บทที่ 1

บทนำ

ยาปฏิชีวนะ (antibiotic)

ยาปฏิชีวนะ (antibiotic) หมายถึงสารประกอบเคมีใด ๆ ที่ผลิตขึ้นหรือสร้างขึ้นโดยจุลชีพชนิดใดชนิดหนึ่ง (อาจเป็นแบคทีเรีย เชื้อรา หรือพวกแอคติโนมัยซีส) ซึ่งมีฤทธิ์ที่สามารถยับยั้งหรือขัดขวางการเจริญเติบโตของจุลชีพอีกกลุ่มหนึ่งหรือมีฤทธิ์ไปทำลายจุลชีพกลุ่มนั้น ๆ ดังนั้นจะเห็นได้ว่ายาปฏิชีวนะเป็นยาที่อยู่ในกลุ่มยาต้านจุลชีพนั่นเอง (มาลินี ลิ้มโภคา , 2525)

1. ประวัติการค้นพบสารปฏิชีวนะ

การค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับสารที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อได้มีการเริ่มต้นมาเป็นเวลานาน โดยมีจุดมุ่งหมายที่จะใช้สารที่ผลิตจากธรรมชาติ เช่น สารสกัดจากพืช พืชสมุนไพรต่าง ๆ สำหรับสารที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์นั้นได้ค้นพบมานานกว่า 100 ปี จนกระทั่งในปี 1912 Paul Ehrlich ค้นพบสารที่สามารถรักษาผู้ป่วยและมีความเป็นพิษน้อย สารชนิดแรกนี้ได้ชื่อว่า สารประกอบ 606 หรือ ซาลวาแซน (salvasan) ดัดแปลงจากโมเลกุลของอาซินิคใช้ในการรักษาโรคซิฟิลิส ในสมัยนั้น นอกจากนี้เขายังเป็นผู้ริเริ่มในการใช้สีย้อมเคมี ย้อมเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อ เพื่อใช้แยกเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อจุลินทรีย์และไม่ติดเชื้อออกจากกัน และจากแนวความคิดนี้ทำให้มีการแยกชนิดของสีย้อมทางเคมีกว่าพันชนิด รวมทั้งเป็นจุดเริ่มต้นของการค้นพบยาซัลฟา (sulfa drugs) ในปี 1932 ด้วย

การค้นพบสารปฏิชีวนะเพนนิซิลลิน (penicillin) ในปี 1929 นับเป็นจุดเริ่มต้น ในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อจากจุลินทรีย์ โดยข้อดีของสารปฏิชีวนะคือ สามารถยับยั้งการเจริญหรือฆ่าจุลินทรีย์อื่นด้วยปริมาณความเข้มข้นต่ำ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์ ดังนั้นจึงมีการนำเพนนิซิลลินมาใช้ในการรักษาหรือช่วยชีวิตผู้ป่วยจากโรคปอดบวม (pneumonia)

และโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียแกรมบวก สารปฏิชีวนะที่สำคัญทางการแพทย์ในปัจจุบันส่วนใหญ่จะถูกค้นพบระหว่างปี 1939 ถึง 1963 ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สารปฏิชีวนะสำคัญที่ค้นพบในปีต่าง ๆ

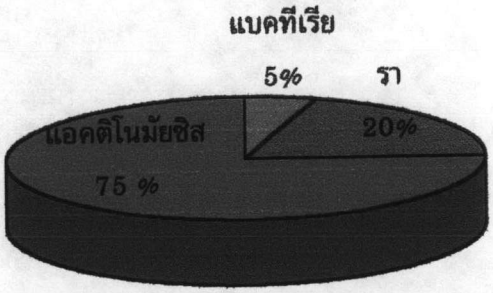
สารปฏิชีวนะ	ปีที่ค้นพบ	แหล่งที่มา	ออกฤทธิ์ยับยั้ง
Isoniazid *	1912	สังเคราะห์ทางเคมี	Mycobacteria
Penicillin G	1928	Penicillium	แบคทีเรียแกรมบวกและ Neisseria
Sulfa drugs *	1935	สังเคราะห์ทางเคมี	แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ
Griseofulvin	1939	Penicillium	รา
Chloroquine *	1941	สังเคราะห์ทางเคมี	*Plasmodium* sp.
Streptomycin	1943	Streptomyces	แบคทีเรียแกรมลบ; Mycobacteria
Bacitracin	1945	Bacillus	แบคทีเรียแกรมบวก
Chloramphenicol	1947	Streptomyces	แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ
Polymyxin	1947	Bacillus	แบคทีเรียแกรมลบ
Tetracycline	1948	Streptomyces	แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ
Cephalosporin	1948	Cephalosporium	แบคทีเรียแกรมบวก
Neomycin	1949	Streptomyces	แบคทีเรียแกรมลบ
Nystatin	1950	Streptomyces	รา
Erythromycin	1952	Streptomyces	แบคทีเรียแกรมบวก
Cycloserine	1954	Streptomyces	แบคทีเรียแกรมบวก
Amphotericin B	1956	Streptomyces	รา
Vancomycin	1956	Streptomyces	แบคทีเรียแกรมบวก
Metronidazole *	1957	สังเคราะห์ทางเคมี	โปรโตซัวและแบคทีเรียไม่ใช้อากาศ
Kanamycin	1957	Streptomyces	แบคทีเรียแกรมลบ

สารปฏิชีวนะ	ปีที่ค้นพบ	แหล่งที่มา	ออกฤทธิ์ยับยั้ง
Rifamycin	1957	Streptomyces	Mycobacteria
Gentamycin	1963	Micromonospora	แบคทีเรียแกรมลบ
Zidovudine *	1964	สังเคราะห์ทางเคมี	Retroviruses
Acyclovir *	1974	สังเคราะห์ทางเคมี	Herpes viruses
Ketaconazole *	1978	สังเคราะห์ทางเคมี	รา
Fluoroquinoline *	1983	สังเคราะห์ทางเคมี	แบคทีเรียแกรมลบ

* เป็นอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ขึ้นไม่ได้สร้างโดยจุลินทรีย์ แต่ออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์บางชนิด ซึ่งจัดเป็น chemotherapeutic agents (McKane and Kandel , 1996)

2. <u>จุลินทรีย์ที่ผลิตสารปฏิชีวนะ</u>

กลุ่มของจุลินทรีย์ที่ผลิตสารปฏิชีวนะประกอบด้วย แบคทีเรีย รา และแอคติโนมัยซิส จะมีแบคทีเรียอยู่จำนวน 5 % ที่ผลิตสารปฏิชีวนะใช้ในปัจจุบัน (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 แผนภูมิแสดงสารปฏิชีวนะทั้งหมดที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

สารปฏิชีวนะที่ผลิตจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* จะเป็นพวกโพลีเปปไทด์ โพลีมัยซิน แกรมมิซิดิน (gramicidin) และไทโรซิดิน (tyrocidin) ซึ่งสารปฏิชีวนะเหล่านี้แม้จะมีสูตรโครงสร้างทางเคมีที่คล้ายกันแต่จะต่างกันที่กลไกการทำงาน เช่น โพลีมัยซิน จะมีผลยับยั้งกับแบคทีเรียแกรมลบ มีผลน้อยต่อพวกแกรมบวก ส่วนแกรมมิซิดิน และไทโรซิดิน ให้ผลตรงข้าม

กลุ่มรา กลุ่มนี้จะมีความสำคัญมากขึ้นต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ 20% ของสารปฏิชีวนะทั้งหมดที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ สารปฏิชีวนะที่ใช้มากทางการแพทย์ จะผลิตโดยราที่อยู่ใน Order Aspergillales คือกลุ่มราที่มีเส้นใยและสร้างสปอร์ สารปฏิชีวนะเหล่านี้ได้แก่ สารปฏิชีวนะพวกเพนนิซิลลิน เซฟาโลสปอริน และ กรดฟูซิดิค (fusidic acid)

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่มีความสำคัญมากที่สุดเป็นพวกที่อยู่ในแอคติโนมัยซิสสกุล *Streptomyces* ซึ่งสามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ 75% ของสารปฏิชีวนะทั้งหมดที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังมี *Nocardia* และ *Micromonospora* ด้วย โดยกลุ่มนี้จะสามารถสังเคราะห์สารประกอบที่ต่อต้านจุลินทรีย์ได้หลายชนิด ซึ่งสารเหล่านี้จะมีทั้งโครงสร้างทางเคมีและกลไกในการทำงานต่างกัน อีกทั้งออกฤทธิ์ในการต่อต้านจุลินทรีย์ในระดับต่าง ๆ ตัวอย่าง เช่น สารแอมโฟเทอริซิน บี (amphotericin B) คลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol) คานามัยซิน (kanamycin) อิริโทรมัยซิน (erythromycin) ไรแฟมมัยซิน (rifamycin) สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) นีโอมัยซิน (neomycin) โนโวไบโอซิน (novobiocin) เป็นต้น

โดยทั่วไปสารปฏิชีวนะจะถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ

1. กลุ่มที่ฆ่าหรือทำให้แบคทีเรียเกิดการแตกสลาย เรียก Bactericidal antibiotics เช่น เพนนิซิลลิน

2. กลุ่มที่เพียงแต่ยับยั้งการเจริญ และการแบ่งตัวของแบคทีเรีย เรียกว่า Bacteristatic antibiotics เช่น คลอแรมเฟนิคอล ซึ่งการทำงานของสารปฏิชีวนะกลุ่มนี้ เป็นผลให้โฮสต์มีการต่อต้านเชื้อจนไม่สามารถเข้าทำลายโฮสต์ได้ และถ้าหยุดการใช้สารในช่วงแรกๆ จุลินทรีย์อาจเจริญต่อไปได้อีก แต่ในกรณีที่ใช้สารปฏิชีวนะในความเข้มข้นสูง ก็อาจใช้ฆ่าจุลินทรีย์ได้ (สายสมร ลำยอง, 2524)

3. การแบ่งชนิดของสารปฏิชีวนะตามกลไกการออกฤทธิ์ (Tortora et al., 1992)

จากกลไกการออกฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะในการยับยั้งหรือฆ่าจุลินทรีย์(รูปที่ 2) สารปฏิชีวนะแบ่งออกได้เป็น 5 ชนิด คือ

