

การศึกษาคุณลักษณะของแอกติโนแบคทีเรียทางทะเลและสารออกฤทธิ์
ทางชีวภาพเพื่อการประยุกต์ใช้ทางด้านเวชสำอาง

CHARACTERIZATION OF THE MARINE ACTINOBACTERIA AND
BIOACTIVE COMPOUNDS FOR FURTHER COSMECEUTICAL APPLICATIONS



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2566
KMITL-2023-SC-M-020-025

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

CHARACTERIZATION OF THE MARINE ACTINOBACTERIA AND
BIOACTIVE COMPOUNDS FOR FURTHER COSMECEUTICAL APPLICATIONS



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

2023

KMITL-2023-SC-M-020-025

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2023

SCHOOL OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาคุณลักษณะของแอกติโนแบคทีเรียทางทะเลและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อการประยุกต์ใช้ทางด้านเวชสำอาง
ชื่อนักศึกษา	นายรวิรัตน์ ปานสมสวย
รหัสประจำตัว	64605092
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ.	2566
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.จิตติ ท่าไฉ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร.ปัทมา พิทยขจรวุฒิ

บทคัดย่อ

แอกติโนแบคทีเรียจำนวน 10 ไอโซเลตถูกคัดแยกจากตัวอย่างทางทะเลบริเวณ หาดบางแสน หาดจอมเทียน และหาดสัตหีบ จังหวัดชลบุรี ประเทศไทย ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน 16S rRNA พบว่า แอกติโนแบคทีเรียเหล่านี้ถูกพิสูจน์เอกลักษณ์เป็นสกุล *Streptomyces* (5 ไอโซเลต) สกุล *Nocardioopsis* (2 ไอโซเลต) และ สกุล *Gordonia* (3 ไอโซเลต) และพบว่าแอกติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ JHD1 และ SW21 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces alkaliterrae* OF1^T (98.5%) และ *Gordonia mangrovi* HNM0687^T (98.7%) มากที่สุด การศึกษาอนุกรมวิธานจีโนมแสดงให้เห็นว่าแอกติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ JHD1 และ SW21 มีค่าเฉลี่ยลำดับนิวคลีโอไทด์ (เอเอ็นไอ) (น้อยกว่าร้อยละ 95) และค่าการเข้าคู่กันของดีเอ็นเอ (ดีดีไอเอ) (น้อยกว่าร้อยละ 70) แสดงให้เห็นว่าแอกติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ JHD1 และ SW21 เป็นสปีชีส์ใหม่ของสกุล *Streptomyces* และ *Gordonia* ตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัดยับยั้งเอนไซม์ของสายพันธุ์ JHD1 แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านการเจริญแบคทีเรียและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และถูกแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี สารบริสุทธิ์เหล่านี้ถูกพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี พบสารทุติยภูมิ 6 ชนิด ได้แก่ *N*-(4-methyl-5-oxodithiolo[4,3-b]pyrrol-6-yl)acetamide (thiolutin), 2,2-dioxidothiolutin, 2,3-dihydroxybenzamide, 2-hydroxy-3-methoxybenzamide, 8-hydroxy-1,3-benzoxazine-2,4-dione (benadrostin) และ 8-amino-1,3-benzoxazine-2,4-dione โดยสาร *N*-(4-methyl-5-oxodithiolo[4,3-b]pyrrol-6-yl)acetamide มีฤทธิ์ต้านการเจริญแบคทีเรียทดสอบทั้งแกรมบวกและแกรมลบหลายชนิด สาร 2,2-dioxidothiolutin มีฤทธิ์ต้านการเจริญแบคทีเรียทดสอบแกรมบวก และสาร 2,3-dihydroxybenzamide แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี ($IC_{50} = 13.0 \pm 0.7 \mu\text{g/mL}$) เทียบเท่า Ascorbic acid (สารควบคุมเชิงบวก) การวิจัยครั้งนี้ถือเป็นครั้งแรกที่พบ 2-hydroxy-3-methoxybenzamide และ 8-amino-1,3-benzoxazine-2,4-dione จากธรรมชาติ

คำสำคัญ : แอกติโนแบคทีเรียทางทะเล อนุกรมวิธาน การวิเคราะห์จีโนม สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Characterization of The Marine Actinobacteria and Bioactive Compounds for Further Cosmeceutical Applications
Student Name	Rawirat Pansomsuay
Student ID	64605092
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Year	2023
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Chitti Thawai
Thesis Co-advisor	Dr. Pattama Pittayakhajonwut

Abstract

Ten actinobacterial strains were isolated from marine samples collected from Bangsaen, Jomtien, and Sattahip Beaches, Chonburi province, Thailand. Based on phenotypic characteristics and 16S rRNA gene sequence analysis, these strains were identified as *Streptomyces* spp. (5 isolates), *Nocardiopsis* spp. (2 isolates), and *Gordonia* spp. (3 isolates). Among them, strains JHD1 and SW21 were closely related to *Streptomyces alkaliterrae* OF1^T (98.5%), and *Gordonia mangrovi* HNM0687^T (98.7%). On the basis of genome-based taxonomy, strains JHD1 and SW21 showed low average nucleotide identity (ANI) (<95%), and digital DNA–DNA hybridization (dDDH) (<70%) to their closely related type strains, indicating that strains JHD1 and SW21 represented as novel species of the genera *Streptomyces* and *Gordonia*, respectively. Furthermore, the crude ethyl acetate extract of the strain JHD1 demonstrated the promising biological activities including antibacterial and antioxidative activities and was isolated and purified by using several chromatographic techniques. The purified compounds were identified by using spectroscopic techniques. They were identified as *N*-(4-methyl-5-oxodithiolo[4,3-*b*]pyrrol-6-yl)acetamide, 2,2-dioxidothiolutin, 2,3-dihydroxybenzamide, 2-hydroxy-3-methoxybenzamide, 8-hydroxy-1,3-benzoxazine-2,4-dione, and 8-amino-1,3-benzoxazine-2,4-dione. The compound, *N*-(4-Methyl-5-oxodithiolo[4,3-*b*]pyrrol-6-yl)acetamide exhibited broad-spectrum antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. The compound, 2,2-dioxidothiolutin showed antibacterial activity against Gram-positive bacteria. The compound, 2,3-dihydroxybenzamide demonstrated significant antioxidant activity (IC₅₀ = of 13.0 ± 0.7 µg/mL) as good as ascorbic acid, the positive control. This research is the first report of finding new natural products, including 2-hydroxy-3-methoxybenzamide and 8-amino-1,3-benzoxazine-2,4-dione.

Keywords : Marine actinobacteria, Taxonomy, Genome analysis, Bioactive compound

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดีจากการได้รับความกรุณาจาก รศ. ดร. จิตติ ท่าไว อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร. ปัทมา พิทยขจรวุฒิ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณอาจารย์ทั้งสองท่านเป็นอย่างยิ่งที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำ ความอนุเคราะห์สถานที่และอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่จำเป็นเพื่อให้งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณ คุณจักรพงศ์ อินทรอดม ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และมอบองค์ความรู้สำคัญมาตลอดระยะเวลาการทำวิจัยฉบับนี้ ตลอดจนขอขอบพระคุณนักวิจัยของห้องปฏิบัติการเคมีอินทรีย์ชีวภาพ หน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพจุลินทรีย์และชีวเคมีภัณฑ์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติทุกท่าน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ อนุเคราะห์อุปกรณ์ที่จำเป็นต่อการดำเนินงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วง

ขอขอบพระคุณประธานกรรมการและคณะกรรมการวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่ได้ให้คำแนะนำและข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้มอบทุนการศึกษาให้แก่ข้าพเจ้า อำนวยความสะดวกทั้งสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมีที่จำเป็นต่อการดำเนินงานวิจัย โดยเฉพาะหน่วยวิจัยทางเชื้อแอกติโนแบคทีเรีย

ขอขอบพระคุณเพื่อน ๆ นักศึกษาระดับปริญญาโทและปริญญาเอกทุกท่านที่คอยให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้าเสมอมา ขอขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาชีววิทยา และภาควิชาเคมี ตลอดจนนักวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยฉบับนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณนางสาวนุชจรี ปานสมสวย และนายนพพร อิศรภักดี มารดาและคุณตาของข้าพเจ้าที่มีส่วนช่วยในการดำเนินงานวิจัยฉบับนี้ ตลอดจนครอบครัวของข้าพเจ้าทุกท่านที่คอยเป็นกำลังใจและเป็นส่วนหนึ่งในการทำให้ข้าพเจ้าสามารถดำเนินการวิจัยและจัดทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้ได้สำเร็จ

รวิรัตน์ ปานสมสวย

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูป	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 แอคติโนแบคทีเรีย.....	3
2.1.1 ลักษณะทั่วไปของแอคติโนแบคทีเรีย.....	3
2.1.2 วงจรชีวิตของแอคติโนแบคทีเรีย.....	3
2.1.3 การกระจายตัวของแอคติโนแบคทีเรียในธรรมชาติ.....	4
2.1.4 การประยุกต์ใช้ประโยชน์จากแอคติโนแบคทีเรีย	5
2.2 ระบบนิเวศน์ทางทะเล และแอคติโนแบคทีเรียทางทะเล.....	5
2.2.1 ระบบนิเวศน์ทางทะเลบริเวณอ่าวไทยตอนบน.....	5
2.2.2 แอคติโนแบคทีเรียทางทะเล	6
2.3 สารทุติยภูมิจากแอคติโนแบคทีเรีย	8
2.4 การจัดจำแนกแอคติโนแบคทีเรีย	8
2.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอคติโนแบคทีเรีย	9
2.5.1 การศึกษาลักษณะทางพีโนไทป์.....	10
2.5.2 การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี.....	10
2.5.3 การศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์.....	17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6	ชีวสารสนเทศ (bioinformatics).....	23
2.6.1	การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรม	23
2.6.2	การทำนายหน้าที่ของจีโนม	24
2.6.3	Average Nucleotide Identity (ANI)	24
2.6.4	Digital DNA-DNA Hybridization (dDDH)	25
2.6.5	การศึกษากลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิของแบคทีเรีย.....	25
2.6.6	การสร้างแผนภูมิสายวิวัฒนาการ.....	25
2.7	หลักการสกัดสาร.....	26
2.7.1	การสกัดสารด้วยวิธีหมัก (Maceration).....	26
2.7.2	การสกัดสารในของเหลวด้วยของเหลว (Liquid-liquid extraction).....	26
2.8	การแยกสารทุติยภูมิให้บริสุทธิ์.....	27
2.9	การวิเคราะห์โครงสร้างและระบุนิตของสารอินทรีย์.....	31
2.9.1	อัลตราไวโอเล็ตสเปกโทรสโกปี	31
2.9.2	อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี	31
2.9.3	นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี	32
2.9.4	แมสสเปกโตรเมทรี.....	32
2.10	เวชสำอาง.....	32
2.10.1	สารออกฤทธิ์ในเวชสำอาง	32
2.11	เอนไซม์และสารประกอบที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์เวชสำอาง	33
2.11.1	ไทโรซิเนส (Tyrosinase).....	33
2.11.2	คอลลาเจน (Collagenase)	34
2.11.3	อีลาสเตส (Elastases).....	34
2.11.4	กรดไฮยาลูโรนิก (Hyaluronic acid)	35
2.12	อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ	35
2.12.1	อนุมูลอิสระ	35
2.12.2	สารต้านอนุมูลอิสระ	36
2.12.3	ภาวะเครียดออกซิเดชัน.....	36
2.12.4	สารต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.12.5 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.....	36
2.13 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ.....	39
2.13.1 วิธี Agar disk diffusion.....	39
2.13.2 วิธี Agar well diffusion.....	39
2.14 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์.....	40
2.15 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	40
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	42
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	42
3.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ.....	43
3.3 การเก็บตัวอย่าง การแยก และการเก็บรักษาแอกติโนแบคทีเรีย.....	43
3.3.1 การเก็บตัวอย่าง.....	43
3.3.3 การเก็บรักษาแอกติโนแบคทีเรีย.....	44
3.4 การศึกษาอนุกรมวิธานของแอกติโนแบคทีเรีย.....	44
3.4.1 การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ (Phenotypic characteristics).....	45
3.4.2 การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี (Chemotaxonomic characteristics).....	49
3.4.3 การศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ (Genotypic characteristics).....	55
3.5 การสกัดสารสกัดหยาบ การแยกสารให้บริสุทธิ์ และการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมี.....	58
3.5.1 การสกัดสารสกัดหยาบ.....	58
3.5.2 การแยกสารให้บริสุทธิ์.....	58
3.5.3 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์.....	61
3.6 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activity).....	61
3.6.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay.....	61
3.6.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี Agar disk diffusion.....	62
3.6.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี Broth microdilution.....	63
3.6.4 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของแอกติโนแบคทีเรีย.....	63
3.7 การทดสอบสมมติฐานทางสถิติ.....	64
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	65
4.1 การเก็บตัวอย่าง และการคัดแยกแอกติโนแบคทีเรีย.....	65

4.2 การศึกษาอนุกรมวิธานเบื้องต้นของแอกติโนแบคทีเรียที่คัดแยก	66
4.3 การคัดเลือกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	84
4.3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay	84
4.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี Agar disk diffusion	84
4.4 การศึกษาอนุกรมวิธานของไอโซเลต SW21 ^T	87
4.4.1 ลักษณะทางฟีโนไทป์	87
4.4.2 ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี	91
4.4.3 ลักษณะทางจีโนไทป์	97
4.4.4 ลักษณะที่แตกต่างกันระหว่างไอโซเลต SW21 ^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง	110
4.4.5 คำอธิบายของ <i>Gordonia aquimaris</i> SW21 ^T	112
4.5 การศึกษาอนุกรมวิธานของไอโซเลต JHD1 ^T	114
4.5.1 ลักษณะทางฟีโนไทป์	114
4.5.2 ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี	122
4.5.3 ลักษณะทางจีโนไทป์	128
4.5.4 ลักษณะทางที่แตกต่างกันของไอโซเลต JHD1 ^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง	147
4.5.5 คำอธิบายของ <i>Streptomyces</i> sp. JHD1 ^T	151
4.6 การแยกสารทุติยภูมิให้บริสุทธิ์และการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี	152
4.6.1 การแยกสารทุติยภูมิให้บริสุทธิ์	152
4.6.2 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์	152
4.7 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารทุติยภูมิจาก <i>Streptomyces</i> sp. JHD1 ^T	162
4.7.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay	162
4.7.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี Agar disk diffusion	163
4.7.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี Broth microdilution	167
4.7.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cell cytotoxicity)	168
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	169
5.1 สรุปผลการวิจัย	169
5.2 ข้อเสนอแนะ	170
เอกสารอ้างอิง	171

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก 190

ภาคผนวก ก..... 191

ภาคผนวก ข..... 202

ภาคผนวก ค..... 209

ภาคผนวก ง 218

ภาคผนวก จ..... 223

ประวัติผู้เขียน..... 238



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1	การกระจายตัวของแอกติโนแบคทีเรียในตัวอย่างทางทะเล.....	7
ตารางที่ 2.2	องค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์แอกติโนแบคทีเรีย.....	11
ตารางที่ 2.3	รูปแบบชนิดของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ของแอกติโนแบคทีเรียซึ่ง ผนังเซลล์ประกอบด้วยกรดไดอะมิโนพิเมลิคแบบ <i>meso</i>	13
ตารางที่ 2.4	ชนิดของฟอสโฟลิปิดที่พบในแอกติโนแบคทีเรีย.....	14
ตารางที่ 3.1	วิธีการเตรียมสารละลายของยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ (CLSI, 2020).....	64
ตารางที่ 4.1	ผลการคัดแยกแอกติโนแบคทีเรียจากตัวอย่างทางทะเล.....	65
ตารางที่ 4.2	ลักษณะการเจริญของแอกติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้บนอาหาร ISP 2 seawater เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 14 วัน.....	81
ตารางที่ 4.3	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน 16S rRNA ของแอกติโน แบคทีเรียที่คัดแยกได้กับฐานข้อมูล EzBioCloud.....	83
ตารางที่ 4.4	ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบแต่ละไอโซเลต.....	84
ตารางที่ 4.5	ฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคของสารสกัดหยาบแต่ละไอโซเลต ที่ความเข้มข้น 1,000 µg/mL.....	86
ตารางที่ 4.6	แสดงลักษณะการเจริญ สีของเส้นใยอาหาร และสีของรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ ของไอโซเลต SW21 ^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง.....	89
ตารางที่ 4.7	ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของไอโซเลต SW21 ^T และ สายพันธุ์ใกล้เคียง.....	91
ตารางที่ 4.8	ชนิดกรดไขมันของไอโซเลต SW21 ^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง.....	95
ตารางที่ 4.9	แสดงรายละเอียดข้อมูลจีโนมของไอโซเลต SW21 ^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง.....	102
ตารางที่ 4.10	ค่า ANIb, ANIm, AAI และ Digital DNA-DNA hybridization ของไอโซเลต SW21 ^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง.....	103
ตารางที่ 4.11	แสดงกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ (≥ 50% similarity) ในจีโนมของไอโซเลต SW21 ^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง.....	107
ตารางที่ 4.12	แสดงกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ (≤ 50% similarity) ในจีโนมของไอโซเลต SW21 ^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง.....	108
ตารางที่ 4.13	ลักษณะทางฟีโนไทป์ของไอโซเลต SW21 ^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง ที่แตกต่างกัน.....	110
ตารางที่ 4.14	แสดงลักษณะการเจริญ สีของเส้นใยอาหาร และสีของรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ ของไอโซเลต JHD1 ^T และสายพันธุ์ใกล้เคียงที่เจริญบนอาหารชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน.....	117
ตารางที่ 4.15	ชนิดกรดไขมันของไอโซเลต JHD1 ^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง.....	127
ตารางที่ 4.16	แสดงรายละเอียดข้อมูลจีโนมของไอโซเลต JHD1 ^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง.....	133

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.17	ค่า ANIb, ANIm, AAI และ Digital DNA-DNA hybridization ของไอโซเลต JHD1 ^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง.....	134
ตารางที่ 4.18	แสดงกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ ($\geq 50\%$ similarity) ในจีโนมของไอโซเลต JHD1 ^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง.....	138
ตารางที่ 4.19	แสดงกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ ($\leq 50\%$ similarity) ในจีโนมของไอโซเลต JHD1 ^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง.....	141
ตารางที่ 4.20	ลักษณะทางพีโนไทป์ของไอโซเลต JHD1 ^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง.....	147
ตารางที่ 4.21	ข้อมูล ¹ H NMR และ ¹³ C NMR สเปกตรัม ของสาร 1.....	155
ตารางที่ 4.22	ข้อมูล ¹ H NMR และ ¹³ C NMR สเปกตรัม ของสาร 2.....	156
ตารางที่ 4.23	ข้อมูล ¹ H NMR และ ¹³ C NMR สเปกตรัม ของสาร 3.....	158
ตารางที่ 4.24	ข้อมูล ¹ H NMR และ ¹³ C NMR สเปกตรัม ของสาร 4.....	159
ตารางที่ 4.25	ข้อมูล ¹ H NMR และ ¹³ C NMR สเปกตรัม ของสาร 5.....	160
ตารางที่ 4.26	ข้อมูล ¹ H NMR และ ¹³ C NMR สเปกตรัม ของสาร 6.....	161
ตารางที่ 4.27	ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารทุติยภูมิจาก <i>Streptomyces</i> sp. JHD1 ^T	162
ตารางที่ 4.28	ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคของสารทุติยภูมิ จาก <i>Streptomyces</i> sp. JHD1 ^T ที่ความเข้มข้น 1,000 $\mu\text{g/mL}$	164
ตารางที่ 4.29	ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคของสาร 1 ที่ความเข้มข้น 500-0.24 $\mu\text{g/mL}$	165
ตารางที่ 4.30	ผลการทดสอบ Broth microdilution แสดงค่า MIC ของสาร 1.....	167
ตารางที่ 4.31	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารทุติยภูมิจาก <i>Streptomyces</i> sp. JHD1 ^T	168

สารบัญรูป

รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศของแอกติโนแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็ง.....	3
รูปที่ 2.2 แสดงแผนผังวงจรชีวิตของแอกติโนแบคทีเรียที่สร้างสปอร์.....	4
รูปที่ 2.3 พื้นที่บริเวณอำเภอไทยตอนบน.....	6
รูปที่ 2.4 แผนภูมิสายวิวัฒนาการแบบ Neighbor-Joining Tree โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน 16S rRNA ในการวิเคราะห์ แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อในคลาส Actinobacteria.....	9
รูปที่ 2.5 ผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก.....	12
รูปที่ 2.6 โครงสร้างเปปติโดไกลแคนของผนังเซลล์แบคทีเรีย.....	12
รูปที่ 2.7 โครงสร้างของฟอสโฟลิปิด.....	14
รูปที่ 2.8 กรดมัคคูลิกบนโครงสร้างผนังเซลล์ของแอกติโนแบคทีเรียในลำดับ Mycobacteriales.....	15
รูปที่ 2.9 โครงสร้างของกรดมัคคูลิก.....	15
รูปที่ 2.10 ชนิดของกรดมัคคูลิก.....	16
รูปที่ 2.11 โครงสร้างของมีนาควิโนน.....	16
รูปที่ 2.12 แสดงหลักการในการสกัดดีเอ็นเอออกจากเซลล์ของสิ่งมีชีวิต.....	19
รูปที่ 2.13 แผนผังกระบวนการสกัดดีเอ็นเอ.....	19
รูปที่ 2.14 องค์ประกอบของโรโบโซมในสิ่งมีชีวิต.....	20
รูปที่ 2.15 แผนผังกระบวนการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Sanger sequencing.....	23
รูปที่ 2.16 แสดงหลักการสกัดสารในของเหลวด้วยของเหลว.....	27
รูปที่ 2.17 อนุภาคเจล.....	28
รูปที่ 2.18 การแยกโมเลกุลของสารที่มีขนาดแตกต่างกันด้วยเจลฟิลเตรชันโครมาโทกราฟี.....	29
รูปที่ 2.19 แสดงหลักการแยกส่วนระหว่างของเหลว-ของเหลว.....	30
รูปที่ 2.20 แสดงปฏิริยาระหว่างอนุมูลอิสระดีพีพีเอชทำปฏิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ.....	34
รูปที่ 2.21 แสดงปฏิริยาระหว่างอนุมูลอิสระ ABTS ทำปฏิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ.....	37
รูปที่ 2.22 แสดงปฏิริยาระหว่างสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ ทำปฏิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ.....	38
รูปที่ 2.23 แสดงแผนผังกระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน.....	39
รูปที่ 3.1 ตำแหน่งไอโซเมอร์ของกรดโตอะมิโนเฟลิกบนแผ่น HPTLC.....	50
รูปที่ 3.2 ตำแหน่งและสีของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์บนแผ่น HPTLC.....	51
รูปที่ 3.3 ตำแหน่งของไขมันชนิดมีซัวบนแผ่น TLC ที่ตีเวลลอปแบบ 2 มิติ.....	53
รูปที่ 3.4 แผนผังแสดงการแยกสารสกัดหยาบจาก <i>Streptomyces</i> sp. JHD1 ^T	60

รูปที่ 3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay บนไม้โครเฟลท.....	62
รูปที่ 4.1 ไอโซเลต BWO1 ที่เจริญบนอาหาร ISP 2 seawater.....	66
รูปที่ 4.2 แผนภูมิต้นไม้ (Neighbor-Joining tree) แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต BWO1 และสายพันธุ์ใกล้เคียง.....	67
รูปที่ 4.3 ไอโซเลต BWO6 ที่เจริญบนอาหาร ISP 2 seawater.....	68
รูปที่ 4.4 แผนภูมิต้นไม้ (Neighbor-Joining tree) แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต BWO6 และสายพันธุ์ใกล้เคียง.....	68
รูปที่ 4.5 ไอโซเลต BHD1 ที่เจริญบนอาหาร ISP 2 seawater.....	69
รูปที่ 4.6 ไอโซเลต JP6 ที่เจริญบนอาหาร ISP 2 seawater.....	70
รูปที่ 4.7 แผนภูมิต้นไม้ (Neighbor-Joining tree) แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต BHD1, JP6 และสายพันธุ์ใกล้เคียง.....	71
รูปที่ 4.8 ไอโซเลต BHD2 ที่เจริญบนอาหาร ISP 2 seawater.....	72
รูปที่ 4.9 แผนภูมิต้นไม้ (Neighbor-Joining tree) แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต BHD2 และสายพันธุ์ใกล้เคียง.....	72
รูปที่ 4.10 ไอโซเลต JR2 ที่เจริญบนอาหาร ISP 2 seawater.....	73
รูปที่ 4.11 แผนภูมิต้นไม้ (Neighbor-Joining tree) แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต JR2 และสายพันธุ์ใกล้เคียง.....	74
รูปที่ 4.12 ไอโซเลต JHD1 ที่เจริญบนอาหาร ISP 2 seawater.....	75
รูปที่ 4.13 แผนภูมิต้นไม้ (Neighbor-Joining tree) แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต JHD1 และสายพันธุ์ใกล้เคียง.....	75
รูปที่ 4.14 ไอโซเลต SW8 ที่เจริญบนอาหาร ISP 2 seawater.....	76
รูปที่ 4.15 ไอโซเลต SW21 ที่เจริญบนอาหาร ISP 2 seawater.....	77
รูปที่ 4.16 ไอโซเลต SW32 ที่เจริญบนอาหาร ISP 2 seawater.....	78
รูปที่ 4.17 แผนภูมิต้นไม้ (Neighbor-Joining tree) แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต SW8, SW21, SW32 และสายพันธุ์ใกล้เคียง.....	79
รูปที่ 4.18 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต SW21 ^T	88
รูปที่ 4.19 ไอโซเมอร์กรดโดอะมิโนพิเมลิกของไอโซเลต SW21 ^T บนแผ่น HPTLC cellulose.....	92
รูปที่ 4.20 น้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ของไอโซเลต SW21 ^T บนแผ่น HPTLC cellulose ฉีดพ่นด้วย Aniline phthalate.....	93
รูปที่ 4.21 ไขมันมีขั้วของไอโซเลต SW21 ^T (Two-dimensional thin-layer chromatograms).....	94
รูปที่ 4.22 Mycolic acid ของไอโซเลต SW21 ^T และ <i>G. mangrovi</i> KCTC 49383 ^T ที่ปรากฏ บนแผ่น Thin layer chromatography ตรวจสอบผ่านการรมควันด้วยไอโอดีน.....	96

รูปที่ 4.23	แผนภูมิต้นไม้ (Neighbor-Joining tree) แสดงตำแหน่งทางอนุกรมวิธานของ ไอโซเลต SW21 ^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง.....	98
รูปที่ 4.24	แผนภูมิต้นไม้ (Maximum-Likelihood tree) แสดงตำแหน่งทางอนุกรมวิธาน ของไอโซเลต SW21 ^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง.....	99
รูปที่ 4.25	แผนภูมิต้นไม้ (Maximum-Parsimony tree) แสดงตำแหน่งทางอนุกรมวิธาน ของไอโซเลต SW21 ^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง.....	100
รูปที่ 4.26	ผลการวิเคราะห์ Phylogenomic tree จากข้อมูลจีโนมของไอโซเลต SW21 ^T และ Type strain ในสกุล <i>Gordonia</i> โดยอาศัยข้อมูลพื้นฐานข้อมูลของ TYGS.....	104
รูปที่ 4.27	ผลการทำนายหน้าที่ของจีโนมไอโซเลต SW21 ^T วิเคราะห์ด้วยซอฟต์แวร์ออนไลน์ RAST (https://rast.nmpdr.org/).....	105
รูปที่ 4.28	Biosynthetic gene clusters ในจีโนมของ SW21 ^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง วิเคราะห์ด้วย antiSMASH version 7.0.....	106
รูปที่ 4.29	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต JHD1 ^T	115
รูปที่ 4.30	ไอโซเมอร์กรดไดอะมิโนพิเมติกของไอโซเลต JHD1 ^T บนแผ่น HPTLC cellulose.....	122
รูปที่ 4.31	น้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ของไอโซเลต JHD1 ^T บนแผ่น HPTLC cellulose ฉีดพ่นด้วย Aniline phthalate.....	123
รูปที่ 4.32	ไขมันมีขั้วของไอโซเลต JHD1 ^T (Two-dimensional thin-layer chromatograms).....	125
รูปที่ 4.33	แผนภูมิต้นไม้ (Neighbor-Joining tree) แสดงตำแหน่งทางอนุกรมวิธาน ของไอโซเลต JHD1 ^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง.....	129
รูปที่ 4.34	แผนภูมิต้นไม้ (Maximum-Likelihood tree) แสดงตำแหน่งทางอนุกรมวิธาน ของไอโซเลต JHD1 ^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง.....	130
รูปที่ 4.35	แผนภูมิต้นไม้ (Maximum-Parsimony tree) แสดงตำแหน่งทางอนุกรมวิธาน ของไอโซเลต JHD1 ^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง.....	131
รูปที่ 4.36	ผลการวิเคราะห์ Phylogenomic tree จากข้อมูลจีโนมของไอโซเลต JHD1 ^T และ Type strain ในสกุล <i>Streptomyces</i> โดยอาศัยข้อมูลพื้นฐานข้อมูลของ TYGS...132	132
รูปที่ 4.37	ผลการทำนายหน้าที่ของจีโนมไอโซเลต JHD1 ^T วิเคราะห์ด้วยซอฟต์แวร์ออนไลน์ RAST (https://rast.nmpdr.org/).....	135
รูปที่ 4.38	Biosynthetic gene clusters ในจีโนมของ JHD1 ^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง วิเคราะห์ด้วย antiSMASH version 7.0.....	137
รูปที่ 4.39	โครงสร้างทางเคมีของสาร 1-6 ที่ผลิตจาก <i>Streptomyces</i> sp. JHD1 ^T	153
รูปที่ 4.40	โครงสร้างทางเคมีของสาร 1 (<i>N</i> -(4-methyl-5-oxodithiolo[4,3- <i>b</i>]pyrrol-6-yl) acetamide, Thiolutin).....	154
รูปที่ 4.41	โครงสร้างทางเคมีของสาร 2 (2,2-dioxidothiolutin).....	156
รูปที่ 4.42	โครงสร้างทางเคมีของสาร 3 (2,3-dihydroxybenzamide, Catecholamide).....	157

รูปที่ 4.43 โครงสร้างทางเคมีของสาร 4 (2-hydroxy-3-methoxybenzamide).....	159
รูปที่ 4.44 โครงสร้างทางเคมีของสาร 5 (8-hydroxy-1,3-benzoxazine-2,4-dione , Benadrostin).....	160
รูปที่ 4.45 โครงสร้างทางเคมีของสาร 6 (8-amino-1,3-benzoxazine-2,4-dione).....	161
รูปที่ 4.46 แผนภูมิเส้นแสดงขนาดของไซนัยบ์ยังต่อเชื้อทดสอบชนิดต่าง ๆ ของสาร 1 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000-0.24 µg/mL.....	166
รูปที่ 4.47 แผนภูมิแท่งแสดงขนาดของไซนัยบ์ยังต่อเชื้อทดสอบชนิดต่าง ๆ ของสาร 1 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000-0.24 µg/mL.....	166



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันผลิตภัณฑ์เวชสำอางและผลิตภัณฑ์อาหารเสริมกำลังเป็นที่ต้องการของผู้บริโภค เห็นได้จากมูลค่าของตลาดผลิตภัณฑ์เวชสำอางที่มีการเติบโตขึ้นอย่างต่อเนื่องในปัจจุบัน และคาดว่าจะในช่วงปีคริสต์ศักราช 2021 ถึง 2025 มูลค่าของตลาดผลิตภัณฑ์เวชสำอางจะเติบโตขึ้นถึง 5 หมื่นล้านดอลลาร์สหรัฐฯ (ReportLinker, 2021) ผลิตภัณฑ์เวชสำอางเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติในการรักษาอาการผิดปกติต่าง ๆ ของผิวหนัง และช่วยดูแลผิวพรรณเพื่อให้เกิดความงาม ผลิตภัณฑ์เวชสำอางที่มีส่วนผสมเป็นสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติกำลังเป็นที่ต้องการของลูกค้าในตลาดเวชสำอาง เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของสารจากธรรมชาติมีสรรพคุณที่หลากหลาย อีกทั้งยังมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อมมากกว่าผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ขึ้นด้วยกระบวนการทางเคมี (Minsat *et al.*, 2021; Resende *et al.*, 2021) ด้วยเหตุนี้อุตสาหกรรมเวชสำอางจึงมีความจำเป็นต้องค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ ๆ จากแหล่งธรรมชาติที่มีคุณสมบัติทางด้านเวชสำอาง โดยสารสำคัญที่ใช้เป็นสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์เวชสำอางมีอยู่หลายชนิด เช่น สารยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานิน สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่มีส่วนช่วยในการทำลายคอลลาเจน อิลาสติน และไฮยาลูรอน สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคบนผิวหนัง โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น (Gupta *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2021; Liyanaarachchi *et al.*, 2018; Wongsukkasem *et al.*, 2018)

สารทุติยภูมิ (secondary metabolites) คือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพส่วนใหญ่ที่พบได้ในธรรมชาติ สามารถพบได้ทั้งใน พืช แบคทีเรีย เชื้อรา และสิ่งมีชีวิตในทะเลจำนวนมาก เช่น ฟองน้ำ ปะการัง และเพรียง (Thirumurugan, 2018) ในบรรดาแหล่งของสารทุติยภูมิจากธรรมชาติ แอคติโนแบคทีเรีย (actinobacteria) เป็นแหล่งที่น่าสนใจในการค้นหาสารทุติยภูมิชนิดใหม่สำหรับนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เวชสำอาง เนื่องจากแอคติโนแบคทีเรียมีความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลาย และมีการนำไปประยุกต์ใช้ได้หลายด้าน ทั้งในอุตสาหกรรมยาและอุตสาหกรรมเภสัช (Salwan & Sharma, 2020) โดยเฉพาะอย่างยิ่งแอคติโนแบคทีเรียทางทะเล (marine actinobacteria) ที่มีรายงานว่าสามารถผลิตสารทุติยภูมิที่เป็นยาปฏิชีวนะ สารต้านอนุมูลอิสระ และสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้หลายชนิด (Manivasagan, 2013) แสดงให้เห็นว่าสารทุติยภูมิจากแอคติโนแบคทีเรียทางทะเลมีคุณสมบัติที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์เวชสำอางได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาและค้นหาสารทุติยภูมิจากแอคติโนแบคทีเรียทางทะเลสำหรับการนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เวชสำอางยังมีไม่มากนัก (Dahal *et al.*, 2020) ดังนั้นการศึกษาและค้นหาสารทุติยภูมิชนิดใหม่จากแอคติโนแบคทีเรียทางทะเลจึงเป็นเรื่องที่ท้าทาย หากพบสารทุติยภูมิ

ชนิดใหม่ที่มีคุณสมบัติน่าสนใจในการนำมาใช้เป็นสารออกฤทธิ์สำคัญในผลิตภัณฑ์เวชสำอางได้ ก็จะสามารถเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์และตอบสนองความต้องการของลูกค้าในตลาดเวชสำอางได้ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น ด้วยเหตุนี้จึงมีความสนใจในการค้นหาสารทุติยภูมิจากแอคติโนแบคทีเรียทางทะเลที่มีคุณสมบัติเป็น สารต้านอนุมูลอิสระ สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคบนผิวหนัง และ/หรือ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เวชสำอาง

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อคัดแยกและคัดเลือกแอคติโนแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารสำคัญสามารถประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเวชสำอาง
- 2) เพื่อค้นหาแอคติโนแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ และศึกษาอนุกรมวิธานแบบหลายส่วน
- 3) เพื่อค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ ที่สามารถประยุกต์ใช้เป็นสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์เวชสำอาง
- 4) เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเชื้อก่อโรคของสารทุติยภูมิจากแอคติโนแบคทีเรียที่คัดเลือก

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1) คัดแยกแอคติโนแบคทีเรียจากตัวอย่างทางทะเลบริเวณอ่าวไทยตอนบน ได้แก่ หาดบางแสน ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี หาดจอมเทียน ตำบลหนองปรือ อำเภอบางละมุง จังหวัดชลบุรี หาดสัดหีบ ตำบลแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี และหาดแหลมเจริญ ตำบลปากน้ำ อำเภอเมือง จังหวัดระยอง
- 2) ศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานแบบหลายส่วนของแอคติโนแบคทีเรียที่มีแนวโน้มเป็นสปีชีส์ใหม่
- 3) ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเชื้อก่อโรค

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ค้นพบแอคติโนแบคทีเรียทางทะเลสปีชีส์ใหม่ และ/หรือ ค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่มีศักยภาพในการผลิตสารที่สามารถใช้เป็นสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์เวชสำอาง ประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเวชสำอางได้ ข้อมูลและองค์ความรู้ที่ได้จากการค้นพบแอคติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่สามารถนำไปตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ ฐาน WOS (ISI)/Scopus
- 2) สารสำคัญที่ได้จากแอคติโนแบคทีเรียดังกล่าวมีแนวโน้มนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเวชสำอางได้ในอนาคต
- 3) ได้องค์ความรู้ใหม่ด้านจุลชีววิทยาและชีวผลิตภัณฑ์ คือ การค้นพบแอคติโนแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่และสารทุติยภูมิชนิดใหม่ ซึ่งมีความสำคัญต่อก่อนจุลชีววิทยาที่ต้องการนำเอาแอคติโนแบคทีเรียที่ได้จากการวิจัยไปทำการศึกษาวิจัยด้านอื่น ๆ ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

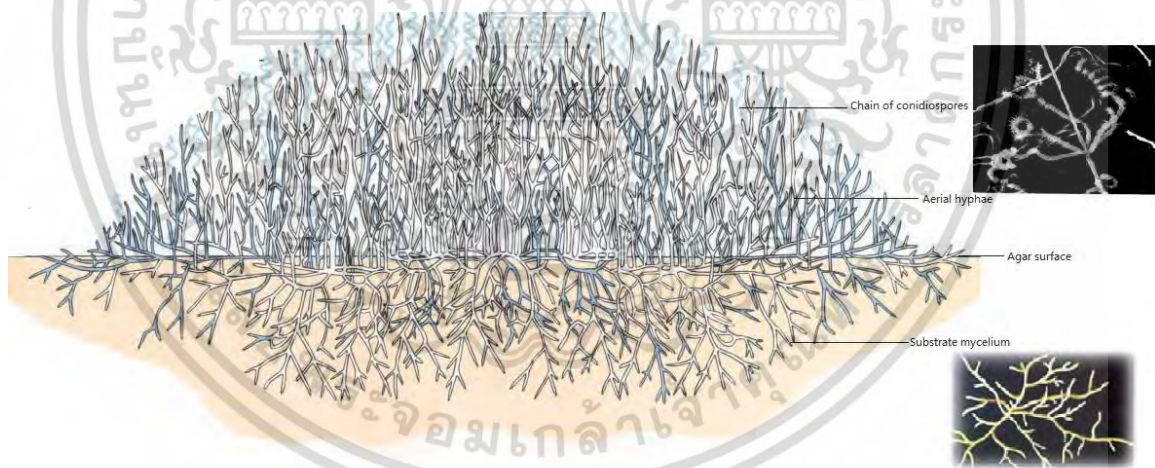
บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แอคติโนแบคทีเรีย

2.1.1 ลักษณะทั่วไปของแอคติโนแบคทีเรีย

แอคติโนแบคทีเรีย (Actinobacteria) เป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณเบสกวานีน (Guanine) และไซโตซีน (Cytosine) สูงกว่าร้อยละ 50 ในสายดีเอ็นเอ (High GC content) แอคติโนแบคทีเรียมีความแตกต่างจากแบคทีเรียทั่วไปเนื่องจากมีความสามารถในการสร้างสปอร์และเส้นใยได้ ทั้งชนิดเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium) และเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium) (Mawang *et al.*, 2021) โดยทั่วไปแอคติโนแบคทีเรียมีความสามารถในการสร้างเส้นใยได้ทั้งชนิดเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ (รูปที่ 2.1) แต่แอคติโนแบคทีเรียบางชนิดสร้างได้เฉพาะเส้นใยอาหารเท่านั้น เช่น สกุล *Micromonospora* และ *Salinispora* (Vobis, 1997) แอคติโนแบคทีเรียส่วนใหญ่สืบพันธุ์โดยการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ และมีรูปแบบการจัดเรียงตัวของสปอร์ที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ (จิตติ ท่าไฉ, 2557)



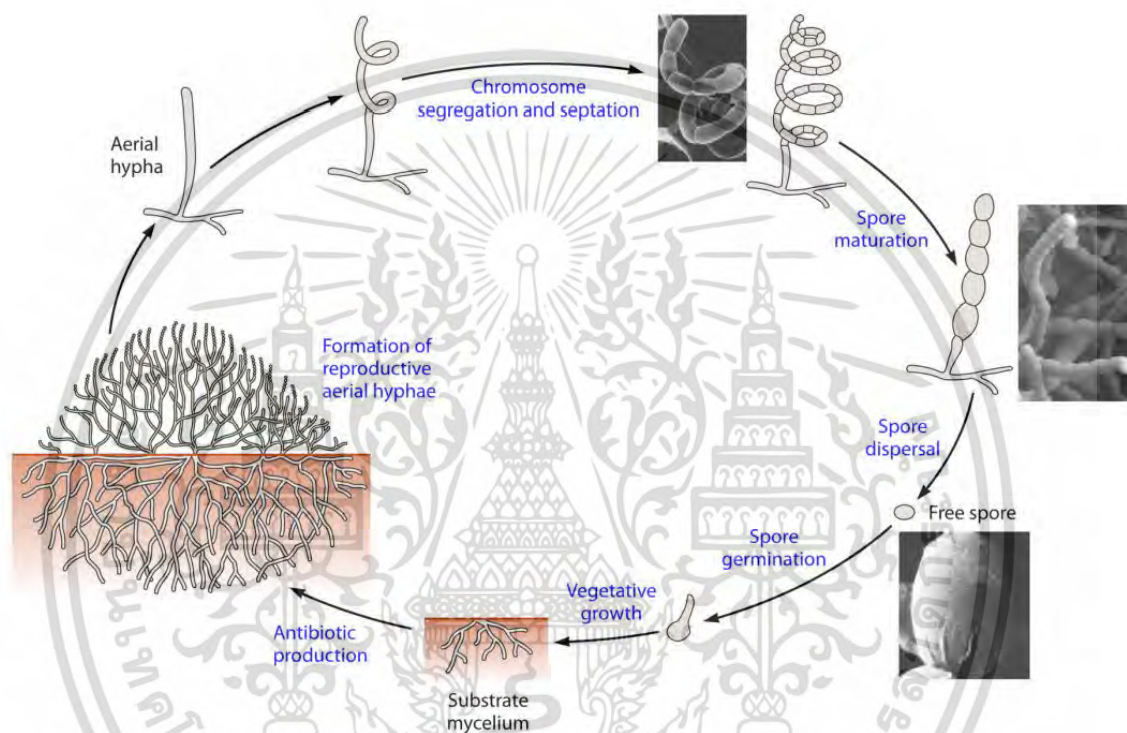
รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็ง
ที่มา : Li *et al.* (2016)

2.1.2 วงจรชีวิตของแอคติโนแบคทีเรีย

การเจริญของแอคติโนแบคทีเรียเริ่มต้นได้จากหลายส่วน ไม่ว่าจะเป็นสปอร์เดี่ยว (Single spore) สปอร์ที่อยู่ภายในถุงหุ้ม (Sporangium) หรือเส้นใยที่เกิดการแตกหัก ขึ้นส่วนต่าง ๆ เหล่านี้เมื่อถูกนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งจะมีการงอกเกิดเป็นเส้นใยใหม่แทงลงไปใต้ผิวของอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลี้ยงเชื้อ เรียกว่า เส้นใยอาหาร (Substrate mycelium) ระยะต่อมาเมื่อสารอาหารบริเวณที่มีการเจริญใกล้หมดจะมีการฟอร์มตัวของสปอร์โดยเริ่มต้นจากการสร้างเส้นใยที่ชูขึ้นบนอากาศ เรียกว่า เส้นใยอากาศ (Aerial mycelium) รวมตัวกันเป็นกลุ่มของเส้นใย (Mycelium) ที่อัดตัวกันแน่นและมีขอบเขตที่ชัดเจน และสุดท้ายเส้นใยอากาศจะเริ่มมีการแบ่งตัวของโครโมโซมและเกิดเป็นสปอร์ที่เรียงต่อกันเป็นสายในรูปแบบต่าง ๆ ในที่สุด (รูปที่ 2.2) (Barka *et al.*, 2015)



รูปที่ 2.2 แสดงแผนผังวงจรชีวิตของแอกติโนแบคทีเรียที่สร้างสปอร์
ที่มา : Barka *et al.* (2015)

2.1.3 การกระจายตัวของแอกติโนแบคทีเรียในธรรมชาติ

แอกติโนแบคทีเรียมีการกระจายตัวอยู่ทั่วไปในธรรมชาติทั้งในระบบนิเวศบนบกและระบบนิเวศในน้ำ เช่น ดิน แหล่งน้ำจืดและน้ำเค็ม ทะเลทราย บ่อน้ำพุร้อน และขั้วโลก อีกทั้งยังสามารถพบได้ในเนื้อเยื่อของสัตว์และพืช แหล่งที่พบแอกติโนแบคทีเรียได้มากที่สุดคือในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ ซึ่งมีความหลากหลายของแอกติโนแบคทีเรียสูง (จิตติ ท่าไฉ, 2557) บทบาทสำคัญของแอกติโนแบคทีเรียคือการย่อยสลายซากพืชและซากสัตว์ ก่อให้เกิดการหมุนเวียนสารประกอบอินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังพบว่าแอกติโนแบคทีเรียบางชนิดมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืชโดยการตรึงไนโตรเจน (จิตติ ท่าไฉ, 2557) ในปัจจุบันพบว่าแอกติโนแบคทีเรียมีมากกว่า 374 สกุล สกุลที่พบได้มากที่สุดคือ *Streptomyces* นอกจากนี้ยังพบสกุลอื่น ๆ อีก เช่น *Actinomyces*, *Kitasatospora*,

Micromonospora, *Nocardia*, *Micrococcus*, *Arthrobacter* และ *Rhodococcus* เป็นต้น (Mawang *et al.*, 2021)

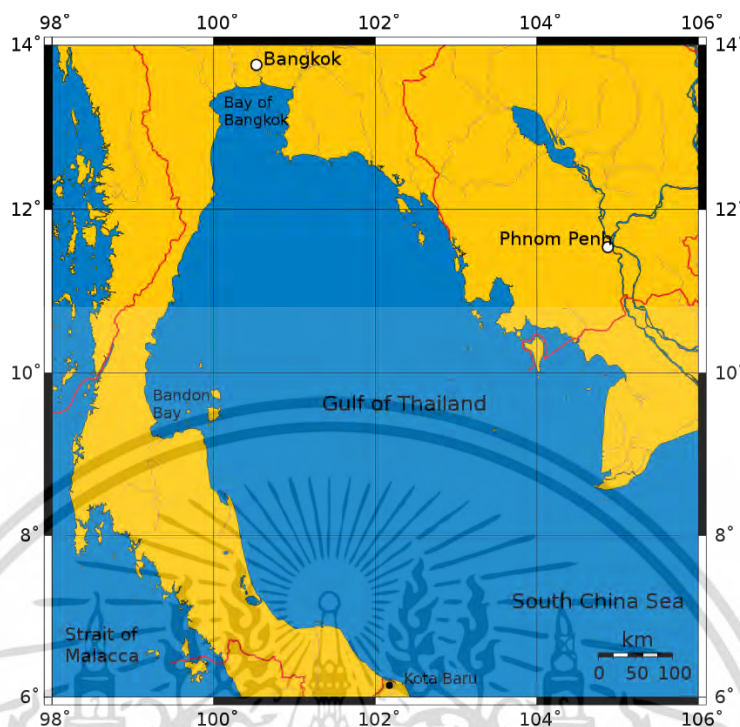
2.1.4 การประยุกต์ใช้ประโยชน์จากแอคติโนแบคทีเรีย

แอคติโนแบคทีเรียมีความโดดเด่นในแง่ของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิด โดยเฉพาะสารปฏิชีวนะ (Antibiotic) ที่นำมาใช้ในทางการแพทย์ในปัจจุบัน นอกจากนี้ยังสามารถผลิตเอนไซม์ (Enzyme) วิตามิน (Vitamin) รวมถึงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดอื่น ๆ (จิตติ ท่าไว, 2557) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแอคติโนแบคทีเรียสามารถนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้หลายด้านทั้งในอุตสาหกรรมยา เทคโนโลยีชีวภาพ อุตสาหกรรมอาหาร การเกษตร และอุตสาหกรรมการผลิตเอนไซม์ (Mawang *et al.*, 2021)

2.2 ระบบนิเวศน์ทางทะเล และแอคติโนแบคทีเรียทางทะเล

2.2.1 ระบบนิเวศน์ทางทะเลบริเวณอ่าวไทยตอนบน

ระบบนิเวศน์ทางทะเลมีพื้นที่มากถึงร้อยละ 70 ของพื้นผิวโลก จัดเป็นระบบนิเวศน์ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง คิดเป็นร้อยละ 95 ของสิ่งมีชีวิตทั้งหมด ระบบนิเวศน์ทางทะเลมีสภาวะแวดล้อมที่ต่างจากจากระบบนิเวศน์บนบกหลายประการ เช่น ความดันสูง มีอุณหภูมิต่ำ และความเค็มสูง (Bull *et al.*, 2000) อ่าวไทยตอนบน (The Gulf of Thailand, GOT) เป็นพื้นที่ทะเลต้นแบบกึ่งปิด ตั้งอยู่ทางตอนเหนือของอ่าวไทย ซึ่งเป็นพื้นที่เขตร้อนทางฝั่งตะวันตกของทะเลจีนใต้ พื้นที่ล้อมรอบด้วยประเทศไทย กัมพูชา เวียดนาม คอมโบเดีย และมาเลเซีย (รูปที่ 2.3) (Boonyatumanond *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2018) ครอบคลุมพื้นที่ประมาณ 320,000 ตารางกิโลเมตร โดยมีแม่น้ำทั้งหมดสี่สายไหลผ่านไปยังบริเวณอ่าวไทย ได้แก่ แม่น้ำบางปะกง เจ้าพระยา ท่าจีน และแม่กลอง จัดเป็นทรัพยากรทางทะเลที่สำคัญของประเทศไทย (Fu *et al.*, 2021; Yu *et al.*, 2018)



รูปที่ 2.3 พื้นที่บริเวณอ่าวไทยตอนบน

2.2.2 แอคติโนแบคทีเรียทางทะเล

จนถึงปัจจุบันพบว่าสารปฏิชีวนะรวมถึงเมแทบอลิต์ (Metabolites) ถูกค้นพบจากจุลินทรีย์ที่กระจายอยู่ในระบบนิเวศบนบกเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นอีกแหล่งทางเลือกหนึ่งในการค้นหาสารประกอบชนิดใหม่จากจุลินทรีย์คือระบบนิเวศน์ทางทะเลซึ่งมีสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างจากระบบนิเวศน์บนบกเป็นอย่างมาก จุลินทรีย์ในระบบนิเวศน์ทางทะเลจึงอาจมีลักษณะที่แตกต่างจากจุลินทรีย์บนบก ด้วยเหตุนี้จึงมีความน่าสนใจในการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่รวมถึงอาจค้นพบแอคติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่จากตัวอย่างทางทะเลได้ แอคติโนแบคทีเรียทางทะเลสามารถพบได้ทั้งในบริเวณมหาสมุทรและชายฝั่งทะเล ตัวอย่างที่มีการคัดแยกแอคติโนแบคทีเรียได้ เช่น น้ำทะเล ฟีช ฟองน้ำทะเล และตะกอนดินทะเล เป็นต้น การกระจายตัวของแอคติโนแบคทีเรียในตัวอย่างทางทะเลมีความแตกต่างกันไป ตัวอย่างชนิดของแอคติโนแบคทีเรียที่พบในตัวอย่างทางทะเลแสดงในตารางที่ 2.1 (จิตติ ท่าวัว, 2557)

ตารางที่ 2.1 การกระจายตัวของแอกติโนแบคทีเรียในตัวอย่างทางทะเล

ตัวอย่างทางทะเล	แอกติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้
น้ำทะเล	<i>Streptomyces, Micromonospora, Aeromicrobium, Arthrobacter, Blastococcus, Brevibacterium, Curtobacterium, Serinicoccus</i>
ตะกอนดินทะเล	<i>Streptomyces, Micromonospora, Nocardioides, Nocardiosis, Pseudonocardia, Rhodococcus, Sanguibacter, Williamsia, Verrucosipora, Actinomadura, Spinactinospora, Sciscionella, Saccharopolyspora, Marinactinospora, Amycolatopsis, Kitasatospora</i>
ทราย	<i>Streptomyces, Micromonospora, Acrocarpospora, Brachybacterium, Nocardia, Nocardioides, Salinispora, Sanguibacter</i>
สาหร่ายและหญ้าทะเล	<i>Streptomyces, Micromonospora, Aeromicrobium, Agrococcus, Labedella, Saccharopolyspora, Actinoalloteichus</i>

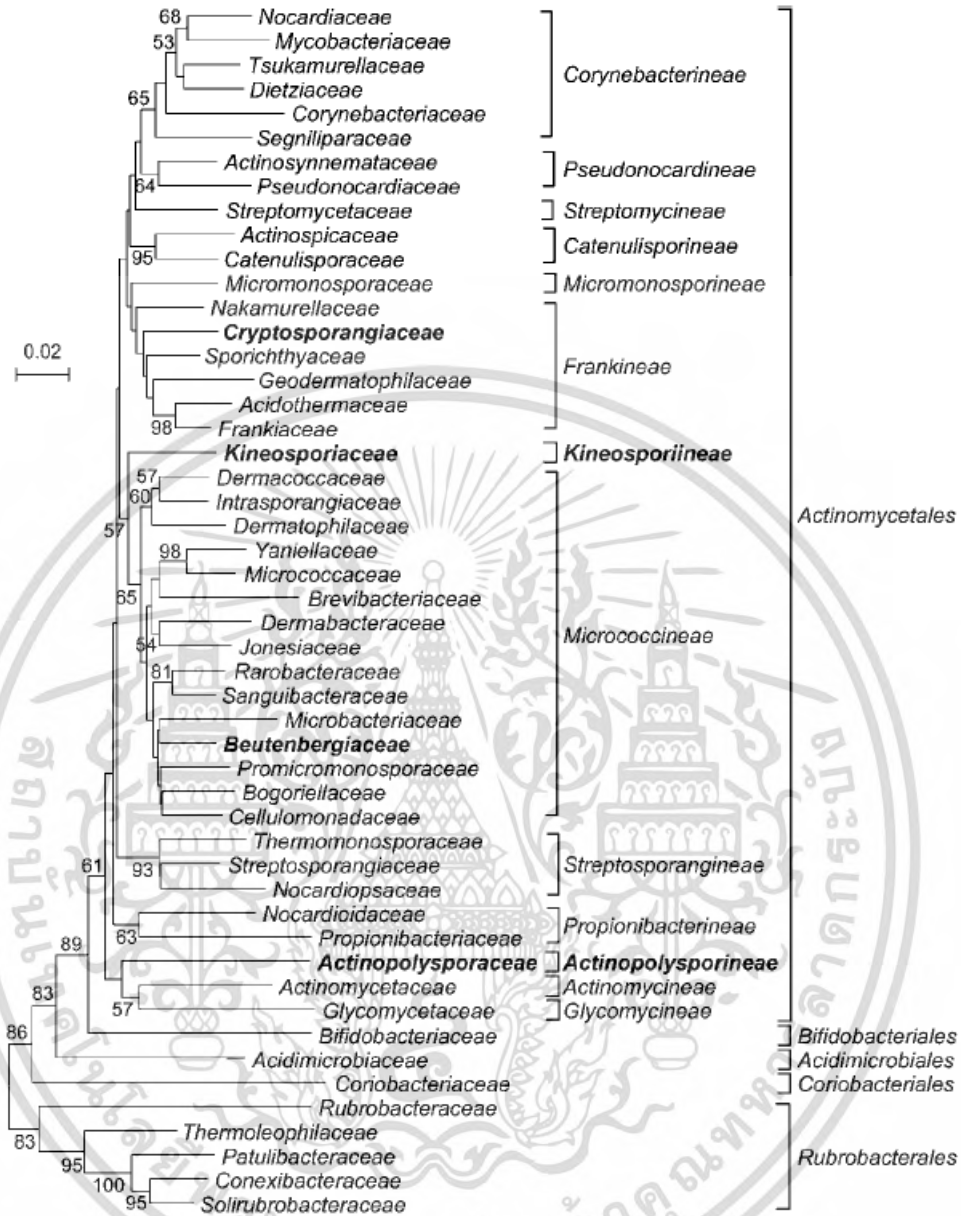
ข้อจำกัดในการเพาะเลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียทางทะเลในห้องปฏิบัติการ คือ แอกติโนแบคทีเรียทางทะเลบางชนิดจำเป็นต้องมีน้ำทะเลเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงจะสามารถเจริญเติบโตได้ (Subramani & Aalbersberg, 2012) กล่าวคือ อาหารที่เหมาะสมสำหรับการคัดแยกแอกติโนแบคทีเรียทางทะเลจำเป็นต้องปรับเปลี่ยนปริมาณธาตุอาหารให้ใกล้เคียงกับสภาพธรรมชาติมากที่สุด ปริมาณแร่ธาตุที่สำคัญที่สุด คือ โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) ควรปรับให้อยู่ในระดับความเข้มข้นร้อยละ 2.5-3.5 (ประมาณ 25-35 ppt) เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาของความเข้มข้นของเกลือในอาหาร นักวิทยาศาสตร์หลายท่านจึงหันมาใช้น้ำทะเลธรรมชาติหรือน้ำทะเลเทียมในอาหารเลี้ยงเชื้อแทน (Supong *et al.*, 2013) เนื่องจากมีปริมาณแร่ธาตุใกล้เคียงกับสภาพความเป็นจริงมากที่สุด อย่างไรก็ตามการทดลองใช้น้ำกลั่นผสมกับโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 ให้ผลสำเร็จในการคัดแยกแอกติโนแบคทีเรียทางทะเลได้เช่นกัน (Maldonado *et al.*, 2005) สำหรับชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียทางทะเลนั้นคล้ายคลึงกับแหล่งไนโตรเจนสำหรับเพาะเลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียทั่วไป แหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ เช่น เปปโตเน สารสกัดยีสต์ คาเซอิน และกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ส่วนชนิดของแหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้ เช่น แป้ง น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และกลีเซอรอล เป็นต้น นอกจากนี้เพื่อเป็นการปรับสภาพของอาหารให้ใกล้เคียงกับสภาพธรรมชาติของทะเลมากที่สุด นักวิทยาศาสตร์บางท่านจึงผสมแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนที่สกัดจากตัวอย่างที่นำมาใช้คัดแยกเชื้อโดยตรง เช่น สารสกัดจากฟองน้ำ สารสกัดตะกอนดินทะเล สารสกัดจากสาหร่าย เพื่อเหนี่ยวนำให้แอกติโนแบคทีเรียที่อาศัยในแหล่งนั้น ๆ สามารถเจริญขึ้นมาได้ (จิตต ท้าว, 2557)

2.3 สารทุติยภูมิจากแอกติโนแบคทีเรีย

แอกติโนแบคทีเรียมีความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิได้หลากหลายชนิด โดยแอกติโนแบคทีเรียจะเริ่มมีการผลิตสารทุติยภูมิเมื่ออยู่ในระยะที่อัตราการเจริญเริ่มช้าลงหรือไม่มีการเจริญเติบโตแล้ว (Sanchez & Demain, 2022) ดังนั้นหากในสิ่งแวดล้อมนั้นมีสารอาหารอย่างเพียงพอต่อการเจริญ เช่น การมีแหล่งคาร์บอนหรือแหล่งไนโตรเจนที่สามารถย่อยสลายและนำไปใช้ได้ง่าย และการมีปริมาณฟอสฟอรัสในระดับสูง จะส่งผลให้การผลิตสารทุติยภูมิเกิดขึ้นได้ช้า (Iwai & Omura, 1981) สารทุติยภูมิที่ผลิตโดยแอกติโนแบคทีเรียออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลาย เช่น มีฤทธิ์เป็นยาปฏิชีวนะ ต้านมะเร็ง ต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บางชนิดได้ (จิตติ ท่าไฉ, 2557; Dahal *et al.*, 2020; Manivasagan *et al.*, 2013) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าแอกติโนแบคทีเรียทางทะเลมีประสิทธิภาพในการผลิตสารทุติยภูมิที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิดเช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ข้างต้น ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้ขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบดังกล่าว อีกทั้งส่วนมากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแอกติโนแบคทีเรียทางทะเลยังสามารถออกฤทธิ์ได้ดีและมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ (Manivasagan *et al.*, 2013) ดังนั้นสารทุติยภูมิจากแอกติโนแบคทีเรียทางทะเลจึงมีความน่าสนใจ และมีแนวโน้มสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในอนาคต

2.4 การจัดจำแนกแอกติโนแบคทีเรีย

แอกติโนแบคทีเรียจัดเป็นไฟลัม (Phylum) ที่ใหญ่ที่สุดในโดเมน (Domain) แบคทีเรีย ในการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียเบื้องต้นนิยมใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในหน่วยยีน 16S rRNA และ 23S rRNA gene ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย จากข้อมูลของ Zhi และคณะ (2009) ได้ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของแอกติโนแบคทีเรียด้วยแผนภูมิสายวิวัฒนาการ (รูปแบบ Neighbor-Joining Tree) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในหน่วยยีน 16S rRNA gene ในการวิเคราะห์ พบว่าแอกติโนแบคทีเรียมีอยู่ทั้งสิ้น 10 ลำดับย่อย (Suborder) 30 วงศ์ (Family) และ 95 สกุล (Genera) ดังแสดงในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการแบบ Neighbor-Joining Tree โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rRNA gene ในการวิเคราะห์ แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อในคลาส Actinobacteria
ที่มา : Zhi *et al.* (2009)

2.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอกติโนแบคทีเรีย

การพิสูจน์เอกลักษณ์ (Identification) ของแอกติโนแบคทีเรีย ใช้วิธีการศึกษาอนุกรมวิธานแบบหลายส่วน (Polyphasic taxonomy) ประกอบด้วยการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ (Phenotypic characteristics) การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี (Chemotaxonomic characteristics) และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ (Genotypic characteristics) ซึ่งลักษณะทั้งหมดนี้จะถูกนำมาใช้การจัดหมวดหมู่ (Classification) ของแอกติโนแบคทีเรียโดยมีรายละเอียดดังนี้

2.5.1 การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์

ลักษณะทางฟีโนไทป์ คือ ลักษณะต่าง ๆ ที่ปรากฏให้เห็น เช่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) ลักษณะการเจริญ (Cultural characteristics) ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี (Physiological and biochemical characteristics)

2.5.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แอกติโนแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างจากแบคทีเรียทั่วไปเนื่องจากมีความสามารถในการสร้างสปอร์และเส้นใยได้ ดังนั้นลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใช้ในการศึกษาแอกติโนแบคทีเรียจึงเป็นการศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการสร้างเส้นใยอากาศ สีของเส้นใยทั้งชนิดเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ การแตกกิ่งก้านของเส้นใย การแบ่งตัวของเส้นใย ความสามารถในการสร้างสปอร์และลักษณะของสปอร์ (เช่น ชนิดของสปอร์ และการจัดเรียงตัวของสปอร์) และสีของรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ เป็นต้น ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันนี้สามารถนำมาใช้ในการจัดหมวดหมู่ของแอกติโนแบคทีเรียในระดับสกุลได้ (Shirling & Gottlieb, 1996) โดยการตรวจสอบลักษณะของเส้นใยและสปอร์เป็นการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยายทั้งหมด 400 เท่า และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM) สำหรับการตรวจสอบสีของเส้นใยและรงควัตถุที่ละลายน้ำ เป็นการตรวจสอบโดยเฉพาะเลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียบนอาหารแข็งชนิดต่าง ๆ ที่ระบุใน International *Streptomyces Project* (ISP) (Shirling and Gottlieb, 1996) แล้วเทียบกับ The NBS-ISCC Colour System (Kelly, 1964)

2.5.1.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

ตัวอย่างการตรวจสอบลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี เช่น การทดสอบความสามารถในการใช้หรือย่อยสลายอินทรีย์วัตถุ การรีดิวซ์ไนเตรต การทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ ความสามารถในการเจริญในสภาวะความเป็นกรด-ด่างระดับต่าง ๆ และการเจริญในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นต้น ลักษณะเหล่านี้สามารถนำมาใช้เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอกติโนแบคทีเรียได้ (Arai, 1975; Shirling & Gottlieb, 1996)

2.5.2 การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี

การวิเคราะห์องค์ประกอบของเซลล์ซึ่งเป็นพื้นฐานของอนุกรมวิธานเคมี สามารถนำมาใช้พิสูจน์เอกลักษณ์และจัดจำแนกแอกติโนแบคทีเรียได้ (Komakata & Suzuki, 1987) การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในเซลล์ เช่น กรดอะมิโน (Amino acid) น้ำตาล (Sugar) ไขมันชนิดมีขั้ว (Polar lipid) กรดไขมัน (Fatty acid) กรดมััยคอลลิก (Mycolic acid) มีนาควิโนน (Menaquinone) และองค์ประกอบของเบสไนติเอ็นเอ (DNA base)

2.5.2.1 องค์ประกอบของผนังเซลล์

ผนังเซลล์ของแอกติโนแบคทีเรียมีโครงสร้างหลักเป็นเปปติโดไกลแคน (Peptidoglycan) โดยองค์ประกอบพื้นฐานของเปปติโดไกลแคนประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 2 ชนิด ได้แก่ *N*-acetylmuramic acid และ *N*-acetylglucosamine โดยมีกรดอะมิโนเชื่อมอยู่กับ *N*-acetylmuramic acid ซึ่งจำนวนและชนิดของกรดอะมิโนที่พบจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแอกติโนแบคทีเรียแต่ละชนิด ในการจัดหมวดหมู่แอกติโนแบคทีเรียจะใช้ความแตกต่างของไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิก (Diaminopimelic acid) และชนิดของเอซิล (*N*-acyl types) ของกรดมิวรามิก (Muramic acid) ที่พบบริเวณผนังเซลล์ ชนิดของกรดอะมิโนต่าง ๆ ที่พบในผนังเซลล์แสดงในตารางที่ 2.2 (Lechevalier & Lechevalier, 1970) ชนิดของกรดอะมิโนที่พบในเปปติโดไกลแคนนี้เป็นข้อมูลสำคัญที่ใช้ในการจัดหมวดหมู่ของแอกติโนแบคทีเรีย โดยที่กรด 2, 6-ไดอะมิโนพิเมลิก (2, 6-diaminopimelic acid, DAP) เป็นกรดอะมิโนชนิดหนึ่งที่สามารถพบได้ในเปปติโดไกลแคน มีไอโซเมอร์ 2 แบบ คือ *LL* และ *meso* ซึ่งในผนังเซลล์ของแอกติโนแบคทีเรียจะมีกรดไดอะมิโนพิเมลิกที่มีไอโซเมอร์ได้เพียงชนิดเดียวเท่านั้น ขึ้นอยู่กับชนิดของแอกติโนแบคทีเรีย ในการตรวจสอบไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกนี้เป็นการนำเซลล์ของแอกติโนแบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบไปย่อยด้วยกรด จากนั้นตรวจสอบชนิดไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกด้วยแผ่นโครมาโตกราฟีแบบกระดาษ (Paper chromatography) หรือใช้แผ่นโครมาโตกราฟีแบบเซลลูโลส (Cellulose thin-layer chromatography) (Komakata & Suzuki, 1987)

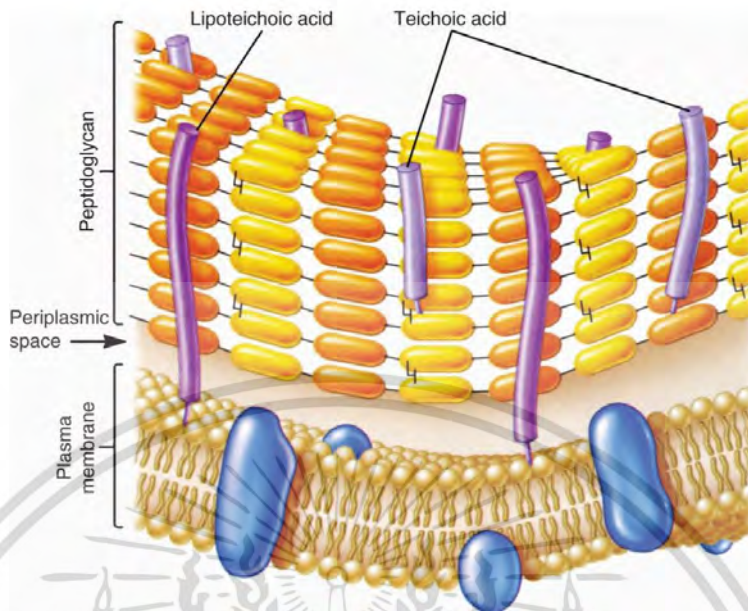
ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์แอกติโนแบคทีเรีย

Cell wall type	DAB	Lysine	Ornithine	Aspartic acid	Glycine	Meso-DAP	LL-DAP	Arabinose	Galactose
I	-	-	-	-	+	-	+	-	-
II	-	-	-	-	+	+**	-	-	-
III	-	-	-	-	-	+	-	-	-
IV	-	-	-	-	-	+	-	+	+
V	-	+	+	-	*	-	-	-	-
VI	-	+	-	+	*	-	-	-	-
VII	+	+	-	+	*	-	-	-	-
VIII	-	-	-	+	*	-	-	-	-

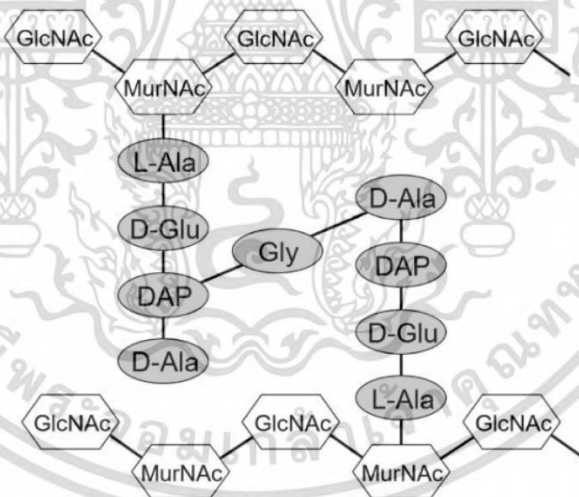
หมายเหตุ : + คือ ตรวจพบ, - คือ ตรวจไม่พบ, * คือ อาจตรวจพบหรือไม่พบ Glycine

** คือ อาจตรวจพบ hydroxy DAP, DAB คือ 2,4-diaminobutyric acid,

DAP คือ 2,6-diaminopimelic acid



รูปที่ 2.5 ผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก
ที่มา : Basicmedicalkey (2017)



รูปที่ 2.6 โครงสร้างเปปติโดไกลแคนของผนังเซลล์แบคทีเรีย
ที่มา : Swift *et al.* (2019)

2.5.2.2 น้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ (Whole-cell sugars)

ชนิดของน้ำตาลที่พบในเซลล์มักถูกใช้เป็นข้อมูลเพื่อจำแนกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอคติโนแบคทีเรีย วิธีการที่ใช้ในการตรวจสอบชนิดของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์คือการนำเซลล์ของแอคติโนแบคทีเรียมาย่อยด้วยกรด จากนั้นตรวจสอบชนิดของน้ำตาลเปรียบเทียบกับน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มาตรฐานโดยใช้แผ่นโครมาโตกราฟีแบบกระดาษหรือใช้แผ่นโครมาโตกราฟีแบบเซลลูโลส (Komakata & Suzuki, 1987) รูปแบบชนิดของน้ำตาลที่ตรวจพบได้ในเซลล์ของแอคติโนแบคทีเรียซึ่งแสดงในตารางที่ 2.3 (Lechevalier & Lechevalier, 1970)

ตารางที่ 2.3 รูปแบบชนิดของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ของแอคติโนแบคทีเรียซึ่งผนังเซลล์ประกอบด้วยกรดไดอะมิโนพีเมติกแบบ *meso*

Type	Diagnostic sugar			
	Arabinose	Galactose	Madurose	Xylose
A	+	+	-	-
B	-	-	+	-
C	No diagnostic sugar			
D	+	-	-	+

หมายเหตุ : + คือ ตรวจพบ, - คือ ตรวจไม่พบ

2.5.2.3 ไขมันชนิดมีขั้ว (Polar lipids)

ฟอสโฟลิปิด (Phospholipids) เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการควบคุมการเข้าออกของสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ มีลักษณะเป็นแอมฟิพาติก (Amphipatic) เนื่องจากในโมเลกุลมีทั้งส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) และส่วนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) ซึ่งประกอบด้วยกรดฟอสโฟริก (Phospholic acid) การวิเคราะห์ชนิดของฟอสโฟลิปิดนิยมทำโดยใช้โครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin-layer chromatography, TLC) ดีเวลอปแบบ 2 มิติ (Two-dimension) ซึ่งจุด (Spot) ของฟอสโฟลิปิดแต่ละชนิดที่ตรวจพบจะมีความจำเพาะกับรีเอเจนต์ (Reagent) ชนิดต่าง ๆ และชนิดของฟอสโฟลิปิดที่ตรวจพบนี้สามารถใช้ในการจัดหมวดหมู่ของแอคติโนแบคทีเรียได้ (Komakata & Suzuki, 1987) รูปแบบของฟอสโฟลิปิดในเยื่อหุ้มเซลล์แสดงในตารางที่ 2.4 (Lechevalier *et al.*, 1977)

ตารางที่ 2.4 ชนิดของฟอสโฟลิปิดที่พบในแอคติโนแบคทีเรีย

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

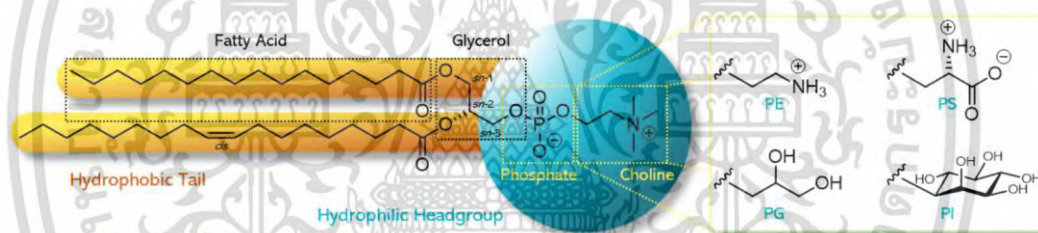
หมายเหตุ : + คือ ตรวจพบ, - คือ ตรวจไม่พบ, V คือ อาจพบหรือไม่พบ

PIMs, Phosphatidyl inositol mannosides; PI, Phosphatidyl inositol;

PC, Phosphatidyl choline; PE, Phosphatidyl ethanolamine;

PME, Phosphatidyl methyl ethanolamine; GluNu, Glucosamine containing unknown phospholipids; APG, Acyl phosphatidyl glycerol;

DPG, diphosphatidyl glycerol



รูปที่ 2.7 โครงสร้างของฟอสโฟลิปิด

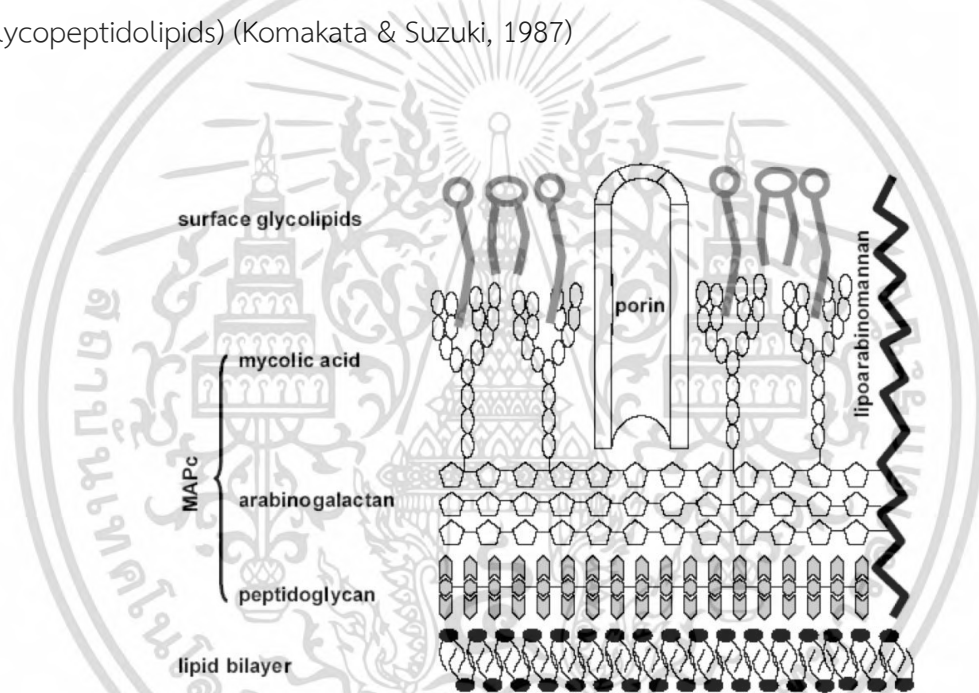
ที่มา : Phospholipid Research Center (2021)

2.5.2.4 กรดไขมันในเซลล์ (Cellular fatty acid)

กรดไขมัน (Fatty acid) เป็นองค์ประกอบของไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ ไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์มีลักษณะเป็นแอมฟิพาติก คือปลายด้านหนึ่งประกอบด้วยกรดฟอสโฟริกที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ (Hydrophilic head) และปลายอีกข้างหนึ่งประกอบด้วยกรดไขมัน 2 ตัว ซึ่งมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ (Hydrophobic tail) กรดไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ กรดไขมันอิ่มตัว (Saturated fatty acid) และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (Unsaturated fatty acid) แอคติโนแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์จะมีเยื่อหุ้มเซลล์ที่ประกอบด้วยกรดไขมันต่างชนิดกัน ดังนั้นชนิดของกรดไขมันที่พบจึงสามารถนำมาใช้ในการจัดหมวดหมู่ของแอคติโนแบคทีเรียได้ (Komakata & Suzuki, 1987) วิธีการวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันคือการตรวจสอบด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas chromatography, GC) เปรียบเทียบชนิดของไขมันกับฐานข้อมูลของ Microbial Identification System (MIDI)

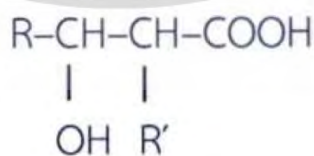
2.5.2.5 กรดมัยคอลลิก (Mycolic acid)

กรดมัยคอลลิก คือ กรดไขมันที่มีหมู่แอลคิลเกาะอยู่กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และมีหมู่ไฮดรอกซิลเกาะอยู่กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของกรดไขมัน (2-alkyl-3-hydroxy fatty acids) ดังแสดงในรูปที่ 2.8 โดยกรดมัยคอลลิกประกอบด้วยคาร์บอน 24-90 อะตอม มักพบในแอคติโนแบคทีเรียสกุล *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* และ *Corynebacterium* กรดมัยคอลลิกจะพบในแบคทีเรียที่มีผนังเซลล์ชนิด IV (มีไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกในผนังเซลล์เป็นแบบ *meso* และภายในเซลล์ประกอบด้วยน้ำตาลชนิดอะราบิโนสและกาแลกโตส) ชนิดของกรดมัยคอลลิกสามารถใช้ในการจำแนกเชื้อในระดับสกุลได้ โดยชนิดของกรดมัยคอลลิกที่พบในผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เช่น ไกลโคลิปิด (Glycolipids) ฟีนอลิก ไกลโคลิปิด (Phenolic glycolipids) หรือไกลโคเปปติโดลิปิด (Glycopeptidolipids) (Komakata & Suzuki, 1987)

