บทที่ 2

อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. อุปกรณ์

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

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

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

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

1.5 ถาดกระจก ขนาดกว้าง 19 เซนติเมตร ยาว 31 เซนติเมตร สูง 1.5 เซนติเมตร

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

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

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

1.9 ถังหมัก (fermenter) ขนาด 5 ลิตร รุ่น MD-300 บริษัท L.E. Marubishi , Japan

1.10 ตู้ดูดอากาศ

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

1.12 เครื่องชั่งน้ำหนัก รุ่น A200S บริษัท Sartorius , Germany

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

1.3 เครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (High performance liquid chromatography , HPLC) รุ่น LC-3A บริษัท Shimadzu , Japan

4. <u>สารเคมี</u>

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

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

วิธีดำเนินการวิจัย

1. จุลินทรีย์

1.1 *Streptomyces kanamyceticus* K1 ได้รับจาก Laboratory of Applied Microbiology, Kyushu University, Japan

1.2 *S. kanamyceticus* สายพันธุ์กลายจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ UUNK15, UUNNK1 และ UUNNK 25 (ศรสดมภ์ , 2539)

1.3 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P

2. การเก็บรักษา

2.1 การเก็บรักษา *S. kanamyceticus* K 1 และสายพันธุ์กลาย

เขี่ยเส้นใย และสปอร์ของ *S. kanamyceticus* โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (needle)ลากบนผิวหน้าของอาหารวุ้นเอียง วายเอส (YS agar, ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7-10 วัน เมื่อเชื้อสร้างสปอร์เต็มที่แล้วจึงนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่เพื่อเก็บรักษาอีก ทุก ๆ 1 เดือน โดยใช้วิธีเดียวกัน

2.2 การเก็บรักษา *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P

เขี่ยเชื้อ *S. aureus* โดยใช้ลูป (loop) ลากลงบนผิวหน้าของอาหารวุ้นเอียงเอ็มวัน (M1 agar , ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญดีแล้ว จึงนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องซาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดใหม่ เพื่อเก็บรักษาอีกทุก ๆ 1 เดือนโดยวิธีเดียวกัน

3. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

3.1 การเตรียมสปอร์แขวนลอยของ *S. kanamyceticus*

นำ *S. kanamyceticus* อายุ 7-10 วัน ซึ่งมีสปอร์เจริญเต็มที่ ที่เพาะเลี้ยงไว้ในอาหารวุ้นเอียงวายเอส เติมสารละลาย ทวีนเอทตี (tween 80) ความเข้มข้น 0.01% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขี่ยสปอร์ให้หลุดเป็นสปอร์แขวนลอย นำสปอร์แขวนลอยที่ได้มากรองด้วยสำลีโดยวิธีการแบบปลอดเชื้อ หลังจากนั้นนำมาเจือจางด้วยสารละลายนอร์มัลซาลีน (0.85% NaCl (น้ำหนักต่อปริมาตร)) ปรับจำนวนสปอร์ให้เท่ากับ $1x10^{7}$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยนับด้วยฮีมาซัยโตมิเตอร์ (haemacytometer)

3.2 การเตรียมเซลล์แขวนลอยของ *S. aureus*

นำ *S. aureus* อายุ 24 ชั่วโมง ที่เจริญบนอาหารวุ้นเลี้ยง เอ็มวัน มาเติมสารละลายนอร์มัลซาลีน 10 มิลลิลิตร เขี่ยเชื้อให้หลุดเป็นเซลล์แขวนลอย นำเซลล์แขวนลอยที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 530 นาโมเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) เจือจางจนวัดค่าการดูดกลืนแสงได้เท่ากับ 0.1

4. <u>การเพาะเลี้ยงเชื้อ</u>

4.1 การเตรียมหัวเชื้อ *S. kanamyceticus*

นำสปอร์แขวนลอยของ *S. kanamyceticus* ที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองในข้อ 3.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลวจีพีวาย (GPY medium, ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี (rotary shaker) ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้สปอร์งอก และใช้เป็นหัวเชื้อในการทดลองต่อไป

4.2 การเพาะเลี้ยง *S. kanamyceticus* ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่าเพื่อผลิตคานามัยซิน

นำ *S. kanamyceticus* ที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองในข้อ 4.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี (KPMB medium, ภาคผนวก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดทดลองรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน

