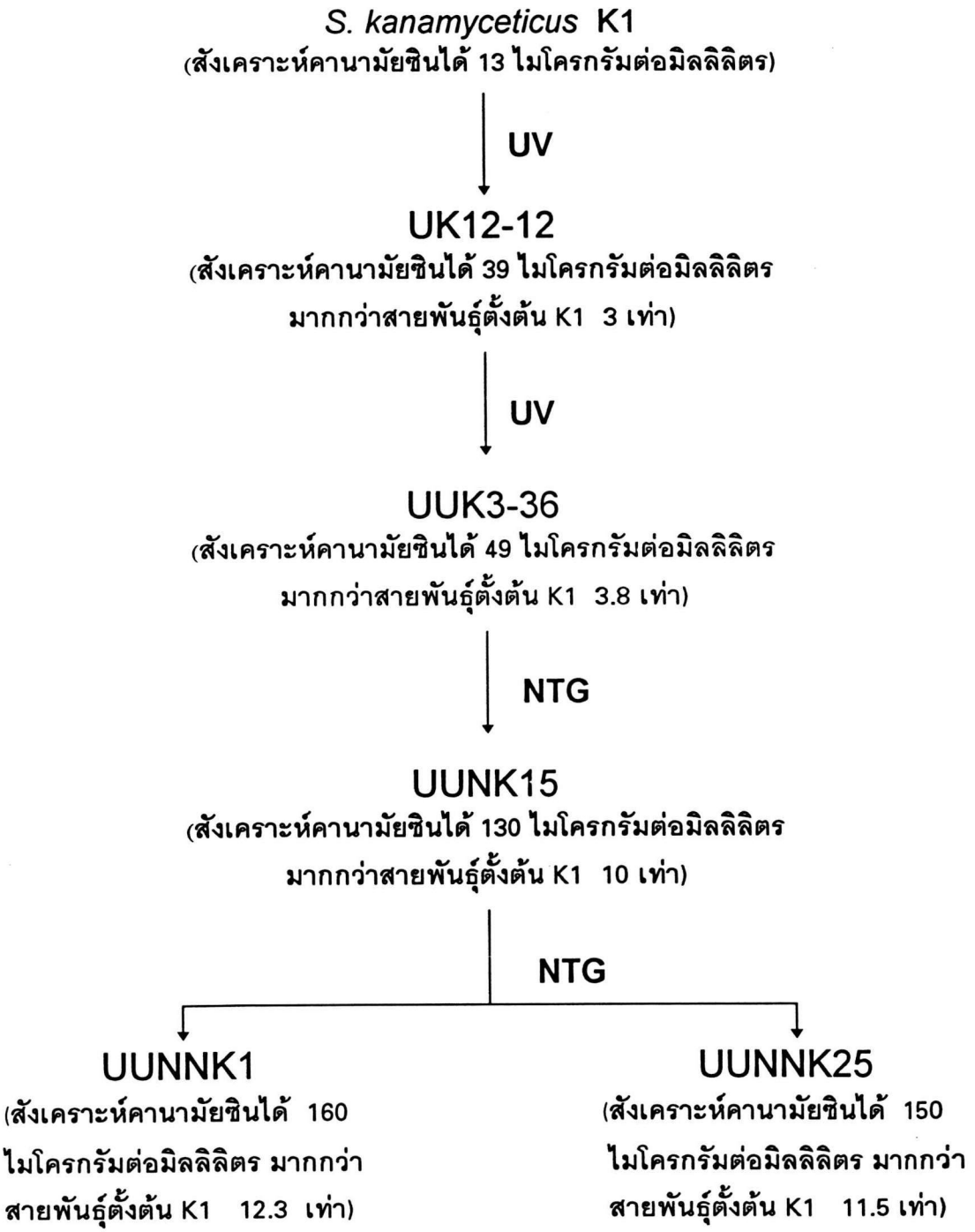
บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ มีจุดมุ่งหมายในการปรับปรุงสายพันธุ์ *S. kanamyceticus* K1 ซึ่งสามารถสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ คานามัยซิน โดยการทดสอบการสังเคราะห์คานามัยซิน ด้วยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า เคพีเอ็มบี ซึ่งเป็นอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดการสังเคราะห์คานามัยซินได้ (Umezawa et al., 1960) พบว่าสายพันธุ์นี้สามารถสังเคราะห์คานามัยซินได้ 13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามวิธีทดสอบทางจุลชีววิทยา (Code of ferderal regulation, title 21, 1987) การปรับปรุงสายพันธุ์ในงานวิจัยนี้ ใช้สิ่งชักนำการเกิดกลายพันธุ์ 2 ชนิด คือ แสงอัลตราไวโอเลต และ NTG เพราะการใช้สารชักนำการเกิดกลายพันธุ์หลาย ๆ ชนิดร่วมกัน จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงบนสารพันธุกรรมได้หลายรูปแบบ ได้สายพันธุ์กลายที่มีสารพันธุกรรมแตกต่างไปจากสายพันธุ์ตั้งต้นมากขึ้น ทำให้มีโอกาสเกิดการกลายพันธุ์กลับ (reverse mutation) ไปมีสารพันธุกรรมเหมือนกับสายพันธุ์ตั้งต้นน้อยลง (Wagner et al., 1980)

