

การตรวจคุณลักษณะและสารต้านอนุมูลอิสระของ *Streptomyces*
ใหม่ สายพันธุ์ AA8

CHARACTERIZATION AND ANTIOXIDANT COMPOUNDS OF
NOVEL *Streptomyces* sp. STRAIN AA8



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2564

KMITL-2021-SC-M-020-031

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

CHARACTERIZATION AND ANTIOXIDANT COMPOUNDS OF
NOVEL *Streptomyces* sp. STRAIN AA8



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-020-031

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2021

SCHOOL OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจคุณลักษณะและสารต้านอนุมูลอิสระของ <i>Streptomyces</i> ใหม่ สายพันธุ์ AA8
ชื่อนักศึกษา	นางสาว อรณิชา ธยานุวัฒนวงศ์
รหัสประจำตัว	60605054
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ	2564
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร.จิตติ ท่าไว
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.ปัทมา พิทยขจรวุฒิ

บทคัดย่อ

แอสติโนมัยีสท์ไอโซเลต AA8 ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างดินที่เก็บจากสวนผลไม้ในจังหวัด กรุงเทพมหานคร ได้ถูกระบุชนิดโดยการศึกษาอนุกรมวิธานหลายส่วน ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ AA8 เป็นสมาชิกของสกุล *Streptomyces* และมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *Streptomyces roseifaciens* DSM 106196^T ที่ระดับความคล้ายคลึงของยีนช่วง 16S rRNA สูงสุดที่ 99.9 เปอร์เซ็นต์ การระบุชนิดด้วยข้อมูลจีโนมแสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ AA8 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *Streptomyces roseifaciens* DSM 106196^T และมีค่า ANI ในระดับต่ำ (94.1 เปอร์เซ็นต์) การวิเคราะห์จีโนมด้วยแพลตฟอร์ม antiSMASH พบว่าสายพันธุ์ AA8 ประกอบไปด้วยยีนกลุ่มยีนสำหรับชีวสังเคราะห์สารทุติยภูมิหลายกลุ่มยีน ได้แก่ กลุ่มยีนโพลีคีไทด์ซินเทสชนิดที่ 1 และ 3 กลุ่มยีนสำหรับชีวสังเคราะห์เทอร์ปีน กลุ่มยีนนั้น-ไรโบโซมอลเปปไทด์ซินทีเทสและกลุ่มยีนที่คล้ายกับนั้น-ไรโบโซมอลเปปไทด์ซินทีเทส สารสกัดหยาบของสายพันธุ์ AA8 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ระดับ IC₅₀ 7.03 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นการตรวจสอบคุณลักษณะทางเคมีจึงถูกดำเนินการควบคู่กับวิธีการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพและนำไปสู่การแยกสารบริสุทธิ์จำนวน 9 สาร ได้แก่ สาร 3,4-dimethoxypropiofenone (A), 6,7,8-Trimethoxy-3-methylisocoumarin (B), 3, 4-dimethoxybenzamide (C), 6, 8-dimethoxy-3-methylisocoumarin (D), 4-hydroxy-3-methoxybenzamide (E), 3,4-dihydroxybenzaldehyde (F), *N*₆- acetyltryptamine (G), 3-Hydroxymethyl-6,7,8-trimethoxyisocoumarin (H), 1-methoxy-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (I) สารที่แยกได้เหล่านี้ถูกประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าทุกสารแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ในช่วง IC₅₀ 0.87–384.85 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้สาร 3,4-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

dihydroxybenzaldehyde และ 6,7,8- trimethoxy-3-methylisocoumarin มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี แสดงให้เห็นว่าเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีศักยภาพ

คำสำคัญ : การต้านอนุมูลอิสระ โครมาโทกราฟี ลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน 16S rRNA สเตรปโตมัยซีท



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Characterization and antioxidant compounds of novel <i>Streptomyces</i> sp. strain AA8
Student Name	Onnicha Thayanuwadtanawong
Student ID	60605054
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 strain AA8, isolated from soil collected from the orchard in Bangkok province, was identified using a polyphasic taxonomic approach. The result showed that strain AA8 was a member of the genus *Streptomyces* and was closely related to *Streptomyces roseifaciens* DSM 106196^T with the highest 16S rRNA gene sequence similarity (99.9 %). Genomic-based identification revealed strain AA8 was most closely related to *Streptomyces roseifaciens* DSM 106196^T and shared the low values of average nucleotide identity (ANI) (94.1%). Genome analysis by antiSMASH platform revealed that strain AA8 contained several secondary metabolite biosynthetic gene clusters (smBGCS) i.e. type I and III polyketide synthase gene clusters, terpene biosynthesis gene clusters, non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) gene clusters, and NRPS-like gene clusters. The crude extract of strain AA8 exhibited antioxidant activity at IC₅₀ 7.03 ± 0.02 mg/ml. Therefore, the chemical investigation was conducted by employing bioassay-guided method and led to the isolation of 9 pure compounds, including 3,4-dimethoxypropiophenone (A), 6,7,8-trimethoxy-3-methylisocoumarin (B), 3, 4-dimethoxybenzamide (C), 6,8-dimethoxy-3-methylisocoumarin (D), 4-hydroxy-3-methoxybenzamide (E), 3,4-dihydroxybenzaldehyde (F), *N*₆- acetyltryptamine (G), 3-Hydroxymethyl-6,7,8-trimethoxyisocoumarin (H), 1-methoxy-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (I).

These isolated compounds were evaluated for antioxidant activity. All compounds exhibited antioxidant activity in the range of IC_{50} 0.87–384.85 mg/ml. Besides, compounds 3,4-dihydroxybenzaldehyde and 6,7,8- trimethoxy-3-methylisocoumarin displayed strong antioxidant activity, indicating a potential for antioxidant agents.

Keywords: *Streptomyces*, 16S rRNA gene sequence, secondary metabolites, antioxidant activity.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเนื่องจากการได้รับการสนับสนุนจากหลายท่านโดยเฉพาะอย่างยิ่งอาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร. จิตติ ท่าไว ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ ให้ความรู้ คำแนะนำ และให้คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์แก่การดำเนินการวิจัยของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ อีกทั้งยังให้การอนุเคราะห์เรื่องอุปกรณ์ สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง และสิ่งอำนวยความสะดวกในการดำเนินการทางด้านเชื้อและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของงานวิจัยตลอดจนแก้ไขงานวิจัยให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์แบบในการทำงานวิจัยวิทยานิพนธ์นี้โดยตลอด

ขอขอบพระคุณ ดร. ปัทมา พิทยขจรวุฒิ และ นาย จักรพงศ์ อินทรอุดม ของหน่วยงานศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ให้การอนุเคราะห์เรื่องอุปกรณ์ สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง และสิ่งอำนวยความสะดวกในการวิจัยของทางด้านการแยกสารสกัดของเชื้อแอคติโนมัยสีทรวมถึงการแยกสารบริสุทธิ์และระบุสารบริสุทธิ์แต่ละชนิดตลอดจนโครงสร้างของสารแต่ละตัวของงานวิจัยฉบับนี้

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณบิดา มารดา พี่ชาย น้องสาว และครอบครัวชยานุวัฒนวงศ์ ที่ให้การสนับสนุนทางด้านกายและใจของข้าพเจ้าตลอดจนเงินทุนต่าง ๆ ในการทำวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีจนทำให้ข้าพเจ้าสามารถทำวิทยานิพนธ์สำเร็จ จึงขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

อรณิชา ชยานุวัฒนวงศ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีที่และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 แอคติโนมัยสีท (actinomycetes).....	3
2.1.1 ลักษณะโดยทั่วไปของแอกติโนมัยสีท.....	3
2.1.2 การแยกแอกติโนมัยสีทจากดิน.....	4
2.1.3 การจัดจำแนกแอกติโนมัยสีท.....	5
2.2 สกุล <i>Streptomyces</i>	8
2.2.1 ลักษณะทั่วไปของ <i>Streptomyces</i>	8
2.3 การศึกษาอนุกรมวิธานของ <i>Streptomyces</i>	9
2.3.1 การศึกษาลักษณะทางด้านฟีโนไทป์ (Phenotype characterization).....	9
2.3.2 การศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานทางเคมี (Chemotypes characterization).....	15
2.3.3 การศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ (Genotypic characterization)	20
2.4 ชีวสารสนเทศ (bioinformatics).....	32
2.4.1 การประกอบชิ้นส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ (DNA sequence assembly).....	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.4.2 การระบุตำแหน่งโดยการทำนายหน้าที่ของจีโนม (genome Annotation).....	34
2.4.3 Average Nucleotide Identity (ANI).....	34
2.4.4 เทคนิค Digital DNA-DNA hybridization (dDDH).....	35
2.4.5 แสดงผลของจีโนมด้วย Circular map.....	35
2.4.6 แสดงผลของจีโนมด้วย Synteny map.....	37
2.4.7 ฐานข้อมูลของ antiSMASH.....	38
2.4.8 แผนภูมิตายวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree).....	38
2.5 การศึกษาสารทุติยภูมิของ <i>Streptomyces</i>	40
2.5.1 การศึกษาการเพาะเลี้ยง.....	40
2.5.2 การศึกษาการสกัด (extraction).....	40
2.6 โครมาโทกราฟี (Chromatography).....	41
2.6.1 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC).....	42
2.7 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี (NMR spectroscopy).....	43
2.7.1 โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ ($^1\text{H-NMR}$).....	44
2.7.2 คาร์บอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (Carbon-Nuclear Magnetic Resonance; $^{13}\text{C-NMR}$).....	45
2.7.3 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์แบบ 2 มิติ (2-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance; 2D-NMR).....	46
2.7.4 แมสสเปกโตรเมตรี (Mass Spectrometry).....	46
2.8 สารทุติยภูมิของ <i>Streptomyces</i>	47
2.9 สารต้านอนุมูลอิสระและอนุมูลอิสระ.....	48
2.9.1 อนุมูลอิสระ (free radicals)	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.9.2 สารต้านอนุมูลอิสระ.....	48
2.9.3 ปฏิกริยาการเกิดอนุมูลอิสระ.....	49
2.9.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH.....	50
2.9.5 ชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระ.....	50
2.9.6 การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีต่าง ๆ.....	55
2.10 อ้างอิงงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	57
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	61
3.1 เครื่องมือ.....	61
3.2 สารเคมี.....	62
3.3 การศึกษาอนุกรมวิธาน.....	62
3.3.1 ลักษณะทางฟีโนไทป์ (Phenotype characterization).....	62
3.3.2 ลักษณะอนุกรมวิธานทางเคมี (Chemotaxonomy characteristic)..	66
3.3.3 ลักษณะทางจีโนไทป์ (Genotype characterization).....	72
3.4 การแยกสารทุติยภูมิให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี.....	77
3.4.1 การสกัดสาร.....	77
3.4.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี.....	77
3.4.3 การแยกสารทุติยภูมิด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	77
3.4.4 การแยกสารด้วยเครื่องแยกของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC).....	78
3.4.5 การวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Infrared (IR) spectroscopy.....	79
3.4.6 Mass spectrometry.....	79
3.4.7 Nuclear magnetic resonance spectroscopy.....	79
3.4.8 Optical rotation.....	79
3.4.9 Ultraviolet-Visible (UV-vis) absorption spectroscopy.....	79
3.5 การทดลองฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	82
3.5.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.....	82

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลองและการอภิปรายผล.....	83
4.1 ลักษณะทางอนุกรมวิธานของไอโซเลต AA8.....	83
4.1.1 ลักษณะทางฟีโนไทป์.....	83
4.1.2 ลักษณะอนุกรมวิธานทางเคมี	86
4.1.3 ลักษณะทางจีโนไทป์.....	87
4.2 การแยกสารทุติยภูมิให้บริสุทธิ์และการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี.....	99
4.2.1 การแยกสารทุติยภูมิโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี.....	99
4.2.2 การแยกสารทุติยภูมิโดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟี	
ของเหลวสมรรถนะสูง.....	100
4.2.3 การศึกษาโครงสร้างของสารบริสุทธิ์.....	101
4.3 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ.....	120
บทที่ 5 ผลการทดลองและการอภิปรายผล.....	123
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	123
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	124
เอกสารอ้างอิง.....	125
ภาคผนวก ก.....	138
ภาคผนวก ข.....	143
ภาพผนวก ค.....	148
ภาพผนวก ง.....	151
ภาพผนวก จ.....	188

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 การเตรียมตัวอย่างดินที่ใช้ในการนำไปแยกแอกติโนมัยสีท.....	5
2.2 แสดงฟิล์มของ <i>Actinobacteria</i> และคลาส <i>Actinobacteria</i>	7
2.3 แสดงถึงรูปแบบของน้ำตาลทั้งหมดที่ถูพบในเซลล์ โดยต้องอาศัยอากาศ และผนังของเซลล์นั้นต้องมีองค์ประกอบของกรดโอะมิโนพิมิลิกในรูปแบบ <i>meso</i>	17
2.4 ฟอสโฟลิปิดที่พบในเซลล์แบคทีเรีย.....	18
2.5 รูปแบบของฟอสโฟลิปิดในแอกติโนมัยสีท.....	19
2.6 เครื่องมือที่ใช้ในการทำหน้าหน้าที่ของจีโนม (genome Annotation).....	34
2.7 ค่าเคมีคัลชีพของคาร์บอนประเภทต่าง ๆ.....	45
2.8 ชนิดของสารปฏิชีวนะที่ได้จาก <i>Streptomyces</i> และฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	52
2.9 แสดงโครงสร้างสารทุติยภูมิที่ได้รับจากเชื้อ <i>Streptomyces</i>	54
3.1 ส่วนประกอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยายาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	73
3.2 วงจรพีซีอาร์ (PCR cycle)	73
3.3 ส่วนประกอบของการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน 16S rRNA	75
3.4 โปรแกรม Big dye	76
4.1 ลักษณะการเจริญของไอโซเลต AA8 บนสูตรอาหารต่าง ๆ.....	84
4.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของไอโซเลต AA8 เทียบกับสายพันธุ์อ้างอิง <i>S. roseifaciens</i> DSM 106196 ^T	90
4.3 ลักษณะการใช้คาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และความสามารถในการสร้างกรด ของไอโซเลต AA8 เทียบกับ <i>S. roseifaciens</i> DSM 106196 ^T	90
4.4 การผลิตเอนไซม์ของไอโซเลต AA8 และ <i>S. roseifaciens</i> DSM 106196 ^T	92
4.5 องค์ประกอบของกรดไขมันภายในเซลล์ของไอโซเลต AA8 และ <i>S. roseofaciens</i> DSM 106196 ^T	93
4.6 ข้อมูลของจีโนมทั้งหมดของไอโซเลต <i>Streptomyces</i> sp. AA8 และ <i>S. roseifaciens</i> DSM 106196 ^T	96

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.7 ยีนที่สร้างสารทุติยภูมิของ <i>Streptomyces</i> sp. AA8 เปรียบเทียบกับ <i>S. roseifaciens</i> DSM 106196 ^T	97
4.8 ข้อมูลของ ¹ H NMR ¹³ C NMR และ ข้อมูล 2D ของสาร A ใน Acetone- <i>d</i> ₆	105
4.9 ข้อมูลของ ¹ H NMR ¹³ C NMR และ ข้อมูล 2D ของสาร B ใน Acetone- <i>d</i> ₆	107
4.10 ข้อมูลของ ¹ H NMR ¹³ C NMR และ ข้อมูล 2D ของสาร C ใน DMSO- <i>d</i> ₆	109
4.11 ข้อมูลของ ¹ H NMR ¹³ C NMR และ ข้อมูล 2D ของสาร D ใน Acetone- <i>d</i> ₆	111
4.12 ข้อมูลของ ¹ H NMR ¹³ C NMR และ ข้อมูล 2D ของสาร E ใน DMSO- <i>d</i> ₆	113
4.13 ข้อมูลของ ¹ H NMR ¹³ C NMR และ ข้อมูล 2D ของสาร F ใน DMSO- <i>d</i> ₆	114
4.14 ข้อมูลของ ¹ H NMR ¹³ C NMR และ ข้อมูล 2D ของสาร G ใน DMSO- <i>d</i> ₆	116
4.15 ข้อมูลของ ¹ H NMR ¹³ C NMR และ ข้อมูล 2D ของสาร H ใน DMSO- <i>d</i> ₆	118
4.16 ข้อมูลของ ¹ H NMR ¹³ C NMR และ ข้อมูล 2D ของสาร I ใน DMSO- <i>d</i> ₆	120
4.17 ค่าสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระที่ 50 เปอร์เซ็นต์ ของสาร A-I.....	122

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ความสัมพันธ์แอกติโนมัยสีทจากวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน 16S rRNA.....	6
2.2 ลักษณะของสปอร์ที่ถูกสร้างโดย <i>Streptomyces</i>	12
2.3 โครงสร้างของเปปติโดไกลแคน.....	16
2.4 แสดงโครงสร้างของไอโซพรีนอยด์ควิโนนที่ถูพบในแบคทีเรีย.....	19
2.5 แสดงโครงสร้างของกรดมัคคอลลิก.....	20
2.6 การจัดลำดับใน next-generation sequencers.....	26
2.7 การเตรียมดีเอ็นเอไลบรารีเพื่อที่จะทำการสร้างดีเอ็นเอสายเดี่ยว (sstDNA) โดยใช้ตัวอะแดปเตอร์ A และ B.....	27
2.8 การตรึงดีเอ็นเอบนเม็ดปิดที่กำลังจะถูกขยายเป็นกลุ่มในอิมัลชันหยด.....	27
2.9 ดีเอ็นเอต้นแบบของ Illumina ที่จีโนมดีเอ็นเอถูกแยกส่วนด้วยเทคนิค nebulization.....	28
2.10 การสร้างดีเอ็นเอต้นแบบและการเชื่อมต่อกันของดีเอ็นเอกับเม็ดปิดผ่านการไหล.....	30
2.11 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย SOLiD/ABI.....	31
2.12 แสดงขั้นตอนของการ Assembly ของดีเอ็นเอ.....	33
2.13 circular map ที่ถูกสร้างโดยโปรแกรม CGview.....	36
2.14 circular map ที่ผ่านการสร้างด้วยโปรแกรม GenomeVx.....	36
2.15 ขั้นตอนที่คำนวณด้วยระบบคอมพิวเตอร์.....	37
2.16 แผนภาพการเปรียบเทียบของ synteny map.....	37
2.17 องค์ประกอบสำคัญของแผนภูมิสายวิวัฒนาการ.....	39
2.18 องค์ประกอบของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง.....	43
2.19 รังสีคลื่นแม่เหล็ก.....	44
2.20 Butylated hydroxytoluene (BHT).....	51
2.21 Vitamin C.....	51
2.22 โครงสร้างอนุมูล ABTS ^{•+}	55
2.23 การเกิดปฏิกิริยาของ FRAP assay.....	56
3.1 แผนภาพแสดงการแยกสารสกัดหยาบของน้ำหมักด้วย HPLC และน้ำหนักรที่ได้อ.....	80
3.2 แผนภาพแสดงการแยกสารสกัดหยาบของเซลล์ด้วย HPLC และน้ำหนักรที่ได้อ.....	81

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต AA8 และ <i>S. roseifaciens</i> DSM 106196 ^T	83
4.2 ตำแหน่งของไอโซเลต AA8 บนแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ (neighbor joining).....	88
4.3 ตำแหน่งของไอโซเลต AA8 บนแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ (maximum parsimony).....	88
4.4 ตำแหน่งของไอโซเลต AA8 บนแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ (maximum likelihood).....	89
4.5 แผนภูมิ Phylogenomic ของ <i>Streptomyces</i> sp. AA8.....	89
4.6 แผนภาพ Circular map ของ <i>Streptomyces</i> sp. AA8.....	94
4.7 แผนภาพ clusters of orthologous genes (COGs) ของ <i>Streptomyces</i> sp. AA8.....	95
4.8 แผนภาพเปรียบเทียบจีโนมของไอโซเลต AA8 และ <i>Streptomyces roseifaciens</i>	95
4.9 สารสกัดหยาบของน้ำหมัก AA8 และส่วนที่ถูกแยกคอลัมน์โครมาโทกราฟีทั้งหมด 6 ส่วน...	99
4.10 สารสกัดหยาบของเซลล์ AA8 และส่วนที่ถูกแยกคอลัมน์โครมาโทกราฟีทั้งหมด 4 ส่วน..	100
4.11 การแยกสารสกัดหยาบของน้ำหมักโดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง....	102
4.12 การแยกสารสกัดหยาบของเซลล์โดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะ.....	103
4.13 โครงสร้างทางเคมีของสาร A.....	104
4.14 โครงสร้างทางเคมีของสาร B.....	105
4.15 โครงสร้างทางเคมีของสาร C.....	107
4.16 โครงสร้างทางเคมีของสาร D.....	109
4.17 โครงสร้างทางเคมีของสาร E.....	111
4.18 โครงสร้างทางเคมีของสาร F.....	113
4.19 โครงสร้างทางเคมีของสาร G.....	115
4.20 โครงสร้างทางเคมีของสาร H.....	116
4.21 โครงสร้างทางเคมีของสาร I.....	118

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แอกติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีเบส กัวนีน (guanine; G) และ ไซโตซีน (cytosine; C) เป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนมากสามารถพบมากที่สุดในดิน (Sykes and Skinner, 1973) เราสามารถพบแอกติโนมัยซีทสกุล (genus) *Streptomyces* ได้มากที่สุดถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ของแอกติโนมัยซีททั้งหมด จึงจัดได้เป็นสกุลที่พบได้ทั่วไป (common) และมีความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) สารทุติยภูมินั้นเป็นสารประกอบทางเคมีที่สำคัญมากต่อสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่ และมีประโยชน์หลากหลาย เช่น สามารถต้านการเจริญเติบโตของรา ต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด กระตุ้นการทำงานของเซลล์สมอง ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ อีกทั้งสารทุติยภูมิบางชนิดปลอดภัยต่อการนำมาใช้ (Bugni and Ireland, 2004) ซึ่งบางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ที่สามารถช่วยเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นน้ำตาลฟรุกโทส และยังมีสารอื่น ๆ ที่สามารถนำไปใช้ในด้านต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมเวชสำอาง อุตสาหกรรมยา และอุตสาหกรรมอาหาร เป็นต้น (Okami and Hotta, 1988)

ในปัจจุบันสภาพแวดล้อมที่เราอาศัยอยู่นั้นมีมลพิษทางอากาศมากมาย ไม่ว่าจะเป็นค่าโอโซนที่สูงขึ้น ฝุ่นละอองที่เกิดจากยานพาหนะ คิวตินที่เกิดจากโรงงานอุตสาหกรรมหรือควันที่เกิดจากการเผาไหม้ของบุหรี่ยี่ ซึ่งสิ่งที่กล่าวมาข้างต้นนั้นอาจจะทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ซึ่งอนุมูลอิสระนั้นคือ โมเลกุลหรืออะตอมที่เกิดจากการไม่เสถียรเนื่องจากขาดอิเล็กตรอน ซึ่งโดยปกติร่างกายของมนุษย์นั้นจะมีโมเลกุลหรืออิเล็กตรอนอยู่เป็นคู่ เมื่อถ้าเกิดการสูญเสียจะทำให้ร่างกายเกิดการเสียสมดุลได้ และส่งผลทำให้ร่างกายเกิดความเสียหาย แหล่งอาหารที่สามารถพบสารต้านอนุมูลอิสระได้แก่ เบต้าแคโรทีน โกลโคปีน ฟลาโวนอยด์ เป็นต้น ดังนั้นในงานวิจัยเรื่องนี้จึงมุ่งเน้นไปที่เรื่องการศึกษาอนุกรมวิธานของ *Streptomyces* sp. AA8 โดยใช้เทคนิค Polyphasic taxonomy ในการศึกษาอนุกรมวิธาน หลังจากศึกษาอนุกรมวิธานแล้วจะนำเชื้อมาแยกสารทุติยภูมิที่สามารถผลิตได้โดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเพื่อแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ และนำสารบริสุทธิ์นั้นมาทำการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี free radical scavenging (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; DPPH) เพื่อนำไปใช้ในการวิจัยอื่น ๆ ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) ศึกษาอนุกรมวิธานของ *Streptomyces* sp. AA8
- 2) ทำการแยกและศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* sp. AA8
- 3) ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารทุติยภูมิที่แยกได้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1) ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของ *Streptomyces* sp. AA8 โดยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน 16S rRNA และการศึกษาจีโนมทั้งหมด (WGS)
- 2) ศึกษาการแยกสารทุติยภูมิของ *Streptomyces* sp. AA8 โดยใช้โครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ และโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)
- 3) ศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารทุติยภูมิที่แยกได้จาก *Streptomyces* sp. AA8 โดยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี
- 4) ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารทุติยภูมิที่แยกได้ โดยใช้วิธี free radical scavenging (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; DPPH)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) สามารถระบุชนิดของ *Streptomyces* sp. AA8 ว่าใกล้เคียงกับ *Streptomyces roseifaciens* DSM 106196^T
- 2) ทราบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบที่ได้จาก *Streptomyces* sp. AA8
- 3) ทราบสารทุติยภูมิที่อยู่ในสารสกัดหยาบของ *Streptomyces* sp. AA8 ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แอคติโนมัยสีท (actinomycetes)

2.1.1 ลักษณะโดยทั่วไปของแอคติโนมัยสีท

แบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีท เป็นแบคทีเรียที่นิยมนำมาศึกษามากกว่าแบคทีเรียทั่วไป และจุลินทรีย์ทั่วไป เนื่องจากแอคติโนมัยสีทมีลักษณะความจำเพาะ และถูกจัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรีย เนื่องจาก ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส และไม่โตคอนเดรีย และนอกจากนั้นยังถูกจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก จัดอยู่ในคลาสของ (class) *Actinobacteria* ในซัพคลาส (subclass) *Actinobacteridae* ถูกจัดไว้ในอันดับ (order) *Actinomycetales* โดยส่วนมากมีลักษณะเป็นเส้นสายคล้ายเชื้อราต้องการอากาศในสถานะของการเจริญเติบโต ผนังเซลล์ของแอคติโนมัยสีทประกอบด้วยมิวโคเพปไทด์ (เอ็น-อะซิติลกลูโคซา เชื่อมกับกรดเอ็น-อะซิติลมิวรามิก) กรด 2, 6-ไดอะมิโนพิเมลิก กรดกลูตามิก ไกลซีน และ แอลานีน (Witt and Stackebrandt, 1990) ดีเอ็นเอโดยทั่วไปของแอคติโนมัยสีทจะมี กัวนีน (guanine; G) และ ไซโตซีน (cytosine; C) ในดีเอ็นเอประมาณ 57 – 75 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป (Kieser *et al.*, 2000) การสร้างเส้นใยของแอคติโนมัยสีทแบ่งเป็นเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศซึ่ง เส้นใยอาหารจะเกิดขึ้นก่อนและจะทำการสร้างเส้นใยลงไปในอาหารเพื่อดูดซึมไปใช้ และเมื่อโคโลนีเจริญขึ้น เส้นใยอากาศจะเกิดขึ้นภายหลัง หน้าที่หลักของเส้นใยอากาศคือการสืบพันธุ์ (Cross and Goodfellow, 1973) เส้นใยอากาศจะมีลักษณะการเจริญแบบแตกกิ่งก้านยัดเกาะกัน ทำให้เห็นโคโลนีมีลักษณะเป็นแผ่นและฝังแน่นลงไปในเรื่องของอาหาร ส่วนโคโลนีที่มีลักษณะอ่อนนุ่มและลักษณะร่วน เกิดจากการที่เส้นใยเกิดการแตกหักเป็นรูปท่อนหรือทรงกลม และโดยส่วนใหญ่เราสามารถพบแอคติโนมัยสีทในสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย เช่น แหล่งน้ำ ดิน โคลน ชากพืช ชากสัตว์ เป็นต้น ซึ่งดินเป็นแหล่งที่สามารถพบจุลินทรีย์ชนิดนี้มากกว่าที่สุดมีประมาณ 10 – 50 เปอร์เซ็นต์ และยังสามารถพบในสภาพแวดล้อมทางทะเล สภาพแวดล้อมทางน้ำ สภาพแวดล้อมที่รุนแรง สภาพแวดล้อมที่มีความอุดมสมบูรณ์ สภาพแวดล้อมตามแหล่งที่อยู่อาศัยของสิ่งมีชีวิต และอยู่ใกล้กับบริเวณเนื้อเยื่อพืช จำนวนที่พบนั้นขึ้นอยู่กับสภาพทางภูมิศาสตร์ อุณหภูมิของแต่ละพื้นที่ว่าจะพบมากหรือน้อย สภาพการเลี้ยงในห้องทดลอง อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเลี้ยง สภาพในการเพาะเลี้ยง รวมถึงเทคนิคการแยกและอื่น ๆ

แอสโคสปอร์เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมทางยา อุตสาหกรรมอาหารเสริม ใช้สารทุติยภูมิที่แอสโคสปอร์ผลิตได้นั้นมาทดลองในการต้านจุลินทรีย์ก่อโรคไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย รา ไวรัสและยังสามารถใช้ในการผลิตสารต้านมะเร็ง ทั้งยังสามารถผลิตสารทุติยภูมิผลต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันอีกด้วย ทางด้านการเกษตรกรรมและสภาพแวดล้อม เช่น การผลิตสารที่สามารถฆ่าวัชพืช การผลิตสารที่ฆ่าแมลง ผลิตสารที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของพืช และผลิตสารที่ทำให้พืชบางชนิดเจริญเติบโตได้ดี นอกจากนี้ยังมีการใช้ *Streptomyces lydicus* WYEC 108 ในการใช้ในการควบคุมโรคพืชและสามารถควบคุมเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช และยังสามารถต้านเชื้อรา การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค การต้านมะเร็ง ผลิตยาปฏิชีวนะ ผลิตยาฆ่ามะเร็ง และ เร่งการเจริญเติบโตของพืช เป็นต้น (Shimiz *et al.*, 2011)

2.1.2 การแยกแอสโคสปอร์จากดิน

การคัดแยกแอสโคสปอร์จากดินนั้นขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติที่นำมา ตัวอย่างดินมาแยก คือ การแยกจะขึ้นอยู่กับตัวอย่างดินนั้น ๆ ว่ามีความอุดมสมบูรณ์ที่สามารถทำให้ที่ต้องการเจริญเติบโตได้มากน้อยเพียงใดและขึ้นอยู่กับประเภทของอาหารที่ใช้ในการคัดเลือก ใช้สารอาหารที่แอสโคสปอร์เจริญเติบโตได้ดีลงไปในอาหารที่ใช้ในการแยก และอีกอย่างหนึ่งคือการใช้สารบางอย่างในการแยกเช่น ยาปฏิชีวนะ เติมนลงไปในอาหารที่ใช้ในการแยก เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหรือราอื่น ๆ เหตุผลหลักที่แยกแอสโคสปอร์จากดินเพื่อใช้แอสโคสปอร์ในการศึกษาความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะ (Poter, 1960)

องค์ประกอบหลักที่แอสโคสปอร์สามารถเจริญได้คือ อาหารที่ประกอบด้วย แหล่งไนโตรเจน และแหล่งคาร์บอน นอกจากนั้นยังสามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่ซับซ้อน ได้แก่ เคซีน (casein) กรดฮิวมิก (humic acid) น้ำตาลดี-กลูโคส (D-glucose) น้ำตาลดี-แมนโนส (D-mannose) เด็กซ์ทริน (dextrin) และ ไคติน (chitin) เป็นต้น ซึ่งการใช้สาร ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแอสโคสปอร์ที่มีความสามารถในการเจริญเมื่อมีสารประกอบเหล่านั้น (Labeda and Shearer, 1990)

การเตรียมตัวอย่างของดินก่อนนำไปใช้ในการแยกแอสโคสปอร์ เป็นอีกหนึ่งวิธีที่สามารถลดการปนเปื้อนจากแบคทีเรียและรา รวมทั้งยังกระตุ้นการงอกของสปอร์ในระยะสงบ (dormant spore) วิธีการเตรียมตัวอย่างดินมีได้หลายวิธีแสดงในตารางที่ 2.1 โดยการแยกตัวอย่างออกจากดินนั้นสามารถแยกโดยใช้ความร้อนในอุณหภูมิที่ต่างกัน ใช้สารเคมี หรือการใช้ยาปฏิชีวนะในการผสมลงไป ในอาหารที่ใช้ในการแยก เป็นต้น

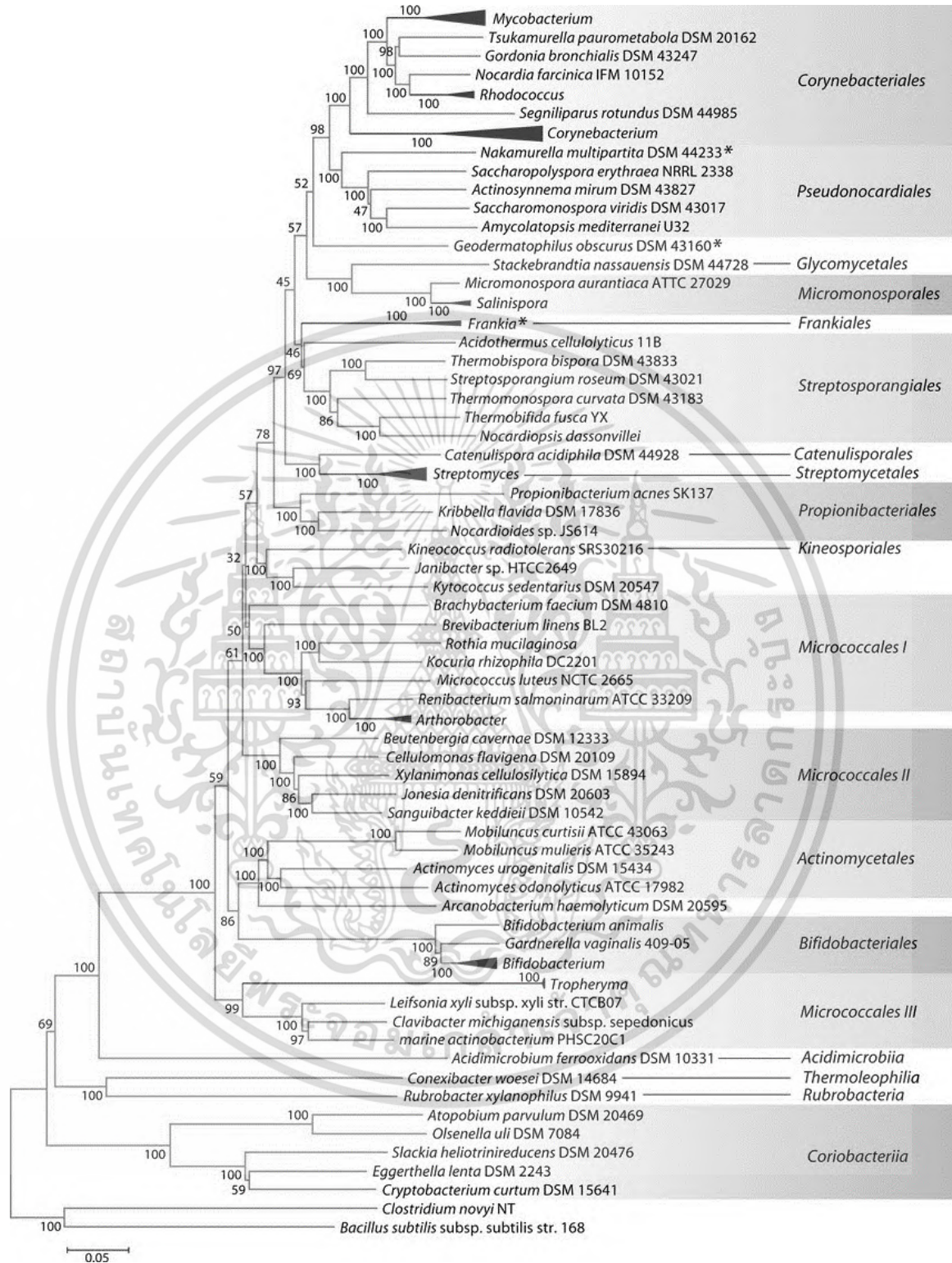
ตารางที่ 2.1 การเตรียมตัวอย่างดินที่ใช้ในการนำไปแยกแอกติโนมัยสีท

การจัดเตรียมตัวอย่างดิน	เอกสารอ้างอิง
ตากดินที่อุณหภูมิห้องจนกว่าดินจะแห้งสนิท	Xu and Jiang, 1996
นำดินไปให้ความร้อน 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที	Seong <i>et al.</i> , 2001
นำดินไปให้ความร้อน 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที	Sirivibool <i>et al.</i> , 2004
นำดินไปให้ความร้อน 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที	Athalye <i>et al.</i> , 1981
ใช้โซเดียมคลอไรด์ 0.9 เปอร์เซ็นต์ ในขั้นตอนการเจือจาง	Thakur <i>et al.</i> , 2007
ปั่นเหวี่ยงดินที่ความเร็วรอบ 4500 เป็นเวลา 1 นาที	Poter <i>et al.</i> , 1960
ใช้นีสตาตินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ใส่ลงไป ในอาหาร	Porter <i>et al.</i> , 1960

2.1.3. การจัดจำแนกแอกติโนมัยสีท

การจัดจำแนกแอกติโนมัยสีทในระดับสกุล สามารถใช้ข้อมูลจากอนุกรมวิธานทางเคมีมาทำการตัดแยกสายพันธุ์ของแอกติโนมัยสีท ได้แก่ ชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์ องค์ประกอบของฟอสโฟลิพิด ชนิดของเมนาควิโนน ชนิดกรดไขมัน และองค์ประกอบของไอโซเมอร์ของกรดโตะอะมิโนพีมิลิก (diaminopimelic acid; DAP) (Boone and Pine, 1968; Lechevalier and Lechevalier, 1980) การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น การแตกกิ่งของเส้นใย การงอกของสปอร์ สีของเส้นใยอากาศ และเส้นใยอาหารโดยการรวมตัวของเส้นใยอากาศจะใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope) ส่วนผิวของสปอร์และโครงสร้างของสปอร์ศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM) และการสร้างรังควัตถุละลายน้ำ (Holt *et al.*, 1994) การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอกติโนมัยสีทสามารถพิสูจน์ได้อีกวิธีหนึ่ง คือข้อมูลทางด้านของสารพันธุกรรม (DNA) ของแอกติโนมัยสีท มีความสำคัญเป็นอย่างมากในการจัดระบบ (systematic) การศึกษาระบบของแต่ละไอโซเลตนั้นมักจะนิยมศึกษา โดยอาศัยข้อมูลทางด้าน วิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน 16S rRNA เป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปของบุคคลที่ทำการศึกษา ดังนั้นจึงมีส่วนสำคัญเป็นอย่างมาก ซึ่งวิธีนี้สามารถจัดจำแนกแอกติโนมัยสีทถึงระดับสปีชีส์จากข้อมูลของยีน 16S rRNA นำวิเคราะห์โดยการสร้างสายวิวัฒนาการด้วยการนำมาสร้างต้นไม้แห่งสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) และนิวคลีโอไทด์ลายเซ็น (signature nucleotide) ซึ่งปัจจุบันพบว่าสามารถแบ่งแอกติโนมัยสีทได้มากกว่า 150 สกุล (รูปที่ 2.1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 ความสัมพันธ์แอคติโนไมซีตจากวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน 16S rRNA (Gao and Gupta, 2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คลาสของ *Actinobacteria* จะประกอบด้วย 15 อันดับ ที่มีความใกล้เคียงกัน (Zhi et al., 2009) ซึ่งมีหน่วยย่อยเป็น *Actinomycetales* เช่นเดียวกับกับ *Bifidobacteriales* ก่อนหน้าจะจำแนกเป็น ลำดับและมี *Jiangellales* ที่เป็นลำดับใหม่ที่สุดในปัจจุบัน (Tang et al., 2011)

ตารางที่ 2.2 แสดงไฟลัมของ *Actinobacteria* และคลาส *Actinobacteria* (Tang et al., 2011)

<p>Order I. Actinomycetales</p> <p>Family I. Actinomycetaceae</p> <p>Order II. Actinopolysporales</p> <p>Family I. Actinopolysporaceae</p> <p>Order III. Bifidobacteriales</p> <p>Family I. Bifidobacteriaceae</p> <p>Order IV. Catenulesporales</p> <p>Family I. Catenulesporaceae</p> <p>Family II. Actinospicaceae</p> <p>Order V. Corynebacteriales</p> <p>Family I. Corynebacteriaceae</p> <p>Family II. Dietziaceae</p> <p>Family III. Mycobacteriaceae</p> <p>Family IV. Nocardiaceae</p> <p>Family V. Segniliparaceae</p> <p>Family VI. Tsukamurellaceae</p> <p>Order VI. Frankiales</p> <p>Family I. Frankiaceae</p> <p>Family II. Acidothermaceae</p> <p>Family III. Cryptosporangiaceae</p> <p>Family IV. Geodermatophilaceae</p> <p>Family V. Nakamurellaceae</p> <p>Family VI. Sporichthyaceae</p> <p>Order VII. Glycomycetales</p> <p>Family I. Glycomycetaceae</p> <p>Order VIII. Jiangellales</p> <p>Family I. Jiangellaceae</p> <p>Order IX. Kineosporiales</p> <p>Family I. Kineosporiaceae</p>	<p>Order X. Micrococcales</p> <p>Family I. Micrococcaceae</p> <p>Family II. Beutenbergiaceae</p> <p>Family III. Bogoriellaceae</p> <p>Family IV. Brevibacteriaceae</p> <p>Family V. Cellulomonadaceae</p> <p>Family VI. Dermabacteriaceae</p> <p>Family VII. Dermacoccaceae</p> <p>Family VIII. Dermatophilaceae</p> <p>Family IX. Intrasporangiacea</p> <p>Family X. Jonesiaceae</p> <p>Family XI. Microbacteriaceae</p> <p>Family XII. Promicromonosporaceae</p> <p>Family XIII. Rarobacteraceae</p> <p>Family XIV. Ruaniaceae</p> <p>Family XV. Sanguibacteraceae</p> <p>Order XI. Micromonosporales</p> <p>Family I. Micromonosporaceae</p> <p>Order XII. Propionibacteriales</p> <p>Family I. Propionibacteriaceae</p> <p>Family II. Nocardioideaceae</p> <p>Order XIII. Pseudonocardiales</p> <p>Family I. Pseudonocardiaceae</p> <p>Order XIV. Streptomycetales</p> <p>Family I. Streptomycetaceae</p> <p>Order XV. Streptosporangiales</p> <p>Family I. Streptosporangiales</p> <p>Family II. Nocardiosaceae</p> <p>Family III. Thermomonosporaceae</p>
--	---

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 สกุล *Streptomyces*

2.2.1 ลักษณะทั่วไปของ *Streptomyces*

Streptomyces เป็นแบคทีเรียแกรมบวกในวงศ์ *Streptomycetaceae* สกุล (genus) *Streptomyces* อันดับ (order) *Actinomycetales* มีลักษณะเป็นเส้นใยไม่มีผนังกัน (coenocytic hypha) สามารถสร้างเส้นใยอากาศและเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่จะสร้างสปอร์ได้ตั้งแต่ 3 สปอร์ขึ้นไป โดยเส้นผ่านศูนย์กลางของสปอร์ประมาณ 0.5 - 2.0 ไมโครเมตร ซึ่งการสร้างสปอร์เป็นสายนั้นมี 4 รูปแบบ ได้แก่ สปอร์แบบเส้นตรง (recti flexibile) สปอร์แบบลูป (retinaculiaperti) สปอร์แบบเวียนเกลียว (spiral) และสปอร์แบบเกลียวกันหอย (Verticillate) ในสายพันธุ์ *Streptomyces* โคโลนีของ *Streptomyces* จะกลายเป็นเส้นใยอากาศ ซึ่งเส้นใยอากาศเริ่มแรกจะมีสีขาวแต่พอเวลาผ่านไปสีของเส้นใยอากาศนั้นจะเริ่มปรากฏขึ้นตอนการเจริญของสปอร์สีของเส้นใยอากาศจะมีสีที่มีความจำเพาะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์นั้น สปอร์นั้นจะมีลักษณะเหมือนแป้งหรือเหมือนกำมะหยี่ซึ่งสามารถแยกออกได้อย่างง่ายดาย ส่วนการเกิดโคโลนีนั้นเกิดปรากฏจากการซ้อนทับกันของเส้นใย ซึ่งลักษณะของผิวโคโลนีที่ปรากฏออกมานั้นจึงจะมีลักษณะขรุขระ และ มีการสร้างเม็ดสีที่หลากหลาย สีที่พบตามธรรมชาติส่วนใหญ่มักพบสี แดง เหลือง เขียว ขาว เทา ม่วง ส้ม และน้ำเงิน เป็นต้น (Cross *et al.*, 1994) *Streptomyces* ถูกจัดว่าเป็นกลุ่มที่สามารถพบได้มากที่สุดและมีความสำคัญมากที่สุด โดยอัตราการพบ *Streptomyces* นั้นมีอยู่ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ของแอคติโนมัยสีททั้งหมด โดยองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ของ *Streptomyces* จะประกอบด้วยเปปติโดไกลแคนชนิด A ที่จะมีกรดอะมิโนที่ตำแหน่งที่ 3 ของสายเอ็น อะซิติลลูรามิก แอซิด เป็น LL-DAP มีฟอสโฟลิปิดประเภท II (PII type) ประกอบด้วย phosphatidylethanolamine และ phosphatidylinositol มีอนุพันธ์ของมินาคิวโนนเป็น MK-9 (H₈) และ MK-9 (H₆) และน้ำตาลที่อยู่ภายในเซลล์ประกอบด้วยกาแลคโตส อะราบิโนส และไซโลส (Williams *et al.*, 1989) มักจะผลิตรงควัตถุที่หลากหลายเช่น สีของโคโลนี สีเส้นใยอากาศและเส้นใยอาหาร เป็นต้น สีของเส้นใยอากาศและเส้นใยอาหารนั้นมักจะมีสีที่แตกต่างกันหรืออาจจะมียสีที่คล้ายกันได้เช่น สีของเส้นใยอากาศมีสีชมพูอมเทา แต่สีของเส้นใยอาหารเป็นสีแดง หรือสีของสีเส้นใยอากาศและเส้นใยอาหารเป็นสีเทาทั้งคู่ (จิตติ, 2553) เป็นต้น โดยลักษณะการเจริญของ *Streptomyces* นั้นสามารถสร้างรงควัตถุที่สามารถละลายได้ในน้ำได้ ซึ่งสีที่ได้นั้นได้มาจากสปอร์ของ *Streptomyces* สีเส้นใยอากาศและเส้นใยอาหารซึ่งรงควัตถุนั้นเป็นจุดเด่นของสปีชีส์ *Streptomyces* ทำให้เราสามารถแยกได้เบื้องต้นว่าอาจจะเป็น *Streptomyces* โดยสังเขป

2.3 การศึกษาอนุกรมวิธานของ *Streptomyces*

การศึกษาอนุกรมวิธานของ *Streptomyces* เป็นวิธีการที่สำคัญมากสำหรับการระบุว่าเป็นสกุลที่ได้รับมาศึกษานั้นมีลักษณะการเจริญเติบโตแบบใด และเป็นสายพันธุ์ใด การศึกษาอนุกรมวิธานจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นต้องศึกษาอย่างมาก ซึ่งการศึกษาอนุกรมวิธานหลายส่วน (Polyphasic taxonomy) ซึ่งจะแยกไปตามแต่ละลักษณะที่จะทำการศึกษา ได้แก่ ลักษณะทางฟีโนไทป์ (Phenotype) ลักษณะอนุกรมวิธานทางเคมี (chemotype) และลักษณะอนุกรมวิธานทางจีโนไทป์ (genotype) โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.3.1 การศึกษาลักษณะทางด้านฟีโนไทป์ (Phenotypic characterization)

การศึกษาลักษณะทางด้านฟีโนไทป์ (Phenotype) คือการศึกษาลักษณะที่ปรากฏขึ้นภายนอกที่สามารถมองเห็นได้หรือลักษณะที่แสดงออกมา เช่น ลักษณะทางสรีระวิทยา ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางชีวเคมี มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.3.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญ (Morphological and cultural characteristics)

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือการศึกษารูปร่าง โดยสังเกตจากลักษณะของเส้นใยอาหาร เส้นใยอากาศ และลักษณะของสปอร์ ซึ่งการศึกษาลักษณะของสปอร์นั้นจำเป็นต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ที่มีเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) ซึ่งจำเป็นต้องเป็นเลนส์วัตถุ และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) (De man and Gupta, 1986)

1. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Electron microscope)

เป็นกล้องจุลทรรศน์ชนิดหนึ่งที่ใช้แสงอิเล็กตรอนแทนแสงธรรมดา กล้องชนิดนี้มีหลักการทำงานแบบกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงแต่กล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้จะใช้แสงอิเล็กตรอนเป็นตัวที่ถูกระเบิดความเร็วแบบหนึ่งที่ทำให้เกิดแสงสว่าง ซึ่งลำแสงอิเล็กตรอนมีขนาดเล็กมากวิ่งผ่านวัตถุและจุดโฟกัสภาพบนจอเรืองแสง เลนส์ต่าง ๆ ความยาวคลื่นของอิเล็กตรอนสั้นกว่าโปรตอนของแสงที่มนุษย์สามารถมองเห็นถึง 100,000 เท่า หลักการคือเมื่อไฟฟ้าเกิดการไหลผ่านตัวกลางจะเกิดสนามแม่เหล็กขึ้น ซึ่งสนามแม่เหล็กจะสลับกับประจุอิเล็กตรอน ทำให้อิเล็กตรอนเบี่ยงเบนไปสู่เป้าหมายที่เราต้องการได้ เลนส์ที่ทำการใช้ส่องสปอร์นั้นใช้เลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) ที่มีกำลังขยาย 400 เท่า เพื่อดูลักษณะพอสังเขปของสปอร์บนอาหาร

2. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope)

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด นั้นเป็นกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ในการศึกษาสภาพของพื้นผิวของตัวอย่างการทำงานของกล้องจุลทรรศน์นั้นจะควบคุมการทำงานโดยใช้ลำแสงอิเล็กตรอนส่องกราดลงไปยังพื้นผิวที่เรา นำตัวอย่างไปศึกษา กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) จึงเป็นที่นิยมใช้ในการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาโดยเฉพาะ เช่น ลักษณะรูปร่างของสปอร์ต่าง ๆ ลวดลายบนพื้นผิวนั้น ๆ และสามารถบอกขนาดของตัวอย่างได้อีกด้วย ทั้งนี้ยังสามารถศึกษาทั้งตัวอย่างที่เป็นทางชีวภาพและเป็นพวกวัตถุศาสตร์ได้อีกด้วย ภาพที่ได้รับจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด นั้นจะได้รับภาพเป็นลักษณะ 3 มิติ (De man and Gupta, 1986)

หลักการพื้นฐานของการทำงานของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2542) ตัวกำเนิดแสงอิเล็กตรอนเกิดจากส่วนที่อยู่ส่วนสุดท้ายของคอลัมน์ต่อกันกับสายของกระแสไฟฟ้าแรงสูงที่เกิดจากหม้อแปลงไฟฟ้า แหล่งกำเนิดอิเล็กตรอนจะประกอบด้วยขดลวดทั้งสเตนรูปร่างตัววี เรียกว่า filament และรูปทรงกรวย (Weinel cylinder) เมื่อ filament เกิดความร้อนขึ้นทำให้ประจุของอิเล็กตรอนหลุดออกมาในสถานะสุญญากาศภายในคอลัมน์โดยปกติแล้วอิเล็กตรอนเป็นประจุลบจึงจะถูกดึงดูดด้วยแผ่นเหล็กขั้วบวก ที่อยู่บริเวณด้านล่างของแหล่งต้นกำเนิดอิเล็กตรอน ประจุของอิเล็กตรอนนั้นจะถูกดึงดูดผ่านช่องของกรวยเข้าไปสู่สนามแม่เหล็ก จึงจะสามารถรวมประจุของอิเล็กตรอนให้เกิดเป็นลำแสงอิเล็กตรอนที่มีความหนาแน่นมากพอต่อการฉายแสงลงตัวอย่าง เลนส์แม่เหล็กและชุดขดลวดควบคุมลำแสงอิเล็กตรอน ทำหน้าที่เกี่ยวกับการรวบรวมอิเล็กตรอนให้อยู่ในกรวยแสงที่เล็กที่สุดไปตกลงบนตัวอย่าง และยังสามารถใช้สนามแม่เหล็กผลักลำแสงอิเล็กตรอนเคลื่อนที่ไปตามทิศทางที่กำหนดบนตัวอย่าง โดยตัวหลักคือเลนส์แม่เหล็กจะเป็นตัวที่กำหนดการเดินทางของลำแสงอิเล็กตรอนที่ผ่านสนามแม่เหล็ก และนอกจากนี้ยังกำหนดปริมาณและขนาดของอิเล็กตรอนที่ตกกระทบตัวอย่างอีกด้วย ช่องของการใส่ตัวอย่างที่เตรียมไว้ นั้นจะวางในช่องว่างใต้เลนส์ของแม่เหล็ก มีบริเวณฐานที่เรียกว่า Goniometer stage โดยจะมีปุ่มควบคุมการเลื่อนฐานได้ 6 ทิศทาง ภาพถ่ายที่ออกมาจะเกิดจาก ตัวแปลงสัญญาณภาพ และจะทำให้ปรากฏภาพบนบริเวณหน้าที่ทำหน้าที่รับภาพ (CRT) พร้อมทั้งจะทำการบันทึกภาพ อุปกรณ์การสร้างภาพนั้นจะประกอบด้วยท่อนำแสง เครื่องขยายสัญญาณและเครื่องเปลี่ยนสัญญาณอิเล็กตรอนให้เป็นแสง กระบวนการของการสร้างภาพนั้นเกิดจากประจุของอิเล็กตรอนถูกจับและรวบรวมไว้ เพื่อนำไปสู่แท่งแก้วใสและท่อนำแสง เพื่อเคลื่อนไปสู่เครื่องขยายแสง (Phot multiplier) ซึ่งจะทำให้การเปลี่ยนแสงชนิดของ

Photons กลายเป็นแสงของอิเล็กตรอน การเตรียมตัวอย่างของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด นั้นไม่มีความซับซ้อนแต่มีการเตรียมตัวอย่างที่หลากหลายแล้วแต่ประเภทของตัวอย่าง

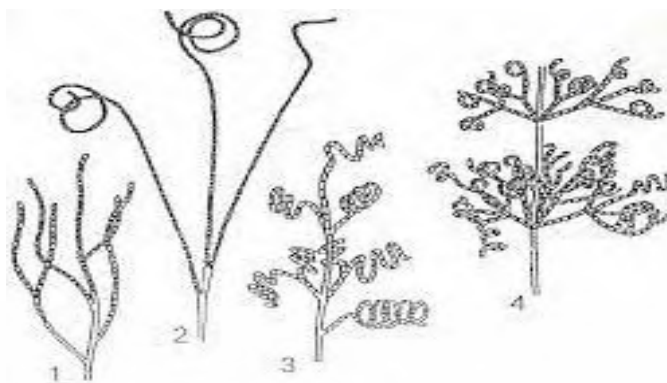
2.3.1.2. ลักษณะของเส้นใย

โดยปกติลักษณะเส้นใยเดี่ยวมีความหนาประมาณ 0.4 – 1.2 ไมโครเมตร มีลักษณะผนังกัน และเจริญแบบแพร่ออกทำให้ลักษณะคล้ายเชื้อรา ทางด้านปลายของเส้นใยสามารถแตกแขนงได้ เมื่อนำ *Streptomyces* ไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเส้นใยของ *Streptomyces* ที่สามารถเจริญลงไปในอาหารจะถูกเรียกว่าเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยที่บางส่วนที่อยู่บนอาหารจะถูกเรียกว่าเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) ซึ่งในระยะแรกของการสร้างโคโลนีจะมีลักษณะที่เรียบแบน แต่เมื่อมีการสร้าง เส้นใยอากาศที่มากขึ้นจนทำให้มีนิวเคลียสที่มากขึ้นไปด้วยและทำให้เกิดการสร้างผนังกันภายในเส้นใยมากขึ้นจนได้เซลล์ที่หลากหลาย แต่ละเซลล์จะถูกพัฒนาไปเป็นสปอร์ในลำดับถัดไป โดยจะต่อกันเป็นสายยาว (รูปที่ 2.5) การที่เส้นใยอากาศซ้อนทับกันมากขึ้นนั้นทำให้ลักษณะของโคโลนีมีความคล้ายคลึงกับแป้ง หรือกำมะหยี่ สปอร์นั้นมีสีสันทันที่หลากหลายได้แก่ ม่วง เขียว แดง เหลือง ดำ เป็นต้น แต่สีของสปอร์นั้นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของ *Streptomyces*

2.3.1.3. ลักษณะของสปอร์

การสร้างสปอร์ของ *Streptomyces* นั้นจะมีลักษณะเป็นการสร้างแบบสายยาว โดยมีจำนวนของสปอร์ที่ถูกสร้างนั้นจะต่อกันเป็นสายยาวประมาณ 50 สปอร์ สายสปอร์นี้มักจะถูกเรียกว่า อาร์โทรสปอร์ (arthrospore) ลักษณะของสายสปอร์นั้นจะแตกต่างกันดังนั้นก็จึงสามารถจำแนกกลุ่มให้เป็นมาตรฐานได้ การสร้างสปอร์ของ *Streptomyces* จึงสามารถแบ่งทั้งหมด 4 ชนิด (รูปที่ 2.2)

1. Rectiflexibiles: ลักษณะเป็นสายตรง หรือโค้งงอ
2. Retinaculiaperti: สายโซ่มีลักษณะเป็นห่วง หรือหมุนเป็นวงกลมประมาณ 1-3 วง
3. Spira: สายโซ่สปอร์มีลักษณะเป็นแบบเกลียว แบ่งออกเป็น 2 ชนิด a) แบบปิด และเกลียวอัดกันแน่น b) แบบเปิด เกลียวยาวและขยายออก
4. Verticillati: สายโซ่มีลักษณะเป็นแบบเกลียวกันหอย และแตกกิ่งออกเหมือนร่ม



รูปที่ 2.2 ลักษณะของสปอร์ที่ลูกสร้างโดย *Streptomyces* (1) *Rectiflexibiles* (2) *Retinaculiaperti* (3) *Spira* (4) *Verticillati* (Vobis, 1987)

2.3.1.4 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี (biological and physiological characteristics)

2.3.1.4.1 ความสามารถของเชื้อในการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ

แต่ละสายพันธุ์มีความต้องการในการใช้อุณหภูมิที่ทำให้เจริญต่างกัน จึงทำให้สามารถจัดแบ่งได้ตามการเจริญที่อุณหภูมิแตกต่างกันได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มไซโครไฟล์ (psychrophile) เจริญเติบโตอยู่ในที่อุณหภูมิต่ำ อุณหภูมิที่สามารถเจริญได้โดยประมาณ 0 – 20 องศาเซลเซียส กลุ่มมีโซไฟล์ (mesophile) เจริญเติบโตอยู่ในที่มีอุณหภูมิปานกลาง อุณหภูมิที่สามารถเจริญโดยประมาณ 25 – 40 องศาเซลเซียส และกลุ่มสุดท้าย คือ เทอร์โมไฟล์ (thermophile) กลุ่มที่สามารถเจริญเติบโตในที่อุณหภูมิสูง อุณหภูมิที่สามารถเจริญเติบโตได้โดยประมาณ 55 – 110 องศาเซลเซียส (Karp, 2010) แต่อุณหภูมิที่แต่ละไอโซเลตสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดอยู่ที่อุณหภูมิประมาณ 23 – 37 องศาเซลเซียส สายพันธุ์จะสามารถเจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่านั้นได้โดยประมาณ 20 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์ก็มักจะชอบที่อุณหภูมิมากกว่านั้นประมาณ 20 – 23 องศาเซลเซียส และบางสายพันธุ์จะชอบอุณหภูมิที่สูงขึ้นไปอีกประมาณ 50 – 65 องศาเซลเซียส (Waksman, 1940)

2.3.1.4.2 ความสามารถของการเจริญบนอาหารที่มีกรด-ด่างในระดับต่าง ๆ

เราสามารถแบ่งการเจริญตามความชอบปริมาณความเป็นกรด-ด่างได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มแอซิโดไฟล์ (acidophile) ที่สามารถเจริญเติบโตที่สภาพแวดล้อมมีความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 5.4 นิวโทรไฟล์ (neutrophilie) ที่เจริญเติบโตได้ดีที่ค่ากรด-ด่างระหว่าง 5.4 – 8.0 และกลุ่มอัลคาลิไฟล์ (alkalophile) จะสามารถเจริญเติบโตได้ที่ค่ากรด-ด่างสูงกว่า 8.0 (Karp, 2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1.4.3 ความสามารถในการเจริญเติบโตบนอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์

การตรวจสอบความสามารถในการเจริญเติบโตบนอาหารที่มีปริมาณเกลือในความเข้มข้นที่มีความแตกต่างกัน สามารถบ่งบอกถึงสถานะที่เชื้อสามารถเจริญในความเข้มข้นสูงสุดได้ และยังสามารถบ่งบอกได้ถึงความแตกต่างของเชื้อแต่ละตัวได้

2.3.1.4.4 คุณสมบัติของการใช้แหล่งคาร์บอน (carbon utilization)

ตามธรรมชาติมักมีสารอาหารที่หลากหลาย ซึ่งจะมีองค์ประกอบของสารอินทรีย์ที่มีอยู่มากมายและหลากหลายที่เป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานอื่น สายพันธุ์ *Streptomyces* แต่ละสปีชีส์สามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันออกไป (Waksman, 1940)

2.3.1.4.5 คุณสมบัติของการย่อยแป้ง (starch hydrolysis)

แป้งส่วนใหญ่ มักจะมีองค์ประกอบเป็นพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide) โดยส่วนใหญ่และพอลิแซคคาไรด์มักจะมีอยู่ 2 ชนิด ได้แก่ อะไมโลส (amylose) และ อะไมโลแพคติน (amylopectin) เมื่อผ่านกระบวนการให้ความร้อนโดยการต้มอะไมโลสจะเกิดการละลายแต่ในส่วนของอะไมโลแพคตินจะไม่ละลายไปด้วย องค์ประกอบของอะไมโลสและอะไมโลแพคติน จะมีองค์ประกอบของ น้ำตาลดี-กลูโคส (D-glucose) ในตัวอะไมโลสนั้นน้ำตาลกลูโคสจะเชื่อมกันด้วยพันธะที่เรียกว่า 1,4-แอลฟา-กลูโคซิดิก (1,4- α -glycosidic) แต่ในส่วนของอะไมโลแพคตินนั้นจะมีทั้ง 1,4-แอลฟา-กลูโคซิดิกและมีพันธะ 1,6-แอลฟา-กลูโคซิดิก (1,6- α -glycosidic) จุลินทรีย์ที่มีความสามารถที่ใช้แป้งเป็นอาหารได้นั้นจำเป็นต้องมีความสามารถผลิตเอนไซม์ภายนอก (exoenzyme) ได้ เอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยแป้งได้แก่ เอนไซม์อะไมเลส (amylase) ที่มีความสามารถในการย่อยแป้งและไกลโคเจน (glycogen) โดยจะทำการตัดพันธะ 1,4-แอลฟา-กลูโคซิดิก (ดวงพร, 2537) การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งเป็นสิ่งจำเป็นในการตรวจคุณสมบัติของการสร้างเอนไซม์อะไมเลสของแบคทีเรีย โดยจำเป็นต้องทดลองโดยใช้สารละลายไอโอดีนหยดลงให้ทั่วพื้นผิวอาหาร ถ้ามีปฏิกิริยาในการย่อยแป้ง จะมีการเกิดโซนใสบริเวณรอบโคโลนีของแบคทีเรีย เนื่องจากบริเวณนั้นจะถูกย่อยไปหมด ส่วนบริเวณที่ยังมีแป้งเหลืออยู่บนอาหารเหล่านั้นจะถูกเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน (สุราษฏร์, 2538)

2.3.1.4.6 คุณสมบัติของการย่อยเจลาติน (gelatin liquefaction)

เจลาตินนั้นเป็นองค์ประกอบของโปรตีนโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ได้รับจากคอลลาเจน (collagen) ซึ่งจัดเป็นองค์ประกอบหลักของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) แบคทีเรียที่ย่อยเจลาตินได้นั้นต้องสามารถสร้างเอนไซม์เจลาติเนส (gelatinase) เพื่อที่จะสามารถย่อย

เจลาตินให้โมเลกุลขนาดเล็กลง เมื่อเจลาตินถูกย่อยจะทำให้เจลาตินนั้นเสียลักษณะการเป็นเจลลง ทำให้เจลาตินนั้นกลายเป็นของเหลวถึงจะอยู่ในอุณหภูมิต่ำ (ดวงพร, 2537)

2.3.1.4.7 คุณสมบัติของการรีดิวซ์ไนเตรท (nitrate reduction)

ความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรท (NO_3) ให้กลายเป็นไนไตรต์ (NO_2) ความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรตนั้นเป็นความสามารถที่นำมาจัดจำแนกสปีชีส์ได้ (Waksman, 1940) โดยกระบวนการของการรีดิวซ์ของสารประกอบไนตรัสไนเตรตให้เป็นไนไตรต์ และแอมโมเนีย (NH_3) หรือเรียกว่าปฏิกิริยาไนเตรต รีดักชัน (nitrate reduction) การที่ไนเตรตสลายตัวนั้นเกิดการเจริญเติบโตในอาหารที่มีโพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) เป็นองค์ประกอบที่ผสมอยู่ การที่จะตรวจสอบว่าไนไตรต์เกิดขึ้นหรือไม่ สามารถตรวจสอบด้วยวิธีการหดยครดซัลฟานิลิก (sulfanilic acid) และแอลฟา-แนฟทิลลามีน (α -naphthylamine) การรวมกันของกรดซัลฟานิลิกและไนไตรต์จะกลายเป็นเกลือไดอะโซเนียม (diazonium salt; diazonium sulfanilic acid) การรวมตัวกันของแอลฟา-แนฟทิลลามีน จะทำให้เกิดสีแดงของสีย้อมที่สามารถละลายน้ำได้ (water-soluble azo dye) (ดวงพร, 2537)

2.3.1.4.8 คุณสมบัติของการย่อยโปรตีนในนม

หางนม คือ นมที่แยกเอาไขมันออก มีสารอาหารเกือบทุกตัวที่เชื้อแบคทีเรียสามารถใช้ประโยชน์ได้ เช่น โปรตีนเคซีนอิน (casein) และน้ำตาลจำพวกแลคโตส (lactose) แบคทีเรียต่างสายพันธุ์สามารถใช้สารอาหารต่างกัน (สุราษฏร์, 2538) แบคทีเรียบางชนิดสามารถสร้างเอนไซม์เคซีนเนส (caseinase) ที่สามารถย่อยสลายโปรตีนเคซีนอินซึ่งเป็นส่วนประกอบหนึ่งในน้ำนมที่เป็นสีขาวโดยผ่านขบวนการเปปโตไนเซชัน (peptonization) เมื่อผ่านขบวนการดังกล่าวแล้วลักษณะน้ำนมจะเหลวและใสขึ้น เราเรียกส่วนที่ใสขึ้นว่า เวย์ (whey) ส่วนนี้อาจจะพบตะกอนละเอียดอยู่บริเวณก้นของภาชนะที่ใส หรืออาจจะมีลักษณะเป็นน้ำใสแยกชั้นกับก้อนแข็ง เชื้อบางชนิดยังสามารถสร้างกรดแลคติก (lactic acid) ได้โดยน้ำตาลแลคโตส (lactose) ที่อยู่ในน้ำนม ทำให้เกิดค่ากรด-ด่างของน้ำนมลดลงและยังทำให้กรดแลคติกไปรวมตัวกับโปรตีนเคซีนอินทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนเคซีน (denature) ผลที่ได้คือน้ำมนั้นจะกลายเป็นลิมแข็ง เมื่อทำการเอียงภาชนะที่ใสไปมาลิมจะคงอยู่ไม่ผสมกับของเหลวอื่น เรียกลักษณะดังกล่าวว่า แอซิคเคิร์ด (acid curd) เชื้อบางชนิดยังสามารถย่อยสลายโปรตีนเคซีนอิน โดยจะมีเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่มีการทำปฏิกิริยาคลายกับเอนไซม์เรนิน (renin like enzyme) ทำหน้าที่ในการจับน้ำนมที่ลักษณะเป็นก้อนนิ่ม หรืออาจจะทำหน้าที่ตกตะกอนน้ำนมที่เป็นลิมให้ละเอียดมากยิ่งขึ้น หรืออาจจะทำหน้าที่แยกน้ำนมที่เป็นลิมนั้นเป็น 2 ส่วน คือจะแยกเป็นส่วนที่น้ำใสกับส่วนที่มีลักษณะเป็นลิมออกจากโปรตีนเคซีนอินที่เป็นตะกอนอยู่ใต้ก้นภาชนะ เรียกลักษณะดังกล่าวว่า

เคิร์ด (rennet curd) หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า สวีทเคิร์ด (sweet curd) หรืออัลคาไลเคิร์ด (alkali curd) (จूरีย์รัตน์, 2552)

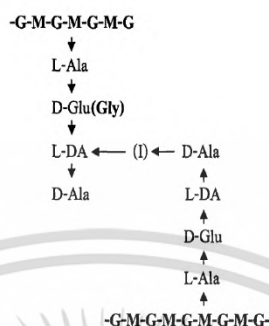
2.3.2 การศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานทางเคมี (chemotypes characterization)

เป็นการศึกษาลักษณะทางองค์ประกอบทางเคมีของแบคทีเรีย โดยการศึกษาจะศึกษาโครงสร้างต่าง ๆ ของเชื้อได้แก่

2.3.2.1 ศึกษากรดไดอะมิโนพิเมลิก (diaminopimelic acid; DAP)

แบคทีเรียเกือบทุกชนิดจะมีผนังเซลล์เป็นองค์ประกอบ ซึ่งผนังเซลล์จะมีเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) หรืออาจจะถูกเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า มิวรีน (murein) เปปติโดไกลแคน (รูปที่ 2.3) คือโครงสร้างที่จะประกอบไปด้วยน้ำตาล 2 ชนิด ได้แก่ เอ็น อะซีติลกลูโคซามีน (*N*-acetylglucosamine) สลับกับกรดเอ็น อะซีติลมิวรามิก (*N*-acetylmuramic acid) โดยตัวของกรดเอ็น-อะซีติลมิวรามิกมีกรดอะมิโนที่ยื่นออกมา ทำหน้าที่เชื่อมต่อกับกรดอะมิโนของกรดเอ็น-อะซีติลมิวรามิกของโมเลกุลหนึ่งซึ่งโมเลกุลนี้จะต่อตัวพันธะเปปไทด์ ชนิดและจำนวนของกรดอะมิโนจะมีความแตกต่างกันในแบคทีเรียของแต่ละสายพันธุ์จะมีความแตกต่างกัน ซึ่งชนิดของกรดอะมิโนที่พบในเปปติโดไกลแคนนั้นเป็นสิ่งที่สำคัญเป็นอย่างมากเพราะว่าข้อมูลที่เราสามารถทำให้เราจัดระบบของแบคทีเรียได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียแกรมบวก โดยจะจัดจำแนกได้โดยกรด 2, 6-ไดอะมิโนพิเมลิก (2, 6-diaminopimelic acid; DAP) เป็นกรดอะมิโนชนิดหนึ่งที่พบได้ในเปปติโดไกลแคน จะมีไอโซเมอร์ทั้งหมด 2 แบบ คืออยู่ในรูป *LL* และ *meso* (*DL*, *DD*) ถ้าพบในผนังเซลล์ของแบคทีเรียมักจะมียีนประกอบของกรดอะมิโนพิเมลิกประกอบอยู่ จะมีไอโซเมอร์ 1 ชนิดเท่านั้น อาจจะเป็นชนิดใดชนิดหนึ่งขึ้นอยู่กับแบคทีเรานั้น ๆ ขั้นตอนการตรวจสอบไอโซเมอร์และกรดอะมิโนพิเมลิกตรวจสอบได้โดยขั้นตอนแรกเริ่มจากการวิเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก แต่ว่าในแบคทีเรียแกรมลบนั้นพบไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกรูปแบบ *meso* ในปริมาณน้อย การพบไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกในรูปแบบ *meso* ในแบคทีเรียแกรมลบไม่ใช่ส่วนที่มีความสำคัญในการจัดระบบต่าง ๆ ของไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกนั้นสามารถตรวจสอบได้ทั้งเซลล์ของแบคทีเรีย การแยกไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกสามารถใช้แผ่นโครมาโตกราฟีแบบกระดาษ (paper chromatography) หรือ โครมาโตกราฟีแบบเซลลูโลส (cellulose thin-layer chromatography) (Komagata and Suzuki, 1987) แอคติโนมัยซิสสายพันธุ์ *Streptomyces* จะมีไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกที่อยู่ในรูปแบบ *LL*-DAP ซึ่งรูปแบบนี้ทำให้เราสามารถจัดได้ว่า *Streptomyces* เป็นแอคติโนมัยซิสที่พบโดยทั่วไป (common actinomycetes) ส่วนแอคติโนมัยซิสในสกุลอื่น ๆ จะถูกจัดให้เป็นแอคติโนมัยซิสที่พบโดยทั่วไปได้ยาก

(rare actinomycetes) มีลักษณะของไอโซเมอร์ของกรดไคอะมิโนพิเมลิกเป็นรูปแบบ *meso* แต่อาจจะพบแอกติโนมัยสีทในบางสกุลเท่านั้น (Komagata and Suzuki, 1987)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของเปปติโดไกลแคน (G คือ *N*-acetylglucosamine, M คือ *N*-acetyl (glycoly) muramic, Ala คือ Alanine, Glu คือ Glutamic acid, Gly คือ glycerine, L-DA คือ L-diamino acid, I คือ interpeptide bridge) (Komagata and Suzuki, 1987)

2.3.2.2 การศึกษาชนิดของ acyl ในผนังเซลล์ (acyl type)

ผนังเซลล์ของแบคทีเรียประกอบด้วยเปปติโดไกลแคนที่ประกอบไปด้วยเอ็น-อะซิติลกลูโคซามีนที่เรียงตัวสลับกับกรดเอ็น-อะซิติลไมวรามิก โดยจะถูกเชื่อมกันด้วยพันธะที่เรียกว่า เบต้า-1,4 กลูโคซิดิก (β -1,4 glucosidic) บางชนิดอาจจะเจอหมู่ไกลโคลิล (glycolyl group) มาแทนที่ตำแหน่งของอะซิติล (acetyl group) โดยอยู่ในโครงสร้างของกรดไมวรามิก ลักษณะของไกลโคลิล (glycolyl type) จะถูกพบบริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรียจำพวกโครีนีฟอร์ม (coryneform bacteria) หรืออาจจะพบได้ในแอกติโนมัยสีท ประโยชน์ของการศึกษานี้คือเราจะสามารถจำแนกและสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่เราต้องการศึกษาได้ การศึกษานี้จะทำการทดลองโดยการวิเคราะห์สี การวิเคราะห์สีจะสามารถตรวจสอบปริมาณของกรดไกลโคลิก (glycolic acid) ได้ถึงระดับไมโครโมลต่อมิลลิกรัม (Komagata and Suzuki, 1987)

2.3.2.3 การศึกษาน้ำตาลทั้งหมดของเซลล์ (whole-cell sugar)

โดยการศึกษารูปแบบประกอบของน้ำตาลทั้งหมดนั้นเป็นข้อมูลที่นิยมถูกนำไปใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียและสามารถนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียได้อีกด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียแกรมบวกและแอกติโนมัยสีท ความสามารถในการทดสอบน้ำตาลทั้งหมดนั้นต้องเริ่มจากการตรวจสอบชนิดของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์โดยเราจะต้องทำการวิเคราะห์ทั้งเซลล์ ดังนั้นน้ำตาลภายในเซลล์จะต้องถูกแยก โดยการแยกนั้นจะต้องใช้แผ่นโครมาโตกราฟีแบบกระดาษ (paper chromatography) (Komagata and Suzuki, 1987) โดยการวิเคราะห์หาน้ำตาลทั้งหมดที่ถูกต้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบในเซลล์ สามารถจำแนกชนิดของน้ำตาลที่พบและลักษณะทางเคมีของผนังเซลล์ (Lechevalier and Lechvalier, 1977) (ตารางที่ 2.3)

ตารางที่ 2.3 แสดงถึงรูปแบบของน้ำตาลทั้งหมดที่ถูกรับในเซลล์ของเชื้อ โดยต้องอาศัยอากาศและผนังของเซลล์นั้นต้องมีองค์ประกอบของกรดไดอะมิโนพีมิลิกในรูปแบบ *meso* (Lechevalier and Lechvalier, 1977)

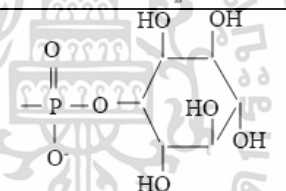
Type	ชนิดของน้ำตาลที่สามารถตรวจพบ
A	galactose arabinose no xylose
B	madurose no arabinose or xylose
C	none
D	xylose arabinose

2.3.2.1 การศึกษาไขมันชนิดมีขั้ว (polar lipid)

ฟอสโฟลิปิด (phospholipids) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีความสัมพันธ์ต่อการควบคุมสารที่เข้าออกนอกเซลล์โดยสารเหล่านั้นจะต้องผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ลักษณะโดยทั่วไปของฟอสโฟลิปิดจะเป็น แอมฟิพาติก (amphipathic) จะมีโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และชอบน้ำ (hydrophilic) ซึ่ง 2 ส่วนนี้จะประกอบไปด้วยกรดฟอสฟอริก (phosphoric acid) โครงสร้างของฟอสโฟลิปิดที่ถูกค้นพบในแบคทีเรียจะถูกแสดงอยู่ในตารางที่ 2.4 โดยตารางจะแสดงโครงสร้างพื้นฐานที่พบเจอรวมทั้งค่าการย่อยของฟอสโฟลิปิด ขั้นตอนที่นิยมใช้วิเคราะห์ฟอสโฟลิปิดคือ ใช้โครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (thin layer chromatography; TLC) ต้องตีเวลอพแบบ 2 ทิศทาง (two-dimension) ซึ่งต้องทำการจุด (spot) ลงบนแผ่นโครมาโตกราฟี โดยที่ฟอสโฟลิปิดแต่ละชนิดนั้นจะต้องทำการตรวจสอบโดยใช้รีเอเจนส์ (reagent) ในชนิดที่ต่างกันออกไป เพราะรีเอเจนส์จะมีความจำเพาะกับฟอสโฟลิปิด ชนิดของฟอสโฟลิปิดที่ตรวจพบนั้นจะสามารถใช้ในการจัดระบบ (systematics) ของแบคทีเรียแต่ละชนิดได้ (Komagata and Suzuki, 1987; Lechevalier *et al.*, 1980) ได้ทำการจัดรูปแบบของฟอสโฟลิปิดในเยื่อหุ้มเซลล์ แสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.4 ฟอสโฟลิปิดที่พบในเซลล์แบคทีเรีย (Komagata and Suzuki, 1987)

$$\begin{array}{c}
 \text{H}_2\text{COCO-R} \\
 | \\
 \text{R}^1\text{-COOCH} \\
 | \\
 \text{H}_2\text{CO-X}
 \end{array}$$

ชนิดของฟอสโฟลิปิด	ตัวย่อ	X
Phosphatidylcholine	PC	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{-P-OCH}_2\text{CH}_2\text{N(CH}_3)_3 \\ \\ \text{O}^- \end{array} $
Phosphatidylethanolamine	PE	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{-P-OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \\ \\ \text{O}^- \end{array} $
Phosphatidylserine	PS	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{-P-OCH}_2\text{CHCOO}^- \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $
Phosphatidylinositol	PI	
Phosphatidylinositolmannosides	PIMs	
Phosphatidylglycerol	PG	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{-OPO}_2^- \\ \\ \text{H-C-OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array} $
Diphosphatidylglycerol	DPG	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{-OPO}_2^- \quad \text{CH}_2\text{OCOR}'' \\ \quad \quad \quad \\ \text{H-C-OH} \quad \text{O} \quad \text{H-C-OCOR}'' \\ \quad \quad \quad \quad \\ \text{CH}_2\text{-O-P-O-CH}_2 \\ \\ \text{O}^- \end{array} $

