รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การปรับปรุงสายพันธุ์ *Streptomyces kanamyceticus* A-38 เพื่อเพิ่มผลผลิตกานามัยซิน โดยวิธีการกลายพันธุ์

Strain Improvement of *Streptomyces kanamyceticus* A-38 to Increase Kanamycin Production by Mutation

เสนอ

ฝ่ายวิจัยคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการวิจัยนี้ ได้รับเงินอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดิน
ปีงบประมาณ 2538

โดย

สุรีนา ชวนิชย์

มกราคม 2539

บทคัดย่อ

จากการทำการกลายพันธุ์ *Streptomyces kanamyceticus* A-38 ซึ่งผลิตกานามัยซินได้ 13 ug/ml โดยการชักนำสปอร์ปริมาณ $1x10^8$ spores/ml ด้วยแสง UV เป็นเวลา 4 นาที คัดเลือกสายพันธุ์กลายนำไปชักนำต่อด้วย UV อีกครั้ง ภายใต้สภาวะเดียวกัน แล้วคัดเลือกสายพันธุ์กลาย จากนั้นนำสปอร์ของสายพันธุ์กลายที่ได้ปริมาณ $1x10^8$ spores/ml ไปชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG ที่ปริมาณความเข้มข้น 0.02 M ใน 0.005 M. Tris-maleic buffer, pH 9.0 ระยะเวลา 45 นาที ที่อุณหภูมิห้อง คัดเลือกสายพันธุ์กลาย แล้วนำไปชักนำต่อด้วย NTG อีกครั้ง ภายใต้สภาวะเดียวกัน ในที่สุดได้สายพันธุ์กลาย UUNN1 ที่มีประสิทธิภาพ ในการผลิตกานามัยซินได้สูงถึง 147 ug/ml คิดเป็น 11 เท่า ของสายพันธุ์ A-38 และลักษณะโคโลนีของสายพันธุ์ UUNN1 ที่ได้จะมีลักษณะแตกต่างไปจากสายพันธุ์ A-38 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ดั้งต้นอย่างเห็นได้ชัดเจน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
สารบัญ	ข
สารบัญรูปภาพ	ค
สารบัญตาราง	จ
บทนำ	1
วิธีการวิจัย	6
ผลของการวิจัย	16
สรุปผลวิจัยและวิจารณ์	31
ข้อเสนอแนะ	33
เอกสารอ้างอิง	34
ภาคผนวก	37

เลขหมู่ จุฬ
วท 15
เลขทะเบียน 008746
วัน,เดือน,ปี 7 มิ.ย. 39

สารบัญรูปภาพ

		หน้า
รูปที่ 1	สูตรโครงสร้างของกานามัยซิน	2
รูปที่ 2	ภาพแสดงการเตรียมอาหารในถาดแก้วสำหรับ *S. kanamyceticus* เพื่อสร้างกานามัยซิน	14
รูปที่ 3	ภาพแสดงการหาปริมาณกานามัยซินด้วยการวัด clear zone เมื่อเลี้ยงบนอาหาร KPMA	15
รูปที่ 4	ภาพแสดงการหาปริมาณกานามัยซินด้วยการวัด clear zone เมื่อเลี้ยงบนอาหาร KPMB	15
รูปที่ 5	กราฟเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ *S. kanamyceticus* หลังจากการฉายแสง UV ด้วยระยะเวลาต่าง ๆ	40
รูปที่ 6	กราฟมาตรฐานหาปริมาณกานามัยซิน (STD-U1)	40
รูปที่ 7	กราฟมาตรฐานหาปริมาณกานามัยซิน (STD-U2)	41
รูปที่ 8	กราฟมาตรฐานหาปริมาณกานามัยซิน (STD-U3)	41
รูปที่ 9	กราฟมาตรฐานหาปริมาณกานามัยซิน (STD-UU1)	42
รูปที่ 10	กราฟมาตรฐานหาปริมาณกานามัยซิน (STD-UU2)	42
รูปที่ 11	กราฟมาตรฐานหาปริมาณกานามัยซิน (STD-UU3)	43
รูปที่ 12	กราฟเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ *S. kanamyceticus* หลังจากการชักนำด้วยสาร NTG ที่ปริมาณความเข้มข้นต่าง ๆ กัน	43
รูปที่ 13	กราฟมาตรฐานหาปริมาณกานามัยซิน (STD-UUN1)	44
รูปที่ 14	กราฟมาตรฐานหาปริมาณกานามัยซิน (STD-UUN2)	44
รูปที่ 15	กราฟมาตรฐานหาปริมาณกานามัยซิน (STD-UUN3)	45
รูปที่ 16	กราฟมาตรฐานหาปริมาณกานามัยซิน (STD-UUNN1)	45
รูปที่ 17	กราฟมาตรฐานหาปริมาณกานามัยซิน (STD-UUNN2)	46
รูปที่ 18	กราฟมาตรฐานหาปริมาณกานามัยซิน (STD-UUNN3)	46
รูปที่ 19	ลักษณะโครมาโตแกรมของ *S. kanamyceticus* A-38	47

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

		หน้า
รูปที่ 20	ลักษณะโครมาโตแกรมของสายพันธุ์กลาย UUNN1	47
รูปที่ 21	ลักษณะโครมาโตแกรมของกานามัยซิน A มาตรฐาน ปริมาณ 1500 ไมโครแกรมต่อมิลลิลิตร	48
รูปที่ 22	ลักษณะโครมาโตแกรมของกานามัยซิน A ปริมาณ 500 ไมโครแกรมต่อมิลลิลิตร	48
รูปที่ 23	ลักษณะโครมาโตแกรมของกานามัยซิน A ปริมาณ 0 ไมโครแกรมต่อมิลลิลิตร	49
รูปที่ 24	ลักษณะโคโลนีของ *S. kanamyceticus* A-38	29
รูปที่ 25	ลักษณะโคโลนีของสายพันธุ์กลาย UUNN1	29
รูปที่ 26	ลักษณะโคโลนีเดียวของ *S. kanamyceticus* A-38	30
รูปที่ 27	ลักษณะโคโลนีเดียวของสายพันธุ์กลาย UUNN1	30

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	การหาจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตหลังจากฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต	17
ตารางที่ 2	เปรียบเทียบการผลิตกานามัยซินโดยวัดขนาดของ clear zone หลังจากการฉายแสง UV ครั้งที่ 1 เพื่อใช้ในการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ	18
ตารางที่ 3	เปรียบเทียบการผลิตกานามัยซินและความเสถียรของสายพันธุ์กลาย หลังจากการฉายแสง UV ครั้งที่ 1 เพื่อใช้ในการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ	19
ตารางที่ 4	เปรียบเทียบการผลิตกานามัยซินโดยวัดขนาดของ clear zone หลังจากการฉายแสง UV ครั้งที่ 2 เพื่อใช้ในการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ	21
ตารางที่ 5	เปรียบเทียบการผลิตกานามัยซินและความเสถียรของสายพันธุ์กลาย หลังจากการฉายแสง UV ครั้งที่ 2 เพื่อใช้ในการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ	22
ตารางที่ 6	เปรียบเทียบจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตหลังจากถูกชักนำด้วยสาร NTG ที่มีปริมาณความเข้มข้นต่าง ๆ ในสารละลาย 0.05 M Tris–maleic buffer pH 9.0	23
ตารางที่ 7	เปรียบเทียบการผลิตกานามัยซินโดยวัดขนาดของ clear zone หลังจากการชักนำด้วยสาร NTG ครั้งที่ 1 เพื่อใช้ในการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ	24
ตารางที่ 8	เปรียบเทียบการผลิตกานามัยซินและความเสถียรของสายพันธุ์กลาย หลังจากการชักนำด้วยสาร NTG ครั้งที่ 1 เพื่อใช้ในการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ	25
ตารางที่ 9	เปรียบเทียบการผลิตกานามัยซินโดยวัดขนาดของ clear zone หลังจากการชักนำด้วยสาร NTG ครั้งที่ 2 เพื่อใช้ในการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ	26
ตารางที่ 10	เปรียบเทียบการผลิตกานามัยซินและความเสถียรของสายพันธุ์กลาย หลังจากการชักนำด้วยสาร NTG ครั้งที่ 2 เพื่อใช้ในการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ	27

บทนำ

กานามัยซิน (Kanamycin)

กานามัยซินเป็นสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากจุลินทรีย์ในกลุ่ม streptomycetes พบครั้งแรกโดยนักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่นชื่อ Hamao Umezawa (Umezawa, 1957) ซึ่งแยกเชื้อจากดินตัวอย่างที่เก็บจากเขต Nagano ในประเทศญี่ปุ่น เขาตั้งชื่อจุลินทรีย์ชนิดนี้ว่า *Streptomyces kanamyceticus* และบรรยายลักษณะของเชื้อชนิดนี้เมื่อเลี้ยงบน agar medium ว่า โคโลนีจะมีลักษณะตั้งแต่สีขาวเหลือง หรือเขียวอ่อน ความกว้างของเส้นใยประมาณ 1 ไมครอน เส้นใยแตกเป็นแขนงไม่มีลักษณะเป็นเกลียว (spirals) หรือหมุนเป็นวงคล้ายก้นหอย (whorls) และมีการสร้างสปอร์บนปลายเส้นใย

กานามัยซินเป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่มอมิโนไกลโคไซด์ (aminoglycoside) มีคุณสมบัติเป็นแบคเทอริซิดัล (bactericidal) คือสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญหรือฆ่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้แก่ แบคทีเรียกลุ่มแกรมบวก แกรมลบ และแอซิดฟาส์ท (acid fast) โดยยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของจุลินทรีย์ สามารถออกฤทธิ์กับแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่กลุ่มเพนนิซิลลินใช้ไม่ได้ผล โดยเฉพาะออกฤทธิ์ได้ดีกับ *Staphylococcus* spp., *Proteus* spp., *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Neisseria* spp., และ *Mycobacterium tuberculosis* เป็นต้น (มาลิน 2532; Kucers และ Mc. Bennet 1975; Edward, 1980)

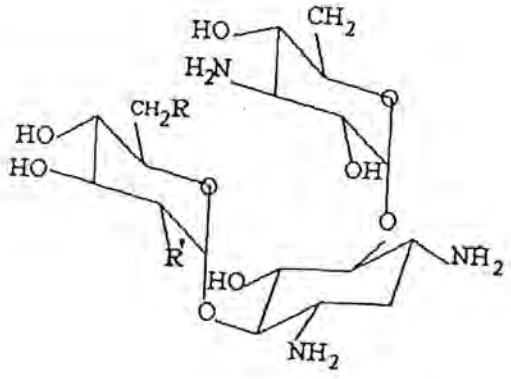
กานามัยซินเป็นยาค่อนข้างเสถียร ดูดซึมผ่านลำไส้ได้น้อย แต่ดูดซึมผ่านเข้ากล้ามเนื้อได้รวดเร็ว จึงนิยมใช้ฉีด ปริมาณที่ใช้ทั่วไป 1–2 กรัมต่อวัน แต่ถ้าใช้ในการรับประทานจะใช้ปริมาณ 4–6 กรัมต่อวัน ที่ใช้มากเกินไปอาจมีผลต่อระบบประสาท ระบบการหายใจ และอาจเป็นพิษต่อไตด้วย (Kucers และ Mc. Bennet, 1975)

กานามัยซินมีโครงสร้างเป็นอะมิโนซูการ์ (amino sugar) ต่อกัน 3 โมเลกุลด้วยพันธะไกลโคซิดิค (glycosidic linkage) ดังรูปที่ 1 มี 3 อนุพันธ์คือ

Kanamycin A $C_{18}H_{36}N_4O_{11}$ $R_1 = NH_2$, $R_2 = OH$

Kanamycin B $C_{18}H_{37}N_5O_{10}$ $R_1 = NH_2$, $R_2 = NH_2$

Kanamycin C $C_{18}H_{36}N_4O_{11}$ $R_1 = OH$, $R_2 = NH_2$



รูปที่ 1 โครงสร้างโมเลกุลของกานามัยซิน
(Cron, M. J. et al. 1968)

กานามัยซินมีสมบัติหลายประการ เช่น ละลายได้ในน้ำมากกว่า 25% ที่ pH 7.0 ไม่ละลายในแอลกอฮอล์ (alcohol), เอน-บิวทานอล (n-butanol), เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate), คลอโรฟอร์ม (chloroform), อีเทอร์ (ether) และเบนซีน (benzene) มีความเสถียรสูงสลายตัวน้อยกว่า 10% เมื่อผ่านการฆ่าเชื้อที่ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 ช.ม. ไม่ดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet, UV) แต่ดูดกลืนแสงอินฟราเรด (infra red) ให้ผลบวกกับการทดสอบด้วยปฏิกริยานินไฮดริน (ninhydrin), เอลสัน-มอรแกนและโมลิช (Elson-Morgan และ Molisch) แต่จะให้ผลลบกับการทดสอบด้วยปฏิกริยารีดิวซิง ชูการ์ (reducing sugar) และมอลโทรเทส์ท (moltol test) (Umezawa, 1960)

การผลิตกานามัยซิน

Umezawaและคณะได้ทำการทดลองผลิตกานามัยซินโดยใช้ *Streptomyces kanamyceticus* K-2J เลี้ยงในถังหมักขนาด 400 ลิตร มีการให้อากาศปริมาณ 200 ลิตรต่อนาที อัตราการกวน

200 รอบต่อนาที ใช้ซิลิโคนหรือพาราฟินเหลวเป็นสารป้องกันการเกิดฟอง (antifoam) pH เริ่มต้น 7.0 เลี้ยงเชื้อในช่วงอุณหภูมิ 27–29 องศาเซลเซียส พบว่าจะได้กานามัยซินปริมาณสูงสุด 253 ไมโครแกรม/มิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 90 ของการหมัก (Umezawa, 1957) ปัจจุบันนิยมผลิตกานามัยซินในรูปแบบซัมเมอร์จ คัลเจอร์ (submerge culture) เริ่มด้วยการนำมัยซีเลียม (mycelium) หรือสปอร์ (spore) ของ *Streptomyces kanamyceticus* จากอะการ์สแลนท์ (agar slant) มาเลี้ยงเพิ่มจำนวนในซีดมีเดียม (seed medium) หรือโกร์ทมีเดียม (growth medium) ซึ่งมีองค์ประกอบอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตหรือเพิ่มจำนวน จากนั้นปรับสภาพของเชื้อเพื่อพร้อมที่จะถูกนำไปเลี้ยงในโพรดัคชั่นมีเดียม (production medium) เพื่อผลิตกานามัยซินต่อไป

การผลิตกานามัยซินในประเทศไทยพัฒนาไปน้อยมาก ไม่เพียงพอกับความต้องการของตลาด ทำให้ต้องมีการสั่งนำเข้ามาจากต่างประเทศปีละเป็นจำนวนไม่น้อย (กองควบคุมอาหารยา 2535) จากสถิติการนำเข้าของกานามัยซินมาใช้รักษาโรคในคนและสัตว์ พบว่ามีแนวโน้มของการใช้เพิ่มขึ้นเรื่อยและราคาในท้องตลาดก็สูงเมื่อเปรียบเทียบกับยาชนิดอื่น การผลิตกานามัยซินในประเทศ ซึ่งสามารถทำได้ถ้ามีสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตยาได้ปริมาณสูง เจริญเติบโตได้ดี และสามารถใช้แหล่งวัตถุดิบที่ได้จากการเกษตรภายในประเทศ การนำจุลินทรีย์ใช้ในอุตสาหกรรมแรกเริ่มนั้น เป็นจุลินทรีย์ที่ได้จากการคัดแยกจากแหล่งธรรมชาติ ซึ่งจำเป็นต้องคัดแยกอยู่ตลอดเวลา เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่สามารถสร้างผลิตภัณฑ์ที่ต้องการมากที่สุด การค้นคว้าหาจุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารปฏิชีวนะได้มากขึ้นกว่าเดิม โดยมากมักจะมุ่งในการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ ซึ่งทำได้โดยการชักนำให้กลายพันธุ์อันจะทำให้มีโอกาสพบเชื้อที่มีคุณสมบัติดีกว่าสายพันธุ์เดิมด้วย (Dulany, 1954; Alikhanian, 1962)

การทำการกลายพันธุ์ (Mutation)

การกลายพันธุ์หมายถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นบนยีน (gene) หรือสายพันธุกรรม ซึ่งทำให้การแสดงออกของรุ่นลูกหลานผิดไปจากสายพันธุ์ดั้งเดิม การกลายพันธุ์มี 2 แบบ คือการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (spontaneous mutation) ที่มีอัตราการเกิดระหว่าง 10^{-5} ถึง 10^{-9} ต่อเซลล์ต่อรุ่น (วัฒนาลัยและสรวง 2536) และการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นโดยการเหนี่ยวนำ (induced mutation) ซึ่งเป็นการกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ในอัตราที่สูงขึ้น เมื่อเทียบกับการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ

