บทที่ 3

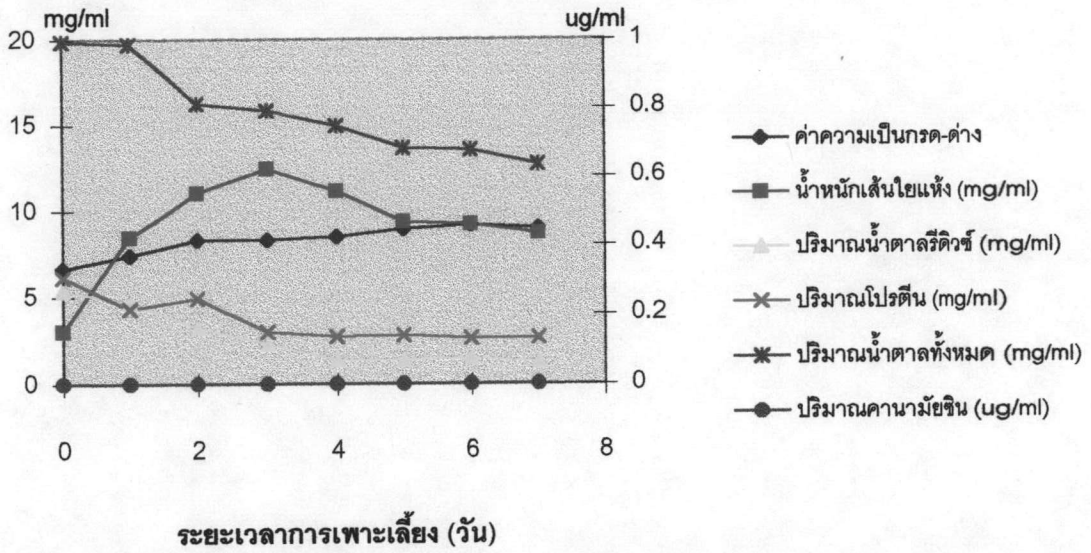
ผลการวิจัย

1. การคัดเลือกสายพันธุ์กลายของ *Streptomyces kanamyceticus*

จากการนำสายพันธุ์กลายจำนวน 3 สายพันธุ์คือ UUNK15 , UUNNK1 และ UUNNK 25 ที่ได้จากการศึกษาของศรสดมภ์ ขัติยะวรา (2539) โดยสายพันธุ์กลายดังกล่าวสามารถผลิตคานามัยซินได้ 130 , 150 และ 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ มาทำการคัดเลือกให้ได้สายพันธุ์กลายที่ดีที่สุดในการผลิตคานามัยซินเพื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น K1 ซึ่งให้ผลดังตารางที่ 4 รูปที่ 7 , ตารางที่ 5 รูปที่ 8, ตารางที่ 6 รูปที่ 9 และตารางที่ 7 รูปที่ 10 ตามลำดับ

ตารางที่ 4 แสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณโปรตีนและปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNK15 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี (KPMB) เป็นเวลา 7 วัน

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเส้นใยแห้ง (mg/ml)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (mg/ml)	ปริมาณคานามัยซิน (μg/ml)
0	6.61	9.02	5.35	6.13	19.87	0
1	7.37	8.44	4.67	4.30	19.70	0
2	8.27	11.00	3.23	4.91	16.20	0
3	8.29	12.38	2.29	2.96	15.80	0
4	8.46	11.10	1.38	2.71	14.90	0
5	8.90	9.17	1.36	2.79	13.63	0
6	9.11	9.30	1.48	2.61	13.50	0
7	8.96	8.64	1.26	2.63	12.66	0

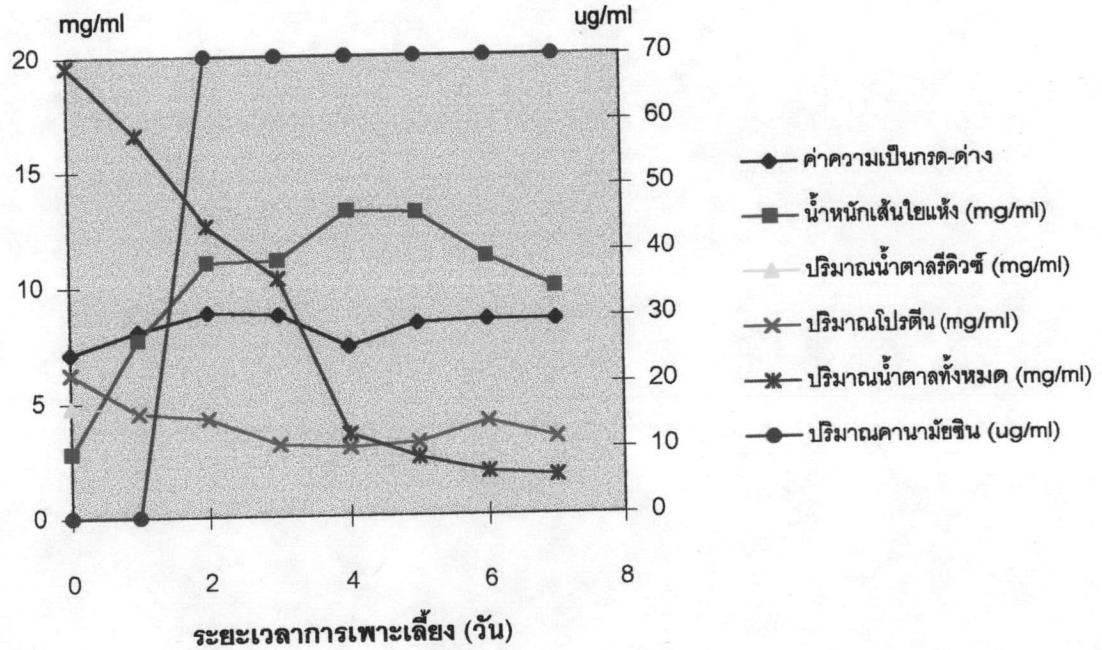


รูปที่ 7 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณโปรตีน ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณคานามัยซิน ของสายพันธุ์กลาย UUNK15

จากรูปที่ 7 พบว่าระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 7 วัน น้ำหนักเส้นใยแห้งของสายพันธุ์ UUNK15 จะค่อย ๆเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีค่าเท่ากับ 12.38 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นจะลดลงจนกระทั่งถึงวันที่ 7 น้ำหนักเส้นใยแห้งจะเหลือเพียง 8.64 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะค่อย ๆเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 7 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เริ่มต้นจาก 19.87 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ถูกนำไปใช้จนเหลือ 12.66 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะค่อย ๆ ลดลงจาก 5.35 มาเป็น 1.26 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณโปรตีนจะลดลงเช่นกันจากปริมาณ 6.13 เป็น 2.63 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้สายพันธุ์ UUNK15 ไม่สามารถผลิตคานามัยซินได้ จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการทดลองต่อ ๆ ไป

ตารางที่ 5 แสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณโปรตีนและปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี เป็นเวลา 7 วัน

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเส้นใยแห้ง (mg/ml)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (mg/ml)	ปริมาณคานามัยซิน (µg/ml)
0	7.10	2.80	4.79	6.25	19.57	0
1	8.05	7.70	4.65	4.54	16.60	0
2	8.85	11.00	4.02	4.27	12.60	70
3	8.73	11.10	3.57	3.13	10.30	70
4	7.37	13.24	3.52	2.99	3.57	70
5	8.34	13.14	3.09	3.17	2.53	70
6	8.48	11.21	1.09	4.08	1.89	70
7	8.46	9.86	0.89	3.34	1.69	70

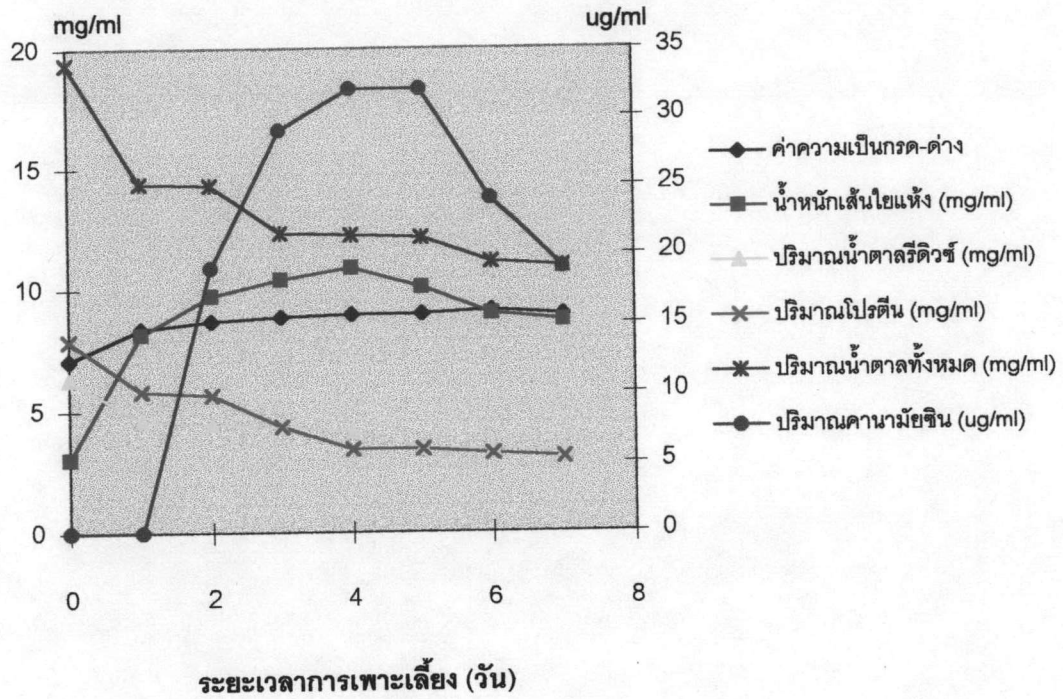


รูปที่ 8 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณโปรตีน ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์กลาย UUNNK1

จากรูปที่ 8 พบว่าน้ำหนักเส้นใยแห้งของสายพันธุ์ UUNNK1 จะสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเป็น 13.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วจะลดลงเหลือ 9.86 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง ค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะอยู่ในช่วง 7.10-8.46 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เริ่มต้นจาก 19.57 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ถูกนำไปใช้จนเหลือเพียง 1.69 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะค่อยๆ ลดลงจาก 4.79 มาเป็น 0.89 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณโปรตีนจะลดลงเช่นกันจากปริมาณ 6.25 เป็น 3.34 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้สายพันธุ์ UUNNK1 สามารถผลิตคานามัยซินได้สูงสุดถึง 70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตั้งแต่วันที่ 2 จนถึงวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง

ตารางที่ 6 แสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณโปรตีนและปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK25 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี เป็นเวลา 7 วัน

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเส้นใยแห้ง (mg/ml)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (mg/ml)	ปริมาณคานามัยซิน (μg/ml)
0	7.08	3.03	6.31	7.88	19.35	0
1	8.35	8.15	4.60	5.80	14.35	0
2	8.67	9.72	4.43	5.65	14.28	19
3	8.84	10.38	4.32	4.34	12.30	29
4	8.93	10.85	4.11	3.41	12.20	32
5	8.97	10.05	3.47	3.39	12.10	32
6	9.09	8.96	3.38	3.21	11.10	24
7	8.90	8.68	3.28	3.07	10.90	19

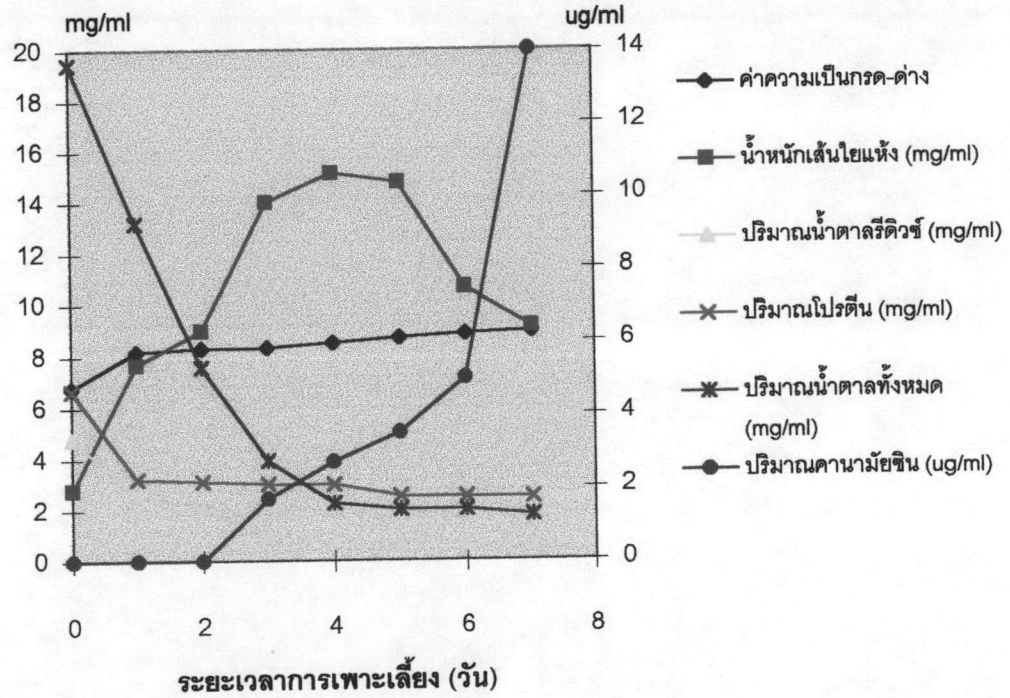


รูปที่ 9 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณโปรตีน ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณคานามัยซิน ของสายพันธุ์กลาย UUNNK25

จากรูปที่ 9 พบว่าน้ำหนักเส้นใยแห้งของสายพันธุ์ UUNNK25 จะเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีค่าเท่ากับ 10.85 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นจะลดลงในวันที่ 7 จะเหลือน้ำหนักเส้นใยแห้ง 8.68 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะอยู่ในช่วง 7.08-8.90 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เริ่มต้นจาก 19.35 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ถูกนำไปใช้จนเหลือ 10.90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะค่อยๆ ลดลงจาก 6.31 มาเป็น 3.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณโปรตีนจะลดลงเช่นกันจากปริมาณ 7.88 เป็น 3.07 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้สายพันธุ์ UUNNK25 สามารถผลิตคานามัยซินได้สูงสุด 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 7 แสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณโปรตีนและปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ K1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี เป็นเวลา 7 วัน