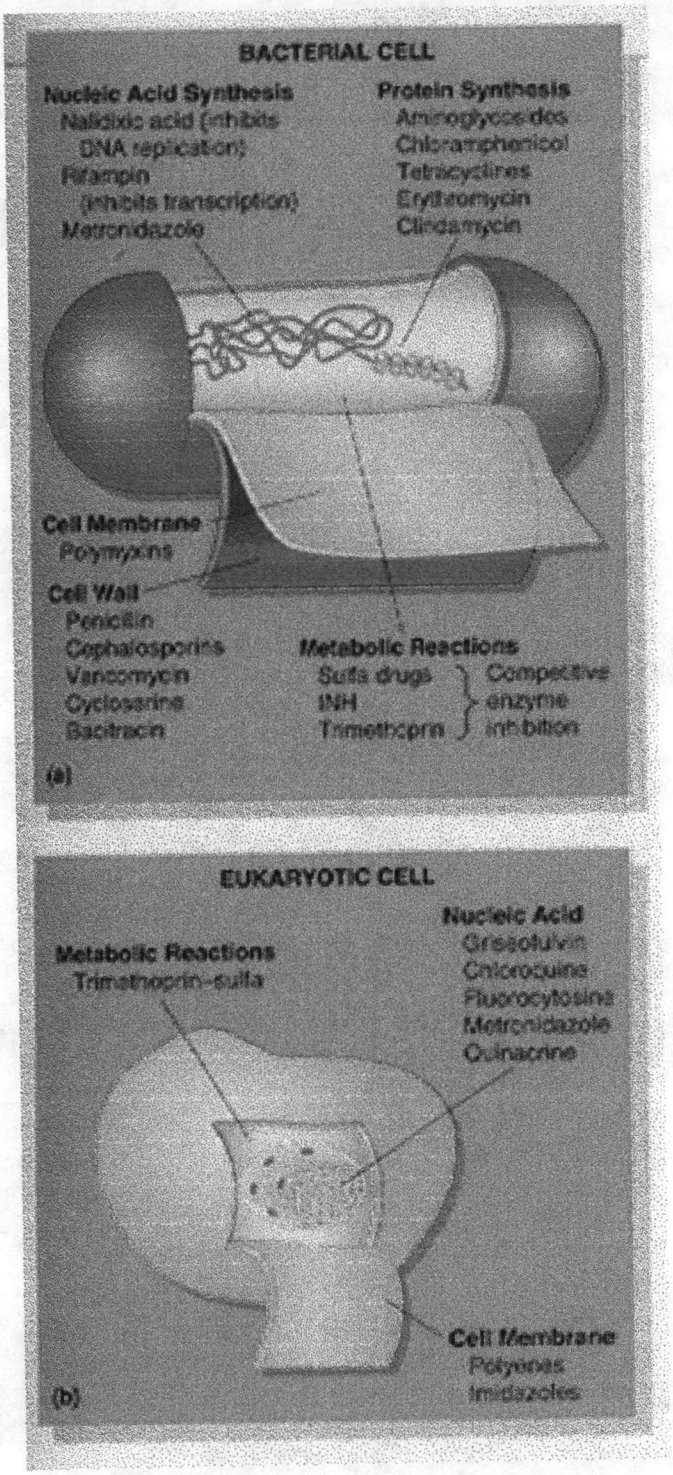
3.1 สารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ ตัวอย่างเช่น ยาในกลุ่มซัลโฟนามีด (sulfonamides)

3.2 สารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ ตัวอย่างเช่น ยาในกลุ่มของเพนนิซิลลิน และเซฟาโลสปอริน (cephalosporin)

3.3สารปฏิชีวนะที่ทำให้เกิดการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ตัวอย่างเช่น โพลีมิกซิน (polymyxin)

3.4 สารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการสร้างโปรตีน ตัวอย่างเช่น ยาในกลุ่มของเตตราไซคลิน อิริโทรมัยซิน กลุ่มแมคโครไลด์ (macrolides) และกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ เช่น ไรแฟมพิน (rifampin) สเตรปโตมัยซิน คานามัยซิน

3.5 สารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก ตัวอย่างเช่น ไรฟามัยซิน กรดนาลิไดซิก (nalidixic acid) และไตรเมโธพริน (trimethoprin)



รูปที่ 2 แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะในเซลล์จุลินทรีย์ (a) ยาที่มีผลยับยั้งแบคทีเรีย (Antibacterial drugs) ; (b) ยาที่มีผลต่อจุลินทรีย์ก่อโรคพวกยูคารีโอติก (drugs used against eukaryotic pathogens) (McKane and Kandel , 1996)

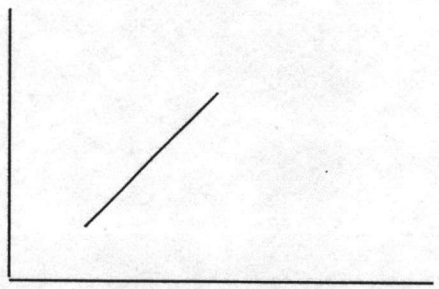
4. ขั้นตอนการวิเคราะห์สารปฏิชีวนะที่ผลิตได้ (Reeves and White , 1983)

4.1 การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา (Microbiological assays)

การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยานี้เป็นการตรวจดูการตอบสนอง (response) ระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์ กับสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้

4.1.1 การแพร่ในวุ้น (Agar diffusion assays)

การแพร่ของยาในวุ้นซึ่งมีจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบเจริญอยู่บริเวณผิวหน้าจะทำให้เกิดวงใส (inhibition zone) เมื่อสังเกตผลจากวงใสที่ปรากฏก็จะทราบว่า จุลินทรีย์นั้นไวต่อสารปฏิชีวนะชนิดใดบ้าง และจำเป็นต้องมีกราฟมาตรฐาน (standard curve) อย่างน้อย 2 ค่าจนถึง 7 ค่า ซึ่งจะต้องครอบคลุมช่วงความเข้มข้นที่วัด กราฟมาตรฐานที่ใช้จะเป็น logarithmic scale (เช่น 0.5 1 2 4 8 16 32 มิลลิกรัมต่อลิตร) การวาดกราฟจะวาดระหว่าง $\log_{10}$ ของความเข้มข้น กับเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร) ซึ่งปกติแล้วจะได้เส้นตรง ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์โดยการแพร่ในวุ้น

สารปฏิชีวนะที่มีความเข้มข้นต่ำมาก ๆ นั้น ยากจะตรวจโดยวิธีทางเคมีหรือฟิสิกส์ แต่สามารถใช้วิธีการแพร่นี้ได้ แต่ต้องคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

ก. ส่วนประกอบของอาหารจะต้องได้มาตรฐาน คือ ควรใช้อาหารที่จะใช้สำหรับการทดสอบสารปฏิชีวนะโดยเฉพาะ ความหนาและปริมาณน้ำในวุ้นก็ต้องอยู่ในมาตรฐาน

ข. เชื้อตั้งต้นต้องมีความคงที่ทั้งปริมาณการเจริญและความไวต่อสารปฏิชีวนะ ถ้าเชื้อตั้งต้นมากเกินไป บริเวณของการยับยั้งจะมองไม่ชัด จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบก็จะต้องใช้จุลินทรีย์ชนิดที่ทราบว่าไวต่อสารปฏิชีวนะแล้ว โดยตรวจสอบจากเอกสาร

ค. ช่วงเวลาการเพาะเลี้ยงและอุณหภูมิต้องคงที่ ถ้าเวลานานเกินไปจะทำให้เกิดการเจริญขึ้นใหม่อีกได้ ในบริเวณที่ถูกยับยั้ง

ง. เพื่อให้ได้ผลถูกต้องแน่นอน ต้องทำการทดลองซ้ำหลายๆ ครั้ง และเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสที่เกิดจากความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะที่ทราบ ต้องนำมาเปรียบเทียบทางสถิติกับเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสที่เกิดจากสารปฏิชีวนะที่เราต้องการทดสอบ

4.1.2 วิธีทางจุลชีววิทยาแบบรวดเร็ว (Rapid microbiological assay methods)

เนื่องจากวิธีวิเคราะห์แบบเดิมจะใช้เวลาในการบ่มเชื้อหลายชั่วโมง จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคให้รวดเร็วขึ้นโดยวัดการแปรผันอัตราการเจริญในช่วงสั้น ๆ วิธีดังกล่าวได้แก่ วิธียูรีเอส (Urease) และลูซิเฟอเรส (Luciferase assay) แต่วิธีทั้งสองนี้จะถูกยับยั้งโดยสารปฏิชีวนะในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ เนื่องจากสารกลุ่มนี้จะยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ทั้งสองวิธีนี้จะให้ความเชื่อถือต่ำ และนำไปประยุกต์ใช้ได้ยาก

4.2 การวิเคราะห์ทางเอนไซม์ที่ติดฉลากรังสี (Radioenzymatic)

การวิเคราะห์โดยวิธีนี้ใช้สำหรับวิเคราะห์สารในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์และคลอแรมเฟนิคอล แต่วิธีนี้จะมีความผิดพลาดค่อนข้างสูง เพราะจะมีนิวคลีโอไทด์รังสี (radionucleotide)ที่มีประจุบวกเจือปนอยู่ในตัวอย่าง จึงทำให้ผลการวิเคราะห์มีแอคติวิตีของรังสีเจือปนอยู่ด้วยเสมอ

4.3 การวิเคราะห์ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (High-Performance or High-pressure Liquid chromatography , HPLC)

วิธี HPLC นี้ถูกพัฒนามาจากโครมาโตรกราฟฟีแบบของเหลว (Liquid chromatography, LC) ในวิธีโครมาโตรกราฟฟีแบบของเหลวจะใช้เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นของเหลวขับผ่านเฟสคงที่ (stationary phase) โดยสารที่เราจะวิเคราะห์จะถูกจับในขณะที่เฟสเคลื่อนที่ผ่านมายังเฟสคงที่และการแยกแบบโครมาโตรกราฟฟีจะเกิดขึ้นในเฟสคงที่ หลังจากผ่านเฟสคงที่แล้ว เฟสเคลื่อนที่จะผ่านต่อไปยังตัวตรวจผล (detector) โดยอาศัยการวัดความสูงหรือพื้นที่ใต้กราฟ ซึ่งวิธีนี้ตัวอย่างจะไม่ถูกทำลายและสามารถเก็บแต่ละ fraction ไปวิเคราะห์แอคติวิตีของสารปฏิชีวนะต่อไป วิธีโครมาโตรกราฟฟีแบบของเหลวนี้สามารถใช้