สารก่อการกลายพันธุ์ (Mutagen) ที่มักนิยมใช้ในอุตสาหกรรมเพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์มี 2 กลุ่ม คือกลุ่มแสงหรือรังสี ได้แก่ แสงอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet light, UV) และกลุ่มสารเคมีที่นิยม ได้แก่ เอ็น-เมธิล-เอ็น-ไนโตร-เอ็น-ไนโตรโซกัวนิดิน (N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine, NTG หรือ MNNG) (Ikyta, 1983; Stanbury and Whitaker, 1984) ซึ่งการเลือกใชสารก่อการกลายพันธ์และเทคนิควิธีการใช้เป็นสิ่งที่ต้องพึงระวังอย่างมาก

แสงอัลตราไวโอเล็ต (Ultraviolet light, UV)

UV เป็นแสงที่มีความยาวคลื่น 200-400 nm. เป็นแสงประเภทไม่แตกตัวเป็นประจุ (non-ionizing) ความยาวคลื่นของแสงอัลตราไวโอเลตที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์อยู่ในช่วงความยาวคลื่น 230-260 nm. ดีเอ็นเอ เบส (DNA bases) สามารถดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต มีผลต่อพันธะโควาเลนต์ (covalent linkage) ของไพริมิดีนเบส (pyrimidine bases)โมเลกุลถัดไปทำให้เกิดเป็นไดเมอร์ (dimer) คือเกิดไพริมิดีนสองโมเลกุลจับกันในโมเลกุลของโพลีดีออกซีนิวคลีโอไทด์ เช่น ไทมีน-ไทมีน ไดเมอร์ (thymin-thymine dimer) ไทมีน-ไซโตซีน-ไดเมอร์ (thymin-cytosine dimer) หรือไซโตซีน-ไซโตซีน ไดเมอร์ (cytosin-cytosine dimer) การเกิดการกลายพันธุ์ด้วยการใช้แสงอัลตราไวโอเลตนี้เกิดขึ้นจากการซ่อมแซม (lesion repair) ส่วนที่ผิดปรกติไปโดยกลไกที่เรียกว่าเอเรอโพรน เมคคานิสซึม) (Error-prone mechanism) ด้วยการทำลายไพรีมิดินไดเมอร์ และมีการเติมเบสใหม่เข้ามาโดยดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) ซึ่งอาจจะทำให้เกิดการจับคู่ผิดของเบสทำให้ลำดับของนิวคลีโอไทด์ผิดไปจากเดิม (Drake และ Baltz, 1976) มีรายงานการปรับปรุงสายพันธุ์ *Streptomyces erythreus* ด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ให้อัตราการรอดชีวิตน้อยกว่า 12% พบว่าได้สายพันธุ์กลาย (mutant) ที่สามารถผลิตอิริโทรมัยซิน (erythromycin) ได้มากกว่าสายพันธุ์ดั้งต้น 8 เท่า (Mandal และคณะ, 1981)

N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG หรือ MNNG)

NTG เป็นสารก่อการกลายพันธุ์ในกลุ่มอัลคิลเลติง เอเจนท์ (alkylating agent) จะให้หมู่อัลคิล (alkyl group) แก่โมเลกุลดีเอ็นเอในปฏิกริยาอัลคิลเลชั่น ((alkylation) ทำให้หมู่อัลคิลเข้าไปในตำแหน่งต่าง ๆ ของเบสในดีเอ็นเอกลายเป็นอัลคิลเลเทดเบส (alkylated base) นอกจากนี้หมู่อัลคิลยังเข้าไปที่ตำแหน่งพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ (phosphodiester bond) และไรโบส (ribose)

ได้ ซึ่งจะมีผลต่อความผิดปรกติของดีเอ็นเอ เช่น ทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบทรานสิชั่น มิวเตชั่น (transtition mutation) คือการจับคู่ระหว่างเบสเปลี่ยนแปลงไป โดย G = C เปลี่ยนไปเป็น A = T ทำให้การเชื่อมต่อระหว่างเบสกัวนีนกับน้ำตาลดีออกซีไรโบส ฟอสเฟต (deoxyribose phosphate) หลวมและหลุดออก เกิดเป็นช่องว่างขึ้นในสายดีเอนเอ เรียกว่า อพิวรีนิค แกป (apurinic gap) และเกิดขบวนการซ่อมแซมที่เรียกว่า เออเรอโพรน เมคคานิซึม (Error–prone mechanism) ซึ่งการนำเบสอื่นเข้ามาแทนที่หากเป็นเบสที่ต่างไปจากเดิมจะทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบทรานซิชั่น (transition) และทรานสเวอชั่น (transversion) (Bautz และ Freese, 1960; Lowley และ Brook, 1961;Glass, 1983)

Johdo และคณะได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์ *Streptomyces violaceus* A262 โดยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ให้อัตราการรอดชีวิตน้อยกว่า 5% และทำการกลายพันธ์ด้วย NTG ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 45 นาที ให้อัตราการรอดชีวิตน้อยกว่า 20% ผลการทดลองได้สายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะเยลลามัยซิน (yellamycin) ได้สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งต้น (Johdo และคณะ 1991)

มีรายงานการปรับปรุงสายพันธุ์ streptomycetes เพื่อเพิ่มผลผลิตของสารปฏิชีวนะหลายชนิดด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตหรือสาร NTG แต่มีส่วนน้อยมากที่เกี่ยวกับ *Streptomyces kanamyceticus* ซึ่งก็จะเป็นผลงานของชาวรัสเซียหรือชาวจีนเท่านั้น

มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย

การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมยังคงใช้กระบวนการทำให้กลายพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์ เหตุผลหลักที่สำคัญที่ยังต้องใช้กระบวนการดังกล่าว เพราะว่าไม่สามารถใช้การผสมพันธุ์โดยอาศัยเพศ หรือยังไม่สามารถนำระบบการโคลน (cloning) ยีนของจุลินทรีย์ที่สนใจมาใช้ได้กับจุลินทรีย์ทุกชนิด ดังนั้นการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ต้องการอาจประสบผลสำเร็จได้โดยการชักนำให้กลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งหรือหลายตำแหน่งบนดีเอ็นเอ (Saunders และ Saunders, 1987)

จากความสำคัญของกานามัยซินซึ่งเป็นยาที่มีประสิทธิภาพสูงและแนวโน้มของความต้องการเพิ่มขึ้น อีกทั้งการศึกษาวิธีการกลายพันธุ์ของ *Streptomyces kanamyceticus* เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการผลิตกานามัยซินยังไม่สำเร็จเท่าที่ควร (Zhao และคณะ 1980; Du Zhao, 1983) ประกอบกับ

ยังมิได้มีรายงานการศึกษาในประเทศไทยเกี่ยวกับการปรับปรุงสายพันธุ์ชนิดนี้ เป็นข้อจูงใจให้ผู้วิจัยใคร่ที่จะศึกษา ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะปรับปรุงสายพันธุ์ *Streptomyces kanamyceticus* A-38 โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารก่อการกลายพันธุ์ 2 ชนิดคือ UV และ NTG เพื่อให้ได้สายพันธุ์กลายที่มีความเสถียรและสามารถผลิตกานามัยซินสูงขึ้น ข้อมูลที่ได้จะนำไปใช้ในการศึกษาการผลิตกานามัยซินในระดับขยายส่วนต่อไป

วิธีวิจัย

อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. อุปกรณ์

ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow) รุ่น BV-124 บริษัท International Scientific Supply Co. Ltd.

ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) รุ่น D 0601 model 500 บริษัท Memmert

เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อ (Shaker) รุ่น Gyrotory G10 บริษัท New Brunswick Scientific

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 บริษัท Bausch & Lomb.

ถาดแก้ว ขนาดกว้าง 19 เซนติเมตร ยาว 31 เซนติเมตร สูง 1.5 เซนติเมตร และขนาดกว้าง 15 เซนติเมตร ยาว 24 เซนติเมตร สูง 1.5 เซนติเมตร

อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (Haemacytometer) ขนาด bright line deep 1/10 มิลลิเมตร บริษัท Boeco

กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) รุ่น CHS บริษัท Olympus Optical Co. Ltd.

เครื่องผสมสาร (Vortex) รุ่น Vortex-2 Genie model G-560E บริษัท Scientific Industries

หลอดแสงอัลตร้าไวโอเลต (Ultraviolet lamp) รุ่น BT51G บริษัท Ainavlys. EtG.

เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) รุ่น Cimarel 2 Barnstead/ Thermolyne model 546720-26

เครื่องดูดสารอัตโนมัติ (Pipette pump) รุ่น P-8049 ขนาด 2 มิลลิลิตร บริษัท Sigma Chemical

หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Auto steam sterilizer) รุ่น H-88L4 บริษัท Kokusan.

แท่งสเตนเลสกลวง (Cylinder) เส้นผ่าศูนย์กลางวงนอก 8 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางวงใน 6 มิลลิเมตร และยาว 10 มิลลิเมตร ($\pm$ 0.1 มิลลิเมตร)

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น KM-15200 บริษัท Kubota

เครื่องไฮเปอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (High Performance Lipuid chromatography, HPLC) รุ่น LC-3A Jeol

2. <u>สารเคมี</u>

กานามัยซินเอ ซัลเฟต (kanamycin A sulfate) บริษัท Sigma-chemical

เอ็น เมธิ เอ็น ไนโตร เอ็น ไนโตรโซกัวนิดีน (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, NTG) บริษัท Sigma Chemical

กรดมาลิอิค (Maleic acid) บริษัท BOH Chemical LTD Poole., England.

ทริส (Tris) บริษัท Sigma Chemical

กรดไตรไนโตรเบนเซนซัลโฟนิก (2,4,6 Trinitrobenzensulphonic acid) บริษัท Sigma Chemical.

ไพริดีน (Pyridine) บริษัท Merck

อะซิโตนไนไตรด์ (Acetonitrile) บริษัท Sigma Chemical

วิธีการทดลอง

1. เชื้อจุลินทรีย์

1.1 *Streptomyces kanamyceticus* A-38 ได้รับจาก Laboratory of Applied Microbiology, Kyushu University, Japan.

1.2 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P

2. การเก็บรักษา

2.1 การเก็บรักษา *Streptomyces kanamyceticus* A-38 และสายพันธุ์กลาย

เขี่ยเส้นใย และสปอร์ของ *Streptomyces kanamyceticus* โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (needle) ลาก (streak) บนผิวหน้าของอาหารวุ้นเอียง (slant agar) วายเอส อการ์ (YS agar, ภาคผนวก) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7-10 วัน แล้วจึงนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการเขี่ยเชื้อเพื่อเก็บรักษาอีกทุกเดือน โดยใช้วิธีเดียวกัน

2.2 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P

เขี่ยเชื้อ S. *aureus* โดยใช้ลูป (loop) ลากลงบนผิวหน้าของอาหารวุ้นเอียง เอ็มวัน อการ์ (M1 agar, ภาคผนวก) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญดีแล้วจึงนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการเขี่ยเชื้อเพื่อเก็บรักษาอีกทุกเดือน โดยใช้วิธีเดียวกัน

3. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

3.1 การเตรียมสปอร์แขวนลอยของ S. kanamyceticus

นำ S. kanamyceticus อายุ 7-10 วัน ซึ่งมีสปอร์เจริญเต็มที่ ที่เพาะเลี้ยงไว้ในอาหารวุ้นเอียง วายเอส อการ์ เติม 5 มิลลิลิตร ของสารละลาย 0.01% ทวีนเอทดี (Tween 80) ขูดสปอร์ด้วยลูป นำสปอร์แขวนลอยที่ได้มากรองด้วยสำลีโดยวิธีการแบบปลอดเชื้อ หลังจากนั้นนำสปอร์มาเจือจางด้วยสารละลายนอร์มัลซาลีน (Normal saline, NaCl 0.85% (w/v)) ให้ได้ปริมาณสปอร์ $1x10^8$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยนับด้วยอุปกรณ์นับเม็ดเลือด (haemacytometer)

3.2 การเตรียมเซลล์แขวนลอยของ S.*aureus*

นำ S.*aureus* อายุ 24 ชั่วโมง ที่เจริญบนอาหารวุ้นเอียง เอ็มวัน อการ์ มาเติมด้วยสารละลายนอร์มัลซาลีน 2 มิลลิลิตร ขูดเชื้อด้วยลูป นำเซลล์แขวนลอยของเชื้อมาเจือจาง แล้วนำไปวัด

ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbent) ที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) เจือจางจนวัดค่าการดูดกลืนแสงได้เท่ากับ 0.1

4. การเพาะเลี้ยงเชื้อ

4.1 การเพาะเลี้ยง S. *kanamyceticus* เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์

ใส่สปอร์แขวนลอยของ S. *kanamyceticus* ที่เตรียมได้จากการทดลองที่ 3.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวจีพีวาย (GPY medium, ภาคผนวก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดทดลองรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี (Rotary shaker) ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30–33 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4.2 การเพาะเลี้ยง S. *kanamyceticus* ในอาหารวุ้นแข็งเพื่อสร้างกานามัยซิน

นำลูปแต่ละลูปเขี่ยเชื้อที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองที่ 4.1 เขี่ยให้ทั่วบริเวณบนผิวหน้าอาหารวุ้นแข็ง เคพีเอ็มเอ (KPMA agar, ภาคผนวก) ที่มีลักษณะเป็นชิ้นกลมที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 มิลลิเมตร และหนา 3 มิลลิเมตร นำไปบ่มเลี้ยงบนถาดแก้วที่มีขนาดความกว้าง 15 เซนติเมตร ยาว 24 เซนติเมตร และสูง 1.5 เซนติเมตร ซึ่งบรรจุอยู่ในกล่องอลูมิเนียม ดังรูปที่ 2 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน

4.3 การเพาะเลี้ยง S. *kanamyceticus* ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่าเพื่อสร้างกานามัยซิน

นำ S. *kanamyceticus* ที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองที่ 4.1 ปริมาณ 1 กรัมของน้ำหนักเส้นใยเปียกใส่ลงในอาหารเหลวผลิตกานามัยซิน เคพีเอ็มบี (KPMB medium, ภาคผนวก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดทดลองรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารีด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

5. การศึกษาความสามารถในการสร้างกานามัยซินของ S. *kanamyceticus*

5.1 การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา (Microbiological assay) โดยวิธีการแพร่ (Agar diffusion method) (CFR 21)

5.1.1 การวัดความสามารถในการสร้างกานามัยซิน ในอาหารวุ้นแข็งเคพีเอ็มเอ

5.1.1.1 การเตรียมตัวอย่างทดสอบ

ใช้ชิ้นอาหารวุ้นแข็งเคพีเอ็มเอที่มีเชื้อ S. *kanamyceticus* เจริญอยู่บนผิวหน้า ที่บ่มเลี้ยงไว้เป็นเวลา 5 วัน ซึ่งเตรียมได้จากวิธีการทดลองที่ 4.2

5.1.1.2 การเตรียมอาหารวุ้นทดสอบ

5.1.1.2.1 การเตรียมอาหารวุ้นชั้นปรับระดับระนาบ (Base layer)

นำอาหารวุ้นแข็งเอ็มไฟว์ (M5 agar, ภาคผนวก) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ที่มีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส เทลงถาดกระจกขนาดกว้าง 19 เซนติเมตร ยาว 31 เซนติเมตรและขอบสูง 1.5 เซนติเมตร ที่ปรับระดับแล้ว รอให้อาหารวุ้นแข็งตัว ซึ่งจะได้ความหนาประมาณ 3 มิลลิเมตร

5.1.1.2.2 การเตรียมอาหารวุ้นทดสอบชั้นที่มีเซลล์แขวนลอยของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (Seed layer)

นำเชื้อ S. *aureus* ATCC 6538P ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองที่ 3.2 ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มไฟว์ ปริมาตร 100 มิลลิตร ที่มีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส เขย่าให้เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบกระจายทั่วอาหาร แล้วเทลงบนถาดกระจกที่มีอาหารวุ้นเอ็มไฟว์ ที่เตรียมจากวิธีการทดลองที่ 5.1.1.2.1 เอียงถาดกระจกให้อาหารวุ้นกระจายถั่วถาด และมีผิวหน้าเรียบเสมำเสมอ ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารวุ้นแข็งตัว

5.1.1.3 การหาปริมาณกานามัยซิน

นำชิ้นวุ้นตัวอย่างที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองที่ 5.1.1.1 วางลงบนถาดวุ้นแข็งที่เตรียมจากวิธีการทดลองที่ 5.1.1.2 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16–18 ชั่วโมง วัดความกว้างเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้งการเจริญ (Clear zone) รอบชิ้นวุ้นตัวอย่าง เพื่อเปรียบเทียบปริมาณกานามัยซิน ดังรูปที่ 3

5.1.2 การวัดความสามารถในการสร้างกานามัยซินในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี

5.1.2.1 การเตรียมตัวอย่างทดสอบ

นำ 10 มิลลิลิตร ของเชื้อ S. *kanamyceticus* ที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองที่ 4.3 ใส่ลงในหลอดทดลองชนิดฝาเกลียว นำไปปั่นแยกเส้นใยและตะกอนออกจากส่วนน้ำใส (Supernatant) โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็ว 3,000 รองต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

