บทที่ 1

บทนำ

สารปฏิชีวนะคานามัยซิน (Kanamycin)

1. ประวัติ และการค้นพบ

Umezawa และคณะ (1957) ได้แยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินบริเวณ Nagano Prefecture ประเทศญี่ปุ่น พบว่าเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนมัยซีทิส (actinomycetes) ตระกูล (family) สเตรปโตมัยเซทตาซีอี (streptomycetaceae) แต่เป็นสปีชีส์ (species) ใหม่ จึงตั้งชื่อว่า *Streptomyces kanamyceticus* สายพันธุ์นี้สามารถสร้างสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ และให้ชื่อว่า "คานามัยซิน" (Umezawa et al., 1957)

2. ลักษณะของ *S. kanamyceticus*

S. kanamyceticus เมื่อเจริญบนอาหารวุ้น เส้นใย (hypha) มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 ไมโครเมตร โคโลนี (colony) มีลักษณะไม่มีสีไปจนถึงสีเหลือง ส่วนที่เจริญอยู่เหนืออาหาร ซึ่งเรียกว่า แอร์เรียล ไมซีเลียม (aerial mycelium) จะมีสีขาวจนถึงสีเหลืองอ่อน เส้นใยที่เจริญอยู่ในอาหารซึ่งเรียกว่า เวเกตเททีฟ ไมซีเลียม (vegetative mycelium) จะใส (hyaline) และแตกแขนง (branch) แต่ไม่มาก สร้างก้านชูสปอร์ (sporophores) ที่ปลายเส้นใย ไม่พบเส้นใยที่ม้วนเป็นเกลียว (spiral) หรือก้นหอย (whorl) ไม่สร้างรงควัตถุ (pigment) ที่มีสีน้ำตาลเข้มเมื่อเจริญบนอาหารอินทรีย์ (organic media) แต่สามารถสร้างรงควัตถุสีน้ำตาลอ่อนเมื่อเลี้ยงในอาหารบางชนิด เช่น Glucose-Asparagine agar (Umezawa, 1958) การเจริญในอาหารสังเคราะห์ (synthetic media) โคโลนีอาจจะมีสีขาว สีชมพูอ่อน สีเหลืองอ่อน หรือ ไม่มีสี นอกจากนี้ยังสามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้ออื่น เช่น Glycerol-Czapek's agar, Calcium malate agar, Starch plate, Milk, Egg medium ฯลฯ (Umezawa et al.,1960)

3. คุณสมบัติของสารปฏิชีวนะคานามัยซิน

คานามัยซิน เป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ (aminoglycoside) สารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้จะมีสูตรโครงสร้างต่างกัน แต่มีส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) คล้ายคลึงกัน โดยทั่วไปสูตรโครงสร้างประกอบด้วย อะมิโนซูการ์ (amino sugar) หนึ่งตัวหรือมากกว่า โดยจับกันด้วยพันธะไกลโคซิดิค (glycosidic bond) ตัวอย่างสารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ เช่น สเตรปโตมัยซิน (Streptomycin) นีโอมัยซิน (Neomycin) เจนตามัยซิน (Gentamycin) อมิคาซิน (Amikacin) คานามัยซิน ฯลฯ (มาลิน จุลศิริ, 2532)

คานามัยซิน มีโครงสร้างโมเลกุลหลักประกอบด้วย 3 ส่วน คือ 3-อะมิโน-3-ดีออกซี-ดี-กลูโคส (3-amino-3-deoxy-D-glucose (3AG)) 2-ดีออกซีสเตรปทามีน (2-deoxystreptamine (2DS)) และ อะมิโนซูการ์ ในรูป chair form ด้วยพันธะไกลโคซิดิค ที่ตำแหน่ง basic 6-member ring ซึ่งเป็นส่วนที่เสถียรกว่าส่วนอื่น ๆ ของโมเลกุล และส่วนที่เป็นอะมิโนซูการ์จะแตกต่างกันในแต่ละชนิดของคานามัยซิน (Umezawa et al., 1986) ตามรูปที่ 1·

คุณสมบัติของคานามัยซิน (Umezawa et al., 1960)

- ละลายในน้ำ
- ไม่ละลายใน เอ็น-บิวทานอล (n-butanol) เอทธิลอะซิเตท (ethyl acetate) บิวทิลอะซิเตท (butyl acetate) อีเธอร์ (ether) คลอโรฟอร์ม (chloroform) และ เบนซิน (benzene)
- ไม่ดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 220-400 นาโนเมตร
- ให้ผลบวกเมื่อทดสอบด้วยปฏิกิริยานินไฮดริน (ninhydrin) ที่ละลายในไพริมิดีน ปฏิริยา Molisch และ Elsin-morgan
- ให้ผลลบเมื่อทดสอบด้วยปฏิกิริยาของ Tollins, Sakaguchi, Fehling, Maltol และ Selinwanoff

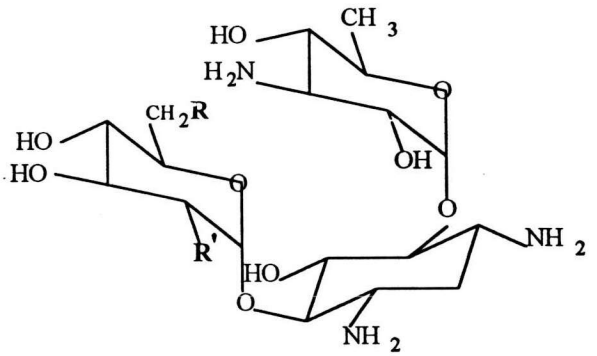
คานามัยซินมี 3 ชนิด คือ

1. คานามัยซิน เอ (kanamycin A) ($C_{18}H_{36}N_4O_{11}$ R =NH_2, R'=OH) มีอะมิโนซูการ์เป็น 6-อะมิโน-6-ดีออกซี-ดี-กลูโคส (6-amino-6-deoxy-D-glucose (6AG)) มีคุณสมบัติทางเคมี คือ ละลายได้ดีในน้ำ เมทธานอล (methanol) และ เอทธานอล (ethanol) มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิสูงกว่า 250 องศาเซลเซียส ค่า LD_{50} i.v. ในหนู เท่ากับ 583 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม เมื่อหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 272-274 องศาเซลเซียส จะให้อนุพันธุ์ซาลิไซลิดีน (salicylidene) เมื่อไฮโดรไลส์ (hydrolize) ด้วยกรดเข้มข้นจะได้ 2-ดีออกซี สเตรปทามีน (2DS) เมื่อทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟูริก เข้มข้น 40 เปอร์เซนต์ ที่อุณหภูมิ

100 องศาเซลเซียส นาน 100 นาที จะให้อนุพันธุ์ที่ดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต มีชื่อเรียกทางการค้า เช่น Kanamycin A sulfate, Cantrex, Enterokanacin, Resistomycin, Kanabristol, Kanicin, Kantrexil ฯลฯ

2. คานามัยซิน บี (kanamycin B) ($C_{18}H_{37}N_5O_{10}$ R =NH_2, R'=NH_2) มีอะมิโนซูการ์เป็น 2,6-ไดอะมิโน-2,6-ไดดีออกซี-ดี-กลูโคส (2,6-diamino-2,6-dideoxy-D-glucose) มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 178-182 องศาเซลเซียส ค่า LD_{50} i.v. ในหนู เท่ากับ 136 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม มีชื่อเรียกทางการค้า เช่น Bekanamycin, Aminodeoxykanamycin และ NK1006

3. คานามัยซิน ซี ($C_{18}H_{36}N_4O_{11}$ R =OH, R'=NH_2) มีอะมิโนซูการ์เป็น2-อะมิโน-2-ดีออกซี-ดี-กลูโคส (2-amino-2-deoxy-D-glucose) (glucosamine) ละลายได้ดีในน้ำ เมทธานอล และ เอทธานอล ละลายได้เล็กน้อยในฟอร์มามีน (formamine) มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิสูงกว่า 270 องศาเซลเซียส (Sechmitz et al., 1958; Umezawa et al., 1968, 1969; Umezawa et al., 1968; Budavari, 1989)



รูปที่ 1 โครงสร้างโมเลกุลคานามัยซิน (Cron et al., 1958)

4. <u>การสังเคราะห์คานามัยซิน</u>

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 6AG ยังสามารถสังเคราะห์ได้จากกลูโคซามีน (glucosamine) (Umezawa et al., 1968) สารเริ่มต้น (precursor) การสังเคราะห์คานามัยซิน 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) ส่วนการ

สังเคราะห์คานามัยซินแบบกึ่งสังเคราะห์ (semisynthesis) พบว่า คานามัยซิน ซี สามารถสังเคราะห์ได้โดยเริ่มจากพาโรมามีน หรือสังเคราะห์ได้จาก คานามัยซิน บี (Umezawa et al., 1957, 1968, 1969, 1986)

คานามัยซิน เป็นสารปฏิชีวนะประเภท บอรดเสปกตรัม (broad spectrum) ที่สามารถฆ่า และยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (bactericidal) ที่เจริญในภาวะที่มีอากาศ (aerobes) ได้หลายชนิดทั้งแบคทีเรียแกรมบวก (gram positive) เช่น *Staphylococcus* sp., *Streptococcus pyogenes* แบคทีเรียแกรมลบ (gram negative) เช่น *Klebsiella pneuminiae, Aerobacter aerogenes, Shigella* sp., *Samonella* sp., *Neisseria* sp., *Escherichia coli, Proteus* sp., *Citrobacter* sp., *Vibrio* sp., *Brucella* sp., *Serratia marcescens* A20019, *Acinetobacter* sp., แบคทีเรีย กลุ่ม Mycobacteria เช่น *M. tuberculosis, M. smegnatis* ATCC607 และโปรโตซัวบางชนิด (ไทยเมจิ ฟาร์มาซูติคอล, 2538; American Medical Association Council on Drugs, 1965; Miller and Litsky, 1976; Soichiro et al., 1977) แต่ไม่มีผลยับยั้งต่อ *Pseudomonas* sp., แบคทีเรียที่เจริญในภาวะที่ไม่มีอากาศ (anaerobes) เช่น *Clostridium* sp., ยีสต์ และรา ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อที่มีความสามารถต้านทานคานามัยซิน จะมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาฟอสโฟมาเลท (phosphomalate) อะเซททิลเลท (acetylate) หรือ อะดีนิลลีเลท (adenylylate) และนอกจากนี้ยังมีเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีความสามารถต้านทานสารปฏิชีวนะตามโรงพยาบาล เช่น *Staphylococcus aureus* หรือเชื้อแกรมลบที่แยกได้จากตัวผู้ป่วย (Goodman, 1975)