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 รูปแบบของฟอสโฟลิปิดในแอคติโนมัยสีท (Lechevalier *et al.*, 1981)

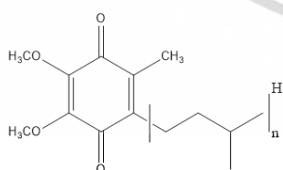
Phospholipids pattern	PE and its derivatives	PC	GluNU
PI	-	-	-
PII	+	-	-
PIII	V	+	-
PIV	+	-	+

หมายเหตุ GluNU คือ glucosamine containing phospholipids

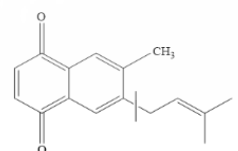
V คือ variation

2.3.2.5 การศึกษาไอโซพรีนอยด์ควิโนน (isoprenoid quinone)

การศึกษาไอโซพรีนอยด์ควิโนน มีบทบาทสำคัญต่อระบบการขนส่งของอิเล็กตรอนที่อยู่ในกระบวนการหายใจของเซลล์ ควิโนน (quinones) มีหลายชนิดที่พบในเซลล์แบคทีเรีย ไอโซพรีนอยด์ควิโนนชนิดที่ถูพบมากที่สุดคือ ยูบิควิโนน (ubiquinones) และมีนาควิโนน (menaquinones) โครงสร้างของยูบิควิโนนและมีนาควิโนน (รูป 2.4) โดยชนิดของมีนาควิโนนและจำนวนทั้งหมดของไอโซพรีน (isoprene units) ระดับของการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน (hydrogenation) นั้นพันธะคู่ของหน่วยไอโซพรีน จะถูกนำมาใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์และการจัดจำแนกของแบคทีเรีย การตรวจสอบทำได้โดยเริ่มจาก ลำดับการตรวจวิเคราะห์ชนิดของควิโนนและตรวจปริมาณจำนวนของไอโซพรีนการตรวจสอบนี้จะต้องใช้เครื่องแมสสเปกโทรเมทรี (Mass spectrometry; MS) การวิเคราะห์โดยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high-performance liquid chromatography, HPLC) ร่วมกันกับการใช้โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบางชนิดกลับเฟส (reverse-phase thin-layer chromatography) นั้นสามารถวิเคราะห์ควิโนนได้อย่างรวดเร็ว โดยที่เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงสามารถใช้ในการแยกและตรวจสอบองค์ประกอบของควิโนนที่มีปริมาณน้อยได้ (Komagata and Suzuki, 1987; Lechevalier *et al.*, 1977)



menaquinone



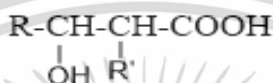
ubiquinones

รูปที่ 2.4 แสดงโครงสร้างของไอโซพรีนอยด์ควิโนนที่ถูพบในแบคทีเรีย (n คือ จำนวนหน่วยของไอโซพรีน H คือ จำนวนอะตอมของไฮโดรเจนที่เข้ามาทำปฏิกิริยาของไฮโดรจีเนสในพันธะคู่)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2.2 การศึกษากรดมัคโคลิก (mycolic acid)

กรดมัคโคลิกเป็นกรดไขมันที่มีหมู่ของแอคซิลเกาะอยู่กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และจะมีหมู่ไฮดรอกซิลเกาะติดอยู่กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (2-alkyl-3hydroxy fatty acids) (รูปที่ 2.5) คาร์บอนมักจะมีประมาณ 24 - 90 อะตอม กรดมัคโคลิกมักจะถูกพบในแบคทีเรียที่มีผนังเซลล์ชนิดที่ IV (ไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนฟลิทิกมีรูปแบบเป็น *meso* ที่อยู่ตรงผนังเซลล์ มีน้ำตาลอะราบิโนส และ น้ำตาลกาแลกโตสที่อยู่ภายในเซลล์) การจำแนกสายพันธุ์นั้นสามารถใช้กรดมัคโคลิกเป็นตัวบ่งชี้ได้ในผนังเซลล์ของแบคทีเรียจะประกอบด้วยกรดมัคโคลิกหลายชนิด (Komagata and Suzuki 1987)



รูปที่ 2.5 แสดงโครงสร้างของกรดมัคโคลิก (R คือคาร์บอนอะตอมของกรดไขมัน R' คือ หมู่แอคซิล) (Komagata and Suzuki, 1987)

2.3.3 การศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ (Genotypic characterization)

การศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ เป็นการจัดจำแนกของแบคทีเรียกลุ่มนี้ โดยจะศึกษา ลักษณะทางพันธุกรรม สารพันธุกรรมทั่วไปของแบคทีเรียประกอบด้วยดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอโดยอาร์เอ็นเอมีทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ เอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ทีอาร์เอ็นเอ (tRNA) และ อาร์อาร์เอ็นเอ (rRNA) ซึ่งในปัจจุบันนิยมใช้การตรวจเอกลักษณ์ของแบคทีเรียทั่วไปโดยเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บน ยีน 16S rRNA คือเทคนิคการตัดแยกเบื้องต้นและเกี่ยวกับการกำหนดตำแหน่งของการวิวัฒนาการของ สิ่งมีชีวิต โดยใช้การวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต การวิวัฒนาการระดับโมเลกุลมาช่วยในการจัดจำแนกหมวดหมู่และนำมาวิเคราะห์สายวิวัฒนาการด้วยการสร้างต้นไม้แห่งสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) (Babalola *et al.*, 2009) (Hozzein and Goodfellow, 2011) การพัฒนาระบบและการจำแนกชนิดโดยทั่วไปมาจากยีน 16S rRNA และการใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) สำหรับการวิเคราะห์ลำดับเบส (Wood *et al.*, 2007; Zhi *et al.*, 2009) แบคทีเรียกลุ่มที่ทำการศึกษามีลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะจีโนไทป์ที่หลากหลาย จึงเป็นการยากแก่การที่จะสามารถจัดจำแนกอนุกรมวิธานที่แน่นอนตลอดจนอดีตจนถึงปัจจุบันยังมีการค้นพบจุลินทรีย์ชนิดใหม่อยู่ตลอดเวลา ทำให้ตำแหน่งของอนุกรมวิธานในระดับวงศ์ สกุล และสปีชีส์ ซึ่งการจัดจำแนกข้างต้นนั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา เพราะมีบุคคลที่ทำการศึกษาวิจัยเพื่อการพบเจอที่หลากหลายมากยิ่งขึ้น โดยปัจจุบันจะทำการยืนยันข้อมูลที่ถูกต้องโดยยึดถือตามหนังสือของ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (ปรับปรุงล่าสุดครั้งที่ 2 ปี ค.ศ 2012)

2.3.3.1 หลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (polymerase chain reaction; PCR)

ปฏิกิริยาของลูกโซ่พอลิเมอร์นั้นเป็นเทคนิคที่จะทำการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอในระยะเวลาอันสั้นโดยจะอาศัยคุณสมบัติของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์ (DNA polymerase) จำเป็นต้องใช้ชนิดที่มีความสามารถในการต่อสายของดีเอ็นเอให้มีความยาวที่เพิ่มขึ้น โดยอาศัยดีเอ็นเอต้นแบบที่มีความยาวของสายดีเอ็นเอสายสั้น เรียกว่า สายดีเอ็นเอสั้นว่า ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primer) เอนไซม์นี้มีคุณสมบัติพิเศษที่มีความสามารถในการทนความร้อนได้มากกว่า 90 องศาเซลเซียส ทำให้เราสามารถปรับอุณหภูมิของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ให้มีอุณหภูมิสูงต่ำได้ตามที่เราต้องการ โดยเอนไซม์จะไม่เกิดการเสียสภาพ

ปัจจัยที่มีความสำคัญของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ประกอบไปด้วย

1. ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ที่ต้องการจะเพิ่มปริมาณ
2. ดีเอ็นเอไพรเมอร์จะมีลำดับคู่เบสคู่สมที่จะตรงกับดีเอ็นเอแม่แบบที่ปลาย 5' และปลาย 3'
3. ดิวอกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ (deoxyribonucleotide) มีดังนี้ dTTP dATP dGTP และ dCTP
4. เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์ (DNA polymerase)
5. โคแฟกเตอร์ (cofactor) ของตัวเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์ ได้แก่ Mn^{2+} หรือ Mg^{2+}

หลักการของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์จะประกอบด้วย 3 ขั้นตอนใหญ่ ๆ คือ

1. การสูญเสียสภาพธรรมชาติของดีเอ็นเอ (DNA denaturation)

การจะทำให้สายดีเอ็นเอต้นแบบนั้นเสียสภาพได้นั้นต้องใช้การเพิ่มอุณหภูมิให้สูงพอที่จะทำลายสภาพธรรมชาติได้ โดยการทำลายสภาพธรรมชาตินั้นทำให้สายพอลินิวคลีโอไทด์ (polynucleotide) สองสายที่พันกันเป็นลักษณะของเกลียวดีเอ็นเอแยกออกจากกัน อุณหภูมิส่วนใหญ่ที่สามารถทำลายได้นั้นต้องอยู่ประมาณ 90 องศาเซลเซียส ซึ่งทั้งหมดขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของเบสกวานีนและไซโทซีนที่อยู่ในสายดีเอ็นเอทำให้มีการทนทานความร้อนแตกต่างกัน

2. การเข้าคู่กันของสายดีเอ็นเอต้นแบบกับดีเอ็นเอที่เป็นไพรเมอร์ (annealing)

เป็นเทคนิคการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิให้มีความเหมาะสมกับดีเอ็นเอไพรเมอร์เข้าคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบ โดยอุณหภูมิที่ถูกใช้ทั่วไปจะมีอุณหภูมิอยู่ประมาณ 52 – 58 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมินั้นจะขึ้นอยู่กับค่าการหลอมเหลว (melting temperature; TM) ของสายดีเอ็นเอไพรเมอร์

3. การต่อกันจนเป็นสายยาวของดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (extension)

เป็นขั้นตอนของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยจะเริ่มจากการสังเคราะห์ต่อจากสายส่วนปลาย 5' ของไพรเมอร์ ตามข้อมูลของสายดีเอ็นเอแต่ละสาย โดยจำเป็นต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์พอลิเมอเรสรวมด้วย ซึ่งเอนไซม์นี้จะสามารถทำงานได้ดีที่สุดในอุณหภูมิประมาณ 72 – 75 องศาเซลเซียส เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสที่ใช้จะคงอยู่ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยา 3 ขั้นตอนดังนี้

กระบวนการของการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอโดยอาศัยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจะดำเนินการเริ่มจาก ขั้นตอนที่ 1 – 3 จะทำการนับเป็น 1 รอบ (one cycle) ขั้นตอนนี้จะทำให้ดีเอ็นเอเพิ่มมากขึ้นเป็นเท่าตัว เมื่อครบประมาณ 30 รอบนั้น จะได้รับดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็น 2^{30} หรืออยู่ประมาณ 10^9 โมเลกุล โดยทั่วไปมักจะนิยมใช้จำนวนรอบประมาณ 20 – 35 รอบ (ตรีทิพย์, 2552)

2.3.3.2 หลักการจัดลำดับของนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอของ 16S rRNA gene

การจัดลำดับสิ่งมีชีวิตระหว่างสองชนิดกันนั้นอาจไม่ได้มีความใกล้ชิดกันมาพอที่จะมีดีเอ็นเอที่คล้ายกัน แต่อาจจะมีไรโบโซมที่คล้ายกัน ซึ่งไรโบโซมนั้นเป็นโครงสร้างเล็ก ๆ ภายในเซลล์ หน้าที่หลักของไรโบโซมคือการสังเคราะห์โปรตีน ไรโบโซมนั้นจะประกอบด้วยโปรตีนและไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ (rRNA) ไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอจะถูกสร้างด้วยอาศัยคำสั่งจากดีเอ็นเอส่วนไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอซิสตรอน (rRNA cistron) ในแบคทีเรียทุกชนิด การจัดลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA gene ถูกพบว่ามีค่าคงตัวสูงมาก ถึงแม้จะถูกวิวัฒนาการมานานแล้วแต่ลำดับนิวคลีโอไทด์จะเปลี่ยนไปน้อยมาก หมายความว่าสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะคล้ายกันมากจะมีดีเอ็นเอที่ไม่คล้ายกัน แต่อาจจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ในไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอซิสตรอน (rRNA cistron) คล้ายกัน ดังนั้นเครื่องมือที่จะทำการหาความใกล้ชิดกันระหว่างสิ่งมีชีวิตได้ในระดับ สกุล (genus) วงศ์ (family) และอันดับ (order) ของความคล้ายกันของไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ (rRNA) และไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ แคตตาล็อกกิ้ง (rRNA oligonucleotide cataloging) วิธีนี้เป็นวิธีใหม่ที่ใช้ในการหาความคล้ายกันของไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอซิสตรอน (rRNA cistron) (นงลักษณ์ และปรีชา, 2544)

การตรวจหาลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอช่วยในการศึกษาเพื่อที่จะทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความแตกต่างของดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ โดยวิธีการตรวจหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ นั้นมีหลากหลายวิธี วิธีที่เป็นที่นิยมมากที่สุดคือ กระบวนการของ Sanger จะอาศัยการขัดขวางการทำงานของตัวเอนไซม์ที่ใช้ในการทำให้เกิดปฏิกิริยาต่อสายดีเอ็นเอทำให้ดีเอ็นเอสายยาวเป็นสายสั้นๆ จากนั้นจะทำการติดฉลากสารรังสีที่มีความจำเพาะเจาะจงกับสายเบสแต่ละชนิดที่ตรงปลายสายของสายดี

เอ็นเอ และทำการตรวจสอบลำดับเบสอาศัยขบวนการแยกสายดีเอ็นเอโดยใช้กระแสไฟฟ้าเข้ามาช่วยผ่านสายดีเอ็นเอที่อยู่บนเจลโพลีอะครีลาไมด์ (polyacrylamide gel electrophoresis) (ตรีทิพย์, 2552)

ในปัจจุบันมีเครื่องมือสำเร็จรูปที่สามารถทำให้การจัดการลำดับเบสนั้นมีความรวดเร็ว สะดวก และมีความแม่นยำมากขึ้น ขั้นตอนการติดฉลากบนสายดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเบสที่กำหนดจะต้องอาศัยสารไดออกซีนิวคลีโอไทด์ (didexynucleotide; ddG, ddA, ddT, ddC) ที่จะทำให้เกิดเป็นสี่ฟลูออเรสเซนต์ที่มีสีที่แตกต่างกัน ทำให้สามารถวิเคราะห์ผลได้โดยไม่ต้องใช้รังสี และได้ผลที่รวดเร็ว (ตรีทิพย์, 2552)

2.3.3.3 ปริมาณเบสกวานีนและไซโทซีน (G+C content)

สิ่งมีชีวิตโดยทั่วไปจะประกอบด้วยเบส กวานีน (G) คู่กับไซโทซีน (C) และอะดีนีน (A) คู่กับไทมีน (T) นิวคลีโอไทด์ของเบสในดีเอ็นเอคิดได้เป็นร้อยละของเบสกวานีนกับไซโทซีนรวมกันถูกเรียกว่า mol% G+C ค่าของเบสเหล่านี้จะแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์แต่ละชนิด แต่ในสปีชีส์ที่มีความใกล้เคียงกันนั้นมักจะมี mol% G+C คล้ายมาก ถ้าสิ่งมีชีวิตนั้นมี mol% G+C ที่แตกต่างกันมาก แสดงว่าสิ่งมีชีวิตนั้นจะไม่ค่อยมีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด แต่อาจจะพบบางกรณีที่สิ่งมีชีวิตนั้นไม่มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกันเลย แต่ตรวจพบว่ามี mol% G+C คล้ายกัน (นงลักษณ์ และปรีชา, 2544)

2.3.3.4 ดีเอ็นเอ ไฮบริไดเซชัน (DNA – DNA Hybridization)

ทำการให้ความร้อนแก่สายดีเอ็นเอสายคู่ (double stranded DNA) สายของดีเอ็นเอแต่ละสายที่เข้าคู่กันจะแยกออกจากกันเพราะพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ถูกทำลายโดยความร้อน และเมื่อปล่อยให้เย็นลง สายของดีเอ็นเอจะทำการกลับมาจับคู่ (base pairing) กันอีกครั้ง โดยจะอาศัยหลักการการจับคู่เบสของดีเอ็นเอ หลักการนี้จะอาศัยการศึกษาการหาความคล้ายกันของลำดับเบสของดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ถ้าสิ่งมีชีวิตสองชนิดที่มีความใกล้เคียงกันอย่างมากหรือมีความใกล้ชิดกันมาก ดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตทั้งสองจะสามารถเข้าคู่กันได้หรือสามารถจับคู่กัน (hybridize) ในการศึกษาหาความคล้ายคลึงของดีเอ็นเอ ในการศึกษาการหาความคล้ายคลึงกันของดีเอ็นเอนั้น จะทำได้โดยการนำดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิต 2 ชนิด มาให้ความร้อนจะแปลงสภาพ (denature) จากการแปลงสภาพนั้นสายดีเอ็นเอจะถูกแยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยว หลังจากแยกออกเป็นสายเดี่ยวแล้วนำสายเดี่ยวนั้นมาผสมกัน ปล่อยให้เย็น และถ้าสิ่งมีชีวิตทั้ง 2 ชนิดนั้นมีความใกล้เคียงกันหรือไม่มีความใกล้เคียงกันจะมีการจับคู่กันของสายดีเอ็นเอ (heteroduplex) คือถ้ามีการที่สายดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตแรก เข้าคู่กับอีกสิ่งมีชีวิตหนึ่งจะมีความใกล้ชิดกัน แต่ถ้าสิ่งมีชีวิตทั้ง 2 ชนิดไม่ใกล้ชิดกันเลยจะเกิดการไม่เข้าคู่กัน ซึ่งวิธีดังกล่าวนี้สามารถใช้ในการตรวจสอบในระดับสปีชีส์ (นงลักษณ์ และปรีชา, 2544)

2.3.3.5 การหาลำดับของจีโนมทั้งหมด (whole genome) (อลิษา และคณะ 2555)

การอ่านค่าของลำดับเบสนิวคลีโอไทด์เบื้องต้น โดยในปัจจุบันใช้วิธีของ Sanger เทคนิคการจัดลำดับถูกพัฒนาอย่างต่อเนื่องและสามารถพัฒนาการจัดลำดับ 2 พันคู่เบส (Kbps) การจัดเรียงลำดับเบสแบบ Shotgun ถูกพัฒนาอย่างต่อเนื่องเพื่อในอนาคตลำดับชิ้นส่วนของเบสแบบ Shotgun จะนำไปใช้ในการศึกษาเบสของโครงการจีโนมมนุษย์ ซึ่งการศึกษาการอ่านลำดับเบส นิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) สามารถใช้เทคนิคของ Sanger sequencing ได้ การหาลำดับของเบส ด้วยเทคนิคของ Sanger sequencing วิธีนี้มีความเสี่ยงว่าจะมีประสิทธิภาพไม่สูงมากเพราะการเรียงลำดับเบสได้แค่ครั้งละ 1 ตัวอย่างเท่านั้น ปัจจุบันจึงมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องเพื่อหาเทคนิคใหม่ ๆ ที่สามารถเรียงลำดับได้หลายตัวอย่างมีประสิทธิภาพที่ดีกว่า มีความไวในการตรวจหาการกลายของสายพันธุ์ดีเอ็นเอสูง วิธีนี้มีชื่อเรียกว่า Next Generation Sequencing (NGS)

2.3.3.6 Next Generation Sequencing (NGS)

Next Generation Sequencing (NGS) หรือ second generation sequencing เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนาขึ้นมาใหม่ ที่มีความสามารถเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่จำนวนมากได้ และในปัจจุบันนิยมใช้อย่างแพร่หลายในการวิจัยหลากหลายด้าน เพื่อที่จะได้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์นั้น ๆ ที่เรานำมาศึกษาหรือทำการวิจัยที่เราสนใจ องค์ประกอบที่จำเป็นในด้านนี้คือลำดับเบสของ Genomic Next Generation Sequencing (NGS) หรือ second generation sequencing ที่ถูกใช้ใน ปัจจุบันนั้นได้แก่ การตรวจหาลำดับเบสของ RNA-sequencing (RNA-seq) เป็นการเป็นการศึกษาลำดับอาร์เอ็นเอทั้งการแปลรหัส (coding) เอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) และไม่มีการแปลรหัส (non coding) อาทิ เช่น small RNA อย่าง miRNA, siRNA, piwiRNA ของสิ่งมีชีวิต ซึ่ง mRNA sequencing นั้นจะเป็นการเปรียบเทียบรูปแบบของการแสดงออกของยีน โดยข้อมูลของยีนแต่ละตัวนั้นจะเป็นไอโซฟอร์ม (isoforms) และ small RNA sequencing เป็นดีเอ็นเอที่ผ่านการเปลี่ยนรหัส (encode) จากพีชหรือสัตว์ที่ทำหน้าที่ตอบสนองต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน โดยทาง macrogen สามารถหาลำดับเบส และตรวจสอบในเชิงปริมาณของกลุ่มตัวอย่างได้ตั้งแต่ miRNA, siRNA, piwiRNA

Whole genome sequencing (WGS) คือเทคนิคที่ทำการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ในสิ่งมีชีวิตทั้งหมดโดยจะเทียบกับลำดับเบสที่เราสนใจกับฐานข้อมูลทั้งหมดที่มีที่คล้ายคลึงกันมากที่สุด ซึ่งวิธีการใช้ short reads จากเทคโนโลยีของ NGS นั้น สามารถนำข้อมูลที่ได้นั้นมาทำแผนภาพกับจีโนมอ้างอิงได้ โดยวิธีนี้จะได้รับการยอมรับสูง ข้อมูลที่จำได้รับมีจำนวนมากและใช้เวลานานในการวิเคราะห์ รวมทั้งค่าใช้จ่ายในการทำวิธี WGS นั้นยังสูงอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

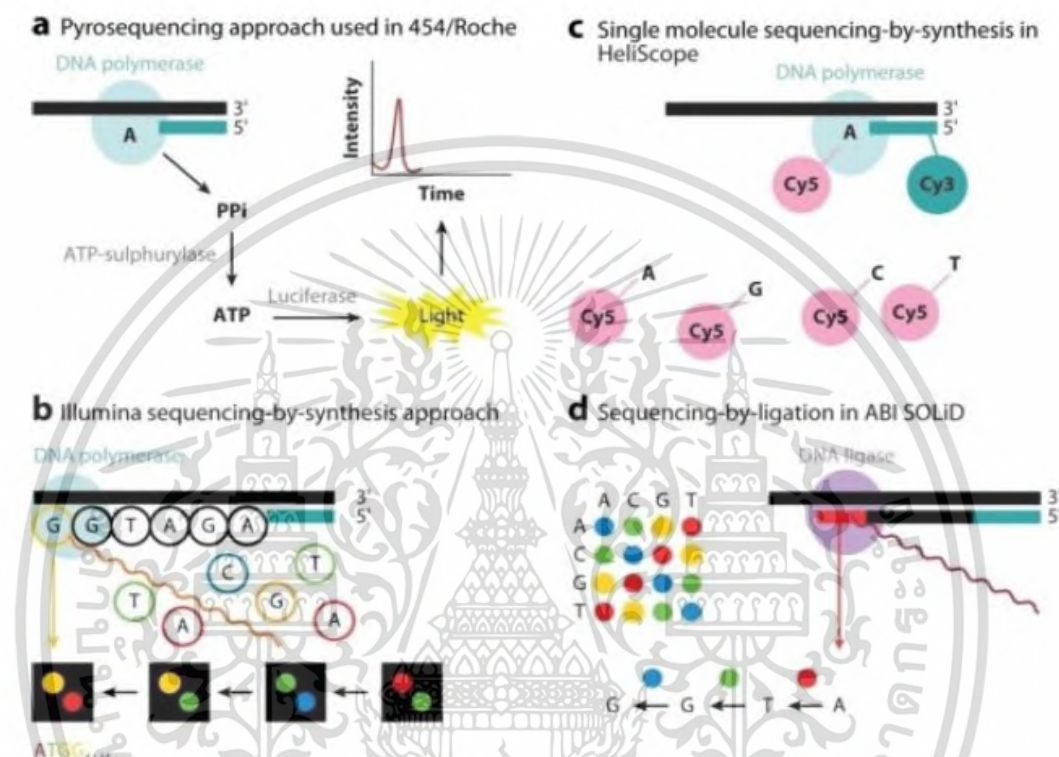
เครื่องมือที่สามารถอ่านค่าลำดับเบสแบบเอ็นจีเอสในปัจจุบัน (next - generation sequencing platforms) นั้นมีหลักๆ 3 เทคโนโลยี ที่นิยมใช้อย่างกว้างขวาง ได้แก่ Roche/Gs-FLX 454 Genome sequencer Illumina/Hiseq 2000 และ ABI/ SOLiD 5500xl และยังมีเทคโนโลยีอื่น ๆ อีก เช่น Polonator/G.007 และมีเทคโนโลยีที่กำลังถูกพัฒนาอยู่อย่างเครื่องมือที่เรียกว่า Third generation NGS platforms มีหลากหลายบริษัทที่กำลังพยายามที่จะพัฒนาเครื่องมือใหม่ ๆอย่างต่อเนื่อง เพื่อที่จะมาพัฒนาและปรับปรุงเครื่องมือที่มีอยู่ให้มีต้นทุนที่ถูกและมีการหาตำแหน่งเบสที่แน่นอน โดยหลักการทำงานของแต่ละเครื่องมือดังนี้

1. เครื่อง 454/Roche genome sequencer

ใช้หลักการของการหาลำดับเบสแบบสังเคราะห์ที่ หรือเรียกว่าเทคนิค pyro sequencing ซึ่งสามารถตรวจวัดค่าไฟโรฟอสเฟต (PPI) จากปฏิกิริยาเคมี (chemiluminescence) และอ่านสัญญาณตามจังหวะแสงของเบสคู่สมหลายๆ พันเบสได้ในครั้งเดียว แสดงในรูปที่ 2.6 ขั้นตอนที่สำคัญที่สุดของวิธีนี้คือการยึด (immobilization) กับดีเอ็นเอกับเม็ดบีด (bead) ในสถานะที่เป็นน้ำมัน (emulsion PCR) และการเพิ่มปริมาณสายดีเอ็นเอมีขั้นตอนดังนี้

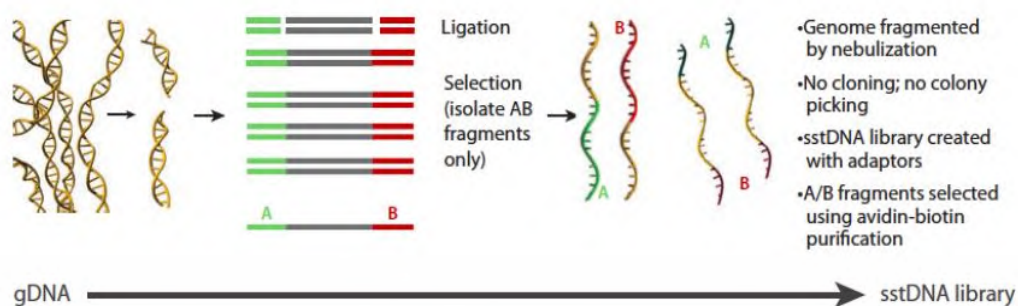
เริ่มต้นด้วยการตัดดีเอ็นเอที่เป็นสายคู่ให้มีขนาดสั้นลงโดยประมาณ 400 – 600 คู่เบส จากนั้นทำการเชื่อมตัวอะแดปเตอร์ A และ B ชนิดพิเศษที่ตรงส่วนปลายของดีเอ็นเอนั้น ด้วยอะแดปเตอร์ B จากด้านของปลาย 5' ที่มีการประกอบด้วยไบโอติน จากนั้นจะทำการเข้าจับกับเม็ดบีดที่ถูกฉาบด้วยสารของสเตรปตาวิดิน (streptavidin) ส่วนตัวอะแดปเตอร์ที่ไม่ได้ทำการถูกจับกับตัวใดเลยจะทำการจับคู่กันเองของอะแดปเตอร์ (adaptor dimers) หรือไม่ก็จะถูกทำการกำจัดออก อะแดปเตอร์ที่ทำการตรึงบนเม็ดบีดได้บางสายจะมีลำดับที่เบสโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ไม่มีการ phosphorylate ทำให้เกิดช่องว่างในสายดีเอ็นเอคู่นั้นจากการที่เกินช่องว่างนั้นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติเป็น strand displacing DNA polymerase จะเข้าไปทำการซ่อมแซมและต่อเติมส่วนที่ขาดไป ทำให้สายดีเอ็นเอนั้นสมบูรณ์ ส่วนดีเอ็นเอสายคู่ที่ไม่มีการตรึงนั้นจะถูกแยกออกเป็นสายเดี่ยว โดยมีสายดีเอ็นเออีกเส้นหนึ่งที่มีตัวอะแดปเตอร์ B/B ที่ยังคงติดกับเม็ดบีดด้วยสเตรปตาวิดิน (streptavidin) และไบโอติน ส่วนสายดีเอ็นเอบางส่วนที่มีตัวอะแดปเตอร์ B ติดอยู่นั้นจะถูกกำจัดทิ้ง สุดท้ายจะได้รับดีเอ็นเอสายเดี่ยว ซึ่งจะมีส่วนของตัวอะแดปเตอร์ A ติดอยู่กับปลายของ 5' ตัวอะแดปเตอร์ B จะติดที่อยู่ปลาย 3' ในขั้นตอนนี้ จากจีโนมิกส์ดีเอ็นเอจะได้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (sstDNA library) (รูปที่ 2.7) เมื่อผ่านขบวนการนี้จึงจะประเมินคุณภาพของดีเอ็นเอต้นแบบได้ด้วยเครื่อง Agilent 2100 BioAnalyzer เช่น การตรวจสอบความยาวของสายดีเอ็นเอเป็นต้น หากว่าดีเอ็นเอมีน้ำหนักมาก จำเป็นจะต้องตรวจสอบว่าความยาวของคู่เบสอยู่ในช่วง 500 - 800 คู่เบส หรือหากมี

น้ำหนักที่น้อยต้องตรวจว่ามีคู่เบสอยู่ประมาณ 150 – 800 คู่ ปริมาณของดีเอ็นเอที่ได้้นั้นมากกว่าหรือเท่ากับ 5 นาโนกรัม และควรมีตัวของอะแดปเตอร์ที่ทำการจับกันเองน้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ด้วย เป็นต้น



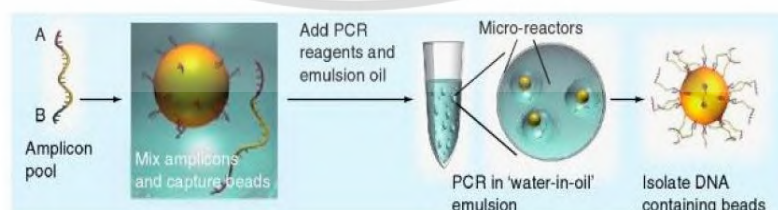
รูปที่ 2.6 การจัดลำดับใน next-generation sequencers (a) เทคนิค Pyrosequencing ที่ใช้ในเครื่อง 454/Roche genome sequencer (b) การ Sequencing โดยการติดสีเรืองแสง 4 ตัว ที่ทำหน้าที่เป็นตัวยุติปฏิกิริยาที่ย้อนกลับได้และดีเอ็นเอพอลิเมอไรเอสในปฏิกิริยา Illumina (c) Helicos เต็มโมเลกุลจัดลำดับโดยสังเคราะห์วิธีด้วยการแม่แบบดีเอ็นเอ Cy3 ติดป้ายผนังไว้กับไพรเมอร์ตรึงบนพื้นผิวของเซลล์ นิวคลีโอไทด์ที่มีฉลาก Cy5 จะถูกเพิ่มในปฏิกิริยารั้งหนึ่ง และการตรวจสอบของนิวคลีโอไทด์ที่จัดตั้งขึ้นจะประสบความสำเร็จ (d) การจัดลำดับโดยวิธี ligation นำมาใช้ในวิธีการ SOLiD การเข้ารหัสสองฐานที่ใช้ภายในระบบและข้อมูลสุดท้ายจะถูกรายงานเป็นการแบบที่ใช้มาตรฐาน (อลิษา และคณะ 2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.7 การเตรียมดีเอ็นเอไลบรารีเพื่อที่จะทำการสร้างดีเอ็นเอสายเดี่ยว (sstDNA) โดยใช้ตัวอะแดปเตอร์ A และ B (อลิซา และคณะ 2555)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบนเม็ดปิด (emulsionbased clonal amplification; emPCR) ทำได้โดยการนำดีเอ็นเอสายเดี่ยวมาตรึงด้วยเม็ดปิดในตัวเม็ดปิดนั้นจะมีไพรเมอร์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ติดอยู่ ซึ่งจะสามารถเข้าคู่กับตัวอะแดปเตอร์ของดีเอ็นเอสายเดี่ยวนั้น (รูปที่ 2.8) โดยที่นับจากดีเอ็นเอกับตัวอะแดปเตอร์นับเป็นหนึ่งโมเลกุล ซึ่งหนึ่งโมเลกุลจะถูกจับอยู่กับเม็ดปิดหนึ่งเม็ด เพื่อที่จะทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหยดน้ำมันที่มีสารสำหรับการทำฟิซิวาร์อยู่ด้านใน (oil aqueous emulsion) เมื่อปฏิกิริยาฟิซิวาร์เสร็จสิ้นแล้ว หยดน้ำมันนั้นจะประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมือนกันเป็นล้านชุดติดอยู่กับที่เม็ดปิด เม็ดปิดที่ไม่มีดีเอ็นเอติดอยู่นั้นจะทำการถูกกำจัดออก สิ่งที่สำคัญที่สุดของวิธีนี้คือการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบนเม็ดปิด คือ การคำนวณจำนวนของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมนั้น เพื่อนำมาใช้ในขั้นตอนนี้ สิ่งจำเป็นที่ต้องคำนวณดีเอ็นเอต้นแบบก่อนเพราะถ้าทำการใส่ปริมาณดีเอ็นเอน้อยเกินไป แต่ถ้ามีจำนวนเม็ดปิดมากพอ ก็อาจจะไม่ต้องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบนเม็ดปิดที่เกิดขึ้นได้ ทำให้ไม่สามารถนำไปหาลำดับเบสต่อได้ หรือถ้าทำการใส่ดีเอ็นเอในปริมาณมากเกินไป จะทำให้บางเม็ดปิดมีปริมาณของดีเอ็นเอมากเกินไป จนสุดท้ายอาจได้ค่าการอ่านที่ไม่สามารถใช้งานได้



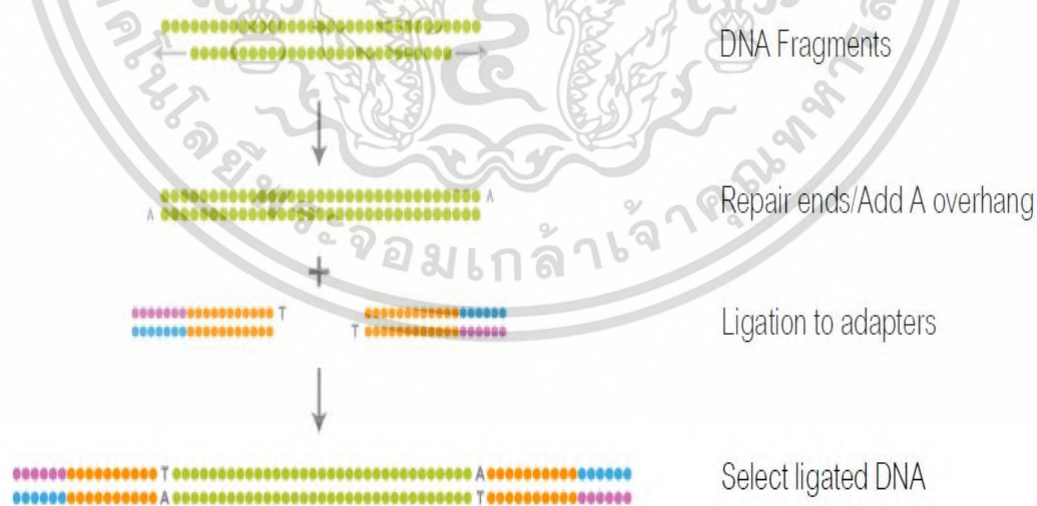
รูปที่ 2.8 การตรึงดีเอ็นเอบนเม็ดปิดที่กำลังจะถูกขยายเป็นกลุ่มในอิมัลชันหยด (emulsion PCR) (อลิซา และคณะ 2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เครื่อง Illumina

ใช้หลักการหาลำดับเบสโดยใช้การติดฉลากด้วยเบสเรืองแสง (fluorescent reversible terminators) ของทั้งหมดสี่เบส และทำการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอเชื่อมต่อกันเป็นสะพานที่มีสถานะเป็นของแข็ง (solid phase bridge amplification) จัดเป็นกลุ่มของสายดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน โดยมีรายละเอียดดังนี้

การเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ ดีเอ็นเอที่สนใจนั้นจะถูกตัดด้วย nebulizer (รูปที่ 2.9) โดยที่ต้องอาศัยเทคนิค nebulization ที่เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว โดยใช้จำนวนดีเอ็นเอน้อยประมาณ 0.5 – 5 มิลลิกรัม เมื่อสารละลายที่มีดีเอ็นเอไหลผ่านเข้าไปภายในขนาดของดีเอ็นเอนั้นจะถูกควบคุม โดยการเปลี่ยนแปลงแรงดันก๊าซที่เข้ามาสู่ภายในของ nebulizer รวมไปถึงปัจจัยอื่น ๆ อีกมากมายเช่น สถานะความหนืดของสารละลายและอุณหภูมิที่ทำให้สายดีเอ็นเอสั้นลง หลังจากการตัดสายดีเอ็นเอความยาวน้อยกว่า 800 คู่เบส จากนั้น ส่วนปลายที่ถูกทำลายจะถูกทำการซ่อมแซมด้วยเอนไซม์ T4 DNA polymerase, Klenow enzyme และ T4 polynucleotide kinase และทำการเติมนิวคลีโอไทด์เบส A ที่ปลาย 3' ของสายดีเอ็นเอนั้น ๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในช่องของการเชื่อมจากนั้นดีเอ็นเอจะถูกตัวอะแดปเตอร์ ซึ่งจะมีความยาวประมาณ 66 คู่เบส และจะติดกับเบส T ที่ปลายทั้ง 2 ข้าง หลังจากนั้น การตัดแยกสายของดีเอ็นเอความยาวประมาณ 150 – 200 คู่เบส ลงบนเจลและทำการเพิ่มปริมาณสายดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์



รูปที่ 2.9 ดีเอ็นเอต้นแบบของ Illumina ที่จีโนมดีเอ็นเอถูกแยกส่วนด้วยเทคนิค nebulization (อลิษา และคณะ 2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสร้างกลุ่มของสายดีเอ็นเอด้วย bridge amplification หลังจากการแยกสายดีเอ็นเอ นำสายดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่แยกได้นั้นมาใส่ลงผ่านกระจกสไลด์ (flow cell channels) แบบสุ่ม โดยผิวของกระจกนั้นสไลด์นั้นจะถูกฉาบด้วยตัวของอะแดปเตอร์ และตัวอะแดปเตอร์ที่เข้าคู่กัน (complementary adapters) ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นเสมือนไพรเมอร์ใช้ในช่วงของการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ จากนั้นทำการเติมนิวคลีโอไทด์และเอนไซม์ เพื่อเริ่มการเพิ่มปริมาณแบบสะพาน (bridge amplification) จากดีเอ็นเอสายเดี่ยวจำนวนหนึ่งโมเลกุลจะจับไพรเมอร์เป็นรูปสะพาน (double-stranded bridges) ในช่วงตอนท้ายสายดีเอ็นเอจะได้สายเดี่ยวเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบอีกครั้งหนึ่ง

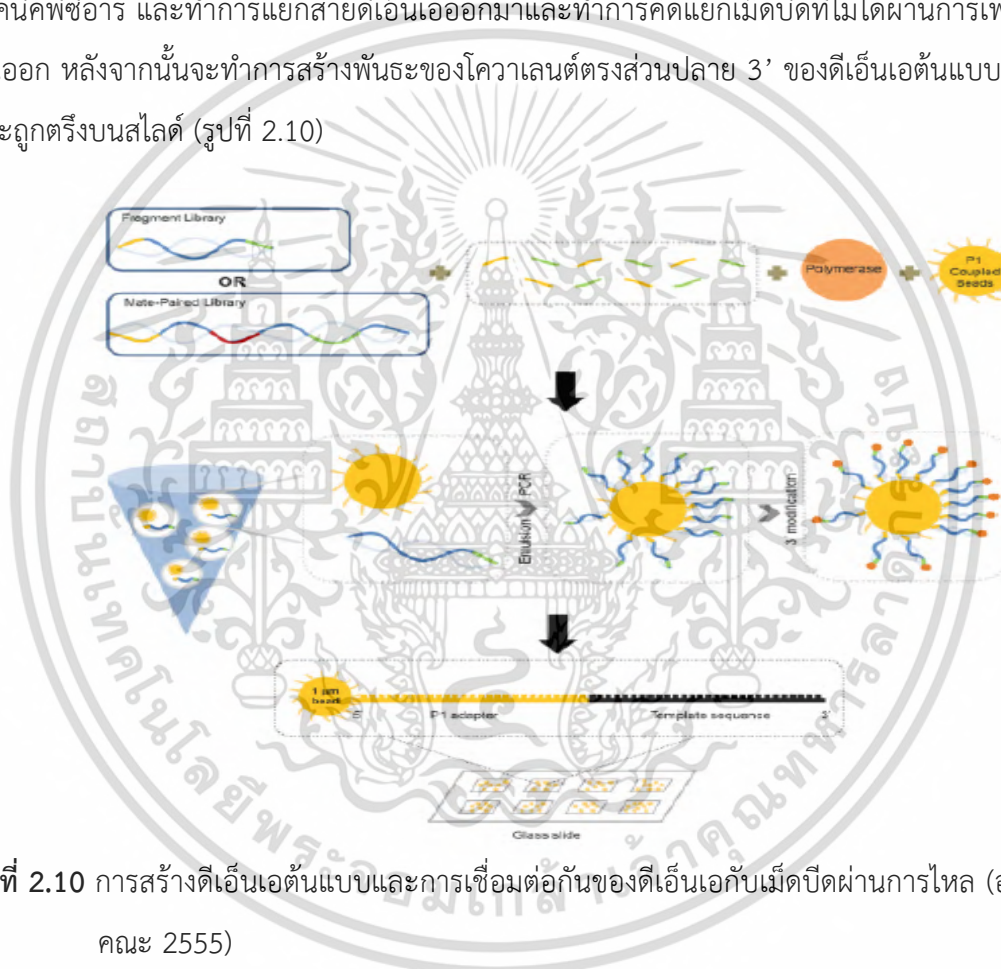
การหาลำดับเบสโดยเทคนิค Illumina ใช้หลักการ sequencing by synthesis โดยทำการแยกสายดีเอ็นเอในแต่ละกลุ่มให้ดีเอ็นเอนั้นเป็นสายเดี่ยว จะมีไพรเมอร์ที่จับจำเพาะกับดีเอ็นเอนั้น ๆ ในช่วงเริ่มต้นของการหาลำดับเบส ทำการเติมเอนไซม์ดีเอ็นเอไพรเมอร์ และนิวคลีโอไทด์ที่มีทั้งสี่เบสติดอยู่กับสารเรืองแสงที่มีสีที่ต่างกันตามการใช้งาน reversible terminator โดยการ block ปลาย 3'OH ไว้ เพื่อหยุดการสังเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ในสายดีเอ็นเอไพรเมอร์ ในขณะที่มีการหยุดการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ นิวคลีโอไทด์ที่ไม่ได้ถูกจับเข้าคู่กันกับสายดีเอ็นเอตั้งต้นที่เหลือในปฏิกิริยาจะถูกกำจัดออก หลังจากนั้นทำการกระตุ้นด้วยแสงเลเซอร์ และจะมีการบันทึกภาพของการปล่อยสารเรืองแสงของนิวคลีโอไทด์จากของแต่ละกลุ่มบนแผ่นกระจกสไลด์ เพื่อที่จะทำการบันทึกความคล้ายกันของลำดับเบสแรก ตามด้วยขั้นตอนการตัด (cleavage) เพื่อที่จะกำจัด terminator และ fluorescent dye ออกไปล้างอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นเติมนิวคลีโอไทด์ชุดใหม่ลงไปพร้อมทั้งเติมเอนไซม์ของ ดีเอ็นเอไพรเมอร์เพื่อทำการสังเคราะห์ต่อไป ทำซ้ำเรื่อย ๆ โดยที่แต่ละรอบ (cycle) นั้นจะเป็นตัวกำหนดของลำดับเบสอื่น ๆ โดยตัวเครื่อง Illumina นี้จะสามารถอ่านค่าของความยาวได้ถึงประมาณ 100 คู่เบส และในการหาลำดับของเบสหนึ่งครั้งนั้น จะได้จำนวนของเบสมามากถึงประมาณ 600 กิกะเบส และความถูกต้องของเบสที่ได้มากกว่า 99.5 เปอร์เซ็นต์

4. เครื่อง SOLiD/ABI

ใช้หลักการหาลำดับเบสแบบการเชื่อมต่อกัน (sequencing by ligation) ซึ่งหลักการนี้คล้ายกับ 454/Roche ที่ทำการติดเม็ดปิดกับดีเอ็นเอ (magnetic bead) ในสถานะที่เป็นน้ำมัน และทำการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอไปพร้อม ๆ กัน ด้วยวิธีนี้จะทำให้ได้คุณภาพของข้อมูลที่ดี แต่วิธีการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบนั้นยุ่งยากและใช้เวลานานกว่า โดยมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ สามารถสร้างได้ทั้งหมด 2 วิธีด้วยกัน ได้แก่ mate-paired library และ sequencing fragment โดยการเลือกแต่ละวิธีนั้นขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ของงานวิจัยที่สนใจ โดยจะทำการเชื่อมต่ออะแดปเตอร์เข้ากับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบกับเม็ดปิด (รูปที่ 2.10)

การเพิ่มดีเอ็นเอต้นแบบบนเม็ดปิด (emulsion-based clonal amplification; emPCR) โดยทำการเตรียมตัว microreactor ที่ภายในจะประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ สารละลายบัฟเฟอร์ต่าง ๆ ที่ต้องใช้ เม็ดปิดและไพรเมอร์ จากนั้นจะทำการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอบนเม็ดปิดโดยเทคนิคพีซีอาร์ และทำการแยกสายดีเอ็นเอออกมาและทำการคัดแยกเม็ดปิดที่ไม่ได้ผ่านการเพิ่มปริมาณนั้นออก หลังจากนั้นจะทำการสร้างพันธะของโควาเลนต์ตรงส่วนปลาย 3' ของดีเอ็นเอต้นแบบที่มีเม็ดปิด และถูกตรึงบนสไลด์ (รูปที่ 2.10)

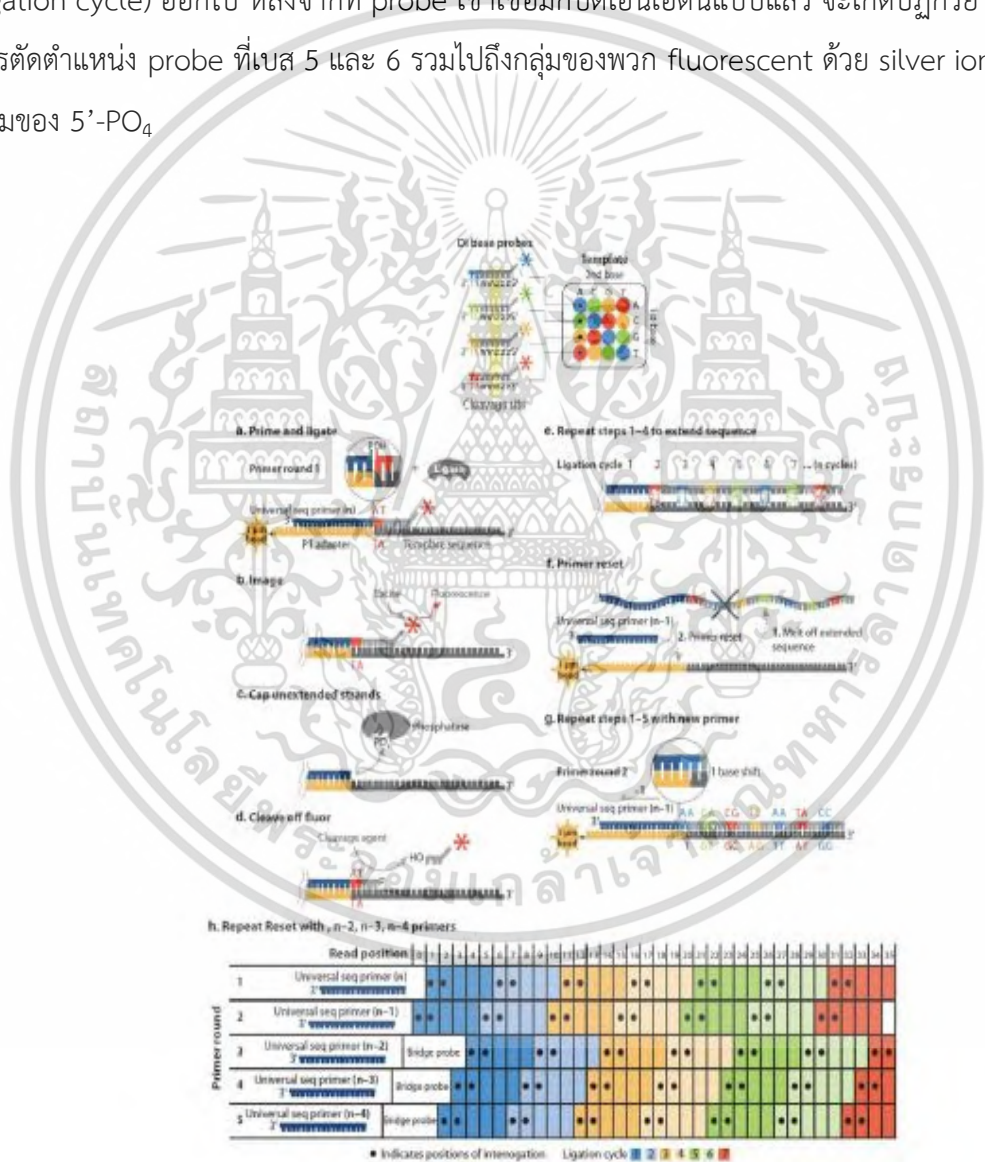


รูปที่ 2.10 การสร้างดีเอ็นเอต้นแบบและการเชื่อมต่อกันของดีเอ็นเอกับเม็ดปิดผ่านการไหล (อลิษา และคณะ 2555)

การหาลำดับเบสของ SOLiD/ABI เป็นการอ่านค่าบนตำแหน่งที่ซ้ำกันของเบสสองครั้ง เรียกว่า Di-base sequencing (รูปที่ 2.11) โดยจะทำการเชื่อมต่อกันด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ทำการติดสี (dye-labeled oligonucleotide) โดยหลักการของ two-base encoding หรือ di-base probe เริ่มต้นด้วยไพรเมอร์ จะทำการจับเข้ากับส่วนของตัวอะแดปเตอร์ที่มีลำดับเบสที่เข้าคู่กัน บนสายดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้ทำการเพิ่มปริมาณแล้ว หลังจากนั้นทำการเติม di-base probe ลงไป ซึ่งการเชื่อมกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถทำให้ได้สองทิศทางจากด้านปลายของ 5'-PO₄ หรือด้านของปลาย 3'-OH หลังจากนั้นเอนไซม์ ligase จะทำหน้าที่เชื่อม probe ที่จะประกอบไปด้วย 8 ไพรเมอร์ โดยที่นิวคลีโอไทด์ที่ 1 และ 2 จะเป็นนิวคลีโอไทด์ที่สามารถเข้าคู่ได้กับดีเอ็นเอต้นแบบนั้นตามด้วยการบันทึกภาพของสี fluorescence ที่ได้จากการบันทึกที่จะเกิดในแต่ละรอบ หลังจากผ่านขั้นตอนการเชื่อมก่อนตัดออกสามเบสแล้ว สุดท้ายของ probe ส่วนของ probe ที่ไม่เข้าคู่กันกับดีเอ็นเอต้นแบบได้อย่างจำเพาะจะถูกทำลายออก เอนไซม์ phosphatase มีหน้าที่ช่วยป้องกันสายดีเอ็นเอที่ไม่สามารถ extend ได้ในช่วงของการที่เชื่อมกัน (ligation cycle) ออกไป หลังจาก probe เข้าเชื่อมกับดีเอ็นเอต้นแบบแล้ว จะเกิดปฏิกิริยาเคมีที่จะทำการตัดตำแหน่ง probe ที่เบส 5 และ 6 รวมไปถึงกลุ่มของพวก fluorescent ด้วย silver ions ทำให้เกิดกลุ่มของ 5'-PO₄



รูปที่ 2.11 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย SOLiD/ABI (อลิษา และคณะ 2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 ชีวสารสนเทศ (bioinformatics)

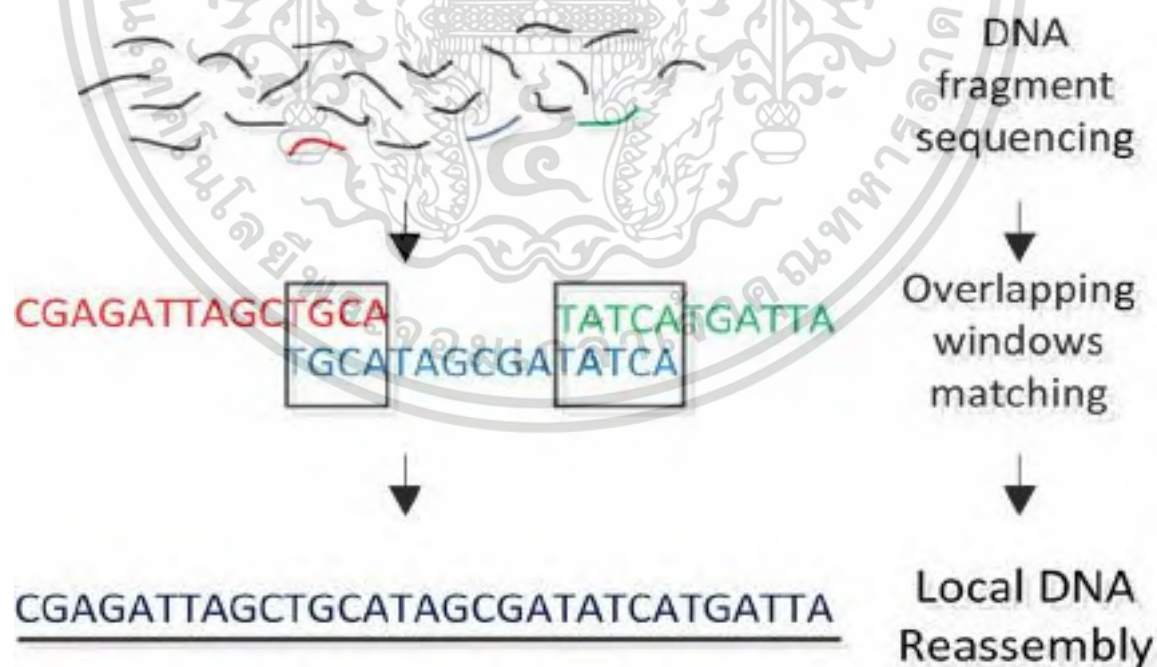
ชีวสารสนเทศ หรือ ไบโอมินฟอร์เมติกส์ (bioinformatics) คือ การศึกษาเกี่ยวกับวิทยาศาสตร์ชีวภาพแขนงใหม่ โดยมักจะใช้เทคนิคที่ใช้การผสมผสานความรู้จากศาสตร์ต่าง ๆ เช่น พันธุวิทยา (genetics) จุลชีววิทยา (microbiology) อนุชีววิทยา (molecular biology) คณิตศาสตร์ สถิติศาสตร์ สารสนเทศ (informatics) และวิทยาการคอมพิวเตอร์ ซึ่งแขนงต่าง ๆ นั้นจะมีส่วนช่วยในการจัดเก็บข้อมูล ประมวลผล และการสืบหาข้อมูลทางชีวภาพอย่างเป็นระบบ และทำให้การดึงข้อมูลต่าง ๆ สะดวกและรวดเร็ว ทั้งหมดนี้สามารถใช้ในการสร้างแบบจำลอง การทำนายผลที่มีความเป็นไปได้ในทางชีววิทยา และยังสามารถทำให้เกิดศาสตร์อีกมากมายเช่น จีโนมิกส์ (Genomic) เมตาบอลอมิกส์ (metabolomics) การศึกษาสายวิวัฒนาการ เป็นต้น ซึ่งในปัจจุบันนั้นมีความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีมากขึ้นทำให้ศาสตร์ของชีวสารสนเทศนั้นเป็นที่นิยมมากขึ้นอย่างมากตามยุคสมัยที่ก้าวหน้า

ข้อมูลทางชีววิทยาที่ได้รับจากชีวสารสนเทศศาสตร์ (bioinformatics) ที่รวบรวมความรู้หลากหลายแขนง เช่น ข้อมูลของรหัสพันธุกรรมต่าง ข้อมูลลำดับโปรตีนแต่ละชนิด ข้อมูลของปริมาณชีวโมเลกุลแต่ละชนิด รวมไปถึงการแสดงออกของยีน (gene) แต่ละชนิด อย่างเช่น พวกข้อมูลของเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) และจำนวนโปรตีนที่ได้รับมาจากยีนนั้น ๆ ข้อมูลหมายเหตุ (annotation data) โดยเราจะนำข้อมูลนี้ไปทำการจัดเรียงลำดับของรหัสโปรตีน การจัดเรียงของโครงสร้างของโปรตีน การทำนายโครงสร้างของโปรตีน การสืบค้นหรือการค้นหา ยีน และการค้นคว้าเพื่อสร้างแบบจำลองวิวัฒนาการต่าง ๆ การสร้างต้นไม้แห่งสายวิวัฒนาการจากข้อมูลดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด เป็นต้น โดยข้อมูลที่ยกตัวอย่างมาทั้งหมดนี้มีข้อมูลอยู่จำนวนมากและมีความซับซ้อนอยู่พอสมควร ดังนั้น การศึกษาชีวสารสนเทศศาสตร์นั้นจึงสำคัญในการที่จะทำให้การจัดเก็บข้อมูล การสืบค้นข้อมูล และการประมวลผลข้อมูลต่าง ๆ เหล่านี้ได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ซึ่งการ Sequencing นั้นเป็นการศึกษาการอ่านค่าลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ สารพันธุกรรมมักจะประกอบไปด้วย อะดีนีน (A) กวานีน (G) ไสโทซีน (C) และ ไทมีน (T) เรียงต่อกันเป็นสายยาว จึงถูกเปรียบเทียบกับเป็นภาษาของสิ่งมีชีวิตที่กว่าได้ โดยจีโนมของมนุษย์นั้นจะประกอบด้วยเบสทั้ง 4 ชนิดนี้ ที่มีการเรียงต่อยาวประมาณ 3 พันล้านตัว เบสทั้ง 4 ตัวนี้ จะมีการเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบ มีทั้งที่เป็นสารพันธุกรรมที่เป็นรหัสสร้างโปรตีน และสารพันธุกรรมที่ไม่ใช่รหัสสร้างโปรตีน ซึ่งการจัดเรียงลำดับของสารพันธุกรรมนั้นต้องอาศัยเอนไซม์ในการตัดให้เป็นชิ้นๆ และทำการอ่านด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์ (Automate Genetic Analyzer) โดยขั้นตอนการศึกษาจีโนมทั้งหมดดังต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.1. การประกอบชิ้นส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ (DNA sequence assembly)

การประกอบชิ้นส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ หรือการ Assembly นั้นคือ การนำลำดับของเบสแต่ละชิ้นของสายดีเอ็นเอมาจัดเรียงหรือนำมาประกอบใหม่ จนได้รับลำดับคู่เบสของดีเอ็นเอทั้งหมดของจีโนม หลังจากได้รับลำดับดีเอ็นเอทั้งหมดของจีโนมแล้วขั้นตอนต่อไปคือ นำลำดับเบสที่เรียงกันเป็นสายยาว มาระบุว่ายีนนั้นมีกี่ชนิด มีจำนวนทั้งหมดกี่ยีนและแต่ละยีนนั้นมีหน้าที่ทำอะไรบ้าง เช่น จีโนมของมนุษย์มีประมาณ 35,000 ยีน จีโนมข้าวมี 33,000 - 50,000 ยีน การค้นพบลำดับเบสหรือการจัดเรียงตัวของเบส อะดีนีน (A) กวานีน (G) ไสโทซีน (C) และ ไทมิน (T) ที่ประกอบกันเป็นยีน และพบว่ายีนแต่ละตัวนั้นมีการจัดเรียงตัวของเบสที่ต่างกัน เปรียบเสมือนการอ่านค่าของคำที่มีการสะกดที่ต่างกันจึงทำให้มีหน้าที่ต่างกัน เพราะเบสในยีนถูกแปลรหัสเพื่อที่จะสร้างกรดอะมิโน โดยมีกฎว่า 3 ตัว ยีนจะถูกแปลรหัสและสร้างกรดอะมิโน 1 ชนิด เรียกว่า รหัสพันธุกรรม (Genetic Code) (ยงยุทธ, 2545) โดยขั้นตอนการทำ Assembly มีดังนี้ เริ่มจากการทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยการสกัดดีเอ็นเอ เมื่อดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์แล้ว ทำการแยกดีเอ็นเอเป็นชิ้นเล็กและต่อด้วยการแยกลำดับดีเอ็นเอ จากนั้นโปรแกรมที่ใช้สำหรับการ Assembly ดีเอ็นเอเพื่อให้โปรแกรมทำการจับคู่ที่ทับซ้อนกันของชิ้นส่วนเพื่อให้ได้ลำดับที่ต่อเนื่อง ลำดับที่ได้นั้นจะประกอบขึ้นมาใหม่ ขั้นตอนทั้งหมดจะถูกแสดงในรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.12 แสดงขั้นตอนของการ Assembly ของดีเอ็นเอ (ยงยุทธ, 2545)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2 การระบุตำแหน่งโดยการทำนายหน้าที่ของจีโนม (genome Annotation)

การ annotation คือ การระบุตำแหน่งที่ทราบแล้วและทำการเรียงลำดับของดีเอ็นเอทั้งหมดแล้ว ซึ่งสามารถทำการค้นหาตำแหน่งของยีนที่ต้องการหา ซึ่งมีอยู่ประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ ในจีโนมทั้งหมด การค้นหานี้อาจจะทำโดย คำนวณรหัสที่สามารถบ่งชี้การเริ่มต้นและจุดสิ้นสุดของยีน ทำโดยการเปรียบเทียบกับยีนต้นแบบที่รู้จัก หรือเปรียบเทียบกันระหว่างจีโนมของสิ่งมีชีวิตที่ต่างชนิด ต่างสปีชีส์กัน เป็นต้น โดยหลักการทำงานของ annotation นั้นคือทำการเปรียบเทียบเพื่อที่จะหาความเหมือนหรือความคล้ายคลึงกัน ค่าความแตกต่าง ของลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอนั้น ๆ หรือลำดับกรดอะมิโนของสายโพลีเปปไทด์ของโปรตีนนั้น ๆ ที่ถูกเปรียบเทียบ (ยงยุทธ, 2545) ก่อนจะเริ่มการทำ annotation นั้น จำเป็นต้องผ่านการทำนายจีโนมก่อน โดยทำการเปรียบเทียบจีโนมที่ต้องการจะศึกษากับจีโนมต้นแบบที่อยู่ในฐานข้อมูล และทำการกำหนดลงบนสายอาร์เอ็นเอ เพื่อทำการหาและระบุตำแหน่งที่มีการ open reading frames (ORFs) บนสายจีโนมโดยใช้เครื่องมือที่สามารถระบุตำแหน่งยีน ได้แก่ Metagene Annotator หรือ Prodigal GeneMark ตำแหน่งของ open reading frames (ORFs) นั้นจะถูกทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่มีอยู่ก่อนแล้ว เช่น ฐานข้อมูลของ Genbank เครื่องมือที่ใช้ในการทำหน้าที่ของจีโนม (genome Annotation) แสดงในตารางที่ 2.6 (Seemann, 2014)

ตารางที่ 2.6 เครื่องมือที่ใช้ในการทำหน้าที่ของจีโนม (genome Annotation)

เครื่องมือ	ทำนายหน้าที่
Prodigal (Hyatt, 2010)	Coding sequence (CDS)
RNAmmer (Lagesen <i>et al.</i> , 2007)	Ribosomal RNA genes (rRNA)
Aragorn (Laslett and Canback, 2004)	Transfer RNA genes
SignalP (Petersen <i>et al.</i> , 2011)	Signal leader peptides
Infernal (Kolbe and Eddy, 2011)	Non-coding RNA

2.4.3 Average Nucleotide Identity (ANI)

Average Nucleotide Identity (ANI) คือค่าที่ใช้ในการวัดความคล้ายคลึงกันทางรหัสพันธุกรรมระดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างขอบเขตของสองจีโนมและการศึกษาก่อนหน้านี้มีการวิจัยชี้ให้เห็นว่าค่า ANI เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและมีความสำคัญมากเป็นพิเศษสำหรับการวัดความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในหมู่สายพันธุ์แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องอย่างใกล้ชิด เช่น ค่า ANI สูงกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง

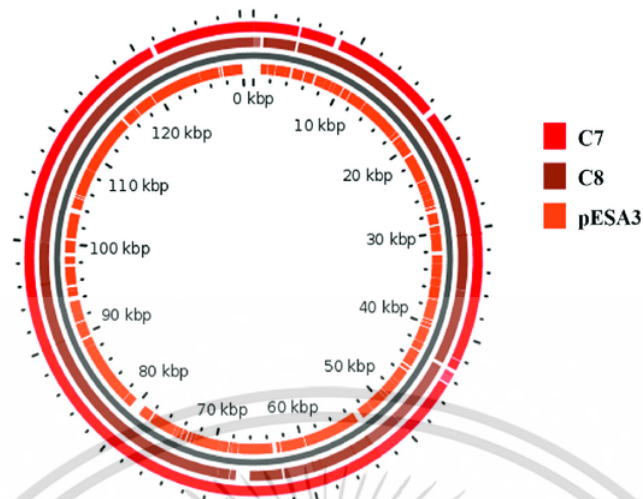
โดยทั่วไปนั้นค่าความสอดคล้องของลำดับยีน rRNA นั้นต้องมากกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ ถึงจะระบุได้ว่าแบคทีเรียผู้นั้นอยู่ในสายพันธุ์นั้น ๆ (Konstantinidis *et al.*, 2005) การคำนวณค่าของ Average Nucleotide Identity (ANI) จำเป็นต้องใช้โปรแกรมทางคอมพิวเตอร์มาช่วยคำนวณ เช่น โปรแกรมของ Gegenees หรือของ JSpecies เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีโปรแกรมที่เปิดใช้ทางสื่อออนไลน์อีกมากมายเช่น EzGenome (<http://www.ezbiocloud.net>) (Mincheol *et al.*, 2014)

2.4.4 เทคนิค Digital DNA-DNA hybridization (dDDH)

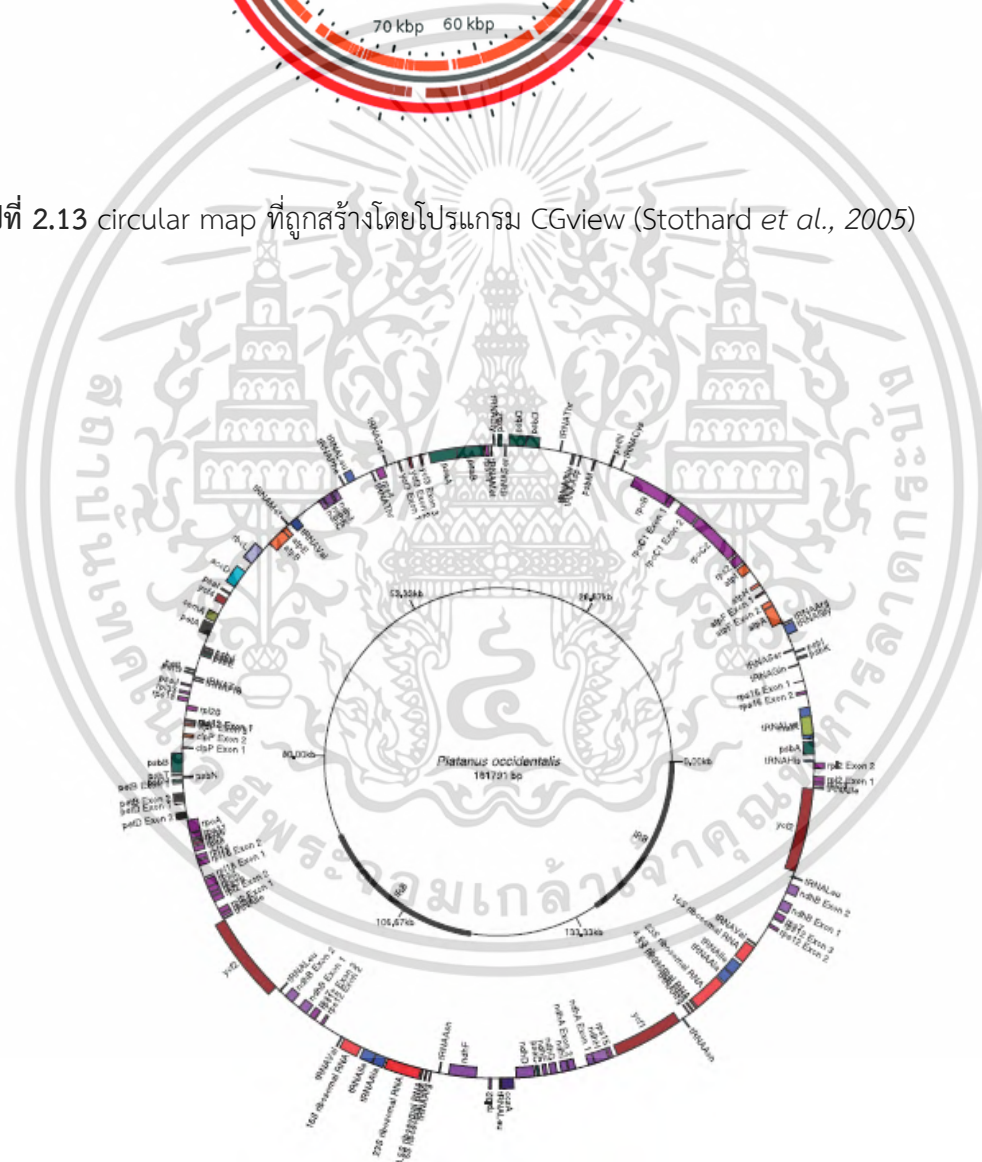
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางเมตาบอลิซึมสามารถนำมาใช้เพื่อจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ได้ในระดับหนึ่ง แต่คุณสมบัติและลักษณะที่สามารถได้รับการยอมรับของความต่างกันของรูปร่างลักษณะนั้นมีความจำเพาะไปในแต่ละสายพันธุ์ ด้วยเหตุนี้ปัจจุบันจึงจำเป็นต้องพิจารณาหัตถทางพันธุกรรม จีโนม คุณสมบัติต่าง ๆ มากขึ้น ดังนั้นเทคนิค Digital DNA-DNA hybridization จึงถูกพัฒนาขึ้นมา โดยการใ้ระบบคอมพิวเตอร์มาช่วยในการคำนวณ (*in silico*) โดยการคำนวณจำเป็นต้องมีโปรแกรมสำเร็จรูปมาช่วยในการคำนวณ โปรแกรมคำนวณในปัจจุบันที่มีให้เลือกใช้ได้แก่ Genome-To-Genome Distance Calculator (GGDC) (<https://ggdc.dsmz.de/ggdc.php>) ซึ่งโปรแกรมหัดกล่าวนี้ จะรับรองข้อมูลของจีโนมที่สมบูรณ์แล้วทั้งหมด (complete genome) และได้รับข้อมูลจีโนมที่ผ่านการเชื่อมต่อสารตีเอ็นเอ (assembly) มาแล้ว (Alexander *et al.*, 2010)

2.4.5 แสดงผลของจีโนมด้วย Circular map

การแสดงผลของจีโนมด้วยการทำให้ออกมาเป็นรูปภาพ (Genomic data visualization) นั้น ทำให้เข้าใจมากขึ้นเพราะเนื่องจากการศึกษาในปัจจุบันนั้นมีความก้าวหน้าขึ้น การรายงานผลของจีโนมเลยมีความหลากหลายมากขึ้น และในปัจจุบันนั้นจีโนมของแต่ละสายพันธุ์เริ่มมีการเพิ่มขึ้นอยู่ตลอดเวลา จึงจำเป็นต้องมีการแสดงผลของข้อมูลที่มีมากขึ้น เลยจำเป็นต้องทำแบบจำลองขึ้นมาเพื่อที่จะใช้ในการแสดงผล ซึ่งสิ่งนี้มีบทบาทอย่างมากในการช่วยวิเคราะห์ข้อมูลของจีโนมที่ทำการวิจัย และยังสามารถอธิบายความสัมพันธ์ของข้อมูลต่าง ๆ ที่ได้รับ ซึ่งการแสดงผลการจำลองนี้เรียกว่าการสร้าง circular map เป็นแผนการจำลองของจีโนมที่มีลักษณะเป็นรูปวงกลม ที่ด้านในวงกลมนั้นจะแสดงข้อมูลของจีโนมที่เราได้รับมาทั้งหมด การสร้าง circular map นั้นจำเป็นต้องการใช้เทคโนโลยีคอมพิวเตอร์มาช่วยในการสร้าง โดยโปรแกรมที่ใช้ได้แก่ CGview (<http://wishart.biology.ualberta.ca/cgview/>) (รูปที่ 2.13) GenomeVx (<http://wolfe.ucd.ie/GenomeVx/>) (รูปที่ 2.14) เป็นต้น



รูปที่ 2.13 circular map ที่ถูกสร้างโดยโปรแกรม CGview (Stothard *et al.*, 2005)



รูปที่ 2.14 circular map ที่ผ่านการสร้างด้วยโปรแกรม GenomeVx (Gavin *et al.*, 2008)

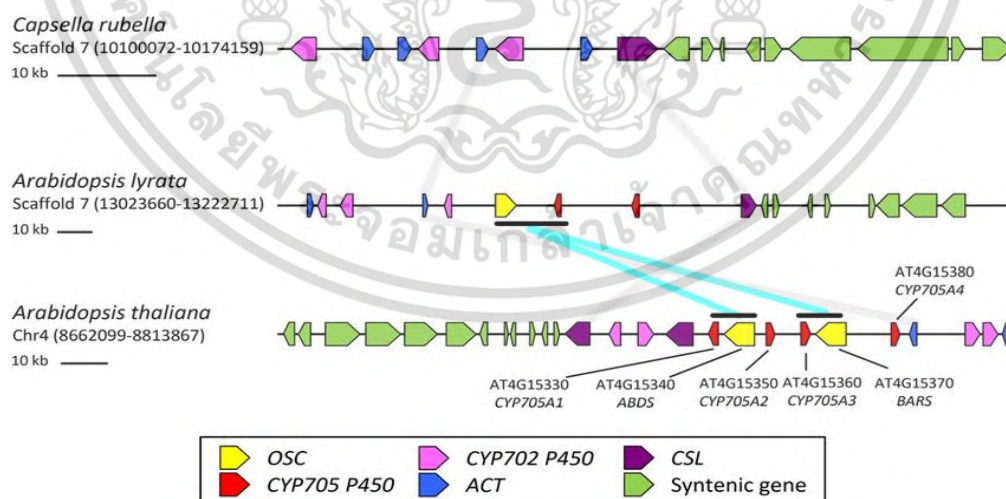
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.6 แสดงผลของจีโนมด้วย Synteny map

การศึกษาการทำ Synteny นั้นคือ การอธิบายการกระจายตัวของโครโมโซมแห่งเดียวกัน โดยจะอธิบายการเปรียบเทียบตำแหน่งของโครโมโซมในสปีชีส์นั้น ๆ มีความใกล้เคียงกับโครโมโซมที่ใช้ในการเปรียบเทียบหรือไม่จะทำการเปรียบเทียบแบบเส้นต่อเส้น โดยการสร้าง Synteny map นั้นจะต้องอาศัยหลักการของยีนที่มีความใกล้เคียงกัน (Homologous gene) เพื่อทำการเปรียบเทียบความคล้ายกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโครงสร้างของจีโนมนั้น ๆ (Song *et al.*, 2004) ซึ่งกว่าจะ Synteny map ออกมานั้นต้องใช้เวลาคำนวณของอัลกอริทึมมาคำนวณด้วยระบบคอมพิวเตอร์เพื่อทำการแสดงผลออกมาเป็นภาพ (รูปที่ 2.15 และ รูปที่ 2.16)



รูปที่ 2.15 ขั้นตอนที่คำนวณด้วยระบบคอมพิวเตอร์



รูปที่ 2.16 แผนภาพการเปรียบเทียบของ synteny map (Wang *et al.*, 2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.7 ฐานข้อมูลของ antiSMASH

ในปัจจุบันนั้นแบคทีเรียและเชื้อราจะประกอบไปด้วยกลุ่มของยีนที่มีประมาณ 40 ยีนที่จะสามารถนำมาถอดรหัสได้และยังสามารถผลิตสารทุติยภูมิได้อีกหลากหลายชนิด ดังนั้นข้อมูลจำพวกนี้จึงมีมากมายและมีการถูกค้นพบอยู่ทุกวัน ดังนั้นฐานของข้อมูลที่ทำกรรองรับข้อมูลเหล่านี้คือ ฐานข้อมูลของ antiSMASH ซึ่งฐานข้อมูลของ antiSMASH นั้นจะทำการรวบรวมข้อมูลของกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมินั้น ๆ ตัวฐานข้อมูล antiSMASH มีระบบปฏิบัติการที่สามารถค้นหาหรือวิเคราะห์กลุ่มยีนที่ได้จากข้อมูลจำพวก complete genome และ draft genome ได้ ทำให้สะดวกต่อการที่จะศึกษาทางพันธุศาสตร์ของเชื้อและยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการทดลองเป็นอย่างมาก (<http://antismash.secondarymetabolites.org/>) (Weber *et al.*, 2015)

2.4.8 แผนภูมิตายวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) (สมชาย, 2551)

แผนภูมิตายวิวัฒนาการหรือแผนภูมิตายวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) นั้นคือการนำข้อมูลทางสัณฐานวิทยาที่นำแต่ลำดับนิวคลีโอไทด์และโปรตีนของยีนต่าง ๆ ที่เป็นแบบ ออร์โธล็อก (orthologue) โดยการต้นไม้แห่งสายวิวัฒนาการนั้นจำเป็นต้องมีส่วนประกอบดังต่อไปนี้คือ กิ่งหรือแขนง (branch) และกิ่งนั้นยังสามารถแยกย่อยเป็นสองทาง (bifurcation) หรือเป็นกิ่งย่อย ๆ ที่มากกว่าสองกิ่ง (multifurcation) ได้ ตำแหน่งที่แตกออกไปจากกิ่งย่อยเป็นจุดนั้นจะเรียกว่า โหนด (node) ซึ่งจะเป็นด้านปลายสุดของลำดับเบส ส่วนใบ (leaf) หรือ แทกซอน (taxon) หรือ หน่วยอนุกรมวิธานเชิงปฏิบัติการ (operational taxonomic unit; OTU) ในนั้นจะมีสปีชีส์ของสิ่งมีชีวิตอยู่ตรงตำแหน่งนั้น ๆ ถ้าทำการพิจารณาแผนภูมิตายวิวัฒนาการเป็นกราฟนั้น ส่วนยอด (vertex) ก็คือโหนด แขนงตรงข้าง ๆ ที่ทำการต่อกับโหนดมีลักษณะเป็นเส้นขอบ (edge) แต่ว่าต้นไม้แห่งสายวิวัฒนาการนั้นอาจจะมีจุดกำเนิดร่วมกันหรือตำแหน่งนี้จะเรียกว่า ราก (rooted tree) ซึ่งจะมีจุดยอดเป็นตำแหน่งของบรรพบุรุษร่วมกันของแทกซา (taxa) หรืออาจจะไม่มีราก (unrooted tree) ก็ได้แสดงอยู่ในรูป 2.17