จากการทำการกลายพันธุ์ *S. kanamyceticus* K1 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต 2 รอบ และ NTG 2 รอบ ทำให้ได้สายพันธุ์กลาย UUNNK1 และ UUNNK25 ซึ่งสามารถสังเคราะห์คานามัยซินได้ 160 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น K1 12.3 และ 11.5 เท่า ตามลำดับ โดยมีลำดับการกลายพันธุ์ดังรูปที่ 47



รูปที่ 47 การลำดับขั้นตอนการกลายพันธุ์ *S. kanamyceticus* K1 ด้วย แสงอัลตราไวโอเลต และ NTG ได้สายพันธุ์กลาย UUNNK1 และ UUNNK25

การที่สายพันธุ์กลาย UUNNK1 และ UUNNK25 สามารถสังเคราะห์คานามัยซินได้เพิ่มมากขึ้น อาจเป็นเพราะแสงอัลตราไวโอเลต และ NTG ไปทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงบนสารพันธุกรรมหรือยีน ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการสังเคราะห์คานามัยซิน จึงมีผลให้เกิดการสังเคราะห์คานามัยซินได้มากขึ้น โดยการเปลี่ยนแปลงนี้อาจจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยในแต่ละขั้นตอนของการกลายพันธุ์ เมื่อทำการกลายพันธุ์ต่อไปอีกหลาย ๆ รอบ อาจจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมเพิ่มมากขึ้น ทำให้การสังเคราะห์คานามัยซินได้มากขึ้นตามลำดับในสายพันธุ์กลายรุ่นต่อ ๆ มา ดังรูปที่ 47 การใช้ NTG มาปรับปรุงสายพันธุ์ *S. kanamyceticus* เพื่อให้ได้สายพันธุ์กลายที่สามารถสังเคราะห์คานามัยซินได้เพิ่มขึ้นนี้ เคยมีรายงานของ Zhao และคณะ (1980) ได้ทำการกลายพันธุ์ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์ K59-75 โดยการชักนำด้วย NTG ในฟอสเฟตบัปเฟอร์ pH 6.0 ที่มีความเข้มข้นของ NTG 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ได้สายพันธุ์กลาย 2 สายพันธุ์ คือ K-102 และ K-41 ซึ่งสามารถสังเคราะห์คานามัยซินเพิ่มมากขึ้นเป็น 26% และ 43.68% ของสายพันธุ์ K59-75 ตามลำดับ การใช้แสงอัลตราไวโอเลต ร่วมกับ NTG มาปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อให้ได้สายพันธุ์กลายที่สามารถสังเคราะห์สารปฏิชีวนะได้เพิ่มขึ้น มีโอกาสจะได้สายพันธุ์กลายสูง และนิยมทำกันมาก เช่น Johdo และคณะ (1991) ทำการกลายพันธุ์ *S. violaceus* A262 ด้วย NTG ร่วมกับ แสงอัลตราไวโอเลต นอกจากได้ *S. violaceus* สายพันธุ์กลาย SC-7 ที่สามารถสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ แอนทราไซคลิน (anthracycline) ได้เพิ่มมากขึ้นแล้วยังได้ สายพันธุ์กลาย SUC-730, SE2-2385, SE2-2385-A1 ที่สังเคราะห์สารปฏิชีวนะชนิดใหม่ คือ อีพิลมัยซิน (epelmycin) โอเบลมัยซิน (obelmycin) และ อัลดิมัยซิน (alldimycin) ตามลำดับ