5. การศึกษาความสามารถในการผลิตคานามัยซินของ *S. kanamyceticus*

5.1 การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา (Microbiological assay) โดยวิธีการแพร่ (Agar diffusion method) (Reeves et al.,1980)

5.1.1 การวัดความสามารถในการผลิตคานามัยซิน ในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี

5.1.1.1 การเตรียมอาหารวุ้นทดสอบชั้นที่มีเซลล์แขวนลอยของเชื้อทดสอบ

นำเชื้อ *S. aureus* ATCC 6538P ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองในข้อ 3.2 ใส่ลงในอาหารวุ้นเอ็มไฟว์ (M5 agar, ภาคผนวก ก) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ที่อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส เขย่าให้เชื้อทดสอบกระจายทั่วอาหารแล้วเทลงบนถาดกระจก เอียงถาดกระจกให้อาหารวุ้นกระจายทั่วถาด และมีผิวหน้าเรียบ สม่ำเสมอ ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารวุ้นแข็งตัว

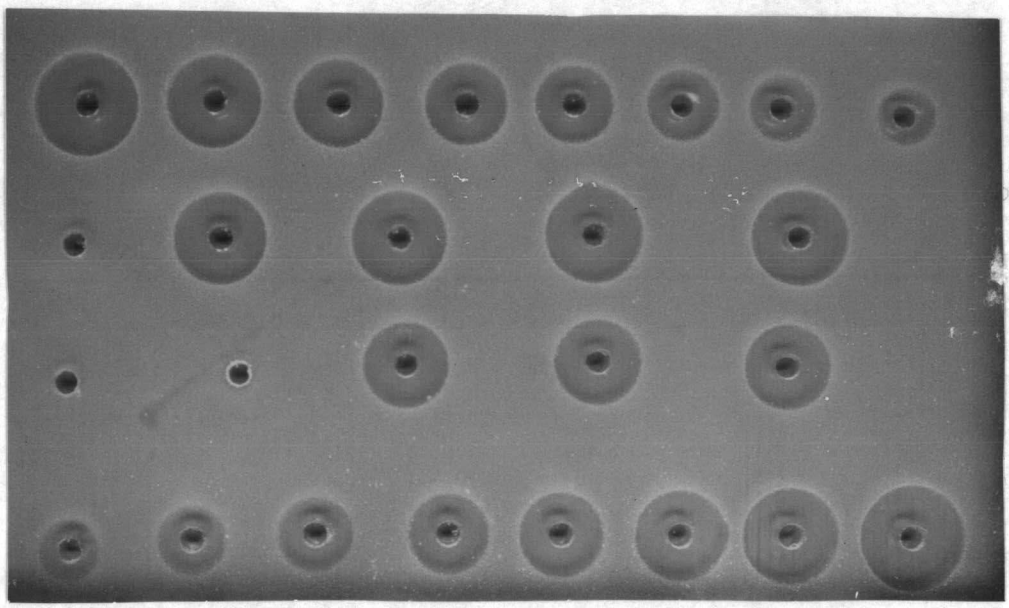
5.1.1.2 การเตรียมตัวอย่างทดสอบ

นำ *S. kanamyceticus* ที่เจริญในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองในข้อ 4.2 นำไปปั่นแยกเส้นใย และตะกอนออกจากส่วนน้ำใส (supernatant) โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ (30 ± 3 องศาเซลเซียส) นำส่วนน้ำใสที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณคานามัยซินต่อไป

5.1.1.3 การหาปริมาณคานามัยซิน

นำที่เจาะวุ้น (cock borrer) เจาะวุ้นที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองในข้อ 5.1.1.1 หยอดตัวอย่างที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองในข้อ 5.1.1.2 และคานามัยซินเอซัลเฟต มาตรฐาน ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยไมโครปิเปต (micro-pipette) ให้เต็มหลุมที่เจาะ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง วัดความกว้างเส้นผ่าศูนย์

กลางบริเวณยับยั้งการเจริญต่อเชื้อทดสอบรอบหลุมที่เจาะเพื่อเปรียบเทียบหาปริมาณคานามัยซินกับกราฟมาตรฐานคานามัยซินเอ ซัลเฟต (ภาคผนวก ค) ดังรูปที่ 5 (ในการหาปริมาณคานามัยซินในตัวอย่าง ต้องทำคานามัยซินเอ ซัลเฟตมาตรฐาน ควบคู่ไปด้วยทุกครั้ง)



