

สารต้านอนุมูลอิสระของ *Streptomyces griseoaurantiacus* C1-2
ที่แยกได้จากดินป่าชายเลน

ANTIOXIDANT COMPOUNDS OF *Streptomyces griseoaurantiacus*
C1-2 ISOLATED FROM MANGROVE SOIL



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2564

KMITL-2021-SC-M-020-030

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ANTIOXIDANT COMPOUNDS OF *Streptomyces griseoaurantiacus*
C1-2 ISOLATED FROM MANGROVE SOIL



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE
DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY SCHOOL OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2021

KMITL-2021-SC-M-020-030
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2021

SCHOOL OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	สารต้านอนุมูลอิสระของ <i>Streptomyces griseoaurantiacus</i> C1-2 ที่แยกได้จากดินป่าชายเลน
ชื่อนักศึกษา	นายสัการ ชนะเดช
รหัสประจำตัว	60605053
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ.	2564
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.จิตติ ท่าไฉ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร.ปัทมา พิทยขจรวุฒิ

บทคัดย่อ

แอคติโนมัยซีทไอโซเลต C1-2 ถูกแยกจากตัวอย่างดินที่เก็บจากป่าชายเลนจังหวัดเพชรบุรี ประเทศไทย การศึกษาอนุกรมวิธานของไอโซเลต C1-2 โดยใช้ลักษณะทางฟีโนไทป์ ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางจีโนมไทป์ ระบุได้ว่าไอโซเลต C1-2 คือ *Streptomyces griseoaurantiacus* จากการวิเคราะห์จีโนมแสดงให้เห็นว่าไอโซเลต C1-2 มี 22 กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารทุติยภูมิ ในส่วนของการศึกษาทางเคมีนั้น สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทของไอโซเลต C1-2 ถูกแยกองค์ประกอบทางเคมีและทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์สารบริสุทธิ์ที่ได้ด้วยวิธีทางสเปกโตรสโกปี เปรียบเทียบกับข้อมูลตีพิมพ์ก่อนหน้านี้ ได้เป็นสารชนิดใหม่ 3 ชนิด ได้แก่ (2E,4E)-7-hydroxy-2,4,6-trimethyldeca-2,4-dienamide (2E,4E)-2,4,6-trimethylhepta-2,4-dienamide และ(E)-2-methyl-4-phenylbut-3-enamide นอกจากนี้เป็นสารที่ค้นพบแล้ว 4 ชนิด ได้แก่ SW-B cornifronin B cyclo(L-phenyl, L-prolyl) และ 2-phenylacetamide การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH แสดงให้เห็นว่าสารทั้งหมดสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ ด้วยค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) อยู่ในช่วง 51.28 ± 0.78 ถึง 206.29 ± 4.14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

คำสำคัญ: การวิเคราะห์จีโนม โครมาโทกราฟี สกุล *Streptomyces* สารต้านอนุมูลอิสระ สเปกโตรสโกปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Antioxidant Compounds of <i>Streptomyces griseoaurantiacus</i> C1-2 Isolated from Mangrove Soil
Student Name	Mr. Sakkarn Chanadech
Student ID	60605053
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Year	2021
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Chitti Thawai
Thesis Co-advisor	Dr. Pattama Pittayakhajonwut

ABSTRACT

An actinomycete, designated C1-2, was isolated from mangrove soil collected from Phetchaburi province, Thailand. Taxonomic studies of strain C1-2 based on phenotypic, chemotaxonomic and genotypic characterizations revealed that strain C1-2 was identified as *Streptomyces griseoaurantiacus*. Genome analysis found that strain C1-2 consists of 22 biosynthesis gene clusters for secondary metabolite production. In chemical studies, the crude ethylacetate extract of strain C1-2 was isolated and purified using several chromatographic techniques. The purified compounds identified using spectroscopic techniques and comparing them with the previously published data, were three new compounds, (2*E*,4*E*)-7-hydroxy-2,4,6-trimethyldeca-2,4-dienamide, (2*E*,4*E*)-2,4,6-trimethylhepta-2,4-dienamide, (*E*)-2-methyl-4-phenylbut-3-enamide. Furthermore, four known compounds, SW-B, cornifronin B, cyclo(L-phenyl, L-protyl) and 2-phenylacetamide were found. The evaluation of DPPH radical scavenging activity revealed that all compounds showed the antioxidant activity with half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) in the range of 51.28 ± 0.78 to 206.29 ± 4.14 µg/mL

Keyword: Genome analyses, Chromatography, *Streptomyces sp.*, Antioxidants, Spectroscopy

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดีจากการได้รับความกรุณาจาก รศ. ดร. จิตติ ท่าวัว อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร.ปัทมา พิทยขจรวุฒิ ที่ได้ให้ ความรู้ ความ อนุเคราะห์ ช่วยเหลือ ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการดำเนินงานวิจัย และจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับ นี้ให้สำเร็จเรียบร้อย อีกทั้งยังให้ความอนุเคราะห์ใช้พื้นที่ของหน่วยวิจัยทางแอกติโนแบคทีเรียและ ห้องปฏิบัติการเคมีอินทรีย์ชีวภาพ ตลอดจนอุปกรณ์และสารเคมีที่จำเป็นต่อการวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไป ด้วยดี ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณอาจารย์ทั้งสองท่านเป็นอย่างยิ่ง

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ คุณจักรพงศ์ อินทรอุดม และนักวิจัยของห้องปฏิบัติการเคมีอินทรีย์ ชีวภาพ หน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพจุลินทรีย์และชีวเคมีภัณฑ์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยี แห่งชาติทุกท่าน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ ให้ความรู้ ตลอดจนอุปกรณ์ที่จำเป็นต่อการดำเนินงานวิจัยนี้ ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณประธานกรรมการและคณะกรรมการวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่ได้ให้คำแนะนำ และข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณนักศึกษาปริญญาเอกและโทของหน่วยวิจัยทางเชื้อแอกติโนแบคทีเรียทุกท่าน ที่ได้ให้คำปรึกษาและช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ เสมอมา

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการประจำภาคชีววิทยาที่ให้อำนวยความสะดวก อุปกรณ์ สารเคมีและสถานที่ในการดำเนินงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณมารดา และญาติพี่น้อง เพื่อน และรุ่นน้อง ทุกท่านที่มีส่วนช่วยและ สนับสนุนข้าพเจ้าในทุก ๆ ด้าน และช่วยเหลือและเป็นส่วนหนึ่งในการทำให้ข้าพเจ้าสามารถ ดำเนินการวิจัยและจัดทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้ได้สำเร็จ

สักการ ชนะเดช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญรูป.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและความเป็นมาของโครงการพิเศษ.....	2
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ.....	2
1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ลักษณะทั่วไปของแอกติโนมัยซีท.....	3
2.2 ระบบนิเวศวิทยาทางทะเล (marine ecosystem) และแอกติโนมัยซีททางทะเล (marine actinomycetes).....	4
2.2.1 ระบบนิเวศวิทยาทางทะเล (marine ecosystem)	4
2.2.2 ระบบนิเวศป่าชายเลน (mangrove ecosystem)	4
2.2.3 แอกติโนมัยซีททางทะเล (marine actinomycetes).....	5
2.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ (identification) ของ <i>Streptomyces</i>	7
2.3.1 ลักษณะทางฟีโนไทป์	7
2.3.2 ลักษณะอนุกรมวิธานเคมี.....	9
2.3.4 ลักษณะทางจีโนไทป์	13
2.3.5 ชีวสารสนเทศ (bioinformatics).....	20
2.4 การสกัดสารทุติยภูมิจาก <i>Streptomyces</i>	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่นๆ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

2.4.1 การเตรียมตัวทำลายในการสกัด.....	26
2.4.2 วิธีสกัดสารทุติยภูมิ.....	26
2.5 การแยกสารทุติยภูมิให้บริสุทธิ์.....	27
2.5.1 หลักการของโครมาโทกราฟี.....	27
2.5.2 โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง.....	28
2.6 การวิเคราะห์โครงสร้างและระบุชนิดของสาร.....	29
2.6.1 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (nuclear magnetic resonance; NMR).....	29
2.6.2 พูเรียทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (fourier transform infrared spectrometer; FT-IR Spectrometer).....	32
2.6.3 แมสสเปกโตรเมทรี (mass spectrometry; MS).....	33
2.6.4 โพลาริมิเตอร์ (polarimeter).....	33
2.6.5 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Vis spectrophotometer).....	33
2.7 สารทุติยภูมิจากสกุล <i>Streptomyces</i>	34
2.8 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารทุติยภูมิ.....	38
2.8.1 อนุมูลอิสระ (free radicals).....	38
2.8.2 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants).....	39
2.8.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity determination).....	41
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	43
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	47
3.1 การแยกแอคติโนมายซีทไอโซเลต C1-2.....	47
3.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของไอโซเลต C1-2.....	47
3.2.1 การศึกษาลักษณะฟีโนไทป์ (phenotypic characterization).....	47
3.2.2 การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี (chemotypic characterization).....	50
3.2.3 การศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ (genotypic characterization).....	51

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับของงานวิจัยที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้
 ได้ในโครงการอื่นใดทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

3.3 การแยกสารทุติยภูมิให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี.....	54
3.3.1 การสกัดสารสกัดหยาบ (extraction of crude extract)	54
3.3.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (chemical profiling analysis).....	54
3.3.3 การแยกสารทุติยภูมิด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (isolation of secondary metabolites by column chromatography)	54
3.3.4 การทำสารทุติยภูมิให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (purification of compounds by high performance liquid chromatography).....	55
3.3.5 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์.....	58
3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity).....	58
3.4.1 การเตรียมสารตัวอย่าง.....	58
3.4.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน.....	58
3.4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay.....	58
3.5 การทดสอบทางสถิติ (statistical analysis).....	59
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	60
4.1 ลักษณะทางอนุกรมวิธานของไอโซเลต C1-2.....	60
4.1.1 ลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotypic characteristics).....	60
4.1.2 ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี (chemotypic characteristics)	63
4.1.3 ลักษณะทางจีโนไทป์ (genotypic characteristics).....	64
4.1.4 ลักษณะทางอนุกรมวิธานจากลักษณะทางจีโนม	68
4.2 การศึกษาสารทุติยภูมิที่ผลิตได้จากไอโซเลต C1-2.....	73
4.2.1 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบและการทำสารสกัดหยาบให้บริสุทธิ์	73
4.2.2 การวิเคราะห์โครงสร้างเคมีของสารทุติยภูมิจากไอโซเลต C1-2.....	75
4.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารทุติยภูมิจากไอโซเลต C1-2.....	87

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตเห็นาไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	90
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	90
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	91
เอกสารอ้างอิง.....	92
ภาคผนวก.....	110
ภาคผนวก ก.....	111
ภาคผนวก ข.....	117
ภาคผนวก ค.....	120
ภาคผนวก ง.....	121
ภาคผนวก จ.....	123
ภาคผนวก ฉ.....	150
ประวัติผู้เขียน.....	152

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ 2.1	การเจริญของเส้นใยของแอสทีโนมัยซีทบนอาหารแข็ง	3
รูปที่ 2.2	ลักษณะโคโลนีของ <i>Streptomyces</i> ที่เจริญบนอาหารแข็ง.....	6
รูปที่ 2.3	ลักษณะสปอร์แบบต่าง ๆ ของสกุล <i>Streptomyces</i>	6
รูปที่ 2.4	ลักษณะพื้นผิวสปอร์แบบต่าง ๆ	7
รูปที่ 2.5	ลักษณะของอาร์โทสปอร์ของ <i>Streptomyces</i>	8
รูปที่ 2.6	ลักษณะสปอร์ของ <i>Streptomyces</i> sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน.....	8
รูปที่ 2.7	โครงสร้างของเพปติโดไกลแคนของผนังเซลล์แบคทีเรีย	10
รูปที่ 2.8	โครงสร้างของผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์	12
รูปที่ 2.9	โครงสร้างเคมีของเมนาควิโนน.....	13
รูปที่ 2.10	แผนภาพแสดงขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ	16
รูปที่ 2.11	องค์ประกอบของโรโบโซมของโปรคาริโอต	17
รูปที่ 2.12	rRNA transcription unit ของโปรคาริโอต.....	17
รูปที่ 2.13	การทำลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธีของ Sanger.....	19
รูปที่ 2.14	Circular map ที่ได้จากโปรแกรม CGview.....	22
รูปที่ 2.15	Circular map ที่ได้จากโปรแกรม Circos	22
รูปที่ 2.16	synteny map เปรียบเทียบ ABDS gene cluster.....	23
รูปที่ 2.17	ส่วนประกอบของแผนภูมิต้นไม้	25
รูปที่ 2.18	แผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) แบบต่าง ๆ.....	25
รูปที่ 2.19	แผนภูมิต้นไม้แบบ phylogenomics	26
รูปที่ 2.20	สเปกตรัม ¹ H-NMR ของสาร Benzyl acetate	29
รูปที่ 2.21	ค่า chemical shift ของโปรตอนในสารประกอบต่าง ๆ.....	30
รูปที่ 2.22	ค่า chemical shift ของคาร์บอนประเภทต่าง ๆ	30
รูปที่ 2.23	สเปกตรัม HSQC ของสาร 1-Bromobutane	32
รูปที่ 2.24	สเปกตรัมอินฟราเรดของ Aniline	32
รูปที่ 2.25	mass spectrum ของ 1-bromopropane	33
รูปที่ 2.26	โครงสร้างของสารต้านอนุมูลอิสระที่ผลิตจากสกุล <i>Streptomyces</i>	37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ 2.27	ปฏิกิริยาของอนุมูล DPPH กับสารต้านอนุมูลอิสระ	42
รูปที่ 2.28	ปฏิกิริยาของอนุมูล ABTS ^{•+} กับสารต้านอนุมูลอิสระ	43
รูปที่ 2.29	ปฏิกิริยาของ FRAP กับสารต้านอนุมูลอิสระ	43
รูปที่ 3.1	แผนผังแสดงการแยกสารสกัดหยาบจาก <i>Streptomyces</i> sp. C1-2.....	56
รูปที่ 4.1	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต C1-2.....	60
รูปที่ 4.2	ลักษณะสัณฐานวิทยาของสปอร์ของ <i>Streptomyces griseoaurantiacus</i>	61
รูปที่ 4.3	แผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) ด้วยวิธี Neighbor-joining แสดงตำแหน่งของไอโซเลต C1-2 และสกุลใกล้เคียง	65
รูปที่ 4.4	แผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) ด้วยวิธี Maximum likelihood แสดงตำแหน่งของไอโซเลต C1-2 และสกุลใกล้เคียง	66
รูปที่ 4.5	แผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) ด้วยวิธี Maximum parsimony แสดงตำแหน่งของไอโซเลต C1-2 และสกุลใกล้เคียง.....	67
รูปที่ 4.6	แผนภูมิต้นไม้จีโนม (Phylogenomic tree) แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต C1-2 และสายพันธุ์ใกล้เคียง	68
รูปที่ 4.7	แผนภาพแสดง Cluster of Orthologous genes (COGs) ของสายพันธุ์ C1-2.....	69
รูปที่ 4.8	แผนที่ยีนแบบวงกลม (circular map) แสดงตำแหน่งยีนบนจีโนมของไอโซเลต C1-2	70
รูปที่ 4.9	แผนที่เชื่อมโยง (Synteny map) แสดงการจัดเรียงยีนบนจีโนมของไอโซเลต C1-2และ <i>Streptomyces griseoaurantiacus</i>	70
รูปที่ 4.10	Chemical profiles ของสารสกัดหยาบจากไอโซเลต C1-2	74
รูปที่ 4.11	Chemical profiles ของส่วนที่ 4 (F4)	74
รูปที่ 4.12	Chemical profiles ของส่วนที่ 5 (F5)	75
รูปที่ 4.13	โครงสร้างเคมีของสาร A-G จาก <i>Streptomyces</i> sp. สายพันธุ์ C1-2.....	75
รูปที่ 4.14	โครงสร้างเคมีของสาร A (antibiotic SW-B; (2E,4E)-2,4,6-trimethyldeca-2,4-dienamide).....	77
รูปที่ 4.15	โครงสร้างเคมีของสาร B (cornifronin B; [(2E,4E)-8-hydroxy-2,4,6-trimethyldeca-2,4-dienamide])	79
รูปที่ 4.16	โครงสร้างเคมีของสาร C [(2E,4E,6R)-7-hydroxy-2,4,6-trimethyldeca-2,4-dienamide]	81
รูปที่ 4.17	โครงสร้างเคมีของสาร D [(2E,4E)-2,4,6-trimethylhepta-2,4-dienamide]	82
รูปที่ 4.18	โครงสร้างเคมีของสาร E ((E)-2-methyl-4-phenylbut-3-enamide).....	84

เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ 4.19 โครงสร้างเคมีของสาร F (cyclo-(L-phenyl, L-prolyl)).....	85
รูปที่ 4.20 โครงสร้างเคมีของสาร G (2-phenylacetamide).....	87
รูปที่ 4.21 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดหยาดและสารมาตรฐานกับ ร้อยละการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH	88



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1	องค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์แอกติโนมัยซีท	9
ตารางที่ 2.2	ชนิดของไขมันมีขี้ที่พบในเยื่อหุ้มเซลล์	11
ตารางที่ 2.3	สารทุติยภูมิที่สร้างได้จากสกุล <i>Streptomyces</i>	35
ตารางที่ 2.4	สารต้านอนุมูลอิสระจาก <i>Streptomyces</i> sp.	36
ตารางที่ 3.1	องค์ประกอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์	52
ตารางที่ 3.2	สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA	52
ตารางที่ 4.1	ลักษณะทางฟิโนไทป์ของไอโซเลต C1-2 และ <i>Streptomyces griseoaurantiacus</i> ..	62
ตารางที่ 4.2	กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิของไอโซเลต C1-2	72
ตารางที่ 4.3	¹ H NMR และ ¹³ C NMR สเปกตรัมของสาร A ใน acetone- <i>d</i> ₆ และ SW-B ใน CD ₃ OD	77
ตารางที่ 4.4	¹ H NMR และ ¹³ C NMR สเปกตรัมของสาร B ใน acetone- <i>d</i> ₆ และ cornifronin-B ใน CDCl ₃	79
ตารางที่ 4.5	¹ H NMR และ ¹³ C NMR สเปกตรัมของสาร C ใน acetone- <i>d</i> ₆	81
ตารางที่ 4.6	¹ H NMR และ ¹³ C NMR สเปกตรัมของสาร D ใน acetone- <i>d</i> ₆	82
ตารางที่ 4.7	สเปกตรัม ¹ H NMR และ ¹³ C NMR ของสาร E ใน acetone- <i>d</i> ₆	84
ตารางที่ 4.8	สเปกตรัม ¹ H NMR ของสาร F และ cyclo-(L-phenyl, L-prolyl)	85
ตารางที่ 4.9	สเปกตรัม ¹ H NMR และ ¹³ C NMR ของสาร G และ 2-phenylacetamide	87
ตารางที่ 4.10	ค่าความเข้มข้นที่สามารถดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50 (IC ₅₀) ของสาร A-G	89

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและความเป็นมาของโครงการพิเศษ

ภาวะการถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล (oxidative stress) นับเป็นปัญหาสำคัญประการหนึ่งที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิต เนื่องจากเป็นภาวะที่เกิดจากความผิดปกติของระบบต้านออกซิเดชันในร่างกายหรือเกิดจากการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระ (โกสินทร์ และคณะ, 2557) ซึ่งทำให้ร่างกายไม่สามารถป้องกันความเสียหายที่เกิดขึ้นจากอนุมูลอิสระได้ ส่งผลให้เซลล์ถูกทำลายและอาจนำไปสู่การเกิดโรคและความผิดปกติอื่น ๆ โดยปกติอนุมูลอิสระสามารถเกิดขึ้นได้จากกระบวนการสังเคราะห์พลังงานภายในเซลล์ ความเครียด รวมไปถึงปัจจัยภายนอก ได้แก่ มลภาวะต่าง ๆ (อนงนาฏ, 2560)

ในปัจจุบันด้วยความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีก่อให้เกิดมลภาวะที่เพิ่มมากขึ้น รวมไปถึงการดำเนินชีวิตของมนุษย์ที่เปลี่ยนแปลงก่อให้เกิดความเครียด จึงอาจส่งผลให้ร่างกายทำงานผิดปกติ เป็นสาเหตุให้เกิดภาวะการถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล จากปัญหาดังกล่าวทำให้ผู้คนหันมาสนใจดูแลสุขภาพมากยิ่งขึ้น โดยบางกลุ่มหันมาบริโภคอาหารเสริมหรือผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยส่วนใหญ่แล้วสารต้านอนุมูลอิสระดังกล่าวมักจะได้มาจากพืช เนื่องจากมีปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระอยู่มาก แต่อย่างไรก็ตามจากงานวิจัยมีการค้นพบว่าจุลินทรีย์เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระแหล่งหนึ่งที่น่าสนใจด้วยเช่นกัน

แอสคิตินอมัยซีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่สามารถสร้างเส้นใยได้ พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เช่น ในเนื้อเยื่อพืช โดยพบมากที่สุด在地ดิน เช่น ดินจากน้ำพุร้อน ดินจากทะเล ดินจากบริเวณต่าง ๆ รวมถึงดินจากป่าชายเลน แอสคิตินอมัยซีทมีความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิ เช่น สารปฏิชีวนะ เอนไซม์ สารต้านอนุมูลอิสระ และสารต้านมะเร็ง *Streptomyces* เป็นสกุลหนึ่งของแอสคิตินอมัยซีทที่มีความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิได้หลายชนิด ทำให้มีผู้สนใจแยกและคัดเลือกแอสคิตินอมัยซีทจากแหล่งต่าง ๆ โดยหวังว่าจะพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ จากที่กล่าวมาข้างต้น แอสคิตินอมัยซีท กระจายตัวอยู่ทั่วไปตามธรรมชาติ ส่งผลให้แอสคิตินอมัยซีทเป็นจุลินทรีย์ที่มีความหลากหลาย โดยเฉพาะสกุล *Streptomyces* เป็นชนิดที่พบมากที่สุดในบรรดาแอสคิตินอมัยซีททั้งหมด ความหลากหลายนี้ทำให้นักวิจัยหันมาสนใจศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Streptomyces* โดยป่าชายเลนเป็นแหล่งที่น่าสนใจแหล่งหนึ่งที่อาจพบ *Streptomyces* ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ เนื่องจากป่าชายเลนเป็นระบบนิเวศที่มีความหลากหลายสูง อีกทั้งยังจัดเป็นสภาวะแวดล้อมแบบรุนแรง (extreme condition) แหล่งหนึ่ง โดยเป็นบริเวณที่มีการผสมผสานระหว่างผืนแผ่นดินและผืนน้ำทะเล ทำให้สภาวะแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา สภาวะดังกล่าวนี้อาจส่งผลให้ *Streptomyces* ที่อาศัยในบริเวณนั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทาง

เอกสารนี้เป็นรัฐธรรมนูญเพื่อปรับตัวสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้เข้ากับสภาพแวดล้อมจึงอาจทำให้สามารถพบ *Streptomyces* สายพันธุ์ใหม่ หรือสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ได้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1.2.1 ศึกษาอนุกรมวิธานแบบหลายส่วนของ *Streptomyces* sp. C1-2 ที่แยกได้จากดินป่าชายเลน

1.2.2 แยกและวิเคราะห์โครงสร้างสารทุติยภูมิที่สร้างจาก *Streptomyces* sp. C1-2

1.2.3 ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จาก *Streptomyces* sp. C1-2

1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

1.3.1 ศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานแบบหลายส่วน ได้แก่ ลักษณะทางฟีโนไทป์ คือ สัณฐานวิทยาและการจัดเรียงตัวของสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ลักษณะทางจีโนไทป์ คือ การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน 16S rRNA และศึกษาจีโนมทั้งหมด (whole genome) ของ *Streptomyces* sp. C1-2 ที่แยกได้จากดินป่าชายเลน จังหวัดเพชรบุรี

1.3.2 สกัดสารสกัดหยาบจากน้ำหมักของ *Streptomyces* sp. C1-2 เพื่อนำไปศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี

1.3.3 วิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ โดยใช้เทคนิคทางสเปกโตรสโกปี

1.3.4 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ โดยใช้วิธี DPPH

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถระบุชนิดของ *Streptomyces* ที่สามารถสร้างสารต้านอนุมูลอิสระได้

1.4.2 สามารถระบุชนิดและโครงสร้างของสารต้านอนุมูลอิสระที่ *Streptomyces* สร้างได้

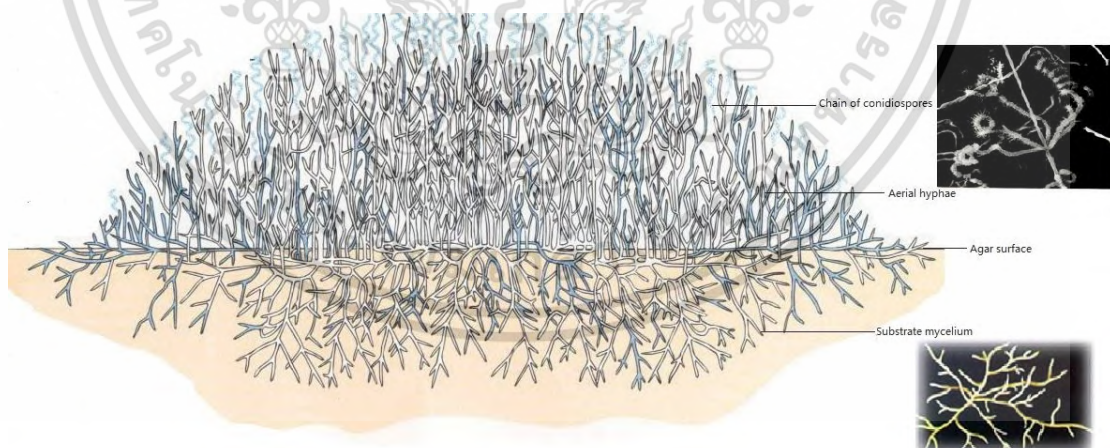
1.4.3 อาจจะสามารถค้นพบสารต้านอนุมูลอิสระหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ได้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทั่วไปของแอกติโนมัยสีท

แอกติโนมัยสีทจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายเชื้อรา สามารถสร้างเส้นใยเจริญลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเรียกว่าเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยที่ชูขึ้นไปในอากาศเรียกว่าเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) (รูปที่ 2.1) มีการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศขึ้นมาบนเส้นใยอากาศเมื่อมีอายุมากขึ้น (กิงจันทร์, 2555) แอกติโนมัยสีทมีหลากหลายสายพันธุ์พบได้ทั่วไปในธรรมชาติที่สภาพแวดล้อมต่าง ๆ ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ความชื้น อากาศ และปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน (Arifuzzaman *et al.*, 2010) ด้วยเหตุนี้จึงสามารถพบแอกติโนมัยสีทได้ทั้งจากระบบนิเวศดินและน้ำ (Sharma *et al.*, 2014) เช่น ทะเลทราย น้ำพุร้อน ภูเขาไฟ ทะเล และป่าชายเลน เป็นต้น แอกติโนมัยสีทมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมยาและการแพทย์เป็นอย่างมาก จากความโดดเด่นในแง่ของการผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ได้หลากหลายชนิด แอกติโนมัยสีทแต่ละสายพันธุ์อาจจะสามารถผลิตสารทุติยภูมิได้ 10-20 ชนิด (Janardhan *et al.*, 2014) และสารทุติยภูมิที่ได้จากจุลินทรีย์ร้อยละ 80 มาจากแอกติโนมัยสีท (Zengler *et al.*, 2005) สารทุติยภูมิส่วนใหญ่ เช่น สารปฏิชีวนะ สารต้านมะเร็ง สารต้านการเจริญของเชื้อรา สารต้านอนุมูลอิสระ ผลิตได้จากแอกติโนมัยสีทในสกุล *Streptomyces*



รูปที่ 2.1 การเจริญของเส้นใยของแอกติโนมัยสีทบนอาหารแข็ง

ที่มา: Li *et al.* (2015)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1 การจัดจำแนกประเภทของแอกติโนมัยสีท (จิตติ, 2557)

แอกติโนมัยสีทจัดอยู่ในโดเมนแบคทีเรีย โดยการจัดหมวดหมู่ของแอกติโนมัยสีทในปัจจุบันจะอาศัยการใช้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์บนช่วงยีน 16S rRNA และช่วงยีน 23S rRNA เพื่อนำมาสร้างเป็นแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และลักษณะทางจีโนมไทป์ มีความหลากหลายมาก ตลอดจนการค้นพบแอกติโนมัยสีทชนิดใหม่อย่างต่อเนื่อง จึงเป็นการยากที่จะที่จะหาตำแหน่งอนุกรมวิธานที่แน่นอนได้ ในปัจจุบันการจัดหมวดหมู่ของแอกติโนมัยสีทจะยึดตามหนังสือ *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* ฉบับปรับปรุงครั้งที่ 2 เล่มที่ 5 (Goodfellow *et al.*, 2012) ภายใต้ไฟลัม (Phylum) แอกติโนแบคทีเรีย โดยประกอบด้วยสมาชิกทั้งหมด 6 คลาส (Class) ได้แก่ *Actinobacteria* *Acidimicrobiia* *Coriobacteriia* *Nitrospirillum* *Rubrobacteria* และ *Thermoleophilina*

2.2 ระบบนิเวศวิทยาทางทะเล (marine ecosystem) และแอกติโนมัยสีททางทะเล (marine actinomycetes)

2.2.1 ระบบนิเวศวิทยาทางทะเล (marine ecosystem) (हररषष และอดิศรณ, 2563)

ทะเลเป็นระบบนิเวศที่มีความสำคัญทางชีววิทยา มีขนาดใหญ่ที่สุดในโลก ครอบคลุมพื้นที่สามในสี่ส่วนของโลกทำให้ระบบนิเวศทางทะเลมีสิ่งมีชีวิตอาศัยอยู่อย่างหลากหลาย สิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในทะเลจะมีการกระจายอยู่อย่างหนาแน่นในบางบริเวณแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับปัจจัยแวดล้อมต่าง ๆ ในทะเล เช่น ลักษณะของพื้นทะเล แสง อุณหภูมิ ความลึก ความเค็ม แรกกัดดัน การขึ้นลงของน้ำทะเล เป็นต้น ระบบนิเวศทางทะเลสามารถแบ่งออกเป็นระบบนิเวศย่อย ตามความแตกต่างของสภาพแวดล้อม ได้แก่ ระบบนิเวศน้ำกร่อย (estuarine ecosystem) ระบบนิเวศหาดทราย (sandy beach ecosystem) ระบบนิเวศหาดหิน (rocky shore ecosystem) ระบบนิเวศหญ้าทะเล (sea grass ecosystem) ระบบนิเวศทะเลเปิด (pelagic ecosystem) ระบบนิเวศพื้นทะเล (benthic ecosystem) นอกจากนี้ในทะเลเขตร้อน เช่น ประเทศไทย มีระบบนิเวศทางทะเลที่สำคัญและเป็นที่ยอมรับไปคือ ระบบนิเวศแนวปะการัง (coral reef ecosystem) และระบบนิเวศป่าชายเลน (mangrove ecosystem) ระบบนิเวศเหล่านี้เป็นองค์ประกอบของระบบนิเวศแบบเปิด จึงทำให้มีการแลกเปลี่ยนมวลสาร พลังงาน และวัตถุต่าง ๆ ตลอดเวลา ส่งผลให้เกิดความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตมากมาย ได้แก่ ผู้ผลิตในทะเล เช่น แพลงก์ตอนพืช หญ้าทะเล และสาหร่ายทะเล ผู้บริโภคในทะเล เช่น ปลา กุ้ง หอย และผู้ย่อยสลายในทะเล เช่น แบคทีเรียและรา เป็นต้น

2.2.2 ระบบนิเวศป่าชายเลน (mangrove ecosystem) (हररषष และอดิศรณ, 2563)

ป่าชายเลนเป็นระบบนิเวศป่าไม้ที่มีความสำคัญแห่งหนึ่ง พบอยู่ตามปากแม่น้ำ หรือบริเวณที่มีน้ำจืดไหลมาบรรจบกับน้ำทะเล ทำให้บริเวณโดยรอบของป่าชายเลนมีการเปลี่ยนแปลงความเค็มอยู่ตลอดเวลา สภาพแวดล้อมโดยทั่วไปของป่าชายเลนจะมีความแตกต่างกับป่าชนิดอื่น เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นับญาติเห็นาเป็เซบระเยชนดานการค้
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยเฉพาะดินที่เป็นดินเลน มีความอุดมสมบูรณ์มากเนื่องจากธาตุอาหารที่ไหลมาจากแหล่งต่าง ๆ และการทับถมของซากพืชซากสัตว์ ป่าชายเลนพบอยู่เฉพาะในเขตร้อนเชื่อมระหว่างแผ่นดินหรือน้ำจืดกับทะเล ทำให้ป่าชายเลนเป็นระบบนิเวศที่มีความพิเศษ เนื่องจากความหลากหลายของสภาพแวดล้อม เช่น ปริมาณความชื้น และความเค็มสูง (Gong *et al.*, 2018) จึงพบสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิดอาศัยอยู่ร่วมกัน เมื่อพืชมีการสังเคราะห์แสงและเจริญเติบโตเกิดการหลุดร่วงของใบและกิ่งทับถมกันกลายเป็นธาตุอาหารของสิ่งมีชีวิตเล็ก ๆ เช่น แพลงก์ตอน สัตว์หน้าดินบางชนิด รวมไปถึงแบคทีเรียและด้วยสภาพแวดล้อมที่ประกอบด้วยดินเลนเป็นส่วนใหญ่จึงอาจพบแบคทีเรียในกลุ่มแอกติโนมัยซีท์ที่กระจายตัวอยู่ในดินได้

2.2.3 แอกติโนมัยซีท์ทางทะเล (marine actinomycetes)

แอกติโนมัยซีท์ทางทะเลสามารถพบได้ทั่วไปในระบบนิเวศทางทะเล กระจายตัวแตกต่างกันไปตามสภาพแวดล้อมในท้องทะเลและสิ่งมีชีวิตผู้เป็นที่ให้อาศัย เช่น สกุล *Salinispora* *Nocardia* *Micromonospora* *Streptomyces* และสกุลอื่น ๆ อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำและสาหร่ายทะเล นอกจากนี้ยังมีแอกติโนมัยซีท์ที่กระจายตัวอย่างอิสระภายในซากตะกอนหรือดินในทะเล เช่น *Actinomadura* *Amycolatopsis* *Micromonospora* *Nonomuraea* *Saccharopolyspora* *Streptomyces* และสกุลอื่น ๆ (จิตติ, 2553) แอกติโนมัยซีท์เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารทุติยภูมิได้หลากหลาย เช่น สารปฏิชีวนะจากสกุล *Amycolatopsis* สกุล *Saccharopolyspora* โดยเฉพาะสกุล *Streptomyces* สามารถสร้างสารทุติยภูมิได้มากที่สุด (Ding *et al.*, 2019) และเป็นสกุลที่ใหญ่ที่สุดของแอกติโนมัยซีท์ทั้งหมด โดยมีมากกว่า 800 สายพันธุ์ (Huang *et al.*, 2018)

2.2.3.1 *Streptomyces* ทางทะเล (สุภาภรณ์ และคณะ, 2557)

Streptomyces เป็นแอกติโนมัยซีท์สกุลหนึ่งที่เป็นสมาชิกอยู่ในวงศ์ (family) *Streptomycetaceae* กระจายตัวอยู่ในดินมากถึงร้อยละ 70-90 ของแอกติโนมัยซีท์ทั้งหมด และมีมากถึง 450 ชนิด (Hayakawa *et al.*, 1988; รัตนาภรณ์ และคณะ, 2549) มีความสำคัญในด้านการผลิตสารปฏิชีวนะ สามารถพบ *Streptomyces* ทางทะเลจากตะกอนดินทะเลที่ระดับความลึกต่าง ๆ นอกจากนี้อาจพบว่าอาศัยอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่นในทะเล เช่น ฟองน้ำ ปลา แมงกระพรุน ได้อีกด้วย (สุภานันท์, 2548) *Streptomyces* สามารถสร้างเส้นใยอากาศและเส้นใยอาหารแบบไม่มีผนังกันหลากหลายสี เช่น สีดำ ฟ้ำ น้ำตาล มะกอก ฟ้า ข้าง ส้ม ม่วง ชมพู แดง เป็นต้น (รูปที่ 2.2) เมื่อเจริญเต็มที่ จะสร้างสปอร์แบบไม่เคลื่อนที่ได้หลากหลายรูปแบบ ได้แก่ แบบเส้นตรง (straight) แบบโค้งงอ (flexous) แบบเกลียว (spiral) (รูปที่ 2.3) สปอร์มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5-10 ไมโครเมตร ลักษณะผิวของสปอร์แตกต่างกัน 5 แบบ ได้แก่ ผิวเป็นหนาม (spiny) ผิวเป็นขน (hairy) ผิวเป็นปุ่มปม (warty) ผิวเรียบ (smooth) ผิวขรุขระ (rugose) (รูปที่ 2.4) เมื่ออายุมากขึ้นเส้นใยอากาศจะพัฒนาเป็นสปอร์ทำให้ผิวโคโลนีมีลักษณะคล้ายแป้งหรือกำมะหยี่ มีหลายสี เช่น สีขาว เทา แดง เหลือง น้ำเงิน เป็นต้น ส่วนเส้นใยอาหารมักเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลจากการสร้างรงควัตถุเมลานินและรงควัตถุ

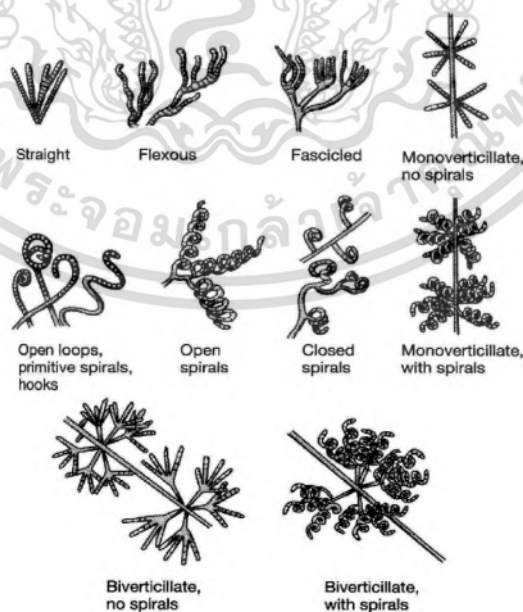
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใดเห็นใบนี้ขอยกเว้นการตีพิมพ์หรือการนำข้อมูลไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อื่นได้อีกหลายชนิด *Streptomyces* ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตและเป็นพวก chemorganotrophic สามารถรีดิวซ์ไนเตรทให้เป็นไนโตรท์ ย่อยอะดีนีน (adenine) เอสคูลิน (esculin) เคซีน (casein) เจลาติน (gelatin) ไฮโปแซนธิน (hypoxanthine) แป้ง และไทโรซีน (L-tyrosine) ได้ สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-30 องศา เซลเซียส พีเอช 6.5-8.0 ส่วนใหญ่เป็นพวก mesophile บางชนิดเป็นพวก psychophile และ thermophile (Lechevalier and Lechevalier, 1970) ต้องการคาร์บอนและไนโตรเจนเป็นแหล่งพลังงาน เช่น กลูโคส กลีเซอรอล และเปปโตน เป็นต้น สามารถทนต่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ได้ดีที่ร้อยละ 3 โดยมวลต่อปริมาตร บางชนิดสามารถทนได้ถึงร้อยละ 13 โดยมวลต่อปริมาตร (รวีวรรณ และคณะ, 2558) *Streptomyces* ทางทะเลสามารถเจริญในสภาวะรุนแรง (extreme condition) ได้ จึงอาจจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะกายภาพ หรือเกิดการวิวัฒนาการทางสายพันธุ์ทำให้เกิดความแตกต่างจากลักษณะทางกายภาพของ *Streptomyces* โดยทั่วไป (Duan *et al.*, 2014)



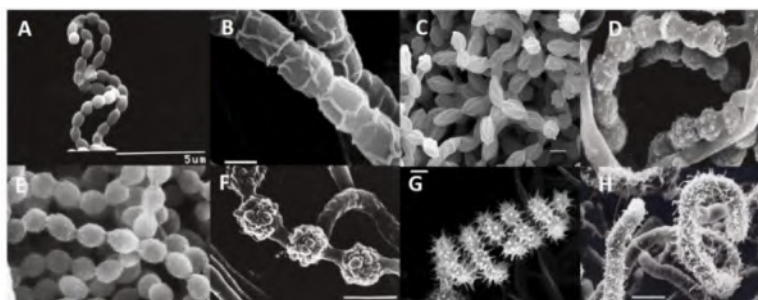
รูปที่ 2.2 ลักษณะโคโลนีของ *Streptomyces* ที่เจริญบนอาหารแข็ง
ที่มา: Hakvag *et al.* (2008); Chater (2006)



รูปที่ 2.3 ลักษณะสปอร์แบบต่าง ๆ ของสกุล *Streptomyces*

ที่มา: Madigan *et al.* (1987)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 ลักษณะพื้นผิวสปอร์แบบต่าง ๆ

ที่มา: Li *et al.* (2015)

2.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ (identification) ของ *Streptomyces*

การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานหลายส่วน (polyphasic taxonomy) ใช้เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอกติโนมัยซีท เนื่องจากการศึกษาลักษณะเพียงแบบเดียวอาจไม่สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอกติโนมัยซีทได้ โดยเฉพาะในสกุล *Streptomyces* ที่พบได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับสกุลอื่น ๆ การศึกษาอนุกรมวิธานแบบหลายส่วนจึงประกอบไปด้วยการศึกษาหลายแบบ ได้แก่ ลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotypic characteristic) ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี (chemotaxonomic characteristic) และลักษณะทางจีโนไทป์ (genotypic characteristic)

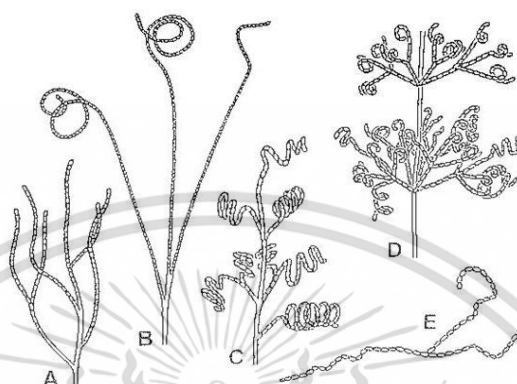
2.3.1 ลักษณะทางฟีโนไทป์

ลักษณะทางฟีโนไทป์คือลักษณะต่าง ๆ ที่ปรากฏให้เห็น ประกอบไปด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา การสร้างเส้นใย ลักษณะทางชีวเคมีและสรีรวิทยา การสร้างรงควัตถุละลายน้ำ การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์มีดังนี้

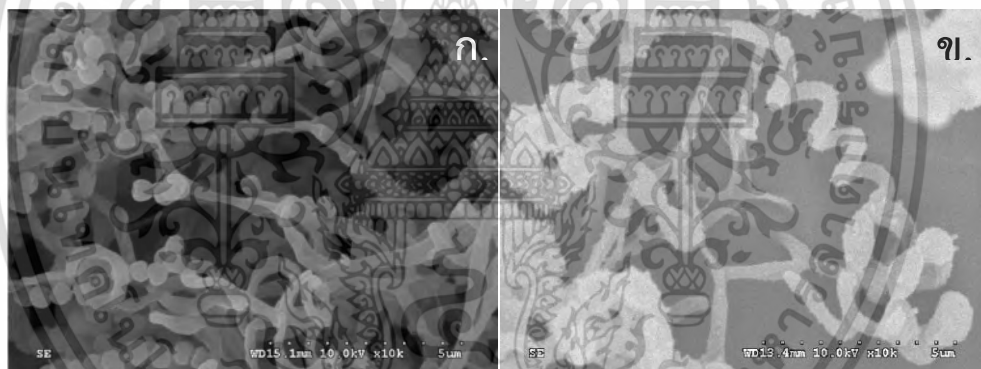
2.3.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะการเจริญ (morphological and cultural characteristics)

เป็นการตรวจสอบลักษณะโคโลนี สีของเส้นใยอาหาร เส้นใยอากาศ และสปอร์ เป็นการพิสูจน์เอกลักษณ์ได้ในระดับสกุล สีของเส้นใยอาหารและรงควัตถุละลายน้ำ สามารถใช้เป็นเกณฑ์ในการจัดจำแนกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของ *streptomyces* ได้เพียงขั้นต้นเท่านั้น เนื่องจากการผลิตรงควัตถุอาจจะขึ้นอยู่กับอิทธิพลของอาหาร อุณหภูมิ พีเอช และอายุ (อำไพทิพย์, 2553) ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์แบบอื่นควบคู่ไปด้วย ได้แก่ การศึกษาลักษณะสปอร์ การจัดเรียงตัวของสปอร์ รูปร่าง เพื่อให้การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์มีความละเอียดมากยิ่งขึ้น สปอร์ของ *Streptomyces* มีจำนวนมากกว่า 50 สปอร์ต่อกันเป็นสายยาวเรียกว่า อาร์โทสปอร์ (arthospore) (รูปที่ 2.5-2.6) ลักษณะของสายสปอร์ที่แตกต่างกันสามารถใช้ในการจัดกลุ่มได้ สีของเส้นใยและรงควัตถุละลายน้ำ สามารถสังเกตได้จากการเปรียบเทียบกับตารางเทียบสีมาตรฐาน เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

the NBS-ISSC color system (Kelly, 1964) การศึกษาสปอร์ทำได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ที่มีเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) และในกรณีที่ต้องการรายละเอียดที่ชัดเจนมากยิ่งขึ้น เช่น ลักษณะพื้นผิวของสปอร์ การจัดเรียงตัวกันของสปอร์สามารถทำการศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) (นันทวัน, 2561)



รูปที่ 2.5 ลักษณะของอาร์โทสปอร์ของ *Streptomyces*
ที่มา: Li *et al.* (2015)



รูปที่ 2.6 ลักษณะสปอร์ของ *Streptomyces* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
ก.) ลักษณะสปอร์ของ *Streptomyces qinglanensis* 172205^T (Hu *et al.*, 2012)
ข.) ลักษณะสปอร์ของ *Streptomyces mangrovi* HA11110^T (Wang *et al.*, 2015)

2.3.1.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี (physiological and biological characteristics)

ประกอบด้วย การทดสอบความสามารถในการใช้หรือย่อยสลายอินทรีย์วัตถุ การรีดิวซ์ไนเตรท การทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ ความสามารถในการเจริญในโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่าง ๆ ความสามารถในการเจริญที่ค่าความเป็นกรดต่าง *Streptomyces* สามารถสังเคราะห์เอนไซม์คะตาเลส (catalase) และรีดิวซ์ไนเตรทให้เป็นไนโตรที่ได้นอกจากนี้ยังสามารถย่อยสลาย อะดีนีน เอสคูลิน เคซีน เจลาติน ไฮโปแซนทีน แป้ง และไทโรซีนได้ (Hasani *et al.*, 2014) จากงานวิจัยของ Reddy *et al.* (2011) พบว่า *Streptomyces rochei* MTCC 10109 ที่เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แยกได้จากน้ำทะเลของอ่าวเบงกอล สามารถทนต่อความเข้มข้นของเกลือได้ ร้อยละ 6 จากงานวิจัยของ Huang *et al.* (2018) พบว่า *Streptomyces caeni* HA15955^T ที่แยกได้จากโคลนป่าชายเลนประเทศจีน สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 20-37 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 7.0-8.0 ความเข้มข้นเกลือที่ร้อยละ 1 สายพันธุ์ดังกล่าวสามารถย่อยสลายเจลาตินและโปรตีน รีดิวซ์ไนเตรทให้เป็นไนไตรท์สังเคราะห์ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H₂S) และเมลานินได้ และสามารถใช้ แมนโนส กลูโคส ซูโครส ราฟฟิโนส เซลโลไบโอส มอลโตส เด็กซ์ตริน แมนิทอล กลีเซอรอล แรมโนส และทรีฮาโลส เป็นแหล่งคาร์บอนได้ Law *et al.* (2019) พบ *Streptomyces* สายพันธุ์ใหม่ที่แยกได้จากดินป่าชายเลนประเทศมาเลเซีย เจริญได้ที่อุณหภูมิ 28-32 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 และเกลือความเข้มข้นร้อยละ 2 สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ อะไมเลส โปรติเอส เซลลูเลส และไลเปสได้

2.3.2 ลักษณะอนุกรมวิธานเคมี

เป็นการวิเคราะห์องค์ประกอบของเซลล์ โดยทำการศึกษารายละเอียดขององค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ ได้แก่ การศึกษาไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนปิเมลิก (diaminopimelic acid) ในผนังเซลล์ การศึกษาชนิดของไขมันมีขั้ว (polar lipid) ในเยื่อหุ้มเซลล์ การศึกษาน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ (whole-cell sugars) การวิเคราะห์กรดไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ (cellular fatty acid) การวิเคราะห์ไอโซพรีนอยด์ควิโนน (isoprenoid quinone) จากการศึกษาและวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีภายในเซลล์สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอกติโนมัยซีทในระดับสกุลได้

2.3.2.1 กรดไดอะมิโนปิเมลิก (2,6-diaminopimelic acid; DAP) (Goodfellow *et al.*, 2012)

แอกติโนมัยซีทจัดว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวกชนิดหนึ่ง จึงมีลักษณะโครงสร้างของผนังเซลล์ไม่ต่างจากแบคทีเรียแกรมบวกชนิดอื่นมากนัก โครงสร้างของผนังเซลล์ดังกล่าวประกอบด้วยสายของเพปติโดไกลแคน (peptidoglycan) โดยมี N-acetylglucosamine และ N-acetylmuramic acid เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิดบีต้า-1,4 หรือที่เรียกว่า sugar backbone โดยตำแหน่งของหมู่คาร์บอกซิลิกของกรด N-acetylmuramic จะมีการแทนที่ด้วยสายพอลิเพปไทด์ (polypeptides) ที่ประกอบขึ้นมาจากกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ เรียงต่อกัน (ตารางที่ 2.1) เป็นโครงสร้างของเพปติโดไกลแคน (รูปที่ 2.7)

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์แอกติโนมัยซีท (นันทวัน, 2561)

Cell wall type	DAB	lys	Asp	gly	meso-DAP	LL-DAP	ornithine	arabinose	galactose
I	-	-	-	+	-	+	-	-	-
II	-	-	-	+	***	-	-	-	-
III	-	-	-	+	+	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่วางไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์แอกติโนมัยซีท (ต่อ)

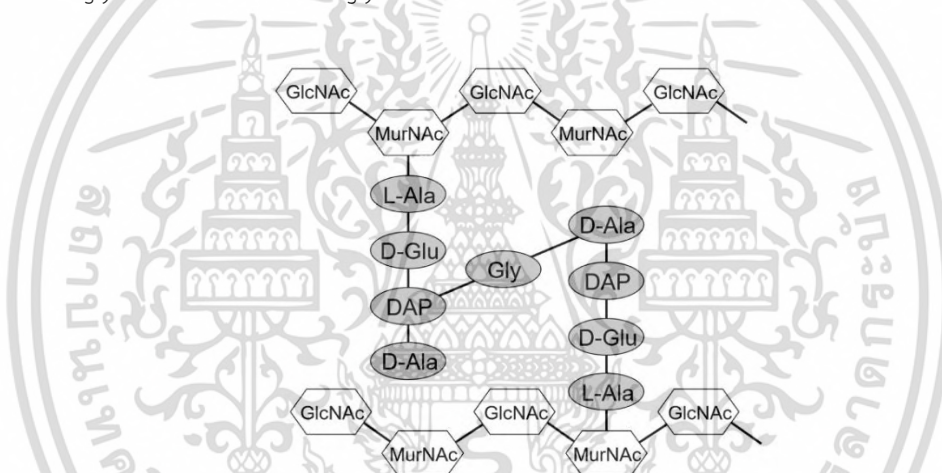
Cell wall type	DAB	lys	Asp	gly	meso-DAP	LL-DAP	ornithine	arabinose	galactose
IV	-	-	-	-	+	-	-	+	+
V	-	+	-	*	-	-	+	-	-
VI	-	+	+	*	-	-	-	-	-
VII	+	+	+	*	-	-	-	-	-
VIII	-	-	+	*	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: + หมายถึง ตรวจพบ * หมายถึง อาจพบหรือไม่พบ ** หมายถึง อาจพบ hydroxy-DAP

DAB หมายถึง 2,4-diaminobutyric acid DAP หมายถึง 2,6-diaminopimelic acid

lys หมายถึง กรดอะมิโน lysine Asp หมายถึง กรดอะมิโน aspartic acid

gly หมายถึง กรดอะมิโน glycine



รูปที่ 2.7 โครงสร้างของเพปติโดไกลแคนของผนังเซลล์แบคทีเรีย

ที่มา: Swift *et al.* (2019)

หนึ่งในกรดอะมิโนที่ต่อกันเป็นสายพอลิเพปไทด์คือกรดไดอะมิโนพิเมลิก (diaminopimelic acid; DAP) มี 2 ชนิด ได้แก่ ชนิด LL-DAP และ meso-DAP สามารถวิเคราะห์ชนิดไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography; TLC) ความแตกต่างของกรดไดอะมิโนพิเมลิกทั้ง 2 ชนิด สามารถนำมาใช้เป็นเกณฑ์ในการจัดจำแนกแอกติโนมัยซีทได้ สกุล *Streptomyces* พบเพปติโดไกลแคนที่ประกอบด้วย เตตระเพปไทด์ L-Ala-D-Glu-LL-DAP-D-Ala และมีเพนตะไกลซินเชื่อมกับพอลิเพปไทด์ข้างเคียง จึงจัดเป็นผนังเซลล์ชนิดที่ 1 (Cell wall type I)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

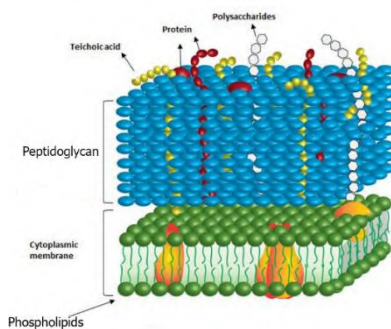
2.3.2.2 ไขมันมีขั้ว (polar lipid)

เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียทำหน้าที่ควบคุมการผ่านเข้าออกของสารสู่เซลล์ มีองค์ประกอบหลักคือฟอสโฟลิปิด (phospholipids) (รูปที่ 2.8) เป็นโครงสร้างแบบ amphipathic มีส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) เป็นด้านที่มีขั้วประกอบด้วยกรดฟอสฟอริก (phosphoric acid) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) เป็นด้านที่ไม่มีขั้ว (นันทวัน, 2561) (รูปที่ 2.11) ฟอสโฟลิปิดดังกล่าวมีหลายชนิดแตกต่างกัน (ตารางที่ 2.2) จึงใช้จัดจำแนกแอสโตโนมัยซีทได้ การตรวจสอบชนิดของฟอสโฟลิปิดอาศัยหลักการทางโครมาโทกราฟี ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (thin layer chromatography; TLC) แบบ 2 ทิศทาง ตรวจสอบฟอสโฟลิปิดบน TLC โดยการฉีดพ่นสารเคมี (reagent) ชนิดต่าง ๆ ปฏิกริยาดังกล่าวจะเกิดขึ้นอย่างจำเพาะกับชนิดของฟอสโฟลิปิด (นันทวัน, 2561) สกุล *Streptomyces* จะพบฟอสโฟลิปิดหลัก ได้แก่ diphosphatidylglycerol (DPG) phosphatidylethanolamine (PE) phosphatidylinositol (PI) และ phosphatidylinositol mannosides (PIM) (Goodfellow *et al.*, 2012) จัดเป็นฟอสโฟลิปิดชนิดที่ 2 (phospholipid type II)

ตารางที่ 2.3 ชนิดของไขมันมีขั้วที่พบในเยื่อหุ้มเซลล์ (นันทวัน, 2561)

Phospholipids type	PIM	PI	PC	PG	PE	PME	GluNu	APG	DPG
I	+	+	-	v	-	-	-	v	v
II	+	+	-	v	+	-	-	v	+
III	v	+	+	v	v	+	-	v	v
IV	v	+	-	-	v	v	+	-	+
V	v	+	-	-	v	-	+	v	+

หมายเหตุ: PIM หมายถึง phosphatidylinositol mannosides PI หมายถึง phosphatidylinositol, PC หมายถึง phosphatidylcholine, PE หมายถึง phosphatidylethanolamine, PME หมายถึง phosphatidyl methyl ethanolamine, GluNu หมายถึง glucosamine containing unknown phospholipids, APG หมายถึง acyl phosphatidylglycerol, DPG หมายถึง diphosphatidylglycerol, v หมายถึง สามารถเปลี่ยนแปลงได้ - หมายถึง ไม่มี + หมายถึง มี



รูปที่ 2.8 โครงสร้างของผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์

ที่มา: Liu *et al.* (2015)

2.3.2.3 น้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ (whole-cell sugars)

ชนิดของน้ำตาลที่พบในเซลล์เป็นอีกข้อมูลหนึ่งที่น่ามาใช้ในการจัดจำแนกแอกติโนมัยซีท์ได้ อาศัยการตรวจสอบชนิดของน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (thin layer chromatography; TLC) ที่มีเฟสคงที่ (stationary phase) เป็นเซลลูโลส (นันทวัน, 2561) สกุล *Streptomyces* มักจะพบน้ำตาล กลูโคส แมนโนส และไรโบส ในเซลล์ปริมาณเล็กน้อยเสมอ (Kroppenstedt, 1977)

2.3.2.4 กรดไขมันในเซลล์ (cellular fatty acid)

กรดไขมันเป็นหนึ่งในองค์ประกอบที่พบอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ ปลายข้างหนึ่งเป็นด้านหัวละลายน้ำได้ (hydrophilic) มีกรดฟอสฟอริก (phosphoric acid) เป็นองค์ประกอบ ปลายอีกข้างเป็นด้านหางไม่ละลายน้ำ (hydrophobic) มีกรดไขมัน 2 ตัวเป็นองค์ประกอบ กรดไขมันแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ กรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid) และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) แอกติโนมัยซีท์ต่างชนิดหรือต่างสายพันธุ์ จะมีกรดไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ต่างกัน ชนิดของกรดไขมันภายในเยื่อหุ้มเซลล์จึงเป็นอีกคุณลักษณะหนึ่งที่ใช้จัดจำแนกแอกติโนมัยซีท์ได้ การวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันจะใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatography ; GC) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Microbial Identification System (MIDI) (นันทวัน, 2561)

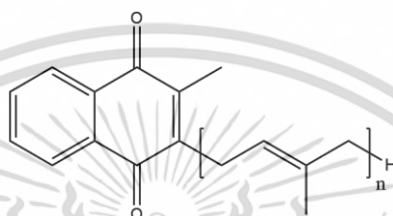
2.3.2.5 ไอโซพรีนอยด์ควิโนน (isoprenoid quinone)

