เอนไซม์โปรติเอสและฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของแอคติโนมัยซีท
จากดินนาเกลือตำบลนาโคก จังหวัดสมุทรสาคร
Protease and antimicrobial activity of Actinomycetes from salt field, Nacoke Samutsakorn

นางสาวไพลิน พาสมบูรณ์
นางสาวภรณ์ชนก มนตรี
นางสาวอรวรรณ แหยมนุช

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

เอนไซม์โปรติเอสและฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของแอคติโนมัยซีท จากดินนาเกลือตำบลนาโคก จังหวัดสมุทรสาคร

Protease and antimicrobial activity of Actinomycetes from salt field, Nacoke Samutsakorn

นางสาวไพลิน พาสมบูรณ์

นางสาวภรณ์ชนก มนตรี

นางสาวอรวรรณ แหยมนุช

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Protease and antimicrobial activity of Actinomycetes from salt field, Nacoke Samutsakorn

Pailin Pasomboon

Pornchanok Montree

Orawan Yaemnuch

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

DEPARTMENT OF BIOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2015

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	เอนไซม์โปรติเอสและฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของแอคติโนมัยซีท จากดินนาเกลือตำบลนาโคก จังหวัดสมุทรสาคร Protease and antimicrobial activity of Actinomycetes from salt field, Nacoke Samutsakorn
ชื่อนักศึกษา	นางสาวไพลิน พาสมบูรณ์ รหัส 55051360 นางสาวภรณ์ชนก มนตรี รหัส 55051362 นางสาวอรวรรณ แหยมนุช รหัส 55051428
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2558
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.คนึงกานต์ กลั่นบุศย์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2558

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดร.จิตติ ท่าไว ประธานกรรมการ	
ดร.สมพิศ สอนโยธา กรรมการ	
ดร.คนึงกานต์ กลั่นบุศย์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	เอนไซม์โปรติเอสและฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของแอคติโนมัยซีท จากดินนาเกลือตำบลนาโคก จังหวัดสมุทรสาคร
ชื่อนักศึกษา	นางสาวไพลิน พาสมบูรณ์ รหัส 55051360
	นางสาวภรณ์ชนก มนตรี รหัส 55051362
	นางสาวอรวรรณ แหยมนุช รหัส 55051428
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2558
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.คนึงกานต์ กลั่นบุศย์

บทคัดย่อ

เชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 33 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินนาเกลือในตำบลนาโคก จังหวัดสมุทรสาคร สามารถจัดกลุ่มได้ 4 กลุ่มโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ การเจริญของเชื้อและลักษณะทางสรีรวิทยาของเชื้อ แล้วจึงนำเชื้อแอคติโนมัยซีททั้งหมดมาทดสอบความสามารถในการเจริญบนอาหาร Starch casein agar ที่มีความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) ดังนี้ 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 เปอร์เซ็นต์ โดยนำเชื้อแอคติโนมัยซีทที่เจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) ร้อยละ 6 ทั้งหมด 23 ไอโซเลท มาทำการทดสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอส โดยสังเกตการเกิดวงใสบนอาหารแข็ง skim milk พบว่ามี 3 ไอโซเลท ได้แก่ PBB 134, PPB 324 และ PPB 512 จึงนำเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 3 ไอโซเลทนี้ มาสกัดเอนไซม์โปรติเอสจากการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทเป็นเวลา 24 และ 30 ชั่วโมง มาใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสด้วยวิธี Azocasein พบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 3 ไอโซเลทนั้นอยู่ในช่วง 7 ถึง 11 สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ดีโดยสาร Ethylene-diamine-tetra-acetic acid (EDTA) และความเสถียรภาพของเอนไซม์อยู่ในช่วงอุณหภูมิ 40 - 50 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของทั้ง 3 ไอโซเลท ด้วยวิธี Agar Disc หรือ Disk diffusion นั้นพบว่าไม่เกิดการยับยั้งเชื้อทดสอบทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ *B. subtilis* ATTC 6633, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *C. albicans* ATCC 90028, *E. coli* ATCC 25922 , *S. aureus* TISTR 118 และ *M. luteus* TISTR 2374 เนื่องจากใช้ความเข้มข้นเพียง 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อดิสก์

คำสำคัญ : แอคติโนมัยซีท, ดินนาเกลือ, เอนไซม์โปรติเอส, ฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Protease and antimicrobial activity of Actinomycetes from salt field, Nacoke Samutsakorn
Students	Miss Pailin Pasomboon Student ID 55051360
	Miss Pornchanok Montree Student ID 55051362
	Miss Orawan Yaemnuch Student ID 55051428
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology Program)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2015
Advisor	Dr. Khanungkan Klanbut

Abstract

33 actinomycetes strains were isolated from salt field soil of Nacoke, Samutsakorn. And it could be grouped into 4 groups based on morphological characteristics and cultural characteristics. A total of 33 actinomycetes were used for screening on high concentration of Sodium Chloride at 6 percent, 23 isolates were selected. 3 isolates obviously produced the proteolytic activity on skim milk agar, including PBB 134, PPB 324 and PPB 512. Then the cultures were incubated for 24 and 30 hours which aid to study the optimal conditions for the protease activity by Azocasein method, the optimum pH and temperature values for protease activity were pH 7 - 11 and 30 °C respectively. Crude enzymes were inhibited by Ethylene-diamine-tetra-acetic acid (EDTA) and was stable at 40-50 °C. Furthermore, the crude extract were tested for antimicrobial activity that can not inhibited *B. subtilis* ATTC6633, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *C. albicans* ATCC 90028, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* TISTR 118 and *M. luteus* TISTR 2374, since the concentration was 1 mg/ml perdisc.

Keywords : Actinomycetes, Salt field soil, Protease, Antimicrobial activity

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีเนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จากหลายๆฝ่ายที่ได้ให้ความกรุณาทั้งด้านความรู้คำแนะนำตลอดจนการแก้ไขและตรวจทานโครงงานพิเศษฉบับนี้ให้ลุล่วงสมบูรณ์ผู้ทำการวิจัยขอขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.จิตติ ท่าไว ประธานกรรมการ และ ดร.สมพิศ สอนโยธา กรรมการ ที่ได้ให้ความรู้ข้อเสนอแนะคำแนะนำตลอดจนสละเวลาตรวจทานและพิจารณาโครงงานพิเศษนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.คนึงกานต์ กลั่นบุศย์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ที่ให้คำปรึกษาคำแนะนำและเอาใจใส่ตลอดการดำเนินงานรวมถึงให้ความกรุณาในการตรวจทานโครงงานพิเศษ ชี้แนะและแก้ไขข้อผิดพลาด เพื่อให้รูปเล่มโครงงานพิเศษสมบูรณ์มากยิ่งขึ้นและให้ยืมอุปกรณ์ต่างๆทำให้โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ตลอดจนอบรมสั่งสอน ให้คำปรึกษาและแนะนำตลอดการศึกษา

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการณ์ตึกจุฬาภรณ์วลัยลักษณ์, ตึกวิทย์เก่า และอาคารพระจอมเกล้า ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเบิกอุปกรณ์ต่างๆตลอดจนเจ้าหน้าที่ธุรการและเจ้าหน้าที่ฝ่ายอาคารที่ให้ความอนุเคราะห์ในการขอใช้อาคารสถานที่ในการทำการทดลอง

ขอบคุณเพื่อนๆที่ให้ความช่วยเหลือให้ยืมอุปกรณ์และให้คำแนะนำตลอดการทำโครงงานพิเศษรวมทั้งผู้มีอุปการคุณที่มิอาจกล่าวนามได้ครบถ้วนมา ณ โอกาสนี้ ในความกรุณาช่วยเหลือ และให้กำลังใจมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดามารดาที่กรุณาอบรมสั่งสอนให้เป็นคนดีและสนับสนุนทุนการศึกษา อุปกรณ์การศึกษา ความช่วยเหลือต่างๆและเคียงข้างให้กำลังใจแก่คณะผู้ทำการวิจัยเสมอมา

ไพลิน พาสมบูรณ์
ภรณ์ชนก มนตรี
อรวรรณ แหยมนุช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ซ
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 นาเกลือ	3
2.1.1 ประวัติความเป็นมาของการทำนาเกลือ	3
2.1.2 ประเภทของเกลือ	4
2.1.3 การกระจายของพื้นที่การทำนาเกลือในประเทศไทย	4
2.1.4 การทำนาเกลือในประเทศไทย	4
2.1.5 ประโยชน์ของนาเกลือ	4
2.2 แอคติโนมัยซีท	7
2.2.1 สัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีท	8
.2.2.2 การจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยซีท	12
2.2.3 แหล่งที่พบของแอคติโนมัยซีท	15
2.3 เอนไซม์โปรติเอส	15
2.3.1 ลักษณะที่สำคัญของเอนไซม์โปรติเอส	16
2.3.2 การแบ่งชนิดของเอนไซม์โปรติเอส	17
2.3.3 สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส	22
2.3.4 เอนไซม์โปรติเอสในแอคติโนมัยซีท	23
2.3.5 การประยุกต์ใช้เอนไซม์โปรติเอสในอุตสาหกรรม	25
2.3.6 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์	26
2.4 ฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ	27
2.4.1 ประเภทของสารต้านจุลชีพ	28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.4 ฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ (ต่อ)

2.4.2 แหล่งที่มาของสารต้านจุลชีพ.......... 29

2.4.3 กลไกการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพ.......... 31

2.4.4 การทดสอบการต้านจุลชีพ.......... 32

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.......... 35

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.......... 35

3.2 เครื่องมือ.......... 35

3.3 สารเคมี.......... 36

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ.......... 37

3.5 เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ.......... 37

3.6 การเก็บตัวอย่างดิน.......... 37

3.7 การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท.......... 38

3.8 การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของตัวอย่างดิน.......... 39

3.8.1 การหาน้ำหนักดิน.......... 39

3.8.2 การหาปริมาณความชื้น.......... 39

3.8.3 การวัดค่าความเป็นกรดด่าง.......... 39

3.9 การเตรียมสารละลายสปอร์เพื่อใช้ในการทดสอบการสร้างเอนไซม์.......... 39

3.10 คัดเลือกแอคติโนมัยซีทที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์.......... 39

3.11 Spore pre – germination.......... 40

3.12 การสกัดเอนไซม์โปรติเอส.......... 40

3.13 การตรวจสอบหาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์.......... 40

3.14 การตรวจสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์.......... 40

3.15 การหาสารยับยั้งที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์.......... 41

3.16 การหาความเสถียรของเอนไซม์.......... 41

3.17 การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ.......... 41

3.17.1 การสกัดสารทุติยภูมิจากน้ำหมักเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย.......... 41

3.17.2 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ.......... 42

3.17.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยเทคนิค Agar disc diffusion.......... 42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล		43
4.1	การหาคุณสมบัติของตัวอย่างดิน	43
4.2	ลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีท	45
4.3	การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีความสามารถในการเจริญบนอาหาร Starch casein agar ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์	69
4.4	การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์	71
4.5	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีท	74
4.6	การตรวจสอบหาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์	77
4.7	การตรวจสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์	81
4.8	การหาสารยับยั้งที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์	82
4.9	การหาความเสถียรของเอนไซม์	84
4.10	การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ	88
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ		93
5.1	สรุปผลการวิจัย	93
5.2	ข้อเสนอแนะ	94
เอกสารอ้างอิง		95
ภาคผนวก		99
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ		100
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมีและบัฟเฟอร์		102
ภาคผนวก ค Azocasein method		112
ภาคผนวก ง สูตรคำนวณ		115
ภาคผนวก จ กระดาษสีมาตรฐาน (The NBs/IBCC color system)		118
ภาคผนวก ฉ ภาพถ่ายสถานที่เก็บตัวอย่างดิน		131
ภาคผนวก ช ผลการทดลอง		134
ประวัติผู้วิจัย		142

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 แสดงเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่างๆที่ผลิตโดยจุลินทรีย์.. 18
2.2 แสดงความจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสในการย่อยสลายพันธะเปปไทด์.............. 20
2.3 แสดงตัวอย่างสารยับยั้งที่มีความจำเพาะต่อเอนไซม์โปรติเอส............................... 23
2.4 แสดงจำนวนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เชื้อแอคติโนมัยซีทผลิตสามารถผลิตได้ในแต่ละสปีชีส์.. 30
4.1 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของตัวอย่างดิน A 43
4.2 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของตัวอย่างดิน B 44
4.3 การจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 33 ไอโซเลตด้วยระบบสี The NBS/IBCC Color System.. 62
4.4 แสดงการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทบนอาหาร Starch casein agar ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6.. 69
4.5 แสดงความกว้างของวงใส (Clear zone) ของเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 23 ไอโซเลท.. 72
4.6 แสดงค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส เมื่อนำไปทดสอบกับค่าความเป็นกรดด่าง.. 77
4.7 แสดงผลของค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 3 ไอโซเลท ได้แก่ PPB 134, PPB 342 และ PPB 512 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 และ 30 ชั่วโมง.. 80
4.8 แสดงค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์เมื่อนำไปทดสอบกับสารยับยั้งต่างๆ................. 83
4.9 แสดงค่าเสถียรภาพของเอนไซม์เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิและเวลาที่แตกต่างกัน........ 85
4.10 แสดงผลของการสกัดเอนไซม์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จากเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจำนวน 3 ไอโซเลท................ 89
ก แสดงค่า pK_a ของกรดอ่อนบางชนิด.. 104
ข แสดงสารยับยั้งทั้ง 3 ชนิด... 114
ค แสดงกระดาษสีมาตรฐาน (the NBs/IBCC color system)...................................... 118
ง แสดงคุณสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่างดิน A...................................... 134
จ แสดงคุณสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่างดิน B 136
ฉ แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส เมื่อนำไปทดสอบกับค่าความเป็นกรดด่าง 137
ช แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ.. 138
ซ แสดงกิจกรรมของเอนไซม์เมื่อทดสอบกับสารยับยั้งชนิดต่างๆ................................. 139
ฌ แสดงเสถียรภาพของเอนไซม์เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิและเวลาที่แตกต่างกัน.......... 140

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	แสดงนาเกลือที่ซาลินาสแถบหุบเขาอุรุบัมบา ประเทศเปรู	3
2.2	แสดงเกลือที่กำลังตกผลึก	5
2.3	แสดงดอกเกลือ	5
2.4	แสดงชาวนากำลังใช้ไม้อีรุนไถผลึกเกลือให้แตก	6
2.5	แสดงโคโลนีของแอคติโนมัยซีทที่เจริญบนอาหารแข็งที่เกิดการสร้างเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)	9
2.6	แสดงลักษณะสปอร์การสร้างสปอร์แบบเดี่ยว	11
2.7	แสดงลักษณะสปอร์การสร้างสปอร์แบบสายยาวในรูปแบบต่างๆ	11
2.8	แสดงปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของเอนไซม์โปรติเอส	16
2.9	แสดงลักษณะโครงสร้างของกรดอะมิโนชนิดแอลและกรดอะมิโนชนิดดี	16
2.10	ภาพแสดงกลไกการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสทั้ง 4 ชนิดได้แก่ Serine protease (A) Cystein protease (B) ,Acid protease (C) และ Metalloprotease (D)	21
3.1	แสดงการเก็บตัวอย่างดินในลักษณะฟันปลาของตัวอย่างดินครั้งที่ 1 (A) จากนาเกลือ ตำบลนาโคก จังหวัดสมุทรสาคร	38
4.1	แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PPA 113	45
4.2	แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PPB 113	46
4.3	แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PPB 134	46
4.4	แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PPB 214	47
4.5	แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PPB 232	47
4.6	แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PPB 313	48
4.7	แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PPB 614	48
4.8	แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PPB 823	49
4.9	แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PPB 1013	49
4.10	แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PPB 1122	50
4.11	แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PPB 222	50
4.12	แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PPA 715	51
4.13	แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PPA 215	51
4.14	แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PPA 222	52
4.15	แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PPB 613	52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ(ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.16 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PPB 512 53
4.17 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PPB 123 53
4.18 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PPB 624 54
4.19 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PPA 1013 54
4.20 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PPB 322 55
4.21 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PPB 342 55
4.22 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PPB 412 56
4.23 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PPB 433 56
4.24 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PPB 1032 57
4.25 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PPB 833 57
4.26 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PPB 632 58
4.27 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PPB 914 58
4.28 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PPB 722 59
4.29 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PPB 1123 59
4.30 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PPA 823 60
4.31 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PPB 714 60
4.32 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PPB 413 61
4.33 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PPB 562 61
4.34 แสดงความกว้างของวงใส (Clear zone) เชื้อแอคติโนมัยซีท บนอาหาร Skim milk agar 71
4.35 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทหมายเลข PPB 134 74
4.36 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทหมายเลข PPB 342 74
4.37 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทหมายเลข PPB 512 75
4.38 การทำ Slide culture และการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีท หมายเลขไอโซเลท PPB 134 75
4.39 แสดงภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท PPB 134 75
4.40 การทำ Slide culture และการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีท หมายเลขไอโซเลท PPB 342 76
4.41 แสดงภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท PPB 342 76

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ(ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.42 การทำ Slide culture และการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีท หมายเลขไอโซเลท PPB 512 76
4.43 แสดงภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท PPB 512 76
4.44 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรดด่างต่างๆกับกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากแอคติโนมัยซีททั้ง 3 ไอโซเลท 79
4.45 แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ที่บ่มในอุณหภูมิต่างๆ และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 82
4.46 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวยับยั้งต่างๆและค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 83
4.47 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ, เวลา และกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากไอโซเลท PPB 134 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 ชั่วโมง 86
4.48 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ, เวลา และกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากไอโซเลท PPB 342 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง 87
4.49 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ, เวลา และกิจกรรมของเอนไซม์ ที่ได้จากไอโซเลท PPB 512 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 ชั่วโมง 87
4.50 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATTC 6633 89
4.51 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 90
4.52 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* ATCC 90028 90
4.53 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E.coli* ATCC 25922 91
4.54 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ จากเชื้อแอคติโนมัยซีท *S.aureus* TISTR 118 91
4.55 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ จากเชื้อแอคติโนมัยซีท *Micrococcus luteus* TISTR 2374 91
ก แสดงการทำงานของบัฟเฟอร์ 103
ข แสดงลักษณะภูมิประเทศของบริเวณจุดเก็บตัวอย่างดินครั้งที่ 1 (A) และครั้งที่ 2 (B) 131
ค แสดงจุดเก็บตัวอย่างดิน A ตำแหน่งที่ 1-11 132
ง แสดงจุดเก็บตัวอย่างดิน B ตำแหน่งที่ 1-11 133

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แอคติโนมัยซีท (*actinomycetes*) เป็นแบคทีเรียจำพวกหนึ่งที่มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อรา กล่าวคือการเจริญเป็นเส้นใย และมีการสร้างสปอร์ แต่ขนาดเซลล์เล็กเท่ากับแบคทีเรีย พบว่ามักยึดเกาะแน่นในโคโลนีที่จมอยู่ในอาหารที่เจริญอยู่ ส่วนของเส้นใยที่สัมผัสกับอากาศแห้งจะมีการเปลี่ยนรูปไปเป็นสปอร์ ซึ่งใช้ในการแพร่พันธุ์เช่นเดียวกันกับเชื้อราสาเหตุที่แอคติโนมัยซีทสามารถเจริญได้ในป่าชายเลนเนื่องจากสภาพแวดล้อมของป่าชายเลนอุดมสมบูรณ์ไปด้วยสารอินทรีย์สูง ได้แก่กำมะถัน,แหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ในการเจริญได้ ดังเช่น สกุล *Streptomyces, Micromonospora, Microbispora, Nonomuraea, Actinoplanes, Arthobacter, Actinomadura, Pseudonocardia, Rhodococcus* และ *Verrucosispora* ซึ่งพบเชื้อแอคติโนมัยซีทเหล่านี้ได้มากที่สุดในบริเวณป่าชายเลนซึ่งในจังหวัดสมุทรปราการ จังหวัดสมุทรสงครามและตามแนวชายฝั่งอ่าวไทย (Hunadanamra *et al.,* 2013) ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์โปรติเอสและฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพจากดินนาเกลือ ต.นาโคก จ.สมุทรสาคร แอคติโนมัยซีทสามารถเจริญได้ในดินนาเกลือ โดยการทำนาเกลือจะสูบน้ำทะเลเข้าพื้นที่และระเหยออกโดยใช้ความร้อนจากแสงอาทิตย์ ทำให้ความเข้มข้นของเกลือในบริเวณนาเกลือจะเพิ่มสูงขึ้นจนกระทั่งอิ่มตัวและตกผลึก (Oren., 1993) ซึ่งในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงมีการพบแบคทีเรียหลายกลุ่ม รวมทั้งกลุ่มแอคติโนมัยซีทในสกุล *Actinopolyspora, Nocardiopsis* และ *Streptomyces* (Kamat *et al.*, 2011) ที่สามารถผลิตสารยับยั้งทางชีวภาพได้ โดยสารยับยั้งทางชีวภาพที่ผลิตได้จากแอคติโนมัยซีทนั้นมีความสามารถต้านทานเชื้อก่อโรคต่างๆ ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ เชื้อรา (Phongsopitanun *et al.*, 2014) นอกจากนี้แล้วสารสกัดที่ได้จากแอคติโนมัยซีท มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราไวรัส เซลล์มะเร็ง และใช้ประโยชน์จากกระบวนการ metabolites ของจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมยา (Berdy, 2005) โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในการกระตุ้นการย่อยโปรตีน โดยการแยกบริเวณของพันธะเปปไทม์ในโปรตีน ซึ่งเกิดการย่อยโดยตรงบริเวณ อะมิโนหรือคาร์บอกซิลของโปรตีนและสามารถย่อยภายในพันธะเปปไทด์ได้ (endopeptideses) สามารถจำแนกเอนไซม์โปรติเอสได้จากบริเวณ active site หรือบริเวณที่เกิดปฏิกิริยารวมทั้งโครงสร้างสามมิติ นอกจากนี้ยังสามารถจำแนกกลุ่มของเอนไซม์โปรติเอสได้จาก pH ความจำเพาะของสารตั้งต้น และความสามารถของการทำงานที่ใกล้เคียงกัน เอนไซม์ โปรติเอสสามารถผลิตได้จากแบคทีเรีย เช่นแอคติโนมัยซีท เชื้อรา ที่อยู่ในสภาวะทนด่าง ซึ่งการผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้ ขึ้นอยู่กับภายใต้สภาวะที่จำเพาะเหมาะสมต่อการเจริญ เอนไซม์โปรติเอสในระดับอุตสาหกรรมนั้นคิดเป็นสัดส่วนไม่น้อยกว่าหนึ่งในสี่ของเอนไซม์ทั่วโลกที่ใช้ในการผลิตยาและที่สำคัญคือกลุ่มเอนไซม์โปรติเอสนั้นสามารถผลิตได้ในเชิงพาณิชย์ และมีการนำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาสูตรของทำความสะอาด การทำลาย proteinceous waste อุตสาหกรรมอาหาร การบำบัดของเสีย อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมการผลิตสารเคมี อุตสาหกรรมฟอกหนังและนม (Ellaiah *et al.,* 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุดประสงค์ของโครงงานพิเศษเพื่อศึกษาและคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทของดินจากนาเกลือที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ ภายใต้สภาวะความเข้มข้นของเกลือในระดับต่างๆที่เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้มากที่สุดรวมทั้งการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของตัวอย่างดินด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อศึกษาการเก็บตัวอย่างและการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินของนาเกลือ ตำบลนาโคก จังหวัดสมุทรสาคร

2. เพื่อศึกษาดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทเช่น การสร้างสปอร์ สีของโคโลนี การเจริญบนผิวหน้าอาหาร เป็นต้น

3.เพื่อศึกษาวิธีการสกัดและศึกษาการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส ที่ได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีท

4. เพื่อศึกษาสภาวะต่างๆที่เชื้อแอคติโนมัยซีทสามารถเจริญและผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้เช่น ระดับความเข้มข้นของเกลือในอาหารความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ สารยับยั้ง (inhibitors) และความเสถียรของเอนไซม์

5. เพื่อศึกษาการผลิตสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆและคุณสมบัติทางกายภาพของตัวอย่างดิน

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

มีการศึกษาการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากตัวอย่างดิน การหาสมบัติทางกายภาพ การทดสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอส การคัดเลือกแอคติโนมัยซีทที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ การสกัดเอนไซม์ รวมไปถึงการตรวจสอบความเป็นกรดด่าง, อุณหภูมิ, สารยับยั้ง (inhibitors), ความเสถียรที่เหมาะสมต่อเอนไซม์ และทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ โดยใช้เชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากดินในนาเกลือ ตำบลนาโคก จังหวัดสมุทรสาคร

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินของนาเกลือ ตำบลนาโคก จังหวัดสมุทรสาครได้

2. สามารถรู้ถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีท และแยกแยะเชื้อแอคติโนมัยซีทออกจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆได้

3. สามารถสกัดเอนไซม์และรู้ถึงการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีท รวมทั้งสภาวะต่างๆที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อแอคติโนมัยซีท

4. ได้เรียนรู้เกี่ยวกับการผลิตสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆและคุณสมบัติทางกายภาพของตัวอย่างดิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 นาเกลือ

นาเกลือมีลักษณะคล้ายกับนาข้าวแต่ไม่ได้ใช้ปลูกพืชแต่นาเกลือเป็นพื้นที่ที่ใช้ผลิตเกลือและในการทำนาเกลือนั้นจะต้องมีพื้นที่ที่กว้างขวาง คือมีเนื้อที่ไม่น้อยกว่า 25 ไร่ เพราะต้องใช้พื้นที่สำหรับการตากน้ำเค็มจำนวนมาก โดยเกลือมีชื่อทางเคมีว่า “โซเดียมคลอไรด์” (NaCl) มีรสชาติเค็มและมีลักษณะเป็นผลึกสีขาว มนุษย์ต้องบริโภคเกลือประมาณวันละ 5-10 กรัม เพื่อรักษาสมดุลของน้ำในร่างกายให้เซลล์เนื้อเยื่อต่างๆ ทำงานตามปกติ นอกจากนี้เกลือยังมีประโยชน์อีกมายมาย เช่น ปรุงอาหาร ถนอมอาหาร เพิ่มความเย็น ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตสารเคมีต่างๆ ได้แก่ โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) หรือโซดาทำขนมโซเดียมคาร์บอเนต ($NaCO_3$) หรือโซดาแอส โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) หรือโซดาไฟ และ ไฮโดรคลอริก (HCl) หรือกรดเกลือ เป็นต้น (ปัณฉัตร, 2549 ; Manatsanan, 2013)

2.1.1 ประวัติความเป็นมาของการทำนาเกลือ

เกลือเป็นสิ่งที่มนุษย์รู้จักมาตั้งแต่สมัยโบราณ มนุษย์นำเกลือมาใช้ประโยชน์ ทั้งใช้เป็นยารักษาโรค ใช้ถนอมอาหารและหลอมเหล็ก เป็นต้น มีหลักฐานระบุชี้ชัดว่า การทำนาเกลือมีกันมาแต่โบราณสมัยชาวอินคา หลายพันปีมาแล้ว นาเกลือโบราณของชาวอินคา อยู่ที่ซาลินาส แถบหุบเขาอุรุบัมบา ประเทศเปรู ซึ่งที่นี่ถือได้ว่าเป็นนาเกลือที่เก่าแก่แห่งหนึ่งของโลก เพราะมีการทำนาเกลือกันมาตั้งแต่สมัยโบราณด้วยระบบชลประทานที่ซับซ้อนจนมีการผันเอาน้ำเกลือ ซึ่งคาดว่าไหลออกมาจากถ้ำบนภูเขา ชาวอินคาเป็นคนมีความฉลาดหลักแหลม พวกเขาได้ทำการสร้างขั้นบันได เพื่อผันเอาน้ำเกลือธรรมชาติมาไว้ในนาเกลือ ซึ่งจะไหลลดหลั่นตามนาเกลือมาเป็นชั้นๆ หลังจากที่ปล่อยน้ำตากแดดเอาไว้ น้ำเกลือก็จะระเหยไปจนหมด จากนั้นก็จะเหลือเกลือบริสุทธิ์เอาไว้มากมาย

รูปที่ 2.1 แสดงนาเกลือที่ซาลินาสแถบหุบเขาอุรุบัมบา ประเทศเปรู
ที่มา : http://travel.mthai.com/world-travel/33833.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 ประเภทของเกลือ

ประเภทของเกลือมีด้วยกัน 2 ประเภท คือ

2.1.2.1 เกลือทะเลหรือเกลือสมุทร (Sea Salt) คือเกลือที่ผลิตขึ้นโดยการนำน้ำทะเลขึ้นมาตากแดดให้น้ำระเหยไปเหลือแต่ผลึกเกลือตกอยู่ เกลือประเภทนี้มีการผลิตและการใช้มาตั้งแต่สมัยโบราณและถือเป็นอาชีพเก่าแก่อาชีพหนึ่งของโลกและของคนไทย (สมฤดีและสุนี , 2537) โดยได้มีการกำหนดเป็นสินค้าเกษตรกรรมขั้นต้นตามพระราชบัญญัติธนาคารเพื่อการเกษตรและสหกรณ์การเกษตร พ.ศ. 2509

2.1.2.2 เกลือหินหรือเกลือสินเธาว์ (Rock Salt) คือเกลือที่ทำจากดินที่น้ำชะดินละลายแล้วแห้ง เห็นเป็นคราบเกลือติดอยู่บนผิวดิน เรียกว่า “ส่าดิน” เมื่อนำผิวดินหรือส่าดินมาละลายน้ำ แล้วต้มจะได้เกลือสินเธาว์ ต่อมาในปี พ.ศ. 2512 ได้มีการค้นพบเกลือหินที่อยู่ใต้ดินในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ทำให้การผลิตเกลือสินเธาว์เปลี่ยนแปลงไปเป็นรูปแบบการใช้เกลือหินแทน โดยใช้วิธีฉีดน้ำลงไปละลายเกลือในบ่อเกลือ หรือใช้วิธีสูบน้ำเกลือใต้ดินขึ้นมาตากแดด หรือโดยการต้มเพื่อให้ได้ตะกอนเกลือ และหากมีการใช้เครื่องจักรที่ทันสมัยจะสามารถผลิตได้ตลอดปี (เพียงตา , 2546)

2.1.3 การกระจายของพื้นที่การทำนาเกลือในประเทศ (บำเพ็ญ , 2554)

ในปัจจุบันแหล่งผลิตเกลือสมุทรของไทยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีการผลิตมาก 90% ของผลผลิตทั้งประเทศ คือ จังหวัดเพชรบุรี สมุทรสาคร และสมุทรสงครามและกลุ่มที่มีการผลิตน้อย 10% ของผลผลิตทั้งประเทศ คือ จังหวัดชลบุรี จันทบุรี ฉะเชิงเทรา และปัตตานี ในประเทศไทยมีพื้นที่ทำนาเกลือทั้งหมดประมาณ 81,485 ไร่ จังหวัดที่มีพื้นที่ทำนาเกลือมากที่สุดคือจังหวัดเพชรบุรีมีพื้นที่ 47% รองลงมาคือจังหวัดสมุทรสาคร 43.1% จังหวัดสมุทรสงคราม 7.7% จังหวัดชลบุรี 1.0% จังหวัดจันทบุรี 0.6% จังหวัดปัตตานี 0.4% และที่น้อยที่สุดคือจังหวัดฉะเชิงเทรา มีพื้นที่เพียง 0.2% เท่านั้น

2.1.4 การทำนาเกลือในประเทศไทย

เมื่อสิ้นสุดฤดูฝน ชาวนาเกลือจะเริ่มต้นฤดูการผลิต ตั้งแต่ เตรียมนาได้แก่การถอนหญ้า กำจัดสิ่งสกปรก ปรับหน้าดินให้เรียบเนียนเพื่อถ่ายเทความร้อนได้อย่างสม่ำเสมอ โดยจะใช้ลูกกลิ้งในการบดดินให้เรียบ (ทัศนีย์, 2556) โดยมีการกลิ้งวันละ 6 ตลบ ซึ่งคำว่า “ตลบ” หมายถึงการนำลูกกลิ้งกลิ้งให้ทั่วแปลงนาแล้วปล่อยให้แดดเผานาให้แห้งเรียกว่า 1 ตลบ ในอดีตจะใช้แรงงานคนลากท่อนซุงหรือใช้รถไถ แต่ปัจจุบันการบดดินง่ายขึ้นเนื่องจากมีการใช้เครื่องจักรมาใช้ทุ่นแรง

จากนั้นก็ทำการแบ่งพื้นที่นาออกเป็นส่วน 3 ส่วน เรียกว่า นาตากนาเชื้อและนาปลง ซึ่งแต่ละส่วนจะยกขอบคันดินให้สูงขึ้นและมีระดับความสูงต่ำลดหลั่นลงมาตามลำดับ คือนาตากซึ่งอยู่ใกล้ทะเลที่สุดให้มีระดับพื้นที่สูงที่สุด นาเชื้อมีระดับต่ำลงมา และนาปลงมีระดับพื้นที่ต่ำที่สุด โดยจะมีร่องระบายน้ำระหว่างแปลง จากนั้นจะสูบน้ำทะเลไปเก็บไว้ในวังขังน้ำหรือบ่อขังน้ำ เพื่อให้โคลนหรือเศษดินตกตะกอน จากนั้นจึงระบายน้ำทะเลจากวังขังน้ำเข้าสู่นาตาก ซึ่งต้องให้ระดับน้ำสูงประมาณ 5 เซนติเมตร เพื่อตากแดดให้น้ำระเหยออกไป และจะมีการวัดค่าความเค็มอยู่เรื่อยๆเพื่อให้มีความเค็มเหมาะสมกับการที่จะนำมาทำเป็นเกลือ เนื่องจากน้ำทะเลปกติมีระดับความเค็มที่ไม่สามารถตกผลึกเป็นเกลือได้จึงต้องมีวิธีการเพิ่มระดับความเค็มด้วยการระเหยของน้ำเรื่อยๆ โดยจะใช้ปรอทในการวัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าความเค็มซึ่งชาวนาเกลือเรียกว่าดีกรีและจะต้องเพิ่มระดับความเค็มของน้ำทะเลปกติจาก 2 ดีกรีให้อยู่ที่ระดับ 25 ดีกรี น้ำทะเลถึงจะกลายเป็นเกลือได้