ขั้นตอนการคัดเลือกสายพันธุ์กลายขั้นปฐมภูมิ ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา ของงานวิจัยนี้เลือกใช้วิธีการเลี้ยงเชื้อบนอาหารวุ้น เคพีเอ็มเอ ซึ่งชักนำการสังเคราะห์คานามัยซิน เป็นวิธีของ Umezawa และคณะ (1977) โดยได้ดัดแปลงให้ชิ้นวุ้นมีขนาดใหญ่ขึ้นจากเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เป็น 15 มิลลิเมตร เพื่อที่จะสามารถดูดซับคานามัยซินที่เชื้อสังเคราะห์ขึ้นได้ทั้งหมด และเพื่อให้เห็นความแตกต่างของความกว้างบริเวณยับยั้งในการเปรียบเทียบการสังเคราะห์คานามัยซินระหว่างสายพันธุ์ตั้งต้น และสายพันธุ์กลายได้อย่างชัดเจน และการคัดเลือกสายพันธุ์กลายขั้นทุติยภูมิด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา เลือกใช้วิธีการแพร่ของตัวอย่างออกจากท่อสเตนเลส (cylinder) ลงสู่อาหารวุ้นทดสอบ แล้ววัดความกว้างบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น ในการทดลองนี้การวัดปริมาณคานามัยซินด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา ผลที่ได้มีความแปรผันพอสมควรดังเห็นได้จากความกว้างบริเวณยับยั้งต่อเชื้อทดสอบที่เท่ากันจะให้ปริมาณคานามัยซินไม่เท่ากัน เช่นในผลการทดลองในข้อ 4.2.1 ตารางที่ 6 ความกว้างบริเวณยับยั้งต่อเชื้อทดสอบ 23 มิลลิเมตร เมื่อเทียบกับ

กราฟมาตรฐานคานามัยซิน เอ ซัลเฟต ที่ทำควบคู่กันจะได้ปริมาณ คานามัยซินเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ในผลการทดลองในข้อ 4.3.2 ตารางที่ 12 ความกว้างบริเวณยับยั้งต่อเชื้อทดสอบ 23 มิลลิเมตร เท่ากัน เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐาน คานามัยซิน เอ ซัลเฟต ที่ทำควบคู่กันจะได้ปริมาณคานามัยซินเท่ากับ 28 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลที่แปรผันเช่นนี้อาจเกิดจาก

1. ปริมาณเชื้อทดสอบในแต่ละการทดลองอาจจะไม่เท่ากัน ถึงแม้ว่าจะใช้เชื้อทดสอบที่มีความขุ่นเท่ากันทุกครั้งของการทดลอง คือ 0.1 ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร (ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.2) และนำมาเจือจางในอาหารวุ้นทดสอบ M5 (ภาคผนวก ก) ในปริมาตรที่เท่ากันก็ตาม แต่จากการสังเกตพบว่าเชื้อทดสอบที่เจริญในอาหารวุ้นทดสอบ M5 ในถาดกระจกชุดที่ 1 และ 2 (ทำการทดลองซ้ำ) มีการเจริญ และปริมาณแตกต่างกัน

2. ความหนาที่ไม่สม่ำเสมอของอาหารวุ้นทดสอบ ก็อาจจะมีผลต่อการแพร่ของคานามัยซินผ่านชั้นวุ้นแตกต่างกัน

