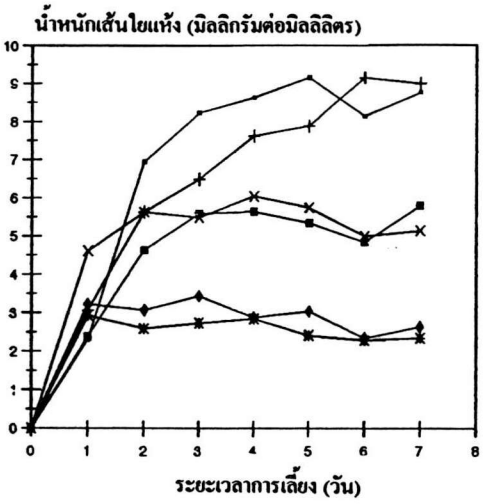
รูป ก แสดง น้ำหนักเส้นใยแห้ง รูป ข แสดง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

รูป ค แสดง ค่าความเป็นกรดด่าง รูป ง แสดง ปริมาณคานามัยซิน

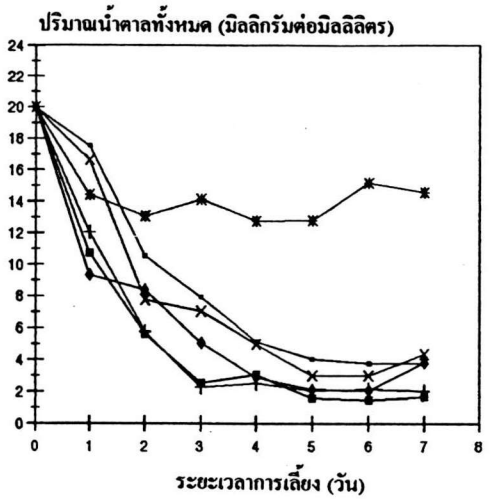
หมายถึง แป้ง หมายถึง มอลโตส

หมายถึง แลคโตส หมายถึง กลูโคส

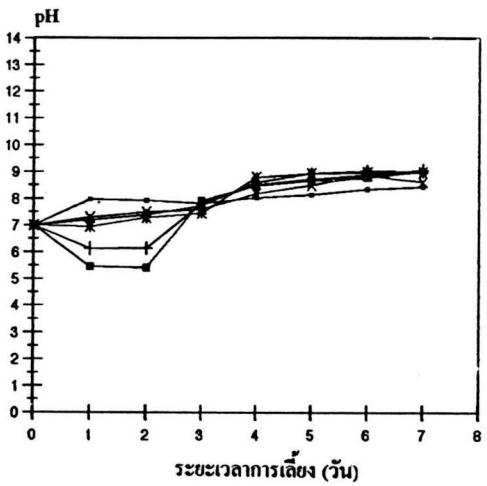
หมายถึง กาแลคโตส หมายถึง กากน้ำตาล



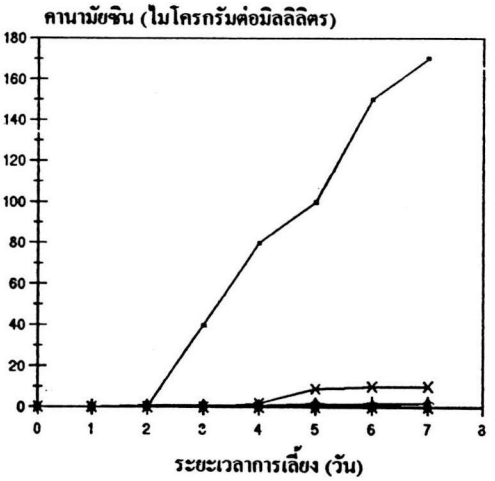
รูป ก



รูป ข



รูป ค



รูป ง

รูปที่ 27 กราฟแสดง น้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์กลาย UUNNK1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว เคพีเอ็มบี ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ กัน

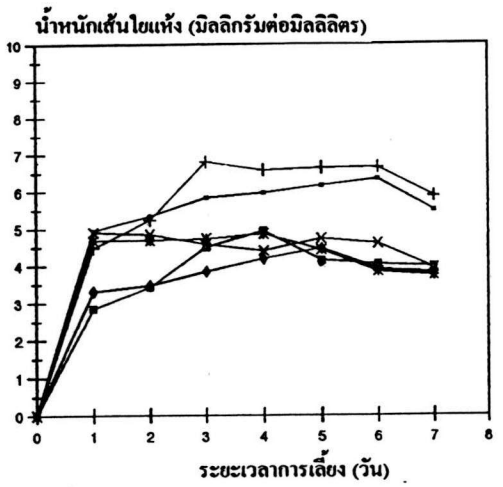
รูป ก แสดง น้ำหนักเส้นใยแห้ง รูป ข แสดง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

รูป ค แสดง ค่าความเป็นกรดด่าง รูป ง แสดง ปริมาณคานามัยซิน

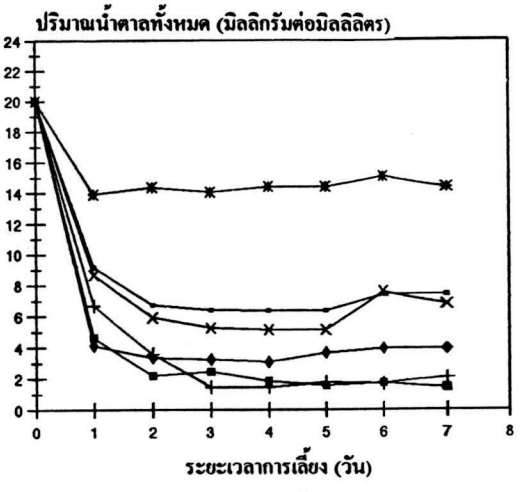
หมายถึง แป้ง หมายถึง มอลโตส

หมายถึง แลคโตส หมายถึง กลูโคส

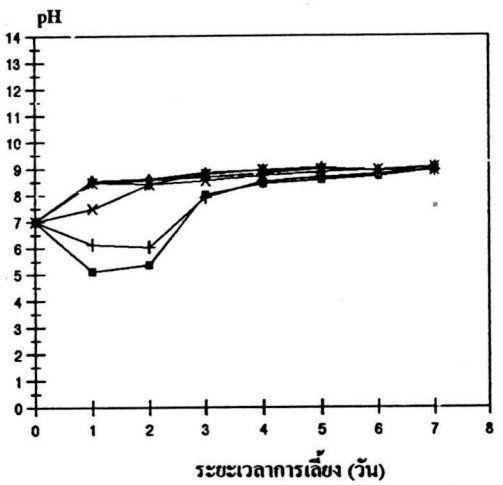
หมายถึง กาแลคโตส หมายถึง กากน้ำตาล



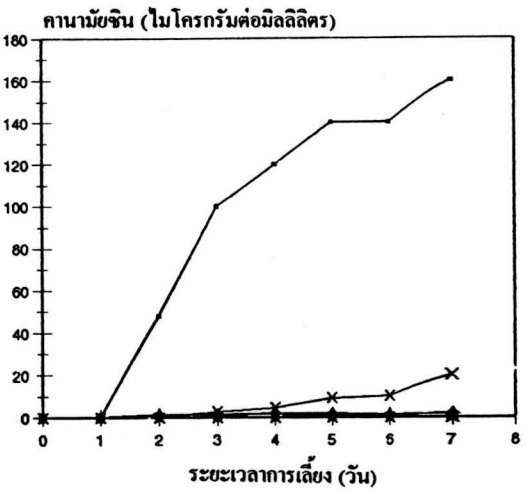
รูป ก



รูป ข



รูป ค



รูป ง

รูปที่ 28 กราฟแสดง น้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ค่าความเป็นกรด-ด่าง และ ปริมาณคานามัยซิน ของสายพันธุ์กลาย UUNNK25 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว เคพีเอ็มบี ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ กัน

