สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตสารเจลดานามัยซินจากเชื้อสเตรปโตมัยเซสสายพันธุ์เอ็มเอ เก้า และตำแหน่งอนุกรมวิธานของเชื้อนั้น

Geldanamycin production from *Streptomyces* sp. MA-9 and it taxonomic position

T117228

มนทิรา จันถาวร

อุษณี ทีหอคำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
เลขทะเบียน 117228
วัน,เดือน,ปี 19 ก.ค. 2554

b 12340116
i

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา ๒๕๕๓

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Geldanamycin production from *Streptomyces* sp. MA-9

and it taxonomic position

Montira Janthavorn

Utsanee Teehokam

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2010

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงาน การผลิตสารเจลดานามัยซินจากเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์เอ็มเอ เก้า และตำแหน่งอนุกรมวิธานของเชื้อนั้น

Geldanamycin production from *Streptomyces* sp. MA-9 and it taxonomic position

ชื่อนักศึกษา นางสาวมนทิรา จันถาวร

นางสาวอุษณี ทีหอคำ

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.จิตติ ท่าไว

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ประจำปี ๒๕๕๓

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.วีนา ชูโชติ	
ผศ.ดร.จิตติ ท่าไว	
อาจารย์สุจิตรา สุคนธมัต	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การผลิตสารเจลดานามัยซินจากเชื้อสเตรปโตมัยเซสสายพันธุ์เอ็มเอเก้า และตำแหน่งอนุกรมวิธานเบื้องต้น
ชื่อนักศึกษา	นางสาวมนทิรา จันถาวร นางสาวอุษณี ทีหอคำ
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา	2553
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. จิตติ ท่าไว

บทคัดย่อ

ตำแหน่งอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลตเอ็มเอเก้าที่สามารถผลิตสารเจลดานามัยซินได้ถูกกำหนดโดยลักษณะทางอนุกรมวิธานหลายด้าน เชื้อไอโซเลตนี้แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางเคมีทั่วไปของเชื้อในสกุล*สเตรปโตมัยเซส* การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีนสิบหก เอส อาร์ อาร์เอ็นเอ สนับสนุนว่าเชื้อไอโซเลตนี้เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทในสกุล*สเตรปโตมัยเซส*ซึ่งมีค่าร้อยละความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับเชื้อ*สเตรปโตมัยเซส มาเลชิเอ็นซิส*มากที่สุดที่ค่าความคล้ายคลึงร้อยละ ๙๙.๑ น้ำหมักเชื้อของเชื้อไอโซเลตนี้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ*แคนดิดา อัลบิแคน* เอทีซีซี ๑๐๒๓๑ และเชื้อ*สแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส* เอทีซีซี ๒๕๙๒๓ ได้อย่างมีนัยสำคัญ การศึกษาแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจนรวมทั้งความเข้มเข้นของเกลือและระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารเจลดานามัยซินได้มากที่สุดแสดงให้เห็นว่าแป้งที่ละลายน้ำได้ (ความเข้มข้นร้อยละ ๑ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) น้ำต้มถั่วเหลือง (ความเข้มข้นร้อยละ ๑ โดยปริมาตรต่อปริมาตร) และ เกลือที่ความเข้มข้นร้อยละ ๔ โดยน้ำหนักต่อ ปริมาตร เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารเจดานามัยซินของเชื้อไอโซเลตนี้เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา ๑๔ วัน ที่อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียส

คำสำคัญ : เจลดานามัยซิน *สเตรปโตมัยเซส*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title Geldanamycin Production from *Streptomyces* sp. MA-9 and it taxonomic position

Students Montira Janthavorn

Utsanee Teehokam

Degree Bachelor of Science

Major program Industrial Microbiology

Academic Year 2010

Advisor Asst. Prof. Dr. Chitti Thawai

ABSTRACT

The taxonomic position of a geldanamycin producing actinomycete, which was designated MA-9, was determined using a polyphasic taxonomic approach. This isolate was shown to have morphological and chemical properties typical of the genus *Streptomyces*. 16S rRNA gene sequence analysis for the isolate supported the assignment of the isolate to the genus *Streptomyces* and the similarity value of the nucleotide sequence between this isolate and the closely related species, *Streptomyces malaysiensis* was 99.1%. The fermentation broth of this isolate significantly inhibited the growth of *Candida albicans* ATCC 10231 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Studies on carbon and nitrogen sources including the optimum concentration of sodium chloride and the period of the cultivation for highest geldanamycin production revealed that the soluble starch (1% w/v), soybean steep liquor (1% v/v) and the concentration of sodium chloride of 4 % w/v for fourteen days of inoculation at 30 ^{o}C were found to be the optimum conditions for geldanamycin production by this isolate.

Keyword : Geldanamycin , *Streptomyces*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของส่วนหนึ่งของการศึกษาวิชาโครงงานพิเศษ ในหัวข้อเรื่องการศึกษาการผลิตสารเจลดานามัยซินจากเชื้อสเตรปโตมัยเซสสายพันธุ์เอ็มเอ เก้าและตำแหน่งอนุกรมวิธานเบื้องต้น ในการทำโครงงานพิเศษนี้จะ ไม่สามารถลุล่วงไปได้ด้วยดีหากไม่ได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลต่อไปนี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.จิตติ ท่าไว ที่ให้คำปรึกษา ความรู้ต่างๆเกี่ยวกับการทดลอง ข้อเสนอแนะ รวมทั้งชี้ให้ในข้อบกพร่องต่างๆที่เกิดในการทดลอง "การผลิตสารเจลดานามัยซินจากเชื้อสเตรปโตมัยเซสสายพันธุ์เอ็มเอ เก้าและตำแหน่งอนุกรมวิธานเบื้องต้น" (Geldanamycin Production from *Streptomyces* sp. MA-9 and it taxonomic position) จนกระทั่งโครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ทางผู้จัดทำขอกราบพระคุณ ประธานกรรมการ ผศ.วีนา ชูโชติ กรรมการ อาจารย์สุจิตรา สุคนธมัต ที่ให้คำปรึกษาและกรุณาตรวจแก้ไขงานวิจัยฉบับนี้ให้สมบูรณ์

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเบิกเครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง รวมทั้งอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องต่างๆในการทำการทดลอง

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่กรุณาให้ใช้สถานที่เพื่อปฏิบัติงานวิจัยในครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานฉบับนี้คงเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่สนใจในงานที่เกี่ยวข้องทางด้านนี้หรือผู้ที่ต้องการศึกษาหาความรู้เกี่ยวกับโครงงานพิเศษนี้ หากมีข้อผิดพลาดประการใดในการจัดทำขออภัยมา ณ ที่นี้

นางสาวมนทิรา จันถาวร

นางสาวอุษณี ทีหอคำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญ (ต่อ)	จ
สารบัญ (ต่อ)	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ซ
สารบัญรูป (ต่อ)	ฌ
บทที่ ๑ บทนำ	๑
๑.๑ ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ	๑
๑.๒ วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	๒
๑.๓ ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	๒
๑.๔ ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	๒
๑.๕ ขั้นตอนการดำเนินงาน	๒
บทที่ ๒ ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	๓
๒.๑ เชื้อแอคติโนมัยสีท	๓
๒.๑.๑ ลักษณะทั่วไปของแอคติโนมัยสีท	๓
๒.๑.๒ ลักษณะทั่วไปของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ใช้ในการศึกษา	๔
๒.๑.๓ ความสำคัญของแอคติโนมัยสีท	๕
๒.๒ สารปฏิชีวนะ	๘
๒.๒.๑ การจัดจำแนกสารปฏิชีวนะ	๘
๒.๒.๒สารปฏิชีวนะที่ผลิตจากเชื้อแอคติโนมัยสีท	๑๐
บทที่ ๓ วิธีการดำเนินการวิจัย	๑๑
๓.๑ อุปกรณ์	๑๑
๓.๒ สารเคมี	๑๑

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
๓.๓ วิธีการทดลอง	๑๒
๓.๓.๑ เชื้อแอคติโนมัยสีทที่ใช้ในการทดลอง	๑๒
๓.๓.๒ การเตรียมเชื้อ	๑๒
๓.๓.๓ การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อ	๑๒
๓.๓.๔ การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนในช่วงสิบเอส อาร์ อาร์เอ็นเอ (16rRNA gene) และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ	๑๘
๓.๓.๕ การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารเจลดานามัยซินจากเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์เอ็มเอเก้า	๒๐
๓.๓.๖ การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	๒๕
บทที่ ๔ ผลการทดลอง	๒๖
๔.๑ การศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานของเชื้อสเตรปโตมัยสีท	๒๖
๔.๑.๑ ลักษณะทางฟีโนไทป์ เคโมไทป์และจีโนไทป์ ของสเตรปโตมัยเซส ไอโซเลต เอ็มเอเก้า	๒๖
๔.๑.๒ ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ ๑๑	๒๗
๔.๒ การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนสิบหกอาร์ อาร์เอ็นเอ(16rRNA gene) และการวิเคราะห์ตำแหน่งบนต้นไม้สายวิวัฒนาการ(phylogenetic tree) ของเชื้อไอโซเลตจีดีเอ็นแปด แปดแปด (GDN8-88)	๓๑
๔.๓ การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นของเกลือที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสาเจลดานามัยซินของเชื้อสเตรปโตมัยสีท สายพันธุ์ เอ็มเอ-เก้า	๓๒
๔.๓.๑ การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารเจลดานามัยซินจากเชื้อสเตรปโตมัยเซส	๓๒
๔.๓.๒ การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารเจลดานามัยซินจากเชื้อสเตรปโตมัยเซส	๓๓

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
๔.๓.๓ การศึกษาความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารเจลดานามัยซินจากเชื้อสเตรปโตมัยเซส	๓๕
๔.๓.๔ การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารเจลดานามัยซิน จากเชื้อสเตรปโตมัยเซส	๓๘
บทที่ ๕ สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ	๓๙
เอกสารอ้างอิง	๔๑
ภาคผนวก ก	๔๒
ภาคผนวก ข	๔๗
ภาคผนวก ค	๖๖

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ ๑ สารทุติยภูมิโดยประมาณที่สร้างจากเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ	๖
ตารางที่ ๒ ตัวอย่างสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากเชื้อแอคติโนมัยสีท	๑๐
ตารางที่ ๓ แสดงส่วนประกอบของอาหารพริดแฮม แอนด์ คอตลีบ อินออแกนนิก ซอลต์ (Pridham and Cott-lieb's inorganic salt medium)	๒๐
ตารางที่ ๔ แสดงแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจนและความเข้มข้นของเกลือที่ใช้เป็นสูตรอาหารต่างๆในการทดลอง	๒๒
ตารางที่ ๕ ลักษณะการเจริญของเชื้อสเตรปโตมัยสีทสายพันธุ์เอ็มเอ เก้า บนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP) ชนิดต่างๆ	๒๘
ตารางที่ ๖ แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ	๒๙
ตารางที่ ๗ แสดงการผลิตกรดจากแหล่งคาร์บอนของเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์เอ็มเอ เก้า	๓๐
ตารางที่ ๘ แสดงความสัมพันธ์ของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิต สารเจลดานามัยซิน	๓๒
ตารางที่ ๙ แสดงความสัมพันธ์ของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิต สารเจลดานามัยซิน	๓๔
ตารางที่ ๑๐ แสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นเกลือที่เหมาะสมต่อการเจริญและ การผลิตสารเจลดานามัยซิน	๓๕
ตารางที่ ๑๑ แสดงความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญและการผลิต สารเจลดานามัยซิน	๓๘

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปภาพที่ ๑ ลักษณะเส้นใยและสปอร์ของสเตรปโตมัยเซส (*Streptomyces*) ๔

รูปภาพที่ ๒ แสดงโครงสร้างทางเคมีของเจลดานามัยซิน ๗

รูปภาพที่ ๓ โครงสร้าง สิบเจ็ด ออลิลอะมิโน สิบเจ็ด ดีเมททรอออกซีเจลดานามัยซิน ๘

รูปภาพที่ ๔ ก แสดงลักษณะโคโลนีและการเจริญของเชื้อสเตรปโตมัยเซส ๒๖
สายพันธุ์ เอ็มเอเก้า (*Streptomyces* MA-9) บนอาหารไอเอสพีสอง (ISP2)
ข รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (๔๐๐ เท่า)
ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

รูปภาพที่ ๕ แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลตเอ็มเอเก้า (MA-9) ที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ๓๑
(phylogenetic tree, NJ method)

รูปภาพที่ ๖ ความสัมพันธ์ความสัมพันธ์ของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตสารเจลดานามัยซิน ๓๓
และน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์ เอ็มเอ เก้า

รูปภาพที่ ๗ ความสัมพันธ์ความสัมพันธ์ของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตสารเจลดานามัยซิน ๓๔
และน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์ เอ็มเอ เก้า

รูปภาพที่ ๘ ความสัมพันธ์ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นเกลือต่อการผลิตสารเจลดานามัยซิน ๓๖
และน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์ เอ็มเอ เก้า

รูปภาพที่ ๙ ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารเจลดานามัยซินและน้ำหนักเซลล์แห้ง ๓๗
ตามแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นของกลือ

รูปภาพที่๑๐ ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารเจลดานามัยซินและน้ำหนักเซลล์แห้ง ๓๘
แห้งตามระยะเวลา

รูปภาพที่ ๑๑ แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธ์เอ็มเอ เก้า ๔๗
บนอาหารไอเอสพีสอง (ISP2)

รูปภาพที่ ๑๒ แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธ์เอ็มเอ เก้า ๔๗
บนอาหารไอเอสพีสาม (ISP3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปภาพที่ ๑๓ แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์เอ็มเอ เก้า บนอาหารไอเอสพีสี่ (ISP4) ๔๘

รูปภาพที่ ๑๔ แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์เอ็มเอ เก้า บนอาหารไอเอสพีสาม (ISP5) ๔๘

รูปภาพที่ ๑๕ แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์เอ็มเอ เก้า บนอาหารไอเอสพีเจ็ด (ISP7) ๔๘

รูปภาพที่ ๑๖ แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์เอ็มเอ เก้า บนอาหาร Czapek's sucrose agar ๔๙

รูปภาพที่ ๑๗ แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์เอ็มเอ เก้า บนอาหาร Glucose asparagines agar ๔๙

รูปภาพที่ ๑๘ แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์เอ็มเอ เก้า บนอาหาร Nutrient agar ๔๙

รูปภาพที่ ๑๙ แสดงกราฟมาตราฐานของสารเจลดานามัยซิน ๖๖

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ ๑
บทนำ

๑.๑ ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

ปัจจุบันวงการแพทย์มีการใช้ยาและสารปฏิชีวนะมากขึ้น เนื่องจากโรคติดเชื้อได้ทวีความรุนแรงมากยิ่งขึ้น ดังนั้นจึงต้องเร่งหายาหรือสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ เพื่อรองรับความต้องการในการรักษาโรคติดเชื้อเหล่านี้ แหล่งของยาหรือสารปฏิชีวนะที่สำคัญได้มาจากธรรมชาติทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์เป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติที่สำคัญแหล่งหนึ่ง สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน โดยเฉพาะเป็นผู้ผลิตสารปฏิชีวนะแหล่งใหม่ที่มีความหลากหลายทางโครงสร้างและการออกฤทธิ์อีกทั้งสามารถเพิ่มผลผลิตได้ง่าย

สเตรปโตมัยเซส (*Streptomyces*) เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกจัดอยู่ในอันดับแอคติโนมัยคีทาเลส (*Actinomycetales*) ที่มีปริมาณเบสสูง โดยมีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อรามีการเจริญเป็นเส้นใย

เชื้อในสกุลนี้มีประโยชน์อย่างมากแก่มนุษย์ เนื่องจากเป็นแหล่งสำคัญของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งมีความสำคัญทั้งทางการแพทย์และมีคุณค่าทางเศรษฐกิจโดยเฉพาะทางเทคโนโลยีชีวภาพเชื้อกลุ่มนี้สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์และราก่อโรคหลายชนิดตัวอย่างของยาปฏิชีวนะที่สร้างได้จากเชื้อสเตรปโตมัยเซส (*Streptomyces*) ที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายได้แก่ สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) นีโอมัยซิน (neomycin) เตตราไซคลีน (tetracycline) อิริโทรมัยซิน (erythromycin) คลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol) และเจลดานามัยซิน (geldanamycin) เป็นต้น สารปฏิชีวนะเจลดานามัยซินมีโครงสร้างเป็นเบนโซควิโนน เอนซามัยซิน (benzoquinone ansamycins antibiotic) เป็นสารทุติยภูมิที่ผลิตได้จากเชื้อสเตรปโตมัยเซสที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ในวงกว้าง ในปัจจุบันได้มีการทดสอบว่าเจลดานามัยซินเป็นยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็ง จากความสำคัญของสารปฏิชีวนะเจลดานามัยซิน โครงงานพิเศษนี้จึงมุ่งเน้นการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารเจลดานามัยซินของเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์ เอ็มเอ เก้า ตลอดจนศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานเบื้องต้นของเชื้อนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

๑.๒ วัตถุประสงค์ของการทดลอง

๑. เพื่อทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์ เอ็มเอ เก้า เพื่อให้สามารถผลิตสารเจลดานามัยซินได้ในปริมาณสูง

๒. เพื่อทำการศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานเบื้องต้น ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา อนุกรมวิธานเคมี และวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วงยีนสิบหกเอส อาร์ อาร์เอ็นเอ (16S rRNA gene)

๑.๓ ขอบเขตของการทดลอง

๑. เลี้ยงเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์เอ็มเอ เก้า เพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา อนุกรมวิธานเคมี และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีนสิบหกเอส อาร์ อาร์เอ็นเอ (16S rRNA gene)

๒. หาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้เชื้อผลิตสารเจลดานามัยซินให้มีปริมาณมากที่สุด โดยการผันแปรแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และความเข้มข้นของเกลือ ตลอดจนระยะเวลาในการเลี้ยง

๑.๔ ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

๑. เพื่อทราบถึงลักษณะทางอนุกรมวิธานเบื้องต้น ของเชื้อในระดับสกุล

๒. เพื่อทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารเจลดานามัยซินที่ดีที่สุด

๓. เป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อใช้ศึกษา และวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์สาธารณสุขต่อไป

๑.๕ ขั้นตอนการดำเนินงาน

๑. ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์ เอ็มเอ เก้า ในอาหารไอเอสพีสอง (ISP2) ที่อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียสเป็นเวลา ๑๔ วัน

๒. ทำการศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อ เช่น การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญทางชีวเคมีสรีรวิทยา ลักษณะอนุกรมวิธานเคมี และวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนสิบหกเอส อาร์ อาร์เอ็น รวมทั้งวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

๓. ทำการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารเจลดานามัยซินได้ปริมาณมากที่สุด โดยการผันแปรแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของเกลือ และระยะเวลาในการเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ ๒
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

๒.๑ เชื้อแอคติโนมัยสีท (actinomycete)

๒.๑.๑ ลักษณะทั่วไปของแอคติโนมัยสีท

แอคติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่สามารถสร้างเส้นใยเป็นสายคล้ายรา ซึ่งส่วนใหญ่สามารถสร้างได้ทั้งเส้นใยใต้ผิวอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยเหนือผิวอาหาร (aerial mycelium) หรืออาจพบเฉพาะเส้นใยใต้ผิวอาหาร เป็นแบคทีเรียที่มีปริมาณโมลร้อยละของเบสกวานีนและไซโตซีนที่สูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป คือประมาณร้อยละ ๕๕ ถึง ๗๘ แบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน แต่ก็มีบางชนิดที่ไม่ต้องการออกซิเจนหรือต้องการเพียงเล็กน้อย โคโลนีของแอคติโนมัยสีทมีลักษณะที่แตกต่างจากโคโลนีของแบคทีเรียอื่นๆ คือมีลักษณะทึบแสงเส้นใยเหนือผิวอาหารแห้ง และมีลักษณะเป็นผงเมื่อมองด้วยตาเปล่า และสามารถสังเกตได้ชัดเจน หรือผิวโคโลนีอาจเรียบคล้ายหนังสัตว์ หรือเป็นรอยย่นเป็นเส้นใยสั้นๆ สังเกตด้วยตาเปล่าคล้ายกำมะหยี่ สามารถสร้างรงควัตถุสีต่างๆ เช่น สีขาว เทา เขียว เหลือง ส้ม แดง น้ำตาล ชมพู ม่วง และสีดำ เป็นต้น (รัตนาภรณ์, ๒๕๔๘)

แอคติโนมัยสีทมีลักษณะก้ำกึ่งระหว่างราและแบคทีเรียโดยลักษณะของแอคติโนมัยสีทที่คล้ายรา คือเส้นใยของแอคติโนมัยสีทจะแตกกิ่งก้านคล้ายรา แอคติโนมัยสีทหลายกลุ่มสามารถสร้างเส้นใยเหนือผิวอาหารตรงปลายมีโคนิเดีย (conidia) คล้ายกับลักษณะเส้นใยและสปอร์ของราแต่เส้นใยของแอคติโนมัยสีทมีขนาดเล็กกว่าราโดยแอคติโนมัยสีทจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยเพียง ๐.๕-๑.๐ ไมโครเมตร ซึ่งรามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเส้นใยถึง ๕-๕๐ ไมโครเมตร

แอคติโนมัยสีทถูกจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียเนื่องจากแอคติโนมัยสีทมีผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยสารเชิงซ้อนของน้ำตาล และกรดอะมิโนซึ่งมีลักษณะคล้ายกับแบคทีเรียแกรมบวก และถูกทำลายได้โดยแบคเทอริโอฝาจ และสารปฏิชีวนะประเภทเดียวกับที่ใช้ทำลายแบคทีเรีย และเมื่อศึกษาองค์ประกอบภายในเซลล์พบว่าแอคติโนมัยสีทไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส ดังนั้น จึงจัดจำแนกแอคติโนมัยสีทไว้ในกลุ่มของแบคทีเรีย (สินีนาถและคณะ, ๒๕๕๒)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

๒.๑.๒ ลักษณะทั่วไปของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ใช้ในการศึกษา

๒.๑.๒.๑ ลักษณะทั่วไปของเชื้อในสกุลสเตรปโตมัยเซส (*Streptomyces*)

เส้นใย (vegetative hyphae) มีขนาด ๐.๕-๒.๐ ไมโครเมตร สามารถแตกกิ่งแขนงได้มากแต่ไม่ค่อยแตกหักเป็นท่อน (รูปที่ ๑) เส้นใยเหนือผิวอาหารที่เจริญเต็มที่จะสร้างสปอร์ตั้งแต่สามถึงหลายสปอร์ต่อกันเป็นสายโซ่ น้อยชนิดมากที่สามารถสร้างสปอร์ต่อเป็นสายสั้นๆที่เส้นใยใต้ผิวอาหาร บางชนิดอาจสร้างโครงสร้างที่คล้ายสเคลอโรเทีย (sclerotia) พิคนิเดีย (pycnidia) อับสปอร์ (sporangia) และซินนีมาตา (synnemata) ได้ สร้างสปอร์ที่ไม่เคลื่อนที่ สร้างโคโลนีได้หลายแบบ ทั้งเส้นใยใต้ผิวอาหารและเส้นใยเหนือผิวอาหาร สามารถสร้างรงควัตถุได้หลายสีและอาจมีรงควัตถุที่สามารถแพร่ลงในอาหารได้ด้วย บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้หนึ่งชนิดหรือมากกว่า ต้องการอากาศ ติดสีแกรมบวกแต่ไม่ติดสีทนกรด (acid fast) อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง ๒๕-๓๕ องศาเซลเซียส แต่บางชนิดก็เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำหรือสูงกว่า ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง ๖.๕-๘.๐ ผนังเซลล์ประกอบด้วยกรดไดอะมิโนพิมิลิกชนิดแอลแอล (*LL*-diaminopimelic acid) ไม่มีกรดไมโคลิค พบอยู่ทั่วไปในดินรวมทั้งซากเน่าเปื่อย มีน้อยชนิดที่ทำให้เกิดโทษในคนและสัตว์แต่ในบางชนิดก็อาจก่อให้เกิดโรคใบพืชได้ มีปริมาณโมลของเบสกวานีนและไซโตซีนร้อยละ ๖๙-๗๘ (Williams, Goodfellow and Alderson, ๑๙๘๙ อ้างถึงโดย รัตนาภรณ์, ๒๕๔๘)

(ก) (ข)

รูปที่ ๑ ลักษณะเส้นใยและสปอร์ของสเตรปโตมัยเซส (*Streptomyces*) เมื่อมองผ่านเลนส์ทำงานระยะไกล (long working distance lens) กำลังขยาย ๔๐๐ เท่า (ก) ลักษณะโคโลนีของเชื้อสเตรปโตมัยเซส (ข) ลักษณะสปอร์ที่ขดเป็นเกลียวของสเตรปโตมัยเซส (*Streptomyces*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