3. ขนาดของท่อสเตนเลสกลวงที่ใช้แต่ละอันอาจจะมีขนาดที่ไม่เท่ากัน ซึ่งมีผลให้ปริมาณสารตัวอย่างที่หยอดลงไปนั้นมีปริมาตรแตกต่างกัน เป็นผลให้ความกว้างของบริเวณยับยั้งต่อเชื้อทดสอบแตกต่างกัน

ในการทดลองได้ป้องกัน และแก้ไข ความแปรผันของการวัดปริมาณคานามัยซินด้วยวิธีการทางจุลชีววิทยา โดยวิธีการแพร่ของตัวอย่างออกจากท่อสเตนเลสนี้ เพื่อที่จะลดโอกาสที่ทำให้เกิดความแปรผันขึ้นโดย

1. การใช้เชื้อทดสอบที่เตรียมได้จากการเจือจางเชื้อทดสอบจากอาหารวุ้นเอียง M1 (ภาคผนวก ก) หลอดตั้งต้นเดียวกันทำให้ได้เชื้อทดสอบที่มีอายุ และปริมาณตั้งต้นเท่ากัน และการใช้อาหารวุ้นทดสอบ M5 ที่มีปริมาตรเท่ากัน และอุณหภูมิเดียวกัน

2. การปรับระนาบถาดกระจก และการเทอาหารวุ้นทดสอบ M5 ชั้นปรับระนาบเพื่อให้อาหารวุ้นทดสอบมีระนาบ และความหนาสม่ำเสมอเท่ากันทั่วทั้งแผ่นวุ้น เป็นผลให้การแพร่ของสารตัวอย่าง และคานามัยซิน เอ ซัลเฟต มาตรฐาน แพร่ได้อย่างระนาบและสม่ำเสมอ

3. กำหนดปริมาตรของสารตัวอย่างที่หยอดลงไปในท่อสเตนเลสให้เท่ากันทุกครั้ง

4. การใช้ถาดแก้วขนาดใหญ่ที่มีพื้นที่ผิวมาก เพื่อที่จะได้ทดสอบหาปริมาณคานามัยซิน จากตัวอย่างได้ครั้งละหลายๆ ตัวอย่างพร้อมๆ กัน และหลายซ้ำ ซึ่งทำให้เป็นการทดลองในภาวะเดียวกัน

5. การทำคานามัยซิน เอ ซัลเฟต มาตรฐาน ความเข้มข้นต่างๆ ในถาดแก้วเดียวกันพร้อมกับตัวอย่างที่จะทดสอบปริมาณคานามัยซินทุกครั้ง ในทุกการทดลอง

การวัดปริมาณคานามัยซินด้วยวิธีการทางจุลชีววิทยา โดยวิธีการแพร่ของตัวอย่างออกจากท่อสเตนเลสนี้ นำมาจากองค์การอาหารและยา สหรัฐอเมริกา (Code of federal regulation, title 21, 1987) ซึ่งมีสถาบันหลายแห่งใช้วิธีนี้ตรวจสอบคุณภาพของสารปฏิชีวนะ เช่น WHO (World Health Organization) และ กองวิเคราะห์ยา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (วีระ ศิลปสุวรรณชัย, 2535)