รูปที่ 2.2 แสดงเกลือที่กำลังตกผลึก

ที่มา : http://www.manager.co.th/Travel

เมื่อระดับความเค็มเพิ่มขึ้นเป็น 20 ดีกรี ก็จะมีการระบายน้ำจากนาตากเข้าสู่นาเชื้อ ซึ่งจะมีระดับความตื้นขึ้นมาอีก และจะมีการบ่มน้ำทะเลด้วยการตากแดดตากลมจนระดับความเค็มเป็น 25 ดีกรี ก็จะถ่ายน้ำส่งไปยังนาปลง โดยจะใช้เวลาประมาณ 45 วัน และหลังจากระบายน้ำเข้าสู่นาปลงประมาณ 2 วัน ผลึกเกลือแกงจะตกลงมาและมีปริมาณมากขึ้นเรื่อยๆอีกทั้งยังมีผลึกแมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl) และแมกนีเซียมซัลเฟต ตกลงมาด้วย ทำให้ได้เกลือแกงที่ไม่บริสุทธิ์และเป็นเกลือแกงที่มีคุณภาพต่ำ ชื้นง่าย การป้องกันไม่ให้ผลึกแมกนีเซียมคลอไรด์และแมกนีเซียมซัลเฟตตกลงมา สามารถทำได้โดยการระบายน้ำจากนาเชื้อเข้าสู่นาปลงอย่างสม่ำเสมอ ซึ่งในขั้นตอนนี้ผลึกเกลือที่ลอยอยู่เหนือน้ำเป็นแพผลึกเล็กๆ นั้นชาวนาเกลือจะเรียกว่าดอกเกลือ ในการเก็บดอกเกลือนั้นชาวนาเกลือจะต้องตื่นแต่เช้าเพื่อรีบช้อนดอกเกลือ ก่อนที่แสงแดดและลมจะทำให้ดอกเกลือจมลงด้านล่าง ดอกเกลือที่เก็บได้นั้นจะมีความละเอียดและมีไอโอดีนสูง เป็นเกลือที่เพิ่งตกผลึกใหม่ๆ ลอยเหนือน้ำไม่ได้สัมผัสกับพื้นดิน ชาวนาเกลือจึงถือว่าดอกเกลือเป็นเกลือที่ดีที่สุดมีคุณภาพสูง ด้วยความที่ปริมาณน้อยจึงมีราคาค่อนข้างสูง โดยส่วนมากจะนำมาผสมในผลิตภัณฑ์ดูแลผิว เช่น เกลือขัดผิว เป็นต้น

รูปที่ 2.3 แสดงดอกเกลือ

ที่มา : http://www.manager.co.th/Travel

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยปกติแล้วจะปล่อยให้เกลือตกผลึกอยู่ในนาปลงประมาณ 9-10 วันจึงขูดเกลือออกโดยใช้ไม้อีรุนทำการรุนโดยไถไปไถมาให้ผลึกเกลือแตกเป็นเม็ดและใช้ไม้อีรุนลากจัดไว้เป็นแถวและนำมารวมกันให้เป็นกองๆ เกลือแกงที่ได้จะมีผลผลิตประมาณ 4-9 ตันต่อไร่ หลังจากนั้นก็จะปล่อยทิ้งไว้ให้แห้งสนิท หลังจากแห้งสนิทแล้ว ก็จะนำเกลือใส่ถุงนำมาเก็บในยุ้งเกลือเพื่อรอจำหน่าย

เกลือรุ่นแรกของปีจะออกช่วงเดือนมกราคม และได้ผลผลิตเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในฤดูแล้งที่มีแดดจัด แต่ชาวนาจะหยุดทำนาเกลือตลอดฤดูฝน เพราะฝนที่ตกลงมาจะทำให้กองเกลือที่กำลังเตรียมเก็บขายละลายกลายเป็นน้ำ และไม่สามารถนำน้ำเกลือนั้นมาตกผลึกได้อีก จะต้องเริ่มทำความสะอาดนาและปล่อยน้ำเข้านาปลงใหม่ ด้วยเหตุนี้ชาวนาเกลือจึงต้องมีการพยากรณ์อากาศที่แม่นยำ ด้วยการดูลางบอกฝนตามภูมิปัญญาที่สืบทอดกันมา เช่น ถ้าน้ำในนาเกลือเริ่มแดง มีเมฆหัวแดงทางทิศตะวันออก หรือถ้าเดินที่คันนาแล้วมีดินติดเท้า นั่นแปลว่าอีก 3-4 วัน จะมีฝนตก (ทัศนีย์, 2556)

รูปที่ 2.4 แสดงชาวนากำลังใช้ไม้อีรุนไถผลึกเกลือให้แตก
ที่มา:http://www.manager.co.th/Travel

2.1.5 ประโยชน์ของนาเกลือ

2.1.5.1 ชาวนาเกลือที่มีพื้นที่กักเก็บน้ำทะเล (วัง) ก็จะมีสัตว์น้ำทะเลต่างๆ เช่น กุ้งขาว กุ้งแชบ๊วย ปลาหมอเทศ ปลากระพง ปูทะเล ฯลฯ อยู่ภายในวัง เป็นการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบธรรมชาติ ทำให้ชาวนาเกลือมีรายได้เสริมอีกทางหนึ่ง

2.1.5.2 ชาวนาเกลือสามารถจำหน่ายน้ำเค็มให้กับเกษตรกรชาวนากุ้ง นำไปผสมกับน้ำปกติเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งเนื่องจากน้ำในนาเกลือมีความเค็มมากกว่าน้ำทะเล

2.1.5.3 เกลือจืด (ยิปซั่ม) เกลือจืดหรือยิปซั่มเป็นสินแร่ที่เกิดในนาเกลือเฉพาะแปลงที่ใช้กักเก็บน้ำแก่ (นารองเชื้อและนาเชื้อ) เกลือจืดจะเกิดอยู่บนหน้าดิน เกษตรกรชาวนาเกลือจะทำเกลือจืดในฤดูฝน หลังจากหมดฤดูทำนาเกลือแล้ว โดยจะขังน้ำฝนไว้ในแปลงนาที่มีเกลือจืด แล้วรวบรวมเกลือจืดเข้าเป็นกองๆ จากนั้นก็จะร่อนและล้างเอาเศษดินเศษโคลนออกให้เหลือแต่เม็ดเกลือจืดที่แข็ง คล้ายทรายหยาบๆ และไม่ละลายน้ำ (บำเพ็ญ , 2554; ณัฏฐา , 2559)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.5.4 เกษตรกรชาวนาเกลือจะเก็บดีเกลือทุกวันในเวลาเช้าก่อนแดดออก เพราะถ้าแดดจัดดีเกลือจะละลายไปกับน้ำ ดีเกลือชนิดนี้จะเป็นเม็ดสีขาวมีรสขม นำไปใช้ประกอบเป็นเครื่องยาไทยโบราณประเภทยาระบายหรือยาถ่าย และน้ำที่อยู่ในนาดีเกลือจะมีความเค็มจัดมากเรียกว่า “น้ำดีเกลือ” นำไปใช้เป็นส่วนประกอบในการทำเต้าหู้ เป็นสารทำให้เต้าหู้แข็งตัว (วันดี , 2525 ; วิทิต , 2528)

2.1.5.5 ขี้แดดหรือดินหนังหมา เป็นส่วนที่อยู่บนผิวดินของนาเกลือ มีลักษณะเป็นแผ่นร่อนอยู่บนผิวนา ซึ่งเกษตรกรชาวนาเกลือต้องทำการเก็บขี้แดดก่อนทำการบดดินตอนต้นฤดูการทำนาเกลือ ขี้แดดนี้สามารถนำไปใช้เป็นปุ๋ยปลูกพืชได้เป็นการเพิ่มรายได้ให้กับชาวนาเกลือ (นันทนิตย์ , 2552)

2.2 แอคติโนมัยซีท (Actinomycetes)

แอคติโนมัยซีทจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีการสร้างเส้นใย (hyphae) ลักษณะคล้ายเชื้อรา โดยสามารถสร้างเส้นใยทั้งภายใต้ผิวอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยบนผิวอาหาร (aerial mycelium) หรืออาจพบเส้นใยใต้ผิวอาหาร ซึ่งเชื้อแอคติโนมัยซีทจะมีความแตกต่างกับเชื้อราตรงที่ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียสและไมโทคอนเดรีย และมีความแตกต่างจากเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไปที่ปริมาณของเบสกัวนีนและไซโตซีน (G+C) สูงมากกว่า 55 % (Remya and Vijayakumar , 2008) โดยโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทนั้นจะมีลักษณะแตกต่างจากเชื้อแบคทีเรียอื่นๆเนื่องจากมีลักษณะทึบแสง และสร้างเส้นใยบนผิวอาหารแข็ง ซึ่งสมารถมองเป็นเป็นผงเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าหรืออาจจะมีผิวโคโลนีเรียบคล้ายหนังสัตว์หรือรอยย่นเป็นเส้นใยสั้นๆและเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าแล้วจะมีลักษณะคล้ายกำมะหยี่ ซึ่งเชื้อแอคติโนมัยซีทนั้นสามารถสร้างรงควัตถุสีต่างๆได้ เช่นสีขาว เทา เขียว ส้ม น้ำตาล เหลือง ดำ ชมพูและม่วงเป็นต้น (กิ่งจันทน์ , 2555) เชื้อแอคติโนมัยซีทนั้นประกอบไปด้วยหลากหลาย สปีชีร์ที่มีความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) เช่น การสร้างสารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดได้แก่ การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส และโปรโตซัว สร้างสารที่สามารถต้านเซลล์มะเร็ง ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ต่างๆได้ โดยกว่า 80% ของสามารถผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) จำพวกยาปฏิชีวนะนั้นสามารถผลิตได้จากสกุล *Streptomyces* และมีบทบาทที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งคือเชื้อแอคติโนมัยซีทสามารถช่วยย่อยสลายอินทรียวัตถุในธรรมชาติโดยเฉพาะอย่างยิ่งการย่อยส่วนประกอบของพืชสัตว์ที่ทนทานต่อการย่อยสลายเช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนินและไคติน (Remya and Vijayakumar , 2008;Oskay et al., 2004) และมีเชื้อแอคติโนมัยซีทบางชนิดที่สามารถก่อให้เกิดโรคได้อีกเช่นกัน (Collier *et al.*, 1998) โดยสามารถพบเชื้อแอคติโนมัยซีทได้ทั่วไปตามแหล่งธรรมชาติต่างๆไม่ว่าจะเป็นในดิน น้ำจืด น้ำเค็ม อากาศ พืชและแหล่งที่สามารถพบได้มากที่สุดคือในบริเวณที่มีการสะสมของสารอินทรีย์เช่น ดินที่มีการเพาะปลูก ปุ๋ยหมัก ตะกอนใต้แม่น้ำ ใต้ทะเล ดินบริเวณน้ำพุร้อน ป่าชายเลน ดินบริเวณรอบรากพืช (rhizophere) (Alexander, 1991;Ramesh and Mathivanan, 2009) และดินในนาเกลือซึ่งมีความเข้มข้นของเกลือที่สูงกว่าพื้นที่ทั่วไป (Chun *et al.*, 2000) ซึ่งปริมาณของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่อยู่ในดินนั้นจะขึ้นอยู่กับชนิดและคุณสมบัติทางกายภาพของดินเช่นค่าความเป็นกรดและด่างของดิน ปริมาณความชื้นและปริมาณอินทรียวัตถุภายในดิน ส่วนใหญ่แล้วเชื้อแอคติโนมัยซีทเป็นพวกที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (aerobe) (Collier *et.al* ,1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับเชื้อแอคติโนมัยซีทที่พบในดินส่วนใหญ่เป็นเชื้อในกลุ่มของ *Streptomyces* ที่มีการกระจายตัวและหนาแน่นมากที่สุด โดยจัดเป็นสกุลที่สำคัญและพบมากที่สุดถึง 90 เปอร์เซ็นของเชื้อแอคติโนมัยซีททั้งหมดเนื่องจากเป็นกลุ่มที่สามารถเจริญเติบโตได้เร็วและมีมากที่สุดในธรรมชาติ (Williams *et al.*, 1989)

2.2.1 สัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีท

2.2.1.1 เส้นใย (Mycelium)

เชื้อแอคติโนมัยซีทมีเส้นใยคล้ายกับรา มีการสร้างผนังกั้นเส้นใยแบบต่างๆและมีการเจริญโดยเส้นใยสามารถแตกแขนงบริเวณปลาย พบโครงสร้างหลักในเส้นใยในไซโตพลาสซึมจะประกอบด้วยดีเอนเอ ไรโบโซมและสารต่างๆรวมอยู่ด้วยกันเช่น โพลีฟอตเฟส ลิปิดหรือพอลิแซ็กคาไรด์ โดยผนังเซลล์ที่ติดอยู่กับส่วนของไซโตพลาสซึมทำให้เกิดมีโซโซมขึ้นซึ่งเป็นส่วนที่ติดอยู่กับโครงสร้างของผนังเซลล์ ซึ่งผนังเซลล์ของเส้นใยมีคุณสมบัติเป็นผนังกั้นชั้นเดียวที่มีความหนาประมาณ 0.4 – 1.2 ไมโครเมตร และมีการสร้างผนังกั้นภายในเส้นใย (septum) โดยมีการสร้างขณะที่เส้นใยเจริญ (Williams *et al.*, 1989)

การแตกสาขาของเส้นใยแอคติโนมัยซีทนั้นสามารถพบได้ 3 รูปแบบคือ

1) Monopodial เป็นรูปแบบที่พบได้มากที่สุด มักพบในสกุล *Streptomyces*

2) Dichotomous พบในสกุล*Actinobifida*

3) Verticillate พบในสกุล *Streptoverticillum*

เส้นใยของแอคติโนมัยซีทสามารถออกเป็น 2 ชนิดคือ

1) เส้นใยอาหาร (substrate mycelium หรือ vegetative mycelium) เป็นเส้นใยของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ใช้ในการแทงลงผิวหน้าของอาหารเพื่อนำสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเข้าสู่เซลล์

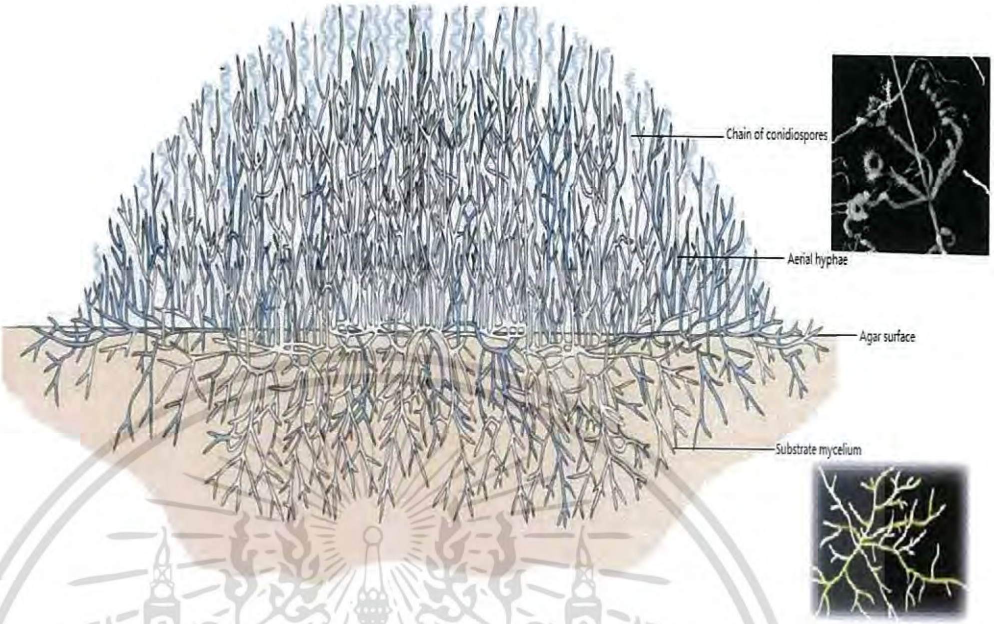
2) เส้นใยอากาศ (aerial mycelium) เป็นเส้นใยที่มีลักษณะอ่อนนุ่มเนื่องจากมีชั้นไฟบรัส ห่อหุ้มอยู่ (fibrous sheath) โดยมีความแตกต่างจากเส้นใยอาหารที่มีผนังของเส้นใยบาง เส้นใยอากาศมักมีสีเข้มกว่า มีการแตกสาขาได้น้อยกว่าเส้นใยอาหาร เส้นใยอาจมีการสร้างสปอร์และแตกสาขาของเส้นใยและเส้นใยอากาศเป็นเส้นใยที่ไม่ชอบน้ำ

2.2.1.2 การสร้างโคโลนี

โคโลนีของแอคติโนมัยซีทเกิดจากการรวมตัวกันของเส้นใย โดยเชื้อที่ถ่ายลงอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มเจริญเป็นเส้นใยแทรกลงไปในอาหารแข็ง (substratemycelium) และจะเกิดการเจริญเติบโตขึ้นเมื่อระยะเวลาผ่านไปก็จะเกิดการสร้างเส้นใยขึ้นมาบนผิวหน้าอาหาร (aerial mycelium) ซึ่งเป็นส่วนที่ใช้สัมผัสอากาศ เมื่อตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดาแล้วนั้นเส้นใยใต้ผิวอาหาร (substratemycelium) จะยอมให้แสงผ่านเห็นเป็นใยใสๆและมีพื้นสีเข้ม ขณะที่เส้นใยเหนือผิวอาหาร (aerial mycelium) จะสะท้อนแสงขณะพื้นที่สว่างและด้วยความแตกต่างกันของเส้นใยใต้ผิวหน้าอาหารและบนผิวหน้าอาหารจึงเป็นลักษณะที่ใช้ในการพิจารณารูปร่างลักษณะภายนอกและภายในของโคโลนี (Li *et al.*, 2014) ลักษณะของโคโลนีมักจะมีความแตกต่างกันบางสายพันธุ์โดยอาจมีลักษณะนูน แบนติดกับอาหารแข็งหรือบางสายพันธุ์บางสายพันธุ์มีลักษณะเป็นแผ่นราบผิวหน้าอาจจะเรียบ แตก ขรุขระ นูน เหี่ยวย่น หรือเป็นเม็ดเล็กๆ โคโลนีของแต่ละชนิดจะมีสีที่แตกต่างกันและจะมีการเจริญขึ้นตามรอยขีดบนอาหารแข็งโดยอาจจะยาวเป็นเส้นหรือเป็นจุดๆก็ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แต่หากเป็นการถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวแอคติโนมัยซีทจะเจริญจับกันเป็นกลุ่มของเส้นใยที่มีรูปร่างเป็นเม็ด (pellets) (ศิริรัตน์, 2552)



รูปที่ 2.5 แสดงโคโลนีของแอคติโนมัยซีทที่เจริญบนอาหารแข็งที่เกิดการสร้างเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

ที่มา: Li *et al.* (2016)

2.2.1.3 รูปร่างลักษณะและการเกิดสปอร์ของแอคติโนมัยซีท

แอคติโนมัยซีทมีการสร้างสปอร์โดยสามารถแบ่งออกเป็น 3 แบบตามลักษณะโครงสร้างภายนอกคือ สปอร์เดี่ยว สปอร์เป็นสายและสร้างสปอร์ในอับสปอร์ โดยสปอร์แต่ละชนิดของแอคติโนมัยซีทจะมีการเจริญและพัฒนาอยู่บนก้านชูสปอร์ (sporophore) ทั้งที่มีลักษณะเป็นก้านชูอันเดียวหรือแตกกิ่งก้านสาขา ซึ่งอาจแตกออกมาจากเส้นใยที่เจริญลงไปในอาหารหรือเส้นใยที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร และถุงหุ้มสปอร์ (sporangium) ถูกสร้างอยู่บนก้านชูสปอร์ตรงบริเวณเกือบปลายหรือปลายสุดของเส้นใย

2.2.1.3.1 การสร้างสปอร์แบบเดี่ยว (monosporous)

พบได้ในหลายสกุล เช่น สกุล *Micromonospora*โดยก้านชูสปอร์เกิดขึ้นบนสายใยอาหาร สปอร์เจริญอยู่บนก้านชูขนาดสั้น การสร้างสปอร์เริ่มจากการโป่งพองบริเวณปลายของเส้นใย จากนั้นมีการสร้างผนังกั้นและสร้างผนังสปอร์ สกุล *Thermomonospora* สร้างสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอากาศที่ปลายก้านชูสปอร์ที่แตกแขนงหรือไม่แตกแขนงซึ่งการแตกแขนงนั้นทำให้เกิดการสร้างเป็นกลุ่มของสปอร์

2.2.1.3.2 การสร้างสปอร์เรียงเป็นเส้นสาย

สามารถจำแนกลักษณะโดยพิจารณาจากรูปร่างตามความยาวหรือจำนวนของสปอร์ที่แบ่งได้ดังนี้

1) สปอร์แบบคู่ (bisporous หรือ disporous) ประกอบด้วยสปอร์คู่ต่อกันตามยาว เช่น สกุล *Microbispora*ที่มีสปอร์ทรงรี 2 สปอร์ อาจเกิดขึ้นบนสายใยอากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรือเกิดบนก้านชูสปอร์สั้นๆ โดยการสร้างสปอร์เริ่มจากการแยกตัวออกตามยาวจากสายใยอากาศเป็นกิ่งสั้นๆ จากนั้นจะมีการพองออกและสร้างผนังกั้นตรงกลาง

2) การสร้างสปอร์เล็กน้อย (oligosporous) มีการพัฒนาจากสปอร์สายสั้นๆ ส่วนมากพบ 7-10 สปอร์ต่อสายและอาจพบสปอร์มากถึง 30 สปอร์ เช่น *Nocardia brevicatena* สร้างสายสปอร์สั้นๆ 2-7 สปอร์ บนสายใยอาหารและสายใยอากาศ ก้านชูสปอร์และสายสปอร์มีการแตกแขนง มีการแตกหักของเส้นใยอาการในสปีชีส์ *Saccharopolyspora rectivirgula*

3) การสร้างสปอร์มาก (polysporous) เช่น สกุล *Streptomyces*มีการสร้างสปอร์ ลักษณะเป็นสายยาวมากกว่า 50 สปอร์ โดยสปอร์ของ *Streptomyces* และแอคติโนมัยซีทชนิดอื่นๆที่มีสปอร์มากมักเรียกว่า arthospores ซึ่งสอดคล้องกับ arthospores ของราในกลุ่ม *Deuteromycota*ที่มีการสร้างสายสปอร์และมีการแตกหักของเส้นใย ซึ่งความแตกต่างของลักษณะสายสปอร์สามารถใช้ในการจัดจำแนกชนิด ได้สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ลักษณะ

3.1) Rectiflexibiles ลักษณะของสายสปอร์ตรงและมีการโค้งงอ (flexuous) เล็กน้อย

3.2) Retinaculiaperti ลักษณะสายสปอร์คล้ายขอเป็นวงเปิดหรือเกลียวซ้อนซ้อนกัน 1-3 ชั้น

3.3) Spira ลักษณะเส้นสายสปอร์ที่มีการขดเป็นเกลียว อาจเป็นเกลียวที่ชิดกันแน่นหรืออาจเป็นเกลียวหลวม หรืออาจเป็นเกลียวห่างๆที่มีความยาวและมีปลายเปิด

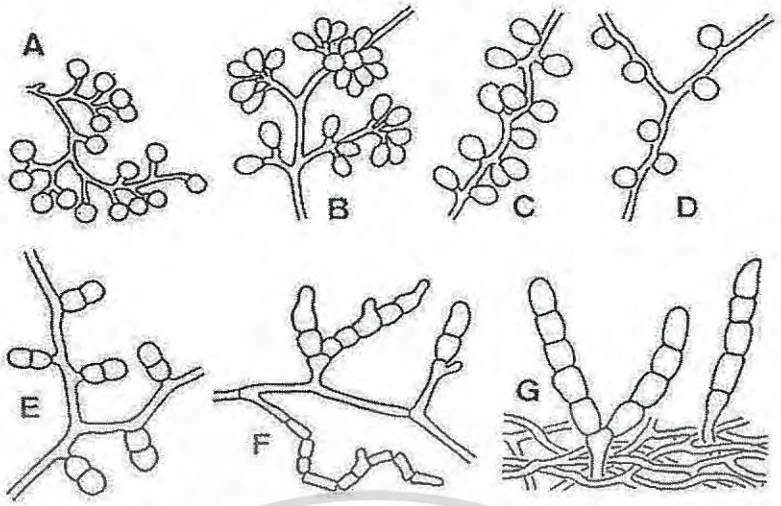
3.4) Verticillati ลักษณะสายสปอร์ขดคล้ายก้นหอยและแตกแขนงออกเป็นช่อ

2.2.1.3.3 การสร้างสปอร์อยู่ภายในอับสปอร์ที่อยู่ในถุงบรรจุสปอร์ (sporangium) ภายในอับสปอร์จะมีสปอร์อยู่มากมายและสามารถแบ่งกลุ่มการสร้างอับสปอร์ได้เป็นสองกลุ่มใหญ่ คือ

กลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนสายใยอาหาร โดยอับสปอร์มีลักษณะทรงกลมหรือคล้ายทรงกลมจึงทำให้มีรูปทรงที่ไม่แน่นอน อยู่บนสายใยอาหารโดยตรงและมีสปอร์ต่อกันเป็นเส้นสายแตกแขนงขดกันเป็นก้อนอยู่ภายในผนังห่อหุ้ม เช่น สกุล *Actinoplanes*เป็นต้น

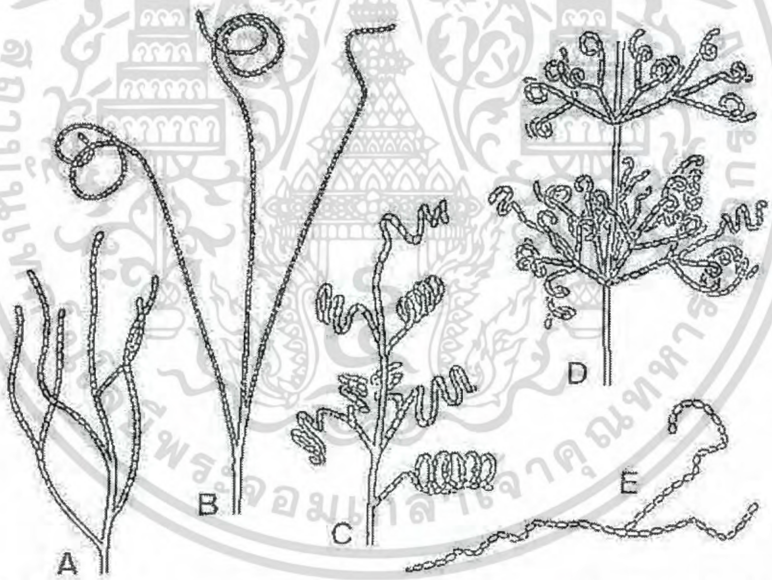
กลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนสายใยอากาศ ประกอบด้วยสกุล *Planompnospora*ที่มีอับสปอร์รูปทรงกระบอกและภายในอับสปอร์มีเพียงหนึ่งสปอร์ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 แสดงลักษณะสปอร์การสร้างสปอร์แบบเดี่ยว (monosporous)ได้แก่ (A) *Micromonospora*, (B)*Thermomonospora*, (C) *Saccharomonospora*, (D) *Thermoactinomyces* การสร้างสปอร์แบบคู่ (bisporous)ได้แก่ (E) *Microbispora* และการสร้างสปอร์เล็กน้อย (oligosporous) ได้แก่ *Nocardia brevicatena*, (G) *Catellatospora*

ที่มา: Miyadoh *et al.* (1997)



รูปที่ 2.7 แสดงลักษณะสปอร์การสร้างสปอร์แบบสายยาวในรูปแบบต่างๆได้แก่ *Streptomyces:* การสร้างสปอร์แบบ *Rectiflexibiles* (A), การสร้างสปอร์แบบ *Retinaculiaperti* (B), การสร้างสปอร์แบบ *Spira* (C), การสร้างสปอร์แบบ *Verticillati* (D) และ *Nocardiopsis*: เกิดการสร้างสปอร์บนสายใยอากาศ (E)

fragmenting branched aerial hyphae

ที่มา : Hütter (1967)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 การจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยซีท

การจำแนกเชื้อแอคติโนมัยซีทสามารถจำแนกตามลักษณะต่างๆ ดังต่อไปนี้

2.2.2.1 ลักษณะทางสันฐานวิทยา

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทมีความจำเป็นสำหรับการจัดจำแนกชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีทออย่างมาก เช่น ลักษณะการสร้างเส้นใยในการเจริญในอาหาร International Streptomyces Project (ISP) ต่าง โดยดูลักษณะเส้นใย เช่น เส้นใยอากาศ การเกิดกระบวนการการแตกกิ่งก้านของเส้นใยอากาศและเส้นใยอาหาร ลักษณะการสร้างสปอร์โดยดูลักษณะของสปอร์ที่เกิดว่าเป็นแบบเดี่ยวๆ เป็นสายยาวหรือสายสั้นๆ ตลอดจนถึงจำนวนของสปอร์แรงเจียม รวมถึงจำนวนสปอร์แรงจิโอสปอร์ต่อสปอร์แรงเจียม (Li *et al.*, 2016)

1) ลักษณะการเจริญอาหารดูระยะการเจริญเติบโตบนอาหาร International Streptomyces Project (ISP) ต่างๆ yeast malt agar medium (ISP medium no. 2) oatmeal agar medium (ISP medium no. 3) Starch inorganic salt agar medium (ISP medium no. 4) เป็นต้น โดยดูลักษณะสีของสันใยอากาศและเส้นใยอาหาร รวมถึงการสร้างเม็ดสีที่ละลายอาหาร (จิตติ , 2552)

2) ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี (Kämpfer, 1998)

2.1) คุณสมบัติในการย่อยโปรตีน เนื่องจากเชื้อแต่ละชนิดมีความสามารถในการย่อยโปรตีนหรือการสร้างเอมไซม์ย่อยโปรตีนได้ต่างกันการสร้างเอมไซม์ย่อยโปรตีนได้ต่างกัน อารสร้างเอนไซม์ในการย่อยโปรตีนมี 2 รูปแบบ คือ

2.1.1) Coagulation เชื้อที่สามารถผลิตเอมไซม์โคแออกกูเลส (coagulase) ได้จะเห็นได้จากการที่มีการรวมกลุ่มหรือตกตะกอนเป็นก้อน ไม่เหลวเหมือนเดิม

2.1.2) Peptonization หากมีการย่อยโปรตีนขึ้นลักษณะของอาหารจะเปลี่ยนจากขุ่นเป็นใส

3.) คุณสมบัติในการรีดิวซ์ไนเตรท (reduction of nitrate) การย่อยสลายตัวของไนเตรทเมื่อเชื้อเจริญในอาหารที่มีโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) สามารถทดสอบได้โดยการหยดกรดซัลฟานิลิค (aulfanilic acid) ก่อนแล้วตามด้วยแอลฟาแนทฑิลลามีน (α-naphthylamine) การรวมตัวระหว่างกรดซัลฟานิคและไนเตรท จะได้เกลือไดอะโซเนียม (dizonium salts) จะรวมตัวกับแนปทิลลามีนเกดสีแดงของสีย้อมที่ละลายน้ำได้ (water-soloble azo dye)

4.) คุณสมบัติในการย่อยแป้ง (Hydrolysis of starch) เป็นความสามารถในการใช้แป้งของเชื้อซึ่งแป้งประกอบด้วยพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide) 2 ชนิด คืออะไมโลส (amylose) และอะไมโลเพคติน (amylopectin) โดยในอะไมโลส (amlose) มีองค์ประกอบของ D-glucose จะเชื่อมกันด้วยพันธะ 1,4-α-glucosidic ส่วนอะไมโลแพคติน (amylopectin) มีองค์ประกอบของ D-glucose จะเชื่อมกันด้วยพันธะ 1,4-α-glucosidic และพันธะ 1,6-แอลฟา-glucosidic (ดวงพร, 2537)

การทดสอบแป้งดูได้จากบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Clear zone) ภายใต้อาหารอาหารและรอบๆ วัดการเจริญจากการย่อยแป้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.) คุณสมบัติในการทนความเป็นกรด-ด่าง เชื้อบางชนิดมีความทนกรด-ด่าง ไม่เท่ากัน ดังนั้นจึงนำมาใช้จัดจำแนกและจัดกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทาเบื้องต้น

6.) ความสามารถในการทนเกลือ สามารถบอกถึงคุณสมบัติการแจริญในสภาวะที่มีระคับเกลือต่างๆ รวมทั้งบอกถึงสภาวะในการเจริญเติบโตของเชื้อชนิดนั้นๆ ด้วย

7.) ความสามารถในการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิต่างๆ สามารถแบ่งแบคทีเรียออกได้ 3 พวก คือ พวกที่เจริญเติบโตในที่อุณหภูมิสูง (thermophilic bacteria) พวกที่เจริญได้ดีในอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic bacteria) และพวกที่เจริญดีในที่อุณหภูมิต่ำ (psycrophilic bacterai) (ดวงพร, 2537) ดังนั้นจึงใช้ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิที่แตกต่างกันนี้ช่วยในการจำแนกและแบ่งกลุ่มของแอคติโนมัยซีท

2.2.2.2 ลักษณะการจำแนกทางเคมี (Kämpfer, 1998)

นอกจากใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้ว ยังใช้องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์มาใช้ในการจำแนก เช่น ชนิดไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิก (diaminoprimelic acid ,DAP) ที่ผนังเซลล์ชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์ฟอสโฟลิปิดโพลาร์ลิปิด (polar lipid) กรดไขมันไอโซพรีนอยด์ควิโนน (isoprenoid quinones) เป็นต้น

องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์เป็นสมบัติที่ใช้ในการจำแนกเชื้อแอคติโนมัยซีท ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เพื่อการจักจำแนกในระดับจักสกุลองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ที่นำมาพิจารณาได้แก่