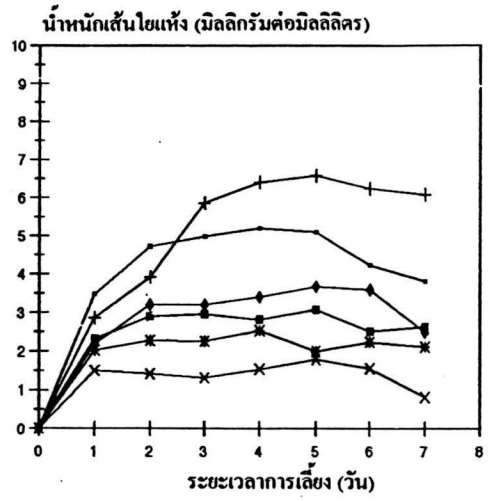
รูป ก แสดง น้ำหนักเส้นใยแห้ง รูป ข แสดง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

รูป ค แสดง ค่าความเป็นกรดด่าง รูป ง แสดง ปริมาณคานามัยซิน

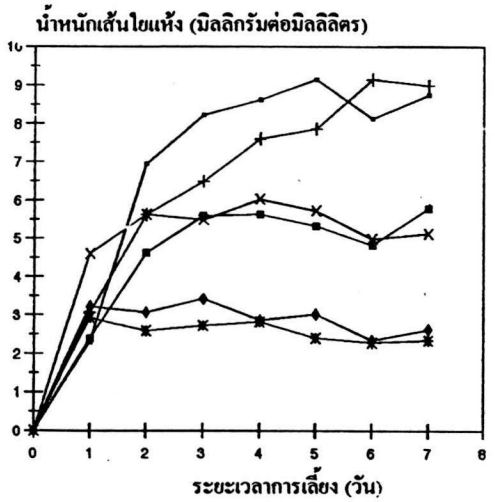
หมายถึง แป้ง หมายถึง มอลโตส

หมายถึง แลคโตส หมายถึง กลูโคส

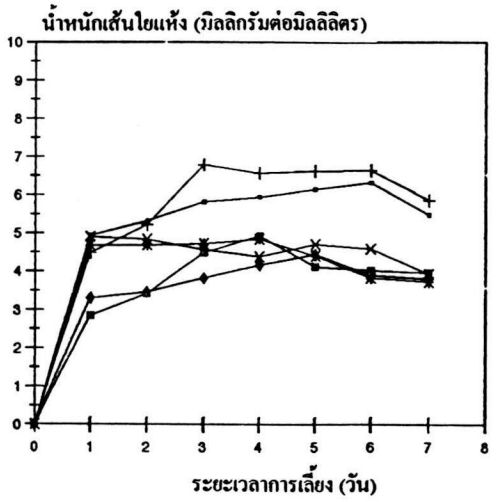
หมายถึง กาแลคโตส หมายถึง กากน้ำตาล



รูป ก



รูป ข



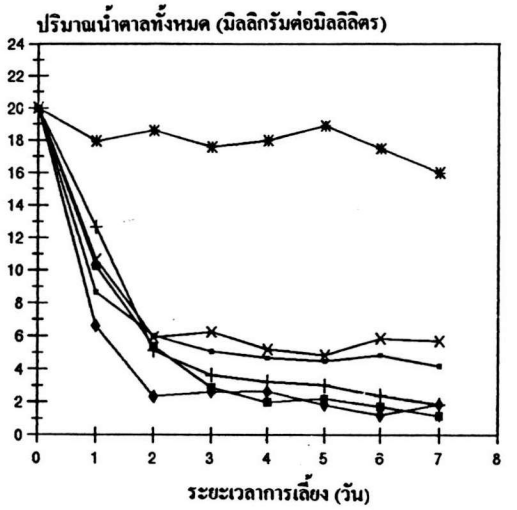
รูป ค

รูปที่ 29 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้งของสายพันธุ์ตั้งต้น K1 และสายพันธุ์กลาย UUNNK1, UUNNK25 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว เคพีเอ็มบี ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ กัน

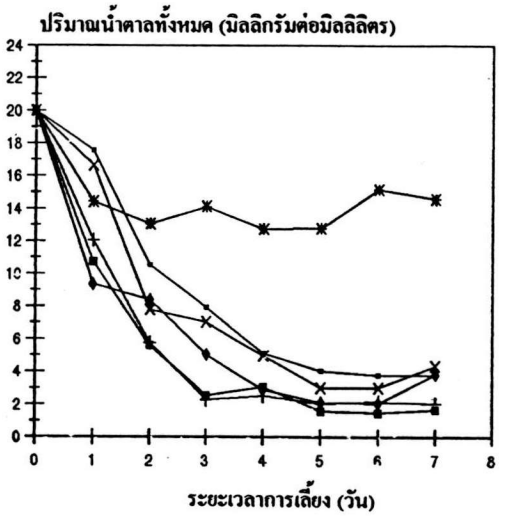
รูป ก แสดง สายพันธุ์ตั้งต้น K1 รูป ข แสดง สายพันธุ์กลาย UUNNK1

รูป ค แสดง สายพันธุ์กลาย UUNNK25

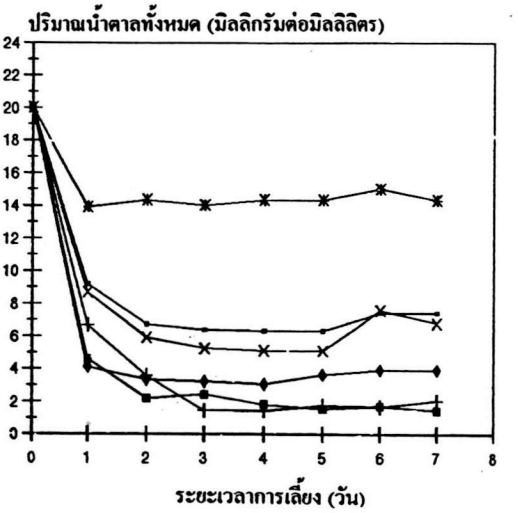
- หมายถึง แป้ง
- หมายถึง มอลโตส
- หมายถึง แลคโตส
- หมายถึง กลูโคส
- หมายถึง กาแลคโตส
- หมายถึง กากน้ำตาล