การสร้างแผนภูมิตายวิวัฒนาการ มีโปรแกรมสำหรับสร้างที่เน้นการสร้างแผนภูมิตายวิวัฒนาการที่ดีที่สุด โดยหลักการสร้างมีอยู่ดังนี้

1) การรวบรวมของชุดข้อมูล

การค้นหาและทำการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ ฐานข้อมูลที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ EMBL (<https://www.ebi.ac.uk/>) NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) เพื่อนำมาทำการบลาส (blast)

2) การนำลำดับทั้งหมดมาทำการจัดเรียง

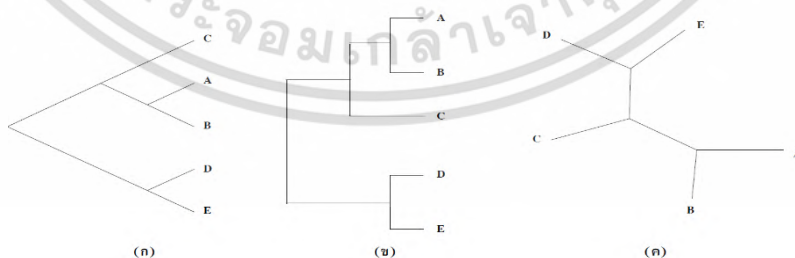
การจัดเรียงนั้นจำเป็นต้องใช้โปรแกรมทางคอมพิวเตอร์มาช่วย เช่น โปรแกรม ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) ข้อมูลที่ได้รับนั้นอาจจะเกิดช่องว่างที่เรียกว่า gap ดังนั้นจำเป็นต้องนำมาแก้ไขด้วยตนเองอีกครั้งด้วยโปรแกรม BioEdit

3) การเลือกใช้วิธีวิเคราะห์โมเดลและโปรแกรมสำหรับการสร้างต้นไม้แห่งสายวิวัฒนาการ

a. การเลือกที่จะสร้างแผนภูมิสายวิวัฒนาการจากลำดับของดีเอ็นเอหรือลำดับของโปรตีน ถ้าเกิดว่าลำดับของโปรตีนมีความใกล้เคียงกันมากจะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอมากด้วยเช่นกัน ดังนั้นควรใช้ลำดับดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์ที่ห่างกันมาก

a. การเลือกที่จะสร้างแผนภูมิสายวิวัฒนาการแบบมีรากหรือไม่มีราก การพิจารณาเพื่อตรวจสอบว่ากลุ่มยีนเป็นออร์โธลอกกันหรือไม่ อาจจำเป็นต้องใช้แผนภูมิสายวิวัฒนาการแบบไม่มีรากแต่ในปัจจุบันการสร้างแผนภูมิสายวิวัฒนาการมักจะมีราก คือแผนภูมิสายวิวัฒนาการที่สามารถแสดงบรรพบุรุษร่วมของทุกแทกซา ที่จำเป็นต้องศึกษาเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อความเข้าใจในกระบวนการวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต การสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการแบบมีราก มีอยู่สองวิธีได้แก่ เริ่มจากการใส่รากกลุ่มเข้าหาในกลุ่มโดยเลือกข้อมูลจำพวกนอกกลุ่มหรือลำดับที่ถูกจำลองมา โดยใช้ข้อมูลลำดับจากเซลล์หนึ่งไปใช้เป็นฐานข้อมูลกลับอีกเซลล์หนึ่ง

b. การจัดเรียงข้อมูลโดยแต่ละคอลัมน์นั้นการจัดเรียงจะเริ่มตั้งแต่ลำดับที่เป็นโฮโมโลกัสกัน กล่าวคือเริ่มจากวิวัฒนาการตำแหน่งเดียวกันบนลำดับเบสเดียวกันโดยไม่มีการตัดลำดับเบสใด ๆ ออก จากนั้นทำการตัดส่วนที่เป็นช่องว่างทั้งหมดทั้งคอลัมน์ที่ยังคลุมเครือออกให้หมด ซึ่งจะทำให้แผนภูมิสายวิวัฒนาการนี้มีคุณสมบัติที่ดีขึ้น



รูปที่ 2.17 องค์ประกอบสำคัญของแผนภูมิสายวิวัฒนาการรูป ก และ ข นั้นแสดงแผนภูมิสายวิวัฒนาการชนิดที่มีรากโดยรูป ข จะมีลักษณะเป็นเส้นแนวนอนส่วนรูป ค เป็นแบบไม่มีราก (สมชาย, 2551)

2.5 การศึกษาสารทุติยภูมิของ *Streptomyces*

ขั้นตอนการศึกษาสารทุติยภูมิของ *Streptomyces* เป็นขั้นตอนที่สำคัญของการศึกษาสารที่ *Streptomyces* ผลิตได้ เพื่อที่จะทราบว่า *Streptomyces* ที่เรานำมาศึกษานั้นมีสารที่เป็นประโยชน์มากน้อยเท่าไร โดยจะเริ่มการศึกษาจาก การเพาะเลี้ยง การสกัด การแยกสาร และการศึกษาโครงสร้างของสารที่แยกได้

2.5.1 การศึกษาการเพาะเลี้ยง

การศึกษาขั้นตอนการเพาะเลี้ยงมีความสำคัญอย่างมากต่อการผลิตสารของ *Streptomyces* เพราะสารที่ถูกผลิตออกมานั้นจะมีอยู่จำนวนมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับวันที่ทำการเพาะเลี้ยงอยู่ที่ระยะเวลาประมาณ 7 - 14 วัน เพราะถ้าเกิดเลี้ยงนานกว่าเวลาดังกล่าวสารอาหารที่ทำการจัดเตรียมไว้จะหมดทำให้เชื้อ *Streptomyces* หยุดการผลิตสารและทำให้สารเสียสภาพหรือบางชนิดอาจจะหาแหล่งพลังงานใหม่โดยการใช้สารทุติยภูมิที่ผลิตเองมาเป็นแหล่งพลังงานเอง ทำให้เราได้รับสารที่ต้องการจะศึกษาน้อยลง (ชัยสิทธิ์, 2558)

2.5.2 การศึกษาการสกัด (extraction)

คือขบวนการแยกสารสกัดหยาบจากสิ่งที่เราต้องการนำมาศึกษาโดยใช้ของเหลวชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติการละลายในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน โดยตัวทำละลาย (solvent) ซึ่งการสกัดนั้นแบบวิธีการสกัดออกเป็น 2 แบบ คือ

2.5.2.1. การสกัดแบบของแข็งกับของเหลว (Solid-Liquid Extraction) ใช้ในการสกัดสารออกมาโดยใช้ตัวทำละลาย ละลายส่วนประกอบที่เป็นของแข็งที่ต้องการทำการสกัด เช่น ต้องการสกัดตัวเซลล์ จำเป็นต้องผ่านขั้นตอนนี้คือ นำตัวเซลล์ที่เจริญครบตามกำหนดมาแช่ด้วยตัวทำละลายที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจนกระทั่งมีสารออกมากับตัวทำละลายมากที่สุด การแช่นั้นมักจะใช้ระยะเวลา 1-3 วัน แล้วแต่ตัวอย่างที่เรานำมาศึกษา โดยที่ตัวเซลล์คือของแข็ง ตัวทำละลายคือของเหลว หลังจากนั้นจะทำการกรองแยกโดยการกรองเพื่อแยกตัวเซลล์ออกจากตัวทำละลาย จะได้รับสารสกัดหยาบ (Crude Extract) โดยสารละลายที่ถูกนำมาใช้ ได้แก่ เมทานอล อะซิโตน เป็นต้น (Handley, 1999)

2.5.2.2. การสกัดแบบของเหลวกับของเหลว (Liquid-Liquid Extraction) เป็นการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายใหม่สกัดออกมาจากสารละลายที่เป็นของเหลว ซึ่งตัวทำละลายที่เติมส่วนมากนั้นมักจะเป็นของเหลวหรือจะอยู่ในรูปแบบน้ำ อุปกรณ์ส่วนใหญ่ที่ใช้ได้แก่ กรวยกรองแยก (separatory funnel) การสกัดด้วยวิธีนี้จำเป็นต้องพิจารณาตัวทำละลายที่เหมาะสมซึ่งสามารถพิจารณาได้ด้วยข้อมูลเหล่านี้คือ ต้องสามารถละลายสารที่ต้องการนำมาศึกษาให้ออกจากสารละลายได้ที่อุณหภูมิห้อง ต้องมาละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลายจนเป็นเนื้อเดียวกันและควรจที่จะมีจุดเดือดที่ต่ำเพื่อให้ง่ายต่ออากาศ และตัวทำละลายนั้นต้องไม่ผสมกับสารตัวอย่าง (นันทวัน, 2555)

2.6 โครมาโทกราฟี (Chromatography)

เป็นเทคนิคการแยกสารบริสุทธิ์ออกมาจากสารตัวอย่างเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในปัจจุบันเป็นอย่างมาก เพื่อที่แยกสารที่ผสมออกจากกัน หลักการของโครมาโทกราฟีคือการแยกสารออกจากกันโดยอาศัยเฟส (phase) อย่างน้อย 2 ชนิด ซึ่งเฟส 2 ชนิด ได้แก่ เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) และเฟสคงที่ (stationary phase) โดยสารตัวอย่างนั้นจะเริ่มเคลื่อนที่ผ่านจากเฟสคงที่ โดยตัวที่จะนำพาสารไปจะเป็นเฟสเคลื่อนที่ซึ่งสารตัวอย่างนั้นจะค่อยๆเคลื่อนที่ผ่านเฟสคงที่ในอัตราการไหลนั้นจะขึ้นอยู่กับปฏิกิริยาที่ต่อกันระหว่างสารตัวอย่างและสารที่อยู่ในเฟสคงที่ กับเฟสเคลื่อนที่ เช่นสารที่สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีในเฟสคงที่ นั้นจะทำให้อัตราการไหลนั้นช้าเฟสคงที่ นั้นมีทั้งหมด 2 ชนิด ได้แก่เฟสคงที่ที่มีสถานะเป็นของเหลว และเฟสคงที่ที่มีสถานะเป็นของแข็ง ซึ่งถ้าเฟสคงที่ที่มีสถานะเป็นของแข็งนั้นจะถูกเรียกว่า absorption หรืออีกชื่อหนึ่งจะเรียกว่า sorption จะมีหน้าที่หลักคือการดูดซับสารได้ชั่วคราวสำหรับเฟสคงที่ที่มีสถานะเป็นของเหลวนั้นอาจจะมีสารเคลือบบาง ๆอยู่บนเม็ดของของแข็งซึ่งที่นิยมใช้นั้นคือ ซิลิกาเจล (silica gel) และ sephadex lh-20 ซึ่งข้อแตกต่างของซิลิกาเจล กับ sephadex lh-20 คือ ซิลิกาเจลจะแยกสารตัวอย่างโดยอาศัยหลักการแยกแบบมีขั้วจะอยู่กับจำพวกมีขั้ว และต้องใช้ตัวทำละลายอย่างน้อย 2 ชนิดขึ้นไป ส่วน sephadex lh-20 นั้นอาศัยหลักการแยกขนาดซึ่งสารตัวอย่างที่มีขนาดใหญ่กว่าจะออกมาก่อนสารที่มีขนาดเล็กเพราะสารที่มีขนาดเล็กต้องไหลผ่านรูพรุนที่อยู่ในเม็ด sephadex lh-20 ก่อนถึงจะไหลออกมาได้ และ sephadex lh-20 มักนิยมใช้ตัวทำละลาย 1 ชนิด โดยชนิดตัวทำละลายที่ใช้ทั่วไปมักจะเป็นเมทานอลข้อดีของการใช้ ซิลิกาเจล คือ ราคาถูกกว่า แต่การที่จะหาตัวทำละลายที่จะแยกสารตัวอย่างออกอย่างชัดเจนนั้นต้องทำการหาตัวทำละลายที่เหมาะสมเป็นเวลานานและเมื่อได้แยกสารหุติยภูมิออกมาได้นั้นขั้นตอนการกลั่นนั้นไม่สามารถนำตัวทำละลายกลับมาใช้ใหม่ได้ ซิลิกาเจลอาจจะไม่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้เพราะบางครั้งสารตัวอย่างนั้นจะติดอยู่กับเฟสคงที่เป็นจำนวนมากจึงไม่สามารถนำกลับมาใช้กับตัวอย่างอื่น ๆ ต่อไปได้ ส่วน sephadex lh-20 มีราคาที่สูง ใช้ตัวทำละลายอย่างน้อย 1 ชนิดถ้าผ่านขบวนการแยกสารหุติยภูมิออกจากตัวทำละลายสามารถนำตัวทำละลายกลับมาใช้ได้ใหม่และยังสามารถนำ sephadex lh-20 นั้นกลับมาใช้ได้ใหม่ (Bellahcene, 2018)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column chromatography) โดยวิธีนี้จำเป็นต้องใช้คอลัมน์แก้ว ซึ่งมีลักษณะเปิดปิดได้ด้านล่างลักษณะเหมือนก๊อก ด้านในจะต้องบรรจุผงดูดซับ (adsorbent) ซึ่งต้องผสมตัวทำละลายไปส่วนหนึ่งและทำการเคาะคอลัมน์ให้ผงและตัวทำละลายแน่นเพื่อที่จะแยกสารตัวอย่างออกเป็นชั้นได้อย่างง่ายเวลาเก็บสารแต่ละชั้นหรือแต่ละ fractions การละลายสารตัวอย่างนั้นจำเป็นต้องละลายโดยใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกัน เมื่อละลายตัวอย่างเสร็จแล้ว เราจะเติมตัวทำละลายที่มีตัวอย่างลงไปคอลัมน์ ตัวทำละลายนั้นจะพาสารตัวอย่างผ่านผงดูดซับจนเกิดแถบสี (color bands) ของแต่ละชั้นสีออกจากกัน (ในกรณีนี้จะเกิดขึ้นได้เพราะสารตัวอย่างมีสีของตัวเอง) แต่ถ้าสารตัวอย่างนั้นไม่มีสีเราสามารถใส่แสงอุลตราไวโอเลตส่องดูแถบสีได้ เป็นต้น

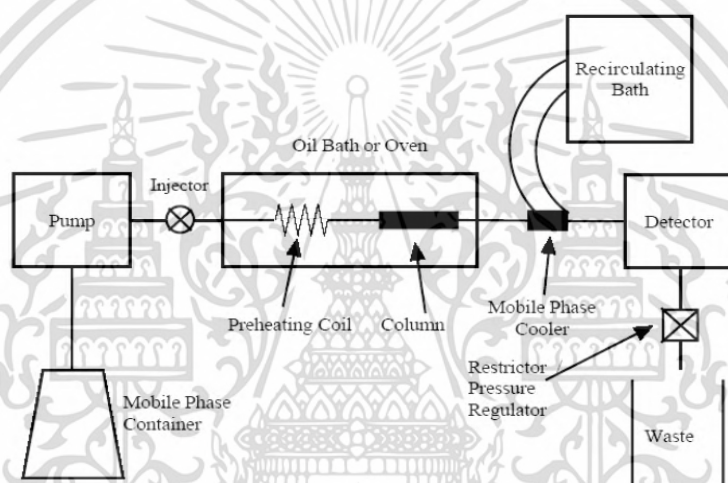
สารทฤษฎีภูมินั้นมักจะมีโครงสร้างที่ซับซ้อนและมีความหลากหลายอย่างมาก ผู้ที่จะทำการทำนายโครงสร้างของสารทฤษฎีภูมินั้นจำเป็นต้องมีความรู้เฉพาะทางที่สูงมากรวมถึงการวิเคราะห์ผลที่ได้จากเทคนิคอื่น ๆ ประกอบเข้าด้วยกัน ซึ่งแต่ละเทคนิคนั้นต้องอาศัยข้อมูลที่สามารถส่งเสริมกันและกันเพื่อที่จะได้วิเคราะห์โครงสร้างของสารทฤษฎีภูมินั้น ๆ ออกมาได้อย่างถูกต้อง ซึ่งข้อมูลที่จะส่งเสริมกันได้มีทั้ง โครงสร้าง น้ำหนักโมเลกุล ค่า optical rotation และทิศทางของแต่ละ stereo center ค่าของแมสสเปกโตรเมทรี เป็นต้น เครื่องมือที่ถูกใช้ในปัจจุบันั้นสามารถอำนวยความสะดวกให้แก่ผู้วิเคราะห์โครงสร้างของสารอย่างมากว่าแต่ก่อน ไม่ว่าจะเป็น LC/MS/MS ที่สามารถทราบได้ถึงน้ำหนักโมเลกุลของสารเหล่านั้นและยังสามารถบอกได้ว่าโครงสร้างของสารหน้าตาประมาณไหน มีโครงสร้างตรงไหนที่สำคัญ โดยจะทราบได้จากแต่ละ fragment ที่สามารถแตกตัวออกมาจากองค์ประกอบกับข้อมูลที่ได้จากเทคนิคที่เรียกว่า Nuclear Magnetic Resonance ทั้งที่เป็นประเภท ¹Dimension-NMR และ ²Dimension-NMR สามารถบอกได้ถึงองค์ประกอบของธาตุคาร์บอน ออกซิเจน ไนโตรเจน ไฮโดรเจน และธาตุอื่น และยังสามารถบอกได้ว่าแต่ละองค์ประกอบอยู่ตำแหน่งไหนอย่างไร เป็นต้น และยังมีอีกเทคนิคที่เรียกว่า Infrared spectroscopy ที่สามารถบอกได้ถึงหมู่ฟังก์ชันบนสารประกอบ เช่น เอมีน หมู่คาร์บอนิล หมู่ไฮดรอกซิล เป็นต้น (Bovey, 1987)

2.6.1 เครื่องโครมาโทกราฟี ของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC)

เครื่องโครมาโทกราฟี ของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้แยกสารภายใต้ความดันของของเหลว ซึ่งวิธีนี้สามารถทำให้ได้คุณภาพการวิเคราะห์และได้ปริมาณการวิเคราะห์ วิธีนี้เป็นที่นิยมมากกับงานด้านต่าง ๆ เช่น ทางด้านการแพทย์ ทางด้านเภสัชกรรม ในงานด้านงานวิจัย งานด้านอุตสาหกรรม เป็นต้น ซึ่งเทคนิค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงนี้ยังสามารถใช้แยกสารผสมได้ ซึ่งตัวสุบนี้อาจทำการสูบล้างที่ทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งเฟสเคลื่อนที่นี้จะทำการพาสารตัวอย่างเข้าไปในหน่วยฉีดสาร ที่จะผ่านอนุภาคที่เป็นเฟสคงที่ (stationary phase) เมื่อผ่านเฟสคงที่ที่เสร็จแล้ว สารตัวอย่างจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์และถูกแยกออกมาเป็นสารบริสุทธิ์ หลังจากแยกออกมาแล้วจะผ่านเข้าสู่ตัวเครื่องวัดสัญญาณในเวลาที่แตกต่างกัน สัญญาณที่ได้นั้นจะอยู่ในรูปไฟฟ้าตามเวลาและปริมาณของสารแต่ละตัวที่สามารถวัดได้ จากนั้นสัญญาณจะถูกส่งกลับไปยังเครื่องบันทึกสัญญาณเพื่อแสดงผลออกมาเป็นโคโมโทแกรม โดยทั่วไปนั้น (กมลรัตน์ และปิยะดา, 2559) เครื่องมือของโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงจะมีส่วนประกอบที่สำคัญอยู่ 6 ส่วน (รูปที่ 2.18) (ชูติมา, 2546) คือ



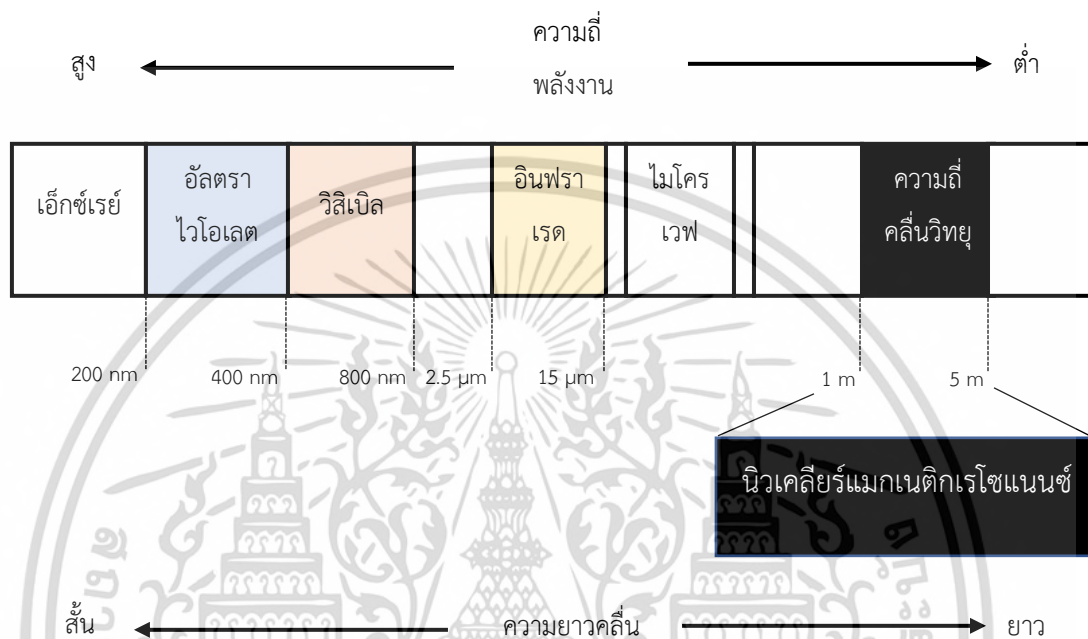
รูปที่ 2.18 องค์ประกอบของเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) (ชูติมา, 2546)

2.7 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี (NMR spectroscopy)

สเปกโตรเมตรีนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry ; NMR) เป็นการศึกษาข้อมูลของการดูดกลืนแสงของพลังงานแม่เหล็กไฟฟ้าโดยนิวเคลียสในอะตอมของโมเลกุลในรูปแบบที่นอกเหนือจากสเปกโตรเมตรีอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet Spectrometry; UV) (รูปที่ 2.19) โดยค่าของสเปกโตรเมตรีนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์นั้น นิวเคลียสถูกวางอยู่ในสนามแม่เหล็กที่มีความแรงของค่าหนึ่งๆ จึงสามารถดูดกลืนพลังงานแม่เหล็กไฟฟ้าในช่วงความถี่ของวิทยุ (radiofrequency; rf) หากนิวเคลียสที่ทำการศึกษาคือนิวเคลียสของอะตอมไฮโดรเจนหรือโปรตอนจะถูกเรียกว่า นิวเคลียสแมกเนติกเรโซแนนซ์ของโปรตอน (Proton NMR; $^1\text{H-NMR}$) ค่าที่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะเกี่ยวกับจำนวนและชนิดของโปรตอนที่อยู่โมเลกุลของสารที่นำมาศึกษา และนิวเคลียสของคาร์บอน จะเรียกว่า นิวเคลียสแมกเนติกเรโซแนนซ์ของคาร์บอน (Carbon NMR; ^{13}C -NMR) (เย็นททัย, 2549) ซึ่ง ข้อมูลทางนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปีที่จะใช้ในการหาโครงสร้างประกอบด้วย



รูปที่ 2.19 รังสีคลื่นแม่เหล็ก

2.7.1 โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (^1H -NMR)

เป็นการศึกษาสมบัติของนิวเคลียสในอะตอม ในนิวเคลียสของอะตอมจะมีประจุที่สามารถหมุนรอบตัวเองได้ (spin) ทำให้เกิดขั้วแม่เหล็ก (magnetic dipole) ตามแกนของนิวเคลียส โปรตอนที่อยู่ในนิวเคลียสของอะตอมไฮโดรเจนสามารถหมุนได้จึงทำให้เกิดโมเมนต์แม่เหล็ก (magnetic moment; μ) ขึ้น เมื่อโปรตอนดังกล่าวอยู่ในสนามแม่เหล็กภายนอก (B_0) จะส่งผลต่อการหมุนของโปรตอนได้ 2 แบบ คือ หมุนในทิศเดียวกันกับสนามแม่เหล็ก B_0 อีกแบบหนึ่งคือ หมุนในทิศตรงข้ามกับสนามแม่เหล็ก B_0 ในโมเลกุลหนึ่งของโปรตอนจะมีการวางตัวของอิเล็กตรอนที่ไม่เหมือนกันเนื่องจากอะตอมที่อยู่ข้างเคียง ทำให้โปรตอนเหล่านั้นมีความหนาแน่นของอิเล็กตรอนแตกต่างกันและได้รับผลจากสนามแม่เหล็กหลักและความถี่คลื่นวิทยุที่ให้เข้าไปไม่เท่ากันจึงเกิดเรโซแนนซ์และปรากฏเป็นสัญญาณที่ตำแหน่งต่างๆ เรียกว่าค่าเคมีคัลชิฟ (chemical shift) ของโปรตอนนั้นโดยปกติค่าเคมีคัลชิฟของโปรตอนจะปรากฏในช่วงประมาณ 0-12 ppm (อรอุมา, 2547)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.2 คาร์บอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (Carbon-Nuclear Magnetic Resonance; $^{13}\text{C-NMR}$)

ข้อมูลที่ได้จากคาร์บอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สามารถนำมาระบุโครงสร้างทางเคมีของสารอินทรีย์ต่างๆ ข้อมูลที่ได้จาก $^{13}\text{C-NMR}$ ก็เช่นเดียวกับข้อมูลที่ได้จาก $^1\text{H-NMR}$ คือบอกให้ทราบถึงจำนวนและชนิดของคาร์บอนที่มีอยู่ในโมเลกุลของสาร และที่สำคัญมากที่สุดคือ ทำให้ทราบถึงการจัดเรียงตัวของคาร์บอนซึ่งเป็นโครงสร้างหลักในโมเลกุลของกลุ่มสารต่างๆ (อรอุมา, 2547) ซึ่งค่าเคมีคัลชิฟของคาร์บอนที่มีหมู่แทนที่ (saturated carbon) จากปรากฏในช่วงประมาณ 8-60 ppm และถ้ามีอะตอมที่มีสภาพไฟฟ้าลบ (electronegative atom) อยู่ข้างเคียงจะเกิดการส่งเสริมของสนามแม่เหล็กไฟฟ้า ทำให้สัญญาณของคาร์บอนตัวนั้นไปปรากฏที่บริเวณสนามต่ำที่ประมาณ 40-70 ppm สำหรับคาร์บอนที่มีพันธะคู่หรือสาม (unsaturated carbon) และคาร์บอนในสารประกอบแอโรแมติก (aromatic carbon) สัญญาณจะปรากฏที่บริเวณ 100-150 ppm ส่วนคาร์บอนของหมู่คาร์บอนิล (carbonyl carbon) เช่น คาร์บอนในสารประกอบพวกอัลดีไฮด์ คีโตน กรดคาร์บอกซิลิก หรือ เอสเทอร์ สัญญาณจะปรากฏที่ตำแหน่งสนามต่ำมากของสเปกตรัม ประมาณ 155-200 ppm (ตารางที่ 2.7) (Pavia *et al.*, 1996)

ตารางที่ 2.7 ค่าเคมีคัลชิฟของคาร์บอนประเภทต่าง ๆ

ประเภทคาร์บอน	ตัวอย่างโครงสร้าง	ช่วงค่า chemical shift (ppm)
saturated carbon	R-CH_3	8 – 30
	$\text{R-CH}_2\text{-R}'$	20 – 45
	$\text{R}_3\text{-CH, R}_4\text{-C}$	30 – 60
	-C-O	50 – 70
	-C-X, X=Cl, Br, I	40 – 65
unsaturated carbon	C=C	100 – 145
aromatic carbon	C_6H_6	110 – 150
nitrile carbon	$\text{C}\equiv\text{N}$	110 – 135
carbonyl carbon	-COOH, -COOR,	155 – 185
	$\text{-COH, R-COR}'$	185 – 220

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.3 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์แบบ 2 มิติ (2-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance; 2D-NMR) (เอ็นทัย, 2549)

นอกจากเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ที่สามารถจำแนกชนิดของคาร์บอนประเภทต่างๆ ได้นั้น การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารทุติยภูมินั้นมีความซับซ้อนดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องอาศัยเทคนิคของนิวเคลียร์แมกเนติกส์เรโซแนนซ์แบบ 2 มิติ (2D-NMR) จะประกอบไปด้วย 3 แกน คือ แกนแรกคือ X (ค่า δ (ppm) หรือ J (Hz)) แกนที่สองคือ Y (ค่า δ (ppm) หรือ J (Hz)) และแกนที่สามคือ Z (ค่าความเข้มสัญญาณ) ค่าสเปกตรัมนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์แบบ 2 มิตินั้นสามารถพล็อตได้ 2 แบบ คือ แบบสแตก (stacked plot) และแบบคอนทัวร์ (contour plot) โดยจะทำการแปลงความเข้มของสัญญาณเป็นจุด ซึ่งมีความนิยมมากกว่าการสแตกพล็อต นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์แบบ 2 มิติ (2-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance; 2D-NMR) นั้นมีชนิดของสเปกตรัมเป็นความสัมพันธ์ระหว่างนิวเคลียสอะตอมเดียวกันหรือต่างชนิดกัน มีดังนี้

2.7.3.1 เทคนิคเอชเอ็มคิวซี (HMQC) หรือเอชเอ็มคิวซี (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence; HMQC) เป็นความสัมพันธ์ระหว่างอะตอมของคาร์บอนและไฮโดรเจนที่อยู่ห่างกันประมาณ 3 พันธะ

2.7.3.2 เทคนิคเอชเอสคิวซี (HSQC) เทคนิคนี้สามารถบอกได้ว่าอะตอมของไฮโดรเจนอยู่บนคาร์บอนใด

2.7.3.3 เทคนิคโคซีระหว่างโปรตอนกับโปรตอน (H-H COSY) เทคนิคที่เรียกว่า โคซี (Correlation Spectroscopy; COSY) นี้เป็นความสัมพันธ์ของอะตอมโปรตอนและโปรตอนข้างเคียงหรือโปรตอนที่อยู่ห่างกันไม่เกิน 3 พันธะ

2.7.3.4 เทคนิคโนซี นี้จะแสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนกับโปรตอนที่เกิดจากอันตรกิริยาผ่านช่องว่าง เนื่องจากผลเชิงนิวเคลียร์โอเวอร์เฮาเซอร์แล้วโปรตอนสองตัวที่เกิดการอันตรกิริยากันจะผ่านช่องว่าง และจะปรากฏพีกตรงข้ามในสเปกตรัมแบบ 2 มิติ ซึ่งสเปกตรัมทั้งสองนี้จะมีลักษณะคล้ายกันกัน โดยมีทั้งแกน X และแกน Y เป็นค่า δ (ppm) ของโปรตอน เทคนิคนี้ใช้เพื่อยืนยันโครงสร้างที่มีมากกว่า 1 ไอโซเมอร์ เช่น ไอโซเมอร์แบบซิส (cis-) และทรานส์ (trans-) ได้

2.7.4 แมสสเปกโตรเมตรี (Mass Spectrometry) (ณัฐธิดา, 2560)

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพสูงและเป็นที่ยอมรับในการหาวิเคราะห์หาสารและยังสามารถใช้ระบุโครงสร้างทางเคมีของสารที่ต่างกันได้ โดยจะตัวแมสสเปกโตรเมตรีจำเป็นต้องอาศัยหลักการเปลี่ยนสารตัวอย่างจากสถานะของแข็งไปเป็นของเหลวหรือก๊าซให้กลายเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก๊าซในรูปไอออน (gaseous ions) ซึ่งอาจจะมีการแตกตัวของสาร (fragmentation) หรืออาจจะไม่ก็ได้ โดยส่วนที่ทำหน้าที่ผลิตไอออน (ion source) จะเป็นตัวที่ให้พลังงานกับโมเลกุลของสารที่สูงเพียงพอ เพื่อให้ทำให้เกิดการไอออไนเซชันให้กลายเป็นไอออนของโมเลกุล

2.8 สารทุติยภูมิของ *Streptomyces*

สารทุติยภูมิ (secondary metabolite) เป็นสารประกอบทางเคมีที่สำคัญมากต่อสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่จะได้รับมาจากสิ่งมีชีวิตจำพวก พืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ ตามปกติทั่วไปแหล่งที่สามารถผลิตได้มากที่สุดคือ พืชจำพวกสมุนไพร ซึ่งทำให้สารทุติยภูมิจากพืชนั้นเป็นที่นิยมนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์อย่างมากมาตามท้องตลาดซึ่งการนำสารทุติยภูมิจากพืชนั้นมีการนำมาใช้ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1800 และหลังจากนั้นนักวิทยาศาสตร์ได้ค้นพบว่าจุลินทรีย์นั้นสามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีความหลากหลายที่อีกทั้งยังมีความแตกต่างที่พบในพืช (Bugni and Ireland, 2004) แอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ส่วนมากจะเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่มีมวลโมเลกุลต่ำสามารถยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ได้ด้วยที่มีความเข้มข้นน้อย ๆ สารปฏิชีวนะโดยประมาณ 2 ใน 3 หรือมากกว่า 4000 ชนิด ถูกพบในธรรมชาติมากกว่าการสังเคราะห์ขึ้นมา และส่วนมากพบสารในแอคติโนมัยสีท มักจะถูกนำไปใช้ในทางการแพทย์ เช่น chloramphenicol macrolides anthracyclines tetracyclines และ aminoglycosides เป็นต้น และยังมีสารอื่น ๆ ที่สามารถนำไปใช้ในต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมเวชสำอาง และอุตสาหกรรมอาหาร เป็นต้น หลังจากทีนักวิทยาศาสตร์นั้นได้ค้นพบว่าจุลินทรีย์นั้นสามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีความแปลกใหม่ได้นั้น จึงทำให้มีการศึกษาจุลินทรีย์มากยิ่งขึ้น ซึ่งต่อมากการศึกษาจุลินทรีย์นั้นได้ค้นพบว่าสามารถแยกได้จากดินนั้นจะมีความหลากหลายทางการผลิตสารทุติยภูมิมากกว่าที่แยกได้จากที่อื่น ๆ และยังมีฤทธิ์การต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคและมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้ (Bhatnagar and Kim, 2012) ดังนั้นสารทุติยภูมิที่ *Streptomyces* สามารถผลิตได้นั้นมีความสำคัญต่อมนุษย์มากในปัจจุบัน เพราะในบางกรณี *Streptomyces* นั้นสามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีความแปลกใหม่ ทางโครงสร้างเคมีของสารที่ทุติยภูมิและสารทุติยภูมิที่ถูกผลิตออกมานั้นบางครั้งก็ไม่มีควมจำเป็นต่อการดำรงชีวิตหรือการเจริญเติบโตของ *Streptomyces* ในบางสปีชีส์แต่สารทุติยภูมิที่ถูกผลิตออกมานั้นมีบทบาทสำคัญในการแข่งขันเพื่อที่จะมีชีวิตรอดในธรรมชาติหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของคู่แข่งหรือฆ่าแบคทีเรียรอบ ๆ ได้ ชนิดของสารทุติยภูมิที่ *Streptomyces* สามารถผลิตได้แสดงอยู่ในตารางที่ 2.8 และโครงสร้างของสารทุติยภูมิที่ถูกผลิตโดย *Streptomyces* แสดงอยู่ในตารางที่ 2.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9 สารต้านอนุมูลอิสระและอนุมูลอิสระ

2.9.1. อนุมูลอิสระ (free radicals)

อนุมูลอิสระ คือ โมเลกุล อะตอม หรือ สารประกอบที่มีอิเล็กตรอนโมเลกุลเดียว อยู่ในออร์บิทัลวงนอกและมีระดับพลังงานมากที่สุด เพราะเนื่องจากอิเล็กตรอนเดี่ยวไม่เสถียรพยายามจับคู่กับอิเล็กตรอนเดี่ยวอื่น จึงมีความไวสูงในการทำให้เกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่น ๆ (โอภา, 2550) อนุมูลอิสระหากเกิดขึ้นกับเซลล์จะสร้างความเสียหายกับเซลล์นั้นโดยจะทำปฏิกิริยากับไขมัน โปรตีน รวมทั้งโครงสร้างหรือเอนไซม์ และกรดนิวคลีอิก (ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ) ทำให้เกิดการเสียหายต่อเซลล์ และทำให้เซลล์ตายในที่สุด (Watson *et al.*, 2008)

2.9.2 สารต้านอนุมูลอิสระ (อัญญา, 2544)

สารต้านอนุมูลอิสระมีความสำคัญต่อกระบวนการออกซิไดซ์อนุมูลอิสระ คือ สารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยปกติสิ่งมีชีวิตมักจะมีกระบวนการป้องกันการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระพร้อมกับประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระมากมายหลายชนิดที่แตกต่างกันออกไปและรวมถึงการทำหน้าที่ที่หลากหลายด้วย ซึ่งประกอบไปด้วยที่เป็นทั้งเอนไซม์และไม่ได้เป็นเอนไซม์ สารประกอบที่สามารถละลายน้ำได้และสารประกอบที่ละลายน้ำไม่ได้แต่ละลายในไขมันแทน โดยสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มักจะมีกลไกการต้านอนุมูลอิสระด้วยกันหลากหลายแบบ เช่น การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอนไป (singlet oxygen quenching) ดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking) จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (metal chelation) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibition) เป็นต้น โดยสารต้านอนุมูลอิสระแบ่งเป็น 5 ประเภทใหญ่ๆ ดังนี้

1. Primary antioxidant

สารที่อยู่ในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ประกอบด้วย สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) ทำหน้าที่ในการหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่การเกิดอนุมูลอิสระในปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน รวมถึงสารโทโคฟีรอลธรรมชาติและสารสังเคราะห์ (Natural and synthetic tocopherol) alkyl gallate BHA BHT TBHQ และอื่น ๆ ซึ่งสารกลุ่มดังกล่าวทำหน้าที่ในการเป็นให้อิเล็กตรอน

2. Oxygen scavenger

สารกลุ่มนี้มักทำปฏิกิริยากับออกซิเจน จึงเป็นการช่วยในการกำจัดออกซิเจนระบบปิดได้ สารที่อยู่ในกลุ่มนี้ประกอบด้วย วิตามินซี หรือกรดแอสคอร์บิก เป็นต้น

3. Secondary antioxidant

สารกลุ่มนี้ทำหน้าที่ในการสลายโมเลกุลของ lipid hydroperoxide ให้เป็นสารที่มีความเสถียร สารกลุ่มนี้ได้แก่ ไดลอริลไทโอโพรพิออนเนต (dilauryl thiopropionate) และ thiopropionic acid

4. Enzymic antioxidant

สารกลุ่มนี้ทำหน้าที่จำกัดออกซิเจนหรืออนุพันธ์ของออกซิเจนโดยเฉพาะ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) สารกลุ่มนี้ประกอบด้วยเอนไซม์ต่าง ๆ ที่เป็น primary antioxidant enzyme และ auxiliary antioxidant enzyme

5. Chelating agent หรือ sequestrant

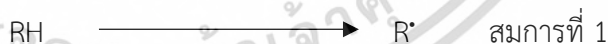
สารกลุ่มนี้ทำหน้าที่จับไอออนเหล็กหรือไอออนโลหะ เช่น ทองแดง เหล็ก ซึ่งไอออนนั้นจะเป็นไอออนที่สามารถส่งเสริมและเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ทำให้เกิดเป็นสารเชิงซ้อนที่มีความเสถียร

2.9.3 ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระ (โอภา, 2549)

ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระถูกจัดอยู่ในปฏิกิริยาลูกโซ่ (Free radical chain reaction) ซึ่งกลไกในการเกิดปฏิกิริยามีทั้งหมด 3 ขั้นตอน ดังนี้

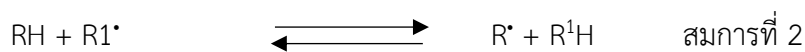
1. Initiation step

การเกิดอนุมูลอิสระในเซลล์เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาสลายพันธะด้วยน้ำ (Hydrolysis) รังสี (Radiolysis) แสง (Photolysis) หรือการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ (Redox reaction) และยังมีเอนไซม์ตัวอื่น ๆ ที่สามารถทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในเซลล์รวมไปถึงโมเลกุลที่มีความไวสูง ในการทำปฏิกิริยา อาทิเช่น singlet oxygen (1O_2) และ nitric oxide (NO) ปฏิกิริยาข้างต้นนั้นจะทำให้เกิดขั้นตอนอินิทิเอชัน ของปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระ ตามสมการที่ 1



2. Propagation step

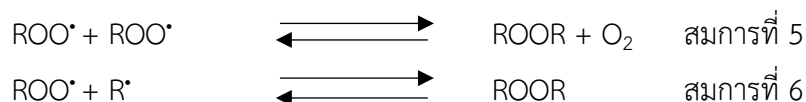
การเกิดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในขั้นตอนอินิทิเอชันจะดำเนินตามปฏิกิริยาต่อไป โดยการเกิดปฏิกิริยาขึ้น 2 ทาง คือ โดยการเอาอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลข้างเคียง หรือโดยเกิดการทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของออกซิเจนที่อยู่ในสถานะ ground state ทำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระตัวใหม่ ตามสมการ 2 - 4



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. Termination step

ขั้นตอนนี้คือมีการเกิดอนุมูลอิสระมารวมกัน 2 อนุมูลมารวมกันเป็นสารที่มีความเสถียร จึงเป็นการหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระ ตามสมการที่ 5-6



2.9.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (2,2 diphenyl-picrylhydrazyl radical scavenging assay)

เป็นวิธีการทดสอบด้วยเคมี โดยใช้สารที่มีองค์ประกอบเป็นคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ โดยสารที่ใช้คือ DPPH (2,2 diphenyl-picrylhydrazyl radical) ซึ่งเป็นสารที่ถูกสังเคราะห์อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่มีความคงตัว มีสีม่วงที่สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดโดยใช้เครื่องมือที่ชื่อว่า สเปกโตรมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และเมื่อ DPPH เกิดทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายด้วยตัวทำละลาย (สารที่ให้อิเล็กตรอน) จะทำปฏิกิริยากับ DPPH จากสีม่วงเข้มเป็นสีม่วงที่อ่อนลงหรือทำให้สีม่วงเป็นสีเหลือง (สมการที่ 7) ก่อนที่จะทำการวัดความเข้มข้นต้องทิ้งให้ทำปฏิกิริยา 30 นาที เมื่อครบ 30 นาที จะสามารถคำนวณหาการต้านอนุมูลอิสระได้จากสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูตรคำนวณได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงหลังจากรอทำปฏิกิริยา 30 นาที มาคำนวณตามสูตร ดังนี้



$$\text{DPPH radical scavenging (\%)} = [(A_0 - A_s)/A_0] \times 100$$

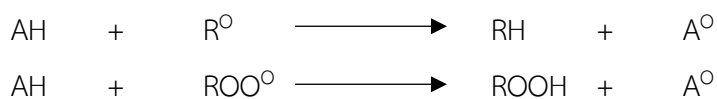
โดย A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น

A_s = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

2.9.5 ชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระ

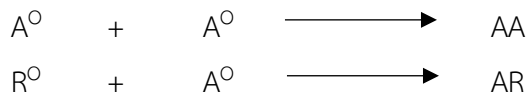
2.9.5.1 true antioxidant

สารต้านอนุมูลอิสระหรือสารต้านออกซิเดชันของสารปฏิกิริยา คือ สารที่สามารถไปยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยการทำให้เกิดปฏิกิริยา free radical ไปทำการขัดขวางปฏิกิริยาลูกโซ่ที่จะเกิดในขั้นตอน propagation molecule ของการออกซิเดชัน (AH) สามารถไปทำให้เกิดปฏิกิริยากับสารอนุมูลอิสระที่ไม่เพียงพอสอดต่อการเกิดปฏิกิริยาขั้นต่อไป และตัวอย่างสารที่ได้แก่



สารอนุมูลอิสระที่เกิดปฏิกิริยานี้จะเปลี่ยนสารประกอบของ inactive

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

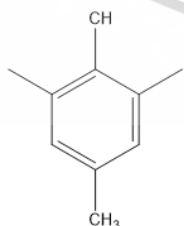


1. Butylate Hydroxyanisole (BHA) เป็นสารประกอบที่ถูกสังเคราะห์มาจาก Butylation of paramethoxyphenol มี 2 - isomer สารตั้งต้นของเป็นสารที่มีปฏิกิริยาที่สามารถต้านออกซิเดชันในส่วน petroleum product

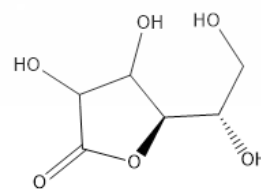
2. Butylated Hydroxytoluene (BHT) เป็นสารประกอบที่ถูกสังเคราะห์ที่มีสมบัติในการละลายน้ำได้ ถูกสังเคราะห์มาจาก rubber และ petroleum product สารพวก BHT, BHA ไม่มีสารจำพวก optimum concentration และ BHT มีความเข้มข้นที่น้อยกว่า BHA เมื่อเทียบกับสัตว์ทดลอง

2.9.5.2 Synergist antioxidation

เป็นสารจำพวก sequestering ที่มีสารในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเล็กน้อยหรืออาจจะมีเลย แต่สารจำพวก sequestering จะมีฤทธิ์ที่ส่งเสริมสารจำพวก true antioxidant โดยสารจำพวก sequestering จะทำปฏิกิริยากับสารจำพวกไอออนของโลหะ ซึ่งจะทำให้ตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันจะถูกยับยั้งไม่ให้เกิด pH ของสารละลายนั้น ๆ หรือไม่ให้เกิด chain reaction ทำให้เกิด oxidation potential สารพวกนี้ได้แก่ citric Acid thiodiprodianic acid เป็นต้น สารที่นิยมใช้ในปัจจุบันได้แก่ EDTA สารต้านอนุมูลอิสระต่าง ๆ นั้นสามารถแบ่งได้ตามลักษณะได้ 2 ชนิดใหญ่ๆได้แก่ สารต้านอนุมูลที่ได้จากธรรมชาติ (Natural antioxidant) เช่น วิตามิน C และสารต้านอนุมูลผ่านขบวนการสังเคราะห์ (synthetic antioxidant) เช่น Butylated hydroxytoluene (BHT) (รูปที่ 2.20 และ 2.21) ข้อดีของวิธีนี้คือ ง่าย สะดวก ใช้เครื่องมือพื้นฐานโดยทั่วไป นิยมใช้สำหรับการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ ยกเว้นสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ ส่วนข้อเสียของวิธีนี้คือ DPPH ค่อนข้างไม่เสถียรและไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายจริง ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สามารถแยกแยะการจัดอันดับที่มีความไวสูงได้



รูปที่ 2.20 Butylated hydroxytoluene (BHT)



รูปที่ 2.21 Vitamin C

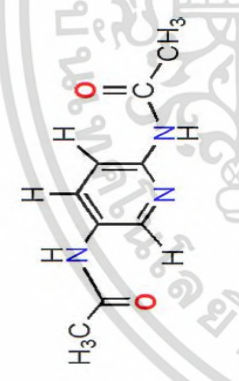
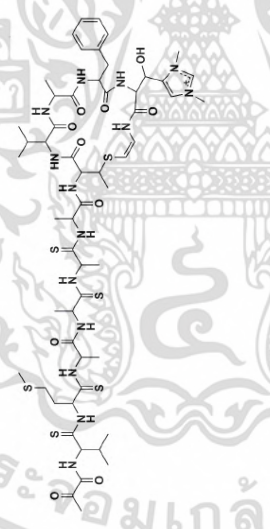
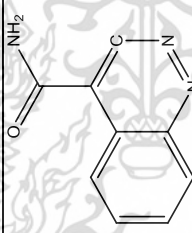
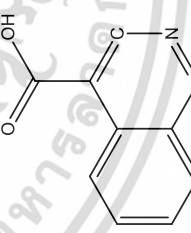
ตารางที่ 2.8 ชนิดของสารปฏิชีวนะที่ได้จาก *Streptomyces* และฤทธิ์ทางชีวภาพ

สาร	สปีชีส์ของ <i>Streptomyces</i>	คุณสมบัติ	อ้างอิง
1,4-Dihydroxy-2-(3-hydroxybutyl)-9,10-anthraquinone 9,10 anthrac	<i>Streptomyces</i> sp. RAUACT-1	Antibacterial	Ravikumar <i>et al.</i> , 2012
1,8-Dihydroxy-2-ethyl-3-methylanthraquinone	<i>Streptomyces</i> sp. FX-58	Antitumor	Huang <i>et al.</i> , 2015
1 <i>H</i> -indole-3-carboxylic acid	<i>Streptomyces</i> sp. TK-VL_333	Antifungal	Solecka <i>et al.</i> , 2012
2-amino-3,4-dihydroxy-5-methoxybenzamide	<i>Streptomyces</i> sp. YIM 67086	Antioxidants	Yang <i>et al.</i> , 2014
5-(2,4-dimethylbenzyl)pyrrolidin-2-one	<i>Streptomyces</i> VITSVK5 spp	Antioxidants	Saurav <i>et al.</i> , 2013
5-iminoaranciamycin	<i>Streptomyces</i> sp. 080513GE-26	Anticancer	Solecka <i>et al.</i> , 2012
11-methoxy-17-formyl-17-demethoxy-18- <i>O</i> -21- <i>O</i> -dihydrogeldanamycin	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Anticancer	Solecka <i>et al.</i> , 2012
Actamycin	<i>Streptomyces</i> sp. E/784	Antibacterial activity	Hooper and Rickards, 1998
Avermectin	<i>Streptomyces avermitilis</i>	Antiparasitic	Denoya <i>et al.</i> , 2021; Solecka <i>et al.</i> , 2012
Bafilomycins	<i>Streptomyces griseus</i>	Antibacterial	Solecka <i>et al.</i> , 2012
Bleomycin	<i>Streptomyces verticillus</i>	Anticancer	Solecka <i>et al.</i> , 2012

ตารางที่ 2.8 ชนิดของสารทุติยภูมิที่ *Streptomyces* สามารถผลิตได้ (ต่อ)

สาร	สปีชีส์ของ <i>Streptomyces</i>	คุณสมบัติ	อ้างอิง
Carboxamycin	<i>Streptomyces</i> sp. NTK 937	Antitumor activity	Solecka et al., 2012
Elaiomycins B and C	<i>Streptomyces</i> sp. BK 190	Antitumor	Helaly et al., 2011
Essramycin	<i>Streptomyces</i> sp. Merv8102	Antibacterial	Solecka et al., 2012
Frigocyclinone	<i>Streptomyces griseus</i>	Antibacterial	Bruntner et al., 2005
Fujianmycin C	<i>Streptomyces</i> sp. B6219	Antibacterial	Solecka et al., 2012
Isoquinoline alkaloid JS-1	<i>Streptomyces</i> sp. 8812	Antibacterial	Solecka et al., 2012
Nikkomycin X and Z	<i>Streptomyces ansiochromogenes</i> .	Antifungal	Solecka et al., 2012
Oligomycins A	<i>Streptomyces avermitilis</i>	Antifungal	Solecka et al., 2012
Platencin	<i>Streptomyces platensis</i> MA 7339	Antibacterial	Solecka et al., 2012
Pyrolo[1- α] pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)	<i>Streptomyces</i> sp. S2A	Antioxidants	Siddharth and Vittal, 2018
sansanmycin F G	<i>Streptomyces</i> sp. SS	Antibacterial	Solecka et al., 2012
Streptozotocin	<i>Streptomyces achromogenes</i>	Anticancer	Solecka et al., 2012
Tartrolon D	<i>Streptomyces</i> sp. MDG-04-17-069	Anticancer	Solecka et al., 2012
Tetracenoquinocin	<i>Streptomyces</i> sp. 080513GE-26	Anticancer	Solecka et al., 2012
Tirandamycin C D	<i>Streptomyces</i> sp. 3079	Antibacterial	Solecka et al., 2012
Valinomycin,	<i>Streptomyces fulvissimus</i>	Antiparasitic	Solecka et al., 2012

ตารางที่ 2.9 แสดงโครงสร้างสารทุติยภูมิที่ได้รับจากเชื้อ *Streptomyces*

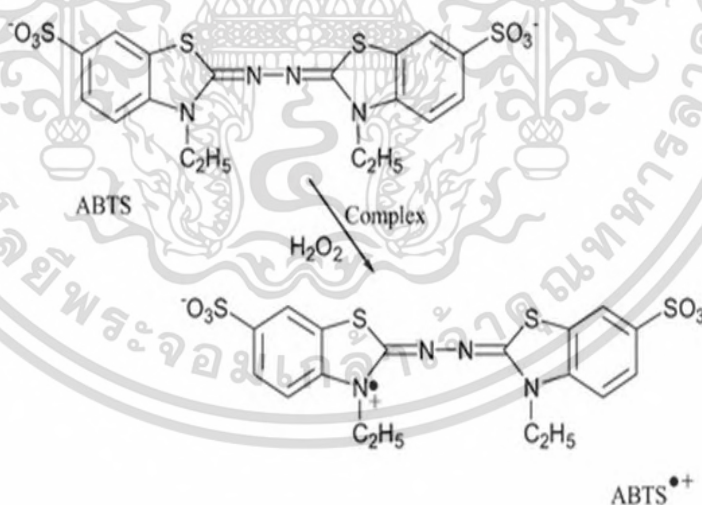
ชื่อโครงสร้างของสาร	ลักษณะโครงสร้างของสาร	แหล่งที่มาของสาร	อ้างอิง
Pyridine-2,5-diacetamide		<i>Streptomyces</i> sp. DA3-7	Nithyaa et al., 2018
Neothioviridamide		<i>Streptomyces</i> sp.	Kawahara et al., 2018
Cinnoline-4-carboxamide		<i>Streptomyces</i> sp. KRA17-580	Kim et al., 2020
Cinnoline-4-carboxylic acid		<i>Streptomyces</i> sp. KRA17-580	Kim et al., 2020

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9.6 การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีต่าง ๆ

2.9.6.1 ABTS assay

ABTS (2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) คือ สารที่ให้กำเนิดอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ เพื่อที่จะวัดความสามารถในการขจัดอนุมูลของ $ABTS^{\bullet+}$ ค่าความดูดกลืนแสงที่ดีของวิธีการนี้จะต้องมีความยาวคลื่นประมาณ 734 นาโนเมตร อนุมูลของตัว $ABTS^{\bullet+}$ นั้นมีความคงตัว แต่จะถูกออกซิไดส์ได้เมื่อทำการเติมสารต้านอนุมูลลงไปทำให้ดูมีสีลดลง (รูปที่ 2.22) เมื่อทำการเปรียบเทียบผลของการวิเคราะห์จะสามารถคำนวณเป็นค่าที่สมมูลกับสารต้านอนุมูลของสารมาตรฐานได้ เรียกว่า Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) ดังนั้นจึงทำการพัฒนาต่อมาทำโดยใช้สารอื่นในการทำให้เกิดอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ เช่น โพตัสเซียมเปอร์ซัลเฟต (KSO_2) และ แมงกานีสไดออกไซด์ (MnO_2) หรือสามารถวิเคราะห์สารต้านอนุมูลที่อยู่ในรูปสารละลายในลิพิด โดยข้อดีของวิธี TEAC คือ ทำการทดลองได้ง่าย อนุมูลของ $ABTS^{\bullet+}$ จะเข้าไปทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็วกับสารต้านอนุมูลภายในเวลาสั้น ๆ ประมาณ 4-5 นาที โดยปกตินั้นจะใช้เวลาประมาณ 30 นาที ในการวิเคราะห์ทำได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่กว้าง สามารถทำการศึกษากลไกได้อย่างละเอียด อนุมูลของ $ABTS^{\bullet+}$ สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์และสามารถละลายในน้ำได้ เพื่อที่จะใช้วิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารได้ไม่ว่าจะเป็นสารที่ละลายน้ำ หรือในไขมัน ส่วนข้อเสียของวิธีนี้คือ ตัวของ $ABTS^{\bullet+}$ ไม่ใช่สารที่ได้รับจากธรรมชาติดังนั้นอาจก่อให้เกิดอนุมูลในร่างกายได้ (วนาพร, 2559)

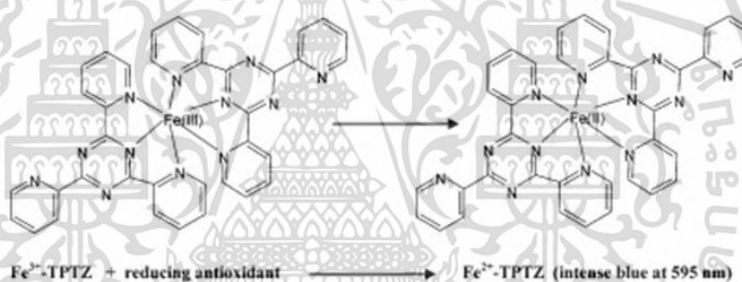


รูปที่ 2.22 โครงสร้างอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ (วนาพร, 2559)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9.6.2 FRAP assay

วิธีนี้เป็นวิธีการวิเคราะห์เพื่อที่จะหาค่า Total Antioxidant Capacity (TAC) โดยตรง มีหลักการ คือ สารต้านอนุมูลที่ออกซิเดชันในร่างกายจะทำหน้าที่คือจะทำการให้อิเล็กตรอนจึงเป็นสารรีดิวซ์ ดังนั้น ค่า TAC จึงเป็นการวัดค่าความสามารถในการรีดิวซ์ วิธีนี้จะใช้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก Fe^{3+} TPTZ (ferric tripyridyl triazine) ที่เป็นสารทดสอบของอะตอมเหล็กในสารนี้จะถูกรีดิวซ์ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอร์รัส Fe^{2+} TPTZ (ferrous tripyridyl triazine) ซึ่งจะมีลักษณะทางภายนอกเป็นสีน้ำเงิน มีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นโดยประมาณ 595 นาโนเมตร (รูปที่ 2.23) สารต้านออกซิเดชันจำพวกเดียวกันนี้จะมีโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายกัน จะทำปฏิกิริยาได้ทั้งวิธีการวิเคราะห์ FRAP และ ABTS สองวิธีนี้จึงมีความแตกต่างกันในเรื่องค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยวิธีของ ABTS จะทำการวิเคราะห์ปฏิกิริยาในสภาวะเป็นกลาง ส่วนวิธีของ FRAP จะทำการวิเคราะห์ปฏิกิริยาในสภาวะเป็นกรดที่มีค่าพีเอชต่ำเพื่อเร่งการส่งผ่านอิเล็กตรอน และเพิ่มค่าต่างศักย์รีดอกซ์



รูปที่ 2.23 การเกิดปฏิกิริยาของ FRAP assay (วนาพร, 2559)

2.9.6.3 การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก

วิธีการวิเคราะห์ Folin - Ciocalteu นั้นมักจะนิยมใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณของฟีนอลิกทั้งหมดที่ไม่สามารถระบุชนิดที่มีอยู่ภายในตัวอย่างได้ วิธีนี้จะสามารถวิเคราะห์เป็นปฏิกิริยารีดักชัน-ออกซิเดชัน (reduction-oxidation) ได้ โดยอาศัยการโพลีฟีนอลที่ถูกออกซิไดซ์ในสภาวะที่มีความเป็นด่าง สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยวิธี Folin - Ciocalteu จะประกอบไปด้วยโซเดียมทังสเตต (sodium tungstate) กรดฟอสฟอริก (phosphoric acid) โซเดียมโมลิบเดต (sodium molybdate) และ โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate) จะสังเกตการเปลี่ยนแปลงไปของสีจากปฏิกิริยาของไอออนโมลิบเดต (Mo (VI)) ซึ่งจากที่มีสีเหลืองเมื่อได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านออกซิเดชันจะถูกเปลี่ยนเป็น Mo(V) สีน้ำเงิน ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นประมาณ 725-730 นาโนเมตร ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (total polyphenol content) จะทำการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแกลลิก

(gallic acid) กลไกของการต้านอนุมูลอิสระขึ้นอยู่กับจำนวนและตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิลของโครงสร้าง

2.9.6.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์

การวิเคราะห์ปริมาณของฟลาโวนอยด์ทั้งหมดโดยใช้วิธี colorimetric assay จะใช้กลไกในการต้านอนุมูลอิสระของสารฟลาโวนอยด์ โดยการทำหน้าที่เป็นตัวให้อิโตรเจนเพื่อที่จะทำการเพิ่มความเสถียรกับอนุมูล ดังสมการต่อไปนี้



2.10 อ้างอิงงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Nakaew *et al.* (2009) ทำการแยกแอกติโนมัยสีทจำนวน 377 ไอโซเลต จากดินตัวอย่างที่เก็บได้จากถ้ำผาตูปและถ้ำผานางคอยในบริเวณภาคเหนือของประเทศไทย เมื่อทำการตรวจสอบพบว่ากว่า 54.44 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อที่ถูกพบนั้นเป็นเชื้อสกุล *Streptomyces* และกว่า 44.56 % นั้นเป็นเชื้อแอกติโนมัยสีทที่สามารถพบได้ยาก

Poter *et al.* (1960) ใช้ยาปฏิชีวนะไนสแตติน (nystatin) และ cycloheximide อย่างละ 50 ไมโครลิตรต่ออาหาร 1 มิลลิตร ผลคือสามารถยับยั้งการเจริญของราได้ และยังไม่มียผลต่อการเจริญของแอกติโนมัยสีท ส่วน Mackay (1977) ใช้ ผลการค้นหาโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) และแมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl₂) เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะเพนิซิลลิน จี (penicillin G) เพื่อลดจำนวนแบคทีเรียแกรมลบที่เจริญอย่างรวดเร็ว เพื่อให้ *Streptomyces* spp. เจริญได้ดี

Oskay *et al.* (2004) ทำการแยกแอกติโนมัยสีทจากดินจากฟาร์มในเมืองมานิซา ประเทศตุรกี ทำการแยกแอกติโนมัยสีทได้ 50 ไอโซเลต โดยวิธีการแยกใช้วิธีการแยกโดยใช้เทคนิคการเจือจางตัวอย่าง (Dilution plating) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณหรือทำการแยกออกจากค่าตามความเข้มข้นแต่ละความเข้มข้น โดยใช้อาหารกลีเซอรอล-ยีสต์แอกแทรกท์ เอการ์ (กลีเซอรอล (Glycerol) 1 กรัม; สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) 0.4 กรัม; ไคโทเทสเซียมฟอสเฟต (K₂HPO₄) 0.02 กรัม; เพปโตน (Peptone) 5.0 กรัม, อะการ์ (Agar) 3 กรัม; น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (Distilled water) 200 ไมโครลิตร) ในอาหารผสมไนสแตติน (50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำการชั่งดินที่แห้งแล้วมาปริมาตร 1 กรัม ใส่ลงไปในน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 9 มิลลิตร นำไปทำการให้ความร้อนที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที นำมาทำการเจือจางเป็น 10⁻³ 10⁻⁵ และ 10⁻⁷ เมื่อการเจือจางเรียบร้อยแล้ว นำมาใส่ในอาหารในปริมาณ 0.1 มิลลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 – 14 วัน เมื่อครบเวลาที่กำหนดทำการเลือกโคโลนีของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอกติโนมัยสีทและนำแอกติโนมัยสีทไปเลี้ยงยังอาหารที่เตรียมใหม่โดยการทำให้เชื้อแอกติโนมัยสีทบริสุทธิ์นั้นจะใช้เทคนิค Streak plate

Teddei *et al.* (2006) ได้ศึกษาแหล่งที่อยู่ของแอกติโนมัยสีทสกุล *Streptomyces* ที่ทำการแยกจากดินในแถบประเทศเวเนซุเอลา จากการศึกษาของวิจัยนี้พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพนั้น ผลปรากฏว่า *Streptomyces* sp. เมื่อเลี้ยงบนอาหาร ISSA การเจริญเติบโตของเชื้อ *Streptomyces* นั้นมีอัตราการเจริญที่ช้ากว่าปกติและต้องการอากาศเป็นอย่างมาก ในการเจริญเติบโตนั้นมีการเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศที่มีลักษณะสีที่แตกต่างกันออกไป จากการศึกษาสปอร์โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงทำให้ได้ทราบว่าลักษณะของสปอร์มีลักษณะเป็นเส้นตรงและโค้งงอ เป็นตะขอหรือเรียกว่าห่วงปลายเปิด บางสายพันธุ์ที่สามารถแยกได้นั้นมีการสร้างสารสีที่ละลายน้ำและสามารถแพร่ลงบนอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโตเส้นใยอากาศที่ *Streptomyces* สามารถสร้างได้นั้นมีสีที่พบเจอได้แก่ ขาว แดง เหลือง ส้ม เขียว น้ำเงิน และเส้นใยอาหารพบสีดังนี้ เหลือง ม่วง ขาวงาช้าง และ สีม่วงแดง

Devine *et al.* (2019) ได้ทำการแยกแอกติโนมัยสีทจากฟาร์มมดแอฟริกัน ได้รับเชื้อสายพันธุ์ใหม่จากการวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน 16S rRNA คือ *Streptomyces formicae* ใช้ด้วยวิธีของชีวสารสนเทศ เริ่มต้นจากการวิเคราะห์ผลถึงการรายงานผลโดยใช้โปรแกรม antiSMASH ในการแสดงผลของการวิเคราะห์

Cortes *et al.* (2019) ได้ทำการแยกแอกติโนมัยสีทจากทะเลทรายอาตากามา ประเทศชิลี โดยตั้งชื่อไอโซเลตนี้ว่า HST21 จากนั้นได้นำเชื้อไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน 16S rRNA และ multilocus sequence phylogenetic ผลออกมาว่าไอโซเลต HST21 เป็นเชื้อ *Streptomyces* สปีชีส์ที่ใกล้เคียงคือ *S. albidochromogenes* DSM 41800^T และ *S. flavidovirens* DSM 40150^T ดังนั้นจึงนำ *Streptomyces* ที่ได้นี้ไปวิเคราะห์ต่อโดยใช้วิธี Digital DNA-DNA hybridization (dDDH) และคำนวณค่า average nucleotide identity (ANI) ของไอโซเลต HST21 และ *S. albidochromogenes* DSM 41800^T (35.6 และ 88.2%) and *S. flavidovirens* DSM 40105^T (47.2 และ 88.8 เปอร์เซ็นต์) ค่า ANI ที่ได้น้อยกว่า 70 % ซึ่งค่ามาตรฐานที่ทำการยอมรับค่า ANI อยู่ที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ระบุได้ว่า *Streptomyces* sp. HST21 เป็นเชื้อสายพันธุ์ใหม่

Jiang *et al.* (2020) ได้ทำการแยกแอกติโนมัยสีทจากดินของภูเขาเมานต์ซ่ง ประเทศจีน ได้ไอโซเลต NEAU-C151 นำเชื้อไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน 16S rRNA และ multilocus sequence phylogenetic ผลออกมาว่าไอโซเลต NEAU-C151 มีค่าความคล้ายคลึงกันดังนี้ *Streptomyces lincolnensis* NRRL 2936^T มีความคล้ายคลึง 97.5 เปอร์เซ็นต์,

Streptomyces coacervatus AS-0823^T มีความคล้ายคลึง 97.4 เปอร์เซ็นต์ และ *Streptomyces longisporus* ISP 5166^T มีค่าความคล้ายคลึง 97.4 เปอร์เซ็นต์ นำไอโซเลต NEAU-C151 มาทำ assignment และวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมี ได้แก่ ศึกษารดไดอะมิโนพีเมติก ชนิดของ acyl ในผนังเซลล์ น้ำตาลทั้งหมดของเซลล์ ไขมันชนิดมีซัว ไอโซพรีนอยด์ควิโนน กรดมัคคอลลิก จึงสามารถระบุได้ว่าไอโซเลต NEAU-C151 เป็นเชื้อสายพันธุ์ใหม่

Paulus *et al.* (2017) ทำการแยกแอกติโนมัยสีทจากดินทะเล ได้เชื้อไอโซเลต MP131-18 เมื่อทำการแยกไอโซเลตเสร็จแล้ว นำไปศึกษาลักษณะทางจีโนมโดยใช้เทคนิควิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน 16S rRNA และ multilocus phylogenetic ทำให้ทราบว่าเป็น *Streptomyces* ดังนั้นจึงนำไปศึกษาจีโนมต่อโดยการใช้โปรแกรม antiSMASH ช่วยในการวิเคราะห์เมื่อทำการศึกษาเสร็จแล้วพบว่า *Streptomyces* sp. MP131-18 นั้น เป็นสายพันธุ์ใหม่ จึงนำ *Streptomyces* sp. MP131-18 ไปทำการศึกษาสารทุติยภูมิเพื่อที่จะค้นหาสายทุติยภูมิใหม่ โดยวิธีการที่ใช้ได้แก่โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์, คาร์บอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์, นิวเคลียร์แมกนีติกเรโซแนนซ์แบบ 2 มิติ, แมสสเปกโทรเมทรี, ฟลูออโรฟลูออโรสโพรโมอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ และ โพลาริมิเตอร์ สารที่ได้รับจากการวิเคราะห์และแยกนั้นมีสารใหม่ประกอบด้วย

HeYangab *et al.* (2018) ทำการศึกษาเกี่ยวกับสารทุติยภูมิที่ *Streptomyces* สามารถผลิตได้ โดยเริ่มจากการแยก *Streptomyces* sp. CS มาจากพืชที่ชื่อว่า *Maytenus hookeri* โดยใช้วิธีวิเคราะห์ด้วย liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) เมื่อผ่านการวิเคราะห์แล้วพบว่าเจอพืชที่ไม่เคยพบใน *Streptomyces* sp. CS จึงทำการแยกสารทุติยภูมิตัวนั้นออกมาแล้วตั้งชื่อว่า CS/asm21-4 และทำการวิเคราะห์โครงสร้างของสารโดยใช้วิธีดังต่อไปนี้ โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์, คาร์บอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์, นิวเคลียร์แมกนีติกเรโซแนนซ์แบบ 2 มิติ, แมสสเปกโทรเมทรี, ฟลูออโรฟลูออโรสโพรโมอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ และ โพลาริมิเตอร์ ผลที่ได้คือทราบองค์ประกอบของสาร CS/asm21-4 คือ $C_{40}H_{49}NO_{12}$ ซึ่งเป็นสารชนิดใหม่ที่ไม่เคยพบใน *Streptomyces* sp. CS มาก่อน

Rodrigues *et al.* (2018) ทำการแยก *Streptomyces* sp. มาจากดินที่ใช้ในการปลูกข้าว นำมาศึกษาสารทุติยภูมิที่ *Streptomyces* sp. โดยใช้เทคนิคดังนี้ โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์, คาร์บอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์, นิวเคลียร์แมกนีติกเรโซแนนซ์แบบ 2 มิติ, แมสสเปกโทรเมทรี, ฟลูออโรฟลูออโรสโพรโมอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ และ โพลาริมิเตอร์ ผลที่ได้คือ สารที่ทำการแยกออกมานั้น เป็นสารที่ไม่เคยพบมาก่อน นำสารที่แยกได้นั้นมาทดสอบการต้านการเจริญด้วยเทคนิค minimum

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

inhibitory concentrations (MIC) ของ *Bacillus* และ *Penicillium* ซึ่งสารที่แยกได้นั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้ออีกด้วย

Manasa *et al.* (2012) ทำการศึกษาแอกติโนมัยสีทสายพันธุ์ *Streptomyces* sp. RAMPP-065 ที่ถูกแยกจากดินตะกอนประเทศอินเดีย ทำการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH และทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยทำการเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยสีทสายพันธุ์ *Streptomyces* sp. RAMPP-065 ในอาหาร ISP2 เป็นเวลา 7 วัน และทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทเมื่อทำการสกัดเสร็จ จึงนำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค 8 ชนิด ผลปรากฏว่ามีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* และนำไปทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการวิเคราะห์การเป็นสารต้านออกซิเดชัน (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl หรือ DPPH) ผลปรากฏว่า เปอร์เซ็นต์ของค่า scavenging activity ต่ำสุดที่สามารถยับยั้งได้คือ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Arumugam *et al.* (2011) ศึกษาแอกติโนมัยสีทสายพันธุ์ *Streptomyces* sp. MS1/7 ที่ถูกแยกจากตะกอนทะเลประเทศอินเดีย นำมาสกัดแยกน้ำหมักกับตัวเซลล์ออกจากกัน หลังจากสกัดเสร็จแล้วนำสารสกัดหยาบโหลกลงไปบนคอลัมน์ซิลิกาเจลและเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงตามลำดับ เมื่อได้สารบริสุทธิ์แล้วนำสารบริสุทธิ์ที่ได้นั้นไปวิเคราะห์โครงสร้างโดยใช้เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโคปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy; NMR) ทราบโครงสร้างแล้วนำสารบริสุทธิ์เหล่านั้นมาทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระผลปรากฏว่ามีโครงสร้างที่สามารถยับยั้งการต้านอนุมูลอิสระอยู่ที่ค่า IC_{50} 22 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งงานวิจัยของ Zarina และ Nanda (2012) ที่ทำการศึกษาแอกติโนมัยสีทสายพันธุ์ *Streptomyces* sp. MS-60 ที่ถูกแยกจากตะกอนดินประเทศอินเดียใช้วิธีการสกัดและแยกเหมือนกับงานวิจัยของ Arumugam *et al.* (2011) แต่โครงสร้างที่สามารถยับยั้งการต้านอนุมูลอิสระมีค่ามากกว่าซึ่งค่าอยู่ที่ IC_{50} 26.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Sivarajan *et al.* (2019) ทำการแยกแอกติโนมัยสีทจากดินป่าชายเลนทางตอนใต้ของประเทศอินเดียและศึกษาข้อมูลทางจีโนมไทป์โดยการศึกษาด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน 16S rRNA เมื่อระบุสายพันธุ์แล้วนำแอกติโนมัยสีทเลี้ยงและทำการแยกสารทุติยภูมิโดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) เพื่อแยกสารทุติยภูมิแต่ละชนิดออกจากกัน เมื่อสารทุติยภูมิออกมาเป็นสารเดี่ยวหรือบริสุทธิ์และจะนำไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโคปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy; NMR) นำสารทุติยภูมิที่แยกออกมาได้นั้นมาทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการวิเคราะห์การเป็นสารต้านออกซิเดชัน (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; DPPH) ผลปรากฏออกมาว่า สาร PA9 มีค่า scavenging activity อยู่ 76 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือ

1. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น PB 3002 บริษัท Mettler Toledo ประเทศไทย
2. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น SI-234 บริษัท Denver ประเทศอังกฤษ
3. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น HM-35V บริษัท Hung Ta Instrument
4. เครื่องผสมสาร (vortex) รุ่น Genie 2 บริษัท Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา
5. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น UC4-1320 ประเทศไทย
6. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow) รุ่น UC4-1320 ประเทศไทย
7. ตู้อบลมร้อน (hot air oven) รุ่น ULE-500 บริษัท memmert ประเทศเยอรมนี
8. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) รุ่น SG-120 Steris ประเทศสหรัฐอเมริกา
9. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) รุ่น Kuhner ISF-1-X บริษัท Kuhner
10. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Sorvall RC5C plus
11. ไมโครเพลสเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96 well plate)
12. กรวยแยก (separatory funnel)
13. เครื่องระเหยสารภายใต้ระบบสุญญากาศ (Rotary Evaporator)
14. เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography)
15. เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโคปี (Nuclear Magnetic Resonance; Spectroscopy)
16. เครื่องวัดการดูดกลืนแสงชนิดนาโน (NanoDrop Spectrophotometer) รุ่น Nanodrop ND-1000 บริษัท Thermo Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
17. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (polymerase chain reaction; PCR) รุ่น ALD-1244 บริษัท MJ Research
18. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CX31 บริษัท Olympus
19. เครื่องดูดสารอัตโนมัติ (automatic pipette)
20. เครื่องระเหิดแห้ง (freeze dryer) รุ่น Modulyo 98 บริษัท Edwards
21. เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ (vacuum evaporator) รุ่น Hei-VAP Precision บริษัท Heidolph ประเทศเยอรมนี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

22. แมสสเปกโตรเมทรี (Mass spectrometry)
23. ฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (Fourier Transform InfraRed Spectrometer)
24. เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (microplate reader)

3.2 สารเคมี

1. สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)
2. สารสกัดจากมอลต์ (malt extract)
3. กลูโคส (glucose)
4. กรดนาลิกซิดิก (nalixidic acid)
5. เอทิล อะซิเตท (Ethyl Acetate)
6. เมทานอล (Methanol)
7. อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile)
8. คลอโรฟอร์ม (Chloroform)
9. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
10. สารละลายมาตรฐานบิวทิล ไฮดรอกซี โทลูอิน (BHT)
11. วุ้น (agar)
12. Sephadex

3.3 การศึกษาอนุกรมวิธาน

3.3.1 ลักษณะทางฟีโนไทป์ (Phenotype characterization)

3.3.1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญ (Morphological and characteristics)

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของแอดดีโนมายส์ที่พิจารณาจากลักษณะของสปอร์และเส้นใยที่เจริญบนอาหารสูตรยีสต์เอ็กแทรกท์ - มอลต์เอ็กแทรกท์เอการ์ (Yeast extract - Malt extract agar; ISP2) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบลักษณะสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เลนส์ส่องระยะไกล (long-work distance) กำลังขยาย 400 เท่า โดยทำการส่องดูลักษณะของสปอร์และใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) เพื่อดูลักษณะของสปอร์โดยภาพที่ได้รับจะเป็น 3 มิติ หลักการเตรียมตัวอย่างสำหรับการส่องสปอร์ เล็ง AA8 เป็นเวลา 14 วัน ตัดสปอร์ที่อยู่บนอาหารขนาด 1x1 เซนติเมตร ใช้เทคนิคคงสภาพโดยใช้สารเคมี 2 ประเภท การคงสภาพครั้งแรกใช้กลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) เพื่อคงสภาพเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของ

ตัวอย่างที่เราทำการคงสภาพ ซึ่งสารนี้จะทำปฏิกิริยากับโปรตีน และ ออสเมียมเตตรอกไซด์ (osmium tetroxide) การคงสภาพครั้งที่ 2 จะเป็นสารที่ทำปฏิกิริยากับไขมันและมีคุณสมบัติเป็นโลหะหนัก ส่วนการดิ่งน้ำออกจากตัวอย่างจะใช้สารละลายอินทรีย์จำพวกเอทิลแอลกอฮอล์ หรืออาจจะใช้อะซิโตนในการดิ่งน้ำออกจากตัวอย่าง ซึ่งงานวิจัยนี้เราได้ส่งตัวอย่างของ *Streptomyces* sp. AA8 ไปทำที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลักษณะการเจริญของแอคติโนมัยสีทจะมีลักษณะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับอาหารแต่ละชนิดโดยอาหารที่ใช้ศึกษา มีดังนี้ อาหารกลูโคสแอสพาราจีนเอการ์ (glucose asparaginase agar) อาหารซาเป็กซูโครสเอการ์ (czapek's sucrose agar) อาหารนิวเทรียนท์เอการ์ (nutrient agar) และอาหารต่าง ๆ ตาม International *Streptomyces* Project (ISP) (Shirling and Gottlieb, 1966) ซึ่งได้แก่ อาหารยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลท์เอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extract – malt extract agar; ISP2) อาหารโอทมีล เอการ์ (oatmeal agar; ISP3) อาหารอินออร์แกนิก ซอลท์-สตาร์ชเอการ์ (inorganic salts – starch agar; ISP4) อาหารกลีเซอรอล-แอสพาราจีน เอการ์ (glycerol – asparagine agar; ISP5) อาหารเปปโตเน-ยีสต์เอ็กแทรกท์ ไอรอน เอการ์ (peptone-yeast extract iron agar; ISP6) และอาหารไทโรซีน เอการ์ (tyrosine agar; ISP7) โดยการทำให้เป็นสารละลายสปอร์ (spore suspension) แล้วหยดลงบนอาหารต่าง ๆ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบผลโดยการเจริญ สีของเส้นใยอาหาร สีของเส้นใยอากาศ และสีของรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ โดยเทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (The NBS-ISCC color system) (Kelly, 1964)

