

อนุกรมวิธานหลายส่วนของแอกติโนมัยสีทชนิดใหม่  
และสารทุติยภูมิของไอโซเลตที่คัดเลือก

POLYPHASIC TAXONOMY OF NOVEL ACTINOMYCETES AND THE  
SECONDARY METABOLITES OF THE SELECTED ISOLATE



อัครารักษ์ น้ามะลิ  
ACHARARAK NAMMALI

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2564

KMITL-2021-SC-M-020-051

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

POLYPHASIC TAXONOMY OF NOVEL ACTINOMYCETES AND THE  
SECONDARY METABOLITES OF THE SELECTED ISOLATE



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-020-051

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	อนุกรมวิธานหลายส่วนของแอกติโนมัยสีทชนิดใหม่ และสารทุติยภูมิของไอโซเลตที่คัดเลือก
ชื่อนักศึกษา	อัครารักษ์ น้ามะลิ
รหัสประจำตัว	62605061
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ.	2564
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.จิตติ ท่าไฉ

### บทคัดย่อ

แอกติโนมัยสีทจำนวน 3 ไอโซเลต ถูกแยกมาจากรากของต้นกาแฟ *Coffea arabica* (L.) ประกอบด้วย ไอโซเลต CA1R205 จากจังหวัดราชบุรี ไอโซเลต CA3R110 จากจังหวัดลำปาง ไอโซเลต CA2R105 จากจังหวัดนครราชสีมา และไอโซเลต PLK6-54 กับ PLK6-60 ถูกแยกจากตัวอย่างดินที่เก็บมาจากป่าพรุลานควาย จังหวัดปัตตานี ตำแหน่งอนุกรมวิธานของแอกติโนมัยสีทเหล่านี้ถูกประเมินโดยการศึกษาอนุกรมวิธานหลายส่วน ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา อนุกรมเคมี และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนช่วงยีน 16S rRNA แสดงให้เห็นว่าไอโซเลต CA1R205 CA3R110 และ PLK6-54 เป็นสมาชิกในสกุล *Streptomyces* โดยไอโซเลต CA1R205 และ CA3R110 มีความใกล้เคียงกับ *S. rapamycinicus* NRRL B-5491<sup>T</sup> ที่ระดับความคล้ายคลึงของยีน 16S rRNA เท่ากับ 98.4 และ 99.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และไอโซเลต PLK6-54 มีความใกล้เคียงกับ *S. rubidus* 13C15<sup>T</sup> ที่ระดับความคล้ายคลึงของยีน 16S rRNA เท่ากับ 99.0 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลต CA2R105 เป็นสมาชิกในสกุล *Nocardia* มีความใกล้เคียงกับ *N. jiangxiensis* NBRC 101359<sup>T</sup> ที่ระดับความคล้ายคลึงของยีน 16S rRNA เท่ากับ 99.2 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไอโซเลต PLK6-60 เป็นสมาชิกในสกุล *Micromonospora* มีความใกล้เคียงกับ *M. aurantiaca* DSM 43813<sup>T</sup> ที่ระดับความคล้ายคลึงของยีน 16S rRNA เท่ากับ 99.1 เปอร์เซ็นต์ ผลของการวิเคราะห์จีโนมทั้งหมด แสดงค่า Average nucleotide identity (ANI) น้อยกว่า 95-96 เปอร์เซ็นต์ และแสดงค่า digital DNA-DNA hybridization (dDDH) ต่ำกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งต่ำกว่าจุดตัดของเกณฑ์การจำแนกในระดับสปีชีส์ รวมทั้งพบลักษณะทางฟิโนไทป์ที่มีความแตกต่างจากสายพันธุ์อ้างอิงที่ใกล้เคียงที่สุด จากหลักฐานทางอนุกรมวิธานหลายส่วนแสดงให้เห็นว่าไอโซเลต CA1R205 CA3R110 และ PLK6-54 จัดเป็นแอกติโนมัยสีทสปีชีส์ใหม่ของสกุล *Streptomyces* ในขณะที่ไอโซเลต CA2R105 และไอโซเลต PLK6-60

จัดเป็นแอคติโนมัยสีทสปีชีส์ใหม่ของสกุล *Nocardia* และ *Micromonospora* ตามลำดับ ไอโซเลต CA3R110 ถูกคัดเลือกมาศึกษาเพื่อค้นหาสารทุติยภูมิโดยใช้คุณสมบัติของฤทธิ์ทางชีวภาพและรูปแบบทางเคมีของสาร สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตตของไอโซเลต CA3R110 ถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการทางโครมาโตกราฟี สารบริสุทธิ์ที่แยกได้ถูกนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโคปี ในการศึกษาครั้งนี้ สารที่ถูกค้นพบแล้ว 2 สาร ได้แก่ Geldanamycin และ 17-O-demethylgeldanamycin ถูกค้นพบ สารทั้งสองไม่แสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ต่อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Micrococcus luteus* ATCC 9341, Methicilin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20654 และ Vancomycin-Resistant *Enterococcus* (VRE ; clinical strain) ในทางตรงข้ามสารทั้งสองแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยสามารถดักจับอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC<sub>50</sub>) ที่ 16.07±0.20 และ 11.00 ±0.08 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

**คำสำคัญ:** อนุกรมวิธานหลายส่วน แอคติโนมัยสีทชนิดใหม่ การวิเคราะห์จีโนม สารต้านอนุมูลอิสระ เจลดานามัยซิน 17-O-ดีเมทิลเจลดานามัยซิน

Thesis Title	Polyphasic taxonomy of novel actinomycetes and the secondary metabolites of the selected isolate
Student Name	Miss Achararak Nammali
Student ID	62605061
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Year	2021
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Chitti Thawai

### Abstract

Three endophytic actinomycete strains were isolated from the root of *Coffea arabica* L. collected from Ratchaburi (CA1R205), Lampang (CA3R110) and Nakhon Ratchasima (CA2R105) and two soil actinomycetes were isolated soil samples collected from of Lan-Kwai peat swamp forest, Pattani Province (PLK6-54 and PLK6-60). The taxonomic position of these strains was evaluated using a polyphasic approach. The details of the morphological, chemotaxonomic properties, and 16S rRNA gene sequence analysis revealed that strains CA1R205, CA3R110 and PLK6-54 were a member of the genus *Streptomyces*. Strains CA1R205 and CA3R110 were closely related to *S. rapamycinicus* NRRL B-5491<sup>T</sup> (98.4, and 99.1% 16S rRNA gene similarity, respectively) and strain PLK6-54 was closely related to *S. rubidus* 13C15<sup>T</sup> (99.0% 16S rRNA gene similarity). Strain CA2R105 was a member of the genus *Nocardia* that was closely related to *N. jiangxiensis* NBRC 101359<sup>T</sup> (99.2% 16S rRNA gene similarity) while strain PLK6-60 was a member of genus *Micromonospora* that was closely related to *M. aurantiaca* DSM 43813<sup>T</sup> (99.1% 16S rRNA gene similarity). The result of whole-genome analysis revealed that all actinomycete strains showed the low average nucleotide identity-blast (ANI<sub>b</sub>), the digital DNA–DNA hybridization values (<95, and 70%, respectively) which were below the 95–96% (for ANI value) and the 70% (for dDDH value) cut-off point for species classification. In addition, several phenotypic differences were observed between these strains and the closely related type strains. It is

evident from the polyphasic taxonomic data presented that strain CA1R205, CA3R110 and PLK6-54 should be classified as representing the novel species of the genus *Streptomyces* whereas strains CA2R105 and PLK6-60 could be judged as the novel species of the genus *Nocardia* and *Micromonospora*, respectively. Strain CA3R110 was selected for further secondary metabolite investigation, based on biological activity and chemical profiles. The crude ethyl acetate extract of strain CA3R110 was purified using several chromatographic techniques. The purified compounds were identified using spectroscopic techniques. In this study, two known compounds, geldanamycin and 17-*O*-demethylgeldanamycin, were discovered. Both compounds showed no antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus. luteus* ATCC 9341, Methicilin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20654 and Vancomycin-Resistant *Enterococcus* (VRE ; clinical strain). In contrast, geldanamycin and 17-*O*-demethylgeldanamycin exhibited the antioxidant activity with half-maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of 16.07±0.20 and 11.00 ±0.08 µg/mL, respectively.

**Keywords:** Polyphasic taxonomy, Novel actinomycetes, Whole-genome analysis, Antioxidants, Geldanamycin, 17-*O*-demethylgeldanamycin.

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับความกรุณาจาก รศ. ดร.จิตติ ท่าไผ่ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร.ปัทมา พิทยขจรวุฒิ ที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำปรึกษา ปรับปรุงแก้ไข ข้อบกพร่องต่าง ๆ ตลอดจนความอนุเคราะห์ให้ข้อมูลและสถานที่ของหน่วยวิจัยทางแอคทีโอบัคทีเรีย และห้องปฏิบัติการเคมีอินทรีย์ชีวภาพ จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณอาจารย์ทั้งสองเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ คุณจักรพงษ์ อินทรอุดม และนักวิจัยของห้องปฏิบัติการเคมีอินทรีย์ชีวภาพ หน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพจุลินทรีย์และชีวเคมีภัณฑ์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติทุกท่าน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือทั้งความรู้ ตลอดจนอุปกรณ์ที่จำเป็นต่อการดำเนินงานวิจัยนี้ รวมถึงประธานและคณะกรรมการวิทยานิพนธ์ที่ได้ให้คำแนะนำและข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการประจำภาคชีววิทยาที่ให้สิ่งอำนวยความสะดวกอุปกรณ์ สารเคมีและสถานที่ในการดำเนินงานวิจัย ขอขอบคุณนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาทุกท่านที่ได้ให้ คำปรึกษาและช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ เสมอมา

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณครอบครัว เพื่อน และรุ่นน้อง ทุกท่านที่มีส่วนช่วยและสนับสนุนข้าพเจ้าใน ทุก ๆ ด้าน และเป็นส่วนหนึ่งในการทำให้ข้าพเจ้าสามารถดำเนินการวิจัยและจัดทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้ได้ สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

อัครรักษ์ น้ามะลิ

# สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฐ
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา .....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย .....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>3</b>
2.1 ลักษณะทั่วไปของแอกติโนมัยสีท.....	3
2.2 การกระจายตัวของแอกติโนมัยสีทในธรรมชาติ.....	6
2.3 การจัดหมวดหมู่ของแอกติโนมัยสีท (The classification of actinomycetes).....	7
2.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอกติโนมัยสีท (identification).....	8
2.4.1 ลักษณะทางฟีโนไทป์ (Phenotypic Characteristics).....	9
2.4.2 ลักษณะอนุกรมวิธานเคมี (Chemotypic characteristics).....	16
2.4.3 ลักษณะทางจีโนไทป์ (Genotypic characteristics).....	22
2.4.4 ชีวสารสนเทศ (Bioinformatics).....	27
2.5 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแอกติโนมัยสีท .....	34
2.5.1 การสร้างสารปฏิชีวนะ.....	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

2.5.2 การสร้างเอนไซม์ .....	35
2.5.3 การสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืช .....	35
2.5.4 การตรึงไนโตรเจน และละลายฟอสเฟต.....	36
2.5.5 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) .....	36
2.5.6 สารต้านมะเร็ง (anticancer) และต้านเนื้องอก (antitumor) .....	36
2.6 การสกัดสารทุติยภูมิ .....	37
2.6.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการสกัด.....	37
2.6.2 วิธีสกัดสารทุติยภูมิ.....	37
2.6.3 การทำให้สารสกัดเข้มข้น.....	39
2.7 การแยกสารทุติยภูมิให้บริสุทธิ์.....	39
2.7.1 โครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (Column Chromatography) .....	39
2.8 การพิสูจน์โครงสร้างและระบุชนิดของสาร .....	41
2.8.1 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy; NMR)...	41
2.8.2 แมสสเปกโตรเมทรี (Mass spectrometry; MS).....	45
2.8.3 ฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (Fourier Transform Infrared Spectrometer; FT-IR Spectrometer).....	45
2.8.4 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Vis spectrophotometer).....	46
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	46
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย .....</b>	<b>49</b>
3.1 แอคติโนมายส์.....	49
3.2 การศึกษาอนุกรมวิธานหลายส่วนของแอคติโนมายส์.....	49
3.2.1 การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ (Phenotypic Characteristics) .....	49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

3.2.2 การศึกษาอนุกรมวิธานเคมี (Chemotypic characteristics) .....	54
3.2.3 การศึกษาลักษณะจีโนไทป์ (Genotypic characteristics).....	58
3.3 การคัดเลือกแอกติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ .....	61
3.3.1 การสกัดสารทุติยภูมิจากแอกติโนมัยสีท .....	61
3.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์โดยวิธี Agar disc diffusion .....	61
3.4 การศึกษาการแยกสารทุติยภูมิให้บริสุทธิ์ และองค์ประกอบทางเคมี .....	62
3.4.1 การสกัดสารสกัดหยาบจากไอโซเลตที่ถูกคัดเลือก.....	62
3.4.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี .....	62
3.4.3 การแยกสารทุติยภูมิด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	62
3.4.4 การแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง.....	62
3.4.5 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ .....	63
3.5 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activities).....	66
3.5.1 การทดสอบฤทธิ์การต้านการเจริญจุลินทรีย์ .....	66
3.5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ .....	66
3.6 การทดสอบทางสถิติ (statistical analysis) .....	67
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล .....</b>	<b>68</b>
4.1 แหล่งที่มาของแอกติโนมัยสีท .....	68
4.2 ลักษณะทางอนุกรมวิธานหลายส่วน (Polyphasic taxonomy).....	69
4.2.1 เอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจากต้นกาแฟ <i>C. arabica</i> (L.) .....	69
4.2.2 แอกติโนมัยสีทจากป่าพรุ.....	121
4.3 คัดเลือกแอกติโนมัยสีทเพื่อทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบ.....	151
4.3.1 ความสามารถในการต้านแบคทีเรียทดสอบ .....	151

## สารบัญ (ต่อ)

4.3.2 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบ.....	151
4.4 การศึกษาสารทุติยภูมิที่ผลิตได้จากไอโซเลต CA3R110 .....	152
4.4.1 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบและการทำสารสกัดหยาบให้บริสุทธิ์ .....	152
4.4.2 การวิเคราะห์โครงสร้างเคมีของสารทุติยภูมิจากไอโซเลต CA3R110 .....	153
4.5 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ .....	159
4.5.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารบริสุทธิ์จากไอโซเลต CA3R110.....	160
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....</b>	<b>162</b>
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	162
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	165
เอกสารอ้างอิง .....	166
ภาคผนวก.....	176
ภาคผนวก ก.....	177
ภาคผนวก ข.....	186
ภาคผนวก ค.....	150
ภาคผนวก ง.....	156
ภาคผนวก ฉ.....	167
ภาคผนวก ช.....	193
ประวัติผู้เขียน.....	194

## สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1	ฟอสโฟลิปิดที่พบในแบคทีเรีย .....	16
ตารางที่ 2.2	รูปแบบของฟอสโฟลิปิดที่พบในแอคติโนมัยสีท .....	18
ตารางที่ 2.3	องค์ประกอบหลักในผนังเซลล์ของแอคติโนมัยสีท .....	22
ตารางที่ 2.4	รูปแบบของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ของแอคติโนมัยสีท ที่ผนังเซลล์ประกอบด้วย meso-DAP .....	22
ตารางที่ 3.1	ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาลูโกโซพอลิเมอร์เรส .....	58
ตารางที่ 3.2	สภาวะในการเกิดปฏิกิริยาลูโกโซพอลิเมอร์เรส .....	59
ตารางที่ 4.1	แอคติโนมัยสีทแต่ละไอโซเลตที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ .....	68
ตารางที่ 4.2	เปอร์เซ็นต์ความใกล้เคียงของแอคติโนมัยสีทไอโซเลตต่าง ๆ กับสายพันธุ์ใกล้เคียง .....	68
ตารางที่ 4.3	ลักษณะการเจริญของไอโซเลต CA1R205, <i>S. rapamycinicus</i> DSM 41530 <sup>T</sup> และ <i>S. iranensis</i> HM 35 <sup>T</sup> .....	71
ตารางที่ 4.4	ชนิดของกรดไขมันในเซลล์ของไอโซเลต CA1R205 และสายพันธุ์อ้างอิง .....	73
ตารางที่ 4.5	เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนช่วง 16S rRNA (% 16S rRNA gene similarity value) ระหว่างไอโซเลต CA1R205 และสายพันธุ์ใกล้เคียงในฐานข้อมูล EzBioCloud .....	75
ตารางที่ 4.6	ค่า ANIb, ANIm และ dDDH ระหว่างโครงร่างจีโนมของ CA1R205, <i>S. rapamycinicus</i> NRRL B-5491 <sup>T</sup> และ <i>S. iranensis</i> HM 35 <sup>T</sup> .....	80
ตารางที่ 4.7	กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิที่มีความคล้ายคลึงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ บนจีโนมของไอโซเลต CA1R205 .....	83
ตารางที่ 4.8	ลักษณะที่แตกต่าง (differential characteristics) ของไอโซเลต CA1R205, <i>S. rapamycinicus</i> DSM 41530 <sup>T</sup> และ <i>S. iranensis</i> HM 35 <sup>T</sup> .....	85
ตารางที่ 4.9	ลักษณะการเจริญของไอโซเลต CA3R110, <i>S. rapamycinicus</i> DSM 41530 <sup>T</sup> และ <i>S. iranensis</i> HM 35 <sup>T</sup> .....	89
ตารางที่ 4.10	ชนิดของกรดไขมันในเซลล์ของไอโซเลต CA3R110 และสายพันธุ์อ้างอิง .....	91

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ 4.11	เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนช่วง 16S rRNA (% 16S rRNA gene similarity value) ระหว่างไอโซเลต CA3R110 และสายพันธุ์ใกล้เคียงในฐานข้อมูล EzBioCloud	93
ตารางที่ 4.12	ค่า ANIb, ANIm และ dDDH ระหว่างโครงสร้างจีโนมของ CA3R110, <i>S. rapamycinicus</i> NRRL B-5491 <sup>T</sup> และ <i>S. iranensis</i> HM 35 <sup>T</sup>	98
ตารางที่ 4.13	กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิที่มีความคล้ายคลึงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ บนจีโนมของไอโซเลต CA3R110	101
ตารางที่ 4.14	ลักษณะที่แตกต่าง (differential characteristics) ของไอโซเลต CA3R110, <i>S. rapamycinicus</i> DSM 41530 <sup>T</sup> และ <i>S. iranensis</i> DSM 41954 <sup>T</sup>	103
ตารางที่ 4.15	ลักษณะการเจริญของไอโซเลต CA2R105 และ <i>N. jiangxiensis</i> NBRC 101359 <sup>T</sup>	109
ตารางที่ 4.16	ชนิดของกรดไขมันในเซลล์ของไอโซเลต CA2R105 และสายพันธุ์อ้างอิง	110
ตารางที่ 4.17	เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนช่วง 16S rRNA (% 16S rRNA gene similarity value) ระหว่างไอโซเลต CA2R105 และสายพันธุ์ใกล้เคียงในฐานข้อมูล EzBioCloud	112
ตารางที่ 4.18	ค่า ANIb, ANIm และ dDDH ระหว่างโครงสร้างจีโนมของ CA2R105, <i>N. jiangxiensis</i> NBRC 101359 <sup>T</sup> และ <i>N. nova</i> DSM 44481 <sup>T</sup>	117
ตารางที่ 4.19	ลักษณะแตกต่าง (differential characteristics) ของไอโซเลต CA2R105, <i>N. jiangxiensis</i> NBRC 101359 <sup>T</sup> และ <i>N. nova</i> DSM 44481 <sup>T</sup>	120
ตารางที่ 4.20	ลักษณะการเจริญของไอโซเลต PLK6-54 และ <i>S. rubidus</i> NBRC 102073 <sup>T</sup>	122
ตารางที่ 4.21	ชนิดของกรดไขมันในเซลล์ของไอโซเลต PLK6-54 และสายพันธุ์อ้างอิง	124
ตารางที่ 4.22	เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนช่วง 16S rRNA (% 16S rRNA gene similarity value) ระหว่างไอโซเลต PLK6-54 และสายพันธุ์ใกล้เคียงในฐานข้อมูล EzBioCloud	126
ตารางที่ 4.23	ค่า ANIb, ANIm และ dDDH ระหว่างโครงสร้างจีโนมของ PLK6-54, <i>S. rubidus</i> 13C15 <sup>T</sup> และ <i>S. bryophytorum</i> NEAU-HZ10 <sup>T</sup>	131

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ 4.24 กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิที่มีความคล้ายคลึงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ บนจีโนมของไอโซเลต PLK6-54 .....	134
ตารางที่ 4.25 ลักษณะที่แตกต่าง (differential characteristics) ของไอโซเลต PLK6-54 และสายพันธุ์ใกล้เคียง .....	135
ตารางที่ 4.26 ลักษณะการเจริญของไอโซเลต PLK6-60 และ <i>M. aurantiaca</i> TT1-11 <sup>T</sup> .....	138
ตารางที่ 4.27 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์ของไอโซเลต PLK6-60 และสายพันธุ์อ้างอิง .....	139
ตารางที่ 4.28 เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนช่วง 16S rRNA (% 16S rRNA gene similarity value) ระหว่างไอโซเลต PLK6-60 และสายพันธุ์ใกล้เคียงในฐานข้อมูล EzBioCloud .....	144
ตารางที่ 4.29 ค่า ANIb, ANIm และ dDDH ระหว่างโครงร่างจีโนมของ PLK6-60, <i>M. aurantiaca</i> ATCC 27029 <sup>T</sup> และ <i>M. siamensis</i> DSM 45097 <sup>T</sup> .....	146
ตารางที่ 4.30 กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิที่มีความคล้ายคลึงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ บนจีโนมของไอโซเลต PLK6-60 .....	149
ตารางที่ 4.31 ลักษณะที่แตกต่าง (differential characteristics) ของไอโซเลต PLK6-60 และสายพันธุ์ใกล้เคียง .....	149
ตารางที่ 4.32 แสดงความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดหยาบ (ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จากไอโซเลต CA1R205 และ CA3R110 .....	151
ตารางที่ 4.33 <sup>1</sup> H NMR และ <sup>13</sup> C NMR สเปกตรัมของสาร A ใน CDCl <sub>3</sub> และ Geldanamycin ใน DMSO-d <sub>6</sub> .....	156
ตารางที่ 4.34 <sup>1</sup> H NMR และ <sup>13</sup> C NMR สเปกตรัมของสาร B ใน MeOD+CDCl <sub>3</sub> และ 17-O-demethylgeldanamycin ใน CD <sub>3</sub> OD .....	157
ตารางที่ 4.35 ค่าความเข้มข้นที่สามารถดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC <sub>50</sub> ) .....	160

## สารบัญรูป

รูปที่ 2.1 ความหลากหลายทางสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยสีท (a) ลักษณะโคโลนีของ <i>Streptomyces coelicolor</i> A3, wild type (ด้านบน) และเชื้อที่กลายพันธุ์ยีน bldA (ด้านล่าง) (b) ภาพไมซีเลียมของสปอร์จากกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ของ <i>S. coelicolor</i> (c) ลักษณะสปอร์ของ <i>Micrococcus luteus</i> (d) ลักษณะสปอร์ของ <i>Actinosynnemna mirum</i> (e) ลักษณะสปอร์ของ <i>Microbispora rosea</i> .....	4
รูปที่ 2.2 การเจริญของแอคติโนมัยสีทบนอาหารแข็ง แสดงลักษณะของเส้นใยอาหาร และเส้นใยอากาศที่มีการสร้างสปอร์แบบไม่มีถุงหุ้ม (conidiospore).....	4
รูปที่ 2.3 สปอร์ที่อยู่ภายในโครงสร้างที่มีถุงหุ้มของ <i>Actinoplanes</i> ; (1) ลักษณะกลม (globose) (2) ทรงกระบอก (cylindrical) (3) ลักษณะขอบหยัก (lobate) (4) ค่อนข้างกลม (subglobose) (5) รูปร่างไม่แน่นอน (irregular) .....	5
รูปที่ 2.4 ลักษณะพื้นผิวของสปอร์ (A) สปอร์ของ <i>Streptomyces otagonensis</i> SANK 62589 มีลักษณะเป็นเกลียว พื้นผิวเรียบ (B) สปอร์ของ <i>Streptomyces</i> sp. OM-6519 ลักษณะสปอร์เป็นปลายตรง พื้นผิวขรุขระ (C) สปอร์ของ <i>Actinomadura rugatobispora</i> AS 6321 มีลักษณะโค้งงอมี 2-3 สปอร์ พื้นผิวขรุขระ (D) สปอร์ของ <i>Actinomadura</i> sp. ATCC 53676 มีลักษณะเป็นเส้นตรงจนถึงโค้งงอสายสั้น พื้นผิวมีลักษณะเป็นตุ่มเล็กๆ (E) สปอร์ของ <i>S. routienii</i> ATCC 39466 เป็นเส้นตรงจนถึงโค้งงอ พื้นผิวมีลักษณะเป็นตุ่มเล็กๆ (F) สปอร์ของ <i>A. verrucosospora</i> JCM 3147 <sup>T</sup> โค้งงอจนถึงเป็นเกลียววน 1 รอบ (G) <i>Streptomyces</i> sp. WK-1875 สายสปอร์มีลักษณะเป็นเกลียว พื้นผิวมีหนาม (H) <i>S. finlayi</i> JCM 4637 <sup>T</sup> เป็นรูปไข่และมีขน .....	6
รูปที่ 2.5 การจัดอนุกรมวิธานในฟิล์มแอคติโนแบคทีเรียตามหนังสือ Bergy Manual of Systematic Bacteriology เล่มที่ 5 ปรับปรุงครั้งที่ 2 ปี ค.ศ. 2012 .....	8
รูปที่ 2.6 เส้นใยอาหารของ <i>Nocardiaasteroides</i> .....	9
รูปที่ 2.7 ลักษณะของสปอร์; สปอร์เดี่ยว (A) <i>Micromonospora</i> (B) <i>Thermomonospora</i> (C) <i>Saccharomonospora</i> (D) <i>Thermoactinomyces</i> ; สปอร์คู่ (E) <i>Microbispora</i> ; สปอร์ที่มากกว่า 2 สปอร์ (F) <i>Nocardia brevicatena</i> (G) <i>Catellatospora</i> .....	11

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ 2.8 ลักษณะสปอร์แบบเป็นสายยาวโดยไม่มีสิ่งห่อหุ้ม; <i>Streptomyces</i> : (A) ลักษณะสปอร์เป็นปลายตรง (Rectiflexibiles type) (B) ลักษณะของสปอร์เป็นรูปตะขอ (Retinaculiaperti type) (C) ลักษณะของสายสปอร์เป็นเกลียว (Spira type) (D) ลักษณะของสายสปอร์เป็นก้นหอย (Verticillati type) ; Nocardiosis (E) มีการสร้างสปอร์เป็นสายยาวและแตกกิ่งก้าน .....	11
รูปที่ 2.9 ผนังสปอร์ที่พัฒนามาจากเส้นใยอาหาร (A) สกุล <i>Actinoplanes</i> : (1) ทรงกลม (2) ทรงกระบอก (3) รูปแหก (4) กิ่งทรงกลม (5) รูปร่างไม่สม่ำเสมอ (B) <i>Pilimelia</i> : (6) รูปไข่ (7) รูประฆัง (8) รูปทรงกระบอก (C) สกุล <i>Dactylosporangium</i> มีผนังสปอร์รูปกระบอก, ผนังสปอร์ที่พัฒนามาจากเส้นใยอากาศ (D) สกุล <i>Planomonospora</i> มีผนังสปอร์รูปกระบอก (E) สกุล <i>Planobispora</i> มีผนังสปอร์รูปทรงกระบอก (F) สกุล <i>Planotetraspora</i> มีผนังสปอร์รูปทรงกระบอก (G) สกุล <i>Planopolyspora</i> มีผนังสปอร์รูปท่อ (H) สกุล <i>Spirillospora</i> มีผนังสปอร์รูปทรงกลม และ (I) สกุล <i>Streptosporangium</i> มีผนังสปอร์รูปทรงกลม.....	12
รูปที่ 2.10 โครงสร้างของกรดมัคโคลิก .....	18
รูปที่ 2.11 ตัวอย่างกรดไขมันที่พบในแบคทีเรีย (A) กรดไขมันอิ่มตัว (B) iso-branched fatty acid (C) anteiso-branched fatty acid (D) กรดไขมันไม่อิ่มตัว (E) cyclohexyl fatty acid (F) cyclopropane fatty acid (G) ladderane fatty acid (H) 2-OH fatty acid (I) internally branched fatty acid และ (J) dicarboxylic fatty acid .....	19
รูปที่ 2.12 โครงสร้างไอโซพรีนอยด์ควิโนน กลุ่มแนฟโทควิโนน (naphthoquinone); (A) มีนาควิโนน (menaquinone) (B) ดีเมทิลมีนาควิโนน (demethylmenaquinone) (C) ฟิโลควิโนน (phyllloquinone) : กลุ่มเบนโซควิโนน (benzoquinone); (D) ยูบิควิโนน (ubiquinone) (E) โรโดควิโนน (rhodoquinone) (F) พลาสโตควิโนน (plastoquinone) .....	20
รูปที่ 2.13 โครงสร้างของเปปติโดไกลแคน ประกอบด้วย N-acetylglucosamine (GlcNAc) และ N-acetylmuramic (MurNAc) ต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก $\beta$ - (1,4) .....	21
รูปที่ 2.14 แสดงการจับคู่ของดีเอ็นเอไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ.....	24

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ 2.15 (a) แผนภาพวงกลมของจีโนมจาก CGView ที่มีการทำเครื่องหมายตำแหน่งของยีน ปริมาณ G+C content ในแต่ละยีน (b) เป็นการแสดงผลบริเวณของยีนที่สนใจ .....	30
รูปที่ 2.16 แสดงแผนที่ Synteny สำหรับบริเวณของยีน ABDS ระหว่าง <i>Capsella rubella</i> , <i>Arabidopsis lyrata</i> และ <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	30
รูปที่ 2.17 ส่วนประกอบของแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ.....	32
รูปที่ 2.18 (ก) และ (ข) แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการที่มีราก (ค) แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการที่ไม่มีราก .....	32
รูปที่ 2.19 แผนภาพ Phylogenomic tree.....	34
รูปที่ 2.20 โครมาโทกราฟฟีแบบเจลฟิวเทรชัน .....	40
รูปที่ 2.21 องค์ประกอบของ HPLC.....	41
รูปที่ 2.22 ตำแหน่งสัญญาณของโปรตอนชนิดต่างๆ ของสารอินทรีย์ .....	42
รูปที่ 2.23 ตำแหน่งสัญญาณหรือความถี่เรโซแนนซ์ของอะตอมคาร์บอน .....	43
รูปที่ 2.24 สเปกตรัม <sup>13</sup> C NMR ของ 1-คลอโร-2-โพรพานอล 1) DEPT 135 2) DEPT 90 และ 3) BB decoupling .....	44
รูปที่ 2.25 แมสสเปกตรัมของเอทิลเบนซีน .....	45
รูปที่ 2.26 สเปกตรัม FT-IR ของแกรฟีนออกไซด์ (Graphene oxide).....	46
รูปที่ 3.1 แผนผังแสดงการแยกสารสกัดหยาบจากไอโซเลต CA3R110 .....	65
รูปที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต CA1R205 (ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP5 (ค) ลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีเลนส์ส่องระยะไกลเป็นเลนส์ใกล้วัตถุ (กำลังขยาย 400 เท่า) และ (ง) สัณฐานวิทยาของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (กำลังขยาย 5,000 เท่า).....	70
รูปที่ 4.2 แผนภูมิต้นไม้ไม่แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต CA1R205 ด้วยวิธี Neighbor-Joining	76
รูปที่ 4.3 แผนภูมิต้นไม้ไม่แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต CA1R205 ด้วยวิธี Maximum-likelihood.....	77
รูปที่ 4.4 แผนภูมิต้นไม้ไม่แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต CA1R205 ด้วยวิธี Maximum-parsimony.....	78

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ 4.5 แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการของจีโนม (Phylogenomic tree) แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต CA1R205 และสายพันธุ์ใกล้เคียง .....	79
รูปที่ 4.6 แผนภาพแสดง Cluster of Orthologous genes (COGs) ของไอโซเลต CA1R205 .....	81
รูปที่ 4.7 แผนภาพแสดงปริมาณกลุ่มยีนบนจีโนมที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิของ CA1R205, <i>S. rapamycinicus</i> NRRL B-5491 <sup>T</sup> และ <i>S. iranensis</i> HM 35 <sup>T</sup> .....	82
รูปที่ 4.8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต CA3R110 (ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 (ค) ลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีเลนส์ส่องระยะไกลเป็นเลนส์ใกล้วัตถุ (กำลังขยาย 400 เท่า) และ (ง) สัณฐานวิทยาของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (กำลังขยาย 7,500 เท่า) .....	87
รูปที่ 4.9 แผนภูมิต้นไม้แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต CA3R110 ด้วยวิธี Neighbor-Joining	94
รูปที่ 4.10 แผนภูมิต้นไม้แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต CA3R110 ด้วยวิธี maximum-likelihood .....	95
รูปที่ 4.11 แผนภูมิต้นไม้แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต CA3R110 ด้วยวิธี maximum-parsimony .....	96
รูปที่ 4.12 แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการของจีโนม (Phylogenomic tree) แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต CA3R110 และสายพันธุ์ใกล้เคียง .....	97
รูปที่ 4.13 แผนภาพแสดง Cluster of Orthologous genes (COGs) ของไอโซเลต CA3R110 .....	99
รูปที่ 4.14 แผนภาพแสดงปริมาณกลุ่มยีนบนจีโนมที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิของ CA3R110, <i>S. rapamycinicus</i> NRRL B-5491 <sup>T</sup> และ <i>S. iranensis</i> HM 35 <sup>T</sup> .....	100
รูปที่ 4.15 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต CA2R105 (ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 (ค) ลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีเลนส์ส่องระยะไกลเป็นเลนส์ใกล้วัตถุ (กำลังขยาย 400 เท่า) และ (ง) สัณฐานวิทยาของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (กำลังขยาย 5,000 เท่า) .....	108
รูปที่ 4.16 แผนภูมิต้นไม้แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต CA2R105 ด้วยวิธี Neighbor-Joining .....	113
รูปที่ 4.17 แผนภูมิต้นไม้แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต CA2R105 ด้วยวิธี maximum-likelihood .....	114

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ 4.18 แผนภูมิต้นไม้แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต CA2R105 ด้วยวิธี maximum-parsimony.....	115
รูปที่ 4.19 แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการของจีโนม (Phylogenomic tree) แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต CA2R105 และสายพันธุ์ใกล้เคียง .....	116
รูปที่ 4.20 แผนภาพแสดง Cluster of Orthologous genes (COGs) ของไอโซเลต CA2R105 .....	118
รูปที่ 4.21 แผนภาพแสดงปริมาณกลุ่มยีนบนจีโนมที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิของ CA2R105, <i>N. jiangxiensis</i> NBRC 101359 <sup>T</sup> และ <i>N. nova</i> DSM 44481 <sup>T</sup> .....	119
รูปที่ 4.22 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PLK6-54 (ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 (ค) ลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีเลนส์ส่องระยะไกลเป็นเลนส์ใกล้วัตถุ (กำลังขยาย 400 เท่า) และ (ง) สัณฐานวิทยาของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (กำลังขยาย 6,000 เท่า).....	123
รูปที่ 4.23 แผนภูมิต้นไม้แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต PLK6-54 ด้วยวิธี Neighbor-Joining .....	127
รูปที่ 4.24 แผนภูมิต้นไม้แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต PLK6-54 ด้วยวิธี maximum-likelihood.....	128
รูปที่ 4.25 แผนภูมิต้นไม้แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต PLK6-54 ด้วยวิธี maximum-parsimony.....	129
รูปที่ 4.26 แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการของจีโนม (Phylogenomic tree) แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต PLK6-54 และสายพันธุ์ใกล้เคียง .....	130
รูปที่ 4.27 แผนภาพแสดง Cluster of Orthologous genes (COGs) ของไอโซเลต PLK6-54.....	132
รูปที่ 4.28 แผนภาพแสดงปริมาณกลุ่มยีนบนจีโนมที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิของ PLK6-54, <i>S. rubidus</i> NBRC 102073 <sup>T</sup> และ <i>S. bryophytorum</i> NEAU-HZ10 <sup>T</sup> .....	133
รูปที่ 4.29 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PLK6-60 (ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 (ค) ลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีเลนส์ส่องระยะไกลเป็นเลนส์ใกล้วัตถุ (กำลังขยาย 400 เท่า) และ (ง) สัณฐานวิทยาของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (กำลังขยาย 15,000 เท่า).....	137

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ 4.30 แผนภูมิต้นไม้แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต PLK6-60 ด้วยวิธี Neighbor-Joining .....	141
รูปที่ 4.31 แผนภูมิต้นไม้แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต PLK6-60 ด้วยวิธี maximum-likelihood.....	142
รูปที่ 4.32 แผนภูมิต้นไม้แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต PLK6-60 ด้วยวิธี maximum-parsimony.....	143
รูปที่ 4.33 แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการของจีโนม (Phylogenomic tree) แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต PLK6-60 และสายพันธุ์ใกล้เคียง .....	145
รูปที่ 4.34 แผนภาพแสดง Cluster of Orthologous genes (COGs) ของไอโซเลต PLK6-60.....	147
รูปที่ 4.35 แผนภาพแสดงปริมาณกลุ่มยีนบนจีโนมที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิของ PLK6-60, <i>M. aurantiaca</i> ATCC 27029 <sup>T</sup> และ <i>M. siamensis</i> DSM 45097 <sup>T</sup> .....	148
รูปที่ 4.36 Chemical profiles ของสารสกัดหยาบที่สกัดจากเอทิลอะซิเตทของไอโซเลต CA1R205 (A) และ CA3R110 (B).....	152
รูปที่ 4.37 Chemical profile ของ F1 .....	153
รูปที่ 4.38 Chemical profile ของ F4 .....	153
รูปที่ 4.39 Chemical profile ของ F5 .....	153
รูปที่ 4.40 โครงสร้างเคมีของ Geldanamycin (สาร A) และ 17-O-demethylgeldanamycin (สาร B) ผลิตจาก <i>Streptomyces</i> sp. CA3R110 <sup>T</sup> .....	154
รูปที่ 4.41 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารบริสุทธิ์ และสารละลายมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) กับเปอร์เซ็นต์ในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH .....	160

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แอกติโนมัยสีท (Actinomycetes) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะเป็นเส้นสาย มีบทบาทสำคัญในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ถูกนำมาใช้ประโยชน์หลายด้านทั้งทางการแพทย์ อุตสาหกรรม และการเกษตร ได้แก่ สารต้านอนุมูลอิสระ สารปฏิชีวนะ สารต้านมะเร็ง สารกดภูมิคุ้มกัน อีกทั้งยังมีการผลิตเอนไซม์ เช่น เอนไซม์ L-asparaginase ถูกนำมาใช้ในการรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาว (Hasegawa et al., 2006) ในปัจจุบันอัตราการค้นพบแอกติโนมัยสีท และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ ๆ มีแนวโน้มลดลง ซึ่งสวนทางกับความต้องการสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อโรคดื้อยา และโรคฉวยโอกาส ที่มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น โดยแอกติโนมัยสีทพบได้ทั่วไปในดิน การค้นหาแอกติโนมัยสีทจากแหล่งธรรมชาติใหม่ ๆ จึงเป็นการเพิ่มโอกาสในการค้นพบแอกติโนมัยสีทสายพันธุ์ใหม่ รวมทั้งเป็นการเพิ่มโอกาสในการค้นพบสารชนิดใหม่ หรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น

ประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้น อีกทั้งยังได้รับอิทธิพลจากลมมรสุมตะวันตกเฉียงใต้พัดผ่านประจำ จึงนำพาฝนและความชุ่มชื้นเข้าสู่ประเทศ สภาพเขชน้ำท่วมเอ่ออำนวยต่อการเกิดและวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต ทั้งยังมีความอุดมสมบูรณ์ และความหลากหลายทางชีวภาพสูง ซึ่งป่าพรุ (peat swamp forest) ในประเทศไทยเป็นพรุเขตร้อนมีการสร้างอินทรีย์วัตถุสูง และธาตุอาหารในดินมีปริมาณมาก สภาพดินมีความเป็นกรดและมีน้ำท่วมขังตลอดเวลา จากสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างจากป่าทั่วไปทำให้สิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่รวมทั้งจุลินทรีย์มีการปรับตัวเพื่อให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ จึงมีความน่าสนใจในการค้นพบแอกติโนมัยสีทสายพันธุ์ใหม่

แอกติโนมัยสีทในเนื้อเยื่อพืช (endophytic actinomycetes) ที่พบตามเนื้อเยื่อของต้น ราก หรือใบในพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางยาป้องกันโรค หรือพืชที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางเครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์สุขภาพ อีกทั้งแอกติโนมัยสีทในเนื้อเยื่อพืชสามารถทนต่อสารทุติยภูมิที่พืชสร้างได้ ไม่ก่อให้เกิดโรคกับพืชที่อาศัย ซึ่งสภาวะแวดล้อมเหล่านี้ อาจมีการค้นพบแอกติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ ๆ ที่แตกต่างไปจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในแอกติโนมัยสีทในดิน ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้แยกแอกติโนมัยสีทมาจากเนื้อเยื่อต้นกาแฟ *Coffea arabica* L.

ในช่วง 25 ปีที่ผ่านมา การศึกษานุกรมวิธานเพื่อจัดจำแนกจุลินทรีย์ได้ขยายขอบเขตในการศึกษาเพิ่มมากขึ้น แทนการใช้วิธีการแบบดั้งเดิมซึ่งเน้นการศึกษาเพียงลักษณะทางสัณฐานวิทยา

สรีรวิทยา และชีวเคมี เนื่องจากปัจจุบันมีการค้นพบจุลินทรีย์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกันมากขึ้น ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมอาจไม่เพียงพอต่อการจัดจำแนก จึงได้มีการนำเอาลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี (Chemotaxonomic characteristic) และลักษณะทางจีโนไทป์ (Genotypic characteristic) เช่น ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน 16S rRNA และ ข้อมูลจีโนมทั้งหมด (Whole-genome data) มาร่วมในการจัดจำแนกจุลินทรีย์ในระดับสกุลและสปีชีส์ เรียกวิธีการนี้ว่า อนุกรมวิธานหลายส่วน (polyphasic taxonomy) ทำให้สามารถระบุชนิด (identify) จุลินทรีย์ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น ด้วยเหตุนี้การวิจัยในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นการนำอนุกรมวิธานหลายส่วนมาใช้ในการจัดจำแนกและระบุชนิดแอกติโนมัยสิต รวมทั้งนำตัวแทนแอกติโนมัยสิตที่น่าสนใจมาศึกษาโครงสร้างสารทุติยภูมิและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารนั้น

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานหลายส่วนของแอกติโนมัยสิตที่แยกได้จากป่าพรุ และเนื้อเยื่อของ *Coffea arabica* L.

1.2.2 ศึกษาองค์ประกอบและวิเคราะห์โครงสร้างของสารทุติยภูมิของไอโซเลตที่คัดเลือก

1.2.3 ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการศึกษาอนุกรมวิธานหลายส่วน ประกอบด้วย ลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotypic characteristics) อนุกรมวิธานเคมี (chemotypic characteristics) และลักษณะทางจีโนไทป์ (genotypic characteristics) ของแอกติโนมัยสิตชนิดใหม่ สกัดและศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์จากสารทุติยภูมิของแอกติโนมัยสิตไอโซเลตที่คัดเลือก

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 คัดแยกแอกติโนมัยสิตสายพันธุ์ใหม่จากป่าพรุ และเนื้อเยื่อของ *Coffea arabica* L. ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้

1.4.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของแอกติโนมัยสิตที่แยกได้จากดินป่าพรุ และ เนื้อเยื่อของ *Coffea arabica* L. สามารถเป็นประโยชน์ให้กับงานวิจัยอื่น ๆ ได้

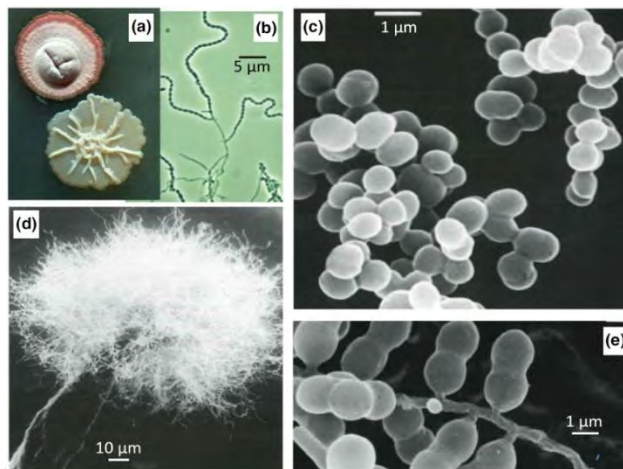
1.4.3 สารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารทุติยภูมิของแอกติโนมัยสิตไอโซเลตที่คัดเลือกอาจเป็นสารชนิดใหม่ และมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ

## ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

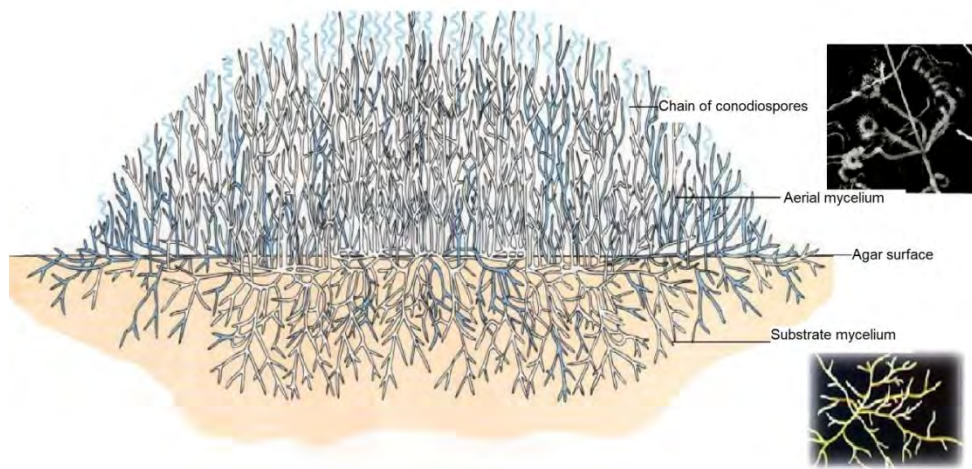
### 2.1 ลักษณะทั่วไปของแอกติโนมัยสีท

แอกติโนมัยสีทถูกจัดจำแนกเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีเบสกวานีน (guanine, G) และไซโตซีน (Cytosine, C) ในสายดีเอ็นเอปริมาณสูง (high G + C content, >55 %mol) ผนังเซลล์ประกอบด้วย แปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) แตกต่างจากผนังเซลล์ของเชื้อราที่ประกอบด้วยไคติน (chitin) และ เซลลูโลส (cellulose) ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส อีกทั้งขนาดของเส้นใยและสปอร์เล็กกว่าเชื้อรา โดยเฉลี่ยเส้นใยของแอกติโนมัยสีทมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 ไมโครเมตร ขณะที่เส้นใยของเชื้อรามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-10 ไมโครเมตร แอกติโนมัยสีทมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลาย (รูปที่ 2.1) ทั้ง รูปร่างกลม (cocci) แท่ง (bacilli) และเป็นเส้นสาย (filamentous) สามารถสร้างสปอร์ได้ เส้นใยของแอกติโนมัยสีทประกอบไปด้วยเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) เส้นใยทั้ง 2 แบบมีผนังกัน และยึดยาวออกที่ส่วนปลายของเส้นใย อีกทั้งมีสีที่แตกต่างกัน เช่น สีขาว เหลือง ส้ม แดง และเขียว เป็นต้น อีกทั้งยังสามารถสร้างสารสีที่ละลายในน้ำ (soluble pigment) ลักษณะเหล่านี้สามารถใช้ในการจัดจำแนกได้

องค์ประกอบเส้นใยของแอกติโนมัยสีท ประกอบด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ที่ห่อหุ้ม ส่วนของไซโตพลาซึม (cytoplasm) ที่มีดีเอ็นเอ (genomic DNA) ไรโบโซม (ribosome) และสารต่าง ๆ ที่สะสมภายในเซลล์ เช่น โพลีฟอสเฟต (polyphosphate) ไขมัน (lipid) และโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) (Li et al., 2016a) สปอร์ของแอกติโนมัยสีท ทั้งสปอร์เดี่ยว (single spore) สปอร์ที่อยู่ในถุงหุ้มสปอร์ (sporangium) และสปอร์ที่เกิดจากการแตกหักของเส้นใย เมื่อนำไปเลี้ยงบนอาหาร แข็งจะเกิดการเจริญเป็นเส้นใยที่แทงลงไปได้อาหาร เรียกว่า เส้นใยอาหาร จากนั้นมีการสร้างเส้นใยชูไปในอากาศเรียกว่า เส้นใยอากาศ รวมกันเป็นกลุ่มเส้นใย (mycelium) (รูปที่ 2.2) ส่วนใหญ่แอกติโนมัยสีทมีการสร้างเส้นใยทั้ง 2 แบบ แต่แอกติโนมัยสีทบางสกุลมีการสร้างเฉพาะเส้นใยอาหาร เช่น สกุล *Micromonospora* *Salinispora* และ *Actinoplanes* โคลนีนีของแอกติโนมัยสีทมีการเจริญกระจายออกจากแนวรัศมี ลักษณะของโคลนีนีมีหลายหลาย เช่น นูน (raise) เรียบแบน (flat) ปกคลุมชั้นเหนียวคล้ายแผ่นหนัง (leather) ความแข็งของโคลนีนีมีตั้งแต่อ่อนจนถึงแข็ง ผิวของโคลนีนีมีลักษณะเรียบ (smooth) เป็นสันนูน (ridged) เหี่ยวย่น (wrinkled) เป็นตุ่ม (granular) หรือเป็นเกล็ด (squamous) (จิตติ, 2557)



รูปที่ 2.1 ความหลากหลายทางสัณฐานวิทยาของแอกติโนมัยซีท (a) ลักษณะโคโลนีของ *Streptomyces coelicolor* A3, wild type (ด้านบน) และเชื้อที่กลายพันธุ์ยีน bldA (ด้านล่าง) (b) ภาพไมซีเลียมของสปอร์จากกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ของ *S. coelicolor* (c) ลักษณะสปอร์ของ *Micrococcus luteus* (d) ลักษณะสปอร์ของ *Actinosynnemima mirum* (e) ลักษณะสปอร์ของ *Microbispora rosea* (Chandra and Chater, 2014)

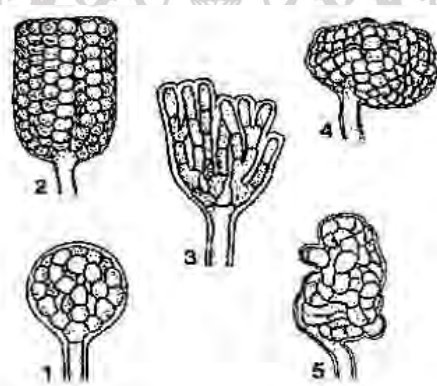


รูปที่ 2.2 การเจริญของแอกติโนมัยซีทบนอาหารแข็ง แสดงลักษณะของเส้นใยอาหาร และเส้นใยอากาศที่มีการสร้างสปอร์แบบไม่มีถุงหุ้ม (conidiospore) (Li et al., 2016b)

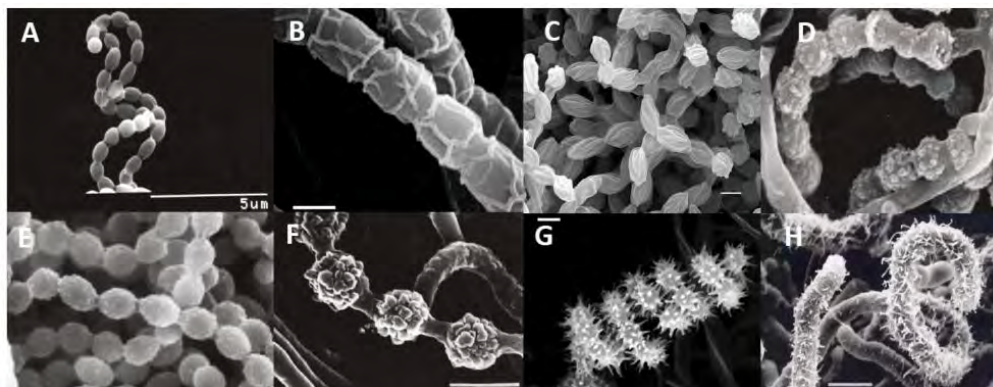
ส่วนใหญ่แอกติโนมัยซีทมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ มีการสร้างสปอร์หลายรูปแบบทั้งสปอร์เดี่ยว (monosporous) สปอร์คู่ (disporous) และสปอร์ที่มากกว่า 2 สปอร์ (oligosporous) หรือการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายยาวโดยไม่มีสิ่งห่อหุ้มสปอร์ เรียกว่า โคนิเดีย (conidia) อยู่บนเส้นใยอากาศ และสปอร์ที่อยู่ภายในโครงสร้างที่มีถุงหุ้ม เรียกว่า สปอร์แรงเจียม (sporangium) มีรูปแบบหลากหลาย เช่น ลักษณะกลม (globose) ทรงกระบอก (cylindrical) จนถึงรูปร่างไม่แน่นอน (irregular) (รูปที่ 2.3) อีกทั้งยังมีสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ (zoospore) เช่น *Kineococcus radiotolerans* SRS30216<sup>T</sup> สปอร์มีรูปร่างหลากหลาย เช่น ทรงกลม ทรงรี โคลิฟอร์ม รูปแท่ง พื้นผิวของสปอร์มีทั้งเรียบ ย่น ขรุขระ มีหนาม หรือพื้นผิวไม่สม่ำเสมอ (รูปที่ 2.4) ลักษณะเหล่านี้สามารถใช้ในการจัดจำแนกได้ แอคติโนมัยซีทมีการสร้างสปอร์เมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ แต่เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม เช่น มีสารอาหารเพียงพอ อุณหภูมิ และความชื้นที่เหมาะสม สปอร์จะมีการเจริญเป็นเส้นใย ส่วนใหญ่แอคติโนมัยซีทดำรงชีวิตแบบ saprophyte ใช้พลังงานจากसानอินทรีย์ดำรงชีวิต (chemoautotroph) โดยการย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ และมีส่วนร่วมในกระบวนการต่าง ๆ เช่น การตรึงแอมโมเนียม การย่อยสลายซากพืช ซากสัตว์ ก่อให้เกิดการหมุนเวียนสารอินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม สร้างความอุดมสมบูรณ์ในดิน (Connell, 2001)



รูปที่ 2.3 สปอร์ที่อยู่ภายในโครงสร้างที่มีถุงหุ้มของ *Actinoplanes* ; (1) ลักษณะกลม (globose) (2) ทรงกระบอก (cylindrical) (3) ลักษณะขอบหยัก (lobate) (4) ค่อนข้างกลม (subglobose) (5) รูปร่างไม่แน่นอน (irregular) (Li et al., 2016b)



**รูปที่ 2.4** ลักษณะพื้นผิวของสปอร์ (A) สปอร์ของ *Streptomyces otagonensis* SANK 62589 มีลักษณะเป็นเกลียว พื้นผิวเรียบ (B) สปอร์ของ *Streptomyces* sp. OM-6519 ลักษณะสปอร์เป็นปลายตรง พื้นผิวขรุขระ (C) สปอร์ของ *Actinomadura rugatobispora* AS 6321 มีลักษณะโค้งงอมี 2-3 สปอร์ พื้นผิวขรุขระ (D) สปอร์ของ *Actinomadura* sp. ATCC 53676 มีลักษณะเป็นเส้นตรงจนถึงโค้งงอ สายสั้น พื้นผิวมีลักษณะเป็นตุ่มเล็กๆ (E) สปอร์ของ *S. routienii* ATCC 39466 เป็นเส้นตรงจนถึงโค้งงอ พื้นผิวมีลักษณะเป็นตุ่มเล็กๆ (F) สปอร์ของ *A. verrucosospora* JCM 3147<sup>T</sup> โค้งงอจนถึงเป็นเกลียววน 1 รอบ (G) *Streptomyces* sp. WK-1875 สายสปอร์มีลักษณะเป็นเกลียว พื้นผิวมีหนาม (H) *S. finlayi* JCM 4637<sup>T</sup> เป็นรูปไข่และมีขน (Li et al., 2016b)

นอกจากนี้แอคติโนมัยซีทส่วนใหญ่ สามารถสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารปฏิชีวนะ (antibiotic) สารต้านมะเร็ง (antitumor agents) สารกดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressive agents) เอนไซม์ (enzymes) และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ (Tirta Kumala et al., 2017) แอคติโนมัยซีทบางชนิดก่อโรคในมนุษย์ เช่น *Mycobacterium tuberculosis* เป็นสาเหตุของวัณโรค บางชนิดก่อโรคในพืช เช่น *S. scabies* สาเหตุของโรคหูดไขมันฝรั่ง แต่แอคติโนมัยซีทที่พบในดินส่วนใหญ่ไม่เป็นอันตราย เช่น สกุล *Frankia* อาศัยร่วมกับรากพืชช่วยในการตรึงไนโตรเจน

## 2.2 การกระจายตัวของแอคติโนมัยซีทในธรรมชาติ

แอคติโนมัยซีทพบได้ทั่วไปในดิน ปริมาณที่พบขึ้นอยู่กับความลึกของหน้าดินโดยจะลดลงตามความลึกที่เพิ่มขึ้น ประเภทของดินที่มักพบแอคติโนมัยซีทปริมาณมากคือ ดินที่มีลักษณะร่วนอุดมไปด้วยสารประกอบอินทรีย์ การกระจายตัวของแอคติโนมัยซีทในดินขึ้นอยู่กับความอุดมสมบูรณ์ในดิน โดยเฉลี่ยพบ  $10^4$ - $10^8$  ต่อดิน 1 กรัม แอคติโนมัยซีทมีความไวต่อดินที่มีความเป็นกรด และบริเวณที่มีน้ำขังจะทำให้พบแอคติโนมัยซีทปริมาณน้อยลงเหลือเพียง 1 เปอร์เซ็นต์ (pH ที่เหมาะสมอยู่ที่ 6.5-8) ดินเป็นแหล่งที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบแอกติโนมัยซีทที่มีความหลากหลายสูง สามารถพบแอกติโนมัยซีทได้หลากหลายสกุล และสายพันธุ์ นอกจากนี้สามารถพบแอกติโนมัยซีทในระบบนิเวศอื่น ๆ ไม่ว่าจะเป็นแหล่งน้ำ เช่น ทะเล น้ำจืด อาศัยอยู่ในระบบร่างกายของสัตว์ เช่น ระบบโครงกระดูกภายนอกของมด ในปอดและผิวหนังของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และภายในเนื้อเยื่อพืช สภาวะแวดล้อมที่มีความรุนแรง (extreme environments) เช่น ตะกอนดินใต้ทะเลลึก สภาวะแวดล้อมที่มีอุณหภูมิต่ำหรือสูง (Lewin et al., 2016)

ปัจจุบันงานวิจัยมากมายได้ศึกษาแอกติโนมัยซีทหายาก เป็นกลุ่มที่น่าสนใจเนื่องจากสามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีลักษณะโครงสร้างทางเคมีที่หลากหลาย อีกทั้งมีฤทธิ์ทางชีวภาพครอบคลุมต่อจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิด ส่งผลให้แหล่งธรรมชาติที่มีทรัพยากรจำกัด หรือระบบนิเวศที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตเป็นแหล่งที่น่าสนใจในการศึกษาแอกติโนมัยซีทหายาก

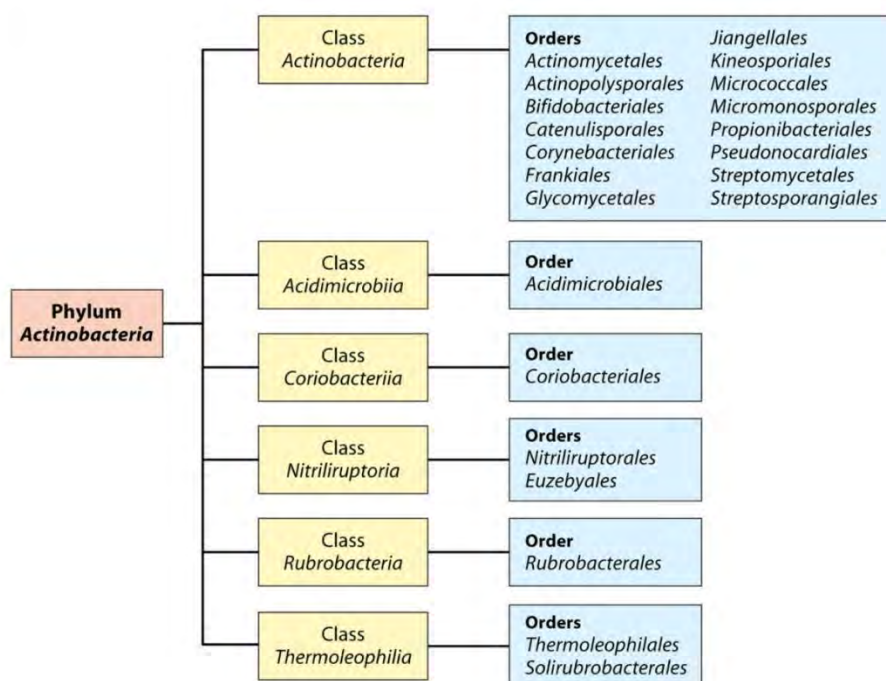
แอกติโนมัยซีทที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช (endophytic actinomycetes) มีบทบาทในการดำรงชีวิตของพืช มีวงจรชีวิตช่วงหนึ่งอยู่ในเนื้อเยื่อพืช อาจอยู่ส่วนราก ลำต้น หรือใบ ส่วนมากไม่เป็นอันตรายต่อพืชที่อาศัย อีกทั้งยังส่งเสริมการเจริญของพืช บางชนิดสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นประโยชน์ต่อพืช ช่วยปกป้องพืชจากการถูกทำลายจากแมลงศัตรูพืช ช่วยให้พืชทนต่อโรคและสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ จึงมีโอกาพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ ๆ มากขึ้น (Singh and Dubey, 2018) มีการรายงานการแยกสารจากจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อพืช พบว่าสารที่ผลิตได้เป็นสารชนิดใหม่ 51 เปอร์เซ็นต์ และสารสำคัญที่แยกได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ ดังนั้นจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อพืชจึงเป็นอีกแหล่งในการศึกษาวิจัยเพื่อค้นหาแอกติโนมัยซีท และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่

ป่าพรุ (peat swamp forest) เป็นระบบนิเวศป่ามีพื้นที่ชุ่มน้ำมีสภาพเป็นแอ่งน้ำจืดขังตลอดทั้งปี มีการสะสมของอินทรีย์วัตถุที่สลายจากซากพืช สภาพดินของป่าพรุมีการสะสมของอินทรีย์วัตถุอย่างต่อเนื่องจนเป็นดินอินทรีย์ (peat) อยู่เหนือชั้นดินแท้ ๆ ความหนาประมาณ 40 เซนติเมตร จนถึง 2 เมตร มีลักษณะเป็นสีน้ำตาลจนถึงดำ อินทรีย์วัตถุที่ถูกย่อยสลายทำให้ดินมีความเป็นกรดอ่อน ๆ (pH 4.5-6.0) พืช รวมทั้งจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในป่าพรุมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่มีน้ำขังตลอดทั้งปี และดินมีความเป็นกรด จึงทำให้เป็นแหล่งที่น่าสนใจในการศึกษาแอกติโนมัยซีทชนิดใหม่ (Posa et al., 2011)

### 2.3 การจัดหมวดหมู่ของแอกติโนมัยซีท (The classification of actinomycetes)

แอกติโนมัยซีทจัดอยู่ในโดเมนแบคทีเรีย (Domain *Bacteria*) ไฟลัมแอกติโนแบคทีเรีย (Phylum *Actinobacteria*) ถูกจัดจำแนกโดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนช่วงยีน 16S rRNA และนำมาวิเคราะห์สายวิวัฒนาการโดยการสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) ตลอดจนถึงปัจจุบันมีแอกติโนมัยซีทชนิดใหม่ถูกค้นพบตลอดเวลา ทำให้ตำแหน่งอนุกรมวิธานในระดับวงศ์ (family) สกุล (genus) และสปีชีส์

(species) มีการเปลี่ยนแปลง ในขณะที่เดียวกันก็มีแอกติโนมัยสีทที่ถูกจัดจำแนกใหม่ การจัดหมวดหมู่แอกติโนมัยสีทยึดตามหนังสือ Bergy Manual of Systematic Bacteriology เล่มที่ 5 ปรับปรุงครั้งที่ 2 ปี ค.ศ. 2012 ประกอบไปด้วย 6 คลาส คือ *Actinobacteria*, *Acidimicrobiia*, *Coriobacteriia*, *Nitriliruptoria*, *Rubrobacteria* และ *Thermoleophilia* (รูปที่ 2.5)



รูปที่ 2.5 การจัดอนุกรมวิธานในไฟลัมแอกติโนมัยสีทที่เรียงตามหนังสือ Bergy Manual of Systematic Bacteriology เล่มที่ 5 ปรับปรุงครั้งที่ 2 ปี ค.ศ. 2012 (Gao and Gupta, 2012)

## 2.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอกติโนมัยสีท

อนุกรมวิธานมีความสำคัญในการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิต แต่เดิมทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเป็นส่วนใหญ่ แต่ไม่เพียงพอในการจัดจำแนกในระดับสกุล ปัจจุบันจึงมีการใช้อนุกรมวิธานหลายส่วน (polyphasic taxonomy) ประกอบไปด้วย ลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotypic characteristics) อนุกรมวิธานเคมี (chemotypic characteristics) และลักษณะทางจีโนไทป์ (genotypic characteristics) มาใช้ในการจัดจำแนกแอกติโนมัยสีท

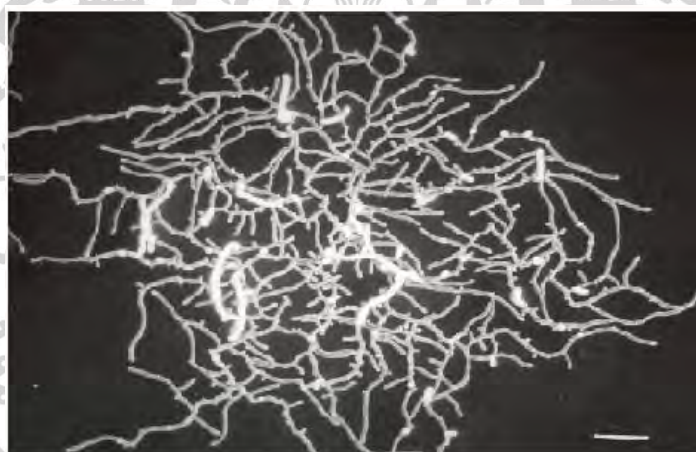
## 2.4.1 ลักษณะทางพีโนไทป์

### 2.4.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristics)

ศึกษาลักษณะโครงสร้าง และรูปร่างของแอกติโนมัยสีท ประกอบด้วยเส้นใยอาหาร และเส้นใยอากาศ แอกติโนมัยสีทบางชนิดสามารถสร้างสปอร์ได้ ลักษณะสปอร์ที่ใช้ในการศึกษา เช่น สปอร์ที่ไม่มีถุงหุ้ม และสปอร์ที่มีถุงหุ้ม การจัดเรียงตัวของสปอร์ ลักษณะผิวของสปอร์ เป็นต้น ลักษณะเหล่านี้มีความสำคัญในการจัดจำแนก

#### 1) เส้นใยอาหาร

เส้นใยอาหารเป็นเส้นใยที่เจริญแทรกลงไปในอาหาร ทำหน้าที่ในการดูดซึมสารอาหารเพื่อใช้ในการเจริญ บางสกุลเส้นใยอาหารมีการแตกหักเป็นท่อนกลมจนถึงลักษณะเป็นแท่ง บางสกุลมีลักษณะเส้นใยอาหารแตกแขนงคล้ายราก เช่น *Nocardia* (รูปที่ 2.6) แอกติโนมัยสีทมีสีของเส้นใยอาหารหลากหลาย เช่น ขาว เหลือง ส้ม แดง และเส้นใยอาหารของแอกติโนมัยสีทบางสกุลสามารถสร้างรงควัตถุที่ละลายในน้ำ



รูปที่ 2.6 เส้นใยอาหารของ *Nocardiaasteroides* (Li et al., 2016b)

#### 2) เส้นใยอากาศ

เส้นใยอากาศพัฒนามาจากเส้นใยอาหาร ประกอบด้วย fibrous sheath ซึ่งเป็นชั้นบางที่ห่อหุ้มผนังเส้นใย และ fibrous sheath นี้พบในเส้นใยอากาศที่มีการสร้างสปอร์ด้วย เนื่องจากผิวของสปอร์มีลักษณะแตกต่างกัน บางชนิดมีหนาม บางชนิดมีปุ่ม เป็นต้น การสร้างเส้นใยอากาศขึ้นอยู่กับแอกติโนมัยสีทแต่ละสกุล สารอาหาร และสภาวะแวดล้อม

### 3) ลักษณะของสปอร์

ลักษณะของสปอร์มีบทบาทสำคัญมากในการจัดจำแนก สปอร์มีลักษณะรูปร่างและพื้นผิวแตกต่างกัน รูปร่างของสปอร์ที่พบบ่อยคือทรงกลม รูปไข่ รูปแท่ง ลักษณะผิวของสปอร์ เช่น เรียบ หนาม เป็นปุ่ม หรือผิวดก สปอร์ที่ไม่มีถุงหุ้ม สปอร์ที่มีถุงหุ้ม การเรียงตัวของสปอร์ และสี แอคติโนมัยซีทมีการสร้างสปอร์ 3 ลักษณะ ดังนี้

#### (1) สปอร์เดี่ยว (monosporous)

สปอร์เดี่ยวเกิดจากการโป่งพองของปลายเส้นใยจนถึงผนังกันแล้วค่อยมีการสร้างผนังสปอร์ ลักษณะของสปอร์เดี่ยวมีทั้งแบบไม่มีก้านชูสปอร์หรือมีก้านชูสปอร์สั้น และแบบอยู่รวมกันเป็นช่อ พบได้ในสกุล *Micromonospora* *Thermomonospora* *Saccharomonospora* และ *Thermoactinomyces* (รูปที่ 2.7)

#### (2) สปอร์ที่สร้างต่อเป็นสาย (spore chains)

สปอร์ที่สร้างต่อเป็นสายเกิดจากการสร้างผนังกันเส้นใยในแต่ละห้องทำให้เส้นใยเปลี่ยนไปเป็นสปอร์ การเรียกชนิดของสปอร์ขึ้นอยู่กับ ความยาวของสายสปอร์ หรือจำนวนสปอร์ เช่น สปอร์คู่ (disporous) สปอร์สายสั้น (Oligosporous) และสปอร์สายยาว (polysporous)

สปอร์คู่ เป็นสปอร์ที่เรียงตัวตามยาวเป็นคู่ สปอร์ถูกจัดเรียงบนเส้นใยอากาศมีก้านชูที่สั้นมาก เนื่องจากการสร้างสปอร์ในช่วงแรกเกิดการแยกตัวออกจากด้านข้างทำให้ก้านชูมีลักษณะสั้น และเกิดการโป่งพองแล้วสร้างผนังกันตรงกลางตามแนวขวาง พบได้ในสกุล *Microbispora* (รูปที่ 2.7)

สปอร์สายสั้น ส่วนมากในแต่ละสายจะมีสปอร์ประมาณ 7-20 สปอร์ สายสปอร์มีทั้งลักษณะเป็นเส้นตรง โค้งงอเป็นรูปตะขอ หรือเป็นเกลียว ตัวอย่างเช่น *Nocardia brevicatena* มีสปอร์ 2 ถึง 7 สปอร์ และมีการแตกหักเป็นท่อน ๆ สกุล *Catellatospora* สร้างสายสปอร์ที่มีลักษณะตรงหรือโค้งงอ มีสปอร์ประมาณ 5-30 สปอร์ โผล่ออกมาโดยตรงจากอาหารบนก้านชูสปอร์ที่สั้น ก้านชูสปอร์อาจมีการแตกแขนง หรือไม่มีการแตกแขนงก็ได้ (รูปที่ 2.7)

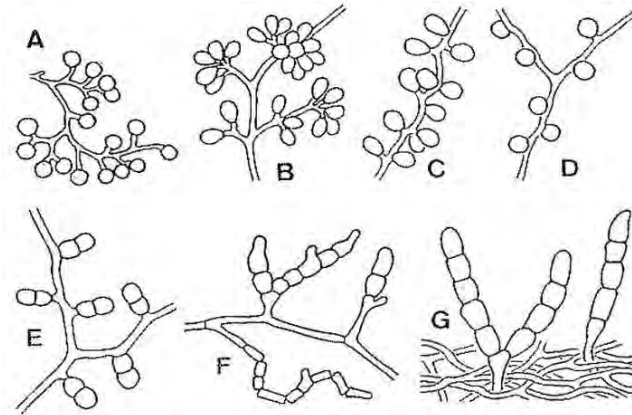
สปอร์สายยาว มีการสร้างสปอร์มากกว่า 50 สปอร์ มักเรียกสปอร์สายยาวว่า อาร์โทรสปอร์ (arthrospores) สปอร์ลักษณะนี้พบได้ทั่วไปในสกุล *Streptomyces* นอกจากนี้สกุล *Nocardiosis* มีการสร้างสปอร์สายยาวแบบโค้งงอ จนถึงรูปร่างซิกแซก (zigzag) ลักษณะสปอร์สายยาวสามารถแบ่งได้เป็น 4 ชนิด (รูปที่ 2.8)

ก. Rectiflexibiles สายของสปอร์มีลักษณะตรง หรือโค้งงอ

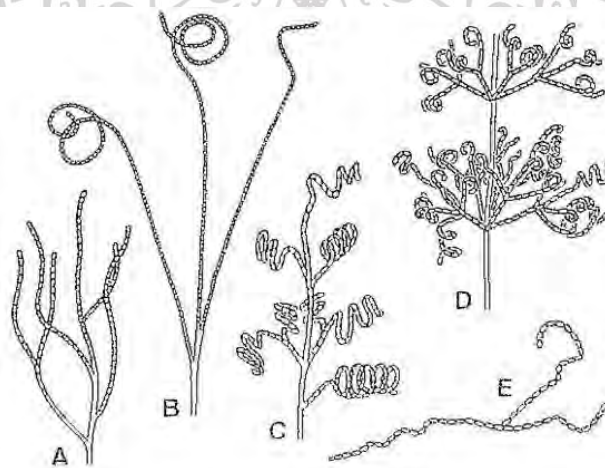
ข. Retinaculiaperti สายของสปอร์มีลักษณะคล้ายตะขอ หรือเป็นเกลียววน 1 ถึง 4 รอบ

ค. Spira สายสปอร์มีลักษณะเป็นเกลียว แบ่งได้ 2 แบบ (1) เกลียวแบบวงปิดติดกันแน่น (2) เกลียวแบบวงเปิดไม่ปิดกันแน่น มีลักษณะยาว และยืดออกไป

ง. Verticillati สายสปอร์ขดเป็นก้นหอย และแตกแขนงออกเป็นช่อ



รูปที่ 2.7 ลักษณะของสปอร์; สปอร์เดี่ยว (A) *Micromonospora* (B) *Thermomonospora* (C) *Saccharomonospora* (D) *Thermoactinomyces* ; สปอร์คู่ (E) *Microbispora* ; สปอร์ที่มากกว่า 2 สปอร์ (F) *Nocardia brevicatena* (G) *Catellatospora* (Li et al., 2016b)



รูปที่ 2.8 ลักษณะสปอร์แบบเป็นสายยาวโดยไม่มีสิ่งห่อหุ้ม; *Streptomyces*: (A) ลักษณะสปอร์เป็นปลายตรง (Rectiflexibiles type) (B) ลักษณะของสปอร์เป็นรูปตะขอ (Retinaculiaperti type) (C) ลักษณะของสายสปอร์เป็นเกลียว (Spira type) (D) ลักษณะของสายสปอร์เป็นก้นหอย (Verticillati type) ; *Nocardiosis* (E) มีการสร้างสปอร์เป็นสายยาวและแตกกิ่งก้าน (Li et al., 2016b)

(3) สปอร์ที่สร้างอยู่ในถุงหุ้ม (spores formed within sporangia)

ถุงหุ้มสปอร์เป็นโครงสร้างคล้ายกระสอบห่อหุ้มสปอร์อยู่ภายในถูกสร้างขึ้นตั้งแต่มีการสร้างสปอร์ จนกระทั่งสปอร์แก่จึงมีการปล่อยสปอร์ออกจากถุงหุ้ม ถุงหุ้มสปอร์มีขนาดและรูปร่างที่หลากหลาย โดยมีขนาดประมาณ 2-50 ไมโครเมตร ขนาดส่วนใหญ่ที่พบคือ 10 ไมโครเมตร และรูปร่างหลากหลาย เช่น ทรงกระบอก (cylindrical) รูปกระบอง (clavate) รูปทรงคล้ายท่อ (tubular) รูปขวด (bottle-shaped)

รูปร่างคล้ายนิ้วมือ (digitate) รูปร่างไม่สม่ำเสมอ (irregular) รูปแฉก (lobate) รูปร่างคล้ายร่ม (umbelliform) ทรงรูปเพอร์ (pyriform) หรือทรงกลม (globose)

ถุงหุ้มสปอร์พัฒนามาจากเส้นใยอาหาร หรือเส้นใยอากาศ แบ่งเป็น 2 รูปแบบ (1) บางสกุลถุงหุ้มสปอร์พัฒนามาจากสายสปอร์ (2) บางสกุลเกิดจากการขยายตัวของก้านชูอับสปอร์ สามารถจำแนกชนิดของสปอร์ได้จากจำนวนสปอร์ที่อยู่ภายในถุงหุ้ม ถุงหุ้มสปอร์ที่มี 1 สปอร์ เรียกว่า monosporous ถุงหุ้มสปอร์ที่มี 2 สปอร์ เรียกว่า bisporous และถุงหุ้มสปอร์ที่มีสปอร์จำนวนมาก เรียกว่า polysporous ซึ่งมีสปอร์ขดเป็นวง หรือเรียงตัวกันเป็นแถวอยู่ในถุงหุ้มสปอร์ที่เชื่อมอยู่กับผนังชั้นนอกของก้านชูสปอร์ แอคติโนมัยซีทสกุลที่สร้างสปอร์บนเส้นใยอาหาร เช่น *Actinoplanes Pilimelia Dactylosporangium* และ *Planomonospora* และสกุลที่สร้างสปอร์อยู่บนเส้นใยอากาศ เช่น *Planomonospora Planobispora Planotetraspora Planopolyspora Spirillospora* และ *Streptosporangium* (รูปที่ 2.9)



รูปที่ 2.9 ถุงหุ้มสปอร์ที่พัฒนามาจากเส้นใยอาหาร (A) สกุล *Actinoplanes* : (1) ทรงกลม (2) ทรงกระบอก (3) รูปแฉก (4) กิ่งทรงกลม (5) รูปร่างไม่สม่ำเสมอ (B) *Pilimelia* : (6) รูปไข่ (7) รูปประฆัง (8) รูปทรงกระบอก (C) สกุล *Dactylosporangium* มีถุงหุ้มสปอร์รูปกระบอก, ถุงหุ้มสปอร์ที่พัฒนามาจากเส้นใยอากาศ (D) สกุล *Planomonospora* มีถุงหุ้มสปอร์รูปกระบอก (E) สกุล *Planobispora* มีถุงหุ้มสปอร์รูปทรงกระบอก (F) สกุล *Planotetraspora* มีถุงหุ้มสปอร์รูปทรงกระบอก (G) สกุล *Planopolyspora* มีถุงหุ้มสปอร์รูปท่อ (H) สกุล *Spirillospora* มีถุงหุ้มสปอร์รูปทรงกลม และ (I) สกุล *Streptosporangium* มีถุงหุ้มสปอร์รูปทรงกลม (Li et al., 2016b)

#### 2.4.1.2 ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Cultural characteristics)

ลักษณะการเจริญของแอกติโนมัยสีทบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารแตกต่างกัน เนื่องจากแอกติโนมัยสีทบางชนิดสามารถเจริญโดยใช้สารประกอบที่มีโครงสร้างง่าย ๆ บางชนิดสามารถเจริญในสารประกอบเชิงซ้อน ซึ่งการเจริญในสารอาหารต่าง ๆ ทำให้แอกติโนมัยสีทมีลักษณะการเจริญที่แตกต่างกัน โดยศึกษาลักษณะการเจริญของสีของเส้นใยอาหาร สีของเส้นใยอากาศ รวมทั้งการสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้

#### 2.4.1.3 ลักษณะทางสรีรวิทยา และชีวเคมี (Physiological and biochemical characteristics)

ลักษณะทางสรีรวิทยา และชีวเคมี เป็นหนึ่งในลักษณะทางฟีโนไทป์ที่สำคัญในการจัดจำแนกระดับสปีชีส์ของแอกติโนมัยสีท โดยใช้ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน 16S rRNA เพื่อวิเคราะห์หาแอกติโนมัยสีทที่มีความใกล้เคียงกันมาทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของลักษณะทางฟีโนไทป์ (Li et al., 2016a)

##### 1) การใช้แหล่งคาร์บอน (Utilization of carbon source)

ในธรรมชาติแอกติโนมัยสีทอาศัยอยู่ในแหล่งที่มีสารอาหารหลากหลาย และใช้สารอาหารเหล่านั้นเป็นแหล่งสำหรับการเจริญ แอกติโนมัยสีทแต่ละชนิดสามารถใช้แหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน ความแตกต่างนี้สามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนกได้ในระดับสปีชีส์

##### 2) การใช้แหล่งไนโตรเจน (Utilization of nitrogen source)

แอกติโนมัยสีทต้องการแหล่งไนโตรเจนจากสารอินทรีย์ หรืออนินทรีย์เพื่อใช้ในการเจริญ เนื่องจากไม่สามารถสร้างกรดอะมิโนที่จำเป็นเองได้ แม้ว่าแอกติโนมัยสีทเจริญได้ค่อนข้างช้าในแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ (Tiwari and Shrestha, 2003)

3) ความสามารถในการเจริญของแอกติโนมัยสีทที่อุณหภูมิต่าง ๆ (Temperature range for growth)

แอกติโนมัยสีทส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 23-40 องศาเซลเซียส (mesophile) แอกติโนมัยสีทที่แยกจากแหล่งที่อุณหภูมิต่ำจะเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิประมาณ 10-15 องศาเซลเซียส (psychrophilic) บางชนิดที่แยกจากน้ำพุร้อน หรือทะเลทรายสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 70 องศาเซลเซียส (thermophilic) (Agarwal and Mathur, 2016)

##### 4) ความสามารถในการเจริญของแอกติโนมัยสีทที่ pH ต่าง ๆ

แอกติโนมัยสีทสามารถเจริญได้ในสิ่งแวดล้อมที่ pH ต่าง ๆ โดยทั่วไปแอกติโนมัยสีทที่เจริญได้ที่ pH ต่ำกว่า 5.4 เรียกว่า acidophile แอกติโนมัยสีทที่เจริญได้ที่ pH อยู่ในช่วง 5.4-8.0 เรียกว่า neutrophile และที่เจริญได้ที่ pH สูงกว่า 8.0 เรียกว่า alkalophile (Shivlata and Tulasi, 2015)

#### 5) ความสามารถในการเจริญของแอคติโนมัยสีทบนอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

เป็นการบ่งบอกถึงสภาวะในการเจริญ และใช้ความสามารถในการทนเกลือเพื่อจัดจำแนกความแตกต่างของแอคติโนมัยสีท นอกจากนี้แอคติโนมัยสีทที่สามารถเจริญได้ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือสูงมีความน่าสนใจเกี่ยวกับความหลากหลายของสารเมตาบอไลต์อีกด้วย (Imada et al., 2010)

#### 6) การย่อยสลายแป้ง (Starch hydrolysis)

แอคติโนมัยสีทสามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ เช่น แป้งที่เป็นพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide) พบมากในพืช ประกอบไปด้วยอะไมโลส (amylose) และอะไมโลแพคติน (amylopectin) โดยอะไมโลสประกอบด้วยน้ำตาลดี-กลูโคส เชื่อมกันด้วยพันธะ 1,4-แอลฟาไกลูโคซิดิก (1,4- $\alpha$ -glucosidic) และอะไมโลแพคตินที่ประกอบด้วยน้ำตาลดี-กลูโคสที่เชื่อมกันด้วยพันธะ 1,4-แอลฟาไกลูโคซิดิก และ 1,6-แอลฟาไกลูโคซิดิก (1,6- $\alpha$ -glucosidic) การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งเป็นการตรวจสอบสมบัติการสร้างเอนไซม์อะไมเลส (amylase)

#### 7) การย่อยเจลาติน (Gelatin hydrolysis)

เจลาตินเป็นโปรตีนโมเลกุลใหญ่พบในคอลลาเจน (collagen) เป็นองค์ประกอบหลักของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) การย่อยเจลาตินเป็นการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เจลาติเนส (gelatinase) ใช้ในการย่อยเจลาตินเป็นกรดอะมิโน การศึกษาคุณสมบัติในการย่อยเจลาตินถูกนำมาใช้ในการจัดจำแนกแอคติโนมัยสีท

#### 8) การรีดิวซ์ไนเตรต (Nitrate reduction)

เมื่อไนเตรตถูกเปลี่ยนเป็นไนไตรต์จะถูกขนส่งเข้าสู่เซลล์โดยผ่านตัวรับที่จำเพาะ พบได้ในแอคติโนมัยสีทบางสายพันธุ์ เช่น *Sanguibacter keddieii* และ *Geodermatophilus obscurus* เป็นต้น ไนไตรต์ ( $\text{NO}_2^-$ ) ที่ได้จากปฏิกิริยาจะถูกเปลี่ยนเป็นแอมโมเนีย ( $\text{NH}_4$ ) หลังจากนั้นเปลี่ยนเป็นกลูตามีน (glutamine) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดอะมิโน (Meng et al., 2017)

#### 9) การย่อยโปรตีนในนม

หางนม หรือนมขาดมันเนย (skim milk) ประกอบด้วยน้ำตาลแลคโตส (lactose) และโปรตีนเคซีน (casein) เป็นการศึกษาความสามารถในแบคทีเรียบางชนิดที่สามารถสร้างกรดแลคติก (lactic acid) จากการใช้น้ำตาลแลคโตส ทำให้ pH ของนํ้านมลดลงและโปรตีนเคซีนเสียสภาพกลายเป็นลิ่มแข็ง (acid curd) แบคทีเรียบางชนิดสามารถย่อยโปรตีนเคซีนโดยเอนไซม์ที่ทำหน้าที่คล้ายเอนไซม์เรนนิน (rennin like enzyme) ทำให้นํ้านมจับเป็นก้อนนิ่ม หรือตะกอนลิ่มเล็ก ๆ แยกชั้นระหว่างส่วนใสและลิ่มละเอียด (rennet curd) และแบคทีเรียบางชนิดสร้างเอนไซม์โปรติเอส (protease) ย่อยสลายโปรตีนเคซีนในนม (peptonization) ทำให้นํ้านมมีลักษณะใส จึงนำหางนมมาใช้ในการจัดจำแนกแอคติโนมัยสีท (El-Sabbagh et al., 2012)

#### 10) คุณสมบัติในการย่อยยูเรีย

เป็นการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (urease enzyme) เพื่อย่อยยูเรีย (Urea) ไปเป็นแอมโมเนีย ( $\text{NH}_4$ ) และคาร์บอนไดออกไซด์ ( $\text{CO}_2$ ) เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการเจริญ อีกทั้งเป็นการใช้ยูเรียที่มีการปนเปื้อนอยู่ในแหล่งธรรมชาติอีกด้วย (Pradhan et al., 2015)

#### 11) คุณสมบัติในการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ ( $\text{H}_2\text{S}$ )

แอกติโนมัยสีทบางชนิดมีความสามารถในการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์โดยการรีดิวซ์ซัลเฟอร์ (sulfur) เป็นหนึ่งในการทดสอบที่ใช้ในการจัดจำแนก อีกทั้งแอกติโนมัยสีทหลากหลายสกุลถูกนำไปใช้ในการควบคุมศัตรูพืชด้วยชีววิธี การทดสอบความสามารถในการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่มีความเป็นพิษต่อพืชจึงเป็นสิ่งสำคัญ