รูป ก



รูป ข



รูป ค

รูปที่ 30 กราฟแสดง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเหลว เคพีเอ็มบี ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ กัน ที่เพาะเลี้ยงสายพันธุ์ตั้งต้น K1 และสายพันธุ์กลาย UUNNK1, UUNNK25

รูป ก แสดง สายพันธุ์ตั้งต้น K1 รูป ข แสดง สายพันธุ์กลาย UUNNK1

รูป ค แสดง สายพันธุ์กลาย UUNNK25

หมายถึง แป้ง

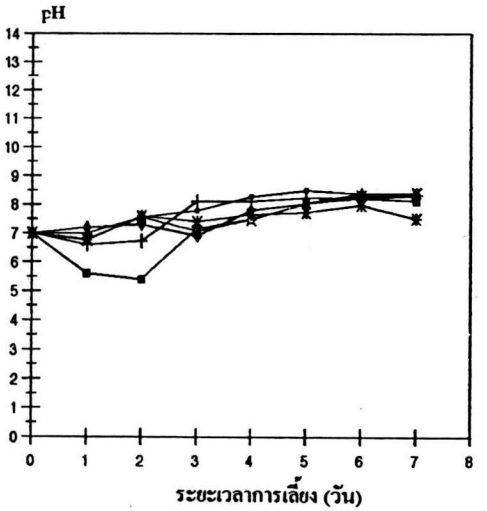
หมายถึง มอลโตส

หมายถึง แลคโตส

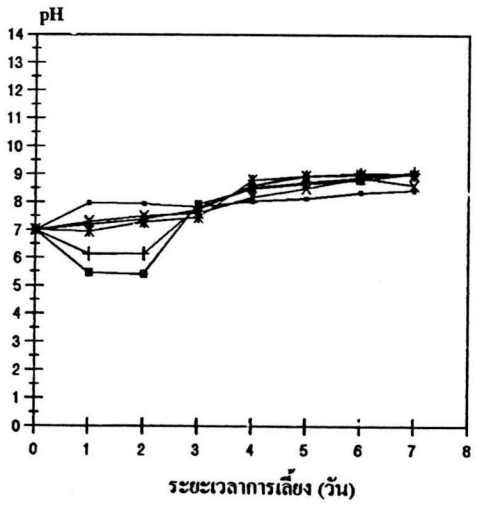
หมายถึง กลูโคส

หมายถึง กาแลคโตส

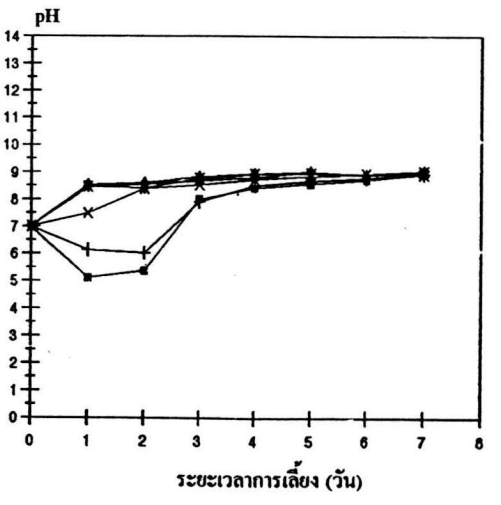
หมายถึง กากน้ำตาล



รูป ก



รูป ข



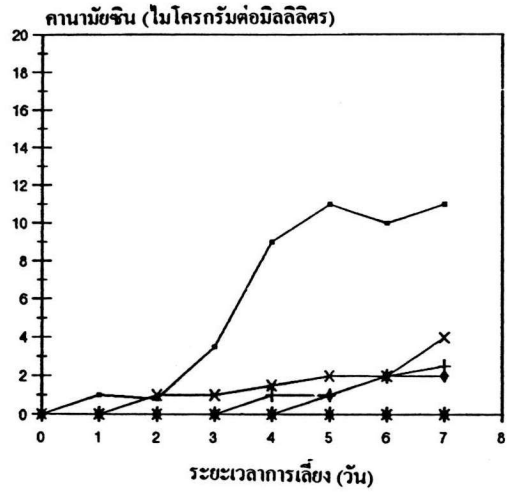
รูป ค

รูปที่ 31 กราฟแสดง ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเหลว เคพีเอ็มบี ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ กัน ที่เพาะเลี้ยงสายพันธุ์ตั้งต้น K1 และสายพันธุ์กลาย UUNNK1, UUNNK25

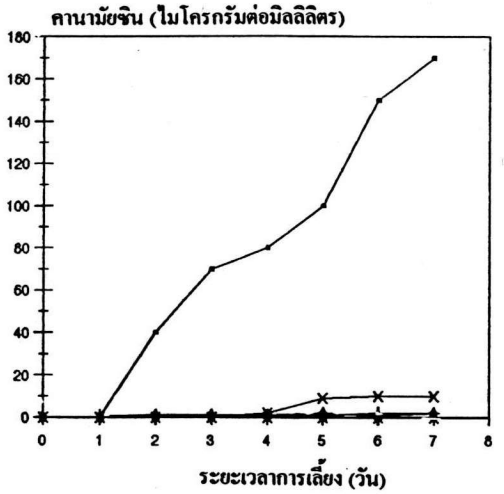
รูป ก แสดง สายพันธุ์ตั้งต้น K1 รูป ข แสดง สายพันธุ์กลาย UUNNK1

รูป ค แสดง สายพันธุ์กลาย UUNNK25

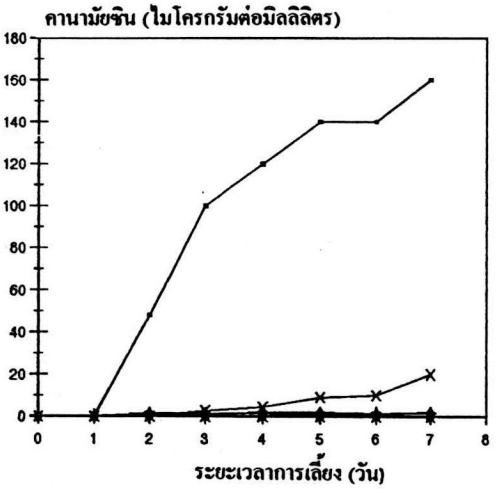
- หมายถึง แป้ง
- หมายถึง มอลโตส
- หมายถึง แลคโตส
- หมายถึง กลูโคส
- หมายถึง กาแลคโตส
- หมายถึง กากน้ำตาล



รูป ก



รูป ข



รูป ค

รูปที่ 32 กราฟแสดง ปริมาณคานามัยซิน ในอาหารเหลว เคพีเอ็มบี ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ กัน ที่เพาะเลี้ยงสายพันธุ์ตั้งต้น K1 และสายพันธุ์กลาย UUNNK1, UUNNK25