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเส้นใยแห้ง (mg/ml)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (mg/ml)	ปริมาณคานามัยซิน (µg/ml)
0	6.75	2.78	4.77	6.65	19.44	0
1	8.17	7.66	2.55	3.21	13.21	0
2	8.29	8.97	2.11	3.11	7.55	0
3	8.31	14.02	0.93	3.02	3.92	2
4	8.49	15.14	0.78	2.99	2.24	3
5	8.70	14.78	0.71	2.54	2.01	4
6	8.85	10.68	0.61	2.51	2.00	5
7	8.94	9.14	0.55	2.48	1.77	14



รูปที่ 10 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณโปรตีน ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณคานามัยซิน ของสายพันธุ์ตั้งต้น K1

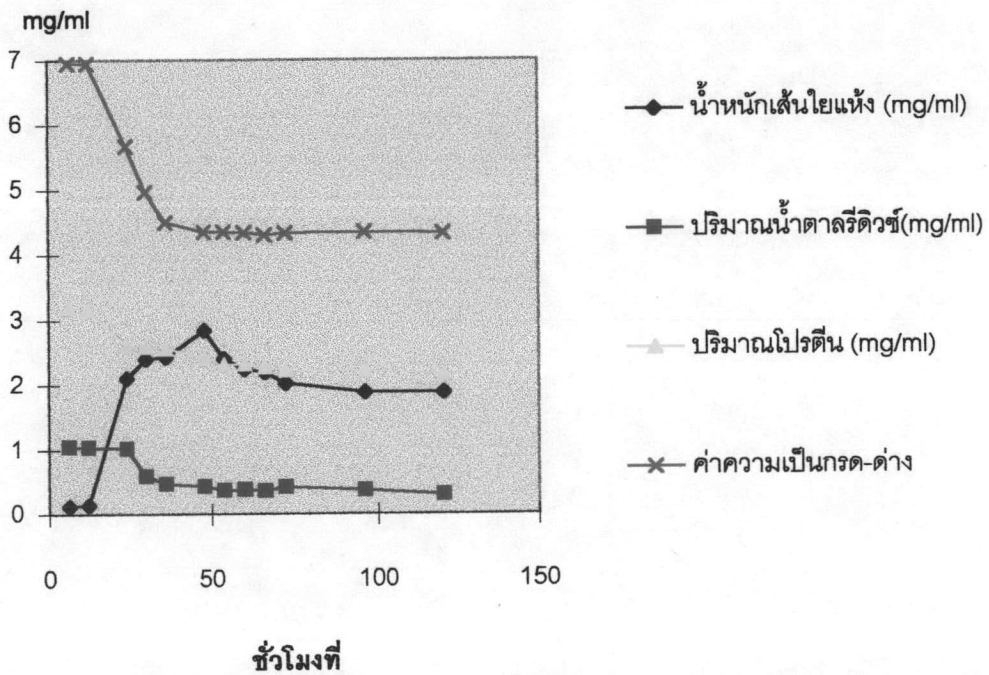
จากรูปที่ 10 พบว่าน้ำหนักเส้นใยแห้งของสายพันธุ์ตั้งต้น K1 จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นจาก 2.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 0 จนถึง 15.14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นจะลดลงจนถึงวันที่ 7 โดยจะเหลือน้ำหนักเส้นใยแห้ง 9.14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะอยู่ในช่วง 6.75-8.94 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เริ่มต้นจาก 19.44 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ถูกนำไปใช้จนเหลือ 1.77 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะค่อยๆ ลดลงจาก 4.77 มาเป็น 0.55 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณโปรตีนจะลดลงเช่นกันจากปริมาณ 6.65 เป็น 2.48 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้สายพันธุ์ K1 สามารถผลิตคานามัยซินได้สูงสุด 14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 7 ซึ่งน้อยกว่าสายพันธุ์กลาย UUNNK1 และ UUNNK25 เป็น 5 เท่า และ 2.3 เท่าตามลำดับ

2. ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงและอัตราการเจริญของสายพันธุ์กลายที่คัดเลือก

จากการศึกษาข้อ 1 พบว่าสายพันธุ์กลายที่เหมาะสมที่จะนำมาศึกษาต่อไป คือ *S. kanamyceticus* UUNNK1 ดังนั้นจึงนำสายพันธุ์ดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงเพื่อหาช่วงระยะเวลาเหมาะสมที่ทำให้มีอัตราการเจริญสูงสุด โดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจีพีวาย ตามวิธีทดลองข้อ 4.1 ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง ของระยะเวลาการเพาะเลี้ยงตั้งแต่ 6- 120 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปปั่นแยกเส้นใยออกจากส่วนน้ำใส นำเส้นใยมาล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ไปชั่งน้ำหนักเส้นใยแห้งด้วยเครื่องชั่งละเอียด เพื่อวัดอัตราการเจริญ ส่วนน้ำใสที่แยกได้นำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้วิธีดีเอ็นเอสเอ (DNSA method) (ภาคผนวก ค) วัดความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter) ให้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 8 และรูปที่ 11

ตารางที่ 8 แสดงผลของระยะเวลา น้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณโปรตีนของสายพันธุ์ UUNNK1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวจีพีวาย ที่ชั่วโมงต่าง ๆ

ชั่วโมงที่	น้ำหนักเส้นใยแห้ง (mg/ml)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
6	0.12	1.04	3.20	6.95
12	0.14	1.04	3.16	6.95
24	2.10	1.02	2.61	5.68
30	2.40	0.59	2.59	4.97
36	2.43	0.46	2.56	4.50
48	2.84	0.43	2.42	4.35
54	2.40	0.37	2.31	4.35
60	2.24	0.38	2.32	4.34
66	2.19	0.35	2.27	4.30
72	2.02	0.41	2.22	4.33
96	1.88	0.37	2.21	4.35
120	1.88	0.30	2.16	4.33



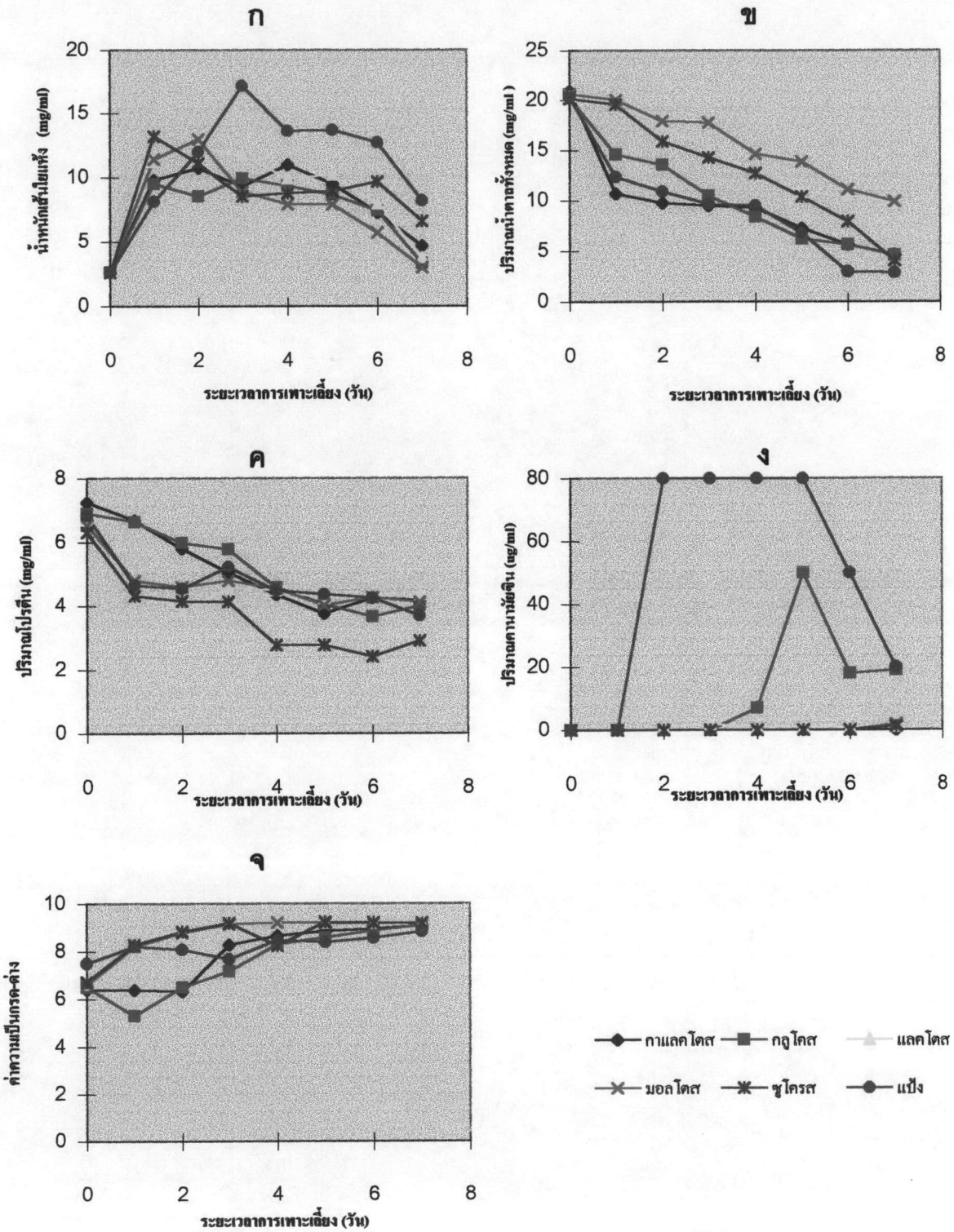
รูปที่ 11 กราฟแสดงผลของระยะเวลา น้ำหนักเส้นใยแห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณโปรตีนของสายพันธุ์ UUNNK1 เมื่อเลี้ยงในอาหารจีพีวาย

จากผลการทดลองเมื่อทำการเพาะเลี้ยงสายพันธุ์ UUNNK1 ในอาหารเหลวจีพีวาย เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมของการเจริญสูงสุด โดยวัดจากน้ำหนักเส้นใยแห้ง พบว่าเชื้อจะมีการเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 โดยมีน้ำหนักเส้นใยแห้งเป็น 2.84 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างจะลดลงจาก 6.95 เหลือ 4.33 ในชั่วโมงที่ 120 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงจาก 1.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็น 0.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณโปรตีนจะลดลงจาก 3.20 เป็น 2.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในชั่วโมงที่ 120 ดังนั้นจึงได้ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวจีพีวายเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนจะย้ายไปลงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี เพื่อทำการทดลองขั้นต่อไป

3. การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 ในระดับขวดเขย่า

3.1 การคัดเลือกแหล่งคาร์บอนและปริมาณที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตคานามัยซิน

จากการศึกษาในข้อ 1 พบว่าสายพันธุ์ UUNNK1 มีความเสถียรทางพันธุกรรมและสามารถผลิตคานามัยซินได้ 70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จึงนำมาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตคานามัยซินต่อไป โดยนำเส้นใยของสายพันธุ์ UUNNK1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวจีพีวายเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามการศึกษาในข้อ 2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี ตามวิธีทดลองข้อ 4.2 โดยเปลี่ยนสูตรอาหารให้มีชนิดของแหล่งคาร์บอนหลักแตกต่างกัน 6 ชนิด คือ แป้ง มอลโตส แลคโตส กลูโคส กาแลคโตส และซูโครส ที่ปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร นำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณโปรตีนและค่าความเป็นกรด-ด่าง ตามวิธีทดลองในข้อ 6 วิเคราะห์ปริมาณคานามัยซินด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา ตามวิธีทดลองในข้อ 5.1 ผลของการแปรผันชนิดแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตคานามัยซินแสดงในรูปที่ 12 และตารางที่ 9



รูปที่ 12 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง (ก) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ข) ปริมาณโปรตีน (ค) ปริมาณคานามัยซิน (ง) และค่าความเป็นกรด-ด่าง (จ) เมื่อมีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

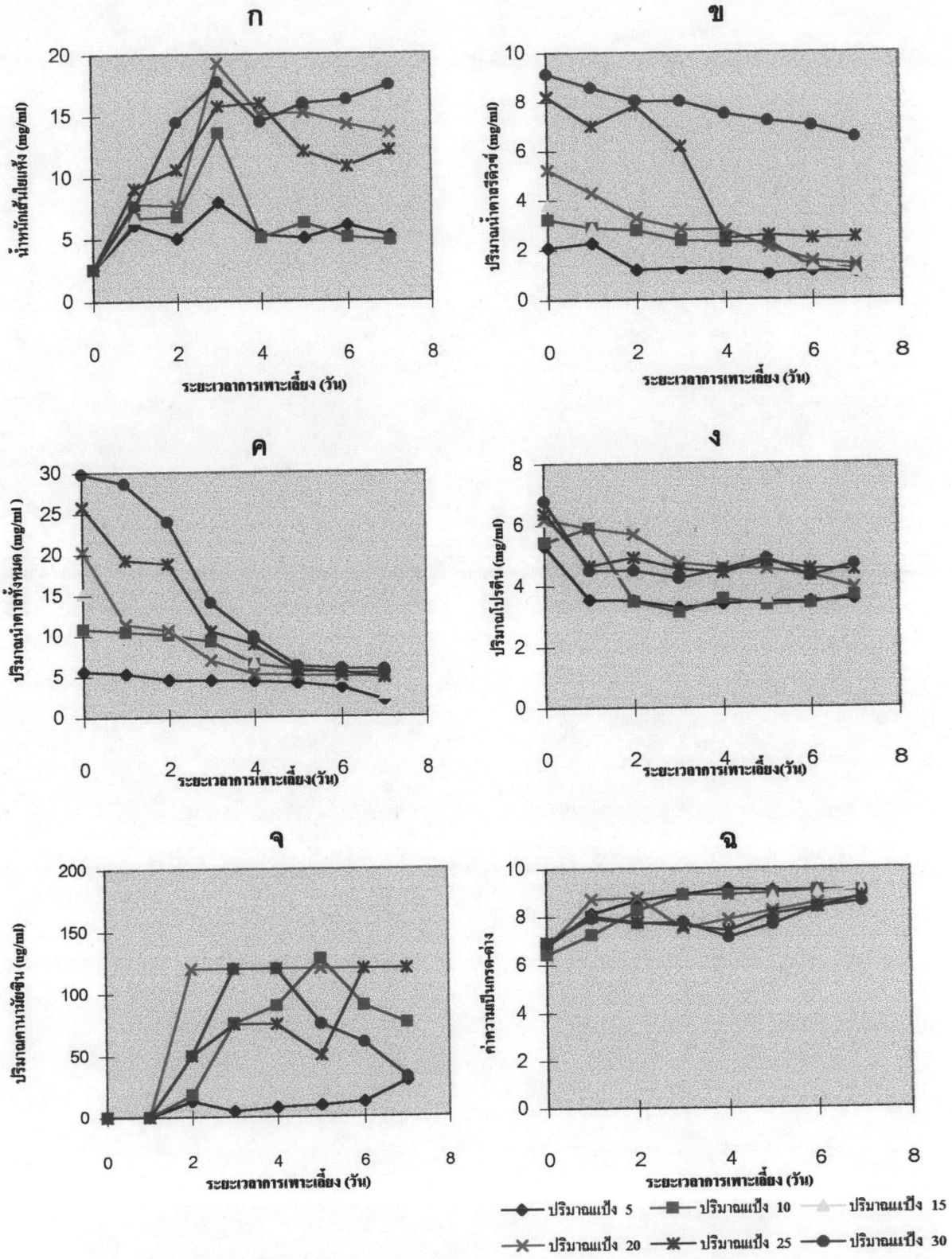
จากรูปที่ 12 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน พบว่าแป้งจะให้น้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุด เป็น 17.18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง รองลงมาคือซูโครส จะให้น้ำหนักเส้นใยแห้ง 13.22 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนมอลโตสและแลคโตสให้ผลใกล้เคียงกันกล่าวคือจะให้น้ำหนักเส้นใยแห้งเป็น 12.98 และ 12.33 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง กาแลคโตสให้น้ำหนักเส้นใยแห้ง 10.96 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และกลูโคสให้น้ำหนักเส้นใยแห้งน้อยที่สุดเป็น 9.88 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน จะอยู่ในช่วง 6.41-9.17 สำหรับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดนั้น พบว่าเมื่อใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหาร จะมีการใช้น้ำตาลมากที่สุด และเมื่อใช้ซูโครส กลูโคส และกาแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน จะมีการใช้น้ำตาลมากรองลงมา ส่วนแลคโตสและมอลโตสมีการใช้น้ำตาลน้อยที่สุด นอกจากนี้สายพันธุ์ UUNNK1 สามารถผลิตคานามัยซินได้สูงสุด 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 2 จนถึงวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเมื่อใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อใช้กลูโคส สามารถผลิตคานามัยซินได้ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อใช้มอลโตส แลคโตส และซูโครส จะผลิตคานามัยซินได้เพียง 2 1 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนกาแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ไม่เหมาะสมต่อการผลิตคานามัยซิน (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 แสดงปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 ที่มีชนิดของแหล่งคาร์บอนหลักแตกต่างกัน