แยกและหาปริมาณสารปฏิชีวนะ โดยมีข้อดีดังนี้คือ เป็นวิธีที่รวดเร็ว ควบคุมง่าย มีความแม่นยำ ความไว และความจำเพาะสูง สามารถแยกสารที่มีสูตรเคมีใกล้เคียงกันออกจากกันได้

4.4 การวิเคราะห์ทางภูมิคุ้มกัน (Immunoassay)

เทคนิควิเคราะห์ทางภูมิคุ้มกันจะใช้ แอนติบอดี (antibody) ที่จำเพาะ โดยวิธีนี้จะมีความจำเพาะและความไวสูง แต่มีข้อเสียคือในการเตรียมต้องใช้เวลาและเสียค่าใช้จ่ายสูง เทคนิควิเคราะห์วิธีนี้ควบคุมง่ายและรวดเร็ว อย่างไรก็ตามวิธีนี้ไม่สามารถวิเคราะห์สารปฏิชีวนะในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ ได้

5. สารปฏิชีวนะคานามัยซิน (Kanamycin)

คานามัยซินเป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ (aminoglycoside) ดังแสดงในตารางที่ 2 ค้นพบครั้งแรกโดย Umezawa และคณะ ในปี 1957

ตารางที่ 2 สารปฏิชีวนะในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์

I. Aminoglycosides without cyclitol or aminocyclitol	
1. Monosaccharides	Nojirimycin
	3-Amino-3-deoxy-D-glucose
	Streptozotocin
2. Disaccharides	Trehalosamine
	Mannosylglucosaminide
II. Aminoglycosides with cyclitol	
1. Disaccharide	Kasugamycin
2. Oligosaccharide	Validamycin

ตารางที่ 2 (ต่อ)

III. Aminoglycosides with aminocyclitol	
1. Disaccharides	Neamine (Neomycin A)
	Paromamine
	6-Amino-6-deoxy-D-glucosyl deoxystreptamine
	3-Amino-3-deoxy-D-glucosyl deoxystreptamine
	Hybrimycins A_3 and B_3
2. Oligosaccharides	
a) Streptomycin group	Streptomycin
	Mannosidostreptomycin (Streptomycin B)
	Hydroxystreptomycin
	Dihydrostreptomycin
	Glebomycin (Bluenosomycin)
b) Kanamycin group	Kanamycin (A), B and C
	NK-1001, NK1012-1
	Tobramycin (Nebramycin factor 6)
c) Gentamicin group	Gentamicins C_1, C_{1a} and C_2, and A
	Sisomicin
d) Spectinomycin (Actinospectacin)	

ตารางที่ 2 (ต่อ)

e) Neomycin group	Neomycin B and C
	(Streptothricin BII and BI)
	Hybrimycins A_1, A_2, B_1 and B_2
	Paromomycins I and II
	(Zygomycins A_1 and A_2)
	Lividomycins A and B
	Mannosylparomomycin
	Ribostamycin
	Butirosins A and B
f) Destomycin group	Destomycins A and B
	Hygromycin B
	A-396-I

ที่มา: Tanaka , 1975

5.1 <u>จุลินทรีย์ที่สร้างคานามัยซิน</u>

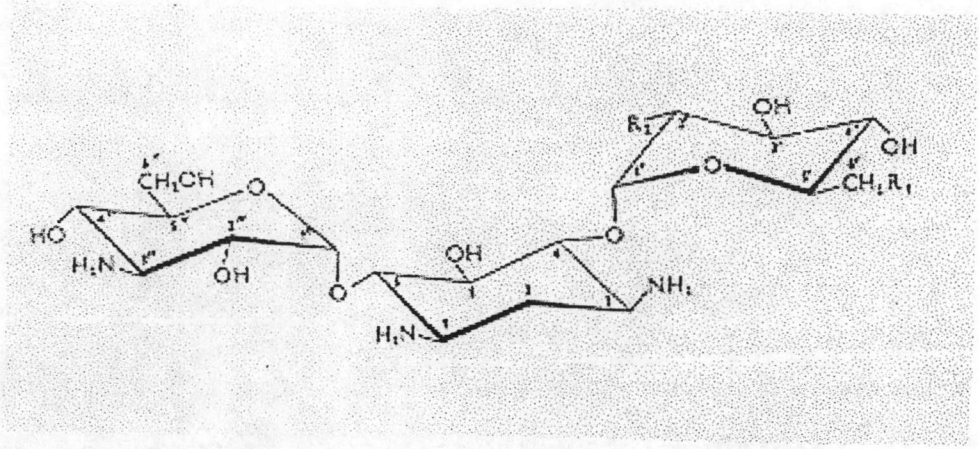
คานามัยซินเป็นสารปฏิชีวนะที่สร้างโดยจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Streptomyces* ถูก ค้นพบโดย Umezawa และคณะ ในปี 1957 เชื้อที่สร้างคือ *Streptomyces kanamyceticus* ต่อมาพบว่านอกจากเชื้อดังกล่าว ยังมี *Streptomyces mitakiensis* และ *Streptomyces canus* สามารถสร้างคานามัยซินได้เช่นเดียวกัน (Abou. - Zeid et al.,1971 ; Abou. - Zeid et al., 1972) แต่ในเชิงอุตสาหกรรมยังผลิตได้น้อย

5.2 กลไกการออกฤทธิ์ (Mode of Action)

เนื่องจากคานามัยซินจัดเป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์เช่นเดียวกับนีโอมัยซิน เจนตามัยซิน และสเตรปโตมัยซิน ดังนั้นจะมีผลต่อการสังเคราะห์โปรตีนโดยยับยั้งการเคลื่อนย้ายตำแหน่งของไรโบโซม (Gale et al., 1981) และยับยั้งการแปลรหัส (translation) ในช่วงเริ่มต้นในการเข้ารวมกันระหว่าง formyl methionine-t RNA กับ 70S subunit ของไรโบโซม รวมทั้งทำให้เกิดการอ่านรหัสบน m RNA ผิด เช่นการอ่านดีเอ็นเอเบสไพริมิดีน (pyrimidine) ในตำแหน่งที่ 1 , 2 ของ codon ผิดเป็นไพริมิดีนตัวอื่น หรือการอ่านรหัสหยุดผิดพลาด ถ้ามีปริมาณคานามัยซินมากจะยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนอย่างถาวร (Jawetz et al .,1984 ; Korzybski et al., 1978 ; Franklin and Snow ,1989 ; Tanaka , 1975 ; Voet and Voet , 1990)

5.3 โครงสร้างทางเคมีของคานามัยซิน

คานามัยซินมีสูตรโมเลกุลเป็น C_{18} H_{36} N_4 O_{11} ประกอบด้วยโครงสร้างหลัก 3 ส่วนคือ 3- อะมิโน-3-ดีออกซี-ดี-กลูโคส (3-amino-3-deoxy-D-glucose (3AG)) 2-ดีออกซีสเตรปทามีน (2-deoxystreptamine (2DS)) และอะมิโนซูการ์ ซึ่งส่วนที่เป็นอะมิโนซูการ์จะแตกต่างกันในแต่ละอนุพันธ์ของคานามัยซิน (Umezawa , 1986) โครงสร้างหลักของ คานามัยซินแสดงในรูปที่ 4 (Korzybski et al., 1978)



รูปที่ 4 โครงสร้างหลักของคานามัยซิน

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

5.4 การสังเคราะห์คานามัยซิน

การสังเคราะห์คานามัยซินทางชีววิทยา (Biosynthesis) จะมีขั้นตอนสรุปดังนี้

Glucose

↓

Glucose-6-phosphate

↓

myoinosital

↓

2-deoxystreptamine-(P)(2DS)

2-deoxystreptamine-(P)(2DS)+NDP-6-amino-6-deoxy-D-glucose(6AG)+
UDP-3-amino-3-deoxy-D-glucose(3AG)

↓

Kanamycin A

2-deoxystreptamine-(P)(2DS)+NDP-2,6-diamino-2,6-dideoxy-D-glucose +
UDP-3-amino-3-deoxy-D-glucose(3AG)

↓

Kanamycin B

2-deoxystreptamine-(P)(2DS)+NDP-glucosamine+
UDP-3-amino-3-deoxy-D-glucose(3AG)

↓

Kanamycin C

3AG, 2DS และ 6AG สามารถสังเคราะห์ได้จากกลูโคส นอกจากนี้ 6 AG ยังสามารถสังเคราะห์ได้จากกลูโคซามีน (glucosamine) (Umezawa et al., 1968) สารเริ่มต้น (precursor) ที่ใช้ในการสังเคราะห์คานามัยซิน ได้แก่ พาโรมามีน (paromamine), 4-ออกซิ-(อัลฟา-ดี-กลูโคซามีนิล-2-ดีออกซิสเตรปทามีน) (4-O-(α-D-glucosaminyl)-2-deoxystreptamine), 2-ดีออกซิ-สเตรปทามีน (2DS) และกลูโคซามีน (Umezawa et al., 1957, 1969) ส่วนการสังเคราะห์คานามัยซินแบบกึ่งสังเคราะห์ (semisynthesis) พบว่าคานามัยซินซี สามารถสังเคราะห์ได้โดยเริ่มจากพาโรมามีน หรือสังเคราะห์ได้จากคานามัยซินบี (Umezawa et al., 1957, 1968, 1969, 1977, 1986)

5.5 <u>สมบัติทางเคมี</u>

สามารถแยกคานามัยซินจากขบวนการหมัก โดยการดูดซับด้วยแอมเบอร์ไลต์ (amberlite) IRC-50 แล้วชะด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มัล สารที่ถูกชะออกมาจะปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 6.0 และทำให้เข้มข้นภายใต้สูญญากาศ ต่อจากนั้นนำมาระเหิดแห้งภายใต้จุดเยือกแข็ง (lyophilize) แล้วทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีดูดซับ หรือวิธีแลก

เปลี่ยนไอออน แล้วตกตะกอน สารที่ได้จะอยู่ในรูปไฮโดรคลอไรด์ เมื่อนำไปแยกด้วยโครมาโตรกราฟฟีแบบกระดาษ (paper chromatography) ซึ่งใช้ตัวทำละลายเป็น 2 % กรดโทลูอีนซัลโฟนิก (toluenesulphonic acid) กับ เอ็น-บิวทานอลที่อิ่มตัว (saturated n-butanol) จะแยกสารปฏิชีวนะได้ 3 ชนิด คือ คานามัยซินซี คานามัยซินเอ และคานามัยซินบี ซึ่งสารทั้ง 3 ชนิดจะมีค่า R_f = 0, 0.21-0.26 และ 0.37 ตามลำดับ โดยสารที่มี R_f = 0 จะไม่ค่อยพบนัก และจะมีความเป็นพิษมากกว่าสองชนิดหลัง สารที่มีค่า Rf = 0.21 - 0.26 จะเป็นสารที่พบมากที่สุดในขบวนการหมักคานามัยซิน สารชนิดที่ R_f = 0.37 จะพบในปริมาณมากรองลงมา (Cron et al., 1958 ; Schmitz et al., 1958 ; Gourevitch et al., 1958-59 ; Umezawa et al., 1960)