2.2.2.2.1 ชนิดของกรดไดอะมิโนพิเมลิกของผนังเซลล์ (2,6-diaminopimelic acid,DAP) เป็นกรดอะมิโนซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียทุกชนิดยกเว้นไมโคพลาสมา (mycoplasma) และอาร์คีแบคทีเรีย (archaebacteria) จะมีเปปติโดไกลเคน (peptidoglycan) เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์โดยประกอบด้วยเปปติโดไกลเคนโมโนเมอร์ (peptidoglycan monomer) ทีสร้างขึ้นการเชื่อต่อกันของอะมิโน ซูการ์ (amino sugar) 2 ชนิด คือ N-acetylglucosamine(NAG) และ N-acetylmuramicacid(NAM) ที่เชื่ออยู่กับกรดอะมิโน 4 ชนิดเช่น ดีเอพี (DAP) อะลานีน (alanine) ไกลซีน (glycine) ไลซีน (lysine) และกรดกลูตามิก (glutamic acid) เป็นต้น ผนังเซลล์ของแอคติโนมัยซีทส่วนใหญ่ยังมีการเชื่อมข้ามสายระหว่างดีเอพี (DAP) กับอะลานีน (alanine) หรือระหว่างไลซีน (lycine) หรือระหว่างไลซีน (lycine) กับอะลานีน (alanine) โดยเปปติโดไกลแคน (pwptidoglycan) ของแอคติโนมัยซีทอาจมีดีเอพี (DAP) เป็นแบบ LL-isomer*meso*-isomerและ OH-isomer หรือไม่มีก็ได้ จึงทำให้สามารถใช้ชนิดของดีเอพี (DAP)ในการจัดจำแนกแอคติโนมัยซีทในระดับสกุลได้ (Lechevalier *et al.*, 1980)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2.2.2 ชนิดของน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ผนังซลล์ของแบคทีเรียประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิด เช่น ไซโลส (xylose) อะราบิโนส (arabinose) กาแลกโตส (galactose) แรมโนส (rhamnose) ไรโบส (ribose) มาดูโรส (madulose) และกลูโคส (glucose) เป็นต้น นอกเหนือจากกลูโคซามีน (glucosamine) และกรดมูรามิก (muramic acid) ของเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) รูปแบบของน้ำตาลสามารถแบ่งแอคติโนมัยซีทที่มีดีเอพี (DAP) เป็นแบบ meso – isomer ออกเป็น 4 ประเภทคือ ชนิด เอ (A tybe) มีน้ำตาลอะราบิโนส (arabinose) และกาแลกโตส (galactose) แต่ไม่มีไซโลส (xylose) ชนิด บี (Type B) มีน้ำตาลมาดูโลส (madulose) แต่ไม่มีอาราบิโนส (arabinose) และไซโลส ชนิด ซี (Tybe C) ไม่สามารถระบุรูปแบบของน้ำตาลที่เฉพาะได้และชนิดดี (Type D) มีน้ำตาลไซโลส (xylose) และอาราบิโนส (arabinose) เป็นองค์ประกอบ (Lechevalier *et.al*, 1980) ลักษณะของโพลาร์ลิพิด (polar lipid) ฟอสโฟลิปิด (phospholipid) เป็นองค์ประกอบที่จำเป็นของเยื่อหุ้มเซลล์และมีความสัมพันธ์ต่อการเลือกผ่านของเนื้อเยื่อและรูปร่างของเนื้อเยื่อ ฟอสโฟลิปิดแสดงงถึงลักษณะของแอมพิฟาทิก (amphipatic) เนื่องจากบริเวณที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และบริเวณที่ชอบน้ำ (hydrophilic) ในโมเลกุล (Komajato and Suzuki ,1987)

2.2.2.2.3 ลักษณะของไอโซพรีนอยด์ควิโนน (isoprenoid quinones) ไอโซพรีนอยด์ควิโนน มีความสำคัญต่อระบบขนส่ง อิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจ ควิโนน (quinones) หลายชนิดพบในเซลล์แบคทีเรียที่ต้องการอาการอากาศในการเจริญเติบโต ชนิดของไอโซพรีนอยด์แบ่งเป็นเมนาควิโนนและไอโซพรีนอยด์ยูบิคควิโนน แบคทีเรียบางชนิดพบแนฟโทควิโนส (naphthoquinones) นอกจากนี้จำนวนหน่วยของไอโซพรีน (isoprene) และระดับของการเกิดไฮโดรจีเนชั่น (hydrogenetion) ของพันธะคู่ในสายของไอโซพรีนิล (isoprenyl) ซึ่งเป็นประโยชน์ในการวิเคราะห์และจำแนกแบคทีเรียซึ่งมักใช้ high performance liquid chromatography (HPLC) และ reverse-phase thin layer chromatography ในการวิเคราะห์(Komajato and Suzuki ,1987)

2.2.2.2.4 กรดมัยคอลิค (Mycolic) กรดมัยคอลิคประกอบด้วยคาร์บอน 70 ถึง 90 อะตอม ใน 1 กิ่ง จะประกอบด้วย 24 คาร์บอน ในสายโซ่แต่ละสายมีตำแหน่งซึ่งประกอบด้วยออกซิเจน 2 ตำแหน่ง ซึ่งเป็นบริเวณที่ใช้จำแนกลักษณะของกรดมัยคอลิค ผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่มีกรดมัยคอลิคเป็นองค์ประกอบพบว่ามีกรดมัยคอลิคหลายชนิด เช่น ไกลโคลิปิด (glycolipids) ฟีลนอลิคไกลโคลิปิด (phenolic glycolipids) ไกลโคเปปติโดลิปิด (glycopeptidolipids) (Liu *et al*., 1996)

2.2.2.3 ลักษณะทางจีโนไทป์

เป็นการศึกษาลักษณะของสายดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษา การศึกษาลักษณะของสายดีเอ็นเอมักลำดับเบสของยีนในช่วงต่างๆ ยีนสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16s rRNA gene) เป็นยีนที่มีรหัสสำหรับโมเลกุลไลโบโซมเป็นสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ยีนสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16s rRNA gene) เป็นช่วงยีนบนสายดีเอ็นเอที่นำมาใช้เนื่องจากมีข้อดีหลายประการ คือ เป็นยีนที่มีอยู่ในแบคทีเรียทุก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดเปรียบเสมือนยีนลายเซ็น (signature gene) ซึ่งมีความแตกต่างกันไปในแต่ละแบคทีเรียแต่ละชนิด และมีบางช่วงของยีนสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16s rRNA gene) ที่เหมือนกันในแบคทีเรียทุกชนิดซึ่งในส่วนที่เหมือนกันนี้จะถูกนำมาใช้เป็นไพรเมอร์ (primer) โดยช่วงที่เหมือนกันถูกนำมาใช้ออกแบบไพรเมอร์ สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (polymerase chain reaction, PCR) การที่สายดีเอ็นเอช่วงนี้มีความเหมือนกันในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดจึงสามารถนำมาใช้เป็นไพรเมอร์สากล (universal primer) คือไพรเมอร์ที่ทำการขยายหรือเพิ่มจำนวน ยีนสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16s rRNA gene) ได้จากแบคทีเรียทุกชนิดและในช่วงของยีนสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16s rRNA gene) จะมีความแตกต่างกันในแต่ละแบคทีเรียแต่ละชนิดสามารถนำมาใช้บอกความแตกต่างของแบคทีเรียในระดับสกุลและสปีชีส์โดยนำมาวิเคราะห์ลำดับเบสเพื่อดูความคล้ายคลึงกันและสร้างสาย phylogenetic tree ซึ่งสามารถบอกสายวิวัฒนาการได้ (ไพรัตน์, 2551)

2.2.3 แหล่งที่พบของแอคติโนมัยซีท

สามารถพบแอคติโนได้มากที่สุดภายในดิน โดยสามารถพบเป็นจำนวนประมาณ 10 เปอร์เซ็นของจุลินทรีย์ทั้งหมดที่มีอยู่ในดิน (Janssen,2006) แอคติโนมัยซีทในดินส่วนใหญ่เป็นแซโพรไฟต์ (saprophyte) ช่วยย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ และย่อยสลายสารประกอบจำพวกพอลิเมอร์ที่ซับซ้อน เช่น ลิกนิน ไคติน สามารถพบแอคติโนมัยซีทในดินที่มีฮิวมัสและแคลเซียมคาบอเนต เป็นจำนวนมากถึง 10^6 เซลล์ต่อน้ำหนักดินแห้ง (Goodfellow and Williams, 1983) ในขณะที่ดินที่มีน้ำขัง ไม่มีออกซิเจน และดินที่เป็นกรดจะพบแอคติโนมัยซีทในจำนวนที่น้อยกว่า คือ 10^2 ถึง 10^3 เซลล์ต่อน้ำหนักดินแห้ง (Williams and Wellington, 1982)

ชนินทร์ และคณะ (2546) รายงานการคัดแยกแอคติโนมัยซีทจากดินในป่าเบญจพรรณและป่าเต็งรัง เขตรักษาพันธุ์สัตว์ห้วยขาแข้ง โดยคัดแยกได้แอคติโนมัยซีท 160 และ 186 ไอโซเลต ตามลำดับ ส่วนใหญ่เป็นแอคติโนมัยซีทในสกุล Streptomyces และพบแอคติโนมัยซีทในกลุ่มที่หายากจำนวน 10 สกุล คือ *Acitomadura* , *Actinoplanes* , *Amycolatopsis* , *Microbispora* , *Micromobospora* , *Streptosporangium* , *Saccharomonospora* , *Saccharopolyspora* , *Nocardia* และ*Microtetraspora*

ชาญวิทย์ และคณะ (2546) พบแอคติโนมัยซีทในกลุ่มที่หายากจำนวน 120 ไอโซเลต จากดินป่าในเขตสงวนชีวมณฑลสะแกราชและไร่สุวรรณ โดยพบสกุล *Micromonospora*ได้มากที่สุดจำนวน 32 ไอโซเลต

Wang *et al*., (2006) ได้พบแอคติโนมัยซีทสกุล *Stretacidiphilus* ในดินนาข้าวของประเทศไทย

2.3 เอนไซม์โปรติเอส (Protease)

เอนไซม์จัดว่าเป็นสารชีวโมเลกุลจำพวกโปรตีนชนิดหนึ่งที่สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด โดยเอนไซม์ทำหน้าที่เกี่ยวการเร่งปฏิกิริยาทางเคมีในกระบวนเมแทบอลิซึมได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ปราณี , 2556) และมีความแตกต่างจากตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมีอื่นๆคือเอนไซม์นั้นมีความจำเพาะต่อประเภทของปฏิกิริยากล่าวคือเอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยาชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้นและมีความจำเพาะต่อซับสเตรทบางชนิดเท่านั้น (จันทิมา , 2553) และเอนไซม์โปรติเอสนั้นเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีนให้เป็นโอลิโกเปปไทด์ (oligopeptide) และกรดอะมิโนต่างๆ โดยเอนไซม์โปรติเอสนั้นมีชื่อสามัญอยู่หลายชื่อได้แก่ เปปติเดส (Peptidase) โปรติเอส (Protease) โปรติเนส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

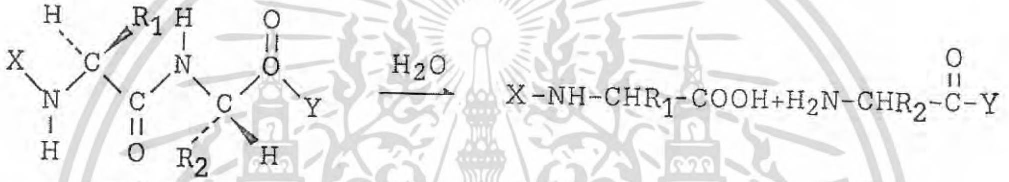
(Protenase) เปปไทด์ไฮโดรเลส(Peptide hydrolase)และเอนไซม์โปรติโอไลติค (Peptilytic)ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด โดยในปัจจุบันได้มีการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์โปรติเอส (Protease) เป็นจำนวนมากเนื่องจากคุณสมบัติเกี่ยวกับความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนของเอนไซม์ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆได้อย่างหลากหลาย

2.3.1 ลักษณะที่สำคัญของเอนไซม์โปรติเอส (ปราณี , 2547)

2.3.1.1 ความจำเพาะต่อซับสเตรท

2.3.1.1.1 ลักษณะธรรมชาติของอณุมูลของกรดอะมิโน 2 ชนิด (R_1 และ R_2)

โดยอณุมูลของกรดอะมิโน R_1 และ R_2 ทำให้เกิดพันธะเปปไทด์ หรือ side chain ของโปรตีน1 พันธะ ดังนั้นหากเอนไซม์โปรติเอสตัวใดมีความจำเพาะต่อ R_1 เอนไซม์นั้นก็จะเข้าตัดพันธะเปปไทด์โดยเข้าตัดบริเวณข้างปลายอะมิโน (N-terminal) ซึ่งที่ตำแหน่ง R_2จะเป็นหมู่อะมิโนอะไรก็ได้ และหากเอนไซม์โปรติเอสตัวใดมีความจำเพาะต่อ R_2 เอนไซม์นั้นก็จะเข้าตัดพันธะเปปไทด์ที่บริเวณข้างปลายคาร์บอกซิล (C-terminal)



รูปที่ 2.8 แสดงปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของเอนไซม์โปรติเอส

ที่มา : ปราณี (2547)

2.3.1.1.2 ลักษณะด้านโครงรูปของอนุมูลกรดอะมิโน (R_1และ R_2) เป็นรูป D- form หรือ L- form

เอนไซม์โปรติเอสจะมีความจำเพาะต่อลักษณะด้านโครงรูปของอนุมูลกรออะมิโน (R_1และ R_2) ในรูป L – amino เท่านั้น ซึ่งปกติแล้วโปรตีนจะประกอบด้วย L – amino เท่านั้น

รูปที่ 2.9 แสดงลักษณะโครงสร้างของกรดอะมิโนชนิดแอลและกรดอะมิโนชนิดดี

ที่มา : ปราณี , 2547

2.3.1.1.3 ขนาดของสารประกอบที่เป็นซับสเตรท

โดยทั่วไปแล้วเอนไซม์โปรติเอสจะไม่มีความจำเพาะต่อขนาดของซับสเตรท ยกเว้นเอนไซม์Acid protease หรือ Aspatic protease ที่มีความจำเพาะต่อขนาดของซับสเตรท

2.3.1.1.4 ลักษณะธรรมชาติของหมู่ H^+และ OH^-

โปรตีนทั่วไปจะมีหมู่ H^+และ OH^-และเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงของหมู่ H^+และ OH^- เป็นหมู่อื่นเช่น acyl group และ ester group นั้นทำให้ความจำเพาะของเอนไซม์มีการเปลี่ยนแปลงตามไปด้วยโดยเอนไซม์จะมีความจำเพาะต่อหมู่ H^+และ OH^- ซึ่งสามารถใช้ในการบ่งชี้ลักษณะการตัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บนสายโพลีเปปไทด์ทำให้สามารถแบ่งชนิดของเอนไซม์ตามลักษณะการตัดบนสายโพลีเปปไทด์ (Polypeptide)ได้เป็นสองชนิด คือเอกโซโปรติเอส (Exoprotease)และเอนโดโปรติเอส (Endoprotease)

2.3.1.1.5 ความต้องการพันธะเปปไทด์

เอนไซม์โปรติเอสมักจะย่อยสลายพันธะอื่นๆที่เข้ามาแทนที่พันธะเปปไทด์ได้ดีกว่าการย่อยสลายพันธะเปปไทด์เอง โดยเฉพาะพันธะเปปไทด์ที่ถูกแทนที่ด้วยหมู่ต่างๆ เช่น หมู่เอไมด์ (-NH2) เอสเทอร์ (-COOR) ไทโอเลสเทอร์ (-COSR) หรือ ไฮโดรซาเมท (-CONHOH) ทำให้ทราบว่าเอนไซม์มีความจำเพาะต่อ อนุมูลกรดอะมิโนชนิด R_1 มากกว่าอณุมูลของกรดอะมิโนชนิด R_2 ซึ่งต่างจากเอนไซม์ Acid protease หรือ Aspatic protease และเอนไซม์เปปซิน ที่มีความจำเพาะต่ออณุมูลของกรดอะมิโนชนิด R_2 ซึ่งหากพันธะเปปไทด์ได้ถูกแทนที่ด้วยหมู่ต่างๆที่กล่าวมาแล้วข้างต้นนั้น ซับสเตรทนั้นก็จะไม่ใช่ซับสเตรทของ Acid protease หรือ Aspatic protease และเอนไซม์เปปซิน

2.3.2 การแบ่งชนิดของเอนไซม์โปรติเอส (Protease)

2.3.2.1.การแบ่งชนิดของเอนไซม์ตามจุดกำเนิดหรือการแบ่งตามแหล่งที่มาของเอนไซม์โดยสามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิดคือ เอนไซม์จากพืช สัตว์และจุลินทรีย์

เอนไซม์โปรติเอสนั้นสามารถผลิตได้จากทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ (Sharmil*et al.*,2012) เช่นเอนไซม์โบรมีเลนจากสับปะรดและเอนไซม์ปาเปนจากยางมะละกอ (อรัญ , 2556) เอนไซม์โปรติเอสจากใบชาที่มีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนได้อย่างดี (Chen*et al.*, 2016) และเอนไซม์เรนนินจาก กระเพาะลูกวัวเป็นต้น (ปราณี , 2543) แต่โดยส่วนใหญ่แล้วเอนไซม์ที่สามารถที่ผลิตได้มักเป็นเอนไซม์ที่ผลิตได้มาจากจุลินทรีย์ต่างๆเช่นเชื้อรา *Aspergillus Flavus* AS2 (Roja *et al.*, 2012) แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp.และเชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่ม*Streptomyces*sp. ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้มักจะมีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์เพื่อใช้ในการย่อยสลายโมเลกุลที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ให้เป็นโมเลกุลขนาดเล็กเพื่อนำสารนั้นมาใช้ในการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นบทบาทที่สำคัญของการผลิตเอนไซม์ในจุลินทรีย์นั้นมีผลมาจากสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ (Elhoul *et al.*,2015) เหตุผลที่ทำให้นิยมใช้จุลินทรีย์ในการผลิตเอนไซม์เพื่อนำมาใช้งานในด้านต่างๆนั้นเนื่องจากเอนไซม์ที่ได้มาจากพืชและสัตว์นั้นมีข้อจำกัดเกี่ยวกับเรื่องพื้นที่และปัจจัยต่อการผลิตซึ่งทำให้เอนไซม์ที่ได้นั้นมีคุณภาพไม่คงที่ ไม่เป็นที่นิยมและมีราคาสูง (ปราณี , 2556) สภาวะและอาหารที่เหมาะสมเช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ การให้อากาศและการเขย่า ความต้องการโลหะไอออน ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ความเข้มข้นของหัวเชื้อและค่าความเป็นกรดและด่างที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ (Elhoul *et al.*,2015)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 แสดงเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่างๆที่ผลิตโดยจุลินทรีย์

กลุ่ม	**ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์**
Serine Protease	
Trypsinlike	*Streptomyces griseus*
	S. tradia
	S. erytrhecus
Alkaline	*Babillus subtilis*
	Saccharomyces cerevesiae
	S. griseus
	S. rectus
	Aspergillus oryzae
Myxobacter-Y-lytic	*Sporangium* sp.
Staphylococcal	*Strapholococcus aurous*
Thiol Protease	
Clostripain	*Clostridium hystolyticum*
Streptococcal	Group A streptococci
Metal containing protease	
Neutral	*Bacillus subtilis*
	B. themoproteolyticus
	B. cereus
	B. megaterium
	S. griseus
	A. oryzae
	Puedomonas aeruginosa
	C. hystolyticum
	B. amyloliquefaciens
Alkaline protease	*Serratia* sp.
Myxobacter protease 1	*Sporngium* sp.
Myxobacter protease 2	*Myxobacter* AL-1

ที่มา : จันทิมาและคณะ (2543)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2.2 การแบ่งชนิดของเอนไซม์ตามลักษณะการตัดบนสายโพลีเปปไทด์ (Polypeptide) ได้เป็นสองชนิด คือ

2.3.2.2.1 เอกโซโปรติเอส (Exoprotease) เป็นเอนไซม์โปรติเอสซึ่งทำหน้าที่ตัดบริเวณปลายสายโพลิเปปไทด์(Polypeptide) และสามารถแบ่งเอนไซม์ตามทิศทางการตัดปลายสายได้ 4 ประเภท คือ

2.3.2.2.1.1 เอนไซม์อะมิโนเปปติเดส (Aminopeptidase ,N-terminal splittng)

เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อซับสเตรทที่มีอนุมูลกรดอะมิโนชนิด R_1 ที่มีหมู่อนุพันธ์ H^+ โดยจะตัดพันธะเปปไทด์โดยเข้าสู่ปลายสายของอะมิโน ไปเรื่อยๆ

2.3.2.2.1.2 เอนไซม์คาร์บอกซิเปปติเดส(Carboxypeptidases , C-terminal splittng)

มีความจำเพาะต่อซับสเตรทที่มีอนุมูลกรดอะมิโนชนิด R_2 ที่มีหมู่อนุพันธ์ OH^- โดยเอนไซม์จะเข้าตัดที่บริเวณด้านปลายคาร์บอกซิล

2.3.2.2.1.3 เอนไซม์ไดเปปติเดส (Dipeptidase, dipeptidase hydrolase)

เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อซับสเตรทที่มีอนุมูลกรดอะมิโนชนิด R_1 ที่มีหมู่อนุพันธ์ H^+ และ R_2 ที่มีหมู่อนุพันธ์ OH^- เหมือนไดเปปไทด์ทั่วไป และมีความจำเพาะแบบ N-terminal มากกว่า C-terminal และสามารถเข้าตัดพันธะเปปไทด์ได้ทั้งในซับสเตรทที่เป็นทั้งไดเปปติเดส (dipeptidase) และไตรเปปติเดส (tripeptidase)

2.3.2.2.1.4 เอนไซม์ไตรเปปติเดส (Tripeptidase)

เป็นเอนไซม์ที่มีลักษณะเหมือนเอนไซม์เอนไซม์ไดเปปติเดส แต่มีลักษณะที่แตกต่างกันที่เอนไซม์
ไตรเปปติเดสสามารถย่อยสลายพันธะเปปไทด์เฉพาะไตรเปปติเดส(tripeptidase)

2.3.2.2.2 เอนโดโปรติเอส (Endoprotease)

เป็นเอนไซม์โปรติเอสที่สามารถย่อยสลายพันธะเปปไทด์ได้อย่างอิสระ ซึ่งทำหน้าที่ตัดบริเวณภายในระหว่างสายโพลีเปปไทด์(Polypeptide)โดยเอนไซม์จะต้องมีความจำเพาะต่ออนุมูลกรดอะมิโนชนิด R_1 และ R_2 จึงจะทำให้เกิดการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 แสดงความจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสในการย่อยสลายพันธะเปปไทด์

เอนไซม์	ตำแหน่งของพันธะเปปไทด์ที่ถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์โปรติเอส
ทริปซิน	Lys หรือ Arg ⬇ ___
ไคโมทริปซิน	Tryp หรือTyr, Phe, Leu ⬇ ___
โปรติเอสจาก *Staphylococcus*	Asp หรือ Glu⬇ ___
ปาเปน	Phe หรือ Val, Leu –Xaa⬇ ___
เทอร์โมไลซีน	___⬇ Leu หรือ Phe___
เปปซิน	Phe หรือ Tyr, Leu ⬇ Trp หรือ Phe ,Tyr

ที่มา: อรัญ (2556)

2.3.2.3 การแบ่งชนิดของเอนไซม์ตามลักษณะบริเวณเร่งหรือกลไกการทำงานของเอนไซม์โดยสามารถแบ่งได้เป็น 4 ชนิดคือ

2.3.2.3.1 Serine protease หรือ Alkali protease

เป็นเอนไซม์เอนโดโปรติเอส (Endoprotease)ที่ย่อยเปปไทด์ภายในสายโพลีเปปไทด์โดยตำแหน่งที่จับกับซับสเตรทจะมีกรดอะมิโนซีรีน ฮิสติดีน และกรดแอสปาติกทำหน้าในการให้อิเลคตรอนส่วนใหญ่เอนไซม์ในกลุ่มนี้มักจะสามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่มีความเป็นกลางและเป็นด่าง (pH 6.7-9)
(อรัญ , 2556)ซึ่งสามารถถูกยับยั้งโดย DPF (diisopropyl-phospho-fluoridate) โดยจะทำปฏิกิริยากับหมู่อนุพันธ์ OH^- ของอนุมูลเซริลในบริเวณเร่งของเอนไซม์ (ปราณี , 2547) เช่น เอนไซม์ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) ที่ผลิตโดยตับอ่อน ซึ่งอยู่ในสภาพที่ไม่ทำงานในรูปโปรไคโมทริปซิน (prochymotrypsin) และเมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) จะทำให้เอนไซม์ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) สามารถทำงานได้ในตำแหน่งที่เอนไซม์จับกับซับสเตรทที่ประกอบด้วย His_{57} , Ser_{95}และ Asp_{102} ซึ่งไม่ชอบน้ำ ทำให้เอนไซม์มีความจำเพาะกับเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำคือไทโรซีน (Try) ฟีนิลอะลานีน (Phe) และลิวซีน (Leu) และเอนไซม์ซับทิลิซีน (subtilisin) ซึ่งเป็นเอนไซม์โปรติเอสที่สามารถพบได้ในจุลินทรีย์โดยเฉพาะ *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B.licheniformis* โดยมีตำแหน่งที่เอนไซม์จับกับซับสเตรทประกอบด้วย Asp_{32}, His_{64}และ Ser_{221}ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่นิยมนำมาใช้ในการแปรรูปอาหาร เครื่องสำอางเป็นต้น (อรัญ , 2556)

2.3.2.3.2 Cystein protease หรือ Sulhydryl protease (ปราณี , 2547)
เป็นเอนไซม์ที่มีกรดอะมิโน ซิสเทอีน (Cys) ฮิสติดีน (His) กรดแอสปาติก (Asp) หรือแอสปาราจีน (Asn) อยู่ที่บริเวณเร่งและสามารถทำงานได้ดีในช่วงที่เป็นกลางและความเป็นด่าง (pH 6 - 7.5)

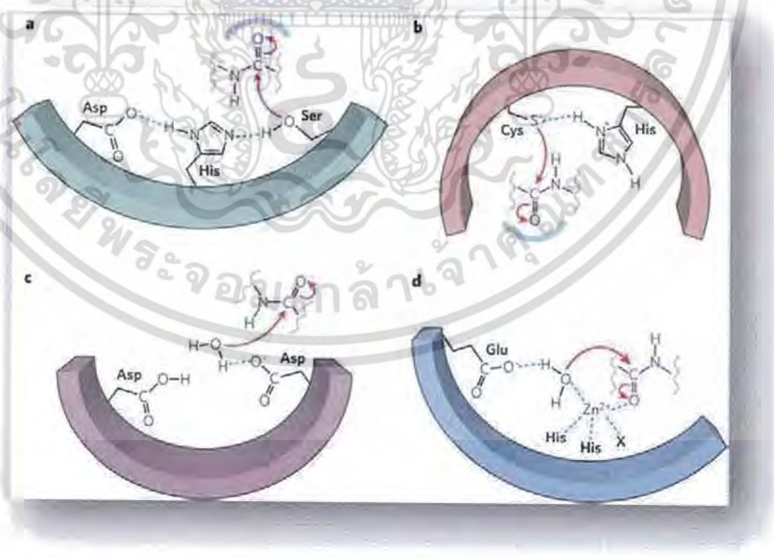
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยเป็นเอนไซม์ที่เข้าสลายพันธะเปปไทด์ภายในสายพอลีเปปไทด์ของโปรตีนและจะถูกยับยั้งการทำงานโดยสาร sulfhydryl reagent หรือกลุ่มไทออล (-SH) และเป็นเอนไซม์ที่สามารถได้มาจากพืชชั้นสูงและจุลินทรีย์บางชนิด เช่น เอนไซม์ปาเปน (papain) จากใบ ผลและยางของมะละกอ เอนไซม์โบรมีเลน(bromelain) จากสับปะรดเป็นส่วนใหญ่ เอนไซม์ฟิซีน (ficin) เป็นเอนไซม์ที่พบในผลและยางมะเดื่อ และเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์บางชนิดเช่น เอนไซม์เปปติเดสสเตรปโตคอกคัส (Stretococcus peptidase) เป็นต้น

2.3.2.3.3 Acid protease หรือ Aspatic protease

เนื่องจากมีหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโน กรดแอสปาติก (Asp) 2 โมเลกุลอยู่ที่บริเวณเร่ง โดยสามารถทำงานได้ดีที่ช่วงความเป็นกรดและด่าง 2 – 4 และมีมวลโมเลกุลระหว่าง 30-40 kDa (Shivakumar, 2012) และเป็นเอนไซม์ที่ทำการสลายภายในสายของพอลิเปปไทด์อีกด้วย (อรัญ , 2556)ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่เอนไซม์เรนนิน (Rennin) หรือเอนไซม์ไคโมซิน (Chymosin) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อการสลายพัยธะเปปไทด์ระหว่าง Phe_{105} – Met_{106}ของเคซีนซึ่งเป็นโปรตีนในนม และเอนไซม์เปปซิน (Pepsin) ที่สามารถพบได้ทั่วไปในน้ำย่อยและมีความจำเพาะต่อการย่อยพันธะเปปไทด์ที่มีหมู่กรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ ฟีนิลอะลานีน (Phe) ไทโรซีน (Tyr) และทริปโตฟาน (Tryp) โดยเฉพาะอย่างยิ่งหมู่อะมิโนที่เป็นอะโรมาติก(ปราณี , 2547)

2.3.2.3.4 Metalloproteaseเป็นเอนไซม์ที่จัดเป็นเอกโซโปรติเอส (Exoprotease) เกือบทั้งหมดและเป็นเอนไซม์ที่ต้องการโลหะไอออนซึ่งส่วนใหญ่เป็นสังกะสี (Zn^{+}) (อรัญ ,2556) ในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์พร้อมทั้งพบโลหะไอออนที่บริเวณเร่งของเอนไซม์อีกด้วย โดยแบ่งออกเป็นสองกลุ่ม คือ Neutral protease (pH 6.5 – 7.5) และ Alkaline – metalloprotease



รูปที่ 2.10 ภาพแสดงกลไกการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสทั้ง 4 ชนิดได้แก่ Serine protease (A) Cystein protease (B) , Acid protease (C) และ Metalloprotease (D)
ที่มา:http://www.nature.com/scitable/content/protease-mechanism-14462487

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3 สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส (Inhibitor)

เอนไซม์จัดเป็นโมเลกุลของโปรตีนซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์และสารตั้งต้น (substrate) ซึ่งเกิดอาจเป็นสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ต่างๆ โลหะหรือสารสังเคราะห์อื่นๆ ซึ่งสัมพันธ์กับการเกิดหรือไม่เกิดพันธะโควาเลนซ์ระหว่างบริเวณเร่งของเอนไซม์ (active site) กับสารต่างๆที่เข้ามาทำปฏิกิริยา โดยสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เอนไซม์นั้นเป็นสารประกอบทางเคมีที่มีมวลโมเลกุลต่ำ (Sharma , 2016)ซึ่งสามารถแบ่งรูปแบบการยับยั้งของเอนไซม์ออกเป็น 3 รูปแบบ (จันทิมา , 2553) ดังนี้

1) การยับยั้งแบบถาวร (inreversible inhibition) ซึ่งเป็นสารที่จับกับเอนไซม์อย่างถาวรด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) และเปลี่ยนเป็นสารประกอบที่มีความเสถียร (stable compounds) โดยตัวยับยั้งไม่หลุดออกจากโมเลกุลของเอนไซม์ทำให้ไม่เกิดการเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์อีกต่อไป

2) การยับยั้งแบบชั่วคราว (reversible inhibition) เป็นตัวยับยั้งที่เกาะบนโมเลกุลของเอนไซม์อย่างชั่วคราวด้วยพันธะอื่นซึ่งไม่ใช่พันธะโควาเลนต์จึงทำให้มีโอกาสหลุดออกจากเอนไซม์และกลับเข้าสู่สภาพเดิมได้โดยแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

2.1) การยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibition) เป็นตัวยับยั้งที่มีโครงสร้างคล้ายกับซับสเตรทจึงเข้าไปเกาะบริเวณเร่งของเอนไซม์แทนที่ซับสเตรทจึงทำให้ซับสเตรทไม่สามารถเข้าไปเกาะบริเวณเร่งของเอนไซด์นั้นได้อีก ทำให้การยับยั้งในรูปแบบนี้จะเกิดขึ้นเพียงชั่วคราวเท่านั้น

2.2) การยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (non-competitive inhibition) เป็นตัวยับยั้งที่มีโครงสร้างไม่คล้ายกับซับสเตรทโดยจะเข้าร่วมกับเอนไซม์บริเวณอื่นที่ไม่ใช่บริเวณเร่งเมื่อตัวยับยั้งเอนไซม์จับกับซับสเตรทแล้ว เอนไซม์ยังคงสามารถจับกับซับสเตรทได้อีกแต่จะสามารถทำปฏิกิริยาได้ช้าลงหรือไม่สามารถทำปฏิกิริยาได้อีกต่อไปเนื่องจากตัวยับยั้งแบบนี้จะไม่เกิดการแข่งขันกับซับสเตรทในการจับกับเอนไซม์

3) การยับยั้งแบบย้อนกลับ (feedback inhibition) เป็นการยับยั้งที่เกิดจากผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาที่มีปริมาณมากเกินพอสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาขั้นแรกในวิถีเมแทบอลิซึมได้โดยสามารถพบการยับยั้งแบบนี้พบได้ในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน โคเลสเตอรอลกรดอะมิโนนิวคลีโอไทด์ และในเมแทบอลิซึมคาร์โบไฮเดรต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 แสดงตัวอย่างสารยับยั้งที่มีความจำเพาะต่อเอนไซม์โปรติเอส

สารยับยั้ง	กลุ่มเอนไซม์เป้าหมาย	กลไกการยับยั้ง
EDTA	metallo proteases	chelating agent และยับยั้งเอนไซม์ที่มีไอออนโลหะ
PMSF	Serin หรือ cystein proteases, trypsin, chymotrypsin, thrombin, papain	การยับยั้งแบบถาวร
TLCK	serin proteases, trypsin, ceras tocytin ยกเว้น chymotrypsin	การยับยั้งแบบถาวรอย่างจำเพาะ
6 1,10-Phenanthroline monohydrate	metallo proteases, carboxypeptidase G2 จาก *Pseudomonas*, peptidase T, and acetylornithinase จาก*E. coli*, aminopeptidase จาก*Apis mellifera*, peptidase V จาก *L. delbrueckii*	ยับยั้งเอนไซม์ที่มีไอออนของโลหะโดยเฉพาะอย่างยิ่งไอออนของสังกะสี
Bestatin hydrochloride	aminopeptidases, aminopeptidase B, leucine aminopeptidase, tripeptide aminopeptidase, aminopeptidases	การยับยั้งแบบแข่งขัน

ที่มา : Elhoul *et al.* (2013); ปราณี (2558)