รูป ก แสดง สายพันธุ์ตั้งต้น K1 รูป ข แสดง สายพันธุ์กลาย UUNNK1

รูป ค แสดง สายพันธุ์กลาย UUNNK25

- หมายถึง แป้ง
- หมายถึง มอลโตส
- หมายถึง แลคโตส
- หมายถึง กลูโคส
- หมายถึง กาแลคโตส
- หมายถึง กากน้ำตาล

จากกราฟแสดง น้ำหนักเส้นใยแห้ง (รูปที่ 29) ชนิดของแหล่งคาร์บอนหลักที่ใช้ในการสร้างเส้นใย ได้ดีที่สุด คือ มอลโตส สามารถให้น้ำหนักเส้นใยแห้ง 6.58, 9.14 และ 6.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของสายพันธุ์ตั้งต้น K1 และสายพันธุ์กลาย UUNNK1, UUNNK25 ตามลำดับและนอกจากนี้สายพันธุ์กลาย UUNNK1 ยังสามารถนำแป้งไปใช้สร้างเส้นใยได้ เท่ากับมอลโตส

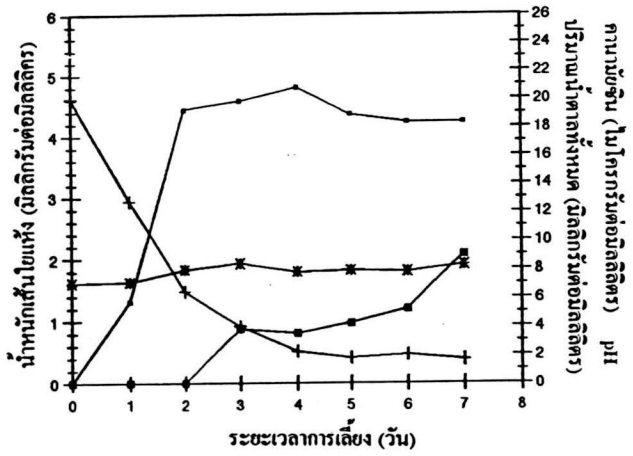
จากกราฟแสดง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (รูปที่ 30) ชนิดของแหล่งคาร์บอนหลักที่ถูกนำไปใช้ในการเจริญ และสังเคราะห์คานามัยซินของเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น และสายพันธุ์กลายได้มากที่สุดคือ มอลโตส และแป้ง จากที่มีปริมาณเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะถูกนำไปใช้จนเหลือปริมาณเฉลี่ยของทั้ง 3 สายพันธุ์ เท่ากับ 2.45 และ 6.46 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับในวันที่ 3 และจะค่อย ๆ ถูกใช้ไปจนสิ้นสุดการทดลอง แต่ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ถูกนำไปใช้น้อยที่สุดคือ แลคโตส โดยจะเหลือปริมาณเฉลี่ยของทั้ง 3 สายพันธุ์ เท่ากับ 15.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 และมีปริมาณคงที่จนสิ้นสุดการทดลอง

จากกราฟแสดง ค่าความเป็นกรด-ด่าง (รูปที่ 31) ค่าความเป็นกรด-ด่าง ในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี ตลอดการเพาะเลี้ยงเชื้อ จะมีค่าอยู่ระหว่าง 5.4-8.5, 5.4-9.0 และ 5.1-9.1 ของสายพันธุ์ตั้งต้น K1 และสายพันธุ์กลาย UUNNK1, UUNNK25 ตามลำดับ และค่าความเป็นกรด-ด่าง ในช่วงการสังเคราะห์คานามัยซิน จะมีค่าอยู่ระหว่าง 7.0-8.3, 7.9-8.4 และ 8.4-9.0 ในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี ที่มีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน ของสายพันธุ์ตั้งต้น K1 และสายพันธุ์กลาย UUNNK1, UUNNK25 ตามลำดับ

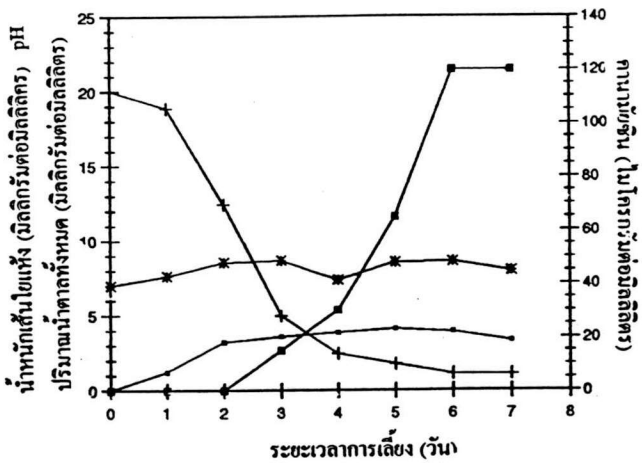
จากกราฟแสดง ปริมาณคานามัยซิน (รูปที่ 32) ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการสังเคราะห์คานามัยซิน ได้ดีที่สุดคือ แป้ง ซึ่งให้ปริมาณคานามัยซิน เท่ากับ 11, 170 และ 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสายพันธุ์ตั้งต้น K1 และสายพันธุ์กลาย UUNNK1, UUNNK25 ตามลำดับ และชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ไม่เหมาะสมในการนำมาใช้สังเคราะห์คานามัยซิน คือ แลคโตส

7. การทดสอบการสังเคราะห์คานามัยซินของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์ตั้งต้น K1 กับสายพันธุ์กลาย UUNNK1 และ UUNNK25 ที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส

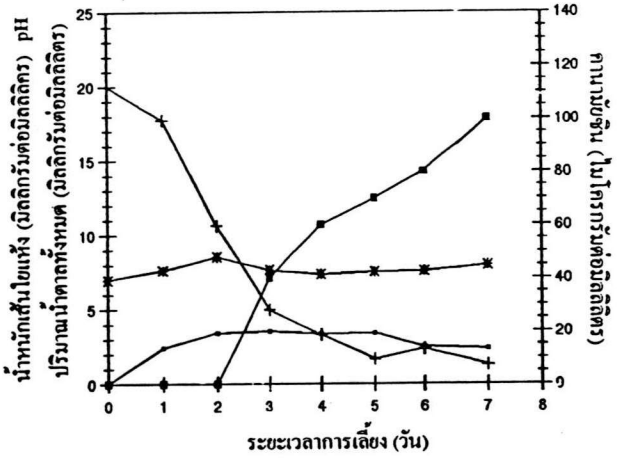
จากการนำสปอร์แขวนลอยของสายพันธุ์ตั้งต้น K1 และสายพันธุ์กลาย UUNNK1, UUNNK25 จำนวน $1x10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเหลว จีพีวาย แล้วนำหัวเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาเลี้ยงต่อในอาหารเหลว เคพีเอ็มบี โดยแยกเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปปั่นแยกเส้นใยออกจากส่วนน้ำใส นำเส้นใยที่แยกได้ไปหาน้ำหนักเส้นใยแห้งเพื่อวัดอัตราการเจริญ ส่วนน้ำใสที่แยกได้มาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลทั้งหมด (ภาคผนวก ค) วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้เครื่องตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง และวิเคราะห์หาปริมาณคานามัยซินด้วยวิธีการทางจุลชีววิทยา ตามวิธีการทดลองในข้อ 5.1.2 โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานคานามัยซิน เอ ซัลเฟต (ภาคผนวก ค) ได้ผลดังตารางที่ 17-18 และรูปที่ 33-34



