การทำคานามัยซินจาก *Streptomyces kanamyceticus* UUNNK1 ให้บริสุทธิ์

นางสาว อรอุมา แก้วกล้า

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-333-177-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

T186970k1

PURIFICATION OF KANAMYCIN FROM *Streptomyces kanamyceticus* UUNNK1

Miss Onuma Kaewkla

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology
Department of Microbiology
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1999

ISBN 974-333-177-8

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การทำคานามัยซินจาก *Streptomyces kanamyceticus* UUNNK1 ให้บริสุทธิ์
โดย	นางสาว อรอุมา แก้วกล้า
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. สุรีนา ชวนิชย์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา กีระนันทน์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุรีนา ชวนิชย์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

อรอุมา แก้วกล้า : การทำคานามัยซินจาก *Streptomyces kanamyceticus* UUNNK1 ให้บริสุทธิ์ (PURIFICATION OF KANAMYCIN FROM *Streptomyces kanamyceticus* UUNNK1) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. สุรีนา ชวนิชย์, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ดร. อมร เพชรสม, 82 หน้า. ISBN 974-333-177-8

จากการหาวิธีที่เหมาะสมในการทำคานามัยซินที่ผลิตจาก *Streptomyces kanamyceticus* UUNNK1 ให้บริสุทธิ์ โดยเปรียบเทียบจำนวนครั้งที่ผ่านส่วนน้ำใสที่ได้จากน้ำหมักอาหารเลี้ยงเชื้อลงคอลัมน์ที่มีเรซินแอมเบอร์ไลต์ IRC-50 ในรูปโซเดียม 1 2 และ 3 ครั้ง หลังจากนั้นกำจัดสีด้วยผงถ่านกัมมันต์ และเก็บในรูปตะกอนซัลเฟต พบว่ามีเปอร์เซนต์ความบริสุทธิ์ของคานามัยซินเท่ากับ 63.0 79.2 และ 86.4 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ และปริมาณของคานามัยซินที่ได้เท่ากับ 51.5 46.8 และ 32.7 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณคานามัยซินในส่วนน้ำใสตั้งต้นคิดเป็น 100 เปอร์เซนต์ และภาวะที่เหมาะสมต่อการกำจัดสีของคานามัยซินด้วยผงถ่านกัมมันต์ คืออยู่ในรูปของคานามัยซินซัลเฟต ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และปริมาณผงถ่านที่ใช้คือ 0.1 -0.2 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

จากการทำโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง โดยใช้ส่วนบนของตัวทำละลายที่มีส่วนผสมของคลอโรฟอร์ม : เมธานอล : แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ด้วยอัตราส่วน 2:1:1 นำมาตรวจสอบแถบด้วยสารละลายนินไฮดริน สามารถแยกสารออกได้แถบเดียว มีลักษณะเป็นหางยาว ได้ค่า R_f เท่ากับ 0.56 และสารมาตรฐานคานามัยซินเอ ซัลเฟต มีค่า R_f เท่ากับ 0.62 จากการวิเคราะห์โครงสร้างของสารปฏิชีวนะ ด้วยวิธีอินฟราเรด สเปกโตรสโกปี และ นิวเคลียร์แมกเนติค เรโซแนนซ์ พบว่าสารปฏิชีวนะชนิดนี้เป็นอนุพันธ์หนึ่งของคานามัยซิน

ภาควิชา	จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต	
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา	
ปีการศึกษา	2542	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	

3972421023 : Major INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD : *Streptomyces kanamyceticus* / PURIFICATION / KANAMYCIN

ONUMA KAEWKLA : PURIFICATION OF KANAMYCIN FROM *Streptomyces kanamyceticus* UUNNK1. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SURINA CHAVANICH, Ph.D. THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF. AMORN PETCHSOM, Ph.D. 82 pp. ISBN 974-333-177-8

Optimal conditions for purification of kanamycin produced by *Streptomyces kanamyceticus* UUNNK1, were investigated. The filtrated broth passing through the sodium form of Amberlite IRC-50 column for 1, 2 and 3 times. Then, kanamycin was decolorized by activated charcoal and precipitated in sulfate form. The percent of purity was 63.0, 79.2 and 86.4 % , respectively, the amounts of antibiotic obtained were 51.5, 46.8 and 32.7 %, respectively in compared with the amounts of 100 % original kanamycin. It was found that the optimal conditions for decolorization of kanamycin in sulfate form to remove impurity were : 0.1-0.2 gram of activated charcoal added to the 100 ml. extract, stirring at 30 °C for 30 minute.