๒.๑.๒.๒ ความสำคัญของแอคติโนมัยสีท

ในปัจจุบันแบคทีเรียหลายชนิดในกลุ่มแอคติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก ทั้งทางเทคโนโลยีชีวภาพ พันธุศาสตร์ นิเวศวิทยา เพราะนอกจากจะพบว่ามีการสร้างสารเมตาบอไลท์ที่สำคัญหลายชนิด และมีโครงสร้างทางพันธุกรรมที่หลากหลายแล้วแอคติโนมัยสีทยังสามารถสร้างเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์ได้อีกหลายชนิดที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ได้หลายด้าน (รัตนาภรณ์, ๒๕๔๘) ในธรรมชาติบทบาทที่สำคัญของแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยสีท คือ ช่วยย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในธรรมชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งช่วยย่อยส่วนประกอบของพืชและสัตว์ที่ทนทานต่อการย่อยสลาย เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และไคติน (ชาญวิทย์, ๒๕๕๒)

ในด้านการสร้างสารทุติยภูมิพบว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีการสร้างสารปฏิชีวนะและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่นำมาใช้ประโยชน์มากที่สุด ได้แก่สกุล สเตรปโตมัยเซส (*Streptomyces*) และเมื่อเปรียบเทียบกับการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆแล้ว แอคติโนมัยสีทก็ยังเป็นกลุ่มที่มีการสร้างสารเหล่านี้เป็นจำนวนมากที่สุดด้วยเช่นกัน โดยพบว่าแอคติโนมัยสีทสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากถึง ๒ ใน ๓ ของสารปฏิชีวนะทั้งหมดที่เรารู้จักกันในปัจจุบัน และในบรรดาสารปฏิชีวนะเหล่านี้มีมากถึงร้อยละ ๘๐ ที่สร้างมากจากเชื้อแอคติโนมัยซีทในสกุลสเตรปโตมัยเซส สำหรับสกุลที่สร้างได้มากรองลงมา ได้แก่ ไมโครโมโนสปอรา (*Micromonospora*) และถ้าหากจะรวมสารทุติยภูมิที่ให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ นอกเหนือจากสารปฏิชีวนะแล้วสารที่สร้างจากแอคติโนมัยสีทก็ยังคงมีมากที่สุดอยู่ดี คือมากกว่า ร้อยละ ๖๐ (รัตนาภรณ์, ๒๕๔๘)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๑ สารทุติยภูมิโดยประมาณ ที่สร้างจากเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ

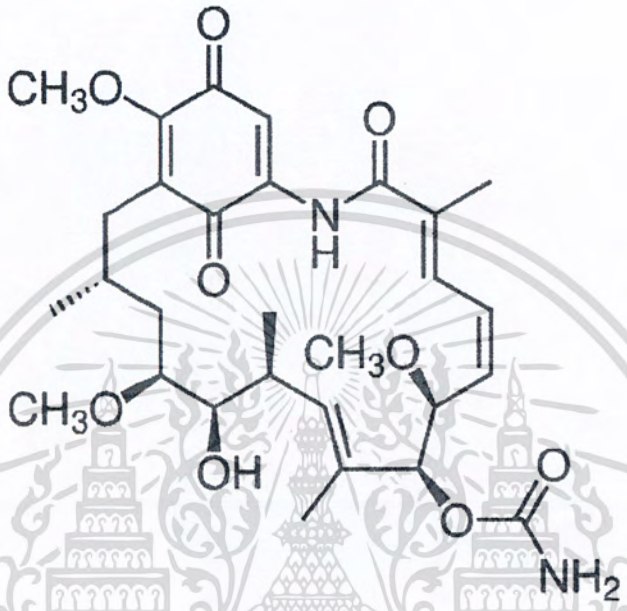
แหล่งที่มา	สารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของจุลินทรีย์				
	สารปฏิชีวนะ		สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ		รวมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งหมด
	ทั้งหมด	สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ	ไม่มีฤทธิ์เป็นสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	
แบคทีเรีย	๒๕๐๐	๗๘๐	๕๐๐	๑๖๘๐	๓๘๐๐
แอคติโนมัยสีท	๘๗๐๐	๒๔๐๐	๑๔๐๐	๓๘๐๐	๑๐๑๐๐
รา	๓๕๐๐	๒๓๐๐	๓๗๐๐	๖๐๐๐	๘๖๐๐
ทั้งหมด	๑๖๕๐๐	๖๐๐๐	๖๐๐๐	๑๑๕๐๐	๒๒๕๐๐

ที่มา : Bérdy (๒๐๐๕)

แอคติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างเส้นใยคล้ายเชื้อรา เชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้มีประโยชน์หลายด้านโดยเฉพาะเป็นผู้ผลิตสารปฏิชีวนะที่สำคัญ ยาปฏิชีวนะหลายตัวที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน เช่น เจนทามิซิน (gentamicin) อีริโทรมัยซิน (erythromycin) สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) แอคติโนมัยซิน ดี (actinomycin D) ล้วนพัฒนามาจากสารหลัก (lead compound) ที่สร้างจากเชื้อแอคติโนมัยซีททั้งสิ้น สารเจลดานามัยซิน (geldanamycin) เป็นสารหลัก (lead compound) ที่น่าสนใจอีกสารหนึ่งเนื่องจากมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา โปรโตซัวตลอดจนมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ และล่าสุดมีรายงานว่าสารเจลดานามัยซิน (geldanamycin) ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (ไมโครโมลาร์ถึงนาโนโมลาร์) สามารถแสดงฤทธิ์กระตุ้นการเจริญของเซลล์ประสาทได้ (Sarin และคณะ๒๐๐๗) สารเจลดานามัยซิน (geldanamycin) ถูกค้นพบครั้งแรกจากเชื้อแอคติโนมัยซีทในสกุลสเตรปโตมัยเซส (*Streptomyces*) ที่พบในดินบนบก สปีชีส์ที่มีรายงานว่าสามารถผลิตสารเจลดานามัยซินได้ คือ สเตรปโตมัยเซส ไฮโกรสโคพิคัส วาร์ไรตี เจลดานัส (*Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารเจลดานามัยซิน จัดเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มเบนโซควินอยด์แอนซามัยซิน (benzoquinoid ansamycin) ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราและเซลล์มะเร็งได้เป็นอย่างดี สารนี้สามารถเข้าจับกับแชปเพอร์โรนฮีทช็อคโปรตีนเก้าสิบ (chaperone heat shock protein 90) ที่ตำแหน่งเอทีพี (ATP binding site) มีผลทำให้เซลล์มะเร็งไม่สามารถพัฒนาได้เต็มที่



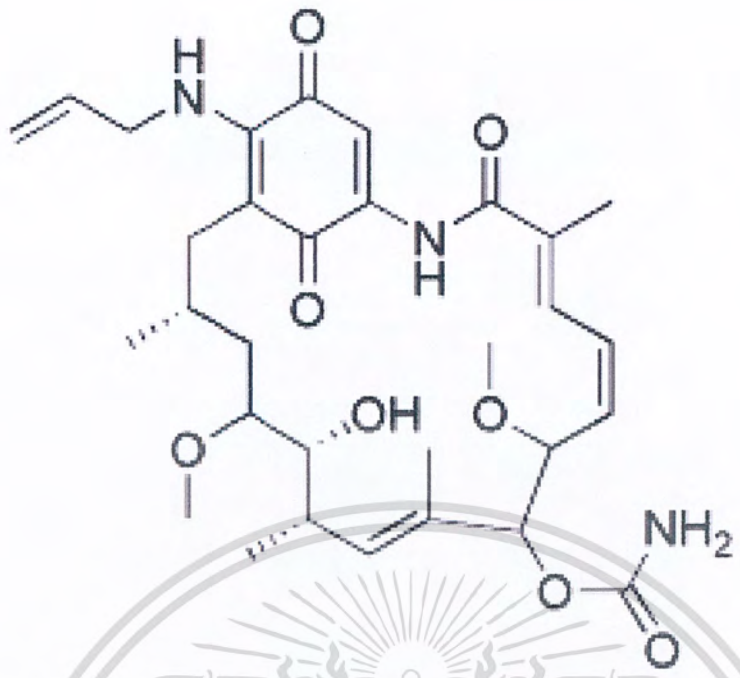
$(C_{28}H_{40}N_2O_9)$

รูปที่ ๒ แสดงโครงสร้างทางเคมีของเจลดานามัยซิน

ที่มา http://en.wikipedia.org/wiki/Geldanamycin

เมื่อเร็วๆ นี้นักวิทยาศาสตร์ได้ค้นพบฤทธิ์ที่น่าสนใจของสารเจลดานามัยซินอีกประการหนึ่งคือ พบว่าสารเจลดานามัยซินสามารถป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากการใช้ยารักษามะเร็งบางชนิด นอกจากนี้สารอนุพันธ์ของเจลดานามัยซิน เช่น สารสิบเจ็ด-อัลลิลอะมิโน-สิบเจ็ด-ดีเมทอกซีเจลดานามัยซิน (17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin) ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเนื้องอกบางชนิดได้ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



$(C_{31}H_{43}N_3O_8)$

รูปที่ ๓ โครงสร้างสารสิบเจ็ด-อัลลิลอะมิโน-สิบเจ็ด-ดีเมทอกซีเจลดานามัยซิน

(17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin)

ที่มา http://en.wikipedia.org/wiki/17-AAG

๒.๒ สารปฏิชีวนะ

สารปฏิชีวนะ หมายถึง ยาหรือสารเคมีใดๆที่ได้มาจากเชื้อจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรียหรือราสายพันธุ์ต่างๆ ซึ่งสารเหล่านี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตหรือทำลายเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดได้ สารปฏิชีวนะแต่ละชนิดอาจมีคุณสมบัติทางเคมี ฟิสิกส์ และเภสัชวิทยาต่างกัน (กำพล, ๒๕๓๘) สารปฏิชีวนะที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นมักเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์จะสร้างสารเหล่านี้ในช่วงปลายล็อกเฟส (late log phase) จนถึงช่วงการเจริญคงที่ (stationary phase) (กฤษณ์, ๒๕๔๘)

๒.๒.๑ การจัดจำแนกสารปฏิชีวนะ (กำพล, ๒๕๓๘)

การแบ่งประเภทของสารปฏิชีวนะสามารถแบ่งได้เป็น ๖ กลุ่มใหญ่ตามกลไกการออกฤทธิ์ของยา คือ

๒.๒.๑.๑ กลุ่มที่มีฤทธิ์ขัดขวางการสร้างผนังเซลล์ (cell wall) ยาในกลุ่มนี้ประกอบด้วย เพนิซิลิน (penicillin) เซฟาโลสปอริน (cephalosporin) แวนโคมัยซิน (vancomicin) เบซิเตรซิน (bacitracin) และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไซโคลเซอรีน (cycloserine) โดยยาในกลุ่มนี้มีผลทำลายผนังหุ้มเซลล์ ทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกและตาย จึงจัดเป็นยากลุ่มที่มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดยตรง (bactericidal action)

๒.๒.๑.๒ กลุ่มที่มีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ยากลุ่มนี้มีผลทำให้ของเหลวภายในเซลล์ซึมออกมานอกเซลล์และทำให้เซลล์ตายในที่สุด ยาที่มีกลไกการออกฤทธิ์เช่นนี้ได้แก่ โพลิมิกซิน (polymyxin) โคลิสติน (colistin) และแอมโฟเทอริซิน บี (amphotericin B)

๒.๒.๑.๓ กลุ่มที่มีผลขัดขวางการสร้างโปรตีน ยากลุ่มนี้มีผลยับยั้งการทำงานของไรโบโซม (ribosome) ซึ่งเป็นกลจักรที่สำคัญของเซลล์ในการสร้างโปรตีน จึงมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (bacteriostatic action) โดยไม่มีผลฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดยตรง ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องอาศัยการทำงานของภูมิต้านทานของร่างกายในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลืออยู่ ยากลุ่มนี้แบ่งย่อยออกได้เป็น ๒ กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีผลต่อไรโบโซมชนิด ๕๐เอส (50S) ได้แก่ คลอแรมเฟนิคอล (chloranphenicol) คลินดามัยซิน (clindamycin) และอิริโธมัยซิน (erythromycin) ส่วนกลุ่มที่มีผลต่อไรโซโซมชนิด ๓๐เอส (30S) ได้แก่ เตตราซัยคลิน (tetracycline)

๒.๒.๑.๔ กลุ่มที่มีผลทำให้กระบวนการสร้างโปรตีนผิดปกติ เกิดจากการที่ยาจับกับไรโบโซมชนิด ๓๐เอส (30S) และทำให้เกิดการสร้างโปรตีนที่ผิดปกติ เป็นผลให้จุลินทรีย์ถูกทำลาย ยาจึงมีสมบัติในการฆ่าเชื้อโดยตรง ยาในกลุ่มนี้ได้แก่ สเตรปติโนมัยซิน (streptinomycin) และอะมิโนไกลโคไซด์ (aminoglycoside) เช่น สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) กานามัยซิน (kanamycin) และนีโอมัยซิน (neomycin)

๒.๒.๑.๕ กลุ่มที่มีผลยับยั้งการสร้างกรดนิวคลีอิก(nucleic acid) ยากลุ่มนี้ทำให้เซลล์ไม่สามารถสร้างดีเอ็นเอ (DNA) ซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของจุลินทรีย์ จึงมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ยากลุ่มนี้ได้แก่ ไรแฟมฟิน (rifampin) เมโทรนิดาโซล (metronidazole) และยาในกลุ่มควิโนโลน (quinolone)

๒.๒.๑.๖ กลุ่มที่ขัดขวางกระบวนการเมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์ ยาในกลุ่มนี้ได้แก่ ยาในกลุ่มซัลโฟนาไมด์ และไตรเมโทพริม ซึ่งจะไปยับยั้งขบวนการเมทาบอลิซึมของกรดโฟลิค ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโตและแบ่งตัวต่อไปได้ ยาจึงออกฤทธิ์แค่ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

๒.๒.๒ สารปฏิชีวนะที่ผลิตจากเชื้อแอคติโนมัยสีท

สารทุติยภูมิที่สร้างขึ้นจากเชื้อแอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่ที่นำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์จะอยู่ในกลุ่มสารปฏิชีวนะที่นำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ โดยตัวอย่างสารที่นำมาใช้เป็นยารักษาโรคได้แก่

ตารางที่ ๒ ตัวอย่างสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากเชื้อแอคติโนมัยสีท

ชนิดของเชื้อแอคติโนมัยสีท	สารปฏิชีวนะที่สร้าง
สเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์เอสเอฟ ๒๕๘๗ (*Streptomyces* sp. SF 2587)	แอนคิโนมัยซิน (ankinomycin)
สเตรปโตมัยเซส เวอติซิลลัส เอที ๒๙๑ (*Streptomyces* verticillus AT 291)	เบรโอมัยซิน เอสอง (bleomycin a_2)
แซคคาโรโพลีสปอรา อิริทราเอีย (*Saccharopolyspora erythraea*)	อิริโทรมัยซิน (erythromycin)
สเตรปโตมัยเซส ริโมซัส (*Streptomyces rimosus*)	พาโรโมซัยซิน (paromocycin)
สเตรปโตมัยเซส คานามัยซีติคัส (*Streptomyces kanamyceticus*)	คานามัยซิน (kanamycin)
ไมโครโมโนสปอรา เพอพิวเรีย (*Micromonospora purpurea*)	เจนตามัยซิน (gentamicin)
สเตรปโตมัยเซส สเปกทาบิลิส (*Streptomyces spectabilis*)	สเปกทิโนมัยซิน (spectinomycin)
อะไมโคลาทอปซีส โอเรียนทาลิส (*Amycolatopsis orientalis*)	แวนโคมัยซิน (vancomycin)
ไมโครโมโนสปอรา กรีซีโอรูบิดา (*Micromonospora griseorubida*)	มายซินามิซินสอง (mycinamicin II)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ ๓

วิธีดำเนินการวิจัย

๓.๑ อุปกรณ์

๓.๑.๑	ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)	รุ่น BE ๖๐๐ บริษัท Memmert, Germany
๓.๑.๒	หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)	HIRAYAMA รุ่น KICLAVE, Japan
๓.๑.๓	กล้องจุลทรรศน์	บริษัท Olympus, Japan
๓.๑.๔	ตู้ปลอดเชื้อ	รุ่น UV-๑๒๖ International Scienfic Supply, Thailand
๓.๑.๕	เครื่องชั่งสารทศนิยม ๔ ตำแหน่ง	รุ่น BA ๖๑๐ บริษัท Sartorius, Germany
๓.๑.๖	เครื่องวัดค่าความเป็นกรด ด่าง (pH meter)	EUTECH INSTRUMENT P4510, USA
๓.๑.๗	ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)	รุ่น LUE ๖๐๐ บริษัท Memmert ,Germany
๓.๑.๘	เครื่องหาปริมาณสารในสภาวะของเหลว (HPLC)	รุ่น SPD-๒๐A SHIMADZU, Japan
๓.๑.๙	เครื่องเขย่า (Shaker)	
๓.๑.๑๐	เครื่องกรองสุญญากาศ (Aspirator)	

๓.๒ สารเคมี

๓.๒.๑	สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)
๓.๒.๒	สารสกัดจากมอลต์ (Malt extract)
๓.๒.๓	ผงวุ้น (Agar)
๓.๒.๔	น้ำตาลกลูโคส (Glucose)
๓.๒.๕	เปปโตน (Peptone)
๓.๒.๖	ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Dipotassiumhydrogenphosphate; K_2HPO_4)
๓.๒.๗	แมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium sulfate; $MgSO_4 . 7H_2O$)
๓.๒.๘	โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride; NaCl)
๓.๒.๙	แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate; $((NH_4)_2SO_4)$)
๓.๒.๑๐	แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride; $CaCl_2$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

๓.๒.๑๓ แมงกานีสคลอไรด์ (Manganese chloride; $MnCl_2 . 4H_2O$)

๓.๒.๑๔ เมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium sulfate; $MgSO_4 . 7H_2O$)

๓.๒.๑๕ กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid; HCl)

๓.๒.๑๖ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide; NaOH)

๓.๒.๑๗ แป้งที่ละลายน้ำได้(Soluble starch)

๓.๒.๑๘ เจลาติน (Gelatin)

๓.๓ วิธีการทดลอง

๓.๓.๑ เชื้อแอคติโนมัยสีทที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์เอ็มเอเก้า(***Streptomyces* sp. MA-9**) แยกได้จากดินป่าชายเลน จังหวัดตรัง ที่อยู่ในอาหารเอียงไอเอสพีสอง (ISP2)

๓.๓.๒ การเตรียมเชื้อ

ทำการเขี่ยเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์เอ็มเอเก้า(*Streptomyces* sp. MA-9) ลงบนอาหารแข็งไอเอสพีสอง (ISP2)ที่มีน้ำทะเลเป็นส่วนประกอบทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียสจนกระทั่งเชื้อเจริญจากนั้นทำการเขี่ยเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวๆใส่ในหลอดอาหารวุ้นเอียง ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียสเป็นเวลา ๗-๑๔ วันจากนั้นทำสารแขวนลอยสปอร์โดยเตรียมจากสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ ๐.๘๕

๓.๓.๓ การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อ

๓.๓.๓.๑ การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อ (Morphological and cultural characteristics)

การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะพิจารณาจากการสร้างสปอร์ของเชื้อโดยเลี้ยงบนอาหารไอเอสพีสอง (ISP2)เจือจางที่ระดับ ๑ ต่อ ๕จากนั้นนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ ๓๐องศาเซลเซียสเป็นเวลา ๒๑ วันเมื่อเชื้อสร้างสปอร์แล้วตรวจสอบลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีเลนส์ส่องระยะไกล

การทดสอบการเจริญของเชื้อทำโดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารมาตรฐานที่กำหนดอยู่ในโครงการสเตรปโตมัยเซส นานาชาติ (International *Streptomyces* Project, ISP)ต่างๆโดยวิธีขีดเชื้อบนจานอาหาร (Crosshatch streak)ได้แก่ Yeast extract Malt extract agar(ISP2), Oatmeal agar(ISP3), Inorganic salt-salt agar(ISP4), Glycerol-asparagine agar(ISP5), Tyrosine agar(ISP7), Peptone iron agar(ISP6), Nutrient agar(NA), Czapek's sucrose agar เป็นเวลา ๑๔ วันที่อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียสทำการตรวจสอบการเจริญเนื้อและสีของโคโลนีด้านบนสีของโคโลนีด้านล่างและรงควัตถุที่ละลายน้ำได้เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(IBC-NBS Carotenoid color chart)(MundieและDavid, ๑๙๕๐) ตรวจดูลักษณะของเส้นใยและการสร้างสปอร์ด้วยเลนส์ทำงานระยะไกล (Long working distance lens)

๓.๓.๓.๒การตรวจสอบลักษณะทางชีวเคมีและสรีระวิทยา (biochemical and physiological characteristics)

๑.การผลิตกรดจากแหล่งคาร์บอน

ในการทดสอบการผลิตกรดจากแหล่งคาร์บอนทำโดยทดสอบในอาหารพื้นฐาน (basal medium agar) (shirling และ Gottlieb, ๑๙๖๖) ที่เติมโบรโมคลีซอลเพอร์เพิล (bromo cresol purple)ที่มีความเข้มข้น ๐.๐๔ เป็นตัวบ่งชี้ (indicator) ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนที่ใช้ทดสอบชนิดต่างๆความเข้มข้นร้อยละ ๑จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ ๑๑๐องศาเซลเซียสเป็นเวลา ๑๐ นาทีแหล่งคาร์บอนที่ใช้ประกอบด้วย

๑.ไม่มีแหล่งคาร์บอน	๙. ดีไรโบส (D-ribose)
๒.ดีไซโลส(D-xylose)	๑๐. อินโนซิทอล (Innositol)
๓. ดีแมนนิทอล(D-manitol)	๑๑. กลีเซอรอล (Glycerol)
๔. แอลแรมโนส(L-ramphinose)	๑๒.ซาลิซิน (Salicin)
๕. ดีราฟฟีโนส(D-Rhaffinose)	๑๓. ดีกาแลคโตส (D-galactose)
๖. เซลโลไบโอส (Cellobiose)	๑๔. แลคโตส (Lactose)
๗. แอลอะราบิโนส (L-arabinose)	๑๕. ดีฟลุคโตส (D-fructose)
๘. ซูโครส(Sucrose)	๑๖. กลูโคส (Glucose)

ทำการทดสอบโดยหยดสารแขวนลอยสปอร์ซึ่งเตรียมจากสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ ๐.๘๕ ลงบนอาหารที่ใช้ทดสอบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียสเป็นเวลา ๑๔วันเมื่อครบเวลาที่กำหนดทำการตรวจผลโดยเปรียบเทียบลักษณะสีที่เปลี่ยนไปของตัวชี้บ่ง(indicator) ในอาหาร

การอ่านผลการทดสอบ

(+) คือมีการผลิตกรดจากแหล่งคาร์บอนโดยดูจากการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีน้ำเงินม่วงเป็นสีเหลือง

(w) คือมีการผลิตกรดจากแหล่งคาร์บอนเล็กน้อย โดยดูจากการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีน้ำเงินม่วงเป็นม่วงแกมเหลืองอ่อน

(-) คือไม่มีการผลิตกรดจากแหล่งคาร์บอนโดยสังเกตจากสีของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนแปลงยังคงเป็นสีม่วงเหมือนเดิม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

๒.การย่อยสลายแป้ง (Starch hydrolysis)

เลี้ยงเชื้อสเตรปโตมัยเซสสายพันธุ์เอ็มเอเก้า (*Streptomyces* sp. MA-9) บนอาหารวุ้นเกลืออนินทรีย์แป้ง (inorganic salt-strach agar, ISP4) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียสเป็นเวลา ๑๔ วันตรวจผลโดยการหยดสารละลายแกรมไอโอดีนลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อถ้ามีการย่อยแป้งเกิดขึ้นจะเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี

๓. การย่อยสลายและการตกตะกอนโปรตีนนม (Coagulation and Peptinization)

เลี้ยงเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์ เอ็มเอเก้า (*Streptomyces* sp. MA-9) ในน้ำนม (Skim milk) ความเข้มข้นร้อยละ ๑๐ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียสเป็นเวลา ๑๔ วัน ถ้ามีการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนมเกิดขึ้น สารละลายน้ำนมจะเปลี่ยนเป็นสารละลายใส หากมีการตกตะกอนของนมจะพบการรวมตัวของโปรตีนในนมเป็นตะกอนแข็งตกลงที่ก้นหลอด

๔. การย่อยสลายเจลาติน (Gelatinization)