5. <u>กลไกการออกฤทธิ์ของคานามัยซิน และการนำไปใช้ในการรักษา</u>

คานามัยซินจะขัดขวางการสังเคราะห์โปรตีน โดยจะไปจับกับ 30S subunit ของไรโบโซม (ribosome) ทำให้ไรโบโซมผิดรูป โดยเฉพาะบริเวณที่จะจับกับ aminoacyl-tRNA และ mRNA ทำให้เกิดการอ่านรหัสบน mRNA ผิด (misreading) (เช่นการอ่านดีเอ็นเอเบส ไพริมิดีน (pyrimidine) ในตำแหน่งที่ 1, 2 ของ codon ผิดเป็นไพริมิดีนตัวอื่น การอ่านไพริมิดีน เป็นอะดีนีน (adenine) ในตำแหน่งที่ 1 ของ codon หรือการอ่าน รหัสหยุด (termination codon) ผิดพลาด ทำให้เกิดการสังเคราะห์สายโพลีเปปไทด์ (polypeptide chain) ยาวผิดปกติ) ทำให้โพลีโซม (polysome) หรือ โพลีไรโบโซม (polyribosome) แตกตัวเป็นหน่วยย่อย (monosome) ไม่สามารถสังเคราะห์สายโพลีเปปไทด์ได้ และถ้ามีปริมาณคานามัยซินมากจะไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนอย่างถาวร (Jawetz et al., 1984; Franklin and Snew., 1989; Voet and Voet, 1990)

คานามัยซินใช้ในการรักษาโรคเกี่ยวกับทางเดินหายใจ เช่น โรคปอด หลอดลมอักเสบ ทอนซิลอักเสบ โรคที่เกิดจากอาการอักเสบของทางเดินปัสสาวะ เช่น ท่อปัสสาวะอักเสบ โรคติดเชื้อของผิวหนัง เยื่อบุอ่อน ต่อมน้ำเหลือง กระดูก อาการไอกรน วัณโรคปอด และวัณโรคของอวัยวะอื่น ๆ (ไทยเมจิ ฟาร์มาซูติคอล, 2538; ลิวินเนอร์ ฟาร์มาซูติคอล, 2538)

คานามัยซินให้ผลข้างเคียง (side effect) ต่อระบบประสาทหู (ototoxicity) ทำให้หูอื้อ หูหนวก ทำให้อวัยวะรูปหอยโข่งหูส่วนใน และ restibular portion ในหูของระบบประสาทรับเสียงถูกทำลาย เกิดอาการวิงเวียน ทรงตัวลำบาก เพราะเกิดจากการถูกกดของเส้นประสาทสมองคู่ที่ 8 นอกจากนี้ให้ผลข้างเคียงต่อไต (nephrotoxicity) อาการช็อค อาการขัดในช่องอก หายใจขัด การบีบของหัวใจเร็วผิดปกติ ความดันโลหิตต่ำ เกิดอาการขาดวิตามินเค เช่น ปริมาณโปรทอมบิน (prothrombin) ในเลือดต่ำ มีแนวโน้มที่จะเกิดการไหลออกของเลือด เกิดอาการขาดวิตามินบี เช่น ลิ้นอักเสบ เยื่อบุเมือกในปากอักเสบ เบื่ออาหาร เส้นประสาทอักเสบ ซึ่งจะพบเป็นส่วนน้อย และยังพบอาการแพ้ยา เช่นการเกิดผื่น (Goodman and Gilman, 1975)

ในปี 1983 มีบริษัทที่ผลิตคานามัยซินทั่วโลก 20 บริษัท ในประเทศไทยมี 4 บริษัท ได้แก่ บริษัทสีลมการแพทย์ บริษัทเจริญเภสัช บริษัทชิเชง เคมีคอล และบริษัทไทยเมจิ ฟาร์มาซูติคอล จำกัด (Vandamme, 1984) บริษัทในประเทศไทยที่นำเข้าคานามัยซินมี 4 บริษัท ได้แก่ ห้างหุ้นส่วนจำกัด กวงเตี้ยงดิสสเปนซารี ห้างหุ้นส่วนจำกัด เดรสซินท์ ดรัก บริษัท พาราวิเซอร์ จำกัด บริษัทโอสถสภา (เต็กเฮงหยู) จำกัด (กองควบคุมอาหารและยา, 2535) ในปัจจุบันตามท้องตลาดจะมีคานามัยซินของบริษัทไทยเมจิ ฟาร์มา ซูติคอลจำกัด และบริษัทลิวินเนอร์ ฟาร์มาซูติคอล จำกัด

ผลิตภัณฑ์คานามัยซินจะอยู่ในรูปของ คานามัยซินซัลเฟต (kanamycin sulfate $C_{18}H_{36}N_4O_{11}.XH_2SO_4$) เช่น คานามัยซินโมโนซัลเฟต ในรูปแบบของแคปซูล (capsule) ยาฉีด สารละลาย (solution) และ ครีม (ointment) (Umezawa, 1986) ปริมาณและวิธีการใช้ ในผู้ใหญ่ให้วันละ 1-2 กรัม ในเด็กวันละ 30-50 มิลลิกรัม โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ถ้าใช้รักษาการอักเสบของระบบทางเดินหายใจให้พ่นเข้าช่องจมูก ด้วยเครื่องพ่นจมูก (ไทยเมจิฟาร์มาซูติคอล, 2538)

การผลิตสารปฏิชีวนะ

สารปฏิชีวนะ คือ ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ สามารถฆ่า หรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยใช้ปริมาณเล็กน้อย ปัจจุบันมีสารปฏิชีวนะมากกว่า 5,000 ชนิด สร้างโดยจุลินทรีย์ในกลุ่ม แอคติโนมัยซิส ประมาณ 4,000 ชนิด และมีการค้นพบสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ประมาณ 300-400 ชนิดต่อปี การผลิตสารปฏิชีวนะในแต่ละปีมีมากกว่า 20,000 ตันต่อปี (Vandamme, 1984)

สารปฏิชีวนะเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ของจุลินทรีย์ การสังเคราะห์จะไม่สัมพันธ์กับการเจริญ (non-growth associate) โดยจะเริ่มสังเคราะห์ตั้งแต่ช่วง ไอไดโอเฟส (idiophase) ของการเจริญ คือ ตั้งแต่ช่วงระยะท้ายสุดของการเจริญในช่วงล็อคเฟส (log phase) จนถึงสิ้นสุดระยะการเจริญคงที่ (stationary phase) เหตุผลของการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะของจุลินทรีย์ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่มีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านพยายามอธิบายโดยให้เหตุผลต่างๆ เช่น สารปฏิชีวนะเป็นของเสียที่ได้จากกระบวนการเมตาบอริซึมของเซลล์ เป็นสารที่เซลล์สังเคราะห์ซึ่งสามารถนำกลับมาใช้เป็นอาหารได้ สังเคราะห์ขึ้นมาเพื่อคงสภาพการทำงานของเอ็นไซม์ สังเคราะห์ขึ้นเพื่อฆ่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เพื่อการคงอยู่รอดของตัวเอง (Gottlieb, 1976; Demain, 1980) การสังเคราะห์มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ (cellular differentiation) เช่น การสร้างสปอร์ (sporulation) หรือการงอกของสปอร์ (germination) (Katz and Demain, 1977) เกี่ยวข้องกับการนำพาโลหะเข้าสู่เซลล์ และเกี่ยวข้องกับการรักษาสภาพในการดำรงชีพอยู่กับสิ่งมีชีวิตอื่นเช่น จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่แบบพึ่งพาซึ่งกันและกันกับพืช (symbiosis) (Demain and Piret, 1981)

กลไก และการควบคุม การสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ มีดังนี้ เช่น

1. สารพันธุกรรม มีการศึกษาพบว่าการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะจะเกี่ยวข้องกับพลาสมิด โดยยีน (gene) ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์มักจะอยู่บนโครโมโซม และยีนที่ควบคุมการแสดงออกให้เกิดการสังเคราะห์อาจจะอยู่บนพลาสมิด (Hopwood et al., 1977; Blatz, 1980) เซลล์ที่ไม่มีพลาสมิด มีแต่โครโมโซมอาจจะไม่สามารถสังเคราะห์สารปฏิชีวนะได้ (Okanishi and Umezawa, 1978) ยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์มักจะจัดเรียงกันอยู่เป็นกลุ่ม (cluster) บนโครโมโซม และอาจจะมีอยู่หลายกลุ่ม มักจะมียีนที่ควบคุมการทำให้เชื้อต้านทานต่อสาร

ปฏิชีวนะที่สังเคราะห์ได้นั้น อยู่ต่อกับยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ หรือ อาจจะอยู่ในกลุ่มยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เลยก็ได้ แต่ยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ และยีนที่ควบคุมการต้านทานจะไม่ถูกควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ (promoter) เดียวกัน (Goodfellow et al., 1988) และการหายไปของพลาสมิด ที่เกิดจากการถ่ายเชื้อ หรือการเก็บรักษาเชื้อ จะทำให้จุลินทรีย์สูญเสียความสามารถในการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ (Okanishi et al., 1970)