ไอโซพรีนอยด์ควิโนน (isoprenoid quinones) เป็นสารประกอบชนิดหนึ่ง ที่พบได้ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด มีบทบาทสำคัญต่อระบบขนส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจ ไอโซพรีนอยด์ควิโนนที่พบได้มากที่สุดเซลล์แบคทีเรีย ได้แก่ เมนาควิโนน (menaquinone) และยูบิควิโนน (ubiquinone) ในสกุล *Streptomyces* จะพบเพียงเมนาควิโนนเท่านั้น (Collins and Jones, 1981) เมนาควิโนนเป็นสารประกอบมาจากวงแหวนแนปโทควิโนน (naphthoquinone) เชื่อมต่อกับสายโซ่ของไอโซพรีนอยด์ (isoprenoid) (รูปที่ 2.9) การตรวจวิเคราะห์ชนิดของเมนาควิโนนทำได้โดยอาศัยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลว

สมรรถนะสูง (high-performance liquid chromatography; HPLC) ร่วมกับเทคนิคโครมาโทกราฟี

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น มิได้อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบบแผ่นบางชนิดกลับเฟส (reverse-phase thin layer chromatography) (นันทวัน, 2561) การวิเคราะห์ชนิดของเมนาควิโนนมีบทบาทสำคัญต่อการจัดจำแนกแอกติโนมัยซีทเป็นอย่างมาก การจัดจำแนกแอกติโนมัยซีทโดยใช้ความแตกต่างกันของเมนาควิโนนนี้จะอาศัยหลักเกณฑ์ 3 อย่าง ได้แก่ จำนวนของไอโซพรีนอยด์ในสายโซ่ ระดับของการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน (hydrogenation) ในสายโซ่ และตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน (hydrogenation) ในสายโซ่ สกุล *Streptomyces* จะพบไอโซพรีนอยด์ที่ถูกไฮโดรจีเนชันสูง และยังพบหน่วยของไอโซพรีนที่เป็นชนิดอิ่มตัว (saturated isoprene units) ประมาณ 3-4 หน่วย หรืออาจพบ 5 หน่วยได้ (Goodfellow *et al.*, 2012)



รูปที่ 2.9 โครงสร้างเคมีของเมนาควิโนน
ที่มา: นันทวัน (2561)

2.3.2.6 ปริมาณเบสกวัวนีนและไซโตซีน (G+C content)

ดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid; DNA) เป็นสารพันธุกรรมที่พบอยู่ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด เกิดจากการเรียงตัวกันของพอลินิวคลีโอไทด์ที่ประกอบมาจาก น้ำตาลดีน้ำตาลดี ออกซีไรโบส (Deoxyribose sugar) หมู่ฟอสเฟต (phosphate group) และไนโตรจีนัสเบส (nitrogenous base) โดยไนโตรจีนัสเบสดังกล่าวมีอยู่ 4 ชนิด ได้แก่ อะดีนีน (adenine; A) ไทมีน (thymine; T) ไซโตซีน (cytosine; C) และกวัวนีน (guanine; G) สายดีเอ็นเอของแบคทีเรียจะมีปริมาณเบสชนิดกวัวนีน และไซโตซีน (G+C content) อยู่ร้อยละ 25-80 โดยแอกติโนมัยซีทจัดเป็นแบคทีเรียที่มีปริมาณเบส G+C สูง นอกจากนี้ปริมาณเบสในสายดีเอ็นเอของแอกติโนมัยซีทสายพันธุ์เดียวกันยังมีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย (1-3 mol% G+C) (นันทวัน, 2561) ดังนั้นการวิเคราะห์หาปริมาณ G+C จึงสามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนกชนิดของแอกติโนมัยซีทได้ แอกติโนมัยซีทสกุล *Streptomyces* จะมีปริมาณ G+C อยู่ในช่วง 69 ถึง 78 โมลเปอร์เซ็นต์ (Goodfellow *et al.*, 2012)

2.3.4 ลักษณะทางจีโนมไทป์

เป็นลักษณะที่สำคัญที่สุดต่อการพิสูจน์เอกลักษณ์ เนื่องจากการนำความรู้ทางด้านชีวโมเลกุลมาประยุกต์ใช้หลายเทคนิค ทำให้สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ได้ในระดับวงศ์ (family) สกุล (genus) ไปจนถึงสายพันธุ์ (strains) นอกจากนี้การศึกษาทางด้านชีวโมเลกุลยังทำให้ทราบถึงคุณสมบัติของยีน และการแสดงออกของยีน จึงช่วยสนับสนุนลักษณะทางฟีโนไทป์และอนุกรมวิธานเคมี ทำให้การพิสูจน์เอกลักษณ์แม่นยำมากยิ่งขึ้น การศึกษาลักษณะทางจีโนมไทป์จึงมีความสำคัญและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สะดวกต่อการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอกติโนมัยสีท โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับสกุล *Streptomyces* ที่มีความหลากหลายทางสายพันธุ์ (อำไพทิพย์, 2553)

2.3.4.1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction) (Chauhan, 2018)

กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (Deoxyribonucleic acid; DNA) พบอยู่ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ประกอบด้วยส่วนที่เป็นข้อมูลทางพันธุกรรม เรียกว่ายีน (genes) อยู่บนสายพอลินิวคลีโอไทด์ ทำหน้าที่ในการควบคุมลักษณะทางพันธุกรรมต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต สามารถถ่ายทอดไปสู่สิ่งมีชีวิตรุ่นต่อไปได้ (Nelson and Cox, 2005) ดีเอ็นเอมีการบวนการจำลองตัวเอง (replication) เพื่อเพิ่มปริมาณสำหรับการแบ่งเซลล์และถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม กระบวนการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอเป็นกระบวนการแบบกึ่งอนุรักษ์ (semiconservative) ส่งผลให้ดีเอ็นเอสายใหม่เหมือนสายเดิมทุกประการ สิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันจึงมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึงกันมาก (Augustyn, 2019) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอจึงมีความสำคัญต่อการระบุชนิดและสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะกับสิ่งมีชีวิตจำพวกจุลินทรีย์ที่มีความหลากหลายทางสายพันธุ์ การแยกและสกัดดีเอ็นเอออกจากเซลล์เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์หรือข้อมูลทางพันธุกรรมจึงจำเป็นต่อการระบุชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรีย การแยกดีเอ็นเอออกมามีหลายขั้นตอน อันดับแรกคือการทำลายผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ เนื่องจากดีเอ็นเออยู่ภายในไซโตพลาสซึมที่ถูกห่อหุ้มด้วยเยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ ดังนั้นการทำลายส่วนห่อหุ้มดังกล่าวจะทำให้ออร์แกเนลล์ (organelle) ต่าง ๆ รวมถึงดีเอ็นเอสามารถออกมานอกเซลล์ได้ จากที่กล่าวมาข้างต้นโครงสร้างของผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ (รูปที่ 2.8) ประกอบด้วยโปรตีนและไขมัน การจะทำลายโครงสร้างดังกล่าวจึงเป็นจุดเริ่มต้นของการสกัดดีเอ็นเอ โดยสามารถทำได้ดังนี้

1. การทำลายด้วยเคมี สารที่นิยมใช้ ได้แก่ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium Dodecyl Sulfate; SDS) ซิทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide; CTAB) และสารลดแรงตึงผิว (detergent) ซึ่งสามารถการละลายโครงสร้างและองค์ประกอบของผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ได้
2. การทำลายด้วยเอนไซม์ ได้แก่ เอนไซม์โปรตีนเนสเค (proteinase K) และเพปติเดส (peptidase) เอนไซม์ทำหน้าที่ได้ดีกว่าสารเคมีชนิดอื่น เนื่องจากทำหน้าที่โดยตรงในการทำลายพันธะที่เชื่อมกันระหว่างโมเลกุล
3. การทำลายเชิงกล ในกรณีที่เซลล์มีผนังที่หนาและแข็งอาจมีความจำเป็นต้องใช้การทำลายเชิงกลเข้ามาช่วยในการทำลายผนังเซลล์ เช่น การบดด้วยโกร่ง

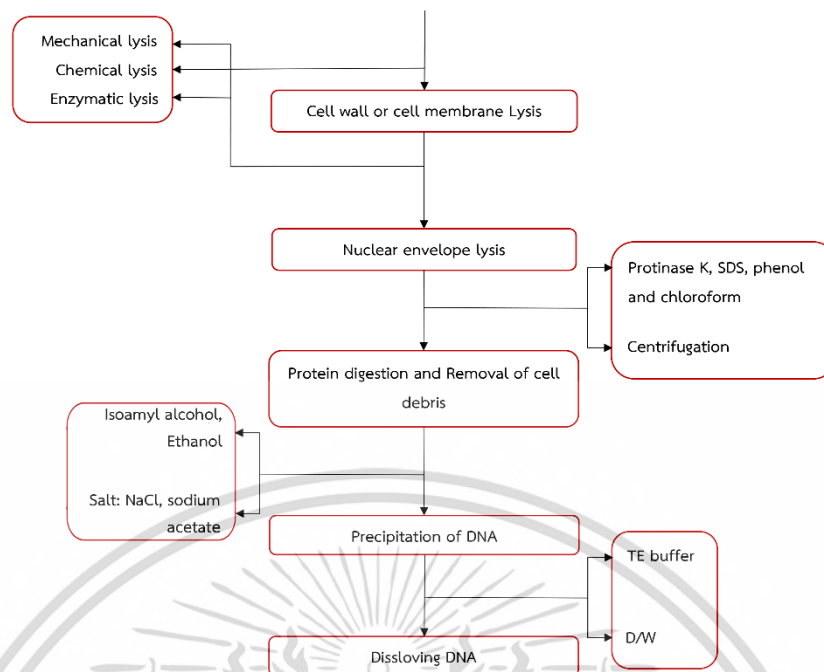
เนื่องจากภายในเซลล์แบคทีเรียประกอบด้วยออร์แกเนลล์ต่าง ๆ หลังจากทำลายผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์แล้ว จะทำให้มีออร์แกเนลล์อื่น ๆ หลุดออกมาด้วย จึงจำเป็นต้องกำจัดซากเซลล์และ

ออร์แกเนลล์อื่น ๆ ที่ไม่ต้องการ ก่อนทำการแยกดีเอ็นเอที่ต้องการออกมา (รูปที่ 2.10) การสกัดเพื่อแยกดีเอ็นเอออกมาจากเซลล์แบคทีเรียมีหลายวิธี ดังนี้

1. วิธีสกัดดีเอ็นเอด้วยฟีนอล-คลอโรฟอร์ม (phenol-chloroform method) เป็นวิธีที่ดีที่สุดในการสกัดดีเอ็นเอ วิธีนี้จะได้ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ดีที่สุด สารเคมีที่จำเป็นต่อวิธีนี้ได้แก่ ฟีนอล คลอโรฟอร์ม ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ บัฟเฟอร์ TE และไลซิสบัฟเฟอร์ (lysis buffer) ที่ประกอบด้วย Tris EDTA แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) SDS และเกลืออื่น ๆ เนื่องจากดีเอ็นเอมีความว่องไวต่อฟิเอช บัฟเฟอร์ Tris จะช่วยรักษาฟิเอช EDTA เป็นสารคีเลต (chelating agent) ซึ่งจะช่วยขัดขวางปฏิกิริยาของเอนไซม์ DNase โดยจะเข้าไปขัดขวางบริเวณ cofactor binding site SDS เป็นสารลดแรงตึงผิวทำให้ผนังและเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย NaCl ช่วยให้ดีเอ็นเอมาอยู่รวมกันและป้องกันการเสียสภาพระหว่างกระบวนการสกัด $MgCl_2$ ป้องกันดีเอ็นเอจากประจุลบของไลโปโปรตีนที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ ป้องกันการผสมกันของดีเอ็นเอ และออร์แกเนลล์อื่น ๆ ฟีนอล คลอโรฟอร์ม และไอโซเอมิลแอลกอฮอล์จะช่วยให้การตกตะกอนโปรตีน หลังจากการปั่นเหวี่ยงแล้วจะทำให้สารละลายแยกออกเป็น 3 ส่วน โดยจะสังเกตเห็นตะกอนโปรตีนอยู่กึ่งกลางระหว่างส่วนของฟีนอล และส่วนของดีเอ็นเอที่ละลายอยู่ในสารละลายด้านล่าง เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอนจนสามารถแยกออกมาได้จำเป็นต้องอาศัยการตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ที่เย็นจัด

2. วิธีสกัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ (enzymatic method) วิธีนี้ คล้ายกับวิธีฟีนอล-คลอโรฟอร์ม แต่จะใช้เอนไซม์ในการย่อยตัวอย่างแทนการใช้ฟีนอล-คลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว ได้ปริมาณดีเอ็นเอที่สูง แต่คุณภาพที่ได้อาจไม่ดีเท่ากับวิธีฟีนอล-คลอโรฟอร์ม

3. วิธีสกัดดีเอ็นเอด้วยเฟสของแข็ง (solid-phase method) ในปัจจุบันได้มีการคิดค้นชุดสกัดดีเอ็นเอขึ้นโดยใช้พื้นฐานจากคุณสมบัติทางเคมีของเฟสของแข็งและของเหลว หนึ่งในวิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้พื้นฐานดังกล่าว ได้แก่ วิธีคอลัมน์ซิลิกา (silica column-based method) อาศัยหลักการจับกันของประจุบวกของโมเลกุลซิลิกากับประจุลบของดีเอ็นเอในระหว่างกระบวนการทำลายผนังและเยื่อหุ้มเซลล์ และการกำจัดซากเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยง ดีเอ็นเอจะยังคงยึดเกาะอยู่กับซิลิกา จนกว่าจะมีการใช้สารละลายชะดีเอ็นเอออกจากซิลิกา ข้อดีของวิธีนี้คือได้ดีเอ็นเอคุณภาพดีและมีขั้นตอนที่ไม่ซับซ้อน เป็นที่ยอมรับกันอย่างแพร่หลาย

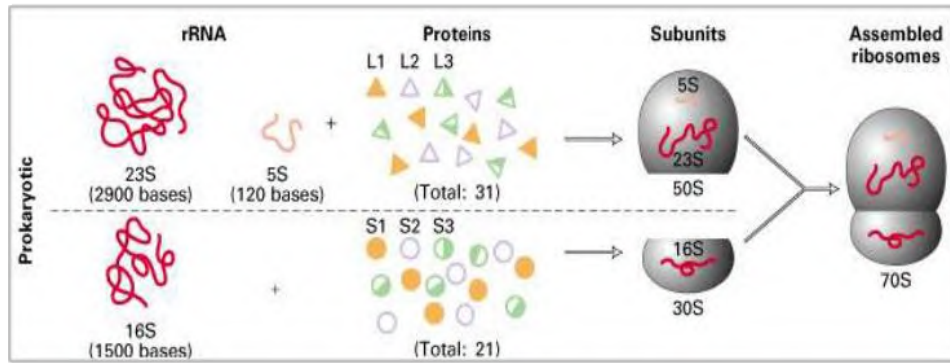


รูปที่ 2.10 แผนภาพแสดงขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ

ที่มา: Chauhan (2018)

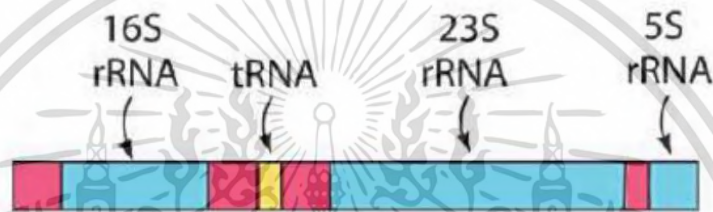
2.3.4.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์บนช่วงยีน 16S rRNA

เนื่องจาก *streptomyces* มีความหลากหลายทางสายพันธุ์สูง ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอส่วนใหญ่อาจมีความแตกต่างกันบ้างตามการวิวัฒนาการ ทำให้ยากต่อการจัดจำแนกและระบุได้ว่าเป็นชนิดเดียวกันหรือไม่ แต่อย่างไรก็ตาม ในแบคทีเรียทุกชนิดจะต้องมีไรโบโซมที่คล้ายกัน ไรโบโซมเป็นโครงสร้างภายในเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์โปรตีน ลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีนของ rRNA มีความคงตัวสูงมาก หมายความว่าแม้แบคทีเรีย 2 ชนิดจะมีวิวัฒนาการจนทำให้มีความใกล้เคียงกันน้อย และอาจจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอที่ต่างกัน แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีนของ rRNA ยังมีความคล้ายคลึงกันอยู่ (นันทวัน, 2561) ซึ่งจะสามารถนำมาใช้เป็นตัวชี้วัดความใกล้เคียงกันของ *Streptomyces* สองชนิดได้ อาร์เอ็นเอโดยทั่วไปแล้วจะประกอบรวมอยู่กับโปรตีนเกิดเป็นองค์ประกอบเชิงซ้อนเรียกว่า ไรโบโซม มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการแปลรหัส (รูปที่ 2.11) ในสิ่งมีชีวิตแบบโปรคาริโอตสามารถแบ่ง rRNA ได้ 3 ชนิด ได้แก่ 23s rRNA 16S rRNA และ 5S rRNA และมียีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์โมเลกุล rRNA แต่ละชนิดเรียงต่อกันเรียกว่า rRNA transcription unit (รูปที่ 2.12) (อำไพทิพย์, 2553) การเพิ่มปริมาณของลำดับนิวคลีโอไทด์บนช่วงยีน 16S rRNA ในการนำมาใช้จำแนกและระบุชนิดของแอกติโนมัยซีทอาศัยหลักการของปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอร์



รูปที่ 2.11 องค์ประกอบของไรโบโซมของโปรคาริโอต

ที่มา: อำไพทิพย์ (2553)



รูปที่ 2.12 rRNA transcription unit ของโปรคาริโอต

ที่มา: อำไพทิพย์ (2553)

2.3.4.3 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (polymerase chain reaction; PCR)

PCR เป็นปฏิกิริยาที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง โดยอาศัยเครื่องมือที่เรียกว่า Thermal cycler เทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่เลียนแบบการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในธรรมชาติ เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอช่วงใดช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอ โดยต้องอาศัยเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส (DNA polymerase) และดีเอ็นเอสายสั้นเรียกว่า ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primer) ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ (Deoxyribonucleotide) ได้แก่ dATP dTTP dGTP และ dCTP และแมกนีเซียม (Mg) หรือแมงกานีส (Mn) ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก ดังนี้

1. การสูญเสียสภาพธรรมชาติของดีเอ็นเอ (DNA denaturation)

เป็นการทำให้สายดีเอ็นเอแม่แบบเกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติโดยทำให้สายพอลินิวคลีโอไทด์ (Polynucleotide) สองสายที่พันกันเป็นเกลียวแยกออกจากกัน ส่วนใหญ่ใช้อุณหภูมิประมาณ 90 องศาเซลเซียส อาจแตกต่างกันขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์ (G+C content) ในสายดีเอ็นเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การเข้าจับกับของดีเอ็นเอไพร์เมอร์ (Annealing)

เป็นการปรับอุณหภูมิให้เหมาะสมเพื่อให้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์เข้าคู่กับสายดีเอ็นเอแม่แบบโดยทั่วไปจะใช้อุณหภูมิประมาณ 52 ถึง 58 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับค่าอุณหภูมิหลอมเหลว (Melting temperature, T_M) ของสายดีเอ็นเอไพร์เมอร์

3. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ (Extension)

เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยการเข้าจับของดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์กับสายดีเอ็นเอแม่แบบ อาศัยการทำงานของเอนไซม์พอลิเมอเรส เอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 72 ถึง 75 องศาเซลเซียส กระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสขั้นตอนที่ 1 ถึง 3 นับเป็น 1 รอบ (cycle) โดยทั่วไปนิยมใช้ 20 ถึง 35 รอบ

2.3.4.4 จีโนมทั้งหมด (Whole genome)

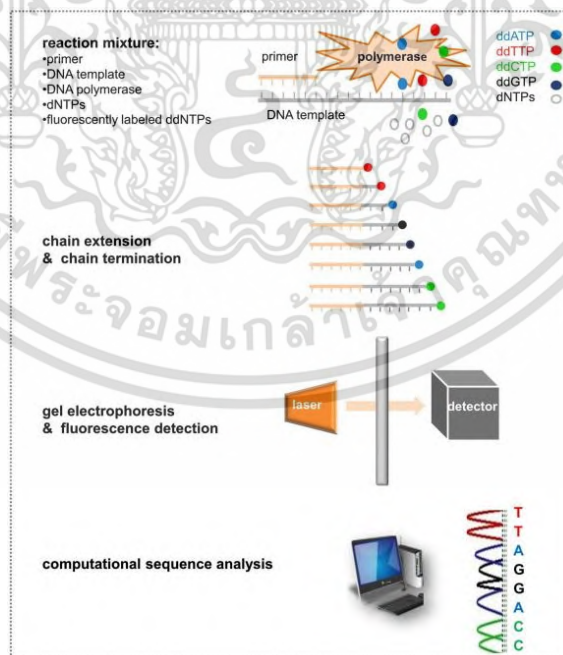
จีโนมคือหน่วยพันธุกรรมทั้งหมดบนดีเอ็นเอที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ดีเอ็นเอมีส่วนที่เก็บรหัสพันธุกรรมสำหรับการสังเคราะห์โปรตีนที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตที่เรียกว่ายีน (gene) และส่วนของดีเอ็นเอที่ไม่ใช่ยีน การศึกษาสิ่งมีชีวิตในระดับจีโนมจึงต้องศึกษาทั้งส่วนที่เป็นยีนและส่วนที่ไม่ใช่ยีน (ประสิทธิ์ และนเรศ, 2543) เช่นเดียวกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนช่วงยีน 16S rRNA สิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอที่มีความใกล้เคียงกัน โดยเฉพาะดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่มีความหลากหลายทางสายพันธุ์ บางสายพันธุ์อาจจะมีการวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกันมาก การศึกษาจีโนมทั้งหมดจึงสามารถนำมาใช้ในการจำแนกและระบุชนิดได้แม่นยำและละเอียดกว่าการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บนช่วงยีน 16S rRNA ซึ่งเป็นเพียงยีนช่วงหนึ่งบนสายดีเอ็นเอเท่านั้น

2.3.4.5 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอ (DNA sequencing)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยุคที่ 1 (First generation sequencing) จะใช้วิธีการของ Sanger (Sanger *et al.*, 1977) หรือเรียกว่าวิธี Dideoxy chain termination ในปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบที่ต้องการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ ไดดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ (dideoxynucleotides; ddNTPs) ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ต่างกัน และดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ (deoxyribonucleotides; dNTPs) ddNTPs มีโครงสร้างคล้ายกับ dNTPs ปกติ แต่ต่างกันที่หมู่ไฮดรอกซีของคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ถูกแทนที่ด้วยไฮโดรเจน ทำให้ไม่สามารถเกิดพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์กับนิวคลีโอไทด์ตัวต่อไปได้ การสังเคราะห์สายดีเอ็นเอจะสิ้นสุดลง ทำให้ปลายสายดีเอ็นเอสายใหม่มีนิวคลีโอไทด์ตัวสุดท้ายเป็น ddNTPs ชนิดต่าง ๆ เสมอ เมื่อทำปฏิกิริยาซ้ำจะทำให้ได้ดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน วิเคราะห์ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแคปิลลารี (capillary electrophoresis) ที่สามารถแยกดีเอ็นเอที่มีความยาวต่างกันเพียงหนึ่งนิวคลีโอไทด์ได้ ตรวจจับสารเรืองแสงที่ติดอยู่บน ddNTPs แต่ละชนิดด้วยเลเซอร์และตัวตรวจวัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัญญาณ (detector) ทำให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอได้ (รูปที่ 2.13) (อารีย์รัตน์, 2560) วิธีของ sanger สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ประมาณ 500 ถึง 800 คู่เบส ด้วยข้อจำกัดดังกล่าวจึงได้มีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ เรียกว่าการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบช็อตกัน (shotgun sequencing) โดยตัดชิ้นดีเอ็นเอให้มีขนาดเล็กลงและมีส่วนซ้อนทับกัน (overlapping) และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่เล็กลง ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะถูกเชื่อมต่อกันเพื่อให้ได้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ตามเดิม เนื่องจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธีของ Sanger สามารถทำได้ครั้งละหนึ่งตัวอย่างของดีเอ็นเอสายสั้น ๆ เท่านั้น การหาลำดับดีเอ็นเอหลายตำแหน่ง หลายยีน หรือหลายตัวอย่าง จำเป็นต้องทำวิธีดังกล่าวหลายครั้ง ทำให้ค่าใช้จ่ายสูงขึ้นตามจำนวนครั้ง วิธีการของ sanger จึงเหมาะกับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์สายสั้น เช่น ลำดับนิวคลีโอไทด์บนช่วงยีน 16S rRNA ไม่สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดบนสายดีเอ็นเอได้ ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคโนโลยีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เรียกว่า Next generation sequencing (NGS) หรือการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยุคที่ 2 ที่สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมของสิ่งมีชีวิตได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพในครั้งเดียว และวิธีนี้ยังสามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยที่ไม่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์มาก่อนได้ ปัจจุบันเทคโนโลยี NGS ถูกพัฒนาขึ้นมาอย่างรวดเร็ว โดยมีรูปแบบที่นิยมใช้อยู่ 4 รูปแบบ ได้แก่ 454/Roche genome sequencer Illumina genome analyzer SolidTM sequencer และ Ion torrent/Life technology



รูปที่ 2.13 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธีของ Sanger

ที่มา: Jamuar *et al.* (2016)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.4.6 การเปรียบเทียบ (Blast) ลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่สนใจจะถูกนำมาเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ใกล้เคียงเพื่อนำมาใช้พิจารณาว่าแบคทีเรียที่ต้องการศึกษามีความใกล้เคียงหรือจัดเป็นแบคทีเรีย สายพันธุ์ใด เครื่องมือที่ใช้ในการค้นหาส่วนของยีนหรือโปรตีนของสิ่งมีชีวิตที่คล้ายคลึงกัน เรียกว่าเครื่องมือค้นหาความคล้ายคลึงกันทางชีวภาพ (Basic Local Alignment Search Tool; BLAST) โดยใช้การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์หรือกรดอะมิโนกับฐานข้อมูล และคำนวณนัยสำคัญทางสถิติของความเหมือน เครื่องมือ Blast จึงสามารถใช้ระบุชนิดของยีน โปรตีน หรือจำแนกสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตได้นอกจากนี้ยังใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างบทบาท หน้าที่ และวิวัฒนาการของยีนในสิ่งมีชีวิตได้อีกด้วย (สัจชัย, 2561) ผลจากการใช้เครื่องมือ Blast ทำให้ทราบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตที่ศึกษามีความคล้ายคลึงหรือเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในฐานข้อมูลร้อยละเท่าใด ทำให้ง่ายต่อการพิจารณาและจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต

2.3.5 ชีวสารสนเทศ (Bioinformatics)

ชีวสารสนเทศเป็นศาสตร์ที่รวมความรู้หลายแขนงวิชา ได้แก่ ชีววิทยา เคมี คณิตศาสตร์ และคอมพิวเตอร์ เป็นเครื่องมือสำคัญในการศึกษาด้านอณูชีววิทยา ปัจจุบันได้มีการพัฒนาโปรแกรมทางชีวสารสนเทศจำนวนมากขึ้นเพื่อรองรับความต้องการในงานประยุกต์ต่าง ๆ (ชมภูษ และวรวิทย์, 2553) เนื่องจากความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีทำให้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาทางชีววิทยาทั่วโลกเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะข้อมูลของสิ่งมีชีวิตในระดับพันธุกรรม การนำชีวสารสนเทศมาใช้วิเคราะห์ข้อมูลดังกล่าวจึงมีความจำเป็น

2.3.5.1 การประกอบชิ้นส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ (DNA sequence assembly) (อลิษา และคณะ, 2555)

เทคโนโลยี NGS สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตได้ในเวลาอันรวดเร็ว แต่ยังมีข้อจำกัดจากการตัดดีเอ็นเอให้มีขนาดเล็ก (reads) เพื่อให้การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์มีความรวดเร็ว การนำแต่ละ reads มาเชื่อมต่อกันเป็นดีเอ็นเอสายยาวเหมือนเดิมโดยไม่ผิดพลาดจึงเป็นเรื่องยาก นอกจากนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ homopolymer ทำให้การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ มีความถูกต้องลดลง เครื่องมือทางชีวสารสนเทศจึงช่วยในการจัดเรียงและเชื่อมต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก NGS เครื่องมือสำหรับใช้ในการประกอบและเรียงชิ้นลำดับนิวคลีโอไทด์ (fragment assembly) อาศัยการนำ reads มาเชื่อมต่อกันให้เป็น contigs จากนั้นรวม contigs ให้ยาวขึ้นกลายเป็น scaffolds เพื่อประกอบเป็นดีเอ็นเอสายใหม่ โดยแบ่งได้เป็น 2 วิธีที่ต่างกัน ได้แก่ *de novo approach* และ *comparative approach* วิธี *De novo approach* ใช้ในการสร้างจีโนมใหม่ (reconstruction) โดยไม่ต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงแตกต่างกับวิธีแบบ *comparative approach* ที่มีการจัดเรียง reads โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงเป็นตัวเปรียบเทียบ วิธีแบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

de novo จึงเหมาะกับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่ เนื่องจากไม่จำเป็นต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอ้างอิง

2.3.5.2 การทำนายหน้าที่ของจีโนม (genome annotation)

Genome annotation เป็นการอธิบายหน้าที่ของยีนบนจีโนม อาศัยระบบชีวสารสนเทศโดยการตรวจวัดความคล้ายคลึง (similarity detection) เช่น ความคล้ายคลึงของโปรตีนกับสายพันธุ์ใกล้เคียง ความคล้ายคลึงของ mRNA กับสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันหรือกับจีโนมอ้างอิง การทำ Genome annotation แบ่งออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ การอธิบายระดับนิวคลีโอไทด์เพื่อหาและระบุตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ เช่น ยีน RNAs และส่วนอื่น ๆ ที่ไม่มีหน้าที่ (repetitive elements) ข้อผิดพลาดจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) และการเชื่อมต่อชิ้นส่วนนิวคลีโอไทด์ (assembly) จะถูกรายงานผลออกมาด้วยการเพิ่มยีน (pseudogenes) หรือตัดยีนออก อีกประเภทหนึ่งของการทำ Genome annotation คือ การอธิบายระดับโปรตีนสามารถ บ่งบอกความเป็นไปได้ว่าสิ่งมีชีวิตมียีนที่สนใจหรือไม่และยีนแต่ละยีนทำหน้าที่ใด ประเภทสุดท้ายคือ การอธิบายระดับกระบวนการ มุ่งเน้นไปที่การระบุวิถีและกระบวนการของยีนที่ทำหน้าที่ (Pablo *et al.*, 2018) การทำ Genome annotation มีขั้นตอนโดยการนำจีโนมที่ผ่านการ assembly มาหาตำแหน่งยีนเพื่อระบุ open reading frames (ORFs) บนจีโนมโดยใช้เครื่องมือหาตำแหน่งยีน เช่น GeneMark และ Metagene Annotator ตำแหน่งของ ORFs จะถูกเปรียบเทียบกับ (blast) กับฐานข้อมูล เช่น Genbank และ Uniprot เพื่อระบุว่า ORFs นั้นจะถูกแปลงเป็นโปรตีนที่มีหน้าที่ และเกี่ยวข้องกับวิถีเมทาบอลิก (metabolic pathway) ใด ข้อมูลจากการทำ Genome annotation จะแสดงออกมาในรูปแบบของ cluster orthologous groups (COGs)

2.3.5.3 การคำนวณค่า Average Nucleotide Identity (ANI)

ค่า Average Nucleotide Identity หรือค่า ANI เป็นค่าที่บ่งชี้ความคล้ายคลึงกันระหว่างคู่ของจีโนมที่นำมาเปรียบเทียบกับกัน สามารถใช้ในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตได้ หากจีโนมของสิ่งมีชีวิตที่นำมาเปรียบเทียบกับกันมีค่า ANI มากกว่าร้อยละ 95 ยอมรับได้ว่าเป็นสิ่งมีชีวิตสายพันธุ์เดียวกัน การคำนวณค่า ANI อาศัยโปรแกรมทางคอมพิวเตอร์ เช่น JSpecies และ Gegenees นอกจากนี้ยังมีโปรแกรมออนไลน์ เช่น EzGenome (<http://www.ezbiocloud.net>) และ ANI calculator (<http://enve-omics.ce.gatech.edu>) (Figueras *et al.*, 2014)

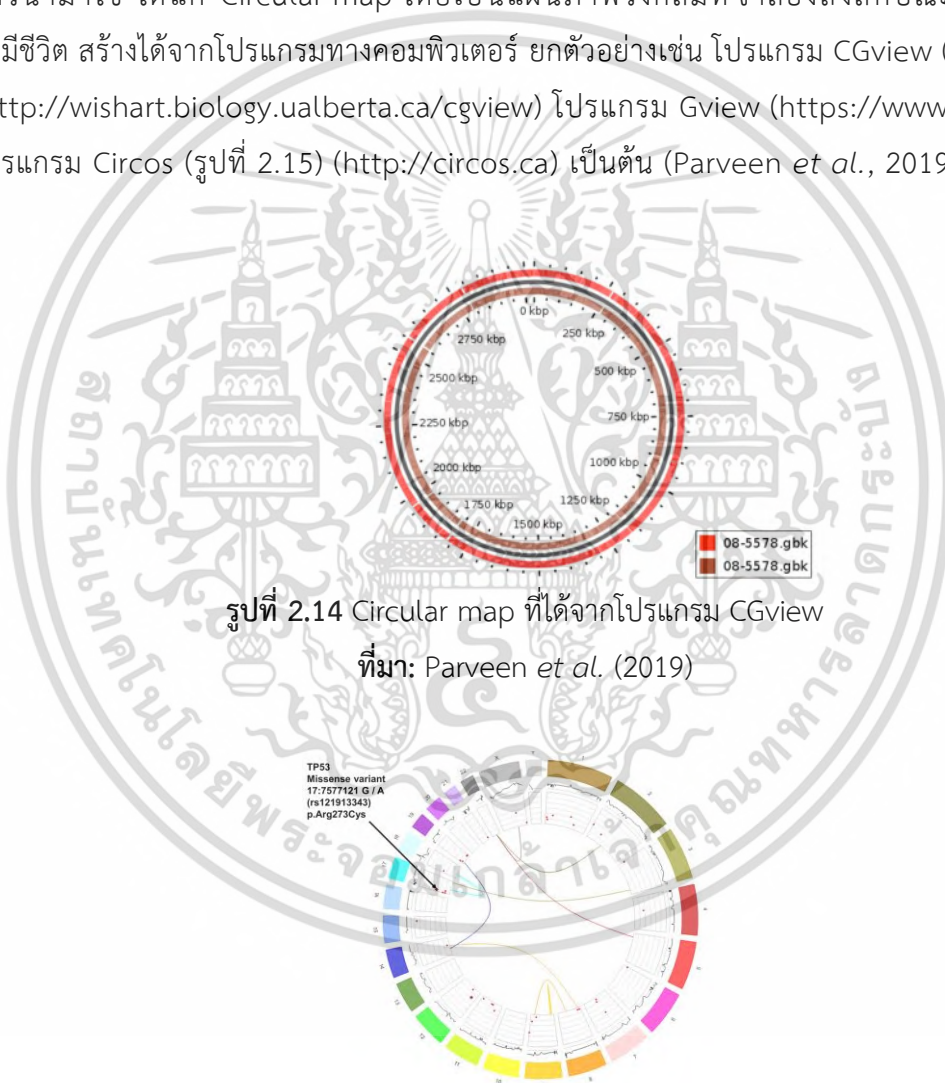
2.3.5.4 เทคนิค Digital DNA-DNA Hybridization (dDDH)

dDDH เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนาขึ้นจากวิธี DNA-DNA hybridization (DDH) อาศัยการคำนวณของคอมพิวเตอร์ (*in silico*) โดยใช้โปรแกรมที่เรียกว่า Genome-To-Genome Distance Calculator (GGDC) (<https://ggdc.dsmz.de/ggdc.php>) GGDC รองรับทั้งข้อมูลจีโนมที่สมบูรณ์ (complete genome) และข้อมูลที่เป็น assembled genome โปรแกรมสามารถเลือกเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

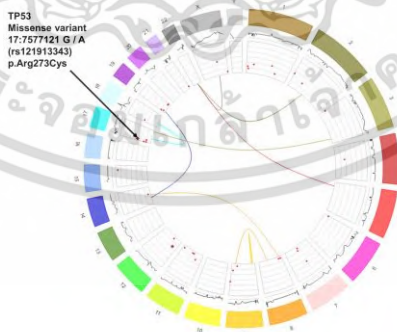
ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในการคำนวณหาระยะห่างระหว่างจีโนมและแปลงออกมาเป็นค่าที่เทียบเท่ากับค่าจาก DDH ปกติ (Sant'Anna *et al.*, 2019)

2.3.5.5 การแสดงผลจีโนมด้วยแผนที่วงกลม (Genome circular map)

การแสดงผลข้อมูลทางจีโนมออกมาเป็นรูปภาพ (Genomic data visualization) ทำให้การศึกษาทางพันธุศาสตร์มีความง่ายมากขึ้น จากการศึกษาข้อมูลทางจีโนมมีมากขึ้น การสร้างแบบจำลองข้อมูลเพื่อใช้ในการวิเคราะห์และการแสดงผลข้อมูลจึงมีบทบาทสำคัญที่ช่วยให้การวิเคราะห์ข้อมูลและอธิบายความสัมพันธ์ของข้อมูลง่ายขึ้น การแสดงผลข้อมูลทางจีโนมแบบหนึ่งที่มีการนำมาใช้ ได้แก่ Circular map โดยเป็นแผนภาพวงกลมที่จำลองถึงลักษณะจีโนมของสิ่งมีชีวิต สร้างได้จากโปรแกรมทางคอมพิวเตอร์ ยกตัวอย่างเช่น โปรแกรม CGview (รูปที่ 2.14) (<http://wishart.biology.ualberta.ca/cgview>) โปรแกรม Gview (<https://www.gview.ca>) โปรแกรม Circos (รูปที่ 2.15) (<http://circos.ca>) เป็นต้น (Parveen *et al.*, 2019)



รูปที่ 2.14 Circular map ที่ได้จากโปรแกรม CGview
ที่มา: Parveen *et al.* (2019)

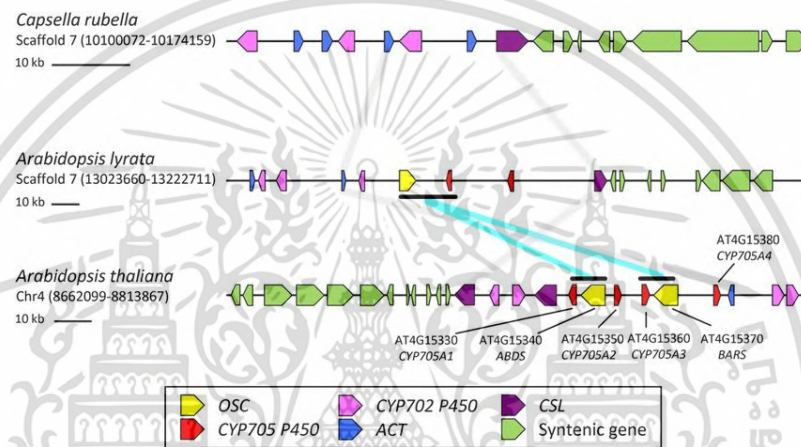


รูปที่ 2.15 Circular map ที่ได้จากโปรแกรม Circos
ที่มา: Parveen *et al.* (2019)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.5.6 การแสดงผลจีโนมด้วยแผนที่เชื่อมโยง (Synteny map)

ในทางพันธุศาสตร์ทั่วไป Synteny จะใช้ในการอธิบายตำแหน่งของยีนบนโครโมโซมแห่งเดียวกัน แต่ในปัจจุบันนักชีววิทยาได้มีการนำ synteny มาใช้เพื่อเปรียบเทียบความคล้ายกันของโครโมโซม 2 ชุด Synteny map อาศัยการนำ Homologous gene ที่เป็นยีนแบบอนุรักษ์ (conservative) บนจีโนมของสิ่งมีชีวิต 2 ชนิดมาเปรียบเทียบกันเพื่อวิเคราะห์รูปแบบที่คล้ายหรือแตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโครงสร้างจีโนม (Drillon *et al.*, 2014) โดยใช้พื้นฐานของแผนที่ยีนและลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนม ซึ่งต้องใช้อัลกอริทึมและการคำนวณด้วยระบบคอมพิวเตอร์เพื่อแสดงผลออกมาเป็นรูปภาพ (รูปที่ 2.16) (soderlund *et al.*, 2020)



รูปที่ 2.16 synteny map เปรียบเทียบ ABDS gene cluster

ที่มา: Sohrabi *et al.* (2015)

2.3.5.7 กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิของแบคทีเรีย

แบคทีเรียส่วนใหญ่ประกอบด้วยกลุ่มยีน (gene cluster) มากกว่า 40 กลุ่มยีนที่ถอดรหัสไปสู่กระบวนการชีวสังเคราะห์ในการสร้างสารทุติยภูมิได้ ดังนั้นการนำข้อมูลทางพันธุศาสตร์มาใช้เพื่อวิเคราะห์ความสามารถในการสังเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตที่สนใจจึงมีความสำคัญในแง่ของการนำไปประยุกต์ใช้ในอนาคต การใช้โปรแกรม antiSMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org>) มีความสะดวกต่อการศึกษาและคาดเดากลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิอย่างมาก เนื่องจากเป็นโปรแกรมที่สามารถวิเคราะห์และคาดเดากลุ่มของยีนได้จากข้อมูลจีโนมได้แบบอัตโนมัติ (Blin *et al.*, 2016)

2.3.5.8 การสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) (สมชาย, 2551)

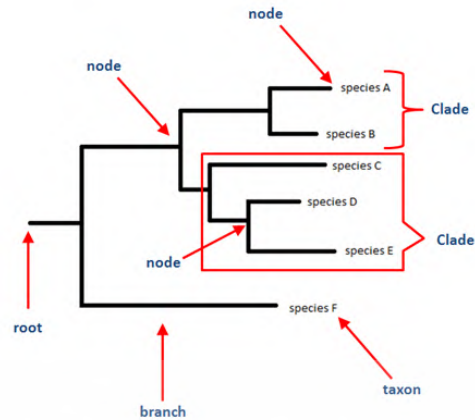
แผนภูมิต้นไม้สร้างโดยอาศัยข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยา ชากตึกดำบรรพ์ หรือข้อมูลระดับโมเลกุลโดยเฉพาะการนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับโปรตีนของยีนต่าง ๆ ที่เป็นออร์โทลอก (orthologue) มาสร้างเป็นแผนภูมิต้นไม้มีความสำคัญต่อการศึกษาวिकासการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

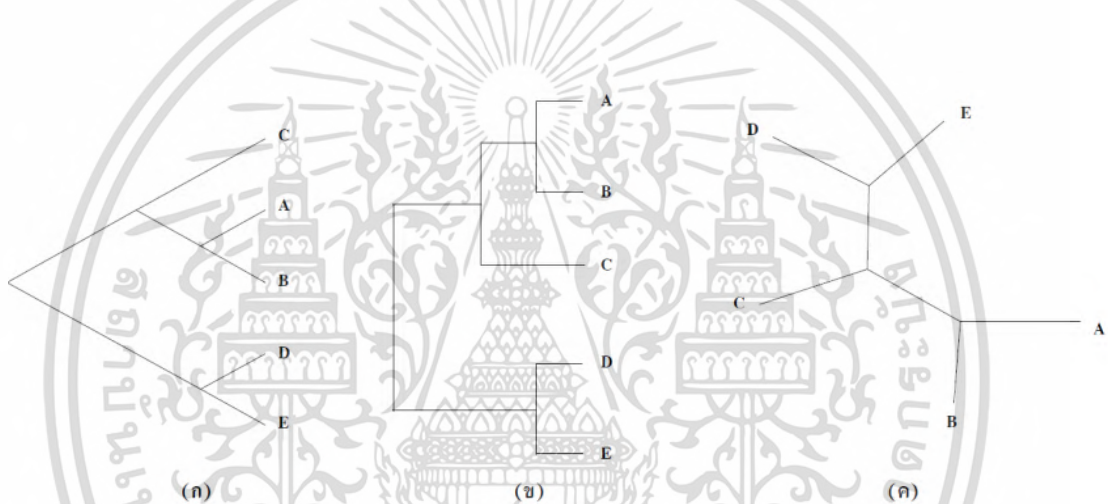
ของสิ่งมีชีวิต แผนภูมิต้นไม้มีองค์ประกอบคล้ายต้นไม้ คือ ประกอบด้วยกิ่งก้าน (branch) ตำแหน่งที่ กิ่งแตกเป็นกิ่งย่อยที่เป็นจุดต่อเรียกว่า ปม (node) โดยที่ปลายสุดของกิ่งจะเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ โพรตีน หรือสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตเรียกว่า แทกซอน (taxon) หรือหน่วยอนุกรมวิธานเชิงปฏิบัติการ (operational taxonomic unit; OTU) แผนภูมิต้นไม้ อาจมีจุดกำเนิดร่วมเรียกว่า ราก (rooted tree) ซึ่งเป็นส่วนยอดที่เป็นตำแหน่งของบรรพบุรุษร่วมของแทกซอน ทั้งหมดหรือไม่มีราก (unrooted tree) ก็ได้ (รูปที่ 2.17) แผนภูมิต้นไม้ที่มีรากจะทำให้ทราบทิศทาง เวลา และบรรพบุรุษ ในการวิวัฒนาการ ความยาวของก้านที่แตกต่างกันจะแสดงระยะห่างของวิวัฒนาการ แต่ละก้านอาจมี อัตราเร็วของวิวัฒนาการแตกต่างกัน ระยะห่างอาจแสดงเป็นตัวเลขบนแต่ละก้านหรืออาจเขียนเป็น สเกลความยาวบอกขนาดในภาพ แผนภูมิวิวัฒนาการอาจเขียนในลักษณะเส้นตรงที่แยกออกจากกัน (รูปที่ 2.18ก) หรืออาจเขียนด้วยเส้นแนวตั้งและแนวนอน (รูปที่ 2.18ข) เพื่อให้เปรียบเทียบความยาว ของก้านได้ง่าย กลุ่มของแทกซอนที่กำเนิดมาจากบรรพบุรุษร่วมกันเรียกว่า สาขา (clade) แผนภูมิ ต้นไม้ อาจมีเพียงสาขาเดียวเรียกว่า monophyletic tree หรือมีหลายสาขาเรียกว่า polyphyletic tree แทกซอนคู่ใด ๆ ที่เส้นขอบบรรจบกันเรียกว่า เป็นเพื่อนบ้านกัน (neighbors) สปีชีส์หรือ แทกซอนที่แยกออกจากสปีชีส์อื่นที่กำลังศึกษาในระยะแรก ๆ ของการวิวัฒนาการจะเรียกว่า พวกนอกกลุ่ม (outgroup) การเตรียมข้อมูลสำหรับสร้างแผนภูมิต้นไม้สามารถทำได้ดังนี้

1. การรวบรวมข้อมูล โดยอาศัยเทคนิคการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล (Blast) ดังที่กล่าวไว้ในข้อที่ 2.3.4.6 เพื่อรวบรวมข้อมูลของสายพันธุ์ใกล้เคียงรวมถึงสายพันธุ์ที่เป็น พวกนอกกลุ่มเพื่อนำข้อมูลที่ได้มาสร้างเป็นแผนภูมิต้นไม้

2. การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ (Multiple alignment) ในการจัดเรียงจะอาศัย โปรแกรมคอมพิวเตอร์ เช่น Clustal W กำหนดค่าพารามิเตอร์โดยผู้ใช้ การจัดเรียงที่ดีที่สุดนั้น จำเป็นต้องกำหนดให้จำนวนของช่องว่าง (gaps) และลำดับนิวคลีโอไทด์หรือดีเอ็นเอที่เข้าคู่ผิด (mismatch) มีค่าน้อยที่สุด (ชมภูนุช และวรวิฑูรี, 2553) สามารถแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ด้วย โปรแกรม Bioedit



รูปที่ 2.17 ส่วนประกอบของแผนภูมิต้นไม้
ที่มา: Liò and Goldman (1998)



รูปที่ 2.18 แผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) แบบต่าง ๆ
ที่มา: สมชาย (2551)

จากเดิมการศึกษานิวคลีโอไทด์ทำได้เพียงช่วงยีนช่วงหนึ่งเท่านั้น แต่ในปัจจุบันด้วยความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีทำให้สามารถศึกษาสิ่งมีชีวิตในระดับพันธุกรรมได้ทั้งจีโนม ด้วยข้อมูลจำนวนมหาศาลทำให้แผนภูมิที่แสดงถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการมีการปรับเปลี่ยนให้สอดคล้องกับข้อมูลที่เพิ่มขึ้นนั้นคือแผนภูมิต้นไม้จีโนม (phylogenomics tree) (รูปที่ 2.19) สร้างขึ้นเพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยข้อมูลของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ ทั้งจีโนม แสดงผลทั้งข้อมูลแบบ phylogenetic tree และข้อมูลของจีโนม ข้อแตกต่างของ phylogenetic tree และ phylogenomics tree นั้นคือ phylogenetic tree จะแสดงข้อมูลในส่วนของยีนเพียงยีนเดียว ในขณะที่ phylogenomics tree จะแสดงข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ทั้งจีโนม (Chan and Ragan, 2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. วิธีหมักแช่ (maceration) เป็นวิธีการสกัดโดยการแช่ในตัวทำละลายในภาชนะปิด เช่น ขวดปากกว้าง ขวดรูปชมพู่ หรือโถ โดยนำตัวอย่างมาเติมน้ำหรือตัวทำละลาย แช่ทิ้งไว้ 12-24 ชั่วโมง หรือมากกว่า แต่ไม่ควรเกิน 48 ชั่วโมง (กรมวิชาการเกษตร, 2535) วิธีนี้มีข้อดี คือสารทุติยภูมิจะไม่ถูกความร้อนในกระบวนการสกัด จึงเหมาะกับสารที่ไม่ทนต่อความร้อน แต่วิธีนี้เป็นวิธีที่เปลืองตัวทำละลายมาก (ภาควิชาเภสัชวินิฉัย มหาวิทยาลัยมหิดล, 2546) และเป็นวิธีที่ใช้เวลานาน จึงมีการประยุกต์โดยนำเอาเครื่องมือต่าง ๆ เช่น เครื่องปั่น เครื่องโฮโมจีไนเซอร์ (homogenizer) เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic) มาช่วยในการทำให้เซลล์แตก เพื่อให้สารทุติยภูมิออกจากตัวเซลล์ได้ง่ายขึ้น (ภาควิชาเภสัชวินิฉัย มหาวิทยาลัยมหิดล, 2546)

2. การสกัดด้วยของเหลวสองชนิด (liquid-liquid extraction) เป็นการสกัดสารทุติยภูมิจากตัวอย่างที่อยู่ในรูปสารละลาย แต่ของเหลวในตัวทำละลายชนิดหนึ่งต้องไม่ผสมกับตัวทำละลายชนิดแรก เช่น การแยกแอลคาลอยด์ตติยภูมิ (tertiary alkaloid) ออกจากแอลคาลอยด์จตุรภูมิ (quaternary alkaloid) ในรูปแบบแอลคาลอยด์อิสระ (free alkaloid) แอลคาลอยด์ตติยภูมิสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ ดังนั้นหากเติมแอลคาลอยด์ทั้งสองชนิดในสภาพเกลือ แอลคาลอยด์ทั้ง 2 ชนิดจะละลายอยู่ในน้ำ เมื่อทำให้สารผสมดังกล่าวอยู่ในสภาวะที่เป็นต่าง แอลคาลอยด์ตติยภูมิจะเปลี่ยนเป็นแอลคาลอยด์อิสระที่ไม่ละลายน้ำ เมื่อนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์จะทำให้แอลคาลอยด์ตติยภูมิละลายอยู่ในชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ ในขณะที่แอลคาลอยด์จตุรภูมียังคงละลายอยู่ในชั้นน้ำ จึงสามารถแยกแอลคาลอยด์ทั้งสองออกจากกันได้ (รัตน, 2547)

2.5 การแยกสารทุติยภูมิให้บริสุทธิ์

การศึกษาสารทุติยภูมิที่ได้จากแหล่งธรรมชาติที่มาจากพืชหรือจากจุลินทรีย์มักจะมีหลากหลายของสารทุติยภูมิที่พืชหรือจุลินทรีย์สามารถสังเคราะห์ได้ ทำให้ยากต่อการทราบว่าสารทุติยภูมิดังกล่าวเป็นสารชนิดใด สารแต่ละชนิดมีคุณสมบัติหรือฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างไร หากต้องการทราบว่าจุลินทรีย์ที่ศึกษาอยู่สามารถสังเคราะห์สารทุติยภูมิชนิดใดบ้างจะต้องมีการแยกสารเหล่านั้นออกจากกันก่อน การแยกสารให้บริสุทธิ์สามารถทำได้โดยอาศัยหลักการของโครมาโทกราฟี

2.5.1 หลักการของโครมาโทกราฟี (ธวัชชัย, 2551)

โครมาโทกราฟี (chromatography) อาศัยหลักการละลายของสารในตัวทำละลายและการถูกดูดซับโดยตัวดูดซับที่ไม่เท่ากัน สารจึงเคลื่อนที่ได้ไม่เท่ากัน โครมาโทกราฟีประกอบด้วย 2 เฟส คือ เฟสคงที่ (stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) สารในเฟสคงที่มีลักษณะเป็นผงละเอียดมีพื้นที่ผิวมาก เช่น อะลูมินา (alumina; Al_2O_3) ซิลิกาเจล (silica gel; SiO_2) ทำหน้าที่ดูดซับ (adsorb) สารผสม หรืออาจจะใช้วัสดุที่สามารถดูดซับได้ดี เช่น ซอล์ กรดคาซ เป็นต้น เฟสเคลื่อนที่จะทำหน้าที่ชะ (elute) สารผสมออกจากเฟสคงที่ สารสามารถเคลื่อนที่ได้มากหรือน้อย จะขึ้นอยู่กับแรงดึงดูดระหว่างสารในสารผสมกับตัวดูดซับในเฟสคงที่ สารที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่จึงมักเลือกสารนี้เป็นสารที่สวมน้ำสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นตัวทำละลาย เช่น บีโตรีเลียมอีเทอร์ เฮกเซน คลอโรฟอร์ม เบนซีน เป็นต้น การทำโครมาโทกราฟีสามารถทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับเฟสคงที่

1. โครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (column chromatography) ทำโดยการบรรจุสารที่เป็นเฟสคงที่ เช่น อลูมินาหรือซิลิกาเจลไว้ในคอลัมน์ เทสารผสมที่เป็นสารละลายของเหลวลงสู่คอลัมน์ สารผสมจะผ่านคอลัมน์ช้า ๆ โดยมีตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่เป็นผู้พาไป สารที่ถูกดูดซับด้วยเฟสคงที่ได้ดีจะเคลื่อนที่ช้า ส่วนที่ถูกดูดซับได้ไม่ดีจะเคลื่อนที่ได้เร็วสารผสมจึงแยกจากกันได้

2. โครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (thin layer chromatography; TLC) เป็นโครมาโทกราฟีแบบระนาบ (plane chromatography) เฟสคงที่มีลักษณะเป็นครีမ်ชั้นนำไปเคลือบบนแผ่นกระจก หยดสารละลายสารผสมที่ต้องการแยกบนแผ่นที่เคลือบเฟสคงที่ไว้ แล้วนำไปจุ่มในภาชนะที่บรรจุตัวทำละลายที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ โดยให้ระดับของตัวทำละลายอยู่ต่ำกว่าระดับของจุดที่หยดสารผสม ตัวทำละลายจะซึมไปตามเฟสคงที่ด้วย เมื่อซึมถึงจุดที่หยดสารผสมไว้ ตัวทำละลายจะชะเอาองค์ประกอบในสารผสมนั้นไปด้วยอัตราเร็วที่แตกต่างกันโดยขึ้นอยู่กับสภาพขั้ว (polarity) ถ้าตัวทำละลายเป็นโมเลกุลมีขั้ว (polar molecules) จะชะเอาองค์ประกอบที่เป็นสารมีขั้วไปได้เร็ว ส่วนองค์ประกอบที่ไม่มีขั้วจะถูกละทิ้งไปช้าสารผสมจึงแยกออกจากกัน

3. โครมาโทกราฟีแบบกระดาษ (paper chromatography) เป็นโครมาโทกราฟีแบบระนาบอีกแบบหนึ่ง มีวิธีการและหลักการเหมือนกับโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง แตกต่างกันที่เฟสคงที่เป็นกระดาษที่สามารถดูดซับได้แทนกระจกที่เคลือบด้วยซิลิกาเจล

2.5.2 โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (รั้วชัย, 2551)

โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography; HPLC) เป็นเครื่องมือสำหรับแยกสารประกอบที่สนใจที่ผสมอยู่ในตัวอย่าง อาศัยหลักการของโครมาโทกราฟี โดยกระบวนการแยกสารประกอบที่สนใจจะเกิดขึ้นระหว่างเฟสคงที่กับเฟสเคลื่อนที่ สารที่มีคุณสมบัติต่างกันจะถูกแยกออกมาในเวลาที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายและจับกันของสารนั้นกับเฟสเคลื่อนที่หรือเฟสคงที่ สารที่สามารถละลายได้ดีกับเฟสเคลื่อนที่จะถูกแยกออกมาก่อน ส่วนสารที่ละลายได้ไม่ดีกับเฟสเคลื่อนที่หรือสามารถจับกันได้ดีกับเฟสคงที่จะถูกแยกออกมาทีหลัง สารที่ถูกแยกออกมาได้นี้จะถูกตรวจวัดด้วยตัวตรวจจับสัญญาณ (detector) แสดงผลในลักษณะของพีคเรียกว่า โครมาโทแกรม (chromatogram) ระยะเวลาที่สารแต่ละชนิดจะถูกหน่วงไว้กับเฟสคงที่ (retention time) หรือตำแหน่งของพีคที่ปรากฏบนโครมาโทแกรมสามารถนำมาใช้ประโยชน์ด้านการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ และพื้นที่ใต้พีคหรือความสูงของพีคสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 การวิเคราะห์โครงสร้างและระบุชนิดของสาร

สารทุกชนิดที่แยกได้จำเป็นต้องนำมาศึกษาโครงสร้างทางเคมีเพื่อระบุและยืนยันชนิดของสารเหล่านั้น เนื่องจากในบางครั้งการระบุชนิดของสารด้วยการเทียบเวลาหน่วงกับสารที่ทราบชนิดแน่นอนอาจไม่เพียงพอต่อการระบุชนิดของสารได้ โดยเฉพาะสารชนิดใหม่ที่ไม่เคยพบมาก่อน ไม่สามารถหาสารอื่นมาเทียบได้ จำเป็นต้องอาศัยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี (spectroscopy) เข้ามาใช้ในระบุชนิดและวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสาร

2.6.1 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (Nuclear Magnetic Resonance; NMR)

2.6.1.1 โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ ($^1\text{H-NMR}$) (สมเดช, 2547)

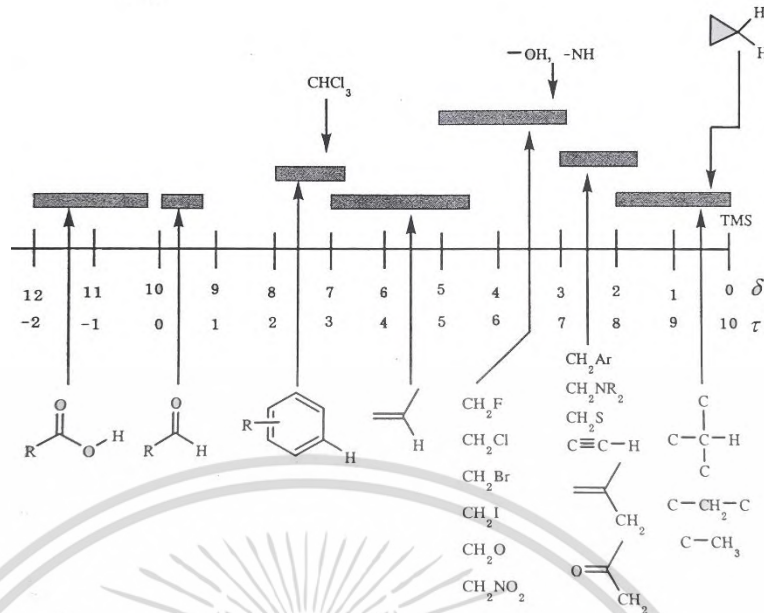
เครื่อง NMR อาศัยการส่งสนามแม่เหล็กในรูปสัญญาณวิทยุเข้าไปในตัวอย่าง ทำให้นิวเคลียสของอะตอมถูกกระตุ้น (excited state) และคายพลังงานในรูปคลื่นวิทยุเพื่อกลับสู่สถานะพื้น (ground state) การประมวลผลสัญญาณที่เกิดขึ้นจำเป็นต้องอาศัยการคำนวณทางคอมพิวเตอร์ เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ออกมาเป็นสเปกตรัม NMR ที่ประกอบด้วยพีคที่มีความสูงและตำแหน่งการเลื่อนทางเคมี (chemicals shift) (รูปที่ 2.20) โดยปกติค่า chemical shift ของโปรตอนจะปรากฏในช่วง 0-12 ppm จากสภาพแวดล้อมทางเคมีที่ต่างกันส่งผลให้มีการคายพลังงานที่ต่างกัน ส่งผลให้โปรตอนแต่ละประเภทมีค่า chemical shift ต่างกัน เทคนิค $^1\text{H-NMR}$ จึงสามารถบ่งบอกประเภทของโปรตอนได้ (รูปที่ 2.21)



รูปที่ 2.20 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร Benzyl acetate

ที่มา: D'Amelia *et al.* (2019)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

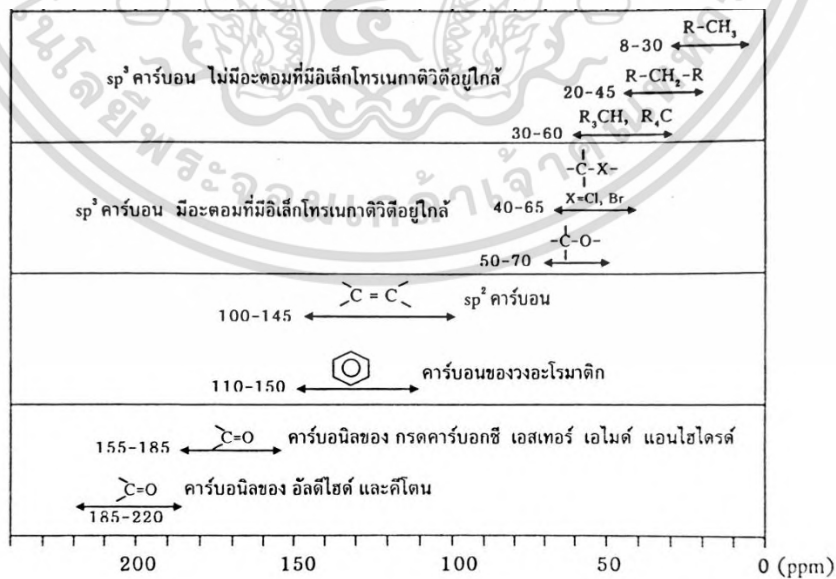


รูปที่ 2.21 ค่า chemical shift ของโปรตอนในสารประกอบต่าง ๆ

ที่มา: สมเดช (2547)

2.6.1.2 คาร์บอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (¹³C-NMR) (สมเดช, 2547)

หลักการของเครื่อง ¹³C-NMR เหมือนกับ ¹H-NMR แต่ค่า chemical shift ของ ¹³C-NMR มีค่าที่กว้างกว่า ¹H-NMR มาก โดยจะปรากฏอยู่ในช่วง 0-220 ppm คาร์บอนแต่ละประเภทมีค่า chemical shift ต่างกัน (รูปที่ 2.22) เทคนิค ¹³C-NMR จึงสามารถบ่งบอกประเภทของคาร์บอนแต่ละชนิดได้



รูปที่ 2.22 ค่า chemical shift ของคาร์บอนประเภทต่าง ๆ

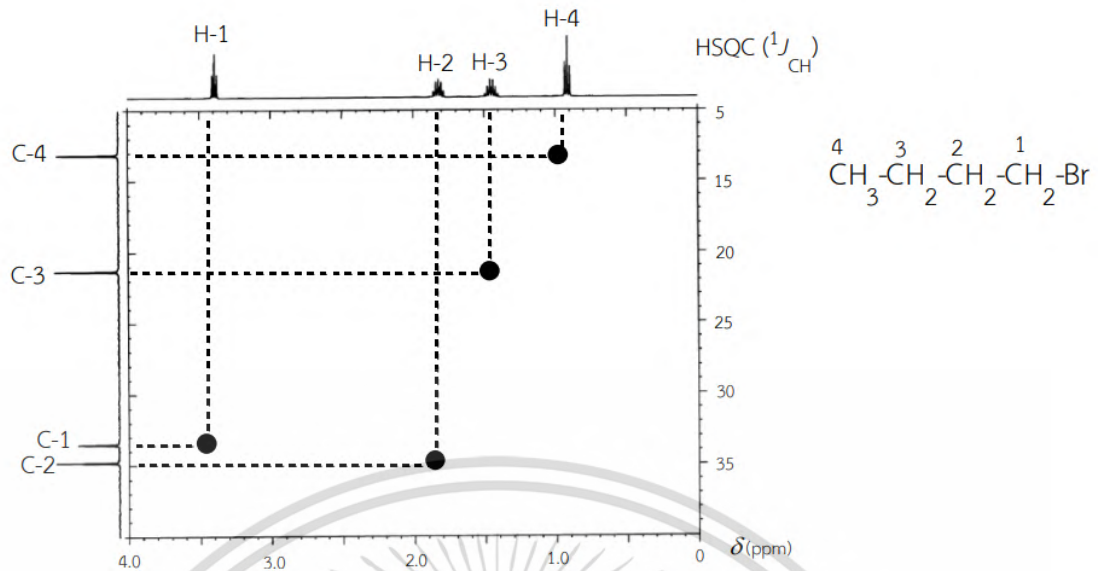
ที่มา: สมเดช (2547)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่า chemical shift ของเมทิลคาร์บอน (methyl carbon; CH_3) เมทิลีนคาร์บอน (methylene carbon; CH_2) และมีไธน์คาร์บอน (methine carbon; CH) มีความใกล้เคียงกันมาก ทำให้การจำแนกประเภทของคาร์บอนดังกล่าวจากค่า chemical shift ของ $^{13}\text{C-NMR}$ เพียงอย่างเดียวเป็นเรื่องยาก จึงต้องอาศัยเทคนิคที่เรียกว่า DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) เข้ามาช่วย เทคนิค DEPT มีหลายแบบ แต่ที่นิยม ได้แก่ DEPT 90 และ DEPT 135 โดย DEPT 90 จะแสดงสัญญาณเฉพาะมีไธน์คาร์บอนเท่านั้น ส่วน DEPT 135 จะแสดงสัญญาณของเมทิลและมีไธน์คาร์บอน ในลักษณะพีคหัวตั้ง ในขณะที่สัญญาณของเมทิลีนคาร์บอนจะมีลักษณะเป็นพีคกลับหัว จากลักษณะดังกล่าวเมื่อนำสเปกตรัมจากเทคนิค $^{13}\text{C-NMR}$ และ DEPT มาเทียบกันจะสามารถจำแนกประเภทของคาร์บอนได้แม่นยำมากขึ้น อย่างไรก็ตามเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ $^{13}\text{C-NMR}$ และ DEPT สามารถจำแนกชนิดของคาร์บอนประเภทต่าง ๆ ได้เท่านั้น การวิเคราะห์โครงสร้างเคมีของสารทฤษฎีที่ได้จากธรรมชาติที่มีความซับซ้อนจึงจำเป็นต้องอาศัยเทคนิคของนิวเคลียร์แมกเนติกส์เรโซแนนซ์แบบ 2 มิติ (2D-NMR) ร่วมกับ ลักษณะสเปกตรัมของเทคนิค 2D-NMR เป็นการพลอตระหว่างค่า chemical shift จากเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกส์เรโซแนนซ์แบบ 1 มิติ (1D-NMR) ในแนวแกน X และ Y แสดงความเข้มของสัญญาณในลักษณะจุด (รูปที่ 2.23) เทคนิค 2D-NMR มีหลายแบบใช้เพื่อแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอะตอมชนิดต่าง ๆ (อรุณรัตน์, 2563)

1. เทคนิค HSQC (Heteronuclear Single-Quantum Coherence) ทำให้ทราบว่าอะตอมไฮโดรเจนอยู่บนคาร์บอนตัวใด
2. เทคนิค HMBC (Heteronuclear Multi-Bond Connectivity) ทำให้ทราบความสัมพันธ์ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนและคาร์บอนที่มีระยะห่างจากกันไม่เกิน 3 พันธะ
3. เทคนิค H-H COSY (Hydrogen-Hydrogen Correlation Spectroscopy) ทำให้ทราบความสัมพันธ์ของอะตอมโปรตอนและโปรตอนข้างเคียงหรือโปรตอนที่อยู่ห่างกันไม่เกิน 3 พันธะ
4. เทคนิค NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) ทำให้ทราบความสัมพันธ์ระหว่างอะตอมโปรตอนกับโปรตอน โปรตอน 2 ตัวที่มีความสัมพันธ์กันจะปรากฏเป็นพิคข้ามในสเปกตรัม จึงสามารถใช้เพื่อยืนยันโครงสร้างที่มีมากกว่า 1 ไอโซเมอร์ เช่น ไอโซเมอร์แบบซิส (cis-) และทรานส์ (trans-) ได้

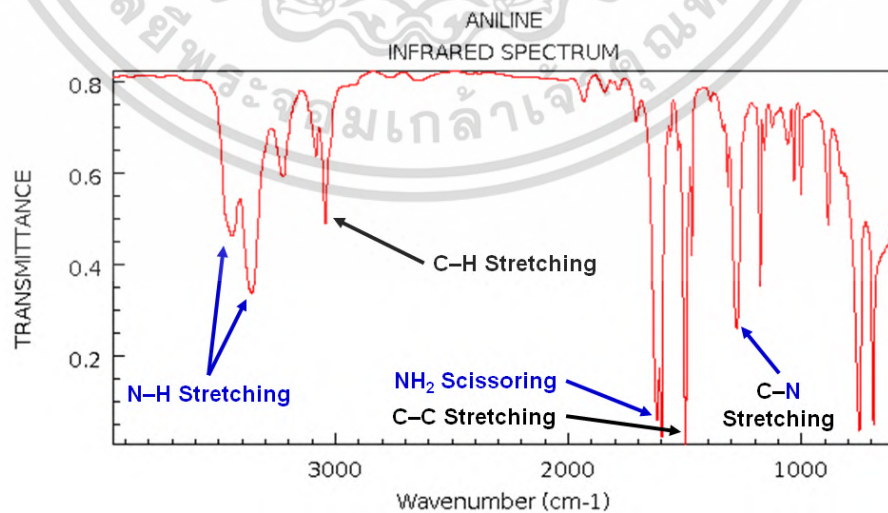
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.23 สเปกตรัม HSQC ของสาร 1-Bromobutane
ที่มา: อรุณรัตน์ (2563)

2.6.2 พูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (Fourier Transform InfraRed Spectrometer; FT-IR Spectrometer) (สมเดช, 2547)

หลักการของเครื่อง FT-IR spectrometer อาศัยการสั่นของพันธะเคมีแต่ละชนิดเมื่อได้รับพลังงานในช่วงอินฟราเรด ($4000-400\text{ cm}^{-1}$) ความแตกต่างของพลังงานที่มีผลต่อการสั่นดังกล่าวจึงใช้ในการจำแนกชนิดของหมู่ฟังก์ชันได้ ผลการวิเคราะห์ที่ได้จากเครื่อง FT-IR มีลักษณะเป็นสัญญาณสเปกตรัมที่แยกค่าการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดแต่ละความถี่ (รูปที่ 2.24) เทคนิค FT-IR สามารถใช้เพื่อยืนยันสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารตัวอย่างได้



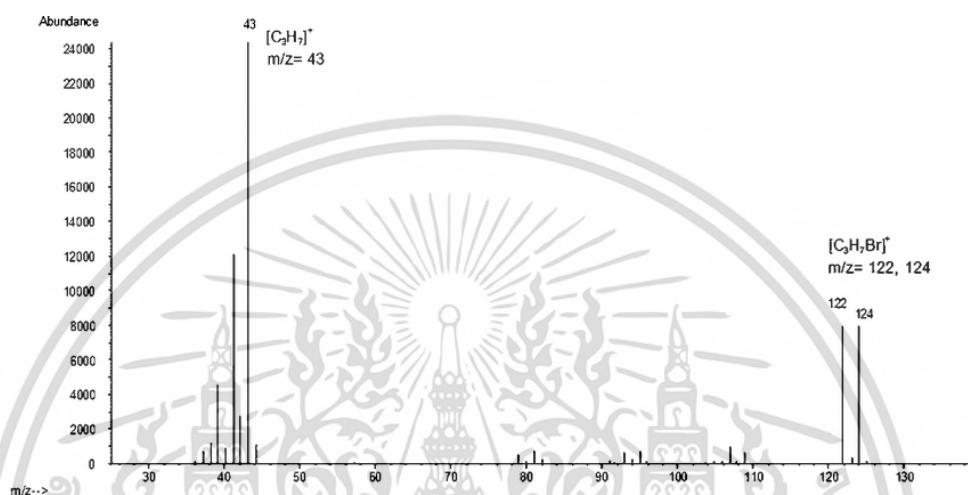
รูปที่ 2.24 สเปกตรัมอินฟราเรดของ Aniline

ที่มา: Dekker (2014).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.3 แมสสเปกโตรเมทรี (Mass spectrometry; MS) (อรุณรัตน์, 2563)

แมสสเปกโตรเมทรีเป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ค่ามวลโมเลกุลของสาร เพื่อใช้ยืนยันและสนับสนุนผลการวิเคราะห์โครงสร้างเคมีจากเทคนิค NMR เช่นเดียวกับเทคนิค FT-IR เทคนิค MS ผลการวิเคราะห์จากเทคนิค MS จะแสดงออกมาในลักษณะของสเปกตรัมแมส (mass spectrum) (รูปที่ 2.25)



รูปที่ 2.25 mass spectrum ของ 1-bromopropane

ที่มา: Rossbach *et al.* (2019)

2.6.4 โพลาริมิเตอร์ (Polarimeter) (เบญจจา, 2551)

สารบางชนิดมีคุณสมบัติในการบิดระนาบแสงโพลาไรซ์ได้เนื่องจากภายในโครงสร้างมี chiral center (โมเลกุลที่มี asymmetric carbon) หรือเรียกว่า Enantiomer การหมุนระนาบแสงโพลาไรซ์จะถูกวัดออกมาเป็นค่าออปติคัลโรเทชัน (optical rotation; $[\alpha]_D$) มีความสัมพันธ์กับองค์ประกอบทางเคมีของสารต่าง ๆ เนื่องจากสารประกอบบางชนิดเท่านั้นที่จะแสดงออปติคัลโรเทชัน วิธีนี้จึงเป็นวิธีที่เฉพาะในการตรวจหาองค์ประกอบของสารในสารผสมและพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีอย่างหนึ่งว่าภายในโมเลกุลมีคาร์บอนแบบ chiral carbon อยู่หรือไม่

2.6.5 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Vis spectrophotometer)

UV-Vis Spectrophotometer เป็นเครื่องมือที่อาศัยหลักการดูดกลืนแสงของสารที่อยู่ในช่วงอัลตราไวโอเล็ต (UV) มีความยาวคลื่นอยู่ระหว่าง 190-400 นาโนเมตร และช่วงแสงที่มองเห็น (Visible light) มีความยาวคลื่นอยู่ระหว่าง 380-800 นาโนเมตร สารอินทรีย์ทุกชนิดที่มีหมู่ฟังก์ชันประเภทต่าง ๆ สามารถดูดกลืนแสงได้ ผลที่ได้จากการวิเคราะห์คือค่าความยาวคลื่นของการดูดกลืน (λ_{max}) ในหน่วยนาโนเมตร และค่าโมลาร์แอบซอร์ปติวิตี (extinction coefficient; ϵ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 สารทุติยภูมิจากสกุล *Streptomyces*

แอกติโนมัยสีทสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลาย โดยสกุล *Streptomyces* สามารถผลิตสารออกฤทธิ์มากกว่า 7500 และมีฤทธิ์ในด้านต่าง ๆ เช่น สามารถยับยั้ง เชื้อรา ยับยั้ง เซลล์มะเร็ง ยับยั้งเอนไซม์ ต้านจุลชีพ กดภูมิคุ้มกัน และต้านอนุมูลอิสระ (ตารางที่ 2.3) จึงนำไปใช้ผลิตหรือเป็นพื้นฐานในการสังเคราะห์ตัวยาเพื่อใช้รักษาโรคได้ สารออกฤทธิ์เหล่านี้มักประกอบด้วย สารหลายประเภท เช่น เทอร์พีน (terpene) อัลคาลอยด์ (alkaloid) โพลีคีไทด์ (polyketide) เป็นต้น ส่วนใหญ่มักพบจาก *Streptomyces* บนพื้นดินจากแหล่งต่าง ๆ แต่ด้วยลักษณะทางสรีรวิทยา ชีวิตเคมี และลักษณะทางจีโนมของ *Streptomyces* ทางทะเลที่มีความแตกต่างจาก *Streptomyces* ทั่วไป จึงอาจพบสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ได้ (Siddharth and Vittal, 2018) สารทุติยภูมิบางชนิด มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (ตารางที่ 2.4) (รูปที่ 2.26) สาร 5-(2,4-dimethylbenzyl) pyrrolidin-2-one (DMBPO) ที่ผลิตจาก *Streptomyces* ทางทะเลสายพันธุ์ VITSVK5 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 44.13 ที่ความเข้มข้น 5 µg/ml นอกจากนี้ยังแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ Hep 2 และ Hep G2 ที่ค่า IC₅₀ 2.8 µg/ml และ 8.3 µg/ml ตามลำดับ (Saurav and Kannabiran, 2012) สาร Naphterpin ที่ผลิตจาก *Streptomyces* ทางทะเลสายพันธุ์ CNQ-509 มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระและกระบวนการลิปิดเพอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) ในไมโครโซม (microsome) ของหนูได้ (Park and Kwon, 2018) สาร Carazostatin และ carbazomycin ที่ได้จากแอกติโนมัยสีทมีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสังเคราะห์ นอกจากนี้สาร Stealthins ที่ผลิตจาก *S. viridochromogenes* สายพันธุ์ 2220-sv2 สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าวิตามินอี และ Carazostatin ที่ผลิตได้จาก *S. chromofuscus* สายพันธุ์ DC 118 สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสาร flunarizine และ BHT ที่เป็นสารสังเคราะห์อีกด้วย สารทุติยภูมิที่ผลิตจากแอกติโนมัยสีทสกุล *Streptomyces* มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่น่าสนใจเป็นอย่างมาก และอาจจะสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร และอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ทดแทนการใช้สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ บางชนิดที่อาจมีผลข้างเคียง นอกจากนี้ *Streptomyces* เป็นจุลินทรีย์จึงจัดว่าเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติเช่นเดียวกับพืช แต่กระบวนการเพาะเลี้ยง การควบคุมและระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระมีความสะดวกมากกว่าการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระจากพืช ด้วยเหตุนี้ จุลินทรีย์จึงเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระแหล่งหนึ่งที่มีความน่าสนใจ (Chandra *et al.*, 2020)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 สารทุติยภูมิที่สร้างได้จากสกุล *Streptomyces*

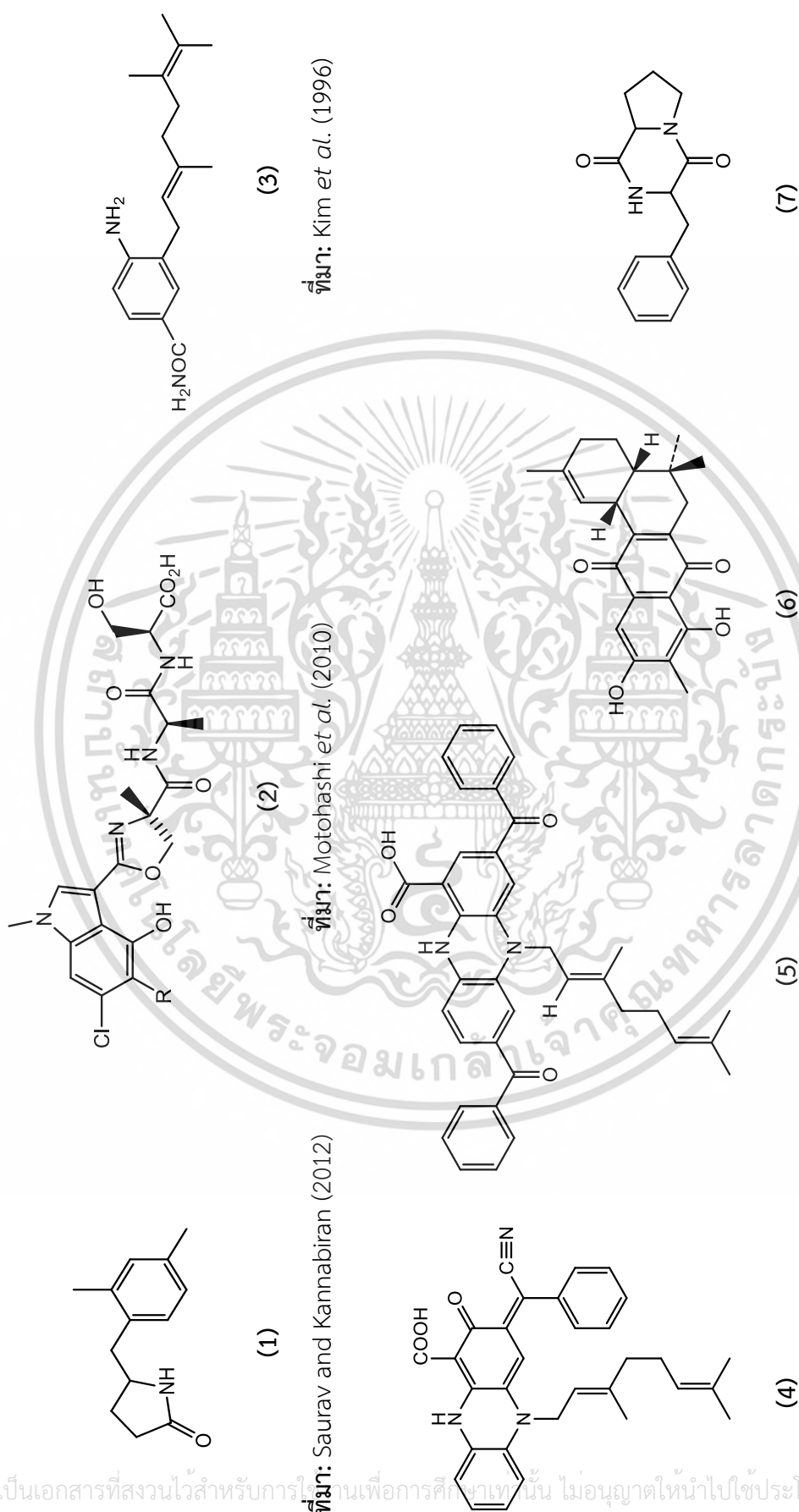
สาร	แอคติโนมัยซีทที่ผลิต	แหล่งที่มา	ฤทธิ์ทางชีวภาพ	อ้างอิง
Bafilomycins B1 and C1	<i>S. cavourensis</i> NA4	ทะเลจีนตะวันออก	Antifungal	Hua-Qi <i>et al.</i> , 2015
Marformycins	<i>S. drozdowiczii</i> SCSIO 10141	ทะเลจีนตะวันออก	Anti-infective	Zhou <i>et al.</i> , 2014
Diketopiperazines	<i>S. fungicidicus</i> YH04	แปซิฟิกตะวันตก	Antifouling products	Li <i>et al.</i> , 2006
Grincamycins B-F	<i>S. lusitanus</i> SCSIO LR32	ทะเลจีนใต้	Anticancer	Huang <i>et al.</i> , 2012
Marfuraquinocins	<i>S. niveus</i> SCSIO 3406	ทะเลจีนใต้	Cytotoxic, antibacterial	Song <i>et al.</i> , 2013
Tetrozolemycins	<i>S. olivaceus</i> FXJ8.012	มหาสมุทรอินเดีย	Metal ion-binding activity	Liu <i>et al.</i> , 2013
Desotamides B-D	<i>S. scopuliridis</i> SCSIO ZJ46	ทะเลจีนใต้	Antibacterial	Song <i>et al.</i> , 2014
Ammosamides A and B	<i>Streptomyces</i> sp. CNR-698	ปาฮามัส	Anticancer	Hughes <i>et al.</i> , 2009
Xiamenmycin C and D	<i>S. xiamenensis</i> M1-94P	มหาสมุทรแปซิฟิก	Anti-fibrotic	Yang <i>et al.</i> , 2014
Benzoxacystol	<i>Streptomyces</i> sp. NTK 935	แอตแลนติก	glycogen synthase inhibitory	Nachtigall <i>et al.</i> , 2011
Caboxamycin	<i>Streptomyces</i> sp. NTK 937	แอตแลนติก	anti-Gram-positive bacteria,	Hohmann <i>et al.</i> , 2009
Spiroindimicins A-D	<i>Streptomyces</i> sp. SCSIO 03032	ทะเลอินเดีย	Anticancer	Zhang <i>et al.</i> , 2012
Streptokordin	<i>Streptomyces</i> sp. KORDI-3238	Ayu Trough	Anticancer	Jeong <i>et al.</i> , 2006
Streptopyrrolidine	<i>Streptomyces</i> sp. KORDI-3973	Ayu Trough	Anti-angiogenesis activity	Shin <i>et al.</i> , 2008
Ahpatinin	<i>Streptomyces</i> sp. ACT232	ท่าเรือซากามิ	Aspartic protease inhibitors	Sun <i>et al.</i> , 2014
Lobophorins E and F	<i>Streptomyces</i> sp. SCSIO 01127	ทะเลจีนใต้	Antibacterial activity	Niu <i>et al.</i> , 2011

ตารางที่ 2.3 สารทุติยภูมิที่สร้างได้จากสกุล *Streptomyces* (ต่อ)

สาร	แอสโตรโนไมซีตีฟผลิต	แหล่งที่มา	ฤทธิ์ทางชีวภาพ	อ้างอิง
Indimicins	<i>Streptomyces</i> sp. SCSIO 03032	มหาสมุทรอินเดีย	Cytotoxic	Zhang <i>et al.</i> , 2014
Champacyclin	<i>S. champavatii</i> C42	ทะเลบอลติก	Antimicrobial	Pesic <i>et al.</i> , 2013

ตารางที่ 2.5 สารต้านอนุมูลอิสระจาก *Streptomyces* sp.

สาร	แอสโตรโนไมซีตีฟผลิต	แหล่งที่มา	อ้างอิง
DMBPO (1)	<i>Streptomyces</i> sp. VITSVK5	ดินทะเล	Saurav and Kannabiran, 2012
Tetrapeptides (2)	<i>Streptomyces</i> sp. Sp080513GE-23	พองน้ำทะเล	Motohashi <i>et al.</i> , 2010
Benzastatin (3)	<i>S. nitrosporeus</i> 30643	ดิน	Kim <i>et al.</i> , 1996
Benthocyanin (4)	<i>S. prunicolor</i> 1884-SVT2	ดิน	Shinya <i>et al.</i> , 1993
Benthophoenin (5)	<i>S. prunicolor</i> 1884-SVT2	ดิน	Shinya <i>et al.</i> , 1993
Naphterpin (6)	<i>Streptomyces</i> sp. CNQ-509	ดินทะเล	Park and Kwon, 2018
pyrrolo [1, 2-A] pyrazine-1, 4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl) (7)	<i>Streptomyces</i> sp. VITMK1	ดินป่าชายเลน	Manimaran and Krishnan, 2017
1-hydroxy-1- norresistomycin (8)	<i>S. variabilis</i> KP149559	ปะการัง	Ramalingam and Rajaram, 2016
1-octadecene (9)	<i>Streptomyces</i> sp. TS1010	ดินบริเวณรากตะมุตะ	Padma <i>et al.</i> , 2018



ที่มา: Saurav and Kannabiran (2012)

ที่มา: Motohashi et al. (2010)

ที่มา: Kim et al. (1996)

ที่มา: Shinya et al. (1993)

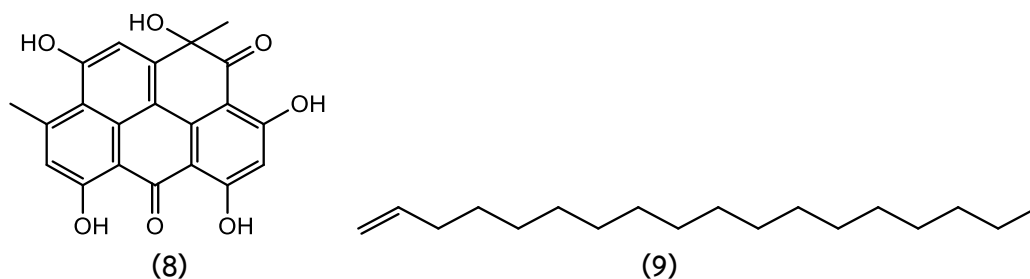
ที่มา: Shinya et al. (1993)

ที่มา: Park and Kwon (2018)

ที่มา: Manimaran and Krishnan (2017)

รูปที่ 2.26 โครงสร้างของสารต้านอนุมูลอิสระที่ผลิตจากสกุล *Streptomyces*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ที่มา: Ramalingam and Rajaram (2016) ที่มา: Padma *et al.*, 2018

รูปที่ 2.26 โครงสร้างของสารต้านอนุมูลอิสระที่ผลิตจากสกุล *Streptomyces* (ต่อ)

2.8 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารทุติยภูมิ

2.8.1 อนุมูลอิสระ (Free Radicals)

อนุมูลอิสระ (Free Radicals) หมายถึง สารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (Unpaired electrons) ในอะตอมหรือโมเลกุล ไม่เสถียร ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบหลักในเซลล์ สามารถกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในสิ่งมีชีวิตที่มีกระบวนการหายใจระดับเซลล์ ปฏิกิริยาออกซิเดชันดังกล่าวเกิดแบบลูกโซ่จากการดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นข้างเคียงมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไปเพื่อให้เกิดความสมดุลหรือเสถียรทำให้มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นได้ตลอดเวลา การเกิดอนุมูลอิสระสามารถเกิดได้หลายกลไกดังนี้ (โอภา, 2550)

1. การแตกของพันธะโควาเลนต์แบบโฮโมไลซิส



2. การได้รับอิเล็กตรอนของอะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า



3. การสูญเสียอิเล็กตรอนของอะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า



อนุมูลอิสระแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มอนุมูลอิสระที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ (reactive oxygen species) สร้างจากไมโทคอนเดรียจากลูกโซ่ถ่ายเทอิเล็กตรอน (electron transport chain) อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นอยู่ในรูปอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (super oxide anion; $O_2 \cdot^-$) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide; H_2O_2) อนุมูลไฮดรอกซิล (hydroxyl radical; $OH \cdot$) อนุมูลไฮโดรเปอร์ออกซิล (hydroperoxyl; $HO_2 \cdot$) ซิงเกิลออกซิเจน (singlet oxygen; 1O_2) เป็นต้น กลุ่มอนุมูลอิสระที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ (reactive nitrogen species) ได้แก่ ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide; $NO \cdot$) และไนโตรเจนไดออกไซด์ (nitrogen dioxide; $NO_2 \cdot^-$, $NO_2 \cdot$)

กลุ่มอนุมูลอิสระที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบ (reactive chlorine species) ได้แก่ อะตอมคลอรีน
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตเห็นไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Cl) เป็นต้นอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์เป็นอนุมูลที่มีความไวในการเกิดปฏิกิริยาสูง และยังเป็นอนุมูลเริ่มแรกในเซลล์ อย่างไรก็ตามอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แทบไม่เป็นอันตรายในสภาวะปกติ แต่อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์สามารถถูกเติมโปรตอน (protonate) กลายเป็นอนุมูลไฮดรอกซิล (hydroperoxyl radical; HO₂[•]) ที่มีความไวต่อปฏิกิริยาสูงกว่า เป็นสาเหตุให้ไขมันถูกเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) นอกจากนี้อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ยังทำปฏิกิริยากับไนตริกออกไซด์ ได้เป็นอนุมูลเปอร์ออกซีไนเตรท (peroxynitrate radical; ONOO[•]) ที่สามารถเติมหมู่นิโตรให้กับโปรตีนต่าง ๆ ในโมเลกุลของเอนไซม์ได้ เช่น การเติมหมู่นิโตรให้กับกรดอะมิโนไทโรซีนในโมเลกุลของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase; SOD) ทำให้เอนไซม์ SOD ไม่สามารถสลายอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ได้ (โอภา, 2550) แม้ว่าอนุมูลอิสระจะส่งผลเสียต่อเซลล์ แต่ในสภาวะปกติร่างกายมีการสร้างอนุมูลอิสระเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เช่น ฟาโกไซต์ (phagocyte) มีการสร้างอนุมูลอิสระเก็บสะสมไว้ เมื่อเกิดการบุกรุกของเชื้อก่อโรคเข้าสู่ร่างกายอนุมูลดังกล่าวจะถูกปลดปล่อยเพื่อทำลายเชื้อก่อโรค เป็นต้น (Pizzino *et al.*, 2017) อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากกลไกนี้มีปริมาณที่ต่ำมากและไม่ส่งผลให้เซลล์ถูกทำลาย นอกจากนี้ร่างกายยังมีกลไกควบคุมและรักษาสมดุลของอนุมูลอิสระไม่ให้มากเกินไปจนส่งผลเสียต่อเซลล์ต่าง ๆ ได้ แต่หากเกิดความผิดปกติขึ้นกับกลไกป้องกันดังกล่าว จนไม่สามารถควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระในร่างกายได้ หรือได้รับอนุมูลอิสระจากสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น รังสีต่าง ๆ มลภาวะ คิวติงจากท่อไอเสียที่ประกอบด้วยไนตรัสออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ ฝุ่น อาหารที่ไหม้เกรียม (วนาพร, 2559) ส่งผลให้อนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น และร่างกายไม่สามารถต่อต้านการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระดังกล่าวได้ จะก่อให้เกิดภาวะการถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล (oxidative stress) (โกสินทร์ และคณะ, 2556) เป็นสาเหตุให้เซลล์ถูกทำลาย เกิดการกลายของดีเอ็นเอในเซลล์ และก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ ได้แก่ โรคชรา (Aging) มะเร็ง (Cancer) หัวใจขาดเลือด (Coronary heart disease) อัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) ข้ออักเสบ (Arthritis) และภูมิแพ้ (Allergies) เกิดความผิดปกติของปอดและระบบประสาท เป็นต้น (วนาพร, 2559)

2.8.2 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ เพื่อกำจัดอนุมูลอิสระให้หมดไป หรือหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ (โอภา, 2550) ป้องกันไม่ให้โมเลกุลหรือเซลล์ถูกทำลาย สารต้านอนุมูลอิสระมีหลายชนิดทั้งที่เป็นเอนไซม์และไม่เป็นเอนไซม์ เช่น เอนไซม์ SOD ทำหน้าที่กำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ โดยเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ให้กลายเป็นไฮดรอกซิลเปอร์ออกไซด์ โดยไฮดรอกซิลเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะถูกกำจัดโดยเอนไซม์คะตาเลส (catalase) และเอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase; GPx) ไฮดรอกซิลเปอร์ออกไซด์สามารถเกิดปฏิกิริยาเพนตันโดยมีไอออนโลหะ Fe²⁺ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาก่อให้เกิดอนุมูลไฮดรอกซิลที่มีความไวต่อปฏิกิริยามากกว่าอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยกันหลายแบบ ดังนี้ (Duangjit *et al.*, 2019)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. การกำจัดอนุมูลอิสระโดยตรง (free radical scavenger) เป็นกลไกยับยั้งอนุมูลอิสระ โดยการให้อะตอมไฮโดรเจนกับอนุมูลอิสระให้มีความเสถียรมากขึ้น (สมการ 2.1-2.4) ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มนี้ ได้แก่ วิตามิน สารประกอบฟีนอล สารบิวทิลไฮดรอกซีโทลูอิน (butylated hydroxytoluene; BHT) บิวทิลไฮดรอกซีอะนิโซล (butylated hydroxyanisole; BHA) โพรพิลแกลเลต (propyl gallate) เป็นต้น



เมื่อ $R\bullet$ และ $RO\bullet$ หมายถึงอนุมูลอิสระ และ AH คือ สารต้านอนุมูลอิสระ

2. การกำจัดออกซิเจน (oxygen scavenger) เป็นกลไกยับยั้งการเกิดออกซิเจน (O_2) ที่เป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดออกซิเดชัน โดยการทำปฏิกิริยากับซิงเกิลออกซิเจน เพื่อเปลี่ยนให้เป็นทริปเพิลออกซิเจน (triplet oxygen; 3O_2) ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มนี้ ได้แก่ วิตามินซี แคโรทีนอยด์ (carotenoids) เป็นต้น

3. สารจับโลหะ (metal chelating agents) เป็นกลไกยับยั้งอนุมูลอิสระโดยการกำจัดไอออนโลหะ เช่น Fe^{2+} Cu^{2+} ทำให้ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มนี้ ได้แก่ กรดซิตริก กรดเอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซิติก (Ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA) เป็นต้น

สารต้านอนุมูลอิสระแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (Synthetic antioxidants) และสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (Natural antioxidants) สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์เกิดจากการกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี เช่น โพรพิลแกลเลต BHA และ BHT เป็นต้น สารสังเคราะห์เหล่านี้มีความคงตัวสูง นิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารมีกลิ่น สี และรสชาติเปลี่ยนแปลงไปแต่มีข้อจำกัดในด้านความปลอดภัยในการบริโภค อีกชนิดหนึ่งคือ สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ มีทั้งเอนไซม์ วิตามินและสารอื่น ๆ ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ เช่น เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส เอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นวิตามิน เช่น วิตามินซี (ascorbic acid) วิตามินอี (vitamin E) สารต้านอนุมูลอิสระอื่น ๆ เช่น แคโรทีนอยด์ (carotenoids) และยูบิควิโนน (ubiquinone) จากรายงานแสดงให้เห็นว่าการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บริโภคสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ในปริมาณสูงอาจส่งผลเสียต่อสุขภาพ ผู้บริโภคส่วนใหญ่จึงหันมาสนใจบริโภคผลิตภัณฑ์ต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ ในด้านต่าง ๆ เช่น เครื่องสำอาง เกษษัณท์ และผลิตภัณฑ์ดูแลสุขภาพ เนื่องด้วยเหตุผลด้านความปลอดภัยที่อาจจะมีมากกว่าการบริโภคสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (Duangjit *et al.*, 2019)

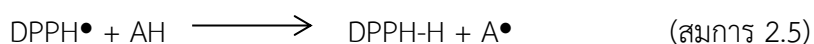
2.8.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity determination)

(วนาพร, 2559)

วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างประเภทต่าง ๆ ที่นิยม ได้แก่ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH•) วิธีการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS•+) และการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (FRAP assay) โดยการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งหรือกำจัดอนุมูลอิสระของตัวอย่างด้วยอนุมูลอิสระที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน วัดปริมาณอนุมูลอิสระที่เหลือ โดยคำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างหลังทำปฏิกิริยาแล้ว ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณอยู่ในรูปแบบของร้อยละการยับยั้ง (percentage of inhibition) ค่าร้อยละที่สูงแสดงถึงความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของตัวอย่างนั้นสูง อีกรูปแบบหนึ่งคือค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (half maximal inhibitory concentration; IC50) ค่าความเข้มข้นที่ต่ำแสดงถึงความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของตัวอย่างนั้นสูง

2.8.3.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (Diphenyl-picrylhydrazyl radical scavenging assay; DPPH assay)

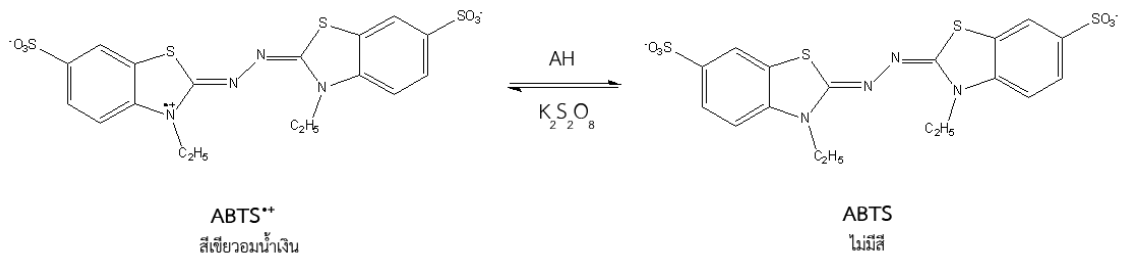
เป็นการทดสอบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระ คืออนุมูลอิสระดีพีพีเอช (diphenyl-picrylhydrazyl radical; DPPH•) เป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัว มีสีม่วง สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เมื่อ DPPH• ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ ทำให้สีม่วงจางลงจนเป็นสีเหลือง (สมการ 2.5) (รูปที่ 2.27) การทดสอบจำเป็นต้องตั้งสารละลายผสม DPPH• และสารตัวอย่างเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาในที่มีดเป็นเวลา 30 นาทีก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง วิเคราะห์การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงของอนุมูลอิสระ DPPH• ก่อนทำปฏิกิริยากับค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงของ DPPH• หลังทำปฏิกิริยากับตัวอย่างแล้ว (สมการ 2.6)



$$\text{ร้อยละการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH (\%)} = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100 \quad (\text{สมการ 2.6})$$

โดย A_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น และ A_s = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

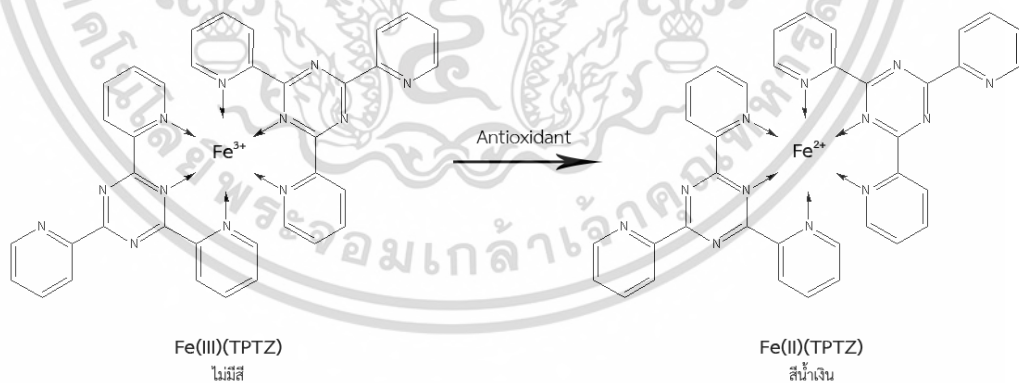
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.28 ปฏิกิริยาของอนุมูล $\text{ABTS}^{\bullet+}$ กับสารต้านอนุมูลอิสระ
ที่มา: วนาพร (2559)

2.8.3.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (บุหรัน, 2556)

วิธีนี้อาศัยหลักการถ่ายเทอิเล็กตรอนของสารต้านอนุมูลอิสระให้กับสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2]^{3+}$ (ferric tripyridyl triazine) กลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ (ferrous tripyridyl triazine) มีสีน้ำเงิน (รูปที่ 2.29) ดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร สารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นสามารถนำมาประเมินความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างในรูป FRAP value เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต (ferrous sulfate; FeSO_4) ข้อดีของวิธีนี้คือ ง่าย ใช้เวลาน้อย ราคาไม่แพง สามารถทำซ้ำแล้วให้ผลเหมือนเดิม แต่มีข้อเสียคือปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในร่างกาย



รูปที่ 2.29 ปฏิกิริยาของ FRAP กับสารต้านอนุมูลอิสระ
ที่มา: วนาพร (2559)

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Huang *et al.* (2018) ได้ทำการศึกษาแอกติโนมัยสีท ซึ่งแยกได้จากโคลนของป่าชายเลน ในประเทศจีน จากการระบุสายพันธุ์ด้วยอนุกรมวิธานแบบหลายส่วน (Polyphasic taxonomy) ด้วยการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าสปอร์มีทั้งลักษณะตรง สายโซ่เอกสาร์เป็นเอกสาร์ที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยามให้เห็นไปไขว้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สปอร์เป็นเกลียว สปอร์มีพื้นผิวเรียบ และจากการศึกษาลักษณะทางจีโนมไทป์ ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอ 16S rRNA พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces speibonae* NRRL B-24240^T มากที่สุดที่ร้อยละความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ ร้อยละ 98.7 จากผลการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ จีโนมไทป์และแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ (phylogenetic tree) พบว่าแอกติโนมัยซีทที่แยกได้เป็นแอกติโนมัยซีทในสกุล *Streptomyces* และเป็นสายพันธุ์ใหม่ มีชื่อว่า *Streptomyces caeni* HA15955^T

Wang *et al.* (2015) ได้ทำการศึกษาแอกติโนมัยซีท ซึ่งแยกได้จากดินของป่าชายเลน ในประเทศจีน จากการระบุสายพันธุ์ด้วยอนุกรมวิธานแบบหลายส่วน (Polyphasic taxonomy) พบว่าไฮโซเลตดังกล่าวสามารถสร้างเส้นใยอากาศสีขาว และเส้นใยอาหารสีเหลืองอ่อน จากการศึกษาลักษณะสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าสปอร์มีลักษณะตรง สายโซ่สปอร์เป็นเกลียว ผิวสปอร์มีลักษณะเป็นหนาม จากการทดสอบทางอนุกรมวิธานเคมีพบว่าผนังเซลล์ประกอบด้วยกรดไคโอะมิโนพิเมติก แบบ LL-DAP พบกรดไขมันแบบ iso-C_{16:0} anteiso-C_{15:0} และ iso-C_{17:0} จากการศึกษาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอ 16S rRNA พบว่าแอกติโนมัยซีทที่แยกได้อยู่ในสกุล *Streptomyces* จากการศึกษาอนุกรมวิธานทำให้ทราบว่า *Streptomyces* ดังกล่าวเป็น *Streptomyces* สายพันธุ์ใหม่ มีชื่อว่า *Streptomyces mangrovi* HA11110^T

Law *et al.* (2019) ได้ค้นพบ *Streptomyces* สายพันธุ์ใหม่ที่มีชื่อว่า *Streptomyces monashensis* MUSC 1J^T ซึ่งแยกได้จากดินป่าชายเลน โดยการระบุสายพันธุ์ของ *Streptomyces* ดังกล่าวจะใช้การศึกษาอนุกรมวิธานหลายส่วน (Polyphasic taxonomy) จากการศึกษาวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการพบว่า มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces corchorusii* DSM 40340^T *Streptomyces olivaceoviridis* NBRC 13066^T *Streptomyces canarius* NBRC 13431^T และ *Streptomyces coacervatus* AS-0823^T มากที่สุด และการวิเคราะห์จีโนมทั้งหมด (whole genome) พบว่ามีปริมาณเบสกวีนีนและไซโตซีน (G+C content) อยู่ที่ 71 โมลเปอร์เซ็นต์ และมีค่า DNA-DNA hybridization เทียบกับสายพันธุ์ใกล้เคียงอยู่ที่ร้อยละ 19.7 ถึง ร้อยละ 49.1 จากข้อมูลทั้งหมดจึงสรุปได้ว่า *Streptomyces* ดังกล่าวเป็น *Streptomyces* สายพันธุ์ใหม่

Li *et al.* (2019) ได้ทำการแยกแอกติโนมัยซีททางทะเล 2 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากฟองน้ำทะเล ประเทศจีน จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา อนุกรมวิธานเคมี และแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ พบว่าทั้งสองสายพันธุ์เป็นแอกติโนมัยซีทในสกุล *Streptomyces* ทั้ง 2 สายพันธุ์สร้างสายสปอร์แบบตะขอและแบบลูกปัด ผิวสปอร์แบบเรียบ มีกรดไคโอะมิโนพิเมติกแบบ LL พบเมนาควิโนนแบบ MK-9 (H₉) พบไขมันมีหัว ใต้ แก่' diphosphatidylglycerol phosphatidylethanolamine และ phosphatidylglycerol พบกรดไขมัน iso-C_{16:0} anteiso-C_{15:0} และ anteiso-C_{17:0} จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนช่วงยีน 16S rRNA การวิเคราะห์ Multilocus sequence (MLSA) ค่า Average Nucleotide Identity (ANI) และค่า digital DNA-DNA hybridization (dDDH) สามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยืนยันได้ว่า *Streptomyces* ทั้ง 2 สายพันธุ์ที่แยกได้เป็น *Streptomyces* สายพันธุ์ใหม่ มีชื่อว่า *Streptomyces reniochaliniae* LHW50302^T และ *Streptomyces diacami* LHW51701^T

Jeya *et al.* (2013) ได้ทำการศึกษาและระบุสายพันธุ์ของ *Streptomyces* ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างดิน จากการศึกษาฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค พบว่าสารสกัดหยาบที่สกัดได้จาก *Streptomyces* ที่แยกได้สามารถต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้

Jorgensen *et al.* (2009) ได้ทำการศึกษาเพื่อหาสารต้านเชื้อราซึ่งได้จากแอกติโนมัยสิตที่แยกจากตัวอย่างดินตะกอนในประเทศนอร์เวย์ จากการศึกษาสายพันธุ์พบว่าแอกติโนมัยสิตที่แยกได้เป็นแอกติโนมัยสิตในสกุล *Streptomyces* ที่มีชื่อว่า *Streptomyces griseus* IMRU 3570 โดยทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา และนำไประบุชนิดของสารต้านเชื้อราโดยนำสารสกัดไปวิเคราะห์ด้วย LC-TOF MS พบว่าสารต้านเชื้อราที่ได้ นั้นเป็นสารในกลุ่ม Polyene macrolide ที่มีชื่อว่า Candicidin D

Choi *et al.* (2019) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ Germicidin A และ B จากแอกติโนมัยสิตสกุล *Streptomyces* ซึ่งแยกได้จากทะเลด้วยวิธีทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS พบว่าสารทั้ง 2 ตัวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีมาก

Kemung *et al.* (2020) ได้ทำการแยกแอกติโนมัยสิตจากดินของป่าชายเลน ประเทศมาเลเซีย จากการศึกษาสายพันธุ์ด้วยลักษณะทางฟีโนไทป์และจีโนไทป์ พบว่าเป็นแอกติโนมัยสิตในสกุล *Streptomyces* จากการนำสารสกัดหยาบในส่วนของเมทานอลมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ABTS และ การจับโลหะ (metal chelating) พบว่าสารสกัดในส่วนของเมทานอลของ *Streptomyces* สายพันธุ์ MUSC 14 แสดงฤทธิ์ที่ดี โดยมีร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระและดักจับโลหะอยู่ที่ ร้อยละ 62.71 24.71 และ 55.82 ตามลำดับ

Pu *et al.* (2011) ได้ทำการศึกษาสารทุติยภูมิชนิดใหม่ N-trans-cinnamoyl 2-amino-3a,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,13a-dodecahydrocyclohexadecahydro[1,2-b]oxazole ที่ผลิตมาจากสกุล *Streptomyces* สารดังกล่าวสามารถแยกได้จากน้ำหมักของ *Streptomyces* สายพันธุ์ CIBYL1 และถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารที่แยกได้ด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี ได้แก่ Optical rotation (OR) Infrared spectrum (IR) Mass spectrum (HRMS) 1D-NMR และ 2D-NMR พบว่าสารที่แยกได้เป็นสารในกลุ่ม cyclohexadecahydro[1,2-b]oxazole ชนิดใหม่

Wang *et al.* (2018) ค้นพบสารในกลุ่ม Manumycin ชนิดใหม่ 2 ชนิดซึ่งแยกมาได้จากแอกติโนมัยสิตในสกุล *Streptomyces* ที่อยู่บนผิวผึ้ง (*Osmia cornifrons*) จากการศึกษาวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารที่แยกได้โดยใช้เทคนิคทางสเปกโตรสโกปี ได้แก่ HRESIMS IR 1D-NMR และ 2D-NMR และเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้ออกมาวิจัยที่มีอยู่พบว่าสารที่แยกได้นั้นเป็นสารชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ และถูกตั้งชื่อว่า cornifronin A และ cornifronin B

Kornsakulkarn *et al.* (2014) ได้ทำการแยกสารทุติยภูมิจากแอกติโนมัยสิตในสกุล *Streptomyces* จากการศึกษาวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค NMR spectroscopic และ เทคนิคไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mass spectrometric พบว่าสารที่แยกได้เป็นสารในกลุ่ม quinazolinones 4 ชนิด สาร 4-phenylbut-3-enamide สาร 2-acetamidobenzamide สาร 1H-indole-3-carbaldehyde และ 2-phenylacetamide โดยหนึ่งในสารที่พบทั้งหมด มีสาร 2-(1H-indol-3-yl)quinazolin-4-(3H)-one ซึ่งเป็นสารชนิดใหม่ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero ที่ค่า IC50 3.30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Takai *et al.* (1963) ได้ทำการแยกสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth regulator) จากแอคติโนมัยซีทในสกุล *Actinomyces* สายพันธุ์ N-29 พบว่าสารที่แยกได้เป็นผลึกที่ไม่มีสี มีจุดหลอมเหลวอยู่ที่ 152 ถึง 154 องศาเซลเซียส จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี จากอินฟราเรดเพกตรัมและอัลตราไวโอเล็ตสเปกตรัม รวมกับข้อมูลจุดหลอมเหลวทำให้สรุปได้ว่าสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่แยกได้นั้นคือสาร 2-phenylacetamide



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 การแยกแอคติโนมัยสีทไอโซเลต C1-2

แอคติโนมัยสีทไอโซเลต C1-2 ถูกแยกจากดินป่าชายเลน จังหวัดเพชรบุรี โดยนำตัวอย่างดิน 1 กรัม ละลายในน้ำทะเลปราศจากจากเชื้อ 10 มิลลิลิตร ที่เติมสารละลายโซเดียมลอริลซัลเฟต (SLS) ร้อยละ 0.01 แอคติโนมัยสีทไอโซเลต C1-2 ถูกเก็บรักษาโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง yeast extract-malt extract (ISP2) ที่ผสมน้ำทะเล และในสารละลายกลีเซอรอลร้อยละ 20 ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสสำหรับการเก็บรักษาในระยะยาวเพื่อใช้ในการทดลองอื่น ๆ ต่อไป

3.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของไอโซเลต C1-2

3.2.1 การศึกษาลักษณะฟีโนไทป์ (phenotypic characterization)

3.2.1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characterization)

แอคติโนมัยสีทไอโซเลต C1-2 ถูกเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง yeast extract-malt extract (ISP2) (Shirling and Gottlieb, 1966; ภาคผนวก ก) ที่ผสมน้ำทะเล เป็นเวลา 14 วัน นำมาส่องดูลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่มีเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance objective lens) กำลังขยาย 40 เท่า สังเกตลักษณะของเส้นใยอาหาร เส้นใยอากาศ และเปรียบเทียบสีของเส้นใยอาหาร เส้นใยอากาศ สารสีละลายน้ำ ด้วยตารางสีมาตรฐาน NBS/IBCC (Kelly, 1964; ภาคผนวก ค) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์ ได้แก่ การจัดเรียงตัวและพื้นผิวของสปอร์ ศึกษาโดยการส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) ยี่ห้อ JEOL InTouchScope รุ่น JSM-IT500HR ของศูนย์เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.1.2 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี (physiological and biochemical characterization)

1. ความสามารถในการย่อยแป้ง (starch hydrolysis)

เพาะเลี้ยงไอโซเลต C1-2 บนอาหารแข็ง inorganic salts-starch (ISP4) (Shirling and Gottlieb, 1966; ภาคผนวก ก) ผสมน้ำทะเล ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน เมื่อครบเวลานำสารละลายไอโอดีนราดลงบนผิวหน้าอาหาร หากเชื้อสามารถย่อยแป้งได้จะเกิดโซนใสรอบโคโลนี หากไม่สามารถย่อยแป้งได้บริเวณที่ไม่ถูกย่อยจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน (Williams and Cross, 1971)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ความสามารถในการย่อยเจลาติน (gelatin liquefaction)

เพาะเลี้ยงไอโซเลต C1-2 ในอาหารเหลวเจลาติน (bouillon gelatin broth) (Arai *et al.*, 1975; ภาคผนวก ก) ผสมน้ำทะเล บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน เมื่อครบเวลานำหลอดอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 30 นาที หากเกิดการย่อยเจลาตินอาหารจะมีลักษณะเหลว

3. ความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรท (nitrate reduction)

เพาะเลี้ยงไอโซเลต C1-2 ในอาหารเหลว peptone KNO₃ (ภาคผนวก ก) ผสมน้ำทะเล ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจผลการทดลองโดยหยดกรดซัลฟานิลิก (sulfanilic acid) (ภาคผนวก ข) จำนวน 2 หยด จากนั้นหยดสารละลาย N,N-dimethyl-1-naphthylamine (ภาคผนวก ข) จำนวน 3 หยด หากสามารถรีดิวซ์ไนเตรท (NO₃) ให้เป็นไนไตรท์ (NO₂) ได้ อาหารจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูแดง (Li *et al.*, 2016)