เลี้ยงเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์ เอ็มเอเก้า (*Streptomyces* sp. MA-9) ในอาหารเหลวเจลาติน (bouillon gelatin broth) จากนั้นไปบ่มที่อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียสเป็นเวลา ๑๔ วัน ตรวจผลโดยนำหลอดทดลองที่เลี้ยงเชื้อไว้ไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ ๔ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๕ นาที จากนั้นนำมาเปรียบเทียบกับหลอดที่ไม่ได้ใส่เชื้อถ้ามีการย่อยเจลาตินจะไม่เกิดการแข็งตัวของเจลาติน

๕.การรีดิซ์ไนเตรท (Nitrate Reduction)

เลี้ยงเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์ เอ็มเอเก้า (*Streptomyces* sp. MA-9) ในอาหารเหลวเปปโตนไนเตรท (peptone nitrate broth) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๔ วันตรวจผลโดยเติมสารละลายกรดซัลฟานิก(sulfanilic acid) ๒ หยดและสารละลายเอ็นเอ็น-ไดเมทิล-แอล-แนพทิลลามีน (*N, N*-dimethyl-L-naphthylamine)๓หยด ถ้าเชื้อมีการรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรต์สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูจนถึงสีแดงส้ม

๖.การเจริญบนอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ

เลี้ยงเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์ เอ็มเอเก้า (*Streptomyces* sp. MA-9)บนอาหารไอเอสพีสอง(ISP2)ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ๑.๕๒๓๔๕๖และ ๗จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ ๓๐ องศา-เซลเซียสเป็นเวลา ๑๔ วันตรวจผลการเจริญที่ความเข้มข้นต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

๗. การเจริญที่ความเป็นกรดด่างต่างๆ

เลี้ยงเชื้อสเตรปโตมัยเซสสายพันธุ์เอ็มเอเก้า (*Streptomyces* sp. MA-9) บนอาหารไอเอสพีสอง (ISP2) ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น ๔ ๔.๕ ๕ ๖ ๘ และ ๙ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๔ วัน ตรวจผลการเจริญของเชื้อที่ระดับค่าความเป็นกรดด่างต่างๆ

๘. การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

เลี้ยงเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์ เอ็มเอเก้า (*Streptomyces* sp. MA-9) บนอาหารไอเอสพีสองจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ ๒๐ ๓๗ ๔๕ ๕๐ ๖๐ และ ๖๕ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๔ วันตรวจผลการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

๓.๓.๓.๓. การตรวจสอบลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี (chemotexonomic characteristics)

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหารไอเอสพีสอง (ISP2) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา ๗ วันเขี่ยเชื้อลงในขวดรูปชมพู่ขนาด ๕๐๐ มิลลิลิตรที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อไอเอสพีสอง (ISP2) ปริมาตร ๒๐๐ มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ ๒๐๐ รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา ๕ วันทำการเก็บเซลล์โดยนำเซลล์มาปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ ๑๐,๐๐๐ รอบต่อนาทีเป็นเวลา ๕ นาทีเพื่อให้ตกตะกอนและล้างด้วยน้ำกลั่น ๕ ครั้ง นำเซลล์ที่เก็บได้ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –๘๐ องศาเซลเซียสเป็นเวลา ๒-๓ วันก่อนนำไปทำระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้งด้วยความเย็น (freeze dryer) นำเซลล์ที่ได้ไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่อไป

๑. การวิเคราะห์ลักษณะไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกในผนังเซลล์ (diaminopimelicacid, DAP)

ตรวจสอบลักษณะไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกของผนังเซลล์ของเชื้อโดยการสลายเซลล์แห้ง ๑๐มิลลิกรัม ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น๖นอร์มอล (6N HCl) ปริมาตร ๑ มิลลิลิตรที่ ๑๐๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๘ ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นแล้วนำมาแยกตะกอนออกนำส่วนที่เป็นสารละลายไปทำให้แห้งภายใต้เครื่องระเหยสภาวะสุญญากาศที่ ๖๐ องศาเซลเซียส ละลายตัวอย่างที่แห้งด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปจุด (spot) บนแผ่นเซลลูโลสทีแอลซีหมายเลข ๕๗๑๖ (cellulose TLC no. 5716) ขนาด ๑๐×๑๐ เซนติเมตร นำแผ่นทีแอลซี (TLC) ที่ได้มาจุ่มลงในตัวทำละลายผสมของเมทานอล–น้ำ–กรดไฮโดรคลอลิคความเข้มข้น ๖ นอร์มอล-ไพริดีน(methanol-water-6N HCl–pyridine) ในอัตราส่วน ๘๐ : ๒๖ : ๔ : ๑๐ ทิ้งไว้จนตัวทำละลายผสมเคลื่อนที่จนสุดแผ่นเป่าให้แห้งนำไปจุ่มลงในตัวทำละลายดังกล่าวอีกครั้งนำแผ่นทีแอลซี (TLC) ที่ได้มาฉีดพ่นด้วยสารละลายนินไฮดรินความเข้มข้นร้อยละ ๐.๕ (0.5% ninhydrin solution) ในอะซีโตน(acetone) ให้ทั่วทั้งแผ่นนำไปอบความร้อนที่ ๑๐๐ องศาเซลเซียส ประมาณ ๒-๓ นาที ตรวจแถบของสารที่เกิดขึ้นเทียบกับสารมาตรฐานกรดไดอะมิโนพิเมลิกไอโซเมอร์ต่างๆ (ชาญวิทย์ สุริยฉัตรกุล,๒๕๔๖)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

๒. การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์(whole cell sugar)

ตรวจสอบชนิดของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์โดยสลายเซลล์แห้ง ๕๐ มิลลิกรัม ด้วยกรดซัลฟูริก ความเข้มข้น ๑ นอร์มอลปริมาตร ๑ มิลลิลิตรที่ ๑๐๐ องศาเซลเซียสเป็นเวลา ๒ ชั่วโมงทิ้งให้เย็นเติมสารละลายอิ่มตัวของแบเรียมไฮดรอกไซด์ ($Ba(OH)_2$) ลงไปจนมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่ ๕.๒-๕.๕ นำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนนำส่วนใสที่ได้มาเติมบิวทานอล ๑-๒ หยดแล้วระเหยให้แห้งภายใต้สุญญากาศเมื่อแห้งแล้วละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นปริมาตร ๔๐๐ ไมโครลิตรนำสารละลายที่ได้ไปจุดบนแผ่นเซลลูโลสทีแอลหมายเลข ๕๗๑๖ (cellulose TLC no. 5716) นำแผ่นทีแอลซี (TLC) ที่ได้มาจุ่มลงในระบบตัวทำละลายผสมของบิวทานอล:น้ำกลั่น:ไพริดีน:โทลูอีน (toluene) อัตราส่วน ๑๐:๖:๖:๑ ทิ้งไว้จนสารละลายเคลื่อนที่จนสุดแผ่นเป่าให้แห้งทำซ้ำอีกครั้งนำแผ่นทีแอลซี (TLC) ที่แห้งแล้วมาพ่นด้วยสารละลายแอนนิลีนพทาเลท (aniline phtalate) ที่ประกอบด้วยกรดพทาลิค (phtalic acid) ๓.๒๕ กรัม บิวทานอลที่อิ่มตัวด้วยน้ำ ๑๐๐ มิลลิลิตร แอนนิลีน (aniline) ๒ มิลลิลิตรนำไปอบที่ ๑๐๐ องศาเซลเซียส๕-๑๐ นาทีเพื่อดูจุดที่เกิดขึ้นเทียบกับสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน (standard) (ชาญวิทย์สุริยฉัตรกุล,๒๕๔๖)

สารละลายน้ำตาลมาตรฐาน (ความเข้มข้น๑๐มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เตรียมเป็น๒กลุ่ม

กลุ่มที่๑. ประกอบด้วยน้ำตาลกาแลคโตส (Lactose) แมนโนส (Mannose) ไซโลส (Xylose) และแรมโนส (Rhamnose)

กลุ่มที่๒. ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส (Glucose) อะราบิโนส (Arabinose) และไรโบส (Ribose)

บริเวณที่ปรากฏแถบสีของน้ำตาลมาตรฐานมี ๒ แบบ คือ แถบสีที่มีสีชมพู ได้แก่ น้ำตาลไรโบส (Ribose) ไซโลส (Xylose) และอะราบิโนส (Arabinose) และแถบสีเหลือง ได้แก่ แรมโนส (Rhamnose) แมนโนส (Mannose) กลูโคส (Glucose) และกาแลคโตส (Galactose)

๓. การวิเคราะห์โพลาร์ลิปิด (polar lipid)

เตรียมสารโพลาร์ลิปิด (polar lipid) ตามวิธีของมินนิคิน(Minnikin และคณะ๑๙๘๔) โดยการสกัดเซลล์แห้ง ๑๕๐ มิลลิกรัม ด้วยเมทานอลน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ ๐.๓ อัตราส่วน ๑๐๐:๑๐ ปริมาตร ๓ มิลลิลิตร และปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) ปริมาตร ๓ มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ ๓,๐๐๐ รอบต่อนาที เป็นเวลา ๑๐ นาที ดูดส่วนบนทิ้งเติมปิโตรเลียมอีเทอร์ปริมาตร ๑ มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ ๓,๐๐๐ รอบต่อนาที เป็นเวลา ๑๐ นาที ดูดส่วนบนทิ้งนำสารส่วนล่างไปบ่มที่อุณหภูมิ ๑๐๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๕ นาที ทำให้เย็นที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๕ นาที นำไปสกัดต่อด้วยคลอโรฟอร์มเมทานอลน้ำ(chloroform,methanol,water)อัตราส่วน ๕๐:๑๐๐:๓๐ ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา ๑ ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ ๓,๐๐๐ รอบต่อนาที เป็นเวลา ๑๐ นาที ดูดส่วนใสไปใส่ในหลอดทดลองใหม่ทำการสกัดซ้ำด้วยคลอโรฟอร์มเมทานอลน้ำ (chloroform,methanol,water)อัตราส่วน ๕๐:๑๐๐:๔๐ ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา ๓๐ นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ ๓,๐๐๐ รอบต่อนาที เป็นเวลา ๑๐ นาที และดูดส่วนใสไปรวมในหลอดทดลองข้างต้นนำส่วนใส่

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ที่ได้ไปสกัดต่อในชั้นคลอโรฟอร์มปริมาตร ๑.๓ มิลลิลิตร และน้ำปริมาตร ๑.๓ มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดูดส่วนบนทิ้งนำสารสกัดส่วนล่างไประเหยแห้งด้วยก๊าซไนโตรเจนทำการวิเคราะห์ฟอสโฟลิปิดโดยละลายสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์มเมทานอล (chloroform,methanol)อัตราส่วน ๒:๑ และดูดสารตัวอย่างจุดลงบนซิลิกาทีซีแอล(silica TLC) คีเซลเจล๖๐เอฟ๒๕๔(Kieselgel 60 F254, 10x10 cm) นำแผ่นพีทีซีแอล (PTLC) ที่ได้มาทำการเดเวลลอป(develop) ๒ ทิศทาง(two dimensional development) ในระบบตัวทำละลาย ๒ ชนิดคือ คลอโรฟอร์มเมทานอลน้ำ (chloroform,methanol,water) อัตราส่วน ๖๕:๒๕:๔ และคลอโรฟอร์มกรดอะซีติคเมทานอลน้ำ (chloroform,acetic acid,methanol,water) (๔๐:๗:๕:๖:๒) เมื่อแห้งแล้วนำไปรมด้วยไอโอดีนแล้วพ่นด้วยสารละลายผสมดังนี้ (Minnikin และคณะ, ๑๙๘๔)

(๑) ดิทท์เมอร์ (Dittmer) และเลสเทอร์ (Lester) สำหรับวิเคราะห์ฟอสโฟลิปิดทั้งหมด (จุดสีน้ำเงิน)

(๒) นินไฮดริล (Ninhydrin) อบที่อุณหภูมิ ๑๑๐ องศาเซลเซียสเป็นเวลา ๑๐ นาทีสำหรับวิเคราะห์ฟอสโฟทิดิลเอทาโนลามายด์ (phosphatidylethanolamine ,PE), เมททิลฟอสฟาทิดิลเอทาโนลามายด์ (methyl - phosphatidylethanolamine, methyl-PE) และไฮดรอกซิลฟอสโฟทิดิลเอทาโนลามายด์ (OH-phosphatidylethanolamine,OH-PE) (จุดสีชมพู)

(๓) อะนิซอลดีไฮด์ (Anisaldehyde) อบที่อุณหภูมิ ๑๐๐ องศาเซลเซียสเป็นเวลา ๑๐ นาทีใช้สำหรับวิเคราะห์ไกลโคลิปิดและลิปิดอื่นๆ (จุดสีเหลืองอมเขียว)

(๔) ดราก้อนดอฟ (Dragendorff) ใช้สำหรับวิเคราะห์ฟอสโฟทิดิลโคลีน(phosphatidylcholine, PC) (จุดสีส้ม)

๓.๓.๓.๔. การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบเบื้องต้นโดยวิธีเอกาเวลดิฟฟิวชัน (agar well diffusion)

๓.๓.๓.๔.๑ การเพาะเลี้ยงเชื้อ

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทในอาหารไอเอสพีสอง (ISP2) ปริมาตร ๑๐๐ มิลลิลิตร ในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ ๒๐๐ รอบต่อนาที อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียสเป็นเวลา ๑๔ วัน (สำหรับเชื้อแอคติโนมัยสีททางทะเลจะใช้น้ำทะเลเทียมแทนน้ำกลั่น)

๓.๓.๓.๔.๒ การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

เตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ บาซิลลัส สับทิลิส เอทีซีซี ๖๖๓๓ (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) สูโดโมแนส แอรูจิโนซา เอทีซีซี ๒๗๘๕๓ (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) ไมโครคอกคัส ลูเทียส เอทีซีซี ๙๓๔๑ (*Micococcus luteus* ATCC 9341) เอสเชอริเชีย โคไล เอทีซีซี ๒๕๙๒๒ (*Escherichiacoli* ATCC 25922) สแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส เอทีซีซี ๒๕๙๒๓ (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) และ แคนดิดา แอลบิแคนส์ เอทีซีซี ๑๐๒๓๑ (*Candida albicans* ATCC 10231) ผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ ๐.๘๕ ที่ปราศจากเชื้อ แล้วปรับให้มีความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน แมคฟาแลน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

117228

(McFarland) เบอร์ ๐.๕ (เทียบเท่ากับการปรับระดับความขุ่น (O.D.) ให้มีค่าอยู่ในช่วง ๐.๐๘ ถึง ๐.๑ เมื่อวัดที่ความยาวคลื่น ๖๒๕ นาโนเมตร) ซึ่งจะมีจำนวนเซลล์โดยประมาณเท่ากับ ๑×๑๐^{๕} ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร

๓.๓.๓.๔.๓ การเตรียมอาหารที่ใช้ทดสอบ

เตรียมอาหารมิวเลอส์ฮินตันเอกา (mueller's hinton agar) หรือ ทริปติกซอยเอกา(tryptic Soy agar) สำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและซาโบรอดส์เดกโตรสเอกา (sabouraud's dextrose Agar) สำหรับเลี้ยงยีสต์ ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ ๑๒๑ องศาเซลเซียส ความดัน ๑๕ ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ๑๕ นาที จากนั้นดูดอาหารปริมาตร ๒๐มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ๙๐มิลลิเมตร วนจานเพาะเชื้อให้อาหารกระจายทั่ว ทิ้งให้อาหารแข็งตัว

๓.๔.๓.๔.๔การทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์โดยวิธีเอกาเวลดิฟฟิวชัน (agar well diffusion)

นำไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อจุ่มลงในสารละลายในข้อ ๓.๔.๓.๔.๒แล้วทา (swab) ให้ทั่วอาหารที่จะใช้ทดสอบรอให้ผิวหน้าอาหารแห้ง จากนั้นเจาะอาหารด้วยแท่งเจาะ (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ๖มิลลิเมตร และดูดน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยสีทปริมาตร ๓๐ไมโครลิตร ใส่ลงหลุมในจานเพาะเลี้ยง นำจานเพาะเลี้ยงไปบ่มที่ ๓๗ องศาเซลเซียส ๒๔ ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรียและ ๓๐องศาเซลเซียส ๔๘ชั่วโมง สำหรับเชื้อยีสต์ ตรวจผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสที่เกิดขึ้นในหน่วยมิลลิเมตรคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีที่สุดมา ๑ ไอโซเลต มาเลี้ยงในปริมาณมาก

๓.๓.๔ การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนในช่วงสิบหกเอส อาร์ อาร์เอ็นเอ (16S rRNA gene) และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

๓.๓.๔.๑ การสกัดดีเอ็นเอ

เลี้ยงเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์เอ็มเอเก้า (*Streptomyces* sp. MA-9) ในอาหารเหลวไอเอสพีสอง (ISP2) ที่เติมกรดอะมิโนไกลซีนความเข้มข้นร้อยละ๐.๑-๐.๓ โดยเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ ๑๘๐ รอบต่อนาที เป็นเวลา ๕ วัน เมื่อครบเวลาที่กำหนดทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำสารละลายเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ ๕,๐๐๐ รอบต่อนาที เป็นเวลา ๕ นาที เทส่วนใสทิ้งและล้างเซลล์ด้วยสารละลายซาลีนอีดีทีเอ พีเอชแปด (saline EDTA, pH 8) ล้างซ้ำ ๒ รอบ จากนั้นเติมสารละลายทริสไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น ๑๐ โมลาร์ (10M Tris-HCL)๒-๓ มิลลิลิตร และเติมไลโซไซม์ (lysozyme) ปริมาณ ๑๐-๑๕ มิลลิกรัม ทำการเขย่าให้เข้ากันซึ่งการเติมไลโซไซม์จะมีผลในการย่อยผนังเซลล์ จากนั้นนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียสเป็นเวลา๒-๓ ชั่วโมง หรือจนกว่าเห็นสารละลายเหนียวหนืด เมื่อครบกำหนดเวลาเติมสารละลายสแตนดาร์ดโซเดียมซิเตรต ความเข้มข้น ๑๐ เท่า (10x Standard sodium citrate, SSC) ปริมาณ ๖๐ ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และเติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต(Sodiumdodecylsulfate)ความเข้มข้นร้อยละ ๑๐ ปริมาณ ๕ มิลลิลิตร บ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ๖๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๐ นาทีจากนั้นนำมาตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์ม (phenol-chloroform) อัตราส่วน ๑ ต่อ ๑เขย่าส่วนผสมให้เข้ากันเป็นเวลา ๑๐-๒๐ นาที แล้วนำมาปั่นเหวี่ยง ๑๐,๐๐๐ รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ ๔ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๐ นาที จากนั้นค่อยๆดูดส่วนใสด้านบนใส่ในบีกเกอร์ขนาดเล็ก เติมแอลกอฮอล์ที่แช่เย็นความเข้มข้นร้อยละ๙๙ ปริมาตร ๒ ใน ๓ ของสารละลายในบีกเกอร์ ซึ่งแอลกอฮอล์นี้จะช่วยตกตะกอนดีเอ็นเอเป็นสีขาวใส จากนั้นใช้แท่งแก้วเล็กหมุน(spooling)พันสายดีเอ็นเอ ทำการล้างดีเอ็นเอด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ร้อยละ ๗๐ และ ๙๕ ตามลำดับปล่อยดีเอ็นเอที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งแห้งแล้วนำมาละลายในสารละลายสแตนดาร์ดโซเดียมซิเตรต ความเข้มข้น ๑ เท่า (1x Standard sodium citrate, SSC) ปิดปากหลอดด้วยพาราฟิล์มเก็บดีเอ็นเอไว้ที่ ๔ องศาเซลเซียส

๓.๓.๔.๒การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนในช่วงสิบหกเอส อาร์ อาร์เอ็นเอ(16S rRNA gene)และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ(phylogenetic tree)

นำดีเอ็นเอที่แยกได้มาเพิ่มปริมาณในช่วงยีนสิบหกเอส อาร์ อาร์เอ็นเอ (16S rRNA gene) โดยใช้ ยี่สิบเอฟไพรเมอร์ (20F primer)และหนึ่งพันห้าร้อยสี่สิบเอ็ดอาร์ไพรเมอร์ (1541R primer) ทำปฏิกิริยาในเครื่องดีเอ็นเอเทอร์มอลไซเคิล (DNA thermal cycle, Gene Amp PCR System ๙๗๐๐; Applied Biosystem) ยีนสิบหกเอส อาร์ อาร์เอ็นเอ (16S rRNA gene) ที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR) นำมาทำให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้เอบีเจ ปริซึม บิ๊กดาย เทอร์มิเนเตอร์ ไซเคิล ซีเควินซิ่ง เรดดี้ รีแอคชั่น คิต(ABJ PRISM bigdye terminator cycle sequencing ready reaction kit) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะทำการเปรียบเทียบ(alignment) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของเจนแบงค์อีเอ็มบีแอล ดีดีบี(Genbank/EMBL/DDBJ)โดยใช้โปรแกรมบลาสท (Blast program)จำลองข้อมูลเป็นมัลติดาต้า เซท(Multi-data set)และสร้างต้นไม้สายวิวัฒนาการด้วยโปรแกรมเมกา ซอฟแวร์รุ่น ๒.๑ (MEGA software version ๒.๑)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

๓.๓.๕ การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารเจลดานามัยซิน จากเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์เอ็มเอเก้า

๓.๓.๕.๑การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่ใช้เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารเจลดานามัยซิน คือ อาหารพริดแฮม แอนด์ ค็อตเลียบ อินออแกนนิก ซอลต์ (Pridham and Cott-lieb's inorganic salt medium) ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

ตารางที่ ๓ แสดงส่วนประกอบของอาหารพริดแฮม แอนด์ ค็อตเลียบ อินออแกนนิก ซอลต์ (Pridham and Cott-lieb's inorganic salt medium)

สารเคมี	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	๒.๓๘
แอมโมเนียมซัลเฟต$(NH_4)_2SO_4$	๒.๖๔
คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 . 5H_2O$)	๐.๐๐๖๔
ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4 . 7H_2O$)	๐.๐๐๑๕
แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2 . 4H_2O$)	๐.๐๐๗๘
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 . 7H_2O$)	๑.๐๐
เฟอรัสซัลเฟต($FeSO_4.7H_2O$)	๐.๐๐๑๑

ทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น ๗.๘จากนั้นฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันสูงที่ ๑๒๑องศาเซลเซียสเป็นเวลา ๑๕นาที

๓.๓.๕.๒ การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นของเกลือที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารเจลดานามัยซินของเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์ เอ็มเอ-เก้า

เตรียมอาหารสูตรต่างๆ ที่มีการผันแปรแหล่งคาร์บอนได้แก่ กลูโคส แป้ง ซูโครส กากน้ำตาล แหล่งไนโตรเจน ได้แก่ เคซีน สารสกัดยีสต์ เปปโตน น้ำต้มถั่วเหลือง น้ำต้มข้าวโพด ความเข้มข้นร้อยละ ๑ รวมทั้งผันแปรปริมาณโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ๓.๕๔ และ ๕ ในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน (ดังตารางที่๔) แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ ๑๒๑ องศาเซลเซียส ๑๕ นาทีจากนั้นเติมสารละลายแขวนลอย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สปอร์ร้อยละ ๒ ลงในอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ ๒๐๐ รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียสเป็นเวลา ๑๔ วัน เมื่อครบกำหนดเวลานำมาตรวจสอบปริมาณสารเจลดานามัยซินด้วยเครื่องเอชพีแอลซี (HPLC,High Performance Liquid Chromatography) ทำการทดลอง ๓ ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๔ แสดงแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจนและความเข้มข้นของเกลือที่ใช้เป็นสูตรอาหารต่างๆในการทดลอง