2. สารอาหาร

2.1 แหล่งคาร์บอน (carbon source) ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้สังเคราะห์สารปฏิชีวนะได้นั้นขึ้นอยู่กับ ชนิดของสารปฏิชีวนะ พบว่า แมนโนส (mannose) และ กาแลคโตส (galactose) เหมาะสมที่สุดต่อการสังเคราะห์คานามัยซิน แป้ง และเดรกตริน (dextrin) ให้ผลการสังเคราะห์ปานกลาง กลีเซอรอล และกรดอินทรีย์ ให้ผลการสังเคราะห์น้อยมาก (Basak and Majumdar, 1973) แต่กลูโคสจะยับยั้งการสังเคราะห์โดยจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เอ็น-อะซิทิล คานามัยซิน อะมิโดไฮเดรส (N-acetyl kanamycin amidohydrase) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์คานามัยซิน (Satoh et al., 1976)

2.2 แหล่งไนโตรเจน (nitrogen source) ชนิด และปริมาณ มีผลต่อการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ จุลินทรีย์สามารถใช้ไนโตรเจนในรูป อินทรีย์ไนโตรเจน (organic nitrogn) เช่น กรดคะมิโน โปรตีน ยูเรีย หรือในรูปอนินทรีย์ไนโตรเจน (inorganic nitrogen) เช่น แก๊สแอมโมเนีย เกลือแอมโมเนีย เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ไนเตรท เป็นต้น ในการสังเคราะห์ สเตรปโตมัยซิน ของ *Streptomyces griseus* แหล่งไนโตรเจนที่ดี คือ โพรลีน (proline) และ กากถั่วเหลือง (soybean meal) (Vandamme, 1984) ในการสังเคราะห์คานามัยซิน แหล่งไนโตรเจนที่ดี คือ คอร์นสตีพ ลิเคอร์ (corn steep liqour) กากถั่วเหลือง เปปโตน (peptone) โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) และ ไกลซีน (glycine) (Umezawa et al., 1960) แหล่งไนโตรเจนที่ไม่เหมาะสมต่อการนำมาเป็นแหล่งสังเคราะห์คานามัยซิน ได้แก่ โพรลีน แอสพาราจีน (asparagine) กรดกลูตามิค (glutamic acid) อะลานีน (alanine) ฮีสทิดีน (histidine) และ อาร์จินีน (arginine) แต่จะเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ (Basak and Majumdar, 1973; Laznikova et al., 1976)

2.3 แร่ธาตุ ความเข้มข้นของแร่ธาตุบางชนิด หรือความเข้มข้นของแร่ธาตุหลาย ๆ ชนิดรวมกัน จะมีผลต่อการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ เช่น ความเข้มข้นของอนินทรีย์ฟอสเฟตมีผลต่อการสังเคราะห์ สเตรปโตมัยซิน (Stanbury and Whitaker, 1984) ฟอสเฟตใน

ปริมาณที่มากเกินไป จะไปยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์ อัลคาไลน์ ฟอสฟาเทส ไอโซเอนไซม์ (alkaline phosphatase isoenzyme) ซึ่งจะมีผลไปยับยั้งการสังเคราะห์คานามัยซิน (Shuyun et al., 1983) ในการเลี้ยง *S. kanamyceticus* เพื่อสังเคราะห์คานามัยซินต้องการ แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) และ ไดโปแตสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4) ที่ความเข้มข้น 0.4 และ 1.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ต้องการโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) ในปริมาณเล็กน้อย ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ เหล็ก (Fe) สังกะสี (Zn) และ โมลิบดีนัม (Mo) คือ 0.25, 0.575 และ 0.04 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ แมงกานีส (Mn) และ แคลเซียม (Ca) ไม่มีผลต่อการสังเคราะห์ แต่ทองแดง (Cu) โคบอลท์ (Co) นิเกิล (Ni) และ วานาเดียม (V) จะยับยั้งการสังเคราะห์คานามัยซิน (Basak and Majumdar, 1975) และพบว่า โคบอลท์ (Co) จะมีส่วนควบคุมการสังเคราะห์เจนตามัยซิน (gentamicin) จาก *Micromonospora purpurea* (Tilly et al., 1975)

2.4 สารเริ่มต้น (precursor) สารเคมีบางชนิดเมื่อเติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำหน้าที่เป็นส่วนประกอบของสารที่ต้องการผลิตได้โดยตรง ทำให้สังเคราะห์สารปฏิชีวนะได้เร็ว และมากขึ้น สารเริ่มต้นของการสร้างคานามัยซิน ได้แก่ พาโรมามีน 4-ออกซิ-(อัลฟา-ดี-กลูโคซามีนิล-2-ดีออกซิสเตรปทามีน) 2-ดีออกซิสเตรปทามีน (2DS) และกลูโคซามีน (Umezawa et al., 1957,1969) หรืออาจจะมีการเติมสารที่เรียกว่า ไบโอเรคกลูเลเตอร์ (bioregulator) ซึ่งไม่ใช่สารเริ่มต้น เช่น A-factor (2-isocapryloyol-3R-hydroxymethyl-γ-butyrolactone) ในการสังเคราะห์สเตรปโตมัยซิน (Khokhlov and Tovarova, 1979)

3. การให้อากาศ (aeration) และการกวน (agitation)

การหมัก เพื่อสังเคราะห์คานามัยซินเป็นการหมักแบบใช้ออกซิเจน มีการกวนเพื่อเพิ่มการละลายของออกซิเจน เพื่อให้เชื้อได้รับออกซิเจนได้อย่างทั่วถึง มีการศึกษาพบว่าการให้ออกซิเจนที่มากเกินไปไม่มีผลต่อการสังเคราะห์คานามัยซิน แต่การลดการให้ออกซิเจนและการลดอัตราการกวนจะส่งผลให้การสังเคราะห์ลดลง (Brinbery et al., 1970) ในการหมักสารที่ใช้เพื่อลดการเกิดฟอง คือ พาราฟินเหลว (liquid paraffin) ซีลิโคน (silicone) (Umezawa et al., 1960)

4. ค่าความเป็นกรด-ด่าง

S. kanamyceticus จะสามารถสังเคราะห์คานามัยซิน ในภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีสภาพเป็นกลางถึงด่าง มีค่า pH อยู่ระหว่าง 7.0-9.0 (Umezawa et al.,1957)

5. อุณหภูมิ

S. kanamyceticus จะสามารถสังเคราะห์คานามัยซิน ได้ในช่วงอุณหภูมิที่ค่อนข้างกว้าง คือ 25-35 องศาเซลเซียส แต่ช่วงที่เหมาะสมที่สุดคือ 27-29 องศาเซลเซียส (Umezawa et al., 1960)

จุลินทรีย์ที่แยกได้ตามธรรมชาติจะสังเคราะห์สารปฏิชีวนะได้ในปริมาณค่อนข้างต่ำ ในการผลิตสารปฏิชีวนะในระดับอุตสาหกรรม การปรับปรุงภาวะการเลี้ยงเชื้อ หรือสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจะสามารถเพิ่มปริมาณการสังเคราะห์ได้ แต่ได้ไม่สูงนัก เนื่องจากความสามารถในการสังเคราะห์จะถูกจำกัดโดยสารพันธุกรรม หรือยีนซึ่งเป็นตัวควบคุม ดังนั้นถ้าต้องการเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้นอีกจึงต้องปรับปรุงให้ยีนที่ควบคุมนั้นมีการเปลี่ยนแปลงไป โดยใช้วิธีการปรับปรุงสายพันธุ์ ซึ่งมีหลายวิธี (Singleton and Sainsbury, 1988) เช่น

1. การกลายพันธุ์ (mutation) คือ การทำให้นิวคลีโอไทด์ในสารพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงชนิด จำนวน หรือลำดับ โดยวิธีทางธรรมชาติ หรือโดยการชักนำด้วยสารก่อการกลายพันธุ์

2. การรีคอมบิเนชั่น (recombination) คือ การรวมกันของสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน หรือต่างชนิดกันมาเชื่อมต่อกันตรงตำแหน่งที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน (homologus)

3. การทำโปรโตพลาสฟิวชั่น (protoplast fusion) คือ การรวมโปรโตพลาสของเซลล์ที่ต่างชนิดกันเข้าด้วยกัน โดยการทำลายผนังเซลล์ (cell wall) เพื่อให้เซลล์มารวมกันแล้วสังเคราะห์ผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่

4. พันธุวิศวกรรม (genetic engineering) คือ การตัดต่อยีนที่มีคุณสมบัติที่ต้องการจากเซลล์หนึ่งไปให้กับอีกเซลล์หนึ่งที่ต้องการให้มีคุณสมบัตินั้น โดยใช้เอนไซม์ที่จำเพาะ

การกลายพันธุ์ (Mutation)

การกลายพันธุ์ เป็นการเปลี่ยนแปลงลำดับ หรือจำนวนของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ในสารพันธุกรรม และสามารถถ่ายทอดสู่รุ่นลูกหลานได้ กระบวนการกลายพันธุ์เรียกว่า มิวตาเจเนซิส (mutagenensis) และสิ่งมีชีวิตที่เกิดการกลายพันธุ์ เรียกว่า สิ่งมีชีวิต กลายพันธุ์ หรือสิ่งมีชีวิตผ่าเหล่า (mutant) การกลายพันธุ์ทำให้เกิดสิ่งมีชีวิตสายพันธุ์ใหม่ได้ (Goodenough and Paullevine, 1974)

ผลของการกลายพันธุ์ต่อโครงสร้าง ดีเอ็นเอ (DNA)

1. ผลต่อดีเอ็นเอ ระดับนิวคลีโอไทด์ 1-2 โมเลกุล (microleisions) แบ่งเป็น

1.1 การแทนที่ดีเอ็นเอเบส (single base substitution)