2.3.4 เอนไซม์โปรติเอสในแอคติโนมัยซีท

เอนไซม์โปรติเอสนั้นจัดได้ว่าเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญเป็นอย่างมากในระดับอุตสาหกรรม เนื่องเป็นเอนไซม์ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างหลากหลายด้วยคุณสมบัติเกี่ยวกับย่อยสลายโมเลกุลของโปรตีนสามารถนำมาใช้เป็นสารเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดยพบว่ามีการใช้เอนไซม์โปรติเอสในระดับอุตสาหกรรมมากกว่าร้อยละ 40 ทั่วโลก (Elhoul*et al.,* 2015)ซึ่งปัจจัยที่ไม่เอื้อต่อการนำเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากสัตว์และพืชมาใช้เนื่องจากพื้นที่ที่ใช้ในการผลิตและต้นทุนการผลิตที่มีราคาค่อนข้างสูงแต่ได้ผลผลิตไม่ดีเท่าที่ควร (อรัญ , 2556) จึงทำให้เอนไซม์นิยมใช้เอนไซม์ที่สามารถผลิตได้โดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆเนื่องจากสามารถควบคุมการผลิตได้ง่ายกว่าเอนไซม์ที่ผลิตที่ได้จากพืชและสัตว์โดยสามารถควบคุมสภาวะต่างๆได้แก่ แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน อุณหภูมิ ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ปริมาณและความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น (Elhoul*et al.,* 2015)โดยแอคติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โนมัยซีทนั้นจัดเป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่สามารถผลิตสารทุติยภูมิเช่น เอนไซม์ไลเปส (lipase) เอนไซม์โปรติเอส (protease) เอนไซม์อะไมเลส (amylase) สารปฏิชีวนะ (antibiotic)สารยับยั้งเซลล์มะเร็ง สารกดภูมิคุ้มกัน (Procópio*et al.*, 2012) สารเคมีกำจัดวัชพืช (Herbicides) และสารกำจัดศัตรูพืช (Pesticide) (Oskay*et al.*, 2004) ด้วยคุณสมบัติที่น่าสนใจข้างต้นนั้นทำให้เชื้อแอคติโนมัยซีทเป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างมากในการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตสารทุติยภูมิที่สามารถผลิตได้เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาคุณสมบัติของสารทุติยภูมิที่เกิดขึ้นในสภาวะต่างๆ ได้แก่ กลไกการทำงานของสารทุติยภูมิที่ได้ สภาพแวดล้อมของแอคติโนในบริเวณที่แตกต่างกัน เป็นต้น

Ramesh และ Mathivanan (2009) ได้ทำการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทในทะเลบริเวณอ่าวเบงกอล ประเทศอินเดียเพื่อทำการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ (antimicrobial) และเอนไซม์ที่มักนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในระดับอุตสาหกรรมที่เชื้อแอคติโนมัยซีทสามารถผลิตได้โดยพบว่า 111 ไอโซเลตสามารถยับยั้งเชื้อที่ก่อโรคภายในมนุษย์และ 151 ไอโซเลตแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในพืชพร้อมกันนั้นพบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยซีท 183 157 116 72 และ 68 ไอโซเลต ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส (lipase)เคซีนเนส (caseinase) เจลลาติเนส (gelatinas) เซลลูเลส (cellulose) และอะไมเลส (amylase) ได้ และพบว่าในช่วงค่าความเป็นกรดและด่าง (pH) ที่แตกต่างกันนั้นจะได้ปริมาณไอโซเลตที่แตกต่างกันไปพร้อมทั้งความสามารถในการผลิตฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพและเอนไซม์ที่ได้ก็มีความหลากหลายที่แตกต่างกัน

Tang และคณะ (2002) ทำการศึกษาเกี่ยวกับลักษณะทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 43 ไอโซเลตจากตัวอย่างดินในนาเกลือจากมณฑลซินเจียง มณฑลเหอเป่ยและมณฑลชิงไห่ สาธารณรัฐประชาชนจีน และเชื้อแอคติโนมัยซีททั่วไป 4 ไอโซเลต โดยการเพาะเลี้ยงภายในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือ Na^{+} K^{+} Mg^{+} และ Ca^{+}ที่แตกต่างกัน พบว่าแอคติโนมัยซีททนเค็ม (halotolerant actinomycetes) นั้นสามารถปรับตัวเข้ากับสภาวะที่มีความเข้มข้นของ Na^{+} K^{+} Mg^{+} สูงและสามารถเจริญได้เล็กน้อยในสภาวะที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ต่ำ และพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ได้นั้นสามารถเจริญได้ตั้งแต่ค่าความเป็นกรดและด่าง (pH) เท่ากับ 6 ถึง10 โดยพบว่าช่วงค่าความเป็นกรดและด่าง (pH) ที่เหมาะต่อการเจริญที่สุดจะอยู่ในช่วง 7 ถึง 8

Gohel และ Singh (2015) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับอุณหพลศาสตร์ของแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ซึ่งสัมพันธ์กับการทนต่อความร้อนของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากแอคติโนมัยซีททนเค็ม (haloalkliphilic actinomycete) *Nocardiopsis alba* OK-5 โดยเอนไซม์ที่ได้นั้นสามารถทำงานได้ดีและความเสถียรสูงในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือ อุณหภูมิ ความเข้มข้นไอออนของโลหะในช่วงที่กว้างและสูง และในสภาวะที่ที่มีสารออกซิเดชันและสารรีดักชัน สารลดแรงตึงผิวสูงและสารทำความสะอาดต่างๆ

Ballav และคณะ (2015) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของแอคติโนมัยซีททนเค็ม บริเวณนาเกลือ เมืองกัว ประเทศอินเดีย โดยเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่เพาะเลียงในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือแตกต่างกันคือ 35 50 75 และ 100 psu ซึ่งเชื้อแอคติโนสามารถเจริญได้ดีในช่วงความเข้มข้นของเกลือตั้งแต่ 0 ถึง 75 psu พบว่าในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือ 35 psu นั้นเหมาะสมต่อการผลิตฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพลิตเชื้อแอคติโนมัยซีทได้ดีที่สุด ซึ่งพบว่าสารยับยั้งทางชีวภาพที่ได้นั้นมากกว่า 50 เปอร์เซ็นของไอโซเลตทั้งหมดสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในมนุษย์ได้มากกว่า 15 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.5 การประยุกต์ใช้เอนไซม์โปรติเอส (Protease) ในอุตสาหกรรม (Anwar และคณะ, 1998; Ellaiah และคณะ, 2002)

เนื่องจากสามารถย่อยสลายโปรตีนและคุณสมบัติเฉพาะต่างๆของเอนไซม์โปรติเอส (Protease) นั้นสามารถนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆได้อย่างหลากหลายได้แก่

2.3.5.1 อุตสาหกรรมสารทำความสะอาด (Detergent formulation)โดยใช้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส มาเป็นองค์ประกอบในสารทำความสะอาดต่าง ๆ เนื่องจากสามารถกำจัดคราบสกปรกของโปรตีนที่ปนเปื้อนได้และยังสามารถปรับปรุงประสิทธิภาพในการซักล้างได้ดีขึ้น เช่น การเติมเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสเป็นองค์ประกอบในผงซักฟอกและน้ำยาล้างจานเพื่อย่อยสลายคราบสกปรกและโปรตีน โดยเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสยังสามารถฆ่าเชื้อโรคที่อยู่ในคอนเทคเลนส์ได้ โดยในทางทฤษฎีแล้วเอมไซน์จะต้องมีความสามารถในการทำงานและความเสถียรภาพที่สูงในช่วงความเป็นกรดและด่างที่กว้างแต่ในความเป็นจริงพบว่าสามารถใช้เอนไซม์ร่วมกับสารทำความสะอาดได้น้อยมาก

2.3.5.2 อุตสาหกรรมการฟอกหนัง (Leather industry)
เนื่องจากเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสมีคุณสมบัติเกี่ยวกับ elastrinolytic และ keranolytic activity ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดขนออกจากผิวหนังสัตว์โดยใช้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสเข้าไปตัดโปรตีน follical ของเส้นขน เพื่อทำให้เส้นขนหลุดออกง่ายขึ้นนอกจากนี้ยังช่วยให้เกิดการของคอลลาเจนทำให้หนังที่ได้มีคุณภาพที่ดีและอ่อนนุ่มซึ่งเป็นวิธีที่ปลอดภัยกว่าการใช้โซเดียมไดซัลไฟด์ซึ่งทำให้เกิดมลพิษต่อสภาพแวดล้อม

2.3.5.3 อุตสาหกรรมการถ่ายภาพ (Silver recovery)
การนำไปใช้ในกระบวนการทางชีวภาพสำหรับ Silver recovery ออกจากฟิล์ม X-ray ได้ โดย ฟิล์ม X-rayนั้นจะมีเจลาตินและมีโลหะเงินเคลือบอยู่ 1.5-2% โดยน้ำหนัก ซึ่งใช้เอนไซม์ในการย่อยเจลาตินที่เคลือบอยู่โดยสามารถนำโลหะเงินที่เคลือบผิวฟิล์ม มาใช้ใหม่ได้อีกด้วยซึ่งเป็นวิธีที่ช่วยลดมลพิษ เนื่องจากวิธีเดิมนั้นจะใช้การเผาฟิล์ม ซึ่งเป็นปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม

2.3.5.4 อุตสาหกรรมเวชภัณฑ์ (Medicinal uses)

สามารถใช้คุณสมบัติของเอนไซม์เกี่ยวกับ elastrinolytic และ keranolytic activity โดยนำมาใช้ในการรักษาแผลบริเวณผิวหนัง เช่น การรักษาแผลไฟไหม้ สิวหัวใหญ่ หนอง ฝี เป็นต้น

2.3.5.5 อุตสาหกรรมอาหารและนม (Food and Dairy food industry)

โดยใช้เอนไซม์ในอาหารเหลวจำพวกนม ไวน์ น้ำผลไม้และเครื่องดื่มชนิดอื่น ๆ เพื่อเพิ่มความเข้มข้นและความใสให้มากยิ่งขึ้นโดยเอมไซน์เข้าไปทำให้โปรตีนเสียสภาพและตกตะกอน นอกจากนี้ยังสามารถนำคุณสมบัติที่สามารถย่อยสลายโปรตีนมาผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเสท ได้แก่ เคซีน หางนมและถั่วเหลืองซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นส่วนผสมในอาการของทารกที่เป็นโรคภูมิแพ้ สามารถทำให้เนื้อนุ่มขึ้นโดยย่อยโปรตีนของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน

2.3.5.6 การบำบัดของเสีย (Waste treatment)

เนื่องจากเอนไซม์โปรติเอสสามารถย่อยสลายโปรตีนจากของเสียโดยผ่านหลายกระบวนการ เผื่อทำให้ได้ของเหลวที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น (liquid concentrates) หรือของแข็งแห้ง (dry solid) ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นอาหารในการทำปศุสัตว์ได้พร้อมทั้งยังสามารถใช้เอนไซม์มาใช้กำจัดเส้นขนที่อุดตันตามท่อระบายน้ำได้ซึ่งเป็นสาเหตุของกลิ่นเน่าเหม็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.5.7 อุตสาหกรรมสารเคมี (Chemical industry)

โดยใช้เอนไซม์โปรติเอสเป็นสารเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพในการสังเคราะห์ทางเคมี

2.3.6 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ (Enzyme activity assay)

กิจกรรมของเอนไซม์หมายถึง ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาหนึ่ง ๆ ของไซม์โดยสามารถตรวจวัดได้จากอัตราการเปลี่ยนซับสเตรทให้เป็นผลิตภัณฑ์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม โดยวิเคราะห์ปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยการทำในส่วนผสมปฏิกิริยา (reaction mixture) ซึ่งประกอบไปด้วยสารละลายเอนไซม์ ซับสเตรท สารละลายบัฟเฟอร์และสารอื่นๆ ที่จำเป็นต่อกิจกรรมของเอนไซม์ (ปราณี , 2556) โดยปัจจัยสำคัญซึ่งมักนิยมนำมาใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง ความคงทนต่อไอออนของโลหะ ความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์และซับสเตรท นอกจากนั้นแล้วชนิดและแหล่งที่มาของเอนไซม์ก็จะทำให้มีรูปแบบหรือความจำเพาะในการวิเคราะห์แตกต่างกันออกไป (Bisswanger, 2014)

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์นิยมโดยการวิเคราะห์สเปกโทรโฟโตเมทริก (spectrophoto metric assay)ซึ่งสามารถทำได้ 2 แบบ (ปราณี , 2556)

2.3.6.1 การวัดกิจกรรมเอนไซม์แบบต่อเนื่อง (continuous enzyme activity assay)

เป็นการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ขณะที่ยังมีการสร้างผลิตภัณฑ์ที่ให้สีหรือระหว่างที่ซับสเตรทที่มีสีปริมาณลดลง และวัดค่าที่ได้ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสมจะมีค่าต่อเนื่องที่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นระดับโดยนิยมใช้ซับสเตรทที่มีสีในการทำปฏิกิริยา

2.3.6.2 การวัดกิจกรรมเอนไซม์แบบไม่ต่อเนื่อง (discontinuous enzyme activity assay)

เป็นการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่ต้องหยุดปฏิกิริยาหลังจากการปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาในช่วงเวลาที่กำหนด หลังจากนั้นจึงใช้สารเคมีชนิดอื่นที่สามารถกระตุ้นให้ซับสเตรทหรือผลิตภัณฑ์เกิดเป็นสารที่สามารถวัดค่ากิจกรรมด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ซึ่งการหยุดปฏิกิริยานั้นทำให้เอนไซม์เสียสภาพและไม่เกิดกิจกรรมอีกต่อไปโดยนิยมใช้การให้ความร้อนในช่วงเวลาสั้นๆ หรือการใช้สารเคมี เช่น กรดแก่ เบส หรือ แอลกอฮอล์

โดยสามารถยกตัวอย่างวิธีการที่นิยมนำใช้ในการวิเคราะห์ได้ดังนี้

1) Folin ciocalteu method

เป็นวิธีการที่นิยมใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารสารประกอบฟีนอลิค (phenolic compound) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากธรรมชาติตรวจสอบโดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันละรีดักชันระหว่างสารฟีนอลิคและไอออนของโลหะ ซึ่งเป็นวิธีที่พัฒนามาจากการวิเคราะห์กรดอะมิโนไทโรซีน (Tyr) ในโปรตีนช่วงศตวรรษที่ 19 (Agbor*et al.*, 2014) โดยสามารถตรวจวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยการปรับสภาพในสารละลายไบยูเรท (biuret) สาร Folin ciocalteu (Folin ciocalteureagent) และสารคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) ในสภาวะที่เป็นด่าง()ซึ่งไอออนของโลหะทองแดง (Cu^{2+}) จะเข้าทำปฏิกิริยากับพันธะเปปไทด์ในโมเลกุลของกรดอะมิโนไทโรซีน (Tyr) ที่ทำปฏิกิริยากับสาร Folin ciocalteu โดยอะตอมของไนโตรเจนภายในพันธะเปปไทด์จะถูกแทนที่ด้วยอะตอมของไฮโดรเจน ทำให้สามารถมองเห็นสีของสารละลายผสมที่ใช้ในการวิเคราะห์มีสีฟ้า ซึ่งค่าที่ได้จากการวิเคราะห์นั้นสามารถตรวจวัดจากค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ซึ่งค่าที่ได้นั้นจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของกรดอะมิโนไทโรซีน (Tyr) (Jadhav *et al.*, 2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) Azocasein method

เป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติที่สำคัญเกี่ยวกับการย่อยสลายโปรตีน (proteolytic activity) โดยการใช้ azocasein เป็นซับสเตรท โดยเอนไซม์ที่ใช้ทำการทดสอบจะย่อยโปรตีนในซับสเตรททำให้สังเกตเห็นเป็นสีส้ม ในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างซับสเตรทกับเอนไซม์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมเช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง และระยะเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา โดยสามารถตรวจสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร ซึ่งปริมาณการย่อยโปรตีนที่เหลือในซับสเตรทของเอนไซม์นั้นทำให้ตกตะกอนโดยการเติมกรดไตรคลอโรอะซิติก (trichloroacetic acid) ซึ่งวิธีการนี้ยังคงเป็นวิธีหนึ่งที่มีความน่าเชื่อถือสุดในการศึกษาความสามารถในการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสเนื่องจากความเสถียรของสีโดยไม่จำเป็นต้องใช้ chromogenic reagents อีกต่อไปและเนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาระหว่างซับสเตรทและเอนไซม์นั้นเกิดได้อย่างจำเพาะทำให้วิธีการ azocasein เป็นวิธีที่กำลังเป็นที่นิยมอย่างแพร่หลายเป็นอย่างมาก (Coêlhoet *al.*, 2016)

2.4 ฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ (Antimicrobial activity)

ฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ(antimicrobial) นั้นรวมได้ถึงสารที่มีฤทธิ์ในการฆ่าหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค ทั้งที่เป็นยาปฏิชีวนะ (antibiotics) ที่ใช้ฆ่า ชะลอหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ยาปฏิชีวนะเป็นกลุ่มหนึ่งของยาต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial) ที่ประกอบด้วย ยาต้านไวรัส (anti-viral drugs) ยาต้านเชื้อรา (anti-fungal drugs) และยาต้านปรสิต (anti-parasitic drugs) และทั้งที่เป็นสารเคมีสังเคราะห์ (chemotherapy) (อภัย, 2556)

ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) หรือยาต้านจุลชีพ หมายถึง ยาที่ผลิตมาจากสิ่งมีชีวิต เพื่อใช้รักษาโรคติดเชื้อ ซึ่งแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยตามคุณสมบัติของยาในการกำจัดเชื้อแต่ละชนิด เช่น ยาต้านเชื้อแบคทีเรีย ยาต้านไวรัส ยาต้านเชื้อรา ชื่ออื่นที่ใช้เรียกยาปฏิชีวนะ เช่น ยาฆ่าเชื้อ หรือ ยาแก้อักเสบ ทำให้เกิดความเข้าใจผิดว่า เป็นยาที่มีคุณสมบัติครอบคลุมทุกโรค สามารถฆ่าเชื้อโรคได้ทุกชนิด แก้อาการอักเสบได้ทุกชนิด ความจริงแล้วยังมีโรคที่เกิดจากภาวะการอักเสบอยู่อีกมากมายที่ไม่สามารถรักษาให้หายได้ด้วยยาปฏิชีวนะ อาจต้องใช้ยาแก้อักเสบ ที่มีคุณสมบัติลดการอักเสบโดยตรง เช่น ยาแอสไพริน หรือพักการใช้อวัยวะส่วนนั้นจนกว่าจะหายดี นอกจากนี้ยังมีการอักเสบ ที่ไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อ เช่น การที่ข้ออักเสบจากโรครูห์มาตอยด์ หรือ จากการบาดเจ็บเสียงแหบ เนื่องจากหลอดเสียงอักเสบ เพราะใช้เสียงมาก ซึ่งยาปฏิชีวนะไม่มีประโยชน์ต่อการรักษา

ในอดีตทางการแพทย์ไม่มียาต้านเชื้อแบคทีเรียโดยตรง หากพบว่ามีการติดเชื้อไวรัสวิธีปฏิบัติ คือ ถ้าเป็นโรคที่ไม่ร้ายแรงเช่น หวัดหรือไข้หวัดใหญ่ก็จะให้พักผ่อนและดื่มน้ำมากๆ ก็จะหายเอง แต่ถ้าติดเชื้อร้ายแรงอย่างโรคพิษสุนัขบ้านั้นไม่มียารักษา แต่ถึงแม้ไม่มียารักษาแต่ก็มีวัคซีนป้องกัน ต่อมาปี ค.ศ. 1980 ก็ได้เกิดยาต้านไวรัสขึ้นมานับสิบๆตัว จากความเจริญก้าวหน้าทางการแพทย์สาขาพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลที่ทำให้เราเข้าใจโครงสร้างและการทำงานของเชื้อไวรัส ประกอบกับความกดดันทางการแพทย์ ที่จะต้องหาทางรักษาโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องจากเชื้อไวรัสเอชไอวี (human immunodeficiency virus - HIV) ที่ทำให้เกิดโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือโรคเอดส์ (acquired immunodeficiency syndrome - AIDS) พัฒนาการยาต้านไวรัสได้มีการทดลองเกี่ยวกับยาต้านไวรัสซึ่งเกิดขึ้นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1960 เป็นการทดลองเกี่ยวกับ ไวรัสเริม (herpesvirus) แบบลองผิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลองถูก (trial-and-error) ไวรัสนั้นอาจจะกล่าวได้ว่าเป็นกึ่งสารเคมีกึ่งสิ่งมีชีวิตเพราะมันประกอบด้วยจีโนม (genome) และบางครั้งมี เอนไซม์ (enzyme-iocatalysts) สองสามตัวบรรจุอยู่ในแคปซูลที่ทำด้วยโปรตีน และบางครั้งห่อหุ้มด้วยชั้นของ ลิพิด (lipid) ไวรัสไม่สามารถสืบพันธุ์ได้ด้วยตัวของมันเอง แต่สามารถแพร่ข้อมูลของมันโดยการเข้าไปครอบครองเซลล์ (hijacking cells) แล้วบังคับให้เซลล์แพร่พันธุ์โดยมีข้อมูลของมันติดไปด้วย การพัฒนายาต้านไวรัสยุคแรกๆ นักวิจัยจะทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเป้าหมาย แล้วใส่สารเคมีเข้าไปในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงนั้น แล้วสังเกตผลการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส ว่าสารเคมีที่ใช้มีผลยับยั้งไวรัสได้หรือไม่ การทำเช่นนี้ใช้เวลามากกว่าจะค้นพบยาต้านไวรัส จนกระทั่งถึงปี ค.ศ. 1980 เมื่อนักวิทยาศาสตร์สามารถค้นพบข้อมูลทางพันธุกรรมของไวรัสทั้งหมด และทราบกลไกการทำงานของมันอย่างละเอียดดังที่กล่าวไปแล้วข้างต้น

2.4.1 ประเภทของสารต้านจุลชีพ (Bennett และ Dolin, 2005)

2.4.1.1 เพนิซิลลิน เป็นยาใช้รักษาการติดเชื้อแบคทีเรียได้ในหลายเนื้อเยื่อของอวัยวะ เช่น คออักเสบ เป็นต้น เพนิซิลลินเป็นกลุ่มยาที่ไม่ทนกับกรดในกระเพาะอาหาร จึงต้องกินยาก่อนอาหาร และถูกขับออกจากร่างกายโดยผ่านไต แต่ยาบางตัวในกลุ่มนี้ก็ถูกขับออกโดยผ่านกระบวนการที่ตับก่อน ยาในกลุ่มเพนิซิลลิน เช่น อะมอกซิซิลลิน (Amoxicillin) แอมพิซิลลิน (Ampicillin) คาร์เบนิซิลลิน (Carbenicillin) คลอกซาซิลลิน (Cloxacillin) และ ฟลูคลอซาซิลลิน (Flucloxacillin)

2.4.1.2 อะมิโนไกลโคไซด์ (Aminoglycosides) เป็นยาปฏิชีวนะใช้รักษาการติดเชื้อแบคทีเรียที่กระดูก ข้อ การติดเชื้อที่ผิวหนัง การติดเชื้อทางเดินหายใจ การติดเชื้อหลังผ่าตัด ยากลุ่มนี้ไม่ค่อยดูดซึมทางลำไส้ ต้องใช้วิธีฉีดเข้ากล้ามหรือฉีดเข้าทางหลอดเลือด มีความเป็นพิษต่อไตและหูชั้นใน กลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ เช่น เจนตามัยซิน (Gentamycin) โทบรามัยซิน (Tobramycin) อะมิคาซิน(Amikacin) สเตรปโตมัยซิน (Streptomycin) สเปคทิโนมัยซิน (Spectinomycin) กานามัยซิน (Kanamycin) และนีโอมัยซิน (Neomycin)

2.4.1.3 เซฟาโลสปอริน (Cephalosporin) จัดเป็นกลุ่มยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด เช่น ชนิดก่อการอักเสบของทางเดินหายใจ และของทางเดินอาหาร ยากลุ่มนี้ไม่ทนกรดเช่นเดียวกับกลุ่มเพนิซิลลิน (Penicillin) และดูดซึมในทาง เดินอาหารได้ไม่ดี จึงต้องใช้การฉีดเข้ากล้ามหรือเข้าหลอดเลือด แต่ก็พบว่า ยาเซฟาโลสปอรินบางตัวมีคุณสมบัติทนกรดได้ดี ทั้งยังสามารถให้ยาโดยการรับประทานได้ ยาเซฟาโลสปอรินขับออกจากร่างกายโดยผ่านทางไตออกมากับปัสสาวะ บางส่วนถูกทำลาย และผ่านออกมาทางตับแต่เป็นส่วนน้อย ตัวอย่างยาในกลุ่ม เซฟาโลสปอริน เช่น เซฟาโซลิน (Cefazolin) เซฟาคลอร์ (Cefaclor) เซฟูรอกซีม (Cefuroxime) เซโฟแทคซีม (Cefotaxime) และ เซฟไตรอะโซน (Ceftriaxone)

2.4.1.4 แมคโครไลด์ (Macrolide) จัดเป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้แพร่หลายอีกกลุ่มหนึ่ง สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยการก่อกวนที่สารพันธุกรรม หรือที่เรียกว่า อาร์เอนเอ (RNA) ตัวอย่างยากลุ่มแมคโครไลด์ เช่น อีรีโทรมัยซิน (Erythromycin) อาซิโทรมัยซิน (Azithromycin) คลาริโทรมัยซิน (Clarithromycin) และรอซิโทรมัยซิน (Roxithromycin) ทำให้เชื้อไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนในการดำรงชีวิตได้ มักใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียในทางเดินหายใจส่วนบนและส่วนล่าง

2.4.1.5 เตตราไซคลีน (Tetracyclines) ใช้รักษาการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะและการติดเชื้อในลำไส้ รักษาหลอดลมอักเสบแผล ฝี หนอง มีกลไกการออกฤทธิ์โดย ก่อ กวนการทำงานของสารพันธุกรรม หรือ RNA ของเชื้อแบคทีเรียทำให้เชื้อไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ และทำให้เชื้อหยุดการเจริญเติบโต ห้ามใช้ยาในเด็กอ่อน และหญิงมีครรภ์ เพราะอาจส่งผลถึงการเจริญเติบโตของ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดูกของเด็กและของทารกในครรภ์ได้หากใช้ร่วมกับยาคุมกำเนิด จะลดประสิทธิภาพในการคุมกำเนิด จึงอาจตั้งท้องได้ ห้ามใช้ร่วมกับยาลดกรด และ ยากลุ่มวิตามินที่มีเหล็กเป็นส่วนประกอบ เพราะจะลดการดูดซึมยาเตตราไซคลีนได้ และข้อควรระวังของยากลุ่มเตตราไซคลีน มีดังนี้ ตัวอย่างยากลุ่มเตตราไซคลีน เช่น เตตราไซคลีน ดอกซีไซคลีน (Doxycycline) และ ออกซีเตตราไซคลีน (Oxytetracycline)

2.4.1.6 ควิโนโลน (Quinolones) ใช้รักษาการติดเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินปัสสาวะ ทางไต และต่อมลูกหมาก แต่ไม่ค่อยนำไปใช้รักษาการติดเชื้อในโพรงไซนัส(Sinusitisไซนูไซติส) ยากลุ่มนี้ออกฤทธิ์โดยรบกวนการสร้างโปรตีนในสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียที่เรียกว่า DNA ข้อควรระวังและห้ามใช้ยากลุ่มควิโนโลน คือ ในผู้ที่เป็นโรคลมชัก เพราะอาจกระตุ้นสมอง เป็นสาเหตุให้ชักได้บ่อยขึ้น ตัวอย่างยากลุ่มควิโนโลน เช่น ไซโปรฟลอซาซิน หรือ ซิโปรฟลอซาซิน (Ciprofloxacin) เลวฟลอซาซิน(Levofloxacin) นอร์ฟลอซาซิน(Norfloxacin) และ โอฟลอซาซิน(Ofloxacin)

2.4.2 แหล่งที่มาของสารต้านจุลชีพ

โดยส่วนมากแล้วยาปฏิชีวนะหรือสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพมักจะผลิตได้จากจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์จำพวกแอคติโนมัยซีทที่จัดเป็นแบคทีเรียที่ดำรงชีวิตแบบอิสระ สามารถย่อยซากพืชซากสัตว์และเป็นแบคทีเรียหลักที่ผลิตสารต้านจุลชีพหรือสารยับยั้งทางชีวภาพ (Valli *et al.*,2012) เป็นจุลินทรีย์กลุ่มสำคัญที่สามารถสร้างสารในกลุ่ม Secondary metabolite ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งทางชีวภาพหลากหลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 แสดงจำนวนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เชื้อแอคติโนมัยซีทผลิตสามารถผลิตได้ในแต่ละสปีชีส์

สปีชีร์ของแอคติโนมัยซีท	**จำนวนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (ชนิด)**
Streptomycetaceae	
Strepptomyces	~ 8000
Streptoverticillium	258
Kitasatosporia	37
Chainia	30
Microellobosporia	11
Mycobacteriaceae	
(*Actinobacteria*)	
Nocardia	357
Mycobacterium	57
Arthrobacter	25
Thermomonosporaceae	
Actinomadura	345
Saccharothrix	68
Microbispora	54
Actinosynmema	51
Nocardiopsis	41
Micromonosporaceae	
(*Actinoplanetes*)	
Micromonospora	740
Actinoplanes	248
Dactylosporangium	58
Psedonocardiaceae	
Saccharopolyspora	131
Amycalotopsis/Nnocardia	120/357
Kibdellosporangium	34
Pudonocardia	27
Amycolata	12
Saccharomonospora	2
Actinopolyspora	1
Psedonocardiaceae	
Saccharopolyspora	131

ที่มา : Berdy (2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.3 กลไกการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพ

2.4.3.1 จำแนกตามขอบเขตการออกฤทธิ์ (ดวงพร , 2530)

1.) Broad spectrum ยาต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์ต่อแบคมีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ เช่น แอมพิซิลลิน (ampicillins) หรือออกฤทธิ์ทั้งต่อแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนด้วย ได้แก่ คลอแรมเฟนิคอล (cloramphenicol) นอกจากนี้ยังอาจครอบคลุมทั้งโปรโตซัว และริกเกตเซีย ได้แก่ เตตร้าซัยคลิน (tetracyclines) คลอแรมเฟนิคอล (choramphenicol) เมโทรนิดาโซล (methronidazole)

2.) Medium spectrum ยาต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบบางชนิดเท่านั้น ได้แก่ ซัลโฟนาไมด์ (sulfonamides)

3.) Narrow spectrum ยาต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียบางชนิด มีฤทธิ์ส่วนใหญ่ต่อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ คล็อกซาซิลลิน (cloxacillin) หรือมีฤทธิ์ส่วนใหญ่ต่อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ อะมิโนกลัยโคไซด์ (aminoglycosids)

2.4.3.2 จำแนกตามฤทธิ์ต่อจุลชีพ (Tortora *et al.*, 1992)

1.) Bactericidal หมายถึง ยาต้านจุลชีพมีฤทธิ์ฆ่าหรือทำลายเชื้อจุลชีพ โดยทั่วไปมักมีกลไกการออกฤทธิ์ต่อผนังเซลล์ และต่อเซลล์เมมเบรนของแบคทีเรีย

2.) Bacteriostatic หมายถึง ยาต้านจุลชีพมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพ มักมีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างโปรตีน ดังนั้น จึงต้องการระบบภูมิคุ้มกันเซลล์เม็ดเลือดขาวเพื่อเก็บกินเชื้อจุลชีพ ถ้าเพิ่มขนาดยามากขึ้นยาต้านจุลชีพเหล่านี้อาจออกฤทธิ์ฆ่าหรือทำลายเชื้อจุลชีพ

2.4.3.3 จำแนกตามกลไกการออกฤทธิ์

1.) ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ เช่น เพนิซิลลิน (penicilin) เซฟาโลสปอริน (cephalosporin) แวนโคมัยซิน (vancomicin) โดยยาในกลุ่มนี้จะทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกและตายไปในที่สุด ซึ่งจัดได้ว่าเป็นกลุ่มยาที่สามารถฆ่าแบคทีเรียโดยตรง (กำพล , 2538)

2.) ออกฤทธิ์ต่อเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น โพลี่มิกซิน (polymyxin) โคลิสติน (colistin) แอมโพเทอริซิน –บี (amphotericin B) โดยยาในกลุ่มนี้จะทำให้ของเหลวที่อยู่ภายในเซลล์ซึมออกมานอกเซลล์และทำให้เซล์ตายไปในที่สุด

3.) ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างโปรตีน (โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นโครงสร้าง หรือเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในการมีชีวิตของแบคทีเรีย) เช่น อีริโทรมัยซิน (erythromycin) อะมิโนกลัยโคไซด์ (aminoglycoside)(ปิยพัฒน์ และคณะ,2552) โดยเป็นกลุ่มยาที่มีผลยับยั้งการทำงานของไรโบโซม ซึ่งเป็นส่วนสำคัญของเซลล์เกี่ยวกับการสร้างโปรตีนจึงมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแต่ไม่มีผลต่อการฆ่าแบคทีเรียโดยตรง จึงจำเป็นต้องอาศัยการทำงานของภูมิคุ้มกันของร่างกายในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลืออยู่ โดยสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย (กำพล , 2538)ได้แก่

3.3.1) กลุ่มที่มีผลต่อไรโบโซมชนิด 50 เอส (50S) ได้แก่ คลอแรมเฟนิคอล (chloranphenicol) คลินดามัยซิน (clindamycin)

3.3.2) กลุ่มที่มีผลต่อไรโบโซมชนิด 30 เอส (30S) ได้แก่ เตตราซัยคลิน (tetracycline)

4.) ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างกรดนิวคลิอิค เช่น ไรแฟมปิน (rifampim) ควิโนโลน (quinolone) และเมโทรนิดาโซล (metronidazole) เป็นยาที่ทำให้เซลล์ไม่สามารถสร้างดีเอ็นเอซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของจุลินทรีย์ จึงมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (กำพล , 2538)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.) รบกวนการสังเคราะห์เมตาบอลิซึมที่จำเป็นในการดำรงชีพของเชื้อจุลชีพ เช่น ซัลโฟนาไมด์ ไอโซไนอะซิดโดยยาจะเข้าไปยับยั้งขบวนการเมตาบอลิซึมของกรดโฟลิกทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโตและแบ่งตัวต่อไปได้ ยาจึงออกฤทธิ์แค่ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

2.4.4 การทดสอบการต้านจุลชีพ

ประสิทธิภาพของสารต้านจุลชีพในการยับยั้งและการฆ่าเชื้อแบคทีเรียแตกต่างกันไปตามชนิดตามสายพันธุ์ของแบคทีเรีย บางกลุ่มมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียในวงกว้างแต่สารต้านจุลชีพบางกลุ่มจะมีลักษณะจำเพาะในการยับยั้งเชื้อบางชนิด (ปิยพัฒน์ และคณะ,2552) มีกลไลออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Bacteriostaticeffect) ได้แก่ ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ ออกฤทธิ์ต่อเซลล์เมมเบรน ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างโปรตีน ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างกรดนิวคลิอิค และรบกวนการสังเคราะห์เมตาบอไลต์ที่จำเป็นในการดำรงชีพของเชื้อจุลชีพ (ประสาทพร และคณะ,2551) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการตรวจสอบเบื้องต้นเกี่ยวกับประสิทธิภาพของสารต้านจุลชีพก่อนนำไปใช้จริง