3.3.1.2 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี (biological and physiological characteristics)

3.3.1.2.1 ความสามารถในการเจริญบนสภาวะที่มีความเป็นกรด-ด่างระดับต่างๆ
นำสารละลายสปอร์ของ *Streptomyces* sp. AA8 หรือสารละลายของเซลล์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลท์เอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extract-malt extract agar, ISP2) ที่ทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างในระดับต่าง ๆ ได้แก่ 4 5 6 7 8 9 และ 10 นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ทำการตรวจสอบผลโดยการดูการเจริญเติบโต

3.3.1.2.2 ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ

นำสารละลายสปอร์ของ *Streptomyces* sp. AA8 หรือสารละลายของเซลล์ในปริมาตรประมาณ 10 ไมโครลิตร นำไปหยดลงบนอาหารยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลท์เอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extract-malt extract agar, ISP2) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ต่างกัน ได้แก่ 20 30 37 40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน และทำการตรวจผลโดยการเจริญเติบโตของแต่ละอุณหภูมิต่าง ๆ

3.3.1.2.3 ความสามารถในการเจริญเติบโตบนอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ในระดับของความเข้มข้นต่าง ๆ

นำสารละลายสปอร์ของ *Streptomyces* sp. AA8 หรือสารละลายของเซลล์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำไปหยดลงบนอาหารยีสต์เอกแทรกท์-มอลท์เอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extract-malt extract agar, ISP2) อาหารได้ทำการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ ได้แก่ 1 2 3 4 5 6 และ 7 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจผลโดยการตรวจสอบการเจริญเติบโต

3.3.1.2.4 การใช้แหล่งคาร์บอน (carbon utilization)

นำสารละลายสปอร์ของ *Streptomyces* sp. AA8 หรือสารละลายของเซลล์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ทำการหยดลงบนอาหารเบซอลเอการ์ (basal agar medium, ISP9) (Shirling and Gottlieb, 1966) ทำการเติมคาร์บอนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการบ่มเป็นเวลา 14 วัน การตรวจผลจะตรวจผลโดยจะเปรียบเทียบกับ การเจริญเติบโตบนอาหารจากแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ ที่ต้องการจะทดสอบ กับชุดควบคุมทางลบโดยชุดควบคุมทางลบคือ อาหารที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ ลงไป และชุดควบคุมทางบวก คือ การเจริญของเชื้อบนอาหารที่ทำกรเติมน้ำตาลดี-กลูโคส (D-glucose) โดยให้ผลการตรวจสอบดังนี้

1. เมื่อเจริญเติบโตบนอาหารที่ทำกรเติมแหล่งคาร์บอนลงไปตามที่ต้องการทดสอบได้เท่ากับหรือมีค่าดีกว่าอาหารชุดควบคุมเชิงบวก ให้ทำการบันทึกผลเป็นบวก (+)

2. เมื่อเจริญเติบโตบนอาหารที่ทำกรเติมแหล่งคาร์บอนลงไปตามที่ต้องการทดสอบได้ดีกว่าชุดอาหารเชิงลบแต่การเจริญเติบโตได้น้อยกว่าอาหารชุดควบคุมเชิงบวก ให้ทำการบันทึกผลเป็นปานกลาง (=)

3. เมื่อเจริญเติบโตบนอาหารที่ทำกรเติมแหล่งคาร์บอนลงไปตามที่ต้องการทดสอบได้เท่ากับหรือน้อยกว่าอาหารชุดควบคุมเชิงลบ ให้ทำการบันทึกผลเป็นลบ (-)

แหล่งคาร์บอนที่ถูกใช้ในการทดสอบ ได้แก่ น้ำตาลดี-กาแลกโตส (D-galactose) น้ำตาลดี-ซาลิซิน (D-salicin) น้ำตาลดี-เซลโลไบโอส (D-cellobiose) น้ำตาลดี-ไซโลส (D-xylose) น้ำตาลแอล-อะราบินโนส (L-arabinose) น้ำตาลดี-แมนโทส (D-mannose) น้ำตาลดี-ราฟฟิโนส (D-raffinise) น้ำตาลแอล-แรมโนส (L-rhamnose) น้ำตาลดี-มอลโทส (D-maltose) น้ำตาลดี-ฟรุคโตส (D-fructose) น้ำตาลดี-เมลิไบโอส (D-melibiose) น้ำตาลแลกโตส (lactose) น้ำตาลดี-ซูโครส (D-sucrose) น้ำตาลดี-แมนนิทอล (D-mannitol) และกลีเซอรอล (glycerol)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.1.2.5 ความสามารถในการย่อยแป้ง (starch hydrolysis)

สารละลายสปอร์ของ *Streptomyces* sp. AA8 หรือสารละลายของเซลล์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำไปหยดลงบนอาหาร อินออร์แกนิก ซอลท์-สตาร์ช เอการ์ (inorganic salts-starch agar; ISP4) (Shirling and Gottlieb, 1966) ที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบของแหล่งคาร์บอน นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำสารละลายไอโอดีนหยดลงผิวอาหาร หากเกิดการย่อยแป้งได้จะเกิดวงใสรอบโคโลนี

3.3.1.2.6 ความสามารถในการย่อยเจลาติน (gelatin liquefaction)

สารละลายสปอร์ของ *Streptomyces* sp. AA8 หรือสารละลายของเซลล์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำหยดลงอาหารเหลวบูลลอน เจลาติน (bouillon gelatin broth) (Arai, 1975) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน การตรวจผลจะตรวจผลโดยการนำหลอดอาหารนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หากมีการเกิดการย่อยเจลาตินอาหารนั้น จะมีลักษณะเหลว

3.3.1.2.7 ความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรท (nitrate reduction)

สารละลายสปอร์ของ *Streptomyces* sp. AA8 หรือสารละลายของเซลล์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรหยดลงบนอาหารเหลวเปปโตเน โปแทสเซียมไนเตรต (peptone KNO₃) (Arai, 1975) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน นำไปทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรทโดยหยดกรดซัลฟานิลิก (sulfanilic acid) ใส่ลงไปปริมาตร 2 หยด และเติมสารละลายไดเมทิลเนฟทิลลอสมีน (N, N-dimethyl-1-naphthylamine) เติมลงไปปริมาตร 3 หยด หากมีการเปลี่ยนแปลง ไนเตรทกลายเป็นไนโตรตีสของอาหารจะเปลี่ยนสีอาหารเป็นสีชมพูหรือสีแดง

3.3.1.2.8 ความสามารถในการย่อยโปรตีน

1. นำสารละลายสปอร์ของ *Streptomyces* sp. AA8 หรือสารละลายของเซลล์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงไปในอาหารเหลวskim milk นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน หากเชื้อสามารถย่อยโปรตีนในอาหารได้อาหารจะมีลักษณะที่ใสขึ้น

2. นำสารละลายสปอร์ของ *Streptomyces* sp. AA8 หรือสารละลายของเซลล์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารแข็งskim milk (Gordon et al., 1974) นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ถ้าเชื้อสามารถย่อยโปรตีนในนมได้จะเกิดลักษณะโซนใสรอบโคโลนี

3.3.1.2.9 ความสามารถในการสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรต (acid production from carbohydrates)

นำสารละลายสปอร์ของ *Streptomyces* sp. AA8 หรือสารละลายของเซลล์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำมาหยดลงบนอาหารเบซอลอินออร์แกนิกไนโตรเจน (basal inorganic nitrogen medium) (Gordon *et al.*, 1974) ที่ทำการเติมแหล่งคาร์โบไฮเดรตลงไปโดยเติมความเข้มข้นร้อยละ 1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน การตรวจผลจะทำได้โดยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีอาหารที่ทดสอบ โดยถ้าหากเชื้อมีความสามารถที่สร้างกรดได้อาหารจะทำการเปลี่ยนสีจากสีม่วงเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

คาร์โบไฮเดรตที่ใช้การทดสอบ คือ น้ำตาลดี-กาแลกโตส (D-galactose) น้ำตาลดี-ไซโลส (D-xylose) น้ำตาลดี-ไรโบส (D-Ribose) น้ำตาลดี-กลูโคส (D-glucose) น้ำตาลแอล-อะราบินโนส (L-arabinose) น้ำตาลดี-ซาลิซิน (D-salicin) น้ำตาลดี-เซลโลไบโอส (D-cellobiose) น้ำตาลแอล-แรมโนส (L-rhamnose) น้ำตาลดี-ฟรุคโตส (D-fructose) น้ำตาลดี-ราฟฟิโนส (D-raffinose) กลีเซอรอล (glycerol) น้ำตาลแลกโตส (lactose) น้ำตาลดี-ซูโครส (D-sucrose) และน้ำตาลดี-แมนนิทอล (D-mannitol)

a. ความสามารถในการผลิตเอนไซม์โดย API ZYM Kit

เลี้ยงไอโซเลต AA8 บนอาหาร ISP 2 agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไอโซเลต AA8 มาเตรียม suspension ใน NSS ปริมาตร 2 มิลลิลิตรให้มีความขุ่น 5 – 6 McFarland (4.8×10^9 – 9.6×10^9 CFU/mL) เติมน้ำกลั่นในหลอดของถาด 5 มิลลิลิตรเพื่อเพิ่มความขุ่น ทำการแกะแถบเอนไซม์ แต่ละอันมาวางบนแถบการทดสอบเอนไซม์ในกล่องที่ใช้บ่ม นำไอโซเลต AA8 ที่เตรียมไว้ หยดลงไปในหลุมบนแถบทดสอบเอนไซม์แต่ละหลุม หลุมละ 65 ไมโครลิตร และทำการเติมไอโซเลต AA8 แล้วทำการปิดฝาถาดบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 – 4.5 ชั่วโมง หลังจากครบเวลาที่กำหนด ทำการหยด ZYM A หลุดละ 1 หยด และ ZYM B หลุดละ 1 หยด ลงไปในแต่ละหลุมเพื่อทำการทดสอบ รอสีเปลี่ยนอย่างน้อย 5 นาที ภายใต้แสง ถ้าผลเป็นบวกจะเปลี่ยนสีอย่างถาวรตามแต่ชนิดของเอนไซม์ (อัมพรรัตน์ 2555)

3.3.2 ลักษณะอนุกรมวิธานทางเคมี (Chemotaxonomy characteristic)

3.3.2.1 การเตรียมเซลล์แห้ง

ทำการเลี้ยง *Streptomyces* sp. AA8 ในอาหารเหลวกลูโคส-ยีสต์เอ็กแทรกท์ (glucose-yeast extract broth) นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ในอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นทำการเก็บเซลล์ โดยทำเซลล์มาทำการปั่นเหวี่ยงที่มีความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง และนำตัวเซลล์ไปล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ

ประมาณ 4-5 ครั้ง นำตัวเซลล์ที่ล้างไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งและเทส่วนใสทิ้ง จากนั้นทำตัวเซลล์ให้แห้งโดยการนำตัวเซลล์ไปใส่ในเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dryer) เมื่อเซลล์แห้งเป็นผงแล้วนำเซลล์ไปเก็บที่ตู้เย็นที่มีอุณหภูมิติดลบ 20 องศาเซลเซียส เพื่อที่จะทำไปวิเคราะห์ต่อไป

3.3.2.2 การวิเคราะห์ลักษณะของไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพีเมลิกที่ผนังเซลล์ (diaminopimelic acid; DAP)

นำเซลล์แห้งหนัก 10 มิลลิกรัม นำลงไปในหลอดทดลองฝาเกลียว เต็มกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 6 นอร์มอล (6N HCl) เป็นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่นและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นตัวลงแล้วกรองนำส่วนใสที่ได้ไปทำการให้แห้งโดยเครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator) ละลายตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 400 ไมโครลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้และสารละลายมาตรฐาน (2, 6 DAF คือ *meso*-DAP และ *LL*-DAP ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ทำการจุดลงบนแผ่น HPLC cellulose (Merck, no. 5716) ขนาด 10x10 เซนติเมตร และนำแผ่น TLC ที่ได้จุ่มลงในตัวทำละลายผสมกับสารละลายเมทานอล: น้ำ: กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 นอร์มอล: ไพริดีน (methanol: H₂O: 6N HCl: pyridine) ในอัตราส่วน 80: 26: 4: 10 ทำทิ้งไว้จนตัวทำละลายทำการเคลื่อนที่ไปถึงขอบที่กำหนดหรือห่างจากขอบ 1 มิลลิเมตร รอจนตัวทำละลายแห้ง ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง และนำแผ่น TLC มาฉีดพ่นด้วยสารละลายนินไฮดรินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 (0.4 % ninhydrin solution) ในสารละลายบิวทานอลที่มีการอิ่มตัวด้วยน้ำ (water-saturated n-butanol) รอจนแห้ง นำไปอบในตู้อบลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที ตรวจสอบแถบของสารที่ปรากฏบนแผ่น TLC และเทียบกับสารมาตรฐานกรดไดอะมิโนพีเมลิกไอโซเมอร์ต่าง ๆ (Komagata and Suzuki, 1987)

3.3.2.3 การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ (whole-cell sugar)

ทำการชั่งน้ำหนักแห้ง 50 มิลลิกรัม เเทลงไปในหลอดทดลองที่มีฝาเกลียวปิด เต็มกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1 นอร์มอล (1N H₂SO₄) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิดฝาเกลียวให้แน่น และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง นำออกมาทิ้งไว้ให้เย็น เติมสารละลายอิ่มตัวแบเรียมไฮดรอกไซด์ (Ba(OH)₂) เพื่อปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ค่าประมาณ 5.2 - 5.5 ทำการนำไปปั่นเหวี่ยงให้เกิดการตกตะกอน นำส่วนใสมาเติมเอทานอล (ethanol) ประมาณ 1-2 หยด เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดฟองแล้วนำไประเหยแห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศ จากนั้นละลายตัวอย่างที่แห้งแล้วด้วยน้ำกลั่นประมาณ 400 ไมโครลิตร นำสารละลายที่ทำการละลายแล้วและสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน (ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) นำมาจุดลงบนแผ่น TLC cellulose (Merck, no. 5716) ที่มีขนาด 10x10 เซนติเมตร จากนั้นนำแผ่น TLC ที่ทำการจุดสารเรียบร้อยแล้ว มาจุ่มลงในตัวทำละลายที่มีการผสมบิวทานอล: น้ำกลั่น: ไพริดีน: โทลูอีน (n-butanol: water: toluene: pyridine) ในอัตราส่วน 10: 6: 6: 1 ทิ้ง

ไว้จนตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปถึงเส้นที่กำหนด (ห่างจากขอบ 1 มิลลิเมตร) รอให้แห้งและทำการ ดีเวลอป (develop) อีก 1 ครั้ง และนำแผ่น TLC ที่ทำการดีเวลอปแล้วมาฉีดพ่นด้วยสารละลายแอนิลีนฟทาเลท (aniline phthalate) รอจนกว่าสารที่ฉีดพ่นแห้ง เมื่อแห้งแล้วนำไปอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 4 นาที ทำการตรวจจุดที่เกิดขึ้นเทียบกับสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน บริเวณที่จะปรากฏจะมี 2 ลักษณะ คือ แบบที่ 1 น้ำตาลที่มีจะมีจำนวนคาร์บอนอะตอมจะเท่ากับ 5 อะตอม แถบที่ปรากฏจะมีสีชมพู ได้แก่ น้ำตาลไซโลส น้ำตาลอะราบิโนส และน้ำตาลโรโบส แบบที่ 2 น้ำตาลที่มีจะมีจำนวนคาร์บอนอะตอมจะเท่ากับ 6 อะตอม แถบที่ปรากฏจะมีสีเหลือง ได้แก่ น้ำตาลแมนโรส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแรมโนส และน้ำตาลกาแลคโตส (Komagata and Suzuki, 1987)

เตรียมสารละลายน้ำตาลมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 จะประกอบด้วยน้ำตาลแรมโนส น้ำตาลแมนโรส น้ำตาลกาแลคโตส น้ำตาลไซโลส กลุ่มที่ 2 จะประกอบด้วย น้ำตาลอะราบิโนส น้ำตาลโรโบส และน้ำตาลกลูโคส

3.3.2.4 การวิเคราะห์กรดไขมันมีขั้ว (polar lipids)

ทำการชั่งน้ำหนักเซลล์แห้ง 150 มิลลิกรัม ใส่ลงไปในหลอดทดลองที่มีฝาเกลียว ปิด เติมสารละลายผสมระหว่างเมทานอล (methanol): น้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 0.3 % (3% NaCl) ในอัตราส่วน 100: 10 ปริมาตร 3 มิลลิกรัม และเติมปิโตรเลียม อีเทอร์ (petroleum ether) ปริมาตร 3 มิลลิกรัม ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 15 นาที ทำการดูดสารละลายส่วนด้านบนทิ้ง เติมปิโตรเลียม อีเทอร์ 1 มิลลิกรัม ผสมให้เข้ากันอีกครั้งแล้วดูดสารละลายด้านบนทิ้ง จากนั้นนำไปให้ความร้อนโดยการต้มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เมื่อต้มเสร็จจะต้องทำการเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม (chloroform): เมทานอล: น้ำ ในอัตราส่วน 90: 100: 30 ในปริมาตร 2.3 มิลลิกรัม ทำการผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการดูดส่วนใสลงไปในหลอดใหม่ ทำการเติมสารละลายสารละลายคลอโรฟอร์ม; เมทานอล; น้ำ ในอัตราส่วน 50; 100; 40 ในปริมาตร 2.3 มิลลิกรัม ลงไปในหลอดเติม ผสมให้เข้ากันประมาณ 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสไปใส่รวมกับหลอดใหม่รอบแรก ทำการสกัดอีก 1 ครั้ง เติมสารละลายสารละลายคลอโรฟอร์มปริมาตร 1.3 มิลลิกรัม และน้ำปริมาตร 1.3 มิลลิกรัม ใส่ไปในหลอดเติมทำการผสมให้เข้ากัน และนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 10 นาที ทำการดูดสารละลายที่ใสด้านบนทิ้งแล้วนำสารที่สกัดส่วนด้านล่างไปให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน เมื่อสารละลายแห้งแล้วทำการเติมคลอโรฟอร์ม; เมทานอล อัตราส่วน 2; 1 ในปริมาตร 60 ไมโครลิตร ทำการดูดสารละลายตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร และจุดลงบนแผ่น silica TLC (Merck 60 F₂₅₄, 10x10 cm) ทำจำนวนทั้งหมด 4 แผ่น จากนั้นนำแผ่น TLC ที่ได้มาดีเวลอป (develop) 2 ทิศทาง (two-dimensional development) ระบบนั้นจะมีตัวทำละลาย 2 ชนิด โดยจะทำการจุ่มแผ่น TLC ลงในตัว

ทำละลายที่ผสมด้วยตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม: เมทานอล: น้ำ ในอัตราส่วน 65: 25: 4 ที่วิ่งกว่าตัวทำละลายจะไปถึงจุดที่กำหนด (ห่างจากขอบ 1 มิลลิเมตร) นำออกมารอบจนแห้ง และนำแผ่น TLC ไปจุ่มในสารละลายคลอโรฟอร์ม: กรดอะซิติก (acetic acid) เมทานอล: น้ำ ในอัตราส่วน 40: 7.5: 6: 2 โดยต้องทำการกลับด้านแผ่น TLC ในทิศทางที่ทำการตั้งฉากกับแนวเดิม ที่วิ่งจนแห้ง ทำการฉีดพ่นด้วยรีเอเจนต์ (reagent) ชนิดต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ (Minnikin *et al.*, 1984)

1. Dittmer & Lester reagent รองจกว่าสารที่ฉีดพ่นแห้ง เพื่อวิเคราะห์ฟอสโฟลิปิดทั้งหมด (จุดสีน้ำเงิน)
2. Ninhydrin reagent รองจกว่าสารที่ฉีดพ่นแห้ง และนำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที เพื่อวิเคราะห์ฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine; PE) ไฮดรอกซิลฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (OH-phosphatidylethanolamine; OH-PE) และเมทิล-ฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (methyl-phosphatidylethanolamine; methyl-PE) (จุดสีชมพู)
3. Anisaldehyde reagent รองจกว่าสารที่ฉีดพ่นแห้ง และนำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที เพื่อใช้วิเคราะห์ไกลโคลิปิด (จุดสีเขียวอมเหลือง) และถ้ามีลิปิดอื่น ๆ จะมีจุดสีน้ำเงิน
4. Dragendorff reagent รองจกว่าสารที่ฉีดพ่นแห้ง เพื่อวิเคราะห์ฟอสฟาติดีลโคลีน (phosphatidylcholine; PC) (จุดสีส้ม)

3.3.2.5. การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน (cellular fatty acid)

ทำการชั่งน้ำหนักเซลล์แห้ง 40 มิลลิกรัม ใส่ลงไปในหลอดทดลองที่มีฝาเกลียว ปิด ทำการเติมสบอนิฟิเคชันรีเอเจนต์ (saponification reagent) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex) เป็นระยะเวลา 5-10 วินาที และนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที แล้วทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร เป็นระยะเวลา 5 - 10 วินาที และนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส อีกครั้งแต่ใช้เวลา 25 นาที รอให้เย็นลงในอุณหภูมิห้อง เมื่อเย็นลงแล้วทำการเติมเมทิลเลชันรีเอเจนต์ (methylation reagent) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทำการผสมให้เข้ากันเป็นระยะเวลา 5 - 10 วินาที นำไปต้มในน้ำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที ทำให้เย็นโดยนำไปแช่น้ำในอุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการเติมตัวทำละลายผสม (extraction solvent) ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร ทำการผสมให้เข้ากันเป็นระยะเวลา 10 นาที ดูดสารละลายที่อยู่ด้านบนลงไปในหลอดใหม่ เติมสารละลายเบสวอช (base wash) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ในหลอดที่ใส่สารละลายส่วนด้านบนไว้ ทำการผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาที ถ้าระหว่างการผสมเกิดอิมัลชัน (emulsion) ให้ทำการเติมสารละลายอิ่มตัวโซเดียมคลอไรด์ (saturated sodium chloride) เติมลงไปเล็กน้อย นำส่วนใสด้านบนนั้นไป

วิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (gas chromatography) ที่มีฐานข้อมูลของ Microbial Identification System (MIDI) (Sasser, 1990) โดยแก๊สตัวพา (carrier gas) เป็นแก๊สไฮโดรเจน (hydrogen 99.999%) โดยมีอัตราการไหลอยู่ที่ 30 มิลลิลิตรต่อนาที คอลัมน์ (column) ที่ใช้คือ HP-ULTRA2 25m x 0.22 mm. i.d. x 0.33 ไมโครเมตร (film) capillary column และใช้ injector temperature ที่ 250 องศาเซลเซียส oven temperature ที่ใช้คือ เริ่มต้นจากอุณหภูมิที่ 170 องศาเซลเซียส จากนั้นจะเริ่มเพิ่มอุณหภูมิเป็น 288 องศาเซลเซียส (อัตราที่เพิ่มจะเพิ่มอยู่ที่ 28 องศาเซลเซียส ต่อนาที) หลังจากนั้นจะทำการเพิ่มอุณหภูมิเป็น 310 องศาเซลเซียส (อัตราที่เพิ่มจะเพิ่มอยู่ที่ 60 องศาเซลเซียสต่อนาที) แล้วจะค้างอุณหภูมิไว้ที่ 310 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 1.25 นาที ส่วนการ detector temperature คือ 300 องศาเซลเซียส

3.3.2.6 การวิเคราะห์ไอโซพรีนอยด์ควิโนน (isoprenoid quinone)

ทำการชั่งน้ำหนักเซลล์แห้ง 100-500 มิลลิกรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีฝาปิดเกลียว ทำการเติมตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์ม: เมทานอล ในอัตราส่วน 2: 1 เติมน้ำไปปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปิดฝาด้วยอลูมิเนียมฟลอยด์ให้แน่น และนำไปปั่นที่เครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อ นาที ทำการปั่นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมากรองด้วยกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 (whatman no. 1) นำสารใส่ที่ผ่านจากการกรองมาทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศที่อุณหภูมิต่ำกว่า 35 องศาเซลเซียส ละลายด้วยอะซีโตนและนำมาจุดลงบนแผ่น silica gel TLC (Merck 60 F₂₅₄, 20x20 เซนติเมตร) โดยทำการจุดเป็นแถบยาว นำแผ่น TLC ที่ทำการจุดเรียบร้อยแล้วไปจุ่มตัวทำละลายเบนซีน (100% benzene) ตรวจสอบโดยนำส่องดูภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร แล้วจะมีแถบมีนาควิโนน (menaquinone) ใช้ดินสอวงบริเวณที่มีแถบปรากฏ แล้วจุด silica gel ใส่ลงไปให้หมด ทดลอง ละลายด้วยอะซีโตนปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปกรองและเป่าให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน นำสารละลายตัวอย่างที่แห้งแล้วด้วยอะซีโตนเล็กน้อย ก่อนนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟี ของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ใช้คอลัมน์ ODS reverse phase silica gel โดยใช้ตัวทำละลายผสมของ เมทานอล: 2-โพรพานอล (2-propanol) ในอัตราส่วน 2 : 1 เป็น mobile phase ให้อัตราการไหลเป็น 1 มิลลิลิตรต่อนาที ค่าดูดแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร (Komagata and Suzuki, 1987)

3.3.2.7 การวิเคราะห์ชนิดของ acyl ในผนังเซลล์ (acyl type)

ทำการชั่งน้ำหนักเซลล์แห้ง 10 มิลลิกรัม ใส่ลงไปให้หมดทดลองที่มีฝาปิด แลเติมกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 6 นอร์มอล ในปริมาตร 100 ไมโครลิตร ปิดฝาให้แน่นแล้วนำไปให้ความร้อนแก่หลอดทดลอง (heating block) ที่อุณหภูมิประมาณ 100 องศาเซลเซียส รวมเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำการบรรจุคอลัมน์ (column) ด้วย Dowex (CH₃COO⁻) ให้มีความสูงอยู่ประมาณ 5 เซนติเมตร โดยตัวคอลัมน์จะใช้พาสเจอร์ปิเปต (pasture pipette) เมื่อทำการบรรจุคอลัมน์เสร็จเรียบร้อยแล้ว นำสาร

ที่ผ่านการย่อยโพลดลงคอลัมน์โดยใช้ น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ให้เป็นตัวชะสารละลายที่ได้จากการย่อยลงไป ในคอลัมน์ รองนแห้ง ทำการชะด้วยน้ำกลั่นอีกครั้งในปริมาตร 1 มิลลิตร ทำซ้ำ 2 ครั้ง ขั้นตอนที่ผ่านมาข้างต้นจะทำให้กรดไกลโคลิก (glycolic acid) ถูกชะออกมาใน ส่วนสุดท้าย จะทำการตรวจสอบผลโดย ดูดสารละลายในส่วนท้ายประมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองฝาเกลียวหลอดใหม่ ทำการเติมสารละลายคอน รีเอเจนต์ (DON reagent) ในปริมาตร 2 มิลลิตร ทำการปิดฝาให้แน่นเพื่อให้เกิดการผสมให้เข้ากัน นำไปให้ความร้อนโดยการเอาไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที ทำให้เย็นโดยการนำไปแช่น้ำที่อุณหภูมิห้อง ทำการเติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 2 นอร์มอล ในปริมาตร 1.9 มิลลิตร ทำการผสมให้เข้ากัน หากมีกรดไกลโคลิก (glycolic acid) ในผนังเซลล์ สารละลายที่นำมาทดสอบจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสีชมพู (Komagata and Suzuki, 1987)

3.3.2.8 การวิเคราะห์กรดมัคคอลลิก (mycolic acid)

ทำการชั่งน้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ 50 – 200 มิลลิกรัม ใส่ลงไปในหลอดทดลองแบบมีฝาปิดเกลียว เติมสารละลายโพแตสเซียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10 (10% KOH) ในเมทานอล ทำการปิดฝาให้แน่นแล้วนำไปย่อยโดยการให้ความร้อน 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง ทำการเติมกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 6 นอร์มอล ในปริมาตร 0.6 มิลลิตร และทำการสกัดด้วยเฮกเซน (n-hexane) หรือปิโตเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) ในปริมาตร 2 มิลลิตร ทำการผสมให้เข้ากัน และนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลาทั้งหมด 10 นาที ทำการดูดสารละลายด้านบนของหลอดที่นำไปปั่นเหวี่ยงลงหลอดอันใหม่ ทำการสกัดซ้ำโดยใช้เฮกเซน ในปริมาตร 2 มิลลิตร ซ้ำ 1 ครั้ง และทำการดูดสารละลายด้านบนไปใส่ลงในหลอดอันใหม่ข้างต้น ทำการเป่าให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน เมื่อแห้งแล้วเติมเบนซีน: เมทานอล: กรดซัลฟิวริก (benzene: MeOH; H₂SO₄) ในอัตราส่วน 10: 20: 1 จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในอุณหภูมิห้อง เมื่อเย็นลงแล้วทำการเติมน้ำปราศจากเชื้อ ปริมาตร 2 มิลลิตร และเฮกเซน ในปริมาตร 2 มิลลิตร ทำการเขย่าให้เข้ากัน และนำไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 10 นาที ดูดสารละลายที่อยู่ด้านบนลงใส่หลอดใหม่ สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนในปริมาตร 2 มิลลิตร ซ้ำอีกครั้ง หลังจากการสกัดซ้ำนำสารละลายทั้งหมดมารวมกัน นำไปเป่าให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน เมื่อแห้งแล้วละลายด้วยเฮกเซนในปริมาตรเล็กน้อย นำไปจุดลงบนแผ่น TLC ขนาด 20 x 20 เซนติเมตร นำแผ่น TLC ไปจุดลงบนสารละลายผสมระหว่างเฮกเซน: ไดเอทิลอีเทอร์ (diethyl ether) ในอัตราส่วน 4: 1 รองนตัวทำละลายเคลื่อนจนสุดแผ่น รองนกว่าแผ่น TLC แห่ง จากนั้นทำการรมแผ่น TLC ด้วยควันทองไอโอดีน (I₂) หรือจะทำการฉีดพ่นด้วยกรดซัลฟิวริกที่มี

ความเข้มข้น 50 % และนำไปอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที ทำการตรวจผลโดยการสังเกตจุดที่ปรากฏขึ้น (Komagata and Suzuki, 1987)

3.3.3 ลักษณะทางจีโนไทป์ (Genotype characterization)

3.3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการเลี้ยง *Streptomyces* sp. AA8 ในอาหารเหลวกลูโคส-ยีสต์เอ็กแทรกท์ (glucose-yeast extract broth) นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 3 วัน ทำการแยกน้ำหมักและตัวเซลล์โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงโดยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 5 นาที เทส่วนที่เป็นน้ำหมักทิ้ง ล้างตัวเซลล์ที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงมาแล้วด้วยสารละลาย TE buffer และนำไปปั่นเหวี่ยงซ้ำ ทำการล้างด้วย TE buffer จนกว่าสารละลาย TE buffer ใส จากนั้นใส่สารละลาย TE buffer ในปริมาตร 380 ไมโครกรัม และเติมไลโซไซม์ (lysozyme) ที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้ากัน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง และทำการเติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลเฟต (SDS) ที่มีความเข้มข้น 10 % ในปริมาตร 40 ไมโครลิตร ทำการผสมกันโดยการกลับหลอดไปมา และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที จากนั้นทำการเติมสารละลายฟีนอล: คลอโรฟอร์ม: ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ (phenol: chloroform: isoamyl alcohol) ในอัตราส่วน 25: 24: 1 ในปริมาตร 400 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้ากัน เป็นระยะเวลา 5 นาที หลังจากทำการผสมกันแล้วนำไปทำการตกตะกอนโดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,500 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 15 นาที ตูดสารละลายด้านบนนำไปใส่หลอดใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยการเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตตที่มีความเข้มข้น 3 โมลาร์ (3M sodium acetate) ในปริมาตร 1 ใน 10 ของสารละลายส่วนใสที่ใส่ลงไปหลอด และทำการเติมเอทานอลที่เย็นจัด ในปริมาตร 2 เท่าของสารละลายที่ได้ ใช้แท่งแก้วที่ปราศจากเชื้อพันสายดีเอ็นเออย่างเบามือ และนำมาตั้งทิ้งไว้จนดีเอ็นเอที่พันกับแท่งแก้วนั้นแห้ง เมื่อแห้งสนิทแล้วนำไปละลายกับ TE buffer ในปริมาตร 50 – 100 ไมโครลิตร (Yukphan, 2006)

3.3.3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR)

การเพิ่มของยีน 16 rRNA จะใช้ปฏิกิริยาของลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR) โดยการนำดีเอ็นเอที่ได้มาทำการแยกเพื่อเพิ่มปริมาณสายดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA โดยใช้ไพรเมอร์สากล (Universal primer) โดยการนำสารที่มีความเข้มข้นและปริมาตรที่แสดงในตารางที่ 3.1 ใส่ลงไปในหลอดที่มีขนาดเล็กและมีฝาปิด ทำการผสมให้เข้ากันและนำไปทำปฏิกิริยาโดยเครื่องเทอร์มอลไซเคลอร์ (Thermal cycler) ซึ่งการให้ความร้อนและเวลาที่ทำการตั้งไว้แสดงในตารางที่ 3.2 (Yukphan *et al.*, 2005)

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาบูลูกโซ่พอลิเมอเรส

	ความเข้มข้น	ปริมาตร
Primer : 9F	10.0 μ M	5.0 μ l
Primer : 1541R	10.0 μ M	5.0 μ l
dNTP	2.0 mM	8.0 μ l
10X Tap buffer	10X	0.5 μ l
MgCl ₂	25.0 mM	8.0 μ l
Tap DNA Polymerase	5 Unit/ μ l	0.5 μ l
Milli Q water	-	61.5 μ l
Template DNA	100 – 200 ng/ μ l	2.0
รวม		100 μ l

หมายเหตุ primer: 20F (5' GAG TTT GAT CCT GC TCA G 3')

primer: 1500R (5' GTT ACC TTG TTA CGA CTT 3')

ตารางที่ 3.2 วงจรพีซีอาร์ (PCR cycle)

อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ (cycle)	ขั้นตอน
94 องศาเซลเซียส	3 นาที	1	Denaturation step
94 องศาเซลเซียส	1 นาที	25	
50 องศาเซลเซียส	1 นาที		Annealing step
72 องศาเซลเซียส	2 นาที		1
72 องศาเซลเซียส	3 นาที		
รวมเวลาทั้งสิ้น : 2 ชั่วโมง 30 นาที			

3.3.3.3 การทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR Product) ให้มีความบริสุทธิ์

การทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของ 16S rRNA นั้นจำเป็นจะต้องนำมาเพิ่มปริมาณก่อน หลังจากการเพิ่มปริมาตรจะถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดของ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit ผลิตโดยบริษัท Geneaid จะทำโดยเริ่มจากการละลายผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ในปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปใส่หลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ (microcentrifuge) ที่มีขนาด 1.5 มิลลิลิตร ในหลอดจำเป็นจะต้องมีสาร PB solution ในปริมาตร 450 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำสารละลายส่งไปในคอลัมน์ QIA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

quick column เพื่อที่จะนำไปปั่นเหวี่ยงที่มีความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลาประมาณ 30 วินาที หลังจากทำการปั่นเหวี่ยงเสร็จเรียบร้อยแล้วให้ทำการเทของเหลวที่ตกลงมาจากการกรองของคอลัมน์ทิ้ง เมื่อทำการเทของเหลวที่ตกลงมาจากคอลัมน์ทิ้งแล้วเติม wash buffer ในปริมาตร 600 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่มีความเร็วรอบ 8,500 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลาประมาณ 30 วินาที เทส่วนที่ตกลงมาจากคอลัมน์อีกครั้ง จากนั้นทำการย้ายตัวของคอลัมน์ใส่หลอดอันใหม่ เมื่อย้ายคอลัมน์ลงไปหลอดใหม่แล้วให้ทำการเติม TB buffer ในปริมาตร 25 ไมโครลิตร โดยจำเป็นต้องใส่ลงไปตรงจุดกึ่งกลางของคอลัมน์ ทำการตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิเป็นระยะเวลาประมาณ 10 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่มีความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลาประมาณ 1 นาที เมื่อทำการปั่นเหวี่ยงเสร็จสิ้นจะได้สารละลายดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป

3.3.3.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอของ 16S rRNA gene

การทำกรวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอของ 16S rRNA gene ในการวิจัยนี้ นั้นจะใช้ชุด BigDye terminator cycle sequencing ready reaction kit (applied biosystem) โดยส่วนประกอบที่ใช้ทั้งหมดจะแสดงในตารางที่ 3.3 ส่วนอุณหภูมิและเวลาของการใช้จะแสดงในตารางที่ 3.4 (Yukphan *et al.*, 2005)

3.3.3.5 การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis)

ทำการจัดเรียง (alignment) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้รับกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่ทำการคัดเลือก (selected sequences) จากข้อมูลต่าง ๆ ได้แก่ genbank / EMBL / DDBJ โดยจำเป็นต้องใช้การ alignment software ซึ่งในการวิจัยเล่มนี้ได้ใช้ CLUSTAL W program package ทำการจำลองข้อมูลให้เป็น multi - data set และทำการสร้างแผนภูมิต้นไม้หรือสร้างแผนภาพของสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) โดยใช้โปรแกรมของ MEGA V.7 package (www.megasoftware.net/) ในการช่วยสร้างแผนภาพของสายวิวัฒนาการ (Yukphan *et al.*, 2005)

3.3.3.6 การวิเคราะห์จีโนมทั้งหมด (whole genomes analysis) และชีวสารสนเทศ (Bioinformatics)

การศึกษาสำหรับเพื่อวิเคราะห์จีโนมทั้งหมด โดยทำให้ดีเอ็นเอที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ต่อบริสุทธิ์ตามข้อที่ 3.3.3.3 หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง illumina Miseq 1 TB platform (illumina Inc. San Diego, US-CA) โดยจะส่งตัวอย่างดีเอ็นเอที่ไปวิเคราะห์ที่ศูนย์วิทยาศาสตร์โอมิกส์และชีวสารสนเทศ (Omics sciences and bioinformatics center) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยหลักการที่ใช้หา Whole genome shotgun sequence (WGS) นั้นจะเริ่มจากการเชื่อมต่อ (assembly) ด้วยโปรแกรม SPAdes เวอร์ชัน 3.10.179 จากนั้นทำการนำลำดับ

นิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปทำนายยีน (annotation) ด้วยโปรแกรม Prokka เวอร์ชัน 1.1280 และ pipeline ของ NCBI (NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline; PGAP) จากนั้นทำการคำนวณค่า Average Nucleotide Identity (ANI) และ digital G+C content ทำโดยค่าใช้ อัลกอริทึม ANI-MUMmer (ANIm) ของ JSpeciesWS web service และ Ezbiocloud (<https://www.ezbiocloud.net/tools/ani>) ส่วนการทำ digital DNA-DNA hybridization (dDDH) นั้นจะทำการเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียง โดยใช้ Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC) เวอร์ชัน 2.186 และทำการวิเคราะห์กลุ่มของยีน (gene cluster) ที่มีความเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ของสารทุติยภูมิ ใช้การวิเคราะห์ด้วย anti-SMASH ในการสร้าง Genome circular map และสร้างโดยใช้โปรแกรม CGview เพื่อที่จะแสดงผลของยีนที่ผ่านการทำ annotation และทำการแบ่งกลุ่มตาม COG (Clusters of Orthologous Groups) และ synteny map ของไอโซเลต *Streptomyces* sp. AA8 และ *Streptomyces roseifaciens* DSM 106196^T สร้างโดยใช้โปรแกรม Artemis Comparison Tools (ACT)

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบของการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene

	ความเข้มข้น (Diluted reaction 0.5X)	ปริมาตร (μ l)
Big dye terminator	-	4.0
5X sequencing Buffer	5 เท่า	2.0
Sequencing Primer*	3.2 (pmol/ μ l)	2.0
น้ำปราศจากไอออน	-	10.0
ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์	-	2.0
รวม		20

หมายเหตุ Primer 27F: AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG

800R : GGY TAC CTT GTT ACG ACT T

520R : CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG

1492R: TAC CAG GGT ATC TAA TCC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.4 โปรแกรม Big dye

อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ(cycle)
96 องศาเซลเซียส	3 วินาที	1
96 องศาเซลเซียส	10 วินาที	25
50 องศาเซลเซียส	5 วินาที	
60 องศาเซลเซียส	4 วินาที	1

3.3.3.6 การวิเคราะห์จีโนมทั้งหมด (whole genomes analysis) และชีวสารสนเทศ (Bioinformatics)

การศึกษานี้เพื่อวิเคราะห์จีโนมทั้งหมด โดยทำให้ดีเอ็นเอที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ต่อบริสุทธิ์ตามข้อที่ 3.3.3.3 หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้นั้นไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง illumina Miseq 1 TB platform (illumina Inc. San Diego, US-CA) โดยจะส่งตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้นั้นไปวิเคราะห์ที่ศูนย์วิทยาศาสตร์โอมิกส์และชีวสารสนเทศ (Omics sciences and bioinformatics center) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยหลักการที่ใช้หา Whole genome shotgun sequence (WGS) นั้นจะเริ่มจากการเชื่อมต่อ (assembly) ด้วยโปรแกรม SPAdes เวอร์ชัน 3.10.179 จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปทำนายยีน (annotation) ด้วยโปรแกรม Prokka เวอร์ชัน 1.1280 และ pipeline ของ NCBI (NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline; PGAP) หลังจากนั้นทำการคำนวณค่าของ Average Nucleotide Identity (ANI) และค่าของ digital G+C content ทำโดยค่าใช้อัลกอริทึม ANI-MUMmer (ANIm) ของ JSpeciesWS web service และ Ezbiocloud (<https://www.ezbiocloud.net/tools/ani>) ส่วนการทำ digital DNA-DNA hybridization (dDDH) นั้นจะทำโดยการเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียง โดยใช้ Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC) เวอร์ชัน 2.186 และทำการวิเคราะห์กลุ่มของยีน (gene cluster) ที่มีความเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ของสารทุติยภูมิ ใช้การวิเคราะห์ด้วย anti-SMASH ในการสร้าง Genome circular map และสร้างโดยใช้โปรแกรม CGview เพื่อที่จะแสดงผลของยีนที่ผ่านการทำ annotation และทำการแบ่งกลุ่มตาม COG (Clusters of Orthologous Groups) และ synteny map ของไอโซเลต *Streptomyces* sp. AA8 และ *Streptomyces roseifaciens* DSM 106196^T สร้างโดยใช้โปรแกรม Artemis Comparison Tools (ACT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 การแยกสารทุติยภูมิให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

3.4.1. การสกัดสาร

เลือกโคโลนีของ *Streptomyces* sp. AA8 โคโลนีเดียว 1 โคโลนี เพื่อมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรยีสต์เอ็กแทรกท์มอลท์แอ็กแทรกท์ (Yeast extract - Malt extract broth; ISP2 broth) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน ปริมาณการเลี้ยงทั้งหมด 20 ลิตร หลังจากเลี้ยงครบตามกำหนดทำการแยกน้ำหมักและเซลล์ด้วยการกรองแยกส่วนกัน น้ำหมักทำการสกัดด้วยวิธีการสกัดของเหลวด้วยของเหลว (liquid – liquid extraction) ด้วยสารละลาย Ethyl Acetate ในอัตราส่วน 1:1 ทำการเขย่า 5 นาที แยกเก็บส่วนใส ทำการสกัดซ้ำ 2 ครั้ง แล้วนำส่วนใสที่ได้ไประเหย Ethyl Acetate ออกด้วยเครื่องระเหยสารภายใต้ระบบสุญญากาศ (Rotary Evaporator) จนกว่าสารละลายจะแห้งติดกับภาชนะ เก็บสารที่ได้ใส่ในขวดแก้วขนาดเล็กโดยการนำเมทานอลมาละลายสารที่ติดอยู่ในภาชนะเพื่อนำมาใส่ขวดเล็กและนำไปเก็บไว้ในโถดูดความชื้น (desiccator) จนสารแห้งอีกครั้ง ส่วนตัวเซลล์ทำการสกัดโดยนำเซลล์มาหมักด้วยสารละลายเมทานอลเป็นเวลา 1-2 วัน หลังจากการหมักเสร็จนำมากรองออกเพื่อนำสารละลายเมทานอลมาระเหยออกด้วยเครื่องระเหยสารภายใต้ระบบสุญญากาศ (Rotary Evaporator) เก็บสารที่ได้ใส่ในขวดแก้วขนาดเล็กโดยการนำเมทานอลมาละลายสารที่ติดอยู่ในภาชนะเพื่อนำมาใส่ขวดเล็กและนำไปเก็บไว้ในโถดูดความชื้น (desiccator) จนสารแห้งเหมือนสารละลายที่ได้จากน้ำหมัก นำไปเก็บรักษาที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ -20 องศาเซลเซียส

3.4.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

นำสารสกัดหยาบละลายด้วยตัวทำละลายเมทานอล เพื่อนำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่องแยกของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC; Ultimate 3000, Dionex) ที่เฟสเคลื่อนที่นั้นเป็นแบบ gradient ที่มีอัตราส่วนอะซิโตไนโตรล์ต่อน้ำอยู่ที่ร้อยละ 5 -10 ด้วยอัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นระยะเวลา 15 นาที คอลัมน์มราใช้ในการแยกคือ C-18 แบบ reverse phase (4.6x150 มิลลิเมตร; 5 ไมโครเมตร)

3.4.3 การแยกสารทุติยภูมิด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

นำสารสกัดหยาบของ *Streptomyces* sp. AA8 มาแยกโดยใช้ sephadex LH-20 ทำโดยดูดสารละลายของน้ำหมักและเซลล์แยกกันลงคอลัมน์ Sephadex ขนาด 45 x 28 เซนติเมตร โดยมีอัตราส่วน เมทานอล 100 % โดยแยกเก็บสารเป็นส่วนๆ นำแต่ละส่วนที่ทำการเก็บได้นั้นไปฉีดดูสารประกอบโดยใช้เครื่องแยกของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ที่เฟสเคลื่อนที่นั้นเป็นแบบ gradient ที่มีอัตราส่วนของอะซิโตไนโตรล์ต่อน้ำอยู่ที่ 5 -10 % ด้วยอัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นระยะเวลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

15 นาที คอลัมน์ที่เราใช้ในการแยกคือ C-18 แบบ reverse phase (4.6x150 มิลลิเมตร; อนุภาคขนาด 5 ไมโครเมตร) เพื่อที่จะนำสารที่เหมือนกันมารวมกัน

3.4.4 การแยกสารด้วยเครื่องแยกของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

สารสกัดหยาบจากเซลล์ที่ได้รับจากการแยกจากคอลัมน์ Sephadex มา 4 fractions ได้แก่ CF1 CF2 CF3 และ CF4 และสารสกัดหยาบที่ได้จากน้ำหมักที่แยกได้จากคอลัมน์ Sephadex มา 6 fractions ได้แก่ BF1 BF2 BF3 BF4 BF5 และ BF6 ถูกนำไปฉีดโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เพื่อวิเคราะห์ดูสารประกอบที่น่าสนใจและมีปริมาณมากพอจะนำไปทำการทดลองต่อไป ซึ่งพบว่าสารทุติยภูมิที่น่าสนใจจะอยู่ใน fractions BF5 BF6 CF3 และ CF4 นอกนั้นจะไม่ทำการแยกต่อเพราะเป็นสารประกอบที่ไม่น่าสนใจ นำ fractions ที่สนใจมาแยกด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบผันกลับ (reverse phase chromatography) โดยใช้คอลัมน์อยู่ 2 ชนิด คือ คอลัมน์ Shiseido ขนาด 20 มิลลิเมตร x 150 มิลลิเมตร และ คอลัมน์ Sunfire ขนาด 19 มิลลิเมตร x 150 มิลลิเมตร โดยใช้อัตราส่วนของ acetonitrile และ น้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ในการแยกสารประกอบของ *Streptomyces* sp. AA8

นำ fractions BF5 มาแยกสารประกอบแต่ละ fractions ด้วย semi-preparative HPLC โดยใช้คอลัมน์ Shiseido ขนาด 20 มิลลิเมตร x 150 มิลลิเมตร โดยใช้อัตราส่วนของ acetonitrile ต่อ น้ำ 0-95 % ในน้ำ ในเวลา 35 นาที ด้วยอัตราการไหล 8 มิลลิตรต่อนาที แยกสารได้จำนวน 12 fractions คือ BF5H1 – BF5H12 ดังแสดงใน รูป 3.1

นำ fractions BF5H7 และ BF5H9 มาแยกซ้ำด้วย semi-preparative HPLC ใช้คอลัมน์ Sunfire ขนาด 19 มิลลิเมตร x 150 มิลลิเมตร โดยใช้อัตราส่วนของ acetonitrile ต่อ น้ำ 5-100% ในเวลา 30 นาที ด้วยอัตราการไหล 15 มิลลิตรต่อนาที สำหรับ BF5H7 ได้มา 2 fractions คือ BF5H7H1 และ BF5H7H2 ส่วน fraction BF5H9 ใช้คอลัมน์ Sunfire ขนาด 19 มิลลิเมตร x 150 มิลลิเมตร โดยใช้อัตราส่วนของ acetonitrile ต่อ น้ำ 10-100 % ต่อ น้ำ ในเวลา 30 นาที ด้วยอัตราการไหล 8 มิลลิตรต่อนาทีได้ 1 fraction คือ BF5H9H1 ดังแสดงใน รูป 3.1

นำ fraction BF6 มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วย semi-preparative HPLC ใช้คอลัมน์ Sunfire ขนาด 19 มิลลิเมตร x 150 มิลลิเมตร โดยใช้อัตราส่วนของ acetonitrile ต่อ น้ำ 2-100% ในเวลา 35 นาที ด้วยอัตราการไหล 12 มิลลิตรต่อนาที แยกสารได้จำนวน 7 fractions คือ BF6H1 – BF6H7 ตามลำดับ ดังแสดงใน รูป 3.1

นำ fraction CF3 มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วย semi-preparative HPLC ใช้คอลัมน์ Shishedo ขนาด 20 มิลลิเมตร x 150 มิลลิเมตร โดยใช้อัตราส่วนของ acetonitrile ต่อ น้ำ 0-95 % ใน

เวลา 35 นาที ด้วยอัตราการไหล 12 มิลลิลิตรต่อนาที แยกสารได้ทั้งหมด 9 fractions คือ CF3H1 – CF3H9 ดังแสดงในรูป 3.2

นำ fraction CF4 มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วย semi-preparative HPLC ใช้คอลัมน์ Sunfire ขนาด 19 มิลลิเมตร x 150 มิลลิเมตร โดยใช้อัตราส่วนของ acetonitrile ต่อ น้ำ 0-95 % ในเวลา 35 นาที ด้วยอัตราการไหล 8 มิลลิลิตรต่อนาที แยกสารได้ทั้งหมด 7 fractions คือ CF4H1 – CF4H7 ดังแสดงในรูป 3.2

3.4.5 การวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Infrared (IR) spectroscopy

เตรียมสารบริสุทธิ์ประมาณ 1 มิลลิกรัม นำมาละลายด้วยอะซิโตนเล็กน้อยจากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าความดูดแสงโดยใช้ลำแสง Alpha FT-IR spectrometer ของบริษัท Bruker

3.4.6 Mass spectrometry

ละลายสารบริสุทธิ์ด้วยเมทานอล เมื่อทำการละลายเสร็จ นำไปวิเคราะห์ค่าของมวลต่อประจุ (m/z) สารบริสุทธิ์ จากเครื่องแมสสเปกโตรเมทรี เพื่อนำไปประกอบในการหาโครงสร้างทางเคมี

3.4.7 Nuclear magnetic resonance spectroscopy หรือ NMR

NMR spectra จะประกอบไปด้วย ^1H ^{13}C DEPT 135 COSY NOESY HMQC และ HMBC ผลที่ได้ทั้งหมดใช้เครื่อง Bruker ADVANC 500 เมกะเฮิรตซ์ (^1H ที่ 500 เมกะเฮิรตซ์ และ ^{13}C ที่ 125 เมกะเฮิรตซ์) และเครื่อง Bruker ADVANC III 400 เมกะเฮิรตซ์ (^1H ที่ 400 เมกะเฮิรตซ์ และ ^{13}C ที่ 100 เมกะเฮิรตซ์)

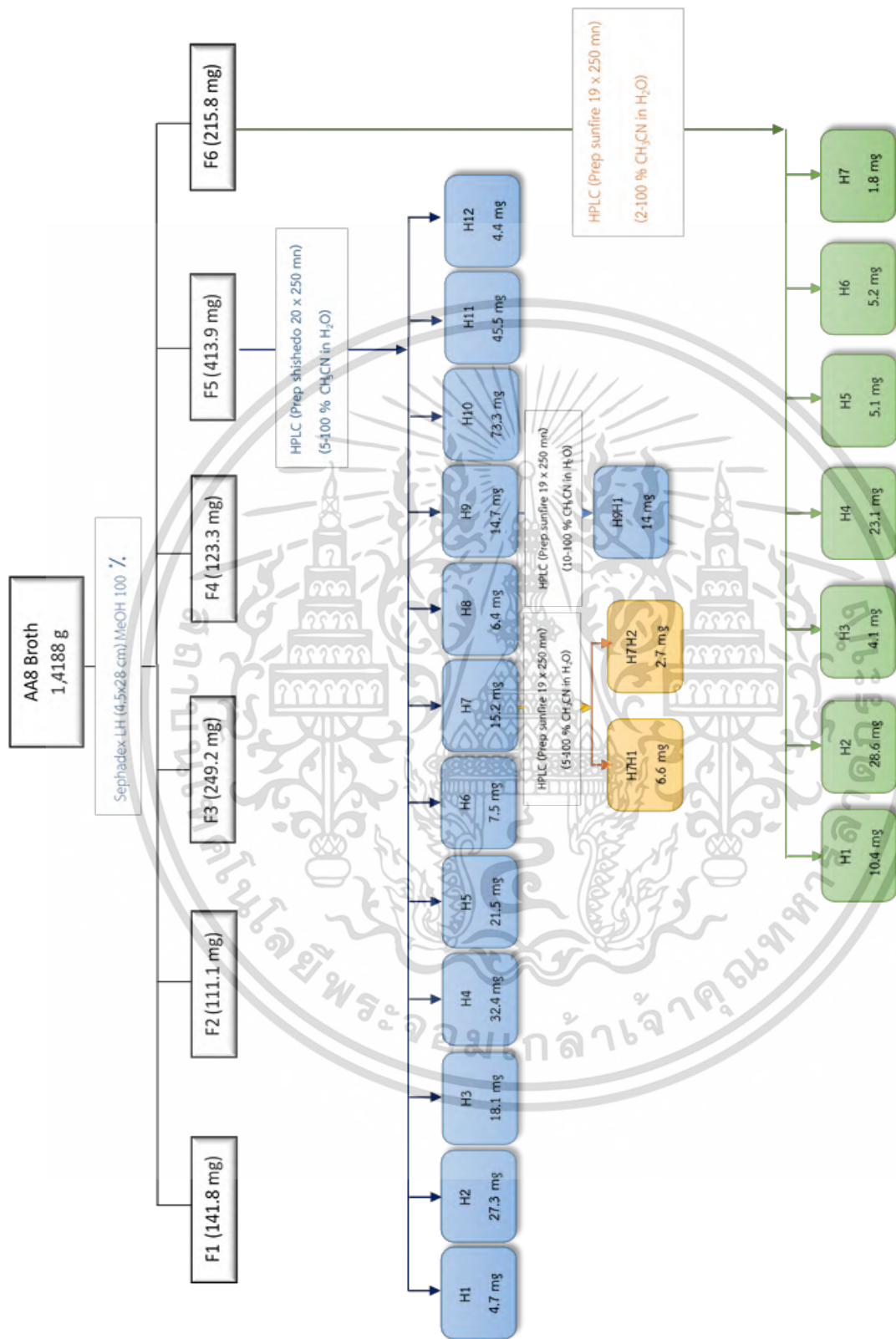
3.4.8 Optical rotation

การวิเคราะห์ค่าการหมุนระนาบของแสงโพลาไรซ์ ทำได้โดยใช้เครื่อง polarimeter ของ JASCO รุ่น P-1030

3.4.9 Ultraviolet-Visible (UV-vis) absorption spectroscopy

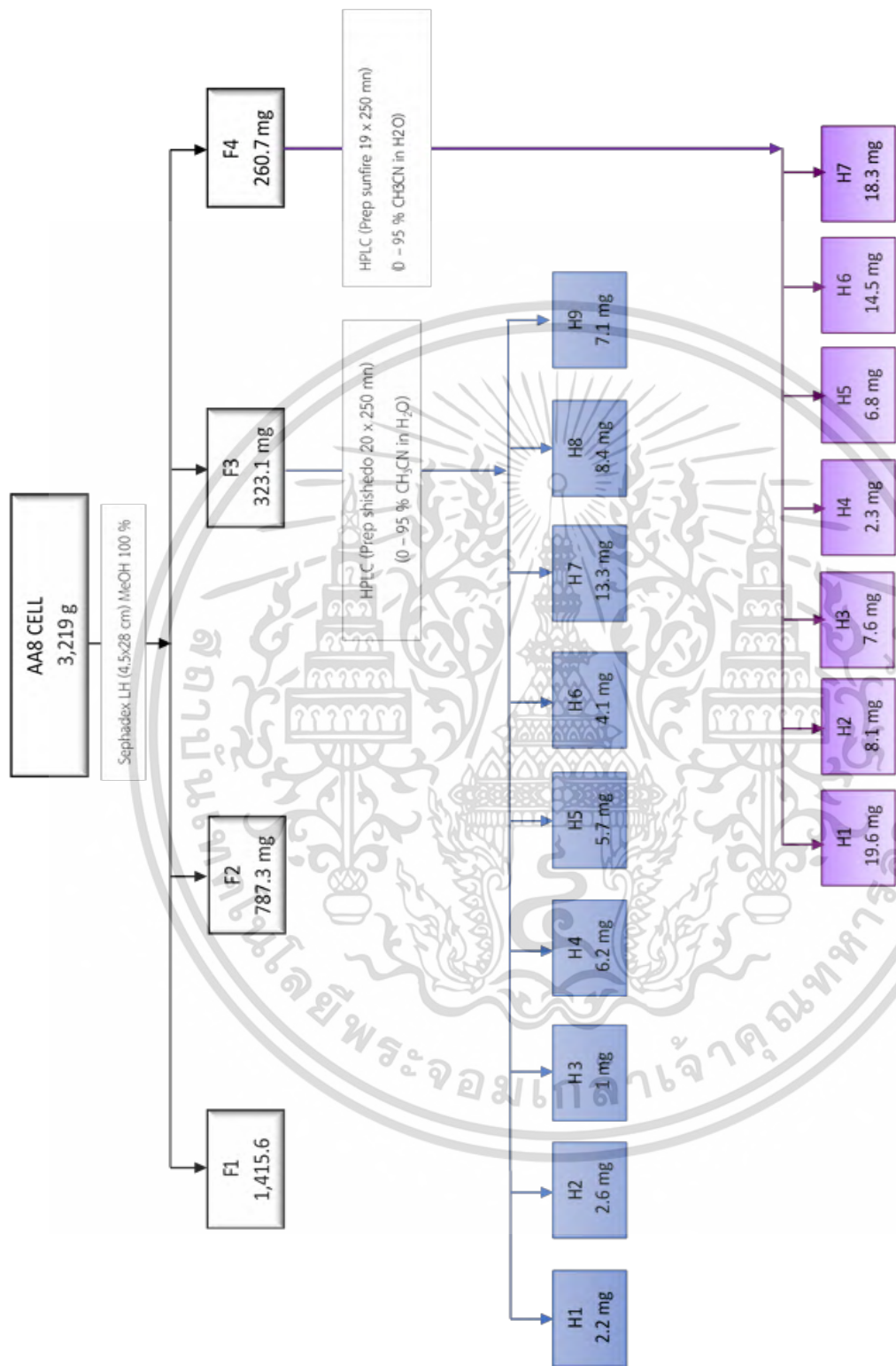
สเปกตรัม UV-vis ของสารทุกชนิดจะถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง Cary 1E UV-vis โดยละลายสารตัวอย่างด้วยเมทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.1 แผนภาพแสดงการแยกสารสกัดของน้ำหมักด้วย HPLC และนำหนักที่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.2 แผนภาพแสดงการแยกสารสกัดของเซลล์ด้วย HPLC และน้ำหมักที่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การทดลองฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.5.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.5.1.1 การเตรียมสารสกัด

ซึ่งสารสกัดหยาบหนัก 1 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นในช่วง 1,000 – 0.97 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสารสกัดหยาบจากนี้หนักหนัก 1 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นในช่วง 1,000 – 0.97 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.5.1.2 การเตรียมสารละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ให้มีความเข้มข้น 2.0 มิลลิโมลาร์

ซึ่งสาร DPPH หนัก 7.9 มิลลิกรัม ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมเมทานอลประมาณครึ่งหนึ่งของขวดวัดปริมาตร แล้วปรับปริมาตรจากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman) เบอร์ 1 เทใส่ขวดแล้วเก็บไว้ในที่มืดห้ามโดนแสง

3.5.1.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Butylated Hydroxytoluene หรือ BHT โดยใช้ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นในช่วง 1,000 – 0.97 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียมสารละลายมาตรฐาน Butylated Hydroxytoluene หรือ BHT โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นในช่วง 1,000 – 0.97 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.5.1.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay

นำสารสกัดหยาบแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงในแต่ละหลุมของ microplate 96 หลุม ทำการผสมสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ จากนั้นหยดสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (Blank sample) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร หยดลงในแต่ละหลุมของไมโครเพลส โดยทำการหยดสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงในแต่ละหลุมของไมโครเพลส จากนั้นหยดเมทานอลปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของสารละลาย DPPH ทดสอบ 3 ซ้ำ จากนั้นหยดเมทานอล (Blank DPPH) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของไมโครเพลส นำไปบ่มในที่มืด 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องเครื่องอ่านปฏิกิริยาบน Microplate Reader โดยใช้สารละลายมาตรฐาน BHT เป็นชุดควบคุมเชิงบวก (positive control) และเมทานอลเป็นตัวทำชุดควบคุมเชิงลบ (negative control) นำผลค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเปรียบเทียบกับผลของชุดควบคุมเชิงบวกแล้วคำนวณหาร้อยละของปฏิกิริยาดักจับอนุมูลอิสระ คำนวณร้อยละของปฏิกิริยาดักจับอนุมูลอิสระ (Free Radical Scavenging) ดังสมการต่อไปนี้

$$\% \text{ inhibition} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{Blank DPPH}}) - (B_{\text{Sample}} - B_{\text{Blank sample}})] / (A_{\text{DPPH}} - A_{\text{Blank DPPH}})$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์อื่นใด การนำเอกสารนี้ไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาตถือว่าผิดกฎหมาย และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

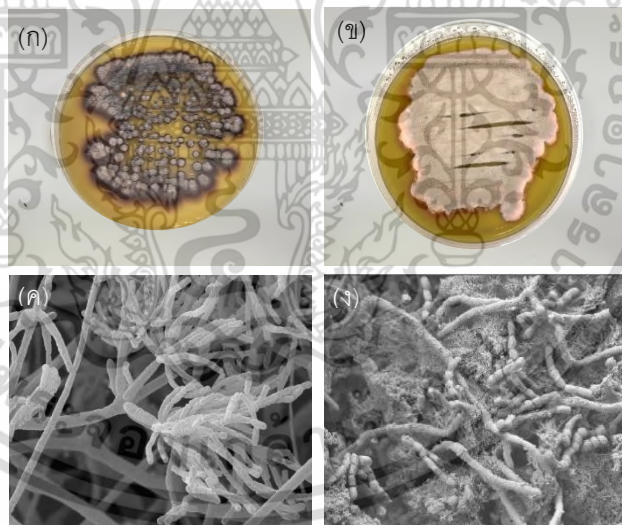
ผลการทดลองและการอภิปรายผล

4.1 ลักษณะทางอนุกรมวิธานของไอโซเลต AA8

4.1.1 ลักษณะทางฟีโนไทป์

4.1.1.1 ลักษณะสัณฐานวิทยา (morphological taxonomy)

เลี้ยงไอโซเลต AA8 บนอาหาร yeast extract – malt extract (ISP2) เป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาลักษณะของสปอร์ใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่มีเลนส์ส่องระยะไกล (Long working distance objective lens) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM) พบว่าไอโซเลต AA8 มีเส้นใยอาหารสีแดงคล้ำ (Dark Red) เส้นใยอากาศสีแดงคล้ำอมเทา (Dark Grayish Red) และสปอร์มีลักษณะสายตรงต่อกันเป็นช่ออยู่บนก้านชูสปอร์ (รูป 4.1) เทียบกับ *Streptomyces roseifaciens* DSM 106196^T มีลักษณะที่ต่างกัน ที่เส้นใยอาหารสีแดงเข้ม (Very Deep Red) เส้นใยอากาศสีแดงอมเทา (Light Grayish Red) และสปอร์เป็นสายตรง (รูป 4.1) (Aart *et al.*, 2018)



รูปที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต AA8 และ *S. roseifaciens* DSM 106196^T

(ก) ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต AA8 (ข) ลักษณะโคโลนีของ *S. roseifaciens* DSM 106196^T (ค) ลักษณะสปอร์ของไอโซเลต AA8 ที่ส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (ง) ลักษณะสปอร์ของ *S. roseifaciens* DSM 106196^T ที่ส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.1.2 ลักษณะการเจริญบนอาหารต่างๆ (cultural characteristic)

เลี้ยงไอโซเลต AA8 บนอาหารแข็ง yeast extract-malt extract (ISP2) Oatmeal (ISP 3) Inorganic salt-starch (ISP4) Glycerol-asparagine (ISP5) Peptone-yeast extract iron (ISP6) และ Tyrosine (ISP7) (ภาพผนวก ก) (Shirling and Gottlieb, 1966) พบว่า ไอโซเลต AA8 เจริญได้ดีในทุกอาหาร สร้างเส้นใยอากาศสีชมพูอมเทา เส้นใยอาหารสีแดง ยกเว้นอาหาร ISP6 ที่สร้างเส้นใยอากาศและเส้นใยอาหารเป็นสีน้ำตาล เหมือนกันกับ *S. roseifaciens* DSM 106196^T (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ลักษณะการเจริญของไอโซเลต AA8 บนสูตรอาหารต่าง ๆ

สูตรอาหาร	ไอโซเลต	
	AA8	<i>S. roseifaciens</i> DSM 106196 ^T
Yeast extract-malt extract agar (ISP2) ความสามารถในการเจริญ สีของเส้นใยอากาศ สีของเส้นใยอาหาร รงควัสดุละลายน้ำ	+ แดงคล้ำอมเทา (Dark Grayish Red) แดงคล้ำ (Dark Red) ส้มแกมเหลือง (Brilliant Orange Yellow)	+ แดงอมเทา (Light Grayish Red) แดงเข้ม (Very Deep Red) เหลืองเข้ม (Deep Yellow)
Oatmeal agar (ISP3) ความสามารถในการเจริญ สีของเส้นใยอากาศ สีของเส้นใยอาหาร รงควัสดุละลายน้ำ	+ ขาวอมชมพู (Pinkish White) แดงเข้ม (Dark Red) -	+ ชมพูอมเทา (Grayish Pink) แดงคล้ำ (Dark Red) -
Inorganic salt-starch agar (ISP4) ความสามารถในการเจริญ สีของเส้นใยอากาศ สีของเส้นใยอาหาร รงควัสดุละลายน้ำ	+ ชมพูอ่อน (Pale Pink) แดงอ่อน (Light Graish Red) -	+ ชมพูเทา (Pinkish Gray) แดงคล้ำ (Dark Red) -

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ลักษณะการเจริญของไอโซเลต AA8 บนสูตรอาหารต่าง ๆ (ต่อ)

สูตรอาหาร	ไอโซเลต	
	AA8	<i>S. roseifaciens</i> DSM 106196 ^T
Glycerol-asparagine agar (ISP5) ความสามารถในการเจริญ สีของเส้นใยอากาศ สีของเส้นใยอาหาร รงควัตถุละลายน้ำ	+ ม่วงแดงเข้ม (Strong Reddish Purple) ม่วงแดงสว่าง (Vivid Reddish Purple) -	+ แดงม่วงเข้ม (Strong Purplish Red) แดงเข้ม (Moderate Red) -
Peptone-yeast extract iron agar (ISP6) ความสามารถในการเจริญ สีของเส้นใยอากาศ สีของเส้นใยอาหาร รงควัตถุละลายน้ำ	+ น้ำตาลเทา (Brownish Gray) น้ำตาลอ่อนอมเทา (Light Grayish Brown) -	+ น้ำตาลเข้ม (Dark Grayish Red) น้ำตาลเข้มอมเทา (Dark Reddish Gray) -
Tyrosine agar (ISP7) ความสามารถในการเจริญ สีของเส้นใยอากาศ สีของเส้นใยอาหาร รงควัตถุละลายน้ำ	+ ขาวอมชมพู (Pinkish White) แดงเข้ม (Very Deep Red) -	+ ขาวอมชมพู (Pinkish White) แดงเข้ม (Very Deep Red) -

หมายเหตุ (+) เจริญได้ (-) ไม่เจริญ

4.1.1.3 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

ไอโซเลต AA8 เจริญได้ในอาหารที่มีค่าพีเอชตั้งแต่ 4 – 9 เจริญได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 10 – 45 องศาเซลเซียส เจริญบนอาหาร ISP2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 1 - 6 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2) พบความสามารถในการใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ อัลฟาแอลแรมโนส (α -L-rhamnose sucrose) น้ำตาลซูโครส (sucrose) ดีแมนโนส (D+mannose) อินูลิน (Inulin) ไมโออินโนซิทอล (myoinositol) ราฟฟิโนส (raffinose) ดีเมลลิโบโอส (D+melibiose) และ ดีแมนนิทอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(D+mannitol) เป็นแหล่งคาร์บอน (ตารางที่ 4.3) ใช้แหล่งไนโตรเจนได้ทุกชนิด สามารถสร้างกรด โดยใช้น้ำตาล ดีไรโบส (D-Ribose) ดีแมนโนส (D+mannose) ดีทรีฮาโลส (D-Trehalose) กลีเซอรอล (glycerol) ดีกลูโคส (D+glucose) และ ดีฟรุคโตส (D-Fructose) ผลิตเอนไซม์ อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline phosphatase) เอสเทอร์เรส (Esterase C 4) เอสเทอร์เรสไลเปส (Esterase Lipase C 8) ลิวซีนอะริลามิเดส (Leucine arylamidase) วาลีนอะริลามิเดส (Valine arylamidase) ซิสเตอีนอะริลามิเดส (Cystine arylamidase) แอลฟาไคโมทริปซิน (α -chymotrypsin) แอซิดฟอสฟาเตส (Acid phosphatase) แนฟโพลเอเอสบีเอลฟอสโฟไฮโดรเลส (Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase) และ เอ็นอะซิetylเบต้ากลูโคซามิเดส (N-acetyl- β -glucosaminidase) (ตารางที่ 4.4) สามารถย่อยและตกตะกอนโปรตีนในนม (milk peptonization and milk coagulation) รีดิซไนเตรท (nitrate reduction) ย่อยสลายเจลาติน (Gelatin test) สร้างเอนไซม์ยูรีเอส (urease test) เอนไซม์คะตาเลส (Catalase test) เอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase test) และเอนไซม์ยูรีเอส (urease test) ได้ เมื่อเทียบไอโซเลต AA8 กับ *S. roseifaciens* DSM 106196^T พบว่า *S. roseifaciens* DSM 106196^T มีการเจริญบนค่าพีเอชตั้งแต่ 5 – 7 เจริญบนโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 1 – 7 เเปอร์เซ็นต์ซึ่งมากกว่าไอโซเลต AA8 นอกจากนี้ยังสามารถใช้น้ำตาลฟรุคโตส และ แลคโตสได้ในขณะที่ไอโซเลต AA8 ไม่สามารถใช้ได้ แต่ *S. roseifaciens* DSM 106196^T ไม่สามารถใช้น้ำตาลแมนโนสได้ในขณะที่ไอโซเลต AA8 สามารถใช้ได้ พบว่า *S. roseifaciens* DSM 106196^T ไม่สามารถใช้น้ำตาลฟรุคโตสในการสร้างกรดได้ และ *S. roseifaciens* DSM 106196^T ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ยูรีเอส ออกซิเดส

4.1.2 ลักษณะอนุกรมวิธานทางเคมี (Chemotaxonomy Characteristic)

ผนังเซลล์ของไอโซเลต AA8 ประกอบไปด้วยไอโซเมอร์ของกรดไดอะมีโนพิเมลิกแบบ LL-DAP พบน้ำตาลกลูโคส (glucose) แมนโนส (mannose) และ ไรโบส (ribose) พบชนิดของหมู่เอซิล แบบอะซีทิล (acteyl) พบชนิดของฟอสโฟลิปิด 4 ชนิด ได้แก่ ฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine; PE) ไดฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol; DPG) ฟอสฟาติดีลอินซิทอล (phosphatidylinositol; PI) และฟอสฟาติดีลอินซิทอลแมนโนสซิเดส (phosphatidylinositol mannosides; PIMs) กรดไขมันที่พบมากในเซลล์ได้แก่ C_{16:0} iso-C₁₅ anteiso-C₁₅ iso-C₁₆ และ anteiso-C₁₇ (ตารางที่ 4.5) พบเมนาควิโนน (menaquinone) MK-10 (H₈) MK-9 (H₈) MK-9 (H₆) MK-9 (H₄) และ MK-9 (H₂) ไม่พบกรดมัคคอลลีโนเซลล์ ในขณะที่ *S. roseifaciens* ไม่พบเมนาควิโนน MK-10 (H₈) MK-9 (H₆) MK-9 (H₄) และ MK-9 (H₂) (Aart et al., 2018) ทำให้ทราบว่าไอโซเลต AA8 เป็นสกุล *Streptomyces* เนื่องจากมีลักษณะคล้ายคลึงกันกับสกุล *Streptomyces* ของหนังสือ Bergey's manual of systematic bacteriology ที่ระบุว่าสกุล

Streptomyces จะพบรูปแบบของกรดไดอะมีโนพิเมลิกในผนังเซลล์ เป็นแบบ
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

LL-DAP ชนิดของกรดไขมันมักจะเป็นชนิดของ *iso* และ *anteiso* ชนิดของเมนาควิโมแมกพบ MK-8 MK-9 และ MK-10 และมักพบชนิดของกรดไขมันมีขั้วแบบ ฟอสฟาติดีลเอทาโนลามีน ไดฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล ฟอสฟาติดีลอีโนซิทอล และฟอสฟาติดีลอีโนซิทอลแมนโนสซิเดส เป็นส่วนใหญ่ (Goodfellow *et al.*, 2012)

4.1.3 ลักษณะทางจีโนมไทป์

4.1.3.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทป์ในช่วงยีน 16S rRNA

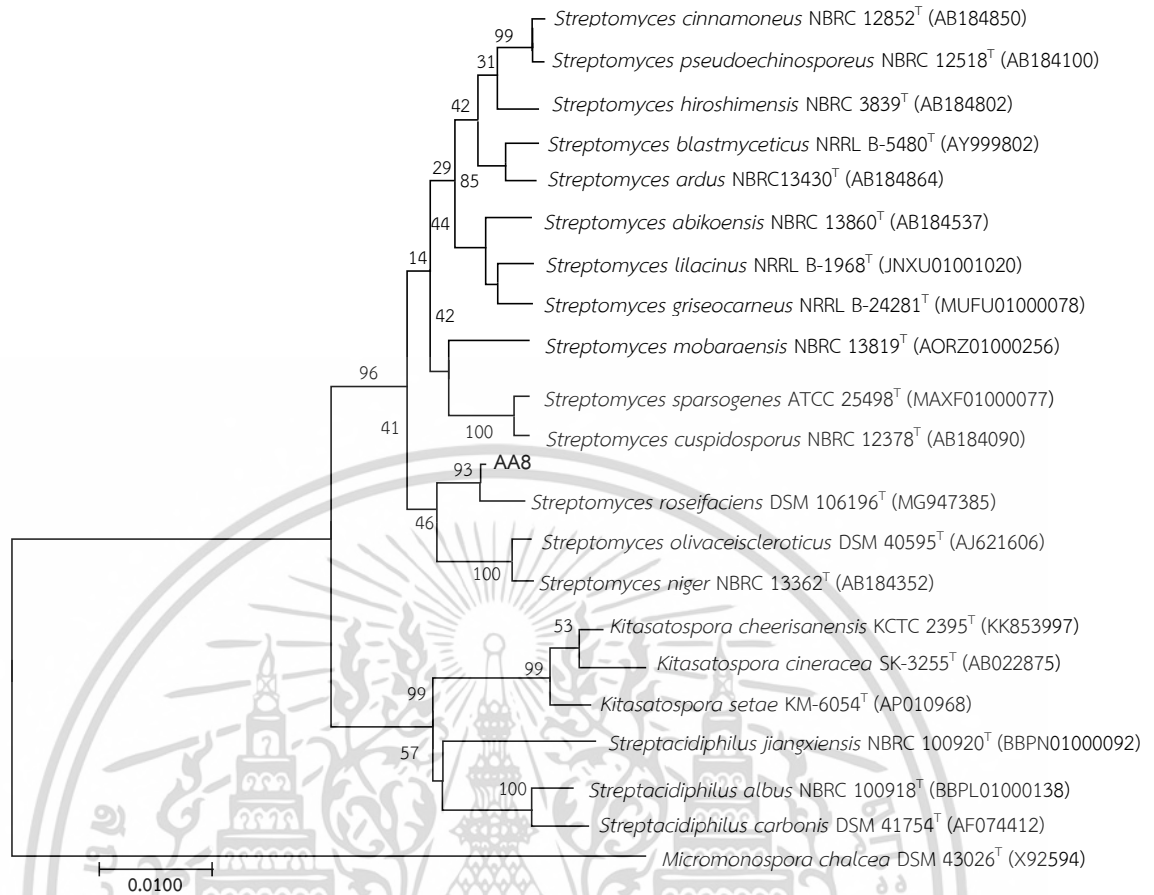
การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทป์ของ 16S rRNA gene ของไอโซเลต AA8 พบว่าใกล้เคียงกับ *S. roseifaciens* DSM 106196^T ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทป์ที่ 99.86 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นำข้อมูลมาจัดเรียงข้อมูล (multiple alignment) เพื่อสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic trees) ทั้ง 3 แบบ ได้แก่ neighbor-joining (NJ) (รูปที่ 4.2) maximum parsimony (MP) (รูปที่ 4.3) และ maximum likelihood (ML) (รูปที่ 4.4) พบว่าไอโซเลต AA8 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ *S. roseifaciens* DSM 106196^T ในแผนภูมิของ NJ ค่า Bootstrap เท่ากับ 93 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลต AA8 มีระยะห่างของการวิวัฒนาการสั้นกว่า *S. roseifaciens* DSM 106196^T อย่างเห็นได้ชัด และแผนภูมิของ MP ค่า Bootstrap เท่ากับ 87 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับ *S. roseifaciens* DSM 106196^T ในขณะที่แผนภูมิของ ML แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต AA8 แยกออกจาก *S. roseifaciens* DSM 106196^T เพราะการจัดกลุ่มแบบ ML เป็นค่าความน่าจะเป็นโดยจะคำนวณจากค่าพารามิเตอร์ของสิ่งมีชีวิตเพื่อบ่งบอกความน่าจะเป็นของค่าความสัมพันธ์ที่แท้จริงดังนั้นไอโซเลต AA8 อาจจะมีลักษณะที่พัฒนาร่วมกันกับ *S. roseifaciens* DSM 106196^T น้อยจึงอาจจะมีโอกาสเป็นสายพันธุ์ใหม่ได้ (พัฒน์, 2547)