1.1.1 การแทนที่ดีเอ็นเอเบสด้วยดีเอ็นเอเบสในกลุ่มเดียวกัน (transition) เป็นการแทนที่กันของดีเอ็นเอเบสกลุ่มเพียวรีน (purine) ด้วยดีเอ็นเอเบสในกลุ่มเพียวรีนด้วยกัน เช่น การแทนที่ อะดีนีน (adenine) ด้วย กัวนีน (guanine) หรือการแทนที่ กัวนีน ด้วย อะดีนีน หรือเป็นการแทนที่กันของเบสกลุ่มไพริมิดีน (pyrimidine) ด้วยเบสในกลุ่มไพริมิดีนด้วยกัน เช่น การแทนที่ ไซโตซีน (cytosine) ด้วย ไทมีน (thymine) หรือการแทนที่ ไทมีน ด้วยไซโตซีน

รูปที่ 2 ตัวอย่างการแทนที่ดีเอ็นเอเบสด้วยดีเอ็นเอเบสในกลุ่มเดียวกัน (Smith and Keary, 1991)

1.1.2 การแทนที่ดีเอ็นเอเบสด้วยดีเอ็นเอเบสต่างกลุ่มกัน (transversions) เป็นการแทนที่กันของ ดีเอ็นเอเบสกลุ่มเพียวรีน ด้วย ดีเอ็นเอเบสกลุ่มไพริมิดีน หรือการแทนที่ ดีเอ็นเอเบสกลุ่มไพริมิดีน ด้วย ดีเอ็นเอเบสกลุ่มเพียวรีน เช่นการแทนที่ กัวนีน ด้วยไซโตซีน หรือ กัวนีน

รูปที่ 3 ตัวอย่างการแทนที่ดีเอ็นเอเบสด้วยดีเอ็นเอเบสต่างกลุ่มกัน (Smith and Keary, 1991)

1.2 เฟรมชิป มิวเตชั่น (framshift mutation)

เป็นการกลายพันธุ์ที่จะทำให้เกิดการเพิ่มนิวคลีโลไทด์บนสายโพลีนิวคลีโอไทด์ 1-2 คู่เบส ทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์เลื่อนตำแหน่ง เมื่อเกิดการแปลรหัส (translation) ในการสังเคราะห์โปรตีน อาจจะทำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนผิดไปจากเดิม หรือถ้าเกิดขึ้นบนยีน ที่ทำหน้าที่ความคุมการทำงาน (regulation gene) ก็อาจจะทำให้ยีนนั้นแสดงออก (express) หรือทำหน้าที่ผิดไปจากเดิม (Livingston, 1981; Smith and Keary, 1991)

2. <u>ผลต่อดีเอ็นเอระดับยีนบนโครโมโซม (macroleision)</u>

2.1 การเพิ่มหรือการหลุดหายของยีน (addition or deletion) และการดูปพิเคชั่น (duplication) ซึ่งเป็นการเพิ่ม หรือลด จำนวนชุดของยีน หรือกลุ่มของยีนในโครโมโซม

2.2 การกลับทิศของยีน (inversion) ยีนที่ถูกตัดหรือแตกหักออกไปจากโครโมโซม กลับเข้ามาต่อกับโครโมโซมเดิม ที่ตำแหน่งเดิม แต่ในลักษณะกลับทิศ

2.3 การเชื่อมกลับผิดตำแหน่งของยีน (translocation) ยีน หรือกลุ่มของยีนที่ถูกตัด หรือแตกหักออกจากโครโมโซมกลับเข้ามาต่อกับโครโมโซมเดิมอีกครั้ง ที่ตำแหน่งใหม่ไม่ใช่ที่ตำแหน่งเดิมที่หลุดออกไป

<u>การเกิดการกลายพันธุ์ (mutagenesis)</u>

1. <u>การกลายพันธุ์โดยธรรมชาติ (spontanous mutation)</u>

เกิดขึ้นได้เองโดยธรรมชาติ แต่มีโอกาสที่จะเกิดขึ้นน้อยมาก ในการถ่ายทอดพันธุกรรมของแบคทีเรีย (bacteria) หรือไวรัส (virus) แต่ละรุ่น โอกาสที่เซลล์รุ่นลูกจะเกิดการกลายพันธุ์ มีโอกาสเพียง 10^{-8} เท่านั้น แต่ในเซลล์สิ่งมีชีวิตกลุ่มยูคาริโอต (eukaryote) เซลล์รุ่นลูกกลายพันธุ์ได้มากกว่าคือ 10^{-5} การเกิดการกลายพันธุ์โดยธรรมชาติสาเหตุแน่นอนยังไม่ทราบแน่ชัด แต่ส่วนใหญ่เกิดจากการแก้ไขที่บกพร่องของการซ่อมแซมดีเอ็นเอในกระบวนการถ่ายทอดพันธุกรรมและอีกสาเหตุหนึ่งก็คือการเปลี่ยนแปลงรูปร่างดีเอ็นเอ

เบส (tautomeric shifts) ในระหว่างการถ่ายทอดพันธุกรรม โดยดีเอ็นเอเบสจะเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของไนโตรเจนอะตอมบางตัวในโมเลกุล (tautomers) ทำให้มีคุณสมบัติการเกิดพันธะของคู่ดีเอ็นเอเบสเปลี่ยนไป เช่น ไทมีน ซึ่งอยู่ในรูปคีโตน ปกติจะจับกับ อะดินีน ด้วยพันธะไฮโดรเจน (H-bond) แต่ถ้าเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างโมเลกุลเป็น ไทมีน ที่อยู่รูปอีนอล (enol-form) จะสามารถจับกับ กัวนีน ได้ (Smith and Keary, 1991)

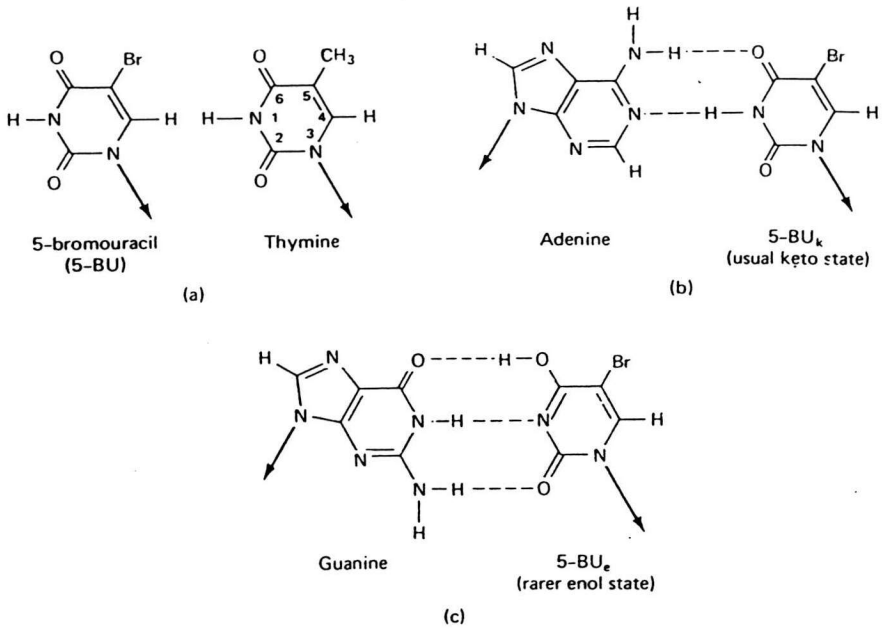
2. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (induced mutation, mutagenesis)

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ สามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้มากกว่าการเกิดขึ้นเองโดยทางธรรมชาติถึงประมาณ 1,000 เท่า กระทำได้โดยใช้สารก่อการกลายพันธุ์ (mutagen) ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 วิธี คือ

2.1 วิธีทางฟิสิกส์ (physical mutagenesis) ใช้รังสีเป็นสารก่อการกลายพันธุ์ (radiation mutation) นิยมใช้ รังสีเอ็กซ์ (x-ray), อัลตราไวโอเลต (UV) และ รังสีแกมม่า (γ-ray) รังสีเอ็กซ์ และรังสีแกมม่า เป็นรังสีที่มีพลังงานมาก มีความสามารถทะลุผ่านได้สูง สามารถทำให้สารตัวกลางแตกตัวได้ (ionizing radiation) พลังงานของรังสีทั้งสองจะไปทำลายพันธะฟอสโฟไดเอสเธอร์ (phosphodiester bond) ของสายดีเอ็นเอ ทำให้เกิดการตัดชิ้นส่วนของยีนออก จากสายดีเอ็นเอ เป็นการเปลี่ยนแปลงระดับโครโมโซม (Drake, 1970)

2.2 วิธีทางสารเคมี (chemical mutagenesis) สารเคมีที่สามารถนำมาใช้เป็นสารก่อการกลายพันธุ์ มีหลายชนิด และมีกลไกที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่แตกต่างกันไป สามารถจัดเป็นกลุ่มได้ดังนี้

2.2.1 เบสอนาลอค (base analogs) เป็นการแทนที่ของสารเคมีที่มีรูปร่างคล้ายคลึงกับดีเอ็นเอเบสซึ่งจะไปแทนที่ดีเอ็นเอเบสในระหว่างการถ่ายทอดสาร พันธุกรรม และจะไม่ถูกเอนไซม์ ดีเอ็นเอโพลีเมอร์เลส (DNA polymerase) ตัดออก ตัวอย่างของสารเคมีในกลุ่มนี้ เช่น 5-โบรโมยูราซิล (5-bromouracil, 5-BU) ซึ่งจะไปแทนที่ ไทมีน แต่ในบางภาวะ 5-BU จะถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (tautomeric shifts) จากรูป คีโตน ไปเป็นรูปอีนอล ทำให้สามารถเกิดพันธะกับกัวนีนได้ และ 2-อะมิโนพิวรีน (2-aminopurine, 2-AP) ซึ่งจะไปแทนที่อะดินีน



รูปที่ 4 คุณสมบัติการแทนที่ดีเอ็นเอเบสของ 5-โบรโมยูราซิล (Aver, 1984)