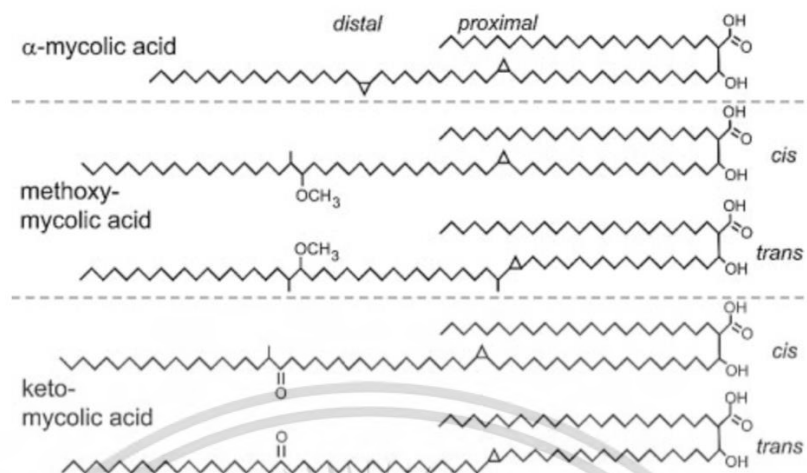


รูปที่ 2.8 กรดมัยคอลลิกบนโครงสร้างผนังเซลล์ของแอคติโนแบคทีเรียในลำดับ Mycobacteriales

ที่มา : SRI International (2022)



รูปที่ 2.9 โครงสร้างของกรดมัยคอลลิก

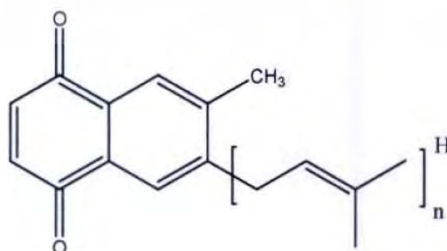


รูปที่ 2.10 ชนิดของกรดมัคคอลลิก

ที่มา : SRI International (2022)

2.5.2.6 ไอโซพรีนอยด์ควิโนน (Isoprenoid quinone)

ไอโซพรีนอยด์ควิโนน มีความสำคัญต่อระบบขนส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจ ภายในเซลล์ของแบคทีเรียสามารถพบควิโนน (Quinone) ได้หลายชนิด ไอโซพรีนอยด์ควิโนนชนิดที่พบได้มากที่สุด คือ มีนาควิโนน (Menaquinones) (รูปที่ 2.11) และยูบิควิโนน (Ubiquinones) ชนิดของควิโนน จำนวนหน่วยของไอโซพรีน (Isoprene units) ในโครงสร้าง และระดับของการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน (Hydrogenation) ของพันธะคู่ในหน่วยไอโซพรีน ถูกนำมาใช้ในการจัดจำแนกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอคติโนแบคทีเรีย วิธีการตรวจวิเคราะห์ชนิดของควิโนนและปริมาณหน่วยของไอโซพรีนเป็นการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High-performance liquid chromatography, HPLC) ร่วมกับการใช้โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบางชนิดกลับเฟส (Reverse-phase thin-layer chromatography) ซึ่งสามารถใช้ในการวิเคราะห์ชนิดของควิโนนได้อย่างรวดเร็ว อีกทั้งเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงยังมีประสิทธิภาพในการแยกและตรวจสอบตัวอย่างที่มีปริมาณน้อย และสามารถวิเคราะห์ควิโนนในเชิงปริมาณได้ (Komakata & Suzuki, 1987; Collins *et al.*, 1977)



รูปที่ 2.11 โครงสร้างของมีนาควิโนน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2.7 องค์ประกอบของเบสในดีเอ็นเอ (DNA base composition)

ดีเอ็นเอประกอบด้วยเบส 4 ชนิด ได้แก่ อะดีนีน (Adenine, A) กวานีน (Guanine, G) ไซโตซีน (Cytosine, C) และ ไทมีน (Thymine, T) ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการจำแนกและระบุชนิดของแอกติโนแบคทีเรียในระดับสกุล และอาจระบุได้ถึงระดับสปีชีส์ โดยทั่วไปองค์ประกอบพื้นฐานของจีโนมแบคทีเรียจะมีปริมาณเบสกวานีนและไซโตซีนตั้งแต่ร้อยละ 25-80 โดยแอกติโนแบคทีเรียจัดเป็นแบคทีเรียที่มีปริมาณเบสกวานีนและไซโตซีนสูง ดังนั้นปริมาณเบสกวานีนและไซโตซีนจึงสามารถแยกความแตกต่างของแอกติโนแบคทีเรียออกจากแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ได้ นอกจากนี้ความแตกต่างองค์ประกอบเบสในดีเอ็นเอของเชื้อสายพันธุ์เดียวกันยังมีค่าอยู่ในช่วงแคบ (1-3 mol% G+C) ดังนั้นความแตกต่างขององค์ประกอบเบสในดีเอ็นเอจึงสามารถบ่งบอกความแตกต่างกันของจีโนมและแยกความแตกต่างในระดับสปีชีส์ได้ (Tamaoka, 1994)

2.5.3 การศึกษาลักษณะทางจีโนม

ข้อมูลในสารพันธุกรรมของแบคทีเรียมีความสำคัญอย่างมากต่อการศึกษาการจัดหมวดหมู่ (Systematic) ของแบคทีเรีย การจัดหมวดหมู่ของแบคทีเรียมักนิยมศึกษาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน 16S rRNA บนสายดีเอ็นเอ เพื่อศึกษาวิวัฒนาการของเชื้อโดยใช้วิธีการวิเคราะห์จากแผนภูมิต้นวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) จำนวนนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดบนสายดีเอ็นเอของแบคทีเรียมีค่าอยู่ในช่วง 0.6-0.8 เมกะเบส (Mb) จัดเป็นรหัสของโปรตีน 600-6,000 ชนิด แต่ยังมีอีกกว่าร้อยละ 30 ของลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอที่ไม่จัดเป็นรหัสสำหรับการสังเคราะห์โปรตีน (Levy & Rogers, 2010)

2.5.3.1 หลักการสกัดดีเอ็นเอ

หลักการสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียเริ่มจากการทำลายผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย จากนั้นกำจัดออร์แกเนลล์อื่น ๆ ภายในเซลล์ที่ไม่ต้องการออกเพื่อให้ได้มาซึ่งดีเอ็นเอ และในขั้นตอนสุดท้ายคือการตกตะกอนดีเอ็นเอและการทำให้ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์ ขั้นตอนที่ใช้ในการทำลายผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ และองค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์ที่ไม่ต้องการนั้นมี 3 วิธี คือ การทำลายโดยใช้สารเคมี การทำลายโดยใช้เอนไซม์ และการทำลายโดยวิธีทางกล (Chauhan, 2018)

(1) การทำลายโดยใช้สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทำลายส่วนของผนังเซลล์แบคทีเรีย เช่น Sodium dodecyl sulfate (SDS), Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) และสารเคมีใด ๆ ที่สามารถย่อยสลายและละลายผนังเซลล์หรือเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ซึ่งกระบวนการที่ใช้ทำลายผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสารเคมี

(2) การทำลายโดยใช้เอนไซม์

เอนไซม์ที่ใช้ในการกำจัดโปรตีน เช่น เอนไซม์ Proteinase K, Peptidase และ Protease ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้มีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนและทำลายโปรตีนได้ดีกว่าการใช้

สารเคมี เนื่องจากเอนไซม์สามารถเข้าไปทำลายพันธะต่าง ๆ ที่เชื่อมต่อนหน่วยย่อยของโปรตีน (กรดอะมิโน) ได้โดยตรง

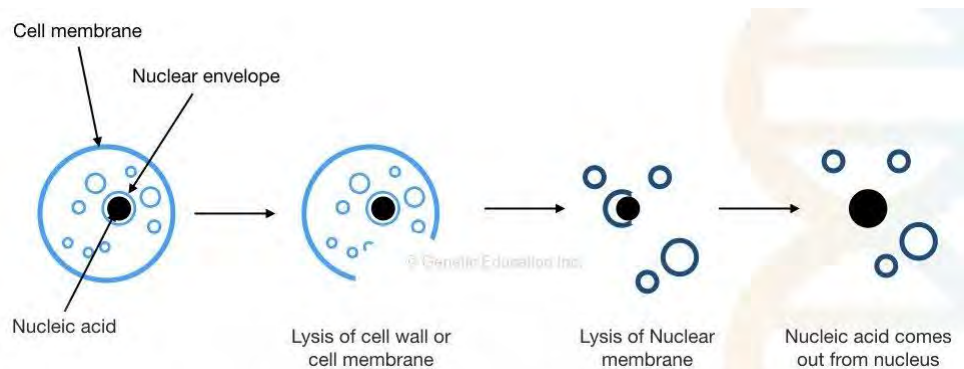
(3) การทำลายโดยวิธีทางกล

การทำลายผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียสามารถทำได้โดยใช้การบด เพื่อให้ผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์นั้นแตกออกส่งผลให้ออร์แกเนลล์ต่าง ๆ รวมถึงสารพันธุกรรมของแบคทีเรียนั้นออกมาจากตัวเซลล์

หลังจากที่ทำการย่อยสลายผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ และโปรตีนต่าง ๆ ภายในเซลล์แล้ว ต้องมีการกำจัดซากเซลล์และออร์แกเนลล์ที่ไม่ต้องการออก เพื่อให้ได้เฉพาะดีเอ็นเอที่ต้องการเท่านั้น ตัวอย่างวิธีการที่ใช้คือการสกัดดีเอ็นเอด้วยฟีนอล-คลอโรฟอร์ม (Phenol-chloroform method) เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ เนื่องจากดีเอ็นเอที่ได้นั้นมีคุณภาพที่ดีและได้ปริมาณค่อนข้างสูง สารเคมีที่ใช้ในวิธีการนี้ได้แก่ ไลซิสบัฟเฟอร์ (Lysis buffer) ฟีนอล และคลอโรฟอร์ม โดยที่ไลซิสบัฟเฟอร์ ประกอบด้วย tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris), ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), magnesium chloride ($MgCl_2$), sodium chloride (NaCl), sodium dodecyl sulfate (SDS) และ เกลือชนิดอื่น ๆ

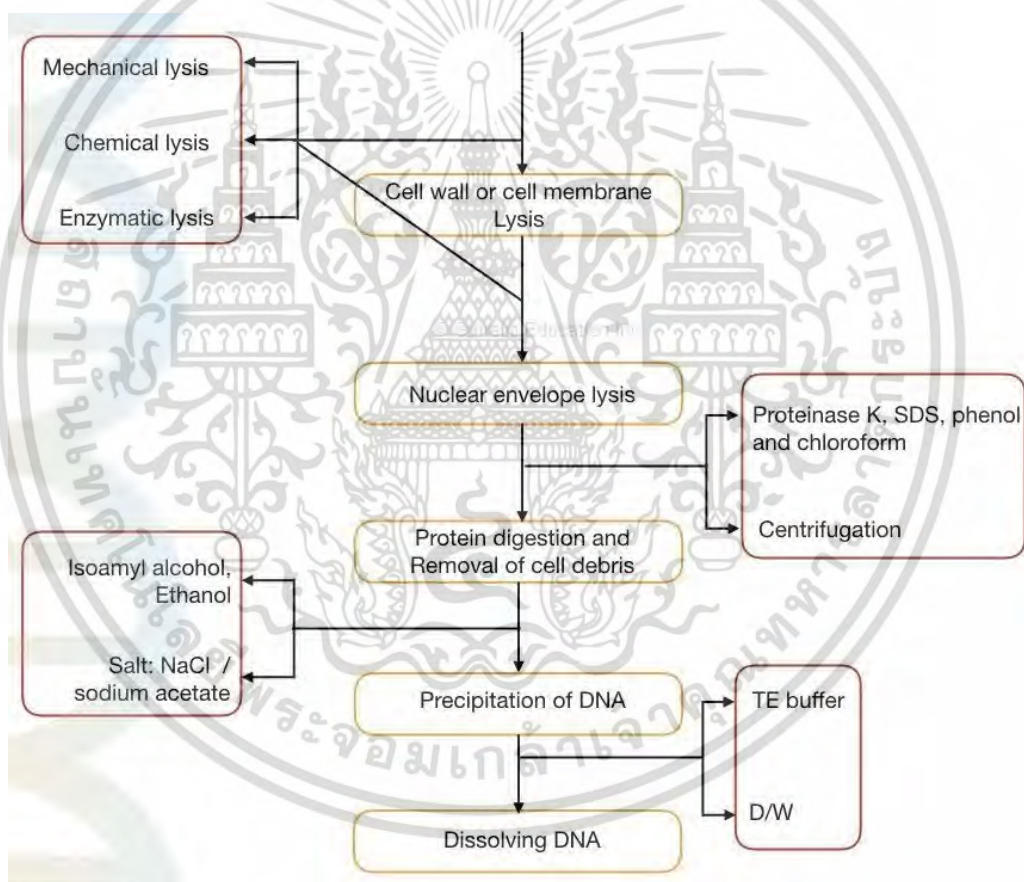
- Tris จะช่วยในการรักษาระดับความเป็นกรด-ด่าง เนื่องจากดีเอ็นเอมีความไวต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง
- EDTA มีคุณสมบัติเป็นสารคีเลตติง (Chelating agent) และสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ดีเอ็นเอส (DNase) ที่สามารถไปทำลายดีเอ็นเอที่เราต้องการได้ โดย EDTA จะทำงานได้ดีเมื่อมี Tris อยู่ในสารละลาย
- SDS มีคุณสมบัติเป็นไอออนิกดีเทอร์เจนต์ (Ionic detergent) เป็นสารลดแรงตึงผิว มีส่วนช่วยในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์
- NaCl ส่วนของโซเดียมไอออน (Na^+) จะสร้างพันธะไอออนิกกับประจุลบของดีเอ็นเอและทำให้มีประจุเป็นกลาง (Neutralizes) มีส่วนช่วยให้ดีเอ็นเอคงตัวมากขึ้น
- $MgCl_2$ ช่วยในการป้องกันสิ่งอันตรายที่จะเกิดขึ้นกับดีเอ็นเอ โดยป้องกันประจุลบของลิโปโปรตีน (Lipoprotein) ในเยื่อหุ้มเซลล์
- ฟีนอลและคลอโรฟอร์ม ช่วยตกตะกอนโปรตีนอื่น ๆ ที่ไม่ต้องการ

เมื่อทำการปั่นเหวี่ยงจะทำให้สารละลายเกิดการแยกออกเป็น 3 ส่วน โดยสามารถสังเกตเห็นตะกอนของโปรตีนอยู่ที่กึ่งกลางระหว่างส่วนของฟีนอล และมีส่วนของดีเอ็นเอละลายอยู่ในสารละลายด้านล่าง เพื่อให้ได้มาซึ่งดีเอ็นเอต้องมีการนำส่วนของสารละลายด้านล่างมาตกตะกอนดีเอ็นเอโดยใช้แอลกอฮอล์ที่เย็นจัด ทำให้บริสุทธิ์ และละลายดีเอ็นเอกลับด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม



รูปที่ 2.12 แสดงหลักการในการสกัดดีเอ็นเอออกจากเซลล์ของสิ่งมีชีวิต

ที่มา : Chauhan (2018)



รูปที่ 2.13 แผนผังกระบวนการสกัดดีเอ็นเอ

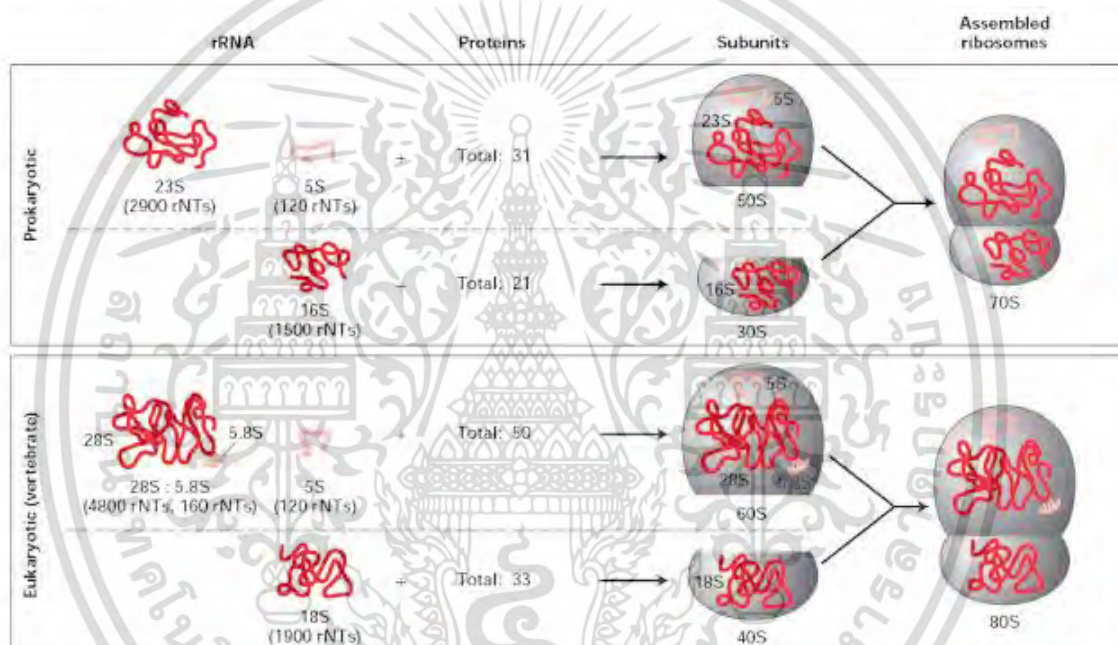
ที่มา : Chauhan (2018)

2.5.3.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน 16S rRNA บนสายดีเอ็นเอ

แม้ว่าสิ่งมีชีวิตสองชนิดจะมีความใกล้เคียงกันแต่ข้อมูลของสารพันธุกรรมอาจมีความแตกต่างกันมาก อย่างไรก็ตามสิ่งมีชีวิตทุกชนิดมีส่วนของไรโบโซมที่คล้ายคลึงกันอยู่ ซึ่งไรโบโซมเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงสร้างเล็กๆภายในเซลล์ที่มีทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีน โครงสร้างของไรโบโซมประกอบด้วยโปรตีน และไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ (rRNA) ไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอถูกสร้างจากดีเอ็นเอในส่วนไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอซิสตรอน (rRNA cistron) ซึ่งพบในแบคทีเรียทุกชนิด และพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน rRNA gene มีความคงตัวสูงมาก ถึงแม้แบคทีเรียชนิดนั้นจะมีวิวัฒนาการมายาวนานแต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง rRNA gene จะมีการเปลี่ยนแปลงไปน้อยมาก เพราะฉะนั้นสิ่งมีชีวิตสองชนิดที่ไม่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันและมีข้อมูลพันธุกรรมที่แตกต่างกัน ยังคงมีลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอซิสตรอนที่ใกล้เคียงกันอยู่ ด้วยเหตุนี้จึงสามารถใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง rRNA gene เป็นเครื่องวัดความใกล้ชิดระหว่างสิ่งมีชีวิตในระดับสกุล (Genus) วงศ์ (Family) และ อันดับ (Order) (นันทวัน เนียมหอม, 2561)



รูปที่ 2.14 องค์ประกอบของไรโบโซมในสิ่งมีชีวิต

ที่มา : Biologyexams4u (2013)

2.5.3.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase) ชนิดที่มีความสามารถในการต่อสายของดีเอ็นเอให้ยาวขึ้นโดยอาศัยดีเอ็นเอต้นแบบสายสั้น ๆ ที่เรียกว่าดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primer) และเอนไซม์ชนิดนี้ต้องมีคุณสมบัติทนความร้อนได้มากกว่า 90 °C เพื่อให้สามารถปรับอุณหภูมิของปฏิกิริยาได้โดยไม่ทำให้เอนไซม์เสียสภาพหรือเสียความสามารถในการทำงาน ปัจจัยสำคัญของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสประกอบด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ที่ต้องการเพิ่มปริมาณ
2. ดีเอ็นเอไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสคู่สมกับดีเอ็นเอแม่แบบที่ปลาย 5' และปลาย 3'
3. ดิวอกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ (Deoxyribonucleotide) คือ dATP dTTP dGTP และ dCTP
4. เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส
5. โคแฟกเตอร์ (Cofactor) ของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส ได้แก่ Mg หรือ Mn

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก คือ

- (1) การเสียสภาพธรรมชาติของดีเอ็นเอ (DNA denaturation)

เป็นการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงพอที่จะทำให้สายดีเอ็นเอแม่แบบเกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติ โดยทำให้สายพอลินิวคลีโอไทด์ (Polynucleotide) สองสายที่พันกันเป็นเกลียวของดีเอ็นเอแยกออกจากกัน อุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนนี้อยู่ที่ประมาณ 90 °C โดยอุณหภูมิที่ใช้จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของเบสกวานีนและไซโตซีน (%G+C content) ในสายดีเอ็นเอ เนื่องจากมีผลต่อความสามารถในการทนความร้อนได้แตกต่างกัน

- (2) การเข้าคู่ของสายดีเอ็นเอตั้งต้นกับดีเอ็นเอที่เป็นไพรเมอร์ (Annealing)

เป็นการปรับอุณหภูมิให้เหมาะสมต่อการเข้าคู่ของสายดีเอ็นเอตั้งต้นกับดีเอ็นเอที่เป็นไพรเมอร์ โดยทั่วไปใช้อุณหภูมิประมาณ 52-58 °C ขึ้นอยู่กับค่าอุณหภูมิการหลอมเหลว (Melting temperature, T_M) ของสายดีเอ็นเอไพรเมอร์ที่เลือกใช้

- (3) การต่อสายยาวของดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (Extension)

เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนของปลาย 5' ของไพรเมอร์ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสาย โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส โดยเอนไซม์ชนิดนี้ทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 72-75 °C และเอนไซม์นี้ควรคงคุณสมบัติของเอนไซม์ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยาทั้งสามขั้นตอน

กระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสนั้น เป็นการดำเนินปฏิกิริยาทั้งสามขั้นตอนข้างต้นซึ่งนับเป็นจำนวน 1 รอบ (One cycle) จะทำให้ได้ดีเอ็นเอใหม่เพิ่มขึ้นเป็นเท่าตัว โดยทั่วไปนิยมทำปฏิกิริยา 20-35 รอบ

2.5.3.4 จีโนมทั้งหมด (Whole genome)

การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ มีอยู่มากมาย แต่การศึกษาวิจัยที่ได้รับการกล่าวถึงอย่างมากในขณะนี้คือ การหาลำดับเบสในสายดีเอ็นเอทั้งหมด (Whole genome sequencing) จีโนม (Genome) หมายถึง สารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอทั้งหมดที่มีอยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ซึ่งมีความจำเป็นต่อการดำเนินชีวิต โดยในจีโนมของสิ่งมีชีวิตจะมีดีเอ็นเอส่วนที่เก็บบรหัสสำหรับสร้างโปรตีนที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ที่เรียกว่า ยีน (Gene) และมีส่วนของดีเอ็นเอที่ไม่ใช่ยีนและยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษาจีโนมนั้นต้องศึกษาทั้งหมด ทั้งส่วนที่เป็นยีนและไม่ใช่ยีน (ประสิทธิ์ ผลิตผลการพิมพ์ และ นเรศ ดำรงชัย, 2543)

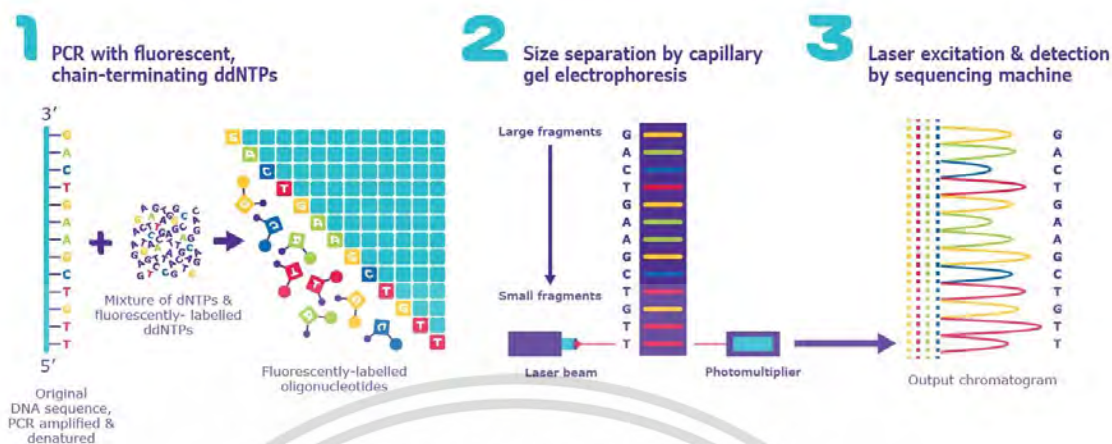
2.5.3.5 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอ (DNA sequencing)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธีแซงเจอร์ (Sanger sequencing) ถูกพัฒนาขึ้นในปี ค.ศ. 1977 โดย Frederick Sanger (Sanger *et al.*, 1977) เป็นเทคนิคที่อาศัยการใช้ Dideoxynucleotide triphosphates (ddNTPs) เป็นตัวหยุดการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ โดยแบ่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเป็นสี่ปฏิกิริยา แต่ละปฏิกิริยาจะมีไพรเมอร์ซึ่งจะเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ และมีเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส ทำหน้าที่สังเคราะห์สายดีเอ็นเอโดยใช้ Deoxynucleotide triphosphates (dNTP) ที่เติมลงในปฏิกิริยาในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ ในแต่ละปฏิกิริยาของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะมีการใส่ ddNTP คนละชนิด (ddATP, ddCTP ddGTP หรือ ddTTP) ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะหยุดเมื่อมี ddNTP เข้ามาจับ ส่งผลให้แต่ละปฏิกิริยาเกิดขึ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีขนาดหลากหลายรวมกันอยู่ ผลผลิตของทั้งสี่ปฏิกิริยาจะถูกนำมาวิเคราะห์ขนาดโดยใช้เจลพอลิอะครีลาไมด์ (Polyacrylamide gel) และใช้วิธีอโตเรดิโอกราฟ (Autoradiograph) แสดงแถบดีเอ็นเอ ต่อมาเทคนิคนี้มีการปรับปรุงให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นโดยมีการใช้สีย้อมฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescence dye) (Smith *et al.*, 1986) แทนการใช้สารกัมมันตรังสีในวิธีอโตเรดิโอกราฟ และรวมปฏิกิริยาทั้งสี่ไว้ในหลอดเดียวกัน และยังมีการใช้โวลต์โรไฟลิสซิสแบบแคปิลลารี (Capillary electrophoresis) แทนการแยกชิ้นของดีเอ็นเอด้วยพอลิอะครีลาไมด์เจล วิธีการนี้นับเป็นเทคโนโลยีการวิเคราะห์ลำดับเบสยุคที่หนึ่ง (First generation sequencing) ข้อจำกัดของวิธีแซงเจอร์คืออ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้อยู่ในช่วง 500-800 คู่เบสเท่านั้น จึงมีการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ เรียกว่า การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบช็อตกัน (Shotgun sequencing) เป็นการตัดชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ให้มีขนาดเล็กลงและให้มีส่วนที่ซ้อนทับกัน (Overlapping) ของชิ้นดีเอ็นเอเพื่อสามารถนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาเชื่อมกันเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอขนาดใหญ่ที่มีอยู่เดิม (กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ และคณะ, 2558) ปัจจุบันเทคโนโลยีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ก้าวเข้าสู่ยุคที่สองและยุคที่สามซึ่งแตกต่างจากยุคแรกตรงที่สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอได้พร้อม ๆ กันจำนวนมาก (Massively parallel sequencing) จากคลังดีเอ็นเอ (DNA library) ต้นแบบที่เตรียมโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ทำให้ได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวนมากในเวลาอันรวดเร็ว (กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ และคณะ, 2558) อย่างไรก็ตามการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Sanger sequencing ได้รับความนิยมมาถึงในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ไม่มีค่าใช้จ่ายสูง (Gibthai, 2019)

เทคโนโลยีเอ็นจีเอสหรือ Next generation sequencing technology มีวัตถุประสงค์หลัก เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมของสิ่งมีชีวิตด้วยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบขนานที่ทำได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ ทำให้ได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวนมากมหาศาลที่มีต้นทุนค่าใช้จ่ายที่ถูกลงกว่าการหาลำดับเบสด้วยเทคโนโลยีของแซงเจอร์ ปัจจุบันเครื่องมือของเทคโนโลยีเอ็นจีเอสมีสามรูปแบบหลักที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางได้แก่ 454/Roche, Illumina, และ SOLiD/Life Technology (ABI) โดยเครื่องมือต่าง ๆ เหล่านี้มีหลักการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ รูปแบบของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์สายสั้น (Reads) และจำนวนของข้อมูล Reads ที่ออกมาแตกต่างกันไป (อลิษา วิลันโท และคณะ, 2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.15 แผนผังกระบวนการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Sanger sequencing
ที่มา : Sigmaaldrich (2018)

2.6 ชีวสารสนเทศ (Bioinformatics)

ชีวสารสนเทศ (Bioinformatics) เป็นศาสตร์การจัดการข้อมูลทางชีววิทยาซึ่งมีอยู่เป็นปริมาณมากเพื่อการประยุกต์ อาศัยการนำผลการทดลองจากการวิจัยในห้องปฏิบัติการ (*In vitro* informations) บันทึกลงในฐานข้อมูลที่แยกประเภทชัดเจน และเมื่อต้องการออกแบบการทดลองใหม่หรือตั้งสมมติฐานใหม่ ก็นำข้อมูลดังกล่าวกลับมาช่วยวิเคราะห์ ทำนายสมมติฐานหรือสร้างต้นแบบการทดลองใหม่ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (*In silico* modeling) ล่วงหน้าก่อนการลงมือทำปฏิบัติการจริงได้ ช่วยลดเวลาและค่าใช้จ่ายในการทำงาน ปัจจุบันนี้มีฐานข้อมูลทางชีววิทยาให้เลือกใช้หลากหลายตามการใช้งาน ตัวอย่างเช่น ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนมของจุลชีพ ข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เซลล์ลูเลสในรา เป็นต้น สามารถแบ่งออกเป็นหมวดหมู่กว้าง ๆ ได้ดังนี้ (ชมภูนุช วิรุณานนท์ และวรวิทย์ จุฬาลักษณ์านุกูล, 2553)

- (1) ฐานข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาจีโนม หรือข้อมูลโครงสร้างและหน้าที่ของยีน
- (2) ฐานข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาทรานสคริปโตม (Transcriptome) หรือข้อมูลการแปลรหัสของยีน
- (3) ฐานข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาโปรตีโอม (Proteome) หรือข้อมูลจากการศึกษาโปรตีนที่อยู่ในสิ่งมีชีวิต
- (4) ฐานข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาเมตาโบโลม (Metabolome) วิถีเมตาบอลิซึม

2.6.1 การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรม

การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์หรือกรดอะมิโนจากสายโพลีเปปไทด์หลาย ๆ สายของทั้งหมดหรือส่วนหนึ่งของสายโพลีเปปไทด์ (Alignment) เป็นข้อมูลพื้นฐานในการทำนายโครงสร้างโปรตีน บริเวณที่จัดเรียงกันได้ดีที่สุดในโครงสร้างจะมีการแสดงผลออกมาโดยการทำงานของโปรแกรมซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กำหนดค่าโดยผู้ใช้ การจัดเรียงที่ดีที่สุดนั้นมักเป็นการพยายามทำให้ทั้งจำนวนและช่องว่างและลำดับกรดอะมิโนหรือดีเอ็นเอที่เข้าคู่ผิด (Mismatch) มีค่าน้อยที่สุด (เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์, 2545)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมจากการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ เป็นประโยชน์ต่อการทำงานทางชีวโมเลกุลมากทางด้านการวิเคราะห์หายีน โครงสร้างของยีน เช่น ส่วนที่ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของยีน (Regulatory elements) ส่วนที่จะทำการแปลรหัสเพื่อให้ได้โปรตีน (Coding sequence) หรือแม้กระทั่งการจัดจำแนกและชี้เฉพาะสปีชีส์ของสิ่งมีชีวิตโดยเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ และสร้างแผนภาพต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตขึ้นมา เป็นต้น (ชมภูณูช วิรุณานนท์ และวรวุฒิ จุฬาลักษณ์านุกูล, 2553)

2.6.2 การทำนายหน้าที่ของจีโนม

การทำนายหน้าที่ของจีโนม (Genome annotation) คือ กระบวนการระบุตำแหน่งของยีนและบริเวณที่สามารถแปลรหัสออกมาเป็นโปรตีนได้ (Coding region) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดในจีโนมนั้น ๆ รวมไปถึงการกำหนดหน้าที่ของยีนต่าง ๆ ในจีโนม (MedicineNet, 2021) กระบวนการในการทำนายหน้าที่ของจีโนมโดยภาพรวมประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอน (Galaxyproject, 2015)

- (1) การระบุส่วนของจีโนมที่ไม่สามารถแปลรหัสออกมาเป็นโปรตีนได้ (Non-coding region)
 - (2) การระบุส่วนของจีโนมที่สามารถแปลรหัสออกมาเป็นโปรตีนได้ (Coding region)
- กระบวนการนี้เรียกว่า Gene finding หรือ Gene prediction
- (3) กำหนดข้อมูลทางชีวภาพให้กับส่วนของยีนต่าง ๆ

หลักการการทำนายหน้าที่ของจีโนมนั้นคือการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมที่ผ่านการ Assembly มาหาตำแหน่งของยีนเพื่อระบุตำแหน่ง Open reading frames (ORFs) บนจีโนมโดยการใช้เครื่องมือหาตำแหน่งยีน เช่น GeneMark และ Metagene annotator ซึ่งตำแหน่งของ ORFs จะถูกนำไปเปรียบเทียบกับ (Blast) กับฐานข้อมูล เช่น Genbank และ Uniport เพื่อระบุว่า ORFs นั้น ๆ จะถูกแปลงไปเป็นโปรตีนที่มีหน้าที่และเกี่ยวข้องกับวิถีเมตาบอลิก (Metabolic pathway) ไต ข้อมูลจากการทำนายหน้าที่ของจีโนมจะแสดงออกมาในรูปแบบของ Cluster orthologous groups (COGs) (สักรการ ชนะเดช, 2564)

2.6.3 Average Nucleotide Identity (ANI)

Average Nucleotide Identity (ANI) คือ ค่าที่ใช้ในการบ่งชี้ความคล้ายคลึงกันระหว่างจีโนมสองจีโนมซึ่งเปรียบเทียบกับในระดับนิวคลีโอไทด์ สามารถใช้ค่า ANI ในการระบุชนิดของจุลินทรีย์ได้ โดยเป็นที่ยอมรับว่าหากมีค่า ANI มากกว่าร้อยละ 95 จะถือว่าสิ่งมีชีวิตทั้งสองชนิดที่เปรียบเทียบกับนั้นเป็นสิ่งมีชีวิตในสปีชีส์เดียวกัน ในปัจจุบันการคำนวณค่า ANI อาศัยโปรแกรมทางคอมพิวเตอร์ เช่น JSpecies และ Gegenees นอกจากนี้ยังมีโปรแกรมออนไลน์ เช่น EzGenome (<http://www.ezbiocloud.net>) และ ANI calculator (<http://enve-omics.ce.gatech.edu>) (Goris *et al.*, 2007; Figueras *et al.*, 2014; Richter and Rosselló-Mora, 2009)

2.6.4 Digital DNA-DNA Hybridization (dDDH)

Digital DNA-DNA hybridization (dDDH) เป็นเทคนิคที่พัฒนามาจากวิธี DNA-DNA hybridization (DDH) แตกต่างกันว่า dDDH นั้นเป็นการทดลองผ่านระบบดิจิทัล (*in silico*) โดยใช้ซอฟต์แวร์ Genome-To-Genome Distance Calculator (GGDC) (<https://ggdc.dsmz.de/ggdc.php>) ซึ่งรองรับข้อมูลที่เป็นจีโนมทั้งหมด (Complete genomes) หรือข้อมูลที่เป็น Assembled genomes โดยค่าความคล้ายคลึง (Similarity values) ที่ได้นั้นเป็นที่ยอมรับกันว่าหากมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 70 ถือว่าสิ่งมีชีวิตทั้งสองที่นำมาเปรียบเทียบกันอาจเป็นสิ่งมีชีวิตต่างสปีชีส์ (Auch *et al.*, 2010; Meier-Kolthoff *et al.*, 2013; Sant'Anna *et al.*, 2019)

2.6.5 การศึกษากลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิของแบคทีเรีย

ในจีโนมของแบคทีเรียนั้นประกอบไปด้วยกลุ่มยีนที่ถอดรหัสไปสู่วิถีเมแทบอลิซึมของสารทุติยภูมิ (Gene clusters for secondary metabolic pathways) (Osbourn, 2010) ข้อมูลทางพันธุศาสตร์จึงสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการวิเคราะห์ความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิของสิ่งมีชีวิตที่สนใจได้ การใช้โปรแกรม antiSMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org>) เป็นเครื่องมือหนึ่งที่ใช้ในการศึกษากลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิของแบคทีเรีย โดยอาศัยการนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนมของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ (Blin *et al.*, 2016)

2.6.6 การสร้างแผนภูมิตายวิวัฒนาการ

แผนภูมิตายวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) คือแผนภูมิที่ใช้ในการศึกษาประวัติและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต โดยนำข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่สนใจมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมทางคอมพิวเตอร์เพื่อให้ได้เป็นแผนภูมิตายวิวัฒนาการ นอกจากนี้ยังใช้เพื่อศึกษาวิวัฒนาการและความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตแล้ว ยังใช้เป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์ในด้านอื่น ๆ เช่น ระบาดวิทยา การควบคุมโรค การออกแบบวัคซีน ยา และเอนไซม์ เป็นต้น สำหรับการสร้างแผนภูมิตายวิวัฒนาการนี้ (สมชาย แสงอำนาจเดช, 2551)

(1) การรวบรวมข้อมูล : คือการนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตที่สนใจจากฐานข้อมูลเพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ ซึ่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์นี้สามารถรวบรวมได้จากการเปรียบเทียบ (BLAST) ในฐานข้อมูลออนไลน์ เช่น ฐานข้อมูล NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

(2) การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ : นำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่รวบรวมได้มาจัดเรียงให้เหมาะสมโดยใช้โปรแกรม เช่น Clustal หรือ ClustalW (<http://www.clustal.org/>) ผลลัพธ์ที่ได้อาจเกิดช่องว่าง (Gaps) ในตำแหน่งที่ไม่เหมาะสมซึ่งต้องทำการปรับแต่งโดยการตรวจสอบด้วยตัวเองอีกครั้ง โดยใช้โปรแกรม Bioedit (<https://www.bioedit.com/>)

(3) การเลือกใช้วิธีวิเคราะห์โมเดลและโปรแกรมสำหรับสร้างแผนภูมิ : พิจารณาเลือกสร้างแผนภูมิจากลำดับนิวคลีโอไทด์หรือลำดับของโปรตีน ตัดสินใจเลือกตัดข้อมูลที่ไม่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ เลือกวิธีการสำหรับคำนวณเพื่อวิเคราะห์แผนภูมิ และเลือกโปรแกรมที่จะใช้ในการวิเคราะห์

(4) การทดสอบ : นิยมใช้ บูทสแตร์พิง (Bootstrapping) ซึ่งเป็นวิธีในการทดสอบความถูกต้องของแผนภูมิ เพื่อทดสอบว่าชุดของข้อมูลทั้งหมดสอดคล้องกับแผนภูมิหรือไม่

(5) การนำเสนอข้อมูล : การนำเสนอแผนภูมิมีหลักการปฏิบัติที่ยอมรับ คือ ความยาวของแขนงจะเขียนเป็นตามสเกล (เป็นสัดส่วนกับปริมาณวิวัฒนาการ) บอกค่าบูทสแตร์พิงเป็นค่าร้อยละ (เปอร์เซ็นต์)

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์จากเดิมที่สามารถศึกษาและเปรียบเทียบได้โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนหรือส่วนของยีนหนึ่ง ๆ เท่านั้น ในปัจจุบันนี้การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นสามารถศึกษาได้ถึงในระดับจีโนม ดังนั้นจึงมีการวิเคราะห์แผนภูมิสายวิวัฒนาการที่ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดในการวิเคราะห์เรียกว่า Phylogenomics tree ส่วนแผนภูมิสายวิวัฒนาการที่ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วน เช่น ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีนหนึ่ง ๆ นั้นเรียกว่า Phylogenetic tree (Elizabeth, 2008; Adhikari *et al.*, 2015)

2.7 หลักการสกัดสาร

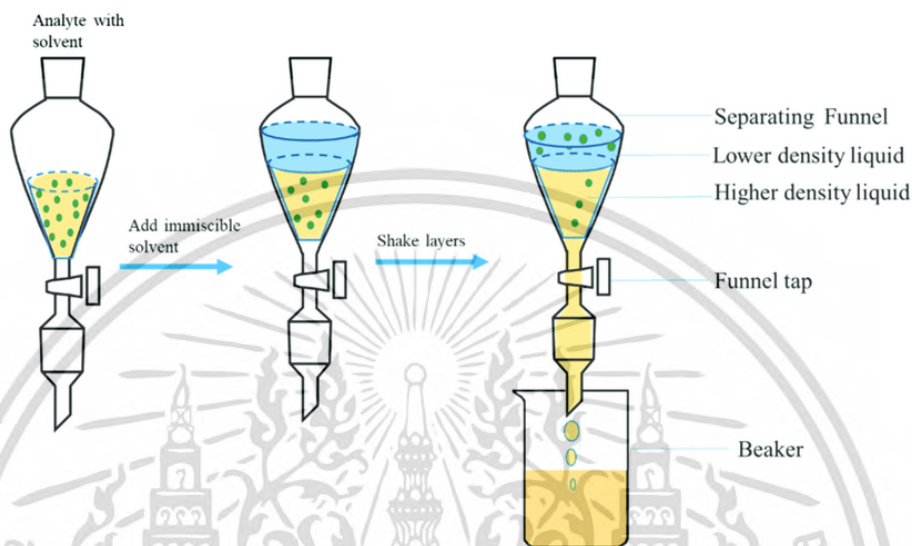
2.7.1 การแช่ในตัวทำละลาย (Maceration)

การแช่ในตัวทำละลาย (Maceration) เป็นวิธีการสกัดอย่างง่าย แต่มีข้อเสีย คือ ใช้เวลาในการสกัดนาน สิ้นเปลืองตัวทำละลาย และมีประสิทธิภาพต่ำ ทำได้โดยแช่ตัวอย่างที่ต้องการสกัดสารในตัวทำละลาย (ตัวอย่างนั้นอาจอยู่ในรูปของแข็งหรืออยู่ในรูปผง) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 3 วัน อาจมีการเขย่าหรือคนในระหว่างการหมัก เมื่อครบกำหนดเวลาให้แยกตัวทำละลายออก และนำตัวทำละลายไประเหยออกเพื่อให้สารสกัดมีความเข้มข้นมากขึ้น จุดสำคัญของวิธีการสกัดสารโดยการแช่ คือ การเลือกชนิดของตัวทำละลาย โดยตัวทำละลายนั้น ๆ ต้องสามารถแยกสารที่ต้องการออกจากตัวอย่างได้ (Mazzutt *et al.*, 2020)

2.7.2 การสกัดสารในของเหลวด้วยของเหลว (Liquid-liquid extraction)

การสกัดสารในของเหลวด้วยของเหลว (Liquid-liquid extraction) คือ การสกัดสารจากตัวอย่างที่อยู่ในรูปสารละลายซึ่งเป็นของเหลวด้วยตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่งซึ่งไม่ผสมกับตัวทำละลายชนิดแรก วิธีนี้ใช้สำหรับแยกสารประกอบตามการละลายสัมพัทธ์ระหว่างของเหลวสองชนิดที่แตกต่างกัน (โดยปกติจะเป็นน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์) การสกัดสารด้วยวิธีการนี้แบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ Extractant lighter คือ สกัดสารโดยใช้ตัวทำละลายที่เบากว่าตัวทำละลายที่ใช้ละลายสาร และ Reffinate lighter คือ สกัดสารโดยใช้ตัวทำละลายที่หนักกว่าตัวทำละลายที่ใช้ละลายสาร ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดทั่วไป เช่น ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) คลอโรฟอร์ม (Chloroform) 1-คลอโรบี

วเทน (1-chlorobutane) โทลูอีน (Toluene) เฮกเซน (Hexane) และเอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate) เป็นต้น (Urkude *et al.*, 2019)



รูปที่ 2.16 แสดงหลักการสกัดสารในของเหลวด้วยของเหลว

ที่มา : Targuma *et al.* (2021)

2.8 การแยกสารทุติยภูมิให้บริสุทธิ์

เนื่องจากสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากตัวอย่างทางธรรมชาตินั้นประกอบไปด้วยสารหลากหลายชนิดรวมอยู่ด้วยกัน จึงไม่สามารถทราบได้แน่ชัดได้ว่าฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกิดขึ้นนั้นเกิดจากสารประกอบชนิดใด ดังนั้นหากต้องมีการวิเคราะห์โครงสร้างและระบุชนิดของสาร หรือต้องการทราบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ชนิดใดชนิดหนึ่งจึงจำเป็นต้องทำการแยกสารผสมออกจากกัน เพื่อให้ได้เป็นสารบริสุทธิ์เสียก่อน การตรวจสอบและแยกสารเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์สามารถทำได้โดยอาศัยเทคนิคของโครมาโทกราฟี (Chromatography) (Chanadech, *et al.*, 2021)

โครมาโทกราฟีเป็นวิธีการแยกสารโดยอาศัยคุณสมบัติในการละลาย ขนาดและประจุของโมเลกุลสารในองค์ประกอบสองส่วน ส่วนแรกคือส่วนคงที่ (Stationary phase) ซึ่งอาจเป็นของแข็งหรือของเหลวที่ฉาบอยู่บนตัวค้ำจุน (Supporting medium) ส่วนนี้จะอยู่กับที่ในขณะที่โมเลกุลของสารที่ต้องการแยกจะต้องผ่านส่วนนี้ไป อีกส่วนหนึ่งคือส่วนเคลื่อนที่ (Moving phase) อาจเป็นของเหลวหรือก๊าซที่จะพาโมเลกุลสารที่ต้องการแยกออกไปจากส่วนคงที่ ชนิดของโครมาโทกราฟีมีดังนี้ (สุนันทา ภิัญญาวิธน์, 2542)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(1) โครมาโทกราฟีแบบดูดซับ (Absorption chromatography)

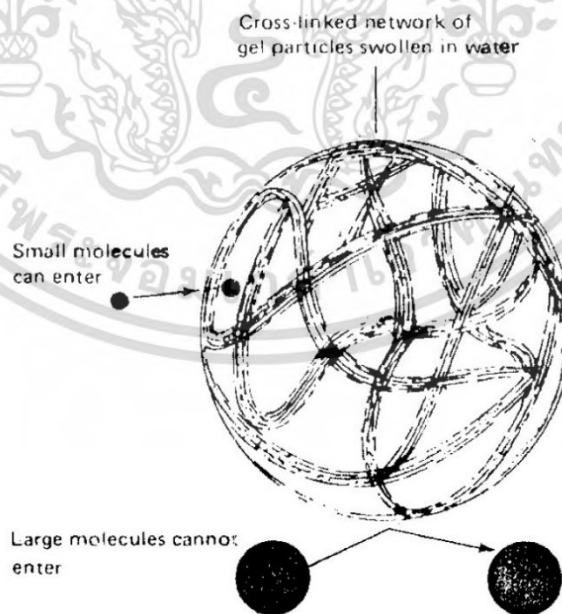
เป็นวิธีการแยกสารโดยใช้สารที่ต้องการแยกลงในคอลัมน์ที่บรรจุตัวดูดซับ (Adsorbent) สารเหล่านั้นจะถูกดูดไว้ที่ผิวหน้าของคอลัมน์ และค่อย ๆ เคลื่อนตัวเองไปตามคอลัมน์ เมื่อผ่านตัวทำละลายหรือตัวทำละลายผสมลงไปแล้ว สารใดที่มีสัมพรรคภาพ (Affinity) กับสารตัวทำละลายสูงจะถูกดูดซับไว้น้อย และเคลื่อนตัวออกจากคอลัมน์ได้ไว

(2) โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (Ion-exchange chromatography)

เป็นวิธีการแยกโดยอาศัยแรงดึงดูดของประจุตรงข้าม ระหว่างประจุบนโมเลกุลของสารที่ต้องการแยกกับประจุบนอนุภาคของเรซิน (Resin) ซึ่งเป็นส่วนคงที่ โมเลกุลของสารใดที่ไม่มีประจุหรือประจุชนิดเดียวกันกับอนุภาคเรซินจะไหลผ่านแลกเปลี่ยนออกจากรวมก่อนด้วยบัฟเฟอร์ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นหรือเปลี่ยนค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของบัฟเฟอร์ที่ใช้ก็จะสามารถชะสารที่เกาะอยู่กับเรซินออกได้

(3) เจลฟิลเตรชันโครมาโทกราฟี (Gel-filtration chromatography)

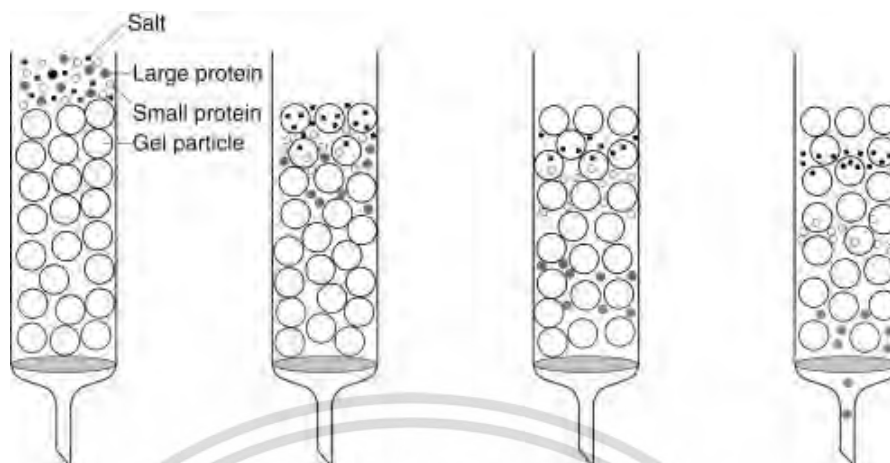
การแยกสารด้วยวิธีนี้อาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุลสาร โดยส่วนคงที่ประกอบด้วยอนุภาคเจลที่มีรูพรุนคล้ายฟองน้ำ (รูปที่ 2.17) ยอมให้น้ำหรือสารโมเลกุลขนาดเล็กกว่ารูพรุนผ่านเข้าออกเนื้อเจลได้ ในขณะที่สารโมเลกุลใหญ่กว่ารูพรุนจะเข้าเจลไม่ได้ จึงถูกชะออกมาตามช่องว่างระหว่างอนุภาคเจลโดยส่วนเคลื่อนที่ สารโมเลกุลใหญ่จะออกจากคอลัมน์ได้ก่อนสารโมเลกุลเล็ก ซึ่งต้องเสียเวลาผ่านเข้าไปในอนุภาคเจล เจลมีขนาดรูพรุนต่างกันไปซึ่งสามารถเลือกใช้เจลที่มีขนาดรูพรุนเหมาะสมในการแยกสารขนาดโมเลกุลต่าง ๆ ได้



รูปที่ 2.17 อนุภาคเจล

ที่มา : สุนันทา ภิณญาวัฒน์ (2542)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.18 การแยกโมเลกุลของสารที่มีขนาดแตกต่างกันด้วยเจลฟิลเตรชันโครมาโทกราฟี
ที่มา : Prapulla, & Karanth (2014)

(4) โครมาโทกราฟีแบบแยกส่วน (Partition chromatography)

การแยกวิธีนี้เป็นอินเตอร์มีเดียระหว่างโครมาโทกราฟีแบบดูดซับและโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ ใช้สำหรับแยกสารที่ละลายได้ทั้งในน้ำและในตัวทำละลายอินทรีย์ ถ้าเรานำสารชนิดหนึ่งไปเทียบกับตัวทำละลายสองชนิดที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกันในกรวยแยกสารนั้นจะแพร่กระจายเข้าไปอยู่ในชั้นทั้งสองของตัวทำละลายอย่างไม่สม่ำเสมอ ที่ภาวะสมดุลอัตราส่วนความเข้มข้นของสารนั้นในชั้นทั้งสองจะมีค่าคงที่ เรียกว่า สัมประสิทธิ์การแยกส่วน (Partition coefficient)

$$\text{Partition coefficient} = \frac{\text{ความเข้มข้นสารในตัวทำละลาย 1}}{\text{ความเข้มข้นสารในตัวทำละลาย 2}}$$

เมื่อปริมาตรของตัวทำละลายทั้งสองเท่ากัน จะได้ว่า

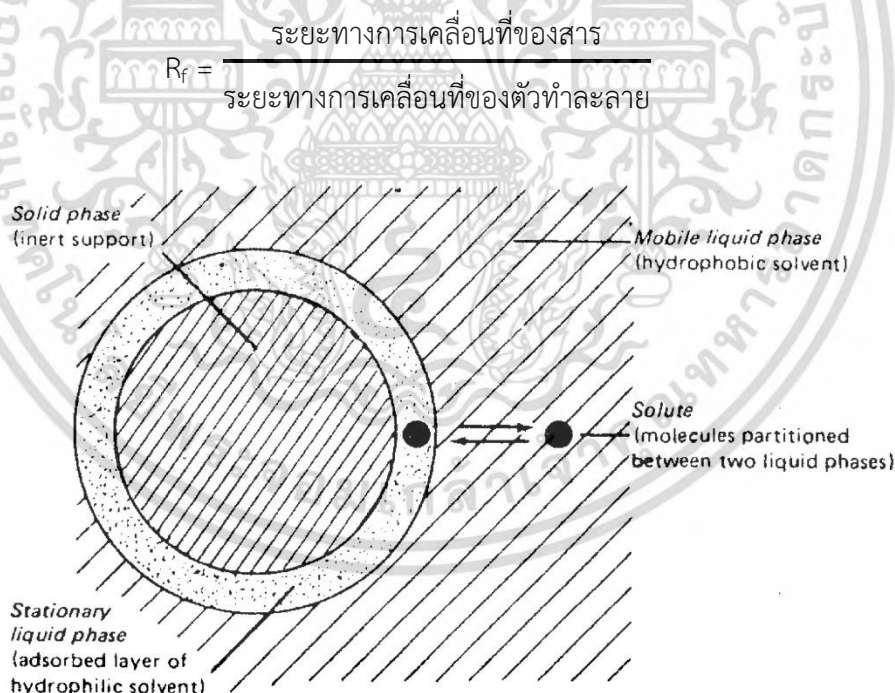
$$\text{Partition coefficient} = \frac{\text{ปริมาณสารในตัวทำละลาย 1}}{\text{ปริมาณสารในตัวทำละลาย 2}}$$

โดยตัวทำละลายหนึ่งมักเป็นน้ำ เป็นส่วนคงที่ที่ติดอยู่กับตัวค้ำจุน ตัวค้ำจุนเป็นสารเฉื่อย (Inert material) อาจบรรจุอยู่ในคอลัมน์หรือฉาบเป็นแผ่นบาง ๆ บนกระดาษ ส่วนเคลื่อนที่เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่อิมัลชันด้วยน้ำซึ่งจะไหลผ่านส่วนคงที่ไป หากค่าสัมประสิทธิ์การแยกส่วนของสารที่จะแยกมีค่าแตกต่างกันมากพอ สารเหล่านั้นจะถูกแยกออกจากกัน

เปเปอร์โครมาโทกราฟีหรืออินแลย์โครมาโทกราฟี (Thin-layer chromatography, TLC) ก็อาศัยหลักการแยกส่วนเช่นกัน โดยใช้สารละลายอิมัลชันของตัวทำละลายอินทรีย์ในตัวทำละลายที่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ช้ามากกว่า เช่น น้ำ เมื่อระบบตัวทำละลายหรือตัวทำละลายผสมนี้เคลื่อนที่ผ่านบนกระดาษ (กรณีเปเปอร์โครมาโทกราฟี) น้ำซึ่งมีช้ามากกว่าจะถูกดูดซับติดกับโมเลกุลเซลลูโลสซึ่งเป็นส่วนคงที่ที่มีขั้ว ในขณะที่ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นสารที่มีขั้วต่ำกว่าจะเคลื่อนที่ผ่านไป เกิดการแยกสารโดยอาศัยค่าสัมประสิทธิ์การแยกส่วนที่แตกต่างกันของสารเหล่านั้น เทคนิคของเปเปอร์โครมาโทกราฟีและอินทรีย์โครมาโทกราฟีนั้นเป็นการหัดสารปริมาณเล็กน้อยลงบนแผ่นกระดาษหรือแผ่นอินทรีย์ (Thin-layer plate) ทำให้แห้งแล้วนำไปจุ่มในภาชนะที่อิมมัวด้วยไอของระบบตัวทำละลาย การเคลื่อนที่ของระบบตัวทำละลายบนแผ่นกระดาษหรือแผ่นอินทรีย์ วิธี Ascending เป็นการเคลื่อนที่ขึ้นโดยอาศัย Capillary action และวิธี Descending เป็นการเคลื่อนที่ลงโดยอาศัยแรงดึงดูดโลก (Gravity) และ Capillary action เมื่อระบบตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปจนเกือบสุดขอบบนของแผ่นกระดาษหรือแผ่นอินทรีย์ซึ่งใช้เวลาแตกต่างกันขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของแผ่นกระดาษหรือแผ่นอินทรีย์นั้น ๆ ระบบตัวทำละลายที่ใช้ และอุณหภูมิ โดยปกติแล้วอินทรีย์โครมาโทกราฟีจะใช้เวลาน้อยกว่าเปเปอร์โครมาโทกราฟี นำแผ่นโครมาโตแกรมที่ได้ไปทำให้แห้ง ฟันด้วยรีเอเจนต์จำเพาะต่อสารนั้น ๆ เพื่อให้เกิดสี หรือถ้าสารนั้นมีคุณสมบัติในการดูดแสงช่วงอัลตราไวโอเล็ต (UV) ก็นำโครมาโตแกรมนั้นไปผ่านแสง UV ในที่มีวัด วงตำแหน่งของจุดต่าง ๆ ไว้เพื่อบันทึกค่า R_f ของแต่ละสารที่แยกได้



รูปที่ 2.19 แสดงหลักการแยกส่วนระหว่างของเหลว-ของเหลว

ที่มา : สุนันทา ภิญญาวัฒน์ (2542)

2.9 การวิเคราะห์โครงสร้างและระบุชนิดของสารอินทรีย์

สารอินทรีย์ที่แยกได้จากธรรมชาติหลายชนิดมีสรรพคุณทางเภสัชวิทยา เช่น ยับยั้งเซลล์มะเร็ง และต้านการอักเสบ เป็นต้น ดังนั้นการหาโครงสร้างของสารอินทรีย์จึงเป็นสิ่งสำคัญเพื่อจะได้นำมาสังเคราะห์ย้อนกลับ (Retrosynthesis) แล้วพัฒนาเป็นยาต่อไป ปกติสารอินทรีย์จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมีโครงสร้างค่อนข้างซับซ้อน ซึ่งการหาโครงสร้างในสมัยก่อนค่อนข้างยุ่งยากและมีข้อจำกัด คือ ตัวอย่างต้องมีปริมาณมาก เครื่องมือและค่าใช้จ่ายสูง แต่ในปัจจุบันมีการพัฒนาเครื่องมือโดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปีทำให้วิเคราะห์ข้อมูลได้ถูกต้องและรวดเร็วขึ้น อีกทั้งยังใช้สารปริมาณเล็กน้อย (อรุณรัตน์ สันฐิติ กวินสกุล, 2563)

วิธีทางสเปกโทรสโกปี (Spectroscopy) เป็นวิธีการที่ใช้ในการตรวจวัดและวิเคราะห์สารประกอบโดยอาศัยคุณสมบัติของรังสีแม่เหล็กไฟฟ้า วิธีทางสเปกโทรสโกปีนั้นมีอยู่หลายวิธี หลักการพื้นฐานที่มีในทุก ๆ วิธี คือ ฉายรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าไปยังตัวอย่างแล้วสังเกตการตอบสนองที่เกิดขึ้น โดยดูการตอบสนองต่อแสงที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ พล็อต (Plot) ของการตอบสนองต่อแสงที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ นี้เรียกว่า สเปกตรัม (Spectrum) เทคนิคการประยุกต์ใช้สเปกโทรสโกปีที่สำคัญ 4 แบบ ได้แก่ อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Infrared spectroscopy, IR) อัลตราไวโอเลตสเปกโทรสโกปี (Ultraviolet spectroscopy, UV) นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy, NMR) และแมสสเปกโทรเมทรี (Mass spectroscopy, MS) สเปกโทรสโกปีใน 3 แบบแรกจัดอยู่ในกลุ่มของสเปกโทรสโกปีประเภทการดูดซับ (Absorption spectroscopy) ซึ่งหมายถึงการดูดซับช่วงพลังงานรังสีแม่เหล็กไฟฟ้า (Electromagnetic radiation) ที่เฉพาะเจาะจงเพื่อกระตุ้นโมเลกุลที่จะตรวจวัดให้อยู่ในสถานะเร้า (Excited state) ดังนั้นการตรวจวัดและวิเคราะห์สารประกอบในแต่ละเทคนิคจะเป็นการเลือกใช้พลังงานรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีขนาดต่าง ๆ กัน นั่นคือต้องเลือกใช้ขนาดของความยาวคลื่นของรังสีดังกล่าวที่เหมาะสมกับความต้องการ (สมเดช กนกเมธากุล, 2547)

2.9.1 อัลตราไวโอเลตสเปกโทรสโกปี

UV-VIS Spectrophotometer เป็นเทคนิคที่ใช้ในวิเคราะห์สารโดยอาศัยหลักการดูดกลืนรังสีของสารที่อยู่ในช่วง Ultra violet (UV) และ Visible (VIS) ความยาวคลื่นประมาณ 190-800 nm โดยที่ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่นแสงต่าง ๆ จะมีความสัมพันธ์กับปริมาณและชนิดของสารที่อยู่ในตัวอย่าง กล่าวคือ เมื่อทำการวัดปริมาณของแสงที่ผ่านหรือสะท้อนมาจากตัวอย่างเทียบกับแสงจากแหล่งกำเนิดที่ความยาวคลื่นค่าต่าง ๆ ตามกฎของ Beer-Lambert ค่าการดูดกลืนแสงของสารจะแปรผันกับจำนวนโมเลกุลที่มีการดูดกลืนแสง ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิคนี้ในระบุชนิดและปริมาณของสารต่าง ๆ ที่มีอยู่ในตัวอย่างได้ (Materials innovation center, 2012)

2.9.2 อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Infrared spectroscopy, IR) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ตรวจสอบเกี่ยวกับโมเลกุลของสาร โดยอาศัยหลักการเกี่ยวกับการสั่น (Vibration) เมื่อได้รับ

พลังงานของรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความยาวคลื่นช่วง 0.8-15 μm ซึ่งลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติเฉพาะโมเลกุลของสาร จึงสามารถดูดกลืนแสงอินฟราเรดได้ที่ความถี่ที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับความแข็งแรงของพันธะและน้ำหนักอะตอมของหมู่แทนที่ในโมเลกุลนั้น ๆ (สมเดช กนกเมธากุล, 2547; Synchrotron Light Research Institute, 2562)

2.9.3 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี

นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy, NMR) เป็นเทคนิคที่มีความสำคัญมากในการวิเคราะห์สารเคมี เนื่องจาก NMR สเปกตรัมสามารถบอกข้อมูลของสภาพแวดล้อมของนิวเคลียสว่าอยู่ในตำแหน่งใดของโมเลกุลเพื่อใช้ประมวลผลและกำหนดโครงสร้างของสาร อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์โครงสร้างของสารจำเป็นต้องใช้วิธีควบคู่กับ IR และ UV สเปกโทรสโกปี รวมถึงแมสสเปกโทรเมทรี (สมเดช กนกเมธากุล, 2547)

2.9.4 แมสสเปกโทรเมทรี

แมสสเปกโทรเมทรี (Mass spectrometry) เป็นเทคนิคที่สามารถบอกค่ามวลของสารและสนับสนุนโครงสร้างของสารที่พิสูจน์โดยวิธีทาง IR และ NMR สเปกโทรสโกปีมาแล้ว โดยเทคนิคแมสสเปกโทรเมทรีนี้พิจารณาจากการแตกของโมเลกุลเมื่อถูกอิเล็กตรอนจากแหล่งพลังงานพุ่งชนทำให้แตกเป็นไอออน แล้วแยกไอออนและส่วนแยกย่อยออกตามค่ามวลต่อประจุ (สมเดช กนกเมธากุล, 2547)

2.10 เวชสำอาง

เครื่องสำอาง (Cosmetics) คือ ผลิตภัณฑ์ดูแลผิวที่มีคุณสมบัติในการทำความสะอาด ขัด นวด ทา ถู พอก และอีกหลากหลายรูปแบบเพื่อให้เกิดความสวยงาม แต่ไม่มีคุณสมบัติในการรักษา บำบัด บรรเทา หรือมีฤทธิ์ในการรักษาแล้วทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ผิวหนังได้

เวชสำอาง (Cosmeceuticals) คือ ผลิตภัณฑ์ดูแลผิวหรือเครื่องสำอางประเภทหนึ่ง มีคุณสมบัติเช่นเดียวกับกับเครื่องสำอาง แต่สิ่งที่แตกต่างคือมีส่วนผสมของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีคุณสมบัติในการรักษาอาการผิดปกติต่าง ๆ บนผิวหนัง เช่น สิว ริวรอย จุดต่างด่าง และฝ้า-กระ ได้เช่นเดียวกับผลิตภัณฑ์ที่เป็นยา กล่าวคือ เป็นผลิตภัณฑ์ที่ผสมผสานคุณสมบัติของเครื่องสำอางและยาเข้าไว้ด้วยกันสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสรีรวิทยาทางผิวหนังได้ จัดเป็นทางเลือกใหม่ของอุตสาหกรรมสุขภาพและมีการขยายตัวทางการตลาดอยู่ตลอดเวลา แต่อย่างไรก็ตามเวชสำอางไม่จัดว่าเป็นผลิตภัณฑ์ยา (Kwan *et al.*, 2015)

2.10.1 สารออกฤทธิ์ในเวชสำอาง

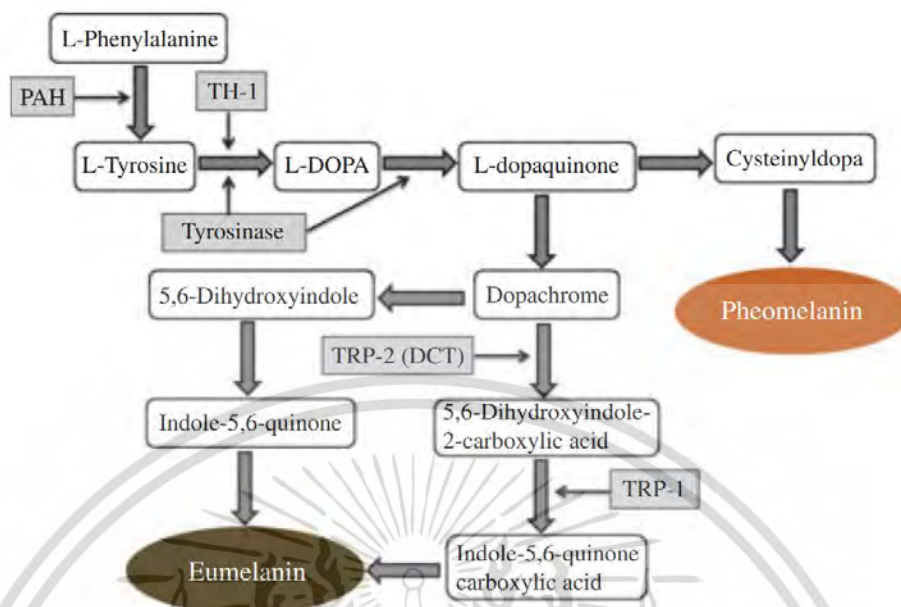
คุณสมบัติของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์เวชสำอาง เช่น มีคุณสมบัติในการชะลอความแก่ชรา (Anti-aging) ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Anti-tyrosinase) และยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Antimicrobial) เป็นต้น โดยสารที่นำมาประยุกต์ใช้นั้น ๆ ไม่ควรมีความเป็นพิษต่อเซลล์ (Nabavi *et*

al., 2015; Klaschka, 2016; Alvarez-Rivera *et al.*, 2018) นอกจากนี้โดยทั่วไปแล้วผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางมักมีการใส่สารป้องกันการเสียสภาพจากจุลินทรีย์ (Antimicrobial preservative) (Herman *et al.*, 2013) เพื่อป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์แล้วทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดการเสียสภาพหรือเสียคุณสมบัติบางอย่างไป การใช้สารออกฤทธิ์จากธรรมชาติที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดแทนการใช้สารกันเสีย (เช่น Methylparabens) อาจให้ผลที่ดีที่สุดและปลอดภัยต่อผู้ใช้ผลิตภัณฑ์มากกว่า (Dahal *et al.*, 2020) โดยเฉพาะสารทุติยภูมิที่ผลิตจากแบคทีเรียอาจช่วยในการป้องกันการเสียสภาพของผลิตภัณฑ์และรวมไปถึงมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคบนผิวหนังได้ (*Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, และ *Staphylococcus aureus*) (Dahal *et al.*, 2017; Herman *et al.*, 2013; Klaschka, 2016)

2.11 เอนไซม์และสารประกอบที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์เวชสำอาง

2.11.1 ไทโรซิเนส (Tyrosinase)

ไทโรซิเนส เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินในผิวหนังของมนุษย์ จัดเป็นสารประกอบไกลโคโปรตีน (Glycoprotein) ที่พบในเมลานโซโซม (Melanosomes) ซึ่งมีหน้าที่ในการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน (Melanin biosynthesis) การบวนการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินนั้นเริ่มจากการเกิดปฏิกิริยา Hydroxylation ของ L-tyrosine แล้วเปลี่ยนไปเป็น 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) โดยเอนไซม์ไทโรซิเนส จากนั้นเกิดกระบวนการออกซิเดชันเปลี่ยนจาก L-DOPA เป็น Dopaquinone และสุดท้ายเกิดกระบวนการ Polymerization ของ Dopaquinone ไปเป็นเม็ดสีเมลานินในที่สุด (รูปที่ 2.20) (Dahal *et al.*, 2020) เม็ดสีเมลานินมีบทบาทในการช่วยป้องกันอันตรายจากรังสียูวีโดยการดูดซับรังสียูวีไว้ไม่ให้ไปทำลายดีเอ็นเอภายในเซลล์ผิว อีกทั้งยังมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ แต่อย่างไรก็ตามหากเกิดสภาวะที่กระตุ้นทำให้เกิดการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินมากเกินไปอาจส่งผลให้เกิดลักษณะผดผื่นขึ้นบนผิวหนังได้ เช่น ฝ้า กระ และรอยดำ เป็นต้น (Gupta *et al.*, 2021) สารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase inhibitors) ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายสำหรับการนำมาเป็นส่วนผสมออกฤทธิ์สำคัญในเครื่องสำอาง ตัวอย่างของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนสและมีการนำมาใช้ในปัจจุบัน เช่น อาบูติน (Arbutin) และ กรดโคจิด (Kojic acid) ซึ่งมีประสิทธิภาพที่ดีในการยับยั้งการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานว่ากรดโคจิดนั้นก่อให้เกิดอาการแพ้ทางผิวหนังได้ รวมถึงอาบูตินก็มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (Sakar *et al.*, 2013; Burnett *et al.*, 2010; Zhu and Gao, 2008)



รูปที่ 2.20 แสดงแผนผังกระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน
ที่มา : Gillbro & Olsson (2011)

2.11.2 คอลลาเจน (Collagenase)

คอลลาเจน คือ โปรตีนที่ประกอบด้วยพอลิเปปไทด์ (Polypeptide) 3 สาย เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในโครงสร้างของสารเคลือบเซลล์ และเป็นโครงสร้างหลักของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective tissues) (Gelse, Poschl & Aigner, 2003) การเสื่อมสภาพของคอลลาเจนในมนุษย์นั้น เริ่มจากการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่เรียกว่าคอลลาจีเนส (Collagenase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Metalloproteinases (MMP) (Nantarat *et al.*, 2020) โดยการสังเคราะห์เอนไซม์คอลลาจีเนสนั้น สามารถถูกกระตุ้นได้ด้วยภาวะเครียดออกซิเดชัน อีกทั้งภาวะเครียดออกซิเดชันนี้ยังช่วยกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจีเนสจึงเกิดการทำลายคอลลาเจนได้มากขึ้น ส่งผลให้เกิดการแก่ชราของผิวหนัง (Nantarat *et al.*, 2020; Wei *et al.*, 2022)

2.11.3 อีลาสเตส (Elastases)

อีลาสเตส จัดเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Serine proteases พบได้มากในเนื้อเยื่อของสัตว์มีกระดูกสันหลัง โดยเฉพาะในปอด เส้นเลือด ผิวหนัง และเส้นเอ็น มีคุณสมบัติที่สามารถทำลายอีลาสติน (Elastin) ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบได้มากในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Wei *et al.*, 2022) ตัวอย่างของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ เช่น Pancreatic elastase, Neutrophil elastase, Macrophage elastase และ Fibroblast elastase (Lee *et al.*, 1999; Siedle *et al.*, 2002) เนื่องจากคอลลาเจนและอีลาสตินเป็นองค์ประกอบหลักของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน หากโปรตีนสองชนิดนี้ถูกทำลายโดยเอนไซม์ในกลุ่มคอลลาจีเนส และอีลาสเตสตามลำดับ จะก่อให้เกิดริ้วรอยหรือการแก่ชราของผิวได้ โดยปกติแล้วกิจกรรมของอีลาสเตสจะเพิ่มขึ้นเมื่อ

อายุเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ความยืดหยุ่นของผิวลดลงและผิวหนังหย่อนคล้อย ดังนั้นการค้นหาสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เหล่านี้จึงน่าสนใจ ซึ่งนอกจากจะยับยั้งกระบวนการแก่ชราของผิวหนังได้แล้ว ยังสามารถป้องกันการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพันได้อีกด้วย (Melzig *et al.*, 2001; Baylac & Racine, 2004)

2.11.4 กรดไฮยาลูโรนิก (Hyaluronic acid)

กรดไฮยาลูโรนิก จัดเป็นสารประกอบไกลโคสะมิโนไกลแคน (Glycosaminoglycan, GAG) ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในสารเคลือบเซลล์ กรดไฮยาลูโรนิกนั้นมีหน้าที่หลายประการ เช่น เป็นสารช่วยเติมเต็มพื้นที่ว่าง (Space filling) และเป็นสารช่วยให้เกิดการหล่อลื่นบริเวณข้อต่อ (Girish *et al.*, 2009; Liang *et al.*, 2016; Papakonstantinou *et al.*, 2012) นอกจากนี้กรดไฮยาลูโรนิกยังมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่เกิดการอักเสบหรือการบาดเจ็บ และเนื่องจากกรดไฮยาลูโรนิกมีคุณสมบัติที่ดูดความชื้นได้สูงจึงเชื่อว่ามีมีความสำคัญต่อการรักษาความชุ่มชื้นให้กับผิวหนัง (Necas, 2008; Papakonstantinou *et al.*, 2012) การเสื่อมสลายของกรดไฮยาลูโรนิกในมนุษย์นั้นมักเกิดจากการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (Hyaluronidase, HAase) โดยการเสื่อมสภาพของกรดไฮยาลูโรนิกนั้นมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดพยาธิสภาพต่าง ๆ บนผิวหนัง เช่น การอักเสบของผิวหนัง และผิวหนังแห้งกร้าน ดังนั้นการควบคุมกิจกรรมของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสจึงมีความสำคัญต่อการรักษาสมดุลของผิวหนัง รวมไปถึงการลดความเสี่ยงที่อาจก่อให้เกิดการอักเสบของผิวหนัง (Cooper *et al.*, 2008; Sandhu *et al.*, 2012)

2.12 อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ

2.12.1 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (Free radical) หมายถึง อะตอมหรือโมเลกุลที่มี unpaired electron อย่างน้อย 1 electron เกิดขึ้นได้เมื่อพันธะระหว่างอะตอมแตกออก อนุมูลอิสระมีความไม่เสถียรและไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลข้างเคียงเพื่อทำให้ตัวเองเสถียรขึ้น ส่งผลให้โมเลกุลข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนเปลี่ยนไปเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ ซึ่งจะเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นต่อไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (Chain reaction) (Cornelli, 2009) อย่างไรก็ตามการที่จะสรุปว่าอนุมูลอิสระทุกชนิดเป็นสารพิษต่อร่างกายนั้นไม่ถูกต้องนัก สิ่งที่เราควรนำมาใช้บอกระดับความเป็นพิษควรเป็นความสามารถในการออกซิไดซ์ (Oxidized) สารชีวโมเลกุลในร่างกาย สารที่มีความสามารถในการออกซิไดซ์สารชีวโมเลกุลในร่างกายเรียกว่า Reactive species (RS) ซึ่งส่วนใหญ่แล้วจะอยู่ในรูปของ Reactive oxygen species (ROS) และยังพบในรูปของ Reactive chlorine species และ Reactive nitrogen species อีกด้วย (Lockwood, 2007)

2.12.2 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) คือสารที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ด้วยเหตุที่ ROS เกิดขึ้นมาจากกระบวนการต่างๆในการดำรงชีวิต ดังนั้นร่างกายจึงต้องสร้างสารต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาเพื่อกำจัดและลดความรุนแรงของ ROS ที่เกิดขึ้นด้วย เช่น Co-enzyme Q10 alpha-lipoic acid เป็นต้น โดยปกติแล้วการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายนั้นมีอย่างเพียงพอต่อการเกิดอนุมูลอิสระขึ้นภายในร่างกาย แต่หากมีสภาวะผิดปกติในร่างกายสารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายสร้างขึ้นอาจไม่เพียงพอต่อการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ ส่งผลให้อนุมูลอิสระที่ไม่ได้ถูกกำจัดไปทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อ ซึ่งเป็นต้นเหตุของการเกิดโรคต่าง ๆ ได้ เช่น ภาวะหลอดเลือดอุดตัน มะเร็ง โรคพาร์กินสัน รวมถึงอาการอักเสบต่าง ๆ

2.12.3 ภาวะเครียดออกซิเดชัน

ภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) มีบทบาทสำคัญในกระบวนการแก่ชราของผิวหนัง ซึ่งเกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ระหว่างอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในร่างกาย ปัจจัยหลักของการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันนั้นเกี่ยวข้องกับการเกิด Reactive oxygen species ที่มากเกินไปในร่างกาย ซึ่งอาจก่อให้เกิดความเสียหายกับสารเคลือบเซลล์ (Extracellular matrix, ECM) บริเวณผิวหนัง โดยเฉพาะคอลลาเจน (Collagen) และกรดไฮยาลูโรนิก (Hyaluronic acid, HA) และอาจกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส (Collagenase) และไฮยาลูโรนิเดส (Hyaluronidase) ได้ (Ganceviciene, 2012; Rinnerthaler, 2015)