4.1.3.2 การวิเคราะห์ลักษณะจีโนมของไอโซเลต AA8

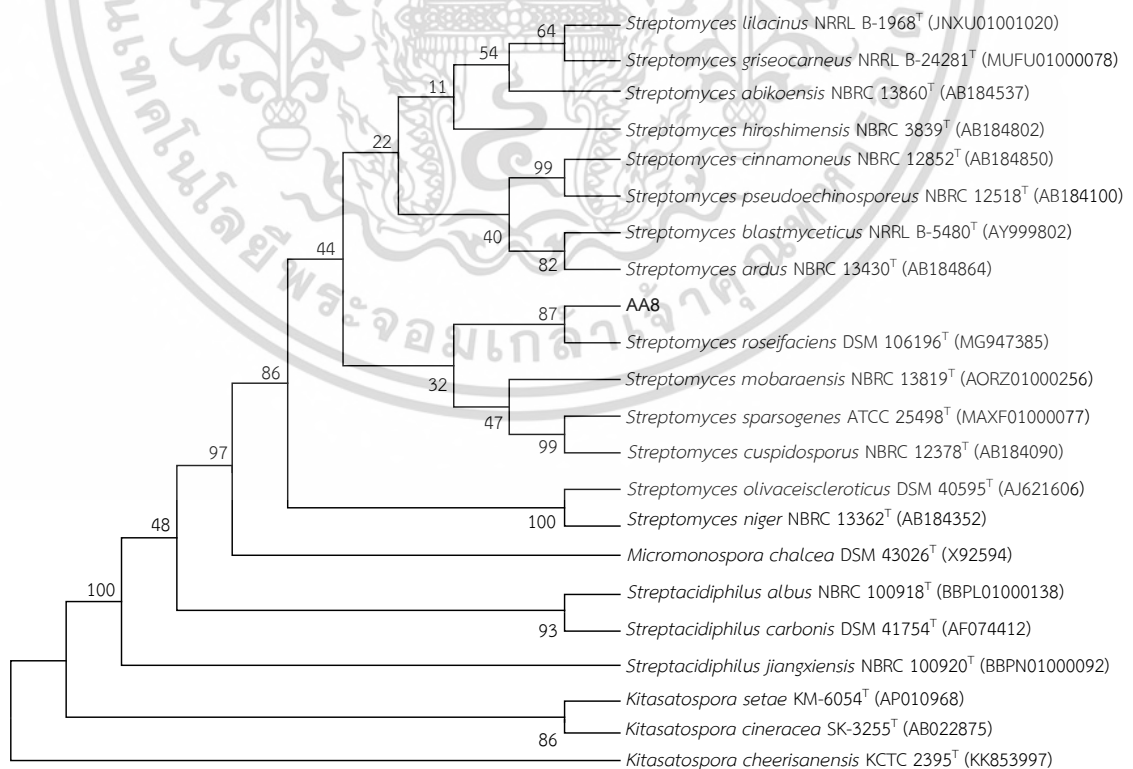
1. ลักษณะทางอนุกรมวิธานของไอโซเลต AA8 เมื่อวิเคราะห์ลักษณะทางจีโนม

พบว่าค่า average nucleotide identity (ANI) ใกล้เคียงกับ *S. roseifaciens* DSM 106196^T *S. hirosimensis* NBRC 3839^T และ *S. cinnamoneus* NBRC 12852^T ที่ค่า ANIb เท่ากับ 94.11 91.06 และ 81.03 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และค่า ANIm เท่ากับ 95.09 92.83 และ 86.95 เปอร์เซ็นต์ ค่า digital DNA – DNA hybridization เทียบกับ *S. roseifaciens* DSM 106196^T อยู่ที่ 68.50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งต่ำกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ และค่า ANIb มีค่าน้อยกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ นำข้อมูลของจีโนมทั้งหมดของไอโซเลต AA8 มาสร้างแผนภูมิ Phylogenomic เพื่อเปรียบเทียบสายพันธุ์ใกล้เคียง ทำให้ยืนยันได้ว่าไอโซเลต AA8 เป็นเชื้อสายพันธุ์ใหม่ ที่มีความใกล้เคียงกับ *S. roseifaciens* DSM 106196^T มากที่สุด (รูปที่ 4.5) ที่ค่าช่วงตัด (cut off) ของ ANI น้อยกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ (Hidalgo *et al.*, 2015) และค่า dDDH ที่น้อยกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ (Kolthoff *et al.*, 2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ผ่านการยินยอมของเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

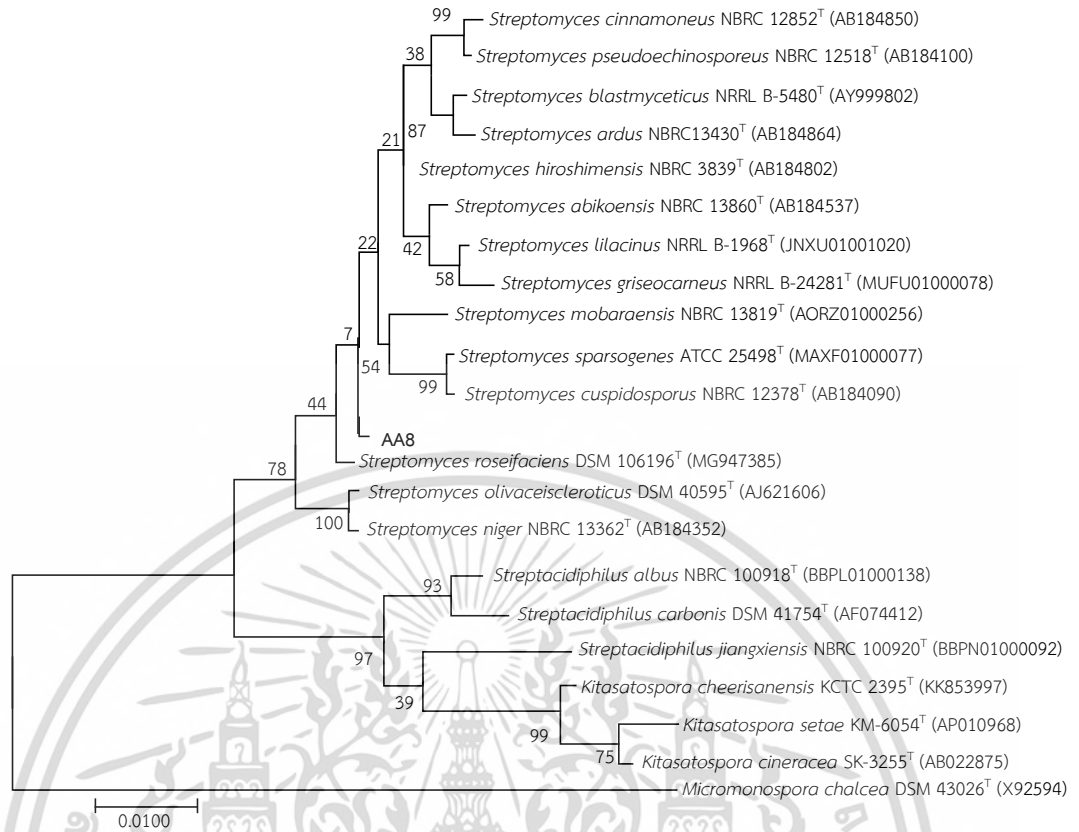


รูปที่ 4.2 ตำแหน่งของไอโซเลต AA8 บนแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ (neighbor-joining)

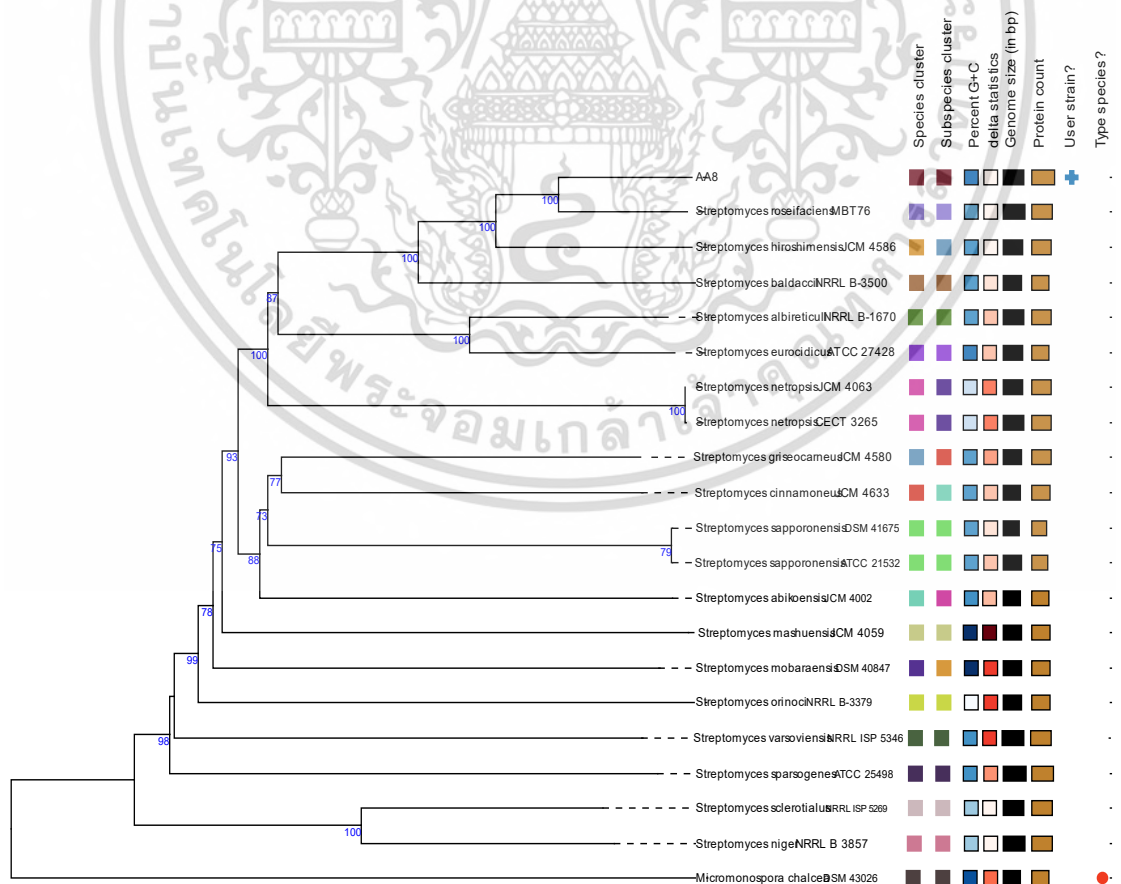


รูปที่ 4.3 ตำแหน่งของไอโซเลต AA8 บนแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ (maximum parsimony)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 ตำแหน่งของไอโซเลต AA8 บนแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ (maximum likelihood)



เอกสารนี้รูปที่ 4.5 แผนภูมิ Phylogenomic ของ Streptomyces sp. AA8
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของไอโซเลต AA8 เทียบกับสายพันธุ์อ้างอิง *S. roseifaciens* DSM 106196^T

ไอโซเลต	ความเข้มข้นเกลือ (%)								ความเป็นกรด - ต่าง								อุณหภูมิ (°C)							
	1	2	3	4	5	6	7	4	4	5	6	7	8	9	10	10	4	10	20	30	40	45	50	
AA8	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	
<i>S. roseifaciens</i> DSM 106196 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	

ตารางที่ 4.3 ลักษณะการใช้คาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และความสามารในการสร้างกรดของไอโซเลต AA8 เทียบกับ *S. roseifaciens* DSM 106196^T

แหล่งคาร์บอน		
ไอโซเลต AA8		
<i>S. roseifaciens</i> DSM 106196 ^T		
D-Fructose	-	+
D+Manitol	+	+
D+Melibiose	+	+
D+Glucose	-	-
Raffinose	+	+
Myoinositol	+	+
Inulin	+	+
D-Trehalose	-	-
D+Galactose	-	-
D+Cellubiose	-	-
Xylitol	-	-
D+Mannose	+	-
Sucrose	+	+
D+Melezitose	-	-
D-Ribose	-	-
D+Lactose	-	+
Dextran	-	-
D+Xylose	-	-
α-L-Rhamnose	+	+
L+Arabinose	-	-

ตารางที่ 4.3 ลักษณะการใช้คาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และความสามารในการสร้างกรดของไอโซเลต AA8 เทียบกับ *S. roseifaciens* DSM 106196^T (ต่อ)

การสังกรร					
ไอโซเลต AA8					
<i>S. roseifaciens</i> DSM 106196 ^T					
แหล่งไนโตรเจน					
ไอโซเลต AA8					
<i>S. roseifaciens</i> DSM 106196 ^T					
D-Fructose	+	-			
D+Manitol	-	-			
D+Melibiose	-	-			
D+Glucose	+	+			
Raffinose	-	-			
Myoinositol	-	-			
Glycerol	+	+			
D-Trehalose	+	+			
D+Galactose	-	-	L-Valine	+	+
D+Cellubiose	-	-	L-Threonine	+	+
Xylitol	-	-	L-Serine	+	+
D+Mannose	-	+	L-Proline	+	+
Sucrose	-	-	L-Phenylalanine	+	+
D+Melezitose	-	-	L-Methionine	+	+
D-Ribose	+	+	L-Hydroxy-Proline	+	+
D+Lactose	-	-	L-Histidine	+	+
Dextran	-	-	L-Cystein	+	+
D+Xylose	-	-	L-Asparagine	+	+
α -L-Rhamnose	-	-	L+Argenin	+	+
L+Arabinose	-	-	DL-2-Aminobutyric	-	-

หมายเหตุ + เจริญเติบโตดี = เจริญเติบโตดี - ไม่เจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 การผลิตเอนไซม์ของไอโซเลต AA8 และ *S. roseifaciens* DSM 106196^T

หมายเลข	การผลิตเอนไซม์	ผล	
		ไอโซเลต AA8	<i>S. roseifaciens</i> DSM 106196 ^T
1	Control	+	+
2	Alkaline phosphatase	+	+
3	Esterase (C 4)	+	+
4	Esterase Lipase (C 8)	+	+
5	Lipase (C 14)	-	-
6	Leucine arylamidase	+	+
7	Valine arylamidase	+	+
8	Cystine arylamidase	+	+
9	Trypsin	-	+
10	α -chymotrypsin	+	+
11	Acid phosphatase	+	+
12	Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	+	+
13	α -galactosidase	-	-
14	β -galactosidase	-	-
15	β -glucuronidase	-	-
16	α -glucosidase	-	-
17	β -glucuronidase	-	-
18	N-acetyl- β -glucosaminidase	+	+
19	α -mannosidase	-	-
20	α -fucosidase	-	-

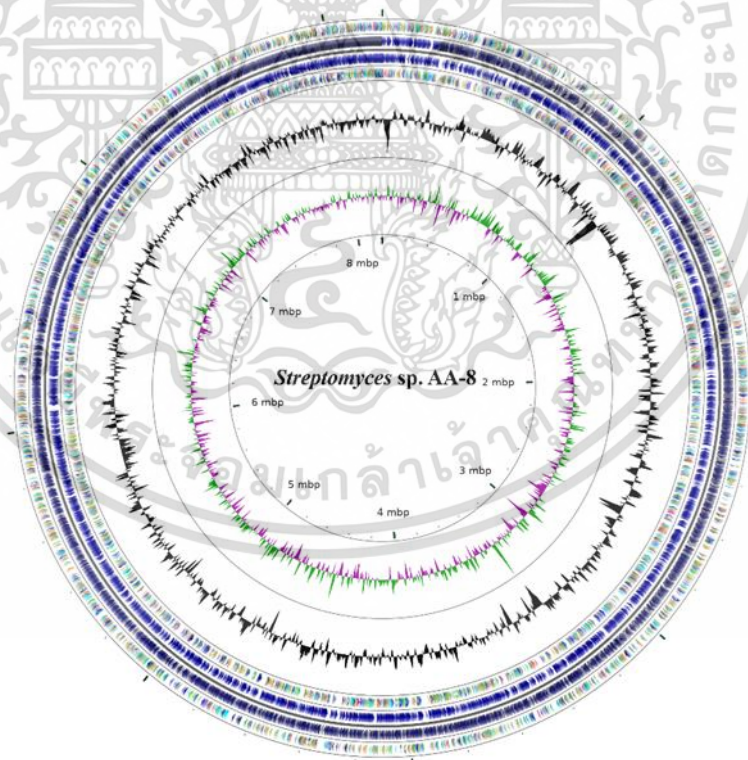
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 องค์ประกอบของกรดไขมันภายในเซลล์ของไอโซเลต AA8 และ *S. roseifaciens* DSM 106196^T

ชนิดของกรดไขมัน	ปริมาณกรดไขมัน (ร้อยละ)	
	ไอโซเลต AA8	<i>S. roseifaciens</i> DSM 106196 ^T (Aart <i>et al.</i> , 2018)
Saturated fatty acids		
C _{12:0}	0.18	-
C _{13:0}	0.05	-
C _{14:0}	0.85	-
C _{16:0}	10.15	5.64
C _{18:0}	0.19	-
Unsaturated fatty acids		
Iso-C _{16:1} H	0.30	-
C _{16:1} ω9	-	2.84
Anteiso-C _{17:1} ω9c	1.00	-
C _{17:1} ω7c	0.10	-
C _{17:0} cyclo	2.30	-
C _{18:1} ω9	-	8.93
C _{20:11} ω11	-	4.53
Branched fatty acids		
anteiso-C ₁₁	0.09	-
Iso-C ₁₂	0.20	-
Iso-C ₁₃	0.44	-
anteiso-C ₁₃	0.39	-
Iso-C ₁₄	3.60	8.28
Iso-C ₁₅	9.96	5.11
Anteiso-C ₁₅	31.59	34.40
anteiso-C ₁₆	-	2.54
iso-C ₁₆	16.83	7.99
Iso-C ₁₇	2.47	-
Anteiso-C ₁₇	10.38	10.92
Iso-C ₁₈	0.78	-
Anteiso-C ₁₉	0.10	-

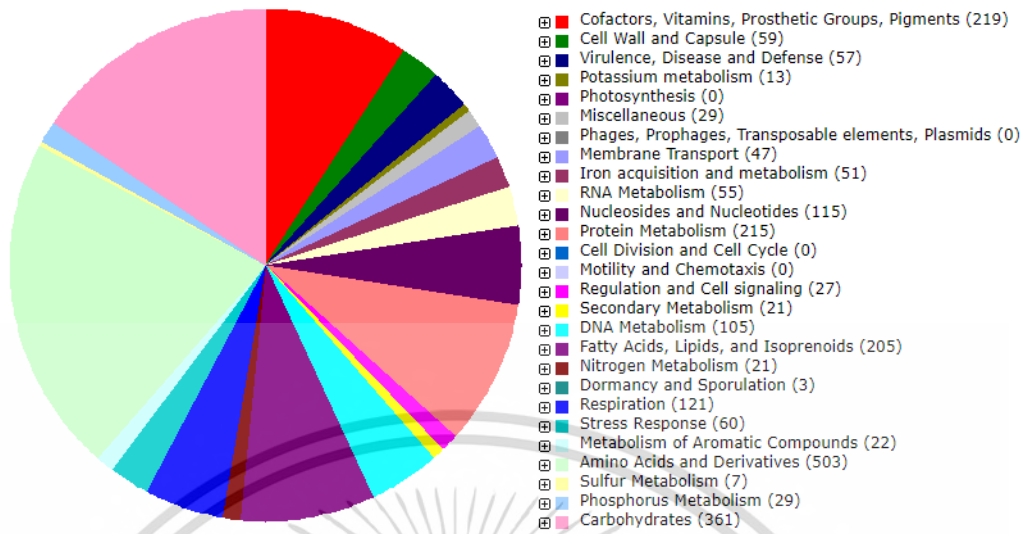
เอกสารนี้เป็นทรัพย์สินทางปัญญาของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อมูลทางชีวสารสนเทศของไอโซแลต AA8 พบว่าแบบร่างของจีโนมทั้งหมดมีความยาว 8,178,700 คู่เบส (bp) จำนวนทั้งหมด 1252 contigs ค่า N50 เท่ากับ 12 กิโลเบส (kp) ครอบคลุมของจีโนมเท่ากับ 90X (ตารางที่ 4.6) (รูปที่ 4.6) ผลจากการทำนายยีน พบยีนทั้งหมด 7,203 ยีน เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับอาร์เอ็นเอ (RNA metabolism) เท่ากับ 56 ยีน ได้แก่ rRNA 3 ยีน tRNA 52 ยีน และ tmRNA 1 ยีน ที่เหลืออีก 7,203 ยีน เป็นยีนที่แปลรหัสไปเป็นโปรตีน การวิเคราะห์ Functional genes โดยใช้ clusters of orthologous genes (COGs) (รูปที่ 4.7) บ่งบอกกลุ่มยีนที่ทำหน้าที่ที่ต่างกันอย่างออกไปเช่น กลุ่มยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างวิตามิน (Vitamin) สารสี (pigments) โคแฟคเตอร์ (cofactors) กรดไขมัน (fatty acids) ลิพิด (lipids) ไอโซพรีนอยด์ (isoprenoids) เมตาบอลิซึมของโปรตีน (protein metabolism) เมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate metabolism) เป็นต้น จากการเปรียบเทียบยีนของไอโซแลต AA8 และ *S. roseifaciens* DSM 106196^T โดยแผนที่ความคล้ายคลึง (Synteny map) มียีนที่เหมือนกันและต่างกัน โดยยีนที่เหมือนกันจะเกิดการเชื่อมโยงกันระหว่าง 2 จีโนม จึงแสดงให้เห็นว่า *Streptomyces* sp. AA8 และ *S. roseifaciens* DSM 106196^T มีทั้งส่วนที่เชื่อมโยงกันและส่วนที่ไม่เชื่อมโยงกันทำให้มีความแตกต่างกันอยู่ในระดับหนึ่ง (รูปที่ 4.8)

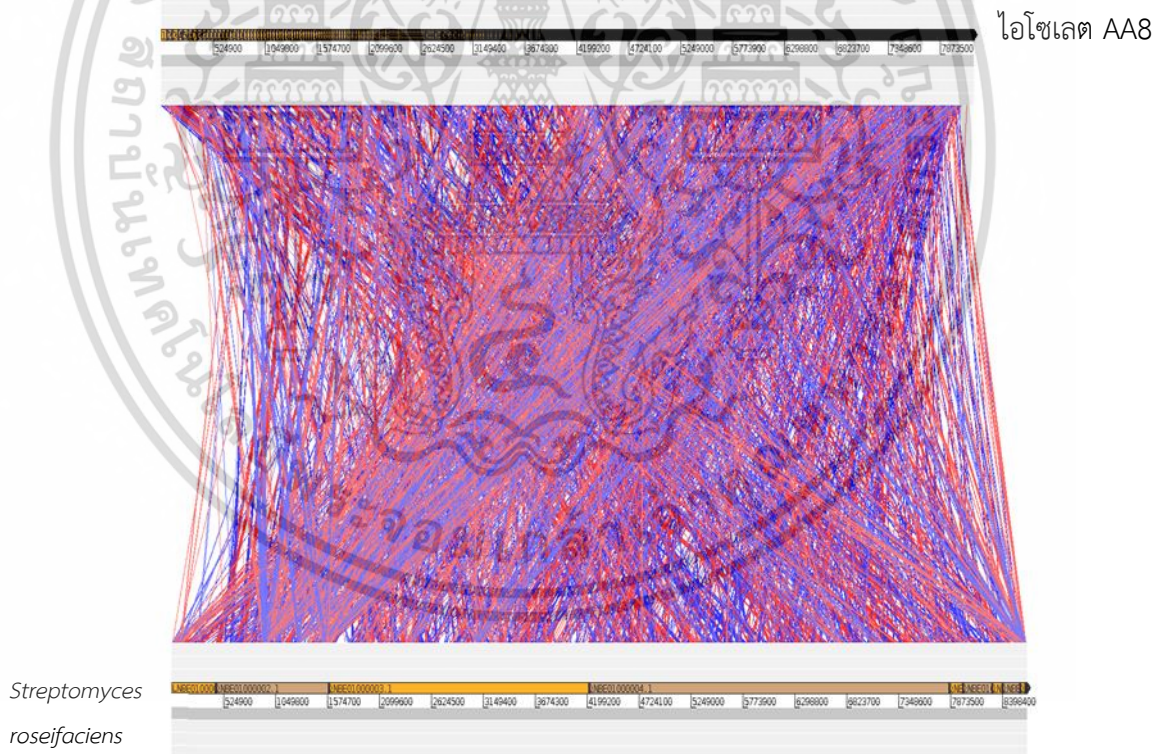


รูปที่ 4.6 แผนภาพ Circular map ของ *Streptomyces* sp. AA8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 แผนภาพ clusters of orthologous genes (COGs) ของ *Streptomyces* sp. AA8



รูปที่ 4.8 แผนที่เชื่อมโยง (Synteny map) แสดงการจัดเรียงยีนบนจีโนมของ *Streptomyces* sp. AA8 และ *S. roseifaciens* DSM 106196^T

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง 4.6 ข้อมูลของจีโนมทั้งหมดของไอโซเลต *Streptomyces* sp. AA8 และ *S. roseifaciens* DSM 106196^T

ข้อมูล	ไอโซเลต AA8	<i>S. roseifaciens</i> DSM 106196 ^T
Sequencing Technology	Illumina MiSeq	Illumina HiSeq
Genome coverage	90X	200.0x
N50	12,659	2,630,732
Number of Contigs	1,252	18
Genome size (bp)	8,178,700	8,639,831
DNA G+C content (%)	72.56	71.90
Number of genes	8,255	7,972
Protein coding genes	7,203	7,598
rRNA	3	ND
tRNA	52	ND
tmRNA	1	ND
misc_RNA	0	ND

2. ทำนายกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับสารทุติยภูมิ

จากการทำนายยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิด้วยโปรแกรม antiSMASH พบว่า *Streptomyces* sp. AA8 มีกลุ่มยีน Polyketide synthase ชนิดที่ 1 (T1PKS) กลุ่มยีน Polyketide synthase ชนิดที่ 2 (T2PKS) กลุ่มยีน Polyketide synthase ชนิดที่ 3 (T3PKS) กลุ่มยีน non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) กลุ่มยีนเทอร์พีน (terpene) เมลานิน (melanin) และกลุ่มยีนอื่นๆ โดยกลุ่มยีนเหล่านี้สามารถสังเคราะห์กลุ่มสาร paenibactin จาก *Paenibacillus elgii* B69 ที่ระดับความคล้ายคลึง 83 เปอร์เซ็นต์ (MIBiG accession BGC0000401; Genbank accession HQ668144.1) กลุ่มยีนที่สังเคราะห์สาร ectoine จาก *Streptomyces anulatus* ที่ระดับความคล้ายคลึง 75 เปอร์เซ็นต์ (MIBiG accession BGC0000853; Genbank accession AY524544.1) กลุ่มยีนที่สังเคราะห์สาร sceliphrolactam จาก *Streptomyces* sp. SD85 (MIBiG accession BGC0001770; Genbank accession KX230849.1) เป็นต้น (ตารางที่ 4.7) จากข้อมูลที่ได้กล่าวมาข้างต้นทำให้เห็นว่า *Streptomyces* sp. AA8 สามารถผลิตสารทุติยภูมิได้หลากหลาย และอาจจะสามารถผลิตสารทุติยภูมิชนิดใหม่ได้เช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ยีนที่สร้างสารทุติยภูมิของ *Streptomyces* sp. AA8 เปรียบเทียบกับ *S. roseifaciens* DSM 106196^T

กลุ่มยีน	ตำแหน่ง (region)	สารทุติยภูมิ	ความคล้ายคลึง (%) <i>Streptomyces</i> sp. AA8	ความคล้ายคลึง (%) <i>S. roseifaciens</i> DSM 106196 ^T	MIBIG accession
T1PKS	contig 8	toxoflavin / fervenulin	57	53	BGC0001972
Terpene					
NRPS					
NRPS	contig 11	paenibactin	83	-	BGC0000401
T3PKS	contig 16	valinomycin / montanastatin	13	8	BGC0001846
Terpene					
transAT-PKS	contig 19	kirromycin	22	-	BGC0001070
NRPS					
T1PKS	contig 25	sceliphrolactam	60	24	BGC0001770
NRPS	contig 27	formicamycins A-M	4	21	BGC0001590
Melanin	contig 43	melanin	28	28	BGC0000908
NRPS-like	contig 51	cyphomycin	2	-	BGC0001877
T1PKS	contig 56	sanglifehrin A	11	-	BGC0001042
etoine	contig 63	etoine	75	-	BGC0000853
T1PKS	contig 65	ibomycin	12	-	BGC0001619
NRPS	contig 69	kirromycin	3	-	BGC0001070
NRPS	contig 74	deimino-antipain	66	66	BGC0001570

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ยีนที่สร้างสารทุติยภูมิของ *Streptomyces* sp. AA8 (ต่อ)

กลุ่มยีน	ตำแหน่ง (region)	สารทุติยภูมิ	ความคล้ายคลึง (%) <i>Streptomyces</i> sp. AA8	ความคล้ายคลึง (%) <i>S. roseifaciens</i> DSM 106196 ^T	MIBiG accession
T1PKS NRPS-like	contig 91	undecylprodigiosin	45	-	BGC0001063
T2PKS	contig 104	hirosidine	62	100	BGC0001960
NRPS NRPS-like	contig 120	A54145	8	-	BGC0000291
LAP	contig 164	telomestatin	33	-	BGC0001797
Terpene	contig 175	hopene	61	76	BGC0000663
NRPS	contig 215	cysteoamide	27	-	BGC0001567
T1PKS	contig 233	filpin	38	-	BGC0000059
NRPS	contig 242	puwainaphycin F minutissamide A	22	-	BGC0001950
T3PKS	contig 250	herboxidiene	2	-	BGC0001065
T1PKS	contig 264	sceliphrolactam	28	24	BGC0001770
Indole	contig 265	cyclomarin D	26	-	BGC0000333
T1PKS	contig 266	sceliphrolactam	24	100	BGC0001770
Melanin	contig 311	Melanin	28	28	BGC0000908

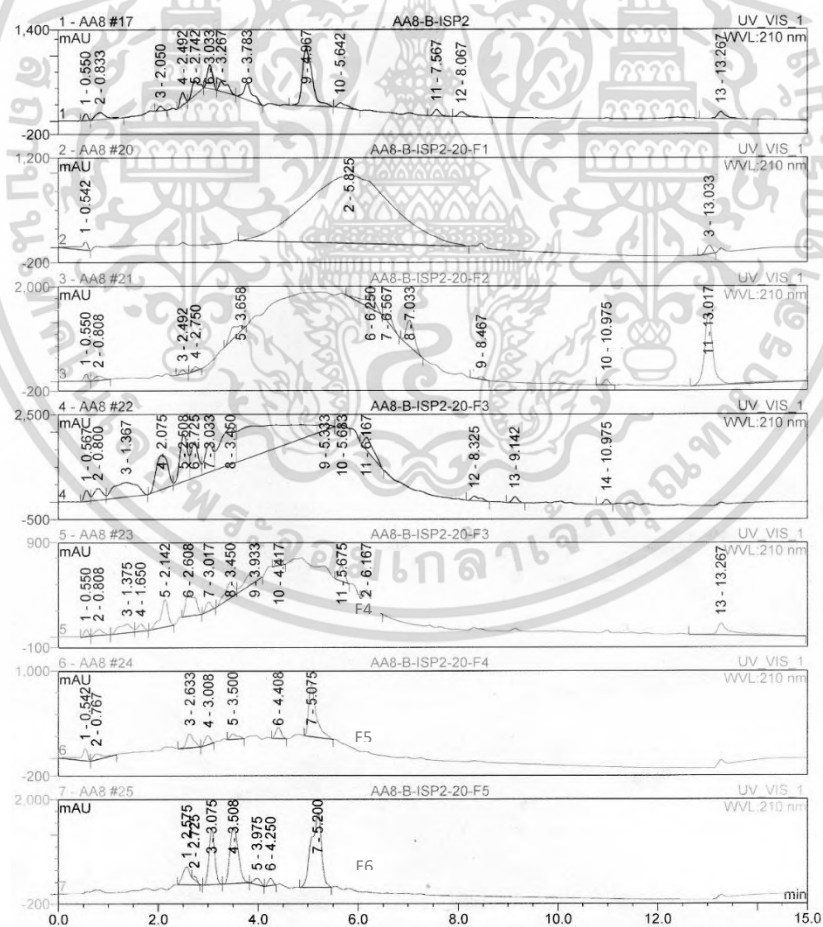
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การแยกสารทุติยภูมิให้บริสุทธิ์และการวิเคราะห์หึ่งค์ประกอบทางเคมี

4.2.1 การแยกสารทุติยภูมิโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี

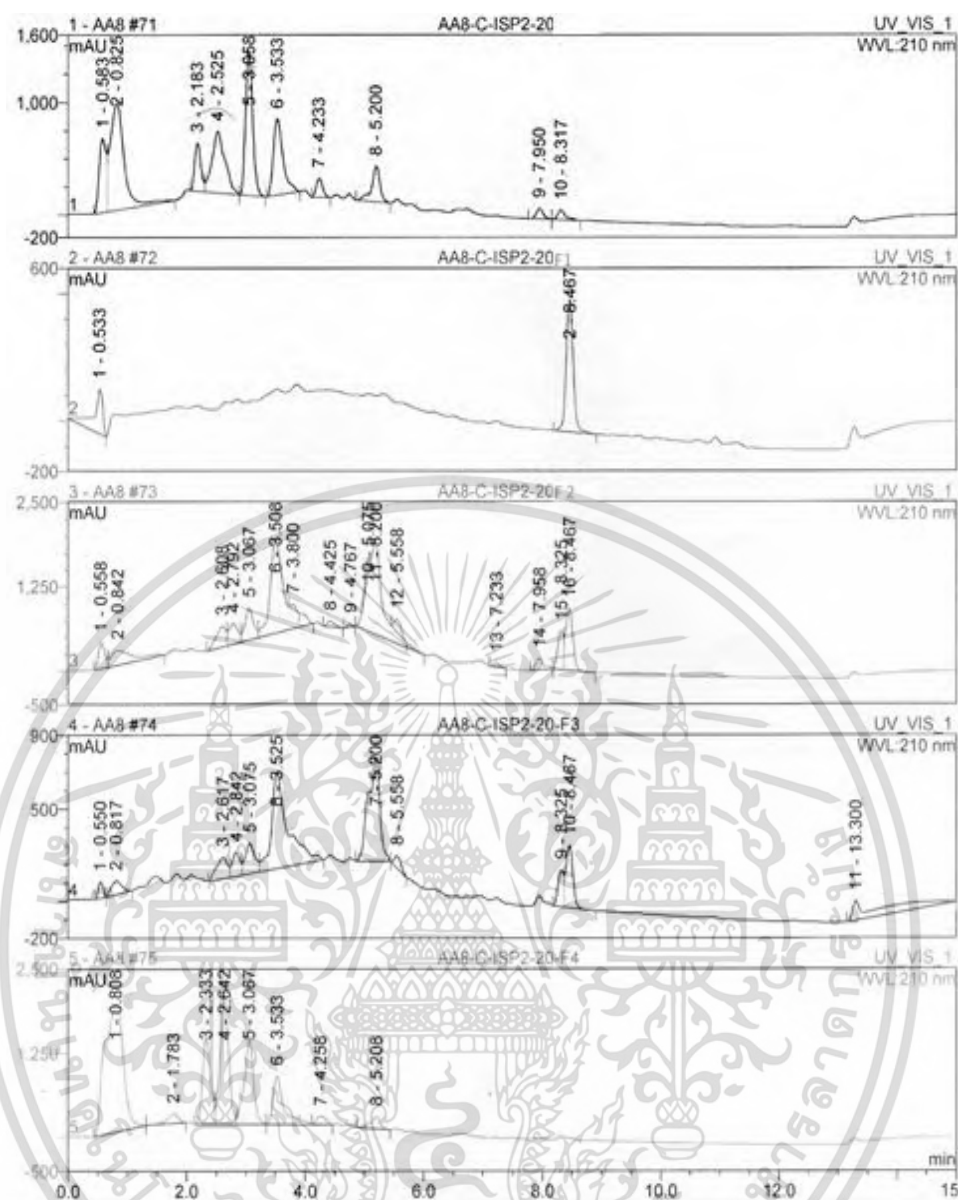
เลี้ยงไอโซเลต AA8 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ได้รับสารสกัดหยาบจากเซลล์โดยการหมักด้วยเมทานอลได้รับสารสกัดทั้งหมด 3.22 กรัม และได้รับสารสกัดหยาบจากน้ำหมักด้วยวิธี liquid-liquid extraction ได้รับสารสกัดหยาบทั้งหมด 1.41 กรัม นำมาแยกสารทุติยภูมิโดยใช้โครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ขนาด 45 x 28 เซนติเมตร เฟสเคลื่อนที่เป็นเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ เฟสคงที่เป็น Sephadex LH-20 เก็บสารที่แยกได้เป็นส่วน (fractions) นำทุกส่วนมาวิเคราะห์หึ่งค์ประกอบทางเคมีด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ส่วนที่มีสารเหมือนกันจะถูกนำมารวมกัน ได้ส่วนของสารสกัดจากน้ำหมัก 6 ส่วน (รูปที่ 4.9) ได้แก่ B1 B2 B3 B4

B5 และ B6 น้ำหนัก 141.8 111.1 249.2 123.3 413.9 และ 215.8 มิลลิกรัม ตามลำดับ ได้ส่วนของสารสกัดจากเซลล์ 4 ส่วน (รูปที่ 4.10) ได้แก่ C1 C2 C3 และ C4 น้ำหนัก 1,415.6 787.3 323.1 และ 260.7 มิลลิกรัม ตามลำดับ



รูปที่ 4.9 สารสกัดหยาบของน้ำหมัก AA8 และส่วนที่ถูกแยกคอลัมน์โครมาโทกราฟีทั้งหมด 6 ส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 สารสกัดหายาบของเซลล์ AA8 และส่วนนที่ถูแยกคอลัมน์โครมาโทกราฟีทั้งหมด 4 ส่วน

4.2.2 การแยกสารทุติยภูมิโดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

นำสารทุติยภูมิส่วน B5 B6 C3 และ C4 นำมาแยกด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เนื่องจากส่วนทั้ง 4 ส่วน นี้มีความน่าสนใจทางเคมี

ส่วนที่ B5 แยกด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้คอลัมน์ C18 แบบ preparative (shishedo 20 x 250 มิลลิเมตร) (ภาคผนวก ค ตารางที่ 1) ได้สารทั้งหมด 12 ส่วนย่อย ได้แก่ H 1 – H 12 (รูปที่ 4.11) นำส่วนย่อย B5H7 (ภาคผนวก ง ตารางที่ 2) และ B5H9 (ภาคผนวก ข ตารางที่ 3) ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วย ใช้คอลัมน์ C18 แบบ preparative (sunfire 19 x เอกสารนี้ 250 มิลลิเมตร) ไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนที่ B6 แยกด้วยเครื่องโครมาโทกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้คอลัมน์ preparative (sunfire 19 x 250 มิลลิเมตร) (ภาคผนวก ค ตารางที่ 4) ได้สารทั้งหมด 7 ตัว ได้แก่ สาร H 1 – H 6 (รูปที่ 4.11)

ส่วนที่ C3 แยกด้วยเครื่องโครมาโทกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง ใช้คอลัมน์ preparative (shishedo 20 x 250 มิลลิเมตร) (ภาคผนวก ค ตารางที่ 5) ได้สารทั้งหมด 9 ตัว ได้แก่ สาร H 1 – H 9 (รูปที่ 4.12)

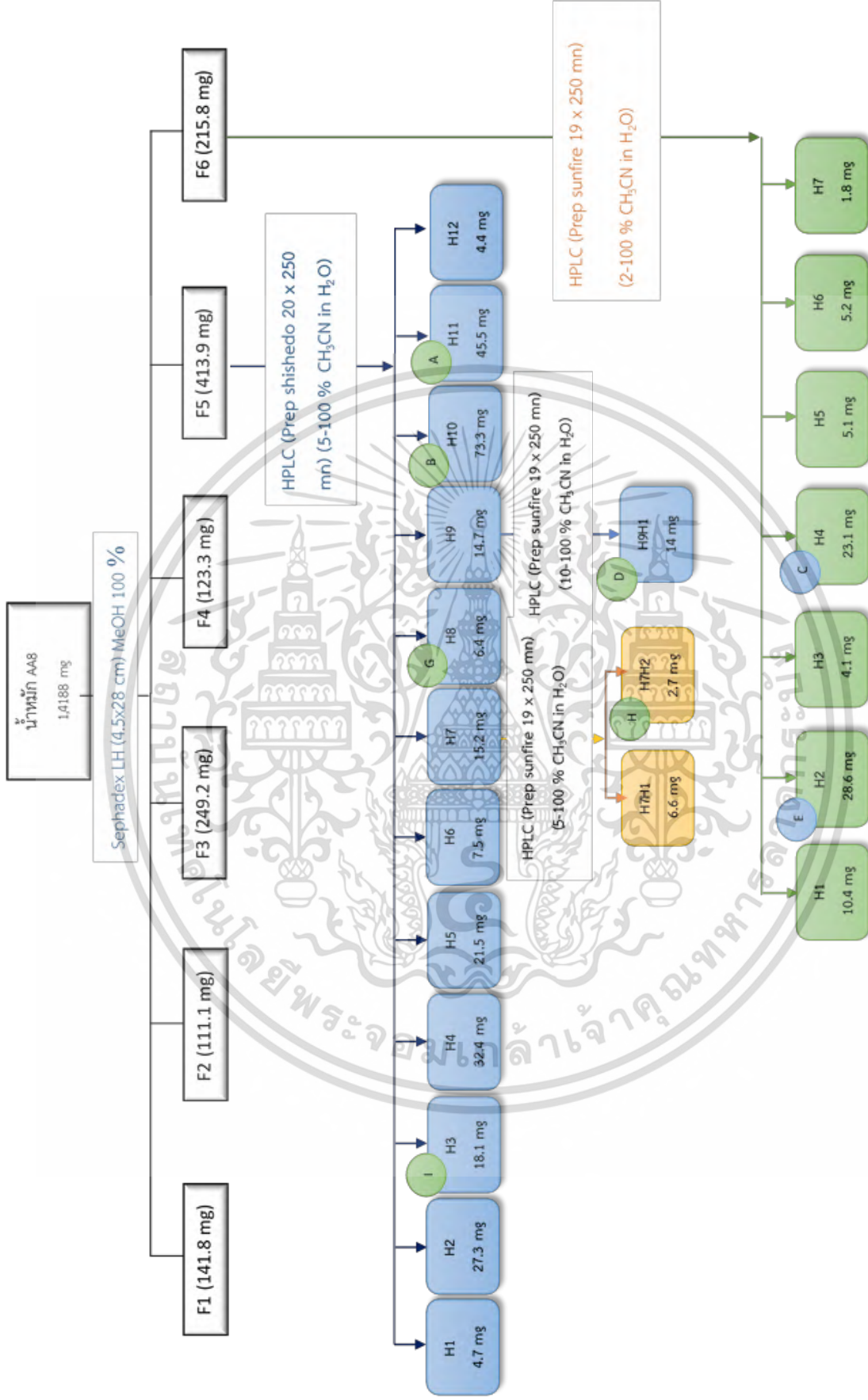
ส่วนที่ C4 แยกด้วยเครื่องโครมาโทกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง ใช้คอลัมน์ preparative (sunfire 19 x 250 มิลลิเมตร) อัตราส่วนที่ใช้แยกส่วนที่ C4 (ภาคผนวก ค ตารางที่ 6) ได้สารทั้งหมด 7 ตัว ได้แก่ สาร H 1 – H 7 (รูปที่ 4.12)

วิเคราะห์หาสารบริสุทธิ์เบื้องต้นด้วย เครื่องโครมาโทกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง ได้รับสารบริสุทธิ์ทั้งหมด 9 สาร ดังนี้ ส่วนของสารสกัดจากเซลล์ ได้แก่ C E และ F (รูป 4.11) ส่วนของสารสกัดจากน้ำหมัก ได้แก่ A B D G H และ I (รูป 4.12)

4.2.3 การศึกษาโครงสร้างของสารบริสุทธิ์

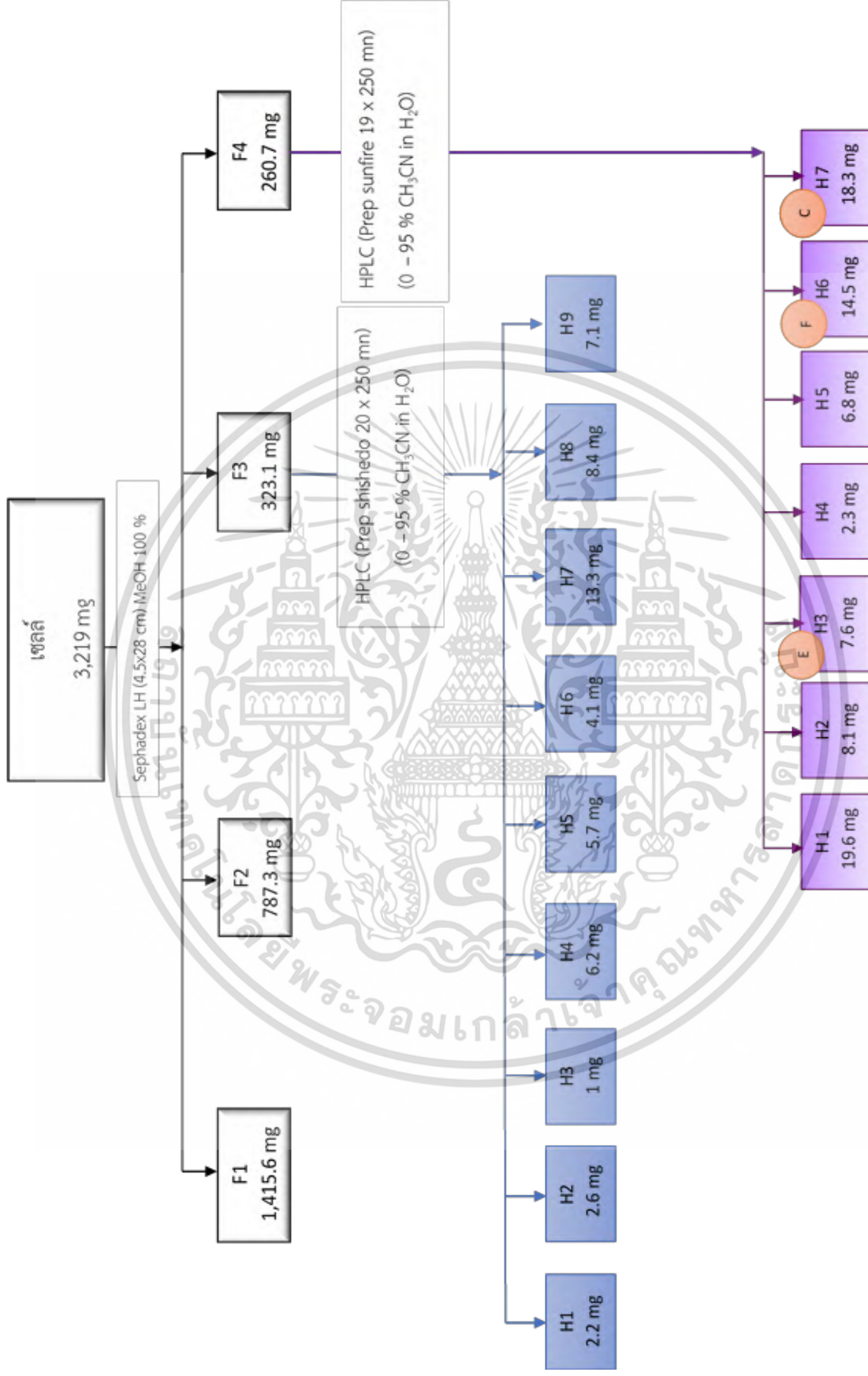
จากการแยกสารบริสุทธิ์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง จะได้รับทั้งหมดสารทั้ง 9 สาร และเมื่อทำการศึกษาทางเทคนิคสเปกโตรสโกปีจะทำให้ทราบโครงสร้างของสารทั้ง 9 สาร จากนั้นนำโครงสร้างของทั้ง 9 สารไปทำการสืบค้นข้อมูลพบว่าเป็นสารที่ถูกค้นพบแล้วทั้งหมด ได้แก่ สาร A (3,4-dimethoxypropiophenone) สาร B (6,7,8- trimethoxy-3-methylisocoumarin) สาร C (3, 4-dimethoxybenzamide) สาร D (6, 8-dimethoxy-3-methylisocoumarin) สาร E (4-hydroxy-3-methoxybenzamide) สาร F (3,4 dihydroxybenzaldehyde) สาร G (N_b - acetyltryptamine) สาร H (3-hydroxymethyl-6,7,8-trimethoxyisocoumarin) และ สาร I (1-methoxy-1H-pyrrole-2-carboxamide) โดยข้อมูลทั้งหมดที่ได้นำมาวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีโดยใช้เทคนิคทางสเปกโตรสโกปี ได้แก่ นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (Nuclear Magnetic Resonance; NMR) แมสสเปกโตรมิเตอร์ (Mass Spectrometer) และเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (uv-spectrophotometer) มีข้อมูลได้ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 การแยกสารสกัดยาของน้ำหมักโดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

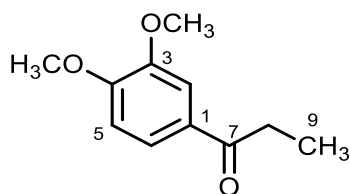
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 การแยกสารสกัดหยาบของเซลล์โดยใช้เครื่องมือโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3.1 สาร A (3,4-dimethoxypropiophenone)



รูปที่ 4.13 โครงสร้างทางเคมีของสาร A

สาร A (BF5H11) เป็นของหนืดสีน้ำตาล มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น λ_{\max} (log ϵ) 301 (4.27) 271 (4.43) 227 (4.60) และ 207 (4.45) นาโนเมตร มีสูตรโมเลกุล คือ $C_{11}H_{14}O_3$ ซึ่งคำนวณมาจากค่ามวลต่อประจุ (m/z) ที่ได้จาก HRESIMS สเปกตรัม เท่ากับ 217.0821 $[M+Na]^+$ ในส่วนของ 1H NMR สเปกตรัม (ภาคผนวก ง รูปที่ 1) พบสัญญาณโปรตอนของวงอะโรมาติกปรากฏที่ δ_H 7.635 (H-6, dd, $J = 8.4, 1.9$ Hz) 7.53 (H-2, d, $J = 1.9$ Hz) และ 7.03 (H-5, d, $J = 8.4$ Hz) นอกจากนี้ยังพบสัญญาณของเมทิลีนโปรตอนปรากฏที่ δ_H 2.99 (H-8, q, $J = 7.3$ Hz) และพบสัญญาณของเมทิลโปรตอนปรากฏที่ δ_H 3.89 (3-OCH₃, s) 3.87 (4-OCH₃, s) และ 1.12 (H-9, s) (ตารางที่ 4.8) ส่วน ^{13}C NMR สเปกตรัม (ภาคผนวก ง รูปที่ 4) พบสัญญาณทั้งหมด 11 สัญญาณ ประกอบด้วยสัญญาณของเมทิลคาร์บอน (methyl; CH₃) จำนวน 3 สัญญาณ ปรากฏที่ δ_C 56.12 (3-OCH₃) 56.00 (4-OCH₃) และ 8.67 (C-9) ppm สัญญาณของเมทิลีนคาร์บอน (methylene; CH₂) จำนวน 1 สัญญาณ ปรากฏที่ δ_C 31.57 (C-8) ppm สัญญาณของมีเทนคาร์บอน (methine; CH) จำนวน 3 สัญญาณ ปรากฏที่ δ_C 123.14 (C-6) 111.42 (C-5) และ 111.21 (C-2) ppm (ตารางที่ 4.8) และสัญญาณของควอเทอนารีคาร์บอน (quaternary; C) จำนวน 4 สัญญาณ ปรากฏที่ δ_C 199.10 (C-7) 154.31 (C-4), 150.09 (C-3) และ 131.00 (C-1) ppm การวิเคราะห์ผลของ COSY สเปกตรัม (ภาคผนวก ง รูปที่ 7) ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนกับโปรตอนพบว่า โปรตอน H-8 สัมพันธ์กับโปรตอน H-9 โปรตอน H-2 สัมพันธ์กับโปรตอน H-6 และโปรตอน H-5 สัมพันธ์กับโปรตอน H-6 ซึ่งสรุปได้ว่าวงอะโรมาติกนี้เป็นแบบวงอะโรมาติกที่มีกลุ่มแทนที่ที่ตำแหน่ง 1,2,4 (1,2,4-trisubstituted benzene) การวิเคราะห์ผลของ HSQC สเปกตรัม (ภาคผนวก ง รูปที่ 8) ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนกับคาร์บอนที่โปรตอนนั้นสัมพันธ์อยู่ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.8 การวิเคราะห์ HMBC สเปกตรัม (ภาคผนวก ง รูปที่ 9) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนกับคาร์บอนในระยะ 2-4 พันธะ พบว่า โปรตอนปรากฏที่ δ_H 7.03 (H-5) สัมพันธ์กับคาร์บอน δ_C 133.00 (C-1) และ 150.09 (C-3) โปรตอนปรากฏที่ δ_H 7.53 (H-2) สัมพันธ์กับคาร์บอน δ_C 123.14 (C-6) 154.31 (C-4) และ 199.10 (C-7) โปรตอนปรากฏที่ δ_H 7.65

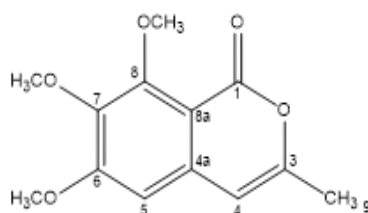
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(H-6) สัมพันธ์กับคาร์บอน δ_C 111.42 (C-2) C-4 และ C-7 โปรตอนปรากฏที่ δ_H 2.99 (H-8) สัมพันธ์กับคาร์บอนตำแหน่ง C-7 และ δ_C 8.67 (C-9) โปรตอนปรากฏที่ δ_H 1.12 (H-9) สัมพันธ์กับคาร์บอนตำแหน่ง C-7 และ δ_C 31.57 (C-8) และโปรตอนปรากฏที่ δ_H 3.89 (3-OCH₃) และ 3.87 (4-OCH₃) สัมพันธ์กับคาร์บอนตำแหน่ง C-3 และ C-4 ตามลำดับ จากข้อมูลทั้งหมดข้างต้นสามารถนำมาประกอบเป็นโครงสร้างทางเคมีของสาร A พบว่าสาร A เหมือนกับสารที่มีผู้รายงานไว้ โดยแยกได้จากเชื้อ *Pteronia camphorata* (Zdero *et al.*, 1990) ดังได้แสดงเปรียบเทียบไว้ในตาราง 4.8

ตารางที่ 4.8 ข้อมูลของ ¹H NMR ¹³C NMR และ ข้อมูล 2D ของสาร A ใน Acetone-d₆

ตำแหน่ง	สาร A		3,4-Dimethoxypropiophenone ใน CDCl ₃ (Zdero <i>et al.</i> , 1990)	
	¹³ C NMR δ_C	¹ H NMR δ_H (multiplicity, <i>J</i> in Hz)	¹³ C NMR δ_C	¹ H NMR δ_H (multiplicity, <i>J</i> in Hz)
1	131.00 (C)	-	-	-
2	111.21 (C)	7.53 (d, <i>J</i> = 1.9 Hz)	-	7.54 (d, <i>J</i> = 1.5 Hz)
3	150.09 (C)	-	-	-
4	154.31 (C)	-	-	-
5	111.42 (C)	7.03 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz)	-	6.88 (d, <i>J</i> = 8 Hz)
6	123.14 (C)	7.65 (dd, <i>J</i> = 8.4, 1.9 Hz)	-	7.59 (dd, <i>J</i> = 1.5, 8 Hz)
7	199.10 (C)	-	-	-
8	31.57 (CH ₂)	2.99 (q, <i>J</i> = 7.3 Hz)	-	2.97 (q, <i>J</i> = 7 Hz)
9	8.67 (CH ₃)	1.12 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz)	-	1.21 (t, <i>J</i> = 7 Hz)
3-OCH ₃	56.12 (CH ₃)	3.89 (s)	-	3.94 (s)
4-OCH ₃	56.00 (CH ₃)	3.87 (s)	-	3.93 (s)

4.3.3.2 สาร B (6,7,8- trimethoxy-3-methylisocoumarin)



รูปที่ 4.14 โครงสร้างทางเคมีของสาร B

เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

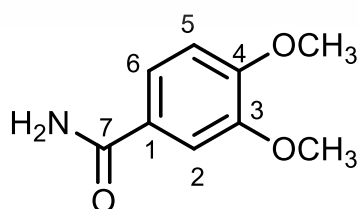
สาร B (BF5H10) เป็นของแข็งสีขาว มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น λ_{\max} (log ϵ) 328 (3.73) 276 (3.95) และ 246 (4.79) นาโนเมตร มีสูตรโมเลกุล คือ $C_{13}H_{14}O_5$ ซึ่งคำนวณมาจากค่ามวลต่อประจุ (m/z) ที่ได้จาก HRESIMS สเปกตรัม เท่ากับ 273.0756 $[M + Na]^+$ ในส่วนของ 1H NMR สเปกตรัม (ภาคผนวก ง รูปที่ 11) พบสัญญาณโปรตอนของวงอะโรมาติกปรากฏที่ δ_H 6.84 (H-5) และ สัญญาณของมีเทนโปรตอนที่ δ_H 6.30 (H-4) นอกจากนี้ยังพบสัญญาณโปรตอนของเมทิลโปรตอนที่ δ_H 3.96 (6-OCH₃) 3.86 (7-OCH₃) 3.81 (8-OCH₃) และ 2.17 (H-9) ตามลำดับ (ตารางที่ 4.9) ส่วน ^{13}C NMR สเปกตรัม (ภาคผนวก ง รูปที่ 13) พบสัญญาณทั้งหมด 13 สัญญาณ ประกอบด้วยเมทิลคาร์บอน (methyl; CH₃) จำนวน 4 สัญญาณ ที่ตำแหน่ง δ_C 61.89 (8-OCH₃) 61.28 (7-OCH₃) 56.51 (6-OCH₃) และ 19.27 (C-9) ppm มีสัญญาณของมีเทนคาร์บอน (methine; CH) จำนวน 2 สัญญาณ ที่ตำแหน่ง δ_C 103.83 (C-5) และ 103.67 (C-4) และสัญญาณของควอเทอร์นารีคาร์บอน (quaternary; C) จำนวน 7 สัญญาณ ปรากฏที่ δ_C 160.18 (C-1) 158.66 (C-3) 156.35 (C-8) 155.11 (C-6) 143.24 (C-7) 137.47 (4a) และ 107.98 (8a) ppm การวิเคราะห์ผลของ HSQC สเปกตรัม (ภาคผนวก ง รูปที่ 16) ได้ผลลัพธ์ของความสัมพันธ์ของโปรตอนและคาร์บอน ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.9 การวิเคราะห์ HMBC สเปกตรัม (ภาคผนวก จ รูปที่ 17) พบว่า โปรตอนตำแหน่งที่ δ_H 6.30 (H-4) สัมพันธ์กับคาร์บอน δ_C 103.67 (C-4) 103.83 (C-5) 155.11 (C-6) 156.35 (C-8) 107.98 (8a) และ 19.27 (C-9) โปรตอนตำแหน่งที่ δ_H 6.84 (H-5) สัมพันธ์กับคาร์บอน δ_C 160.18 (C-1) C-4 C-5 143.24 (C-7) และ 8a โปรตอนตำแหน่งที่ δ_H 2.17 (H-9) สัมพันธ์กับคาร์บอน δ_C C-1 158.66 (C-3) C-4 C-5 C-6 และ C-8 โปรตอนตำแหน่งที่ δ_H 3.95 (6-OCH₃) สัมพันธ์กับคาร์บอน δ_C C-1 C-3 C-6 และ C-8 และโปรตอนตำแหน่งที่ δ_H 3.81 (8-OCH₃) สัมพันธ์กับคาร์บอน δ_C C-7 ส่วนคาร์บอนที่ปรากฏที่ δ_C 160.18 (C-1) เป็นแลคโตนโดยยืนยันจากค่า แมสสเปกตรัม นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ NOESY สเปกตรัม (ภาคผนวก ง รูปที่ 18) แสดงให้เห็นว่าตำแหน่งโปรตอนที่ H-4 สามารถเห็นโปรตอนตำแหน่งที่ H-5 แสดงว่าอยู่ในระนาบเดียวกัน ขณะที่โปรตอน H-5 สามารถเห็นโปรตอน 6-OCH₃ โปรตอน 8-OCH₃ สามารถเห็นโปรตอน 7-OCH₃ และ โปรตอน H-4 สามารถเห็นโปรตอน H-9 จากข้อมูลทั้งหมดข้างต้นสามารถนำมาประกอบเป็นโครงสร้างทางเคมีของสาร B และพบว่า สาร B เหมือนกับสารที่มีผู้รายงานไว้ โดยแยกได้จากเชื้อ *Streptomyces* sp. ANK302 (Zinada *et al.*, 2011) ดังได้เปรียบเทียบไว้ในตาราง 4.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 ข้อมูลของ ^1H NMR ^{13}C NMR และ ข้อมูล 2D ของสาร B ใน Acetone- d_6

ตำแหน่ง	สาร B		6,7,8-trimethoxy-3-methyl-1H- isochromen-1-one (Zinada <i>et al.</i> , 2011)	
	^{13}C NMR δ_{C}	^1H NMR δ_{H} (multiplicity, J in Hz)	^{13}C NMR δ_{C}	^1H NMR δ_{H} (multiplicity, J in Hz)
1	160.18 (C)	-	167.3 (C)	-
3	158.66 (C)	-	152.9 (C)	-
4	103.67 (C)	6.30 (s)	104.3 (C)	6.09 (d, $J = 1.0$ Hz)
4a	137.47 (C)	-	134.4 (C)	-
5	103.83 (CH)	6.84 (s)	98.0 (C)	6.47 (s)
6	155.11 (C)	-	159.9 (C)	-
7	143.24 (C)	-	139.0 (C)	-
8	156.35 (C)	-	154.6 (C)	-
8a	107.98 (C)	-	100.7 (C)	-
9	19.27 (CH ₃)	2.17 (s)	19.2 (CH ₃)	2.20 (d, $J = 09$ Hz)
6-OCH ₃	56.51 (CH ₃)	3.95 (s)	56.1 (CH ₃)	3.85 (s)
7-OCH ₃	61.28 (CH ₃)	3.86 (s)	60.5 (CH ₃)	3.98 (s)
8-OCH ₃	61.89 (CH ₃)	3.81 (s)	56.6 (CH ₃)	3.95 (s)

4.3.3.3 สาร C (3, 4-dimethoxybenzamide)



รูปที่ 4.15 โครงสร้างทางเคมีของสาร C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

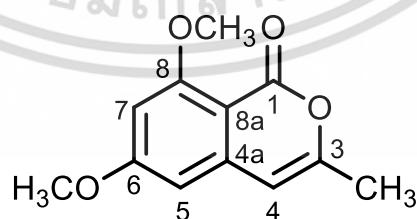
สาร C (BF₆H₄) มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น λ_{\max} (log ϵ) 287 (3.48) 257 (3.78) และ 209 (4.20) นาโนเมตร มีสูตรโมเลกุลคือ C₉H₁₁O₃N ซึ่งคำนวณมาจากค่ามวลต่อประจุ (m/z) ที่ได้จาก HRESIMS สเปกตรัม เท่ากับ 204.0631 [M + Na]⁺ ในส่วนของ ¹H NMR สเปกตรัม (ภาคผนวก ง รูปที่ 19) พบสัญญาณโปรตอนของวงอะโรมาติกจำนวน 3 สัญญาณ ปรากฏที่ δ_{H} 7.49 (H-6, dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz) 7.45 (H-2, d, $J = 2.1$ Hz) และ 6.99 (H-5, d, $J = 8.4$ Hz) พบสัญญาณของเมทิลโปรตอนจำนวน 2 สัญญาณ ปรากฏที่ δ_{H} 3.79 (4-OCH₃) และ 3.78 (3-OCH₃) นอกจากนี้ยังพบเอมีนโปรตอนปรากฏที่ δ_{H} 7.21 (7-NH₂) ในส่วนของ ¹³C NMR สเปกตรัม (ภาคผนวก ง รูปที่ 22) พบว่ามีสัญญาณทั้งหมด 9 สัญญาณ ประกอบด้วยเมทิลคาร์บอน (methyl; CH₃) จำนวน 2 สัญญาณ ปรากฏที่ δ_{C} 55.70 (4-OCH₃) และ 55.62 (3-OCH₃) ppm พบสัญญาณมีไธน์คาร์บอน (methine; CH) จำนวน 3 สัญญาณ ปรากฏที่ δ_{C} 120.92 (C-6) 110.96 (C-5) และ 110.89 (C-2) ppm และพบสัญญาณควอเทอนารีคาร์บอน (quaternary; C) จำนวน 4 สัญญาณ ปรากฏที่ δ_{C} 167.79 (C-7) 151.39 (C-4) 148.26 (C-3) และ 126.56 (C-1) ppm ในส่วนของการวิเคราะห์ผลของ COSY สเปกตรัม (ภาคผนวก ง รูปที่ 26) พบว่าโปรตอนที่ δ_{H} 7.49 (H-6) อยู่ติดกันกับโปรตอนที่ δ_{H} 6.99 (H-5) (7.49) ด้วยค่า coupling constant 8.4 Hz และพบว่าโปรตอนที่ δ_{H} 7.45 (H-2) อยู่ตำแหน่ง meta ของวงอะโรมาติกกับ H-6 โดยมีค่า coupling constant 2.1 Hz การวิเคราะห์ผลของ HSQC สเปกตรัม (ภาคผนวก ง รูปที่ 27) ได้ผลลัพธ์ของความสัมพันธ์ของโปรตอนและคาร์บอน ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.10 การวิเคราะห์ HMBC สเปกตรัม (ภาคผนวก ง รูปที่ 28) พบว่า โปรตอนปรากฏที่ δ_{H} 7.45 (H-2) สัมพันธ์กับคาร์บอนปรากฏที่ δ_{C} 120.92 (C-6), 151.39 (C-4) และ 167.79 (C-7) โปรตอนปรากฏที่ δ_{H} 6.99 (H-5) สัมพันธ์กับคาร์บอนปรากฏที่ δ_{C} 126.56 (C-1), 148.26 (C-3) และ C-4 โปรตอนปรากฏที่ δ_{H} 7.49 (H-6) สัมพันธ์กับคาร์บอนปรากฏที่ δ_{C} 110.89 (C-2), C-4 และ C-7 นอกจากนี้เมทิลโปรตอนปรากฏที่ δ_{H} 3.78 (3-OCH₃) และ 3.79 (4-OCH₃) มีความสัมพันธ์กับคาร์บอนตำแหน่ง C-3 และ C-4 ตามลำดับ นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ NOESY สเปกตรัม (ภาคผนวก ง รูปที่ 29) แสดงให้เห็นว่าโปรตอนตำแหน่ง H-2 และ ตำแหน่ง H-5 สามารถเห็นโปรตอนปรากฏที่ δ_{H} 3.78 (3-OCH₃) และ 3.79 (4-OCH₃) ตามลำดับ แสดงว่า H-6 อยู่ในระนาบเดียวกันกับ 3-OCH₃ และ H-5 อยู่ในระนาบเดียวกันกับ 4-OCH₃ จากข้อมูลทั้งหมดข้างต้นสามารถนำมาประกอบเป็นโครงสร้างทางเคมีของสาร C และพบว่า สาร C คือ 3, 4-dimethoxybenzamide ซึ่งเป็นสารที่มีผู้รายงานไว้แล้วจากการสังเคราะห์ (Alia and Punniyamurthy, 2010) ดังได้เปรียบเทียบไว้ในตาราง 4.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 ข้อมูลของ ^1H NMR และ ^{13}C NMR และ ข้อมูล 2D ของสาร C ใน $\text{DMSO-}d_6$

ตำแหน่ง	สาร C		3,4-Dimethoxybenzamide (Alia and Punniyamurthy, 2010)	
	^{13}C NMR δ_{C}	^1H NMR δ_{H} (multiplicity, J in Hz)	^{13}C NMR δ_{C} ใน CDCl_3 : $\text{DMSO-}d_6$ (3:1)	^1H NMR ใน CDCl_3 δ_{H} (multiplicity, J in Hz)
1	126.56 (C)	-	125.8 (C)	-
2	110.89 (C)	7.45 (d, $J = 2.1$ Hz)	109.7 (CH)	7.43 (d, $J = 2.0$ Hz)
3	148.26 (C)	-	147.9 (C)	-
4	151.39 (C)	-	151.1 (C)	-
5	110.96 (C)	6.99 (d, $J = 8.4$ Hz)	110.4 (CH)	6.85 (d, $J = 8.4$ Hz)
6	120.92 (C)	7.49 (dd, $J = 8.4,$ 2.1 Hz)	120.4 (CH)	7.30 (dd, $J =$ $8.4, 2.0$ Hz)
7	167.79 (C)	-	168.6 (C)	-
3-OCH ₃	55.62 (CH ₃)	3.78 (s)	55.4 (CH ₃)	3.91 (s)
4-OCH ₃	55.70 (CH ₃)	3.79 (s)	55.4 (CH ₃)	3.91 (s)
NH ₂	-	7.21 (br s.)	-	5.88 (br, s)

4.3.3.4 สาร D (6, 8-dimethoxy-3-methylisocoumarin)



รูปที่ 4.16 โครงสร้างทางเคมีของสาร D

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

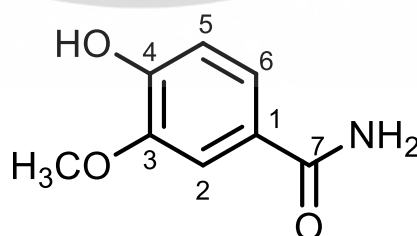
สาร D (BF5H9H1) มีลักษณะเป็นของแข็งไม่มีสี มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น λ_{\max} (log ϵ) 327 (3.69) และ 244 (4.55) นาโนเมตร มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{12}H_{12}O_4$ ซึ่งคำนวณมาจากค่ามวลต่อประจุ (m/z) ที่ได้จาก HRESIMS สเปกตรัม เท่ากับ 243.0628 $[M + Na]^+$ ในส่วนของ 1H NMR สเปกตรัม (ภาคผนวก ง รูปที่ 30) พบสัญญาณโปรตอนของวงอะโรมาติกปรากฏที่ δ_H 6.57 (H-7, d, $J = 2.30$ Hz) และ 6.56 (H-5, d, $J = 2.30$ Hz) นอกจากนี้ยังพบสัญญาณของมีเทนโปรตอนที่ δ_H 6.35 (H-4, s) พบสัญญาณของเมทิลโปรตอนปรากฏที่ δ_H 3.86 (6-OCH₃), 3.84 (8-OCH₃) และ 2.15 (3-CH₃) (ตารางที่ 4.11) ส่วน ^{13}C NMR สเปกตรัม (ภาคผนวก ง รูปที่ 33) พบสัญญาณทั้งหมด 12 สัญญาณ ประกอบด้วยสัญญาณของเมทิลคาร์บอน (methyl; CH₃) จำนวน 3 สัญญาณปรากฏที่ δ_C 56.12 (6-OCH₃) 55.85 (8-OCH₃) และ 19.03 (3-CH₃) ppm สัญญาณของมีเทนคาร์บอน (methine; CH) จำนวน 3 สัญญาณ ปรากฏที่ δ_C 103.33 (C-4) 100.24 (C-5) และ 98.24 (C-7) และพบสัญญาณของควอเทอนารีคาร์บอน (quaternary; C) จำนวน 6 สัญญาณ ปรากฏที่ δ_C 165.30 (C-8) 162.86 (C-6) 157.96 (C-1) 155.22 (C-3) 142.07 (4a) และ 100.24 (8a) ppm จากการวิเคราะห์ผลของ COSY สเปกตรัม (ภาคผนวก ง รูปที่ 36) และค่า coupling constant (J) ของโปรตอน H-5 และ H-7 พบว่าโปรตอนทั้งสองนี้อยู่ตำแหน่ง meta ซึ่งกันและกันของวงอะโรมาติก การวิเคราะห์ผลของ HSQC สเปกตรัม (ภาคผนวก ง รูปที่ 37) ได้ผลลัพธ์ของความสัมพันธ์ของโปรตอนและคาร์บอน ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.11 นอกจากนี้การวิเคราะห์ HMBC สเปกตรัม (ภาคผนวก ง รูปที่ 38) พบว่า โปรตอนปรากฏที่ δ_H 6.35 (H-4) สัมพันธ์กับคาร์บอน δ_C 155.22 (C-3) 100.24 (8a) และ 19.02 (3-CH₃) โปรตอนปรากฏที่ δ_H 6.57 (H-5) สัมพันธ์กับคาร์บอนปรากฏที่ δ_C 98.24 (C-7) และ 100.24 (8a) โปรตอนปรากฏที่ δ_H 6.56 (H-7) สัมพันธ์กับคาร์บอนปรากฏที่ δ_C 100.24 (C-5 และ 8a) โปรตอนปรากฏที่ δ_H 2.15 (3-CH₃) สัมพันธ์กับคาร์บอน δ_C 100.33 (C-4) และ 155.22 (C-3) และโปรตอนปรากฏที่ δ_H 3.86 (6-OCH₃) และ 3.84 (8-OCH₃) สัมพันธ์กับคาร์บอน δ_C 162.86 (C-6) และ 165.30 (C-8) ตามลำดับ ส่วนคาร์บอนที่ปรากฏที่ δ_C 157.96 (C-1) น่าจะเป็นคาร์บอนของแลคโตน การวิเคราะห์ผลของ NOESY สเปกตรัม (ภาคผนวก ง รูปที่ 39) แสดงให้เห็นว่าตำแหน่งโปรตอนปรากฏที่ δ_H 6.35 (H-4) สามารถเห็นโปรตอนปรากฏที่ δ_H 6.57 (H-5) แสดงว่าอยู่ในระนาบเดียวกัน ส่วนโปรตอนปรากฏที่ δ_H 3.86 (6-OCH₃) และ 3.84 (8-OCH₃) สามารถเห็นโปรตอนตำแหน่ง H-5 และ H-7 ตามลำดับ จากข้อมูลทั้งหมดข้างต้นสามารถนำมาประกอบเป็นโครงสร้างทางเคมีของสาร D ได้ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4.16 และพบว่า สาร D เป็นสารที่มีผู้รายงานไว้แล้ว โดยเป็นสารที่แยกได้จาก *Streptomyces* sp. ANK302 (Zinad *et al.*, 2010) ดังได้เปรียบเทียบไว้ในตาราง 4.11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 ข้อมูลของ ^1H NMR ^{13}C NMR และ ข้อมูล 2D ของสาร D ใน Acetone- d_6

ตำแหน่ง	สาร D		6, 8-dimethoxy-3-methylisocoumarin ใน CDCl_3 (Zinad <i>et al.</i> , 2010)	
	^{13}C NMR δ_{C}	^1H NMR δ_{H} (multiplicity, J in Hz)	^{13}C NMR δ_{C}	^1H NMR δ_{H} (multiplicity, J in Hz)
1	157.96 (C)	-	159.4 (C)	-
3	155.22 (C)	-	155.3 (C)	-
4	103.33 (CH)	6.35 (s)	103.6 (CH)	6.08 (s)
4a	142.07 (C)	-	142.3 (C)	-
5	100.24 (CH)	6.57 (d, $J =$ 2.30)	99.3 (CH)	6.29 (d, $J = 2.3$ Hz)
6	162.86 (C)	-	165.2 (C)	-
7	98.24 (C)	6.56 (d, $J =$ 2.30)	98.0 (CH)	6.41 (d, $J = 2.3$ Hz)
8	165.30 (C)	-	163.1 (C)	-
8a	100.24 (C)	-	102.7 (C)	-
3- CH_3	19.03 (CH_3)	2.15 (s)	19.5 (CH_3)	2.21 (s)
6- OCH_3	56.12 (CH_3)	3.84 (s)	55.6 (CH_3)	3.88 (s)
8- OCH_3	55.85 (CH_3)	3.86 (s)	56.2 (CH_3)	3.95 (s)

4.3.3.5 สาร E (4-hydroxy-3-methoxybenzamide)



รูปที่ 4.17 โครงสร้างทางเคมีของสาร E

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

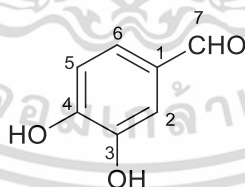
สาร E (BF₆H₂) มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น (λ_{\max}) (log ϵ) 288 (2.35) 259 (2.64) และ 210 (3.02) นาโนเมตร มีสูตรโมเลกุล คือ C₈H₉NO₃ ซึ่งคำนวณมาจากค่ามวลต่อประจุ (m/z) ที่ได้จาก HRESIMS สเปกตรัม เท่ากับ 190.0472 [M + Na]⁺ ในส่วนของ ¹H NMR สเปกตรัม (ภาคผนวก ง รูปที่ 40) พบสัญญาณโปรตอนของวงอะโรมาติกปรากฏที่ δ_{H} 7.44 (H-2, d, J = 1.8 Hz) 7.36 (H-6, dd, J = 8.20 Hz) และ 6.78 (H-5, d, J = 8.2 Hz) และพบสัญญาณโปรตอนของเมทิลปรากฏที่ δ_{H} 3.77 (s, 3-OCH₃) นอกจากนี้ยังพบสัญญาณของไฮดรอกซีโปรตอนและ เอมีนโปรตอนปรากฏที่ δ_{H} 7.11 (s) 7.79 (s) และ 9.59 (br) ในส่วน ¹³C NMR สเปกตรัม (ภาคผนวก ง รูปที่ 42) พบสัญญาณทั้งหมด 8 สัญญาณ ประกอบด้วยสัญญาณของเมทิลคาร์บอน (methyl; CH₃) จำนวน 1 สัญญาณ ปรากฏที่ δ_{C} 55.69 (3-OCH₃) พบสัญญาณของมีไธน์คาร์บอน (methine; CH) จำนวน 3 สัญญาณ ปรากฏที่ δ_{C} 121.13 (C-6) 114.76 (C-5) และ 111.67 (C-2) และสัญญาณของควอเทอนารีคาร์บอน (quaternary; C) จำนวน 4 สัญญาณ ปรากฏที่ δ_{C} 167.80 (C-7) 149.58 (C-4) 147.11 (C-3) และ 125.29 (C-1) จากการวิเคราะห์ของ COSY สเปกตรัม (ภาคผนวก ง รูปที่ 44) พบว่าโปรตอนปรากฏที่ δ_{H} 6.78 (H-5) อยู่ติดกันกับโปรตอนที่ปรากฏที่ δ_{H} 7.36 (H-6) และการวิเคราะห์ COSY สเปกตรัม และ ค่า coupling constant (J) ยังพบอีกว่าโปรตอนที่ปรากฏที่ δ_{H} 7.44 (H-2, J = 1.8 Hz) มีความสัมพันธ์แบบ meta กับ โปรตอนที่ปรากฏที่ δ_{H} 7.36 (H-6) ดังนั้นสามารถสรุปได้จากผลของ COSY สเปกตรัมว่า วงอะโรมาติกเป็นแบบ 1,3,4-trisubstituted benzene (วงอะโรมาติกที่มีกลุ่มแทนที่ที่ตำแหน่ง 1, 3 และ 4) จากการวิเคราะห์ผลของ HSQC สเปกตรัม (ภาพผนวก ง รูปที่ 45) ได้ผลลัพธ์ของความสัมพันธ์ของโปรตอนและคาร์บอนของโปรตอนนั้นๆ ได้แสดงผลในตารางที่ 4.12 จากการวิเคราะห์ HMBC สเปกตรัม (ภาคผนวก ง รูปที่ 46) พบว่าโปรตอนปรากฏที่ δ_{H} 7.44 (H-2) สัมพันธ์กับคาร์บอน δ_{C} 121.13 (C-6) 149.58 (C-4) และ 167.80 (C-7) โปรตอนปรากฏที่ δ_{H} 6.78 (H-5) สัมพันธ์กับคาร์บอน δ_{C} 125.29 (C-1) และ 147.11 (C-3) โปรตอนปรากฏที่ δ_{H} 7.36 (H-6) สัมพันธ์กับคาร์บอนตำแหน่ง C-4, δ_{C} 111.67 (C-2) และ C-7 และโปรตอนปรากฏที่ δ_{H} 3.77 (3-OCH₃) สัมพันธ์กับคาร์บอนตำแหน่ง C-3 นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ NOESY สเปกตรัม (ภาคผนวก ง รูปที่ 55) แสดงให้เห็นว่าโปรตอนตำแหน่ง H-2 สามารถเห็นโปรตอนตำแหน่ง 3-OCH₃ จากข้อมูลทั้งหมดข้างต้นสามารถนำมาประกอบเป็นโครงสร้างทางเคมีของสาร E และพบว่า สาร E คือ สาร 4-hydroxy-3-methoxybenzamide ซึ่งเป็นสารที่มีผู้รายงานไว้แล้ว โดยแยกมาจากพืชไม้เลื้อย *Naravelia zeylanica* (Jaroszewski et al., 2004) ดังได้เปรียบเทียบไว้ในตาราง 4.12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 ข้อมูลของ ^1H NMR และ ^{13}C NMR และ ข้อมูล 2D ของสาร E ใน DMSO-d₆