Thin- Layer Chromatography of antibiotic was also investigated by using solvent mixture of chloroform : methanol : ammonium hydroxide in 2 : 1 : 1 ratio and bands were detected by ninhydrin solution. The antibiotic was separated into only one long- tail band with R_f value 0.56 while the R_f value of kanamycin A sulfate was 0.62. The structure of antibiotic was analyzed by Infrared Spectroscopy and Nuclear Magnetic Resonance. It was found that the antibiotic was identified as derivative of kanamycin.

ภาควิชา	จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต	
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา	
ปีการศึกษา	2542	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลือ และความกรุณาอย่างดียิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร. สุรีนา ชวนิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านได้กรุณาให้คำแนะนำ ตลอดจนเป็นที่ปรึกษาในทุกเรื่องด้วยดีมาตลอด รวมถึงความรัก ความเมตตา ความช่วยเหลือ กำลังใจ ในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และยังได้ช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ. ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม วิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านได้กรุณาให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือ กำลังใจ ในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และยังได้ช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าจึงขอกราบขอบพระคุณ เป็นอย่างสูงไว้ ณ. ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการสอบ ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ได้ให้ความรู้ในการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษานี้

ขอขอบคุณ คุณอรอนงค์ พริ้งศุลกะ คุณเจนจิรา เดชรักษา คุณวีระวัฒน์ ปิยะเกรียงไกร คุณธีรพัฒน์ เวชชประสิทธิ์ คุณอุรัจฉวี อุณหเลขกะ คุณสุกัลยา ทาโบราณ คุณสุดา สุภาชีวินสวัสดิ์ คุณอดิศักดิ์ หิรัญรัตนากร คุณกฤษฎา เวทีวุฒาจารย์ คุณสุภิญญา พุ่มแดง คุณสถาพร ผลไพร ที่เป็นที่ปรึกษา และช่วยให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ กลุ่มโออีซีเอฟทุกคนในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ให้ความช่วยเหลือแก่ข้าพเจ้าด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณ คุณ ธนิต สิงหบุญพงศ์ คุณกนกวรรณ ศรีนิธิ คุณสุทธิรักษ์ นิยมฤทธิ์ คุณทองรวย สุผารี และเจ้าหน้าที่ของภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์ ด้วยดีตลอดหลักสูตรการศึกษานี้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนอุดหนุนงานวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่สาว และพี่ชายของข้าพเจ้า ซึ่งเป็นกำลังสำคัญที่สุดที่ช่วยเหลือด้านทุนทรัพย์ และให้กำลังใจตลอดการทำวิทยานิพนธ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ซ

สารบัญรูป..... ฌ

บทที่

1. บทนำ..... 1
2. วารสารปริทรรศน์..... 4
3. อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย..... 30
4. ผลการวิจัย..... 42
4. สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย..... 63

รายการอ้างอิง..... 70

ภาคผนวก..... 75

ประวัติผู้เขียน..... 82

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	สารปฏิชีวนะในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์	7
2.	ชนิดของเรซินที่ใช้ในโครมาโตกราฟี	18
3.	ผลการเปรียบเทียบสารละลายคานามัยซินในรูปซัลเฟต และรูปที่ปรับพีเอชเป็นกลางด้วยกรดอะเซติค ในการขจัดสิ่งปนเปื้อนด้วยผงถ่านกัมมันต์	43
4.	ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการขจัดสิ่งปนเปื้อนด้วยผงถ่าน	44
5.	ผลของเวลาที่เหมาะสมต่อการขจัดสิ่งปนเปื้อนด้วยผงถ่าน	46
6.	ผลของปริมาณผงถ่านที่เหมาะสมในการขจัดสิ่งปนเปื้อน	47
7.	ปริมาณคานามัยซินหลังจากถูกทำให้บริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอนที่ผ่านลงคอลัมน์ที่ใช้แอมเบอร์ไลต์ IRC-50 1 ครั้ง	49
8.	ปริมาณคานามัยซินหลังจากถูกทำให้บริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอนที่ผ่านลงคอลัมน์ที่ใช้แอมเบอร์ไลต์ IRC-50 2 ครั้ง	50
9.	ปริมาณคานามัยซินหลังจากถูกทำให้บริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอนที่ผ่านลงคอลัมน์ที่ใช้แอมเบอร์ไลต์ IRC-50 3 ครั้ง	52
10.	ค่า R_f ของสารมาตรฐานคานามัยซินเอซัลเฟตและคานามัยซินซัลเฟต	57