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง(วัน)	ปริมาณคานามัยซิน (μg/ml)					
	แหล่งคาร์บอน					
	กาแลคโตส	กลูโคส	แลคโตส	มอลโตส	ซูโครส	แป้ง
0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	1	0	เล็กน้อย	80
3	0	0	2	0	เล็กน้อย	80
4	เล็กน้อย	7	1	เล็กน้อย	เล็กน้อย	80
5	เล็กน้อย	50	1	เล็กน้อย	เล็กน้อย	80
6	เล็กน้อย	19	1	เล็กน้อย	เล็กน้อย	50
7	เล็กน้อย	19	1	2	1	20

3.1.1 การแปรผันปริมาณแป้งที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากข้อ 3.1 พบว่า แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตคานามัยซินคือแป้ง จึงนำเส้นใยของสายพันธุ์ UUNNK1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวจีพีวาย เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี โดยเปลี่ยนสูตรอาหารให้มีการแปรผันปริมาณของแหล่งคาร์บอนหลักที่คัดเลือกได้คือแป้ง เป็น 5 10 15 20 25 และ 30 กรัมต่อลิตร โดยปริมาณแป้งที่ใช้ในสูตรอาหารเหลวเคพีเอ็มบีเดิม คือ 20 กรัมต่อลิตร นำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณโปรตีนและค่าความเป็นกรด-ด่างวิเคราะห์ปริมาณคานามัยซินด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา ผลของการแปรผันปริมาณแป้งที่เหมาะสมเพื่อการผลิตคานามัยซิน แสดงในรูปที่ 13 และตารางที่ 10



รูปที่ 13 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง (ก) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ข) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ค) ปริมาณโปรตีน (ง) ปริมาณคานามัยซิน (จ) และค่าความเป็นกรด-ด่าง (ฉ) เมื่อทำการแปรผันปริมาณแป้ง

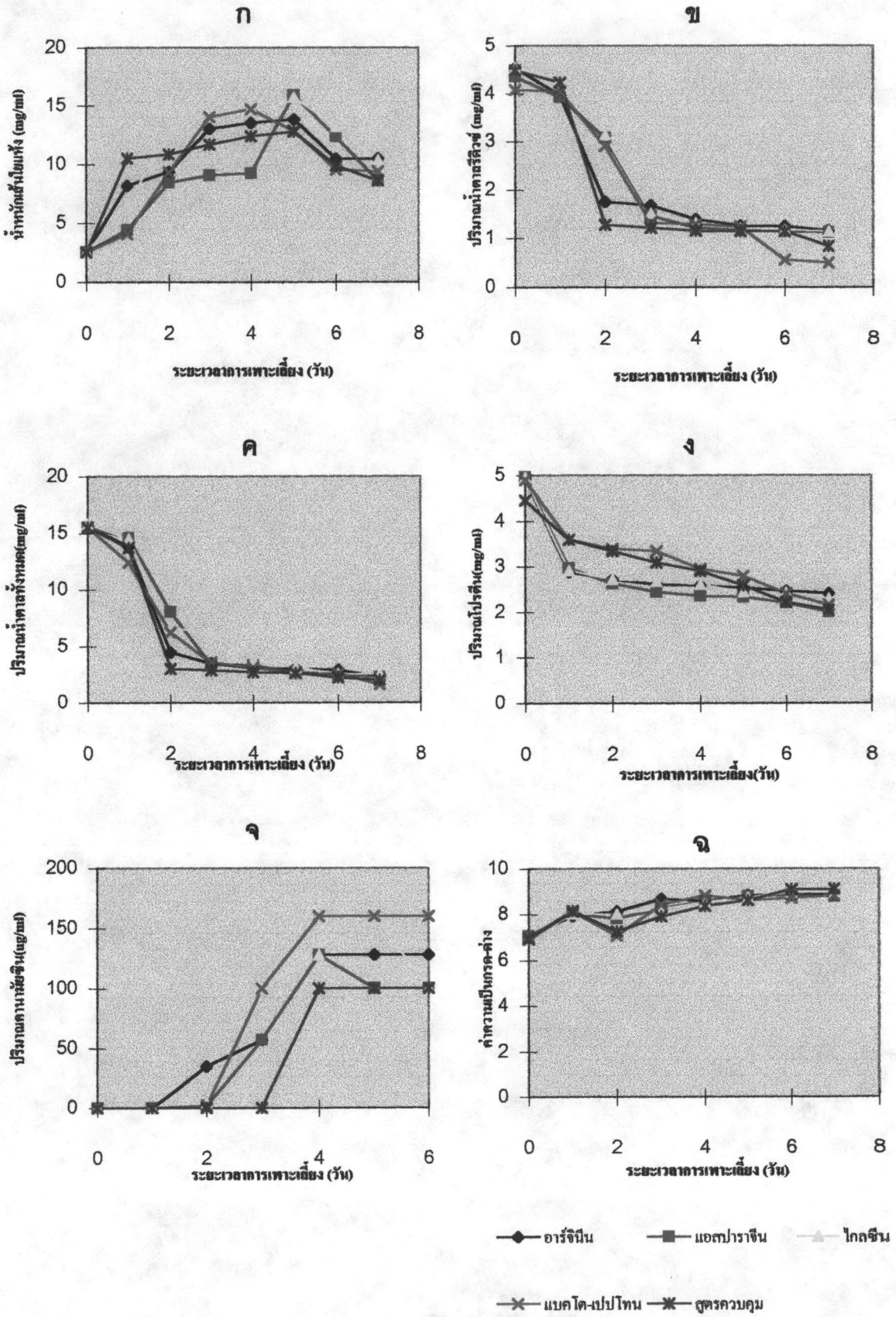
จากรูปที่ 13 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีปริมาณแป้งแตกต่างกัน พบว่าเมื่อใช้แป้ง 20 กรัมต่อลิตรจะให้น้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุดเป็น 19.27 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง น้ำหนักเส้นใยแห้งจะน้อยรองลงมาเมื่อใช้แป้งที่ 30 กรัมต่อลิตร จะให้น้ำหนักเส้นใยแห้ง 17.74 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนแป้งที่ 25 และ 15 กรัมต่อลิตรให้น้ำหนักเส้นใยแห้งใกล้เคียงกันคือ 15.98 ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง และ 15.88 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ แป้งที่ 10 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักเส้นใยแห้ง 13.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนแป้ง 5 กรัมต่อลิตรไม่เหมาะสมต่อการสร้างเส้นใยของสายพันธุ์นี้ ค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งต่างกัน จะอยู่ในช่วง 6.76-9.13 สำหรับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของปริมาณแป้งทั้ง 6 ความเข้มข้น พบว่าเมื่อใช้แป้งที่ 30 กรัมต่อลิตรจะมีการใช้น้ำตาลมากที่สุด และเมื่อใช้แป้งที่ 25 กรัมต่อลิตรจะมีการใช้น้ำตาลมากรองลงมา ส่วนแป้งที่ 20 15 10 และ 5 กรัมต่อลิตรมีการใช้น้ำตาลลดลงตามลำดับ ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะมีการลดลงมากที่สุดเมื่อใช้แป้ง 25 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือแป้ง 20 กรัมต่อลิตร ส่วนแป้งที่ปริมาณ 30 15 10 และ 5 มีการใช้ลดลงตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าแป้งที่ 15 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตคานามัยซินได้มากที่สุด เป็น 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 4 จนถึงวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง และเมื่อใช้แป้งที่ 10 กรัมต่อลิตร จะผลิตคานามัยซินได้ 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนแป้งที่ 20 25 และ 30 กรัมต่อลิตรมีการผลิตคานามัยซินเท่ากัน คือ 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 2 วันที่ 6 และวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ ดังนั้นแป้งที่ 15 กรัมต่อลิตรจึงเหมาะสมที่สุดที่ใช้ในการผลิตคานามัยซิน (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 แสดงปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 ที่มีปริมาณแป้งแตกต่างกัน

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	ปริมาณคานามัยซิน (μg/ml) ปริมาณแป้ง (g/l)					
	5	10	15	20	25	30
0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0
2	13	18	128	120	50	50
3	4	76	128	120	75	120
4	8	90	160	120	75	120
5	9	128	160	120	50	75
6	12	90	160	120	120	60
7	29	76	160	120	120	32

3.2 การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนรองที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากข้อ 3.1 พบว่า ปริมาณแป้งที่เหมาะสมในการสร้างคานามัยซินได้แก่ แป้ง 15 กรัมต่อลิตร จึงนำเส้นใยของสายพันธุ์ UUNNK1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวจีพีวาย เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี โดยเปลี่ยนสูตรอาหารให้มีแหล่งไนโตรเจนรองต่างกัน 5 ชนิดคือ อาร์จินีน แอสปาราจีน ไกลซีน แบคโต-เปปโทน โดยมีปริมาณของแหล่งไนโตรเจนรองเป็น 0.06065 กรัมไนโตรเจนต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเทียบเท่ากับแบคโต-เปปโทน 3 กรัมต่อลิตร ในสูตรอาหารเหลวเคพีเอ็มบีเดิม ทำการเปรียบเทียบกับสูตรอาหารควบคุม (control) ที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจนรองในอาหาร นำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณโปรตีนและค่าความเป็นกรด-ด่าง และวิเคราะห์ปริมาณคานามัยซิน ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา ผลของการคัดเลือกชนิดแหล่งไนโตรเจนรองเพื่อการผลิตคานามัยซินแสดงในรูปที่ 14 และตารางที่ 11



รูปที่ 14 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง (ก) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ข) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ค) ปริมาณโปรตีน (ง) ปริมาณคานามัยซิน (จ) และค่าความเป็นกรด-ด่าง (ฉ) เมื่อมีแหล่งไนโตรเจนรองในอาหารแตกต่างกัน

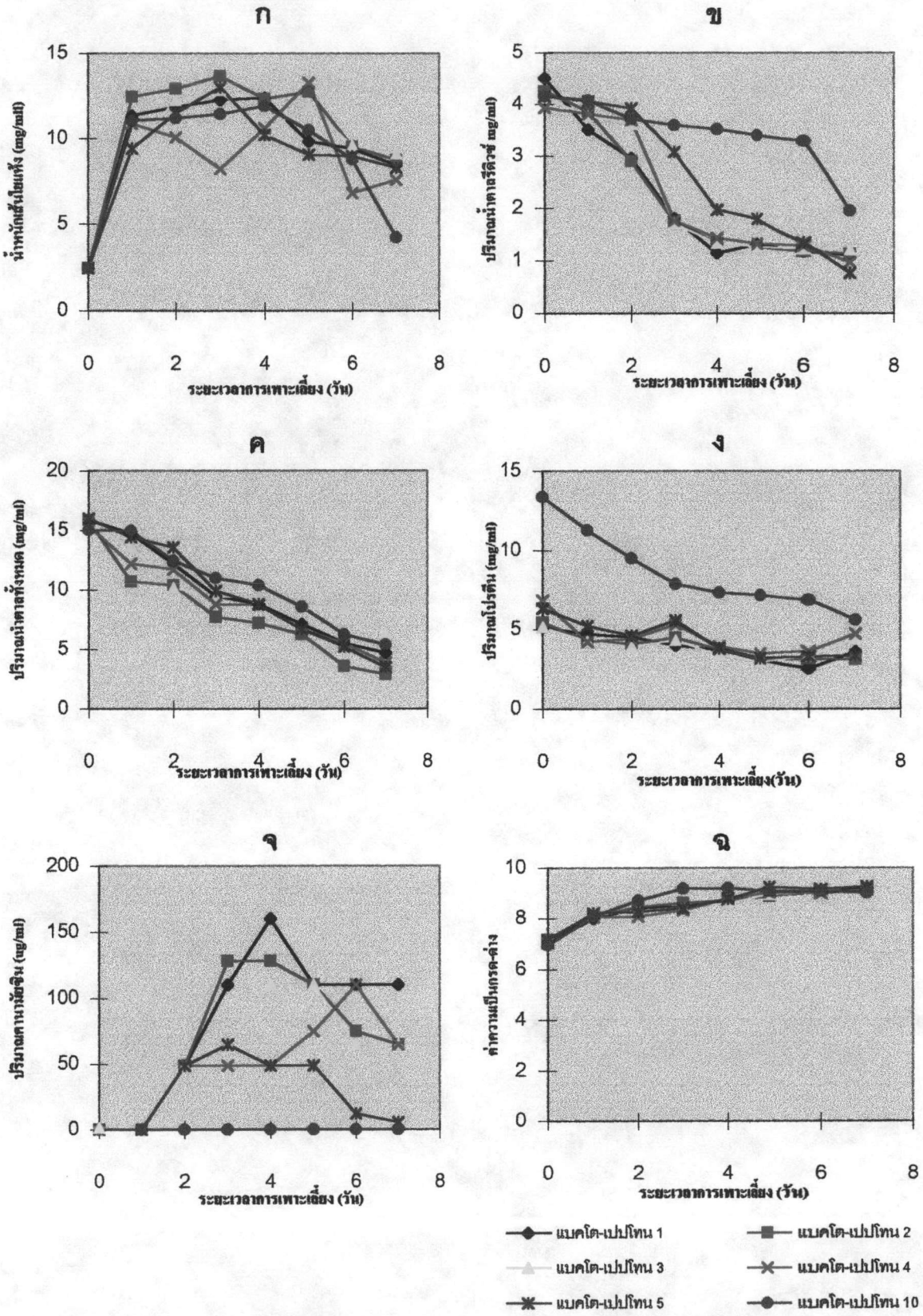
จากรูปที่ 14 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีแหล่งไนโตรเจนรองแตกต่างกัน พบว่าแอสปาราจีน จะให้น้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุด คือเป็น 15.90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง รองลงมาคือไกลซีน โดยมีน้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุดใกล้เคียงกันคือ 15.88 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนแบคโต-เปปโทน และอาร์จินีนให้น้ำหนักเส้นใยแห้งเป็น 14.72 ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง และ 13.82 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ ซึ่งแหล่งไนโตรเจนรองทุกชนิดให้น้ำหนักของเส้นใยแห้งมากกว่าสูตรอาหารควบคุม ค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนรองต่างกัน จะอยู่ในช่วง 6.91-8.8 สำหรับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของแหล่งไนโตรเจนรองทั้ง 4 ชนิดนั้น พบว่าเมื่อใช้แบคโต-เปปโทนจะมีการลดลงของน้ำตาลมากที่สุด จะเหลือ 1.27 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนแหล่งไนโตรเจนอื่นมีการใช้น้ำตาลใกล้เคียงกัน ในส่วนของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะให้ผลเช่นเดียวกับปริมาณน้ำตาลทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบว่าแบคโต-เปปโทนทำให้มีการผลิตคานามัยซิน มากที่สุด เป็น 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเท่ากับไกลซีน แต่ไกลซีนจะผลิตคานามัยซินได้ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง รองลงมาคือแอสปาราจีนและอาร์จินีน ผลิตได้ 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งแหล่งไนโตรเจนรองทุกชนิดจะผลิตได้มากกว่าสูตรอาหารควบคุม ดังนั้นแบคโต-เปปโทนจึงเหมาะสมที่สุดที่ใช้ในการผลิตคานามัยซิน เนื่องจากผลิตได้เร็วกว่าไกลซีน (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 แสดงปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 ที่มีแหล่งไนโตรเจนรองแตกต่างกัน