4. ความสามารถในการย่อยโปรตีนในนม (peptonization and coagulation of milk)

เพาะเลี้ยงไอโซเลต C1-2 ในอาหารแข็ง skim milk ความเข้มข้นร้อยละ 10 (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน หากเกิดการย่อยโปรตีนในนมจะเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี (Li *et al.*, 2016)

เพาะเลี้ยงไอโซเลต C1-2 ในอาหารเหลว skim milk ความเข้มข้นร้อยละ 10 (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน หากเกิดการย่อยโปรตีนในนมจะเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี (Li *et al.*, 2016)

5. การใช้แหล่งคาร์บอน (carbon utilization)

เพาะเลี้ยงไอโซเลต C1-2 บนอาหาร basal agar medium (ISP9) (Shirling and Gottlieb, 1966; ภาคผนวก ก) ผสมน้ำทะเล เติมแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ ได้แก่ กลูโคส (glucose) (ตัวควบคุมเชิงบวก) เซลโลไบโอส (cellobiose) ฟรุคโตส (fructose) กาแลคโตส (galactose) แมนโนส (mannose) เมลิไบโอส (melibiose) ราฟฟิโนส (raffinose) ไรโบส (ribose) ไซโลส (xylose) อะราบิโนส (arabinose) แรมโนส (rhamnose) อินอซิทอล (inositol) แลคโตส (lactose) แมนนิทอล (mannitol) ซูโครส (sucrose) ร้อยละ 1 และไม่เติมแหล่งคาร์บอน (ตัวควบคุมเชิงลบ) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน หากเชื้อสามารถเจริญได้มากกว่าหรือเท่ากับตัวควบคุมเชิงบวกให้ผลเป็นบวก (positive; +) หากสามารถเจริญได้น้อยกว่าตัวควบคุมเชิงบวกแต่มากกว่าตัวควบคุมเชิงลบให้ผลเป็นบวกอย่างอ่อน (weak positive; w) หากเจริญได้น้อยกว่าหรือเท่ากับตัวควบคุมเชิงลบให้ผลลบ (negative; -)

6. การใช้แหล่งไนโตรเจน (nitrogen utilization)

เพาะเลี้ยงไอโซเลต C1-2 บนอาหารแข็ง basal medium (Li *et al.*, 2016; ภาคผนวก ก) ผสมน้ำตาลเล เต็มแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ ได้แก่ แอสพาราจिन (asparagine) (ตัวควบคุมเชิงบวก) กรดอะมิโนบิวทีริก (aminobutyric acid) อาร์จินีน (arginine) ซิสทีน (cysteine) ฮิสทีดีน (histidine) ไฮดรอกซีโพรลีน (hydroxy-proline) เมไทโอนีน (methionine) ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) โพรลีน (proline) ซีรีน (serine) ทรีโอนีน (threonine) วาลีน (valine) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และไม่เติมแหล่งไนโตรเจน (ตัวควบคุมเชิงลบ) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน หากเชื้อสามารถเจริญได้มากกว่าหรือเท่ากับตัวควบคุมเชิงบวกให้แปรผลเป็นบวก (positive; +) หากสามารถเจริญได้น้อยกว่าตัวควบคุมเชิงบวกแต่มากกว่าตัวควบคุมเชิงลบให้แปรผลเป็นบวกอย่างอ่อน (weak positive; w) หากเจริญได้น้อยกว่าหรือเท่ากับตัวควบคุมเชิงลบให้แปรผลเป็นลบ (negative; -)

7. การย่อยสลายสารไม่ละลายน้ำ (decomposition of insoluble compounds)

เพาะเลี้ยงไอโซเลต C1-2 บนอาหารแข็ง ISP2 (Shirling and Gottlieb, 1966; ภาคผนวก ก) ผสมน้ำตาลเล เต็มสารไม่ละลายน้ำ ได้แก่ ไทโรซีน (tyrosine) ไฮโปแซนทีน (hypoxanthine) แซนทีน (xanthine) อะดีนีน (อะดีนีน) และเซลลูโลส (cellulose) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน หากเชื้อสามารถย่อยสลายสารไม่ละลายน้ำได้ จะเกิดโซนใสบริเวณรอบโคโลนี (Lechevalier *et al.*, 1986)

8. ความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ (NaCl tolerance)

เพาะเลี้ยงไอโซเลต C1-2 บนอาหารแข็ง ISP2 (Shirling and Gottlieb, 1966; ภาคผนวก ก) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0-15 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อ

9. ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ (temperature tolerance)

เพาะเลี้ยงไอโซเลต C1-2 บนอาหารแข็ง ISP2 (Shirling and Gottlieb, 1966; ภาคผนวก ก) ผสมน้ำตาลเล บ่มที่อุณหภูมิ 4 10 15 20 25 30 37 40 45 50 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อ

10. ความสามารถในการย่อยสลายยูเรีย (decomposition of urea)

เพาะเลี้ยงไอโซเลต C1-2 บนอาหารแข็ง urea ความเข้มข้นร้อยละ 2 (Gordon *et al.*, 1974; ภาคผนวก ก) ผสมน้ำตาลเล บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน หากเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้ อาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีชมพู

11. การทดสอบเอนไซม์คะตาเลส (catalase test)

เพาะเลี้ยงไอโซเลต C1-2 บนอาหารแข็ง ISP2 (Shirling and Gottlieb, 1966; ภาคผนวก ก) ผสมน้ำทะเล บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ใช้ไม้จิ้มฟันปราศจากเชื้อเชื้อโคโลนีเกลี่ยลงบนสไลด์แก้ว หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้นร้อยละ 3 ลงไปบนโคโลนี หากเชื้อมีการสร้างเอนไซม์คะตาเลสจะเกิดฟองแก๊สขึ้นภายในเวลา 30 วินาที (Gledhill and Casida, 1969)

12. การทดสอบเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase test)

เพาะเลี้ยงไอโซเลต C1-2 บนอาหารแข็ง ISP2 (Shirling and Gottlieb, 1966 ภาคผนวก ก) ผสมน้ำทะเล บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ใช้ไม้จิ้มฟันปราศจากเชื้อเชื้อโคโลนีเกลี่ยลงบนกระดาษกรองที่หยดสารละลาย N, N, N', N',-tetramethyl-p-phenylenediamine-dihydrochloride (TMPPD) ความเข้มข้นร้อยละ 1 (ภาคผนวก ข) หากเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ออกซิเดสกระดาษกรองจะเปลี่ยนเป็นม่วงภายในเวลา 90 วินาที (Steel, 1961)

13. ความสามารถในการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (hydrogen sulfide production)

ใช้เข็มเย็บเชื้อ (needle) เย็บโคโลนีของไอโซเลต C1-2 จากนั้นนำมาแทง (stab inoculation) ลงในอาหารแข็ง triple iron sugar (TSI) (ภาคผนวก ก) ใช้ปลายเข็มขีด (simple streak) บนผิวหน้าอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน หากเชื้อมีการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์อาหารจะเปลี่ยนเป็นสีดำ (Coleman *et al.*, 1969)

3.2.2 การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี (chemotypic characterization)

ศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีโดยการวิเคราะห์ไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิก (diaminopimelic acid analysis) ในผนังเซลล์ เพาะเลี้ยงไอโซเลต C1-2 ในอาหารเหลว ISP2 (Shirling and Gottlieb, 1966; ภาคผนวก ก) ผสมน้ำทะเล ในสภาวะเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน นำน้ำหมักไปปั่นเหวี่ยง ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จนไม่มีอาหารเลี้ยงเชื้อหลงเหลืออยู่ นำเซลล์ที่ได้ไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dryer) ย่อยเซลล์แห้งของไอโซเลต C1-2 10 มิลลิกรัม ด้วย 6N HCL ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง กรองแล้วนำส่วนที่กรองได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ละลายตัวอย่างที่แห้งแล้วด้วยน้ำกลั่น และนำไประเหยแห้งอีกครั้ง จากนั้นนำมาละลายด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐาน (LL- และ meso-2,6-diaminopimelic acid) จุดลงบนโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบางที่มีเซลลูโลสเป็นเฟสคงที่ (HPTLC cellulose) ขนาด 10x10 เซนติเมตร จากนั้นนำไปแช่ (develop) ในตัวทำละลายผสม เมทานอล: น้ำ: 6N HCL: ไพริดีน ในอัตราส่วน 80: 26: 4: 10 รอให้แห้งแล้วนำไป develop ในตัวทำละลายผสมอีกครั้ง เมื่อแห้งนำมาฉีดพ่นด้วยสารละลายนินไฮดริน (ภาคผนวก ข) รอให้แห้งแล้วนำไปอบในตู้อบลมร้อน เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตเห็นาไปขอประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เปรียบเทียบจุด (spot) ที่เกิดขึ้นได้กับสารละลายมาตรฐาน (Komagata and Suzuki, 1988)

3.2.3 การศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ (genotypic characterization)

3.2.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

เพาะเลี้ยงไอโซเลต C1-2 ในอาหารเหลว ISP2 (Shirling and Gottlieb, 1966; ภาคผนวก ก) ผสมน้ำทะเล ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นทำการแยกตะกอนเซลล์ออกจากน้ำหมักด้วยการนำไปปั่นเหวี่ยง ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนเซลล์ที่ได้ด้วยสารละลายไดโซเดียมอีดีทีเอ (disodium EDTA) พีเอช 8.0 (ภาคผนวก ข) จนกว่าจะปราศจากอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปเติมไลโซไซม์ (lysozyme) เล็กน้อย บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate; SDS) ความเข้มข้นร้อยละ 10 (ภาคผนวก ข) บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำการเติมสารละลายฟีนอล: คลอโรฟอร์ม (1:1) (ภาคผนวก ข) ผสมให้เข้ากันอย่างเบามือโดยการกลับหลอดไปมาเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่ลงไปในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ ทำการเติมเอทานอลที่เย็นจัด กลับหลอดไปมาเบาๆ จะสังเกตเห็นตะกอนดีเอ็นเอเกิดขึ้น ดูดส่วนสารละลายออกไป จากนั้นนำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไปผึ่งให้แห้งบนกระดาษทิชชูปราศจากเชื้อ (ดัดแปลงจาก Tamaoka, 1994)

3.2.3.2 การทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์

ดีเอ็นเอที่ได้จะถูกนำมาละลายด้วยน้ำบริสุทธิ์สูง (ultrapure water) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเติมสารละลาย RNase (ภาคผนวก ข) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน เติมสารละลาย Proteinase K (ภาคผนวก ข) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำการเติมสารละลายฟีนอล: คลอโรฟอร์ม (1:1) และตกตะกอนดีเอ็นเอตามข้อที่ 3.4.2.1 (ดัดแปลงจาก Andreou, 2013)

3.4.3.3 การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA

การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) นำดีเอ็นเอที่แยกได้ เอนไซม์พอลิเมอเรส ไพรเมอร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ dNTPs บัฟเฟอร์ และน้ำบริสุทธิ์สูง (ตารางที่ 3.1) ใส่ลงในหลอดพีซีอาร์ (PCR tube) ผสมให้เข้ากัน นำไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง Thermal cycler (Tamaoka, 1994) (ตารางที่ 3.2)

ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

สารเคมี	ความเข้มข้น	ปริมาตร
Primer: 27F	10.0 μ M	5.0 μ l
primer: 1492R	10.0 μ M	5.0 μ l
dNTPs	2.0 mM	8.0 μ l
10X <i>Taq</i> buffer	10X	0.5 μ l
MgCl ₂	25.0 mM	8.0 μ l
<i>Taq</i> DNA Polymerase	5 U/ μ l	0.5 μ l
Ultrapure water	-	61.5 μ l
Template DNA	100-200 ng/ μ l	2.0 μ l
รวม		100 μ l

ตารางที่ 3.2 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ (cycle)
Initial denaturation	94 องศาเซลเซียส	3 นาที	1
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	40
Annealing	56 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	90 วินาที	
Final extension	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	1

3.2.3.4 การทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR Product) ให้มีความบริสุทธิ์

ทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน 16S rRNA ให้มีความบริสุทธิ์โดยใช้ FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit (Favorgen, Taiwan) นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำฟอว์ FADF ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำสารละลายที่ได้ใส่ในคอลัมน์ FADF ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนของเหลวที่ตกจากคอลัมน์ทิ้ง จากนั้นเติมน้ำ wash buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนของเหลวที่ตกจากคอลัมน์ทิ้ง นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 13500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ย้ายคอลัมน์ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์หลอดใหม่ เติมน้ำ Elution buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงตรงกลางคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) โดยใช้เจลอะกาโรส (agarose gel) ความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ร้อยละ 0.8 เป็นตัวกลาง และเครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ (nanodrop spectrophotometer) ก่อนนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธีของ Sanger (sanger's sequencing) ของ Frist base Laboratory Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย

3.2.3.5 การสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic Analysis)

เปรียบเทียบ (blast) ลำดับนิวคลีโอไทด์บนช่วงยีน 16S rRNA กับฐานข้อมูล Ezbiocloud (<https://www.ezbiocloud.net/identify>) (Yoon *et al.*, 2017) นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลต C1-2 และสายพันธุ์ใกล้เคียงทั้งหมดมาจัดเรียง (multiple Alignment) โดยใช้โปรแกรม Bioedit เวอร์ชัน 7.0.5.3 (Hall, 1999) สร้างแผนภูมิต้นไม้ ด้วยวิธี Neighbor-joining วิธี Maximum-Likelihood และวิธี Maximum Parsimony โดยใช้แบบจำลอง Kimura's 2 parameter (Kimura, 1980) ด้วยโปรแกรม MEGA เวอร์ชัน 7 (Tamura *et al.*, 2013) ที่ค่าความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstrap) 1000 ครั้ง (Felsenstein, 1985)

3.2.3.6 การวิเคราะห์จีโนมทั้งหมด (whole genomes analysis) และชีวสารสนเทศ (Bioinformatics)

วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ตามข้อที่ 3.4.2.1 และทำให้บริสุทธิ์ตามข้อที่ 3.4.2.2 ด้วยเครื่อง illumina Miseq 1 TB platform (illumina Inc. San Diego, US-CA) ของศูนย์วิทยาศาสตร์โอมิกส์และชีวสารสนเทศ (Omics sciences and bioinformatics center) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเชื่อมต่อกัน (assembly) ด้วยโปรแกรม SPAdes เวอร์ชัน 3.10.179 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เชื่อมต่อแล้วถูกใช้ในการวิเคราะห์ด้านต่าง ๆ ดังนี้ ทำนายยีน (annotation) ด้วยเซิร์ฟเวอร์ออนไลน์ Rapid Annotations using Subsystems Technology (RAST) เวอร์ชัน 2.0 (<https://rast.nmpdr.org>) คำนวณค่า Average Nucleotide Identity (ANI) และ digital G+C content โดยใช้อัลกอริทึม ANI-MUMmer (ANIm) บนบริการออนไลน์ของ JSpeciesWS (<http://jspecies.ribohost.com/jspeciesws>) วิเคราะห์ค่า digital DNA-DNA hybridization (dDDH) โดยใช้ Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC) เวอร์ชัน 2.1 บนบริการออนไลน์ของ DSMZ (<https://www.dsmz.de/services/online-tools/genome-to-genome-distance-calculator-ggdc>) สร้างแผนที่จีโนมแบบวงกลม (genome circular map) ด้วยโปรแกรม CGview แสดงผลการทำนายยีนและการแบ่งกลุ่มตาม COG (Clusters of Orthologous Groups) สร้างแผนที่เชื่อมโยง (synteny map) วิเคราะห์ความคล้ายคลึงของตำแหน่งยีนของไอโซเลต C1-2 และสายพันธุ์ใกล้เคียง ด้วยโปรแกรม Artemis Comparison Tools (ACT) สร้างแผนภูมิต้นไม้จีโนม (phylogenomic tree) ด้วย Type Strain (genome) server ของ DSMZ (<https://tygs.dsmz.de>) วิเคราะห์กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิด้วยบริการออนไลน์ของ anti-SMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org>)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 การแยกสารทุติยภูมิให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

3.3.1 การสกัดสารสกัดหยาบ (extraction of crude extract)

เพาะเลี้ยงไอโซเลต C1-2 ในอาหารเหลว ISP2 ผสมน้ำตาลเล พีเอช 8.0 ในสภาวะเขย่า 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน นำน้ำหมักมากรองผ่านกระดาษกรอง (Whatman no.1) ส่วนของน้ำหมักถูกสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate) อัตราส่วน 1:1 สกัดซ้ำ 3 ครั้ง (liquid-liquid extraction) นำชั้นเอทิลอะซิเตทมาระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator) อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (Ahsan *et al.*, 2017) จะได้สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate crude extract) ส่วนของตัวเซลล์สกัดโดยการแช่ในเมทานอล (maceration) ในที่มืด เป็นเวลา 2 วัน เมื่อครบเวลานำมากรองผ่านกระดาษกรอง (Whatman no.1) นำชั้นเมทานอลมาระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary Evaporator) อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (Abd-Ellatif *et al.*, 2019) จะได้สารสกัดหยาบในชั้นเมทานอล (methanolic crude extract) เก็บรักษาสารสกัดหยาบที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

ในส่วนของการเพาะเลี้ยงขนาดใหญ่ (large scale fermentation; 20 L) น้ำหมักและตัวเซลล์ของไอโซเลต C1-2 ถูกสกัดรวมกันด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท อัตราส่วน 1:1 สกัดซ้ำ 3 ครั้ง ได้สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตท (1551.1 mg) เพื่อนำไปแยกองค์ประกอบทางเคมีต่อไป

3.3.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (chemical profiling analysis)

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์จากไอโซเลต C1-2 ในรูปสารละลายด้วยเครื่องแยกของเหลวสมรรถสูง (High Performance Liquid chromatography; HPLC) ของ Thermo Fisher Scientific Dionex Ultimate 3000 โดยใช้คอลัมน์ C-18 Purospher RP-18 (2x55 mm; 3 μ m) เป็นเฟสคงที่ (stationary phase) และเฟสคงที่ (mobile phase) แบบ gradient อะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile) ร้อยละ 0-100 ต่อน้ำผสมกรดฟอร์มิก (formic acid) ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

3.3.3 การแยกสารทุติยภูมิด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (isolation of secondary metabolites by column chromatography)

สารสกัดหยาบจากไอโซเลต C1-2 ถูกแยกผ่าน sephadex LH-20 (4.5 x 28 cm) ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (column chromatography) ด้วยเฟสเคลื่อนที่เมทานอลต่อไดคลอโรมีเทน อัตราส่วน 7:3 เก็บส่วนตัวอย่างสาร (fraction) ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อ 1 ส่วน วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของส่วนที่เก็บได้ตามข้อที่ 3.5.2 รวมส่วนที่มีองค์ประกอบทางเคมีชนิดเดียวกัน เพื่อใช้ในการทำสารให้บริสุทธิ์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.4 การทำสารบริสุทธิ์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (purification of compounds by high performance liquid chromatography)

จากการแยกสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ และรวมส่วนที่มีองค์ประกอบทางเคมีชนิดเดียวกัน ได้สารทั้งหมด 6 ส่วน ส่วนที่สนใจ ได้แก่ ส่วนที่ 3 (F3) ส่วนที่ 4 (F4) และส่วนที่ 5 (F5) ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) โดยใช้สภาวะต่าง ๆ (รูปที่ 3.1) ดังนี้

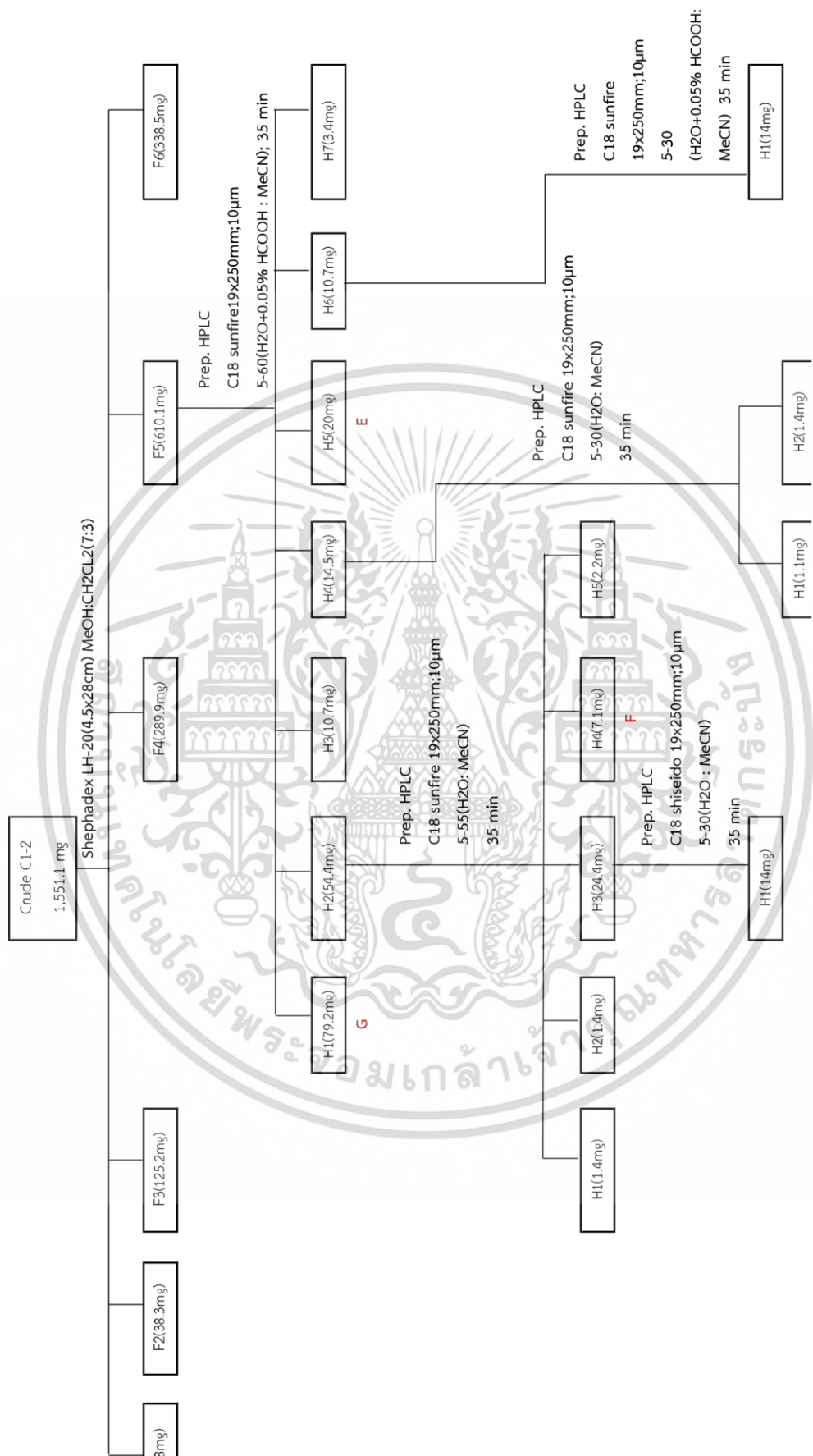
ส่วนที่ 3 (F3) แยกด้วยคอลัมน์แบบ preparative ของ sunfire (10 μm , 19x250 mm) โดยใช้เฟสเคลื่อนที่แบบ gradient ด้วยตัวทำละลายอะซิโตนไนโตรไร้อยู่ 5-45 ต่อน้ำกลั่นที่ผสมกรดฟอร์มิกร้อยละ 0.05 อัตราการไหลของตัวทำละลาย 12 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ได้ส่วนย่อย (subfractions) ทั้งหมด 4 ส่วนย่อย ได้แก่ F3H1-F3H4 โดยส่วนย่อย F3H3 ระบุให้เป็นสาร B และส่วนย่อย F3H4 ระบุให้เป็นสาร C

ส่วนที่ 4 (F4) แยกด้วยคอลัมน์แบบ preparative ของ sunfire (10 μm , 19x250 mm) โดยใช้เฟสเคลื่อนที่แบบ gradient ด้วยตัวทำละลายอะซิโตนไนโตรไร้อยู่ 5-70 ต่อน้ำกลั่นที่ผสมกรดฟอร์มิกร้อยละ 0.05 อัตราการไหลของตัวทำละลาย 15 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 35 นาที ได้ส่วนย่อยทั้งหมด 14 ส่วนย่อย ได้แก่ F4H1-F4H11 F4H5-1 F4H6-1 และ F4H7-1 โดยส่วนย่อย F4H5 และ F4H5-1 ระบุให้เป็นสาร B และส่วนย่อย F4H6 F4H9 F4H11 ระบุให้เป็นสาร C สาร D และสาร A ตามลำดับ ส่วนย่อย F4H6-1 ทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์แบบ preparative ของ shiseido (5 μm , 20x250 mm) โดยใช้เฟสเคลื่อนที่แบบ gradient ด้วยตัวทำละลายอะซิโตนไนโตรไร้อยู่ 5-55 ต่อน้ำกลั่นที่ผสมกรดฟอร์มิกร้อยละ 0.05 อัตราการไหลของตัวทำละลาย 12 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 35 นาที ได้เป็นสาร B และสาร C

ส่วนที่ 5 (F5) แยกด้วยคอลัมน์แบบ preparative ของ sunfire (10 μm , 19x250 mm) โดยใช้เฟสเคลื่อนที่แบบ gradient ด้วยตัวทำละลายอะซิโตนไนโตรไร้อยู่ 3-60 ต่อน้ำกลั่นผสมกรดฟอร์มิกร้อยละ 0.05 อัตราการไหลของตัวทำละลาย 15 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 35 นาที ได้ส่วนย่อยทั้งหมด 7 ส่วนย่อย ส่วนย่อย F5H1 ระบุให้เป็นสาร G และส่วนย่อย F5H5 ระบุให้เป็นสาร E ส่วนย่อย F5H2 ทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์แบบ preparative ของ sunfire (10 μm , 19x250 mm) โดยใช้เฟสเคลื่อนที่แบบ gradient ด้วยตัวทำละลาย อะซิโตนไนโตรไร้อยู่ 5-30 ด้วยอัตราการไหลของตัวทำละลาย 15 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 35 นาที ได้ fractionย่อยของ F5H2 ระบุให้เป็นสาร F

ทุกส่วนที่ผ่านการแยกด้วยคอลัมน์แบบ preparative จะถูกนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง HPLC ตามข้อที่ 3.5.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.1 แผนผังแสดงการแยกสารสกัดจาก Streptomyces sp. C1-2 (ต่อ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.5 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์

3.3.5.1 Ultraviolet-Visible (UV-vis) absorption spectroscopy

สเปกตรัม UV-vis ของสารทุติยภูมิวิเคราะห์ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง รุ่น V-730 ของ Jasco ในตัวทำละลายเมทานอล

3.3.5.2 Infrared absorption spectroscopy

สเปกตรัมอินฟราเรดของสารทุติยภูมิวิเคราะห์ด้วย FT-IR spectrometer ของ Bruker รุ่น ALPHA

3.3.5.3 Optical rotation

การหมุนแสงระนาบโพลาไรซ์วิเคราะห์ด้วยเครื่อง polarimeter ของ JASCO รุ่น P-2000

3.3.5.4 Nuclear Magnetic Resonance

สเปกตรัม NMR ได้แก่ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT 135, COSY, NOESY, HMQC, HMBC, HSQC ถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่อง NMR ของ Bruker รุ่น ADVANCE 500 MHz (^1H 500 MHz และ ^{13}C 125 MHz) และ Bruker รุ่น AVANCE III (^1H 400 MHz และ ^{13}C 100 MHz)

3.3.5.5 Mass spectrometry

มวลโมเลกุลของสารทุติยภูมิ ถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่อง mass spectrometer ชนิดแยกชัดสูง High Resolution electrospray ionization mass spectra (HRESIMS) ในหน่วยมวลต่อประจุ (m/z) ของ Bruker รุ่น micrOTOF

3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity)

3.4.1 การเตรียมสารตัวอย่าง

เตรียมสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์ โดยทำการเจือจางด้วยเมทานอลให้มีความเข้มข้นในช่วง 0.97-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.4.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินซี (ascorbic acid) บิวทิลไฮดรอกซีโทลูอีน (BHT) โดยทำการเจือจางด้วยเมทานอลให้มีความเข้มข้นในช่วง 0.97-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay

นำสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์แต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในไมโครเพลท 96 หลุม (96 well plate) ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับตัวอย่างผสม เมทานอล (Blank sample) และสารละลาย DPPH (Blank DPPH) (ภาคผนวก ฉ) บ่มในที่มืด 30 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนด นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (Microplate Reader) โดยใช้สารละลายมาตรฐานวิตามินซี และ BHT เป็นชุดควบคุมเชิงบวก (Positive control) คำนวณร้อยละการดักจับอนุมูลอิสระสารตัวอย่างและ สารมาตรฐานตามสมการที่ 3.1 (ดัดแปลงจาก Chen *et al.*, 2012) สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ความเข้มข้นของสาร (x) และร้อยละการดักจับอนุมูลอิสระ (y) เพื่อหาค่าความเข้มข้นที่สามารถดักจับ อนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC₅₀)

$$\% \text{ inhibition} = \frac{[(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{Blank DPPH}}) - (B_{\text{Sample}} - B_{\text{Blank sample}})]}{(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{Blank DPPH}})} \times 100 \quad (\text{สมการ 3.1})$$

3.5 การทดสอบทางสถิติ (statistical analysis)

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าความเข้มข้นที่สามารถดักจับอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) เฉลี่ยของแต่ละตัวอย่างด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ตามวิธีของ Duncan (Duncan's multiple range test) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) ด้วย โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 26.

บทที่ 4

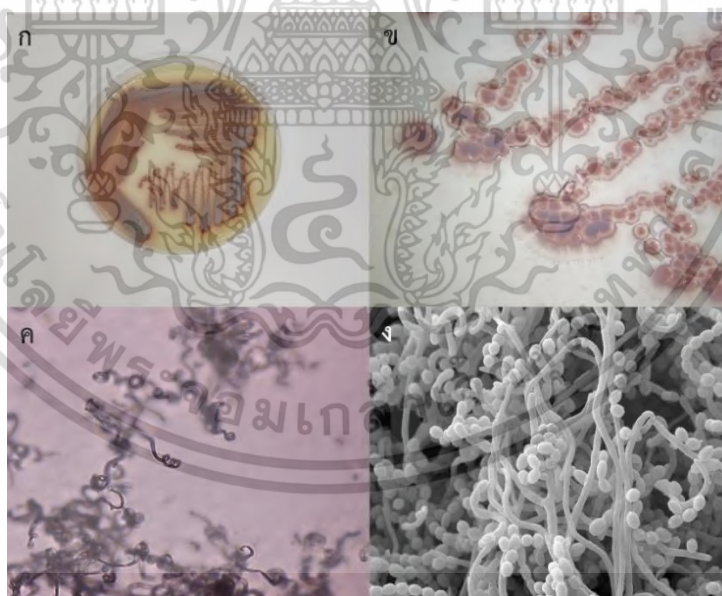
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ลักษณะทางอนุกรมวิธานของไอโซเลต C1-2

4.1.1 ลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotypic characteristics)

4.1.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะการเจริญ (morphological and cultural characteristics)

จากการสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่มีเลนส์ส่องระยะไกล (Long working distance objective Lens) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope) และการสังเกตสีของเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ เปรียบเทียบกับตารางสีมาตรฐาน (The NBS/ISCC color system) (Kelly, 1964) พบว่า ไอโซเลต C1-2 มีการสร้างเส้นใยอาหารสีน้ำตาลแดง (strong reddish brown) และเส้นใยอากาศสีเทากลาง (medium gray) บนอาหารแข็ง ISP2 ผสมน้ำทะเล มีการสร้างสปอร์ผิวเรียบเรียงต่อกันเป็นเกลียวบนเส้นใยอากาศ (รูปที่ 4.1)



รูปที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต C1-2

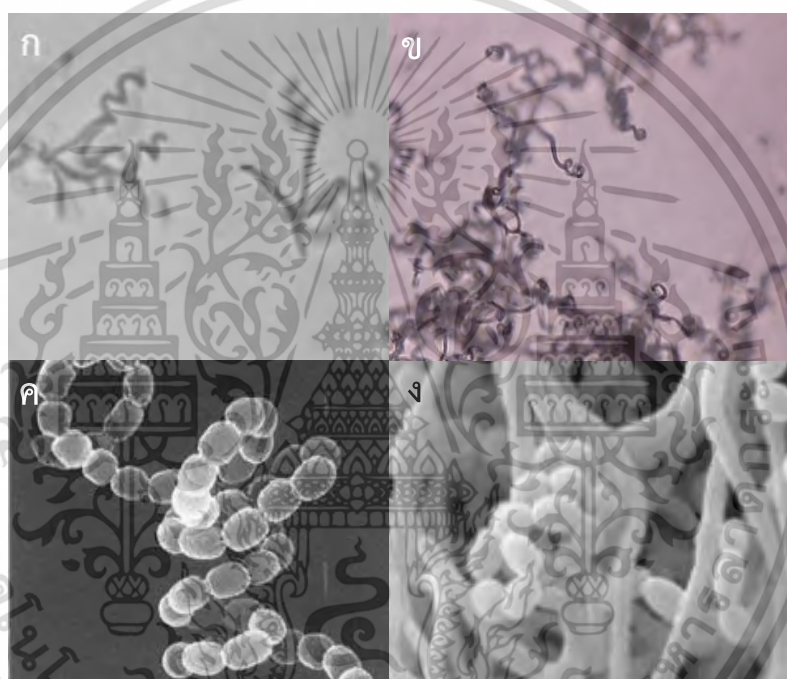
ก และ ข ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง ISP2

ค ลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีเลนส์ส่องระยะไกลเป็นเลนส์ใกล้วัตถุ (กำลังขยาย 400 เท่า)

ง ลักษณะสัณฐานวิทยาของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (กำลังขยาย 5000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญ รวมถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์ของไอโซเลต C1-2 กับ *Streptomyces griseoaurantiacus* DSM 40430^T พบว่า *Streptomyces griseoaurantiacus* DSM 40430^T มีการสร้างเส้นใยอากาศสีเทา สร้างสปอร์เรียงต่อกันเป็นเกลียวบนเส้นใยอากาศ และมีการสร้างเส้นใยอาหารสีแดง (Shaaban *et al.*, 2011) นอกจากนี้ จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่า *Streptomyces griseoaurantiacus* DSM 40430^T มีการสร้างสปอร์ผิวเรียบเรียงต่อกันเป็นเกลียวเช่นเดียวกันกับลักษณะสปอร์ของไอโซเลต C1-2 (Shirling and Gottlieb, 1972; Matsumoto *et al.*, 1998) (รูปที่ 4.2)



รูปที่ 4.2 ลักษณะสปอร์ของ *Streptomyces griseoaurantiacus* และไอโซเลต C1-2

ก และ ข ลักษณะสปอร์ของ *S. griseoaurantiacus* DSM 40430^T (Shirling and Gottlieb, 1972) และไอโซเลต C1-2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ค และ ง ลักษณะสปอร์ของ *S. griseoaurantiacus* DSM 40430^T (Matsumoto *et al.*, 1998) และไอโซเลต C1-2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

4.1.1.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี (physiological and biochemical characteristics)

ลักษณะทางสรีรวิทยา ได้แก่ ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ และโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่าง ๆ แสดงให้เห็นว่าไอโซเลต C1-2 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 15-37 องศาเซลเซียส และโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0-6 ในส่วนของลักษณะทางชีวเคมี ได้แก่ ความสามารถในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตจะถือว่าผิดกฎหมาย

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ความสามารถในการย่อยสลายสารที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble compounds) การย่อยแป้ง (starch hydrolysis) การย่อยเจลาติน (gelatin liquefaction) การย่อยและตกตะกอนโปรตีนในนม (milk peptonization and milk coagulation) การรีดิวซ์ไนเตรท (nitrate reduction) การสร้างเอนไซม์คิตาเลส ออกซิเดส และการย่อยสลายยูเรีย (urease test) พบว่าไอโซเลต C1-2 สามารถใช้น้ำตาลเซลโลไบโอส ฟรุกโตส กาแลคโตส กลูโคส แลคโตส แมนิทอล เมลิไบโอส แรมโนส ซูโครส ซิลิทอล ซิโลส แมนโนส อะราบิโนส และราฟิโนสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนที่ทดสอบได้ทั้งหมด ไอโซเลต C1-2 สามารถย่อยสลายไทโรซีนที่เป็นสารไม่ละลายน้ำ สามารถย่อยแป้ง เจลาติน และตกตะกอนโปรตีนในนม สร้างเอนไซม์คิตาเลส รีดิวซ์ไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายยูเรียได้ จากการศึกษาลักษณะทางจีโนมไทป์และวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) ของไอโซเลต C1-2 และสายพันธุ์ใกล้เคียง บ่งชี้ได้ว่าไอโซเลต C1-2 คือ *Streptomyces griseoaurantiacus* DSM 40430^T ข้อมูลและรายละเอียดของลักษณะทางจีโนมไทป์แสดงในข้อที่ 4.1.3 จากการเปรียบเทียบลักษณะทางฟีโนไทป์กับงานวิจัยก่อนหน้า เพื่อยืนยันข้อมูลดังที่กล่าวมาข้างต้น จากงานวิจัยของ Matsumoto *et al.* (1998) พบว่า *Streptomyces griseoaurantiacus* ISP 5430 สามารถใช้น้ำตาลอะราบิโนส ซิโลส กลูโคส ฟรุกโตส แรมโนส และแมนิทอล เป็นแหล่งคาร์บอน แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาลซูโครสและราฟิโนสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ สามารถตกตะกอนโปรตีนในนม รีดิวซ์ไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ และสามารถย่อยแป้งได้ เช่นเดียวกับกับไอโซเลต C1-2 นอกจากนี้งานวิจัยของ He *et al.* (2005) พบว่า *Streptomyces griseoaurantiacus* DSM 40430 สามารถใช้น้ำตาลอะราบิโนส แลคโตส ราฟิโนส แรมโนส ไโรโบส และซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ไม่เกินร้อยละ 5 ไม่สามารถย่อยสลายอะดีนีน แซนทีน และไฮโปแซนทีนได้ เช่นเดียวกับกับไอโซเลต C1-2 (ตารางที่ 4.1) จากลักษณะดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าไอโซเลต C1-2 เป็นสายพันธุ์หนึ่งของ *Streptomyces griseoaurantiacus* DSM 40430^T

ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางฟีโนไทป์ของไอโซเลต C1-2 และ *Streptomyces griseoaurantiacus*

ลักษณะทางฟีโนไทป์	1	2	3	4
ลักษณะพื้นฐานของสปอร์				
-การจัดเรียงตัว	เกลียว	เกลียว	เกลียว	เกลียว
-พื้นผิว	เรียบ	เรียบ	เรียบ	เรียบ
การย่อยโปรตีนในนม	+	+	nd	+
การย่อยสลายเจลาติน	+	-	nd	+
การย่อยแป้ง	+	+	nd	nd

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางฟีโนไทป์ของไอโซเลต C1-2 และ *S. griseoaurantiacus* (ต่อ)

ลักษณะทางฟีโนไทป์	1	2	3	4
ความสามารถในการรื้อตัวในเตรท	+	+	nd	+
ความสามารถในการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์	-	nd	nd	-
ความสามารถในการทนเกลือโซเดียมคลอไรด์	0-7 %	nd	0-4 %	0-7 %
ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ	15-38	20-37	nd	15-35
การใช้แหล่งคาร์บอน				
-กลูโคส	+	+	+	+
-ฟรุกโตส	+	+	nd	+
-กาแลคโตส	+	nd	nd	+
-แลคโตส	+	nd	+	nd
-แมนนิทอล	+	+	nd	+
-แรมโนส	+	+	+	+
-ซูโครส	+	-	+	+
-ไซโลส	+	+	nd	+
-ไรโบส	+	nd	+	nd
-อะราบิโนส	+	+	+	+
-ราฟิโนส	+	-	+	+
การย่อยสลายสารไม่ละลายน้ำ				
-อะดีนีน	-	nd	-	nd
-เซลลูโลส	-	nd	nd	nd
-ไฮโปแซนทีน	-	nd	-	nd
-ไทโรซีน	+	nd	nd	nd
-แซนทีน	-	nd	-	nd

หมายเหตุ: 1 ไอโซเลต C1-2, 2 *S. griseoaurantiacus* ISP 5430 (Matsumoto *et al.*, 1998), 3 *S. griseoaurantiacus* DSM 40430 (He *et al.*, 2005), 4 *S. griseoaurantiacus* E5 (Kansoh *et al.*, 2009)
+ หมายถึง ให้ผลบวก, - หมายถึง ให้ผลลบ, nd หมายถึง ไม่มีข้อมูล

4.1.2 ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี (chemotypic characteristics)

ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี ได้แก่ ไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนปิเมลิกในผนังเซลล์ (2,6-diaminopimelic acid; DAP) พบว่าผนังเซลล์ของไอโซเลต C1-2 ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดเอกซารีนเป็นเอกซารีนที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยามให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไดอะมิโนอะมิโนพิเมติกแบบ LL-DAP จากข้อมูลของ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology ฉบับปรับปรุงครั้งที่ 2 เล่มที่ 5 แอคติโนมัยสีทในสกุล *Streptomyces* มีองค์ประกอบของผนังเซลล์ประกอบไปด้วย LL-DAP (Goodfellow *et al.*, 2012) จากงานวิจัยของ Matsumoto *et al.* (1998) Kansoh *et al.*, (2009) และ Li *et al.*, (2005) ที่ศึกษาลักษณะไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมติกในผนังเซลล์ของ *Streptomyces griseoaurantiacus* พบไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมติกเป็นแบบ LL-DAP เช่นเดียวกันกับไอโซเลต C1-2 จากข้อมูลดังกล่าวจึงยืนยันในระดับสกุลได้ว่าไอโซเลต C1-2 จัดเป็นแอคติโนมัยสีทในสกุล *Streptomyces*

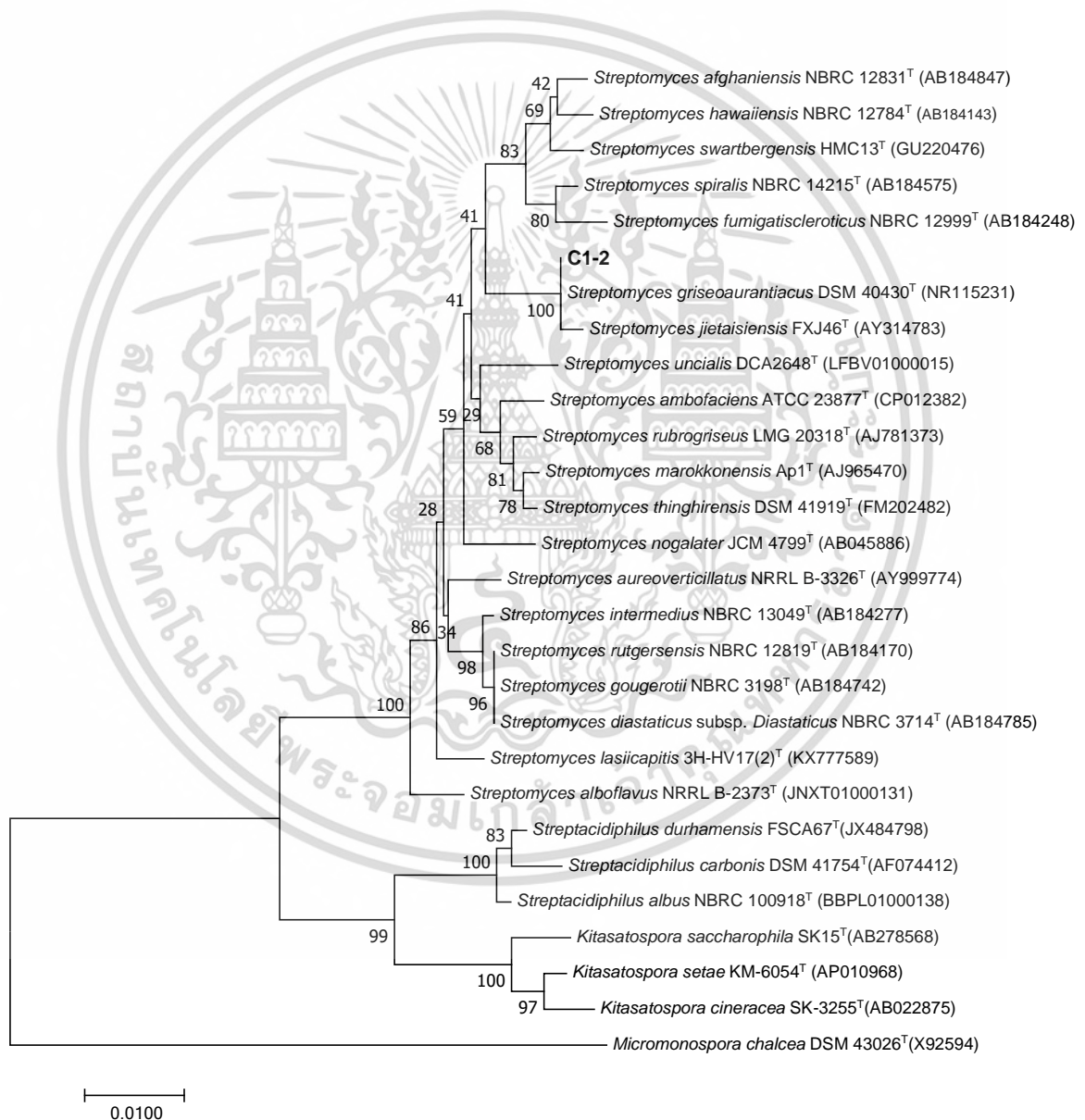
4.1.3 ลักษณะทางจีโนไทป์ (genotypic characteristics)

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนช่วงยีน 16S rRNA โดยการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Ezbiocloud พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลต C1-2 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces griseoaurantiacus* DSM 40430^T มากที่สุด รองลงมาได้แก่ *Streptomyces jietaisiensis* FXJ46^T และ *Streptomyces spiralis* NBRC 14215^T ด้วยระดับความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์บนช่วงยีน 16S rRNA (16S rRNA gene sequence similarity) ร้อยละ 100 99.79 และ 98.33 ตามลำดับ จากการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic trees) แบบ neighbor-joining (รูปที่ 4.3) และ Maximum likelihood (รูปที่ 4.4) แสดงให้เห็นว่าตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต C1-2 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ *Streptomyces griseoaurantiacus* DSM 40430^T และ *Streptomyces jietaisiensis* FXJ46^T ด้วยค่า Bootstrap ร้อยละ 100 โดยไอโซเลต C1-2 มีระยะห่างวิวัฒนาการ (evolutionary distances) เท่ากับ *Streptomyces griseoaurantiacus* DSM 40430^T แต่มีระยะห่างวิวัฒนาการแตกต่างกับ *Streptomyces jietaisiensis* FXJ46^T อย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่แผนภูมิต้นไม้แบบ Maximum parsimony (รูปที่ 4.5) ตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต C1-2 มีการจับคู่อยู่กับ *Streptomyces jietaisiensis* FXJ46^T ในระดับความเชื่อมั่นต่ำด้วยค่า bootstrap ร้อยละ 47 โดยค่า bootstrap แสดงถึงระดับความเชื่อมั่นของการวิเคราะห์ กำกับไว้ในแต่ละปม (node) ของแผนภูมิ ค่า bootstrap ที่อยู่ในช่วงร้อยละ 85-100 บ่งชี้ว่าผลจากการวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการที่ node ดังกล่าวมีความเชื่อมั่นสูง หากค่า bootstrap อยู่ในช่วงร้อยละ 75-84 มีความเชื่อมั่นปานกลาง และหากอยู่ในช่วง 50-74 ถือว่าผลการวิเคราะห์ใน node นั้นมีความเชื่อมั่นในระดับต่ำ (Richardson *et al.*, 2000) ในลักษณะเดียวกันกับการนำข้อมูลจีโนมของไอโซเลต C1-2 มาสร้างแผนภูมิต้นไม้จีโนม (Phylogenomics) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ใกล้เคียง แสดงให้เห็นว่าไอโซเลต C1-2 มีระยะวิวัฒนาการเท่ากันและมีตำแหน่งอนุกรมวิธานใกล้เคียงกับ *Streptomyces griseoaurantiacus* DSM 40430^T (รูปที่ 4.6)

จากการวิเคราะห์จีโนมของไอโซเลต C1-2 มีค่า digital G+C content อยู่ที่ร้อยละ 72.74 ค่า Average nucleotide identity (ANI) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมของไอโซเลต C1-2 มาทำการเปรียบเทียบกับ *Streptomyces griseoaurantiacus* DSM 40430^T ที่เป็นสายพันธุ์ใกล้เคียง

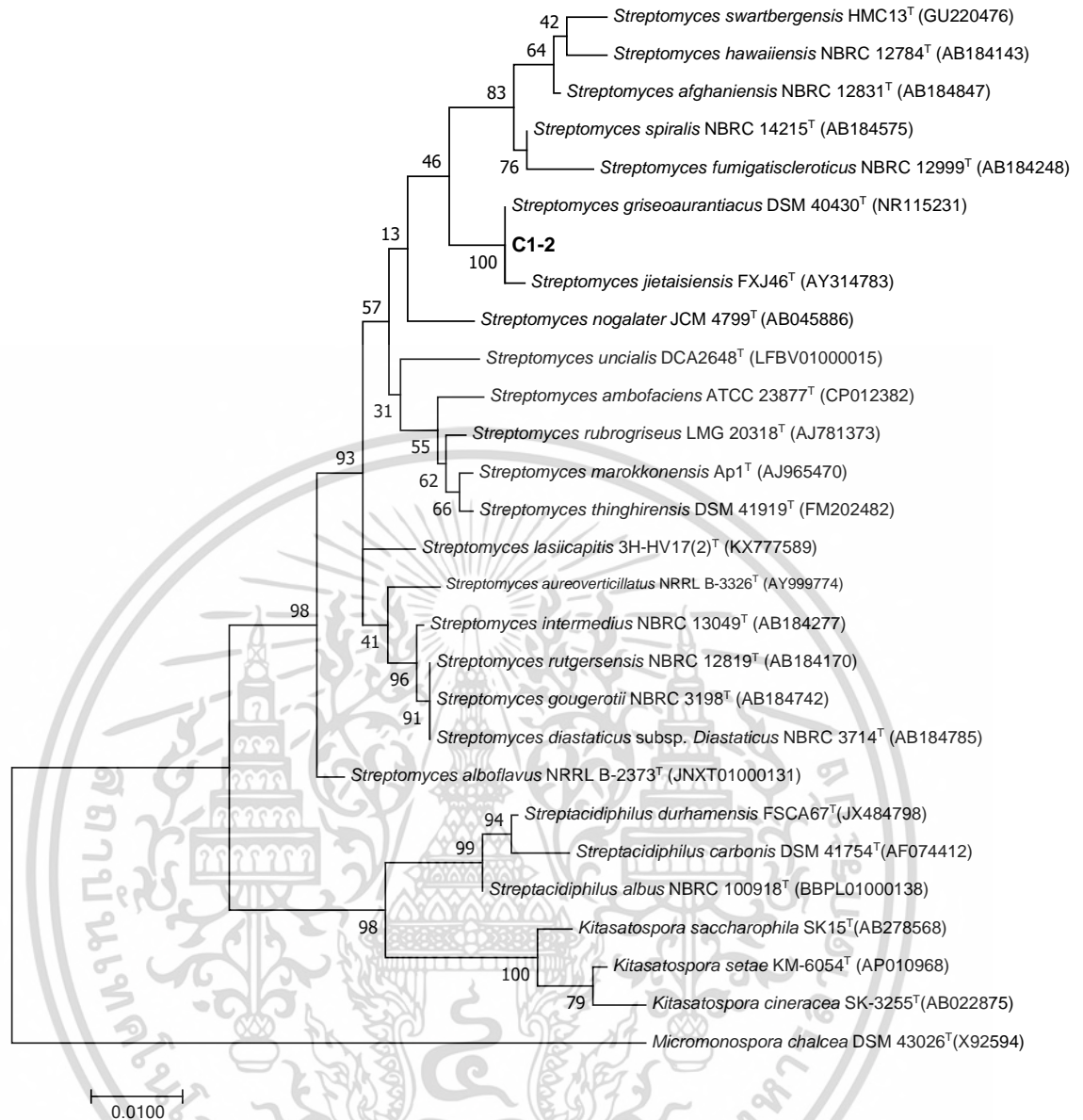
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์ การนำเอกสารนี้ไปใช้โดยไม่ผ่านการยินยอมจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่ามีความ ANIb อยู่ที่ร้อยละ 98.71 และค่า ANIm อยู่ที่ร้อยละ 98.96 โดยค่า ANI ที่มากกว่าร้อยละ 95 บ่งชี้ว่าทั้ง 2 สายพันธุ์เป็นสายพันธุ์เดียวกัน (Chun *et al.*, 2018) จากการคำนวณค่า digital DNA-DNA hybridization ระหว่างไอโซเลต C1-2 และ *Streptomyces griseoaurantiacus* DSM 40430^T พบว่ามีค่า dDDH อยู่ที่ร้อยละ 90.40 โดยค่า DDH ที่มากกว่าร้อยละ 70 บ่งชี้ว่าทั้ง 2 สายพันธุ์เป็นสายพันธุ์เดียวกัน (Wayne *et al.*, 1987) จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าไอโซเลต C1-2 คือ *Streptomyces griseoaurantiacus* C1-2 ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บนช่วงยีน 16S rRNA และจีโนมของไอโซเลต C1-2 ถูกจัดเก็บไว้ในฐานข้อมูล Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ภายใต้หมายเลขจำเพาะ (accession number) MT229476 และ JAATEQ000000000 ตามลำดับ

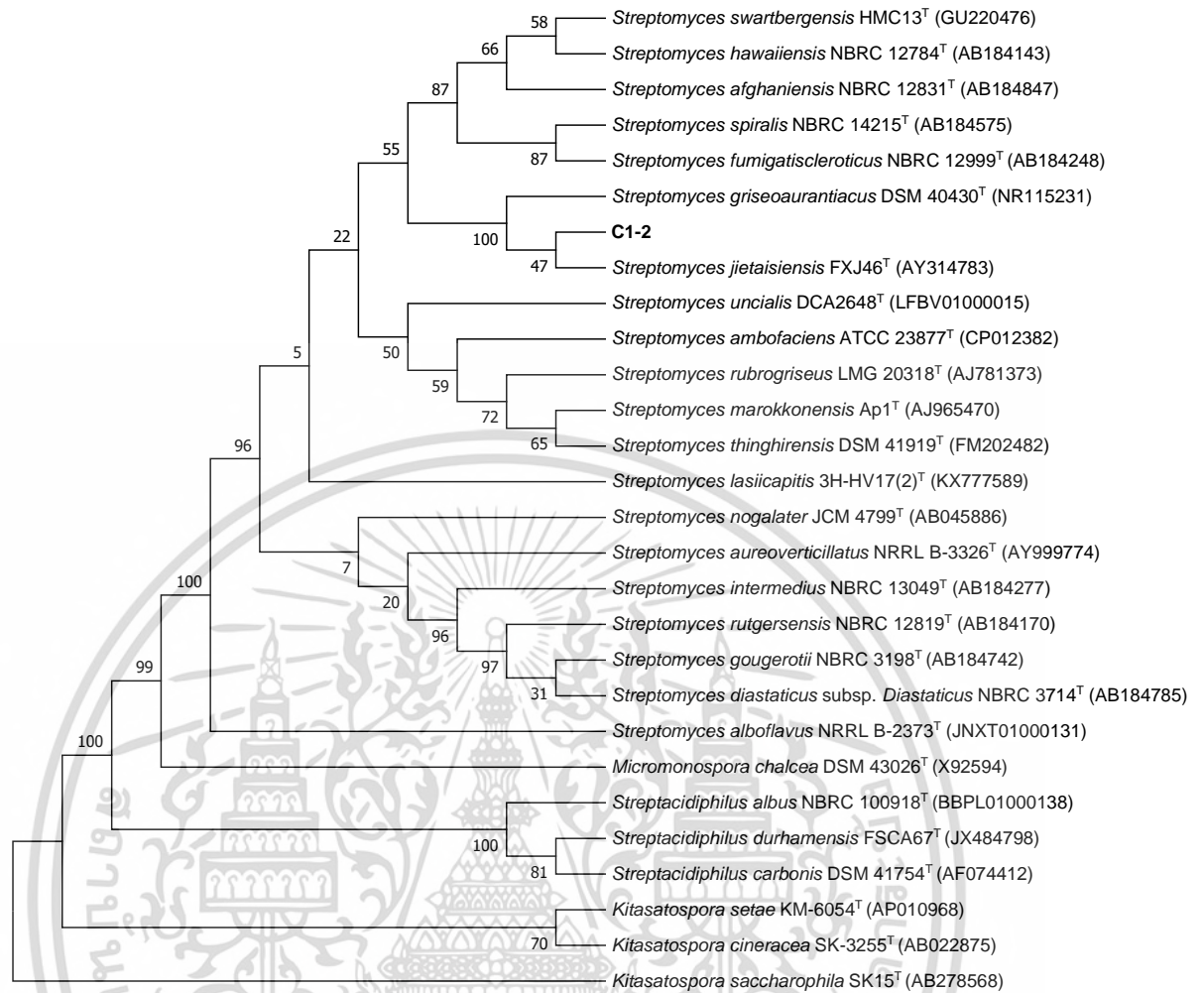


รูปที่ 4.3 แผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) ด้วยวิธี Neighbor-joining แสดงตำแหน่งของไอโซเลต C1-2 และสกุลใกล้เคียง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