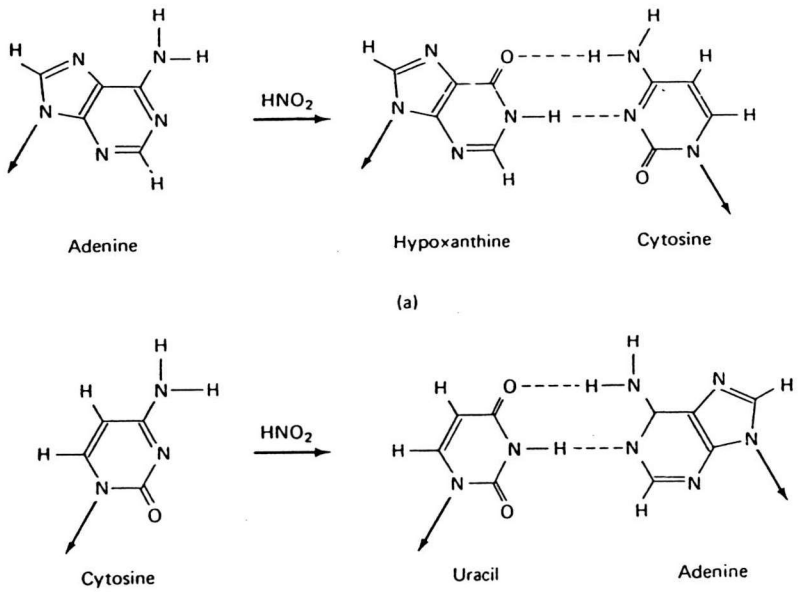
(a) โครงสร้างโมเลกุลของ 5-โบรโมยูราซิล เทียบกับ ไทมีน

(b) การเกิดพันธะระหว่าง 5-โบรโมยูราซิล (ในรูปคีโตน) กับ อะดีนีน

(c) การเกิดพันธะระหว่าง 5-โบรโมยูราซิล (ในรูปอีนอล) กับ กัวนีน

2.2.2 อินเตอร์คาเลทิงเอเจนท์ (intercalating agent) เป็นสารเคมีที่มีรูปร่างโมเลกุลเป็นวง (aromatic) 3 วง ประกอบกัน จะไปแทรกอยู่ระหว่างคู่ของดีเอ็นเอเบส ทำให้เกิดความผิดพลาดระหว่างการถ่ายทอดสารพันธุกรรม หรือทำให้เกิดการตัดทิ้ง และทำให้เกิด เฟรมชิป มิวเตชั่น แต่จะไม่ทำให้เกิดการแทนที่ของดีเอ็นเอเบส ตัวอย่างสารเคมีในกลุ่มนี้ ได้แก่ 9-อะมิโนอะคริดีน (9-aminoacridine) เอทธิเดียมโบรมายด์ (ethidiumbromide)

2.2.3 กรดไนตรัส (nitrus acid, HNO_2) กรดไนตรัสจะไปทำปฏิกิริยาตัดกลุ่มอะมิโนในโมเลกุลของดีเอ็นเอเบส แล้วเติมออกซิเจนลงไป (oxidation) ซึ่งจะทำให้โมเลกุลของดีเอ็นเอเบสเปลี่ยนแปลงไปจาก อะดินีน เป็น ไฮโปแซนทีน (hypoxanthine) ไซโตซีน เป็น ยูราซิล และ กัวนีน เป็น แซนทีน (xanthine) เมื่อเกิดการถ่ายทอดทางพันธุกรรม ไฮโปแซนทีน จะจับคู่กับ ไซโตซีน ยูราซิล จะจับคู่กับ อะดินีน (Redei, 1982; Aver, 1984)

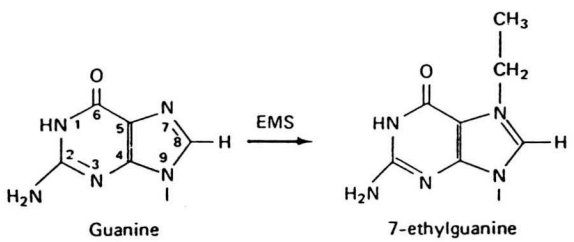


รูปที่ 5 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย กรดไนตริก (Aver, 1984)

(a) การเกิดปฏิกิริยาระหว่าง อะดินีน กับ กรดไนตริก ได้ ไฮโปรแซนทีน และการเกิดพันธะระหว่างไฮโปแซนทีน กับ ไซโตซีน

(b) การเกิดปฏิกิริยาระหว่าง ไซโตซีน กับ กรดไนตริก ได้ ยูราซิล และการเกิดพันธะระหว่าง ยูราซิล กับ อะดินีน

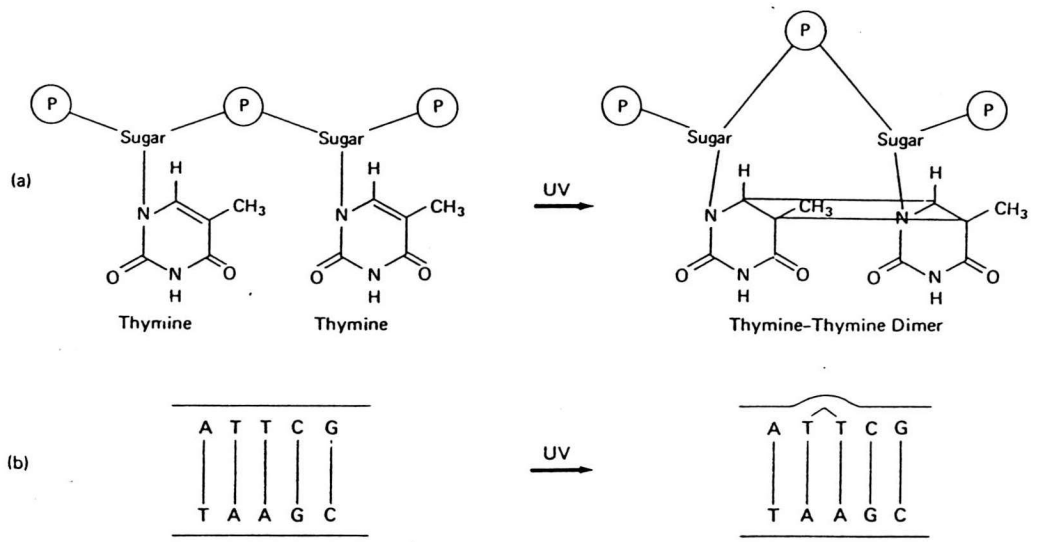
2.2.4 อัลคีเลติง เอเจนท์ (alkylating agent) เป็นสารที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์สูง โดยใช้ส่วนของอัลคิล (alkyl) เช่น เมธิล (methyl, CH_3^-) เอธิล (ethyl, $CH_3CH_2^-$) หรือ อะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอนอื่น ๆ (aliphatic hydrocarbon group) จับที่ตำแหน่งต่างๆ ของดีเอ็นเอเบส ทำให้การจับคู่ของดีเอ็นเอเบสนั้นผิดพลาด เกิดกระบวนการซ่อมแซมแบบ เอสโอเอส (SOS repair system) ทำให้เกิดการแทนที่ของดีเอ็นเอเบส โดยดีเอ็นเอเบสกลุ่มเดียวกันหรือต่างกลุ่มกัน และทำให้พันธะระหว่าง พิวรีนและ โครงสร้างแกนระหว่างน้ำตาลกับฟอสเฟต (sugar-phosphate back bone) ขาดออกจากกัน (Redei, 1982) ตัวอย่างของสารในกลุ่มนี้ ได้แก่ ไนโตรเจน ซัลเฟอร์มัสตาส (sulfer mustard) เอธิลอีเธนซัลโฟเนต (ethyl ethane sulfonate, EES) เอธิลมีเธนซัลโฟเนต (ethyl methane sulfonate, EMS) (EES และ EMS จะจำเพาะกับ กัวนีน ที่ตำแหน่ง C-7) และ เอ็น-เมธิล-เอ็น-ไนโตร-เอ็น-ไนโตรโซกัวนิดีน (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, NTG, MNNG, NG) (Drake, 1970 and Aver, 1984)



รูปที่ 6 การเกิดปฏิกิริยาระหว่าง กัวนีน และ EMS ได้ 7-เอทธิลกัวนีน (7-ethylguanine) (Aver, 1984)

<u>อัลตราไวโอเลต</u> **(ultraviolet, UV)**

แสงอัลตราไวโอเลต เป็นที่สารก่อการกลายพันธุ์ชนิดหนึ่งที่นิยมนำมาใช้การกลายพันธุ์ ผู้ที่นำมาใช้เป็นคนแรกคือ Altenburg โดยทำการทดลองฉายแสงอัลตราไวโอเลต ไปยัง polar cap cell ของ Drosophila eggs แสงอัลตราไวโอเลต มีความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 200-400 นาโนเมตร แต่ช่วงความยาวคลื่นที่นำมาใช้ในการกลายพันธุ์ จะมีค่าเท่ากับ 254-260 นาโนเมตร เพราะเป็นความยาวคลื่นที่ ดีเอ็นเอ จะดูดซับแสงอัลตราไวโอเลตได้ดีที่สุด แสงอัลตราไวโอเลตเป็นรังสีที่ไม่ทำให้การตัวกลางแตกตัว (non-ionizing radiation) มีความสามารถในการทะลุผ่านต่ำ แสงอัลตราไวโอเลตจะทำให้เกิด ไพริมิดีน ไดเมอร์ (pyrimidine dimer) ขึ้นในสายดีเอ็นเอ เป็นการจับกันระหว่างดีเอ็นเอเบสในกลุ่มไพริมิดีนที่อยู่ติดกันบนสายดีเอ็นเอเดียวกัน เกิดพันธะโควาเลนท์ (covalent bond) เชื่อมระหว่างอะตอมของคาร์บอนของแต่ละโมเลกุลเป็นวงกลม เรียกว่า ไซโคลบิวทิลริง (cyclobutyl ring) ส่วนใหญ่จะเกิดพันธะระหว่าง ไทมีนกับไทมีน มากกว่า ไซโตซีนกับไซโตซีน และ ไทมีนกับไซโตซีน ตามลำดับ ทำให้โครงสร้างของดีเอ็นเอผิดรูป, พันธะไฮโดรเจนถูกทำลาย ซึ่งจะทำให้เซลล์ตายเมื่อเกิดการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ แต่ปริมาณการฉายแสงอัลตราไวโอเลตไม่ได้สัมพันธ์กับจำนวนการเกิดการกลายพันธุ์ (Strickberger, 1985; Smith and Keary, 1991)