#### 12) คุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส

ใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase) โดยทั่วไปเป็นแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจนในการเจริญ โดยทำหน้าที่ในการขนส่งอิเล็กตรอนไปให้ออกซิเจน ( $\text{O}_2$ ) ซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในปฏิกิริยาการถ่ายทอดอิเล็กตรอน (electron transport chain)

#### 13) คุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส

เอนไซม์คะตะเลส (catalase) ทำหน้าที่สลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) เป็นผลผลิตจากการโบไฮเดรตเมทาบอลิซึม (carbohydrate metabolism) มีความเป็นพิษต่อเซลล์แบคทีเรีย

#### 14) คุณสมบัติในการย่อยสารประกอบไม่ละลายน้ำ (insoluble compounds)

เป็นการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียในการสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสารประกอบที่ไม่ละลายในน้ำ เช่น อะดีนีน (adenine) ไฮโปแซนทีน (hypoxanthine) แซนทีน (xanthine) เป็นเบสพิวรีน (purine) ใช้ในการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก (nucleic acid) แอล-ไทโรซีน (L-tyrosine) เป็น aromatic amino acid และเซลลูโลส (cellulose) เป็นคาร์โบไฮเดรตพบมากในพืช (Bora et al., 2015)

#### 15) ความสามารถในการสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรต

แบคทีเรียสามารถสร้างกรดจากแหล่งคาร์บอนจำพวกคาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ ได้ เช่น กลูโคส (glucose) ไซโลส (xylose) แมนนิทอล (mannitol) ราฟฟิโนส (raffinose) และแมนโนส (mannose) เป็นต้น (Georg et al., 1964)

## 2.4.2 ลักษณะอนุกรมวิธานเคมี

เป็นการศึกษาลักษณะองค์ประกอบทางเคมีของโครงสร้างต่าง ๆ ของแอกติโนมัยซีท์ ได้แก่

### 2.4.2.1 ไขมันชนิดมีขั้ว (polar lipid)

ฟอสโฟลิปิด (phospholipids) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์มีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการเข้าออกของสาร ฟอสโฟลิปิดเกิดจากการรวมตัวของกรดไขมัน (fatty acid) 2 โมเลกุล และหมู่ฟอสเฟต (phosphate group) มีคุณสมบัติเป็นแอมฟิพาธิค (amphipathic) เนื่องจากโมเลกุลมีทั้งส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) โครงสร้างของฟอสโฟลิปิดชนิดต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 2.1 ฟอสโฟลิปิดชนิดต่าง ๆ สามารถใช้ในการจัดจำแนกแอกติโนมัยซีท์ได้ออกเป็น 5 กลุ่ม ตามรูปแบบที่แสดงดังตารางที่ 2.2 แอกติโนมัยซีท์ส่วนใหญ่พบฟอสโฟลิปิดชนิด ไดฟอสฟาทีดิลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) ฟอสฟาทีดิลอินโนซิทอล (phosphatidylinositol) และฟอสฟาทีดิลอินซิทอลแมนโนไซด์ (phosphatidylinositolmannosides)

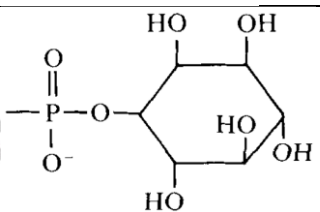
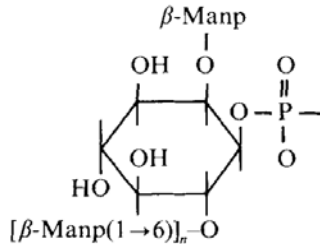
### 2.4.2.2 กรดมัคคอลลิก (mycolic acids)

กรดมัคคอลลิก คือสารพวก 2-alkyl-3-hydroxy fatty acids เป็นกรดไขมันที่มีหมู่แอลคิลมาเกาะที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และหมู่ไฮดรอกซิลเกาะที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (รูปที่ 2.10) กรดมัคคอลลิกประกอบด้วยคาร์บอนประมาณ 24-90 อะตอม พบได้ทั้งในชั้นของไขมันและไกลโคลิปิดเป็นตัวเชื่อมระหว่างชั้นของไขมันกับชั้นของผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่มีผนังเซลล์รูปแบบ IV (มีกรดไดอะมิโนพีเมสิกชนิด *meso* และน้ำตาลอะราบินอส และกาแลคโตส) กรดมัคคอลลิกที่พบในผนังเซลล์ของแบคทีเรียมีหลายชนิด เช่น ไกลโคลิปิด (glycolipids) และไกลโคเปปติโดลิปิด (glycopeptidolipids) ในแอกติโนมัยซีท์มักพบในสกุล *Mycobacterium* *Nocardia* *Rhodococcus* และ *Corynebacterium*

ตารางที่ 2.1 ฟอสโฟลิปิดที่พบในแบคทีเรีย (Komagata and Suzuki, 1988)

ชนิดของฟอสโฟลิปิด	ตัวย่อ	X
Phosphatidylcholine	PC	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ -\text{P}-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \\   \\ \text{O}^- \end{array}$
Phosphatidylethanolamine	PE	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ -\text{P}-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \\   \\ \text{O}^- \end{array}$

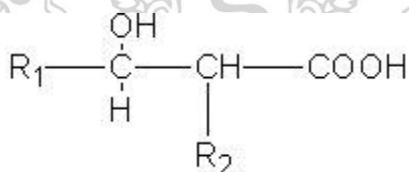
ตารางที่ 2.1 ฟอสโฟลิปิดที่พบในแบคทีเรีย (ต่อ)

ชนิดของฟอสโฟลิปิด	ตัวย่อ	X
Phosphatidylserine	PS	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ -\text{P}-\text{OCH}_2\text{CHCOO}^- \\   \\ \text{O}^- \quad \text{NH}_2 \end{array}$
Phosphatidylinositol	PI	
Phosphatidylinositolmannosides	PIMs	
Phosphatidylglycerol	PG	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{OPO}_2^- \\   \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\   \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$
Diphosphatidylglycerol	DPG	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{OPO}_2^- \quad \text{CH}_2\text{OCO R}'' \\   \quad \quad \quad   \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \quad \quad \text{H}-\text{C}-\text{OCOR}''' \\   \quad \quad \quad   \\ \text{CH}_2-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2 \\    \\ \text{O}^- \end{array}$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 รูปแบบของฟอสโฟลิปิดที่พบในแอกติโนมัยสีท (Komagata and Suzuki, 1988)

รูปแบบ	ชนิดของฟอสโฟลิปิด					แอกติโนมัยสีท
	PG	PC	PE	PME	GLUNU	
PI	-	-	-	-	-	<i>Actinomadura</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Microtetraspora</i> , <i>Nocardioides</i>
PII	-	-	+	-	-	<i>Actinoplanes</i> , <i>Chainia</i> , <i>Dactylosporangium</i> , <i>Microellobosporia</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Micropolyspora brevicatena</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Streptovercillum</i>
PIII	+	+	-	+	-	<i>Micropolyspora faeni</i> , <i>Nocardia</i> <i>autotrophica</i> , <i>Nocardiosis</i> , <i>Pseudonocardia</i>
PIV	-	-	+	-	+	<i>Intrasporangium</i> , <i>Microbispora</i> , <i>Streptosporangium</i>
PV	+	-	-	-	+	<i>Oerskovia</i> , <i>Promicromonospora</i>



รูปที่ 2.10 โครงสร้างของกรดไขมันคอลลิก (Komagata and Suzuki, 1988)

R<sub>1</sub> คือ คาร์บอนอะตอมของกรดไขมัน หรือหมู่แทนที่ เช่น หมู่ไฮดรอกซิล เมทอกซิล คีโต หรือคาร์บอกซิล

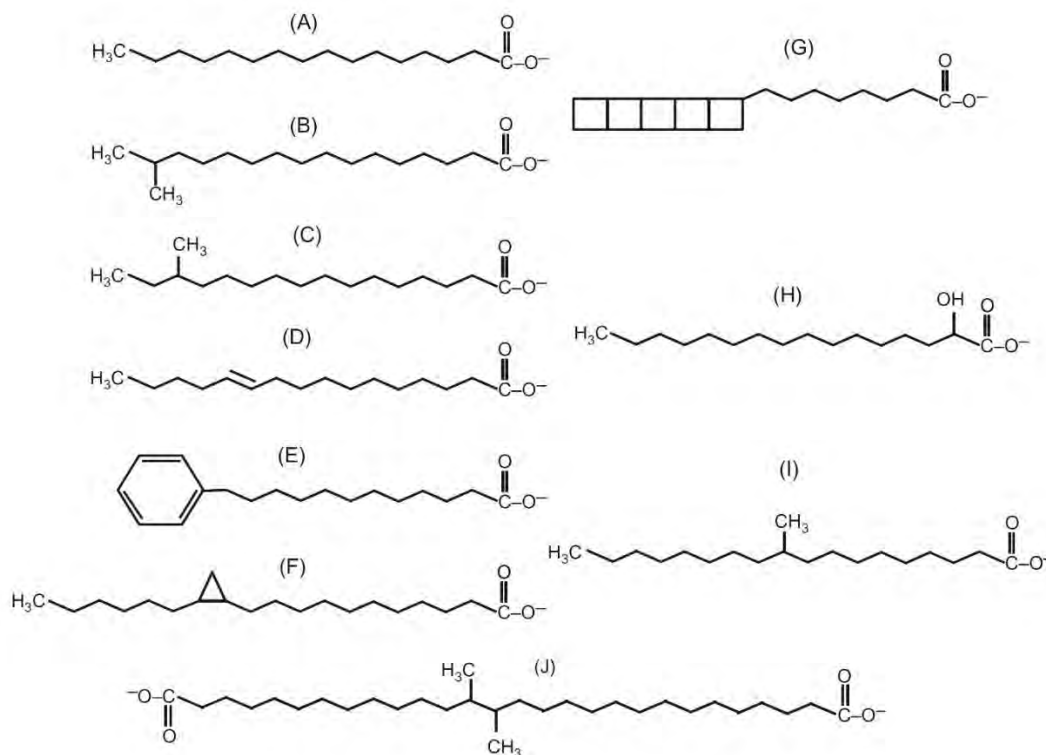
R<sub>2</sub> คือ หมู่แอลคิล

#### 2.4.2.3 กรดไขมันในเซลล์ (cellular fatty acids)

กรดไขมันเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของไขมันในเซลล์ พบอยู่ในส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ ได้แก่ ไขมันชนิดมีขั้ว และไกลโคลิปิด กรดไขมันมีคุณสมบัติเป็นแอมฟิพาธิค (amphipathic) เนื่องจากในโมเลกุลมีทั้งส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) แบคทีเรียมีกรดไขมันหลากหลายชนิด ทั้งกรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid) กรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

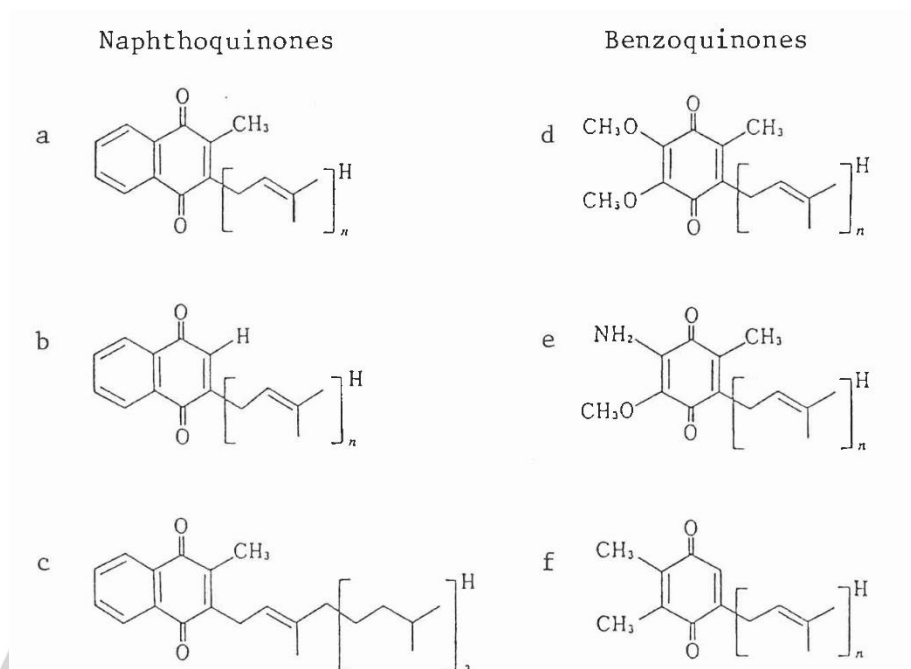
acid) กรดไขมันแบบมีกิ่งก้าน (iso- and anteiso-branched fatty acids) กรดไขมันไฮดรอกซี (hydroxy fatty acids) และ cyclopropane fatty acids เป็นต้น (รูปที่ 2.11) (Da Costa et al., 2011) รูปแบบของกรดไขมันที่พบสามารถใช้จัดจำแนกแอกติโนมัยสีทได้



รูปที่ 2.11 ตัวอย่างกรดไขมันที่พบในแบคทีเรีย (A) กรดไขมันอิ่มตัว (B) iso-branched fatty acid (C) anteiso-branched fatty acid (D) กรดไขมันไม่อิ่มตัว (E) cyclohexyl fatty acid (F) cyclopropane fatty acid (G) ladderane fatty acid (H) 2-OH fatty acid (I) internally branched fatty acid และ (J) dicarboxylic fatty acid (Da Costa et al., 2011)

#### 2.4.2.4 ไอโซพรีนอยด์ควิโนน (isoprenoid quinones)

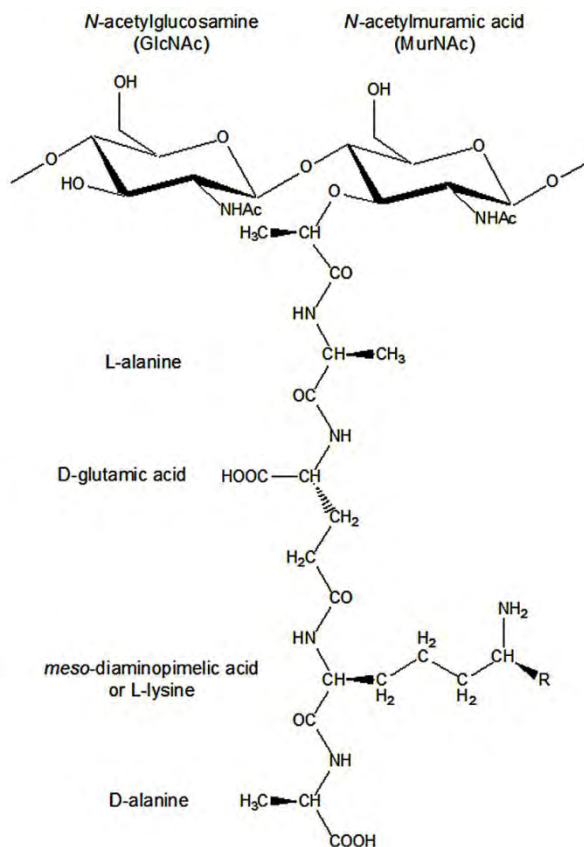
ไอโซพรีนอยด์ควิโนนมีความสำคัญต่อการขนส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจ ในแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจน (aerobic bacteria) พบไอโซพรีนอยด์ควิโนนในเยื่อหุ้มเซลล์ได้หลายชนิด แต่ที่พบในแอกติโนมัยสีทส่วนใหญ่คือ มีนาควิโนน (menaquinone; MK-n( $H_m$ )) และยูบิควิโนน (ubiquinone; Q-n) (รูปที่ 2.12) เมื่อ n คือ จำนวนไอโซพรีน (isoprene units) และ m คือ จำนวนไฮโดรเจนอะตอมที่ทำปฏิกิริยาไฮโดรจิเนชัน (hydrogenation) ไอโซพรีนในพันธะคู่ ถูกใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรีย



รูปที่ 2.12 โครงสร้างไอโซพรีนอยด์ควิโนน กลุ่มแนฟโทควิโนน (naphthoquinone); (A) มีนาควิโนน (menaquinone) (B) ดีเมทิลมีนาควิโนน (demethylmenaquinone) (C) ฟิโลควิโนน (phyllloquinone) : กลุ่มเบนโซควิโนน (benzoquinone); (D) ยูบิควิโนน (ubiquinone) (E) โรโดควิโนน (rhodoquinone) (F) พลาสโตควิโนน (plastoquinone) (Hiraishi, 1989)

#### 2.4.2.5 กรดไดอะมิโนพิเมลิก (diaminopimelic acid; DAP)

กรดไดอะมิโนพิเมลิก (diaminopimelic acid) เป็นส่วนประกอบอยู่ในชั้นเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ในผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก รวมทั้งแอคติโนมัยซีท ชั้นเปปติโดไกลแคนของแบคทีเรียประกอบด้วยน้ำตาล N-acetylglucosamine (GlcNAc) เรียงสลับกับน้ำตาล N-acetylmuramic acid (MurNAc) โดยที่กรดอะมิโนที่ยื่นมาจากกรดอะมิโนของ N-acetylmuramic acid ต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ กรดอะมิโนส่วนใหญ่ที่พบคือ L-Alanine, D-Glutamine, meso-2,6-diaminopimelic acid (หรือ L-Lysine) และ D-Alanine (รูปที่ 2.13) จำนวนและชนิดของกรดอะมิโนแตกต่างกันไปในแบคทีเรียแต่ละชนิด กรดไดอะมิโนพิเมลิกเป็นกรดอะมิโนชนิดหนึ่งที่พบในชั้นเปปติโดไกลแคน ประกอบด้วย 3 ไอโซเมอร์ คือ แบบ LL, meso และ 3-Hydroxy (Vollmer et al., 2008)



รูปที่ 2.13 โครงสร้างของเปปติโดไกลแคน ประกอบด้วย N-acetylglucosamine (GlcNAc) และ N-acetylmuramic (MurNAc) ต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก  $\beta$ - (1,4) (McGroty et al., 2013)

แอกติโนมัยซีทในสกุล *Streptomyces* มีกรดไดอะมิโนพิเมลิกแบบ LL จัดเป็นแอกติโนมัยซีททั่วไป (common actinomycetes) แอกติโนมัยซีทในสกุลอื่นจัดเป็นแอกติโนมัยซีทหายาก (rare actinomycetes) ที่พบกรดไดอะมิโนพิเมลิกแบบ meso เช่น *Nocardia* และ *Mycobacterium* บางสกุลพบทั้ง LL และ meso เช่น *Kitasatospora* นอกจากนี้สามารถพบไอโซเมอร์แบบ 3-Hydroxy ในบางสกุลเช่น *Actinoplanes* และ *Ampullariella* ส่วนใหญ่พบไอโซเมอร์แบบ 3-Hydroxy ร่วมกับแบบ meso (Komagata and Suzuki, 1988) ในการจัดกลุ่มของผนังเซลล์แอกติโนมัยซีทแสดงดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบหลักในผนังเซลล์ของแอกติโนมัยสีท (Lechevalier and Lechevalier, 1970)

Cell wall type	DAP		Carbohydrates/Amino acid		
	Meso-	LL-	Arabinose	Galactose	Glycine
I	-	+	-	-	+
II	+*	-	-	-	+
III	+	-	-	-	-
IV	+	-	+	+	-

หมายเหตุ: + คือ ตรวจพบ

\* คือ อาจตรวจพบ hydroxy DAP

#### 2.4.2.6 น้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugars)

ผนังเซลล์ของแบคทีเรียประกอบไปด้วยน้ำตาล ซึ่งองค์ประกอบของน้ำตาลแต่ละชนิดที่พบในแบคทีเรียแกรมบวก รวมทั้งแอกติโนมัยสีท ถูกใช้ในการจัดจำแนกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย รูปแบบชนิดของน้ำตาลที่ใช้ในการจัดจำแนกลักษณะทางเคมีของผนังเซลล์แสดงดังตารางที่

2.4

ตารางที่ 2.4 รูปแบบของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ของแอกติโนมัยสีท ที่ผนังเซลล์ประกอบด้วย meso-DAP (Lechevalier and Lechevalier, 1970)

Pattern	Carbohydrates			
	Galactose	Arabinose	Xylose	Madurose
A	+	+	-	-
B	-	-	-	+
C	-	-	-	-
D	-	+	+	-

#### 2.4.3 ลักษณะทางจีโนมไทป์

เป็นการนำวิธีการทางพันธุกรรมมาใช้ในการระบุจัดจำแนกแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ เพื่อความรวดเร็ว และแม่นยำ โดยให้ความสนใจในส่วนของอาร์เอ็นเอ และดีเอ็นเอ เช่น การจำแนกโดยใช้ยีนเป้าหมาย เช่น ยีน 16S rRNA เป็นยีนที่พบในแบคทีเรียทุกชนิด มีความผันแปรทางวิวัฒนาการต่ำ มีความเป็นบริเวณอนุรักษ์สูง และมีขนาดที่เหมาะสม (ประมาณ 1.5 kb) (Janda and Abbott, 2007) เพื่อศึกษาหาสายวิวัฒนาการของแบคทีเรียโดยวิเคราะห์จากแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษา DNA Sequencing ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ในสิ่งมีชีวิต (complete DNA) โดยเทคนิคพื้นฐานที่ใช้ คือ Polymerase Chain Reaction (PCR) และ Whole Genome Sequencing (WGS)

#### 2.4.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

เทคนิคทางชีวโมเลกุล (molecular technique) ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาการจำแนกสิ่งมีชีวิต โดยศึกษาดีเอ็นเอ ที่เป็นสารพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิต ดังนั้นขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจึงเป็นขั้นตอนที่สำคัญ วิธีการสกัดดีเอ็นเอมีหลากหลาย โดยหลักการและวิธีการมีดังนี้

1.) การทำให้เซลล์แตก (cell lysis) โดยการทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ หรือผนังเซลล์แตกออกเพื่อปลดปล่อยให้ดีเอ็นเอออกมาโดยใช้สารพวก detergent เช่น sodium dodecyl sulfate (SDS) การใช้เอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme) เป็นต้น

2.) การย่อยโปรตีนและอาร์เอ็นเอ (Deproteinization) โดยใช้เอนไซม์โปรติเอส (protease) และอาร์เอ็นเอส (RNase) จากนั้นตกตะกอนโปรตีนด้วย phenol/chloroform บางครั้งอาจเติมเกลือ sodium chloride หรือ sodium acetate เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตกตะกอนโปรตีน

3.) การตกตะกอนดีเอ็นเอ (DNA precipitation) ดีเอ็นเอสามารถตกตะกอนโดยใช้ไอโซโพรพานอล 70 เปอร์เซ็นต์ หรือเอทานอล (70% iso-propanol) หรือ แอบโซลูทเอทานอล (absolute ethanol) แชนั่น เนื่องจากเอทานอลมีความหนาแน่นมากกว่าน้ำ ดังนั้นเอทานอลจะลอยอยู่ด้านบนและละลายในน้ำได้ดีกว่าดีเอ็นเอ ทำให้ดีเอ็นเอจับตัวและตกตะกอน

ตัวอย่างวิธีการสกัดดีเอ็นเอ เช่น สกัดดีเอ็นเอด้วยฟีนอล-คลอโรฟอร์ม (phenol-chloroform method) เป็นวิธีที่ดีที่สุดในการสกัดดีเอ็นเอ วิธีนี้จะได้ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ดีมาก สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ซึ่งเป็นสารประกอบ detergent ที่มีประจุบวกสามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และจับโมเลกุลของกรดนิวคลีอิก (Ketchum et al., 2018)

#### 2.4.3.2 ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR)

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน (amplification) DNA ที่สนใจอย่างจำเพาะในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้น โดยอาศัยหลักการเกี่ยวกับการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ (DNA replication) ที่พบในสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติ

องค์ประกอบหลักของปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

1. ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ที่มีส่วนของสายดีเอ็นเอที่ต้องการ และทราบลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ ปริมาณของดีเอ็นเอต้นแบบต้องเหมาะสมเพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอและความไวที่เหมาะสมต่อปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

2. ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primer) เป็นนิวคลีโอไทด์สายเดี่ยวสายสั้น ๆ มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ (complementary) ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสต้องมีไพรเมอร์อย่างน้อย 1 คู่คือ

(1) ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณปลาย 5' เรียกว่า Forward primer จะจับกับดีเอ็นเอต้นแบบสาย 3' ไป 5' (anti-sense strand)

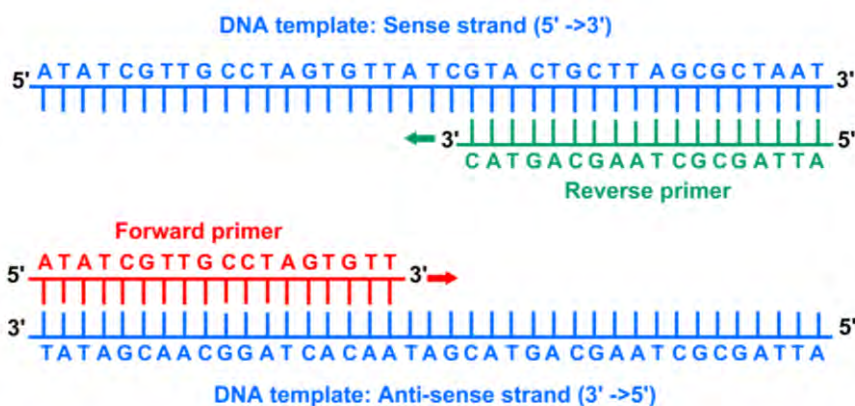
(2) ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณปลาย 3' เรียกว่า Reverse primer จะจับกับดีเอ็นเอต้นแบบสาย 5' ไป 3' (sense strand) (รูปที่ 2.14)

(3) ด็อกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ (Deoxynucleotide triphosphates; dNTPs) ได้แก่ dATP, dTTP, dGTP, dCTP นิวคลีโอไทด์ทั้งสี่ชนิดนี้ใช้ในการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่

(4) เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase) เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสร้างสายดีเอ็นเอที่มีคุณสมบัติทนความร้อนได้สูงถึง 94-95 องศาเซลเซียส โดยไม่เสียสภาพ ปัจจุบันนิยมใช้ Taq DNA polymerase เป็นเอนไซม์ที่สกัดมาจากแบคทีเรียที่มีชื่อว่า *Thermus Aquaticus* (Taq) ซึ่งอาศัยอยู่บริเวณน้ำพุร้อน

(5) PCR buffer ควบคุมสถานะของการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสม

(6) โคแฟกเตอร์ (cofactor) เพื่อช่วยส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ได้แก่ Magnesium ion ( $Mg^{2+}$ )



รูปที่ 2.14 แสดงการจับคู่ของดีเอ็นเอไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (อารีย์รัตน์, 2560)

ขั้นตอนของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน

1. การเสียสภาพของสายดีเอ็นเอ (Denaturation) เป็นการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น เพื่อแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบจากสายคู่ (double strand DNA; dsDNA) เป็นสายเดี่ยว (single strand DNA; ssDNA) โดยทั่วไปใช้อุณหภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับปริมาณของเบส (GC content)

ถ้ามีปริมาณมากต้องเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น เวลาประมาณ 30-60 วินาที การใช้เวลานานและอุณหภูมิที่สูงเกินไป ทำให้เอนไซม์และนิวคลีโอไทด์สูญเสียคุณสมบัติ ในทางตรงข้ามการใช้เวลาน้อยและอุณหภูมิต่ำเกินไป ทำให้สายดีเอ็นเอแยกออกจากกันไม่ได้ดี ทำให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ลดลง

2. การเข้าคู่กันของดีเอ็นเอต้นแบบกับไพรเมอร์ (Annealing) เป็นการลดอุณหภูมิลง โดยทั่วไปใช้อุณหภูมิประมาณ 50 ถึง 66 องศาเซลเซียส ขึ้นกับค่าตำแหน่งของสายดีเอ็นเอต้นแบบและอุณหภูมิการหลอมเหลว (Melting temperature;  $T_m$ ) ของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา ประมาณ 30 วินาที เพื่อให้ไพรเมอร์เข้าจับกับสายดีเอ็นเอต้นแบบ ในบริเวณที่เป็นนิวคลีโอไทด์ที่เป็นคู่สมทั้งสองสายอย่างจำเพาะ

3. การสังเคราะห์สายดีเอ็นเอใหม่ต่อจากไพรเมอร์ (Extension) ทิศทางจาก 5' ไป 3' ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบจากนิวคลีโอไทด์ (dNTPs) ทั้งสี่ชนิดที่ใส่ลงไปในปฏิกิริยา โดยทั่วไป Taq DNA polymerase จะมีอุณหภูมิเหมาะสมในขั้นตอนนี้อยู่ในช่วง 62-72 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับชนิดของ Taq DNA polymerase ระยะเวลาในขั้นตอนนี้อยู่ประมาณ 30-180 วินาที

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันดำเนินการตั้งแต่ขั้นตอนที่ 1-3 หลังทำปฏิกิริยาประมาณ 30-40 รอบ ดีเอ็นเอที่สนใจจะถูกเพิ่มปริมาณขึ้นแบบทวีคูณ ( $2^n$ ;  $n$  = จำนวนรอบที่ใช้ในปฏิกิริยา) หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันได้หลายเทคนิคที่นิยมคือ เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel electrophoresis) เพื่อเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอให้ตรงกับ DNA Marker ขนาด 1.5 kb (อารีย์รัตน์, 2560)

#### 2.4.3.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอบนช่วงยีน 16S rRNA

การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในการจำแนกประเภทและจัดจำแนกแบคทีเรีย ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอบนช่วงยีน 16S rRNA (16S ribosomal ribonucleic acid) เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของหน่วยย่อยขนาดเล็ก (SSU) ของไรโบโซมโปรคาริโอต เป็นยีนที่พบในแบคทีเรียทุกชนิด ภายในยีนมีทั้งบริเวณที่ผันแปร (variable region) และบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ความยาวประมาณ 1,500 bp ถูกนำมาใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ โดยการใช้บริเวณอนุรักษ์เป็นจุดอ้างอิง เพื่อเทียบหาความแตกต่างของบริเวณผันแปรระหว่างสิ่งมีชีวิตได้ในระดับสกุล (genus) วงศ์ (family) และอันดับ (order) นิยมศึกษาโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rRNA ด้วยไพรเมอร์สากล (universal primer) และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) (Hakovirta et al., 2016)

#### 2.4.3.4 จีโนมทั้งหมด (whole genome sequencing)

ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคโนโลยี Next generation sequencing (NGS) หรือ second generation sequencing ซึ่งมีความสามารถในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนม (whole genome)

ของสิ่งมีชีวิตเทียบกับจีโนมอ้างอิงของสิ่งมีชีวิตใกล้เคียง ประกอบด้วยทั้งส่วนที่สามารถแปลเป็นลำดับกรดอะมิโน (coding region) และบริเวณที่ไม่มีการแปลรหัส (non-coding region) ได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ โดยใช้ข้อมูลที่อ่านได้มาวิเคราะห์หาความสมบูรณ์ของข้อมูลและนำไปวิเคราะห์หาสปีชีส์ต่อไป (อารีย์รัตน์, 2560)

#### 2.4.3.5 การวิเคราะห์ลำดับเบสในสายดีเอ็นเอ

การหาลำดับเบสของสายดีเอ็นเอในยุคแรก (First generation sequencing) คือการหาลำดับเบสโดยวิธีแซงเกอร์ (Sanger sequencing) อาศัยการใช้ dideoxynucleotide triphosphates (ddNTPs) เป็นตัวหยุดการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ โดยแบ่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเป็น 4 ปฏิกิริยา ในแต่ละปฏิกิริยาจะมีไพรเมอร์ซึ่งจะเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ และเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส (DNA polymerase) และ dideoxynucleotide triphosphates ประกอบด้วย ddATP, ddCTP, ddGTP ทำการเติม ddTTP ลงในแต่ละปฏิกิริยาเพื่อสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ ในแต่ละปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ จะหยุดเมื่อมี dideoxynucleotide triphosphates เข้าจับทำให้แต่ละปฏิกิริยามีชิ้นดีเอ็นเอหลากหลายขนาด ผลผลิตของทั้ง 4 ปฏิกิริยานำมาวิเคราะห์ขนาดด้วยเจลพอลิอะครีลาไมด์ (polyacrylamide gel) และใช้วิธีออโตเรดิโอกราฟี (autoradiograph) แสดงแถบดีเอ็นเอ ต่อมาได้มีการปรับปรุงให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยใช้สีย้อมฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence dye) แทนการใช้สารกัมมันตรังสีในวิธีออโตเรดิโอกราฟี และรวมปฏิกิริยาเข้าด้วยกัน วิธีแซงเกอร์สามารถวิเคราะห์ลำดับเบสขนาด 500-800 bp เนื่องจากมีข้อจำกัดในการอ่านลำดับเบส จึงได้มีการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ที่เรียกว่า การวิเคราะห์ลำดับเบสแบบช็อตกัน (shotgun sequencing) โดยตัดชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ให้มีขนาดเล็กลงและให้มีส่วนซ้อนทับกัน (overlapping) ของชิ้นดีเอ็นเอเพื่อนำข้อมูลลำดับเบสมาเชื่อมกันได้เป็นข้อมูลที่มีขนาดใหญ่ และวิธีการของ sanger มีข้อจำกัดคือ สามารถทำได้ครั้งละ 1 ตัวอย่างของดีเอ็นเอสายสั้น ๆ เท่านั้น จึงเหมาะกับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์สายสั้น เช่น ลำดับนิวคลีโอไทด์บนช่วงยีน 16S rRNA ปัจจุบันจึงมีการพัฒนาให้สามารถวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอได้หลายตัวอย่าง หลายตำแหน่งยีนจากคลังดีเอ็นเอ (DNA library) ต้นแบบที่เตรียมโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ทำให้ได้ข้อมูลลำดับเบสปริมาณมากในเวลาอันรวดเร็ว มีรูปแบบที่นิยมใช้อยู่ 4 รูปแบบ คือ 454/Roche genome sequencer, Illumina Genome Analyzer, Applied Biosystems SOLiDTM Sequencer (SOLiD) และ Ion Personal Genome Machine (PGM)

#### 2.4.3.7 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล (blast)

เป็นการนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาค้นหาความเหมือนหรือความแตกต่าง (identity and similarity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล (database) ของ

สิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้เคียงกัน เปรียบเทียบความเหมือนกันระหว่างสายลำดับดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ หรือ โปรตีนมากกว่าสองเส้นของยีนเดียวกัน ซึ่งอาจจะเป็นลำดับเบสจากแบคทีเรียชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์ หรือสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน สามารถนำมาใช้ในการแบ่งกลุ่มเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตได้ (ณลักษณ์ และคณะ 2558) โดยมี algorithms ในการคำนวณที่แตกต่างกันไปตามแต่วัตถุประสงค์ของการทำงาน ซึ่งในปัจจุบันได้มีการออกแบบโปรแกรม blast ให้เลือกใช้งานตามแต่วัตถุประสงค์ของงานที่ต้องการศึกษา โดย blast ที่นิยมเลือกใช้ งานได้แก่ blastn, blastp, blastx, tblastn, tblastx และ PSI-BLAST เป็นต้น

#### 2.4.4 ชีวสารสนเทศ (Bioinformatics)

ชีวสารสนเทศเป็นการผนวกความรู้หลายด้านทั้งทางชีววิทยา เคมี คณิตศาสตร์ และ คอมพิวเตอร์ ปัจจุบันมีโปรแกรมทางชีวสารสนเทศเพื่อรองรับความต้องการการใช้งานประยุกต์ต่าง ๆ รวมทั้งการวิเคราะห์ข้อมูลจากการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการทำงานทางชีวโมเลกุลในการจัดจำแนกของสิ่งมีชีวิตโดยเทียบความคล้ายคลึงจากลำดับนิวคลีโอไทด์ และสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นจึงมีการนำชีวสารสนเทศมาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมที่มีจำนวนมาก (ชมภูนุช และวรวุฒิ 2553)

2.4.4.1 อัลกอริธึมและโปรแกรมที่ใช้ในการจัดเรียงลำดับเบส (mapping) และโปรแกรมสำหรับใช้ในประกอบเรียงชิ้นลำดับเบสของดีเอ็นเอใหม่ (DNA sequence assembly)

เทคโนโลยี NGS สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตได้ในเวลาอันรวดเร็ว แต่ด้วยจำนวนข้อมูลของลำดับเบสสายสั้น (reads) มีจำนวนมากทำให้ยากต่อการวิเคราะห์ข้อมูล ดังนั้นประสิทธิภาพและจำนวนของ reads ที่เข้าคู่กัน อาจจะไม่ใช่การเข้าคู่กันของ reads ที่แท้จริง ปัจจุบันมีการคิดค้นเครื่องมือทางชีวสารสนเทศโดยเฉพาะงานทางด้านการจัดเรียงและเชื่อมต่อลำดับ นิวคลีโอไทด์ (alignment reads) สามารถแบ่งเป็นสองหลักการด้วยกัน คือ (1) การบ่งชี้ตำแหน่งในจีโนม (index genome) ด้วยวิธี BWT (Burrows-Wheeler space transformation) ซึ่งช่วยลดหน่วยความจำเป็นหลักสำคัญ เช่นโปรแกรม Bowties และ SOAP และ (2) การสร้างตารางอ้างอิงตำแหน่ง (hash table) ซึ่งสามารถทำได้เป็นสองแบบ คือ การให้จีโนมเป็นตัวบ่งชี้ หรือลำดับนิวคลีโอไทด์ของ reads เป็นตัวบ่งชี้ ตัวอย่างโปรแกรมที่ใช้วิธีสร้างตารางอ้างอิงตำแหน่ง และใช้ reads เป็นตัวบ่งชี้ เช่น MAQ, SHRiMP และ Newbler สำหรับโปรแกรมที่ใช้วิธีสร้างตารางอ้างอิงตำแหน่ง และใช้จีโนมเป็นตัวบ่งชี้ เช่น Bowtie, BWA, Mosaik, SOAP, PASS, SSAHA2

โปรแกรมต่างๆ ข้างต้น บางโปรแกรมไม่สนับสนุนข้อมูลที่ได้จากเครื่อง 454/Roche genome sequencer เช่น SOAP และ MAQ เป็นต้น ปัจจุบันมีโปรแกรมที่เกิดขึ้นใหม่ เช่น TAPyR ซึ่ง

ใช้วิธีการผสมผสานของ 2 อัลกอริธึม มาจัดการกับข้อมูลสำหรับเครื่อง Illumina และ 454/Roche genome sequencer และแก้ปัญหาของข้อมูลที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำ 1 เบส (homopolymer)

โปรแกรมสำหรับใช้ในการประกอบเรียงชิ้นลำดับนิวคลีโอไทด์ (fragment assembly) อาศัยหลักการ คือ การจัดกลุ่มรวมกันของชิ้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอสายสั้นๆ เป็น contig จาก contig รวมกันเป็น contig ที่ยาวขึ้น หรือที่เรียกว่า scaffold เพื่อประกอบเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอสายใหม่ โดยแบ่งได้เป็น 2 วิธี ได้แก่ *de novo* approach มีเป้าหมายในการสร้างจีโนมใหม่ (reconstruction) สามารถทำได้โดยไม่ต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง และ resequencing หรือ comparative approach ที่มีการแมป reads โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงเป็นตัวเปรียบเทียบ เพื่อให้ได้สายใหม่จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตนั้น ปัจจัยที่มีผลต่อการวิเคราะห์คือ ความยาวและปริมาณของ reads ถ้า reads ที่สั้น มักมีลักษณะที่เป็นนิวคลีโอไทด์ซ้ำเกิดขึ้นมาก ทำให้การประกอบเรียงชิ้นลำดับนิวคลีโอไทด์ทำได้ค่อนข้างยาก การจัดการกับปริมาณของ reads ที่มีจำนวนเยอะ และค่อนข้างสั้น ประมาณ 35 ถึง 400 bp ส่งผลต่อการออกแบบการประกอบเรียงชิ้นลำดับเบสเพื่อให้ได้ค่า coverage ที่ดี (อลิษา และคณะ 2555)

#### 2.4.4.2 การระบุตำแหน่งและทำนายหน้าที่ของยีนในจีโนม (genome annotation)

เป็นการระบุตำแหน่งของยีน (annotation) เมื่อทราบการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอทั้งหมดแล้วจึงค้นหาตำแหน่งของยีนในข้อมูลจีโนมทั้งหมด ทั้งนี้อาจทำได้โดยการค้นหารหัสบ่งชี้การเริ่มต้นและสิ้นสุดของยีน หรือโดยการเปรียบเทียบกับยีนที่รู้ข้อมูลแล้ว สามารถทำได้โดยใช้ชีวสารสนเทศกับคุณสมบัติเฉพาะ ประกอบด้วย (1) ตัวส่งสัญญาณ (signal sensors) เช่น TATA box, start และ stop Codon หรือ การตรวจจับสัญญาณ poly-A (2) ตัววัดกระแส (content sensors) เช่น G+C content, codon usage หรือ การตรวจจับความถี่ของ dicodon และ (3) ความคล้ายคลึง เช่น ระหว่างโปรตีนของสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้เคียงกัน mRNA จากสิ่งมีชีวิตเดียวกัน และจีโนมของสิ่งมีชีวิตที่ใช้อ้างอิง

การระบุตำแหน่งและทำนายหน้าที่ของยีนในจีโนม แบ่งออกเป็น 3 แบบ

(1) การวิเคราะห์ระดับนิวคลีโอไทด์ ที่ระบุตำแหน่งและองค์ประกอบของสายดีเอ็นเอ เช่น ยีน RNA หรือบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำ ๆ (repetitive elements) ข้อจำกัดของการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) และการเชื่อมต่อชิ้นส่วนนิวคลีโอไทด์ (assembly) โดยมีการเพิ่มหรือตัดยีนออก โดยยีนที่ถูกเพิ่มเข้ามา เรียกว่า pseudogenes

(2) การวิเคราะห์ระดับโปรตีน ค้นหาความเป็นไปได้ในการทำงานของยีน และการมี หรือไม่มี ยีนเหล่านั้นในสิ่งมีชีวิต

(3) การวิเคราะห์ระดับกระบวนการ ที่มีจุดมุ่งหมายในการระบุวิถีและกระบวนการในยีนต่าง ๆ (Sa et al., 2018)

#### 2.4.4.3 การคำนวณค่า Average Nucleotide Identity (ANI)

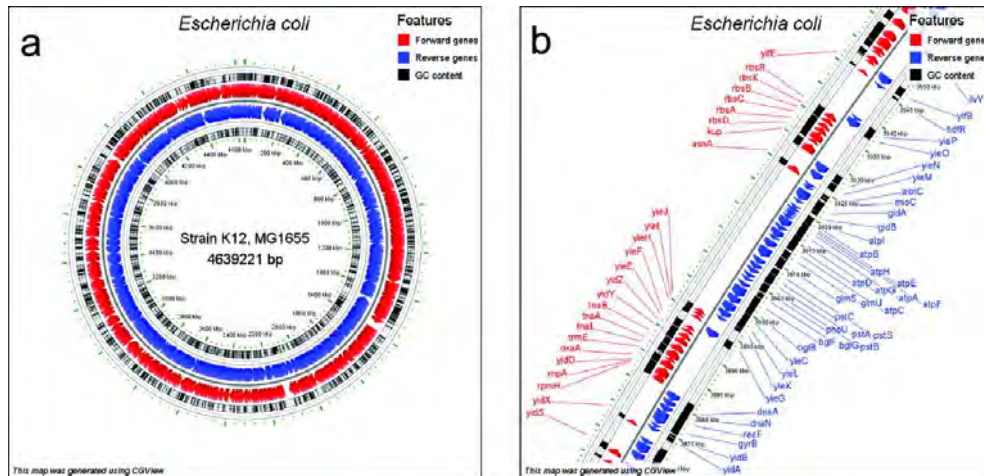
เป็นการวัดความคล้ายคลึงกันของนิวคลีโอไทด์ในบริเวณยีนที่สามารถแปลรหัสได้ (coding regions) ระหว่างจีโนมของสิ่งมีชีวิตจำพวกโปรคาริโอตโดยเปรียบเทียบกับปริมาณ G+C content ถ้าจีโนมของสิ่งมีชีวิตที่นำมาเปรียบเทียบกับกันมีค่า ANI มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ ถือว่าเป็นสิ่งมีชีวิตสายพันธุ์เดียวกัน หรือจีโนมของสิ่งมีชีวิตที่ใกล้เคียงกันมาก การคำนวณค่า ANI สามารถใช้ได้หลายเซิร์ฟเวอร์ เช่น JSpecies (<http://www.imedeia.uib.es/jspecies>) และ Gegenees (<http://www.gegenees.org/documentation.html>) หรือการคำนวณผ่านซอฟต์แวร์ออนไลน์ เช่น EzGenome (<http://www.ezbiocloud.net/ezgenome/ani>) และ ANI calculator (<http://enveomics.ce.gatech.edu/ani/index>) (Figueras et al., 2014)

#### 2.4.4.4 เทคนิค Digital DNA-DNA Hybridization (dDDH)

Digital DNA-DNA hybridizations เป็นอีกหนึ่งเทคนิคที่ใช้ในการแยกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ด้วยการทำไฮบริดเซชันระหว่างจีโนมของจุลินทรีย์ที่สนใจกับสายพันธุ์ใกล้เคียง โดยใช้การคำนวณบนเว็บเซิร์ฟเวอร์ Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC) (<http://ggdc.dsmz.de/>) (Kayansamruaj et al., 2017) GGDC รองรับข้อมูลจีโนมที่สมบูรณ์ (complete genome) และข้อมูล assembled genome ถ้าจีโนมของสิ่งมีชีวิตที่นำมาเปรียบเทียบกับกันมีค่า dDDH ต่ำกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ถือเป็นข้อบ่งชี้ว่าจุลินทรีย์เป็นคนละสายพันธุ์ (Auch et al., 2010)

#### 2.4.4.5 การแสดงผลจีโนมด้วย circular map

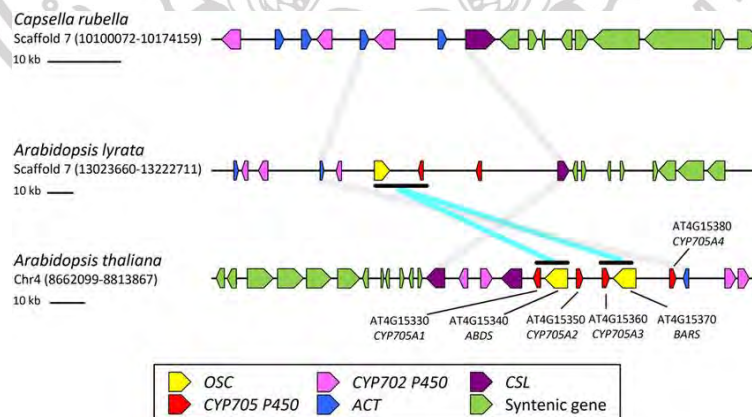
แผนภาพของจีโนมทำให้สามารถศึกษาทางพันธุศาสตร์ และตำแหน่งของยีนง่าย และรวดเร็วมากยิ่งขึ้น อีกทั้งช่วยให้สามารถมองเห็นบริบทของยีนได้และสามารถใช้เพื่อระบุ operons ในแบคทีเรียแต่ละสปีชีส์ มีบทบาทสำคัญในการช่วยวิเคราะห์ข้อมูลจีโนม และอธิบายความสัมพันธ์ของข้อมูลที่ได้ การแสดงผลข้อมูลทางจีโนมด้วย Circular map สามารถทำได้ในซอฟต์แวร์ที่หลากหลาย เช่น The Microbial Genome Viewer เป็นเว็บเซิร์ฟเวอร์ที่ใช้ในการทำแผนภาพของจีโนม GenomePlot เป็นโปรแกรมที่มีระบบปฏิบัติการแบบเดี่ยว (standalone program) และ CGView เป็นโปรแกรม Java application (รูปที่ 2.15) เป็นต้น (Stothard and Wishart, 2005)



รูปที่ 2.15 (a) แผนภาพวงกลมของจีโนมจาก CGView ที่มีการทำเครื่องหมายตำแหน่งของยีน ปริมาณ G+C content ในแต่ละยีน (b) เป็นการแสดงผลบริเวณของยีนที่สนใจ (Stothard and Wishart, 2005)

2.4.4.6 การแสดงผลจีโนมด้วย Synteny map

Synteny เป็นลักษณะของยีนตั้งแต่สองยีนขึ้นไปอยู่บนโครโมโซมเดียวกัน ไม่ว่าจะเชื่อมต่อกันหรือไม่ก็ตาม นักชีววิทยานำ synteny มาใช้กับโครโมโซม 2 ชุดเพื่อเปรียบเทียบกันโดยใช้พื้นฐานมาจากแผนที่ยีนและลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนม ซึ่งต้องอาศัยการใช้อัลกอริทึมและการคำนวณด้วยระบบคอมพิวเตอร์ เพื่อแสดงผลออกมาเป็นรูปภาพ Synteny map อาศัยหลักการของ Homologous gene ซึ่งเป็นยีนแบบอนุรักษ์ (conservative) ของจีโนมที่นำมาเปรียบเทียบกัน การสร้าง synteny map จะเปรียบเทียบรูปแบบที่คล้ายหรือแตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโครงสร้างจีโนม (รูปที่ 2.16) (Soderlund et al., 2006)



รูปที่ 2.16 แสดงแผนที่ Synteny สำหรับบริเวณของยีน ABDS ระหว่าง *Capsella rubella*, *Arabidopsis lyrata* และ *Arabidopsis thaliana* (Soderlund et al., 2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

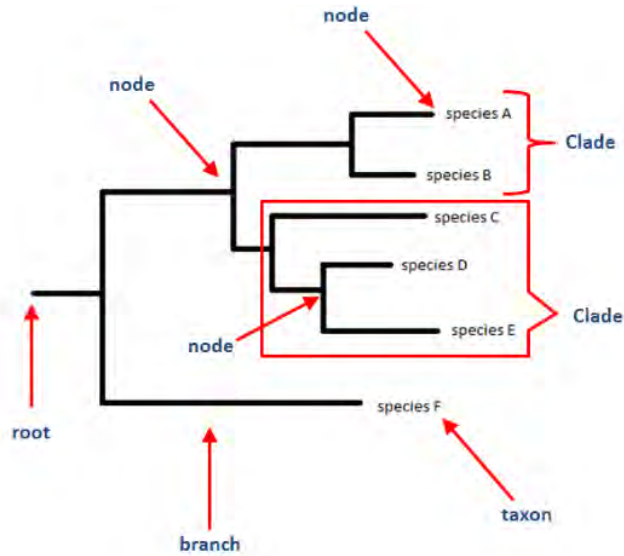
#### 2.4.4.7 ฐานข้อมูล antiSMASH

antiSMASH (antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell) ใช้ศึกษา คาคาการณกลุ่มยีนที่สามารถสร้างสารทุติยภูมิได้ รวมทั้งกลุ่มของสารทุติยภูมินั้น ๆ เช่น โพลีคีไทด์ (polyketides), non-ribosomal peptides, เทอร์ปีน (terpenes), อะมิโนไกลโคไซด์ (aminoglycosides), อะมิโนโคมาริน (aminocoumarins), อินโดโลคาร์บาโซล (indolocarbazoles), แลนติไบโอติก (lantibiotics), แบคทีริโอซิน (bacteriocins), นิวคลีโอไซด์ (nucleosides), เบตา-แลคแทม (beta-lactams), บิวทีโรแลคโตน (butyrolactones), ซิเดอโรฟอร์ (siderophores), เมลานิน (melanins) เป็นต้น โดยสามารถวิเคราะห์กลุ่มยีนที่สร้างสารทุติยภูมิโดยเทียบกับฐานข้อมูล (<http://antismash.secondarymetabolites.org>) (Medema et al., 2011)

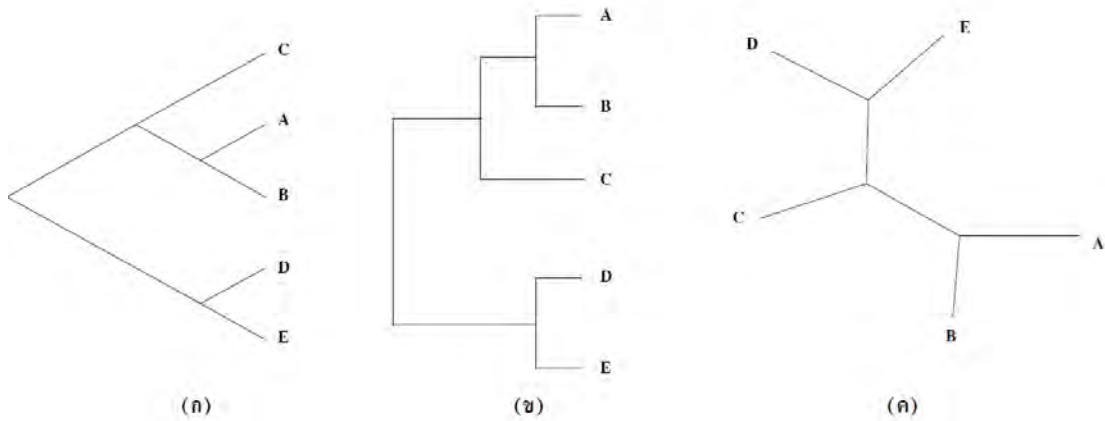
#### 2.4.4.8 ไฟโลเจเนติกกับการจัดหมวดหมู่สิ่งมีชีวิต (phylogenetic tree)

เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต แสดงเป็นแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) มีลักษณะคล้ายต้นไม้ ประกอบด้วยกิ่งก้าน (branch) อาจแตกออกเป็นกิ่งย่อยแบบสองทาง (bifurcation) หรือหลายทาง (multifurcation) ตำแหน่งที่ก้านแตกเป็นกิ่งย่อยที่เป็นจุดต่อ เรียกว่า โหนด (node) โดยที่ปลายสุดของกิ่งจะเป็นลำดับเบส หรือโปรตีน หรือสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต เรียกว่า แทกซอน (taxon) แผนภูมิวิวัฒนาการอาจมีจุดกำเนิดร่วม เรียกว่า ราก (rooted tree) ซึ่งเป็นส่วนยอดที่เป็นตำแหน่งของบรรพบุรุษร่วมของแทกซา (taxa) ทั้งหมด (รูปที่ 2.17) แผนภูมิวิวัฒนาการที่มีรากจะทำให้ทราบทิศทาง บรรพบุรุษในการวิวัฒนาการ ความยาวของก้านที่แตกต่างกันแสดงระยะห่างของวิวัฒนาการ ซึ่งแต่ละก้านอาจมีอัตราเร็วของวิวัฒนาการแตกต่างกัน ระยะห่างอาจแสดงเป็นตัวเลขบนแต่ละก้านหรืออาจเขียนเป็นสเกลความยาวบอกขนาดในภาพ แผนภูมิวิวัฒนาการอาจเขียนในลักษณะเส้นตรงที่แยกออกจากกัน หรืออาจเขียนด้วยเส้นแนวตั้งและแนวนอนเพื่อให้เปรียบเทียบความยาวของก้านได้ง่าย กลุ่มของแทกซาที่กำเนิดมาจากบรรพบุรุษร่วมกันเรียกว่า เคลด (clad) แผนภูมิวิวัฒนาการอาจมีเพียงเคลดเดียวเรียกว่า monophyletic tree หรือมีหลายเคลดเรียกว่า polyphyletic tree แทกซาคู่ใด ๆ ที่เส้นขอบวงไปบรรจบกันเรียกว่า เป็นเพื่อนบ้านกัน (neighbors) สำหรับสปีชีส์ หรือแทกซาที่แยกออกจากสปีชีส์อื่นที่กำลังศึกษาในระยะแรก ๆ ของการวิวัฒนาการจะ เรียกว่า พวกนอกกลุ่ม (outgroup) ซึ่งสปีชีส์เหล่านี้สามารถนำมาใช้เพื่อสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการแบบมีรากได้ (รูปที่ 2.18)

ลักษณะที่ใช้ในการศึกษาสามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา หรือลักษณะในระดับโมเลกุลโดยเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) ของตำแหน่งจำเพาะ (specific site) สามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตได้อย่างแม่นยำ และรวดเร็ว โดยการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะในแอคติโนมัยซีทที่ต้องการจัดจำแนก หรือระบุชนิด จากนั้นจึงสร้างแผนภูมิต้นไม้ด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์



รูปที่ 2.17 ส่วนประกอบของแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ (Liò and Goldman 1998)



รูปที่ 2.18 (ก) และ (ข) แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการที่มีราก (ค) แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการที่ไม่มีราก (สมชาย , 2556)

การวิเคราะห์ข้อมูลทำได้ 2 วิธี ประกอบด้วย

1. การวิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) เป็นการสรุปความแตกต่างโดยการสร้างตารางแมทริกซ์ ซึ่งแสดงระยะห่างและความแตกต่างเป็นค่าตัวเลข ระหว่างลำดับเบส หรือโปรตีนต่างๆ โดยเปรียบเทียบลำดับแต่ละคู่และหาความแตกต่างระหว่างลำดับ และทำการจัดกลุ่มด้วยวิธีต่างๆ เช่น Neighbor-Joining (NJ) วิธีนี้พิจารณาจากแผนภูมิที่ไม่มีราก ประกอบด้วย 4 แทกซา พบว่าผลบวกระยะห่างระหว่างคู่ของเพื่อนบ้านทั้ง 2 คู่ จะน้อยกว่าผลบวกระยะห่างระหว่างคู่ที่

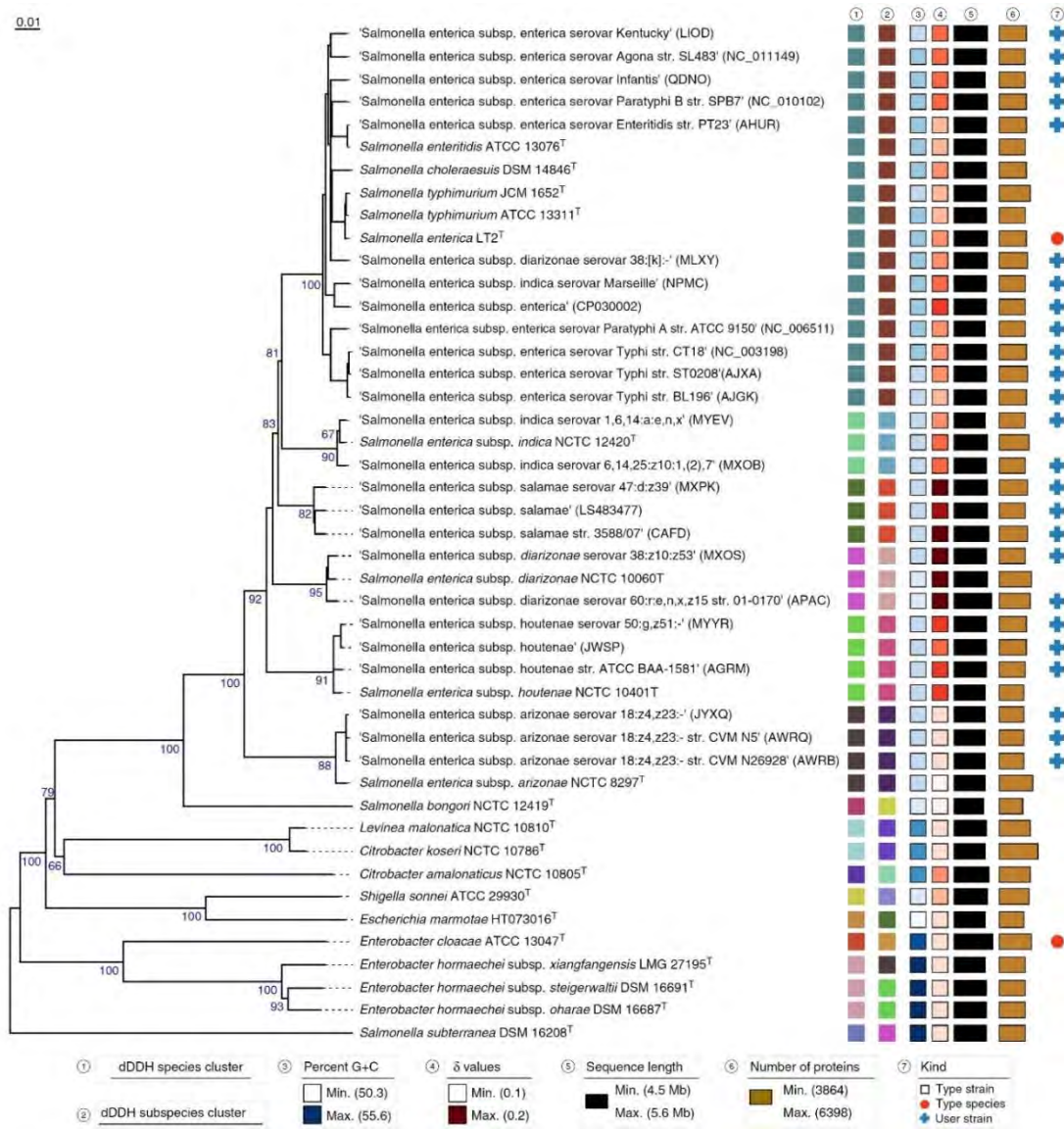
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไม่ใช่เพื่อนบ้านกันเสมอ เรียกว่า เงื่อนไข 4 จุด (4-point condition) และใช้เป็นพื้นฐานในการคำนวณในการทดสอบความถูกต้องในการสร้างแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ (สมชาย, 2556)

2. การวิเคราะห์สภาวะลักษณะ (character state) ของสิ่งเปรียบเทียบ (operational taxonomic unit, OTUs) ข้อมูลลักษณะนี้มาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทำการเปรียบเทียบสามารถนำไปสร้างแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการได้โดยตรง เช่น Maximum parsimony เป็นการเปรียบเทียบและค้นหาแผนภูมิที่สั้นที่สุดนั่นคือ จำนวนการกลายพันธุ์ (mutation) ที่เกิดขึ้นน้อยที่สุดในกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา Maximum likelihood วิธีการนี้คล้ายกับ maximum parsimony แต่แตกต่างตรงที่มีการวิเคราะห์ทางสถิติร่วมด้วย (จินตนา, 2550)

การทดสอบความเชื่อมั่นของสายวิวัฒนาการในแผนภูมิสามารถทำได้ด้วยการวิเคราะห์หาค่าบูทสเตรป (bootstrap analysis) โดยค่าบูทสเตรป (bootstrap value) มาก แสดงว่าสายวิวัฒนาการนั้นมีความเชื่อมั่นสูง และค่าน้อย แสดงว่าสายวิวัฒนาการนั้นมีความเชื่อมั่นต่ำ (สุคนทิพย์, 2562, จินต์ และคณะ, 2558)

นอกจากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตโดยใช้ลำดับเบสจากกลุ่มยีนเพียงกลุ่มเดียวที่มีความเป็นบริเวณอนุรักษ์สูงแล้ว ยังมีการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้จีโนม (phylogenomic tree) ซึ่งการวิเคราะห์มีความซับซ้อนและต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญที่มีความรู้ จึงได้มีการนำชีวสารสนเทศเข้ามาช่วยในการจัดการ โดเมนเว็บไซต์ที่วิเคราะห์ เช่น the Type (Strain) Genome Server (TYGS) (รูปที่ 2.19)



รูปที่ 2.19 แผนภาพ Phylogenomic tree (Meier-Kolthoff and Göker, 2019)

## 2.5 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแอคติโนมัยสีท

แอคติโนมัยสีทมีบทบาทสำคัญในการสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ อีกทั้งพบได้ตามธรรมชาติสารเหล่านั้นมักมีบทบาทสำคัญต่อสิ่งแวดล้อมที่พวกมันอาศัย เช่นการสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสารบางชนิดให้พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ สร้างสารยับยั้งการเจริญสิ่งมีชีวิตอื่น ทำให้แอคติโนมัยสีทเป็นแหล่งสำคัญในการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีการนำมาใช้ประโยชน์ในหลาย ๆ ด้าน ทั้งทางการแพทย์ การเกษตร และทางด้านอุตสาหกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.5.1 การสร้างสารปฏิชีวนะ

สารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ต่อต้านแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัสส่วนใหญ่ได้จากแอคติโนมัยซีทสกุล *Streptomyces* สารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ต่อต้านแบคทีเรีย เช่น สารปฏิชีวนะกลุ่มอมิโนไกลโคไซด์ ได้แก่ สเตรปโตมัยซิน (Streptomycin), นีโอไมซิน (neomycin) และ คานามัยซิน (kanamycin) สร้างจาก *S. griseus*, *S. fradiae* และ *S. kanamyceticus* สารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อรา เช่น นิสตาติน (nystatin), แอมโฟเทอริซิน บี (amphotericin B), นาตาไมซิน (natamycin) สร้างจาก *S. noursei*, *S. nodosus* และ *S. natalensis* นอกจากนี้ยังพบการสร้างสารปฏิชีวนะจากแอคติโนมัยซีทหายาก เช่น *Micromonospora Nocardia Actinomadura Actinoplanes Saccharopolyspora* และ *Streptosporangium* ตัวอย่างสารปฏิชีวนะจาก *Micromonospora* sp. คือ แอนตราไซคลิน (anthracycline) ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Aspergillus fumigates* (Raja and Prabakarana, 2011)

### 2.5.2 การสร้างเอนไซม์

แอคติโนมัยซีทส่วนใหญ่พบในดินมีความสามารถในการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในดินโดยเฉพาะองค์ประกอบของพืชและสัตว์ที่ย่อยสลายยาก ซึ่งแอคติโนมัยซีทหลากหลายชนิดสามารถย่อยสลายสารพวกกรดอินทรีย์ น้ำตาล แป้ง ไขมัน และโปรตีน ตัวอย่างแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น สกูล *Thermomospora* ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) ที่ทำปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส สกูล *Streptomyces* ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายไซแลน (xylan) ซึ่งพบในไม้เนื้อแข็ง เช่น *S. flavogriseus* และ *S. lividans* และยังพบในสกูล *Thermomospora* ที่สามารถทำปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิสูง สกูล *Streptosporangium* สามารถสร้างเอนไซม์ thermostable glucamylase ที่ย่อยแป้ง นิยมใช้ในอุตสาหกรรม (Stamford et al., 2002)

### 2.5.3 การสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืช

แอคติโนมัยซีทที่พบในดินบางชนิดสามารถอยู่บนผิวของพืช หรือภายในเนื้อเยื่อของพืชโดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อพืช มีการอาศัยแบบพึ่งพากัน ได้แก่ *Actinomadura Microbispora Micromonospora Nocardia Nonomurea Mycobacterium Frankia Actinoplanes Saccharopolyspora* และ *Verrucosipora*

เอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทสกุล *Nocardiosis* ที่พบในสัสมันดารีนิ พบว่าสามารถสร้างกรดอินโดล-3-แอซีติก (Indole-3-acetic acid; IAA) ปริมาณมาก และ *S. hygroscopicus* มีการสร้าง pteridic acids A และ B มีหน้าที่คล้ายออกซินทำให้มีการแบ่งเซลล์และยึดตัวในรากของต้นถั่ว (Sathya et al., 2017)

#### 2.5.4 การตรึงไนโตรเจน และละลายฟอสเฟต

แอกติโนมัยสีทบางสกุลสามารถตรึงก๊าซไนโตรเจนได้เมื่ออยู่ร่วมกับรากของพืช ได้แก่ สกุล *Frankia* สามารถตรึงไนโตรเจนในพืชที่นอกเหนือจากตระกูลถั่ว และยังจัดเป็นแอกติโนมัยสีทที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อรากทำให้เกิดปม สกุล *Nocardia* บางสายพันธุ์สามารถตรึงไนโตรเจนได้ แอกติโนมัยสีทสกุลอื่น ๆ ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ เช่น *Arthrobacter Agromyces Corynebacterium Mycobacterium Micromonospora Propionibacteria* และ *Streptomyces*

ฟอสฟอรัสที่อยู่ในดินเป็นรูปของสารประกอบฟอสเฟตที่พืชไม่สามารถนำไปใช้ได้ อีกทั้งฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารที่ละลายน้ำได้ยาก โดยพืชอาศัยแบคทีเรียที่อยู่ในดิน หรือรากในการช่วยละลายฟอสเฟตให้อยู่ในรูปฟอสเฟตไอออนที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ เช่น *Micromonospora endolithica* สามารถละลายฟอสเฟตส่งเสริมต่อการเจริญของต้นถั่ว (Sathya et al., 2017)

#### 2.5.5 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

สารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความสำคัญในการกำจัดอนุมูลอิสระพวก reactive oxygen species (ROS) เช่น ไฮดรอกซิลแรดิคัล ( $\text{OH}^\bullet$ ) ซุปเปอร์ออกไซด์แรดิคัล ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) อนุมูลอิสระจะทำลายเซลล์ก่อให้เกิดผลทางพยาธิสภาพ ได้แก่ ดีเอ็นเอถูกทำลาย การก่อเกิดมะเร็ง และเซลล์เกิดการเสื่อมสภาพ (cellular degeneration) ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระจึงมีความสำคัญ แอกติโนมัยสีทสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้หลากหลาย เช่น dihydroherbimycin A, N-carbamoyl-2,3-dihydroxybenzamide, 2-allyloxyphenol, phenazines และ Saccharomonopyrone A สารต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่พบในแอกติโนมัยสีทสกุล *Streptomyces* (Mohammadipanah and Momenilandi, 2018)

#### 2.5.6 สารต้านมะเร็ง (anticancer) และต้านเนื้องอก (antitumor)

โรคมะเร็งเป็นหนึ่งในปัญหาสุขภาพที่ร้ายแรงในมนุษย์ โดยเฉพาะมะเร็งเต้านมที่มีอัตราการตายเป็นอันดับสองในผู้หญิง การรักษาโรคมะเร็งมีได้หลายวิธี ได้แก่ การผ่าตัด การฉายรังสี การรักษาด้วยภูมิคุ้มกันบำบัด และการรักษาด้วยเคมีบำบัด สารต้านมะเร็งที่ได้จากแอกติโนมัยสีท เช่น บลิโอมัยซิน (bleomycin) จาก *S. verticillus* รักษาโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดนอนฮอดจกิน (non-Hodgkins's lymphoma) เนื้องอกที่ศีรษะและคอ เนื้องอกที่อัณฑะ (testicular teratomas) ด็อกโซรูบิซิน (doxorubicin) ใช้รักษามะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน (acute leukemia) มะเร็งชนิดเป็นก้อน (solid tumours) (นันทวัน 2555)

## 2.6 การสกัดสารทุติยภูมิ

สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (Natural Product) เป็นแหล่งสำคัญที่ใช้ในการศึกษาเพื่อพัฒนาชนิดใหม่ ๆ ยาเคมีสังเคราะห์ครั้งหนึ่งท้องค้การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration; FDA) ให้การรับรองล้วนได้มาจากการสังเคราะห์โดยมีสารผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติเป็นต้นแบบ การสกัดเป็นขั้นตอนแรกในการแยกผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่ต้องการออกจากวัตถุดิบ ฉะนั้นลักษณะของสารจากธรรมชาติจึงเป็นสิ่งสำคัญในการใช้พิจารณาเลือกวิธีการ และตัวทำละลายในการสกัด (Q.-W. Zhang et al., 2018)

การสกัดประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอนหลัก ๆ คือ

(1) การที่ตัวทำละลายเข้าสู่เนื้อเยื่อ หรือเซลล์ของตัวอย่าง ทำให้สารทุติยภูมิถูกละลายอยู่ในตัวทำละลาย ซึ่งตัวทำละลายอาจใช้เพียงชนิดเดียว หรือตัวทำละลายผสมขึ้นอยู่กับคุณสมบัติความเป็นขั้วของสารทุติยภูมิ ทำให้แยกส่วนที่ไม่ต้องการออกจากสารทุติยภูมิ เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น

(2) การแยกตัวถูกละลายออกจากตัวทำละลาย มีการใช้การระเหย (Evaporation) การกลั่น (distillation) การตกผลึก (crystallization)

(3) การแยกสารทุติยภูมิให้บริสุทธิ์ มีวิธีการแยกหลากหลาย เช่น คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography) โครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (Thin-layer Chromatography; TLC) และโครมาโทกราฟีของเหลวความดันสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) เป็นต้น

### 2.6.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการสกัด

สารทุติยภูมิมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน การพิจารณาความสามารถในการละลายจึงเป็นสิ่งสำคัญ โดยคุณสมบัติของตัวทำละลายที่ดี จะต้องสามารถละลายสารที่ต้องการสกัดได้พอดี และไม่ระเหยยากหรือง่ายเกินไป รวมถึงไม่ทำปฏิกิริยากับกับสารที่สนใจ ไม่เป็นพิษ ส่วนมากนิยมใช้แอลกอฮอล์ เช่น เอทานอล และเมทานอล เป็นตัวทำละลายในการสกัดสารฟฤทเคมี (Phytochemical) อีกทั้งความสามารถในการละลายจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น เนื่องจากตัวทำละลายแทรกซึมเข้าสู่เซลล์ของตัวอย่างได้ดีขึ้น แต่ถ้าอุณหภูมิสูงเกินไปสารที่ไม่ทนความร้อนจะเสียสภาพ อีกทั้งตัวทำละลายระเหยทำให้สกัดได้สารที่ไม่ต้องการได้ (Roopashree and Naik, 2019)

### 2.6.2 วิธีสกัดสารทุติยภูมิ

การสกัดสารทุติยภูมิสามารถทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของสารสกัด คุณสมบัติของสาร ในการทนต่อความร้อนและชนิดของตัวทำละลายที่ใช้

### 2.6.2.1 มาเซอร์ชัน (Maceration)

เป็นกระบวนการสกัดที่ทำให้เนื้อเยื่ออ่อนนุ่ม สกัดที่ทำให้เนื้อเยื่ออ่อนนุ่ม และแตกออกโดยใช้ตัวทำละลายในภาชนะปิด เช่น ขวดปากกว้าง หรือขวดรูปชมพู่ ทิ้งไว้ 12 ถึง 24 ชั่วโมง หรือมากกว่านั้นแต่ไม่เกิน 2 วัน ทำให้สารในเซลล์ถูกละลายออกมาอยู่ในตัวทำละลายที่ใช้สกัด สารสกัดที่ได้จะประกอบไปด้วยสารหลายชนิด เช่น ฟีนอล เทอร์ปีน ฟลาโวนอยด์ และสารสี ข้อดีของการมาเซอร์ชันคือไม่มีการใช้ความร้อน แต่เปลืองตัวทำละลาย (Sharma et al., 2018)

### 2.6.2.2 เพอร์โคเลชัน (Percolation)

เป็นกระบวนการสกัดที่ตัวทำละลายอิมตัวถูกแทนที่ด้วยตัวทำละลายใหม่อย่างต่อเนื่อง มีประสิทธิภาพมากกว่าการสกัดด้วยวิธีมาเซอร์ชัน โดยใช้เครื่องมือเพอร์โคเลเตอร์ (percolator) ทำการบดตัวอย่างให้ละเอียดหมักกับตัวทำละลาย 1 ชั่วโมง และบรรจุเข้าไปในเครื่องเติมตัวทำละลายทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ทำการเติมตัวทำละลายตลอดเวลา (ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย มหาวิทยาลัยมหิดล 2546)

### 2.6.2.3 การสกัดแบบต่อเนื่อง (continuous extraction)

มีการใช้ความร้อน เป็นระบบปิด และใช้เครื่องสกัดซอกซ์เลต (soxhlet extractor) โดยตัวทำละลายที่ใช้มีจุดเดือดต่ำ ความร้อนทำให้ตัวทำละลายในฟลาสก์ (flask) ระเหยตัวขึ้นไปแล้วกลั่นตัวลงมาใน thimble ซึ่งบรรจุตัวอย่างเมื่อตัวทำละลายใน extracting chamber สูงถึงระดับจะเกิดการลักน้ำ สารสกัดจะไหลกลับลงในฟลาสก์ ด้วยวิธีการลักน้ำ ฟลาสก์จะได้รับความร้อนตัวทำละลายจึงระเหยขึ้นไป ทิ้งสารสกัดไว้ในฟลาสก์ ตัวทำละลายเมื่อกระทบ condenser จะกลั่นตัวกลับลงมาเป็นสารสกัดใหม่ วิธีนี้เหมาะกับการสกัดสารที่ทนต่อความร้อน ใช้ตัวทำละลายไม่สิ้นเปลืองและไม่ควรเป็นตัวทำละลายผสม เนื่องจากจุดเดือดที่แตกต่างกันจะเกิดการแยกของตัวทำละลายแต่ละชนิด (รัตนา 2547)

### 2.6.2.4 การสกัดด้วยของเหลวสองชนิด (Liquid-liquid extraction)

เป็นการสกัดที่ทำให้ตัวถูกละลายที่ละลายอยู่ในตัวทำละลายแรก (ตัวทำละลายของน้ำ) กระจายสู่ตัวทำละลายที่สอง (ตัวทำละลายอินทรีย์) ตัวทำละลายทั้งสองชนิดจะถูกผสมกันแต่ไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกัน โดยใช้กรวยแยก (Separatory funnel) ในการแยกชั้นของสารละลายผสม เมื่อการกระจายของตัวถูกละลายระหว่างตัวทำละลายทั้งสองถึงสมดุลจะเกิดการแยกชั้น

### 2.6.2.5 การสกัดของแข็งด้วยของเหลว (Solid-liquid extraction)

เป็นการสกัดสารจากของแข็งด้วยตัวทำละลายของเหลว การสกัดด้วยวิธีนี้ขึ้นอยู่กับ การละลายของตัวถูกละลายในตัวทำละลายของเหลวและระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด การสกัดด้วยวิธีนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการสกัดสารทางชีววิทยา สาอินทรีย์ หรือสารอนินทรีย์ได้

### 2.6.3 การทำให้สารสกัดเข้มข้น

สารสกัดที่ได้จะมีปริมาณมาก และเจือจาง ทำให้การแยกสารทำได้ยากและไม่มีประสิทธิภาพ จึงต้องทำให้สารสกัดมีความเข้มข้นขึ้น สามารถทำได้หลายวิธี

#### 2.6.3.1 การระเหย

ทำให้ตัวทำละลายออกจากสารสกัดโดยใช้ความร้อนจากหม้ออังน้ำ (water bath) หรือแผ่นความร้อน (hot plate) จึงต้องคำนึงถึงอุณหภูมิที่ก่อให้เกิดการสลายตัวของสารที่ต้องการ หรือสนใจได้

#### 2.6.3.2 การกลั่นในภาวะสุญญากาศ

เป็นการระเหยตัวทำละลายโดยใช้อุณหภูมิต่ำ และลดความดันโดยใช้เครื่องระเหยแห้งสภาวะสุญญากาศ (rotary evaporator) ซึ่งประกอบด้วย 3 ส่วน คือ ภาชนะบรรจุสารสกัด (distillation flask) คอนเดนเซอร์ หรือส่วนควบแน่นไอของสารละลาย (condenser) และภาชนะรองสารละลายหลังจากการกลั่น (receiving flask)

#### 2.6.3.3 การทำให้แห้ง

เป็นการระเหยตัวทำละลายจนได้สารสกัดในรูปของแข็ง หรือกึ่งของแข็ง โดยใช้ความเย็น (lyophilizer หรือ freeze dryer) หรือการใช้ความร้อน (spary dryer)

#### 2.6.3.4 อัลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration)

เป็นการทำให้สารสกัดเข้มข้นโดยใช้แผ่นเมมเบรน (membrane) มักใช้กับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) สูงกว่า 5,000

## 2.7 การแยกสารทุติยภูมิให้บริสุทธิ์

โครมาโทกราฟีเป็นวิธีการแยกสารทุติยภูมิที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย อาศัยความแตกต่างกันของโมเลกุลของสาร เช่น คุณสมบัติในการละลาย ประจุบนโมเลกุล หมู่ทางเคมี โดยโมเลกุลของสารละลายเมื่อเข้าสู่ระบบของโครมาโทกราฟีที่ประกอบไปด้วยเฟสคงที่ (stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) คุณสมบัติที่ต่างกันของสารจะเคลื่อนที่อยู่ในแต่ละส่วน โดยสารที่ยึดกับเฟสคงที่ได้ดีจะเคลื่อนที่ช้า ส่วนสารที่ถูกพาไปพร้อมเฟสเคลื่อนที่ก็จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า ระยะทางของสารแต่ละชนิดในการเคลื่อนที่จึงแตกต่างกันทำให้สามารถแยกสารต่าง ๆ ออกจากกันได้

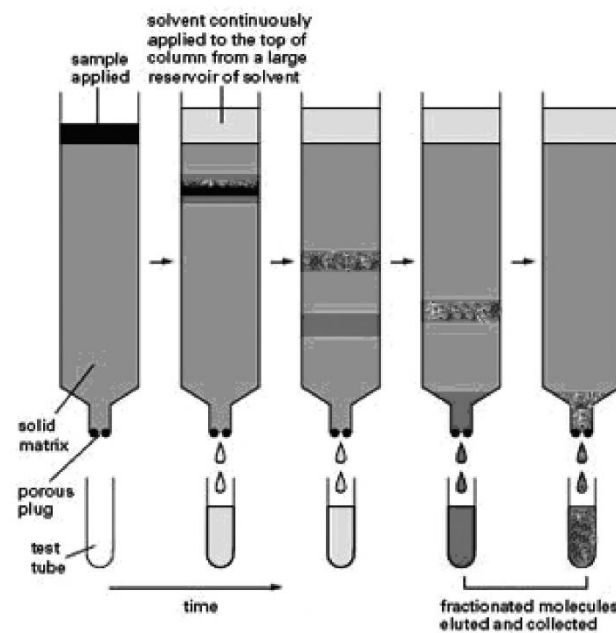
### 2.7.1 โครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (Column Chromatography)

เป็นการแยกสารโดยเฟสคงที่เป็นตัวดูดซับบรรจุอยู่ในคอลัมน์ เฟสเคลื่อนที่คือตัวทำละลายที่ไหลผ่านคอลัมน์ โครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ที่ใช้ในการแยกสารทุติยภูมิในงานวิจัยนี้ประกอบด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.7.1.1 โครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเทรชัน (gel filtration chromatography)

แยกสารโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุล เฟสคงที่ในระบบคือเจลที่ถูกบรรจุลงในคอลัมน์ เฟสเคลื่อนที่คือตัวทำละลาย หรือบัฟเฟอร์ที่ไหลผ่านคอลัมน์ที่สามารถละลายตัวอย่างได้ดี เจลที่ใช้มักเป็นพอลิเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำแต่ดูดซับน้ำได้ดี รูปร่างเป็นทรงกลมมีการเชื่อมโยงกันเป็นร่างแห เกิดเป็นเม็ดเจลที่มีรูพรุน (porous gel bead) โมเลกุลของสารจะถูกแยกโดยอาศัยขนาดที่แตกต่างกัน โดยสารที่มีขนาดใหญ่ไม่สามารถผ่านรูพรุนของเจลได้ จึงละลายในเฟสเคลื่อนที่และเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ได้เร็ว ส่วนสารขนาดเล็กจะติดอยู่ในรูพรุนของเจลจึงเคลื่อนที่ออกมาได้ช้ากว่า สารที่ใช้ในการผลิตเจลเป็นสารพอลิเมอร์ประเภทต่าง ๆ เช่น เด็กซ์แทรน เป็นพอลิเมอร์ของกลูโคส ชื่อทางการค้าของเด็กซ์แทรน คือ sephadex มีหลากหลายขนาดขึ้นอยู่กับการใช้งาน ซึ่งเหมาะสำหรับการแยกผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (รูปที่ 2.20)



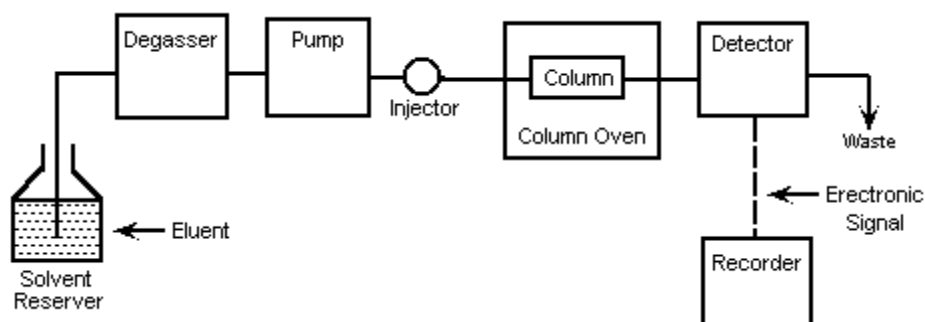
รูปที่ 2.20 โครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเทรชัน (รัชชัย 2551)

### 2.7.1.2 โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High-performance liquid chromatography; HPLC)

หลักการในการแยกคือการดูดซับ การแลกเปลี่ยนไอออน หรือขนาด โดยตัวกลางถูกบรรจุอยู่ในคอลัมน์ที่มีขนาดเล็กและยาว สามารถแยกได้อย่างรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพ เนื่องจากมีการใช้ความดันทำให้เฟสเคลื่อนที่ไหลได้เร็วขึ้น การแยกเกิดขึ้นระหว่าง 2 ส่วน คือเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่ ทำให้สามารถแยกสารออกมาในเวลาที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับความเข้ากันได้ของสารตัวอย่างกับเฟสคงที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรือเฟสเคลื่อนที่ สารที่เข้ากันได้ดีกับเฟสเคลื่อนที่จะออกมาก่อน และสารที่เข้ากันได้ดีกับเฟสคงที่จะออกมาทีหลัง จะถูกตรวจจับด้วยตัววัดสัญญาณ และแสดงผลออกมาในรูปของพีค คือ โครมาโทแกรม (chromatogram) ระยะเวลาที่สารแต่ละชนิดออกมา หรือตำแหน่งของพีคที่ปรากฏ คือ retention time ( $t_R$ ) องค์ประกอบสำคัญของโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (รูปที่ 2.21)



รูปที่ 2.21 องค์ประกอบของ HPLC (DENKO, 2005)

## 2.8 การพิสูจน์โครงสร้างและระบุชนิดของสาร

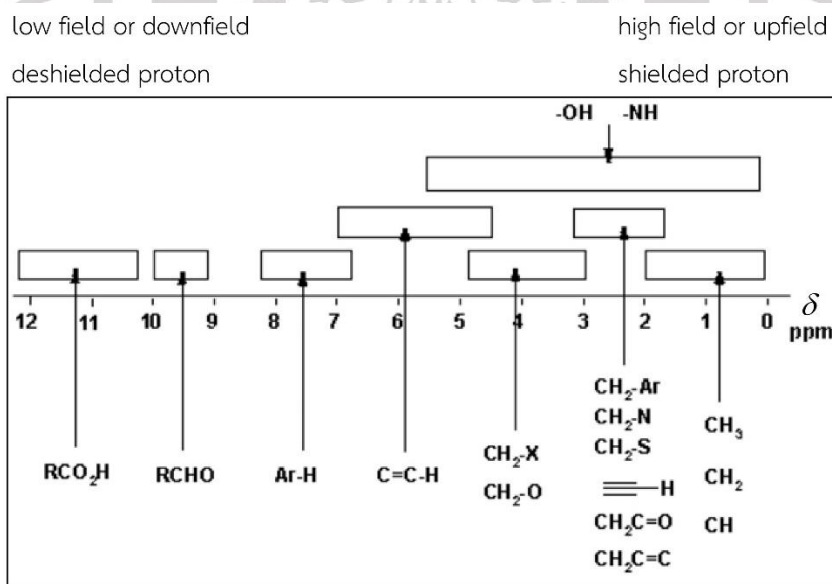
การพิสูจน์โครงสร้างสารอินทรีย์ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ อาศัยเทคนิคสเปกโทรสโกปี ได้แก่ นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy; NMR) แมสสเปกโตรเมทรี (Mass spectrometry; MS) ฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (Fourier Transform Infrared spectrometer; FT-IR Spectrometer) โพลาริมิเตอร์ (Polarimeter) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Vis spectrophotometer) หลักการของสเปกโทรสโกปี คือ คุณสมบัติในการดูดกลืนรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าอย่างจำเพาะของนิวเคลียส อะตอม ไอออน หรือโมเลกุลของสารอินทรีย์ จะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพลังงาน เกิดเป็นลักษณะลายซั้บ่ง (fingerprint) ในสเปกตรัม เป็นข้อมูลจำเพาะของโครงสร้าง เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ร่วมกันจะได้โครงสร้างสารอินทรีย์ การวิเคราะห์โครงสร้างด้วยสเปกโทรสโกปีเป็นเทคนิคที่ใช้เวลาวิเคราะห์น้อย และใช้ปริมาณตัวอย่างน้อย