2.4.4.1 ประเภทการทดสอบ (ประสาทพร และคณะ,2551)

1.) Agar diffusiom test

วิธีที่ใช้แพร่หลายมากที่สุดคือ Disc diffusion method (Kriby-Bauer) เนื่องจากประหยัด สะดวกและใช้เวลาน้อยกว่าวิธีอื่นๆ วิธีเป็นวิธีทดสอบในเชิงคุณภาพ สามารถบอกผลได้ว่าเชื้อมีความไวต่อการทดสอบหรือไม่ ไม่อาจทราบค่า MIC และ MLC ได้ ไม่เหมาะในการทดสอบเชื้อที่เจริญช้า และเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้อากาศในการดำรงชีพ

วิธีการทดลอง

เตรียมเชื้อเพื่อใช้ในการทดสอบโดยเพิ่มจำนวนแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว วัดความขุ่นของเชื้อเพื่อให้ได้จำนวนเชื่อที่เหมาะสมกับการทดสอบแล้ว Spread เชื้อลงบนอาหาร Muller-Hinton agar ให้ทั่ว จุ่มกระดาษกรองปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มม. ในสารละลายสกัด และวางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ควรทำกลุ่มควบคุม คือ กระดาษกรองปลอดเชื้อที่จุ่มในตัวทำละลายด้วย นำไปบ่มแล้ววัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibitor zone โดยเทียบกับกลุ่มควบคุมบวกที่ใช้ disc ยาปฏิชีวนะที่ทราบปริมาณที่แน่นอน

2.) Dilution Susceptibility Test หรือการทดสอบ MIC

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี dilution test เป็นการทดสอบเชิงปริมาณ เพราะสามารถทราบค่าความเข้มข้นของสารสกัดได้ นิยมใช้ทดสอบยืนยันผลวิธีการ diffusion

วิธีการทำ Broth dilution test

วิธีการนี้สามารถแบ่งเป็น macrodilution หรือ tube test และ microdilution dilution test

Broth macrodilution test ทำในหลอดทดลอง โดยทำการเจือจางสารสกัด Stock solution ด้วยตัวเจือจางหรือ broth ในลักษณะลดลงทุกๆ 2 เท่า จนปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 0.5 มล. เตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ โดยใช้วิธีเทียบความขุ่นกับ McFarland เบอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.5 หรืออาจใช้การวัดความขุ่นด้วย spectrophotometer แล้วเจือจางให้เชื้อได้ความเข้มข้นที่ต้องการ

Broth microdilution dilution test ทำใน microtiter plate 96-well โดยเจือจาง Stock solution ด้วยตัวเจือจางหรือ broth ในลักษณะลดลงทุกๆ 2 เท่า มีหลุมควบคุมเป็น Broth ที่ไม่มีสารสกัด ในแต่ละหลุมมีปริมาตรเท่ากับ 50 ไมโคลิตร จากนั้นใส่เชื้อที่ปรับขนาดแล้วลงในแต่ละหลุมแล้วปิดฝาก่อนนำไปบ่ม อ่านค่า MIC โดยดูความขุ่นด้วยตาเปล่า

3.) Agar well diffusion (Devi *et al.*,2008)
ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่จะใช้ในการทดสอบ ปรับปริมาณเชื้อให้เทียบเท่ากับ mcFrland No. 0.5 และใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อจุ่มลงในหลอดเพาะเชื้อ นำมาเกลี่ยบนผิวหน้าอาหาร Mueller-Hinton Agar ใช้ Cork borer เส้นผ่าศูนย์กลาง 8 mm เจาะบนอาหารที่เกลี่ยเชื้อแล้วหยดสารสกัดลงในหลุมที่เจาะไว้ และใช้ยาปฏิชีวนะเป็นชุดควบคุมบวก และตัวทำละลายเป็นชุดควบคุมลบ นำไปบ่มจากนั้นบันทึกผลโดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส

2.4.4.2 ชีววิทยาของเชื้อที่นำมาทดสอบ

จากงานวิจัยเรื่อง การจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ Streptomyces ที่มีฤทธิ์ต้านทางชีวภาพจากตะกอนดินของป่าชายเลนในประเทศไทย ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างตะกอนดินจากป่าชายเลนจังหวัดสมุทรสงคราม สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทได้ทั้งหมด 2 สายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์ D2-1 และ D2-2 ทำการนำตัวอย่างมาตรวจคัดกรองฤทธิ์ต้านทางชีวภาพจากสารสกัดของน้ำหมัก พบการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aerugiosa* ATCC 27853 ในขณะที่สายพันธุ์ D2-1 ได้มีการพัฒนาการสกัดทำให้สารที่ได้มีความสามารถในการต่อต้านเชื้อ *Candida albicans* ATTC 10231 สำหรับการจัดจำแนกเชื้อ *Streptomyces*ของทั้ง 2 สายพันธุ์มีพื้นฐานของ Polyphasic taxonomy ซึ่งเชื้อทั้งสองชนิดนี้มีการผลิตสารยับยั้งสารต่างๆดังนี้ ผลิต *LL*-DAP ของ peptidoglycan ในผนังเซลล์ แต่ส่วนใหญ่จะผลิต Menaquinone ได้แก่ MK-9 (H_6) และ MK-9 (H_8) และที่สำคัญที่สุดคือ Cellular fatty acid ประกอบด้วย iso-$C_{16:0}$ anteiso-$C_{15:0}$ iso- $C_{15:0}$ iso- $C_{14:0}$ $C_{17:0}$Cycle anteiso- $C_{17:0}$ สุดท้ายการวิเคราะห์ลำดับยีน 16s rRNA ของสายพันธุ์ D2-1 และ D2-2 มีลำดับเบสคล้ายกับ*Streptomyces sundabansensis.* 99.78% และ*Streptomyces iranensis* HM35. 99.57% ตามลำดับ โดยมีการจัดจำแนกสายพันธุ์ D2-1 ให้เป็น*Streptomyces iranensis* และสายพันธุ์ D2-2 ให้เป็น*Streptomyces sundabansensis* (Phongsopitanun *et al.*, 2014) ผลของงานวิจัยดังกล่าว
แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งของสารปฏิชีวนะที่มาจากแอคติโนมัยซีทไม่เหมือนกันจึงจำเป็นต้องมีการทดสอบกับเชื้อหลายชนิดดังต่อไปนี้

1. *Staphylococcus aureus*
2. *Bacillus subtilis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. *Escherichia coli*
4. *Pseudomonas aeruginosa*
5. *Candida albicans*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 หลอดทดลอง
3.1.2 แท่งแก้วรูปตัวแอล
3.1.3 บีกเกอร์
3.1.4 กระบอกตวง
3.1.5 ฟลาสก์ขนาด 250 ml
3.1.6 ขวดดูแรน
3.1.7 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ
3.1.8 แท่งแก้วคนสาร
3.1.9 ช้อนตักสาร
3.1.10 Needle
3.1.11 ปิเปต
3.1.12 ลูกยาง
3.1.13 Eppendorf
3.1.14 ไม้พันสำลี
3.1.15 ตะเกียงแอลกอฮอล์
3.1.16 ห่วงเขี่ยเชื้อ
3.1.17 Forceps
3.1.18 Centrifuge Tube
3.1.19 แผ่นสไลด์และกระจกปิดสไลด์
3.1.20 Autopipette
3.1.21 Tips
3.1.22 paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร

3.2 เครื่องมือ

3.2.1 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)	รุ่น ES-315, ยี่ห้อ TOMY, JAPAN
3.2.2 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	รุ่น GF-800 ยี่ห้อ AND, Japan
3.2.3 อ่างควบคุมอุณหภูมิ	บริษัท MEMMERT, Germany
3.2.4 เครื่องวัดความเป็น กรด – เบส	รุ่น Starter 3000 ยี่ห้อ OHAUS, USA
3.2.5 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow)	รุ่น 120 BS ยี่ห้อ Super clean, Major scientific Thailand
3.2.6 เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex mixer)	รุ่น Vortex-genie 2, 230v-g560e บริษัท Scientific industries, USA
3.2.7 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ	ยี่ห้อ Gallenkamp, UK

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.8 ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น 1300 ยี่ห้อ Contherm, New Zealand

3.2.9 ตู้อบด้วยความร้อนแห้ง (hot air oven) บริษัท MEMMERT, Germany

3.2.10 ปั่นแยกสารแบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Z383K ยี่ห้อ HERMLE, Germany

3.2.11 กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH30 ยี่ห้อ Olympus, Japan

3.2.12 ตู้แช่แข็ง - 20°C รุ่น SF-PC697 ยี่ห้อ Panasonic, TH

3.2.13 ตู้แช่เย็น รุ่น SYC-120P, Sanden intercool, TH

3.2.14 เครื่องไมโครเวฟ รุ่น R-250 sharp, Thailand

3.3 สารเคมี

3.3.1Sodium chloride (NaCl: MERCK KGaA, 64271 Darmstadt, Germany)

3.3.2Glycerol ($C_3H_8O_3$: ajax finechem Pty Ltd, Auckland, New Zealand)

3.3.3 Malt extract (HiMedia laboratories Pvt. Ltd. A-516, Swastik Disha Bussiness park, Via Vadhani Ind. Est., LBS Marg, Mumbai-400086, India)

3.3.4 สารสกัดจากยีสต์ (biomark laboratories, India)

3.3.5 Glucose ($C_6H_{12}O_6$)

3.3.6 วุ้น (agar: Bio agar)

3.3.7 Peptone (titan biotech Ltd., India)

3.3.8 แป้งที่ละลายน้ำได้ (soluble starch research laboratories Pvt. Ltd, India)

3.3.9 Potassiun nitrate (KNO_3: BHD Chemical Ltd, Poole, England)

3.3.10 Casein (Sigma-Aldich Chemie GmbH, St.louis, MO 63103, USA)

3.3.11 Magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$: fluka chemical AG CH-9470, Buchs, Switzerland)

3.3.12 Calcium carbonate ($CaCO_3$: ajax finechem Pty Ltd, Auckland, New Zealand)

3.3.13 Ferrous heptahydrate ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$: Carlo erba Ltd., Italy)

3.3.14 แป้งถั่วเหลือง (soya flour :doi kham food product Co., Ltd, TH)

3.3.15 Mannitol

3.3.16 Skim milk powder (HiMedia laboratories Pvt. Ltd. A-516, Swastik Disha Bussiness park, Via Vadhani Ind. Est., LBS Marg, Mumbai-400086, India)

3.3.17 casein enzymatic hydrolysate (HiMedia laboratories Pvt. Ltd. A-516, SwastikDishaBussiness park, Via Vadhani Ind. Est., LBS Marg, Mumbai-400086, India)

3.3.18 สารสกัดจากเนื้อ (biomark laboratories., India)

3.3.19 แอลกอฮอล์ 70% และ 95%

3.3.20 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

3.3.21 สารละลาย EDTA ($C_{10}H_{16}N_2O_8$)

3.3.22 Nystatin (Sigma-Aldrich, Co., USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.23 Azocasein (Sigma-Aldrich, Co., USA)

3.3.24 สารละลาย Trichloroacetic acid ($C_2HCl_3O_2$)

3.3.25 Papain (fluka chemical AG CH-9470, Buchs, Switzerland)

3.3.26 di-sodium hydrogen phosphate heptahydrate ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$: MERCK KGaA, 64271 Darmstadt, Germany)

3.3.27 Citric acid ($C_6H_8O_7$: Snp scientific Ltd., TH)

3.3.28 Tris (hydroxymethyl) aminomethane ($C_4H_{11}NO_3$: Vivantis technologies Sdn. Bhd., Malaysia)

3.3.29 Boric acid (H_3BO_3)

3.3.30 Borax ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$: MERCK KGaA, 64271 Darmstadt, Germany)

3.3.31 Sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$: Carlo erba Ltd., Italy)

3.3.32 Potassium permanganate ($KMnO_4$)

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.4.1 Mueller-Hinton Broth (MHA: sisco research laboratories Pvt. Ltd., India)

3.4.2 Sabourand dextrose agar (SDA: Becton-Dickinson company sparks, MD 21152, USA)

3.5 เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

3.5.1 *Escherichia coli* ATCC 25922

3.5.2 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

3.5.3 *Bacillus subtilis* ATCC 6633

3.5.4 *Micrococcus luteus* TISTR 2374

3.5.5 *Staphylococcus aureus* TISTR 118

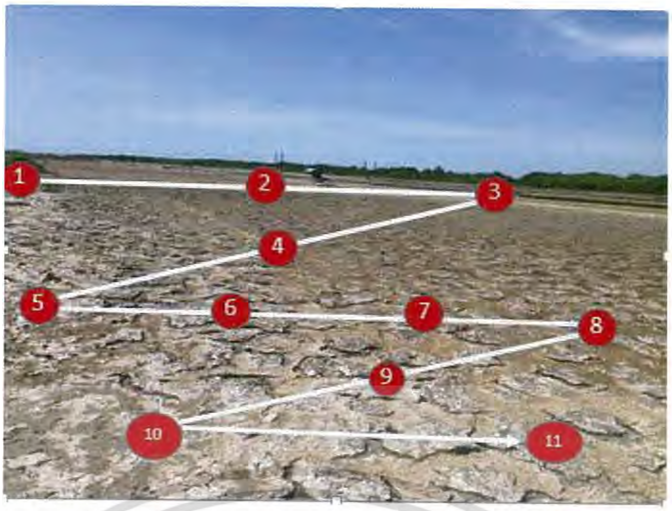
3.5.6 *Candida albicans* ATCC 90028

วิธีดำเนินการวิจัย

3.6 การเก็บตัวอย่างดิน (Klanbut, 2013)

เก็บตัวอย่างดินนาเกลือในตำบลนาโคกจังหวัดสมุทรสาครโดยจัดเตรียมอุปกรณ์สำหรับการเก็บตัวอย่าง (เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง, พลั่วตักดิน, ถุงพลาสติก, น้ำกลั่น) และเก็บตัวอย่างดินที่ลึกลงไปจากหน้าดิน 2 – 3 เซนติเมตร ในลักษณะฟันปลา ประมาณ 500 กรัม ใส่ถุงพลาสติกปลอดเชื้อ จากนั้นวัดค่าความเป็นกรดด่างของตัวอย่างดินโดยใช้เครื่องวัดความเป็นกรดด่างและบันทึกค่าความเป็นกรดด่างที่วัดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.1 แสดงการเก็บตัวอย่างดินในลักษณะฟันปลาของตัวอย่างดินครั้งที่ 1 (A) จากนาเกลือ ตำบลนาโคก จังหวัดสมุทรสาคร

3.7 การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท (Klanbut, 2013)

เตรียมน้ำกลั่นปลอดเชื้อเพื่อทำการเจือจางตัวอย่างในหลอดทดลองปริมาตร 9 มิลลิลิตรและใส่ตัวอย่างดินหนัก 1 กรัมลงไป (ระดับความเจือจาง 10^{-1}) จากนั้นนำตัวอย่างดินที่ระดับความเจือจาง 10^{-1}ไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) นาน 6 นาทีแล้วนำตัวอย่างดินที่ระดับความเจือจาง 10^{-1}ไปทำการเจือจางต่อจนถึงระดับความเจือจางที่ 10^{-5}เมื่อทำการเจือจางตัวอย่างเรียบร้อยแล้วนำตัวอย่างที่ระดับความเจือจางที่ 10^{-2} ถึง 10^{-5} มาทำ Spread plate technique ลงบนอาหาร International Streptomyces Project (ISP-2) และอาหาร ISP-2 ที่มีการเติม NaCl 1% โดยอาหารทั้งสองนั้นจะมีการเติม Nystatin 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่ออาหาร 100 มิลลิลิตรนำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 14 วันโดยมีการตรวจผลการเจริญของเชื้อทุกๆ 7 วัน

คัดเลือกโคโลนีของเชื้อที่เจริญมาทำการ Cross streak บนอาหาร ISP-2 และอาหาร ISP-2 ที่มีการเติม NaCl 1% โดยอาหารทั้งสองนั้นจะมีการเติม Nystatin 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่ออาหาร 100 มิลลิลิตรจนกระทั่งได้โคโลนีเดี่ยวและนำโคโลนีเดี่ยวมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Starch casein agar (SCA) ที่มีความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) ที่หลากหลายคือ 0%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% และ 6% ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 14 วัน (Prasad *et al.*, 2013) เพื่อหาค่าความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมที่สุดในการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้มาจากตัวอย่างดินในนาเกลือจากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวที่ได้มาเตรียมสารละลายสปอร์เพื่อใช้ในการทดสอบการสร้างเอนไซม์ต่อไป (ข้อ 3.9) และนำโคโลนีเดี่ยวมาทำ Slide culture เพื่อดูลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8 การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของตัวอย่างดิน (คนึงกานต์, 2558)

3.8.1 การหาน้ำหนักดิน

เทสารแขวนลอยของดินความเจือจางตัวอย่างดินที่ 10^{-1} ลงในบีกเกอร์ที่ทราบน้ำหนักนำบีกเกอร์ไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสจนน้ำระเหยหมดและน้ำหนักคงที่ จากนั้นชั่งน้ำหนักของบีกเกอร์อีกครั้งคำนวณน้ำหนักของดินที่ใช้ในการแยกเชื้อจากผลต่างของน้ำหนักบีกเกอร์ก่อนและหลังอบ

3.8.2 การหาปริมาณความชื้น

ชั่งตัวอย่างดิน 1-2 กรัม ใส่ในถ้วยเซรามิกหรือบีกเกอร์ที่ทราบน้ำหนักนำเซรามิกหรือบีกเกอร์ไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่จากนั้นคำนวณหาปริมาณความชื้นในดินตัวอย่างจากน้ำหนักดินที่หายไป

3.8.3 การวัดค่าความเป็นกรดด่าง

ชั่งตัวอย่างดิน 2 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นค่อยๆเติมน้ำกลั่นลงไปทีละน้อยและคนตัวอย่างไปด้วยในขณะเดียวกันโดยใช้ช้อนตักสารหรือแท่งแก้วคนสารจน สังเกตเห็นแผ่นฟิล์มบางๆบนผิวน้ำ (ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที – 1 ชั่วโมง) ทำการวัดค่าความเป็นกรดด่างและทำซ้ำ 3 ครั้ง รายงานผลในรูปของค่าเฉลี่ยจากการวัดทั้ง 3 ครั้ง

3.9 การเตรียมสารละลายสปอร์เพื่อใช้ในการทดสอบการสร้างเอนไซม์ (Klanbut, 2013)

นำโคโลนีเดี่ยวของแอคติโนมัยซีทที่แยกได้มาทำ Spore Suspension โดย streak เชื้อลงบนอาหาร ISP-2 และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน จากนั้นเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในเพลทอาหาร ใช้ไม้พันสำลีขูดเชื้อที่อยู่บนผิวหน้าเพลททิ้งและนำน้ำบนเพลทไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5-10 นาที แล้วเทส่วนใส (supernatant) ทิ้งและ resuspension ด้วย glycerol 20% (w/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.10 คัดเลือกแอคติโนมัยซีทที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ (คนึงกานต์ และอัญชลี, 2543)

นำสารละลายแขวนลอยสปอร์ที่ได้จากข้อ 3.9 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหาร Skim milk agar และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน จากนั้นตรวจสอบการผลิตเอนไซม์เบื้องต้นโดยวัดจากความกว้างของวงใส (Clear zone) โดยเลือกเฉพาะไอโซเลทที่เกิดวงใสมาทำการศึกษาในขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.11 Spore pre – germination (Klanbut, 2013)

คัดเลือกไอโซเลตที่ทำให้เกิดวงใสบนอาหาร Skim milk agar จากนั้นดูดสารละลายสปอร์ของไอโซเลตที่ต้องการ 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหาร Yeast extract Malt extract broth (YEME) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มในสภาวะเขย่าโดยใช้ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ทำการเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนใส (Supernatant) ทิ้ง จากนั้นใส่น้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer จากนั้นคำนวณหาปริมาตรของสปอร์ตั้งต้นในแต่ละฟลาสก์

$$C = (OD\ 450/\ 0.04) \times (4 \times 106\ gs\ ml^{-1}) = OD\ 450 \times 108\ gs\ ml^{-1}$$

$$V = (3 \times 106/C) \times 1000\ \mu l$$

3.12 การสกัดเอนไซม์โปรติเอส (คนึงกานต์ และ อัญชลี, 2543)

ดูดสปอร์ตั้งต้นที่คำนวณได้ใส่ลงในอาหาร Yeast extract Malt extract broth (YEME) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มในสภาวะเขย่าโดยใช้ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างเชื้อเมื่อครบ 24 ชั่วโมง และ 30 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสที่ได้ (Supernatant) เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมในขั้นตอนต่อไป

3.13 การตรวจสอบหาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (คนึงกานต์ และ อัญชลี, 2543)

นำเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.12 มาหาความเป็นกรดด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการทำงานโดยใช้วิธี Azocasein method ซึ่งใช้ Citrate - phosphate buffer (pH 7), Boric acid-borax buffer (pH 8), Tris-HCl buffer (pH 8), Boric acid-borax buffer (pH 9),Tris-HCl buffer (pH 9), Sodium borate buffer (pH 10), Sodium bicarbonate buffer (pH 10) และ Sodium bicarbonate buffer (pH 11) (ภาคผนวก ข) จากนั้นทำการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตรโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer

3.14 การตรวจสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (คนึงกานต์ และ อัญชลี, 2543)

นำเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.12 มาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โดยใช้วิธี Azocasein method และใช้บัฟเฟอร์จากขั้นตอนการหาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมมาทำการบ่มที่อุณหภูมิต่างกันได้แก่ 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.15 การหาสารยับยั้งที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (คนึงกานต์ และ อัญชลี, 2543)

นำเอนไซม์ที่สกัดได้ในข้อ 3.12 มาหาสารยับยั้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์ (Inhibitor) โดยใช้สารยับยั้งดังนี้ Ethylene-diamine-tetra-acetic acid (EDTA), $KMnO_4$ และ Papain โดยเติมสารยับยั้งกับเอนไซม์ (ต้องแช่เย็นตลอดเวลา) จากนั้นทดสอบด้วยวิธี Azocasein method โดยใช้บัฟเฟอร์จากขั้นตอนการหาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมจากข้อ 3.13 และบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 3.14 และตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตรโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer

3.16 การหาความเสถียรของเอนไซม์ (คนึงกานต์ และ อัญชลี, 2543)

นำเอนไซม์ที่สกัดได้ในข้อ 3.12 บ่มใน Water bath ที่อุณหภูมิต่างกันดังนี้ 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บเอนไซม์ทุกๆ 10 นาที ครั้งละ 20 ไมโครลิตร จนครบ 1 ชั่วโมง ทำการทดลองเช่นเดียวกับการหาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์และใช้บัฟเฟอร์ที่ได้จากขั้นตอนการหาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยใช้วิธี Azocasein method แล้วตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer

* Control ไม่ต้องนำเอนไซม์ไปบ่มและ Blank ใช้น้ำกลั่นแทนบัฟเฟอร์และเอนไซม์

3.17 การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ (Ballav *et al.*, 2014)

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทบนอาหาร Yeast extract malt extract agar (ISP-2) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน มาทำการเขี่ยสปอร์ของเชื้อจำนวน 1 ลูปลงในอาหาร ISP-2 broth บ่มในสภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน แล้วทำการเลี้ยงต่อในอาหาร ISP-2 broth ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตปริมาตร 100 มิลลิลิตร และเติม Inoculum ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่เลี้ยงไว้จนครบ 5 วัน ใส่ลงไปบ่มในสภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน

3.17.1 การสกัดสารทุติยภูมิจากน้ำหมักเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย

นำน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยซีทมาทำการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman no.1 เพื่อแยกเอาเส้นใยของเชื้อแอคติโนมัยซีทและอาหารเหลวออกจากกัน จากนั้นนำน้ำหมักส่วนใสที่ปราศจากเส้นใยมาทำการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์คือ เอทิลอะซีเตท โดยทำการเติมเอทิลอะซีเตทลงไปในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ซึ่งในเฟสบนของเอทิลอะซีเตทที่มีสารมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์จะแยกตัวออกจากเฟสของน้ำ จากนั้นนำไปประเหยให้แห้งภายใต้การลดความดันด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะทำให้ได้สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตท จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปทำการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพส่วนเซลล์และเส้นใยที่ติดอยู่บนกระดาษกรองทำการล้างด้วยเมทานอลประมาณ 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มต่อในสภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ได้ มาทำการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman no.1 เพื่อแยกเอาเส้นใยของเชื้อแอคติโนมัยซีทและอาหารเหลวออกจากกัน จากนั้นนำไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระเหยให้แห้งภายใต้การลดความดันด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศจะทำให้ได้สารสกัดหยาบในชั้นเมทานอลจากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปทำการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.17.2 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* TISTR 2374, *Staphylococcus aureus* TISTR 118 และ *Candida albicans* ATCC 90028 ผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่ปราศจากเชื้อ แล้วปรับให้มีความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน แมคฟาแลน หมายเลข 0.5 ซึ่งจะมีจำนวนเซลล์โดยประมาณเท่ากับ 1.0×10^8 CFU/ml

ทำการเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร Mueller-Hinton agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง และเลี้ยงยีสต์บนอาหาร Sabouraud's dextrose agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง

3.17.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยเทคนิค Agar disc diffusion

การทดสอบนี้อาศัยหลักการแพร่ของสารซึ่งสกัดออกมาโดยรอบแผ่นทดสอบ ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวุ้นเป็นส่วนประกอบ โดยบริเวณยับยั้ง จะขึ้นอยู่กับฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของสารสกัด จากนั้นใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อ ชุบเชื้อแขวนลอยที่เตรียมไว้ และทาลงบนอาหารแข็งด้วยวิธีปลอดเชื้อ ให้เชื้อทดสอบกระจายตัวอยู่บนอาหารอย่างสม่ำเสมอ เตรียมสารละลายของสารสกัดหยาบปริมาตร 5 ไมโครลิตรต่อดิสก์ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หยดลงบนแผ่นทดสอบรอจนแห้ง จากนั้นวางลงบนอาหารที่ได้ทาเชื้อเอาไว้แล้ว และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อแบคทีเรีย ส่วนเชื้อยีสต์บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจผลการทดสอบได้ด้วยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสที่เชื้อไม่เจริญในหน่วยที่เป็นมิลลิเมตร

พระจอมเกล้าเจ้าคุณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การหาคุณสมบัติทางกายภาพบางประการของดินตัวอย่าง

จากการเก็บตัวอย่างดินนาเกลือ ตำบลนาโคก จังหวัดสมุทรสาคร ทั้งหมด 11 จุด (ภาคผนวก ฉ) นำมาหาคุณสมบัติของตัวอย่างดิน (ดังวิธีการที่ 3.8 และภาคผนวก ง) พบว่าน้ำหนักดินเฉลี่ยของตัวอย่างดิน (ภาคผนวก ช) ได้ผลดังตารางที่ 4.1 - 4.2 และนำตัวอย่างดินไปทำการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทดังวิธีการที่ 3.7 จากนั้นกำหนดไอโซเลท ให้กับเชื้อบริสุทธิ์

ตารางที่ 4.1 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของตัวอย่างดิน A

ตัวอย่างดิน	น้ำหนักดิน (กรัม)	ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
จุดที่ 1	0.579	45.5415	7.86
จุดที่ 2	0.661	55.9174	8.07
จุดที่ 3	0.579	46.7465	7.82
จุดที่ 4	0.604	48.6414	7.85
จุดที่ 5	0.574	48.7494	7.81
จุดที่ 6	0.632	58.6216	7.895
จุดที่ 7	0.605	47.4074	8.00
จุดที่ 8	0.581	42.7592	7.85
จุดที่ 9	0.665	46.0123	7.94
จุดที่ 10	0.853	67.8283	8.005
จุดที่ 11	0.469	35.3962	8.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของตัวอย่างดิน B

ตัวอย่างดิน	น้ำหนักดิน(กรัม)	ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
จุดที่ 1	0.547	45.2372	8.135
จุดที่ 2	0.53	50.2188	8.27
จุดที่ 3	0.568	46.3678	8.2
จุดที่ 4	0.527	51.1351	8.135
จุดที่ 5	0.608	50.1899	8.27
จุดที่ 6	0.562	50.794	8.26
จุดที่ 7	0.643	52.2926	8.135
จุดที่ 8	0.562	44.5771	8.15
จุดที่ 9	0.543	41.4704	7.995
จุดที่ 10	0.575	45.6215	7.96
จุดที่ 11	0.652	57.0968	8.04

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 33 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินนาเกลือ ตำบลนาโคก จังหวัดสมุทรสาคร

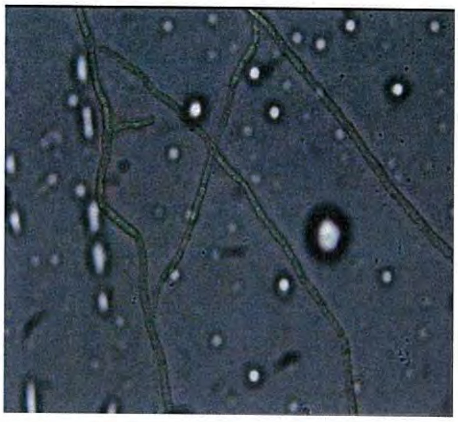
จากการเก็บตัวอย่างดินจากดินนาเกลือ ตำบลนาโคก จังหวัดสมุทรสาคร (ภาคผนวก ฉ) และทำการเจือจางตัวอย่างเพื่อคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทโดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จากนั้น Spread plate ลงบน Starch casein agar (ภาคผนวก ก) ซึ่งเติม Nystatine ปริมาณ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน จากวิธีการทดลองที่ 3.7 การเตรียมสารละลายสปอร์เพื่อใช้ในการทดสอบการสร้างเอนไซม์ พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทเจริญบนอาหารและสามารถคัดแยกเชื้อได้จำนวน 33 ไอโซเลท และตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการเจริญของเชื้อโดยสังเกตสีโคโลนีที่เจริญบนผิวอาหารและใต้ผิวอาหารโดยทำการเปรียบเทียบกับระบบสี The NBS/IBCC Color System (ภาคผนวก จ) ตรวจสอบลักษณะของเส้นใย และสปอร์ของแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้ด้วยเทคนิค slide culture ดังรูปที่ (4.1-4.33) เพื่อจัดกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม จากลักษณะ ดังแสดงในตารางที่ 4.3

(ก)

(ข)

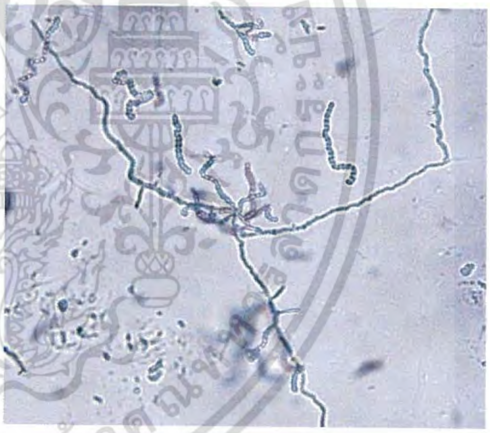
รูปที่ 4.1 (ก) แสดงลักษณะการเจริญบนผิวหน้าอาหารและใต้ผิวอาหาร โคโลนีมีสีเขียวอมดำ (ข) แสดงภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PPA 113 ลักษณะเส้นใยเป็นเส้นสายยาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก) (ข)

รูปที่ 4.2 (ก) แสดงลักษณะการเจริญบนผิวหน้าอาหารและใต้ผิวอาหาร โคโลนีมีสีดำเข้ม
(ข) แสดงภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PPB 113 ลักษณะเส้นใยเป็นท่อนยาวเรียงต่อกัน

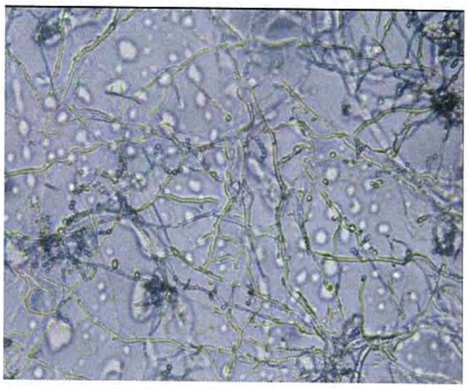


(ก) (ข)

รูปที่ 4.3 (ก) แสดงลักษณะการเจริญบนผิวหน้าอาหารและใต้ผิวอาหารโคโลนีมีสีเทาขาว
(ข) แสดงภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PPB 134 ลักษณะเส้นใยเป็นท่อนเรียงต่อกันเป็นโซ่ยาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก)



(ข)

รูปที่ 4.4 (ก) แสดงลักษณะการเจริญบนผิวหน้าอาหารและใต้ผิวอาหารโคโลนีมีสีดำอมเขียวมืด

(ข) แสดงภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท PPB 214 ลักษณะเส้นใยเป็นท่อนเรียงต่อกันเป็นโซ่ยาว

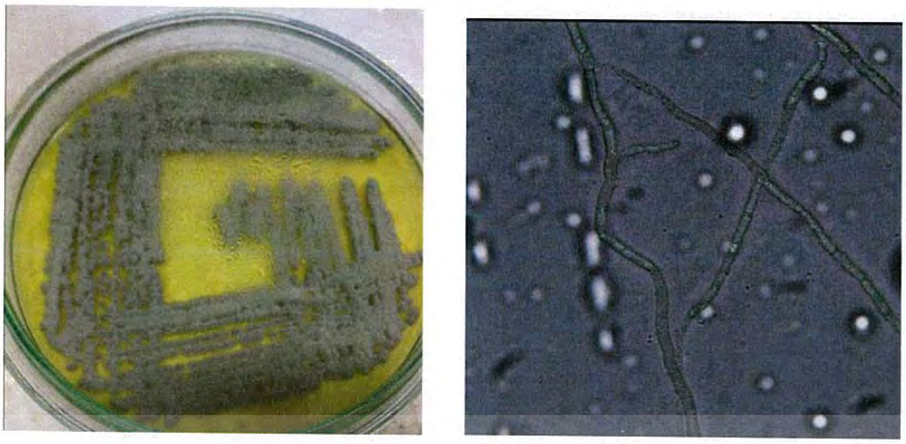
(ก)

(ข)

รูปที่ 4.5 (ก) แสดงลักษณะการเจริญบนผิวหน้าอาหารและใต้ผิวอาหารโคโลนีมีสีดำอมเขียว

(ข) แสดงภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท PPB 232 ลักษณะเส้นใยเป็นสายยาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