รูปที่ 7 การเกิดไทมีน ไดเมอร์ โดยการฉายแสงอัลตราไวโอเลต (Aver, 1984)

(a) ไทมีน ไดเมอร์ จับกันด้วยพันธะไฮโดรเจน

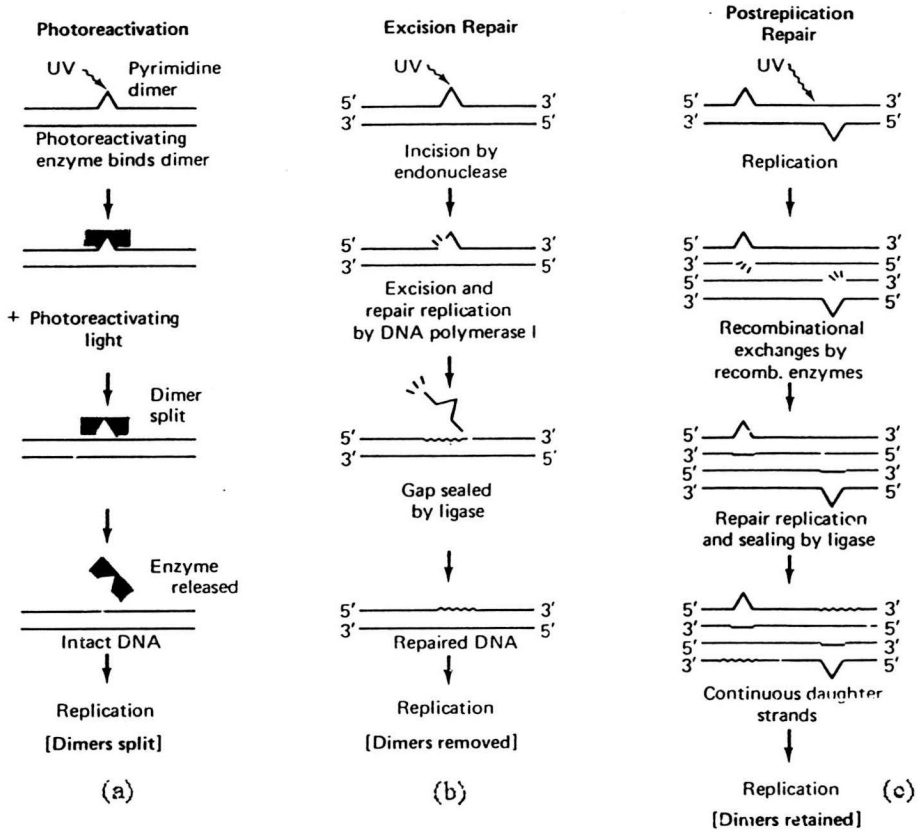
(b) ไทมีน ไดเมอร์ บนสาย ดีเอ็นเอ

เมื่อเซลล์ถูกฉายแสงอัลตราไวโอเลต และเกิดไทมีนไดเมอร์ขึ้นในสายดีเอ็นเอ เซลล์จะมีกลไกแก้ไขความผิดปกติที่เกิดขึ้น มีการศึกษาเซลล์ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต ไปเลี้ยงในที่ๆ มีแสงสว่างเปรียบเทียบกับที่มืด ปรากฏว่า การเลี้ยงในที่ๆ มีแสงสว่างจะมีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์สูงกว่า ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า โฟโตรีเอกติเวชั่น (photoreactivation) หรือ โฟโตเรสโทเรชั่น (photorestoration) เป็นการซ่อมแซมดีเอ็นเอ โดยใช้เอนไซม์ที่มีการทำงานเกี่ยวข้องกับแสงสว่างที่เรียกว่า โฟโตไลเอส (photolyase) มาตัดพันธะโควาเลนท์ที่เชื่อมไดเมอร์นั้น ซึ่งแสงสว่างที่มีผลต่อการซ่อมแซมดีเอ็นเอนี้ จะมีช่วงความยาวคลื่นอยู่ระหว่าง 310-400 นาโนเมตร ใน *E. coli* การซ่อมแซมจะใช้เอนไซม์ ดีเอ็นเอโพลีเมอร์เลส (DNA polymerase) ซึ่งได้จากการควบคุมของยีน *phr* (Scancar et al., 1987)

นอกจากนี้ในที่ๆ ไม่มีแสงสว่าง พบว่ามีการซ่อมแซมได้เช่นเดียวกัน เรียกว่า การซ่อมแซมในที่มืด (dark repair) เรียกกระบวนการซ่อมแซมว่า เอ็กซ์ซีชั่น รีแพร์ (excision repair) กระบวนการซ่อมแซมทั้ง 2 แบบ ใช้เอนไซม์ต่างๆ ที่ถูกควบคุมโดยยีน คนละชุดกัน และมีวิธีการซ่อมแซมที่แตกต่างกัน โดยใน โฟโตรีเอกติเวชั่น นิวคลีโอไทด์ที่เป็นไดเมอร์กันจะไม่ถูกตัดออก แต่ใน เอ็กซ์ซีชั่น รีแพร์ นิวคลีโอไทด์ที่เป็นไดเมอร์กันจะถูกตัดออก ในบางครั้ง

นิวคลีโอไทด์โมเลกุลถัดไปที่อยู่ติดกับไดเมอร์นั้นจะถูกตัดออกมาด้วยโดยเอนไซม์เอ็นโดนิวคลีเลส (endonuclease) ต่อมาเอนไซม์เอ็กซ์โซนิวคลีเอส (exonuclesae) จะมาย่อยนิวคลีโอไทด์ไดเมอร์นั้นออกไป แล้วเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอร์เลสจะมาสร้างส่วนของนิวคลีโอไทด์ที่ถูกตัดออกไป และเอนไซม์ไลเกส (ligase) จะมาเชื่อมปลายทั้ง 2 ด้านให้ต่อกับดีเอ็นเอสายเดิม กระบวนการซ่อมแซมระบบนี้ยังเกี่ยวข้องกับการทำงานของยีน *phr* แต่จะไม่เกิดใน *B. subtilis* (Hays et al., 1985)

หากการทำงานของระบบซ่อมแซมทั้ง 2 แบบข้างต้นไม่ทำงานและเซลล์อยู่ในที่ ๆ ไม่มีแสงสว่าง เซลล์จะมีวิธีการซ่อมแซมอีกระบบหนึ่งเรียกว่า โพสต์เรปพิลเคชั่น (postreplication) หรือ รีคอมบิเนชั่นรีแพร์ (recombination repair) การซ่อมแซมระบบนี้จะเกิดระหว่างการถ่ายทอดสารพันธุกรรม เกิดจากเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอร์เลสจะมาหยุดการทำงานที่ตำแหน่งที่เกิดไดเมอร์ และข้ามไปทำงานอีกครั้งเมื่อพบรหัสเริ่ม (start codon) ถัดไปที่อยู่หลังไดเมอร์นั้นออกไป ซึ่งจะทำให้สายพันธุกรรมในรุ่นลูก (daughter-stand) เกิดช่องว่าง (gap) ซึ่งอาจจะมีบริเวณกว้างถึง 1,000 นิวคลีโอไทด์ แต่สายพันธุกรรมรุ่นลูกที่เกิดช่องว่างนี้ สามารถใช้สายพันธุกรรมอีกเส้นหนึ่ง (homologus) ที่ถูกที่สังเคราะห์มาพร้อม ๆ กันนั้น เป็นต้นแบบ (template) ในการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์เพื่อไปซ่อมแซมช่องว่างที่เกิดขึ้นได้ (Singleton and Sainsbury, 1988)



รูปที่ 8 การซ่อมแซมสายดีเอ็นเอ 3 กระบวนการ (Aver, 1984)

(a) โฟโตรีเอกติเวชั่น

(b) เอ็กซ์ซีชั่น รีแพร์

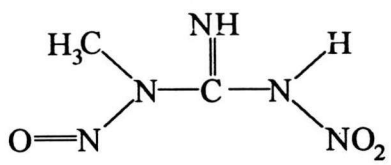
(c) โพสต์เรปพิลเคชั่น

การซ่อมแซมดีเอ็นเอของเซลล์นั้น อาจจะเกิดมีการผิดผลาดทำให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ใหม่หรือเปลี่ยนแปลงไป นำมาสู่การเกิดการกลายพันธุ์ซึ่งการซ่อมแซมดีเอ็นเอที่ผิดพลาดนี้เรียกว่า เออเรอ-โพรน รีแพร์ (error-prone repair) เรียกกระบวนการซ่อมแซมว่า เอสโอเอส รีแพร์ ซึ่งเป็นการแสดงออกของกลุ่มยีน เอสโอเอสยีน (*SOS* gene) การแสดงออกของยีนกลุ่มนี้ชักนำให้เกิดการซ่อมแซมซึ่งมาจากการแสดงออกของยีน *umc*D และ *umc*C การซ่อมแซมที่เกิดจากยีนทั้ง 2 นี้ นอกจากทำให้เซลล์กลับรอดชีวิตแล้วยังจะก่อให้เกิดการกลายพันธุ์อีกด้วย ซึ่งวิธีการซ่อมยังไม่ทราบแน่ชัดแต่มีการศึกษาพบว่า อาจจะเกิดจากการที่เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอร์เลสทำงานผ่านช่วงของดีเอ็นเอที่เสียหาย ซึ่งจะทำให้การตรวจสอบ