แหล่งคาร์บอน / แหล่งไนโตรเจน	กลูโคส (C_1)			ซูโครส (C_2)			กากน้ำตาล (C_3)			แป้ง (C_4)		
	ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ			ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ			ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ			ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ		
	๓.๕ (Na_1)	๔ (Na_2)	๕ (Na_3)	๓.๕(Na_1)	๔ (Na_2)	๕ (Na_3)	๓.๕(Na_1)	๔ (Na_2)	๕ (Na_3)	๓.๕(Na_1)	๔ (Na_2)	๕ (Na_3)
เคซีน (N_1)	ซีหนึ่งเอ็นหนึ่งเอ็นเอหนึ่ง ($C_1 N_1 Na_1$)	ซีหนึ่งเอ็นหนึ่งเอ็นเอสอง ($C_1 N_1 Na_2$)	ซีหนึ่งเอ็นหนึ่งเอ็นเอสาม ($C_1 N_1 Na_3$)	ซีสองเอ็นหนึ่งเอ็นเอหนึ่ง ($C_2 N_1 Na_1$)	ซีสองเอ็นหนึ่งเอ็นเอสอง ($C_2 N_1 Na_2$)	ซีสองเอ็นหนึ่งเอ็นเอสาม ($C_2 N_1 Na_3$)	ซีสามเอ็นหนึ่งเอ็นเอหนึ่ง ($C_3N_1 Na_1$)	ซีสามเอ็นหนึ่งเอ็นเอสอง ($C_3N_1 Na_2$)	ซีสามเอ็นหนึ่งเอ็นเอสาม ($C_3N_1 Na_3$)	ซีสี่เอ็นหนึ่งเอ็นเอหนึ่ง ($C_4N_1 Na_1$)	ซีสี่เอ็นหนึ่งเอ็นเอสอง ($C_4N_1 Na_2$)	ซีสี่เอ็นหนึ่งเอ็นเอสาม ($C_4N_1 Na_3$)
สารสกัดยีสต์(N_2)	ซีหนึ่งเอ็นสองเอ็นเอหนึ่ง ($C_1 N_2 Na_1$)	ซีหนึ่งเอ็นสองเอ็นเอสอง ($C_1 N_2 Na_2$)	ซีหนึ่งเอ็นสองเอ็นเอสาม ($C_1 N_2 Na_3$)	ซีสองเอ็นสองเอ็นเอหนึ่ง ($C_2 N_2 Na_1$)	ซีสองเอ็นสองเอ็นเอสอง ($C_2 N_2 Na_2$)	ซีสองเอ็นสองเอ็นเอสาม ($C_2 N_2 Na_3$)	ซีสามเอ็นสองเอ็นเอหนึ่ง ($C_3N_2 Na_1$)	ซีสามเอ็นสองเอ็นเอสอง ($C_3N_2 Na_2$)	ซีสามเอ็นสองเอ็นเอสาม ($C_3N_2 Na_3$)	ซีสี่เอ็นสองเอ็นเอหนึ่ง ($C_4N_2 Na_1$)	ซีสี่เอ็นสองเอ็นเอสอง ($C_4N_2 Na_2$)	ซีสี่เอ็นสองเอ็นเอสาม ($C_4N_2 Na_3$)
เปปโตน(N_3)	ซีหนึ่งเอ็นสามเอ็นเอหนึ่ง ($C_1 N_3 Na_1$)	ซีหนึ่งเอ็นสามเอ็นเอสอง ($C_1 N_3 Na_2$)	ซีหนึ่งเอ็นสามเอ็นเอสาม ($C_1 N_3 Na_3$)	ซีสองเอ็นสามเอ็นเอหนึ่ง ($C_2 N_3 Na_1$)	ซีสามเอ็นสองเอ็นเอสอง ($C_2 N_3 Na_2$)	ซีสองเอ็นสามเอ็นเอสาม ($C_2 N_3 Na_3$)	ซีสามเอ็นสามเอ็นเอหนึ่ง ($C_3N_3 Na_1$)	ซีสามเอ็นสามเอ็นเอสอง ($C_3N_3 Na_2$)	ซีสามเอ็นสามเอ็นเอสาม ($C_3N_3 Na_3$)	ซีสี่เอ็นสามเอ็นเอหนึ่ง ($C_4N_3 Na_1$)	ซีสี่เอ็นสามเอ็นเอสอง ($C_4N_3 Na_2$)	ซีสี่เอ็นสามเอ็นเอสอง ($C_4N_3 Na_3$)
ผงถั่วเหลืองบด (N_4)	ซีหนึ่งเอ็นสี่เอ็นเอหนึ่ง ($C_1 N_4 Na_1$)	ซีหนึ่งเอ็นสี่เอ็นเอสอง ($C_1 N_4 Na_2$)	ซีหนึ่งเอ็นสี่เอ็นเอสาม($C_1 N_4 Na_3$)	ซีสองเอ็นสี่เอ็นเอหนึ่ง ($C_2 N_4 Na_1$)	ซีสองเอ็นสี่เอ็นเอสอง ($C_2 N_4 Na_2$)	ซีสองเอ็นสี่เอ็นเอสาม ($C_2 N_4 Na_3$)	ซีสามเอ็นสี่เอ็นเอหนึ่ง ($C_3N_4 Na_1$)	ซีสามเอ็นสี่เอ็นเอสอง ($C_3N_4 Na_2$)	ซีสามเอ็นสี่เอ็นเอสาม ($C_3N_4 Na_3$)	ซีสี่เอ็นสี่เอ็นเอหนึ่ง ($C_4N_4 Na_1$)	ซีสี่เอ็นสี่เอ็นเอสอง ($C_4N_4 Na_2$)	ซีสี่เอ็นสี่เอ็นเอสาม ($C_4N_4 Na_3$)

น้ำต้มข้าวโพด (N_5)	ซีหนึ่งเอ็นห้าเอ็นเอหนึ่ง ($C_1 N_5 Na_1$)	ซีหนึ่งเอ็นห้าเอ็นเอสอง ($C_1 N_5 Na_2$)	ซีหนึ่งเอ็นห้าเอ็นเอสาม ($C_1 N_5 Na_3$)	ซีสองเอ็นห้าเอ็นเอหนึ่ง ($C_2 N_5 Na_1$)	ซีสองเอ็นห้าเอ็นเอสอง ($C_2 N_5 Na_2$)	ซีสองเอ็นห้าเอ็นเอสาม ($C_2 N_5 Na_3$)	ซีสามเอ็นห้าเอ็นเอหนึ่ง ($C_3N_5 Na_1$)	ซีสามเอ็นห้าเอ็นเอสอง ($C_3N_5 Na_2$)	ซีสามเอ็นห้าเอ็นเอสาม ($C_3N_5 Na_3$)	ซีสี่เอ็นห้าเอ็นเอหนึ่ง ($C_4N_5 Na_1$)	ซีสี่เอ็นห้าเอ็นเอสอง ($C_4N_5 Na_2$)	ซีสี่เอ็นห้าเอ็นเอสาม ($C_4N_5 Na_3$)

หมายเหตุ ตัวอย่างสูตรอาหารเช่น ซีหนึ่งเอ็นหนึ่งเอ็นเอหนึ่ง ($C_1N_1Na_1$) หมายความว่า มีการเติมแหล่งคาร์บอน คือ กลูโคส

มีการเติมแหล่งไนโตรเจน คือ เคซีน

มีการเติมเกลือที่ระดับความเข้มข้น ๓.๕ เปอร์เซนต์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

๓.๓.๕.๒.๑. การวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำกระดาษกรองวอทแมน เบอร์ ๑ (Whatman no.1) ไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ ๑๑๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๓ ชั่วโมง จากนั้นนำมาทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ นำไปชั่งเพื่อหาน้ำหนักที่แน่นอนและบันทึกค่าของน้ำหนักกระดาษกรองไว้ นำน้ำหมักเชื้อในแต่ละสภาวะมาทำการกรองด้วยกระดาษกรองที่เตรียมไว้โดยเครื่องกรองแบบสุญญากาศ (Membrane Filtration) นำกระดาษกรองที่ทำการกรองเซลล์แล้วไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ ๑๐๕ องศาเซลเซียสเป็นเวลา ๒๔ ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์จนกระทั่งน้ำหนักคงที่และนำไปชั่งเพื่อหาน้ำหนักเซลล์

๓.๓.๕.๒.๒. การวิเคราะห์หาปริมาณสารเจลดานามัยซินที่เชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์เอ็มเอ เก้า (*Streptomyces* sp. MA-9) ผลิตในสภาวะต่างๆ

นำน้ำหมักเชื้อที่กรองได้จากข้อ ๓.๔.๕.๒.๑ มาวิเคราะห์ปริมาณเจลดานามัยซินด้วยเครื่องเอชพีแอลซี (HPLC, High-Performance Liquid Chromatography) โดยสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์มีดังนี้

คอลัมน์ (column) : C_{18} reverse phase,5µm(19x150mm)

เฟสเคลื่อนที่(mobile phase) : สารอะซิโตไนไตรล์ : เมทานอล : น้ำ (acetonitrile : methanol : water) ในอัตราส่วน ๗๐ : ๒๐ : ๑๐

อัตราการไหล (flow rate) : ๑ มิลลิลิตรต่อนาที

เครื่องตรวจวัด (detector) : UV-VIS detector ความยาวคลื่น ๒๕๔ นาโนเมตร

ปริมาณตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ : ๒๐ ไมโครลิตร

การเตรียมตัวอย่างก่อนทำการวิเคราะห์:

นำน้ำหมักเชื้อที่กรองได้จากข้อ ๓.๓.๕.๒.๑มากรองผ่านแผ่นกรองเซลลูโลสเมมเบรนที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุน ขนาด ๐.๔๕ ไมโครเมตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องเอชพีแอลซี

เมื่อทราบถึงสูตรอาหารที่มีแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นของเกลือที่ดีที่สุดต่อการผลิตสารเจลดานามัยซินแล้ว จึงนำมาทำการศึกษาหาผลของระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตสารเจลดานามัยซินต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

๓.๓.๕.๒.๓ การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตสารเจลดานามัยซินของเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์เอ็มเอ เก้า (*Streptomyces* sp. MA-9)

ทำการเลี้ยงเชื้อสเตปโตมัยเซส สายพันธุ์ เอ็มเอเก้า (*Streptomyces*sp. MA-9) ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นของเกลือที่ดีที่สุดต่อ การผลิตสารเจลดานามัยซินที่ได้จากข้อ๓.๔.๕.๒ บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ ๒๐๐ รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๗ และ๑๔ วัน เมื่อครบกำหนดนำมาตรวจสอบปริมาณสารเจลดานามัยซินที่เชื้อผลิตด้วยเครื่องเอชพีแอลซี (HPLC,High Performance Liquid Chromatography) ตามสภาวะดังข้อ ๓.๔.๕.๒.๒

๓.๓.๖ การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การทดลองที่ได้ทั้งสามซ้ำวางแผนการทดลองเป็นแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) ดังนั้นจึงต้องวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA) โดยใช้โปรแกรมเอสพีเอสเอส วินโดร์(SPSS for Window)จากนั้นนำมาการวิเคราะห์และการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธีดันแคน (Duncan)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ ๔

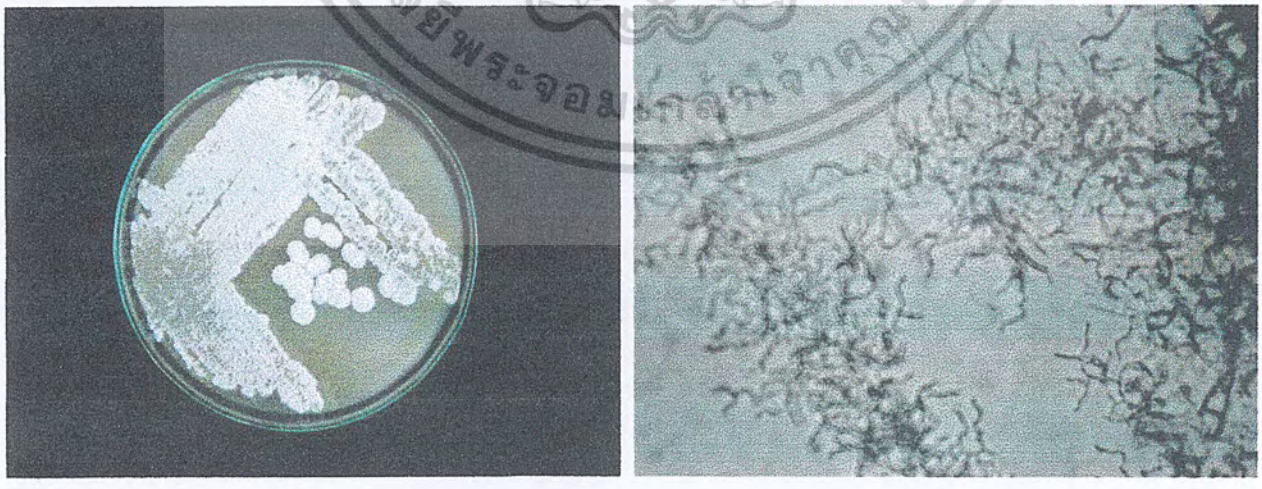
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

๔.๑ การศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานของเชื้อสเตรปโตมัยเซส (*Streptomyces* sp. MA-9)

๔.๑.๑ ลักษณะทางฟีโนไทป์ เคโมไทป์และจีโนไทป์ ของ สเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์ เอ็มเอ เก้า(*Streptomyces* sp. MA-9)

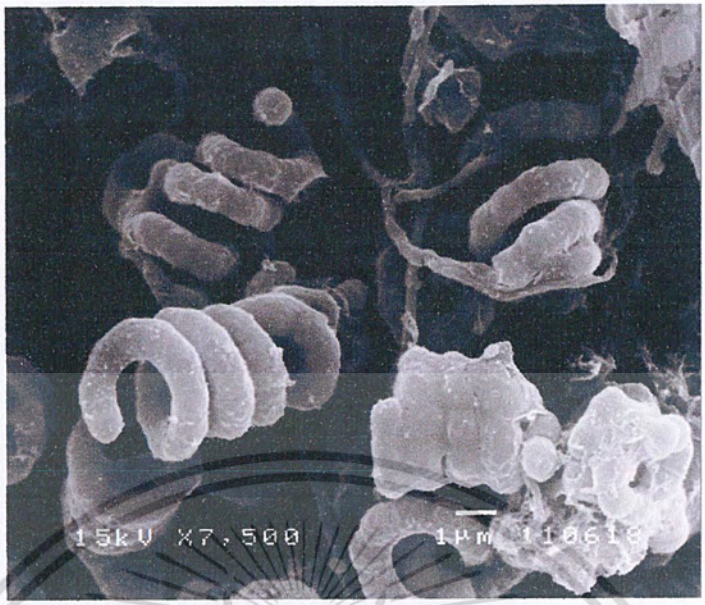
เป็นเชื้อแอคติโนมัยเซส ที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาวอมเทาและเส้นใยอาหารสีเหลืองอ่อน ไม่สร้างรงควัตถุในอาหาร สปอร์มีลักษณะเป็นท่อนสั้นต่อกันเป็นเกลียว (รูปที่ ๔) เจริญได้ดีบนอาหารไอเอสพีสอง (ISP2)

เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ ๖ สามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายแป้งและเจลาตินได้ แต่ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรท์ได้ สามารถผลิตกรดจากแหล่งคาร์บอนได้เกือบทุกชนิด ยกเว้น ดี-ไซโลส (D-xylose) และซูโครส (Sucrose) และสามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อบาซิลลัส ซับไทลิส เอทีซีซี ๖๖๓๓ (*Bacillussubtilis* ATCC 6633) ไมโครคอกคัส ลูเทียส เอทีซีซี ๙๓๔๑ (*Micrococcus luteus* ATCC 9341) สแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส เอทีซีซี ๒๕๙๒๓ (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) และแคนดิดา แอลบิแคน เอทีซีซี ๑๐๒๓๑ (*Candida albicans* ATCC 10231) ได้



ก ข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ค

รูปที่ ๔ ก แสดงลักษณะโคโลนีและการเจริญของเชื้อสเตรปโตมัยเซสสายพันธุ์ เอ็มเอเก้า (*Streptomyces* MA-9) บนอาหารไอเอสพีสอง (ISP2)

ข รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (๔๐๐ เท่า)

ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

๔.๑.๒ ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ ๑๑

ผนังเซลล์ของเชื้อนี้ประกอบด้วยกรดดีอะมิโนพิมีลิกแบบแอลแอล (*LL*, cell wall type 1) พบน้ำตาลกลูโคส ไรโบส กาแลคโตส และอะราบิโนส เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติดิลเอทาโนลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสฟาติดิลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) ฟอสฟาติดิลอินโนซิทอล (phosphatidylinositol) ฟอสฟาติดิลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุลสเตรปโตมัยเซส (*Streptomyces*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๕ ลักษณะการเจริญของเชื้อสเตรปโตมัยสีท สายพันธุ์เอ็มเอ เก้า บนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP) ชนิดต่างๆ

อาหาร	การเจริญ	ลักษณะสีของเส้นใยอากาศ	ลักษณะสีของเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุที่สร้าง
ไอเอสพีสอง (ISP2)	ดีมาก	ขาวอมเทา	เหลืองอมส้ม	-
ไอเอสพีสาม (ISP3)	ดีมาก	ขาว	เหลืองอมส้มสว่าง	-
ไอเอสพีสี่ (ISP4)	ดีมาก	ขาวอมเหลือง	เหลืองอมส้ม	-
ไอเอสพีห้า (ISP5)	ดีมาก	ขาวอมเหลือง	เหลืองอมขาว	-
ไอเอสพีเจ็ด (ISP7)	ดีมาก	ขาว	เหลืองอมส้ม	-
ชาเป็กซูโครส (Cz.Sucose)	ดีมาก	ขาว	เหลืองอมชมพู	-
กลูโคสแอสปาราจีน เอการ์ (Glu.A)	ดีมาก	ขาวอมเหลือง	เหลืองอมส้ม	-
นิวเตรียน เอการ์ (N.A)	ดีมาก	ขาวอมเหลือง	เหลืองอมส้ม	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๖ แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ

กลุ่ม	รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นเกลือที่ทนได้							ความเป็นกรดด่างที่เจริญได้					การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ						หางนม		ย่อยสลายเจลาติน	รีดิวส์ไนเตรท	ย่อยสลายแป้ง
		๑.๕	๒	๓	๔	๕	๖	๗	๔	๔.๕	๖	๘	๙	๒๐	๓๗	๔๐	๔๕	๕๐	๕๕	ย่อยสลายโปรตีน	ตกตะกอนโปรตีน			
ทะเล	MA-9	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+
	JCM 10672	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+

หมายเหตุ เจซีเอ็ม ๑๐๖๗๒ (JCM 10672) คือ สเตรปโตมัยเซส มาเลซิเอ็นซิส เจซีเอ็ม ๑๐๖๗๐ (*Streptomyces malaysiensis* JCM 10672)

ตารางที่ ๗ แสดงการผลิตกรดจากแหล่งคาร์บอนของเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์เอ็มเอ เก้า

รหัสเชื้อ	แหล่งคาร์บอน													
	ดี แมนนิทอล (D-manitol)	ดีไซโรส (D-xylose)	แอลแรมโนส (L-ramphinose)	อินโนสิทอล (Innositol)	ดีราฟฟิโนส (D-Rhaffinose)	กลีเซอรอล (Glycerol)	ซาลิซิน (Salicin)	แลคโตส (Lactose)	ดีกาแลคโตส (D-galactose)	แอลอะราบิโนส (L-arabinose)	เซลโลไบโอส (Cellobiose)	ดีฟรุกโตส (D-fructose)	ดีไซโรส (D-xylose)	ซูโครส (Sucrose)	กลูโคส (Glucose)
MA-9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
JCM 10672	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

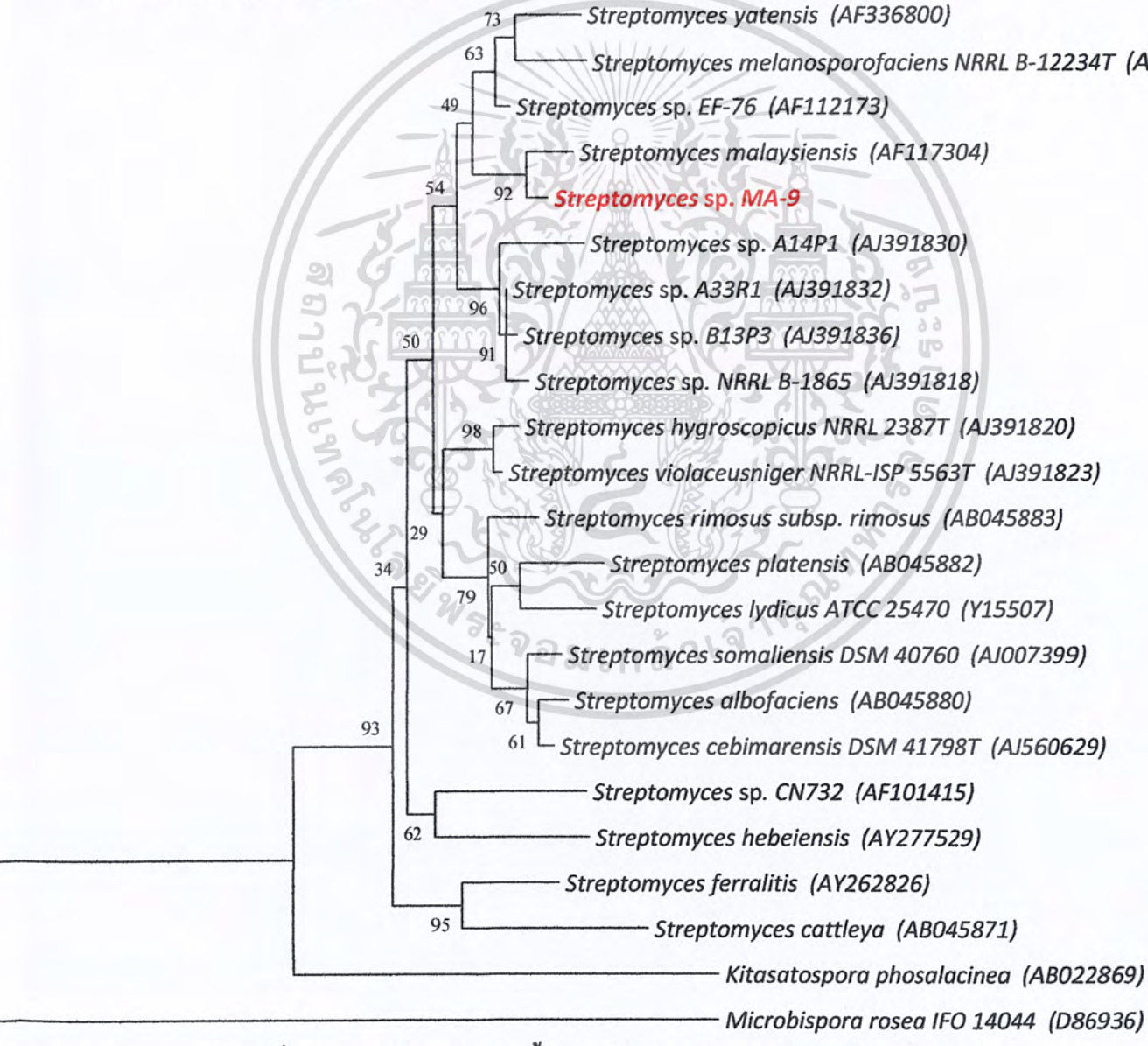
หมายเหตุ + = การเกิดการเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์จากสีน้ำเงินม่วงเป็นสีเหลือง

- = ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีอินดิเคเตอร์

W = เกิดการเปลี่ยนสีอินดอเคเตอร์เล็กน้อย

๔.๒ การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนในช่วงสิบหกเอส อาร์ อาร์เอ็นเอ (16S rRNA gene) และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์ เอ็มเอเก้า (*Streptomyces* sp. MA-9)

จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนในช่วงสิบหกเอส อาร์ อาร์เอ็นเอ (16S rRNA gene) ของเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์ เอ็มเอเก้า (*Streptomyces* sp. MA-9) พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อสเตรปโตมัยเซส มาเลซิเอ็นซีส (*Streptomyces malaysiensis*) มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ ๙๙.๑ ที่ระดับความเชื่อมั่นของค่าบูทสแตรป (bootstrap values) บนตำแหน่งบนต้นไม้สายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ที่ร้อยละ ๙๒ (รูปที่ ๕)



รูปที่ ๕ แสดงตำแหน่งของเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์ เอ็มเอเก้า (*Streptomyces* sp. MA-9) บนต้นไม้สายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree, NJ method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

๔.๓ ผลของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นของเกลือที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารเจลดานามัยซินจากเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์ เอ็มเอเก้า (*Streptomyces* sp. MA-9)

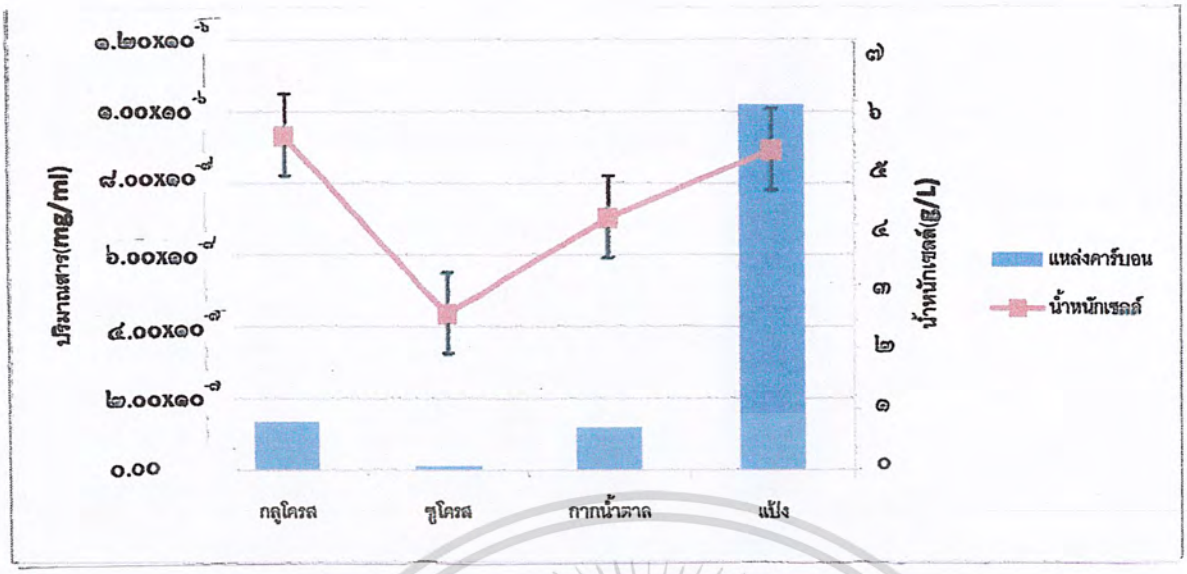
๔.๓.๑การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารเจลดานามัยซินจากเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์เอ็มเอ เก้า (*Streptomyces* sp. MA-9)