### 2.8.1 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy; NMR)

นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์เป็นเทคนิคหนึ่งที่สำคัญ เป็นการศึกษาค่าข้อมูลของการดูดกลืนแสงของพลังงานแม่เหล็กไฟฟ้าโดยนิวเคลียสในอะตอมของโมเลกุล เมื่ออะตอมดูดกลืนรังสีแม่เหล็กไฟฟ้า คลื่นวิทยุช่วงความถี่ 3 เฮิรตซ์ ถึง 300 จิกะเฮิรตซ์ จะเกิดการเปลี่ยนแปลงภายในนิวเคลียสของอะตอม

### 2.8.1.1 โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (Proton-Nuclear Magnetic Resonance; $^1\text{H}$ NMR)

อนุภาคที่มีประจุภายในอะตอม ได้แก่ อิเล็กตรอนมีประจุลบ และโปรตอนมีประจุบวก สามารถเกิดการหมุนควง (precession) รอบแกนนิวเคลียส ส่งผลให้นิวเคลียสมีสมบัติคล้ายแท่งแม่เหล็ก และเกิดโมเมนต์แม่เหล็กได้ (magnetic moment,  $\mu$ ) โปรตอนที่ถูกกำบังด้วยอิเล็กตรอนที่มีสภาพแวดล้อมทางแม่เหล็ก (magnetic environment) และสภาพแวดล้อมทางเคมี (chemical environment) ไม่เหมือนกัน จะได้รับความเข้มสนามแม่เหล็กภายนอกไม่เท่ากัน ทำให้โปรตอนดูดกลืนความถี่คลื่นวิทยุ และเกิดความถี่เรโซแนนซ์ที่แตกต่าง โดยเทียบความถี่เรโซแนนซ์ของโปรตอนกับสารอ้างอิง ได้แก่ เททระเมทิลไซเลน (Tetramethylsilane (TMS),  $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ ) เรียกว่า ค่าการเลื่อนทางเคมี (chemical shift) โดยปกติค่า chemical shift ของโปรตอนจะปรากฏในช่วงประมาณ 0-12 ppm สเปกตรัม  $^1\text{H}$  NMR และตำแหน่งสัญญาณของโปรตอนชนิดต่าง ๆ ของสารอินทรีย์แสดงดังรูปที่ 2.22

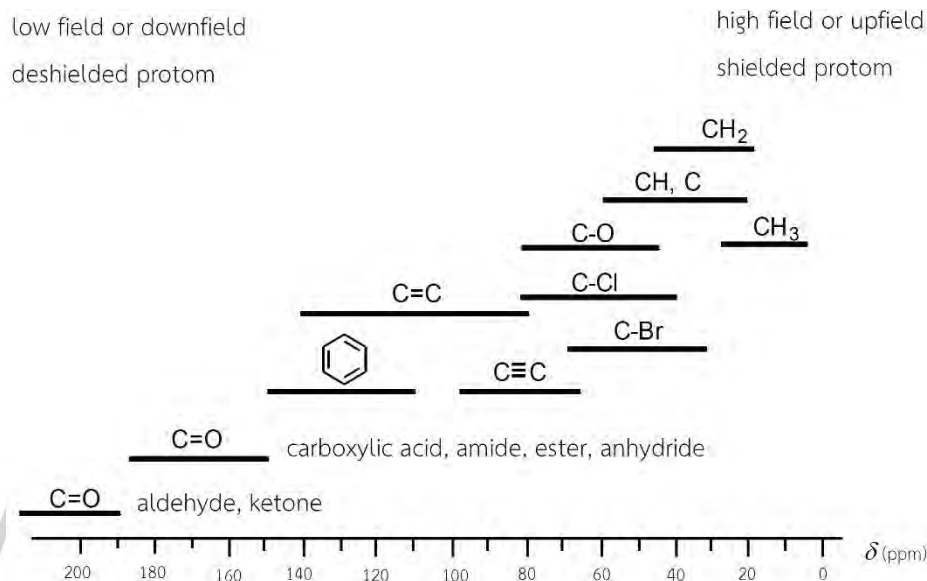


รูปที่ 2.22 ตำแหน่งสัญญาณของโปรตอนชนิดต่างๆ ของสารอินทรีย์ (อรุณรัตน์, 2563)

### 2.8.1.2 อะตอมคาร์บอน-13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (Carbon-Nuclear Magnetic Resonance; $^{13}\text{C}$ NMR)

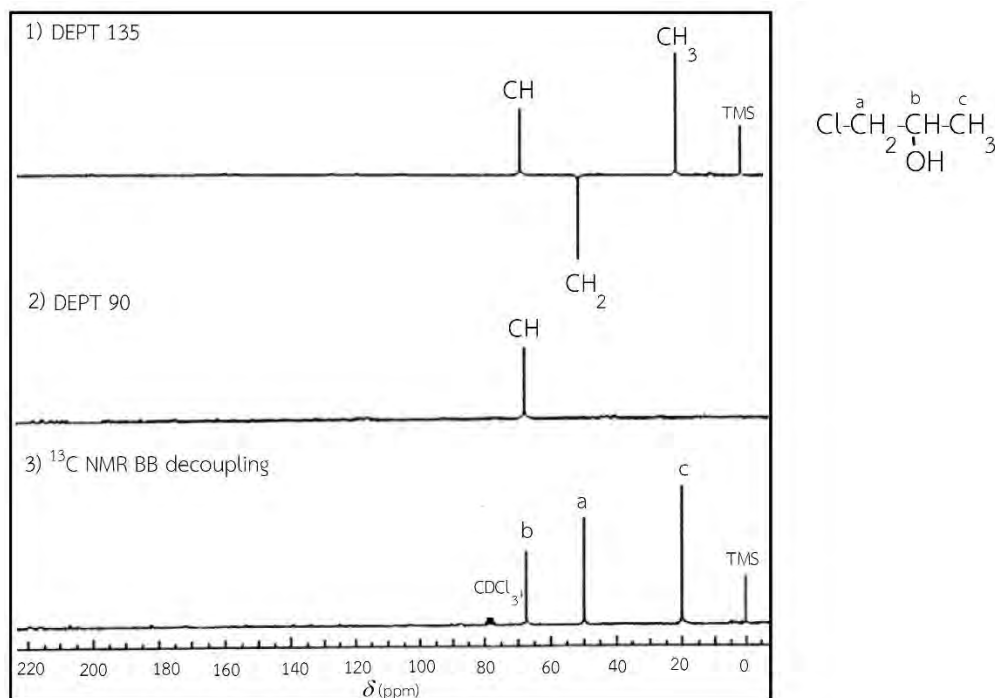
คาร์บอนที่ดูดกลืนรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าคลื่นวิทยุทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในนิวเคลียส เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า อะตอมคาร์บอน-13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ โดยข้อมูลที่ได้จากสเปกตรัม  $^{13}\text{C}$  NMR ทำให้ทราบจำนวน และชนิดของอะตอมคาร์บอนในโครงสร้างของสารอินทรีย์ค่า

chemical shift ของ  $^{13}\text{C}$  ( $\delta_{\text{C}}$ ) จะอยู่ในช่วง 0 ถึง 220 ppm โดยเทียบกับความถี่เรโซแนนซ์ของสารมาตรฐานเททระเมทิลไซเลน ตำแหน่งสัญญาณเรโซแนนซ์ของอะตอมคาร์บอนแสดงดังรูปที่ 2.23



รูปที่ 2.23 ตำแหน่งสัญญาณหรือความถี่เรโซแนนซ์ของอะตอมคาร์บอน (อรุณรัตน์, 2563)

ถ้าโครงสร้างมีความซับซ้อน สัญญาณจะซ้อนทับกันเกิดกระบวนการ เรียกว่า broadband (BB) decoupling สามารถทำให้ช่วงคลื่นความถี่วิทยุของทุกโปรตอนเกิดเรโซแนนซ์พร้อมกัน จึงไม่สามารถจำแนกชนิดของอะตอมคาร์บอนในโครงสร้างได้ จึงมีการทดลองเดปต์ (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer; DEPT) โดยเทียบกับสเปกตรัม  $^{13}\text{C}$  NMR การทดลองเดปต์มีหลายแบบ ได้แก่ DEPT 90 และ DEPT 135 จากรูปที่ 2.24 สเปกตรัม DEPT 90 จะปรากฏเฉพาะสัญญาณของ CH อยู่ด้านบน (positive) ส่วนสเปกตรัม DEPT 135 ปรากฏสัญญาณของเมทิลีนคาร์บอน (methylene carbon; CH<sub>2</sub>) อยู่ด้านล่าง (negative) ส่วนมีเทนคาร์บอน (methine carbon; CH) และ เมทิลคาร์บอน (methyl carbon; CH<sub>3</sub>) อยู่ด้านบน ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับสเปกตรัม DEPT 90 และ DEPT 135 กับสเปกตรัม  $^{13}\text{C}$  NMR BB decoupling จะทำให้ทราบจำนวนและตำแหน่งสัญญาณของอะตอมคาร์บอนสี่ธาตุ (C) ที่มาปรากฏในเดปต์ได้



รูปที่ 2.24 สเปกตรัม  $^{13}\text{C}$  NMR ของ 1-คลอโร-2-โพรพานอล 1) DEPT 135 2) DEPT 90 และ 3) BB decoupling (เอ็นหทัย 2549)

### 2.8.1.3 นิวเคลียร์แมกนีติกเรโซแนนซ์แบบ 2 มิติ (2-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance; 2D-NMR)

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติส่วนใหญ่มีโครงสร้างซับซ้อน จึงต้องใช้เทคนิคนิวเคลียร์แมกนีติกเรโซแนนซ์แบบ 2 มิติ ร่วมด้วย สเปกตรัมของนิวเคลียร์แมกนีติกเรโซแนนซ์แบบ 2 มิติ ประกอบด้วย 3 แกน คือ แกน X และ Y เป็นค่า chemical shift ( $\delta$ ; ppm) และ แกน Z เป็นความเข้มสัญญาณ ชนิดสเปกตรัมเป็นความสัมพันธ์ระหว่างนิวเคลียสอะตอมเดียวกันหรือต่างชนิดกัน ได้แก่

#### 1) เอชเอสคิวซี (Heteronuclear Single-Quantum Coherence; HSQC)

ความสัมพันธ์ระหว่างอะตอมคาร์บอนกับไฮโดรเจน จะทราบข้อมูลของอะตอมไฮโดรเจนอยู่บนคาร์บอนตัวใด

#### 2) เอชเอ็มบีซี (Heteronuclear Multi-Bond Connectivity; HMBC)

ความสัมพันธ์ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนและคาร์บอน จะทราบข้อมูลของอะตอมไฮโดรเจนและคาร์บอน ที่มีระยะห่างจากกันไม่เกิน 3 พันธะ

3) โคซีระหว่างโปรตอนกับโปรตอน ((Hydrogen-Hydrogen Correlation Spectroscopy; H-H COSY)

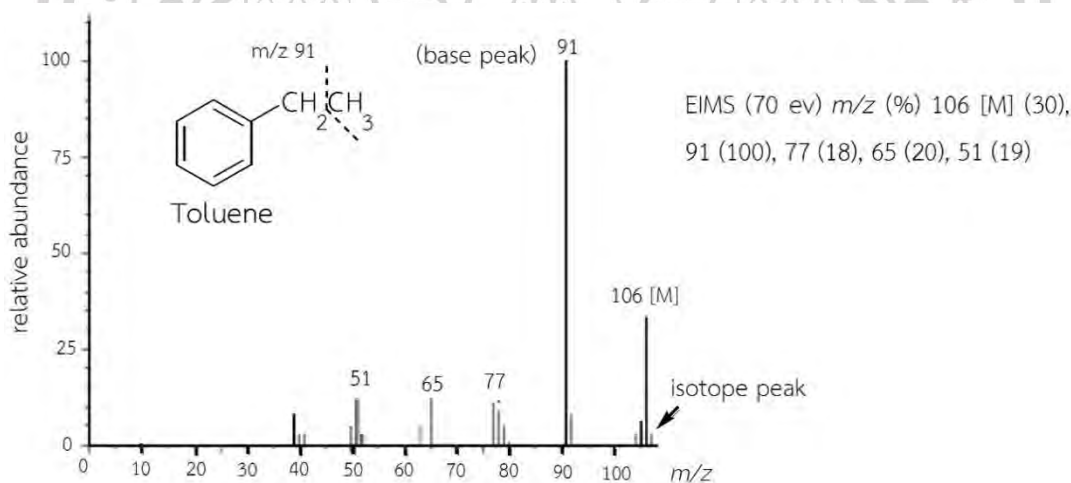
ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนกับโปรตอน จะทราบข้อมูลของโปรตอนและโปรตอนข้างเคียงที่อยู่ห่างกันไม่เกิน 3 พันระ

4) โนซี (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy; NOESY)

เทคนิคโนซีมีประโยชน์เพื่อใช้ยืนยันโครงสร้างที่มีสเตอริโอไอโซเมอร์มากกว่าหนึ่งไอโซเมอร์ เช่น ซิส-ทรานส์-โครงสร้างที่มีโครงรูป หรือโครงสร้างเป็นวง ปรากฏเป็นพิคข้ามในสเปกตรัม

### 2.8.2 แมสสเปกโตรเมทรี (Mass spectrometry; MS)

แมสสเปกโตรเมทรีอาศัยหลักการดูดกลืนรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าของสารอินทรีย์ เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานอิเล็กตรอนิกส์ ระดับพลังงานการสั่น และระดับพลังงานการหมุน ข้อมูลที่ได้จากแมสสเปกตรัม (mass spectrum) คือมวลโมเลกุล และยืนยันโครงสร้างได้ แมสสเปกตรัมมีลักษณะเป็นเบสพิค (base peak) ซึ่งมักเป็นพิคของไอออนที่เสถียรที่สุด โดยแกน y ของกราฟจะแสดงเปอร์เซ็นต์ความอุดมสมบูรณ์ (% relative abundance) ของไอออน และแกน x แสดงค่ามวลต่อประจุ (รูปที่ 2.25)



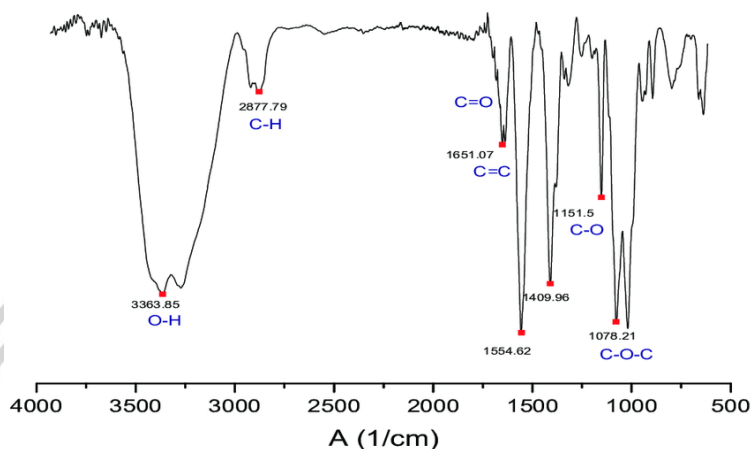
รูปที่ 2.25 แมสสเปกตรัมของเอทิลเบนซีน (อรุณรัตน์, 2563)

### 2.8.3 ฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (Fourier Transform Infrared Spectrometer; FT-IR Spectrometer)

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FT-IR สามารถใช้ได้กับตัวอย่างทั้งของแข็ง ของเหลว และแก๊ส ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้แม้ตัวอย่างจะมีปริมาณน้อย ใช้ในการวิเคราะห์ตรวจสอบโมเลกุลของสาร อาศัยหลักการการสั่น (Vibration) ของโมเลกุลจากการดูดกลืนแสงที่อยู่ในช่วงอินฟราเรดประมาณ 4,000 ถึง 400  $\text{cm}^{-1}$  ลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารแต่ละชนิดมีคุณสมบัติเฉพาะ จะเกิดการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปลี่ยนแปลงระดับพลังงานการสั่นพร้อมกับการเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานการหมุน โดยการเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานการสั่นทำให้ทราบชนิดหมู่ฟังก์ชัน (functional group) เช่น พันธะคู่ พันธะสาม หมู่คาร์บอนิล หมู่ไฮดรอกซิล หมู่อะมิโน (รูปที่ 2.26) (ศิรินิตย์ และ ปฐมพร 2561)



รูปที่ 2.26 สเปกตรัม FT-IR ของแกรฟีนออกไซด์ (Graphene oxide) (Valencia et al., 2018)

#### 2.8.4 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Vis spectrophotometer)

อาศัยคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเล็ต (UV) และช่วงแสงที่มองเห็น (Visible light) มีความยาวคลื่นประมาณ 190-1000 นาโนเมตร เมื่อโมเลกุลของสารตัวอย่างถูกฉายด้วยแสงที่ระดับพลังงานเหมาะสมจะทำให้อิเล็กตรอนเกิดการดูดกลืนแสงแล้วเปลี่ยนสถานะไปอยู่ในชั้นที่มีระดับพลังงานสูงกว่า ทำการวัดปริมาณของแสงที่ผ่านหรือสะท้อนจากตัวอย่างเทียบกับแหล่งกำเนิดแสง ตามกฎของ Beer-Lambert ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) มีความสัมพันธ์กับปริมาณและชนิดของสารตัวอย่าง จึงสามารถระบุชนิดและปริมาณของสารต่าง ๆ ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้จะแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) และค่าความยาวคลื่น (Wavelength)

#### 2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Yu และคณะ (2021) แยกแอกติโนมัยสีทจากรากของต้นข้าวสาลี จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา อนุกรมวิธานเคมี และจากการวิเคราะห์ DNA-DNA hybridization พบแอกติโนมัยสีทในสกุล *Streptomyces* สายพันธุ์ใหม่ และถูกกำหนดชื่อเป็น *Streptomyces triticiradicis* sp. nov. อีกทั้งสารเมตาบอไลต์ที่แยกได้ 5 ชนิดนำมาทำการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิคสเปกโตรสโกปี พบสารที่มีการค้นพบแล้ว 3 สาร และสารชนิดใหม่ 1 สาร ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา (Yu et al., 2020)

Zhang และคณะ (2021) พบแอกติโนมัยสีทไอโซเลต XJ31 จากการวิเคราะห์ยีน 16S rRNA พบว่าเป็นสกุล *Nocardia* สายพันธุ์ใหม่ อีกทั้งจากการแยกสารทุติยภูมิพบสารกลุ่ม benz[ $\alpha$ ]anthraquinones 2 สาร ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Mycobacterium tuberculosis* โดยเป็นสารชนิดใหม่ 1 สาร คือ brasiliquinone E (Zhang et al., 2020)

Fu และคณะ (2020) ทำการแยกแอกติโนมัยสีทไอโซเลต HM134 จากดินป่าชายเลน ประเทศจีน นำมาทำการศึกษาลักษณะทางจีโนมไทป์ ลักษณะทางฟีโนไทป์ และอนุกรมวิธานเคมี พบว่า ไอโซเลต HM134 จัดอยู่ในสกุล *Micromonospora* สปีชีส์ใหม่และถูกกำหนดชื่อเป็น *Micromonospora zhangzhouensis* sp. nov. อีกทั้งสารสกัดหยาบของเชื้อนี้สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ เซลล์มะเร็งลำไส้ และ เซลล์มะเร็งปอดชนิด A549 เมื่อทำการวิเคราะห์โครงสร้างสารด้วยเทคนิคสเปกโตรสโกปี พบว่าเป็นอนุพันธ์ของไดเทอเพินอยด์ชนิดใหม่ (Fu et al., 2020)

Sengupta et al. (2015) ทำการแยกแอกติโนมัยสีทจากป่าชายเลนในอุทยานแห่งชาติ Sundarban ได้ทั้งหมด 54 ไอโซเลต คัดเลือกเบื้องต้นโดนทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จำนวน 15 ชนิด และ 3 ชนิดเป็นจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในพืช พบว่าแอกติโนมัยสีทเพียง 9 ไอโซเลตที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เหล่านี้ได้ จึงนำมาทำการจัดจำแนกโดยใช้อนุกรมวิธานหลายส่วน รวมทั้งศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บนช่วงยีน 16S rRNA พบว่าแอกติโนมัยสีท 8 ไอโซเลตมีความใกล้เคียงสกุล *Streptomyces* มากที่สุด และ 3 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ก่อโรคในพืช ไอโซเลต SMS\_SU21 ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ มีค่า MIC เท่ากับ 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถต้านอนุมูลอิสระ มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $0.242 \pm 0.33$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Gong et al. (2018) ทำการแยกแอกติโนมัยสีทจากป่าชายเลนของทะเล Maowei ในประเทศจีน ได้แอกติโนมัยสีทจำนวน 54 ไอโซเลต นำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนช่วงยีน 16S rRNA พบว่าส่วนใหญ่เป็นสกุล *Streptomyces* และพบแอกติโนมัยสีทหายากสกุล *Stenotrophomonas* ในการศึกษาพบแอกติโนมัยสีทจำนวน 20 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์คือยา Vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) และ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) และสารทุติยภูมิของแอกติโนมัยสีท 29 ไอโซเลต พบเอนไซม์ nonribosomal peptide synthetase (NRPS) เอนไซม์ polyketide synthase type I (PKS-I) และ polyketide synthase type II (PKS-II)

Hong et al. (2009) ทำการแยกแอกติโนมัยสีทจากดินและพืชในป่าชายเลน ประเทศจีน สามารถคัดแยกแอกติโนมัยสีทได้ถึง 2,000 ไอโซเลต ทำการจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางฟีโนไทป์ และจีโนมไทป์ พบแอกติโนมัยสีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง Human Colon Tumor 116 cells ได้ 20 เปอร์เซ็นต์ ยับยั้ง *Candida albicans* ได้ 5 เปอร์เซ็นต์ และยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ได้ 10

เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่แอคติโนมัยสีท 3 เปอร์เซ็นต์ ยับยั้งโปรตีนไทโรซีนฟอสฟาเทส 1บี (tyrosine phosphatase 1B; PTP1B) ที่เกี่ยวข้องกับโรคเบาหวาน พบในสกุล *Micromonospora* และ *Streptomyces* ผู้วิจัยจึงพบว่าแอคติโนมัยสีทจากปายเลนเป็นแหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย

Hassan et al. (2018) ได้ศึกษาเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากพืชสมุนไพรที่ชื่อว่า มอร์นิงกลอรี (*Convolvulus arvensis*) บาสาริยาโอเอซิส ประเทศอียิปต์ ทำการจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะการเจริญ และเทคนิคทางชีวโมเลกุล พบว่า *Streptomyces capillispiralis* Ca-1 สามารถสังเคราะห์อนุภาคนาโนของทองแดงชนิดใหม่ และไม่มีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ได้ทำการยืนยันอนุภาคนาโนของทองแดงโดยใช้ UV-Vis spectroscopy ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ศึกษาขนาดและรูปร่างของอนุภาคนาโนของทองแดงด้วย Transmission Electron Microscopy (TEM) และทำการยืนยันหมู่ฟังก์ชันในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดย FT-IR Spectrometer อย่างไรก็ตามอนุภาคนาโนของทองแดงที่สังเคราะห์ได้จากธรรมชาติมีการนำไปใช้ทางการแพทย์อย่างแพร่หลาย ทั้งใช้ในการยับยั้งการติดเชื้อจากจุลินทรีย์ ใช้ในการควบคุมเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคและแมลงที่เป็นศัตรูพืช

Singh et al. (2018) ทำการแยกเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากพืช 6 ชนิด จากรัฐอุตตราขัณฑ์ ประเทศอินเดีย เพื่อคัดเลือกเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ในการกำจัดศัตรูพืช Congress Grass (*Parthenium hysterophorus*) สาบแร้งสาบกา (*Ageratum conyzoides*) และหญ้าก้านจ้าวขาว (*Bidens biternata*) ทำการศึกษาโดยการหมักในอาหารเหลว SCN และ GS (submerged culture) พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดสาบแร้งสาบกาพร้อมกับ *Nocardiodes* sp. 1, *Nocardiodes* sp.2 และ *Actinomadura* sp. สามารถลดการงอกของเมล็ดวัชพืชได้ถึง 60 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีผลต่อระยะการงอกในหญ้าก้านจ้าวขาว ในอาหารเหลว SCN สกุล *Nocardiodes* sp.1 สามารถลดการงอกของ Congress Grass ได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่อาหารเหลว GS สกุล *Saccharopolyspora* sp. สามารถลดการงอกได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ในสภาวะหลังการงอกของวัชพืชยังสามารถลดการเจริญของรากและยอด จากงานวิจัยนี้ทำให้พบแอคติโนมัยสีทเป็นอีกหนึ่งแหล่งในการค้นพบสารกำจัดศัตรูพืช

Ranjan และ Jadeja (2017) ทำการศึกษารูปแบบชีวิตที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในคน *Staphylococcus aureus* โดยแยกแอคติโนมัยสีทจากแพงพวยฝรั่ง (*Catharanthus roseus*) พบว่า *Micrococcus yunnanensis* rsk5 โดยสารสกัดหยาบที่ได้จากการนำอาหารเหลวมาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต ทำการแยกโดยใช้ HPLC พบว่าสารปฏิชีวนะนี้เป็นสารชนิดใหม่ยังไม่มีการระบุ

Goudjal et al. (2014) คัดแยกแอคติโนมัยสีทจำนวน 34 ไอโซเลต จากพืชท้องถิ่นของทะเลทรายซาฮารา ประเทศอัลจีเรีย พบแอคติโนมัยสีท 6 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* โดยทดสอบในดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อซึ่งดินทั้ง 2 แบบทำการ

ทดลองพร้อมทั้งทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของเมล็ดมะเขือเทศ พบว่าสายพันธุ์ CA-2 และ AA-2 สามารถลดอัตราการเกิดโรคเช่นเดียวกับ thioperoxydicarbonic diamide และ tetramethylthiram (TMTD) และสามารถเพิ่มน้ำหนักของต้นอ่อน ความยาวของรากในต้นกล้าที่เพาะเมล็ดโดยเทียบกับการทดลองควบคุม

Baba et al. (2015) ได้ทำการศึกษาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านมาลาเรียจากสารสกัดหยาบของเอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยสีทหลากหลายสายพันธุ์ที่แยกจากพืชสมุนไพรในประเทศมาเลเซีย ทดสอบสารสกัดหยาบของ *Streptomyces* sp. SUK8 SUK10 และ SUK27 ในหนูตัวผู้สายพันธุ์ ICR ในการยับยั้ง *Plasmodium berghei* PZZ1/100 ที่ก่อโรคมลาเรีย สารสกัดหยาบของไอโซเลต SUK10 ที่แยกได้จากเนื้อไม้ของต้นยางนา (*Shorea ovalis*) สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. berghei* ในหนูทดลอง โดยความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของปรสิตก่อโรคมลาเรียคือ 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวหนู พบว่าหนูกว่ากว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีชีวิตรอดได้มากกว่า 90 วัน หลังจากที่ได้รับปรสิตจากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ *Streptomyces* SUK10 เป็นสปีชีส์ใหม่



## บทที่ 3

# วิธีการดำเนินงานวิจัย

### 3.1 แอคติโนมัยสีท

แอกติโนมัยสีทแยกได้จากป่าพรุลานควาย จังหวัดปัตตานี (2 ไอโซเลต) และเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทของเนื้อเยื่อพืช *Coffea arabica* L. จากไร่กาแฟชูนันต์ จังหวัดราชบุรี (1 ไอโซเลต) ชุมชนกาแฟดงมะไฟ จังหวัดนครราชสีมา (1 ไอโซเลต) และหมู่บ้านแม่คำหล้า จังหวัดลำปาง (1 ไอโซเลต) โดยนักศึกษาปริญญาตรีที่จบการศึกษาในปี 2562

### 3.2 การศึกษาอนุกรมวิธานหลายส่วนของแอกติโนมัยสีท

#### 3.2.1 การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ (Phenotypic Characteristics)

##### 3.2.1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics)

เลี้ยงแอกติโนมัยสีทบนอาหารสูตรดัดแปลง soil extract agar (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14-21 วัน จนมีการสร้างสปอร์ ตรวจสอบลักษณะของสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ (LEICA รุ่น DM750) โดยใช้เลนส์ส่องระยะไกล (long-working distance lens) (LEICA รุ่น 506298) ที่กำลังขยายภาพ 400 เท่า และตรวจสอบลักษณะของสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (scanning electron microscope) (JEOL InTouchScope รุ่น JSM-IT500HR) เตรียมตัวอย่างโดยวิธีของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

##### 3.2.1.2 การศึกษาลักษณะการเจริญของแอกติโนมัยสีท (Cultural characteristics)

เลี้ยงแอกติโนมัยสีทบนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP) ประกอบด้วย yeast extract-malt extract (ISP2) oat meal agar (ISP3) inorganic salts-starch agar (ISP4) glycerol-asparagine agar (ISP5) peptone-yeast extract iron agar (ISP6) tyrosine agar (ISP7) (Shirling & Gottlieb, 1966) glucose asparagines agar czapek's sucrose agar และ nutrient agar (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน สังเกตลักษณะการเจริญ สีของเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) เส้นใยอากาศ (aerial mycelium) และรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ (soluble pigments) โดยเทียบกับกระดาศสีมาตรฐาน ISCC-NBS color charts

### 3.2.1.3 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา และชีวเคมี

#### 1. การใช้แหล่งคาร์บอน (Carbon utilization)

เลี้ยงแอกติโนมัยสีทบนอาหาร Carbon utilization medium (ISP9) (ภาคผนวก ก) (Shirling and Gottlieb, 1966) ที่เติมแหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ ดี-ฟรุคโตส (D-fructose) อะโดนิทอล (adonitol) ดี-ราฟฟิโนส (D-raffinose) ซิลิทอล (xylitol) ดี-แลคโตส (lactose) ไมโอ-อินนิซิทอล (myo-inisitol) ดี-เมลิไบโอส (D-melibiose) ดี-ซูโครส (D-sucrose) อินนูลิน (inulin) ดี-ไรโบส (D-ribose) เดกซ์แทรน (dextran) ดี-กาแลคโตส (D-galactose) แอล-อะราบิโนส (L-arabinose) ดี-ไซโลส (D-xylose) ทรีฮาโลส (trehalose) แอล-แรมโนส (L-rhamnase) ดี-แมนนิทอล (D-mannitol) ดี-แมนโนส (D-mannose) และ ดี-เมลิไซโตส (D-melizitose) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน โดยใช้ชุดควบคุมเชิงลบ คือ อาหารที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน และชุดควบคุมเชิงบวก คือ อาหารที่เติม ดี-กลูโคส (D-glucose) เป็นแหล่งคาร์บอน ตรวจสอบผลโดยการเปรียบเทียบการเจริญกับชุดควบคุมโดยให้ผลการตรวจสอบดังนี้

- เมื่อมีการเจริญบนอาหารที่เติมแหล่งคาร์บอนที่ต้องการทดสอบได้เท่ากับหรือดีกว่าชุดควบคุมเชิงบวก ให้บันทึกผลเป็นบวก (+)
- เมื่อมีการเจริญบนอาหารที่เติมแหล่งคาร์บอนที่ต้องการทดสอบได้ดีกว่าชุดควบคุมเชิงลบแต่เจริญได้น้อยกว่าชุดควบคุมเชิงบวก ให้บันทึกผลการทดลองเป็นปานกลาง (w)
- เมื่อมีการเจริญบนอาหารที่เติมแหล่งคาร์บอนที่ต้องการทดสอบได้เท่ากับหรือน้อยกว่าชุดควบคุมเชิงลบ ให้บันทึกผลเป็นลบ (-)

#### 2. การใช้แหล่งไนโตรเจน (Nitrogen utilization)

เลี้ยงแอกติโนมัยสีทบนอาหาร basal medium (ภาคผนวก ก) (Li et al. 2016) ที่เติมแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ 2-อะมิโนบิวเทน (2-aminobutane) แอล-อาร์จินีน (L-arginine) แอล-ซิสเทอีน (L-cystein) แอล-ฮิสทีดีน (L-histidine) 4-ไฮดรอกซีโพรลีน (4-hydroxyproline) แอล-โพรลีน (L-proline) แอล-เมไทโอนีน (L-methionine) แอล-ฟีนิลอะลานีน (L-phenylalanine) แอล-เซอรีน (L-serline) แอล-ทรีโอนีน (L-threonine) และแอล-วาเลอีน (L-valine) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน โดยใช้ชุดควบคุมเชิงลบ คือ อาหารที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน และชุดควบคุมเชิงบวก คือ อาหารที่เติม แอสพาราจีน (asparagine) เป็นแหล่งไนโตรเจน ตรวจสอบผลโดยการเปรียบเทียบการเจริญกับชุดควบคุมโดยให้ผลการตรวจสอบดังนี้

- เมื่อมีการเจริญบนอาหารที่เติมแหล่งไนโตรเจนที่ต้องการทดสอบได้เท่ากับหรือดีกว่าชุดควบคุมเชิงบวก ให้บันทึกผลเป็นบวก (+)

- เมื่อมีการเจริญบนอาหารที่เติมแหล่งไนโตรเจนที่ต้องการทดสอบได้ดีกว่าชุดควบคุมเชิงลบแต่เจริญได้น้อยกว่าชุดควบคุมเชิงบวก ให้บันทึกผลการทดลองเป็นปานกลาง (w)

- เมื่อมีการเจริญบนอาหารที่เติมแหล่งไนโตรเจนที่ต้องการทดสอบได้เท่ากับหรือน้อยกว่าชุดควบคุมเชิงลบ ให้บันทึกผลเป็นลบ (-)

3. ความสามารถในการเจริญของแอกติโนมัยสีทที่อุณหภูมิต่าง ๆ

เลี้ยงแอกติโนมัยสีทบนอาหาร yeast extract-malt extract (ISP2) บ่มที่อุณหภูมิ 10 20 30 37 40 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบผลการเจริญ

4. ความสามารถในการเจริญของแอกติโนมัยสีทที่ pH ระดับต่าง ๆ

เลี้ยงแอกติโนมัยสีทบนอาหาร yeast extract-malt extract (ISP2) ที่ระดับพีเอช 4-12 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบผลการเจริญ

5. ความสามารถในการเจริญของแอกติโนมัยสีทบนอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

เลี้ยงแอกติโนมัยสีทบนอาหาร yeast extract-malt extract (ISP2) ที่มีโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 1-8 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบผลการเจริญ

6. ความสามารถในการย่อยสลายแป้ง (Starch hydrolysis)

เลี้ยงแอกติโนมัยสีทบนอาหาร inorganic-salt starch (ISP4) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน นำสารละลายไอโอดีน 1 เปอร์เซ็นต์ ลาดลงบนอาหาร หากแอกติโนมัยสีทสามารถย่อยแป้งจะเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี ให้บันทึกผลการทดลองเป็นบวก (+) (Booth, 1971)

7. ความสามารถในการย่อยเจลาติน (Gelatin liquefaction)

เลี้ยงแอกติโนมัยสีทในอาหารเหลว bouillon gelatin (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน หลังจากนั้นนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หากมีการย่อยเจลาตินอาหารจะมีลักษณะเหลว ให้บันทึกผลการทดลองเป็นบวก (+)

8. ความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรต (Nitrate reduction)

เลี้ยงแอกติโนมัยสีทในอาหารเหลว peptone KNO<sub>3</sub> (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบการรีดิวซ์ไนเตรตโดยหยดกรดซัลฟานิลิก (sulfanilic acid) ปริมาตร 2 หยด และสารละลายไดเมทิลลามีน (N,N-dimethyl-1-naphthylamine) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 3 หยด หากมีการรีดิวซ์ไนเตรตอาหารจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู หรือแดง ให้บันทึกผลการทดลองเป็นบวก (+)

### 9. ความสามารถในการย่อยโปรตีน (Coagulation and peptonization of skim milk)

เลี้ยงแอกติโนมัยสีทในอาหารเหลว skim milk (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน หากย่อยโปรตีนในนมได้อาหารจะมีลักษณะใส ให้บันทึกผลการทดลองเป็นบวก (+)

เลี้ยงแอกติโนมัยสีทบนอาหารแข็ง skim milk (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน หากย่อยโปรตีนในนมได้จะเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี ให้บันทึกผลการทดลองเป็นบวก (+) (Li et al., 2016a)

### 10. ความสามารถในการย่อยยูเรีย (Urea hydrolysis)

เลี้ยงแอกติโนมัยสีทในอาหารเหลวยูเรียความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน อาหารจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นชมพูเมื่อเกิดการย่อยยูเรีย ให้บันทึกผลการทดลองเป็นบวก (+) (D. Sharma et al., 2011)

### 11. ความสามารถในการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Hydrogen sulfide production)

นำแอกติโนมัยสีทถ่ายลงอาหาร triple sugar iron agar (TSI agar) (ภาคผนวก ก) (Goodfellow et al., 2012) โดยการแทงแอกติโนมัยสีท (stab inoculation) ลงไปในอาหาร และขีด (simple streak) บนผิวหน้าอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน หากมีการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์อาหารจะเปลี่ยนเป็นสีดำของเฟอร์รัสซัลไฟด์

### 12. การทดสอบเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase test)

เลี้ยงแอกติโนมัยสีทบนอาหาร yeast extract-malt extract (ISP2) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เชื้อโคโลนีของแอกติโนมัยสีทโดยใช้ไม้จิ้มฟันปราศจากเชื้อ จากนั้นนำไปวางบนกระดาษกรองที่หยดสารละลาย Kovács ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีสารละลายบริเวณโคโลนีของแอกติโนมัยสีทบนกระดาษกรอง หากเปลี่ยนเป็นสีม่วงภายในเวลา 60-90 วินาที ให้บันทึกผลการทดลองเป็นบวก (+) หากผ่านไป 2 นาที แล้วยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงให้บันทึกผลการทดลองเป็นลบ (-) (Li et al., 2016a)

### 13. การทดสอบเอนไซม์คะตะเลส (Catalase test)

เลี้ยงแอกติโนมัยสีทบนอาหาร yeast extract-malt extract (ISP2) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เชื้อโคโลนีของแอกติโนมัยสีทโดยใช้ไม้จิ้มฟันปราศจากเชื้อ จากนั้นนำไปวางบนสไลด์แล้วหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 30 วินาที หากมีฟองแก๊สของออกซิเจนเกิดขึ้น ให้บันทึกผลการทดลองเป็นบวก (+)

14. ความสามารถในการย่อยสารที่ไม่ละลายน้ำ (Decomposition of insoluble substrates)

เลี้ยงแอกติโนมัยสีทบนอาหาร yeast extract-malt extract (ISP2) ที่เติมสารที่ไม่ละลายน้ำ ได้แก่ ไทโรซีน (tyrosine) แซนทีน (xanthine) ไฮโปแซนทีน (hypoxanthine) อะดีนีน (adenine) และเซลลูโลส (cellulose) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน หากสามารถย่อยสารที่ไม่สามารถละลายน้ำได้จะเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี ให้บันทึกผลการทดลองเป็นบวก (+)

15. ความสามารถในการสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรต (Acid production from carbohydrates)

เลี้ยงแอกติโนมัยสีทบนอาหาร Basal inorganic nitrogen (ภาคผนวก ก) ที่เติมแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ ได้แก่ ดี-กลูโคส (D-glucose) ดี-ฟรุคโตส (D-fructose) อะโดนิทอล (adonitol) ดี-เซลโลไบโอส (D-cellobiose) ดี-ราฟฟิโนส (D-raffinose) ซิลิทอล (xylitol) ดี-แลคโตส (lactose) ดี-ซาลิซิน (D-salicin) ไมโอ-อินนิซิทอล (myo-inisitol) ดี-เมลิไบโอส (D-melibiose) ดี-ซูโครส (D-sucrose) อินนูลิน (inulin) ดี-ไรโบส (D-ribose) เดกซ์แทรน (dextran) ดี-กาแลคโตส (D-galactose) แอล-อะราบินโนส (L-arabinose) ดี-ไซโลส (D-xylose) ทรีฮาโลส (theehalose) แอล-แรมโนส (L-rhamnose) ดี-แมนนิทอล (D-mannitol) ดี-แมนโนส (D-mannose) ดี-เมลิไซโตส (D-melizitose) และกลีเซอรอล (glycerol) โดยใช้ชุดควบคุมเชิงลบ คือ อาหารที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน หากสามารถสร้างกรดจากแหล่งคาร์บอนนั้น ๆ ได้ อาหารจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นเหลือง ให้บันทึกผลการทดลองเป็นบวก (+)

16. การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยชุดทดสอบ API ZYM (bioMérieuxapi® SA)  
เลี้ยงแอกติโนมัยสีทบนอาหาร yeast extract-malt extract (ISP2) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ขูดโคโลนีของแอกติโนมัยสีทลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปราศจากเชื้อ 1,000 ไมโครลิตร ปรับความหนาแน่นของแอกติโนมัยสีทเทียบเท่ากับ 6 McFarland ( $1.8 \times 10^9$  CFU/ml) หลังจากนั้นเติมสารละลายแอกติโนมัยสีทปริมาตร 80 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของชุดทดสอบ API ZYM และเติมน้ำลงในภาตก่อนวางชุดทดสอบลงในภาตและปิดฝา บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำการหยดสารละลาย ZYM A จำนวน 1 หยดในแต่ละหลุม และตามด้วยสารละลาย ZYM B จำนวน 1 หยด ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีในแต่ละหลุมเปรียบเทียบกับตารางตรวจผล

การทดสอบคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์โดยชุดทดสอบ API ZYM ประกอบด้วย เอนไซม์ 19 ชนิด ได้แก่ Alkaline phosphatase Esterase (C 4) Esterase Lipase (C 8) Lipase (C 14) Leucine arylamidase Valine arylamidase Cystine arylamidase Trypsin Chymotrypsin

Acid phosphatase Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase  $\alpha$ -galactosidase  $\beta$ -galactosidase  $\beta$ -glucuronidase  $\alpha$ -glucosidase  $\beta$ -glucosidase N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase,  $\alpha$ -mannosidase และ  $\alpha$ -fucosidase

### 17. การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Antibiotics susceptibility)

ทำการเตรียมสารละลายแอคติโนมัยซีทในโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที เพื่อให้เซลล์ที่หนักตกตะกอนเหลือแต่สปอร์และเส้นใยอากาศลอยอยู่ด้านบน ดูดส่วนบนมาปรับความหนาแน่นเทียบเท่ากับ 0.5 McFarland ( $1.5 \times 10^8$  CFU/ml) และใช้ไม้พันสำลี จุ่มสารละลายแอคติโนมัยซีทลาก (Swab) บนอาหาร mueller hinton agar (MHA) (ภาคผนวก ก) เป็นแนวระนาบ 3 ระนาบ จากนั้นนำดิสก์ยา Amikacin Amoxicillin Amphotericin Ampicillin Cycloheximide Ofloxacin Oxacillin Penicillin Tobramycin และ Vancomycin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วางดิสก์ยาลงบนอาหารที่ swab แอคติโนมัยซีท บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยสังเกตบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) โดยใช้ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 เป็นจุลินทรีย์ควบคุม (control organisms) (Lebeaux et al., 2019)

## 3.2.2 การศึกษาอนุกรมวิธานเคมี (Chemotypic characteristics)

### 3.2.2.1 การเตรียมเซลล์แห้ง

เลี้ยงแอคติโนมัยซีทในอาหารเหลว yeast extract-malt extract (ISP2) ในสภาวะเขย่า 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเก็บเซลล์โดยนำน้ำหมักปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง และล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจนใส นำเซลล์ที่ได้ไปทำแห้งโดยใช้เครื่องระเหิดแห้ง (freeze drier) เก็บรักษาเซลล์ที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

### 3.2.2.2 การวิเคราะห์ไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนปิเมลิก (Diaminopimelic acid (DAP) isomers analysis)

ชั่งเซลล์แห้ง 10 มิลลิกรัม ลงในหลอดทดลองฝาเกลียว เต็มกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 6 นอร์มอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ทำการกรองเซลล์แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผ่านกระดาษกรอง นำส่วนใสที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสภาวะสุญญากาศ (evaporator) ละลายตัวอย่างที่แห้งด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำสารละลายที่ได้และสารละลายมาตรฐาน 2,6 Diaminopimelic acid ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จุดลงบนแผ่น HPTLC cellulose (10 x 10 เซนติเมตร) นำแผ่น HPTLC cellulose จุ่มลงในตัวทำละลายผสมของ เมทานอล : น้ำ : กรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 6 นอร์มอล : โพร

ดิน (methanol : water : 6 N HCl : pyridine) ในอัตราส่วน 80:26:4:10 ทิ้งไว้จนตัวทำละลายผสมเคลื่อนที่จนสุดแผ่น และทำซ้ำอีก 1 ครั้ง นำแผ่น HPTLC cellulose ที่ได้รอให้แห้ง ฉีดด้วยนินไฮดริน ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) รอให้แห้งแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบแถบของสารเทียบกับแถบของสารละลายมาตรฐาน

### 3.2.2.3 การวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (Whole-cell sugars analysis)

ชั่งเซลล์แห้ง 50 มิลลิกรัม ลงในหลอดทดลองฝาเกลียว เติมกรดซัลฟิวริก เข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ปรับ pH ด้วยสารละลายอิมตัวแบเรียมไฮดรอกไซด์ ( $Ba(OH)_2$ ) จนมี pH ประมาณ 5.2-5.5 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ไปเติมเอทานอล (ethanol) จำนวน 1-2 หยด และระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสภาวะสุญญากาศ ละลายตัวอย่างที่แห้งด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำสารละลายที่ได้และสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน เข้มข้น 10 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร จุดลงบนแผ่น HPTLC cellulose (10 x 10 เซนติเมตร) นำแผ่น HPTLC cellulose จุ่มลงในตัวทำละลายผสมของ บิวทานอล : น้ำ : ไพริดีน : โทลูอีน (butanol : water : pyridine : toluene) ในอัตราส่วน 20:12:12:2 ทิ้งไว้จนตัวทำละลายผสมเคลื่อนที่จนสุดแผ่น และทำซ้ำอีก 1 ครั้ง นำแผ่น HPTLC cellulose ที่ได้รอให้แห้ง ฉีดด้วยแอนนิลีนพทาเลท (aniline phthalate) (ภาคผนวก ข) รอให้แห้งแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที ตรวจสอบแถบของสารเทียบกับแถบของสารละลายมาตรฐาน แถบสีของน้ำตาลมาตรฐานมี 2 แบบ คือน้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอม จะปรากฏแถบสีเหลืองอมน้ำตาล และแถบสีของน้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม จะปรากฏแถบสีชมพู

สารละลายน้ำตาลมาตรฐาน เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมเป็น 2 กลุ่ม  
 กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส แมนโนส ซาโลส และแรมโนส  
 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส อะราบินอส และไรโบส

### 3.2.2.4 การวิเคราะห์ชนิดไขมันมีขั้ว (Polar lipids analysis)

ชั่งเซลล์แห้ง 150 มิลลิกรัม ลงในหลอดทดลองฝาเกลียว เติมสารละลายผสมของ เมทานอล : โซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ (methanol : 0.3% NaCl) ในอัตราส่วน 100:10 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และปิโตรเลียม อีเทอร์ (petroleum ether) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง เติมปิโตรเลียม อีเทอร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง และนำสารละลายส่วนล่างบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมคลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ (chloroform : methanol : water) ในอัตราส่วน 90:100:30 ปริมาตร 2.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่

ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูส่วนใสไปใส่หลอดทดลองใหม่ เติมน้ำละลายผสมคลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ ในอัตราส่วน 50:100:40 ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูส่วนใสไปใส่หลอดทดลองใหม่ข้างต้นและนำมาเติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1.3 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 1.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูส่วนใสไปใส่หลอดทดลองใหม่ และทำให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน

ละลายสารตัวอย่างด้วยคลอโรฟอร์ม : เมทานอล ในอัตราส่วน 2:1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จุดสารตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตร บนแผ่น silica TLC (Kieselgel 60 F<sub>254</sub> 10 x 10 cm) ทำจำนวน 5 แผ่น นำแผ่น TLC ที่ได้มาทำการจุ่ม (develop) 2 ทิศทาง (two dimensional development) ในสารละลายผสม 2 ชนิด โดยจุ่ม TLC ในสารละลายผสมแรกคือ คลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ อัตราส่วน 65:25:4 จนสารละลายเคลื่อนที่ไปสุดแผ่นรองจนแห้ง และนำไปจุ่มในสารละลายผสมที่สองคือ คลอโรฟอร์ม : กรดอะซิติก : เมทานอล : น้ำ อัตราส่วน 40:7.5:6:2 ในทิศทางตั้งฉากกับทิศทางแรก ที่วิ่งจนสารละลายเคลื่อนที่ไปจนสุดแผ่น รอให้แห้งและนำไปฉีดพ่นด้วยรีเอเจนต์ (reagent) ชนิดต่าง ๆ

(1) ฉีดพ่นด้วย blue spay reagent แล้วรอให้แห้ง สำหรับวิเคราะห์ฟอสโฟลิปิดทั้งหมด (จุดสีน้ำเงิน)

(2) ฉีดพ่นด้วย ninhydrin reagent (ภาคผนวก ข) แล้วรอให้แห้ง อบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สำหรับวิเคราะห์ฟอสฟาติลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine ; PE) เมทิล-ฟอสฟาติลเอทานอลามีน (methyl-phosphatidylethanolamine ; methyl-PE) และไฮดรอกซิล-ฟอสฟาติลเอทานอลามีน (OH-phosphatidylethanolamine ; OH-PE) (จุดสีชมพู)

(3) ฉีดพ่นด้วย anisaldehyde reagent (ภาคผนวก ข) แล้วรอให้แห้ง อบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สำหรับวิเคราะห์ไกลโคลิปิด (glycolipid) (จุดสีเขียวอมเหลือง) และลิปิดอื่นๆ (จุดสีน้ำเงิน)

(4) ฉีดพ่นด้วย dragendroff's reagent (ภาคผนวก ข) แล้วรอให้แห้ง สำหรับวิเคราะห์ฟอสฟาติลโคลีน (phosphatidylcholine ; PC) (จุดสีส้ม)

(5) ฉีดพ่นด้วย phosphomolybdic acid reagent (ภาคผนวก ข) แล้วรอให้แห้ง อบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สำหรับวิเคราะห์ชนิดไขมันมีขั้วทั้งหมด

### 3.2.2.5 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน (Cellular fatty acids analysis)

ชั่งเซลล์แห้ง 40 มิลลิกรัม ลงในหลอดทดลองฝาเกลียว เติมน้ำ saponification reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ผสมให้เข้ากัน 5-10 วินาที ด้วยเครื่องผสมสาร (vortex) ต้มในน้ำที่

อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ผสมให้เข้ากัน 5-10 วินาที ต้มในน้ำที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม methylation reagent (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน 5-10 วินาที ต้มในน้ำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม extraction solvent (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนบนใส่หลอดทดลองใหม่ เติม base wash (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสด้านบนไปวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography ; GC)

### 3.2.2.6 การวิเคราะห์มีนาควิโนน (Menaquinones analysis)

ซังเซลล์แห้ง 100-200 มิลลิกรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ เติมคลอโรฟอร์ม : เมทานอล อัตราส่วน 2:1 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิทและหุ้มฟลอยด์ ปั่นข้ามคืนที่อุณหภูมิห้องในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ทำการกรองเอาเศษเซลล์ออกและล้างกระดาษกรองอีกรอบโดยเติมคลอโรฟอร์ม : เมทานอล อัตราส่วน 2:1 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำสารละลายตัวอย่างไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสภาวะสุญญากาศ ละลายสารตัวอย่างด้วยอะซิโตน (acetone) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จุดลงบน silica TLC (Kieselgel 60 F<sub>254</sub> 20 x 5 cm) จุ่มในสารละลายเบนซีน (benzene) จนสุดแผ่น รอให้แห้ง ตรวจสอบแถบของมีนาควิโนนด้วยแสงยูวี (UV) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และทำการจุดซิลิกาบนแผ่น TLC บริเวณแถบของมีนาควิโนน และละลายมีนาควิโนนในซิลิกาด้วยอะซิโตน (HPLC grade) ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography ; HPLC) โดยใช้ คอลัมน์ Cosmosil 5 C18 (4.6 x 150 มิลลิเมตร) และเมทานอล : โพรพานอล (Methanol : 2-propanol) อัตราส่วน 2:1 เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 270 นาโนเมตร

### 3.2.2.7 การวิเคราะห์กรดมัคโคลิก (Mycolic acid analysis)

ซังเซลล์แห้ง 50-200 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียว เติมโพแทสเซียมในเมทานอล (KOH-methanol) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปิดฝาให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง รอให้เย็นเติมกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 6 นอร์มอล ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร และเฮกเซน (n-hexane) หรือ ปีโตรเลียม อีเทอร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสด้านบนใส่หลอดทดลองฝาเกลียวหลอดใหม่ เติมเฮกเซน (n-hexane) หรือ ปีโตรเลียม อีเทอร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายส่วนล่างเพื่อสกัดซ้ำอีกรอบ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วน

ใส่ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียวใหม่ข้างต้น และทำให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน นำสารตัวอย่างที่แห้งเติมเบนซีน : เมทานอล : กรดซัลฟิวริก (benzene : methanol : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) อัตราส่วน 10:20:1 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง รอให้เย็นและเติมน้ำ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และเฮกเซน ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสด้านบนใส่หลอดทดลองฝาเกลียวหลอดใหม่ เติมเฮกเซน (n-hexane) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายส่วนล่างเพื่อสกัดซ้ำอีกรอบ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูส่วนใสใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียวใหม่ข้างต้น และทำให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน ละลายสารตัวอย่างที่แห้งด้วยเฮกเซนเล็กน้อย จุดบน silica TLC จุ่มในสารละลายผสมเฮกเซน : ไดเอทิลอีเทอร์ (hexane : diethylether) อัตราส่วน 4:1 จนสุดแผ่น รอให้แห้ง นำแผ่น TLC รมควันของไอโอดีน หรือฉีดด้วยกรดซัลฟิวริก เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ตรวจสอบผลโดยแถบของสารที่เกิดขึ้น

### 3.2.3 การศึกษาลักษณะจีโนไทป์ (Genotypic characteristics)

3.2.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และการทำให้บริสุทธิ์

นำแอกติโนมัยสีทเลี้ยงบนอาหารแข็ง yeast extract-malt extract (ISP2) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 วัน สกัดดีเอ็นเอโดยการใช้ไม้จิ้มฟันปราศจากเชื้อเชียวโคลินีใส่ใน TE buffer (ภาคผนวก ข) บดให้เซลล์แตกละเอียด จากนั้นดูดสารละลายดีเอ็นเอแม่แบบ 2 ไมโครลิตร ผสมลงใน master mix ของบริษัท Bioneer ตารางที่ 3.1 มีปริมาตรรวมเท่ากับ 50 ไมโครลิตร ทำการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction ; PCR) โดยการนำหลอด master mix ที่มีดีเอ็นเอแม่แบบผสมอยู่ใส่ลงในเครื่อง Thermal cycler ที่มีสภาวะดังตารางที่ 3.2 และทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR Product) ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Gel electrophoresis) เพื่อเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอให้ตรงกับ DNA Marker ขนาด 1,500 bp

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

	ความเข้มข้น	ปริมาตร
Primer: 9F	10.0 pmol/μl	5.0 μl
Primer: 1541R	10.0 pmol/μl	5.0 μl
Master mix	2.0 mM	25.0 μl
Water	-	13.0 μl
Template DNA	100 - 200 ng/μl	2.0 μl
	รวม	50.0 μl

ตารางที่ 3.2 สภาวะในการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส

อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ (cycle)	ขั้นตอน
95 องศาเซลเซียส	3 นาที	1	Pre-denaturation
95 องศาเซลเซียส	30 วินาที	35	Denaturation
55 องศาเซลเซียส	30 วินาที		Annealing
72 องศาเซลเซียส	1 นาที		Extension
72 องศาเซลเซียส	5 นาที	1	Final extension
4 องศาเซลเซียส	∞	-	Cool down
รวมเวลาทั้งสิ้น : 1 ชั่วโมง 57 นาที			

ทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ให้บริสุทธิ์โดยใช้ DNA Purification Kit ของบริษัท Bioneer ดูดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ (microcentrifuge tube) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ FADF Buffer ปริมาตรเป็น 5 เท่าของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ หลังจากนั้นดูดสารละลายใส่ FADF column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนที่อยู่ใน collection tube ทิ้ง จากนั้นเติม wash buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนที่อยู่ใน collection tube ทิ้ง นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที ย้ายคอลัมน์ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ใหม่ เติม Elution buffer ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ใส่ลงตรงกลางคอลัมน์ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ตรวจสอบความบริสุทธิ์และความเข้มข้นด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer อัตราส่วนของค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ต่อ 280 นาโนเมตร (A260/A280) อยู่ในช่วง 1.6-1.8 และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1<sup>st</sup> base laboratory ประเทศมาเลเซีย

### 3.2.3.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ระบบชีวสารสนเทศ (Bioinformatics)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA มาทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (BLAST) ในฐานข้อมูล EzBioCloud เพื่อเปรียบเทียบหาสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงมากที่สุด และสกุลที่แตกต่างเพื่อนำไปจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ (Alignment) โดยใช้โปรแกรม Bioedit เวอร์ชัน 7.2.5.0 และสร้างแผนภูมิต้นไม้ 3 แบบ ได้แก่ Neighbor Joining (NJ) Maximum parsimony (MP) และ Maximum likelihood (ML) โดยใช้โปรแกรม MEGA เวอร์ชัน 7.0.26 เพื่อหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

### 3.2.3.3 การสกัดจีโนม

เลี้ยงแอกติโนมัยสีทในอาหารเหลว yeast extract-malt extract (ISP2) บ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเก็บเซลล์โดยนำน้ำหมักปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง และล้างเซลล์ด้วยสารละลาย S-EDTA ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (pH 8) (ภาคผนวก ข) ปราศจากเชื้อจนใส และเท S-EDTA ที่เหลือไว้เล็กน้อย ดูดสารละลายเซลล์ ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ เติมไลโซไซม์ (lysozyme) เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulphate ; SDS) เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และเอนไซม์โปรตีนเนส เค (proteinase K) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 8 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา บ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 ชั่วโมง (ถ้าเซลล์ยังถูกย่อยไม่หมดสังเกตจากความใส และหนืดของสารละลาย สามารถบ่มข้ามคืนได้) เติมโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ CTAB/NaCl (Cetyltrimethylammonium bromide) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที รอให้เย็น เติมคลอโรฟอร์มปริมาตรเป็น 1 เท่าของสารละลาย ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนบนใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ใหม่เติมฟีนอล : คลอโรฟอร์ม (phenol : chloroform) อัตราส่วน 1:1 (ภาคผนวก ข) ปริมาตรเป็น 1 เท่าของสารละลายผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนบนใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ใหม่เติมเอนไซม์อาร์เอ็นเอส เอ (RNase A) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยุดการทำงานของเอนไซม์อาร์เอ็นเอส เอ โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมฟีนอล : คลอโรฟอร์ม อัตราส่วน 1:1 ปริมาตรเป็น 1 เท่าของสารละลายผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนบนใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ใหม่ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติมเอทานอลที่เย็นจัด ปริมาตรเป็น 2 เท่าของสารละลาย ทำซ้ำ 2-3 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้จนดีเอ็นเอแห้งแล้วนำไปละลายด้วยสารละลายซาลีน-โซเดียมซิเตรต (Saline sodium citrate ; SSC) ความเข้มข้น 1 เท่า (ภาคผนวก ข) ตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แล้วตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติมเอทานอลที่เย็นจัดตั้งทิ้งไว้จนดีเอ็นเอแห้ง ส่งตัวอย่างดีเอ็นเอวิเคราะห์ที่ศูนย์วิทยาศาสตร์โอมิคส์และชีวสารสนเทศ (Omics Science and Bioinformatics Center) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 3.2.3.4 การวิเคราะห์จีโนม (Whole genome analysis) และชีวสารสนเทศ (Bioinformatics)

การวิเคราะห์จีโนมทางศูนย์วิทยาศาสตร์โอมิคส์และชีวสารสนเทศ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ใช้เครื่อง illumina Miseq 1TB (illumina Inc. San Diego, US-CA) ทาลำดับนิวคลีโอไทด์ นำ Whole genome shotgun sequence (WGS) ที่ได้มาเชื่อม (assembly) ด้วยโปรแกรม SPAdes เวอร์ชัน 3.10.179 นำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ (Contig) ไปทำนายยีน (annotation) ด้วยโปรแกรม Prokka เวอร์ชัน 1.1280 และ pipeline ของ NCBI (NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline; PGAP) การคำนวณค่า Average Nucleotide Identity (ANI) และ digital G+C content ทำโดยใช้ อัลกอริทึม ANI-MUMmer (ANIm) และ ANI-BLAST (ANiB) ของ JSpeciesWS การทำ digital DNA-DNA hybridization (dDDH) เทียบกับสายพันธุ์ใกล้เคียง สามารถทำได้โดยใช้ Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC) เวอร์ชัน 2.186 สำหรับการวิเคราะห์กลุ่มยีน (gene cluster) ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิวิเคราะห์ด้วยฐานข้อมูล anti-SMASH การสร้าง Genome circular map โดยใช้โปรแกรม CGview โดยจะแสดงผลของยีนที่ผ่านการทำ annotation และแบ่งกลุ่มตาม COG (Clusters of Orthologous Groups)

## 3.3 การคัดเลือกแอกติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

### 3.3.1 การสกัดสารทุติยภูมิจากแอกติโนมัยสีท

เลี้ยงแอกติโนมัยสีทในอาหารเหลว yeast extract-malt extract (ISP2) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน หลังจากนั้นนำส่วนน้ำหมักที่ได้มาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate) ในอัตราส่วน 1:1 นำชิ้นของเอทิลอะซิเตทมาระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสภาวะสุญญากาศที่อุณหภูมิไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส นำสารสกัดหยาบมาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

### 3.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์โดยวิธี Agar disc diffusion

ทำการทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 8 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Escherichia coli* ATCC 25922 *Micrococcus luteus* ATCC 9341 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 Methicilin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20654 Vancomycin-Resistant Enterococcus (VRE ; clinical strain) และ *Candida albicans* ATCC 10231 ทำสารละลายจุลินทรีย์ทดสอบในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปรับความหนาแน่นของจุลินทรีย์เทียบเท่ากับ 0.5 McFarland ( $1.5 \times 10^8$  CFU/ml) ใช้ไม้พันสำลีจุ่มสารละลายจุลินทรีย์ทดสอบลาก (Swab) บนอาหาร mueller hinton agar (MHA) สำหรับแบคทีเรีย และอาหาร potato dextrose agar (PDA) สำหรับ

ยีสต์ (ภาคผนวก ก) เป็นแนวระนาบ 3 ระนาบ จากนั้นละลายสารสกัดหยาบด้วยเมทานอลให้มีความเข้มข้น 1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หยดสารละลายสารสกัดหยาบปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนดิสก์ (disc) รอให้แห้ง โดยใช้ตัวทำละลายที่ละลายสารสกัดหยาบเป็นตัวควบคุมเชิงลบ (Negative control) วางดิสก์ลงบนอาหารที่ swab จุลินทรีย์ทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สำหรับแบคทีเรีย และบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส สำหรับยีสต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone)

### 3.4 การศึกษาการแยกสารทุติยภูมิให้บริสุทธิ์ และองค์ประกอบทางเคมี

#### 3.4.1 การสกัดสารสกัดหยาบจากไอโซเลตที่ถูกคัดเลือก

เลี้ยงไอโซเลต CA3R110 ในอาหารเหลว yeast extract-malt extract (ISP2) บ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน หลังจากนั้นนำส่วนน้ำหมักที่ได้มาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate) ในอัตราส่วน 1:1 สกัดซ้ำ 3 ครั้ง นำชั้นของเอทิลอะซิเตทมาระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสภาวะสุญญากาศ เก็บรักษาสารสกัดหยาบที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

#### 3.4.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

สารสกัดหยาบของ CA3R110 ละลายในตัวทำละลายผสมเมทานอล : ไดคลอโรมีเทน (methanol : dichloromethane) อัตราส่วน 7:3 นำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (UltiMate 3000, DIONEX) คอลัมน์ RP C-18 (3 ไมโครเมตร, 55 × 2 มิลลิเมตร) (Purospher®STAR; Merck) และอะซิโตนไนโตรล : น้ำ (CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O) 0-100 เปอร์เซ็นต์ เป็นเฟสเคลื่อนที่ ที่อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

#### 3.4.3 การแยกสารทุติยภูมิด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

นำสารสกัดหยาบของ CA3R110 ทำการแยกโดยใช้คอลัมน์แก้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร บรรจุด้วย sephadex LH-20 เป็นเฟสคงที่สูง 40 เซนติเมตร และเฟสเคลื่อนที่คือ เมทานอล : ไดคลอโรมีเทน อัตราส่วน 7:3 เก็บตัวอย่างสารที่ไหลผ่านคอลัมน์ (fraction) ใส่หลอดทดลอง หลังจากนั้นนำแต่ละ fraction วิเคราะห์องค์ประกอบตามข้อ 3.4.2 โดยทำการรวม fraction ที่มีลักษณะโครมาโทแกรมเหมือนกันเข้าด้วยกัน นำไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป

#### 3.4.4 การแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

จากการนำสารสกัดหยาบแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ และรวม fraction ที่มีลักษณะโครมาโทแกรมเหมือนกันเข้าด้วยกันแล้วได้สารทั้งหมด 5 Fraction ซึ่ง Fraction ที่สนใจ ได้แก่ Fraction ที่ 1 Fraction ที่ 4 และ Fraction ที่ 5 จึงนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้สภาวะต่าง ๆ (รูปที่ 3.1) ดังนี้

Fraction ที่ 1 (F1) แยกโดยใช้คอลัมน์แบบ preparative ของ sunfire ขนาด 21.2x250 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาคของเฟสคงที่ 10 ไมโครเมตร เฟสเคลื่อนที่เป็นแบบ gradient คืออะซิโตไนล์ต่อน้ำกลั่น 55 ถึง 95 เปอร์เซ็นต์ ผสมกรดฟอร์มิก 0.05 เปอร์เซ็นต์ อัตราการไหล 12 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 35 นาที ได้ fraction ย่อย ทั้งหมด 2 fraction ย่อย ได้แก่ F1H1 และ F1H2 โดย fraction ย่อยที่ F1H1 คือสาร C และ F1H2 คือสาร D

Fraction ที่ 4 (F4) แยกโดยใช้คอลัมน์แบบ preparative ของ sunfire ขนาด 21.2x250 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาคของเฟสคงที่ 10 ไมโครเมตร เฟสเคลื่อนที่เป็นแบบ gradient คืออะซิโตไนล์ต่อน้ำกลั่น 5 ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ ผสมกรดฟอร์มิก 0.05 เปอร์เซ็นต์ อัตราการไหล 12 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 35 นาที ได้ fraction ย่อย ทั้งหมด 11 fraction ย่อย ได้แก่ F4H1 ถึง F4H11 โดย fraction ย่อยที่ F4H5 คือสาร E, F4H8 คือสาร F, F4H10 คือสาร B และ F4H11 คือสาร A

Fraction ที่ 5 (F5) ใช้คอลัมน์แบบ preparative ของ sunfire C18 ขนาด 21.2x250 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาคของเฟสคงที่ 10 ไมโครเมตร ในการแยก โดยมีเฟสเคลื่อนที่เป็นแบบ gradient คืออะซิโตไนล์ต่อน้ำกลั่น 5 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ผสมกรดฟอร์มิก 0.05 เปอร์เซ็นต์ อัตราการไหล 12 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 35 นาที ได้ fraction ย่อย ทั้งหมด 2 fraction ย่อย ได้แก่ F5H8 คือสาร F, F5H9 คือสาร B และ F5H10 คือสาร A

ทุก Fraction ที่ผ่านการแยกด้วยคอลัมน์แบบ preparative จะถูกนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง HPLC ตามข้อที่ 3.4.2

### 3.4.5 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์

#### 3.4.5.1 Ultraviolet-Visible (UV-vis) spectroscopy

สเปกตรัม UV-vis ของสารทุติยภูมิจะถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Shimadzu รุ่น UV-1800) โดยละลายสารตัวอย่างด้วยเมทานอล

#### 3.4.5.2 Infrared spectroscopy (IR)

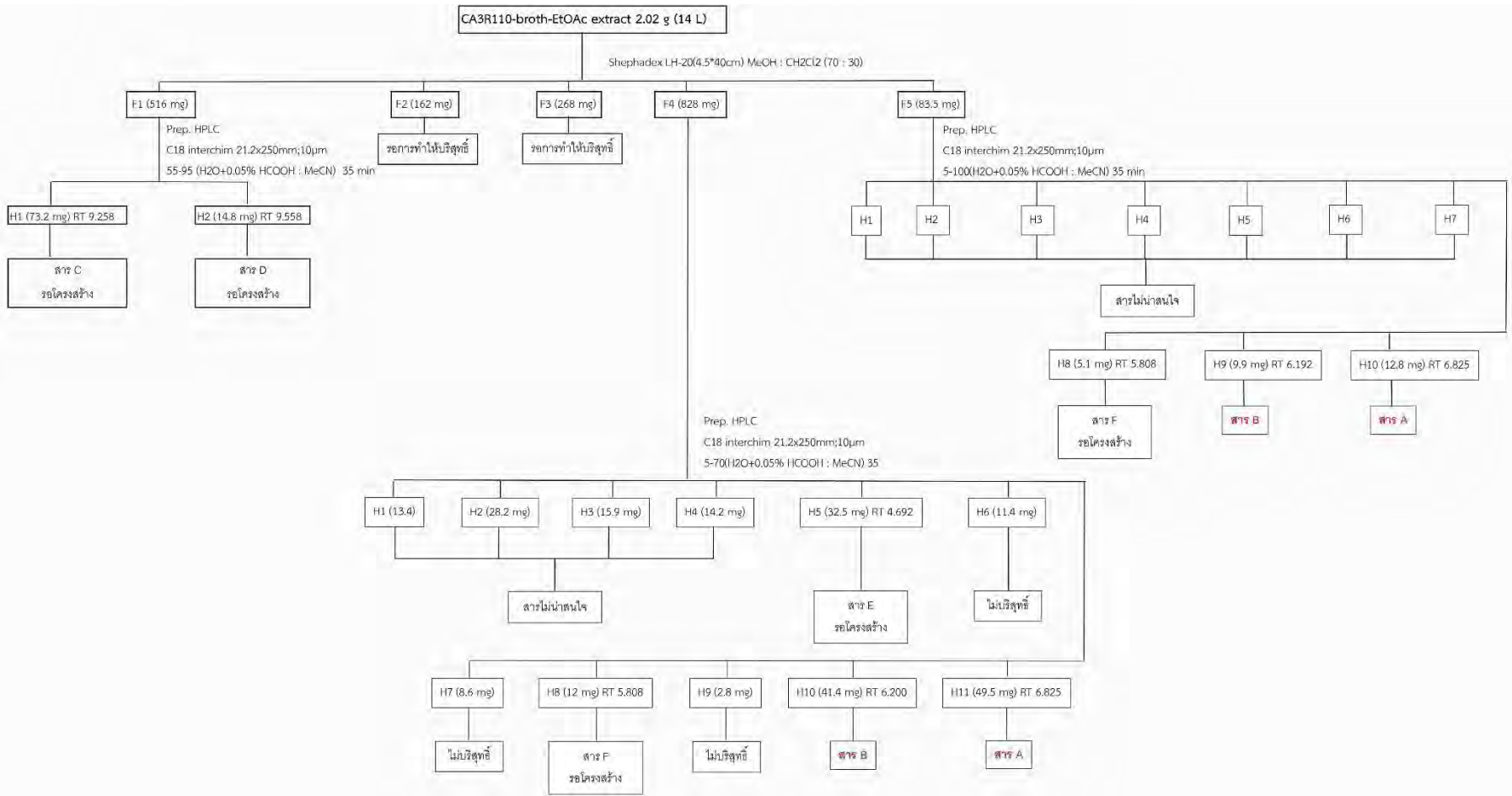
สเปกตรัมอินฟราเรดของสารทุติยภูมิจะถูกวิเคราะห์ด้วย FT-IR spectrometer ของ Bruker

#### 3.4.5.3 Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

สเปกตรัม NMR ได้แก่  $^1\text{H-NMR}$   $^{13}\text{C-NMR}$  DEPT 135 COSY NOESY HMBC HSQC ถูกวิเคราะห์โดยเครื่อง NMR ของ Bruker รุ่น ADVANCE 500 MHz ( $^1\text{H}$  500 MHz และ  $^{13}\text{C}$  125 MHz)

#### 3.4.5.5 Mass spectrometry

มวลโมเลกุลของสารทุติยภูมิ และสเปกตรัม Mass spectroscopy ได้จากการวิเคราะห์ด้วย High Resolution electrospray ionization mass spectra (HRESIMS) ของ Bruker ในหน่วย  $m/z$



รูปที่ 3.1 แผนผังแสดงการแยกสารสกัดหยาบจากไอโซเลต CA3R110

### 3.5 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activities)

#### 3.5.1 การทดสอบฤทธิ์การต้านการเจริญจุลินทรีย์

##### 3.5.1.1 การเตรียมสารละลายจุลินทรีย์ทดสอบ

นำจุลินทรีย์ที่สารสกัดหยาบสามารถยับยั้งการเจริญจาก 3.5.2 มาทำการทดสอบ โดยนำโคลนอายุประมาณ 24 ชั่วโมง เลี้ยงในอาหาร mueller hinton broth (MHB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับค่าความขุ่นโดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความหนาแน่นของจุลินทรีย์ทดสอบเทียบเท่ากับ 0.5 McFarland ( $1.5 \times 10^8$  CFU/ml) แล้วนำมาปรับความหนาแน่นของเชื้อให้ได้ประมาณ  $1 \times 10^6$  CFU/ml ด้วยอาหารเหลว MHB

##### 3.5.1.2 การเตรียมสารบริสุทธิ์

นำสารบริสุทธิ์มาทำการเตรียมในตัวทำละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide; DMSO) เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ให้มีความเข้มข้นของสารบริสุทธิ์ลดลงแบบลำดับสอง (two-fold serial dilution) โดยมีความเข้มข้น 0.488 ถึง 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.5.1.3 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถต้านการเจริญของเชื้อ (Minimal inhibitory concentration; MIC) ด้วย Microdilution broth

ทำการวิเคราะห์ด้วยไมโครเพลท 96 หลุม (96 well plate) โดยเติมสารบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.225 ถึง 1,000) ลงในหลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และอาหารเหลว MHB ปริมาตร 90 ไมโครลิตร สารละลายจุลินทรีย์ทดสอบที่ปรับความขุ่นแล้ว ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ( $1 \times 10^5$  CFU/ml) ปิดฝาแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง การอ่านผลค่า MIC สังเกตความขุ่นหรือใสของอาหารที่ไม่มีเชื้อเจริญ เปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่มีแต่อาหารกับสารบริสุทธิ์ โดยมีชุดควบคุมเชิงลบ คือ อาหาร MHB ปริมาตร 190 ไมโครลิตร กับสารละลายเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้ว ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ชุดควบคุมของตัวทำละลาย คือสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร อาหาร MHB ปริมาตร 90 ไมโครลิตร และสารละลายเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้ว ปริมาตร 10 ไมโครลิตร (Koeth et al., 2015)

#### 3.5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

##### 3.5.2.1 การเตรียมสารบริสุทธิ์

เตรียมสารบริสุทธิ์ในตัวทำละลายเมทานอลให้มีความเข้มข้นลดลงแบบลำดับสอง (two-fold serial dilution) โดยมีความเข้มข้น 0.97 ถึง 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

### 3.5.2.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) และบิวทิลไฮดรอกซีโทลูอีน (BHT) โดยทำการเจือจางด้วยเมทานอลให้ความเข้มข้นในช่วง 0.97 ถึง 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

### 3.5.2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH free radical scavenging

ทำการวิเคราะห์ด้วยไมโครเพลท 96 หลุม โดยนำสารบริสุทธิ์ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับตัวอย่างผสมเมทานอล (Blank sample) และสารละลาย DPPH (Blank DPPH) (ภาคผนวก ฉ) บ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท (Microplate Reader) โดยใช้สารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก และ BHT เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (Positive control) คำนวณร้อยละการดักจับอนุมูลอิสระสารตัวอย่าง และสารมาตรฐานตามสมการที่ 3.1 สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสาร (x) และเปอร์เซ็นต์การดักจับอนุมูลอิสระ (y) เพื่อหาค่าความเข้มข้นที่สามารถดักจับอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC<sub>50</sub>) (Chen et al., 2012)

$$\text{Inhibition percentage (\%)} = \frac{[(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{Blank DPPH}}) - (A_{\text{sample}} - A_{\text{Blank sample}})] \times 100}{A_{\text{DPPH}} - A_{\text{Blank DPPH}}} \quad (\text{สมการที่ 3.1})$$

## 3.6 การทดสอบทางสถิติ (statistical analysis)

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าความเข้มข้นที่สามารถดักจับอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC<sub>50</sub>) เฉลี่ยของแต่ละตัวอย่างด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ตามวิธีของ Duncan (Duncan's multiple range test) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p < 0.05) ด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 26

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

#### 4.1 แหล่งที่มาของแอคติโนมัยสีท

แยกแอคติโนมัยสีทจากตัวอย่าง 2 ชนิด คือ ดินจากป่าพรุลานควาย จังหวัดปัตตานี และรากของต้นกาแฟ *Coffea arabica* (L.) จากไร่กาแฟชูนันต์ จังหวัดราชบุรี หมู่บ้านแม่คำหาล้า จังหวัดลำปาง และชุมชนกาแฟดงมะไฟ จังหวัดนครราชสีมา รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แอคติโนมัยสีทแต่ละไอโซเลตที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ

สถานที่	จังหวัด	ชนิดตัวอย่าง	ไอโซเลต	อุณหภูมิของดิน (°C)
ไร่กาแฟชูนันต์	ราชบุรี	รากของต้นกาแฟ <i>C. arabica</i> (L.)	CA1R205	-
หมู่บ้านแม่คำหาล้า	ลำปาง		CA3R110	-
ชุมชนกาแฟดงมะไฟ	นครราชสีมา		CA2R105	-
ป่าพรุลานควาย (6°41'53.0"N101°26'52.2"E)	ปัตตานี	ดินปนทราย (pH 4.9)	PLK6-54 และ PLK6-60	28.0

จากการนำแอคติโนมัยสีททั้ง 5 ไอโซเลต มาทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บนช่วงยีน 16S rRNA เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล EzBioCloud พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละไอโซเลตมีความใกล้เคียงกับแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ต่าง ๆ สามารถจัดจำแนกได้ 3 สกุล ได้แก่ สกุล *Streptomyces* จำนวน 3 ไอโซเลต สกุล *Nocardia* จำนวน 1 ไอโซเลต และสกุล *Micromonospora* จำนวน 1 ไอโซเลต (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 เปรอ์เซ็นต์ความใกล้เคียงของแอคติโนมัยสีทไอโซเลตต่าง ๆ กับสายพันธุ์ใกล้เคียง

ไอโซเลต	Similarity (%)	สายพันธุ์ใกล้เคียง
CA1R205	98.44	<i>S. rapamycinicus</i> NRRL B-5491 <sup>T</sup>
	98.40	<i>S. iranensis</i> HM 35 <sup>T</sup>
CA3R110	99.14	<i>S. rapamycinicus</i> NRRL B-5491 <sup>T</sup>
	99.02	<i>S. iranensis</i> HM 35 <sup>T</sup>
CA2R105	99.17	<i>N. jiangxiensis</i> NBRC 101359 <sup>T</sup>
	98.61	<i>N. nova</i> NBRC 15556 <sup>T</sup>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์ความใกล้เคียงของแอสโคดิโนมัยสียาไอโซเลตต่าง ๆ กับสายพันธุ์ใกล้เคียง (ต่อ)

PLK6-54	99.01	<i>S. rubidus</i> 13C15 <sup>T</sup>
	98.41	<i>S. bryophytorum</i> NEAU-HZ10 <sup>T</sup>
PLK6-60	99.14	<i>M. aurantiaca</i> DSM 43813 <sup>T</sup>
	99.14	<i>M. siamensis</i> DSM 45097 <sup>T</sup>

#### 4.2 ลักษณะทางอนุกรมวิธานหลายส่วน (Polyphasic taxonomy)

จากข้อมูลในตารางที่ 4.2 พบว่าไอโซเลต CA1R205 มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของยีน 16S rRNA ที่ระดับ 98.44 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีระดับต่ำกว่าเกณฑ์กำหนดความเป็นสปีชีส์ใหม่ที่กำหนดโดย Rossi-Tamisier และคณะ (2015) สำหรับไอโซเลต CA3R110 CA2R105 PLK6-54 และ PLK6-60 มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของยีน 16S rRNA สูงกว่าเกณฑ์กำหนดความเป็นสปีชีส์ใหม่ อย่างไรก็ตาม การใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บนช่วงยีน 16S rRNA อาจไม่เพียงพอในการระบุชนิดของแอสโคดิโนมัยสียาได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นควรทำการศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานเพิ่มเติม ด้วยลักษณะอนุกรมวิธานหลายส่วน (polyphasic taxonomy) ประกอบด้วย ข้อมูลของลักษณะทางฟีโนไทป์ อนุกรมวิธานเคมี และลักษณะทางจีโนมไทป์ เพื่อยืนยันตำแหน่งอนุกรมวิธานในระดับสกุล และสปีชีส์

##### 4.2.1 เอนโดไฟติกแอสโคดิโนมัยสียาจากต้นกาแฟ *C. arabica* (L.)

###### 4.2.1.1 ไอโซเลต CA1R205

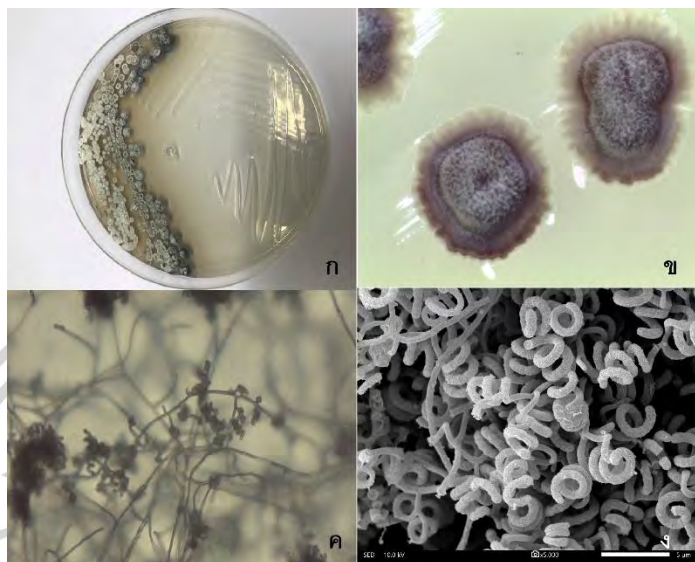
###### (1) ลักษณะทางฟีโนไทป์

ไอโซเลต CA1R205 สามารถเจริญได้ดีบนอาหารแข็ง ISP2 ISP3 ISP4 ISP5 และ glucose asparagines เจริญได้ปานกลางบนอาหารแข็ง ISP6 และ nutrient agar และเจริญได้น้อยบนอาหารแข็ง ISP7 และ czapek's sucrose เส้นใยอาหารมีสีเหลืองอมเขียว (moderate greenish yellow) จนถึงสีแดงเข้ม (very deep red) สามารถสร้างเส้นใยอากาศและสปอร์สีขาวอมเทาบนอาหารแข็ง ISP3 ISP4 ISP5 czapek's sucrose และ nutrient agar มีการสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสีเหลืองอมเขียว (vivid greenish yellow) จนถึงสีน้ำตาล (grayish yellowish brown) บนอาหารแข็ง ISP3 ISP4 ISP5 ISP6 และ glucose asparagines (ตารางที่ 4.3) จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์บนอาหารแข็ง ISP5 ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่มีเลนส์ส่องระยะไกล พบว่าไอโซเลต CA1R205 สร้างสปอร์ที่มีการเรียงต่อกันเป็นเกลียว (spiral spore chains) บนเส้นใยอากาศ (รูปที่ 4.1) เมื่อตรวจสอบลักษณะของผิวสปอร์โดยการส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (กำลังขยาย 5,000 เท่า) พบว่าผิวสปอร์มีลักษณะขรุขระ (rugose) ลักษณะสัณฐานวิทยาของสปอร์ดังกล่าวพบได้ทั่วไปในสกุล *Streptomyces* (Goodfellow et al. 2012) และมีลักษณะการเรียงตัวของสปอร์และผิวสปอร์คล้ายคลึงกับ *S. rapamycinicus* DSM 41530<sup>T</sup> (Kumar and Goodfellow,

2008) จากการเปรียบเทียบลักษณะการเจริญของไอโซเลต CA1R205 และ *S. rapamycinicus* DSM

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้เผยแพร่จะต้องแจ้งชื่อผู้จัดทำเอกสารทุกครั้ง ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

41530<sup>T</sup> ซึ่งเป็นสายพันธุ์อ้างอิง (reference strain) ที่ใกล้เคียง คือ พบความแตกต่างของสีเส้นใยอาหารและการผลิตรงควัตถุที่ละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ในทางตรงกันข้ามเชื้อทั้งสองมีสีของเส้นใยอากาศและสปอร์ที่คล้ายคลึงกัน (ตารางที่ 4.3)



รูปที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต CA1R205 (ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP5 (ค) ลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีเลนส์ส่องระยะไกลเป็นเลนส์ใกล้วัตถุ (กำลังขยาย 400 เท่า) และ (ง) สัณฐานวิทยาของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (กำลังขยาย 5,000 เท่า)

ไอโซเลต CA1R205 สามารถเจริญบนอาหาร ISP2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์สูงสุด 3 เปอร์เซ็นต์ ช่วงพีเอช 6-9 และอุณหภูมิระหว่าง 20-40 องศาเซลเซียส สามารถย่อยแป้ง และโปรตีนในนม แต่ไม่สามารถย่อยเจลาติน ยูเรีย ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรต และไม่สามารถสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้ มีการสร้างกรดในแหล่งคาร์บอนทุกชนิดที่นำมาทดลอง สามารถใช้ดี-กลูโคส ดี-เซลโลไบโอส ดี-ราฟฟิโนส ซิลิทอล ดี-แลคโตส ดี-ซาลิซิน ไมโอ-อินนิซิทอล ดี-เมลิไบโอส อินนูลิน เดกซ์แทรน ดี-กาแลคโตส ดี-ไซโลส ทรีฮาโลส แอล-แรมโนส และ ดี-ฟรุคโตส เป็นแหล่งคาร์บอน และสามารถใช้ออสพาราจिन แอล-ฮิสทีดีน 4-ไฮดรอกซีไพโรลีน แอล-เมไทโอนีน แอล-ฟีนิลอะลานีน และแอล-ทรีโอนีน เป็นแหล่งไนโตรเจน และสามารถย่อยอะดีนีน สร้างเอนไซม์อะเลสและออกซิเดสได้ เมื่อนำไปทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยชุดทดสอบ API ZYM ไอโซเลต CA1R205 สามารถสร้างเอนไซม์ Alkaline phosphatase, Leucine arylamidase, Chymotrypsin, Acid phosphatase และ Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase (ภาคผนวก ค)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ลักษณะการเจริญของไอโซเลต CA1R205, *S. rapamycinicus* DSM 41530<sup>T</sup> และ *S. iranensis* HM 35<sup>T</sup>

สายพันธุ์	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สารสีละลายน้ำ
CA1R205	ISP2	ดี	Very deep red	Grayish greenish yellow	-
	ISP3	ดี	Very deep red	White	Grayish yellowish brown
	ISP4	ดี	Very deep red	White	Light brownish gray
	ISP5	ดี	Very deep red	Light greenish gray	Dark grayish yellow
	ISP6	ปานกลาง	Grayish greenish yellow	-	Vivid greenish yellow
	ISP7	น้อย	Moderate greenish yellow	-	-
	GluA	ดี	Very deep red/Bluish gray	-	Pale yellowish green
	Czapek	น้อย	Very deep red	White	-
	NA	ปานกลาง	Moderate greenish yellow	White	-
<i>S. rapamycinicus</i> DSM 41530 <sup>T</sup>	ISP2	ดี	Pale greenish yellow	White	-
	ISP3	ดี	Pale greenish yellow	White/spore: Brownish gray	-
	ISP4	ดี	Grayish greenish yellow	White/spore: Brownish gray	Brilliant greenish yellow
	ISP5	ดี	Moderate greenish yellow	White	-
	ISP6	ปานกลาง	Pale greenish yellow	-	-
	ISP7	ดี	Moderate greenish yellow	White	-