รูปที่ 5 การวัดปริมาณคานามัยซินด้วยวิธีทางจุลชีววิทยาของ *S. kanamyceticus* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี

5.2 การวิเคราะห์ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (High performance liguid chromatography , HPLC) โดยใช้เครื่องตรวจวัดความแตกต่างของดรรชนีหักเห (Refractive Index (RI) Detector)

นำตัวอย่างส่วนน้ำใสที่เตรียมได้จากวิธีทดลองในข้อ 5.1.1.2 และคานามัยชินเอ ซัลเฟต มาตรฐานต่างๆ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาวิเคราะห์ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี โดยใช้เครื่องตรวจวัดความแตกต่างของดรรชนีหักเห ตามภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ดังนี้ (Gambardella et al., 1985) คือ

คอลัมน์ : Lichrocarp C18 reverse phase ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง วงใน 0.4 เซนติเมตร ยาว 25.0 เซนติเมตร

สารละลายตัวพา : 0.02 โมลาร์ โปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 (ภาคผนวก ข) ต่ออะซิโตไนไตรด์ ต่อ เมธานอล = 40:45:15 (ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร)

อัตราการไหล : 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที

อุณหภูมิ : 45 องศาเซลเซียส

6. <u>การวิเคราะห์น้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณโปรตีน และค่าความเป็นกรด-ด่าง</u>

นำตัวอย่างที่ได้จากข้อ 4.2 ไปปั่นแยกเส้นใยออกจากส่วนน้ำใส ตามวิธีการทดลองในข้อ 5.1.1.2 นำเส้นใยนำมาล้างแคลเซียมคาร์บอเนตที่ปนเปื้อนออก ด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 นอร์มัล แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำไปชั่งน้ำหนักแห้งด้วยเครื่องชั่งละเอียด เพื่อวัดอัตราการเจริญ ส่วนน้ำใสที่แยกได้นำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยใช้วิธี ฟีนอล-ซัลฟูริค (phenol-sulfuric method)(ภาคผนวก ค) วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNSA (ภาคผนวก ค) วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry (ภาคผนวก ค) วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter)

7. <u>การคัดเลือกสายพันธุ์กลายของ *S. kanamyceticus* จำนวน 3 สายพันธุ์ให้ได้สายพันธุ์กลายที่เสถียรและสามารถผลิตคานามัยซินได้สูงสุด</u>

นำเส้นใยของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์ตั้งต้น K1 และสายพันธุ์กลายจำนวน 3 สายพันธุ์ ที่เตรียมโดยวิธีทดลองข้อ 4.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี (KPMB medium, ภาคผนวก ก) ตามวิธีการทดลองข้อ 4.2 นำมาวิเคราะห์ตามวิธีทดลองในข้อ 6 และวิเคราะห์ปริมาณคานามัยซินด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา ตามวิธีทดลองข้อ 5.1 นำผลที่ได้มาคัดเลือกหาสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตคานามัยซินได้สูงสุด นำไปหาภาวะที่เหมาะสมต่อไป

8. <u>การหาความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาที่เหมาะสมของการเพาะเลี้ยงกับอัตราการเจริญของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จาก ข้อ 7</u>

ศึกษาช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมของการเพาะเลี้ยงเพื่อให้สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้มีอัตราการเจริญสูงสุด โดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจีพีวาย ตามวิธีทดลองข้อ 4.1 ทำการเก็บตัวอย่าง ทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปปั่นแยกเส้นใยออกจากส่วนน้ำใส ส่วนเส้นใยนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำไปชั่งน้ำหนักแห้งด้วยเครื่องชั่งละเอียด เพื่อวัดอัตราการเจริญ ส่วนน้ำใสที่แยก

ได้นำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้วิธีดีเอ็นเอสเอ (DNSA method) (ภาคผนวก ค) วัดความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter)

9. <u>การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตคานามัยซินของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 7 ในระดับขวดเขย่า</u>