5.1.2.2 การเตรียมอาหารวุ้นทดสอบ

วิธีการเตรียมเช่นเดียวกับวิธีการทดลองที่ 5.1.1.2

5.1.2.3 การหาปริมาณกานามัยซิน

นำท่อสเตนเลส (Cylinder) วางลงบนถาดวุ้นแข็งที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองที่ 5.1.2.2 ดังรูปที่ หยดตัวอย่างที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองที่ 5.1.2.1 โดยใช้พาสเจอร์ปิเปต (Pasture pipette) ให้เต็มแท่งสเตนเลส นำไปไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16–18 ชั่วโมง วัดความกว้างเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้งการเจริญ รอบแท่งสเตนเลสเพื่อเปรียบเทียบปริมาณกานามัยซิน ดังรูปที่ 4

5.2 การวิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (High Performance Liquid chromatography, HPLC)

นำตัวอย่างที่เตรียมได้จากข้อ 5.1.2.1 มาวิเคราะห์หาปริมาณกานามัยซินด้วยเครื่อง HPLC ตามวิธีของ Gambardella และคณะ (1985)

5.2.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างที่ได้จากข้อ 5.1.2.1 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรผสมกับสารละลายกานามัยซินซัลเฟตมาตรฐานเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเติม 1 มิลลิลิตร ของ 0.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) กรดไตรไนโตรเบนเซนซัลโฟนิก (2,4,6 Trinitrobenzensulphonic acid) และ 1.5 มิลลิลิตร ของไพริดีน (Pyridine) ใส่ลงในหลอดขนาดเล็ก (Vial) นำไปให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นด้วยน้ำประปา และเติม 1 มิลลิลิตร ของอะซิโตไนไตรด์ (Acetonitrile) ผสมให้เข้ากัน

5.2.2 ภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

คอลัมน์ : C_{18} reverse s..phase
ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.46 เซนติเมตร
ยาว 12.5 เซนติเมตร

สารละลายตัวพา : 0.02 โมลาร์โปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 : อะซิโตไนไตรด์ : เมธานอล = 40:46:15 (ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) (ภาคผนวก)

อัตราการไหล : 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที

อุณหภูมิ : 25 องศาเซลเซียส

เครื่องตรวจวัด : ความยาวคลื่น อัลตร้าไวโอเลต 350 นาโนเมตร

6. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

6.1 การชักนำด้วยรังสีอัลตร้าไวโอเลต (Ultraviolet, UV)

นำสปอร์แขวนลอยของ S. *kanamyceticus* ที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองที่ 3.1 จำนวน 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Pretri dish) ที่มีเข็มยาว 7 เซนติเมตร (เพื่อกวนสปอร์ให้กระจายอย่างสม่ำเสมอในระหว่างการแายแสง UV) และสารละลายนอร์มอลซาลีน 20 มิลลิลิตร อยู่ วางจานอาหารเลี้ยงเชื้อลงบนเครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) ฉายแสง UV ที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีระยะห่าง 30 เซนติเมตร ระหว่างหลอด UV และจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ฉายแสง UV เป็นเวลา 0, 2, 4, 8, 16, 32 และ 64 นาทีตามลำดับ นำสปอร์ที่ผ่านการฉายแสง UV ไปเจือจางด้วยการแปรความเข้มข้นต่าง ๆ และนำ 0.1 มิลลิลิตรของสปสอร์แขวนลอยไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นแข็ง วายเอส อการ์ โดยวิธีสเปรดเพลท (Spread plate) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ที่ไม่มีแสง เป็นเวลา 3–4 วัน นับจำนวนโคโลนี (Colony) ของเชื้อที่รอดชีวิตอยู่ระหว่าง 30–300 โคโลนีต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำมาคำนวณเป็นจำนวนสปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยกำหนดให้ 1 โคโลนีเจริญมาจาก 1 สปอร์ และคำนวณหาเปอร์เซนต์การรอดชีวิดของสปอร์ที่ผ่านการฉายแสง UV ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน ให้สปอร์ที่ผ่านการฉายแสง UV นาน 0 นาที มีเปอร์เซนต์การรอดชีวิตเป็น 100 เปอร์เซนต์ นำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟอัตราการรอดชีวิดของสปอร์ที่ถูกฉายแสง UV ในระยะเวลาต่าง ๆ กัน โดยให้เปอร์เซนต์การรอดชีวิตเป็นแกน Y และเวลาที่ฉายแสง UV เป็นแกน X

เก็บเชื้อกลายพันธุ์ที่มีเปอร์เซนต์การรอดชีวิตที่อยู่ในช่วง 1–2 เปอร์เซนต์ มาทำการคัดเลือกในขั้นปฐมภูมิต่อไป (Johdo et al., 1991)

6.2 การชักนำด้วยสาร NTG

นำสปอร์แขวนลอยของ S. *kanamyceticus* ที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองที่ 3.1 จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองชนิดฝาเกลียว เติม 1 มิลลิลิดรของสารละลาย NTG ที่ละลายใน 0.05 โมลาร์ ทริสมาลิอิค บัฟเฟอร์ pH 9.0 (ภาคผนวก) เข้มข้น 0.1, 0.02, 0.01, 0.002, 0.001, 0.0002, 0.0001, 0.00002 และ 0 โมลาร์ เพื่อให้ได้สารแขวนลอยสปอร์ที่อยู่ในสารละลาย NTG เข้มข้น 0.05, 0.01, 0.005, 0.001, 0.0005, 0.0001, 0.00005,

0.00001 และ 0 โมลาร์ตามลำดับ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นแบ่งสารละลายสปอร์มา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก (eppendorf) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นแยกสปอร์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บสปอร์แล้วปั่นล้างสปอร์ด้วย 1 มิลลิลิตร ของสารละลายนอร์มัลซาลีน ทำการปั่นล้าง 2 ครั้ง เติมสารละลายนอร์มัลซาลีน 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปเจือจางให้ได้ความเข้มข้นของสปอร์ต่าง ๆ กัน นำไปทดสอบหาเปอร์เซนต์การรอดชีวิตของสปอร์หลังจากทำปฏิกริยากับ NTG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยใช้วิธีเช่นเดียวกับวิธีการทดลองที่ 6.1 นำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ที่ทำปฏิกริยากับ NTG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยให้เปอร์เซนต์การรอดชีวิตเป็นแกน Y และความเข้มข้นสารละลาย NTG เป็นแกน X

เก็บเชื้อที่มีเปอร์เซนต์การรอดชีวิตอยู่ในช่วง 1–2 เปอร์เซนต์ มาดำเนินการคัดเลือกในขั้นปฐมภูมิต่อไป (Delic et al., 1970)

7. <u>การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่สามารถสร้างกานามัยซินได้สูงขึ้น</u>

7.1 การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ

คัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วยแสง UV หรือสาร NTG โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสร้างกานามัยซินของเชื้อกลายพันธุ์กับสายพันธุ์ดั้งต้น ที่เลี้ยงในอาหารวุ้นแข็งเคพีเอ็มเอ ตามวิธีการทดลองที่ 4.1 คัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ที่ให้ความกว้างบริเวณยังยั้ง (Clear zone) มากกว่าสายพันธุ์ดั้งต้นโดยใช้วิธีการทดลองที่ 5.1.1 มาทดสอบในขั้นทุติยภูมิต่อไป

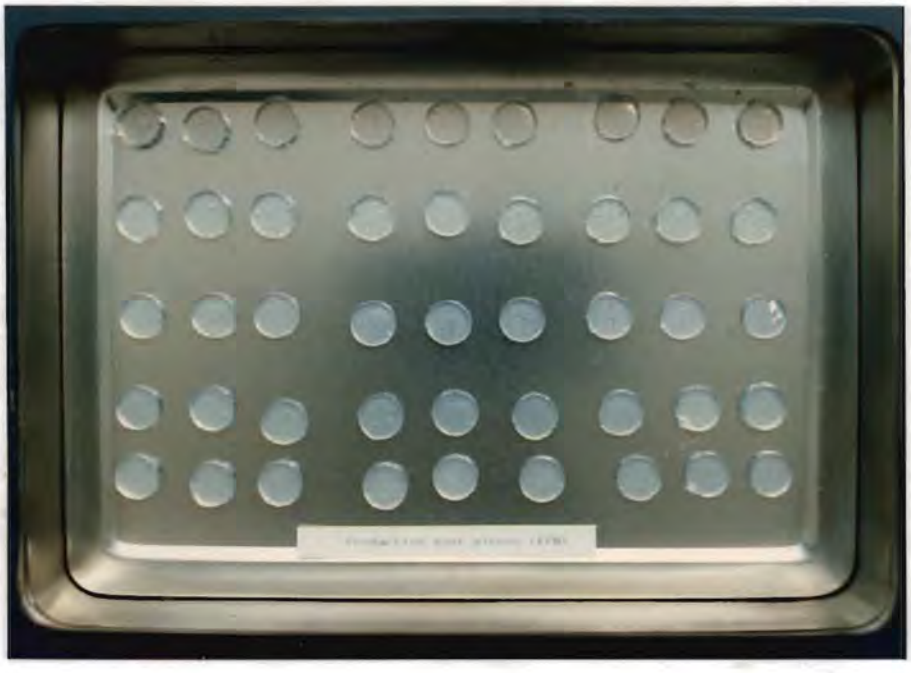
7.2 การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ

นำเชื้อสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้จากขั้นปฐมภูมิ มาเลี้ยงในอาหารเคพีเอ็มบีตามวิธีการทดลองข้อ 4.3 นำน้ำหมักที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณกานามัยซินเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งต้น ด้วยวิธีการทางจุลชีววิทยา ตามวิธีการทดลองที่ 5.1.2 นำเชื้อกลายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างกานามัยซินสูงสุด มาวิเคราะห์หาปริมาณกานามัยซินด้วยเครื่อง HPLC ตามวิธีการทดลองที่ 5.2 เก็บเชื้อกลายพันธุ์ดังกล่าว เป็นสายพันธุ์ดั้งต้นในการทำการกลายพันธุ์ต่อไป

8. <u>การทดสอบความเสถียรในการสร้างกานามัยซินของเชื้อกลายพันธุ์</u>

นำเชื้อกลายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากขั้นทุติยภูมิ มาเลี้ยงในอาหารเคพีเอ็มบีตามวิธีการทดลองที่ 4.3 วิเคราะห์หาปริมาณกานามัยซินด้วยวิธีการทางจุลชีววิทยา ตามวิธีการทดลองที่ 5.1.2

โดยทำการทดลองไม่ต่ำกว่า 3 รุ่นของเชื้อ คัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ที่ยังสามารถผลิตกานามัยซินได้อย่างสม่ำเสมอ และมีปริมาณมากกว่าสายพันธุ์ดั้งต้น



รูปที่ 2 แสดงการเตรียมอาหารในถาดแก้วสำหรับ *S. kanamyceticus* เพื่อสร้างกานามัยซิน

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3 แสดงการหาปริมาณกานามัยซินด้วยการวัด clear zone เมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหาร KPMA

รูปที่ 4 แสดงการหาปริมาณกานามัยซินด้วยการวัด clear zone เมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหาร KPMB

ผลของการวิจัย

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV)

เมื่อนำสปอร์แขวนลอยของ *S. kanamycetic* A-38 ที่ผลิตกานามัยซินได้ 13 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการฉานแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ระยะห่างจากหลอด UV เป็น 30 เซนติเมตร ด้วยระยะเวลาต่าง ๆ กัน (ตามวิธีทดลองที่ 6.1) จะได้จำนวนเชลล์ที่รอดชีวิตจากการฉายแสง (ตารางที่ 1) นำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของสปอร์ที่ถูกฉายแสงในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ กัน ดังกราฟในรูปที่ 5 (ภาคผนวก)

จากค่าในตารางและกราฟพบว่า ช่วงระยะเวลาของการฉายแสง 4 นาที จะเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดที่จะนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

การฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตครั้งที่หนึ่ง

การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ (Primary screening)

จากการทำการกลายพันธุ์ของ A-38 ด้วยแสง UV เป็นเวลานาน 4 นาทีต่อครั้ง เป็นจำนวน 10 ครั้ง ได้สายพันธุ์กลายของสปอร์ที่รอดชีวิตรวม 256 สายพันธุ์ เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งต้น A-38 ในจำนวน 256 สายพันธุ์เหล่านี้มีอยู่ 8 สายพันธุ์คือ U7-1, U8-1, U8-10, U9-15, U10-16, U10-22, U10-26, U10-27 สามารถผลิตกานามัยซินและให้บริเวณยับยั้ง (inhibition zone or clear zone ตามวิธีการทดลองที่ 5.1.1) ที่มีขนาดกว้างกว่า กับจุลินทรีย์ทดสอบ *S. aureus* ATCC 6538p (ดังตารางที่ 2)

การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ (Secondary screening)

เมื่อนำ 8 สายพันธุ์ที่ได้จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิไปทำการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิต่อไป (ตามวิธีการทดลองที่ 5.1.2) พร้อมทั้งทดสอบความเสถียรของการผลิตกานามัยซินไปจนถึง 3 รุ่น (generation) ได้สายพันธุ์ที่มีความเสถียรและมีความสามารถในการผลิตกานามัยซินสูงกว่าสายพันธุ์ A-38 อยู่ 3 สายพันธุ์คือ U9-15, U10-26 และ U10-27 ซึ่งสามารถผลิตกานามัยซินได้ 26, 29 และ 39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สูงกว่าของสายพันธุ์ A-38 อยู่ 2, 2.23 และ 3 เท่า ตามลำดับ (ดังตารางที่ 3)

ตารางที่ 1 การหาจำนวนของเชื้อที่รอดชีวิตหลังจากฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV)

ระยะเวลาการฉายแสง (นาที)	การเจือจาง (dilution)	ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีของเชื้อที่รอดชีวิต ต่อ 0.1 มิลลิลิตร	ต่อ 1.0 มิลลิลิตร	เปอร์เซ็นของการรอด
	undilute	> 300	ND	ND
0	10^{-2}	> 300	ND	ND
	10^{-4}	44	4.4×10^{6}	100
	undilute	> 300	ND	ND
1	10^{-2}	56	5.6×10^{4}	1.27
	10^{-4}	6	6.0×10^{5}	32.00
	undilute	173	1.7×10^{3}	0.04
2	10^{-2}	2	2.0×10^{3}	0.05
	10^{-4}	2	3.0×10^{5}	7.00
	undilute	33	3.3×10^{2}	0.008
4	10^{-2}	0	0	0
	10^{-4}	0	0	0
	undilute	9	9.0x10	0.002
8	10^{-2}	0	0	
	10^{-4}	1	1.0×10^{4}	0.230
	undilute	20	2.0×10^{2}	0.005
16	10^{-2}	0	0	0
	10^{-4}	0	0	0
	undilute	23	2.3×19^{2}	0.005
32	10^{-2}	0	4.0×10^{2}	0.009
	10^{-4}	0	0	0
	undilute	25	2.5×10^{2}	0.006
64	10	4	4.0×10^{2}	0.009
	10	0	0	0

ND = หาค่าไม่ได้

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบการผลิตกานามัยซินโดยวัดขนาด Clear zone หลังจากการฉายแสง UV ครั้งที่ 1 เพื่อใช้ในการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ

ขนาดของ Clear zone (ซ.ม)				
สายพันธุ์	สายพันธุ์กลาย	สายพันธุ์ A–38	ความแตกต่าง (ซ.ม)	ความแตกต่างที่เพิ่มขึ้น (%)
U7–2	3.50	3.15	0.35	11.11
U8–1	2.00	1.85	0.15	8.11
U8–10	2.10	1.85	0.25	13.51
U9–15	2.55	2.40	0.15	6.25
U10–16	2.15	1.95	0.20	10.25
U10–22	1.80	1.65	0.15	9.09
U10–26	1.90	1.65	0.25	15.15
U10–27	2.00	1.65	0.35	21.12

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบการผลิตกานามัยซินและความเสถียร (stability) ของสายพันธุ์กลาย หลังจากการฉายแสง UV ครั้งที่ 1 เพื่อใช้ในการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ

	ความเสถียร						
	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3		
สายพันธุ์	ขนาด clear zone (cm.)	ปริมาณ กานามัยซิน (ug/ml)	ขนาด clear zone (cm.)	ปริมาณ กานามัยซิน (ug/ml)	ขนาด clear zone (cm.)	ปริมาณ กานามัยซิน (ug/ml)	ค่าเฉลี่ย (ug/ml)
A-38	2.40	15.0	2.35	14.0	2.00	15.0	15.0
U7-2	2.40	15.0	2.20	8.0	-	-	
U8-1	2.20	7.5	-	-	-	-	
U8-10	2.45	18.0	2.30	12.0	1.80	6.0	6.0
U9-15	2.55	23.0	2.60	27.0	2.15	28.0	26.0
U10-16	2.30	10.0	-	-	-	-	
U10-22	2.35	12.0	2.20	8.0	-	-	
U10-26	2.70	33.0	2.65	30.0	2.10	24.0	29.0
U10-27	2.75	43.0	2.70	38.0	2.20	35.0	39.0