สำหรับการหาปริมาณคานามัยซินด้วยเครื่องวิเคราะห์ HPLC งานวิจัยนี้ได้ทำตามวิธีของ Gambardella และ คณะ (1985) ซึ่งใช้ 2,4,6 ไตรไนโตรเบนซินซัลโฟนิก เอซิด ที่มีคุณสมบัติสามารถจับกับสารกลุ่ม เอมีน อะมิโนเอซิด และ เปปไทด์ แล้วทำให้สารเหล่านี้สามารถถูกตรวจจับด้วยแสงอัลตราไวโอเลตได้ คานามัยซินเป็นสารปฏิชีวนะกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ปกติจะไม่ดูดซับแสงทั้งในช่วงคลื่นที่มองเห็นได้ (visible light) และช่วงแสงอัลตราไวโอเลต แต่เมื่อจับกับ 2,4,6 ไตรไนโตรเบนซินซัลโฟนิก เอซิด ก็จะสามารถถูกตรวจจับได้ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต จากผลการทดลองในข้อ 5 เมื่อเปรียบเทียบชนิดของสารที่ถูกแยกออกมาได้ (ปรากฏเป็นแท่งกราฟ (peak)) และปริมาณของสารที่ถูกแยกออก (พื้นที่ใต้แท่งกราฟ) ระหว่างการวิเคราะห์คานามัยซิน เอ ซัลเฟต มาตรฐาน เข้มข้น 1,500, 512 และ 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 20-22) จากการวิเคราะห์คานามัยซิน เอ ซัลเฟต มาตรฐาน เข้มข้น 1,500 และ 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะให้แท่งกราฟ หรือสารที่ถูกแยกได้อย่างเด่นชัดออกมา 2 ชนิด ที่เวลา (retention time) ใกล้เคียงกัน โดยคานามัยซิน เอ ซัลเฟต มาตรฐาน เข้มข้น 1,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะให้แท่งกราฟที่เวลา 2.46 และ 5.31 นาที ซึ่งมีพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 89,974 และ 174,730 หน่วยตามลำดับ และ คานามัยซิน เอ ซัลเฟต มาตรฐาน เข้มข้น 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะให้แท่งกราฟที่เวลา 2.49 และ 5.31 นาที ซึ่งมีพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 36,453 และ 74,696 หน่วยตามลำดับ แต่คานามัยซิน เอ ซัลเฟต มาตรฐาน เข้มข้น 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะไม่พบแท่งกราฟที่เวลาทั้ง 2 ดังกล่าว จากผลการทดลองของ Gambardella และ คณะ ที่สามารถแยกตัวอย่างคานามัยซิน เอ ซัลเฟต มาตรฐาน (มีคานามัยซิน บี ปนเปื้อนอยู่ในปริมาณเล็กน้อย) ของ บริษัทเมจิ (ประเทศญี่ปุ่น) ได้ออกเป็นอนุพันธุ์ของคานามัยซินทั้ง 3 ชนิด โดยใช้เครื่อง HPLC ได้คานามัยซิน เอ, คานามัยซิน ซี และ คานามัยซิน บี ซึ่งถูกแยกออกมาที่เวลา 5.37, 7.45 และ 9.52 นาที ตามลำดับ ดังนั้นจึงคาดว่าสารที่ถูกแยกออกมาที่เวลา 5.31 นาที ของคานามัยซิน เอ ซัลเฟต มาตรฐาน เข้มข้น 1,500 และ 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร น่าจะเป็น คานามัยซินเอ เนื่องจากเวลาของสารที่ถูกแยกออกมาได้ที่ 5.31 นาที ของคานามัยซิน เอ ซัลเฟต มาตรฐาน เข้มข้น 1,500 และ 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นั้นใกล้เคียงกับเวลาของคานามัยซิน เอ ที่ถูกแยกได้ที่เวลา 5.37 นาทีของการทดลองของ