โดยทั่วไปคานามัยซินเอจะถูกแยกในรูปไฮโดรคลอไรด์หรือซัลเฟต ถ้าในรูปไฮโดรคลอไรด์จะละลายได้ในน้ำและเมธานอล ละลายได้เล็กน้อยในเอธานอล แต่ไม่ละลายในอะซีโตน เอธิลอะซีเตท บิวทิลอะซีเตท อีเทอร์เบนซีน และปิโตรเลียมอีเทอร์

คานามัยซินเอ ประกอบด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic link) ระหว่างดีออกซีสเตรปทามีน (deoxystreptamine) และคาโนซามีน (kanasamine) ทำให้ทนต่อการไฮโดรไลซ์ด้วยกรด (Maeda et al., 1958 ; Umezawa and Tsuchiya , 1962)

คานามัยซินเอจะมีชื่อเรียกทางการค้า เช่น Kanamycin A sulfate , Cantrex , Enterokanamycin , Resistomycin , Kanabristol , Kanacin , Kantrexil ฯลฯ

คานามัยซินบี จัดเป็นสารที่มีฤทธิ์เป็นเบส ละลายได้ในน้ำ สามารถแยกจากคานามัยซินเอ โดยการทำโครมาโตรกราฟฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน โดยมีโดเวกซ์ (Dowex) เป็นตัวแลกเปลี่ยนไอออน (ion exchanger) (Rothrock et al.,1959)

คานามัยซินบี สลายตัวด้วยความร้อนที่อุณหภูมิมากกว่า 170 องศาเซลเซียส และไม่ดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต แต่เมื่อทำการไฮโดรไลซ์ในกรดไฮโดรคลอริก 6 นอร์มัล เป็นเวลา 40 นาที จะดูดกลืนแสงเล็กน้อยที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร สามารถละลายได้ในน้ำและฟอร์มามีด (formamide) ละลายได้เล็กน้อยในคลอโรฟอร์มและไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์ แต่จะไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ตัวอื่น ๆ

การย่อยสลายคานามัยซินบีในกรดไฮโดรคลอริก 6 นอร์มัล โดยให้ความร้อนเป็นเวลา 30 นาที พบว่าจะได้ degradation product ที่มีแอคติวิตีเหลืออยู่ 20% ซึ่งในภาวะเดียวกันนี้คานามัยซินเอจะไม่มีแอคติวิตีเหลืออยู่

คานามัยซินบี มีชื่อเรียกทางการค้า เช่น Bekanamycin , Aminodeoxykanamycin และ NK1006

คานามัยซินซี พบโดย Murase และคณะในปี 1961 สามารถถูกแยกออกจากคานามัยซินเอและบีที่ได้จากกระบวนการหมักด้วยการตกผลึกซ้ำ ๆ (repeated recrystallization) ด้วยสารละลายผสมของไดเมธิลฟอร์มามีด (dimethylformamide) กับน้ำ ผลึกที่ได้จะไม่มีสี

คานามัยซินซี สลายตัวด้วยความร้อนประมาณ 270 องศาเซลเซียส ไม่ดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต สามารถละลายในน้ำ ละลายได้เล็กน้อยในฟอร์มามีด แต่จะไม่ละลายในเมธานอล เอธานอล ไอโซโพรพานอล เอ็น-บิวทานอล ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ เมธิลเอธิลคีโตน อะซีโตน คลอโรฟอร์ม คาร์บอนเตตระคลอไรด์ เบนซีน โทลูอีน ปิโตรเลียม อีเทอร์ เอสเทอร์และไดออกเซน

คานามัยซินซี เมื่อทำปฏิกิริยากับกรดไฮโดรคลอริก 6 นอร์มัล เป็นเวลา 10 นาที จะสูญเสียแอคติวิตีถึง 40% และจะสูญเสียแอคติวิตีทั้งหมด เมื่อทำปฏิกิริยานาน 30 นาที

คานามัยซินซีจัดเป็นไอโซเมอร์ (isomer) ของคานามัยซินเอ สามารถออกฤทธิ์คล้ายคลึงกับคานามัยซินเอ ในกรณีของแบคทีเรียแอซิดฟาสต์ จะออกฤทธิ์ได้น้อยกว่าคานามัยซินเอ (Korzybski et al ., 1967 ; Umezawa et al ., 1968 ;Umezawa et al., 1969 ; Budavari , 1989 ; Sechmitz et al ., 1958)

5.6 การสกัดและการทำบริสุทธิ์

คานามัยซินสามารถถูกดูดซับในคอลัมน์ที่บรรจุด้วยเรซินชนิดแลกเปลี่ยนประจุบวก (cation exchange resin) และถูกชะออก (elute) ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก สารละลายกรดซัลฟูริก และสารละลายแอมโมเนีย ซึ่งจะได้สารละลายคานามัยซินออกมาในรูปของคานามัยซินไฮโดรคลอไรด์ คานามัยซินซัลเฟต และคานามัยซินเบส ตามลำดับ

การตกผลึกคานามัยซินอาศัยคุณสมบัติที่คานามัยซินซัลเฟตจะละลายในน้ำแต่ไม่ละลายใน 50 % เมธานอล ดังนั้นเมื่อใช้เมธานอลเติมลงในสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ จะได้คานามัยซินซัลเฟตตกผลึกออกมา ส่วนคานามัยซินไฮโดรคลอไรด์และคานามัยซินเบส จะต้องเปลี่ยนให้อยู่ในรูปคานามัยซินซัลเฟตเสียก่อนจึงนำมาตกผลึกได้ ผลึกซัลเฟตของคานามัยซินจะอยู่ในรูปเฮมิซัลเฟต (hemisulfate) และในรูปโมโนซัลเฟต (Umezawa, 1958)

5.7 ลักษณะบางประการของ *Streptomyces kanamyceticus*

โคโลนีของ *S. kanamyceticus* เมื่อเจริญบนอาหารวุ้น จะให้ไมซีเลียมที่มีความกว้างประมาณ 1 ไมโครเมตร และมีการแตกแขนง (branching) โคโลนีจะมีสีเหลือง โดยอาจมีสีเขียวหรือสีชมพูปนอยู่ด้วยส่วนไมซีเลียมที่เจริญฝังลงในอาหารเรียกว่า เวเจตเททีฟ ไมซีเลียม (vegetative mycelium) จะใส (hyaline) ไมซีเลียมที่เจริญอยู่ในอากาศเรียกว่า แอร์เรียล ไมซีเลียม (aerial mycelium) จะมีสีขาวจนถึงสีเหลืองอ่อน สร้างก้านชูสปอร์ (sporophores) ที่ปลายเส้นใย ไม่พบส่วนเส้นใยที่ม้วนเป็นเกลียว (spiral) หรือก้นหอย (whorl) ไม่สร้างรงควัตถุ (pigment) บนอาหารอินทรีย์ (organic media) แต่สามารถสร้างรงควัตถุสีน้ำตาลอ่อนในอาหารสังเคราะห์ (synthetic media) บางชนิดเช่น Glyceral-Czapek agar (Umezawa ,1958) นอกจากนี้สามารถเจริญในอาหารชนิดอื่นได้ เช่น Krainsky's glucose asparagine agar , calcium malate agar , starch plate , potato plug , carrot plug , peptone-meat extract agar , blood agar เป็นต้น (Umezawa et al ., 1960)

S. kanamyceticus เมื่อเจริญในสภาวะที่เหมาะสมจะมีการผลิตคานามัยซิน โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตคานามัยซินนั้น เตรียมได้โดยนำสปอร์หรือเส้นใยของจุลินทรีย์ดังกล่าว มาเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมภายใต้สภาวะมีอากาศสำหรับการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเพื่อที่จะผลิตคานามัยซินก็สามารถทำได้แต่พบว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวจะมีปริมาณของคานามัยซินมากกว่า (Umezawa et al.,1960)

5.8 การผลิตคานามัยซินของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์ต่าง ๆ

ในการผลิตคานามัยซินของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์ต่างๆ มีรายงานโดย Umezawa (Umezawa et al ., 1958 ; Umezawa et al., 1960) ซึ่งได้ทำการเพาะเลี้ยง *S. kanamyceticus* K-2J ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย แป้ง 2.0% กลูโคส 0.5% กากถั่วเหลือง 1.2% KCl 0.05% $MgSO_4$ 0.1% K_2HPO_4 0.1% NaCl 0.3% เปปโตน 0.3% $CaCO_3$ 0.3% ในถังหมักขนาด 400 ลิตร เป็นเวลา 78 ชั่วโมง จะให้ปริมาณคานามัยซิน 273 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในปี 1976 Satoh และคณะ ได้ทำการเพาะเลี้ยง *S. kanamyceticus* 133-28 สามารถผลิตคานามัยซินได้ 110 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และในปี 1975 Basak และ Majumdar ได้ทำการเพาะเลี้ยง *S. kanamyceticus* ATCC 12853 ในอาหาร

เลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย กาแลคโตส 20.0 กรัม โซเดียมไนเตรท 5.1 กรัม K_2HPO_4 1.0 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 0.4 กรัม $FeSO_4 . 7H_2O$ 0.00125 กรัม $ZnSO_4 . 7H_2O$ 0.0025 กรัม $Na_2MoO_4.2H_2O$ 0.0001 กรัม สามารถให้ปริมาณคานามัยซินเป็น 195 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5.9 <u>การควบคุมการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ</u> (Control of Antibiotic Biosynthesis)