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	ปริมาณคานามัยซิน (μg/ml) ชนิดแหล่งไนโตรเจนรอง				
	อาร์จินีน	แอสปาราจีน	ไกลซีน	แบคโต-เปปโทน	สูตรควบคุม
0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0
2	35	2	4	2	เล็กน้อย
3	57	57	100	100	เล็กน้อย
4	128	128	128	160	100
5	128	100	160	160	100
6	128	100	100	160	100
7	128	100	100	128	100

3.2.1 การแปรผันปริมาณแบคโต-เปปโทนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากข้อ 3.2 พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมใช้ในการผลิตคานามัยซิน ได้แก่ แบคโต-เปปโทน ดังนั้นจึงนำเส้นใยของสายพันธุ์ UUNNK1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวจีพีวาย เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี โดยเปลี่ยนสูตรอาหารให้มีการแปรผันปริมาณ แบคโต-เปปโทนเป็น 1 2 3 4 5 และ 10 กรัมต่อลิตร โดยแบคโต-เปปโทนที่ใช้ในสูตรอาหารเหลวเคพีเอ็มบีเดิมคือ 3 กรัมต่อลิตร นำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณโปรตีน และค่าความเป็นกรด-ด่าง วิเคราะห์ปริมาณคานามัยซินด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา ผลของการแปรผันปริมาณแบคโต-เปปโทน เพื่อการผลิตคานามัยซินแสดงในรูปที่ 15 และตารางที่ 12



รูปที่ 15 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง (ก) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ข) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ค) ปริมาณโปรตีน (ง) ปริมาณคานามัยซิน (จ) และค่าความเป็นกรด-ด่าง (ฉ) เมื่อทำการแปรผันปริมาณแบคโต-เปปโทน

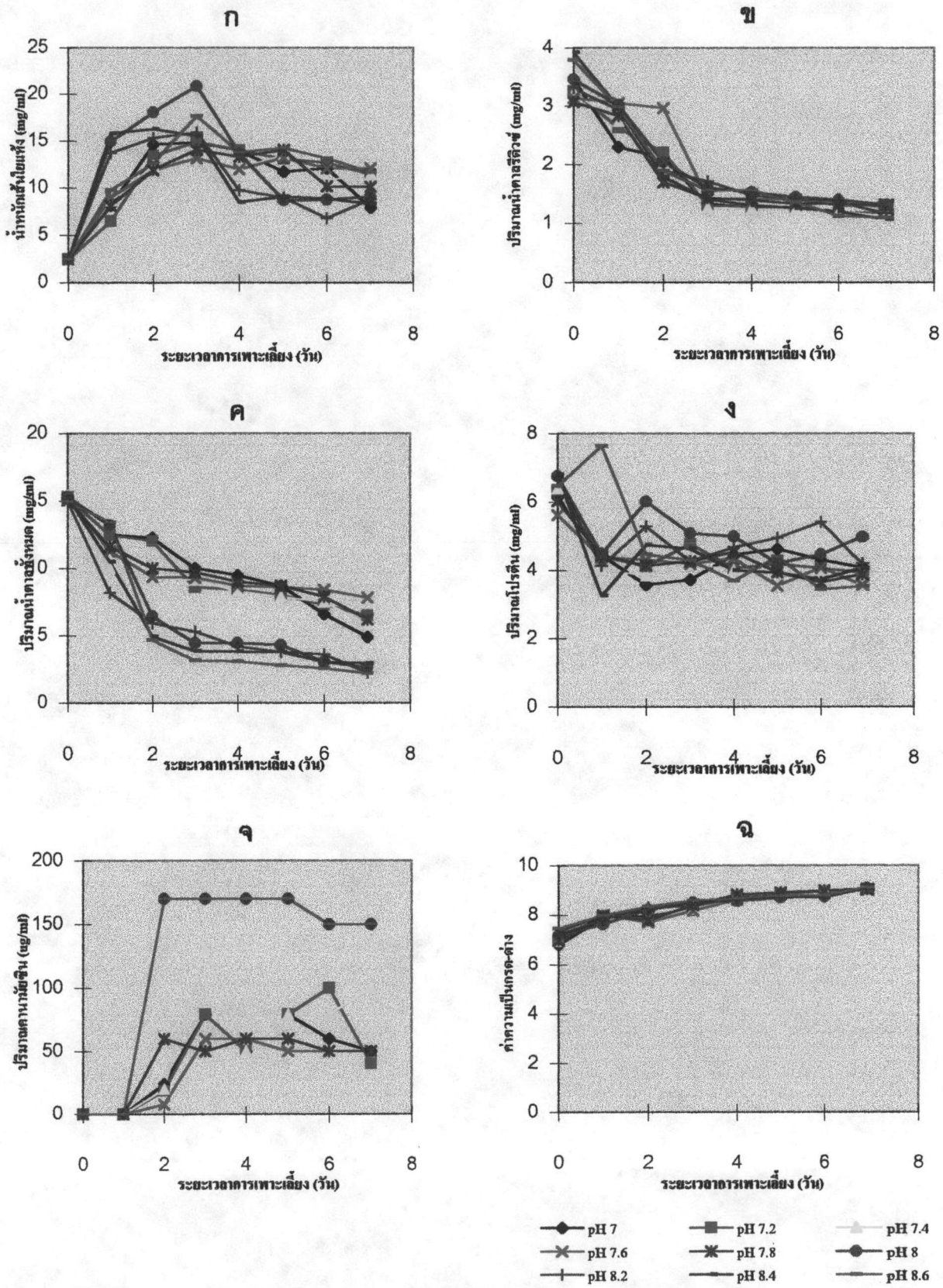
จากรูปที่ 15 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีปริมาณแบคโต-เปปโทนต่างกัน พบว่าที่ 2 และ 4 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักเส้นใยแห้งใกล้เคียงกันเป็น 13.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 13.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 และวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ แบคโต-เปปโทนที่ 3 และ 1 กรัมต่อลิตรให้น้ำหนักเส้นใยแห้งใกล้เคียงกันเป็น 12.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 12.38 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 และวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนแบคโต-เปปโทนที่ปริมาณอื่น เช่น 10 และ 5 กรัมต่อลิตร จะให้น้ำหนักเส้นใยแห้งเป็น 11.9 และ 11.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณของแบคโต-เปปโทนต่างกัน จะอยู่ในช่วง 7.04-9.27 สำหรับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดพบว่าแบคโต-เปปโทนที่ 2 กรัมต่อลิตรจะมีการใช้น้ำตาลมากที่สุด รองลงมาคือแบคโต-เปปโทนที่ 5 4 และ 1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แบคโต-เปปโทนที่ 10 กรัมต่อลิตร มีการใช้น้ำตาลค่อนข้างน้อย ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงใกล้เคียงกันคือ อยู่ในช่วง 2.924 - 3.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณโปรตีนที่ปริมาณต่างๆ จะมีการลดลงเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบว่า แบคโต-เปปโทนที่ 1 กรัมต่อลิตรทำให้มีการผลิตคานามัยซินมากที่สุด เป็น 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง รองลงมาคือที่ 2 กรัมต่อลิตร ผลิตได้ 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนแบคโต-เปปโทนที่ 3 และ 4 กรัมต่อลิตรสามารถผลิตคานามัยซินได้ 110 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 และวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ และแบคโต-เปปโทนที่ 5 กรัมต่อลิตรมีการผลิตคานามัยซิน เป็น 65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 แสดงปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK 1 ที่มีปริมาณแบคโต-เปปโทนต่างกัน

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	ปริมาณคานามัยซิน (μg/ml) ปริมาณแบคโต- เปปโทน (g/l)					
	1	2	3	4	5	10
0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0
2	49	49	49	49	49	0
3	110	128	65	49	65	0
4	160	128	110	49	49	0
5	110	110	110	75	49	0
6	110	75	65	110	12	0
7	110	65	65	65	5	0

3.3 การหาค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบเหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.1-3.2 โดยแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต

จากข้อ 3.1-3.2 พบว่า แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมคือ แป้งปริมาณ 15 กรัมต่อลิตร และแหล่งไนโตรเจนรองที่เหมาะสมคือ แบคโต-เปปโทน 1 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงนำเส้นใยของสายพันธุ์ UUNNK1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวจีพีวาย เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบีสูตรปรับปรุงข้างต้น นำมาแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น ที่ 7.0 7.2 7.4 7.6 7.8 8.0 8.2 8.4 และ 8.6 โดยค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่ใช้ในสูตรอาหารเหลวเคพีเอ็มบีเดิมคือ 7.0 นำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณโปรตีน และค่าความเป็นกรด-ด่าง และวิเคราะห์ปริมาณคานามัยซินด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา ผลของการแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างแสดงในรูปที่ 16 และตารางที่ 13



รูปที่ 16 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง (ก) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ข) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ค) ปริมาณโปรตีน (ง) ปริมาณคานามัยซิน (จ) และค่าความเป็นกรด-ด่าง (ฉ) เมื่อทำการแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่าง

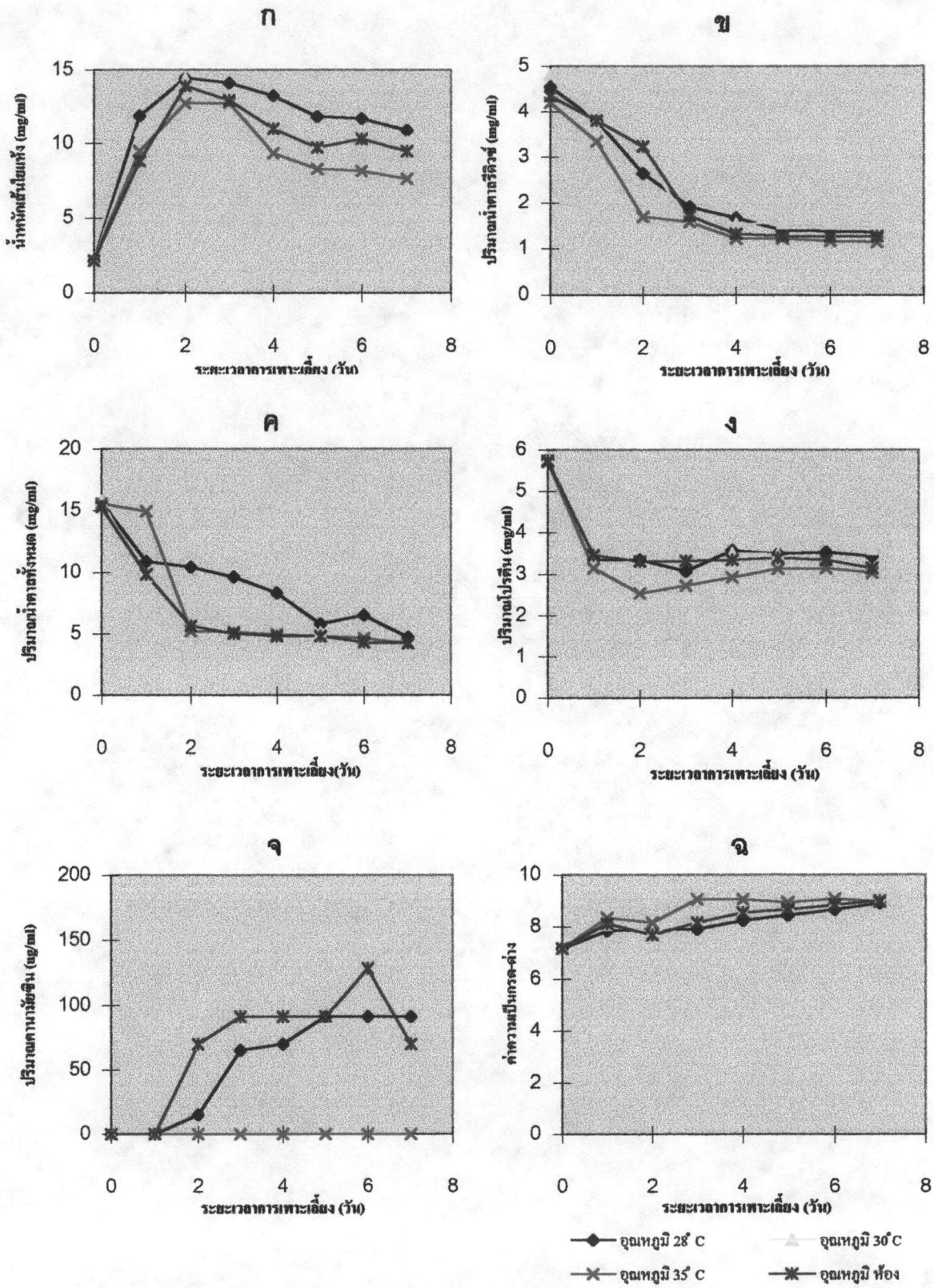
จากรูปที่ 16 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นแตกต่างกัน พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0 มีน้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุดเป็น 20.86 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.6 8.4 และ 8.2 จะให้น้ำหนักเส้นใยแห้งใกล้เคียงกันคือ 17.64 16.26 และ 15.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.2 7.0 7.8 7.6 และ 7.4 จะให้น้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเป็น 14.87 14.84 14.06 13.16 และ 12.96 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนแปลงในระหว่าง 7 วันของการเพาะเลี้ยง จะอยู่ในช่วง 6.9-9.11 และจากปริมาณน้ำตาลทั้งหมดพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 8.0- 8.6 มีการลดลงของน้ำตาลใกล้เคียงกัน โดยที่ 8.6 มีการลดลงมากที่สุด ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ต่ำกว่า 7.8 จะมีการลดลงจนเหลือปริมาณน้ำตาลอยู่ในช่วง 4.9-6.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในส่วนของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่แปรผันทั้ง 9 ชนิด จะมีอัตราการลดลงใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ยังพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง ตั้งแต่ 8.0 - 8.6 มีการผลิตคานามัยซินมากที่สุด เป็น 170 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.4 ผลิตได้ 130 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.2 7.0 7.6 และ 7.8 มีการผลิตคานามัยซิน เป็น 100 79 60 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 แสดงปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK 1 ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นในอาหารเหลวเคพีเอ็มบีต่างกัน