Gambardella และคณะ และจากการเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟที่เวลา 5.31 นาที ระหว่างคานามัยซิน เอ ซัลเฟต มาตรฐาน เข้มข้น 1,500 และ 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ซึ่งมีปริมาณคานามัยซินต่างกัน 2.93 เท่า) มีพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 174,730 และ 74,696 หน่วยตามลำดับ พบว่าพื้นที่ใต้กราฟที่เวลาดังกล่าวของคานามัยซิน เอ ซัลเฟต มาตรฐาน เข้มข้น 1,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีค่าเป็น 2.34 เท่าของพื้นที่ใต้กราฟของคานามัยซิน เอ ซัลเฟต มาตรฐาน เข้มข้น 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ส่วนสารที่ถูกแยกออกมาที่เวลา 2.49 นาที ของคานามัยซิน เอ ซัลเฟต มาตรฐาน เข้มข้น 1,500 และ 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟแล้วปรากฏว่า พื้นที่ใต้กราฟของ คานามัยซิน เอ ซัลเฟต มาตรฐาน เข้มข้น 1,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีค่าเป็น 2.47 เท่าของพื้นที่ใต้กราฟของคานามัยซิน เอ ซัลเฟต มาตรฐาน เข้มข้น 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่แท่งกราฟที่ถูกแยกออกมาที่เวลา 2.49 นาทีนี้ไม่ปรากฏในรายงานผลการทดลองของ Gambardella และ คณะ จึงคาดว่าสารที่ถูกแยกออกมาที่เวลา 2.49 นาทีนี้น่าจะเป็นสารปนเปื้อนประเภท เอมีน อะมิโนเอซิด หรือ เปปไทด์ ที่ปนเปื้อนอยู่ใน สารมาตรฐานคานามัยซิน เอ ซัลเฟต ซึ่ง2,4,6 ไตรไนโตรเบนซินซัลโฟนิกเอซิด สามารถไปจับแล้วทำให้แสงอัลตราไวโอเลตตรวจจับได้

การหาปริมาณคานามัยซินด้วยเครื่องวิเคราะห์ HPLC ในตัวอย่างอาหารเหลวเคพีเอ็มบีที่ใช้เลี้ยงสายพันธุ์ตั้งต้น K1 และสายพันธุ์กลาย UUNNK1, UUNNK25 (ดังผลการทดลองข้อ 5) พบว่าการหาปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ตั้งต้น K1 (รูปที่ 23) ไม่พบแท่งกราฟ ณ เวลา 5.31 นาที อาจเป็นเพราะปริมาณคานามัยซินที่สายพันธุ์ตั้งต้น K1 สังเคราะห์ได้ 13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา) มีปริมาณน้อยเกินไปที่เครื่อง HPLC จะตรวจวัดได้ ผลการหาปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์กลาย UUNNK1 และ UUNNK25 (รูปที่ 24, 25) จะพบแท่งกราฟ ณ เวลา 5.27 และ 5.15 นาที ตามลำดับ ซึ่งเมื่อคำนวณเปรียบเทียบหาปริมาณคานามัยซินจากกราฟมาตรฐานคานามัยซิน เอ ซัลเฟต (ภาคผนวก ค) ได้ปริมาณคานามัยซิน เท่ากับ 12 และ 7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งน้อยกว่าการวิเคราะห์โดยวิธีทางจุลชีววิทยา ที่ตรวจวัดได้ 160 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะตัวอย่างอาหารเหลว เคพีเอ็มบี ที่นำมาหาปริมาณคานามัยซิน นั้นยังไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์เพียงพอ ซึ่งในอาหารเหลว เคพีเอ็มบี จะมีสารประเภท อะมิโน เอซิด และเปปไทด์เป็นส่วนประกอบในสูตรอาหารคงเหลืออยู่ ทำให้ 2,4,6 ไตรไนโตรเบนซินซัลโฟนิก เอซิด มีโอกาสไปจับ แทนที่จะจับกับคานามัยซิน จึงทำให้แสงอัลตราไวโอเลตตรวจจับสารปนเปื้อนได้มากแทน ซึ่งปรากฏเป็นแท่งกราฟขนาดใหญ่ ณ เวลาประมาณ 1.95 นาที ของการหาปริมาณ

คานามัยซินของตัวอย่างทั้ง 3 ดังรูปที่ 23-25 เป็นผลทำให้ 2,4,6 ไตรไนโตรเบนซินซัลโฟนิก เอซิด ไปจับกับคานามัยซินได้น้อย ส่งผลให้แสงอัลตราไวโอเลตตรวจจับได้น้อยกว่าความเป็นจริงมาก ดังนั้นจึงควรนำตัวอย่างอาหารเหลว เคพีเอ็มบี ไปผ่านการทำให้บริสุทธิ์ก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเครื่อง HPLC เช่น โดยการผ่านคอลัมน์ cation-exchange resins Amberlite IRC-50 (Na-type) (Umezawa et al., 1960) แต่อย่างไรก็ดีผลการทดลองครั้งนี้ก็สามารถนำมายืนยันได้ว่าในตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์นั้นมีคานามัยซินอยู่จริง