หมายเหตุ ปริมาณกานามัยซินของครั้งที่ 1, 2, 3 คำนวนจากกราฟมาตรฐานของ STD-U1, STD-U2 และ STD-U3 ตามรูปภาพที่ 6, 7 และ 8 ตามลำดับ (ภาคผนวก)

การฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตครั้งที่ 2

จากการนำสายพันธุ์กลาย U9-15, U10-26 และ U10-27 มาทำการกลายพันธุ์ต่อด้วยการฉายแสง UV ทำการทดลองซ้ำ 4 ครั้ง ได้เชื้อที่รอดชีวิตเป็นจำนวน 133 สายพันธุ์ และเมื่อนำไปทดสอบความสามารถสร้างกานามัยซินเพื่อทำการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิพบว่า สายพันธุ์กลาย UU2-5 และ UU2-10 สามารถให้บริเวณ clear zone สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งต้น U9-15 และสายพันธุ์กลาย UU4-30 และ UU4-36 ก็สามารถให้บริเวณ clear zone สูงกว่าสายพันธุ์ U10-27 เช่นกัน ส่วนสายพันธุ์อื่น ๆ ที่ได้มาจากสายพันธุ์ U10-26 ไม่ปรากฏให้ clear zone ที่สูงกว่า (ตารางที่ 4)

และเมื่อทำ 4 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากขั้นปฐมภูมิไปทำการทดสอบความสามารถในการสร้างกานามัยซิน เพื่อคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ พร้อมทั้งทดสอบความเสถียรไปจนถึงรุ่นที่ 3 พบว่า สายพันธุ์ UU2-5 และ UU4-36 ที่ยังสามารถคงคุณสมบัติเดิม และผลิตกานามัยซินได้ 52 และ 46 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 4 และ 3.5 เท่าของสายพันธุ์ A-38 ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบการผลิตกานามัยซินโดยวัดขนาด clear zone หลังจากการฉายแสง UV ครั้งที่ 2 เพื่อใช้ในการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ

ขนาดของ clear zone (ซม.)				
สายพันธุ์	สายพันธุ์กลาย	สายพันธุ์ A-38	ความแตกต่าง (ซม.)	ความแตกต่างที่เพิ่มขึ้น (%)
U9-15	3.05	3.00	0.05	1.67
UU2-5	3.40	3.00	0.40	13.33
UU2-10	3.40	3.00	0.40	13.33
U10-27	2.55	2.15	0.40	18.60
UU4-30	2.65	2.15	0.50	23.26
UU4-36	2.65	2.15	0.50	23.26

หมายเหตุ สายพันธุ์กลาย UV2-5,UU2-10 ได้จากการกลายพันธุ์ U9-15
สายพันธุ์กลาย UU4-30, UU4-36 ได้จากการกลายพันธุ์ U10-27
สายพันธุ์ U10-26 หลังจากการฉายแสงไม่ปรากฏสายพันธุ์กลายที่ให้ Clear zone

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบการผลิตกานามัยซินและความเสถียร (stability) ของสายพันธุ์กลาย หลังจากการฉายแสง UV ครั้งที่ 2 เพื่อใช้ในการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ

	ความเสถียร						
	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3		
สายพันธุ์	ขนาด clear zone (cm.)	ปริมาณ กานามัยซิน (ug/ml)	ขนาด clear zone (cm.)	ปริมาณ กานามัยซิน (ug/ml)	ขนาด clear zone (cm.)	ปริมาณ กานามัยซิน (ug/ml)	ค่าเฉลี่ย (ug/ml)
A-38	1.90	20.0	1.90	18.0	1.95	19.0	19.0
U9-15	1.90	20.0	2.00	19.0	2.10	28.0	22.0
UU2-5	2.10	33.0	2.35	60.0	2.45	62.0	52.0
U2-10	1.80	17.0	2.00	19.0	2.20	35.0	23.0
U10-27	2.05	30.0	2.25	40.0	2.20	35.0	35.0
UU4-30	1.95	23.0	2.00	19.0	2.20	35.0	25.0
UU4-36	2.25	50.0	2.30	19.0	2.20	35.0	25.0

หมายเหตุ ปริมาณกานามัยซินของครั้งที่ 1, 2, และ 3 คำนวนจากกราฟมาตรฐานของ STD-UU1, และ STD-UU2 และ STD-UU3 ตามรูปภาพที่ 9, 10 และ 11 ตามลำดับ (ภาคผนวก)

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสาร NTG

(N-methyl-N'nitro'N-nitrosoguanidine)

เมื่อนำสปอร์แขวนลอยของ *S. kanamyceticus* A-38 มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสาร NTG ที่แปรปริมาณความเข้มข้น (ตามวิธีการทดลองที่ 6.2) นำข้อมูลที่ได้ (ดังตารางที่ 6) มาเขียนกราฟหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของสปอร์หลังจากถูกชักนำด้วยสาร NTG ดังกราฟรูปที่ 12, ภาคผนวก)

จากการทดลองพบว่า สภาวะที่เหมาะสมของการกลายพันธุ์ด้วยการชักนำด้วยสาร NTG คือใช้สปอร์ปริมาณ $1x10^8$ สปอร์/มิลลิลิตร ความเข้มข้นของสาร NTG 0.02 M. ใน 0.05 M. Tris-maleic buffer ที่ pH 9.0 ระยะเวลา 45 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่จะนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตหลังจากถูกชักนำด้วยสาร NTG ที่ปริมาณความเข้มข้นต่าง ๆ ในสารละลาย 0.05 M Tris-maleic buffer pH 9.0

NTG (M.)	จำนวนเชื้อที่รอดชีวิต (cell/ml)		เปอร์เซ็นต์	
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
0	$8.36x10^8$	$5.15x10^7$	100	100
0.00001	$6.12x10^8$	$5.00x10^7$	73.26	97.09
0.00005	$4.52x10^8$	$2.33x10^7$	54.07	45.24
0.0001	$4.01x10^8$	$2.04x10^7$	48.00	39.61
0.0005	$3.59x10^8$	$1.85x10^7$	43.04	35.92
0.001	$2.45x10^8$	$5.30x10^6$	29.41	10.29
0.005	$3.60x10^7$	$1.00x10^6$	4.31	1.94
0.01	$4.93x10^6$	$2.20x10^3$	0.59	0.00

การชักนำด้วยสาร NTG ครั้งที่ 1

ก่ารคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ

เมื่อนำสายพันธุ์ UU2-5 และ UU4-36 มาทำการกลายพันธุ์ต่อด้วยการชักนำด้วยสาร NTG พบว่าได้สายพันธุ์กลายที่รอดชีวิตมานับเป็นจำนวนร้อยสายพันธุ์ จากนั้น นำมาคัดเลือกต่อขั้นปฐมภูมิ ด้วยการสุ่มสายพันธุ์กลายที่มาจาก UU2-5 และ UU4-36 อย่างละ 38 สายพันธุ์ (เพื่อให้พอดีกับจำนวนที่จะทดสอบได้แต่ละครั้งในถาดแก้ว) ได้สายพันธุ์กลาย UUN1, UUN21, และ UUN25 ที่สามารถให้ clear zone ได้กว้างกว่าสายพันธุ์ UU2-5 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้น และเช่นเดียวกัน สายพันธุ์กลาย UUN15 และ UUN24 ก็ให้ clear zone ได้กว้างกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น UU4-36 (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบการผลิตกานามัยซินโดยวัด clear zone หลังจากการชักนำด้วยสาร NTG ครั้งที่ 1 เพื่อใช้ในการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ

ขนาดของ clear zone (ซม.)				
สายพันธุ์	สายพันธุ์กลาย	สายพันธุ์ U2-5	ความแตกต่าง (ซม.)	ความแตกต่างที่เพิ่ม (%)
UUN1	2.75	2.53	0.22	8.70
UUN21	2.55	2.53	0.02	0.80
UUN25	3.00	2.53	0.47	18.58
สายพันธุ์ U4-36				
UUN15	3.00	2.75	0.25	9.09
UUN24	2.95	2.75	0.20	7.27

การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ

เมื่อนำสายพันธุ์กลายจำนวน 5 สายพันธุ์ที่ได้จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิพร้อมทั้งสายพันธุ์ UU2-5 และ UU4-36 ไปเลี้ยงในอาหาร KPM ที่ใช้สำหรับผลิตกานามัยซินเพื่อทำการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ พร้อมทั้งทดสอบความเสถียรของสายพันธุ์ (ตารางที่ 8) พบว่า มีสายพันธุ์กลาย UUN15 เพียงสายพันธุ์เดียวเท่านั้น ที่สามารถผลิตกานามัยซินได้สูงถึง 130 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งคิดเทียบกับ 10 เท่าของปริมาณที่ผลิตโดยสายพันธุ์ A-38

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบการผลิตกานามัยซินและความเสถียรของสายพันธุ์กลาย หลังจากการชักนำด้วย NTG ครั้งที่ 1 เพื่อใช้ในการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ

สายพันธุ์	ความเสถียร						
	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3		
	ขนาด clear zone (cm.)	ปริมาณกานามัยซิน (ug/ml)	ขนาด clear zone (cm.)	ปริมาณกานามัยซิน (ug/ml)	ขนาด clear zone (cm.)	ปริมาณกานามัยซิน (ug/ml)	ค่าเฉลี่ย (ug/ml)
UU2-5	2.50	45.0	2.35	40.0	2.00	30.0	38.0
UUN1	2.30	28.0	2.10	25.0	1.85	20.0	24.0
UUN21	2.30	28.0	2.30	35.0	2.05	35.0	33.0
UUN25	2.55	50.0	2.35	40.0	2.10	40.0	43.0
UU4-36	2.45	40.0	2.00	20.0	1.90	25.0	28.0
UUN15	2.90	130.0	3.00	160.0	2.50	100.0	130.0
UUN24	2.25	50.0	2.10	25.0	2.10	40.0	38.0

หมายเหตุ ปริมาณกานามัยซินของครั้งที่ 1, 2, และ 3 คำนวนจากกราฟมาตรฐานของ STD-UUN1, STD-UUN2 และ STD-UUN3 ตามรูปภาพที่ 13, 14 และ 15 ตามลำดับ (ภาคผนวก)

การชักนำด้วยสาร NTG ครั้งที่ 2

เมื่อนำ UUN15 ไปทำการกลายพันธุ์ด้วย NTG ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ได้สายพันธุ์กลายเป็นจำนวนร้อย เมื่อสุ่มมาทั้งหมด 38 สายพันธุ์ เพื่อทำการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ พบว่ามี 5 สายพันธุ์กลาย คือ UUNN1, UUNN14, UUNN22 และ UUNN28 สามารถให้ clear zone ได้กว้างกว่าของ UUN15 (ตารางที่ 9)

เมื่อนำสายพันธุ์ทั้ง 5 ดังกล่าวข้างต้น ไปเลี้ยงในอาหารเหลว KPM เพื่อทำการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิต่อไป พร้อมทั้งทดสอบความเสถียรของสายพันธุ์ไปจนถึง generations ที่ 3 พบว่าสายพันธุ์ UUNN1 สามารถผลิตกานามัยซินได้สูงถึง 147 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ตารางที่ 10) ซึ่งคิดเทียบเท่ากับ 11 เท่าของปริมาณที่ผลิตจากสายพันธุ์ตั้งต้น A-38

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบการผลิตกานามัยซินโดยวัด clear zone หลังจากการชักนำด้วยสาร NTG ครั้งที่ 2 เพื่อใช้ในการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ

	ขนาดของ clear zone (ซม.)			
สายพันธุ์	สายพันธุ์กลาย	สายพันธุ์ UUN15	ความแตกต่าง (ซม.)	ความแตกต่างที่เพิ่ม (%)
UUNN1	2.70	2.60	0.10	3.85
UUNN14	2.65	2.60	0.05	1.92
UUNN22	2.80	2.60	0.20	1.69
UUNN25	2.75	2.60	0.15	5.77
UUNN28	2.70	2.60	0.10	3.85

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบการผลิตกานามัยซินและความเสถียร (stability) ของสายพันธุ์กลาย หลังจากการฉายแสง UV ครั้งที่ 2 เพื่อใช้ในการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ

	ความเสถียร						
	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3		
สายพันธุ์	ขนาด clear zone (cm.)	ปริมาณ กานามัยซิน (ug/ml)	ขนาด clear zone (cm.)	ปริมาณ กานามัยซิน (ug/ml)	ขนาด clear zone (cm.)	ปริมาณ กานามัยซิน (ug/ml)	ค่าเฉลี่ย (ug/ml)
UUN15	2.55	160.0	2.45	130.0	2.45	100.0	130.0
UUNN1	2.60	180.0	2.50	160.0	2.45	100.0	147.0
UUNN14	2.45	120.0	2.40	100.0	2.40	85.0	102.0
UUNN22	2.45	120.0	2.45	130.0	2.30	60.0	103.0
UUNN25	2.55	160.0	2.45	130.0	2.50	120.0	137.0
UUNN28	2.55	160.0	2.40	100.0	2.45	100.0	120.0

หมายเหตุ ปริมาณกานามัยซินของครั้งที่ 1, 2, และ 3 คำนวนจากกราฟมาตรฐานของ STD-UUNN1, STD-UUNN2 และ STD-UUNN3 ตามรูปภาพที่ 16, 17 และ 18 ตามลำดับ (ภาคผนวก)

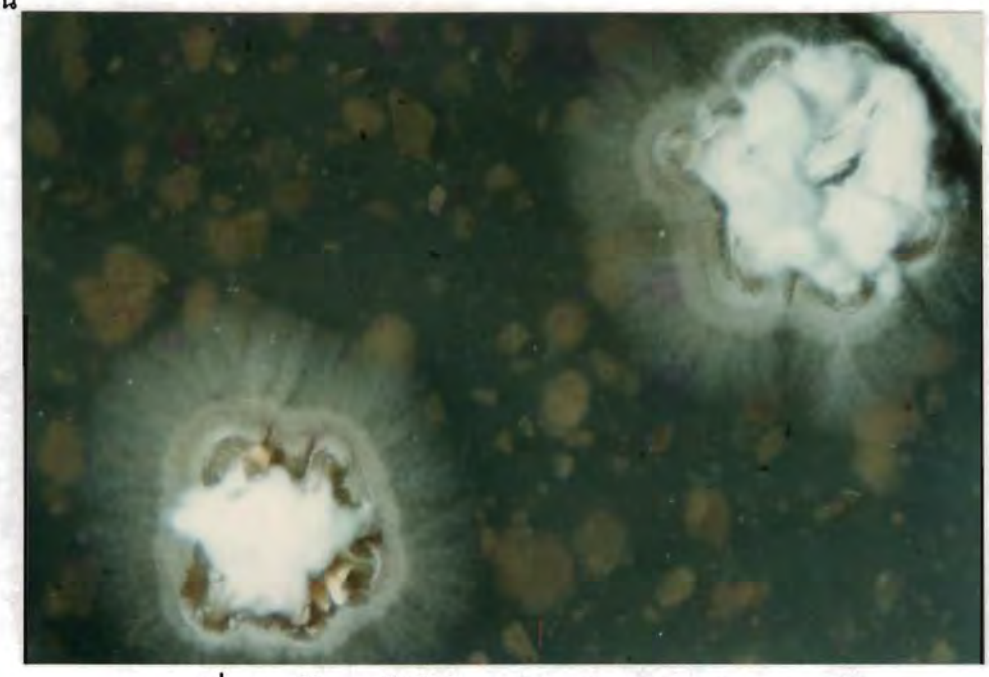
การวิเคราะห์หาปริมาณกานามัยซินโดยไฮเปอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (High performance liquid chromatography, HPLC)

จากการหาปริมาณกานามัยซินที่ผลิตโดยสายพันธุ์ดั้งต้น A-38 และสายพันธุ์กลาย UUNN1 ด้วยวิธี HPLC (ตามวิธีการทดลองที่ 5.2.1) นำโครมาโตแกรมของสายพันธุ์ดังกล่าวทั้ง 2 (รูปที่ 19, 20) เปรียบเทียบกับโครมาโตแกรมของสแตนดาร์ดกานามัยซิน A จากบริษัท Sigma ที่มีปริมาณ 1500, 500 และ 0 ไมโครแกรมต่อมิลลิลิตร ดังรูปที่ 21, 22 และ 23 ตามลำดับ พบว่าโครมาโตแกรมของแสตนดาร์ดกานามัยซินปริมาณ 1500 ไมโครกรมต่อมิลลิลตร มี peak เด่นชัดปรากฏ ณ เวลา 5.26 นาที มี area เท่ากับ 209,089 unit ส่วนโครมาโตแกรมของกานามัยซินปริมาณ 500 ไมโครแกรมต่อมิลลิลิตร ก็จะให้ peak ปรากฏที่เวลา 5.31 นาที มี area เท่ากับ 74,696 unit ในขณะที่โครมาโตแกรมของกานามัยซินปริมาณ 0 ไมโครแกรมต่อมิลลิลิตร ไม่มี peak ปรากฏให้เห็น ณ เวลาดังกล่าวมาข้างต้น เช่นเดียวกันกับโครมาโตแกรมของสายพันธุ์ A-38 ไม่ปรากฏ peak ให้เห็นในเวลาใกล้เคียงกันนั้น ส่วนโครมาโตแกรมของสายพันธุ์กลาย UUNN1 ที่เวลา 5.27 นาที จะมี shoulder ให้เห็นโดยมี area ประมาณ 1,697 unit