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	ปริมาณคานามัยซิน (μg/ml) ค่าความเป็นกรด-ด่าง								
	7.0	7.2	7.4	7.6	7.8	8.0	8.2	8.4	8.6
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	24	19	20	8	60	170	170	170	170
3	79	79	130	60	50	170	170	170	170
4	50	50	50	60	60	170	170	170	170
5	79	79	79	60	60	170	170	170	170
6	60	100	79	50	50	150	150	150	150
7	50	40	100	50	50	150	150	150	150

3.4 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมโดยใช้ภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.1-2.5

จากข้อ 3.1-3.3 พบว่า แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมคือ แป้งปริมาณ 15 กรัมต่อลิตร และแหล่งไนโตรเจนรองที่เหมาะสมคือ แบคโต-เปปโทน 1 กรัมต่อลิตร โดยปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในช่วง 8.0-8.6 ดังนั้นจึงนำเส้นใยของสายพันธุ์ UUNNK1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวจีพีวาย เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบีสูตรปรับปรุง โดยแยกเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 30 35 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง นำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณโปรตีน และค่าความเป็นกรด-ด่าง และวิเคราะห์ปริมาณคานามัยซินด้วยวิธีการทางจุลชีววิทยา แล้วนำมาแปรผันอุณหภูมิต่างๆ กันคือ 28 30 35 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (30$\pm$ 3) ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตคานามัยซินแสดงในรูปที่ 17 และตารางที่ 14



รูปที่ 17 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง (ก) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ข) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ค) ปริมาณโปรตีน (ง) ปริมาณคานามัยซิน (จ) และค่าความเป็นกรด-ด่าง (ฉ) เมื่อทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างๆ

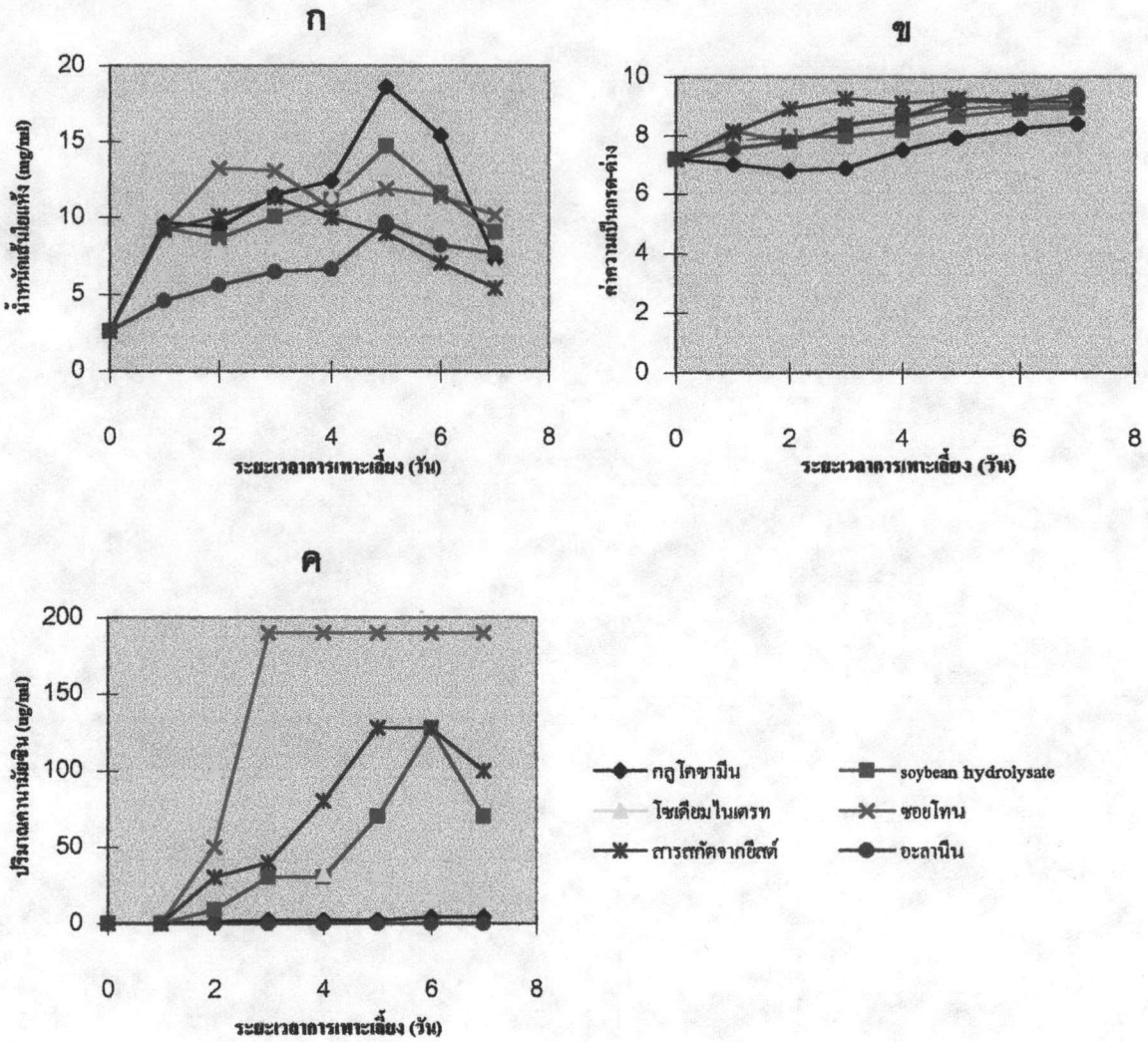
จากรูปที่ 17 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าที่อุณหภูมิ 28 และ 30 องศาเซลเซียส ให้น้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุดใกล้เคียงกันเป็น 14.45 และ 14.44 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จะมีน้ำหนักเส้นใยแห้งเป็น 14.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง โดยที่อุณหภูมิห้องมีน้ำหนักเส้นใยแห้งน้อยที่สุด เป็น 12.93 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง ค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอุณหภูมิต่างกัน จะอยู่ในช่วง 7.18-9.05 สำหรับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดพบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีการลดลงของน้ำตาลมากที่สุด ส่วนที่อุณหภูมิอื่นๆ จะมีการลดลงของน้ำตาลทั้งหมดใกล้เคียงกัน ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะคล้ายคลึงกับปริมาณน้ำตาลทั้งหมด กล่าวคือที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะมีการลดลงมากที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีการผลิตคานามัยซินมากที่สุด เป็น 190 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง รองลงมาคือที่อุณหภูมิห้องผลิตได้ 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส มีการผลิตคานามัยซิน เป็น 91 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสไม่มีการผลิตคานามัยซิน (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 แสดงปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 เมื่อทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างๆ

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	ปริมาณคานามัยซิน (μg/ml)			
	อุณหภูมิ (°C)			
	28	30	35	อุณหภูมิห้อง
0	0	0	0	0
1	0	0	0	0
2	15	70	0	70
3	65	160	0	91
4	70	160	0	91
5	91	190	0	91
6	91	190	0	128
7	91	190	0	70

3.5 การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนหลักที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากข้อ 3.1-3.4 พบว่า แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมคือ แป้งปริมาณ 15 กรัมต่อลิตร และแหล่งไนโตรเจนรองที่เหมาะสมคือ แบคโต-เปปโทน 1 กรัมต่อลิตร โดยปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในช่วง 8.0-8.6 อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 องศาเซลเซียส เพื่อทำการหาแหล่งไนโตรเจนหลักที่เหมาะสมในการผลิต จึงได้นำสายพันธุ์ UUNNK1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวจีพีวาย เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี ที่มีแหล่งไนโตรเจนหลักที่ต่างกันคือ อะลานีน กลูโคซามีน โซเดียมไนเตรท ซอยโทน สารสกัดจากยีสต์ และกากถั่วเหลืองที่ถูกย่อยด้วยกรด (SBH) โดยปรับปริมาณของไนโตรเจนหลักในอาหาร เป็น 1.104 กรัมไนโตรเจนต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ เทียบเท่ากับซอยโทน 12 กรัมต่อลิตร ในสูตรอาหารเหลวเคพีเอ็มบีเดิม นำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักเส้นใยแห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และวิเคราะห์ปริมาณคานามัยซินด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา ผลการคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนแสดงในรูปที่ 18 และตารางที่ 15



รูปที่ 18 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง (ก) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (ข) และปริมาณคานามัยซิน (ค) เมื่อมีแหล่งไนโตรเจนหลักชนิดต่างๆ

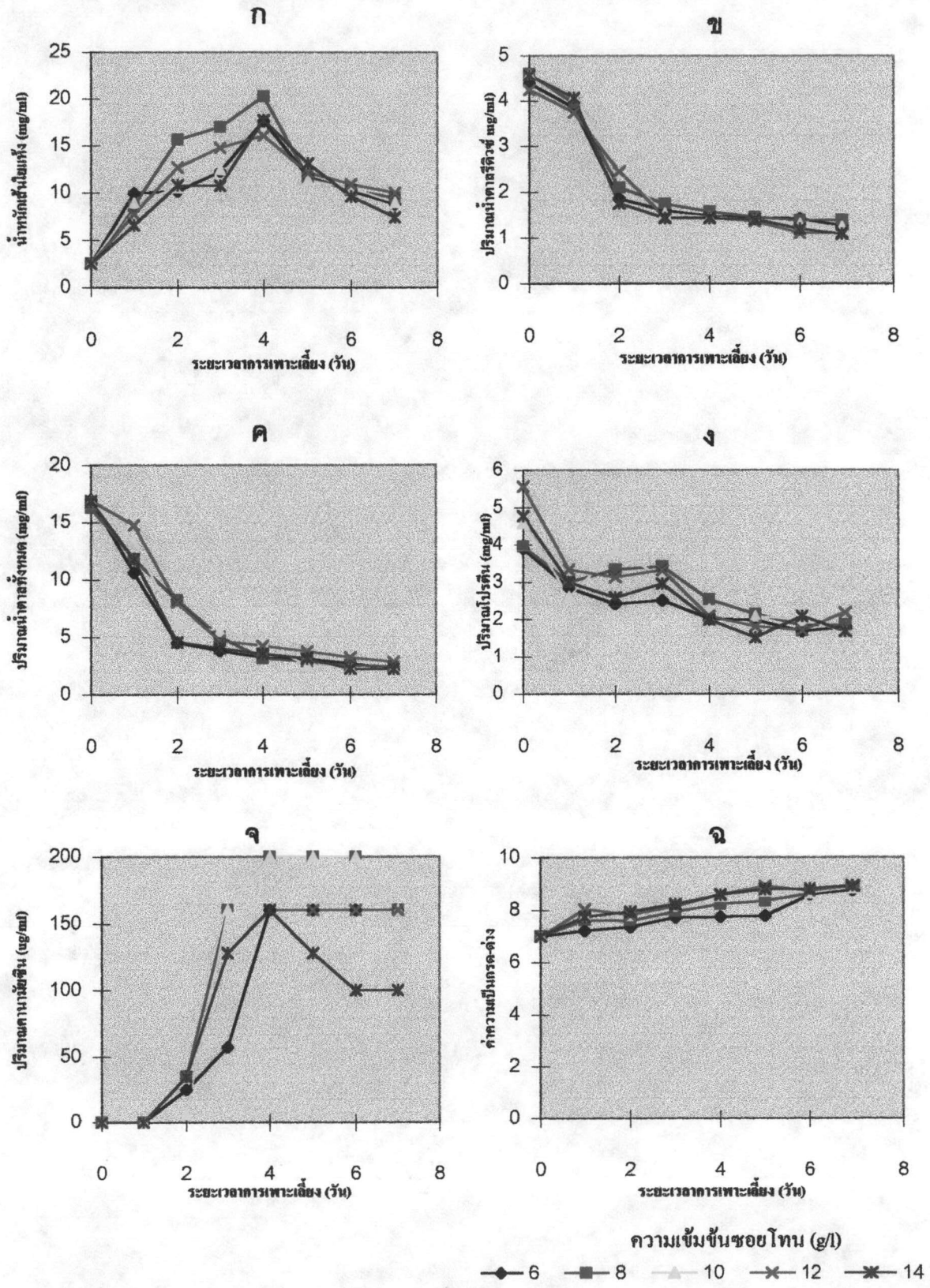
จากรูปที่ 18 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีแหล่งไนโตรเจนหลักแตกต่างกัน พบว่ากลูโคซามีนจะให้น้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุดเป็น 18.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง เนื่องจากกลูโคซามีนเป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน กากถั่วเหลืองย่อยด้วยกรด (SBH) จะให้น้ำหนักเส้นใยแห้งรองลงมาเป็น 14.68 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง โซเดียมไนเตรทและซอยโทนให้ผลใกล้เคียงกันกล่าวจะให้น้ำหนักเส้นใยแห้งเป็น 13.32 และ 13.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 5 และวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากยีสต์ให้น้ำหนักเส้นใยแห้งเป็น 11.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง และอะลานีนให้น้ำหนักเส้นใยแห้งน้อยที่สุดเป็น 9.66 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนหลักต่างกัน จะอยู่ในช่วง 7.19 -9.39 นอกจากนี้สายพันธุ์ UUNNK1 สามารถผลิตคานามัยซินได้สูงสุดเป็น 190 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อใช้ซอยโทนเป็นแหล่งไนโตรเจนหลัก รองลงมาคือโซเดียมไนเตรท สารสกัดจากยีสต์และกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรด โดยสามารถผลิตคานามัยซินได้ 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 วันที่ 5 และวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ แต่เมื่อใช้กลูโคซามีนจะผลิตคานามัยซินได้เพียงเล็กน้อย ส่วนอะลานีนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไม่เหมาะสมต่อการผลิตคานามัยซิน ในการทดลองนี้ไม่สามารถวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และ ปริมาณโปรตีน เนื่องจากแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดมีสีต่างกัน ผลที่ได้จึงมีความคลาดเคลื่อน (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 15 แสดงปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 เมื่อทำการแปรผันชนิดแหล่งไนโตรเจน