ตำแหน่ง	สาร E		4-hydroxy-3-methoxybenzamide (Jaroszewski <i>et al.</i> , 2004)	
	^{13}C NMR δ_{C}	^1H NMR δ_{H} (multiplicity, J in Hz)	^{13}C NMR δ_{C}	^1H NMR δ_{H} (multiplicity, J in Hz)
1	125.29 (C)	-	122.1 (C)	-
2	111.67 (CH)	7.44 (d, $J = 1.8$ Hz)	110.9 (CH)	7.27-7.29 (m)
3	147.11 (C)	-	148.5 (C)	-
4	149.58 (C)	-	158.3 (C)	-
5	114.76 (CH)	6.78 (d, $J = 8.2$ Hz)	115.0 (CH)	6.49 (d, $J = 8.1$ Hz)
6	121.13 (C)	7.36 (dd, $J = 8.2$ Hz)	118.0 (CH)	7.27-7.29 (m)
7	167.80 (C)	-	168.4 (C)	-
3-OCH ₃	55.69 (CH ₃)	3.77 (s)	55.1 (CH ₃)	3.71 (s)
OH and NH ₂	-	7.11 (s) 7.79 (s) 9.59 (br s)	-	7.43 (s) 8.52 (br, s)

4.3.3.6 สาร F (3,4 dihydroxybenzaldehyde)



รูปที่ 4.18 โครงสร้างทางเคมีของสาร F

สาร F (CF₄H₆) เป็นของแข็งสีเหลืองมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น

λ_{max} (log ϵ) 312 (2.80) 278 (2.87) 232 (3.03) และ 207 (3.09) นาโนเมตร สูตรโครงสร้างคือ C₇H₆O₃ ซึ่งคำนวณมาจากค่ามวลต่อประจุ (m/z) ที่ได้จาก HRESIMS สเปกตรัม เท่ากับ 137.0243 [M + Na]⁺ ข้อมูลจาก ^1H NMR สเปกตรัม (ภาคผนวก ง รูปที่ 48) ปรากฏสัญญาณโปรตอนของวงอโรมาติกที่ δ_{H} 7.23 (H-2) 6.90 (H-5) และ 7.27 (H-6) และพบสัญญาณโปรตอนของหมู่แอลดีไฮด์ที่

δ_{H} 9.69 (H-7) ข้อมูลจาก ^{13}C NMR สเปกตรัม (ภาคผนวก ง รูปที่ 50) พบสัญญาณทั้งหมด
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปเผยแพร่บนเว็บไซต์หรือสื่อ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7 สัญญาณ ประกอบด้วย 4 สัญญาณของมีไธน์คาร์บอน (methine; CH) ที่ δ_C 114.40 (C-2) 115.62 (C-5) 124.70 (C-6) และ 191.27 (C-7) และ พบ 3 สัญญาณของควอเทอนารีคาร์บอน (quaternary; C) ที่ตำแหน่ง δ_C 128.92 (C-1) 146.00 (C-3) และ 152.30 (C-4) (แสดงดังตารางที่ 4.13) การวิเคราะห์ของ COSY สเปกตรัม (ภาพผนวก ง รูปที่ 52) ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนกับโปรตอน พบว่าโปรตอนที่ δ_H 6.90 (H-5) อยู่ติดกันกับโปรตอนที่ 7.27 (H-6) และการวิเคราะห์ผลของ HSQC สเปกตรัม (ภาพผนวก ง รูปที่ 53) ได้ผลลัพธ์ของความสัมพันธ์ของโปรตอนและคาร์บอน ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.13 การวิเคราะห์ HMBC สเปกตรัม (ภาพผนวก ง รูปที่ 54) พบว่า โปรตอนตำแหน่งที่ δ_H 7.23 (H-2) สัมพันธ์กับคาร์บอน δ_C 146.00 (C-3) 152.30 (C-4) และ 191.27 (C-7) โปรตอนตำแหน่งที่ δ_H 6.90 (H-5) สัมพันธ์กับคาร์บอนที่ δ_C 128.92 (C-1) 146.00 (C-3) และ 152.30 (C-4) และโปรตอนตำแหน่งที่ δ_H 7.27 (H-6) สัมพันธ์กับคาร์บอนที่ δ_C 114.40 (C-2) และ 191.27 (C-7) นอกจากนั้นจากการวิเคราะห์ NOESY สเปกตรัม (ภาพผนวก ง รูปที่ 55) แสดงให้เห็นว่าโปรตอนตำแหน่ง H-7 สามารถเห็นโปรตอนตำแหน่ง H-2 และ H-6 แสดงว่าอยู่ในระนาบเดียวกัน และยังแสดงว่าโปรตอนตำแหน่งที่ H-5 อยู่ในระนาบเดียวกันกับโปรตอน H-6 จากข้อมูลทั้งหมดข้างต้น สาร F คือ สาร 3, 4-dihydroxybenzaldehyde ซึ่งเป็นสารที่มีผู้รายงานไว้แล้ว (Koslehmäinen *et al*, 1995) โดยได้เปรียบเทียบกับข้อมูลไว้ในตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4.13 ข้อมูลของ ^1H NMR ^{13}C NMR และ ข้อมูล 2D ของสาร F ใน $\text{DMSO-}d_6$

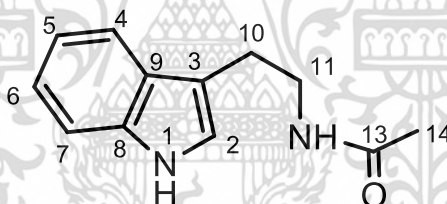
ตำแหน่ง	สาร F		3,4-dihydroxybenzaldehyde (Koslehmäinen <i>et al</i> , 1995)	
	^{13}C NMR δ_C	^1H NMR δ_H (multiplicity, J in Hz)	^{13}C NMR δ_C	^1H NMR δ_H (multiplicity, J in Hz)
1	128.92 (C)	-	128.9 (C)	-
2	114.40 (CH)	7.23 (s)	114.5 (CH)	7.51 (d, $J_{2,5} = 0.53$ Hz, $J_{2,6} = 1.96$ Hz)
3	146.00 (C)	-	145.9 (CH)	-
4	152.30 (C)	-	152.2 (C)	-
5	115.62 (CH)	6.90 (d, $J = 8.03$ Hz)	115.6 (CH)	7.16 (d, $J_{5,\text{OH}} = 0.29$ Hz, $J_{5,6} = 7.81$ Hz)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.13 ข้อมูลของ ^1H NMR ^{13}C NMR และ ข้อมูล 2D ของสาร F ใน $\text{DMSO-}d_6$ (ต่อ)

ตำแหน่ง	สาร F		3,4-dihydroxybenzaldehyde (Kolehmainen <i>et al.</i> , 1995)	
	^{13}C NMR δ_{C}	^1H NMR δ_{H} (multiplicity, J in Hz)	^{13}C NMR δ_{C}	^1H NMR δ_{H} (multiplicity, J in Hz)
6	124.70 (CH)	7.27 (d, $J = 8.03$ Hz)	124.5 (CH)	7.49 (d, $J_{5,6} = 7.81$ Hz)
7	191.27 (CHO)	9.69 (s)	191.1 (CHO)	9.93 (s)
3-OH	-	-	-	-
4-OH	-	-	-	-

4.3.3.7 สาร G (N_b -acetyltryptamine)



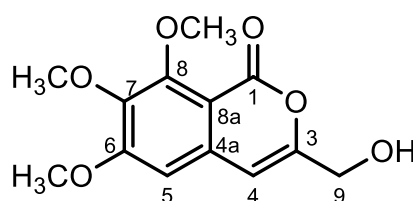
รูปที่ 4.19 โครงสร้างทางเคมีของสาร G

สาร G (BF5H8) มีลักษณะเป็นของหนืดสีเหลือง สูตรโครงสร้างคือ $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$ ซึ่งคำนวณมาจากค่ามวลต่อประจุ (m/z) ที่ได้จาก HRESIMS สเปกตรัม เท่ากับ 225.0996 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ จากฐานข้อมูลในไบโอเทคพบว่า สาร G น่าจะเป็น N_b -acetyltryptamine ดังนั้นจึงได้ยืนยันด้วยข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR สเปกตรัมเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของสาร N_b -acetyltryptamine ที่ได้รายงานไว้แล้ว ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.14 ซึ่งพบว่ามี ความคล้ายคลึงกัน ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าสาร G คือ N_b -acetyltryptamine โดยสารนี้ได้แยกมาจากเชื้อราที่ไม่ได้ระบุชื่อ เป็นเชื้อราที่แยกมาจากพื้นผิวของสาหร่ายสีแดง *Gracilaria verrucosa* (Li *et al.*, 2003)

ตารางที่ 4.14 ข้อมูลของ ^1H NMR ^{13}C NMR และ ข้อมูล 2D ของสาร G ใน $\text{DMSO-}d_6$

ตำแหน่ง	สาร G		N_b -acetyltryptamine ใน CDCl_3 (Li <i>et al.</i> , 2003)	
	^{13}C NMR (100 MHz) δ_{C}	^1H NMR (400 MHz) δ_{H} (multiplicity, J in Hz)	^{13}C NMR δ_{C}	^1H NMR δ_{H} (multiplicity, J in Hz)
1	-	10.04 (s)	-	8.14 (br, s)
2	122.61 (CH)	7.16 (s)	122.0 (CH)	7.04 (d, $J = 2.2$ Hz)
3	111.46 (C)	-	113.1 (C)	-
4	118.63 (CH)	7.59 (d, $J = 7.9$ Hz)	118.7 (CH)	7.60 (d, $J = 8.0$ Hz)
5	118.70 (CH)	7.01 (t, $J = 7.5$ Hz)	119.5 (CH)	7.13 (dd, $J = 8.0,$ 8.0 Hz)
6	121.40 (CH)	7.09 (t, $J = 7.5$ Hz)	122.2 (CH)	7.21 (dd, $J = 8.0,$ 8.0 Hz)
7	111.41 (CH)	7.37 (d, $J = 8.1$ Hz)	111.2 (CH)	7.38 (d, $J = 8.0$ Hz)
8	137.06 (C)	-	136.4 (C)	-
9	127.95 (C)	-	127.3 (C)	-
10	25.66 (CH_2)	2.92 (t, $J = 7.3$ Hz)	25.3 (CH_2)	2.98 (t, $J = 6.5$ Hz)
11	40.06 (CH_2)	3.48 (dt, $J = 7.3,$ 6.0 Hz)	39.8 (CH_2)	3.60 (dt, $J = 6.5,$ 6.0 Hz)
12	-	-	-	5.53 (br, s)
13	169.31 (C)	-	170.0 (C)	-
14	22.32 (CH_3)	1.86 (s)	23.4 (CH_3)	1.92 (s)

4.3.3.8 สาร H (3-Hydroxymethyl-6,7,8-trimethoxyisocoumarin)



รูปที่ 4.20 โครงสร้างทางเคมีของสาร H

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

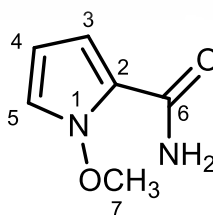
สาร H (BF₅H₇H₂) มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น λ_{max} (log ϵ) 324 (2.70) 277 (2.14) และ 246 (2.99) นาโนเมตร มีสูตรโครงสร้างคือ C₁₃H₁₄O₆ ซึ่งคำนวณมาจากค่ามวลต่อประจุ (m/z) ที่ได้จาก HRESIMS สเปกตรัม เท่ากับ 289.0683 [M + Na]⁺ ในส่วนของ ¹H NMR สเปกตรัม (ภาคผนวก ง รูปที่ 56) พบสัญญาณโปรตอนของวงอะโรมาติกปรากฏที่ δ_{H} 7.04 (H-5) สัญญาณของมีเทนโปรตอนที่ δ_{H} 6.57 (H-4) สัญญาณเมทิลีนโปรตอนปรากฏที่ δ_{H} 4.22, (H-9, d, $J = 4.25$ Hz) และสัญญาณของเมทิลโปรตอนที่ δ_{H} 3.92 (6-OCH₃) 3.80 (8-OCH₃) และ 3.77 (7-OCH₃) ในส่วนของ ¹³C NMR สเปกตรัม (ภาคผนวก ง รูปที่ 59) พบสัญญาณทั้งหมด 13 สัญญาณ ประกอบด้วยสัญญาณของเมทิลคาร์บอน (methyl; CH₃) จำนวน 3 สัญญาณ ที่ตำแหน่ง δ_{C} 61.61 (8-OCH₃) 60.97 (7-OCH₃) และ 56.37 (6-OCH₃) ppm สัญญาณของเมทิลีนคาร์บอน (methylene; CH₂) จำนวน 1 สัญญาณ δ_{C} 59.55 (C-9) ppm สัญญาณของมีเทนคาร์บอน (methine; CH) จำนวน 2 สัญญาณ ที่ตำแหน่ง δ_{C} 101.74 (C-4) และ 104.18 (C-5) ppm และสัญญาณของควอเทอเนารีคาร์บอน (quaternary; C) จำนวน 7 สัญญาณ ที่ตำแหน่ง δ_{C} 159.07 (C-6) 157.68 (C-1) 157.03 (C-3) 154.86 (C-8) 142.07 (C-7) 135.89 (4a) และ 106.88 (8a) ppm จากการวิเคราะห์ผลของ HSQC สเปกตรัม (ภาคผนวก ง รูปที่ 61) ได้ผลลัพธ์ของความสัมพันธ์ของโปรตอนกับคาร์บอนที่โปรตอนติดอยู่ ดังแสดงไว้ในตาราง 4.15 จากการวิเคราะห์ผลของ COSY สเปกตรัม (ภาคผนวก ง รูปที่ 62) พบว่าโปรตอนปรากฏที่ δ_{H} 4.23 (H-9) ติดกับกลุ่มไฮดรอกซีซึ่งมีโปรตอนปรากฏที่ δ_{H} 5.62 จากการวิเคราะห์ HMBC สเปกตรัม (ภาคผนวก ง รูปที่ 64) พบว่า โปรตอนปรากฏที่ δ_{H} 6.57 (H-4) สัมพันธ์กับคาร์บอน δ_{C} 157.03 (C-3) และ 154.86 (C-8) โปรตอนปรากฏที่ δ_{H} 7.04 (H-5) สัมพันธ์กับคาร์บอน δ_{C} 159.07 (C-6) 142.07 (C-7) และ 106.88 (8a) โปรตอนปรากฏที่ δ_{H} 4.23 (H-9) สัมพันธ์กับคาร์บอนตำแหน่ง C-3 และ 101.73 (C-4) โปรตอนปรากฏที่ δ_{H} 3.92 (6-OCH₃) 3.77 (7-OCH₃) และ 3.80 (8-OCH₃) สัมพันธ์กับคาร์บอน δ_{C} 159.07 (C-6) 142.07 (C-7) และ 154.86 (C-8) ตามลำดับ จากข้อมูลทั้งหมดข้างต้นสามารถนำมาประกอบเป็นโครงสร้างทางเคมีของสาร H และพบว่า สาร H คือ 3-Hydroxymethyl-6,7,8-trimethoxyisocoumarin ซึ่งมีผู้รายงานไว้แล้ว โดยเป็นสารที่มาจากการสังเคราะห์จากสารที่แยกได้จากธรรมชาติ คือ สาร 8-Hydroxy-6,7-dimethoxy-3-hydroxymethylisocoumarin แยกมาจากเชื้อ *Streptomyces mobaraensis* (Saeed, 2013) โดยได้เปรียบเทียบกับไว้ในตาราง 4.15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.15 ข้อมูลของ ^1H NMR ^{13}C NMR และ ข้อมูล 2D ของสาร H ใน $\text{DMSO-}d_6$

ตำแหน่ง	สาร H		3-hydroxymethyl-6,7,8-Trimethoxyisocoumarin ใน CDCl_3 (Saeed, 2013)	
	^{13}C NMR δ_{C}	^1H NMR δ_{H} (multiplicity, J in Hz)	^{13}C NMR δ_{C}	^1H NMR δ_{H} (multiplicity, J in Hz)
1	157.68 (C)	-	171.1 (C)	-
3	157.03 (C)	-	140.6 (C)	-
4	101.74 (CH)	6.57, (s)	102.7 (CH)	6.41 (s)
4a	135.89 (C)	-	130.9 (C)	-
5	104.18 (CH)	7.04, (s)	103.2 (CH)	6.62 (s)
6	159.07 (C)	-	159.3 (C)	-
7	142.07 (C)	-	143.2 (C)	-
8	154.86 (C)	-	155.5 (C)	-
8a	106.88 (C)	-	108.2 (C)	-
9	59.55 (CH_2)	4.23, (d, $J = 4.3$ Hz)	61.43 (CH_2)	4.46 (s)
9-OH	-	5.62, (t, $J = 5.5$ Hz)	-	-
6-OCH ₃	56.37 (CH_3)	3.92, (s)	60.42 (CH_3)	3.93 (s)
7-OCH ₃	60.97 (CH_3)	3.77, (s)	60.42 (CH_3)	3.98 (s)
8-OCH ₃	61.61 (CH_3)	3.80, (s)	56.23 (CH_3)	4.0 (s)

4.3.3.9 สาร I (1-methoxy-1H-pyrrole-2-carboxamide)



รูปที่ 4.21 โครงสร้างทางเคมีของสาร I

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาร I (BF5H3) มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีค่าความดูดกลืนแสงได้ที่ (λ_{\max}) (log ϵ) 361 (3.22) และ 203 (3.14) นาโนเมตร มีสูตรโครงสร้างคือ $C_6H_8N_2O_2$ ซึ่งคำนวณมาจากค่ามวลต่อประจุ (m/z) ที่ได้จาก HRESIMS สเปกตรัม เท่ากับ 163.0475 $[M + Na]^+$ ในส่วนของ 1H NMR สเปกตรัม (ภาคผนวก ง รูปที่ 66) พบสัญญาณของมีไทน์โปรตอนปรากฏที่ δ_H 7.17 (H-5, t, $J = 2.2$ Hz) 6.59 (H-3, dd, $J = 4.4, 2.2$ Hz) และ 5.95 (H-4, dd, $J = 4.4, 2.8$ Hz) พบสัญญาณของเมทิลโปรตอนปรากฏที่ δ_H 3.98 (H-7) นอกจากนี้ยังพบสัญญาณโปรตอนของเอมีนโปรตอนปรากฏที่ δ_H 7.35 (s) และ 7.09 (s) (ตารางที่ 4.16) ในส่วนของ ^{13}C NMR สเปกตรัม (ภาคผนวก ง รูปที่ 68) พบสัญญาณทั้งหมด 6 สัญญาณ ประกอบด้วยสัญญาณของเมทิลคาร์บอน (methyl; CH_3) จำนวน 1 สัญญาณ ที่ตำแหน่ง δ_C 67.59 (C-7) ppm สัญญาณของมีไทน์คาร์บอน (methine; CH) จำนวน 3 สัญญาณ ที่ตำแหน่ง δ_C 120.56 (C-5), 109.89 (C-3) และ 103.57 (C-4) ppm และสัญญาณของควอเทอนารีคาร์บอน (quaternary; C) จำนวน 2 สัญญาณ ปรากฏที่ δ_C 160.40 (C-6) และ 121.55 (C-2) ppm จากการวิเคราะห์ผลของ COSY สเปกตรัม (ภาคผนวก ง รูปที่ 70) พบว่าโปรตอนปรากฏที่ δ_H 6.59 (H-3) อยู่ติดกันกับโปรตอนปรากฏที่ δ_H 5.95 (H-4) และโปรตอนนี้อยู่ติดกันกับโปรตอนปรากฏที่ δ_H 7.17 (H-5) จากการวิเคราะห์ผลของ HSQC สเปกตรัม (ภาคผนวก ง รูปที่ 71) ได้ผลของความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนและคาร์บอนที่ติดกับโปรตอนนั้นดังได้แสดงในตารางที่ 4.16 การวิเคราะห์ HMBC สเปกตรัม (ภาคผนวก ง รูปที่ 72) พบว่าโปรตอนปรากฏที่ δ_H 6.59 (H-3) สัมพันธ์กับคาร์บอน δ_C 121.55 (C-2) 103.57 (C-4) 120.56 (C-5) และ 160.40 (C-6) โปรตอนปรากฏที่ δ_H 5.95 (H-4) สัมพันธ์กับคาร์บอน C-2 และ C-5 และโปรตอนปรากฏที่ δ_H 7.17 (H-5) สัมพันธ์กับคาร์บอน C-2 และ δ_C 109.86 (C-3) จากข้อมูลทั้งหมดข้างต้นสามารถนำมาประกอบเป็นโครงสร้างทางเคมีของสาร I และพบว่า สาร I คือ สาร 1-methoxy-1H-pyrrole-2-carboxamide หรือ kumamonamide ซึ่งเป็นสารที่มีผู้รายงานไว้แล้ว โดยแยกมาจากเชื้อ *Streptomyces werraensis* MK493-CF1 (Ishida *et al.*, 2021) ดังได้เปรียบเทียบไว้ในตาราง 4.16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.16 ข้อมูลของ ^1H NMR ^{13}C NMR และ ข้อมูล 2D ของสาร I ใน $\text{DMSO}-d_6$

ตำแหน่ง	สาร I		Kumamonamide ใน CDCl_3 (Ishida <i>et al.</i> , 2021)	
	^{13}C NMR δ_{C}	^1H NMR δ_{H} (multiplicity, J in Hz)	^{13}C NMR δ_{C}	^1H NMR δ_{H} (multiplicity, J in Hz)
1	-	-	-	-
2	121.55 (C)	-	121.0 (C)	-
3	109.89 (CH)	6.59 (dd, $J = 4.4, 2.2$ Hz)	112.2 (CH)	6.78 (dd, $J = 2.5, 4.5$ Hz)
4	103.57 (CH)	5.95 (dd, $J = 4.4, 2.8$ Hz)	105.0 (CH)	6.07 (dd, $J = 2.8, 4.8$ Hz)
5	120.56 (CH)	7.17 (t, $J = 2.2$ Hz)	119.9 (CH)	6.94 (t, $J = 2.5$ Hz)
6	160.40 (C)	-	161.1 (C)	-
7	67.59 (OCH_3)	3.99, (s)	68.3 (OCH_3)	4.10 s
NH_2	-	7.09 (s) / 7.35 (s)	-	-

4.3 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

นำสารสกัดจากเซลล์และน้ำหมักไปทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH free radical scavenging พบว่าสารสกัดจากน้ำหมักมีฤทธิ์ดีกว่าสารสกัดจากเซลล์ที่ค่าความเข้มข้นที่สามารถดับจับอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) เท่ากับ 7.03 ± 0.02 และ 10.47 ± 0.04 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.17) จากค่า IC_{50} ของตัวเซลล์และน้ำหมักมีค่าการต้านอนุมูลอิสระที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จึงนำสารสกัดทั้ง 2 ชนิดมาแยกและศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ได้ทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ A B C D E F G H และ I มาทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH free radical scavenging พบค่า IC_{50} อยู่ในช่วงตั้งแต่ 0.87 ± 0.03 ถึง 384.85 ± 3.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.17) โดยสารที่ยับยั้งการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดคือสาร F ที่ค่า IC_{50} 0.87 ± 0.03 รองลงมาคือสาร B I E A C D G และ H นอกจากนี้สาร F มีค่า IC_{50} ที่ใกล้เคียงกับวิตามินซี และสาร B C E G และ I มีค่า IC_{50} ที่น้อยกว่าสารละลายมาตรฐาน BHT อีกด้วยแต่เมื่อเอกลำต้นนำมาทดสอบค่าความแตกต่างทางสถิติ ด้วยวิธี Duncan's New multiple range test พบว่าสาร B ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ F สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระเท่ากับกรดแอสคอร์บิกอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 2.49 ± 0.23 และ 0.87 ± 0.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สาร A C E G และ I สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารมาตรฐาน BHT อย่างมีนัยสำคัญที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 16.60 ± 0.39 19.59 ± 0.10 12.39 ± 0.98 63.23 ± 0.63 และ 12.70 ± 0.59 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สาร D สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระเท่ากับสารมาตรฐาน BHT อย่างมีนัยสำคัญที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 99.21 ± 0.85 และ สาร H สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระน้อยกว่าสารมาตรฐาน BHT อย่างมีนัยสำคัญที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 384.85 ± 3.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารทั้ง 9 ชนิดสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้แต่ต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับการโครงสร้างของสารแต่ละตัว เนื่องจากอนุมูลอิสระมีความไม่คงตัว และมีความไวต่อการทำปฏิกิริยาสูง ดังนั้นโครงสร้างสารที่ประกอบไปด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ซึ่งจัดเป็นสารออกซิไดส์แรงสูง (reactive oxygen species) ที่มีความว่องไวสูง และโครงสร้างสารที่ประกอบไปด้วยพันธะคู่จะมีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดี (Halliwell, 1999) โครงสร้างของสารทั้ง 9 ชนิด ประกอบไปด้วยหมู่ไฮดรอกซิล และพันธะคู่ ทำให้มีฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระได้ สาร F และ E ที่มีจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลและพันธะคู่ ทำให้สาร F และ E มีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระที่สูง แต่สาร H ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลและพันธะคู่มีฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระที่น้อยกว่าอย่างเห็นได้ชัดเพราะว่าตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิลมีผลต่อฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (Snelgrove *et al.*, 2001) ส่วนสาร A B C D และ I ไม่มีองค์ประกอบของหมู่ไฮดรอกซิลทำให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระน้อยกว่า F และ E สอดคล้องกับงานวิจัยของ Syafni และคณะในปี 2012 ที่ได้ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH free radical scavenging ของสาร 3,4 dihydroxybenzaldehyde ผลปรากฏว่ามีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระเท่ากับ 0.58 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ใกล้เคียงกันกับนอกจากทั้ง 9 สารนี้มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ดีแล้วยังพบงานวิจัยที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ เช่น งานวิจัยของ Divakaran และ Sukumaran ในปี 2014 ได้นำสาร 4-hydroxy-3-methoxybenzamide (สาร E) มาทดสอบการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี Superoxide Radical Scavenging มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารอยู่ที่ 800 ไมโครกรัม งานวิจัยของ Muirhead และ Deverall ในปี 1984 พบว่าสาร 3,4 dihydroxybenzaldehyd (สาร F) มีสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราในเปลือกกล้วย งานวิจัยของ Maheshwari และ Mahmood ในปี 2020 พบว่า 3,4 dihydroxybenzaldehyd (สาร F) มีผลในการลดความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดที่เกิดจากการได้รับ Pentachlorophenol และงานวิจัยของ Ishida และคณะในปี 2021 นำสาร 1-methoxy-1H-pyrrole-2-carboxamide (สาร I) ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช พบว่าระดับความเข้มข้น 500 ไมโครเมตรสามารถยับยั้งการงอกรากของพืชได้ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.17 ค่าสามารถยับยั้งอนุมูลิสรที่ 50 เปอร์เซ็นต์ ของสาร A-I

ตัวอย่าง	ค่า IC ₅₀ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
สารสกัดจากน้ำหมัก	7.03 ± 0.02 ⁱ
สารสกัดจากตัวเซลล์	10.47 ± 0.04 ^h
A	16.60 ± 0.39 ^f
B	2.49 ± 0.23 ^j
C	19.59 ± 0.10 ^e
D	99.21 ± 0.85 ^b
E	12.39 ± 0.98 ^g
F	0.87 ± 0.03 ^j
G	63.22 ± 0.63 ^d
H	384.85 ± 3.50 ^a
I	12.70 ± 0.59 ^g
BHT	92.53 ± 0.15 ^c
วิตามิน C	0.89 ± 0.20 ^j

หมายเหตุ : a - j คือค่าเฉลี่ยของ IC₅₀ ของสารที่นำมาทดสอบที่แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ (ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์) ด้วยวิธี Duncan's New multiple range test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

ผลการทดลองและการอภิปรายผล

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาไอโซเลต AA8 ที่ถูกแยกมาจากดินในจังหวัดกรุงเทพมหานคร นำมาระบุสายพันธุ์ด้วยวิธีการศึกษาอนุกรมวิธานหลายส่วน (Polyphasic taxonomy) ซึ่งได้แก่ ลักษณะทางฟีโนไทป์ ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี และลักษณะทางจีโนมไทป์ ลักษณะฟีโนไทป์พบว่ามีส่วนประกอบสีแดงคล้ำ เส้นใยอากาศสีแดงคล้ำอมเทา และสปอร์มีลักษณะเส้นตรงต่อกันเป็นช่ออยู่บนก้านชูสปอร์ ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีพบว่ากรดไดอะมิโนพิเมอิกเป็นแบบ LL-DAP พบน้ำตาลในเซลล์คือ กลูโคส แมนโนส และไรโบส ชนิดของกรดฟอสโฟลิปิดพบ ฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine; PE) ไดฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol; DPG) ฟอสฟาติดีลอินซิทอล (phosphatidylinositol; PI) และฟอสฟาติดีลอินซิทอลแมนโนสซิด (phosphatidylinositolmannosides; PIMs) พบกรดไขมันที่พบมากในเซลล์ได้แก่ $C_{16:0}$ $iso-C_{15}$ $anteiso-C_{15}$ $iso-C_{16}$ และ $anteiso-C_{17}$ และพบเมนาควิโนน (menaquinone) MK-10 (H_8) MK-9 (H_8) MK-9 (H_6) MK-9 (H_4) และ MK-9 (H_2) ซึ่งพบได้ทั่วไปจากสกุล *Streptomyces* ดังนั้นไอโซเลต AA8 คือสกุล *Streptomyces* ลักษณะทางจีโนมไทป์จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของไอโซเลต AA8 พบว่าใกล้เคียงกับ *S. roseifaciens* ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 99.86 เปอร์เซ็นต์ ในแผนภูมิ neighbor-joining และ maximum parsimony และการวิเคราะห์ลักษณะอนุกรมวิธานโดยใช้ลักษณะทางจีโนมเปรียบเทียบไอโซเลต AA8 และ *S. roseifaciens* พบว่าค่า Average nucleotide identity (ANI) และ digital DNA-DNA hybridization (dDDH) มีค่าเท่ากับ 94.11 และ 68.50 เปอร์เซ็นต์ จึงสามารถระบุได้ว่าไอโซเลต AA8 เป็นสปีชีส์ใหม่ของสกุล *Streptomyces* โดยมีความสัมพันธ์ของสายวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ *S. roseifaciens*

การแยกสารทุติยภูมิโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี นำสารสกัดหยาบของตัวเซลล์น้ำหนัก 3.21 กรัม และน้ำหนักน้ำหนัก 1.41 กรัม แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี เฟสเคลื่อนที่เป็นเมทานอล 100 % เฟสคงที่เป็น Sephadex LH-20 จากนั้นทำการเก็บเป็นแฟคชันได้ทั้งหมด 10 ส่วน ได้แก่ B1 B2 B3 B4 B5 B6 C1 C2 C3 และ C4 แยกด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ได้สารบริสุทธิ์ 9 ตัวดังนี้ สาร A คือ 3,4 dimethoxypropiohenone แยกมาจาก BF5H11 สาร B คือ 6,7,8-trimethoxy-3-methylisocoumarin แยกมาจาก BF5 H1 1 สาร C คือ 3, 4-dimethoxybenzamide แยกมาจาก BF6H4 สาร D คือ 6,8-dimethoxy-3-methylisocoumarin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ขออนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แยกมาจาก BF5H9H1 สาร E คือ 4-hydroxy-3-methoxybenzamide แยกมาจาก BF6H2 สาร F คือ 3,4 dihydroxybenzaldehyde แยกจาก CF4H6 สาร G คือ *N*_b-acetyltryptamine แยกจาก BF5H8 สาร H คือ 3-hydroxymethyl-6,7,8-trimethoxyisocoumarin แยกจาก BF5H7H2 และ สาร I คือ 1-methoxy-1H-pyrrole-2-carboxamide แยกจาก BF5H3 ซึ่งสารทั้ง 9 ตัวนี้เป็นสารที่เคยถูกค้นพบมาแล้วทั้งหมด จากนั้นนำสารทั้งหมดมาวิเคราะห์หาค่า IC₅₀ โดยใช้วิธี free radical scavenging (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; DPPH) ได้ผลดังต่อไปนี้ โดยค่า IC₅₀ จะเรียงจากค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดไปถึงต่ำสุด ได้แก่สาร F B E I A C G D และ H ค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.88 2.49 12.39 12.70 16.60 19.59 63.23 98.88 และ 384.85 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 งานวิจัยนี้มีข้อมูลเกี่ยวกับการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทเบื้องต้น การศึกษาอนุกรมวิธานขั้นพื้นฐานของเชื้อที่ได้จากดิน จังหวัดกรุงเทพมหานคร จึงสามารถนำข้อมูลเหล่านี้มาศึกษาข้อมูลในด้านอื่นๆ หรือนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ได้

5.2.2 งานวิจัยนี้ได้ทำแยกสารบริสุทธิ์จากน้ำหมักและตัวเซลล์ของไอโซเลต AA8 เพื่อหาสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่โดดเด่น ดังนั้นก่อนทำการแยกสารบริสุทธิ์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ต้องนำสารที่แยกได้จากคอลัมน์ในแต่ละส่วนมาทำการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระก่อนทำการแยกให้บริสุทธิ์

5.2.3 งานวิจัยนี้สามารถนำข้อมูลทางฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นของสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ดีมาใช้ในด้านอื่นๆ ได้เช่น สามารถนำไปศึกษาต่อทางด้านเภสัชกรรม เพื่อนำมาใช้ในการรักษาโรค หรือนำมาผลิตเป็นอาหารเพื่อเสริมสุขภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กมลรัตน์ เลียบศิริ และ ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ 2559 “เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง สำหรับการวิเคราะห์ไทเอมีนและโรโบฟลาวินแบบรวดเร็วในผลิตภัณฑ์นม.” *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*. 21(1) : 26-36.

จूरีย์รัตน์ ลีสमितย์. 2552 **ปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป**. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จิตติ ท่าวา. 2553. “กิจกรรมต้านจุลินทรีย์และการกำหนดองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของเชื้อแอกติโนมัยซีททางทะเล.” รายงานการวิจัย คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชุติมา ศรีวิบูลย์. 2546 **การวิเคราะห์โดยเครื่องมือโครมาโทกราฟี**. กรุงเทพฯ สำนักพิมพ์มหาสมุทรคำแหง

ชัยสิทธิ์ นิยะสม. 2558 “ฤทธิ์ต้านจุลชีพของ Acidophilic actinomycetes ที่แยกได้จากดินกรตๆในจังหวัดพัทลุง” โครงการวิจัยมหาลัยทักษิณ สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาลัยทักษิณ.

ณัฐธิดา ศรีบุญวรกุล 2560 “การประยุกต์ใช้แมสสเปกโตรเมทรีในห้องปฏิบัติการวิจัยทางคลินิก.” *วารสารเทคนิคการแพทย์*. 45(3) : 6126-6139.

ดวงพร คันธโชติ. 2537 **อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ**. กรุงเทพฯ : โอ.เอส.พรีนติ้ง เฮ้าส์

ตรีทิพย์ รัตนวรชัย. 2552 **อนุพันธุศาสตร์เบื้องต้น: มหัศจรรย์ของดีเอ็นเอ**. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544 **จุลชีววิทยาทั่วไป**. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นันทวัน เนียมหอม. 2555. “ฤทธิ์ทางชีวภาพและอนุกรมวิธานของเชื้อแอกติโนมัยซีทหายากจากป่าพรุเขตอบอุ่นในประเทศไทย”. วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พัฒน์ จันทร์โรทัย. 2547. **วิวัฒนาการความเป็นมาและกระบวนการกำเนิดสิ่งมีชีวิต** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วนาพร แซ่อึ้ง. 2557. “การสกัดและการเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันรำข้าวไร้เพื่อประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ยงยุทธ ยุทธวงศ์ ศิริศักดิ์ เทพาคำ 2545. “Genomics จีโนมิกส์ ภาษาแห่งชีวิต มูลนิธิบัณฑิตสภา วิทยาศาสตร์ และ เทคโนโลยีแห่งประเทศไทย” ฝ่ายสื่อสิ่งพิมพ์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

สมชาย แสงอำนาจเดช. 2551 “ขั้นตอนง่ายๆ ในการสร้างไฟโลเจเนติกทรี.” *Naresuan University Journal*. 16(2) : 181-188.

สุราษฎร์ กุณอินทร์ม อมรา จันทนาโอ และสุรางค์ สุธิราวุธ. 2538 **วิทยาแบคทีเรียดีเทอร์มิเนตีฟปฏิบัติการ**. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อัญญา เจนวิถิ 2554 “การตรวจหาและบ่งชี้ชนิดสารต้านอนุมูลอิสระจากผักพื้นบ้านและสมุนไพรไทย.” วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

อัมพรรัตน์ ประไพวงศ์ 2555 “การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเล” วิทยานิพนธ์หลักสูตรมหาบัณฑิตวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาลัยสงขลานครินทร์.

อลิษา วิสันโท อรุณข ประดิษฐ์ทรัพย์ วรณวิสาข์ เจริญฉิม ศุภศักดิ์ กุลวงศ์ อนันต์ชัย อัครเมฆิน และศิษฏ์ ทองสิมา “เทคโนโลยีเอ็นจีเอสและการประยุกต์ในงานวิจัยโอมิก” *Thai Journal of Genetics*. 5(2) : 104-129.

โอภา วัชรระคุป, ปรีชา บุญจง, จัทนา บุญยรัตน์ และมาลีรักษ์ อัดต์สินทอง 2550. **สารต้านอนุมูลอิสระ**. พิมพ์ครั้งที่ 2, กรุงเทพฯ : นิวไทยมิตรการพิมพ์ จำกัด.

เย็นหทัย แน่นหนา 2549 **สเปกโทรสโกปีสำหรับเคมีอินทรีย์** กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Aart, L.T. Nouinou, I. Kloosterman, A. Ingal, J.M. Willemse, J. Goodfellow, M. Wezel, G.P. 2018. “Classification of the gifted natural product producer *Streptomyces roseofaciens* sp. nov. by polyphasic taxonomy” *Department of Microbial Ecology* 72(1) : 40-52.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Alexander, F. Mathias, V. Hans, P. Markus, G. 2010. "Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison" *Standards in Genomic Sciences*. 2(1) : 117-134.
- Ali, A.B. Baere, R.D. Auwera, G.V.D. Wachter, R.D. and Peer, Y.V. 2001 "Phylogenetic relationships among algae based on complete large-subunit rRNA sequences" *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51(1) : 737-749.
- Alia, M.A. and Punniyamurthya, T. 2009 "Palladium-Catalyzed One-Pot Conversion of Aldehydes to Amides" *Adv. Synth. Catal.* 352(1) : 288-292.
- Arumugam, M. Mitra, A. Pramanik, A. Saha, M. Gachhui, R. and Mukherjee, J 2010. "Streptomyces sundarbansensis sp. nov., an actinomycete that produces 2-allyloxyphenol" *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 61 : 2664-2669.
- Athalye, M. Lacey, J. and Goodfellow, M. 1981. "Selective isolation and enumeration of actinomycetes using rifampicin". *Journal of Applied Bacteriology*. 51 : 289-297.
- Babalola, S. and Fatusi, A. 2009. **Determinants of use of maternal health services in Nigeria - looking beyond individual and household factors**. BMC Med Central.
- Bellahcene, Z. Fortas and R. Pogni. 2018. **Basic Biology and Applications of Actinobacteria**. 2nd London: IntechOpen.
- Bhatnagar, B. and Kim, J. 2012. "Pharmacologically prospective antibiotic agents and their sources: A marine microbial perspective". *Appl. Environmental Toxicology and Pharmacology*. 34(3) : 631-643.
- Boone, C.J and Pine, L. 1968. "Rapid method for characterization of actinomycetes by cell wall composition". *Appl. Microbiol.* 16 : 279-284
- Bovey, F.A. 1987. **Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, 2nd Edition., Academic Press, N. Y. and London.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Bruntner, C. Binder, T. Pathomaree, W. Goodfellow, M. Bull, A. Potterat, O. Puder, C. Hörer, P. Schmid, A. Bolek, W. Wagner, K. Mihm G. and Fiedler, H. 2005 “Frigocyclinone, a Novel Angucyclinone Antibiotic Produced by a *Streptomyces griseus* Strain from Antarctica.” *The Journal of Antibiotics* 58(1) : 346–349.
- Bugni, S. and Ireland, M. 2004 “Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms.” *Department of Medicinal Chemistry*. 21(1) : 143-163.
- Cortes, C.A. Dorador, C. Schumann, P. Schniete, J.K. Herron, P. Andrews, B. Asenjo, J. and Nouioui, I. 2019 “*Streptomyces altiplanensis* sp. nov., an alkalitolerant species isolated from Chilean Altiplano soil, and emended description of *Streptomyces chryseus* (Krasil’nikov et al. 1965) Pridham 1970” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 69(8) : 2498-2505.
- Cross, T. and Goodfellow, T. 1973. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria.** United States: University of Georgia
- Cross, T. 1994. “Growth and examination of actinomycetes-some guidelines. In J. B. Holt, N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams (eds.).” *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 1994 : 605-623.
- Devine, R. Qin, Z. Wilkinson, B. and Hutchings, M. 2019 “Discovering novel antimicrobials from *Streptomyces formicae*, a symbiont of fungus farming plant ants, using CRISPR/Cas9 genome editing” *ACCESS MICROBIOLOGY*. 1(1) : 67-71.
- De man, J. M. man L., and Gupta, S. 1986. “Texture and microstructure of soybean curd (tofu) as affected by different coagulant”. *Food Micro. Struct.* 5 : 83-89.
- Denoya, C.D. Fedechko, R.W. Hafner, E.W. McArthur, H.A. Morgenstern, M.R. Skinner, D.D. Stutzman-Engwall, K. Wax, R.G. and Wernau, W.C. 2021 “A second branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase gene cluster (bkdFGH) from *Streptomyces avermitilis*: its relationship to avermectin biosynthesis and the

construction of a bkdF mutant suitable for the production of novel antiparasitic avermectins” *Journal of Bacteriology*. 177(12) : 3504-3511.

Divakaran, D. and Sukumaran, S. 2014 “Antioxidant activity of acetone extract of *Naravelia zeylanica*” *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 3(5) : 131-133.

Gao, B. and Gupta, R.S. 2012. “Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum Actinobacteria” *Microbiology and Molecular Biology Reviews Journal*. 76(1) : 66-112.

Goodfellow, M 1989 a. “Suprageneric classification of actinomycetes” *Zentralblatt für Bakteriologie*. 4(1) : 2333-2339.

Gavin, C. Conant, G. and Kenneth, H. 2008. “GenomeVx: simple web-based creation of editable circular chromosome maps” *BIOINFORMATICS APPLICATIONS NOTE*. 24(6) : 861–862.

Halliwell, B. 1999 “Antioxidant Defence Mechanisms: From the Beginning to the End (of the Beginning)” *Free Radical Research*. 31 : 261-272.

Handley, A.J. 1999. “Extraction Methods in Organic Analysis.” **ShefReId: ShefReId Academic Press.**

HeYangab, Y. Yangab, D. HongLi, G. Liu, G. QinZhang, X.W.H. and JiZhaoa, P. 2018 “New secondary metabolites from an engineering mutant of endophytic *Streptomyces* sp. CS” *ELSEVIER*. 130 : 17-25.

Hidalgo, R.B. Hossain, M.J. Liles, M.R. and Figueras, M.J. 2014. **Strategies to Avoid Wrongly Labelled Genomes Using as Example the Detected Wrong Taxonomic Affiliation for *Aeromonas* Genomes in the GenBank Database.** Turgay Unver, Cankiri Karatekin University, TURKEY

Holt, J.G. Krieg, N.R. Sneath, P.H.A. Staley, J.T. and Williams, S.T. 1994. **Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology.** 9th ed. Baltimore. USA.

- Hozzein, W.N. Goodfellow, M. 2011. "Actinopolyspora *egyptensis* sp. Nov., a new halophilic actinomycetes." *African Journal of Microbiology Research*. 5 : 100-105.
- Huang, Y.F. Tian, L. Wei, H. Ming, H. and Pai, Y. 2015 "One new anthraquinone from marine *Streptomyces* sp. FX-58" *Natural Product Research*. 20(13) : 1207-1210.
- Hyatt, D. Chen, G.L. LoCascio, P.F. Miriam, L.L. Larimer, F.W and Hauser L.J. 2010. "Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification." *BMC Bioinformatics*. 11(1) : 110-119.
- Ishida, T. Yoshimura, H. Takekawa, M. Higaki, T. Ideue, T. Hatano, M. Igarashi, M. Tani, T. Sawa, S. and Ishikawa, H. "Discovery, characterization and functional improvement of kumamonamide as a novel plant growth inhibitor that disturbs plant microtubules" *Scientific Reports*. 11 : 60-77.
- Jaroszewski, J.H. Staerk, D. HolmMøller, S.B. Jensen, T.H. Franzyk, H. and Somanadhan, B. 2013. "NARAVELIA ZEYANICA: OCCURRENCE OF PRIMARY BENZAMIDES IN FLOWERING PLANTS" *Natural Product Research*. 19(3) : 291-294.
- Jiang, H. Han, L. Li, J. Yu, M. Zhao, J. Guo, X. Xiang, W. and Wang, X. 2020 "*Streptomyces montanus* sp. nov., a novel actinomycete isolated from soil" *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 70(5) : 3226-3233.
- Karp, G. 2010 **Cell biology**. 6th ed. New York: John Wiley & Sons.
- Kawahara, T. Izumikawa, M. Kozone, I. Hashimoto, J. Kagaya, N. Koiwai, H. Komatsu, M. Fujie, M. Sato, N. Ikeda, H. and Shinya, K. 2018. "Neothioviridamide, a Poly Thioamide Compound Produced by Heterologous Expression of a *Streptomyces* sp. Cryptic RiPP Biosynthetic Gene Cluster" *Journal of Natural Products*. 81(2) : 264-269.
- Kelly, K. 1965. **ISCC-NBS color-name charts illustrated with centroid colors** U.S: National Bureau of Standards.

- Kieser, T. Bibb, M.J. Buttner, M.J. Chater, K.F. and Hopwood, D.A. 2000. **Practical *Streptomyces* Genetics**. John Innes Foundation. Norwich: UK.
- Kim, H.J. Bo, A.B. Kim, J. Kim Y.S. Khaitov, B. Kwan, Y. Cho, K. Jang, K.S. Park, W. and Choi, J.S. 2020 “Herbicidal Characteristics and Structural Identification of the Potential Active Compounds from *Streptomyces* sp. KRA17-580” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 68(52) : 15373–15380.
- Kolehmaine, E.T. Laihia, K.P. Hyotylainen, M.I and Kauppine, R.T 1995 “ ^1H , ^{13}C and ^{17}O NMR spectral study of chlorinated 3,4-dihydroxybenzaldehydes (protocatechualdehydes)” *Spectrochimica Acta*. 51(3) : 419 – 427.
- Kolbe, D.L. and Eddy, S.R. 2011 “Fast filtering for RNA homology search.” *Bioinformatics*. 27 : 3102–3109.
- Kolthoff, M.J. Klenk, H.P. and Goker, M. 2014 “Taxonomic use of DNA G+C content and DNA–DNA hybridization in the genomic age” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 64 : 352–356.
- Komagata, K. and Suzuki, K.I. 1987. “Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematics” *Methods in microbiology*. 19 : 161-207
- Konstantinidis, K.T. and Tiedje, J.M. 2005 “Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102(7) : 2567–2572.
- Labeda, D.P. and Shearer, M.C. 1990. **Isolation of actinomycetes for biotechnological application**, pp. 1-19. *In* D. P. Labeda (ed). Isolation of Biotechnological Organisms from Nature. McGraw-Hill, New York.
- Lagesen, K. Hallin, P. Roodland, E.A. Stærfeldt, H.H. Rognes, T. and Ussery D.W. 2007. “RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes.” *Nucleic Acids Research*. 35(9) : 3100–3108.

- Laslett, D. and Canback, B. 2004 “ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences.” *Nucleic Acids Research*. 32(1) : 11-16.
- Lechevalier, M.P. DeBievre, C. and Lechevalier, H. A. 1977. “Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition”. *Biochemical Systematics and Ecology*. 5(4) : 249-260.
- Lechevalier, M.P. Lechevalier, H.A. 1980 “Procedures for studying and characterization actinomycetes with emphasis on *streptomyces*. Part III. A university laboratory approach) emphasis on generic characterization)” *Society for Industrial Microbiology*. 1980 : 255-291.
- Li, Y. Li, X.F. Kim, D. Choi, H. and Son, B. 2003 “Indolyl Alkaloid Derivatives, N₆-Acetyltryptamine and Oxaline from a Marine-Derived Fungus” *Archives of Pharmacal Research*. 26(1) : 21-23.
- Loh, T. Chan, K.G. Chan, C.K. Khan, T.M. Lee, L.H. and Goh, B.H. 2018. “Antioxidative Potential of a *Streptomyces* sp. MUM292 Isolated from Mangrove Soil” *BioMed Research International*. 2018 : 1-13.
- Manasa, M. Poornima, G. Abhipsa, V. Rekha, C. PrashithKekuda, T.R. Onkarappa, R. and Mukunda, S. 2015 “Antimicrobial and Antioxidant Potential of *Streptomyces* sp. RAMPP-065 isolated from Kudremukh soil, Karnataka, India.” *Science, Technology and Arts Research Journal*. 1(3) : 39-44.
- Mincheol, K. Hyun, H.O. Park, S.C. and Chun, J. 2014 “Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 64(2) : 346-351.
- Minnikin, D.E. Donnell, A.G. Goodfellow, M. Alderson, G. Athalye, M. Schaal, A. and Parlett. J.H. 1984. “An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids.” *Journal of microbiological Methods*. 2(5) : 233-241.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Nakaew, N. Pathomaree, W. and Lumyong, S 2009. "Generic Diversity of Rare Actinomycetes from Thai Cave Soils and Their Possible Use as New Bioactive Compounds" *Actinomycetologica*. 23(2) : 21–26.
- Nithyaa, K. Muthukumarb, C. Biswasc, B Alharbid, N.S. Kadaikunnand, S. Khaledd, J.M. and Dhanasekarana, D. 2018 "Desert actinobacteria as a source of bioactive compounds production with a special emphasis on Pyridine-2,5-diacetamide a new pyridine alkaloid produced by *Streptomyces* sp. DA3-7" *Microbiological Research*. 207(1) : 116–133.
- Okami, Y. and Hotta, K. 1988. "Search and discovery of new antibiotics. In Goodfellow, M., S. T. Williams, and M. Mordaski." (Eds.) *Actinomycetes in biotechnology*. 1988 : 189-192.
- Oskay, M.A. Tamer, U. and Azeri, C. 2004. "Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey" *African Journal of Biotechnology*. 3(9) : 441-446.
- Paulus, C. Rebets, Y. Tokovenko, B. Nadmid, S. Terekhova, L.P. Myronovskyi, M. Zotchev, S.B. Ruckert, C. Braig, S. Zahler, S. Kalinowski, J and Luzhetskyy, A. 2017 "New natural products identified by combined genomics-metabolomics profiling of marine *Streptomyces* sp. MP131-18" *Scientific Reports*. 7 : 423-482.
- Ravikumar, S. Gnanadesigan, M. Saravanan, A. Monisha, N. Brindha, V. and Muthumari, 2012 "Antagonistic properties of seagrass associated *Streptomyces* sp. RAUACT-1: A source for anthraquinone rich compound" *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2012 : 887-890.
- Rodrigues, J.R Prova, S.S. Alberto, L. Moraes, B. and Rocha, D. 2018. "Characterization and mapping of secondary metabolites of *Streptomyces* sp. from caatinga by desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI-MS)" *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 410 : 7135-7144.

- Pavia, D., Lampman, G.M. and Kriz, G.S. 1996. **Introduction to spectroscopy: A Guide for Students of Organic Chemistry**, 2nd ed., Saunders Golden Sunburst, Fort Worth
- Petersen, T.N. 2011 “SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions.” *Nature Methods*. 8 : 785–786.
- Poter, J.N. Wilhelm, J.J. and Trener, H.D. 1960. “Method for preferential isolation of actinomycetes from soil” *Applied Microbiology*. 8 : 174-178.
- Pridham, T.G. Hasseltine, C.W. and Benedict, R.G. 1958. “A guide for the classification of *Streptomyces* according to selected group. Placement of strain in morphological section” *Applied Microbiology*. 6 : 51-79.
- Saeed Aamer. 2013 “Microwave-Assisted Synthesis of cAMP Phosphodiesterase Inhibitor 8-Hydroxy-6,7-dimethoxy-3-hydroxymethylisocoumarin” *Synthetic Communications*. 37(9) : 1485-1490.
- Saurav, K. Rajakumar, G. Kannabiran, K. Rahuman, A. Velayutham, K. Elango, G. Kamaraj, C. and Zahir, A. 2013 “Larvicidal activity of isolated compound 5-(2,4-dimethylbenzyl) pyrrolidin-2-one from marine *Streptomyces VITSVK5* sp. against *Rhipicephalus (Boophilus)*” *Parasitology Research*. 112 : 15–226.
- Seemann, T 2014. “Prokka: rapid prokaryotic genome annotation” *Bioinformatic Application Note*. 30(14) : 2068–2069.
- Seong, C.N. Choi, J.H. and Baik, K.S. 2001. “An improved selective isolation of rare actinomycetes from forest soil”. *Journal of Microbiology*. 39(1) : 17-23.
- Shirling, E.B and Gottlieb, D. 1966 “Methods for characterization of *Streptomyces* species” *International Journal of Systematic Bacteriology*. 16 : 313-340.
- Siddharth, S. and Vittal, R. 2018 “Evaluation of Antimicrobial, Enzyme Inhibitory, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Partially Purified Volatile Metabolites of Marine *Streptomyces* sp. S2A” *Journal of Microorganisms*. 6(3) : 72-85.

- Sirivibool, R. Kurakami, K. Sukchotiratana, M. and Tokuyama, S. 2004. "Coastal soil actinomycetes. Thermotolerant strains producing *N*-acylamino acid racemase". *Science Asia*. 30 : 123-126.
- Sivarajan, T. Shanmugasundaram, M. Sangeetha, M. Radhakrishnan, and R. Balagurunathan "Screening, production, and characterization of biologically active secondary metabolite(s) from marine *Streptomyces* sp. PA9 for antimicrobial, antioxidant, and mosquito larvicidal activity" *Indian Journal of Geo Marine Sciences*. 48(08) : 1319-1326.
- Snelgrove, D.W. Luszyk, J. Banks, J.T. Mulder, P. and Ingold, K.U. 2001 "Kinetic Solvent Effects on Hydrogen-Atom Abstractions: Reliable, Quantitative Predictions via a Single Empirical Equation" *Journal of the American Chemical Society*. 123(3) : 469-477.
- Solecka, J. Zajko, J. Postek, M. and Rajnisz, A 2012 "Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes" *Central European Journal of Biology*. 7(3) : 373-390.
- Song, A. and Yi, Z. 2004 "Comparative Genomics—An Application for Positional Cloning of the weissherbst Mutant" *Methods in Cell Biology*. 77 : 459-473.
- Stothard, F. and David, S. Wishart, T. 2005 "Circular genome visualization and exploration using CGView" *Bioinformatics Applications Note*. 21(4) : 537-539.
- Sykes, G. and Skinner, F.A. 1973. "Adctinoniyeetales: Characteristics and Practical Importance" *Appl Microbiol*. 2 : 339-342.
- Tang, K.H. Barry, K. Chertkov, O. Dalin, E. Han, C. and Hauser, L. 2011. "Complete genome sequence of the filamentous anoxygenic phototrophic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*." *BMC Genomics*. 12 : 334-355.
- Teddei, A. Jose, M Rodriguez, Vilchez, E. Castelli, C. 2006. "Isolation and identification of *Streptomyces* spp. from Venezuelan soils: Morphological and biochemical studies" *Appl Microbiol*. 161(3) : 222-231.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Thakur, D. Yadav, A. Gogoi, B.K. and Bora, T.C. 2007. "Isolation and screening of *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites" *Journal de Mycologie Medicale* 17(4) : 242-249.
- Weber, T. Blin, K. Duddela, S. Krug, D. Kim, H.U. Brucoleri, R. Lee, S.Y. Fischbach, M.A. Muller, R. Wohlleben, W. Breitling, R. Takano, E. and Medema, M.H. 2015. "antiSMASH 3.0^a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters" *Nucleic Acids Research*. 43(1) : 237-243.
- Williams, S.T., Sharpe M. E. and Holt J.G. 1989. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. United states.
- Vobis, G. 1984. Sporogenesis in the *Pilimelia* species, In: Ortiz-Ortiz, L., Bojalil, L. F. and Yakoleff, V. (eds.) *Biological, Biochemical, and Biomedical Aspect of actinomycetes*. Academic press: Orlando.
- Vobis, G. 1987. **Sporangiate Actinoplaneten Actinomycetales mi yaro aquatischen Lebenszyklus**. Forum : Mikrobiol.
- Waksman, S.A. and Wooruff, H.B. 1940. "Bacteriostatic and bactericidal substances produced by a soil actinomyces" *Journal of Bacteriology*. 45 : 609-614.
- Wang, W. Zhong, J. Su, B. Zhou, Y. and Wang, Y.Q. 2007 "Comparison of Pax1/9 Locus Reveals 500-Myr-Old Syntenic Block and Evolutionary Conserved Noncoding Regions" *Molecular Biology and Evolution*. 24(3) : 784-791.
- Watson, T.A. Callister, R. and Garg, L.M. 2008. **Hankbook of nutraceuticals and functional food**. London : CRC Press.
- William, S.T. and Sharples, G.P. 1976. "*Streptosporangium corrugatum* sp. Nov, an actinomycetes with some unusual morphological features". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 26(4) : 45-52.

- Witt, D. and Stackebrandt, E. 1990. "Unification of the Genera *Streptoverticillum*, *Streptomyces* and *Amendation* of *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943." *Systematic and Applied Microbiology*. 13(4) : 361-371.
- Wood, A.R, Apte, S. Macavoy, E.S. and Gardner, J.P.A. 2007. "A molecular phylogeny of the marine mussel genus *Perna* (Bivalvia: Mytilidae) based on nuclear (ITS1&2) and mitochondrial (COI) DNA sequences." *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 44(2) : 685-698.
- Xu, L. and Jiang, C. 1996. "Diversity of aquatic actinomycetes in lakes of the middle plateau, Yunnan, China" *Applied and Environmental Microbiology*. 62 : 249-253.
- Yang, X. Peng, T. Yang, Y. Li, W. Xiong, J. Zhao, L. and Ding, Z. 2014 "Antimicrobial and antioxidant activities of a new benzamide from endophytic *Streptomyces* sp. YIM 67086" *Natural Product Research*. 29(4) : 331-335.
- Zdero, C. JAKUPOVIC, J. and BOHLMANN, F. 1990 "Diterpenes and other constituents from *pteronza* species" *Phytochemistry*. 29(4) : 1231-1245.
- Zhi, X.Y. Tian, X.P. Qiu, Y.Q. Zhang, Y.Q. Tang, S.K., Xu, L.H. Zhang, S. and Li, W.J. 2009. "Sciscionella marina gen. nov., sp. nov., a marine actinomycete isolated from a sediment in the northern South China Sea." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59 : 222-228.
- Zinada, S.D. Shaabana, K.A. Abdallaa, M.A. Islamb, M.D. Schüfflerd, A. and Laatscha, H. 2010 "Bioactive Isocoumarins from a Terrestrial *Streptomyces* sp. ANK302" *Institute of Biotechnology and Drug Research*. 6(1) : 45 – 48.

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

Yeast extract – malt extract ager (ISP2)

Yeast extract	4	กรัม
Malt extract	10	กรัม
Glucose	4	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
pH 7.5		

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Oatmeal agar (ISP3)

Oatmeal	20	กรัม
Tract salts solution	1	มิลลิลิตร
Agar	18	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
pH 7.2		

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Inorganic salts – starch agar (ISP4)

Soluble starch	10	กรัม
K_2HPO_4	1	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1	กรัม
NaCl	1	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	2	กรัม
$CaCO_3$	2	กรัม
Trace salts solution	1	มิลลิลิตร
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
pH 7.0 – 7.4		

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Glycerol – asparagine agar (ISP5)

L-asparagine	1	กรัม
Glycerol	10	กรัม
K ₂ HPO ₄	1	กรัม
Trace salts solution	1	มิลลิลิตร
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
pH 7.0 – 7.4		

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Peptone – yeast extract iron agar (ISP6)

Peptone iron agar (Difco)	36	กรัม
Yeast extract	1	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
pH 7.0 – 7.2		

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Tyrosine agar (ISP7)

Glycerol	15	กรัม
L-tyrosine	0.5	กรัม
L- asparagine	1	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.5	กรัม
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01	กรัม
Trace salts solution	1	มิลลิลิตร
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
pH 7.0 – 7.2		

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Czapek's sucrose agar

Sucrose	30	กรัม
K ₂ HPO ₄	1	กรัม
MgSO ₄	0.5	กรัม
KCl	0.5	กรัม
FeSO ₄	0.01	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

pH 7.0 – 7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Glucose asparagine agar

Glucose	10	กรัม
Asparagine	0.5	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

pH 6.8 – 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Nutrient agar (Difco)

Beef Extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

pH 6.8

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Bouillon gelatin broth

Peptone	1	กรัม
Meat extract	0.5	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
Gelatin	15	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
----------	-----	-----------

pH 7.0 – 7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Peptone KNO₃ broth

Peptone	10	กรัม
---------	----	------

KNO ₃	1	กรัม
------------------	---	------

NaCl	5	กรัม
------	---	------

น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
----------	------	-----------

pH 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Peptonization and Coagulation test medium

Skim milk (Difco)	10	กรัม
-------------------	----	------

น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
----------	-----	-----------

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

Carbon utilization medium (ISP9)

Carbon sources

Carbohydrate	10	กรัม
--------------	----	------

น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
----------	-----	-----------

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

Pridham and Gottlieb trace salts

CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.64	กรัม
--------------------------------------	------	------

FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.11	กรัม
--------------------------------------	------	------

MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.79	กรัม
--------------------------------------	------	------

ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.15	กรัม
--------------------------------------	------	------

น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
----------	-----	-----------

Basal mineral salts agar

(NH ₄) ₂ SO ₄	2.64	กรัม
---	------	------

KH ₂ PO ₄ Anhydrous	2.38	กรัม
---	------	------

K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	5.65	กรัม
--	------	------

MgSO ₄ ·7H ₂ O	1	กรัม
--------------------------------------	---	------

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pridham and Gottlieb trace salts	1	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	900	มิลลิลิตร
Agar	15	กรัม
pH 6.8 – 7.0		

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ทิ้งไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วทำการเติม carbohydrate ที่ปราศจากเชื้อปริมาณ 100 มิลลิลิตรลงไปใน Basal mineral salts agar

Luria – Bertani (LB) agar

Tryptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
NaCl	5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
pH 7.0		

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

สารเคมี

สารที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ Polar lipids

Dittmer & Lester reagent

Solution A

Molybdc anhydride (MoO_3)	4.011	กรัม
25 N sulfuric acid	100	มิลลิลิตร

ละลาย Molybdc anhydride ใน 25N sulfuric acid โดยใช้ความร้อน

Solution B

Molybdc anhydride (MoO_3)	0.178	กรัม
Solution A	50	มิลลิลิตร

ละลาย Molybdc anhydride ใน Solution A โดยใช้ความร้อนและต้มให้เดือดเป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งให้เย็น เทแยกส่วนที่ตกตะกอนทิ้ง

*เตรียมใหม่ก่อนใช้โดยผสม Solution A ปริมาตร 50 มิลลิลิตร กับ Solution B ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Ninhydrin reagent

Ninhydrin	0.4	กรัม
water-saturated n-butanol	100	มิลลิลิตร

Anisaldehyde reagent

Ethanol	90	มิลลิลิตร
Sulfuric acid	5	มิลลิลิตร
<i>p</i> -Anisaldehyde	5	มิลลิลิตร
Acetic acid	1	มิลลิลิตร

Dragendorff reagent

Solution A

basic bismuth nitrate	1.7	กรัม
Acetic acid	80	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Solution B

KI	40	กรัม
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

*เตรียมใหม่ก่อนใช้โดยผสม Solution A ปริมาตร 10 มิลลิลิตร กับ Solution B ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และ Acetic acid ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

สารที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์หองค์ประกอบของกรดไขมัน (cellular fatty acid)

Reagent 1, Saponification reagent

Sodium hydroxide	15	กรัม
Methanol (HPLC grade)	50	มิลลิลิตร
Milli-Q water	50	มิลลิลิตร

ละลาย Sodium hydroxide ใน Milli-Q water ก่อนแล้วค่อยผสมกับ Methanol

Reagent 2, Methylation reagent

6 N Hydrochloric acid	65	มิลลิลิตร
Methanol (HPLC grade)	55	มิลลิลิตร
pH ต่ำกว่า ๓		

Reagent 3, Extraction solvent

n-Hexane (HPLC grade)	50	มิลลิลิตร
Methyl-tert-Butyl Ether (HPLC grade)	50	มิลลิลิตร

Reagent 4, Base wash

Sodium hydroxide	1.2	กรัม
Milli-Q water	100	มิลลิลิตร

Reagent 5, Saturated sodium chloride

Sodium chloride	40	กรัม
Milli-Q water	100	มิลลิลิตร

การเตรียม Dowex (CH₃COO)

1. แช่ว Dowex 1 ใน 2 N NaOH เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองผ่านกระดาษกรองแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นจนมีค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 7
2. แช่ว Dowex 1 ใน 1N CH₃COOH เป็นเวลา 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรองแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นจนมีค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DON reagent

2, 7-Dihydroxynapthalene	10	มิลลิลิตร
Sulfuric acid	50	มิลลิลิตร

ละลาย 2, 7-Dihydroxynapthalene ใน Sulfuric acid เข้มข้น จะได้สารละลายสีเหลือง หุ้มภาชนะที่บรรจุด้วยอลูมิเนียมฟลอยด์ เก็บไว้ค้างคืนในที่มืด สารละลายจะเปลี่ยนสีจากสีเหลืองกลายเป็นไม่มีสี

TE buffer

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)	10	มิลลิลิตร
1 mM EDTA (pH 8.0)	4	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	986	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1M EDTA (pH 8.0)

EDTA	372.24	มิลลิลิตร
------	--------	-----------

น้ำกลั่น

ผสม EDTA กับน้ำกลั่นให้เข้ากัน

ปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 8.0 ด้วย 1N NaOH ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร

1M Tris-Cl (pH 8.0)

Tris-base	121.1	กรัม
-----------	-------	------

น้ำกลั่น

ผสม Tris-base กับน้ำกลั่นให้เข้ากัน

ปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 8.0 ด้วย HCl ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร

RNase A ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

RNase A	100	มิลลิกรัม
0.15 M NaCl	10	มิลลิลิตร

ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 – 10 นาที เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

Proteinase K ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Proteinase K	100	มิลลิกรัม
50 mM Tris-HCl	10	มิลลิลิตร

pH 7.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

20xSSC

NaCl	175.3	กรัม
------	-------	------

Tri-sodium citrate 2H ₂ O	88.2	กรัม
--------------------------------------	------	------

น้ำกลั่น

ชั่ง NaCl และ Tri-sodium citrate 2H₂O ใส่ในน้ำกลั่น แล้วผสมให้เข้ากัน

ปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 7.2 ด้วย 10 M NaOH

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร

นิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1xSSC

20xSSC	5	มิลลิลิตร
--------	---	-----------

น้ำกลั่น	95	มิลลิลิตร
----------	----	-----------

นิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารที่ใช้ในการทำ DNA – DNA hybridization

10xPBBSM

MgCl ₂ · 7H ₂ O	95	มิลลิกรัม
---------------------------------------	----	-----------

10xPBS	10	มิลลิลิตร
--------	----	-----------

Pre-hybridization solution

20xSSC	1	มิลลิลิตร
--------	---	-----------

50xDenhardt solution	1	มิลลิลิตร
----------------------	---	-----------

Denaturated Salmon DNA (10 mg/ml)	0.1	มิลลิลิตร
-----------------------------------	-----	-----------

Fomamide	5	มิลลิลิตร
----------	---	-----------

น้ำกลั่น	2.9	มิลลิลิตร
----------	-----	-----------

Hybridization solution

น้ำกลั่น	2.8	มิลลิลิตร
----------	-----	-----------

Dextran sulfate	0.25	กรัม
-----------------	------	------

20xSSC	1	มิลลิลิตร
--------	---	-----------

50xDenhardt solution	1	มิลลิลิตร
----------------------	---	-----------

Denaturated Salmon DNA (10 mg/ml)	0.1	มิลลิลิตร
-----------------------------------	-----	-----------

Fomamide	5	มิลลิลิตร
----------	---	-----------

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Solution I

BSA	0.25	กรัม
Triton-X-100	50	ไมโครลิตร
1X PBS	50	มิลลิลิตร

Solution II

Streptavidin POD	1	ไมโครลิตร
Solution I	4	มิลลิลิตร

Solution III

TMD (10 mg/ml in DMFO)	100	ไมโครลิตร
0.3 % H ₂ O ₂	100	ไมโครลิตร
0.1 M Citric acid in 10 % DMFO + 0.2 M Na ₂ HPO ₄ buffer pH 6.2	5	มิลลิลิตร

100x Denhardt solution

Bovine serum albumin (fraction V)	2	กรัม
Polyvinylpyrrolidone	2	กรัม
Ficoll 400	2	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

2xPBS

8 mM Na ₂ HPO ₄	1.15	กรัม
1.5 mM KH ₂ PO ₄	0.2	กรัม
137 mM NaCl	8.0	กรัม
2.7 mM KCl	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

pH 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวก ค

ตารางแสดงอัตราส่วนที่ใช้ในการแยกแต่ละส่วน

ตารางที่ 1. อัตราส่วนที่ใช้แยกส่วนที่ B5 ของสารสกัดหยาบน้ำหมัก

เวลา (นาทีก)	อัตราไหล (มิลลิลิตร/นาทีก)	% A (water)	% B (Acetonitrile)
0	8	95	5
0	8	95	5
21	8	50	50
24	8	50	50
27	8	0	100
30	8	0	100

ตารางที่ 2 อัตราส่วนที่ใช้แยกส่วนที่ B5H7 ของสารสกัดหยาบน้ำหมัก

เวลา (นาทีก)	อัตราไหล (มิลลิลิตร/นาทีก)	% A (water)	% B (Acetonitrile)
0	15	95	5
0	15	95	5
21	15	75	35
24	15	75	35
26	15	0	100
30	15	0	100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 อัตราส่วนที่ใช้แยกส่วนที่ B5H9 ของสารสกัดหยาบน้ำหมัก

เวลา (นาทีก)	อัตราไหล (มิลลิลิตร/นาทีก)	% A (water)	% B (Acetonitrile)
0	8	90	10
0	8	90	10
18	8	50	50
20	8	50	50
25	8	0	100
30	8	0	100

ตารางที่ 4 อัตราส่วนที่ใช้แยกส่วนที่ B6 ของสารสกัดหยาบน้ำหมัก

เวลา (นาทีก)	อัตราไหล (มิลลิลิตร/นาทีก)	% A (water)	% B (Acetonitrile)
0	12	98	2
0	12	98	2
21	12	60	40
25	12	60	40
27	12	0	100
35	12	0	100

ตารางที่ 5 อัตราส่วนที่ใช้แยกส่วนที่ C3 ของสารสกัดหยาบจากเซลล์

เวลา (นาทีก)	อัตราไหล (มิลลิลิตร/นาทีก)	% A (water)	% B (Acetonitrile)
0	12	95	5
0	12	95	5
22	12	25	75
25	12	25	75
30	12	0	100
40	12	0	100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 อัตราส่วนที่ใช้แยกส่วนที่ C4 ของสารสกัดหยาบจากเซลล์

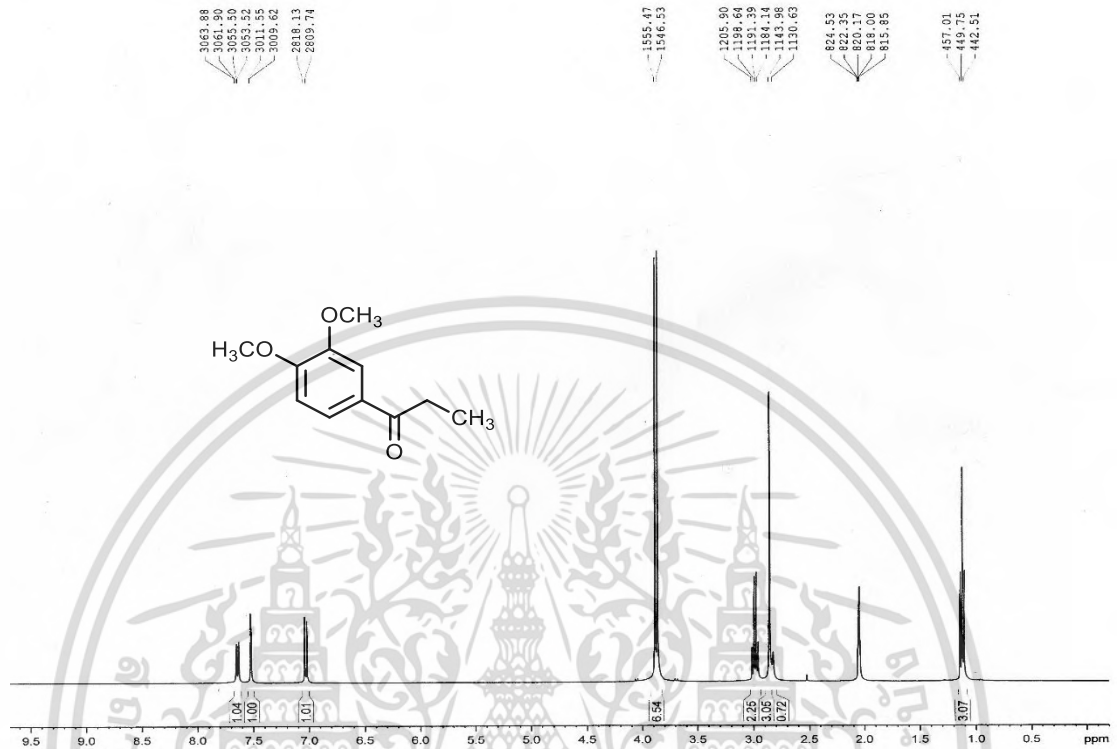
เวลา (นาที)	อัตราไหล (มิลลิลิตร/นาที)	% A (water)	% B (Acetonitrile)
0	8	95	5
0	8	95	5
21	8	75	25
25	8	75	25
27	8	0	100
35	8	0	100



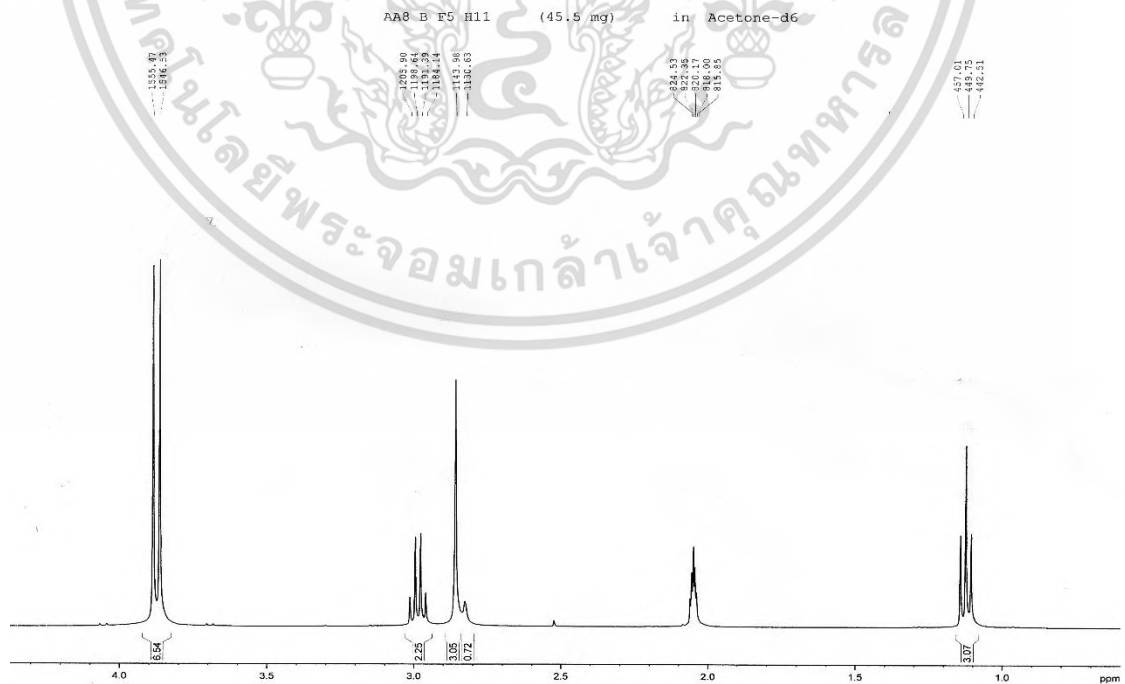
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวก ง