9.1 การคัดเลือกแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตคานามัยซิน

นำเส้นใยของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์ตั้งต้น และสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้ที่เตรียมโดยวิธีทดลองข้อ 4.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี ตามวิธีทดลองข้อ 4.2 โดยเปลี่ยนสูตรอาหารให้มีชนิดของแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 6 ชนิด คือ แป้ง มอลโตส แลคโตส กลูโคส กาแลคโตส และซูโครส เข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร นำมาวิเคราะห์ตามวิธีการทดลองในข้อ 6 และวิเคราะห์ปริมาณคานามัยซิน ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา ตามวิธีทดลองในข้อ 5.1 นำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่สายพันธุ์กลายสามารถนำไปใช้ในการผลิตคานามัยซินได้สูงสุด

9.1.1 การแปรผันปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่คัดเลือกได้ในการผลิตคานามัยซิน

นำเส้นใยของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้ที่เตรียมโดยวิธีทดลองข้อ 4.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี ตามวิธีทดลองข้อ 4.2 โดยเปลี่ยนสูตรอาหารให้มีการแปรผันปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่คัดเลือกได้ เป็น 5 10 15 20 25 และ 30 กรัมต่อลิตร นำมาวิเคราะห์ตามวิธีทดลองข้อ 6 และวิเคราะห์ปริมาณคานามัยซินด้วยวิธีทางจุลชีววิทยาตามวิธีทดลองข้อ 5.1 นำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่สายพันธุ์กลายสามารถนำไปใช้ในการผลิต คานามัยซินได้สูงสุด

9.2 การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนรองชนิดต่าง ๆ เพื่อการผลิตคานามัยซิน

นำเส้นใยของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้ ที่เตรียมโดยวิธีทดลองข้อ 4.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบีตามวิธีทดลอง

ข้อ 4.2 โดยเปลี่ยนสูตรอาหารให้มีชนิดของแหล่งไนโตรเจนรองต่างกัน 5 ชนิดคือ อาร์จินีน แอสปาราจีน ไกลซีน แบคโต-เปปโทน เปรียบเทียบกับสูตรอาหารควบคุมที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจนรอง โดยมีปริมาณไนโตรเจนรองในอาหารเป็น 0.06065 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับของแบคโต-เปปโตน 3 กรัมต่อลิตรในสูตรอาหารเดิม (วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนโดยวิธี Kjeldahl , ภาคผนวก ค) นำมาวิเคราะห์ตามวิธีทดลองในข้อ 6 และวิเคราะห์ปริมาณคานามัยซิน ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยาตามวิธีการทดลองข้อ 5.1 นำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาชนิดของแหล่งไนโตรเจนรองที่สายพันธุ์กลายสามารถนำไปใช้ในการผลิตคานามัยซินได้สูงสุด

9.2.1 การแปรผันปริมาณแหล่งไนโตรเจนรองที่คัดเลือกได้เพื่อการผลิตคานามัยซิน

นำเส้นใยของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้ที่เตรียมโดยวิธีทดลองข้อ 4.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบีตามวิธีทดลองข้อ 4.2 โดยเปลี่ยนสูตรอาหารให้มีการแปรผันปริมาณของแหล่งไนโตรเจนรองที่คัดเลือกได้ เป็น 1 2 3 4 5 10 20 และ 30 กรัมต่อลิตร นำมาวิเคราะห์ตามวิธีทดลองข้อ 6 และวิเคราะห์ปริมาณคานามัยซินด้วยวิธีทางจุลชีววิทยาตามวิธีทดลองข้อ 5.1 นำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณของแหล่งไนโตรเจนรองที่สายพันธุ์กลายนำไปใช้ในการผลิตคานามัยซินได้สูงสุด

9.3 การแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตคานามัยซิน

นำเส้นใยของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้ ที่เตรียมโดยวิธีทดลองข้อ 4.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี ตามวิธีทดลองข้อ 4.2 โดยเปลี่ยนสูตรอาหารให้มีการแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เป็น 7.0-8.6 นำมาวิเคราะห์ตามวิธีทดลองข้อ 6 และวิเคราะห์ปริมาณคานามัยซิน ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยาตามวิธีทดลองข้อ 5.1 นำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมที่สายพันธุ์กลายสามารถนำไปใช้ในการผลิตคานามัยซินได้สูงสุด