สารปฏิชีวนะจัดเป็นสารเมตาโบไลต์ ขั้นที่ 2 (secondary metabolites) โดยบางครั้งจะถูกเรียกว่า ไอดิโอไลท์ (idiolites) (Walker , 1974) เนื่องจากเกิดในระยะไอดิโอเฟส (idiophase) หรือระยะสร้างผลผลิต (production phase) ของการเลี้ยงเชื้อแบบงวดเดียว (batch culture) ซึ่งสารจำพวกนี้จะไม่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ แต่จะทำให้สามารถรอดชีวิตในธรรมชาติได้ สารเมตาโบไลต์ขั้นที่ 2 นี้จะถูกสร้างโดยหลายวิถีทางที่แตกต่างกัน ส่วนใหญ่จะเกิดจากการรวมตัวกันของสารเมตาโบไลต์ที่เป็นสารมัธยันต์ (intermediary metabolites) 2-3 ชนิด ลักษณะที่สำคัญของสารเมตาโบไลต์ ขั้นที่ 2 คือ จะสร้างในช่วงที่อัตราการเจริญลดลง โดยอาศัยการควบคุมจากตัวควบคุม 2 ชนิด คือ ชนิดแรกเป็นตัวที่ควบคุมเกี่ยวกับอัตราการเจริญ และชนิดที่ 2 เป็นตัวควบคุมความจำเพาะต่อการสร้างสารปฏิชีวนะ (Martin and Demain , 1980)

การสร้างสารปฏิชีวนะจะเกิดในกรณีที่มีสารอาหารต่อการเจริญจำกัด ดังนั้นจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้จะมีความได้เปรียบและสามารถรอดชีวิตในสิ่งแวดล้อมได้ดีกว่า เช่น *Cephalosporium gramineum* จะผลิตเซฟาโลสปอรินในที่มีสารอาหารจำกัดเพื่อให้สามารถอยู่รอดในธรรมชาติได้ (Bruchl et al.,1969) การขาดสารอาหารมักจะก่อให้เกิดการเหนี่ยวนำการเปลี่ยนแปลงในตัวจุลินทรีย์ (differentiation effectors) เช่น การสร้างสปอร์ใน bacilli (Hodgson ,1970) และการสร้างโคนิเดียใน streptomycetes และบางครั้งสารปฏิชีวนะบางชนิดอาจเป็นตัวที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวขึ้น เช่นสารปฏิชีวนะนั้น ๆ อาจเป็นตัวที่กระตุ้นการ สร้างสปอร์หรือการงอกของสปอร์ (Demain and Piret , 1979 ; Sadoff ,1972 ; Sarkar and Paulus , 1972)

5.10 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารปฏิชีวนะ

ระยะ 20 ปีที่ผ่านมา ได้มีงานวิจัยที่เกี่ยวกับการหาภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารปฏิชีวนะด้วยวิธีการเลี้ยงแบบงวดเดียว (batch) และวิธีการเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่อง (fed-batch cultures) (Bajpai and Reuss , 1981 ; Matsumura et al., 1981 ; Lim et al., 1986 ; Modak and Lim , 1989 ; San and Stephanopoulos , 1989) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นงานวิจัยที่นำวิธีทางคณิตศาสตร์มาสร้างแบบจำลอง ซึ่งจะใช้เวลานานมากและไม่สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรม ดังนั้นจึงได้มีการทดลองที่เน้นไปทางภาวะการเลี้ยง เช่น ปี 1983 Mou และ Cooney ได้ทำการศึกษาปริมาณการเติมสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะในการหมักเพนนิซิลลิน ซึ่งการควบคุมดังกล่าวทำโดยค่อยๆ เติมกลูโคสและคอร์นสตีพลิเคอร์ (corn steep liquor) ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดซับซ้อน (complex medium) เมื่อช่วงระยะของการเจริญผ่านไปครึ่งหนึ่ง ทำให้มีการสร้างเพนนิซิลลินสูงขึ้น ดังนั้นเทคโนโลยีทางการหมักจึงควรมีการพัฒนาต่อไปเรื่อยๆ โดยอาศัยด้านเครื่องมือที่ซับซ้อน การประยุกต์เทคนิค การควบคุมย้อนกลับ (feedback control) การใช้คอมพิวเตอร์ รวมทั้งการแปรผันทั้งปริมาณและปรับปรุงเซลล์ในช่วงผลิตผลให้มีการผลิตมากขึ้น (Hugo and Russel , 1983)

การสร้างสารปฏิชีวนะนั้นเกิดจากการที่จุลินทรีย์ขาดสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญหนึ่งชนิดหรือมากกว่า ซึ่งจะทำให้การเจริญคงที่และจะเข้าสู่ระยะผลิตผลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารที่จำกัดต่อการเจริญ จะพบว่าเชื้อจะเริ่มมีการผลิตสารปฏิชีวนะในขณะที่การเจริญเกิดขึ้นช้าๆ (Martin and Demain , 1980) อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าอัตราการสร้างสารปฏิชีวนะจะไม่เกี่ยวข้องกับอัตราการเจริญในระยะสร้างผลผลิต แต่ปริมาณเซลล์ในระยะการเจริญจะเกี่ยวข้องกับการสร้างสารปฏิชีวนะในระยะสร้างผลผลิต ดังนั้นภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อเพื่อให้มีการสร้างสารปฏิชีวนะมากที่สุดนั้น จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องควบคุมเซลล์ในระยะการเจริญ (Yang et al., 1995)

ปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการสร้างสารปฏิชีวนะมีดังนี้คือ

5.10.1 แหล่งคาร์บอน

โดยปกติกลูโคสจะเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ แต่ก็จะขัดขวาง (interfere) การสร้างสารปฏิชีวนะของจุลินทรีย์หลายชนิด ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การควบคุมการสร้างสารปฏิชีวนะโดยแหล่งคาร์บอน

สารปฏิชีวนะ	ชนิดคาร์บอนที่ขัดขวางการสร้าง	ชนิดคาร์บอนที่ไม่ขัดขวางการสร้าง	เอกสารอ้างอิง
เพนนิซิลลิน (penicillin)	กลูโคส	แลคโตส	Soltero and Johnson , 1954
แอคติโนมัยซิน (actinomycin)	กลูโคส	กาแลคโตส	Gallo and Katz , 1972
สเตรปโตมัยซิน (streptomycin)	กลูโคส	แมนแนนและการเติมกลูโคสอย่างช้า ๆ	Inamine et al.,1969; Demain and Inamine , 1970
ซิโอมัยซิน (siomycin)	กลูโคส	มอลโตส	Kimura , 1967
อินโดลมัยซิน (indolmycin)	กลูโคส	ฟรุกโตส	Hurley and Bialek , 1974
เบซิเทรซิน (bacitracin)	กลูโคส	ซิเตรท	Haavik , 1974
เซฟาโลสปอริน-ซี (cephalosporin-c)	กลูโคส	ซูโครส	Demain , 1963
คลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol)	กลูโคส	กลีเซอรอล	Smith and Hinman , 1963
วิโอลาซีอิน (violacein)	กลูโคส	มอลโตส	DeMoss , 1967
โพรดิจิโอซิน (prodigiosin)	กลูโคส	กาแลคโตส	Ramsey et al.,1973

ตารางที่ 3 (ต่อ)

สารปฏิชีวนะ	ชนิดคาร์บอนที่ขัดขวางการสร้าง	ชนิดคาร์บอนที่ไม่ขัดขวางการสร้าง	เอกสารอ้างอิง
มิโตมัยซิน (mitomycin)	กลูโคส	กลูโคสปริมาณต่ำ	Kirsch , 1967
นีโอมัยซิน (neomycin)	กลูโคส	มอลโตส	Majumdar and Majumdar , 1971
คานามัยซิน (kanamycin)	กลูโคส	กาแลคโตส	Basak and Majumdar , 1973
เอนเนียทิน (enniatin)	กลูโคส	แลคโตส	Audhya and Russell , 1975
พูโรมัยซิน (puromycin)	กลูโคส	กลีเซอรอล	Sankaran and Pogell , 1975
โนโวไบโอซิน (novobiocin)	ซิเตรท	กลูโคส	Kominek , 1972
แคนดิดิน (candidin)	กลูโคส	การเติมกลูโคสอย่างช้า ๆ	Martin and McDaniel , 1974
แคนดิฮีซิน (candihexin)	กลูโคส	การเติมกลูโคสอย่างช้า ๆ	Martin and McDaniel , 1974
บิวทิโรซิน (butirosin)	กลูโคส	กลีเซอรอล	Howell et al.,1972
เซฟามัยซิน (cephamycin)	กลีเซอรอล	แอสปาราจีน, แป้ง	Aharonowitz and Demain , 1978

มีรายงานการศึกษาว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการสร้างสารปฏิชีวนะมักจะเป็นโพลีแซคคาไรด์(polysaccharide)หรือโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) (Soltero และ Johnson, 1953) โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกลูโคสและแหล่งคาร์บอนอื่นที่ใช้ได้ยากกว่า พบว่ากลูโคสจะถูกใช้ก่อนในช่วงที่ไม่มีการสร้าง

สารปฏิชีวนะหลังจากกลูโคสถูกใช้หมด แหล่งคาร์บอนที่สองที่ใช้ได้ยากกว่าจะถูกใช้ในการสร้างสารปฏิชีวนะ (Audhya and Russell , 1975 ; Demain , 1963 ; Gallo and Katz , 1972) สาเหตุประการสำคัญที่กลูโคสไม่เหมาะสมในการสร้างสารปฏิชีวนะ เนื่องจากกลูโคสจะทำให้เกิดการคาตาโบไลท์รีเพรสชันของคาร์บอน ซึ่งเกี่ยวข้องทั้งอัตราการเจริญและการควบคุมการสร้างสารปฏิชีวนะด้วย (Bu′ Lock , 1974 ; Martin and Demain , 1978) ตัวอย่างเห็นได้จากการสร้างเพนนิซิลลิน พบว่าการเติมกลูโคสอย่างช้า ๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้เกิดการเจริญอย่างช้า ๆ พร้อมกับกำจัดการยับยั้งของกลูโคส (Soltero and Johnson , 1954) ในบางกรณีกลูโคสจะกด (repress) การทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการสร้างสารปฏิชีวนะ เช่น กลูโคสจะยับยั้งการสร้างนีโอมัยซินใน *Streptomyces fradiae* โดยจะกดการทำงานของเอนไซม์ฟอสฟาเทส (phosphatase) (Majumdar and Majumdar , 1971)