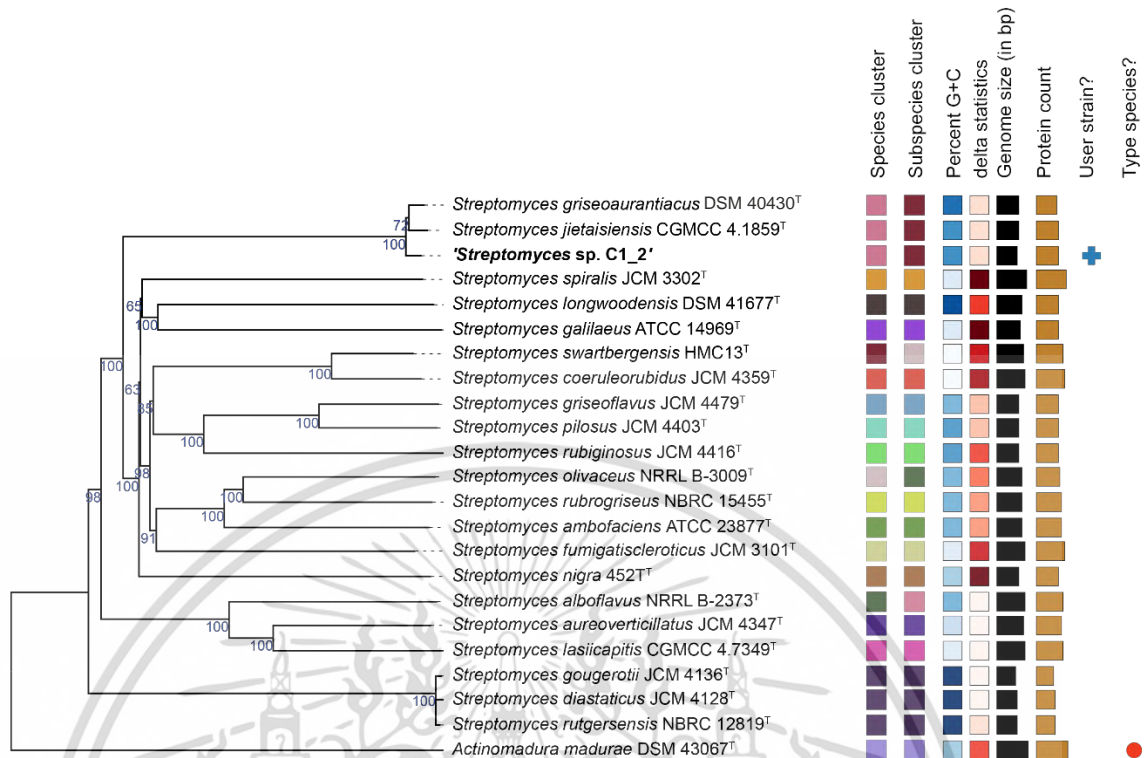


รูปที่ 4.4 แผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) ด้วยวิธี Maximum likelihood แสดงตำแหน่งของ ไอโซเลต C1-2 และสกุลใกล้เคียง



รูปที่ 4.5 แผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) ด้วยวิธี Maximum parsimony แสดงตำแหน่งของ ไอโซเลต C1-2 และสกุลใกล้เคียง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



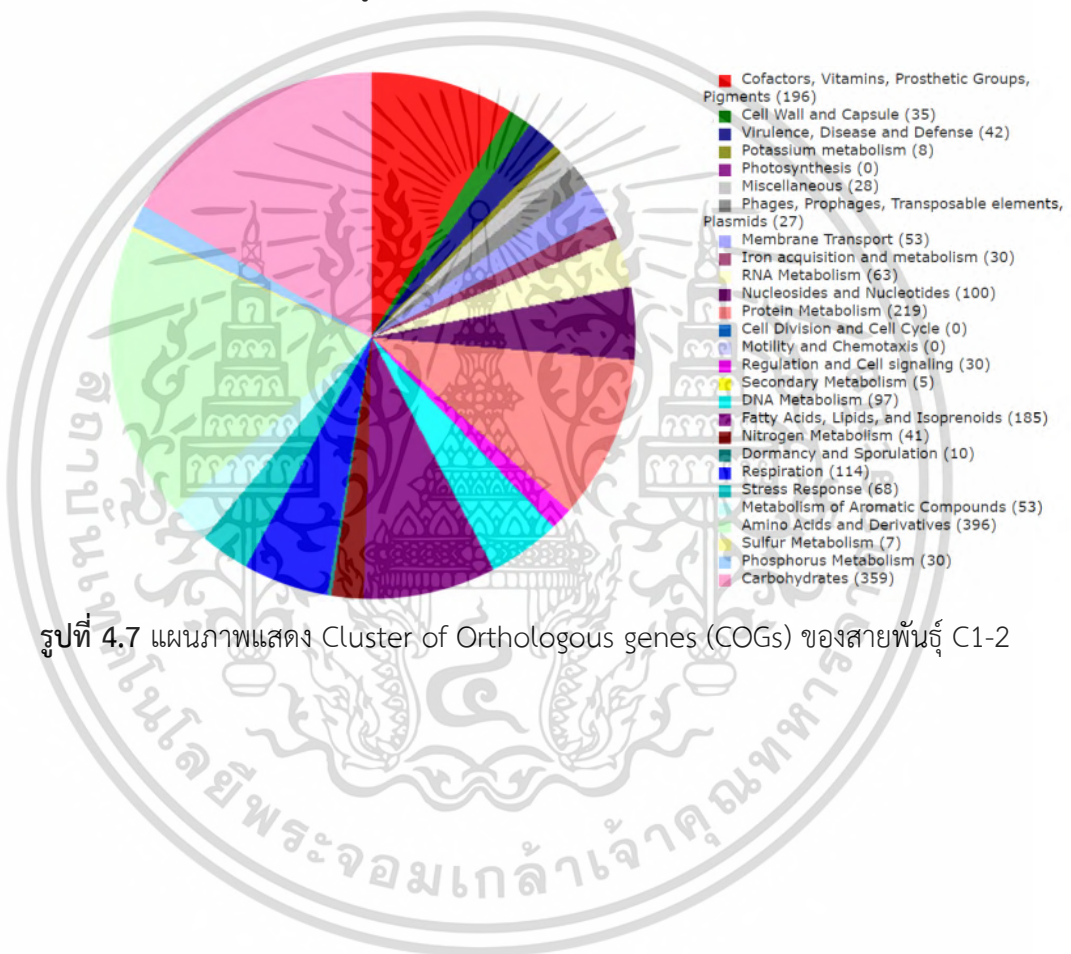
รูปที่ 4.6 แผนภูมิต้นไม้จีโนม (Phylogenomic tree) แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต C1-2 และสายพันธุ์ใกล้เคียง

4.1.4 ลักษณะทางอนุกรมวิธานจากลักษณะทางจีโนม

การวิเคราะห์ข้อมูลจีโนมโดยใช้ชีวสารสนเทศ (bioinformatics) โดยการเชื่อมต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ (*de novo* assembly) ทำให้ได้ร่างจีโนม (draft genome) ของไอโซเลต C1-2 มีความยาวทั้งหมด 6,957,809 คู่เบส (bp) จำนวน 914 contigs มีค่า N50 เท่ากับ 15,340 คู่เบส (bp) และมีค่า Genome coverage ที่ 75x ผลจากการทำนายยีน (annotation) สามารถทำนายได้ว่าไอโซเลต C1-2 มียีนทั้งหมด 6820 ยีน โดยเป็นยีนที่แปลรหัสเป็นโปรตีน 6756 ยีน ยีนที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของอาร์เอ็นเอ (RNA metabolism) 64 ยีน ประกอบด้วยยีน tRNA 59 ยีน rRNA 2 ยีน และอื่น ๆ 3 ยีน จาก Cluster of orthologous genes (COGs) พบกลุ่มยีนที่ทำหน้าที่ (Functional genes) ต่างกัน ได้แก่ กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับโคแฟกเตอร์ วิตามิน และสารสี (cofactors, vitamins, prosthetic groups, pigments) เมตาบอลิซึมของโปรตีน (protein metabolism) กรดไขมัน ลิพิด และไอโซพรีนอยด์ (fatty acids, lipids and isoprenoids) เมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate metabolism) เมตาบอลิซึมของสารประกอบอะโรมาติก (metabolism of aromatic compounds) เมตาบอลิซึมของกรดอะมิโนและอนุพันธ์ของกรดอะมิโน (amino acids and derivatives) และยีนอื่น ๆ (รูปที่ 4.7) แสดงให้เห็นว่าไอโซเลต C1-2 อาจจะสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน กรดไขมัน ไอโซพรีนอยด์ สารประกอบอะโรมาติก

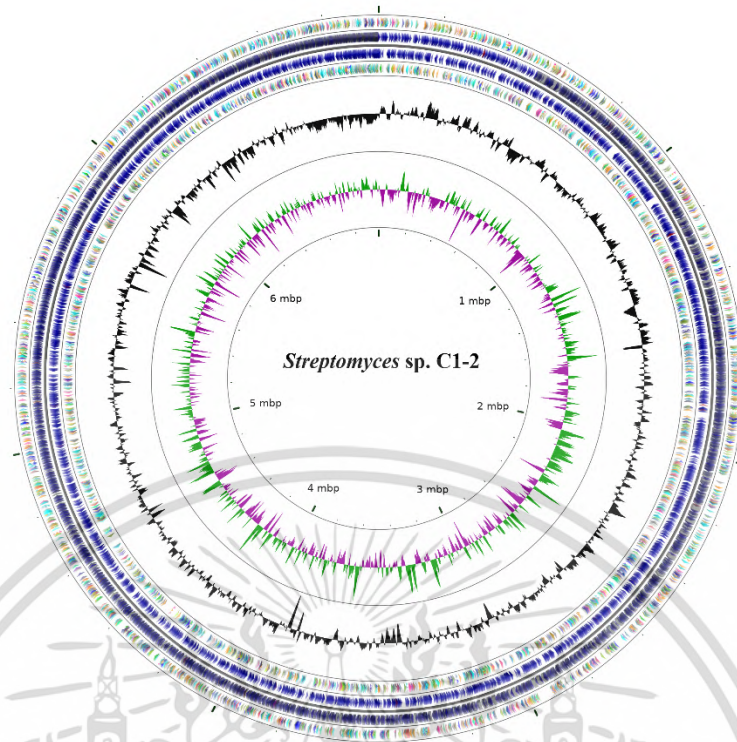
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรืออนุพันธ์ที่เกี่ยวข้องได้ จากการนำข้อมูล COGs สร้างแผนที่จีโนมแบบวงกลม (genome circular map) ของไอโซเลต C1-2 แสดงให้เห็นตำแหน่งยีนบนสาย forward และ สาย reverse บนจีโนมของ ไอโซเลต C1-2 โดยสีที่แตกต่างกันจะบ่งบอกถึงยีนที่ทำหน้าที่แตกต่างกัน (รูปที่ 4.8) การวิเคราะห์ การจัดเรียงยีนบนจีโนมด้วยโปรแกรม Artemis Comparison Tool (ACT) โดยอาศัยข้อมูลจากการ เปรียบเทียบจีโนมของสายพันธุ์ C1-2 และ *Streptomyces griseoaurantiacus* DSM 40430^T ตำแหน่งยีนที่เหมือนกันบนสาย forward และสาย reverse บนจีโนมของทั้งสองสายพันธุ์แสดงใน ลักษณะเส้นเชื่อมโยงระหว่างยีนที่เหมือนกัน จากผลการเปรียบเทียบแสดงให้เห็นว่าทั้ง 2 สายพันธุ์มี การจัดเรียงของยีนที่คล้ายกันมาก (รูปที่ 4.9)

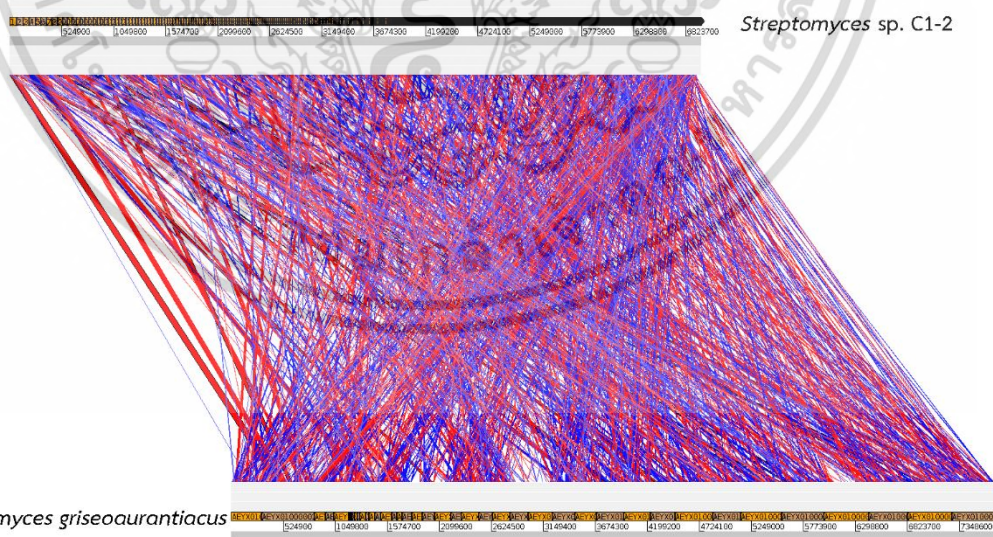


รูปที่ 4.7 แผนภาพแสดง Cluster of Orthologous genes (COGs) ของสายพันธุ์ C1-2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 แผนที่จีโนมแบบวงกลม (circular map) แสดงตำแหน่งยีนบนจีโนมของไอโซเลต C1-2 โดยวงกลมวงที่ 1 และ 2 จากด้านนอกแสดงตำแหน่งยีนอ้างอิงจาก COGs (สีที่แตกต่างกันแสดงถึงหน้าที่ของยีนที่แตกต่างกัน) วงที่ 3 และ 4 ตำแหน่งยีนจาก COGs และยีนทั้งหมดบนสาย reverse วงที่ 6 ปริมาณ C+G content วงที่ 7 G+C skew และวงที่ 8 (ด้านในสุด) แสดงขนาดของจีโนม



รูปที่ 4.9 แผนที่เชื่อมโยง (Synteny map) แสดงการจัดเรียงยีนบนจีโนมของไอโซเลต C1-2 และ *Streptomyces griseoaurantiacus* DSM 40430^T โดยแถบสีแดงและน้ำเงิน แสดงตำแหน่งยีนที่เหมือนกันบนสาย forward และ reverse ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทำนายกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิด้วย antiSMASH แสดงให้เห็นว่าบนจีโนมของสายพันธุ์ C1-2 มีกลุ่มยีน (gene clusters) เทอร์พีน (terpene) กลุ่มยีน Polyketide synthase ชนิดที่ 1 (T1PKS) กลุ่มยีน Polyketide synthase ชนิดที่ 2 (T2PKS) กลุ่มยีน Polyketide synthase ชนิดที่ 3 (T3PKS) และกลุ่มยีน non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) และกลุ่มยีนอื่น ๆ โดยมีความคล้ายคลึงกับกลุ่มยีนที่สังเคราะห์สาร undecylprodigiosin จาก *Streptomyces coelicolor* A3(2) ร้อยละ 72 (MIBiG accession BGC0001063; Genbank accession AL645882.2) กลุ่มยีนที่สังเคราะห์สาร ectoine จาก *Streptomyces anulatus* ร้อยละ 100 (MIBiG accession BGC0000853; Genbank accession AY524544.1) กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สาร avermitilol จาก *Streptomyces avermitilis* MA-4680 ร้อยละ 100 (MIBiG accession BGC0000683; Genbank accession BA000030.3) และกลุ่มยีนที่สังเคราะห์สาร geosmin (MIBiG accession BGC0001181; Genbank accession AL645882.2) ร้อยละ 100 นอกจากนี้ยังพบกลุ่มยีนที่สังเคราะห์สารอื่น แต่มีความคล้ายคลึงกันในระดับที่ต่ำ และกลุ่มยีนที่ไม่คล้ายคลึงกับกลุ่มยีนใดเลยจากฐานข้อมูล antiSMASH เมื่อเปรียบผลการวิเคราะห์กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิของไอโซเลต C1-2 และ *Streptomyces griseoaurantiacus* DSM 40430^T (ตารางที่ 4.2) พบกลุ่มยีนชนิดเดียวกัน และพบบางกลุ่มยีนที่สังเคราะห์สารชนิดเดียวกัน จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าไอโซเลต C1-2 มีกลุ่มยีนที่สามารถสังเคราะห์สารทุติยภูมิได้หลากหลาย และอาจจะสามารถสังเคราะห์สารทุติยภูมิชนิดใหม่ได้ จากงานวิจัยของ Hu *et al.*, 2018 ทำการศึกษาสารทุติยภูมิที่สร้างจาก *Streptomyces parvulus* สายพันธุ์ 03 โดยอาศัยการทำนายกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิด้วย antiSMASH ร่วมกับการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทด้วยเทคนิค LC-MS ผลการทำนายกลุ่มยีนพบกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เมลานิน และสาร Desferrioxamin B ด้วยระดับความคล้ายคลึงกับกลุ่มยีนในฐานข้อมูล antiSMASH ร้อยละ 80 และ 100 ตามลำดับ นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ LC-MS พบเมลานิน และ Desferrioxamin B เป็นองค์ประกอบในสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทเช่นเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์ข้อมูลจีโนมด้วย antiSMASH มีประโยชน์อย่างมากต่อการศึกษาสารทุติยภูมิ ซึ่งทำให้สามารถคาดคะเนกลุ่มของสารทุติยภูมิที่ *Streptomyces* sp. ที่นำมาศึกษาสามารถสังเคราะห์ได้

ตารางที่ 4.2 กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิของไอโซเลต C1-2

กลุ่มยีน	สารทุติยภูมิ	ความคล้ายคลึง (%)	
		1	2
Terpene	Hopene	61	53
	Chalcomycin A	9	9
	Carotenoid	18	nd
	Avermitilol	100	100
	Isoprenieratene	50	75
	Geosmin	100	100
	Brasilicardin A	nd	38
	Julichrome Q3-3, Q3-5	nd	22
	Unknown	2 genes	nd
NRPS-like	Cadaside A, B	19	nd
	Undecylprodigiosin	72	90
	Unknown	1 g	nd
Thiopeptide	Zorbamycin	6	6
RiPP-like	Informatipeptin	nd	42
	Unknown	1 gene	1 gene
Nucleosides	Paromomycin	7	7
NRPS	Herbimycin A	6	nd
	Diisonitrile antibiotic SF2768	66	66
	Stenothricin	9	nd
	Daptomycin	nd	3
	Divergolide A-D	nd	13
	Rimosamide	nd	21
	Coelibactin	nd	100
	Rhizomide A-C	nd	100
Unknown	4 genes	nd	
Melanin	Melanin	60	60
Siderophore	Desferrioxamin B, E	50	83
	Unknown	1 gene	1 gene

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิของไอโซเลต C1-2 (ต่อ)

กลุ่มยีน	สารทุติยภูมิ	ความคล้ายคลึง (%)	
		1	2
T1PKS	Tetronasin	11	nd
	Paulomycin	nd	9
	catenulisporolides	nd	14
	Unknown	1 gene	nd
T2PKS	Spore pigment	58	83
T3PKS	Pheganomycin	14	38
Ectoine	Ectoine	100	100

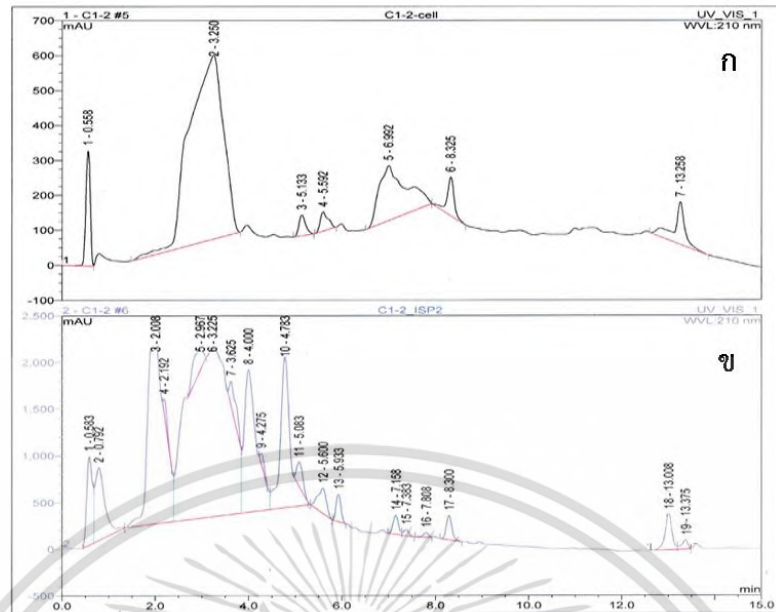
หมายเหตุ: 1 ไอโซเลต C1-2, 2 *Streptomyces griseoaurantiacus* DSM 40430^T

nd หมายถึง ไม่พบกลุ่มยีน

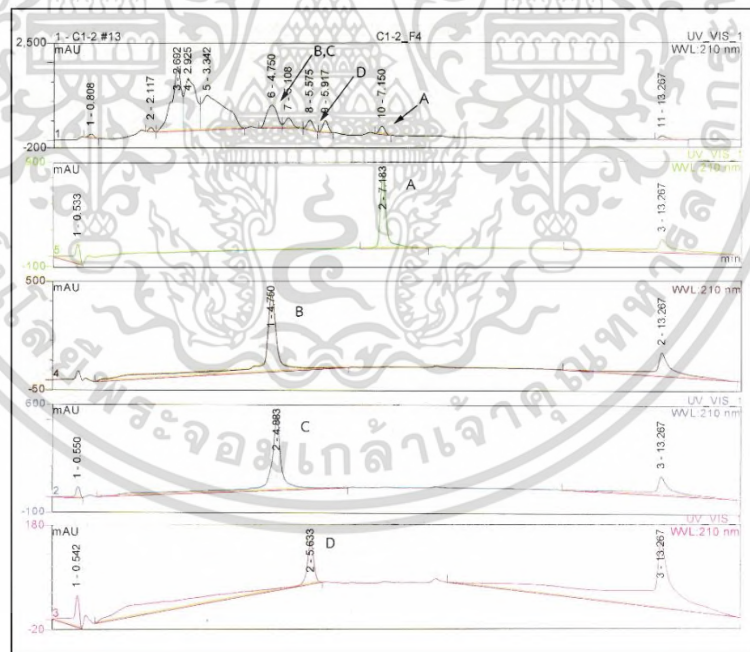
4.2 การศึกษาสารทุติยภูมิที่ผลิตได้จากไอโซเลต C1-2

4.2.1 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบและการทำสารสกัดหยาบให้บริสุทธิ์

สารสกัดหยาบที่ได้จากไอโซเลต C1-2 ถูกนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง HPLC จากรูปแบบทางเคมี (chemical profiles) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทของไอโซเลต C1-2 มีองค์ประกอบทางเคมีซับซ้อนกว่าสารสกัดในชั้นเมทานอล (รูปที่ 4.10) และมีองค์ประกอบที่น่าสนใจในแง่ของการปรากฏของพีคในเวลาที่แตกต่างกัน (retention time; t_R) และรูปแบบของการดูดกลืนแสงในช่วงของ UV (UV spectrum) จากการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทจึงถูกเลือกเพื่อแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี จากการเก็บส่วนตัวอย่าง (fraction) และรวมส่วนที่มีรูปแบบขององค์ประกอบทางเคมีเหมือนกัน ทำให้ได้องค์ประกอบทั้งหมด 6 ส่วน (fraction) ส่วนที่สนใจถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ C-18 preparative และใช้ระบบตัวทำละลายแบบ gradient ในการเก็บพีค (peak) ที่น่าสนใจในส่วนที่ 3 (F3) ที่ปรากฏค่า t_R ที่ 4.717 และ 4.854 นาที ในส่วนที่ 4 (F4) เก็บ peak ที่ปรากฏค่า t_R ที่ 4.758 (B), 4.833 (C), 5.633 (D), และ 7.183 (A) นาที (รูปที่ 4.11) และในส่วนที่ 5 (F5) เก็บ peak ที่ปรากฏค่า t_R ที่ 3.025 (G), 3.775 (F), และ 4.792 (E) นาที (รูปที่ 4.12)

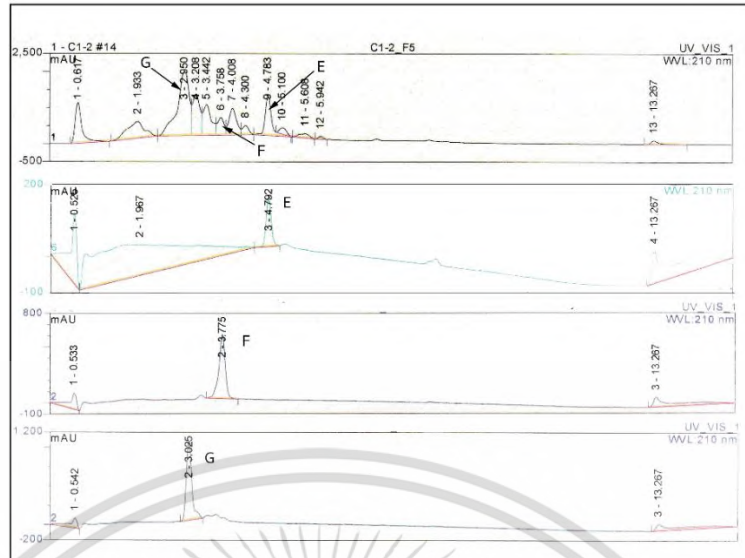


รูปที่ 4.10 Chemical profiles ของสารสกัดหยาบจากไอโซเลต C1-2
 (ก) chemical profile ของสารสกัดหยาบในชั้นเมทานอล
 (ข) chemical profile ของสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตท



รูปที่ 4.11 Chemical profiles ของส่วนที่ 4 (F4)

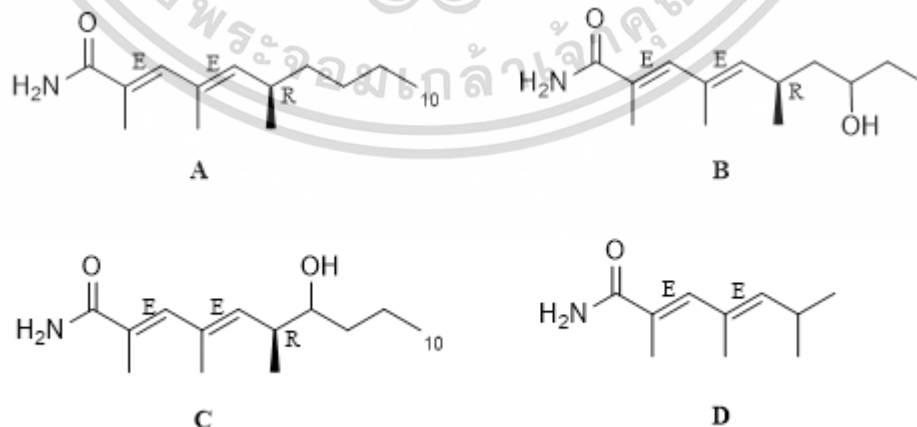
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 Chemical profiles ของส่วนที่ 5 (F5)

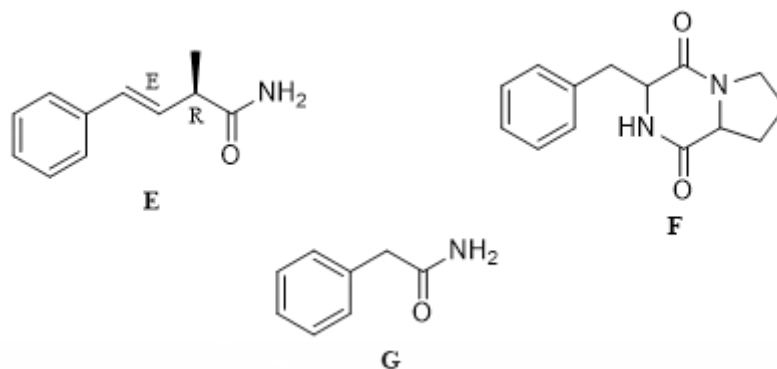
4.2.2 การวิเคราะห์โครงสร้างเคมีของสารทุติยภูมิจากไอโซเลต C1-2

จากการแยกสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี และทำให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง HPLC ทำให้ได้สารบริสุทธิ์ทั้งหมด 7 สาร (รูปที่ 4.13) โดยพบว่าเป็นสารชนิดใหม่ 3 สาร ได้แก่ (2*E*,4*E*)-7-hydroxy-2,4,6-trimethyldeca-2,4-dienamide (สาร C; t_R 4.833), (2*E*,4*E*)-2,4,6-trimethylhepta-2,4-dienamide (สาร D; t_R 5.633), และ (*E*)-2-methyl-4-phenylbut-3-enamide (สาร E; t_R 3.775) นอกนั้นเป็นสารที่มีผู้รายงานไว้แล้วจำนวน 4 สาร ซึ่งได้แก่ SW-B (สาร A; t_R 7.183) (Hwang *et al.*, 1996), cornifronin B (สาร B; t_R 4.758) (Wang *et al.*, 2018), cyclo (*L*-phenyl, *L*-proyl) diketopiperazine (สาร F; t_R 3.775) (Hamza *et al.*, 2018), และ 2-phenylacetamide (สาร G; t_R 3.025) (Dillman and Cardellina, 1991)



รูปที่ 4.13 โครงสร้างเคมีของสาร A – สาร G ผลิตจาก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ C1-2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

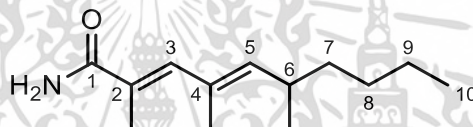


รูปที่ 4.14 โครงสร้างเคมีของสาร A – สาร G ผลิตจาก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ C1-2 (ต่อ)

จากการนำสารบริสุทธิ์ทั้งหมดที่แยกได้มาวิเคราะห์หาโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี ทำให้ได้โครงสร้างเคมีและคุณสมบัติทางเคมีของสารทั้ง 7 ชนิด โดยมีรายละเอียด ดังนี้

สาร A (SW-B; 2,4,6-trimethyldeca-2*E*,4*E*-dienamide) (รูปที่ 4.14) เป็นของเหลวหนืด สีเหลืองอมน้ำตาล สูตรโมเลกุลคือ $C_{13}H_{23}NO$ โดยคำนวณมาจากค่ามวลต่อประจุ (m/z) ที่ได้จาก HRESIMS สเปกตรัม เท่ากับ $232.1637 [M + Na]^+$ มีค่าการดูดกลืน UV ที่ความยาวคลื่น (λ_{max}) และ ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง ($\log \epsilon$) ในตัวทำละลายเมทานอล ดังนี้คือ 207 (3.52) นาโนเมตร จากสเปกตรัมของ ^{13}C NMR และ DEPT-135 ในตัวทำละลายอะซิโตน ($Acetone-d_6$) พบสัญญาณของเมทิลคาร์บอน (methyl; CH_3) จำนวน 4 หมู่ มีค่า chemical shift (δ_c) ที่ตำแหน่ง δ_c 14.5 (C-10), 16.8 (4- CH_3), 14.3 (2- CH_3), และ 21.2 (6- CH_3) ppm เมทิลีนคาร์บอน (methylene; CH_2) จำนวน 3 หมู่ ที่ตำแหน่ง δ_c 37.9 (C-7), 30.2 (C-8), และ 23.4 (C-9) ppm มีไธนคาร์บอน (methine; CH) จำนวน 3 หมู่ ที่ δ_c 138.2 (C-3), 140.9 (C-5), และ 33.4 (C-6) ppm และคาร์บอนจตุรภูมิ (quaternary carbon; C) จำนวน 3 อะตอม ที่ δ_c 171.7 (C-1), 129.9 (C-2), และ 131.4 (C-4) ppm สเปกตรัมของ 1H NMR พบสัญญาณของเมทิลโปรตอน จำนวน 4 หมู่ ที่ตำแหน่ง δ_H 0.88 (H-10) 0.98 (6- CH_3) 1.80 (4- CH_3) และ 1.98 (6- CH_3) ppm เมทิลีนโปรตอน จำนวน 3 หมู่ ที่ตำแหน่ง δ_H 1.25-1.30 (H-7), 1.28-1.35 (H-9), และ 1.35-1.41 (H-8) ppm มีไธนโปรตอน จำนวน 3 หมู่ ที่ตำแหน่ง δ_H 2.49 (H-6), 5.27 (H-5), และ 6.81 (H-3) ppm จากเทคนิค HMBC แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนและคาร์บอน โดยโปรตอน H-3 (δ_H 6.81) มีความสัมพันธ์กับคาร์บอนตำแหน่ง C-1 (δ_c 171.1), C-2 (δ_c 14.3), 2- CH_3 (δ_c 16.8), 4- CH_3 (δ_c 16.8), และ C-5 (δ_c 140.9) โปรตอน H-5 (δ_H 5.27) สัมพันธ์กับคาร์บอนตำแหน่ง C-3 (δ_c 138.2), 4- CH_3 (δ_c 16.8), และ C-6 (δ_c 33.4) โปรตอน H-6 (δ_H 2.49) สัมพันธ์กับคาร์บอนตำแหน่ง C-7 (δ_c 37.9) โปรตอน H-7 (δ_H 1.23-1.35 และ 1.35-1.42) สัมพันธ์กับคาร์บอนตำแหน่ง C-6, C-8 (δ_c 30.2) และคาร์บอน C-9 (δ_c 23.4) โปรตอน H-9 (δ_H 1.23-1.35) สัมพันธ์กับคาร์บอนตำแหน่ง C-7 และ C-8 โปรตอน H-10 (δ_H 0.90) สัมพันธ์กับคาร์บอนตำแหน่ง C-8 และ C-9 โปรตอนที่ตำแหน่ง 2- CH_3 (δ_H 1.98) เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัมพันธ์กับคาร์บอน C-1, C-2 และ C-3 โปรตอนที่ตำแหน่ง 4-CH₃ (δ_H 1.80) สัมพันธ์กับคาร์บอนตำแหน่ง C-3, C-4 และ C-5 โปรตอนที่ตำแหน่ง 6-CH₃ (δ_H 0.98) สัมพันธ์กับคาร์บอนตำแหน่ง C-5, C-6, และ C-7 โปรตอนที่ตำแหน่ง 2-CH₃ (δ_H 1.98) สัมพันธ์กับคาร์บอนตำแหน่ง C-1, C-2, และ C-3 และโปรตอนที่ตำแหน่ง 4-CH₃ (δ_H 1.80) สัมพันธ์กับคาร์บอนตำแหน่ง C-3, C-4, และ C-5 นอกจากนี้ ¹H-¹H COSY สเปกตรัมยังพบการคู่ควระหว่างโปรตอนที่ตำแหน่ง 6-CH₃ (δ_H 0.98) กับโปรตอน H-6 (δ_H 2.49) และ โปรตอน H-10 (δ_H 0.88) กับโปรตอน H-9 (δ_H 1.28-1.35) สเปกตรัมของ NOESY แสดงให้เห็นว่าโปรตอน H-3 มีความสัมพันธ์กับโปรตอน H-5 และโปรตอน 4-CH₃ กับโปรตอน 2-CH₃ แสดงความสัมพันธ์ของพันธะคู่ว่าเป็น *trans*- เมื่อเปรียบเทียบสเปกตรัม ¹H และ ¹³C NMR ของสาร A กับสาร SW-B (2,4,6-trimethyldeca-2E,4E-dienamide) (Hwang *et al.*, 1996) (ตาราง 4.3) พบว่ามีความใกล้เคียงกัน ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าสาร A คือ SW-B ที่ได้รายงานไว้จาก *Streptomyces flavescens* (Hwang *et al.*, 1996)



รูปที่ 4.15 โครงสร้างทางเคมีของสาร A (SW-B หรือ 2,4,6-trimethyldeca-2E,4E-dienamide)

ตารางที่ 4.4 ¹H NMR และ ¹³C NMR สเปกตรัมของสาร A ใน acetone-*d*₆ และ SW-B ใน CD₃OD

ตำแหน่ง	สาร A ^a		SW-B ^a (Hwang <i>et al.</i> , 1996)	
	δ_C (ppm), ชนิดของคาร์บอน	δ_H (ppm), รูปแบบของสัญญาณ	δ_C (ppm), ชนิดของคาร์บอน	δ_H (ppm), รูปแบบของสัญญาณ
1	171.8, C	-	175.4, C	-
2	129.9, C	-	129.4, C	-
3	138.2, CH	6.78, s	140.2, CH	6.77, s
4	131.4, C	-	131.7, C	-
5	141.0, CH	5.27, d (<i>J</i> = 9.6 Hz)	142.0, CH	5.27, d (<i>J</i> = 9.7 Hz)
6	33.4, CH	2.46-2.54, m	33.9, CH	2.49, m
7	37.9, CH ₂	1.23-1.35, m / 1.35-1.42, m	38.3, CH ₂	1.25-1.30, m
8	30.2, CH ₂	1.23-1.35, m	31.0, CH ₂	1.35-1.40, m
9	23.4, CH ₂	1.23-1.35, m	23.9, CH ₂	1.28-1.35, m

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์การใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อเผยแพร่ให้ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ^1H NMR และ ^{13}C NMR สเปกตรัมของสาร A ใน acetone- d_6 และ SW-B ใน CD_3OD (ต่อ)

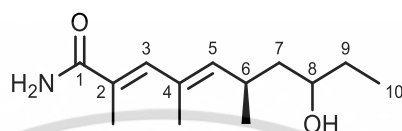
ตำแหน่ง	สาร A ^a		SW-B ^a (Hwang <i>et al.</i> , 1996)	
	δ_{C} (ppm), ชนิดของคาร์บอน	δ_{H} (ppm), รูปแบบของสัญญาณ	δ_{C} (ppm), ชนิดของคาร์บอน	δ_{H} (ppm), รูปแบบของสัญญาณ
9	23.4, CH_2	1.23-1.35, m	23.9, CH_2	1.28-1.35, m
10	14.5, CH_3	0.90, t ($J = 6.7$ Hz)	14.5, CH_3	0.89, t
2- CH_3	14.3, CH_3	1.98, s	14.4, CH_3	1.97, s
4- CH_3	16.8, CH_3	1.80, s	16.7, CH_3	1.81, s
6- CH_3	21.2, CH_3	0.98, d ($J = 6.7$ Hz)	21.2, CH_3	0.98, d
NH_2		6.01 (s) / 6.84 (s)		

หมายเหตุ ^a ^1H NMR 500 MHz และ ^{13}C NMR 125 MHz

สาร B (Cornifronin B หรือ 8-hydroxy-2,4,6R-trimethyldeca-2E,4E-dienamide) (รูปที่ 4.15) เป็นสารที่มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลือง สูตรโครงสร้างคือ $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{NO}_2$ มวลโมเลกุลจาก HRESIMS ในหน่วย m/z คือ 248.1629 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ มีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น λ_{max} ในตัวทำละลายเมทานอล คือ 209 และ 260 นาโนเมตร มีค่ามุมของการหมุนของแสงของระนาบโพลาไรซ์ (optical rotation; $[\alpha]_{\text{D}}^{26}$) ในตัวทำละลายคลอโรฟอร์มเท่ากับ -15.63 จากการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วย FTIR พบสัญญาณที่ความถี่ 3356 3208 2961 2926 2870 1660 1592 1453 1380 1339 1123 และ 1015 cm^{-1} จาก ^{13}C NMR และ DEPT 135 สเปกตรัม ในตัวทำละลายอะซิโตน (Acetone- d_6) พบสัญญาณของเมทิลคาร์บอน (methyl; CH_3) จำนวน 4 สัญญาณ ที่ตำแหน่ง δ_{C} 10.3 (C-10), 14.5 (2- CH_3), 16.9 (4- CH_3) และ 21.8 (6- CH_3) ppm สัญญาณของเมทิลีนคาร์บอน (methylene; CH_2) จำนวน 2 สัญญาณ ที่ตำแหน่ง δ_{C} 32.0 (C-9) และ 45.7 (C-7) ppm สัญญาณของมีไธน์คาร์บอน (methine; CH) จำนวน 4 สัญญาณ ที่ตำแหน่ง δ_{C} 33.4 (C-6), 71.1 (C-8), 138.4 (C-3) และ 140.8 (C-5) ppm และสัญญาณของคาร์บอนจตุรภูมิ (quaternary carbon; C) 3 สัญญาณ ที่ตำแหน่ง δ_{C} 129.8 (C-2), 131.9 (C-4) และ 171.8 (C-1) ppm ส่วน ^1H NMR สเปกตรัม พบสัญญาณของเมทิลโปรตอนจำนวน 4 สัญญาณ ที่ตำแหน่ง δ_{H} 0.89 (H-10), 0.99 (6- CH_3), 1.84 (4- CH_3), และ 1.98 (2- CH_3) สัญญาณของเมทิลีนโปรตอน ที่ตำแหน่ง δ_{H} 1.35-1.38 (H-7 และ H-9) และ สัญญาณของมีไธน์โปรตอน ที่ตำแหน่ง δ_{H} 2.80-2.95 (H-6), 3.34-3.38 (H-8), 5.26 (H-5), และ 6.78 (H-3) ประกอบกับการวิเคราะห์ผลจากเทคนิค COSY และ HMBC พบว่า สาร B มีความคล้ายคลึงกับในทางโครงสร้างกับสาร cornifronin B เมื่อเปรียบเทียบ ^1H NMR และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้ใช้ในเชิงวิชาการเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

^{13}C NMR สเปกตรัมของสาร B กับ cornifronin B หรือ (2*E*,4*E*,6*R*)-8-hydroxy-2,4,6-trimethyldeca-2,4-dienamide (Wang *et al*, 2018) พบว่าเหมือนกัน (ตาราง 4.4) นอกจากนี้ ค่ามุมของการหมุนของแสงของระนาบโพลาไรซ์ (optical rotation value, $[\alpha]_D$) ของสาร B พบว่ามีความใกล้เคียงกับ cornifronin B ($[\alpha]_D^{20}$ -27.5, MeOH) ดังนั้นจึงสรุปว่าโครงสร้างสามมิติของสาร B (รูปที่ 4.15) เหมือนกับ cornifronin B ที่แยกได้จาก *Streptomyces* sp. OC1401 (Wang *et al.*, 2018)



รูปที่ 4.16 โครงสร้างเคมีของสาร B (cornifronin B; (2*E*,4*E*,4*R*)-8-hydroxy-2,4,6-trimethyldeca-2,4-dienamide)

ตารางที่ 4.6 ^1H NMR และ ^{13}C NMR สเปกตรัมของสาร B ใน acetone- d_6 และ cornifronin B ใน CDCl_3

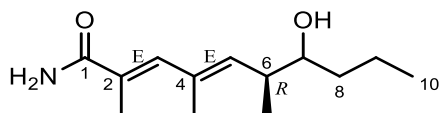
ตำแหน่ง	สาร B ^a		cornifronin B ^b (Wang <i>et al.</i> , 2018)	
	δ_C (ppm), ชนิดของ คาร์บอน	δ_H (ppm) รูปแบบของสัญญาณ	δ_C (ppm), ชนิดของ คาร์บอน	δ_H (ppm) รูปแบบของสัญญาณ
1	171.8, C	-	171.9, C	-
2	129.8, C	-	127.7, C	-
3	138.4, CH	6.78, s	139.5, CH	6.84, s
4	131.9, C	-	131.1, C	-
5	140.8, CH	5.26, d ($J = 10.0$ Hz)	140.9, CH	5.28, d ($J = 9.9$ Hz)
6	30.0, CH	2.80-2.95, m	29.6, CH	2.81, m
7	45.7, CH ₂	1.35-1.48, m	44.7, CH ₂	1.45, m
8	71.1, CH	3.34-3.38, m	71.6, CH	3.45, m
9	32.0, CH ₂	1.35-1.38, m	31.1, CH ₂	1.45, m
10	10.3, CH ₃	0.89, t ($J = 7.4$ Hz)	9.9, CH ₃	0.93, t ($J = 7.5$ Hz)
2-CH ₃	14.5, CH ₃	1.98, s	14.3, CH ₃	2.02, s
4-CH ₃	16.9, CH ₃	1.84, s	16.6, CH ₃	1.87, s
6-CH ₃	21.8, CH ₃	0.99, d ($J = 6.7$ Hz)	21.4, CH ₃	1.02, d ($J = 6.7$ Hz)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์อื่นใด ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ ^a ¹H NMR 400 MHz และ ¹³C NMR 100 MHz , ^b ¹H NMR 500 MHz และ ¹³C NMR 125 MHz

สาร C ((2E,4E)-7-hydroxy-2,4,6-trimethyldeca-2,4-dienamide) (รูปที่ 4.16) ลักษณะเป็นของหนืดสีเหลือง สูตรโครงสร้างคือ C₁₃H₂₃NO₂ มวลโมเลกุลจาก HRESIMS ในหน่วย *m/z* คือ 248.1629 [M + Na]⁺ ความยาวคลื่นสูงสุดและค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง ($\lambda_{\max}(\log \epsilon)$) ของสาร B ในตัวทำละลายเมทานอล คือ 201 (4.50) และ 259 (4.45) นาโนเมตร มีค่ามุมของการหมุนของแสงของระนาบโพลาริซ (optical rotation; $[\alpha]_D^{26}$) ในตัวทำละลายคลอโรฟอร์มเท่ากับ -5.45 จากการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วย FTIR พบสัญญาณที่ 3355 3210 2959 2930 2871 1661 1592 1454 1380 และ 1011 cm⁻¹ จาก ¹³C NMR และ DEPT 135 สเปกตรัม พบสัญญาณของเมทิลคาร์บอน (methyl; CH₃) จำนวน 4 สัญญาณ ที่ตำแหน่ง δ_C 14.4 (2-CH₃), 14.5 (C-10), 16.5 (6-CH₃) และ 16.9 (4-CH₃) ppm พบสัญญาณเมทิลีนคาร์บอน (methylene; CH₂) จำนวน 2 สัญญาณ ที่ตำแหน่ง δ_C 19.8 (C-9) และ 38.3 (C-8) ppm พบสัญญาณมีไธนคาร์บอน (methine; CH) จำนวน 3 สัญญาณ ที่ตำแหน่ง δ_C 40.2 (C-6), 75.3 (C-7) และ 138.3 (C-3, C-5) ppm และสัญญาณของคาร์บอนจตุรภูมิ (quaternary carbon; qC) 3 สัญญาณ ที่ตำแหน่ง δ_C 130.0 (C-2), 131.9 (C-4) และ 171.8 (C-1) ppm ในส่วนของ ¹H NMR สเปกตรัม พบสัญญาณของเมทิลโปรตอนจำนวน 4 สัญญาณ ที่ตำแหน่ง δ_H 0.88 (H-10) 1.03 (6-CH₃) 1.82 (4-CH₃) และ 1.98 (2-CH₃) ppm สัญญาณของเมทิลีนโปรตอนจำนวน 2 สัญญาณ ที่ δ_H 1.30-1.40 และ 1.44-1.55 (H-8, H-9) ppm และสัญญาณของมีไธนโปรตอนจำนวน 4 สัญญาณ ที่ δ_H 2.42-2.54 (H-6), 3.34-3.42 (H-7), 5.41 (H-5) และ 6.78 (H-3) ppm จากการวิเคราะห์ผลของ COSY สเปกตรัม พบว่า H-5 – H-10 ต่อกับเป็นแบบเส้นตรง โดยที่ 2-CH₃ ติดกับ C-6 ผลจาก HSQC สเปกตรัม (ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ของโปรตอนที่ติดกับคาร์บอนนั้นๆ) พบว่า C-7 ต่อกับออกซิเจนโดยมีค่า $\delta_C = 75.3$ จากการวิเคราะห์ผลจาก HMBC สเปกตรัม (ตารางที่ 4.5) พบว่า โปรตอนที่ตำแหน่ง δ_H 1.98 (2-CH₃) สัมพันธ์กับคาร์บอนตำแหน่ง C-1 (δ_C 171.8), C-2 (δ_C 130.0) และ C-3 (δ_C 138.3) โปรตอนที่ตำแหน่ง δ_H 1.82 (4-CH₃) สัมพันธ์กับคาร์บอนตำแหน่ง C-3, C-4 (δ_C 131.9) และ C-5 (δ_C 138.3) โปรตอนที่ตำแหน่ง δ_H 1.03 (6-CH₃) สัมพันธ์กับคาร์บอนตำแหน่ง C-5, C-6 (δ_C 40.2) และ C-7 (δ_C 75.3) นอกจากนี้ จากการวิเคราะห์ผลของ NOESY สเปกตรัม พบว่า H-3 สามารถเห็นโปรตอน H-5 และโปรตอนที่ตำแหน่ง 2-CH₃ สามารถเห็นโปรตอน 4-CH₃ จากข้อมูลของ NOESY สามารถสรุปได้ว่าพันธะคู่ของสาร C ควรจะเป็นแบบ *E* (*trans*-) จากข้อมูลทั้งหมดข้างต้นสามารถวาดโครงสร้างทางเคมีของสาร C ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4.16 โดยสาร C คือ (2E,4E)-7-hydroxy-2,4,6-trimethyldeca-2,4-dienamide จากการสืบค้นพบว่าสาร C เป็นสารใหม่ และ น่าจะมาจากชีวสังเคราะห์เดียวกันกับสาร A และ B ดังนั้นรูปแบบ configuration ที่ตำแหน่ง C-6 ควรจะเป็น *R* เหมือนกับสาร A และสาร B

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.16 โครงสร้างเคมีของสาร C [(2E,4E,6R)-7-hydroxy-2,4,6-trimethyldeca-2,4-dienamide]

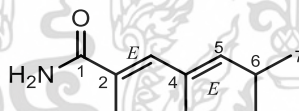
ตารางที่ 4.7 ^1H NMR และ ^{13}C NMR สเปกตรัมของสาร C ใน acetone- d_6

ตำแหน่ง	สาร C ^a		ผลจาก HMBC
	δ_{C} (ppm), ชนิดของคาร์บอน	δ_{H} (ppm), รูปแบบของสัญญาณ	
1	171.8, C	-	
2	130.0, C	-	
3	138.3, CH	6.78, s	C-1, C-2, C-5, 2-CH ₃ , 4-CH ₃
4	131.9, C	-	
5	138.3, CH	5.41, d ($J = 9.9$ Hz)	C-3, C-7, 4-CH ₃ , 6-CH ₃
6	40.2, CH	2.42-2.54, m	C-4, C-8
7	75.3, CH	3.34-3.42, m	C-5, C-8, C-9
8	38.3, CH ₂	1.30-1.40, m / 1.44-1.55, m	C-6, C-8, C-10
9	19.8, CH ₂	1.30-1.40, m / 1.44-1.55, m	C-7, C-8, C-10
10	14.5, CH ₃	0.88, t ($J = 6.8$ Hz)	C-8, C-9
2-CH ₃	14.4, CH ₃	1.98, s	C-1, C-2, C-3
4-CH ₃	16.9, CH ₃	1.82, s	C-3, C-4, C-5
6-CH ₃	16.5, CH ₃	1.03, d ($J = 6.7$ Hz)	C-5, C-6, C-7
7-OH		3.52, s	C-6, C-7, C-8
NH ₂		6.16, br	

หมายเหตุ ^a ^1H NMR 400 MHz และ ^{13}C NMR 100 MHz

สาร D [2E,4E)-2,4,6-trimethylhepta-2,4-dienamide] (รูปที่ 4.17) ลักษณะเป็นของหนืด สีเหลือง สูตรโครงสร้างคือ C₁₀H₁₇NO มวลโมเลกุลจาก HRESIMS ในหน่วย m/z คือ 190.1216 [M + Na]⁺ ความยาวคลื่นสูงสุดและค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง (λ_{max} (log ϵ)) ของสาร D ในตัวทำละลายเมทานอล คือ 201 (4.38) และ 254 (4.06) นาโนเมตร จากการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วย FTIR เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น มิอนุญาตให้นำไปใช้เพื่อเผยแพร่ข้อมูล การค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบสัญญาณที่ 3343, 3217, 2959, 2930, 2870, 1661, 1592, 1450, 1380, 1100, 1024 cm^{-1} ^{13}C NMR และ DEPT 135 สเปกตรัมในตัวทำละลายอะซิโตน ($\text{Acetone-}d_6$) (ตาราง 4.4) พบสัญญาณของเมทิลคาร์บอน (methyl; CH_3) จำนวน 3 สัญญาณ ที่ตำแหน่ง δ_{C} 14.4 (2- CH_3), 16.5 (4- CH_3) และ 22.9 (C-7, 6- CH_3) ppm สัญญาณของมีเทนคาร์บอน (methine; CH) จำนวน 3 สัญญาณ ที่ตำแหน่ง δ_{C} 28.1 (C-6), 138.2 (C-3) และ 141.8 (C-5) ppm และพบสัญญาณของคาร์บอนจตุรภูมิ (quaternary carbon; qC) 3 สัญญาณ ที่ตำแหน่ง δ_{C} 130.0 (C-2), 130.7 (C-4) และ 171.8 (C-1) ppm ^1H NMR สเปกตรัม พบสัญญาณของเมทิลโปรตอนจำนวน 3 สัญญาณ ที่ δ_{H} 0.99 (H-7 และ 6- CH_3), 1.81 (4- CH_3) และ 1.97 (2- CH_3) ppm จากผลของของ ^1H - ^1H COSY สเปกตรัม แสดงให้เห็นการคู่ควบของโปรตอน H-6 (δ_{H} 2.60-2.70) กับโปรตอน H-7 / 6- CH_3 (δ_{H} 0.99) และ H-5 (δ_{H} 5.32) ผลจากการวิเคราะห์ด้วย HMBC สเปกตรัม พบว่าโปรตอนที่ δ_{H} 1.97 (2- CH_3) สัมพันธ์กับ C-1 (δ_{C} 171.8), C-2 (δ_{C} 130.0) และ C-3 (δ_{C} 138.2) โปรตอนที่ δ_{H} 1.81 (4- CH_3) สัมพันธ์กับ C-3, C-4 (δ_{C} 130.7) และ C-5 (δ_{C} 141.8) โปรตอนที่ δ_{H} 0.99 สัมพันธ์กับ C-5 และ C-6 (δ_{C} 28.1) โปรตอนที่ δ_{H} 6.76 (H-3) สัมพันธ์กับ C-1 และ C-5 โปรตอนที่ δ_{H} 5.32 (H-5) สัมพันธ์กับ C-3 และ C-7 / 6- CH_3 จากผลของ NOESY แสดงให้เห็นว่าความสัมพันธ์ของพันธะคู่ในสาร D เป็นแบบ *E*- โดยโปรตอนของ H-3 สามารถเห็นโปรตอนของ H-5 และ โปรตอนที่ตำแหน่ง 6- CH_3 สามารถเห็นโปรตอนที่ตำแหน่ง 2- CH_3 จากข้อมูล 2D ข้างต้น สามารถสรุปโครงสร้างทางเคมีได้ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4.17 ดังนั้น สาร D คือ (2*E*,4*E*)-2,4,6-trimethylhepta-2,4-dienamide



รูปที่ 4.17 โครงสร้างเคมีของสาร D [(2*E*,4*E*)-2,4,6-trimethylhepta-2,4-dienamide]

ตารางที่ 4.6 ^1H NMR และ ^{13}C NMR สเปกตรัมของสาร D ใน $\text{acetone-}d_6$

ตำแหน่ง	สาร D ^a		ผลของ HMBC
	δ_{C} (ppm), ชนิดของคาร์บอน	δ_{H} (ppm), รูปแบบของสัญญาณ	
1	171.8, C	-	
2	130.0, C	-	
3	138.2, CH	6.76, s	C-1, C-5
4	130.7, C	-	
5	141.8, CH	5.32, d ($J = 9.2$ Hz)	C-3, C-7, 4- CH_3 , 6- CH_3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

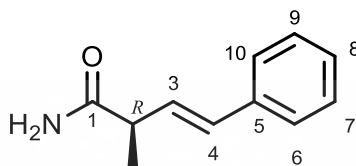
ตารางที่ 4.6 ^1H NMR และ ^{13}C NMR สเปกตรัมของสาร D ใน acetone- d_6 (ต่อ)

ตำแหน่ง	สาร D ^a		ผลของ HMBC
	δ_{C} (ppm), ชนิดของคาร์บอน	δ_{H} (ppm), รูปแบบของสัญญาณ	
6	28.1, CH	2.60-2.70, m	C-4, C-7, 6-CH ₃
7	22.9, CH ₃	0.99, d ($J = 6.6$ Hz)	C-5, C-6, 6-CH ₃
8	-	-	
9	-	-	
10	-	-	
2-CH ₃	14.4, CH ₃	1.97, s	C-1, C-2, C-3
4-CH ₃	16.5, CH ₃	1.81, s	C-3, C-4, C-5
6-CH ₃	22.9, CH ₃	0.99, d ($J = 6.6$ Hz)	C-5, C-6, 6-CH ₃

หมายเหตุ ^a ^1H NMR 400 MHz และ ^{13}C NMR 100 MHz

สาร E [(*R*, *E*)-2-methyl-4-phenylbut-3-enamide] (รูปที่ 4.18) ลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาล สูตรโครงสร้างคือ $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}$ มวลโมเลกุลจาก HRESIMS ในหน่วย m/z คือ 198.0889 [$\text{M} + \text{Na}$]⁺ ความยาวคลื่นสูงสุดและค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง (λ_{max} ($\log \epsilon$)) ของสาร E ในตัวทำละลายเมทานอล คือ 201 (4.27) และ 252 (3.96) นาโนเมตร มีค่ามุมของการหมุนของแสงของระนาบโพลาไรซ์ (optical rotation; $[\alpha]_D^{26}$) ในตัวทำละลายคลอโรฟอร์มเท่ากับ -7.10 จากการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วย FTIR พบสัญญาณที่ความถี่ 3339 3192 2971 2932 1663 1614 1515 1495 1451 1380 1276 1155 968 748 695 cm^{-1} ^{13}C NMR และ DEPT 135 สเปกตรัม พบสัญญาณของเมทิลคาร์บอน (methyl; CH₃) จำนวน 1 สัญญาณ ที่ตำแหน่ง chemical shift (δ_{C}) 18.2 (2-CH₃) ppm พบสัญญาณมีไธน์คาร์บอน (methine; CH) จำนวน 6 สัญญาณ ที่ตำแหน่ง δ_{C} 44.9 (C-2), 127.0 (C-6, C10), 129.3 (C-7, C-9), 131.1 (C-4) และ 131.9 (C-3) ppm และคาร์บอนจตุรภูมิ (quaternary carbon จำนวน 2 สัญญาณ ที่ตำแหน่ง δ_{C} 176.1 (C-1) และ 138.2 (C-5) ppm จากผลของ COSY พบว่าสัญญาณของมีไธน์โปรตอนตำแหน่ง δ_{H} 7.23, 7.31 (2 โปรตอน) และ 7.41 (2 โปรตอน) แสดงถึงสัญญาณของวงเบนซีนที่มีกลุ่มแทนที่ 1 ตำแหน่ง นอกจากนั้นยังพบว่า มีไธน์โปรตอนตำแหน่ง δ_{H} 6.36 และ 6.53 คือ ไวนิล โปรตอน ซึ่งมีความสัมพันธ์เป็นแบบทรานส์ (*trans*-) เนื่องจากแสดงค่า coupling constant 15.9 Hz จากการวิเคราะห์ผลของ HMBC พบว่าโปรตอนที่ δ_{H} 6.53 (H-4) สัมพันธ์กับ C-5 (δ_{C} 138.2) และ C-6/C-10 (δ_{C} 127.0) เมทิลโปรตอนที่ δ_{H} 1.27 (2-CH₃) สัมพันธ์กับ C-1 (δ_{C} 176.1), C-2 (δ_{C} 44.9z) และ C-3 (δ_{C} 131.9) เมื่อนำข้อมูลข้างต้นประกอบกับ mass สเปกตรัม พบว่าสาร E คือ (*E*)-2-methyl-4-เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์ใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

phenylbut-3-enamide โดยพบว่ามีข้อมูล NMR คล้ายกับ (*E*)-2-methyl-4-phenylbut-3-enoic acid (ตาราง 4.7) นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบค่า optical rotation พบว่ามีค่าเป็นลบเหมือนกับ (*R, E*)-2-methyl-4-phenylbut-3-enoic acid ($[\alpha]_D -30$, CHCl_3) (Yadav et al., 2017) ดังนั้นตำแหน่ง C-2 ของสาร E ควรจะมี configuration เป็น *R* (รูปที่ 4.18)