เมื่อทำการผันแปรแหล่งคาร์บอนได้แก่ กลูโคส ซูโครส กากน้ำตาลและแป้ง พบว่าเชื้อมีการผลิตสารเจลดานามัยซินปริมาณมากที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนคือแป้งโดยสามารถผลิตสารเจลดานามัยซินได้ ๑.๐๒×๑๐$^{-๖}$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีน้ำหนักเซลล์แห้ง ๕.๒๑กรัมต่อลิตร รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคสโดยเชื้อสามารถผลิตสารเจลดานามัยซินได้ ๑.๓๗×๑๐$^{-๗}$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีน้ำหนักเซลล์แห้ง ๕.๔๔ กรัมต่อลิตร ในขณะเดียวกันอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนคือกลูโคสพบว่าเชื้อมีอัตราการเจริญสูงสุดคือมีน้ำหนักเซลล์แห้ง๕.๔๔กรัมต่อลิตร (ดังตารางที่ ๘)จากการศึกษานี้พบว่าเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์ เอ็มเอ เก้า (*Streptomyces* sp. MA-9) สามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส ซึ่งสอดคล้องกับ Singh และคณะ (๒๐๐๙) ที่พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส ทำให้เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดเช่นกัน แต่การศึกษาในครั้งนี้พบว่าเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์ เอ็มเอ เก้า (*Streptomyces* sp. MA-9) สามารถผลิตสารทุติยภูมิได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบ ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของนักวิทยาศาสตร์ในหลายๆบทความที่มักสรุปว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทจะสามารถสร้างสารทุติยภูมิได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ ๘ แสดงความสัมพันธ์ของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตสารเจลดานามัยซิน

แหล่งคาร์บอน	ปริมาณสาร (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
กลูโคส	๑.๓๗×๑๐$^{-๗}$	๕.๔๔
ซูโครส	๑.๒๑×๑๐$^{-๘}$	๒.๕๔
กากน้ำตาล	๑.๒๑×๑๐$^{-๗}$	๔.๑๑
แป้ง	๑.๐๒×๑๐$^{-๖}$	๕.๒๑

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ๖ ความสัมพันธ์ของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตสารเจลดานามัยซินและน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์ เอ็มเอ เก้า (*Streptomyces* sp. MA-9)

๔.๓.๒ การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารเจลดานามัยซินของเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์ เอ็มเอ เก้า (*Streptomyces* sp. MA-9)

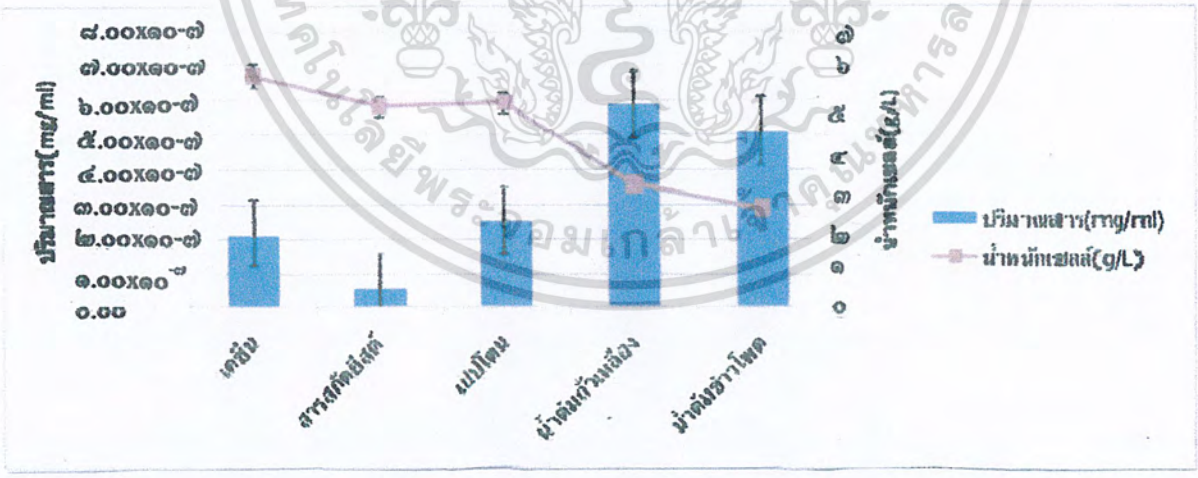
เมื่อทำการผันแปรแหล่งไนโตรเจนได้แก่ เคซีน สารสกัดจากยีสต์ เปปโตน น้ำต้มถั่วเหลือง และน้ำต้มข้าวโพด พบว่าเชื้อมีการผลิตสารเจลดานามัยซินปริมาณมากที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนคือน้ำต้มถั่วเหลือง โดยสามารถผลิตสารเจลดานามัยซินได้ ๕.๘๕×๑๐^{๗} มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีน้ำหนักเซลล์แห้ง ๓.๐๘ กรัมต่อลิตร รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจน เป็นน้ำต้มข้าวโพด โดยเชื้อสามารถผลิตสารเจลดานามัยซินได้ ๕.๑๐×๑๐^{๗} มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีน้ำหนักเซลล์แห้ง ๒.๔๘ กรัมต่อลิตร ในขณะเดียวกันอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจน คือ เคซีน พบว่าเชื้อมีอัตราการเจริญสูงสุดคือมีน้ำหนักเซลล์แห้ง ๕.๘๓ กรัมต่อลิตร (ดังตารางที่ ๕) จากการศึกษานี้พบว่าเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์ เอ็มเอ เก้า (*Streptomyces* sp. MA-9) สามารถสารทุติยภูมิได้ดีที่สุดในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นน้ำต้มถั่วเหลืองซึ่งสอดคล้องกับ Singh และคณะ (๒๐๐๕) ที่พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจน เป็นอาหารที่มีส่วนประกอบของถั่วเหลืองจะทำให้เชื้อสามารถผลิตสารทุติยภูมิได้ดีที่สุดเช่นกัน แต่การศึกษาในครั้งนี้พบว่าเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์ เอ็มเอ เก้า (*Streptomyces* sp. MA-9) สามารถเจริญได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีคซีนเป็นส่วนประกอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Singh และคณะ (๒๐๐๙) ที่สรุปว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทจะสามารถเจริญได้ดีที่สุด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนประกอบของถั่วเหลือง เป็นแหล่งไนโตรเจน

ตารางที่ ๙แสดงความสัมพันธ์ของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตสารเจลดานามัยซิน

แหล่งไนโตรเจน	ปริมาณสาร (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
เดซีน	๒.๑๕×๑๐$^{-๗}$	๕.๘๓
สารสกัดยีสต์	๕.๖๘×๑๐$^{-๘}$	๕.๐๖
เปปโตน	๒.๕๐×๑๐$^{-๗}$	๕.๑๕
น้ำต้มถั่วเหลือง	๕.๘๕×๑๐$^{-๗}$	๓.๐๘
น้ำต้มข้าวโพด	๕.๑๐×๑๐$^{-๗}$	๒.๔๕



รูปที่ ๗ ความสัมพันธ์ของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตสารเจลดานามัยซินและน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ สเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์ เอ็มเอ เก้า (*Streptomyces* sp. MA-9)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

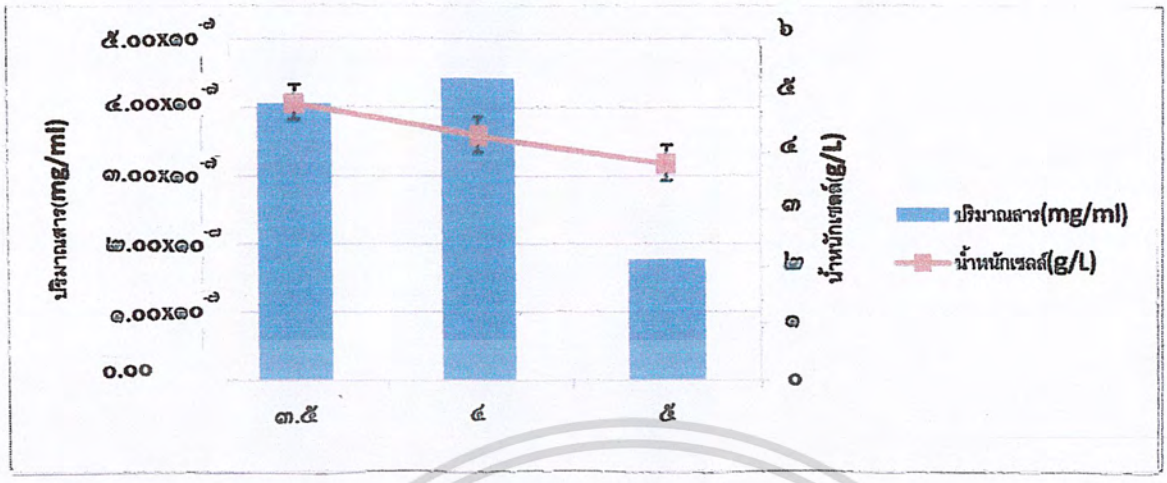
๔.๓.๑.๓ การศึกษาความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารเจลดานามัยซิจากเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์ เอ็มเอ เก้า(*Streptomyces* sp. MA-9)

เมื่อทำการผันแปรความเข้มข้นของเกลือ ในความเข้มข้นร้อยละ ๓.๕ ๔ และ๕ พบว่าเชื้อมีการผลิตสารเจลดานามัยซินปริมาณมากที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นเกลือร้อยละ ๔ โดยสามารถผลิตสารเจลดานามัยซินได้ ๔.๔๓×๑๐$^{-๗}$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและมีน้ำหนักเซลล์แห้ง ๔.๓๐ กรัมต่อลิตร รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นเกลือร้อยละ ๓.๕ โดยเชื้อสามารถผลิตสารเจลดานามัยซินได้ ๔.๐๖×๑๐$^{-๗}$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและมีน้ำหนักเซลล์แห้ง๔.๘๗ กรัมต่อลิตร (ดังตารางที่ ๑๐) ซึ่งไม่สอดคล้องกับการวิจัยของนักวิทยาศาสตร์ในหลายๆบทความทั้งนี้เนื่องจากเชื้อแอคติโนมัยสีทในแต่ละสายพันธุ์มีความต้องการความเข้มข้นของเกลือต่อการเจริญและการสร้างสารทุติยภูมิที่แตกต่างกัน

ตารางที่ ๑๐แสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นเกลือต่อการเจริญและการผลิตสารเจลดานามัยซิน

ความเข้มข้นของเกลือร้อยละ	ปริมาณสาร (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์ (กรัมต่อลิตร)
๓.๕	๔.๐๖×๑๐$^{-๗}$	๔.๘๗
๔	๔.๔๓×๑๐$^{-๗}$	๔.๓๐
๕	๑.๗๗×๑๐$^{-๗}$	๓.๘๑

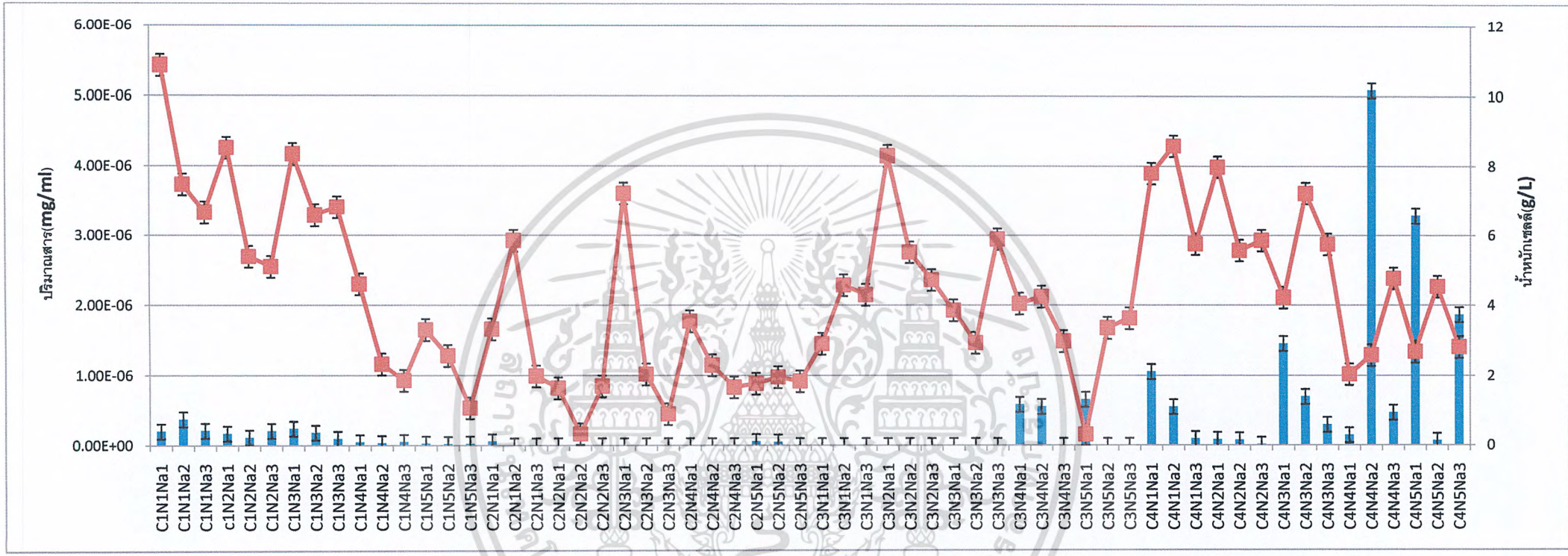
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ๙ ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นเกลือต่อการผลิตสารเจลดานามัยซินและน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์ เอ็มเอ เก้า (*Streptomyces* sp. MA-9)

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารเจลดานามันซินจากเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์ เอ็มเอเก้า(*Streptomyces* sp. MA-9) จากแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และความเข้มข้นของเกลือ พบว่าอาหารสูตรซีสี่เอ็นสี่เอ็นเอสอง ($C_4N_4Na_2$) ซึ่งประกอบไปด้วย แป้ง น้ำต้มถั่วเหลือง และความเข้มข้นเกลือร้อยละ๔ เหมาะสมต่อการผลิตสารเจลดานามัยซินมากที่สุด โดยสามารถผลิตสารเจลดานามัยซิน ๕.๐๙×๑๐^{๖} มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และน้ำหนักเซลล์แห้ง ๒.๖ กรัมต่อลิตร แต่อาหารสูตรซีหนึ่งเอ็นหนึ่งเอ็นเอหนึ่ง ($C_1N_1Na_1$) ที่ประกอบด้วย กลูโคส เคซีนและความเข้มข้นเกลือร้อยละ ๓.๕ เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อมากที่สุดโดยให้ปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลล์มากที่สุดที่ ๑๐.๘๘ กรัมต่อลิตร แต่ผลิตสารเจลดานามัยซินได้น้อย จากการทดลองจะเห็นว่าการผลิตสารเจลดานามัยซินและการเจริญของเชื้อนี้ในอาหารสูตรต่างๆไม่มีความสัมพันธ์กัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



หมายเหตุ แสดงปริมาณสารเจลดานามัยซิน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)

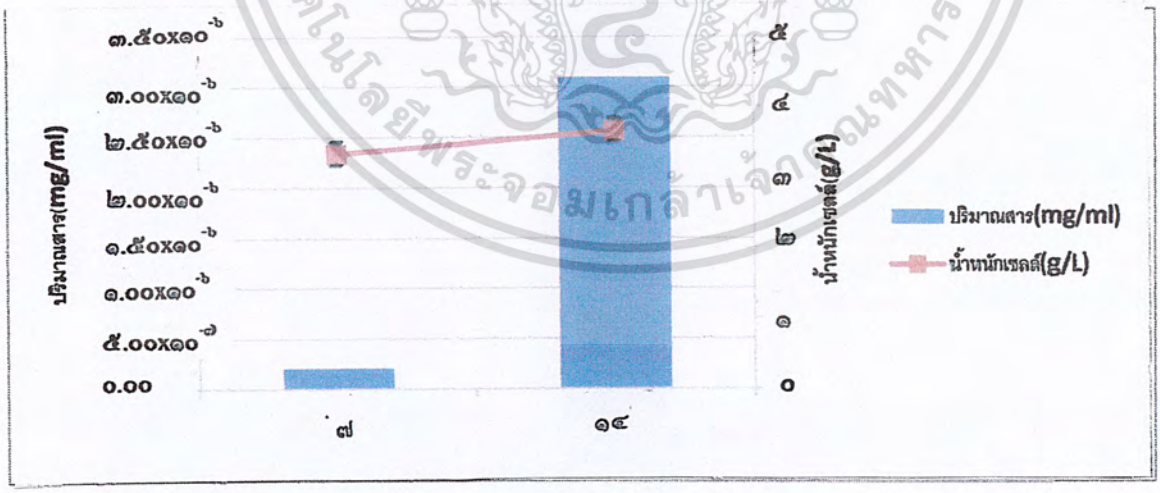
รูปที่ ๙ ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารเจลดานามัยซินและน้ำหนักเซลล์แห้งตามแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นของกลือ

๔.๓.๒ การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารเจลดานามัยซิน จากเชื้อสเตรปโตมัยเซสสายพันธุ์ เอ็มเอเก้า(*Streptomyces* sp. MA-9)

เมื่อทำการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารเจลดานามันซินจากเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์ เอ็มเอ-เก้า(*Streptomyces* sp. MA-9) ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรซีสี่เอ็นสี่เอ็นเอสอง ($C_4N_4Na_2$)พบว่าเชื้อมีการเจริญและผลิตสารเจลดานามัยซินสูงสุดเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา ๑๔ วัน โดยสามารถผลิตสารเจลดานามัยซินได้ ๓.๐๕×๑๐$^{-๖}$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและมีน้ำหนักเซลล์แห้ง ๓.๖๖ กรัมต่อลิตรซึ่งไม่สอดคล้องกับการวิจัยของ Singh และคณะ (๒๐๐๕) ที่รายงานว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ศึกษาสามารถเจริญและสร้างสารทุติยภูมิได้ดีเมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา อย่างน้อยที่สุด ๖ วัน ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อแอคติโนมัยสีทในแต่ละสายพันธุ์มีอัตราการเจริญและสร้างสารทุติยภูมิที่แตกต่างกัน

ตารางที่ ๑๑แสดงความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญและการผลิตสารเจลดานามัยซิน

วัน (เวลา)	ปริมาณสาร (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์(กรัมต่อลิตร)
๗	๒.๐๓๕๓๕×๑๐$^{-๗}$	๓.๓๓๑๔
๑๔	๓.๐๕๑๘×๑๐$^{-๖}$	๓.๖๖๐๐



รูปที่ ๑๐ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการผลิตสารเจลดานามัยซินและน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์ เอ็มเอ เก้า (*Streptomyces* sp. MA-9)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการนำเชื้อแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต เอ็มเอเก้า มาศึกษาลักษณะอนุกรมวิธาน พบว่าเป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาวอมเทาและเส้นใยอาหารสีเหลืองอ่อน ไม่สร้างรงควัตถุในอาหารสปอร์มีลักษณะเป็นท่อนสั้นต่อกันเป็นเกลียว เจริญได้ดีบนอาหารไอเอสพีสอง (ISP2) ผนังเซลล์ของเชื้อนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดไดอะมิโนพิมีลิกแบบแอลแอล (*LL*, cell wall type 1) พบน้ำตาลกลูโคส ไรโบส กาแลคโตส และอะราบิโนส เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติดิลเอทาโนลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสฟาติดิลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) ฟอสฟาติดิลอินโนซิทอล (phosphatidylinositol) ฟอสฟาติดิลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุลสเตรปโตมัยเซส (*Streptomyces*) จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนในช่วงสิบหกเอส อาร์ อาร์เอ็นเอ (16S rRNA gene) พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อสเตรปโตมัยเซส มาเลซิเอ็นซีส (*Streptomyces malaysiensis*) มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ ๙๙.๑

จากการศึกษาสภาวะโดยการผันแปรแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารเจลดานามัยซิน พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารเจลดานามัยซินได้ปริมาณมากที่สุดในอาหารที่ประกอบด้วย แป้ง น้ำต้มถั่วเหลือง และความเข้มข้นของเกลือร้อยละ ๔ โดยสามารถผลิตสารเจลดานามัยซินได้ ๓.๐๙๑๘×๑๐$^{-6}$ เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา ๑๔ วันที่อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียส แต่เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุด ในอาหารที่ประกอบด้วย กลูโคส เคซีน และความเข้มข้นของเกลือร้อยละ ๓.๕ โดยให้น้ำหนักแห้งปริมาณ ๑๐.๘๘ กรัมต่อลิตร

จากการศึกษานี้สามารถนำไปประยุกต์เพื่อเพิ่มผลผลิตในการสร้างสารเจลดานามัยซินในปริมาณมากซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการผลิตสารเจลดานามัยซินในระดับอุตสาหกรรมและงานวิจัยทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสนอแนะ

ในการวิจัยครั้งนี้ไม่ได้ทำการศึกษาระยะเวลาในการผลิตสารเจลดานามัยซินที่มีระยะเวลามากกว่า ๑๔ วัน ทางคณะผู้วิจัยเห็นว่าควรมีการศึกษาเปรียบเทียบระยะเวลาในการเลี้ยงให้นานกว่า ๑๔ วัน เพื่อจะได้บทสรุปของระยะเวลาที่แน่นอนต่อการผลิตสารเจลดานามัยซินต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กำพล ศรีวัฒนกุล. ๒๕๓๘. ยาต้านจุลชีพ. คู่มือการใช้ยาฉบับสมบูรณ์. พิมพ์ครั้งที่ ๓. กรุงเทพฯ : สยาม สปอร์ต ซินดิเคต

จิราพร วรเสน. ๒๕๔๕. ไวรัส แบคทีเรีย และพาราสิต. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยรามคำแหง

ชาญวิทย์ สุริยฉัตรกุล. ๒๕๕๒. แบคทีเรียแอคติโนมัยสีท. *Science in action*. ปีที่ ๕ ฉบับที่ ๔. ๒๓

ปรีชาและนงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. ๒๕๔๘. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ ๕. ก รุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์-มหาวิทยาลัย.

รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์ .๒๕๔๘. แอคติโนมัยซีท. พิมพ์ครั้งที่ ๑. สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี.

สินีนาถ กันธิพรรณ์, อากรณัท รัตนวงษ์ และ อุมาพร ลิขิตวิเศษกุล. ๒๕๕๒. ฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์จากสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสีททางทะเล. ปริญญานิพนธ์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

Berdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites. The Journal of Antibiotics. 58, 1–26

Edwards, D. I. 1980. Antimicrobial drug action. The macmillan Press LTD, Hong Kong, 8 – 18.