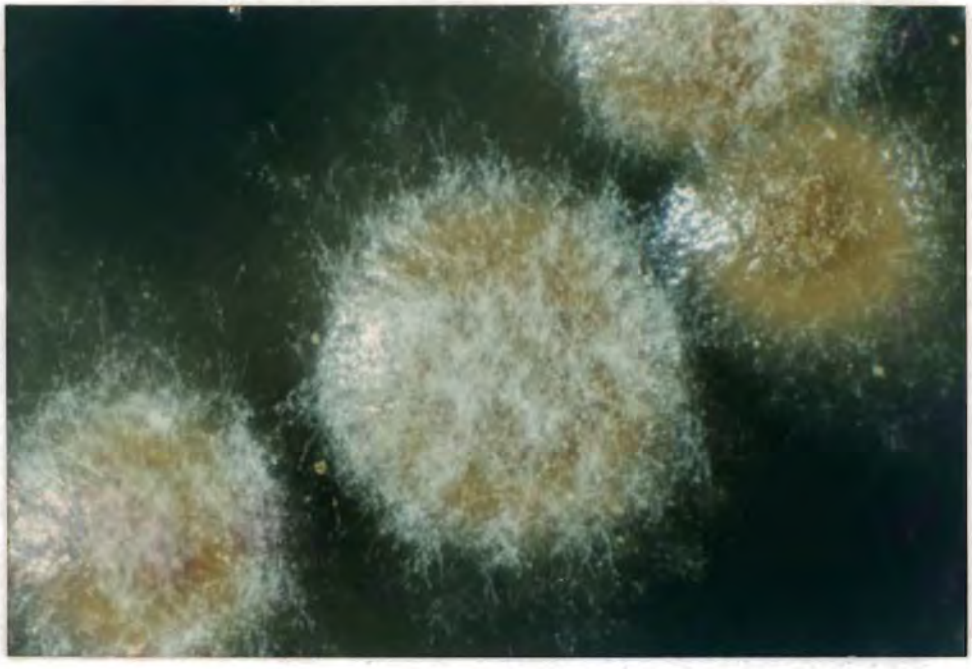
สายพันธุ์กลาย UUNN1

ผลจากการนำสายพันธุ์ A-38 ซึ่งสามารถผลิตกานามัยซินได้ 13 ไมโครแกรมต่อมิลลิลิตรมาทำการกลายพันธุ์ด้วยแสง UV 2 ครั้ง (2 รอบ) และด้วยสาร NTG 2 ครั้ง (2 รอบ) สามารถคัดเลือกได้สายพันธุ์กลาย UUNN1 ซึ่งผลิตกานามัยซินได้ 147 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งต้น 11 เท่า UUNN1 ที่ได้นี้จะมีลักษณะโคโลนีแตกต่างจากโคโลนีของ A-38 ได้อย่างเห็นชัด เมื่อเลี้ยงบนอาหาร MS (ภาคผนวก) ดังรูปที่ 24, 25, 26 และ 27 กล่าวคือ สายพันธุ์ UUNN1 โคโลนีมีสีน้ำตาลอมเหลือง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.3-0.4 เซนติเมตร ขอบโคโลนีค่อนข้างเรียบแต่ผิวหน้าไม่เรียบ นูนตรงกลางและโคโลนีมีแนวโน้มที่จะ spread ติดต่อกันเส้นใยสีขาว ลักษณะปุยฝ้าย ไม่หนาแน่น เส้นใยเจริญแพร่ลงบนผิวหน้าอาหารได้น้อย ส่วนสายพันธุ์ A-38 โคโลนีมีสีน้ำตาล ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5-0.6 เซนติเมตร ขอบเว้าเป็นลอนอย่างเด่นชัด ผิวหน้าไม่เรียบ ลักษณะหยักเป็นชั้น เส้นใยสีขาวขึ้นกันอย่างหนาแน่น โดยเฉพาะผิวหน้าของโคโลนีขึ้นฟูสีขาวและเส้นใยเจริญแพร่ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะเส้นใยและสปอร์ของสายพันธุ์ A-38 เมื่อดูจากกล้องจุลทัศน์ จะเห็นเส้นใยแตกแขนงไม่พบ septate เส้นใยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ

1 ไมโครเมตร และมีการสร้างสปอร์ที่ปลายเส้นใย ลักษณะกลมรี ส่วนของ UUNN1 ลักษณะเส้นใยและสปอร์ ดูแล้วไม่ค่อยให้ความแตกต่างกันมาก จาก A–38 ขณะนี้กำลังรอผลดูจากกล้องจุลทัศน์อีเลคตรอน



รูปที่ 24 ลักษณะโคโลนีของ *S. kanamyceticus* A–38



รูปที่ 25 ลักษณะโคโลนีของสายพันธุ์กลาย UUNN1

รูปที่ 26 ลักษณะโคโลนีเดียวของ *S. kanamyceticus* A–38 กำลังขยาย 0.67x10

รูปที่ 27 ลักษณะโคโลนีเดียวของสายพันธุ์กลาย UUNN1 กำลังขยาย 0.67x10

สรุปผลและวิจารณ์

จากการทำ *S. kanamyceticus* A-38 ซึ่งผลิตกานามัยซินได้ 13 ug/ml มาทำการกลายพันธุ์ด้วยแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เป็นระยะเวลา 4 นาที คัดเลือกสายพันธุ์กลาย แล้วกลายพันธุ์อีกด้วยแสง UV ภายใต้สภาวะเดียวกัน คัดเลือกสายพันธุ์กลาย กลายพันธุ์ต่อด้วย NTG ที่ปริมาณความเข้มข้น 0.02 M. ใน 0.005 M. Tris-maleic buffer pH 9.0 ระยะเวลา 45 นาที ที่อุณหภูมิห้อง คัดเลือกสายพันธุ์กลาย และกลายพันธุ์ต่อด้วย NTG อีกครั้งใต้สภาวะเดียวกัน ผลที่สุดได้สายพันธุ์กลาย UUNN1 ซึ่งสามารถผลิตกานามัยซินได้ 147 ug/ml สูงกว่าของสายพันธุ์ดั้งเดิม A-38 ถึง 11 เท่า จากการกลายพันธุ์ด้วยการใช้ UV 2 ครั้ง และ NTG 2 ครั้ง จะเป็นวิธีที่ดีที่สุดในการทดลองครั้งนี้ การตรวจสอบหาปริมาณกานามัยซินโดยวิธี agar diffusion method จะเป็นวิธีที่ให้ผลได้อย่างชัดเจน ครั้นเมื่อนำไปตรวจหาโดยวิธี HPLC เทียบกับ standard กานามัยซินปริมาณ 0, 500 และ 1500 ug/ml พบว่า การตรวจหาปริมาณกานามัยซินของสายพันธุ์ A-38 จะไม่มี peak หรือ shoulder ปรากฏให้เห็น ทั้งนี้เป็นเพราะปริมาณที่ผลิตโดยสายพันธุ์นี้น้อยมาก ส่วนของสายพันธุ์ UUNN1 จะมี shoulder ปรากฏให้เห็นที่เวลา 5.27 นาที และ area ที่ได้ถ้าเทียบกับ area ของ standard ไม่สามารถที่จะคำนวนเปรียบเทียบกลับมา กล่าวคือถ้าคำนวนจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC ปริมาณกานามัยซินจะได้ไม่ถึง 147 ug/ml ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่า ตัวอย่างกานามัยซินของ UUNN1 ที่นำไปวิเคราะห์นั้น เป็น crude broth ที่ได้จากการปั่นแยกเอาเส้นใยออกไปเท่านั้น ยังไม่ได้ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์เลยจึงเป็นไปได้ว่ามีสารอื่น ๆ ปนเปื้อนอยู่ที่ทำให้ขัดขวางหรือรบกวนการจับกันของกานามัยซินในตัวอย่างกับสาร Trinitrobenzenesulfonic acid ซึ่งเป็นสารที่ช่วยให้ UV detect ได้ ถึงแม้ว่าจะทำให้สารตัวอย่างของ UUNN1 มีความเข้มข้นขึ้น 50 เท่าด้วยการทำ lyophilize แล้วก็ตาม peak ที่ได้ก็ยังมี area น้อยมาก ดังนั้น จึงควรที่จะทำให้สารตัวอย่างที่จะไปวิเคราะห์มีความบริสุทธิ์ขึ้นบางส่วนเสียก่อนแล้ว จึงค่อยนำไปฉีดเข้า HPLC ขณะนี้ผู้วิจัยกำลังจะทำการทดลองใหม่ คาดว่าน่าจะได้ผลออกมาเป็นที่พอใจขึ้น ถ้าเปรียบเทียบลักษณะโคโลนีของสายพันธุ์ UUNN1 กับสายพันธุ์ A-38 จะเห็นความแตกต่างกันอย่างชัดเจนดังรูปภาพที่ 24, 25, 26 และ 27 ครั้นทำ slide culture ดูลักษณะของเส้นใยและสปอร์แล้วยากที่จะเห็นความแตกต่างได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงกำลังดำเนินการเปรียบเทียบโดยอาศัยกล้องจุลทัศน์อีเลคตรอน ซึ่งจะได้ผลประมาณปลายเดือนกุมภาพันธ์ เนื่องจากกำหนดการส่งรายงานวิจัยได้สิ้นสุดลงจึงไม่สามารถที่จะส่งผล

มาพร้อมกับรายงานฉบับนี้ได้ งานวิจัยครั้งนี้ได้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีตามแผนดำเนินงานวิจัยตามโครงการที่เสนอไว้ตั้งแต่แรกท่ามกลางอุปสรรคหลายประการในระหว่างการทำวิจัย เช่น ไฟฟ้าที่ดับกันเป็นประจำ ทำให้ต้องทำการทดลองตั้งต้นใหม่อยู่หลาย ๆ ครั้ง

อย่างไรก็ดี งานวิจัยนี้จะเป็นรายงานครั้งแรกในประเทศของการทำการกลายพันธุ์ *Streptomyces kanamyceticus* เพื่อเพิ่มผลผลิตกานามัยซิน ข้อมูลที่ได้ไม่เพียงแต่จะนำไปใช้ในการผลิตกานามัยซินในระดับขยายส่วนยังสามารถนำไปใช้ในการกลายพันธุ์ streptomycetes สายพันธุ์อื่นต่อไปได้อีกด้วย

ข้อเสนอแนะ

จากความสำคัญของกานามัยซิน สารปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อทั้งในคนและสัตว์มีการสั่งนำเข้ามาจากต่างประเทศปีละเป็นจำนวนมาก และแนวโน้มของการใช้ยาชนิดนี้ก็สูงขึ้นเรื่อย อีกทั้งราคาในท้องตลาดก็สูงเมื่อเทียบกับยาชนิดอื่น ถ้าประเทศไทยสามารถพัฒนาการผลิตกานามัยซินให้ดีขึ้นและให้เพียงพอกับความต้องการ นอกจากจะช่วยลดการเสียดุลย์การค้าให้กับประเทศแล้ว ยังช่วยแบ่งเบาภาระของผู้บริโภค เช่น เกษตรกรอีกด้วย ดังนั้นงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกานามัยซิน น่าที่จะได้รับการสนับสนุนให้มีการศึกษากันอย่างจริงจัง เพื่อข้อมูลที่ได้จะเป็นแนวทางสำหรับนำไปใช้ในการผลิตต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กองควบคุมอาหารและยา (2535) ข้อมูลที่ได้จากกองควบคุมอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข

มาลิน จุลศิริ (2532) ยาต้านจุลชีพ ความรู้พื้นฐาน และประยุกต์ พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพมหานคร โรงพิมพ์อักษรบัณฑิต. หน้า 21-26

วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ดและสรวง อุดมวรภัณฑ์ (2536) Mutagenesis ในหนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย

Alikhanian, S. (1962) Induced Mutagenesis in the Selection of Microorganisms. Adv. Appl. Microbiol. Vol.4:1-50

Bautz, E. and Freese, E. (1960) On the Mutagenic Effect of Alkylating Agent. Proc. Natl. Sci. US. 46:1585-1594

Code of Federal Regulation. 1987. Title 21, Microbiological Assay Methods. Part 436100 Food and Drug, FAD Printing Office, Washington, D.C., 269-286

Cron, M. J., Fardig, O. B., Johnson, D. J., Palermiti, F. M., Schmitz, H. and Hooper, I. R. 1958. The Chemistry of Kanamycin. Ann. NY. Acad. Sco. 76:21-25

Delic, F., Hopwood, D.A., Friend, E.J., 1970. Mutagenesis by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) in *Streptomyces* coelicolor. Mutation Research. 9:167-182

Drake, J. W. and Baltz, R. H. (1976). The Biochemistry of Mutagenesis. Ann. Rev. Biochem. 45:11-37

Du, R. and Ihao, J. (1983). Selection of High Yielding Strain of Streptomyces kanamyceticus from Kanamycin Resistant Mutant. Kangshengsu 8(1):24-28

Dulany, E.L. (1954) Induced Mutation and Strain Selection in Some Industrially Important Microorganisms. Ann. N. Y. Acad. Sci. Vol.60:155-163

Edward, D. I. (1980) Antimicrobial Drug Action. The Macmillian Press Ltd., London.

Gambardella, P., Punziano, J., Gionti, M., Guadalupi, C., and Manoini, G., 1985. Quantitative Determination and Separation of Analogues of Aminoglycoside Antibiotics by High Performance Liquid Chromatography. J. Chromatograph. 348:229-240

Glass, L. E. (1983). Mutation. Gene Function: 1-50. Burkley, University of California

Ikyta, S. (1983). Genetic of Industrial Microorganism. In Moss, M. O. (ed.), Methods in Industrial Microbiology, pp.214-250. Czechoslavakia : Ellis Harwood Ltd.

Johdo, O. Ishikura, T., and Yoshimoto, A. (1991). Anthracycline Metabolism from *Streptomyces violaceus* A262 : I. Isolation of Antibiotic-Blocked Mutant from *Streptomyces violaceus* A262. J. of Antibiotic 44(10):1110-1120

Kojima, M., Yamada, Y. and Umezawa, H. (1968). Studies on the Biosynthesis of Kanamycin : Part I. Incorperation of ^{14}C-Glucose or ^{14}C-Glucosamine into Kanamycins and Kanamycin-Related Compounds. Agr. Biol. Chem. 32(4):467-473

Kucers, A. and Mc. Bennet, N. (1975). Mc. The Use of Antibiotics. A Comprehensive Review with Clinical Emphasis. William Heinemann Med. Books Ltd., London

Lowley, P. D. and Brook, P. (1961). Acidic Dissociation of 7:9 Dialkylguanine and Its Possible Relation to Mutagenic Properties of Alkylation Agent. Nature. 192:1081-1082

Mandal, S. K. Chattopadhyay, M. K. and Roy, D. K. (1981) Erythromycin Fermentation : Strain Selection of *Streptomyces erythreus* for Improved Erythromycin Production. IRCS Med. Sci. 9(10):939-940

Saunders, V. A. and Saunders, J. R. (1987). Microbial Strain Improvement and Novel Products. In Microbial Genetics Applied to Biotechnology, pp.265-305. England : Crom Helm

Stanbury, P. F. and Whitaker, A. (1954). The Isolation, Preservation, and Improvement of Industrial Microorganism. In Principles of Fermentation Technology, pp.26-73. Great Britain : BPPC Wheatons Ltd. Exeter.

Umezawa, H., Maeda, K., and Ueda, M. (1960) Kanamycin and Processes for the Preparation Thereof. US. Patent No.2, 931, 798:935-948

Umezawa, H., Ueda, M., Maeda, K., Yagishita, K., Kondo, S. Okam, Y., (1957) Production and Isolation of A New Antibiotic Kanamycin. J. of Antibiotics ser. A 10(5):181-188

Zhao, J. P., Li, C. Y., Chen, Y. H., and Tu, J. P. (1980) Mutagenic Breeding of *Streptomyces kanamyceticus* with NTG. I Ch'uan 2:17-19

ภาคผนวก ก.