รูป ก



รูป ข



รูป ค

รูปที่ 33 กราฟเปรียบเทียบ น้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ค่าความเป็นกรด-ด่าง และ ปริมาณคานามัยซิน ของสายพันธุ์ตั้งต้น K1 และสายพันธุ์กลาย UUNNK1, UUNNK25 ในอาหารเหลว เคพีเอ็มบี ซึ่งบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

รูป ก แสดง การบ่มเลี้ยงสายพันธุ์ตั้งต้น K1

รูป ข แสดง การบ่มเลี้ยงสายพันธุ์กลาย UUNNK1

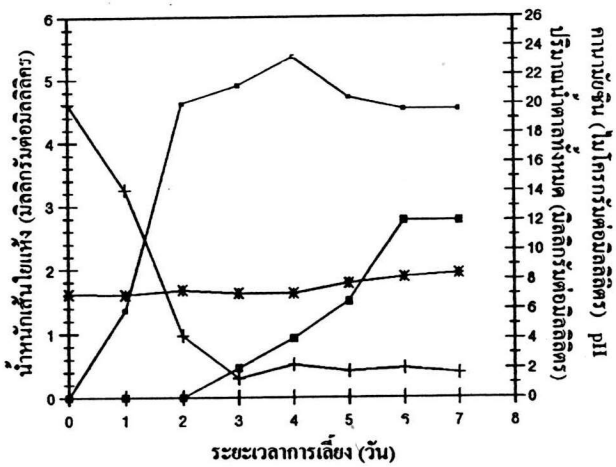
รูป ค แสดง การบ่มเลี้ยงสายพันธุ์กลาย UUNNK25

—●— หมายถึง น้ำหนักเส้นใยแห้ง —+— หมายถึง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

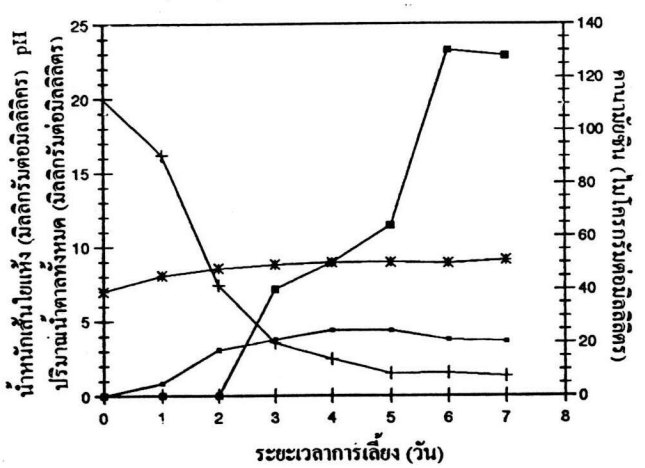
—✳— หมายถึง ค่าความเป็นกรดด่าง —■— หมายถึง ปริมาณคานามัยซิน

ตารางที่ 17 เปรียบเทียบ น้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณคานามัยซิน ของสายพันธุ์ดั้งต้น K1 และสายพันธุ์กลาย UUNNK1, UUNNK25 ในอาหารเหลว เคพีเอ็มบี ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

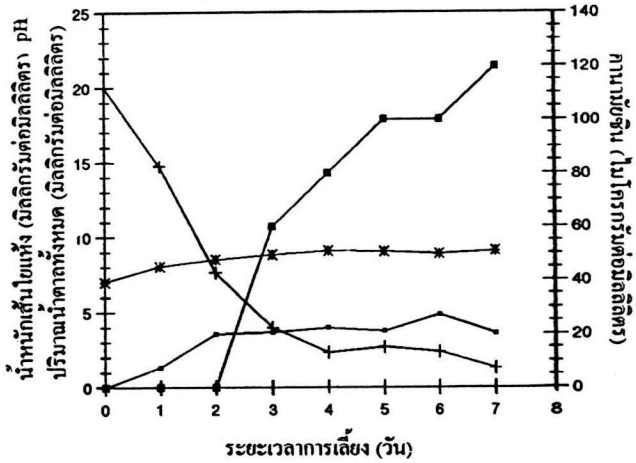
ผลการทดลอง	*S. kanamyceticus* สายพันธุ์		
	K1	UUNNK1	UUNNK25
1. น้ำหนักเส้นใยแห้ง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	4.80	4.10	3.60
2. ระยะเวลาการเจริญ ในช่วงล็อคเฟส (ชั่วโมง)	48	48	48
3. ค่าความเป็นกรด-ด่างตลอดระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ	7.0-8.4	7.0-8.7	7.0-8.5
4. ค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วงสังเคราะห์คานามัยซิน	7.8-8.4	7.4-8.7	7.7-8.5
5. ปริมาณคานามัยซินที่สังเคราะห์ได้ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	9	120	100
6. อายุของเชื้อ เมื่อเริ่มสังเคราะห์คานามัยซิน (ชั่วโมง)	48	48	48



รูป ก



รูป ข



รูป ค

รูปที่ 34 กราฟเปรียบเทียบ น้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ค่าความเป็นกรด-ด่าง และ ปริมาณคานามัยซิน ของสายพันธุ์ตั้งต้น K1 และสายพันธุ์กลาย UUNNK1, UUNNK25 ในอาหารเหลว เคพีเอ็มบี ซึ่งบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

รูป ก แสดง การบ่มเลี้ยงสายพันธุ์ตั้งต้น K1

รูป ข แสดง การบ่มเลี้ยงสายพันธุ์กลาย UUNNK1

รูป ค แสดง การบ่มเลี้ยงสายพันธุ์กลาย UUNNK25

—●— หมายถึง น้ำหนักเส้นใยแห้ง —+— หมายถึง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

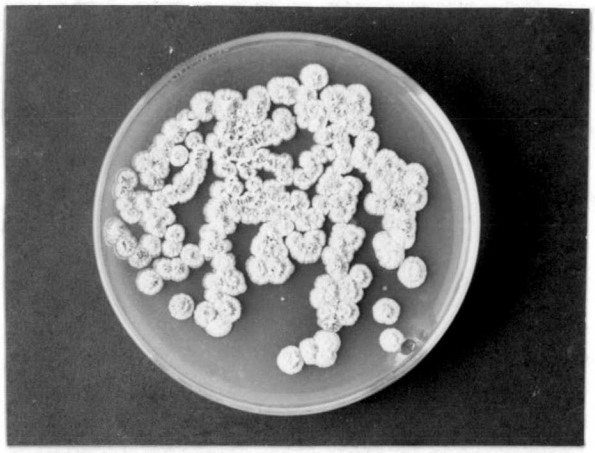
—✳— หมายถึง ค่าความเป็นกรดด่าง —■— หมายถึง ปริมาณคานามัยซิน