รูปที่ 4.18 โครงสร้างเคมีของสาร E [(*R, E*)-2-methyl-4-phenylbut-3-enamide]

ตารางที่ 4.7 ^1H NMR และ ^{13}C NMR สเปกตรัมของสาร E ใน acetone- d_6

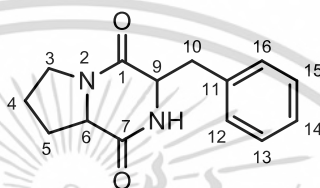
ตำแหน่ง	สาร E ^a		2-Methyl-4-phenylbut-3-enoic acid ^b ใน CDCl_3 (Yadav et al., 2017)	
	δ_{C} (ppm), ชนิดของคาร์บอน	δ_{H} (ppm), รูปแบบของสัญญาณ	δ_{C} (ppm), ชนิดของคาร์บอน	δ_{H} (ppm), รูปแบบของสัญญาณ
1	176.1, C	-	180.9, C	-
2	44.9, CH	3.23, quint ($J = 7.2$)	43.0, CH	3.34, m
3	131.9, CH	6.36, dd ($J = 15.9, 8.2$)	131.6, CH	6.28, dd ($J = 15.8, 8.3$)
4	131.1, CH	6.53, d ($J = 15.9$)	128.5, CH	6.51, d ($J = 15.8$)
5	138.2 C	-	136.7, C	-
6, 10	127.0, CH	7.41, d ($J = 7.7$)	126.3, C	7.18-7.43, m
7, 9	129.3, CH	7.31, t ($J = 7.4$)	127.9, CH	7.18-7.43, m
8	128.1, CH	7.23, t ($J = 7.9$)	127.6, CH	7.18-7.43, m
2-CH ₃	18.2, CH ₃	1.27, d ($J = 7.0$)	17.1, CH ₃	1.40, d ($J = 6.8$)

หมายเหตุ ^a คือ เครื่อง ^1H NMR 500 MHz และ ^{13}C NMR 125 MHz

^b คือ เครื่อง ^1H NMR 300 MHz และ ^{13}C NMR 75 MHz

สาร F (diketopiperazine cyclo-(L-phenyl, L-prolyl) (รูปที่ 4.19) มีลักษณะเป็นของหนืด สีเหลือง สูตรโครงสร้างคือ $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$ มวลโมเลกุลจาก HRESIMS ในหน่วย m/z คือ 267.1104 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ สเปกตรัม ^1H NMR พบสัญญาณของเมทิลีนโปรตอนจำนวน 4 สัญญาณที่ตำแหน่ง δ_{H} 3.47-3.50 (H-3) 1.73-1.81 (H-4) 1.28-1.38 (H-5) และ 3.08 (H-10) ppm เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีไทน์โปรตอน 2 สัญญาณ ที่ตำแหน่ง δ_{H} 4.07 (H-6) และ 4.41 (H-9) ppm พบสัญญาณมีไทน์โปรตอนของวงอะโรมาติก(aromatic protons) จำนวน 5 โปรตอน ที่ตำแหน่ง δ_{H} 7.19-7.31 เมื่อเปรียบเทียบ ^1H NMR สเปกตรัม ของสาร F กับสาร cyclo-(L-phenyl, L-prolyl) (Furtado *et al.*, 2005) ในตัวทำละลายเมทานอล (methanol- d_4) พบว่ามีความเหมือนกัน ดังนั้นสาร F คือ cyclo-(L-phenyl, L-prolyl) สารนี้เป็นสารที่มีผู้รายงานไว้แล้ว โดยแยกจาก *Streptomyces* sp. A 4.4 (Hamza *et al.*, 2018) ข้อมูลสเปกตรัม ^1H NMR และ ^{13}C NMR ของสาร F และ cyclo-(L-phenyl, L-prolyl) แสดงในตารางที่ 4.8



รูปที่ 4.19 โครงสร้างเคมีของสาร F [cyclo-(L-phenyl, L-prolyl)]

ตารางที่ 4.8 ^1H NMR สเปกตรัมของสาร F และ cyclo-(L-phenyl, L-prolyl)

ตำแหน่ง	^1H NMR ของสาร G ^{a,c} δ_{H} (ppm), รูปแบบของ สัญญาณ	^1H NMR ของสาร cyclo-(L-phenyl, L- prolyl) ^{b,c} δ_{H} (ppm), รูปแบบของสัญญาณ (Furtado <i>et al.</i> , 2005)
3	3.47-3.50, m	3.48-3.56, m
4	1.73-1.81, m	1.75-1.83, m
5	1.28-1.38, m	1.15-1.24, m
6	4.07, dd ($J = 6.84, 10.04$ Hz)	4.06, ddd ($J = 1.7, 6.3, 10.8$ Hz)
9	4.41, t ($J = 4.72$ Hz)	4.44, ddd ($J = 1.0, 4.8, 5.0$ Hz)
10	3.08, dd ($J = 5.96, 14.2$ Hz)	3.14, dd ($J = 5.0, 14.4$ Hz)
12	7.17-7.29, m	7.20-7.29, m
13	7.17-7.29, m	7.20-7.29, m
14	7.17-7.29, m	7.20-7.29, m
15	7.17-7.29, m	7.20-7.29, m
16	7.17-7.29, m	7.20-7.29, m

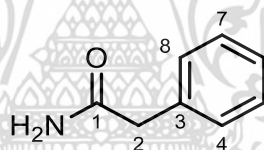
หมายเหตุ ^a ในตัวทำละลาย acetone- d_6 + D_2O

^b ในตัวทำละลาย CD_3OD

^c ^1H NMR 400 MHz

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาร G (2-phenylacetamide) (รูปที่ 4.20) ลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง สูตรโครงสร้างคือ C_8H_9NO มวลโมเลกุลจาก HRESIMS ในหน่วย m/z คือ 158.0588 $[M + Na]^+$ จาก ^{13}C NMR และ DEPT 135 สเปกตรัม ในตัวทำละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ($DMSO-d_6$) พบสัญญาณของเมทิลีนคาร์บอนจำนวน 1 สัญญาณ ที่ตำแหน่ง δ_C 42.3 (C-2) สัญญาณของมีเทนคาร์บอนจำนวน 3 สัญญาณ ที่ δ_C 126.3 (C-6), 128.2 (C-4, C-8) และ 129.1 (C-5, C-7) และสัญญาณของคาร์บอนจตุรภูมิ (quaternary carbon; qC) 2 สัญญาณ ที่ δ_C 136.5 (C-3) และ 172.4 (C-1) 1H NMR สเปกตรัมพบสัญญาณของเมทิลีนโปรตอนจำนวน 1 สัญญาณ ที่ δ_H 3.36 (H-2) สัญญาณของมีเทนโปรตอนของวงอะโรมาติก (aromatic protons) จำนวน 5 โปรตอน ที่ δ_H 7.19-7.31 (H-4, H-5, H-6, H-7, H-8) แสดงถึงวงเบนซีนที่มีหมู่แทนที่ 1 ตำแหน่ง จากการวิเคราะห์ผลของ HMBC แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ของโปรตอน H-2 (δ_H 3.36) กับ คาร์บอนตำแหน่ง C-1 (δ_C 172.4), C-3 (δ_C 136.5) และ C-4 / C-8 (δ_C 128.2) จากข้อมูลทั้งหมดข้างต้นสามารถสรุปได้ว่า สาร G 2-phenylacetamide และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับสาร 2-phenylacetamide (Dillman *et al.*, 1991) พบว่ามีความเหมือนกัน (ตาราง 4.9) สาร 2-phenylacetamide ได้มีผู้รายงานไว้แล้วว่าแยกได้จาก *Streptomyces* sp. OC1401 (Kornsakulkarn *et al.*, 2015)



รูปที่ 4.20 โครงสร้างเคมีของสาร G (2-phenylacetamide)

ตารางที่ 4.9 1H NMR และ ^{13}C NMR สเปกตรัม ของสาร G และ 2-phenylacetamide

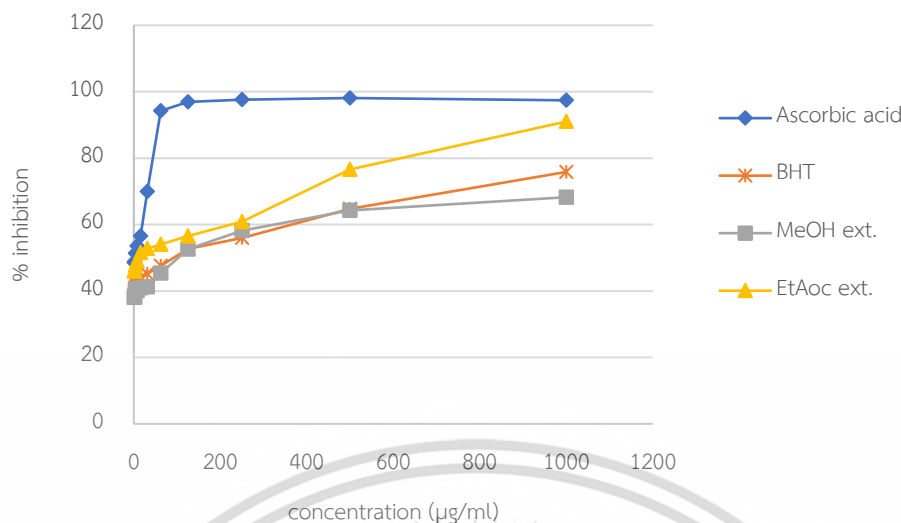
ตำแหน่ง	สาร G ^{a, c}		2-phenylacetamide ^{b, c} (Dillman <i>et al.</i> , 1991)	
	δ_C (ppm), ชนิดของ คาร์บอน	δ_H (ppm), รูปแบบของ สัญญาณ ^c	δ_C (ppm), ชนิด ของคาร์บอน ^d	δ_H (ppm), รูปแบบของ สัญญาณ
1	172.4	-	173.5	-
2	42.3	3.36, s	43.3	3.60, s
3	136.5	-	134.8	-
4, 8	128.2	7.19-7.31, m	129.0	7.3-7.4, m
5, 7	129.1	7.19-7.31, m	129.4	7.3-7.4, m
6	126.3	7.19-7.31, m	127.4	7.3-7.4, m

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับบริการใช้บนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์อื่นใด
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- หมายเหตุ ^a ในตัวทำละลาย DMSO- d_6
^b ในตัวทำละลาย acetone- d_6
^c ^1H NMR 400 MHz และ ^{13}C NMR 100 MHz
^d ในตัวทำละลาย CDCl_3

4.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารทุติยภูมิจากไอโซเลต C1-2

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระถูกทดสอบโดยนำสารสกัดหยาบในชั้นเมทานอล (methanolic crude extract) และสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate crude extract) ไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ด้วยวิธี DPPH free radical scavenging จากการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทแสดงความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีกว่าสารสกัดหยาบในชั้นเมทานอลอย่างเห็นได้ชัด ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทสามารถดักจับอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 91.03 ± 0.91 ด้วยค่าความเข้มข้นที่สามารถดักจับอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ที่ 10.85 ± 0.51 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดหยาบในชั้นเมทานอลสามารถดักจับอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 68.24 ± 0.47 ที่ความเข้มข้นเดียวกัน โดยมีค่า IC_{50} 111.44 ± 0.95 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.21) (ตารางที่ 4.10) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทมีความน่าสนใจที่จะนำมาแยกและศึกษาองค์ประกอบทางเคมี นอกจากนี้งานวิจัยแสดงให้เห็นว่าสารทุติยภูมิหลายชนิดที่สกุล *Streptomyces* สร้างขึ้นมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ยกตัวอย่างเช่น สาร naphterpin ที่แยกจาก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ CNQ-509 (Park *et al.*, 2018) สาร 1-hydroxy-1-norresistomycin ที่แยกจาก *Streptomyces variabilis* (Ramalingam and Rajaram, 2016) สารในกลุ่ม diketopiperazine จาก *Streptomyces* สายพันธุ์ VITMK1 (Manimaran and Krishnan, 2017) จากข้อมูลดังกล่าวสารทุติยภูมิที่แยกได้จากไอโซเลต C1-2 อาจจะสามารถแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้



รูปที่ 4.21 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดหยาบในชั้นเมทานอล เอทิลอะซิเตท และสารมาตรฐานกับร้อยละการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH

องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทที่ผ่านการแยกและวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีถูกทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH radical scavenging จากการทดลองพบว่าสารบริสุทธิ์ทั้ง 7 ชนิดมีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ได้ โดยมีค่า IC_{50} อยู่ระหว่าง 51.82 ± 0.78 ถึง 206.30 ± 4.14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สาร B สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีที่สุด รองลงมาคือสาร A โดยแสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีกว่าสารมาตรฐาน BHT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ค่า IC_{50} 51.28 ± 0.78 และ 56.21 ± 0.37 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่สาร E แสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ไม่แตกต่างจากสารมาตรฐาน BHT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ค่า IC_{50} 90.52 ± 1.65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสาร C D G และ F แสดงฤทธิ์น้อยกว่าสารมาตรฐาน BHT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ค่า IC_{50} 101.25 ± 0.62 109.47 ± 2.74 136.85 ± 0.58 และ 206.30 ± 4.14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.9) แสดงให้เห็นว่าสารบริสุทธิ์ที่ได้จากสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตททั้ง 7 ชนิด สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ เนื่องจากจากหมู่ไฮดรอกซิลและการเรียงกันของพันธะเดี่ยวสลับกับพันธะคู่ (conjugated double bonds) ที่อยู่ในโครงสร้างมีอิทธิพลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Wojtunik-Kulesza *et al.*, 2018) โครงสร้างเคมีของ สาร A-G มีหมู่ไฮดรอกซิลและพันธะคู่อยู่ในโครงสร้าง ดังนั้นสาร A-G จึงสามารถแสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ สำหรับสาร B เห็นได้ชัดว่ามีทั้งหมู่ไฮดรอกซิลและ conjugated double bonds จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดในทางกลับกัน แม้ว่าสาร C จะมีทั้งหมู่ไฮดรอกซิลและ conjugated double bonds เช่นเดียวกับกับสาร B แต่กลับมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแยกว่าสาร B ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิล ทำให้สาร B และ C แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ต่างกัน (Seyoum *et al.*, 2006) ในขณะที่สาร F และ G เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมอนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ผ่านการพิจารณาใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไม่มีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ในโครงสร้างจึงแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้แก่กว่าสาร B และ C แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าสาร F (cyclo (L-phenyl, L-prolyl) diketopiperazine) สามารถป้องกันรังสี (radioprotective) ได้ (Lee and Rhee, 2008) และยังสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNA topoisomerase ได้อีกด้วย (Rhee, 2002) จากงานวิจัยพบว่าสาร G (2-phenylacetamide) สามารถกระตุ้นการเจริญของพืช (plant growth regulator) ได้ (Takai *et al.*, 1963) นอกจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแล้วจากงานวิจัยพบว่าสาร A (SW-B) สามารถต้านการเจริญของจุลินทรีย์ และเชื้อราได้ (Hwang *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2018) ในขณะที่สาร B (cornifronin B) สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น (MIC > 1 mg/ml) (wang *et al.*, 2018) จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารทุติยภูมิทั้ง 7 ชนิดที่ผลิตจาก *Streptomyces griseoaurantiacus* สายพันธุ์ C1-2 นอกจากสามารถต้านอนุมูลอิสระได้แล้วยังมีศักยภาพในด้านอื่นอีกด้วยจึงอาจจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระหรือประยุกต์ใช้ในด้านอื่น ๆ ได้

ตารางที่ 4.10 ค่าความเข้มข้น ที่สามารถกักจับอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) ของสาร A-G

สาร	IC ₅₀ (µg/ml)
A	56.21±0.38 ^f
B	51.28±0.78 ^g
C	101.25±0.62 ^d
D	109.47±2.74 ^c
E	90.52±1.65 ^e
F	206.30±4.14 ^a
G	136.85±0.58 ^b
สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตท	10.85±0.51 ^h
สารสกัดหยาบในชั้นเมทานอล	111.44±0.95 ^c
กรดแอสคอร์บิก	0.89±0.09 ^j
BHT	92.55±1.55 ^e

หมายเหตุ ตัวอักษร a-i ที่แตกต่างกันในแถวแสดงถึงค่าเฉลี่ยของค่า IC₅₀ ของสารที่นำมาทดสอบที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95) ด้วยวิธี Duncan's New multiple range test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการนำแอคติโนมัยสีทไอโซเลต C1-2 ที่แยกได้จากดินป่าชายเลน จังหวัดเพชรบุรี มารับสายพันธุ์โดยใช้การศึกษาทางอนุกรมวิธาน ได้แก่ ลักษณะทางฟีโนไทป์ ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี และลักษณะทางจีโนมไทป์ จากการศึกษาทางอนุกรมวิธานทำให้ทราบว่าไอโซเลต C1-2 มีการสร้างเส้นใยอาหารสีน้ำตาลแดงและเส้นใยอากาศสีเทา กลาง สปอร์มีผิวเรียบเรียงต่อกันเป็นเกลียว จากลักษณะอนุกรมวิธานเคมีพบว่าไอโซเลต C1-2 มีกรดไดอะมิโนพิเมลิกเป็นแบบ LL-DAP จึงจัดเป็นสมาชิกในสกุล *Streptomyces* จากลักษณะทางจีโนมไทป์และการวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการพบว่าไอโซเลต C1-2 มีร้อยละความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์บนช่วงยีน 16S rRNA ร้อยละ 100 และมีตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต C1-2 จับคู่อยู่กับ *Streptomyces griseoaurantiacus* บนแผนภูมิวิวัฒนาการแบบ Neighbor-joining และ Maximum likelihood ด้วยค่า bootstrap ร้อยละ 100 จากการศึกษาวิเคราะห์ลักษณะอนุกรมวิธานโดยใช้ลักษณะทางจีโนม โดยเปรียบเทียบไอโซเลต C1-2 กับ *Streptomyces griseoaurantiacus* จากค่า Average nucleotide identity (ANI) และค่า digital DNA-DNA hybridization (dDDH) แสดงให้เห็นว่าไอโซเลต C1-2 คือ *Streptomyces griseoaurantiacus* ด้วยค่า ANI และ dDDH ร้อยละ 98.96 และร้อยละ 80 ตามลำดับ

การเพาะเลี้ยง *Streptomyces griseoaurantiacus* สายพันธุ์ C1-2 ในอาหารเหลว ISP2 ในสภาวะเขย่าเพื่อสกัดสารสกัดหยาบและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทมีความซับซ้อนขององค์ประกอบทางเคมีมากกว่าสารสกัดหยาบในชั้นเมทานอล สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทจึงถูกนำมาแยกองค์ประกอบทางเคมีและวิเคราะห์โครงสร้างเคมีของสารที่แยกได้ จากการแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ทำให้ได้สารทั้งหมด 6 ส่วน (Fractions) ส่วนที่ 3 4 และ 5 มีความน่าสนใจทางเคมี จึงถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง HPLC ทำให้ได้สารบริสุทธิ์ทั้งหมด 7 ชนิด จากการวิเคราะห์โครงสร้างเคมีด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปีพบว่า เป็นสารที่ถูกค้นพบแล้ว 4 ชนิด ได้แก่ สาร SW-B cornifronin B cyclo(phenyl-prolyl) diketopiperazine และ 2-phenylacetamide เป็นสารชนิดใหม่ 3 ชนิด ได้แก่ (2E,4E)-7-hydroxy-2,4,6-trimethyldeca-2,4-dienamide (2E,4E)-2,4,6-trimethylhepta-2,4-dienamide และ (E)-2-methyl-4-phenylbut-3-enamide

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารบริสุทธิ์ทั้ง 7 ชนิด ด้วยวิธี DPPH radical scavenging พบว่าสารบริสุทธิ์ทั้ง 7 ชนิดสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ โดยสาร Cornifronin B (สาร B) แยกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีที่สุด (IC₅₀= 51.28±0.78^g) รองลงมาคือ สาร A (IC₅₀=56.21±0.37^f) สาร E (IC₅₀=90.52±1.65^e) สาร D (IC₅₀=109.47±2.74^c) สาร C (IC₅₀=101.25±0.62^d) สาร G (IC₅₀=136.85±0.58^b) และสาร F (IC₅₀=206.30±4.14^a) ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารทุติยภูมิที่ผลิตจาก *Streptomyces griseoaurantiacus* สายพันธุ์ C1-2 มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารทุติยภูมิที่ผลิตได้จาก *Streptomyces griseoaurantiacus* สายพันธุ์ C1-2 โดยใช้ความน่าสนใจของสารทุติยภูมิจากลักษณะทางเคมีของสาร ดังนั้นหากต้องการสารทุติยภูมิชนิดอื่นที่อาจจะมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่มากกว่านี้ ควรจะต้องทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากแต่ละส่วน (fractions) ที่แยกได้จากเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ร่วมด้วย เพื่อที่จะสามารถคัดเลือกส่วนที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูง และอาจนำมาซึ่งการได้สารบริสุทธิ์ที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด

5.2.2 ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลองเท่านั้น เพื่อที่จะสามารถนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปประยุกต์ใช้ในด้านอื่น ๆ โดยเฉพาะการใช้กับมนุษย์ จึงควรที่จะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม ยกตัวอย่างเช่น การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ และการทดสอบอื่น ๆ เพื่อยืนยันความปลอดภัยในการนำไปใช้ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตรกระทรวงสาธารณสุขและสหกรณ์. 2535. **การใช้สารธรรมชาติป้องกันกำจัดศัตรูพืช**. กรุงเทพฯ.
- กิ่งจันทร์ มะลิซ้อน. 2555. “ความหลากหลายของแอคติโนแบคทีเรียในดิน” รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.
- กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ มาริสา รักสุขสมบัติ และสุภาภรณ์ ขานโบ. 2558. “เทคโนโลยีการวิเคราะห์ลำดับเบสยुकที่สองและสาม.” *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. 23(4) : 634-650.
- โกสินทร์ วิระชกร กุลธิดา กล้ารอด ประณิธิ หงส์ประภาส และพัชรี บุญศิริ. 2557. “ภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุลและสารต้านออกซิเดชันกับโรคมะเร็ง” *ศรีนครินทร์เวชสาร*. 29(2) : 207-219.
- จิตติ ท่าไ้. 2553. “กิจกรรมต้านจุลินทรีย์และการกำหนดองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยสีททางทะเล” รายงานการวิจัย คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ชมภูษ วิภูณานนท์ และวรวิฑู จุฬาลักษณ์านุกูล. 2553. “ชีวสารสนเทศ : การประยุกต์ใช้ในงานวิจัยวิทยาศาสตร์ชีวภาพ.” *Burapha Sci. J.* 15(2) : 99-106.
- ณัฐธิดา ศรีบุญวรกุล. 2560. “การประยุกต์ใช้แมสสเปกโทรเมทรีในห้องปฏิบัติการวิจัยทางคลินิก.” *วารสารเทคนิคการแพทย์*. 45(3) : 6127-6139.
- ธวัชชัย ศรีวิบูลย์. 2551. **ลิวิตโครมาโทกราฟี**. [Online]. Available : <http://old-book.ru.ac.th/e-book/c/CM334/CM334-4.pdf>.
- นันทวัน เนียมหอม. 2555. “ฤทธิ์ทางชีวภาพและอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากจากป่าพรุเขตอบอุ่นในประเทศไทย.” *วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง*.
- นันทวัน เนียมหอม. 2561. “อนุกรมวิธาน ฤทธิ์ทางชีวภาพ และความหลากหลายของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารประกอบโพลีคีโตนชนิดที่ 1 ของเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากพืชวงศ์ขิงของไทย.” *วิทยานิพนธ์ ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง*.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- เบญจมา ชุตินทรศาสตร์. 2551. การตรวจสอบออปติคอลโรเทชัน (Optical Rotation) โดยใช้เครื่อง polarimeter. [Online]. Available : [http://old-book.ru.ac.th/e-book/f/FY473\(51\)/FY473-4.pdf](http://old-book.ru.ac.th/e-book/f/FY473(51)/FY473-4.pdf).
- ประสิทธิ์ ผลิตผลการพิมพ์ และนเรศ ดำรงชัย. 2543. จีโนม : เรื่องที่ทุกคนควรรู้. พิมพ์ครั้งที่ 1. ปทุมธานี. :หน่วยเผยแพร่เทคโนโลยีและประชาสัมพันธ์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ.
- รวีวรรณ วัฒนดิถก ปาริชาติ นารีบุญ และสมรัฐ ทวีเดช. 2558. การค้นหาแรงควัตถุที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ทะเล. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- รัชณี ตัณฑพานิชกุล. 2550. โปรตอน-นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโตรสโกปี. [Online]. Available : <http://old-book.ru.ac.th/e-book/c/CM328/CM328-11.pdf>.
- รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2547. การตรวจสอบและการสกัดแยกสาระสำคัญจากสมุนไพร. กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- รัตนารักษ์ ศรีวิบูล จีรวรรณ เพ็ญ และปรากรม ประยูรรัตน์. 2549. “การแยกเชื้อและจำแนกสเตรปโตมัยซีสจากดินชายฝั่งของเกาะช้าง จังหวัดตราด” *Burapha Sci. J.* 2 : 61-66.
- วนาพร แซ่อึ้ง. 2557. “การสกัดและการเมินฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระของน้ำมันรำข้าวไร้เพื่อประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- สมชาย แสงอำนาจเดช. 2551. “ขั้นตอนง่าย ๆ ในการสร้างไฟโลเจเนติกทรี.” *NU. J.* 16(2) : 181-188.
- สัณชัย พยุภกร. 2561. *อณูไวรัสวิทยาเชิงคอมพิวเตอร์*. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ. : โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุภานันท์ แซ่ลิ้ม. 2548. “สารต้านแบคทีเรียจากแอคติโนมัยซีทในทะเลของประเทศไทย” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- สุภาพรณ พัทธ์กิจ วสันต์ เพชรรัตน์ และเสมอใจ ชื่นจิตต์. 2557. “การคัดเลือกเชื้อ *Streptomyces* spp. จากดินรอบโคนต้นปาล์มน้ำมันในภาคใต้ของประเทศไทยสำหรับควบคุมเชื้อราก่อโรคปาล์มน้ำมันโดยชีววิธี.” *วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์*. 1(1) : 77-81.
- หรรษา จรรย์แสง และอดิสรณ์ มนต์วิเศษ. 2563. *Eye on the Ocean*. [online]. Available : http://www.arri.chula.ac.th/Academic/karuvichai/Sara_MS/sara4.pdf.
- อนงนาฏ ไพนุงศ์. 2560. “อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระกับสุขภาพ” *PKRU. Scitech. Journal*. 1(2) : 20-27.
- อรทัย ลีลาพจนานพร. 2546. *Fourier Transform InfraRed Spectrometer*. [Online]. Available : http://www.dss.go.th/images/st-article/lpd_10_2546_ft-ir.pdf.
- อรุณรัตน์ สัตตฤติกวินสกุล. 2563. *อะตอมคาร์บอน-13 นิวเคลียร์แมกนีติกเรโซแนนซ์และนิวเคลียร์แมกนีติกเรโซแนนซ์แบบ 2 มิติ*. [Online]. Available : <http://pws.npru.ac.th/arunrat/data/files/ch6%2013C%20NMR%262D%20NMR.pdf>.
- อลิษา วิลันโท อรุณช ประดิษฐ์ทรัพย์ วรณวิสาข์ เจริญฉิม ศุภศักดิ์ กุลวงศ์อนันชัย อนันต์ชัย อัครเมฆินและศิษฏศ ทองสีมา. 2555. “เทคโนโลยีเอ็นจีเอสและการประยุกต์ในงานวิจัยโอมิกส์.” *Thai. J. Genet*. 5(2) : 104-129.
- อารีย์รัตน์ หนูนวล. 2560. *Fundamentals of Human Genetics and Genomics*. [online]. Available : https://meded.psu.ac.th/binlaApp/class02/B2_364_221/Molecular_genetic_part1.
- อำไพทิพย์ สุขหอม. 2553. “ความหลากหลายของแบคทีเรียสเตรปโตมัยซีทบริเวณหมู่เกาะตะรุเตา.” *รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์*.
- Abd-Ellatif, A. E., Abdel-Razek, A. S., Hamed, A., Soltan, M. M., Soliman, H. S., and Shaaban, M. 2019. "Bioactive compounds from marine *Streptomyces* sp.: Structure identification and biological activities." *Vietnam J. Chem*. 57(5) : 628-635.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Ahsan, T., Chen, J., Zhao, X., Irfan, M., and Wu, Y. 2017. "Extraction and identification of bioactive compounds (eicosane and dibutyl phthalate) produced by *Streptomyces* strain KX852460 for the biological control of *Rhizoctonia solani* AG-3 strain KX852461 to control target spot disease in tobacco leaf." *AMB Express*. 7(1) : 54.
- Andreou, L.-V. 2013. "Preparation of genomic DNA from bacteria." *Methods Enzymol*. 529 : 143-151.
- Ansorge, W.J., 2009. "Next-generation DNA sequencing techniques." *New. Biotechnol*. 25(4) : 195-203.
- Arai, T., Tamotsu, F., Masa, H., Akihiro, M., and Yuzuru, M. 1975. " Culture media for actinomycetes." *Tokyo: The Society for Actinomycetes Japan* : 1-20.
- Arifuzzaman, M., Khaton, M.R., and Rahman, H. 2010. "Isolation and screening of actinomycetes from Sundarbans soil for antibacterial activity." *Afr. J. Biotechnol*. 9(29) : 4615-4619.
- Augustyn, A., Bauer, P., Duignan, B., Eldridge, A., Gregersen, E., Mckenna, A., Petruzzello, M., Rafferty, J.P., Ray, M., Rogers, K., Tikkanen, A., Wallenfeldt, J., Zeidan, A. and Zelazko, A. 2019. **DNA**. [online]. Available: <https://www.britannica.com/science/DNA>.
- Blin, K. Medema, M.H., Kottmann, R., Lee, S.Y. and Weber, T. 2016. "The antiSMASH database, a comprehensive database of microbial secondary metabolite biosynthetic gene clusters." *Nucleic Acids Res*. 45 : 555-559.
- Bryant, D.W. Jr., Wong, W.K. and Mockler, T.C. 2009. "QSRA: a quality-value guided *de novo* short read sequence assembler." *BMC. Bioinform*. 10 : 69.
- Chandra, P., Sharma, R. K., and Arora, D. S. 2020. "Antioxidant compounds from microbial sources: A review." *Food Res. Int*. 129 : 108849.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Chater, K.F. 2006. "Streptomyces inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics." *Phil. Trans. R. Soc. B.* 361 : 761-768.
- Chauhan, T. 2018. **Different types of DNA extraction methods.** [online]. Available : <https://geneticeducation.co.in/different-types-of-dna-extraction-methods/>.
- Ceballos, R.A.C. and Niessan, W.M.A. 2017. **Interpretation of MS-MS Mass Spectra of Drugs and Pesticides.** New York : Wiley.
- Chen, G.-t., Ma, X.-m., Liu, S.-t., Liao, Y.-l., and Zhao, G.-q. 2012. "Isolation, purification and antioxidant activities of polysaccharides from *Grifola frondosa*." *Carbohydr. Polymers.* 89(1) : 61-66.
- Choi, G., Ryu, M.J., Park, Y.G. and Nam, S.J. 2019. "Antioxidant Activity of Germicidin A and B Isolated from the Marine-Derived *Streptomyces* sp. SCS525." *J. Mar. Biol. Oceanogr.* 8(2) : 1-4.
- Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahal, D. R., da Costa, M. S., Rooney, A. P., Yi, H., Xu, X.-W., De Meyer, S., and Trujillo, M. E. 2018. "Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes." *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68(1) : 461-466.
- Coleman, R. M., Georg, L. K., and Rozzell, A. R. 1969. "Actinomyces naeslundii as an Agent of Human Actinomycosis." *Appl. microbiol.* 18(3) : 420-426.
- Collins, M.D. and D. Jones. 1982. "Lipid composition of *Corynebacterium Paurometabolum* (Steinhaus)." *FEMS. Microbiol. Lett.* 13 : 13-16.
- Dekker, T. 2014. **Infrared spectroscopy.** [Online]. Available : <https://scientificgems.wordpress.com/tag/infrared-spectroscopy/>.
- Dillman, R. L., and Cardellina, J. H. 1991. "Aromatic Secondary Metabolites from the Sponge *Tedania ignis*." *J. Nat. Prod.* 54(4) : 1056-1061.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Ding, T., Yang, L.J., Zhang, W.D. and Shen, Y.H. 2019. "The secondary metabolites of rare actinomycetes: chemistry and bioactivity" *RSC. Adv.* 9 : 21964–21988.
- Drillon, G. Carbone, A. and Fischer, G. 2014. "SynChro: A Fast and Easy Tool to Reconstruct and Visualize Synteny Blocks along Eukaryotic Chromosomes." *PLoS. One.* 9(3) : e92621.
- Duan, Y.Y., Ming, H., Dong, L. Yin, Y.R., Zhang, Y., Zhou, E.M., Liu, L., Nie, G.X. and Li, W.J. 2014. "*Streptomyces calidiresistens* sp. nov., isolated from a hot spring sediment." *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 106 : 189-196.
- Duangjit, S., Suwannarat, K., Kittiphinitnuntha, K., Ongwisut, P., Bumrunghai, S., Ngawhirunpat, T., Charoenputtakun, P., and Sila-On, W. 2019. "Role of Natural Antioxidants for Topical Applications: Properties Efficacy Safety and Novel Delivery Systems." *Isan J. Pharm. Sci.* 15(1) : 21-48.
- Felsenstein, J. 1985. "Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap." *Evolution.* 39(4) : 783-791.
- Figueras, M.J., Beaz-Hidaigo, R., Hossain, M.J., and Liles, M.R. 2014. "Taxonomic Affiliation of New Genomes Should Be Verified Using Average Nucleotide Identity and Multilocus Phylogenetic Analysis." *Genome Announc.* 2(6) : 1-2.
- Furtado, N., Pupo, M., Ivone, C., Campo, V., and Duarte, M. 2005. "Diketopiperazines produced by an *Aspergillus fumigatus* Brazilian strain." *J. Braz. Chem. Soc.* 16(6B) : 1448-1453.
- Gega, A. and Kazal, M.J. 2011. "New technology to detect low-level drug-resistant HIV variants." *Future Virol.* 6(1) : 17-26
- Gledhill, W. E., and Casida, L. E. 1969. "Predominant Catalase-negative Soil Bacteria. III. *Agromyces*, gen. n., Microorganisms Intermediary to *Actinomyces* and *Nocardia*." *Appl. microbiol.* 18(3) : 340-349.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Gong, B., Chen, S. Lan, W., Huang, Y. and Zhu, X. 2018. "Antibacterial and Antitumor Potential of Actinomycetes Isolated from Mangrove Soil in the Maowei Sea of the Southern Coast of China." *Iran. J. Pharm. Res.* 17(4) : 1339-1346.
- Goodfellow, M., Kampfer, P., Busse, H.J., Trujillo M.E., Suzuki, K.I., Ludwig, W. and Whitman, W.B. 2012. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. London. : Springer Science Business Media.
- Gordon, R. E., Barnett, D. A., Handerhan, J. E., and Pang, C. H.-N. 1974. "*Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica*, and the *Nocardia* Strain." *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 24(1) : 54-63.
- Hakvåg, S., Fjærvik, E., Josefsen, K.D., Ian, E., Ellingsen, T.E., and Zotchev, S.B. 2008. "Characterization of *Streptomyces* spp. Isolated from the Sea Surface Microlayer in the Trondheim Fjord, Norway." *Mar. Drugs.* 6 : 620-635.
- Hall, T. A. (1999). "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT". *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41 : 95-98.
- Hamza, A. A., Clark, B. R., and Murphy, C. D. 2018. "Antitumor Activity of the Cyclo (L-Phenyl, L-Prolyl) Diketopiperazines Produced By a Newly Isolated *Streptomyces* Sp. A4.4." *Sumerianz J. Biotechnol.* 1(5) : 113-118.
- Hasani, A., Kariminik, A. and Issazadeh, K. 2014. "Streptomyces: Characteristics and Their Antimicrobial Activities." *Int. J. Adv. Biol. Biomed. Res.* 2(1): 63-75.
- Hayakawa, M., Ishizawa, K. and Nonomura, H. 1988. "Distribution of rare Actinomycetes in Japanese soils." *Ferment. Technol.* 66 : 367-373.
- He, L., Li, W., Huang, Y., Wang, L., Liu, Z., Lanoot, B., Vancanneyt, M., and Swings, J. 2005. "*Streptomyces jietaisiensis* sp. nov., isolated from soil in northern China." *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55 : 1939-1944.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Hohmann, C., Schneider, K., Bruntner, C., Irran, E., Nicholson, G., Bull, A. T., Jones, A. L., Brown, R., Stach, J. E. M., Goodfellow, M., Beil, W., Krämer, M., Imhoff, J. F., Süssmuth, R. D., and Fiedler, H.-P. 2009. "Caboxamycin, a new antibiotic of the benzoxazole family produced by the deep-sea strain *Streptomyces* sp. NTK 937." *J. Antibiot.* 62(2) : 99-104.
- Hossain, M.S., Azimi, N. and Skiena, S. 2009. "Crystallizing short-read assemblies around seeds." *BMC Bioinform.* 10: 16.
- Hua-Qi, P., Su-Ya, Y., Chun-Feng, S., Nan, W., Hui-Ming, H., and Jiang-Chun, H. 2015. "Identification and Characterization of the Antifungal Substances of a Novel *Streptomyces cavourensis* NA4." *J. Microbiol. Biotechnol.* 25(3) : 353-357.
- Huang, H., Yang, T., Ren, X., Liu, J., Song, Y., Sun, A., Ma, J., Wang, B., Zhang, Y., Huang, C., Zhang, C., and Ju, J. 2012. "Cytotoxic Angucycline Class Glycosides from the Deep Sea Actinomycete *Streptomyces lusitanus* SCSIO LR32." *J. Nat. Prod.* 75(2) : 202-208.
- Huang, H., Liu, M., Zhong, W., Mo, K., Zhu, J., Zou, X., Hu, Y. and Bao, S. 2018. "*Streptomyces caeni* sp. nov., isolated from mangrove mud." *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68 : 3080-3083.
- Hu, D., Chen, Y., Sun, C., Jin, T., Fan, G., Liao, Q., ... & Lee, M. Y. S. (2018). "Genome guided investigation of antibiotics producing actinomycetales strain isolated from a Macau mangrove ecosystem." *Sci. rep.* 8(1) : 1-12.
- Hu, H., Lin, H.P., Xie, Q., Li, L., Xie, X.Q. and Hong, K. 2010. "*Streptomyces qinglanensis* sp. nov., isolated from mangrove sediment." *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62(3) : 596-600.
- Hughes, C. C., MacMillan, J. B., Gaudêncio, S. P., Jensen, P. R., and Fenical, W. 2009. "The Ammosamides: Structures of Cell Cycle Modulators from a Marine-Derived *Streptomyces* Species." *Angew. Chem. Int. Ed.* 48(4) : 725-727.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Hwang, B. K., Lee, J. Y., Kim, B. S., and Moon, S. S. 1996. "Isolation, Structure Elucidation, and Antifungal Activity of a Manumycin-Type Antibiotic from *Streptomyces flaveus*." *J. Agric. Food Chem.* 44(11) : 3653-3657.
- Jamuar, S.S., D’Gama, A.M., Walsh, C.A. 2016. **Genomics, Circuits, and Pathways in Clinical Neuropsychiatry.** Massachusetts : Academic Press.
- Janardhan, A., Kumar, A.P., Viswanath, B., Saigopal, D.V.R., and Narasimha, G. 2014. "Production of Bioactive Compounds by Actinomycetes and Their Antioxidant Properties" *Biotechnol. Res. Int.* 2014 : 1-8.
- Jeong, S.-Y., Shin, H. J., Kim, T. S., Lee, H.-S., Park, S.-k., and Kim, H. M. 2006. "Streptokordin, a New Cytotoxic Compound of the Methylpyridine Class from a Marine-derived *Streptomyces* sp. KORDI-3238." *J. Antibiot.* 59(4) : 234-240.
- Jeya, K.R., Kiruthika, K. and Veerapagu, M. 2013. "Isolation of antibiotic producing *Streptomyces* sp. from soil of Perambalur district and a study on the antibacterial activity against clinical pathogens." *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 5(3) : 1207-1211.
- Jørgensen, H., Fjærvik, E., Hakvåg, S., Bruheim, P., Bredholt, H., Klinkenberg, G., Ellingsen, T.E. and Zotchev, S.B. 2009. "Candicidin Biosynthesis Gene Cluster Is Widely Distributed among *Streptomyces* spp. Isolated from the Sediments and the Neuston Layer of the Trondheim Fjord, Norway." *Appl. Environ. Microbiol.* 75(10) : 3296–3303.
- Kansoh, A., Hossiny, E., Abd, E., and Hameed, E. 2009. "Keratinase production from feathers wastes using some local *Streptomyces* isolates." *Aust. J. Basic Appl. Sci.* 3 : 561-571.
- Kchouk, M., Gibrat, J.F. and Elloumi, M. 2017. "Generations of Sequencing Technologies: From First to Next Generation." *Biol. Med.* 9(3) : 1-8.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Kelly, K.L. 1964. **Inter-Society Color Council – National Bureau of Standard Color Name Charts Illustrated with Centroid Colors.** Washington DC. : US Government Printing Office.
- Kemung, H.M., Tan, L.T.H., Chan, K.G., Ser, H.L., Law, J.W.F., Lee, L.H. and Goh, B.H. 2020. "Antioxidant Activities of *Streptomyces* sp. strain MUSC 14 from Mangrove Forest Soil in Malaysia." *BioMed. Res. Int.* 2020 : 1-12.
- Kim, W. G., Kim, J. P., Kim, C. J., Lee, K. H., and Yoo, I. D. 1996. "Benzastatins A, B, C, and D: new free radical scavengers from *Streptomyces nitrosporeus* 30643. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activities." *J. Antibiot.* 49(1) : 20-25.
- Kimura, M. 1980. "A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences." *J. Mol. Evol.* 16(2) : 111-120.
- Komagata, K., and Suzuki, K.-I. 1988. "4 Lipid and Cell-Wall Analysis in Bacterial Systematics." 161-207. In R. R. Colwell and R. Grigorova. **Methods in Microbiology.** Academic Press.
- Kornsakulkarn, J., Saepua, S., Srijomthong, K., Rachtawee, P., and Thongpanchang, C. 2015. "Quinazolinone alkaloids from actinomycete *Streptomyces* sp. BCC 21795." *Phytochem. Lett.* 12 : 6-8.
- Law, J.W.F., Ser, H.L., Mutalib, N.S.A., Saokaew, S., Duangjai, A., Khan, T.M., Chan, K.G., Goh, B.H. and Lee, L.H. 2019. "*Streptomyces monashensis* sp. nov., a novel mangrove soil actinobacterium from East Malaysia with antioxidative potential." *Sci. Rep.* 9 : 3056-3073.
- Lechevalier, M. P., Prauser, H., Labeda, D. P., and Ruan, J. S. 1986. "Two New Genera of Nocardioform Actinomycetes: *Amycolata* gen. nov. and *Amycolatopsis* gen. nov." *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 36(1) : 29-37.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Lee, K. H., and Rhee, K. H. 2008. "Radioprotective effect of cyclo(L-phenylalanyl-L-prolyl) on irradiated rat lung." *J. Microbiol. Biotechnol.* 18(2) : 369-376.
- Li, F., Maskey, R. P., Qin, S., Sattler, I., Fiebig, H. H., Maier, A., Zeeck, A., and Laatsch, H. 2005. "Chinikomycins A and B: Isolation, Structure Elucidation, and Biological Activity of Novel Antibiotics from a Marine *Streptomyces* sp. Isolate M045." *J. Nat. Prod.* 68(3) : 349-353.
- Li, L., Wang, J., Zhou, Y.J., Lin, H.W. and Lu, Y.H. 2019. "*Streptomyces reniochaliniae* sp. nov. and *Streptomyces diacarni* sp. nov., from marine sponges." *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 69 : 99-104.
- Li, Q., Chen, X., Jiang, Y. and Jiang, C. 2015. **Morphological Identification of Actinobacteria.** Intechopen.
- Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., and Jiang, C. 2016. "Cultural, Physiological, and Biochemical Identification of Actinobacteria." **Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications.**
- Li, X., Dobretsov, S., Xu, Y., Xiao, X., Hung, O. S., and Qian, P.-y. 2006. "Antifouling diketopiperazines produced by a deep-sea bacterium, *Streptomyces fungicidicus*." *Biofouling.* 22(3) : 187-194.
- Liu, N., Shang, F., Xi, L., and Huang, Y. 2013. "Tetroazolemycins A and B, Two New Oxazole-Thiazole Siderophores from Deep-Sea *Streptomyces olivaceus* FXJ8.012." *Mar. drugs.* 11(5) : 1524-1533.
- Liu, Y., Qin, R., Zaat, S.A.J., Breukink, E. and Heger, M. 2015. "Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections." *J. Clin. Transl. Res.* 1(3) : 140-167.
- Madigan, M.T., Martinko J.M., Parker, J. and Brock, T.D. 1987. **Brock Biology of microorganisms.** New Jersey. : Prentice Hall.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Manimaran, M., and Krishnan, K. 2017. "Marine Sp. VITMK1 Derived Pyrrolo [1, 2-A] Pyrazine-1, 4-Dione, Hexahydro-3-(2-Methylpropyl) and Its Free Radical Scavenging Activity." *Open Bioact. Compd. J.* 5 : 23-30.
- Matsumoto, N., Momose, I., Umekita, M., Kinoshita, N., Chino, M., Inuma, H., Sawa, T., Hamada, M., and Takeuchi, T. 1998. "Diperamycin, a new antimicrobial antibiotic produced by *Streptomyces griseoaurantiacus* MK393-AF2. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activities." *J. Antibiot.* 51(12) : 1087-1092.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bemben, L.A. 2005. "Genome sequencing in micro fabricated high-density picolitre reactors." *Nature.* 437 : 376-380.
- Motohashi, K., Takagi, M., and Shin-ya, K. 2010. "Tetrapeptides Possessing a Unique Skeleton, JBIR-34 and JBIR-35, Isolated from a Sponge-Derived Actinomycete, *Streptomyces* sp. Sp080513GE-23." *J. Nat. Prod.* 73(2) : 226-228.
- Nachtigall, J., Schneider, K., Bruntner, C., Bull, A. T., Goodfellow, M., Zinecker, H., Imhoff, J. F., Nicholson, G., Irran, E., Süssmuth, R. D., and Fiedler, H.-P. 2011. "Benzoxacystol, a benzoxazine-type enzyme inhibitor from the deep-sea strain *Streptomyces* sp. NTK 935." *J. Antibiot.* 64(6) : 453-457.
- Nelson, D. and Cox, M. 2005. **Lehninger Principles of Biochemistry.** New York. : W.H. Freeman and company.
- Niu, S., Li, S., Chen, Y., Tian, X., Zhang, H., Zhang, G., Zhang, W., Yang, X., Zhang, S., Ju, J., and Zhang, C. 2011. "Lobophorins E and F, new spirotetronate antibiotics from a South China Sea-derived *Streptomyces* sp. SCSIO 01127." *J. Antibiot.* 64(11) : 711-716.
- Pablo, H.C.G., Luis, C.G., Diego, A.G., Adonney, A.O.V., Debmalya B., Vasco, A., Artur, L.C.S. and Rommel, T.J.R. 2018. **Omics Technologies and Bio-Engineering.** Massachusetts. : Academic Press.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Padma, B. J., K., S., P., A., and Shiny R., A. 2018. "Isolation, characterization and evaluation of antioxidant activities of secondary metabolites producing actinomycetes of terrestrial origin." *Int. J. Res. Med. Sci.* 6(3) : 1017-1028.
- Park, J.-S., and Kwon, H. C. 2018. "New Naphthoquinone Terpenoids from Marine Actinobacterium, *Streptomyces* sp. CNQ-509." *Mar. drugs.* 16(3) : 90-98.
- Parveen, A., Khurana, S. and Kumar, A. 2019. "Overview of Genomic Tools for Circular Visualization in the Nextgeneration Genomic Sequencing Era." *Curr. Genomics.* 20 : 90-99.
- Pesic, A., Baumann, H. I., Kleinschmidt, K., Ensle, P., Wiese, J., Süßmuth, R. D., and Imhoff, J. F. 2013. "Champacyclin, a New Cyclic Octapeptide from *Streptomyces* Strain C42 Isolated from the Baltic Sea." *Mar. drugs.* 11(12) : 4834-4857.
- Pu, X., Li, G., Yang, T., Li, G., Yi, J., Zhang, G. and Luo, Y. 2011. "A new cyclododeca[d]oxazole derivative from *Streptomyces* spp. CIBYL1." *Nat. Prod. Res.* 27(7) : 1-6.
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., and Bitto, A. 2017. "Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2017 : 1-13.
- Ramalingam, V., and Rajaram, R. 2016. "Antioxidant activity of 1-hydroxy-1-norresistomycin derived from *Streptomyces variabilis* KP149559 and evaluation of its toxicity against zebra fish *Danio rerio*." *RSC Adv.* 6(20) : 16615-16623.
- Reddy, N.G., Ramakrishna, D.P.N., and Gopal, S.V.R. 2011. "A Morphological, Physiological and Biochemical Studies of Marine *Streptomyces rochei* (MTCC 10109) Showing Antagonistic Activity Against Selective Human Pathogenic Microorganisms." *Asian J. Biol. Sci.* 4(1) : 1-14.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Rhee, K.-H. 2002. "Inhibition of DNA Topoisomerase I by Cyclo(L-Prolyl-L-Phenylalanyl) Isolated from *Streptomyces* sp. AMLK-335." *J. Microbiol. Biotechnol.* 12(6) : 1013-1016.
- Richardson, J. E., Fay, M. F., Cronk, Q. C. B., Bowman, D., and Chase, M. W. 2000. "A phylogenetic analysis of *Rhamnaceae* using *rbcl* and *trnL-F* plastid DNA sequences." *Am. J. Bot.* 87(9) : 1309-1324.
- Rosbach, B., Ribler, E., Budnik, L.T., Finger, S., Goen, T. and Hartwig, A. 2019. **The MAK-Collection for Occupational Health and Safety.** Wiley Online Library.
- Sant'Anna, F.H., Bach, E., Porto, R.Z., Guella, F., Sant'Anna, E.H. and Passaglia, L.M.P. 2019. "Genomic metrics made easy: what to do and where to go in the new era of bacterial taxonomy." *Crit. Rev. Microbiol.* 45(2) : 182-200.
- Saurav, K., and Kannabiran, K. 2012. "Cytotoxicity and antioxidant activity of 5-(2,4-dimethylbenzyl)pyrrolidin-2-one extracted from marine *Streptomyces* VITSVK5 spp." *Saudi j. biol. sci.* 19(1) : 81-86.
- Seyoum, A., Asres, K., and El-Fiky, F. K. 2006. "Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids." *Phytochemistry.* 67(18) : 2058-2070.
- Shaaban, K. A., Helmke, E., Kelter, G., Fiebig, H. H., and Laatsch, H. 2011. "Glucopiericidin C: a cytotoxic piericidin glucoside antibiotic produced by a marine *Streptomyces* isolate." *J. Antibiot.* 64(2) : 205-209.
- Sharma, M., Dangi, P. and Choudhary, M. 2014. "Actinomycetes: Source, Identification, and Their Applications." *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 3(2) : 801-832.
- Shin, H. J., Kim, T. S., Lee, H.-S., Park, J. Y., Choi, I.-K., and Kwon, H. J. 2008. "Streptopyrrolidine, an angiogenesis inhibitor from a marine-derived *Streptomyces* sp. KORDI-3973." *Phytochemistry.* 69(12) : 2363-2366.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Shinya, K., Furihata, K., Teshima, Y., Hayakawa, Y., and Seto, H. 1993. "Benthocyanins B and C, new free radical scavengers from *Streptomyces prunicolor*." *J. Org. Chem.* 58(15) : 4170-4172.
- Shirling, E. B., and Gottlieb, D. 1966. "Methods for characterization of *Streptomyces* species." *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 16(3) : 313-340.
- Shirling, E. B., and Gottlieb, D. 1972. "Cooperative Description of Type Strains of *Streptomyces*." *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 22(4) : 265-394.
- Siddharth, S., and Vittal, R. R. 2018. "Evaluation of Antimicrobial, Enzyme Inhibitory, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Partially Purified Volatile Metabolites of Marine *Streptomyces* sp.S2A." *Microorganisms.* 6(3) : 72-84.
- Simpson, J.T., Wong, K., Jackman, S.D., Schein, J.E., Jones, S. J. M. and Birol, I. 2009. "ABYSS: a parallel assembler for short read sequence data." *Genome. Res.* 19 : 1117-1123.
- Soderlund, C., Nelson, W., Shoemaker, A. and Paterson, A. 2020. "SyMAP: A system for discovering and viewing syntenic regions of FPC maps." *Genome. Res.* 16 : 1159-1168.
- Sohrabi, R., Huh, J.H., Badiyan, S., Rakotondraibe, L.H., Kliebenstein, D.J., Sobrado, P. and Tholl, D. 2015. "In Planta Variation of Volatile Biosynthesis: An Alternative Biosynthetic Route to the Formation of the Pathogen-Induced Volatile Homoterpene DMNT via Triterpene Degradation in *Arabidopsis* Roots." *Plant. Cell.* 27(3) : 874-890.
- Song, Y., Huang, H., Chen, Y., Ding, J., Zhang, Y., Sun, A., Zhang, W., and Ju, J. 2013. "Cytotoxic and Antibacterial Marfuraquinocins from the Deep South China Sea-Derived *Streptomyces niveus* SCSIO 3406." *J. Nat. Prod.* 76(12) : 2263-2268.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Song, Y., Li, Q., Liu, X., Chen, Y., Zhang, Y., Sun, A., Zhang, W., Zhang, J., and Ju, J. 2014. "Cyclic Hexapeptides from the Deep South China Sea-Derived *Streptomyces scopuliridis* SCSIO ZJ46 Active Against Pathogenic Gram-Positive Bacteria." *J. Nat. Prod.* 77(8) : 1937-1941.
- Steel, K. J. 1961. "The Oxidase Reaction as a Taxonomic Tool." *Microbiology.* 25(2) : 297-306.
- Sun, Y., Takada, K., Nogi, Y., Okada, S., and Matsunaga, S. 2014. "Lower Homologues of Ahpatinin, Aspartic Protease Inhibitors, from a Marine *Streptomyces* sp." *J. Nat. Prod.* 77(7) : 1749-1752.
- Swift, S.M., Reid, K.P., Donovan, D.M. and Ramsay, T.G. 2019. "Thermophile Lytic Enzyme Fusion Proteins that Target *Clostridium perfringens*." *Antibiotics.* 8 : 214-231.
- Takai, M., Miyamoto, S., Hattori, Y., and Tamura, S. 1963. "Isolation of 2-Phenylacetamide as a Plant Growth Regulator Produced by *Actinomyces*." *Agric. Biol. Chem.* 27(12) : 876-877.
- Tamaoka, J. 1994. "Determination of DNA base composition." 463-470. In M. Goodfellow and A. G. O'Donnel. **Chemical Methods in Prokaryotic Systematics** Chichester: John Wiley and Son.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. 2013. "MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0." *Mol. Biol. Evol.* 30(12) : 2725-2729.
- Verma, S.P. and Santoyo, E. 2007. "High-Performance Liquid and Ion Chromatography: Separation and Quantification Analytical Techniques for Rare Earth Elements." *Geostand. Geoanal. Res.* 31 : 161-184.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Wang, Y., Huang, H., Yuan, W., Wei, H., Chen, Y., Zhu, J., Liu, M., Zou, X.X., and Bao, S. 2015. "*Streptomyces mangrovi* sp. nov., an actinomycete from mangrove soil." *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65 : 3086-3090.
- Wang, Z., Peng, A.H., Lu, D.D., Song, Y.J., Wang, C.L. and Xie, W.D. 2018. "Manumycin-type Derivatives from a *Streptomyces* sp. Associated with Meson Bee *Osmia cornifrons*." *Nat. Prod. Commun.* 13(6) : 673-676.
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P., and Truper, H. G. 1987. "Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics." *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 37(4) : 463-464.
- Williams, S. T., and Cross, T. 1971. "Chapter XI Actinomycetes." 295-334. In C. Booth. **Methods in Microbiology.** Academic Press.
- William, W., Krieg, N.R., Ludwig, W., Hedlund, B.P., Paster, B.J., Staley, J.T., Ward, N., Brown, D. and Parte, A. 2012. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** Berlin. : Springer Science & Business Media.
- Wojtunik-Kulesza, K. A., Ciesla, L. M., & Waksmundzka-Hajnos, M. 2018. "Approach to Determination a Structure-Antioxidant Activity Relationship of Selected Common Terpenoids Evaluated by ABTS (center dot+) Radical Cation Assay." *Nat. Prod. Commun.* 13(3) : 295-298.
- Yadav, J. S., Dhara, S., and Mohapatra, D. K. 2017. "Stereoselective total synthesis of 10-epi-tirandamycin E." *Tetrahedron.* 73(10) : 1358-1366.
- Yang, Y., Fu, L., Zhang, J., Hu, L., Xu, M., and Xu, J. 2014. "Characterization of the Xiamenmycin Biosynthesis Gene Cluster in *Streptomyces xiamenensis* 318." *PLOS ONE.* 9(6) : e99537.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Yoon, S.-H., Ha, S.-M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., and Chun, J. 2017. "Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies." *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67(5) : 1613-1617.
- Zengler, K., Paradkar, A. and Keller, M. 2005. **Natural products: Drug discovery and therapeutic medicine.** New Jersey : Humana Press Inc.
- Zhang, W., Liu, Z., Li, S., Yang, T., Zhang, Q., Ma, L., Tian, X., Zhang, H., Huang, C., Zhang, S., Ju, J., Shen, Y., and Zhang, C. 2012. "Spiroindimicins A–D: New Bisindole Alkaloids from a Deep-Sea-Derived Actinomycete." *Org. Lett.* 14(13) : 3364-3367.
- Zhang, W., Ma, L., Li, S., Liu, Z., Chen, Y., Zhang, H., Zhang, G., Zhang, Q., Tian, X., Yuan, C., Zhang, S., Zhang, W., and Zhang, C. 2014. "Indimicins A–E, Bisindole Alkaloids from the Deep-Sea-Derived *Streptomyces* sp. SCSIO 03032." *J. Nat. Prod.* 77(8) : 1887-1892.
- Zhou, X., Huang, H., Li, J., Song, Y., Jiang, R., Liu, J., Zhang, S., Hua, Y., and Ju, J. 2014. "New anti-infective cycloheptadepsipeptide congeners and absolute stereochemistry from the deep sea-derived *Streptomyces drozdovicii* SCSIO 10141." *Tetrahedron.* 70(42) : 7795-7801.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหาร Nitrogen utilization ผสมน้ำทะเล