ตารางที่ 4.3 ลักษณะการเจริญของไอโซเลต CA1R205, *S. rapamycinicus* DSM 41530<sup>T</sup> และ *S. iranensis* HM 35<sup>T</sup> (ต่อ)

สายพันธุ์	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สารสีละลายน้ำ
<i>S. rapamycinicus</i> DSM 41530 <sup>T</sup> (ต่อ)	GluA	น้อย	Moderate greenish yellow	White	-
	Czapek	น้อย	Yellowish white	-	-
	NA	ปานกลาง	Grayish greenish yellow	White	-
<i>S. iranensis</i> HM 35 <sup>T</sup>	ISP2	ดี	Beige	Greyish-white to Grey	Pale yellow
	ISP3	ดี	Brownish-yellow	Grey to greyish black	-
	ISP4	ดี	Light brownish-yellow	Grey	-
	ISP5	ดี	Light brownish-yellow	Greyish-white	-
	ISP6	ดี	Light yellowish-brown	-	-
	ISP7	ปานกลาง	Yellowish-brown	Greyish-white	-
	GluA	น้อย	Yellowish-white	-	-
	Czapek	ดี	Yellowish-white	Greyish-white	-
	NA	ดี	Light brownish-yellow	Greyish-white	-

## (2) ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี

ไอโซเมอร์ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในผนังเซลล์ของไอโซเลต CA1R205 เป็นแบบ LL พบน้ำตาลกลูโคส กลูโคส แมนโนส และไรโบสภายในเซลล์ กรดไขมันหลัก (>10%) ในเซลล์ที่พบ คือ iso-C<sub>15:0</sub>, anteiso-C<sub>15:0</sub>, iso-C<sub>16:0</sub> และ C<sub>16:0</sub> นอกจากนี้พบ C<sub>12:0</sub>, C<sub>13:1</sub>, iso-C<sub>14:0</sub>, C<sub>14:0</sub>, iso-C<sub>16:1</sub> H, anteiso-C<sub>17:1</sub> ω9c, iso-C<sub>17:0</sub>, anteiso-C<sub>17:0</sub>, C<sub>17:0</sub>, C<sub>18:1</sub> ω9c, C<sub>18:0</sub> และ C<sub>17:0</sub> cyclo เป็นกรดไขมันรอง (ตารางที่ 4.4) ชนิดของไขมันมีหัวที่พบคือ phosphatidylethanolamine (PE), hydroxyphosphatidylethanolamine (OH-PE), phosphatidylglycerol (PG), diphosphatidylglycerol (DPG) และ phosphatidylinositol (PI) (ภาคผนวก ง) พบมีนาควิโนนหลัก คือ MK-9(H<sub>6</sub>) (57.3%) และ MK-9(H<sub>4</sub>) (10.8%) นอกจากนี้พบ MK-10(H<sub>4</sub>) (6.1%), MK-10(H<sub>6</sub>) (1.0%), MK-10(H<sub>2</sub>) (0.9%), และ MK-10(H<sub>8</sub>) (0.3%) เป็นมีนาควิโนนรอง ไม่พบกรดมัคคอลลิก (mycolic acid) โดยลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของไอโซเลต CA1R205 คล้ายคลึงกับลักษณะอนุกรมวิธานเคมีทั่วไปที่พบในสกุล *Streptomyces* (Goodfellow et al., 2012) เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิงคือ *S. rapamycinicus* DSM 41530<sup>T</sup> ซึ่งทั้งสองมีรูปแบบของกรดไขมันหลักคล้ายคลึงกัน แต่มีชนิดของน้ำตาลในเซลล์และชนิดของฟอสโฟลิปิดแตกต่างกัน โดย *S. rapamycinicus* DSM 41530<sup>T</sup> ไม่พบน้ำตาลกลูโคสและแมนโนสในเซลล์ รวมทั้งไม่พบ phosphatidylethanolamine (PE) และ hydroxyphosphatidylethanolamine (OH-PE)

ตารางที่ 4.4 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์ของไอโซเลต CA1R205 และสายพันธุ์อ้างอิง

กรดไขมัน (%)	1	2	3
iso-C <sub>15:0</sub>	10.3	21.5	27.6
anteiso-C <sub>15:0</sub>	11.6	14.6	18.5
iso-C <sub>16:0</sub>	19.4	18.1	12.1
C <sub>16:0</sub>	23.4	10.4	8.3
iso-C <sub>10:0</sub>	1.0	-	0.1
C <sub>12:0</sub>	1.8	0.2	-
iso-C <sub>13:0</sub>	0.5	-	0.2
C <sub>13:1</sub>	1.1	-	-
iso-C <sub>14:0</sub>	5.7	2.9	1.4
C <sub>14:0</sub>	3.4	1.9	0.1
iso-C <sub>16:1</sub> H	1.3	0.4	1.0
C <sub>15:0</sub> 2OH	0.5	0.1	0.2
iso-C <sub>17:1</sub>	-	1.2	3.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์ของไอโซเลต CA1R205 และสายพันธุ์อ้างอิง (ต่อ)

กรดไขมัน (%)	1	2	3
anteiso-C <sub>17:1</sub>	-	1.3	2.2
anteiso-C <sub>17:1</sub> ω <sub>9c</sub>	0.6	0.1	-
iso-C <sub>17:0</sub>	2.8	10.2	13.2
anteiso-C <sub>17:0</sub>	4.0	8.9	7.1
C <sub>17:0</sub>	1.3	3.5	-
C <sub>16:1</sub> ω <sub>7c</sub>	-	-	-
C <sub>16:1</sub> ω <sub>9c</sub>	-	0.1	1.3
C <sub>18:1</sub> ω <sub>9c</sub>	0.7	-	-
C <sub>18:0</sub>	0.8	0.1	0.1
C <sub>17:0</sub> cyclo	1.2	0.2	0.5

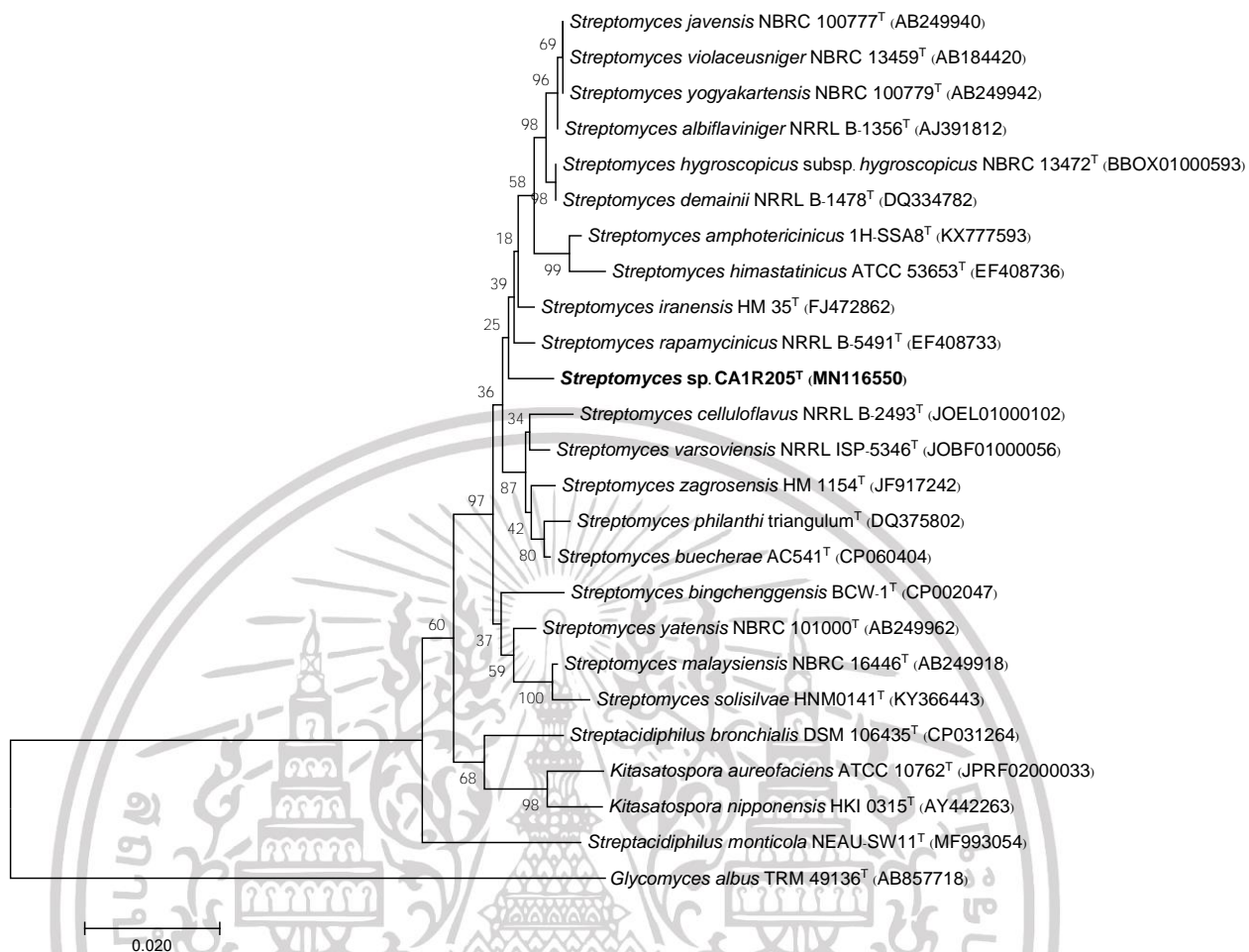
หมายเหตุ: สายพันธุ์: 1. CA1R205, 2. *S. rapamycinicus* DSM 41530<sup>T</sup> และ 3. *S. iranensis* DSM 41954<sup>T</sup>

### (3) ลักษณะทางจีโนมไทป์

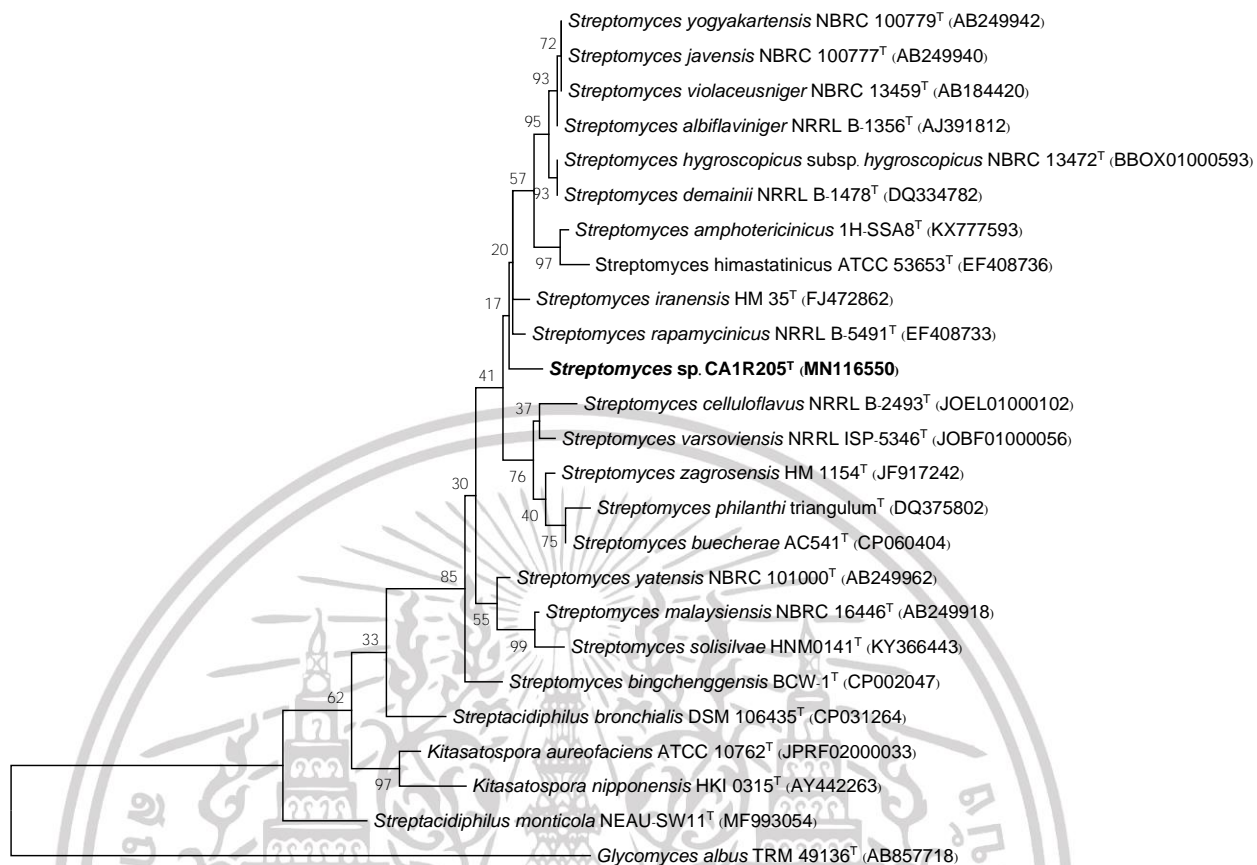
จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนช่วงยีน 16S rRNA ของไอโซเลต CA1R205 พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *S. rapamycinicus* NRRL B-5491<sup>T</sup> มากที่สุด ด้วยเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) เท่ากับ 98.44 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าจุดตัด (cutoff point) ของเกณฑ์กำหนดความแตกต่างระดับสปีชีส์ (<98.7%) ที่กำหนดโดย Rossi-Tamisier และคณะ (2015) จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่าไอโซเลต CA1R205 มีแนวโน้มที่จะเป็นสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Streptomyces* (ตารางที่ 4.5) นอกจากนี้การวิเคราะห์ตำแหน่งอนุกรมวิธานจากแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic trees) แบบ maximum-likelihood, neighbor-joining และ maximum-parsimony มีลักษณะคล้ายคลึงกัน โดยตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต CA1R205 แยกออกจาก *S. rapamycinicus* NRRL B-5491<sup>T</sup> และ *S. iranensis* HM 35<sup>T</sup> อย่างชัดเจน (รูปที่ 4.2-4.4) แต่มีค่าความเชื่อมั่น (bootstrap value) ในระดับต่ำ (<50%) บนแผนภูมิต้นไม้ทั้งสามแบบ นอกจากนี้มีระยะทางบนสายวิวัฒนาการ (evolutionary distances) ห่างกัน จากข้อมูลข้างต้นสามารถสรุปได้ว่าไอโซเลต CA1R205 มีความแตกต่างทางอนุกรมวิธานจาก *S. rapamycinicus* NRRL B-5491<sup>T</sup> และ *S. iranensis* HM 35<sup>T</sup>

ตารางที่ 4.5 เปรอ์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนช่วง 16S rRNA (% 16S rRNA gene similarity value) ระหว่างไอโซเลต CA1R205 และสายพันธุ์ใกล้เคียงในฐานข้อมูล EzBioCloud

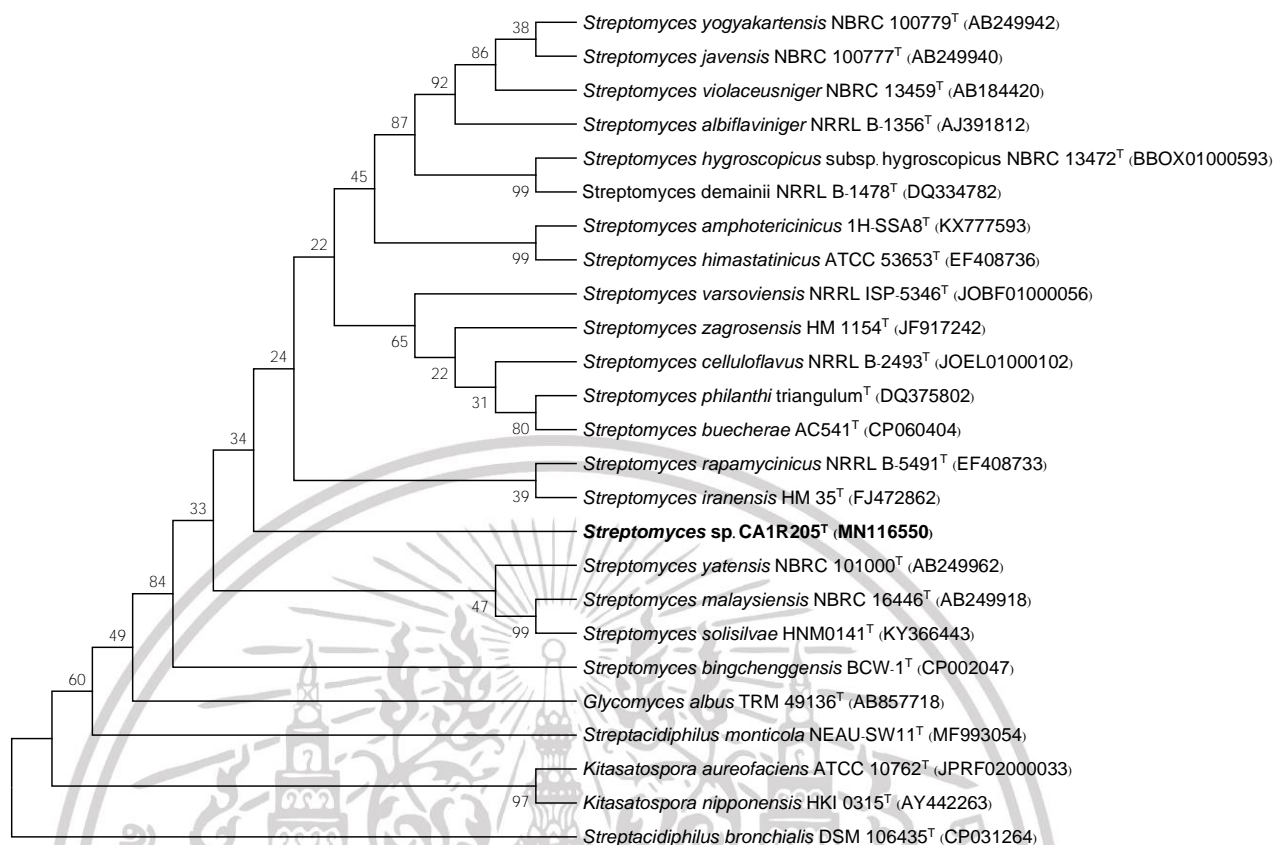
	สายพันธุ์ใกล้เคียง	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	CA1R205	100	98.44	98.40	98.40	98.33	98.13	98.09	97.99	97.99	97.98	97.92	97.92	97.85	97.85	97.80	97.80	97.78	97.78	97.78	97.78
2	<i>S. rapamycinicus</i>	98.44	100	99.40	99.10	98.10	99.10	98.60	98.90	98.90	98.90	98.60	98.80	98.80	97.80	98.40	99.00	98.30	98.40	98.70	98.90
3	<i>S. iranensis</i>	98.40	99.40	100	99.20	98.30	99.20	98.40	99.10	99.10	99.10	98.70	98.60	98.60	97.80	98.30	99.20	98.20	98.30	98.80	98.70
4	<i>S. hygrosopicus</i> subsp. <i>hygrosopicus</i>	98.40	99.10	99.20	100	98.00	100	98.10	99.60	99.60	99.60	98.30	99.00	98.30	97.60	98.60	99.60	97.90	97.90	98.50	98.40
5	<i>S. malaysiensis</i>	98.33	98.10	98.30	98.00	100	98.00	97.30	97.70	97.70	97.70	98.90	97.50	97.50	99.30	97.20	97.80	97.80	97.90	97.50	97.60
6	<i>S. demainii</i>	98.13	99.10	99.20	100	98.00	100	98.10	99.60	99.60	99.60	98.30	99.00	98.30	97.60	98.60	99.60	97.90	97.90	98.50	98.40
7	<i>S. philanthei</i>	98.09	98.60	98.40	98.10	97.30	98.10	100	98.10	98.10	98.10	98.20	98.30	99.00	96.80	98.00	98.10	98.80	97.90	98.80	99.50
8	<i>S. yogyakartensis</i>	97.99	98.90	99.10	99.60	97.70	99.60	98.10	100	100	100	98.20	98.90	98.30	97.30	98.50	99.90	97.90	97.80	98.50	98.40
9	<i>S. javensis</i>	97.99	98.90	99.10	99.60	97.70	99.60	98.10	100	100	100	98.20	98.90	98.30	97.30	98.50	99.90	97.90	97.80	98.50	98.40
10	<i>S. violaceusniger</i>	97.98	98.90	99.10	99.60	97.70	99.60	98.10	100	100	100	98.20	98.90	98.30	97.30	98.50	99.90	97.90	97.80	98.50	98.40
11	<i>S. yatensis</i>	97.92	98.60	98.70	98.30	98.90	98.30	98.20	98.20	98.20	98.20	100	98.10	98.10	98.30	97.90	98.30	98.60	98.60	98.10	98.50
12	<i>S. amphotericinicus</i>	97.92	98.80	98.60	99.00	97.50	99.00	98.30	98.90	98.90	98.90	98.10	100	98.40	97.00	99.30	99.00	98.30	98.00	98.40	98.50
13	<i>S. zagrosensis</i>	97.85	98.80	98.60	98.30	97.50	98.30	99.00	98.30	98.30	98.30	98.10	98.40	100	97.00	98.20	98.30	98.80	98.10	99.20	99.40
14	<i>S. solisilvae</i>	97.85	97.80	97.80	97.60	99.30	97.60	96.80	97.30	97.30	97.30	98.30	97.00	97.00	100	96.60	97.30	97.30	97.40	97.00	97.10
15	<i>S. himastatinicus</i>	97.80	98.40	98.30	98.60	97.20	98.60	98.00	98.50	98.50	98.50	97.90	99.30	98.20	96.60	100	98.60	97.90	97.60	98.20	98.30
16	<i>S. albiflaviniger</i>	97.80	99.00	99.20	99.60	97.80	99.60	98.10	99.90	99.90	99.90	98.30	99.00	98.30	97.30	98.60	1.00	97.90	97.90	98.50	98.40
17	<i>S. celluloflavus</i>	97.78	98.30	98.20	97.90	97.80	97.90	98.80	97.90	97.90	97.90	98.60	98.30	98.80	97.30	97.90	97.90	100	98.00	99.00	98.90
18	<i>S. bingchenggensis</i>	97.78	98.40	98.30	97.90	97.90	97.90	97.90	97.80	97.80	97.80	98.60	98.00	98.10	97.40	97.60	97.90	98.00	100	98.10	98.20
19	<i>S. varsoviensis</i>	97.78	98.70	98.80	98.50	97.50	98.50	98.80	98.50	98.50	98.50	98.10	98.40	99.20	97.00	98.20	98.50	99.00	98.10	100	99.00
20	<i>S. buecheriae</i>	97.78	98.90	98.70	98.40	97.60	98.40	99.50	98.40	98.40	98.40	98.50	98.50	99.40	97.10	98.30	98.40	98.90	98.20	90.00	100



รูปที่ 4.2 แผนภูมิต้นไม้แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต CA1R205 ด้วยวิธี Neighbor-Joining



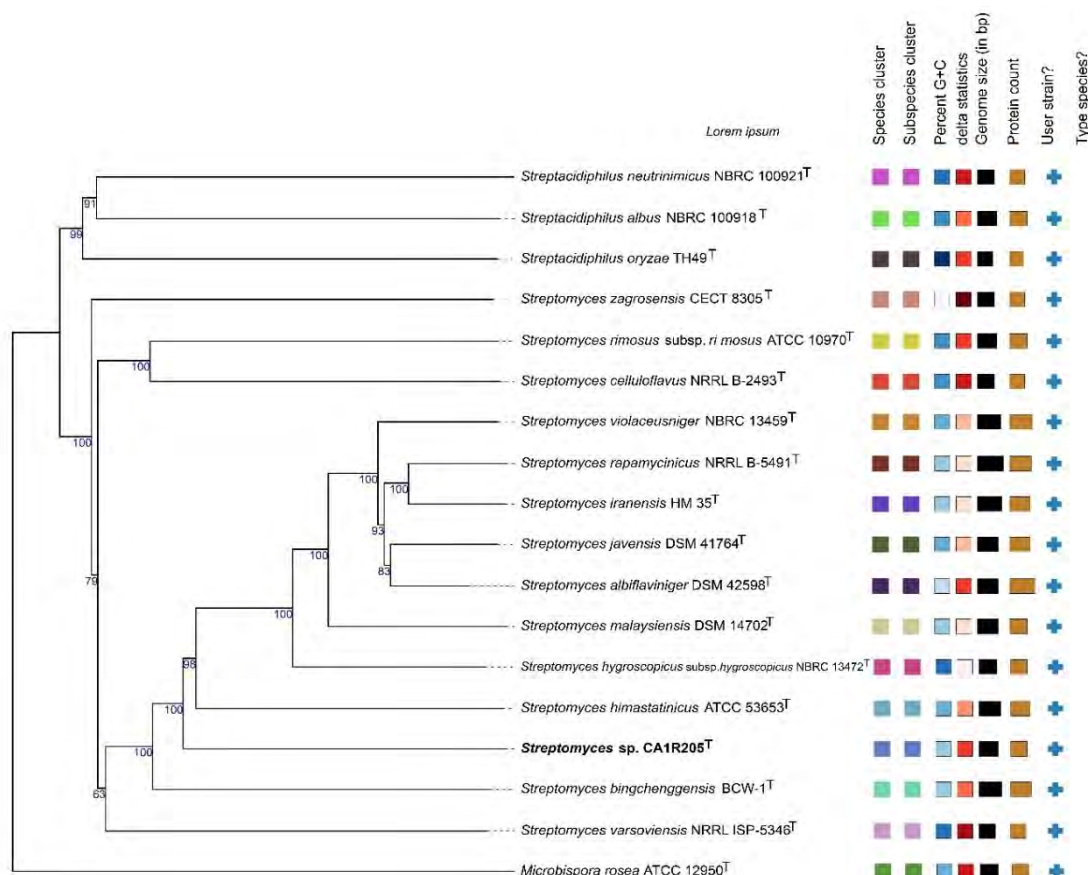
รูปที่ 4.3 แผนภูมิต้นไม้แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต CA1R205 ด้วยวิธี Maximum-likelihood



รูปที่ 4.4 แผนภูมิต้นไม้แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต CA1R205 ด้วยวิธี Maximum-parsimony

การตรวจคุณลักษณะอนุกรมวิธานด้วยคุณสมบัติจีโนมของไอโซเลต CA1R205 พบว่า โครงร่างจีโนม (draft genome) มีนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 9,896,405 นิวคลีโอไทด์ (ประกอบด้วย 253 contigs โดย contig ที่ยาวสุดมีขนาด 546,980 นิวคลีโอไทด์ มีค่า N50 มีความยาว 229,793 นิวคลีโอไทด์ มีค่า Genome coverage เท่ากับ 90X) ไอโซเลต CA1R205 มีปริมาณเบส G+C ในจีโนม (digital G+C content) เท่ากับ 70.68 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับปริมาณ G+C content ของสกุล *Streptomyces* ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 66-73 เปอร์เซ็นต์ (Goodfellow et al. 2012) จากการเปรียบเทียบจีโนมของไอโซเลต CA1R205 และสายพันธุ์ใกล้เคียงได้แก่ *S. rapamycinicus* NRRL B-5491<sup>T</sup> และ *S. iranensis* HM 35<sup>T</sup> พบว่า มีค่า Average nucleotide identity-Blast (ANIb) เท่ากับ 81.5 และ 81.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และค่า digital DNA-DNA hybridization (dDDH) เท่ากับ 27.2 และ 27.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6) ซึ่งมีค่าต่ำกว่าจุดตัด (cutoff point) ของเกณฑ์กำหนดความแตกต่างระดับสปีชีส์ (<95-96% สำหรับค่า ANI และ <70% สำหรับค่า dDDH) ที่กำหนดโดย Chun และคณะ (2018) และ Wayne และคณะ (1987) ตามลำดับ นอกจากนี้ตำแหน่งอนุกรมวิธานบนแผนภูมิต้นไม้ของจีโนม (phylogenomic tree) ของไอโซเลต CA1R205 ก่อตัวอยู่บน

คนละกิ่ง (branch) กับ *S. rapamycinicus* NRRL B-5491<sup>T</sup> และ *S. iranensis* HM 35<sup>T</sup> โดยมีค่า bootstrap เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.5)



รูปที่ 4.5 แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการของจีโนม (Phylogenomic tree) แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของ ไอโซเลต CA1R205 และสายพันธุ์ใกล้เคียง

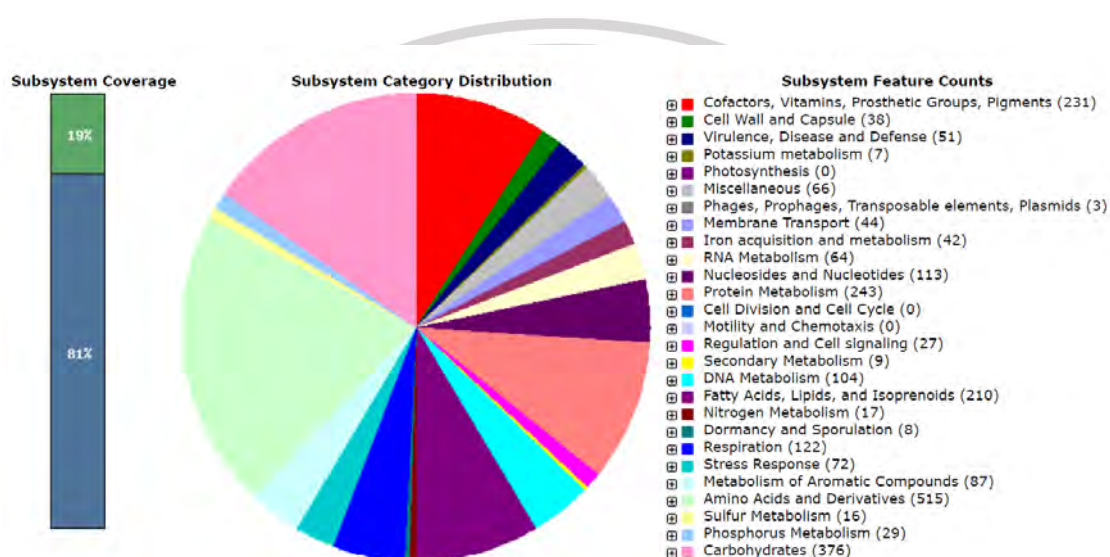
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ค่า ANIb, ANIm และ dDDH ระหว่างโครงสร้างจีโนมของ CA1R205, *S. rapamycinicus* NRRL B-5491<sup>T</sup> และ *S. iranensis* HM 35<sup>T</sup>

ไอโซเลต	สายพันธุ์อ้างอิง	ANIb (%)	ANIm (%)	Digital DNA-DNA hybridization relatedness												G+C difference
				Formula 1*				Formula 2**				Formula 3***				
				% dDDH	Model C.I. (%)	Distance	Prob. DDH $\geq 70$ (same species)	% dDDH	Model C.I. (%)	Distance	Prob. DDH $\geq 70$ (same species)	% dDDH	Model C.I. (%)	Distance	Prob. DDH $\geq 70$ (same species)	
<i>Streptomyces</i> sp. CA1R205 <sup>T</sup>	<i>S. rapamycinicus</i> NRRL B-5491 <sup>T</sup>	81.5	87.3	28.8	25.4-32.4	0.5322	0.06	27.2	24.9-29.7	0.1585	0.03	27.3	24.4-30.4	0.6064	0.00	0.36
	<i>S. iranensis</i> HM 35 <sup>T</sup>	81.7	87.4	29.1	25.7-32.7	0.5273	0.06	27.7	25.4-30.2	0.1553	0.04	27.6	24.7-30.7	0.6007	0.00	0.22

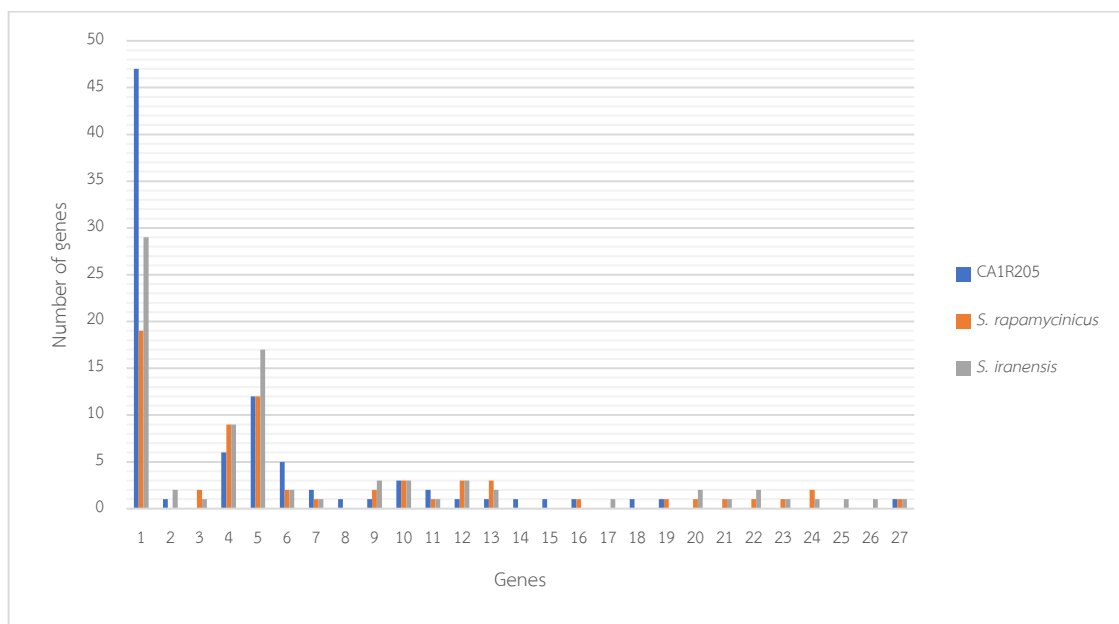
หมายเหตุ: \*Formula 1 คือ HSP length / total length, \*\*Formula 2 คือ identities/HSP length, \*\*\*Formula 3 คือ identities / total length เป็นการวิเคราะห์โดยไม่ขึ้นอยู่กับความยาวของโครงสร้างจีโนม

การทำนายยีนบนจีโนม (annotation) ของไอโซเลต CA1R205 พบยีนทั้งหมด 8,418 ยีน โดยมียีนที่แปลรหัสเป็นโปรตีน จำนวน 8,180 ยีน misc\_RNA จำนวน 152 ยีน tRNA จำนวน 80 ยีน rRNA จำนวน 3 ยีน และ tmRNA จำนวน 1 ยีน จากแผนภาพวงกลม (circular map) พบกลุ่มยีนออร์ทอโลกัส (Cluster of Orthologous genes; COGs) ที่ทำหน้าที่ต่าง ๆ ได้แก่ กลุ่มยีนกรดอะมิโนและอนุพันธ์ของกรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต (carbohydrates) เมทาบอลิซึมของโปรตีน (protein metabolism) โคแฟกเตอร์ (cofactors) วิตามิน (vitamins) สารสี (pigments) กรดไขมัน (fatty acids) ไขมัน (lipids) และไอโซพรีนอยด์ (isoprenoids) และกลุ่มยีนอื่น ๆ (รูปที่ 4.6)



รูปที่ 4.6 แผนภาพแสดง Cluster of Orthologous genes (COGs) ของไอโซเลต CA1R205

การทำนายกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิ (antismash) บนจีโนมของไอโซเลต CA1R205 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ใกล้เคียง *S. rapamycinicus* NRRL B-5491<sup>T</sup> และ *S. iranensis* HM 35<sup>T</sup> พบกลุ่มยีน Polyketide synthase ชนิดที่ 1 (T1PKS), Terpene, non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) และ Other unspecified ribosomally synthesised and post-translationally modified peptide product (RiPP) cluster มีปริมาณยีนแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด นอกจากนี้พบกลุ่มยีน melanin, linaridin, transAT-PKS และ lanthipeptide class IV ที่พบในจีโนมของไอโซเลต CA1R205 เท่านั้น ในขณะที่ไม่พบในสายพันธุ์ใกล้เคียง ดังนั้นการทำนายกลุ่มยีนจึงสามารถบ่งบอกความแตกต่างของเชื้อแต่ละชนิดได้ (รูปที่ 4.7)



รูปที่ 4.7 แผนภาพแสดงปริมาณกลุ่มยีนบนจีโนมที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิของ CA1R205, *S. rapamycinicus* NRRL B-5491<sup>T</sup> และ *S. iranensis* HM 35<sup>T</sup>

หมายเหตุ: 1. T1PKS (Polyketide synthase type I), 2. T2PKS (Polyketide synthase type II), T3PKS (Polyketide synthase type III), 4. Terpene, 5. Non-ribosomal peptide synthetase cluster (NRPS), 6. Other unspecified ribosomally synthesised and post-translationally modified peptide product (RiPP) cluster, 7. Ectoine, 8. Melanin, 9. Butyrolactone, 10. Siderophore, 11. heterocyst glycolipid synthase-like PKS (hglE-KS), 12. Ladderane, 13. Arylpolyene, 14. Linaridin, 15. transAT-PKS, 16. lanthipeptide class I, 17. lanthipeptide class II, 18. lanthipeptide class IV, 19. Indole, 20. Nucleoside, 21. Lasso peptide, 22. Hserlactone, 23. redox-cofactor, 24. Betalactone, 25. Phosphonate, 26. acyl\_amino\_acids และ 27. Other

นอกจากนี้ไอโซเลต CA1R205 พบว่ามีกลุ่มยีน T1PKS, กลุ่มยีน Polyketide synthase ชนิดที่ 2 (T2PKS), กลุ่มยีน terpene, กลุ่มยีน ectoine, กลุ่มยีน NRPS, กลุ่มยีน melanin, กลุ่มยีน RiPP และกลุ่มยีนอื่น ๆ โดยมี 16 กลุ่มยีนที่มีความคล้ายคลึงกับกลุ่มยีนที่ค้นพบแล้ว (known cluster) มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.7) และกลุ่มยีนที่มีการสร้างสารทุติยภูมิโดยมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงต่ำ เช่น กลุ่มยีนที่สังเคราะห์สาร naphthomycin A (31%), กลุ่มยีนที่สังเคราะห์สาร conglobatin (31%), กลุ่มยีนที่สังเคราะห์สาร melanin (28%), กลุ่มยีนที่สังเคราะห์สาร oligomycin (22%) และกลุ่มยีนที่สังเคราะห์สาร cyphomycin (16%) เป็นต้น (ภาคผนวก จ) จึงมีแนวโน้มว่า CA1R205 สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่แตกต่างไปจากสารที่มีการค้นพบแล้ว จึงมีความเป็นไปได้ว่าจะสร้างสารทุติยภูมิชนิดใหม่ได้

ตารางที่ 4.7 กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิที่มีความคล้ายคลึงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์บนจีโนมของไอโซเลต CA1R205

กลุ่มยีน	สารทุติยภูมิ	ผลิตจากสายพันธุ์	%Similarity
geosmin biosynthetic gene cluster	geosmin	<i>S. coelicolor</i> A3	100
coelibactin biosynthetic gene cluster	coelibactin		100
hopene biosynthetic gene cluster	hopene		61
nigericin biosynthetic gene cluster	nigericin	<i>S. violaceusniger</i>	61 และ 88
2-methylisoborneol biosynthetic gene cluster	2-methylisoborneol	<i>S. griseus</i> subsp. <i>griseus</i> NBRC 13350 <sup>T</sup>	100
desferrioxamin B biosynthetic gene cluster	desferrioxamin B		100
ectoine biosynthetic gene cluster	ectoine	<i>S. anulatus</i>	100
pristinol biosynthetic gene cluster	pristinol	<i>S. pristinaespiralis</i> ATCC 25486 <sup>T</sup>	100
neoantimycin biosynthetic gene cluster	neoantimycin	<i>S. conglobatus</i>	100
netropsin biosynthetic gene cluster	netropsin	<i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877 <sup>T</sup>	86
neocarzilin A biosynthetic gene cluster	neocarzilin A neocarzilin B	<i>S. carzinostaticus</i>	78

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิที่มีความคล้ายคลึงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์บนจีโนมของไอโซเลต CA1R205 (ต่อ)

กลุ่มยีน	สารทุติยภูมิ	ผลิตจากสายพันธุ์	%Similarity
ochronotic pigment biosynthetic gene cluster	ochronotic pigment		75
spore pigment biosynthetic gene cluster	spore pigment	<i>S. avermitilis</i>	75
5-isoprenylindole-3-carboxylate $\beta$ -D-glycosyl ester biosynthetic gene cluster	5-isoprenylindole-3-carboxylate $\beta$ -D-glycosyl ester	<i>Streptomyces</i> sp. RM-5-8	61
salinamide A biosynthetic gene cluster	salinamide A-F desmethylsalinamide C desmethylsalinamide E	<i>Streptomyces</i> sp. CNB091	50
pladienolide B biosynthetic gene cluster	pladienolide B	<i>S. platensis</i>	50

(4) ลักษณะแตกต่างระหว่างไอโซเลต CA1R205 และสายพันธุ์อ้างอิงใกล้เคียงจากการเปรียบเทียบลักษณะฟีโนไทป์ของไอโซเลต CA1R205 และสายพันธุ์อ้างอิงใกล้เคียง ได้แก่ *S. rapamycinicus* NRRL B-5491<sup>T</sup> และ *S. iranensis* HM 35<sup>T</sup> พบว่ามีลักษณะบางประการที่แตกต่างกัน อาทิเช่น ไอโซเลต CA1R205 สามารถตกตะกอนโปรตีนในนม สามารถใช้ดี-เมลลิโบไอส ดี-ไซโลส แต่ไม่สามารถใช้ ดี-เมลลิไซโตส เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถใช้ 4-ไฮดรอกซีไพโรลีน ไม่สามารถใช้ แอล-อาร์จินีน แอล-โพรีน และแอล-วาซีน เป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถสร้างกรดในแหล่งคาร์บอน คือ ซาลิทอล ดี-ซาลิซิน อินนูลิน และดี-เมลลิไซโตส ไม่มีการสร้างเอนไซม์  $\alpha$ -galactosidase,  $\alpha$ -glucosidase และ N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase ลักษณะดังกล่าวมีความแตกต่างจากสายพันธุ์ใกล้เคียงทั้งสอง (ตารางที่ 4.8)

ตารางที่ 4.8 ลักษณะที่แตกต่าง (differential characteristics) ของไอโซเลต CA1R205, *S. rapamycinicus* DSM 41530<sup>T</sup> และ *S. iranensis* HM 35<sup>T</sup>

ลักษณะ	CA1R205*	<i>S. rapamycinicus</i> DSM 41530 <sup>T</sup> *	<i>S. iranensis</i> DSM 41954 <sup>T**</sup>
การเรียงตัวของสปอร์และผิวสปอร์	เกลียว/ขรุขระ	เกลียว/ขรุขระ	เกลียว/ขรุขระ
สีโคโลนีบนอาหาร ISP2	very deep red	pale greenish yellow	Beige
ความสามารถในการทนเกลือ (%NaCl (w/v))	1-3	1-4	1-3
อุณหภูมิที่เจริญ (°C)	20-40	20-40	20-37
พีเอช	6-9	6-9	6-11
การย่อยแป้ง	w	w	nd
การย่อยยูเรีย	-	-	nd
การย่อยเจลาติน	-	+	+
การย่อยโปรตีนในนม:			
Coagulation	+	-	+
ความสามารถในการเจริญบนแหล่ง คาร์บอน:			
ดี-เมลิโบไออส	+	-	+
ดี-ไรโบส	-	-	nd
แอล-อะราบิโนส	-	-	+
ดี-ไซโลส	+	-	+
ดี-แมนนิทอล	-	-	+
ดี-แมนโนส	-	-	+
ดี-เมลิไซโตส	-	+	nd
การเจริญในแหล่งไนโตรเจน:			
แอล-อาร์จินีน	-	w	+
แอล-ฮิสทีดีน	w	w	-
4-ไฮดรอกซีไพโรลีน	w	-	+
แอล-ไพโรลีน	-	+	+
แอล-วาเลอีน	-	w	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 ลักษณะที่แตกต่าง (differential characteristics) ของไอโซเลต CA1R205, *S. rapamycinicus* DSM 41530<sup>T</sup> และ *S. iranensis* HM 35<sup>T</sup> (ต่อ)

ลักษณะ	CA1R205*	<i>S. rapamycinicus</i> DSM 41530 <sup>T</sup> *	<i>S. iranensis</i> DSM 41954 <sup>T</sup> **
การสร้างกรดในแหล่งคาร์บอน:			
ไซลิทอล	+	-	nd
ดี-ซาลิซิน	+	-	nd
อินนูลิน	+	-	nd
การสร้างกรดในแหล่งคาร์บอน:			
ดี-เมลิไซโตส	+	-	nd
การย่อยสารประกอบไม่ละลายน้ำ:			
อะดีนีน	+	+	-
ไฮโปแซนทีน	-	-	nd
ไทโรซีน	-	w	+
การสร้างเอนไซม์ (API ZYM)			
$\alpha$ -galactosidase	-	w	nd
$\alpha$ -glucosidase	-	w	nd
N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase	-	+	nd

หมายเหตุ: \*ข้อมูลจากการทดลอง \*\*ข้อมูลจาก Hamedิ และคณะ (2010)

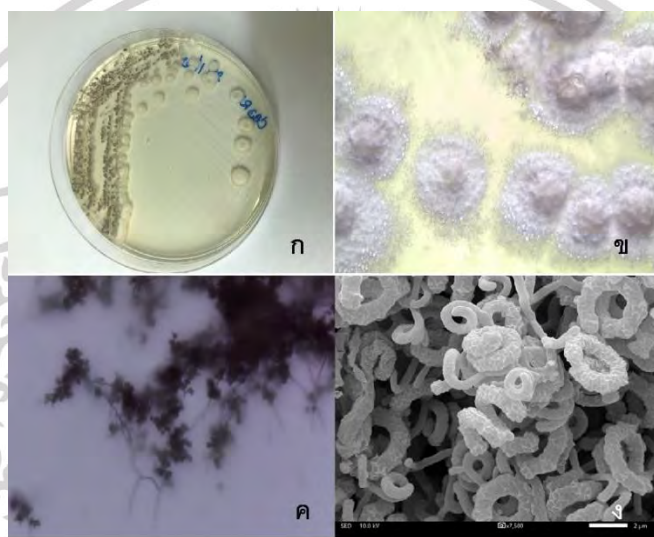
จากข้อมูลของอนุกรมวิธานหลายส่วน ซึ่งประกอบด้วยลักษณะทางฟีโนไทป์ ลักษณะอนุกรมวิธานเคมี และลักษณะจีโนมไทป์ สามารถสรุปได้ว่า ไอโซเลต CA1R205 จัดเป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่ของสกุล *Streptomyces* และถูกกำหนดชื่อเป็น *Streptomyces coffeae* sp. nov.

#### 4.1.1.2 ไอโซเลต CA3R110

##### (1) ลักษณะทางฟีโนไทป์

ไอโซเลต CA3R110 สามารถเจริญได้ดีบนอาหารแข็ง ISP2 ISP4 ISP5 ISP6 czapek's sucrose และ nutrient agar เจริญได้ปานกลางบนอาหารแข็ง ISP7 และเจริญได้น้อยบนอาหารแข็ง glucose asparagines เส้นใยอาหารมีสีเหลืองอมเขียวอ่อน (pale greenish yellow) จนถึงสีเหลืองอมเขียวเข้ม (strong greenish yellow) สามารถสร้างเส้นใยอากาศและสปอร์สีขาวอมเทาบนอาหารแข็งทุกชนิด มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำสีเหลืองอมเขียว (brilliant greenish yellow) บนอาหารแข็ง ISP5 และ ISP7 (ตารางที่ 4.9) จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์บนอาหารแข็ง ISP2 ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่มีเลนส์ส่องระยะไกล พบว่าไอโซเลต CA3R110 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สร้างสปอร์ที่มีการเรียงต่อกันเป็นเกลียวบนเส้นใยอากาศ (รูปที่ 4.8) เมื่อตรวจสอบลักษณะของผิวสปอร์โดยการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (กำลังขยาย 7,500 เท่า) พบว่าผิวสปอร์มีลักษณะขรุขระ ลักษณะสัณฐานวิทยาของสปอร์ดังกล่าวพบได้ทั่วไปในสกุล *Streptomyces* (Goodfellow et al. 2012) และมีลักษณะการเรียงตัวของสปอร์และผิวสปอร์คล้ายคลึงกับ *S. rapamycinicus* DSM 41530<sup>T</sup> (Kumar and Goodfellow, 2008) จากการเปรียบเทียบลักษณะการเจริญของไอโซเลต CA3R110 และ *S. rapamycinicus* DSM 41530<sup>T</sup> ซึ่งเป็นสายพันธุ์อ้างอิง (reference strain) ที่ใกล้เคียง คือ เชื้อทั้งสองมีสีเส้นใยอาหาร สีของเส้นใยอากาศและสีสปอร์ รวมทั้งการผลิตรงควัตถุที่ละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ที่คล้ายคลึงกัน (ตารางที่ 4.9)



รูปที่ 4.8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต CA3R110 (ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 (ค) ลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีเลนส์ส่องระยะไกลเป็นเลนส์ใกล้วัตถุ (กำลังขยาย 400 เท่า) และ (ง) สัณฐานวิทยาของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (กำลังขยาย 7,500 เท่า)

ไอโซเลต CA3R110 สามารถเจริญบนอาหาร ISP2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์สูงสุด 3 เปอร์เซ็นต์ ช่วงพีเอช 6-9 และอุณหภูมิระหว่าง 20-40 องศาเซลเซียส สามารถย่อยยูเรีย เจลาติน และโปรตีนในนมได้ ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรต และไม่สามารถสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ มีการสร้างกรดโดยใช้ ดี-กลูโคส อะโดนิทอล ดี-เซลโลไบโอส ดี-ราฟฟิโนส ไมโอ-อินนิซิทอล ดี-เมลิไบโอส ดี-ซูโครส อินนูลิน ดี-ไรโบส เดกซ์แทรน ดี-กาแลคโตส แอล-อะราบิโนส ดี-ไซโลส ทรีฮาโลส แอล-แรมโนส ดี-แมนนิทอล ดี-แมนโนส ดี-เมลิไซโตส กลีเซอรอล และดี-ฟรุคโตส เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถใช้ดี-กลูโคส ดี-เซลโลไบโอส ซิลิทอล ไมโอ-อินนิซิทอล ดี-เมลิไบโอส เดกซ์แทรน ดี-กาแลคโตส ทรีฮาโลส แอล-แรมโนส ดี-แมนนิทอล ดี-แมนโนส และดี-ฟรุคโตส เป็นแหล่งคาร์บอน และสามารถใช้อัล-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตเห็นไปขอประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดีนิน ไฮโปแซนทีน และไทโรซีน ที่เป็นสารประกอบไม่ละลายน้ำ สร้างเอนไซม์คะตะเลสและออกซิเดส ได้ เมื่อนำไปทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยชุดทดสอบ API ZYM ไอโซเลต CA3R110 สามารถสร้างเอนไซม์ Alkaline phosphatase, Leucine arylamidase, Chymotrypsin, Acid phosphatase, Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase,  $\alpha$ -glucosidase และ N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase (ภาคผนวก ค)

## (2) ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี

ไอโซเมอร์ของกรดไขมันพิวเมติกในผนังเซลล์ของไอโซเลต CA3R110 เป็นแบบ LL พบน้ำตาลกาแลคโตส กลูโคส และไรโบส มีกรดไขมันหลัก (>10%) ในเซลล์ที่พบ คือ iso-C<sub>15:0</sub>, iso-C<sub>16:0</sub> และ C<sub>16:0</sub> นอกจากนี้พบ anteiso-C<sub>15:0</sub>, iso-C<sub>14:0</sub>, C<sub>14:0</sub>, iso-C<sub>17:0</sub>, anteiso-C<sub>17:0</sub> และ C<sub>17:0</sub> cyclo เป็นกรดไขมันรอง (ตารางที่ 4.10) ชนิดของไขมันมีขั้วที่พบคือ diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylethanolamine (PE), hydroxyphosphatidylethanolamine (OH-PE), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylinositol (PI) และ phosphatidylinositolmannoside (PIM) (ภาคผนวก ง) พบมีนาควิโนนหลัก คือ MK-9(H<sub>6</sub>) (73.2%) และ MK-9(H<sub>8</sub>) (23.7%) นอกจากนี้พบ MK-9(H<sub>4</sub>) (2.9%) และ MK-9(H<sub>2</sub>) (0.2%) เป็นมีนาควิโนนรอง ไม่พบกรดมัคคอลลิก โดยลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของไอโซเลต CA3R110 คล้ายคลึงกับลักษณะอนุกรมวิธานเคมีทั่วไปที่พบในสกุล *Streptomyces* (Goodfellow et al., 2012) เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ใกล้เคียงคือ *S. rapamycinicus* DSM 41530<sup>T</sup> พบว่า เชื้อทั้งสองมีรูปแบบของกรดไขมันหลักคล้ายคลึงกัน แต่มีชนิดของน้ำตาลในเซลล์ ชนิดมีนาควิโนน และชนิดของฟอสโฟลิปิดแตกต่างกัน โดย *S. rapamycinicus* DSM 41530<sup>T</sup> ไม่พบน้ำตาลกาแลคโตส มีนาควิโนนชนิด MK-10(H<sub>2</sub>) รวมทั้งไม่พบ phosphatidylethanolamine (PE) และ hydroxy-phosphatidylethanolamine (OH-PE) ในเซลล์

ตารางที่ 4.9 ลักษณะการเจริญของไอโซเลต CA3R110, *S. rapamycinicus* DSM 41530<sup>T</sup> และ *S. iranensis* HM 35<sup>T</sup>

สายพันธุ์	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สารสีละลายน้ำ
CA3R110	ISP2	ดี	Pale greenish yellow	White	-
	ISP3	ดี	Pale greenish yellow	White	-
	ISP4	ดี	Pale greenish yellow	White/spore: Brownish gray	-
	ISP5	ดี	Strong greenish yellow	White	Brilliant greenish yellow
	ISP6	ดี	Pale greenish yellow	White	-
	ISP7	ปานกลาง	Strong greenish yellow	White	Brilliant greenish yellow
	GluA	น้อย	Moderate greenish yellow	White	-
	Czapek	ดี	Yellowish white	White/spore: Brownish gray	-
	NA	ดี	Grayish greenish yellow	White/spore: Brownish gray	-
<i>S. rapamycinicus</i> DSM 41530 <sup>T</sup>	ISP2	ดี	Pale greenish yellow	White	-
	ISP3	ดี	Pale greenish yellow	White/spore: Brownish gray	-
	ISP4	ดี	Grayish greenish yellow	White/spore: Brownish gray	Brilliant greenish yellow
	ISP5	ดี	Moderate greenish yellow	White	-
	ISP6	ปานกลาง	Pale greenish yellow	-	-
	ISP7	ดี	Moderate greenish yellow	White	-
	GluA	น้อย	Moderate greenish yellow	White	-

ตารางที่ 4.9 ลักษณะการเจริญของไอโซเลต CA3R110, *S. rapamycinicus* DSM 41530<sup>T</sup> และ *S. iranensis* HM 35<sup>T</sup> (ต่อ)

สายพันธุ์	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สารสีละลายน้ำ
<i>S. rapamycinicus</i> DSM 41530 <sup>T</sup>	Czapek	น้อย	Yellowish white	-	-
	NA	ปานกลาง	Grayish greenish yellow	White	-
<i>S. iranensis</i> HM 35 <sup>T</sup>	ISP2	ดี	Beige	Greyish-white to Grey	Pale yellow
	ISP3	ดี	Brownish-yellow	Grey to greyish black	-
	ISP4	ดี	Light brownish-yellow	Grey	-
	ISP5	ดี	Light brownish-yellow	Greyish-white	-
	ISP6	ดี	Light yellowish-brown	-	-
	ISP7	ปานกลาง	Yellowish-brown	Greyish-white	-
	GluA	น้อย	Yellowish-white	-	-
	Czapek	ดี	Yellowish-white	Greyish-white	-
	NA	ดี	Light brownish-yellow	Greyish-white	-

ตารางที่ 4.10 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์ของไอโซเลต CA3R110 และสายพันธุ์อ้างอิง

กรดไขมัน (%)	1	2	3
iso-C <sub>15:0</sub>	19.36	21.53	27.57
anteiso-C <sub>15:0</sub>	9.83	14.61	18.48
iso-C <sub>16:0</sub>	27.94	18.12	12.11
C <sub>16:0</sub>	17.68	10.39	8.26
iso-C <sub>10:0</sub>	0.15	-	0.11
C <sub>12:0</sub>	0.42	0.2	-
iso-C <sub>13:0</sub>	0.98	-	0.17
C <sub>13:1</sub>	-	-	-
iso-C <sub>14:0</sub>	6.88	2.91	1.44
C <sub>14:0</sub>	2.04	1.86	0.10
iso-C <sub>16:1</sub> H	0.84	0.4	1.01
C <sub>15:0</sub> 2OH	0.10	0.1	0.23
iso-C <sub>17:1</sub>	-	1.24	3.12
anteiso-C <sub>17:1</sub>	-	1.33	2.17
anteiso-C <sub>17:1</sub> ω9c	0.50	0.1	-
iso-C <sub>17:0</sub>	5.77	10.24	13.21
anteiso-C <sub>17:0</sub>	4.10	8.87	7.14
C <sub>17:0</sub>	0.83	3.50	-
Iso-C <sub>17:0</sub> 3OH	0.24	-	-
C <sub>16:1</sub> ω9c	-	0.1	1.32
C <sub>18:0</sub>	0.34	0.1	0.1
iso-C <sub>18:0</sub>	0.35	-	-
C <sub>18:1</sub> ω9c	0.2	-	-
C <sub>17:0</sub> cyclo	1.18	0.21	0.46

หมายเหตุ: สายพันธุ์: 1. CA3R110, 2. *S. rapamycinicus* DSM 41530<sup>T</sup> และ 3. *S. iranensis* DSM 41954<sup>T</sup>

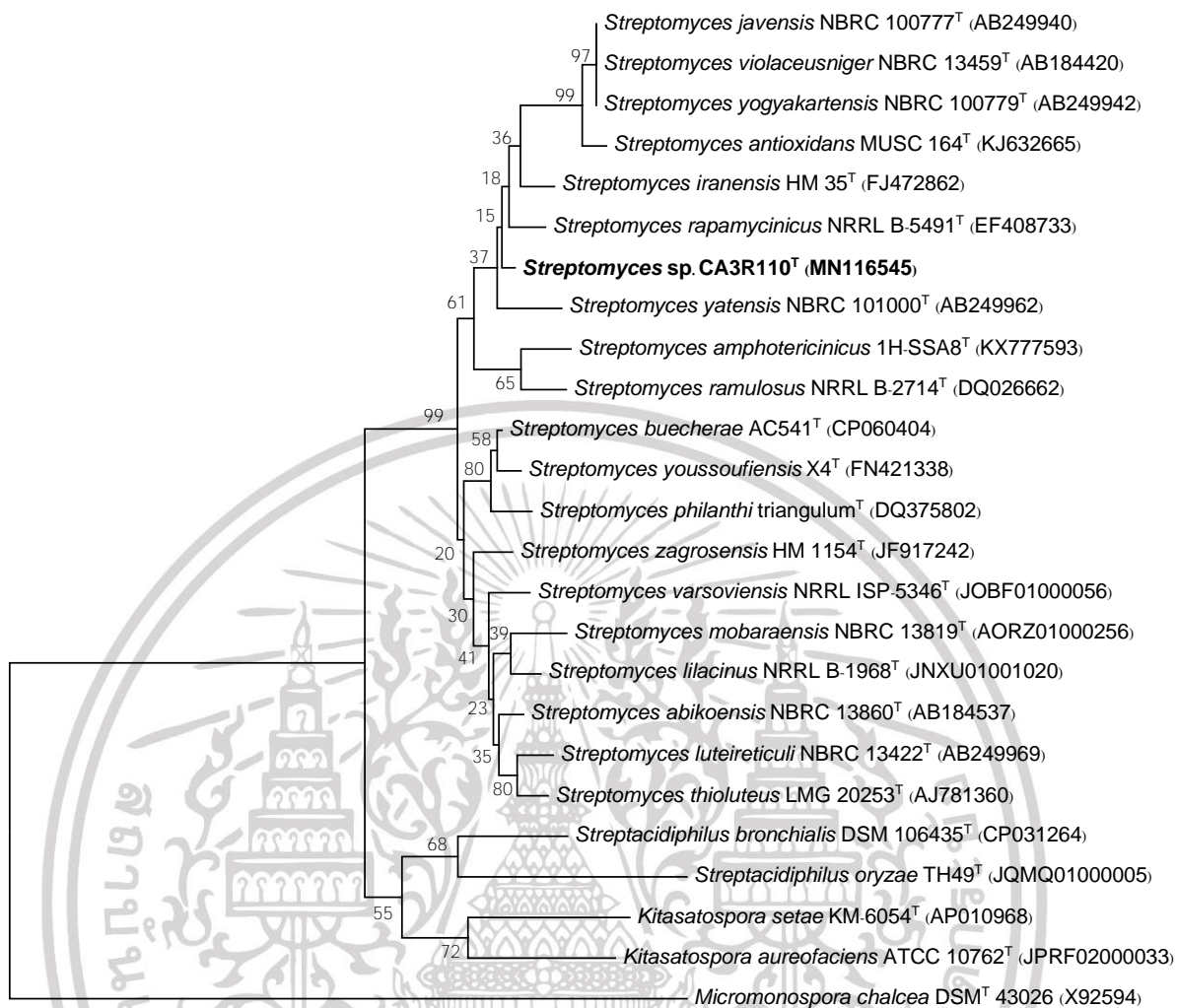
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### (3) ลักษณะทางจีโนมไทป์

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนช่วงยีน 16S rRNA ของไอโซเลต CA3R110 พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *S. rapamycinicus* NRRL B-5491<sup>T</sup> และ *S. iranensis* DSM 41954<sup>T</sup> ที่เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 99.14 และ 99.02 ตามลำดับ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของยีน 16S rRNA สูงกว่าเกณฑ์กำหนดความเป็นสปีชีส์ใหม่ (<98.7%) ที่กำหนดโดย Rossi-Tamisier และคณะ (2015) (ตารางที่ 4.11) แต่สามารถใช้ข้อมูลของจีโนมจากการวิเคราะห์ค่า dDDH และวิเคราะห์ค่า ANIb และ ANIm เพื่อยืนยันว่าสายพันธุ์ใกล้เคียงต่างสปีชีส์กันได้ (Kim et al., 2014) นอกจากนี้การวิเคราะห์ตำแหน่งอนุกรมวิธานจากแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) แบบ maximum-likelihood, neighbor-joining และ maximum-parsimony มีลักษณะคล้ายคลึงกัน โดยตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต CA3R110 แยกออกจาก *S. rapamycinicus* NRRL B-5491<sup>T</sup> และ *S. iranensis* HM 35<sup>T</sup> อย่างชัดเจน (รูปที่ 4.9-4.11) แต่มีค่าความเชื่อมั่น (bootstrap value) ในระดับต่ำ (<50%) บนแผนภูมิต้นไม้ทั้งสามแบบ นอกจากนี้มีระยะทางบนสายวิวัฒนาการ (evolutionary distances) ห่างกัน จากข้อมูลข้างต้นสามารถสรุปได้ว่าไอโซเลต CA3R110 มีความแตกต่างทางอนุกรมวิธานจาก *S. rapamycinicus* NRRL B-5491<sup>T</sup> และ *S. iranensis* HM 35<sup>T</sup>

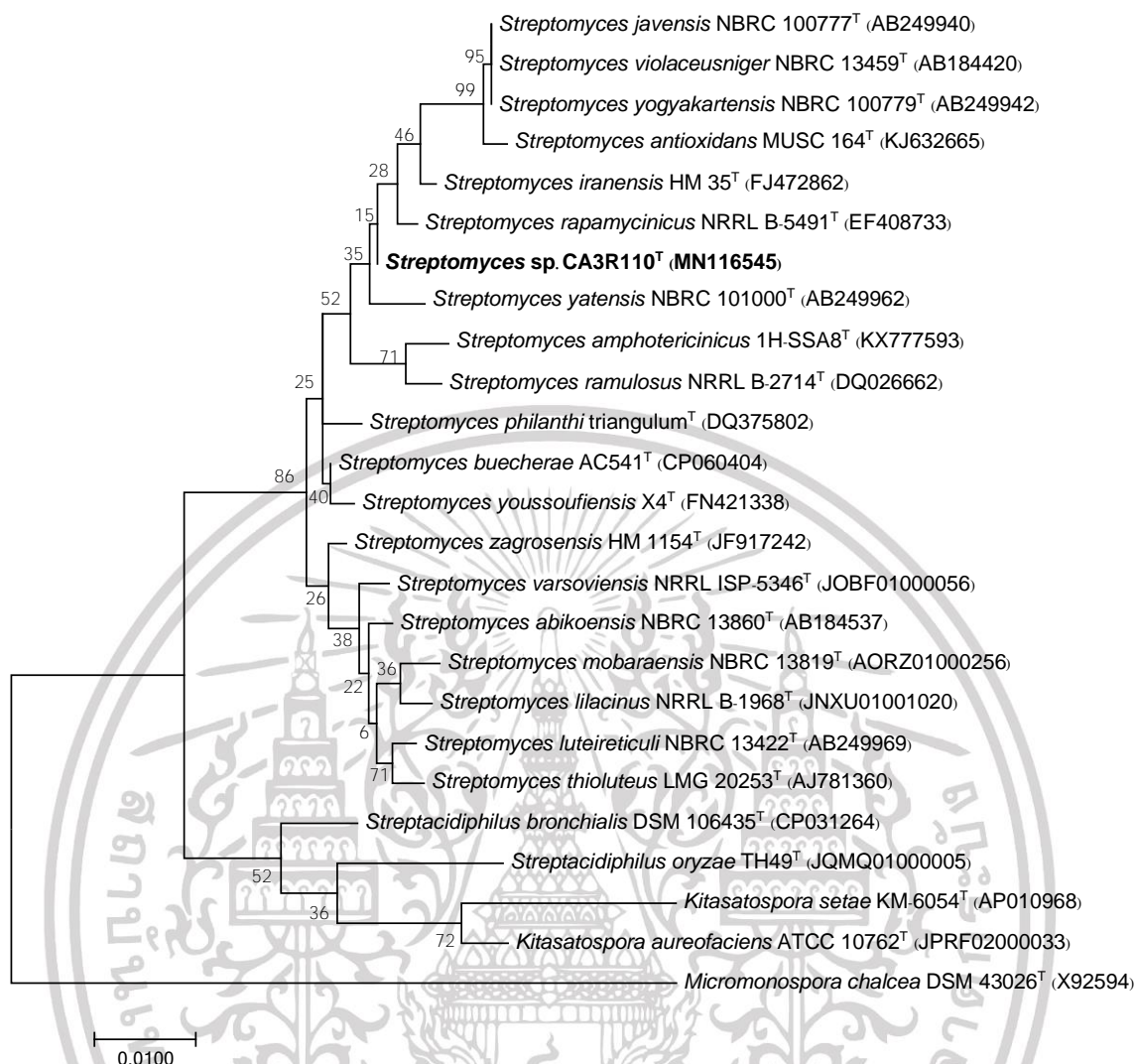
ตารางที่ 4.11 เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนช่วง 16S rRNA (% 16S rRNA gene similarity value) ระหว่างไอโซเลต CA3R110 และสายพันธุ์ใกล้เคียงในฐานข้อมูล EzBioCloud

	สายพันธุ์ใกล้เคียง	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	CA3R110	100	99.23	99.14	99.02	99.01	99.01	99.01	98.80	98.73	98.73	98.66	98.59	98.59	98.59	98.59	98.59	98.59	98.59	98.52	98.52
2	<i>S. buecheriae</i>	99.23	100	99.00	98.80	98.70	99.70	99.50	99.00	99.40	98.90	98.60	98.50	98.50	98.80	98.50	98.90	99.00	98.50	99.00	99.00
3	<i>S. rapamycinicus</i>	99.14	99.00	100	99.40	98.80	98.70	98.60	98.50	98.70	98.30	98.90	98.90	98.90	98.90	98.70	98.30	98.30	98.90	98.40	98.70
4	<i>S. iranensis</i>	99.02	98.80	99.40	100	98.80	98.60	98.50	98.40	98.60	98.30	98.70	99.10	99.10	99.00	99.00	98.30	98.20	99.10	98.30	98.80
5	<i>S. mobaraensis</i>	99.01	98.70	98.80	98.80	100	98.60	98.60	99.00	98.90	99.00	98.20	98.30	98.30	98.60	98.20	98.80	99.20	98.30	98.50	99.00
6	<i>S. youssoufiensis</i>	99.01	99.70	98.70	98.60	98.60	100	99.40	98.80	99.20	98.60	98.40	98.30	98.30	98.60	98.30	98.60	99.00	98.30	98.90	99.00
7	<i>S. philanthi</i>	99.01	99.50	98.60	98.50	98.60	99.40	100	98.70	99.00	98.60	98.40	98.20	98.20	98.50	98.20	98.60	98.90	98.20	98.70	98.90
8	<i>S. abikoensis</i>	98.80	99.00	98.50	98.40	99.00	98.80	98.70	100	99.10	99.30	98.30	98.10	98.10	98.30	98.00	99.20	99.50	98.10	98.30	99.30
9	<i>S. zagrosensis</i>	98.73	99.40	98.70	98.60	98.90	99.20	99.00	99.10	100	99.10	98.40	98.30	98.30	98.40	98.00	98.90	99.00	98.30	98.60	99.10
10	<i>S. luteireticuli</i>	98.73	98.90	98.30	98.30	99.00	98.60	98.60	99.30	99.10	100	98.20	98.00	98.00	98.30	97.90	99.30	99.00	98.00	98.20	99.20
11	<i>S. amphotericinicus</i>	98.66	98.60	98.90	98.70	98.20	98.40	98.40	98.30	98.40	98.20	100	99.00	99.00	98.30	98.80	98.20	98.00	99.00	99.20	98.50
12	<i>S. yogyakartaensis</i>	98.59	98.50	98.90	99.10	98.30	98.30	98.20	98.10	98.30	98.00	99.00	100	100	98.40	99.60	98.00	97.90	100	98.50	98.50
13	<i>S. javensis</i>	98.59	98.50	98.90	99.10	98.30	98.30	98.20	98.10	98.30	98.00	99.00	100	100	98.40	99.60	98.00	97.90	100	98.50	98.50
14	<i>S. yatensis</i>	98.59	98.80	98.90	99.00	98.60	98.60	98.50	98.30	98.40	98.30	98.30	98.40	98.40	100	98.50	98.40	98.30	98.40	98.30	98.30
15	<i>S. antioxidans</i>	98.59	98.50	98.70	99.00	98.20	98.30	98.20	98.00	98.00	97.90	98.80	99.60	99.60	98.50	100	97.80	97.90	99.60	98.60	98.30
16	<i>S. thioluteus</i>	98.59	98.90	98.30	98.30	98.80	98.60	98.60	99.20	98.90	99.30	98.20	98.00	98.00	98.40	97.80	100	98.90	98.00	98.20	99.10
17	<i>S. lilacinus</i>	98.59	99.00	98.30	98.20	99.20	99.00	98.90	99.50	99.00	99.00	98.00	97.90	97.90	98.30	97.90	98.90	100	97.90	98.50	99.00
18	<i>S. violaceusniger</i>	98.59	98.50	98.90	99.10	98.30	98.30	98.20	98.10	98.30	98.00	99.00	100	100	98.40	99.60	98.00	97.90	100	98.50	98.50
19	<i>S. ramulosus</i>	98.52	99.00	98.40	98.30	98.50	98.90	98.70	98.30	98.60	98.20	99.20	98.50	98.50	98.30	98.60	98.20	98.50	98.50	100	98.50
20	<i>S. varsoviensis</i>	98.52	99.00	98.70	98.80	99.00	99.00	98.90	99.30	99.10	99.20	98.50	98.50	98.50	98.30	98.30	99.10	99.00	98.50	98.50	100

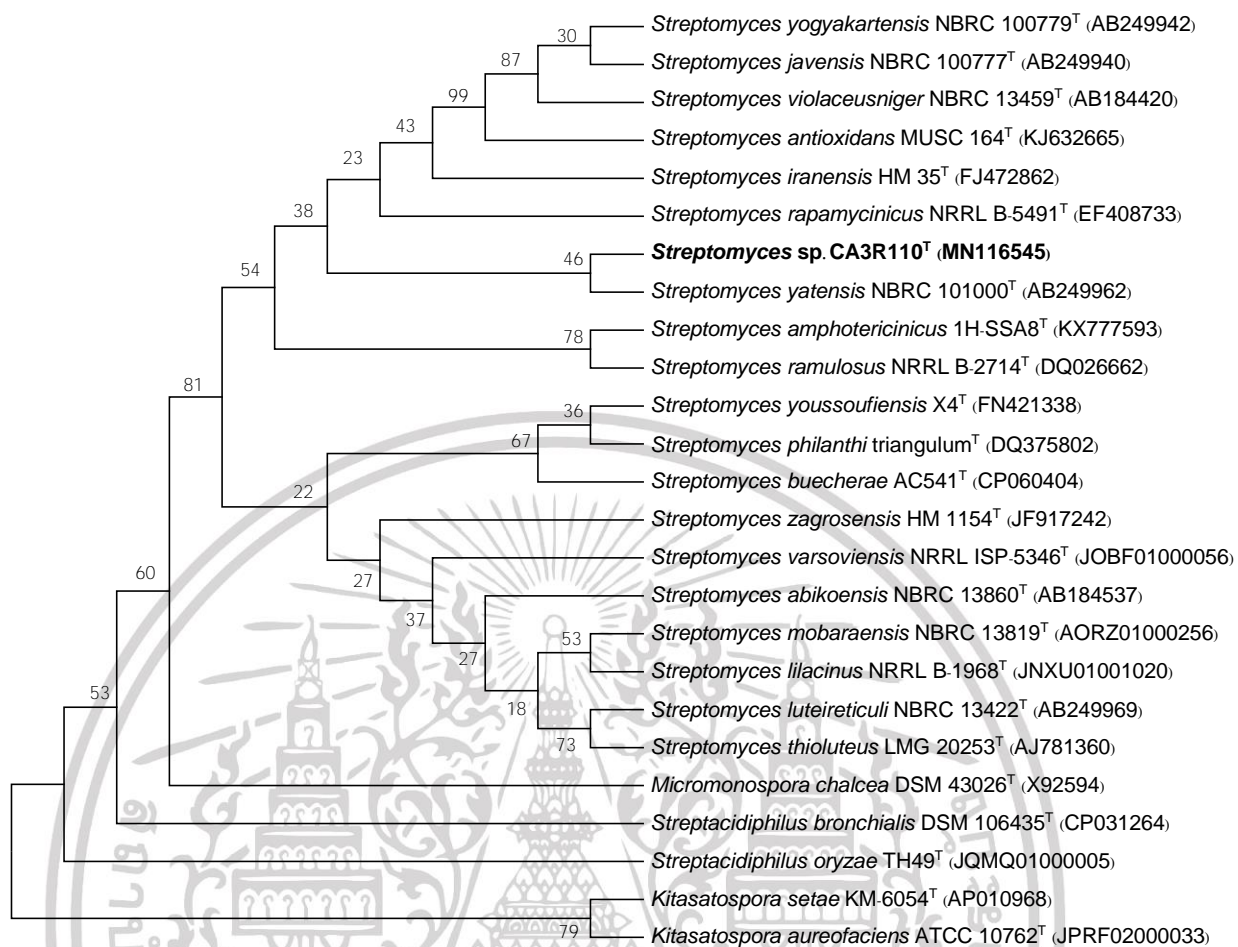


รูปที่ 4.9 แผนภูมิต้นไม้แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต CA3R110 ด้วยวิธี Neighbor-Joining

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 แผนภูมิต้นไม้แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต CA3R110 ด้วยวิธี maximum-likelihood

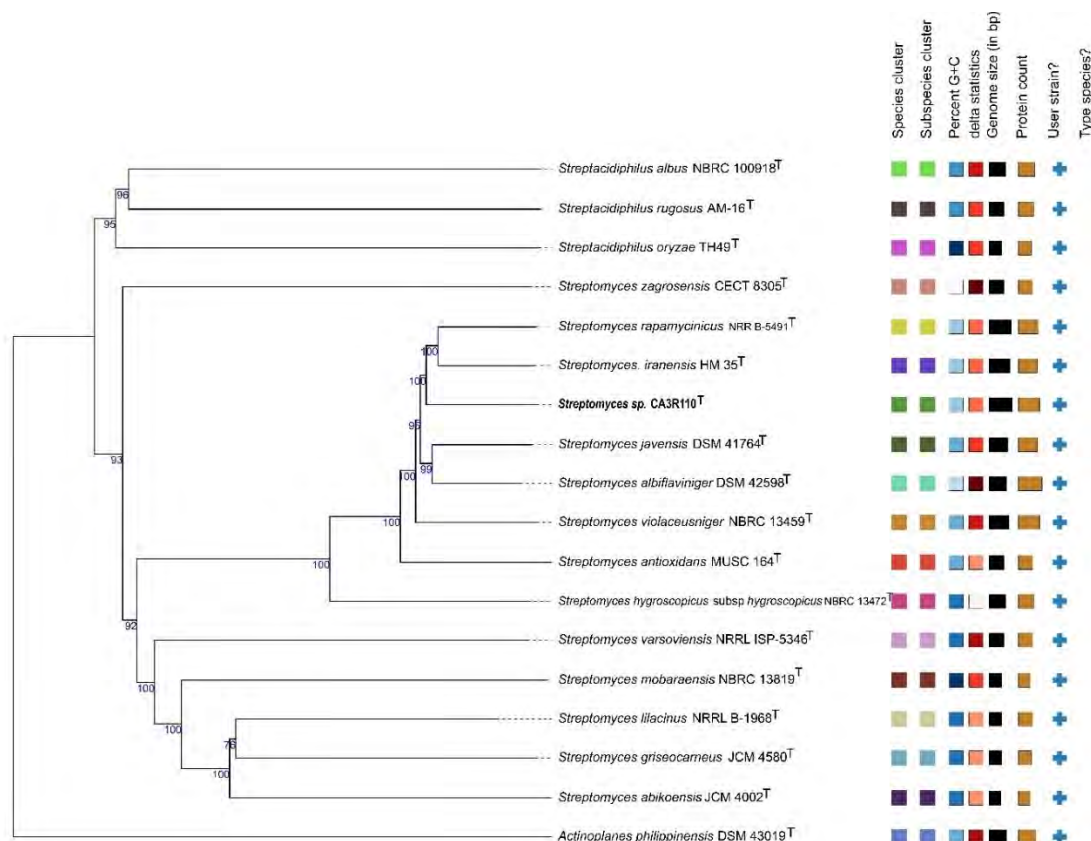


รูปที่ 4.11 แผนภูมิต้นไม้แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต CA3R110 ด้วยวิธี maximum-parsimony

การตรวจคุณลักษณะอนุกรมวิธานด้วยคุณสมบัติจีโนมของไอโซเลต CA3R110 พบว่า โครงสร้างจีโนม มีนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 13,128,250 นิวคลีโอไทด์ (ประกอบด้วย 269 contigs โดย contig ที่ยาวสุดมีขนาด 2,063,463 นิวคลีโอไทด์ มีค่า N50 มีความยาว 328,265 มีค่า Genome coverage เท่ากับ 138X) ไอโซเลต CA3R110 มีปริมาณเบส G+C ในจีโนม เท่ากับ 70.93 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับปริมาณ G+C content ของสกุล *Streptomyces* ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 66-73 เปอร์เซ็นต์ (Goodfellow et al. 2012) จากการเปรียบเทียบจีโนมของไอโซเลต CA3R110 และสายพันธุ์ใกล้เคียงได้แก่ *S. rapamycinicus* NRRL B-5491<sup>T</sup> และ *S. iranensis* HM 35<sup>T</sup> พบว่า มีค่า Average nucleotide identity-Blast (ANIb) เท่ากับ 92.2 และ 92.1 เปอร์เซ็นต์ และค่า digital DNA-DNA hybridization (dDDH) เท่ากับ 55.6 และ 55.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.12) ซึ่งมีค่าต่ำกว่าจุดตัดของเกณฑ์กำหนดความแตกต่างระดับสปีชีส์ (<95-96% สำหรับค่า ANI และ <70% สำหรับค่า dDDH) ที่กำหนดโดย Chun และคณะ (2018) และ Wayne และคณะ (1987) ตามลำดับ นอกจากนี้ตำแหน่งอนุกรมวิธานบนแผนภูมิต้นไม้ของจีโนมของไอโซเลต CA3R110 ก่อตัวอยู่บนคนละ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิ่ง (branch) กับ *S. rapamycinicus* NRRL B-5491<sup>T</sup> และ *S. iranensis* HM 35<sup>T</sup> โดยมีค่า bootstrap เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.12) จากข้อมูลข้างต้นไอโซเลต CA3R110 เป็นสกุล *Streptomyces* สปีชีส์ใหม่ ลำดับนิวคลีโอไทด์บนช่วงยีน 16S rRNA และจีโนมของไอโซเลต CA3R110 จัดเก็บไว้ในฐานข้อมูล Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) โดยมีหมายเลขจำเพาะ MN116545 และ JAERRG000000000 ตามลำดับ



รูปที่ 4.12 แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการของจีโนม (Phylogenomic tree) แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต CA3R110 และสายพันธุ์ใกล้เคียง

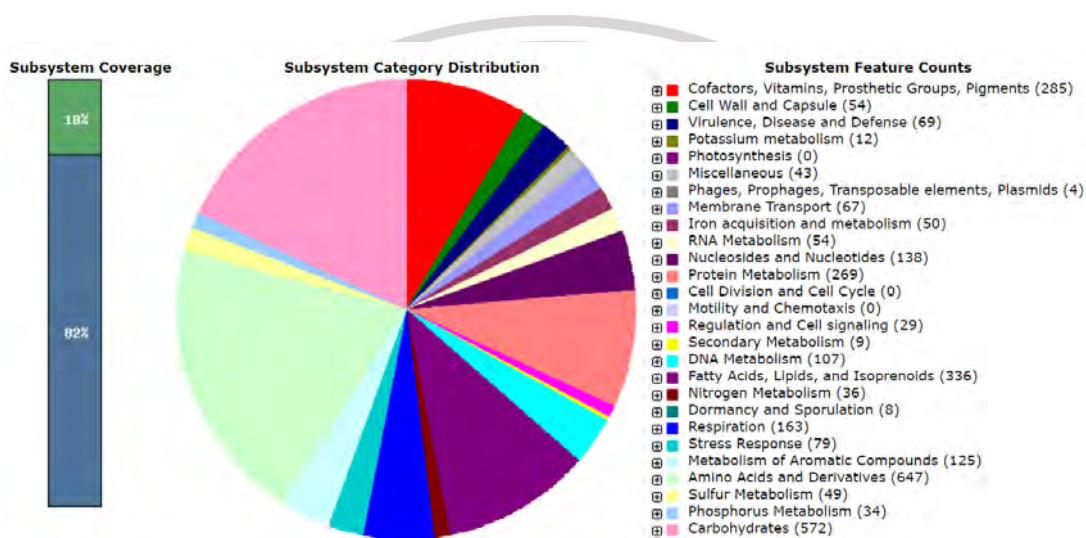
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 ค่า ANIb, ANIm และ dDDH ระหว่างโครงสร้างจีโนมของ CA3R110, *S. rapamycinicus* NRRL B-5491<sup>T</sup> และ *S. iranensis* HM 35<sup>T</sup>

ไอโซเลต	สายพันธุ์อ้างอิง	ANIb (%)	ANIm (%)	Digital DNA-DNA hybridization relatedness												G+C difference
				Formula 1*				Formula 2**				Formula 3***				
				% dDDH	Model C.I. (%)	Distance	Prob. DDH $\geq 70$ (same species)	% dDDH	Model C.I. (%)	Distance	Prob. DDH $\geq 70$ (same species)	% dDDH	Model C.I. (%)	Distance	Prob. DDH $\geq 70$ (same species)	
<i>Streptomyces</i> sp. CA3R110 <sup>T</sup>	<i>S. rapamycinicus</i> NRRL B-5491 <sup>T</sup>	92.2	93.8	57.0	53.4-60.5	0.2586	31.44	55.6	52.8-58.3	0.0598	36.99	57.6	54.4-60.8	0.3029	16.36	0.11
	<i>S. iranensis</i> HM 35 <sup>T</sup>	92.1	93.9	56.0	52.4-59.5	0.2653	27.99	57.0	54.2-59.8	0.0570	42.07	57.0	53.8-60.1	0.3072	14.41	0.03

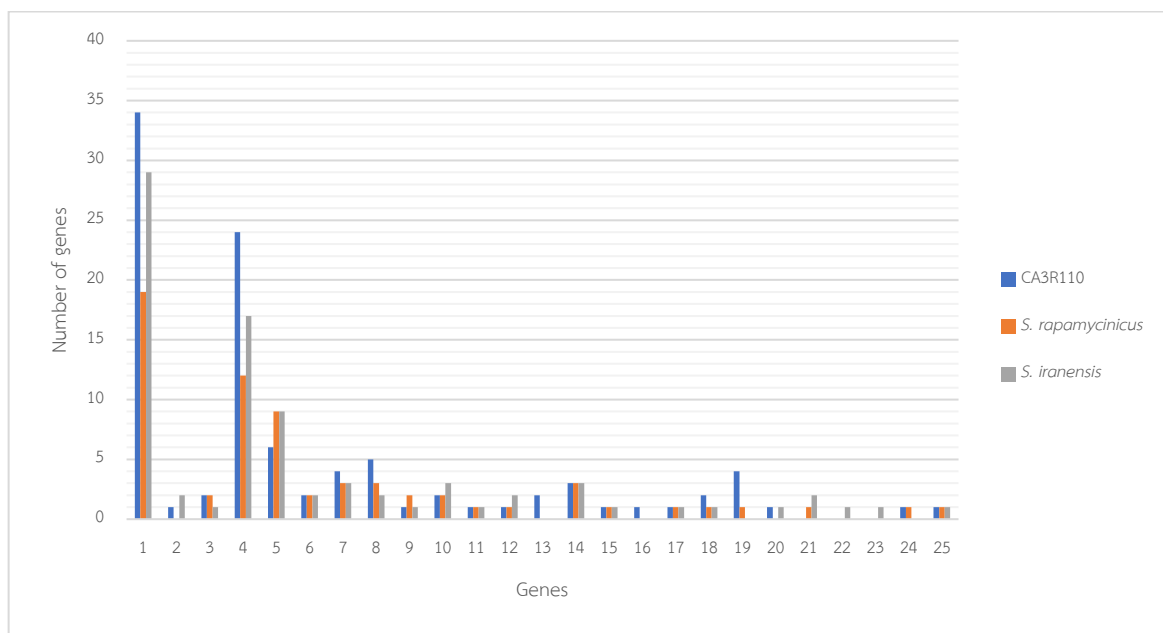
หมายเหตุ: \*Formula 1 คือ HSP length / total length, \*\*Formula 2 คือ identities/HSP length, \*\*\*Formula 3 คือ identities / total length เป็นการวิเคราะห์โดยไม่ขึ้นอยู่กับความยาวของโครงสร้างจีโนม

การทำนายยีนบนจีโนมของไอโซเลต CA3R110 พบยีนทั้งหมด 10,940 ยีน โดยมี ยีนที่แปลรหัสเป็นโปรตีน จำนวน 10,797 ยีน misc\_RNA จำนวน 46 ยีน tRNA จำนวน 94 ยีน rRNA จำนวน 3 ยีน และ tmRNA จำนวน 1 ยีน จากแผนภาพวงกลมพบกลุ่มยีนอโธโลจิส (Cluster of Orthologous genes; COGs) ที่ทำหน้าที่ต่าง ๆ ได้แก่ กลุ่มยีนกรดอะมิโนและอนุพันธ์ของกรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต (carbohydrates) เมตาบอลิซึมของโปรตีน (protein metabolism) โคแฟกเตอร์ (cofactors) วิตามิน (vitamins) สารสี (pigments) กรดไขมัน (fatty acids) ไขมัน (lipids) และไอโซพรีนอยด์ (isoprenoids) และกลุ่มยีนอื่น ๆ (รูปที่ 4.13)



รูปที่ 4.13 แผนภาพแสดง Cluster of Orthologous genes (COGs) ของไอโซเลต CA3R110

การทำนายกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิ (antismash) บนจีโนมของ ไอโซเลต CA3R110 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ใกล้เคียง *S. rapamycinicus* NRRL B-5491<sup>T</sup> และ *S. iranensis* HM 35<sup>T</sup> พบกลุ่มยีน T1PKS, NRPS, Terpene, Arylpolyene และ lanthipeptide class I มี ปริมาณยีนแตกต่างกันเห็นได้ชัด นอกจากนี้พบกลุ่มยีน non-alpha poly-amino acids like e-Polylysin (NAPAA) และ Aminocoumarin ที่พบในจีโนมของไอโซเลต CA3R110 เท่านั้น ในขณะที่ ไม่พบในจีโนมของสายพันธุ์ใกล้เคียง ดังนั้นการทำนายกลุ่มยีนจึงสามารถบ่งบอกความแตกต่างของเชื้อ แต่ละชนิดได้ (รูปที่ 4.14)



รูปที่ 4.14 แผนภาพแสดงปริมาณกลุ่มยีนบนจีโนมที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิของ CA3R110, *S. rapamycinicus* NRRL B-5491<sup>T</sup> และ *S. iranensis* HM 35<sup>T</sup>

หมายเหตุ: 1. T1PKS (Polyketide synthase type I), 2. T2PKS (Polyketide synthase type II), 3. T3PKS (Polyketide synthase type III), 4. Non-ribosomal peptide synthetase cluster (NRPS), 5. Terpene, 6. Other unspecified ribosomally synthesised and post-translationally modified peptide product (RiPP) cluster, 7. Ladderane, 8. Arylpolyene, 9. Betalactone, 10. Butyrolactone, 11. redox-cofactor, 12. Hserlactone, 13. non-alpha poly-amino acids like e-Polylysine (NAPAA), 14. Siderophore, 15. hglE-KS, 16. Aminocoumarin, 17. Ectoine, 18. Lasso peptide, 19. lanthipeptide class I, 20. lanthipeptide class II, 21. Nucleoside, 22. Phosphonate, 23. acyl\_ amino\_ acids, 24. Indole และ 25. other

นอกจากนี้ไอโซเลต CA3R110 พบว่ามีกลุ่มยีน T1PKS, กลุ่มยีน T2PKS, กลุ่มยีน T3PKS, กลุ่มยีน terpene, กลุ่มยีน ectoine, กลุ่มยีน NRPS, กลุ่มยีน betalactone, กลุ่มยีน butyrolactone, กลุ่มยีน heterocyst glycolipid synthase-like PKS (hglE-KS), กลุ่มยีน siderophore และกลุ่มยีนอื่น ๆ โดยมี 21 กลุ่มยีนที่มีความคล้ายคลึงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.13) และกลุ่มยีนที่มีการสร้างสารทุติยภูมิโดยมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงต่ำ เช่น กลุ่มยีนที่สังเคราะห์สาร rustmicin (33%), กลุ่มยีนที่สังเคราะห์สาร atratumycin (28%), กลุ่มยีนที่สังเคราะห์สาร rapamycin (21%), กลุ่มยีนที่สังเคราะห์สาร himastatin (20%) และกลุ่มยีนที่สังเคราะห์สาร tiancilactone (17%) เป็นต้น (ภาคผนวก จ) จึงมีแนวโน้มว่า CA3R110 สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่แตกต่างไปจากสารที่มีการค้นพบแล้ว จึงมีความเป็นไปได้ว่าอาจสร้างสารทุติยภูมิชนิดใหม่ได้

ตารางที่ 4.13 กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิที่มีความคล้ายคลึงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์บนจีโนมของไอโซเลต CA3R110

กลุ่มยีน	สารทุติยภูมิ	ผลิตจากสายพันธุ์	%Similarity
coelichelin biosynthetic gene cluster	coelichelin	<i>S. coelicolor</i> A3	100
geosmin biosynthetic gene cluster	geosmin		100
coelibactin biosynthetic gene cluster	coelibactin		100
hopene biosynthetic gene cluster	hopene		53
azalomycin F3a biosynthetic gene cluster	azalomycin F3a	<i>Streptomyces</i> sp. 211726	100
nigericin biosynthetic gene cluster	nigericin	<i>S. violaceusniger</i>	100
2-methylisoborneol biosynthetic gene cluster	2-methylisoborneol	<i>S. griseus</i> subsp. <i>griseus</i> NBRC 13350 <sup>T</sup>	100
desferrioxamin B biosynthetic gene cluster	desferrioxamin B		100
ectoine biosynthetic gene cluster	ectoine	<i>S. anulatus</i>	100
pristinol biosynthetic gene cluster	pristinol	<i>S. pristinaespiralis</i> ATCC 25486 <sup>T</sup>	100
elaiophylin biosynthetic gene cluster	elaiophylin	-	87
spore pigment biosynthetic gene cluster	spore pigment	<i>S. avermitilis</i>	83
feglymycin biosynthetic gene cluster	feglymycin	<i>Streptomyces</i> sp. DSM 11171 <sup>T</sup>	78

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.13 กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิที่มีความคล้ายคลึงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์บนจีโนมของไอโซเลต CA3R110 (ต่อ)

กลุ่มยีน	สารทุติยภูมิ	ผลิตจากสายพันธุ์	%Similarity
geldanamycin biosynthetic gene cluster	geldanamycin	<i>S. hygrosopicus</i>	69
mediomycin A biosynthetic gene cluster	mediomycin A	<i>Kitasatospora mediocidica</i>	68
sceliphrolactam biosynthetic gene cluster	sceliphrolactam	<i>Streptomyces</i> sp. SD85	60
atratumycin biosynthetic gene cluster	atratumycin	<i>S. atratus</i>	57
glycinocin A biosynthetic gene cluster	glycinocin A	<i>S. viridochromogenes</i>	53
griseochelin biosynthetic gene cluster	griseochelin	<i>S. griseus</i>	53
5-isoprenylindole-3-carboxylate $\beta$ -D-glycosyl ester biosynthetic gene cluster	5-isoprenylindole-3-carboxylate $\beta$ -D-glycosyl ester	<i>Streptomyces</i> sp. RM-5-8	52
bafilomycin B1 biosynthetic gene cluster	bafilomycin B1	<i>S. lohii</i>	50

(4) ลักษณะแตกต่างระหว่างไอโซเลต CA3R110 และสายพันธุ์อ้างอิงใกล้เคียงจากการเปรียบเทียบลักษณะฟีโนไทป์ของไอโซเลต CA3R110 และสายพันธุ์อ้างอิงใกล้เคียง ได้แก่ *S. rapamycinicus* NRRL B-5491<sup>T</sup> และ *S. iranensis* HM 35<sup>T</sup> พบว่ามีลักษณะบางประการที่แตกต่างจากสายพันธุ์ใกล้เคียง อาทิเช่นไอโซเลต CA3R110 สามารถย่อยยูเรีย และตกตะกอนโปรตีนในนม สามารถใช้ดี-เมลิไบโอส ดี-แมนนิทอล ดี-แมนโนส แต่ไม่สามารถใช้ ดี-แลคโตส แอล-อะราบิโนส ดี-ไซโลส ดี-เมลิไซโตส เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถใช้ 4-ไฮดรอกซีไพโรลีน ไม่สามารถใช้ แอล-อาร์จินีน และแอล-วาซีน เป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถสร้างกรดในแหล่งคาร์บอนคือ อินนูลิน และดี-เมลิไซโตส มีการสร้างเอนไซม์  $\alpha$ -glucosidase ลักษณะดังกล่าวมีความแตกต่างจากสายพันธุ์ใกล้เคียงทั้งสอง *S. rapamycinicus* DSM 41530<sup>T</sup> และ *S. iranensis* DSM 41954<sup>T</sup> (ตารางที่ 4.14)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.14 ลักษณะที่แตกต่าง (differential characteristics) ของไอโซเลต CA3R110, *S. rapamycinicus* DSM 41530<sup>T</sup> และ *S. iranensis* DSM 41954<sup>T</sup>

ลักษณะ	CA3R110*	<i>S. rapamycinicus</i> DSM 41530 <sup>T</sup> *	<i>S. iranensis</i> DSM 41954 <sup>T**</sup>
การเรียงตัวของสปอร์และผิวสปอร์	เกลียว/ขรุขระ	เกลียว/ขรุขระ	เกลียว/ขรุขระ
สีโคลนบนอาหาร ISP2	pale greenish yellow	pale greenish yellow	Beige
ความสามารถในการทนเกลือ (%NaCl (w/v))	1-3	1-4	1-3
อุณหภูมิที่เจริญ (°C)	20-40	20-40	20-37
pH	6-9	6-9	6-11
การย่อยยูเรีย	+	-	nd
<b>การย่อยโปรตีนในนม:</b>			
Coagulation	+	-	+
Peptonization	w	w	+
<b>ความสามารถในการเจริญบน แหล่งคาร์บอน:</b>			
ดี-ราฟิโนส	-	w	+
ดี-แลคโตส	-	+	nd
ดี-เมลีไบโอส	+	-	+
อินนูลิน	-	w	nd
เดกซ์แทรน	+	w	nd
แอล-อะราบิโนส	-	-	+
ดี-ไซโลส	-	-	+
แอล-แรมโนส	+	w	+
ดี-แมนนิทอล	+	-	+
ดี-แมนโนส	+	-	+
ดี-เมลีไซโตส	-	+	nd
ดี-ฟรุคโตส	+	w	nd
<b>การเจริญในแหล่งไนโตรเจน:</b>			
แอล-อาร์จินีน	-	w	+
แอล-ฮิสทีดีน	w	w	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.14 ลักษณะที่แตกต่าง (differential characteristics) ของไอโซเลต CA3R110, *S. rapamycinicus* DSM 41530<sup>T</sup> และ *S. iranensis* DSM 41954<sup>T</sup> (ต่อ)

ลักษณะ	CA3R110*	<i>S. rapamycinicus</i> DSM 41530 <sup>T</sup> *	<i>S. iranensis</i> DSM 41954 <sup>T</sup> **
<b>การเจริญในแหล่งไนโตรเจน:</b>			
4-ไฮดรอกซีไพโรลีน	+	-	+
แอล-ฟีนิลอะลานีน	w	+	nd
แอล-วาเลอีน	-	w	+
<b>การสร้างกรดในแหล่งคาร์บอน:</b>			
ดี-แลคโตส	-	+	nd
อินนูลิน	+	-	nd
ดี-เมลลิไซโตส	+	-	nd
<b>การย่อยสารประกอบไม่ละลายน้ำ:</b>			
อะดีนีน	+	+	-
ไฮโปแซนทีน	+	-	nd
ไทโรซีน	+	w	+
<b>การสร้างเอนไซม์ (API ZYM)</b>			
$\alpha$ -galactosidase	-	w	nd
$\beta$ -galactosidase	w	-	nd
$\alpha$ -glucosidase	+	w	nd
$\beta$ -glucosidase	w	-	nd
$\alpha$ -mannosidase	w	-	nd

หมายเหตุ: \*ข้อมูลจากการทดลอง \*\*ข้อมูลจาก Hamedิ และคณะ (2010)

จากข้อมูลของอนุกรมวิธานหลายส่วน (polyphasic taxonomy) ซึ่งประกอบด้วยลักษณะทางฟีโนไทป์ ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะจีโนไทป์ สามารถสรุปได้ว่า ไอโซเลต CA3R110 จัดเป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่ของสกุล *Streptomyces* และถูกกำหนดชื่อเป็น *Streptomyces endocoffeicus* sp. nov.