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. วายเอส อการ์ (YS agar) สำหรับเก็บรักษา *Streptomyces kanamyceticus* (Johdo et al., 1991)

แป้ง (Starch)	10.0 กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	3.0 กรัม
วุ้นผง (Agar)	15.0 กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 7.2 อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที)

2. เอ็มวัน อการ์ (M1 agar) สำหรับเก็บรักษา *Streptomyces aureus* ATCC 6538P (Code of Regurations 21, 1987)

แบคโตเปปโตน (Bacto-peptone)	6.0 กรัม
เคซีน (Casein)	4.0 กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	3.0 กรัม
สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	1.5 กรัม
เดกซ์โตรส (Dextrose)	1.0 กรัม
วุ้นผง (Agar)	15.0 กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 6.5-6.6 อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

3. จีพีวาย มีเดียม (GPY medium) สำหรับเพิ่มจำนวนเซลล์ของ *S. kanamyceticus* (Umezawa et al., 1977)

กลูโคส (Glucose)	10.0 กรัม
แบคโตเปปโตน (Bacto-peptone)	4.0 กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	4.0 กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	4.0 กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2.0 กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 7.0 อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

4. เคพีเอ็มเอ อการ์ (KPMA agar) สำหรับเลี้ยงเชื้อ *S. kanamyceticus* เพื่อผลิตกานามัยซิน (Umezawa et al., 1977)

กลูโคส (Glucose)	1.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	2.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($Mg_2SO_4.7H_2O$)	2.5	กรัม
วุ้นผง (Agar)	15.0	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 7.0 อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

5. เคพีเอ็มบี มีเดียม (KPMB medium) สำหรับเลี้ยงเชื้อ *S. kanamyceticus* เพื่อผลิตกานามัยซิน (Umezawa et al., 1960)

แป้ง (Starch)	20.0	กรัม
ถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยแล้วด้วยเอ็นไซม์ (Soytone)	12.0	กรัม
โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($Mg_2SO_4.7H_2O$)	0.5	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	3.0	กรัม
แบคโตเปปโตน (Bacto–peptone)	3.0	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)	5.0	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 7.0 อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

6. เอ็มไฟว์ อการ์ (M5 agar) สำหรับทดสอบปริมาณกานามัยซิน (Code of Regurations 21, 1987)

แบคโตเปปโตน (Bacto–peptone)	6.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	3.0	กรัม

สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	1.5	กรัม
วุ้นผง (Agar)	15.0	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 7.8–8.0 อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

7. เอ็มเอส อการ์ (MS agar) สำหรับเลี้ยงเชื้อ *S. kanamyceticus*

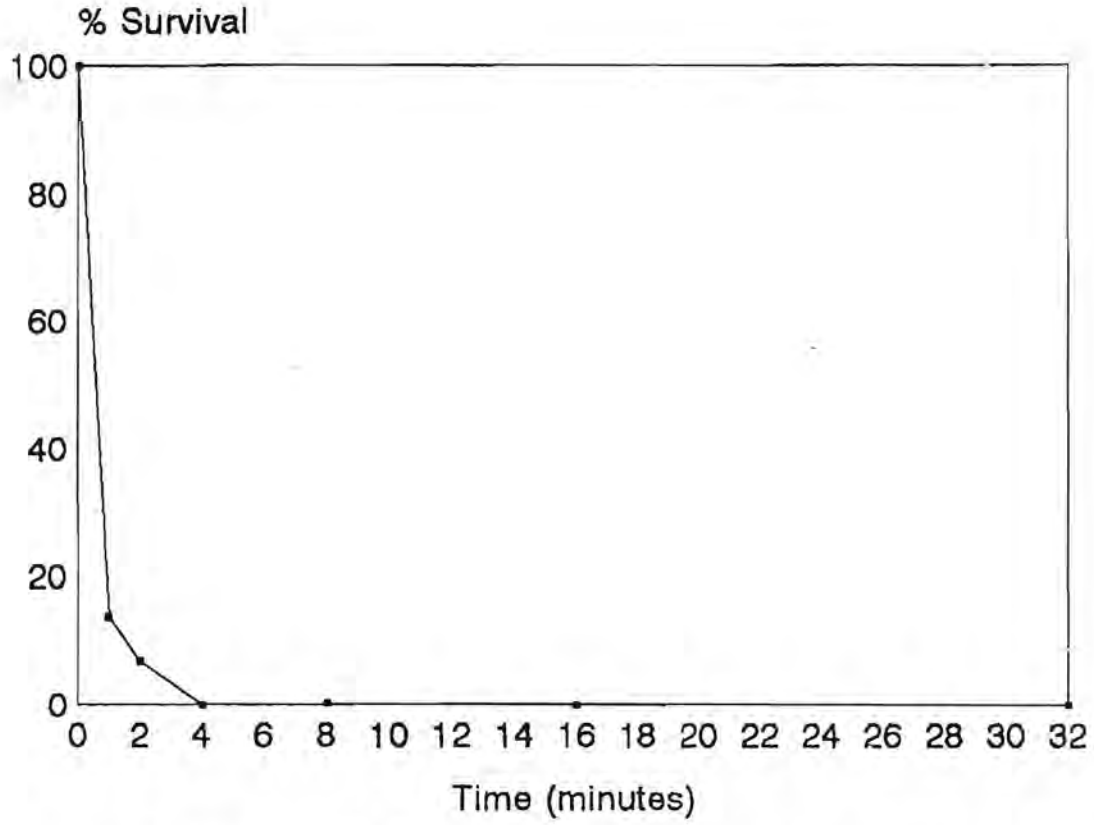
ถั่วเหลืองบด	20	กรัม
น้ำตาล ดี–แมนนิทอล	20	กรัม
วุ้นผง	18	กรัม

เติมน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร และน้ำประปา 500 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 7.0 อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

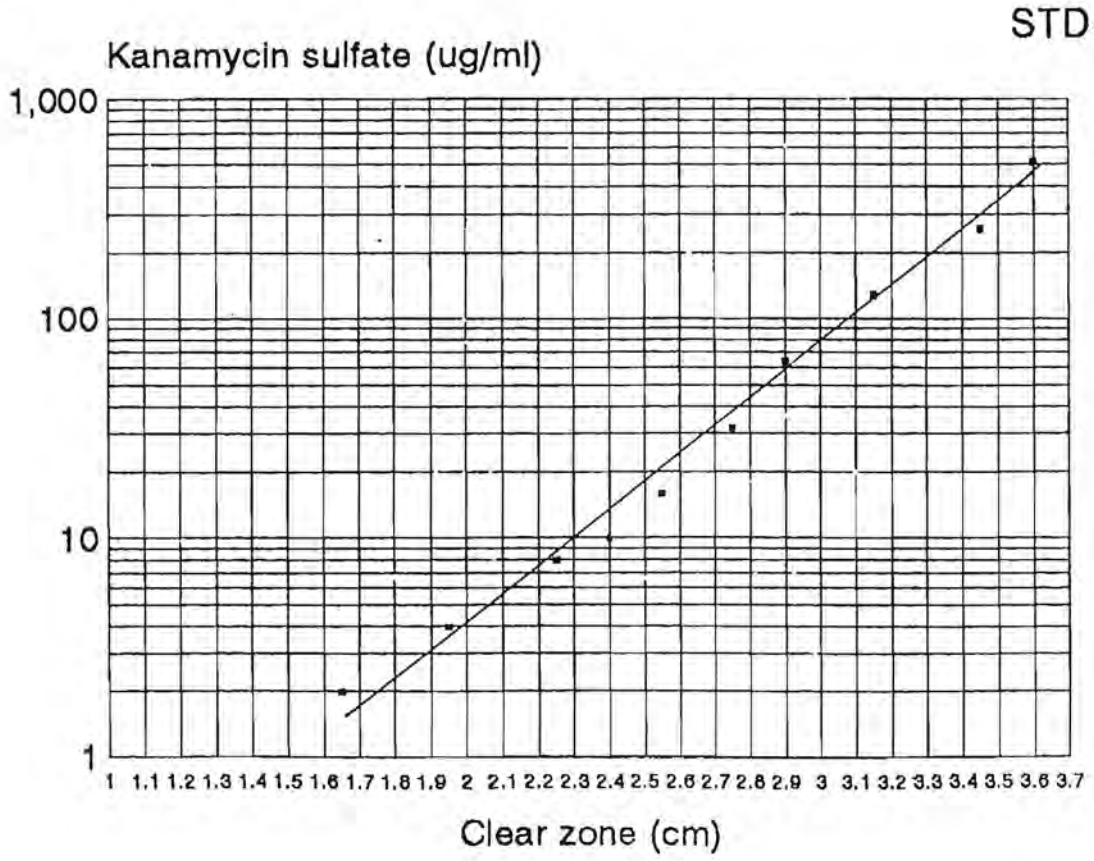
8. 0.05 M. Tris–maleic buffer pH 9.0

Tris	0.61	กรัม
Maleic acid	0.58	กรัม

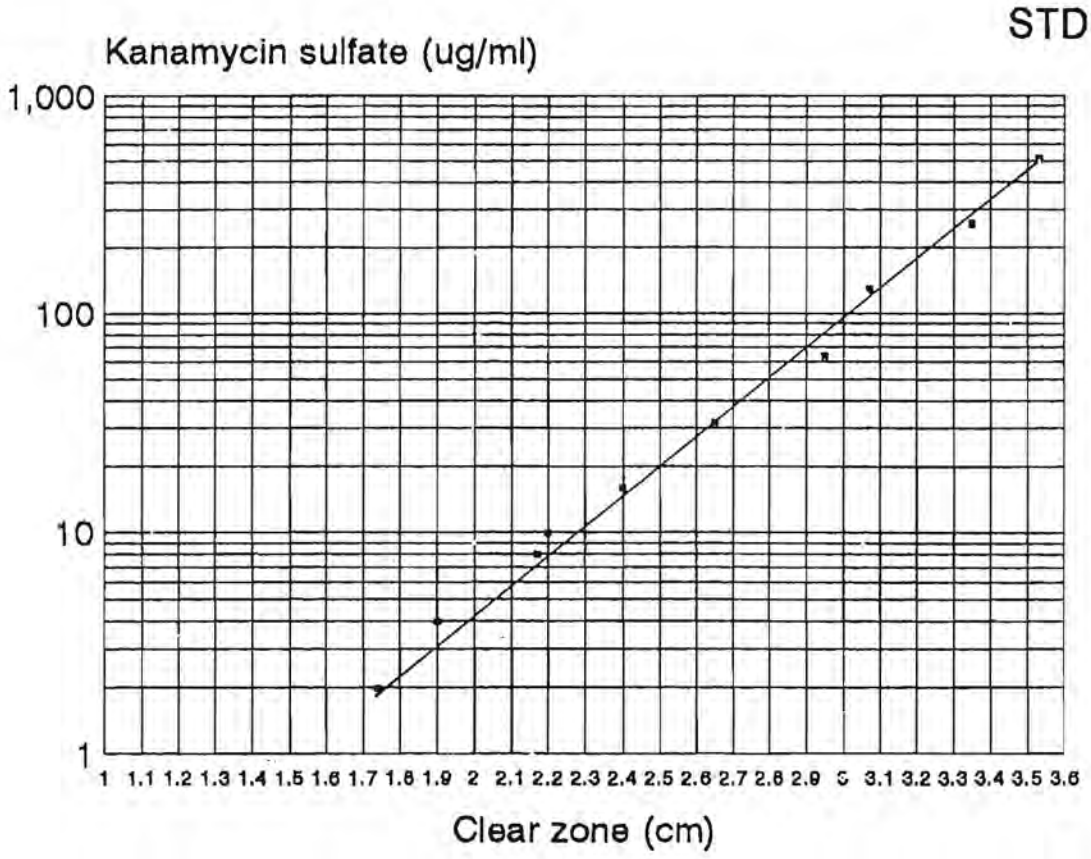
ละลายในน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 9.0 ด้วย 1M. NaOH แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น



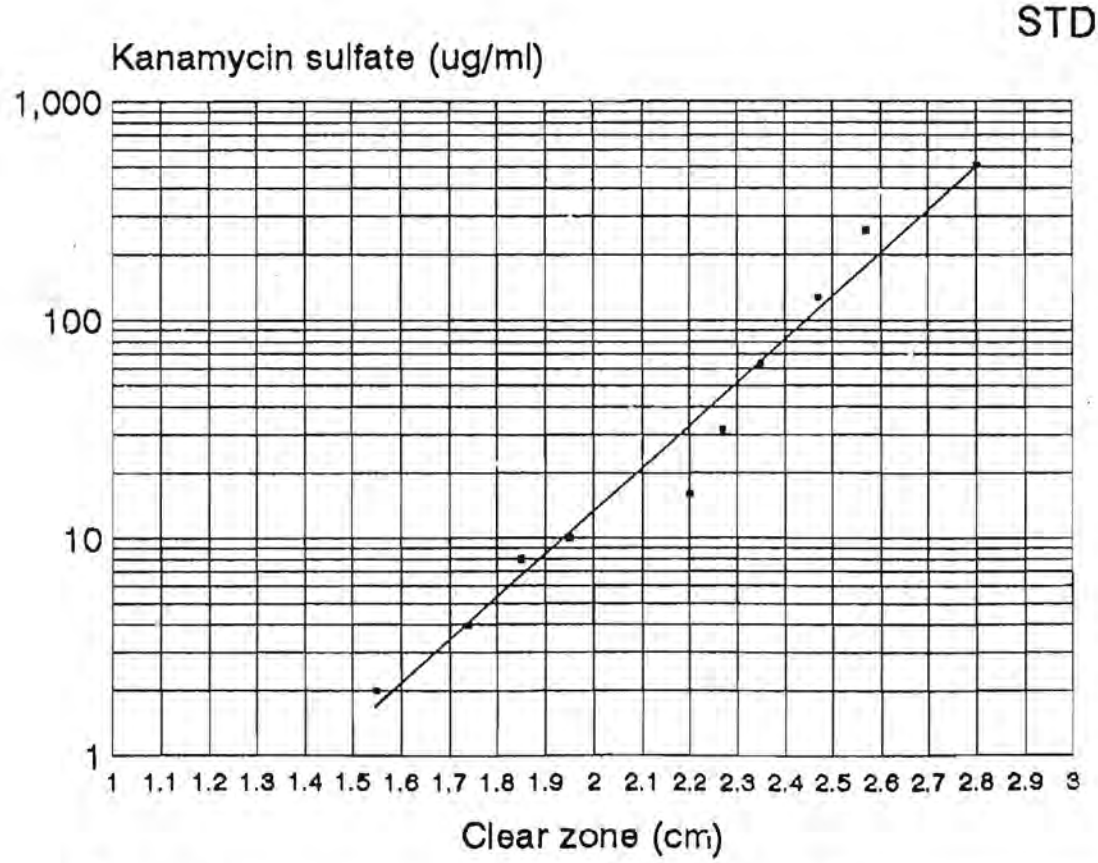
รูปที่ 5 กราฟเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ *S. kanamyceticus* หลังจากการฉายแสง UV ด้วยระยะเวลาต่าง ๆ



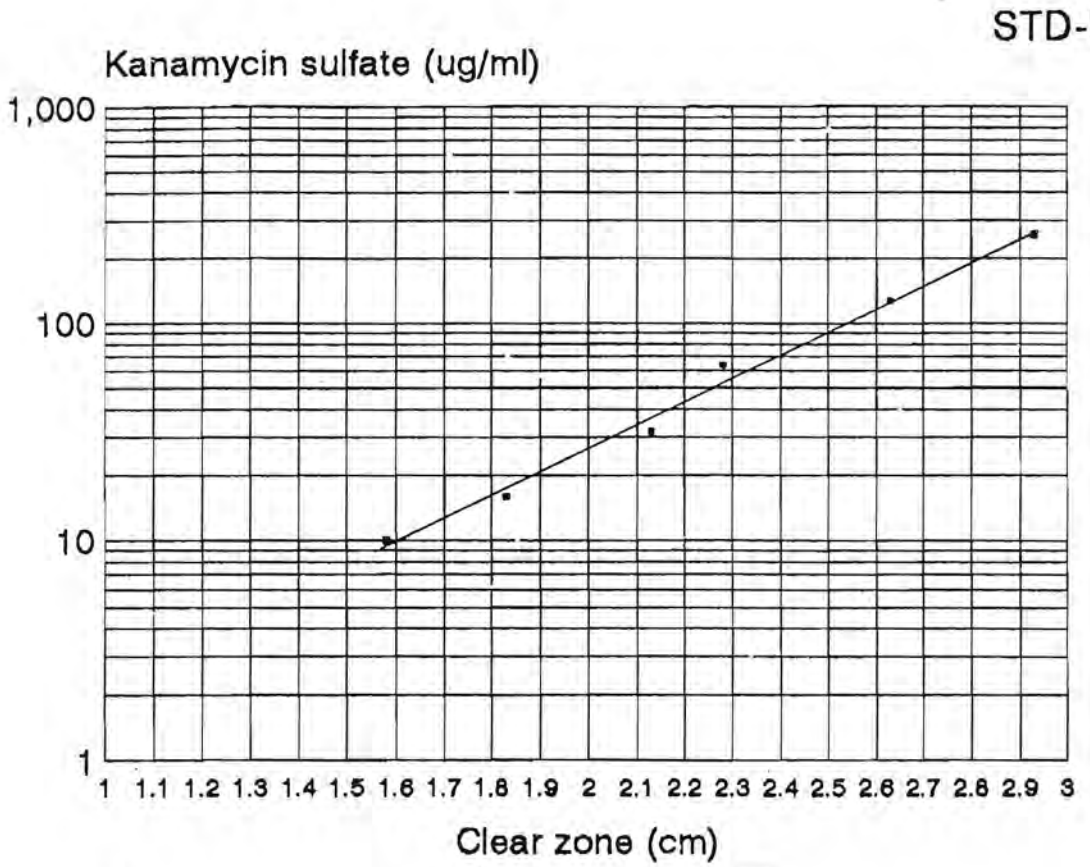
รูปที่ 6 กราฟมาตรฐานหาปริมาณกานามัยซินหลังจากการฉายแสง UV และตรวจสอบความเสถียรครั้งที่ 1 (STD-U1)