Glucose	1.0	g
NaCl	0.05	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05	g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.001	g
K ₂ HPO ₄	0.01	g
Agar	18	g
น้ำทะเล	600	ml
น้ำกลั่น	390	ml
pH	8.0	ml

ฆ่าเชื้อด้วย autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

Nitrogen source	1.0	g
น้ำกลั่น	10	ml

ฆ่าเชื้อด้วย autoclave อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 10 นาที

หลังจากฆ่าเชื้อแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงที่ 50 องศาเซลเซียส นำสารละลายแหล่งไนโตรเจนผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารแข็ง Starch-casein nitrate ผสมน้ำทะเล

Soluble starch	10	g
Sodium caseinate	0.3	g
KNO ₃	2	g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	g
K ₂ HPO ₄	2	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05	g
NaCl	2	g
CaCO ₃	0.02	g
Agar	18	g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำทะเล	600	ml
น้ำกลั่น	400	ml
pH	8.0	

ฆ่าเชื้อด้วย autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

อาหาร Yeast extract-malt extract (ISP2) ผสมน้ำทะเล

Yeast extract	4	g
Malt extract	10	g
Glucose	4	g
Agar	18	g
น้ำทะเล	600	ml
น้ำกลั่น	400	ml
pH	8.0	

ฆ่าเชื้อด้วย autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

อาหาร Inorganic salts – starch agar (ISP4) ผสมน้ำทะเล

Soluble starch	10.0	g
K ₂ HPO ₄	1.0	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0	g
NaCl	1.0	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0	g
CaCO ₃	2.0	g
Agar	18	g
Trace salts solution	1.0	ml
น้ำทะเล	600	ml
น้ำกลั่น	400	ml
pH	7.2	

ฆ่าเชื้อด้วย autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

Trace salts solution

FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1	g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.1	g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.1	g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำกลั่น	100	ml
----------	-----	----

อาหาร Carbon utilization (ISP9) ผสมน้ำตาล

แหล่งคาร์บอน

carbohydrates	10.0	g
---------------	------	---

น้ำกลั่น	100	ml
----------	-----	----

ฆ่าเชื้อด้วย autoclave อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 10 นาที

อาหาร Basal mineral salts

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.64	g
------------------------------	------	---

$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	5.65	g
--	------	---

KH_2PO_4 anhydrous	2.38	g
------------------------------------	------	---

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1	g
---	---	---

Pridham and Gottlieb trace salts	1	ml
----------------------------------	---	----

Agar	18	g
------	----	---

น้ำตาล	600	ml
--------	-----	----

น้ำกลั่น	300	ml
----------	-----	----

pH	8.0	
----	-----	--

ฆ่าเชื้อด้วย autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

หลังจากฆ่าเชื้อแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงที่ 50 องศาเซลเซียส นำสารละลายแหล่งคาร์บอนผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ

Pridham and Gottlieb trace salts

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.64	g
---	------	---

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.11	g
---	------	---

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.79	g
---	------	---

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.15	g
---	------	---

น้ำกลั่น	100	ml
----------	-----	----

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเหลว Bouillon gelatin ผสมน้ำทะเล

peptone	1	g
Meat extract	0.5	g
NaCl	0.5	g
Gelatin	15	g
น้ำทะเล	60	ml
น้ำกลั่น	40	ml
pH	8.0	

ฆ่าเชื้อด้วย autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

อาหารเหลว Peptone KNO₃

peptone	10	g
KNO ₃	1.0	g
NaCl	5.0	g
น้ำทะเล	600	ml
น้ำกลั่น	400	ml
pH	8.0	

ฆ่าเชื้อด้วย autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

อาหาร Peptonization และ Coagulation test

skim milk (Difco)	10.0	g
NaCl	0.3	g
น้ำกลั่น	100	ml
Agar (สำหรับ peptonization test)	18	g

ฆ่าเชื้อด้วย autoclave อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 10 นาที

อาหาร Insoluble compound

Yeast extract	0.4	g
Malt extract	1	g
Glucose	0.4	g
Agar	1.8	g
น้ำทะเล	60	ml
น้ำกลั่น	30	ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์อื่นใด
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฆ่าเชื้อด้วย autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

Uns soluble compounds	0.5	g
น้ำกลั่น	10	ml

ฆ่าเชื้อด้วย autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

หลังจากฆ่าเชื้อแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงที่ 50 องศาเซลเซียส ผสมกันแล้วนำไปเทลงในจานเพาะเชื้อด้วยเทคนิค pour plate

อาหาร Urea ผสมน้ำทะเล

KH_2PO_4	10.0	g
Na_2HPO_4	9.5	g
Yeast extract	1.0	g
Phenol red	0.012	g
Agar	18	g
น้ำทะเล	600	ml
น้ำกลั่น	300	ml

ฆ่าเชื้อด้วย autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

Urea	20	g
น้ำกลั่น	100	ml

กรองผ่าน filter membrane ก่อนนำไปผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหาร Triple Sugar Iron (TSI)

Meat extract	3.0	g
peptone	20.0	g
Yeast extract	3.0	g
Phenol red	0.024	g
Glucose	1.0	g
Lactose	10.0	g
Sucrose	10.0	g
FeSO_4	0.2	g
NaCl	5.0	g
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	0.3	g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Agar	15	g
น้ำทะเล	600	ml
น้ำกลั่น	400	ml
pH	7.2	

ฆ่าเชื้อด้วย autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

สารเคมี

6N HCl

conc. HCl	50	ml
น้ำกลั่น	50	ml

เท conc. HCl ลงไปในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน

5N acetic acid

acetic acid	28.74	ml
น้ำกลั่น	71.26	ml

เท acetic acid ลงไปในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน

Nitrate reduction test reagent

<u>sulfanilic acid</u>		
Sulfanilic acid	0.8	g
5 N acetic acid	100	ml
<u>N,N-dimethyl-1-naphthylamine</u>		
N,N-dimethyl-1-naphthylamine	0.5	g
5 N acetic acid		

ละลายโดยใช้ความร้อน

สารละลาย Ninhydrin

Ninhydrin	0.3	g
n-Butanol saturated with water	100	ml

n-Butanol saturated with water

นำ n-butanol ผสมกับน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:1 นำไปเขย่าทิ้งไว้ข้ามคืน จะได้บิวทานอลที่
อิ่มตัวอยู่ด้านบน (สารละลายส่วนบน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1 mM Na₂-EDTA (S-EDTA) pH 8.0

EDTA	338.32	mg
น้ำกลั่น	1	L

ละลาย EDTA 338.32 mg ในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เท่ากับ 8.0 ด้วย NaOH pellets ปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น และนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

10% Sodium dodecyl sulphate (SDS)

ละลาย sodium dodecyl sulphate 10 กรัม ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 100 ml

1 M Tris-HCl pH 8.0

Tris-HCl	121.1	mg
น้ำกลั่น	1	L

ละลาย Tris-HCl 121.1 g ในน้ำกลั่น ปรับ pH ด้วย conc. HCl ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่นและนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

TE buffer

10 mM Tris-HCl (pH 8)	10	ml
1 mM Na ₂ -EDTA (pH 8)	10	ml
น้ำกลั่น	980	ml

ฆ่าเชื้อด้วย autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

RNase A solution

RNase A	20	mg
0.15M NaCl	10	ml

ละลาย RNase A ใน 0.15M NaCl นำไปให้ความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5-10 นาที เก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส

Proteinase K

Proteinase K	4	mg
50 mM Tris-HCl (pH 7.5)	1	ml

เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนการใช้งาน

Phenol:Chloroform (1:1 v/v)

หลอมผลึก phenol ให้เป็นของเหลวที่ 65 °C ผสมกับ chloroform ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) เก็บสารละลายในขวดสีชา

0.8% agarose gel (ย้อมด้วย gel stain)

Agarose	0.2	g
1X TBE หรือ TAE buffer	25	ml
SYBR® safe DNA gel stain	1	µl

0.3% H₂O₂

3% H ₂ O ₂	10	ml
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	90	ml

1% N, N, N', N',-tetramethyl-p-phenylenediamine-dihydrochloride

1% N, N, N', N',-tetramethyl-p-phenylenediamine-dihydrochloride	0.1	g
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	100	ml

0.2 mM DPPH solution

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	0.004	g
Methanol	50	ml

ละลาย DPPH 0.004 กรัม ด้วยเมทานอล นำไป sonicate เป็นเวลา 15-30 นาที ปรับปริมาตรให้เป็น 50 ml

ภาคผนวก ค

ข้อมูลลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง
ข้อมูลลักษณะทางจีโนมไทป์

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทั่วไปของลำดับนิวคลีโอไทด์บนจีโนมของไอโซเลต C1-2 และ *S. griseoaurantiacus* MBK6

Features	<i>Streptomyces</i> sp. C1-2	<i>S. griseoaurantiacus</i> MBK6
Bioproject	PRJNA613987	PRJNA647866
Accession no.	JAATEQ000000000	JACERG000000000.1
Sequencing technology	Illumina Miseq	Illumina Miseq
Genome coverage	75x	144x
Number of Contigs	914	24
Genome size (bp)	6972874	7632724
DNA G+C content (%)	72.74	72.70
Number of genes	6820	6693
Protein coding genes	6756	6597
Number of RNAs	64	96
rRNA	2	26
tRNA	59	67
Other RNA	3	3
Pseudogene	336	121

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity
Region 5.1	terpene ☒	1	18,140	hopene ☒	61%
Region 35.1	LAP ☒, thiopeptide ☒	1	16,590	zorbamycin ☒	6%
Region 46.1	RIPP-like ☒	4,707	16,008		
Region 57.1	nucleoside ☒	20,198	41,040	paromomycin ☒	7%
Region 58.1	terpene ☒	1	10,989	chalomycin A ☒	9%
Region 72.1	NRPS ☒	1	13,420	herbimycin A ☒	6%
Region 74.1	melanin ☒	5,147	12,919	melanin ☒	60%
Region 115.1	siderophore ☒	1	7,885	desferrioxamin B / desferrioxamine E ☒	50%
Region 235.1	siderophore ☒	878	12,938		
Region 242.1	terpene ☒	1	6,671	carotenoid ☒	18%
Region 320.1	terpene ☒	1	5,396	avermilol ☒	100%
Region 322.1	T2PKS ☒	1	5,355	spore pigment ☒	58%
Region 355.1	NRPS ☒	1	4,772		
Region 369.1	terpene ☒	1	4,530	isorenieratene ☒	50%
Region 405.1	T3PKS ☒	1	4,005	pheganomycin ☒	14%
Region 443.1	terpene ☒	1	3,627		
Region 446.1	NRPS ☒	1	25,060	disionitrite antibiotic SF2768 ☒	66%
Region 457.1	ectoine ☒	9,952	20,353	ectoine ☒	100%
Region 504.1	NRPS ☒	1	2,873		
Region 597.1	NRPS ☒	1	2,164	stenothricin ☒	9%
Region 634.1	terpene ☒	1,719	21,917	geosmin ☒	100%
Region 650.1	terpene ☒	1	1,750		
Region 662.1	NRPS ☒	1	1,715		
Region 701.1	T1PKS ☒	1	21,447	tetronasin ☒	11%
Region 756.1	T1PKS ☒, siderophore ☒	1	20,509		
Region 778.1	NRPS ☒	24,726	54,388		
Region 790.1	T1PKS ☒	1	20,404		

รูปที่ 2 ผลการวิเคราะห์กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิด้วย antiSMASH ของไอโซเลต C1-2

Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity
Region 2.1	T1PKS ☒	34,834	80,323	catenulisporolides ☒	14%
Region 2.2	siderophore ☒	235,768	247,628		
Region 4.1	T1PKS ☒, siderophore ☒	107,624	155,183	paulomycin ☒	9%
Region 5.1	nucleoside ☒	137,833	158,675	paromomycin ☒	7%
Region 7.1	siderophore ☒	58,913	70,682	desferrioxamin B / desferrioxamine E ☒	83%
Region 7.2	NRPS ☒	76,484	125,577	daptomycin ☒	3%
Region 11.1	T2PKS ☒	259	72,774	spore pigment ☒	83%
Region 18.1	T3PKS ☒, guanidinotides ☒	9,658	50,746	pheganomycin ☒	38%
Region 20.1	terpene ☒, NRPS ☒, T1PKS ☒	40,498	100,206	chalomycin A ☒	9%
Region 21.1	ectoine ☒	12,279	22,680	ectoine ☒	100%
Region 22.1	terpene ☒	55,018	77,468	geosmin ☒	100%
Region 23.1	terpene ☒	43,752	65,536	brasilcardin A ☒	38%
Region 31.1	terpene ☒	18,587	39,500	julichrome Q3-3 / julichrome Q3-5 ☒	22%
Region 36.1	terpene ☒	1	21,963	isorenieratene ☒	75%
Region 46.1	T1PKS ☒, prodigiosin ☒	18,599	53,965	undecylprodigiosin ☒	90%
Region 47.1	NRPS ☒	1	27,251	divergolide A / divergolide B / divergolide C / divergolide D ☒	13%
Region 51.1	LAP ☒, thiopeptide ☒	4,662	50,308	zorbamycin ☒	6%
Region 53.1	NRPS ☒	1	39,633	rimosamide ☒	21%
Region 54.1	furan ☒	25,874	46,983	asukamycin ☒	24%
Region 58.1	melanin ☒	23,236	33,847	melanin ☒	60%
Region 70.1	NRPS ☒	1	37,979	copalactin ☒	100%
Region 76.1	NRPS ☒	1	29,992	disionitrite antibiotic SF2768 ☒	66%
Region 83.1	terpene ☒	10,885	29,417	avermilol ☒	100%
Region 90.1	terpene ☒	1	18,816	hopene ☒	53%
Region 103.1	RIPP-like ☒	7,762	19,063		
Region 110.1	RIPP-like ☒	1	9,255	informatidepein ☒	42%
Region 134.1	NRPS ☒	1	6,637	rhizomide A / rhizomide B / rhizomide C ☒	100%

รูปที่ 3 ผลการวิเคราะห์กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิด้วย antiSMASH ของ *Streptomyces griseoaurantiacus* M045

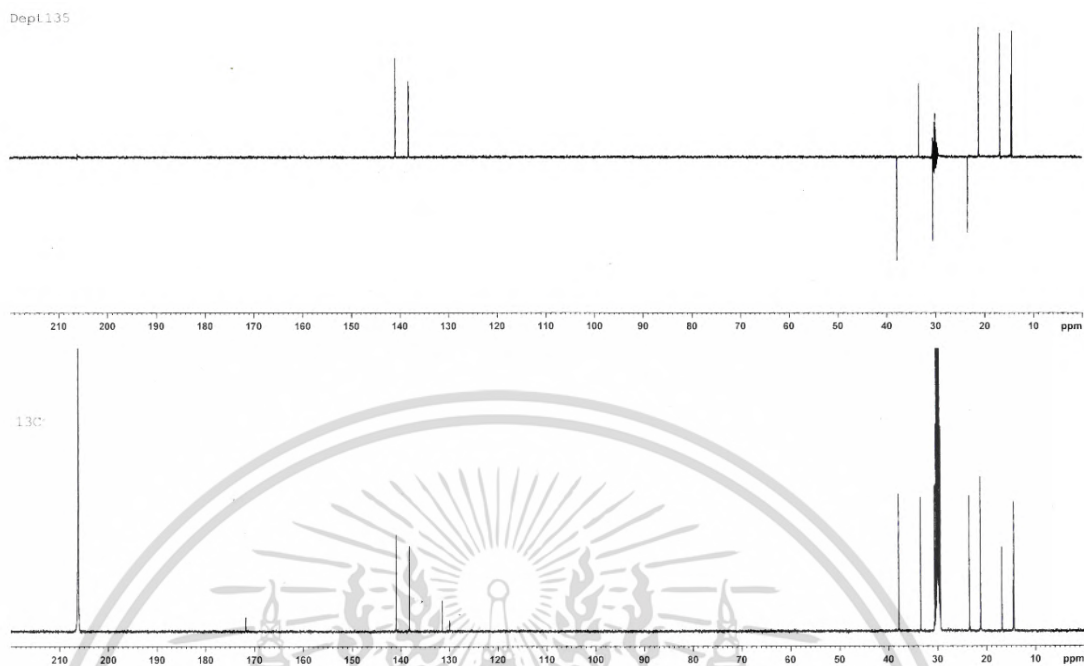
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

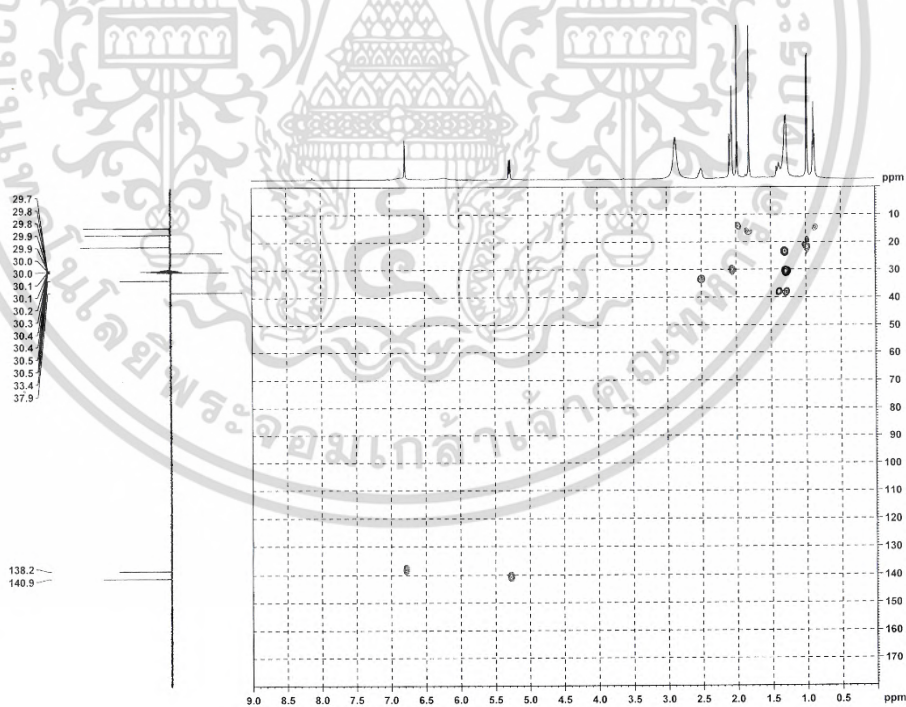
ข้อมูลทางสเปกโตรสโกปีของสารบริสุทธิ์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

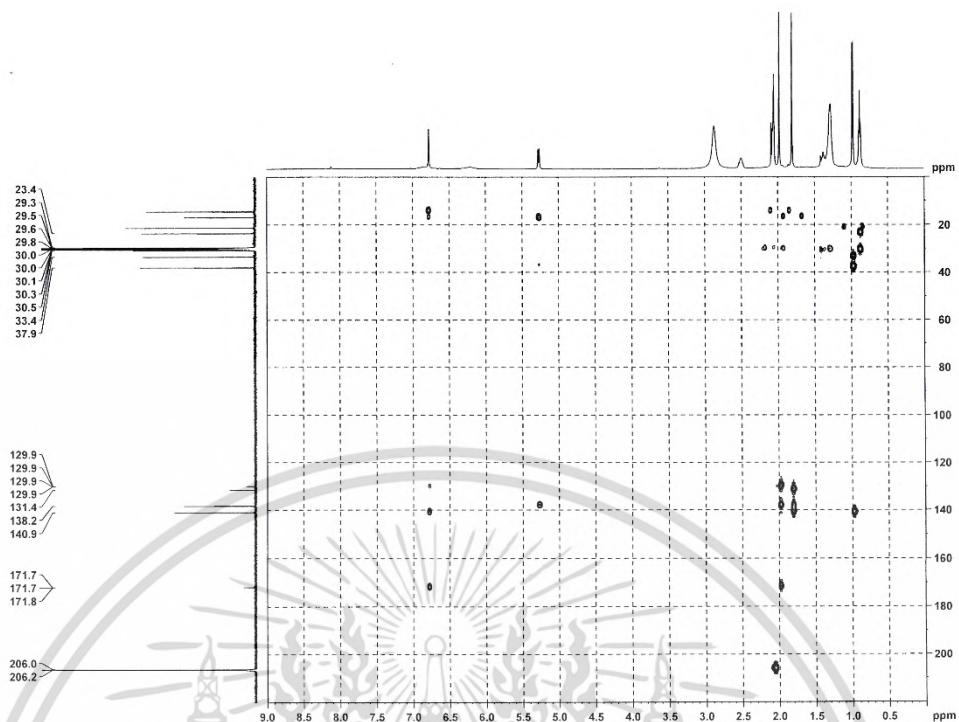


รูปที่ 6 สเปกตรัม DEPT 135 (125 MHz, acetone-d₆) ของสาร A

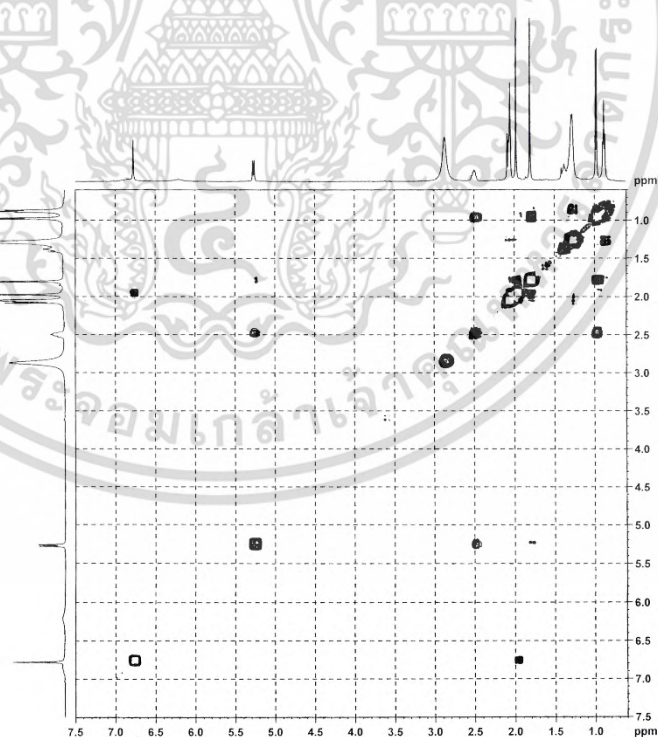


รูปที่ 7 สเปกตรัม HSQC (125 MHz, acetone-d₆) ของสาร A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

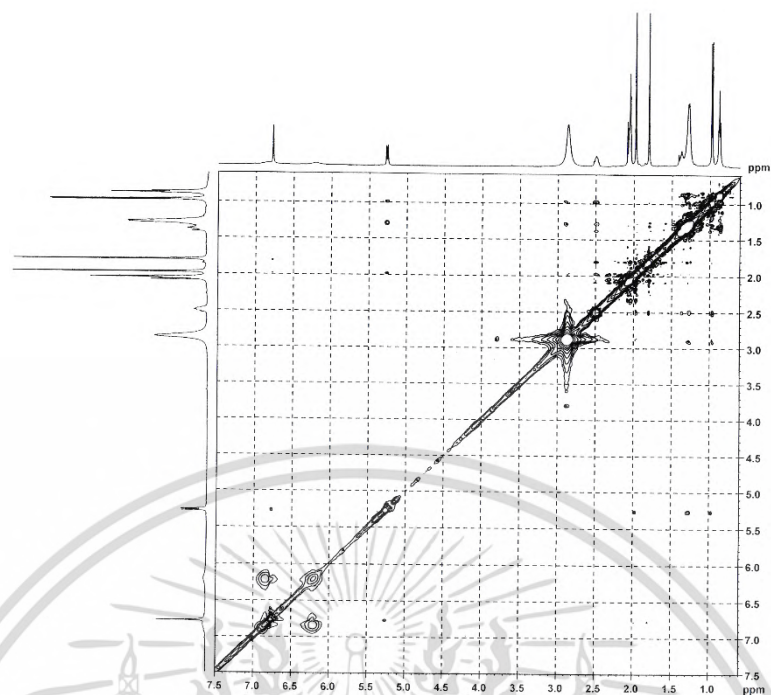


รูปที่ 8 สเปกตรัม HMBC (125 MHz, acetone-d₆) ของสาร A



รูปที่ 9 สเปกตรัม COSY (125 MHz, acetone-d₆) ของสาร A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

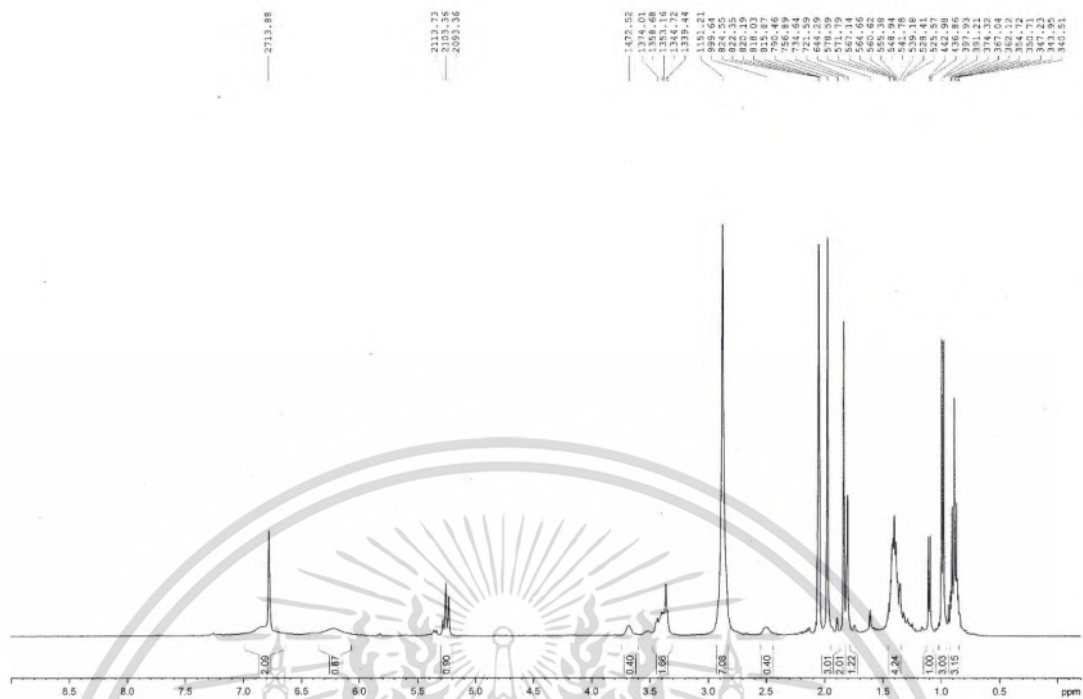


รูปที่ 10 สเปกตรัม NOESY (125 MHz, acetone-d₆) ของสาร A

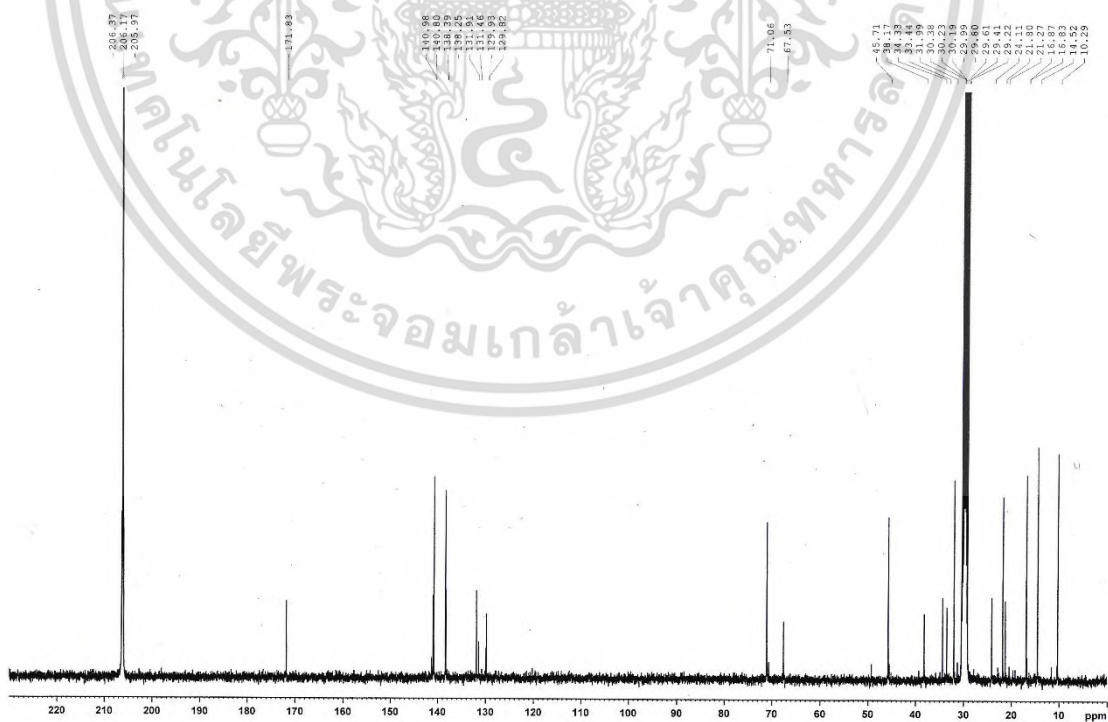


รูปที่ 11 สเปกตรัม HRMSIMS [M+Na] ของสาร A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

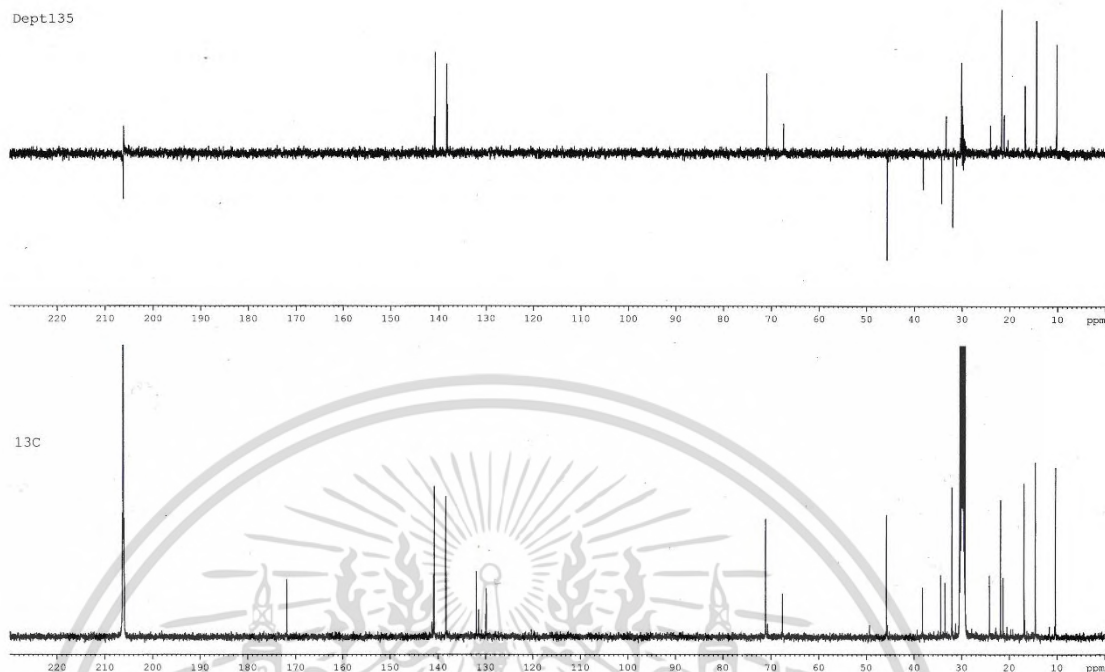


รูปที่ 12 สเปกตรัม ^1H NMR (400 MHz, acetone- d_6) ของสาร B

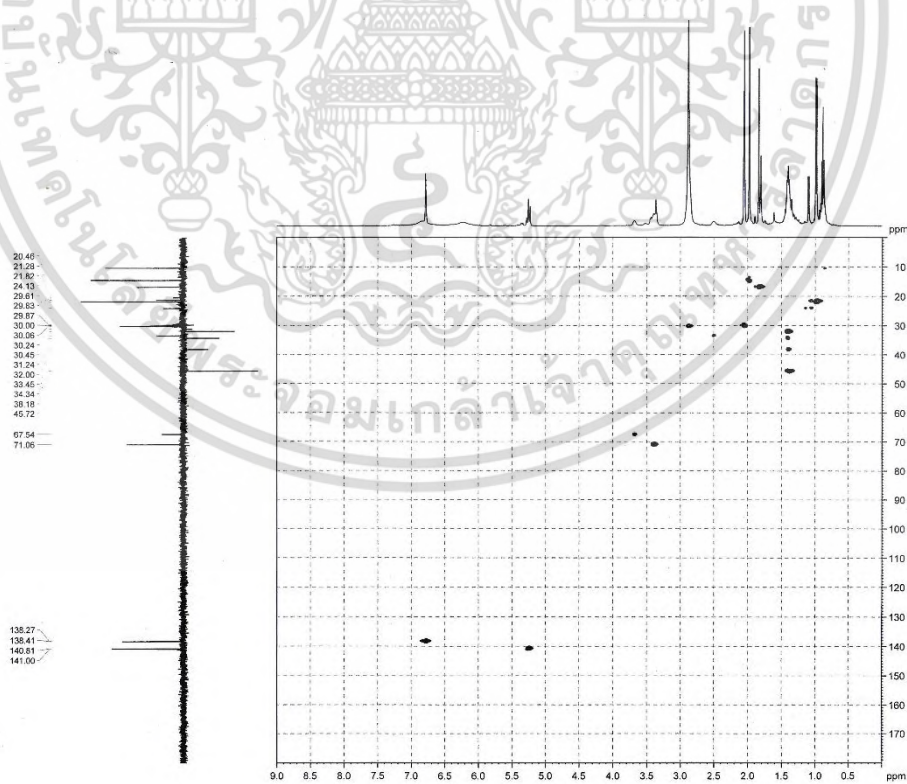


รูปที่ 13 สเปกตรัม ^{13}C NMR (100 MHz, acetone- d_6) ของสาร B

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

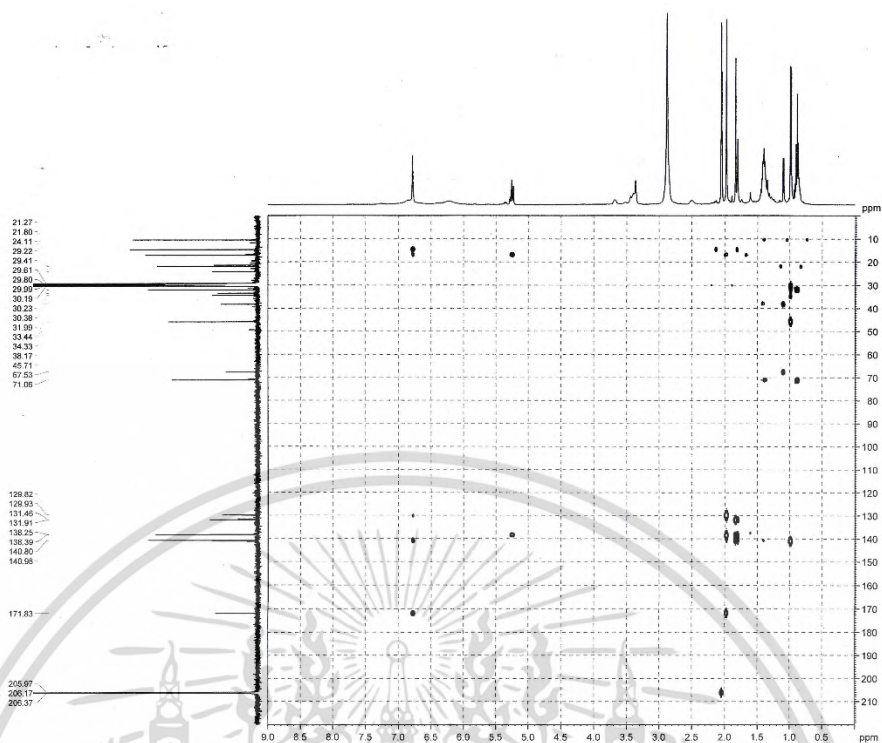


รูปที่ 14 สเปกตรัม DEPT 135 (100 MHz, acetone-d₆) ของสาร B

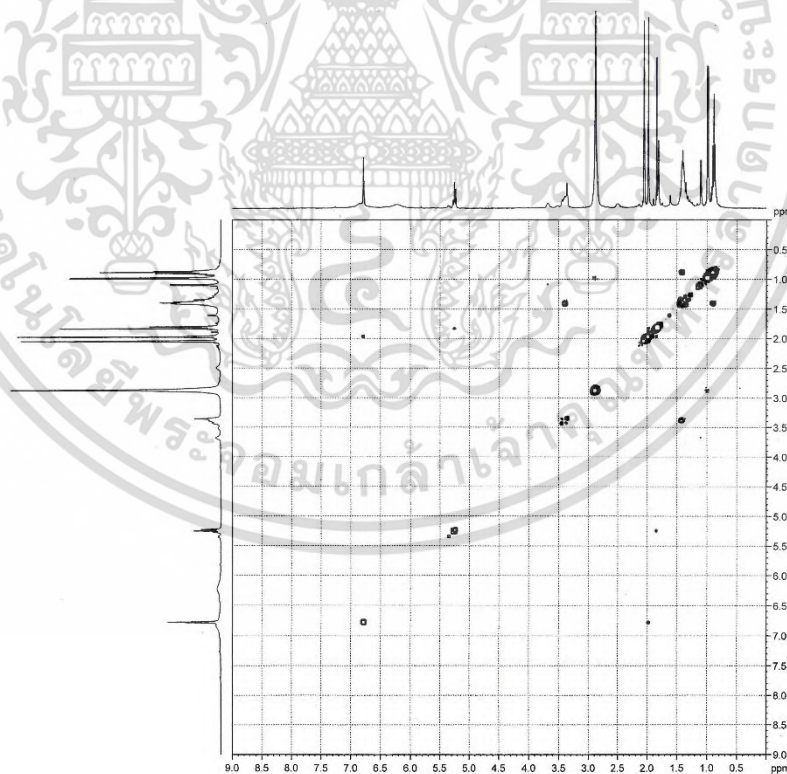


รูปที่ 15 สเปกตรัม HSQC (100 MHz, acetone-d₆) ของสาร B

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

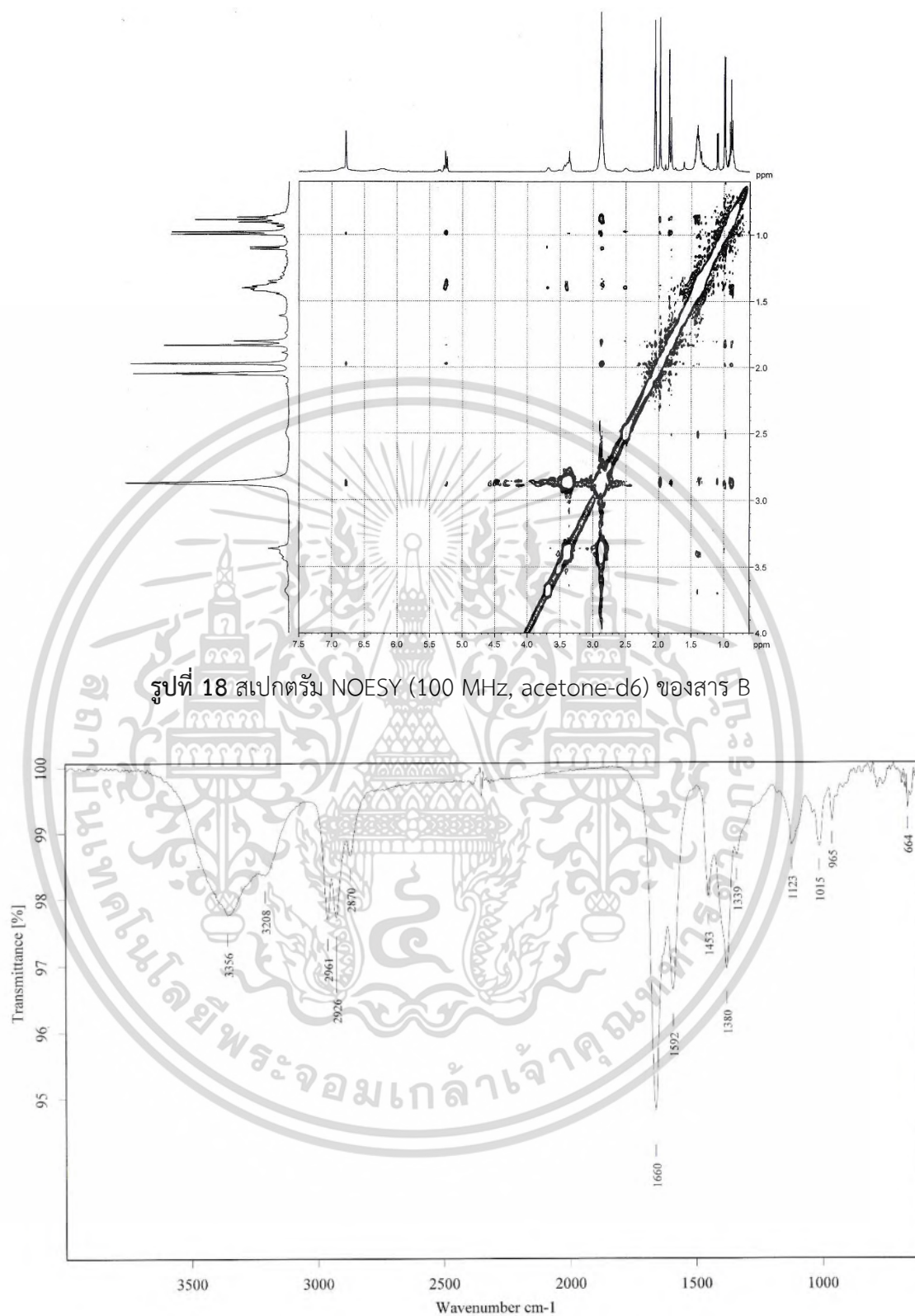


รูปที่ 16 สเปกตรัม HMBC (100 MHz, acetone-d₆) ของสาร B



รูปที่ 17 สเปกตรัม COSY (100 MHz, acetone-d₆) ของสาร B

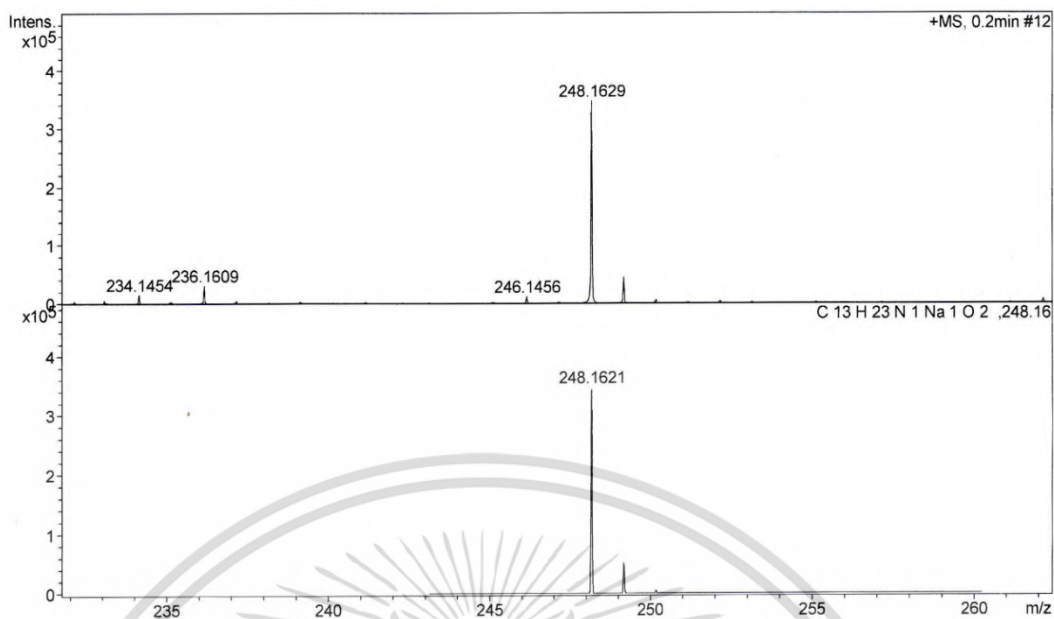
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



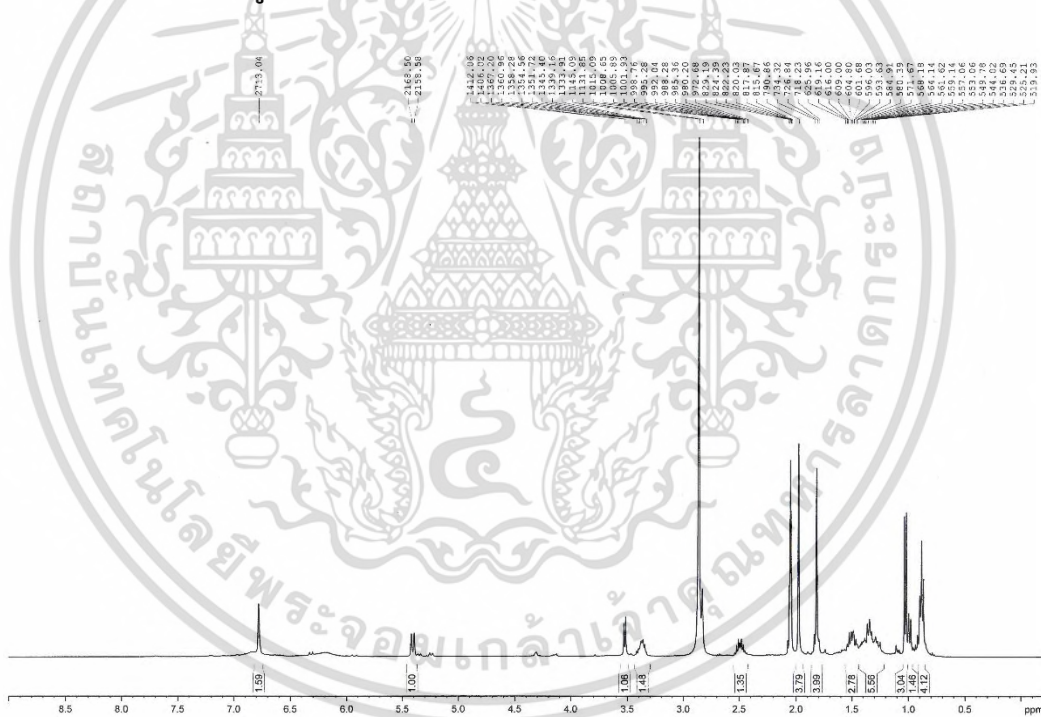
รูปที่ 18 สเปกตรัม NOESY (100 MHz, acetone-d₆) ของสาร B

รูปที่ 19 สเปกตรัม IR ของสาร B

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 20 สเปกตรัม HRESIMS [M+Na] ของสาร B



รูปที่ 21 สเปกตรัม ^1H NMR (400 MHz, acetone- d_6) ของสาร C

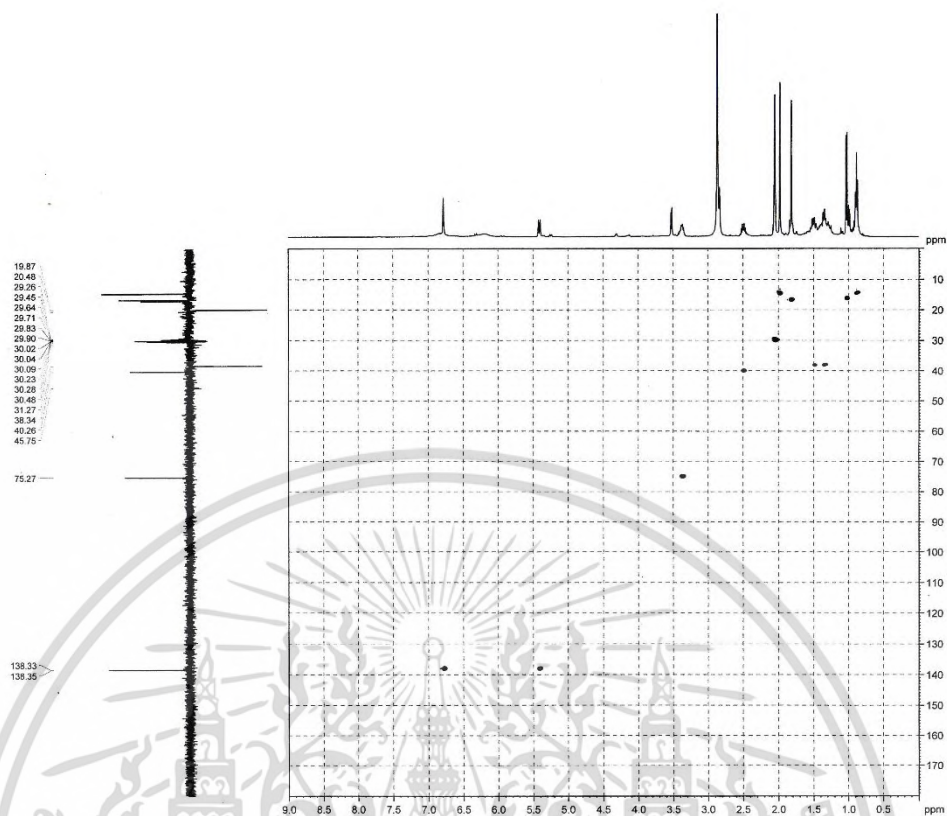
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



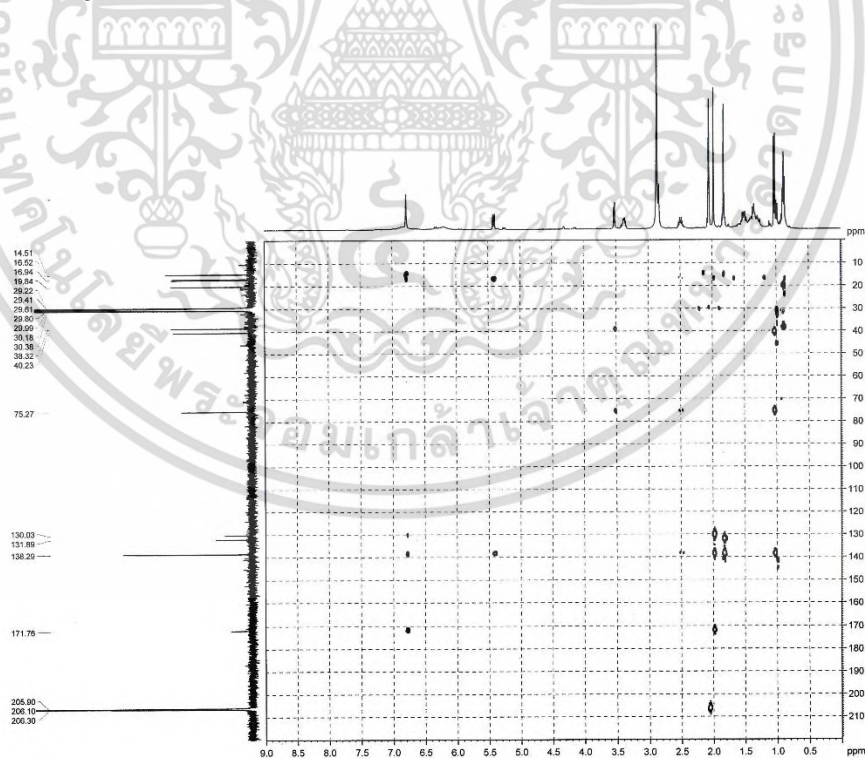
รูปที่ 22 สเปกตรัม ^{13}C NMR (100 MHz, acetone- d_6) ของสาร C

รูปที่ 23 สเปกตรัม DEPT 135 (100 MHz, acetone- d_6) ของสาร C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

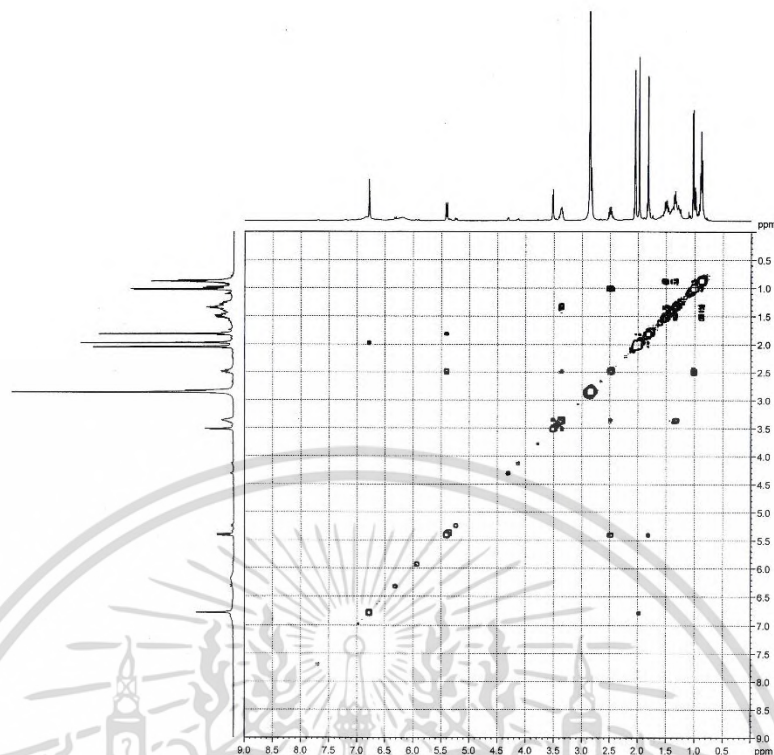


รูปที่ 24 สเปกตรัม HSQC (100 MHz, acetone-d₆) ของสาร C

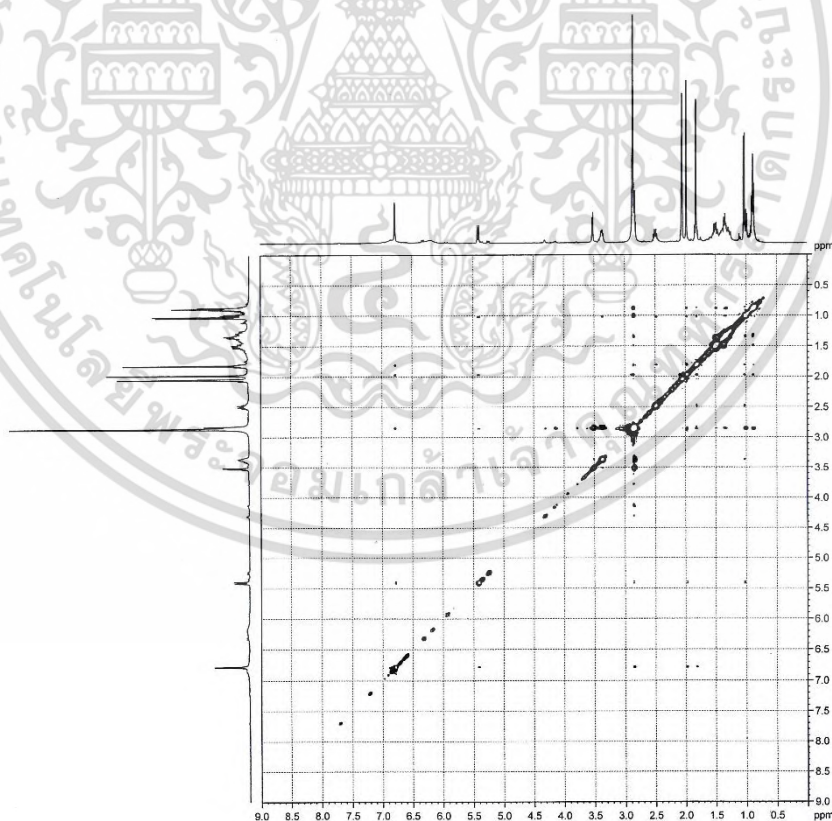


รูปที่ 25 สเปกตรัม HMBC (100 MHz, acetone-d₆) ของสาร C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

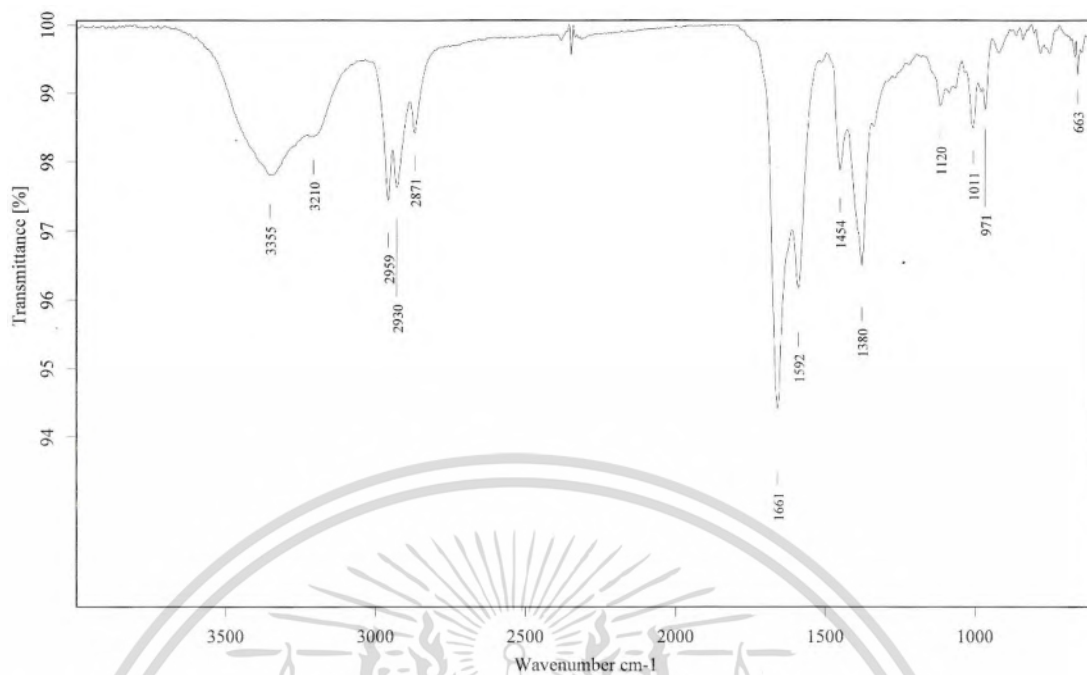


รูปที่ 26 สเปกตรัม COSY (100 MHz, acetone-d₆) ของสาร C

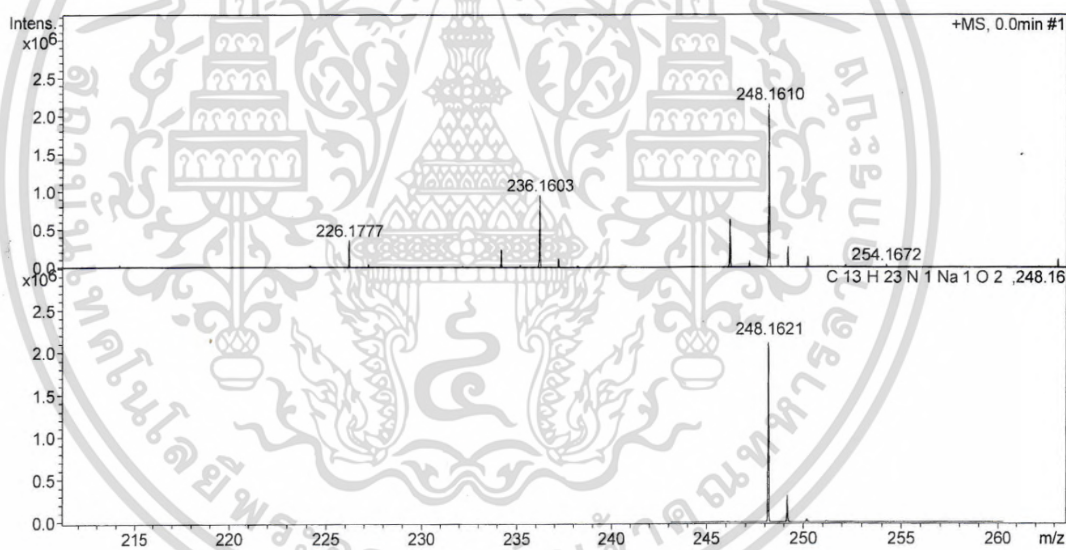


รูปที่ 27 สเปกตรัม NOESY (100 MHz, acetone-d₆) ของสาร C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