(5) ลักษณะแตกต่างระหว่างไอโซเลต CA1R205 และ CA3R110

จากการเปรียบเทียบลักษณะต่าง ๆ ของ CA1R205 และ CA3R110 พบว่ามีลักษณะบางประการที่แตกต่างจากสายพันธุ์ใกล้เคียง อาทิเช่น การเจริญของไอโซเลต CA3R110 พบมีการสร้างเส้นใยอาหารสีโทนเหลืองอมเขียวบนอาหารทดสอบทุกชนิด แต่ไอโซเลต CA1R205 มีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่ขึ้นต้นการตีพิมพ์ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สร้างเส้นใยอาหารสีโทนเหลืองอมเขียวบนอาหาร ISP6 และ ISP7 และสร้างเส้นใยอาหารสีโทนแดงบนอาหารทดสอบที่เหลือ อีกทั้งไอโซเลต CA1R205 ไม่สามารถย่อยยูเรีย และเจลาติน สามารถใช้ ดี-ราฟฟิโนส ดี-แลคโตส และดี-ไซโลส เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถสร้างกรดในแหล่งคาร์บอน ไซลิตอล ดี-แลคโตส และดี-ซาลิซิน สำหรับอนุกรมวิธานเคมีพบน้ำตาลแมนโนส และมีนาควิโนนหลักชนิด MK-9(H<sub>4</sub>) ซึ่งมีความแตกต่างกับไอโซเลต CA3R110 อย่างชัดเจน (ตารางที่ 4.15)

**ตารางที่ 4.15** ลักษณะที่แตกต่าง (differential characteristics) ของไอโซเลต CA1R205, CA3R110, *S. rapamycinicus* DSM 41530<sup>T</sup> และ *S. iranensis* DSM 41954<sup>T</sup>

ลักษณะ	CA1R205*	CA3R110*	<i>S. rapamycinicus</i> DSM 41530 <sup>T</sup> *	<i>S. iranensis</i> DSM 41954 <sup>T**</sup>
การเรียงตัวของสปอร์และฟิวสปอร์	เกลียว/ขรุขระ	เกลียว/ขรุขระ	เกลียว/ขรุขระ	เกลียว/ขรุขระ
สีโคโลนีบนอาหาร ISP2	very deep red	pale greenish yellow	pale greenish yellow	Beige
ความสามารถในการทนเกลือ (%NaCl (w/v))	1-3	1-3	1-4	1-3
อุณหภูมิที่เจริญ (°C)	20-40	20-40	20-40	20-37
pH	6-9	6-9	6-9	6-11
การย่อยยูเรีย	-	+	-	nd
การย่อยเจลาติน	-	+	+	+
<b>ความสามารถในการเจริญบน แหล่งคาร์บอน:</b>				
ดี-ราฟฟิโนส	w	-	w	+
ดี-แลคโตส	+	-	+	nd
ดี-ไซโลส	+	-	-	+
ดี-แมนนิทอล	-	+	-	+
ดี-แมนโนส	-	+	-	+
<b>การเจริญในแหล่งไนโตรเจน:</b>				
4-ไฮดรอกซีไพโรลีน	w	+	-	+
แอล-ไพโรลีน	-	+	+	+
<b>การสร้างกรดในแหล่งคาร์บอน:</b>				
ไซลิตอล	+	-	-	nd

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.15 ลักษณะที่แตกต่าง (differential characteristics) ของไอโซเลต CA1R205, CA3R110, *S. rapamycinicus* DSM 41530<sup>T</sup> และ *S. iranensis* DSM 41954<sup>T\*\*</sup> (ต่อ)

ลักษณะ	CA1R205*	CA3R110*	<i>S. rapamycinicus</i> DSM 41530 <sup>T</sup> *	<i>S. iranensis</i> DSM 41954 <sup>T**</sup>
<b>การสร้างกรดในแหล่งคาร์บอน:</b>				
ไซลิทอล	+	-	-	nd
ดี-แลคโตส	+	-	+	nd
ดี-ซาลิซิน	+	-	-	nd
<b>การย่อยสารประกอบไม่ละลายน้ำ:</b>				
ไฮโปแซนทีน	-	+	-	nd
ไทโรซีน	-	+	w	+
<b>การสร้างเอนไซม์ (API ZYM)</b>				
$\beta$ -galactosidase	-	w	-	nd
$\alpha$ -glucosidase	-	+	w	nd
$\beta$ -glucosidase	-	w	-	nd
N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase	-	+	+	nd
$\alpha$ -mannosidase	-	w	-	nd
<b>อนุกรมวิธานเคมี</b>				
น้ำตาลทั้งหมด	กาแลคโตส แมนโนส กลูโคส และไรโบส	กาแลคโตส กลูโคส และไรโบส	กลูโคส และไรโบส	nd
มีนาควิโนนหลัก	MK-9(H <sub>6</sub> ) และ MK-9(H <sub>4</sub> )	MK-9(H <sub>6</sub> ) และ MK-9(H <sub>8</sub> )	MK-9(H <sub>6</sub> ) และ MK-9(H <sub>4</sub> )	MK-9(H <sub>4</sub> ), MK-9(H <sub>6</sub> ) และ MK-9(H <sub>8</sub> )

หมายเหตุ: \*ข้อมูลจากการทดลอง \*\*ข้อมูลจาก Hamed และคณะ (2010)

จากการเปรียบเทียบจีโนมของไอโซเลต CA1R205 และ CA3R110 พบว่า มีค่า Average nucleotide identity-Blast (ANIb) เท่ากับ 81.8 เปอร์เซ็นต์ และค่า digital DNA-DNA hybridization (dDDH) เท่ากับ 27.6 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.16) ซึ่งมีค่าต่ำกว่าจุดตัดของเกณฑ์กำหนดความแตกต่างระดับสปีชีส์ (<95-96% สำหรับค่า ANI และ<70% สำหรับค่า dDDH) ที่กำหนดโดย Chun และคณะ (2018) และ Wayne และคณะ (1987) ตามลำดับ จากข้อมูลข้างต้นยืนยันว่าไอโซเลต CA1R205 มีความแตกต่างกับ CA3R110 ในระดับสปีชีส์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.16 ค่า ANIb, ANIm และ dDDH ระหว่างโครงร่างจีโนมของ CA1R205, CA3R110, *S. rapamycinicus* NRRL B-5491<sup>T</sup> และ *S. iranensis* HM 35<sup>T</sup>

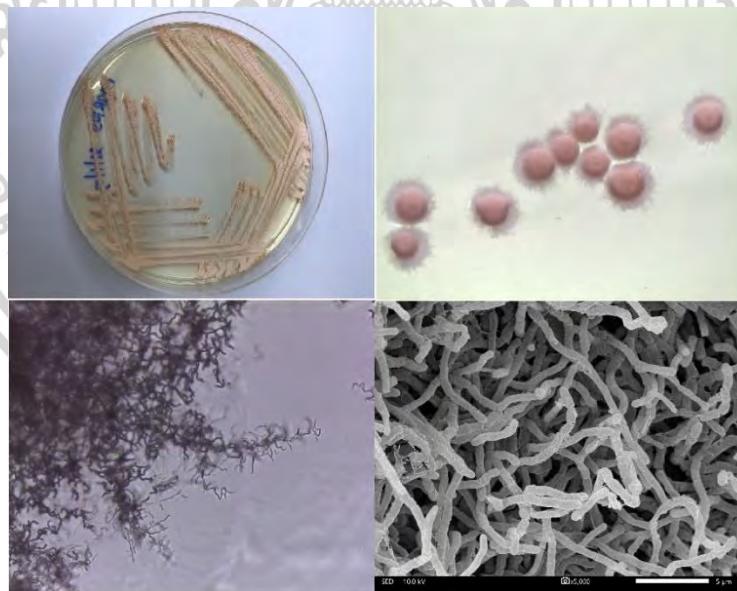
ไอโซเลต	สายพันธุ์อ้างอิง	ANIb (%)	ANIm (%)	Digital DNA-DNA hybridization relatedness												G+C difference
				Formula 1*				Formula 2**				Formula 3***				
				% dDDH	Model C.I. (%)	Distance	Prob. DDH $\geq 70$ (same species)	% dDDH	Model C.I. (%)	Distance	Prob. DDH $\geq 70$ (same species)	% dDDH	Model C.I. (%)	Distance	Prob. DDH $\geq 70$ (same species)	
<i>Streptomyces</i> sp. CA1R205 <sup>T</sup>	<i>Streptomyces</i> sp. CA3R110 <sup>T</sup>	81.8	87.4	28.4	25.0-32.0	0.5385	0.05	27.6	25.2-30.1	0.1564	0.04	27.0	24.1-30.1	0.6106	0.00	0.25
	<i>S. rapamycinicus</i> NRRL B-5491 <sup>T</sup>	81.5	87.3	28.8	25.4-32.4	0.5322	0.06	27.2	24.9-29.7	0.1585	0.03	27.3	24.4-30.4	0.6064	0.00	0.36
	<i>S. iranensis</i> HM 35 <sup>T</sup>	81.7	87.4	29.1	25.7-32.7	0.5273	0.06	27.7	25.4-30.2	0.1553	0.04	27.6	24.7-30.7	0.6007	0.00	0.22

หมายเหตุ: \*Formula 1 คือ HSP length / total length, \*\*Formula 2 คือ identities/HSP length, \*\*\*Formula 3 คือ identities / total length เป็นการวิเคราะห์โดยไม่มีขึ้นอยู่กับความยาวของโครงร่างจีโนม

#### 4.1.1.3 ไอโซเลต CA2R105

##### (1) ลักษณะทางฟิโนไทป์

ไอโซเลต CA2R105 สามารถเจริญได้ดีบนอาหารเกือบทุกชนิด แต่เจริญได้น้อยบนอาหาร ISP4 เส้นใยอาหารมีสีส้มอ่อน (pale orange yellow) จนถึงสีส้มเข้ม (strong orange yellow) สามารถสร้างเส้นใยอากาศสีส้มอ่อนบนอาหารทุกชนิด และไม่มีการสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำบนอาหารทุกชนิด (ตารางที่ 4.17) จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยบนอาหารแข็ง ISP2 ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่มีเลนส์ส่องระยะไกล พบว่าไอโซเลต CA2R105 สร้างเส้นใยที่มีลักษณะขดไปมา (zig-zag) เมื่อตรวจสอบลักษณะของผิวเส้นใยโดยการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (กำลังขยาย 5,000 เท่า) พบว่าเส้นใยสามารถแตกหักกลายเป็นชิ้นส่วนรูปร่างแท่งได้ (rod) (รูปที่ 4.15) ลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใยดังกล่าวพบได้ในสกุล *Nocardia* (Goodfellow et al. 2012) และมีลักษณะของเส้นใยคล้ายคลึงกับ *N. jiangxiensis* NBRC 101359<sup>T</sup> (Cui et al., 2005) จากการเปรียบเทียบลักษณะการเจริญของไอโซเลต CA2R105 และ *N. jiangxiensis* NBRC 101359<sup>T</sup> ซึ่งเป็นสายพันธุ์อ้างอิง (reference strain) ที่ใกล้เคียง คือ พบความคล้ายคลึงของสีเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ และเชื้อทั้งสองมีสีของเส้นใยอากาศและสปอร์ที่เหมือนกัน (ตารางที่ 4.17)



รูปที่ 4.15 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต CA2R105 (ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 (ค) ลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีเลนส์ส่องระยะไกลเป็นเลนส์ใกล้วัตถุ (กำลังขยาย 400 เท่า) และ (ง) สัณฐานวิทยาของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (กำลังขยาย 5,000 เท่า)

ตารางที่ 4.17 ลักษณะการเจริญของไอโซเลต CA2R105 และ *N. jiangxiensis* NBRC 101359<sup>T</sup>

	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สารสีละลายน้ำ
CA2R105	ISP2	ดีมาก	Strong orange yellow	Pale orange yellow	-
	ISP3	ดีมาก	Moderate orange yellow	Pale orange yellow	-
	ISP4	น้อย	Pale orange yellow	Pale orange yellow	-
	ISP5	ดี	Moderate orange yellow	Pale orange yellow	-
	ISP6	ดี	Moderate orange yellow	Pale orange yellow	-
	ISP7	ดีมาก	Moderate orange yellow	Pale orange yellow	-
	GluA	ดีมาก	Moderate orange yellow	Pale orange yellow	-
	Czapek	ดี	Pale orange yellow	Pale orange yellow	-
	NA	ดีมาก	Light orange yellow	Pale orange yellow	-
<i>N. jiangxiensis</i> NBRC 101359 <sup>T</sup>	ISP2	ดีมาก	Moderate orange yellow	Pale orange yellow	-
	ISP3	ดี	Moderate orange yellow	Pale orange yellow	-
	ISP4	น้อย	Pale orange yellow	-	-
	ISP5	ดี	Pale orange yellow	Pale orange yellow	-
	ISP6	ดี	Moderate orange yellow	Pale orange yellow	-
	ISP7	ดีมาก	Moderate orange yellow	Pale orange yellow	-
	GluA	ดีมาก	Moderate orange yellow	Pale orange yellow	-
	Czapek	ดี	Pale orange yellow	Pale orange yellow	-
	NA	ดี	Moderate orange yellow	Pale orange yellow	-

ไอโซเลต CA2R105 สามารถเจริญบนอาหาร ISP2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์สูงสุด 4 เปอร์เซ็นต์ ช่วงพีเอช 6-11 และอุณหภูมิระหว่าง 20-40 องศาเซลเซียส ไม่สามารถย่อยแป้ง ยูเรีย เจลาติน และโปรตีนในนม สามารถรีดิวซ์ไนเตรต และไม่สามารถสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้ มีการสร้างกรดโดยใช้ดี-กลูโคส ดี-เมลีโบไอส ดี-ซูโครส อินนูลิน ดี-ไรโบส เดกซ์แทรน ดี-กาแลคโตส แอล-อะราบิโนส ดี-ไซโลส ทรีฮาโลส แอล-แรมโนส ดี-แมนนิทอล ดี-เมลีไซโตส กลีเซอรอล และดี-ฟรุกโตส เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถใช้ดี-กลูโคส ดี-เซลโลโบไอส ซิลิทอล ดี-แลคโตส ดี-เมลีโบไอส อินนูลิน ดี-ไรโบส ดี-กาแลคโตส แอล-อะราบิโนส ดี-ไซโลส ทรีฮาโลส แอล-แรมโนส และ ดี-ฟรุกโตส เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนทุกชนิดที่นำมาทดลอง และย่อยไฮโปแซนทีนที่เป็นสารไม่ละลายน้ำ สร้างเอนไซม์อะไมเลส แต่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ออกซิเดสได้ เมื่อนำไปทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยชุดทดสอบ API ZYM ไอโซเลต CA2R105 สามารถสร้างเอนไซม์ Leucine arylamidase, acid phosphatase, Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase,  $\beta$ -galactosidase,  $\alpha$ -glucosidase และ  $\beta$ -glucosidase (ภาคผนวก ค) มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Antimicrobial Susceptibility) อะมิกาซิน อะม็อกซิซิลลิน แอมพิซิลลิน โอฟลอกซาซิน เพนิซิลลิน และโทบรามัยซิน แต่ทนต่อแอมโพเทอริซิน ไซโคลเฮกซิไมด์ ออกซาซิลลิน และแวนโคมัยซิน

## (2) ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี

ไอโซเมอร์ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในผนังเซลล์ของไอโซเลต CA2R105 เป็นแบบ meso พบน้ำตาลกาแลคโตส กลูโคส อะราบิโนส และไรโบสภายในเซลล์ กรดไขมันหลัก (>10%) ในเซลล์ที่พบ คือ C<sub>16:0</sub>, C<sub>18:1</sub> ω9c, C<sub>18:0</sub> และ 10-methyl C<sub>18:0</sub> (TSBA) นอกจากนี้พบ C<sub>14:0</sub>, C<sub>17:0</sub> 10-methyl, Iso-C<sub>19:0</sub> และ C<sub>20:1</sub> ω9c เป็นกรดไขมันรอง (ตารางที่ 4.18) ชนิดของไขมันมีหัวที่พบ คือ diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylinositol (PI) และ phosphatidylinositolmannoside (PIM) (ภาคผนวก ง) พบมีนาควิโนนหลัก คือ MK-8(H<sub>4</sub>, ω-cyclo) (80.8%) พบกรดไขมันคอлик โดยลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของไอโซเลต CA2R105 คล้ายคลึงกับลักษณะอนุกรมวิธานเคมีทั่วไปที่พบในสกุล *Nocardia* (Goodfellow et al., 2012) เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ใกล้เคียงคือ *N. jiangxiensis* NBRC 101359<sup>T</sup> พบว่า เชื้อทั้งสองมีรูปแบบของกรดไขมันหลัก และมีนาควิโนนคล้ายคลึงกัน แต่มีชนิดของน้ำตาลในเซลล์และชนิดของฟอสโฟลิปิดแตกต่างกัน โดย *N. jiangxiensis* NBRC 101359<sup>T</sup> ไม่พบน้ำตาลกลูโคส และไรโบส รวมทั้งไม่พบ phosphatidylglycerol (PG)

## ตารางที่ 4.18 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์ของไอโซเลต CA2R105 และสายพันธุ์อ้างอิง

กรดไขมัน (%)	1	2	3
C <sub>16:0</sub>	36.41	41.02	43.6
C <sub>18:0</sub> 10-methyl	13.80	11.25	15.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.18 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์ของไอโซเลต CA2R105 และสายพันธุ์อ้างอิง (ต่อ)

กรดไขมัน (%)	1	2	3
C <sub>18:0</sub>	11.42	8.75	11.2
C <sub>18:1</sub> ω9c	21.20	23.93	12.1
C <sub>14:0</sub>	0.98	0.95	1.0
C <sub>16:1</sub> ω9c	0.51	0.71	0.3
C <sub>17:0</sub>	-	-	1.15
C <sub>17:0</sub> 10-methyl	0.55	-	-
Iso-C <sub>17:1</sub> ω10c	-	0.69	-
Iso-C <sub>19:0</sub>	1.41	0.58	-
C <sub>19</sub> : 1 cyclo 9,10	-	-	-
C <sub>20:0</sub>	0.50	1.33	-
C <sub>20:1</sub> ω9c	4.94	4.15	-
Summed feature 3	5.1	4.3	14.3

หมายเหตุ: สายพันธุ์: 1. CA2R105; 2. *N. jiangxiensis* NBRC 101359<sup>T</sup>, 3. *N. nova* DSM 44481<sup>T</sup> (Kageyama et al., 2004); Summed feature 3 คือ C<sub>16:1</sub> ω6c และ/หรือ C<sub>16:1</sub> ω7c

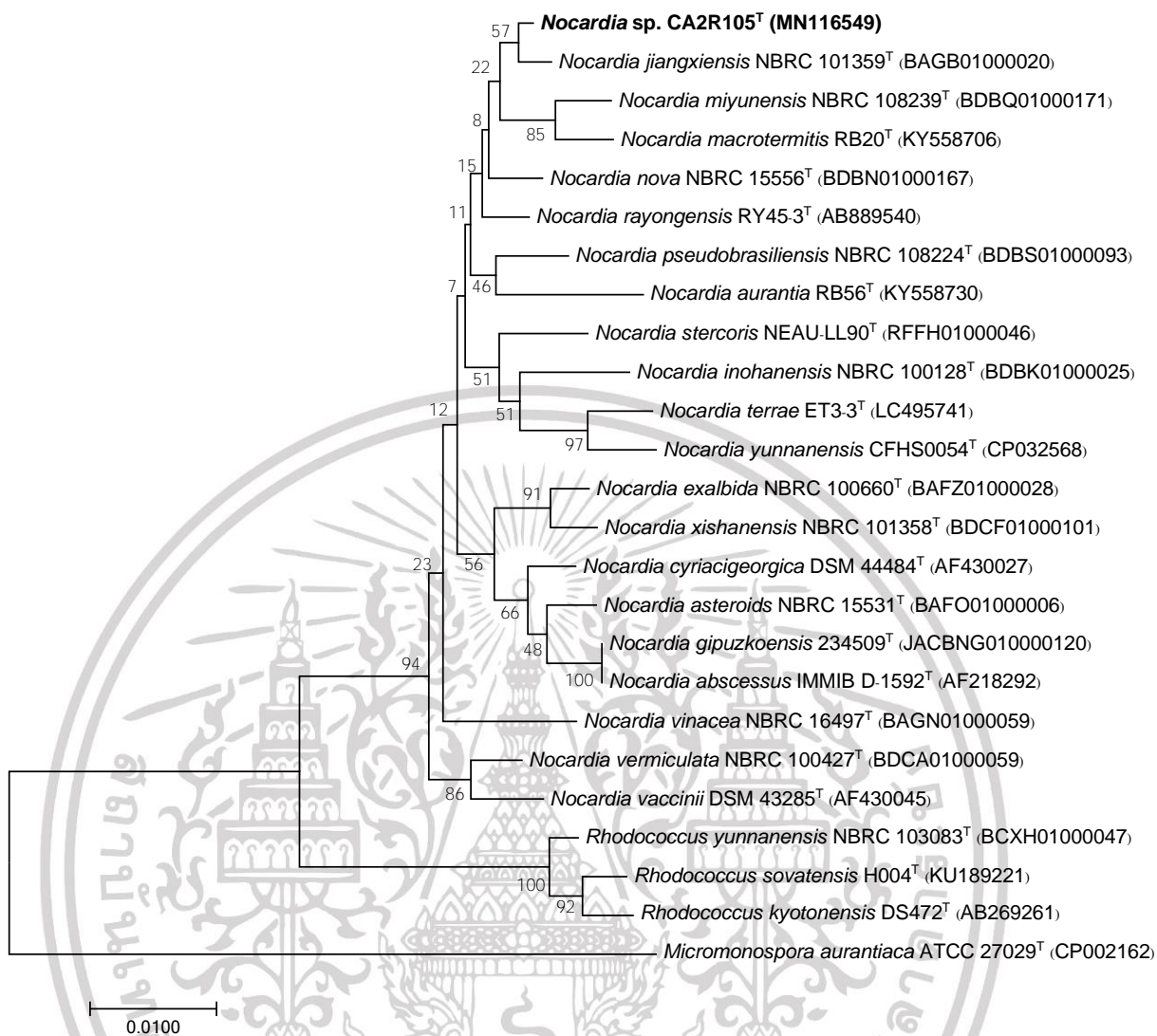
### (3) ลักษณะทางจีโนมไทป์

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนช่วงยีน 16S rRNA ของไอโซเลต CA2R105 พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *N. jiangxiensis* NBRC 101359<sup>T</sup> และ *N. nova* DSM 44481<sup>T</sup> ด้วยเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 99.17 และ 98.61 ตามลำดับ ซึ่งสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงที่สุดมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของยีน 16S rRNA สูงกว่าเกณฑ์กำหนดความเป็นสปีชีส์ใหม่ (<98.7%) ที่กำหนดโดย Rossi-Tamisier และคณะ (2015) (ตารางที่ 4.19) แต่สามารถใช้ข้อมูลของจีโนมจากการวิเคราะห์ค่า dDDH และวิเคราะห์ค่า ANIb และ ANIm เพื่อยืนยันว่าสายพันธุ์ใกล้เคียงต่างสปีชีส์กันได้ (Kim et al., 2014) นอกจากนี้การวิเคราะห์ตำแหน่งอนุกรมวิธานจากแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) แบบ maximum-likelihood, neighbor-joining และ maximum-parsimony โดยตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต CA2R105 แยกออกจาก *N. jiangxiensis* NBRC 101359<sup>T</sup> และ *N. nova* DSM 44481<sup>T</sup> อย่างชัดเจน (รูปที่ 4.16-4.18) แต่มีค่าความเชื่อมั่น (bootstrap value) ในระดับต่ำ (<50%) บนแผนภูมิต้นไม้ maximum-likelihood และ maximum-parsimony นอกจากนี้มีระยะทางบนสายวิวัฒนาการ (evolutionary distances) ห่างกัน จากข้อมูลข้างต้นสามารถสรุปได้ว่าไอโซเลต CA2R105 มีความแตกต่างทางอนุกรมวิธานจาก *N. jiangxiensis* NBRC 101359<sup>T</sup> และ *N. nova* DSM 44481<sup>T</sup>

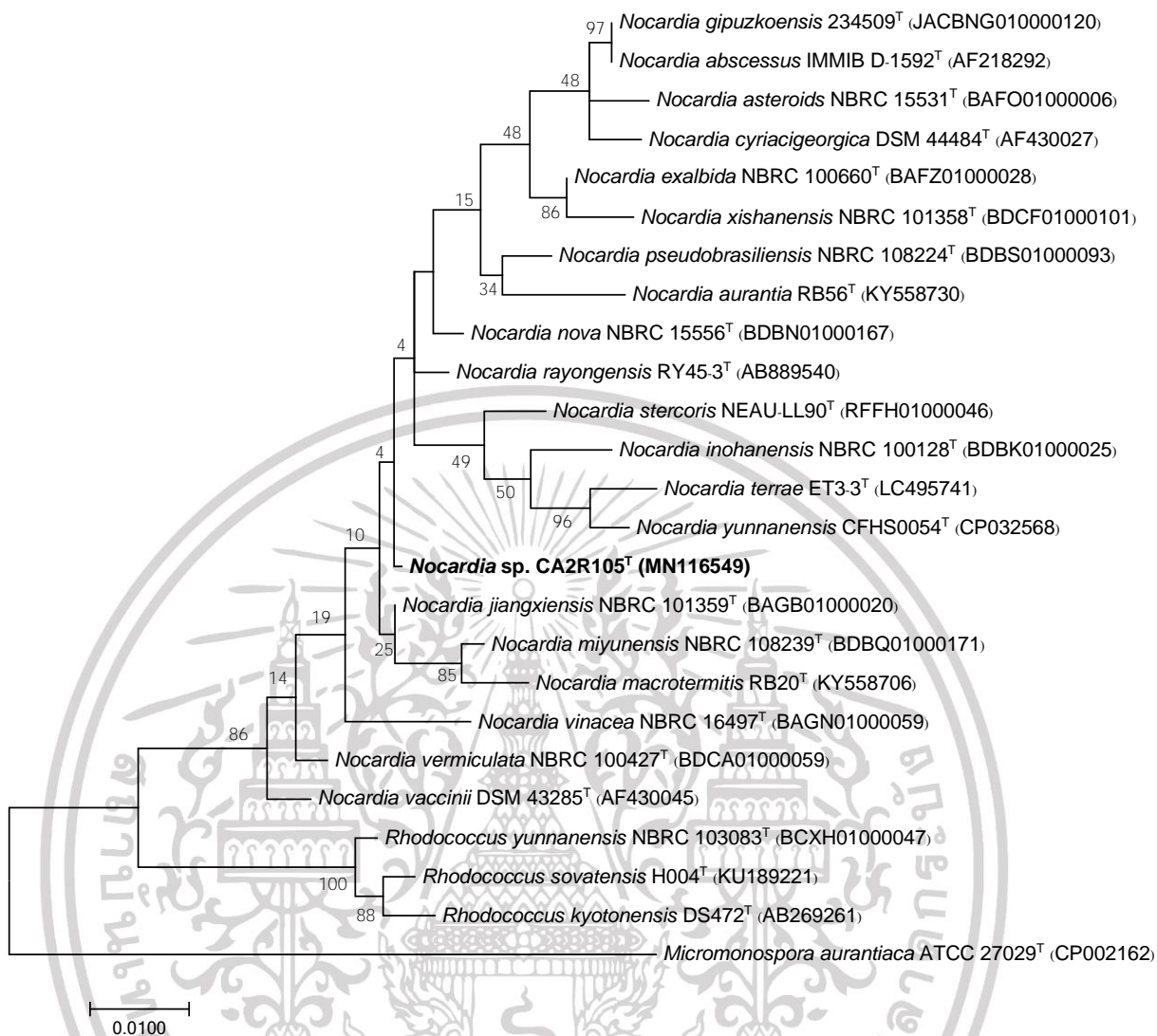
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.19 เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนช่วง 16S rRNA (% 16S rRNA gene similarity value) ระหว่างไอโซเลต CA2R105 และสายพันธุ์ใกล้เคียงในฐานข้อมูล EzBioCloud

	สายพันธุ์ใกล้เคียง	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	CA2R105	100	99.17	98.89	98.61	98.40	98.26	98.12	98.05	98.05	97.98	97.98	97.93	97.92	97.92	97.92	97.85	97.78	97.78	97.78	97.78
2	<i>N. jiangxiensis</i>	99.17	100	99.10	99.00	99.10	98.70	98.30	98.20	98.30	98.70	98.00	97.70	98.30	98.30	98.00	98.20	97.80	97.60	97.90	98.20
3	<i>N. rayongensis</i>	98.89	99.10	100	99.10	98.50	98.50	98.90	98.60	98.40	98.20	98.20	97.70	98.20	98.30	98.20	98.20	98.00	97.90	98.10	98.70
4	<i>N. nova</i>	98.61	99.00	99.10	100	98.50	98.60	98.50	98.20	98.50	98.70	98.10	98.00	98.50	98.30	98.50	98.20	98.00	98.00	98.10	98.50
5	<i>N. miyunensis</i>	98.40	99.10	98.50	98.50	100	98.30	98.50	97.40	97.80	99.10	97.60	97.30	97.80	97.70	97.80	97.70	97.70	97.30	97.70	97.70
6	<i>N. vermiculata</i>	98.26	98.70	98.50	98.60	98.30	100	97.50	97.80	98.20	98.00	97.20	97.80	99.00	98.00	97.90	97.80	98.00	97.30	98.00	98.10
7	<i>N. pseudobrasiliensis</i>	98.12	98.30	98.90	98.50	98.50	97.50	100	98.20	98.30	98.50	98.20	97.60	97.40	97.80	98.50	98.20	98.10	98.20	98.00	98.50
8	<i>N. asteroides</i>	98.05	98.20	98.60	98.20	97.40	97.80	98.20	100	98.90	97.20	97.80	97.40	97.50	98.20	98.50	98.50	97.20	97.40	99.20	98.10
9	<i>N. cyriaci</i> <i>georgica</i>	98.05	98.30	98.40	98.50	97.80	98.20	98.30	98.90	100	97.60	97.70	97.90	97.70	97.60	98.50	98.30	97.60	98.00	99.20	98.00
10	<i>N. macrotermis</i>	97.98	98.70	98.20	98.70	99.10	98.00	98.50	97.20	97.60	100	97.40	97.70	98.20	97.90	97.60	97.50	97.80	97.70	97.50	98.00
11	<i>N. aurantia</i>	97.98	98.00	98.20	98.10	97.60	97.20	98.20	97.80	97.70	97.40	100	96.70	97.20	97.50	97.70	97.50	97.00	96.80	97.30	97.60
12	<i>N. terrae</i>	97.93	97.70	97.70	98.00	97.30	97.80	97.60	97.40	97.90	97.70	96.70	100	97.70	97.50	98.00	98.20	97.90	98.90	97.60	98.20
13	<i>N. vaccinii</i>	97.92	98.30	98.20	98.50	97.80	99.00	97.40	97.50	97.70	98.20	97.20	97.70	100	98.20	97.50	97.60	97.90	97.00	97.50	98.00
14	<i>N. vinacea</i>	97.92	98.30	98.30	98.30	97.70	98.00	97.80	98.20	97.60	97.90	97.50	97.50	98.20	100	98.00	97.70	96.80	97.00	97.60	97.90
15	<i>N. exalbida</i>	97.92	98.00	98.20	98.50	97.80	97.90	98.50	98.50	98.50	97.60	97.70	98.00	97.50	98.00	100	99.30	97.40	97.70	99.00	97.60
16	<i>N. xishanensis</i>	97.85	98.20	98.20	98.20	97.70	97.80	98.20	98.50	98.30	97.50	97.50	98.20	97.60	97.70	99.30	100	97.70	97.90	98.60	97.70
17	<i>N. inohanensis</i>	97.78	97.80	98.00	98.00	97.70	98.00	98.10	97.20	97.60	97.80	97.00	97.90	97.90	96.80	97.40	97.70	100	98.20	97.50	98.20
18	<i>N. yunnanensis</i>	97.78	97.60	97.90	98.00	97.30	97.30	98.20	97.40	98.00	97.70	96.80	98.90	97.00	97.00	97.70	97.90	98.20	100	97.60	98.20
19	<i>N. gipuzkoensis</i>	97.78	97.90	98.10	98.10	97.70	98.00	98.00	99.20	99.20	97.50	97.30	97.60	97.50	97.60	99.00	98.60	97.50	97.60	100	97.60
20	<i>N. stercoris</i>	97.78	98.20	98.70	98.50	97.70	98.10	98.50	98.10	98.00	98.00	97.60	98.20	98.00	97.90	97.60	97.70	98.20	98.20	97.60	100

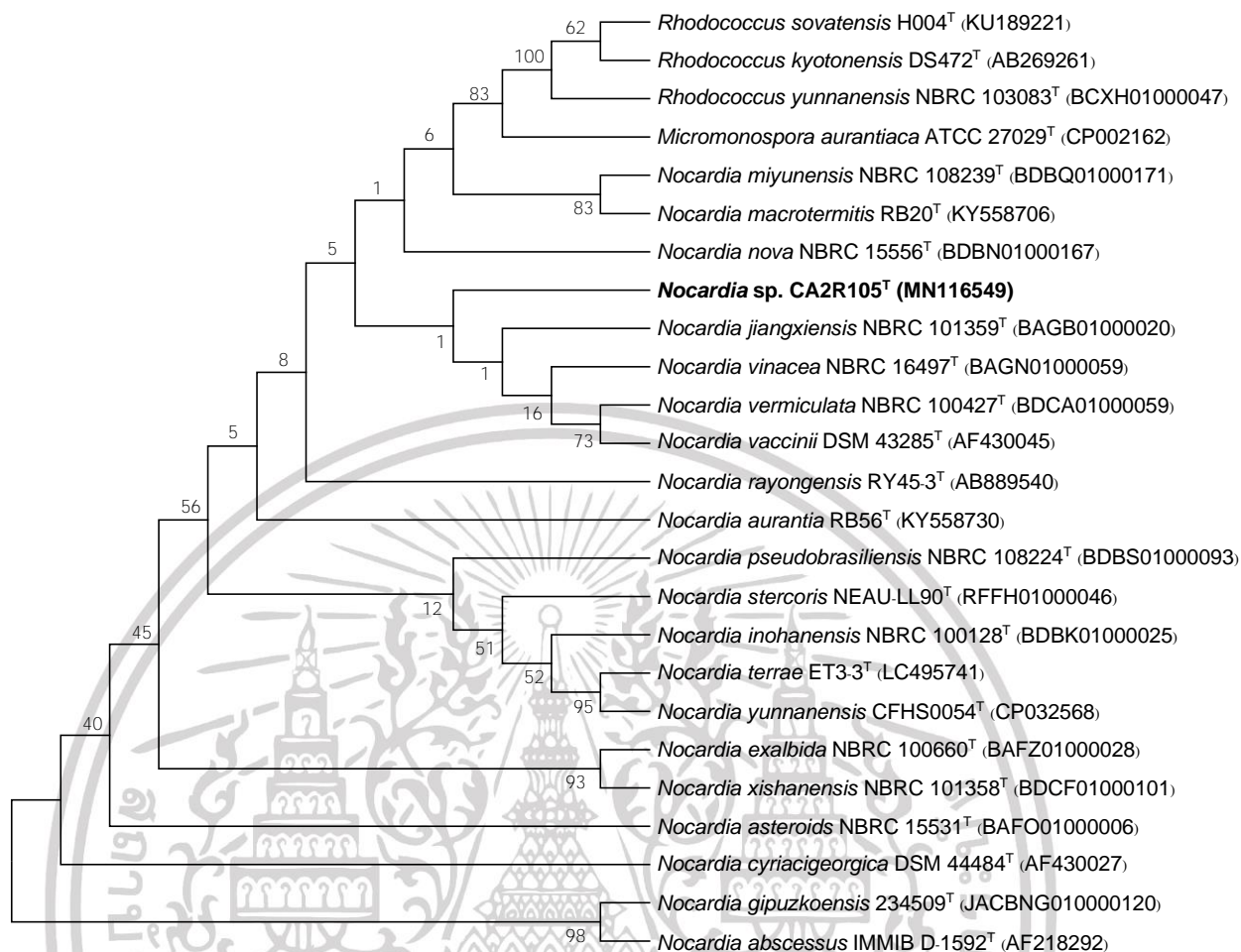


รูปที่ 4.16 แผนภูมิต้นไม้แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต CA2R105 ด้วยวิธี Neighbor-Joining



รูปที่ 4.17 แผนภูมิต้นไม้แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต CA2R105 ด้วยวิธี maximum-likelihood

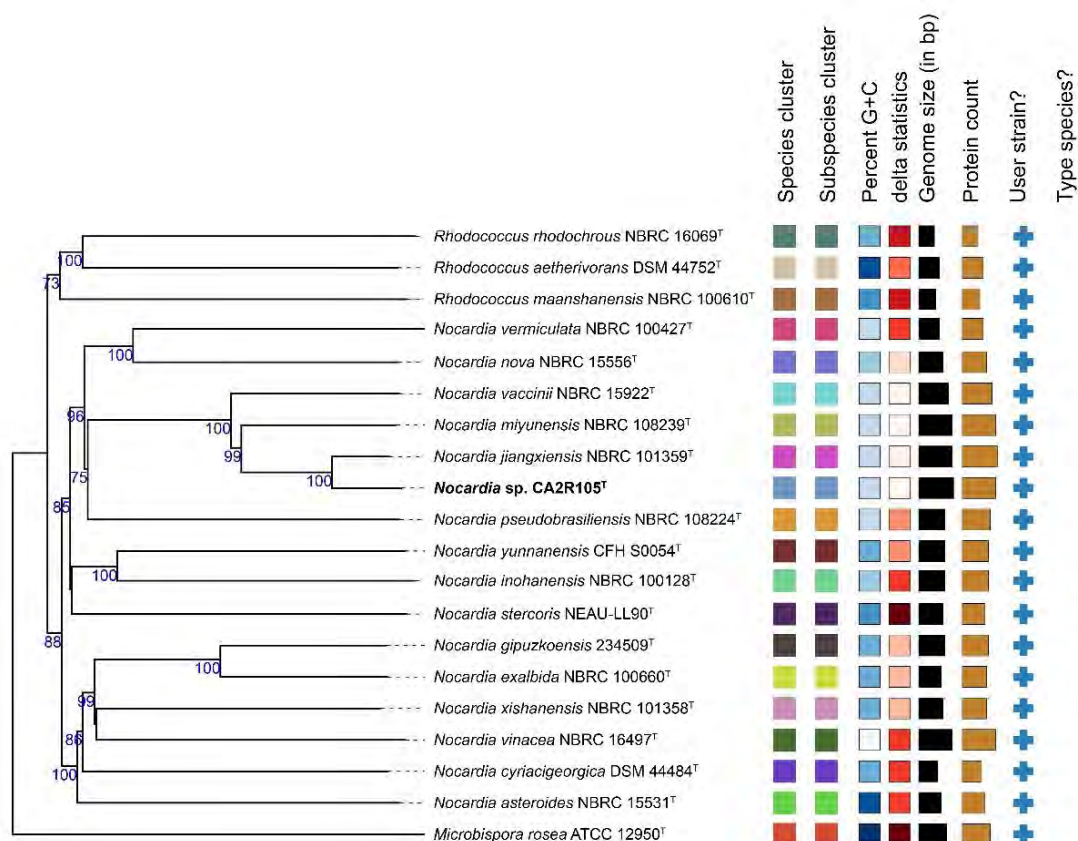
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.18 แผนภูมิต้นไม้แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต CA2R105 ด้วยวิธี maximum-parsimony

การตรวจคุณลักษณะอนุกรมวิธานด้วยคุณสมบัติจีโนมของไอโซเลต CA2R105 พบว่า โครงร่างจีโนม มีนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 10,562,586 นิวคลีโอไทด์ (ประกอบด้วย 106 contigs โดย contig ที่ยาวสุดมีขนาด 2,055,843 นิวคลีโอไทด์ มีค่า N50 มีความยาว 540,076 นิวคลีโอไทด์ มีค่า Genome coverage เท่ากับ 40X) ไอโซเลต CA2R105 มีปริมาณเบส G+C ในจีโนม เท่ากับ 66.95 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับปริมาณ G+C content ของสกุล *Nocardia* ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 63-73 เปอร์เซ็นต์ (Goodfellow et al. 2012) จากการเปรียบเทียบจีโนมของไอโซเลต CA2R105 และสายพันธุ์ใกล้เคียงได้แก่ *N. jiangxiensis* NBRC 101359<sup>T</sup> และ *N. nova* DSM 44481<sup>T</sup> พบว่า มีค่า Average nucleotide identity-Blast (ANIb) เท่ากับ 93.7 และ 75.6 เปอร์เซ็นต์ และค่า digital DNA-DNA hybridization (dDDH) เท่ากับ 65.2 และ 22.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.20) ซึ่งมีค่าต่ำกว่าจุดตัดของเกณฑ์กำหนดความแตกต่างระดับสปีชีส์ (<95-96% สำหรับค่า ANI และ <70% สำหรับค่า dDDH) ที่กำหนดโดย Chun และคณะ (2018) และ Wayne และคณะ (1987) ตามลำดับ นอกจากนี้ตำแหน่งอนุกรมวิธานบนแผนภูมิต้นไม้ของจีโนม (phylogenomic tree) ของไอโซเลตนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โซลิต CA2R105 ก่อตัวอยู่บนคนละกิ่ง (branch) กับ *N. jiangxiensis* NBRC 101359<sup>T</sup> และ *N. nova* DSM 44481<sup>T</sup> โดยมีค่า bootstrap เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.19) จากข้อมูลข้างต้น ยืนยันว่าไอโซลิต CA2R105 มีความแตกต่างในระดับสปีชีส์กับสายพันธุ์ใกล้เคียงทั้งสอง ลำดับนิวคลีโอไทด์บนช่วงยีน 16S rRNA และจีโนมของไอโซลิต CA2R105 จัดเก็บไว้ในฐานข้อมูล Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) โดยมีหมายเลขจำเพาะ MN116549 และ JAINZY000000000 ตามลำดับ



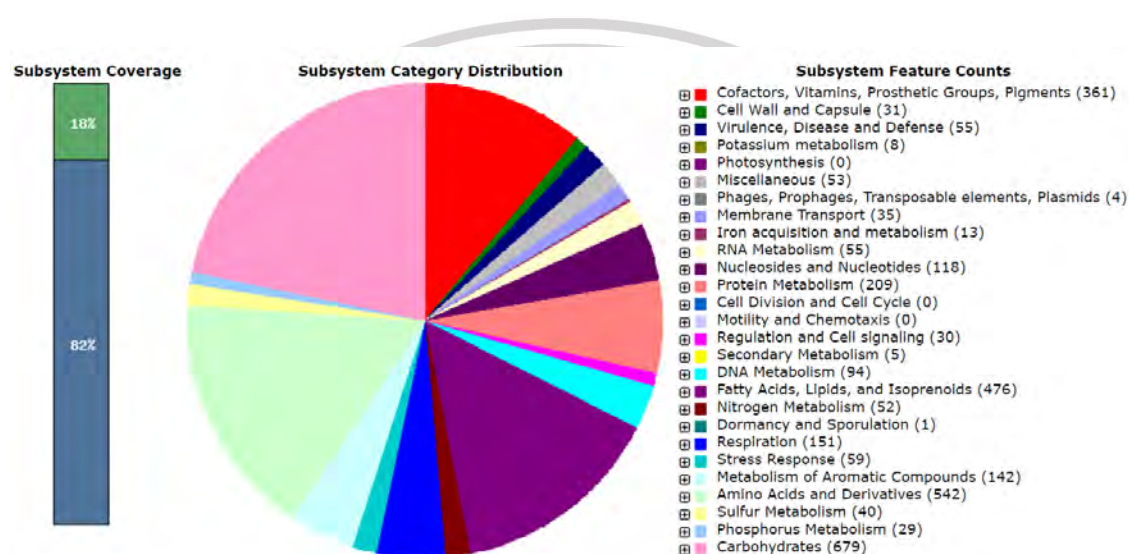
รูปที่ 4.19 แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการของจีโนม (Phylogenomic tree) แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซลิต CA2R105 และสายพันธุ์ใกล้เคียง

ตารางที่ 4.20 ค่า ANIb, ANIm และ dDDH ระหว่างโครงสร้างจีโนมของ CA2R105, *N. jiangxiensis* NBRC 101359<sup>T</sup> และ *N. nova* DSM 44481<sup>T</sup>

ไอโซเลต	สายพันธุ์อ้างอิง	ANIb (%)	ANIm (%)	Digital DNA-DNA hybridization relatedness												G+C difference
				Formula 1*				Formula 2**				Formula 3***				
				% dDDH	Model C.I. (%)	Distance	Prob. DDH $\geq 70$ (same species)	% dDDH	Model C.I. (%)	Distance	Prob. DDH $\geq 70$ (same species)	% dDDH	Model C.I. (%)	Distance	Prob. DDH $\geq 70$ (same species)	
<i>Nocardia</i> sp. CA2R105 <sup>T</sup>	<i>N. jiangxiensis</i> NBRC 101359 <sup>T</sup>	93.7	95.9	60.3	56.6-63.8	0.2384	42.9	65.2	62.3-68.0	0.0431	67.9	62.5	59.2-65.7	0.2712	37.2	0.20
	<i>N. nova</i> DSM 44481 <sup>T</sup>	75.6	84.8	18.5	15.4-22.1	0.7540	0.0	22.4	20.1-24.8	0.1958	0.0	18.2	15.6-21.2	0.8022	0.0	0.89

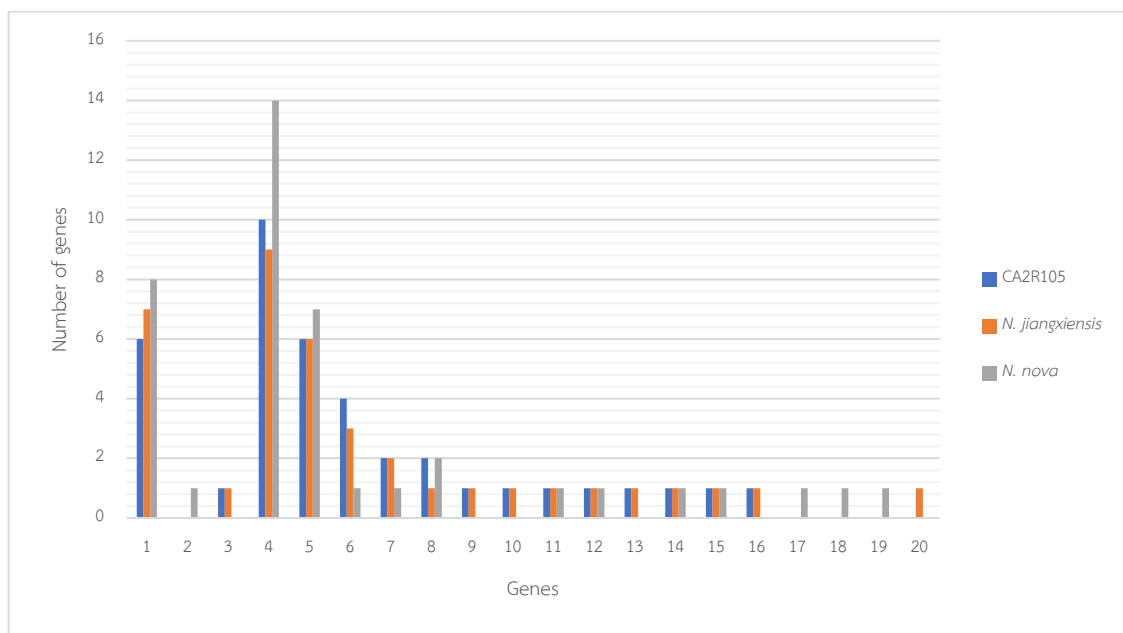
หมายเหตุ: \*Formula 1 คือ HSP length / total length, \*\*Formula 2 คือ identities/HSP length, \*\*\*Formula 3 คือ identities / total length เป็นการวิเคราะห์โดยไม่ขึ้นอยู่กับความยาวของโครงสร้างจีโนม

การทำนายยีนบนจีโนม (annotation) ของไอโซเลต CA2R105 พบยีนทั้งหมด 9,495 ยีน โดยมียีนที่แปลรหัสเป็นโปรตีน จำนวน 9,435 ยีน misc\_RNA จำนวน 152 ยีน tRNA จำนวน 80 ยีน rRNA จำนวน 3 ยีน และ tmRNA จำนวน 1 ยีน จากแผนภาพวงกลมพบกลุ่มยีนอโธล็อกัส (Cluster of Orthologous genes; COGs) ที่ทำหน้าที่ต่าง ๆ ได้แก่ กลุ่มยีนกรดอะมิโนและอนุพันธ์ของกรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต (carbohydrates) เมตาบอลิซึมของโปรตีน (protein metabolism) โคแฟคเตอร์ (cofactors) วิตามิน (vitamins) สารสี (pigments) กรดไขมัน (fatty acids) ไขมัน (lipids) และไอโซพรีนอยด์ (isoprenoids) และกลุ่มยีนอื่น ๆ (รูปที่ 4.20)



รูปที่ 4.20 แผนภาพแสดง Cluster of Orthologous genes (COGs) ของไอโซเลต CA2R105

การทำนายกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิ (antismash) บนจีโนมของไอโซเลต CA2R105 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ใกล้เคียง *N. jiangxiensis* NBRC 101359<sup>T</sup> และ *N. nova* DSM 44481<sup>T</sup> พบกลุ่มยีน T1PKS, NRPS, Terpene และ Betalactone มีปริมาณยีนแตกต่างกันเห็นได้ชัด ดังนั้นการทำนายกลุ่มยีนจึงสามารถบ่งบอกความแตกต่างของเชื้อแต่ละชนิดได้ (รูปที่ 4.21)



รูปที่ 4.21 แผนภาพแสดงปริมาณกลุ่มยีนบนจีโนมที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิของ CA2R105, *N. jiangxiensis* NBRC 101359<sup>T</sup> และ *N. nova* DSM 44481<sup>T</sup>

หมายเหตุ: 1. T1PKS (Polyketide synthase type I), 2. T2PKS (Polyketide synthase type II), 3. T3PKS (Polyketide synthase type III), 4. Non-ribosomal peptide synthetase cluster (NRPS), 5. Terpene, 6. Betalactone, 7. non-alpha poly-amino acids like e-Polylysine (NAPAA), 8. redox-cofactor, 9. lanthipeptide class I, 10. lanthipeptide class V, 11. Ectoine, 12. Other, 13. hgL-EKS, 14. Other unspecified ribosomally synthesised and post-translationally modified peptide product (RiPP) cluster, 15. Arylpolyene, 16. Resorcinol, 17. Furan, 18. Butyrolactone, 19. Lasso peptide และ 20. phosphonate

นอกจากนี้ไอโซเลต CA2R105 พบว่ามีกลุ่มยีน T1PKS, กลุ่มยีน T3PKS, กลุ่มยีน terpene, กลุ่มยีน ectoine, กลุ่มยีน NRPS, กลุ่มยีน melanin, กลุ่มยีน betalactone และกลุ่มยีนอื่น ๆ โดยมี 2 กลุ่มยีนที่มีความคล้ายคลึงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ คือ กลุ่มยีนที่สังเคราะห์สาร ectoine (100%) ความ และกลุ่มยีนที่สังเคราะห์สาร 2-methylisoborneol (75%) รวมทั้งกลุ่มยีนที่มีการสร้างสารทุติยภูมิโดยมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงต่ำ เช่น กลุ่มยีนที่สังเคราะห์สาร isorenieratene (28%), กลุ่มยีนที่สังเคราะห์สาร coelichelin (27%), กลุ่มยีนที่สังเคราะห์สาร carotenoid (27%) และกลุ่มยีนที่สังเคราะห์สาร 5-isoprenylindole-3-carboxylate  $\beta$ -D-glycosyl ester (14%) เป็นต้น (ภาคผนวก จ) จึงมีแนวโน้มว่า CA2R105 สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่มีแนวโน้มว่าอาจเป็นสารทุติยภูมิชนิดใหม่

(4) ลักษณะแตกต่างระหว่างไอโซเลต CA2R105 และสายพันธุ์อ้างอิงใกล้เคียง

จากการเปรียบเทียบลักษณะฟีโนไทป์ของไอโซเลต CA2R105 และสายพันธุ์อ้างอิง

ใกล้เคียง ได้แก่ *N. jiangxiensis* NBRC 101359<sup>T</sup> และ *N. nova* DSM 44481<sup>T</sup> พบว่ามีลักษณะบางเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประการที่แตกต่างกัน อาทิเช่นไอโซเลต CA2R105 สามารถใช้ไซลิทอล ดี-เมลิโบไอส แอล-อะราบิโนส และแอล-แรมโนส เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถใช้ 2-อะมิโนบิวเทน เป็นแหล่งไนโตรเจน ไม่สามารถสร้างกรดในแหล่งคาร์บอน คือ อะโดนิทอล และไซลิทอล มีการสร้างเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase และ  $\alpha$ -mannosidase ลักษณะดังกล่าวมีความแตกต่างจากสายพันธุ์ใกล้เคียงทั้งสอง (ตารางที่ 4.21)

**ตารางที่ 4.21** ลักษณะแตกต่าง (differential characteristics) ของไอโซเลต CA2R105, *N. jiangxiensis* NBRC 101359<sup>T</sup> และ *N. nova* DSM 44481<sup>T\*\*</sup>

ลักษณะ	CA2R105*	<i>N. jiangxiensis</i> NBRC 101359 <sup>T*</sup>	<i>N. nova</i> DSM 44481 <sup>T**</sup>
สีโคโลนีบนอาหาร ISP2	strong orange yellow	moderate orange yellow	orange
ความสามารถในการทนเกลือ (%NaCl (w/v))	1-4	1-4	1-7
อุณหภูมิที่เจริญ (°C)	20-40	20-40	15-37
pH	6-11	6-11	4-8
<b>ความสามารถในการเจริญบนแหล่งคาร์บอน:</b>			
ไซลิทอล	+	-	nd
ดี-ซูโครส	-	-	w
ดี-เมลิโบไอส	+	+	nd
แอล-อะราบิโนส	+	-	-
แอล-แรมโนส	+	-	-
ดี-แมนนิทอล	-	-	w
ดี-แมนโนส	-	+	nd
<b>การเจริญในแหล่งไนโตรเจน:</b>			
2-อะมิโนบิวเทน	+	-	nd
<b>การสร้างกรดในแหล่งคาร์บอน:</b>			
อะโดนิทอล	-	+	+
ไซลิทอล	-	+	nd
ดี-เมลิไซโตส	+	-	nd
<b>การย่อยสารประกอบไม่ละลายน้ำ:</b>			
ไฮโปแซนทีน	w	+	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.21 ลักษณะแตกต่าง (differential characteristics) ของไอโซเลต CA2R105, *N. jiangxiensis* NBRC 101359<sup>T</sup> และ *N. nova* DSM 44481<sup>T</sup> (ต่อ)

ลักษณะ	CA2R105*	<i>N. jiangxiensis</i> NBRC 101359 <sup>T</sup> *	<i>N. nova</i> DSM 44481 <sup>T</sup> **
การสร้างเอนไซม์ (API ZYM)			
$\beta$ -galactosidase	+	w	nd
$\alpha$ -mannosidase	w	w	nd

หมายเหตุ: \*ข้อมูลจากการทดลอง \*\*ข้อมูลจาก Kageyama และคณะ (2004)

จากข้อมูลของอนุกรมวิธานหลายส่วน (polyphasic taxonomy) ซึ่งประกอบด้วย ลักษณะทางฟีโนไทป์ ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะจีโนไทป์ สามารถสรุปได้ว่า ไอโซเลต CA2R105 จัดเป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่ของสกุล *Nocardia* และถูกกำหนดชื่อเป็น *Nocardia coffeae* sp. nov.

#### 4.1.2 แอคติไมซีตจากป่าพรุ

##### 4.1.2.1 ไอโซเลต PLK6-54

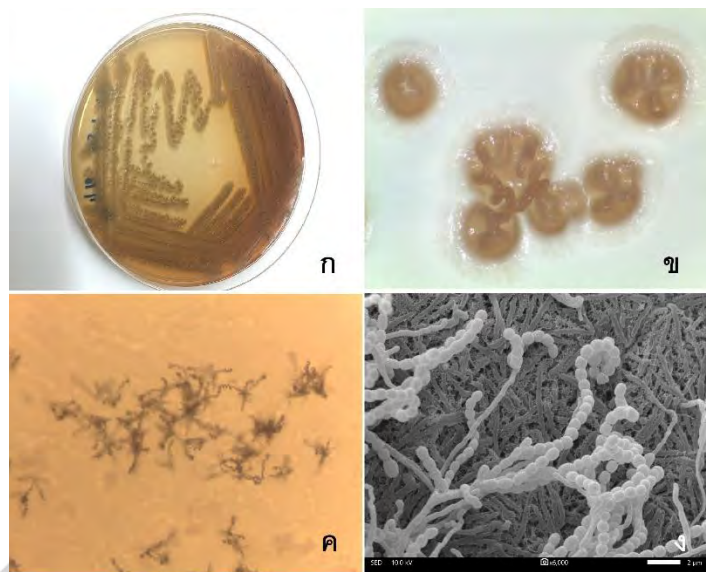
##### (1) ลักษณะทางฟีโนไทป์

ไอโซเลต PLK6-54 สามารถเจริญได้ดีบนอาหารแข็งเกือบทุกชนิด แต่เจริญได้น้อยบนอาหาร ISP6 เส้นใยอาหารมีสีน้ำตาลอ่อน (light olive brown) จนถึงน้ำตาลเข้ม (dark grayish yellow) สามารถสร้างเส้นใยอากาศและสปอร์สีน้ำตาลอมเทา (Olive gray) บนอาหาร ISP3 มีการสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสีเหลืองอ่อน (pale yellow) จนถึงสีเหลืองอมน้ำตาล (moderate yellowish brown) บนอาหารแข็ง ISP2 ISP3 ISP4 ISP5 glucose asparagines และ nutrient agar (ตารางที่ 4.22) จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์บนอาหารแข็ง ISP3 ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่มีเลนส์ส่องระยะไกล พบว่าไอโซเลต PLK6-54 สร้างสปอร์ที่มีการเรียงต่อกันเป็นสายตรงปลายโค้ง (flexuous spore chains) บนเส้นใยอากาศ (รูปที่ 4.22) เมื่อตรวจสอบลักษณะของผิวสปอร์โดยการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (กำลังขยาย 6,000 เท่า) พบว่าผิวสปอร์มีลักษณะเรียบ (smooth) ลักษณะสัณฐานวิทยาของสปอร์ดังกล่าวพบได้ทั่วไปในสกุล *Streptomyces* (Goodfellow et al. 2012) และมีลักษณะการเรียงตัวของสปอร์และผิวสปอร์คล้ายคลึงกับ *S. rubidus* NBRC 102073<sup>T</sup> (Xu et al., 2006) จากการเปรียบเทียบลักษณะการเจริญของไอโซเลต PLK6-54 และ *S. rubidus* NBRC 102073<sup>T</sup> ซึ่งเป็นสายพันธุ์อ้างอิง (reference strain) ที่ใกล้เคียง คือ เชื้อทั้งสองมีสีเส้นใยอาหารและการผลิตรงควัตถุที่ละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ รวมทั้งมีสีของเส้นใยอากาศและสีสปอร์ที่คล้ายคลึงกัน (ตารางที่ 4.22)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.22 ลักษณะการเจริญของไอโซเลต PLK6-54 และ *S. rubidus* NBRC 102073<sup>T</sup>

Strain	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สารสีละลายน้ำ
PLK6-54	ISP2	ดีมาก	Light olive brown	-	Moderate yellow
	ISP3	ดีมาก	Grayish olive	Light bluish gray/Olive gray	Moderate yellowish brown
	ISP4	ดีมาก	Dark grayish yellow	-	Pale yellow
	ISP5	ดีมาก	Dark grayish yellow	-	Pale yellow
	ISP6	ปานกลาง	Dark grayish yellow	-	-
	ISP7	ดีมาก	Dark grayish yellow	-	-
	GluA	ดีมาก	Moderate greenish yellow	-	Pale yellow
	Czapek	ดีมาก	Light greenish gray	-	-
	NA	ดีมาก	Dark grayish yellow	-	Moderate yellow
<i>S. rubidus</i> NBRC 102073 <sup>T</sup>	ISP2	ดีมาก	Dark grayish yellow	-	Dark yellow
	ISP3	ดีมาก	Moderate olive brown	-	Moderate yellowish brown
	ISP4	ดีมาก	Dark grayish yellow	-	Grayish yellow
	ISP5	ดีมาก	Dark grayish yellow	-	Grayish yellow
	ISP6	ดีมาก	Dark grayish yellow	-	Grayish greenish yellow
	ISP7	ดีมาก	Dark grayish yellow	-	Pale greenish yellow
	GluA	ดีมาก	Pale yellow	-	Pale yellow
	Czapek	น้อย	Purplish gray	-	-
	NA	ดีมาก	Pale yellow	-	Pale greenish yellow



รูปที่ 4.22 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PLK6-54 (ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 (ค) ลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีเลนส์ส่องระยะไกลเป็นเลนส์ใกล้วัตถุ (กำลังขยาย 400 เท่า) และ (ง) สัณฐานวิทยาของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (กำลังขยาย 6,000 เท่า)

ไอโซเลต PLK6-54 สามารถเจริญบนอาหาร ISP2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์สูงสุด 2 เปอร์เซ็นต์ ช่วงพีเอช 6-8 และอุณหภูมิระหว่าง 20-40 องศาเซลเซียส สามารถย่อยแป้ง และโปรตีนในนม แต่ไม่สามารถย่อยเจลาติน ยูเรีย ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรต และไม่สามารถสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้ มีการสร้างกรดในแหล่งคาร์บอนเกือบทุกชนิดที่ใช้ทดสอบ ยกเว้นดี-แลคโตส สามารถใช้ดี-กลูโคส, ดี-เซลโลไบโอส, ดี-แลคโตส, ไมโอ-อินนิซิทอล, ดี-เมลิโบไอส, ดี-ซูโครส, อินนูลิน, ดี-กาแลคโตส, แอล-อะราบิโนส, ดี-ไซโลส, ทรีฮาโลส, แอล-แรมโนส, ดี-แมนนิทอล, ดี-แมนโนส และดี-เมลิไซโตส เป็นแหล่งคาร์บอน และสามารถใช้แอสพาราจिन, 4-ไฮดรอกซีไพโรลีน, แอล-เมไทโอนีน, แอล-ฟีนิลอะลานีน, แอล-โพรลีน, แอล-เซอร์รีน, แอล-ทรีโอนีน และแอล-วาเลอีนเป็นแหล่งไนโตรเจน และไม่สามารถย่อยสารประกอบไม่ละลายน้ำ สร้างเอนไซม์อะไมเลสและออกซิเดสได้ เมื่อนำไปทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยชุดทดสอบ API ZYM ไอโซเลต PLK6-54 สามารถสร้างเอนไซม์ Alkaline phosphatase, Leucine arylamidase, Acid phosphatase, Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase,  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucosidase, N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase และ  $\alpha$ -mannosidase (ภาคผนวก ค)

## (2) ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี

ไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกในผนังเซลล์ของไอโซเลต PLK6-54 เป็นแบบ LL พบน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส และไรโบสภายในเซลล์ กรดไขมันหลัก (>10%) ในเซลล์ที่พบ คือ iso-C<sub>14:0</sub>, anteiso-C<sub>15:0</sub> และ iso-C<sub>16:0</sub> นอกจากนี้พบ iso-C<sub>10:0</sub>, C<sub>12:0</sub>, iso-C<sub>15:0</sub>, C<sub>16:0</sub>, iso-C<sub>16:1</sub> H,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

anteiso-C<sub>17:0</sub> และ anteiso-C<sub>17:1</sub> ω9c เป็นกรดไขมันรอง (ตารางที่ 4.23) ชนิดของไขมันมีขั้วที่พบคือ diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylglycerol (PG) และ phosphatidylinositol (PI) (ภาคผนวก ง) มีนาควิโนนหลักที่พบ คือ MK-10(H<sub>2</sub>) (69.5%) และ MK-9(H<sub>6</sub>) (16.2%) นอกจากนี้พบ MK-9(H<sub>2</sub>) (6.2%) และ MK-9(H<sub>8</sub>) (4.5%) เป็นมีนาควิโนนรอง ไม่พบกรดมายคอลลิก โดยลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของไอโซเลต PLK6-54 คล้ายคลึงกับลักษณะอนุกรมวิธานเคมีทั่วไปที่พบในสกุล *Streptomyces* (Goodfellow et al., 2012) เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ใกล้เคียงคือ *S. rubidus* NBRC 102073<sup>T</sup> พบว่า เชื้อทั้งสองมีรูปแบบของกรดไขมันหลัก และชนิดของน้ำตาลในเซลล์คล้ายคลึงกัน แต่มีชนิดของฟอสโฟลิปิดแตกต่างกัน โดย *S. rubidus* NBRC 102073<sup>T</sup> พบ phosphatidylmethylethanolamine (PDME) ในเซลล์

ตารางที่ 4.23 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์ของไอโซเลต PLK6-54 และสายพันธุ์อ้างอิง

กรดไขมัน (%)	1	2	3
iso-C <sub>14:0</sub>	11.19	3.91	9.2
anteiso-C <sub>15:0</sub>	13.75	25.47	13.3
iso-C <sub>16:0</sub>	25.18	26.38	37.1
iso-C <sub>10:0</sub>	6.29	-	-
C <sub>12:0</sub>	3.72	-	-
anteiso-C <sub>13:0</sub>	1.10	-	-
anteiso-C <sub>14:0</sub>	1.14	-	-
C <sub>14:0</sub>	0.78	0.57	0.60
C <sub>15:0</sub>	-	-	8.3
iso-C <sub>15:0</sub>	6.67	7.25	-
C <sub>15:0</sub> 2OH	1.30	-	-
C <sub>15:1</sub> ω6c	-	0.55	-
C <sub>16:0</sub>	3.44	10.67	12.2
iso-C <sub>16:1</sub> H	3.49	-	-
C <sub>16:1</sub> ω5c	0.78	-	-
C <sub>16:1</sub> ω7c	-	-	1.9
iso-C <sub>17:0</sub>	1.28	2.76	-
anteiso-C <sub>17:0</sub>	3.46	13.91	6.7
C <sub>17:0</sub> cyclo	0.70	-	3.8
C <sub>17:0</sub>	-	1.34	2.7
anteiso-C <sub>17:1</sub> ω9c	2.77	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาติให้พิมพ์ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.23 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์ของไอโซเลต PLK6-54 และสายพันธุ์อ้างอิง (ต่อ)

กรดไขมัน (%)	1	2	3
Iso-C <sub>17:1</sub> ω5c	0.91	-	-
C <sub>18:0</sub> 3OH	-	0.63	-
C <sub>18:0</sub>	0.77	-	4.2
C <sub>18:1</sub> ω9c	0.91	1.79	-
C <sub>18:1</sub> 2OH	1.26	-	-
Iso-C <sub>19:0</sub>	0.75	-	-

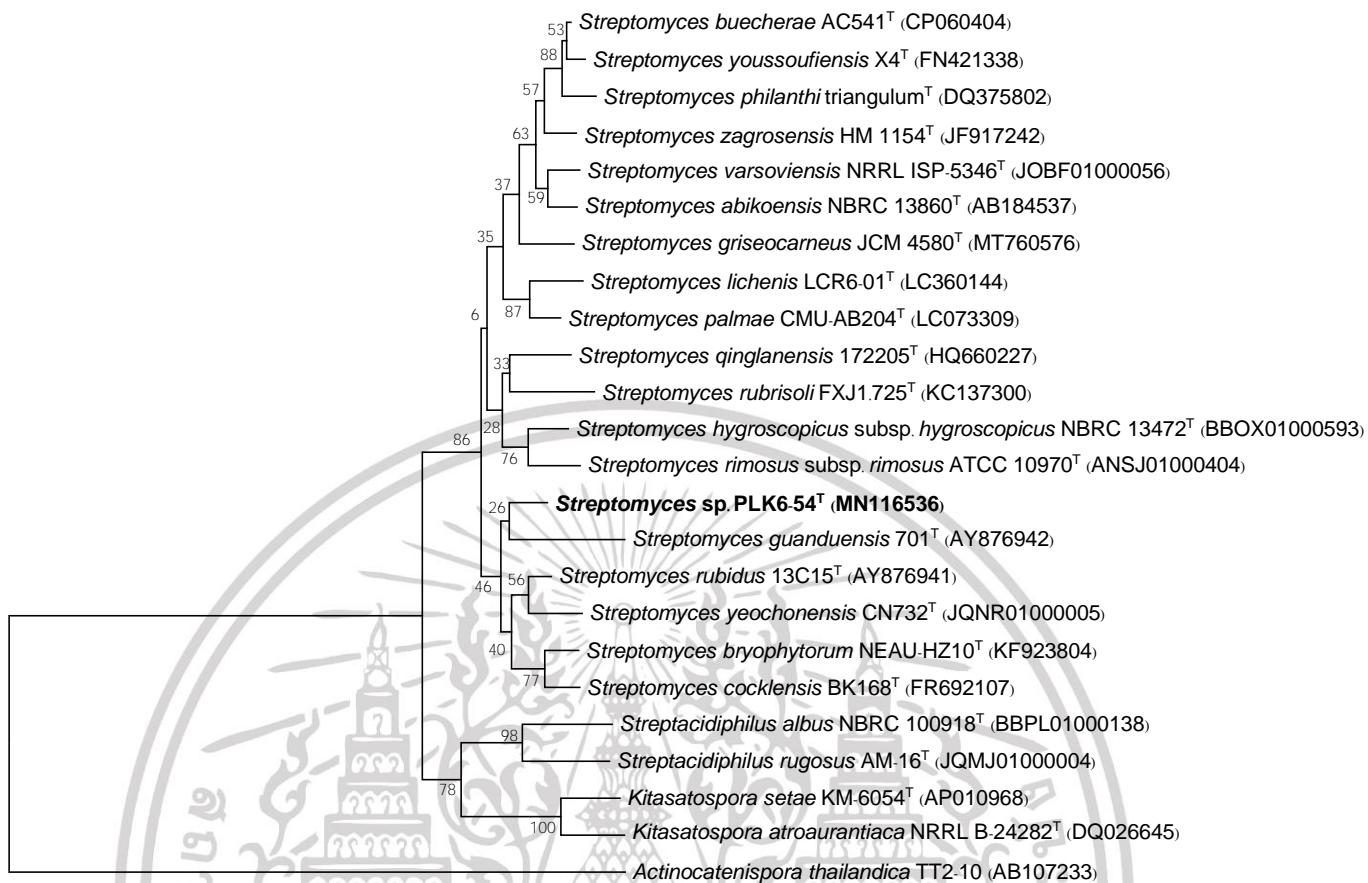
หมายเหตุ: สายพันธุ์: 1. PLK6-54 2. *S. rubidus* NBRC 102073<sup>T</sup>, 3. *S. bryophytorum* NEAU-HZ10<sup>T</sup> (Chuang et al., 2016)

### (3) ลักษณะทางจีโนมไทป์

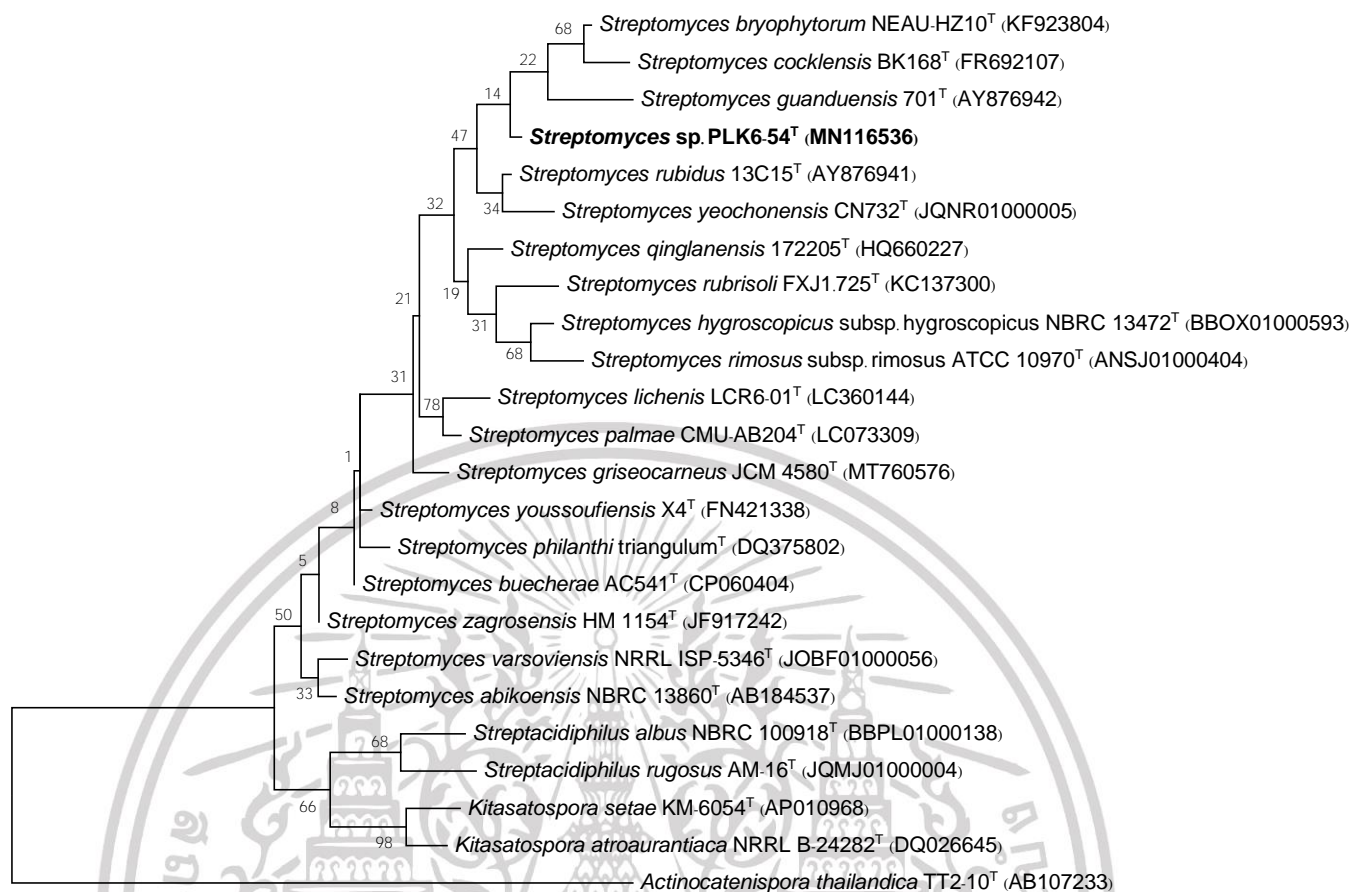
จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนช่วงยีน 16S rRNA ของไอโซเลต PLK6-54 พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *S. rubidus* 13C15<sup>T</sup> และ *S. bryophytorum* NEAU-HZ10<sup>T</sup> ด้วยเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 99.01 และ 98.41 ตามลำดับ ซึ่งสายพันธุ์ใกล้เคียงที่สุดมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของยีน 16S rRNA สูงกว่าเกณฑ์กำหนดความเป็นสปีชีส์ใหม่ (<98.7%) ที่กำหนดโดย Rossi-Tamisier และคณะ (2015) (ตารางที่ 4.24) แต่สามารถใช้ข้อมูลของจีโนมจากการวิเคราะห์ค่า dDDH และวิเคราะห์ค่า ANIb และ ANIm เพื่อยืนยันว่าสายพันธุ์ใกล้เคียงต่างสปีชีส์กันได้ (Kim et al., 2014) นอกจากนี้การวิเคราะห์ตำแหน่งอนุกรมวิธานจากแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) แบบmaximum-likelihood, neighbor-joining และ maximum-parsimony มีตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต PLK6-54 แยกออกจาก *S. rubidus* 13C15<sup>T</sup> และ *S. bryophytorum* NEAU-HZ10<sup>T</sup> อย่างชัดเจน (รูปที่ 4.23-4.25) แต่มีค่าความเชื่อมั่นในระดับต่ำ (<50%) บนแผนภูมิต้นไม้ทั้งสามแบบ นอกจากนี้มีระยะทางบนสายวิวัฒนาการ (evolutionary distances) ห่างกัน จากข้อมูลข้างต้นสามารถสรุปได้ว่าไอโซเลต PLK6-54 มีความแตกต่างทางอนุกรมวิธานจาก *S. rubidus* 13C15<sup>T</sup> และ *S. bryophytorum* NEAU-HZ10<sup>T</sup>

ตารางที่ 4.24 เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนช่วง 16S rRNA (% 16S rRNA gene similarity value) ระหว่างไอโซเลต PLK6-54 และสายพันธุ์ใกล้เคียงในฐานข้อมูล EzBioCloud