Singh, S. Mazumder and T.C. Bora. 2009. Optimisation of process paramenters for growth and bioactive metabolite produced by a salt-tolerant and alkaliphilic actinomycete, *Streptomyces tanashiensis* strain A2D. India. 225-233

Shinji, M.Editor. 1997. Atlas of actinomycetes.Japan:Society for actinomycetes Japan

Shiring, E.B. and Gottlieb, D. 1966. Method for Characterization of *Streptomyces* species. Int. *J. Syst. Bacteriol*. 16:313-340

William, S, T., Goodfellow, M. and Anderson, G., 1989. Genus *Streptomyces* Wakman and Henrici 1943,339^{AL} In Williams,Sharpe, and Holt (eds). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 4. Williams and Wilkins. Baltimore. pp.2452-2492

[Online].Available: wikipedia.org/wiki/Geldanamycin

[Online].Available: wikipedia.org/wiki/17-AAG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture media)

Yeast extract-malt extract agar, YMA, ISP2

Yeast extract	๐.๔	กรัม
Malt extract	๑	กรัม
Glucose	๐.๔	กรัม
Agar	๑.๕-๑.๘	กรัม
Sea Water	๑๐๐	มิลลิลิตร
pH	๗.๘	

Oatmeal agar, ISP3

Oatmeal	๒๐.๐	กรัม
Agar	๑.๕-๑.๘	กรัม
Sea Water	๑๐๐	มิลลิลิตร

Inorganic salt-strach agar, ISP4

Soluble starch	๑.๐	กรัม
K_2HPO_4	๐.๑	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	๐.๑	กรัม
NaCl	๐.๑	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	๐.๒	กรัม
$CaCO_3$	๐.๒	กรัม
Trace salt solution (A)	๐.๑	มิลลิลิตร
Agar	๑.๕-๑.๘	กรัม
Sea Water	๑๐๐	มิลลิลิตร
pH	๗.๘	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Glycerol-asparagine agar, GlyA, ISP5

Glycerol	๑.๐	กรัม
L-Asparagine	๐.๑	กรัม
K_2HPO_4	๐.๑	กรัม
Trace salt solution (A)	๐.๑	มิลลิลิตร
Agar	๑.๕-๑.๘	กรัม
Sea Water	๑๐๐	มิลลิลิตร
pH	๗.๘	

Tyrosine agar, TA, ISP7

Glycerol	๑.๕	กรัม
L-Tyrosine	๐.๐๕	กรัม
L-Asparagine	๐.๑	กรัม
K_2HPO_4	๐.๐๕	กรัม
$MgSo_4.7H_2O$	๐.๐๕	กรัม
NaCl	๐.๐๕	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$)	๐.๐๐๑	กรัม
Trace salt solution (A)	๐.๑	มิลลิลิตร
Agar	๑.๕-๑.๘	กรัม
pH	๗.๘	

Carbon utilization medium, ISP9

Carbohydrate	๑.๐	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	๐.๒๖๔	กรัม
$K_2HPO_4.3H_2O$	๐.๕๖๕	กรัม
$K_2HPO_4.3H_2O$	๐.๒๓๘	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	๐.๑	กรัม
Pridham and Gottlieb trace salt (B)	๐.๑	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nutrient agar, NA

Beef extract	๑.๐	กรัม
Peptone	๑.๐	กรัม
NaCl	๐.๑๕	กรัม
Agar	๑.๕-๑.๘	กรัม
Sea Water	๑๐๐	มิลลิลิตร

Glucose asparagines agar

Glucose	๑.๐	กรัม
Asparagine	๐.๐๕	กรัม
K_2HPO_4	๐.๐๕	กรัม
Agar	๑.๕-๑.๘	กรัม
Sea Water	๑๐๐	มิลลิลิตร
pH	๗.๘	

Czapek's sucrose agar

Sucose	๓.๐	กรัม
K_2HPO_4	๐.๑	กรัม
$MgSO_4$	๐.๐๕	กรัม
KCl	๐.๐๕	กรัม
$FeSO_4$	๐.๐๐๑	กรัม
Agar	๑.๕-๑.๘	กรัม
Sea Water	๑๐๐	มิลลิลิตร
pH	๗.๘	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Peptone KNO_3 broth

Peptone	๑.๐	กรัม
KNO_3	๐.๑	กรัม
NaCl	๐.๕	กรัม
Sea Water	๑๐๐	มิลลิลิตร
pH	๗.๘	

Boullion gelatin broth

Peptone	๑.๐	กรัม
Meat extract	๐.๕	กรัม
NaCl	๐.๕	กรัม
Gelatin	๑๕	กรัม
Sea Water	๑๐๐	มิลลิลิตร
pH	๗.๘	

Peptinization and Coagulation test medium

Skim milk (Difco)	๑๐	กรัม
Sea Water	๑๐๐	มิลลิลิตร

Basal inorganic nitrogen medium

Carbohydrate	๑๐.๐	กรัม
$(NH_4)HPO_4$	๐.๑	กรัม
KCl	๐.๐๒	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	๐.๐๒	กรัม
0.04% Bromocresol purple	๑.๕	มิลลิลิตร
Agar	๑.๕-๑.๘	กรัม
Water	๑๐๐	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Trace salt solution (A)

$FeSO_4.7H_2O$	๐.๑	กรัม
$MnCl_2.4H_2O$	๐.๑	กรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	๐.๑	กรัม
Sea Water	๑๐๐	มิลลิลิตร

น้ำทะเลเทียม

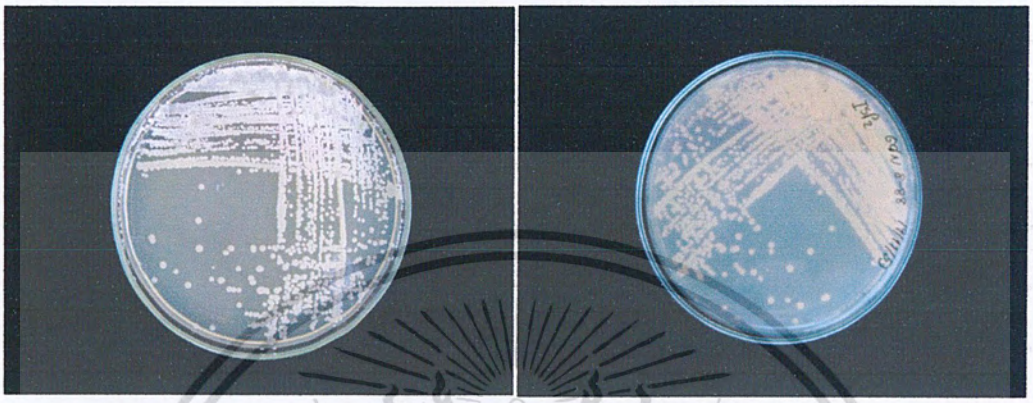
เกลือทะเลยี่ห้อ คิว ซี

ส่วนประกอบ	โมลต่อกิโลกรัม
Na^+	๔๔๔.๖๔
K^+	๘.๕๒
Mg^{++}	๕๐.๐๘
Ca^{++}	๘.๑๖
Sr^{++}	๐.๐๘
Cl^-	๕๐๘.๕๐
$SO4^{--}$	๒๗.๑๘
Br^-	๐.๗๔
F^-	๐.๐๗
I^-	๐.๐๑
$HCO_3^-(+CO_2+CO_3^{2-})$	๒.๐-๒.๕
$B(OH)_3 + B(OH_4)^-$	๐.๔๗
$Si(OH_4) + SiO(OH)_3^-$	๐.๐๑-๐.๑
$H_2PO_4^- + HPO_4^{--} + PO_4^{---}$	nill
NO_3^-	nill

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ลักษณะการเจริญของเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์เอ็มเอ เก้า บนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP) ชนิดต่างๆเทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (NBS-ISCC color system)



ภาพที่ ๑๑ แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์เอ็มเอ เก้า บนอาหารไอเอสพีสอง (ISP2)

ภาพที่ ๑๒ แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์เอ็มเอ เก้า บนอาหารไอเอสพีสาม (ISP3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ ๑๓ แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์เอ็มเอ เก้า บนอาหารไอเอสพีสี่ (ISP4)

ภาพที่ ๑๔ แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์เอ็มเอ เก้า บนอาหารไอเอสพีห้า (ISP5)

ภาพที่ ๑๕ แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์เอ็มเอ เก้า บนอาหารไอเอสพีเจ็ด (ISP7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ ๑๖ แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์เอ็มเอ เก้า บนอาหาร Czapek's sucrose agar

ภาพที่ ๑๗ แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์เอ็มเอ เก้า บนอาหาร Glucose asparagines agar

ภาพที่ ๑๘ แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์เอ็มเอ เก้า บนอาหาร Nutrient agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The NBS/IBCC Color System

Centroid	Munsell	RGB	Swatch
Red, Pink			
1 Vivid Pink	1r 8.0 13.0	#FF7E93	
2 Strong Pink	1.2r 6.9 8.2	#FD7B7C	
3 Deep Pink	2.1r 6.0 11.1	#F3545E	
4 Light Pink	2.6r 8.5 4.0	#FFBCAD	
5 Moderate Pink	2.8r 7.2 5.3	#EE9086	
6 Dark Pink	2.7r 5.9 6.1	#C76864	
7 Pale Pink	2.0r 8.7 2.1	#FFCBBB	
8 Grayish Pink	2.6r 7.2 2.3	#CF9B8F	
9 Pinkish White	5.8r 9.0 0.8	#F9DBC8	
10 Pinkish Gray	9.8r 7.4 1.0	#C8A696	
11 Vivid Red	5.0r 3.9 15.4	#C10020	
12 Strong Red	4.0r 4.4 12.1	#BF2233	
13 Deep Red	5.1r 2.8 10.1	#7B001C	
14 Very Deep Red	6.5r 1.7 8.4	#4F0014	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

15 Moderate Red	3.8r 4.4 9.1	#AB343A	
16 Dark Red	4.0r 2.8 6.8	#681C23	
17 Very Dark Red	2.0r 1.2 4.8	#320A18	
18 Light Grayish Red	5.3r 5.9 3.5	#B17267	
19 Grayish Red	4.0r 4.4 4.8	#8C4743	
20 Dark Grayish Red	2.9r 2.7 2.1	#482A2A	
21 Blackish Red	3.9r 0.8 1.7	#1F0E11	
22 Reddish Gray	7.0r 5.4 1.3	#8B6C62	
23 Dark Reddish Gray	6.0r 3.4 1.0	#523C36	
24 Reddish Black	2.0r 0.9 0.9	#1E1112	
Yellowish Pink			
25 Vivid Yellowish Pink	8.0r 8.0 13.0	#FF845C	
26 Strong Yellowish Pink	8.4r 7.0 9.5	#FF7A5C	
27 Deep Yellowish Pink	5.5r 5.8 12.1	#F64A46	
28 Light Yellowish Pink	1.9yr 8.2 4.6	#FFB28B	
29 Moderate Yellowish Pink	0.7yr 7.2 4.9	#EE9374	
30 Dark Yellowish Pink	7.0r 6.0 6.1	#CC6C5C	
31 Pale Yellowish Pink	4.2yr 8.6 2.2	#FFC8A8	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

32 Grayish Yellowish Pink	1.3yr 7.2 2.4	#D39B85	
Reddish Orange, Reddish Brown			
33 Brownish Pink	7.0yr 7.1 2.3	#CD9A7B	
34 Vivid Reddish Orange	9.8r 5.4 14.5	#F13A13	
35 Strong Reddish Orange	9.3r 5.4 12.2	#FFB961	
36 Deep Reddish Orange	9.2r 3.9 12.1	#A91D11	
37 Moderate Reddish Orange	9.3r 5.5 9.2	#D35339	
38 Dark Reddish Orange	9.3r 4.0 9.1	#9B2F1F	
39 Grayish Reddish Orange	0.4yr 5.4 6.2	#B85D43	
40 Strong Reddish Brown	0.3yr 3.1 9.9	#7F180D	
41 Deep Reddish Brown	1.6yr 1.5 8.3	#490005	
42 Light Reddish Brown	0.5yr 5.5 4.1	#AA6651	
43 Moderate Reddish Brown	9.0r 3.4 5.2	#712F26	
44 Dark Reddish Brown	9.6r 1.3 3.6	#321011	
45 Light Grayish Reddish Brown	2.9yr 5.4 2.3	#966A57	
46 Grayish Reddish Brown	9.0r 3.4 2.4	#5E3830	
47 Dark Grayish Reddish Brown	9.0r 2.0 2.0	#371F1C	
Orange Brown			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

48 Vivid Orange	4.1yr 6.5 15.0	#FF6800	
49 Brilliant Orange	4.0yr 9.0 12.0	#FFB841	
50 Strong Orange	4.3yr 6.5 12.2	#FF6F1A	
51 Deep Orange	4.1yr 5.1 11.3	#C34D0A	
52 Light Orange	4.8yr 7.8 7.2	#FFA161	
53 Moderate Orange	4.6yr 6.5 8.2	#E8793E	
54 Brownish Orange	4.1yr 5.0 8.0	#B15124	
55 Strong Brown	4.6yr 3.5 7.6	#753313	
56 Deep Brown	5.6yr 2.4 5.2	#4D220E	
57 Light Brown	5.4yr 5.4 4.8	#A86540	
58 Moderate Brown	5.6yr 3.5 3.9	#673923	
59 Dark Brown	5.3yr 1.6 3.4	#35170C	
60 Light Grayish Brown	6.4yr 5.4 2.2	#946B54	
61 Grayish Brown	5.5yr 3.5 1.8	#5A3D30	
62 Dark Grayish Brown	5.5yr 2.0 1.5	#32221A	
63 Light Brownish Gray	7.0yr 5.4 1.2	#8B6D5C	
64 Brownish Gray	5.65r 3.4 0.9	#503D33	
65 Brownish Black	7.8yr 0.6 0.9	#140F0B	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Orange Yellow, Yellowish Brown			
66 Vivid Orange Yellow	8.6yr 7.3 15.2	#FF8E00	
67 Brilliant Orange Yellow	0.1y 8.1 10.5	#FFB02E	
68 Strong Orange Yellow	9.1yr 7.1 11.6	#FF8E0D	
69 Deep Orange Yellow	8.6yr 6.0 12.1	#D76E00	
70 Light Orange Yellow	9.4yr 8.3 6.8	#FFB961	
71 Moderate Orange Yellow	8.7yr 7.2 8.3	#F7943C	
72 Dark Orange Yellow	9.3yr 6.0 7.9	#C37629	
73 Pale Orange Yellow	9.2yr 8.7 4.4	#FFCA86	
74 Strong Yellowish Brown	8.8yr 4.6 8.5	#95500C	
75 Deep Yellowish Brown	8.8yr 3.1 5.0	#593315	
76 Light Yellowish Brown	8.7yr 6.5 5.0	#BB8B54	
77 Moderate Yellowish Brown	9.5yr 4.4 3.9	#7D512D	
78 Dark Yellowish Brown	9.4yr 2.3 3.3	#3F2512	
79 Light Grayish Yellowish Brown	9.7yr 6.4 2.5	#B48764	
80 Grayish Yellowish Brown	9.5yr 4.6 2.1	#785840	
81 Dark Grayish Yellowish Brown	8.8yr 2.5 1.6	#3D2B1F	
Yellow, Olive Brown			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

82 Vivid Yellow	3.3y 8.0 14.3	#FFB300	
83 Brilliant Yellow	4.4y 8.7 8.9	#FFCF40	
84 Strong Yellow	3.7y 7.2 9.3	#E59E1F	
85 Deep Yellow	3.7y 5.9 9.1	#B57900	
86 Light Yellow	4.3y 8.8 6.8	#FFD35F	
87 Moderate Yellow	3.8y 7.1 6.5	#D79D41	
88 Dark Yellow	3.9y 6.0 6.4	#B07D2B	
89 Pale Yellow	4.7y 9.0 3.8	#FFDB8B	
90 Grayish Yellow	4.4y 7.2 3.8	#CEA262	
91 Dark Grayish Yellow	3.8y 5.9 4.0	#A47C45	
92 Yellowish White	4.5y 9.2 1.2	#FFE2B7	
93 Yellowish Gray	3.8y 7.4 1.4	#CAA885	
94 Light Olive Brown	2.1y 4.9 7.9	#945D0B	
95 Moderate Olive Brown	2.7y 3.6 5.5	#64400F	
96 Dark Olive Brown	2.0y 1.9 2.2	#302112	
Greenish Yellow, Olive			
97 Vivid Greenish Yellow	9.1y 8.2 12.0	#F4C800	
98 Brilliant Greenish Yellow	9.8y 8.8 9.5	#FFDC33	

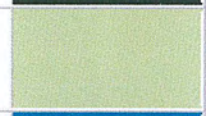
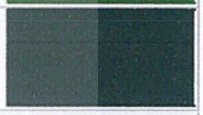
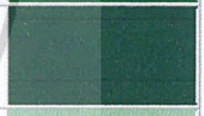
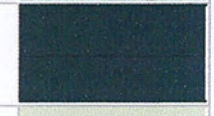
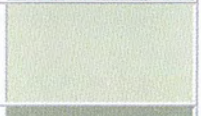
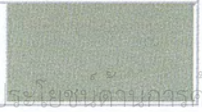
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

99 Strong Greenish Yellow	9.2y 7.2 9.2	#CCA817	
100 Deep Greenish Yellow	9.2y 5.9 9.2	#9F8200	
101 Light Greenish Yellow	9.8y 8.9 7.0	#FFDE5A	
102 Moderate Greenish Yellow	9.5y 7.1 6.5	#C4A43D	
103 Dark Greenish Yellow	9.4y 5.9 6.3	#9B8127	
104 Pale Greenish Yellow	9.5y 9.0 4.2	#FFDF84	
105 Grayish Greenish Yellow	9.0y 7.2 3.9	#C4A55F	
106 Light Olive	8.2y 5.1 5.6	#846A20	
107 Moderate Olive	7.6y 3.8 5.4	#5E490F	
108 Dark Olive	8.9y 2.4 3.1	#362C12	
109 Light Grayish Olive	7.85y 5.5 2.5	#8B734B	
110 Grayish Olive	8.0y 3.6 2.0	#52442C	
111 Dark Grayish Olive	9.7y 2.0 1.8	#2B2517	
112 Light Olive Gray	6.9y 5.5 1.3	#887359	
113 Olive Gray	8.1y 3.5 0.9	#4D4234	
114 Olive Black	9.0y 1.1 0.9	#121910	
Yellow Green, Olive Green			
115 Vivid Yellowish Green	5.4gy 6.8 11.2	#93AA00	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

116 Brilliant Yellow Green	4.9gy 8.2 9.1	#CED23A	
117 Strong Yellow Green	5.4gy 6.0 8.7	#7F8F18	
118 Deep Yellow Green	7.4gy 4.2 7.1	#425E17	
119 Light Yellow Green	5.0gy 8.4 5.6	#DCD36A	
120 Moderate Yellow Green	4.8gy 6.0 5.0	#8B8940	
121 Pale Yellowish Green	3.4gy 8.7 2.4	#F0D698	
122 Grayish Yellowish Green	4.4gy 6.0 2.3	#90845B	
123 Strong Olive Green	4.0gy 3.0 11.0	#0A4500	
124 Deep Olive Green	4.0gy 1.5 11.0	#142300	
125 Moderate Olive Green	5.7gy 3.6 4.8	#434B1B	
126 Dark Olive Green	8.0gy 2.2 3.6	#232C16	
127 Grayish Olive Green	4.6gy 3.5 2.0	#48442D	
128 Dark Grayish Olive Green	5.4gy 2.0 1.8	#27261A	
129 Vivid Yellowish Green	1.1g 5.9 11.2	#379931	
Yellowish Green			
130 Brilliant Yellowish Green	0.3g 7.7 8.6	#8CCB5E	
131 Strong Yellowish Green	0.4g 5.4 8.7	#478430	
132 Deep Yellowish Green	0.9g 3.5 9.0	#00541F	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

133 Very Deep Yellowish Green	10.0gy 1.5 11.0	#002800	
134 Very Light Yellowish Green	0.2g 8.6 4.6	#C6DF90	
135 Light Yellowish Green	0.7g 7.4 5.2	#007BA7	
136 Moderate Yellowish Green	0.5g 5.5 4.8	#657F4B	
137 Dark Yellowish Green	0.6g 3.5 5.0	#304B26	
138 Very Dark Yellowish Green	0.3g 1.8 4.3	#132712	
Green			
139 Vivid Green	3.2g 4.9 11.1	#007D34	
140 Brilliant Green	6.2g 6.5 8.3	#47A76A	
141 Strong Green	5.8g 4.4 8.7	#006B3C	
142 Deep Green	5.1g 3.0 8.1	#004524	
143 Very Light Green	6.5g 7.8 4.9	#98C793	
144 Light Green	6.0g 6.4 5.1	#719B6E	
145 Moderate Green	6.3g 4.5 5.1	#386646	
146 Dark Green	6.6g 2.8 4.6	#203A27	
147 Very Dark Green	8.0g 1.8 3.0	#16251C	
148 Very Pale Green	7.3g 8.8 1.9	#D8DEBA	
149 Pale Green	7.6g 6.4 1.7	#8D917A	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

150 Grayish Green	8.8g 4.5 1.8	#575E4E	
151 Dark Greenish Yellowish Green	1.0bg 2.9 1.8	#313830	
152 Blackish Green	10.0g 1.0 1.4	#141613	
153 Greenish White	10.0g 9.2 0.8	#F5E6CB	
154 Light Greenish Gray	3.0g 7.5 0.9	#BAAF96	
155 Greenish Gray	7.5g 5.5 1.0	#7A7666	
156 Dark Greenish Gray	1.5bg 3.5 0.9	#45433B	
157 Greenish Black	8.7g 1.0 0.7	#181513	
Bluish Green			
158 Vivid Bluish Green	5.0bg 5.0 13.0	#00836E	
159 Brilliant Bluish Green	2.9bg 6.0 9.6	#009B76	
160 Strong Bluish Green	4.6bg 4.5 8.5	#006D5B	
161 Deep Bluish Green	2.8bg 2.4 8.3	#00382B	
162 Very Light Bluish Green	4.4bg 8.3 4.6	#A0D6B4	
163 Light Bluish Green	4.6bg 6.5 4.9	#669E85	
164 Moderate Bluish Green	4.6bg 4.5 5.0	#2F6556	
165 Dark Bluish Green	4.9bg 2.7 5.0	#013A33	
166 Very Dark Bluish Green	3.6bg 1.2 4.0	#001D18	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

167 Vivid Greenish Blue	5.0b 5.0 13.0	#007BA7
Greenish Blue		
168 Brilliant Greenish Blue	4.6b 5.9 7.7	#2A8D9C
169 Strong Greenish Blue	4.9b 4.5 8.4	#00677E
170 Deep Greenish Blue	5.0b 5.0 13.0	#007BA7
171 Very Light Greenish Blue	4.0b 8.0 4.0	#A3C6C0
172 Light Greenish Blue	4.5b 6.5 5.4	#649A9E
173 Moderate Greenish Blue	4.7b 4.5 5.2	#30626B
174 Dark Greenish Blue	3.7b 2.7 5.0	#003841
175 Very Dark Greenish Blue	5.0b 1.5 3.6	#022027
Blue		
176 Vivid Blue	5.0b 5.0 14.0	#007CAD
177 Brilliant Blue	1.6pb 5.9 9.4	#4285B4
178 Strong Blue	2.9pb 4.1 10.4	#00538A
179 Deep Blue	2.8pb 2.5 7.9	#002F55
180 Very Light Blue	2.7pb 7.9 6.0	#A6BDD7
181 Light Blue	1.6pb 6.4 6.9	#6C92AF
182 Moderate Blue	3.0pb 4.3 6.8	#395778

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

183 Dark Blue	2.2pb 1.7 5.5	#002137
184 Very Pale Blue	1.5pb 8.3 3.3	#C1CACA
185 Pale Blue	0.6pb 6.5 2.6	#919192
186 Grayish Blue	0.2pb 4.2 3.0	#4A545C
187 Dark Grayish Blue	9.2b 2.7 2.0	#2C3337
188 Blackish Blue	9.8b 1.3 1.5	#161A1E
189 Bluish White	9.2b 9.1 1.2	#F9DFCF
190 Light Bluish Gray	8.2b 7.5 1.0	#BEADA1
191 Bluish Gray	8.9b 5.5 0.9	#7D746D
192 Dark Bluish Gray	0.3pb 3.6 1.1	#464544
193 Bluish Black	9.6b 1.1 0.8	#151719
	Purplish Blue	
194 Very Purplish Blue	7.8pb 2.0 12.5	#20155E
195 Brilliant Purplish Blue	7.3pb 5.1 9.0	#62639B
196 Strong Purplish Blue	8.0pb 4.0 10.9	#474389
197 Deep Purplish Blue	7.8pb 1.5 8.0	#1A153F
198 Very Light Purplish Blue	7.4pb 7.6 5.2	#BAACC7
199 Light Purplish Blue	7.3pb 6.0 6.5	#837DA2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

200 Moderate Purplish Blue	7.9pb 3.5 6.5	#423C63	
201 Dark Purplish Blue	8.0pb 1.3 4.3	#1A162A	
202 Very Pale Purplish Blue	7.0pb 8.0 3.7	#CBBAC5	
203 Pale Purplish Blue	7.0pb 6.0 3.9	#8A7F8E	
204 Grayish Purplish Blue	6.9pb 3.4 3.8	#413D51	
Violet			
205 Vivid Violet	2.0p 5.0 14.0	#884BAE	
206 Brilliant Violet	9.9pb 5.1 9.4	#755D9A	
207 Strong Violet	0.2p 3.7 10.1	#53377A	
208 Deep Violet	1.1p 1.2 8.6	#240935	
209 Very Light Violet	2.0p 8.5 7.0	#EEBEF1	
210 Light Violet	0.5p 5.6 7.1	#876C99	
211 Moderate Violet	1.4p 3.6 7.0	#543964	
212 Dark Violet	1.4p 1.3 4.9	#22132B	
213 Very Pale Violet	9.7pb 7.9 3.7	#D8B1BF	
214 Pale Violet	1.3p 6.0 4.0	#957B8D	
215 Grayish Violet	1.2p 3.3 3.9	#46394B	
Purple			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