ตารางที่ 18 เปรียบเทียบ น้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณคานามัยซิน ของสายพันธุ์ตั้งต้น K1 และสายพันธุ์กลาย UUNNK1, UUNNK25 ในอาหารเหลว เคพีเอ็มบี ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

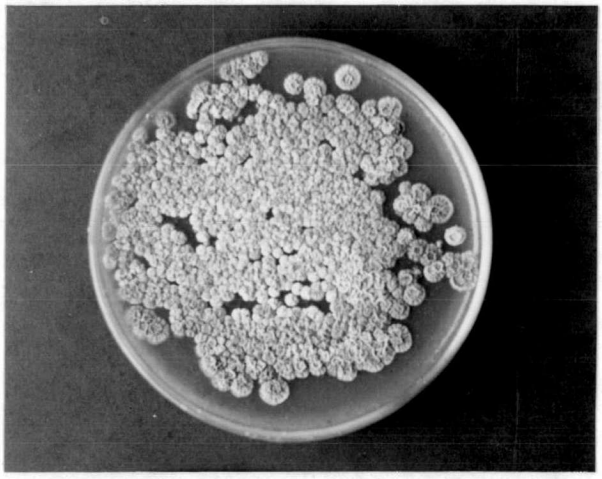
ผลการทดลอง	*S. kanamyceticus* สายพันธุ์		
	K1	UUNNK1	UUNNK25
1. น้ำหนักเส้นใยแห้ง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	5.36	4.40	4.84
2. ระยะเวลาการเจริญ ในช่วงล็อคเฟส (ชั่วโมง)	48	48	48
3. ค่าความเป็นกรด-ด่างตลอดระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ	7.0-8.4	7.0-9.1	7.0-9.1
4. ค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วงสังเคราะห์คานามัยซิน	7.1-8.4	8.8-9.1	8.8-9.1
5. ปริมาณคานามัยซินที่สังเคราะห์ได้ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	12	130	120
6. อายุของเชื้อ เมื่อเริ่มสังเคราะห์คานามัยซิน (ชั่วโมง)	48	48	48

8. <u>การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสายพันธุ์ตั้งต้น K1 และ สายพันธุ์กลาย UUNNK1, UUNNK25</u>

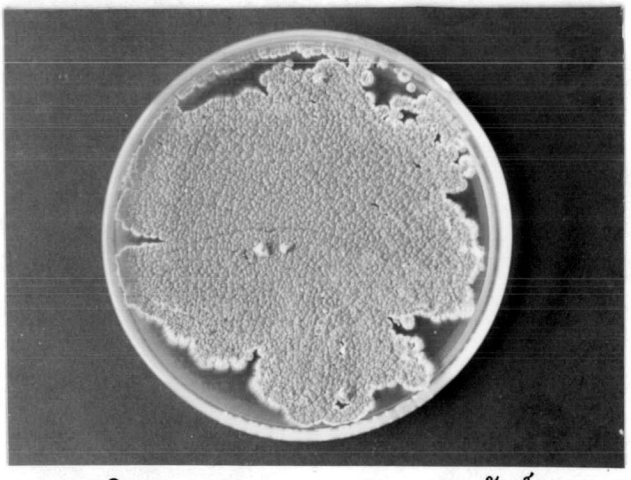
เมื่อนำเส้นใย และสปอร์ของสายพันธุ์ตั้งต้น K1 และสายพันธุ์กลาย UUNNK1, UUNNK25 มาเลี้ยงบนอาหารวุ้น เอ็มเอส ที่อยู่ในจานเพาะเชื้อ และอยู่บนแผ่นสไลด์ (slide culture) ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.1 เป็นเวลา 7-10 วัน จนเชื้อเจริญเต็มที่ และสร้างสปอร์ นำสายพันธุ์ตั้งต้น และสายพันธุ์กลายทั้ง 2 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยดูด้วยตาเปล่า ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทั้งชนิดสเตอริโอไมโครสโคป (sterio microscope) และไลท์ไมโครสโคป (light microscope) และด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด ซึ่งจะให้ลักษณะดังรูปที่ 35-46



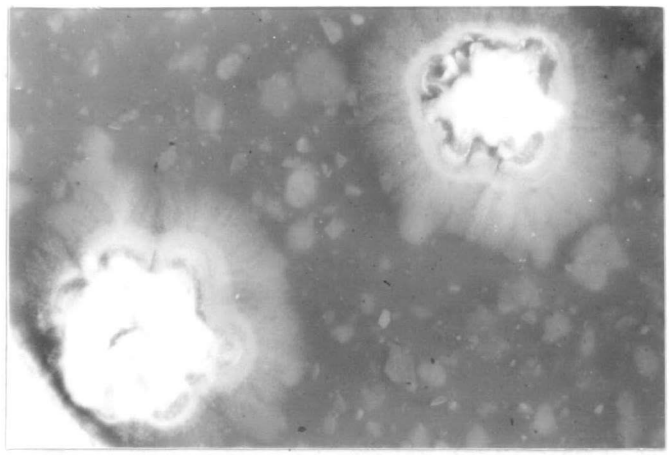
รูปที่ 35 ลักษณะการเจริญของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์ตั้งต้น K1 บนอาหารวุ้น เอ็มเอส



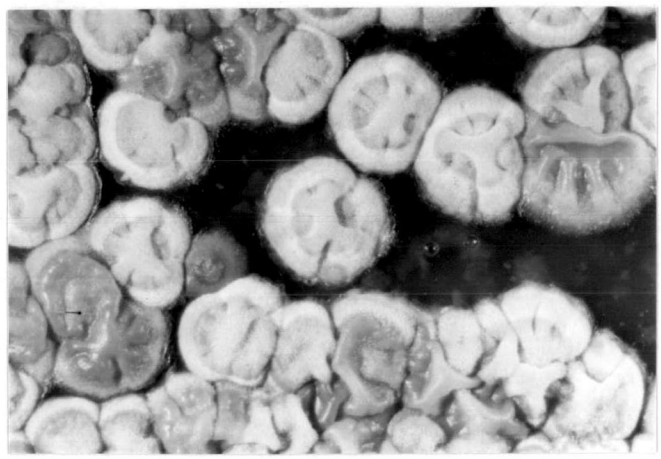
รูปที่ 36 ลักษณะการเจริญของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์กลาย UUNNK1 บนอาหารวุ้น เอ็มเอส