สารพันธุกรรม (proofreading) ของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอร์เลสลดลงเป็นผลให้ไม่มีการแก้ไข โดย เอ็กซ์ซีชั่น รีแพร์ หรือการแทนที่ดีเอ็นเอเบส (Strickberger, 1985)

<u>เอ็น-เมธิล-เอ็น-ไนโตร-เอ็น-ไนโตรโซกัวนิดีน</u> (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, NTG, MNNG, NG)

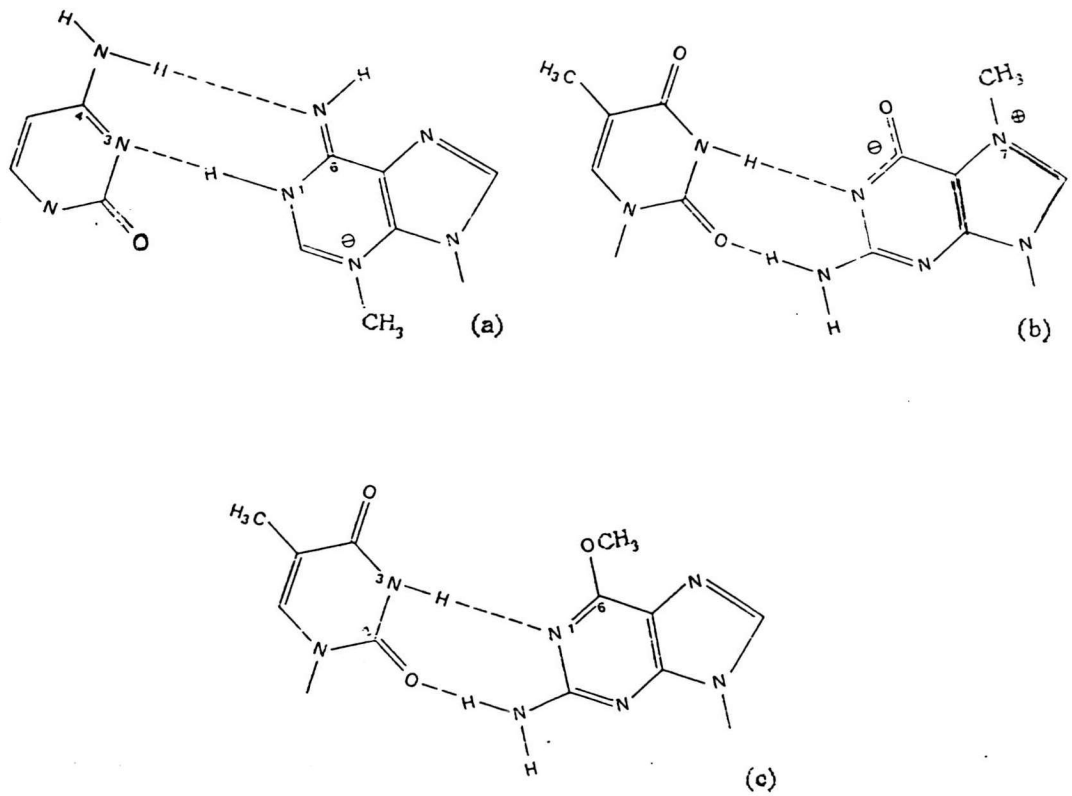
สังเคราะห์ครั้งแรกโดย Mckay และ Wright เมื่อปีค.ศ. 1947 ได้จากการเกิดปฏิกิริยาไนโตรเซชั่น (nitrozation) ระหว่าง เมธิลไนโตรกัวนิดีน (methylnitroguanidine) และโซเดียมไนไตรด์ (sodium nitrite) มีสูตรเคมีเป็น $C_2H_5N_5O_3$ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 147.10 ประกอบด้วย C 16.33%, H 3.43%, N 47.6% และ O 32.63% ลักษณะเป็นผลึกสีเหลือง มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 118 องศาเซลเซียส จุดเดือดที่อุณหภูมิ 123.5 องศาเซลเซียส ละลายในตัวทำละลายที่เป็นเบส (alkaline solution) จะได้แก๊ส มีความเสถียรเมื่อละลายอยู่ในน้ำที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีครึ่งชีวิตประมาณ (half-life) 40 ชั่วโมง เมื่อละลายอยู่ในฟอสเฟตซิตริก เอซิด บัปเฟอร์ (phosphate-citric acid buffer) pH 5.0 มีสูตรโครงสร้าง ดังรูปที่ 9



รูปที่ 9 โครงสร้างโมเลกุลของ NTG (Mckay and Wright, 1947)

มีคุณสมบัติเป็นสารก่อการกลายพันธุ์ (Mandell and Greenberg, 1960) ชนิดอัลคิเลติง เอเจนต์ จัดอยู่ในกลุ่มสารประกอบ เอ็น-ไนโตรโซ (N-nitroso) เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วงกรดจะสลายตัวให้กรดไนตรัส ทำปฏิกิริยากับโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ในรูปของเหลวจะได้ไดอะโซมีเธน (diazomethane) NTG จะเกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่เมธิลที่ตำแหน่ง N-3 ของอะดินีนกลายเป็น N^3-เมธิลอะดินีน (N^3-methyladenine) หรือ ไฮโปแซนทีน ซึ่งสามารถจะไปจับกับไซโตซีน แทนกัวนีน เติมหมู่เมธิลที่ตำแหน่ง N-7 ของกัวนีน กลายเป็น N^7-เมธิลกัวนีน (N^7-methylguanine) หรือ แซนทีน (Craddock, 1969)

หรือเติมหมู่เมธิลที่ตำแหน่ง O-6 ของกัวนีน กลายเป็น O^6-เมธิลกัวนีน (O^6-methylguanine) ซึ่งสามารถจะไปจับกับ ไทมีน แทน อะดินีน เป็นสาเหตุให้เกิดการ กลายพันธุ์ (Singleton and Sainsbury, 1988) แต่เซลล์จะสามารถแก้ไข O^6-เมธิลกัวนีน ให้กลับเป็น กัวนีน ปกติได้ โดยใช้เอนไซม์ เมธิลทรานส์เฟอเรส (methyltransferase) แต่การซ่อมแซมนี้ถ้าซ่อมแซมขณะที่สายดีเอ็นเอเป็นสายเดี่ยว จะช้ากว่าการซ่อมแซมขณะที่สายดีเอ็นเอเป็นสายคู่ (Lindahl et al., 1982)



รูปที่ 10 โครงสร้างโมเลกุลของดีเอ็นเบส เมื่อทำปฏิกิริยากับ NTG (Redei, 1982)

(a) N^3-เมธิลอะดินีน

(b) N^7-เมธิลกัวนีน

(c) O^6-เมธิลกัวนีน

NTG จะทำปฏิกิริยากับสายดีเอ็นเอ ขณะแยกสายคู่ เมื่อเกิดการถ่ายทอดพันธุกรรม (DNA replication fork) (Singleton and Sainsbury, 1988) แต่ยังไม่พบว่า NTG จะไปทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอเบสในกลุ่มไพริมิดีน (Lawley, 1968) ในเซลล์ที่เจริญอยู่ในช่วง log phase NTG จะทำให้นิวคลีโอไทด์เกิดการเปลี่ยนแปลงหลายๆ จุดบนโครโมโซม แต่ถ้าเซลล์เจริญอยู่ในช่วง stationary phase NTG จะทำให้เกิดการกลายพันธุ์เป็นจุดใหญ่ๆ เพียงจุดเดียวบนโครโมโซม (Botstein and Jone, 1969) NTG มีประสิทธิภาพสูงในการทำให้เกิดกลายพันธุ์ สามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ดีกว่าวิธีทางธรรมชาติถึง 10,000 เท่า และให้ผลดีกว่าการใช้แสง UV และ รังสีเอ็กซ์เรย์ 10-100 เท่า (Sinha and Chattoo, 1975) NTG สามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง และชั้นต่ำ ตัวอย่างเช่น

ในแบคทีเรีย *E. coli* ถ้าให้ปริมาณ NTG ที่จะทำให้เชื้อมีอัตราการรอดชีวิต 10^{-4} จะได้เชื้อสายพันธุ์กลายที่เป็นออกโซโทป (auxotrophs) 10 เปอร์เซนต์ (Mandell and Greenberg, 1960) และถ้าให้ปริมาณที่ทำให้เชื้อมีอัตราการรอดชีวิต 10^{-2} จะได้เชื้อสายพันธุ์กลายที่มีความไวต่ออุณหภูมิ (temperature-sensitive mutant) (Sinha and Chattoo, 1975) NTG มีผลต่อการสร้างสปอร์ใน *B. subtilis* (Piggot and Mandelstam, 1973) และ *Microsporum gypseum* (Sinha and Chattoo, 1975) และสามารถกลายพันธุ์ *Agrobacterium tumafaciens* ทำให้ได้เชื้อสายพันธุ์กลายที่ทนต่อสารปฏิชีวนะ (antibiotic-resistance mutant) (Sinha and Chattoo, 1975)

NTG สามารถชักนำให้ไวรัสเกิดการกลายพันธุ์แบบทรานซิชั่น เมื่ออยู่ในรูปอิสระได้สายพันธุ์กลายที่มีรูปร่างสมบรูณ์ดีกว่า เมื่อถูกชักนำในภาวะ RNA ที่ไม่มีเปลือกหุ้ม (Singer and Fraenkel-Conrat, 1967) ในแบคทีริโอเฟจ (bacteriophage) NTG สามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ต่อเมื่อเฟจนั้นเข้าสู่ (infect) เซลล์ (Goldfarb et al., 1966) ใน SV-40 ไวรัส เมื่อทำการกลายพันธุ์ด้วย NTG ที่ความเข้มข้นสูง ไวรัสที่อยู่นอกเซลล์จะมีประสิทธิภาพในการทำงานลดลง (inactivated) แต่ถ้าให้ NTG ที่ความเข้มข้นต่ำ ไวรัสที่อยู่ในเซลล์จะมีความสามารถในการจำลองตัวเองลดลง (Tegtmeyer et al., 1970) และจะได้เชื้อสายพันธุ์กลายที่มีความไวต่ออุณหภูมิ (Kimura and Dulbecco, 1972)

ในสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว *Anacystis nidulans* NTG จะทำให้เกิดเชื้อสายพันธุ์กลายที่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี และสัณฐานวิทยา (Balen, 1965) และถ้าทำการกลายพันธุ์ด้วย NTG และแสง UV จะได้เชื้อสายพันธุ์กลายที่ทนต่อสารปฏิชีวนะ สเตรปโตมัยซิน และ NTG ชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมทั้งบนโครโมโซม และนอกโครโมโซมในสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวทั่วไป (Sinha and Chattoo, 1975)

ในรา *Schizosaccharomyces pombe* เมื่อถูกทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG ในปริมาณที่ให้อัตราการรอดชีวิต 20 เปอร์เซนต์ จะได้เชื้อสายพันธุ์กลาย 8 เปอร์เซนต์ที่เป็นออกโซโทป (auxotroph mutant) (Megnet, 1965) ในการกลายพันธุ์ *Claviceps purpurea* ด้วย NTG จะได้เชื้อสายพันธุ์กลายที่สามารถสะสมสารอัลคาลอยด์ เพิ่มมากขึ้น (Kobel and Sanglier, 1973) และในการกลายพันธุ์ *Penicillium chrysogenum* ด้วย NTG จะได้เชื้อสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะเพนนิซิลลินเพิ่มมากขึ้น (Crueger and Cureger, 1987)

ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง NTG จะมีผลทั้งทำให้เกิดการกลายพันธุ์ และชักนำให้เกิดมะเร็ง (carcinogenic) ในข้าวบาร์เลย์การใช้ NTG ร่วมกับฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต เช่น กรดอินโดลีอะซิติก (indoleacetic acid) หรือ กรดอัลฟาเนฟธิลอะซิติก (α-naphthylacetic acid) จะทำให้อัตราการเกิดการกลายพันธุ์สูงขึ้น ที่เป็นเช่นนี้ได้เพราะว่าฮอร์โมนดังกล่าวมีส่วนเกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดพันธุกรรม และการแปลรหัสพันธุกรรม (transcription) (Sinha and Chattoo, 1975) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม NTG จะยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอมากกว่าเมื่อเทียบกับการใช้สารปฏิชีวนะสเตรปโตโซโทซิน (Streptozotocin) 1,000 เท่า (Kelly and Legator, 1971) ในหนูเมื่อให้ NTG ทางปากจะทำให้เกิดมะเร็งในกระเพาะอาหาร (Hashimoto et al., 1973) ในเซลล์ของลิงแอฟริกาสีเขียว (BS-C-1) NTG จะให้เกิดเซลล์สายพันธุ์กลายที่มีความไวต่ออุณหภูมิ (Naba, 1969) นอกจากนี้ NTG มีผลต่อการจัดเรียงตัวของเซลล์ตัวอ่อนของมนุษย์ (embryonic human diploid cells) ที่เลี้ยงไว้ (Sinha and Chattoo, 1975)

การกลายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สังเคราะห์สารปฏิชีวนะ

การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีความสามารถสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ นิยมใช้วิธีการกลายพันธุ์ เนื่องจากกลไกการควบคุมการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะที่เป็นสารทุติยภูมิยังไม่ทราบอย่างสมบูรณ์ การกลายพันธุ์นอกจากทำให้สามารถสังเคราะห์สารปฏิชีวนะได้เพิ่มมากขึ้นแล้ว ยังอาจจะทำให้สามารถสังเคราะห์สารปฏิชีวนะชนิดใหม่ขึ้นมาได้ การกลายพันธุ์นิยมใช้รังสี และสารเคมีกลุ่มต่าง ๆ ร่วมกัน และทำการกลายพันธุ์เป็นขั้น เพื่อให้จุลินทรีย์สามารถสังเคราะห์สารปฏิชีวนะได้เพิ่มขึ้นมาก และมีความเสถียรทางพันธุกรรม เช่น การ กลายพันธุ์ *P. chrysogenum* ทำให้สังเคราะห์เพนนิซิลลินได้เพิ่มมากขึ้นถึง 25,000 เท่า (จาก 20 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เป็น 50,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) โดยการกลายพันธุ์ด้วยธรรมชาติ และโดยการใช้สารก่อการกลายพันธุ์ UV, X-ray, NTG, EMS อย่างเป็นขั้นตอน (Riviere, 1977; Crueger and Cureger, 1987) *S. griseus* สายพันธุ์ดั้งเดิมซึ่งแยกได้จากดินในปี 1944 สามารถผลิตสาร

ปฏิชีวนะ สเตรปโตมัยซินได้ 50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อถูกทำให้กลายพันธุ์อย่างเป็นขั้นตอนมาเรื่อยๆ จนปี 1972 ได้สายพันธุ์ใหม่ที่สามารถผลิตสเตรปโตมัยซินได้ 15,000 ยูนิต ต่อมิลลิลิตร (Stanbury and Whitaker, 1984)

ในการสังเคราะห์คานามัยซินของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์ต่าง ๆ มีรายงานว่า Umezawa และคณะ (1960) ได้ทำการเพาะเลี้ยง *S. kanamyceticus* K-2J ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน และกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ในถังหมักขนาด 400 ลิตร สามารถผลิตคานามัยซินได้ในปริมาณ 550 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร Satoh และคณะ (1976) ได้ทำการเพาะเลี้ยง *S. kanamyceticus* 133-28 สามารถสังเคราะห์คานามัยซินได้ 110 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร Basak และ Majunda (1978) ได้เพาะเลี้ยง *S. kanamyceticus* ซึ่งสามารถสังเคราะห์คานามัยซินได้ 151 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การปรับปรุงสายพันธุ์ *S. kanamyceticus* ในการทำการกลายพันธุ์มักจะทำให้ได้เชื้อสายพันธุ์กลายที่มีความสามารถสังเคราะห์คานามัยซินสูง และทนต่อคานามัยซินเอง (Murakami et al., 1983) มีการทำการกลายพันธุ์ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์ K59-75 โดยการใช้ NTG หลาย ๆ ความเข้มข้น หลาย ๆ ช่วงเวลา ในสารละลายบัปเฟอร์ หลายๆ ชนิด พบว่าภาวะที่เหมาะสม คือ ในฟอสเฟตบัปเฟอร์ pH 6.0 ที่มีความเข้มข้นของ NTG 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเวลา 1-2 ชั่วโมง ซึ่งจะให้สายพันธุ์กลายพันธุ์ 2 สายพันธุ์ คือ K-102 และ K-41 ซึ่งสามารถสังเคราะห์คานามัยซินเพิ่มมากขึ้น 26% และ 43.68% ของ สายพันธุ์ K59-75 ตามลำดับ (Zhao et al., 1980) การกลายพันธุ์โดยใช้ ไตรเมธิลามีน (triethylamine) ที่ความเข้มข้น 1 ต่อ 100 หรือ 1 ต่อ 1000 ทำให้ได้เชื้อสายพันธุ์กลายของ *S. kanamyceticus* ที่มีความสามารถสังเคราะห์คานามัยซินได้มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น (Duseeva and Zabirova, 1971) การกลายพันธุ์สปอร์ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์ที่ทนต่อคานามัยซินเองด้วยรังสีแกมม่า เข้มข้น $1\text{-}5\text{x}10^4$ R ทำให้ได้เชื้อสายพันธุ์กลายที่ทนต่อคานามัยซินได้ถึง 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถสังเคราะห์คานามัยซินได้มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 33% (Zhao and Du, 1983) การตัดต่อยีน 6-เอ็น-อะซิธิลทรานสเฟอร์เรส (6'-N-acetyltranferase) ของ *S. kanamyceticus* สายพันธุ์ M1164 ลงในเวกเตอร์ pIJ702 ซึ่งมีคุณสมบัติในการจำลองตัวเองสูง (high copy number) และ ทรานส์ฟอร์ม (transform) เข้าใน *S. kanamyceticus* ATCC 12853 จะได้สายพันธุ์ที่ทนต่อคานามัยซินเพิ่มขึ้น และมีความสามารถสังเคราะห์คานามัยซินเพิ่มมากขึ้นเป็น 360 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Crameri and Davies, 1986)

ในงานวิจัยนี้ ใช้วิธีการกลายพันธุ์ ปรับปรุงสายพันธุ์ *Streptomyces kanamyceticus* สายพันธุ์ K1 ซึ่งมีคุณสมบัติในการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะคานามัยซิน (kanamycin) โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet, UV) และสารเคมี เอ็น-เมธิล-เอ็น-ไนโตร-เอ็น-ไนโตรโซกัวนิดีน (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, NTG, MNNG, NG) โดยคาดว่าจะได้สายพันธุ์กลายที่มีความสามารถสังเคราะห์สารปฏิชีวนะคานามัยซินได้สูงขึ้นจากสายพันธุ์ตั้งต้น และมีความเสถียรทางพันธุกรรม

<u>ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย</u>

ได้เชื้อ *Streptomyces kanamyceticus* สายพันธุ์ใหม่ที่สามารถสังเคราะห์คานามัยซินได้สูงขึ้น และข้อมูลที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ในการกลายพันธุ์ขั้นต่อไป และนำไปใช้ในการผลิตคานามัยซินในระดับขยายส่วนต่อไป

<u>ขั้นตอนการวิจัย</u>

1. หาภาวะที่เหมาะสมในการชักนำ *S. kanamyceticus* ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสง UV และ NTG
2. ชักนำ *S. kanamyceticus* ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสง UV และ NTG
3. คัดเลือกสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตคานามัยซินสูงขึ้น โดยวิเคราะห์ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา และ HPLC
4. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสายพันธุ์กลาย และความเสถียรทางพันธุกรรม