2.12.4 สารต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ

ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีขายในปัจจุบันกว่าร้อยละ 90 จัดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ส่วนการนำไปใช้เพื่อหวังผลด้านสุขภาพนั้นขึ้นกับการศึกษาทั้งทางด้าน *In vitro*, *In vivo* และ Clinical research โดยทั่วไปแล้วผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมักจะมีประโยชน์กับระบบต่างๆ เช่น โรคจากความเสื่อมของระบบต่าง ๆ ระบบหัวใจและหลอดเลือด ช่วยในการมองเห็น เพื่อป้องกันโรคมะเร็ง และเสริมสุขภาพความงามของผิวและเส้นผม สารต้านอนุมูลอิสระที่พบได้ในอาหารและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติส่วนใหญ่ เช่น วิตามินอี และวิตามินซี สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ และสารกลุ่มฟีนอลิก โดยลักษณะสำคัญของสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ที่มีร่วมกันก็คือการมี Conjugated double bond อยู่ในโครงสร้างของโมเลกุล เพราะเมื่อสารเหล่านี้รับหรือสูญเสียอิเล็กตรอนไป สารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะ Delocalized ภายในโครงสร้างได้ และทำให้โมเลกุลมีความเสถียรกว่าสารที่ไม่มี Conjugated double bond ดังนั้นความรุนแรงของอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นมาใหม่จึงจะลดลง (Mason, 2011)

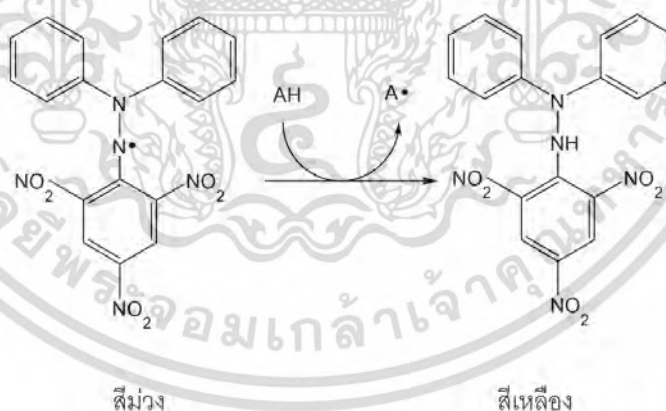
2.12.5 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่นิยมในปัจจุบันนั้นมีอยู่ 3 วิธี ได้แก่ วิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Radical scavenging activity, 2,2'-azino-bis (3-

ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), Radical cation decolorization assay และ ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay

2.12.5.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH radical scavenging assay)

เป็นการทดสอบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวและมีสีม่วง สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 515 nm (ปวีณา พันทอง, 2559) DPPH เป็นสารอนุมูลอิสระที่มีความเสถียรเมื่ออยู่ในตัวทำละลาย เมทานอล (methanol) หรือเอทานอล (ethanol) หากอยู่ในรูปสารละลายจะมีสีม่วงเข้ม การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีนี้เป็น การวัดความสามารถของสารทดสอบในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธีให้ไฮโดรเจนอะตอมหรือการให้อิเล็กตรอนให้กับโมเลกุลของ DPPH ส่งผลทำให้สีของสารละลาย DPPH เปลี่ยนจากสีม่วงไปเป็นสีเหลืองดังแสดงในรูปที่ 2.21 (Sricharoen *et al.*, 2015) โดยสีที่เปลี่ยนแปลงไปขึ้นอยู่กับความสามารถในการให้ไฮโดรเจนอะตอมหรืออิเล็กตรอนของสารที่นำมาทดสอบ ข้อดีของวิธีนี้คือ ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ส่วนข้อเสีย คือ DPPH ค่อนข้างเสถียรไม่วางต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายจริง จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้า ทำให้ค่าการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบได้น้อยกว่าความเป็นจริง อีกทั้งต้องเตรียมสารละลายในตัวทำละลายที่เป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งจะทำให้โปรตีนตกตะกอนจึงไม่สามารถวิเคราะห์ในตัวอย่างที่เป็นเลือดได้ รวมไปถึงสารปนเปื้อนและโลหะอาจรบกวน (Interfere) ซึ่งสามารถเป็นตัวรบกวนแล้วทำให้สีของ DPPH จางลงได้เช่นกัน (ปวีณา พันทอง, 2559)



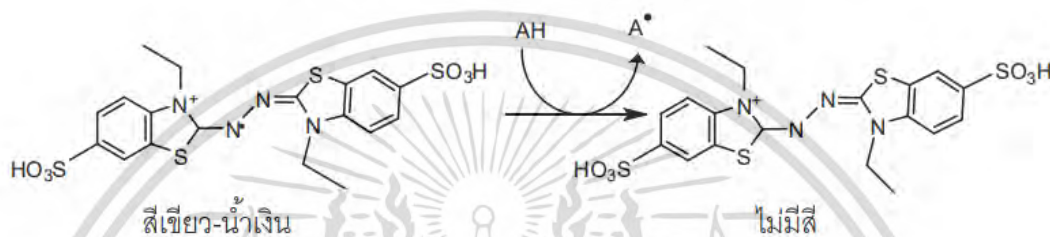
รูปที่ 2.21 แสดงปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิสระดีพีพีเอชทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ

ที่มา : ปวีณา พันทอง (2559)

2.12.5.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS radical cation decolorization assay)

เป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่มีสีเขียวปนน้ำเงิน สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 nm เนื่องจากสีของ

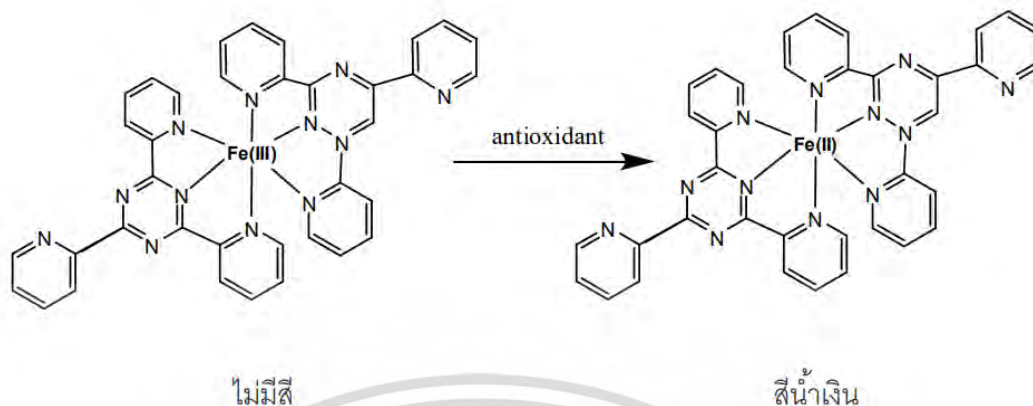
ABTS ปกติจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูง จึงต้องทำการเจือจาง ABTS ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นจึงนำ ABTS มาทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่ละลายด้วยเอทานอลเจือจาง หากสารทดสอบนั้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะส่งผลให้สีของสารละลายจางลงดังแสดงในรูปที่ 2.22 (ปวีณา พันทอง, 2559) ข้อดีของวิธีนี้ คือ ABTS ละลายได้ดีทั้งในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์จึงทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH กว้าง ส่วนข้อเสีย คือ ABTS ไม่จัดเป็นสารธรรมชาติที่พบในร่างกายหรือในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนถึงจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระ (Apak *et al.*, 2013)



รูปที่ 2.22 แสดงปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิสระ ABTS ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ
ที่มา : ปวีณา พันทอง (2559)

2.12.5.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (FRAP assay)

วิธีการนี้อาศัยหลักการของความสามารถสารของต้านอนุมูลอิสระที่สามารถถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับสารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2]^{3+}$ ซึ่งไม่มีสี ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปเป็น $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ ที่มีสีน้ำเงินดังแสดงในรูปที่ 2.23 วิธีการนี้เป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาน้อย ไม่แพง และสามารถทำซ้ำแล้วให้ผลเหมือนเดิม แต่ข้อเสีย คือ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกิริยาเคมีที่ไม่เกี่ยวข้องกับสภาวะร่างกายและสารละลายที่ใช้อ้างอิงต้องใช้น้ำปราศจากไอออน (Deionized water) (ปวีณา พันทอง, 2559)



รูปที่ 2.23 แสดงปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ

ที่มา : ปวีณา พันทอง (2559)

2.13 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ

การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพในห้องปฏิบัติการมีหลายวิธี จุดประสงค์ของการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพคือ เพื่อประเมินหรือคัดกรองฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหรือสารบริสุทธิ์ โดยวิธีการที่นิยมใช้ได้แก่ วิธี Agar disk diffusion และวิธี Agar well diffusion

2.13.1 วิธี Agar disk diffusion

วิธี Agar disk diffusion มีการพัฒนาขึ้นในปี ค.ศ. 1940 เป็นวิธีการที่ใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางคลินิกหลายแห่งเพื่อทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ โดยมีการ Spread หรือ Swab เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่มีอายุ 18-24 ชั่วโมงทั่วบริเวณผิวหน้าอาหารแข็ง จากนั้นวางแผ่น Disk (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มม.) ที่มีสารที่ต้องการทดสอบลงบนผิวหน้าอาหารดังกล่าว นำไปบ่มภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ สารทดสอบในแผ่น disk จะเกิดการแพร่กระจายเข้าไปในวุ้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ หากสารทดสอบนั้นมีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อชนิดนั้น ๆ จะเกิดโซนใสรอบบริเวณของแผ่น Disk ดังกล่าว (Balouiri *et al.*, 2016)

2.13.2 วิธี Agar well diffusion

วิธี Agar well diffusion เป็นอีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการประเมินฤทธิ์ต้านจุลชีพของพืชหรือสารสกัดจากจุลินทรีย์ วิธีนี้มีหลักการคล้ายกับวิธี Agar disk diffusion นั่นคือมีการ Spread หรือ Swab เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทั่วบริเวณผิวหน้าอาหารแข็ง จากนั้นเจาะวุ้นอาหารให้เป็นหลุมด้วยที่เจาะจุกคอร์ก (Cork borer) ที่ปราศจากเชื้อ ให้มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6-8 mm จากนั้นเปิดตสารต้านจุลชีพหรือสารละลายสกัดที่ความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบลงในหลุมที่เจาะไว้ ปริมาตร 20-100 μ L นำไปบ่มภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ สารทดสอบในหลุมดังกล่าวจะเกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การแพร่กระจายเข้าไปในวุ้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ หากสารทดสอบนั้นมีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อชนิดนั้น ๆ จะเกิดโซนใสรอบบริเวณของหลุมดังกล่าว (Balouiri *et al.*, 2016)

2.14 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการคัดกรองด้านความปลอดภัยของสารเคมี โดยการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ควรมีการเลือกใช้เซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสอดคล้องกับการได้รับสัมผัสสารทดสอบนั้น เช่น เซลล์หนังกำพวด เซลล์หนังแท้ เซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เซลล์เยื่อบุช่องปาก เซลล์เหงือก และเซลล์ตับ เป็นต้น (NSTDA, 2564) ตัวอย่างวิธีที่นิยมใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ คือ MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue) assay วิธีนี้อาศัยการตรวจสอบปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิตโดยสังเกตจากการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายที่ทำปฏิกิริยา โดยเซลล์ของสิ่งมีชีวิตจะถูกบ่มกับสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบเป็นระยะเวลาหนึ่ง จากนั้นทำปฏิกิริยากับสารละลายของ MTT ซึ่งมีสีเหลือง ซึ่งจะมีเพียงเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้นที่สามารถเปลี่ยนจาก MTT ไปเป็นผลิตภัณฑ์ไม่ละลายน้ำของ Formazan ซึ่งมีสีม่วง โดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ Mitochondrial dehydrogenase (Rekas *et al.*, 2014)

2.15 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Dahal *et al.* (2020) ได้ทำการศึกษาการพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางโดยประยุกต์ใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแอคติโนแบคทีเรียสกุล *Streptomyces* สายพันธุ์ T65 ซึ่งคัดแยกได้จากตัวอย่างดิน โดยงานวิจัยนี้มุ่งเน้นค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ออกฤทธิ์ทางเวชสำอาง ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH free radical scavenging assay) ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Mushroom tyrosinase) ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์อีลาสเตส (Porcine pancreatic elastase, PPE) และฤทธิ์ยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์ก่อโรค อีกทั้งยังทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ผลการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบจากแอคติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มนุษย์ทุกชนิดที่นำมาทดสอบ อีกทั้งยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนสและเอนไซม์อีลาสเตส มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งเชื้อก่อโรคที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสิว (*Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis*)

Georgousaki *et al.* (2020) ได้ทำการศึกษาค้นหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนสจากแอคติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Streptomyces* sp. CA-123531 ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างในเกาะมาร์ตีนิก (Martinique) ประเทศฝรั่งเศส พบว่าสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทแสดงฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ และเมื่อทำการแยกสารสกัดหยาบให้ได้สารบริสุทธิ์พบว่าสารบริสุทธิ์ trichostatin A แสดงฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดี โดยมีค่าความเข้มข้นของสารที่

ออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ร้อยละ 50 (50% Inhibitory Concentration, IC₅₀) ที่ 2.18 μM ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดีกว่ากรดโคจิก (kojic acid) (IC₅₀ 14.07 μM) ซึ่งเป็นตัวควบคุมเชิงบวก

Arumugam *et al.* (2010) ได้ทำการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแอคติโนแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างทางทะเล โดยเป็นแอคติโนแบคทีเรียในสกุล *Streptomyces* (สายพันธุ์ MS1/7) หลังจากนำสารสกัดหยาบมาทำให้เป็นสารบริสุทธิ์โดยอาศัยเทคนิคโครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นส่วนคงที่ (Silica gel column chromatography) และเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High-performance liquid chromatography, HPLC) รวมถึงการระบุชนิดของสารด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปี (IR, NMR spectroscopy และ Mass spectrometry) ผลการวิจัยพบสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ มีชื่อว่า 2-allyloxyphenol ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของแบคทีเรียกว่า 21 ชนิด และยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 3 ชนิด อีกทั้งยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี (DPPH assay) โดยมีค่า IC₅₀ = 22 $\mu\text{g/mL}$



บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ตู้ปลอดเชื้อ (Air flow laminar)
2. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)
3. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
4. เครื่องชั่งสารแบบทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง (Analytical balance)
5. กระดาษลิตมัสวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH Test strip)
6. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
7. โกร่งบดสาร (Mortar and pestle)
8. เครื่องเขย่า (Shaker)
9. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
10. เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer)
11. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ (Ultra-low temperature freezer)
12. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope)
13. เลนส์ส่องระยะไกล (Long-working distance lens)
14. เครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท (Microplate reader)
15. เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator)
16. โถดูดความชื้น (Desiccator)
17. ขวดฝาเกลียว (Duran)
18. ปีกเกอร์ (Beaker)
19. หลอดทดลอง (Test tube)
20. หลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ (Microcentrifuge tube, Eppendorf tube)
21. จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
22. ลูปเขี่ยเชื้อ (Loop)
23. ลวดเขี่ยเชื้อ (Microneedle)
24. แท่งแก้วรูปตัวแอล (L-shape glass rod)
25. หลอดพลาสติกทนความเย็น (Cryotube)
26. กรวยแยก (Separatory funnel)
27. กระดาษสำหรับชุบสารปฏิชีวนะ (Antibiotic assay paper discs)
28. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

29. ปิเปตอัตโนมัติ (Automatic pipette)
30. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermo cycler)
31. เครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ (Nanodrop spectrophotometer)
32. เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC)
33. เครื่องระเหิดแห้ง (Freeze dryer)
34. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

3.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

1. *Candida albicans* ATCC 10231
2. *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763
3. *Escherichia coli* ATCC 25922
4. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
5. *Kocuria rhizophila* ATCC 9341
6. *Enterococcus faecium* ATCC 51559
7. Vancomycin-resistant *Enterococci* (VRE) ATCC 51559
8. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P
9. Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) DSM 20654
10. *Bacillus subtilis* ATCC 6633
11. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990

3.3 การเก็บตัวอย่าง การแยก และการเก็บรักษาแอกติโนแบคทีเรีย

3.3.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างทางทะเลเพื่อนำมาคัดแยกแอกติโนแบคทีเรีย โดยสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำทะเล ตะกอนดินทะเล และตัวอย่างอื่น ๆ เช่น ซากพืช ซากสัตว์ และเปลือกหอย ในพื้นที่ชายหาดบริเวณอ่าวไทยตอนบน 4 จุด ได้แก่ หาดบางแสน ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี (13° 17'18.2"N 100° 54' 39.4"E) หาดจอมเทียน ตำบลหนองปรือ อำเภอบางละมุง จังหวัดชลบุรี (12° 52'54.3"N 100° 52'54.0"E) และหาดสัตหีบ ตำบลแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (12° 32'37.0"N 100° 56'50.4"E) เก็บตัวอย่างในภาชนะที่ปราศจากเชื้อและเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำกว่าก่อนนำไปคัดแยกแอกติโนแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.2 การคัดแยกแอกติโนแบคทีเรีย

3.3.2.1 แอกติโนแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำทะเล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คัดแยกแอกติโนแบคทีเรียทางทะเลโดยวิธีการดัดแปลงจาก (Ramesh & Mathivanan, 2009) เจือจางตัวอย่างน้ำทะเลในลักษณะ Ten-fold serial dilution จนถึงระดับการเจือจาง 10^{-3} นำมา spread plate ลงบนอาหารแข็ง Starch casein nitrate (SCN) seawater agar และ Zhang's starch soil extract (ZSSE) seawater agar (Zhang & Zhang, 2011) ที่เติมยาปฏิชีวนะ ไนสแตติน (Nystatin) ความเข้มข้น 100 mg/L และกรดนาลิดิซิก (Nalidixic acid) ความเข้มข้น 50 mg/L บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 30 วัน จากนั้นตรวจสอบและคัดเลือกโคโลนีของแอกติโนแบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวน และทำให้เชื้อบริสุทธิ์ (Pure culture) บนอาหารแข็ง Yeast extract-malt extract (ISP2) seawater agar (Shirling & Gottlieb, 1966)

3.3.2.2 แอกติโนแบคทีเรียจากตัวอย่างตะกอนดินทะเล

นำตัวอย่างดินมาตากแห้ง (Air dry) ที่อุณหภูมิ 30 °C จากนั้นแบ่งตัวอย่างดินที่แห้งแล้วมาอบที่อุณหภูมิสูง (Dry heat) ที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 60 นาที และนำตัวอย่างดินที่แห้งแล้วอีกส่วนหนึ่งมาให้ความร้อนชื้น (Wet heat) ที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 15 นาที นำตัวอย่างดินที่ได้ทั้งสามส่วนมาทำเป็นสารแขวนลอยโดยชั่งน้ำหนักดิน 10 g ใส่ลงในน้ำทะเลปราศจากเชื้อ 90 mL (ได้ระดับการเจือจาง 10^{-1}) นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาเจือจางต่อในลักษณะ Ten-fold serial dilution จนถึงระดับการเจือจาง 10^{-3} นำตัวอย่างแต่ละระดับความเจือจาง Spread plate ลงบนอาหารและบ่มที่สภาวะเช่นเดียวกันกับวิธีการในข้อ 3.3.2.1

3.3.2.3 แอกติโนแบคทีเรียจากตัวอย่างอื่น ๆ

ตัวอย่างทางทะเลอื่น ๆ เช่น หอย เปลือกไม้ และวัสดุยึดเกาะต่าง ๆ นำตัวอย่างมาบดละเอียดด้วยโกร่งปราศจากเชื้อ เจือจางตัวอย่างในลักษณะ Ten-fold serial dilution จนถึงระดับการเจือจาง 10^{-3} นำตัวอย่างแต่ละระดับความเจือจาง Spread plate ลงบนอาหาร และบ่มที่สภาวะเช่นเดียวกันกับวิธีการในข้อ 3.3.2.1

3.3.3 การเก็บรักษาแอกติโนแบคทีเรีย

เก็บรักษาแอกติโนแบคทีเรียเพื่อใช้งานในระหว่างการศึกษาวิจัย (Working stock) โดยเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง ISP 2 seawater agar ที่อุณหภูมิ 30 °C สำหรับการเก็บรักษาแอกติโนแบคทีเรียในระยะยาว ให้เพาะเลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียบนอาหารแข็ง ISP 2 seawater agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7-14 วัน ตัดชิ้นวุ้นที่มีแอกติโนแบคทีเรียที่เจริญแล้วเก็บลงในสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 20 ที่ปราศจากเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 หรือ -80 °C

3.4 การศึกษาอนุกรมวิธานของแอกติโนแบคทีเรีย

การศึกษานุกรมวิธานของแอกติโนแบคทีเรียประกอบด้วยการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ การศึกษา ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี และการศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ ในงานวิจัยนี้แอกติโนแบคทีเรียทุกไอโซเลตที่คัดแยกได้จะถูกนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง

ยีน 16S rRNA โดยไอโซเลตที่ถูกคัดเลือกแล้วว่ามีแนวโน้มจัดเป็นแอกติโนแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่จะถูกนำมาศึกษาอนุกรมวิธานแบบหลายส่วนเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ในระดับสปีชีส์

3.4.1 การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ (Phenotypic characteristics)

การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ ได้แก่ การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การศึกษา ลักษณะการเจริญ และการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี (Arai, 1975; Shirling & Gottlieb, 1966)

3.4.1.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา

เพาะเลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียบนอาหารแข็ง ISP 2 seawater agar ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 14 วัน ศึกษาลักษณะการจัดเรียงตัวของสปอร์และเส้นใยของแอกติโนแบคทีเรีย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยายทั้งหมด 400 เท่า สำหรับไอโซเลตที่ถูกคัดเลือกจะถูกนำมาศึกษาลักษณะของสปอร์เพิ่มเติมภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM)

3.4.1.2 การศึกษาลักษณะการเจริญ

เพาะเลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียบนอาหารแข็งชนิดต่าง ๆ ได้แก่ อาหาร Yeast extract-malt extract (ISP 2) agar อาหาร Oatmeal (ISP 3) agar อาหาร Inorganic salts-starch (ISP4) agar อาหาร Glycerol-asparagine (ISP5) agar อาหาร Peptone-yeast extract iron (ISP6) agar อาหาร Tyrosine (ISP7) agar อาหาร Glucose asparagines agar อาหาร Czapek's sucrose agar และอาหาร Nutrient agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบลักษณะการเจริญ และบันทึกสีของเส้นใยอากาศ เส้นใยอาหาร และสีของรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ โดยเปรียบเทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน NBS/IBCC color system (Kelly, 1964)

3.4.1.3 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

1. ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน (Carbon utilization)

เพาะเลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียบนอาหารแข็ง Carbon utilization (ISP 9) agar ที่เติม แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ (21 ชนิด) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 ได้แก่ แอล-อะราบินอส (L-arabinose) ดี-เซลโลไบโอส (D-Cellobiose) เดกซ์แทรน (Dextran) ดี-ฟรุคโตส (D-Fructose) ดี-กาแลคโตส (D-Galactose) ดี-กลูโคส (D-Glucose) กลีเซอรอล (Glycerol) ไมโอ-อินนิซิทอล (Myo-Inositol) อินนูลิน (Inulin) ดี-แลคโตส (D-Lactose) ดี-แมนนิทอล (D-Mannitol) ดี-แมนโนส (D-Mannose) ดี-เมลิไบโอส (D-Melibiose) ดี-ราฟฟิโนส (D-Raffinose) แอล-รามโนส (L-Rhamnose) ดี-ไรโบส (D-Ribose) ดี-ซาลิซิน (D-Salicin) ซูโครส (Sucrose) ดี-ทรีฮาโลส (D-Trehalose) ซิลิทอล (Xylitol) และ ดี-ไซโลส (D-Xylose) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 14 วัน โดยใช้ชุดควบคุมเชิงลบ (Negative control) คือ อาหารที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน และชุดควบคุมเชิงบวก (Positive control) คืออาหารที่เติม ดี-กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน (Shirling & Gottlieb, 1966) ตรวจสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนโดยเปรียบเทียบ การเจริญของแอกติโนแบคทีเรียกับชุดควบคุมโดยบันทึกผลการตรวจสอบดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

2. ความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจน (Nitrogen utilization)

เพาะเลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียบนอาหารแข็ง Nitrogen utilization agar ที่เติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ (12 ชนิด) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ได้แก่ กรด ดีแอล-2-อะมิโนบิวทีริก (DL-2-aminobutyric acid) แอล-อาร์จินีน (L-arginine) แอล-แอสพาราจีน (L-asparagine) แอล-ซิสเทอีน (L-cysteine) แอล-ฮิสทีดีน (L-histidine) 4-ไฮดรอกซีโพรลีน (4-hydroxyproline) แอล-เมไทโอนีน (L-methionine) แอล-ฟีนิลอะลานีน (L-phenylalanine) แอล-โพรลีน (L-proline) แอล-เซอรีน (L-serine) แอล-ทรีโอนีน (L-threonine) แอล-วาเลอีน (L-valine) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 14 วัน โดยใช้ชุดควบคุมเชิงลบ คือ อาหารที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน และชุดควบคุมเชิงบวก คือ อาหารที่เติมแอสพาราจีนเป็นแหล่งไนโตรเจน ตรวจสอบผลการเจริญเทียบกับการเจริญกับชุดควบคุมโดยบันทึกผลการตรวจสอบดังนี้

- เมื่อมีการเจริญบนอาหารที่เติมแหล่งไนโตรเจนที่ต้องการทดสอบได้เท่ากับหรือดีกว่าชุดควบคุมเชิงบวก ให้บันทึกผลเป็นบวก (+)
- เมื่อมีการเจริญบนอาหารที่เติมแหล่งไนโตรเจนที่ต้องการทดสอบได้ดีกว่าชุดควบคุมเชิงลบแต่เจริญได้น้อยกว่าชุดควบคุมเชิงบวก ให้บันทึกผลเป็นปานกลาง (w)
- เมื่อมีการเจริญบนอาหารที่เติมแหล่งไนโตรเจนที่ต้องการทดสอบได้เท่ากับหรือน้อยกว่าชุดควบคุมเชิงลบ ให้บันทึกผลเป็นลบ (-)

3. ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ

เพาะเลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียบนอาหารแข็ง ISP 2 agar บ่มที่อุณหภูมิ 4 10 12 15 20 37 40 42 และ 45 °C เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบการเจริญของแอกติโนแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

4. ความสามารถในการเจริญของแอกติโนแบคทีเรียที่ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ระดับต่าง ๆ

เลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียบนอาหารเหลว ISP 2 ที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง 3-10 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบการเจริญของแอกติโนแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ

5. ความสามารถในการเจริญของแอกติโนแบคทีเรียบนอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

เพาะเลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียบนอาหาร ISP 2 agar ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1-20 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบการเจริญของแอกติโนแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

6. ความสามารถในการย่อยแป้ง (Starch hydrolysis)

เพาะเลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียบนอาหารแข็ง ISP 4 agar ซึ่งมีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบความสามารถในการย่อยแป้งโดยหยดสารละลายไอโอดีน ความเข้มข้นร้อยละ 1 ลงบนผิวอาหาร หากสามารถย่อยแป้งได้จะเกิดโซนใส (Clear zone) รอบโคโลนี บันทึกลงผลเป็นบวก (+) ในขณะที่บริเวณที่แป้งไม่ถูกย่อยจะเกิดสีน้ำเงิน

7. ความสามารถในการย่อยเจลาติน (Gelatin liquefaction)

เพาะเลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียในอาหารเหลว Bouillon gelatin broth (Arai, 1975) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 21 วัน ตรวจสอบความสามารถในการย่อยเจลาตินโดยนำหลอดอาหารดังกล่าวไปให้ความเย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที หากสามารถย่อยเจลาตินได้อาหารจะมีลักษณะเหลว บันทึกลงผลเป็นบวก (+)

8. ความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรต (Nitrate reduction)

เพาะเลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียในอาหารเหลว Peptone KNO₃ broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7-14 วัน ตรวจสอบความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรตโดยหยดสารละลายกรดซัลฟานิก (Sulfanilic acid) 2 หยด และสารละลายไดเมทิลนาฟทิลลามีน (N,N-dimethyl-1-naphthylamine) 3 หยดลงในอาหารเหลวดังกล่าว หากมีการเปลี่ยนรูปไนเตรต (NO₃⁻) เป็นไนไตรต์ (NO₂⁻) อาหารจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูหรือสีแดง บันทึกลงผลเป็นบวก (+)

9. ความสามารถในการตกตะกอนและย่อยโปรตีนในนม (Coagulation and peptonization of skim milk)

สำหรับการทดสอบ Coagulation of skin milk เพาะเลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียในอาหารเหลว skim milk broth ความเข้มข้นร้อยละ 1 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7-14 วัน หากสามารถตกตะกอนโปรตีนในนมได้อาหารจะมีส่วนของโปรตีนนมที่จับเป็นก้อน บันทึกลงผลเป็นบวก (+)

สำหรับการทดสอบ Peptonization of skin milk เพาะเลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียบนอาหารแข็ง Skim milk agar ความเข้มข้นร้อยละ 1 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7-14 วัน หากสามารถย่อยโปรตีนในนมได้จะเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี บันทึกลงผลเป็นบวก (+)

10. ความสามารถในการย่อยยูเรีย (Urea hydrolysis)

เพาะเลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียบนอาหารแข็ง Urea agar (Christensen, 1946) ที่มียูเรีย ความเข้มข้นร้อยละ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7-14 วัน หากมีการย่อยยูเรียเกิดขึ้น อาหารจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีชมพูรอบโคโลนี บันทึกลงผลเป็นบวก (+)

11. ความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Hydrogen sulfide production)

เพาะเลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียบนอาหารเอียง Triple sugar iron (TSI) agar slant โดยการแทง (Stab inoculation) แอกติโนแบคทีเรียลงในอาหารเอียง และขีด (Simple streak) แอกติโนแบคทีเรียบนผิวหน้าอาหารเอียง บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 14 วัน หากมีการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ อาหารจะเปลี่ยนเป็นสีดำของเฟอร์รัสซัลไฟด์ (Ferrous sulfide)

12. ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase test)

เพาะเลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียบนอาหารแข็ง ISP 2 agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 5 วัน เชื้อโคโลนีของแอกติโนแบคทีเรียโดยใช้ไม้จิ้มฟันปราศจากเชื้อ นำไปวางบนกระดาษกรองปราศจากเชื้อที่ชุ่มด้วยสารละลาย N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD) ความเข้มข้นร้อยละ 1 สังเกตการเปลี่ยนสีบริเวณที่ขีดแอกติโนแบคทีเรียบนกระดาษกรอง หากสามารถผลิตเอนไซม์ออกซิเดสจะเกิดสีม่วงภายในเวลา 60-90 วินาที บันทึกผลเป็นบวก (+) ในขณะที่เมื่อเวลาผ่านไป 2 นาที แล้วยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงให้บันทึกผลเป็นลบ (-)

13. ความสามารถในการผลิตเอนไซม์คะตะเลส (Catalase test)

เพาะเลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียบนอาหารแข็ง ISP 2 agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 5 วัน ใช้ไม้จิ้มฟันปราศจากเชื้อเชื้อโคโลนีของแอกติโนแบคทีเรียไปวางบนแผ่นสไลด์ หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 ลงบนโคโลนีของแอกติโนแบคทีเรีย หากมีการผลิตเอนไซม์คะตะเลส ภายในเวลา 30 วินาที จะเกิดฟองก๊าซของออกซิเจน บันทึกผลเป็นบวก (+)

14. ความสามารถในการย่อยสลายสารที่ไม่ละลายน้ำ (Decomposition of insoluble substrates)

เพาะเลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียบนอาหารแข็ง ISP 2 agar ที่มีการเติมสารที่ไม่ละลายน้ำ ได้แก่ อะดีนีน (Adenine) เซลลูโลส (Cellulose) ไฮโปแซนทีน (Hypoxanthine) แอล-ไทโรซีน (L-tyrosine) และ แซนทีน (Xanthine) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 5-7 วัน หากสามารถย่อยสารที่ไม่ละลายน้ำได้จะเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี บันทึกผลเป็นบวก (+)

15. ความสามารถในการผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรต (Acid production from carbohydrates)

เพาะเลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียในอาหารเหลว Basal inorganic nitrogen medium ที่เติมอินดิเคเตอร์เป็น Bromocresol-purple รวมทั้งเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ (21 ชนิด) ความเข้มข้นร้อยละ 1 ได้แก่ แอล-อะราบิโนส (L-Arabinose) ดี-เซลโลไบโอส (D-Cellobiose) เดกซ์แทรน (Dextran) ดี-ฟรุคโตส (D-Fructose) ดี-กาแลคโตส (D-Galactose) ดี-กลูโคส (D-Glucose) กลีเซอรอล (Glycerol) ไมโอ-อินนินซิทอล (Myo-Inositol) อินนูลิน (Inulin) ดี-แลคโตส (D-Lactose) ดี-แมนนิทอล (D-Mannitol) ดี-แมนโนส (D-Mannose) ดี-เมลิโบโอส (D-Melibiose) ดี-ราฟฟิโนส (D-Raffinose) แอล-รามโนส (L-Rhamnose) ดี-ไรโบส (D-Ribose) ดี-ซาลิซิน (D-Salicin) ซูโครส (Sucrose) ดี-ทรีฮาโลส (D-Trehalose) ซิลิทอล (Xylitol) และ ดี-ไซโลส (D-Xylose) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 14 วัน โดยใช้ชุดควบคุมเชิงลบเป็นอาหารที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน หากเชื้อสามารถใช้แหล่งคาร์บอนนั้น ๆ ในการผลิตกรดได้ อาหารจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง บันทึกผลเป็นบวก (+)

16. การทดสอบอื่น ๆ ได้แก่ ความสามารถในการย่อยสลาย Carboxymethyl cellulose (CMC) ทดสอบบนอาหาร CMC agar (Ariffin *et al.*, 2006) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 14 วัน ตรวจผลโดยรด Congo red (ความเข้มข้น 1 mg/mL) 15 นาที จากนั้นล้างด้วย 5M NaCl โดยแช่เป็นเวลา 15 นาทีก่อนเทออก สังเกตโซนใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนี บันทึกผลเป็นบวก (+) ความสามารถในการย่อยสลาย Xylan ทดสอบบนอาหาร Xylan agar (Ninawe *et al.*, 2006) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30

°C เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบผลโดยยราด Congo red (ความเข้มข้น 1 mg/mL) 15 นาที จากนั้นล้างด้วย 1M NaCl โดยแช่เป็นเวลา 15 นาทีก่อนเทออก สังเกตโซนใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนี บันทึกผลเป็นบวก (+) การทดสอบการย่อยสลาย Chitin ทดสอบบนอาหาร Chitin agar (Nawani *et al.*, 2002) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบผลโดยสังเกตโซนใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนี บันทึกผลเป็นบวก (+) และการทดสอบการย่อยสลาย Tween 80 ทดสอบบนอาหาร Tween 80 agar (Rai *et al.*, 2014) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบผลโดยสังเกตตะกอนที่เกิดขึ้นรอบโคโลนี บันทึกผลเป็นบวก (+)

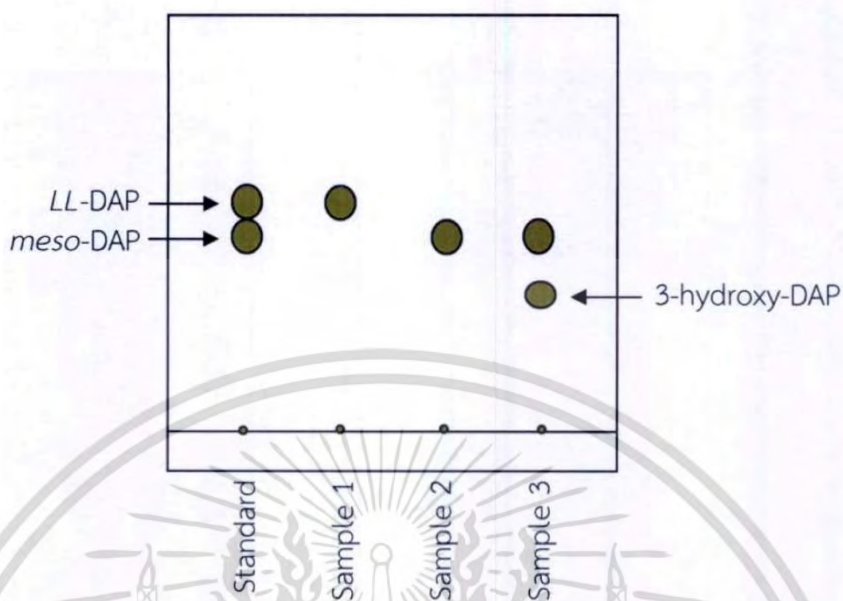
3.4.2 การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี (Chemotaxonomic characteristics)

3.4.2.1 การเตรียมเซลล์แห้ง

เพาะเลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียในอาหารเหลว ISP 2 broth ในสภาวะเขย่า 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 5 วัน เก็บเซลล์โดยนำอาหารเหลวที่มีเซลล์ของแอกติโนแบคทีเรียไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนของน้ำหมัก และล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ นำเซลล์ที่ผ่านการล้างไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่องระเหิดแห้ง (Freeze drier) เก็บรักษาเซลล์แห้งที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้ในการศึกษาอนุกรมวิธานเคมีต่อไป

3.4.2.2 การวิเคราะห์ไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนปิเมลิก (Diaminopimelic acid (DAP) isomers analysis)

ชั่งเซลล์แห้ง 10 mg ใส่ลงในหลอดทดลองฝาเกลียว เติมน้ำละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6 นอร์มอล ปริมาตร 1 mL บ่มที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อย่อยเซลล์ เมื่อครบเวลานำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ทำการกรองเซลล์แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 mL ผ่านกระดาษกรอง นำส่วนใสที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสภาวะสุญญากาศ (Evaporator) ละลายตัวอย่างที่แห้งด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 400 μ L นำสารละลายตัวอย่างที่ได้และสารละลายมาตรฐาน 2,6-diaminopimelic acid ความเข้มข้น 10 mg/mL จุดลงบนแผ่น HPTLC cellulose (ขนาด 10 x 10 cm) นำแผ่น TLC ที่ได้มาตีเวลลอป (Develop) ในตัวทำละลายผสมของ เมทานอล : น้ำ : กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6 นอร์มอล : ไพริดีน (Methanol : Water : 6N HCl : Pyridine) ในอัตราส่วน 80:26:4:10 ตั้งทิ้งไว้จนตัวทำละลายผสมเคลื่อนที่บนแผ่น TLC จนถึงขอบเขตที่กำหนด นำแผ่น TLC ออกมารอให้แห้งแล้วทำการตีเวลลอปซ้ำอีก 1 ครั้ง รอให้แผ่น TLC แห้งแล้วจึงฉีดพ่น (Spray) ด้วยนินไฮดริน ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 (0.4% Ninhydrin reagent) รอให้แห้งแล้วนำไปอบในตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบจุดของสารที่เกิดขึ้นเทียบกับจุดของสารมาตรฐานกรดไดอะมิโนปิเมลิกไอโซเมอร์ต่าง ๆ (Komagata & Suzuki, 1987) โดยจุดของไดอะมิโนปิเมลิกจะมีสีเขียวเข้ม ซึ่งตำแหน่งของ meso-DAP จะอยู่ต่ำกว่า LL-DAP และสูงกว่า 3-hydroxy-DAP (Staneck and Roberts, 1974) ดังแสดงในรูปที่ 3.1



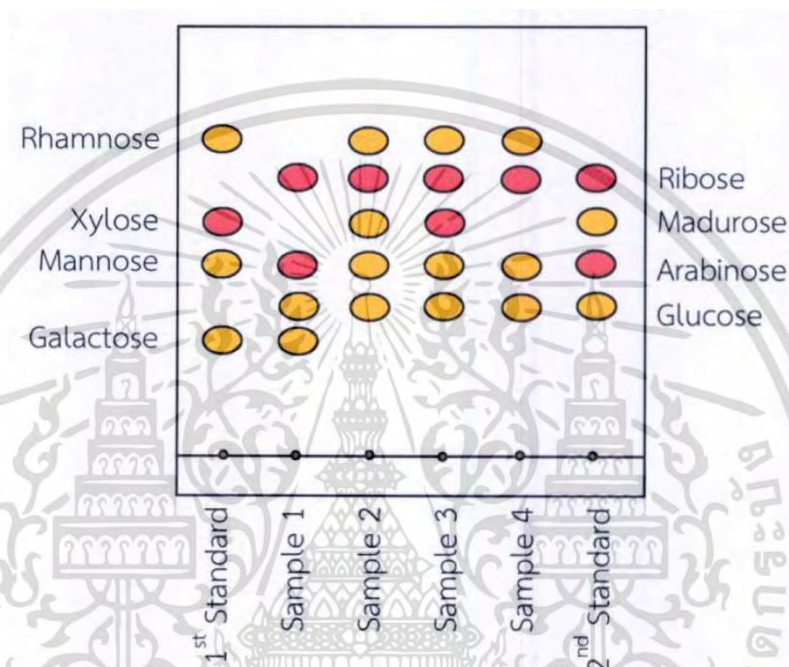
รูปที่ 3.1 ตำแหน่งไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมติกบนแผ่น HPTLC
ที่มา : นันทวัน เนียมหอม (2561)

3.4.2.3 การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ (Whole-cell sugars analysis)

ซึ่งเซลล์แห้ง 50 mg ใส่ลงในหลอดทดลองฝาเกลียว เติมสารละลายกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 1 นอร์มอล (1N H₂SO₄) ปริมาตร 1 mL บ่มที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อย่อยเซลล์ เมื่อครบเวลานำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ปรับความเป็นกรด-ด่าง ด้วยสารละลายอิมิตัวแบเรียมไฮดรอกไซด์ (Ba(OH)₂) จนมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 5.2-5.5 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตะกอน จากนั้นนำส่วนใสด้านบนที่ได้ไปเติมเอทานอล (Ethanol) 1-2 หยด ก่อนนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสภาวะสุญญากาศ เพื่อป้องกันการเกิดฟอง ละลายตัวอย่างที่แห้งด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 400 µL นำสารละลายตัวอย่างที่ได้และสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน ความเข้มข้น 10 mg/mL จุดลงบนแผ่น HPTLC cellulose (ขนาด 10 x 10 cm) นำแผ่น TLC จุ่มลงในตัวทำละลายผสมของ บิวทานอล : น้ำ : ไพริดีน : โทลูอีน (n-Butanol : Water : Pyridine : Toluene) ในอัตราส่วน 10:6:6:1 ตั้งทิ้งไว้จนตัวทำละลายผสมเคลื่อนที่ผ่าน TLC ไปจนถึงขอบเขตที่กำหนด นำออกมา รอให้แห้งแล้วทำการดีเวลลอปซ้ำอีก 1 ครั้ง นำแผ่น TLC ที่ได้มาตั้งไว้ให้แห้งแล้วฉีดพ่นด้วยแอนนิลีนพทาเลท (Aniline phthalate) รอให้แห้งแล้วนำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 4 นาที ตรวจสอบจุดและสีที่เกิดขึ้นเทียบกับสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน โดยน้ำตาลที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมเท่ากับ 5 อะตอม จะให้จุดสีชมพู ได้แก่ Ribose, Xylose และ Arabinose ส่วนน้ำตาลที่มีคาร์บอน

อะตอมเท่ากับ 6 อะตอม จะให้จุดสีเหลือง ได้แก่ Rhamnose, Mannose, Glucose และ Galactose (Komagata & Suzuki, 1987) ดังแสดงในรูปที่ 3.2

สารละลายน้ำตาลมาตรฐาน ความเข้มข้น 10 mg/mL เตรียมเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย น้ำตาลกาแลคโตส แมนโนสไซโรส และแรมโนส กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส และไรโบส



รูปที่ 3.2 ตำแหน่งและสีของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์บนแผ่น HPTLC

ที่มา : นันทวัน เนียมหอม (2561)

3.4.2.4 การวิเคราะห์ชนิดไขมันมีขี้ (Polar lipids analysis)

ซึ่งเซลล์แห้ง 150 mg ใส่ลงในหลอดทดลองฝาเกลียว เติมสารละลายผสมของ เมทานอล : โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 3 (Methanol : 0.3% NaCl) ในอัตราส่วน 100:10 ปริมาตร 3 mL และปิโตรเลียม อีเทอร์ (Petroleum ether) ปริมาตร 3 mL ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง เติมปิโตรเลียม อีเทอร์ ปริมาตร 1 mL ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง และนำสารละลายส่วนล่างไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นหรือแช่ในน้ำที่มีอุณหภูมิ 30 °C เติมสารละลายผสมของ คลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ (Chloroform : Methanol : Water) ในอัตราส่วน 90:100:30 ปริมาตร 2.3 mL ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสไปใส่หลอดทดลองใหม่ สกัดซ้ำอีกครั้งโดยเติมสารละลายผสมคลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ (Chloroform : Methanol : Water) ในอัตราส่วน 50:100:40 ปริมาตร 2.3 mL ในหลอดทดลองเดิม ผสมให้เข้ากันเป็น

เวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสไปใส่หลอดทดลองใหม่ข้างต้น นำหลอดทดลองที่มีส่วนใสนี้มาเติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1.3 mL และน้ำกลั่น ปริมาตร 1.3 mL ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสไปใส่หลอดทดลองใหม่ และทำให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน (Minnikin *et al.*, 1984)

ละลายตัวอย่างที่แห้งด้วยตัวทำละลายผสมคลอโรฟอร์ม : เมทานอล (Chloroform : Methanol) ในอัตราส่วน 2:1 ปริมาตร 60-100 μ L จุดสารตัวอย่างที่ได้ปริมาตร 10 μ L บนแผ่น TLC (silica gel 60 F₂₅₄, Merck no. 105553) ขนาด 10 x 10 cm จำนวน 5 แผ่น นำแผ่น TLC ที่ได้มาตีเวลลอปแบบ 2 ทิศทาง (Two dimensional development) ในระบบตัวทำละลาย (Solvent system) 2 ชนิด ดังนี้

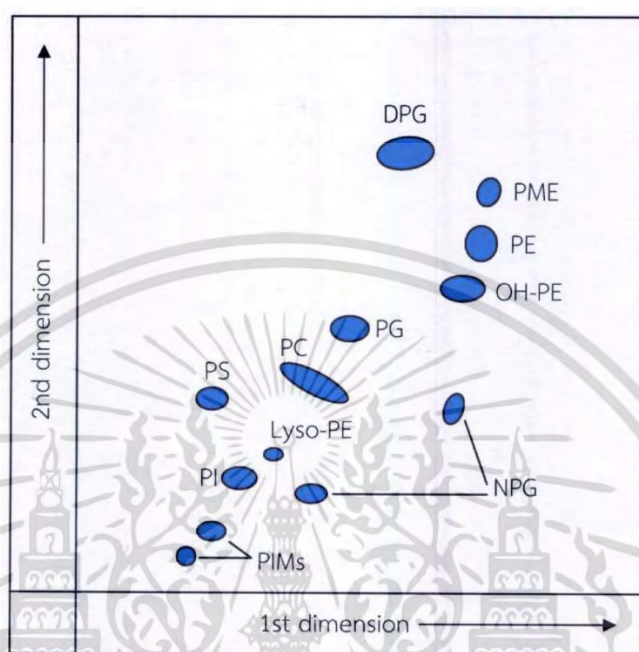
- ระบบตัวทำละลายที่ 1 : คลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ (Chloroform : Methanol : Water) ในอัตราส่วน 62:25:4
- ระบบตัวทำละลายที่ 2 : คลอโรฟอร์ม : กรดอะซิติก : เมทานอล : น้ำ (Chloroform : Acetic acid : Methanol : Water) ในอัตราส่วน 40:7.5:6:2

ทำการตีเวลลอปแบบ 2 ทิศทาง (Minnikin *et al.*, 1984) โดยจุ่มแผ่น TLC ในระบบตัวทำละลายแรก รอให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่บนแผ่น TLC จนถึงขอบเขตที่กำหนด นำแผ่น TLC ออกมารอแห้ง จากนั้นจึงนำไปจุ่มในระบบตัวทำละลายที่สอง โดยให้จุ่มแผ่น TLC ในทิศทางตั้งฉากกับทิศทางแรก ตั้งทิ้งไว้จนสารละลายเคลื่อนที่บนแผ่น TLC จนถึงขอบเขตที่กำหนด นำแผ่น TLC ออกมารอให้แห้ง เมื่อทำการตีเวลลอปจนครบทั้ง 5 แผ่นแล้วตรวจสอบจุดของไขมันชนิดมีซีว โดยนำแผ่น TLC แต่ละแผ่นไปฉีดพ่นด้วยรีเอเจนต์ (Reagent) ชนิดต่าง ๆ ดังแสดงด้านล่าง โดยตำแหน่งของไขมันชนิดมีซีวบนแผ่น TLC เมื่อตีเวลลอปแบบ 2 มิติ แสดงดังรูปที่ 3.3

1. Blue spay reagent สำหรับวิเคราะห์ฟอสโฟลิปิด (Phospholipid) ทั้งหมด (จุดสีน้ำเงิน)
2. Ninhydrin reagent สำหรับ วิเคราะห์ ฟอสฟาทีดิลเอทานอลามีน (Phosphatidylethanolamine, PE) และอนุพันธ์ เช่น เมทิล-ฟอสฟาทีดิลเอทานอลามีน (Methyl-phosphatidylethanolamine, methyl-PE) และไฮดรอกซิล-ฟอสฟาทีดิลเอทานอลามีน (OH-phosphatidylethanolamine, OH-PE) (จุดสีชมพู) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110 °C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากฉีดพ่น
3. Anisaldehyde reagent สำหรับวิเคราะห์ไกลโคลิปิด (Glycolipid) (จุดสีเขียวอมเหลือง) และไขมันชนิดอื่น ๆ (จุดสีน้ำเงิน) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110 °C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากฉีดพ่น
4. ฉีดพ่นด้วย Dragendorff's reagent สำหรับ วิเคราะห์ ฟอสฟาทีดิลโคลีน (Phosphatidylcholine, PC) (จุดสีส้ม)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ฉีดพ่นด้วย Phosphomolybdic acid reagent สำหรับวิเคราะห์ไขมันชนิดมีขี้ผึ้งทั้งหมด (จุดสีน้ำเงินเข้ม) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 120 °C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากฉีดพ่น



รูปที่ 3.3 ตำแหน่งของไขมันชนิดมีขี้ผึ้งบนแผ่น TLC ที่ดีเวลลอปแบบ 2 มิติ
ที่มา : นันทวัน เนียมหอม (2561)

คำย่อ : DPG, Diphosphatidylglycerol; PG, Phosphatidylglycerol

PME, Phosphatidylmethylethanolamine; PE, Phosphatidylethanolamine

OH-PE, Hydroxy-phosphatidylethanolamine

Lyso-PE, Lyso-phosphatidylethanolamine; PC, Phosphatidylcholine

PS, Phosphatidylserine; PI, Phosphatidylinositol

PIMs, Phosphatidylinositol mannosides

NPG, Ninhydrin-positive phosphoglycolipids

3.4.2.5 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน (Cellular fatty acids analysis)

เตรียม Fatty acid methyl ester (FAME) ตามวิธีการมาตรฐานของ Sherlock Microbial Identification System (MIDI) (Sasser, 1990) โดยซั่งเซลล์แห้ง 40 mg ใส่ลงในหลอดทดลองฝาเกลียวที่สะอาด เติมนon-saponification reagent ปริมาตร 1 mL ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (Vortex) เป็นเวลา 5-10 นาที ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 5 นาที ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง 5-10 วินาที จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 25 นาที ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมนon-methylation reagent ปริมาตร 2 mL ผสมให้เข้ากัน 5-10 วินาที ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 °C เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เวลา 10 นาที ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม Extraction solvent ปริมาตร 1.25 mL ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่ในหลอดทดลองใหม่ เติม Base wash ปริมาตร 3 mL ผสมให้เข้ากัน 5 นาที หากเกิดอิมัลชันให้เติม Saturated sodium chloride ลงไปเล็กน้อย นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนบนไปวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography, GC)

3.4.2.6 การวิเคราะห์มีนาควิโนน (Menaquinones analysis)

ซึ่งเซลล์แห้ง 100-200 mg ใส่ในขวดรูปชมพู่ ทำการสกัดโดยเติมตัวทำละลายผสม คลอโรฟอร์ม : เมทานอล (Chloroform : Methanol) ในอัตราส่วน 2:1 ปริมาตร 20 mL ปิดฝาให้สนิทและหุ้มฟลอยด์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 คืน กรองเอาเศษเซลล์ออกโดยใช้กระดาษกรอง Whatman no.1 และล้างกระดาษกรองอีกรอบด้วยตัวทำละลายผสม คลอโรฟอร์ม : เมทานอล (Chloroform : Methanol) ในอัตราส่วน 2:1 ปริมาตร 20 mL นำสารละลายตัวอย่างไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสภาวะสุญญากาศที่อุณหภูมิต่ำกว่า 35 °C จากนั้นละลายตัวอย่างที่แห้งด้วยอะซิโตน (Acetone) ปริมาตร 500 μ L นำสารละลายที่ได้ไปจุดลงบนแผ่น Silica gel TLC (Merck 60 F₂₅₄) ขนาด 20 x 5 cm ดีเวลลอปในตัวทำละลายเบนซีน (Benzene) ให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่บน TLC จนถึงขอบเขตที่กำหนด รอให้แห้ง ตรวจสอบแถบของมีนาควิโนนด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 nm จุดซิลิกาเจลบนแผ่น TLC บริเวณที่ปรากฏแถบของมีนาควิโนน จากนั้นละลายมีนาควิโนนในซิลิกาเจลด้วยอะซิโตน (HPLC grade) ปริมาตร 1 mL จากนั้นกรองและเป่าให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน ละลายตัวอย่างที่แห้งด้วย อะซิโตน (HPLC grade) ปริมาตร 100 μ L ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC) โดยใช้คอลัมน์ Cosmosil 5 C18 (4.6 x 150 mm) และใช้สารละลายผสม เมทานอล : โพรพานอล (Methanol : 2-Propanol) อัตราส่วน 2:1 เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1 mL/min ใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 270 นาโนเมตร

3.4.2.7 การวิเคราะห์กรดมัคโคลิก (Mycolic acid analysis)

ซึ่งเซลล์แห้ง 50-200 mg ใส่ลงในหลอดทดลองฝาเกลียว ย่อยเซลล์โดยเติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในเมทานอล (KOH-methanol) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 2 mL ปิดฝาหลอดให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง รอให้เย็นแล้วเติมกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6 นอร์มอล ปริมาตร 0.6 mL ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมเฮกเซน (n-Hexane) หรือ ปีโตรเลียม อีเทอร์ (Petroleum ether) ปริมาตร 2 mL ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียวหลอดใหม่ สกัดสารละลายส่วนล่างซ้ำอีกครั้ง โดยเติมเฮกเซน หรือ ปีโตรเลียม อีเทอร์ ปริมาตร 2 mL ใส่ในสารละลายส่วนล่าง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสใส่ลงในหลอดทดลองฝาเกลียวใหม่ข้างต้น จากนั้นทำให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน ละลายตัวอย่างที่แห้งด้วยการเติมตัวทำละลายผสม เบน

ขึ้น : เมทานอล : กรดซัลฟิวริก (Benzene : Methanol : H₂SO₄) ในอัตราส่วน 10:20:1 ปริมาตร 2 mL ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Methylation step) รอให้เย็น เติมน้ำปริมาตร 2 mL และสกัดด้วยเฮกเซน ปริมาตร 2 mL ผสมให้เข้ากันด้วยการเขย่า นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียวหลอดใหม่ สกัดสารละลายส่วนล่างซ้ำอีกครั้งโดยเติมเฮกเซน (n-Hexane) ปริมาตร 2 mL ใส่ในสารละลายส่วนล่าง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียวใหม่ข้างต้น และทำให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน ละลายสารตัวอย่างที่แห้งแล้วด้วยเฮกเซน ปริมาณเล็กน้อย จุดสารละลายดังกล่าวบนแผ่น silica gel TLC (Merck 60 F₂₅₄) ขนาด 20 x 20 cm ดีเวลลอปในตัวทำละลายผสม เฮกเซน : ไดเอทิลอีเทอร์ (n-Hexane : Diethylether) ในอัตราส่วน 4:1 แล้วรมแผ่น TLC ด้วยควันของไอโอดีน (I₂) หรือฉีดพ่นด้วยกรดซัลฟิวริก ร้อยละ 50 (50% H₂SO₄) นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 150 °C เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบแถบของสารที่เกิดขึ้นบนแผ่น TLC (Minnikin *et al.*, 1975)

3.4.3 การศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ (Genotypic characteristics)

3.4.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอตามวิธีการดัดแปลงจาก Tamaoka (1994) นำแอกติโนแบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ISP 2 broth ในสภาวะเขย่า 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 4-5 วัน เก็บเซลล์ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (Microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 mL ล้างเซลล์ด้วย TE buffer และละลายใน TE buffer ปริมาตร 380 µL จากนั้นเติมไลโซไซม์ (Lysozyme) ลงไปเล็กน้อยแล้วบ่มใน Water bath ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากบ่ม เติมสารละลาย SDS ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 40 µL ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบา ๆ บ่มที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมสารละลายผสม ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม (Phenol : Chloroform) อัตราส่วน 1:1 v/v ในปริมาณที่เท่ากับสารละลายในหลอด เขย่าด้วยมือเบา ๆ เป็นเวลา 5 นาที เพื่อกำจัดโปรตีนและอื่น ๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดสารละลายส่วนบนมาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย Absolute ethanol ที่เย็นจัดในปริมาตร 2 เท่า ใช้แท่งแก้วพันเก็บดีเอ็นเอแล้วตั้งทิ้งไว้ให้แห้งเมื่อแห้งแล้วละลายใน Milli-Q water เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

3.4.3.2 การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.4.3.1 ซึ่งละลายด้วย Milli-Q water มาบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ดีเอ็นเอละลายได้เต็มที่ จากนั้นเติมสารละลาย RNase ในปริมาตรที่เหมาะสม บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงหรือข้ามคืน เพื่อกำจัด RNA ที่อาจปะปนอยู่ในสารละลายดีเอ็นเอ เมื่อครบกำหนดเวลาแล้วเติมสารละลายฟีนอล : คลอโรฟอร์ม (Phenol : Chloroform) อัตราส่วน 1:1 และตกตะกอนดีเอ็นเอตามข้อที่ 3.4.3.1

3.4.3.3 การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.4.3.1 มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน โดยใช้ *Taq* DNA polymerase ตามวิธีการของ Trcek and Teuber (2022) สารที่ใช้ใน 1 ปฏิกิริยา (ปริมาตรทั้งหมด 100 μ L) ประกอบด้วย ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ปริมาตร 2 μ L *Taq* DNA polymerase (5 units/ μ L) (Invitrogen, USA) ปริมาตร 0.5 μ L 10X Polymerase buffer (Invitrogen, USA) ปริมาตร 10 μ L 25 mM MgCl₂ (Invitrogen, USA) ปริมาตร 8 μ L 2 mM dNTP (Invitrogen, USA) ปริมาตร 8 μ L 10 μ M Forward primer (9F) ปริมาตร 8 μ L 10 μ M Reverse primer (1541R) ปริมาตร 8 μ L และ Milli-Q water ปริมาตร 61.5 μ L นำสารผสมที่ได้มาทำปฏิกิริยาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเครื่อง T100™ Thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, USA) โดยอุณหภูมิที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนมีดังนี้ คือ เริ่มต้นในขั้นตอน Initial denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาจำนวน 40 รอบ โดยใช้อุณหภูมิในขั้นตอน Denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่ 52 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ Extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 90 วินาที เมื่อทำปฏิกิริยาครบ 40 รอบ ทำอุณหภูมิในขั้นตอน Final extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที

นำผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) ที่ได้ปริมาตร 1 μ L มาตรวจสอบโดยวิธี เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel electrophoresis) โดยรันบนเจลอะกาโรส ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 ที่ผสมสีย้อม SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen, USA) ใน 0.5X TBE buffer โดยใช้ค่าความต่าง ศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นตรวจดูแถบ (Band) ของ 16S rRNA โดยใช้เครื่อง UltraSlim® LED Illuminator (MaestroGen, USA)

3.4.3.4 การทำผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) ให้บริสุทธิ์

ทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์โดยใช้ FavorPrep™ PCR purification kit (Favorgen, Taiwan) โดยนำผลิตภัณฑ์ PCR ปริมาตร 100 μ L ใส่ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวก์ขนาด 1.5 mL เติม FADF buffer ปริมาตร 500 μ L ผสมให้เข้ากัน ดูดสารละลายใส่ลงใน FADF column ที่มี Collection tube จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายใน Collection tube ทิ้ง แล้วล้างด้วย Wash buffer ปริมาตร 750 μ L นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายใน Collection tube ทิ้ง นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ FADF column แห้ง วาง FADF column ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวก์ใหม่ สะเด็ดน้ำโดยหยด Elution buffer ปริมาตร 25 μ L แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เก็บรักษาดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 °C

3.4.3.5 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์แล้วมาวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธีแซงเจอร์ (Sanger sequencing) (Sanger *et al.*, 1977) โดยใช้ไพรเมอร์ 518F, 800R และ 1492R

3.4.3.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และการสร้างแผนภูมิสายวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์จากทุกไพรเมอร์มาเชื่อมต่อกันด้วย BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.2.5) ได้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล EzBioCloud (BLAST) เลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 16S rRNA ของเชื้อ Type strain สายพันธุ์ใกล้เคียงมาใช้สำหรับการสร้างแผนภูมิสายวิวัฒนาการ โดยเริ่มจากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่ทดสอบและเชื้อ Type strain ของสายพันธุ์ใกล้เคียงมาทำ Alignment โดยใช้โปรแกรม CLUSTAL W ใน BioEdit sequence alignment editor (version 7.2.5) ลบช่องว่าง (Gap) และนิวคลีโอไทด์ที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ออก จากนั้นสร้างแผนภูมิต้นไม้ด้วย MEGA software (version 7.0.26) วิเคราะห์แผนภูมิแบบ Neighbor-Joining Tree, Maximum Likelihood Tree และ Maximum Parsimony Tree โดยค่าความเชื่อมั่นในการวิเคราะห์แผนภูมิสายวิวัฒนาการถูกกำหนดด้วยค่า Bootstrap (Bootstrap value = 1,000)

3.4.3.7 การวิเคราะห์จีโนมทั้งหมด (Whole genomes analysis) และชีวสารสนเทศ (Bioinformatics)

วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเชื่อมต่อกัน (Assembly) ด้วยโปรแกรม SPAdes เพื่อให้ได้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดบนสายดีเอ็นเอ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เชื่อมต่อแล้วนี้จะถูกนำไปใช้ในการวิเคราะห์ด้านต่าง ๆ ดังนี้

(1) ทำนายยีน (Annotation) ด้วยเซิร์ฟเวอร์ออนไลน์ Rapid Annotations using Subsystems Technology (RAST) เวอร์ชัน 2.0

(2) คำนวณค่า Average Nucleotide Identity (ANI) และ digital G+C content โดยใช้ อัลกอริทึม ANIm (Based on MUMmer), ANIb (Based on BLAST+) และ Tetra value บนบริการออนไลน์ของ JSpeciesWS (<http://jspecies.ribohost.com/jspeciesws>)

(3) วิเคราะห์ค่า digital DNA-DNA hybridization (dDDH) โดยใช้ Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC) เวอร์ชัน 2.1 บนบริการออนไลน์ของ DSMZ (<https://www.dsmz.de/services/online-tools/genome-to-genome-distance-calculator-ggdc>)

(5) สร้างแผนภูมิต้นไม้จีโนม (Phylogenomic tree) ด้วยบริการออนไลน์ Type Strain (genome) server ของ DSMZ (<https://tygs.dsmz.de>)

(6) วิเคราะห์กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิด้วย บริการออนไลน์ของ anti-SMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org>)

3.5 การสกัดสารสกัดหยาบ การแยกสารให้บริสุทธิ์ และการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมี

3.5.1 การสกัดสารสกัดหยาบ

เพาะเลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียในอาหารเหลว ISP 2 seawater ปริมาตร 200 mL ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 mL โดยบ่มในสภาวะเขย่า 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 14 วัน ทำการแยกน้ำหมักออกจากเซลล์ด้วยกระดาษกรอง Whatman no.1 นำส่วนของน้ำหมักไปสกัดด้วยวิธี Liquid-liquid extraction โดยใช้เอทิลอะซิเตทเป็นตัวทำละลาย (ใช้ตัวทำละลายใหม่สกัดสารจากส่วนของน้ำหมักเดิมซ้ำ 3 ครั้ง) นำส่วนของเอทิลอะซิเตทที่มีสารสกัดไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ละลายสารสกัดที่แห้งด้วยเอทิลอะซิเตทปริมาณเล็กน้อย คูดสารละลายใส่ในภาชนะที่ทราบน้ำหนักแล้วนำไปตั้งไว้ในเดซิเคเตอร์เพื่อระเหยตัวทำละลายออกจนหมด เก็บสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทที่แห้งแล้วที่อุณหภูมิ -20 °C

3.5.2 การแยกสารให้บริสุทธิ์

นำสารสกัดหยาบที่คัดเลือกแล้วว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพน่าสนใจมาแยกให้เป็นสารบริสุทธิ์ โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟี ได้แก่ เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีซึ่งใช้เฟสคงที่ (Stationary phase) เป็น Sephadex LH-20 และใช้เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) เป็นเมทานอล อีกเทคนิคหนึ่งคือโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ซึ่งใช้คอลัมน์ SunFire C18 Column, 10µm, 19 x 250 mm เป็นเฟสคงที่ และใช้เฟสเคลื่อนที่แบบ Gradient โดยใช้ตัวทำละลายผสมอะซิโตไนล์ (Acetonitrile) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5-35 ในน้ำ ที่อัตราการไหล 10 mL/min โดยความเข้มข้นของอะซิโตไนล์และระยะเวลาที่ใช้ในการแยกสารให้บริสุทธิ์จะขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของตัวอย่าง

แผนผังขั้นตอนการแยกสารสกัดหยาบที่ผลิตโดย *Streptomyces* sp. JHD1^T เพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์แสดงไว้ดังรูปที่ 3.4 เริ่มต้นโดยนำสารสกัดหยาบมาแยกสารโดยอาศัยคุณสมบัติในการละลายในตัวทำละลายเมทานอลซึ่งจะเกิดการแบ่งส่วนของสารเป็นสองส่วน ได้แก่ ส่วนของ Filtrate (ส่วนที่ละลายได้ดีในเมทานอล) และส่วนของ Solid (ส่วนที่ละลายได้ไม่ดีในเมทานอล)

ส่วนของ Filtrate จะถูกนำมาแยกด้วยการใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีซึ่งใช้เฟสคงที่เป็น Sephadex LH-20 และใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นเมทานอล ทำให้ได้สารออกมาทั้งหมด 5 ส่วน โดยสารที่อยู่ในส่วน F3 และ F4 มีความน่าสนใจจึงถูกนำมาแยกให้บริสุทธิ์ต่อไปด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงซึ่ง โดยที่ส่วนของ F3 จะใช้คอลัมน์ SunFire C18 Column, 10µm, 19 x 250 mm เป็นเฟสคงที่ และใช้เฟสเคลื่อนที่แบบ gradient โดยใช้ตัวทำละลายผสมอะซิโตไนล์ (Acetonitrile) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5-30 ในน้ำ ที่อัตราการไหล 10 mL/min เป็นเวลา 30 นาที ทำให้ได้สารบริสุทธิ์ F3H5 ซึ่งระบุให้เป็นสาร 4

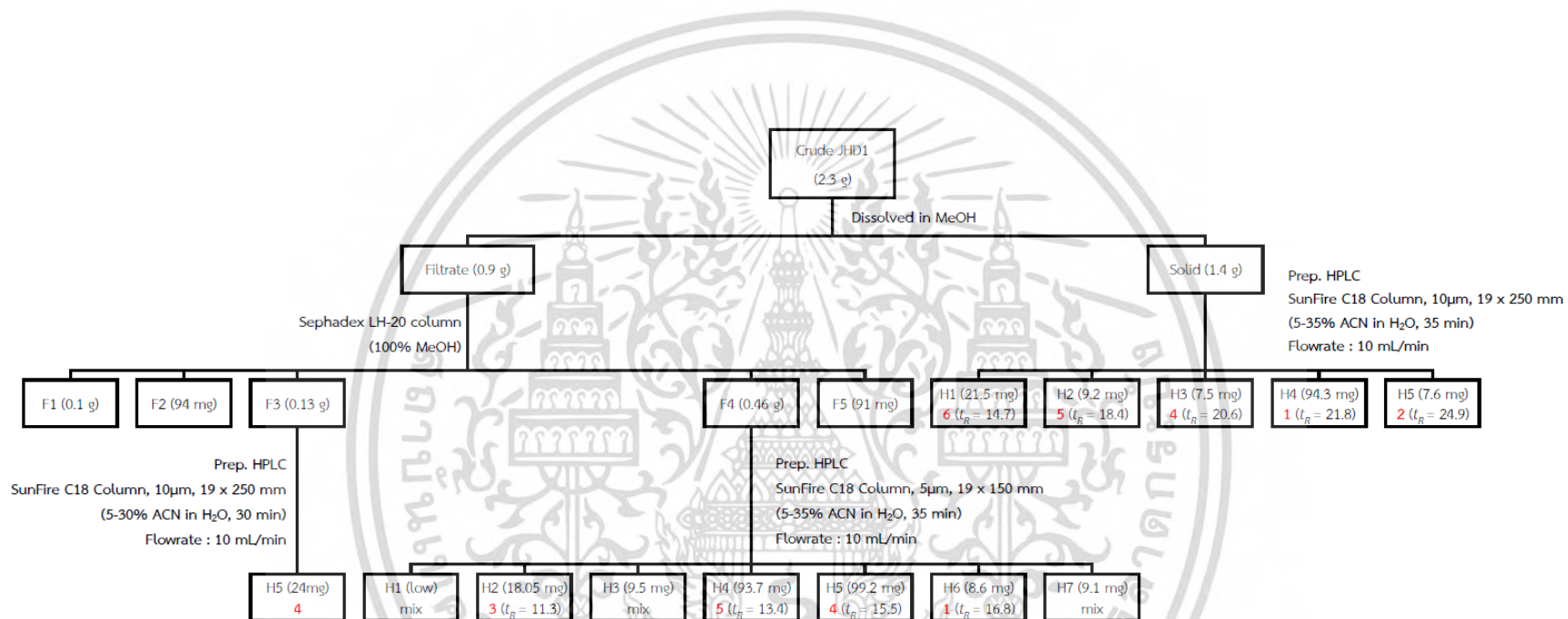
สำหรับสารส่วน F4 จะใช้คอลัมน์ SunFire C18 Column, 5µm, 19 x 150 mm เป็นเฟสคงที่ และใช้เฟสเคลื่อนที่แบบ gradient โดยใช้ตัวทำละลายผสมอะซิโตไนล์ (Acetonitrile) ที่

ความเข้มข้นร้อยละ 5-35 ในน้ำ ที่อัตราการไหล 10 mL/min เป็นเวลา 35 นาที ทำให้ได้สารทั้งหมด 7 ส่วน โดยสารในส่วนที่เป็นสารบริสุทธิ์มีทั้งหมด 4 ส่วน ประกอบด้วย F4H2 ระบุให้เป็นสาร 3, F4H4 ระบุให้เป็นสาร 5, F4H5 ระบุให้เป็นสาร 4 และ F4H6 ระบุให้เป็นสาร 1

ส่วนของ Solid จะถูกนำมาแยกด้วยด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยใช้คอลัมน์ SunFire C18 Column, 10 μ m, 19 x 250 mm เป็นเฟสคงที่ และใช้เฟสเคลื่อนที่แบบ gradient โดยใช้ตัวทำละลายผสมอะซิโตนไทรล์ (Acetonitrile) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5-35 ในน้ำ ที่อัตราการไหล 10 mL/min เป็นเวลา 35 นาที ทำให้ได้สารบริสุทธิ์ออกมาทั้งหมด 5 ส่วน ได้แก่ SH1 ระบุให้เป็นสาร 6, SH2 ระบุให้เป็นสาร 5, SH3 ระบุให้เป็นสาร 4, SH4 ระบุให้เป็นสาร 1 และ SH5 ระบุให้เป็นสาร 2 ทั้งนี้ความน่าสนใจของสารที่แยกได้ในแต่ละขั้นตอนขึ้นอยู่กับปรากฏของพีคในเวลาที่แตกต่างกัน (Retention time, t_R) รูปแบบของการดูดกลืนแสงในช่วงรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV spectrum) และการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.4 แผนผังแสดงการแยกสารสกัดหายาจาก *Streptomyces* sp. JHD1^T

3.5.3 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์

นำสารบริสุทธิ์ที่คัดเลือกมาวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีโดยอาศัยผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปี ดังนี้

3.5.3.1 การวิเคราะห์สเปกตรัม UV-vis ของสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Ultraviolet-Visible absorption spectroscopy

3.5.3.2 การวิเคราะห์สเปกตรัมอินฟราเรดของสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Infrared absorption spectroscopy

3.5.3.3 การวิเคราะห์สเปกตรัม NMR (Nuclear Magnetic Resonance) ได้แก่ $^1\text{H-NMR}$ $^{13}\text{C-NMR}$ DEPT 135 COSY NOESY HMQC HMBC และ HSQC

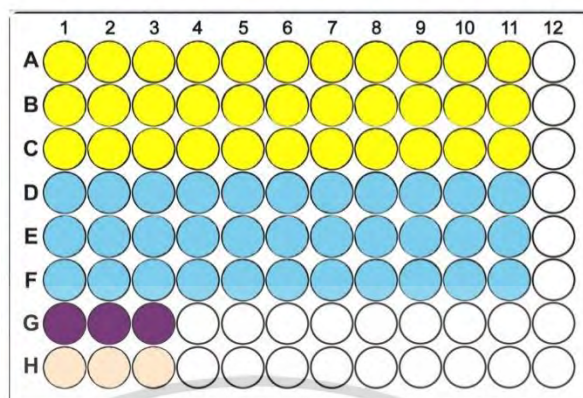
3.5.3.4 วิเคราะห์มวลของสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Mass spectrometry

3.6 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activity)

3.6.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay

เตรียมสารตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.97-1,000 $\mu\text{g/mL}$ โดยใช้ตัวทำละลายเป็นเมทานอล นำสารตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ความเข้มข้น 0.2 mM ในเมทานอล โดยทำปฏิกิริยาบนไมโครเพลทดังแสดงในรูปที่ 3.5 นำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (Microplate reader) ที่ความยาวคลื่น 517 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาร้อยละของปฏิกิริยาดักจับอนุมูลอิสระ (Free radical scavenging) ดังสมการด้านล่าง โดยใช้ตัวควบคุมเชิงบวก (Positive control) เป็นกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid, Vitamin C) และ บิวทิลไฮดรอกซีโทลูอีน (Butylated hydroxytoluene, BHT)

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{[(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{blankDPPH}}) - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blanksample}})]}{A_{\text{DPPH}} - A_{\text{blankDPPH}}} \times 100$$



-  คือ DPPH [0.2 mM] 100 μ l + Sample 100 μ l
-  คือ Sample 100 μ l + Methanol 100 μ l
-  คือ DPPH [0.2 mM] 100 μ l + Methanol 100 μ l
-  คือ Methanol 200 μ l

รูปที่ 3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay บนไม้โครเพลท

3.6.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี Agar disk diffusion

เพาะเลี้ยงเชื้อก่อโรคแบคทีเรีย ได้แก่ *B. subtilis*, *E. faecium*, *K. rhizophila*, Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *S. aureus*, *S. epidermidis*, Vancomycin-resistant *Enterococci* (VRE), *E. coli*, และ *P. aeruginosa* บนอาหารแข็ง Mueller hinton agar (MHA) และเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ *C. albicans* และ *S. cerevisiae* บนอาหารแข็ง Potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เตรียมสารตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1,000 μ g/mL โดยใช้ตัวทำละลายเป็นเมทานอล ปิเปตต์สารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 20 μ L ลงบนแผ่น disc ที่ปราศจากเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm รอให้แห้ง (ได้ตัวอย่างเข้มข้น 20 μ g/ดิสก์) จากนั้นเตรียมสารแขวนลอยของเชื้อก่อโรคที่มีอายุ 24 ชั่วโมง ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (0.85% NaCl) ที่ปราศจากเชื้อ โดยปรับความขุ่นให้เท่ากับ McFarland no. 0.5 ใช้ก้านพันสำลีที่ปราศจากเชื้อทำการ swab เชื้อก่อโรคให้ทั่วผิวหน้าอาหาร MHA สำหรับทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคที่เป็นแบคทีเรีย และอาหาร PDA สำหรับทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคที่เป็นเชื้อยีสต์ นำแผ่นดิสก์ที่มีสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบมาวางบนผิวหน้าอาหารที่ทำการ Swab เชื้อก่อโรคไว้แล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบฤทธิ์ต้านเชื้อโดยสังเกตโซนยับยั้ง (Inhibition zone) ที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.6.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี Broth microdilution

เพาะเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบบนอาหารแข็ง MHA บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เตรียมสารทดสอบให้มีความเข้มข้น 512 µg/mL ในตัวทำละลายน้ำ (หากสารตัวอย่างละลายได้ไม่ดีให้เติม DMSO ให้มีความเข้มข้นไม่เกิน 10% ในสารละลาย) และเจือจางที่ละสองเท่าจนสารละลายทดสอบมีความเข้มข้นตั้งแต่ 512-1.0 µg/mL ปรับความขุ่นเชื้อแบคทีเรียทดสอบด้วยอาหารเหลว Mueller hinton broth (MHB) ให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland no. 0.5 (ได้เชื้อแขวนลอย 1.5×10^8 CFU/mL) ใช้ข้อโด้บีเปดต์ที่ปราศจากเชื้อดูดสารแขวนลอยเชื้อดังกล่าวปริมาตร 1 mL ใส่ลงในขวดที่มีอาหารเหลว MHB อยู่ปริมาตร 9 mL (ได้เชื้อแขวนลอย 1×10^7 CFU/mL ปริมาตร 10 mL) ทำการทดสอบบนไมโครเพลท (96-Well plate) ที่ปราศจากเชื้อ โดยแต่ละหลุมประกอบด้วยสารละลายทดสอบ (100 µL) อาหารเหลว MHB (90 µL) และเชื้อแขวนลอยที่ 1×10^7 CFU/mL (10 µL) (จะได้เชื้อแขวนลอยในปฏิกิริยาสุดท้ายอยู่ในช่วง $1-5 \times 10^5$ CFU/mL) ปริมาตรสุทธิในแต่ละหลุมเท่ากับ 200 µL ทั้งนี้ทำการทดสอบที่ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาของสารทดสอบเท่ากับ 256-0.5 µg/mL (10 หลุม) และหลุมที่ 11 ให้ใส่น้ำปราศจากเชื้อแทนสารละลายทดสอบ (ตัวควบคุมเชิงบวก) ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจสอบความขุ่นที่เกิดขึ้นในแต่ละหลุม โดยที่ความเข้มข้นของสารทดสอบสูงสุดหลุมแรกที่ใส ให้ระบุเป็นค่าความเข้มข้นของสารระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC)