216 Vivid Purple	6.0p 4.5 14.0	#943391	
217 Brilliant Purple	6.0p 7.0 11.0	#DD80CC	
218 Strong Purple	6.5p 4.3 9.2	#803E75	
219 Deep Purple	6.3p 2.7 9.1	#531A50	
220 Very Deep Purple	5.0p 1.5 8.0	#320B35	
221 Very Light Purple	6.5p 7.8 5.1	#E3A9BE	
222 Light Purple	6.2p 6.5 6.5	#BA7FA2	
223 Moderate Purple	6.6p 4.5 7.1	#7F4870	
224 Dark Purple	6.3p 2.8 4.9	#472A3F	
225 Very Dark Purple	6.9p 1.0 4.5	#230D21	
226 Very Pale Purple	5.5p 8.2 3.2	#E6BBC1	
227 Pale Purple	7.9p 6.4 3.1	#AE848B	
228 Grayish Purple	8.1p 4.5 2.7	#72525C	
229 Dark Grayish Purple	0.5rp 2.8 2.0	#452D35	
230 Blackish Purple	0.8rp 0.9 1.6	#1D1018	
231 Purplish White	2.5rp 9.0 0.8	#FADBC8	
232 Light Purplish Gray	0.3rp 7.5 1.1	#C8A99E	
233 Purplish Gray	1.0rp 5.5 0.9	#88706B	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

234 Dark Purplish Gray	1.0rp 3.6 1.0	#564042	
235 Purplish Black	9.54p 0.9 0.6	#1B1116	
Reddish Purple			
236 Vivid Reddish Purple	1.0rp 3.0 14.0	#7E0059	
237 Strong Reddish Purple	1.3rp 4.4 10.2	#9A366B	
238 Deep Reddish Purple	1.0rp 2.8 9.5	#641349	
239 Very Deep Reddish Purple	0.9rp 1.9 8.9	#470736	
240 Light Reddish Purple	0.7rp 6.0 6.9	#BB6C8A	
241 Moderate Reddish Purple	0.8rp 4.5 7.0	#8C4566	
242 Dark Reddish Purple	1.3rp 2.8 4.8	#4F273A	
243 Very Dark Reddish Purple	1.5rp 1.0 4.8	#270A1F	
244 Pale Reddish Purple	1.3rp 6.0 4.2	#AC7580	
245 Grayish Reddish Purple	1.0rp 4.5 4.2	#7D4D5D	
Purplish Pink, Purplish Red			
246 Brilliant Purplish Pink	6.0rp 8.5 11.0	#FF97BB	
247 Strong Purplish Pink	5.6rp 6.8 9.0	#F6768E	
248 Deep Purplish Pink	4.4rp 6.0 12.2	#EB5284	
249 Light Purplish Pink	4.6rp 8.0 5.5	#FFA8AF	

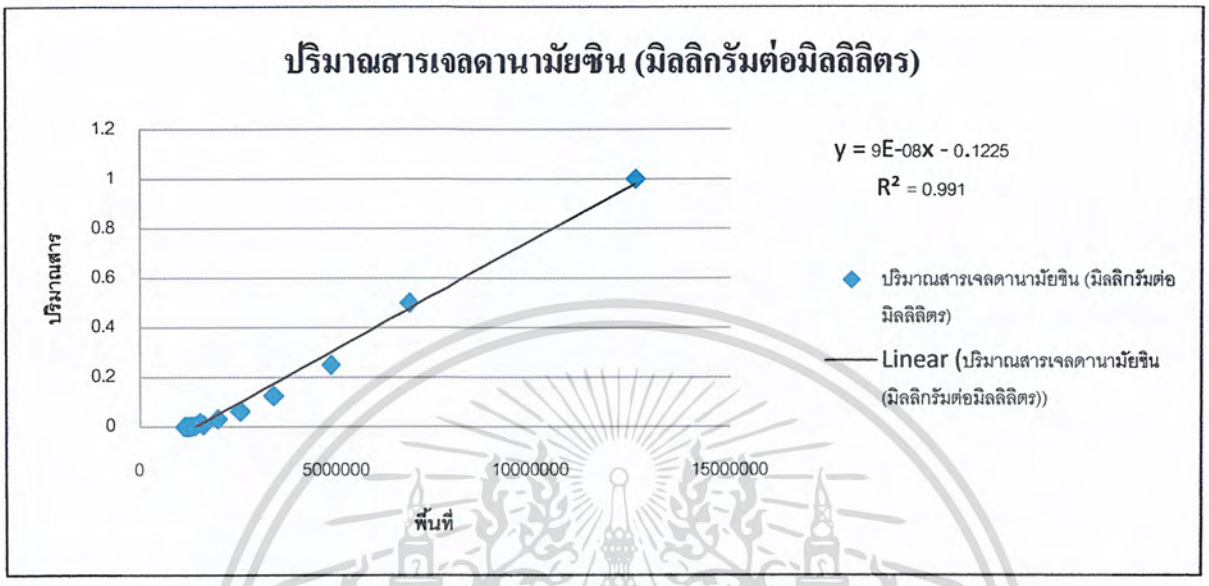
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

250 Moderate Purplish Pink	4.6rp 6.8 6.7	#E28090	
251 Dark Purplish Pink	6.4rp 5.9 7.0	#C76574	
252 Pale Purplish Pink	3.7rp 8.4 3.3	#FDBDBA	
253 Grayish Purplish Pink	3.7rp 7.0 3.5	#CC9293	
254 Vivid Purplish Red	7.6rp 4.9 13.6	#D5265B	
255 Strong Purplish Red	7.3rp 4.4 11.4	#B32851	
256 Deep Purplish Red	7.3rp 2.6 10.1	#6F0035	
257 Very Deep Purplish Red	6.8rp 1.7 8.0	#470027	
258 Moderate Purplish Red	7.1rp 4.5 9.0	#A73853	
259 Dark Purplish Red	7.1rp 2.7 6.0	#5B1E31	
260 Very Dark Purplish Red	6.6rp 0.9 4.8	#28071A	
261 Light Grayish Purplish Red	7.8rp 5.9 4.2	#B27070	
262 Grayish Purplish Red	7.0rp 4.5 5.1	#8C4852	
263 White	2.5pb 9.5 0.2	#FFC9D7	
264 Light Gray	6.7y 7.4 0.2	#C2A894	
265 Medium Gray	3.3gy 5.4 0.1	#817066	
266 Dark Gray	2.5pb 3.5 0.0	#49423D	
267 Black	2.5pb 0.8 0.0	#131313	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ผลการศึกษาการผลิตสารเจลดานามัยซินและน้ำหนักเซลล์แห้ง



รูปที่ ๑๕ แสดงกราฟมาตรฐานของปริมาณสารเจลดามัยซิน

ตารางที่ ๑๒ แสดงปริมาณสารและน้ำหนักเซลล์แห้งอาหารไอเอสพีสอง (ISP2) ที่ความเข้มข้นของเกลือที่ระดับต่างๆ

ความเข้มข้นเกลือ	ปริมาณสาร(พื้นที่ใต้กราฟ)	ปริมาณสาร(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์(กรัมต่อลิตร)
๓.๕	๓๖๗๖๕๕	๒.๓๐๖๖x๑๐$^{-๖}$	๑.๘๒๒
๓.๕	๐	๐	๐
๓.๕	๒๑๗๑๓	๑.๓๖๒๑๑x๑๐$^{-๗}$	๔.๓๘๔
ค่าเฉลี่ย	๑๕๔๗๐๖	๑.๒๒๑๔๔x๑๐$^{-๖}$	๓.๑๐๓
๔	๔๔๖๒๘	๒.๗๕๕๖๒x๑๐$^{-๗}$	๑.๘๒๒
๔	๓๘๘๑	๒.๔๓๔๖๔x๑๐$^{-๘}$	๒.๑
๔	๗๔๗๓๓๑	๔.๖๘๘๑๘x๑๐$^{-๖}$	๔.๓๘๔
ค่าเฉลี่ย	๒๖๕๒๘๐	๑.๖๖๔๑๖x๑๐$^{-๖}$	๒.๗๖๘
๕	๗๕๗๖	๕.๐๐๓๕๓x๑๐$^{-๘}$	๔.๑๖๒
๕	๑๕๑๘๗	๕.๕๒๗๑๖x๑๐$^{-๘}$	๔.๗๘๕
๕	๒๐๕๘๖	๑.๒๕๑๔๑x๑๐$^{-๗}$	๔.๓๖๗
ค่าเฉลี่ย	๑๔๕๘๓	๕.๑๔๒๕x๑๐$^{-๘}$	๔.๔๓๘

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๑๓ แสดงปริมาณสารและน้ำหนักเซลล์ของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นของเกลือที่ใช้เป็นสูตรอาหารต่างๆในการทดลอง

สูตรอาหาร	ปริมาณสาร(พื้นที่ใต้กราฟ)	ปริมาณสาร(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์(กรัมต่อลิตร)
ซีหนึ่งเอ็นหนึ่งเอ็นเอหนึ่ง ($C_1N_1Na_1$)	๓๒๙๔๒	๒.๐๖๖๕๓x๑๐$^{-๗}$	๑๐.๔๔
ซีหนึ่งเอ็นหนึ่งเอ็นเอหนึ่ง ($C_1N_1Na_1$)	๖๐๕๒๓	๓.๗๙๖๗๕x๑๐$^{-๗}$	๙.๗๗๓
ซีหนึ่งเอ็นหนึ่งเอ็นเอหนึ่ง ($C_1N_1Na_1$)	๕๙๖๘๒	๓.๗๔๓๙๙x๑๐$^{-๗}$	๑๒.๔๓๒
ค่าเฉลี่ย	๕๑๐๔๙	๓.๒๐๒๔๒x๑๐$^{-๗}$	๑๐.๘๘๑
ซีหนึ่งเอ็นหนึ่งเอ็นเอสอง ($C_1N_1Na_2$)	๔๗๒๑๔	๒.๙๖๑๘๔x๑๐$^{-๗}$	๔.๙๖๗
ซีหนึ่งเอ็นหนึ่งเอ็นเอสอง ($C_1N_1Na_2$)	๐	๐	๐
ซีหนึ่งเอ็นหนึ่งเอ็นเอสอง ($C_1N_1Na_2$)	๕๑๒๓๕	๓.๒๑๐๙๙x๑๐$^{-๗}$	๙.๙๗๒
ค่าเฉลี่ย	๔๙๒๒๔.๕	๓.๐๘๗๙๗x๑๐$^{-๗}$	๗.๔๖๙
ซีหนึ่งเอ็นหนึ่งเอ็นเอสาม ($C_1N_1Na_3$)	๒๕๐๓	๑.๕๗๐๑x๑๐$^{-๕}$	๒.๘๕๙
ซีหนึ่งเอ็นหนึ่งเอ็นเอสาม ($C_1N_1Na_3$)	๓๒๓๙	๒.๐๓๑๙x๑๐$^{-๕}$	๙.๐๙๖
ซีหนึ่งเอ็นหนึ่งเอ็นเอสาม ($C_1N_1Na_3$)	๙๗๗๔๘	๖.๑๓๑๙๖x๑๐$^{-๗}$	๘.๐๕๔
ค่าเฉลี่ย	๓๔๔๙๖.๖๖๖	๒.๑๖๔๐๖x๑๐$^{-๗}$	๖.๖๖๙

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรอาหาร	ปริมาณสาร(พื้นที่ใต้กราฟ)	ปริมาณสาร(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์(กรัมต่อลิตร)
ซีหนึ่งเอ็นสองเอ็นเอหนึ่ง ($C_1N_2Na_1$)	๒๘๖๒	๑.๗๕๕๔x๑๐$^{-๔}$	๘.๕๐๕
ซีหนึ่งเอ็นสองเอ็นเอหนึ่ง ($C_1N_2Na_1$)	๓๐๗๗๗	๑.๕๓๐๗๑x๑๐$^{-๗}$	๑๑.๑๓๓
ซีหนึ่งเอ็นสองเอ็นเอหนึ่ง ($C_1N_2Na_1$)	๔๘๘๑๑	๓.๐๖๒๐๓x๑๐$^{-๗}$	๕.๕๒
ค่าเฉลี่ย	๒๗๔๘๓.๓๓๓๓	๑.๗๔๐๕x๑๐$^{-๗}$	๘.๕๑๕
ซีหนึ่งเอ็นสองเอ็นเอสอง ($C_1N_2Na_2$)	๐	๐	๐
ซีหนึ่งเอ็นสองเอ็นเอสอง ($C_1N_2Na_2$)	๓๔๓๗๐	๒.๑๕๖๑๑x๑๐$^{-๗}$	๔.๕๗๕
ซีหนึ่งเอ็นสองเอ็นเอสอง ($C_1N_2Na_2$)	๒๗๕๓	๑.๗๒๗๐๒x๑๐$^{-๔}$	๕.๘๑๖
ค่าเฉลี่ย	๑๘๕๖๑.๕	๑.๑๖๔๔๑x๑๐$^{-๗}$	๕.๓๕๗๕
ซีหนึ่งเอ็นสองเอ็นเอสาม (C1N2Na3)	๐	๐	๐
ซีหนึ่งเอ็นสองเอ็นเอสาม ($C_1N_2Na_3$)	๒๘๗๖๘	๑.๘๐๔๖๘x๑๐$^{-๗}$	๔.๒๕
ซีหนึ่งเอ็นสองเอ็นเอสาม ($C_1N_2Na_3$)	๓๘๘๐๖	๒.๔๓๔๗๕x๑๐$^{-๗}$	๕.๕๗๒
ค่าเฉลี่ย	๓๓๗๘๗	๒.๑๑๕๕๔x๑๐$^{-๗}$	๕.๑๑๑
สูตรอาหาร	ปริมาณสาร(พื้นที่ใต้กราฟ)	ปริมาณสาร(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์(กรัมต่อลิตร)
ซีหนึ่งเอ็นสามเอ็นเอหนึ่ง ($C_1N_3Na_1$)	๓๐๕๐๐	๑.๕๓๘๔๓x๑๐$^{-๗}$	๑๐.๒๗
ซีหนึ่งเอ็นสามเอ็นเอหนึ่ง ($C_1N_3Na_1$)	๕๓๔๓๓	๓.๓๕๑๕๘x๑๐$^{-๗}$	๑๑.๗๐๘
ซีหนึ่งเอ็นสามเอ็นเอหนึ่ง ($C_1N_3Na_1$)	๓๒๘๘๖	๒.๐๓๐๑x๑๐$^{-๗}$	๓.๐๕๑
ค่าเฉลี่ย	๓๕๐๗๓	๒.๔๕๑๑๔x๑๐$^{-๗}$	๘.๓๔๓
ซีหนึ่งเอ็นสามเอ็นเอสอง ($C_1N_3Na_2$)	๒๕๘๕๖	๑.๘๗๒๕๔x๑๐$^{-๗}$	๕.๒๔
ซีหนึ่งเอ็นสามเอ็นเอสอง ($C_1N_3Na_2$)	๓๐๒๗๑	๑.๘๕๘๕๗x๑๐$^{-๗}$	๔.๗๖๓
ซีหนึ่งเอ็นสามเอ็นเอสอง ($C_1N_3Na_2$)	๒๕๓๒๓	๑.๘๓๕๕x๑๐$^{-๗}$	๕.๗๕๓

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าเฉลี่ย	๒๙๘๑๖.๖๖๖๖	๑.๘๗๐๔๗x๑๐$^{-๗}$	๖.๕๘๕
ซีหนึ่งเอ็นสาเอ็นเอสาม ($C_1N_3Na_3$)	๒๘๒๒๐	๑.๗๗๐๓๑x๑๐$^{-๗}$	๑๑.๐๓๗
ซีหนึ่งเอ็นสามเอ็นเอสาม ($C_1N_3Na_3$)	๐	๐	๐
ซีหนึ่งเอ็นสามเอ็นเอสาม ($C_1N_3Na_3$)	๓๐๙๓	๑.๙๔๐๓๑x๑๐$^{-๔}$	๔.๕๔๑
ค่าเฉลี่ย	๑๕๖๕๖.๕	๙.๘๒๑๖๘x๑๐$^{-๔}$	๖.๘๑๙
สูตรอาหาร	ปริมาณสาร(พื้นที่ใต้กราฟ)	ปริมาณสาร(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์(กรัมต่อลิตร)
ซีหนึ่งเอ็นสี่เอ็นเอหนึ่ง (C1N4Na1)	๑๔๑๖๙	๘.๘๘๘๕๔x๑๐$^{-๔}$	๓.๐๑๙
ซีหนึ่งเอ็นสี่เอ็นเอหนึ่ง ($C_1N_4Na_1$)	๕๓๙๒	๓.๓๘๒๓x๑๐$^{-๔}$	๒.๔๑
ซีหนึ่งเอ็นสี่เอ็นเอหนึ่ง ($C_1N_4Na_1$)	๔๑๒๒	๒.๕๘๕๘๓x๑๐$^{-๔}$	๘.๓๙๕
ค่าเฉลี่ย	๗๘๙๔.๓๓๓๓	๔.๙๕๒๓x๑๐$^{-๔}$	๔.๖๐๘
ซีหนึ่งเอ็นสี่เอ็นเอสอง (C1N4Na2)	๗๔๐๕	๔.๖๔๕๓๓x๑๐$^{-๔}$	๒.๕๘๒
ซีหนึ่งเอ็นสี่เอ็นเอสอง ($C_1N_4Na_2$)	๖๗๑๓	๔.๒๑๑๒๒x๑๐$^{-๔}$	๒.๖๔๖
ซีหนึ่งเอ็นสี่เอ็นเอสอง ($C_1N_4Na_2$)	๓๓๒๘	๒.๐๘๗๗๓x๑๐$^{-๔}$	๑.๗๖๓
ค่าเฉลี่ย	๕๘๑๕.๓๓๓๓	๓.๖๔๘๐๙x๑๐$^{-๔}$	๒.๓๓
ซีหนึ่งเอ็นสี่เอ็นเอสาม ($C_1N_4Na_3$)	๑๑๙๕๘	๗.๕๐๑๕๓x๑๐$^{-๔}$	๑.๕๕๙
ซีหนึ่งเอ็นสี่เอ็นเอสาม ($C_1N_4Na_3$)	๒๖๔๘	๑.๖๖๑๑๕x๑๐$^{-๔}$	๒.๐๙๙
ซีหนึ่งเอ็นสี่เอ็นเอสาม ($C_1N_4Na_3$)	๑๐๕๖๔	๖.๖๒๗๐๔x๑๐$^{-๔}$	๑.๙๓๕
ค่าเฉลี่ย	๘๓๙๐	๕.๒๖๗๒๔x๑๐$^{-๔}$	๑.๘๖๔

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรอาหาร	ปริมาณสาร(พื้นที่ใต้กราฟ)	ปริมาณสาร(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์(กรัมต่อลิตร)
ซีหนึ่งเอ็นห้าเอ็นเอหนึ่ง ($C_1N_5Na_1$)	๔๑๖๕	๒.๖๑๕๓๑x๑๐$^{-๔}$	๑.๕๖๑
ซีหนึ่งเอ็นห้าเอ็นเอหนึ่ง ($C_1N_5Na_1$)	๖๔๕๕	๔.๐๔๕๓๗x๑๐$^{-๔}$	๔.๖๔๗
ซีหนึ่งเอ็นห้าเอ็นเอหนึ่ง ($C_1N_5Na_1$)	๒๕๑๕	๑.๘๒๘๖๕x๑๐$^{-๔}$	๓.๓๑๑
ค่าเฉลี่ย	๔๕๑๓	๒.๘๓๑๑๑x๑๐$^{-๔}$	๓.๓๐๖
ซีหนึ่งเอ็นห้าเอ็นเอสอง ($C_1N_5Na_2$)	๓๐๓๐	๑.๕๐๐๗๕x๑๐$^{-๔}$	๐.๑๘๓๒
ซีหนึ่งเอ็นห้าเอ็นเอสอง (C1N5Na2)	๓๕๖๕	๒.๔๘๕๘๕x๑๐$^{-๔}$	๓.๓๐๘
ซีหนึ่งเอ็นห้าเอ็นเอสอง (C1N5Na2)	๐	๐	๐
ค่าเฉลี่ย	๓๔๕๕.๕	๒.๑๕๕๓๒x๑๐$^{-๔}$	๒.๕๗
ซีหนึ่งเอ็นห้าเอ็นเอสาม ($C_1N_5Na_3$)	๓๗๕๑	๒.๓๗๘๑๘x๑๐$^{-๔}$	๐.๕๑๓
ซีหนึ่งเอ็นห้าเอ็นเอสาม ($C_1N_5Na_3$)	๓๒๔๔	๒.๐๓๕๐๔x๑๐$^{-๔}$	๑.๒๘๕
ซีหนึ่งเอ็นห้าเอ็นเอสาม ($C_1N_5Na_3$)	๕๗๗๐	๓.๖๑๕๖๕x๑๐$^{-๔}$	๑.๐๓๖
ค่าเฉลี่ย	๔๒๖๘.๓๓๓	๒.๖๗๗๖๒x๑๐$^{-๔}$	๑.๐๗๕
สูตรอาหาร	ปริมาณสาร(พื้นที่ใต้กราฟ)	ปริมาณสาร(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์(กรัมต่อลิตร)
ซีสองเอ็นหนึ่งเอ็นเอหนึ่ง ($C_2N_1Na_1$)	๑๓๗๒๓	๘.๖๐๘๗๖x๑๐$^{-๔}$	๕.๓๔๒
ซีสองเอ็นหนึ่งเอ็นเอหนึ่ง ($C_2N_1Na_1$)	๕๒๓๕	๓.๒๘๖๕๕x๑๐$^{-๔}$	๑.๓๑
ซีสองเอ็นหนึ่งเอ็นเอหนึ่ง ($C_2N_1Na_1$)	๐	๐	๐
ค่าเฉลี่ย	๕๔๘๑	๕.๕๔๗๖๕x๑๐$^{-๔}$	๓.๓๒๖
ซีสองเอ็นหนึ่งเอ็นเอสอง ($C_2N_1Na_2$)	๐	๐	๕.๗๘๕
ซีสองเอ็นหนึ่งเอ็นเอสอง ($C_2N_1Na_2$)	๐	๐	๐
ซีสองเอ็นหนึ่งเอ็นเอสอง	๐	๐	๑.๕๒๕

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$(C_2N_1Na_2)$			
ค่าเฉลี่ย	๐	๐	๕.๘๕๗
ซีสองเอ็นหนึ่งเอ็นเอสาม $(C_2N_1Na_3)$	๐	๐	๑.๕๕
ซีสองเอ็นหนึ่งเอ็นเอสาม $(C_2N_1Na_3)$	๐	๐	๐.๘๗๑
ซีสองเอ็นหนึ่งเอ็นเอสาม $(C_2N_1Na_3)$	๐	๐	๓.๕๕๑
ค่าเฉลี่ย	๐	๐	๑.๕๕
สูตรอาหาร	ปริมาณสาร(พื้นที่ใต้กราฟ)	ปริมาณสาร(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์(กรัมต่อลิตร)
ซีสองเอ็นสองเอ็นเอหนึ่ง $(C_2N_2Na_1)$	๐	๐	๑.๘๑๔
ซีสองเอ็นสองเอ็นเอหนึ่ง $(C_2N_2Na_1)$	๐	๐	๐
ซีสองเอ็นสองเอ็นเอหนึ่ง $(C_2N_2Na_1)$	๐	๐	๑.๔๗๓
ค่าเฉลี่ย	๐	๐	๑.๖๔๓๕
ซีสองเอ็นสองเอ็นเอสอง $(C_2N_2Na_2)$	๐	๐	๐.๔๓๕
ซีสองเอ็นสองเอ็นเอสอง $(C_2N_2Na_2)$	๐	๐	๐.๕๖๕
ซีสองเอ็นสองเอ็นเอสอง $(C_2N_2Na_2)$	๐	๐	๐
ค่าเฉลี่ย	๐	๐	๐.๓๓๖
ซีสองเอ็นสองเอ็นเอสาม $(C_2N_2Na_3)$	๐	๐	๑.๕๑๕
ซีสองเอ็นสองเอ็นเอสาม $(C_2N_2Na_3)$	๐	๐	๐
ซีสองเอ็นสองเอ็นเอสาม $(C_2N_2Na_3)$	๐	๐	๑.๘๘๗
รวม	๐	๐	๑.๗๐๓