แหล่งคาร์บอนสำคัญที่พบว่ามีผลต่อการสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ ซึ่งผลิตโดย *Streptomyces* แอคติโนมัยซิส และแบคทีเรีย ได้แก่ แป้ง เดกซ์ทริน กลูโคส กลีเซอรอล และผลิตภัณฑ์ข้างเคียง (by-products) ที่ได้จากวัตถุดิบทางการเกษตร เช่น กากถั่วเหลือง (soybean meal) คอร์นสตีพลิเคอร์ (corn-steep liquor) แป้งจากเมล็ดฝ้าย (cottonseed flour) สารที่ได้จากการไฮโดรไลเซท (hydrolysate) และสารสกัดจากยีสต์ (Okachi and Nara ,1980) การใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันจะทำให้ผลิตผลของสารปฏิชีวนะที่ได้แตกต่างกันด้วย ดังนั้นการผลิตสารปฏิชีวนะในระดับอุตสาหกรรมจำต้องเลือกแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด หรือแหล่งคาร์บอนผสมโดยคำนึงถึงหลักเศรษฐศาสตร์หรือต้นทุนด้วย

สำหรับแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตคานามัยซิน มีรายงานดังนี้ คือ ปี 1957 Umezawa และคณะ รายงานว่า เมื่อเลี้ยง *Streptomyces kanamyceticus* K2-J ในอาหาร Czapak salt basal พบว่าเชื้อสามารถใช้อะราบิโนส เดกซ์ทริน ฟรุคโตส กาแลคโตส กลูโคส กลีเซอรอล มอลโตส แมนนิทอล ราฟฟิโนส (raffinose) แป้ง ซูโครส และซัคซิเนต แต่ไม่ใช้อินโนซิทอล (inositol) อินนูลิน (innulin) แลคโตส แรมโนส (rhamnose) ซอร์โบส (sorbose) ไซโลส และอะซิเตต นอกจากนี้ยังพบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบ จะให้ค่า yield ของคานามัยซินสูงสุด (Umezawa et al., 1957) ต่อมาในปี 1973 มีรายงานของ Basak และ Majumdar ได้ศึกษาแหล่งคาร์บอนใน *S. kanamyceticus* ATCC 12853 โดยใช้อาหาร basal mineral salts ที่ประกอบด้วย K_2HPO_4 1.0 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 กรัม, $CaCl_2.2H_2O$ 0.04 กรัม, $FeSO_4.7H_2O$ 0.005 กรัม, $ZnSO_4.7H_2O$ 0.0005 กรัม ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 7.5 ± 0.1 พบว่า

กาแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด โดยเดกซ์ตริน แป้ง แป้งมันฝรั่ง และมอลโตส ให้ผลในการเจริญมากกว่าการผลิตคานามัยซิน ส่วนกลูโคส แมนโนส อะราบิโนส เป็นแหล่งคาร์บอนที่ไม่เหมาะสมต่อการผลิตคานามัยซิน แอลกอฮอล์ น้ำตาลแอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ จะเป็นแหล่งคาร์บอนที่ไม่เหมาะสมทั้งการเจริญและการผลิตคานามัยซิน สำหรับกลูโคสนั้น Satoh และคณะ (1976) รายงานว่ากลูโคสจะกด(repress)การทำงานของเอนไซม์ เอ็น-อะเซทิลคานามัยซิน อะมิโดไฮโดรเลส (N-acetyl-kanamycin amidohydrolase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวสุดท้ายในวิถีการสร้างคานามัยซิน

5.10.2 แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนที่ถูกใช้ได้ง่าย เช่นแอมโมเนียจะทำให้เกิดการกดการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนนั้นเป็นซับสเตรท (substrate) ดังนั้นจึงหลีกเลี่ยงปรากฏการณ์ดังกล่าว โดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ยาก เช่นการผลิตสเตรปโตมัยซิน จะใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน (Aharonowitz, 1980) สำหรับแหล่งไนโตรเจนที่สังเคราะห์นั้น พบว่าโพรลีน (proline) จะให้ผลดีที่สุดในการผลิตสเตรปโตมัยซิน ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากโพรลีนถูกใช้อย่างช้าๆ ในขณะที่เกลือแอมโมเนียอื่น ๆไม่ให้ผลดีเท่ากับโพรลีน ส่วนไอโซลิวซีน (isoleucine) นั้น เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ใช้สร้างคลอแรมเฟนิคอลที่ดีที่สุด (Chatterjee and Vining , 1981) ดังนั้นการเลือกแหล่งไนโตรเจนที่สังเคราะห์นั้นจะต้องเป็นกรดอะมิโนที่จุลินทรีย์ใช้ได้อย่างช้าๆ (Dulaney , 1948) สำหรับแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างสารปฏิชีวนะในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ พบว่าวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น กากถั่วเหลือง คอร์นสตีพลิเคอร์ และสารสกัดจากยีสต์ จะเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในบางกรณีอาจเติมพวกแอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโมเนียมไนเตรทลงไปด้วย (Okachi and Nara , 1980)

มีรายงานการใช้แหล่งไนโตรเจนในการผลิตคานามัยซิน คือ ปี 1957 Umezawa และคณะ พบว่าคานามัยซินจะถูกสร้างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกากถั่วเหลือง กากถั่วลิสง กากเมล็ดฝ้าย คอร์นสตีพลิเคอร์ เปปโตน สารสกัดจากยีสต์ หรือสารสกัดจากเนื้อ โดยแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดคือ กากถั่วเหลือง การเติมคอร์นสตีพลิเคอร์ เปปโตน สารสกัดจากยีสต์ หรือ ไนเตรทในอัตราส่วนต่างๆ จะทำให้มีการสร้างคานามัยซินเพิ่มขึ้น ในปี 1973 Basak และ Majumdar ได้ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนในอาหาร basal mineral salts พบว่าโซเดียมไนเตรท 5.1 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณคานามัยซินสูงสุด และการเติมไกลซีน อาร์จินีน แอสปาราจีน ในปริมาณน้อยจะทำให้ผลผลิตของคานามัยซินสูงขึ้น

5.10.3 แร่ธาตุ

Umezawa และคณะพบว่า ในอาหารซับซ้อน (complex media) จะต้องใช้โปแตสเซียม (K) แมกนีเซียม (Mg) โซเดียม (Na) แคลเซียม (Ca) และฟอสเฟต สำหรับการผลิตคานามัยซิน Basak และ Majumdar (1976) รายงานว่า เมื่อใช้อาหารสังเคราะห์เลี้ยง *S. kanamyceticus* ATCC 12853 จะต้องการแมกนีเซียมซัลเฟตและโปแตสเซียมฟอตเฟตที่ความเข้มข้น 0.4 และ 1.0 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ในการผลิตคานามัยซินและเพื่อการเจริญของเชื้อ ต้องการความเข้มข้นของเหล็ก (Fe) 0.25 สังกะสี (Zn) 0.575 และโมลิบดินัม (Mo) 0.04 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อให้มีการเจริญของเซลล์และการผลิตสูงสุด ทองแดง (Cu) โคบอลต์ (Co) นิเกิล (Ni) และวาเนเดียม (V) จะมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ รวมทั้งการผลิตคานามัยซิน ซึ่งต่อมาได้ศึกษาถึงเอนไซม์ที่สร้างขึ้นในระหว่างการสร้างคานามัยซินพบว่าอัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase) มีผลโดยตรงต่อการสร้างคานามัยซิน โดยเอนไซม์นี้จะถูกยับยั้งที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 7 และโดย EDTA แอมโมเนียมโมลิบเดต อนินทรีย์ฟอสเฟต ซึ่งปฏิกิริยาการยับยั้งด้วย EDTA จะผันกลับได้โดยการเติมแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) แมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) และแมงกานีสไอออน (Mn^{2+}) ซึ่งจะทำให้เอนไซม์กลับมาทำงานได้อีก (Basak and Majumdar , 1977)

5.10.4 สารตั้งต้น (precursor) หรือสารที่เติมเพื่อให้เกิดการกระตุ้น (stimulatory additives)

การสร้างสารปฏิชีวนะในบางครั้งจำเป็นต้องมีสารตั้งต้นของสารปฏิชีวนะนั้น ๆเติมลงไปด้วย (Bu′ Lock , 1965 ; Martin and Demain , 1980) การเติมสารตั้งต้นมักเติมในช่วงของการสร้างสารปฏิชีวนะ การเติมสารตั้งต้นจะทำให้ทราบว่าสารที่ได้เป็นสารปฏิชีวนะเพียงชนิดเดียว ไม่มีสารที่ไม่ต้องการปนออกมา เช่น การสร้างเพนนิซิลลินจะมีการเติมสารตั้งต้นคือ กรดฟีนิลอะซีติก (phenylacetic acid) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วงที่เริ่มสร้าง พบว่าค่า yield ของเพนนิซิลลินสูงขึ้นและมั่นใจได้ว่า ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นสารประกอบชนิดเดียวคือเพนนิซิลลินจี หรือเบนซิล เพนนิซิลลิน (benzyl penicillin) ในทางกลับกันถ้าเติมกรดฟีนอกซีอะซิติก (phenoxy acetic acid) เป็นสารตั้งต้นแทนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นฟีนอกซีเมทธิลเพนนิซิลลิน (phenoxymethyl penicillin) หรือ เพนนิซิลลินวีแทน (Franklin and Snow , 1971)

สารที่เติมเพื่อให้เกิดการกระตุ้น หรือการเหนี่ยวนำ (induction) ไม่จัดเป็นสารตั้งต้น เช่น เอ-แฟคเตอร์ (A-Factor) (2-S-isocapryloyl-3-R-hydroxymethyl-γ-butyrolactone) เหนี่ยวนำการสร้างสเตรปโตมัยซิน (Khokhlov and Tovarova, 1979) หรือเมไธโอนีน (methionine) ซึ่งเป็นทั้งสารตั้งต้นและสารเหนี่ยวนำในการสร้างเซฟาโลสปอรินซี โดย *Cephalosporium acremonium* (Drew and Demain, 1975)

สารตั้งต้นของการสร้างคานามัยซิน ได้แก่ พาโรมามีน 4-ออกซิ-(อัลฟา-ดี-กลูโคซามีนิล-2-ดีออกซิสเตรปทามีน) 2-ดีออกซิสเตรปทามีน (2 DS) และกลูโคซามีน (Umezawa et al., 1960 ; Golets et.al ., 1995)