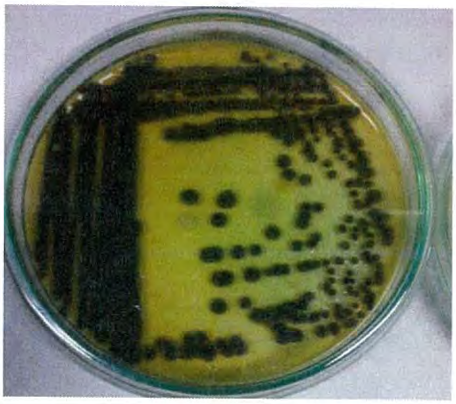
(ก) (ข)

รูปที่ 4.6 (ก) แสดงลักษณะการเจริญบนผิวหน้าอาหารและใต้ผิวอาหารโคโลนีมีสีเทาอมเขียว (ข) แสดงภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท PPB 313 ลักษณะเส้นใยเป็นสายยาว

(ก) (ข)

รูปที่ 4.7 (ก) แสดงลักษณะการเจริญบนผิวหน้าอาหารและใต้ผิวอาหารโคโลนีมีสีดำเข้ม (ข) แสดงภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท PPB 614 ลักษณะเส้นใยเป็นเส้นสายแตกแขนงยาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)

(ข)

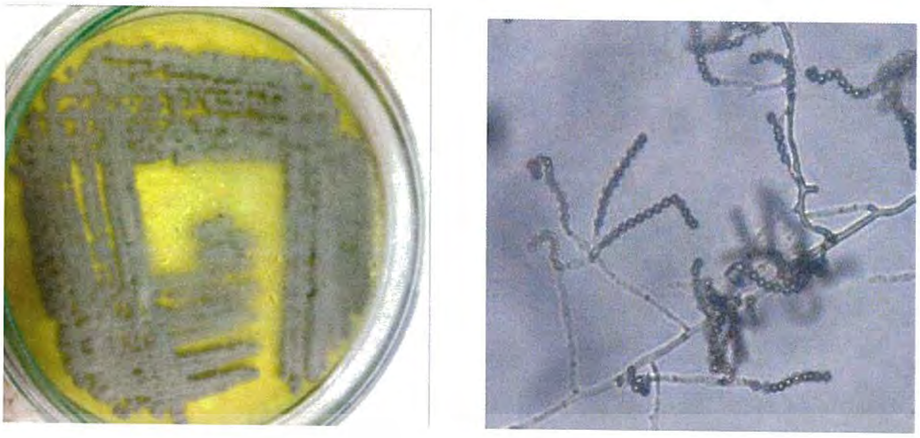
รูปที่ 4.8 (ก) แสดงลักษณะการเจริญบนผิวหน้าอาหารและใต้ผิวอาหารโคโลนีมีสีดำมืด (ข) แสดงภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท PPB 823 ลักษณะเส้นใยกลมเรียงต่อกันเป็นสายยาว

(ก)

(ข)

รูปที่ 4.9 (ก) แสดงลักษณะการเจริญบนผิวหน้าอาหารและใต้ผิวอาหารโคโลนีมีสีเขียวอมส้ม (ข) แสดงภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท PPB 1013 ลักษณะเส้นใยเรียงต่อกันเป็นสายยาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



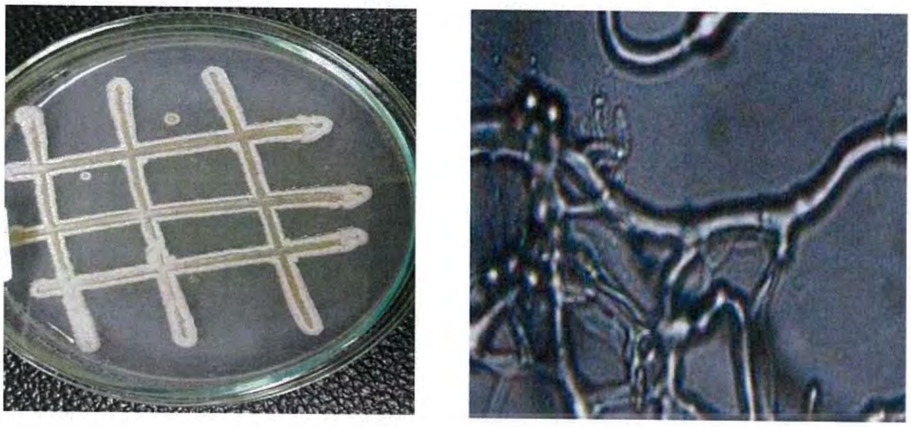
(ก) (ข)

รูปที่ 4.10 (ก) แสดงลักษณะการเจริญบนผิวหน้าอาหารและใต้ผิวอาหารโคโลนีมีสีเทาอมเขียว (ข) แสดงภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท PPB 1122 ลักษณะเส้นใยกลมต่อกันเป็นสายยาว

(ก) (ข)

รูปที่ 4.11 (ก) แสดงลักษณะการเจริญบนผิวหน้าอาหารและใต้ผิวอาหารโคโลนีมีสีเทาขาว (ข) แสดงภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท PPB 222 ลักษณะเส้นใยเป็นสายยาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



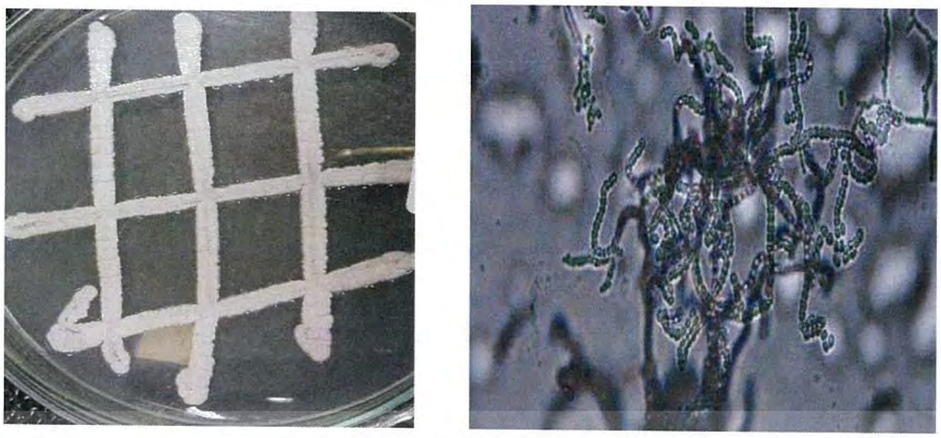
(ก) (ข)

รูปที่ 4.12 (ก) แสดงลักษณะการเจริญบนผิวหน้าอาหารและใต้ผิวอาหารโคโลนีมีสีเทาขาว
(ข) แสดงภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท PPA 715 ลักษณะเส้นใยเป็นสายยาวเกาะกลุ่มกัน

(ก) (ข)

รูปที่ 4.13 (ก) แสดงลักษณะการเจริญบนผิวหน้าอาหารและใต้ผิวอาหารโคโลนีมีสีเทาเข้ม
(ข) แสดงภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท PPA 215 ลักษณะเส้นใยเป็นสายยาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



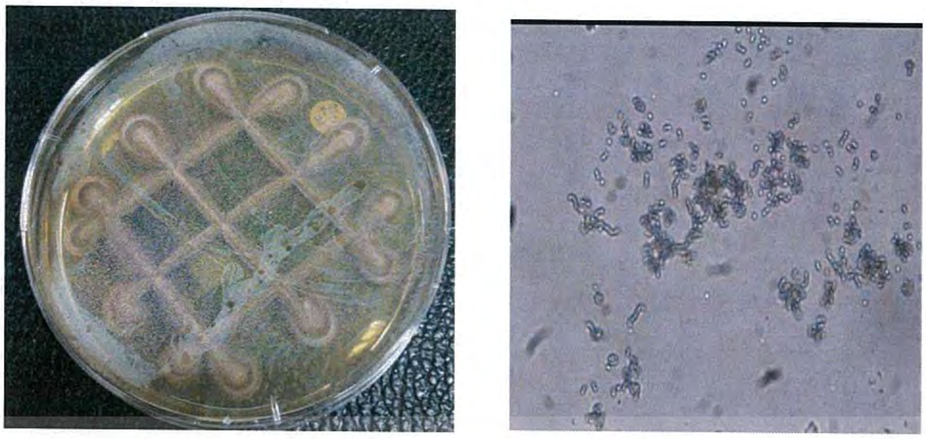
(ก) (ข)

รูปที่ 4.14 (ก) แสดงลักษณะการเจริญบนผิวหน้าอาหารและใต้ผิวอาหารโคโลนีมีสีเทาขาว
(ข) แสดงภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท PPA 222 ลักษณะเส้นใยกลมเกาะกันเป็นสายยาว

(ก) (ข)

รูปที่ 4.15 (ก) แสดงลักษณะการเจริญบนผิวหน้าอาหารและใต้ผิวอาหารโคโลนีมีสีเทาเข้ม
(ข) แสดงภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท PPB 613 ลักษณะเส้นใยเป็นสายยาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



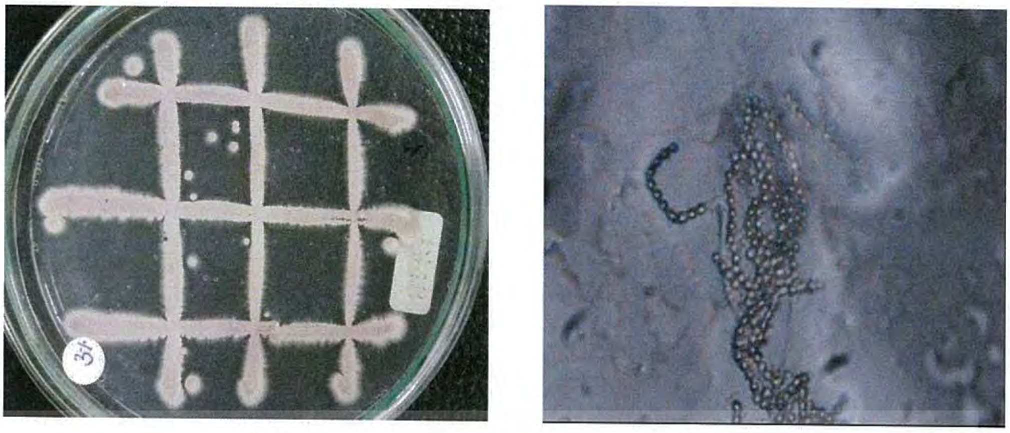
(ก) (ข)

รูปที่ 4.16 (ก) แสดงลักษณะการเจริญบนผิวหน้าอาหารและใต้ผิวอาหารโคโลนีมีสีเทาเข้ม (ข) แสดงภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท PPB 512 ลักษณะเส้นใยกลมสั้น

(ก) (ข)

รูปที่ 4.17 (ก) แสดงลักษณะการเจริญบนผิวหน้าอาหารและใต้ผิวอาหารโคโลนีมีสีเทาสว่าง (ข) แสดงภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท PPB 123 ลักษณะเส้นใยกลมรี กระจายตัวเดี่ยวๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



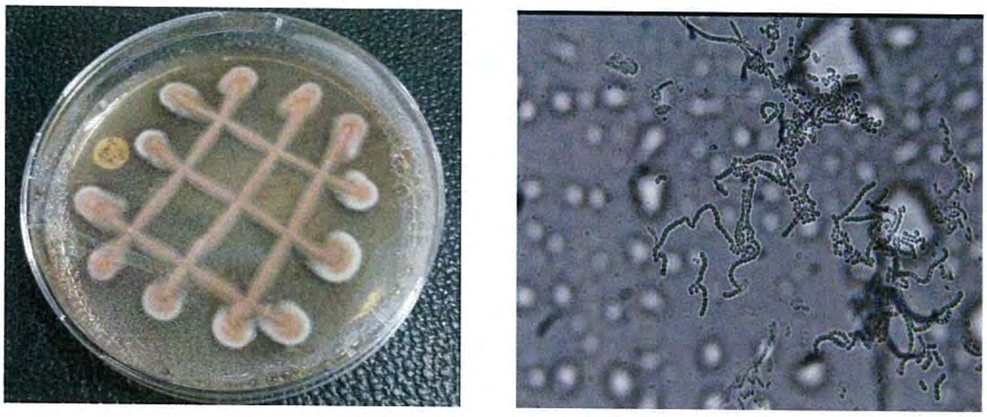
(ก) (ข)

รูปที่ 4.18 (ก) แสดงลักษณะการเจริญบนผิวหน้าอาหารและใต้ผิวอาหารโคโลนีมีสีเทาสว่าง (ข) แสดงภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท PPB 624 ลักษณะเส้นใยกลมเรียงต่อกันเป็นโซ่ยาว

(ก) (ข)

รูปที่ 4.19 (ก) แสดงลักษณะการเจริญบนผิวหน้าอาหารและใต้ผิวอาหารโคโลนีมีสีน้ำตาลส้มสว่าง (ข) แสดงภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท PPA 1013 ลักษณะเส้นใยเป็นเส้นสายยาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก) (ข)

รูปที่ 4.20 (ก) แสดงลักษณะการเจริญบนผิวหน้าอาหารและใต้ผิวอาหารโคโลนีมีสีส้มขาว

(ข) แสดงภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท PPB 322 ลักษณะเส้นใยกลมเรียงต่อกันเป็นโซ่ยาว

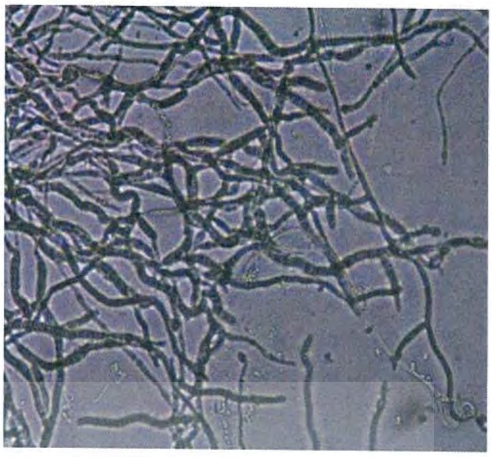
(ก) (ข)

รูปที่ 4.21 (ก) แสดงลักษณะการเจริญบนผิวหน้าอาหารและใต้ผิวอาหารโคโลนีมีสีส้มอมน้ำตาล

(ข) แสดงภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท PPB 342 ลักษณะเส้นใยกลมเรียงต่อกันเป็นสายสั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก)


(ข)

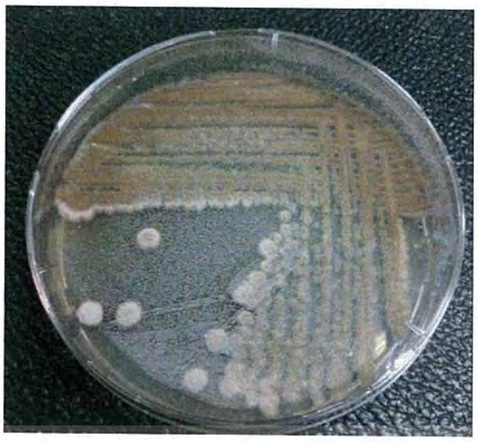
รูปที่ 4.22 (ก) แสดงลักษณะการเจริญบนผิวหน้าอาหารและใต้ผิวอาหารโคโลนีมีสีส้มอมน้ำตาล (ข) แสดงภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท PPB 412 ลักษณะเส้นใยกลมเรียงต่อกันเป็นสายยาว

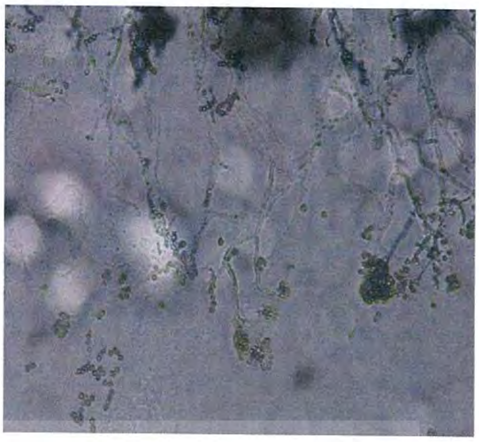
(ก)

(ข)

รูปที่ 4.23 (ก) แสดงลักษณะการเจริญบนผิวหน้าอาหารและใต้ผิวอาหารโคโลนีมีสีน้ำตาลเข้มอมส้ม (ข) แสดงภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท PPB 433 ลักษณะเส้นใยกลมเรียงต่อกันเป็นสายยาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้





(ก) (ข)

รูปที่ 4.24 (ก) แสดงลักษณะการเจริญบนผิวหน้าอาหารและใต้ผิวอาหารโคโลนีมีสีน้ำตาลอมส้ม ขอบโคโลนีมีสีขาว

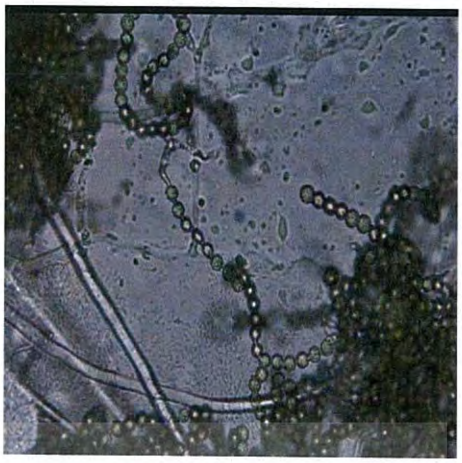
(ข) แสดงภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท PPB 1032 ลักษณะเส้นใยกลมเรียงต่อกันจับเป็นกลุ่ม

(ก) (ข)

รูปที่ 4.25 (ก) แสดงลักษณะการเจริญบนผิวหน้าอาหารและใต้ผิวอาหารโคโลนีมีสีน้ำตาลเข้ม ขอบโคโลนีมีสีขาว

(ข) แสดงภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท PPB 833 ลักษณะเส้นใยเป็นเส้นสายยาวแตกแขนง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก) (ข)

รูปที่ 4.26 (ก) แสดงลักษณะการเจริญบนผิวหน้าอาหารและใต้ผิวอาหารโคโลนีมีสีส้มอ่อน ขอบโคโลนีมีสีขาว

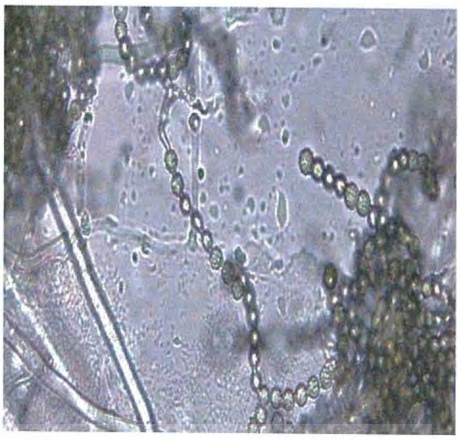
(ข) แสดงภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท PPB 632 ลักษณะเส้นใยกลมเรียงต่อกันเป็นสายยาว

(ก) (ข)

รูปที่ 4.27 (ก) แสดงลักษณะการเจริญบนผิวหน้าอาหารและใต้ผิวอาหารโคโลนีมีสีส้มอ่อน ขอบโคโลนีมีสีขาว

(ข) แสดงภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท PPB 914 ลักษณะเส้นใยกลมเรียงต่อกันเป็นสายยาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก) (ข)

รูปที่ 4.28 (ก) แสดงลักษณะการเจริญบนผิวหน้าอาหารและใต้ผิวอาหารโคโลนีมีสีส้มอมน้ำตาลอ่อน ขอบโคโลนีมีสีขาว

(ข) แสดงภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท PPB 722 ลักษณะเส้นใยกลมเรียงต่อกันเป็นสายยาว

(ก) (ข)

รูปที่ 4.29 (ก) แสดงลักษณะการเจริญบนผิวหน้าอาหารและใต้ผิวอาหารโคโลนีมีสีส้มอ่อน ขอบโคโลนีมีสีขาว

(ข) แสดงภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท PPB 1123 ลักษณะเส้นใยกลมเรียงต่อกันเป็นสายยาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก) (ข)

รูปที่ 4.30 (ก) แสดงลักษณะการเจริญบนผิวหน้าอาหารและใต้ผิวอาหารโคโลนีมีสีน้ำตาลอมส้ม ขอบโคโลนีมีสีขาว

(ข) แสดงภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท PPA823 ลักษณะเส้นใยกลมเรียงต่อกันจับเป็นกลุ่ม

(ก) (ข)

รูปที่ 4.31 (ก) แสดงลักษณะการเจริญบนผิวหน้าอาหารและใต้ผิวอาหารโคโลนีมีสีน้ำตาลเข้ม ขอบโคโลนีมีสีขาว

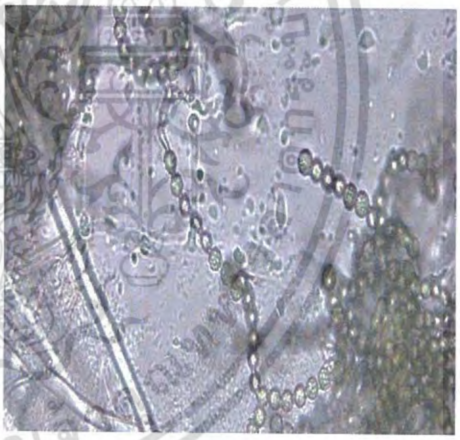
(ข) แสดงภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท PPB 714 ลักษณะเส้นใยเป็นเส้นสายยาวแตกแขนง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก) (ข)

รูปที่ 4.32 (ก) แสดงลักษณะการเจริญบนผิวหน้าอาหารและใต้ผิวอาหารโคโลนีมีสีน้ำตาลอมส้ม ขอบโคโลนีมีสีขาว

(ข) แสดงภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท PPB 413 ลักษณะเส้นใยกลมเรียงต่อกันจับเป็นกลุ่ม



(ก) (ข)

รูปที่ 4.33 (ก) แสดงลักษณะการเจริญบนผิวหน้าอาหารและใต้ผิวอาหารโคโลนีมีสีน้ำตาลเข้ม ขอบโคโลนีมีสีขาว

(ข) แสดงภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท PPB 562 ลักษณะเส้นใยเป็นเส้นสายยาว กลม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 การจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 33 ไอโซเลตด้วยระบบสี The NBS/IBCC Color System

กลุ่ม	หมายเลข ไอโซเลท	เจริญบนอาหาร Starch casein agar	สีเส้นใยบนผิวหน้าอาหาร	สีเส้นใยใต้ผิวหน้าอาหาร	สีของรงควัตถุ
กลุ่มที่ 1	PPA 113	+	#25241d Olive_Black	#403d21 Dark_Olive	#16251C Very Dark Green
	PPB 113	+	#25241dOlive_Black	#403d21 Dark_Olive	#16251C Very Dark Green

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 การจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 33 ไอโซเลตด้วยระบบสี The NBS/IBCC Color System (ต่อ)

กลุ่มที่	หมายเลข	เจริญบนอาหาร Starch casein agar	สีเส้นใยบนผิวหน้าอาหาร	สีเส้นใยใต้ผิวหน้าอาหาร	สีของรงควัตถุ
กลุ่มที่ 1	PPB 214	+	#25241d Olive_Black	#403d21 Dark_Olive	#16251C Very Dark Green
	PPB 232	+	#25241d Olive_Black	#403d21 Dark_Olive	#16251C Very Dark Green
	PPB 313	+	#25241d Olive_Black	#403d21 Dark_Olive	#16251C Very Dark Green
	PPB 614	+	#25241d Olive_Black	#403d21 Dark_Olive	#16251C Very Dark Green
	PPB 823	+	#25241d Olive_Black	#403d21 Dark_Olive	#16251C Very Dark Green
	PPB 1013	+	#25241d Olive_Black	#403d21 Dark_Olive	#16251CVery Dark Green
	PPB 1122	+	#25241d Olive_Black	#403d21 Dark_Olive	#16251CVery Dark Green

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 การจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 33 ไอโซเลตด้วยระบบสี The NBS/IBCC Color System (ต่อ)

กลุ่ม	หมายเลขไอโซเลท	เจริญบนอาหาร Starch casein agar	สีเส้นใยบนผิวหน้าอาหาร	สีเส้นใยใต้ผิวหน้าอาหาร	สีของรงควัตถุ
กลุ่มที่ 2	PPB 222	+	#b2beb5 Light Greenish Gray	#b9b57d Grayish Greenish Yellow	#8D917A Pale Green
	PPA 215	+	#bfb9bd Light Purplish Gray	#b9b57d Grayish Greenish Yellow	#8A7F8E Pale Purplish Blue
	PPA 222	+	#958070 Light Grayish Brown	#e8e3e5 Purplish White	#C4A55F Grayish Greenish Yellow
	PPA 715	+	#958070 Light Grayish Brown	#e8e3e5 Purplish White	#C4A55F Grayish Greenish Yellow
	PPB 613	+	bfb9bd Light Purplish Gray	#403d21 Dark Olive	#8A7F8E Pale Purplish Blue

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 การจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 33 ไอโซเลตด้วยระบบสี The NBS/IBCC Color System (ต่อ)

กลุ่ม	หมายเลข ไอโซเลท	เจริญบนอาหาร Starch casein agar	สีเส้นใยบน ผิวหน้าอาหาร	สีเส้นใยใต้ ผิวหน้าอาหาร	สีของรงควัตถุ
กลุ่มที่ 2	PPB 123	+	#b2beb5 Light Greenish Gray	#b9b57d Grayish Greenish Yellow	#8D917A Pale Green
	PPB 134	+	#b2beb5 Light Greenish Gray	#b9b57d Grayish Greenish Yellow	#8D917A Pale Green
	PPB 512	+	#b2beb5 Light Greenish Gray	#b9b57d Grayish Greenish Yellow	#8D917A Pale Green

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 การจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 33 ไอโซเลตด้วยระบบสี The NBS/IBCC Color System (ต่อ)

กลุ่ม	หมายเลขไอโซเลท	เจริญบนอาหาร Starch casein agar	สีเส้นใยบนผิวหน้าอาหาร	สีเส้นใยใต้ผิวหน้าอาหาร	สีของรงควัตถุ
กลุ่มที่ 3	PPB 624	+	#b9b57d Grayish_Greenish Yellow	#b9b57d Grayish_Greenish Yellow	#C4A55F **Grayish Greenish Yellow**
	PPA 1013	+	#b9b57d Grayish_Greenish Yellow	#e8e3e5 Purplish_White	#8D917A **Pale Green**
	PPB 322	+	#b9b57d Grayish_Greenish Yellow	#b9b57d Grayish_Greenish Yellow	#8D917A **Pale Green**
	PPB 342	+	#b9b57d Grayish_Greenish Yellow	#C4A55F **Grayish Greenish Yellow**	#8D917A **Pale Green**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 การจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 33 ไอโซเลตด้วยระบบสี The NBS/IBCC Color System (ต่อ)

กลุ่ม	หมายเลขไอโซเลท	เจริญบนอาหาร Starch casein agar	สีเส้นใยบนผิวหน้าอาหาร	สีเส้นใยใต้ผิวหน้าอาหาร	สีของรงควัตถุ
กลุ่มที่ 4	PPB 412	+	#FF6F1A Strong Orange	#B15124 Brownish Orange	#D76E00 Deep Orenge Yellow
	PPB 413	+	#B15124 Brownish Orange	#B15124 Brownish Orange	ไม่สร้าง
	PPB 324	+	#9500C Strong Yellowish Brown	#B15124 Brownish Orange	ไม่สร้าง
	PPB 433	+	#9500C Strong Yellowish Brown	#B15124 Brownish Orange	ไม่สร้าง
	PPB 1032	+	#B15124 Brownish Orange	#B15124 Brownish Orange	ไม่สร้าง
	PPB 833	+	#B15124 Brownish Orange	#B15124 Brownish Orange	ไม่สร้าง
	PPB 632	+	#9500C Strong Yellowish Brown	#B15124 Brownish Orange	ไม่สร้าง
	PPB 914	+	#FF6F1A Strong Orange	#B15124 Brownish Orange	#D76E00 Deep Orenge Yellow

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 การจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 33 ไอโซเลตด้วยระบบสี The NBS/IBCC Color System (ต่อ)

กลุ่ม	หมายเลขไอโซเลท	เจริญบนอาหาร Starch casein agar	สีเส้นใยบนผิวหน้าอาหาร	สีเส้นใยใต้ผิวหน้าอาหาร	สีของรงควัตถุ
กลุ่มที่ 4	PPB 722	+	#FF6F1A Strong Orange	#B15124 Brownish Orange	ไม่สร้าง
	PP1123	+	#FF6F1A Strong Orange	#B15124 Brownish Orange	ไม่สร้าง
	PPB 823	+	#FF6F1A Strong Orange	#B15124 Brownish Orange	ไม่สร้าง
	PPB 714	+	#FF6F1A Strong Orange	#B15124 Brownish Orange	#D76E00 Deep Orenge Yellow

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยที่มีความสามารถในการเจริญบนอาหาร Starch casein agar ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6

จากเชื้อแอคติโนมัยซีททั้งหมด 33 ไอโซเลท นำเชื้อบริสุทธิ์มาเลี้ยงบนอาหาร Starch casein agar ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ทุกไอโซเลทเพื่อคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่เจริญบนอาหาร Starch casein agar ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงสุด ร้อยละ 6 พบว่ามีเชื้อทั้งหมด 23 ไอโซเลทที่สามารถเจริญบนอาหาร Starch casein agar เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6

ตารางที่ 4.4 แสดงการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทบนอาหาร Starch casein agar ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6

หมายเลขไอโซเลท	ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (ร้อยละ)							
	0	0.5	1	2	3	4	5	6
PPA 113	+	+	+	+	+	+	-	-
PPA 222	+	+	+	+	+	+	+	+
PPA 715	+	+	+	+	+	+	+	+
PPA 1013	+	+	+	+	+	+	+	+
PPA 1123	+	+	+	+	+	+	+	+
PPB 113	+	+	+	+	+	+	-	-
PPB 123	+	+	+	+	+	+	+	+
PPB 134	+	+	+	+	+	+	+	+
PPB 214	+	+	+	+	+	-	-	-
PPB 222	+	+	+	+	+	+	+	+
PPB 232	+	+	+	+	+	+	+	+
PPB 313	+	+	+	+	+	-	-	-
PPB 322	+	+	+	+	+	+	+	+
PPB 324	+	+	+	+	+	+	+	+

*** หมายเหตุ ผล + หมายถึง เจริญได้
ผล - หมายถึง ไม่สามารถเจริญได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทบนอาหาร Starch casein agar ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 (ต่อ)

หมายเลขไอโซเลท	ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (ร้อยละ)							
	0	0.5	1	2	3	4	5	6
PPB 342	+	+	+	+	+	+	+	+
PPB 412	+	+	+	+	+	+	+	+
PPB 413	+	+	+	+	-	-	-	-
PPB 433	+	+	+	+	+	+	+	+
PPB 512	+	+	+	+	+	+	+	+
PPB 523	+	+	+	+	+	+	+	+
PPB 613	+	+	+	+	+	+	+	+
PPB 614	+	+	+	+	-	-	-	-
PPB 624	+	+	+	+	+	+	+	+
PPB 632	+	+	+	+	+	+	+	+
PPB 714	+	+	+	+	+	+	+	+
PPB 722	+	+	+	+	+	+	+	+
PPB 724	+	+	+	+	+	-	-	+
PPB 823	+	+	+	+	+	-	-	-
PPB 833	+	+	+	+	+	+	+	+
PPB 914	+	+	+	+	+	+	+	+
PPB 1013	+	+	+	+	+	-	-	-
PPB 1032	+	+	+	+	+	+	+	+
PPB 1122	+	+	+	+	+	+	-	-

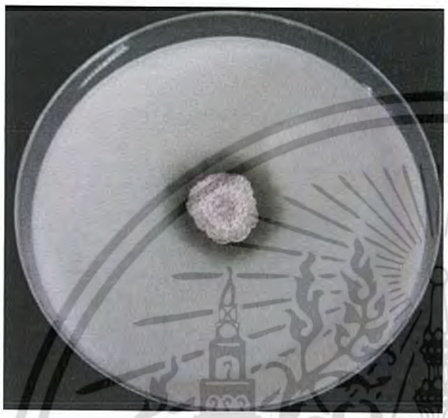
*** หมายเหตุ ผล + หมายถึง เจริญได้

ผล - หมายถึง ไม่สามารถเจริญได้

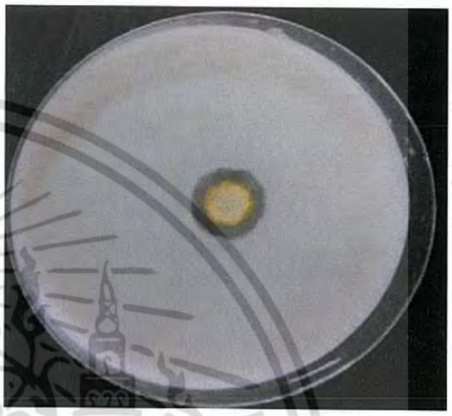
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การคัดเลือกแอคติโนมัยซีทที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์

จากเชื้อแอคติโนมัยซีททั้งหมด 36 ไอโซเลทที่คัดแยกได้ ทำการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถเจริญบนอาหารStarch casein agar ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 6 ทั้งหมด 23 ไอโซเลท เพื่อทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์พบว่ามีเชื้อไอโซเลตที่ PPB134, PPB342 และ PPB512 (รูปที่ 4.34) เกิดวงใส (Clear zone) บนอาหาร Skim milk agar (ภาคผนวก ก) ดังแสดงในตารางที่ 4.5 เนื่องจากเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้ มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ย่อยโปรตีน



(ก)



(ข)

(ค)

รูปที่ 4.34 แสดงความกว้างของวงใส (Clear zone) เชื้อแอคติโนมัยซีททั้งหมด 3 ไอโซเลท ได้แก่ PBB 134 (ก) PPB 342 (ข) และ PPB 512 (ค) บนอาหาร Skim milk agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงความกว้างของวงใส (Clear zone) ของเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 23 ไอโซเลท

หมายเลขไอโซเลท	ขนาดของวงใส ซ้ำที่ 1 (mm)	ขนาดของวงใส ซ้ำที่ 2 (mm)	ขนาดของวงใส ซ้ำที่ 3 (mm)	ค่าเฉลี่ย (mm)
PPA 113	0	0	0	0
PPA 214	0	0	0	0
PPA 222	0	0	0	0
PPA 715	0	0	0	0
PPA 1013	0	0	0	0
PPA 1123	0	0	0	0
PPB 113	0	0	0	0
PPB 123	0	0	0	0
PPB 134	4.0	3.0	4.0	3.67
PPB 214	0	0	0	0
PPB 222	0	0	0	0
PPB 232	0	0	0	0
PPB 313	0	0	0	0
PPB 322	0	0	0	0
PPB 324	0	0	0	0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงความกว้างของวงใส (Clear zone) ของเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 23 ไอโซเลท (ต่อ)