3.6.4 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของแอกติโนแบคทีเรีย

ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของแอกติโนแบคทีเรียไอโซเลต SW21^T ตามวิธีการของ Zhang *et al.* (2013) ซึ่งทำการทดสอบโดยใช้วิธี Agar disk diffusion บนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ISP 2 โดยชนิดของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบ (12 ชนิด) อ้างอิงตาม CLSI (2020) ได้แก่ (ความเข้มข้น µg/ดิสก์) Amikacin (30), Amoxicillin (10), Ampicillin (10), Clindamycin (2), Gentamicin (10), Nalidixic acid (30), Ofloxacin (5), Oxacillin (1), Penicillin G (10 units), Streptomycin (50), Tobramycin (10) และ Vancomycin (30) ทำการบีเบดต์สารละลายของยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดลงบนแผ่นดิสก์ ที่ปราศจากเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm รอให้แห้ง จากนั้นเตรียมสารละลายแขวนลอยของแอกติโนแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ ที่มีอายุ 24 ชั่วโมง ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (0.85% NaCl) ที่ปราศจากเชื้อ โดยปรับความขุ่นให้เท่ากับ McFarland no. 0.5 ใช้ก้านพันสำลีที่ปราศจากเชื้อทำการ Swab แอกติโนแบคทีเรียให้ทั่วผิวหน้าอาหาร ISP 2 agar จากนั้นนำแผ่นดิสก์ที่มียาปฏิชีวนะที่ต้องการทดสอบมาวางบนผิวหน้าอาหารที่ทำการ Swab แอกติโนแบคทีเรียไว้ บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะโดยสังเกตโซนยับยั้งที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 3.1 วิธีการเตรียมสารละลายของยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ (CLSI, 2020)

ยาปฏิชีวนะ	Solvent (Diluent)	ความเข้มข้น
Amikacin	Water (Water)	30 µg/disk
Amoxicillin	Phosphate buffer, pH6, 0.1M (Same)	10 µg/disk
Ampicillin	Phosphate buffer, pH8, 0.1M (pH6)	10 µg/disk
Clindamycin	Water (Water)	2 µg/disk
Gentamicin	Water (Water)	10 µg/disk
Nalidixic acid	½ Water + 1M NaOH dropwise (water)	30 µg/disk
Ofloxacin	½ Water + 0.1M NaOH dropwise (Water)	5 µg/disk
Oxacillin	Water (Water)	1 µg/disk
Penicillin G	Water (Water)	10 units (6 µg/disk)
Streptomycin	Water (Water)	50 µg/disk
Tobramycin	Water (Water)	10 µg/disk
Vancomycin	Water (Water)	30 µg/disk

3.7 การทดสอบสมมติฐานทางสถิติ

ทดสอบสมมติฐานทางสถิติเพื่อทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของประชากรที่มีตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไปโดยใช้ซอฟต์แวร์ Minitab 19 รูปแบบการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) โดยทำการเปรียบเทียบด้วย Tukey HSD (Honestly Significant Difference) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การเก็บตัวอย่าง และการตัดแยกแอคติโนแบคทีเรีย

ตัวอย่างทางทะเลถูกเก็บจากพื้นที่บริเวณอ่าวไทยตอนบนทั้งหมด 3 จุด ได้แก่ หาดบางแสน หาดจอมเทียน และหาดสัตหีบ โดยเก็บตัวอย่างที่เป็น น้ำทะเล ตะกอนดินทะเล ซากพืช และตัวอย่างอื่น ๆ เช่น ฟองน้ำทะเล และลึนทะเลหรือกระดองปลาหมึก แอคติโนแบคทีเรียจำนวน 10 ไอโซเลต ถูกตัดแยกจากตัวอย่างบริเวณหาดบางแสนจำนวน 2 ตัวอย่าง คือ ซากไม้ (2 ไอโซเลต ได้แก่ BWO1 และ BWO6) และดินทะเล (2 ไอโซเลต ได้แก่ BHD1 และ BHD2) หาดจอมเทียนจำนวน 3 ตัวอย่าง คือ ฟองน้ำทะเล (1 ไอโซเลต คือ JP6) ลึนทะเลหรือกระดองปลาหมึก (1 ไอโซเลต คือ JR2) และดิน (1 ไอโซเลต คือ JHD1) ตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณหาดสัตหีบตัดแยกแอคติโนแบคทีเรียได้ 3 ไอโซเลต ได้แก่ SW8, SW21 และ SW32 ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ผลการตัดแยกแอคติโนแบคทีเรียจากตัวอย่างทางทะเล

สถานที่เก็บตัวอย่าง	ตัวอย่าง	ไอโซเลต
หาดบางแสน (13° 17' 18.2"N 100° 54' 39.4"E)	ซากไม้	BWO1 BWO6
	ตะกอนดินทะเล (Heat dry)	BHD1 BHD2
หาดจอมเทียน (12° 52' 54.3"N 100° 52' 54.0"E)	ฟองน้ำทะเล	JP6
	ลึนทะเลหรือกระดองปลาหมึก	JR2
	ตะกอนดินทะเล (Heat dry)	JHD1
หาดสัตหีบ (12° 32' 37.0"N 100° 56' 50.4"E)	น้ำทะเล	SW8 SW21 SW32

4.2 การศึกษาอนุกรมวิธานเบื้องต้นของแอกติโนแบคทีเรียที่คัดแยก

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแอกติโนแบคทีเรียทั้งหมดที่คัดแยกได้จากตัวอย่างทางทะเลบริเวณอ่าวไทยตอนบนทั้ง 10 ไอโซเลต พบว่ามีทั้งแอกติโนแบคทีเรียชนิดเส้นใยและแอกติโนแบคทีเรียชนิดเซลล์เดี่ยว และการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน 16S rRNA เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล EzBioCloud พบว่ามีแอกติโนแบคทีเรียจำนวน 3 สกุล ประกอบด้วย สกุล *Streptomyces* (5 ไอโซเลต ได้แก่ BWO1, BWO6, BHD2, JR2 และ JHD1) สกุล *Nocardiosis* (2 ไอโซเลต ได้แก่ BHD1 และ JP6) และสกุล *Gordonia* (3 ไอโซเลต ได้แก่ SW8, SW21 และ SW32) รายละเอียดการศึกษาอนุกรมวิธานเบื้องต้นของแต่ละไอโซเลตมีดังนี้

ไอโซเลต BWO1 เป็นแอกติโนแบคทีเรียเส้นใย พื้นผิวโคโลนีมีลักษณะเป็นผงแห้ง เส้นใยอาหารมีสีน้ำตาลอมแดงอ่อน และเส้นใยอากาศมีสีเทา สปอร์มีการจัดเรียงตัวแบบเกลียว ไม่พบการสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ เจริญได้ดีบนอาหาร ISP 2 seawater (รูปที่ 4.1) ลักษณะดังกล่าวสอดคล้องกับลักษณะของแอกติโนแบคทีเรียในสกุล *Streptomyces* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก สามารถสร้างเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศได้ บริเวณเส้นใยอากาศมีการสร้างสปอร์จัดเรียงตัวหลากหลายรูปแบบ โคโลนีในช่วงที่มีการสร้างเส้นใยอากาศจะมีลักษณะคล้ายผงแห้ง (Goodfellow *et al.*, 2012) จึงสันนิษฐานว่าไอโซเลต BWO1 จัดเป็นแอกติโนแบคทีเรียในสกุล *Streptomyces* นอกจากนี้ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน 16S rRNA ในฐานข้อมูล EzBioCloud พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces ardesiacus* NRRL B-1773^T (99.5%) ซึ่งคัดแยกได้จากปุ๋ยหมัก (Komaki & Tamura, 2020) สอดคล้องกับการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี Neighbor-joining แสดงให้เห็นว่าไอโซเลต BWO1 จัดอยู่ในกลุ่มของแอกติโนแบคทีเรียสกุล *Streptomyces* และมีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces ardesiacus* NRRL B-1773^T (รูปที่ 4.2)



รูปที่ 4.1 ไอโซเลต BWO1 ที่เจริญบนอาหาร ISP 2 seawater (รูป ก-ค) โคโลนีบนอาหาร ISP 2 seawater (รูป ง) ภาพไตกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายทั้งหมด 400 เท่า



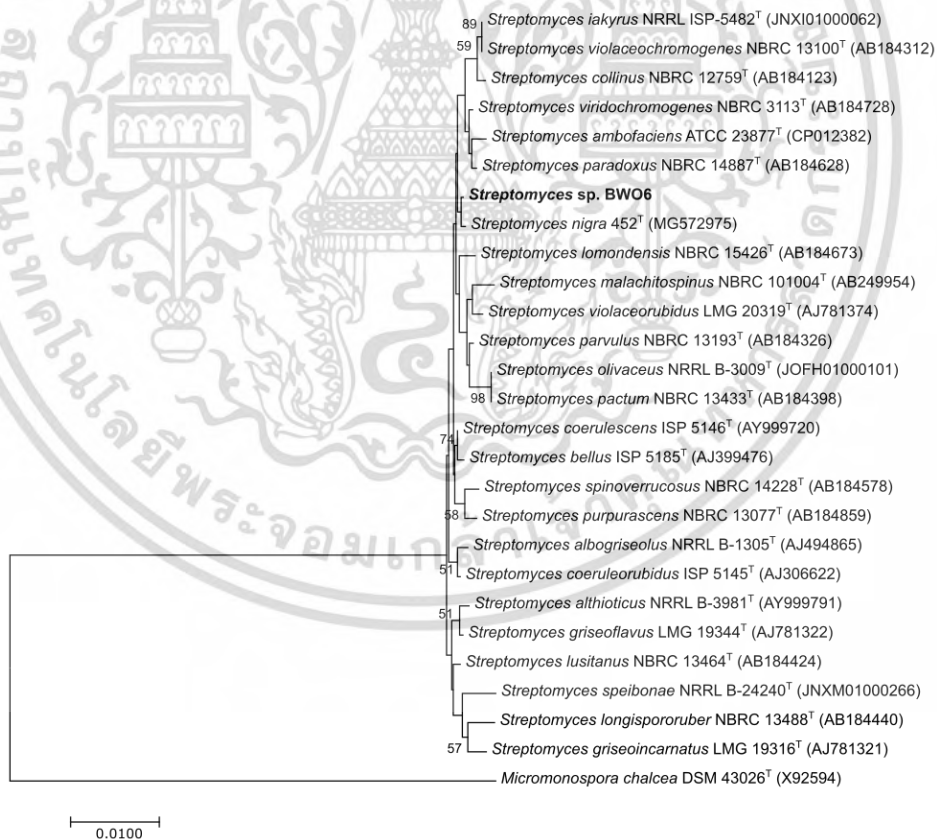
รูปที่ 4.2 แผนภูมิต้นไม้ (Neighbor-Joining tree) แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต BWO1 และสายพันธุ์ใกล้เคียง

ไอโซเลต BWO6 เป็นแอกติโนแบคทีเรียเส้นใย พื้นผิวโคโลนีมีลักษณะเป็นผงแห้ง เส้นใยอาหารมีสีเหลืองอมเขียวจัด และเส้นใยอากาศมีสีฟ้าชัดเจนมาก สปอร์มีการจัดเรียงตัวแบบเกลียว ไม่พบการสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ เจริญได้ดีบนอาหาร ISP 2 seawater (รูปที่ 4.3) ลักษณะดังกล่าวสอดคล้องกับลักษณะของแอกติโนแบคทีเรียในสกุล *Streptomyces* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก สามารถสร้างเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศได้ บริเวณเส้นใยอากาศมีการสร้างสปอร์จัดเรียงตัวหลากหลายรูปแบบ โคโลนีในช่วงที่มีการสร้างเส้นใยอากาศจะมีลักษณะคล้ายผงแห้ง (Goodfellow *et al.*, 2012) จึงสันนิษฐานว่าไอโซเลต BWO6 จัดเป็นแอกติโนแบคทีเรียในสกุล *Streptomyces* นอกจากนี้ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน 16S rRNA ในฐานข้อมูล EzBioCloud พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces nigra* 452^T (99.8%) ซึ่งคัดแยกจากดินป่าชายเลนบริเวณต้นแสมทะเล (*Avicennia Marina*) ประเทศจีน โคโลนีบนอาหาร ISP 2 สร้างเส้นใยอาหารสีขาว และเส้นใยอากาศสีขาว ไม่พบการสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ โคโลนีพื้นผิวหยาบ (Chen *et al.*, 2018) สอดคล้องกับการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี Neighbor-

joining แสดงให้เห็นว่าไอโซเลต BWO6 จัดอยู่ในกลุ่มของแอกติโนแบคทีเรียสกุล *Streptomyces* และมีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces nigra* 452^T (รูปที่ 4.4)



รูปที่ 4.3 ไอโซเลต BWO6 ที่เจริญบนอาหาร ISP 2 seawater (รูป ก-ค) โคโลนีบนอาหาร ISP 2 seawater (รูป ง) ภาพไตกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายทั้งหมด 400 เท่า



รูปที่ 4.4 แผนภูมิต้นไม้ (Neighbor-Joining tree) แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต BWO6 และสายพันธุ์ใกล้เคียง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต BHD1 เป็นแอกติโนแบคทีเรียเส้นใย พื้นผิวโคโลนีมีลักษณะเป็นผงแห้ง เส้นใยอาหารมีสีน้ำตาลอมเหลืองอมเทา และเส้นใยอากาศมีสีเทาอมฟ้าอ่อน สปอร์มีการจัดเรียงตัวเป็นสายยาว สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสีน้ำตาลอมแดงอมเทาอ่อน เจริญได้ดีบนอาหาร ISP 2 seawater (รูปที่ 4.5) ลักษณะดังกล่าวสอดคล้องกับลักษณะของแอกติโนแบคทีเรียในสกุล *Nocardioopsis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก สามารถสร้างเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศได้ เส้นใยอากาศยาวมีการแตกแขนง มีลักษณะเป็นเส้นตรงไปจนถึงโค้งงอซึ่งจะแยกส่วนเป็นสปอร์ต่อกันเป็นสายยาวที่มีความยาวแตกต่างกันไป (Goodfellow *et al.*, 2012) จึงสันนิษฐานว่าไอโซเลต BHD1 จัดเป็นแอกติโนแบคทีเรียในสกุล *Nocardioopsis* นอกจากนี้ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน 16S rRNA ในฐานข้อมูล EzBioCloud พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Nocardioopsis dassonvillei* subsp. *Crassaminis* D1^T (100%) ซึ่งคัดแยกจากตะกอนดินแหล่งน้ำจืดในแม่น้ำ San Pablo ในชุมชน La Risueña จังหวัด Santiago de Cuba ประเทศคิวบา โคโลนีมีเส้นใยอาหารสีเหลืองอ่อน เส้นใยอากาศมีสีขาว และสร้างสปอร์จัดเรียงตัวเป็นสายยาว (Camacho Pozo *et al.*, 2020) สอดคล้องกับการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี Neighbor-joining แสดงให้เห็นว่าไอโซเลต BHD1 จัดอยู่ในกลุ่มของแอกติโนแบคทีเรียสกุล *Nocardioopsis* และมีความคล้ายคลึงกับ *Nocardioopsis dassonvillei* subsp. *Crassaminis* D1^T (รูปที่ 4.7)



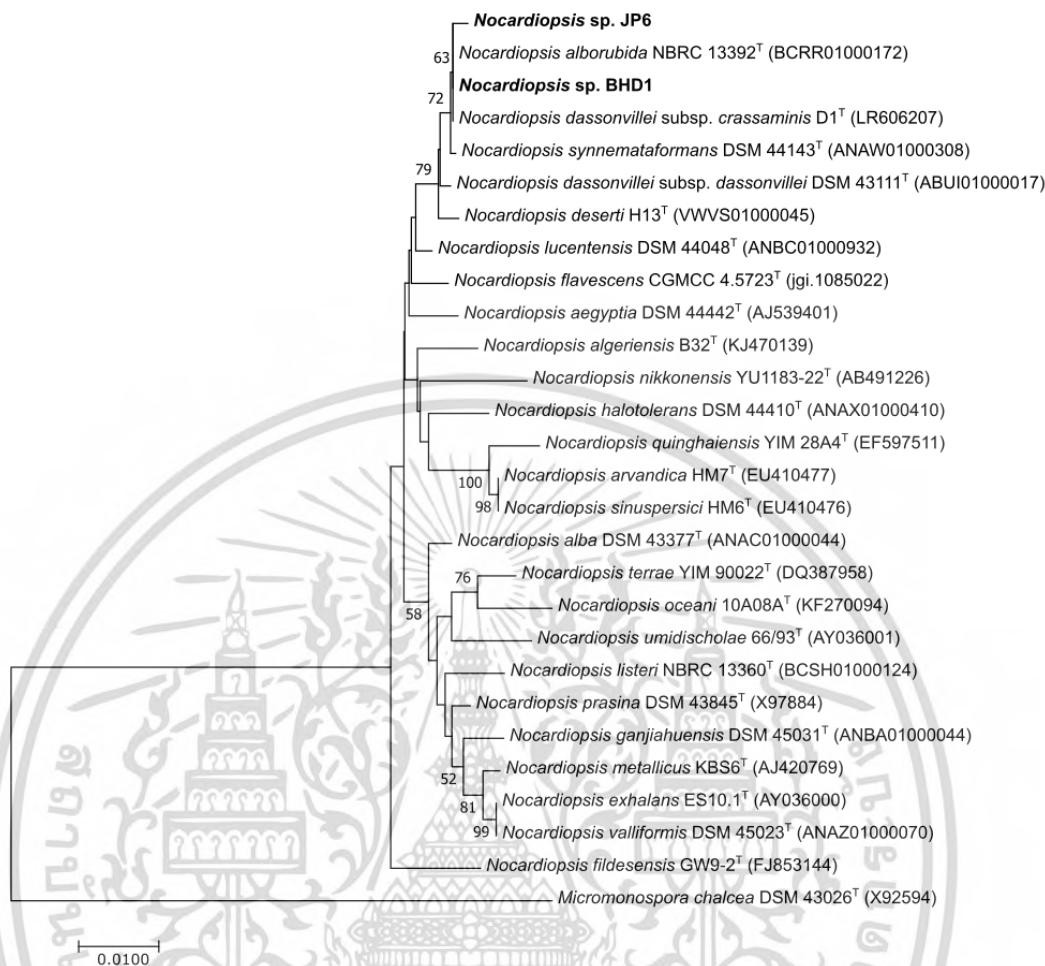
รูปที่ 4.5 ไอโซเลต BHD1 ที่เจริญบนอาหาร ISP 2 seawater
(รูป ก-ค) โคโลนีบนอาหาร ISP 2 seawater
(รูป ง) ภาพไตกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายทั้งหมด 400 เท่า

ไอโซเลต JP6 เป็นแอกติโนแบคทีเรียเส้นใย พื้นผิวโคโลนีมีลักษณะเป็นผงแห้ง เส้นใยอาหารมีสีเหลืองอมเขียวอมเทา และเส้นใยอากาศมีสีเทาอมเหลือง สปอร์มีการจัดเรียงตัวเป็นสายยาว ไม่พบการสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ เจริญได้ดีบนอาหาร ISP 2 seawater (รูปที่ 4.6) ลักษณะดังกล่าวสอดคล้องกับลักษณะของแอกติโนแบคทีเรียในสกุล *Nocardioopsis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก สามารถสร้างเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศได้ เส้นใยอากาศยาวมีการแตกแขนง มีลักษณะเป็นเส้นตรงไปจนถึงโค้งงอซึ่งจะแยกส่วนเป็นสปอร์ต่อกันเป็นสายยาวที่มีความยาวแตกต่างกันไป (Goodfellow *et al.*, 2012) จึง

สันนิษฐานว่าไอโซเลต JP6 จัดเป็นแอกติโนแบคทีเรียในสกุล *Nocardiopsis* นอกจากนี้ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน 16S rRNA ในฐานข้อมูล EzBioCloud พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *Crassaminis* D1^T (99.8%) (Camacho Pozo *et al.*, 2020) (เช่นเดียวกับกับไอโซเลต BHD1) สอดคล้องกับการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี Neighbor-joining แสดงให้เห็นว่าไอโซเลต JP6 จัดอยู่ในกลุ่มของแอกติโนแบคทีเรียสกุล *Nocardiopsis* และมีความคล้ายคลึงกับ *Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *Crassaminis* D1^T (รูปที่ 4.7)



รูปที่ 4.6 ไอโซเลต JP6 ที่เจริญบนอาหาร ISP 2 seawater (รูป ก-ค) โคโลนีบนอาหาร ISP 2 seawater (รูป ง) ภาพไตกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายทั้งหมด 400 เท่า



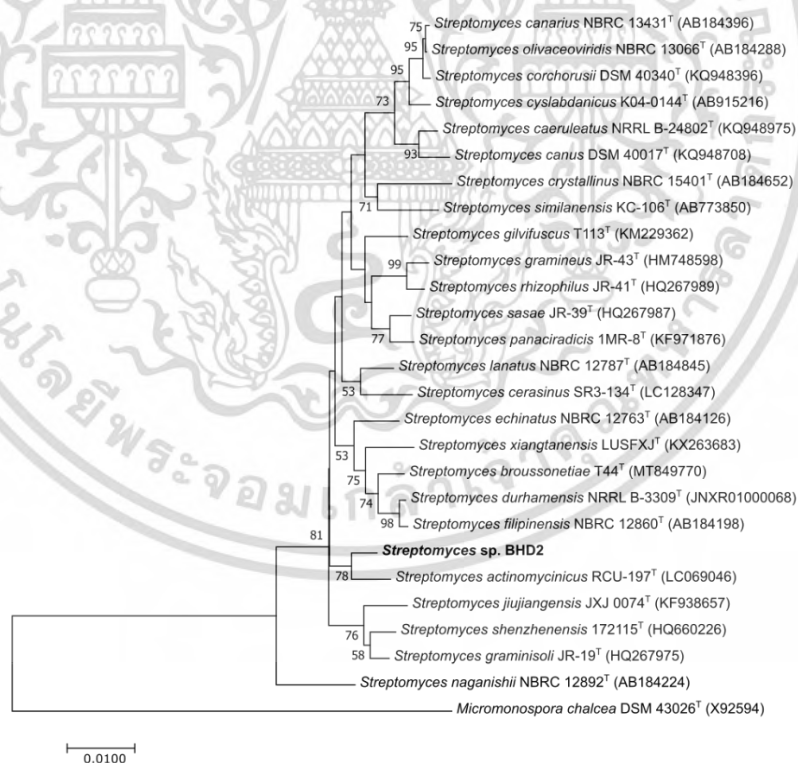
รูปที่ 4.7 แผนภูมิต้นไม้ (Neighbor-Joining tree) แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต BHD1, JP6 และสายพันธุ์ใกล้เคียง

ไอโซเลต BHD2 เป็นแอกติโนแบคทีเรียเส้นใย พื้นผิวโคโลนีมีลักษณะเป็นผงแห้ง เส้นใยอาหารมีสีเหลืองอมเขียวจัด และเส้นใยอากาศมีสีเทาอมเขียวอ่อน สปอร์มีการจัดเรียงตัวแบบเกลียว ไม่พบการสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ เจริญได้ดีบนอาหาร ISP 2 seawater (รูปที่ 4.8) ลักษณะดังกล่าวสอดคล้องกับลักษณะของแอกติโนแบคทีเรียในสกุล *Streptomyces* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก สามารถสร้างเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศได้ บริเวณเส้นใยอากาศมีการสร้างสปอร์จัดเรียงตัวหลากหลายรูปแบบ โคโลนีในช่วงที่มีการสร้างเส้นใยอากาศจะมีลักษณะคล้ายผงแห้ง (Goodfellow *et al.*, 2012) จึงสันนิษฐานว่า ไอโซเลต BHD2 จัดเป็นแอกติโนแบคทีเรียในสกุล *Streptomyces* นอกจากนี้ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน 16S rRNA ในฐานข้อมูล EzBioCloud พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces actinomycinicus* RCU-197^T (98.9%) ซึ่งคัดแยกจากดินป่าพรุ โคโลนีมีเส้นใยอาหารสีเหลืองเข้ม เส้นใยอากาศมีสีเทาอมเขียว สร้างรงควัตถุสีเหลืองอมเขียว สปอร์จัดเรียงตัวแบบเกลียว (Tanasupawat *et*

al., 2016) สอดคล้องกับการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี Neighbor-joining แสดงให้เห็นว่าไอโซเลต BHD2 จัดอยู่ในกลุ่มของแอกติโนแบคทีเรียสกุล *Streptomyces* และมีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces actinomycinicus* RCU-197^T (รูปที่ 4.9)



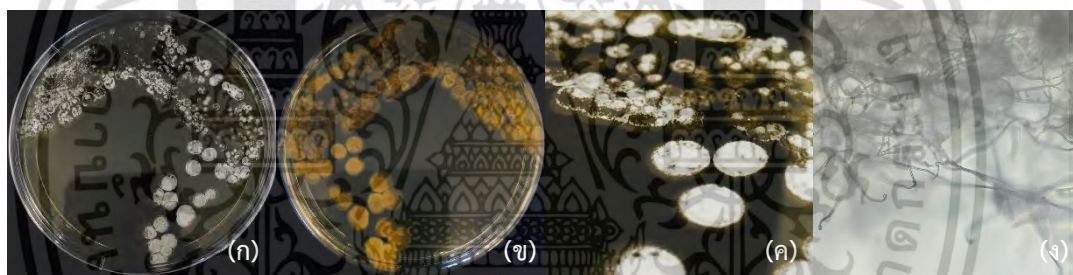
รูปที่ 4.8 ไอโซเลต BHD2 ที่เจริญบนอาหาร ISP 2 seawater (รูป ก-ค) โคโลนีบนอาหาร ISP 2 seawater (รูป ง) ภาพไตกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายทั้งหมด 400 เท่า



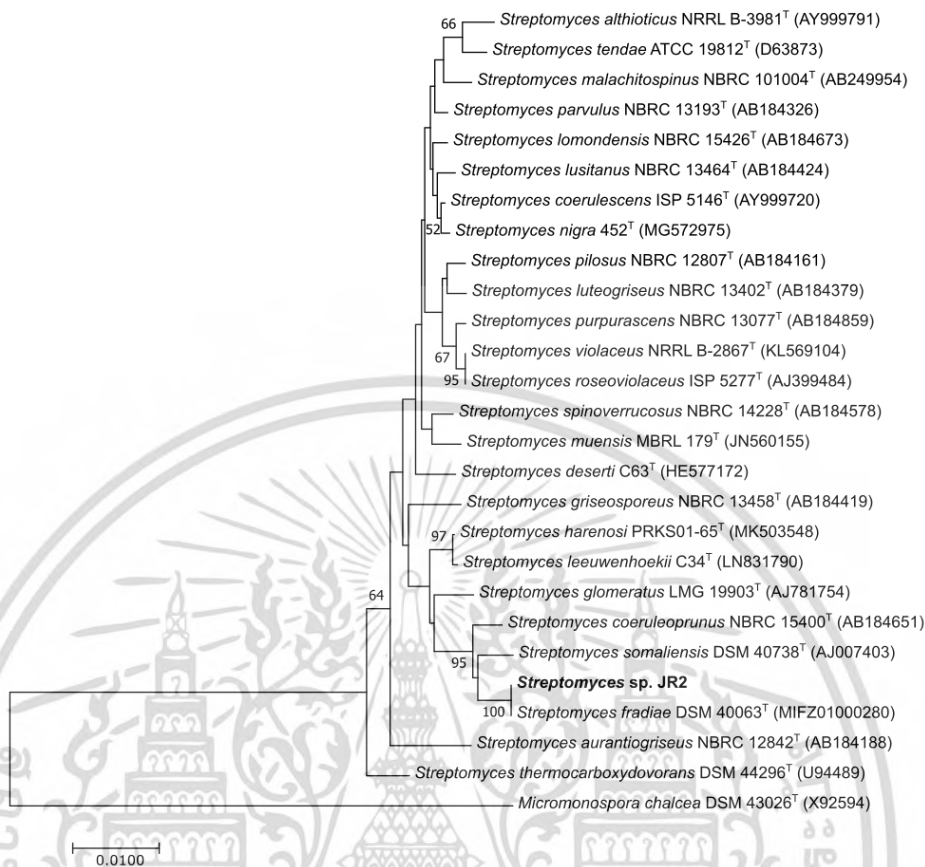
รูปที่ 4.9 แผนภูมิต้นไม้ (Neighbor-Joining tree) แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต BHD2 และสายพันธุ์ใกล้เคียง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต JR2 เป็นแอกติโนแบคทีเรียเส้นใย พื้นผิวโคโลนีมีลักษณะเป็นผงแห้ง เส้นใยอาหารมีสีเหลืองอมเขียวอมเทา เส้นใยอากาศมีสีเทา สปอร์มีการจัดเรียงตัวแบบสายยาวโค้งงอคล้ายรูปตะขอ ไม่พบการสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ เจริญได้ดีบนอาหาร ISP 2 seawater (รูปที่ 4.10) ลักษณะดังกล่าวสอดคล้องกับลักษณะของแอกติโนแบคทีเรียในสกุล *Streptomyces* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก สามารถสร้างเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศได้ โคโลนีในระยะที่ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศมีพื้นผิวหลากหลายรูปแบบ เช่น คล้ายหนังสัตว์ หยาบ หรือพื้นผิวเรียบ แต่ในระยะต่อมาเมื่อสร้างเส้นใยอากาศแล้วจะมีลักษณะคล้ายผงแห้ง (Goodfellow *et al.*, 2012) จึงสันนิษฐานว่าไอโซเลต JR2 จัดเป็นแอกติโนแบคทีเรียในสกุล *Streptomyces* นอกจากนี้ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน 16S rRNA ในฐานข้อมูล EzBioCloud พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces fradiae* DSM 40063^T (100%) ซึ่งคัดแยกได้จากดิน (Reimer *et al.*, 2022) สอดคล้องกับการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี Neighbor-joining แสดงให้เห็นว่าไอโซเลต JR2 จัดอยู่ในกลุ่มของแอกติโนแบคทีเรียสกุล *Streptomyces* และมีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces fradiae* DSM 40063^T (รูปที่ 4.11)



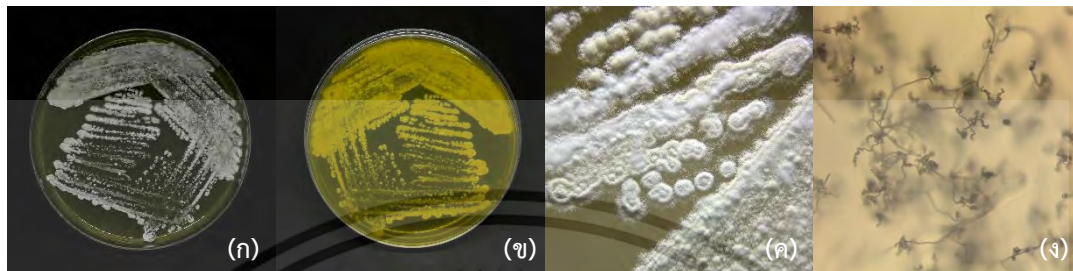
รูปที่ 4.10 ไอโซเลต JR2 ที่เจริญบนอาหาร ISP 2 seawater (รูป ก-ค) โคโลนีบนอาหาร ISP 2 seawater (รูป ง) ภาพได้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายทั้งหมด 400 เท่า



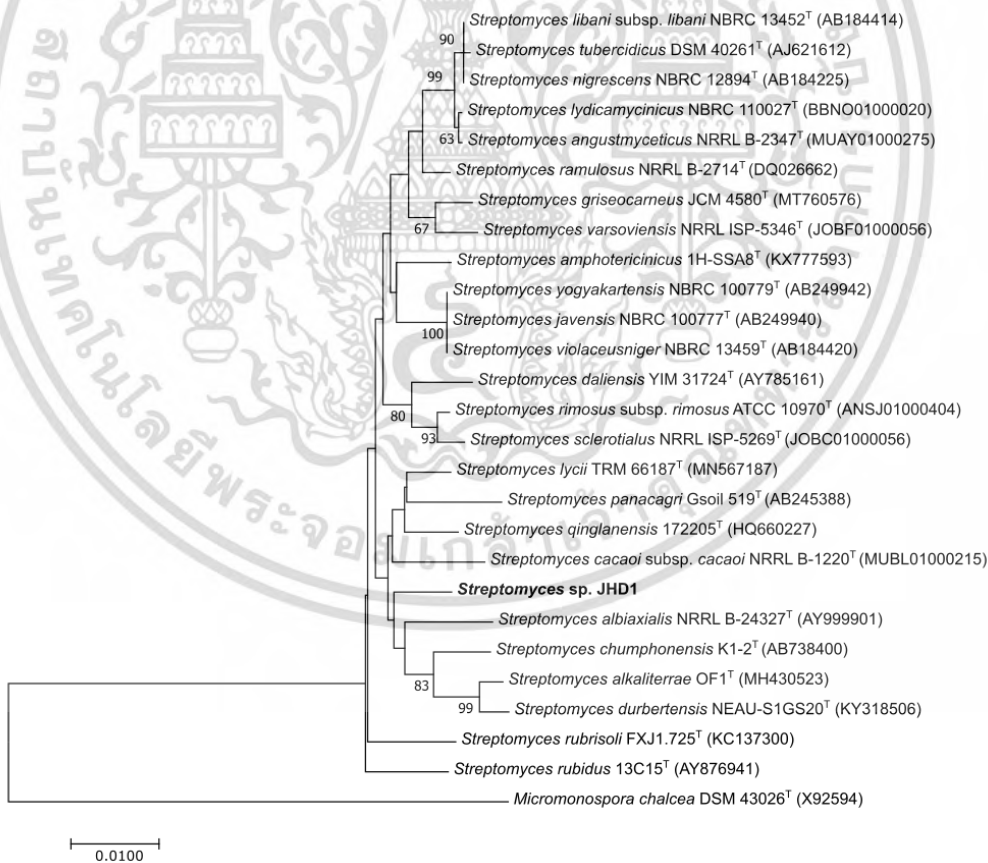
รูปที่ 4.11 แผนภูมิต้นไม้ (Neighbor-Joining tree) แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต JR2 และสายพันธุ์ใกล้เคียง

ไอโซเลต JHD1 เป็นแอกติโนแบคทีเรียเส้นใย พื้นผิวโคโลนีมีลักษณะเป็นผงแห้ง เส้นใยอาหารมีสีเหลืองอมเขียวจัด และเส้นใยอากาศมีสีขาวอมเขียว สปอร์มีการจัดเรียงตัวแบบเกลียว สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสีเหลืองอมเขียวอ่อน เจริญได้ดีบนอาหาร ISP 2 seawater (รูปที่ 4.12) ลักษณะดังกล่าวสอดคล้องกับลักษณะของแอกติโนแบคทีเรียในสกุล *Streptomyces* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก สามารถสร้างเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศได้ บริเวณเส้นใยอากาศมีการสร้างสปอร์จัดเรียงตัวหลากหลายรูปแบบ โคโลนีในช่วงที่มีการสร้างเส้นใยอากาศจะมีลักษณะคล้ายผงแห้ง (Goodfellow *et al.*, 2012) จึงสันนิษฐานว่าไอโซเลต JHD1 จัดเป็นแอกติโนแบคทีเรียในสกุล *Streptomyces* นอกจากนี้ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน 16S rRNA ในฐานข้อมูล EzBioCloud พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces alkaliterrae* OF1^T (98.5%) ซึ่งคัดแยกจากดินที่เป็นต่าง บนอาหาร ISP 2 สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอมส้มอ่อน เส้นใยอากาศสีขาว สปอร์จัดเรียงตัวแบบเกลียว (Świecimska *et al.*, 2020) การวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี Neighbor-joining แสดงให้เห็นว่าไอโซเลต JHD1 จัดอยู่ในกลุ่มของแอกติโนแบคทีเรียสกุล *Streptomyces* และมีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces albiacialis*

NRRL B-24327^T, *Streptomyces chumphonensis* K1-2^T, *Streptomyces alkaliterrae* OF1^T และ *Streptomyces durbertensis* NEAU-S1GS20^T (รูปที่ 4.13)



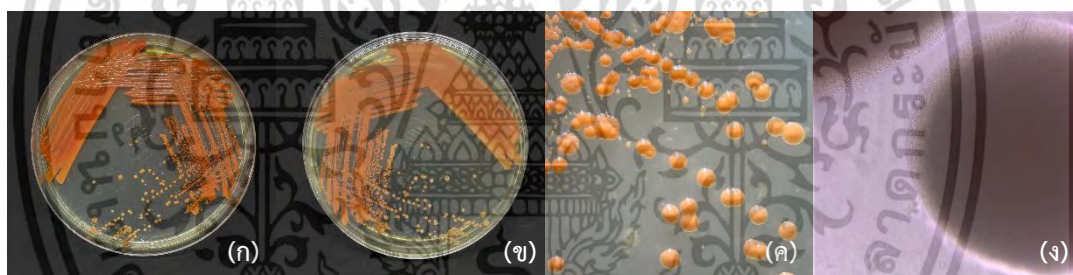
รูปที่ 4.12 ไอโซเลต JHD1 ที่เจริญบนอาหาร ISP 2 seawater (รูป ก-ค) โคโลนีบนอาหาร ISP 2 seawater (รูป ง) ภาพใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายทั้งหมด 400 เท่า



รูปที่ 4.13 แผนภูมิต้นไม้ (Neighbor-Joining tree) แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต JHD1 และสายพันธุ์ใกล้เคียง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

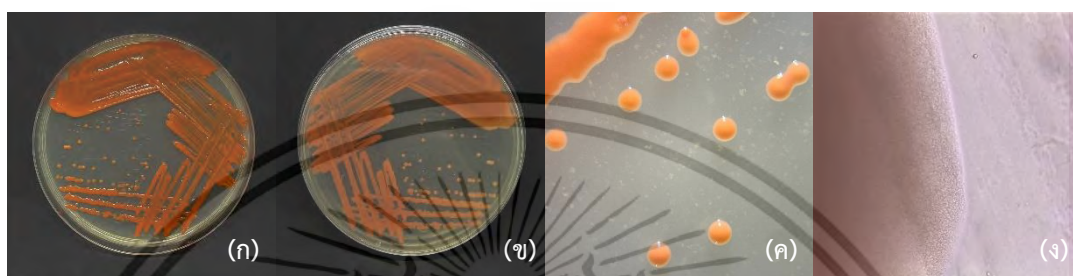
ไอโซเลต SW8 เป็นแอกติโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว โคโลนีรูปร่างกลมมน พื้นผิวเรียบ ไม่สร้างเส้นใยอากาศ ไม่สร้างสปอร์ โคโลนีมีสีส้มอมแดงกลาง ไม่พบการสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ เจริญได้ดีบนอาหาร ISP 2 seawater (รูปที่ 4.14) ลักษณะดังกล่าวสอดคล้องกับลักษณะของแอกติโนแบคทีเรียในสกุล *Gordonia* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ จัดเป็นพวก Acid-alcohol-fast เซลล์มีรูปร่างท่อนหรือกลม โคโลนีมีลักษณะหลากหลาย เช่น นูน เงา พื้นผิวเรียบ พื้นผิวหยาบ หรืออาจมีรอยพับที่ขอบโคโลนีอย่างไม่สม่ำเสมอ สีของโคโลนี เช่น สีครีม สีเหลืองอ่อน สีแทน สีส้ม สีชมพู หรือสีแดง (Goodfellow *et al.*, 2012) จึงสันนิษฐานว่าไอโซเลต SW8 จัดเป็นแอกติโนแบคทีเรียในสกุล *Gordonia* นอกจากนี้ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน 16S rRNA ในฐานข้อมูล EzBioCloud พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Gordonia mangrovi* HNM0687^T (Similarity 98.5%) ซึ่งคัดแยกได้จากดินป่าชายเลน มณฑลไห่หนาน โคโลนีบนอาหาร ISP 2 มีสีส้มอมแดง ไม่พบการสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ (Xie *et al.*, 2020) สอดคล้องกับการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี Neighbor-joining แสดงให้เห็นว่าไอโซเลต SW8 จัดอยู่ในกลุ่มของแอกติโนแบคทีเรียสกุล *Gordonia* และมีความคล้ายคลึงกับ *Gordonia mangrovi* HNM0687^T (รูปที่ 4.17)



รูปที่ 4.14 ไอโซเลต SW8 ที่เจริญบนอาหาร ISP 2 seawater (รูป ก-ค) โคโลนีบนอาหาร ISP 2 seawater (รูป ง) ภาพไตกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายทั้งหมด 400 เท่า

ไอโซเลต SW21 เป็นแอกติโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว โคโลนีรูปร่างกลมมน พื้นผิวเรียบ ไม่สร้างเส้นใยอากาศไม่สร้างสปอร์ โคโลนีมีสีส้มสด ไม่พบการสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ เจริญได้ดีบนอาหาร ISP 2 seawater (รูปที่ 4.15) ลักษณะดังกล่าวสอดคล้องกับลักษณะของแอกติโนแบคทีเรียในสกุล *Gordonia* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ จัดเป็นพวก Acid-alcohol-fast เซลล์มีรูปร่างท่อนหรือกลม โคโลนีมีลักษณะหลากหลาย เช่น นูน เงา พื้นผิวเรียบ พื้นผิวหยาบ หรืออาจมีรอยพับที่ขอบโคโลนีอย่างไม่สม่ำเสมอ สีของโคโลนี เช่น สีครีม สีเหลืองอ่อน สีแทน สีส้ม สีชมพู หรือสีแดง (Goodfellow *et al.*, 2012) จึงสันนิษฐานว่าไอโซเลต SW21 จัดเป็นแอกติโนแบคทีเรียในสกุล *Gordonia* นอกจากนี้ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน 16S rRNA ในฐานข้อมูล EzBioCloud พบว่ามีความใกล้เคียง

กับ *Gordonia mangrovi* HNM0687^T (Similarity 98.7%) (เช่นเดียวกับกับไอโซเลต SW8) สอดคล้องกับการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี Neighbor-joining แสดงให้เห็นว่าไอโซเลต SW21 จัดอยู่ในกลุ่มของแอกติโนแบคทีเรียสกุล *Gordonia* และมีความคล้ายคลึงกับ *Gordonia mangrovi* HNM0687^T (รูปที่ 4.17)

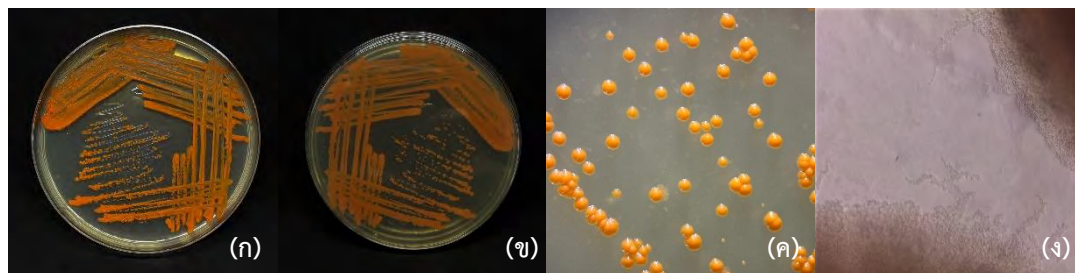


รูปที่ 4.15 ไอโซเลต SW21 ที่เจริญบนอาหาร ISP 2 seawater

(รูป ก-ค) โคโลนีบนอาหาร ISP 2 seawater

(รูป ง) ภาพใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายทั้งหมด 400 เท่า

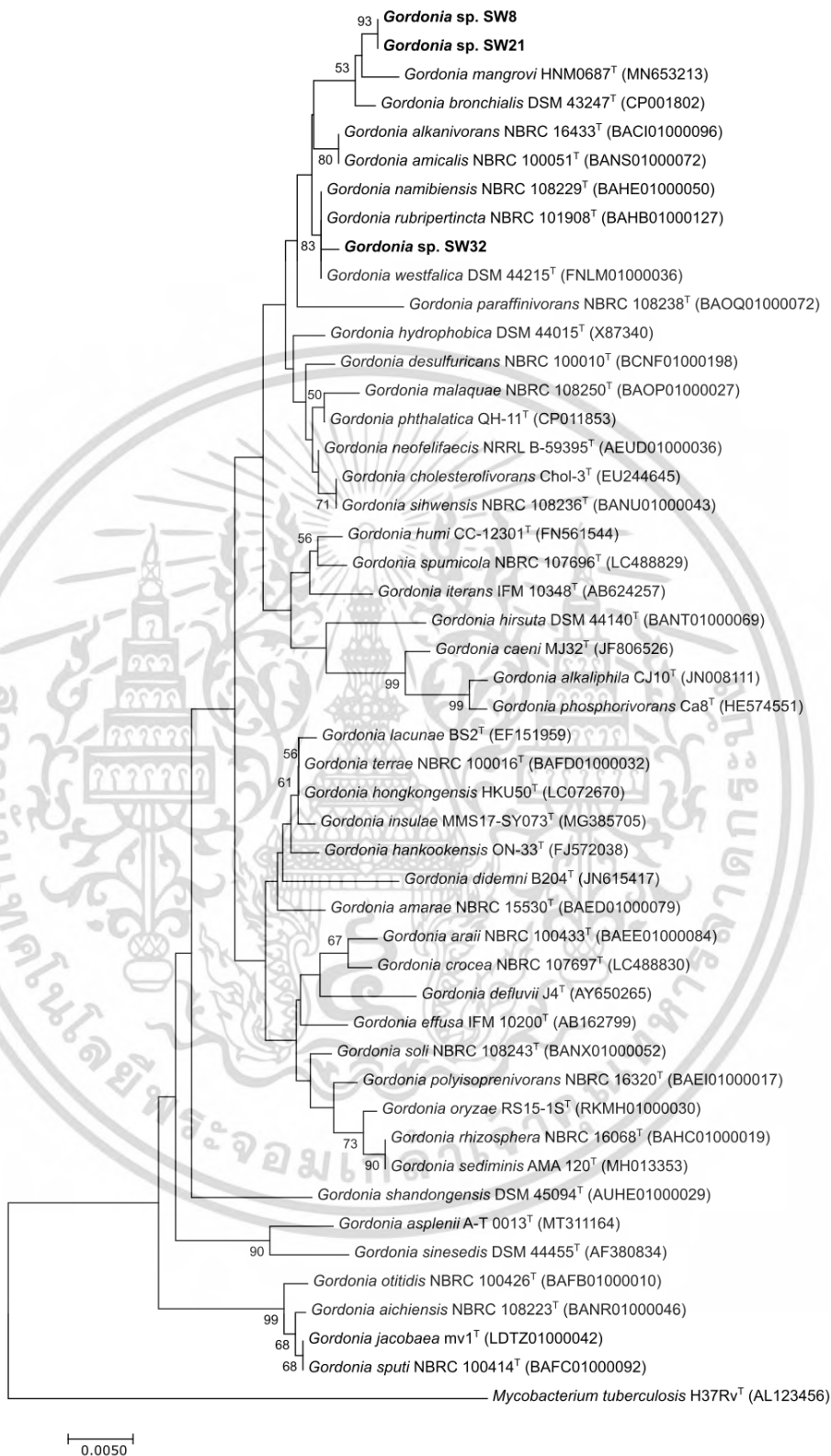
ไอโซเลต SW32 เป็นแอกติโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว โคโลนีรูปร่างกลมนูน พื้นผิวเรียบ ไม่สร้างเส้นใยอากาศไม่สร้างสปอร์ โคโลนีมีสีส้มสด ไม่พบการสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ เจริญได้ดีบนอาหาร ISP 2 seawater (รูปที่ 4.16) ลักษณะดังกล่าวสอดคล้องกับลักษณะของแอกติโนแบคทีเรียในสกุล *Gordonia* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ จัดเป็นพวก Acid-alcohol-fast เซลล์มีรูปร่างท่อนหรือกลม โคโลนีมีลักษณะหลากหลาย เช่น นูน เงาม พื้นผิวเรียบ พื้นผิวหยาบ หรืออาจมีรอยพับที่ขอบโคโลนีอย่างไม่สม่ำเสมอ สีของโคโลนี เช่น สีครีม สีเหลืองอ่อน สีแทน สีส้ม สีชมพู หรือสีแดง (Goodfellow *et al.*, 2012) จึงสันนิษฐานว่าไอโซเลต SW32 จัดเป็นแอกติโนแบคทีเรียในสกุล *Gordonia* นอกจากนี้ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน 16S rRNA ในฐานข้อมูล EzBioCloud พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Gordonia westfalica* DSM 44215^T (Similarity 99.9%) ซึ่งคัดแยกจากน้ำเสียในยางรถยนต์ประเทศเยอรมัน โคโลนีมีสีส้มพาสเทล พื้นผิวโคโลนีหยาบและแบน มีระยะขอบไม่สม่ำเสมอ (Linos *et al.*, 2002) สอดคล้องกับการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี Neighbor-joining แสดงให้เห็นว่าไอโซเลต SW32 จัดอยู่ในกลุ่มของแอกติโนแบคทีเรียสกุล *Gordonia* และมีความคล้ายคลึงกับ *Gordonia westfalica* DSM 44215^T (รูปที่ 4.17)



รูปที่ 4.16 ไอโซเลต SW32 ที่เจริญบนอาหาร ISP 2 seawater
 (รูป ก-ค) โคโลนีบนอาหาร ISP 2 seawater
 (รูป ง) ภาพใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายทั้งหมด 400 เท่า



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.17 แผนภูมิต้นไม้ (Neighbor-Joining tree) แสดงตำแหน่งอนุกรมวิธานของไอโซเลต SW8, SW21, SW32 และสายพันธุ์ใกล้เคียง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน 16S rRNA ข้างต้น พบว่ามีจำนวน 3 ไอโซเลต (คิดเป็น 30% ของไอโซเลตทั้งหมด) ที่มีแนวโน้มเป็นแอคติโนแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ ได้แก่ ไอโซเลต JHD1 (สายพันธุ์ใกล้เคียง *Streptomyces alkaliterrae* OF1^T, similarity 98.5%) SW8 (สายพันธุ์ใกล้เคียง *Gordonia mangrovi* HNM0687^T, Similarity 98.5%) และ SW21 (สายพันธุ์ใกล้เคียง *Gordonia mangrovi* HNM0687^T, similarity 98.7%) เนื่องจาก Similarity value ระหว่างไอโซเลตดังกล่าวและสายพันธุ์ใกล้เคียงมีค่าต่ำกว่า 98.7% ซึ่งจัดเป็นเกณฑ์ที่ได้รับการยอมรับว่ามีแนวโน้มเป็นเชื้อต่างสปีชีส์กัน (Stackebrandt & Ebers, 2006) แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน 16S rRNA นั้นอาจไม่เพียงพอต่อการยืนยันว่าไอโซเลตดังกล่าวจัดเป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่ จึงมีความจำเป็นต้องมีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในระดับจีโนมทั้งหมดเพิ่มเติม (Kim *et al.*, 2014) ไอโซเลต SW8 และ SW21 มีสายพันธุ์ใกล้เคียงเหมือนกันตามฐานข้อมูล EzBioCloud จึงทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างสองไอโซเลตข้างต้นพบว่ามีค่า Similarity 100% ผู้ทดลองจึงเลือกเฉพาะไอโซเลต SW21 และ JHD1 มาศึกษาอนุกรมวิธานแบบหลายส่วนต่อไป

ตารางที่ 4.2 ลักษณะการเจริญของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้บนอาหาร ISP 2 seawater เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 14 วัน

ไอโซเลต	ลักษณะการเจริญ	สีเส้นใยอาหาร	สีเส้นใยอากาศ	สีรงควัตถุที่ละลายน้ำ
แอคติโนแบคทีเรียเส้นใย				
BWO1	เจริญได้ดี	น้ำตาลอมแดงอ่อน (light reddish brown)	เทา (gray)	-
BWO6	เจริญได้ดี	เหลืองอมเขียวจัด (strong greenish yellow)	ฟ้าซีดมาก (very pale blue)	-
BHD1	เจริญได้ดี	น้ำตาลอมเหลืองอมเทา (grayish yellowish brown)	เทาอมฟ้าอ่อน (light bluish gray)	น้ำตาลอมแดงอมเทาอ่อน (light grayish reddish brown)
BHD2	เจริญได้ดี	เหลืองอมเขียวจัด (strong greenish yellow)	เทาอมเขียวอ่อน (light greenish gray)	-
JP6	เจริญได้ดี	เหลืองอมเขียวอมเทา (grayish greenish yellow)	เทาอมเหลือง (yellowish gray)	-
JR2	เจริญดี	เหลืองอมเขียวอมเทา (grayish greenish yellow)	เทา (gray)	-
JHD1	เจริญได้ดี	เหลืองอมเขียวจัด (strong greenish yellow)	ขาวอมเขียว (greenish white)	เหลืองอมเขียวอ่อน (light greenish yellow)

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ลักษณะการเจริญของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้บนอาหาร ISP 2 seawater เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 14 วัน

ไอโซเลต	ลักษณะการเจริญ	สีเส้นใยอาหาร	สีเส้นใยอากาศ	สร้างวัตถุที่ละลายน้ำ
แอคติโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว				
SW8	เจริญได้ดี	ส้มอมแดงกลาง (moderate reddish orange)	-	-
SW21	เจริญได้ดี	ส้มสด (vivid orange)	-	-
SW32	เจริญได้ดี	ส้มจัด (strong orange)	-	-

หมายเหตุ : สัญลักษณ์ - หมายถึง ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ หรือไม่มีการสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้

ตารางที่ 4.3 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน 16S rRNA ของแอกติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้กับฐานข้อมูล EzBioCloud

ไอโซเลต	ความยาว (b.p.)	สายพันธุ์ใกล้เคียง	Similarity (%)
BWO1	1,554	<i>Streptomyces ardesiacus</i> NRRL B-1773 ^T	99.5
BWO6	1,548	<i>Streptomyces nigra</i> 452 ^T	99.8
BHD1	1,443	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i> subsp. <i>crassaminis</i> D1 ^T	100
BHD2	1,456	<i>Streptomyces actinomycinicus</i> RCU-197 ^T	98.9
JP6	1,442	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i> subsp. <i>crassaminis</i> D1 ^T	99.8
JR2	1,595	<i>Streptomyces fradiae</i> DSM 40063 ^T	100
JHD1	1,503	<i>Streptomyces alkaliterrae</i> OF1 ^T	98.5
SW8	1,450	<i>Gordonia mangrovi</i> HNM0687 ^T	98.5
SW21	1,427	<i>Gordonia mangrovi</i> HNM0687 ^T	98.7
SW32	1,436	<i>Gordonia westfalica</i> DSM 44215 ^T	99.9

4.3 การคัดเลือกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

4.3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay ของสารสกัดหยาบในชั้นตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทจากแอกติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ แสดงไว้ดังตารางที่ 4.4 จากผลการทดสอบพบว่ามีความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้ 50% (IC_{50}) อยู่ในช่วง 275.3 ± 3.2 $\mu\text{g/mL}$ ถึง $3,841.7 \pm 73.9$ $\mu\text{g/mL}$ โดยสารสกัดหยาบของไอโซเลต JR2 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด คิดเป็น IC_{50} เท่ากับ 275.3 ± 3.2 $\mu\text{g/mL}$ รองลงมาคือสารสกัดหยาบของไอโซเลต BWO6 ($IC_{50} = 515.3 \pm 12.6$ $\mu\text{g/mL}$) และ BHD1 ($IC_{50} = 531.8 \pm 6.0$ $\mu\text{g/mL}$) ตามลำดับ ผลการทดสอบดังกล่าวสอดคล้องกับข้อมูลก่อนหน้าที่รายงานว่าสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ผลิตจากแอกติโนแบคทีเรียส่วนใหญ่มักพบในสกุล *Streptomyces* (Chandra *et al.*, 2020) และยังพบได้ในสกุล *Nocardopsis* (Janardhan *et al.*, 2014) แอกติโนแบคทีเรียทางทะเลจัดเป็นแหล่งที่น่าสนใจในการค้นหาสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากการอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีสภาวะแบบสุดโต่งนี้อาจส่งผลให้มีความสามารถผลิตสารเมตาบอไลต์ได้อย่างหลากหลาย (Kamala *et al.*, 2023)

ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบแต่ละไอโซเลต

ไอโซเลต	ค่า IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Streptomyces</i> sp. JR2	275.3 ± 3.2
<i>Streptomyces</i> sp. BWO6	515.3 ± 12.6
<i>Nocardopsis</i> sp. BHD1	531.8 ± 6.0
<i>Streptomyces</i> sp. JHD1	681.7 ± 8.7
<i>Gordonia</i> sp. SW32	795.9 ± 6.5
<i>Nocardopsis</i> sp. JP6	846.7 ± 13.3
<i>Streptomyces</i> sp. BHD2	$1,287.0 \pm 19.2$
<i>Streptomyces</i> sp. BWO1	$1,373.5 \pm 16.2$
<i>Gordonia</i> sp. SW8	$1,744.0 \pm 31.5$
<i>Gordonia</i> sp. SW21	$3,841.7 \pm 73.9$
Vitamin C	17.0 ± 0.1
BHT	59.0 ± 2.5

4.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี Agar disk diffusion

การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี Agar disk diffusion ของสารสกัดหยาบในชั้นตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทจากแอกติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้แสดงไว้ดังตารางที่ 4.5 จากผลการทดสอบพบว่าสารสกัดหยาบของแอกติโนแบคทีเรียจำนวน 1 ไอโซเลต (คิดเป็น 10% ของไอโซเลต

ทั้งหมด) แสดงฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ คือ ไอโซเลต JHD1 โดยแสดงฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ อีกทั้งยังมีขนาดของโซนยับยั้งกว้างแสดงถึงฤทธิ์ต้านการเจริญที่ดี สอดคล้องกับข้อมูลก่อนหน้าที่พบว่าแอกติโนแบคทีเรียสกุล *Streptomyces* จัดเป็นแหล่งสำคัญของสารปฏิชีวนะ (Goodfellow *et al.*, 2012) ผู้ทดลองจึงมีความสนใจนำสารสกัดหยาบของไอโซเลต JHD1 มาทำให้บริสุทธิ์ ติดตามฤทธิ์ทางชีวภาพ และพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่ผลิตโดยไอโซเลต JHD1 ต่อไป

การศึกษานุกรมวิธานเบื้องต้นและการคัดเลือกไอโซเลตที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดดเด่น เพื่อค้นหาแอกติโนแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ จากผลการศึกษาข้างต้น ผู้ทดลองจึงสนใจศึกษานุกรมวิธานแบบหลายส่วนของไอโซเลต SW21 และ JHD1 ซึ่งมีแนวโน้มเป็นแอกติโนแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ โดยเฉพาะไอโซเลต JHD1 ที่นอกจากมีแนวโน้มเป็นแอกติโนแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ ยังสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่โดดเด่น จึงมีความเป็นไปได้ในการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ได้ ผลการศึกษานุกรมวิธานแบบหลายส่วนของไอโซเลต SW21 และ JHD1 ได้กล่าวไว้ในหัวข้อที่ 4.4 และ 4.5 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.5 ฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคของสารสกัดหยาบแต่ละไอโซเลตที่ความเข้มข้น 1,000 µg/mL

ไอโซเลต	ขนาดของโซนยับยั้ง (มม.)					
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	MRSA DMST 20654	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>E. coli</i> ATCC 25922
<i>Streptomyces</i> sp. BWO1	-	-	-	-	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. BWO6	-	-	-	-	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. BHD2	-	-	-	-	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. JR2	-	-	-	-	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. JHD1	20.7	24.0	25.7	21.3	20.7	20.3
<i>Nocardiosis</i> sp. BHD1	-	-	-	-	-	-
<i>Nocardiosis</i> sp. JP6	-	-	-	-	-	-
<i>Gordonia</i> sp. SW8	-	-	-	-	-	-
<i>Gordonia</i> sp. SW21	-	-	-	-	-	-
<i>Gordonia</i> sp. SW32	-	-	-	-	-	-

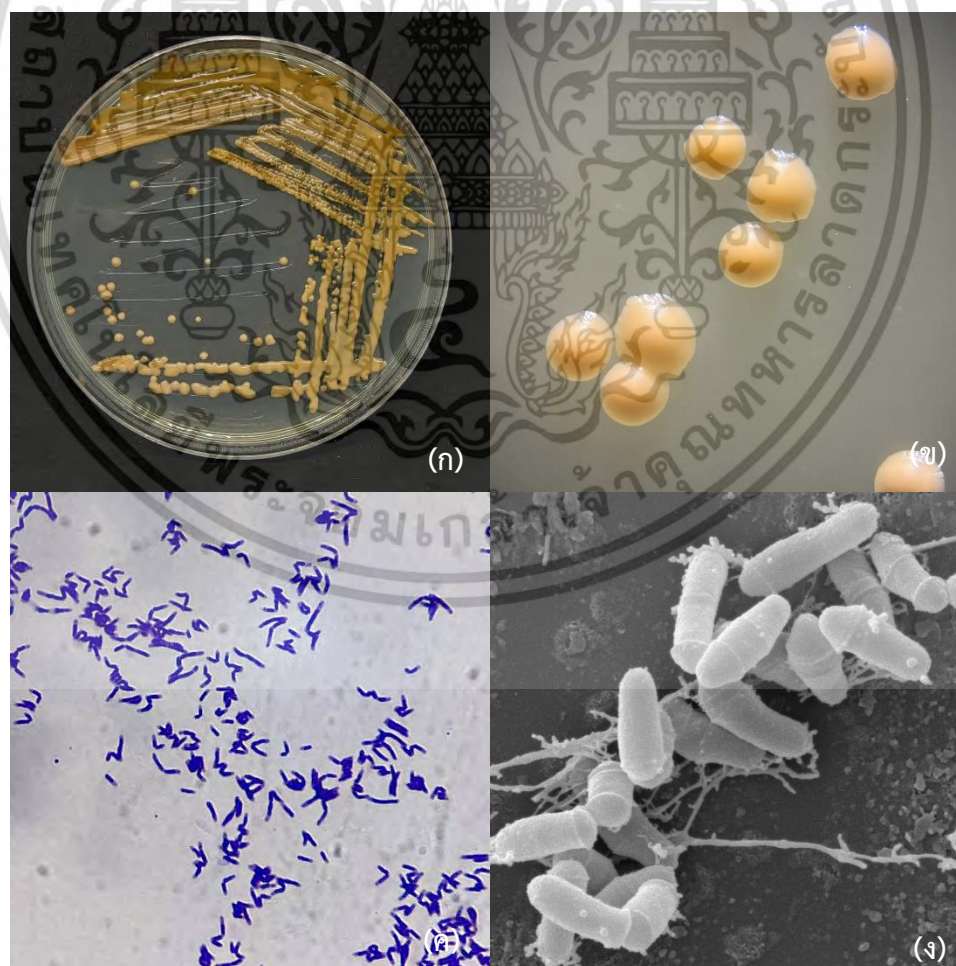
หมายเหตุ : สัญลักษณ์ - หมายถึง ไม่เกิดโซนยับยั้ง

4.4 การศึกษาอนุกรมวิธานของไอโซเลต SW21^T

4.4.1 ลักษณะทางฟีโนไทป์

4.4.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอกติโนแบคทีเรียไอโซเลต SW21^T ที่เจริญบนอาหาร ISP 2 seawater เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 14 วัน แสดงให้เห็นว่าไอโซเลต SW21^T จัดเป็นแอกติโนแบคทีเรียชนิดเซลล์เดี่ยว โคโลนีมีโทนสีส้ม พื้นผิวเรียบ โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่าเซลล์มีรูปร่างแบบท่อนสั้น (Rod-shaped) และมีความสามารถในการผลิตไบโอฟิล์ม (Biofilm) ได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.18 สอดคล้องกับลักษณะของแอกติโนแบคทีเรียสกุล *Gordonia* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ จัดเป็นพวก Acid-alcohol-fast เซลล์มีรูปร่างท่อนหรือกลม โคโลนีมีลักษณะหลากหลาย เช่น หนูน เงาม พื้นผิวเรียบ พื้นผิวหยาบ หรืออาจมีรอยพับที่ขอบโคโลนีอย่างไม่สม่ำเสมอ สีของโคโลนี เช่น สีครีม สีเหลืองอ่อน สีแทน สีส้ม สีชมพู หรือสีแดง (Goodfellow *et al.*, 2012)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.18 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต SW21^T

- (ก และ ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต SW21^T บนอาหารแข็ง ISP 2 seawater agar
 (ค) แสดงลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายทั้งหมด 1,000 เท่า)
 (ง) แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด
 (กำลังขยายทั้งหมด 15,000 เท่า)

4.4.1.2 ลักษณะการเจริญ

การศึกษาลักษณะการเจริญ สีของเส้นใยอาหาร และสีของรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ของแอกติโนแบคทีเรียไอโซเลต SW21^T ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.6 สีของเส้นใยอาหารของไอโซเลต SW21^T ที่เจริญบนอาหารทดสอบทั้ง 9 ชนิด ส่วนใหญ่มีกัมมีโทนสีส้มและสีส้มอมเหลือง ในขณะที่สายพันธุ์ใกล้เคียง *Gordonia mangrovi* KCTC 49383^T มีกัมมีโทนสีส้มและสีส้มอมแดง การศึกษาลักษณะการเจริญพบว่าไอโซเลต SW21^T เจริญได้ดีบนอาหารชนิด ISP 2, ISP 4, ISP 5, ISP 7, Glucose asparagine agar และ Nutrient agar เจริญได้ปานกลางบนอาหาร ISP 3 และ ISP 6 และเจริญได้ไม่ดีบนอาหาร Czapek's sucrose agar ทั้งนี้ไม่พบสีรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ในอาหารทดสอบจากทั้งไอโซเลต SW21^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง

ตารางที่ 4.6 แสดงลักษณะการเจริญ สีของเส้นใยอาหาร และสีของรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ของไอโซเลต SW21^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง

ชนิดอาหาร	ลักษณะการเจริญ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุที่ละลายน้ำ
<i>Gordonia</i> sp. SW21 ^T			
ISP 2	เจริญได้ดี	ส้มสด (vivid orange)	-
ISP 3	เจริญปานกลาง	ส้มเข้ม (strong orange)	-
ISP 4	เจริญได้ดี	ส้มเข้ม (strong orange)	-
ISP 5	เจริญได้ดี	เหลืองอมส้มปานกลาง (moderate orange yellow)	-
ISP 6	เจริญปานกลาง	ส้มสด (vivid orange)	-
ISP 7	เจริญได้ดี	เหลืองอมส้มปานกลาง (moderate orange yellow)	-
Glucose asparagine agar	เจริญได้ดี	ส้มอ่อน (light orange)	-
Czapek's sucrose agar	เจริญได้ไม่ดี	ส้มปานกลาง (moderate orange)	-
Nutrient agar	เจริญได้ดี	เหลืองอมส้มเข้ม (deep orange yellow)	-
<i>Gordonia mangrovi</i> KCTC 49383 ^T			
ISP 2	เจริญได้ดี	ส้มอมแดงปานกลาง (moderate reddish orange)	-
ISP 3	เจริญได้ดี	ส้มอมแดงปานกลาง (moderate reddish orange)	-
ISP 4	เจริญได้ปานกลาง	ส้มเข้ม (strong orange)	-
ISP 5	เจริญได้ปานกลาง	ส้มเข้ม (strong orange)	-
ISP 6	เจริญได้ดี	ส้มอมแดงปานกลาง (moderate reddish orange)	-
ISP 7	เจริญได้ปานกลาง	เหลืองอมส้มเข้ม (deep orange yellow)	-
Glucose asparagine agar	เจริญได้ดี	ชมพูอมเหลืองสด (vivid yellowish pink)	-
Czapek's sucrose agar	เจริญได้ดี	ส้มปานกลาง (moderate orange)	-
Nutrient agar	เจริญได้ดี	ส้มสด (vivid orange)	-

หมายเหตุ : สัญลักษณ์ - หมายถึง ไม่มีการสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้

4.4.1.3 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของไอโซเลต SW21^T พบว่าไอโซเลต SW21^T มีความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 15-37 °C และเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 °C เจริญได้ในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์สูงสุด 14% (w/v) เจริญได้ในสภาวะกรด-ต่างช่วง pH 6-8 และเจริญได้ดีที่สุดที่ระดับ pH 7 ให้ผลบวกในการทดสอบการย่อยสลายยูเรีย (Hydrolysis of urea) การรีดิวซ์ไนเตรต (Reduction of nitrate) และการผลิตเอนไซม์คะตะเลส (Production of catalase) แต่ให้ผลลบในการทดสอบการย่อยแป้ง (Starch hydrolysis) การย่อยเจลาติน (Gelatin liquefaction) การตกตะกอนโปรตีนนม (Milk coagulation) การย่อยโปรตีนนม (Peptonization of milk) การสร้างเมลานิน (Melanin production) การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H₂S Production) และการผลิตเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase production) มีความสามารถในการย่อยสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำ Tween 80 แต่ไม่สามารถย่อย Adenine, Carboxymethylcellulose, Cellulose, Hypoxanthine, Tyrosine, Xanthine, Chitin และ Xylan ได้ ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่สามารถใช้ในการเจริญเติบโตได้ดี ได้แก่ Cellobiose, Fructose, Glucose, Glycerol, Myo-Inositol, Lactose, Mannitol, Mannose, Melibiose, rhamnose, Sucrose, Trehalose, Xylitol และ Xylose ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเจริญได้ไม่ดี ได้แก่ Inulin, Ribose และ Raffinose แต่ไม่สามารถใช้ Arabinose, Dextran, Galactose และ Salicin เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในการเจริญได้ ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการเจริญได้ดี ได้แก่ Arginine, Asparagine, Proline, Serine และ Valine ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการเจริญได้ไม่ดี ได้แก่ Cysteine และ Methionine แต่ไม่สามารถใช้ 2-Aminobutyric acid, Histidine, 4-Hydroxyproline, Phenylalanine และ Threonine เป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อใช้ในการเจริญได้ สามารถผลิตกรดจากแหล่งคาร์บอนหลายชนิด ได้แก่ Fructose, Glucose, Glycerol, Myo-Inositol, Mannitol, Rhamnose, Sucrose, Trehalose, Xylitol และ Xylose ผลิตกรดได้เล็กน้อยจากแหล่งคาร์บอนที่เป็น Galactose, Inulin และ Mannose แต่ไม่สามารถผลิตกรดจากการใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็น Arabinose, Cellobiose, Dextran, Lactose, Melibiose, Raffinose และ Salicin การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ด้วย API ZYME System พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase, Esterase (C 4), Esterase Lipase (C 8), Leucine arylamidase, Acid phosphatase, Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase และ α -glucosidase พบกิจกรรมของเอนไซม์ Lipase (C 14), Valine arylamidase และ Cystine arylamidase ได้เล็กน้อย แต่ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ Trypsin, α -chymotrypsin, α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, β -glucosidase, N-acetyl- β -glucosaminidase, α -mannosidase และ α -fucosidase ทั้งนี้ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีดังกล่าวมีความแตกต่างกับสายพันธุ์ใกล้เคียงดังแสดงในตารางที่ 4.13

4.4.1.4 ความไวต่อยาปฏิชีวนะ

การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของไอโซเลต SW21^T พบว่ามีความไวต่อยาปฏิชีวนะ Amikacin, Amoxicillin, Ampicillin, Gentamicin, Nalidixic acid, Ofloxacin, Oxacillin, Penicillin G, Streptomycin, Tobramycin และ Vancomycin โดยมีความไวต่อยาปฏิชีวนะ Amoxicillin มากที่สุด แต่ไม่ไวต่อยาปฏิชีวนะ Clindamycin ดังแสดงในตารางที่ 4.7 จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าไอโซเลต SW21^T มีความไวต่อยาปฏิชีวนะบางชนิดแตกต่างกันกับสายพันธุ์ใกล้เคียงจัดเป็นอีกหนึ่งลักษณะที่แสดงถึงแนวโน้มการเป็นเชื้อแอคติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ได้

ตารางที่ 4.7 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของไอโซเลต SW21^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง

ยาปฏิชีวนะ (ความเข้มข้น µg/disk)	ขนาดของโซนยับยั้ง (มม.)	
	<i>Gordonia</i> sp. SW21 ^T	<i>G. mangrovi</i> KCTC 49383 ^T
Amikacin (30)	18.0	19.0
Amoxicillin (10)	62.7	53.0
Ampicillin (10)	60.0	62.0
Clindamycin (2)	-	22.7
Gentamicin (10)	11.0	12.0
Nalidixic acid (30)	19.7	-
Ofloxacin (5)	50.0	52.0
Oxacillin (1)	27.0	19.0
Penicillin G (10 units)	50.3	41.0
Streptomycin (50)	23.3	25.0
Tobramycin (10)	12.0	12.0
Vancomycin (30)	39.7	40.7

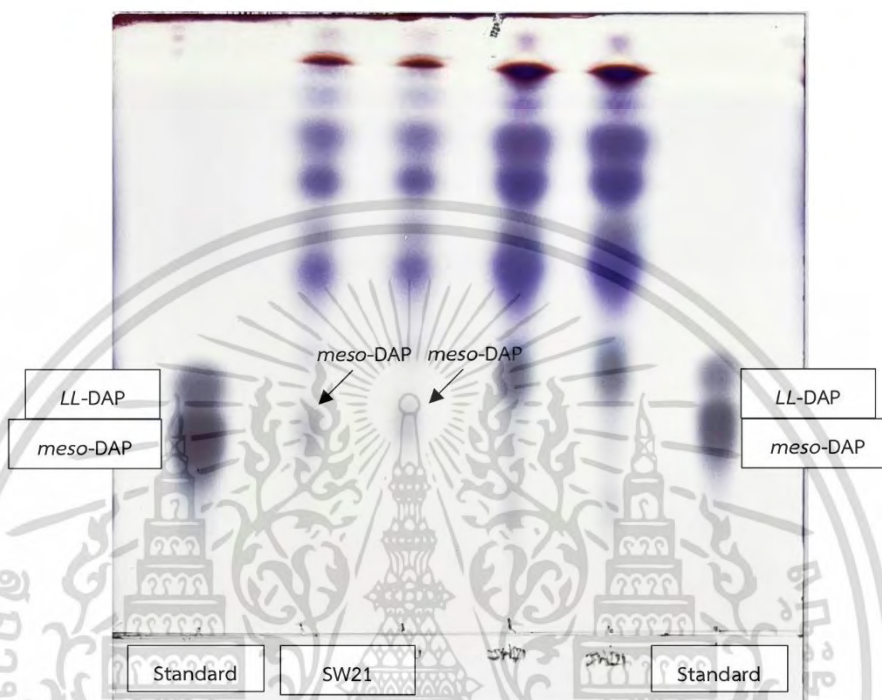
หมายเหตุ : สัญลักษณ์ - หมายถึง ไม่เกิดโซนยับยั้ง

4.4.2 ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี

4.4.2.1 การวิเคราะห์ไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิก

การวิเคราะห์ไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกในผนังเซลล์ของไอโซเลต SW21^T พบว่าผนังเซลล์ของไอโซเลต SW21^T ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกแบบ

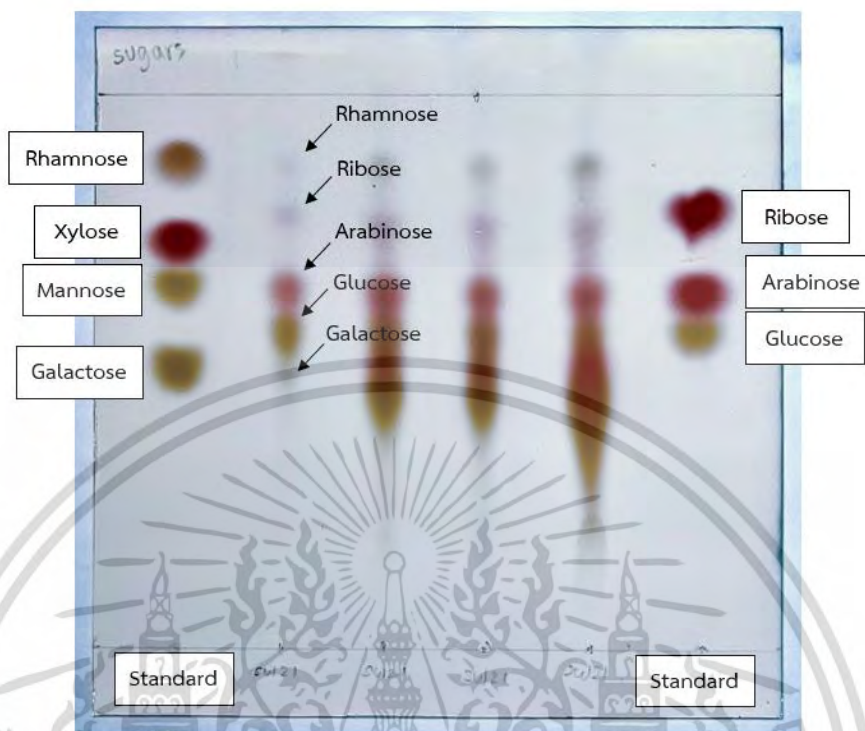
meso-DAP (รูปที่ 4.19) สอดคล้องกับข้อมูลก่อนหน้าที่กล่าวไว้ว่าผนังเซลล์ของแอคติโนแบคทีเรียในสกุล *Gordonia* ที่ประกอบด้วยชนิดของกรดไดอะมิโนพิเมลิกแบบ *meso*-DAP (Goodfellow *et al.*, 2012)



รูปที่ 4.19 ไอโซเมอร์กรดไดอะมิโนพิเมลิกของไอโซเลต SW21^T บนแผ่น HPTLC cellulose

4.4.2.2 การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์

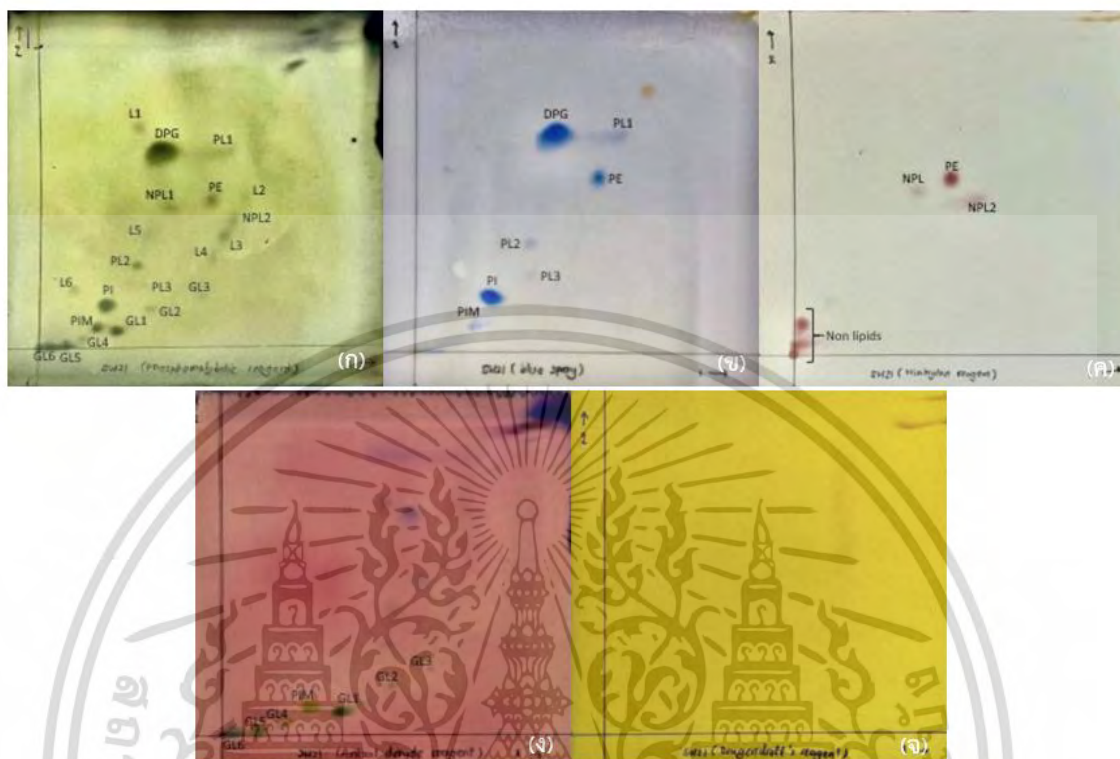
การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ของไอโซเลต SW21^T พบว่าเซลล์ของไอโซเลต SW21^T ประกอบด้วยน้ำตาล Glucose, Galactose, Rhamnose, Ribose และ Arabinose (รูปที่ 4.20) ในขณะที่ *G. mangrovi* HNM0687^T ประกอบด้วย Arabinose และ Galactose (Xie *et al.*, 2020) จากข้อมูลดังกล่าวสอดคล้องกับข้อมูลก่อนหน้าที่ได้รายงานไว้ว่าองค์ประกอบน้ำตาลหลักในเซลล์ของแอคติโนแบคทีเรียสกุล *Gordonia* ที่พบ ได้แก่ Arabinose และ Galactose (Goodfellow *et al.*, 2012)