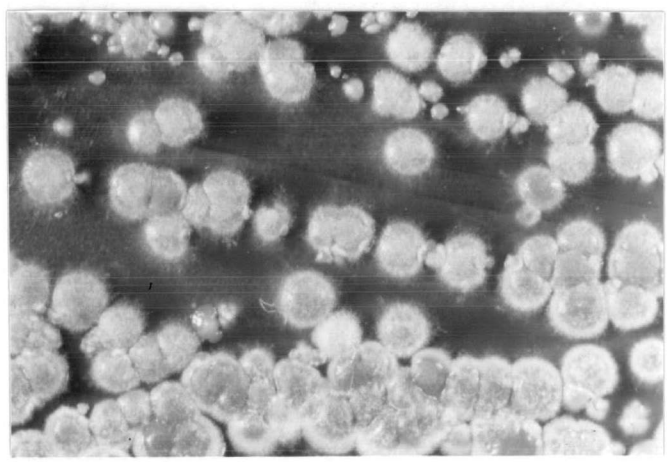
รูปที่ 37 ลักษณะการเจริญของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์กลาย UUNNK25 บนอาหารวุ้น เอ็มเอส



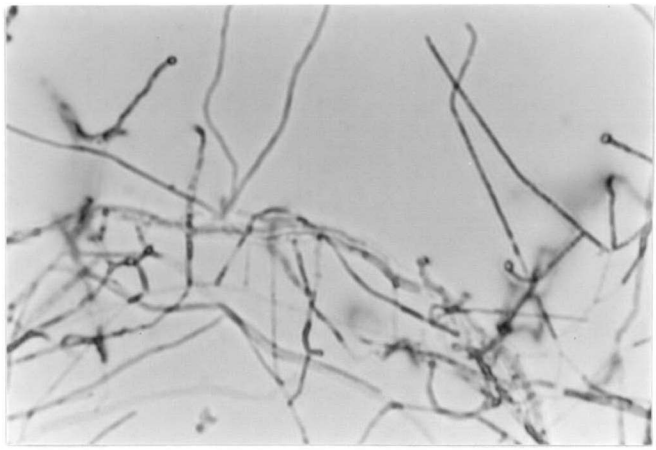
รูปที่ 38 ลักษณะโคโลนีของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์ตั้งต้น K1
ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคป กำลังขยาย 9 เท่า



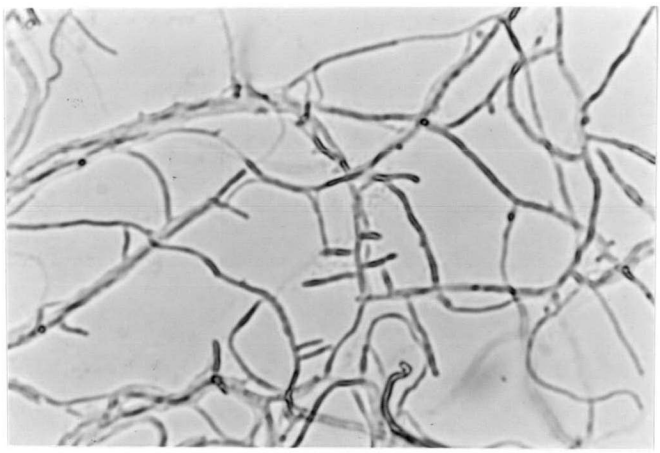
รูปที่ 39 ลักษณะโคโลนีของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์กลาย UUNNK1
ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคป กำลังขยาย 6.7 เท่า



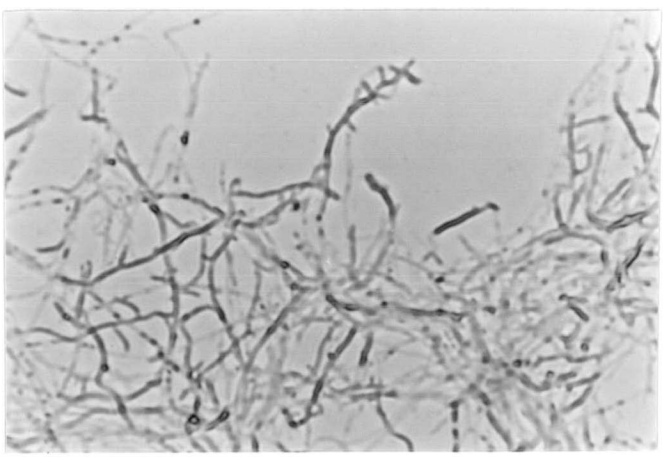
รูปที่ 40 ลักษณะโคโลนีของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์กลาย UUNNK25
ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคป กำลังขยาย 6.7 เท่า



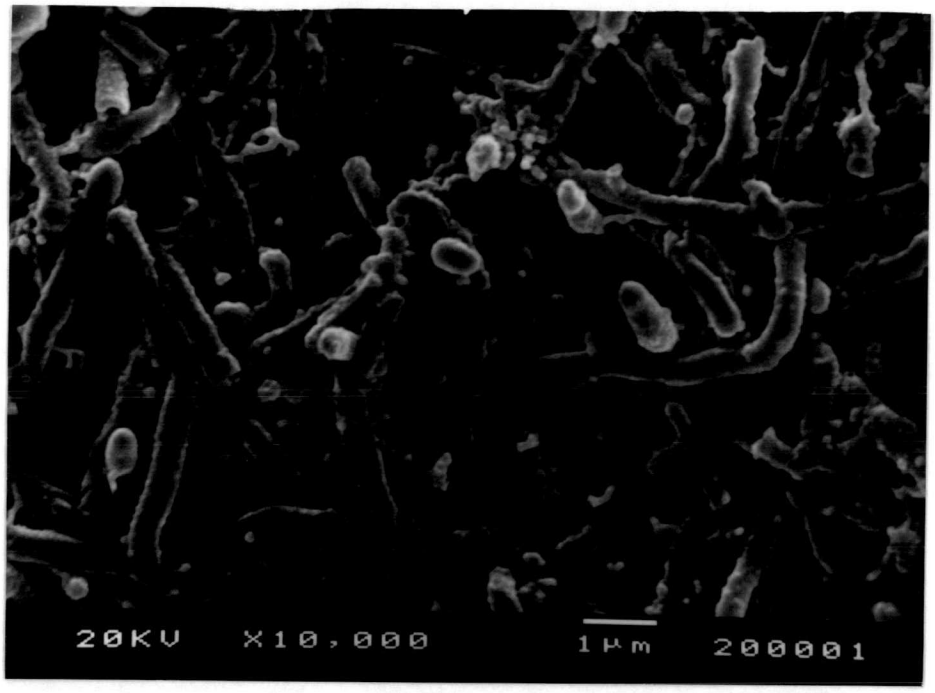
รูปที่ 41 ลักษณะเส้นใย และสปอร์ของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์ตั้งต้น K1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ไลท์ไมโครสโคป กำลังขยาย 1,000 เท่า