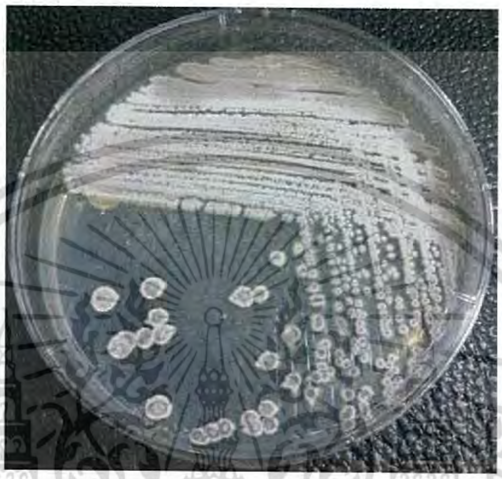
หมายเลขไอโซเลท	ขนาดของวงใส ซ้ำที่ 1 (mm)	ขนาดของวงใส ซ้ำที่ 2 (mm)	ขนาดของวงใส ซ้ำที่ 3 (mm)	ค่าเฉลี่ย (mm)
PPB 342	0.7	0.7	0.6	0.67
PPB 412	0	0	0	0
PPB 413	0	0	0	0
PPB 433	0	0	0	0
PPB 512	1	1.1	2.0	1.37
PPB 523	0	0	0	0
PPB 613	0	0	0	0
PPB 614	0	0	0	0
PPB 624	0	0	0	0
PPB 632	0	0	0	0
PPB 714	0	0	0	0
PPB 722	0	0	0	0
PPB 724	0	0	0	0
PPB 823	0	0	0	0
PPB 833	0	0	0	0
PPB 914	0	0	0	0
PPB 1013	0	0	0	0
PPB 1032	0	0	0	0
PPB 1122	0	0	0	0

งานวิจัยของ สุธีรา และคณะ (2556) ศึกษาการเจริญและสามารถคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทได้จากของเหลือทิ้งจากกระบวนการอุตสาหกรรมเมื่อนำมาทดสอบบนอาหาร Skim milk agar ก็สามารถเกิดวงใส (Clear zone) ได้เช่นเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีททั้งหมด 3 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้มากที่สุด

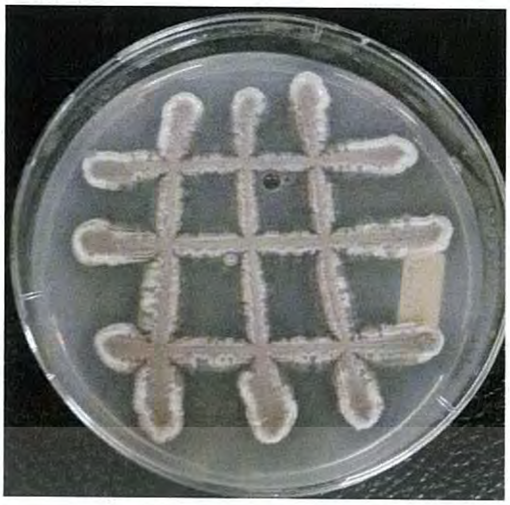
จากผลการทดลองที่ 4.3 ได้ทำการเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทได้ 3 ไอโซเลท ที่เกิดวงใสกว้างมากที่สุดมาทำการทดลองต่อ โดยได้ศึกษาและสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อบนอาหาร Starch casein agar (ภาคผนวก ก) ดังรูปที่ 4.35 - 4.37



รูปที่ 4.35 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทหมายเลข PPB 134 มีลักษณะโคโลนีเรียบแข็ง คล้ายหนังสัตว์หรือกำมะหยี่ เกาะอยู่บนผิวหน้าอาหาร ตรงกลางโคโลนีมีสีเทา ขอบโคโลนีมีสีขาว เส้นใยใต้ผิวอาหารมีสีเทาอมเขียวสว่าง

รูปที่ 4.36 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทหมายเลข PPB 342 มีลักษณะโคโลนีนูนแข็ง คล้ายหนังสัตว์หรือกำมะหยี่ เกาะอยู่บนผิวหน้าอาหาร ตรงกลางโคโลนีสีเทาอ่อน ขอบโคโลนีมีสีขาวเล็กน้อยเส้นใยใต้ผิวอาหารมีสีเทาสว่าง

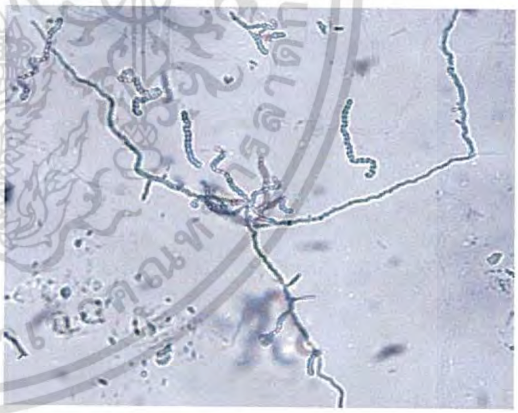
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.37 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทหมายเลข PPB 512 มีลักษณะโคโลนีเรียบแข็งคล้ายกำมะหยี่ เกาะอยู่บนผิวหน้าอาหาร ตรงกลางโคโลนีมีสีเทาเข้มอมเขียว ขอบโคโลนีมีสีขาวเส้นใยใต้ผิวอาหารมีสีเทาอมเหลืองสว่าง

หลังจากได้ทำการศึกษาผลการทดลองที่ 4.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 3 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้มากที่สุด โดยเทคนิค Slide culture เพื่อทำการศึกษาลักษณะของเส้นใย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยายของภาพ 1000 เท่า แสดงผลดังรูปที่ 4.38 - 4.44

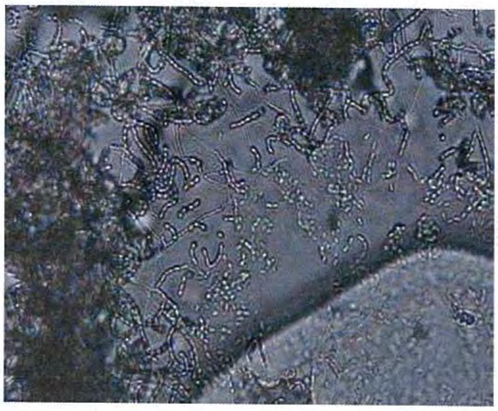
รูปที่ 4.38 การทำ Slide culture และการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทหมายเลขไอโซเลท PPB 134



รูปที่ 4.39 แสดงภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท PPB 134 ลักษณะเส้นใย เป็นท่อนเรียงต่อกันเป็นโซ่ยาว

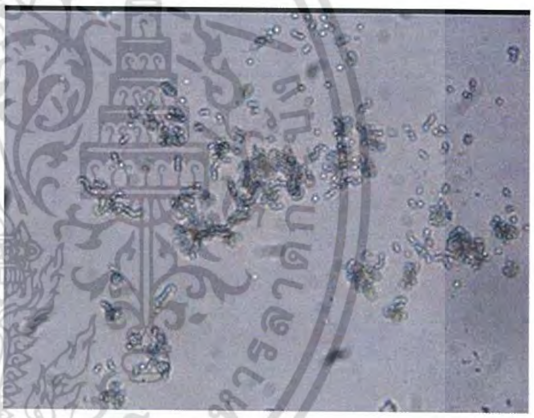
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.40 การทำ Slide culture และการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีท หมายเลขไอโซเลท PPB 342



รูปที่ 4.41 แสดงภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท PPB 342 ลักษณะเส้นใยเป็นท่อนกลมเรียงต่อกันเป็นสายสั้น

รูปที่ 4.42 การทำ Slide culture และการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีท หมายเลขไอโซเลท PPB 512



รูปที่ 4.44 แสดงภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท PPB 512 ลักษณะเส้นใยเป็นท่อนรียาวเรียงต่อกันเป็นสายสั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 การตรวจสอบค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

จากการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยการเกิดวงใส (clear zone) รอบโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทบนอาหาร Skim milk agar จากนั้นทำการคำนวณหาสปอร์เริ่มต้นของเชื้อที่ทำให้เกิดวงใสสูงที่สุดทั้งหมด 3 ไอโซเลท ด้วยวิธีการ Spore pre-germination (ภาคผนวก ง) และสกัดเอนไซม์จากเชื้อแอคติโนมัยซีทโดยทำตามขั้นตอนที่ 3.12 ต่อมาจึงทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสโดยใช้วีธี Azocasein method (ภาคผนวก ค) เพื่อตรวจหาค่ากิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรดและด่างแตกต่างกันโดยนำเอนไซม์ที่สกัดได้มาทดสอบหาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ตามหัวข้อที่ 3.8 ใช้วีธี Azocasein method (ภาคผนวก ค) ซึ่งบัฟเฟอร์ที่ใช้ ได้แก่ Citrate - phosphate buffer (pH 7), Boric acid-bores buffer (pH 8),Tris-HCl buffer (pH 8), Tris-HCl buffer (pH 9), Boric acid-bores buffer (pH 9), Sodium borate buffer (pH 10), sodium bicarbonate buffer (pH 10 และpH 11) (ภาคผนวก ค) และทำการวัดค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer แสดงผลดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 แสดงค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส เมื่อนำไปทดสอบกับค่าความเป็นกรดด่าง

หมายเลขไอโซเลท	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์			
	Citrate-phosphate buffer (pH 7)	Tris-HCl buffer (pH 8)	Boric acid-bores buffer (pH 8)	Tris-HCl buffer (pH 9)
PPB 134 (24 ชั่วโมง)	0.0990	0.0700	0.0690	0.0360
PPB 134 (30 ชั่วโมง)	0.0960	0.0780	0.1100	0.1050
PPB 342 (24 ชั่วโมง)	0.0550	0.0640	0.0390	0.0360
PPB 342 (30 ชั่วโมง)	0.0660	0.0600	0.2600	0.1110
PPB 512 (24 ชั่วโมง)	0.0670	0.0900	0.1610	0.0940
PPB 512 (30 ชั่วโมง)	0.0840	0.1070	0.0910	0.1790

*Control เติมน้ำกลั่นแทนเอนไซม์และสารละลายบัฟเฟอร์

Control ที่เพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ค่าความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร เท่ากับ 0.101

Control ที่เพาะเลี้ยง 30 ชั่วโมง ค่าความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร เท่ากับ 0.119

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 แสดงค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส เมื่อนำไปทดสอบกับค่าความเป็นกรดด่างต่างๆ (ต่อ)

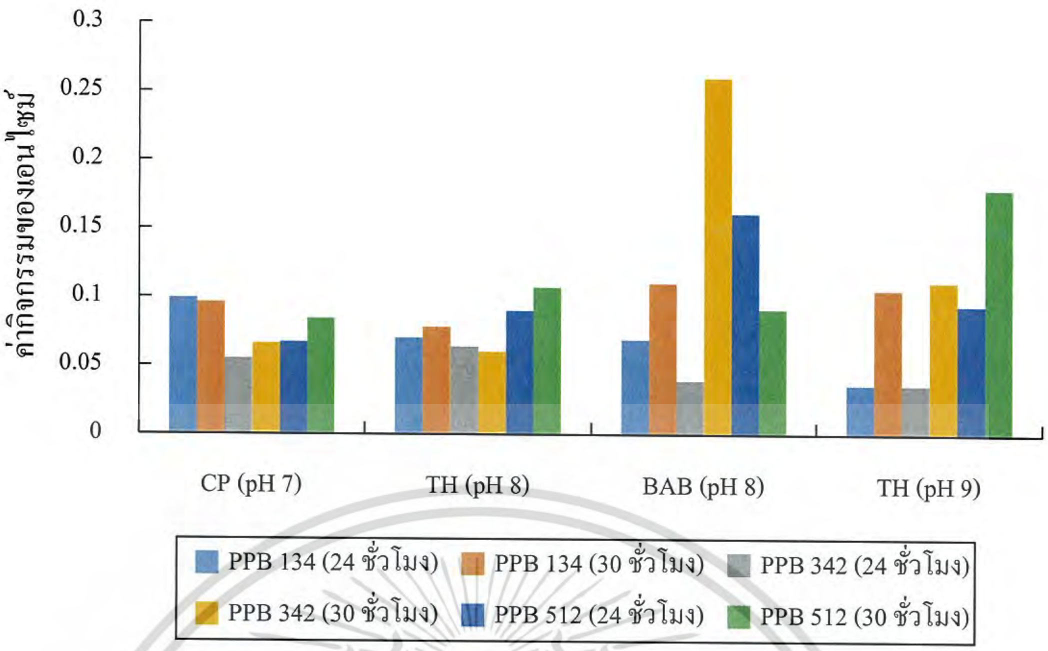
หมายเลขไอโซเลท	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์			
	Boric acid-bores buffer (pH 9)	Sodium borate buffer (pH 10)	sodium bicarbonate buffer (pH 10)	sodium bicarbonate buffer (pH 11)
PPB 134 (24 ชั่วโมง)	0.2550	0.1470	0.0380	0.0620
PPB 134 (30 ชั่วโมง)	0.1000	0.0880	0.0890	0.1285
PPB 342 (24 ชั่วโมง)	0.0410	0.0310	0.0360	0.0650
PPB 342 (30 ชั่วโมง)	0.1110	0.0960	0.0627	0.1160
PPB 512 (24 ชั่วโมง)	0.0520	0.1340	0.0980	0.1210
PPB 512 (30 ชั่วโมง)	0.1190	0.0910	0.1195	0.1090

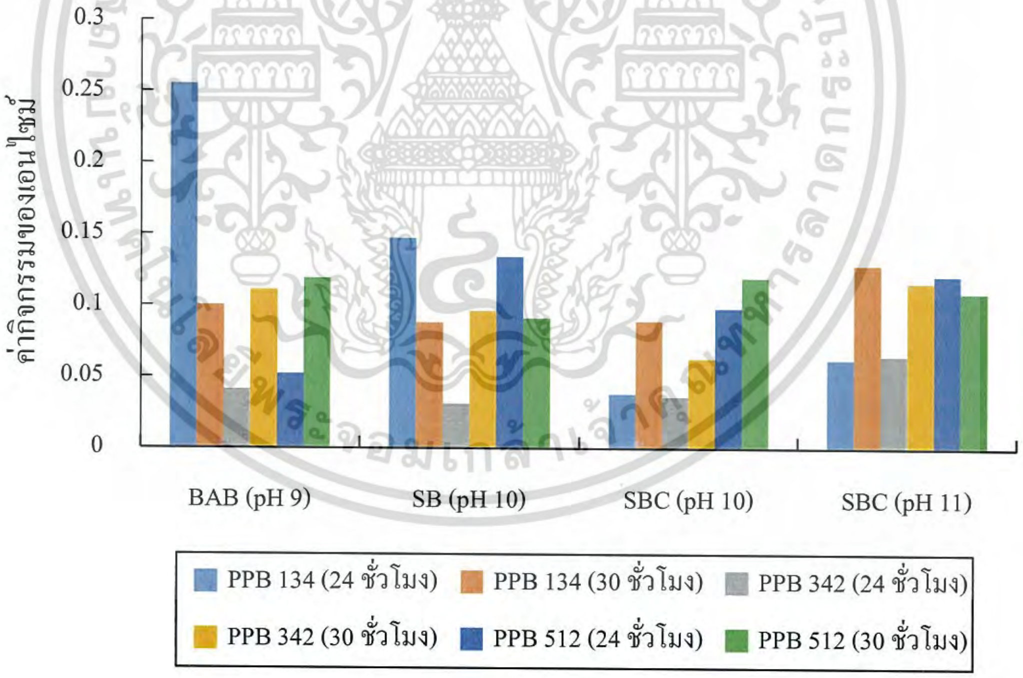
*Control เติมน้ำกลั่นแทนเอนไซม์และสารละลายบัฟเฟอร์

Control ที่เพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ค่าความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร เท่ากับ 0.101

Control ที่เพาะเลี้ยง 30 ชั่วโมง ค่าความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร เท่ากับ 0.119

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้





รูปที่ 4.45 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรดด่างต่างๆกับกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากแอคติโนมัยซีททั้ง 3 ไอโซเลท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

** หมายเหตุ	CP	หมายถึง	Citrate-phosphate buffer (pH 7)
	BAB	หมายถึง	Boric acid-bores buffer (pH 8)
	TH	หมายถึง	Tris-HCl buffer (pH 8 และ pH 9)
	SB	หมายถึง	Sodium borate buffer (pH 10)
	SBC	หมายถึง	sodium bicarbonate buffer (pH 10 และ pH 11)

จากรูปที่ 4.45 พบว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 3 ไอโซเลท ได้แก่ PPB 134, PPB 342 และ PPB 512 ที่ทำการเพาะเลี้ยงในระยะเวลาแตกต่างกัน (24 และ 30 ชั่วโมง) เอนไซม์ที่ได้นั้นจะมีความสามารถในการทำงาน หรือกิจกรรมของเอนไซม์ที่แตกต่างกันไป ถึงแม้ว่าจะเป็นเชื้อไอโซเลทเดียวกัน โดยพบว่า ไอโซเลท PPB 134 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ pH 9 (Tris-HCl buffer) ขณะที่การเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ pH 11 (sodium bicarbonate buffer) ไอโซเลท PPB 342 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ pH 11 (sodium bicarbonate buffer) ขณะที่การเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 30 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ pH 8 (Boric acid-bores buffer) และไอโซเลท PBB 512 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ pH 8 (Boric acid-bores buffer) และการเพาะเลี้ยงที่ 30 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ pH 9 (Tris - HCL buffer) จากผลการทดลองข้างต้น จึงได้เลือกใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดด่างที่ทำให้เกิดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้สูงสุดของแต่ละไอโซเลท เพื่อใช้ในการวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์ต่อไปดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 แสดงผลของค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 3 ไอโซเลท ได้แก่ PPB 134, PPB 342 และ PPB 512 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 และ 30 ชั่วโมง

หมายเลขไอโซเลท	ชนิดของบัฟเฟอร์	pH	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์
PPB 134 (24 ชั่วโมง)	Boric acid-bores buffer	9	0.2550
PPB 134 (30 ชั่วโมง)	Sodium bicarbonate buffer	11	0.1285
PPB 342 (24 ชั่วโมง)	Citrate - phosphate buffer	7	0.0550
PPB 342 (30 ชั่วโมง)	Boric acid-bores buffer	8	0.2600
PPB 512 (24 ชั่วโมง)	Sodium borate buffer	10	0.1340
PPB 512 (30 ชั่วโมง)	Tris-HCl buffer	9	0.1700

จากตารางที่ 4.7 พบว่าไอโซเลท PPB 134 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 30 ชั่วโมง โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 0.2550 และ 0.1285 ในสารละลายบัฟเฟอร์ Boric

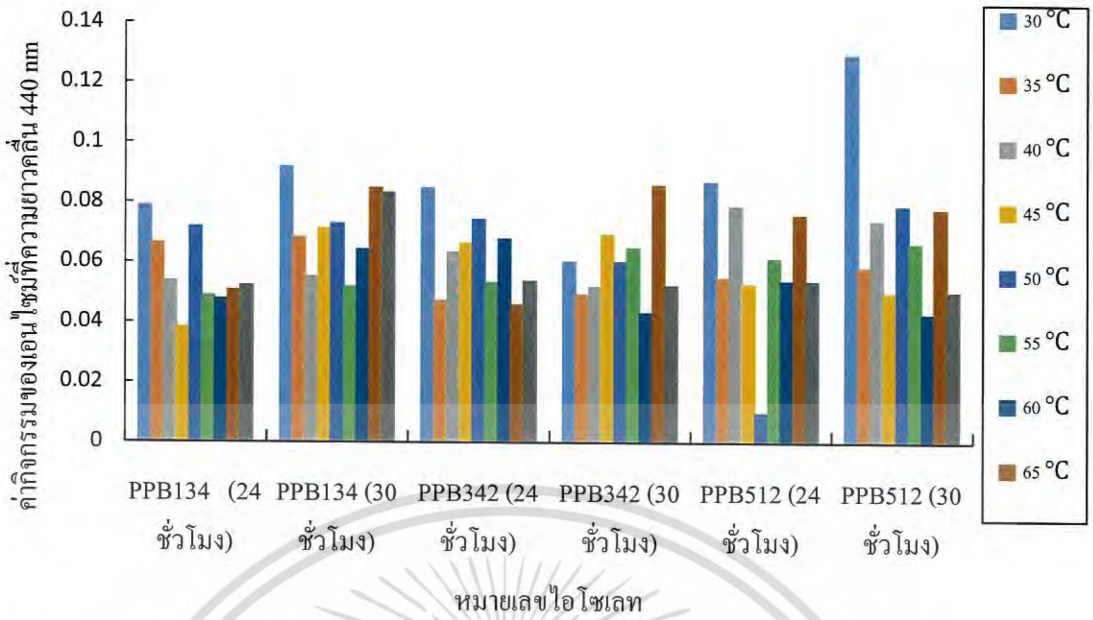
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

acid-bores buffer มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 9 และ Sodium bicarbonate buffer ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 11 ตามลำดับ ไอโซเลท PPB 342 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 และ 30 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 0.0550 และ 0.2600 ในสารละลายบัฟเฟอร์ Citrate - phosphate buffer มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 และ Boric acid-bores buffer มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 ตามลำดับ และไอโซเลท PPB 512 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 30 ชั่วโมง โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 0.1340 และ 0.1700 ในสารละลายบัฟเฟอร์ Sodium borate buffer มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 10 และ ที่ Tris-HCl buffer มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 9 ตามลำดับ โดยค่าที่ได้จากการตรวจหาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งมีความจำเพาะต่อเอนไซม์ที่สกัดได้จากแต่ละไอโซเลทที่ผ่านระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 24 และ 30 ชั่วโมง ซึ่งค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้สูงสุดนั้น จัดได้ว่าเป็นค่าความเป็นกรดด่างที่มีความเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่สกัดได้ (optimum pH) (พัชรา, 2541) และสามารถนำสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเหมาะสมกับกิจกรรมของเอนไซม์ข้างต้น มาใช้ในการวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์ต่อไป

4.7 การตรวจสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

จากการทดสอบหาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธี Azocasein นำเอนไซม์ที่ได้จากการสกัดมาทำการวิเคราะห์อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เพื่อตรวจหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์สกัดได้จากแต่ละไอโซเลทที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 และ 30 ชั่วโมง ซึ่งสามารถวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตรโดยทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดสอบหาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมแต่ทำการเปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม ได้แก่ 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส และเปลี่ยนไปใช้บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมจากข้อ 4.6 จากนั้นวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตรโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ทำการคัดเลือกไอโซเลทที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดจาก 3 ไอโซเลท ที่ได้จากการเก็บตัวอย่างที่เวลา 24 ชั่วโมงและ 30 ชั่วโมง ในขั้นตอนการหาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (ภาคผนวก ช) แสดงดังภาพที่ 4.46 จากกราฟแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ที่ได้จากไอโซเลท PPB 134 ที่ทำการเพาะเลี้ยง 30 ชั่วโมง, PPB 342 ที่ทำการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง และ PPB 512 ที่ทำการเพาะเลี้ยง 30 ชั่วโมง สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดคือ 0.092, 0.085 และ 0.1295 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.46 แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ที่บ่มในอุณหภูมิต่างๆ และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร

จากรูปที่ 4.46 พบว่าเอนไซม์จากเชื้อไอโซเลท PPB 134 และ PBB 512 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 และ 30 ชั่วโมง มีความสามารถในการทำงานหรือค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ขณะที่เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PPB 342 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 และ 30 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดแตกต่างกันคือ การเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมงมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และการเพาะเลี้ยงเวลา 30 ชั่วโมงจะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนั้นเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์จากทั้ง 3 ไอโซเลท และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการทดลองนี้ อยู่ในช่วงการทำงานของเอนไซม์ จากการทดลองของ Ningthoujam และคณะ (2013)ซึ่งพบว่าสามารถสกัดเอนไซม์โปรติเอสจากแอคติโนมัยซีทที่เจริญได้ดีในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือและอุณหภูมิสูง (Alkalithermotolerant Actinomycetes) โดยเอนไซม์ที่ได้มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และพบว่าเอนไซม์ที่ได้มีความสามารถในการทำงานในช่วงของอุณหภูมิกว้างคือ ตั้งแต่ 20-65 องศาเซลเซียส

4.8 การหาสารยับยั้งที่สามารถยังยั้งการทำงานของเอนไซม์

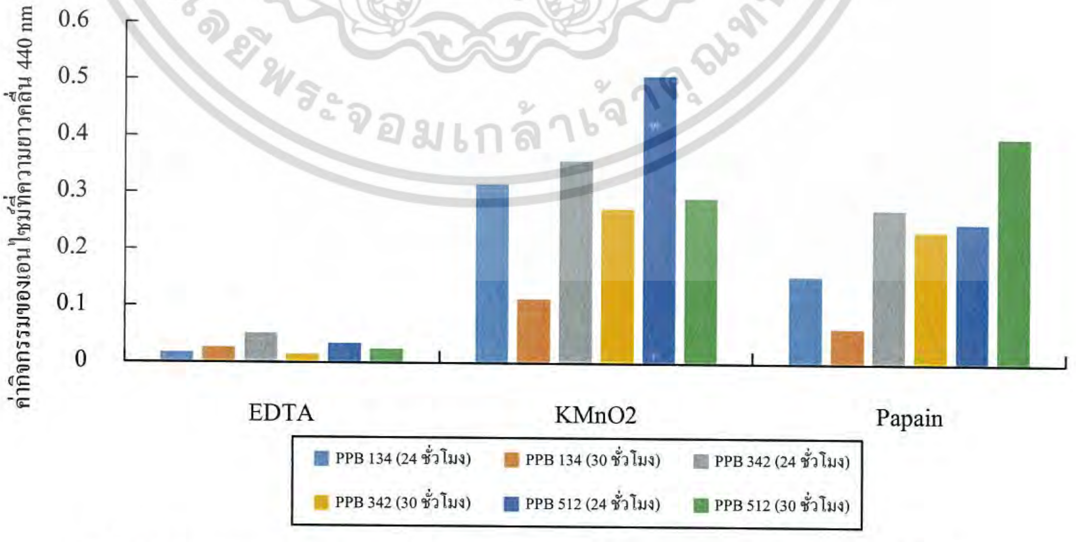
จากการนำเอนไซม์ที่สกัดได้มาทดสอบหาสารยับยั้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์ (Inhibitor) โดยใช้ Inhibitor 3 ชนิด ได้แก่ Ethylene-diamine-tetra-acetic acid (EDTA), KMnO4 และ Papain (ภาคผนวก ค) เพื่อตรวจหาสารยับยั้งที่สามารถยับยั้งการทำงานเอนไซม์ ซึ่งเป็นคุณสมบัติหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการแบ่งกลุ่มของเอนไซม์ตามกลไกการทำงานหรือลักษณะบริเวณเร่งของเอนไซม์ได้เนื่องจากบริเวณเร่งของเอนไซม์นั้นมีกรดอะมิโนในบริเวณเร่งที่แตกต่างกันตามชนิดหรือกลุ่มของเอนไซม์ทำให้สารยับยั้งนั้นมีความสามารถอย่างจำเพาะต่อเอนไซม์บางกลุ่มเท่านั้น โดยใช้บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมจากขั้นตอนการหาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (ข้อที่ 4.6) และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (ข้อที่ 4.7) จากวัดนั้นค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร

ตารางที่ 4.8 แสดงค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์เมื่อนำไปทดสอบกับสารยับยั้งต่างๆ

หมายเลขไอโซเลท	ค่ากิจกรรมเอนไซม์เมื่อนำไปทดสอบกับสารยับยั้งชนิดต่างๆ		
	EDTA	$KMnO_2$	Papain
PPB 134 (24 ชั่วโมง)	0.017	0.315	0.154
PPB 134 (30 ชั่วโมง)	0.026	0.113	0.062
PPB 342 (24 ชั่วโมง)	0.051	0.357	0.2715
PPB 342 (30 ชั่วโมง)	0.014	0.2725	0.2335
PPB 512 (24 ชั่วโมง)	0.0335	0.507	0.248
PPB 512 (30 ชั่วโมง)	0.024	0.291	0.399



รูปที่ 4.47 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวยับยั้งต่างๆและค่ากิจกรรมของเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.47 ผลที่ได้จากการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร พบว่าสารยับยั้ง $KMnO_2$ มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด และไอโซเลทที่วัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้น้อยที่สุด คือ PPB 134 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 ชั่วโมง สารยับยั้ง Papain พบว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเล็กน้อย ซึ่งไอโซเลทที่วัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้น้อยที่สุด คือ PPB 134 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 ชั่วโมง และสารยับยั้ง EDTA มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์น้อยในทุกไอโซเลท โดยไอโซเลทที่วัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้น้อยที่สุด คือ PPB 342 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 ชั่วโมงแสดงให้เห็นว่าสารยับยั้งต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ดีที่สุด คือ EDTA Papain และ $KMnO_2$ตามลำดับ สอดคล้องกับผลการทดลองของ Omran (2005) ที่ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดยใช้สารยับยั้ง EDTA พบว่า สารยับยั้ง EDTA ที่ความเข้มข้น 1.0 mM มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มากถึงร้อยละ 98 และสารยับยั้ง EDTA ที่ความเข้มข้น 50 mM มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ร้อยละ 86 เมื่อทำการศึกษาสารยับยั้ง Papain และ $KMnO_2$ พบว่าสารยับยั้งทั้ง 2 ชนิด สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสได้เช่นเดียวกัน (Zindel*et al*., 2013) แต่ค่าการวัดกิจกรรมของเอนไซม์มีค่ามากกว่าสารยับยั้ง EDTA ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารยับยั้ง Papain และ $KMnO_2$ มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสน้อยกว่าสารยับยั้ง EDTA โดยสามารถแบ่งชนิดของเอนไซม์ได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสารยับยั้งต่างๆ ซึ่งมีความจำเพาะต่อชนิดของเอนไซม์ และการหาสารยับยั้งต่อการทำงานของเอนไซม์จากทั้ง 3 ไอโซเลทข้างต้นพบว่าเอนไซม์ถูกยับยั้งโดยสารยับยั้ง EDTA ได้สูงที่สุดจึงสามารถจัดให้เอนไซม์ดังกล่าวอยู่ในกลุ่มของ metallo proteases (Elhoul*et al*., 2015)

4.9 การหาความเสถียรภาพของเอนไซม์

จากการนำเอนไซม์ที่ได้จากการสกัดไปบ่ม ใน water bath ที่อุณหภูมิ 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส แล้วทำการเก็บเอนไซม์ทุก 10 นาทีครั้งละ 20 ไมโครลิตร จนครบ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทดสอบโดยวิธีการ Azocasine method (ภาคผนวก ค) และต้องใช้บัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมจากขั้นตอนที่ 4.6 ที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ เพื่อตรวจหาความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ เวลาและกิจกรรมของเอนไซม์โดยศึกษาจากค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ณ อุณหภูมิหนึ่งเมื่อเวลาผ่านไป โดยนำไปวัดหาค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร ได้ผลดังตารางที่ 4.9

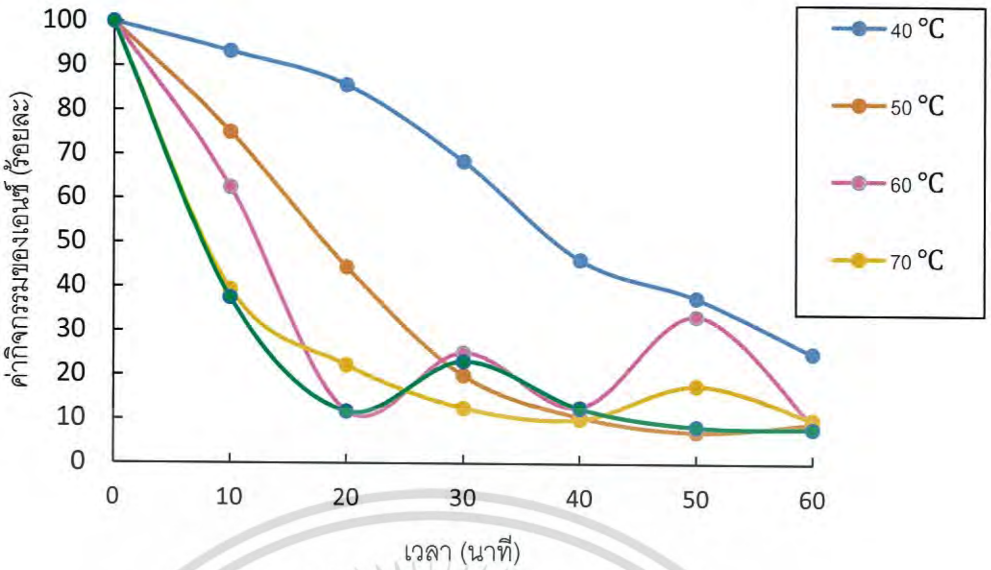
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 แสดงค่าเสถียรภาพของเอนไซม์เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิและเวลาที่แตกต่างกัน

หมายเลขไอโซเลท	อุณหภูมิ/เวลา (นาที)	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ความยาวคลื่น 440 nm					
		10	20	30	40	50	60
PPB 134 (30 ชั่วโมง)	40	0.023	0.017	0.022	0.016	0.012	0.012
	50	0.015	0.013	0.015	0.013	0.011	0.012
	60	0.014	0.011	0.012	0.016	0.014	0.010
	70	0.013	0.011	0.010	0.010	0.012	0.037
	80	0.018	0.011	0.012	0.011	0.010	0.012
PPB 342 (24 ชั่วโมง)	40	0.017	0.025	0.017	0.013	0.011	0.014
	50	0.012	0.015	0.013	0.013	0.011	0.010
	60	0.013	0.010	0.010	0.014	0.009	0.009
	70	0.013	0.010	0.017	0.009	0.019	0.008
	80	0.015	0.011	0.008	0.010	0.009	0.009
PPB 512 (30 ชั่วโมง)	40	0.025	0.025	0.018	0.014	0.013	0.013
	50	0.016	0.014	0.016	0.014	0.013	0.013
	60	0.015	0.015	0.014	0.016	0.009	0.009
	70	0.016	0.015	0.014	0.014	0.015	0.013
	80	0.016	0.017	0.015	0.014	0.014	0.015

จากการหาความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียสพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 3 ไอโซเลท (PPB 134 (30 ชั่วโมง), PPB 342 (24 ชั่วโมง) และ PPB 512 (30 ชั่วโมง)) มีความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ, เวลา และกิจกรรมของเอนไซม์ ดังรูปที่ 4.48 - 4.50