รูปที่ 4.20 น้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ของไอโซเลต SW21^T บนแผ่น HPTLC cellulose ฉีดพ่นด้วย Aniline phthalate

4.4.2.3 การวิเคราะห์ชนิดไขมันมีขี้

การวิเคราะห์ชนิดไขมันมีขี้ในเซลล์ของไอโซเลต SW21^T พบว่าเซลล์ของไอโซเลต SW21^T ประกอบด้วย Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamine, Phosphatidylinositol, Phosphatidylinositol mannoside, Unidentified glycolipids (GLs) (6 ตำแหน่ง), Unidentified phospholipids (PLs) (3 ตำแหน่ง) และ Unidentified lipids (Ls) (6 ตำแหน่ง) Ninhydrin-positive lipid (NPLs) (2 ตำแหน่ง) ดังแสดงในรูปที่ 4.21 โดยจากผลการวิเคราะห์ชี้ให้เห็นว่าชนิดของไขมันมีขี้ในเซลล์ของไอโซเลต SW21^T นั้นมีความสอดคล้องกับชนิดไขมันมีขี้หลักที่พบในเซลล์ของแอกติโนแบคทีเรียในสกุล *Gordonia* ซึ่งประกอบด้วย Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamine, Phosphatidylinositol และ Phosphatidylinositol mannoside (Goodfellow *et al.*, 2012) นอกจากนี้ยังพบว่าชนิดของไขมันมีขี้ในเซลล์ของไอโซเลต SW21^T มีความใกล้เคียงกับชนิดไขมันมีขี้หลักที่พบในเซลล์ของสายพันธุ์ใกล้เคียง *Gordonia mangrovi* HNM0687^T ซึ่งประกอบด้วย Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamine และ Phosphatidylinositol (Xie *et al.*, 2020)



รูปที่ 4.21 ไขมันมีขั้วของไอโซเลต SW21^T (Two-dimensional thin-layer chromatograms)

- (ก) Phosphomolybdic acid reagent
- (ข) Blue spray reagent
- (ค) Ninhydrin reagent
- (ง) Anisaldehyde reagent
- (จ) Dragendorff's reagent

4.4.2.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน

การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในเซลล์ของไอโซเลต SW21^T พบว่าชนิดของกรดไขมันหลักภายในเซลล์ (มีมากกว่า 10%) ได้แก่ C_{16:0} (41.8%), C_{18:1} ω9c (23.6%), C_{18:0} (10.9%) และ C_{18:0} 10-methyl (TBSA) (10.7%) และชนิดของกรดไขมันรองในเซลล์ (มีมากกว่า 0.5%) ได้แก่ C_{16:1} ω7c/C_{16:1} ω6c (4.4%), C_{14:0} (3.0%), C_{20:2} ω6c/C_{20:2} ω9c (1.6%), C_{17:0} (1.3%), C_{16:1} ω9c (0.7%) และ C_{17:1} ω8c (0.5%) ส่วนการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในเซลล์ของ *Gordonia mangrovi* KCTC 49383^T พบว่าชนิดของกรดไขมันหลักในเซลล์ (มีมากกว่า 10%) ได้แก่ C_{16:0} (33.2%), C_{18:0} 10-methyl (TBSA) (29.0%) และ C_{18:0} (10.5%) ชนิดกรดไขมันรอง (มีมากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.5%) ได้แก่ C_{18:1} ω9c (9.6%), C_{16:1} ω7c/C_{16:1} ω6c (6.9%), C_{20:2} ω6/ C_{20:2} ω9c (4.0%), C_{14:0} (2.2%), C_{17:0} (1.2%), C_{17:1} ω8c (0.9%), *iso*-C_{17:1} ω10c (0.5%) และ C_{16:1} ω9c (0.3%) องค์ประกอบของกรดไขมันในเซลล์ของ *Gordonia bronchialis* NBRC 16047^T ตามรายงานของ Sangkanu *et al.* (2019) พบว่าชนิดของกรดไขมันหลักในเซลล์ (มีมากกว่า 10%) ได้แก่ C_{16:0} (35.0%), C_{18:1} ω9c (29.0%) และ C_{18:0} 10-methyl, TBSA (11.0%) ชนิดของกรดไขมันรองในเซลล์ (มีมากกว่า 0.5%) ได้แก่ C_{16:1} ω7c/C_{16:1} ω6c (9.0%), C_{18:0} (5.0%), C_{17:0} (4.0%), C_{14:0} (3.0%), C_{17:1} ω8c (1.0%) และ C_{19:1} ω7c/C_{19:1} ω6c (1.0%) (ตารางที่ 4.8) จากผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าชนิดของกรดไขมันหลักและชนิดของกรดไขมันรองในเซลล์ของไอโซเลต SW21^T และสายพันธุ์ใกล้เคียงมีความแตกต่างกันบางชนิด

ตารางที่ 4.8 ชนิดกรดไขมันของไอโซเลต SW21^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง

Fatty acid (%)	1	2	3*
C _{16:0}	41.8	33.2	35.0
C _{18:1} ω9c	23.6	9.6	29.0
C _{18:0}	10.9	10.5	5.0
C _{18:0} 10-methyl, TBSA	10.7	29.0	11.0
Summed feature 3	4.4	6.9	9.0
C _{14:0}	3.0	2.2	3.0
C _{20:2} ω6/C _{20:2} ω9c	1.6	4.0	-
C _{17:0}	1.3	1.2	4.0
C _{16:1} ω9c	0.7	0.3	-
C _{17:1} ω8c	0.5	0.9	1.0
<i>iso</i> -C _{17:1} ω10c	0.4	0.5	-
Summed feature 7	0.1	0.2	1.0

หมายเหตุ : * , ข้อมูลจาก Sangkanu *et al.* (2019)

Strains: 1, SW21^T; 2, *Gordonia mangrovi* KCTC 49383^T; 3, *Gordonia bronchialis* NBRC 16047^T

Summed feature 3, C_{16:1} ω7c/C_{16:1} ω6c; Summed feature 7, C_{19:1} ω7c/C_{19:1} ω6c

4.4.2.5 การวิเคราะห์กรดไขมัน

การวิเคราะห์กรดมัคคอลลิกของไอโซเลต SW21^T ด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) พบว่าไอโซเลต SW21^T มีกรดมัคคอลลิกเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ดังแสดงในรูปที่ 4.22 เช่นเดียวกับสายพันธุ์ใกล้เคียง *Gordonia mangrovi* KCTC 49383^T สอดคล้องกับข้อมูลในรายงานก่อนหน้านี้ซึ่งได้กล่าวไว้ว่าแอคติโนแบคทีเรียในสกุล *Gordonia* นั้นมีกรดมัคคอลลิกเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ (Goodfellow *et al.*, 2012)



รูปที่ 4.22 Mycolic acid ของไอโซเลต SW21^T และ *G. mangrovi* KCTC 49383^T ที่ปรากฏบนแผ่น Thin layer chromatography ตรวจสอบผ่านการรมควันด้วยไอโอดีน

4.4.2.6 การวิเคราะห์ชนิดของมีนาควิโนน

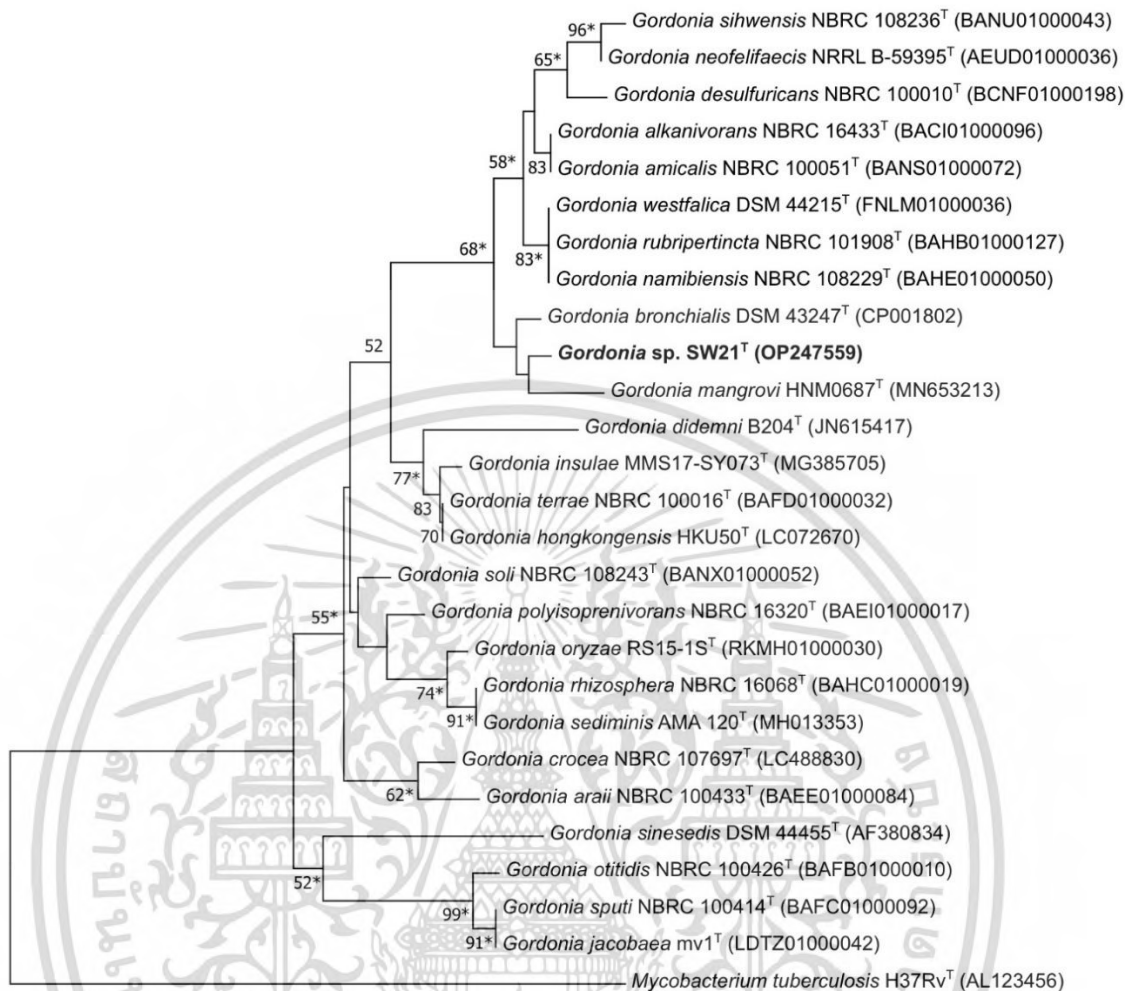
การวิเคราะห์ชนิดของมีนาควิโนนพบว่าเซลล์ของไอโซเลต SW21^T ประกอบด้วยชนิดของมีนาควิโนนหลัก ได้แก่ MK-9(H₂) (86.5%) และ MK-7(H₂) (13.5%) เช่นเดียวกับกับชนิดมีนาควิโนนหลักที่พบในเซลล์ของ *Gordonia mangrovi* KCTC 49383^T ซึ่งประกอบด้วย MK-9(H₂) และ MK-7(H₂) (Xie *et al.*, 2020) ซึ่งสอดคล้องการข้อมูลก่อนหน้านี้ที่กล่าวไว้ว่าชนิดของมีนาควิโนนหลักที่พบในแอคติโนแบคทีเรียในสกุล *Gordonia* คือชนิด MK-9(H₂) (Goodfellow *et al.*, 2012)

4.4.3 ลักษณะทางจีโนมไทป์

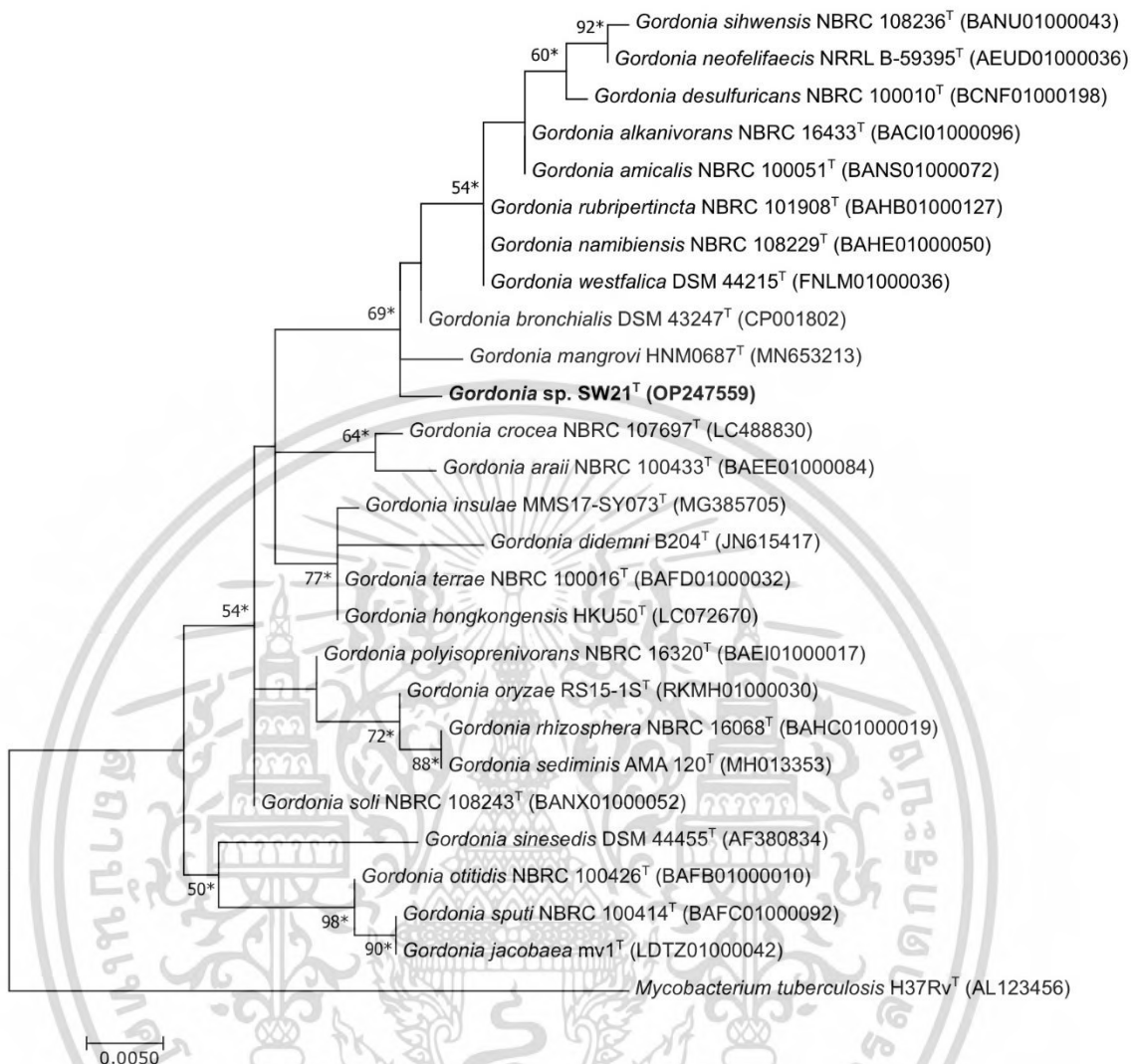
4.4.3.1 การวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน 16S rRNA

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลต SW21^T (1,427 b.p., completeness 98.8%) กับฐานข้อมูลออนไลน์ EzBiocloud 16S database (www.ezbiocloud.net) พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน 16S rRNA ใกล้เคียงกับ *Gordonia mangrovi* HNM0687^T (MN653213) (98.7%) และรองลงมาคือ *Gordonia bronchialis* DSM 43247^T (CP001802) (98.53%) จากผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน 16S rRNA นี้ชี้ให้เห็นว่าไอโซเลต SW21^T มีความใกล้เคียงกับแอกติโนแบคทีเรียในสกุล *Gordonia* และมีแนวโน้มสูงที่จะถูกจัดเป็นเชื้อในสปีชีส์ใหม่ เนื่องจาก similarity value ระหว่างไอโซเลต SW21^T และสายพันธุ์ใกล้เคียงนั้นมีค่าต่ำกว่า 98.7% ซึ่งเป็นเกณฑ์ที่ได้รับการยอมรับว่ามีแนวโน้มเป็นเชื้อต่างสปีชีส์กัน (Stackebrandt & Ebers, 2006) แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน 16S rRNA นั้นอาจไม่เพียงพอต่อการยืนยันว่าไอโซเลต SW21^T นั้นจัดเป็นเชื้อในสปีชีส์ใหม่ จึงมีความจำเป็นต้องมีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในระดับจีโนมทั้งหมดเพิ่มเติม (Kim *et al.*, 2014)

การวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้ด้วยโปรแกรม Mega 7 software โดยอาศัยข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน 16S rRNA ของสายพันธุ์ใกล้เคียงในสกุล *Gordonia* จำนวน 25 สายพันธุ์ในฐานข้อมูล EzBiocloud 16S database รวมถึงแอกติโนแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv^T (Out group) โดยทำการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี Neighbor-joining, Maximum-likelihood และ Maximum parsimony โดยกำหนดค่าความเชื่อมั่นในการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้ด้วย Bootstrap resampling method (1,000 ซ้ำ) ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.23-4.26 จากแผนภูมิต้นไม้ที่วิเคราะห์ด้วยทั้งสองวิธีการดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าไอโซเลต SW21^T จัดอยู่ในกลุ่มของแอกติโนแบคทีเรียในสกุล *Gordonia* และมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *Gordonia mangrovi* HNM0687^T และ *Gordonia bronchialis* DSM 43247^T



รูปที่ 4.23 แผนภูมิต้นไม้ (Neighbor-Joining tree) แสดงตำแหน่งทางอนุกรมวิธานของไอโซเลต SW21^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง



รูปที่ 4.24 แผนภูมิต้นไม้ (Maximum-Likelihood tree) แสดงตำแหน่งทางอนุกรมวิธานของไอโซเลต SW21^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง



รูปที่ 4.25 แผนภูมิต้นไม้ (Maximum-Parsimony tree) แสดงตำแหน่งทางอนุกรมวิธานของไอโซเลต SW21^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง

4.4.3.2 การวิเคราะห์จีโนมทั้งหมดและชีวสารสนเทศ

การวิเคราะห์จีโนมทั้งหมดของแอกติโนแบคทีเรียไอโซเลต SW21^T พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 5,393,233 b.p. และมีค่า Average G+C content อยู่ที่ 66.5% จากข้อมูลของจีโนมของไอโซเลต SW21^T พบว่ามีอนุกรมวิธานอยู่ในแอกติโนแบคทีเรียสกุล *Gordonia* โดยรายละเอียดข้อมูลจีโนมของไอโซเลต SW21^T และสายพันธุ์ใกล้เคียงได้แสดงไว้ดังตารางที่ 4.9 การวิเคราะห์ Phylogenomic tree โดยอาศัยข้อมูลจีโนมของสายพันธุ์ใกล้เคียงจาก Type (Strain) Genome Server (TYGS) (<https://tygs.dsmz.de/>) แสดงให้เห็นว่าไอโซเลต SW21^T มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันกับ *Gordonia mangrovi* HNM0687^T ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลการวิเคราะห์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในหน่วยยีน 16S rRNA ดังกล่าวข้างต้น ในขณะที่พบว่า *Gordonia bronchialis* DSM 43247^T ไม่มี

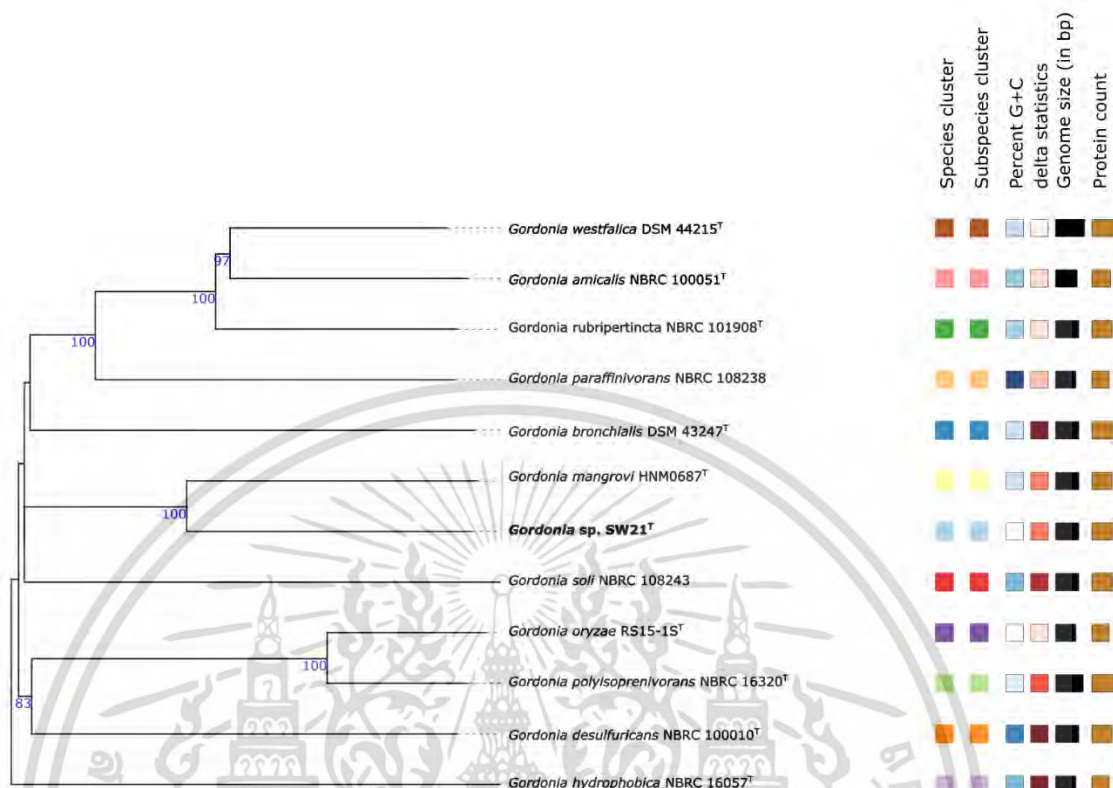
ความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันกับไอโซเลต SW21^T (รูปที่ 4.26) แตกต่างจากผลการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน 16S rRNA การวิเคราะห์ Digital DNA-DNA hybridization (dDDH) ด้วย Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC) 3.0 (Meier-Kolthoff *et al.*, 2022) โดยเปรียบเทียบระหว่างจีโนมของไอโซเลต SW21^T และจีโนมของสายพันธุ์ใกล้เคียง *Gordonia mangrovi* HNM0687^T และ *Gordonia bronchialis* DSM 43247^T พบว่ามีค่า DDH similarity อยู่ที่ 30.7% และ 21.5% ตามลำดับ ซึ่งถือว่าไอโซเลต SW21^T และสายพันธุ์ใกล้เคียงดังกล่าวมีความแตกต่างกันในระดับสปีชีส์ เนื่องจากการเปรียบเทียบระหว่างจีโนมนั้นหากมีค่า DDH similarity ต่ำกว่าหรือเท่ากับ 70% จะสามารถระบุได้ว่าเชื้อทั้งสองเป็นเชื้อต่างสปีชีส์กัน (Goris *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2013; Wayne *et al.*, 1987; Tindall *et al.*, 2010) การวิเคราะห์ค่า ANI และ AAI ของไอโซเลต SW21^T เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ใกล้เคียง *Gordonia mangrovi* HNM0687^T และ *Gordonia bronchialis* DSM 43247^T พบว่า มีค่า ANIb อยู่ในช่วง 75.54-85.46% มีค่า ANIm อยู่ในช่วง 85.3-87.7% มีค่า AAI อยู่ในช่วง 72.5-87.7 เนื่องจากค่า AAI และ ANI ที่ต่ำกว่า 95% ถือเป็นเกณฑ์ที่ได้รับการยอมรับว่าเป็นเชื้อต่างสปีชีส์กัน (Teeling *et al.*, 2004; Goris *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2013; Richter & Rosselló-Mora, 2009; Konstantinidis *et al.*, 2017) จากข้อมูลดังกล่าวจึงแสดงให้เห็นว่า ไอโซเลต SW21^T และ *Gordonia mangrovi* HNM0687^T จัดเป็นเชื้อต่างสปีชีส์กัน และระบุได้ว่าแอกติโนแบคทีเรียไอโซเลต SW21^T เป็นแอกติโนแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ที่จัดอยู่ในสกุล *Gordonia*

ตารางที่ 4.9 แสดงรายละเอียดข้อมูลจีโนมของไอโซเลต SW21^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง

คุณสมบัติ	<i>Gordonia</i> sp. SW21 ^T	<i>Gordonia mangrovi</i> HNM0687 ^T	<i>Gordonia bronchialis</i> DSM 43247 ^T
Bioproject	PRJNA888249	WMBR01	PRJNA29549
Accession no.	GCA_026262595.1	GCA_009828195.1	GCA_000024785.1
Genome coverage	97.0x	200x	-
N50 (b.p.)	148,331	722,718	5,208,602
No. of contigs	99	18	2
Genome size (b.p.)	5,393,233	5,365,300	5,290,012
DNA G+C content (%)	66.5	67	67
Number of gene	4,948	4,852	4,972
Protein coding genes	5,128	4,794	4,914
Number of RNAs	52	58	58
rRNA	3	3	6
tRNA	46	46	49
Other RNA	3	3	3
Pseudogene	89	107	235

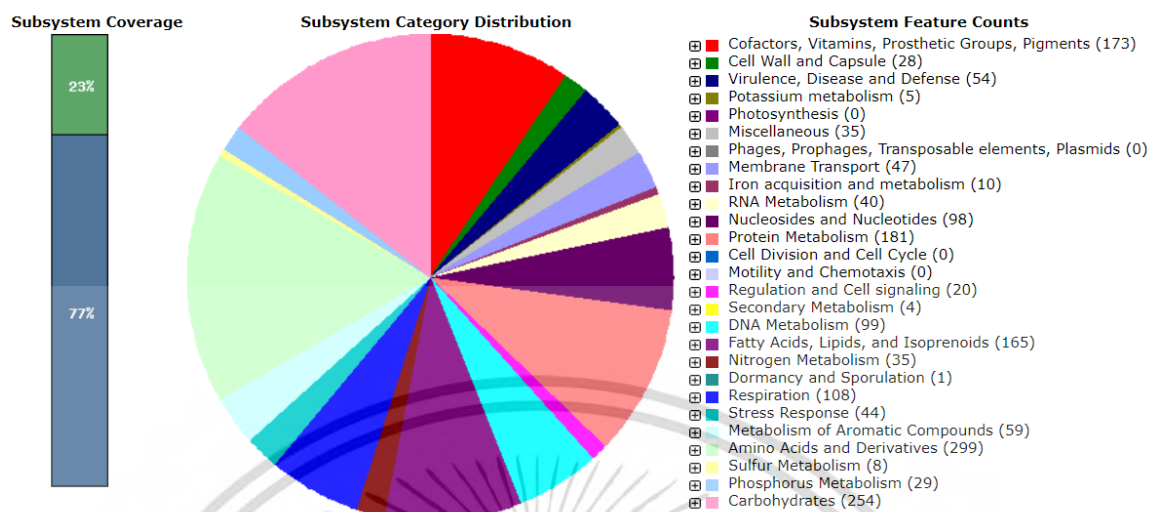
ตารางที่ 4.10 ค่า ANIb, ANIm, AAI และ Digital DNA-DNA hybridization ของไอโซเลต SW21^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง

Query genome	Reference genome	ANIb (%)	ANIm (%)	AAI (%)	dDDH (%)
<i>Gordonia</i> sp. SW21 ^T	<i>Gordonia mangrovi</i> HNM0687 ^T	85.46	87.65	88.65	30.7
	<i>Gordonia bronchialis</i> DSM 43247 ^T	75.54	85.25	72.52	21.5



รูปที่ 4.26 ผลการวิเคราะห์ Phylogenomic tree จากข้อมูลจีโนมของไอโซเลต SW21^T และ Type strain ในสกุล *Gordonia* โดยอาศัยข้อมูลพื้นฐานข้อมูลของ TYGS

ผลการทำนายหน้าที่ของจีโนม (Genome annotation) โดยใช้ซอฟต์แวร์ออนไลน์ RAST (<https://rast.nmpdr.org/>) (Aziz *et al.*, 2008; Overbeek *et al.*, 2014) แสดงให้เห็นว่าจีโนมของไอโซเลต SW21^T ประกอบด้วยกลุ่มยีนที่ทำหน้าที่หลากหลายหมวดหมู่ กลุ่มยีนที่พบมากที่สุดคือกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการดอะมิโนและอนุพันธ์ของกรดอะมิโน (Amino acids and Derivatives) คิดเป็น 299 กลุ่มยีน รองลงมาคือกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrates) กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของโปรตีน (Protein Metabolism) กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับโคแฟกเตอร์ วิตามิน กลุ่มของโคเอนไซม์ และรงควัตถุ (Cofactors, Vitamins, Prosthetic Groups, Pigments) กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการดไขมัน ไขมัน และไอโซพรีนอยด์ (Fatty acids, Lipids, Isoprenoids) และกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการกระบวนการหายใจ (Respiration) ตามลำดับ รายละเอียดของกลุ่มยีนอื่น ๆ ได้แสดงไว้ในรูปที่ 4.27

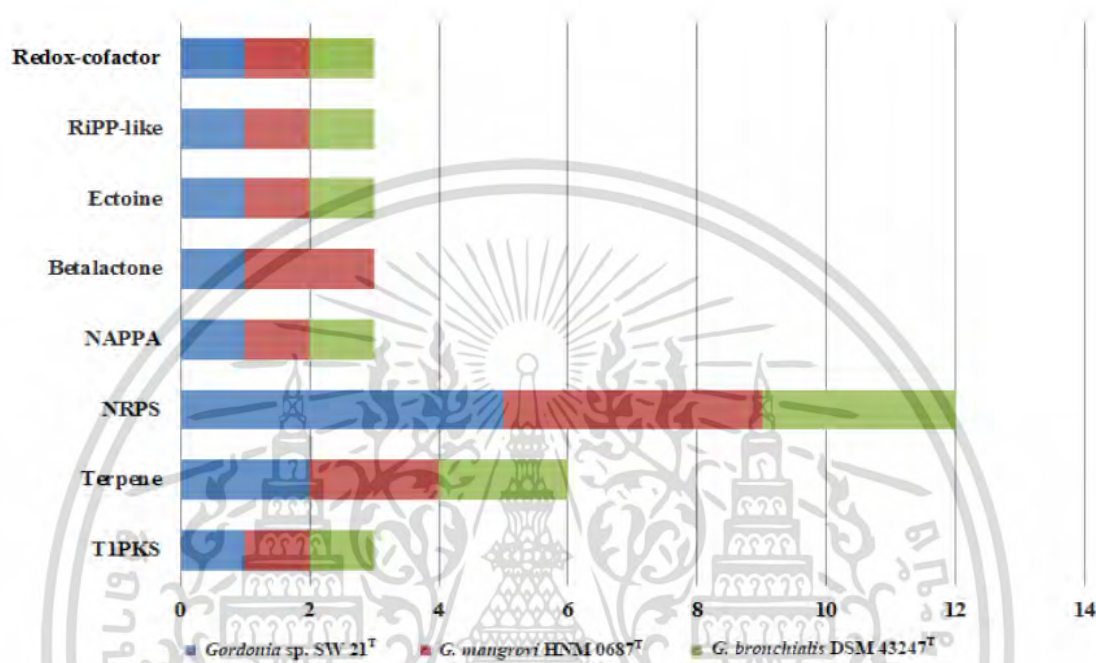


รูปที่ 4.27 ผลการทำนายหน้าที่ของจีโนมไอโซเลต SW21^T วิเคราะห์ด้วยซอฟต์แวร์ออนไลน์ RAST (<https://rast.nmpdr.org/>)

ผลการทำนายกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิด้วยซอฟต์แวร์ออนไลน์ antiSMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org/>) (Blin *et al.*, 2021) แสดงให้เห็นว่าจีโนมของไอโซเลต SW21^T ประกอบด้วยกลุ่มยีนชนิด Non-ribosomal peptide synthetases (NRPS) และ Terpene จำนวนมาก กลุ่มยีน NRPS และ Polyketide synthase (PKS) เป็นกลุ่มยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านการเจริญจุลชีพ (Borsetto *et al.*, 2019) และกลุ่มยีน Terpene เป็นกลุ่มยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพหลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านการเจริญจุลชีพ และฤทธิ์ต้านมะเร็ง เป็นต้น (Masyita *et al.*, 2022) โดยไอโซเลต SW21^T และสายพันธุ์ใกล้เคียงประกอบด้วยกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิตั้งแสดงในตารางที่ 4.11 และ 4.12

การทำนายกลุ่มยีนผลิตสารทุติยภูมิที่พบในจีโนมของไอโซเลต SW21^T ที่มีค่า Similarity มากกว่า 50% นั้นพบว่าสารทุติยภูมิหลายชนิดมีแนวโน้มน่าสนใจในการนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ทางด้านเวชสำอางและทางด้านอื่น ๆ ได้ เช่น Nocobactin NA เป็นสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของมนุษย์ชนิด HL-60 (promyelocytic leukemic cell line, HL 60) (Hoshino *et al.*, 2011) Ectoine คือสารที่มีบทบาทสำคัญในการปกป้องเซลล์ไม่ได้รับความเสียหายจากสภาวะแวดล้อมภายนอก เช่น ความดันภายนอกเซลล์ อุณหภูมิ แร่ดินออสโมติก ความแห้ง และรังสี โดย Ectoine มีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการนำมาประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้ เนื่องจากมีคุณสมบัติในการให้ความชุ่มชื้น และป้องกันรังสีอัลตราไวโอเล็ตได้ และยังสามารถประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมยาเพื่อใช้ในการช่วยรักษาโรคต่าง ๆ (Ma *et al.*, 2022) และ ϵ -Poly-L-lysine ซึ่งเป็นวัสดุทางชีวภาพที่สามารถละลายน้ำได้ ย่อยสลายทางธรรมชาติได้ สามารถทานได้และไม่มีความเป็นพิษต่อ

มนุษย์และสิ่งแวดล้อม โดยมีแนวโน้มที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้หลากหลายแนวทาง เช่น เป็นสารกันบูดในอาหาร สารอิมัลซิไฟเออร์ สารปรุงแต่งในอาหาร ไฟเบอร์ ไฮโดรเจลดูดซับน้ำ ใช้เป็นตัวนำพายา (Drug carriers) เป็นสารเสริมฤทธิ์สารต้านมะเร็ง และยา (Shih et al., 2006)



รูปที่ 4.28 Biosynthetic gene clusters ในจีโนมของ SW21^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง วิเคราะห์ด้วย antiSMASH version 7.0

ตารางที่ 4.11 แสดงกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ ($\geq 50\%$ similarity) ในจีโนมของไอโซเลต SW21^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง

Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity (%)	MIBiG BGC-ID
<i>Gordonia</i> sp. SW21^T						
Region 4.2	NRP-metallophore, NRPS	274,643	336,571	Nocobactin NA, nocobactin NA 10152B	100	BGC0001027
Region 6.1	ectoine	151,534	161,971	Ectoine	75	BGC0002052
Region 18.1	NAPAA	24,674	58,543	ε-Poly-L-lysine	100	BGC0002174
<i>Gordonia mangrovi</i> HNM0687^T						
Region 11.3	NRP-metallophore, NRPS	819,197	868,018	Nocobactin NA, Nocobactin NA 10152B	87	BGC0001027
Region 12.2	ectoine	565,642	576,079	Ectoine	75	BGC0002052
Region 15.1	NAPAA	152,693	186,610	ε-Poly-L-lysine	100	BGC0002174
<i>Gordonia bronchialis</i> DSM 43247^T						
Region 1.2	NRP-metallophore, NRPS	639,238	723,511	Terpenibactin A, Terpenibactin B, Terpenibactin C	85	BGC0002352
Region 1.3	ectoine	2,189,811	2,200,239	Ectoine	75	BGC0000853
Region 1.9	NAPAA	4,703,126	4,737,007	ε-Poly-L-lysine	100	BGC0002174

หมายเหตุ : MIBiG คือ Minimum Information about a Biosynthetic Gene Cluster

ตารางที่ 4.12 แสดงกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ ($\leq 50\%$ similarity) ในจีโนมของไอโซเลต SW21^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง

Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity (%)	MIBiG BGC-ID
<i>Gordonia</i> sp. SW21^T						
Region 2.1	NRPS	1	51,653	Coelichelin	27	BGC0000325
Region 4.1	NRPS	126,993	170,198	Oxalomycin B	6	BGC0001106
Region 8.1	NRPS	1	92,844	Colibrimycin	3	BGC0002100
Region 9.1	Redox-cofactor	22,407	45,401	-	-	-
Region 13.1	terpene	110,805	131,935	Lymphostin, Neolymphostinol B, Lymphostinol, Neolymphostin B	16	BGC0001006
Region 15.1	NRPS	66,099	120,447	-	-	-
Region 25.1	betalactone	52,148	79,153	-	-	-
Region 32.1	T1PKS	10,113	55,551	-	-	-
Region 33.1	Terpene	8,247	29,161	Carotenoid	14	BGC0000636
<i>Gordonia mangrovi</i> HNM0687^T						
Region 1.1	betalactone	75,561	97,972	-	-	-
Region 10.1	NRPS	95,436	152,261	Coelichelin	27	BGC0000325
Region 10.2	NRPS	557,677	609,554	Mycinamicin II	14	BGC0000102
Region 10.3	Redox-cofactor	808,671	831,641	-	-	-
Region 10.4	NRPS	837,794	910,825	Colibrimycin	3	BGC0002100
Region 11.1	T1PKS	320,596	365,956	-	-	-
Region 11.2	Terpene	514,648	535,559	Carotenoid	33	BGC0000644

ตารางที่ 4.12 (ต่อ) แสดงกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ ($\leq 50\%$ similarity) ในจีโนมของไอโซเลต SW21^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง

Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity (%)	MIBiG BGC-ID
Region 12.1	Terpene	201,462	222,580	SF2575	6	BGC0000269
Region 14.1	betalactone	144,543	186,042	Pyrrrolomycin A, Pyrrrolomycin B, Pyrrrolomycin C, Pyrrrolomycin D	5	BGC0000130
<i>Gordonia bronchialis</i> DSM 43247 ^T						
Region 1.1	T1PKS	211,835	257,114	-	-	-
Region 1.4	Terpene	2,541,148	2,560,113	SF2575	6	BGC0000269
Region 1.5	NRPS	2,573,542	2,617,529	Myxochelin B, Myxochelin A	33	BGC0002492
Region 1.6	Terpene	2,721,242	2,742,165	Carotenoid	14	BGC0000636
Region 1.7	NRPS	3,915,826	4,049,657	Cinnapeptin	14	BGC0002108
Region 1.8	Redox-cofactor	4,052,811	4,075,867	-	-	-

หมายเหตุ : MIBiG คือ Minimum Information about a Biosynthetic Gene Cluster

4.4.4 ลักษณะที่แตกต่างกันระหว่างไอโซเลต SW21^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง

ลักษณะทางฟีโนไทป์ที่แตกต่างกัน ระหว่างไอโซเลต SW21^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง ได้แก่ ความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีไซเคียมคลอไรด์ ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ การรีดิวซ์ไนเตรต ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน ได้แก่ Arabinose, Galactose, Glycerol, Inulin, Lactose, Mannitol, Melibiose, Raffinose, Rhamnose, Ribose, Sucrose, Trehalose, Xylitol และ Xylose การผลิตกรดจากแหล่งคาร์บอน ได้แก่ Fructose, Fructose, Galactose, Glycerol, Inulin, Mannitol, Mannose, Rhamnose, Sucrose, Trehalose, Xylitol และ Xylose ความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจน ได้แก่ 2-Aminobutyric acid, Cysteine, Histidine, Methionine, Phenylalanine และ Threonine การย่อยสลายสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำ ได้แก่ Adenine และ Tween 80 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ ได้แก่ Esterase (C 4), Esterase Lipase (C 8), Lipase (C 14), Valine arylamidase, Cystine arylamidase และ β -glucosidase (ตารางที่ 4.13) ไอโซเลต SW21^T และ *G. mangrovi* HNM0687^T มีความไวต่อยาปฏิชีวนะแตกต่างกัน โดยไอโซเลต SW21^T ไม่ถูกยับยั้งด้วย Clindamycin แต่ไวต่อ Nalidixic acid ในขณะที่ *G. mangrovi* HNM0687^T ไม่ถูกยับยั้งด้วย Nalidixic acid แต่ไวต่อ Clindamycin นอกจากนี้ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีที่แตกต่างกันของไอโซเลต SW21^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง ได้แก่ ชนิดของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ ชนิดของไขมันมีขี้ และชนิดของกรดไขมันหลัก ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน 16S rRNA ในฐานข้อมูล EzBioCloud พบว่า similarity value ระหว่างไอโซเลต SW21^T และสายพันธุ์ใกล้เคียงมีค่าต่ำกว่า 98.7% ซึ่งเป็นเกณฑ์ที่ได้รับการยอมรับว่ามีแนวโน้มเป็นเชื้อต่างสปีชีส์กัน (Stackebrandt & Ebers, 2006) และการวิเคราะห์ระหว่างจีโนมของไอโซเลต SW21^T และสายพันธุ์ใกล้เคียงพบว่ามีค่า DDH similarity ต่ำกว่า 70% ระบุได้ว่าเชื้อทั้งสองเป็นเชื้อต่างสปีชีส์กัน (Goris *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2013; Wayne *et al.*, 1987; Tindall *et al.*, 2010) อีกทั้งยังมีค่า ANI และ AAI ต่ำกว่า 95% ซึ่งถือว่าสิ่งมีชีวิตทั้งสองชนิดที่เปรียบเทียบกันเป็นสิ่งมีชีวิตต่างสปีชีส์ (Teeling *et al.*, 2004; Goris *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2013; Richter & Rosselló-Mora, 2009; Konstantinidis *et al.*, 2017; Figueras *et al.*, 2014) จากความแตกต่างของลักษณะทางอนุกรมวิธานและการวิเคราะห์ข้อมูลทางจีโนมไทป์แสดงให้เห็นว่า ไอโซเลต SW21^T จัดเป็นแอคติโนแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Gordonia* ซึ่งมีชื่อว่า *Gordonia aquimaris* sp. nov. (Pansomsuay *et al.*, 2023)

ตารางที่ 4.13 ลักษณะทางฟีโนไทป์ของไอโซเลต SW21^T และสายพันธุ์ใกล้เคียงที่แตกต่างกัน

Characteristics	<i>Gordonia</i> sp. SW21 ^T	<i>G. mangrovi</i> HNM0687 ^T	<i>G. bronchialis</i> DSM 43247 ^{T*}
Tolerance tests:			
NaCl % w/v tolerance	0-14	0-9	2.5 (maximum)
Temperature range (°C)	12-37	12-37	20-40

ตารางที่ 4.13 (ต่อ) ลักษณะทางฟีโนไทป์ของไอโซเลต SW21^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง

Characteristics	<i>Gordonia</i> sp. SW21 ^T	<i>G. mangrovi</i> HNM0687 ^T	<i>G. bronchialis</i> DSM 43247 ^{T*}
Biochemical test:			
Nitrate reduction	+	-	-
Carbon utilization:			
Arabinose	-	w	-
Galactose	-	w	+
Glycerol	+	-	+
Inulin	w	-	w
Lactose	+	w	-
Mannitol	+	-	-
Melibiose	+	-	-
Raffinose	w	w	-
Rhamnose	+	w	-
Ribose	w	w	-
Sucrose	+	-	+
Trehalose	+	-	+
Xylitol	+	-	-
Xylose	+	+	-
Acid production from carbon source:			
Fructose	+	+	-
Galactose	w	-	-
Glycerol	+	-	ND
Inulin	w	-	ND
Mannitol	+	+	-
Mannose	w	+	+
Rhamnose	+	+	-
Sucrose	+	+	-
Trehalose	+	w	+
Xylitol	+	-	ND
Xylose	+	-	-
Nitrogen Utilization:			
2-Aminobutyric acid	-	+	ND

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.13 (ต่อ) ลักษณะทางฟีโนไทป์ของไอโซเลต SW21^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง

Characteristics	<i>Gordonia</i> sp. SW21 ^T	<i>G. mangrovi</i> HNM0687 ^T	<i>G. bronchialis</i> DSM 43247 ^{T*}
Cysteine	w	+	ND
Histidine	-	+	-
Methionine	w	+	+
Phenylalanine	-	+	w
Threonine	-	w	ND
Degradation of:			
Adenine	-	-	+
Tween 80	+	+	-
Enzymatic activity:			
Esterase (C 4)	+	+	-
Esterase Lipase (C 8)	+	+	-
Lipase (C 14)	w	-	-
Valine arylamidase	w	w	+
Cystine arylamidase	w	w	+
β-glucosidase	-	-	+

หมายเหตุ : สัญลักษณ์ +, positive; w, weak; -, negative; ND, Not detected

*, ข้อมูลจาก Goodfellow *et al.* (2012), Reimer *et al.* (2022) และ Sangkanu *et al.* (2019)

4.4.5 คำอธิบายของ *Gordonia aquimaris* SW21^T

การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานแบบหลายส่วนสามารถอธิบายได้ว่า *Gordonia* sp. SW21^T เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ต้องการอากาศในการเจริญ มีกรดมัคคูลิกเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ เซลล์รูปร่างท่อน เจริญได้ดีในอาหารชนิด ISP 2, ISP 4, ISP 5, ISP 7, Glucose asparagine agar และ Nutrient agar เจริญได้ปานกลางในอาหาร ISP 3 และ ISP 6 และเจริญได้ไม่ดีในอาหาร Glucose asparagine agar โคโลนีบนอาหารมีโทเนสส์บนอาหารทดสอบทุกชนิด ไม่พบการผลิตรงควัตถุที่ละลายน้ำ เจริญที่อุณหภูมิ 15-37 °C และเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 °C เจริญได้ในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์สูงสุด 14% (w/v) เจริญได้ในสภาวะกรด-ด่างช่วง pH 6-8 และเจริญได้ดีที่สุดที่ระดับ pH 7 ให้ผลบวกในการทดสอบการย่อยสลายยูเรีย การรีดิวซ์ไนเตรต และการผลิตเอนไซม์อะไมเลส แต่ให้ผลลบในการทดสอบการย่อยแป้ง การย่อยเจลาติน การตกตะกอนโปรตีนนม การย่อยโปรตีนนม การสร้างเมลานิน การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ และการผลิตเอนไซม์ออกซิเดส มีความสามารถในการย่อยสารประกอบที่ไม่

ละลายน้ำ Tween 80 แต่ไม่สามารถย่อย Adenine, Carboxymethylcellulose, Cellulose, Hypoxanthine, Tyrosine, Xanthine, Chitin และ Xylan ได้ ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่สามารถใช้ในการเจริญเติบโตได้ดี ได้แก่ Cellobiose, Fructose, Glucose, Glycerol, Myo-Inositol, Lactose, Mannitol, Mannose, Melibiose, Rhamnose, Sucrose, Trehalose, Xylitol และ Xylose ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเจริญเติบโตไม่ได้ ได้แก่ Inulin, Ribose และ Raffinose แต่ไม่สามารถใช้ Arabinose, Dextran, Galactose และ Salicin เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่สามารถใช้ในการเจริญเติบโตได้ดี ได้แก่ Arginine, Asparagine, Proline, Serine และ Valine ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการเจริญเติบโตไม่ได้ ได้แก่ Cysteine และ Methionine แต่ไม่สามารถใช้ 2-Aminobutyric acid, Histidine, 4-Hydroxyproline, Phenylalanine และ Threonine เป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต สามารถผลิตกรดจากแหล่งคาร์บอนหลายชนิด ได้แก่ Fructose, Glucose, Glycerol, Myo-Inositol, Mannitol, Rhamnose, Sucrose, Trehalose, Xylitol และ Xylose ผลิตกรดได้เล็กน้อยจากแหล่งคาร์บอนที่เป็น Galactose, Inulin และ Mannose แต่ไม่สามารถผลิตกรดจากการใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็น Arabinose, Cellobiose, Dextran, Lactose, Melibiose, Raffinose และ Salicin การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ด้วย API ZYME System พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase, Esterase (C 4), Esterase Lipase (C 8), Leucine arylamidase, Acid phosphatase, Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase และ α -glucosidase พบกิจกรรมของเอนไซม์ Lipase (C 14), Valine arylamidase และ Cystine arylamidase ได้เล็กน้อย แต่ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ Trypsin, α -chymotrypsin, α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, β -glucosidase, N-acetyl- β -glucosaminidase, α -mannosidase และ α -fucosidase มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ Amikacin, Amoxicillin, Ampicillin, Gentamicin, Nalidixic acid, Ofloxacin, Oxacillin, Penicillin G, Streptomycin, Tobramycin และ Vancomycin แต่ไม่ไวต่อยาปฏิชีวนะ Clindamycin ผนังเซลล์ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมติกแบบ meso-DAP มีนาควิโนนหลัก ได้แก่ MK-9(H₂) และ MK-7(H₂) น้ำตาลในเซลล์ทั้งหมดประกอบด้วย Glucose, Galactose, Rhamnose, Ribose และ Arabinose ไขมันมีหัวในเซลล์ประกอบด้วย Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamine, Phosphatidylinositol และ Phosphatidylinositol mannoside ชนิดของกรดไขมันหลักในเซลล์ ได้แก่ C_{16:0}, C_{18:1} ω 9c, C_{18:0} และ C_{18:0} 10-methyl (TBSA)

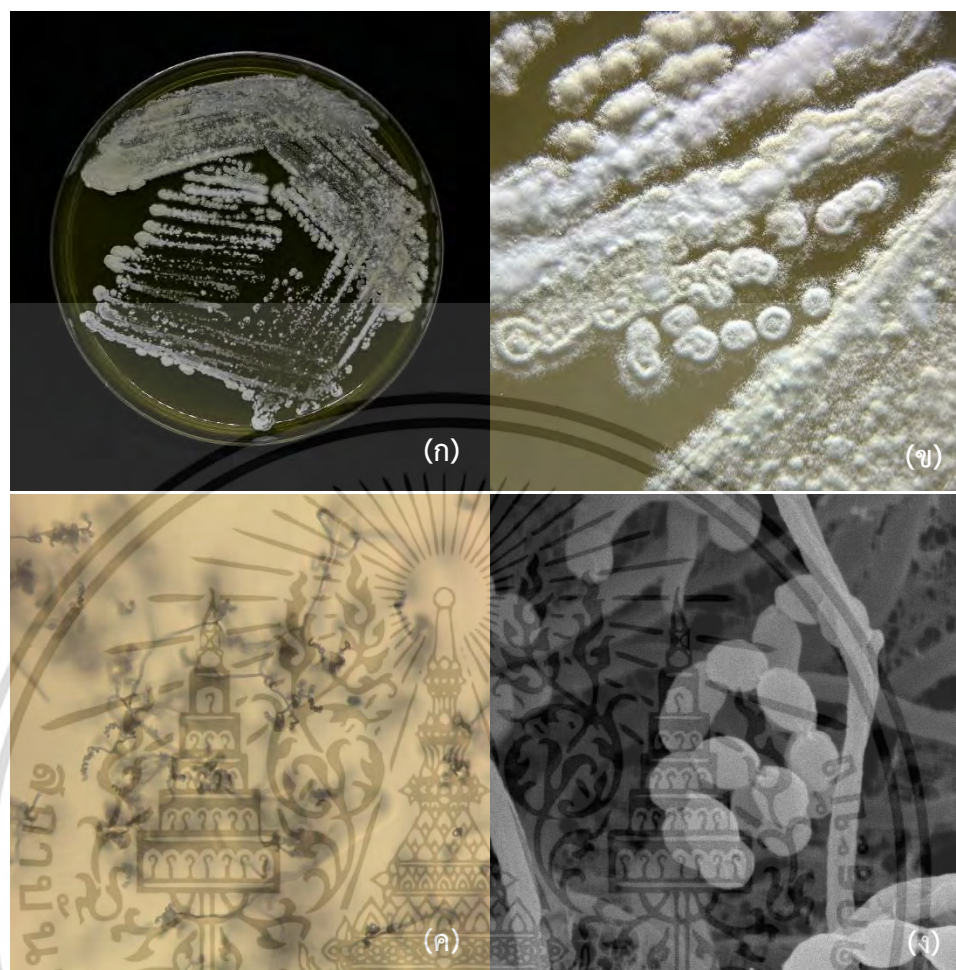
4.5 การศึกษาอนุกรมวิธานของไอโซเลต JHD1^T

4.5.1 ลักษณะทางฟีโนไทป์

4.5.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์แอคติโนแบคทีเรียไอโซเลต JHD1^T ที่เจริญบนอาหาร ISP 2 seawater agar เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 14 วัน แสดงให้เห็นว่าไอโซเลต JHD1^T จัดเป็นแอคติโนแบคทีเรียที่สร้างเส้นใยอากาศและมีการสร้างสปอร์ การศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าสปอร์มีการจัดเรียงตัวแบบเกลียวและสปอร์มีพื้นผิวค่อนข้างเรียบ ดังแสดงในรูปที่ 4.29





รูปที่ 4.29 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต JHD1^T

- (ก และ ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต JHD1^T บนอาหารแข็ง ISP 2 seawater agar
 (ค) แสดงลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายทั้งหมด 400 เท่า)
 (ง) แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด
 (กำลังขยายทั้งหมด 15,000 เท่า)

4.5.1.2 ลักษณะการเจริญ

การศึกษาลักษณะการเจริญ สีของเส้นใยอาหาร และสีของรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ของแอกติโนแบคทีเรียไอโซเลต JHD1^T ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.14 ผลการทดสอบพบว่า สีของเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศของไอโซเลต JHD1^T ส่วนใหญ่มีโทนสีเทาอมเขียวและสีขาวอมเขียวตามลำดับ สำหรับลักษณะการเจริญพบว่าไอโซเลต JHD1^T เจริญได้ดีบนอาหารชนิด ISP 2, ISP 4 และ ISP 6 เจริญได้ปานกลางบนอาหาร ISP 5, ISP 7 และ Nutrient agar เจริญได้ไม่ดีบนอาหาร Glucose asparagine agar และ Czapek's sucrose agar และไม่เจริญบนอาหาร ISP 3 พบสีของรงควัตถุที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละลายน้ำโทนสีเหลืองได้ในทุกอาหารทดสอบที่มีการเจริญ ยกเว้นอาหารทดสอบสูตร Glucose asparagine agar แตกต่างจากสายพันธุ์ใกล้เคียงทั้งสองซึ่งส่วนใหญ่ไม่พบการสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำในอาหารทดสอบ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.14 แสดงลักษณะการเจริญ สีของเส้นใยอาหาร และสีของรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ของไอโซเลต JHD1^T และสายพันธุ์ใกล้เคียงที่เจริญบนอาหารชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน

ชนิดอาหาร	ลักษณะการเจริญ	สีเส้นใยอาหาร	สีเส้นใยอากาศ	สีรงควัตถุที่ละลายน้ำ
<i>Streptomyces</i> sp. JHD1 ^T				
ISP 2	เจริญได้ดี	เหลืองอมเขียวเทา (grayish greenish yellow)	ขาวอมเขียว (greenish white)	เหลืองอมเขียวปานกลาง (moderate greenish yellow)
ISP 3	ไม่เจริญ	-	-	-
ISP 4	เจริญได้ดี	เทาอมเขียวอ่อน (light greenish gray)	ขาวอมเขียว (greenish white)	เขียวเหลืองอ่อน (light yellow green)
ISP 5	เจริญได้ปานกลาง	เทาอมเขียวอ่อน (light greenish gray)	ขาวอมเขียว (greenish white)	เขียวเหลืองอ่อน (light yellow green)
ISP 6	เจริญได้ดี	เขียวอมเหลืองเทา (grayish yellowish green)	ขาวอมเขียว (greenish white)	เหลืองอมเขียวปานกลาง (moderate greenish yellow)
ISP 7	เจริญได้ปานกลาง	เทาอมเขียวอ่อน (light greenish gray)	ขาวอมเขียว (greenish white)	เขียวเหลืองอ่อน (light yellow green)
Glucose asparagine agar	เจริญได้ไม่ดี	ขาวอมเขียว (greenish white)	.*	-
Czapek's sucrose agar	เจริญได้ไม่ดี	เทาอมเขียวอ่อน (light greenish gray)	.*	เขียวเหลืองอ่อน (light yellow green)

ตารางที่ 4.14 (ต่อ) แสดงลักษณะการเจริญ สีของเส้นใยอาหาร และสีของรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ของไอโซเลต JHD1^T และสายพันธุ์ใกล้เคียงที่เจริญบนอาหารชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน

ชนิดอาหาร	ลักษณะการเจริญ	สีเส้นใยอาหาร	สีเส้นใยอากาศ	สีรงควัตถุที่ละลายน้ำ
Nutrient agar	เจริญได้ปานกลาง	เขียวอมเหลืองเทา (grayish yellowish green)	ขาวอมเขียว (greenish white)	เขียวเหลืองอ่อน (light yellow green)
<i>Streptomyces alkaliterrae</i> NCIMB 15195 ^T				
ISP 2	เจริญได้ปานกลาง	เหลืองอมเขียวเทา (grayish greenish yellow)	-*	-
ISP 3	เจริญได้ไม่ดี	เทาอมเหลือง (yellowish gray)	-*	-
ISP 4	เจริญได้ปานกลาง	เหลืองอมเขียวปานกลาง (moderate greenish yellow)	ขาวอมเขียว (greenish white)	-
ISP 5	เจริญได้ปานกลาง	เหลืองอมเขียวเทา (grayish greenish yellow)	-*	-
ISP 6	เจริญได้ดี	เทาอมฟ้าอ่อน (light bluish gray)	ขาวอมฟ้า (bluish white)	เทาอมน้ำตาล (brownish gray)
ISP 7	เจริญได้ปานกลาง	เหลืองอมเขียวเทา (grayish greenish yellow)	-*	-
Glucose asparagine agar	เจริญได้ไม่ดี	เหลืองอมเขียวเทา (grayish greenish yellow)	-*	-
Czapek's sucrose agar	เจริญได้ปานกลาง	เขียวเหลืองอ่อน (light yellow green)	-*	-

ตารางที่ 4.14 (ต่อ) แสดงลักษณะการเจริญ สีของเส้นใยอาหาร และสีของรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ของไอโซเลต JHD1^T และสายพันธุ์ใกล้เคียงที่เจริญบนอาหารชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน

ชนิดอาหาร	ลักษณะการเจริญ	สีเส้นใยอาหาร	สีเส้นใยอากาศ	สีรงควัตถุที่ละลายน้ำ
Nutrient agar	เจริญได้ดี	เทาอมเขียวอ่อน (light greenish gray)	ขาวอมเขียว (greenish white)	เหลืองอมเทาเข้ม (dark grayish yellow)
<i>Streptomyces chumphonensis</i> KK1-2 ^T				
ISP 2	เจริญได้ปานกลาง	เหลืองอมเขียวเทา (grayish greenish yellow)	-*	เหลืองอมเขียวเทา (grayish greenish yellow)
ISP 3	ไม่เจริญ	-	-*	-
ISP 4	เจริญได้ดี	เหลืองอมเขียวเทา (grayish greenish yellow)	เทาอมเขียวอ่อน (light greenish gray)	-
ISP 5	เจริญได้ปานกลาง	เทาอมเขียวอ่อน (light greenish gray)	ขาวอมเขียว (greenish white)	-
ISP 6	เจริญได้ปานกลาง	เหลืองอมเทา (grayish yellow)	ขาวอมเขียว (greenish white)	-
ISP 7	เจริญได้ดี	เทาอมเขียวอ่อน (light greenish gray)	ขาวอมเขียว (greenish white)	-
Glucose asparagine agar	เจริญได้ไม่ดี	เหลืองซีด (pale yellow)	-*	-
Czapek's sucrose agar	เจริญได้ไม่ดี	เหลืองซีด (pale yellow)	-*	-

ตารางที่ 4.14 (ต่อ) แสดงลักษณะการเจริญ สีของเส้นใยอาหาร และสีของรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ของไอโซเลต JHD1^T และสายพันธุ์ใกล้เคียงที่เจริญบนอาหารชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน

ชนิดอาหาร	ลักษณะการเจริญ	สีเส้นใยอาหาร	สีเส้นใยอากาศ	สีรงควัตถุที่ละลายน้ำ
Nutrient agar	เจริญได้ดี	เหลืองอมเขียวเทา (grayish greenish yellow)	-*	-

หมายเหตุ : สัญลักษณ์ - หมายถึง ไม่พบการสร้างเส้นใยหรือไม่พบสีของรงควัตถุ
 สัญลักษณ์ -* หมายถึง ไม่พบการสร้างเส้นใยอากาศภายในระยะเวลา 14 วัน

4.5.1.3 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

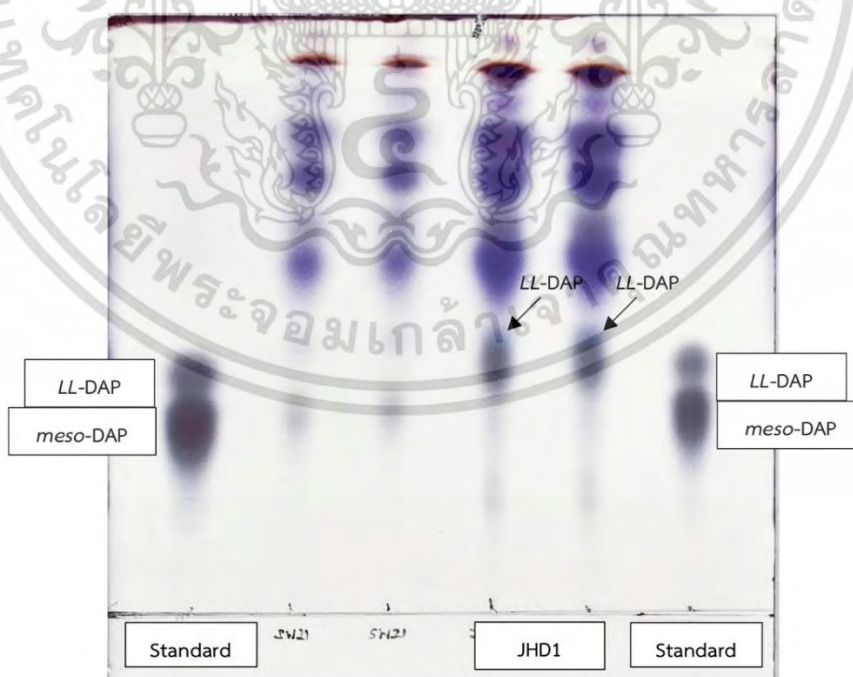
การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาของไอโซเลต JHD1^T ได้แก่ ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ ความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ความสามารถในการเจริญในสภาวะกรด-ต่างระดับต่าง ๆ ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน/แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ในการเจริญ และความในการผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรต รวมถึงการศึกษาลักษณะทางชีวเคมีซึ่งประกอบด้วย การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายแป้ง การย่อยสลายยูเรีย การย่อยสลายสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำ การย่อยสลายเจลาติน การย่อยโปรตีนในนม การผลิตเมลานิน การผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ และการรีดิวซ์ไนเตรต นอกจากนี้ยังตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase activity) และการผลิตเอนไซม์คะตะเลส (Catalase activity) และศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อื่น ๆ ด้วย API ZYM system (BioMérieux) การทดสอบพบว่าไอโซเลต JHD1^T มีความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 20-37 °C และเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 °C เจริญได้ในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์สูงสุด 10% (w/v) เจริญได้ในสภาวะกรด-ต่างช่วง pH 6-8 และเจริญได้ดีที่สุดที่ระดับ pH 7 ให้ผลบวกในการทดสอบการย่อยแป้ง (Starch hydrolysis) การย่อยสลายยูเรีย (Hydrolysis of urea) การย่อยเจลาติน (Gelatin liquefaction) การย่อยโปรตีนนม (Peptonization of milk) การผลิตเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase production) และการผลิตเอนไซม์คะตะเลส (Production of catalase) แต่ให้ผลลบในการทดสอบการตกตะกอนโปรตีนนม (Milk coagulation) การสร้างเมลานิน (Melanin production) การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H₂S Production) และการรีดิวซ์ไนเตรต (Reduction of nitrate) มีความสามารถในการย่อยสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำ Hypoxanthine, Tween 80 และ Chitin แต่ไม่สามารถย่อย Adenine, Carboxymethylcellulose, Cellulose, Tyrosine, Xanthine และ Xylan ได้ ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่สามารถใช้ในการเจริญเติบโตได้ดี ได้แก่ Dextran, Glucose, Lactose, Mannose, Salicin และ Xylitol ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเจริญได้ไม่ดี ได้แก่ Cellobiose, Fructose และ Glycerol แต่ไม่สามารถใช้ Arabinose, Galactose, Myo-Inositol, Inulin, Mannitol, Melibiose, Raffinose, Rhamnose, Ribose, Sucrose, Trehalose และ Xylose เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในการเจริญได้ ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่สามารถใช้ในการเจริญได้ดี คือ Asparagine ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการเจริญได้ไม่ดี ได้แก่ Arginine, Histidine, 4-Hydroxyproline, Methionine, Proline, Serine, Threonine, Valine แต่ไม่สามารถใช้ 2-Aminobutyric acid, Cysteine และ Phenylalanine เป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อใช้ในการเจริญได้ สามารถผลิตกรดจากแหล่งคาร์บอนหลายชนิด ได้แก่ Dextran, Glucose, Cellobiose, Glycerol และ Ribose ผลิตกรดได้เล็กน้อยจากแหล่งคาร์บอนที่เป็น Mannose และ Fructose แต่ไม่สามารถผลิตกรดจากการใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็น Lactose, Salicin, Xylitol, Arabinose, Galactose, Myo-Inositol, Inulin, Mannitol, Melibiose, Raffinose, Rhamnose, Sucrose, Trehalose และ Xylose การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ด้วย API ZYME System พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ Leucine arylamidase และ Naphthol-AS-BI-

phosphohydrolase พบกิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase, Esterase (C 4), Esterase Lipase (C 8), Lipase (C 14), Valine arylamidase และ Cystine arylamidase ได้เล็กน้อย แต่ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ Trypsin, α -chymotrypsin, Acid phosphatase, α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, α -glucosidase, β -glucosidase, N-acetyl- β -glucosaminidase, α -mannosidase และ α -fucosidase ทั้งนี้ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีดังกล่าวมีความแตกต่างกับสายพันธุ์ใกล้เคียงดังแสดงในตารางที่ 4.20

4.5.2 ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี

4.5.2.1 การวิเคราะห์ไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนปิเมลิก (Diaminopimelic acid (DAP) isomer analysis)

การวิเคราะห์ไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนปิเมลิกในผนังเซลล์ของไอโซเลต JHD1^T พบว่าผนังเซลล์ของไอโซเลต JHD1^T ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนปิเมลิกแบบ LL-DAP (รูปที่ 4.30) สอดคล้องกับข้อมูลก่อนหน้านี้ที่กล่าวไว้ว่าผนังเซลล์ของแอกติโนแบคทีเรียในสกุล *Streptomyces* นั้นประกอบด้วยชนิดของกรดไดอะมิโนปิเมลิกแบบ LL-DAP (Goodfellow *et al.*, 2012)

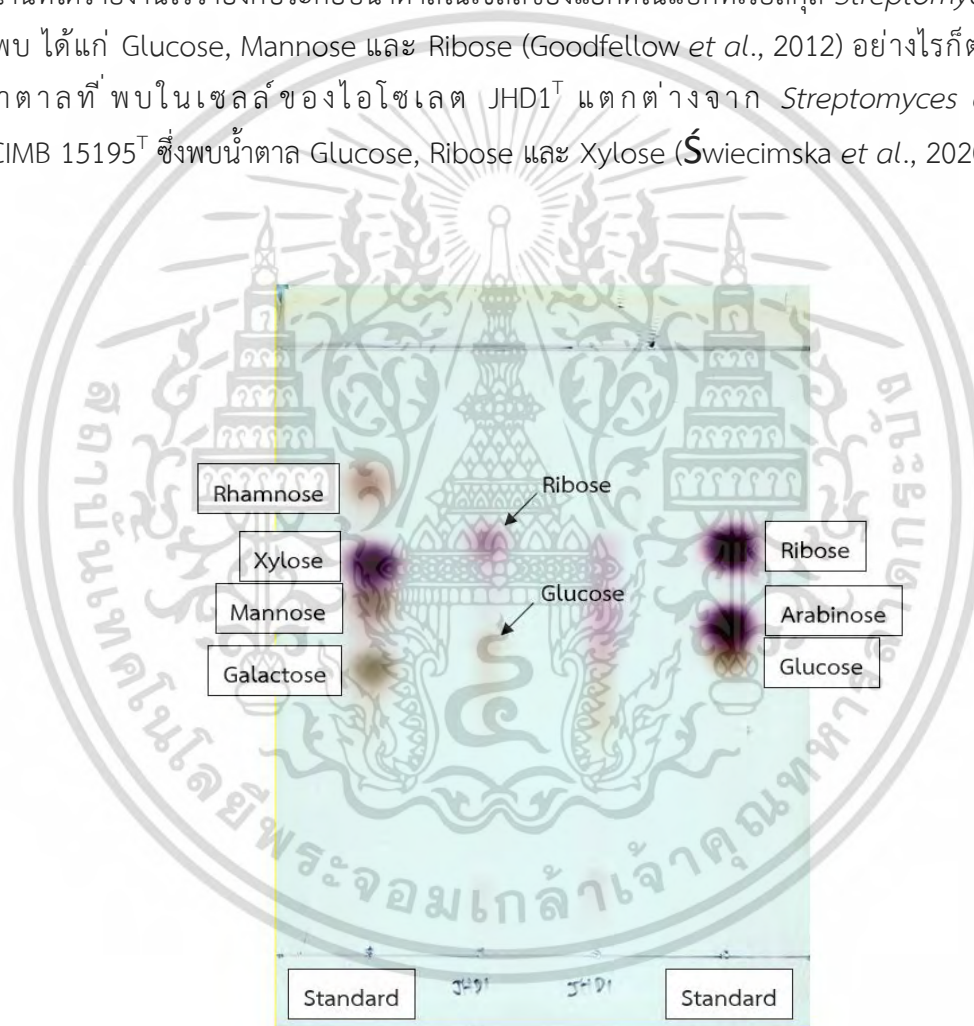


รูปที่ 4.30 ไอโซเมอร์กรดไดอะมิโนปิเมลิกของไอโซเลต JHD1^T บนแผ่น HPTLC cellulose

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.2.2 การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ (Whole-cell sugars analysis)

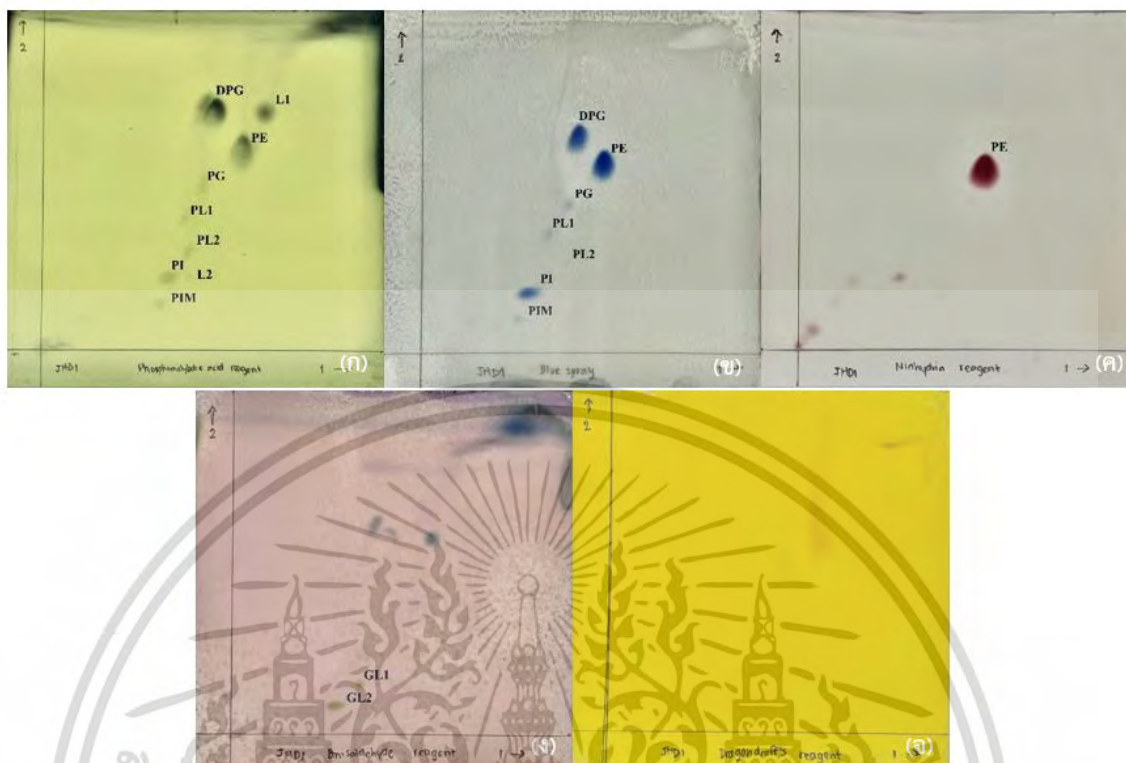
การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ของไอโซเลต JHD1^T พบว่าเซลล์ของไอโซเลต JHD1^T ประกอบด้วยน้ำตาล Ribose และ Glucose (รูปที่ 4.31) เช่นเดียวกันกับ *Streptomyces chumphonensis* KK1-2^T (Phongsopitanun *et al.*, 2014) สอดคล้องกับข้อมูลก่อนหน้านี้นี้ที่ได้รายงานไว้ว่าองค์ประกอบน้ำตาลในเซลล์ของแอกติโนแบคทีเรียสกุล *Streptomyces* ส่วนใหญ่ที่พบ ได้แก่ Glucose, Mannose และ Ribose (Goodfellow *et al.*, 2012) อย่างไรก็ตามชนิดของน้ำตาลที่พบในเซลล์ของไอโซเลต JHD1^T แตกต่างจาก *Streptomyces alkaliterrae* NCIMB 15195^T ซึ่งพบน้ำตาล Glucose, Ribose และ Xylose (Świecimska *et al.*, 2020)



รูปที่ 4.31 รูปที่ 4.31 น้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ของไอโซเลต JHD1^T บนแผ่น HPTLC cellulose ฉีดพ่นด้วย Aniline phthalate

4.5.2.3 การวิเคราะห์ชนิดไขมันมีขั้ว (Polar lipids analysis)

การการวิเคราะห์ชนิดไขมันมีขั้วในเซลล์ของไอโซเลต JHD1^T พบว่าเซลล์ของไอโซเลต JHD1^T ประกอบด้วย Diposphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamine, Phosphatidylglycerol, Phosphatidylinositol, Phosphatidylinositol mannoside, Unidentified phospholipids (PLs) (2 ตำแหน่ง), Unidentified polar lipids (Ls) (2 ตำแหน่ง) และ Unidentified glycolipids (GLs) (2 ตำแหน่ง) ดังแสดงในรูปที่ 4.32 โดยจากผลการวิเคราะห์ชี้ให้เห็นว่าชนิดของไขมันมีขั้วในเซลล์ของไอโซเลต JHD1^T นั้นมีความสอดคล้องกับชนิดไขมันมีขั้วหลักที่พบในเซลล์ของแอกติโนแบคทีเรียในสกุล *Streptomyces* ซึ่งประกอบด้วย Diposphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamine, Phosphatidylinositol และ Phosphatidylinositol mannoside (Goodfellow *et al.*, 2012) นอกจากนี้ยังพบว่าชนิดของไขมันมีขั้วในเซลล์ของไอโซเลต JHD1^T มีความใกล้เคียงกันกับชนิดไขมันมีขั้วหลักที่พบในเซลล์ของสายพันธุ์ใกล้เคียง *Streptomyces alkaliterrae* NCIMB 15195^T และ *Streptomyces chumphonensis* KK1-2^T ซึ่งประกอบด้วย Diposphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamine, Phosphatidylglycerol, Phosphatidylinositol และ Phosphatidylinositol mannoside (Świecimska *et al.*, 2020; Phongsopitanun *et al.*, 2014)



รูปที่ 4.32 ไขมันมีขั้วของไอโซเลต JHD1^T (Two-dimensional thin-layer chromatograms)

(ก) Phosphomolybdate acid reagent

(ข) Blue spray reagent

(ค) Ninhydrin reagent

(ง) Anisaldehyde reagent

(จ) Dragendorff's reagent

4.5.2.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน (Cellular fatty acids analysis)

การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในเซลล์ของไอโซเลต JHD1^T พบว่าชนิดของกรดไขมันหลักภายในเซลล์ (มีมากกว่า 10%) ได้แก่ *anteiso*-C_{15:0} (21.3%), *iso*-C_{16:0} (33.3%) และ *anteiso*-C_{17:0} (14.9%) และชนิดของกรดไขมันรองในเซลล์ (มีมากกว่า 0.5%) ได้แก่ *iso*-C_{14:0} (8.8%), *iso*-C_{15:0} (3.8%), C_{16:0} (2.3%), *iso*-C_{17:0} (3.9%), C_{18:1} ω9c (5.2%), C_{18:1} ω7c (1.1%), *iso*-C_{18:0} (1.1%), *iso*-C_{19:0} (0.7%) และ *anteiso*-C_{19:0} (0.5%) ส่วนการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในเซลล์ของ *Streptomyces alkaliterrae* NCIMB 15195^T พบว่าชนิดของกรดไขมันหลักในเซลล์ (มีมากกว่า 10%) ได้แก่ *anteiso*-C_{15:0} (11.6%), *iso*-C_{16:0} (14.5%) และ *anteiso*-C_{17:0} (28.3%) ชนิดของกรดไขมันรอง (มากกว่า 0.5%) ได้แก่ *iso*-C_{15:0} (2.0%), C_{16:1} ω7c/C_{16:1} ω6c (1.8%), C_{16:0} (8.1%),

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10-methyl-C_{16:0} (1.3%), *anteiso*-C_{17:1} **ω**9c (2.6%), *iso*-C_{17:0} (5.2%), C_{17:1} **ω**8c (1.3%), C_{17:0} (2.6%), *iso*-C_{18:0} (1.4%), *anteiso*-C_{18:0}/C_{18:2} **ω**6c,**ω**9c (3.5%), C_{18:1} **ω**9c (8.1%), C_{18:1} **ω**7c (1.4%), C_{18:0} (1.1%), 3OH-C_{17:0} (0.7%), *iso*-C_{19:0} (0.5%) และ *anteiso*-C_{19:0} (0.9%) องค์ประกอบของกรดไขมันในเซลล์ของ *Streptomyces chumphonensis* KK1-2^T จากรายงานของ Phongsopitanun *et al.* (2014) พบว่าชนิดของกรดไขมันหลักภายในเซลล์ (มีมากกว่า 10%) ได้แก่ *iso*-C_{16:0} (22.7%), *anteiso*-C_{15:0} (22.0%), *iso*-C_{15:0} (14.2%) และ *anteiso*-C_{17:0} (11.2%) ชนิดของกรดไขมันรอง (มากกว่า 0.5%) ได้แก่ *iso*-C_{14:0} (3.5%), *iso*-C_{17:0} (9.2%), C_{16:0} (8.1%), *iso*-C_{18:0} (0.5%), *anteiso*-C_{17:1} **ω**9c (0.6%), C_{17:0} (0.8%), C_{14:0} (0.6%) และ *iso*-C_{16:1} H (0.8%) จากผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าชนิดของกรดไขมันหลักและชนิดของกรดไขมันรองในเซลล์ของไอโซเลต JHD1^T และสายพันธุ์ใกล้เคียงมีความแตกต่างกันบางชนิด