ข้อมูลของ ^1H ^{13}C NMR และ แมสสเปกโตรมิเตอร์

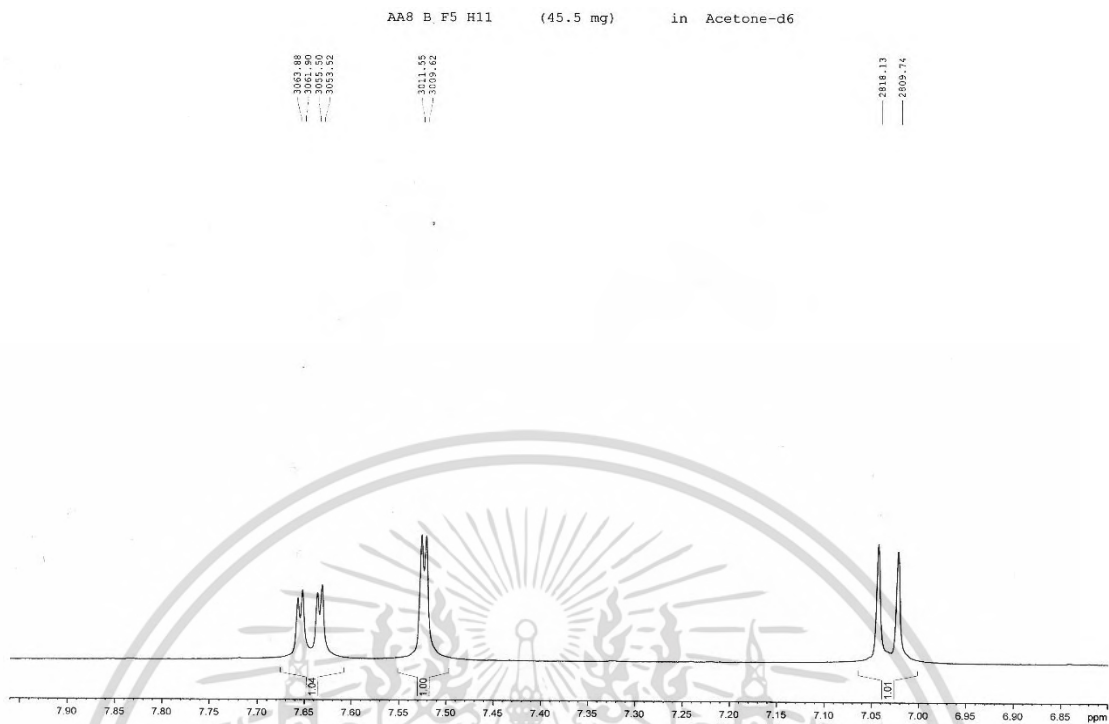


รูปที่ 1 ^1H NMR (400 MHz, acetone- d_6) ของสาร A

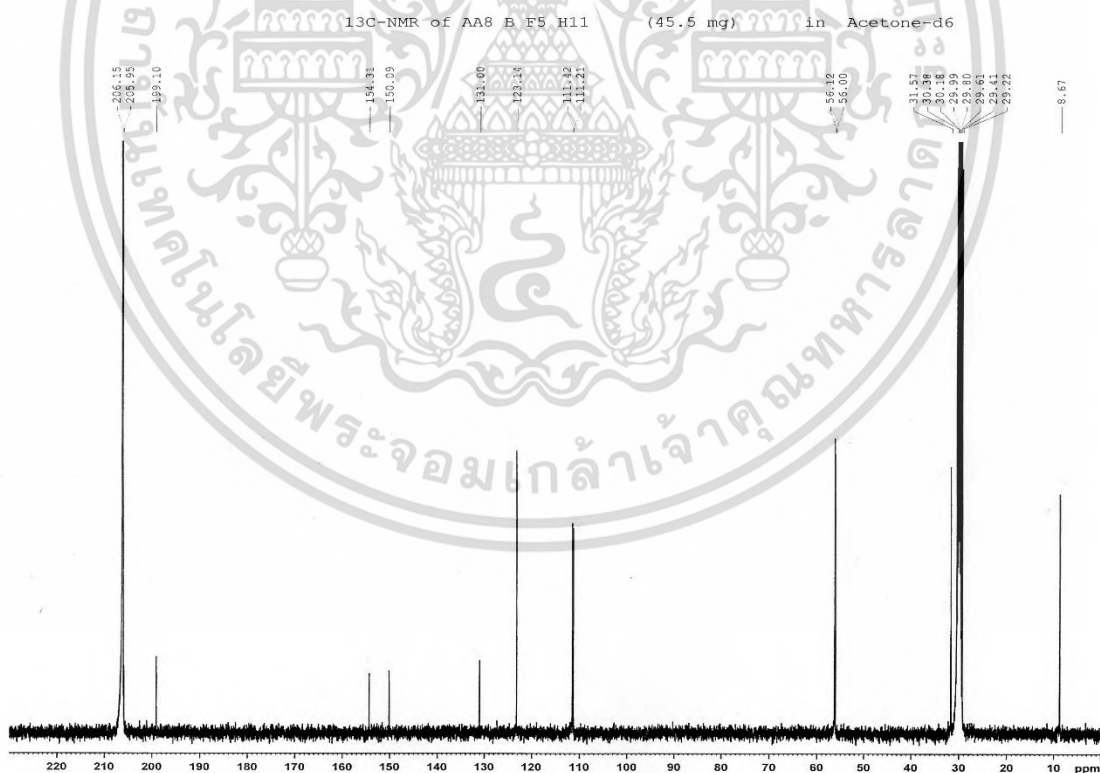


รูปที่ 2 ^1H NMR (400 MHz, acetone- d_6) ของสาร A (ขยายจากรูปที่ 1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

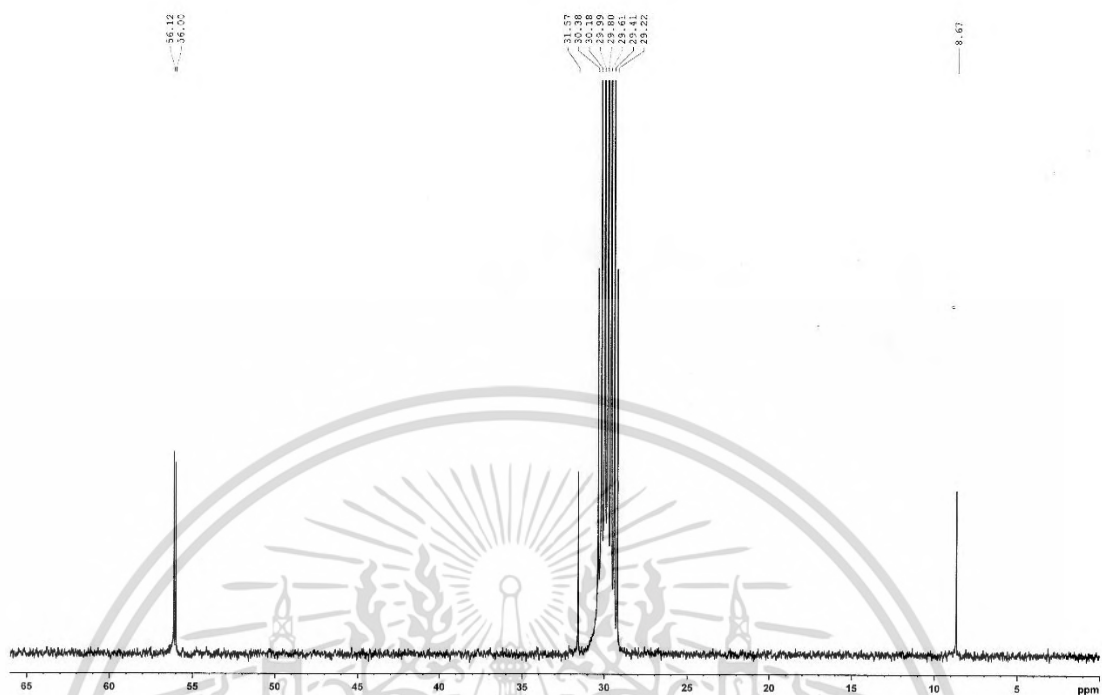


รูปที่ 3 ^1H NMR (400 MHz, acetone-d6) ของสาร A (ขยายจาก รูปที่ 1)



รูปที่ 4 ^{13}C NMR (400 MHz, acetone-d6) ของสาร A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

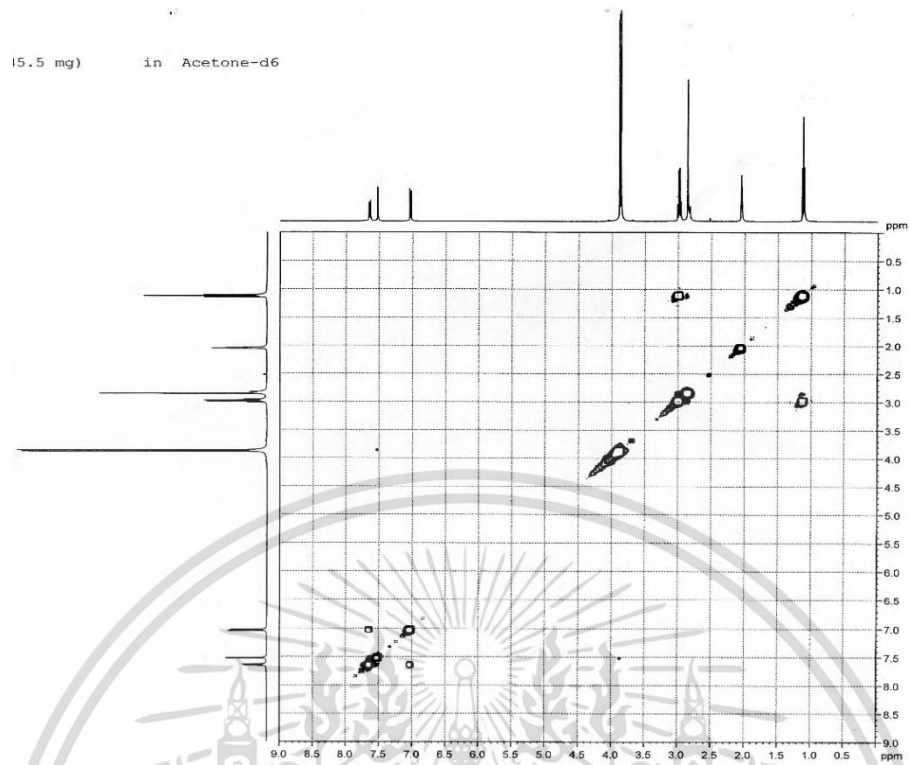


รูปที่ 5 ^{13}C NMR (400 MHz, acetone- d_6) ของสาร A (ขยายจาก รูปที่ 4)

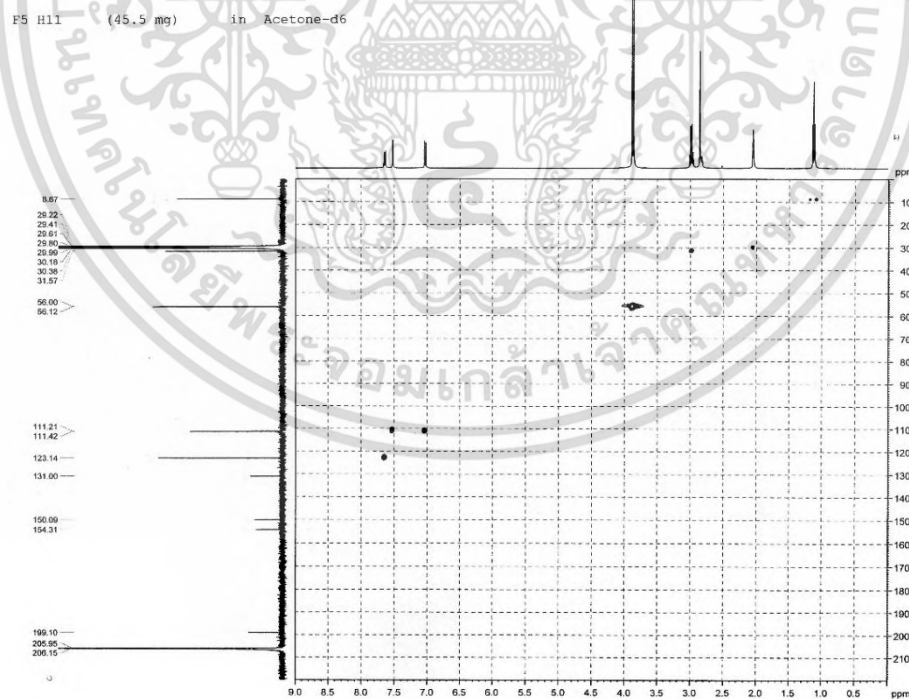


รูปที่ 6 ^{13}C NMR (400 MHz, acetone- d_6) ของสาร A (ขยายจาก รูปที่ 4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

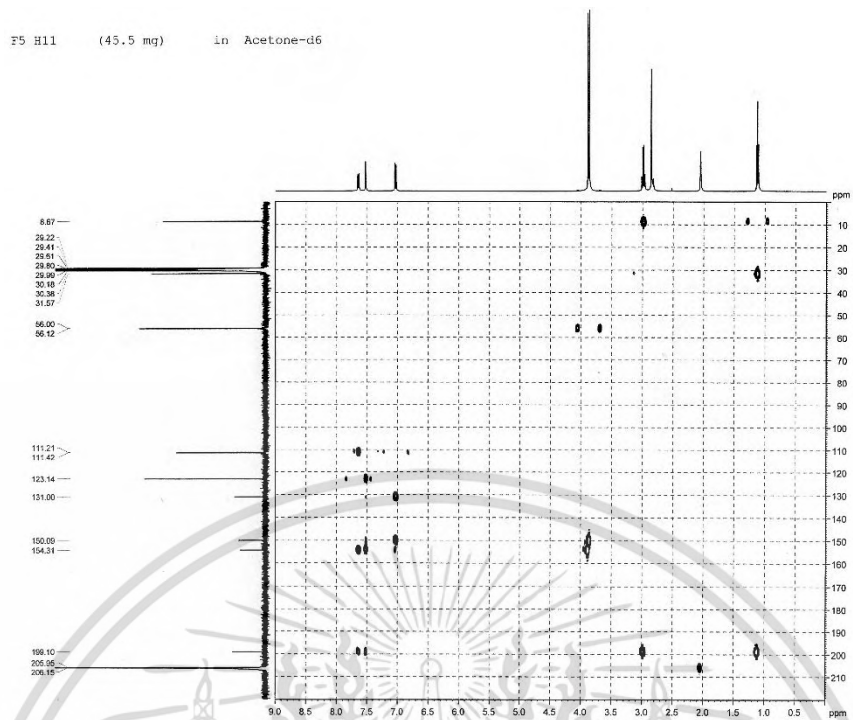


รูปที่ 7 COSY ของสาร A (400 MHz, acetone-d₆) ของสาร A

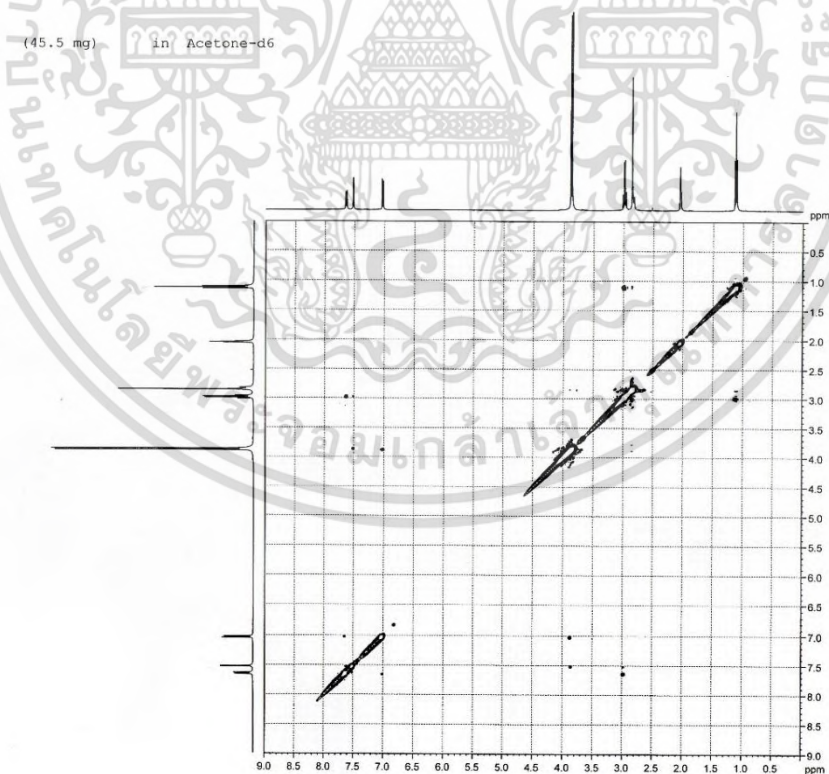


รูปที่ 8 HSQC ของสาร A (400 MHz, acetone-d₆) ของสาร A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

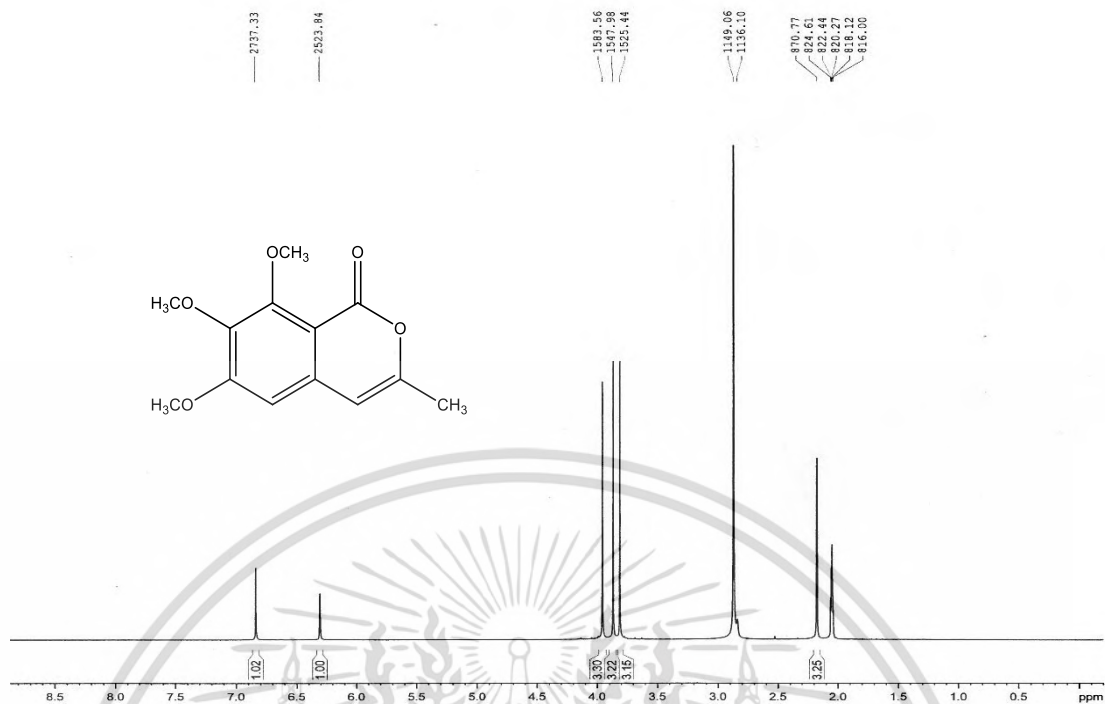


รูปที่ 9 HMBC ของสาร A (400 MHz, acetone-d6) ของสาร A



รูปที่ 10 NOESY ของสาร A (400 MHz, acetone-d6) ของสาร A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

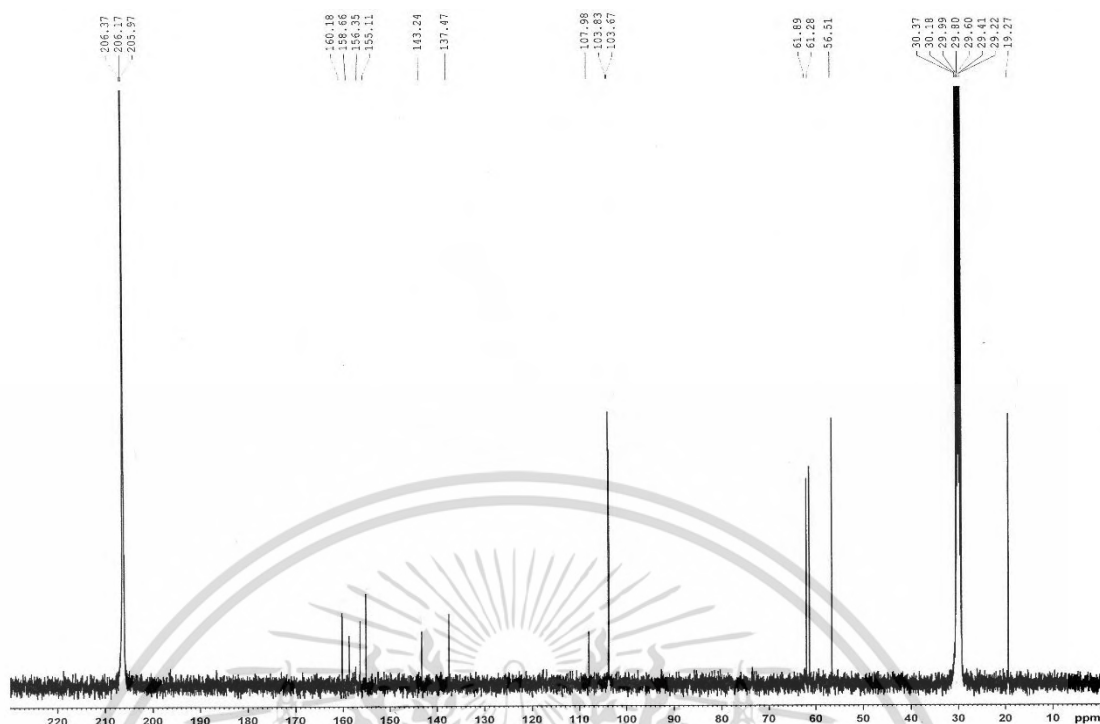


รูปที่ 11 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Acetone- d_6) ของสาร B

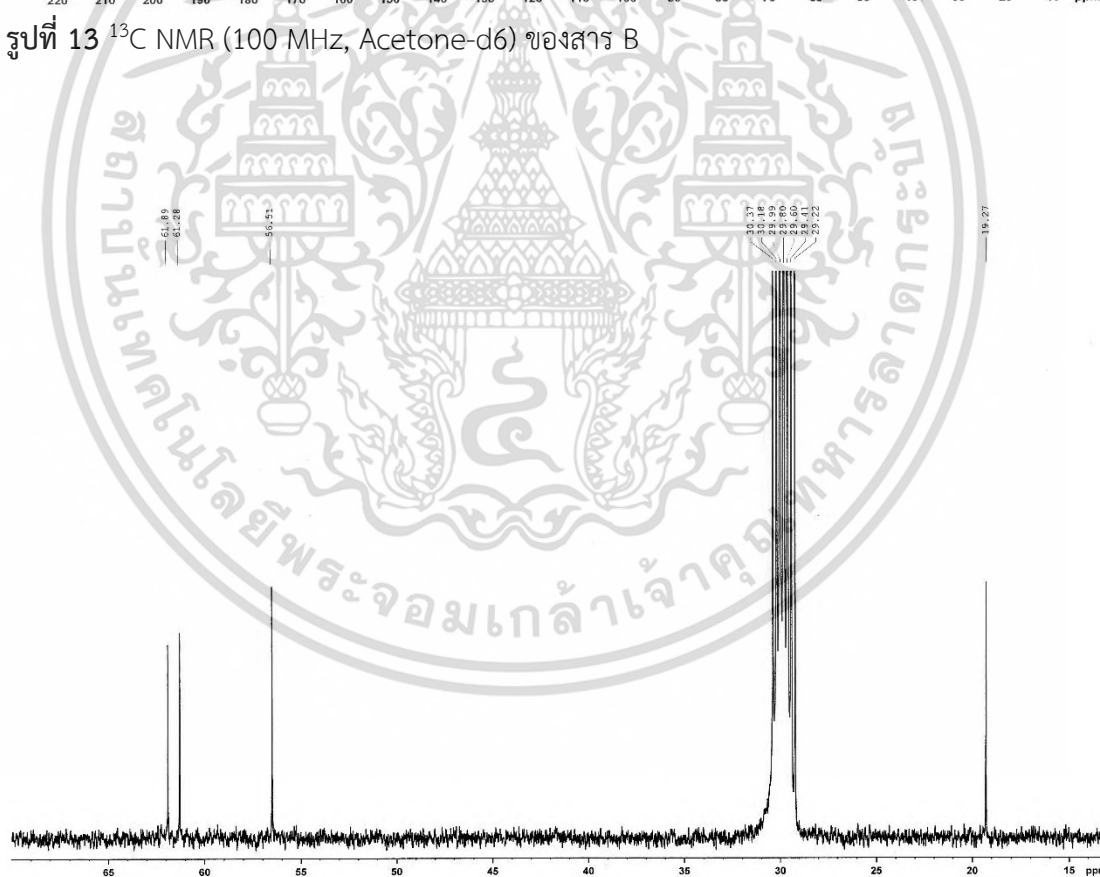


รูปที่ 12 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Acetone- d_6) ของสาร B (ขยายมาจากรูปที่ 11)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

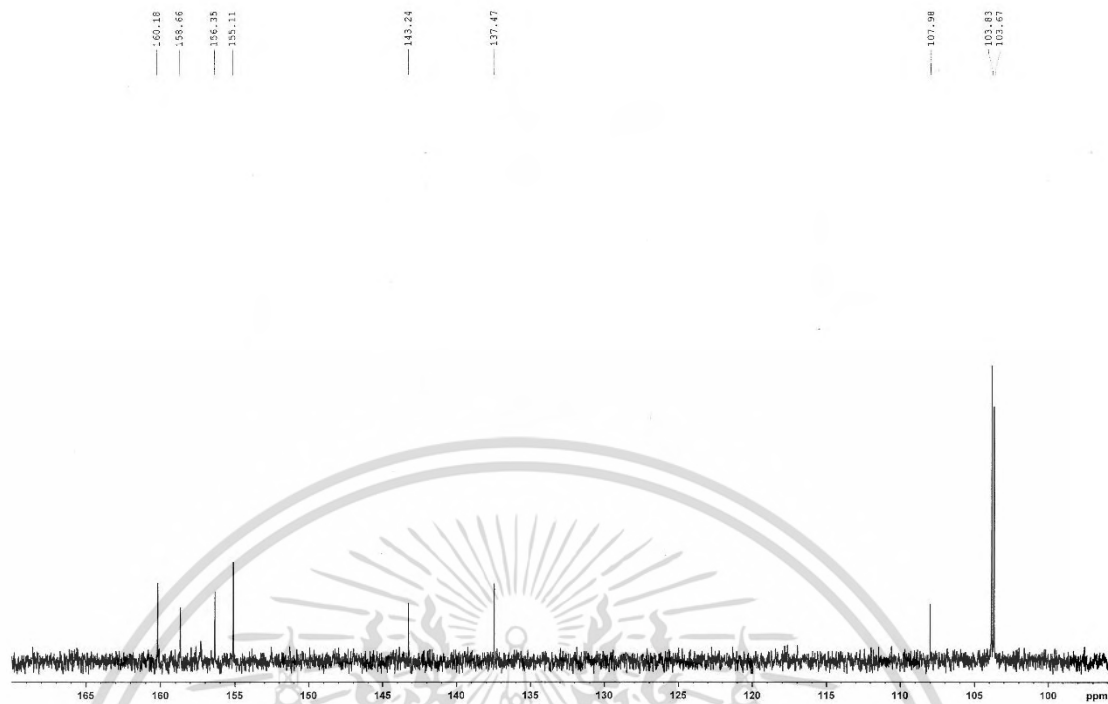


รูปที่ 13 ^{13}C NMR (100 MHz, Acetone- d_6) ของสาร B

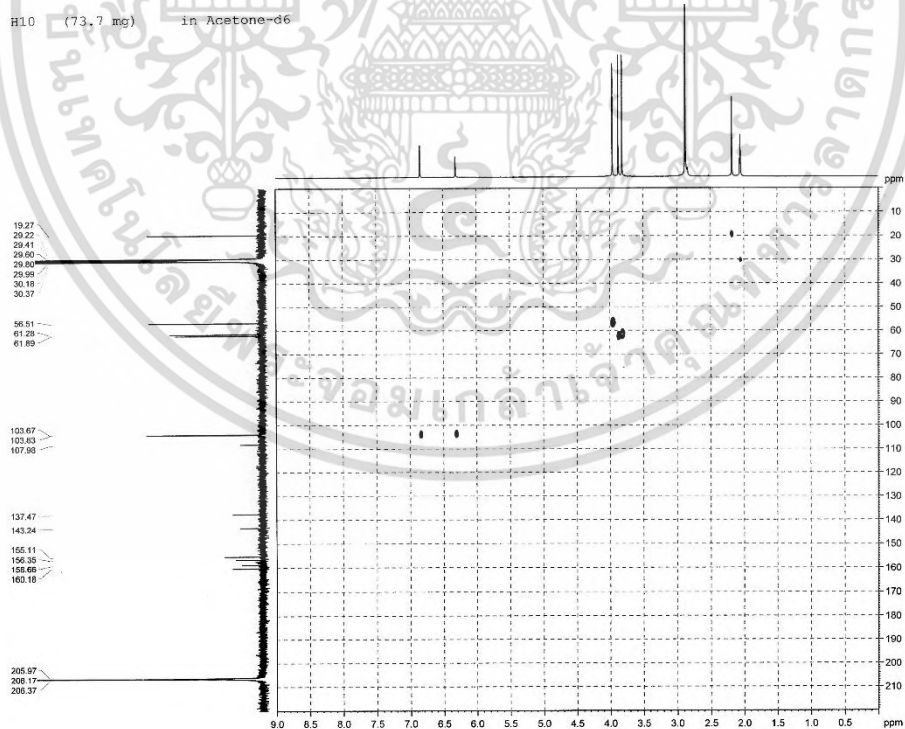


รูปที่ 14 ^{13}C NMR (100 MHz, Acetone- d_6) ของสาร B (ขยายมาจากรูปที่ 13)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

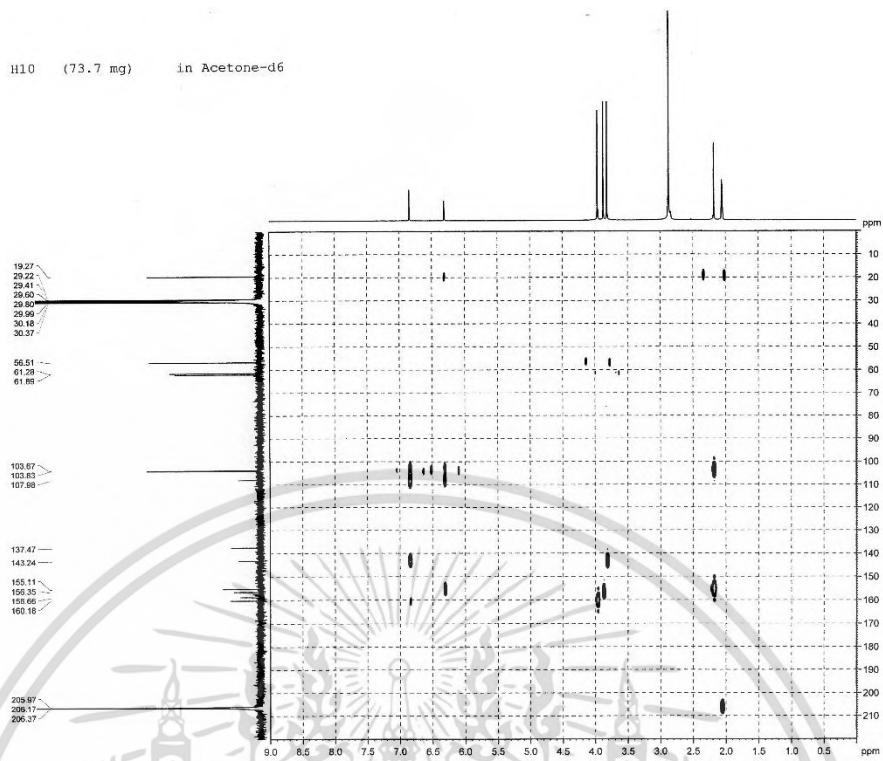


รูปที่ 15 ^{13}C NMR (100 MHz, Acetone- d_6) ของสาร B (ขยายมาจากรูปที่ 13)

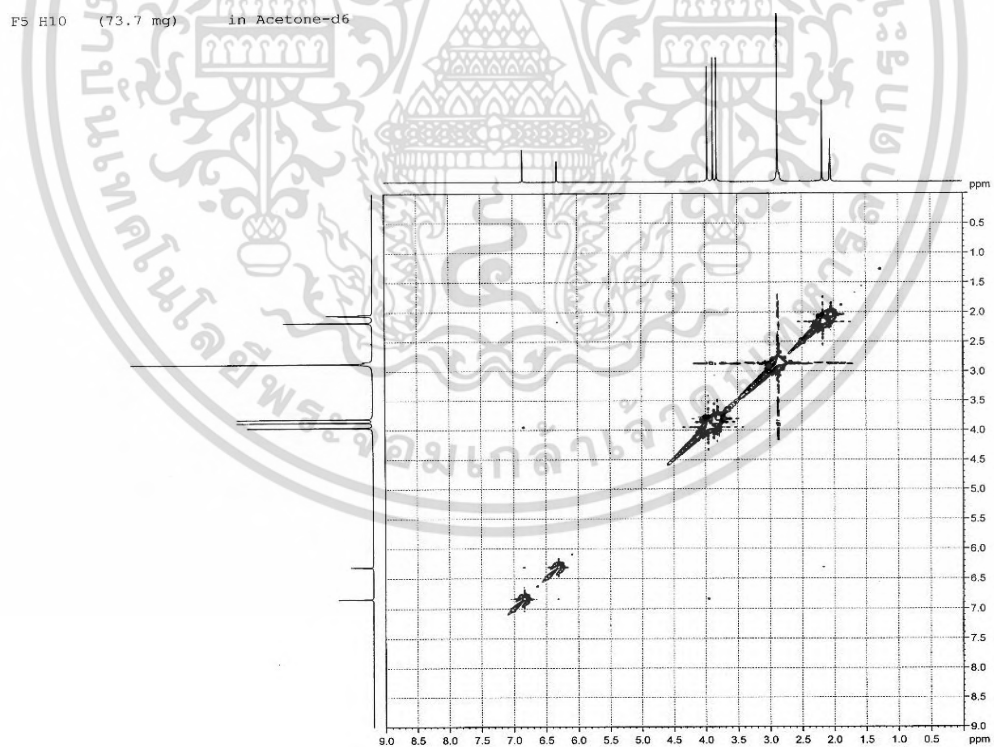


รูปที่ 16 HSQC (100 MHz, Acetone- d_6) ของสาร B

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

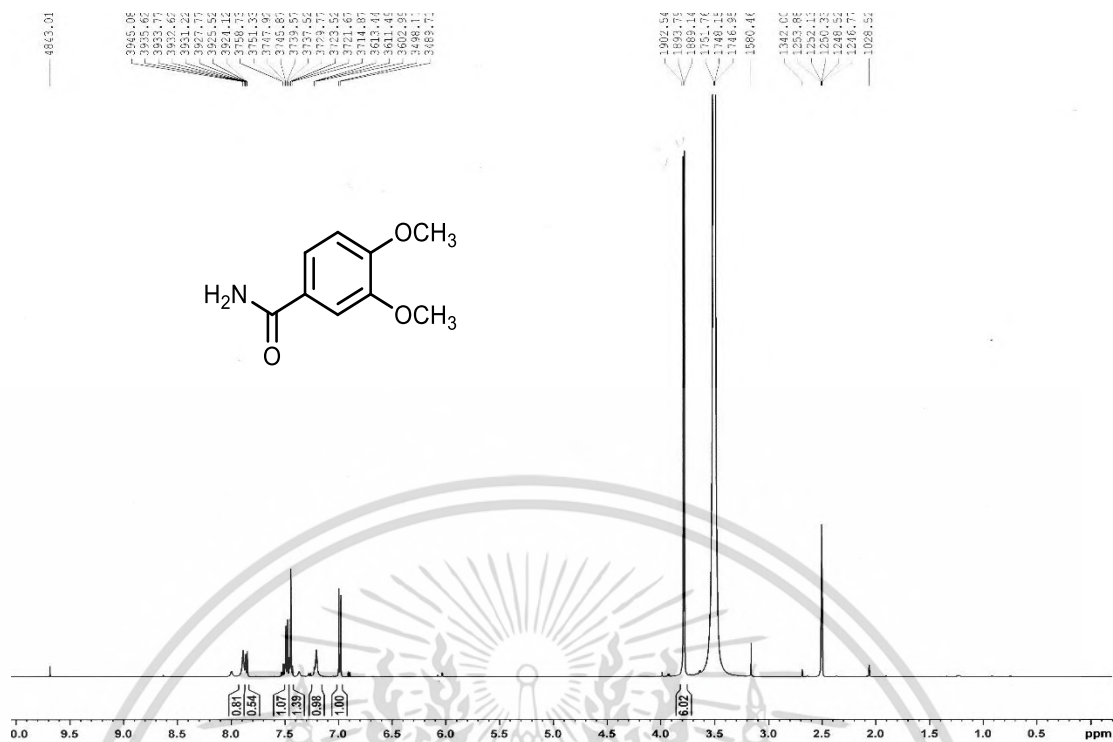


รูปที่ 17 HMBC (100 MHz, Acetone-d6) ของสาร B

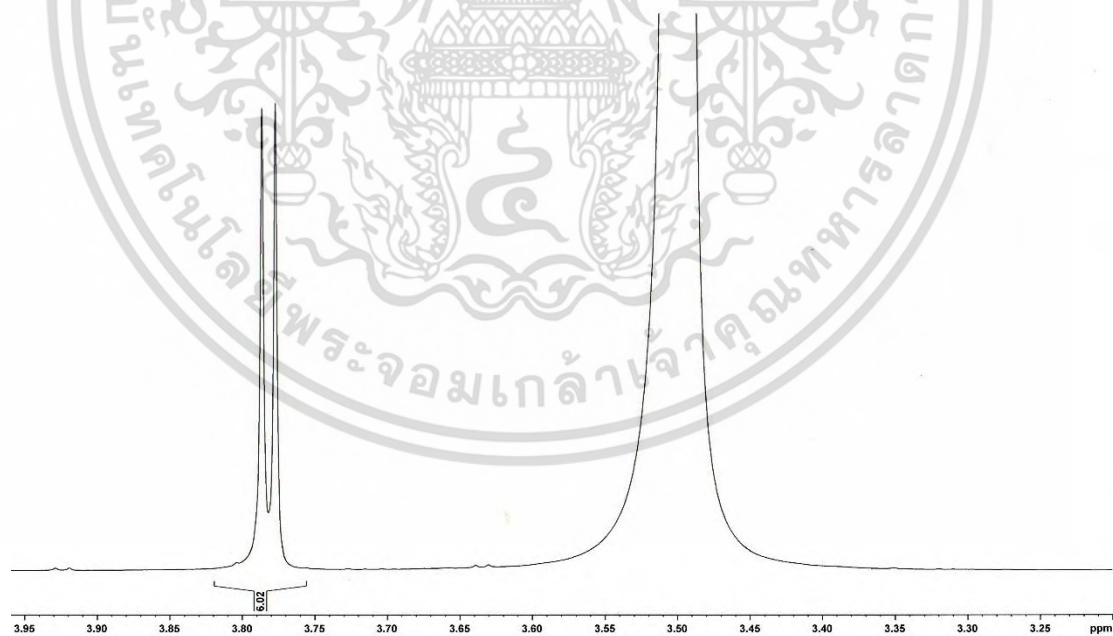


รูปที่ 18 NOESY (100 MHz, Acetone-d6) ของสาร B

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

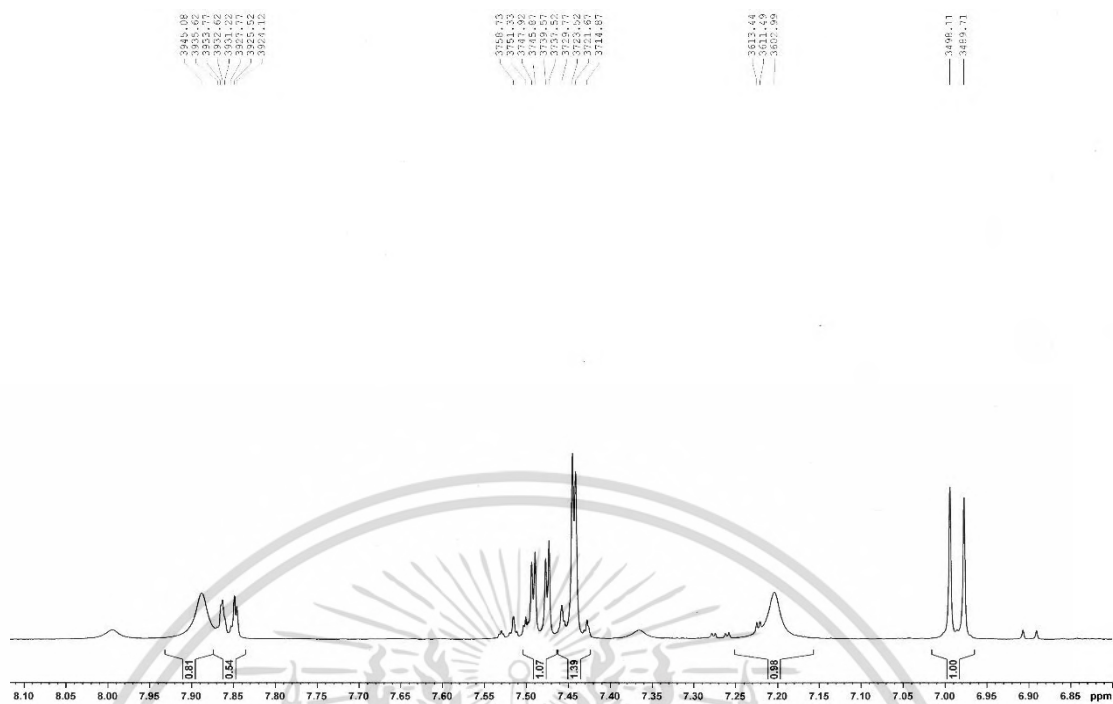


รูปที่ 19 ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) ของสาร C

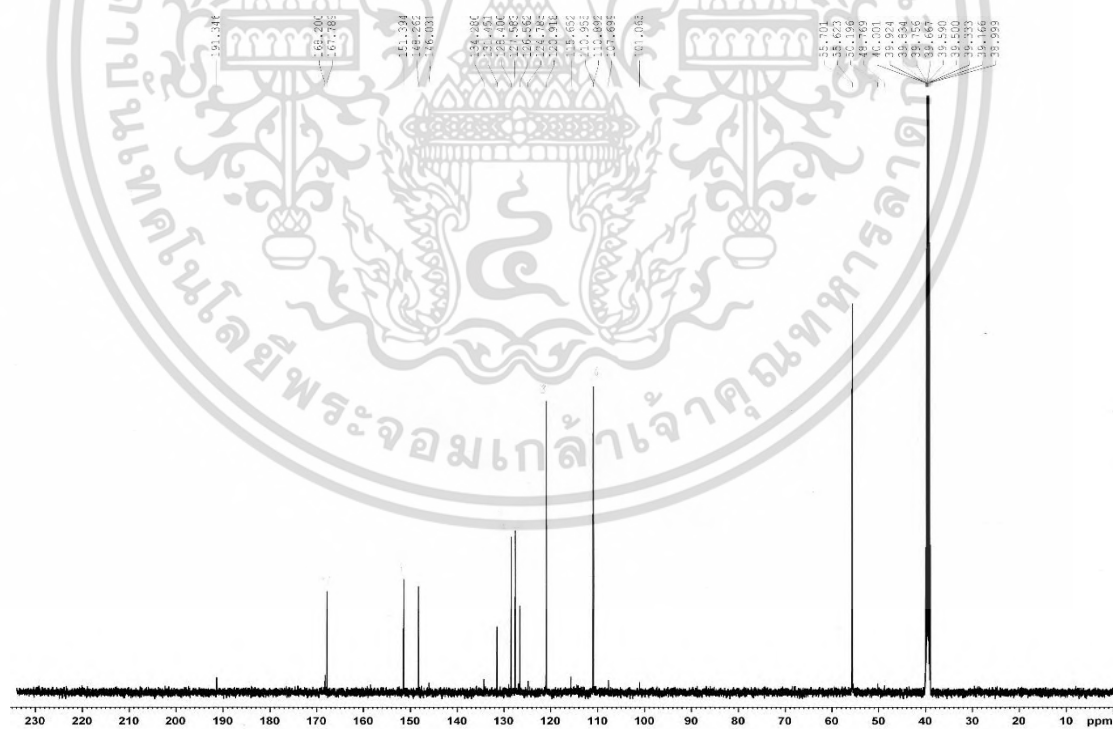


รูปที่ 20 ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) ของสาร C (ขยายมาจากรูปที่ 19)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

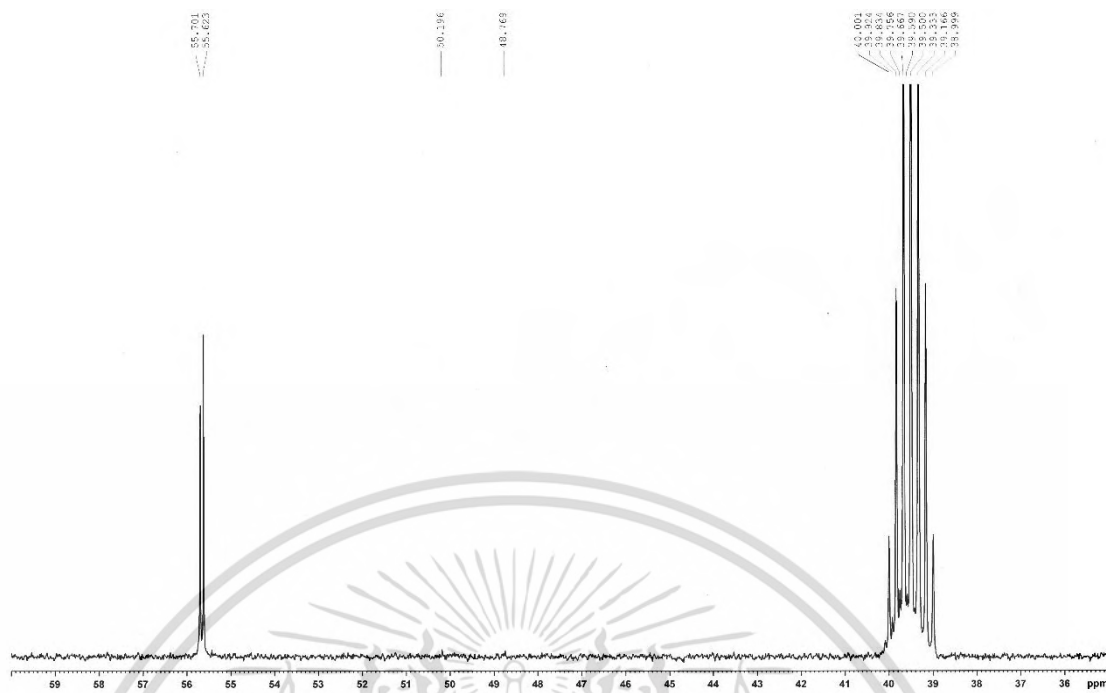


รูปที่ 21 ^1H (500 MHz, DMSO-d₆) ของสาร C (ขยายมาจากรูปที่ 19)

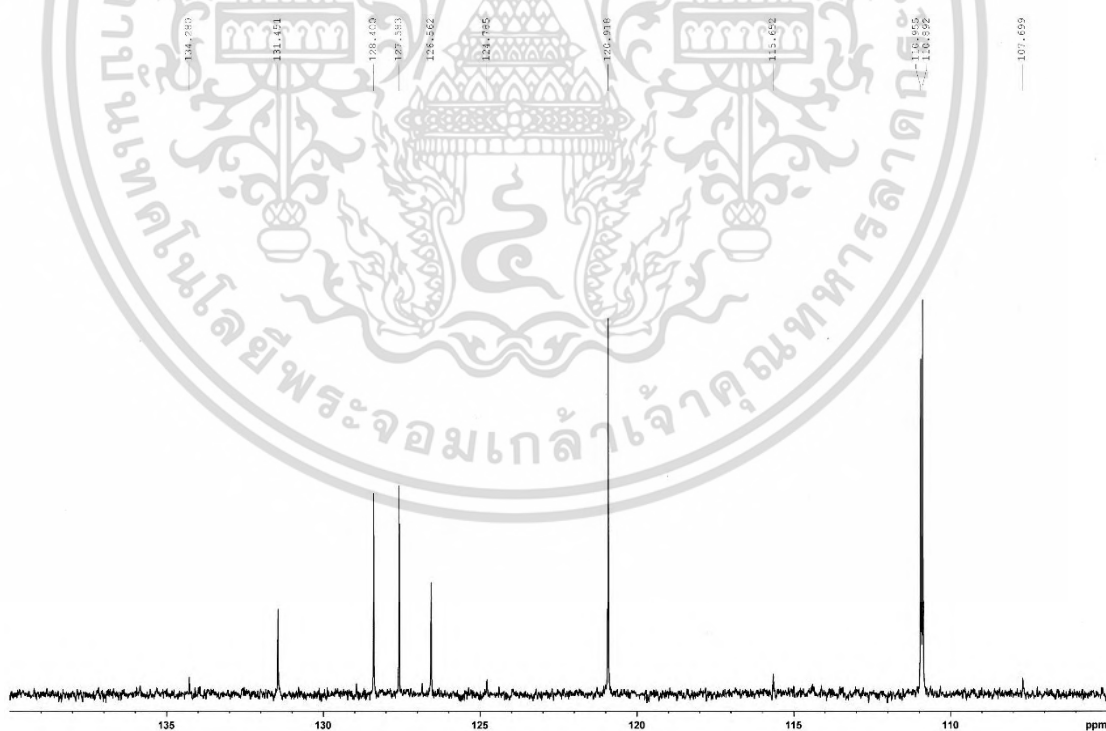


รูปที่ 22 ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) ของสาร C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

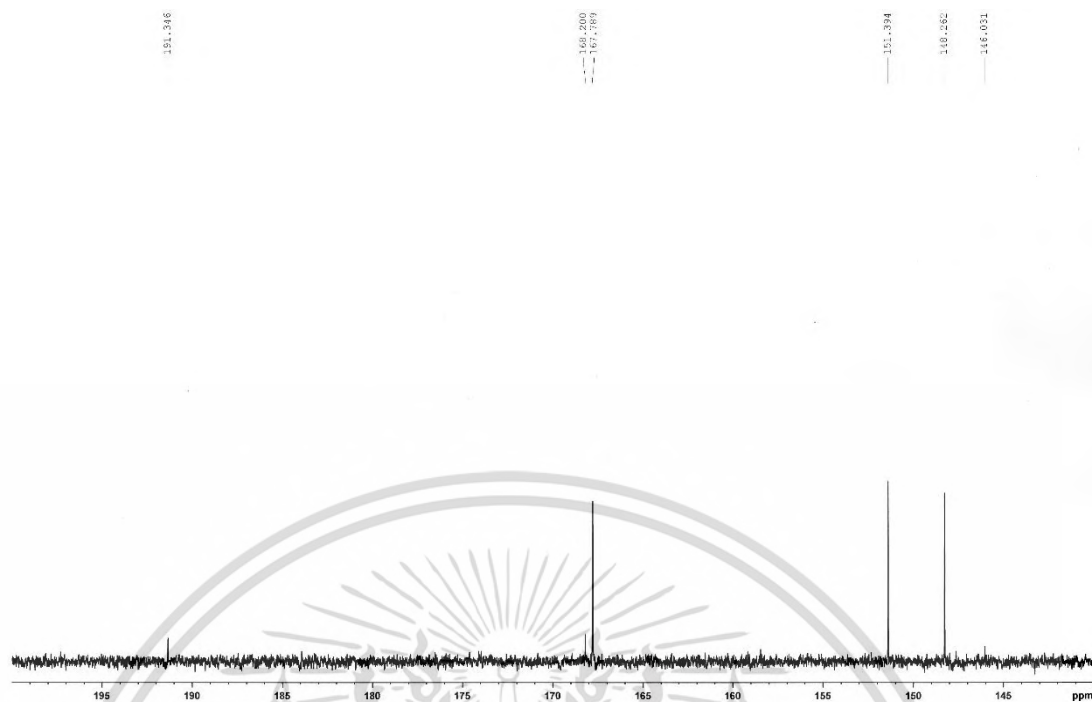


รูปที่ 23 ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) ของสาร C (ขยายจากรูปที่ 22)

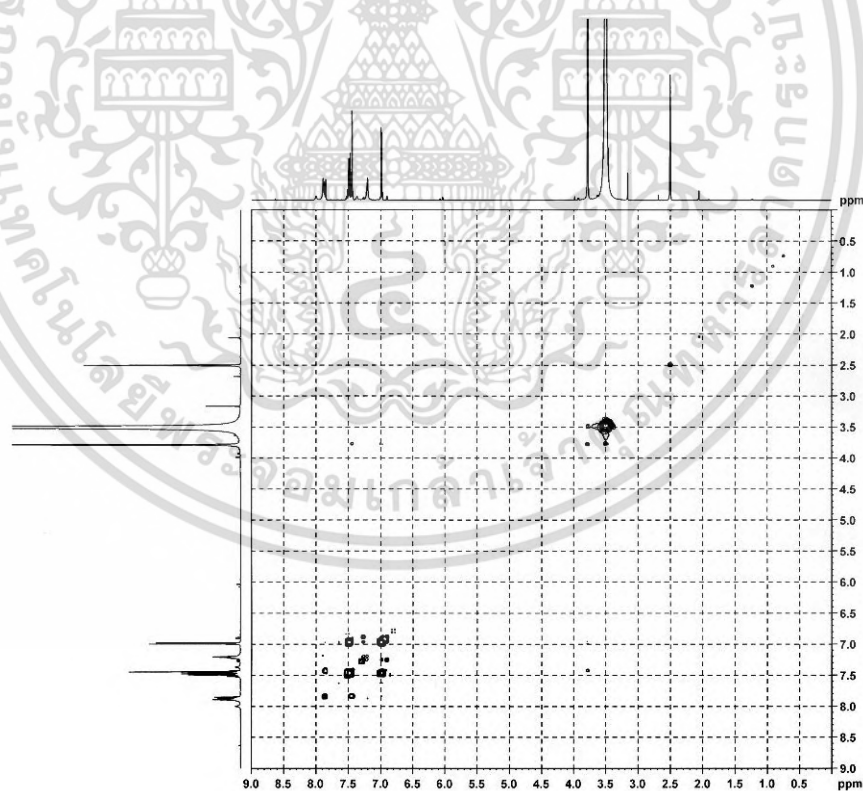


รูปที่ 24 ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) ของสาร C (ขยายจากรูปที่ 22)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

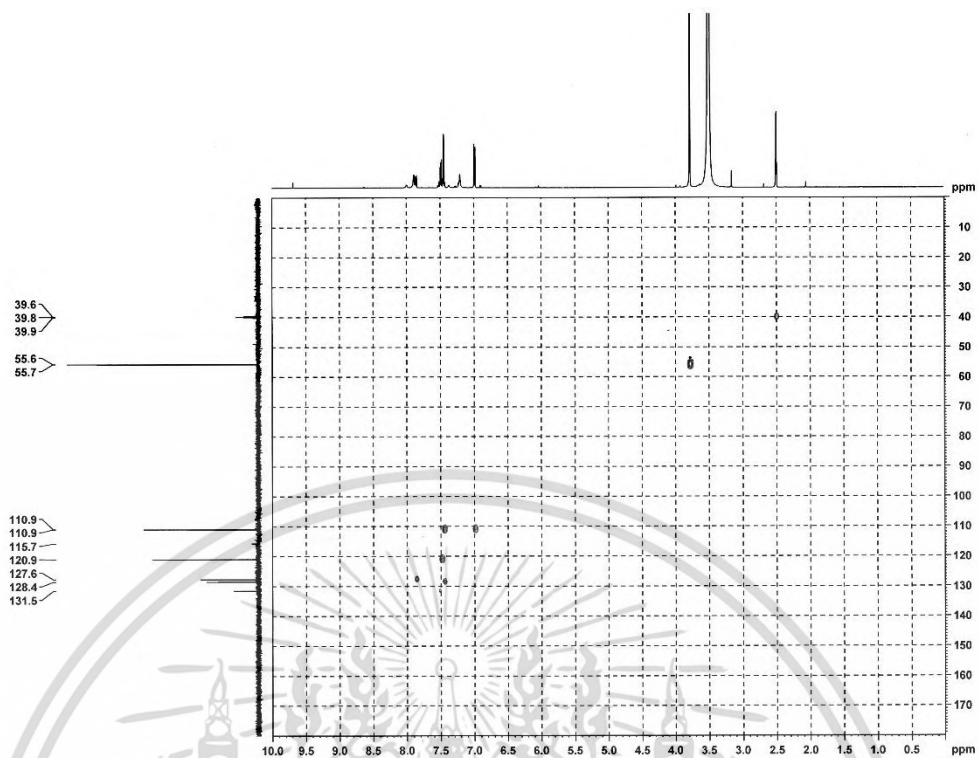


รูปที่ 25 ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) ของสาร C (ขยายจากรูปที่ 22)

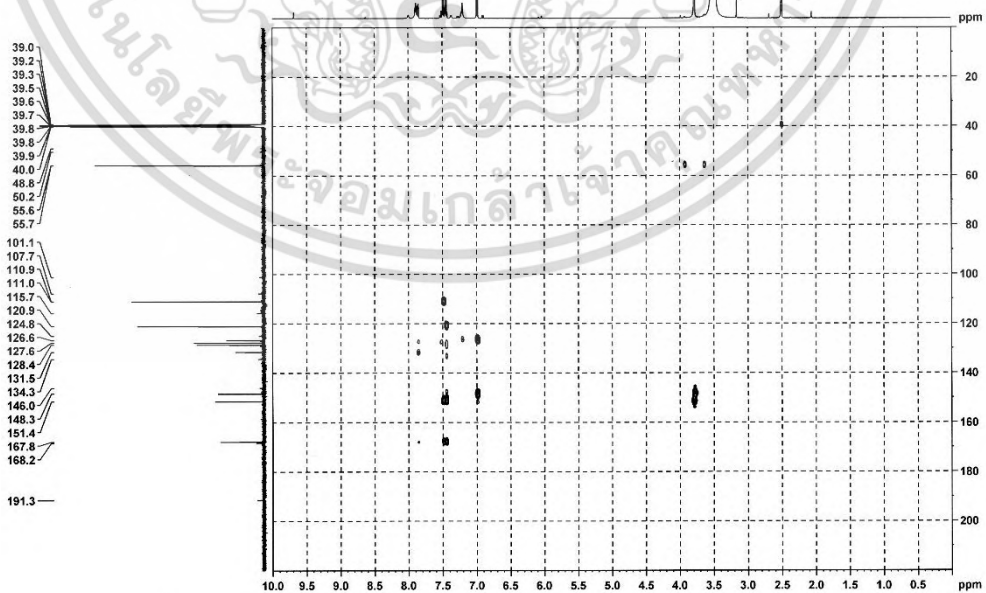


รูปที่ 26 COSY (125 MHz, DMSO- d_6) ของสาร C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

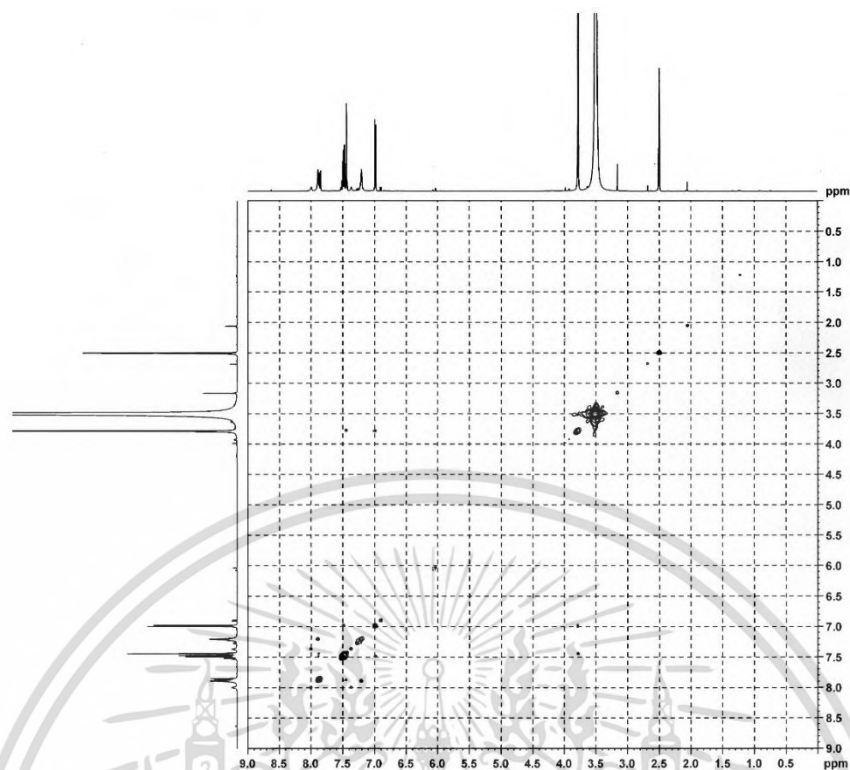


รูปที่ 27 HSQC (125 MHz, DMSO-d₆) ของสาร C

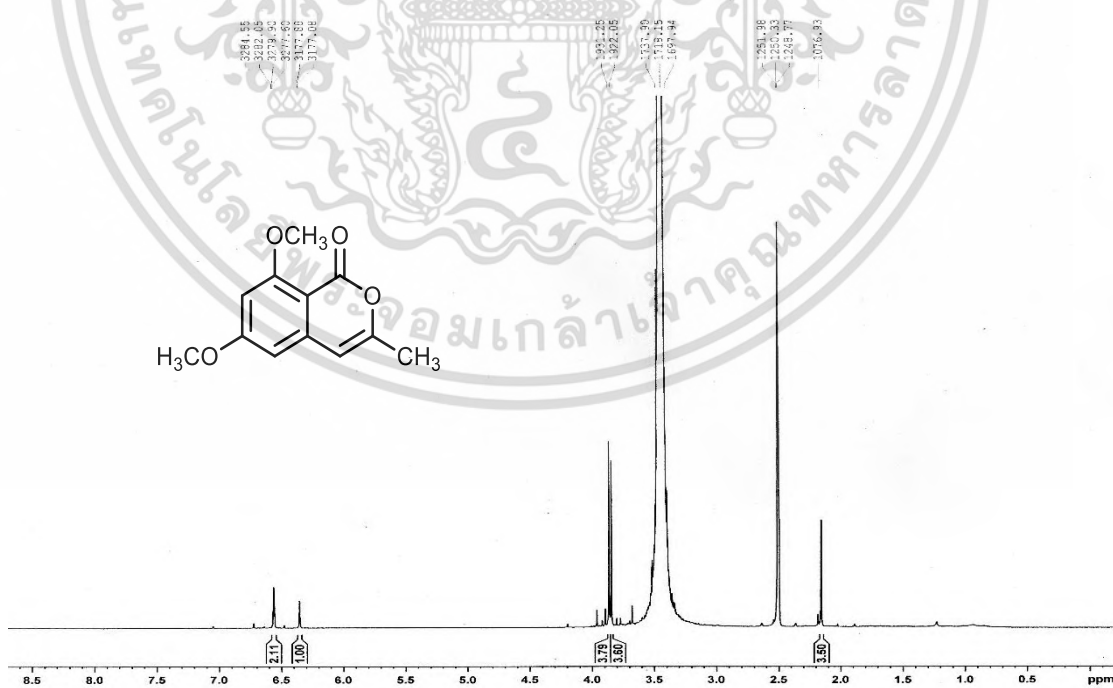


รูปที่ 28 HMBC (125 MHz, DMSO-d₆) ของสาร C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

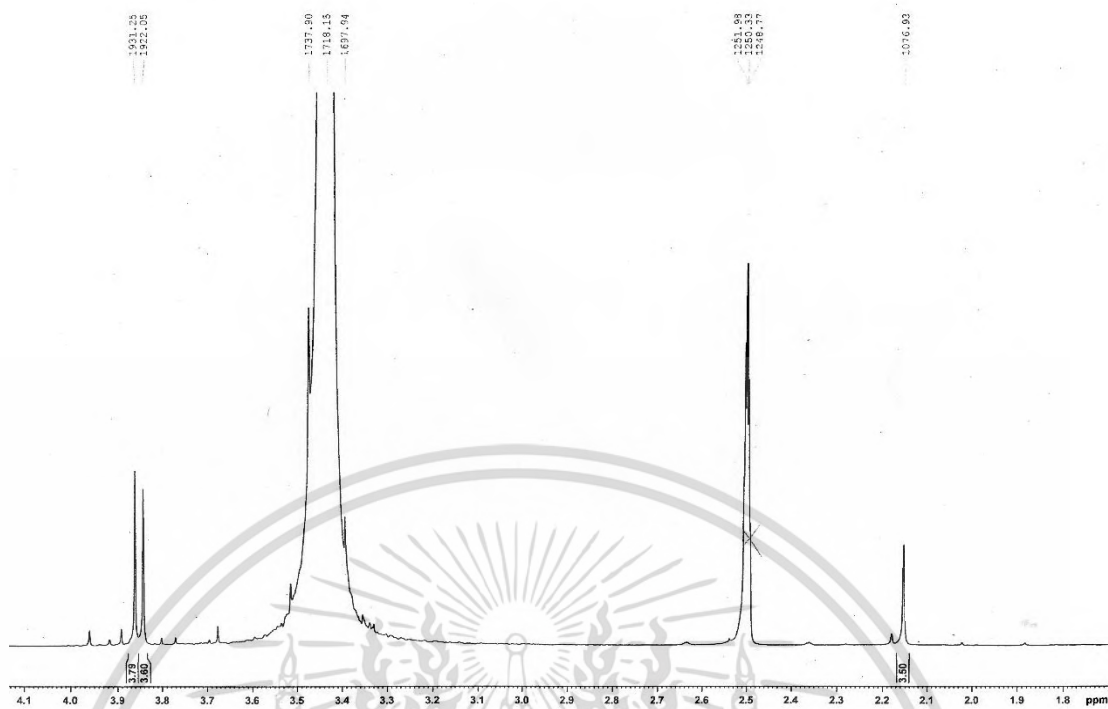


รูปที่ 29 NOESY (125 MHz, DMSO-d₆) ของสาร C

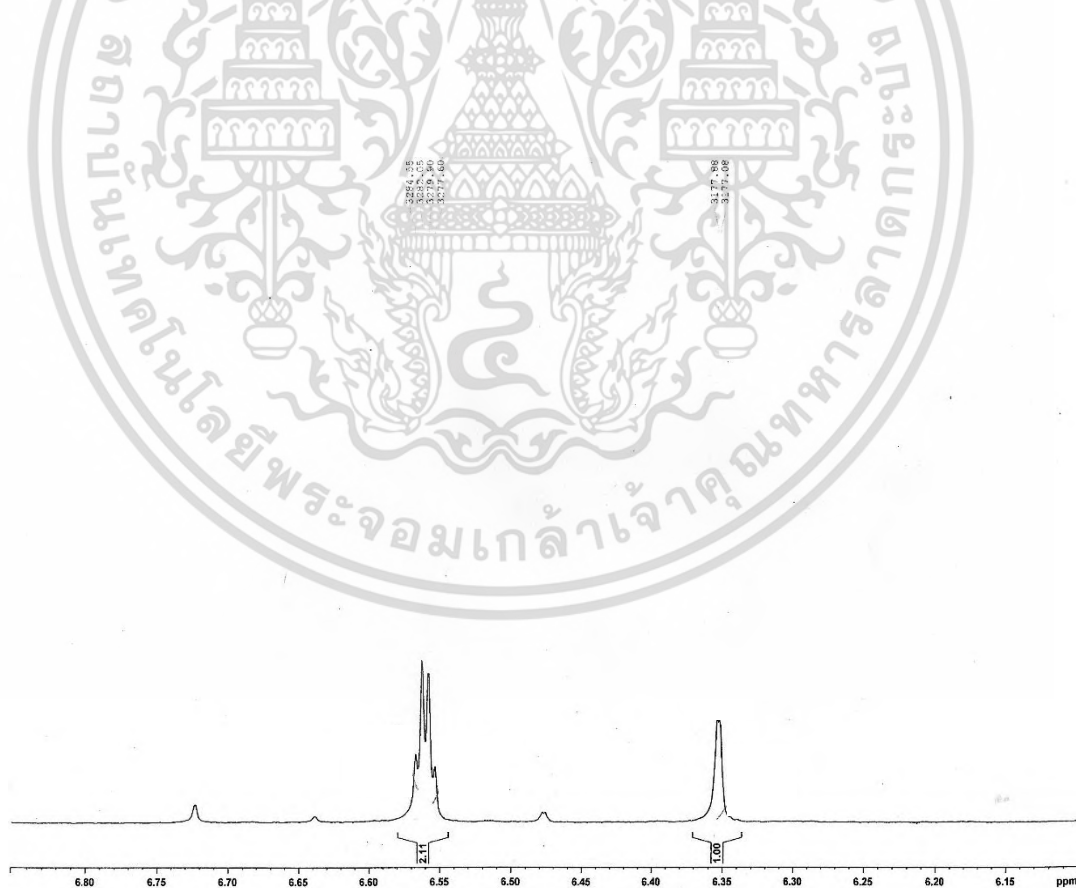


รูปที่ 30 ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) ของสาร D

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

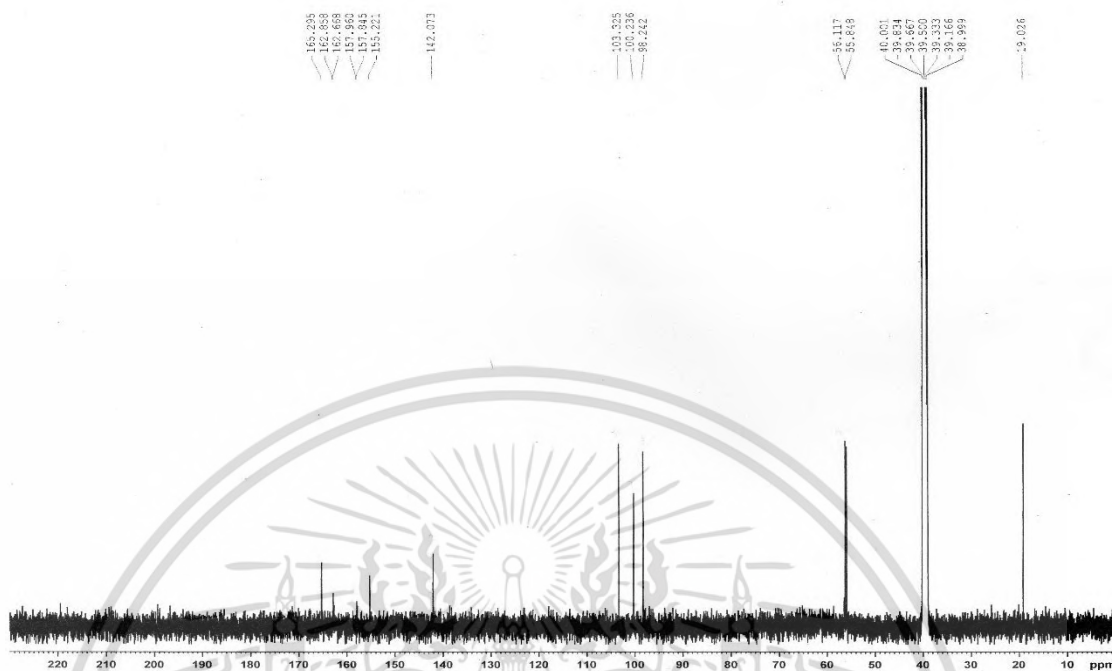


รูปที่ 31 ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) ของสาร D (ขยายจากรูปที่ 30)

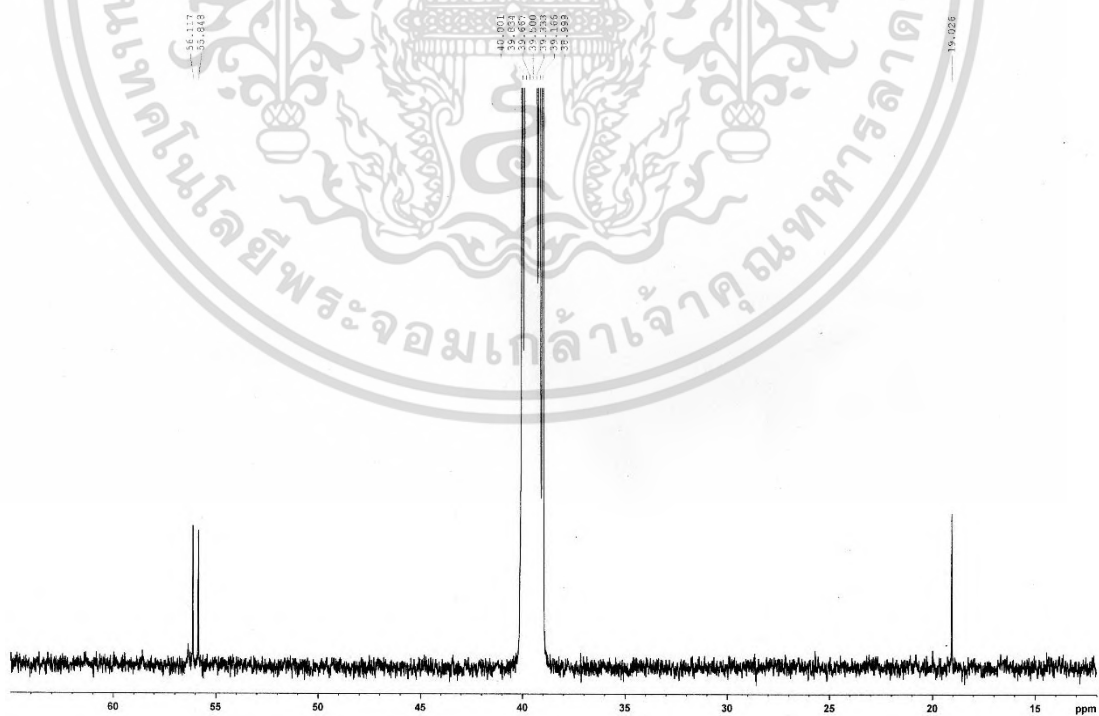


รูปที่ 32 ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) ของสาร D (ขยายจากรูปที่ 30)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

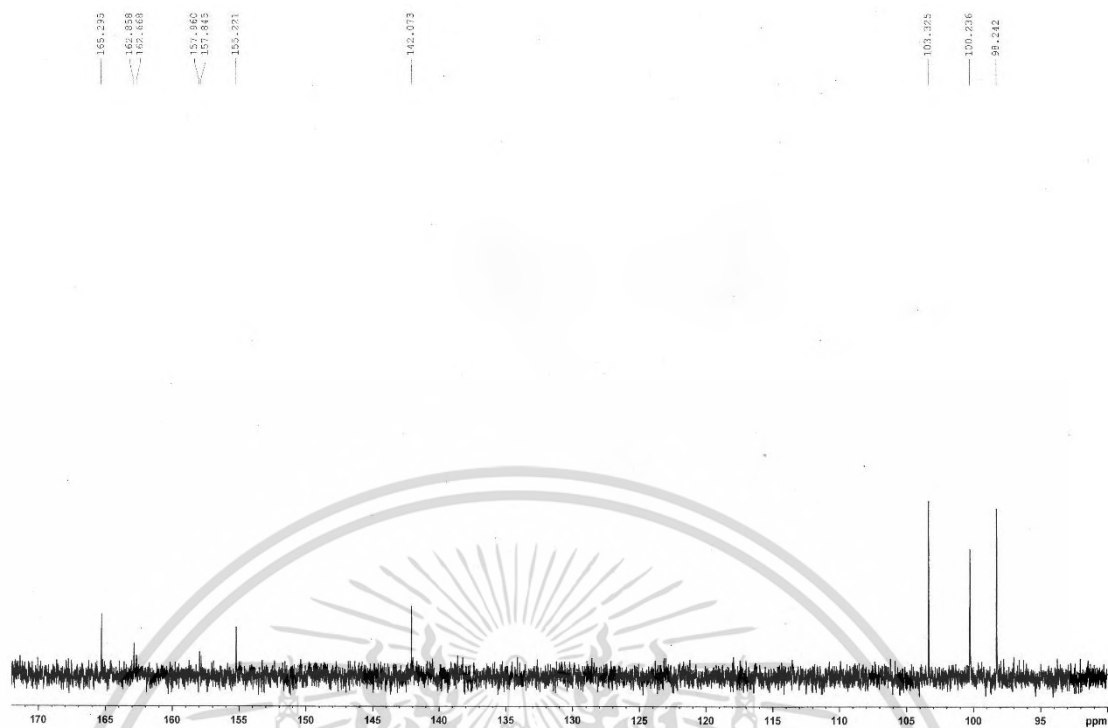


รูปที่ 33 ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) ของสาร D

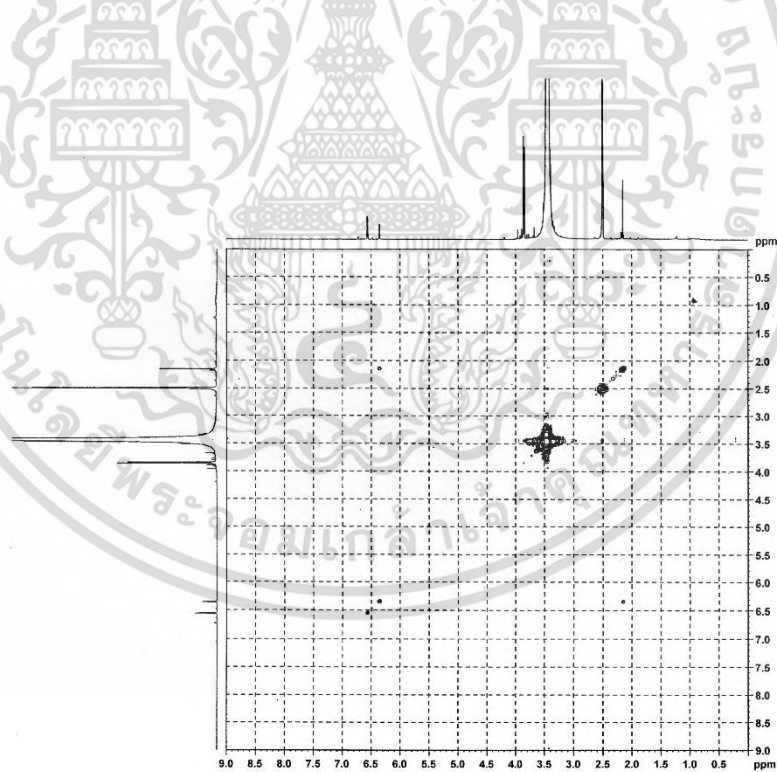


รูปที่ 34 ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) ของสาร D (ขยายมาจากรูปที่ 33)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

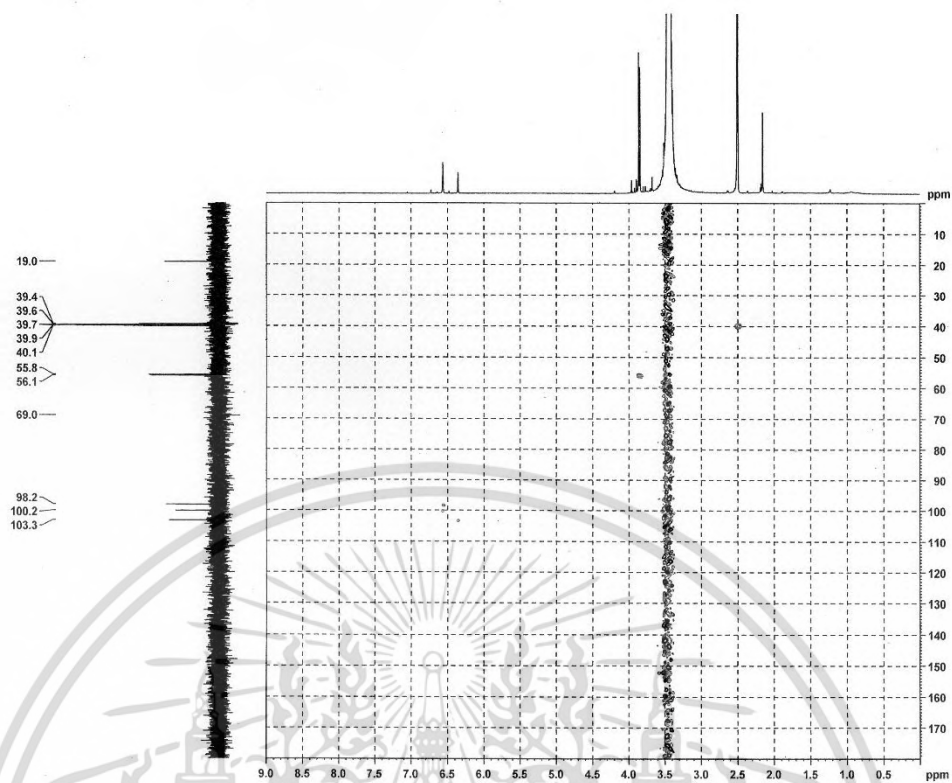


รูปที่ 35 ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) ของสาร D (ขยายมาจากรูปที่ 33)