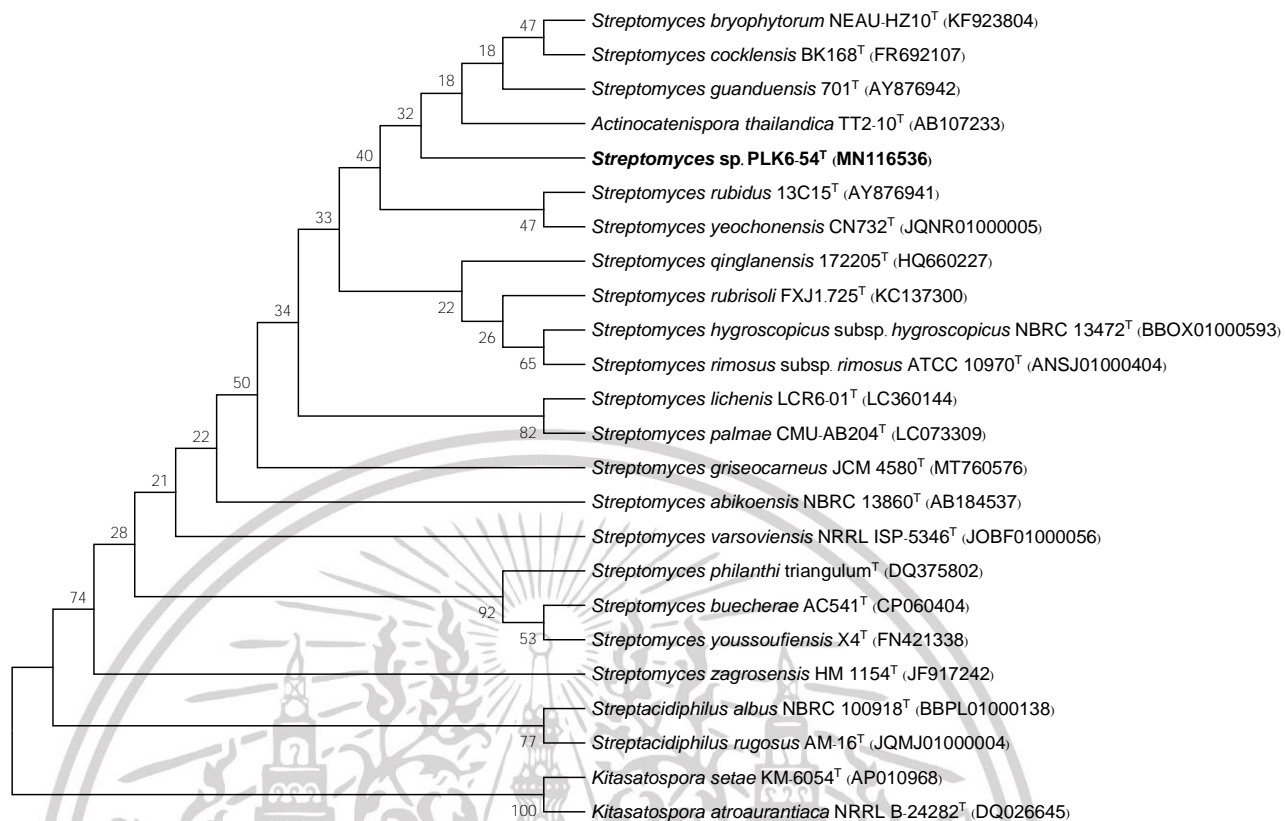
	สายพันธุ์ใกล้เคียง	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	PLK6-54	100	99.01	98.41	98.24	98.20	98.17	98.13	98.13	98.06	97.94	97.93	97.90	97.86	97.86	97.86	97.85	97.84	97.79	97.72
2	<i>S. rubidus</i>	99.01	100	98.30	98.30	97.60	97.90	97.90	98.50	99.00	97.60	97.90	98.40	98.30	98.30	97.90	97.80	98.60	98.30	98.10
3	<i>S. bryophytorum</i>	98.41	98.30	100	97.60	97.30	98.30	97.40	97.60	98.80	97.40	97.60	97.80	97.70	97.90	97.50	97.60	99.20	97.60	97.20
4	<i>S. griseocaneus</i>	98.24	98.30	97.60	100	98.80	97.10	98.60	98.20	97.90	98.30	98.60	98.60	97.80	98.90	98.60	99.00	97.60	98.30	98.30
5	<i>S. varsoviensis</i>	98.20	97.60	97.30	98.80	100	97.40	99.20	97.90	97.20	98.90	99.00	97.90	97.60	98.20	98.90	99.30	97.20	98.40	98.50
6	<i>S. guanduensis</i>	98.17	97.90	98.30	97.10	97.40	100	97.60	97.20	97.60	97.50	97.80	97.50	97.60	97.90	97.60	97.60	97.90	97.60	97.20
7	<i>S. zagrosensis</i>	98.13	97.90	97.40	98.60	99.20	97.60	100	97.90	97.40	99.00	99.50	97.90	97.90	98.30	99.30	99.20	97.10	98.30	98.30
8	<i>S. qinglanensis</i>	98.13	98.50	97.60	98.20	97.90	97.20	97.90	100	97.90	97.80	98.10	98.10	98.30	98.20	97.90	97.90	97.90	98.40	98.10
9	<i>S. yeochonensis</i>	98.06	99.00	98.80	97.90	97.20	97.60	97.40	97.90	100	97.10	97.40	97.90	97.70	97.80	97.30	97.40	98.80	97.90	97.70
10	<i>S. philanthei</i>	97.94	97.60	97.40	98.30	98.90	97.50	99.00	97.80	97.10	100	99.50	97.90	97.60	98.50	99.40	98.70	97.20	98.10	98.20
11	<i>S. buecheriae</i>	97.93	97.90	97.60	98.60	99.00	97.80	99.50	98.10	97.40	99.50	100	98.00	97.90	98.60	99.70	99.00	97.40	98.40	98.30
12	<i>S. lichenis</i>	97.90	98.40	97.80	98.60	97.90	97.50	97.90	98.10	97.90	97.90	98.00	100	97.70	99.00	97.90	98.30	97.90	97.90	97.80
13	<i>S. rubrisoli</i>	97.86	98.30	97.70	97.80	97.60	97.60	97.90	98.30	97.70	97.60	97.90	97.70	100	98.00	97.60	97.90	98.00	98.60	98.00
14	<i>S. palmae</i>	97.86	98.30	97.90	98.90	98.20	97.90	98.30	98.20	97.80	98.50	98.60	99.00	98.00	100	98.60	98.50	97.80	98.30	98.10
15	<i>S. youssoufiensis</i>	97.86	97.90	97.50	98.60	98.90	97.60	99.30	97.90	97.30	99.40	99.70	97.90	97.60	98.60	100	98.80	97.30	98.20	98.30
16	<i>S. abikoensis</i>	97.85	97.80	97.60	99.00	99.30	97.60	99.20	97.90	97.40	98.70	99.00	98.30	97.90	98.50	98.80	100	97.40	98.30	98.00
17	<i>S. cocklensis</i>	97.84	98.60	99.20	97.60	97.20	97.90	97.10	97.90	98.80	97.20	97.40	97.90	98.00	97.80	97.30	97.40	100	98.00	97.80
18	<i>S. hygrosopicus</i> <i>subsp. hygrosopicus</i>	97.79	98.30	97.60	98.30	98.40	97.60	98.30	98.40	97.90	98.10	98.40	97.90	98.60	98.30	98.20	98.30	98.00	100	98.90
19	<i>S. rimosus subsp.</i> <i>rimosus</i>	97.72	98.10	97.20	98.30	98.50	97.20	98.30	98.10	97.70	98.20	98.30	97.80	98.00	98.10	98.30	98.00	97.80	98.90	100



รูปที่ 4.23 แผนภูมิต้นไม้แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต PLK6-54 ด้วยวิธี Neighbor-Joining



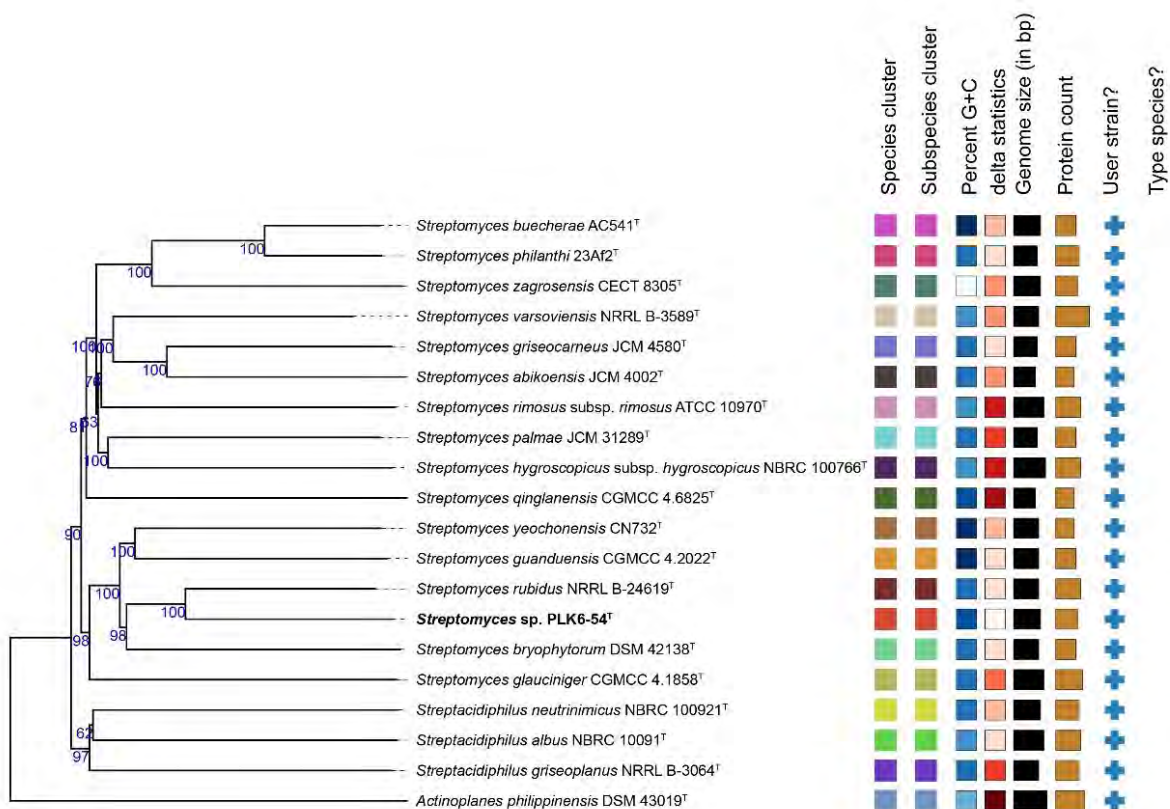
รูปที่ 4.24 แผนภูมิต้นไม้แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต PLK6-54 ด้วยวิธี maximum-likelihood



รูปที่ 4.25 แผนภูมิต้นไม้แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต PLK6-54 ด้วยวิธี maximum-parsimony

การตรวจคุณลักษณะอนุกรมวิธานด้วยคุณสมบัติจีโนมของไอโซเลต PLK6-54 พบว่า โครงร่างจีโนม มีนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 8,476,032 นิวคลีโอไทด์ (ประกอบด้วย 171 contigs โดย contig ที่ยาวสุดมีขนาด 384,406 นิวคลีโอไทด์ มีค่า N50 มีความยาว 116,494 นิวคลีโอไทด์ มีค่า Genome coverage เท่ากับ 63X) ไอโซเลต PLK6-54 มีปริมาณเบส G+C ในจีโนม เท่ากับ 72.70 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับปริมาณ G+C content ของสกุล *Streptomyces* ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 66-73 เปอร์เซ็นต์ (Goodfellow et al. 2012) จากการเปรียบเทียบจีโนมของไอโซเลต PLK6-54 และสายพันธุ์ใกล้เคียงได้แก่ *S. rubidus* 13C15<sup>T</sup> และ *S. bryophytorum* NEAU-HZ10<sup>T</sup> พบว่า มีค่า Average nucleotide identity-Blast (ANIb) เท่ากับ 85.5 และ 79.9 เปอร์เซ็นต์ และค่า digital DNA-DNA hybridization (dDDH) เท่ากับ 32.3 และ 24.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.25) ซึ่งมีค่าต่ำกว่าจุดตัดของเกณฑ์กำหนดความแตกต่างระดับสปีชีส์ (<95-96% สำหรับค่า ANI และ <70% สำหรับค่า dDDH) กำหนดโดย Chun และคณะ (2018) และ Wayne และคณะ (1987) ตามลำดับ นอกจากนี้ ตำแหน่งอนุกรมวิธานบนแผนภูมิต้นไม้ของจีโนม (phylogenomic tree) ของไอโซเลต PLK6-54 ก่อตัวอยู่บนคนละกิ่ง (branch) กับ *S. rubidus* 13C15<sup>T</sup> และ *S. bryophytorum* NEAU-HZ10<sup>T</sup> โดยมีค่า bootstrap เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.26) จากข้อมูลข้างต้นไอโซเลต PLK6-54 เป็นสกุล *Streptomyces* สปีชีส์ใหม่ ลำดับนิวคลีโอไทด์บนช่วงยีน 16S rRNA และจีโนมของไอโซเลต PLK6-54 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จัดเก็บไว้ในฐานข้อมูล Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) โดยมีหมายเลขจำเพาะ MN116545 และ JAINZZ000000000 ตามลำดับ



รูปที่ 4.26 แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการของจีโนม (Phylogenomic tree) แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต PLK6-54 และสายพันธุ์ใกล้เคียง

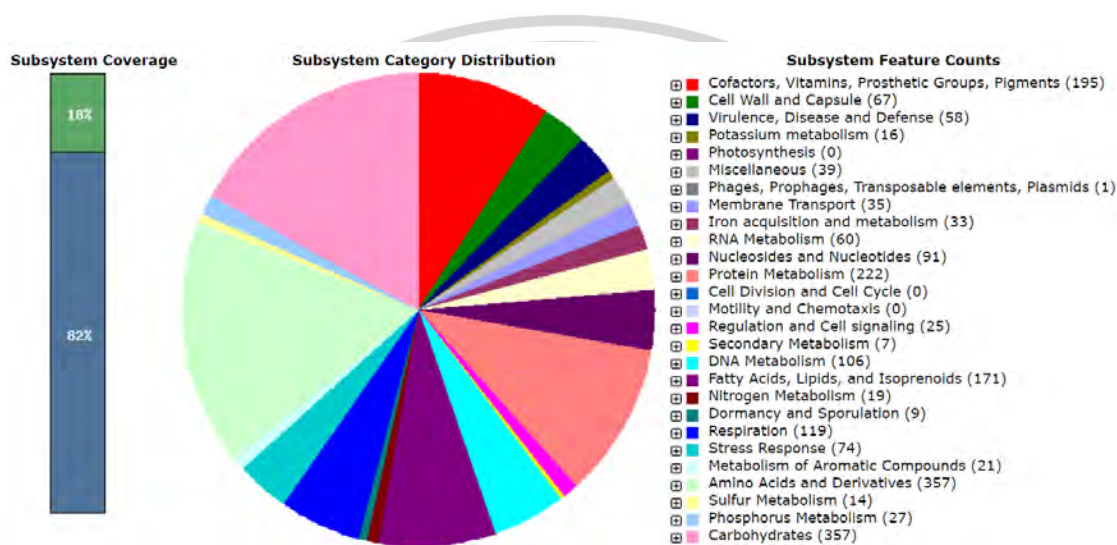
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.25 ค่า ANIb, ANIm และ dDDH ระหว่างโครงสร้างจีโนมของ PLK6-54, *S. rubidus* 13C15<sup>T</sup> และ *S. bryophytorum* NEAU-HZ10<sup>T</sup>

ไอโซเลต	สายพันธุ์อ้างอิง	ANIb (%)	ANIm (%)	Digital DNA-DNA hybridization relatedness												G+C difference
				Formula 1*				Formula 2**				Formula 3***				
				% dDDH	Model C.I. (%)	Distance	Prob. DDH $\geq 70$ (same species)	% dDDH	Model C.I. (%)	Distance	Prob. DDH $\geq 70$ (same species)	% dDDH	Model C.I. (%)	Distance	Prob. DDH $\geq 70$ (same species)	
<i>Streptomyces</i> sp. PLK6-54 <sup>T</sup>	<i>S. rubidus</i> 13C15 <sup>T</sup>	85.5	88.0	38.2	34.8-41.7	0.4109	1.08	30.7	28.3-33.2	0.1382	0.14	36.0	33.0-39.0	0.4878	0.03	0.20
	<i>S. bryophytorum</i> NEAU-HZ10 <sup>T</sup>	79.9	86.0	25.7	22.3-29.3	0.5850	0.02	24.9	22.6-27.4	0.1746	0.01	24.4	21.5-27.5	0.6574	0.00	0.20

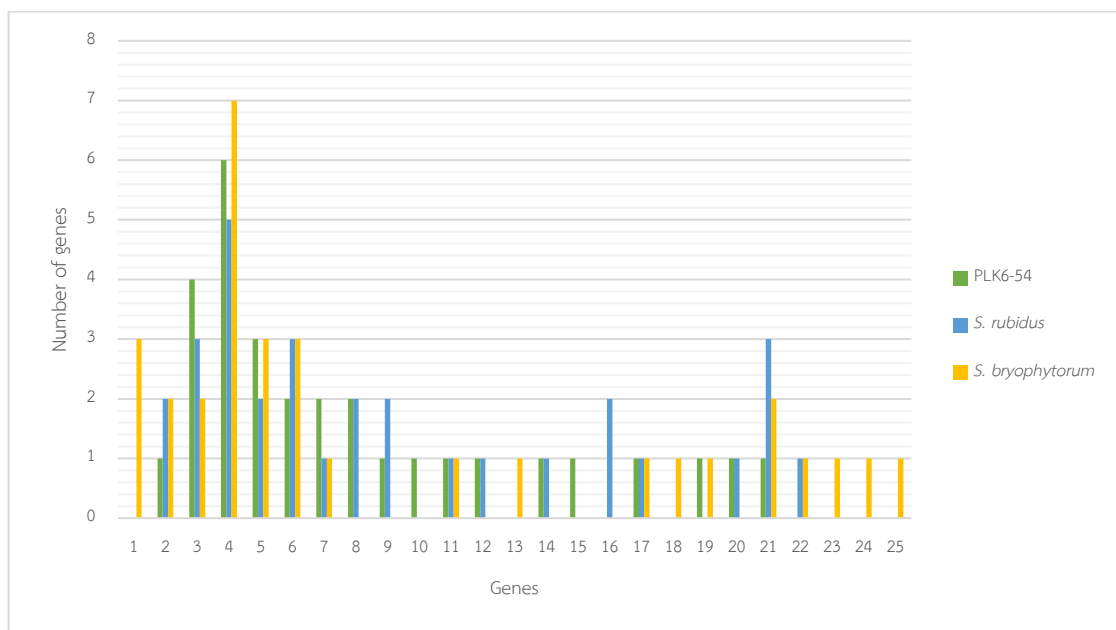
หมายเหตุ: \*Formula 1 คือ HSP length / total length, \*\*Formula 2 คือ identities/HSP length, \*\*\*Formula 3 คือ identities / total length เป็นการวิเคราะห์โดยไม่ขึ้นอยู่กับความยาวของโครงสร้างจีโนม

การทำนายยีนบนจีโนมของไอโซเลต PLK6-54 พบยีนทั้งหมด 7,441 ยีน โดยมียีนที่แปลรหัสเป็นโปรตีน จำนวน 7,346 ยีน tRNA จำนวน 88 ยีน rRNA จำนวน 5 ยีน และ tmRNA จำนวน 2 ยีน จากแผนภาพวงกลมพบกลุ่มยีนออร์ทอโลกัส (Cluster of Orthologous genes; COGs) ที่ทำหน้าที่ต่าง ๆ ได้แก่ กลุ่มยีนกรดอะมิโนและอนุพันธ์ของกรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต (carbohydrates) เมทาบอลิซึมของโปรตีน (protein metabolism) โคแฟกเตอร์ (cofactors) วิตามิน (vitamins) สารสี (pigments) กรดไขมัน (fatty acids) ไขมัน (lipids) และไอโซพรีนอยด์ (isoprenoids) และกลุ่มยีนอื่น ๆ (รูปที่ 4.27)



รูปที่ 4.27 แผนภาพแสดง Cluster of Orthologous genes (COGs) ของไอโซเลต PLK6-54

การทำนายกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิ (antismash) บนจีโนมของไอโซเลต PLK6-54 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ใกล้เคียง *S. rubidus* NBRC 102073<sup>T</sup> และ *S. bryophytorum* NEAU-HZ10<sup>T</sup> พบกลุ่มยีน T1PKS, T3PKS และ Terpene มีปริมาณยีนแตกต่างกันเห็นได้ชัด นอกจากนี้พบกลุ่มยีน ectoine และ thioamitides ที่พบในจีโนมของไอโซเลต PLK6-54 เท่านั้น ในขณะที่ไม่พบในจีโนมของสายพันธุ์ใกล้เคียง ดังนั้นการทำนายกลุ่มยีนจึงสามารถบ่งบอกความแตกต่างของเชื้อแต่ละชนิดได้ (รูปที่ 4.28)



รูปที่ 4.28 แผนภาพแสดงปริมาณกลุ่มยีนบนจีโนมที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิของ PLK6-54, *S. rubidus* NBRC 102073<sup>T</sup> และ *S. bryophytorum* NEAU-HZ10<sup>T</sup>

หมายเหตุ: 1. T1PKS (Polyketide synthase type I), 2. T2PKS (Polyketide synthase type II), 3. T3PKS (Polyketide synthase type III), 4. terpene, 5. Non-ribosomal peptide synthetase cluster (NRPS), 6. Other unspecified ribosomally synthesised and post-translationally modified peptide product (RiPP) cluster, 7. Butyrolactone, 8. Siderophore, 9. Furan, 10. Ectoine, 11. Melanin, 12. Thiopeptide, 13. Thioamitides, 14. Linear azol(in)e-containing peptides (LAP), 15. Phosphonate, 16. lanthipeptide class I, 17. lanthipeptide class III, 18. lanthipeptide class IV, 19. Ladderane, 20. Arylpolyene, 21. Other, 22. non-alpha poly-amino acids like e-Polylysine (NAPAA), 23. Phenazine, 24. Indole และ 25. transAT-PKS

นอกจากนี้ไอโซเลต PLK6-54 พบกลุ่มยีน T2PKS, กลุ่มยีน T3PKS, กลุ่มยีน terpene, กลุ่มยีน siderophore, กลุ่มยีน ectoine, กลุ่มยีน NRPS, กลุ่มยีน RiPP-like, กลุ่มยีน thiopeptide, กลุ่มยีน melanin และกลุ่มยีนอื่น ๆ โดยมี 8 กลุ่มยีนที่มีความคล้ายคลึงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.26) และกลุ่มยีนที่มีการสร้างสารทุติยภูมิโดยมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงต่ำ เช่น กลุ่มยีนที่มีการสร้างสาร showdomycin (47%), กลุ่มยีนที่มีการสร้างสาร melanin (40%), กลุ่มยีนที่มีการสร้างสาร cysteoamide (27%), กลุ่มยีนที่มีการสร้างสาร furaquinocin B (21%) และกลุ่มยีนที่มีการสร้างสาร streptolydigin (10%) เป็นต้น (ภาคผนวก จ) จึงมีแนวโน้มว่า PLK6-54 สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่แตกต่างไปจากสารที่มีการค้นพบแล้ว จึงมีความเป็นไปได้ว่าอาจสร้างสารทุติยภูมิชนิดใหม่ได้

ตารางที่ 4.26 กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิที่มีความคล้ายคลึงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์บนจีโนมของไอโซเลต PLK6-54

กลุ่มยีน	สารทุติยภูมิ	ผลิตจากสายพันธุ์	%Similarity
geosmin biosynthetic gene cluster	geosmin	<i>S. coelicolor</i> A3	100
hopene biosynthetic gene cluster	hopene		69
germicidin biosynthetic gene cluster	germicidin	<i>S. argillaceus</i>	100
alkylresorcinol biosynthetic gene cluster	alkylresorcinol	<i>S. griseus</i> subsp. <i>griseus</i> NBRC 13350 <sup>T</sup>	100
desferrioxamin B biosynthetic gene cluster	desferrioxamin B		80
spore pigment biosynthetic gene cluster	spore pigment	<i>S. avermitilis</i>	66
isorenieratene biosynthetic gene cluster	isorenieratene	<i>S. collinus</i> Tu 365	63
furaquinocin B biosynthetic gene cluster	furaquinocin B	<i>Streptomyces</i> sp. KO-3988	60

(4) ลักษณะแตกต่างระหว่างไอโซเลต PLK6-54 และสายพันธุ์อ้างอิงใกล้เคียง

จากการเปรียบเทียบลักษณะฟีโนไทป์ของไอโซเลต PLK6-54 และสายพันธุ์อ้างอิงใกล้เคียง ได้แก่ *S. rubidus* NBRC 102073<sup>T</sup> และ *S. bryophytorum* NEAU-HZ10<sup>T</sup> พบว่ามีลักษณะบางประการที่แตกต่างกัน อาทิเช่นไอโซเลต PLK6-54 ไม่สามารถย่อยเจลาติน สามารถใช้ดี-ซูโครส อินนูลิน แอล-อะราบิโนส ทรีฮาโลส ดี-แมนนิทอล และดี-แมนโนส เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถใช้เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอล-ฟีนิลอะลานีน และแอล-วาเลอีน แต่ไม่สามารถใช้แอล-อาร์จินีน เป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถสร้างกรดในแหล่งคาร์บอน อะโดนิทอล ดี-เซลโลโบโอส ซิลิทอล ดี-ซาลิซิน ไมโอ-อินนิซิทอล เดกซ์แทรน และดี-เมลิไซโตส มีการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส Cystine arylamidase Chymotrypsin  $\alpha$ -glucosidase และ  $\alpha$ -mannosidase ลักษณะดังกล่าวมีความแตกต่างจากสายพันธุ์ใกล้เคียงทั้งสอง (ตารางที่ 4.27)

**ตารางที่ 4.27** ลักษณะที่แตกต่าง (differential characteristics) ของไอโซเลต PLK6-54 และสายพันธุ์ใกล้เคียง

ลักษณะ	PLK6-54*	<i>S. rubidus</i> NBRC 102073 <sup>T*</sup>	<i>S. bryophytorum</i> NEAU-HZ10 <sup>T**</sup>
การเรียงตัวของสปอร์และผิวสปอร์	ปลายโค้ง/เรียบ	ปลายโค้ง/เรียบ	ปลายโค้ง/เรียบ
สีโคโลนินบนอาหาร ISP2	Light olive brown	Dark grayish yellow	Dark Grayish Brown
ความสามารถในการทนเกลือ (%NaCl (w/v))	1-2	1	1-2
อุณหภูมิที่เจริญ (°C)	20-40	20-30	15-37
pH	6-8	6-8	6-10
การย่อยเจลาติน	-	-	+
การทดสอบออกซิเดส	+	-	-
การทดสอบอะซิเดส	+	+	+
ความสามารถในการเจริญบนแหล่งคาร์บอน:			
ดี-ซูโครส	+	-	+
อินนูลิน	+	-	nd
ดี-ไรโบส	-	-	+
แอล-อะราบิโนส	+	-	+
ทรีฮาโลส	+	-	nd
ดี-แมนนิทอล	+	-	-
ดี-แมนโนส	+	+	-
การเจริญในแหล่งไนโตรเจน:			
แอล-อาร์จินีน	-	+	+
แอล-ฟีนิลอะลานีน	+	-	nd

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.27 ลักษณะที่แตกต่าง (differential characteristics) ของไอโซเลต PLK6-54 และสายพันธุ์ใกล้เคียง (ต่อ)

ลักษณะ	PLK6-54*	<i>S. rubidus</i> NBRC 102073 <sup>T</sup> *	<i>S. bryophytorum</i> NEAU-HZ10 <sup>T</sup> **
การเจริญในแหล่งไนโตรเจน:			
แอล-วาซีน	+	-	nd
การสร้างกรดในแหล่งคาร์บอน:			
อะโดนิทอล	+	-	nd
ดี-เซลโลไบโอส	+	-	nd
ไซลิทอล	+	-	nd
ดี-ซาลิซิน	+	-	nd
ไมโอ-อินนิซิทอล	+	-	nd
เดกซ์แทรน	+	-	nd
ดี-เมลิไซโตส	+	-	nd
การย่อยสารประกอบไม่ละลายน้ำ:			
ไฮโปแซนทีน	-	+	nd
การสร้างเอนไซม์ (API ZYM)			
Cystine arylamidase	w	-	nd
Chymotrypsin	w	-	nd
$\alpha$ -glucosidase	w	-	nd
$\alpha$ -mannosidase	+	-	nd

หมายเหตุ: \*ข้อมูลจากการทดลอง \*\*ข้อมูลจาก Chuang และคณะ (2016)

จากข้อมูลของอนุกรมวิธานหลายส่วน (polyphasic taxonomy) ซึ่งประกอบด้วยลักษณะทางฟีโนไทป์ ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะจีโนไทป์ สามารถสรุปได้ว่า ไอโซเลต PLK6-54 จัดเป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่ของสกุล *Streptomyces*

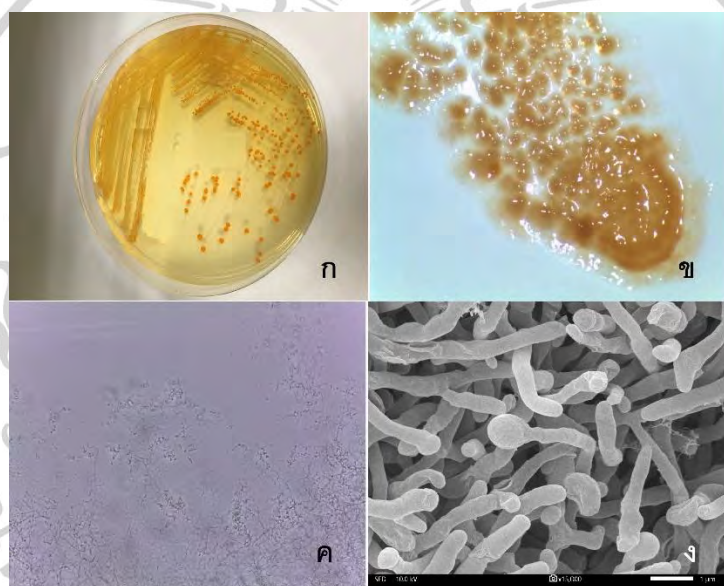
#### 4.1.2.2 ไอโซเลต PLK6-60

##### (1) ลักษณะทางฟีโนไทป์

ไอโซเลต PLK6-60 สามารถเจริญได้ดีบนอาหารแข็ง ISP2 ISP3 ISP6 และ nutrient agar เจริญได้ปานกลางบนอาหารแข็ง ISP4 และเจริญได้น้อยบนอาหารแข็ง ISP5 ISP7 glucose asparagines และ czapek's sucrose เส้นใยอาหารมีสีส้มเข้ม (strong orange yellow) ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ และมีการสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสีเหลือง (vivid yellow) บนอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ISP2 และ nutrient agar (ตารางที่ 4.28) จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์บนอาหารแข็ง ISP2 ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่มีเลนส์ส่องระยะไกล พบว่าไอโซเลต PLK6-60 สร้างสปอร์เดี่ยวรูปร่างกลมรีบริเวณปลายของสปอร์โรฟอรัส (sporophores) บนเส้นใยอาหารโดยตรง (รูปที่ 4.29) เมื่อตรวจสอบลักษณะของผิวสปอร์โดยการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (กำลังขยาย 15,000 เท่า) พบว่าผิวสปอร์มีลักษณะเรียบ ลักษณะสัณฐานวิทยาของสปอร์ดังกล่าวพบได้ทั่วไปในสกุล *Micromonospora* (Goodfellow et al. 2012) แต่มีลักษณะของผิวสปอร์แตกต่างกับ *M. aurantiaca* TT1-11<sup>T</sup> ที่ผิวสปอร์มีลักษณะขรุขระ (Thawai et al., 2004) จากการเปรียบเทียบลักษณะการเจริญของไอโซเลต PLK6-60 และ *M. aurantiaca* TT1-11<sup>T</sup> ซึ่งเป็นสายพันธุ์อ้างอิง (reference strain) ที่ใกล้เคียง คือ พบความแตกต่างของสีเส้นใยอาหารและการผลิตรงควัตถุที่ละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ (ตารางที่ 4.28)



รูปที่ 4.29 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PLK6-60 (ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 (ค) ลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีเลนส์ส่องระยะไกลเป็นเลนส์ใกล้วัตถุ (กำลังขยาย 400 เท่า) และ (ง) สัณฐานวิทยาของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (กำลังขยาย 15,000 เท่า)

ตารางที่ 4.28 ลักษณะการเจริญของไฮโซเลต PLK6-60 และ *M. aurantiaca* TT1-11<sup>T</sup>

Strain	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สารสีละลายน้ำ
PLK6-60	ISP2	ดีมาก	Strong orange yellow	-	Vivid yellow
	ISP3	ดี	Strong yellowish brown	-	-
	ISP4	ปานกลาง	Pale orange yellow	-	-
	ISP5	น้อย	Orange	-	-
	ISP6	ดีมาก	Strong orange	-	-
	ISP7	น้อย	Orange	-	-
	GluA	น้อย	Orange	-	-
	Czapek	น้อย	Orange	-	-
	NA	ดีมาก	Strong orange yellow	-	Vivid yellow
<i>M. aurantiaca</i> TT1-11 <sup>T</sup>	ISP2	ดีมาก	Brownish black to black	-	Brown
	ISP3	ดีมาก	Brownish black	-	-
	ISP4	ดี	Orange to brownish black	-	-
	ISP5	น้อย	Orange	-	-
	ISP6	-	-	-	-
	ISP7	-	-	-	-
	GluA	น้อย	Orange	-	-
	Czapek	ดีมาก	Orange	-	-
	NA	ดี	Dark orange	-	-

ไอโซเลต PLK6-60 สามารถเจริญบนอาหาร ISP2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์สูงสุด 2 เปอร์เซ็นต์ ช่วงพีเอช 6-10 และอุณหภูมิระหว่าง 20-40 องศาเซลเซียส สามารถย่อยแป้ง เจลาติน และโปรตีนในนม แต่ไม่สามารถย่อยยูเรียได้ ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรต และไม่สามารถสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ มีการสร้างกรดโดยใช้ดี-เซลล์โลโบส ดี-แลคโตส อินนูลิน ดี-กาแลคโตส แอล-อะราบิโนส ดี-ไซโลส ดี-แมนโนส ดี-เมลีไซโตส และดี-ฟรุคโตส เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถใช้ดี-กลูโคส, ดี-แลคโตส และแอล-อะราบิโนส เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถใช้แอล-อาร์จินีน แอล-เมไทโอนีน แอล-ฟีนิลอะลานีน แอล-เซอรีน และแอล-ทรีโอนีน เป็นแหล่งไนโตรเจน และไม่สามารถย่อยสารประกอบไม่ละลายน้ำ สร้างเอนไซม์อะไมเลส แต่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ออกซิเดสได้ เมื่อนำไปทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยชุดทดสอบ API ZYM ไอโซเลต PLK6-60 สามารถสร้างเอนไซม์ Esterase, Esterase Lipase, Leucine arylamidase, Trypsin, acid phosphatase, Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase,  $\alpha$ -glucosidase และ  $\beta$ -glucosidase (ภาคผนวก ค)

#### (2) ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี

ไอโซเมอร์ของกรดไขมันโนพีนเมติกในผนังเซลล์ของไอโซเลต PLK6-60 เป็นแบบ meso พบน้ำตาลกลูโคส แมนโนส ไซโลส และไรโบสภายในเซลล์ กรดไขมันหลัก (>10%) ในเซลล์ที่พบ คือ anteiso-C<sub>15:0</sub>, iso-C<sub>16:0</sub>, C<sub>16:0</sub> และ anteiso-C<sub>17:0</sub> นอกจากนี้พบ anteiso-C<sub>15:0</sub>, iso-C<sub>17:0</sub>, anteiso-C<sub>17:0</sub>, C<sub>17:0</sub>, 10-methyl และ C<sub>18:0</sub> เป็นกรดไขมันรอง (ตารางที่ 4.29) ชนิดของไขมันมีขั้วที่พบคือ diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylglycerol (PG) และ phosphatidylinositolmannoside (PIM) (ภาคผนวก ง) มีนาควิโนนหลักที่พบ คือ MK-10(H<sub>8</sub>) (68.5%) และ MK-10(H<sub>8</sub>) (15.5%) นอกจากนี้พบ MK-9(H<sub>4</sub>) (1.2%), MK-9(H<sub>6</sub>) (9.6%), MK-9(H<sub>8</sub>) (1.7%) และ MK-10(H<sub>4</sub>) (3.6%) เป็นมีนาควิโนนรอง ไม่พบกรดมัคโคลิก โดยลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของไอโซเลต PLK6-60 คล้ายคลึงกับลักษณะอนุกรมวิธานเคมีทั่วไปที่พบในสกุล *Micromonospora* (Goodfellow et al., 2012) เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ใกล้เคียงคือ *M. aurantiaca* TT1-11<sup>T</sup> พบว่า เชื้อทั้งสองมีรูปแบบของกรดไขมันหลักคล้ายคลึงกัน แต่มีชนิดของน้ำตาลในเซลล์และชนิดของฟอสโฟลิปิดแตกต่างกัน โดย *M. aurantiaca* TT1-11<sup>T</sup> พบน้ำตาลอะราบิโนส และกาแลคโตส นอกจากนี้พบ phosphatidylinositol (PI) แต่ไม่พบ phosphatidylglycerol (PG) ในเซลล์

ตารางที่ 4.29 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์ของไอโซเลต PLK6-60 และสายพันธุ์อ้างอิง

กรดไขมัน (%)	1	2
iso-C <sub>15:0</sub>	26.64	11.50
iso-C <sub>16:0</sub>	10.98	39.10
C <sub>17:0</sub>	11.23	1.40
C <sub>17:1</sub> ω8c	10.20	1.50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.29 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์ของไอโซเลต PLK6-60 และสายพันธุ์อ้างอิง (ต่อ)

กรดไขมัน (%)	1	2
ISO C <sub>12:0</sub>	-	0.80
iso-C <sub>14:0</sub>	0.74	3.50
anteiso-C <sub>15:0</sub>	6.19	4.60
C <sub>15:0</sub>	-	0.50
ISO C <sub>15:1</sub>	-	1.00
C <sub>16:0</sub>	2.57	0.70
iso-C <sub>16:1</sub>	-	9.50
iso-C <sub>16:1</sub> H	0.55	-
C <sub>16:1</sub> 2OH	-	0.60
iso-C <sub>17:0</sub>	5.32	4.70
anteiso-C <sub>17:0</sub>	6.60	5.80
C <sub>17:0</sub> 10-methyl	3.50	2.40
anteiso-C <sub>17:1</sub> ω9c	1.12	1.40
ISO-C <sub>17:1</sub> ω9c	-	2.70
C <sub>18:0</sub> 10-methyl	-	0.90
iso-C <sub>18:0</sub>	-	1.90
C <sub>18:0</sub>	1.50	1.50
C <sub>18:1</sub> ω9c	1.27	1.10

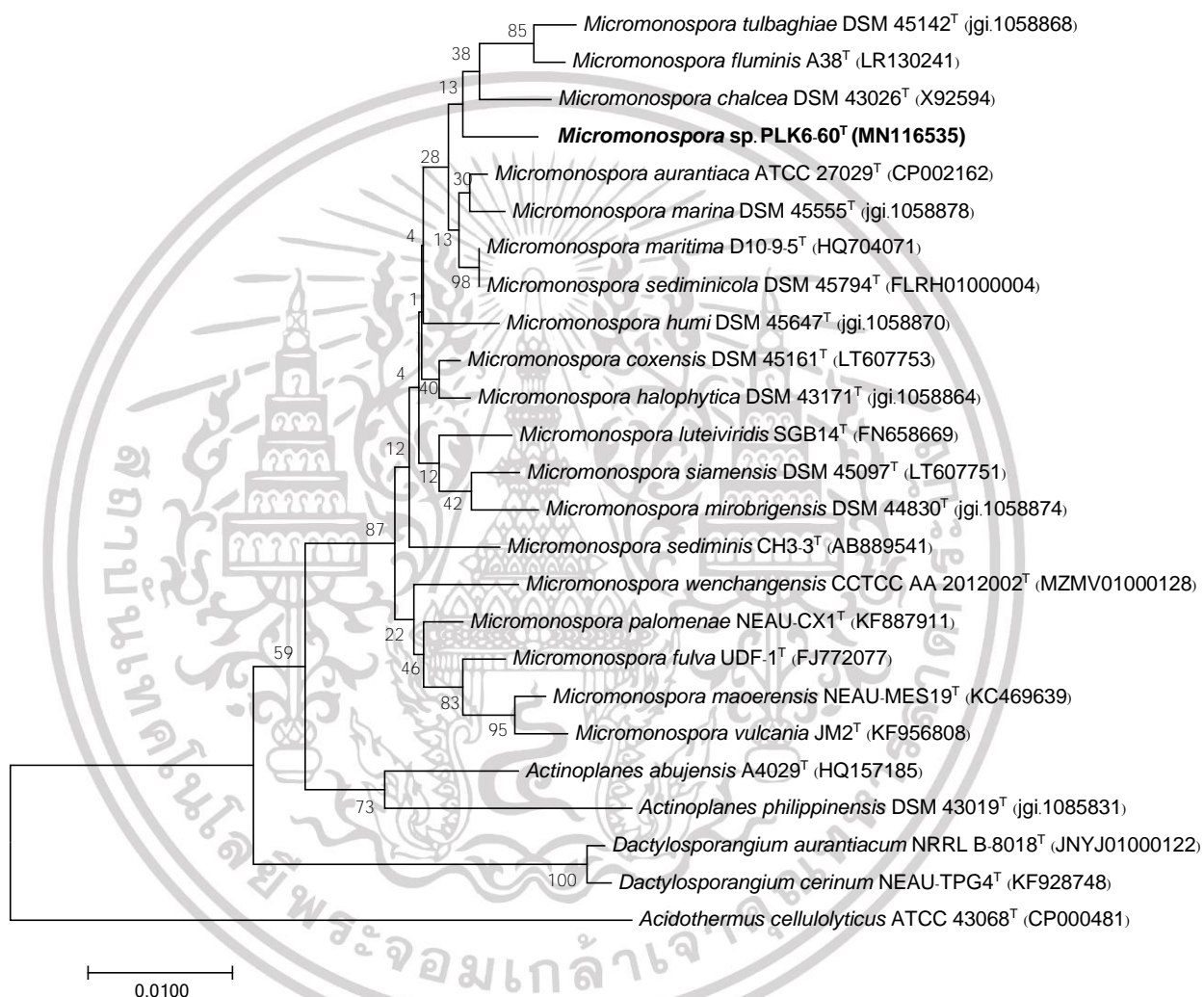
หมายเหตุ: สายพันธุ์: 1. PLK6-60 และ 2. *M. aurantiaca* TT1-11<sup>T</sup>

### (3) ลักษณะทางจีโนมไทป์

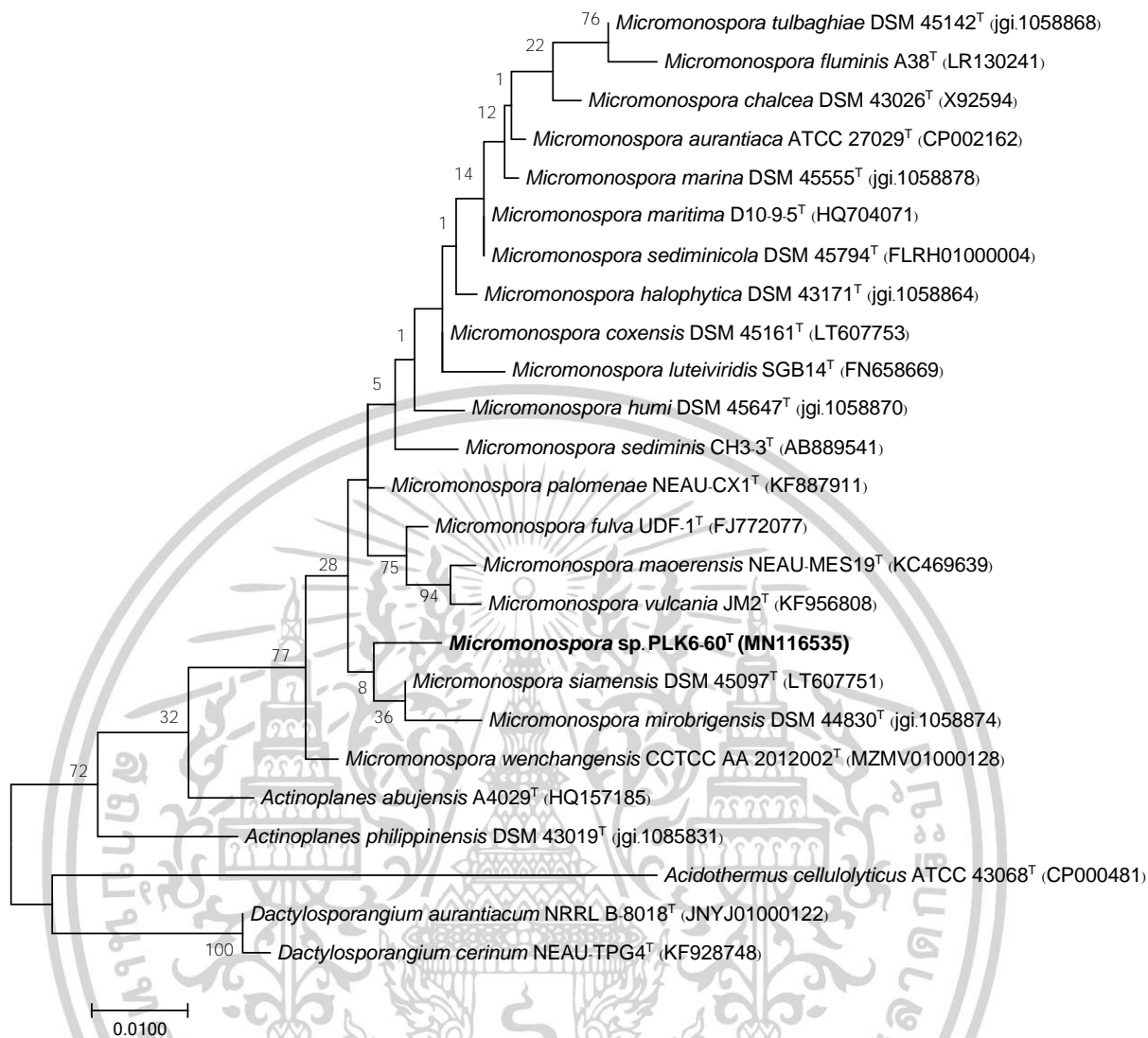
จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนช่วงยีน 16S rRNA ของไอโซเลต PLK6-60 พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *M. aurantiaca* ATCC 27029<sup>T</sup> และ *M. siamensis* DSM 45097<sup>T</sup> ด้วยเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 สายพันธุ์ เท่ากับ 99.14 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของยีน 16S rRNA สูงกว่าเกณฑ์กำหนดความเป็นสปีชีส์ใหม่ (<98.7%) ที่กำหนดโดย Rossi-Tamisier และคณะ (2015) (ตารางที่ 4.30) แต่สามารถใช้ข้อมูลของจีโนมจากการวิเคราะห์ค่า dDDH และวิเคราะห์ค่า ANIb และ ANIm เพื่อยืนยันว่าสายพันธุ์ใกล้เคียงต่างสปีชีส์กันได้ (Kim et al., 2014) นอกจากนี้ การวิเคราะห์ตำแหน่งอนุกรมวิธานจากแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) แบบ maximum-likelihood และ maximum-parsimony มีลักษณะคล้ายคลึงกัน โดยตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต PLK6-60 แยกออกจาก *M. aurantiaca* ATCC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

27029<sup>T</sup> และ *M. siamensis* DSM 45097<sup>T</sup> อย่างชัดเจน (รูปที่ 4.30-4.32) แต่มีค่าความเชื่อมั่น (bootstrap value) ในระดับต่ำ (<50%) บนแผนภูมิต้นไม้ทั้งสามแบบ นอกจากนี้มีระยะทางบนสายวิวัฒนาการ (evolutionary distances) ห่างกัน จากข้อมูลข้างต้นสามารถสรุปได้ว่าไอโซเลต PLK6-60 มีความแตกต่างทางอนุกรมวิธาน *M. aurantiaca* ATCC 27029<sup>T</sup> และ *M. siamensis* DSM 45097<sup>T</sup>

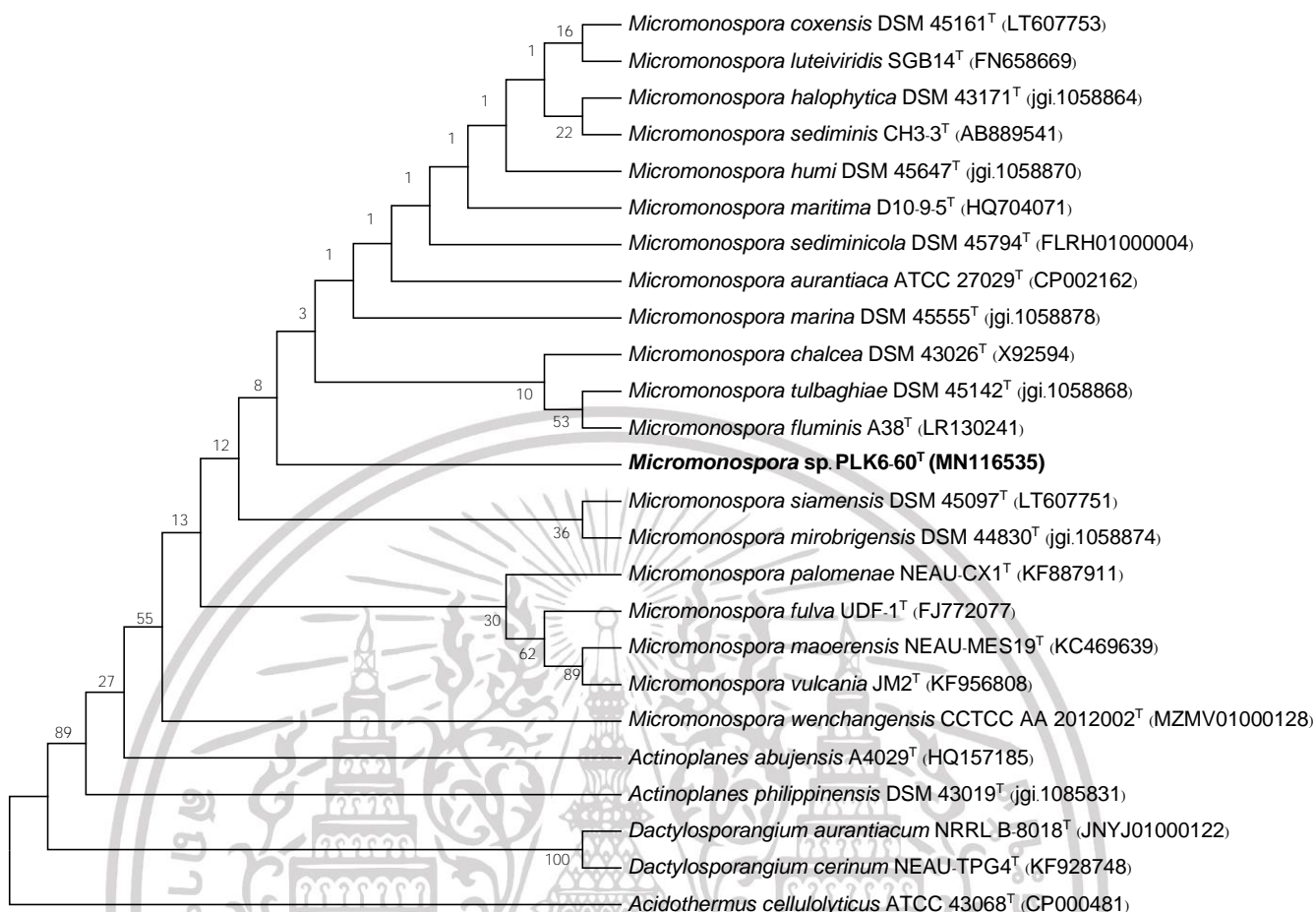


รูปที่ 4.30 แผนภูมิต้นไม้แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต PLK6-60 ด้วยวิธี Neighbor-Joining



รูปที่ 4.31 แผนภูมิต้นไม้แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต PLK6-60 ด้วยวิธี maximum-likelihood

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



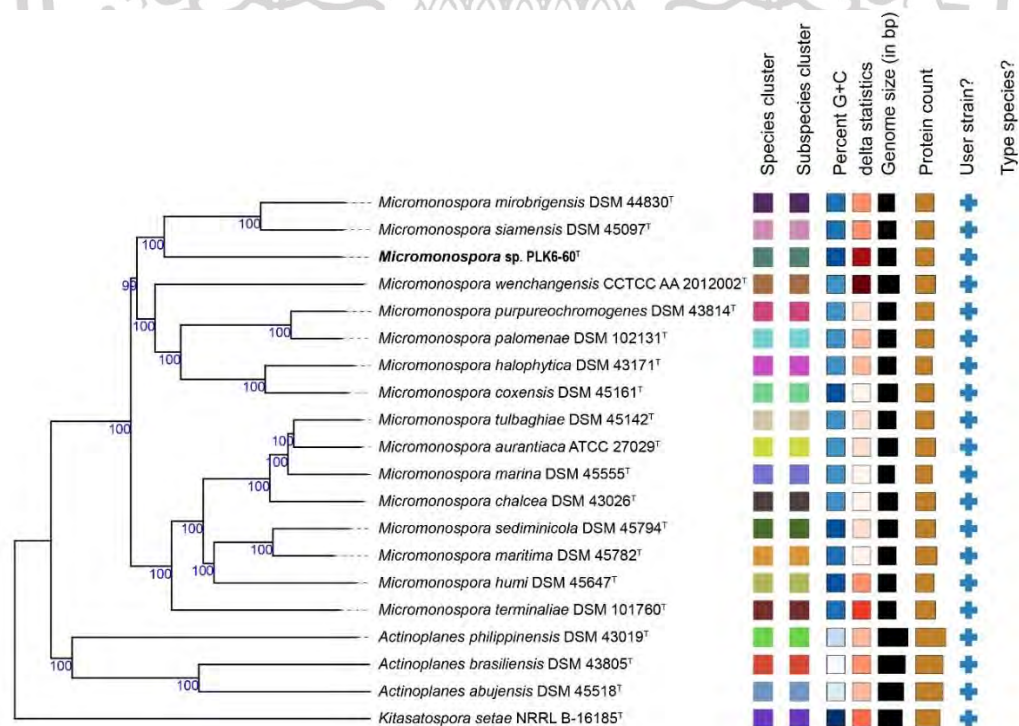
รูปที่ 4.32 แผนภูมิต้นไม้แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต PLK6-60 ด้วยวิธี maximum-parsimony

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.30 เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนช่วง 16S rRNA (% 16S rRNA gene similarity value) ระหว่างไอโซเลต PLK6-60 และสายพันธุ์ใกล้เคียงในฐานข้อมูล EzBioCloud

	สายพันธุ์ใกล้เคียง	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	PLK6-60	100	99.14	99.14	99.07	99.07	98.92	98.92	98.92	98.92	98.85	98.78	98.71	98.71	98.71	98.64	98.64	98.56	98.56	98.56	98.56
2	<i>M. aurantiaca</i>	99.14	100	98.60	99.10	99.60	98.80	99.50	99.50	98.70	98.60	99.40	99.30	98.20	98.80	98.80	99.10	98.90	98.40	99.10	98.00
3	<i>M. siamensis</i>	99.14	98.60	100	98.40	98.50	98.30	98.60	98.60	99.10	98.70	98.70	98.70	98.60	98.70	99.20	98.00	98.70	98.90	98.60	98.30
4	<i>M. chalcea</i>	99.07	99.10	98.40	100	99.00	99.10	99.00	99.00	98.60	98.40	98.60	98.50	98.10	98.70	97.90	98.60	98.70	98.20	98.20	97.90
5	<i>M. marina</i>	99.07	99.60	98.50	99.00	100	98.90	99.60	99.60	98.50	98.50	99.20	99.10	97.90	98.50	98.70	99.30	98.90	98.20	98.70	97.80
6	<i>M. tulbaghiae</i>	98.92	98.80	98.30	99.10	98.90	100	98.70	98.70	98.30	98.20	98.30	98.20	97.80	98.40	97.80	99.40	98.40	97.90	97.90	97.60
7	<i>M. maritima</i>	98.92	99.50	98.60	99.00	99.60	98.70	100	100	98.80	98.40	99.50	99.40	97.90	98.70	98.70	99.20	99.20	98.40	98.90	97.80
8	<i>M. sedimnicola</i>	98.92	99.50	98.60	99.00	99.60	98.70	100	100	98.80	98.40	99.50	99.40	97.90	98.70	98.70	99.20	99.20	98.40	98.90	97.80
9	<i>M. palomenae</i>	98.92	98.70	99.10	98.60	98.50	98.30	98.80	98.80	100	99.20	99.20	98.80	98.80	98.90	98.40	98.10	98.90	98.90	98.70	98.70
10	<i>M. fulva</i>	98.85	98.60	98.70	98.40	98.50	98.20	98.40	98.40	99.20	100	98.70	98.40	99.00	98.60	98.00	97.90	98.70	98.50	98.10	99.00
11	<i>M. coxensis</i>	98.78	99.40	98.70	98.60	99.20	98.30	99.50	99.50	99.20	98.70	100	99.60	98.40	98.90	98.90	98.80	99.20	98.60	99.30	98.20
12	<i>M. halophytica</i>	98.71	99.30	98.70	98.50	99.10	98.20	99.40	99.40	98.80	98.40	99.60	100	98.00	99.10	98.90	98.70	99.00	98.30	98.90	97.90
13	<i>M. maoerensis</i>	98.71	98.20	98.60	98.10	97.90	97.80	97.90	97.90	98.80	99.00	98.40	98.00	100	98.20	98.00	97.50	98.20	98.50	98.20	99.40
14	<i>M. sediminis</i>	98.71	98.80	98.70	98.70	98.50	98.40	98.70	98.70	98.90	98.60	98.90	99.10	98.20	100	98.30	98.00	98.70	98.30	98.50	98.10
15	<i>M. mirobrigensis</i>	98.64	98.80	99.20	97.90	98.70	97.80	98.70	98.70	98.40	98.00	98.90	98.90	98.00	98.30	100	98.20	98.60	98.30	99.10	97.90
16	<i>M. fluminis</i>	98.64	99.10	98.00	98.60	99.30	99.40	99.20	99.20	98.10	97.90	98.80	98.70	97.50	98.00	98.20	100	98.50	97.70	98.20	97.40
17	<i>M. humi</i>	98.56	98.90	98.70	98.70	98.90	98.40	99.20	99.20	98.90	98.70	99.20	99.00	98.20	98.70	98.60	98.50	100	98.40	98.70	97.90
18	<i>M. wenchangensis</i>	98.56	98.40	98.90	98.20	98.20	97.90	98.40	98.40	98.90	98.50	98.60	98.30	98.50	98.30	98.30	97.70	98.40	100	98.20	98.30
19	<i>M. luteiviridis</i>	98.56	99.10	98.60	98.20	98.70	97.90	98.90	98.90	98.70	98.10	99.30	98.90	98.20	98.50	99.10	98.20	98.70	98.20	100	98.20
20	<i>M. vulcania</i>	98.56	98.00	98.30	97.90	97.80	97.60	97.80	97.80	98.70	99.00	98.20	97.90	99.40	98.10	97.90	97.40	97.90	98.30	98.20	100

การตรวจคุณลักษณะอนุกรมวิธานด้วยคุณสมบัติจีโนมของไอโซเลต PLK6-60 พบว่า โครงร่างจีโนม มีนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 6,459,941 นิวคลีโอไทด์ (ประกอบด้วย 51 contigs โดย contig ที่ยาวสุดมีขนาด 718,602 นิวคลีโอไทด์ มีค่า N50 มีความยาว 405,520 นิวคลีโอไทด์ มีค่า Genome coverage เท่ากับ 60X) ไอโซเลต PLK6-60 มีปริมาณเบส G+C ในจีโนม เท่ากับ 73.49 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับปริมาณ G+C content ของสกุล *Micromonospora* ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 68-75 เปอร์เซ็นต์ (Goodfellow et al. 2012) จากการเปรียบเทียบจีโนมของไอโซเลต PLK6-60 และสายพันธุ์ใกล้เคียงได้แก่ *M. aurantiaca* ATCC 27029<sup>T</sup> และ *M. siamensis* DSM 45097<sup>T</sup> พบว่ามีค่า Average nucleotide identity-Blast (ANIb) เท่ากับ 82.9 และ 86.0 เปอร์เซ็นต์ และค่า digital DNA-DNA hybridization (dDDH) เท่ากับ 27.4 และ 32.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.31) ซึ่งมีค่าต่ำกว่าจุดตัดของเกณฑ์กำหนดความแตกต่างระดับสปีชีส์ (<95-96% สำหรับค่า ANI และ <70% สำหรับค่า dDDH) ที่กำหนดโดย Chun และคณะ (2018) และ Wayne และคณะ (1987) ตามลำดับ นอกจากนี้ตำแหน่งอนุกรมวิธานบนแผนภูมิต้นไม้ของจีโนม (phylogenomic tree) ของไอโซเลต PLK6-60 ก่อตัวอยู่บนคนละกิ่ง (branch) กับ *M. aurantiaca* ATCC 27029<sup>T</sup> และ *M. siamensis* DSM 45097<sup>T</sup> โดยมีค่า bootstrap เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.33) จากข้อมูลข้างต้น ไอโซเลต PLK6-60 เป็นสกุล *Micromonospora* สปีชีส์ใหม่ ลำดับนิวคลีโอไทด์บนช่วงยีน 16S rRNA และจีโนมของไอโซเลต PLK6-60 จัดเก็บไว้ในฐานข้อมูล Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) โดยมีหมายเลขจำเพาะ MN116535 และ JAIOAA000000000 ตามลำดับ



รูปที่ 4.33 แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการของจีโนม (Phylogenomic tree) แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต PLK6-60 และสายพันธุ์ใกล้เคียง

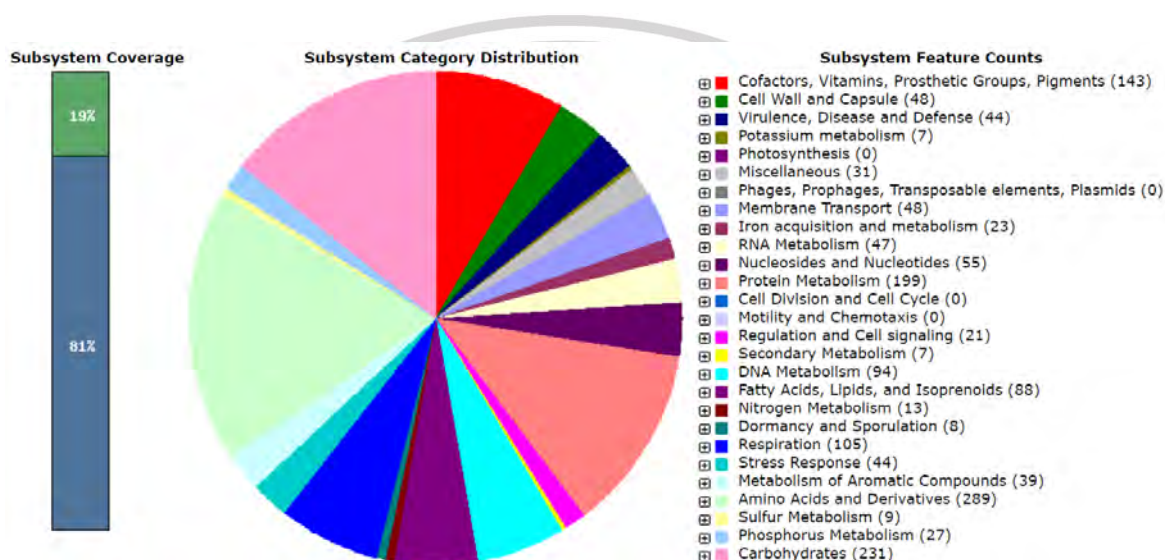
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.31 ค่า ANIb, ANIm และ dDDH ระหว่างโครร่างจีโนมของ PLK6-60, *M. aurantiaca* ATCC 27029<sup>T</sup> และ *M. siamensis* DSM 45097<sup>T</sup>

ไอโซเลต	สายพันธุ์อ้างอิง	ANIb (%)	ANIm (%)	Digital DNA-DNA hybridization relatedness												G+C difference
				Formula 1*				Formula 2**				Formula 3***				
				% dDDH	Model C.I. (%)	Distance	Prob. DDH $\geq 70$ (same species)	% dDDH	Model C.I. (%)	Distance	Prob. DDH $\geq 70$ (same species)	% dDDH	Model C.I. (%)	Distance	Prob. DDH $\geq 70$ (same species)	
<i>Micromonospora</i> sp. PLK6-60 <sup>T</sup>	<i>M. aurantiaca</i> ATCC 27029 <sup>T</sup>	82.9	87.0	33.0	29.6-36.6	0.4713	0.25	27.4	25.0-29.9	0.1575	0.03	30.7	27.7-33.8	0.5546	0.00	0.7
	<i>M. siamensis</i> DSM 45097 <sup>T</sup>	86.0	88.5	44.4	41.0-47.8	0.3517	4.47	32.2	29.8-34.7	0.1309	0.25	40.8	37.9-43.9	0.4365	0.18	0.3

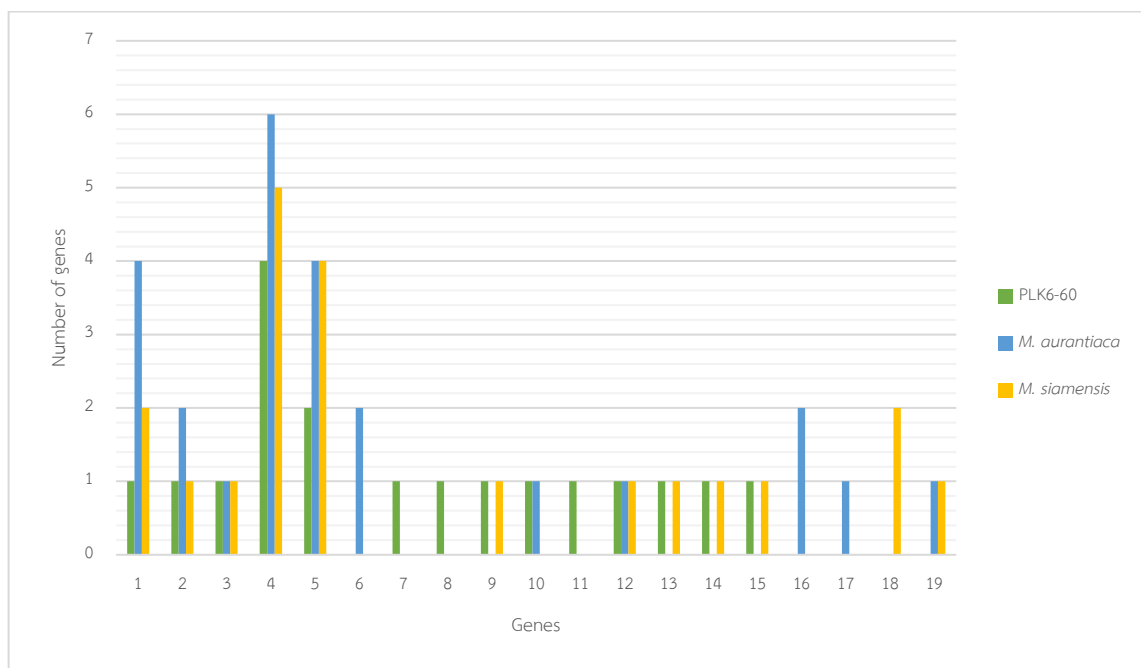
หมายเหตุ: \*Formula 1 คือ HSP length / total length, \*\*Formula 2 คือ identities/HSP length, \*\*\*Formula 3 คือ identities / total length เป็นการวิเคราะห์โดยไม่ขึ้นอยู่กับความยาวของโครร่างจีโนม

การทำนายยีนบนจีโนม (annotation) ของไอโซเลต PLK6-60 พบยีนทั้งหมด 5,937 ยีน โดยมียีนที่แปลรหัสเป็นโปรตีน จำนวน 5,861 ยีน tRNA จำนวน 72 ยีน rRNA จำนวน 3 ยีน และ tmRNA จำนวน 1 ยีน จากแผนภาพวงกลมพบกลุ่มยีนออร์ทอโลกัส (Cluster of Orthologous genes; COGs) ที่ทำหน้าที่ต่าง ๆ ได้แก่ กลุ่มยีนกรดอะมิโนและอนุพันธ์ของกรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต (carbohydrates) เมตาบอลิซึมของโปรตีน (protein metabolism) โคแฟกเตอร์ (cofactors) วิตามิน (vitamins) สารสี (pigments) กรดไขมัน (fatty acids) ไขมัน (lipids) และไอโซพรีนอยด์ (isoprenoids) และกลุ่มยีนอื่น ๆ (รูปที่ 4.34)



รูปที่ 4.34 แผนภาพแสดง Cluster of Orthologous genes (COGs) ของไอโซเลต PLK6-60

การทำนายกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิ (antismash) บนจีโนมของไอโซเลต PLK6-60 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ใกล้เคียง *M. aurantiaca* ATCC 27029<sup>T</sup> และ *M. siamensis* DSM 45097<sup>T</sup> พบกลุ่มยีน T1PKS, Terpene และ NRPS มีปริมาณยีนแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด นอกจากนี้พบกลุ่มยีน นอกจากนี้พบกลุ่มยีน lanthipeptide class II, lanthipeptide class III และ Linaridin ที่พบในจีโนมของไอโซเลต PLK6-60 เท่านั้น ในขณะที่ไม่พบในจีโนมของสายพันธุ์ใกล้เคียง ดังนั้นการทำนายกลุ่มยีนจึงสามารถบ่งบอกความแตกต่างของเชื้อแต่ละชนิดได้ (รูปที่ 4.35)



รูปที่ 4.35 แผนภาพแสดงปริมาณกลุ่มยีนบนจีโนมที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิของ PLK6-60, *M. aurantiaca* ATCC 27029<sup>T</sup> และ *M. siamensis* DSM 45097<sup>T</sup>

หมายเหตุ: 1. T1PKS (Polyketide synthase type I), 2. T2PKS (Polyketide synthase type II), 3. T3PKS (Polyketide synthase type III), 4. Terpene, 5. Non-ribosomal peptide synthetase cluster (NRPS), 6. lanthipeptide class I, 7. lanthipeptide class II, 8. lanthipeptide class III, 9. Thioamitides, 10. Siderophore, 11. Linaridin, 12. N-acetylglutamylglutamine amide (NAGGN), 13. Thiopeptide, 14. Linear azol(in)e-containing peptides (LAP), 15. Other unspecified ribosomally synthesised and post-translationally modified peptide product (RiPP) cluster, 16. Oligosaccharide, 17. transAT-PKS, 18. Betalactone และ 19. other

นอกจากนี้ไอโซเลต PLK6-60 พบกลุ่มยีน T1PKS, กลุ่มยีน T2PKS, กลุ่มยีน T3PKS, กลุ่มยีน terpene, กลุ่มยีน NRPS, กลุ่มยีน RiPP-like, กลุ่มยีน betalactone, กลุ่มยีน thioamitides, กลุ่มยีน lantipeptide class II และ class III, กลุ่มยีน thiopeptide, กลุ่มยีน siderophore และกลุ่มยีนอื่น ๆ โดยมี 4 กลุ่มยีนที่มีความคล้ายคลึงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.32) และกลุ่มยีนที่มีการสร้างสารทุติยภูมิโดยมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงต่ำ เช่น กลุ่มยีนที่มีการสร้างสารsporolide A (27%), กลุ่มยีนที่มีการสร้างสาร carotenoid (18%), กลุ่มยีนที่มีการสร้างสาร legonaridin (16%), กลุ่มยีนที่มีการสร้างสาร xantholipin (14%) และกลุ่มยีนที่มีการสร้างสาร dynemicin A (5%) เป็นต้น (ภาคผนวก จ) จึงมีแนวโน้มว่า PLK6-60 สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่แตกต่างไปจากสารที่มีการค้นพบแล้ว จึงมีความเป็นไปได้ว่าอาจสร้างสารทุติยภูมิชนิดใหม่ได้

ตารางที่ 4.32 กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิที่มีความคล้ายคลึงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์บนจีโนมของไอโซเลต PLK6-60

กลุ่มยีน	สารทุติยภูมิ	ผลิตจากสายพันธุ์	%Similarity
alkyl-O-dihydrogeranyl-methoxyhydroquinones biosynthetic gene cluster	alkyl-O-dihydrogeranyl-methoxyhydroquinones	<i>Actinoplanes missouriensis</i> 431	85
desferrioxamin B biosynthetic gene cluster	desferrioxamin B	<i>S. griseus</i> subsp. <i>griseus</i> NBRC 13350 <sup>T</sup>	80
SapB biosynthetic gene cluster	SapB	<i>S. coelicolor</i> A3	75
lymphostin biosynthetic gene cluster	lymphostin neolymphostinol B lymphostinol neolymphostin B	<i>Salinispora tropica</i> CNB-440	50

(4) ลักษณะแตกต่างระหว่างไอโซเลต PLK6-60 และสายพันธุ์อ้างอิงใกล้เคียงจากการเปรียบเทียบลักษณะฟีโนไทป์ของไอโซเลต PLK6-60 และสายพันธุ์อ้างอิงใกล้เคียง ได้แก่ *M. aurantiaca* ATCC 27029<sup>T</sup> และ *M. siamensis* DSM 45097<sup>T\*\*</sup> พบว่ามีลักษณะบางประการที่แตกต่างกัน อาทิเช่นไอโซเลต PLK6-60 ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรต ไม่สามารถใช้ ดี-เซลโลไบโอส ดี-ราฟฟิโนส ดี-เมลิไบโอส ดี-ไรโบส ดี-กาแลคโตส ดี-ไซโลส แอล-แรมโนส และดี-ฟรุคโตส ลักษณะดังกล่าวมีความแตกต่างจากสายพันธุ์ใกล้เคียงทั้งสอง (ตารางที่ 4.33)

ตารางที่ 4.33 ลักษณะที่แตกต่าง (differential characteristics) ของไอโซเลต PLK6-60 และสายพันธุ์ใกล้เคียง

ลักษณะ	PLK6-60*	<i>M. aurantiaca</i> ATCC 27029 <sup>T*</sup>	<i>M. siamensis</i> DSM 45097 <sup>T**</sup>
การเรียงตัวของสปอร์และผิวสปอร์	สปอร์เดี่ยว/ เรียบ	สปอร์เดี่ยว/ขรุขระ	สปอร์เดี่ยว/เรียบ
สีโคโลนีบนอาหาร ISP2	strong orange yellow	brownish black	brownish black

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.33 ลักษณะที่แตกต่าง (differential characteristics) ของไอโซเลต PLK6-60 และสายพันธุ์ใกล้เคียง (ต่อ)

ลักษณะ	PLK6-60*	<i>M. aurantiaca</i> ATCC 27029 <sup>T*</sup>	<i>M. siamensis</i> DSM 45097 <sup>T**</sup>
ความสามารถในการทนเกลือ (%NaCl (w/v))	1-2	1-2	1-5
อุณหภูมิที่เจริญ (°C)	20-40	25-40	25-40
pH	6-10	6-10	nd
<b>การย่อยโปรตีนในนม:</b>			
Coagulation	+	w	+
Peptonization	+	w	+
รีดิวซ์ไนเตรต	-	+	-
<b>ความสามารถในการเจริญบนแหล่งคาร์บอน:</b>			
ดี-เซลโลไบโอส	-	+	+
ดี-ราฟฟิโนส	-	+	+
ดี-เมลลิไบโอส	-	+	+
ดี-ไรโบส	-	+	-
ดี-กาแลคโตส	-	+	+
ดี-ไซโลส	-	+	+
ทรีฮาโลส	-	w	nd
แอล-แรมโนส	-	-	+
ดี-แมนนิทอล	-	-	+
ดี-ฟรุคโตส	-	+	+
<b>การย่อยสารประกอบไม่ละลายน้ำ:</b>			
ไทโรซีน	-	-	nd

หมายเหตุ: \*ข้อมูลจากการทดลอง \*\*ข้อมูลจาก Thawai และคณะ (2005)

จากข้อมูลของอนุกรมวิธานหลายส่วน (polyphasic taxonomy) ซึ่งประกอบด้วยลักษณะทางฟีโนไทป์ ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะจีโนไทป์ สามารถสรุปได้ว่า ไอโซเลต PLK6-60 จัดเป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่ของสกุล *Micromonospora*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 4.3 คัดเลือกแอคติโนมัยีสท์เพื่อทำการศึกษางค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบ

#### 4.3.1 ความสามารถในการต้านจุลินทรีย์ทดสอบ

จากการนำสารสกัดหยาบที่สกัดจากเอทิลอะซิเตทจากน้ำหมักของแอคติโนมัยีสท์ 5 ไอโซเลตมาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 8 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, Methicilin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20654, Vancomycin-Resistant Enterococcus (VRE ; clinical strain) และ *Candida albicans* ATCC 10231 พบว่าสารสกัดหยาบที่สกัดจากเอทิลอะซิเตทของแอคติโนมัยีสท์จำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ CA1R205 และ CA3R110 สามารถต้านจุลินทรีย์ทดสอบบางชนิดได้ (ตารางที่ 4.34) แต่ทั้ง 2 ไอโซเลต ไม่สามารถยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *C. albicans* ATCC 10231

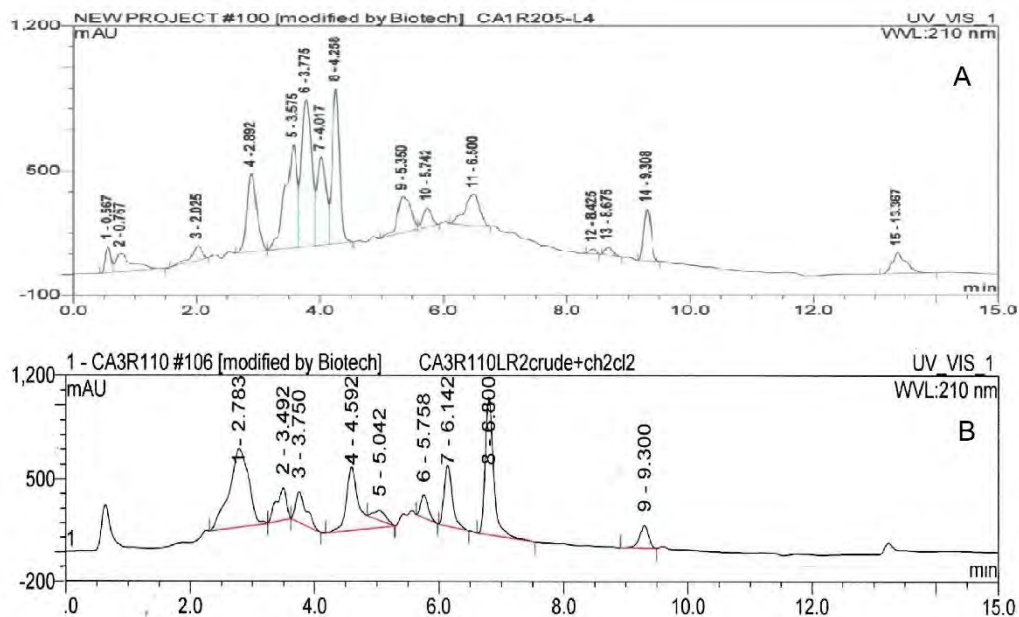
ตารางที่ 4.34 แสดงความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดหยาบ (ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จากไอโซเลต CA1R205 และ CA3R110

จุลินทรีย์ทดสอบ	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	
	CA1R205	CA3R110
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	10.1	14.0
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	-	13.3
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	11.4	21.3
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-
MRSA	-	14.3
VRE	-	14.7
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	-	-

#### 4.3.2 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบ

สารสกัดหยาบที่สกัดจากเอทิลอะซิเตทของไอโซเลต CA1R205 และ CA3R110 ถูกนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วย HPLC จากรูปแบบทางเคมี (chemical profiles) พบว่าสารสกัดหยาบของทั้ง 2 ไอโซเลตมีองค์ประกอบทางเคมีที่น่าสนใจของการปรากฏของ peak ในเวลาที่แตกต่างกัน (retention time;  $t_R$ ) และมีรูปแบบการดูดกลืนแสงในช่วง UV ที่แตกต่างกัน โดยดูจากรูปแบบของ UV spectrum กับฐานข้อมูลทางเคมีของทีมิววิจัยเคมีอินทรีย์ชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) (รูปที่ 4.36)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



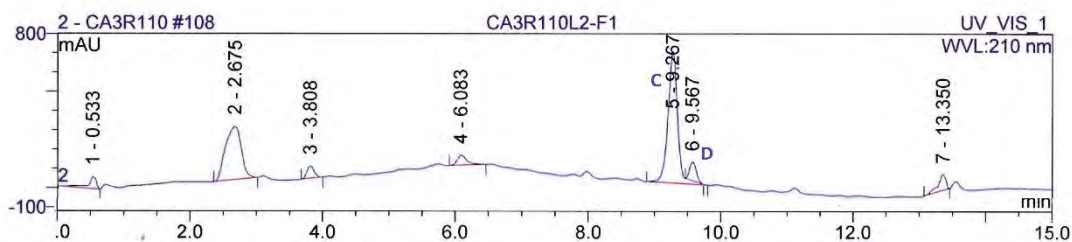
รูปที่ 4.36 Chemical profiles ของสารสกัดหยาบที่สกัดจากเอทิลอะซิเตทของไอโซเลต CA1R205 (A) และ CA3R110 (B)

จากผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ทดสอบ และองค์ประกอบทางเคมี พบว่าไอโซเลต CA3R110 สามารถต้านจุลินทรีย์ทดสอบได้หลายชนิด ได้แก่ *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341, MRSA และ VRE อีกทั้งยังมีองค์ประกอบทางเคมีที่น่าสนใจในแง่ของของการปรากฏของ peak ในเวลาที่แตกต่างกัน และมีรูปแบบการดูดกลืนแสงในช่วง UV ที่แตกต่างกัน ดังนั้นไอโซเลต CA3R110 จึงถูกเลือกเพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมี วิเคราะห์โครงสร้าง และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์

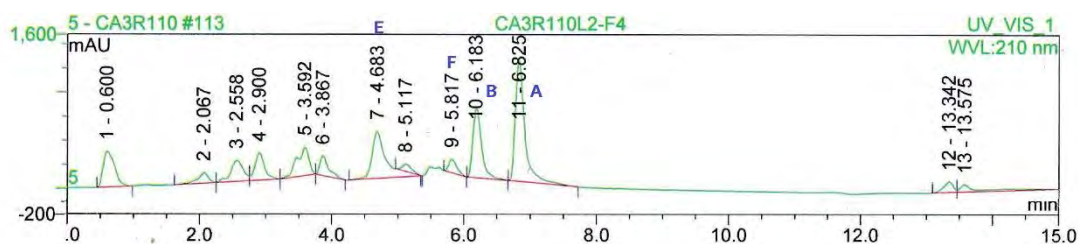
#### 4.4 การศึกษาสารทุติยภูมิที่ผลิตได้จากไอโซเลต CA3R110

##### 4.4.1 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบและการทำสารสกัดหยาบให้บริสุทธิ์

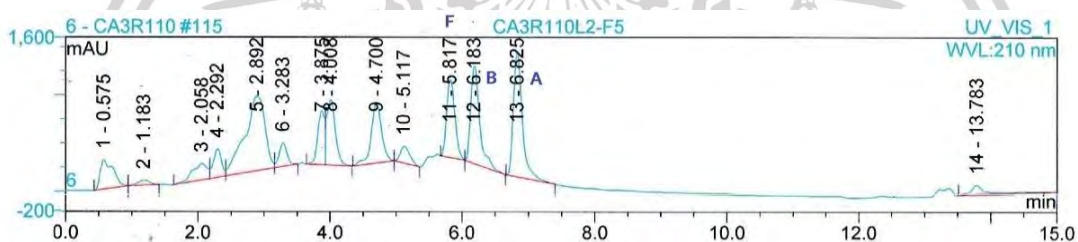
สารสกัดหยาบที่ได้จากไอโซเลต CA3R110 ถูกนำมาแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้คอลัมน์ Sephadex LH20 ในขั้นต้นสามารถแยกได้ทั้งหมด 5 fractions โดย fractions ที่น่าสนใจ คือ F1, F4 และ F5 ถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง preparative HPLC โดยใช้คอลัมน์ C-18 และใช้ตัวทำละลายแบบ linear gradient ในการเก็บสารที่มีพีค (peak) ของสารที่น่าสนใจใน fraction ที่ 1 (F1) เก็บ peak ที่ปรากฏค่า  $t_R$  (นาที) ที่ 9.258 (สาร C) และ 9.558 (สาร D) (รูปที่ 4.37) fraction ที่ 4 (F4) เก็บ peak ที่ปรากฏค่า  $t_R$  (นาที) ที่ 4.683 (สาร E), 5.817 (สาร F), 6.183 (สาร B) และ 6.825 (สาร A) (รูปที่ 4.38) และ fraction ที่ 5 (F5) เก็บ peak ที่ปรากฏค่า  $t_R$  (นาที) ที่ (F), 6.183 (B), และ 6.825 (A) (รูปที่ 4.39)



รูปที่ 4.37 Chemical profile ของ F1



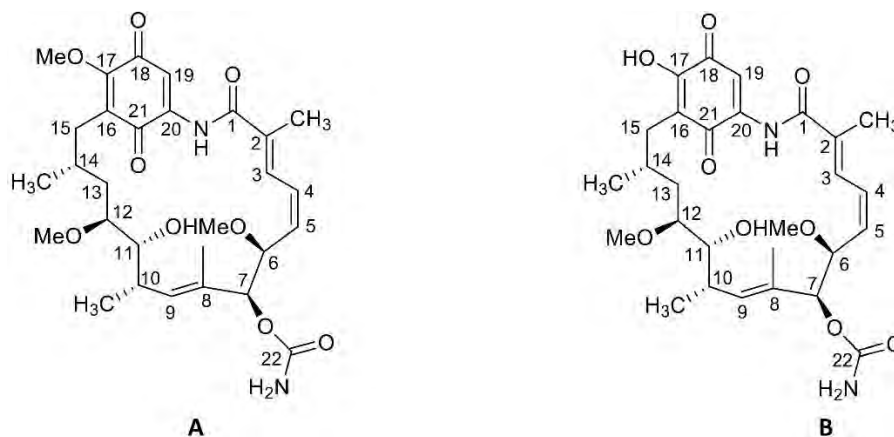
รูปที่ 4.38 Chemical profile ของ F4



รูปที่ 4.39 Chemical profile ของ F5

#### 4.4.2 การวิเคราะห์โครงสร้างเคมีของสารทุติยภูมิจากไอโซเลต CA3R110

จากการแยกสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี และทำให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง HPLC ได้สารบริสุทธิ์ทั้งหมด 6 สาร คือ (สาร A;  $t_R = 6.825$ , สาร B;  $t_R = 6.183$ , สาร C;  $t_R = 9.267$ , สาร D;  $t_R = 9.567$ , สาร E;  $t_R = 4.683$ , และ สาร F;  $t_R = 5.817$ ) ซึ่งสารบริสุทธิ์นี้จะถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทาง NMR spectroscopy ในการหาโครงสร้างทางเคมีของสารเหล่านี้ ในขณะที่สามารถหาโครงสร้างทางเคมีได้ 2 สาร คือ สาร A และ สาร B (รูปที่ 4.40) ซึ่งสารทั้ง 2 สารมีรายงานว่ามีการค้นพบแล้ว สาร A คือ Geldanamycin และสาร B คือ 17-O-demethylgeldanamycin (Tadtong et al., 2007) นอกจากนี้จากการศึกษาการทำนายกลุ่มยีนบนจีโนมที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิของ CA3R110 พบกลุ่มยีนที่มีการสร้างสาร geldanamycin ที่ความคล้ายคลึง 69%



รูปที่ 4.40 โครงสร้างเคมีของ Geldanamycin (สาร A) และ 17-O-demethylgeldanamycin (สาร B) ผลิตจาก *Streptomyces* sp. CA3R110<sup>T</sup>

เมื่อนำสารบริสุทธิ์ A และ B มาทำการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิคสเปกโตรสโกปี ได้รายละเอียดทางเคมีดังต่อไปนี้