9.4 การแปรผันอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตคานามัยซิน

นำเส้นใยของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์กลาย ที่เตรียมได้จากวิธีทดลองข้อ 4.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี ตามวิธีทดลองข้อ 4.2 โดยแยกเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 30 35 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง นำมาวิเคราะห์ตามวิธีทดลองข้อ 6 และวิเคราะห์ปริมาณคานามัยซิน ด้วยวิธีการทางจุลชีววิทยา ตามวิธีทดลองข้อ 5.1 นำผลที่ได้มาวิเคราะห์อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สายพันธุ์กลายสามารถนำไปใช้ในการผลิตคานามัยซินได้สูงสุด

9.5 การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนหลักชนิดต่าง ๆ เพื่อการผลิตคานา-มัยซิน

นำเส้นใยของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้ ที่เตรียมโดยวิธีทดลองข้อ 4.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี ตามวิธีทดลองข้อ 4.2 โดยเปลี่ยนสูตรอาหารให้มีแหล่งไนโตรเจนหลักต่างกัน 5 ชนิด คือ อะลานีน กลูโคซามีน โซเดียมไนเตรท ซอยโทน สารสกัดจากยีสต์ และ กากถั่วเหลืองที่ถูกย่อยด้วยกรด โดยมีปริมาณของแหล่งไนโตรเจนหลักเป็น 1.104 กรัมไนโตรเจนต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ นำมาวิเคราะห์ตามวิธีทดลองข้อ 6 และวิเคราะห์ปริมาณคานามัยซิน ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยาตามวิธีการทดลองข้อ 5.1 นำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาชนิดของแหล่งไนโตรเจนหลักที่สายพันธุ์กลายสามารถนำไปใช้ในการผลิตคานามัยซินได้สูงสุด

9.5.1 การแปรผันปริมาณแหล่งไนโตรเจนหลักที่คัดเลือกได้เพื่อการผลิตคานามัยซิน

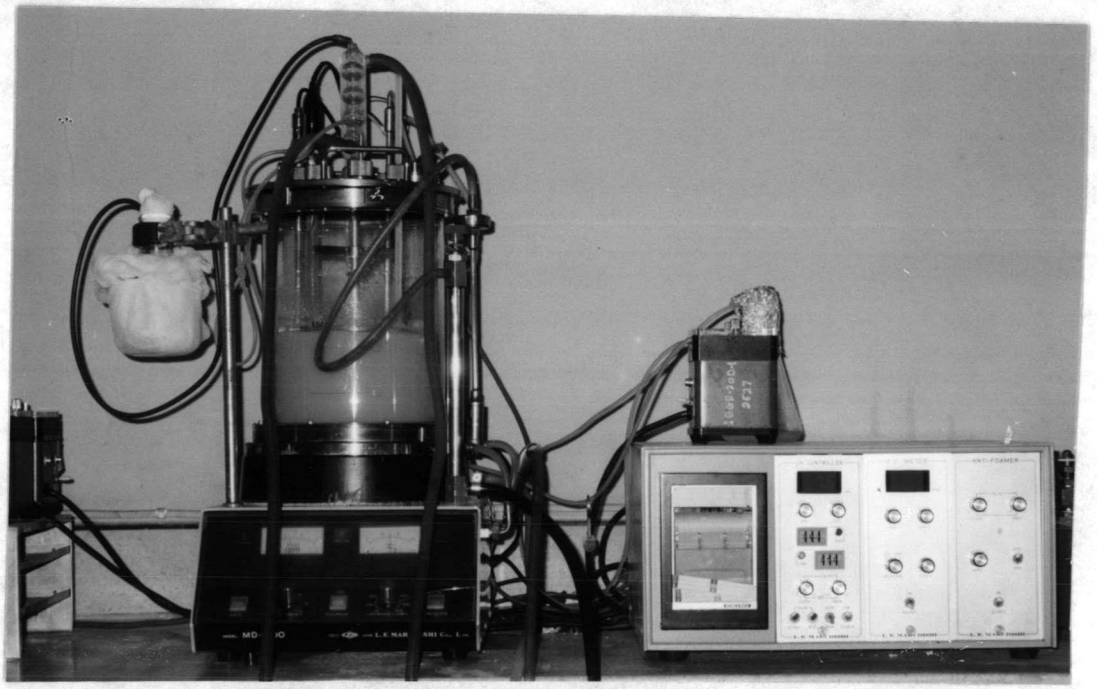
นำเส้นใยของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้ที่เตรียมโดยวิธีการทดลองข้อ 4.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี ตามวิธีการทดลองข้อ 4.2 โดยเปลี่ยนสูตรอาหารให้มีการแปรผันปริมาณของแหล่งไนโตรเจนหลักที่คัดเลือกได้ เป็น 6 8 10 12 และ 14 กรัมต่อลิตร นำมาวิเคราะห์ตามวิธีทดลองข้อ 6 และวิเคราะห์ปริมาณคานามัยซิน ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยาตามวิธีทดลองข้อ 5.1 นำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณของแหล่งไนโตรเจนหลักที่สายพันธุ์กลายที่ใช้ในการผลิตคานามัยซินได้สูงสุด