ตารางที่ 4.15 ชนิดกรดไขมันของไอโซเลต JHD1^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง

Fatty acid (%)	1	2	3 ^a
<i>iso</i> -C _{16:0}	33.3	14.5	22.7
<i>anteiso</i> -C _{15:0}	21.3	11.6	22.0
<i>anteiso</i> -C _{17:0}	14.9	28.3	11.2
<i>iso</i> -C _{14:0}	8.8	0.4	3.5
C _{18:1} ω9c	5.2	8.1	-
<i>iso</i> -C _{17:0}	3.9	5.2	9.2
<i>iso</i> -C _{15:0}	3.8	2.0	14.2
C _{16:0}	2.3	8.1	8.1
Summed Feature 8	1.1	1.4	-
<i>iso</i> -C _{18:0}	1.1	1.4	0.5
<i>iso</i> -C _{19:0}	0.7	0.5	-
<i>anteiso</i> -C _{19:0}	0.5	0.9	-
<i>anteiso</i> -C _{17:1} ω9c	0.5	2.6	0.6
C _{18:0}	0.4	1.1	0.3
Summed Feature 3	0.4	1.8	-
C _{17:0}	0.3	2.6	0.8
3OH-C _{17:0}	0.1	0.7	-
C _{17:1} ω8c	0.1	1.3	-
Summed Feature 9	-	1.3	-
Summed Feature 5	-	3.5	-
C _{14:0}	0.1	0.4	0.6
<i>iso</i> -C _{16:1} H	0.2	0.4	0.8

หมายเหตุ : ^a, ข้อมูลจาก Phongsopitanun *et al.* (2014); ^b, ข้อมูลจาก Yu *et al.* (2018)
 Strains: 1 = *Streptomyces* sp. JHD1^T; 2 = *Streptomyces alkaliterrae* NCIMB 15195^T; 3 = *Streptomyces chumphonensis* KK1-2^T
 Summed Feature 3 = C_{16:1} ω7c/C_{16:1} ω6c; Summed Feature 5 = *anteiso*-C_{18:0}/C_{18:2} ω6c, ω9c; Summed Feature 8 = C_{18:1} ω7c; Summed Feature 9 = 10-methyl-C_{16:0}

4.5.2.5 การวิเคราะห์ชนิดของมีนาควิโนน (Menaquinones analysis)

การวิเคราะห์ชนิดของมีนาควิโนนพบว่าเซลล์ของไอโซเลต JHD1^T ประกอบด้วยชนิดของมีนาควิโนนหลัก ได้แก่ MK-9(H₂) (8.4%), MK-9(H₄) (16.34%), MK-9(H₆) (30.89%) และ MK-9(H₈) (44.38%) เช่นเดียวกับชนิดของมีนาควิโนนหลักที่พบในเซลล์ของสายพันธุ์ใกล้เคียง

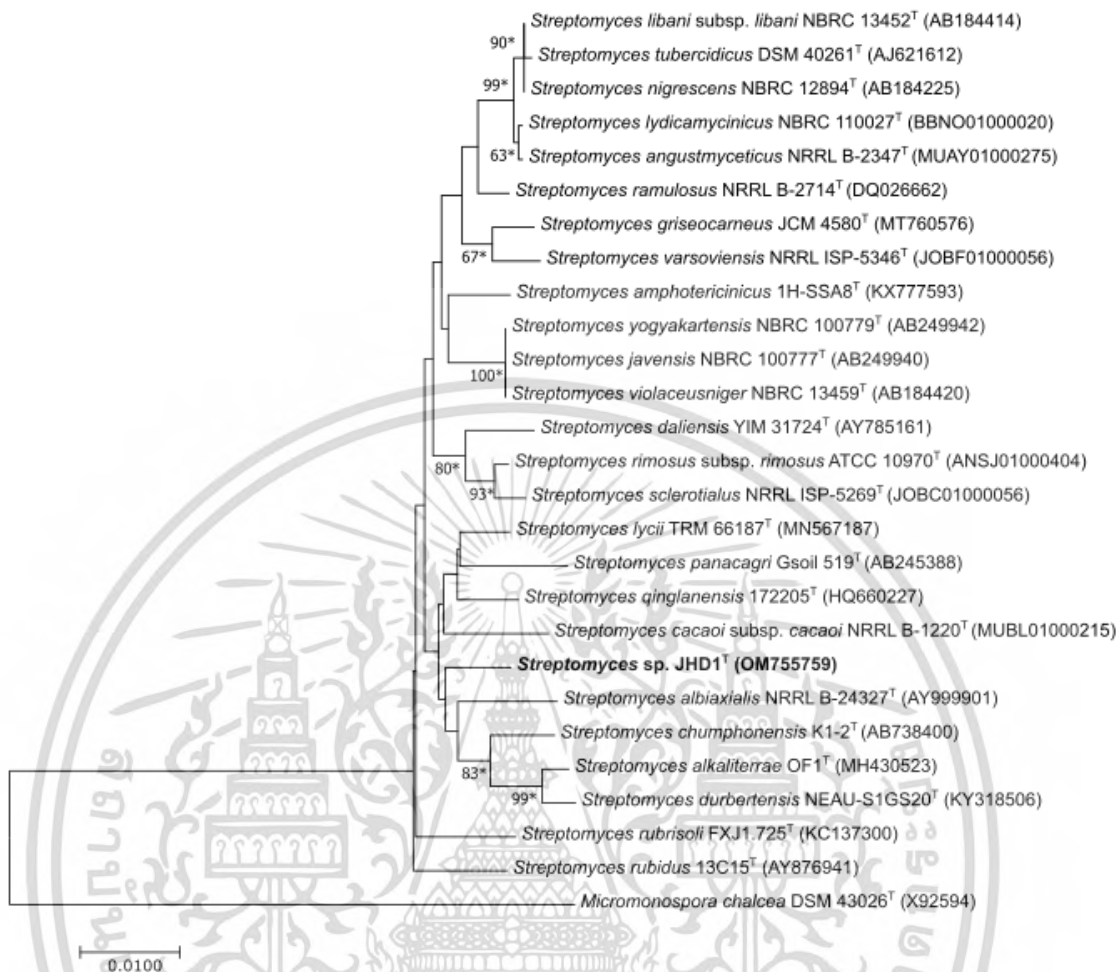
Streptomyces alkaliterrae NCIMB 15195^T ได้แก่ MK-9(H₂) (5.57%), MK-9(H₄) (35.67%), MK-9(H₆) (24.15%) และ MK-9(H₈) (34.61%) ในขณะที่รายงานของ Phongsopitanun *et al.* (2014) พบว่าชนิดของมีนาควิโนนหลักที่พบในเซลล์ของสายพันธุ์ใกล้เคียง *Streptomyces chumphonensis* KK1-2^T ได้แก่ MK-9(H₆) และ MK-9(H₈) แสดงให้เห็นว่า ชนิดของมีนาควิโนนหลักที่พบในเซลล์ของไอโซเลต JHD1^T นั้นมีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ใกล้เคียงทั้งสอง แต่มีความแตกต่างที่มีนาควิโนนชนิด MK-9(H₂) และ MK-9(H₄) เป็นชนิดของมีนาควิโนนหลักที่พบเฉพาะในไอโซเลต JHD1^T และ *Streptomyces alkaliterrae* NCIMB 15195^T เท่านั้น

4.5.3 ลักษณะทางจีโนมไทป์

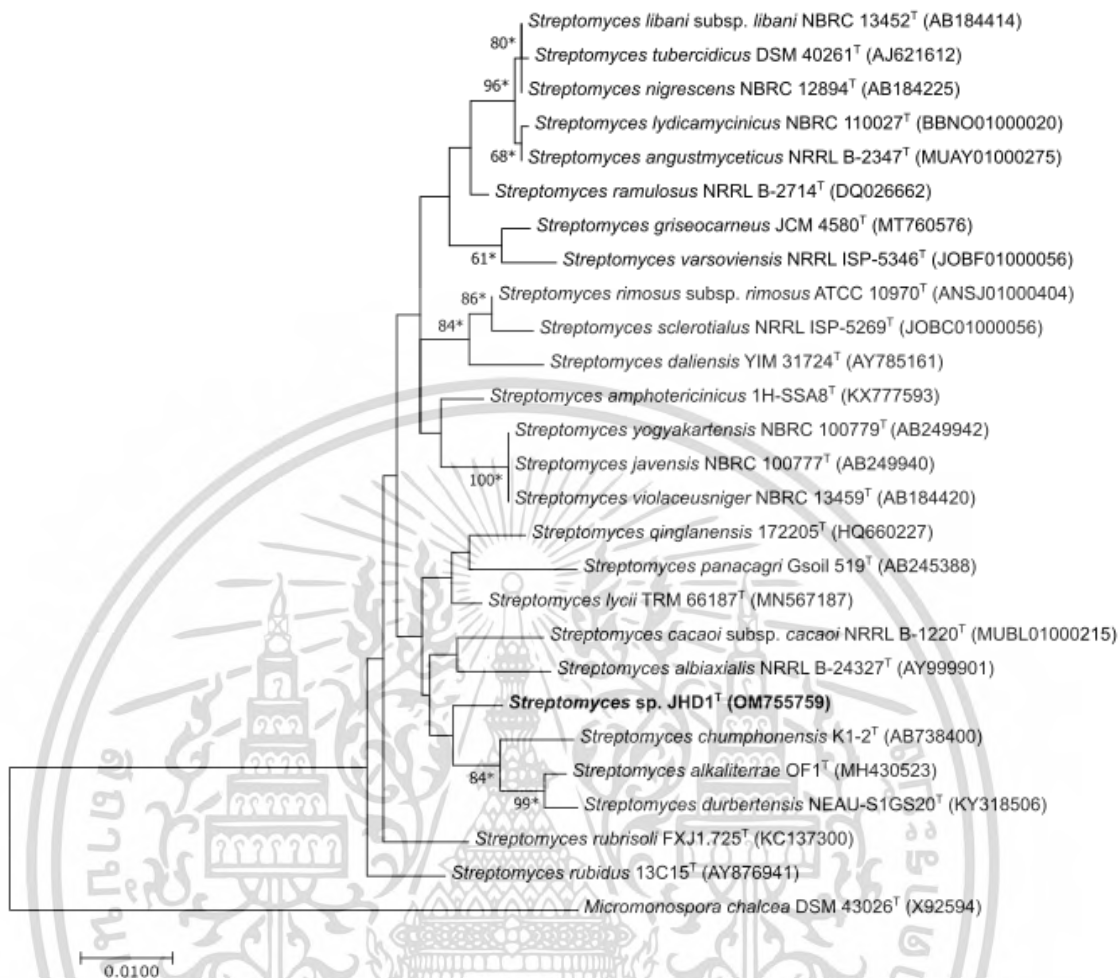
4.5.3.1 การวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน 16S rRNA

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลต JHD1^T (1,503 b.p., completeness 100%) กับฐานข้อมูลออนไลน์ EzBioCloud 16S database (www.ezbiocloud.net) พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน 16S rRNA ใกล้เคียงกับ *Streptomyces alkaliterrae* OF1^T (similarity 98.5%) จากผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน 16S rRNA นี้ชี้ให้เห็นว่าไอโซเลต JHD1^T มีความใกล้ชิดกับแอกติโนแบคทีเรียในสกุล *Streptomyces* และมีแนวโน้มสูงที่จะถูกจัดเป็นเชื้อในสปีชีส์ใหม่ เนื่องจาก Similarity value ระหว่างไอโซเลต JHD1^T และสายพันธุ์ใกล้เคียงนั้นมีค่าต่ำกว่า 98.7% ซึ่งเป็นเกณฑ์ที่ได้รับการยอมรับว่ามีแนวโน้มเป็นเชื้อต่างสปีชีส์กัน (Stackebrandt & Ebers, 2006) แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน 16S rRNA นั้นอาจไม่เพียงพอการยืนยันว่าไอโซเลต JHD1^T นั้นจัดเป็นเชื้อในสปีชีส์ใหม่ จึงมีความจำเป็นต้องมีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในระดับจีโนมทั้งหมดเพิ่มเติม (Kim *et al.*, 2014)

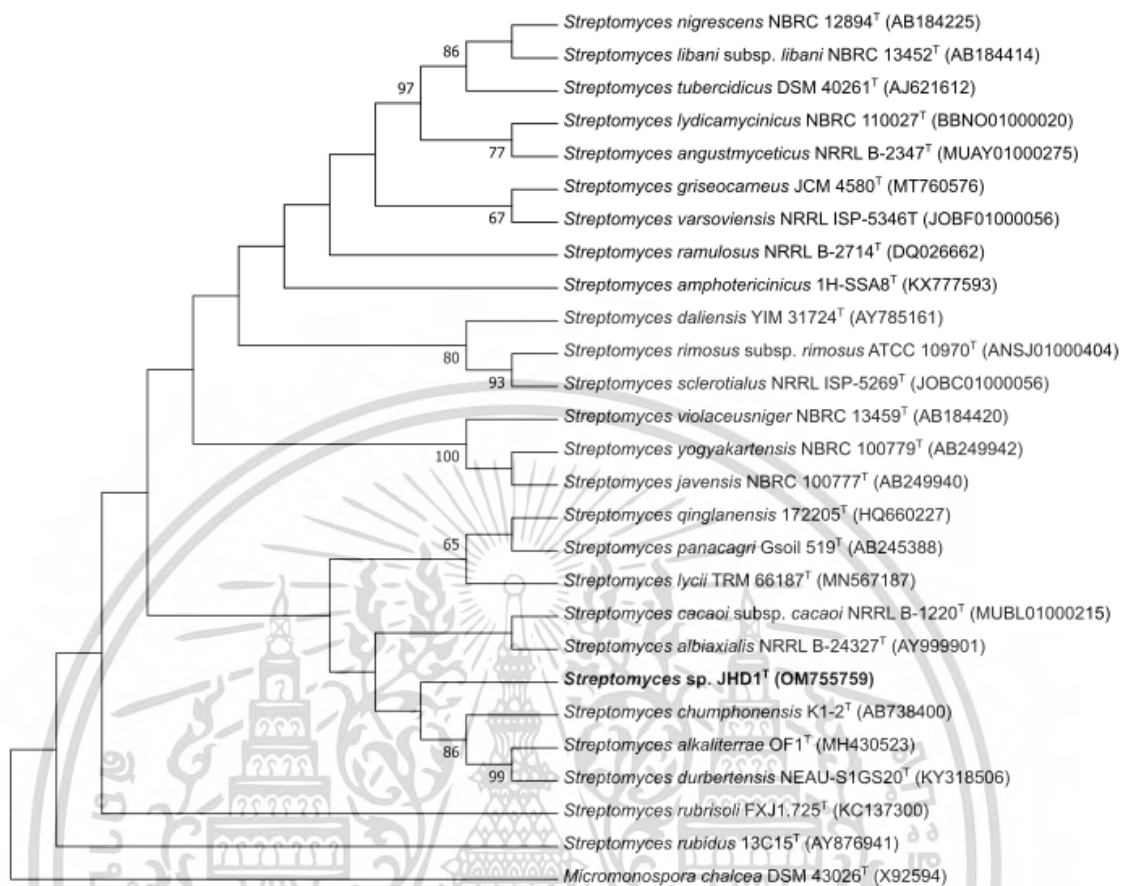
ผลของการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้ด้วยโปรแกรม Mega 7 software โดยอาศัยข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน 16S rRNA ของสายพันธุ์ใกล้เคียงในสกุล *Streptomyces* จำนวน 25 สายพันธุ์ในฐานข้อมูล EzBioCloud 16S database รวมถึงแอกติโนแบคทีเรีย *Micromonospora chalybeata* DSM 43026^T (Out group) โดยทำการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี Neighbor-joining, Maximum-likelihood และ Maximum parsimony โดยกำหนดค่าความเชื่อมั่นในการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้ด้วย Bootstrap resampling method (1,000 ซ้ำ) ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.33-4.37 จากแผนภูมิต้นไม้ที่วิเคราะห์ด้วยทั้งสองวิธีการดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าไอโซเลต JHD1^T จัดอยู่ในกลุ่มของแอกติโนแบคทีเรียในสกุล *Streptomyces* และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Streptomyces alkaliterrae* OF1^T, *Streptomyces chumphonensis* K1-2^T และ *Streptomyces durbertensis* NEAU-S1GS20^T



รูปที่ 4.33 แผนภูมิต้นไม้ (Neighbor-Joining tree) แสดงตำแหน่งทางอนุกรมวิธานของไอโซเลต JHD1^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง



รูปที่ 4.34 แผนภูมิต้นไม้ (Maximum-Likelihood tree) แสดงตำแหน่งทางอนุกรมวิธานของไอโซเลต JHD1^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง



รูปที่ 4.35 แผนภูมิต้นไม้ (Maximum-Parsimony tree) แสดงตำแหน่งทางอนุกรมวิธานของไอโซเลต JHD1^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง

4.5.3.2 การวิเคราะห์จีโนมทั้งหมด (Whole genomes analysis) และชีวสารสนเทศ (Bioinformatics)

การวิเคราะห์จีโนมทั้งหมดของแอสคิตีโนแบคทีเรียไอโซเลต JHD1^T พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 5,646,503 b.p. และมีค่า Average G+C content อยู่ที่ 74.7% จากข้อมูลของจีโนมของไอโซเลต JHD1^T พบว่ามีอนุกรมวิธานอยู่ในแอสคิตีโนแบคทีเรียสกุล *Streptomyces* โดยรายละเอียดข้อมูลจีโนมของไอโซเลต JHD1^T และสายพันธุ์ใกล้เคียงได้แสดงไว้ดังตารางที่ 1 การวิเคราะห์ phylogenomic tree โดยอาศัยข้อมูลจีโนมของสายพันธุ์ใกล้เคียงจาก Type (Strain) Genome Server (TYGS) (<https://tygs.dsmz.de/>) แสดงให้เห็นว่าไอโซเลต JHD1^T มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับกับ *Streptomyces alkaliterrae* OF1^T และ *Streptomyces chumphonensis* K1-2^T (รูปที่ 4.36) ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลการวิเคราะห์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน 16S rRNA ดังกล่าวข้างต้น การวิเคราะห์ Digital DNA-DNA hybridization (dDDH) ด้วย Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC) 3.0 (Meier-Kolthoff *et al.*, 2022) โดยเปรียบเทียบระหว่างจีโนมของไอโซเลต

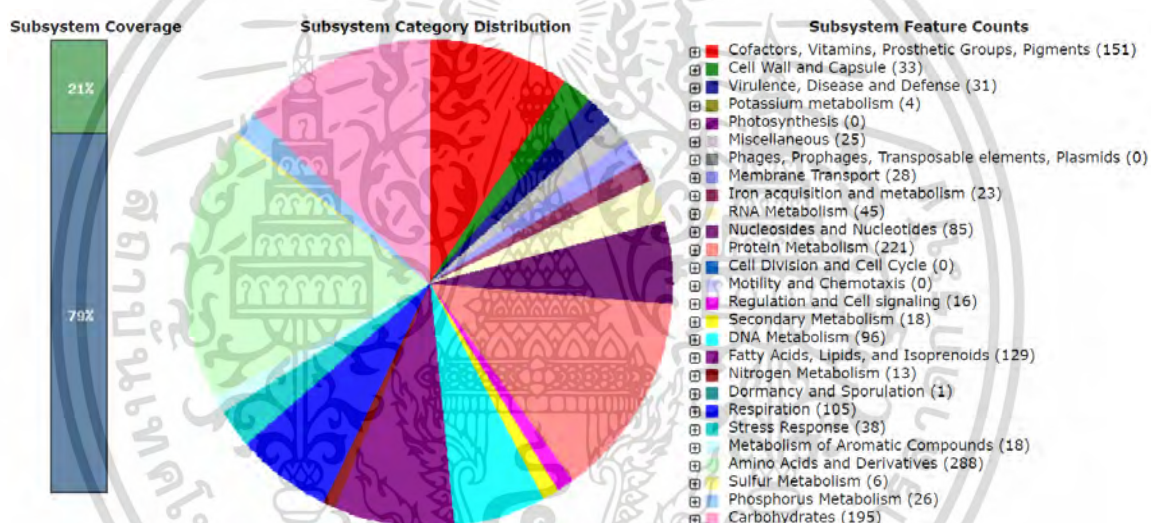
ตารางที่ 4.16 แสดงรายละเอียดข้อมูลจีโนมของไอโซเลต JHD1^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง

คุณสมบัติ	<i>Streptomyces sp.</i> JHD1 ^T	<i>Streptomyces chumphonensis</i> KK1-2 ^T	<i>Streptomyces alkaliterrae</i> OF1 ^T
Bioproject	PRJNA888249	PRJNA664662	PRJNA552584
Accession no.	GCA_026262575.1	GCA_014779715.1	GCA_007097205.2
Genome coverage	101x	30x	30x
N50 (b.p.)	170,825	350,958	15,903
No. of contigs	141	52	769
Genome size (b.p.)	5,646,503	5,823,549	5,999,109
DNA G+C content (%)	74.7	73.3	72.0
Number of gene	4,888	5,202	5,616
Protein coding genes	4,689	5,044	5,334
Number of RNAs	66	68	77
rRNA	2	3	13
tRNA	61	62	61
Other RNA	3	3	3
Pseudogene	133	90	205

ตารางที่ 4.17 ค่า ANIb, ANIm, AAI และ Digital DNA-DNA hybridization ของไอโซเลต JHD1^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง

Query genome	Reference genome	ANIb (%)	ANIm (%)	AAI (%)	dDDH (%)
<i>Streptomyces</i> sp. JHD1 ^T	<i>S. chumphonensis</i> KK1-2 ^T	81.6	86.2	78.1	25.0
	<i>S. alkaliterrae</i> OF1 ^T	78.7	85.7	71.8	23.4

จากผลการทำนายหน้าที่ของจีโนม (Genome annotation) โดยใช้ซอฟต์แวร์ออนไลน์ RAST (<https://rast.nmpdr.org/>) (Aziz *et al.*, 2008; Overbeek *et al.*, 2014) แสดงให้เห็นว่าจีโนมของไอโซเลต JHD1^T ประกอบด้วยกลุ่มยีนที่ทำหน้าที่หลากหลายหมวดหมู่ กลุ่มยีนที่พบมากที่สุดคือกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการดอะมิโนและอนุพันธ์ของกรดอะมิโน (Amino acids and Derivatives) คิดเป็น 288 กลุ่มยีน รองลงมาคือกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของโปรตีน (Protein Metabolism) กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrates) กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับโคแฟกเตอร์ วิตามิน กลุ่มของโคเอนไซม์ และรงควัตถุ (Cofactors, Vitamins, Prosthetic Groups, Pigments) กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการดไขมัน ไขมัน และไอโซพรีนอยด์ (Fatty acids, Lipids, Isoprenoids) และกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหายใจ (Respiration) ตามลำดับ รายละเอียดของกลุ่มยีนอื่น ๆ ได้แสดงไว้ในรูปที่ 4.37

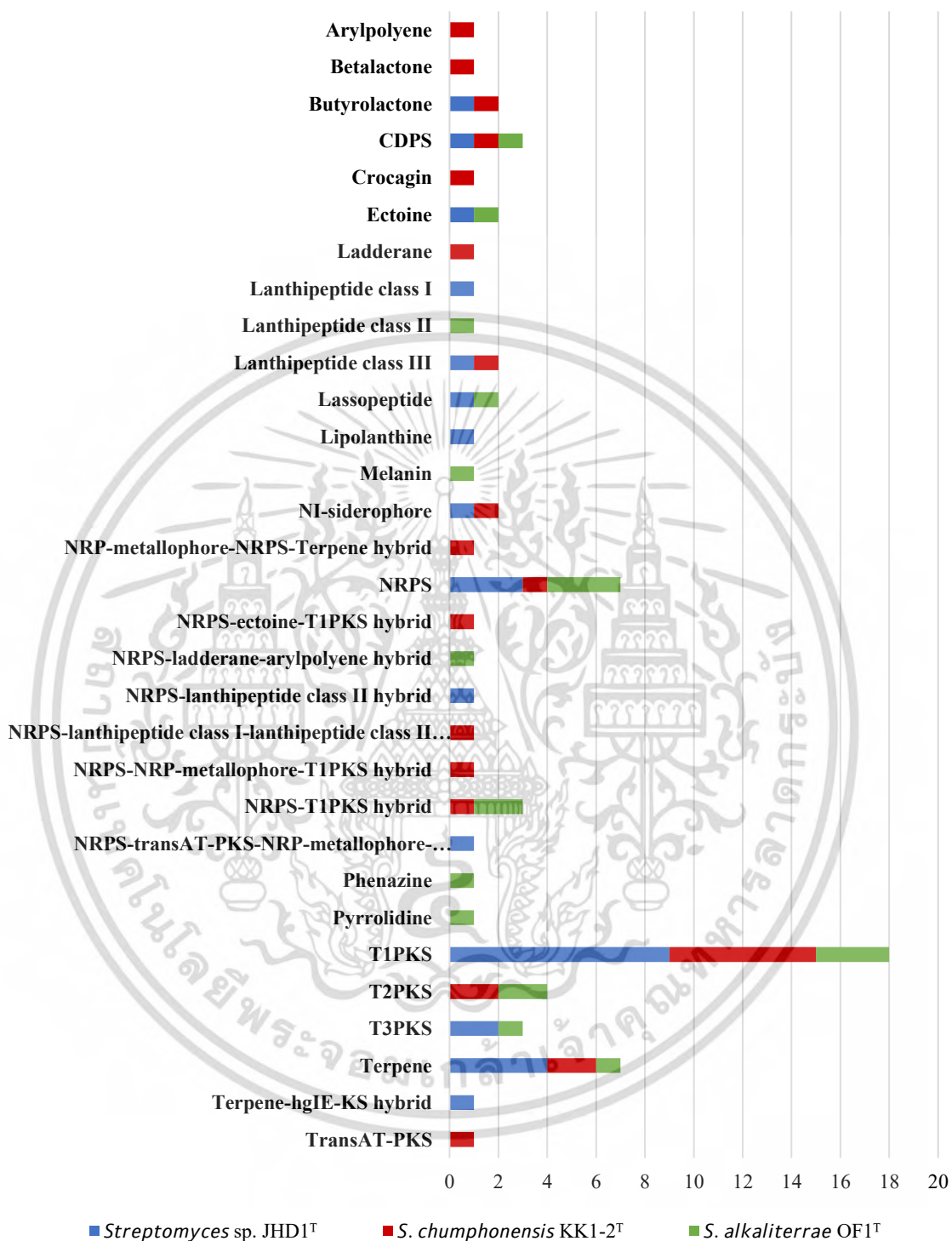


รูปที่ 4.37 ผลการทำนายหน้าที่ของจีโนมไอโซเลต JHD1^T วิเคราะห์ด้วยซอฟต์แวร์ออนไลน์ RAST (<https://rast.nmpdr.org/>)

ผลการทำนายกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิด้วยซอฟต์แวร์ออนไลน์ antiSMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org/>) (Blin *et al.*, 2021) แสดงให้เห็นว่าจีโนมของไอโซเลต JHD1^T และสายพันธุ์ใกล้เคียงประกอบด้วยกลุ่มยีนชนิด NRPS, PKS และ Terpene จำนวนมาก กลุ่มยีน NRPS และ PKS เป็นกลุ่มยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านการเจริญจุลชีพ (Borsetto *et al.*, 2019) และกลุ่มยีน Terpene เป็นกลุ่มยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพหลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านการเจริญจุลชีพ และฤทธิ์ต้านมะเร็ง เป็นต้น (Masyita *et al.*, 2022) โดยไอโซเลต JHD1^T และสายพันธุ์ใกล้เคียงประกอบด้วยกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิดังแสดงในตารางที่ 4.18 และ 4.19

การทำนายกลุ่มยีนผลิตสารทุติยภูมิที่พบในจีโนมของไอโซเลต JHD1^T ที่มีค่า Similarity มากกว่า 50% นั้นพบว่าสารทุติยภูมิหลายชนิดมีแนวโน้มน่าสนใจในการนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ทางด้านเวชสำอางและทางด้านอื่น ๆ ได้ เช่น Alkylresorcinol เป็นสารประกอบธรรมชาติที่พบมากในธัญพืชไม่ขัดสี ออกฤทธิ์ต้านจุลชีพ ต้านมะเร็ง ต้านไขมันในเลือด และต้านอนุมูลอิสระ (Zabolotneva *et al.*, 2022) Naringenin เป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งมีผลในการต้านการอักเสบและต้านการเกิดเนื้องอก (Álvarez-Álvarez *et al.*, 2015) Ectoine เป็นสารที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการนำมาประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้ เนื่องจากมีคุณสมบัติในการให้ความชุ่มชื้น และป้องกันรังสีอัลตราไวโอเล็ตได้ (Ma *et al.*, 2022) Sibiromycin มีคุณสมบัติในการต้านเนื้องอกได้ดี แต่มีความเป็นพิษต่อเซลล์หัวใจของสัตว์ (Li *et al.*, 2009) และ Isorenieratene สารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และป้องกันการทำร้ายจากรังสียูวี (Chen *et al.*, 2019)





รูปที่ 4.38 Biosynthetic gene clusters ในจีโนมของ JHD1^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง วิเคราะห์ด้วย antiSMASH version 7.0

ตารางที่ 4.18 แสดงกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ ($\geq 50\%$ similarity) ในจีโนมของไอโซเลต JHD1^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง

Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity (%)	MIBiG BGC-ID
<i>Streptomyces sp. JHD1^T</i>						
Region 7.1	T3PKS	110,517	151,692	Alkylresorcinol	100	BGC0000282
Region 8.1	T3PKS	72,656	113,747	Naringenin	100	BGC0001310
Region 12.2	Lipolanthine, lanthipeptide class III	265,886	299,952	SapB	75	BGC0000551
Region 33.1	Ectoine	1	5,498	Ectoine	50	BGC0000853
Region 34.1	NRPS	225,906	270,516	Sibiromycin	69	BGC0000428
Region 44.1	Terpene	1	15,687	Geosmin	100	BGC0001181
Region 45.2	Terpene	240,568	264,632	Isorenieratene	87	BGC0001456
<i>Streptomyces chumphonensis</i> KK1-2^T						
Region 1.2	NRPS, T1PKS, ectoine	110,663	175,514	Ectoine	100	BGC0002052
Region 1.4	Lanthipeptide class III	708,929	731,553	SRO15-2212	57	BGC0000553
Region 1.5	crocagin	800,484	823,293	Massinidine	66	BGC0002647
Region 5.1	NRPS	32,292	76,734	Diisonitrile antibiotic SF2768	66	BGC0001574
Region 8.1	T1PKS	79,108	119,567	Arsono-polyketide	64	BGC0001283
Region 10.1	Ladderane, arylpolyene	1	38,990	o-dialkylbenzene 1/o-dialkylbenzene 2	64	BGC0002441

ตารางที่ 4.18 (ต่อ) แสดงกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ ($\geq 50\%$ similarity) ในจีโนมของไอโซเลต JHD1^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง

Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity (%)	MIBiG BGC-ID
Region 12.2	NRP- metallophore, NRPS, terpene	135,099	210,149	Mirubactin	78	BGC0000392
Region 15.1	Terpene	1	14,644	Geosmin	100	BGC0001181
Region 29.2	T1PKS	267,007	304,194	Piericidin A1	91	BGC0000124
<i>Streptomyces alkaliterrae</i> OF1^T						
Region 7.1	Lanthipeptide class II	1	17,039	Birimositide	62	BGC0002110
Region 24.1	T1PKS	1	33,072	Thiolactomycin	90	BGC0001237
Region 68.1	lassopeptide	13,563	33,384	Citrulassin F	50	BGC0001552
Region 75.1	Terpene	1	12,400	Geosmin	100	BGC0001181
Region 124.1	pyrrolidine	3,007	31,342	Anisomycin	100	BGC0001510
Region 211.1	ectoine	1	6,929	Ectoine	75	BGC0002052
Region 334.1	NRPS, ladderane, arylpolyene	1	53,159	Cinnapeptin	64	BGC0002108
Region 556.1	T1PKS, T2PKS	1	46,103	Streptophenazine B, Streptophenazine C, Streptophenazine F, Streptophenazine G, Streptophenazine H	75	BGC0002010

ตารางที่ 4.18 (ต่อ) แสดงกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ ($\geq 50\%$ similarity) ในจีโนมของไอโซเลต JHD1^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง

Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity (%)	MIBiG BGC-ID
Region 613.1	T3PKS	1	17.908	Naringenin	100	BGC0001310

หมายเหตุ : MIBiG คือ Minimum Information about a Biosynthetic Gene Cluster



ตารางที่ 4.19 แสดงกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ ($\leq 50\%$ similarity) ในจีโนมของไอโซเลต JHD1^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง

Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity (%)	MIBiG BGC-ID
<i>Streptomyces</i> sp. JHD1 ^T						
Region 2.1	NRPS, transAT- PKS, NRP metallophore, butyrolactone	623	164,626	Phthoxazolin	20	BGC0001740
Region 3.1	Lanthipeptide class I	19,400	45,851	-	-	-
Region 4.1	CDPS	36,435	57,205	Echoside A/Echoside B/Echoside C/Echoside D/Echoside E	35	BGC0000340
Region 11.1	T1PKS	9,115	53,677	Chlorothricin/deschlorothricin	4	BGC0000036
Region 12.1	NRPS	129,545	175,982	Pyrruloformamide A/Pyrruloformamide B/Pyrruloformamide D/Pyrruloformamide C	8	BGC0002340
Region 14.1	Terpene	49,920	72,000	Hopene	30	BGC0000663
Region 16.1	T1PKS	61,402	90,519	Lavendiol	6	BGC0001649
Region 17.1	Lanthipeptide class I	66,199	84,909	Cacaoidin	7	BGC0002130
Region 23.1	Lasso peptide	169,239	191,571	Kendomycin B	9	BGC0002671

ตารางที่ 4.19 (ต่อ) แสดงกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ ($\leq 50\%$ similarity) ในจีโนมของไอโซเลต JHD1^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง

Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity (%)	MIBiG BGC-ID
Region 25.1	NRPS-independent-siderophore	48,323	63,132	-	-	-
Region 27.1	T1PKS	1	30,861	Coelimycin P1	29	BGC0000038
Region 28.1	T1PKS	1	48,398	X-14547	26	BGC0000079
Region 30.1	butyrolactone	31,590	45,524	Griseoviridin/fijimycin A	11	BGC0000459
Region 33.2	NRPS, lanthipeptide class II	7,876	32,771	SF2575	6	BGC0000269
Region 36.1	phosphonate	14,546	27,467	-	-	-
Region 37.1	Terpene	1	18,416	K-252a	14	BGC0000813
Region 41.1	T1PKS	1	18,203	Rifamycin	15	BGC0000137
Region 45.1	Terpene, hglE-KS	86,361	138,275	Accramycin A	8	BGC0002315
Region 47.1	T1PKS	1	12,397	Niphimycins C-E	29	BGC0001700
Region 48.1	T1PKS	1	11,420	Aculeximycin	23	BGC0000002
Region 54.1	T1PKS	1	5,489	-	-	-

ตารางที่ 4.19 (ต่อ) แสดงกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ ($\leq 50\%$ similarity) ในจีโนมของไอโซเลต JHD1^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง

Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity (%)	MIBiG BGC-ID
Region 56.1	Lanthipeptide class I	80,331	105,665	-	-	-
Region 57.1	T1PKS	1	5,183	Trichostatin RK	20	BGC0002364
Region 60.1	T1PKS	1	4,330	Lasalocid	40	BGC0001648
Region 61.1	NRPS	1	4,141	-	-	-
Region 62.1	T1PKS	1	3,613	-	-	-
Region 65.1	T1PKS	1	2,967	-	-	-
Region 66.1	T1PKS	1	2,937	-	-	-
Region 78.1	NRPS	2	52,427	Pyrruloformamide A/Pyrruloformamide B/Pyrruloformamide D/Pyrruloformamide C	45	BGC0002340
Region 78.2	NRPS-independent siderophore	111,145	127,405	Nonactin/Monactin/143ynactin/Trinactin /Tetranactin	33	BGC0000244
<i>Streptomyces chumphonensis</i> KK1-2^T						
Region 1.1	transAT-PKS	16,927	95,509	Lagriamide	9	BGC0001646
Region 1.3	NRPS-independent-siderophore	250,565	266,816	Nonactin/Monactin/143ynactin/Trinactin /Tetranactin	33	BGC0000244

ตารางที่ 4.19 (ต่อ) แสดงกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ ($\leq 50\%$ similarity) ในจีโนมของไอโซเลต JHD1^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง

Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity (%)	MIBiG BGC-ID
Region 11.1	NRPS, lanthipeptide class I, lanthipeptide class II	20,210	73,888	Argimycin PI, Argimycin PII, Nigrifactin, Argimycin PIV, Argimycin PV, Argimycin PVI, Argimycin PIX	8	BGC0001433
Region 12.1	T2PKS	6,838	79,107	Hiroshidine	41	BGC0001960
Region 12.3	terpene	264,024	286,014	Hopene	30	BGC0000663
Region 12.4	NRPS, T1PKS	522,691	566,031	Friulimicin A, Friulimicin B, Friulimicin C, Friulimicin D	9	BGC0000354
Region 13.1	T1PKS	38,500	91,497	Pyrrolomycin A, Pyrrolomycin B, Pyrrolomycin C, Pyrrolomycin D	40	BGC0000130
Region 22.1	T1PKS	1	2,874	Nocamycin V	20	BGC0002649
Region 23.1	Lanthipeptide class III m thiopeptide, LAP	378,586	428,740	-	-	-
Region 23.2	betalactone	438,781	458,923	A-500359 A, A-500359 B	5	BGC0000949
Region 25.1	T1PKS	1	2,542	-	-	-
Region 27.1	butyrolactone	278,150	289,058	Streptonigrin	5	BGC0001783
Region 27.2	T1PKS	394,317	425,142	Fluvirucin B2	11	BGC0001597

ตารางที่ 4.19 (ต่อ) แสดงกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ ($\leq 50\%$ similarity) ในจีโนมของไอโซเลต JHD1^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง

Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity (%)	MIBiG BGC-ID
Region 29.1	NRPS-independent-siderophore	68,596	83,262	-	-	-
Region 30.1	T1PKS	1	47,303	lorneic acid A	23	BGC0001200
Region 30.2	other	108,822	149,922	loseolamycin A1, Loseolamycin A2	12	BGC0002362
Region 31.1	NRP-metallophore, NRPS, T1PKS	60,481	134,351	Incednine	5	BGC0000078
Region 32.1	CDPS	26,119	46,859	Primycin	5	BGC0001447
Region 32.2	T2PKS	183,082	237,461	Griseusin	25	BGC0002143
<i>Streptomyces alkaliterrae</i> OF1^T						
Region 10.1	NRPS-independent-siderophore	1	11,183	-	-	-
Region 11.1	GDPS	1	15,674	Lobosamide A, Lobosamide B, Lobosamide C	4	BGC0001303
Region 32.1	NRPS	1	14,997	Thiazostatin, Watasemycin A, Watasemycin B, 2-hydroxyphenylthiazoline Enantiopyochelin, Isopyochelin	13	BGC0001801

ตารางที่ 4.19 (ต่อ) แสดงกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ ($\leq 50\%$ similarity) ในจีโนมของไอโซเลต JHD1^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง

Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity (%)	MIBiG BGC-ID
Region 35.1	NRPS, T1PKS	1	37,791	Crochelin A	12	BGC0002001
Region 37.1	NRPS	1	14,600	Thiocoraline	15	BGC0000445
Region 59.1	guanidinotides	1	13,402	-	-	-
Region 85.1	terpene	1	11,770	-	-	-
Region 180.1	phenazinr	1	7,721	Streptophenazine B, Streptophenazine C, Streptophenazine F, Streptophenazine G, Streptophenazine H	17	BGC0002010
Region 186.1	NRPS-independent-siderophore	1	7,632	-	-	-
Region 208.1	NRPS	1	7,098	-	-	-
Region 212.1	melanin	5,331	15,723	Melanin	28	BGC0000908
Region 226.1	Terpene	1	6,795	-	-	-
Region 246.1	T1PKS, NRPS	1	27,778	Conglobatin	10	BGC0001215
Region 412.1	T2PKS	1	24,445	Collinomycin	20	BGC0000266
Region 479.1	Terpene	9,098	23,654	-	-	-
Region 545.1	Other, T1PKS	1	22,530	Tambjamine BE-18591	14	BGC0002381
Region 601.1	NRPS	1	19,282	Clifenamide A	30	BGC0001553
Region 606.1	Terpene	1	14,329	-	-	-

หมายเหตุ : MIBiG คือ Minimum Information about a Biosynthetic Gene Cluster

4.5.4 ลักษณะที่แตกต่างกันของไอโซเลต JHD1^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง

ลักษณะทางฟีโนไทป์ที่แตกต่างกัน ของไอโซเลต JHD1^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง ได้แก่ ความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ ความสามารถในการเจริญในสภาวะกรด-ด่าง ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ การย่อยแป้ง การย่อยสลายยูเรีย การย่อยสลายเจลาติน การผลิตเมลานิน การรีดิวซ์ไนเตรต การผลิตเอนไซม์ออกซิเดส ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน ได้แก่ Cellobiose, Dextran, Fructose, Glycerol, Myo-Inositol, Inulin, Lactose, Mannitol, Mannose, Melibiose, Raffinose, Rhamnose, Salicin, Sucrose และ Xylitol การผลิตกรดจากแหล่งคาร์บอน ได้แก่ Arabinose, Cellobiose, Dextran, Fructose, Galactose, Glycerol, Myo-Inositol, Lactose, Mannitol, Mannose, Melibiose, Raffinose, Rhamnose, Salicin, Sucrose, Trehalose, Xylitol และ Xylose ความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจน ได้แก่ 2-Aminobutyric acid, Arginine, Histidine, 4-Hydroxyproline, Methionine, Proline, Serine และ Valine ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ ได้แก่ Alkaline phosphatase, Esterase (C 4), Esterase Lipase (C 8), Trypsin, Acid phosphatase, α -glucosidase และ β -glucosidase (ตารางที่ 4.20) นอกจากนี้ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีที่แตกต่างกันของไอโซเลต JHD1^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง ได้แก่ ชนิดของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ ชนิดของกรดไขมันหลัก และชนิดของมีนาควิโนน ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน 16S rRNA ในฐานข้อมูล EzBioCloud พบว่า Similarity value ระหว่างไอโซเลต JHD1^T และสายพันธุ์ใกล้เคียงมีค่าต่ำกว่า 98.7% ซึ่งเป็นเกณฑ์ที่ได้รับการยอมรับว่ามีแนวโน้มเป็นเชื้อต่างสปีชีส์กัน (Stackebrandt & Ebers, 2006) และการวิเคราะห์ระหว่างจีโนมของไอโซเลต JHD1^T และสายพันธุ์ใกล้เคียงพบว่ามีค่า DDH similarity ต่ำกว่า 70% ระบุได้ว่าเชื้อทั้งสองเป็นเชื้อต่างสปีชีส์กัน (Goris *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2013; Wayne *et al.*, 1987; Tindall *et al.*, 2010) อีกทั้งยังมีค่า ANI และ AAI ต่ำกว่า 95% ซึ่งถือว่ามีชีวิตทั้งสองชนิดที่เปรียบเทียบกันเป็นสิ่งมีชีวิตต่างสปีชีส์ (Teeling *et al.*, 2004; Goris *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2013; Richter & Rosselló-Mora, 2009; Konstantinidis *et al.*, 2017; Figueras *et al.*, 2014) จากความแตกต่างของลักษณะทางอนุกรมวิธานหลายส่วนและการวิเคราะห์ข้อมูลทางจีโนมไทป์แสดงให้เห็นว่าไอโซเลต JHD1^T จัดเป็นแอกติโนแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Streptomyces*

ตารางที่ 4.20 ลักษณะทางฟีโนไทป์ของไอโซเลต JHD1^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง

Characteristics	<i>Streptomyces</i> sp. JHD1 ^T	<i>Streptomyces</i> <i>alkaliterrae</i> NCIMB 15195 ^T	<i>Streptomyces</i> <i>chumphonensis</i> KK1-2 ^T
Tolerance tests:			
NaCl % w/v tolerance	0-10	0-8	0-10

ตารางที่ 4.20 (ต่อ) ลักษณะทางฟีโนไทป์ของไอโซเลต JHD1^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง

Characteristics	<i>Streptomyces</i> sp. JHD1 ^T	<i>Streptomyces</i> <i>alkaliterrae</i> NCIMB 15195 ^T	<i>Streptomyces</i> <i>chumphonensis</i> KK1-2 ^T
pH range	6-8	6-12	6-8
Temperature range (°C)	20-37	12-40	12-40
Biochemical test:			
Starch hydrolysis	+	-	+
Hydrolysis of urea	+	+	-
Gelatin liquefaction	+	+	-
Melanin production	-	+	-
Nitrate reduction	-	-	+
Oxidase activity	+	-	-
Carbon utilization:			
D-cellobiose	w	+	-
Dextran	+	-	-
D-fructose	w	+	-
Glycerol	w	+	-
Myo-inositol	-	+	-
Inulin	-	w	-
D-lactose	+	-	-
D-mannitol	-	+	-
D-mannose	+	+	w
D-melibiose	-	+	-
D-raffinose	-	+	-
L-rhamnose	-	+	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.20 (ต่อ) ลักษณะทางฟีโนไทป์ของไอโซเลต JHD1^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง

Characteristics	<i>Streptomyces</i> sp. JHD1 ^T	<i>Streptomyces</i> <i>alkaliterrae</i> NCIMB 15195 ^T	<i>Streptomyces</i> <i>chumphonensis</i> KK1-2 ^T
Salicin	+	-	+
Sucrose	-	+	-
Xylitol	+	-	-
Acid production from carbon source:			
Arabinose	-	-	w
Cellobiose	+	+	-
Dextran	+	+	-
Fructose	w	+	+
Galactose	-	+	-
Glycerol	+	+	w
Myo-Inositol	-	+	-
Lactose	-	+	-
Mannitol	-	w	-
Mannose	w	w	-
Melibiose	-	w	-
Raffinose	-	w	-
Rhamnose	-	+	-
Salicin	-	w	-
Sucrose	-	w	w
Trehalose	-	+	-
Xylitol	-	+	-
Xylose	-	+	-
Nitrogen Utilization:			
2-Aminobutyric acid	-	w	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.20 (ต่อ) ลักษณะทางฟีโนไทป์ของไอโซเลต JHD1^T และสายพันธุ์ใกล้เคียง

Characteristics	<i>Streptomyces</i> sp. JHD1 ^T	<i>Streptomyces</i> <i>alkaliterrae</i> NCIMB 15195 ^T	<i>Streptomyces</i> <i>chumphonensis</i> KK1-2 ^T
Arginine	w	+	+
Histidine	w	+	+
4-Hydroxyproline	w	w	-
Methionine	w	w	-
Proline	w	+	-
Serine	w	w	-
Valine	w	w	-
Enzymatic activity:			
Alkaline phosphatase	w	+	+
Esterase (C 4)	w	+	+
Esterase Lipase (C 8)	w	+	+
Trypsin	-	w	-
Acid phosphatase	-	+	-
α -glucosidase	-	+	+
β -glucosidase	-	-	w

หมายเหตุ : สัญลักษณ์ +, positive; w, weak; -, negative; ND, Not detected

*, ข้อมูลจาก Yu *et al.* (2018)

4.5.5 คำอธิบายของ *Streptomyces* sp. JHD1^T

การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานแบบหลายส่วนสามารถอธิบายได้ว่า *Streptomyces* sp. JHD1^T เป็นแบคทีเรียแกรมบวกสร้างเส้นใย ต้องการอากาศในการเจริญ สปอร์มีการจัดเรียงตัวแบบเกลียวและสปอร์มีพื้นผิวค่อนข้างเรียบ เจริญได้ดีบนอาหารชนิด ISP 2, ISP 4 และ ISP 6 เจริญได้ปานกลางบนอาหาร ISP 5, ISP 7 และ Nutrient agar เจริญได้ไม่ดีบนอาหาร Glucose asparagine agar และ Czapek's sucrose agar และไม่เจริญบนอาหาร ISP 3 พบสีของรงควัตถุที่ละลายน้ำโทนสีเหลืองได้ในทุกอาหารทดสอบที่มีการเจริญ ยกเว้นอาหารทดสอบสูตร Glucose asparagine agar เจริญที่อุณหภูมิ 20-37 °C และเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 °C เจริญได้ในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์สูงสุด 10% (w/v) เจริญได้ในสภาวะกรด-ด่างช่วง pH 6-8 และเจริญได้ดีที่สุดที่ระดับ pH 7 ให้ผลบวกในการทดสอบการย่อยแป้ง (Starch hydrolysis) การย่อยสลายยูเรีย (Hydrolysis of urea) การย่อยเจลาติน (Gelatin liquefaction) การย่อยโปรตีนนม (Peptonization of milk) การผลิตเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase production) และการผลิตเอนไซม์คะตะเลส (Production of catalase) แต่ให้ผลลบในการทดสอบ การตกตะกอนโปรตีนนม (Milk coagulation) การสร้างเมลานิน (Melanin production) การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H₂S Production) และการรีดิวซ์ไนเตรต (Reduction of nitrate) มีความสามารถในการย่อยสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำ Hypoxanthine, Tween 80 และ Chitin แต่ไม่สามารถย่อย Adenine, Carboxymethylcellulose, Cellulose, Tyrosine, Xanthine และ Xylan ได้ ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่สามารถใช้ในการเจริญเติบโตได้ดี ได้แก่ Dextran, Glucose, Lactose, Mannose, Salicin และ Xylitol ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเจริญได้ไม่ดี ได้แก่ Cellobiose, Fructose และ Glycerol แต่ไม่สามารถใช้ Arabinose, Galactose, Myo-Inositol, Inulin, Mannitol, Melibiose, Raffinose, Rhamnose, Ribose, Sucrose, Trehalose และ Xylose เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในการเจริญได้ ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่สามารถใช้ในการเจริญได้ดี คือ Asparagine ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการเจริญได้ไม่ดี ได้แก่ Arginine, Histidine, 4-Hydroxyproline, Methionine, Proline, Serine, Threonine, Valine แต่ไม่สามารถใช้ 2-Aminobutyric acid, Cysteine และ Phenylalanine เป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อใช้ในการเจริญได้ สามารถผลิตกรดจากแหล่งคาร์บอนหลายชนิด ได้แก่ Dextran, Glucose, Cellobiose, Glycerol และ Ribose ผลิตกรดได้เล็กน้อยจากแหล่งคาร์บอนที่เป็น Mannose และ Fructose แต่ไม่สามารถผลิตกรดจากการใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็น Lactose, Salicin, Xylitol, Arabinose, Galactose, Myo-Inositol, Inulin, Mannitol, Melibiose, Raffinose, Rhamnose, Sucrose, Trehalose และ Xylose การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ด้วย API ZYME System พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ Leucine arylamidase และ Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase พบกิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase, Esterase (C 4), Esterase Lipase (C 8), Lipase (C 14), Valine arylamidase และ Cystine arylamidase ได้เล็กน้อย แต่ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ Trypsin, α -chymotrypsin, Acid phosphatase, α -galactosidase, β -

galactosidase, β -glucuronidase, α -glucosidase, β -glucosidase, N-acetyl- β -glucosaminidase, α -mannosidase และ α -fucosidase ผนังเซลล์ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดไโตอะมิโนพิเมลิกแบบ LL-DAP มีนาควิโนนหลัก ได้แก่ MK-9(H₂), MK-9(H₄), MK-9(H₆) และ MK-9(H₈) น้ำตาลในเซลล์ทั้งหมดประกอบด้วย Ribose และ Glucose ไขมันมีไข้วในเซลล์ประกอบด้วย Diposphatidylglycerol (DPG), Phosphatidylethanolamine (PE), Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylinositol (PI) และ Phosphatidylinositol mannoside (PIM) ชนิดของกรดไขมันหลักในเซลล์ ได้แก่ *anteiso*-C_{15:0}, *iso*-C_{16:0} และ *anteiso*-C_{17:0}

4.6 การแยกสารทุติยภูมิให้บริสุทธิ์และการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

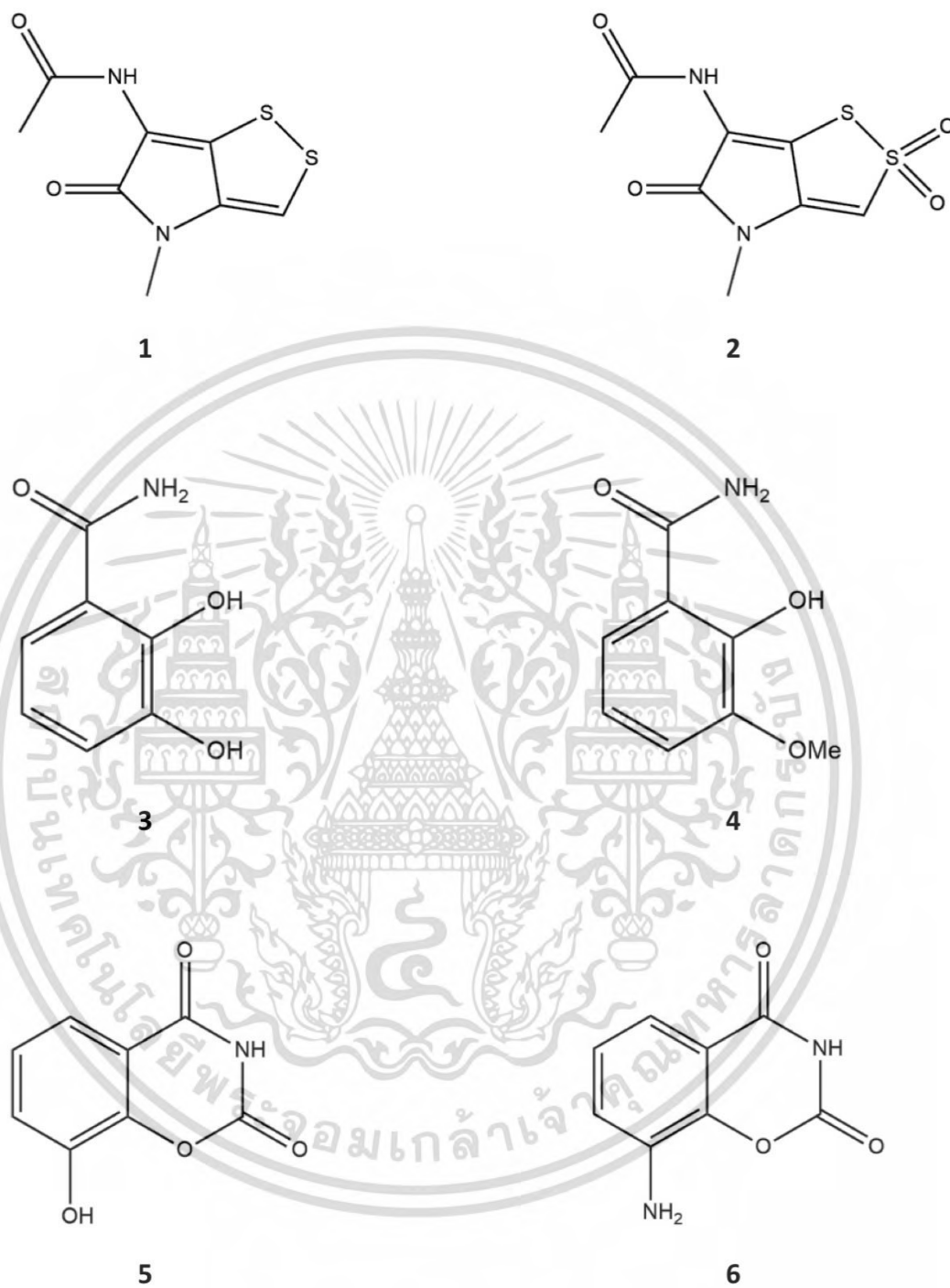
4.6.1 การแยกสารทุติยภูมิให้บริสุทธิ์

สืบเนื่องจากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบที่ผลิตโดย *Streptomyces* sp. JHD1^T ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อก่อโรค จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารทุติยภูมิที่ผลิตโดยไอโซเลต JHD1^T มีแนวโน้มที่ดีต่อการนำไปประยุกต์ใช้ทางเวชสำอาง ผู้ทดลองจึงมีความสนใจนำสารสกัดหยาบของไอโซเลต JHD1^T มาทำให้บริสุทธิ์ ติดตามฤทธิ์ทางชีวภาพ และพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีของสารทุติยภูมิที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ การแยกสารสกัดหยาบให้ได้สารบริสุทธิ์ตามวิธีการข้างต้นทำให้ได้สารทุติยภูมิบริสุทธิ์จำนวน 6 ตัวอย่าง โดยระบุให้เป็นสาร 1-6 โดยมีรายละเอียดดังนี้

4.6.2 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์

การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์โดยอาศัยเทคนิค NMR สเปกโทรสโกปี ทำให้ทราบโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ทั้ง 6 ตัวอย่างดังแสดงในภาพที่ 4.41 ประกอบด้วย N-(4-methyl-5-oxodithiolo[4,3-b]pyrrol-6-yl)acetamide, Thiolutin (สาร 1), 2,2-dioxidothiolutin (สาร 2), 2,3-dihydroxybenzamide, Catecholamide (สาร 3), 2-hydroxy-3-methoxybenzamide (สาร 4), 8-hydroxy-1,3-benzoxazine-2,4-dione, Benadrostin (สาร 5) และ 8-amino-1,3-benzoxazine-2,4-dione (สาร 6) โดยสาร 2 สามารถยืนยันโครงสร้างโดยใช้เทคนิควิเคราะห์การเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ (X-ray crystallography) แบบ 3 มิติเป็นครั้งแรก การวิเคราะห์ข้อมูลทางเคมีโดยใช้ฐานข้อมูล SciFinder ทำให้ทราบว่ามีการพบสาร 2 ชนิดที่พบว่าเป็นสารใหม่ คือ 2-hydroxy-3-methoxybenzamide (สาร 4) และ 8-amino-1,3-benzoxazine-2,4-dione (สาร 6) นอกจากนี้พบว่าเป็นสารประกอบทางชีวภาพที่มีผู้รายงานไว้แล้วจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ N-(4-methyl-5-oxodithiolo[4,3-b]pyrrol-6-yl)acetamide, Thiolutin (สาร 1) (Šturdíková *et al.*, 1990), 2,2-dioxidothiolutin (สาร 2) (Song *et al.*, 2022), 2,3-dihydroxybenzamide, Catecholamide (สาร 3) (Cheng *et al.*, 2017) และ 8-hydroxy-1,3-benzoxazine-2,4-dione, Benadrostin (สาร 5) (Aoyagi *et al.*, 1988) ข้อมูลของสารทุติยภูมิบริสุทธิ์ทั้ง 6 ชนิด ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีมีรายละเอียด ดังนี้

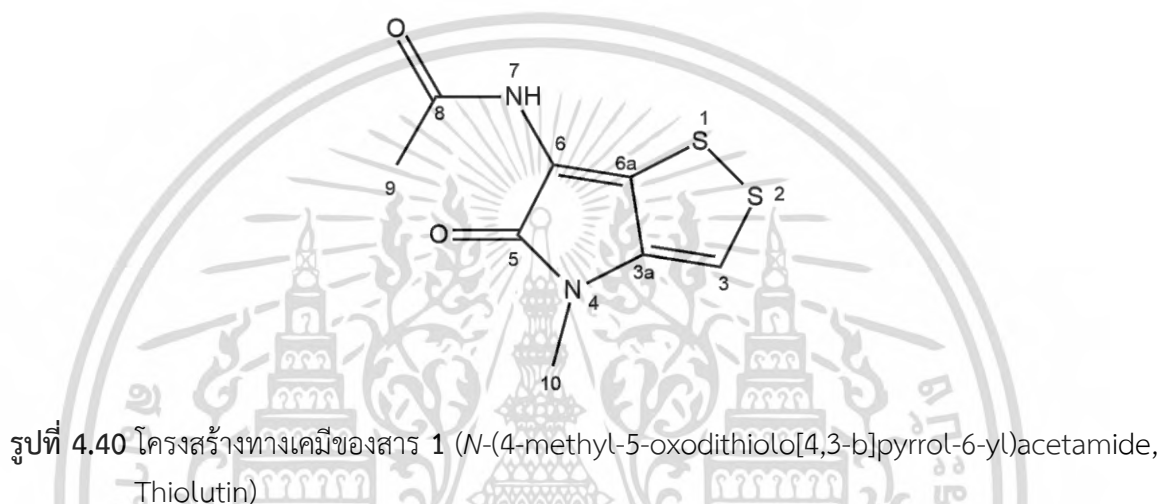
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.39 โครงสร้างทางเคมีของสาร 1-6 ที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. JHD1^T

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาร 1 (*N*-(4-methyl-5-oxodithiolo[4,3-*b*]pyrrol-6-yl)acetamide, Thiolutin) เป็นสารประกอบที่มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลือง สูตรโมเลกุลคือ $C_8H_8N_2O_2S_2$ (Molecular Weight: 228.29) ดูดกลืนแสงได้ดีที่สุดที่ความยาวคลื่น 388 nm เป็นสารประกอบทางชีวภาพที่พบใน *Saccharothrix algeriensis* (Huang *et al.*, 2015), *Streptomyces kasugaensis* และ *Streptomyces celluloflavus* (Šturdíková *et al.*, 1990) จากรายงานก่อนหน้าพบว่า มีฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบหลายชนิด (Song *et al.*, 2022)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

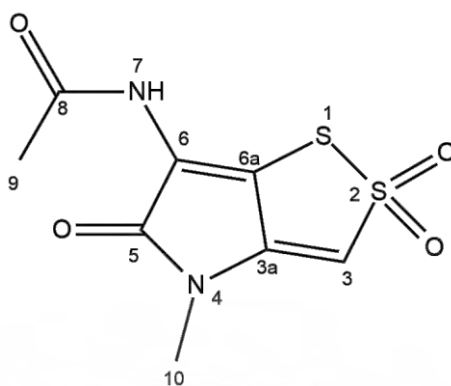
ตารางที่ 4.21 ข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR สเปกตรัม ของสาร 1

ตำแหน่ง	สาร 1 ^a		N-(4-methyl-5-oxodithiolo[4,3-b]pyrrol-6-yl)acetamide, Thiolutin ^b (Song <i>et al.</i> , 2022)	
	δ_c (ppm), ชนิดของคาร์บอน	δ_H (ppm), รูปแบบของสัญญาณ	δ_c (ppm), ชนิดของคาร์บอน	δ_H (ppm), รูปแบบของสัญญาณ
3	110.9, CH	7.34, s, 1H	111.0, CH	7.34, s, 1H
3a	136.0, C	-	136.0, C	-
5	166.1, C	-	166.1, C	-
6	114.8, C	-	114.8, C	-
6a	132.4, C	-	132.4, C	-
8	168.8, C	-	168.8, C	-
9	22.4, CH ₃	2.02, s, 3H	22.4, CH ₃	2.02, s, 3H
10	27.5, CH ₃	3.25, s, 3H	27.5, CH ₃	3.25, s, 3H
NH	-	10.0, bs, 1H	-	9.99, s, 1H

หมายเหตุ : ^a คือ วิเคราะห์ด้วยเครื่อง ^1H NMR 400 MHz และ ^{13}C NMR 100 MHz (DMSO-*d*₆)

^b คือ วิเคราะห์ด้วยเครื่อง ^1H NMR 500 MHz และ ^{13}C NMR 125 MHz (DMSO-*d*₆)

สาร 2 (2,2-dioxidothiolutin) เป็นสารประกอบที่มีลักษณะเป็นผลึกสีส้ม สูตรโมเลกุลคือ C₈H₈N₂O₄S₂ (Molecular Weight: 260.29) ดูดกลืนแสงได้ดีที่สุดที่ความยาวคลื่น 301 nm และสาร 2 ถูกยืนยันโครงสร้างโดยใช้เทคนิควิเคราะห์ด้วยเทคนิค X-ray crystallography เป็นครั้งแรก เป็นสารประกอบทางชีวภาพที่พบใน *Streptomyces* sp. BTBU20218885 (Song *et al.*, 2022) จากรายงานก่อนหน้าพบว่า มีฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบหลายชนิด (Song *et al.*, 2022)



รูปที่ 4.41 โครงสร้างทางเคมีของสาร 2 (2,2-dioxidothiolutin)

ตารางที่ 4.22 ข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR สเปกตรัม ของสาร 2

ตำแหน่ง	สาร 2 ^a		2,2-dioxidothiolutin ^b (Song <i>et al.</i> , 2022)	
	δ_c (ppm), ชนิดของ คาร์บอน	δ_H (ppm), รูปแบบของ สัญญาณ	δ_c (ppm), ชนิดของ คาร์บอน	δ_H (ppm), รูปแบบของ สัญญาณ
3	109.6, CH	7.57, s, 1H	109.6, CH	7.56, s, 1H
3a	145.5, C	-	145.5, C	-
5	164.3, C	-	164.3, C	-
6	123.1, C	-	114.1, C	-
6a	114.5, C	-	123.1, C	-
8	170.5, C	-	170.5, C	-
9	22.6, CH ₃	2.10, s, 3H	22.6, CH ₃	2.10, s, 3H
10	27.9, CH ₃	3.10, s, 3H	27.9, CH ₃	3.10, s, 3H
NH	-	8.27, s, 1H	-	-

หมายเหตุ : ^a คือ วิเคราะห์ด้วยเครื่อง ^1H NMR 400 MHz และ ^{13}C NMR 100 MHz (DMSO-*d*₆)

^b คือ วิเคราะห์ด้วยเครื่อง ^1H NMR 500 MHz และ ^{13}C NMR 125 MHz (DMSO-*d*₆)

สาร 3 (2,3-dihydroxybenzamide, Catecholamide) สูตรโมเลกุลคือ $C_7H_7NO_3$ (Molecular Weight: 153.14) ดูดกลืนแสงได้ดีที่สุดที่ความยาวคลื่น 320 nm เป็นสารประกอบที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาลเข้ม เป็นสารประกอบทางชีวภาพที่ผลิตโดยแอคติโนแบคทีเรียสกุล *Streptomyces* (Cheng *et al.*, 2017) จากรายงานก่อนหน้าพบว่า มีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของมนุษย์ชนิด HL-60 (Promyelocytic leukemic cell line, HL 60) และ เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ในมนุษย์ชนิด HT-29 (Human colon adenocarcinoma, HT-29) (Cheng *et al.*, 2017) นอกจากนี้ยังพบว่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี (Sugiyama & Hirota, 2009)



รูปที่ 4.42 โครงสร้างทางเคมีของสาร 3 (2,3-dihydroxybenzamide, Catecholamide)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

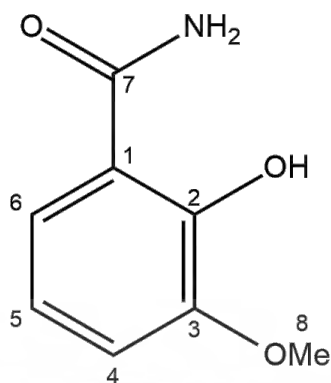
ตารางที่ 4.23 ข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR สเปกตรัม ของสาร 3

ตำแหน่ง	สาร 3 ^a		2,3-dihydroxybenzamide, Catecholamide ^b (Cheng <i>et al.</i> , 2017)	
	δ_c (ppm), ชนิดของ คาร์บอน	δ_H (ppm), รูปแบบของ สัญญาณ	δ_c (ppm), ชนิดของ คาร์บอน	δ_H (ppm), รูปแบบของ สัญญาณ
1	115.9, C	-	113.5, C	-
2	151.0, C	-	150.5, C	-
3	147.3, C	-	145.9, C	-
4	120.1, CH	6.96, dd, 1H ($J = 7.8, 1.1$)	120.5, CH	6.98, dd, 1H ($J = 7.8, 1.6$)
5	119.5, CH	6.72, t, 1H ($J = 8.0$)	118.4, CH	6.71, t, 1H ($J = 7.8$)
6	119.5, CH	7.24, dd, 1H ($J = 8.1, 1.0$)	120.0, CH	7.24, dd, 1H ($J = 7.8, 1.6$)
7	174.4, C	-	172.5, C	-

หมายเหตุ : ^a คือ วิเคราะห์ด้วยเครื่อง ^1H NMR 400 MHz และ ^{13}C NMR 100 MHz (CD_3OD)

^b คือ วิเคราะห์ด้วยเครื่อง ^1H NMR 600 MHz และ ^{13}C NMR 150 MHz ($\text{DMSO}-d_6$)

สาร 4 (2-hydroxy-3-methoxybenzamide) สูตรโมเลกุลคือ $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_3$ (Molecular Weight: 167.16) ดูดกลืนแสงได้ดีที่สุดที่ความยาวคลื่น 310 nm เป็นสารประกอบที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว เป็นสารประกอบที่ยังไม่พบรายงานว่าสารชนิดนี้ผลิตจากสิ่งมีชีวิต อีกทั้งจากฐานข้อมูล SciFinder (มีนาคม 2566) ยังไม่พบรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบชนิดนี้



รูปที่ 4.43 โครงสร้างทางเคมีของสาร 4 (2-hydroxy-3-methoxybenzamide)

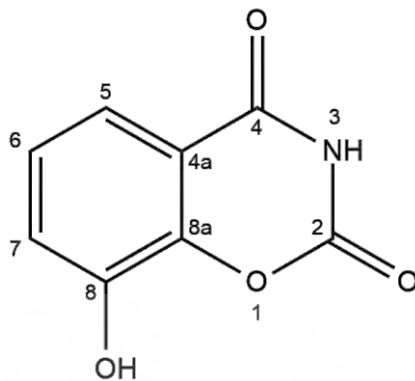
ตารางที่ 4.24 ข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR สเปกตรัม ของสาร 4

ตำแหน่ง	สาร 4 ^a (2-hydroxy-3-methoxybenzamide)	
	δ_c (ppm), ชนิดของคาร์บอน	δ_H (ppm), รูปแบบของสัญญาณ
1	116.6, C	-
2	151.5, C	-
3	149.9, C	-
4	116.5, CH	7.11, dd, 1H ($J = 8.00, 1.3$)
5	119.6, CH	6.84, t, 1H ($J = 8.1$)
6	121.1, CH	7.39, dd, 1H ($J = 8.2, 1.4$)
7	173.5, C	-
8	56.7, CH ₃	3.87, s, 3H

หมายเหตุ : ^a คือ วิเคราะห์ด้วยเครื่อง ^1H NMR 400 MHz และ ^{13}C NMR 100 MHz (CD₃OD)

สาร 5 (8-hydroxy-1,3-benzoxazine-2,4-dione , Benadrostin) สูตรโมเลกุลคือ C₈H₅NO₄ (Molecular Weight: 179.13) ดูดกลืนแสงได้ดีที่สุดที่ความยาวคลื่น 222 nm เป็นสารประกอบที่มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว เป็นสารประกอบทางชีวภาพที่พบใน *Streptomyces flavovirens* (Aoyagi *et al.*, 1988) จากรายงานก่อนหน้าพบว่ามีความสัมพันธ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ poly(ADP-ribose) synthetase (PARS) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีผลก่อให้เกิดการอักเสบของเซลล์ และเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพต่าง ๆ เช่น โรคหลอดเลือดสมอง (stroke) ภาวะกล้ามเนื้อหัวใจและลำไส้ขาดเลือด (myocardial and intestinal ischaemia-reperfusion) และ โรคเบาหวาน (diabetes mellitus) (Aoyagi *et al.*, 1988; Szabó & Dawson, 1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.44 โครงสร้างทางเคมีของสาร 5 (8-hydroxy-1,3-benzoxazine-2,4-dione , Benadrostin)

ตารางที่ 4.25 ข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR สเปกตรัม ของสาร 5

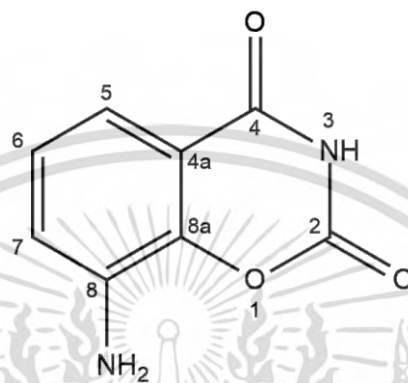
ตำแหน่ง	สาร 5 ^a		8-hydroxy-1,3-benzoxazine-2,4-dione , Benadrostin ^b (Yoshida <i>et al.</i> , 1988)	
	δ_c (ppm), ชนิดของ คาร์บอน	δ_H (ppm), รูปแบบของ สัญญาณ	δ_c (ppm), ชนิดของ คาร์บอน	δ_H (ppm), รูปแบบของ สัญญาณ
2	148.1, C	-	147.6, C	-
4	162.6, C	-	161.9, C	-
4a	115.9, C	-	116.7, C	-
5	121.6, CH	7.23, d, 1H ($J = 7.5$)	118.1, CH	7.48, dd, 1H ($J = 8.5, 1.5$)
6	124.6, CH	7.14, t, 1H ($J = 7.8$)	126.0, CH	7.25, t, 1H ($J = 8.5$)
7	115.9, CH	7.30, d, 1H ($J = 7.6$)	123.2, CH	7.32, dd, 1H ($J = 8.5, 1.5$)
8	145.4, C	-	145.9, C	-
8a	142.9, C	-	143.7, C	-
NH	-	8.38, bs, 1H	-	10.67, bs, 1H
8-OH	-	-	-	9.21, bs, 1H

หมายเหตุ : ^a คือ วิเคราะห์ด้วยเครื่อง ^1H NMR 400 MHz และ ^{13}C NMR 100 MHz (DMSO- d_6)

^b คือ วิเคราะห์ด้วยเครื่อง ^1H NMR 400 MHz และ ^{13}C NMR 100 MHz (Me₂CO- d_6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาร 6 (8-amino-1,3-benzoxazine-2,4-dione) สูตรโมเลกุลคือ $C_8H_6N_2O_3$ (Molecular Weight: 178.14) ดูดกลืนแสงได้ดีที่สุดที่ความยาวคลื่น 225 nm เป็นสารประกอบที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว เป็นสารประกอบที่ยังไม่พบรายงานว่าสารชนิดนี้ผลิตจากสิ่งมีชีวิต อีกทั้งจากฐานข้อมูล SciFinder (มีนาคม 2566) ยังไม่พบรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบชนิดนี้



รูปที่ 4.45 โครงสร้างทางเคมีของสาร 6 (8-amino-1,3-benzoxazine-2,4-dione)

ตารางที่ 4.26 ข้อมูล 1H NMR และ ^{13}C NMR สเปกตรัม ของสาร 6

ตำแหน่ง	สาร 6 ^a (8-amino-1,3-benzoxazine-2,4-dione)	
	δ_c (ppm), ชนิดของคาร์บอน	δ_H (ppm), รูปแบบของสัญญาณ
2	159.7, C	-
4	166.3, C	-
4a	118.3, C	-
5	116.0, CH	7.28, dd, 1H ($J = 6.6, 2.71$)
6	124.5, CH	7.13, t, 1H ($J = 8.0$)
7	119.6, CH	7.15, d, 1H ($J = 8.0$)
8	144.8, C	-
8a	142.6, C	-
NH	-	8.06, s, 1H
8-NH ₂	-	8.06, 10.38, 2H

หมายเหตุ : ^a คือ วิเคราะห์ด้วยเครื่อง 1H NMR 400 MHz และ ^{13}C NMR 100 MHz (DMSO- d_6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารทุติยภูมิจาก *Streptomyces* sp. JHD1^T

4.7.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay ของสารทุติยภูมิที่แยกได้จาก *Streptomyces* sp. JHD1^T แสดงไว้ดังตารางที่ 4.27 จากผลการทดสอบดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสาร 3 (2,3-dihydroxybenzamide) และ สาร 4 (2-hydroxy-3-methoxybenzamide) ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างทางเคมีใกล้เคียงกัน สามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี โดยที่สาร 3 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด คิดเป็นค่า IC₅₀ เท่ากับ 13.0 ± 0.7 µg/mL เทียบเท่ากับ ascorbic acid (Vitamin C) อย่างมีนัยสำคัญ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sugiyama & Hirota (2009) ซึ่งพบว่า 2,3-dihydroxybenzamide มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี นอกจากนี้ยังพบว่า สาร 4 ก็ยังสามารถแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระคิดเป็นค่า IC₅₀ เท่ากับ 59.1 ± 1.4 µg/mL เทียบเท่ากับ butylated hydroxytoluene (BHT) อย่างมีนัยสำคัญ จากผลการทดสอบชี้ให้เห็นว่าการที่สาร 4 มีกลุ่ม methoxy (-OCH₃) มาแทนที่หมู่ hydroxy (-OH) ที่ตำแหน่งที่ 3 ของโมเลกุล (รูปที่ 4.26-4.28) ส่งผลให้สารประกอบดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระลดลง ทั้งนี้รายงานฉบับนี้ยังเป็นครั้งแรกที่รายงานถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาร 4 และแสดงให้เห็นว่าสารทุติยภูมิที่ผลิตโดย *Streptomyces* sp. JHD1^T มีความน่าสนใจและมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์เวชสำอางต่อไปได้

ตารางที่ 4.27 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารทุติยภูมิจาก *Streptomyces* sp. JHD1^T

ตัวอย่างทดสอบ	IC ₅₀ (µg/mL)
N-(4-methyl-5-oxodithiolo[4,3-b]pyrrol-6-yl)acetamide, Thiolutin (สาร 1)	934.6 ± 126.9 ^B
2,2-dioxidothiolutin (สาร 2)	7,497.0 ± 736.0 ^A
2,3-dihydroxybenzamide, Catecholamide (สาร 3)	13.0 ± 0.7 ^D
2-hydroxy-3-methoxybenzamide (สาร 4)	59.1 ± 1.4 ^{C,D}
8-hydroxy-1,3-benzoxazine-2,4-dione, Benadrostin (สาร 5)	596.4 ± 28.4 ^{B,C,D}
8-amino-1,3-benzoxazine-2,4-dione (สาร 6)	778.8 ± 56.6 ^{B,C}
Vitamin C	17.0 ± 0.1 ^D
BHT	59.0 ± 2.5 ^{C,D}

หมายเหตุ : IC₅₀ หมายถึง ค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้ 50%
ตัวอักษร A - D ที่แตกต่างกันในแต่ละแถวแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

4.7.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี Agar disk diffusion

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี Agar disk diffusion ของสารทุติยภูมิจาก *Streptomyces* sp. JHD1^T แสดงไว้ดังตารางที่ 4.28 จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่า สารทุติยภูมิที่ออกฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้แก่ สาร 1 (*N*-(4-methyl-5-oxodithiolo[4,3-*b*]pyrrol-6-yl)acetamide, Thiolutin) และ สาร 2 (2,2-dioxidothiolutin) ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างทางเคมีใกล้เคียงกัน โดยสารทุติยภูมิ สาร 1 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้ดีอีกทั้งยังพบว่ามียาระยะของโซนยับยั้งมากที่สุด ในขณะที่ สาร 2 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบเฉพาะที่เป็นแกรมบวกและมีขนาดของโซนยับยั้งน้อยกว่าสาร 1 ซึ่งชี้ให้เห็นว่า sulfone ในสาร 2 (รูปที่ 4.25) ส่งผลให้สารประกอบดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้น้อยลง ผลการทดสอบดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่ได้รายงานไว้ว่า Thiolutin และ 2,2-dioxidothiolutin นั้นมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหลายชนิด (Song *et al.*, 2022) นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่าสารทุติยภูมิที่ผลิตโดย *Streptomyces* sp. JHD1^T มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับเวชสำอางหลายชนิด เช่น *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, และ *Staphylococcus aureus* เป็นต้น นอกจากนี้สารทุติยภูมิดังกล่าวยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ได้หลายชนิด จึงมีความน่าสนใจนำไปประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์ทางเวชสำอางและอุตสาหกรรมยาได้