5.10.5 การให้อากาศ

ความต้องการออกซิเจนของเชื้อจัดเป็นปัจจัยสำคัญที่ควบคุมการสร้างสารปฏิชีวนะจะพบว่า เมื่อจำกัดออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้ปริมาณเซลล์สูงขึ้น ซึ่งส่งผลต่อแอคติวิตีของเซลล์และลดอัตราการสร้างสารปฏิชีวนะ (Vardar , 1982 ; Vardar and Lilly , 1982) การเพิ่มอัตราการผลิตสารปฏิชีวนะทำได้ด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของค่าการละลายออกซิเจน (dissolved oxygen (DO) concentration) ซึ่งได้มีการศึกษาการสร้างเพนนิซิลลินจากเชื้อ *Penicillium chrysogenum* (Hersbach et al., 1984) และในเซฟาโลสปอรินซี จากเชื้อ *Cephalosporium acremonium* (Hilgendorf et al.,1987) นอกจากนี้ Yegneswaran และ Gray (Yegneswaran and Gray ,1991(1)) รายงานว่าถ้าเพิ่มความเข้มข้นของการละลายออกซิเจนจนถึงระดับสูงสุดจะทำให้การสร้างเซฟาโลสปอรินซีเพิ่มขึ้น 2.4 เท่า อย่างไรก็ตามในบางกรณีค่าการละลายออกซิเจนที่ต่ำสามารถเพิ่มผลผลิตของสารปฏิชีวนะบางชนิด เช่น แกรมมิซิดิน ที่ผลิตจาก *Bacillus brevis* (Agathos and Demain , 1986)

สำหรับอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศในกระบวนการหมักในระดับขยายส่วนนั้นจะต้องเหมาะสมเนื่องจากออกซิเจนละลายได้ช้าในน้ำ จึงต้องเพิ่มอัตราการละลายของออกซิเจนในน้ำ (Hugo and Russel , 1983) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการผลิตสารปฏิชีวนะจากพวกที่มีเส้นใย เช่น *Penicillium* , *Cephalosporium* และ *Streptomyces* เมื่อทำการหมักจะมีความหนืดสูงขึ้นเรื่อยๆ ทำให้อัตราการกวนและอัตราการละลายของออกซิเจนลดลง การผลิตสารปฏิชีวนะก็ลดลงตามไปด้วย (Yegneswaran and Gray , 1991 (2)) ดังนั้นในการผลิตสารปฏิชีวนะจะต้องมีอัตราการกวนที่เหมาะสม ถ้ามากเกินไปก็จะเกิดแรงเฉือนที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ของจุลินทรีย์ซึ่งทำให้ผลผลิตต่ำลง ตัวอย่างเช่นในการผลิต

เพนนิซิลลินจาก *P. chrysogenum* 1088 อัตราการให้อากาศอยู่ในช่วง 0.5-1.0 ลิตรต่อ 1 ลิตรของอาหารต่อนาที อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที (วนิดา เรืองศรี , 2532) ในการผลิตเบซิเทรซินจาก *B. licheniformis* อัตราการให้อากาศ 1.0 ลิตรต่อ 1 ลิตรของอาหารต่อนาที อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที (Qudeer et al ., 1988) และในการผลิตไทโลซิน (Tylosin) จาก *Streptomyces fradiae* อัตราการให้อากาศ 1.0 ลิตรต่อ 1 ลิตรอาหารต่อนาที อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที (Chen and Wilde , 1990)

การหมักเพื่อผลิตคานามัยซินเป็นการหมักแบบใช้ออกซิเจน มีการกวนเพื่อเพิ่มการละลายของออกซิเจน เพื่อให้เชื้อได้รับออกซิเจนได้อย่างทั่วถึง มีการศึกษาพบว่า การให้ออกซิเจนที่มากเกินไปไม่มีผลต่อการสังเคราะห์คานามัยซิน แต่การลดการให้ออกซิเจนและลดอัตราการกวนจะส่งผลให้การสังเคราะห์ลดลง (Brainbery et al.,1970) มีรายงานว่าในการหมักเพื่อการผลิตคานามัยซินปริมาตร 400 ลิตร จะใช้อัตราการกวนเป็น 200 รอบต่อนาที (Umezawa et al., 1960)

5.10.6 อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญในการผลิตสารปฏิชีวนะไม่น้อยไปกว่าปัจจัยอื่น เช่น ถ้าอุณหภูมิสูงเกินไปผลผลิตที่ได้ก็จะต่ำ ความร้อนจะสร้างขึ้นโดยกระบวนการเมตาบอลิสมในการใช้อาหารของจุลินทรีย์และกำลังจากใบพัดที่ใช้จากใบกวน ฉะนั้นในการผลิตสารปฏิชีวนะจึงต้องควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วงที่พอเหมาะโดยการมีท่อน้ำเย็นขดที่ฐานของถังหมัก (Hugo and Russel , 1983)

อุณหภูมิที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ *S. kanamyceticus* เพื่อการผลิตคานามัยซินนั้น พบว่าจะอยู่ในช่วงกว้างคือ 25-35 องศาเซลเซียส ซึ่งจุลินทรีย์เจริญได้ แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 27-32 องศาเซลเซียส (Umezawa , 1957)

5.10.7 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญต่อการผลิตสารปฏิชีวนะมาก ได้มีการศึกษาสารปฏิชีวนะประเภทเปปไทด์ที่ผลิตออกมาในช่วงหลังของการเจริญนั้นว่าขึ้นอยู่กับความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสำคัญ จากความสำคัญของค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว ฉะนั้นสามารถทำให้เกิดการผลิตในช่วงของการเจริญได้ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเหมาะสม (Haavik , 1974a

; Egorov et al ., 1986) สำหรับการผลิตคานามัยซินนั้น *S. kanamyceticus* จะสร้างคานามัยซินในช่วงที่เป็นด่าง (Umezawa , 1957 ; Basak and Majumdar , 1973)

5.10.8 พันธุกรรมของตัวจุลินทรีย์

การสร้างสารปฏิชีวนะจะอาศัยกลไกควบคุมเช่นเดียวกับเมตาบอลิสมของสารปฐมภูมิ (primary metabolism) ซึ่งกลไกดังกล่าวต้องอาศัยพันธุกรรมของจุลินทรีย์ จึงได้มีผู้ริเริ่มปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์โดยการกลายพันธุ์ (mutation) ซึ่งจะทำให้การสร้างสารปฏิชีวนะเพิ่มสูงขึ้นกว่าเดิม 100 ถึง 1,000 เท่า (Demain, 1973) การปรับปรุงโดยวิธีการกลายพันธุ์ ด้วยการทดสอบจุลินทรีย์ที่รอดชีวิต (survivors) แบบชนิดสุ่ม (random)เอาสายพันธุ์กลายที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ต่างออกไปจากสายพันธุ์เดิมมาทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะ ซึ่งจากการกลายพันธุ์บางครั้งจะได้สายพันธุ์กลายที่ทนต่อสารปฏิชีวนะที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น ข้อดีของการกลายพันธุ์อีกประการหนึ่งคือสามารถกำจัดสารปฏิชีวนะที่ไม่ต้องการในอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อมกับได้สารปฏิชีวนะชนิดใหม่ ดังนั้นจึงได้มีการนำการกลายพันธุ์มาใช้ในการสร้างสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ เรียกวิธีนี้ว่าการสังเคราะห์จากการกลายพันธุ์ (mutational biosynthesis) (Shier et al., 1969)

5.11 การเลือกสารปฏิชีวนะเพื่อใช้ในการรักษาโรค

การรักษาผู้ป่วยด้วยสารปฏิชีวนะพบว่าไม่มีสารปฏิชีวนะชนิดใดที่ให้ผลต่อการรักษาโรคติดเชื้อได้ทุกชนิดหรือปลอดภัยกับผู้ป่วยทุกราย ดังนั้นการนำสารปฏิชีวนะมาใช้ในผู้ป่วยเพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงสุดในการรักษา ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้คือ

5.11.1 ความเป็นพิษจำเพาะของยา (The Selective Toxicity of the Drug)

สารปฏิชีวนะที่นำมาใช้ในการรักษาโรคนั้นจะมีความเป็นพิษจำเพาะ กล่าวคือ จะยับยั้งหรือฆ่าจุลินทรีย์โดยไม่มีผลข้างเคียงเป็นอันตรายกับผู้ป่วย ยาที่ปลอดภัยที่สุดนั้น จะต้องขัดขวางกระบวนการทางเมตาโบลิสมของพวกโปรคารีโอต เช่น เพนนิซิลิน และเซฟาโลสปอรินจะยับยั้งการสังเคราะห์เปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียแต่ไม่พบในเซลล์ยูคารีโอต สำหรับยาที่มีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย ได้แก่ยาที่มีฤทธิ์ทำลายจุลินทรีย์ในกลุ่มยูคาริโอต เช่น รา หรือโปรโตซัว เนื่องจาก

เซลล์โฮสต์และเซลล์จุลินทรีย์มีความคล้ายคลึงกัน ดังนั้นยาที่มีผลต่อจุลินทรีย์ในกลุ่มยูคาริโอตจะมีผลข้างเคียงกับเซลล์มนุษย์ด้วย

5.11.2 การรับไวของจุลินทรีย์ก่อโรคที่มีต่อยา (Susceptibility of the Pathogen)

การที่สารปฏิชีวนะสามารถฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคนั้น แสดงว่าจะต้องยอมรับยาชนิดนั้น ซึ่งปัจจุบันมักจะพบว่าจุลินทรีย์ก่อโรคนั้นดื้อยา (resistant) มากขึ้น ดังนั้นจำเป็นที่จะต้องทดสอบการยอมรับสารปฏิชีวนะของจุลินทรีย์ก่อโรค เพื่อให้แน่ใจว่ายานั้นสามารถฆ่าหรือยับยั้งได้

5.11.3 ขอบเขตการออกฤทธิ์หรือสเปกตรัมของกิจกรรม (Spectrum of Activity)

การจำแนกสารปฏิชีวนะโดยอาศัยผลการทำลายจุลินทรีย์สามารถแบ่งสารปฏิชีวนะได้ 2 ประเภทใหญ่ คือ สารปฏิชีวนะที่ยับยั้งจุลินทรีย์ได้กว้างหรือออกฤทธิ์อย่างกว้าง (Broad-spectrum) และพวกที่ยับยั้งหรือออกฤทธิ์ในวงจำกัด (Narrow-spectrum) เช่น สามารถยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้น นอกจากนี้ยังมีสารปฏิชีวนะที่มีความจำเพาะมากที่สุด (Narrowest spectrum) ต่อจุลินทรีย์ก่อโรค สารชนิดนี้มีประสิทธิภาพอย่างยิ่งเมื่อเปรียบเทียบกับพวกที่สามารถยับยั้งได้อย่างกว้าง ซึ่งจะทำลายจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) ทำให้สูญเสียความสมดุลและเป็นผลต่อสุขภาพของผู้ป่วย อย่างไรก็ตามพวกที่ยับยั้งได้อย่างกว้าง เช่น เตตราไซคลิน คานามัยซิน สามารถใช้ในการรักษาการติดเชื้อผสม (mixed infection) จากจุลินทรีย์ก่อโรคที่อันตรายหรือใช้ในกรณีฉุกเฉินที่ไม่สามารถรอผลจากห้องปฏิบัติการได้