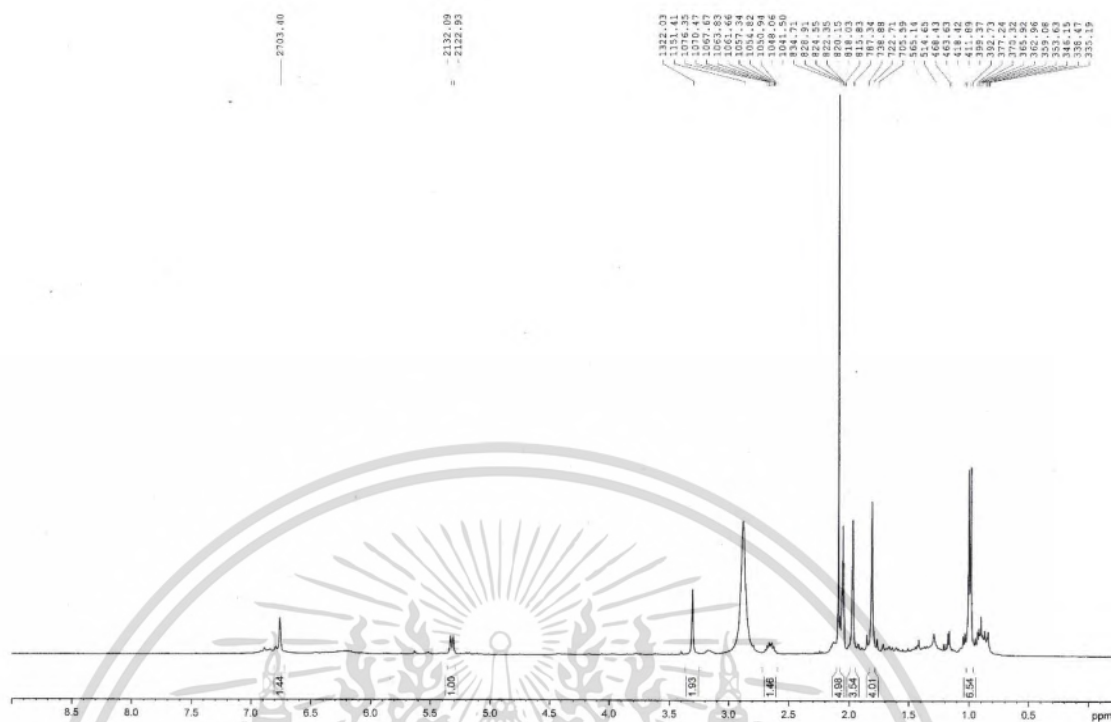


รูปที่ 28 สเปกตรัม IR ของสาร C

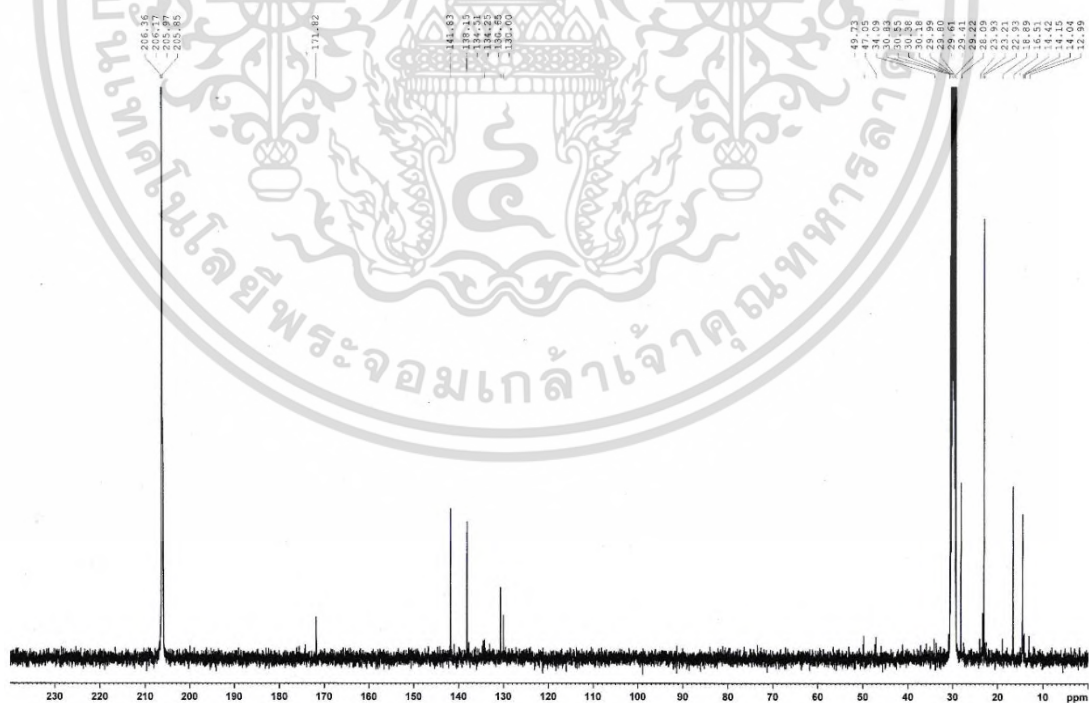


รูปที่ 29 สเปกตรัม HRESIMS [M+Na] ของสาร C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

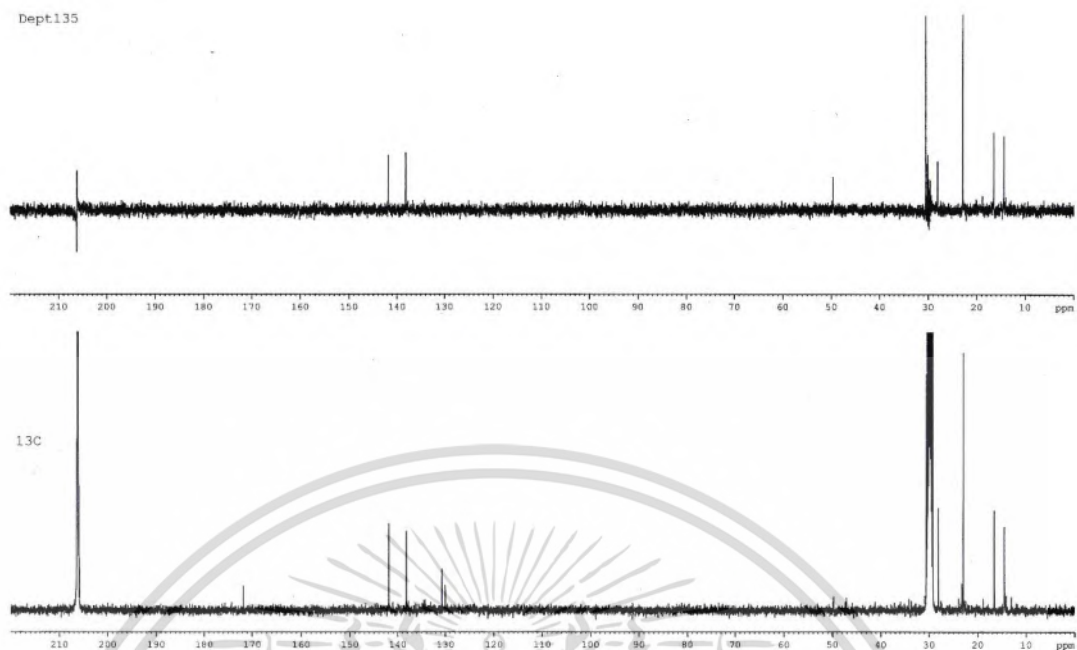


รูปที่ 30 สเปกตรัม ^1H NMR (400 MHz, acetone- d_6) ของสาร D

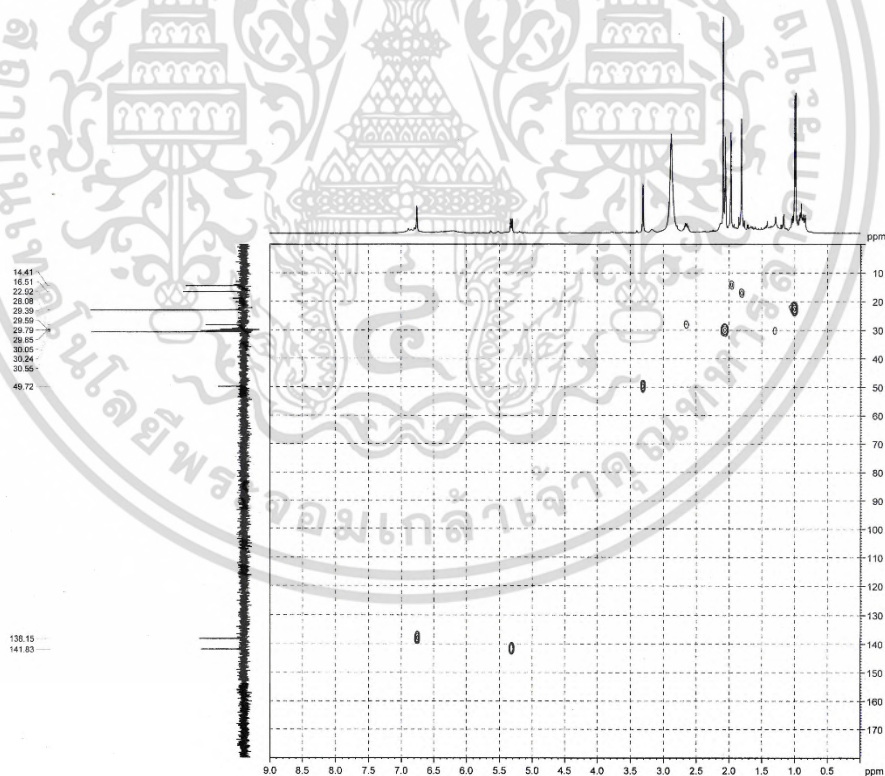


รูปที่ 31 สเปกตรัม ^{13}C NMR (100 MHz, acetone- d_6) ของสาร D

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

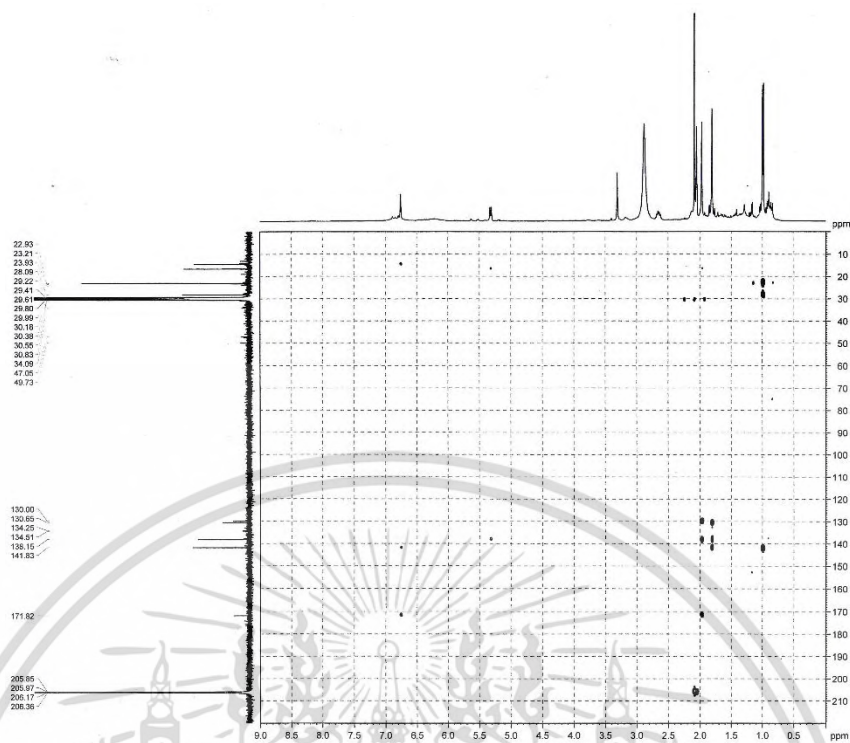


รูปที่ 32 สเปกตรัม DEPT 135 (100 MHz, acetone-d₆) ของสาร D

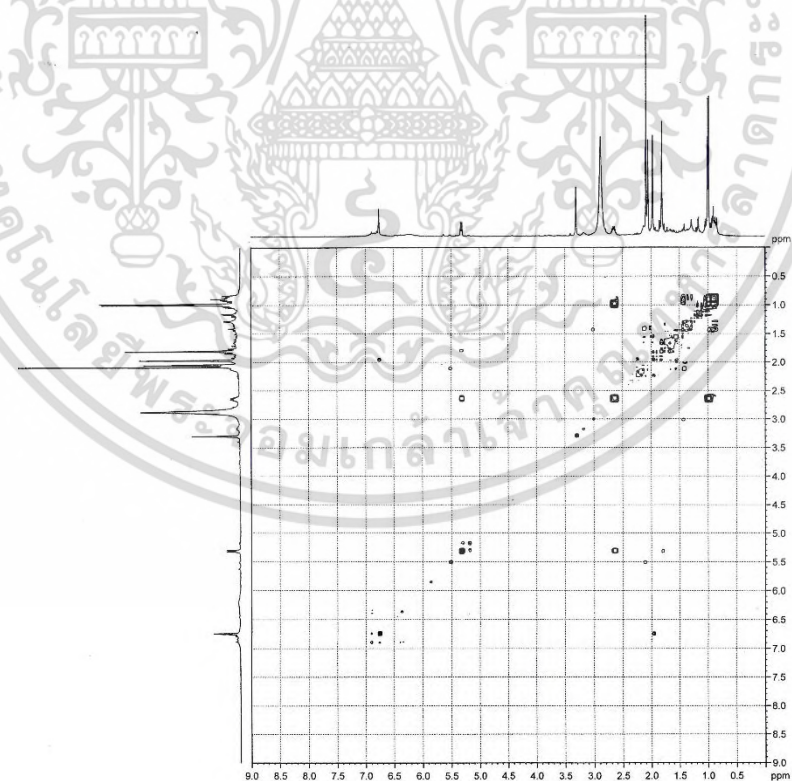


รูปที่ 33 สเปกตรัม HSQC (100 MHz, acetone-d₆) ของสาร D

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

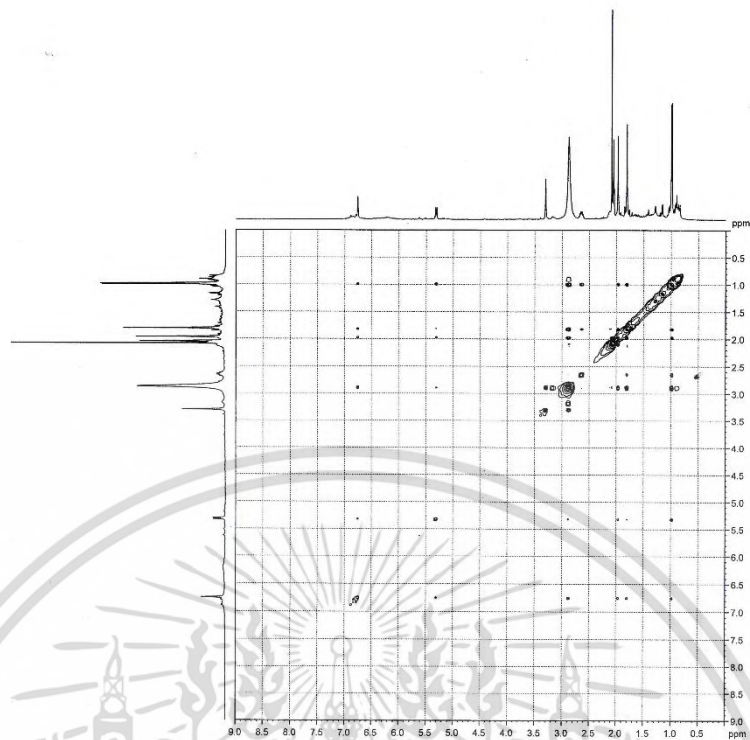


รูปที่ 34 สเปกตรัม HMBC (100 MHz, acetone-d₆) ของสาร D

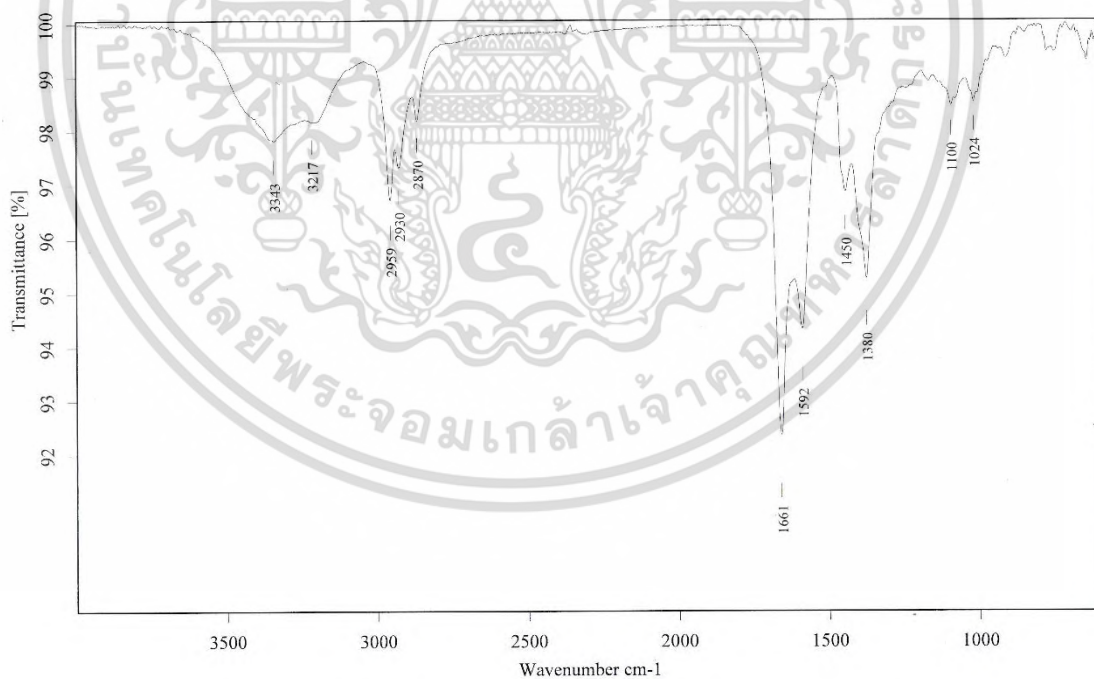


รูปที่ 35 สเปกตรัม COSY (100 MHz, acetone-d₆) ของสาร D

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

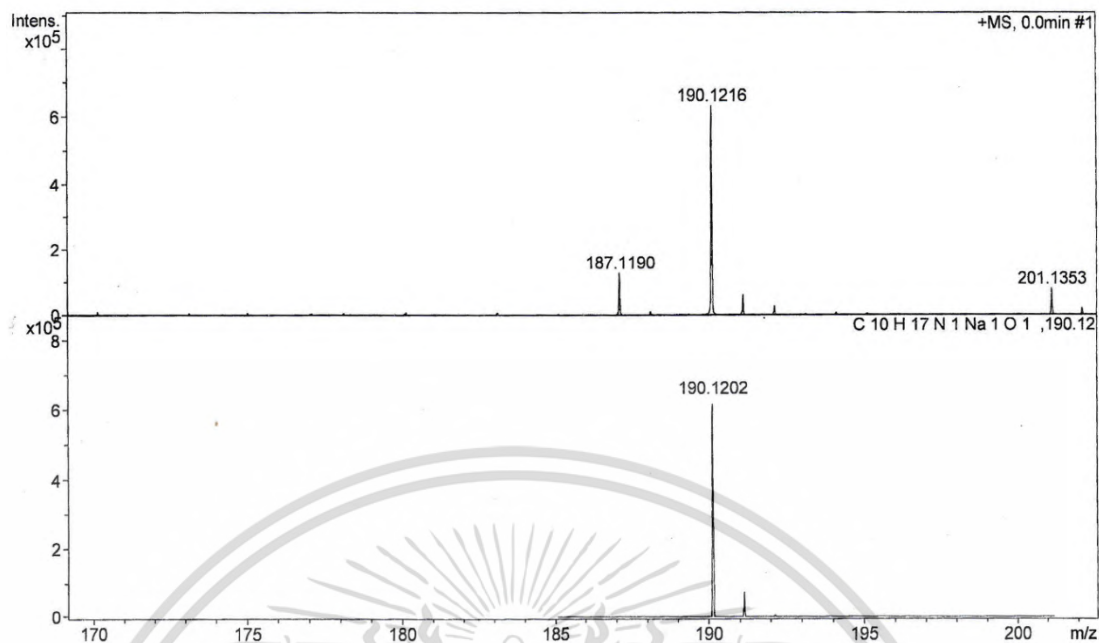


รูปที่ 36 สเปกตรัม NOESY (100 MHz, acetone-d₆) ของสาร D

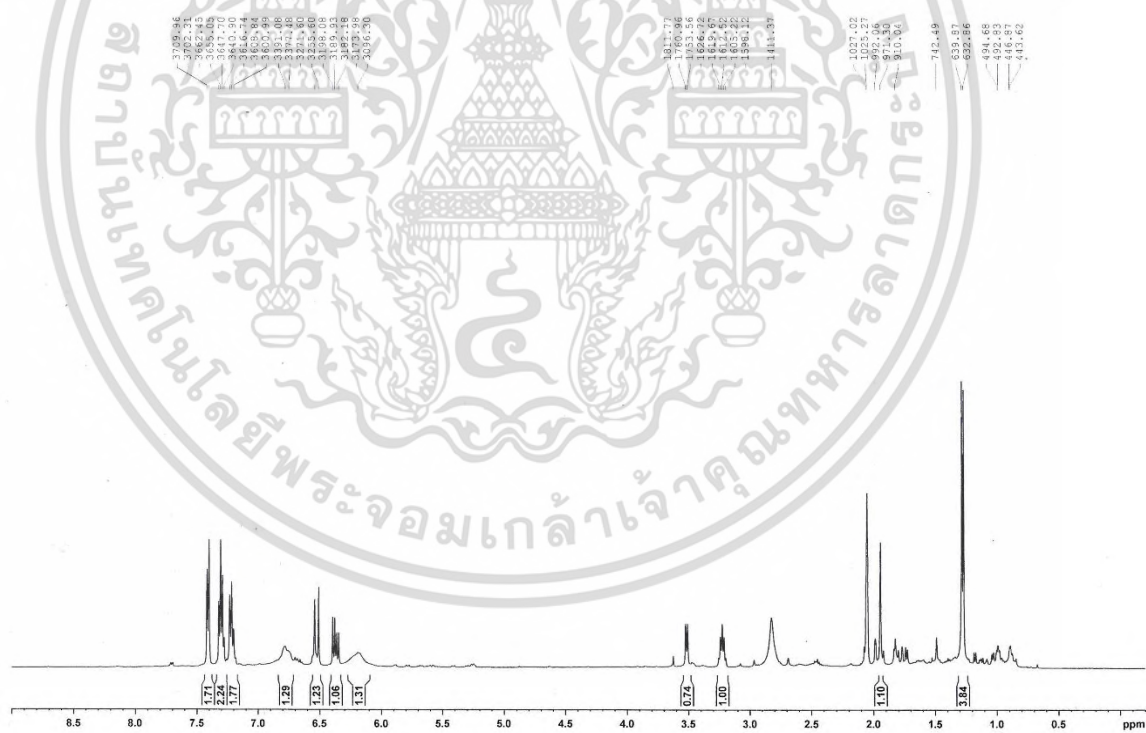


รูปที่ 37 สเปกตรัม IR ของสาร D

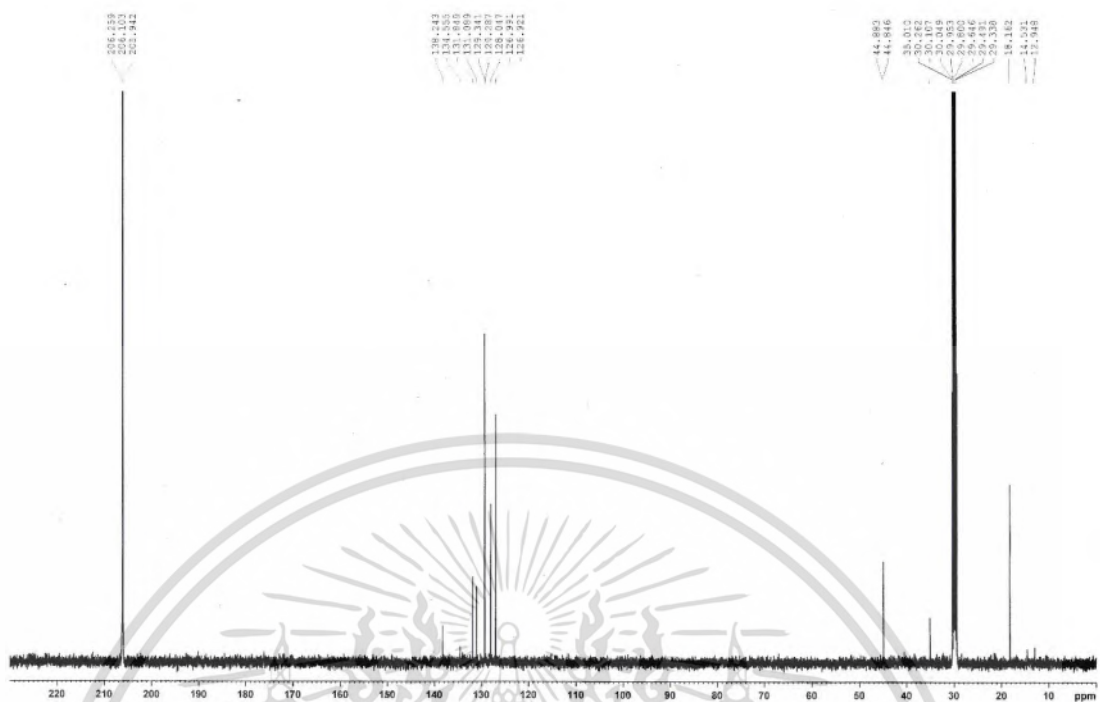
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



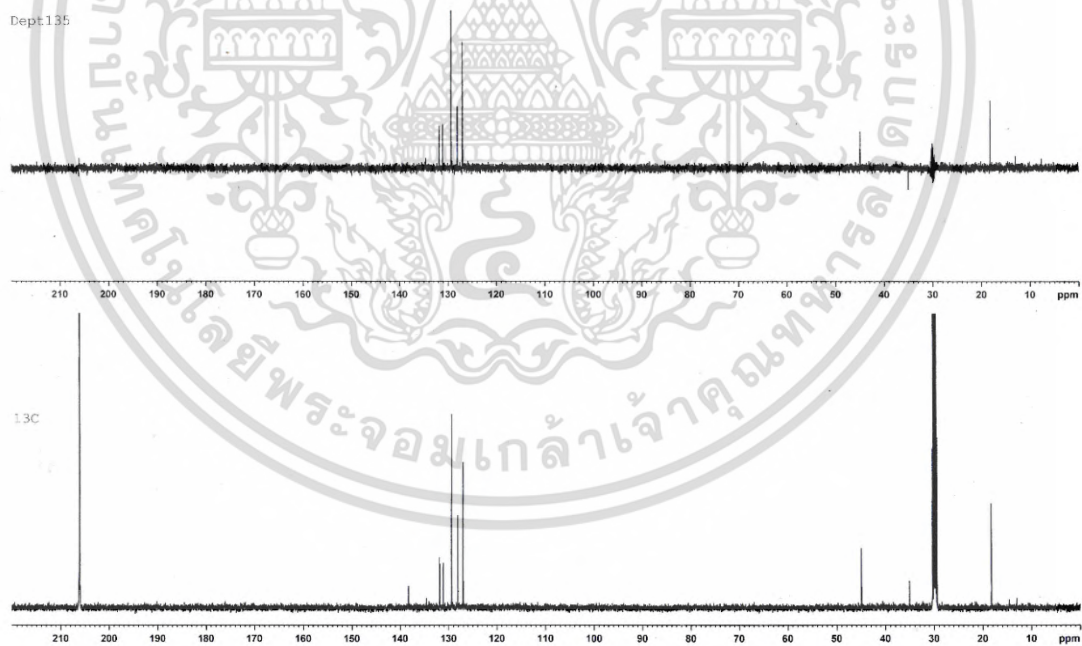
รูปที่ 38 สเปกตรัม HRESIMS [M+Na] ของสาร D

รูปที่ 39 สเปกตรัม ^1H NMR (500 MHz, acetone- d_6) ของสาร E

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

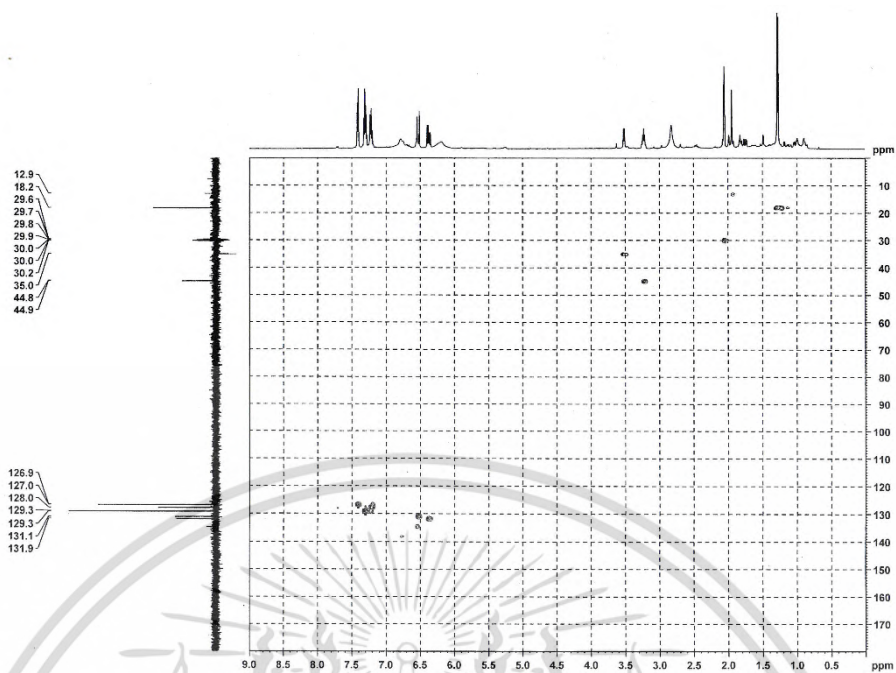


รูปที่ 40 สเปกตรัม ^{13}C NMR (125 MHz, acetone- d_6) ของสาร E

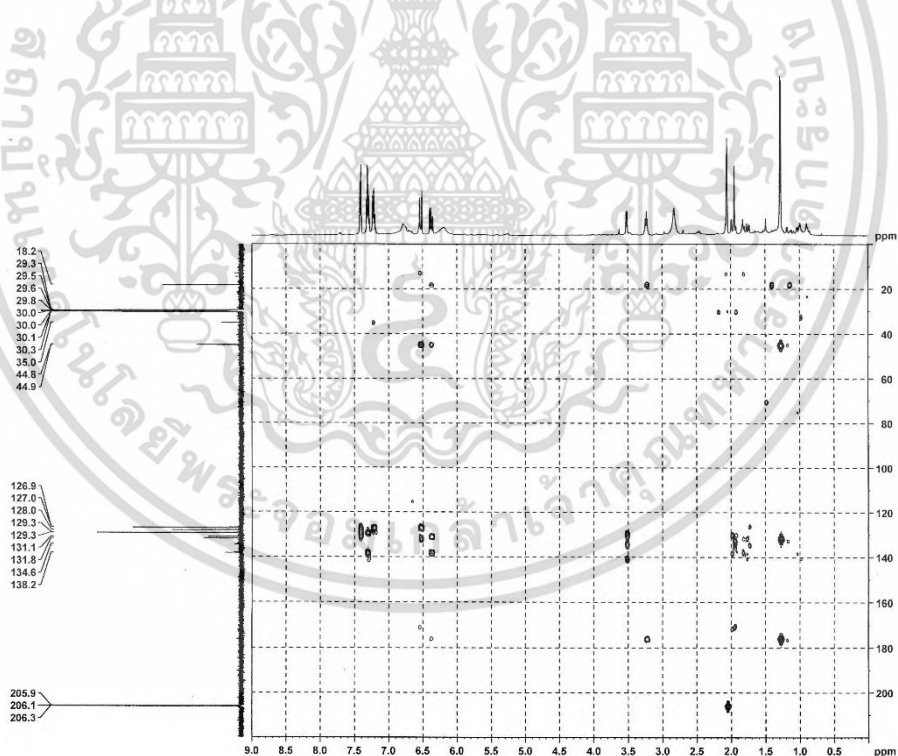


รูปที่ 41 สเปกตรัม DEPT 135 (125 MHz, acetone- d_6) ของสาร E

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

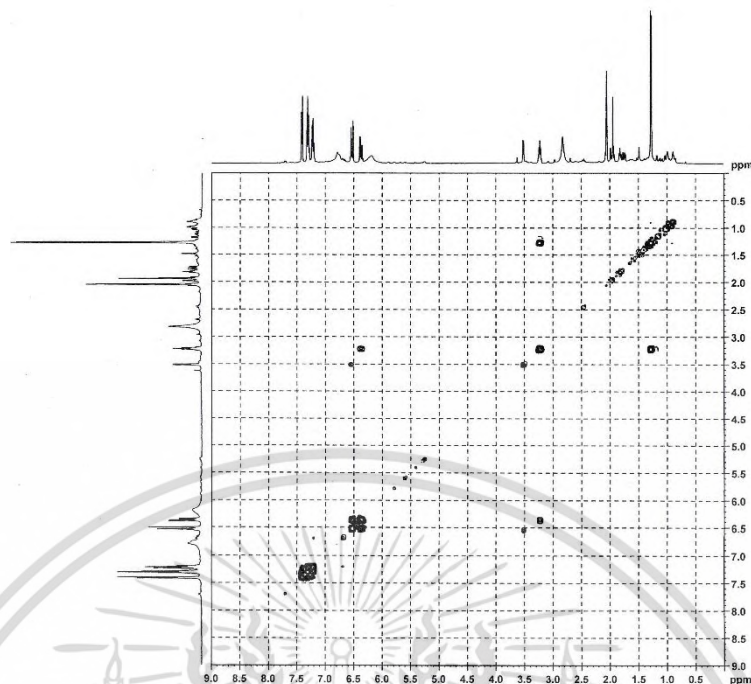


รูปที่ 42 สเปกตรัม HSQC (125 MHz, acetone-d₆) ของสาร E

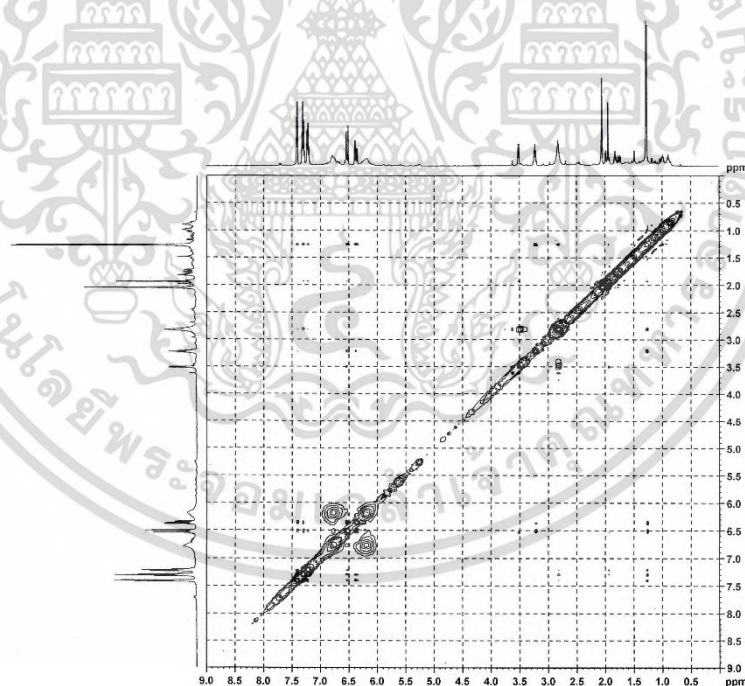


รูปที่ 43 สเปกตรัม HMBC (125 MHz, acetone-d₆) ของสาร E

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

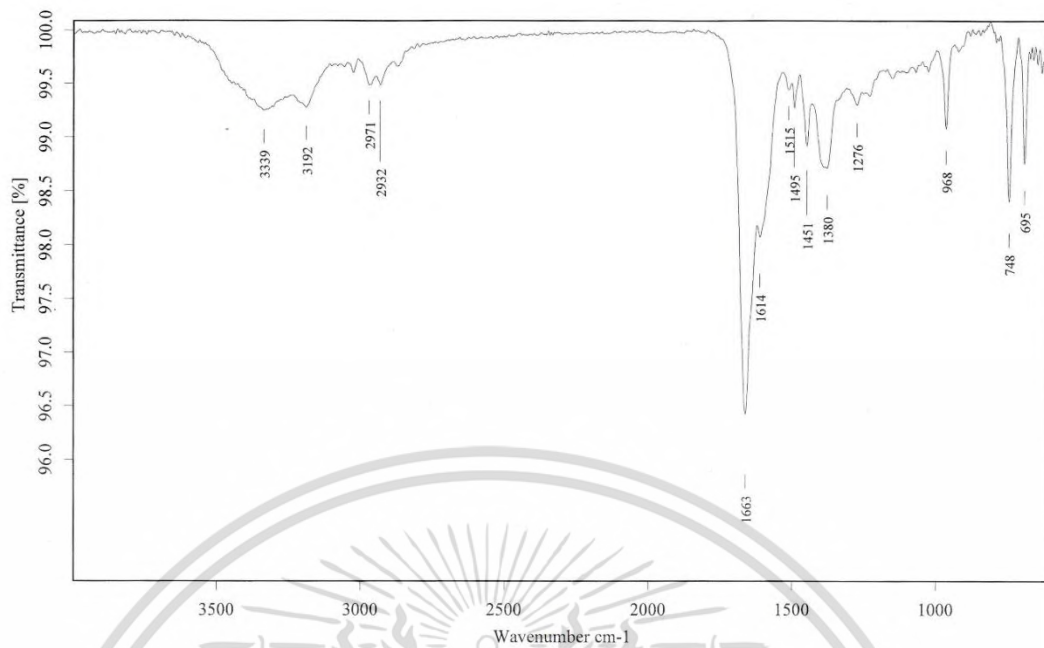


รูปที่ 44 สเปกตรัม COSY (125 MHz, acetone-d6) ของสาร E

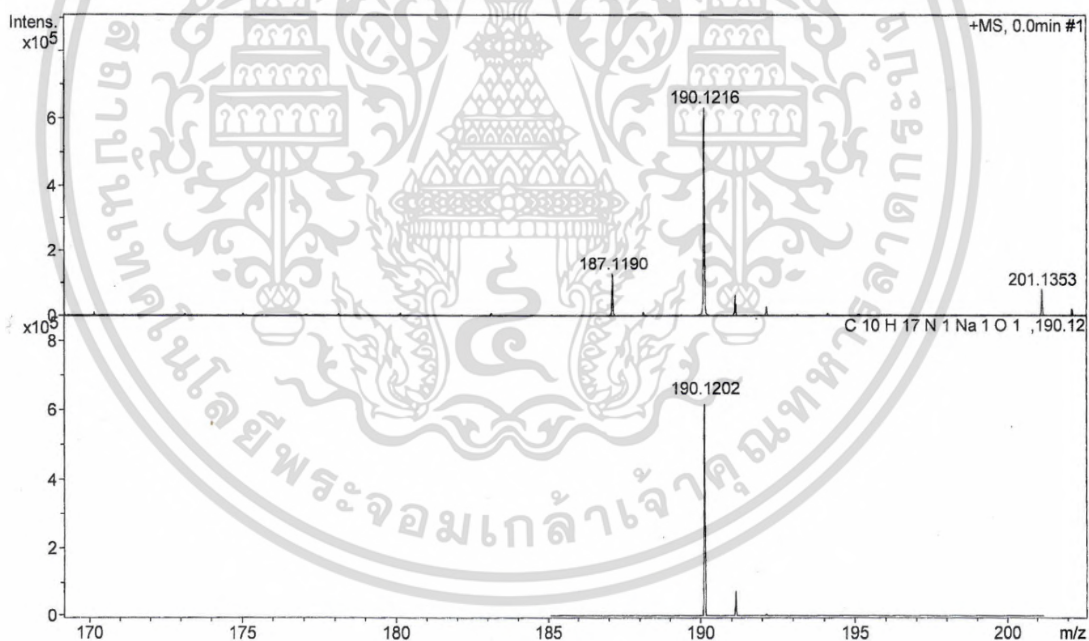


รูปที่ 45 สเปกตรัม NOESY (125 MHz, acetone-d6) ของสาร E

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

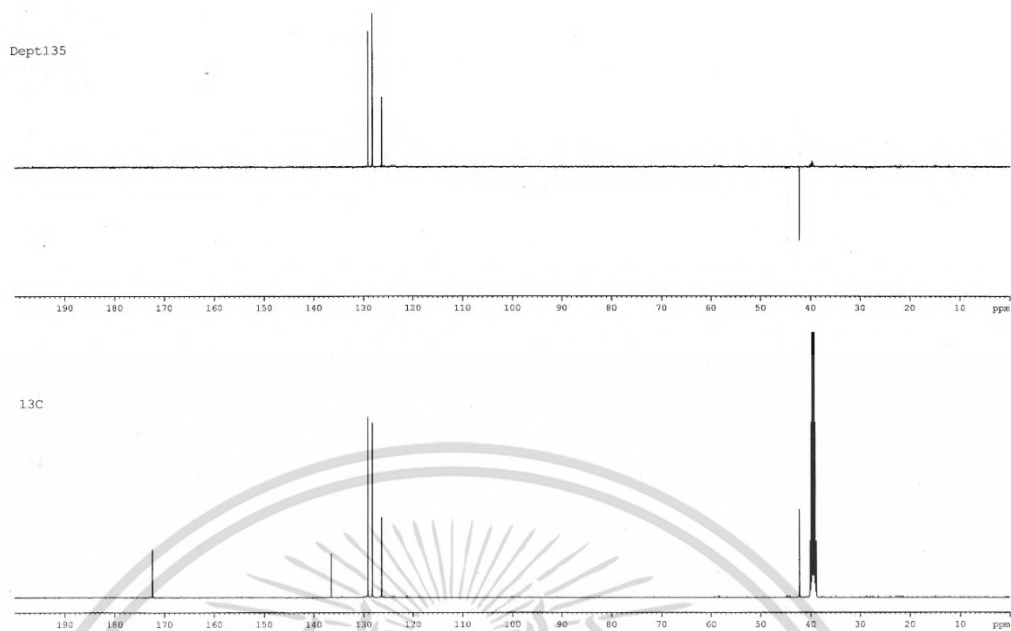


รูปที่ 46 สเปกตรัม IR ของสาร E

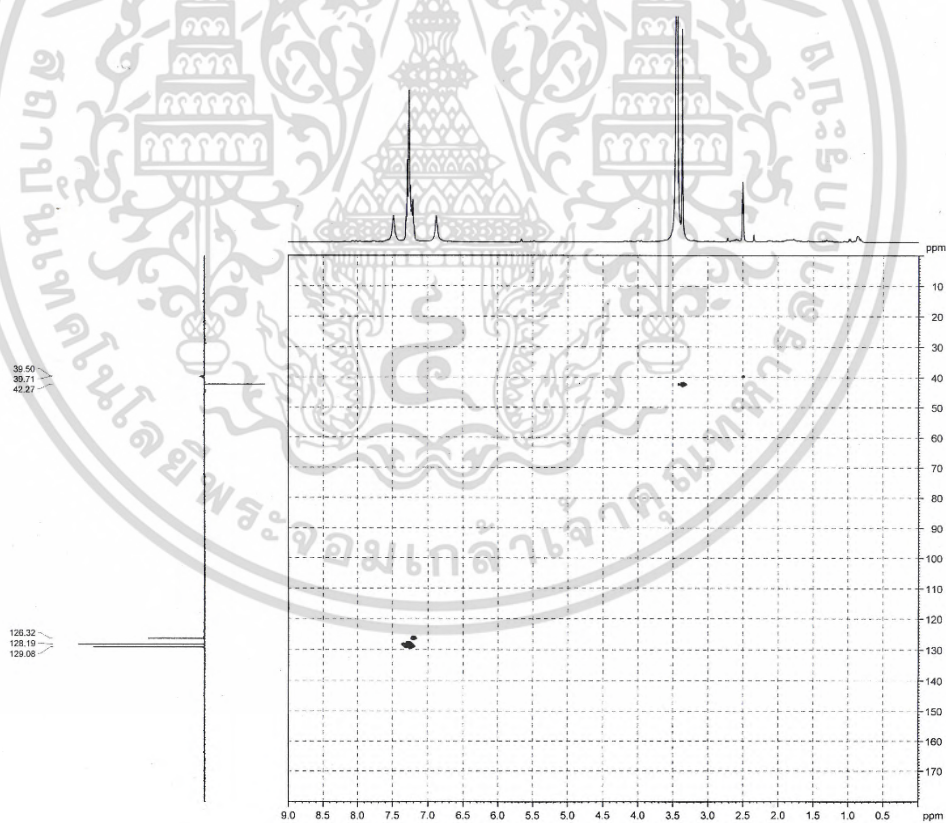


รูปที่ 47 สเปกตรัม HRESIMS [M+Na] ของสาร E

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

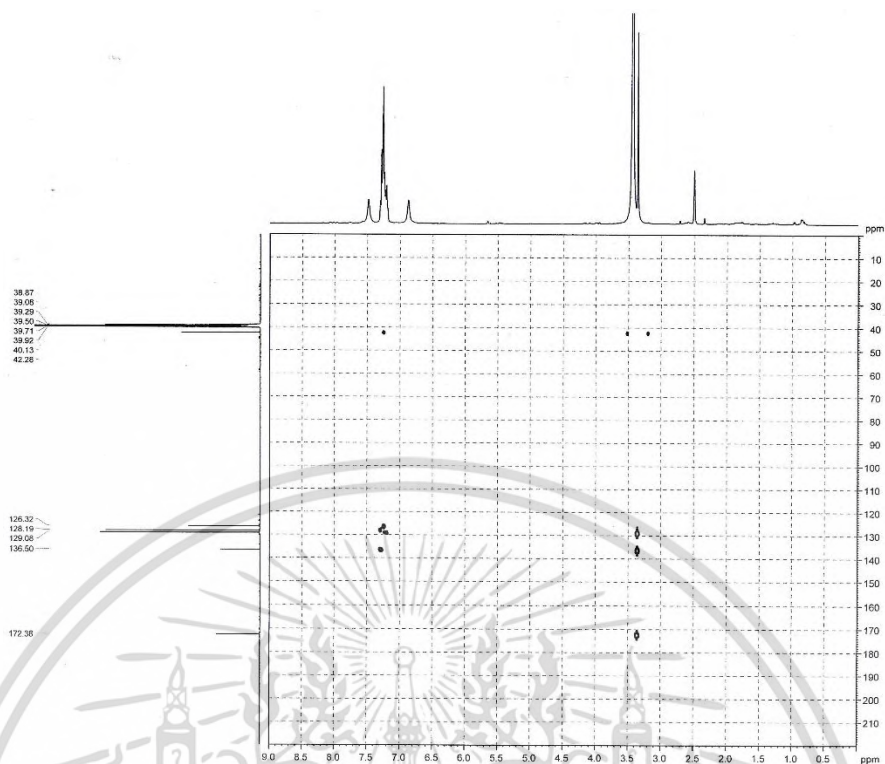


รูปที่ 52 สเปกตรัม DEPT 135 (100 MHz, DMSO-d6) ของสาร G

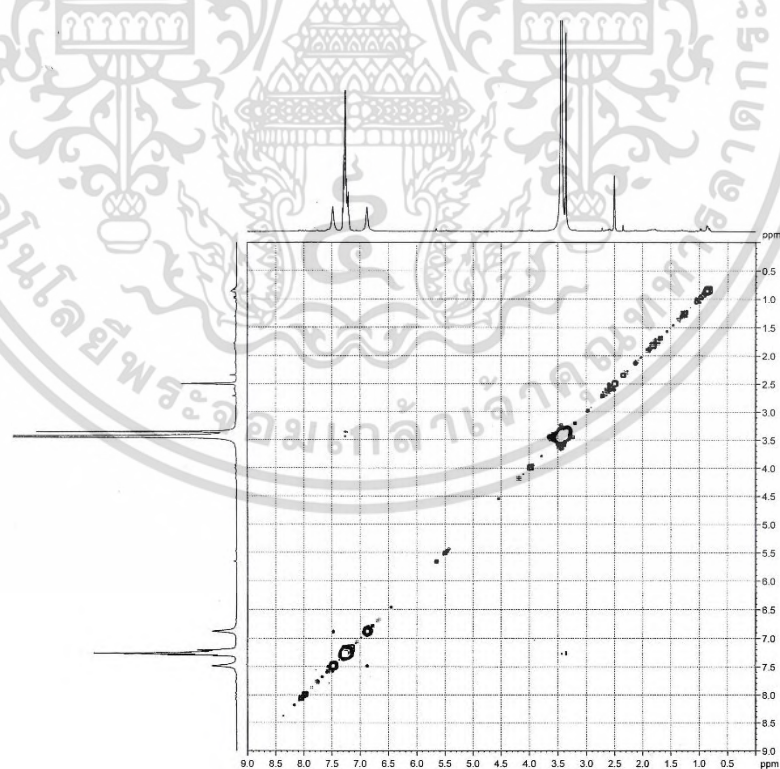


รูปที่ 53 สเปกตรัม HSQC (100 MHz, DMSO-d6) ของสาร G

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

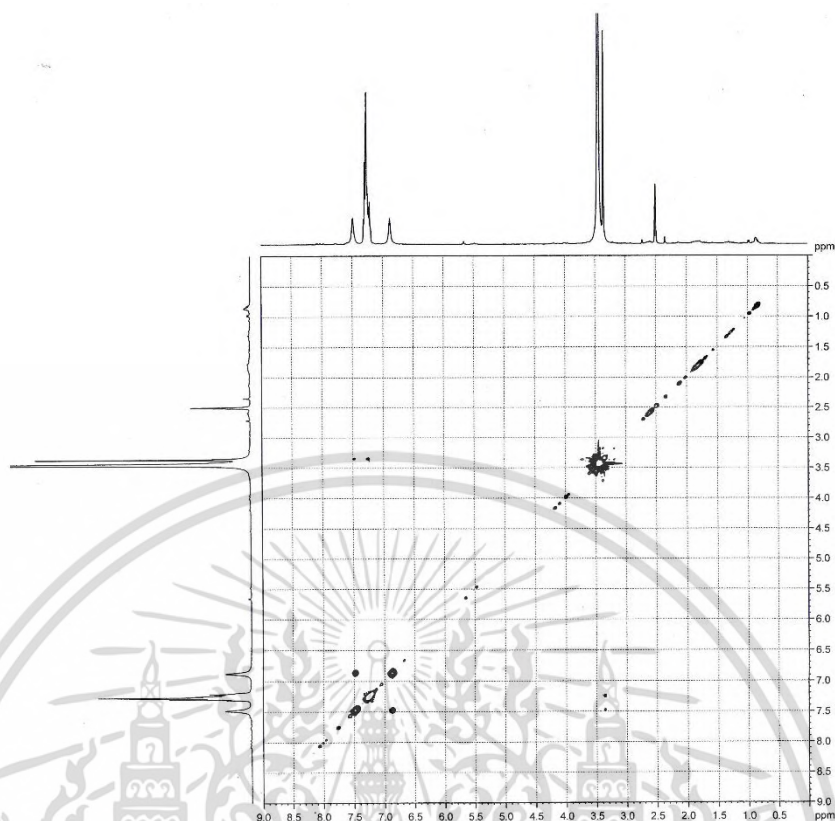


รูปที่ 54 สเปกตรัม HMBC (100 MHz, DMSO-d₆) ของสาร G

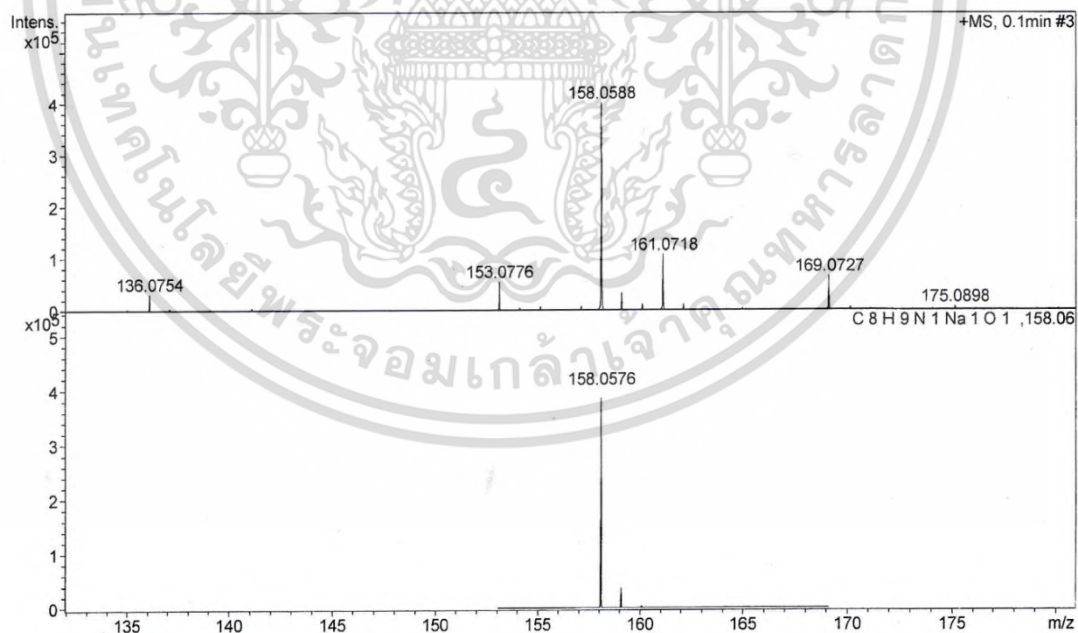


รูปที่ 55 สเปกตรัม COSY (400 MHz, DMSO-d₆) ของสาร G

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 56 สเปกตรัม NOESY (400 MHz, DMSO-d6) ของสาร G



รูปที่ 57 สเปกตรัม HRESIMS [M+Na] ของสาร G

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ

ข้อมูลทางสถิติ

Descriptives

IC50

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
A	3	56.2133	.37501	.21651	55.2818	57.1449	55.84	56.59
B	3	51.2800	.78307	.45211	49.3347	53.2253	50.54	52.10
C	3	101.2467	.61978	.35783	99.7070	102.7863	100.84	101.96
D	3	109.4667	2.74504	1.58485	102.6476	116.2857	106.73	112.22
E	3	90.5167	1.65210	.95384	86.4126	94.6207	88.96	92.25
F	3	206.2963	4.14783	2.39475	195.9926	216.6001	201.51	208.69
G	3	136.8538	.57855	.33403	135.4166	138.2910	136.26	137.42
VitC	3	.8900	.09000	.05196	.6664	1.1136	.80	.98
BHT	3	92.5496	1.54961	.89467	88.7002	96.3990	91.48	94.33
crudeEtoAC	3	10.8500	.50567	.29195	9.5939	12.1061	10.36	11.37
crudeMeOH	3	111.4367	.95443	.55104	109.0657	113.8076	110.37	112.21
Total	33	87.9636	56.05300	9.75757	68.0881	107.8391	.80	208.69

รูปที่ 58 ข้อมูลสถิติเชิงพรรณนาของสารบริสุทธิ์ สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตท สารสกัดหยาบในชั้นเมทานอล และสารมาตรฐาน ด้วยโปรแกรม spss เวอร์ชัน 26

ANOVA

IC50

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	100476.990	10	10047.699	3398.892	.000
Within Groups	65.036	22	2.956		
Total	100542.025	32			

รูปที่ 59 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA) ด้วยโปรแกรม spss เวอร์ชัน 26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

IC50

Duncan^a

compounds	N	Subset for alpha = 0.05									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
VitC	3	.8900									
crudeEtoAC	3		10.8500								
B	3			51.2800							
A	3				56.2133						
E	3					90.5167					
BHT	3						92.5496				
C	3							101.2467			
D	3								109.4667		
crudeMeOH	3									111.4367	
G	3									136.8538	
F	3										206.2963
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	.162	1.000	.174	1.000	1.000	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

รูปที่ 60 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย IC₅₀ ด้วยวิธี Duncan โดยใช้โปรแกรม spss เวอร์ชัน 26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายสัการ ชนะเดช
วัน เดือน ปีเกิด	19 พฤษภาคม 2538
ที่อยู่ปัจจุบัน	9 ถนนสันติธรรม ตำบลช้างเผือก อำเภอเมืองเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่
ประวัติการศึกษา	(2560) วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (2564) วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนรายได้คณะวิทยาศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง (2561-01-05-66)
ผลงานทางวิชาการ	1. Chanadech, S., Thawai, C., Pittayakhajonwut, P., Intaraudom, C. 2019. "Characterization of <i>Streptomyces</i> sp. C1-2 and its anti-oxidant activity." <i>The 11th Science Reseach Conference</i> . 1 : 1361-1369. 2. Chanadech, S., Ruen-ngam, D., Intaraudom, C., Pittayakhajonwut, P., Chongruchiroj, S., Pratuangdejkul, J., and Thawai, C. 2021. "Isolation of manumycin-type derivatives and genome characterization of a marine <i>Streptomyces</i> sp. C1-2." <i>Research in Microbiology</i> . 172(2): 103812

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้