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.	โครงสร้างหลักของคานามัยซิน	10
2.	ประเภทของเรซิน	19
3.	ขั้นตอนการแลกเปลี่ยนประจุ	19
4.	โครมาโตแกรมของคานามัยซินเอ โดยวิธี HPLC ใช้เครื่องตรวจวัดชนิด RI	27
5.	โครมาโตแกรมของคานามัยซินเอ บี และซี โดยวิธี HPLC ใช้เครื่องตรวจวัดชนิดยูวีวิสิเบิล	29
6	โครมาโตแกรมของคานามัยซินเอ และบี โดยวิธี HPLC ใช้เครื่องตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนซ์	29
7.	การวัดปริมาณคานามัยซินด้วยวิธีทางจุลชีววิทยาของ *S. kanamyceticus* UUNNK1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี	34
8.	การผ่านส่วนน้ำใสลงคอลัมน์ที่มีเรซินแอมเบอร์ไลต์ IRC-50	37
9.	การชะคอลัมน์และเก็บลำดับส่วนของสาร	38
10.	สารละลายคานามัยซินซัลเฟต a. ก่อนเติมผงถ่าน b. หลังเติมผงถ่านเป็นเวลา 30 นาที	45
11.	แถบของสารจากวิธี TLC ในระบบ ก. ตัวทำละลายคือคลอโรฟอร์ม : แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ : เมธานอล (2:1:1) (ปริมาตร / ปริมาตร /ปริมาตร)	54
12.	แถบของสารจากวิธี TLC ในระบบ ข. ตัวทำละลายคือแอมโมเนียมอะซิเตท : เมธานอล (1:1) (ปริมาตร /ปริมาตร)	55
13.	แถบของสารจากวิธี TLC ในระบบ ค. ตัวทำละลายคือเอ็น-บิวทานอล : เอธานอล : คลอโรฟอร์ม : แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (4 : 5 : 2 : 5)(ปริมาตร / ปริมาตร)	56
14.	โครมาโตแกรมของคานามัยซินเอ ซัลเฟตมาตรฐาน a. ความเข้มข้น 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร b. ความเข้มข้น 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร c. ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	58

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

15. อินฟราเรดสเปกตรัมของคานามัยซินซัลเฟต..... 60
16. อินฟราเรดสเปกตรัมของสารมาตรฐานคานามัยซินเอ ซัลเฟต..... 60
17. ลักษณะสเปกตรัม ^{1}H NMR ใน D_2O ที่ 125 MH_z ของคานามัยซินซัลเฟต..... 61
18. ลักษณะสเปกตรัม ^{13}C NMR ใน D_2O ที่ 125 MH_z ของสารมาตรฐานคานามัยซิน เอ ซัลเฟต..... 61
19. ลักษณะสเปกตรัม ^{13}C NMR ใน D_2O ที่ 500 MH_z ของคานามัยซินซัลเฟต..... 62
20. ลักษณะสเปกตรัม ^{13}C NMR ใน D_2O ที่ 125 MH_z สารมาตรฐานคานามัยซินเอ ซัลเฟต..... 62
21. ไดอะแกรมสรุปขั้นตอนการทำคานามัยซินให้บริสุทธิ์..... 65
22. โครงสร้างหลักของคานามัยซินเอ..... 69
23. กราฟมาตรฐานคานามัยซินเอ ซัลเฟต โดยวิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา..... 81