สาร A มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง สูตรโมเลกุล  $C_{29}H_{40}N_2O_9$  จาก HRESIMS สเปกตรัมมีมวลต่อประจุ  $m/z$  เท่ากับ 560.2626  $[M + Na]^+$  มีค่าการดูดกลืนแสง UV ( $\lambda_{max}$ ) และค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง ( $\log \epsilon$ ) ในตัวทำละลายเมทานอล เท่ากับ  $\lambda_{max}$  ( $\log \epsilon$ ): 305 (3.06), 255 (2.94) และ 205 (3.90) นาโนเมตร วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วย FTIR พบสัญญาณที่ความถี่ ( $\nu$ ) 3,437 (O-H stretching), 1,700 (C=O stretching) และ 1,653 (C=O stretching, amide)  $cm^{-1}$  และจาก  $^1H$  NMR สเปกตรัมในตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม-D พบสัญญาณของเมทิลโปรตอน (methyl;  $CH_3$ ) จำนวน 4 สัญญาณ ที่ตำแหน่ง chemical shift ( $\delta_H$ , ppm) ที่  $\delta_H$  0.97 (10- $CH_3$ ), 1.00 (14- $CH_3$ ), 1.79 (8- $CH_3$ ), 2.02 (2- $CH_3$ ) สัญญาณของ methoxy โปรตอน 3 สัญญาณ ที่ตำแหน่ง  $\delta_H$  3.30 (6-O $CH_3$ ), 3.35 (12-O $CH_3$ ) และ 4.12 (17-O $CH_3$ ) สัญญาณของเมทิลีนโปรตอน (methylene;  $CH_2$ ) จำนวน 2 สัญญาณ ที่ตำแหน่ง  $\delta_H$  1.60-1.80/2.37-2.51 (13- $CH_2$ ) และ 2.38-2.53 (15- $CH_2$ ) สัญญาณของมีเทนโปรตอน (methine;  $CH$ ) จำนวน 11 สัญญาณ ที่ตำแหน่ง  $\delta_H$  1.70 (14- $CH$ ), 2.76-2.80 (10- $CH$ ), 3.37 (12- $CH$ ), 3.53 (11- $CH$ ), 4.31 (6- $CH$ ), 5.18 (7- $CH$ ), 5.81 (9- $CH$ ), 5.89 (5- $CH$ ), 6.57 (4- $CH$ ), 6.94 (3- $CH$ ) และ 7.28 (19- $CH$ ) สำหรับ  $^{13}C$  NMR และ DEPT-135 ในตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม-D พบสัญญาณเมทิลคาร์บอน จำนวน 4 สัญญาณ ที่ตำแหน่ง  $\delta_C$  12.3 (14- $CH_3$ ), 12.6 (8- $CH_3$ ), 12.9 (2- $CH_3$ ), และ 22.9 (10- $CH_3$ ) และสัญญาณของ methoxy คาร์บอน 3 สัญญาณ ที่ตำแหน่ง  $\delta_C$  56.7 (12-O $CH_3$ ), 57.3 (6-O $CH_3$ ), และ 61.7 (17-O $CH_3$ ) สัญญาณของเมทิลีนคาร์บอน จำนวน 2 สัญญาณ ที่ตำแหน่ง  $\delta_C$  32.7 (C-15) และ 34.4 (C-13) สัญญาณของมีเทนคาร์บอน จำนวน 11 สัญญาณ ที่ตำแหน่ง  $\delta_C$  28.0 (C-14), 32.2 (C-10), 72.7 (C-11), 80.4 (C-12), 81.0 (C-6), 81.3 (C-7), 111.8 (C-19), 126.3 (C-4), 127.2 (C-3), 133.3 (C-9) และ 136.5 (C-5) และสัญญาณของคาร์บอนจตุรภูมิ จำนวน 9 สัญญาณ ที่ตำแหน่ง  $\delta_C$  127.6 (C-16), 133.1 (C-8), 134.8 (C-2),

138.1 (C-20), 156.0 (C-22), 157.0 (C-17), 168.2 (C-1), 183.3 (C-18) และ 185.0 (C-21) จากเทคนิค COSY แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ของโปรตอนตำแหน่ง H-4 ( $\delta_H$  6.57) คู่ควบกับ H-3 ( $\delta_H$  6.94) และ H-5 ( $\delta_H$  5.89) โปรตอนตำแหน่ง H-6 ( $\delta_H$  4.31) คู่ควบกับ H-5 และ H-7 ( $\delta_H$  5.18) โปรตอนตำแหน่ง H-10 ( $\delta_H$  2.73-2.83) คู่ควบกับ H-9 ( $\delta_H$  5.81), H-11 ( $\delta_H$  3.53) และ 10-CH<sub>3</sub> ( $\delta_H$  0.97) โปรตอนตำแหน่ง H-13 ( $\delta_H$  1.60-1.80 / 2.37-2.51) คู่ควบกับ H-12 ( $\delta_H$  3.37) และ H-14 ( $\delta_H$  1.60-1.80) โปรตอนตำแหน่ง H-14 คู่ควบกับ H-15 ( $\delta_H$  2.37-2.51) และ 14-CH<sub>3</sub> ( $\delta_H$  1.00) เทคนิค จาก HMBC แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ของ heteronuclear หลายพันธะ ซึ่งในที่นี้คือความสัมพันธ์ของโปรตอนและคาร์บอนในระยะ 2-3 พันธะ ( $^2J_{CH}$  และ  $^3J_{CH}$ ) โดยแสดงความสัมพันธ์ดังนี้ โปรตอนตำแหน่ง 2-CH<sub>3</sub> ( $\delta_H$  2.02) แสดงความสัมพันธ์กับ C-1 ( $\delta_C$  168.2), C-2 ( $\delta_C$  134.8) และ C-3 ( $\delta_C$  127.2) โปรตอนตำแหน่ง H-4 ( $\delta_H$  6.57) แสดงความสัมพันธ์กับ C-2 และ C-6 ( $\delta_C$  81.0) โปรตอนตำแหน่ง H-5 ( $\delta_H$  5.89) แสดงความสัมพันธ์กับ C-3 และ C-7 ( $\delta_C$  81.3) โปรตอนตำแหน่ง 8-CH<sub>3</sub> ( $\delta_H$  1.79) แสดงสัมพันธ์กับ C-7, C-8 ( $\delta_C$  133.1) และ C-9 ( $\delta_C$  133.3) โปรตอนตำแหน่ง H-9 ( $\delta_H$  5.81) แสดงความสัมพันธ์กับ C-7 และ C-11 ( $\delta_C$  72.7) โปรตอนตำแหน่ง 10-CH<sub>3</sub> ( $\delta_H$  0.97) แสดงความสัมพันธ์กับ C-9, C-10 ( $\delta_C$  32.2) และ C-11 โปรตอนตำแหน่ง H-12 ( $\delta_H$  3.34-3.43) สัมพันธ์กับตำแหน่ง C-10 และ C-14 ( $\delta_C$  28.0) โปรตอนตำแหน่ง 14-CH<sub>3</sub> ( $\delta_H$  1.00) แสดงความสัมพันธ์กับ C-13 ( $\delta_C$  34.4), C-14 และ C-15 ( $\delta_C$  32.7) โปรตอนตำแหน่ง H-15 ( $\delta_H$  2.37-2.51) แสดงความสัมพันธ์กับ C-16 ( $\delta_C$  127.6), C-17 ( $\delta_C$  157.0), C-21 ( $\delta_C$  185.0) และ 14-CH<sub>3</sub> ( $\delta_C$  12.3) โปรตอนตำแหน่ง H-19 ( $\delta_H$  7.28) แสดงความสัมพันธ์กับ C-17, C-20 ( $\delta_C$  138.1) และ C-21 โปรตอนของเอมีนตำแหน่ง  $\delta_H$  8.95 แสดงความสัมพันธ์กับ C-1, C-19 ( $\delta_C$  111.8) และ C-21 จากความสัมพันธ์ดังกล่าวข้างต้นสามารถสร้างวง macrocyclic เชื่อมกับวง benzoquinone ที่ตำแหน่ง C-16 และ C-20 นอกจากนั้น HMBC ยังแสดงความสัมพันธ์ของ methoxy ปรากฏที่  $\delta_H$  3.30, 3.36 และ 4.12 กับ C-6, C-12 ( $\delta_C$  80.4) และ C-17 แสดงว่าคาร์บอนตำแหน่งที่ 6, 12 และ 17 มีกลุ่ม methoxy เกาะอยู่ และโปรตอนตำแหน่ง H-7 แสดงความสัมพันธ์กับ C-22 ( $\delta_C$  156.0) แสดงว่าตำแหน่งที่ 7 มีกลุ่ม carbamate เมื่อเปรียบเทียบกับโครงสร้างทางเคมีพบว่า สาร A มีโครงสร้างทางเคมีเหมือนกับ Geldanamycin ซึ่งสารนี้มีผู้รายงานไว้แล้ว (Rinehart and Shield, 1976 และ Ōmura et al., 1979) เมื่อเปรียบเทียบ  $^1H$  และ  $^{13}C$  NMR (ตารางที่ 4.35) พบว่าเหมือนกับที่ได้มีผู้รายงานไว้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า สาร A คือ Geldanamycin

ตารางที่ 4.35  $^1\text{H}$  NMR และ  $^{13}\text{C}$  NMR สเปกตรัมของสาร A ใน  $\text{CDCl}_3$  และ Geldanamycin ใน  $\text{DMSO-d}_6$ 

ตำแหน่ง	สาร A <sup>a</sup>		Geldanamycin	
	$^1\text{H}$ NMR	$^{13}\text{C}$ NMR	$^1\text{H}$ NMR <sup>b</sup>	$^{13}\text{C}$ NMR <sup>c</sup>
1	-	168.2, C	-	169.1, C
2	-	134.8, C	-	133.2, C
3	6.94, d ( $J = 11.6$ )	127.2, CH	6.95, d	128.4, CH
4	6.57, dd ( $J = 11.3, 11.5$ )	126.3, CH	6.56, t	125.7, CH
5	5.89, dd ( $J = 10.2, 10.3$ )	136.5, CH	5.80, t	137.8, CH
6	4.31, d ( $J = 9.4$ )	81.0, CH	4.34, d	81.6, CH
7	5.18, s	81.3, CH	4.86, sb	80.6, CH
8	-	133.1, C	-	132.6, CH
9	5.81, d ( $J = 9.37$ )	133.3, CH	5.51, d	131.9, CH
10	2.76-2.80, m	32.2, CH	3.61	32.1, CH
11	3.53, d ( $J = 7.2$ )	72.7, CH	3.29	71.9, CH
12	3.34-3.43, m	80.4, CH	3.07	80.2, CH
13	1.60-1.80, m / 2.37-2.51, m	34.4, $\text{CH}_2$	1.45, sb	31.0, $\text{CH}_2$
14	1.60-1.70, m	28.0, CH	1.91	26.6, CH
15	2.37-2.51, m	32.7, $\text{CH}_2$	2.42, m	31.7, $\text{CH}_2$
16	-	127.6, C	-	128.1, C
17	-	157.0, C	-	156.4, C
18	-	183.3, C	-	183.6, C
19	7.28, s	111.8, CH	7.02, s	110.9, CH
20	-	138.1, C	-	139.6, C
21	-	185.0, C	-	183.1, C
22	-	156.0, C	6.45, sb	156.0, C
2- $\text{CH}_3$	2.02, s	12.9, $\text{CH}_3$	1.91	12.2, $\text{CH}_3$
6- $\text{OCH}_3$	3.30, s	57.3, $\text{CH}_3$	3.25, s	56.0, $\text{CH}_3$
8- $\text{CH}_3$	1.79, s	12.6, $\text{CH}_3$	1.61, sb	12.5, $\text{CH}_3$
10- $\text{CH}_3$	0.97, d ( $J = 6.2$ )	22.9, $\text{CH}_3$	0.97, d	23.3, $\text{CH}_3$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่ไปยังบุคคลอื่นใด

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.35  $^1\text{H}$  NMR และ  $^{13}\text{C}$  NMR สเปกตรัมของสาร A ใน  $\text{CDCl}_3$  และ Geldanamycin ใน  $\text{DMSO-d}_6$  (ต่อ)

ตำแหน่ง	สาร A <sup>a</sup>		Geldanamycin	
	$^1\text{H}$ NMR	$^{13}\text{C}$ NMR	$^1\text{H}$ NMR <sup>b</sup>	$^1\text{H}$ NMR <sup>c</sup>
12-OCH <sub>3</sub>	3.36, s	56.7, CH <sub>3</sub>	3.25, s	56.5, CH <sub>3</sub>
14-CH <sub>3</sub>	1.00, d (J = 6.8)	12.3, CH <sub>3</sub>	0.76	13.0, CH <sub>3</sub>
17-OCH <sub>3</sub>	4.12, s	61.7, CH <sub>3</sub>	3.93, s	61.0, CH <sub>3</sub>
1-NHCO	8.95, s	-	9.14, sb	-

หมายเหตุ : a คือ  $^1\text{H}$  NMR 500 MHz และ  $^{13}\text{C}$  NMR 125 MHz; b (Rinehart and Shield, 1976); c (Ömura et al., 1979)

สาร B มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีน้ำตาล สูตรโมเลกุล  $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_9$  จาก HRESIMS สเปกตรัมมีมวลต่อประจุ  $m/z$  เท่ากับ 546.2505 [M-H]<sup>-</sup> มีค่าการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น ( $\lambda_{\text{max}}$ ) และค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง (log  $\epsilon$ ) ในตัวทำละลายเมทานอล เท่ากับ  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ): 313 (3.99), 244 (3.84) และ 204 (4.63) นาโนเมตร วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วย FTIR พบสัญญาณที่ความถี่ ( $\nu$ ) 3,393 (O-H stretching), 1,713 (C=O stretching) และ 1,648 (C=O stretching, amide)  $\text{cm}^{-1}$  จากสเปกตรัม  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR และ DEPT-135 ของโครงสร้างหลักในตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม-D ไกล่เคียงกับสาร A แต่แตกต่างที่  $^1\text{H}$  NMR สัญญาณของหมู่ methoxy หายไป 1 หมู่ จาก HMBC พบว่า หมู่ methoxy ตำแหน่งที่ C-17 หายไป และถูกแทนที่ด้วยหมู่ hydroxy จากโครงสร้างทางเคมีพบว่าสาร B คือ 17-O-demethylgeldanamycin ซึ่งมีผู้รายงานไว้แล้ว (Baksh et al., 2017) และเมื่อเปรียบเทียบ  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR ของสาร B กับ 17-O-demethylgeldanamycin (ตารางที่ 4.36) พบว่าเหมือนกัน ดังนั้นจึงสรุปว่า สาร B คือ 17-O-demethylgeldanamycin

ตารางที่ 4.36  $^1\text{H}$  NMR และ  $^{13}\text{C}$  NMR สเปกตรัมของสาร B ใน  $\text{MeOD}+\text{CDCl}_3$  และ 17-O-demethylgeldanamycin ใน  $\text{CD}_3\text{OD}$

ตำแหน่ง	สาร B <sup>a</sup>		17-O-demethylgeldanamycin <sup>b</sup> (Baksh et al., 2017)	
	$^1\text{H}$ NMR	$^{13}\text{C}$ NMR	$^1\text{H}$ NMR	$^{13}\text{C}$ NMR
1	-	170.1, C	-	170.8, C
2	-	133.9, C	-	135.3, C
3	7.01, d (J = 9.6)	129.2, CH	7.12-7.15-, m	129.7, CH
4	6.60, t (J = 11.4, 11.5)	126.9, CH	6.65, t (J = 11.4)	127.2, CH

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.36  $^1\text{H}$  NMR และ  $^{13}\text{C}$  NMR สเปกตรัมของสาร B ใน MeOD+ $\text{CDCl}_3$  และ 17-O-demethylgeldanamycin ใน  $\text{CD}_3\text{OD}$  (ต่อ)

ตำแหน่ง	สาร B <sup>a</sup>		17-O-demethylgeldanamycin <sup>b</sup> (Baksh et al., 2017)	
	$^1\text{H}$ NMR	$^{13}\text{C}$ NMR	$^1\text{H}$ NMR	$^{13}\text{C}$ NMR
5	5.87, t ( $J = 9.4$ , 10.1)	137.7, CH	5.87-5.91, m	138.4, CH
6	4.43, d ( $J = 7.7$ )	82.3, CH	4.50, d ( $J = 8.4$ )	82.8, CH
7	5.12, s	82.8, CH	5.10, s	82.6, CH
8	-	131.6, CH	-	134.4, CH
9	5.65, d ( $J = 8.7$ )	133.1, CH	5.60, d ( $J = 9.8$ )	133.3, CH
10	2.71-2.75, m	33.5, CH	2.73, brs	34.1, CH
11	3.44, s	73.7, CH	3.45-3.48, m	74.2, CH
12	3.36, s	82.1, CH	3.35, brs	80.2, CH
13	1.63-1.70, m	34.8, $\text{CH}_2$	1.58-1.63, m	34.6, $\text{CH}_2$
14	1.73, s	29.5, CH	1.90-1.95, m	29.8, CH
15	2.30-2.48, m	32.3, $\text{CH}_2$	2.49, dd ( $J =$ 13.1, 6.5)	32.5, $\text{CH}_2$
16	-	118.5, C	-	118.4, C
17	-	158.6, C	-	159.1, C
18	-	183.9, C	-	186.0, C
19	7.70, s	109.3, CH	7.12-7.15, m	109.4, CH
20	-	135.0, C	-	142.5, C
21	-	185.3, C	-	183.4, C
22	-	158.4, C	-	159.1, C
2- $\text{CH}_3$	2.00, s	12.5, $\text{CH}_3$	2.03, s	12.4, $\text{CH}_3$
6- $\text{OCH}_3$	3.34, s	57.7, $\text{CH}_3$	3.32, s	57.6, $\text{CH}_3$
8- $\text{CH}_3$	1.62, s	12.6, $\text{CH}_3$	1.74, s	13.2, $\text{CH}_3$
10- $\text{CH}_3$	0.92, d ( $J = 6.9$ )	13.3, $\text{CH}_3$	0.91, d ( $J = 6.9$ )	13.6, $\text{CH}_3$
12- $\text{OCH}_3$	3.35, s	56.9, $\text{CH}_3$	3.34, s	56.9, $\text{CH}_3$
14- $\text{CH}_3$	0.98, d ( $J = 6.3$ )	23.5, $\text{CH}_3$	1.00, d ( $J = 6.1$ )	23.5, $\text{CH}_3$
1-NHCO	8.13, s	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำเพื่อประโยชน์ทางการค้า  
 หมายเหตุ : a คือ  $^1\text{H}$  NMR 500 MHz และ  $^{13}\text{C}$  NMR 125 MHz; b คือ  $^1\text{H}$  NMR 700 MHz และ  $^{13}\text{C}$  NMR 176 MHz  
 ไม่ว่ากรรมใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.5 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์

นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ และได้พิสูจน์โครงสร้างทางเคมีแล้ว คือ geldanamycin และ 17-O-demethylgeldanamycin นำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนี้

### 4.5.1 ฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ

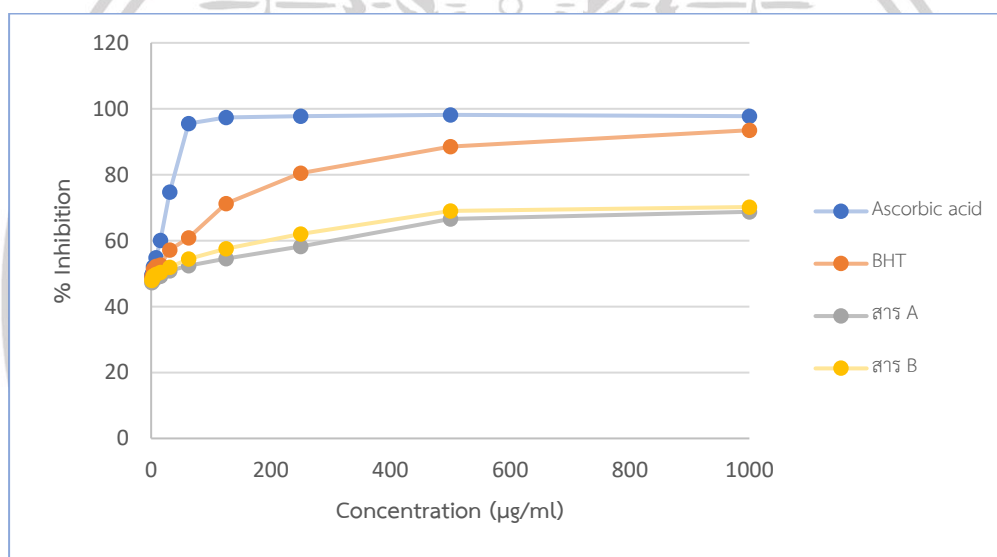
จากการทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบของไอโซเลต CA3R110 พบว่าแสดงฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ดังต่อไปนี้ ได้แก่ *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341, MRSA และ VRE (ตารางที่ 4.34) จากนั้นนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ดังกล่าว และหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ดังกล่าวด้วยวิธี Microdilution broth พบว่า สาร A (geldanamycin) และ สาร B (17-O-demethylgeldanamycin) ไม่แสดงฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบข้างต้น ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบ เนื่องจากสารบริสุทธิ์ไม่สามารถละลายได้หมดในสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยทั่วไปนิยมใช้ DMSO ในการละลายสารที่ต้องการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เพราะ DMSO ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ หรือต่อจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ทดสอบที่ในระดับความเข้มข้นไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งสามารถใช้เป็นตัวทำละลายร่วมกับน้ำได้ (ชุตติมา, 2547) นอกจากนี้ geldanamycin มีความสามารถในการละลายต่ำ (Fukuyo et al., 2010) ซึ่งความสามารถในการละลายของสารส่งผลต่อความเข้มข้นที่ต้องการของสาร และความสามารถในการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพอีกด้วย (Savjani et al., 2012) และเนื่องจากมีความจำกัดเกี่ยวกับปริมาณสารจึงไม่สามารถยืนยันผลทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยวิธี Agar disc diffusion ได้

จากงานวิจัยอื่น ๆ เกี่ยวกับ geldanamycin ที่พบได้จาก *S. hygroscopicus* PNK1-3 สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (Jongrungruangchok et al., 2006) มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของ *S. aureus* ATCC 25923 และ *C. albicans* ATCC 10231 สำหรับ 17-O-demethylgeldanamycin ไม่พบฤทธิ์ในต้านการเจริญของจุลินทรีย์ ทำการทดสอบด้วยวิธี Agar disc diffusion (Anansiriwattana et al. 2006) ซึ่งวิธี Agar disc diffusion และ Microdilution broth มีความแตกต่างกัน โดย Agar disc diffusion เป็นการตรวจกรองฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์เบื้องต้น ซึ่งบอกผลในเชิงคุณภาพว่าเชื้อมีความไวต่อการทดสอบหรือไม่ โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางจากบริเวณโซนใสของการยับยั้ง (clear zone inhibition) ซึ่งสารที่ใช้ทดสอบต้องมีความสามารถในการละลายน้ำ เนื่องจากมีการแพร่จาก disc สู่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ (Tenover, 2019) แตกต่างจาก Microdilution broth เป็นวิธีการหาความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum inhibition concentration; MIC) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เป็นการเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีสารทดสอบที่เจือจางในปริมาณต่าง ๆ ผสมอยู่ วิธีนี้สามารถบ่งบอกค่าความเข้มข้นของสารที่ยับยั้งและทำลายจุลินทรีย์ได้ (Marroki and Bousmaha-Marroki, 2021)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.5.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารบริสุทธิ์จากไอโซเลต CA3R110

นำสารบริสุทธิ์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH free radical scavenging จากการทดลองปรากฏว่าสาร A (geldanamycin) สามารถดักจับอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ( $IC_{50}$ ) ที่ระดับความเข้มข้น  $16.07 \pm 0.20$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสาร B (17-O-demethylgeldanamycin) สามารถดักจับอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น  $11.00 \pm 0.08$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการทดลองพบว่าสาร B สามารถดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีกว่าสาร A โดยสาร A กับ B มีความแตกต่างกันที่หมู่ฟังก์ชันที่เกาะอยู่บนคาร์บอนตำแหน่งที่ 17 โดยสาร A เป็นหมู่ methoxy ส่วนสาร B เป็น hydroxy และมีผู้รายงานว่า หมู่ hydroxy สามารถดักจับอนุมูลอิสระได้ดีกว่า (Farhoosh et al., 2016) จากรูปที่ 4.41 แสดงให้เห็นว่า ที่ความเข้มข้นในระดับเดียวกัน สารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก และ BHT สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสาร A และ สาร B ที่นำมาคำนวณค่าความเข้มข้นในการดักจับอนุมูลอิสระที่ 50 เปอร์เซ็นต์ ได้ดังแสดงในตาราง 4.37



รูปที่ 4.41 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารบริสุทธิ์ และสารละลายมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) กับเปอร์เซ็นต์ในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH

ตารางที่ 4.37 ค่าความเข้มข้นที่สามารถดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ( $IC_{50}$ )

สาร	$IC_{50}$ (µg/ml)
A	$16.07 \pm 0.20^a$
B	$11.00 \pm 0.08^b$
BHT	$2.34 \pm 0.04^c$
กรดแอสคอร์บิก	$0.89 \pm 0.09^d$

หมายเหตุ : ตัวอักษร a-d ที่แตกต่างกันแสดงถึงค่าเฉลี่ยของค่า  $IC_{50}$  ของสารที่นำมาทดสอบที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์) ด้วยวิธี Duncan's New multiple range test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาร A (Geldanamycin) และสาร B (17-O-demethylgeldanamycin) เป็นสารที่มีการรายงานการค้นพบแล้ว จากงานวิจัยอื่น ๆ พบว่า Geldanamycin ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อของ *S. hygroscopicus* var. *geldanus* เป็นสารต้านมะเร็ง และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ATPase ของฮีตช็อกโปรตีน 90 (heat shock protein 90; Hsp90) (Singh et al. 2010) อีกทั้งยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส (virus replication) และมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งโพรงจมูก และมะเร็งเต้านม (Jongrungruangchok et al. 2006) แต่มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ และมีความเป็นพิษต่อตับ ข้อจำกัดเหล่านี้จึงทำให้ Geldanamycin ถูกนำมาใช้ได้อย่างจำกัด จึงนิยมนำ Geldanamycin มาสังเคราะห์อนุพันธ์ต่าง ๆ เพื่อเพิ่มคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetic properties) ที่สามารถยับยั้ง Hsp90 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และมีความเป็นพิษต่ำ (Taechowisan et al., 2021) โดยทั่วไปมักดัดแปลงโครงสร้างของ Geldanamycin ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 17 เช่น 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG, tanespimycin) และ 17-Dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG, alvespimycin) เป็นต้น (Baksh et al. 2017)

จากงานวิจัยพบว่า *S. hygroscopicus* DEM20745<sup>T</sup> สามารถผลิตสาร 17-O-demethylgeldanamycin เป็นสารต้านมะเร็ง และเป็นสารตั้งต้นในชีวสังเคราะห์ของ Geldanamycin จึงเป็นที่สนใจในการพัฒนา Geldanamycin กิ่งสังเคราะห์ เช่น 17-arylgeldanamycin ใช้ 17-O-demethylgeldanamycin เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ผ่านกระบวนการ triflation/Suzuki coupling แต่มีข้อจำกัดเนื่องจาก 17-O-demethylgeldanamycin ไม่ได้เป็นสารที่จุลินทรีย์สามารถผลิตได้ในปริมาณมาก (Baksh et al. 2017)

## บทที่ 5

# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

### 5.1 สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากตัวอย่าง 2 ชนิด คือ รากของต้นกาแฟ *Coffea arabica* (L.) จากไร่กาแฟชูนันต์ จังหวัดราชบุรี หมู่บ้านแม่คำหล้า จังหวัดลำปาง และชุมชนกาแฟดงมะไฟ จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 3 ไอโซเลต อีกตัวอย่างคือ ดินจากป่าพรุลานควาย จังหวัดปัตตานี จำนวน 2 ไอโซเลต เพื่อยืนยันตำแหน่งอนุกรมวิธานในระดับสกุล และสปีชีส์โดยใช้ อนุกรมวิธานหลายส่วน ประกอบด้วย ลักษณะทางฟีโนไทป์ อนุกรมวิธานเคมี และลักษณะทางจีโนมไทป์

ไอโซเลต CA1R205 แยกได้จากรากของต้นกาแฟ *C. arabica* (L.) ไร่กาแฟชูนันต์ จังหวัดราชบุรี จากการศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานพบว่า ไอโซเลต CA1R205 สร้างเส้นใยอาหารสีน้ำตาลอ่อนจนถึงสีน้ำตาลดำ และสร้างเส้นใยอากาศและสปอร์สีขาวอมเทา สปอร์มีลักษณะผิวขรุขระเรียงต่อกันเป็นเกลียวบนเส้นใยอากาศ ผนังเซลล์ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมติกแบบ LL พบน้ำตาลกาแลคโตส กลูโคส แมนโนส และไรโบสภายในเซลล์ พบมีนาควิโนนชนิด MK-10(H<sub>4</sub>), MK-9(H<sub>6</sub>), MK-10(H<sub>2</sub>), MK-9(H<sub>4</sub>), MK-10(H<sub>6</sub>) และ MK-10(H<sub>8</sub>) มีกรดไขมันหลัก คือ iso-C<sub>15:0</sub>, anteiso-C<sub>15:0</sub>, iso-C<sub>16:0</sub> และ C<sub>16:0</sub> ชนิดของไขมันมีขั้วที่พบ คือ diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylethanolamine (PE), hydroxyphosphatidylethanolamine (OH-PE) และ phosphatidylinositol (PI) ไม่พบกรดมัคคอลลิก (mycolic acid) ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีเหล่านี้พบได้ทั่วไปในสกุล *Streptomyces* จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนช่วงยีน 16S rRNA มีความใกล้เคียงกับ *S. rapamycinicus* NRRL B-5491<sup>T</sup> ที่ 98.44 เปอร์เซ็นต์ การวิเคราะห์ค่า dDDH และ ANIb ได้ 27.2 และ 81.5 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณ G+C content 70.68 เปอร์เซ็นต์ จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ขั้วเคมี และจีโนมไทป์ ที่มีความแตกต่างจากสายพันธุ์ใกล้เคียง จึงสรุปได้ว่าไอโซเลต CA1R205 เป็นสมาชิกในสกุล *Streptomyces* สปีชีส์ใหม่ ถูกกำหนดชื่อเป็น *Streptomyces coffeae* CA1R205<sup>T</sup> sp. nov.

ไอโซเลต CA3R110 แยกได้จากรากของต้นกาแฟ *C. arabica* (L.) หมู่บ้านแม่คำหล้า จังหวัดลำปาง จากการศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานพบว่า ไอโซเลต CA3R110 สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอมเขียวอ่อนจนถึงเหลืองอมเขียวเข้ม และสร้างเส้นใยอากาศและสปอร์สีขาวอมเทา สปอร์มีลักษณะผิวขรุขระเรียงต่อกันเป็นเกลียวบนเส้นใยอากาศ ผนังเซลล์ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมติกแบบ LL พบน้ำตาลกาแลคโตส กลูโคส และไรโบส พบมีนาควิโนนชนิด MK-9(H<sub>2</sub>), MK-9(H<sub>4</sub>), MK-9(H<sub>6</sub>) และ MK-10(H<sub>2</sub>) มีกรดไขมันหลัก คือ iso-C<sub>15:0</sub>, iso-C<sub>16:0</sub> และ C<sub>16:0</sub> ชนิดของไขมันมีขั้วที่พบคือ diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylinositolmannoside (PIM), phosphatidylinositol (PI), hydroxyphosphatidylethanolamine (OH-PE) และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

phosphatidylethanolamine (PE) ไม่พบกรดมัคคอลลิก ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีเหล่านี้พบได้ทั่วไปในสกุล *Streptomyces* จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนช่วงยีน 16S rRNA มีความใกล้เคียงกับ *S. rapamycinicus* DSM 41530<sup>T</sup> และ *S. iranensis* DSM 41954<sup>T</sup> ที่เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 99.14 และ 99.02 ตามลำดับ การวิเคราะห์ค่า dDDH ได้ 55.6 และ 55.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ ANIb ได้ 92.2 และ 92.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีปริมาณ G+C content 70.93 เปอร์เซ็นต์ จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และจีโนมไทป์ ที่มีความแตกต่างจากสายพันธุ์ใกล้เคียง จึงสรุปได้ว่าไอโซเลต CA3R110 เป็นสมาชิกในสกุล *Streptomyces* สปีชีส์ใหม่ ถูกกำหนดชื่อเป็น *Streptomyces endocoffeicus* CA3R110<sup>T</sup> sp. nov.

ไอโซเลต CA2R105 แยกได้จากรากของต้นกาแฟ *C. arabica* (L.) ชุมชนกาแฟดงมะไฟ จังหวัดนครราชสีมา จากการศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานพบว่า ไอโซเลต CA2R105 สร้างเส้นใยอาหารสีส้ม พบเส้นใยมีลักษณะหดไปสามารถแตกหักกลายเป็นชิ้นส่วนรูปร่างแท่งได้ มีการสร้างเส้นใยอากาศสีส้มอ่อน ผนังเซลล์ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกแบบ *meso* พบน้ำตาลกาแลคโตส กลูโคส อะราบิโนส และไรโบสภายในเซลล์ พบมีนาควิโนนชนิด MK-8(H<sub>4</sub>, ω-cyclo) มีกรดไขมันหลัก คือ C<sub>16:0</sub>, C<sub>18:1</sub> ω9c, C<sub>18:0</sub> และ 10-methyl C<sub>18:0</sub> (TSBA) ชนิดของไขมันมีหัวที่พบ คือ diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylinositol (PI) และ phosphatidylinositolmannoside (PIM) และพบกรดมัคคอลลิก ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีเหล่านี้พบได้ทั่วไปในสกุล *Nocardia* จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนช่วงยีน 16S rRNA มีความใกล้เคียงกับ *N. jiangxiensis* NBRC 101359<sup>T</sup> และ *N. nova* DSM 44481<sup>T</sup> เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง เท่ากับ 99.17 และ 98.61 ตามลำดับ การวิเคราะห์ค่า dDDH ได้ 65.2 และ 22.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และค่า ANIb ได้ 93.7 และ 75.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีปริมาณ G+C content 66.95 เปอร์เซ็นต์ จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และจีโนมไทป์ ที่มีความแตกต่างจากสายพันธุ์ใกล้เคียง จึงสรุปได้ว่าไอโซเลต CA2R105 เป็นสมาชิกในสกุล *Nocardia* สปีชีส์ใหม่ ถูกกำหนดชื่อเป็น *Nocardia coffeae* CA2R105<sup>T</sup> sp. nov.

ไอโซเลต PLK6-54 แยกได้จากดินจากป่าพรุลานควาย จังหวัดปัตตานี จากการศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานพบว่า ไอโซเลต PLK6-54 สร้างเส้นใยอาหารสีน้ำตาลอ่อนจนถึงน้ำตาลเข้ม สามารถสร้างเส้นใยอากาศและสปอร์สีน้ำตาลอมเทา สปอร์มีลักษณะผิวเรียบเรียงต่อกันเป็นสายตรงปลายโค้งบนเส้นใยอากาศ ผนังเซลล์ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกแบบ *LL* พบน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส และไรโบส มีกรดไขมันหลัก คือ iso-C<sub>14:0</sub>, anteiso-C<sub>15:0</sub> และ iso-C<sub>16:0</sub> ชนิดของไขมันมีหัวที่พบคือ diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylglycerol (PG) และ phosphatidylinositolmannoside (PIM) พบมีนาควิโนนชนิด MK-9(H<sub>2</sub>), MK-9(H<sub>6</sub>), MK-9(H<sub>8</sub>) และ MK-10(H<sub>2</sub>) ไม่พบกรดมัคคอลลิก ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีเหล่านี้พบทั่วไปในสกุล *Streptomyces* จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนช่วงยีน 16S rRNA มีความใกล้เคียงกับ *S. rubidus* 13C15<sup>T</sup> และ *S. bryophytorum* NEAU-HZ10<sup>T</sup> ที่เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของนิวคลีโอ

ไทด์ เท่ากับ 99.01 และ 98.41 ตามลำดับ การวิเคราะห์ค่า dDDH ได้ 32.3 และ 24.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ ANIb ได้ 85.5 และ 79.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีปริมาณ G+C content 72.70 เปอร์เซ็นต์ จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และจีโนมไทป์ ที่มีความแตกต่างจากสายพันธุ์ใกล้เคียง จึงสรุปได้ว่าไอโซเลต PLK6-54 เป็นสมาชิกในสกุล *Streptomyces* สปีชีส์ใหม่

ไอโซเลต PLK6-60 แยกได้จากดินจากป่าพรุลานควาย จังหวัดปัตตานี จากการศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานพบว่า ไอโซเลต PLK6-60 สร้างเส้นใยอาหารสีส้ม ไม่พบการสร้างเส้นใยอากาศ พบสปอร์เดี่ยวรูปร่างกลมรีผิวเรียบบริเวณปลายของสปอร์โรฟอร์บนเส้นใยอาหารโดยตรง ผนังเซลล์ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิคแบบ *meso* พบน้ำตาลกลูโคส แมนโนส ซิโลส และไรโบสภายในเซลล์ พบมีนาควิโนนชนิด MK-9(H<sub>4</sub>), MK-9(H<sub>6</sub>), MK-9(H<sub>8</sub>), MK-10(H<sub>4</sub>), MK-10(H<sub>6</sub>) และ MK-10(H<sub>8</sub>) มีกรดไขมันหลัก คือ anteiso-C<sub>15:0</sub>, iso-C<sub>16:0</sub>, C<sub>16:0</sub> และ anteiso-C<sub>17:0</sub> ชนิดของไขมันมีไขมันที่พบ คือ phosphatidylglycerol (PG), diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylethanolamine (PE), และ phosphatidylinositolmannoside (PIM) ไม่พบกรดมัคคอลลิก ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีเหล่านี้พบได้ทั่วไปในสกุล *Micromonospora* จากการศึกษาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนช่วงยีน 16S rRNA มีความใกล้เคียง *M. aurantiaca* ATCC 27029<sup>T</sup> และ *M. siamensis* DSM 45097<sup>T</sup> มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 สายพันธุ์เท่ากันที่ 99.14 เปอร์เซ็นต์ การวิเคราะห์ค่า dDDH ได้ 27.4 และ 32.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ ANIb ได้ 82.9 และ 86.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีปริมาณ G+C content 73.49 เปอร์เซ็นต์ จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และจีโนมไทป์ ที่มีความแตกต่างจากสายพันธุ์ใกล้เคียง จึงสรุปได้ว่าไอโซเลต PLK6-60 เป็นสมาชิกในสกุล *Micromonospora* สปีชีส์ใหม่

ทำการคัดเลือกแอสโคตินมัยสียเพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบโดยศึกษาฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ทดสอบ และองค์ประกอบทางเคมี พบว่าไอโซเลต CA1R205 สามารถต้านจุลินทรีย์ทดสอบ *S. aureus* ATCC 25923 และ *M. luteus* ATCC 9341 ไอโซเลต CA3R110 สามารถต้านจุลินทรีย์ทดสอบ *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341, MRSA DMST 20654 และ VRE (clinical strain) แต่ทั้ง 2 ไอโซเลต ไม่สามารถต้านการเจริญของ *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *C. albicans* ATCC นอกจากนี้ทั้ง 2 ไอโซเลต มีองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบที่สกัดจากเอทิลอะซิเตทที่น่าสนใจในแง่ของพืชปรกฏ แต่ไอโซเลต CA3R110 สามารถต้านการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้หลายชนิด จึงถูกเลือกเพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมี วิเคราะห์โครงสร้าง และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์

สารสกัดหยาบที่สกัดจากเอทิลอะซิเตทของไอโซเลต CA3R110 ถูกนำมาแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี และทำให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง HPLC ได้สารบริสุทธิ์ทั้งหมด 6 สาร คือ สาร A-สาร F และหาโครงสร้างทางเคมีของสารเหล่านี้ด้วยเทคนิคทาง NMR spectroscopy ในขณะนี้สามารถหาโครงสร้างทางเคมีได้ 2 สาร คือ สาร A และ สาร B ซึ่งเป็นสารที่มีการรายงานว่ามีผู้ค้นพบแล้ว สาร A คือ geldanamycin และสาร B คือ 17-O-demethylgeldanamycin และจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ การใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้เผยแพร่ขอสงวนสิทธิ์  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทำนายกลุ่มยีนบนจีโนมไอโซเลต CA3R110 ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิด้วยฐานข้อมูล anti-SMASH พบกลุ่มยีนที่มีความคล้ายคลึงในการสร้าง geldanamycin ที่ 69 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์โดยหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถต้านการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ (MIC) ด้วยวิธี Microdilution broth พบว่าสารบริสุทธิ์ทั้ง 2 ชนิด ไม่สามารถต้านการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้ ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากสารบริสุทธิ์ละลายได้ไม่หมดในสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 เปอร์เซ็นต์ และศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH radical scavenging พบว่า 17-O-demethylgeldanamycin (สาร B,  $IC_{50} = 11.00 \pm 0.08^b$ ) สามารถดักจับอนุมูลอิสระได้ดีกว่า geldanamycin (สาร A,  $IC_{50} = 16.07 \pm 0.20^a$ ) สารทั้ง 2 ชนิดแตกต่างกันที่หมู่ฟังก์ชันที่เกาะอยู่บนคาร์บอนตำแหน่งที่ 17 โดยสาร Geldanamycin เป็นหมู่ methoxy ส่วนสาร 17-O-demethylgeldanamycin เป็นหมู่ hydroxy ทำให้คุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพแตกต่างกัน อีกทั้งตำแหน่งนี้ถูกใช้ในการดัดแปลงโครงสร้างของ geldanamycin เพื่อสังเคราะห์สารอนุพันธ์ที่มีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีขึ้น

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ในการศึกษาสารสกัดหยาบที่สกัดจากเอทิลอะซิเตทไอโซเลต CA1R205 มีองค์ประกอบทางเคมีที่น่าสนใจเช่นเดียวกับ CA3R110 ดังนั้นจึงควรนำไปศึกษาองค์ประกอบทางเคมี วิเคราะห์โครงสร้างเพื่อนำสารบริสุทธิ์มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

5.2.2 ในการศึกษาจากการแยกสารสกัดหยาบของ CA3R110 และทำให้บริสุทธิ์ ทำให้ได้สารบริสุทธิ์ทั้งหมด 6 สาร ซึ่งทำการยืนยันโครงสร้างแล้ว 2 สาร อีก 4 สาร อาจจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ จึงควรทำการยืนยันโครงสร้าง และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

5.2.3 สารบริสุทธิ์ที่แยกได้ทั้ง 2 สาร ได้แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จึงควรศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการนำสารไปประยุกต์ใช้ในอนาคต

## เอกสารอ้างอิง

กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ, มาริสา รักสุขสมบัติ และสุภาภรณ์ ขานโบ. 2558. เทคโนโลยีการวิเคราะห์ลำดับเบสยุงที่สองและสาม. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. (23)4: 633-650.

จินต์ ทองสม, ภัทรพร คุ่มภัย และธีระชัย ธนานันต์. 2558. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA*. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. (23)6: 994-1005.

จิตติ ท่าไว. 2557. “เทคนิคการแยกและคัดเลือกรหัสดีเอ็นเอ” แอคติโนแบคทีเรีย I, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

จินตนา อิงคินันท์. 2550. เอกสารประกอบคำสอนวิชาการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน.

ชุตินา ลีมีทวาทร์ดี. 2547. การค้นพบยาจากการสลายตัวของสาร. *ไทยโภชนาการนิพนธ์*. 1:113-122.

ชูชาติ อารีจิตรานุสรณ์. 2544. โครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง. *เครื่องมือวิทยาศาสตร์*. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ชมภูษ วิรุฒานนท์ และ วรวิทย์ จุฬาลักษณ์านุกุล. 2553. ชีวสารสนเทศ: การประยุกต์ใช้ในงานวิจัยวิทยาศาสตร์ชีวภาพ. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*. 15(2): 99-106.

ณลักขณา คิตเหมาะ, พยุง มีสัง และสุนันทา สดสี. 2558. การสำรวจงานวิจัยด้านชีวสารสนเทศและการประยุกต์ใช้. *วารสารแม่ใจเทคโนโลยีสารสนเทศและนวัตกรรม*. 1(2): 16-31.

ธวัชชัย ศรีวิบูลย์. 2551. ลิกวิดโครมาโทกราฟี. [Online]. เข้าถึงได้จาก: <http://old-book.ru.ac.th/e-book/c/CM334/CM334-4.pdf>.

นันทวัน เนียมหอม. 2555. ฤทธิ์ทางชีวภาพและอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากจากป่าพรุเขตอบอุ่นในประเทศไทย. *วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ*. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ศิรินิตย์ ธารธาดา และ ปฐมพร อำนานอนันต์. 2561. เทคโนโลยี Fourier Transform Infrared Spectroscopy: ทฤษฎีและการประยุกต์ใช้. *วารสารวิทยาศาสตร์สุขภาพสัตว์และเทคโนโลยี*. 2(1): 29-33.

สมชาย แสงอำนาจเดช. 2013. ขั้นตอนง่าย ๆ ในการสร้างไฟโลจีเนติกทรี. *Naresuan University Journal: Science and Technology (NUJST)* (2):181-188.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุคนทิพย์ เศวตนลินทล. 2562. อนุกรมวานของครัสตาเซียนขนาดเล็กน้ำจืด. มหาวิทยาลัย  
มหาสารคาม.

อลิษา วิลันโท, อรุณช ประดิษฐ์ทรัพย์, วรณวิสาข์ เจริญฉิม, ศกศักดิ์ กุลวงศ์อนันชัย, อนันต์ชัย อัคร  
เมฆิน และศิษเกศ ทองสีมา. 2555. เทคโนโลยีเอนจีเอสและการประยุกต์ในงานวิจัยโอมิกส์.  
*Thai J. Genet.* 5(2): 104-129.

อรุณรัตน์ สันฐิติกวินสกุล. 2563. สเปกโทรสโกปีสำหรับเคมีอินทรีย์. นครปฐม: มหาวิทยาลัยราชภัฏ  
นครปฐม.

อารีรัตน์ หนูนวล. 2560. *Fundamentals of Human Genetics and Genomics* 2560 [Online].  
เข้าถึงได้จาก:[https://meded.psu.ac.th/binlaApp/class02/B2\\_364\\_221/Molecular\\_](https://meded.psu.ac.th/binlaApp/class02/B2_364_221/Molecular_genetic_part3/index.html)  
[genetic\\_part3/index.html](https://meded.psu.ac.th/binlaApp/class02/B2_364_221/Molecular_genetic_part3/index.html).

Agarwal, A., and Mathur, N. (2016). THERMOPHILIC ACTINOMYCETES ARE POTENTIAL  
SOURCE OF NOVEL BIOACTIVE COMPOUNDS: A REVIEW. *Eur J Pharm Med Res*,  
3(2), 130-138.

Auch, A. F., von Jan, M., Klenk, H. P., and Goker, M. (2010). Digital DNA-DNA hybridization  
for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence  
comparison. *Stand Genomic Sci*, 2(1), 117-134.

Baba, M. S., Zin, N. M., Hassan, Z. A. A., Latip, J., Pethick, F., Hunter, I. S., Edrada-Ebel,  
R., and Herron, P. R. (2015). In vivo antimalarial activity of the endophytic  
actinobacteria, *Streptomyces* SUK 10. *J. Microbiol.*, 53(12), 847-855.

Baksh, A., Kepplinger, B., Isah, H. A., Probert, M. R., Clegg, W., Wills, C., Goodfellow, M.,  
Errington, J., Allenby, N., and Hall, M. J. (2017). Production of 17-O-demethyl-geldanamycin,  
a cytotoxic ansamycin polyketide, by *Streptomyces hygroscopicus* DEM20745. *Nat Prod*  
*Res*, 31(16), 1895-1900.

Booth, C. (1971). *Methods in microbiology*: Academic Press.

Bora, N., Dodd, C., and Desmaures, N. (2015). *Diversity, dynamics and functional role*  
*of Actinomycetes on European smear ripened cheeses*: Springer.

Chandra, G., and Chater, K. F. (2014). Developmental biology of *Streptomyces* from the  
perspective of 100 actinobacterial genome sequences. *FEMS Microbiol Rev*,  
38(3), 345-379.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Chen, G. T., Ma, X. M., Liu, S. T., Liao, Y. L., and Zhao, G. Q. (2012). Isolation, purification and antioxidant activities of polysaccharides from *Grifola frondosa*. *Carbohydr Polym*, 89(1), 61-66.
- Chuang, L., Pinjiao, J., Chongxi, L., Zhaoxu, M., Junwei, Z., Jiansong, L., Xiangjing, W., and Wensheng, X. (2016). *Streptomyces bryophytorum* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from moss (Bryophyta). *Antonie Van Leeuwenhoek*, 109(9), 1209-1215.
- Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahal, D. R., da Costa, M. S., Rooney, A. P., Yi, H., Xu, X. W., De Meyer, S., and Trujillo, M. E. (2018). Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol*, 68(1), 461-466.
- Connell, N. D. (2001). Expression systems for use in actinomycetes and related organisms. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 12(5), 446-449.
- Cui, Q., Wang, L., Huang, Y., Liu, Z., and Goodfellow, M. (2005). *Nocardia jiangxiensis* sp. nov. and *Nocardia miyunensis* sp. nov., isolated from acidic soils. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55(5), 1921-1925.
- Da Costa, M. S., Albuquerque, L., Nobre, M. F., and Wait, R. (2011). The identification of fatty acids in bacteria. *Methods Microbiol.*, 38, 183-196.
- DENKO, S. (2005). Introduction to HPLC. Retrieved from <https://www.shodex.com/en/kouza/a.html>
- El-Sabbagh, S. M., Mohamed, T., and Areeg, I. (2012). Characterization and Identification of some Actinomycetes producing protease enzyme in the aquatic habitat. *Egypt J Exp Biol*, 8(2), 161-173.
- Farhoosh, R., Johnny, S., Asnaashari, M., Molaahmadibahraseman, N., and Sharif, A. (2016). Structure-antioxidant activity relationships of o-hydroxyl, o-methoxy, and alkyl ester derivatives of p-hydroxybenzoic acid. *Food Chem.*, 194, 128-134.
- Figueras, M. J., Beaz-Hidalgo, R., Hossain, M. J., and Liles, M. R. (2014). Taxonomic affiliation of new genomes should be verified using average nucleotide identity and multilocus phylogenetic analysis. *Genome Announc*, 2(6).

- Fu, G., Wang, R., Ding, J., Qi, H., Zhao, Z., Chen, C., Zhang, H., Xue, Z., Wang, J., and Wu, M. (2020). *Micromonospora zhangzhouensis* sp. nov., a Novel Actinobacterium Isolated from Mangrove Soil, Exerts a Cytotoxic Activity in vitro. *Sci Rep*, 10(1), 3889.
- Fukuyo, Y., Hunt, C. R., and Horikoshi, N. (2010). Geldanamycin and its anti-cancer activities. *Cancer Lett.*, 290(1), 24-35.
- Gao, B., and Gupta, R. S. (2012). Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum Actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 76(1), 66-112.
- Georg, L. K., Robertstad, G. W., and Brinkman, S. A. (1964). Identification of species of Actinomycetes. *J. Bacteriol. Res.*, 88(2), 477-490.
- Gong, B., Chen, S., Lan, W., Huang, Y., and Zhu, X. (2018). Antibacterial and antitumor potential of actinomycetes isolated from mangrove soil in the Maowei Sea of the southern coast of China. *Iran. J. Pharm. Sci.*, 17(4), 1339.
- Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.-J., Trujillo, M. E., Suzuki, K.-i., Ludwig, W., and Whitman, W. B. (2012). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Five The Actinobacteria, Part A*: Springer.
- Goudjal, Y., Toumatia, O., Yekkour, A., Sabaou, N., Mathieu, F., and Zitouni, A. (2014). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara. *Microbiol. Res.*, 169(1), 59-65.
- Hakovirta, J. R., Prezioso, S., Hodge, D., Pillai, S. P., and Weigel, L. M. (2016). Identification and analysis of informative single nucleotide polymorphisms in 16S rRNA gene sequences of the *Bacillus cereus* group. *J. Clin. Microbiol.*, 54(11), 2749-2756.
- Hamedi, J., Mohammadipanah, F., Klenk, H.-P., Pötter, G., Schumann, P., Spröer, C., Von Jan, M., and Kroppenstedt, R. M. (2010). *Streptomyces iranensis* sp. nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60(7), 1504-1509.
- Hasegawa, S., Meguro, A., Shimizu, M., Nishimura, T., and Kunoh, H. (2006). Endophytic Actinomycetes and Their Interactions with Host Plants. *Actinomycetologica*, 20(2), 72-81.

- Hassan, S. E.-D., Salem, S. S., Fouda, A., Awad, M. A., El-Gamal, M. S., and Abdo, A. M. (2018). New approach for antimicrobial activity and bio-control of various pathogens by biosynthesized copper nanoparticles using endophytic actinomycetes. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.*, 11(3), 262-270.
- Hiraishi, A. (1989). Isoprenoid Quinone profiles for identifying and Classifying Microorganisms in the Environment. In T. Hattori, Y. Ishida, Y. Maruyama, R. Y. Morita, & A. Uchida (Eds.), *Recent Advances in Microbial Ecology*. Tokyo, Japan.
- Hong, K., Gao, A.-H., Xie, Q.-Y., Gao, H. G., Zhuang, L., Lin, H.-P., Yu, H.-P., Li, J., Yao, X.-S., and Goodfellow, M. (2009). Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. *Mar. Drugs*, 7(1), 24-44.
- Imada, C., Masuda, S., Kobayashi, T., Hamada-Sato, N., and Nakashima, T. (2010). Isolation and characterization of marine and terrestrial actinomycetes using a medium supplemented with NaCl. *Actinomycetologica*, 24(1), 12-17.
- Janda, J. M., and Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.*, 45(9), 2761-2764.
- Jongrungruangchok, S., Tanasupawat, S., Kitakoop, P., Bavovada, R., Kobayashi, H., and Kudo, T. (2006). Identification of *Streptomyces* and *Kitasatospora* strains from Thai soils with geldanamycin production strain. *Actinomycetologica*, 20(1), 10-14.
- Kageyama, A., Torikoe, K., Iwamoto, M., Masuyama, J.-I., Shibuya, Y., Okazaki, H., Yazawa, K., Minota, S., Kroppenstedt, R. M., and Mikami, Y. (2004). *Nocardia arthritidis* sp. nov., a new pathogen isolated from a patient with rheumatoid arthritis in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, 42(6), 2366-2371.
- Kayansamruaj, P., Dong, H. T., Hirono, I., Kondo, H., Senapin, S., and Rodkhum, C. (2017). Comparative genome analysis of fish pathogen *Flavobacterium columnare* reveals extensive sequence diversity within the species. *Infect. Genet. Evol.*, 54, 7-17.
- Ketchum, R. N., Smith, E. G., Vaughan, G. O., Phippen, B. L., McParland, D., Al-Mansoori, N., Carrier, T. J., Burt, J. A., and Reitzel, A. M. (2018). DNA Extraction Method Plays a Significant Role When Defining Bacterial Community Composition in the Marine Invertebrate *Echinometra mathaei*. *Front. Mar. Sci.*, 5(255).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อเผยแพร่ให้ผู้อื่นโดยไม่ได้รับอนุญาตเป็นการผิดกฎหมาย

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Kim, M., Oh, H.-S., 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. *Int. J. Syst. Evol.*, 64(2), 346-351.
- Koeth, L. M., DiFranco-Fisher, J. M., and McCurdy, S. (2015). A Reference Broth Microdilution Method for Dalbavancin In Vitro Susceptibility Testing of Bacteria that Grow Aerobically. *J Vis Exp* (103).
- Komagata, K., and Suzuki, K.-I. (1988). 4 Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematics. *Methods Microbiol.*, 19, 161-207.
- Kumar, Y., and Goodfellow, M. (2008). Five new members of the *Streptomyces violaceusniger* 16S rRNA gene clade: *Streptomyces castelarensis* sp. nov., comb. nov., *Streptomyces himastatinicus* sp. nov., *Streptomyces mordarskii* sp. nov., *Streptomyces rapamycinicus* sp. nov. and *Streptomyces ruanii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58(6), 1369-1378.
- Lebeaux, D., Bergeron, E., Berthet, J., Djadi-Prat, J., Mouniee, D., Boiron, P., Lortholary, O., and Rodriguez-Nava, V. (2019). Antibiotic susceptibility testing and species identification of *Nocardia* isolates: a retrospective analysis of data from a French expert laboratory, 2010-2015. *Clin Microbiol Infect*, 25(4), 489-495.
- Lechevalier, M. P., and Lechevalier, H. (1970). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int. J. Syst. Evol.*, 20(4), 435-443.
- Lewin, G. R., Carlos, C., Chevrette, M. G., Horn, H. A., McDonald, B. R., Stankey, R. J., Fox, B. G., and Currie, C. R. (2016). Evolution and Ecology of Actinobacteria and Their Bioenergy Applications. *Annu. Rev. Microbiol.*, 70(1), 235-254.
- Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., and Jiang, C. (2016a). Cultural, physiological, and biochemical identification of actinobacteria. *Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications*, 88-111.
- Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., and Jiang, C. (2016b). Morphological identification of actinobacteria. *Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications. Rijeka, Croatia: InTech*, 59-86.

- Marroki, A., and Bousmaha-Marroki, L. (2021). Antibiotic Resistance Diagnostic Methods for Pathogenic Bacteria *Reference Module in Biomedical Sciences*: Elsevier.
- McGroty, S. E., Pattaniyil, D. T., Patin, D., Blanot, D., Ravichandran, A. C., Suzuki, H., Dobson, R. C., Savka, M. A., and Hudson, A. O. (2013). Biochemical characterization of UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate: meso-2,6-diaminopimelate ligase (MurE) from *Verrucomicrobium spinosum* DSM 4136(T). *PLoS One*, 8(6), 66458.
- Medema, M. H., Blin, K., Cimermancic, P., de Jager, V., Zakrzewski, P., Fischbach, M. A., Weber, T., Takano, E., and Breitling, R. (2011). antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res*, 39, 339-346.
- Meier-Kolthoff, J. P., and Göker, M. (2019). TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nat. Commun.*, 1-10.
- Meng, S., Wu, H., Wang, L., Zhang, B., and Bai, L. (2017). Enhancement of antibiotic productions by engineered nitrate utilization in actinomycetes. *Appl. Microbiol*, 101(13), 5341-5352.
- Mohammadipanah, F., and Momenilandi, M. (2018). Potential of rare actinomycetes in the production of metabolites against multiple oxidant agents. *Pharm Biol*, 56(1), 51-59.
- Ōmura, S., Nakagawa, A., and Sadakane, N. (1979). Structure of herbimycin A new ansamycin antibiotic. *Tetrahedron Letters*, 20(44), 4323-4326.
- Posa, M. R. C., Wijedasa, L. S., and Corlett, R. T. (2011). Biodiversity and conservation of tropical peat swamp forests. *BioScience*, 61(1), 49-57.
- Pradhan, S., Mishra, B., B, and Rout, S. (2015). Screening of Novel Actinomycetes from Near Lake Shore Sediment of the Chilika Lake, Odisha, India. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 4(8), 66-82.
- Raja, A., and Prabakarana, P. (2011). Actinomycetes and Drug-An Overview. *Am. J. Drug Discov. Dev.*, 1(2), 75-84.

- Ranjan, R., and Jadeja, V. (2017). Isolation, characterization and chromatography based purification of antibacterial compound isolated from rare endophytic actinomycetes *Micrococcus yunnanensis*. *J. Pharm. Anal.*, 7(5), 343-347.
- Rinehart, K. L., Jr., and Shield, L. S. (1976). Chemistry of the ansamycin antibiotics. *Fortschr Chem Org Naturst*, 33, 231-307.
- Roopashree, K., and Naik, D. (2019). Advanced method of secondary metabolite extraction and quality analysis. *J. pharmacogn. phytochem.*, 8(3), 1829-1842.
- Rossi-Tamisier, M., Benamar, S., Raoult, D., and Fournier, P. E. (2015). Cautionary tale of using 16S rRNA gene sequence similarity values in identification of human-associated bacterial species. *Int J Syst Evol Microbiol*, 65(Pt 6), 1929-1934.
- Sa, P. H. C. G. d., Guimaraes, L. C., Gracas, D. A. d., Veras, A. A. d. O., Barh, D., Azevedo, V., Silva, A. L. d. C. d., and Ramos, a. R. T. J. (2018). Next-Generation Sequencing and Data Analysis: Strategies, Tools, Pipelines and Protocols. In D. Barh & V. Azevedo (Eds.), *Omics Technologies and Bio-engineering: Towards Improving Quality of Life*, 1, 191-207.
- Sathya, A., Vijayabharathi, R., and Gopalakrishnan, S. (2017). Plant growth-promoting actinobacteria: a new strategy for enhancing sustainable production and protection of grain legumes. *3 Biotech*, 7(2), 1-10.
- Savjani, K. T., Gajjar, A. K., and Savjani, J. K. (2012). Drug solubility: importance and enhancement techniques. *International Scholarly Research Notices*, 2012.
- Sengupta, S., Pramanik, A., Ghosh, A., and Bhattacharyya, M. (2015). Antimicrobial activities of actinomycetes isolated from unexplored regions of Sundarbans mangrove ecosystem. *BMC microbiology*, 15(1), 1-16.
- Sharma, B. R., Kumar, V., Gat, Y., Kumar, N., Parashar, A., and Pinakin, D. J. (2018). Microbial maceration: a sustainable approach for phytochemical extraction. *3 Biotech* 8(9), 401-413.
- Sharma, D., Kaur, T., Chadha, B., and Manhas, R. K. (2011). Antimicrobial activity of actinomycetes against multidrug resistant *Staphylococcus aureus*, *E. coli* and various other pathogens. *Trop. J. Pharm. Res.*, 10(6), 801-808.

- Shirling, E. T., and Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Evol Microbiol*, 16(3), 313-340.
- Shivlata, L., and Tulasi, S. (2015). Thermophilic and alkaliphilic Actinobacteria: biology and potential applications. *Front. Microbiol.*, 6, 1014.
- Singh, and Dubey, A. K. (2018). Diversity and Applications of Endophytic Actinobacteria of Plants in Special and Other Ecological Niches. *Front. Microbiol.*, 9, 1767.
- Singh, H., Naik, B., Kumar, V., and Bisht, G. S. (2018). Screening of endophytic actinomycetes for their herbicidal activity. *Ann. Agrar. Sci.*, 16(2), 101-107.
- Soderlund, C., Nelson, W., Shoemaker, A., and Paterson, A. (2006). SyMAP: A system for discovering and viewing syntenic regions of FPC maps. *Genome Res*, 16(9), 1159-1168.
- Stamford, T., Stamford, N., Coelho, L., and Araujo, J. (2002). Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp. endophyte of maize leaves. *Bioresour. Technol.*, 83(2), 105-109.
- Stothard, P., and Wishart, D. S. (2005). Circular genome visualization and exploration using CGView. *Bioinformatics*, 21(4), 537-539.
- Tadtong, S., Meksuriyen, D., Tanasupawat, S., Isobe, M., and Suwanborirux, K. (2007). Geldanamycin derivatives and neuroprotective effect on cultured P19-derived neurons. *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 17(10), 2939-2943.
- Taechowisan, T., Samsawat, T., Jaramornburapong, C., Phutdhawong, W., and Phutdhawong, W. S. (2021). Evaluating the effect of dopamine-geldanamycin hybrids on anticancer activity. *J App Pharm Sci*, 11(07), 117-126.
- Tenover, F. C. (2019). Antimicrobial Susceptibility Testing. In T. M. Schmidt (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology*, Oxford: Academic Press.
- Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K., and Kudo, T. (2004). *Micromonospora aurantionigra* sp. nov., Isolated from a Peat Swamp Forest in Thailand. *Actinomycetologica*, 18, 8-14.
- Tirta Kumala, D., Dwi, A., and Sarjiya, A. (2017). Secondary Metabolites Production by Actinomycetes and their Antifungal Activity. *KnE Life Sciences*, 3(4), 256-264.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Tiwari, K. B., and Shrestha, U. T. (2003). Nitrogen Assimilation in Actinomycetes. *Nepalese Journal of Microbiology*, 2(1), 61-65.
- Valencia, C., Valencia, C. H., Zuluaga, F., Valencia, M. E., Mina, J. H., and Grande-Tovar, C. D. (2018). Synthesis and application of scaffolds of chitosan-graphene oxide by the freeze-drying method for tissue regeneration. *Molecules*, 23(10), 2651.
- Vollmer, W., Blanot, D., and de Pedro, M. A. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev*, 32(2), 149-167.
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P., and Truper, H. G. (1987). Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *Int J Syst Evol Microbiol*, 37(4), 463-464.
- Xu, C., Wang, L., Cui, Q., Huang, Y., Liu, Z., Zheng, G., and Goodfellow, M. (2006). Neutrotolerant acidophilic *Streptomyces* species isolated from acidic soils in China: *Streptomyces guanduensis* sp. nov., *Streptomyces paucisporeus* sp. nov., *Streptomyces rubidus* sp. nov. and *Streptomyces yanglinensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56(5), 1109-1115.
- Yu, Z., Han, C., Yu, B., Zhao, J., Yan, Y., Huang, S., Liu, C., and Xiang, W. (2020). Taxonomic Characterization, and Secondary Metabolite Analysis of *Streptomyces triticiradicis* sp. nov.: A Novel Actinomycete with Antifungal Activity. *Microorganisms*, 8(1), 77.
- Zhang, L., Zhang, J., Ren, B., Lu, W., Hou, C., Wang, J., Ma, X., Ma, R., Liu, M., Liu, Z., Li, J., Ding, K., Dai, H., Zhang, L., and Liu, X. (2020). Characterization of anti-BCG benz[±]anthraquinones and new siderophores from a Xinjiang deser” isolated rare actinomycete *Nocardia* sp. XJ31. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1 - 12.
- Zhang, Q.-W., Lin, L.-G., and Ye, W.-C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chin. Med.*, 13(1), 1-26.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ

### Soil extract agar (สูตรดัดแปลง)

CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.5	กรัม
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.25	กรัม
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05	กรัม
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.03	กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.02	กรัม
NaHCO <sub>3</sub>	0.1	กรัม
Trace element mix 1	0.3	มิลลิลิตร
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.02	กรัม
Yeast extract	0.1	กรัม
Casamino acids	0.1	กรัม
Glucose	0.2	กรัม
Soil extract	100.0	มิลลิลิตร
Agar	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร
pH 7.0		

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

#### - Trace element mix 1

CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	4.0	กรัม
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.0	กรัม
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O	0.1	กรัม
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5.0	กรัม
KI	0.05	กรัม
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.5	กรัม
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.2	กรัม
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	2.0	กรัม
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.05	กรัม
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 95-97% p.a.	1.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**- Soil extract**

Humic soil	1.0	กิโลกรัม
------------	-----	----------

น้ำกลั่น	1.0	ลิตร
----------	-----	------

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที  
กรองและนำส่วนใสมาทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**Yeast extract-malt extract agar (ISP2)**

Yeast extract	4.0	กรัม
---------------	-----	------

Glucose	4.0	กรัม
---------	-----	------

Malt Extract	10.0	กรัม
--------------	------	------

Agar	18.0	กรัม
------	------	------

pH 7.3

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**Oatmeal agar (ISP3)**

Oatmeal	20.0	กรัม
---------	------	------

trace salts solution	1.0	มิลลิลิตร
----------------------	-----	-----------

Agar	20.0	กรัม
------	------	------

น้ำกลั่น	1.0	ลิตร
----------	-----	------

pH 7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**Inorganic salts-starch agar (ISP4)**

Soluble starch	10.0	กรัม
----------------	------	------

$K_2HPO_4$ (anhydrous)	1.0	กรัม
------------------------	-----	------

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.0	กรัม
----------------------	-----	------

NaCl	1.0	กรัม
------	-----	------

$(NH_4)_2SO_4$	2.0	กรัม
----------------	-----	------

$CaCO_3$	2.0	กรัม
----------	-----	------

trace salts solution	1.0	มิลลิลิตร
----------------------	-----	-----------

Agar	20.0	กรัม
------	------	------

น้ำกลั่น	1.0	ลิตร
----------	-----	------

pH 7.0 - 7.4

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Glycerol - asparagine agar (ISP5)**

L-asparagine (anhydrous)	1.0	กรัม
Glycerol	10.0	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhydrous)	1.0	กรัม
trace salts solution	1.0	มิลลิลิตร
Agar	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร
pH 7.0 - 7.4		

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**Peptone - yeast extract iron agar (ISP6)**

Peptone iron agar	36.0	กรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร
pH 7.0 - 7.2		

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**Tyrosine agar (ISP7)**

Glycerol	15.0	กรัม
L-tyrosine	0.5	กรัม
L-asparagine	1.0	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhydrous)	0.5	กรัม
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01	กรัม
trace salts solution	1.0	มิลลิลิตร
Agar	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร
pH 7.2 - 7.4		

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**- trace salts solution**

FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1	กรัม
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.1	กรัม
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## Carbon utilization medium (ISP9)

- Carbon source

Carbohydrate	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร

- Pridham and Gottlieb trace salts

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.64	กรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.11	กรัม
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.79	กรัม
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.15	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

- Basal mineral salts agar

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.64	กรัม
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ · anhydrous	2.38	กรัม
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	5.65	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0	กรัม
Pridham and Gottlieb trace salts	1.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	900	มิลลิลิตร
Agar	15.0	กรัม

pH 6.8 - 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที  
หลังนึ่งฆ่าเชื้อแล้วนำ carbon sources มาผสมกับ Basal mineral salts agar

## Glucose asparagines agar

Glucose	10.0	กรัม
Asparagine	0.5	กรัม
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.5	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 6.8 - 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**Czapek's sucrose agar**

Sucrose	30.0	กรัม
NaNO <sub>3</sub>	2.0	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0	กรัม
MgSO <sub>4</sub>	0.5	กรัม
KCl	0.5	กรัม
FeSO <sub>4</sub>	0.01	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.3

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**Nutrient agar**

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 6.8

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**Nitrogen utilization medium****- Nitrogen source**

Nitrogen	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร

**- Basal medium agar**

Glucose	10.0	กรัม
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0	กรัม
Agar	12.0	กรัม
น้ำกลั่น	900.0	มิลลิลิตร

pH 7.0 - 7.4

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้ท่านไปเผยแพร่ขึ้นต้นการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังนึ่งฆ่าเชื้อแล้วนำ Nitrogen sources มาผสมกับ Basal medium agar

### Coagulation test medium

Skim milk	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

### Peptonization test medium

#### - Solution A

Skim milk	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	50.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

#### - Solution B

Agar	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	50.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว รอให้สารละลายเย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส นำ solution A ผสมกับ solution B

### Boullion gelatin broth

Peptone	1.0	กรัม
Meat extract	0.5	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
Gelatin	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

pH 7.0 - 7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### Peptone KNO<sub>3</sub> broth

Peptone	1.0	กรัม
KNO <sub>3</sub>	0.1	กรัม
Nacl	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

pH 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Urea broth****- Basal medium broth**

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	10.0	กรัม
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	9.5	กรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
Red phenol red solution เข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์	20.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	900.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**- Urea solution**

ยูเรีย	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อโดยการกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร

หลังจากนั้นรอให้ Basal medium broth เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส นำผสมกับ urea solution

**Basal inorganic nitrogen medium**

Carbohydrate	10.0	กรัม
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	1.0	กรัม
KCl	0.2	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร
pH 7.0		
0.04% Bromocresol-purple	15.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

**Unsoluble compound**

Yeast extract	0.4	กรัม
Malt extract	1	กรัม
Glucose	0.4	กรัม
Agar	1.8	กรัม
น้ำกลั่น	90	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

Unsoluble compounds	0.5	กรัม
---------------------	-----	------

น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร
----------	----	-----------

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่ขึ้นต้นในการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที หลังจากฆ่าเชื้อแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงที่ 50 องศาเซลเซียส ผสมกันแล้วนำไปเทลงในจานเพาะเชื้อ

#### triple sugar iron agar (TSI agar)

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	20.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Sucrose	10.0	กรัม
Dextrose monohydrate	1.0	กรัม
Ferrous sulphate	0.2	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Sodium thiosulphate	0.3	กรัม
Phenol red	0.024	กรัม
Agar	12.0	กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที

#### Sabouraud dextrose agar

Special peptone	10.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร
pH 5.6		

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

#### Mueller Hinton Agar

Beef extract	2.0	กรัม
Acid hydrolysate of casein	17.5	กรัม
Starch	1.5	กรัม
Agar	17.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร
pH 7.3		

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### Potato dextrose agar

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	17	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

## สารเคมี

## 6 N HCl

Conc. HCl	50	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร
เติม Conc. HCl ลงในน้ำกลั่นผสมให้เข้ากัน		

## Ninhydrin เข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์

Ninhydrin	0.4	กรัม
n-butanol saturated with water	100	มิลลิลิตร

## aniline phthalate

aniline	0.93	กรัม
o-phthalic	1.66	กรัม
n-butanol saturated with water	100	มิลลิลิตร

## Polar lipids reagent

anisaldehyde reagent

acetic acid	1.0	มิลลิลิตร
p-anisaldehyde	5.0	มิลลิลิตร
Conc. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5.0	มิลลิลิตร
Ethanol	90.0	มิลลิลิตร

dragendroff's reagent- Solution A

Basic bismuth nitrate	1.7	กรัม
acetic acid	20.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	80.0	มิลลิลิตร

- Solution B

KI 40.0	กรัม	
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

นำ Solution A และ B อย่างละ 10 มิลลิลิตร ผสมกับ acetic acid 10 มิลลิลิตร

**phosphomolybdic acid reagent**

phosphomolybdic acid	5.0	กรัม
absolute ethanol	100.0	มิลลิลิตร

**Fatty acid reagent****saponification reagent**

NaOH	15.0	กรัม
Methanol (HPLC)	50.0	มิลลิลิตร
Milli Q water	50.0	มิลลิลิตร

ละลาย NaOH ใน Milli Q water และเติม Methanol

**methylation reagent**

6 N HCl	65.0	มิลลิลิตร
Methanol (HPLC)	55.0	มิลลิลิตร
pH ต่ำกว่า 1.5		

**extraction solvent**

n-hexane (HPLC)	50.0	มิลลิลิตร
methyl-tert-butyl ether (HPLC)	50.0	มิลลิลิตร

**base wash**

NaOH	1.2	กรัม
Milli Q water	100.0	มิลลิลิตร

**Nitrate reduction test reagent****sulfanilic acid เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์**

sulfanilic acid	0.8	กรัม
acetic acid	100.0	มิลลิลิตร

**สารละลาย N,N-dimethyl-1-naphthylamine**

N,N-dimethyl-1-naphthylamine	5.0	กรัม
Conc. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

เติม Conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ลงในน้ำกลั่นผสมให้เข้ากัน และเติมไดเมทิลอะมีน**สารละลาย Kovács เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์**

tetramethyl- p-phenylenediamine dihydrochloride	1.0	กรัม
น้ำเกลือปราศจากเชื้อ	100.0	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

### TE buffer

10 mM Tris-HCl (pH 8)	10	มิลลิลิตร
1 mM Na <sub>2</sub> -EDTA (pH 8)	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	980	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA (S-EDTA) pH 8.0

EDTA	33.83	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลาย EDTA 33.83 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เท่ากับ 8.0 ด้วย NaOH pellets ปรับ ปริมาตรสารละลายให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### 1 M Tris-Cl pH 8.0

Tris-base	121.1	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ผสม Tris-base กับน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เท่ากับ 8.0 ด้วย HCl และปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

### 0.15 M NaCl

NaCl	8.766	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

### 5 M NaCl

NaCl	292.2	กรัม
Milli Q water	1	ลิตร

### 1 M Tris-HCl pH 8.0

Tris	12.11	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลาย Tris 12.11 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH ด้วย conc. HCl ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### Sodium dodecyl sulphate (SDS) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

sodium dodecyl sulphate	10	กรัม
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	100	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**CTAB/NaCl**

CTAB	10	กรัม
NaCl	4.1	กรัม
Milli Q water		

ละลาย NaCl 4.1 กรัม ใน Milli Q water 80 มิลลิลิตร เติม CTAB 10 กรัม ทำการกวนและให้ความร้อน 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ปรับปริมาตร ให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วย Milli Q water และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**phenol: chloroform (1:1 v/v)**

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

**1X Saline sodium citrate (SSC)**

NaCl	8.765	กรัม
Tris-sodium citrate.2H <sub>2</sub> O	4.41	กรัม
น้ำกลั่น		

ชั่ง NaCl และ Tris-sodium citrate.2H<sub>2</sub>O ผสมในน้ำกลั่น ปรับ pH ด้วย 10 M NaOH ให้เท่ากับ 7.2 และปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**Lysozyme เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร**

Lysozyme	500	มิลลิกรัม
1 M Tris-Cl pH 8.0	10	มิลลิลิตร

**proteinase K เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร**

proteinase K	100	มิลลิกรัม
50 mM Tris-HCl	10	มิลลิลิตร

pH 7.5

**RNase A ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร**

RNase A	100	มิลลิกรัม
0.15 M NaCl	10	มิลลิลิตร

**agarose gel 0.8 เปอร์เซ็นต์ (ย้อมด้วย gel stain)**

Agarose	0.2	กรัม
1X TBE หรือ TAE buffer	25	มิลลิลิตร
SYBR® safe DNA gel stain	1	ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**0.2 mM 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl**

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

0.0019 กรัม

Methanol

25 มิลลิลิตร

ซึ่งสาร 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl 0.0019 กรัม ละลายใน methanol นำไป sonicate เป็นเวลา 15-30 นาที ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ตารางที่ 1 ลักษณะทางฟิสิกส์ของไอโซเลตต่าง ๆ และสายพันธุ์ใกล้เคียง (ต่อ)

ลักษณะทางฟิสิกส์	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
ความสามารถในการเจริญบนแหล่งคาร์บอน:													
ดี-เซลโลไบโอส	w	+	w	nd	+	+	+	+	+	nd	-	+	+
ดี-ราฟไฟโนส	w	-	w	+	-	-	nd	-	-	-	-	+	+
ไซลิทอล	+	+	w	nd	+	-	nd	-	-	nd	-	nd	nd
ดี-แลคโตส	+	+	+	nd	+	+	nd	+	+	+	+	+	+
ไมโอ-อินนิซิทอล	+	+	+	nd	-	-	nd	+	+	nd	-	nd	nd
ดี-เมลิไบโอส	+	+	-	+	+	+	nd	+	+	nd	-	+	+
ดี-ซูโครส	-	-	-	nd	-	-	w	+	-	+	-	nd	nd
อินนูลิน	w	-	w	nd	+	+	nd	+	-	nd	-	nd	nd
ดี-โรโบส	-	-	-	nd	+	+	nd	-	-	+	-	+	-
เดกซ์แทรน	+	+	w	nd	-	-	nd	-	-	nd	-	nd	nd
ดี-กาแลคโตส	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
แอล-อะราบิโนส	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+
ดี-ไซโลส	+	-	-	+	+	+	w	+	+	+	-	+	+
ทรีฮาโลส	+	+	+	nd	+	+	nd	+	-	nd	-	w	nd
แอล-แรมโนส	w	+	w	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+
ดี-แมนนิทอล	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
ดี-แมนโนส	-	+	+	+	-	+	nd	+	+	-	-	nd	nd
ดี-เมลิไซโตส	-	-	+	nd	-	-	nd	+	+	nd	-	nd	nd
ดี-ฟรุคโตส	w	+	w	nd	+	+	-	+	+	+	-	+	+

ตารางที่ 1 ลักษณะทางฟิสิกส์ของไอโซเลตต่าง ๆ และสายพันธุ์ใกล้เคียง (ต่อ)

ลักษณะทางฟิสิกส์	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<b>การเจริญในแหล่งไนโตรเจน:</b>													
2-อะมิโนบิวเทน	-	-	-	nd	+	-	nd	-	-	nd	-	nd	nd
แอล-อาร์จินีน	-	-	w	+	+	+	nd	-	+	+	+	nd	nd
แอสพาราจिन	w	+	+	nd	+	+	nd	+	+	+	-	nd	nd
แอล-ซิสเทอีน	-	-	-	nd	+	+	nd	-	-	nd	-	nd	nd
แอล-ฮิสทีดีน	w	w	w	-	+	+	nd	-	-	nd	-	nd	nd
4-ไฮดรอกซีไพโรลีน	w	+	-	+	+	+	nd	+	+	nd	-	nd	nd
แอล-เมไทโอนีน	+	+	+	nd	+	+	nd	+	+	nd	+	nd	nd
แอล-ฟีนิลอะลานีน	w	w	+	nd	+	+	nd	+	-	nd	+	nd	nd
แอล-โพรลีน	-	+	+	+	+	+	nd	+	+	+	-	nd	nd
แอล-เซอริน	-	-	-	nd	+	+	nd	+	+	+	+	nd	nd
แอล-ทรีโอนีน	w	w	w	nd	+	+	nd	+	+	+	+	nd	nd
แอล-วาเลอีน	-	-	w	+	+	+	nd	+	-	nd	-	nd	nd
<b>การสร้างกรดในแหล่งคาร์บอน:</b>													
ดี-กลูโคส	+	+	+	nd	+	+	nd	+	+	nd	-	nd	nd
อะโดนิทอล	+	+	+	nd	-	+	nd	+	-	nd	nd	nd	nd
ดี-เซลโลไบโอส	+	+	+	nd	-	-	nd	+	-	nd	+	nd	nd
ดี-ราฟฟิโนส	+	+	+	nd	-	-	nd	+	+	nd	-	nd	nd
ไซลิทอล	+	-	-	nd	-	+	nd	+	-	nd	-	nd	nd
ดี-แลคโตส	+	-	+	nd	-	-	nd	-	-	nd	+	nd	nd

ตารางที่ 1 ลักษณะทางฟิสิกส์ของไอโซเลตต่าง ๆ และสายพันธุ์ใกล้เคียง (ต่อ)

ลักษณะทางฟิสิกส์	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
การสร้างกรดในแหล่งคาร์บอน:													
ดี-ซาลิซิน	+	-	-	nd	-	-	nd	+	-	nd	nd	nd	nd
ไมโอ-อินนิซิทอล	+	+	+	nd	-	-	nd	+	-	nd	-	nd	nd
ดี-เมลิไบโอส	+	+	+	nd	+	+	nd	+	+	nd	-	nd	nd
ดี-ซูโครส	+	+	+	nd	+	+	nd	+	+	nd	-	nd	nd
อินนูลิน	+	+	-	nd	+	+	nd	+	+	nd	+	nd	nd
ดี-โรโบส	+	+	+	nd	+	+	nd	+	+	nd	-	nd	nd
เดกซ์แทรน	+	+	+	nd	+	+	nd	+	-	nd	-	nd	nd
ดี-กาแลคโตส	+	+	+	nd	+	+	nd	+	+	nd	+	nd	nd
แอล-อะราบิโนส	+	+	+	nd	+	+	nd	+	+	nd	+	nd	nd
ดี-ไซโลส	+	+	+	nd	+	+	nd	+	+	nd	+	nd	nd
ทรีฮาโลส	+	+	+	nd	+	+	nd	+	+	nd	-	nd	nd
แอล-แรมโนส	+	+	+	nd	+	+	nd	+	+	nd	-	nd	nd
ดี-แมนนิทอล	+	+	+	nd	+	+	nd	+	+	nd	-	nd	nd
ดี-แมนโนส	+	+	+	nd	-	-	nd	+	+	nd	+	nd	nd
ดี-เมลิไซโตส	+	+	-	nd	+	-	nd	+	-	nd	+	nd	nd
กลีเซอรอล	+	+	+	nd	+	+	nd	+	+	nd	-	nd	nd
ดี-ฟรุคโตส	+	+	+	nd	+	+	nd	+	+	nd	+	nd	nd
การย่อยสารประกอบไม่ละลายน้ำ:													
อะดีนีน	+	+	+	-	-	-	-	-	-	nd	-	-	-

ตารางที่ 1 ลักษณะทางฟีโนไทป์ของไอโซเลตต่าง ๆ และสายพันธุ์ใกล้เคียง (ต่อ)

ลักษณะทางฟีโนไทป์	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
การย่อยสารประกอบไม่ละลายน้ำ:													
เซลลูโลส	-	-	-	nd	-	-	nd	-	-	-	-	nd	nd
ไฮโปแซนทีน	-	+	-	nd	w	+	-	-	+	nd	-	-	-
แซนทีน	-	-	-	nd	-	-	-	-	-	nd	-	-	-
ไทโรซีน	-	+	w	+	-	-	-	-	-	-	-	-	nd

หมายเหตุ: 1. ไอโซเลต CA1R205 2. ไอโซเลต CA3R110 3. *S. rapamycinicus* DSM 41530<sup>T</sup> 4. *S. iranensis* DSM 41954<sup>T</sup> (Hamedi et al., 2010) 5. ไอโซเลต CA2R105 6. *N. jiangxiensis* NBRC 101359<sup>T</sup> 7. *N. nova* DSM 44481<sup>T</sup> (Kageyama et al., 2004) 8. ไอโซเลต PLK6-54 9. *S. rubidus* NBRC 102073<sup>T</sup> 10. *S. bryophytorum* NEAU-HZ10<sup>T</sup> (Chuang et al., 2016) 11. ไอโซเลต PLK6-60 12. *M. aurantiaca* TT1-11<sup>T</sup> (Thawai et al., 2004) 13. *M. siamensis* TT2-4<sup>T</sup> (Thawai et al., 2005)

ตารางที่ 2 กิจกรรมของเอนไซม์ของไอโซเลตต่าง ๆ ด้วยชุดทดสอบ API ZYM

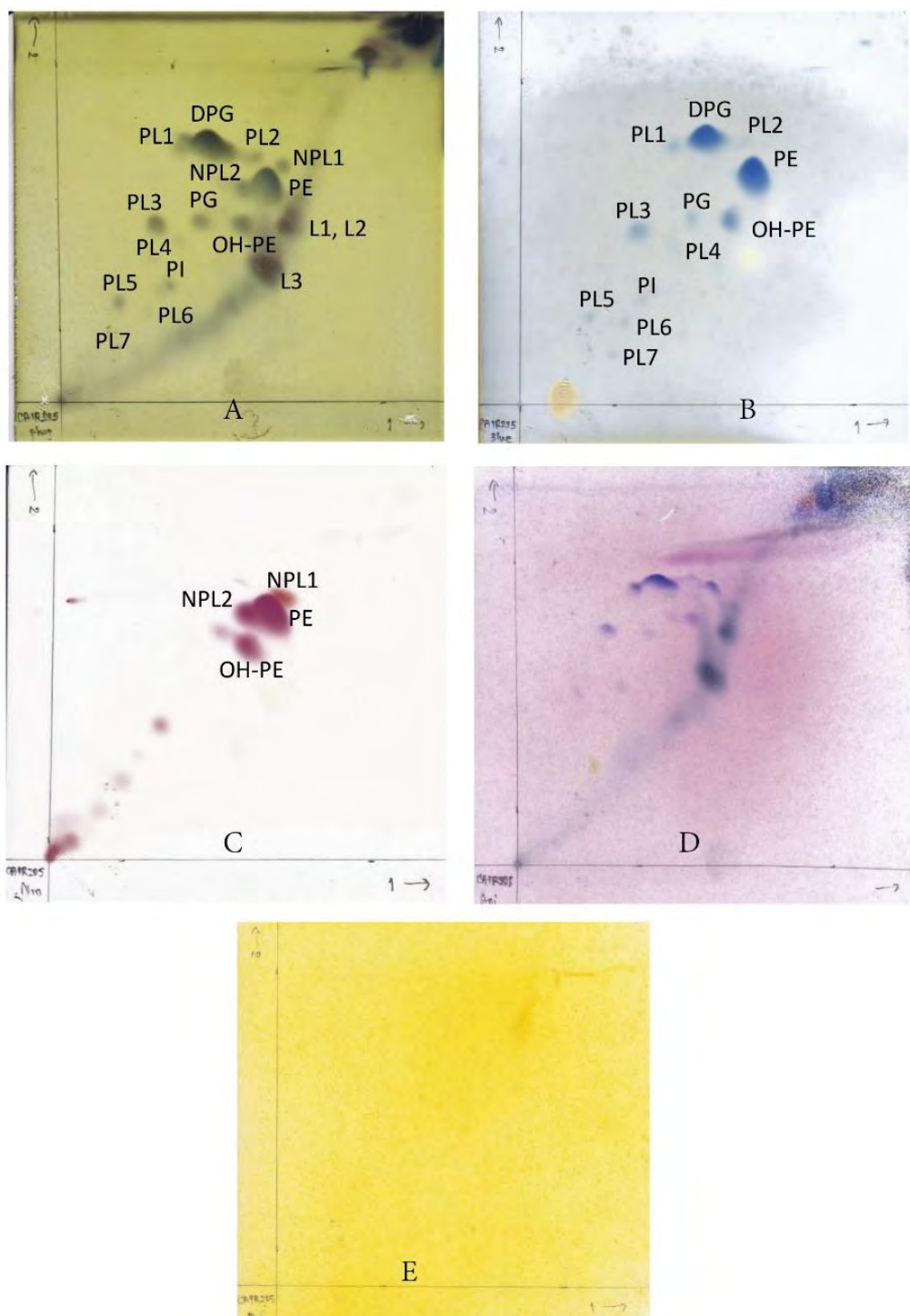
เอนไซม์	1	2	3	4	5	6	7	8	9
alkaline phosphatase	+	+	+	w	w	w	+	+	-
Esterase (C 4)	w	w	w	w	w	+	w	w	w
Esterase Lipase (C 8)	-	-	-	w	w	+	w	w	w
Lipase (C 14)	-	-	-	-	-	w	-	-	-
Leucine arylamidase	+	+	+	+	+	+	+	+	w
Valine arylamidase	w	w	w	w	w	w	w	w	-
Cystine arylamidase	w	w	w	w	w	w	w	-	-
Trypsin	w	w	w	w	w	-	-	-	w
Chymotrypsin	+	+	+	w	w	w	w	-	-
acid phosphatase	+	+	+	+	+	+	+	+	w
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	+	+	+	+	+	w	+	+	w
$\alpha$ -galactosidase	-	-	w	-	-	-	+	+	-
$\beta$ -galactosidase	-	w	-	+	w	+	+	+	-
$\beta$ -glucuronidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -glucosidase	-	+	w	+	+	+	w	-	+
$\beta$ -glucosidase	-	w	-	+	+	+	+	+	w
N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase	-	+	+	-	-	-	+	+	-
$\alpha$ -mannosidase	-	w	-	w	w	-	+	-	-
$\alpha$ -fucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: 1. CA1R205 2. CA3R110 3. *S. rapamycinicus* DSM 41530<sup>T</sup> 4. CA2R105 5. *N. jiangxiensis* NBRC 101359<sup>T</sup> 6. *N. rayongensis* RY45-3<sup>T</sup> (Tanasupawat et al. 2016) 7. PLK6-54 8. *S. rubidus* NBRC 102073<sup>T</sup> 9. PLK6-60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