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	ปริมาณคานามัยซิน (μg/ml) ชนิดของแหล่งไนโตรเจน					
	อะลานีน	กลูโคซามีน	โซเดียมไนเตรท	ซอยโทน	สารสกัดจากยีสต์	กากถั่วเหลืองย่อยด้วยกรด
0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0
2	0	1	100	50	30	9
3	0	2	128	190	40	30
4	0	2	32	190	80	30
5	0	4	32	190	128	70
6	0	4	16	190	128	128
7	0	4	16	190	100	70

3.5.1 การแปรผันปริมาณซอยโทนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากข้อ 3.1-3.5 พบว่า แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมคือ แป้งปริมาณ 15 กรัมต่อลิตร และแหล่งไนโตรเจนรองที่เหมาะสมคือ แบคโต-เปปโทน 1 กรัมต่อลิตร โดยปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในช่วง 8.0-8.6 อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 องศาเซลเซียส แหล่งไนโตรเจนหลักที่เหมาะสมในการผลิตได้แก่ซอยโทน ดังนั้นจึงนำเส้นใยของสายพันธุ์ UUNNK1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบีโดยเปลี่ยนสูตรอาหารให้มีการแปรผันปริมาณของซอยโทน เป็น 6 8 10 12 และ 14 กรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณซอยโทนที่ใช้ในสูตรอาหารเหลวเคพีเอ็มบีเดิม คือ 12 กรัมต่อลิตร นำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณโปรตีน และค่าความเป็นกรด-ด่าง และวิเคราะห์ปริมาณคานามัยซิน ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา ผลของการแปรผันปริมาณซอยโทนแสดงในรูปที่ 19 และตารางที่ 16



รูปที่ 19 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง (ก) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ข) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ค) ปริมาณโปรตีน (ง) ปริมาณคานามัยซิน (จ) และค่าความเป็นกรด-ด่าง (ฉ) เมื่อแปรผันปริมาณของซอยโทน

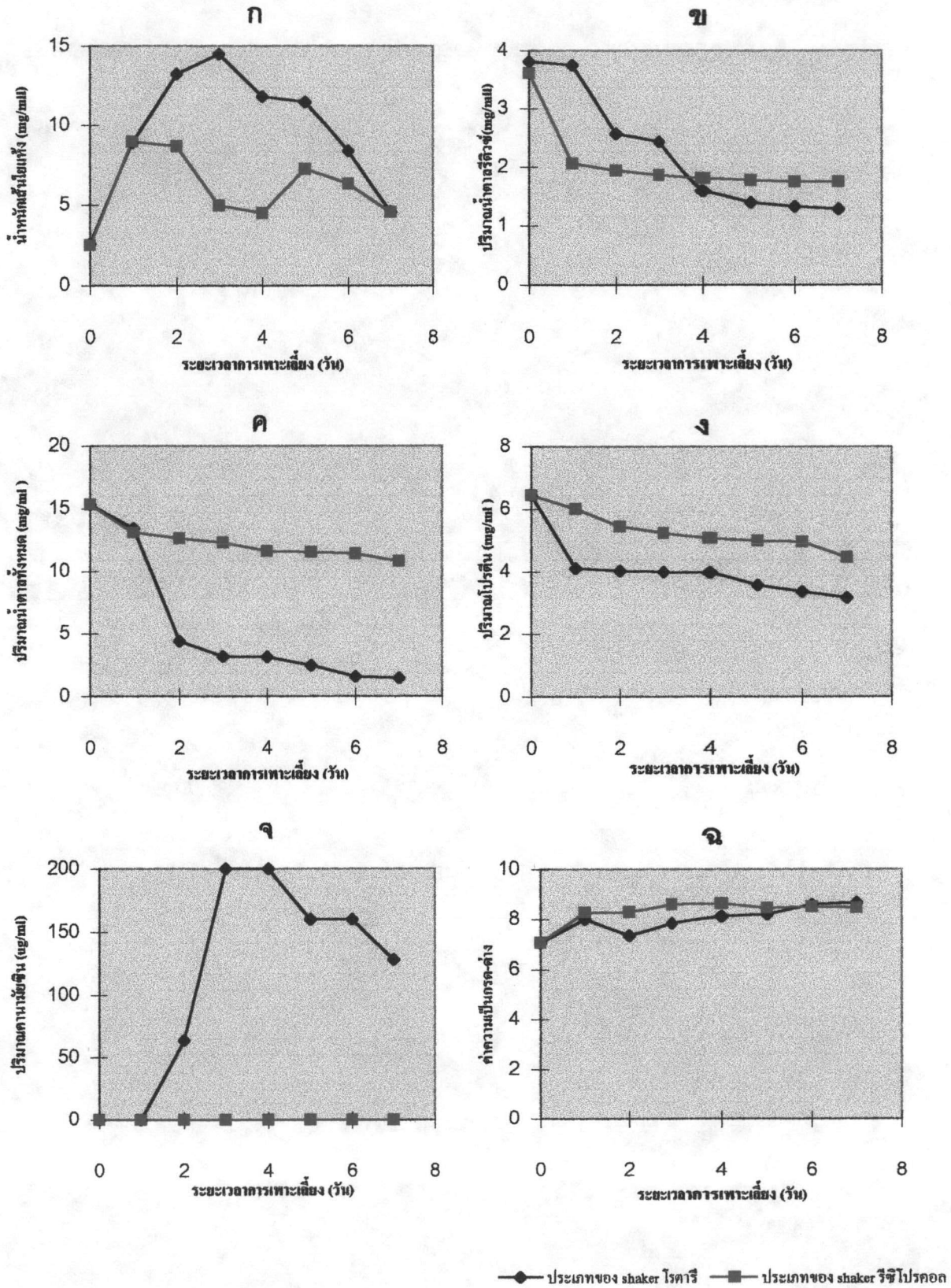
จากรูปที่ 19 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีปริมาณซอยโทนแตกต่างกัน พบว่า ซอยโทน 12 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุดเป็น 21.54 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง น้ำหนักเส้นใยแห้งจะหนักน้อยลงมาเมื่อใช้ซอยโทนที่ 10 8 6 และ 14 กรัมต่อลิตร เป็น 19.24 17 12.24 และ 11.52 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซอยโทนต่างกันจะอยู่ในช่วง 6.99-8.93 สำหรับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดพบว่าเมื่อใช้ซอยโทน 10 กรัมต่อลิตรจะมีการใช้น้ำตาลมากที่สุด ส่วนซอยโทนที่ 6 8 และ 12 กรัมต่อลิตร มีการใช้น้ำตาลใกล้เคียงกัน และที่ 14 กรัมต่อลิตรมีการใช้น้ำตาลน้อยที่สุด การใช้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะใกล้เคียงกัน ในส่วนของปริมาณโปรตีนเมื่อมีปริมาณซอยโทนแตกต่างกัน พบว่า ซอยโทนที่ปริมาณ 12 กรัมต่อลิตร ปริมาณโปรตีนจะมีการลดลงมากที่สุด และที่ 14 และ 10 กรัมต่อลิตร จะมีการลดลงของปริมาณโปรตีนใกล้เคียงกันรองลงมา ซอยโทนที่ 8 และ 6 กรัมต่อลิตร มีการลดลงของปริมาณโปรตีนน้อยที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อปริมาณของซอยโทนเป็น 8 และ 10 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตคานามัยซินมากที่สุดเป็น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงเลือกใช้ซอยโทนที่ปริมาณ 8 กรัมต่อลิตร เนื่องจากเป็นปริมาณที่น้อยกว่า ส่วนซอยโทนที่ 6 12 และ 14 กรัมต่อลิตร มีการผลิตคานามัยซินเท่ากันคือ 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 16)

ตารางที่ 16 แสดงปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 เมื่อทำการแปรผันปริมาณซอยโทน

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	ปริมาณคานามัยซิน (μg/ml) ปริมาณซอยโทน (g/l)				
	6	8	10	12	14
0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0
2	25	35	6	35	35
3	57	160	160	125	125
4	160	200	200	160	160
5	160	200	200	160	125
6	160	160	200	160	125
7	160	160	160	160	100

3.6 การเปรียบเทียบชนิดของเครื่องเขย่า

จากข้อ 3.1-3.5 ได้ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตคานามัยซิน คือมีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีปริมาณ 15 กรัมต่อลิตร แบคโต-เปปโทนเป็นแหล่งไนโตรเจนรองที่ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ซอยโทนเป็นแหล่งไนโตรเจนหลักที่ปริมาณ 8 กรัมต่อลิตรค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นอยู่ในช่วง 8.0-8.6 และอุณหภูมิเพาะเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส สิ่งเหล่านี้เป็นภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตคานามัยซิน ดังนั้นจึงนำเส้นใยของสายพันธุ์ UUNNK1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวจีพีวาย เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบีบนเครื่องเขย่า โดยใช้ภาวะดังกล่าวข้างต้น เครื่องเขย่าที่ใช้เป็นแบบโรตารี (rotary shaker) และแบบรีซิโปรคอล (reciprocal shaker) จากนั้นนำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณโปรตีน และค่าความเป็นกรด-ด่าง และวิเคราะห์ปริมาณคานามัยซิน ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา ผลของการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแสดงในรูปที่ 20 และตารางที่ 17



รูปที่ 20 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง (ก) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ข) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ค) ปริมาณโปรตีน ปริมาณคานามัยซิน (จ) และค่าความเป็นกรด-ด่าง (ฉ) เมื่อใช้รูปแบบของเครื่องเขย่า 2 ชนิด

จากรูปที่ 20 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่าที่แตกต่างกัน 2 ชนิด คือ แบบโรตารีและแบบรีซิโปรคอล พบว่าแบบโรตารี สามารถให้น้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง เป็น 14.48 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรแต่แบบรีซิโปรคอลจะให้น้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุดในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง เป็น 8.97 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าทั้งสองชนิด จะอยู่ในช่วง 7.21-8.67 สำหรับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดพบว่าแบบโรตารีมีการใช้น้ำตาลมากกว่าแบบรีซิโปรคอล เช่นเดียวกันกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณโปรตีน นอกจากนี้เมื่อเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบโรตารีสามารถผลิตคานามัยซินได้มากถึง 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนแบบรีซิโปรคอลจะไม่สามารถผลิตคานามัยซินได้ ซึ่งอาจเนื่องมาจากการเขย่าที่แรงเกินไป (ตารางที่ 17)

ตารางที่ 17 แสดงปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 เมื่อใช้เครื่องเขย่า 2 ชนิด

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	ปริมาณคานามัยซิน (μg/ml) ชนิดของเครื่อง เขย่า	
	โรตารี	รีซิโปรคอล
0	0	0
1	0	0
2	64	0
3	200	0
4	200	0
5	160	0
6	160	0
7	128	0

4. การทดลองผลิตคานามัยซินโดย *S. kanamyceticus* สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้ในระดับถังหมักโดยอาศัยข้อมูลจากระดับขวดเขย่า

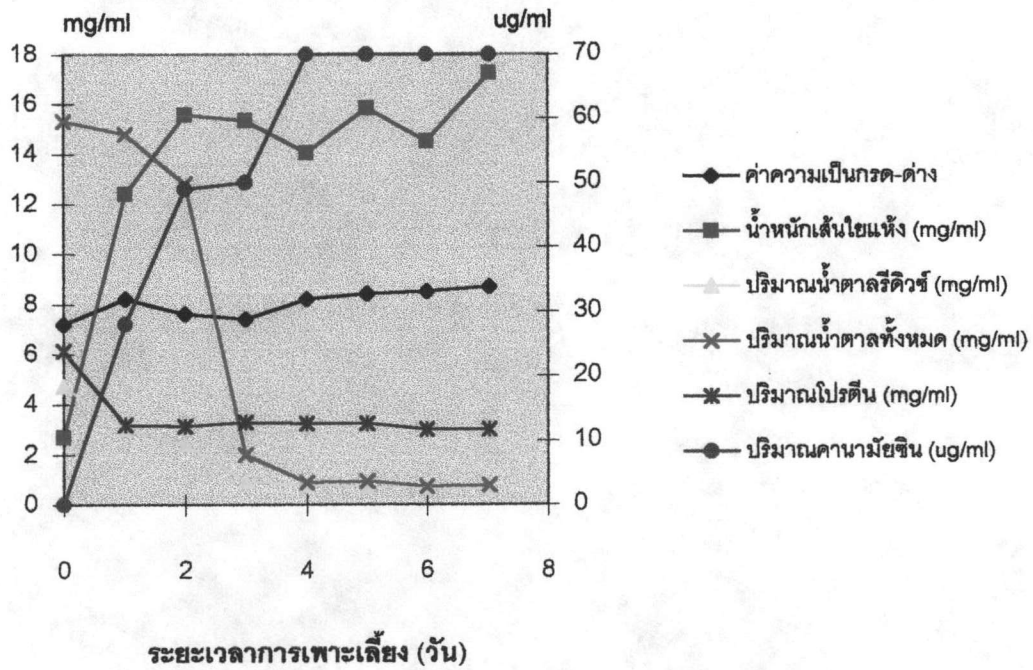
นำเส้นใยของ *S. kanamyceticus* UUNNK1 สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้ ที่เตรียมโดยวิธีการทดลองข้อ 4.1 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบีสูตรปรับปรุง ปริมาตร 2,250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยอาศัยข้อมูลจากระดับขวดเขย่า ทำการศึกษาภาวะบางประการที่เหมาะสมต่อการผลิตคานามัยซินในถังหมักขนาด 5 ลิตร ดังต่อไปนี้

4.1 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการหมักต่อการผลิตคานามัยซิน