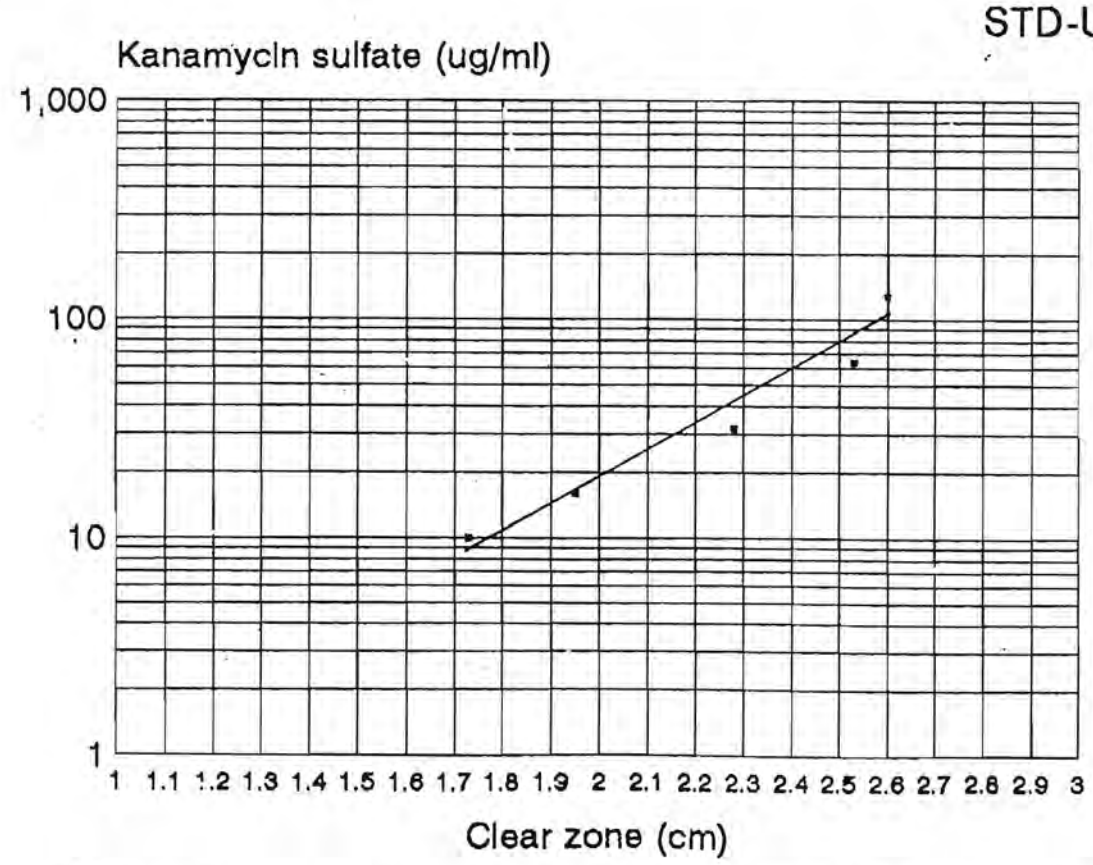
รูปที่ 7 กราฟมาตรฐานหาปริมาณกานามัยซินหลังจากการฉายแสง UV และตรวจสอบความเสถียรครั้งที่ 2 (STD–U2)



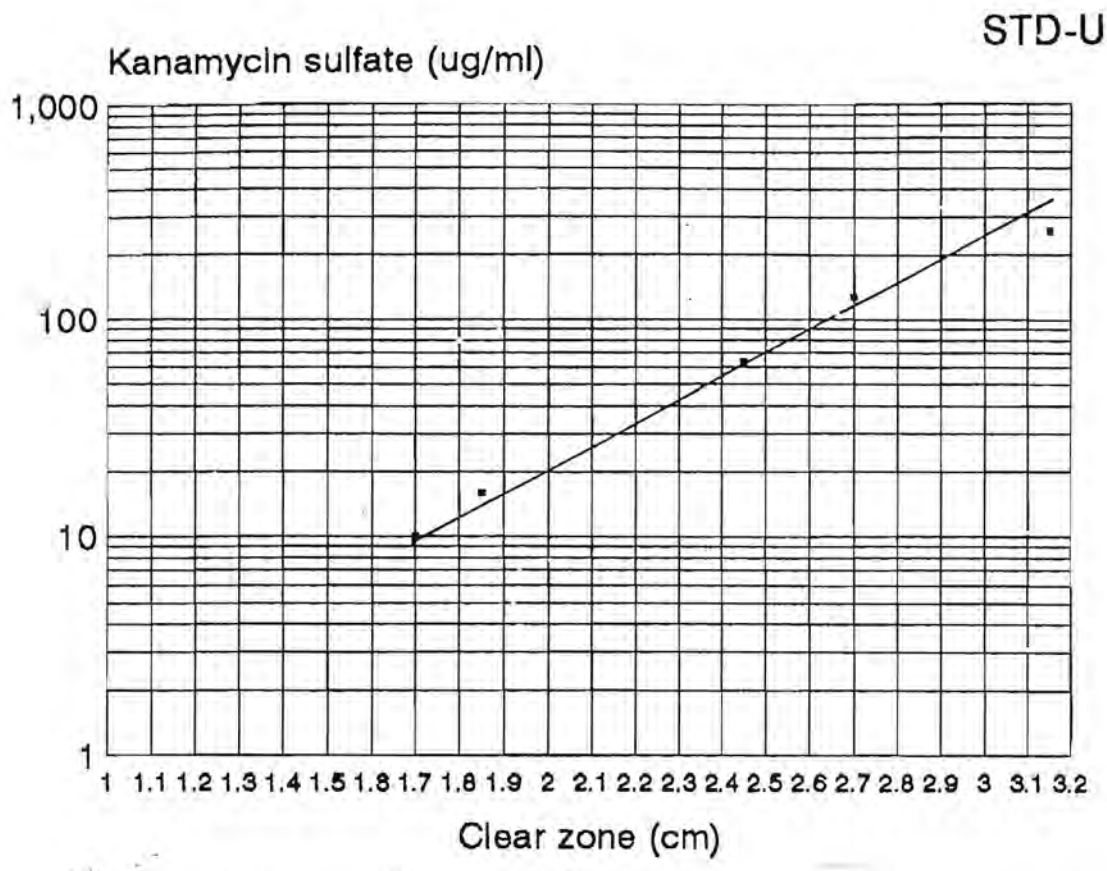
รูปที่ 8 กราฟมาตรฐานหาปริมาณกานามัยซินหลังจากการฉายแสง UV และตรวจสอบความ



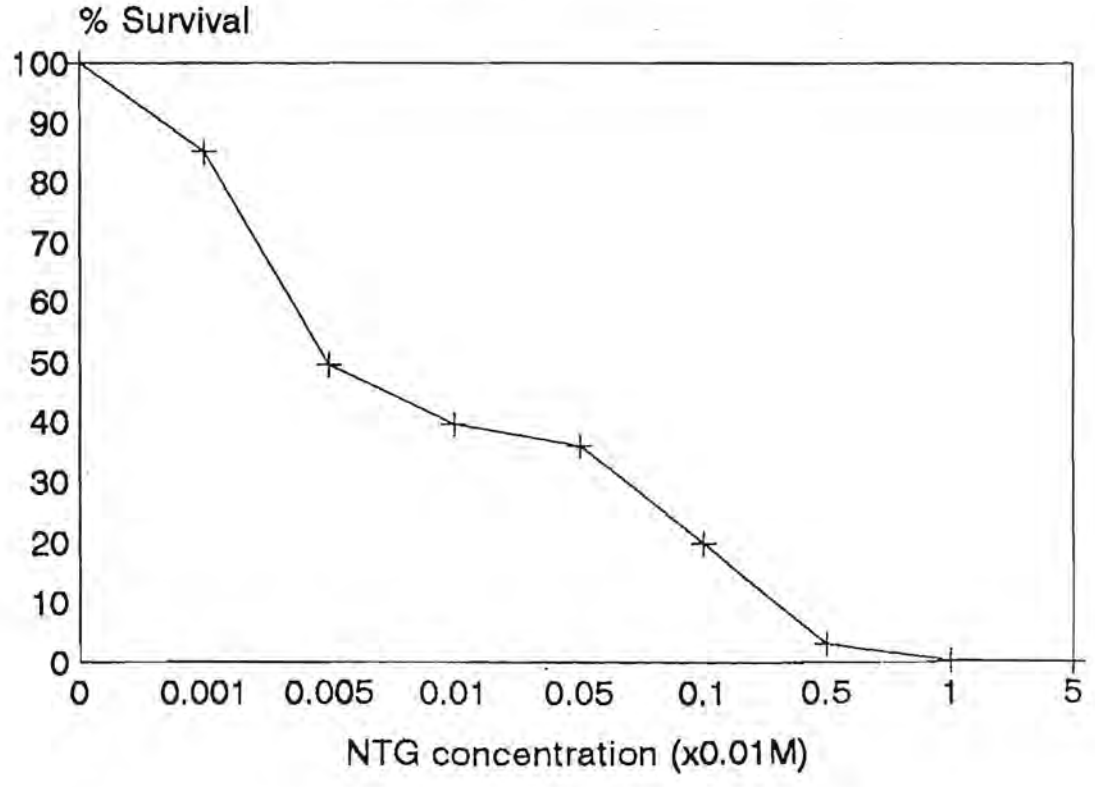
รูปที่ 9 กราฟมาตรฐานหาปริมาณกานามัยซินหลังจากการฉายแสง UV และตรวจสอบความเสถียรครั้งที่ 1 (STD–UU1)



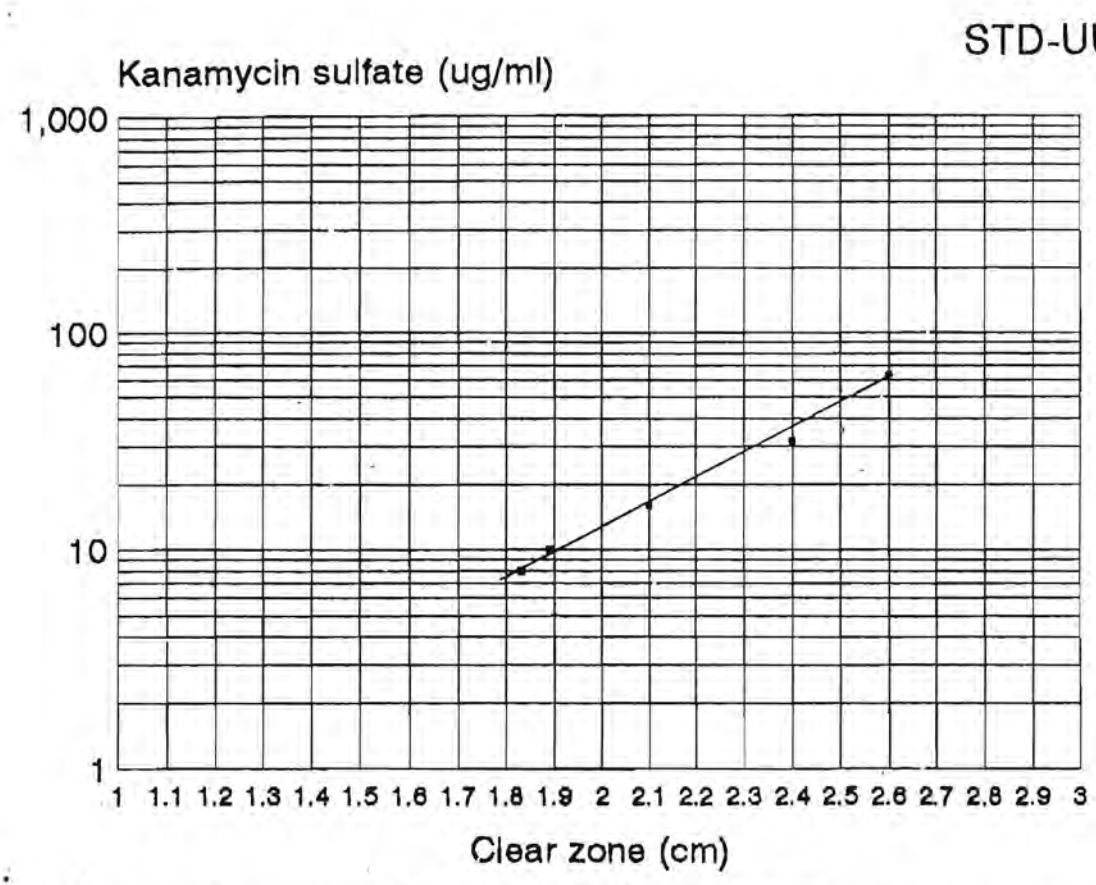
รูปที่ 10 กราฟมาตรฐานหาปริมาณกานามัยซินหลังจากการฉายแสง UV และตรวจสอบความเสถียรครั้งที่ 2 (STD–UU2)



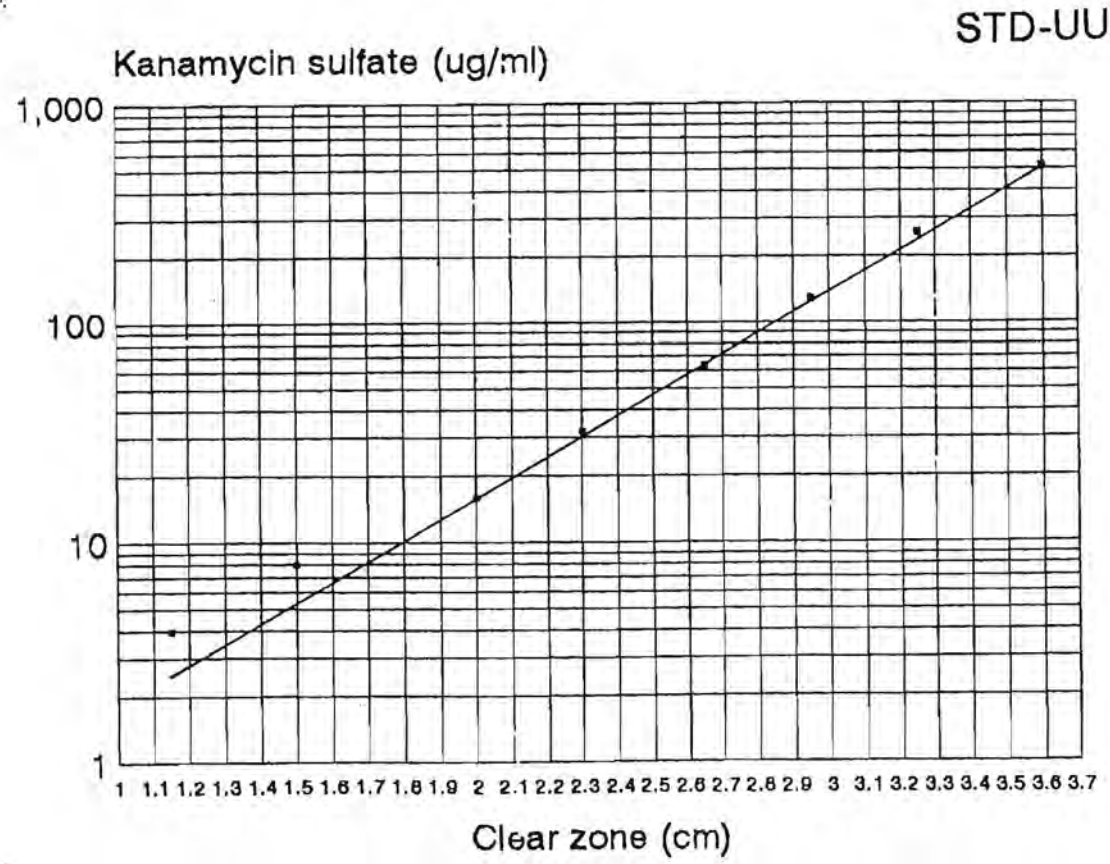
รูปที่ 11 กราฟมาตรฐานหาปริมาณกานามัยซินหลังจากการฉายแสง UV และตรวจสอบความเสถียรครั้งที่ 3 (STD–UU3)