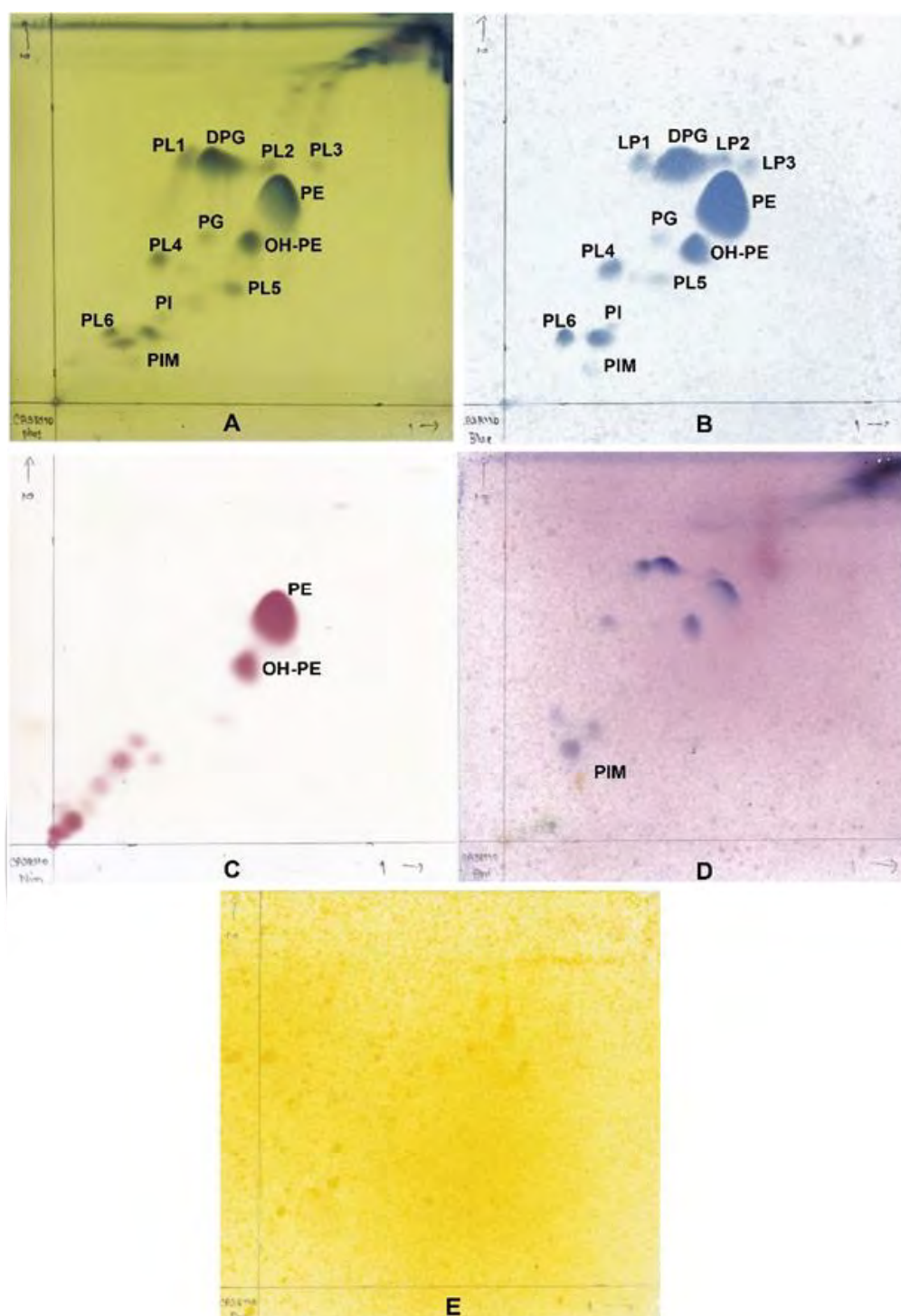
## ภาคผนวก ง

### ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี



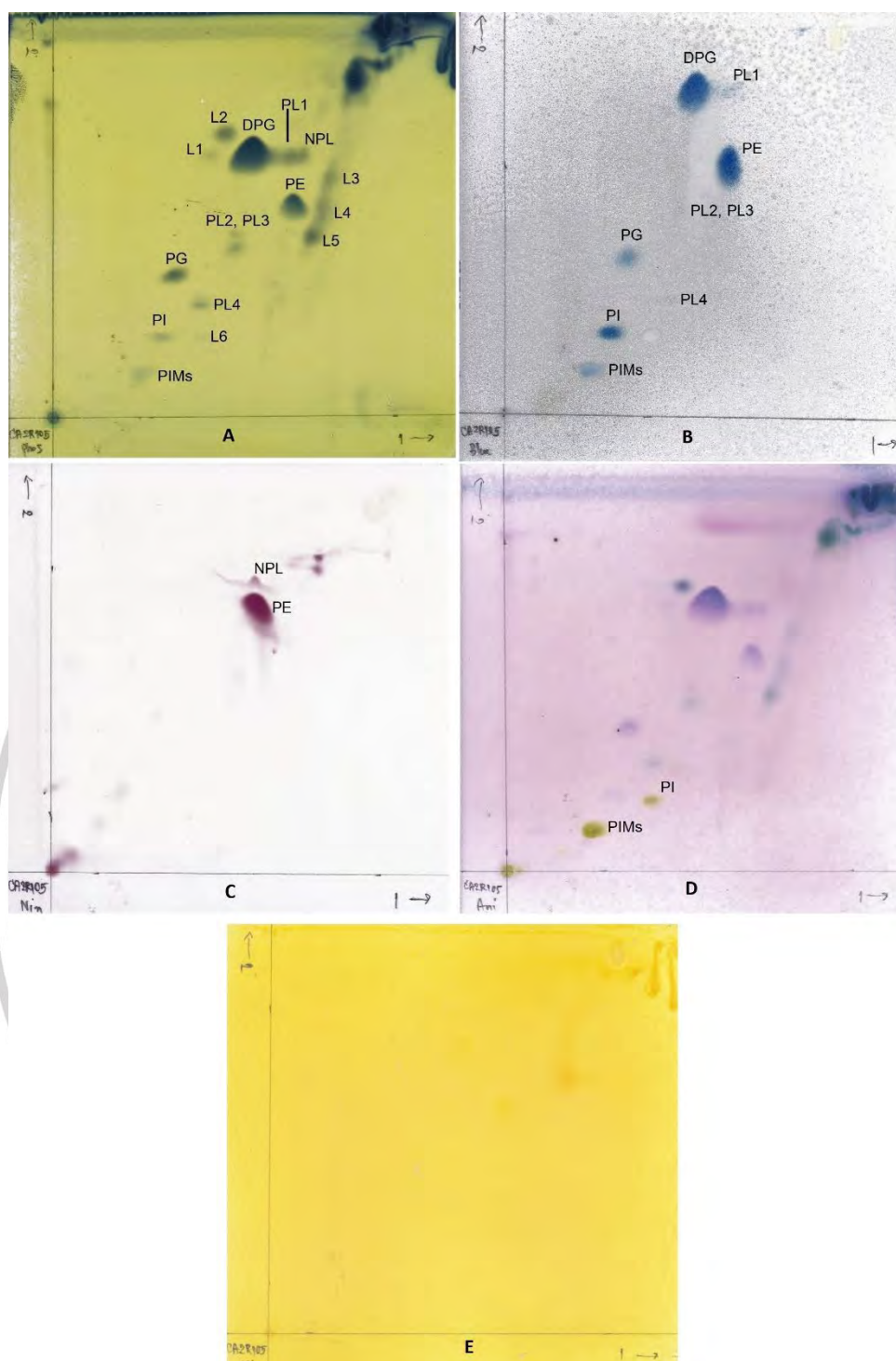
รูปที่ 1 ชนิดของไขมันมีขี้ที่พบในไอโซเลต CA1R205

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



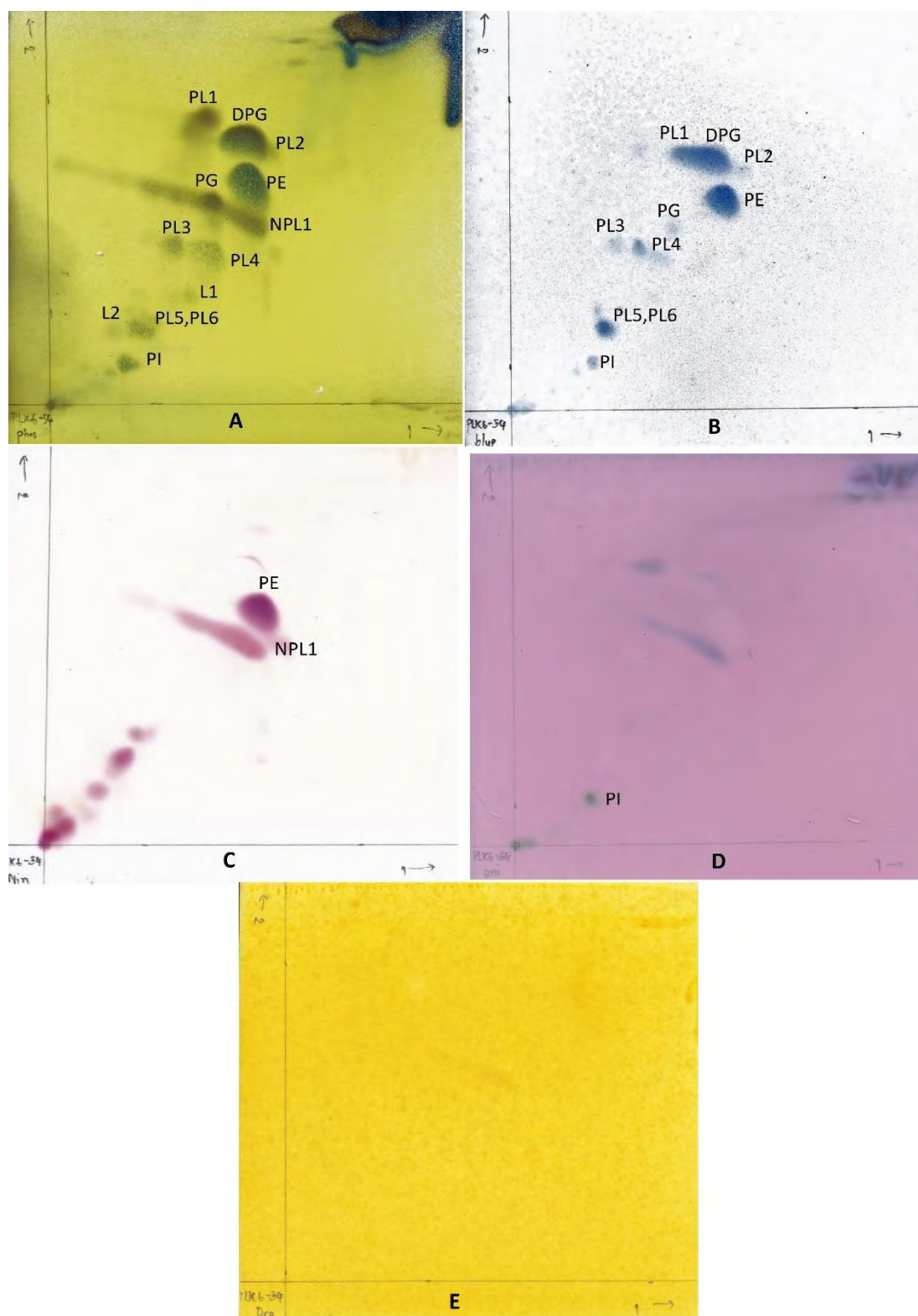
รูปที่ 2 ชนิดของไขมันมีขี้ที่พบในไอโซเลต CA3R110

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



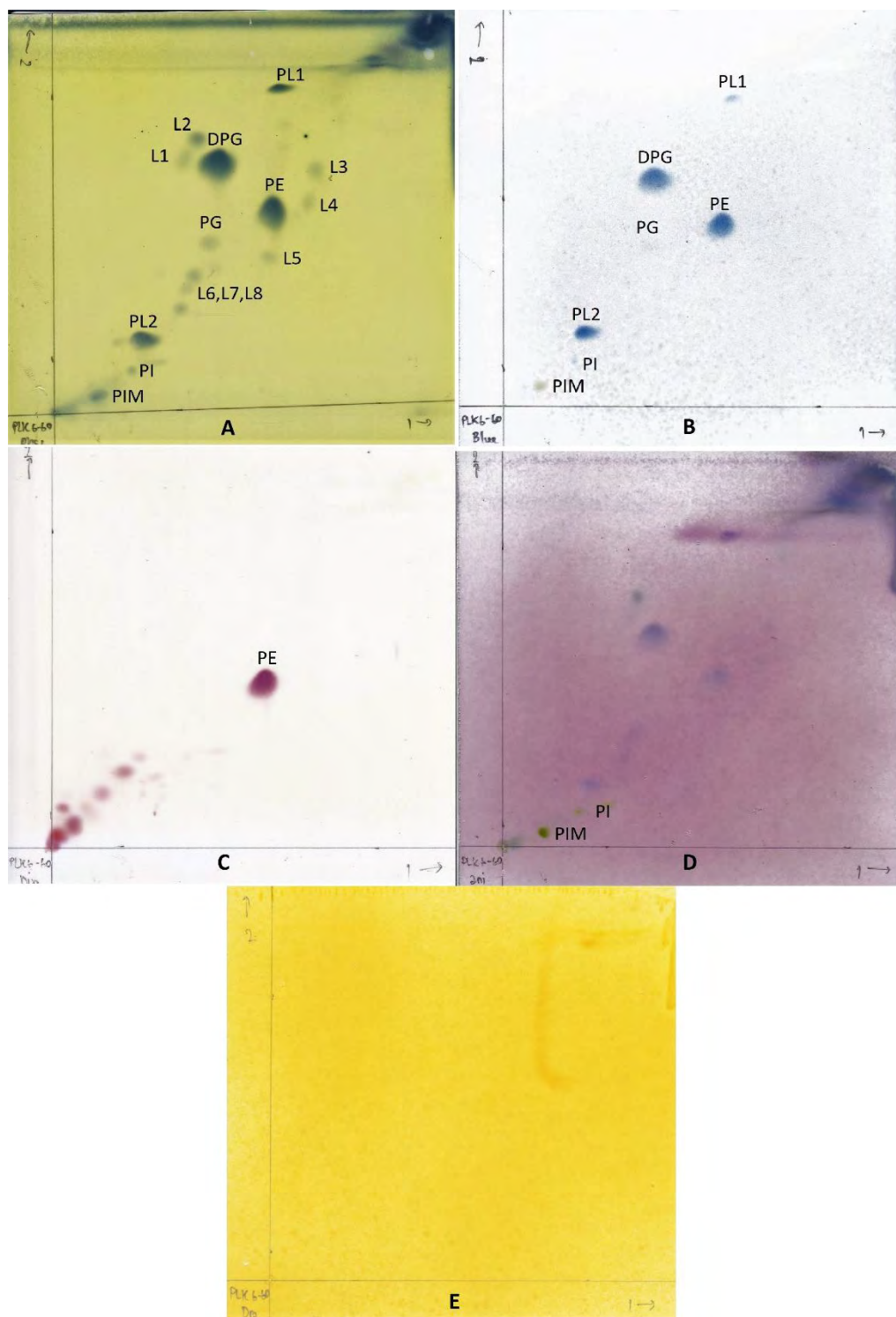
รูปที่ 3 ชนิดของไขมันมีขี้ที่พบในไฮโซเลต CA2R105

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4 ชนิดของไขมันมีขี้ที่พบในไอโซเลต PLK6-54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 5 ชนิดของไขมันมีขั้วที่พบในไอโซเลต PLK6-60

หมายเหตุ: (A) silica TLC ที่สเปรย์ Phosphomolybdic acid (B) silica TLC ที่สเปรย์ Dittmer & Lester (C) silica TLC ที่สเปรย์ Ninhydrin (D) silica TLC ที่สเปรย์ Anisaldehyde (E) silica TLC ที่สเปรย์ Dragendrof

ตัวย่อ : diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylethanolamine (PE), hydroxyphosphatidylethanolamine (OH-PE), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylinositol (PI),

unidentified phospholipids (PL), ninhydrin-positive lipids (NPL) และ unidentified lipids (L)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ สงวนลิขสิทธิ์ หรือเป็นการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่  
 ใม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก จ

### ลักษณะทางจีโนมไทป์

Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity
Region 2.1	T1PKS	3	21,626	nigericin	Polyketide:Modular type I 61%
Region 2.2	T1PKS	497,163	539,637	naphthomycin A	Polyketide 31%
Region 3.1	terpene	490,082	509,847	geosmin	Terpene 100%
Region 4.1	terpene	412,404	433,537	pristinol	Terpene 100%
Region 5.1	ectoine	415,726	426,130	ectoine	Other 100%
Region 6.1	melanin	56,077	66,526	melanin	Other 28%
Region 6.2	RiPP-like	85,281	95,496		
Region 6.3	T1PKS	112,382	175,522	conglobatin	NRP 31%
Region 6.4	T1PKS	189,326	236,769	borrelidin	Polyketide 8%
Region 6.5	T1PKS	426,547	458,480	nigericin	Polyketide:Modular type I 61%
Region 7.1	T1PKS	2	44,094	oligomycin	Polyketide 22%
Region 7.2	terpene	92,021	113,913	borrelidin	Polyketide 5%
Region 7.3	T1PKS	199,996	246,314	quartromicin A1	Polyketide 11%
Region 7.4	NRPS	343,755	400,988	SW-163C / UK-63598 / SW-163E / SW-163F / SW-163G	NRP 71%
Region 7.5	T1PKS	404,508	450,287	kendomycin	Polyketide:Modular type I 25%
Region 8.1	NRPS	414,054	443,073	salinamide A / salinamide B / salinamide C / salinamide D / salinamide E / salinamide F / desmethylsalinamide C / desmethylsalinamide E	NRP:Cyclic depsipeptide + Polyketide:Modular type I 50%
Region 9.1	NRPS	562	43,168		
Region 9.2	NRPS	110,309	161,739	rimosamide	NRP 21%
Region 9.3	T1PKS , NRPS	225,935	310,916	neoantimycin	NRP 100%
Region 10.1	butyrolactone	233,091	244,023		
Region 11.1	siderophore	7,532	19,319	desferrioxamin B	Other 100%
Region 11.2	T1PKS	249,122	278,261	salinomycin	Polyketide:Modular type I 10%
Region 12.1	T1PKS , NRPS	3	49,062	netropsin	NRP 86%
Region 12.2	NRPS , ectoine	114,891	163,863	kosinostatins	NRP + Polyketide 11%
Region 12.3	T1PKS , hglE-KS	173,791	229,793	sanglifehrin A	NRP + Polyketide 11%
Region 14.1	NRPS	86,515	130,591	ochronotic pigment	Other 75%
Region 14.2	ladderane , arylpolyene	173,066	207,682	atratumycin	NRP 34%
Region 15.1	siderophore	114,598	128,379		
Region 16.1	RiPP-like	130,854	142,167		
Region 17.1	NRPS	1	27,831	A54145	NRP 3%
Region 18.1	T1PKS	1	24,318	cyphomycin	Polyketide 16%
Region 18.2	linaridin	31,469	52,023	a201a	Other:Nucleoside 5%
Region 19.1	siderophore	53,104	64,933	ficellomycin	NRP 3%
Region 20.1	NRPS , transAT-PKS , T1PKS	12,194	145,041	coelibactin	NRP 100%
Region 21.1	NRPS	31,289	109,949	pyoverdins	NRP 1%
Region 22.1	T2PKS	73,873	146,379	spore pigment	Polyketide 75%
Region 23.1	T1PKS	1	43,516	neocarzilins A / neocarzilins B	Polyketide 78%
Region 23.2	terpene	118,604	137,202	hopene	Terpene 61%
Region 24.1	RiPP-like	39,423	51,342		
Region 24.2	lanthipeptide-class-iv , terpene	84,481	124,213	2-methylisoborneol	Terpene 100%
Region 25.1	T1PKS , RiPP-like	48,325	94,720	salinomycin	Polyketide:Modular type I 6%

รูปที่ 6 การทำนายกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิโดย antismash ของไอโซเลต  
 เอกสาร CA1R205 ที่ส่งมอบไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Region 27.1	indole ☑	84,994	106,151	5-isoprenylindole-3-carboxylate β-D-glycosyl ester ☑	Other	61%
Region 29.1	T1PKS ☑	1	47,342	pladienolide B ☑	Polyketide	50%
Region 30.1	other ☑	65,585	97,451	A-503083 A / A-503083 B / A- 503083 E / A-503083 F ☑	NRP	7%
Region 32.1	terpene ☑	31,139	52,047	kanamycin ☑	Saccharide	1%
Region 33.1	lanthipeptide- class-i ☑	19,991	44,069			
Region 35.1	T1PKS ☑	43,367	90,334	piericidin A1 ☑	Polyketide:Modular type I	33%
Region 38.1	hglE-KS ☑	13,813	65,679	nataxazole ☑	Polyketide	22%
Region 39.1	T1PKS ☑ , NRPS ☑	1	59,555	nystatin-like Pseudonocardia polyene ☑	Polyketide	39%
Region 44.1	T1PKS ☑	1	38,487	stambomycin A / stambomycin B / stambomycin C / stambomycin D ☑	Polyketide:Modular type I + Saccharide:Hybrid/tailoring	36%
Region 46.1	T1PKS ☑ , RiPP-like ☑	17,042	46,572	X-14547 ☑	Polyketide	52%
Region 47.1	T1PKS ☑	1	40,246	primycin ☑	Polyketide	18%
Region 49.1	T1PKS ☑	7,944	37,051	lavendiol ☑	Polyketide	6%
Region 52.1	T1PKS ☑	1	34,513	nigericin ☑	Polyketide:Modular type I	88%
Region 54.1	T1PKS ☑	1	30,785	totopotensamide A / totopotensamide B ☑	NRP + Polyketide	5%
Region 55.1	T1PKS ☑	1	27,853	naphthomycin A ☑	Polyketide	12%
Region 59.1	T1PKS ☑	1	18,849	pimaricin ☑	Polyketide	29%
Region 60.1	T1PKS ☑	1	15,853	caniferolide A / caniferolide B / caniferolide C / caniferolide D ☑	Polyketide:Modular type I	9%
Region 62.1	T1PKS ☑	1	15,137	oligomycin ☑	Polyketide	38%
Region 63.1	T1PKS ☑	1	14,573	caniferolide A / caniferolide B / caniferolide C / caniferolide D ☑	Polyketide:Modular type I	9%
Region 64.1	T1PKS ☑	1	12,432	mediomycin A ☑	Polyketide	28%
Region 68.1	T1PKS ☑	1	10,724	mediomycin A ☑	Polyketide	28%
Region 69.1	T1PKS ☑	1	10,175	mediomycin A ☑	Polyketide	28%
Region 71.1	T1PKS ☑	1	9,499	mediomycin A ☑	Polyketide	28%
Region 72.1	T1PKS ☑	1	9,418	mediomycin A ☑	Polyketide	28%
Region 73.1	T1PKS ☑	1	8,820			
Region 75.1	T1PKS ☑	1	8,552			
Region 77.1	T1PKS ☑	1	7,794	cyphomycin ☑	Polyketide	13%
Region 78.1	T1PKS ☑	1	6,970			
Region 82.1	T1PKS ☑	1	5,669			
Region 88.1	T1PKS ☑	1	4,127			
Region 95.1	T1PKS ☑	1	3,269			
Region 102.1	T1PKS ☑	1	2,509			
Region 107.1	T1PKS ☑	1	2,033			
Region 111.1	T1PKS ☑	1	1,831			
Region 115.1	T1PKS ☑	1	1,711			

รูปที่ 6 การทำนายกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิโดย antismash ของไอโซเลต CA1R205 (ต่อ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity
Region 1.1	betalactone ☒	984	26,186		
Region 1.2	NRPS ☒	268,947	318,955	coelichelin ☒ NRP	100%
Region 1.3	T1PKS ☒	398,763	456,219	simocyclinone D8 ☒ Saccharide + Polyketide:Modular type I + Polyketide:Type II + Other:Aminocoumarin	8%
Region 1.4	T1PKS ☒	521,921	569,112		
Region 1.5	butyrolactone ☒	630,975	639,861	cyphomycin ☒ Polyketide	9%
Region 1.6	NRPS ☒	723,301	798,937	glycinocin A ☒ NRP	53%
Region 1.7	T1PKS ☒	881,369	1,019,972	azalomycin F3a ☒ Polyketide	100%
Region 1.8	T1PKS ☒	1,190,050	1,328,285	nigericin ☒ Polyketide:Modular type I	100%
Region 1.9	T1PKS ☒	1,330,904	1,374,848	salinomycin ☒ Polyketide:Modular type I	8%
Region 1.10	T1PKS ☒	1,474,274	1,550,282	elaiophylin ☒ Polyketide	87%
Region 1.11	redox-cofactor ☒	1,583,203	1,605,315	lankacidin C ☒ NRP + Polyketide	13%
Region 1.12	hserlactone ☒	1,726,587	1,747,342	daptomycin ☒ NRP	3%
Region 1.13	butyrolactone ☒	1,758,364	1,769,299	meilingmycin ☒ Polyketide	2%
Region 1.14	T1PKS ☒ , NRPS ☒	1,934,665	1,987,417	meilingmycin ☒ Polyketide	4%
Region 2.1	T1PKS ☒	188,624	372,431	mediomycin A ☒ Polyketide	68%
Region 3.1	NAPAA ☒	1,047	33,366	ikarugamycin ☒ NRP + Polyketide:Iterative type I	12%
Region 3.2	T1PKS ☒	72,880	121,336	niphimycins C-E ☒ Polyketide	12%
Region 3.3	NAPAA ☒	175,613	211,905	rustmicin ☒ Polyketide:Iterative type I	33%
Region 3.4	terpene ☒	241,960	263,261	2-methylisoborneol ☒ Terpene	100%
Region 5.1	siderophore ☒	431,892	443,679	desferrioxamin B ☒ Other	100%
Region 6.1	T1PKS ☒ , hglE-KS ☒ , RiPP-like ☒	1	61,413	sanglifehrin A ☒ NRP + Polyketide	4%
Region 6.2	NRPS ☒	65,409	144,158	leinamycin ☒ NRP + Polyketide:Modular type I + Polyketide:Trans-AT type I	5%
Region 6.3	terpene ☒	198,409	220,063	tiancilactone ☒ Terpene	17%
Region 6.4	terpene ☒	338,135	359,043	oxalomycin B ☒ NRP + Polyketide	6%
Region 8.1	siderophore ☒	52,882	64,945		
Region 8.2	ladderane ☒ , arylpolyene ☒ , NRPS ☒ , aminocoumarin ☒	132,593	207,847	atratumycin ☒ NRP	57%
Region 8.3	RiPP-like ☒	347,039	358,460		
Region 8.4	T1PKS ☒	413,308	442,036	s56-p1 ☒ NRP	11%
Region 9.1	T2PKS ☒	1	68,451	spore pigment ☒ Polyketide	83%
Region 9.2	lanthipeptide-class-i ☒ , arylpolyene ☒	141,769	190,230		
Region 10.1	ectoine ☒	246,612	257,016	ectoine ☒ Other	100%
Region 11.1	siderophore ☒	82,736	96,402		
Region 14.1	lanthipeptide-class-i ☒	33,808	58,225	steffimycin D ☒ Polyketide:Type II + Saccharide:Hybrid/tailoring	8%
Region 14.2	lassopeptide ☒	200,677	222,933		
Region 15.1	T1PKS ☒ , ladderane ☒ , arylpolyene ☒	13,230	64,677	atratumycin ☒ NRP	28%
Region 18.1	T1PKS ☒	1	60,145	baflomycin B1 ☒ Polyketide:Modular type I	50%
Region 18.2	lanthipeptide-class-ii ☒	92,302	115,700	reveromycin A ☒ Polyketide	9%
Region 19.1	T3PKS ☒	207,056	242,468		
Region 20.1	T1PKS ☒	1	31,324	mycotrienin I ☒ NRP + Polyketide	7%
Region 20.2	terpene ☒	122,129	143,229	pristinol ☒ Terpene	100%
Region 22.1	terpene ☒	141,526	163,901	geosmin ☒ Terpene	100%
Region 23.1	arylpolyene ☒ , ladderane ☒ , NRPS ☒	118,005	182,652	RP-1776 ☒ Polyketide + NRP:Cyclic depsipeptide	24%
Region 24.1	NRPS ☒	149,802	178,099		
Region 26.1	NRPS ☒	9,442	53,467		
Region 26.2	ladderane ☒ , arylpolyene ☒	119,303	154,578	atratumycin ☒ NRP	34%
Region 27.1	T3PKS ☒ , NRPS ☒ , other ☒	1	61,006	feglymycin ☒ NRP	78%

รูปที่ 7 การทำนายกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิโดย antismash ของไอโซเลต

CA3R110

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Region 29.1	lanthipeptide-class-i ☑	1,163	25,204			
Region 31.1	NRPS ☑	11,719	63,253	actinomycin D ☑	NRP	7%
Region 33.1	T1PKS ☑	60,590	87,965			
Region 38.1	NRPS ☑	26,070	72,255			
Region 39.1	indole ☑	47,515	68,657	5-isoprenylindole-3-carboxylate β-D-glycosyl ester ☑	Other	52%
Region 40.1	T1PKS ☑	1	34,499	geldanamycin ☑	Polyketide	69%
Region 42.1	T1PKS ☑	25,085	62,716	kanamycin ☑	Saccharide	1%
Region 46.1	NRPS ☑	1	30,765	himastatin ☑	NRP	28%
Region 47.1	lassopeptide ☑	21,400	43,874			
Region 51.1	T1PKS ☑	1	29,803	streptovaricin ☑	Polyketide	14%
Region 52.1	lanthipeptide-class-i ☑	27,664	45,494			
Region 54.1	NRPS ☑	1	41,013	coelibactin ☑	NRP	100%
Region 56.1	T1PKS ☑	1	37,949	sceliphrolactam ☑	Polyketide	60%
Region 57.1	T1PKS ☑	1	37,631	X-14547 ☑	Polyketide	21%
Region 61.1	T1PKS ☑	3,632	30,373	rapamycin ☑	NRP + Polyketide	21%
Region 64.1	terpene ☑	1	18,420	hopene ☑	Terpene	53%
Region 65.1	NRPS ☑	1	27,951	himastatin ☑	NRP	20%
Region 67.1	NRPS ☑	1	24,724	atratumycin ☑	NRP	7%
Region 72.1	T1PKS ☑	1	19,519	lydicamycin ☑	NRP + Polyketide:Modular type I	32%
Region 75.1	T1PKS ☑	1	16,220			
Region 77.1	T1PKS ☑, NRPS ☑	1	15,968	rapamycin ☑	NRP + Polyketide	14%
Region 80.1	T1PKS ☑	1	11,503	griseochelin ☑	Polyketide	53%
Region 81.1	T1PKS ☑	1	10,153	ibomycin ☑	Polyketide	15%
Region 84.1	T1PKS ☑	1	8,912			
Region 86.1	NRPS ☑	1	8,006			
Region 87.1	NRPS ☑	1	7,905			
Region 90.1	NRPS ☑	1	7,497			
Region 91.1	NRPS ☑	1	7,034			
Region 93.1	T1PKS ☑	1	6,200	catenulisporolides ☑	NRP + Polyketide	8%
Region 94.1	T1PKS ☑	1	6,058			
Region 97.1	T1PKS ☑	1	5,128	lasalocid ☑	Polyketide	12%
Region 102.1	T1PKS ☑	1	4,558	lobosamide A / lobosamide B / lobosamide C ☑	Polyketide	15%
Region 106.1	NRPS ☑	1	3,737			
Region 114.1	NRPS ☑	1	2,756			
Region 122.1	T1PKS ☑	1	2,023			
Region 136.1	NRPS ☑	1	1,594			
Region 141.1	T1PKS ☑	1	1,432			
Region 159.1	T1PKS ☑	1	1,087			
Region 162.1	NRPS ☑	1	1,072			

รูปที่ 7 การทำนายกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิโดย antimash ของไอโซเลต CA3R110 (ต่อ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity
Region 1.1	T1PKS	106,942	150,213	meilingmycin	Polyketide 5%
Region 1.2	lanthipeptide-class-i	152,788	177,033	5-isoprenylindole-3-carboxylate $\beta$ -D-glycosyl ester	Other 14%
Region 1.3	NAPAA	211,847	245,860	reveromycin A	Polyketide 6%
Region 1.4	NRPS, T3PKS	307,647	393,604		
Region 1.5	lanthipeptide-class-v, NRPS, T1PKS	442,535	572,292	coelichelin	NRP 27%
Region 1.6	terpene, NRPS	584,523	646,015	lasalocid	Polyketide 3%
Region 1.7	betalactone	972,885	1,005,520	saquayamycin A	Polyketide 5%
Region 1.8	T1PKS	1,476,694	1,521,967		
Region 1.9	ectoine	1,650,026	1,660,421	ectoine	Other 100%
Region 1.10	other	2,009,571	2,050,467		
Region 2.1	T1PKS	5,234	51,683	leinamycin	NRP + Polyketide:Modular type I + Polyketide:Trans-AT type I 4%
Region 2.2	betalactone	659,268	694,532	dactylocycline A	Polyketide 5%
Region 2.3	hglE-KS	775,246	821,893	dutomycin	Polyketide 6%
Region 3.1	NRPS, RIPP-like	309,215	399,572	himastatin	NRP 8%
Region 4.1	NRPS	321,626	379,685		
Region 4.2	betalactone	467,351	495,725		
Region 5.1	T1PKS	243,032	288,824		
Region 6.1	terpene	184,393	205,496		
Region 6.2	NAPAA	468,012	501,935	steffimycin D	Polyketide:Type II + Saccharide:Hybrid/tailoring 8%
Region 8.1	terpene	137,549	156,011	A54145	NRP 5%
Region 8.2	terpene	214,190	235,161	isorenieratene	Terpene 28%
Region 8.3	NRPS	344,110	393,043		
Region 10.1	redox-cofactor	387,606	404,194		
Region 12.1	betalactone, terpene	1	32,437	2-methylisborneol	Terpene 75%
Region 12.2	arylpolyene	53,592	94,767		
Region 12.3	terpene	241,798	262,742	carotenoid	Terpene 27%
Region 14.1	T1PKS	90,708	157,388	azalomycin F3a	Polyketide 30%
Region 14.2	resorcinol	254,997	286,250		
Region 15.1	redox-cofactor	172,752	195,461		
Region 19.1	NRPS	1	29,506	cetoniacytone A	Other:Cyclitol 6%
Region 20.1	NRPS	193	54,298		
Region 23.1	NRPS	1	48,573		
Region 28.1	NRPS	3,010	43,161	thiocoraline	NRP:Cyclic depsipeptide 7%

รูปที่ 8 การทำนายกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิโดย antismash ของไอโซเลต CA2R105

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity
Region 1.1	ectoine ☑	310,012	320,386	showdomycin ☑ Other	47%
Region 2.1	RIPP-like ☑	20,332	30,556		
Region 2.2	terpene ☑	216,470	238,767	geosmin ☑ Terpene	100%
Region 5.1	butyrolactone ☑ , furan ☑	86,142	115,550	methylenomycin A ☑ Other	14%
Region 6.1	melanin ☑	203,148	213,564	melanin ☑ Other	40%
Region 6.2	RiPP-like ☑	251,816	262,625		
Region 8.1	thiopeptide ☑, LAP ☑	86,104	113,680	kanamycin ☑ Saccharide	11%
Region 10.1	terpene ☑	8,226	33,641	isorenieratene ☑ Terpene	63%
Region 13.1	siderophore ☑	7,330	22,274	ficellomycin ☑ NRP	3%
Region 16.1	T3PKS ☑	63,727	104,794	alkylresorcinol ☑ Polyketide	100%
Region 22.1	lanthipeptide-class-iii ☑	2,403	25,006	gobichelin A / gobichelin B ☑ NRP	11%
Region 23.1	ladderane ☑ , arylpolyene ☑	85,866	111,088	atratumycin ☑ NRP	21%
Region 26.1	terpene ☑	35,063	56,112	ebelactone ☑ Polyketide	5%
Region 37.1	siderophore ☑	19,512	31,422	desferrioxamin B ☑ Other	80%
Region 42.1	terpene ☑	34,459	61,066	hopene ☑ Terpene	69%
Region 48.1	phosphonate ☑ , butyrolactone ☑	11,813	52,679	meilingmycin ☑ Polyketide	5%
Region 71.1	T3PKS ☑, other ☑ , terpene ☑	1	36,755	furaquinocin B ☑ Terpene + Polyketide	60%
Region 82.1	NRPS ☑	1	26,098	streptolydigin ☑ NRP + Polyketide:Modular type I + Saccharide:Hybrid/tailoring	10%
Region 88.1	T3PKS ☑	1	22,404	germicidin ☑ Other	100%
Region 102.1	terpene ☑	1	13,971		
Region 106.1	T2PKS ☑	1	11,720	spore pigment ☑ Polyketide	66%
Region 114.1	T3PKS ☑	1	7,979	furaquinocin B ☑ Terpene + Polyketide	21%
Region 115.1	NRPS ☑	1	7,134	cysteamide ☑ NRP	27%
Region 116.1	NRPS ☑	1	7,060	RP-1776 ☑ Polyketide + NRP:Cyclic depsipeptide	6%

รูปที่ 9 การทำนายกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิโดย antimash ของไอโซเลต PLK6-54

Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity
Region 1.1	siderophore ☑	58,157	69,956	desferrioxamin B ☑ Other	80%
Region 1.2	T2PKS ☑ , lanthipeptide-class-ii ☑	111,485	184,086	xantholipin ☑ Polyketide	14%
Region 1.3	NRPS ☑	501,980	545,147	dynemicin A ☑ Polyketide	5%
Region 1.4	thioamitides ☑ , T1PKS ☑	630,505	677,741	sporolide A / sporolide B ☑ NRP + Polyketide:Enediyne type I	27%
Region 2.1	linaridin ☑	199,480	220,031	legonaridin ☑ RIPP	16%
Region 2.2	lanthipeptide-class-iii ☑	677,228	699,777	SapB ☑ RiPP:Lanthipeptide	75%
Region 3.1	terpene ☑	657,593	675,503	carotenoid ☑ Terpene	18%
Region 4.1	NAGGN ☑	64,975	79,832		
Region 5.1	thiopeptide ☑, LAP ☑ , terpene ☑, RiPP-like ☑	97,810	150,227	lymphostin / neolyphostinol B / lymphostinol / neolyphostinol B ☑ NRP + Polyketide	50%
Region 5.2	terpene ☑	314,052	335,002		
Region 6.1	T3PKS ☑	347,375	388,436	alkyl-O-dihydrogeranyl-methoxyhydroquinones ☑ Terpene + Polyketide	85%
Region 16.1	terpene ☑	46,337	67,548	caniferolide A / caniferolide B / caniferolide C / caniferolide D ☑ Polyketide:Modular type I	3%
Region 17.1	NRPS ☑	36,832	82,900	a201a ☑ Other:Nucleoside	8%

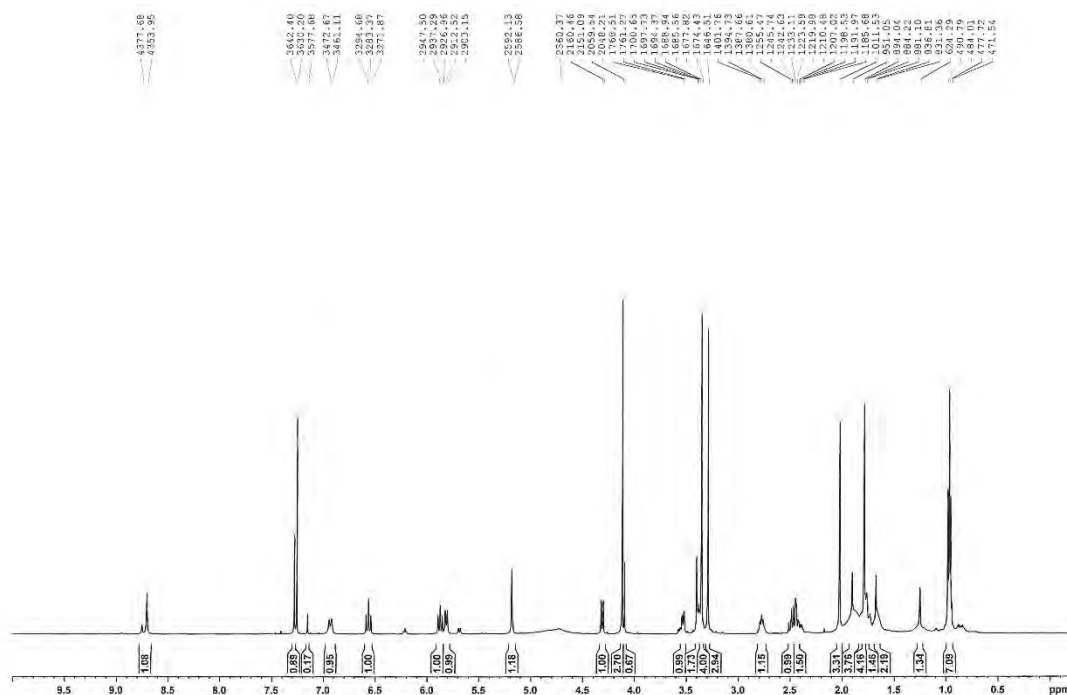
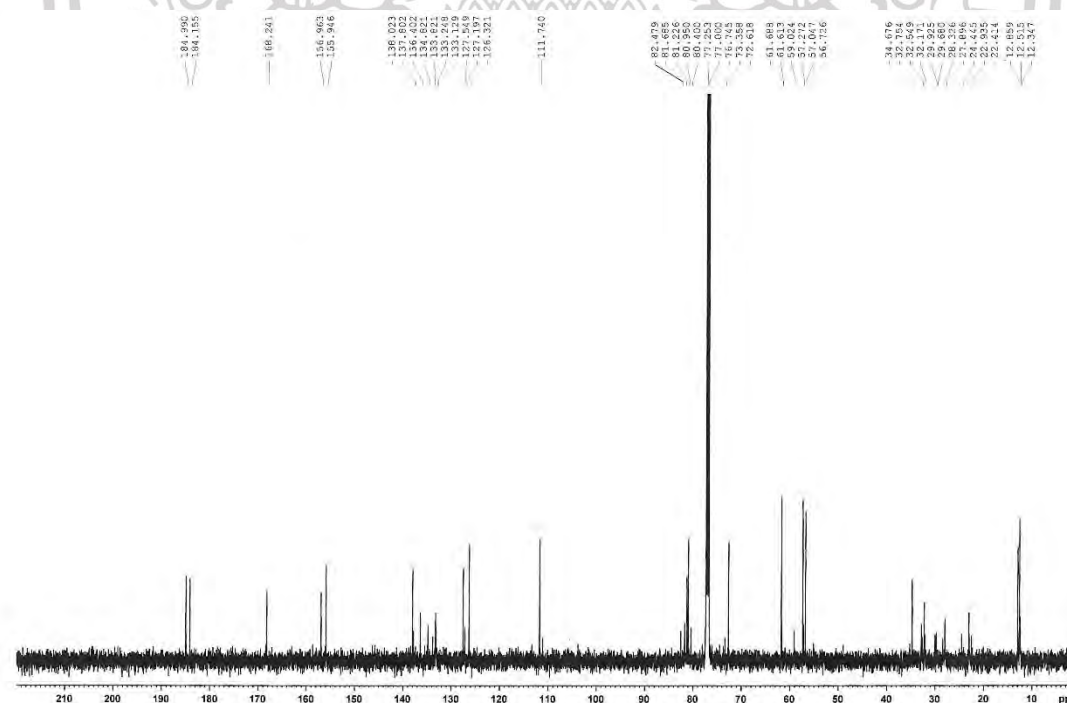
รูปที่ 10 การทำนายกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิโดย antimash ของไอโซเลต PLK6-

60

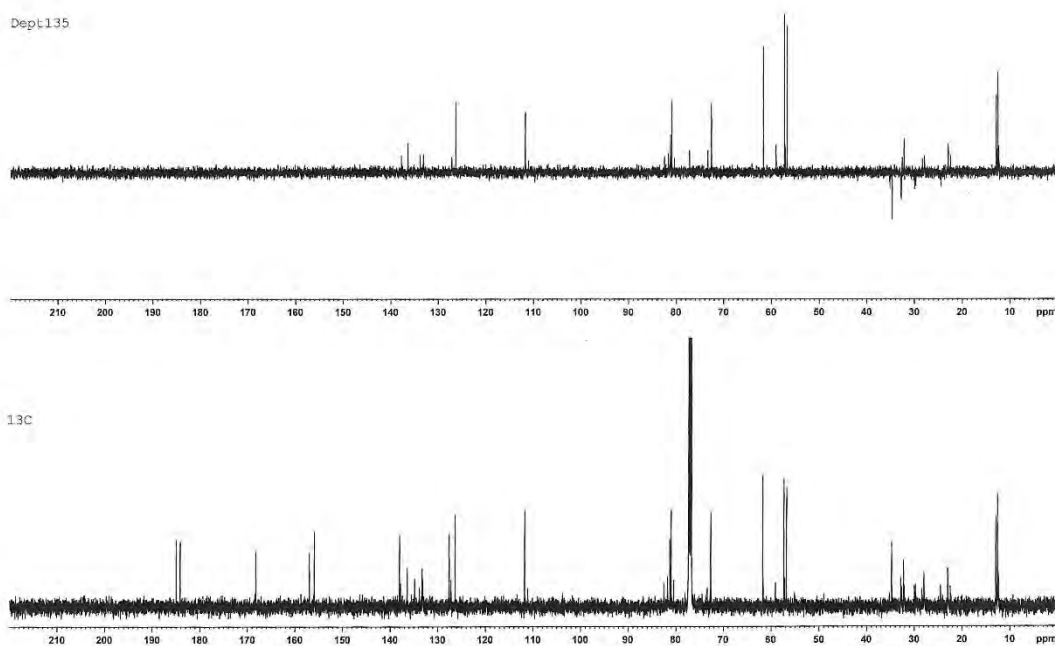
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ฉ

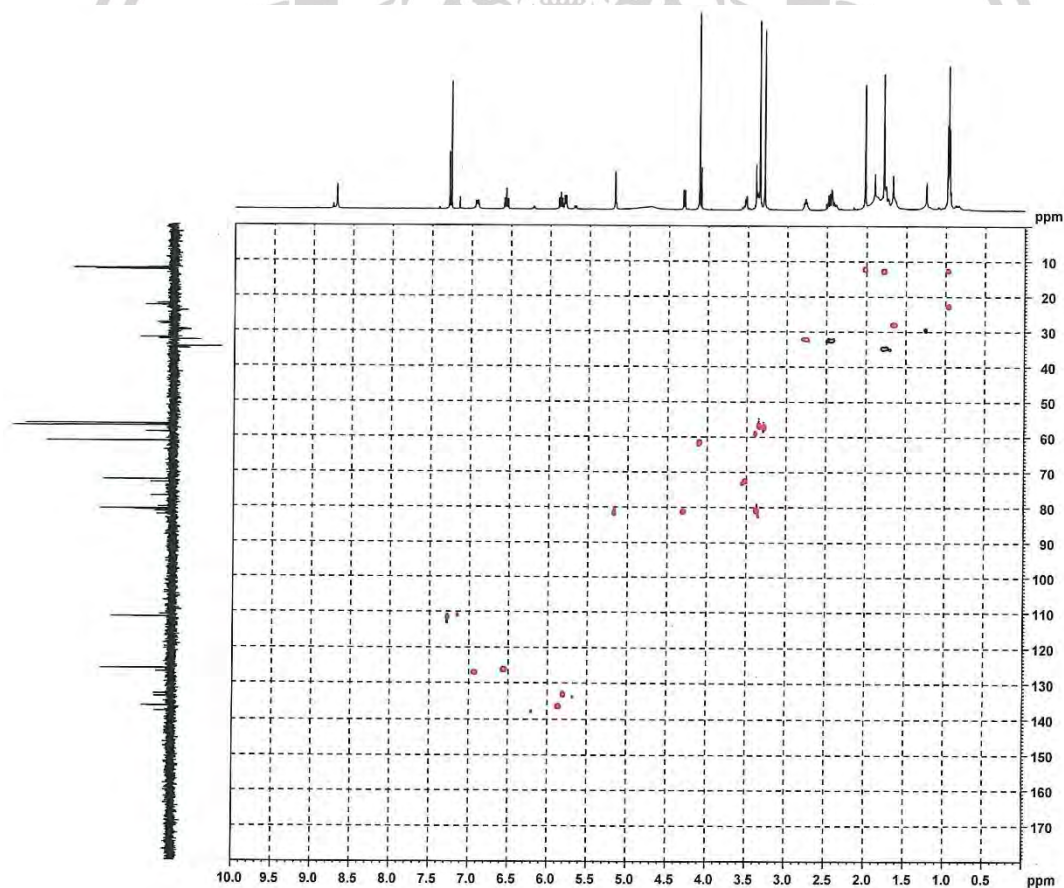
## ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีของสารบริสุทธิ์

รูปที่ 11 สเปกตรัม  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ของสาร Aรูปที่ 12 สเปกตรัม  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ของสาร A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

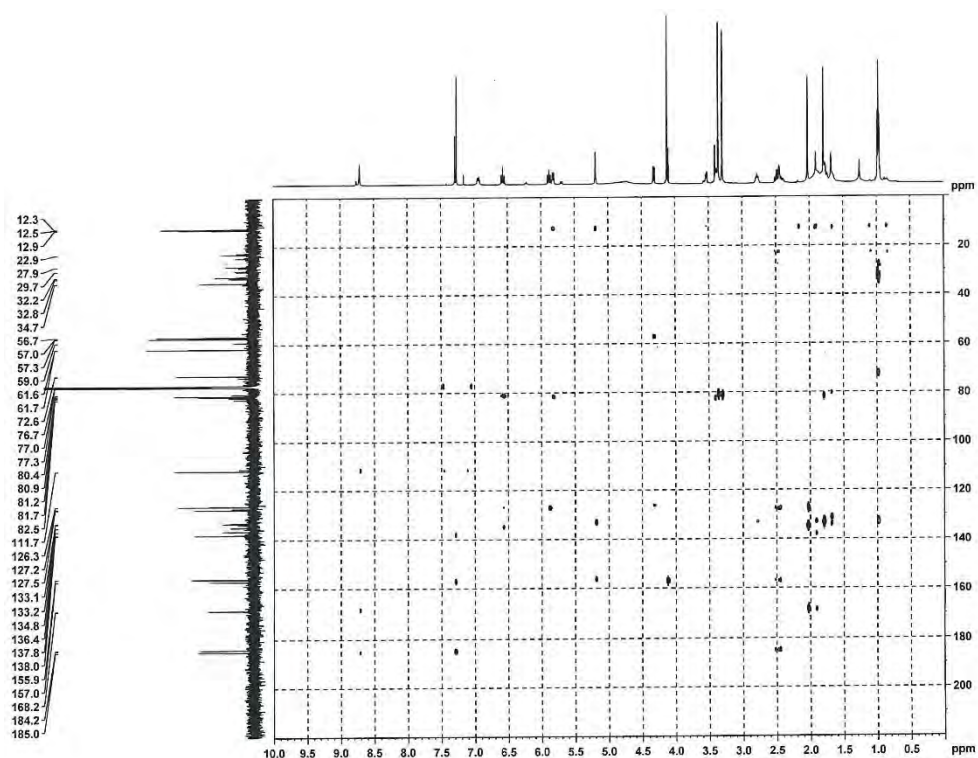


รูปที่ 13 สเปกตรัม DEPT 135 (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ของสาร A

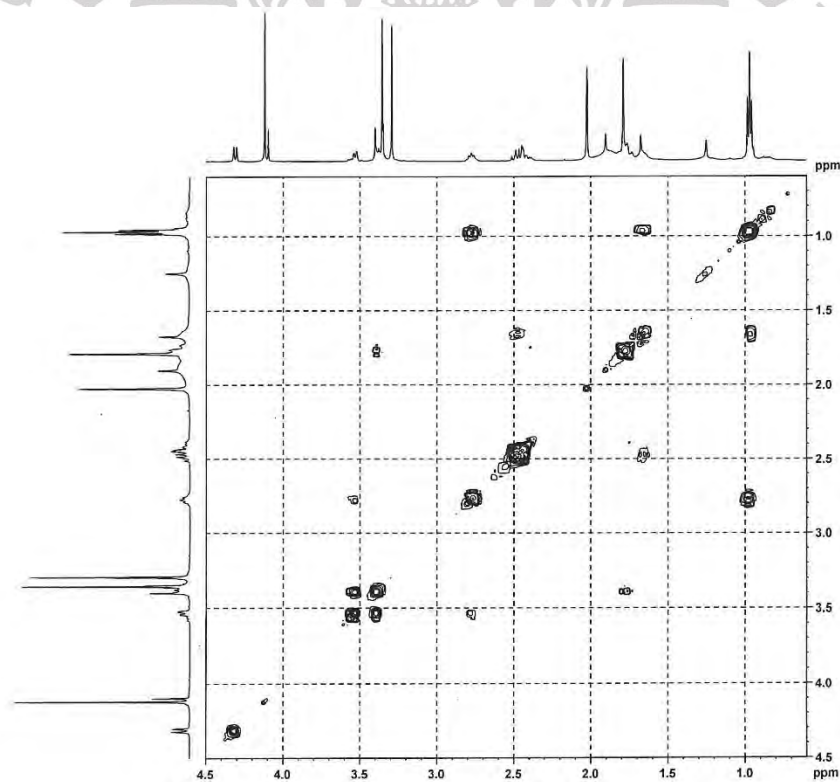


รูปที่ 14 สเปกตรัม HSQC (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ของสาร A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

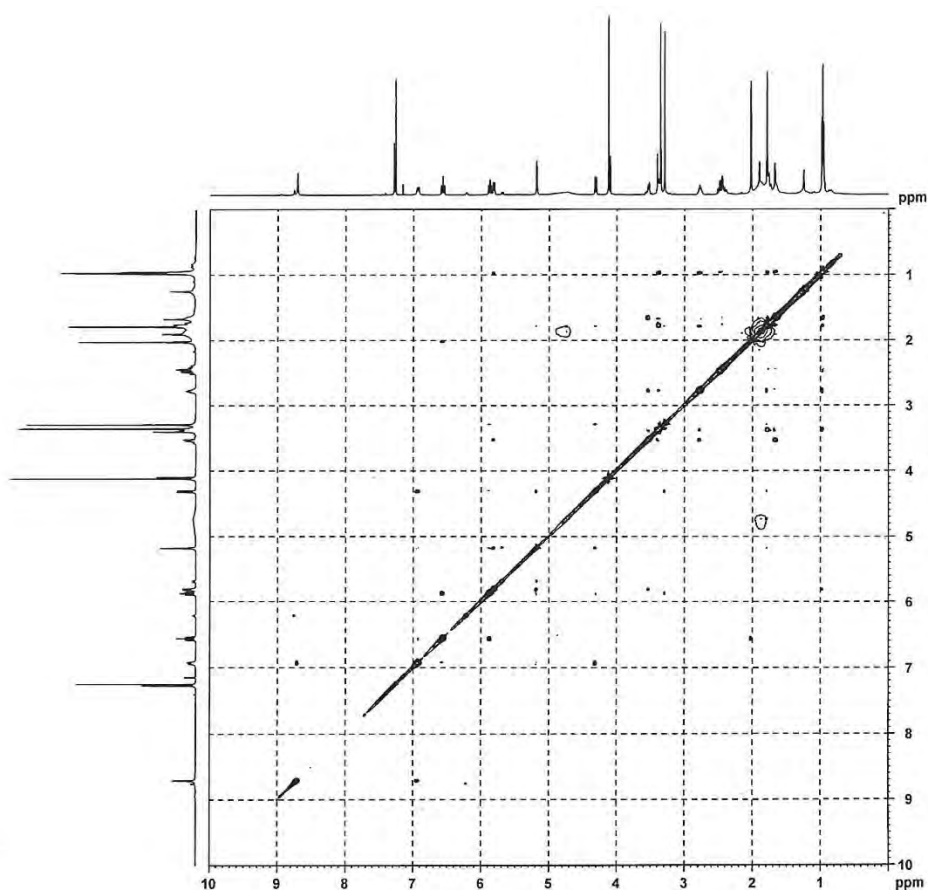


รูปที่ 15 สเปกตรัม HMBC (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ของสาร A

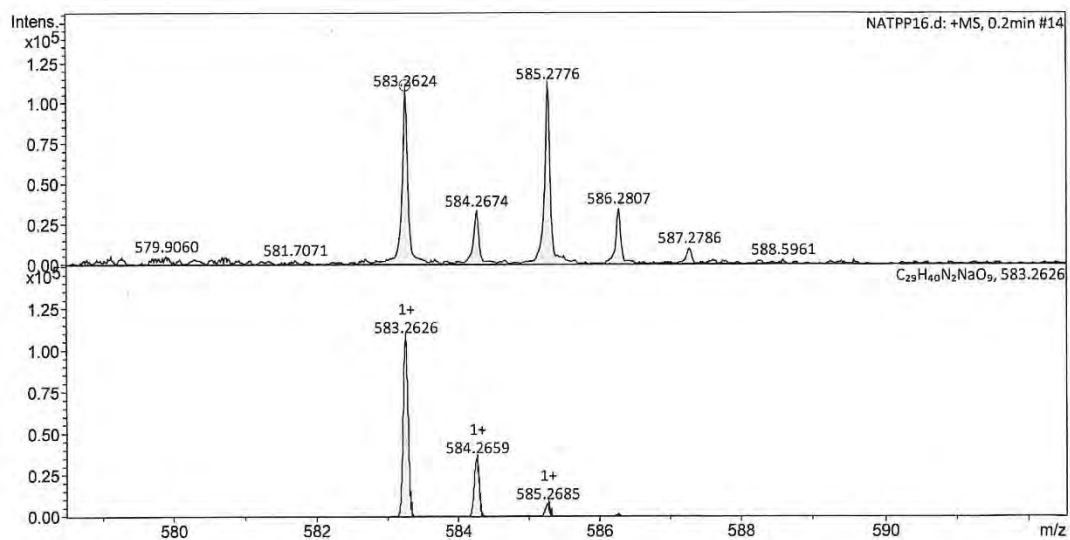


รูปที่ 16 สเปกตรัม COSY (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ของสาร A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

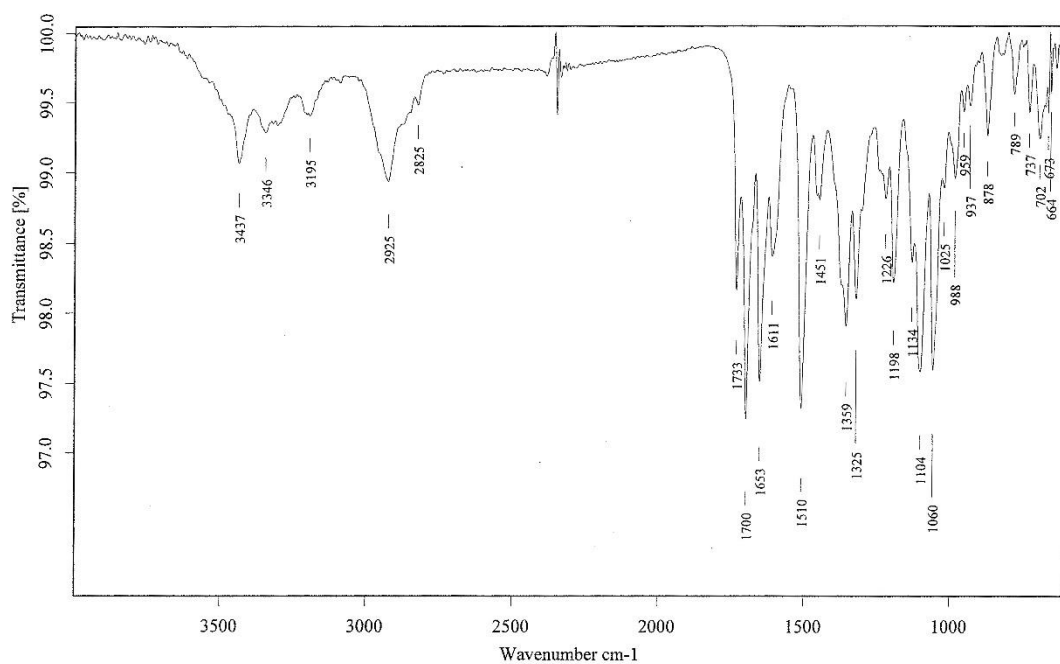


รูปที่ 17 สเปกตรัม NOESY (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ของสาร A



รูปที่ 18 สเปกตรัม HRESIMS  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  ของสาร A

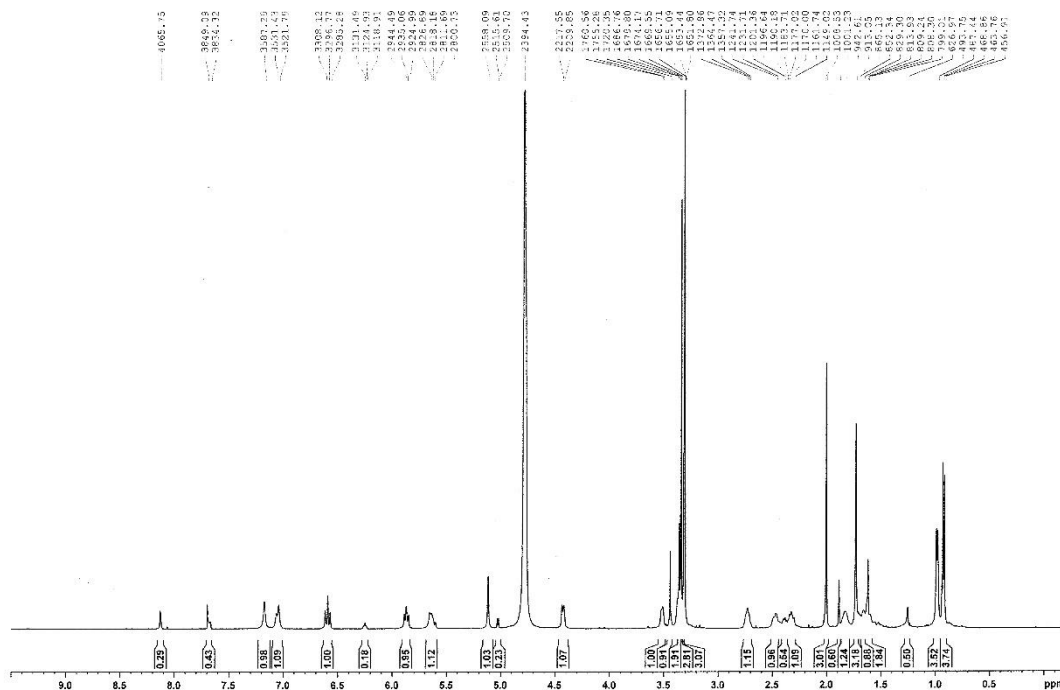
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



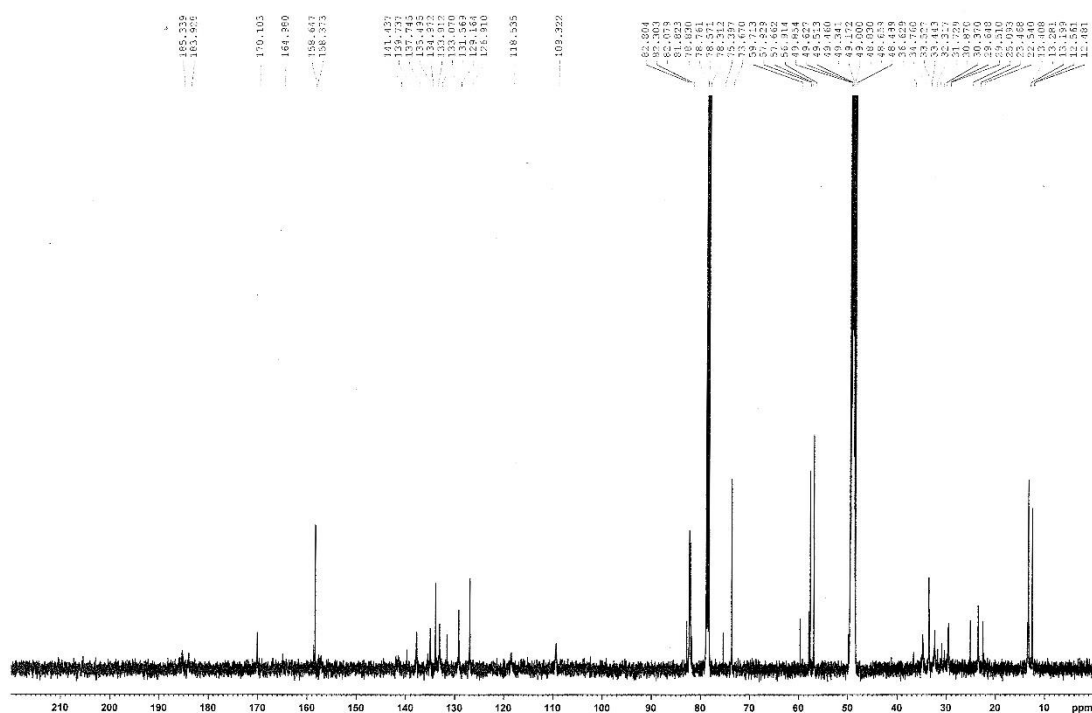
รูปที่ 19 สเปกตรัม IR ของสาร A



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

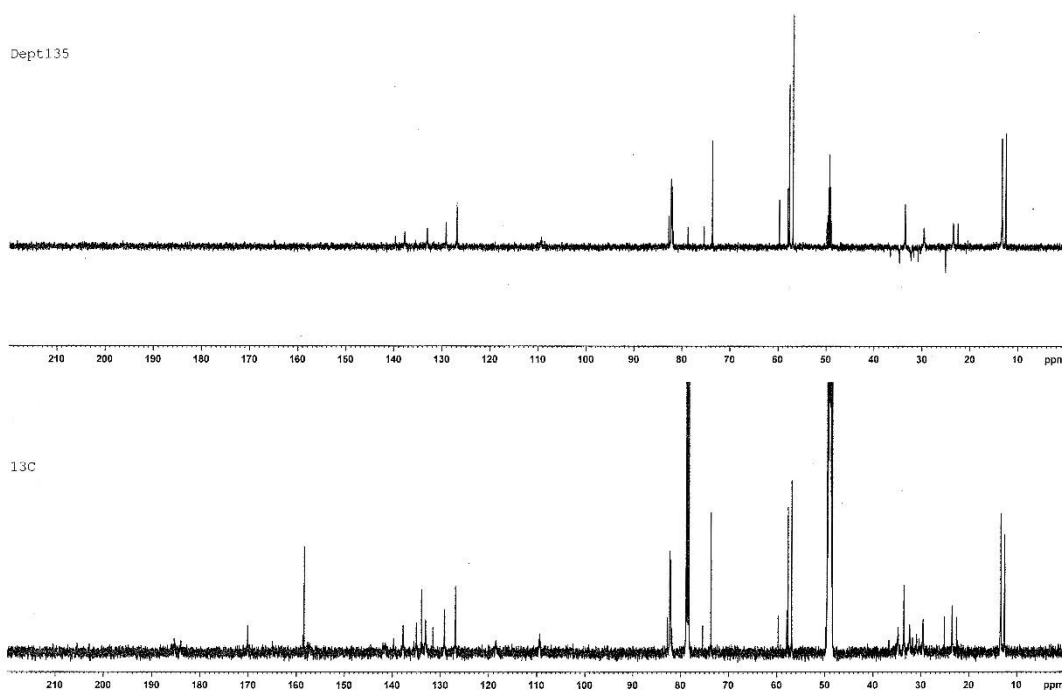


รูปที่ 20 สเปกตรัม  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, MeOD+ $\text{CDCl}_3$ ) ของสาร B

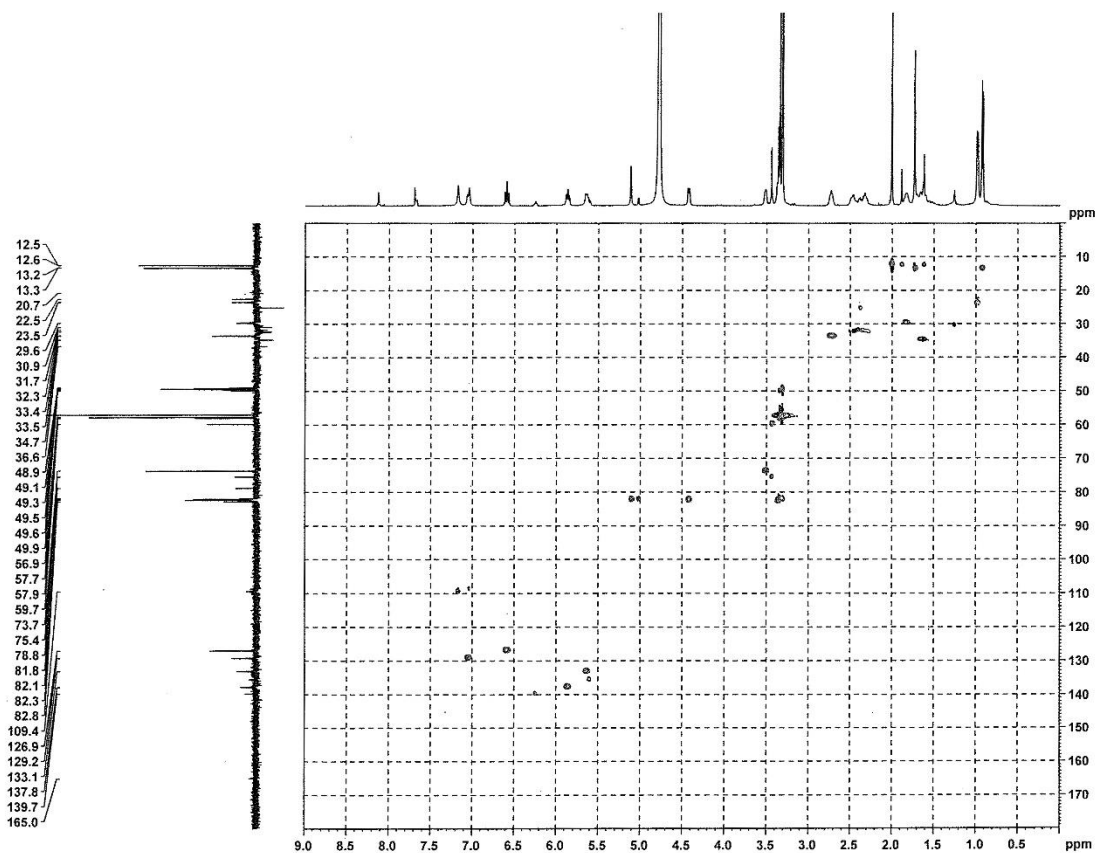


รูปที่ 21 สเปกตรัม  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, MeOD+ $\text{CDCl}_3$ ) ของสาร B

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

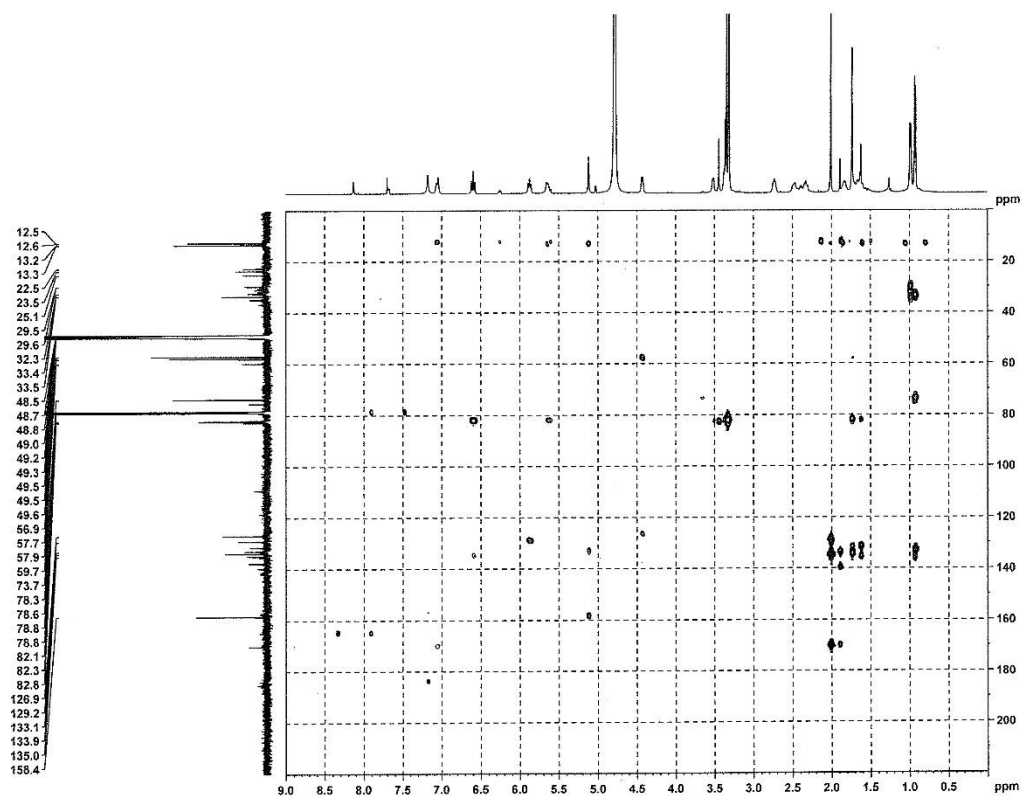


รูปที่ 22 สเปกตรัม DEPT 135 (125 MHz, MeOD+CDCl<sub>3</sub>) ของสาร B

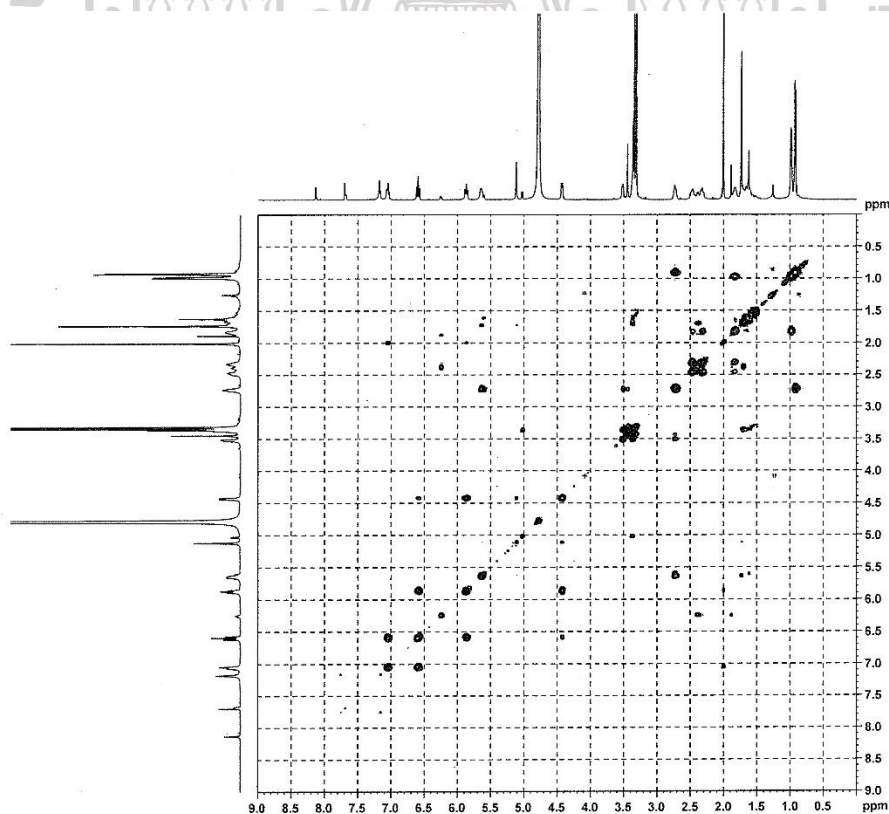


รูปที่ 23 สเปกตรัม HSQC (125 MHz, MeOD+CDCl<sub>3</sub>) ของสาร B

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

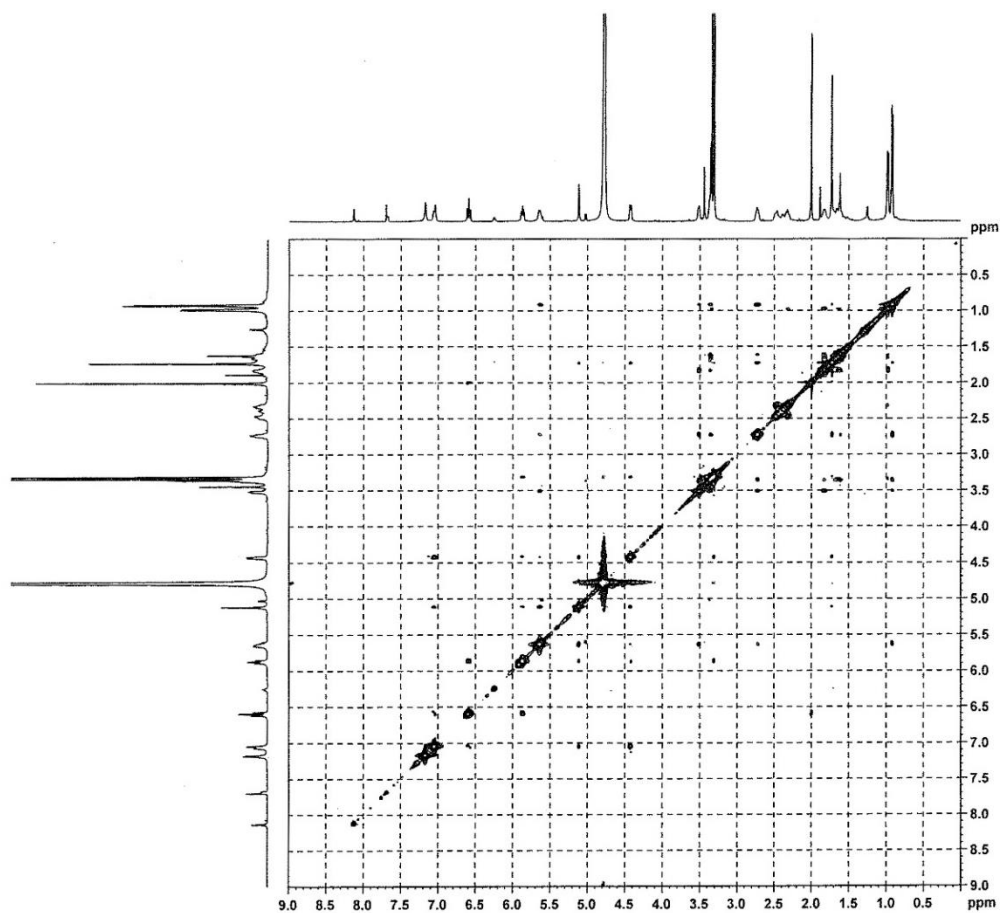


รูปที่ 24 สเปกตรัม HSQC (125 MHz, MeOD+CDCl<sub>3</sub>) ของสาร B

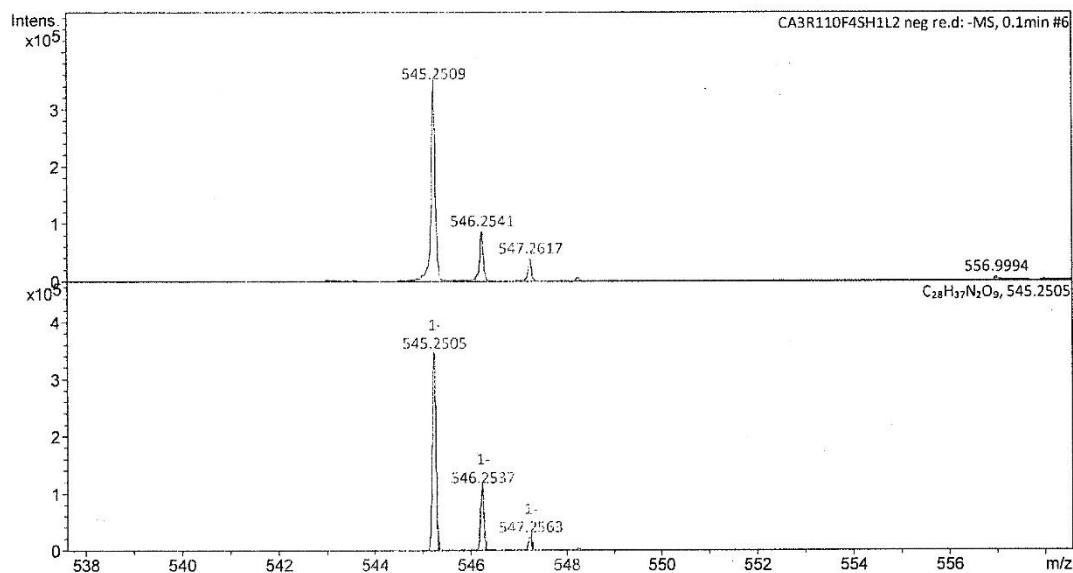


รูปที่ 25 สเปกตรัม COSY (125 MHz, MeOD+CDCl<sub>3</sub>) ของสาร B

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

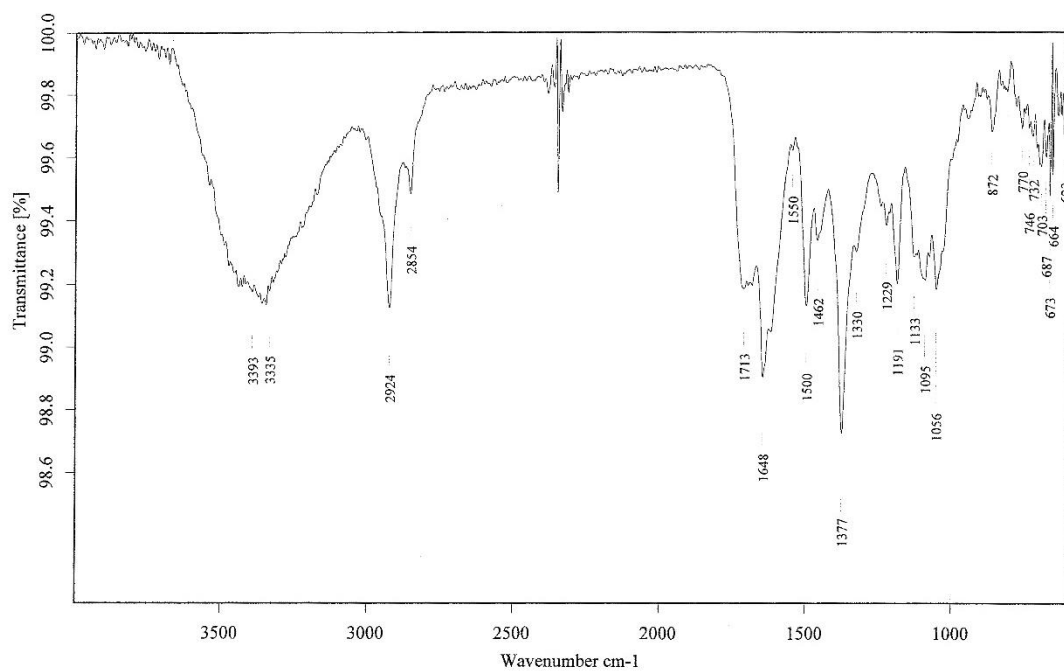


รูปที่ 26 สเปกตรัม NOESY (125 MHz, MeOD+CDCl<sub>3</sub>) ของสาร B



รูปที่ 27 สเปกตรัม HRESIMS [M-H]<sup>-</sup> ของสาร B

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 28 สเปกตรัม IR ของสาร B



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข  
ข้อมูลทางสถิติ

Descriptives

IC50

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
A	3	16.074499	.2005731	.1158009	15.576247	16.572750	15.8739	16.2751
B	3	11.001314	.0816647	.0471491	10.798448	11.204180	10.9203	11.0836
ascorbic acid	3	.890000	.0900000	.0519615	.666428	1.113572	.8000	.9800
BHT	3	2.340777	.0432381	.0249635	2.233368	2.448186	2.2980	2.3845
Total	12	7.576647	6.5248892	1.8835733	3.430931	11.722364	.8000	16.2751

รูปที่ 29 ข้อมูลสถิติเชิงพรรณนาของสารบริสุทธิ์ และสารมาตรฐาน ด้วยโปรแกรม spss เวอร์ชัน 26

ANOVA

IC50

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	468.202	3	156.067	10977.480	.000
Within Groups	.114	8	.014		
Total	468.316	11			

รูปที่ 30 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA) ด้วยโปรแกรม spss เวอร์ชัน 26

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวอัครารักษ์ น้ามะลิ
วัน เดือน ปีเกิด	16 เมษายน 2537
ที่อยู่ปัจจุบัน	162/137 หมู่ 10 ตำบลสุรศักดิ์ อำเภอสรีราชา จังหวัดชลบุรี
ประวัติการศึกษา	(2561) วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (2564) วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะ วิทยาศาสตร์ สถาบันพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนผู้ช่วยวิจัยและทุนผู้ช่วยสอน (RA/TA-2562-M-021)
ผลงานทางวิชาการ	1. Nammali, A., Intaradom, C., Pittayakhajonwut, P., Suriyachadkun, C., Tadtong, S., Srabua, P., and Thawai, C. (2021). <i>Streptomyces coffeae</i> sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the root of <i>Coffea arabica</i> (L.). <i>Int J Syst Evol Microbiol</i> , 71(6). 2. Nammali, A., Intaradom, C., Pittayakhajonwut, P., Suriyachadkun, C., Tadtong, S., Tanasupawat, S., and Thawai, C. (2021). <i>Streptomyces endocoffeicus</i> sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from <i>Coffea arabica</i> (L.). <i>Antonie Van Leeuwenhoek</i> , 114(11), 1889-1898. 3. Nammali, A., Duangupama T., Suriyachadkun C., Tanasupawat S., and Thawai C. (2021). <i>Nocardia coffeae</i> sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from the root of <i>Coffea arabica</i> (L.). <i>Int J Syst Evol Microbiol</i> .