ศึกษาความสัมพันธ์ของระยะเวลากับการผลิตคานามัยซินในถังหมักขนาด 5 ลิตร ทำการหมักโดยใช้สูตรอาหารเหลวและภาวะที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อจากขวดเขย่า คือมีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีปริมาณ 15 กรัมต่อลิตร แบคโต-เปปโทนเป็นแหล่งไนโตรเจนรองที่ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ซอยโทนเป็นแหล่งไนโตรเจนหลักที่ปริมาณ 8 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นอยู่ในช่วง 8.0-8.6 และอุณหภูมิเพาะเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส โดยมีอัตราการให้อากาศสูงสุดเป็น 1.3 ลิตรต่อ 1 ลิตรของอาหารต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน นำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณโปรตีน วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่องวัดพีเอชที่ติดตั้งในถังหมัก (pH probe) และวิเคราะห์ปริมาณคานามัยซินด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 18 และรูปที่ 21

ตารางที่ 18 แสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณโปรตีนและปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี โดยใช้อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเส้นใยแห้ง (mg/ml)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (mg/ml)	ปริมาณคานามัยซิน (µg/ml)
0	7.2	2.70	4.73	6.12	15.30	0
1	8.2	12.40	2.99	3.17	14.80	28
2	7.6	15.57	2.41	3.13	12.80	49
3	7.4	15.33	0.94	3.28	1.99	50
4	8.2	14.04	0.78	3.24	0.89	70
5	8.4	15.82	0.71	3.22	0.94	70
6	8.5	14.50	0.65	2.99	0.73	70
7	8.7	17.24	0.61	2.99	0.76	70



รูปที่ 21 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณโปรตีน ปริมาณคานามัยซิน และค่าความเป็นกรด-ด่าง เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยมีอัตราการกวน 200 รอบต่อนาที

จากตารางที่ 18 และรูปที่ 21 เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าน้ำหนักเส้นใยแห้งจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นจาก 2.70 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 0 จนเป็น 17.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 3 ของการหมัก หลังจากนั้นจะลดลงจนถึงวันที่ 7 โดยจะเหลือน้ำหนักเส้นใยแห้ง 4.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมักจะเพิ่มขึ้นจาก 7.2 เป็น 8.4 ในวันที่ 7 ของการหมัก สำหรับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะลดลงจาก 15.33 เป็น 0.76 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงจาก 4.73 เป็น 0.61 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 7 ของการหมักและปริมาณโปรตีนจะลดลงจาก 6.12 เป็น 2.99 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามสายพันธุ์ UUNNK1 สามารถผลิตคานามัยซินได้เพียง 70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 4 ของการหมัก ซึ่งน้อยกว่าการผลิตคานามัยซินในระดับขวดเขย่า

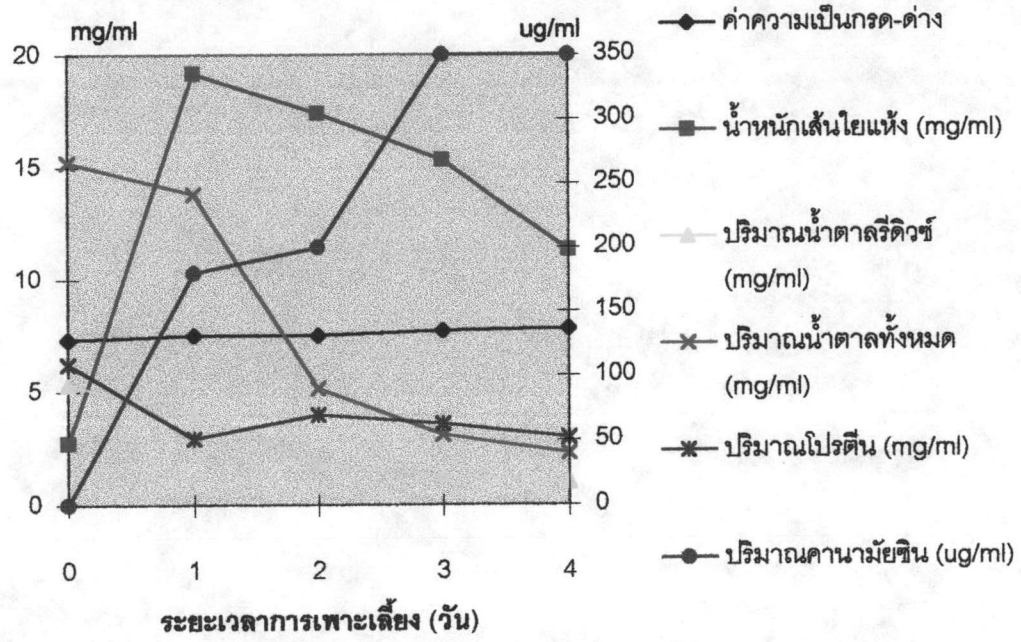
4.2 การหาอัตราการกวนที่เหมาะสมที่ใช้ในการหมักต่อการผลิตคานามัยซิน

4.2.1 อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที

ศึกษาอัตราการกวน 300 รอบต่อนาทีในถังหมักขนาด 5 ลิตร ทำการหมักโดยใช้สูตรอาหารเหลวและภาวะที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อจากขวดเขย่า โดยมีอัตราการให้อากาศสูงสุดเป็น 1.3 ลิตรต่อ 1 ลิตรของอาหารต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 วัน เนื่องจากเชื้อจะสร้างคานามัยซินได้สูงสุดในวันที่ 4 นำมาวิเคราะห์น้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณโปรตีน วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่องวัดพีเอชที่ติดตั้งในถังหมัก และวิเคราะห์ปริมาณคานามัยซินด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา ได้ผลดังตารางที่ 19 และรูปที่ 22

ตารางที่ 19 แสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณโปรตีนและปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบีโดยใช้อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเส้นใยแห้ง (mg/ml)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (mg/ml)	ปริมาณคานามัยซิน (µg/ml)
0	7.3	2.72	5.29	6.20	15.20	0
1	7.5	19.18	4.03	2.92	13.80	180
2	7.5	17.40	1.84	3.98	5.16	200
3	7.7	15.30	1.29	3.59	3.10	350
4	7.8	11.30	1.01	2.97	2.28	350



รูปที่ 22 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณโปรตีน ปริมาณคานามัยซิน และค่าความเป็นกรด-ด่าง เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยมีอัตราการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที

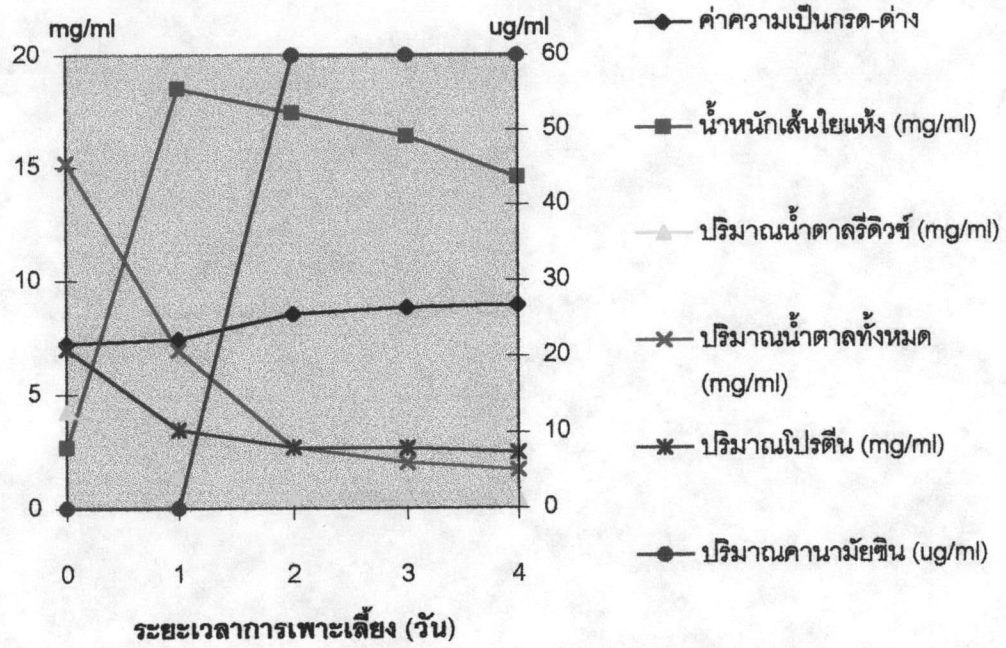
จากตารางที่ 19 และรูปที่ 22 เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยมีอัตราการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที พบว่าน้ำหนักเส้นใยแห้งจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจาก 2.72 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น 19.18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 2 ของการหมัก หลังจากนั้นจะลดลงจนถึงวันที่ 4 โดยจะเหลือน้ำหนักเส้นใยแห้ง 11.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก จะเพิ่มขึ้นจาก 7.3 เป็น 7.8 ในวันที่ 4 ของการหมัก สำหรับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะลดลงจาก 15.20 เป็น 2.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงจาก 5.29 เป็น 1.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 4 และปริมาณโปรตีนจะลดลงจาก 6.20 เป็น 2.97 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถผลิตคานามัยซินได้สูงสุดถึง 350 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการหมัก

4.2.2 อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที

ศึกษาอัตราการกวน 400 รอบต่อนาที ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ทำการหมักโดยใช้สูตรอาหารเหลวและภาวะที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อจากขวดเขย่า โดยมีอัตราการให้อากาศสูงสุดเป็น 1.3 ลิตรต่อ 1 ลิตรของอาหารต่อนาที นำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณวัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่องวัดพีเอชที่ติดตั้งในถังหมัก วิเคราะห์ปริมาณคานามัยซินด้วยวิธีการทางจุลชีววิทยา ทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 วัน ได้ผลดังตารางที่ 20 และรูปที่ 23

ตารางที่ 20 แสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณโปรตีนและปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบีโดยใช้อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเส้นใยแห้ง (mg/ml)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (mg/ml)	ปริมาณคานามัยซิน (μg/ml)
0	7.2	2.66	4.22	6.97	15.17	0
1	7.4	18.50	1.39	3.44	6.91	0
2	8.5	17.42	0.45	2.68	2.67	60
3	8.8	16.38	0.41	2.64	1.99	60
4	8.9	14.54	0.39	2.43	1.68	60



รูปที่ 23 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณโปรตีน ปริมาณคานามัยซิน และค่าความเป็นกรด-ด่าง เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยมีอัตราการกวนเป็น 400 รอบต่อนาที

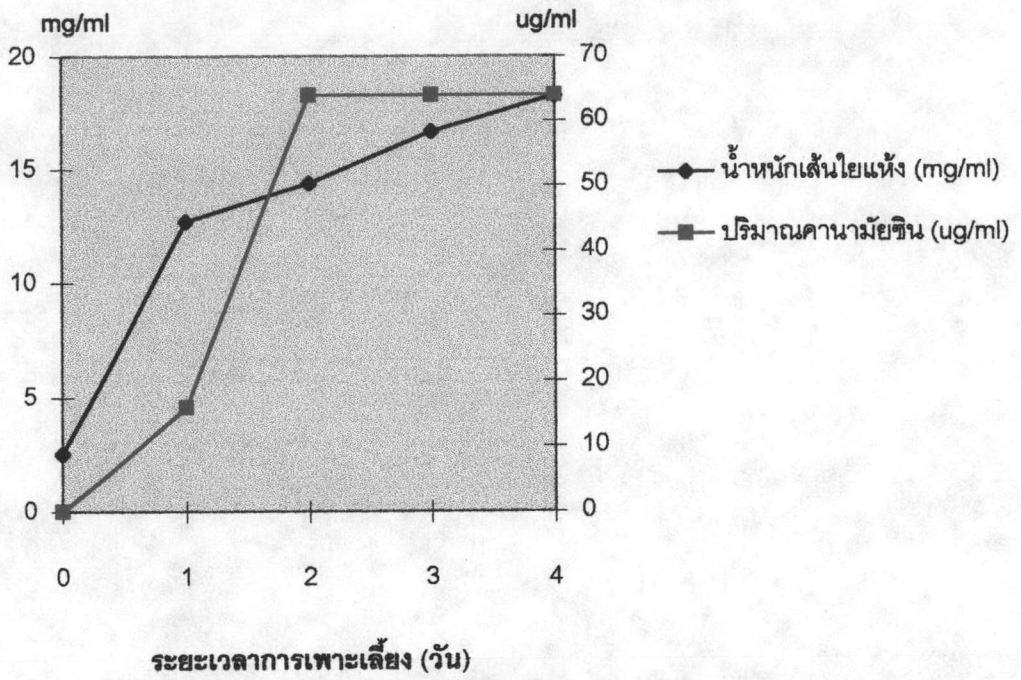
จากตารางที่ 20 และรูปที่ 23 เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยมีอัตราการกวนเป็น 400 รอบต่อนาที พบว่าน้ำหนักเส้นใยแห้งจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจาก 2.66 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็น 18.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นจะลดลงเป็น 14.54 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 4 ของการหมัก ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก จะเพิ่มขึ้นจาก 7.2 เป็น 8.9 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะลดลงจากปริมาณเริ่มต้น 15.17 เป็น 1.68 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงจากปริมาณเริ่มต้น 4.24 เป็น 0.39 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 4 ของการหมักและปริมาณโปรตีนจะลดลงจากปริมาณเริ่มต้น 6.97 เป็น 2.43 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามเชื้อสามารถผลิตคานามัยซินได้เพียง 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตั้งแต่วันที่ 2 ของการหมัก

4.3 การทดลองเปรียบเทียบการผลิตคานามัยซินโดย *S. kanamyceticus* สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้เมื่อควบคุมและไม่ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง

ศึกษาความแตกต่างในการผลิตคานามัยซินในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้สูตรอาหารเหลวและภาวะที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อจากขวดเขย่า แต่เปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนเป็นกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรด และมีอัตราการให้อากาศสูงสุดเป็น 1.3 ลิตรต่อ 1 ลิตรของอาหารต่อนาที นำมาวิเคราะห์น้ำหนักเส้นใยแห้ง วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่องวัดพีเอชที่ติดตั้งในถังหมัก วิเคราะห์ปริมาณคานามัยซินด้วยวิธีการทางจุลชีววิทยา ทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 วัน แต่เพิ่มการศึกษาโดยการควบคุม (ตารางที่ 21 , รูปที่ 24) และไม่ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง (ตารางที่ 22 , รูปที่ 25)

ตารางที่ 21 แสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง และปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี มีแหล่งไนโตรเจนเป็นกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรด อัตราการกวน 300 รอบต่อนาทีในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	น้ำหนักเส้นใยแห้ง(mg/ml)	ปริมาณคานามัยซิน(μg/ml)
0	2.52	0
1	12.68	16
2	14.36	64
3	16.66	64
4	18.23	64