9.6 การเปรียบเทียบรูปแบบของเครื่องเขย่าที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตคานามัยซิน

นำเส้นใยของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้ ที่เตรียมโดยวิธีทดลองข้อ 4.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบีบนเครื่องเขย่าตามวิธีทดลองข้อ 4.2 โดยใช้แบบโรตารี (rotary shaker) และ แบบรีซิโปรคอล (reciprocal shaker) นำมาวิเคราะห์ตามวิธีการทดลองข้อ 6 และวิเคราะห์ปริมาณคานามัยซิน ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา ตามวิธีการทดลองข้อ 5.1 นำผลที่ได้มาวิเคราะห์รูปแบบของเครื่องเขย่าที่สายพันธุ์กลายผลิตคานามัยซินได้สูงสุด

10. การทดลองผลิตคานามัยซินโดย *S. kanamyceticus* สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้ในระดับถังหมัก

นำเส้นใยของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้ ที่เตรียมโดยวิธีการทดลองข้อ 4.1 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี ตามวิธีทดลองข้อ 4.2 ปริมาตร 2,250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ดังรูปที่ 6 โดยอาศัยข้อมูลจากระดับขวดเขย่า ทำการศึกษาภาวะบางประการที่เหมาะสมต่อการผลิตคานามัยซินในถังหมักขนาด 5 ลิตรได้แก่



รูปที่ 6 การเพาะเลี้ยง *S. kanamyceticus* ในอาหารเหลวเคพีเอ็มบีระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อผลิตคานามัยซิน

10.1 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการหมักเพื่อการผลิตคานามัยซิน

ศึกษาความสัมพันธ์ของระยะเวลากับการผลิตคานามัยซินในถังหมักขนาด 5 ลิตร ทำการหมักโดยใช้สูตรอาหารเหลวและภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ได้จากระดับขวดเขย่า เก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน นำมาวิเคราะห์ตามวิธีทดลองข้อ 6 วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่องวัดพีเอชที่ติดตั้งในถังหมัก (pH probe) และวิเคราะห์ปริมาณคานามัยซินด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา ตามวิธีการทดลองข้อ 5.1 นำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาระยะเวลาที่เหมาะสมในการหมักที่สายพันธุ์กลายนำไปใช้ในการผลิตคานามัยซินได้สูงสุด

10.2 การหาอัตราการกวนที่เหมาะสมต่อการหมักในการผลิตคานามัยซิน

ศึกษาอัตราการกวนที่เหมาะสมในถังหมักขนาด 5 ลิตร ทำการหมักโดยใช้สูตรอาหารเหลวและภาวะการเลี้ยงเชื้อจากระดับขวดเขย่า แปรผันอัตราการกวนเป็น 200 300 และ 400 รอบต่อนาที โดยให้อัตราการให้อากาศสูงสุดเป็น 1.3 ลิตรต่อ 1 ลิตรของอาหารต่อนาที วิเคราะห์ตามวิธีข้อ 10.1 นำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาอัตราการกวนที่เหมาะสมที่ใช้ในการหมักที่สายพันธุ์กลายสามารถนำไปใช้ในการผลิตคานามัยซินได้สูงสุด

10.3 การเปรียบเทียบการผลิตคานามัยซินเมื่อควบคุมและไม่ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง

ศึกษาการผลิตคานามัยซินในถังหมักขนาด 5 ลิตร ทำการหมักโดยใช้สูตรอาหารเหลว ภาวะการเลี้ยงเชื้อจากระดับขวดเขย่า และอัตราการกวนที่เหมาะสมจากข้อ 10.2 แต่เพิ่มการศึกษาโดยการควบคุม และไม่ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง นำมาวิเคราะห์ตามวิธีข้อ 10.1