เพื่อตรวจสอบความเข้มข้นของสารที่เหมาะสมต่อการนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ อันเป็นผลมาจากความสามารถในการละลายของสาร 1 ที่ผู้ทดลองพบว่าสารดังกล่าวละลายได้ไม่ดีในตัวทำละลายหลายชนิด จึงได้ทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคของสาร 1 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เริ่มตั้งแต่ 500-0.24 µg/mL ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้นของสาร 1,000-500 µg/mL ส่งผลให้มีขนาดของโซนยับยั้งใกล้เคียงกัน เนื่องจากความสามารถในการละลายของสาร 1 ที่มีจำกัด อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 250 µg/mL เป็นต้นไปพบว่ามียาระยะของโซนยับยั้งลดลงตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.29 และรูปที่ 4.46-4.49

ตารางที่ 4.28 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคของสารทุติภูมิจาก *Streptomyces* sp. JHD1^T ที่ความเข้มข้น 1,000 µg/mL

สาร	ขนาดของโซนยับยั้ง (มม.)											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	25.0	9.7	29.3	19.3	19.0	19.0	27.3	12.0	-	10.3	-	-
2	15.0	9.0	11.3	11.3	7.0	11.3	23.0	-	-	10.0	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crude	20.7	22.0	33.3	21.3	24.0	20.7	25.7	20.3	-	16.7	-	-

หมายเหตุ : สัญลักษณ์ - หมายถึง ไม่เกิดโซนยับยั้ง

หมายเลข 1 = *N*-(4-methyl-5-oxodithiolo[4,3-b]pyrrol-6-yl)acetamide, Thiolutin (สาร 1); 2 = 2,2-dioxidothiolutin (สาร 2); 3 = 2,3-dihydroxybenzamide (สาร 3); 4 = 2-hydroxy-3-methoxybenzamide (สาร 4); 5 = 8-hydroxy-1,3-benzoxazine-2,4-dione , Benadrostin (สาร 5); 6 = 8-amino-1,3-benzoxazine-2,4-dione (สาร 6); Crude = สารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* sp. JHD1^T

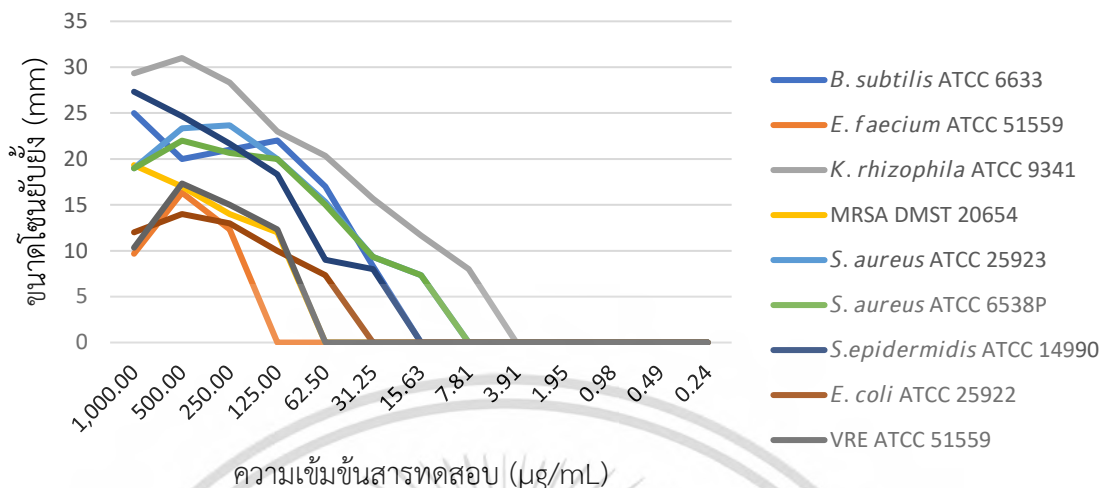
ตัวอักษร A = *B. subtilis* ATCC 6633; B = *E. faecium* ATCC 51559; C = *K. rhizophila* ATCC 9341; D = Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20654; E = *S. aureus* ATCC 25923; F = *S. aureus* ATCC 6538P; G = *S. epidermidis* ATCC 14990; H = *E. coli* ATCC 25922; I = *P. aeruginosa* ATCC 27853; J = Vancomycin-resistant *Enterococci* (VRE) ATCC 51559 ; K = *C. albicans* ATCC 10231; L = *S. cerevisiae* ATCC 9763

ตารางที่ 4.29 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคของสาร 1 ที่ความเข้มข้น 500-0.24 µg/mL

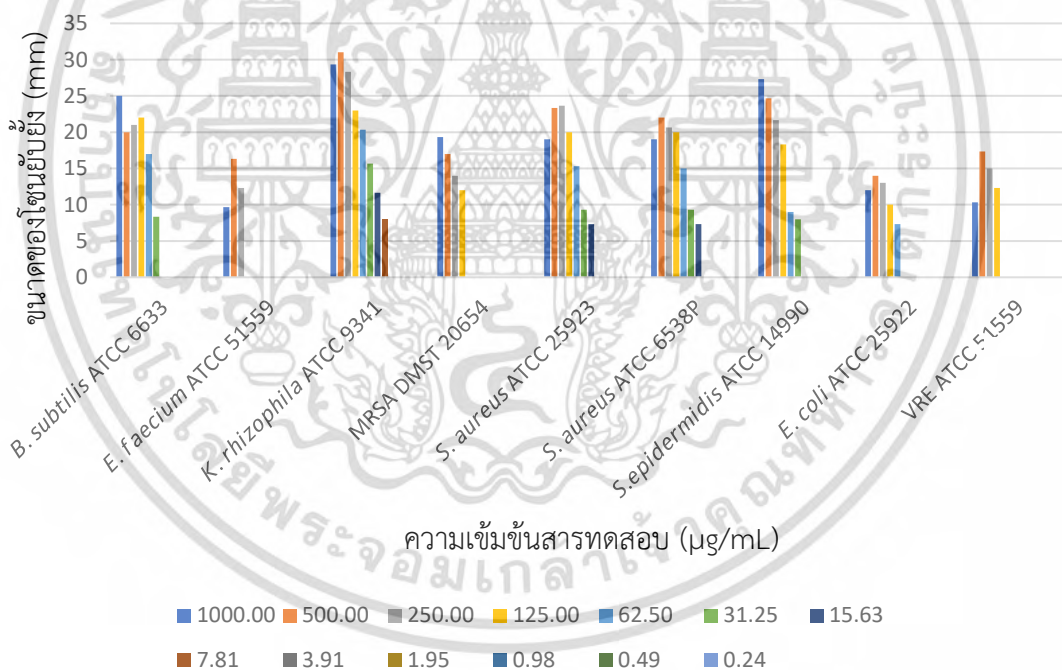
เชื้อทดสอบ	ขนาดของโซนยับยั้ง (mm) ที่ความเข้มข้นของสารระดับต่าง ๆ (µg/mL)											
	500	250	125	62.5	21.25	15.63	7.81	3.91	1.95	0.98	0.49	0.24
A	20.0	21.0	22.0	17.0	8.3	-	-	-	-	-	-	-
B	16.3	12.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	31.0	28.3	23.0	20.3	15.7	11.7	8.0	-	-	-	-	-
D	17.0	14.0	12.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	23.3	23.7	20.0	15.3	9.3	7.3	-	-	-	-	-	-
F	22.0	20.7	20.0	15.0	9.3	7.3	-	-	-	-	-	-
G	24.7	21.7	18.3	9.0	8.0	-	-	-	-	-	-	-
H	14.0	13.0	10.0	7.3	-	-	-	-	-	-	-	-
I	17.3	15.0	12.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ : สัญลักษณ์ - หมายถึง ไม่เกิดโซนยับยั้ง

ตัวอักษร A = *B. subtilis* ATCC 6633; B = *E. faecium* ATCC 51559; C = *K. rhizophila* ATCC 9341; D = Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20654; E = *S. aureus* ATCC 25923; F = *S. aureus* ATCC 6538P; G = *S. epidermidis* ATCC 14990; H = *E. coli* ATCC 25922; I = Vancomycin-resistant *Enterococci* (VRE) ATCC 51559



รูปที่ 4.46 แผนภูมิเส้นแสดงขนาดของโซนยับยั้งต่อเชื้อทดสอบชนิดต่าง ๆ ของสาร 1 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000-0.24 µg/mL



รูปที่ 4.47 แผนภูมิแท่งแสดงขนาดของโซนยับยั้งต่อเชื้อทดสอบชนิดต่าง ๆ ของสาร 1 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000-0.24 µg/mL

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี Broth microdilution

การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี Disk diffusion agar ที่แสดงให้เห็นว่าสารทุติยภูมิ สาร 1 ที่ผลิตโดย *Streptomyces* sp. JHD1^T นั้นแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้หลายชนิด ผู้ทดลองจึงทำการทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคของสารทุติยภูมิดังกล่าวด้วยวิธี Broth Microdilution ต่อไป เพื่อหาค่าของความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.30 จากผลการทดสอบพบว่าสารทุติยภูมิ สาร 1 ออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบที่เกี่ยวข้องกับเวชสำอาง (*S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 6538P, Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20654 และ *S. epidermidis* ATCC 14990 ในช่วงความเข้มข้น 1-2 µg/mL ซึ่งมีค่า MIC อยู่ในช่วงเดียวกันกับยาปฏิชีวนะส่วนใหญ่ที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อในสกุล *Staphylococcus* (CLSI, 2020) ดังนั้นสารทุติยภูมิที่ผลิตโดย *Streptomyces* JHD1^T จึงมีแนวโน้มน่าสนใจในการนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์เวชสำอางต่อไปในอนาคต

ตารางที่ 4.30 ผลการทดสอบ Broth microdilution แสดงค่า MIC ของสาร 1

เชื้อก่อโรคทดสอบ	MIC (µg/mL)
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	1.6 ^a
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	8.0
<i>E. faecium</i> ATCC 51559	16.0
<i>K. rhizophila</i> ATCC 9341	0.5
Methicillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) DMST 20654	2.0
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1.0
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	2.0
<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	1.0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	32.0
Vancomycin-resistant <i>Enterococci</i> (VRE) ATCC 51559	16.0

หมายเหตุ : ^a, ทดสอบตามวิธีการของ Institute, C.a.L.S. (2006)

4.7.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cell cytotoxicity)

จากผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมในมนุษย์ (MCF-7) และเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) ตามวิธีการของ O'Brien *et al.* (2000) และเซลล์ปกติ (Vero) ตามวิธีการของ Changsen *et al.* (2003) โดยทดสอบที่ความเข้มข้นสารสูงสุด 50 µg/mL การทดสอบพบว่า สาร 1 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบทุกชนิด ได้แก่ MCF-7 (IC₅₀ = 1.3 µg/mL), NCI-H187 (IC₅₀ = 0.1 µg/mL) และ Vero (IC₅₀ = 0.1 µg/mL) สาร 3 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ NCI-H187 (IC₅₀ = 5.6 µg/mL) และสาร 5 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 (IC₅₀ = 17.9 µg/mL) และ NCI-H187 (IC₅₀ = 6.9 µg/mL) แสดงให้เห็นว่าสาร 1 แม้จะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ดีแต่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ดังนั้นควรมีการปรับปรุงคุณสมบัติของสารให้มีความปลอดภัยต่อการนำไปประยุกต์ใช้ทางเวชสำอาง อย่างไรก็ตามสำหรับสาร 3 และ 4 ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี พบว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ จึงมีความน่าสนใจอย่างยิ่งต่อการนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์ทางเวชสำอาง ทั้งนี้สาร 2 ไม่ถูกนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื่องจากสารบริสุทธิ์ที่ถูกคัดแยกมีปริมาณน้อยมาก อย่างไรก็ตามโครงสร้างทางเคมีที่ใกล้เคียงกับสาร 1 นี้สามารถบ่งบอกแนวโน้มความเป็นพิษต่อเซลล์ของสาร 2 ได้เบื้องต้น

ตารางที่ 4.31 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารทุติยภูมิจาก *Streptomyces* sp. JHD1^T

สาร	Cytotoxicity (IC ₅₀ , µg/mL)		
	MCF-7	NCI-H187	Vero
<i>N</i> -(4-methyl-5-oxodithiolo[4,3- <i>b</i>]pyrrol-6-yl)acetamide, Thiolutin (สาร 1)	1.3	0.1	0.1
2,3-dihydroxybenzamide, Catecholamide (สาร 3)	-	5.6	-
2-hydroxy-3-methoxybenzamide (สาร 4)	-	-	-
8-hydroxy-1,3-benzoxazine-2,4-dione , Benadrostin (สาร 5)	17.9	6.9	-
8-amino-1,3-benzoxazine-2,4-dione (สาร 6)	-	-	-

หมายเหตุ : - หมายถึง ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ทำการทดสอบ

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การคัดแยกแอกติโนแบคทีเรียจากตัวอย่างทางทะเลบริเวณอ่าวไทยตอนบน ได้แก่ หาดบางแสน หาดจอมเทียน และหาดสัตหีบ สามารถคัดแยกแอกติโนแบคทีเรียได้จำนวน 10 ไอโซเลต ประกอบด้วย สกุล *Streptomyces* (5 ไอโซเลต) สกุล *Norcardiopsis* (2 ไอโซเลต) และสกุล *Gordonia* (3 ไอโซเลต) พบแอกติโนแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่จำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ *Gordonia* sp. SW21^T (*Gordonia aquimaris* SW21^T) และ *Streptomyces* sp. JHD1^T โดย *Gordonia aquimaris* SW21^T เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ต้องการอากาศในการเจริญ มีกรดมัธยคอลิกเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ เซลล์รูปร่างท่อน เจริญที่อุณหภูมิ 15-37 °C เจริญได้ในสภาวะกรด-ต่างช่วง pH 6-8 เจริญได้ในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ สูงสุด 14% (w/v) ผนังเซลล์ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพีเมลิคแบบ meso-DAP, glucose, galactose, rhamnose, ribose และ arabinose ไขมันมีไขว้ในเซลล์ ประกอบด้วย diposphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol และ phosphatidylinositol mannoside (PIM) มีนาควิโนนหลัก ได้แก่ MK-9(H₂) และ MK-7(H₂) ชนิดของกรดไขมันหลักในเซลล์ ได้แก่ C_{16:0}, C_{18:1} ω9c, C_{18:0} และ C_{18:0} 10-methyl (TBSA) สำหรับ *Streptomyces* sp. JHD1^T เป็นแบคทีเรียแกรมบวกสร้างเส้นใย ต้องการอากาศในการเจริญ สปอร์มีการจัดเรียงตัวแบบเกลียวและสปอร์มีพื้นผิวค่อนข้างเรียบ เจริญที่อุณหภูมิ 20-37 °C เจริญได้ในสภาวะกรด-ต่างช่วง pH 6-8 เจริญได้ในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์สูงสุด 10% (w/v) ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพีเมลิคแบบ LL-DAP, ribose และ glucose ไขมันมีไขว้ในเซลล์ ประกอบด้วย diposphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine, phosphatidylglycerol, phosphatidylinositol และ phosphatidylinositol mannoside มีนาควิโนนหลัก ได้แก่ MK-9(H₂), MK-9(H₄), MK-9(H₆) และ MK-9(H₈) ชนิดของกรดไขมันหลักในเซลล์ ได้แก่ anteiso-C_{15:0}, iso-C_{16:0} และ anteiso-C_{17:0}

นอกจากนี้ การศึกษาสารทุติยภูมิที่ผลิตโดย *Streptomyces* sp. JHD1^T ค้นพบสารทุติยภูมิ 6 ชนิด ได้แก่ N-(4-methyl-5-oxodithiolo[4,3-b]pyrrol-6-yl)acetamide, thiolutin (สาร 1) 2,2-dioxidothiolutin (สาร 2) 2,3-dihydroxybenzamide, catecholamide (สาร 3) 2-hydroxy-3-methoxybenzamide (สาร 4) 8-hydroxy-1,3-benzoxazine-2,4-dione, benadrostin (สาร 5) และ 8-amino-1,3-benzoxazine-2,4-dione (สาร 6) สาร N-(4-methyl-5-oxodithiolo[4,3-b]pyrrol-6-yl)acetamide, thiolutin (สาร 1) และ 2,2-dioxidothiolutin (สาร 2) ออกฤทธิ์ต้านการเจริญแบคทีเรียได้หลายชนิด แต่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบ อย่างไรก็ตามงานวิจัยฉบับนี้เป็นครั้งแรกที่รายงานถึงสาร

พบสารทุติยภูมิจากธรรมชาติชนิดใหม่ จำนวน 2 ชนิด คือ 2-hydroxy-3-methoxybenzamide (สาร 4) และ 8-amino-1,3-benzoxazine-2,4-dione (สาร 6) โดยสาร 2-hydroxy-3-methoxybenzamide (สาร 4) เป็นสารที่มีคุณสมบัติออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีเทียบเท่ากับ butylated hydroxytoluene ($IC_{50} = 59.1 \pm 1.4 \mu\text{g/mL}$) อีกทั้งยังไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบทั้งชนิด MCF-7, NCI-H187 และ Vero จึงถือว่าเป็นสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติชนิดใหม่ที่ผลิตจากแอคติโนแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ มีความน่าสนใจต่อการนำไปประยุกต์พัฒนาใช้เป็นสารออกฤทธิ์ทางเวชสำอางเป็นอย่างยิ่ง

5.2 ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากการศึกษานี้พบว่ามีจำนวนไอโซเลตที่ผลิตสารออกฤทธิ์ด้านการเจริญจุลินทรีย์ได้เพียง 10% ของไอโซเลตที่คัดแยกได้ทั้งหมด มีความเป็นไปได้ว่าบริเวณที่เก็บตัวอย่างเพื่อคัดแยกแอคติโนแบคทีเรียนั้นอยู่ในเขตชุมชน จึงอาจมีสิ่งปนเปื้อนหรือมลพิษในบริเวณที่เก็บตัวอย่าง สภาพสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมนี้อาจส่งผลให้แอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกไม่มีความหลากหลายเท่าที่ควร ดังนั้นในการเก็บตัวอย่างในการศึกษาต่อไปควรเก็บตัวอย่างในบริเวณที่ใกล้เคียงสภาพธรรมชาติมากที่สุด การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับเวชสำอาง ในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญของเชื้อก่อโรคและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การศึกษาต่อไปควรมีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับทางเวชสำอาง ได้แก่ เอนไซม์คอลลาจีเนส ไทโรซิเนส อิลาสเตส และไฮยาลูโรนิเดส เนื่องจากเอนไซม์ข้างต้นมีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับเวชสำอาง นอกจากนี้การพัฒนาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสำหรับประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ทางเวชสำอางในอนาคตควรมีการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ชนิดอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับผิวหนัง เช่น เซลล์ผิวหนังชนิด HaCaT (Human keratinocyte cell line) ตลอดจนศึกษากลไกการออกฤทธิ์และคุณสมบัติอื่น ๆ เช่น การดูดซึม การแพร่กระจายของสาร และกลไกการขับออกจากร่างกาย เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

- กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ, มาริสรา รักสุขสมบัติ และสุภาภรณ์ ขานโบ. 2558. “เทคโนโลยีการวิเคราะห์ลำดับเบสยุคที่ สองและสาม (Second and Third Generation Sequencing Technologies).” *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. 23(4) : 634-650.
- จิตติ ท่าไว. 2557. **แอดดีโนแบคทีเรีย**. กรุงเทพฯ : บริษัทแดเน็กซ์อินเตอร์คอร์ปอเรชั่น จำกัด.
- เจษฎา เต็นดวงบริพันธ์. 2545. “การสร้างวงษ์วานวิวัฒนาการ ขึ้นมาใหม่ขั้นพื้นฐาน.” **หนังสือการประชุมวิชาการเรื่อง Molecular techniques for biodiversity research**. กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ชมภูช วิรุณานนท์ และวรวิฑู จุฬาลักษณ์านุกูล. 2553. “ชีวสารสนเทศ : การประยุกต์ใช้ในงานวิจัยวิทยาศาสตร์ชีวภาพ (Bioinformatics : Application in Biological Science Research).” *Burapha Science Journal*. 15 : 99-106.
- นันทวัน เนียมหอม. 2561. “อนุกรมวิธาน ฤทธิ์ทางชีวภาพ และความหลากหลายของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารประกอบโพลีคีโตนชนิดที่ 1 ของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสียที่แยกได้จากพืชวงศ์ขิงของไทย.” *วิทยานิพนธ์ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง*.
- ประสิทธิ์ ผลิตผลการพิมพ์ และนเรศ ดำรงชัย. 2543. **จีโนม : เรื่องที่ทุกคนควรรู้ Understanding Genome**. กรุงเทพฯ : หน่วยเผยแพร่เทคโนโลยีและประชาสัมพันธ์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ.
- ปวีณา พันทอง. 2559. “การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีCUPRAC โดยใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ.” *วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา*.
- พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์. 2556. **Collagen / คอลลาเจน**. [Online]. Available : <https://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0727/collagen-คอลลาเจน>.
- วิรุณา ปัญญาแก้ว. 2558. “การศึกษาผลของการรับประทานคอลลาเจนเสริมต่อความยืดหยุ่นและความชุ่มชื้นของผิว.” *วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์, มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์*.

- สมชาย แสงอำนาจเดช. 2551. “ขั้นตอนง่าย ๆ ในการสร้างไฟโลเจเนติกทรี.” *Naresuan University Journal*. 16 : 181- 188.
- สมเดช กนกเมธากุล. 2547. **สเปกโทรสโกปีในการพิสูจน์โครงสร้างของสารอินทรีย์**. ขอนแก่น : ขอนแก่นการพิมพ์.
- สักการ ชนะเดช. 2564. “สารต้านอนุมูลอิสระของ *Streptomyces griseoaurantiacus* C1-2 ที่แยกได้จากดินป่าชายเลน.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- สุนันทา ภิัญญาวัฒน์. 2542. **ชีวเคมี 1 (Biochemistry 1)**. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง.
- อรุณรัตน์ สันฐิติกวินสกุล. 2563. **สเปกโทรสโกปีสำหรับเคมีอินทรีย์**. โครงการตำรามหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม.
- อลิษา วิลันโท, อรุณช ประดิษฐ์ทรัพย์, วรณวิสาข์ เจริญฉิม, ศุภศักดิ์ กุลวงศ์อนันชัย, อนันต์ชัย อิศวเมชิน และศิษฏ์ ทองสิมา. 2555. “เทคโนโลยีเอ็นจีเอสและการประยุกต์ในงานวิจัยโอมิกส์ Next generation sequencing (NGS) technologies and their applications in omics-research.” *Thai Journal of Genetics*. 5 : 104-129.
- Adhikari, A., Nandi, S., Bhattacharya, I., Roy, M.D., Mandal, T. and Dutta, S. 2015. “Phylogenetic analysis based evolutionary study of 16S rRNA in known *Pseudomonas* sp.” *Bioinformation*. 11 : 474-480.
- Álvarez-Álvarez, R., Botas, A., Albillos, S. M., Rumbero, A., Martín, J. F. and Liras, P. 2015. “Molecular genetics of naringenin biosynthesis, a typical plant secondary metabolite produced by *Streptomyces clavuligerus*.” *Microbial Cell Factories*. 14 : 1-12.
- Alvarez-Rivera, G., Llompart, M., Lores, M. and Garcia-Jares, C. 2018. “Preservatives in cosmetics: Regulatory aspects and analytical methods.” *Analysis of Cosmetic Products*. 175-224.
- Aoyagi, T., Yoshida, S., Harada, S., Okuyama, A., Nakayama, C., Yoshida, T., Hamada, M., Takeuchi, T. and Umezawa, H. 1988. “Benadrostin, new inhibitor of poly (ADP-ribose) synthetase, produced by actinomycetes I. taxonomy, production, isolation,

physico-chemical properties and biological activities.” *The Journal of Antibiotics*. 41 : 1009-1014.

Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, KM., Özyürek, M. and Güçlü, K. 2013. “Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC technical report).” *Pure and Applied Chemistry*. 85 : 957–998.

Arai, T. 1975. **Culture Media for Actinomycetes**. Tokyo : The Society for Actinomycetes.

Ariffin, H., Abdullah, N., Umi Kalsom, M.S., Shirai, Y. and Hassan, M.A. 2006. “Production and characterization of cellulase by *Bacillus pumilus* EB3.” *International Journal of Engineering and Technology*. 3 : 47-53.

Arumugam. M., Mitra, A., Jaisankar, P., Dasgupta, S., Sen, T., Gachhui, R., Mukhopadhyay, U.K. and Mukherjee, J. 2010. “Isolation of an unusual metabolite 2-allyloxyphenol from a marine actinobacterium, its biological activities and applications.” *Applied Microbiology and Biotechnology*. 86 : 109-117.

Auch, A.F., Jan, M.V., Klenk, H.P. and Göker, M. 2010. “Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison.” *Standards in Genomic Sciences*. 2 : 117-134.

Aziz, R.K., Bartels, D., Best, A.A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards R.A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E.M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G.J., Olson, R., Osterman, A.L., Overbeek, R.A., McNeil, L.K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G.D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A. and Zagnitko, O. 2008. “The RAST server: rapid annotations using subsystems technology.” *BMC Genomics*. 9 : 9-75.

Balouiri, M., Sadiki, M. and Ibensouda, S.K. 2016. “Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review.” *Pharmaceutical Analysis*. 6 : 71-19.

Barka, E.A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.P., Clement, Y.O. and Wezel, G.P.V. 2015. “Taxonomy, physiology, and natural products of actinobacteria.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 80 : 1-43.

Basicmedicalkey. 2017. **21 Bacteria—Basic Concepts**. [Online]. Available : <https://basicmedicalkey.com/21-bacteria-basic-concepts>.

Baylac, S. and Racine, P. 2004. “Inhibition of human leukocyte elastase by natural fragrant extracts of aromatic plants.” *International Journal of Aromatherapy*. 14 : 179-182.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Biologyexams4u. 2013. **Difference between 70S and 80S Ribosome (Prokaryotic vs Eukaryotic Ribosomes).** [online]. Available : <https://www.biologyexams4u.com201302difference-between-70s-and-80s-ribosomes.html>.
- Blin, K., Medema, M.H., Kottmann, R., Lee, S.Y. and Weber, T. 2016. “The antiSMASH database, a comprehensive database of microbial secondary metabolite biosynthetic gene clusters.” *Nucleic Acids Research*. 45 : 555-559.
- Blin, K., Shaw, S., Kloosterman, A.M., Charlop-Powers, Z., Weezel, G.P.V., Medema, M.H. and Weber, T. 2021. “AntiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities.” *Nucleic Acids Research*. 49 : W29–W35.
- Boonyatumanond, R., Wattayakorn, G., Amano, A., Inouchi, Y. and Takada, H. 2007. “Reconstruction of pollution history of organic contaminants in the upper Gulf of Thailand by using sediment cores: first report from Tropical Asia Core (TACO) project.” *Marine Pollution Bulletin*. 54 : 554–565.
- Borsetto, C., Amos, G.C., da Rocha, U.N., Mitchell, A.L., Finn, R.D., Laidi, R.F., Vallin, C., Pearce, D.A., Newsham, K.K. and Wellington, E.M. 2019. “Microbial community drivers of PK/NRP gene diversity in selected global soils.” *Microbiome*. 7 : 1-11.
- Bull, A.T., Ward, A.C. and Goodfellow, M. 2000. “Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64 : 573-606.
- Bunbamrung, N., Intaraudom, C., Dramaee, A., Thawai, C., Tadtong, S., Auncharoen, P., and Pittayakhajonwut, P. 2020. “Antibacterial, antitubercular, antimalarial and cytotoxic substances from the endophytic *Streptomyces* sp. TBRC7642.” *Phytochemistry*. 172 : 112275.
- Burnett, C.L., Bergfeld, W.F., Belsito, D.V., Hill, R.A., Klaassen, C.D., Liebler, D.C., Marks, J.G.J., Shank, R.C., Slaga, T.J., Synder, P.W. and Anderson, F.A. 2010. “Final report of the safety assessment of kojic acid au used in cosmetics.” *International Journal of Toxicology*. 29 : 244-273.
- Camacho Pozo, M.I., Wieme, A.D., Pérez, S.R., Llaurodo Maury, G., Snauwaert, C., Lescaylle Veranes, Y., Pena Zamora, L., Schumann, P. and Vandamme, P., 2020.

“*Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *crassaminis* subsp. nov., isolated from freshwater sediment, and reappraisal of *Nocardiopsis alborubida* Grund and Kroppenstedt 1990 emend. Nouiouei *et al.* 2018.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 70 : 6172-6179.

Chanadech, S., Ruen-ngam, D., Intaraudom, C., Pittayakhajonwut, P., Chongruchiroj, S., Pratuangdejkul, J. and Thawai, C. 2021. “Isolation of manumycin-type derivatives and genome characterization of a marine *Streptomyces* sp. C1-2.” *Research in Microbiology*. 172 : 103812.

Chandra, P., Sharma, R.K. and Arora, D.S., 2020. “Antioxidant compounds from microbial sources: A review.” *Food Research International*. 129 : 108849.

Changsen, C., Franzblau, S. G., and Palittapongarnpim, P. 2003. “Improved green fluorescent protein reporter gene-based microplate screening for antituberculosis compounds by utilizing an acetamidase promoter.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47 : 3682-3687.

Chauhan, T. 2018. **Different types of DNA extraction methods.** [online]. Available : <https://geneticeducation.co.in/different-types-of-dna-extraction-methods/>.

Chen, C., Ye, Y., Wang, R., Zhang, Y., Wu, C., Debnath, S.C., Ma, Z., Wang, J. and Wu, M. 2018. “*Streptomyces nigra* sp. nov. is a novel actinobacterium isolated from mangrove soil and exerts a potent antitumor activity in vitro.” *Frontiers in Microbiology*. 9 : 1587.

Chen, Y., Guo, M., Yang, J., Chen, J., Xie, B., and Sun, Z. 2019. “Potential TSPO ligand and photooxidation quencher isorenieratene from Arctic Ocean *Rhodococcus* sp. B7740.” *Marine Drugs*. 17 : 316.

Cheng, C., Othman, E. M., Stopper, H., Edrada-Ebel, R., Hentschel, U., and Abdelmohsen, U. R. 2017. “Isolation of petrocidin A, a new cytotoxic cyclic dipeptide from the marine sponge-derived bacterium *Streptomyces* sp. SBT348.” *Marine Drugs*. 15 : 383.

- Christensen, W.B. 1946. "Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types." *Journal of Bacteriology*. 52 : 461-466.
- CLSI. 2020. **M100, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 30th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. USA.
- Collins, M.D., Pirouz, T., Goodfellow, M. and Minnikin, D.E. 1977. "Distribution of menaquinones in actinomycetes and corynebacterial." *Microbiology*. 100 : 221-230.
- Cooper, C.A., Brown, K.K., Meletis, C.D. and Zabriskie, N. 2008. "Inflammation and hyaluronic acid." *Alternative & Complementary Therapies*. 14 : 78-84.
- Cornelli, U. 2009. "Antioxidant Use in Nutraceuticals." *Clinics in Dermatology*. 27 : 175-94.
- Dahal, R.H. and Shim, D.S. Kim, J. 2017. "Development of actinobacterial resource for functional cosmetics." *Journal of Cosmetic Dermatology*. 16 : 243-252.
- Dahal, R.H., Nguyen, T.M., Shim, D.S., Kim, J.Y., Lee, J. and Kim, J. 2020. "Development of Multifunctional Cosmetic Cream Using Bioactive Materials from *Streptomyces* sp. T65 with Synthesized Mesoporous Silica Particles SBA-15." *Antioxidants*. 9 : 278.
- Drillon, G., Carbone, A. and Fischer, G. 2014. "SynChro: A Fast and Easy Tool to Reconstruct and Visualize Synteny Blocks along Eukaryotic Chromosomes." *PLoS. One*. 9 : e92621.
- Elizabeth, P. 2008. "Building the Tree of Life, Genome by Genome". *Science*. 320 : 1716-1717.
- Figueras, M.J., Beaz-Hidalgo, R., Hossain, M.J. and Lilesb, M.R. 2014. "Taxonomic affiliation of new genomes should be verified using average nucleotide identity and multilocus phylogenetic analysis." *Genome Announcements*. 2 : e00927-14.
- Fu, Z., Piumsomboon, A., Punnarak, P., Uttayarnmanee, P., Leaw, C.P., Lim, P.T., Wang, A. and Gu H. 2021. "Diversity and distribution of harmful microalgae in the Gulf of Thailand assessed by DNA metabarcoding." *Harmful Algae*. 106.

- Galaxyproject. 2015. **Genome Annotation.** [Online]. Available : <https://training.galaxyproject.org/training-material/topics/genome-annotation/tutorials/genome-annotation/tutorial.html>.
- Ganceviciene, R., Liakou, A.I., Theodoridis, A., Makrantonaki, E. and Zouboulis, C.C. 2012. "Skin anti-aging strategies." *Dermato-Endocrinology*. 4 : 308-319.
- Gelse, K., Poschl, E. and Aigner, T. 2003. "Collagens - structure, function, and biosynthesis." *Advanced Drug Delivery Reviews*. 55 : 1531-1546.
- Georgousaki, K., Tsafantakis, N., Gumenib, S., Gonzalez, I., Mackenzie, T.A., Reyes, F., Lambert, C., Trougakos, I.P., Genilloud, O. and Fokialakis, N. 2020. "Screening for tyrosinase inhibitors from actinomycetes; Identification of trichostatin derivatives from *Streptomyces* sp. CA-129531 and scale up production in bioreactor." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 30 : 126952.
- Gibthai. 2019. **Capillary DNA sequencing (Sanger Sequencing).** [Online]. Available : https://www.gibthai.com/service/article_detail/214.
- Gillbro J.M. and Olsson M.J. 2011. "The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents – existing and new approaches." *International Journal of Cosmetic Science*. 33 : 210-221.
- Girish, K.S., Kemparaju, K., Nagaraju, S. and Vishwanath, B.S. 2009. "Hyaluronidase inhibitors: A biological and therapeutic perspective." *Current Medicinal Chemistry*. 16 : 2261-2288.
- Goodfellow, M., and Jones, A. 2012. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** Actinobacteria New York, NY: USA.
- Goris, J., Konstantinidis, K.T., Klappenbach, J.A., Coenye, T., Vandamme, P. and Tiedje, J.M. 2007. "DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57 : 81–91.
- Green, E. 2022. **GENE MAPPING.** [Online]. Available : <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Gene-Mapping>.

- Gupta, M.K., Senthikumar, S., Chiranjivi, A.K., Banik, K., Girisa, S., Kunnumakkara, A.B., Dubey, V.K. and Rangan, L. 2021. "Antioxidant, anti-tyrosinase and anti-inflammatory activities of 3,5-dihydroxy-4',7-dimethoxyflavone isolated from the leaves of *Alpinia nigra*." *Phytomedicine Plus*. 1 : 100097.
- Herman, A., Herman, A.P., Domagalska, B.W. and Mlynarczyk, A. 2013. "Essential oils and herbal extracts as antimicrobial agents in cosmetic emulsion." *Indian Journal of Microbiology*. 53 : 232-237.
- Hoshino, Y., Chiba, K., Ishino, K., Fukai, T., Igarashi, Y., Yazawa, K., Mikami, Y. and Ishikawa, J. 2011. "Identification of nocobactin NA biosynthetic gene clusters in *Nocardia farcinica*." *Journal of Bacteriology*. 193 : 441-448.
- Huang, S., Him Tong, M., Qin, Z., Deng, Z., Deng, H. and Yu, Y. 2015. "Identification and characterization of the biosynthetic gene cluster of thiolutin, a tumor angiogenesis inhibitor, in *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137." *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 15 : 277-284.
- Institute, C.a.L.S. 2006. **M7-A7, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically**. seventh ed. Approved Standard, vol. 26 Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, P. A.
- Iwai, Y. and Omura, S. 1981. "Culture conditions for screening of new antibiotics." *The Journal of Antibiotics*. 35 : 123-141.
- Janardhan, A., Kumar, A.P., Viswanath, B., Saigopal, D.V.R. and Narasimha, G., 2014. "Production of bioactive compounds by actinomycetes and their antioxidant properties." *Biotechnology Research International*.
- Kamala, K., Sivaperumal, P., Kumar, G.J. and Ganapathy, D.M., 2023. **Antioxidant properties from novel marine actinobacteria**. In *Marine Antioxidants*. Academic Press. 215-220.
- Kelly, K.L. 1964. **Inter-Society Color Council-National Bureau of Standard Color Name Charts Illustrated with Centroid Colors**. Washington, DC : Government Printing Office.
- 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.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 64 : 346-351.
- Klaschka, U. 2016. “Natural personal care products-analysis of ingredient lists and legal situation.” *Environmental Sciences Europe*. 28 : 1-14
- Komagata, K. and Suzuki, K.I. 1987. “Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematics.” *Method Microbiol*. 19 : 161-207.
- Komaki, H. and Tamura, T. 2020. “Reclassification of *Streptomyces diastaticus* subsp. *ardesiacus*, *Streptomyces gougerotii* and *Streptomyces rutgersensis*.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 70 : 4291-4297.
- Konstantinidis, K.T., Rosselló-Móra, R. and Amann, R. 2017. “Uncultivated microbes in need of their own taxonomy.” *The ISME Journal*. 11 : 2399-2406.
- Krishnamoorthy, M., Dharmaraj, D., Rajendran, K., Karuppiyah, K., Balasubramanian, M. and Ethiraj, K. 2020. “Pharmacological activities of coral reef associated actinomycetes, *Saccharopolyspora* sp. IMA1.” *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 28 : 101748.
- Kwan, Y.H., Tung, Y.K., Kochhar, J.S., Li, H., Poh, A.L. and Kang, L. 2015. **Handbook of Cosmeceutical Excipients and their Safeties**. Woodhead Publishing.
- Lechevalier, M.P. and Lechevalier, H.A. 1970. “Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 20 : 435-443.
- Lechevalier, M.P., DeBievre, C. and Lechevalier, H.A. 1977. “Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition.” *Biochemical Systematics and Ecology*. 5 : 249-260.
- Lee, K.K., Kim, J.H., Cho, J.J. and Choi, J.D. 1999. “Inhibitory Effects of 150 plant extract on elastase activity, and their antu-inflammatory effects.” *International Journal of Cosmetic Science*. 21 : 71-82.
- Levy, S. and Rogers, Y.H. 2010. **Essentials of Genomic and Personalized Medicine : Chapter 3 - DNA Sequencing for the Detection of Human Genome Variation**. Academic press. 27-37.

- Li, M., Xie, J., Bai, X. and Du, Z. 2021. "Anti-aging potential, anti-tyrosinase and antibacterial activities of extracts and compounds isolated from *Rosa chinensis* cv. 'JinBian'." *Industrial Crops & Products*. 159 : 113059.
- Li, Q., Chen, X., Jiang, Y. and Jiang, C. 2016. **Morphological Identification of Actinobacteria**. Intech.
- Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., and Jiang, C. 2016. "Cultural, physiological, and biochemical identification of actinobacteria." **Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications**. 87-111.
- Li, W., Khullar, A., Chou, S., Sacramo, A., and Gerratana, B. 2009. "Biosynthesis of sibiromycin, a potent antitumor antibiotic." *Applied and Environmental Microbiology*. 75 : 2869-2878.
- Liang, J., Jiang, D. and Noble, P.W. 2016. "Hyaluronan as a therapeutic target in human diseases." *Advanced Drug Delivery Reviews*. 97 : 186-203.
- Linos, A., Berekaa, M.M., Steinbüchel, A., Kim, K.K., Sproer, C. and Kroppenstedt, R.M. 2002. "*Gordonia westfalica* sp. nov., a novel rubber-degrading actinomycete." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52 : 1133-1139.
- Linos, A., Steinbüchel, A., Spröer, C. and Kroppenstedt, R.M. 1999. "*Gordonia polyisoprenivorans* sp. nov., a rubber-degrading actinomycete isolated from an automobile tyre." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 49 : 1785-1791.
- Liyanaarachchi, G.D., Samarasekera, J., Mahanama, K. and Hemalal, K. 2018. "Tyrosinase, elastase, hyaluronidase, inhibitory and antioxidant activity of Sri Lankan medicinal plants for novel cosmeceuticals." *Industrial Crops and Products*. 111 : 597-605.
- Lockwood, B. 2007. **Nutraceuticals: A Guide for Healthcare Professionals**. Second ed. London : Pharmaceutical Press.
- Ma, Z., Wu, C., Zhu, L., Chang, R., Ma, W., Deng, Y., and Chen, X. 2022. "Bioactivity profiling of the extremolyte ectoine as a promising protectant and its heterologous production." *3 Biotech*. 12 : 331.

- Maldonado, L.A., Stach, J.E.M., Pathom-aree, W., Ward, A.C., Bull, A.T. and Goodfellow, M. 2005. "Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments." *Antonie van Leeuwenhoek*. 87 : 11-18.
- Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K. and Kim, S.K. 2013. "Marine actinobacterial metabolites: Current status and future perspectives." *Microbiological Research*. 168 : 311-332.
- Mason, P. 2011. **Dietary Supplements**. Fourth ed. London : Pharmaceutical Press.
- Masyita, A., Sari, R.M., Astuti, A.D., Yasir, B., Rumata, N.R., Emran, T.B., Nainu, F. and Simal-Gandara, J. 2022. "Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives." *Food chemistry*. 13 : 100217.
- Materials innovation center. 2012. **UV-visible spectrophotometer**. [Online]. Available : http://mic.eng.ku.ac.th/facilities-detail.php?id_sub=41&id=46.
- Mawang, C., Azman, A., Fuad, A. and Ahamad, M. 2021. "Actinobacteria: An eco-friendly and promising technology for the bioaugmentation of contaminants." *Biotechnology Reports*. 32 : e00679.
- Mazzutti, S., Pedrosa, R.C. and Ferreira, S.R.S. 2020. "Green processes in Foodomics. Supercritical Fluid Extraction of Bioactives." *Reference Module in Food Science*. 1-19.
- MedicineNet. 2021. **Medical Definition of Genome annotation**. [Online]. Available : https://www.medicinenet.com/genome_annotationdefinition.htm.
- Meier-Kolthoff, J.P., Auch, A.F., Klenk, H.P. and Goker, M. 2013. "Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions." *BMC Bioinformatics*. 14 : 60.
- Meier-Kolthoff, J.P., Sardà Carbasse, J., Peinado-Olarte, R.L. and Göker, M. 2022. "TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes." *Nucleic Acids Research*. 50 : D801–D807.
- Melzig, M.F., Loser, B. and Ciesielski, S. 2001. "Inhibition of neutrophil elastase activity by phenolic compounds from plants." *Pharmazie*. 56 : 967-970.

- Minnikin, D.E., Alshamaony, L. and Goodfellow, M. 1975. "Differentiation of *Mycobacterium*, *Norcardia* and related taxa by thin-layer chromatographic analysis of whole-organism methanolysates." *Microbiology*. 88 : 200-204.
- Minnikin, D.E., O'donnell, A.G., Goodfellow, M., Alderson, G., Athalye, M., Schaal, A. and Parlett, J.H. 1984. "An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids." *Journal of Microbiological Methods*. 2 : 233-241.
- Minsat, L., Peyrot, C., Brunissen, F., Renault, J.H. and Allais, F. 2021. "Synthesis of Biobased Phloretin Analogues: An Access to Antioxidant and Anti-Tyrosinase Compounds for Cosmetic Applications." *Antioxidants*. 10 : 515
- Mundie, D. A. 1995. **The NBS/ISCC Color System/ David A. Mundie Pittsburgh, PA: Polymath Systems 535.6 dc- 20.** [Online]. Available: <http://www.anthus.com/Colors/Cent.html>.
- Nabavi, S.F., Di Lorenzo, A., Izadi, M., Sobarzo-Sanchez, E., Daglia, M. and Nabavi, S.M. 2015. "Antibacterial effects of cinnamon: From farm to food, cosmetic and pharmaceutical industries." *Nutrients*. 7 : 7729-7748.
- Nantarat, N., Mueller, M., Lin, W., Lue, S., Viernstein, H., Chansakaow, S., Sirithunyalug, J. and Leelapornpisid, P. 2020. "Sesaminol diglucoside isolated from black sesame seed cake and its antioxidant, anti-collagenase and anti-hyaluronidase activities." *Food Bioscience*. 36 : 100628.
- National Center for Biotechnology Information. 2023. **PubChem Compound Summary for CID 6870, Thiolutin.** [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Thiolutin>.
- Nawani, N.N., Kapadnis, B.P., Das, A.D., Rao, A.S. and Mahajan, S.K. 2002. "Purification and characterization of a thermophilic and acidophilic chitinase from *Microbispora* sp. V2." *Journal of Applied Microbiology*. 93 : 965-975.
- Necas, J., Bastosikova, L., Brauner, P. and Kolar J. 2008. "Hyaluronic acid (hyaluronan): A review." *Veterinari Medicina*. 53 : 397-411.

- Ninawe, S., Lal, R. and Kuhad, R.C. 2006. "Isolation of three xylanase-producing strains of actinomycetes and their identification using molecular methods." *Current Microbiology*. 53 : 178-182.
- NSTDA. 2564. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity). [Online]. Available : <https://www.nstda.or.th/tbes/cytotoxicity/>.
- O'brien, J., Wilson, I., Orton, T. and Pognan, F., 2000. "Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity." *European Journal of Biochemistry*. 267 : 5421-5426.
- Osbourn, A. 2010. "Secondary metabolic gene clusters: evolutionary toolkits for chemical innovation." *Trends in Genetics*. 26 : 449-457.
- Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G.D., Olsen, G.J., Davis, J.J., Disz, T., Edwards, R.A., Gerdes, S., Parrello, B., Shukla, M., Vonstein, V., Wattam, A.R., Xia, F. and Stevens, R. 2014. "The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST)." *Nucleic Acids Research*. 42 : D206-D214.
- Pansomsuay, R., Duangupama, T., Pittayakhajonwut, P., Intaraudom, C., Suriyachadkun, C., He, Y.W., Tanasupawat, S. and Thawai, C., 2023. "*Gordonia aquimaris* sp. nov., a novel marine actinobacterium isolated from seawater in the upper gulf of Thailand." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 73 : 005804.
- Papakonstantinou, E., Roth, M. and Karakiulakis, G. 2012. "Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging." *Dermato-Endocrinology*. 4 : 253-258.
- Parveen, A., Khurana, S. and Kumar, A. 2019. "Overview of genomic tools for circular visualization in the nextgeneration genomic sequencing era." *Current genomics*. 20 : 90-99.
- Phongsopitanun, W., Thawai, C., Suwanborirux, K., Kudo, T., Ohkuma, M., and Tanasupawat, S. 2014. "*Streptomyces chumphonensis* sp. nov., isolated from marine sediments." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 64 : 2605-2610.
- Phospholipid Research Center. 2021. **Types of Phospholipids**. [Online]. Available : <httpswww.phospholipid-research-center.comphospholipidtypes>.

- Prapulla, S.G. and Karanth, N.G. 2014. **Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)**. London: Academic Press is an imprint of Elsevier.
- Promega. 2011. **Buffers for Biochemical Reactions**. [Online]. Available : <https://www.promega.com/resources/guides/lab-equipment-and-supplies/buffers-for-biochemical-reactions/>.
- Rai, B., Shrestha, A., Sharma, S. and Joshi, J. 2014. “Screening, optimization and process scale up for pilot scale production of lipase by *Aspergillus niger*.” *Biomedicine and Biotechnology*. 2 : 54-59.
- Ramesh, S. and Mathivanan, N. 2009. “Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes.” *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25 : 2103-2111.
- Ratnasooriya, W.D., Abeysekera, W.P.K.M. and Ratnasooriya, C.T.D. 2014. “In vitro anti-hyaluronidase activity of Sri Lankan low grown orthodox orange pekoe grade black tea (*Camellia sinensis* L.)” *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 4 : 959-963.
- Reimer, L.C., Sardà Carbasse, J., Koblitz, J., Ebeling, C., Podstawka, A. and Overmann, J. 2022. “Bac Dive in 2022: the knowledge base for standardized bacterial and archaeal data.” *Nucleic Acids Research*. 50 : 741-746.
- Rekas, A., Cappai, R., Curtain, C., and Pham, C. L. L. 2014. “Dopamine-induced α -synuclein oligomers.” 291-300. **Bio-nanoimaging**. Academic Press.
- ReportLinker. 2021. **Global Cosmetic Skin Care Market 2021-2025**. [Online]. Available : https://www.reportlinker.com/p05734192/Global-Cosmetic-Skin-Care-Market.html?utm_source=GNW.
- Resende, D., Ferreira, M., Magalhaes, C., Lobo, J.S., Sousa, E. and Almeida, I.F. 2021. “Trends in the use of marine ingredients in anti-aging cosmetics.” *Algal Research*. 55. 102273.
- Richter, M. and Rosselló-Mora, R. 2009. “Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition.” *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106 : 19126 –19131.

- Rinnerthaler, M., Bischof, J., Streubel, M., Trost, A. and Richter, K. 2015. "Oxidative stress in aging human skin." *Biomolecules*. 5 : 545-589.
- Sakar, R., Arora, P. and Garg, K.V. 2013. "Cosmeceuticals for Hyperpigmentation: What is Available?" *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*. 6 : 4-11.
- Salwan, R., and Sharma, V. 2020. "Molecular and biotechnological aspects of secondary metabolites in actinobacteria." *Microbiological Research*. 231 : 126374.
- Sanchez, S. and Demain, A.L. 2022. "Metabolic regulation of fermentation processes." *Enzyme and Microbial Technology*. 31 : 895-906.
- Sandhu, S.V., Gupta, S., Bansal, H. and Singla, K. 2012. "Collagen in health and disease." *Journal of Orofacial Research*. 2 : 153-159.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. 1977. "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proceedings of The National Academy of Sciences*. 74 : 5463-5467.
- Sangkanu, S., Suriyachadkun, C., and Phongpaichit, S. 2019. "*Gordonia sediminis* sp. nov., an actinomycete isolated from mangrove sediment." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 69 : 1814-1820.
- Sant'Anna, F.H., Bach, E., Porto, R.Z., Guella, F., Sant'Anna, E.H. and Passaglia, L.M.P. 2019. "Genomic metrics made easy: what to do and where to go in the new era of bacterial taxonomy." *Critical Reviews in Microbiology*. 45 : 182-200.
- Sasser, M. 1990. **Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular Fatty Acids (MIDI Technnical Note 101)**. Newark, DE : MIDI.
- Shih, L., Shen, M. H. and Van, Y. T. 2006. "Microbial synthesis of poly (ϵ -lysine) and its various applications." *Bioresource Technology*. 97 : 1148-1159.
- Shirling, E. B., and Gottlieb, D. 1966. "Methods for characterization of *Streptomyces* species." *International Journal of Systematic Bacteriology*. 16 : 313-340.
- Siedle, B., Cisielski, S., Murillo, R., Loser, B., Castro, V., Klaas, C.A., Hucke, O., Labahn, A., Melzig, M.F. and Merfort, I. 2002. "Sesquiterpene lactones as inhibitors of human neutrophil elastase." *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 10 : 2855-2861.

- Sigmaaldrich. 2018. **Sanger Sequencing Steps & Method.** [Online]. Available : <httpswww.sigmaaldrich.comTHentechicaldocumentsprotocolgenomicssequencinggsanger-sequencing>.
- Smith, L.M., Sanders, J.Z., Kaiser, R.J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C.R., Heiner, C., Kent, S.B. and Hood, L.E. 1986. "Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis." *Nature*. 321 : 674-679.
- Soderlund, C., Nelson, W., Shoemaker, A. and Paterson, A. 2020. "SyMAP: A system for discovering and viewing syntenic regions of FPC maps." *Genome Research*. 16 : 1159- 1168.
- Song, F., Hu, J., Zhang, X., Xu, W., Yang, J., Li, S. and Xu, X. 2022. "Unique Cyclized Thiolopyrrolones from the Marine-Derived *Streptomyces* sp. BTBU20218885." *Marine Drugs*. 20 : 214.
- SRI International. 2022. **Overview of the Mycobacterial Mycolic Acid Biosynthesis Pathway.** [Online]. Available : <http://spl.csl.sri.commycolate-overview.html>.
- Sricharoen, P., Techawongstein, S., Luthria, D. and Chanthai, S. 2015. "Standardization of DPPH, ABTS and FRAP assays with six reference compounds for setimating antioxidant capacity of the tomato extracts using an ultrasound assisted extraction." *International Journal of Phytomedicinr*. 6 : 608-616.
- Stackebrandt, E. and Ebers, J. 2006. "Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards." *Microbiol Today*. 33 : 152-155.
- Staneck, J.L. and Roberts, G.D. 1974. "Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography." *Applied Microbiology*. 28 : 226-231.
- Šturdíková, M., Proksa, B., Uhrín, D., and Fuska, J. 1990. "Regulation of biosynthesis of thiolutin and aureothricin in *Streptomyces kasugaensis*." *Folia Microbiologica*. 35 : 278-283.
- Subramani, R. and Aalbersberg, W. 2012. "Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites." *Microbiological Research*. 167 : 571-580.
- Sugiyama, Y., and Hirota, A. 2009. "New potent DPPH radical scavengers from a marine-derived actinomycete strain USF-TC31." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 73 : 2731-2734.

Supong, K., Suriyachadkun, C., Tanasupawat, S., Suwanborirux, K., Pittayakhajonwut, P., Kudo, T. and Thawai, C. 2013. “*Micromonospora sediminicola* sp. nov., isolated from a marine sediment of the Andaman Sea of Thailand.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 63 : 570-575.

Świelcimska, M., Golińska, P., Nouioui, I., Wypij, M., Rai, M., Sangal, V., and Goodfellow, M. 2020. “*Streptomyces alkaliterrae* sp. nov., isolated from an alkaline soil, and emended descriptions of *Streptomyces alkaliphilus*, *Streptomyces calidiresistens* and *Streptomyces durbertensis*.” *Systematic and Applied Microbiology*. 43 : 126153.

Swift, S.M., Reid, K.P., Donovan, D.M. and Ramsay, T.G. 2019. “Thermophile Lytic Enzyme Fusion Proteins that Target *Clostridium perfringens*.” *Antibiotics*. 8 : 214-231.

Synchrotron Light Research Institute. 2562. ระบบลำเลียงแสงที่ 4.1: IR Spectroscopy and Imaging . [Online]. Available : <https://www.slri.or.th/th/beamline/bl41.html>.

Szabó, C., and Dawson, V. L. 1998. “Role of poly (ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischaemia-reperfusion.” *Trends in Pharmacological Sciences*. 19 : 287-298.

Tamaoka, J. 1994. “Dertermination of DNA Base Composition. 463-470.” In Goodfellow, M. and O’Donnell AG. **Chemical Methods in Prokaryotic Systematics**. Chichester : John Wiley and Sons.

Tanasupawat, S., Phongsopitanun, W., Suwanborirux, K., Ohkuma, M. and Kudo, T., 2016. “*Streptomyces actinomycinicus* sp. nov., isolated from soil of a peat swamp forest.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 66 : 290-295.

Targuma, S., Njobeh, P.B. and Ndungu, P.G. 2021. “Current applications of magnetic nanomaterials for extraction of mycotoxins, pesticides, and pharmaceuticals in food commodities.” *Molecules*. 26 : 4284.

Teeling, H., Meyerdieks, A., Bauer, M., Amann, R. and Glöckner, F.O. 2004. “Application of tetranucleotide frequencies for the assignment of genomic fragments.” *Environmental Microbiology*. 6 : 938-947.

- Thirumurugan, D., Cholarajan, A., Raja, S.S.S. and Vijayakumar, R. 2018. **An Introductory Chapter: Secondary Metabolites.** [Online]. Available : <https://www.intechopen.com/chapters/62731>.
- Thompson, C.C., Chimetto, L., Edwards, R.A., Swings, J., Stackebrandt, E. and Thompson, F.L. 2013. "Microbial genomic taxonomy." *BMC genomics*. 14 : 1-8.
- Tindall, B.J., Rosselló-Móra, R., Busse, H.J., Ludwig, W. and Kämpfer, P. 2010. "Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60 : 249-266.
- Trcek, J. and Teuber, M. 2002. "Genetic and restriction analysis of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions of the acetic acid bacteria." *FEMS Microbiology Letters*. 19 : 69-75.
- Urkude, R., Dhurvey, V. and Kochhar, S. 2019. "Pesticide Residues in Beverages." *Quality Control in the Beverage Industry*. 17 : 529-560.
- Vobis, G. 1997. **Morphology of Actinomycetes.** In **Atlas of Actinomycetes**. 180- 191. The Society for Actinomycetes Japan. Asakura Publishing.
- 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." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 37 : 463-464.
- Wei, L., Liao, Z., Ma, H., Wei, J. and Peng, C. 2022. "Antioxidant properties, anti- SARS-CoV-2 study, collagenase and elastase inhibition effects, anti-human lung cancer potential of some phenolic compounds." *Journal of the Indian Chemical Society*. 99 : 100416.
- Willey, J.M., Sherwood, L.M. and Woolverton, C.J. 2009. **Prescott's Principles of Microbiology.** New York: The McGraw-Hill Companies.
- Wongsukkasem, N., Soynark, O., Suthakitmanus, M., Chongdiloet, E., Chairattanapituk, C., Vattanikitsiri, P., Hongratanaworakit, T. and Tadtong, S. 2018. "Antiacne-causing bacteria, antioxidant, anti-tyrosinase, anti-elastase and anti-collagenase activities of

- blend essential oil comprising rose, bergamot and patchouli oils.” *Natural Product Communications*. 13 : 639-642.
- Xie, Y., Zhou, S., Xu, Y., Wu, W., Xia, W., Zhang, R., Huang, D. and Huang, X. 2020. “*Gordonia mangrovi* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from mangrove soil in Hainan.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 70 : 4537-4543.
- Yu, X., Guo, X., Morimoto, A. and Buranapratheprat, A. 2018. “Simulation of river plume behaviors in a tropical region: case study of the Upper Gulf of Thailand.” *Continental Shelf Research*. 153 : 16–29.
- Zabolotneva, A., Shatova, O.P., Sadova, A.A., Shestopalov, A.V. and Roumiantsev, S.A. 2022. “An overview of alkylresorcinols biological properties and effects.” *Journal of nutrition and metabolism*.
- Zhang, J. and Zhang, L. 2011. “Improvement of an isolation medium for actinomycetes.” *Modern Applied Science*. 5 : 124.
- Zhang, X., Zhang, J., Zheng, J., Xin, D., Xin, Y. and Pang, H. 2013. “*Streptomyces wuyuanensis* sp. nov., an actinomycete from soil.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 63 : 2945–2950.
- Zhi, X.Y., Li, W.J. and Stackebrandt, E. 2009. “An update of the structure and ยืนยัน 16S rRNA sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59 : 589-608.
- Zhu, W. and Gao, J. 2008. “The use of botanical extracts as topical skin-lightening agents for the improvement of skin pigmentation disorders.” *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. 13 : 20-24.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารสำหรับคัดแยกเชื้อ

Strach casein nitrate (SCN) seawater agar

Soluble starch	10.0	g
Sodium caseinate	1.0	g
KNO ₃	2.0	g
KH ₂ PO ₄	0.5	g
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0.5	g
Agar	18.0	g
น้ำทะเล	1.0	L

pH 7.2 ± 0.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เมื่อนึ่งฆ่าเชื้อเสร็จรอให้อาหารเย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50 °C จากนั้นเติมยาปฏิชีวนะ

Nalidixic acid 50 mg (ละลายใน 0.2N NaOH) และ Nystatin 100 mg (ละลายใน 100% DMSO)
ผ่านตัวกรองขนาด 0.45 µm

Zhang's starch soil extract (ZSSE) seawater agar

Soluble starch	5.0	g
KNO ₃	1.0	g
Agar	18.0	g
Soil extract solution*	1.0	L

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เมื่อนึ่งฆ่าเชื้อเสร็จรอให้อาหารเย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50 °C จากนั้นเติมยาปฏิชีวนะ

Nalidixic acid 50 mg (ละลายใน 0.2N NaOH) และ Nystatin 100 mg (ละลายใน 100% DMSO)
ผ่านตัวกรองขนาด 0.45 µm

*เตรียม Soil extract solution โดยการชั่งน้ำหนักดิน 1 kg ผสมกับน้ำทะเลปริมาตร 1 L จากนั้นนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน นำส่วนใสมาใช้ในการทำอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารตรวจสอบลักษณะการเจริญ

Yeast extract-malt extract (ISP 2) agar

Glucose	4.0	g
Yeast extract	4.0	g
Malt extract	10.0	g
น้ำกลั่น	1.0	L

pH 7.2 ± 0.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Oatmeal agar (ISP 3)

Oatmeal	20.0	g
Trace salts solution	1.0	mL
Agar	18.0	g
น้ำกลั่น	1.0	L

pH 7.2 ± 0.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Inorganic salts – starch agar (ISP 4)

Soluble starch	10.0	g
K ₂ HPO ₄	1.0	g
MgSO ₄ • 7H ₂ O	1.0	g
NaCl	1.0	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0	g
CaCO ₃	2.0	g
Trace salts solution	1.0	mL
Agar	20.0	g
น้ำกลั่น	1.0	L

pH 7.2 ± 0.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Glycerol – asparagine agar (ISP 5)

L-asparagine	1.0	g
Glycerol	10.0	g
K ₂ HPO ₄	1.0	g
Trace salts solution	1.0	mL
Agar	20.0	g
น้ำกลั่น	1.0	L

pH 7.2 ± 0.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Peptone – yeast extract iron agar (ISP 6)

Peptone iron agar (Difco)	36.0	g
Yeast extract	1.0	g
น้ำกลั่น	1.0	L

pH 7.2 ± 0.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Tyrosine agar (ISP 7)

Glycerol	15.0	g
L-tyrosine	0.5	g
L-asparagine	1.0	g
K ₂ HPO ₄	0.5	g
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0.5	g
NaCl	0.5	g
FeSO ₄ • 7H ₂ O	0.01	g
Trace salts solution	1.0	mL
Agar	20.0	g
น้ำกลั่น	1.0	L

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pH 7.2 ± 0.2 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาทีTrace salts solution

FeSO ₄ • 7H ₂ O	0.1	g
MnCl ₂ • 4H ₂ O	0.1	g
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	0.1	g
น้ำกลั่น	100.0	mL

Glucose asparagine agar

Glucose	10.0	g
Asparagine	0.5	g
K ₂ HPO ₄	0.5	g
Agar	15.0	g
น้ำกลั่น	1.0	L

pH 7.2 ± 0.2 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาทีCzapek's sucrose agar

Sucrose	30.0	g
K ₂ HPO ₄	1.0	g
MgSO ₄	0.5	g
KCl	0.5	g
FeSO ₄	0.01	g
Agar	15.0	g
น้ำกลั่น	1.0	L

pH 7.2 ± 0.2 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาทีNutrient agar (Difco)

Beef extract	3.0	g
--------------	-----	---

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Peptone	5.0	g
Agar	15.0	g
น้ำกลั่น	1.0	L
pH 6.8		
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที		

อาหารทดสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน

Carbon utilization (ISP 9) medium

แหล่งคาร์บอน	10.0	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.64	g
K ₂ HPO ₄ • 3H ₂ O	5.65	g
KH ₂ PO ₄ anhydrous	2.38	g
MgSO ₄ • 7H ₂ O	1.0	g
Pridham and Gottlieb trace salts	1.0	g
Agar	18.0	g
น้ำกลั่น	1.0	L
pH 7.2 ± 0.2		

นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 110 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 10 นาที

Pridham and Gottlieb trace salts

CuSO ₄ • 5H ₂ O	0.64	g
FeSO ₄ • 7H ₂ O	0.11	g
MnCl ₂ • 4H ₂ O	0.79	g
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	0.15	g
น้ำกลั่น	100.0	mL

อาหารทดสอบความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจน

Nitrogen utilization medium

แหล่งไนโตรเจน	1.0	g
Glucose	1.0	g
NaCl	0.05	g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

MgSO ₄ • 7H ₂ O	0.05	g
FeSO ₄ • 7H ₂ O	0.001	g
K ₂ HPO ₄	0.01	g
Agar	18.0	g
น้ำกลั่น	1.0	L
pH 7.2 ± 0.2		

นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 110 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 10 นาที

อาหารทดสอบความสามารถในการผลิตกรดจากแหล่งคาร์โบไฮเดรต

Basal inorganic nitrogen medium

แหล่งคาร์บอน	10.0	g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1.0	g
KCl	0.2	g
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0.2	g
Agar	18.0	g
น้ำกลั่น	1.0	L
0.04% Bromocresol-purple	15.0	mL
pH 7.2 ± 0.2		

นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 110 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 10 นาที

0.04% Bromocresol-purple

Bromocresol-purple	0.04	g
น้ำกลั่น	100.0	mL

อาหารทดสอบลักษณะทางชีวเคมี

Bouillon gelatin broth

Peptone	1.0	g
Meat extract	0.5	g
NaCl	0.5	g
Gelatin	15.0	g
น้ำกลั่น	100.0	mL

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pH 7.2 ± 0.2

นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

Carboxymethyl cellulose (CMC) agar

MgSO ₄ • 7H ₂ O	0.1	g
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0.2	g
FeSO ₄ • 7H ₂ O	0.04	g
NaCl	0.2	g
KH ₂ PO ₄	0.3	g
K ₂ HPO ₄	0.5	g
Yeast extract	0.1	g
Carboxymethyl cellulose	10.0	g
Agar	18.0	g
น้ำกลั่น	100.0	mL

pH 7.2 ± 0.2

นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

Chitin agar

KH ₂ PO ₄	0.3	g
K ₂ HPO ₄	0.7	g
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0.5	g
FeSO ₄ • 7H ₂ O	0.01	g
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	0.01	g
MnCl ₂ • 4H ₂ O	0.01	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.25	g
Yeast extract	0.2	g
Chitin	10.0	g
Agar	18.0	g
น้ำกลั่น	1.0	L

pH 7.2 ± 0.2

นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Christensen's urea agar

Peptone	1.0	g
Glucose	1.0	g
NaCl	5.0	g
KH ₂ PO ₄	0.3	g
Phenol red	0.012	g
Agar	18.0	g
น้ำกลั่น	900.0	mL
20% Urea solution*	100.0	mL

pH 6.8 ± 0.1

นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

*เมื่อนึ่งฆ่าเชื้อเสร็จรอให้อาหารเย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50 °C จากนั้นเติมสารละลาย urea 20 g ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 mL โดยใช้ตัวกรองขนาด 0.45 µm

Peptone potassium nitrate broth

Peptone	1.0	g
KNO ₃	0.1	g
NaCl	0.5	g
น้ำกลั่น	100	mL

pH 7.2 ± 0.2

นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

10% Skim milk broth

Skim milk	10.0	g
น้ำกลั่น	100	mL

นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 110 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 10 นาที

Skim milk agar

Skim milk	2.0	g
Glucose	1.0	g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

K_2HPO_4	0.2	g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	Trace	
Agar	18.0	g
น้ำกลั่น	1.0	L

pH 7.2 ± 0.2

นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ $110^\circ C$ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 10 นาที

Triple sugar iron (TSI) agar

Beef extract	3.0	g
Peptone	20.0	g
Yeast extract	3.0	g
Lactose	10.0	g
Sucrose	10.0	g
Dextrose	1.0	g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	g
NaCl	5.0	g
$Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$	0.3	g
Phenol red	0.024	g
Agar	12.0	g
น้ำกลั่น	1.0	L

pH 7.2 ± 0.2

นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ $115^\circ C$ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

Tween 80 agar

Peptone	10.0	g
NaCl	5.0	g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.1	g
Tween 80	10.0	mL
Agar	18.0	g
น้ำกลั่น	1.0	L

pH 7.2 ± 0.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

Xylan agar

Yeast extract	0.4	g
Malt extract	1.0	g
Glucose	0.4	g
Xylan	2.5	g
pH 6.8 – 7.2		

นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

Insoluble compound test medium

Yeast extract	0.4	g
Malt extract	1.0	g
Glucose	0.4	g
Insoluble compound	0.5	g
Agar	1.8	g
น้ำกลั่น	100	mL
pH 7.2 ± 0.2		

นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

อาหารสำหรับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

Potato dextrose agar (PDA)

Potatoes, infusion form	200	g
Dextrose	20.0	g
Agar	18.0	g
น้ำกลั่น	1.0	L
pH 5.6 ± 0.2		

นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

Mueller Hinton agar

Beef extract powder	2.0	g
---------------------	-----	---

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Acid digest of casein	17.5	g
Soluble starch	1.5	g
Agar	18.0	g

pH 7.2 ± 0.2

นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

สารเคมี

1 N H₂SO₄

Conc. H ₂ SO ₄	1.0	mL
น้ำกลั่น	34.0	mL
ค่อย ๆ เติม Conc. H ₂ SO ₄ ลงในน้ำกลั่น		

6 N HCl

Conc. HCl	60.0	mL
น้ำกลั่น	60.0	mL
ค่อย ๆ เติม Conc. HCl ลงในน้ำกลั่น		

5 N Acetic acid

Glacial acetic acid	28.74	mL
น้ำกลั่น	71.26	mL
ค่อย ๆ เติม glacial acetic acid ลงในน้ำกลั่น		

0.4% ninhydrin solution

Ninhydrin	0.4	g
n-butanol saturated with water	100	mL

ชั่ง Ninhydrin 0.4 g เติมลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL เติม n-butanol saturated with water 50 mL ผสมให้เข้ากันดีปรับปริมาตรด้วย n-butanol saturated with water จนครบ 100 mL ผสมให้เข้ากัน

n-butanol saturated with water

เตรียม n-butanol saturated with water โดยทำการผสม n-butanol กับน้ำกลั่นในปริมาตร 1:1 ในภาชนะปิด จากนั้นทำการบ่มที่สภาวะเขย่าข้ามคืน ดูดสารละลายส่วนบนมาใช้จะได้ n-butanol saturated with water

Aniline phthalate

Phthalic acid	3.25	g
n-butanol saturated with water	100	mL
Aniline	2.0	mL

ชั่ง Phthalic acid 3.25 g เติมลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL เติม n-butanol saturated with water 50 mL ผสมให้เข้ากันดีปรับปริมาตรด้วย n-butanol saturated with water จนครบ 100 mL ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม Aniline 2 mL ผสมให้เข้ากัน

Reagent for nitrate reduction analysis**Sulphanilic acid solution**

Sulphanilic acid	0.8	g
5 N Acetic acid	100	mL

ชั่ง Sulphanilic acid 0.8 g เติมลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL เติม 5 N Acetic acid 50 mL ผสมให้เข้ากันดีปรับปริมาตรด้วย 5 N Acetic acid จนครบ 100 mL ผสมให้เข้ากัน

***N, N*-dimethyl-1-naphthylamine reagent**

<i>N, N</i> -dimethyl-1-naphthylamine	0.5	g
5 N Acetic acid	100	mL

ชั่ง *N, N*-dimethyl-1-naphthylamine 0.5 g เติมลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL เติม 5 N Acetic acid 50 mL ผสมให้เข้ากันดีปรับปริมาตรด้วย 5 N Acetic acid จนครบ 100 mL ผสมให้เข้ากัน

Reagent for fatty acid**Reagent 1 (Saponification reagent)**

NaOH	15.0	g
Methanol (HPLC grade)	50.0	mL
Milli-Q water	50.0	mL

ชั่ง NaOH 15 g เติมลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL เติม Milli-Q water 50 mL ผสมให้เข้ากันดีปรับปริมาตรด้วย Methanol (HPLC grade) จนครบ 100 mL ผสมให้เข้ากัน

Reagent 2 (Methylation reagent)

6 N HCl	65.0	mL
Methanol (HPLC grade)	55.0	mL
pH < 1.5		

Reagent 3 (Extraction solvent)

N-Hexane (HPLC grade)	50.0	mL
Methyl-3-Buthyl ether (HPLC grade)	50.0	mL

Reagent 4 (Base wash reagent)

NaOH	1.2	g
Milli-Q water	100	mL

ซึ่ง NaOH 1.2 g เติมลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL เติม Milli-Q water 50 mL ผสมให้เข้ากันดีปรับปริมาตรด้วย Milli-Q water จนครบ 100 mL ผสมให้เข้ากัน

Reagent 5 (Saturated solution chloride)

เตรียม NaOH saturated in milli-Q water โดยทำการผสม NaOH กับ milli-Q water ในปริมาณ 1:1 ในภาชนะปิด จากนั้นทำการบ่มที่สภาวะเขย่าข้ามคืน ดูดสารละลายส่วนบนมาใช้จะได้ NaOH saturated in milli-Q water

Reagent for polar lipid analysis**Anisaldehyde reagent**

Ethanol	90.0	mL
Conc. H ₂ SO ₄	5.0	mL
p-anisaldehyde	5.0	mL
Acetic acid	1.0	mL

Dragendorff's reagent**Solution A**

Basic bismuth nitrate	1.7	g
Acetic acid	20.0	mL
น้ำกลั่น	80.0	mL

ชั่ง Basic bismuth nitrate 1.7 g เติมลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL เติมน้ำกลั่น 80 mL ผสมให้เข้ากันดี ค่อย ๆ ปรับปริมาตรด้วย Acetic acid จนครบ 100 mL ผสมให้เข้ากัน

Solution B

KI	40.0	g
น้ำกลั่น	100	mL

ชั่ง KI 40 g เติมลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL เติมน้ำกลั่น 50 mL ผสมให้เข้ากันดี ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 mL ผสมให้เข้ากัน ก่อนใช้ให้ผสม solution A (10 mL) กับ solution B (10 mL) และ Acetic acid (10 mL)

Phosphomolybdic acid reagent

Phosphomolybdic acid	5.0	g
Absolute ethanol	100	mL

ชั่ง Phosphomolybdic acid 5 g เติมลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL เติม Absolute ethanol 50 mL ผสมให้เข้ากันดี ปรับปริมาตรด้วย Absolute ethanol จนครบ 100 mL ผสมให้เข้ากัน

สารละลายสำหรับตรวจผลทดสอบการสร้างเอนไซม์

1 mg/mL Congo red solution

Congo red	0.1	g
น้ำกลั่น	100	mL

ชั่ง Congo red 0.1 g เติมลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL เติมน้ำกลั่น 50 mL ผสมให้เข้ากันดี ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 mL ผสมให้เข้ากัน

5M NaCl

NaCl	29.22	g
น้ำกลั่น	100	mL

ชั่ง NaCl 29.22 g เติมลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL เติมน้ำกลั่น 50 mL ผสมให้เข้ากันดี ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 mL ผสมให้เข้ากัน

1M NaCl

NaCl	5.84	g
น้ำกลั่น	100	mL

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่ง NaCl 5.84 g เติมลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL เติมน้ำกลั่น 50 mL ผสมให้เข้ากันดี ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 mL ผสมให้เข้ากัน

Iodine solution

Iodine	5.0	g
KI	10.0	g
น้ำกลั่น	100	mL

ชั่ง Iodine 5 g และชั่ง KI 10 g เติมลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL เติมน้ำกลั่น 50 mL ผสมให้เข้ากันดี ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 mL ผสมให้เข้ากัน

สารเคมีสำหรับทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

0.2 mM 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	0.008	g
Methanol	100	mL

ละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ในตัวทำละลาย Methanol ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรให้มีปริมาตร 100 mL ทำให้ละลายจนหมดด้วย Ultra Sonicator เป็นเวลา 30 นาที เก็บในภาชนะที่บดแสงปิดฝาให้สนิท

0.5 McFarland standard

1% (v/v) Sulfuric acid	9.95	mL
1.175% (w/v) (BaCl ₂ • 2H ₂ O)	0.05	mL

1% (v/v) Sulfuric acid

เติมน้ำกลั่น 90 mL ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL เติม H₂SO₄ เข้มข้น ปริมาตร 1.0 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเท่ากับ 100 mL ผสมให้เข้ากัน

1.175% (w/v) (BaCl₂ • 2H₂O)

ชั่ง BaCl₂ • 2H₂O 1.175 g เติมลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL เติมน้ำกลั่น 50 mL ผสมให้เข้ากันดี ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 mL เขย่าให้เข้ากัน

สารเคมีสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ

CTAB/NaCl

CTAB	10.0	g
NaCl	4.1	g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Milli-Q water	80	mL
---------------	----	----

ทำการละลาย NaCl และ CTAB โดยใช้ความร้อนที่ 65 °C ปั่นกวนอัตโนมัติไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นปรับปริมาตรด้วย milli-Q water จนมีปริมาตร 100 mL นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

10X TE buffer

Tris-HCl	15.759	g
EDTA	2.92	g
Milli-Q water	1.0	L

ชั่ง Tris-HCl 15.759 g เติมลงในน้ำกลั่น 800 mL ผสมให้เข้ากัน ปรับ pH = 8 ด้วย 5M NaOH จากนั้นชั่ง EDTA 2.92 g ผสมให้เข้ากัน ปรับ pH = 8 ด้วย 5M NaOH ปรับปริมาตรด้วย Milli-Q water จนมีปริมาตรครบ 1.0 L ก่อนนำไปใช้ เจือจาง 10X TE buffer ให้เป็น 1X TE buffer ด้วย Milli-Q water นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

Lysozyme (100 µg/mL)

Lysozyme	0.0001	g
1 M Tris-HCl (pH 8)	1.0	mL

ชั่ง Lysozyme 0.0001 g เติม 1 M Tris-HCl (pH 8) ปริมาตร 1 mL ผสมให้เข้ากัน

10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)

Sodium dodecyl sulfate	10.0	g
Milli-Q water	100	mL

ชั่ง Sodium dodecyl sulfate 10 g เติมลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL เติม Milli-Q water 50 mL ผสมให้เข้ากันดี ปรับปริมาตรด้วย Milli-Q water จนครบ 100 mL ผสมให้เข้ากัน ไม่ต้องฆ่าเชื้อด้วย autoclave

5M NaCl

NaCl	29.22	g
Milli-Q water	100	mL

ชั่ง NaCl 29.22 g เติมลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL เติม Milli-Q water 50 mL ผสมให้เข้ากันดี ปรับปริมาตรด้วย Milli-Q water จนครบ 100 mL นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

Phenol : Chloroform (1:1 v/v)

ทำการบ่ม Phenol ที่มีสถานะเป็นของแข็งที่อุณหภูมิ 65 °C จนกระทั่งมีสถานะเป็นของเหลว จากนั้นผสมกับ Chloroform ในอัตราส่วน 1:1 เก็บรักษาในที่มืด

RNase A solution

RNase A	20.0	mg
---------	------	----

0.15 M NaCl	10	mL
-------------	----	----

ทำการละลาย RNase A ด้วย 0.15 M NaCl และบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C

3M sodium acetate

Sodium acetate	24.61	g
----------------	-------	---

Milli-Q water	100	mL
---------------	-----	----

ชั่ง Sodium acetate 24.61 g เติมลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL เติม Milli-Q water 50 mL ผสมให้เข้ากันดี ปรับปริมาตรด้วย Milli-Q water จนครบ 100 mL นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

0.8% Agarose gel (stained gel)

Agarose	0.8	g
---------	-----	---

1X TBE or TAE buffer	100	mL
----------------------	-----	----

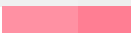


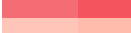






















SYBR® safe DNA gel stain	1.0	µL
--------------------------	-----	----

ชั่ง Agarose 0.8 g เติมลงในขวดขวดรูปชมพู่ขนาด 200 mL เติม buffer 100 mL ผสมให้เข้ากันดีโดยใช้ความร้อนจนสารละลายใส รอให้อุณหภูมิต่ำลงประมาณ 60 °C แล้วจึงเติม SYBR® safe DNA gel stain 1 µL ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การดาขสีมาตรฐาน NBS/ISCC color system

การดาขสีมาตรฐาน NBS/ISCC color system (Mundie, 1995)