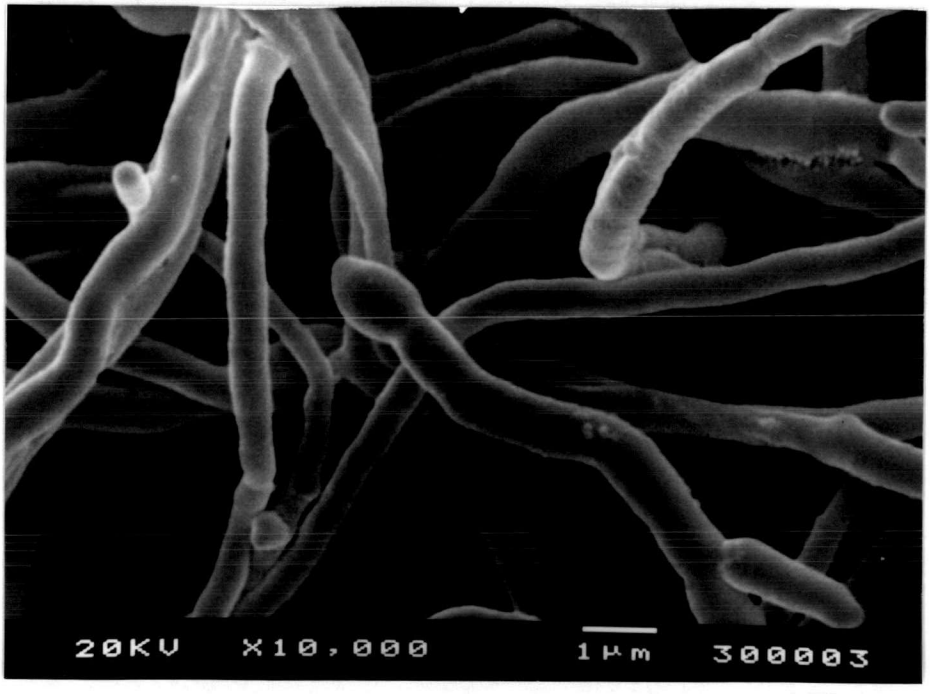
รูปที่ 42 ลักษณะเส้นใย และสปอร์ของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์กลาย UUNNK1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ไลท์ไมโครสโคป กำลังขยาย 1,000 เท่า



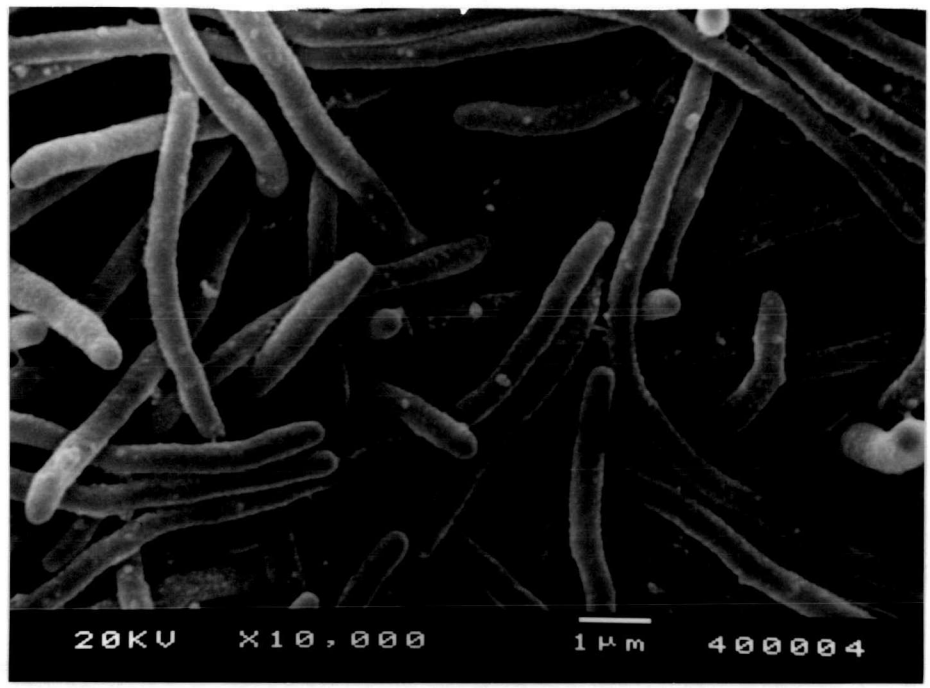
รูปที่ 43 ลักษณะเส้นใย และสปอร์ของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์กลาย UUNNK25 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ไลท์ไมโครสโคป กำลังขยาย 1,000 เท่า



รูปที่ 44 ลักษณะเส้นใย และสปอร์ของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์ตั้งต้น K1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด กำลังขยาย 10,000 เท่า



รูปที่ 45 ลักษณะเส้นใย และสปอร์ของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์กลาย UUNNK1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด กำลังขยาย 10,000 เท่า



รูปที่ 46 ลักษณะเส้นใย และสปอร์ของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์กลาย UUNNK25 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด กำลังขยาย 10,000 เท่า

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสายพันธุ์ตั้งต้น K1 พบว่า โคโลนีมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ขอบโคโลนีมีลักษณะหยักเป็นคลื่น ผิวหน้าไม่เรียบ โคโลนีมีสีน้ำตาล เส้นใยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ไมโครเมตร เส้นใยมีสีขาว ลักษณะฟูหนาเจริญปกคลุมทั่วโคโลนี พบเส้นใยที่เจริญเข้าไปในผิวอาหารวุ้น ผิวของเส้นใยไม่เรียบ เส้นใยแตกแขนงมาก ไม่พบผนังกั้นระหว่างเซลล์ (septate) สปอร์มีลักษณะกลมรีจะอยู่ที่ปลายเส้นใย

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสายพันธุ์กลาย UUNNK1 พบว่า โคโลนีมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร ขอบโคโลนีมีลักษณะหยักเป็นคลื่น ผิวหน้าไม่เรียบ โคโลนีมีสีน้ำตาล เส้นใยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.9 ไมโครเมตร เส้นใยมีสีขาว ลักษณะฟูหนาเจริญปกคลุมทั่วโคโลนี แต่ไม่ฟูหนาเท่าสายพันธุ์ตั้งต้น K1 พบเส้นใยที่เจริญเข้าไปในผิวอาหารวุ้นน้อยกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น K1 ผิวของเส้นใยเรียบ เส้นใยแตกแขนงน้อย ไม่พบผนังกั้นระหว่างเซลล์ สปอร์มีลักษณะกลมรี จะอยู่ที่ปลายเส้นใย

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสายพันธุ์กลาย UUNNK25 พบว่า โคโลนีมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร ขอบโคโลนีมีลักษณะหยักเป็นคลื่น ผิวหน้าเรียบ โคโลนีมีสีน้ำตาล เส้นใยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ไมโครเมตร เส้นใยมีสีขาว เจริญปกคลุมทั่วโคโลนีบาง ๆ พบเส้นใยที่เจริญเข้าไปในผิวอาหารวุ้นน้อย ผิวของเส้นใยเรียบ เส้นใยแตกแขนงน้อย ไม่พบผนังกั้นระหว่างเซลล์ สปอร์มีลักษณะกลมรี จะอยู่ที่ปลายเส้นใย