จากผลการศึกษาการสังเคราะห์คานามัยซิน โดยใช้แหล่งคาร์บอนหลักชนิดต่าง ๆ ในการทดลองข้อ 6 ของสายพันธุ์ตั้งต้น K1 สายพันธุ์กลาย UUNNK1 และ UUNNK25 ให้ผลคล้ายคลึงกัน และแตกต่างกันบางประการดังนี้ คือ

1. มอลโตส เป็นชนิดของแหล่งคาร์บอน ที่ใช้ในการเจริญ สร้างเส้นใยได้มากที่สุด รองลงมาคือ แป้ง ส่วนแลคโตส กลูโคส กาแลคโตส และกากน้ำตาล ให้น้ำหนักเส้นใยแห้งใกล้เคียงกัน ในกรณีที่ใช้มอลโตสสายพันธุ์กลาย UUNNK1 จะมีการสร้างเส้นใยได้มากกว่าของสายพันธุ์กลาย UUNNK25 และสายพันธุ์ตั้งต้น K1 โดยมีน้ำหนักเส้นใยแห้ง 9.14, 6.78 และ 6.58 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

2. แป้ง เป็นชนิดของแหล่งคาร์บอนหลักที่นำมาใช้ในการสังเคราะห์คานามัยซินได้ปริมาณสูงที่สุด รองลงมาได้แก่ กาแลคโตส มอลโตส และกลูโคส

3. แลคโตส เป็นชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ไม่สามารถนำมาใช้สังเคราะห์คานามัยซิน

4. กากน้ำตาล ซึ่งเป็นของเหลือใช้ที่ได้จากการผลิตน้ำตาลสามารถนำมาใช้ในการสังเคราะห์คานามัยซินได้ปริมาณเล็กน้อย

การที่สายพันธุ์ตั้งต้น K1 และสายพันธุ์กลาย UUNNK1, UUNNK25 สามารถใช้แป้งสังเคราะห์คานามัยซินได้ 13, 170 และ 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ได้ดีกว่าแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นนั้นสอดคล้องกับการทดลองของ Umezawa และคณะ (1960) ที่รายงานว่าแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดในการสังเคราะห์คานามัยซินของ *S. kanamyceticus* K-2J ซึ่งสังเคราะห์ได้ 250ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเหลวเคพีเอ็มบีที่มีชนิดของแหล่งคาร์บอนหลักแตกต่างกัน ในช่วงที่สายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลายสังเคราะห์คานามัยซิน ค่าความเป็นกรด-ด่าง จะมีค่าอยู่ระหว่าง 7.0-9.0 ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์คานามัยซิน โดยสอดคล้องกับผลการทดลองของ Umezawa และคณะ (1957) ที่ได้รายงานว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์คานามัยซิน จะมีค่าอยู่ระหว่างกลางถึงเบส