Centroid	Munsell	RGB	Swatch
Red, Pink			
1 Vivid Pink	1r 8.0 13.0	#FF7E93	
2 Strong Pink	1.2r 6.9 8.2	#FD7B7C	
3 Deep Pink	2.1r 6.0 11.1	#F3545E	
4 Light Pink	2.6r 8.5 4.0	#FFBCAD	
5 Moderate Pink	2.8r 7.2 5.3	#EE9086	
6 Dark Pink	2.7r 5.9 6.1	#C76864	
7 Pale Pink	2.0r 8.7 2.1	#FFCBBB	
8 Grayish Pink	2.6r 7.2 2.3	#CF9B8F	
9 Pinkish White	5.8r 9.0 0.8	#F9DBC8	
10 Pinkish Gray	9.8r 7.4 1.0	#C8A696	
11 Vivid Red	5.0r 3.9 15.4	#C10020	
12 Strong Red	4.0r 4.4 12.1	#BF2233	
13 Deep Red	5.1r 2.8 10.1	#7B001C	
14 Very Deep Red	6.5r 1.7 8.4	#4F0014	
15 Moderate Red	3.8r 4.4 9.1	#AB343A	
16 Dark Red	4.0r 2.8 6.8	#681C23	
17 Very Dark Red	2.0r 1.2 4.8	#320A18	
18 Light Grayish Red	5.3r 5.9 3.5	#B17267	
19 Grayish Red	4.0r 4.4 4.8	#8C4743	
20 Dark Grayish Red	2.9r 2.7 2.1	#482A2A	
21 Blackish Red	3.9r 0.8 1.7	#1F0E11	
22 Reddish Gray	7.0r 5.4 1.3	#8B6C62	
23 Dark Reddish Gray	6.0r 3.4 1.0	#523C36	
24 Reddish Black	2.0r 0.9 0.9	#1E1112	
Yellowish Pink			
25 Vivid Yellowish Pink	8.0r 8.0 13.0	#FF845C	
26 Strong Yellowish Pink	8.4r 7.0 9.5	#FF7A5C	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

27 Deep Yellowish Pink	5.5r 5.8 12.1	#F64A46	
28 Light Yellowish Pink	1.9yr 8.2 4.6	#FFB28B	
29 Moderate Yellowish Pink	0.7yr 7.2 4.9	#EE9374	
30 Dark Yellowish Pink	7.0r 6.0 6.1	#CC6C5C	
31 Pale Yellowish Pink	4.2yr 8.6 2.2	#FFC8A8	
32 Grayish Yellowish Pink	1.3yr 7.2 2.4	#D39B85	
Reddish Orange, Reddish Brown			
33 Brownish Pink	7.0yr 7.1 2.3	#CD9A7B	
34 Vivid Reddish Orange	9.8r 5.4 14.5	#F13A13	
35 Strong Reddish Orange	9.3r 5.4 12.2	#FFB961	
36 Deep Reddish Orange	9.2r 3.9 12.1	#A91D11	
37 Moderate Reddish Orange	9.3r 5.5 9.2	#D35339	
38 Dark Reddish Orange	9.3r 4.0 9.1	#9B2F1F	
39 Grayish Reddish Orange	0.4yr 5.4 6.2	#B85D43	
40 Strong Reddish Brown	0.3yr 3.1 9.9	#7F180D	
41 Deep Reddish Brown	1.6yr 1.5 8.3	#490005	
42 Light Reddish Brown	0.5yr 5.5 4.1	#AA6651	
43 Moderate Reddish Brown	9.0r 3.4 5.2	#712F26	
44 Dark Reddish Brown	9.6r 1.3 3.6	#321011	
45 Light Grayish Reddish Brown	2.9yr 5.4 2.3	#966A57	
46 Grayish Reddish Brown	9.0r 3.4 2.4	#5E3830	
47 Dark Grayish Reddish Brown	9.0r 2.0 2.0	#371F1C	
Orange Brown			
48 Vivid Orange	4.1yr 6.5 15.0	#FF6800	
49 Brilliant Orange	4.0yr 9.0 12.0	#FFB841	
50 Strong Orange	4.3yr 6.5 12.2	#FF6F1A	
51 Deep Orange	4.1yr 5.1 11.3	#C34D0A	
52 Light Orange	4.8yr 7.8 7.2	#FFA161	
53 Moderate Orange	4.6yr 6.5 8.2	#E8793E	
54 Brownish Orange	4.1yr 5.0 8.0	#B15124	
55 Strong Brown	4.6yr 3.5 7.6	#753313	
56 Deep Brown	5.6yr 2.4 5.2	#4D220E	
57 Light Brown	5.4yr 5.4 4.8	#A86540	
58 Moderate Brown	5.6yr 3.5 3.9	#673923	
59 Dark Brown	5.3yr 1.6 3.4	#35170C	
60 Light Grayish Brown	6.4yr 5.4 2.2	#946B54	
61 Grayish Brown	5.5yr 3.5 1.8	#5A3D30	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

62 Dark Grayish Brown	5.5yr 2.0 1.5	#32221A	
63 Light Brownish Gray	7.0yr 5.4 1.2	#8B6D5C	
64 Brownish Gray	5.65r 3.4 0.9	#503D33	
65 Brownish Black	7.8yr 0.6 0.9	#140F0B	
Orange Yellow, Yellowish Brown			
66 Vivid Orange Yellow	8.6yr 7.3 15.2	#FF8E00	
67 Brilliant Orange Yellow	0.1y 8.1 10.5	#FFB02E	
68 Strong Orange Yellow	9.1yr 7.1 11.6	#FF8E0D	
69 Deep Orange Yellow	8.6yr 6.0 12.1	#D76E00	
70 Light Orange Yellow	9.4yr 8.3 6.8	#FFB961	
71 Moderate Orange Yellow	8.7yr 7.2 8.3	#F7943C	
72 Dark Orange Yellow	9.3yr 6.0 7.9	#C37629	
73 Pale Orange Yellow	9.2yr 8.7 4.4	#FFCA86	
74 Strong Yellowish Brown	8.8yr 4.6 8.5	#95500C	
75 Deep Yellowish Brown	8.8yr 3.1 5.0	#593315	
76 Light Yellowish Brown	8.7yr 6.5 5.0	#BB8B54	
77 Moderate Yellowish Brown	9.5yr 4.4 3.9	#7D512D	
78 Dark Yellowish Brown	9.4yr 2.3 3.3	#3F2512	
79 Light Grayish Yellowish Brown	9.7yr 6.4 2.5	#B48764	
80 Grayish Yellowish Brown	9.5yr 4.6 2.1	#785840	
81 Dark Grayish Yellowish Brown	8.8yr 2.5 1.6	#3D2B1F	
Yellow, Olive Brown			
82 Vivid Yellow	3.3y 8.0 14.3	#FFB300	
83 Brilliant Yellow	4.4y 8.7 8.9	#FFCF40	
84 Strong Yellow	3.7y 7.2 9.3	#E59E1F	
85 Deep Yellow	3.7y 5.9 9.1	#B57900	
86 Light Yellow	4.3y 8.8 6.8	#FFD35F	
87 Moderate Yellow	3.8y 7.1 6.5	#D79D41	
88 Dark Yellow	3.9y 6.0 6.4	#B07D2B	
89 Pale Yellow	4.7y 9.0 3.8	#FFDB8B	
90 Grayish Yellow	4.4y 7.2 3.8	#CEA262	
91 Dark Grayish Yellow	3.8y 5.9 4.0	#A47C45	
92 Yellowish White	4.5y 9.2 1.2	#FFE2B7	
93 Yellowish Gray	3.8y 7.4 1.4	#CAA885	
94 Light Olive Brown	2.1y 4.9 7.9	#945D0B	
95 Moderate Olive Brown	2.7y 3.6 5.5	#64400F	
96 Dark Olive Brown	2.0y 1.9 2.2	#302112	

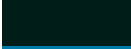






















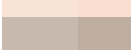










เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Greenish Yellow, Olive			
97 Vivid Greenish Yellow	9.1y 8.2 12.0	#F4C800	
98 Brilliant Greenish Yellow	9.8y 8.8 9.5	#FFDC33	
99 Strong Greenish Yellow	9.2y 7.2 9.2	#CCA817	
100 Deep Greenish Yellow	9.2y 5.9 9.2	#9F8200	
101 Light Greenish Yellow	9.8y 8.9 7.0	#FFDE5A	
102 Moderate Greenish Yellow	9.5y 7.1 6.5	#C4A43D	
103 Dark Greenish Yellow	9.4y 5.9 6.3	#9B8127	
104 Pale Greenish Yellow	9.5y 9.0 4.2	#FFDF84	
105 Grayish Greenish Yellow	9.0y 7.2 3.9	#C4A55F	
106 Light Olive	8.2y 5.1 5.6	#846A20	
107 Moderate Olive	7.6y 3.8 5.4	#5E490F	
108 Dark Olive	8.9y 2.4 3.1	#362C12	
109 Light Grayish Olive	7.85y 5.5 2.5	#8B734B	
110 Grayish Olive	8.0y 3.6 2.0	#52442C	
111 Dark Grayish Olive	9.7y 2.0 1.8	#2B2517	
112 Light Olive Gray	6.9y 5.5 1.3	#887359	
113 Olive Gray	8.1y 3.5 0.9	#4D4234	
114 Olive Black	9.0y 1.1 0.9	#121910	
Yellow Green, Olive Green			
115 Vivid Yellowish Green	5.4gy 6.8 11.2	#93AA00	
116 Brilliant Yellow Green	4.9gy 8.2 9.1	#CED23A	
117 Strong Yellow Green	5.4gy 6.0 8.7	#7F8F18	
118 Deep Yellow Green	7.4gy 4.2 7.1	#425E17	
119 Light Yellow Green	5.0gy 8.4 5.6	#DCD36A	
120 Moderate Yellow Green	4.8gy 6.0 5.0	#8B8940	
121 Pale Yellowish Green	3.4gy 8.7 2.4	#F0D698	
122 Grayish Yellowish Green	4.4gy 6.0 2.3	#90845B	
123 Strong Olive Green	4.0gy 3.0 11.0	#0A4500	
124 Deep Olive Green	4.0gy 1.5 11.0	#142300	
125 Moderate Olive Green	5.7gy 3.6 4.8	#434B1B	
126 Dark Olive Green	8.0gy 2.2 3.6	#232C16	
127 Grayish Olive Green	4.6gy 3.5 2.0	#48442D	
128 Dark Grayish Olive Green	5.4gy 2.0 1.8	#27261A	
129 Vivid Yellowish Green	1.1g 5.9 11.2	#379931	
Yellowish Green			
130 Brilliant Yellowish Green	0.3g 7.7 8.6	#8CCB5E	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

131 Strong Yellowish Green	0.4g 5.4 8.7	#478430	
132 Deep Yellowish Green	0.9g 3.5 9.0	#00541F	
133 Very Deep Yellowish Green	10.0gy 1.5 11.0	#002800	
134 Very Light Yellowish Green	0.2g 8.6 4.6	#C6DF90	
135 Light Yellowish Green	0.7g 7.4 5.2	#007BA7	
136 Moderate Yellowish Green	0.5g 5.5 4.8	#657F4B	
137 Dark Yellowish Green	0.6g 3.5 5.0	#304B26	
138 Very Dark Yellowish Green	0.3g 1.8 4.3	#132712	
Green			
139 Vivid Green	3.2g 4.9 11.1	#007D34	
140 Brilliant Green	6.2g 6.5 8.3	#47A76A	
141 Strong Green	5.8g 4.4 8.7	#006B3C	
142 Deep Green	5.1g 3.0 8.1	#004524	
143 Very Light Green	6.5g 7.8 4.9	#98C793	
144 Light Green	6.0g 6.4 5.1	#719B6E	
145 Moderate Green	6.3g 4.5 5.1	#386646	
146 Dark Green	6.6g 2.8 4.6	#203A27	
147 Very Dark Green	8.0g 1.8 3.0	#16251C	
148 Very Pale Green	7.3g 8.8 1.9	#D8DEBA	
149 Pale Green	7.6g 6.4 1.7	#8D917A	
150 Grayish Green	8.8g 4.5 1.8	#575E4E	
151 Dark Greenish Yellowish Green	1.0bg 2.9 1.8	#313830	
152 Blackish Green	10.0g 1.0 1.4	#141613	
153 Greenish White	10.0g 9.2 0.8	#F5E6CB	
154 Light Greenish Gray	3.0g 7.5 0.9	#BAAF96	
155 Greenish Gray	7.5g 5.5 1.0	#7A7666	
156 Dark Greenish Gray	1.5bg 3.5 0.9	#45433B	
157 Greenish Black	8.7g 1.0 0.7	#181513	
Bluish Green			
158 Vivid Bluish Green	5.0bg 5.0 13.0	#00836E	
159 Brilliant Bluish Green	2.9bg 6.0 9.6	#009B76	
160 Strong Bluish Green	4.6bg 4.5 8.5	#006D5B	
161 Deep Bluish Green	2.8bg 2.4 8.3	#00382B	
162 Very Light Bluish Green	4.4bg 8.3 4.6	#A0D6B4	
163 Light Bluish Green	4.6bg 6.5 4.9	#669E85	
164 Moderate Bluish Green	4.6bg 4.5 5.0	#2F6556	
165 Dark Bluish Green	4.9bg 2.7 5.0	#013A33	































เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

166 Very Dark Bluish Green	3.6bg 1.2 4.0	#001D18	
167 Vivid Greenish Blue	5.0b 5.0 13.0	#007BA7	
Greenish Blue			
168 Brilliant Greenish Blue	4.6b 5.9 7.7	#2A8D9C	
169 Strong Greenish Blue	4.9b 4.5 8.4	#00677E	
170 Deep Greenish Blue	5.0b 5.0 13.0	#007BA7	
171 Very Light Greenish Blue	4.0b 8.0 4.0	#A3C6C0	
172 Light Greenish Blue	4.5b 6.5 5.4	#649A9E	
173 Moderate Greenish Blue	4.7b 4.5 5.2	#30626B	
174 Dark Greenish Blue	3.7b 2.7 5.0	#003841	
175 Very Dark Greenish Blue	5.0b 1.5 3.6	#022027	
Blue			
176 Vivid Blue	5.0b 5.0 14.0	#007CAD	
177 Brilliant Blue	1.6pb 5.9 9.4	#4285B4	
178 Strong Blue	2.9pb 4.1 10.4	#00538A	
179 Deep Blue	2.8pb 2.5 7.9	#002F55	
180 Very Light Blue	2.7pb 7.9 6.0	#A6BDD7	
181 Light Blue	1.6pb 6.4 6.9	#6C92AF	
182 Moderate Blue	3.0pb 4.3 6.8	#395778	
183 Dark Blue	2.2pb 1.7 5.5	#002137	
184 Very Pale Blue	1.5pb 8.3 3.3	#C1CACA	
185 Pale Blue	0.6pb 6.5 2.6	#919192	
186 Grayish Blue	0.2pb 4.2 3.0	#4A545C	
187 Dark Grayish Blue	9.2b 2.7 2.0	#2C3337	
188 Blackish Blue	9.8b 1.3 1.5	#161A1E	
189 Bluish White	9.2b 9.1 1.2	#F9DFCF	
190 Light Bluish Gray	8.2b 7.5 1.0	#BEADA1	
191 Bluish Gray	8.9b 5.5 0.9	#7D746D	
192 Dark Bluish Gray	0.3pb 3.6 1.1	#464544	
193 Bluish Black	9.6b 1.1 0.8	#151719	
Purplish Blue			
194 Very Purplish Blue	7.8pb 2.0 12.5	#20155E	
195 Brilliant Purplish Blue	7.3pb 5.1 9.0	#62639B	
196 Strong Purplish Blue	8.0pb 4.0 10.9	#474389	
197 Deep Purplish Blue	7.8pb 1.5 8.0	#1A153F	
198 Very Light Purplish Blue	7.4pb 7.6 5.2	#BAACC7	
199 Light Purplish Blue	7.3pb 6.0 6.5	#837DA2	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

200 Moderate Purplish Blue	7.9pb 3.5 6.5	#423C63	
201 Dark Purplish Blue	8.0pb 1.3 4.3	#1A162A	
202 Very Pale Purplish Blue	7.0pb 8.0 3.7	#CBBAC5	
203 Pale Purplish Blue	7.0pb 6.0 3.9	#8A7F8E	
204 Grayish Purplish Blue	6.9pb 3.4 3.8	#413D51	
Violet			
205 Vivid Violet	2.0p 5.0 14.0	#884BAE	
206 Brilliant Violet	9.9pb 5.1 9.4	#755D9A	
207 Strong Violet	0.2p 3.7 10.1	#53377A	
208 Deep Violet	1.1p 1.2 8.6	#240935	
209 Very Light Violet	2.0p 8.5 7.0	#EEBEF1	
210 Light Violet	0.5p 5.6 7.1	#876C99	
211 Moderate Violet	1.4p 3.6 7.0	#543964	
212 Dark Violet	1.4p 1.3 4.9	#22132B	
213 Very Pale Violet	9.7pb 7.9 3.7	#D8B1BF	
214 Pale Violet	1.3p 6.0 4.0	#957B8D	
215 Grayish Violet	1.2p 3.3 3.9	#46394B	
Purple			
216 Vivid Purple	6.0p 4.5 14.0	#943391	
217 Brilliant Purple	6.0p 7.0 11.0	#DD80CC	
218 Strong Purple	6.5p 4.3 9.2	#803E75	
219 Deep Purple	6.3p 2.7 9.1	#531A50	
220 Very Deep Purple	5.0p 1.5 8.0	#320B35	
221 Very Light Purple	6.5p 7.8 5.1	#E3A9BE	
222 Light Purple	6.2p 6.5 6.5	#BA7FA2	
223 Moderate Purple	6.6p 4.5 7.1	#7F4870	
224 Dark Purple	6.3p 2.8 4.9	#472A3F	
225 Very Dark Purple	6.9p 1.0 4.5	#230D21	
226 Very Pale Purple	5.5p 8.2 3.2	#E6BBC1	
227 Pale Purple	7.9p 6.4 3.1	#AE848B	
228 Grayish Purple	8.1p 4.5 2.7	#72525C	
229 Dark Grayish Purple	0.5rp 2.8 2.0	#452D35	
230 Blackish Purple	0.8rp 0.9 1.6	#1D1018	
231 Purplish White	2.5rp 9.0 0.8	#FADBC8	
232 Light Purplish Gray	0.3rp 7.5 1.1	#C8A99E	
233 Purplish Gray	1.0rp 5.5 0.9	#88706B	
234 Dark Purplish Gray	1.0rp 3.6 1.0	#564042	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

235 Purplish Black	9.54p 0.9 0.6	#1B1116	
Reddish Purple			
236 Vivid Reddish Purple	1.0rp 3.0 14.0	#7E0059	
237 Strong Reddish Purple	1.3rp 4.4 10.2	#9A366B	
238 Deep Reddish Purple	1.0rp 2.8 9.5	#641349	
239 Very Deep Reddish Purple	0.9rp 1.9 8.9	#470736	
240 Light Reddish Purple	0.7rp 6.0 6.9	#BB6C8A	
241 Moderate Reddish Purple	0.8rp 4.5 7.0	#8C4566	
242 Dark Reddish Purple	1.3rp 2.8 4.8	#4F273A	
243 Very Dark Reddish Purple	1.5rp 1.0 4.8	#270A1F	
244 Pale Reddish Purple	1.3rp 6.0 4.2	#AC7580	
245 Grayish Reddish Purple	1.0rp 4.5 4.2	#7D4D5D	
Purplish Pink, Purplish Red			
246 Brilliant Purplish Pink	6.0rp 8.5 11.0	#FF97BB	
247 Strong Purplish Pink	5.6rp 6.8 9.0	#F6768E	
248 Deep Purplish Pink	4.4rp 6.0 12.2	#EB5284	
249 Light Purplish Pink	4.6rp 8.0 5.5	#FFA8AF	
250 Moderate Purplish Pink	4.6rp 6.8 6.7	#E28090	
251 Dark Purplish Pink	6.4rp 5.9 7.0	#C76574	
252 Pale Purplish Pink	3.7rp 8.4 3.3	#FDBDBA	
253 Grayish Purplish Pink	3.7rp 7.0 3.5	#CC9293	
254 Vivid Purplish Red	7.6rp 4.9 13.6	#D5265B	
255 Strong Purplish Red	7.3rp 4.4 11.4	#B32851	
256 Deep Purplish Red	7.3rp 2.6 10.1	#6F0035	
257 Very Deep Purplish Red	6.8rp 1.7 8.0	#470027	
258 Moderate Purplish Red	7.1rp 4.5 9.0	#A73853	
259 Dark Purplish Red	7.1rp 2.7 6.0	#5B1E31	
260 Very Dark Purplish Red	6.6rp 0.9 4.8	#28071A	
261 Light Grayish Purplish Red	7.8rp 5.9 4.2	#B27070	
262 Grayish Purplish Red	7.0rp 4.5 5.1	#8C4852	
263 White	2.5pb 9.5 0.2	#FFC9D7	
264 Light Gray	6.7y 7.4 0.2	#C2A894	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

265 Medium Gray	3.3gy 5.4 0.1	#817066
266 Dark Gray	2.5pb 3.5 0.0	#49423D
267 Black	2.5pb 0.8 0.0	#131313



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง
ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน 16S rRNA
ของแอสโตโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้

>*Streptomyces* sp. BWO1 (1,554 b.p.)

TGATCCTGGCTCAGGAAGTCGTAACAAGGTAACAGTTGAGTTTGATCCTGGCTCAGGAAGTCGTAACAAGGTAACAGTTTGAGTTTGGA
 ATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCACTTCGGGTGGGGATTAGTGGCGAACG
 GGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGACCTGCCAAGGCAT
 CTTGGCGGGTCGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGTCCACCAAGGCGACGACG
 GGTAGCCGCCCTGAGAGGGCGACCGCCACACTGGGAATGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCAC
 AATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGT
 GACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGG
 CGTAAAGAGCTCGTAGGGCGCTTGTGCGTTCGGTTGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAG
 TTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGC
 CGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCCTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGGTGGGCACTAGGTG
 TGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGACGTAACGCATTAAGTGCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAAACCTCAAAGGA
 ATTGACGGGGGCCCGACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACCGGAAGAACCCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAA
 AGCATCAGAGATGGTGCCCCCTTGTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC
 CGCAACGAGCGCAACCTTGTCCCGTGTGCCAGCAACTCTTCGAGGTTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGTCAACTCGGAGGA
 AGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCA
 AGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAG
 ATCAGCATTGCTCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCGTCACGTACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGC
 CCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAATC

>*Streptomyces* sp. BWO6 (1,548 b.p.)

ATCCTGGCTCAGGAAGTCGTAACAAGGTAACAGTTGAGTTTGATCCTGGCTCAGGAAGTCGTAACAAGGTAACAGTTGAGTTTGAAATTC
 TGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCACTTCGGGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAG
 TAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGATCTGCTTGGGCATCCAAGTG
 GTTCGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGTCCACCAAGGCGACGACGGGTAGCC
 GGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGC
 GAAAGCCTGATGCAGCGACCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTACGGGTA
 CCTGCAGAAGAAGCGCCGGTAACACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAG
 AGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTA
 GGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACT
 GACGCTGAGGAGCGAAAGCCTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAA
 CATTCCACGTTGTCCGTGCCGACGTAACGCATTAAGTGCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACG
 GGGCCCCGACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACCGGAAGAACCCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACGTCCA
 GAGATGGGCGCCCCCTTGTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAAC
 GAGCGCAACCCCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGTGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

GGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGGAGGT
 GGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCA
 GCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCAA
 CCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAT

>*Nocardiopsis* sp. BHD1 (1,443 b.p.)

CCTGCTCAGGACGAACGCTGGCGGGCTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAAGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCGAACGGGTGA
 GTAACACGTGAGCAACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCGGTGAAAACGCCGTCTAATACCGGATACGACCCGCCACCTCATGGTGA
 GGGTGGAAAGTTTTTCGGTCAGGGATGGGCTCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGATTACGGGTAGCC
 GGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTGCGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGG
 CGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCTGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTACCACCAACGCAGGCTCGAAGTTCTC
 TTCGGGTTGACGGTAGGTGGGAATAAGGACCGGTAACACTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTCCGAGCGTTGTCCGGAA
 TTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGCGGTGTGCGCTGTCTGTGTAAAGACCGGGCTTAACCTCCGGTTCTGCAGTGGATACGGGCA
 TGCTAGAGGTAGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGT
 CTCTGGGCCTTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGTTGGGC
 GCTAGGTGTGGGACTTTCCACGGTTTCCGCGCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAAAC
 CAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACCGAAGAACCTTACCAAGTTTGACATCA
 CCCGTGGACTCGCAGAGATGTGAGTCAATTTAGTTGGCGGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGG
 GTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTGTCCATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGTCAACTCGG
 AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGCCGGTACAATGGGCGTGGCATA
 CCGTAAGGTGGAGCAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTGGAGTGCCTAGTAAT
 CGGGATCAGCAACGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTACGAAAGTCGGCAACACCCGAAACTT
 GCGCCTAACCCCTTGTGGGAGGGAGTGAAG

>*Streptomyces* sp. BHD2 (1,456 b.p.)

CTGCTCAGGACGAACGCTGGCGGGCTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAG
 TAACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGAGCCGGAACCGCATGGTTCTG
 GCTGTAAGTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGAGTAACGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCC
 GGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGC
 GAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTACGACGGAAGAAGCGAAAGTACGGT
 ACCTGCAGAAGAAGCGCCGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCGGAAATTATTGGGCGTAA
 GAGCTCGTAGGGCTTGTACGTCGATTGTGAAAGCCCGAGGCTTAACCTCGGGTCTGACGTGATACGGCTAGCTAGAGTGTGGT
 AGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGCCATTAC
 TGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGGTGGGAACTAGGTGTTGGCG
 ACATTCACGTCGTCGGTGCCGACGTAACGCATTAAGTTCGCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGAC
 GGGGGCCCGACAAGCGCGGAGCATGTGGCTAATTCGACGCAACCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACCGGAAAAACCT
 GGAGACAGGTTCCCTTGTGGTGGTATACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCA
 CGAGCGCAACCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGGTGGGACTCACAGGAGACCGCGGGTCAACTCGGAGGAAGG
 TGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGTGGAG
 TGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCA
 GCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCAA
 CCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTCTAAGGTGGGACTGGCGATTGGGAC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

>*Nocardiopsis* sp. JP6 (1,442 b.p.)

CGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCGAACGGGTGAGT
AACACGTGAGCAACTGCCCTGACTCCGGGATAAGCGGTGGAACGCCGTCTAATACCGGATACGACCCGCCACTCATGGTGGAGG
GTGGAAAGTTTTTCGGTCAGGGATGGGCTCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGATTACGGGTAGCCGG
CCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGCCAGACTCCTGCGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGCGA
AAGCCTGACGCAGCGACCCGCGTGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTTACCACCAACGCAGGCTCGAAGTTCTCTTC
GGGTTGACGGTAGGTGGCGAATAAGGACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGCGTCCGAGCGTTGTCCGGAATTA
TTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCGTGTGCGTCTGCTGTGAAAGACCGGGGCTTAACCTCCGGTTCTGCAGTGGATACGGGCATGC
TAGAGGTAGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGAACACCGGTGGCGAAGCGGGTCTC
TGGGCCTTACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGTTGGGCGCT
AGGTGTGGGGACTTTCCACGTTTTCCGCGCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAA
AGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGTTTGACATCACCC
GTGGACTCGCAGAGATGTGAGGTCAATTTAGTTGGCGGGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTT
AAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTGTTCATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGG
AAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGCCGGTACAATGGGCGTGCATACCG
TAAGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGGTGGAGTGCCTAGTAATCGC
GGATCAGCAACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGCAACACCCGAAACTTGGC
GCCTAACCCCTTGTGGGAGGGAGTGAGGTGAAG

>*Streptomyces* sp. JR2 (1,595 b.p.)

TCTTGGGTTCAGGAAGTTGTAACAAGGTAACAGTTGAGTTTGATCCTGGCTCAGGAAGTCGTAACAAGGTAACAGTTGAGTCTGATCCT
GGCTCAGGAAGTCGTAACAAGGTAACAGTTTGGTCTCTGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCG
AACGATGAACCCACTTCGGTGGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGG
AAACGGGGTCTAATACCGGATACGACCCTTACGGCATCTGATGGTGGTGAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATC
AGCTAGTTGGTGAAGTAACGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTT
CGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGG
GTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTC-
GTAGGCGGCTGTACGTCGGATGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCGGGCTGTCATTGATACGGGCGAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGA
GATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGC
TGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGAACTAGGTGTGGGCGACATTC
CACGTCGTCGGTCCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCGCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGC
CCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACCGGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACCCGGAACACCCAGAGAT
GGGTGCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG
CAACCCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGTGGGACTCACGGGAGACCGCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGAC
GACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAAAGAGCTGCGATACCGCAAGGTGGAGC
GAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTGCCTAGTAATCGCAGATCAGCATTG
CTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTT
GTGGGAGGGAGTGTGCAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAATC

>*Streptomyces* sp. JHD1 (1,503 b.p.)

GTTTGATTTCTGGTCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCGCTTCGGTGGTGAAGAGTG
GCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAACGGGGTCTAATACCGGATACGACTGCCGG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

CCGCATGGTCTGGTGGTGGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGGTGGCTACCAAGGC
 GACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA
 TATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAA
 GCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAA
 TTATTGGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGCTCGGATGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCCGGCTCTGCATTTCGATACGGGC
 AGGCTAGAGTTCCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCCGAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGA
 TCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGG
 AACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTGCTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTTCCTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAA
 CTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGGGAGCATGTGGCTTAATTGACGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGCTTGACAT
 ACACCGGAAAACCGTGGAGACACGTTCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTG
 GGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATTCTGTGTTGCCAGCACGCCCTTCGGGGTGGTGGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGT
 CAACTCGGAGGAAGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGTAACATGAG
 CTGCGATGCCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCCG
 CTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTACGAAAAGTCGGTAACACC
 CGAAGCCGGTGGCTAACCCCTTGTGGAGAGGAATCGTGAAGTGGGACTGGCGATTGGGGACAAAGTCGTAACAAGGTAGCAGG
 TGGAAAGT

>*Gordonia* sp. SW8 (1,450 b.p.)

CGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTCTAACACATGCAAGTCAACGGAAGGCCAGCTTGTGGTGGTCTGAGTGGCGAACGGGT
 GAGTAACACGCTGGGTGATCTGCCCTGACTTTGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCAGTTGGTGCATGCCTT
 CTGGTGGAAAGCCTTGTGCGGTTGGGGATGGGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGTA
 GCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTTGCACAATG
 GCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTACCAGGGACGAAGCGCAAGTGACG
 GTACCTGGAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTA
 AAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGCTGCTGTGAAATTCGAGCTTAACTGCAGGCGTGCAGGCGATACGGGCGACTTGAGTACTA
 CAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGCGGGTCTCTGGGTAGTAA
 CTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGGTGGTACTAGGTGTGGGG
 CTCATTTACAGAGTTCGGTGCCTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGAC
 GGGGGCCCGCACAAGCGGGGAGCATGTGGATTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGGTTGACATACCCAGATGCGGCT
 AGAGATAGTCGTTCCCTTGTGGTTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAAC
 GAGCGCAACCTTGTCTGTATTGCCAGCGGTTATGCCGGGACTTGACAGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATG
 ACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTACACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGCTGCGATAACCGTGGAGTGGAGCG
 AATCCCTTAAAGCCGCTCAGTTCGGATCGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGC
 TGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTGATGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCTTGTG
 GAGGGAGCCGTCGAAAGTGGGATCGGGCATTGCGAC

>*Gordonia* sp. SW21 (1,427 b.p.)

CTGGCGCGTGTCTAACACATGCAAGTCAACGGAAGGCCAGCTTGTGGTGGTCTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTTGGT
 GATCTGCCCTGACTTTGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCAGTTGGTGCATGCCTTCTGGTGGAAAGCCTT
 GTGCGGTTGGGGATGGGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCTGAGAGGG
 TGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATG
 CAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTACCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGGAGAAGAA
 GCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGC
 GTTGTGCGCTGCTGTGAAATTCGAGCTTAACTGCAGGCGTGCAGGCGATACGGGCGACTTGAGTACTACAGGGGAGACTGGA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ATTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGTAGTAACTGACGCTGAGGAG
 CGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGTGGGTACTAGGTGTGGGGCTCATTTACGAGT
 TCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACA
 AGCGGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATACACCAGATGCGGCTAGAGATAGTCGTTT
 CCTGTGGTTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTG
 TCCTGTATTGCCAGCGGGTTATGCCGGGGACTTGCAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCA
 TGCCCTTATGTCCAGGGCTTACACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCC
 GGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACG
 TTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCGAAAGCCGGTGGCCTAACCTTGTGGAGGGAGCCGTC
 GAAGGTGGGATCGGCG

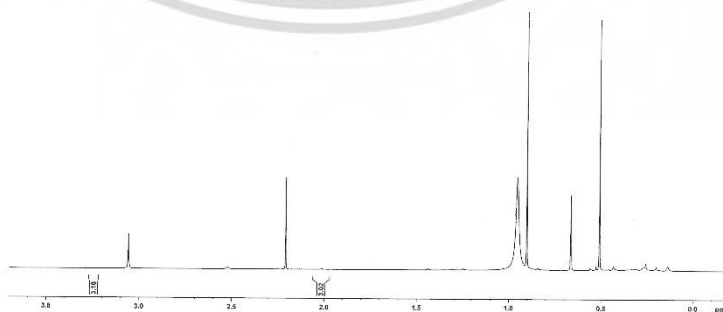
>*Gordonia* sp. SW32 (1,436 b.p.)

TCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAAAGGCCAGCTTGCTGGGTACTCGAGTGGCGAACG
 GGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGAACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTTGGAGTGCATGC
 TGTGGGGTGAAAGCTTTTGGGTTTCAGGATGGGCCCGCGGCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGGCAGCAGCGG
 TAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAA
 TGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCTTTCGGGTTGTAACCTTCTTTACACAGGGACGAAGCGTGAGT
 GACGGTACCTGGAGAAGAAGCACCGCCAAATACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGAATTACTGGG
 CGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGTCTGTGAAATTCTGCAACTCAATTGTAGGCGTGACGGGATACGGGCAGACTTGGT
 ACTACAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGT
 GTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGTGGGTACTAGGTGT
 GGGGCTCATTTACGAGTTCCTGCGGTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAA
 TTGACGGGGGCCGCACAAGCGGGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATACACCAGACG
 CATGTAGAGATACATGTTCCCTTGTGGTTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC
 GCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTATTGCCAGCGGGTTATGCCGGGGACTTGCAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGG
 GGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTACACATGCTACAATGGCTGGTACAGAGGGCTGCGATACCGTGAGGTGG
 AGCGAATCCCTTAAAGCCAGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCA
 ACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCGAAAGCCGGTGGCCTAACCC
 CTTGTGGGAGGGAGCTGTGGAAG

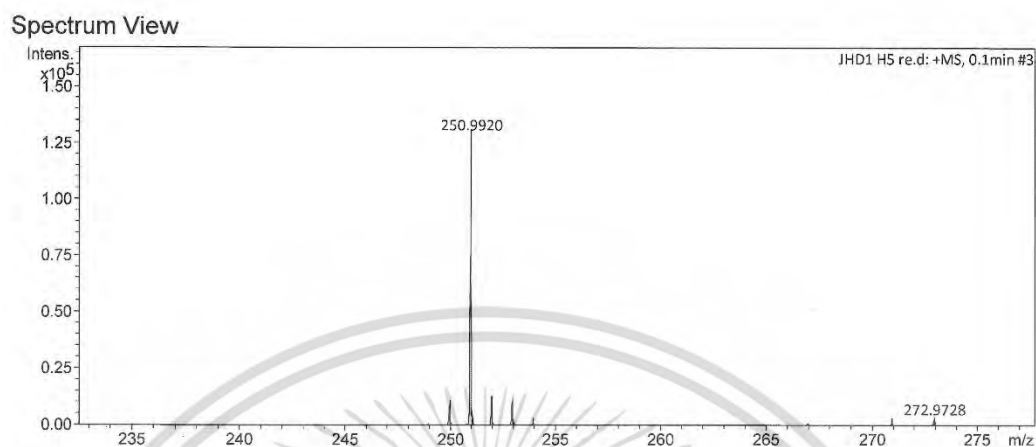
ภาคผนวก จ

ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีของสารทุติยภูมิที่ผลิตโดย
Streptomyces sp. JHD1^T

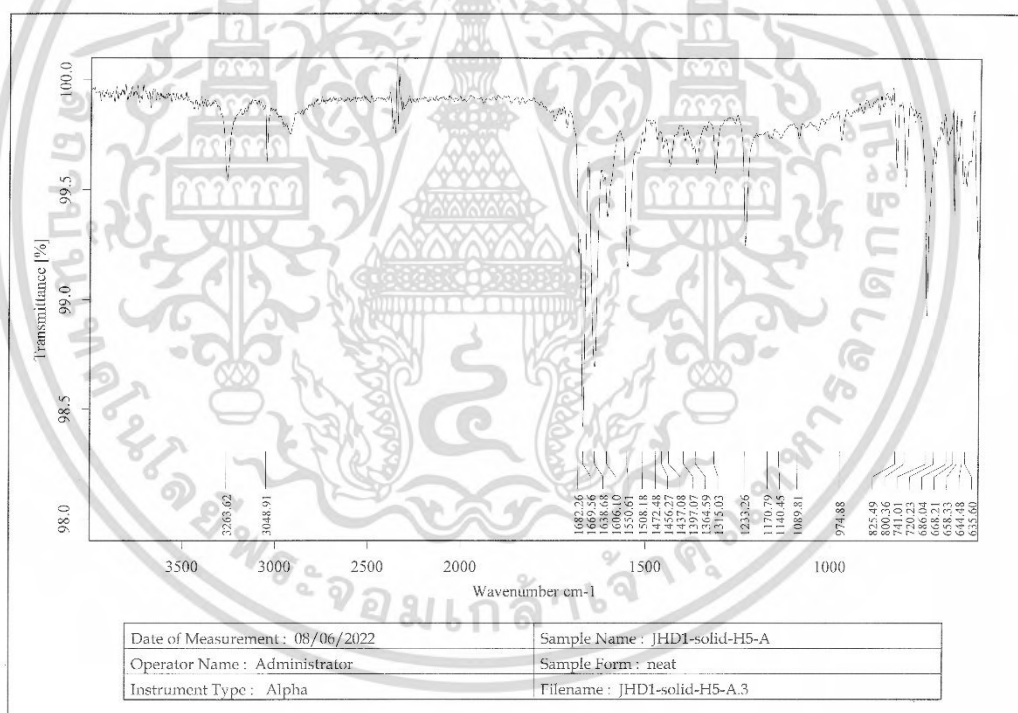
สาร 1 (*N*-(4-methyl-5-oxodithiolo[4,3-*b*]pyrrol-6-yl)acetamide, Thiolutin)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

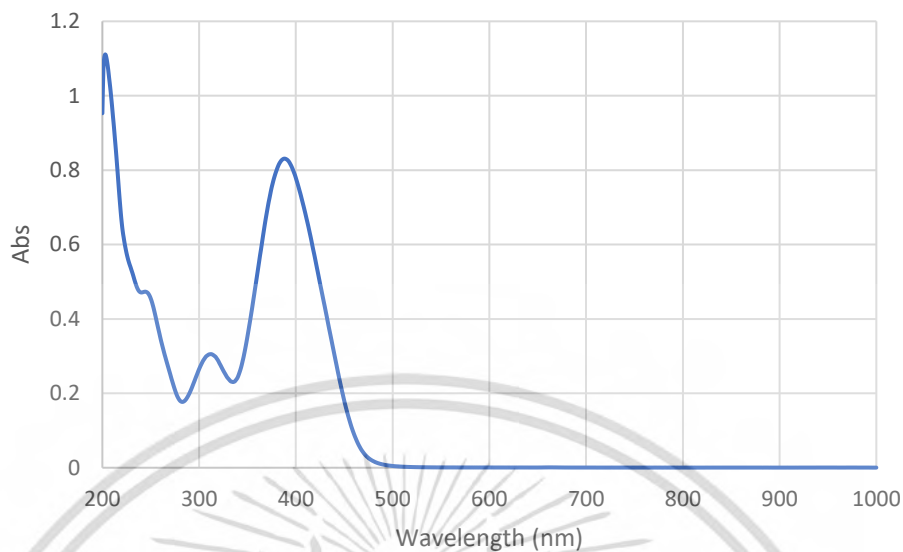


รูปที่ 3 สเปกตรัม HRESIMS [M+Na] ของสาร 1



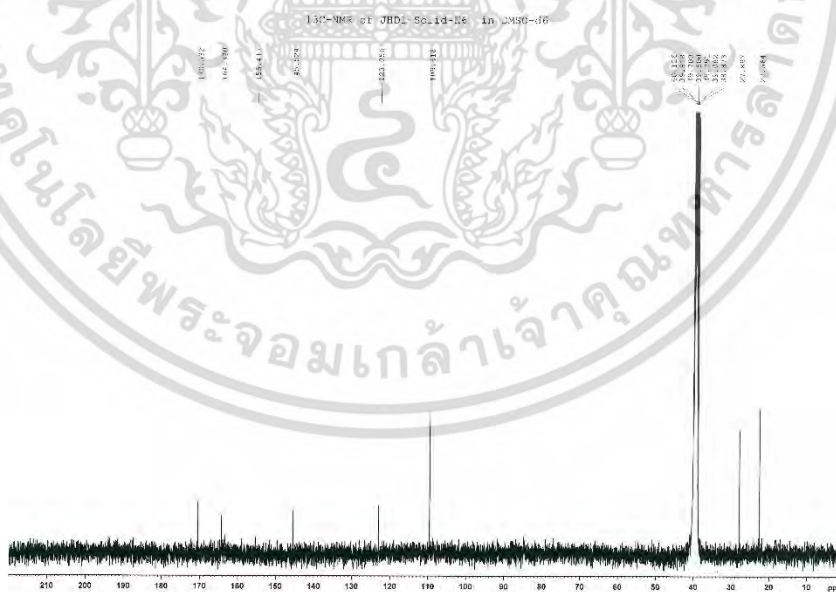
รูปที่ 4 สเปกตรัม IR ของสาร 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



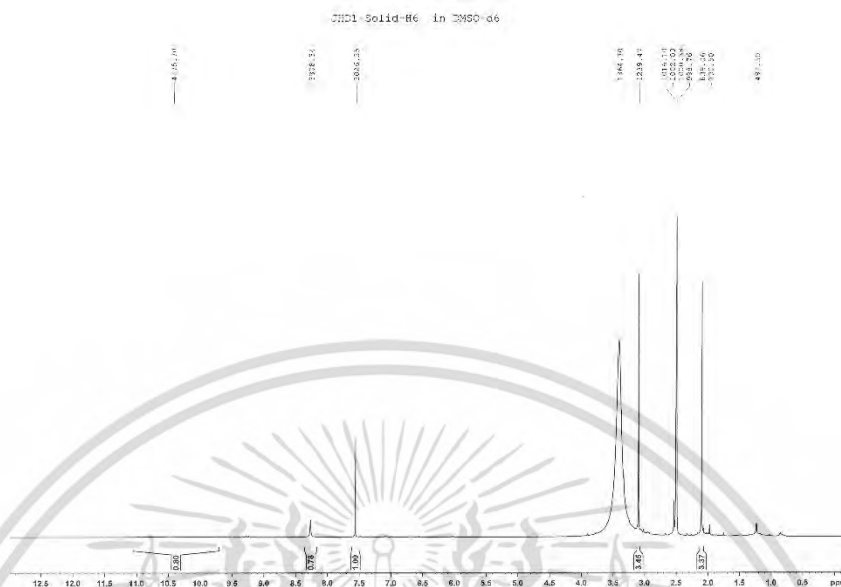
รูปที่ 5 สเปกตรัม UV-visible ของสาร 1

สาร 2 (2,2-dioxidothiolutin)

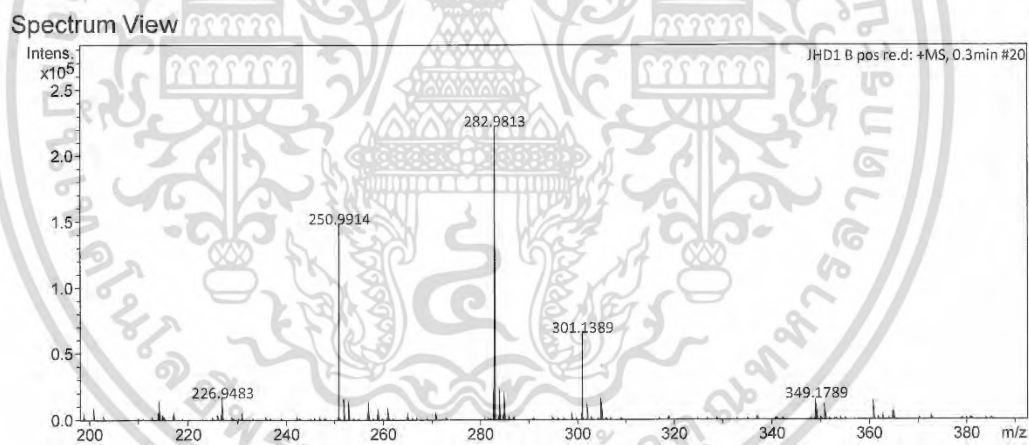


รูปที่ 6 สเปกตรัม ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) ของสาร 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

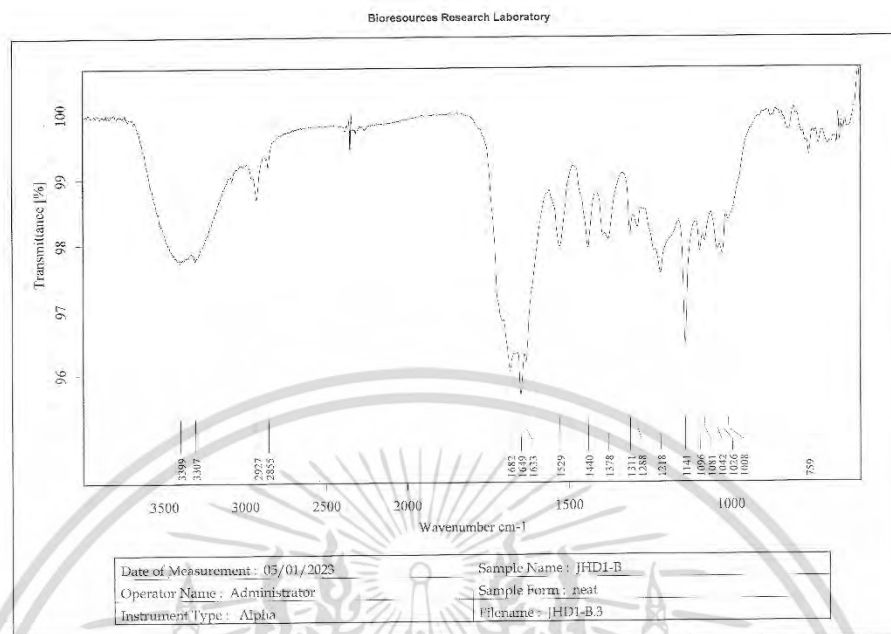


รูปที่ 7 สเปกตรัม ^1H NMR spectrum (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) ของสาร 2

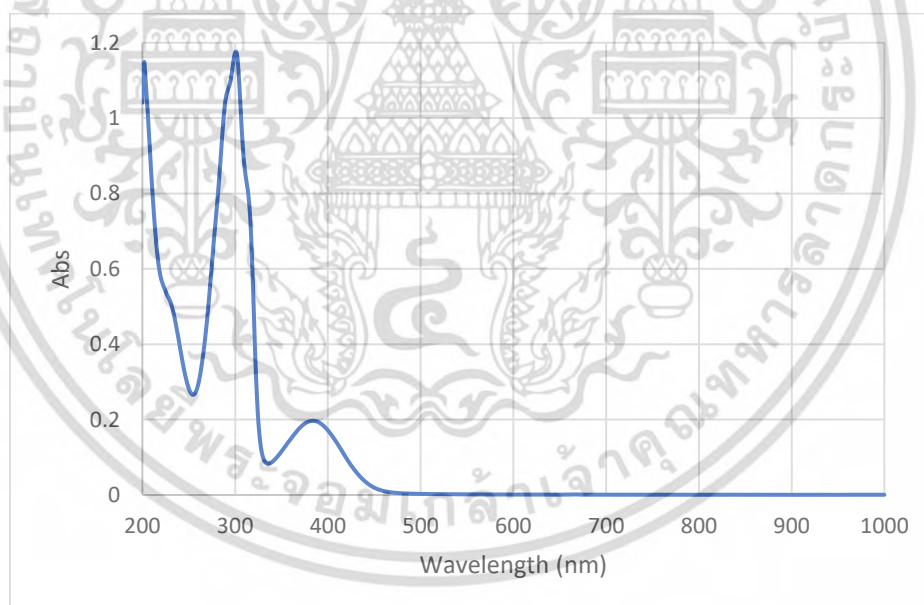


รูปที่ 8 สเปกตรัม HRMSIMS [M+Na] ของสาร 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 9 สเปกตรัม IR ของสาร 2



รูปที่ 10 สเปกตรัม UV-visible ของสาร 2

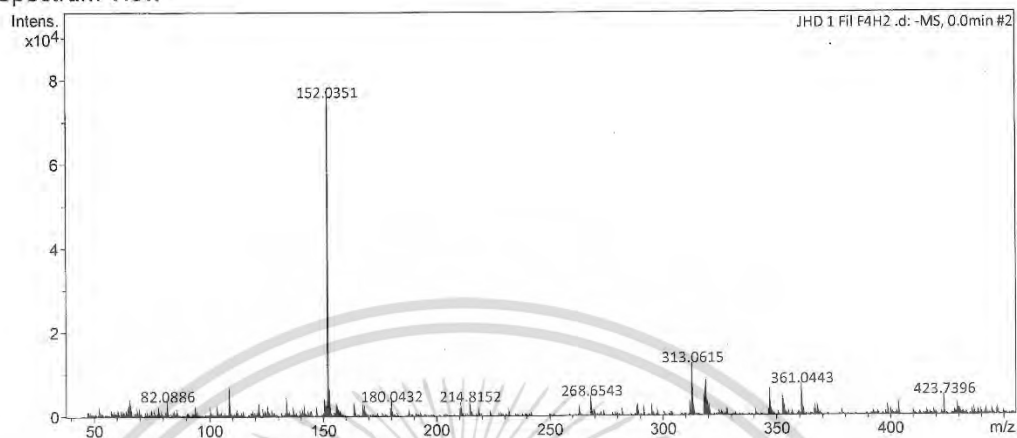
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาร 3 (2,3-dihydroxybenzamide, Catecholamide)

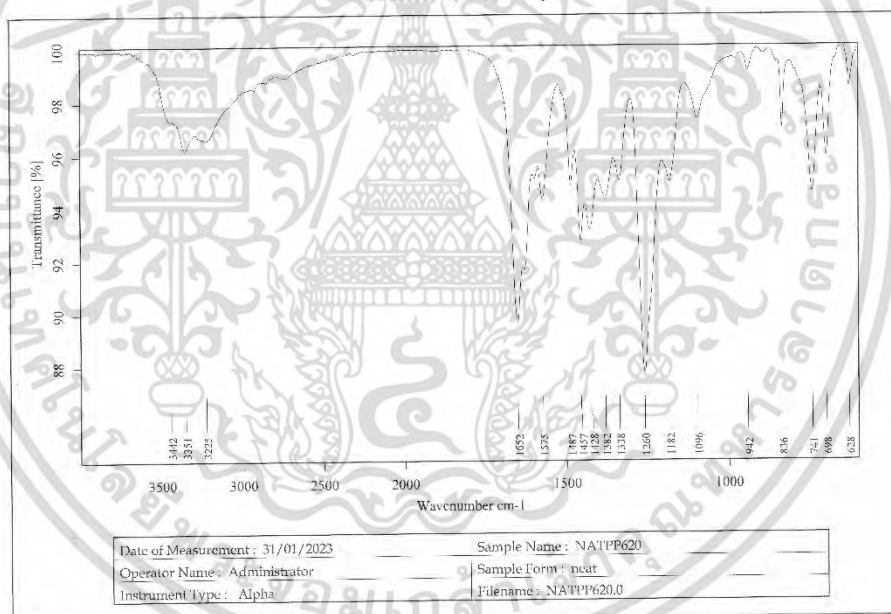


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Spectrum View

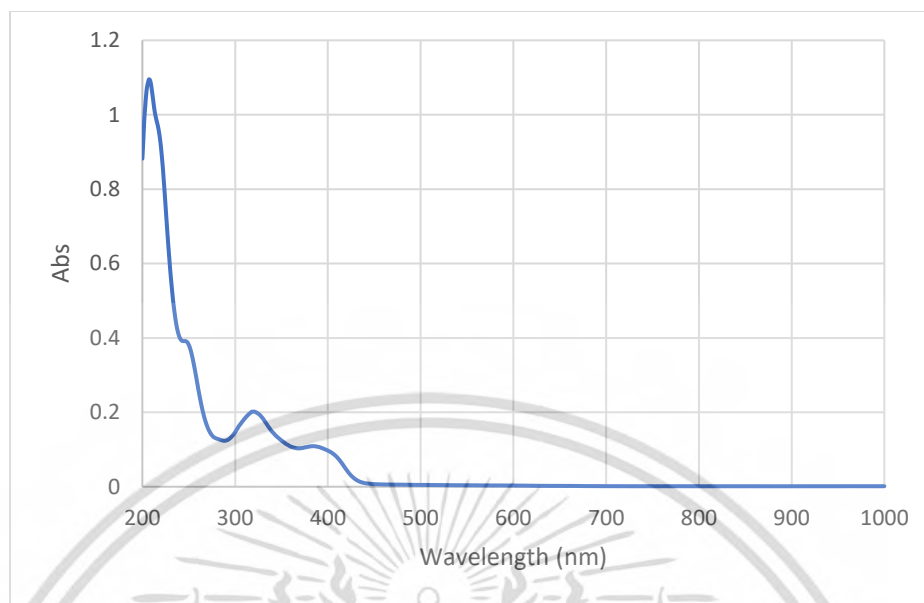


รูปที่ 13 สเปกตรัม HRESIMS [M+Na] ของสาร 3



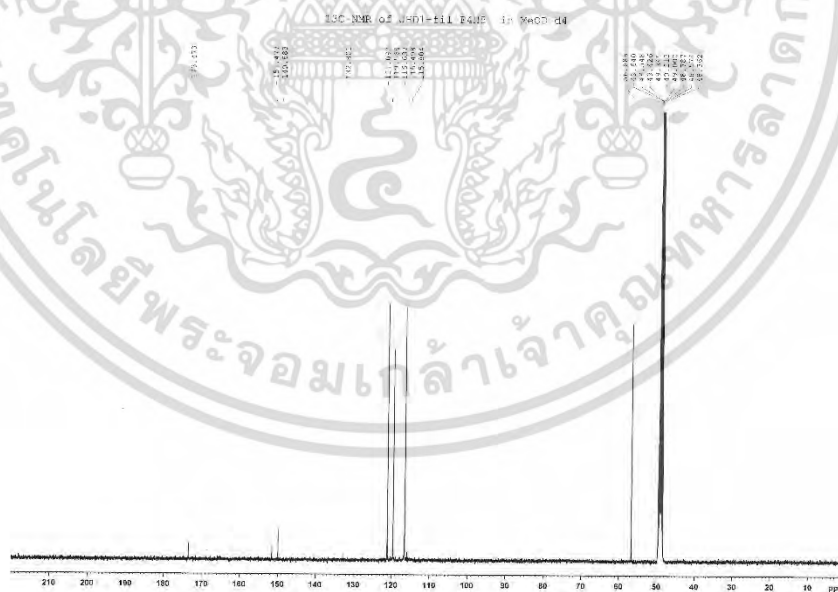
รูปที่ 14 สเปกตรัม IR ของสาร 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



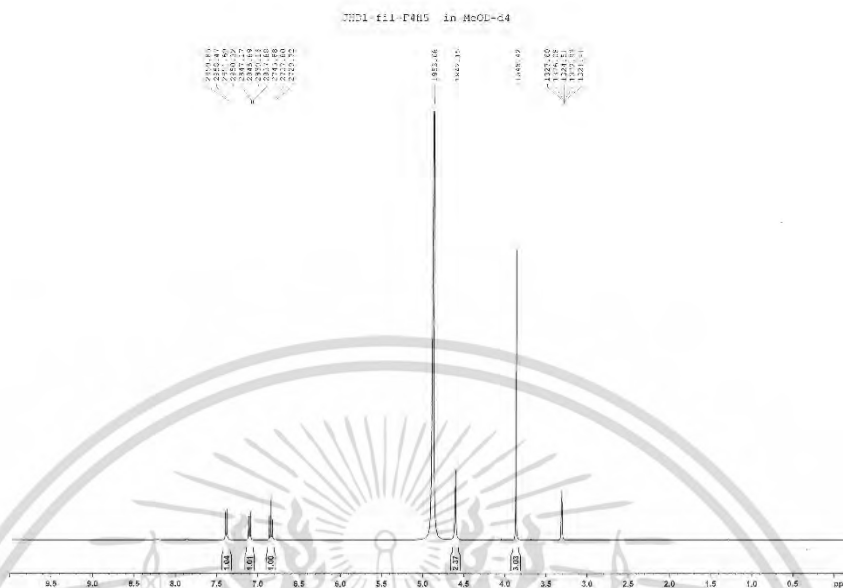
รูปที่ 15 สเปกตรัม UV-visible ของสาร 3

สาร 4 (2-hydroxy-3-methoxybenzamide)

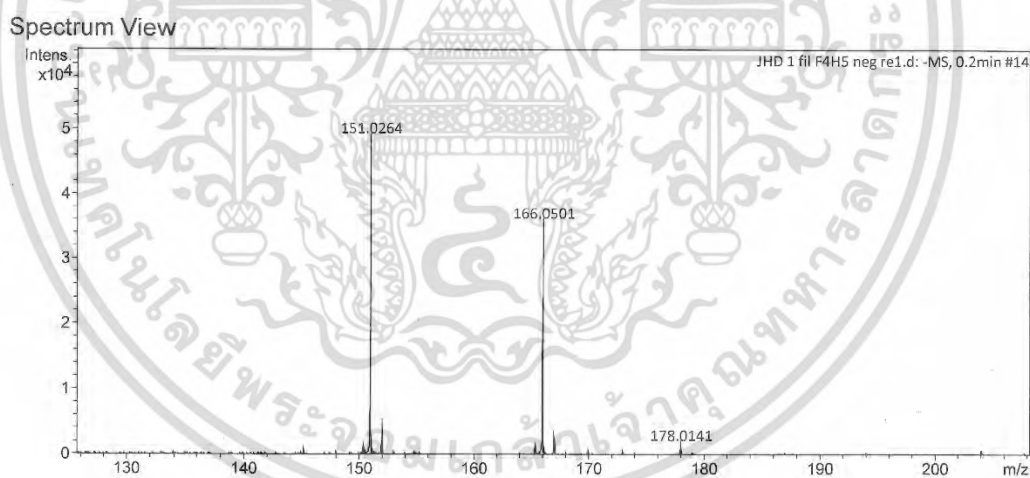


รูปที่ 16 สเปกตรัม ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) ของสาร 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

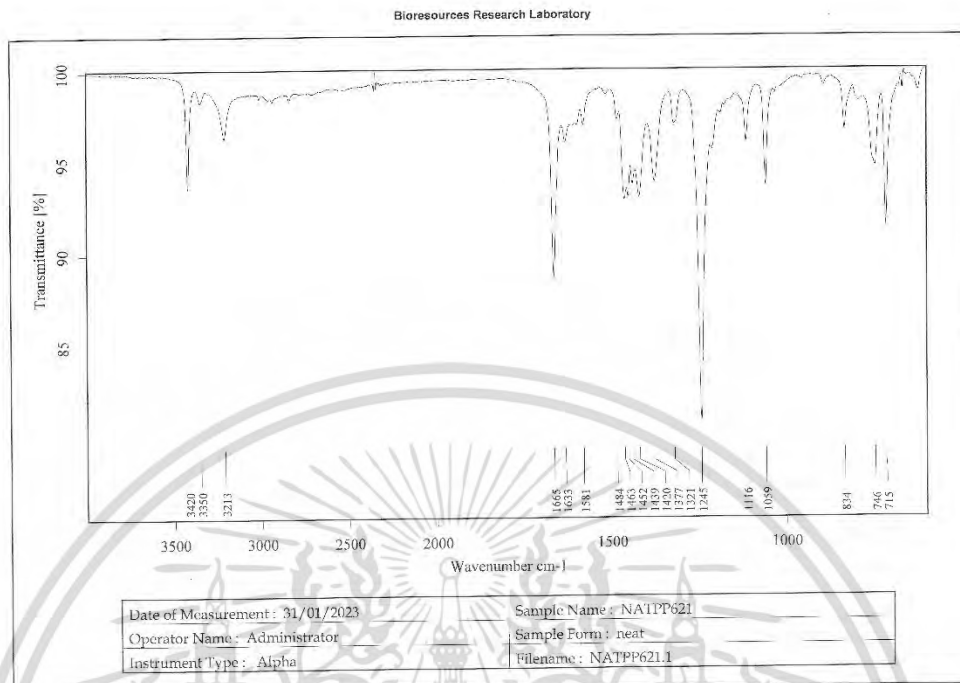


รูปที่ 17 สเปกตรัม ^1H NMR spectrum (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) ของสาร 4

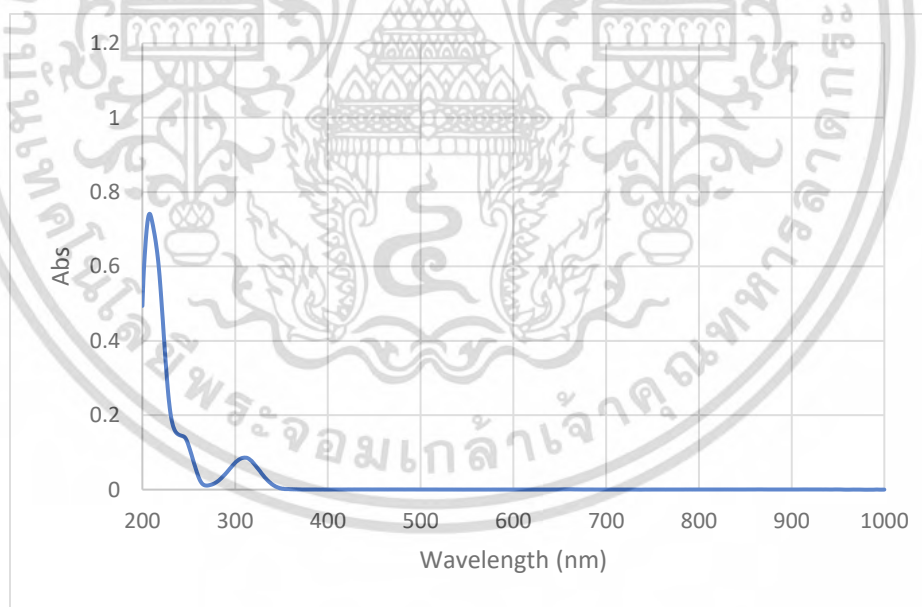


รูปที่ 18 สเปกตรัม HRESIMS $[\text{M}+\text{Na}]$ ของสาร 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 19 สเปกตรัม IR ของสาร 4



รูปที่ 20 สเปกตรัม UV-visible ของสาร 4

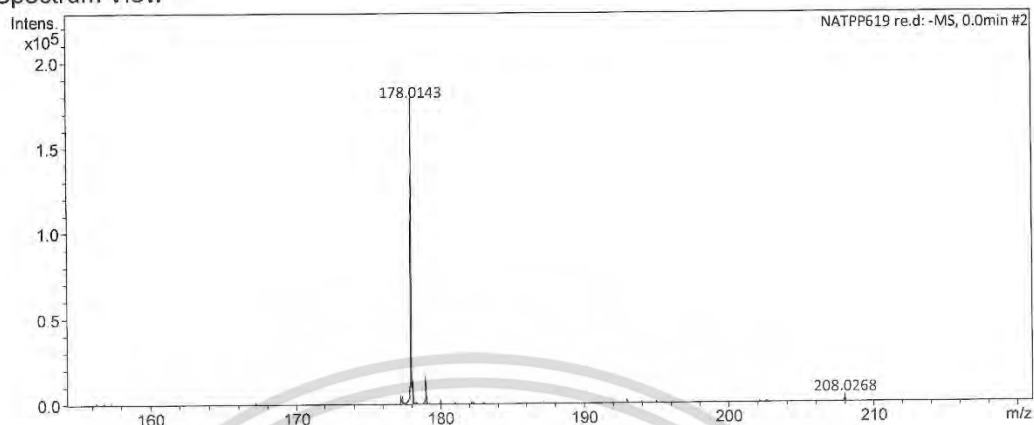
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาร 5 (8-hydroxy-1,3-benzoxazine-2,4-dione , Benadrostin)

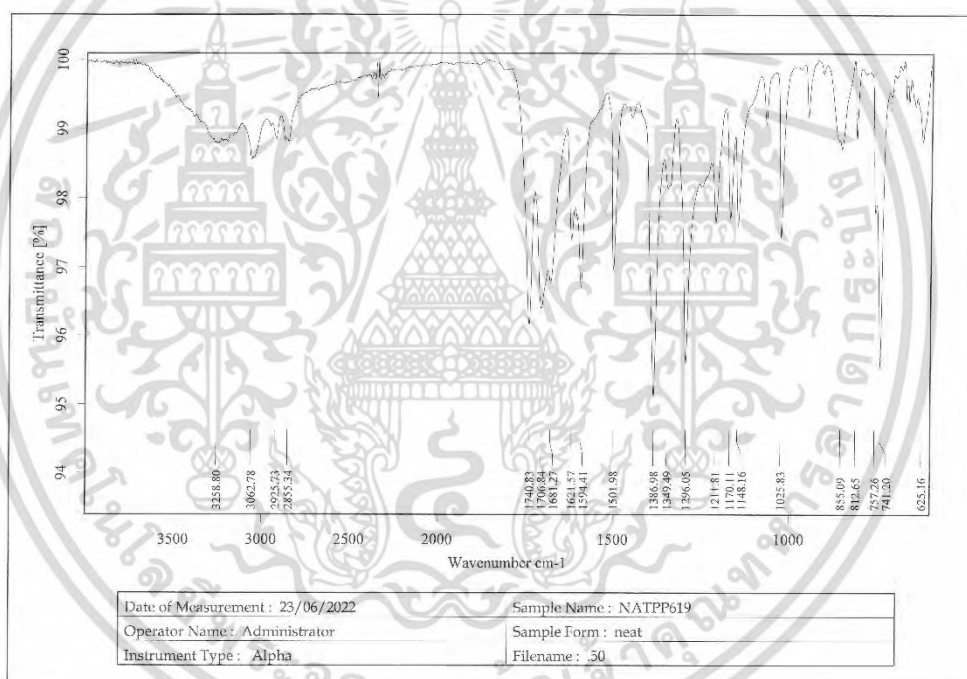
รูปที่ 22 สเปกตรัม ^1H NMR spectrum (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) ของสาร 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Spectrum View

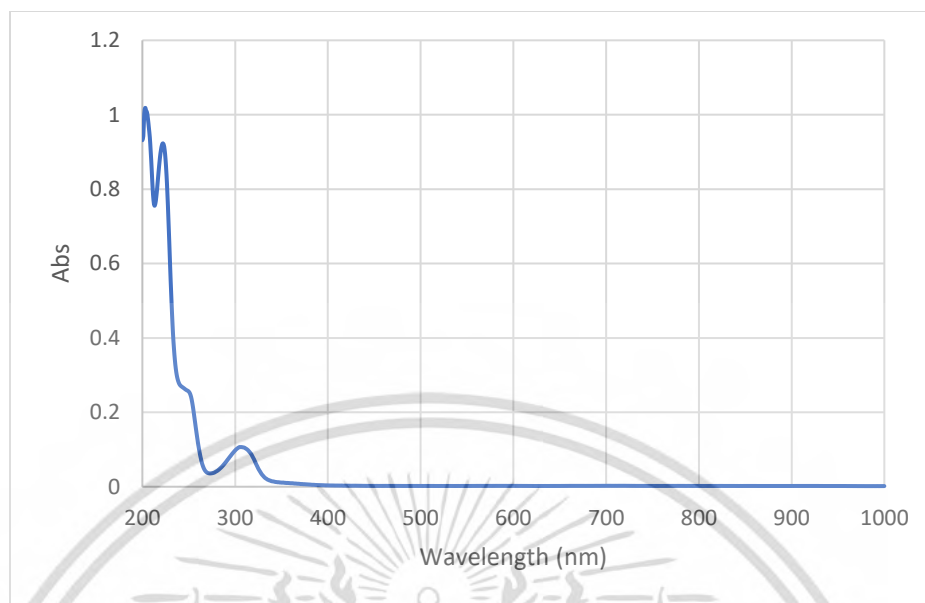


รูปที่ 23 สเปกตรัม HRESIMS [M+Na] ของสาร 5



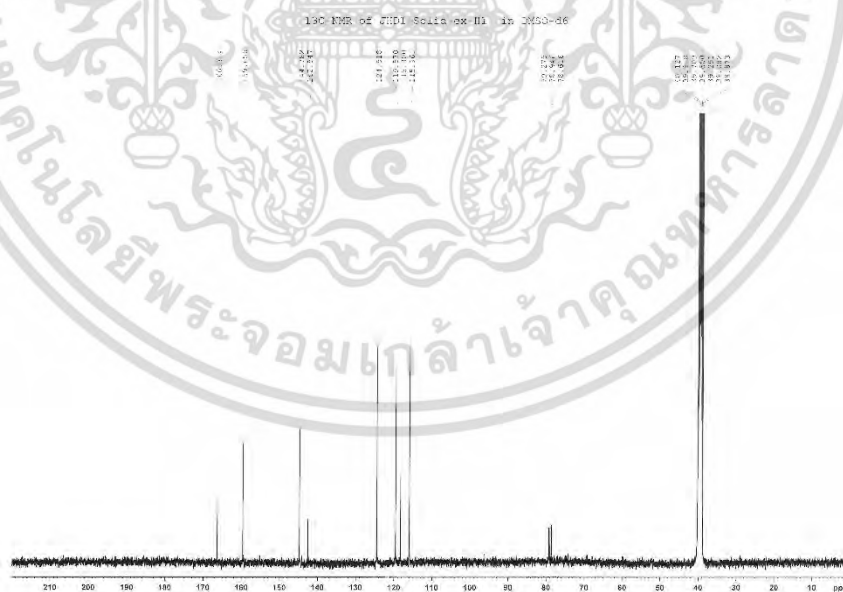
รูปที่ 24 สเปกตรัม IR ของสาร 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



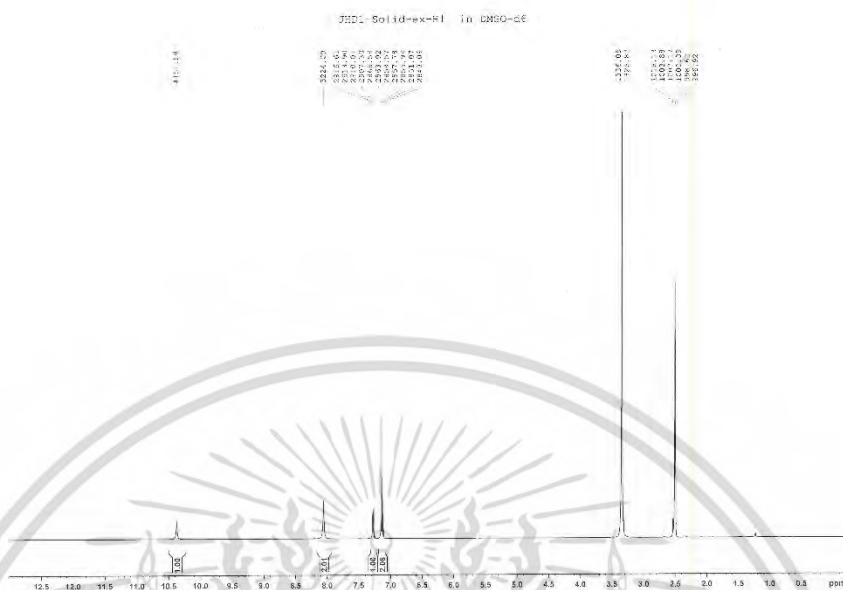
รูปที่ 25 สเปกตรัม UV-visible ของสาร 5

สาร 6 (8-amino-1,3-benzoxazine-2,4-dione)

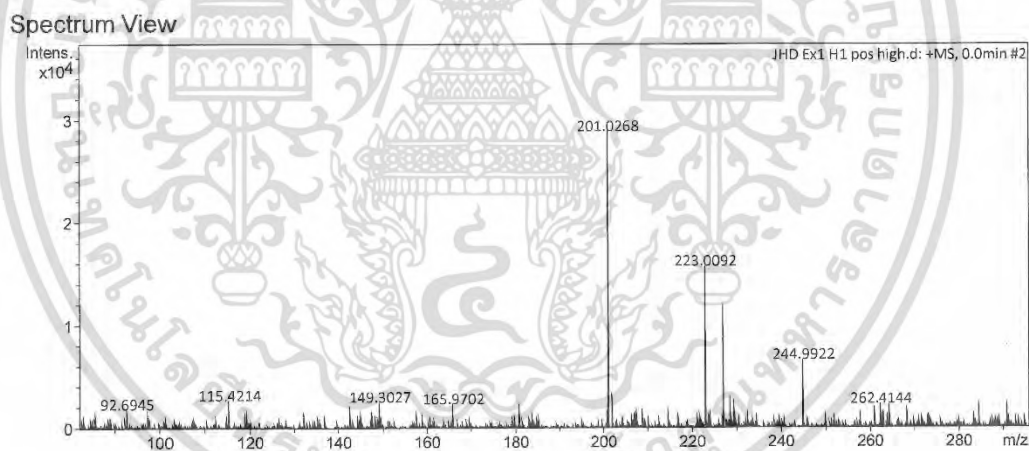


รูปที่ 26 สเปกตรัม ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) ของสาร 6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

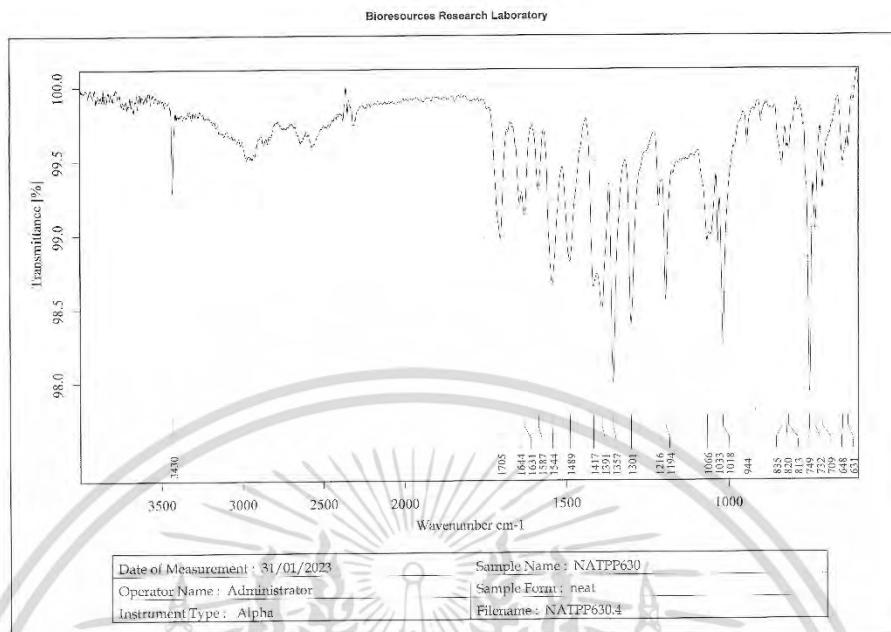


รูปที่ 27 สเปกตรัม ^1H NMR spectrum (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) ของสาร 6

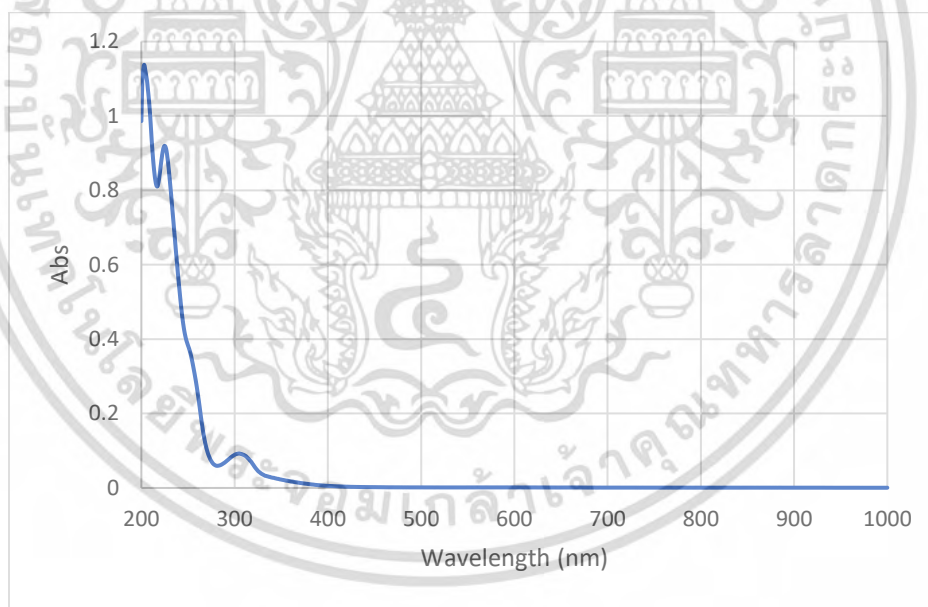


รูปที่ 28 สเปกตรัม HRESIMS $[\text{M}+\text{Na}]$ ของสาร 6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 29 สเปกตรัม IR ของสาร 6



รูปที่ 30 สเปกตรัม UV-visible ของสาร 6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายรวีรัตน์ ปานสมสวย
วัน เดือน ปีเกิด	วันที่ 24 มกราคม พ.ศ.2542
E-mail	aumrawirat@gmail.com
ประวัติการศึกษา	(2563) วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม เกรดเฉลี่ย 3.83 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนอุดหนุนการศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษาของคณะวิทยาศาสตร์ ประเภทที่ ๑ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผลงานทางวิชาการ	ตีพิมพ์งานวิจัยในวารสารระดับนานาชาติ
<p>Pansomsuay, R., Duangupama, T., Pittayakhajonwut, P., Intaraudom, C., Suriyachadkun, C., He, Y.W., Tanasupawat, S. and Thawai, C. 2023. “<i>Gordonia aquimaris</i> sp. nov., a novel marine actinobacterium isolated from seawater in the upper gulf of Thailand.” <i>International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology</i>. 73 : 005804.</p> <p>Pansomsuay, R., Duangupama, T., Pittayakhajonwut, P., Intaraudom, C., Suriyachadkun, C., He, Y.W., Tanasupawat, S. and Thawai, C. 2023. “<i>Micromonospora thermarum</i> sp. nov., an actinobacterium isolated from hot spring soil.” <i>Archives of Microbiology</i>. 205 : 123.</p> <p>Pansomsuay, R., Duangupama, T., Pittayakhajonwut, P., Intaraudom, C., Suriyachadkun, C., He, Y.W., Tanasupawat, S. and Thawai, C. 2023. “<i>Streptomyces zingiberis</i> sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from the root tissue of <i>Zingiber montanum</i>.” <i>International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology</i>. 73 : 005765.</p> <p>Duangupama, T., Pansomsuay, R., Pittayakhajonwut, P., Intaraudom, C., Suriyachadkun, C., He, Y.W., Tanasupawat, S. and Thawai, C. 2023. “<i>Micromonospora solifontis</i> sp. nov., an actinobacterium isolated from hot spring soil.” <i>International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology</i>. 73 : 005819.</p>	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้