5.11.4 ปฏิกิริยาที่ไม่พึงปรารถนา (Adverse Drugs Reactions)

สารปฏิชีวนะจะให้ผลข้างเคียงเกิดขึ้นกับผู้ป่วยมากน้อยต่างกัน บางรายอาจมีผลน้อย เช่น หนาวสั่น เป็นไข้ ปวดหัว เป็นผื่น ในรายที่ได้รับผลข้างเคียงมาก เช่น ทำให้เกิดการสะสมของยาในไตทำให้เกิดการทำลายไต กรณีนี้จะไม่ใช้ในผู้ป่วยที่มีอายุมากหรือเป็นโรคไตมาก่อน

5.11.5 ตำแหน่งของการติดเชื้อและการกระจายของยาในร่างกาย (Site of Infection and Drug Distribution Within the Body)

สารปฏิชีวนะอาจจะไม่ให้ผลในการรักษา ถ้าไม่สามารถเข้าถึงตำแหน่งที่ติดเชื้อหรือมีความเข้มข้นไม่สูงพอที่จะทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อโรค

5.11.6 เมตาบอลิสมของยา (Metabolism of the drug)

ยาหลายชนิดจะถูกเมตาบอไลท์โดยร่างกาย อาจทำให้ผลในการต้านสารปฏิชีวนะเพิ่มขึ้นหรือลดลง เช่น สารปฏิชีวนะหลายชนิดถูกทำลายในกระเพาะอาหารเนื่องจากความเป็นกรดต่ำ

5.11.7 ระยะของการรักษา (Duration of Treatment)

สารปฏิชีวนะส่วนใหญ่มักจะถูกเมตาบอไลท์หรือถูกขับออกก่อนที่จุลินทรีย์ก่อโรคจะถูกกำจัด จึงจำต้องมีการศึกษาโดยละเอียดถึงการให้ยา (administration) และแม้แต่ช้าเพียง 1 ชั่วโมง อาจลดผลการรักษาลงได้

5.11.8 อันตรกิริยาของยา (Drug Interactions)

การให้สารปฏิชีวนะหลายชนิดร่วมกัน มักเกิดในกรณีที่มีการติดเชื้อผสม หรือในกรณีที่ไม่สามารถวินิจฉัยโรคได้ ซึ่งจะทำให้เกิดการเสริมฤทธิ์ (synergism) ของสารปฏิชีวนะที่ใช้ร่วมกันมากกว่าการใช้เพียงชนิดเดียว โดยทั่วไปมักใช้ความเข้มข้นต่ำเพื่อป้องกันการเกิดผลข้างเคียง สารปฏิชีวนะบางชนิดทำให้เกิดการต้านฤทธิ์ซึ่งกันและกัน (antagonize) จึงไม่ควรที่จะนำมาใช้ร่วมกัน (McKane and Kandel , 1996)

5.12. <u>การออกฤทธิ์ของคานามัยซินต่อจุลินทรีย์ที่รับไว (Sensitive Organisms)</u>

คานามัยซินเป็นสารปฏิชีวนะที่สามารถฆ่าและยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (bactericidal) โดยออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียชนิดแกรมบวก เช่น *Streptococcus pyogenes* และ *Staphylococcus epidermidis* และแบคทีเรียแกรมลบเช่น *Escherichia coli, Enterobacter spp. , Klebsiella spp. , Proteus spp., Salmonella spp.* และ *Shigella spp.* รวมทั้งแบคทีเรียใน *paracolon* เช่น *Serratia marcescens, Citrobacter freundii, Providence*

และแอซิดฟาสต์แบคทีเรีย (acid fast bacteria) (Goodman and Gilman , 1975) โดยคานามัยซินจะออกฤทธิ์ได้ดีในกลุ่มที่ต้องการออกซิเจน (Gourevitch et al., 1958-1959)

ผลิตภัณฑ์คานามัยซินจะอยู่ในรูปของ คานามัยซินซัลเฟต (kanamycin sulfate $C_{18}H_{36}N_4O_{11}.XH_2SO_4$) เช่น คานามัยซินโมโนซัลเฟต ในรูปแบบของแคปซูล (capsule) ยาฉีดสารละลาย (solution) และครีม (ointment) (Umezawa, 1986) ปริมาณและวิธีการใช้ในผู้ใหญ่ให้วันละ 1-2 กรัม ในเด็กวันละ 30-50 มิลลิกรัม โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ การฉีดเข้าเส้นเลือด (Intravenous) ถ้าใช้รักษาการอักเสบของระบบทางเดินหายใจให้พ่นเข้าช่องจมูก ด้วยเครื่องพ่นจมูก (ไทยเมจิฟาร์มาซูติคอล, 2538)

คานามัยซินใช้ในการรักษาโรคเกี่ยวกับทางเดินหายใจ เช่น โรคปอดหลอดลมอักเสบ ทอนซิลอักเสบ โรคที่เกิดจากอาการอักเสบของทางเดินปัสสาวะ เช่น ท่อปัสสาวะอักเสบ โรคติดเชื้อของผิวหนัง เยื่อบุอ่อน ต่อมน้ำเหลือง กระดูก อาการไอกรน วัณโรคปอด และวัณโรคของอวัยวะอื่นๆ (ไทยเมจิ ฟาร์มาซูติคอล, 2538; ลิวินเนอร์ ฟาร์มาซูติคอล, 2538)

ปี 1983 มีบริษัทที่ผลิตคานามัยซินทั่วโลกอยู่ 20 บริษัท สำหรับประเทศไทยมี 4 บริษัท ได้แก่ บริษัทสีลมการแพทย์ บริษัทเจริญเภสัช บริษัทชิเชงเคมีคอล และบริษัทไทยเมจิ ฟาร์มาซูติคอล จำกัด (Vandamme, 1984) บริษัทที่นำคานามัยซินเข้าประเทศมี 4 บริษัท ได้แก่ ห้างหุ้นส่วนจำกัดกวงเตี้ยงดิสสเปนซารี ห้างหุ้นส่วนจำกัดเดรสซินท์ดรัก บริษัท พาราวินเซอร์ จำกัด บริษัท โอสถสภา (เต็กเฮงหยู) จำกัด (กองควบคุมอาหารและยา, 2535) ปัจจุบันตามท้องตลาดจะมีคานามัยซินของบริษัทไทยเมจิ ฟาร์มาซูติคอล จำกัด และบริษัทลิวินเนอร์ ฟาร์มาซูติคอล จำกัด

ข้อควรระวังของการใช้คานามัยซินด้วยวิธีการฉีดเข้าสู่ร่างกาย คือผู้ป่วยอาจเกิดอาการแพ้ยา เป็นไข้ มีผื่นขึ้นตามผิวหนัง ฤทธิ์ข้างเคียงที่สำคัญคือต่อระบบประสาทหู (ototoxicity) ทำให้หูอื้อ หูหนวก ทำให้อวัยวะรูปหอยโข่งหูส่วนใน และ restibular portion ในหูของระบบประสาทรับเสียงถูกทำลาย เกิดอาการวิงเวียน ทรงตัวลำบาก เพราะเกิดจากการถูกกดของเส้นประสาทสมองคู่ที่ 8 นอกจากนี้ให้ผลข้างเคียงต่อไต (nephrotoxicity) เช่นเดียวกับสเตรปโตมัยซิน อาการช็อค อาการขัดในช่องอก หายใจขัด การบีบของหัวใจเร็วผิดปกติ ความดันโลหิตต่ำ เกิดอาการขาดวิตามินเค เช่น ปริมาณโปรทอมบิน (prothrombin) ในเลือดต่ำ มีแนวโน้มที่จะเกิดการไหลออกของเลือด เกิดอาการขาดวิตามินบี เช่น ลิ้นอักเสบ เยื่อบุเมือกในปากอักเสบ เบื่ออาหาร เส้นประสาทอักเสบ ซึ่งจะพบเป็นส่วนน้อยอีกด้วย (Goodman and Gilam, 1975)

จากความสำคัญของคานามัยซิน ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะที่นำมาใช้ในการรักษาโรคทั้งในคนและสัตว์มีแนวโน้มของการใช้เพิ่มมากขึ้น อีกทั้งการศึกษาการกลายพันธุ์ของ *S. kanamyceticus* เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการผลิตคานามัยซินสูงขึ้นกว่าเดิมยังไม่ประสบความสำเร็จมากเท่าที่ควร ประกอบกับนายศรสดมภ์ ขัติยะวรา (2539) สามารถปรับปรุง *S. kanamyceticus* K1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตคานามัยซินได้ด้วยวิธีการกลายพันธุ์ให้ได้สายพันธุ์กลาย 3 สายพันธุ์ คือ UUNK15 UUNNK1 และ UUNNK25 ที่มีคุณสมบัติแตกต่างไปจากสายพันธุ์ K1 จึงต้องมีการปรับภาวะใหม่เพื่อให้มีการผลิตคานามัยซินสูงขึ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะทำการคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีความเสถียรทางพันธุกรรมและสามารถผลิตคานามัยซินได้สูงขึ้น โดยนำมาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตคานามัยซิน เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการผลิตคานามัยซินในระดับขยายส่วนต่อไป

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

ทราบภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตคานามัยซินโดยสายพันธุ์กลายของ *S. kanamyceticus* ให้ได้ผลผลิตสูงสุดและนำข้อมูลดังกล่าวมาทดลองผลิตในระดับถังหมักเพื่อใช้เป็นแนวทางในการประยุกต์ในระดับขยายส่วนต่อไป

ขั้นตอนการวิจัย

1. คัดเลือกสายพันธุ์กลายของ *S. kanamyceticus* จากจำนวน 3 สายพันธุ์กลาย ให้ได้สายพันธุ์กลายที่มีความเสถียรและสามารถผลิตคานามัยซินได้สูงสุด
2. หาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตคานามัยซินของสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้จากข้อ 1 โดยการแปรผันปริมาณแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง ในระดับขวดเขย่า
3. ทดลองผลิตคานามัยซินโดย *S. kanamyceticus* สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้ในระดับถังหมักโดยอาศัยข้อมูลจากระดับขวดเขย่า