จากการศึกษาการสังเคราะห์คานามัยซิน ที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส ของสายพันธุ์ตั้งต้น K1 และสายพันธุ์กลาย UUNNK1, UUNNK25 ในผลการทดลองข้อ 7 พบว่าที่อุณหภูมิทั้ง 2 ดังกล่าวข้างต้น สายพันธุ์กลายยังคงสามารถสังเคราะห์คานามัยซินได้มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น โดยที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สายพันธุ์ตั้งต้น K1 สายพันธุ์กลาย UUNNK1 และ UUNNK25 สามารถสังเคราะห์คานามัยซินได้ 9, 120 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถสังเคราะห์คานามัยซินได้ 12, 130และ 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบการสังเคราะห์คานามัยซินที่อุณหภูมิทั้ง 2 ข้างต้น พบว่าทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถสังเคราะห์คานามัยซิน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และในทำนองเดียงกัน ผลการเปรียบเทียบการสร้างเส้นใยที่อุณหภูมิทั้ง 2 ข้างต้น พบว่า ทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถสร้างเส้นใยที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มากกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แสดงว่าสายพันธุ์ตั้งต้น K1 และสายพันธุ์กลาย UUNNK1, UUNNK25 สามารถเจริญ และสังเคราะห์คานามัยซินที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Umezawa และคณะ (1960) ที่ได้รายงานว่า *S. kanamyceticus* K-2J สามารถเจริญ และสังเคราะห์คานา-มัยซิน ได้ในช่วงอุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส แต่จะเหมาะสมที่สุดในช่วงอุณหภูมิ 27-32 องศาเซลเซียส ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเหลว เคพีเอ็มบี ระหว่างการสังเคราะห์คานามัยซิน ที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส ของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่าจะอยู่ในช่วง 7.1-9.1 ซึ่งเป็นช่วงความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์คานามัยซิน ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

จากผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนหลักที่สายพันธุ์ตั้งต้น และสายพันธุ์กลายทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถนำไปใช้ในการสังเคราะห์คานามัยซิน ตลอดจนผลจากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อสังเคราะห์คานามัยซิน ที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส ดังกล่าวเป็นข้อมูลเบื้องต้นบางประการที่สามารถนำไปใช้หาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อสังเคราะห์คานามัยซินให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นต่อไป

สายพันธุ์กลาย UUNNK1 และ UUNNK25 นอกจากสามารถสังเคราะห์คานามัยซินได้มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น K1 แล้ว สายพันธุ์กลายทั้ง 2 ยังมีลักษณะทางสัณฐานวิทยา แตกต่างไปจากสายพันธุ์ตั้งต้นอีกด้วย เช่น มีขนาดโคโลนีเล็กลง และปริมาณของการสร้างเส้นใยลดลง ดังผลการทดลองในข้อ 8 (รูปที่ 34-45) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต และ NTG นอกจากจะไปเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์คานามัยซินให้มีความสามารถสังเคราะห์ได้มากขึ้นแล้ว ยังอาจจะไปเปลี่ยนแปลง

สารพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมลักษณะทางสันฐานวิทยา ทำให้สายพันธุ์กลายทั้ง 2 มีลักษณะทางสันฐานวิทยาแตกต่างไปจากสายพันธุ์ตั้งต้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Balen (1965) ที่ได้รายงานว่า NTG สามารถชักนำให้สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว *Anacystis nidulans* เกิดการกลายพันธุ์ได้สายพันธุ์กลายที่มีคุณสมบัติทางชีวเคมี และสัณฐานวิทยาที่แตกต่างไปจากสายพันธุ์ตั้งต้น

ผลของการวิจัยครั้งนี้ได้บรรลุตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ กล่าวคือ สามารถปรับปรุงสายพันธุ์ *S. kanamyceticus* K1 ด้วยวิธีการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสง UV ร่วมกับ NTG ได้สายพันธุ์กลาย 2 สายพันธุ์ที่สามารถสังเคราะห์คานามัยซินได้ 160 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น คิดเป็น 12.3 และ 11.5 เท่าตามลำดับ ถึงแม้ว่าปริมาณการสังเคราะห์คานามัยซินของสายพันธุ์กลายทั้ง 2 นี้ จะต่ำกว่าสายพันธุ์จากต่างประเทศที่ใช้อยู่ในอุตสาหกรรมในประเทศไทยในปัจจุบันก็ตาม งานวิจัยนี้จะเป็นงานวิจัยแรกของประเทศที่รายงานเกี่ยวกับการปรับปรุงสายพันธุ์ *S. kanamyceticus* ให้เกิดการกลายพันธุ์ได้สายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพในการผลิตคานามัยซินสูงขึ้นกว่าสายพันธุ์เดิม ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในปรับปรุงสายพันธุ์ของ *S. kanamyceticus* เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์คานามัยซินในระดับขยายส่วนต่อไป