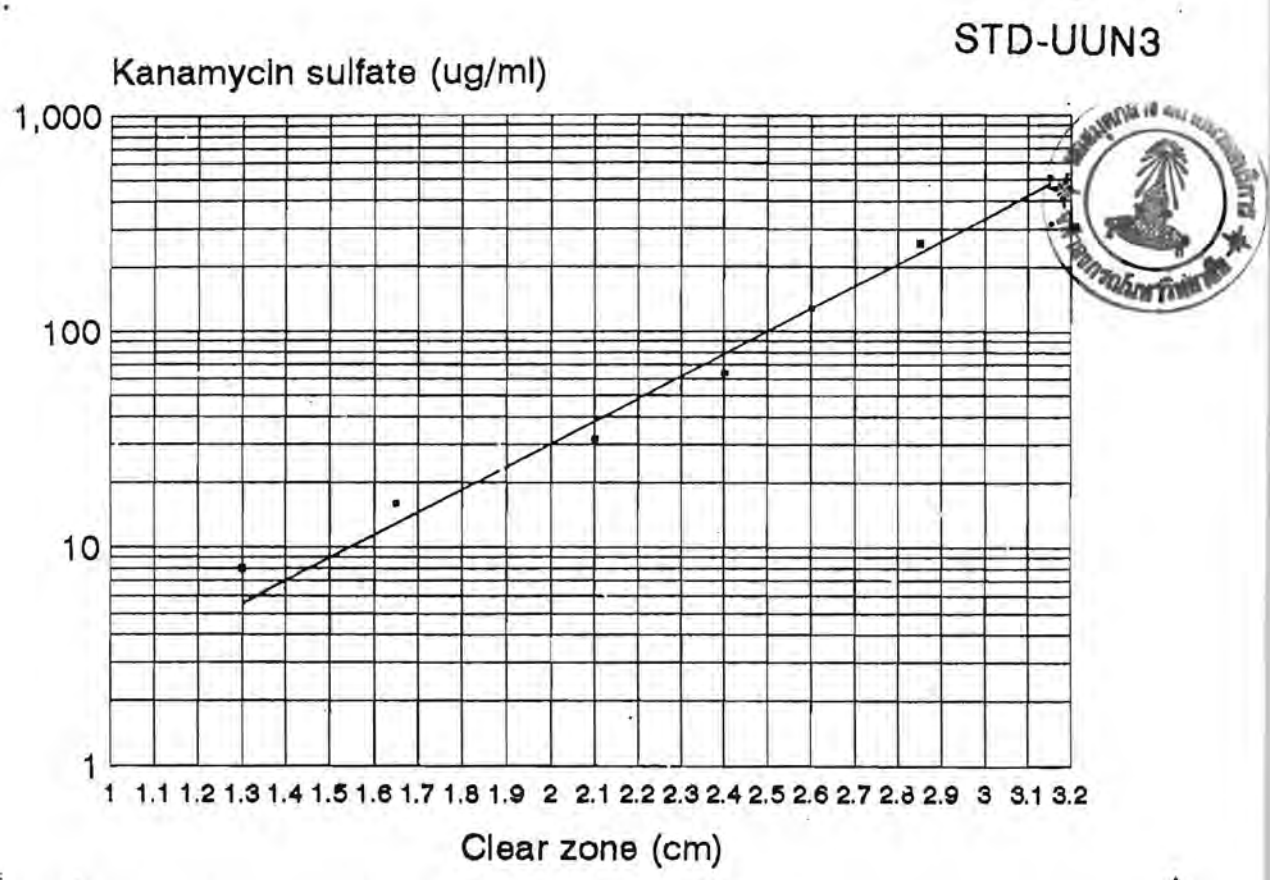
รูปที่ 12 กราฟเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ *S. kanamyceticus* หลังจากการชักนำด้วยสาร NTG ที่ปริมาณความเข้มข้นต่าง ๆ กัน



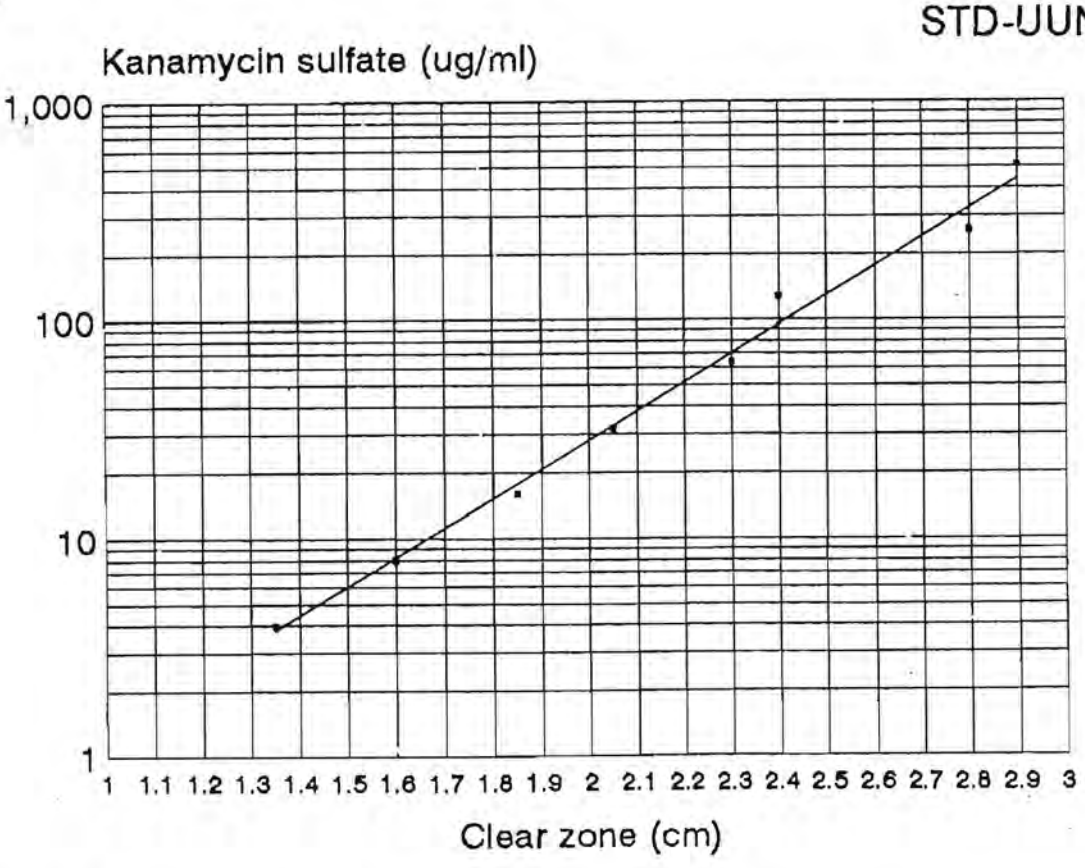
รูปที่ 13 กราฟมาตรฐานหาปริมาณกานามัยซินหลังจากการชักนำด้วยสาร NTG และตรวจสอบความเสถียรครั้งที่ 1 (STD–UUN1)



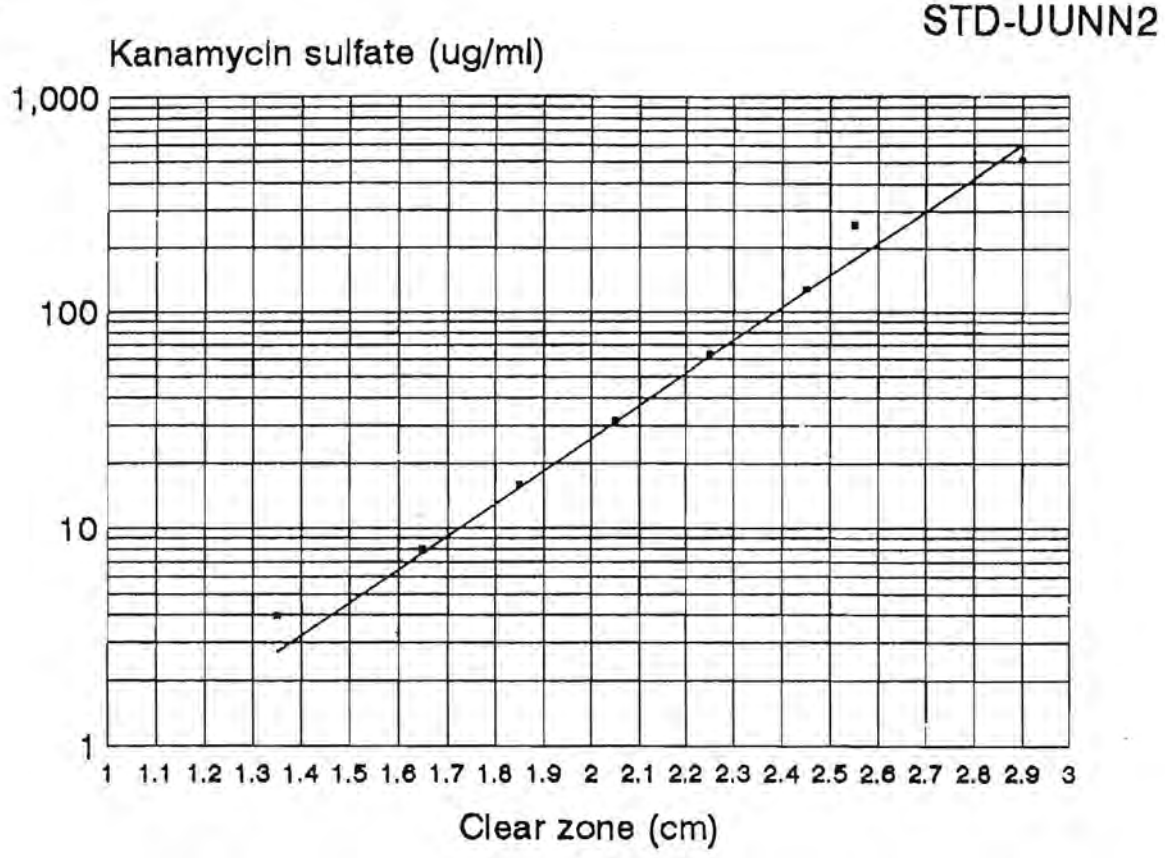
รูปที่ 14 กราฟมาตรฐานหาปริมาณกานามัยซินหลังจากการชักนำด้วยสาร NTG และตรวจสอบความเสถียรครั้งที่ 2 (STD–UUN2)



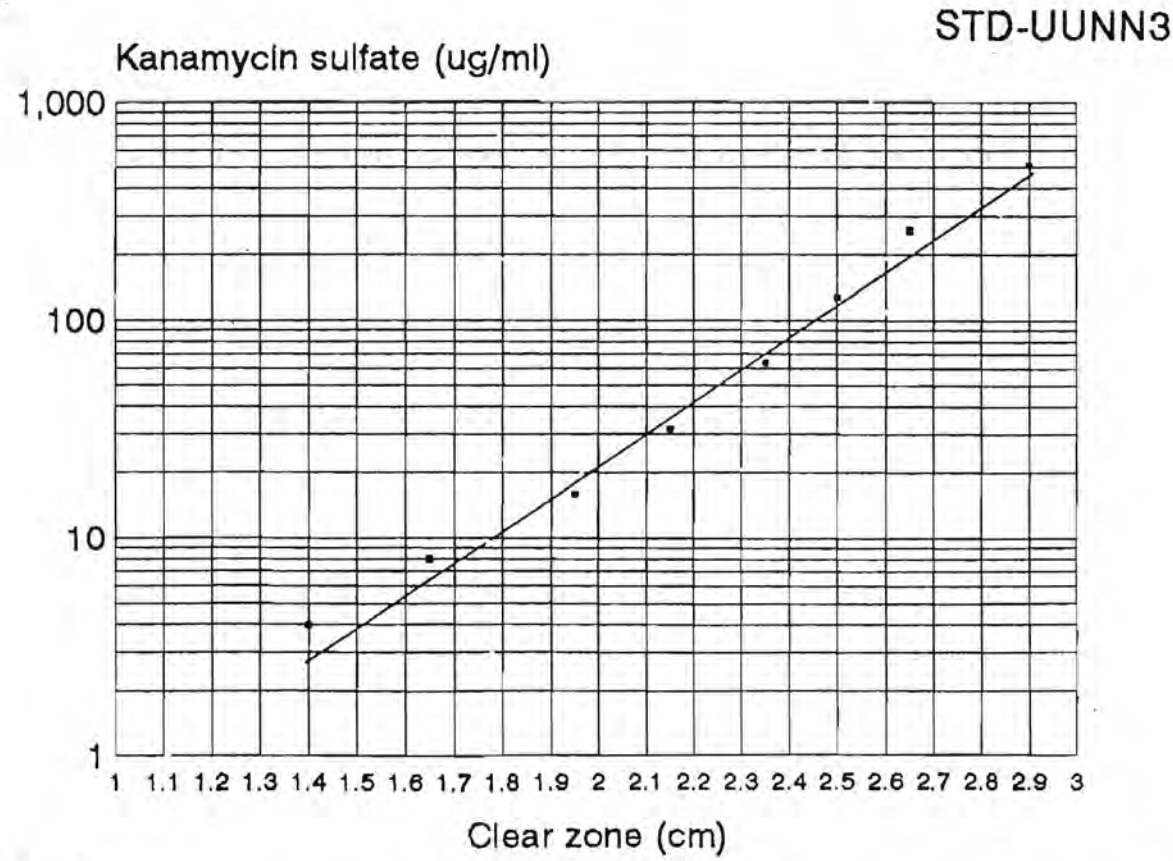
รูปที่ 15 กราฟมาตรฐานหาปริมาณกานามัยซินหลังจากการชักนำด้วยสาร NTG และตรวจสอบความเสถียรครั้งที่ 3 (STD–UUN3)



รูปที่ 16 กราฟมาตรฐานหาปริมาณกานามัยซินหลังจากการชักนำด้วยสาร NTG และตรวจสอบ



รูปที่ 17 กราฟมาตรฐานหาปริมาณกานามัยซินหลังจากการชักนำด้วยสาร NTG และตรวจสอบความเสถียรครั้งที่ 2 (STD–UUNN2)

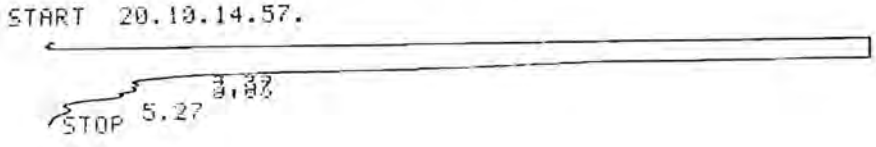


รูปที่ 18 กราฟมาตรฐานหาปริมาณกานามัยซินหลังจากการชักนำด้วยสาร NTG และตรวจสอบ

C-R1A
SMPL # 00
FILE # 1
REPT # 433
METHOD 41

#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		1.52	83.1841		201860
0		1.94	12.3205		29897
0		2.39	3.7977		9215
0		3.82	0.6975		1692
	TOTAL		99.9999		242666

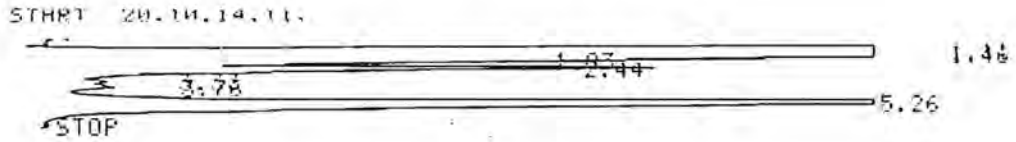
รูปที่ 19 ลักษณะโครมาโตแกรมของ *S. kanamyceticus* A-38



C-R1A
SMPL # 00
FILE # 1
REPT # 437
METHOD 41

#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		1.95	95.6445		80887
0		3.37	0.7243		612
0		3.83	1.6235	V	1373
0		5.27	2.0075		1697
	TOTAL		100		84570

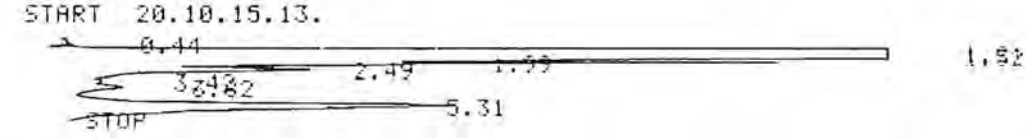
รูปที่ 20 ลักษณะโครมาโตแกรมของสายพันธุ์กลาย UUNN1



C-R1A
SMPL # 00
FILE # 1
REPT # 431
METHOD 41

#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		1.11	54.9295		753700
0		1.46	19.1153	V	262286
0		1.83	3.2182	V	44157
0		2.44	6.13	V	84111
0		3.33	0.5428	V	7448
0		3.76	0.8255	V	11327
0		5.26	15.2384	V	209089
	TOTAL		99.9999		1372122

รูปที่ 21 ลักษณะโครมาโตแกรมของกานามัยซิน A มาตรฐาน ปริมาณ 1500 ไมโครแกรมต่อมิลลิลิตร



C-R1A
SMPL # 00
FILE # 1
REPT # 439
METHOD 41

#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		0.44	0.0812		855
0		1.21	70.5735		742831
0		1.52	13.779	V	145032
0		1.99	3.7377	V	39342
0		2.49	3.4633	V	36453
0		3.42	0.4028	V	4240
0		3.82	0.8656	V	9111
0		5.31	7.0966	V	74696
	TOTAL		99.9999		1052563

รูปที่ 22 ลักษณะโครมาโตแกรมของกานามัยซิน A ปริมาณ 500 ไมโครแกรมต่อมิลลิลิตร

START 20.10.14.19.

STOP6.57

C-R1A
SMPL # 00
FILE # 1
REPT # 432
METHOD 41

#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		1.15	86.3766		743138
0		1.47	6.5847	V	56651
0		1.87	5.2372	V	45058
0		2.9	0.8323	V	7160
0		3.83	0.969	V	8337
	TOTAL		99.9999		860346

รูปที่ 23 ลักษณะโครมาโตแกรมของกานามัยซิน A ปริมาณ 0 ไมโครแกรมต่อมิลลิลิตร