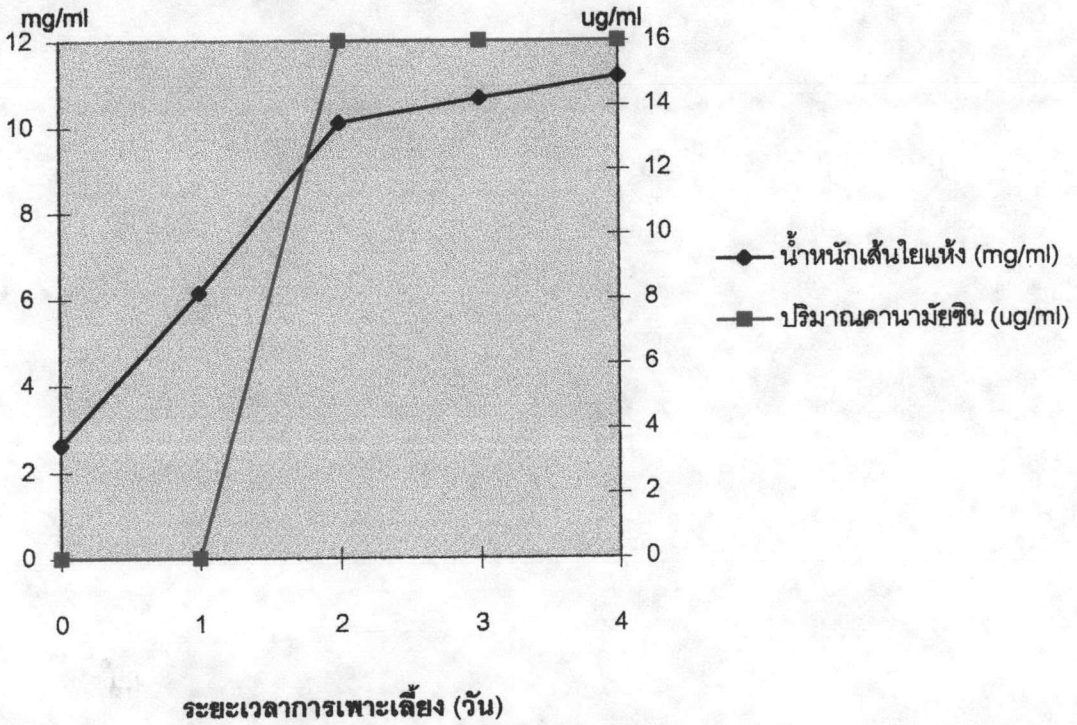


รูปที่ 24 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง และ ปริมาณคานามัยซิน เมื่อเพาะเลี้ยง UUNNK 1 ในอาหารเหลวที่มีกากถั่วเหลืองย่อยด้วยกรดเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง

จากตารางที่ 21 และรูปที่ 24 เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเหลวที่มีกากถั่วเหลืองย่อยด้วยกรดเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าน้ำหนักเส้นใยแห้งจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจาก 2.52 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น 18.23 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 4 ของการหมัก และเชื้อสามารถผลิตคานามัยซินได้ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตั้งแต่วันที่ 2 ของการหมัก

ตารางที่ 22 แสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณคานามัยซินของสายพันธุ์ UUNNK1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี โดยมีแหล่งไนโตรเจนเป็นกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรด อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ไม่ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเส้นใยแห้ง (mg/ml)	ปริมาณคานามัยซิน (µg/ml)
0	6.8	2.62	0
1	7.5	6.14	0
2	7.7	10.10	16
3	7.8	10.66	16
4	8.1	11.18	16



รูปที่ 25 กราฟแสดงน้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณคานามัยซิน เมื่อเพาะเลี้ยง UUNNK1 ในอาหารเหลวที่มีกากถั่วเหลืองย่อยด้วยกรดเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที ในถังหมักขนาด 5 ลิตรที่ไม่ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง

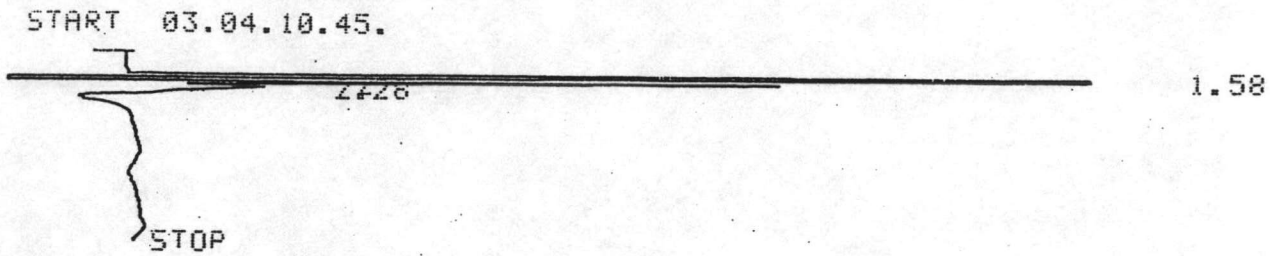
จากตารางที่ 22 และรูปที่ 25 เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยไม่ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเหลวที่มีกากถั่วเหลืองย่อยด้วยกรดเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าน้ำหนักเส้นใยแห้งจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นจาก 2.62 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น 11.18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 4 ของการหมัก ค่าความเป็นกรด-ด่างจะเมจาก 6.8 เป็น 8.1 ในวันที่ 4 ของการหมักสามารถผลิตคานามัยซินได้ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 2 ของการหมัก

จากผลการทดลองข้างต้น สามารถสรุปภาวะที่เหมาะสมของสายพันธุ์ UUNNK1 ต่อการผลิตคานามัยซินในระดับขวดเขย่า เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารเหลวเดิม คือ

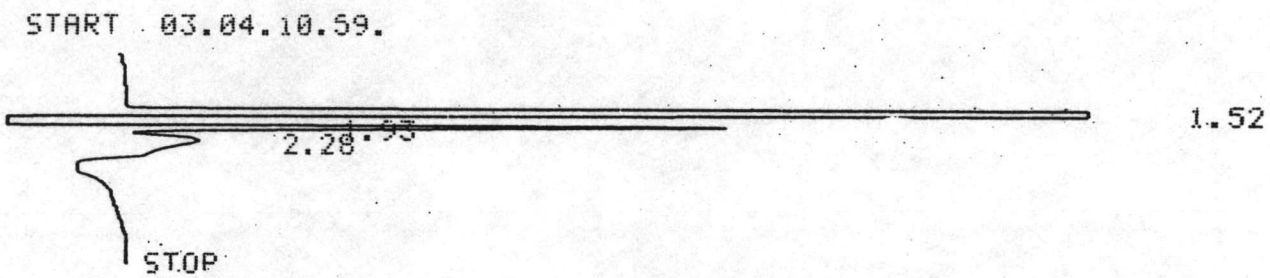
ภาวะ	อาหารเหลวเคพีเอ็มบีเดิม	อาหารเหลวเคพีเอ็มบี สำหรับสายพันธุ์ UUNNK1
1. แหล่งคาร์บอน	แป้ง 20 กรัมต่อลิตร	แป้ง 15 กรัมต่อลิตร
2. แหล่งไนโตรเจนหลัก	ซอยโทน 12 กรัมต่อลิตร	ซอยโทน 8 กรัมต่อลิตร
3. แหล่งไนโตรเจนรอง	แบคโต-เปปโทน 3 กรัมต่อลิตร	แบคโต-เปปโทน 1 กรัมต่อลิตร
4. ค่าความเป็นกรด-ด่างก่อนนึ่งฆ่าเชื้อ	7.0	8.0-8.6
5. อุณหภูมิ	28-32 องศาเซลเซียส	30 องศาเซลเซียส
6. ประเภทของเครื่องเขย่า	โรตารี	โรตารี

5. การวิเคราะห์สารตัวอย่างด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (HPLC) ของสายพันธุ์กลาย UUNNK1 โดยใช้เครื่องตรวจวัดความแตกต่างของดรรชนีหักเห (Refractive Index(RI) Detector)

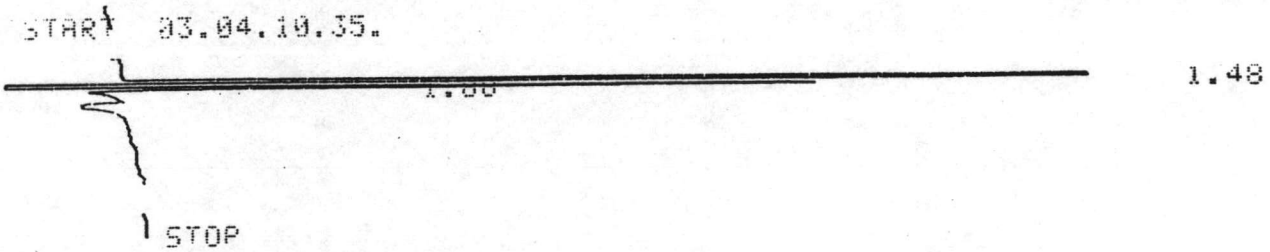
นาตัวอย่างสายพันธุ์กลาย UUNNK1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเคพีเอ็มบี เป็นเวลานาน 7 วัน มาแยกส่วนน้ำใส ออกจากเส้นใยด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง นำส่วนน้ำใส 20 ไมโครลิตร มาวิเคราะห์หาปริมาณคานามัยซิน ด้วยเครื่อง HPLC เปรียบเทียบกับคานามัยซินเอ ซัลเฟตมาตรฐานความเข้มข้น 0 , 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามภาวะในวิธีการทดลองข้อ 5.2 ได้ผลดังรูปที่ 26-28



ก



ข



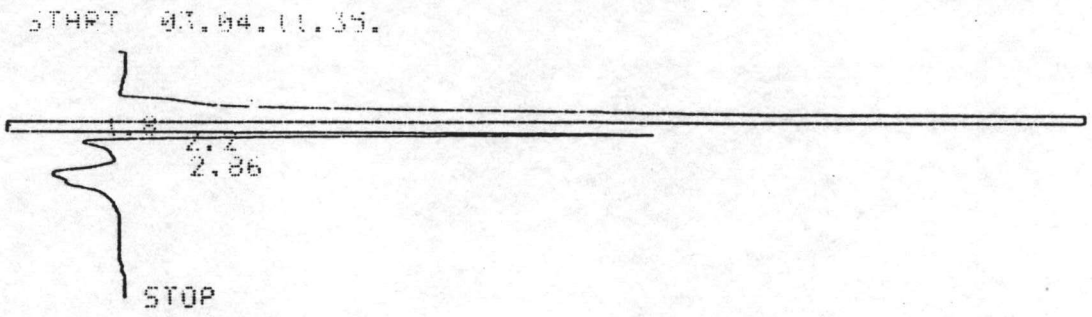
ค

รูปที่ 26 ลักษณะโครมาโตแกรมของคานามัยซินซัลเฟต

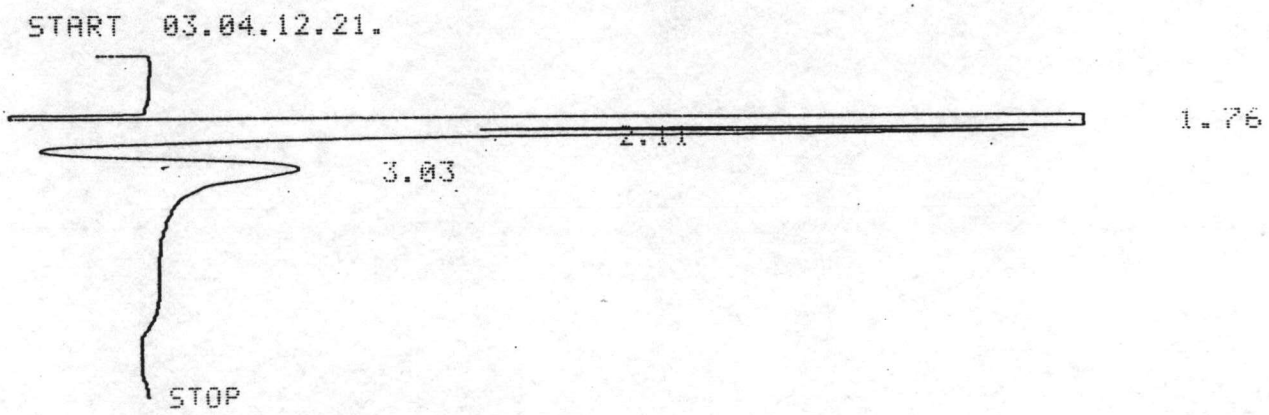
ก ปริมาณ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ข ปริมาณ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ค ปริมาณ 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 27 ลักษณะโครมาโตแกรมของน้ำหมักของสายพันธุ์กลาย UUNNK1



รูปที่ 28 ลักษณะโครมาโตแกรมของสารตัวอย่างผสมระหว่างคานามัยซินเอ ซัลเฟตเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับน้ำหมักที่ได้จากสายพันธุ์กลาย UUNNK1

จากการวิเคราะห์คานามัยซินที่ผลิตได้โดยสายพันธุ์กลาย UUNNK1 ด้วยวิธี HPLC ตามภาวะในวิธีการทดลองข้อ 5.2 นำโครมาโตแกรมของสายพันธุ์กลายดังกล่าว (รูปที่ 27-28) มาเปรียบเทียบกับโครมาโตแกรมของคานามัยซินเอ ซัลเฟต มาตรฐาน เข้มข้น 2,000 1,000 และ 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 26) ตามลำดับ พบว่าโครมาโตแกรมของคานามัยซินเอ ซัลเฟต มาตรฐาน เข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC จะให้พีค (peak) เด่นชัด ณ เวลา 2.28 นาที โดยมีพื้นที่ใต้กราฟ เท่ากับ 148,604 หน่วย และคานามัยซินเอ ซัลเฟต มาตรฐานเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะให้พีคเด่นชัด ณ เวลาเดียวกัน คือ 2.28 นาที โดยมีพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 114,393 หน่วย ในขณะที่คานามัยซินเอ ซัลเฟต มาตรฐานเข้มข้น 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะไม่พบพีคที่เวลาดังกล่าว

ส่วนน้ำหมักของสายพันธุ์กลาย UUNNK1 เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC จะปรากฏ พีคเด่นชัด ณ เวลา 2.86 นาที โดยมีพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 370,990 หน่วย (รูปที่ 27) และตัวอย่างผสมระหว่างคานามัยซินเอ ซัลเฟต มาตรฐานเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 10 ไมโครลิตร กับน้ำหมักที่ได้จากสายพันธุ์ UUNNK1 จำนวน 10 ไมโครลิตร จะพบพีค ณ เวลา 3.03 นาที โดยมีพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 241,662 หน่วย (รูปที่ 28)