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรอาหาร	ปริมาณสาร(พื้นที่ใต้กราฟ)	ปริมาณสาร(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์(กรัมต่อลิตร)
ซีสองเอ็นสามเอ็นเอหนึ่ง ($C_2N_3Na_1$)	๐	๐	๒.๑
ซีสองเอ็นสามเอ็นเอหนึ่ง ($C_2N_3Na_1$)	๐	๐	๓.๘๘๓
ซีสองเอ็นสามเอ็นเอหนึ่ง ($C_2N_3Na_1$)	๐	๐	๑.๒๒๕
ค่าเฉลี่ย	๐	๐	๓.๒๑๒
ซีสองเอ็นสามเอ็นเอสอง ($C_2N_3Na_2$)	๐	๐	๓.๐๕๒
ซีสองเอ็นสามเอ็นเอสอง ($C_2N_3Na_2$)	๐	๐	๐
ซีสองเอ็นสามเอ็นเอสอง ($C_2N_3Na_2$)	๐	๐	๑.๐๒๕
ค่าเฉลี่ย	๐	๐	๒.๐๔
ซีสองเอ็นสามเอ็นเอสาม ($C_2N_3Na_3$)	๐	๐	๑.๔๑๓
ซีสองเอ็นสามเอ็นเอสาม ($C_2N_3Na_3$)	๐	๐	๐.๘๖๘
ซีสองเอ็นสามเอ็นเอสาม ($C_2N_3Na_3$)	๐	๐	๐.๔๔๒
ค่าเฉลี่ย	๐	๐	๐.๕๐๗
สูตรอาหาร	ปริมาณสาร(พื้นที่ใต้กราฟ)	ปริมาณสาร(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์(กรัมต่อลิตร)
ซีสองเอ็นสี่เอ็นเอหนึ่ง ($C_2N_4Na_1$)	๐	๐	๔.๓๕๘
ซีสองเอ็นสี่เอ็นเอหนึ่ง ($C_2N_4Na_1$)	๐	๐	๐.๒๗๒
ซีสองเอ็นสี่เอ็นเอหนึ่ง ($C_2N_4Na_1$)	๐	๐	๖.๐๒๔
ค่าเฉลี่ย	๐	๐	๓.๕๕๑
ซีสองเอ็นสี่เอ็นเอสอง ($C_2N_4Na_2$)	๐	๐	๒.๗๘๔
ซีสองเอ็นสี่เอ็นเอสอง ($C_2N_4Na_2$)	๐	๐	๒.๗๓๒
ซีสองเอ็นสี่เอ็นเอสอง ($C_2N_4Na_2$)	๐	๐	๑.๓๗๘

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าเฉลี่ย	๐	๐	๒.๒๕๘
ซีสองเอ็นสี่เอ็นเอสาม ($C_2N_4Na_3$)	๐	๐	๒.๐๒๖
ซีสองเอ็นสี่เอ็นเอสาม ($C_2N_4Na_3$)	๐	๐	๒.๕๒๖
ซีสองเอ็นสี่เอ็นเอสาม ($C_2N_4Na_3$)	๐	๐	๐.๔๕๕
ค่าเฉลี่ย	๐	๐	๑.๖๗
สูตรอาหาร	ปริมาณสาร(พื้นที่ใต้กราฟ)	ปริมาณสาร(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์(กรัมต่อลิตร)
ซีสองเอ็นห้าเอ็นเอหนึ่ง ($C_2N_5Na_1$)	๘๑๖๕	๕.๑๒๒๐๕x๑๐$^{-๔}$	๑.๘๗๓
ซีสองเอ็นห้าเอ็นเอหนึ่ง ($C_2N_5Na_1$)	๑๒๐๓๗	๗.๕๕๑๐๕x๑๐$^{-๔}$	๑.๑๘๓
ซีสองเอ็นห้าเอ็นเอหนึ่ง ($C_2N_5Na_1$)	๘๑๒๓	๕.๐๕๕๗๕x๑๐$^{-๔}$	๒.๒๗
ค่าเฉลี่ย	๕๔๔๑.๖๖๖	๕.๕๒๒๕๘x๑๐$^{-๔}$	๑.๗๗๕
ซีสองเอ็นห้าเอ็นเอสอง ($C_2N_5Na_2$)	๔๖๑๔	๒.๘๕๔๔๗x๑๐$^{-๕}$	๒.๒๗๕
ซีสองเอ็นห้าเอ็นเอสอง ($C_2N_5Na_2$)	๒๕๖๖	๑.๖๐๕๗x๑๐$^{-๕}$	๑.๕๒๖
ซีสองเอ็นห้าเอ็นเอสอง ($C_2N_5Na_2$)	๑๗๒๗๕	๑.๐๘๓๗x๑๐$^{-๗}$	๑.๖๗๔
ค่าเฉลี่ย	๘๑๕๑.๖๖๖	๕.๑๑๓๗๓x๑๐$^{-๔}$	๑.๕๕๕
ซีสองเอ็นห้าเอ็นเอสาม ($C_2N_5Na_3$)	๑๕๕๐๔	๕.๗๒๖๐๒x๑๐$^{-๕}$	๒.๒๒๗
ซีสองเอ็นห้าเอ็นเอสาม ($C_2N_5Na_3$)	๑๗๒๕	๑.๐๘๒๑๓x๑๐$^{-๔}$	๑.๗๕๖
ซีสองเอ็นห้าเอ็นเอสาม ($C_2N_5Na_3$)	๑๗๓๗๖	๑.๐๕๐๐๔x๑๐$^{-๗}$	๑.๕๕๒
ค่าเฉลี่ย	๑๑๕๓๕	๗.๒๓๖๑๗x๑๐$^{-๔}$	๑.๘๔๕

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรอาหาร	ปริมาณสาร(พื้นที่ใต้กราฟ)	ปริมาณสาร(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์(กรัมต่อลิตร)
ซีสามเอ็นหนึ่งเอ็นเอหนึ่ง($C_3N_1Na_1$)	๐	๐	๓.๘๐๕
ซีสามเอ็นหนึ่งเอ็นเอหนึ่ง($C_3N_1Na_1$)	๐	๐	๒.๗๘๘
ซีสามเอ็นหนึ่งเอ็นเอหนึ่ง($C_3N_1Na_1$)	๐	๐	๒.๑๒๕
ค่าเฉลี่ย	๐	๐	๒.๕๐๘
ซีสามเอ็นหนึ่งเอ็นเอสอง($C_3N_1Na_2$)	๐	๐	๖.๖๖๑
ซีสามเอ็นหนึ่งเอ็นเอสอง($C_3N_1Na_2$)	๐	๐	๕.๔๕๖
ซีสามเอ็นหนึ่งเอ็นเอสอง($C_3N_1Na_2$)	๐	๐	๑.๕๗๓
ค่าเฉลี่ย	๐	๐	๔.๕๗๖
ซีสามเอ็นหนึ่งเอ็นเอสาม($C_3N_1Na_3$)	๐	๐	๐
ซีสามเอ็นหนึ่งเอ็นเอสาม($C_3N_1Na_3$)	๐	๐	๓.๔๘๘
ซีสามเอ็นหนึ่งเอ็นเอสาม($C_3N_1Na_3$)	๐	๐	๕.๑๑๕
ค่าเฉลี่ย	๐	๐	๔.๓๐๑
สูตรอาหาร	ปริมาณสาร(พื้นที่ใต้กราฟ)	ปริมาณสาร(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์(กรัมต่อลิตร)
ซีสามเอ็นสองเอ็นเอหนึ่ง($C_3N_2Na_1$)	๐	๐	๔.๕๕
ซีสามเอ็นสองเอ็นเอหนึ่ง($C_3N_2Na_1$)	๐	๐	๑๓.๔๑๕
ซีสามเอ็นสองเอ็นเอหนึ่ง($C_3N_2Na_1$)	๐	๐	๖.๔๘๕
ค่าเฉลี่ย	๐	๐	๘.๒๕๘
ซีสามเอ็นสองเอ็นเอสอง($C_3N_2Na_2$)	๐	๐	๖.๑๓๒
ซีสามเอ็นสองเอ็นเอสอง($C_3N_2Na_2$)	๐	๐	๔.๓๓๔
ซีสามเอ็นสองเอ็นเอสอง($C_3N_2Na_2$)	๐	๐	๖.๑๐๒

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าเฉลี่ย	๐	๐	๕.๕๒๒
ซีสามเอ็นสองเอ็นเอสาม($C_3N_2Na_3$)	๐	๐	๓.๕๔๔
ซีสามเอ็นสองเอ็นเอสาม($C_3N_2Na_3$)	๐	๐	๒.๙๕๑
ซีสามเอ็นสองเอ็นเอสาม($C_3N_2Na_3$)	๐	๐	๗.๖๘๑
ค่าเฉลี่ย	๐	๐	๐๔.๗๒๕
สูตรอาหาร	ปริมาณสาร(พื้นที่ใต้กราฟ)	ปริมาณสาร(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์(กรัมต่อลิตร)
ซีสามเอ็นสามเอ็นเอหนึ่ง($C_3N_3Na_1$)	๐	๐	๒.๒๓๔
ซีสามเอ็นสามเอ็นเอหนึ่ง($C_3N_3Na_1$)	๐	๐	๓.๘๘๓
ซีสามเอ็นสามเอ็นเอหนึ่ง($C_3N_3Na_1$)	๐	๐	๕.๗๖๑
ค่าเฉลี่ย	๐	๐	๓.๘๕๙
ซีสามเอ็นสามเอ็นเอสอง($C_3N_3Na_2$)	๐	๐	๓.๗๖๔
ซีสามเอ็นสามเอ็นเอสอง($C_3N_3Na_2$)	๐	๐	๒.๑๗๑
ซีสามเอ็นสามเอ็นเอสอง($C_3N_3Na_2$)	๐	๐	๒.๘๘๓
ค่าเฉลี่ย	๐	๐	๒.๙๓๙
ซีสามเอ็นสามเอ็นเอสาม($C_3N_3Na_3$)	๐	๐	๐
ซีสามเอ็นสามเอ็นเอสาม($C_3N_3Na_3$)	๐	๐	๔.๕๒๑
ซีสามเอ็นสามเอ็นเอสาม($C_3N_3Na_3$)	๐	๐	๗.๒๘
ค่าเฉลี่ย	๐	๐	๕.๙

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรอาหาร	ปริมาณสาร(พื้นที่ใต้กราฟ)	ปริมาณสาร(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์(กรัมต่อลิตร)
ซีสามเอ็นสี่เอ็นเอหนึ่ง ($C_3N_4Na_1$)	๑๐๖๒๘๕	๖.๖๖๗๗x๑๐$^{-๗}$	๓.๕๓๘
ซีสามเอ็นสี่เอ็นเอหนึ่ง ($C_3N_4Na_1$)	๗๑๕๕๒	๔.๔๘๘๖๒x๑๐$^{-๗}$	๓.๕๑๔
ซีสามเอ็นสี่เอ็นเอหนึ่ง ($C_3N_4Na_1$)	๑๐๔๑๘๓	๖.๕๓๕๖๔x๑๐$^{-๗}$	๔.๒๕๘
ค่าเฉลี่ย	๕๔๐๐๘	๕.๘๕๗๓x๑๐$^{-๗}$	๔.๐๕
ซีสามเอ็นสี่เอ็นเอสอง (C3N4Na2)	๑๐๐๐๖๘	๖.๒๗๗๕x๑๐$^{-๗}$	๓.๖๕๔
ซีสามเอ็นสี่เอ็นเอสอง (C3N4Na2)	๐	๐	๐
ซีสามเอ็นสี่เอ็นเอสอง (C3N4Na2)	๗๘๕๓๒	๔.๕๒๖๔๕x๑๐$^{-๗}$	๔.๘๐๒
ค่าเฉลี่ย	๘๕๓๐๐	๕.๖๐๒x๑๐$^{-๗}$	๔.๒๔๘
ซีสามเอ็นสี่เอ็นเอสาม (C3N4Na3)	๐	๐	๒.๒๒๗
ซีสามเอ็นสี่เอ็นเอสาม (C3N4Na3)	๐	๐	๒.๖๕๘
ซีสามเอ็นสี่เอ็นเอสาม (C3N4Na3)	๐	๐	๔.๐๖๕
รวม	๐	๐	๒.๕๘๔
สูตรอาหาร	ปริมาณสาร(พื้นที่ใต้กราฟ)	ปริมาณสาร(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์
ซีสามเอ็นห้าเอ็นเอหนึ่ง (C3N5Na1)	๐	๐	๓.๗๑
ซีสามเอ็นห้าเอ็นเอหนึ่ง (C3N5Na1)	๔๕๕๕๓	๓.๑๓๖๑๘x๑๐$^{-๗}$	๓.๒๔
ซีสามเอ็นห้าเอ็นเอหนึ่ง (C3N5Na1)	๑๖๑๑๗๖	๑.๐๑๑๐๕x๑๐$^{-๖}$	๒.๕๑
รวม	๑๐๕๕๘๔	๖.๖๒๓๕๖x๑๐$^{-๗}$	๓.๑๕๓
ซีสามเอ็นห้าเอ็นเอสอง ($C_3N_5Na_2$)	๐	๐	๓.๑๗
ซีสามเอ็นห้าเอ็นเอสอง ($C_3N_5Na_2$)	๐	๐	๓.๓๑๑
ซีสามเอ็นห้าเอ็นเอสอง ($C_3N_5Na_2$)	๐	๐	๓.๕๕๕

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รวม	๐	๐	๓.๓๖
ซีสามเอ็นห้าเอ็นแอสาม (C3N5Na3)	๐	๐	๓.๙๗
ซีสามเอ็นห้าเอ็นแอสาม (C3N5Na3)	๐	๐	๔.๗๗๖
ซีสามเอ็นห้าเอ็นแอสาม (C3N5Na3)	๐	๐	๒.๑๕๖
รวม	๐	๐	๓.๖๓๔
สูตรอาหาร	ปริมาณสาร(พื้นที่ใต้กราฟ)	ปริมาณสาร(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์(กรัมต่อลิตร)
ซีสี่เอ็นหนึ่งเอ็นเอหนึ่ง ($C_4N_1Na_1$)	๒๑๒๙๓๕	๑.๓๓๗๙๕x๑๐$^{-๖}$	๕.๔๕๓
ซีสี่เอ็นหนึ่งเอ็นเอหนึ่ง ($C_4N_1Na_1$)	๓๓๘๕๓	๒.๑๒๓๖๘๘x๑๐$^{-๗}$	๙.๖๗๑
ซีสี่เอ็นหนึ่งเอ็นเอหนึ่ง ($C_4N_1Na_1$)	๒๖๐๘๓๒	๑.๖๓๖๒๖๖x๑๐$^{-๗}$	๘.๒๕๙
รวม	๑๖๙๒๐๖.๖๖๗	๑.๐๖๑๔๗๗x๑๐$^{-๖}$	๗.๗๙๔
ซีสี่เอ็นหนึ่งเอ็นเอสอง ($C_4N_1Na_2$)	๔๔๐๑๘	๒.๗๖๑๓๕๑x๑๐$^{-๗}$	๙.๐๒๗
ซีสี่เอ็นหนึ่งเอ็นเอสอง ($C_4N_1Na_2$)	๑๐๖๒๐๓	๖.๖๖๒๓๖๖x๑๐$^{-๗}$	๑๐.๔๓
ซีสี่เอ็นหนึ่งเอ็นเอสอง ($C_4N_1Na_2$)	๑๑๖๑๓๘	๗.๒๘๕๖๑๑x๑๐$^{-๗}$	๖.๒๘๘
รวม	๘๘๗๘๖.๓๓๓๓	๕.๕๖๙๗๗x๑๐$^{-๗}$	๘.๕๘๑
ซีสี่เอ็นหนึ่งเอ็นเอสาม ($C_4N_1Na_3$)	๒๒๓๕๗	๑.๔๐๒๕๑๑x๑๐$^{-๗}$	๖.๔
ซีสี่เอ็นหนึ่งเอ็นเอสาม ($C_4N_1Na_3$)	๑๓๘๕๑	๘.๖๘๙๐๕x๑๐$^{-๘}$	๕.๖๓๘
ซีสี่เอ็นหนึ่งเอ็นเอสาม ($C_4N_1Na_3$)	๑๐๗๑๐	๖.๗๑๖๓x๑๐$^{-๘}$	๕.๕๒๔๕
รวม	๑๕๖๓๙.๓๓๓๓	๙.๘๑๐๙๒x๑๐$^{-๘}$	๕.๗๖๑

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรอาหาร	ปริมาณสาร(พื้นที่ใต้กราฟ)	ปริมาณสาร(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์(กรัมต่อลิตร)
ซีสี่เอ็นสองเอ็นเอหนึ่ง ($C_4N_2Na_1$)	๑๔๘๓๔	๕.๓๐๕๗๑x๑๐$^{-๔}$	๗.๕๕๕
ซีสี่เอ็นสองเอ็นเอหนึ่ง ($C_4N_2Na_1$)	๑๒๖๕๒	๗.๕๖๑๕๕x๑๐$^{-๔}$	๗.๕๕๓
ซีสี่เอ็นสองเอ็นเอหนึ่ง ($C_4N_2Na_1$)	๐	๐	๐
รวม	๑๓๗๖๓	๘.๖๓๓๘๕x๑๐$^{-๔}$	๗.๕๗๖
ซีสี่เอ็นสองเอ็นเอสอง ($C_4N_2Na_2$)	๑๔๑๖๘	๘.๘๘๗๕๑x๑๐$^{-๔}$	๗.๘๓
ซีสี่เอ็นสองเอ็นเอสอง ($C_4N_2Na_2$)	๑๐๕๗๗	๖.๘๘๖๑๓x๑๐$^{-๔}$	๘.๘๘๘
ซีสี่เอ็นสองเอ็นเอสอง ($C_4N_2Na_2$)	๐	๐	๐
รวม	๑๒๕๗๒.๕	๗.๘๘๗๐๒x๑๐$^{-๔}$	๕.๕๗๒
ซีสี่เอ็นสองเอ็นเอสาม ($C_4N_2Na_3$)	๐	๐	๐
ซีสี่เอ็นสองเอ็นเอสาม ($C_4N_2Na_3$)	๒๒๓๕	๑.๔๐๒๐๗x๑๐$^{-๔}$	๕.๒๒๖
ซีสี่เอ็นสองเอ็นเอสาม ($C_4N_2Na_3$)	๒๘๐๓	๑.๗๕๘๓๕x๑๐$^{-๔}$	๒.๕๐๓
รวม	๒๕๑๕	๑.๕๘๐๒๓x๑๐$^{-๔}$	๕.๘๖๔
สูตรอาหาร	ปริมาณสาร(พื้นที่ใต้กราฟ)	ปริมาณสาร(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์(กรัมต่อลิตร)
ซีสี่เอ็นสามเอ็นเอหนึ่ง ($C_4N_3Na_1$)	๒๒๗๕๘๗	๑.๔๒๗๗๑x๑๐$^{-๖}$	๖.๐๓
ซีสี่เอ็นสามเอ็นเอหนึ่ง ($C_4N_3Na_1$)	๒๓๗๗๕๕	๑.๔๕๑๗๗x๑๐$^{-๖}$	๒.๔๑๘
ซีสี่เอ็นสามเอ็นเอหนึ่ง ($C_4N_3Na_1$)	๐	๐	๐
รวม	๒๓๒๖๕๓	๑.๔๕๕๗๔x๑๐$^{-๖}$	๔.๒๒๔
ซีสี่เอ็นสามเอ็นเอสอง ($C_4N_3Na_2$)	๒๑๐๕๕	๑.๓๒๓๕๕x๑๐$^{-๗}$	๓.๕๑๕
ซีสี่เอ็นสามเอ็นเอสอง ($C_4N_3Na_2$)	๒๐๒๕๓๔	๑.๒๗๓๐๕x๑๐$^{-๖}$	๑๐.๕๑๘
ซีสี่เอ็นสามเอ็นเอสอง ($C_4N_3Na_2$)	๐	๐	๐

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รวม	๑๑๒๐๑๖.๕	๗.๐๒๗๐๕x๑๐$^{-๗}$	๗.๒๑๘
ซีสี่เอ็นสามเอ็นเอสาม ($C_4N_3Na_3$)	๗๐๖๖๓	๔.๔๓๒๘๕x๑๐$^{-๗}$	๓.๕๒๕
ซีสี่เอ็นสามเอ็นเอสาม ($C_4N_3Na_3$)	๔๒๑๔	๒.๖๔๓๕๔x๑๐$^{-๘}$	๕.๒๕๕
ซีสี่เอ็นสามเอ็นเอสาม ($C_4N_3Na_3$)	๖๘๖๕๐	๔.๓๐๖๕๗x๑๐$^{-๗}$	๔.๐๗๖
รวม	๔๗๘๒.๓๓๓๓	๓.๐๐๐๑๒๖x๑๐$^{-๗}$	๕.๗๕๓
สูตรอาหาร	ปริมาณสาร(พื้นที่ใต้กราฟ)	ปริมาณสาร(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์(กรัมต่อลิตร)
ซีสี่เอ็นสี่เอ็นเอหนึ่ง ($C_4N_4Na_1$)	๕๕๖๑๕๐	๓.๕๒๔๕๓x๑๐$^{-๗}$	๒.๐๘๗
ซีสี่เอ็นสี่เอ็นเอหนึ่ง ($C_4N_4Na_1$)	๘๕๗๕	๕.๓๗๕๓x๑๐$^{-๘}$	๒.๓๕๕
ซีสี่เอ็นสี่เอ็นเอหนึ่ง ($C_4N_4Na_1$)	๖๗๕๘	๔.๒๓๕๔๕x๑๐$^{-๘}$	๑.๖๘๗
ค่าเฉลี่ย	๒๓๘๔๑	๑.๔๕๕๖x๑๐$^{-๗}$	๒.๐๔๔
ซีสี่เอ็นสี่เอ็นเอสอง ($C_4N_4Na_2$)	๐	๐	๐
ซีสี่เอ็นสี่เอ็นเอสอง ($C_4N_4Na_2$)	๖๘๒๔๐๘	๔.๒๘๐๕x๑๐$^{-๖}$	๒.๖๕๘
ซีสี่เอ็นสี่เอ็นเอสอง ($C_4N_4Na_2$)	๕๔๑๕๓๑	๕.๕๐๖๔๔x๑๐$^{-๖}$	๒.๔๘๗
ค่าเฉลี่ย	๘๑๑๕๖๕.๕	๕.๐๕๓๖๗x๑๐$^{-๖}$	๒.๕๕๒
ซีสี่เอ็นสี่เอ็นเอสาม ($C_4N_4Na_3$)	๖๕๓๗๕	๔.๑๐๑๑๓x๑๐$^{-๗}$	๓.๓๗๓
ซีสี่เอ็นสี่เอ็นเอสาม ($C_4N_4Na_3$)	๕๖๒๐๑	๖.๐๓๔๕๑x๑๐$^{-๗}$	๒.๔๘๗
ซีสี่เอ็นสี่เอ็นเอสาม ($C_4N_4Na_3$)	๖๕๔๖๗	๔.๑๐๖๕x๑๐$^{-๗}$	๘.๔๔๒
ค่าเฉลี่ย	๗๕๖๘๑	๔.๗๔๗๖๔x๑๐$^{-๗}$	๔.๗๖๗

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรอาหาร	ปริมาณสาร(พื้นที่ใต้กราฟ)	ปริมาณสาร(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์(กรัมต่อลิตร)
ซีสี่เอ็นห้าเอ็นเอหนึ่ง ($C_4N_5Na_1$)	๖๒๒๒๑๕	๓.๕๐๓๓x๑๐$^{-๖}$	๒.๗๕๓
ซีสี่เอ็นห้าเอ็นเอหนึ่ง ($C_4N_5Na_1$)	๔๒๖๑๕๓	๒.๖๗๓๓x๑๐$^{-๖}$	๒.๕๕๑
ซีสี่เอ็นห้าเอ็นเอหนึ่ง ($C_4N_5Na_1$)	๐	๐	๐
ค่าเฉลี่ย	๕๒๔๑๘๔	๓.๒๘๘๓๓x๑๐$^{-๖}$	๒.๖๕๒
ซีสี่เอ็นห้าเอ็นเอสอง ($C_4N_5Na_2$)	๐	๐	๐
ซีสี่เอ็นห้าเอ็นเอสอง ($C_4N_5Na_2$)	๕๐๕๘	๕.๖๘๒๒๕x๑๐$^{-๘}$	๔.๑๐๕
ซีสี่เอ็นห้าเอ็นเอสอง ($C_4N_5Na_2$)	๑๓๔๐๕	๘.๔๑๑๗๘x๑๐$^{-๘}$	๔.๕๖๗
ค่าเฉลี่ย	๑๑๒๓๓.๕	๗.๐๔๗๐๓x๑๐$^{-๘}$	๔.๕๓๘
ซีสี่เอ็นห้าเอ็นเอสาม ($C_4N_5Na_3$)	๒๕๕๔๐๔	๑.๘๕๓๑๔x๑๐$^{-๖}$	๑.๖๗๘
ซีสี่เอ็นห้าเอ็นเอสาม ($C_4N_5Na_3$)	๔๕๐๓๔๔	๒.๘๒๕๑๑x๑๐$^{-๖}$	๓.๒๒๗
ซีสี่เอ็นห้าเอ็นเอสาม ($C_4N_5Na_3$)	๑๔๘๔๐๑	๕.๓๐๕๕๔x๑๐$^{-๗}$	๓.๕๗
ค่าเฉลี่ย	๒๕๘๐๔๕.๖๖๖๗	๑.๘๖๕๗๓x๑๐$^{-๖}$	๒.๘๒๕

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้