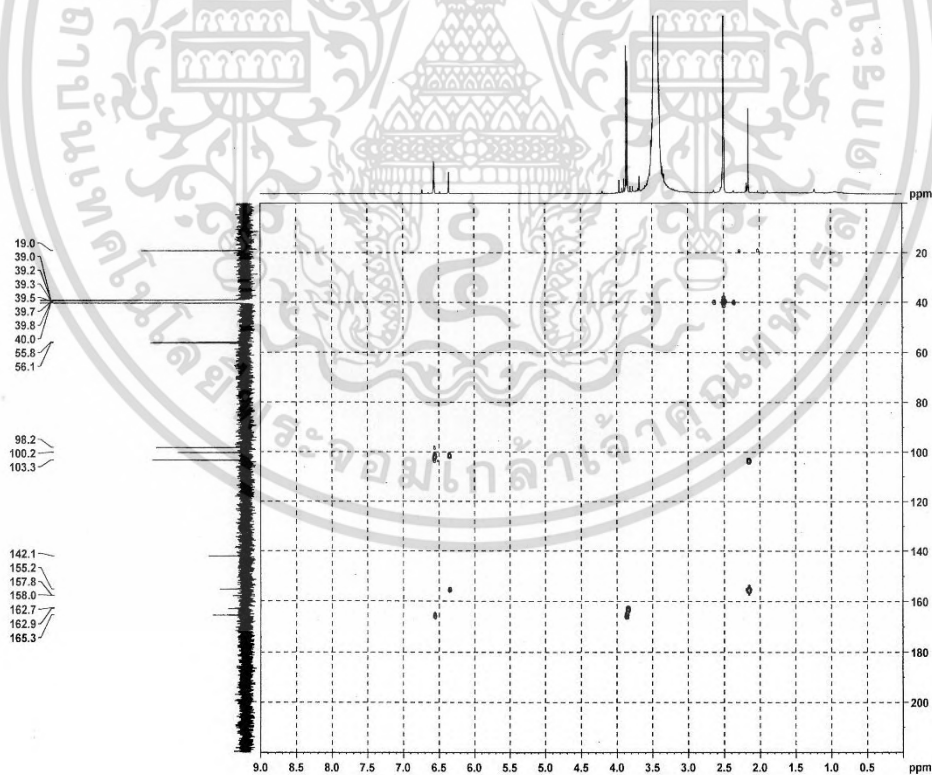


รูปที่ 36 COSY (125 MHz, DMSO-d₆) ของสาร D

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

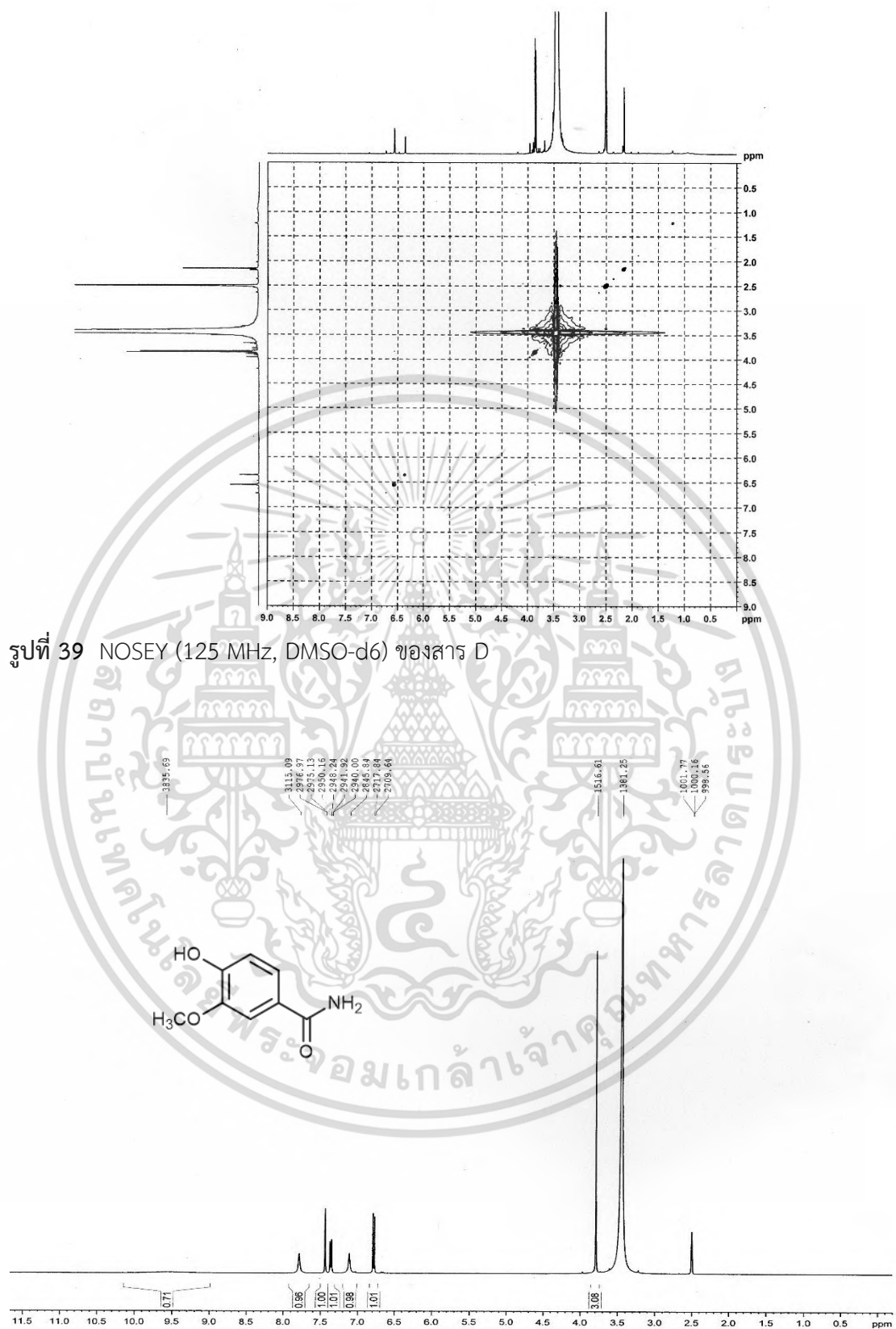


รูปที่ 37 HSQC (125 MHz, DMSO-d₆) ของสาร D



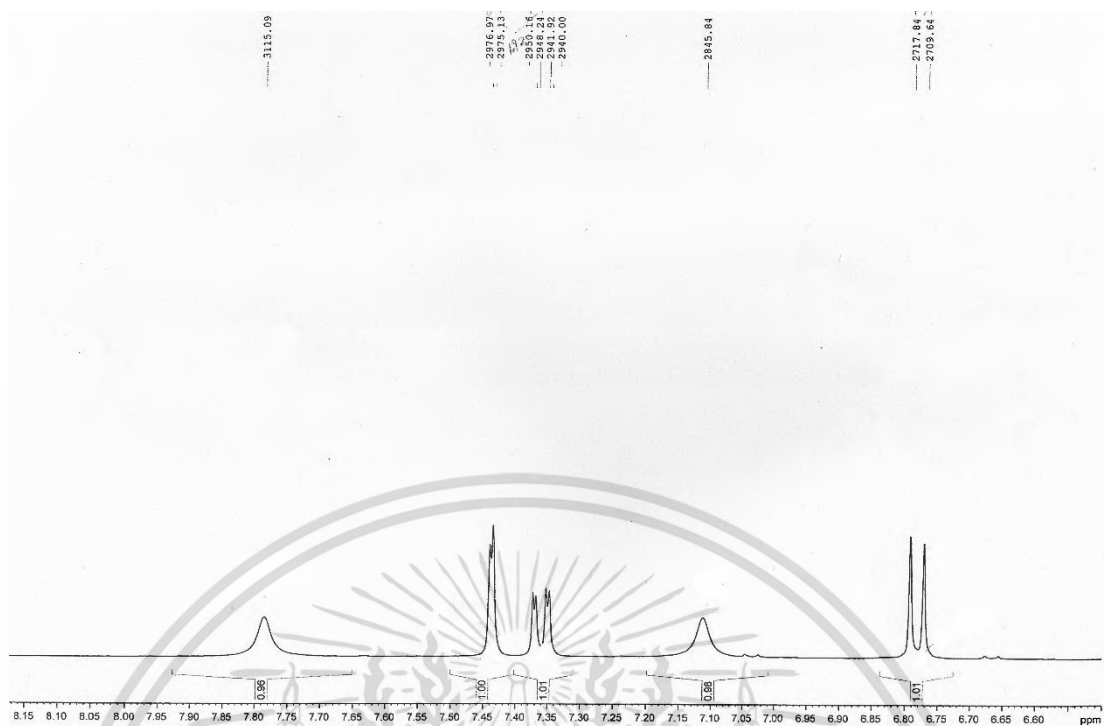
รูปที่ 38 HMBC (125 MHz, DMSO-d₆) ของสาร D

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

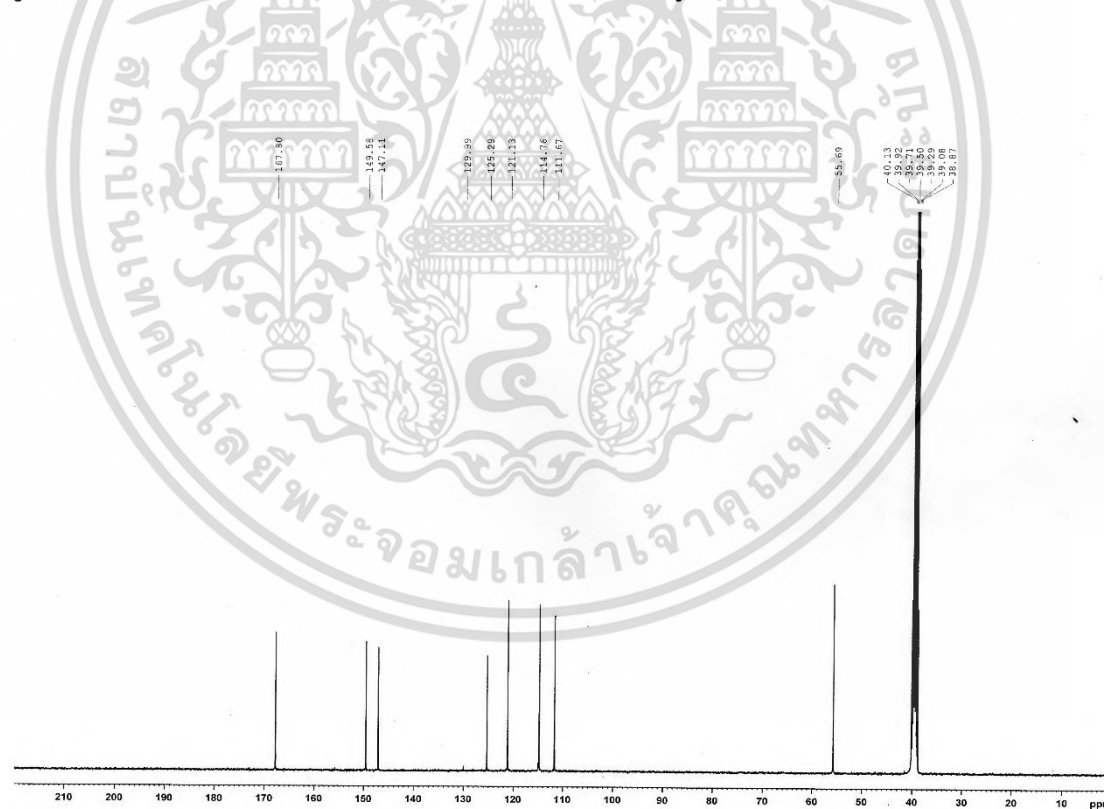


รูปที่ 40 ¹H (400 MHz, DMSO-d6) ของสาร E

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

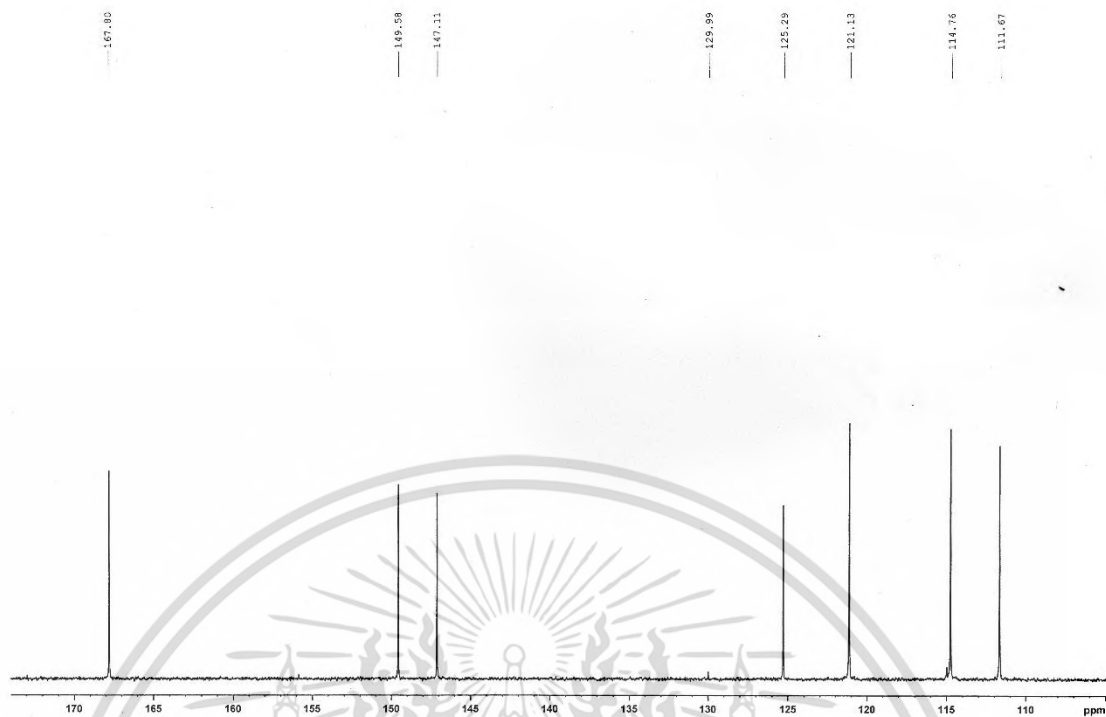


รูปที่ 41 ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) ของสาร E (ขยายจากรูปที่ 40)

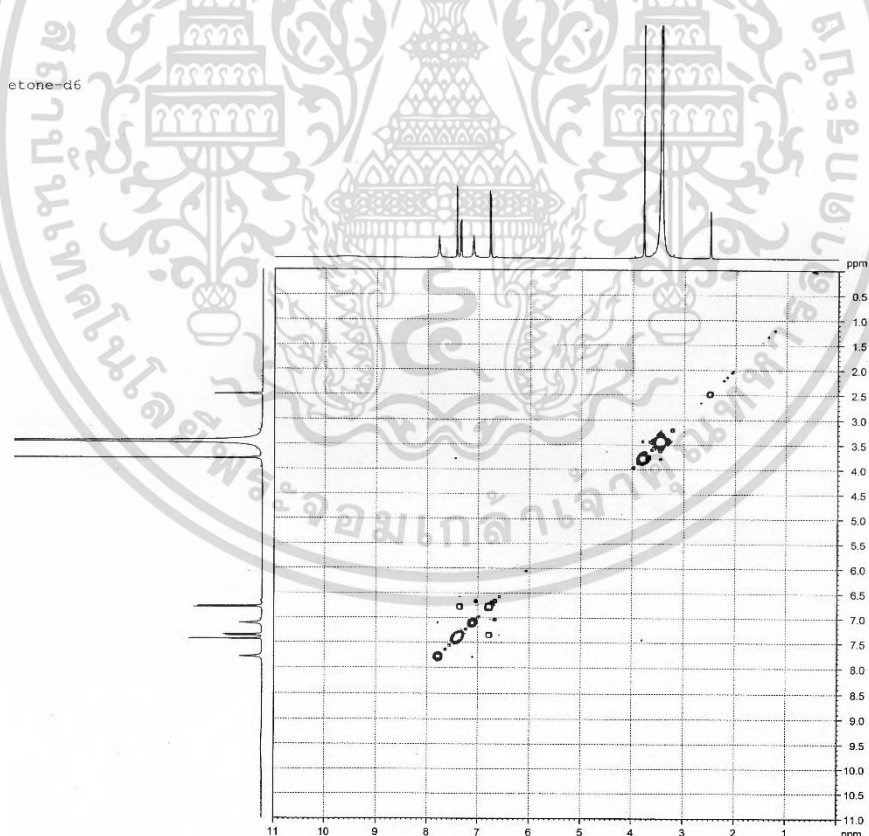


รูปที่ 42 ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) ของสาร E

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

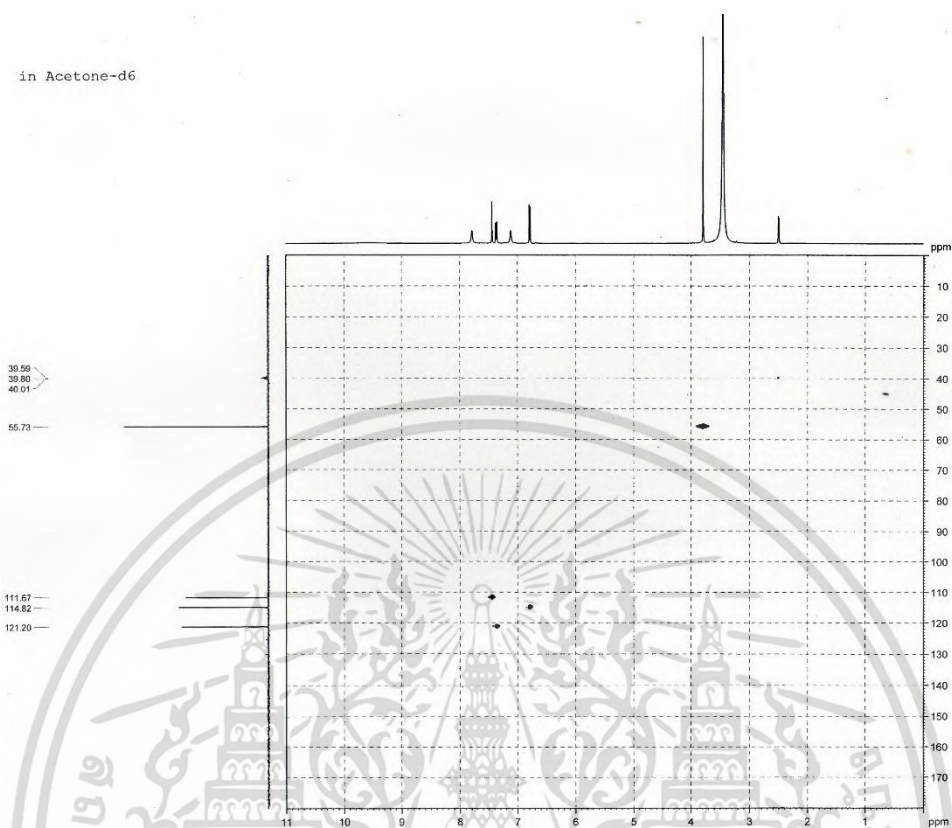


รูปที่ 43 ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) ของสาร E (ขยายจากรูปที่ 42)

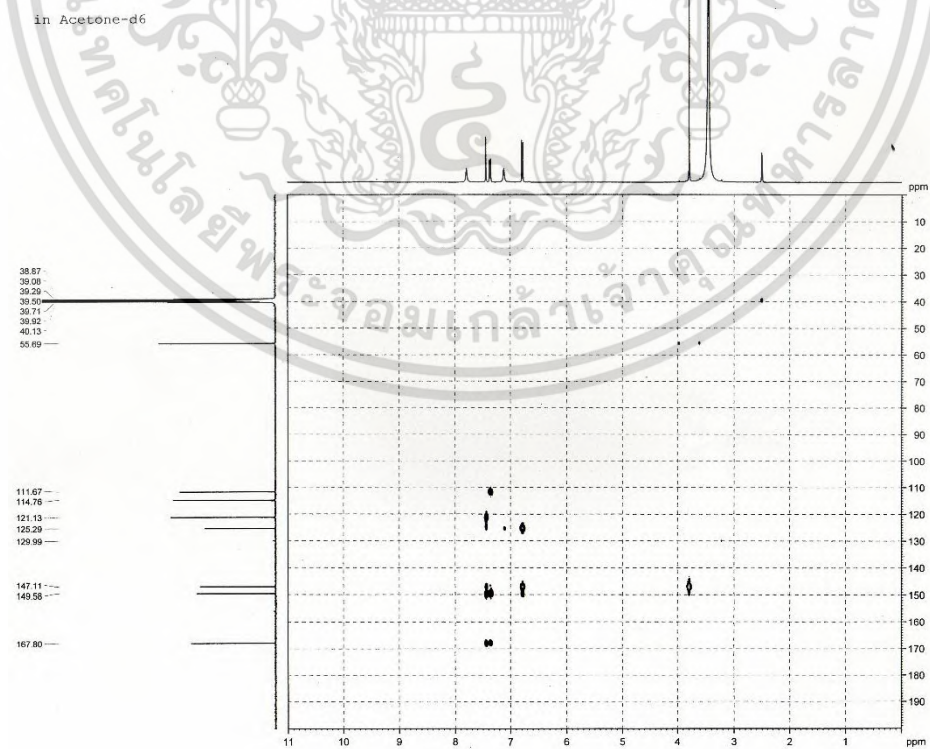


รูปที่ 44 COSY (100 MHz, DMSO-d₆) ของสาร E

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

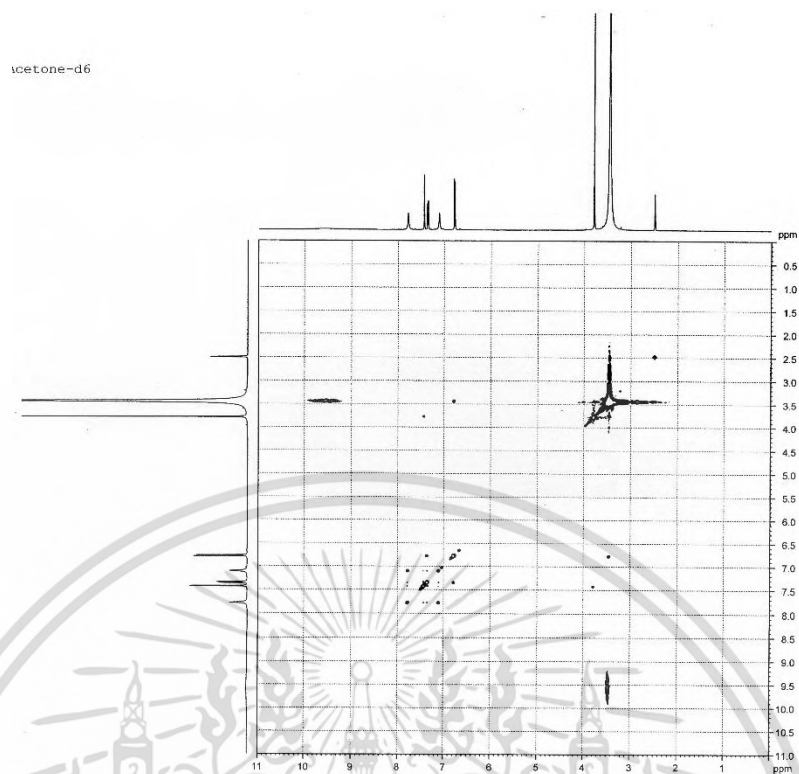


รูปที่ 45 HSQC (100 MHz, DMSO-d₆) ของสาร E

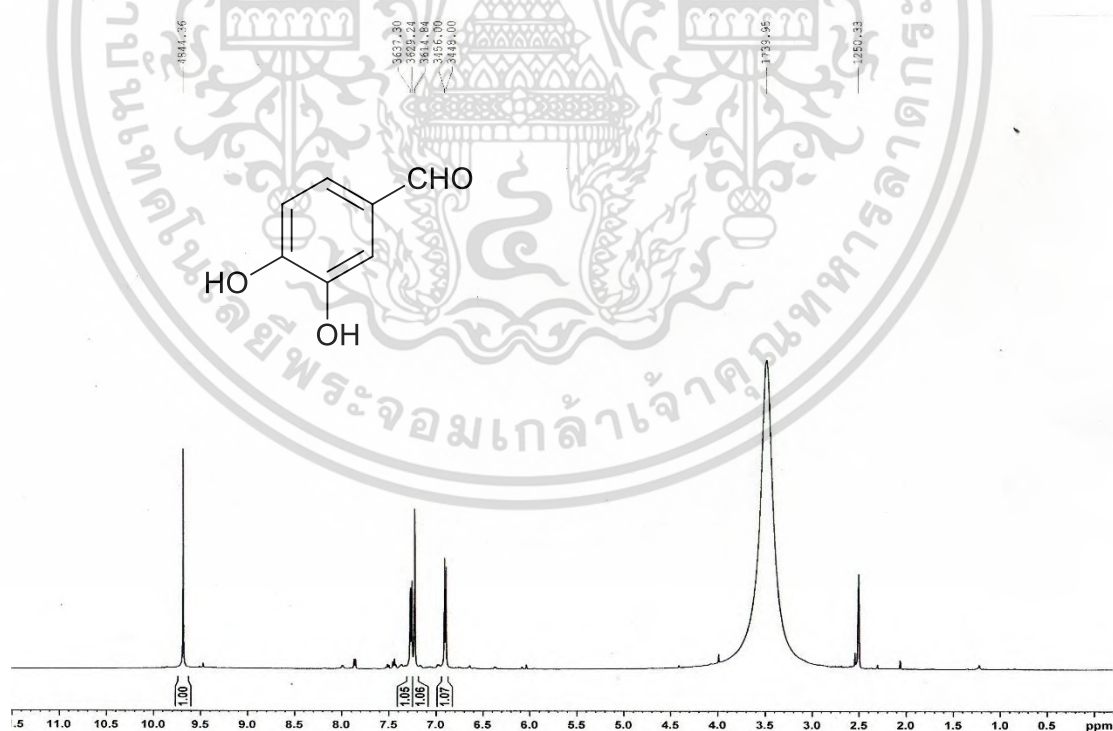


รูปที่ 46 HMBC (100 MHz, DMSO-d₆) ของสาร E

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 47 NOESY (100 MHz, DMSO-d6) ของสาร E

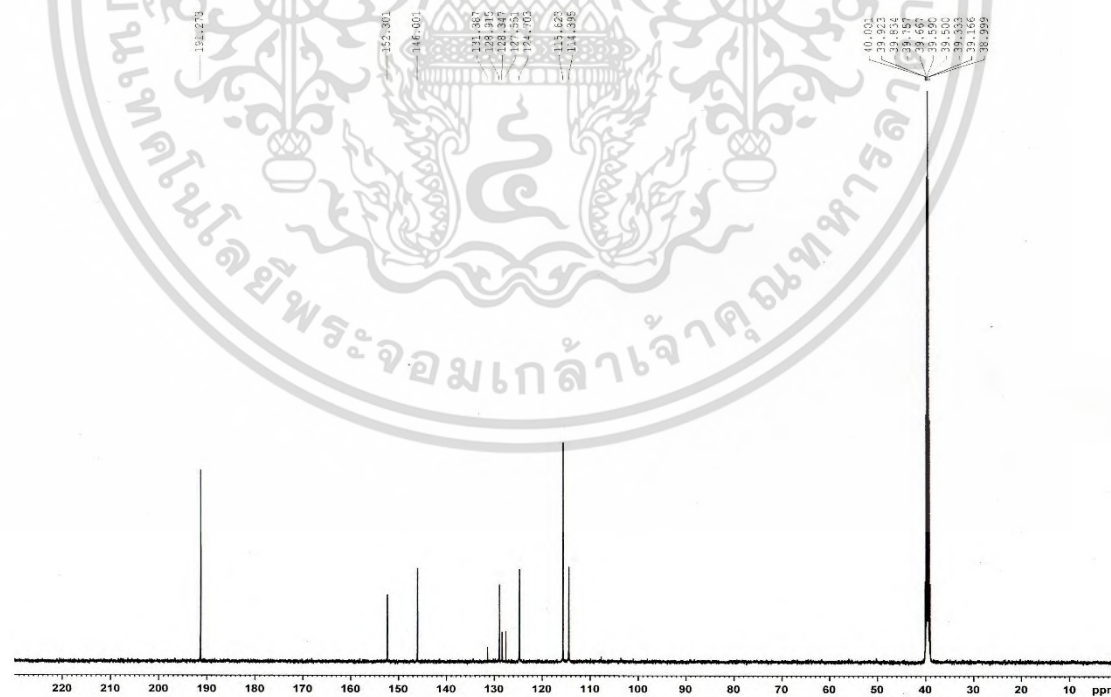


รูปที่ 48 ^1H (500 MHz, DMSO-d6) ของสาร F

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

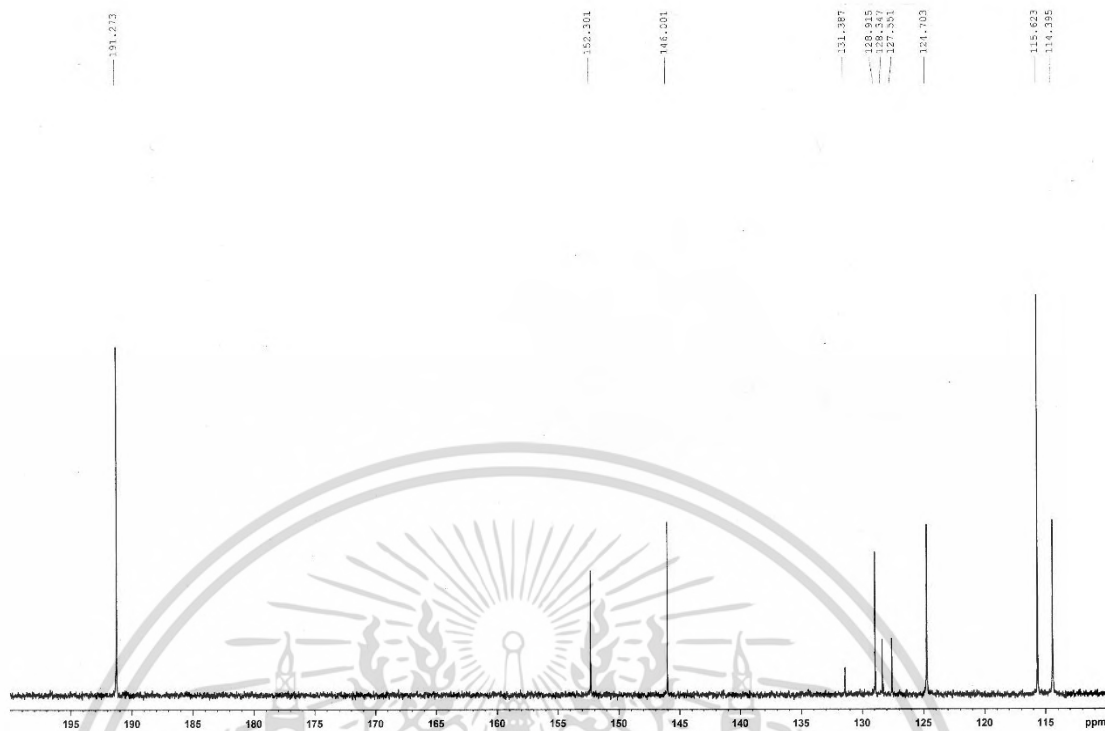


รูปที่ 49 ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) ของสาร F (ขยายจากรูปที่ 48)

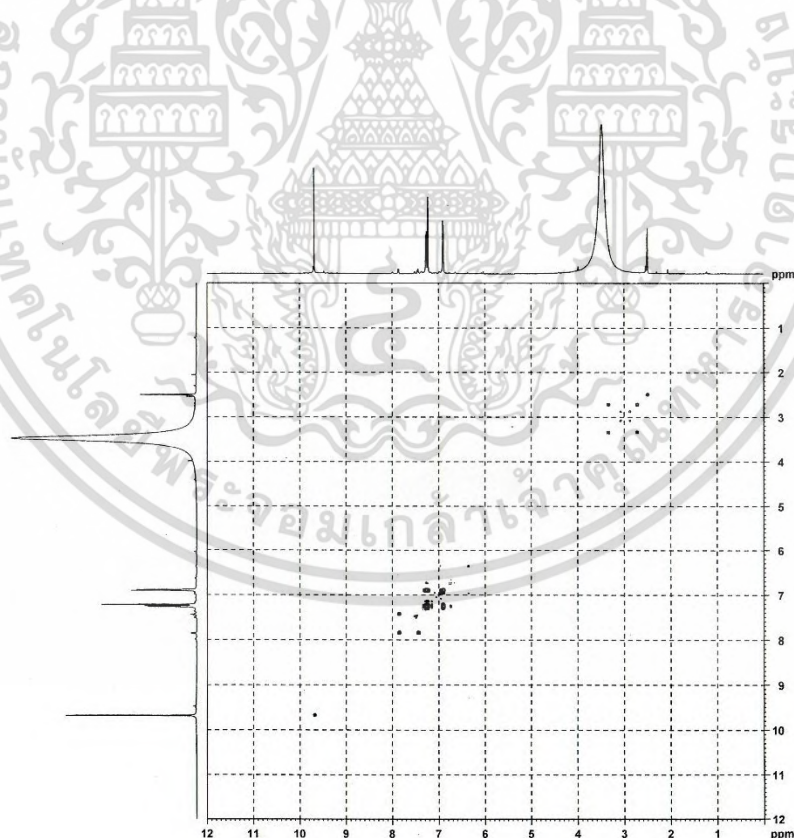


รูปที่ 50 ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) ของสาร F

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

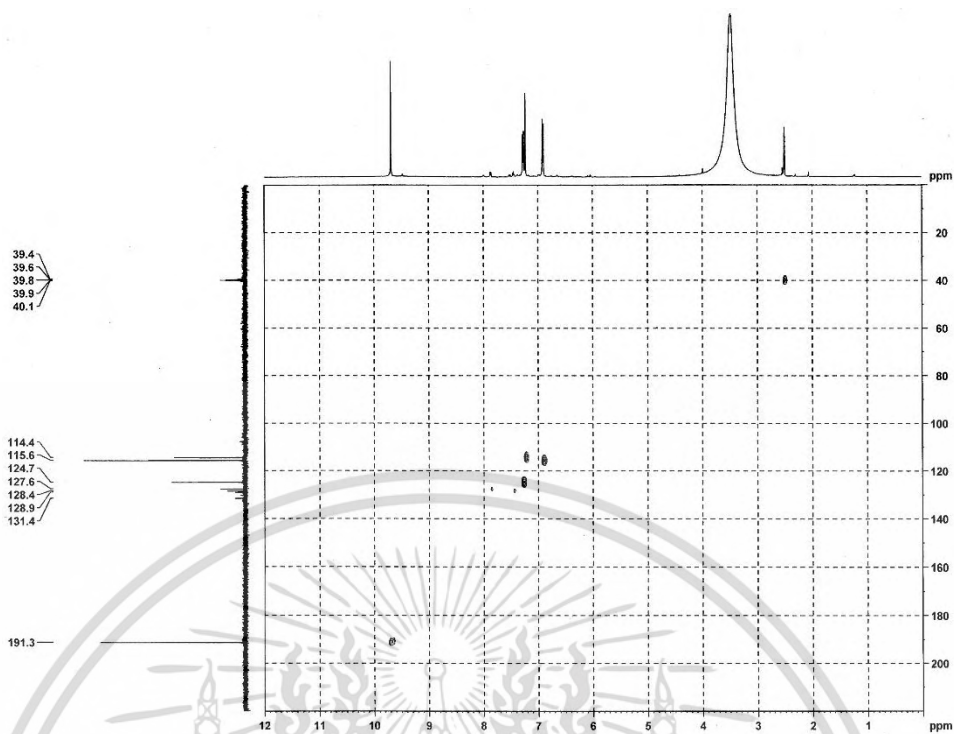


รูปที่ 51 ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) ของสาร F (ขยายจากรูปที่ 50)

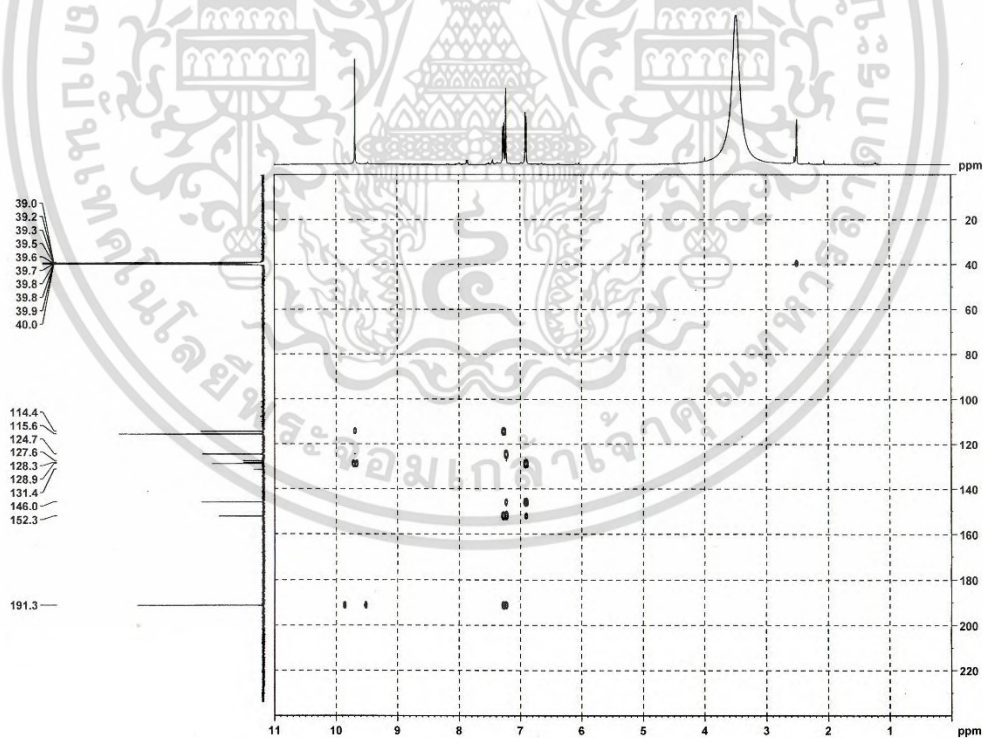


รูปที่ 52 COSY (125 MHz, DMSO-d₆) ของสาร F

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

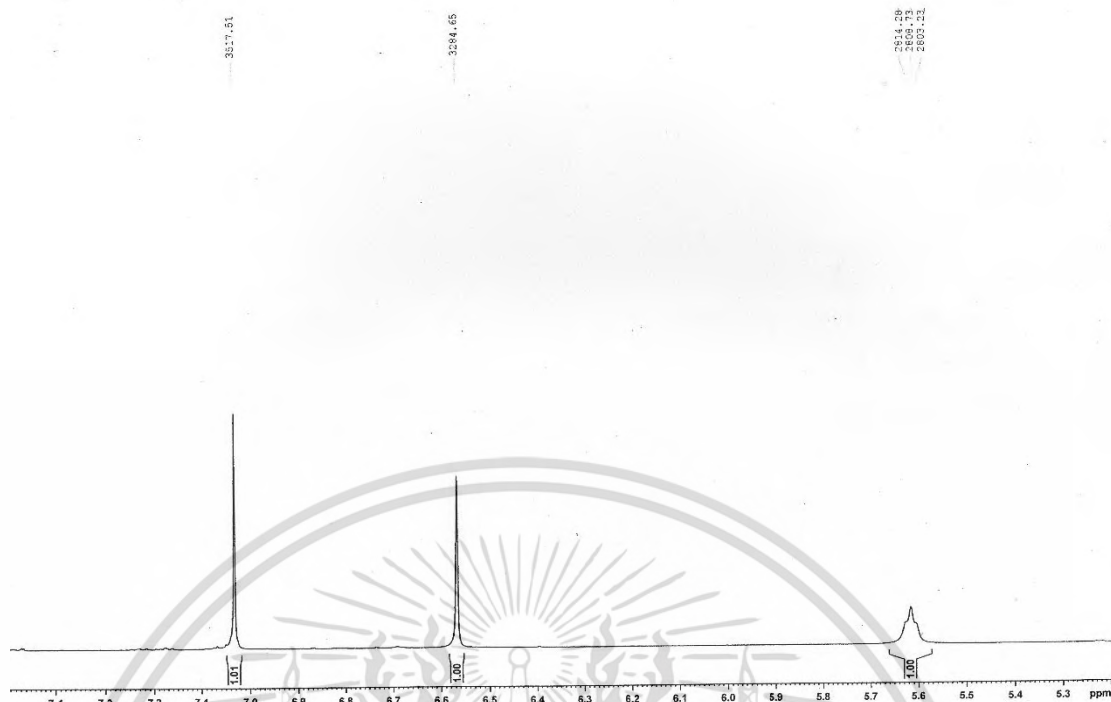


รูปที่ 53 HSQC (125 MHz, DMSO-d6) ของสาร F

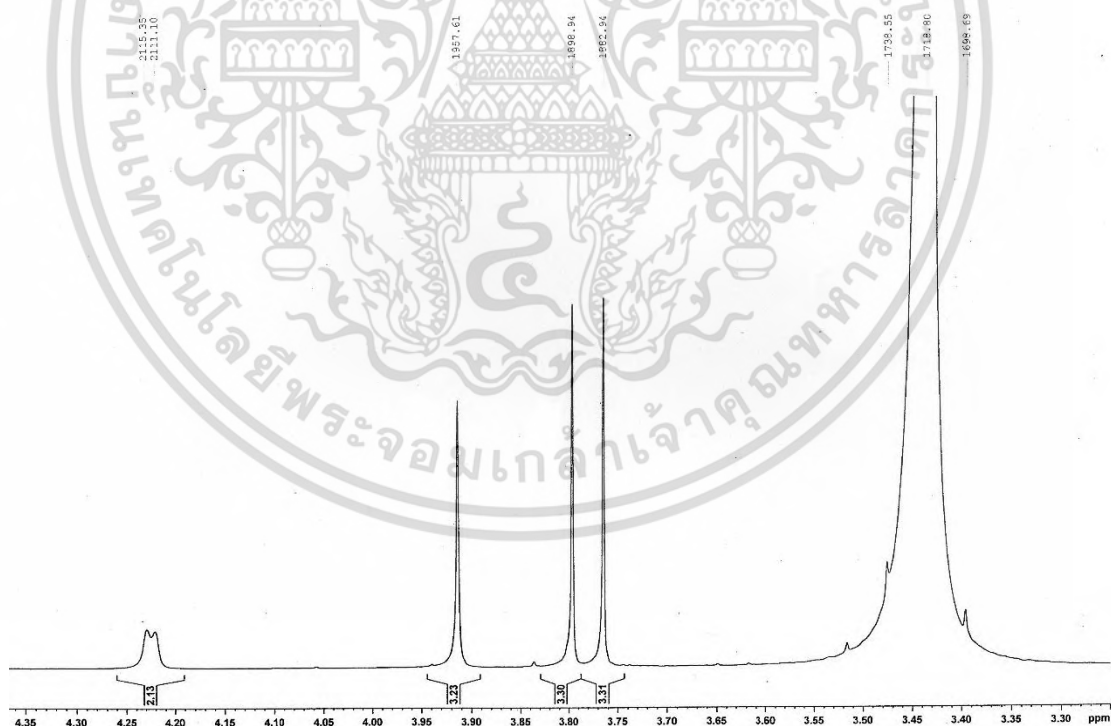


รูปที่ 54 HMBC (125 MHz, DMSO-d6) ของสาร F

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

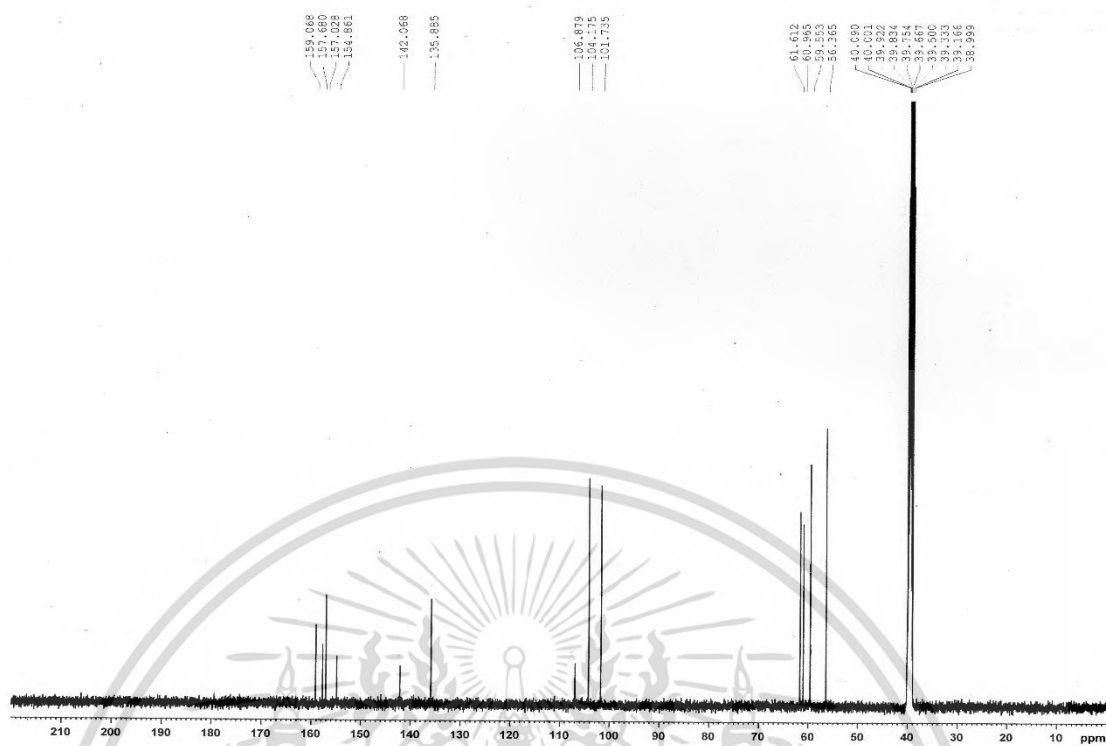


รูปที่ 57 ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) ของสาร H (ขยายจากรูปที่ 56)

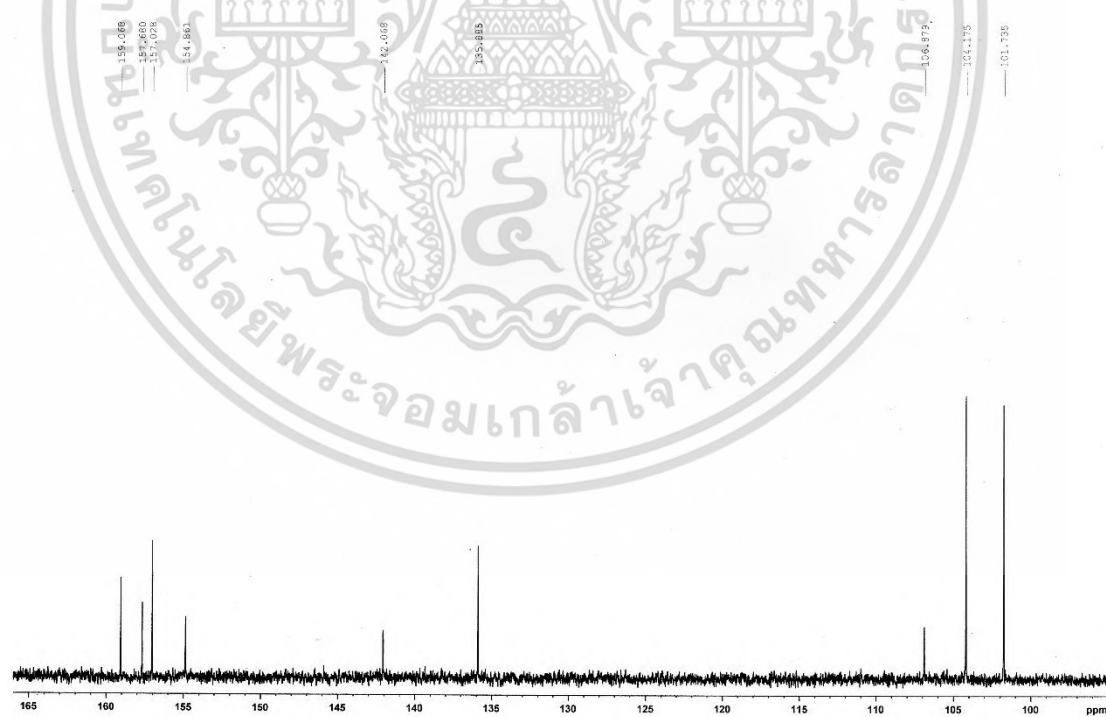


รูปที่ 58 ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) ของสาร H (ขยายจากรูปที่ 56)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

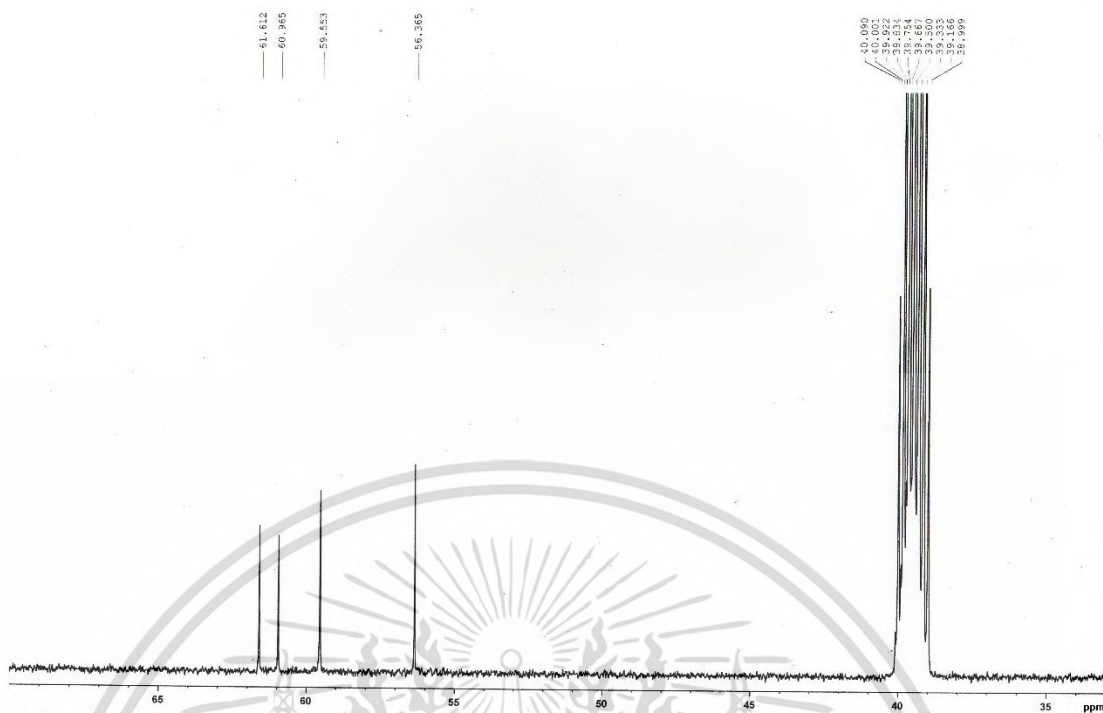


รูปที่ 59 ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) ของสาร H

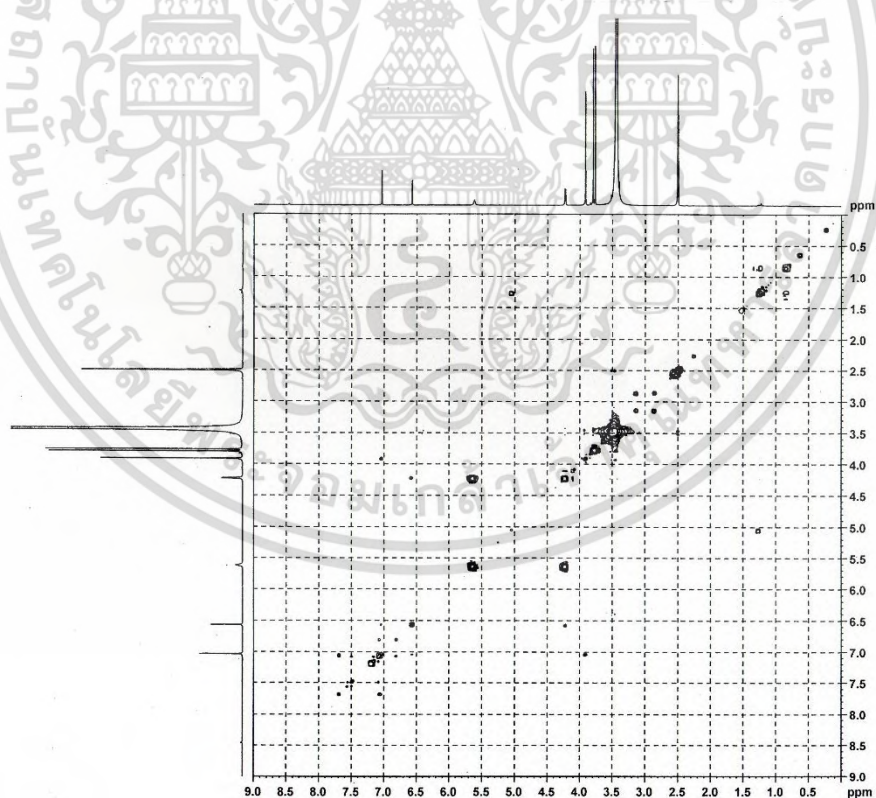


รูปที่ 60 ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) ของสาร H (ขยายจากรูปที่ 59)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

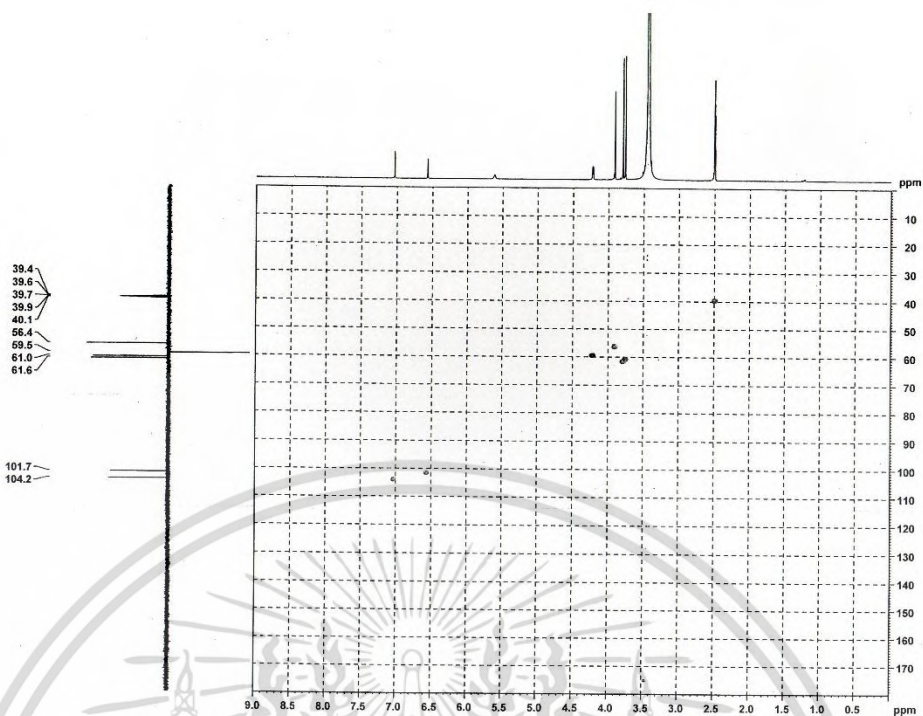


รูปที่ 61 ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) ของสาร H (ขยายจากรูปที่ 59)

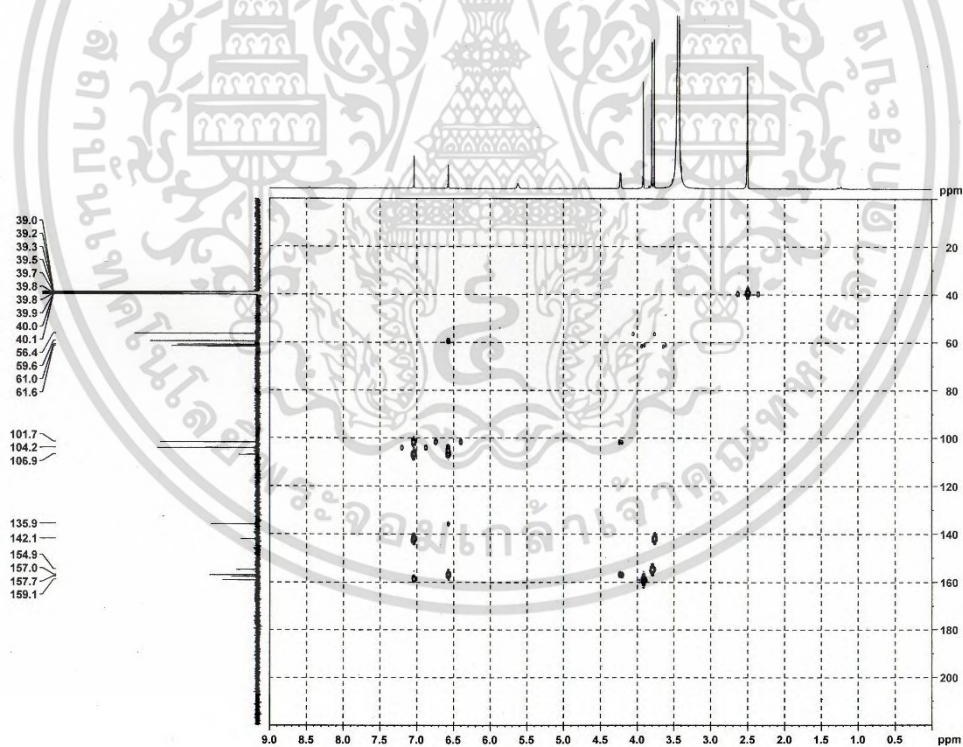


รูปที่ 62 COSY (125 MHz, DMSO- d_6) ของสาร H

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

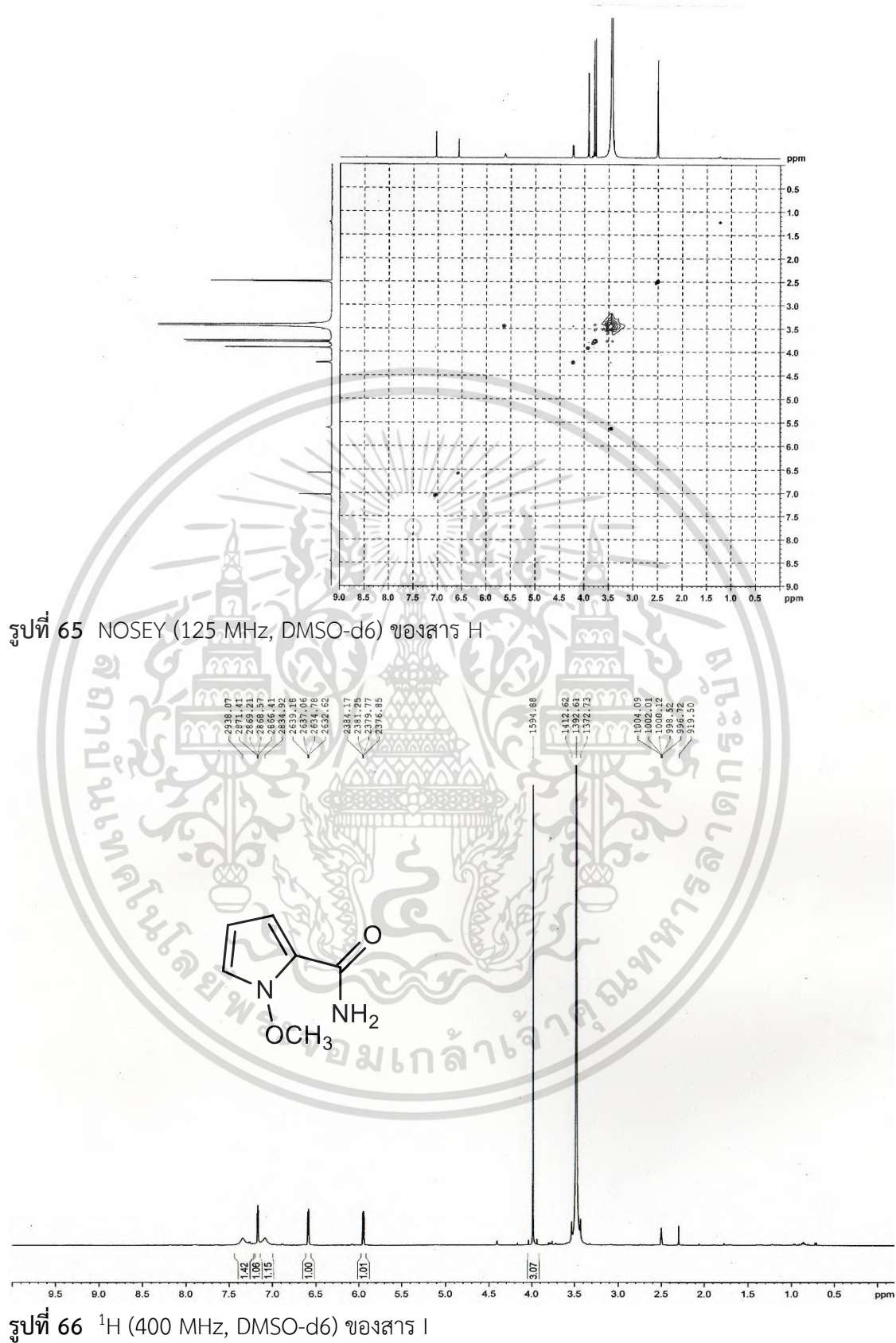


รูปที่ 63 HSQC (125 MHz, DMSO-d₆) ของสาร H

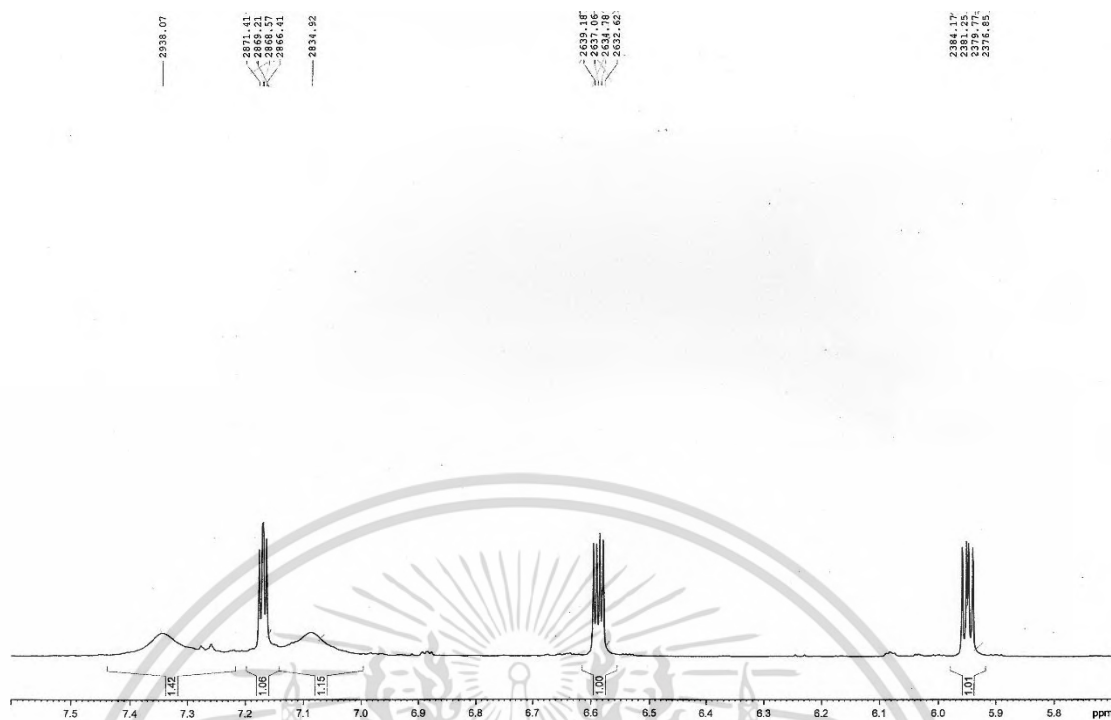


รูปที่ 64 HMBC (125 MHz, DMSO-d₆) ของสาร H

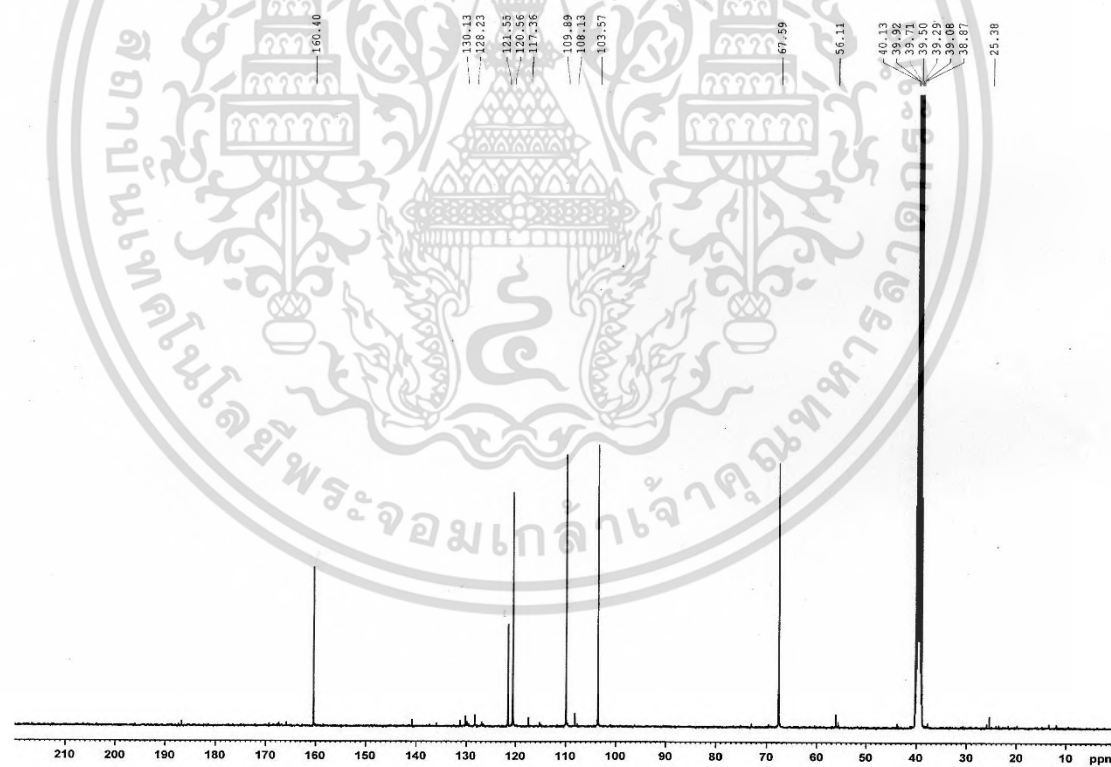
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

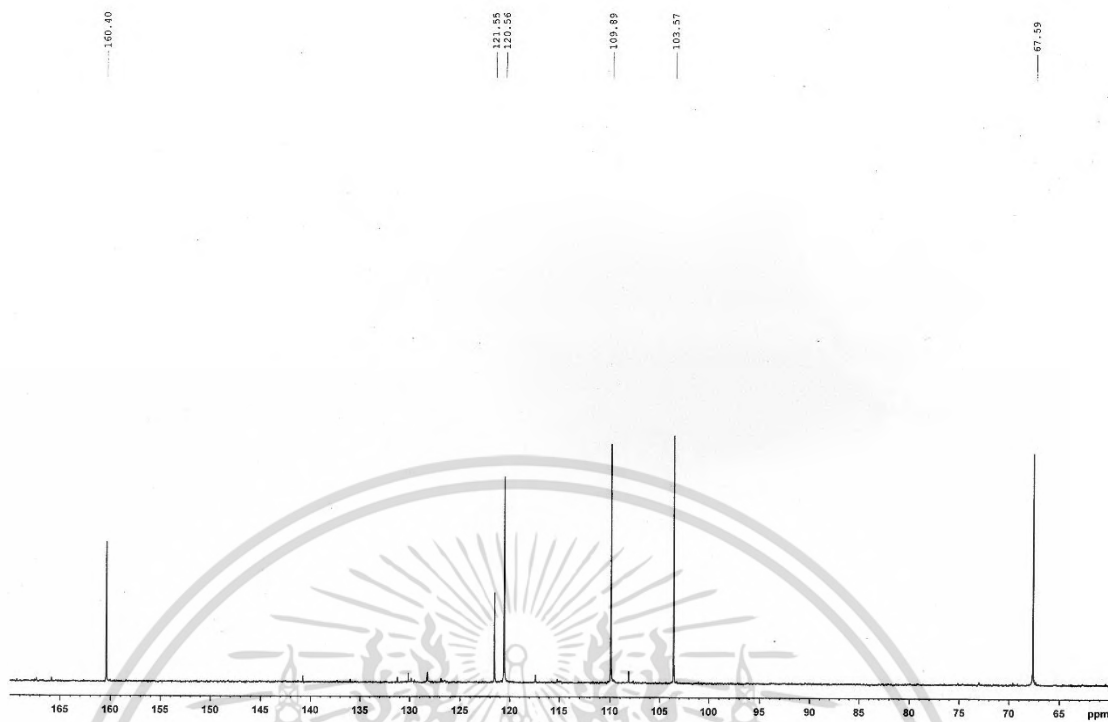


รูปที่ 67 ^1H (400 MHz, DMSO-d₆) ของสาร I (ขยายจากรูปที่ 66)

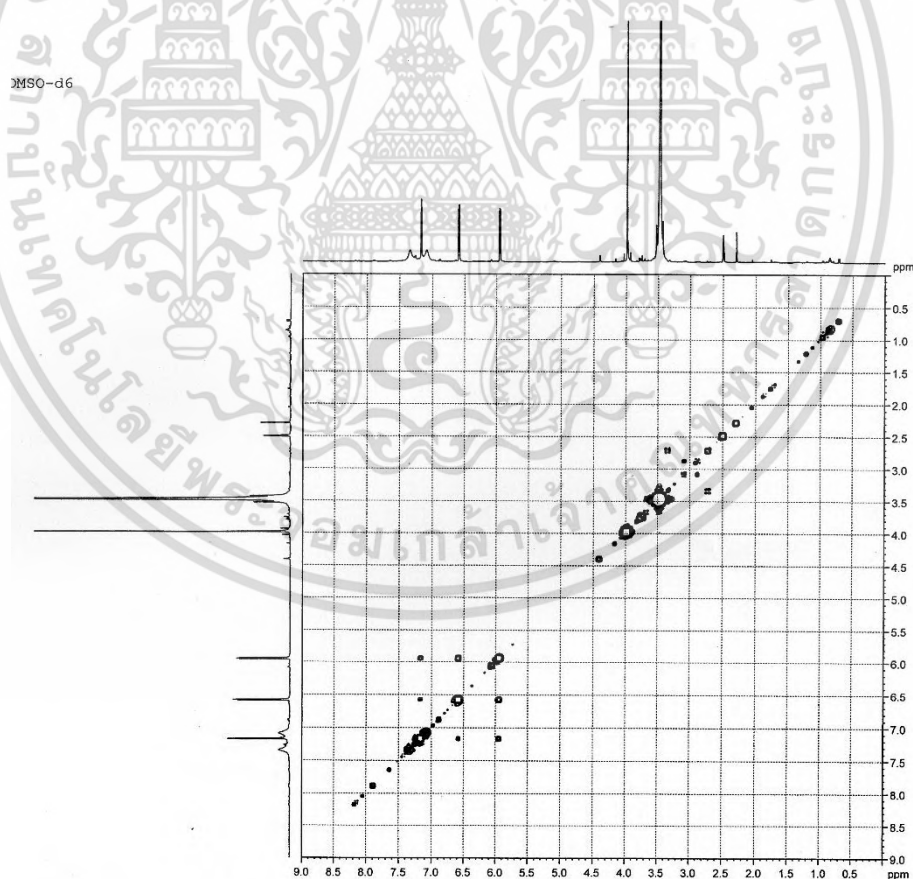


รูปที่ 68 ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) ของสาร I

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

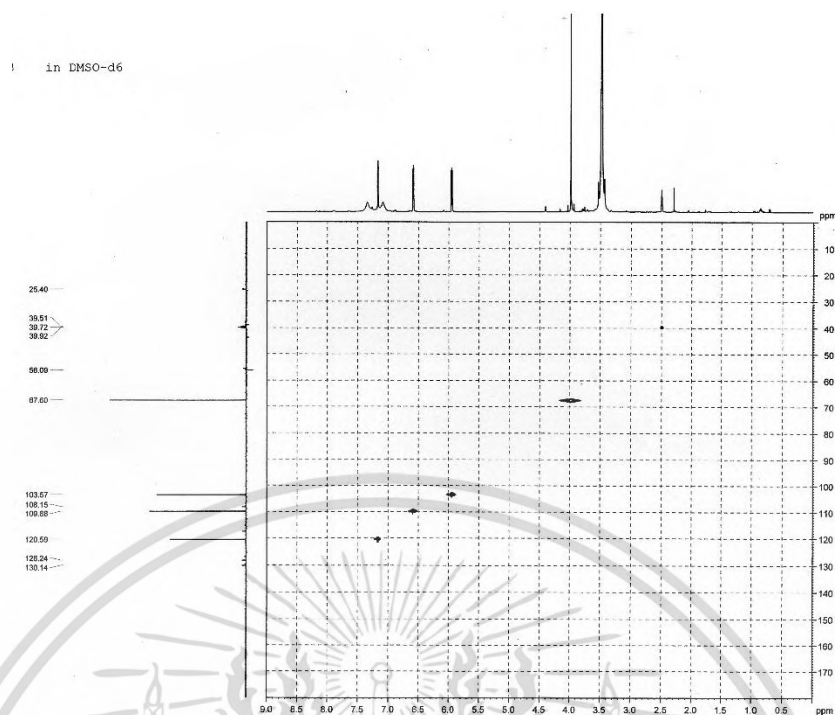


รูปที่ 69 ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) ของสาร I (ขยายจากรูปที่ 68)

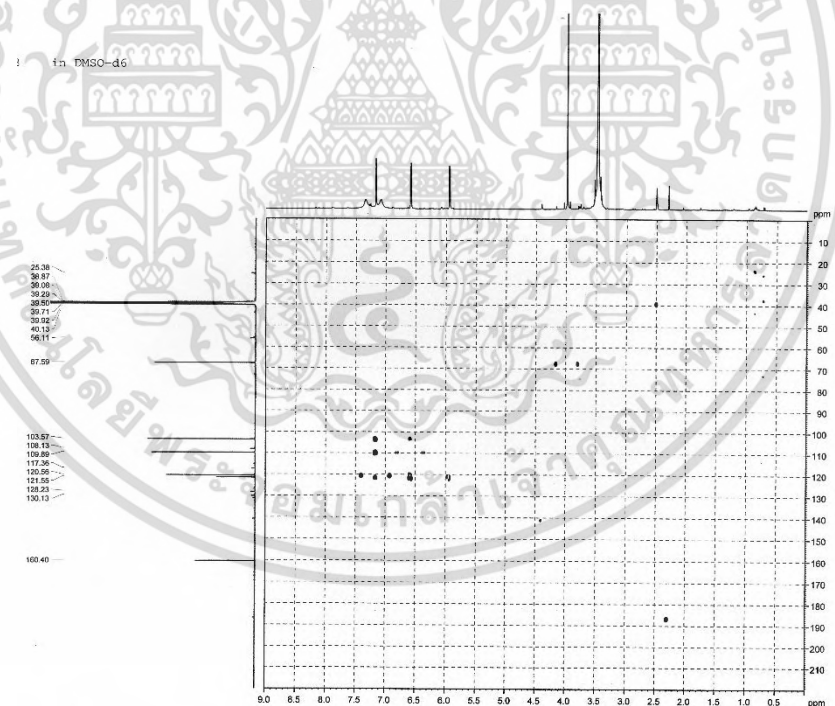


รูปที่ 70 COSY (100 MHz, DMSO- d_6) ของสาร I

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

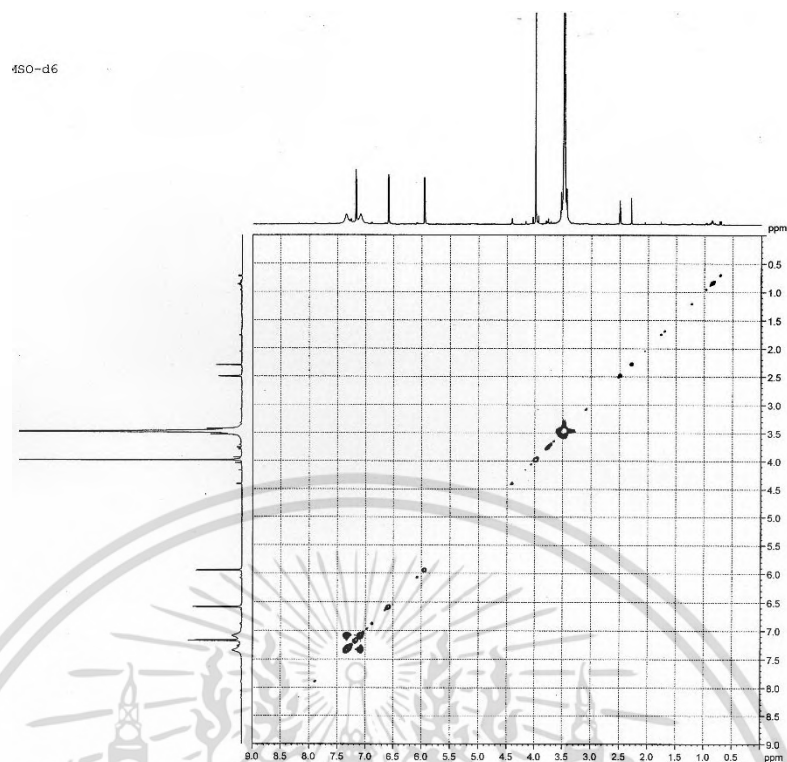


รูปที่ 71 HSQC (100 MHz, DMSO-d₆) ของสาร 1



รูปที่ 71 HMBC (100 MHz, DMSO-d₆) ของสาร 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 72 NOSEY (100 MHz, DMSO-d₆) ของสาร I

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวก จ
ข้อมูลทางสถิติ

Descriptives

IC₅₀

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
broth	3	7.0300	.02646	.01528	6.9643	7.0957	7.00	7.05
cell	3	10.4633	.04509	.02603	10.3513	10.5753	10.42	10.51
A	3	16.5967	.39954	.23068	15.6042	17.5892	16.15	16.92
B	3	2.4867	.23671	.13667	1.8986	3.0747	2.35	2.76
C	3	19.5867	.10116	.05840	19.3354	19.8380	19.47	19.65
D	3	99.2100	.85082	.49122	97.0964	101.3236	98.23	99.76
E	3	12.3867	.98906	.57103	9.9297	14.8436	11.35	13.32
F	3	.8733	.03055	.01764	.7974	.9492	.84	.90
G	3	63.2233	.63540	.36685	61.6449	64.8018	62.49	63.61
H	3	384.8400	3.50915	2.02601	376.1228	393.5572	380.80	387.13
I	3	12.7033	.59011	.34070	11.2374	14.1693	12.12	13.30
BHT	3	92.5333	.01528	.00882	92.4954	92.5713	92.52	92.55
vitamin C	3	.8900	.01000	.00577	.8652	.9148	.88	.90
Total	39	55.6018	101.87621	16.3132	22.5773	88.6262	.84	387.13

ANOVA

IC₅₀

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	394362.943	12	32863.579	28485.376	.000
Within Groups	29.996	26	1.154		
Total	394392.939	38			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

IC₅₀

Duncan^a

compound	N	Subset for alpha = 0.05									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
F	3	.8733									
vitamin C	3	.8900									
B	3	2.4867									
broth	3		7.0300								
cell	3			10.4633							
E	3				12.3867						
I	3				12.7033						
A	3					16.5967					
C	3						19.5867				
G	3							63.2233			
BHT	3								92.5333		
D	3									99.2100	
H	3										384.8400
Sig.		.093	1.000	1.000	.721	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ต้นฉบับไม่มีหน้าประวัติผู้วิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้