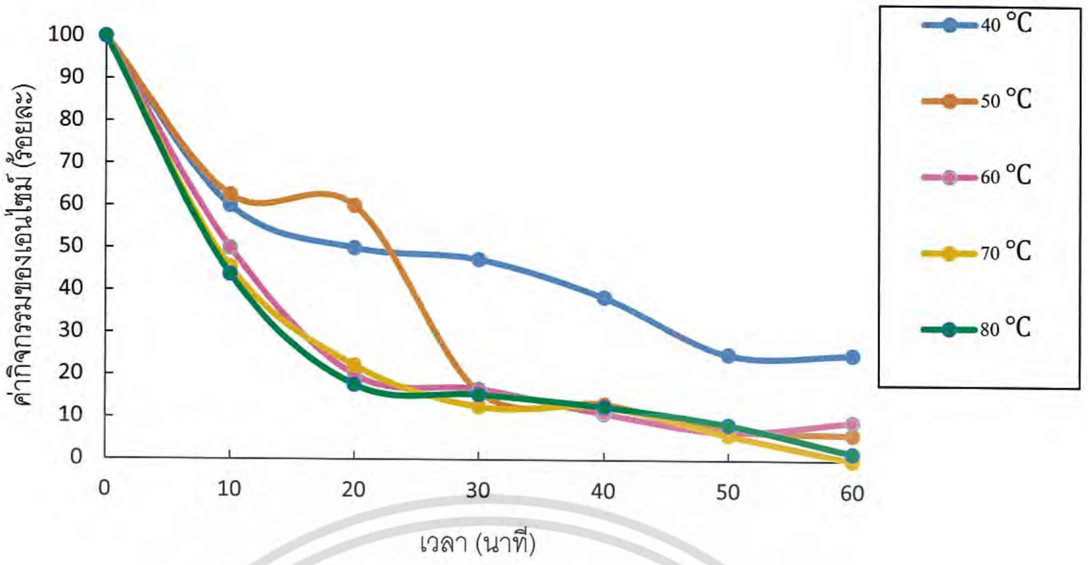
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.48 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ, เวลา และกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากไอโซเลท PPB 134 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 ชั่วโมง

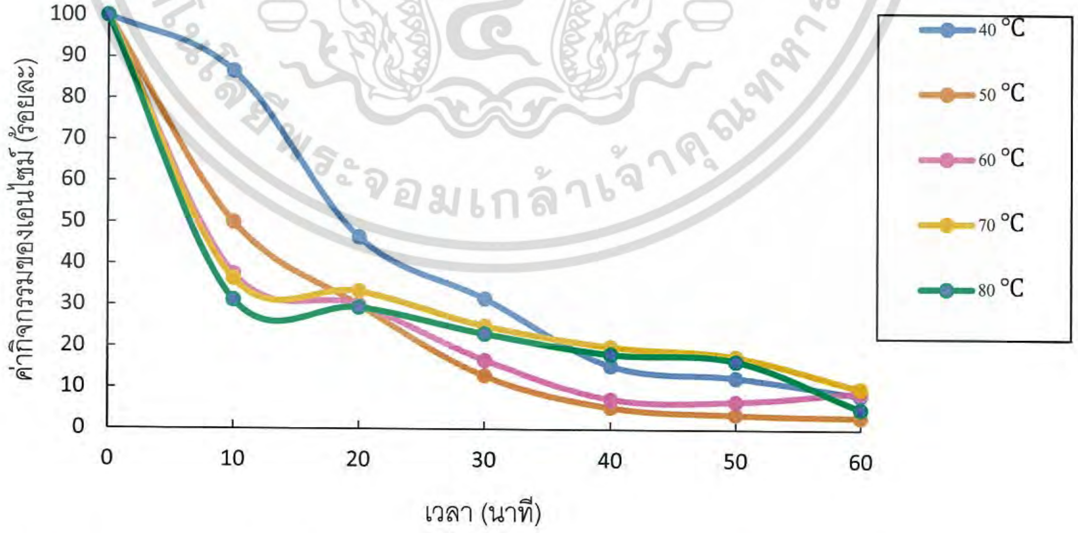
จากรูปที่ 4.48 แสดงให้เห็นว่าไอโซเลท PPB 134 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 ชั่วโมง เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือร้อยละ 25 เมื่อเอนไซม์อยู่ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาทีลดลงเหลือร้อยละ 9.09 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ลดลงเหลือร้อยละ 9.09 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ลดลงเหลือร้อยละ 10.00 ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และลดลงเหลือร้อยละ 8.00 ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.49 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ, เวลา และกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากไอโซเลท PPB 342 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากรูปที่ 4.49 แสดงให้เห็นว่าไอโซเลท PPB 342 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาทีลดลงเหลือร้อยละ 6.06 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ลดลงเหลือร้อยละ 9.09 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ไม่มีกิจกรรมเอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และ ลดลงเหลือเพียงร้อยละ 1.69 ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที



รูปที่ 4.50 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ, เวลา และกิจกรรมของเอนไซม์ ที่ได้จากไอโซเลท PPB 512 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.50 แสดงให้เห็นว่าไอโซเลท PPB 512 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 ชั่วโมง เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือร้อยละ 8.33 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ลดลงเหลือร้อยละ 3.03 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ลดลงเหลือร้อยละ 9.09 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ลดลงเหลือร้อยละ 10 ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และ ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาทีลดลงเหลือเพียงร้อยละ 5.08

จากการทดลองพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 3 ไอโซเลท มีกิจกรรมเอนไซม์อยู่ที่อุณหภูมิ 40 – 50 องศาเซลเซียส และเอนไซม์เสียสภาพการทำงานที่ช่วงอุณหภูมิ 60 - 80 องศาเซลเซียส สามารถสรุปได้ว่าที่อุณหภูมิหนึ่ง เมื่อเวลาผ่านไปค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีทจะมีค่าลดลง เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นและเวลาที่มากขึ้น ทำให้เอนไซม์เสียสภาพการทำงาน จึงมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลง (Tabsri *et al.,* 2016)

จากผลการทดสอบหาความเสถียรของเอนไซม์ข้างต้นพบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีความคลาดเคลื่อน เนื่องจากการทดลองใช้สาร azocasein เป็นสารตั้งต้น (substrate) ซึ่งเอนไซม์จะไปยึดกับ azocasein โดย azocasein มีความจำเพาะต่อเอนไซม์โปรติเอสเท่านั้น ดังทฤษฎีแม่กุญแจ-ลูกกุญแจ (lock-nd-key theory) ที่กล่าวไว้ว่า เอนไซม์จะมีบริเวณเร่ง (active site) ที่มีโครงสร้างเหมาะสมกับโครงสร้างโมเลกุลของสารตั้งต้น เหมือนกับลูกกุญแจที่มีโครงสร้างเหมาะกับแม่กุญแจ ในทางปฏิบัติทางผู้วิจัยทำการละลายสาร azocasein ในน้ำกลั่น พบว่ามีสาร azocasein บางส่วนละลายได้ไม่หมดและจับตัวเป็นก้อน ในส่วนของสาร azocasein ที่ละลายได้นั้นทำให้เอนไซม์โปรติเอสสามารถจับหรือยึดเกาะได้ จึงทำให้สารตั้งต้นที่ไม่ละลายตกตะกอน เมื่อนำไปวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทำให้ค่าที่วัดได้มีความคลาดเคลื่อน

4.10 การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ

จากจำนวนเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้ทั้งหมด 33 ไอโซเลต นำมาทำการคัดเลือกลักษณะเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีความแตกต่างกันจำนวน 3 ไอโซเลท โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะการเจริญของเชื้อ ลักษณะทางสรีรวิทยาและลักษณะทางชีวเคมี (Skim milk agar) เป็นเกณฑ์ในการจัดกลุ่ม จากนั้นนำตัวแทนเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 3 ไอโซเลท ที่แตกต่างกันมาเพาะเลี้ยงเพื่อทำการสกัดน้ำหมักด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดเอธิลอะซีเตต (Ethylacetate) และเมทานอล (methanol) พบว่าไม่มีสารสกัดหยาบในตัวทำละลายชนิดเอธิลอะซีเตต และสารสกัดที่ใช้ เมทานอลเป็นตัวทำละลาย พบว่าสารสกัดหยาบมีปริมาตร 1.1 มิลลิลิตร (1.1 กรัม) จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ 6 ชนิด

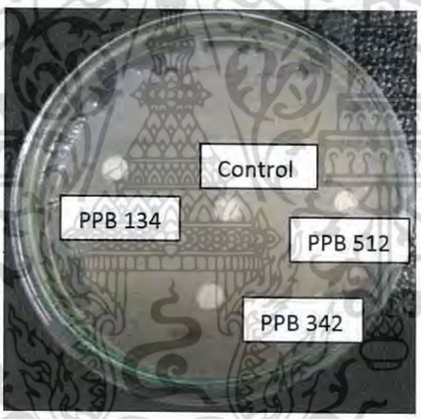
เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยเทคนิค agar disc diffusion (ดังวิธีการทดลอง 3.17.3) โดยนำสารสกัดหยาบที่ได้หยดลงบนแผ่น disc ปริมาตร 5 ไมโครลิตร พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 3 ไอโซเลท (PPB 134, PPB 342 และ PPB 512) ไม่มีการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ เนื่องจากการทดสอบไม่เกิดวงใส (clear zone) แสดงดังตารางที่ 4.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 แสดงผลของการสกัดเอนไซม์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จากเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจำนวน 3 ไอโซเลท

หมายเลขไอโซเลท	*B.subtili* *s*ATTC 6633	*P.aeruginosa* ATCC 27853	*C.albican* *s*ATCC 90028	*E.coli* ATCC 25922	*S.aureus* TISTR 118	*M.luteus* TISTR 2374
PPB 134	-	-	-	-	-	-
PPB 342	-	-	-	-	-	-
PPB 512	-	-	-	-	-	-

จากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATTC 6633 พบว่าไม่เกิดวงใส (Clear zone) บนผิวหน้าอาหาร เนื่องจากเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 3 ไอโซเลท (PPB 134, PPB 342 และ PPB 512) ไม่ผลิตสารยับยั้งทางชีวภาพ จึงไม่มีการผลิตสารบางชนิดที่มีความสามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATTC 6633 ได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.51



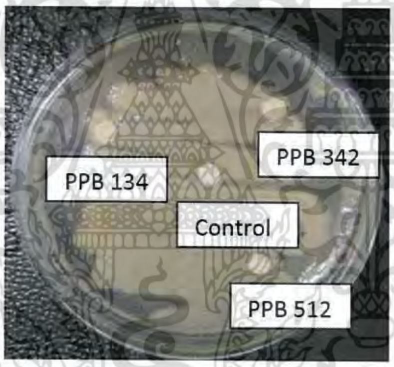
รูปที่ 4.51 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATTC 6633 จากเชื้อแอคติโนมัยซีท หมายเลขไอโซเลท PPB 134, PPB 342 และ PPB 512

จากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 พบว่าไม่เกิดวงใส (Clear zone) บนผิวหน้าอาหาร เนื่องจากเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 3 ไอโซเลท (PPB 134, PPB 342 และ PPB 512) ไม่ผลิตสารยับยั้งทางชีวภาพ จึงไม่มีการผลิตสารบางชนิดที่มีความสามารถยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.52 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 จากเชื้อแอคติโนมัยซีท หมายเลขไอโซเลท PPB 134, PPB 342 และ PPB 512

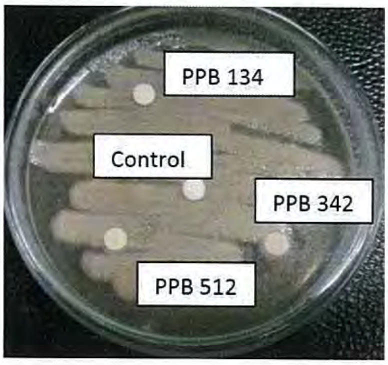
จากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* ATCC 90028 พบว่าไม่เกิดวงใส (Clear zone) บนผิวหน้าอาหาร เนื่องจากเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 3 ไอโซเลท (PPB 134, PPB 342 และ PPB 512) ไม่ผลิตสารยับยั้งทางชีวภาพ จึงไม่มีการผลิตสารบางชนิดที่มีความสามารถยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* ATCC 90028 ได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.53



รูปที่ 4.53 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* ATCC 90028 จากเชื้อแอคติโนมัยซีท หมายเลขไอโซเลท PPB 134, PPB 342 และ PPB 512

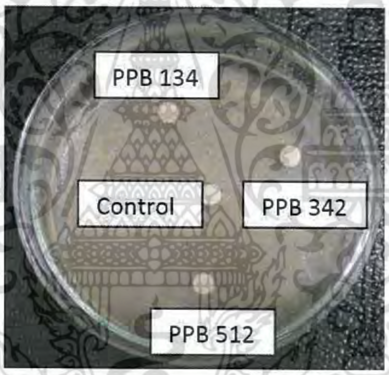
จากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *E.coli* ATCC 25922 พบว่าไม่เกิดวงใส (Clear zone) บนผิวหน้าอาหาร เนื่องจากเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 3 ไอโซเลท (PPB 134, PPB 342 และ PPB 512) ไม่ผลิตสารยับยั้งทางชีวภาพ จึงไม่มีการผลิตสารบางชนิดที่มีความสามารถยับยั้งเชื้อ *E.coli* ATCC 25922 ได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

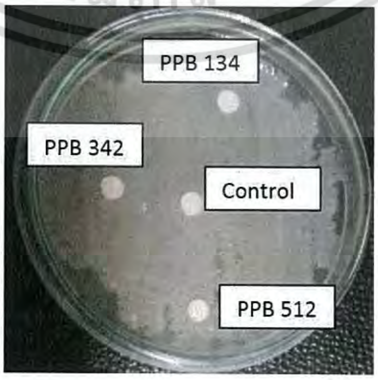


รูปที่ 4.54 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E.coli* ATCC 25922 จากเชื้อแอคติโนมัยซีท หมายเลขไอโซเลท PPB 134, PPB 342 และ PPB 512

จากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S.aureus* TISTR 118 พบว่าไม่เกิดวงใส (Clear zone) บนผิวหน้าอาหาร เนื่องจากเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 3 ไอโซเลท (PPB 134, PPB 342 และ PPB 512) ไม่ผลิตสารยับยั้งทางชีวภาพ จึงไม่มีการผลิตสารบางชนิดที่มีความสามารถยับยั้งเชื้อ *S.aureus* TISTR 118 ได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.55



รูปที่ 4.55 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ จากเชื้อแอคติโนมัยซีท *S.aureus* TISTR 118 หมายเลขไอโซเลท PPB 134, PPB 342 และ PPB 512



รูปที่ 4.56 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ จากเชื้อแอคติโนมัยซีท *Micrococcus luteus* TISTR 2374 หมายเลขไอโซเลท PPB 134, PPB 342 และ PPB 512

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดสอบหาสารยับยั้งทางชีวภาพจากเชื้อแอคติโนมัยซีททั้งหมด 3 ไอโซเลท (PPB 134, PPB 342 และ PPB 512) พบว่าไม่เกิดวงใส (Clear zone) บนผิวหน้าอาหาร เนื่องจากปริมาตรและความเข้มข้นสารละลายของสารสกัดหยาบน้อยเกินไป ซึ่งทางผู้วิจัยได้เตรียมสารละลายของสารสกัดหยาบปริมาตร 5 ไมโครลิตรต่อดิสก์ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้ผลการทดสอบพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 3 ไอโซเลท ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้ ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงมีข้อเสนอแนะว่า ควรเตรียมสารละลายของสารสกัดหยาบให้มีปริมาตรและความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจากงานวิจัยของ Grebreyohannes และคณะ (2013) ได้ทำการวิจัยเกี่ยวกับความสามารถในการผลิตสารยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากน้ำและตะกอน รายงานว่าวิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพด้วยเทคนิค agar disc diffusion นั้น มีการเตรียมสารละลายของสารสกัดหยาบปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อดิสก์ ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยที่ดิสก์มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ผลการทดสอบของงานวิจัยนี้พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาตรและความเข้มข้นสารละลายของสารสกัดหยาบที่เหมาะสม มีผลต่อการทดสอบหาสารยับยั้งทางชีวภาพ

จากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 พบว่าไม่เกิดวงใส (Clear zone) บนผิวหน้าอาหาร เนื่องจากเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 3 ไอโซเลท (PPB 134, PPB 342 และ PPB 512) ไม่ผลิตสารยับยั้งทางชีวภาพ จึงไม่มีการผลิตสารบางชนิดที่มีความสามารถยับยั้งเชื้อ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 ได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการทดลองเอนไซม์โปรติเอสและฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของแอคติโนมัยซีท จากดินนาเกลือ ตำบลนาโคก จังหวัดสมุทรสาคร พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทได้ทั้งหมด 33 ไอโซเลท จากการเก็บตัวอย่างดินนาเกลือ 2 แหล่ง ครั้งละ 11 จุด การเก็บตัวอย่างดินครั้งที่ 1 มีค่าความกรดด่างตั้งแต่ 7.81 – 8.07 มีค่าความชื้นโดยเฉลี่ยร้อยละ 49.42 และการเก็บตัวอย่างดินครั้งที่ 2 มีค่าความกรดด่างตั้งแต่ 7.96 – 8.27 มีค่าความชื้นโดยเฉลี่ยร้อยละ 48.64 และคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถเจริญได้บนอาหาร Starch csein agar (SCA) ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6 ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดของเกลือโซเดียมตลอไรด์ โดยพบว่ามี 23 ไอโซเลท สามารถเจริญได้ จึงนำทั้ง 23 ไอโซเลท ที่ได้มาทดสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอส

จากการศึกษาเอนไซม์โปรติเอสพบว่ามี 3 ไอโซเลท ได้แก่ PPB 134, PPB 342 และ PPB 512 เกิดการสร้างเอนไซม์ เนื่องจากการเกิดวงใสบนอาหารที่ใช้ในการทดสอบ (skim milk agar) จึงนำเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 3 ไอโซเลท มาทำการสกัดเอนไซม์โปรติเอส โดยการเก็บตัวอย่าง 24 ชั่วโมง และ 30 ชั่วโมง และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยการตรวจสอบค่าความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ สารยับยั้ง และความเสถียรด้วยวิธี azocasein method

จากการตรวจหาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ซึ่งมีความจำเพาะต่อเอนไซม์ที่สกัดได้จากแต่ละไอโซเลท ที่ผ่านระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 24 และ 30 ชั่วโมง พบว่าไอโซเลท PPB 134 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 30 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 0.2550 และ 0.1285 ในสารละลายบัฟเฟอร์ Boric acid-bores buffer มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 9 และ Sodium bicarbonate buffer ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 11 ตามลำดับ ไอโซเลท PPB 342 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 และ 30 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 0.0550 และ 0.2600 ในสารละลายบัฟเฟอร์ Citrate - phosphate buffer มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 และ Boric acid-bores buffer ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 ตามลำดับและไอโซเลท PPB 512 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 30 ชั่วโมง โดยมีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 0.1340 และ 0.1700 ในสารละลายบัฟเฟอร์ Sodium borate buffer มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 10 และ ที่ Tris-HCl buffer มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 9 ตามลำดับ

จากการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์พบว่าเอนไซม์จากเชื้อไอโซเลท PPB 134 และ PBB 512 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 และ 30 ชั่วโมง มีความสามารถในการทำงานหรือค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ขณะที่เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PPB 342 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 และ 30 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่แตกต่างกันคือ การเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และการเพาะเลี้ยงเวลา 30 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส สามารถกล่าวได้ว่าเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 3 ไอโซเลท นั้นสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดสอบหาสารยับยั้งที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดได้ ถูกยับยั้งโดย Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ได้สูงสุด และ Papain สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้เล็กน้อย แต่เมื่อทดสอบกับ Potassium permanganate ($KMnO_4$) พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมสูงมากขึ้น 1-4 เท่า ซึ่งทำให้สามารถจัดกลุ่มของเอนไซม์ที่ได้จากทั้ง 3 ไอโซเลทได้ว่าอาจจะอยู่ในกลุ่มของ metallo proteases เนื่องจากสามารถถูกยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ดีโดยสารยับยั้ง EDTA

จากการทดสอบหาเสถียรภาพของเอนไซม์โปรติเอส พบว่าเสถียรภาพของเอนไซม์อยู่ในช่วงอุณหภูมิ 40 -50 องศาเซลเซียส ซึ่งยังมีกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ เมื่อเวลาผ่านไปทุก 10 นาทีเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเล็กน้อย และที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 0-10 นาที พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็ว แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์เสียสภาพการทำงานที่อุณหภูมิสูงกว่า 70 องศาเซลเซียส

จาการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพจากเชื้อแอคติโนมัยซีทกับเชื้อจุลินทรีย์ 6 สกุล ได้แก่ *Bacillus subtilis*ATTC 6633, *Staphylococcus aureus*TISTR 118, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa*ATCC 27853, *Micrococcus luteus*TISTR 2374 และ *Candida albicans* ATCC 90028 พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 3 ไอโซเลท ที่เพาะเลี้ยงเพื่อสกัดน้ำหมักด้วยเมทานอลไม่เกิดการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ เนื่องจากการคำนวณความเข้มข้นสารสกัดและใช้สารสกัดในปริมาณที่น้อยเกินไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 จากการศึกษางานวิจัยในครั้งนี้ สามารถคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีจำนวนหลากหลายได้จากการเก็บตัวอย่างดินจากนาเกลือ ตำบลนาโคก จังหวัดสมุทรสาคร 2 แหล่งจึงควรมีการเก็บตัวอย่างดินนาเกลือจากพื้นที่อื่นเพื่อนำมาเปรียบเทียบหาความหลากหลายทางชีวภาพของแอคติโนมัยซีทจากแหล่งต่างๆ

5.2.2 จากการศึกษางานวิจัยในครั้งนี้หากมีการศึกษาต่อเพื่อหาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพและเอนไซม์โปรติเอสในกลุ่มแอคติโนมัยซีท เช่น ปริมาณเริ่มต้นของสปอร์ปัจจัยต่างๆของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ ระยะเวลาและความเร็วรอบในการเพาะเลี้ยง (Elhoul*et al.*, 2015) รวมไปถึงวิธีการสกัดสารทุติยภูมิให้มีความบริสุทธิ์และได้สารดังกล่าวในปริมาณสูงเพื่อสามารถนำความรู้ที่ได้ไปใช้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรมในด้านการใช้ประโยชน์จากสารยับยั้งทางชีวภาพและเอนไซม์

5.2.3 จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้ทำเพียงการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เท่านั้นจึงทำให้ทราบลักษณะของเอนไซม์ได้จากค่าความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ สารยับยั้งและความเสถียรซึ่งเป็นปัจจัยที่สามารถนำมาใช้ในเอกลักษณ์ของเอนไซม์ได้เพียงเบื้องต้น จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในระดับโมเลกุลเพื่อทำให้งานวิจัยมีความสมบูรณ์มากขึ้นและสามารถนำประโยชน์จากการวิจัยมาประยุกต์ใช้ได้มากขึ้น

5.2.4 ควรมีการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อแอคติโนมัยซีทตลอดจนการการศึกษาการตัดต่อยีนเพื่อให้เชื้อแอคติโนมัยซีทสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสและสารยับยั้งทางชีวภาพที่ต้องการได้ในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กิ่งจันทน์มะลิซ้อน. 2555. **ความหลากหลายของแอคติโนแบคทีเรียในดิน**. อุดรธานี : สาขาวิชาชีววิทยาคณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.

จิตติมา เจริญพานิช. 2553.**เอนไซม์วิทยา.** พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: โอ.เอส. พริ้นติ้งเฮ้าส์,..

ดร.ชัยสิทธิ์ นิยะสม. "การคัดแยกและคัดเลือกแอคติโนมัยซีทที่ผลิตสารออกฤทธาทางชีวภาพจากดินบริเวณมหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง".2556. สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

นริศเกื้อกุลพัฒนา, จักตุรงค์โอวาทและพีระพลทองหาญ. 2557. "การศึกษาฟอสโฟลิปิดและการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกจากดินป่าชายเลนจังหวัดชลบุรี." ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิตสาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรมคณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

บัญญัติ สุขศรีงาม, 2534, จุลชีววิทยาทั่วไป, สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, วังบูรพา, กรุงเทพฯ, 507 หน้า.

ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร. **การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ**: 2551. คณะสัตวแพทศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ปราณี อ่านเปรื่อง. **เอนไซม์ทางอาหาร**.2547.พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ:สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล.**เอนไซม์เทคโนโลยี.**2556.กรุงเทพฯ:สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปิยพัฒน์ สุสานนท์, วณัช เล็กอาราม, อนนท์ วารีกุล, อภิชาต มีป้อ, อัครพล เหล่าลี และ อุดมศักดิ์อินทรีย์. การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเชิงคุณภาพ. สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

มาลิน จุลศิริ. 2532. **ยาต้านจุลชีพ:** ความรู้พื้นฐานและประยุกต์. คณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล. พิมพ์ครั้งที่ 1. 173 หน้า

ลักษมี ศุกระกาญจนะ. 2556. "การคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ." ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, มหาวิทยาลัยศรีนครินทร์วิโรฒ.กรุงเทพฯ

วีระสิทธิ์ กัลยากฤต. 2555. "คุณลักษณะของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรียชอบเกลือความเข้มข้นปานกลาง และความเข้มข้นสูงที่แยกจากน้ำปลา." ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ

ศศิธร ควัฒน์กุล และ กฤตยศ เชาวนปรีชา, 2554, สารสกัดจากสมุนไพรไทยบางชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร, ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ. กรุงเทพฯ

สุธีรา ศรีสมัย. 2013. "การคัดเลือกและศึกษาการเจริญของสเตรปโตมัยซีทในอาหารเหลวที่เตรียมจากน้ำล้างมันฝรั่งและน้ำหางนมกระบือ." ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยาคณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อรัญ หันพงศ์กิตติกูล.**เทคโนโลยีเอนไซม์**.2556. พิมพ์ครั้งที่ 2 .สงขลา : ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ลำแพน พูลสวัสดิ์. เกลือคืออะไร. 2555. กรุงเทพฯ: คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง

ทัศนีย์ จันอินทร์. **เส้นทางสายเกลือ .** 2556. สมุทรสาคร: สำนักงานอุทยานการเรียนรู้สมุทรสาคร

Agbor, A.G., Vinson, A.J. and Donnelly, P.E. 2014. "**Folin-Ciocalteau Reagent for Polyphenolic Assay.**" International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics. 3(8) : 147-156.

Alya, S., Alya, K., Hadder, A., El-Hadj Ali, N.,Basma, GF., Kanoun, S., Nasri, M. 2006. Stabillity of thermostable alkaline protease from*Bacillus lichniformis* RP 1 in commercial solid laundry detergent formulations

Anwar, A.and Saleemuddin, M. 1998. **Alkaline Protease: A Review.** Bioresource Techology. 64(1998) : 175-183.

Ara, I., Najat, A., Bukhari, D. ,Wijayanti, R. and Bakir, M.A. 2012. "Proteolytic activity of alkaliphilic, salt-tolerant actinomycetes from various regions in Saudi Arabia". African Journal of Biotechnology . 11(16) :3849-3857.

Ballav, S., Kerkar, S., Thomas, S. and Augustine, N. 2014. "**Halophilic and halotolerant** actinomycetes from a marine saltern of Goa, India producing anti-bacterial metabolities." *Journal of Bioscience and Bioengineering*. n.d.: 1-8.

Baskaran, R., Vijayakumar, R. and Mohan, P.M. 2011."Enrichment method for the isolation of bioactive actinomycetes from mangrovesediments of Andaman Islands, India. " Malaysian Journal of Microbiology, 7(1) : 26-32.

Blainski, A., Lopes, G.C. and Palazzo, C,J.M. 2013. "Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense"Molecules*. *18*: 6852-6865

Broawyn, M. Marilze, R.H. Craig, S.C Stephanie, G.B. Tuffin, I.M. Cowan, D.A. 2005. Actinobacterial Diversity Associated with Antarctic Dry Velly Mineral Soils.

Chatchawan, T., Peerapornpisal, Y. and Komárek, J. 2011. "Diversity of cyanobacteria in man-made solar saltern, Petchaburi Province,Thailand – a pilot study". Fottea 11(1) : 203–214

Chun, J., Bae, K.S., Moon,E.Y., Jung, S.O., Lee, HK. and Kim, SJ. 2000. *"Nocardiopsis kunsanenesis* sp. nov., amoderately halophilic actinomycete isolated from a saltern". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 50(2000):1909–1913.

Coêlho, D.F., Saturnino, T.P., Fernandes, F.F., Mazzola, P.G., Silveira, E. and Tambourgi E.B.2016. "Azocasein Substrate for Determination of Proteolytic Activity:

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Reexamining a Traditional Method Using Bromelain Samples" Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International.

Debananda, S., Ningthoujam, Kshetri, P., Sanasam, S. and Nimaichand, S. 2009. Halophilic Alkalithermotolerant Indigenous Actinomycetes." World Applied Sciences Journal. 7 (7) : 907-916.

Ellaiah, P.,Srinivasulu, B. and Adinarayana, K. 2002. A Review on Microbial Alkaline Protease. Journal of Scientific & Industrial Research. 61(2002) : 690-704.

Finch, R.G. 1998. Antubiotic resistance. **J. of Antimicrobial Chemotheapy** 42(2): 125-128.

Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H. J., Trujillo, M. E., Suzuki, K. I., Ludwig, W. and Whitman, W. B. 2012. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 5. 2nd ed. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.

Goodfellow, M., Williams, S.T. and Mordarski, M. 1988. Actinomyces in biotechnology. Academic Press Limited, London. 501 p.

Hozzein, N.W. Ahmed, M.B. Abdel Tawab, M.S. 2012. Efficiency of some actinomycetes isolates in biological treatment and removal of heavy metals from wastewater. African Journal of biotechnology. 11(5): 1163-1168.

Jadhav, A.P., Kareparamban, J.A., Nikam, P.H., Kadam, V.J." 2012. Spectrophotometric Estimation of Ferulic Acid from *Ferula asafoetida* by
Folin - Ciocalteu's Reagent." Der Pharmacia Sinica . 3(6):680-684.

Khandan, N.D. and Janardhana, G.R. 2013. Diversity and antimicrobial activities of actinomycetes isolate from soil samples of Kodagu, Karnataka state. India. *International Journal of Microbiology Research.* (5): 404-409.

Kim, S.B. Yoon, J.H. Kim, H. Lee, S.T. Park, Y.H Goodfellow, M. 1995. A Phylogenetic Analysis of the Genus *Saccharomonospora* Conducted with 16S rRNA Gene Sequences. *International Journal of* Systematic Bacteriology. 351-356.

Mohan, R. and Ramasamy, V. 2008. "ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF MARINE ANTAGONISTIC ACTINOMYCETES FROM WEST COAST OF INDIA."Medicine and Biology. 15 (1) : 13 – 19.

Moncheva, P., Tishkov, S., Dimitrova, N., Chipeva, V., Stefka, A.N. and Bogatzevska, N. "CHARACTERISTICS OF SOIL ACTINOMYCETESFROM ANTARCTICA. " JOURNAL OF CULTURE COLLECTIONS Volume 3. 2000-2002, pp. 3-14.

Omran, R.2005. Characterization of Alkaline Protease from Thermoactinomyces sp. Babyion University. (19): 446-456.

Prasad, P. Singh, T. Bedi, S. 2013. Characterization of thecellulorytic enzyme produced by *Streptomyces griseorubens* (Accession No. AB184139) isolated from Indian soil. Journal of King Saud University-Science. (25)3: 245-250.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Procó pioa, R.E.L.,Silvaa, I.R., Martinsa, M.K., Azevedoa, J.L. and Araú jo, J.M.2012. "Antibiotics produced by Streptomyces. " The Brazilian Journal of Infectious Diseases.16 (5) : 466–471.

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 Microbiol Biotechnol. 25: 2103 – 2111.Bisswanger, H. "Enzyme assays" .2014.PerspectivesinScience. (2014) 1: 41–55.

Sharma M. 2014. "Actinomycetes: Source, Identification, and Their Applications" *International .Journal.Current.Microbiology and.Application.Sciences* . 3(2): 801-832.

Suthindhiran, K., Jayasri, M.A., Dipali, D. and Prasar, A. 2014. Screening and characterization of protease producingactinomycetes from marine saltern Journal Basic Microbiol. 54(2014), 1098–1109.

Tang Shu-Kun, Li Wen-Jun, Dong Wang, Zhang Yong-Guang, Xu Li-Hua and Jiang Cheng-Lin .2002. " **Studies of the Biological Characteristics of Some Halophilic and Halotolerant Actinomycetes Isolated from Saline and Alkaline Soils".** Actinomycetol. 17(2002) :06–10.

WAHID, S., FERDOUSE, J. and ANWAR, M. 2009. "Factor Influencing Production and Prooerties of Exracellular Proteasefrom Streptomyces bikiniensis. " The Chittagong Univ. J. B. Sci.,Vol. 4(1 &2):153-163.

Wang, L., Huang,Y., Liu, Z., Goodfellow M.and Rodrı, C. 2006. *Streptacidiphilus oryzae* sp. nov., an actinomycete isolated from rice-field soil in Thailand International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2006) 56 : 1257–1261.

Wahid, S.H.W. Ferdouse, W. Anwar, M.N. 2009. Factor Influencine the Production and Properties of Extracellur Protease from *Streptomyces bikiniensis.* The Chittagong Univ. J.B. 4(1&2): 153-163.

Zahra, D., Homaei, A., Zeinali, F., Sajedi, R.H. and Khajeh, K. 2016. " Extraction and purification of a highly thermostable alkaline caseinolyticprotease from wastes Penaeus vannamei suitable for food anddetergent industries." Food Chemistry 202 (2016): 110–115.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้

Yeast extract malt extract agar (ISP-2)

ส่วนประกอบ

Yaest extract	4	กรัม
Malt extract	10	กรัม
Glucose	4	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 7.3

*ทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธี Autoclave ที่ความดัน 15 psi อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

Starch casein agar (SCA)

ส่วนประกอบ

Soluble starch	10	กรัม	
KNO_3	2	กรัม	เตรียมเป็นสารละลาย
NaCl	2	กรัม	เตรียมเป็นสารละลาย
Casein	0.3	กรัม	เตรียมเป็นสารละลาย
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05	กรัม	เตรียมเป็นสารละลาย
$CaCO_3$	0.02	กรัม	เตรียมเป็นสารละลาย
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01	กรัม	เตรียมเป็นสารละลาย
Agar	15	กรัม	เตรียมเป็นสารละลาย
น้ำกลั่น	1	ลิตร	

pH 7.0-7.2

ละลาย KNO_3, NaCl, Casein, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCO_3$และ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ให้เข้ากันก่อน จากนั้นจึงเติมสารที่เหลือ และเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรตามที่ต้องการ

*ทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธี Autoclave ที่ความดัน 15 psi อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

Skim milk agar

ส่วนประกอบ

Skim milk powder	28	กรัม
Casein enzymatic hydrolysate	25	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Glucose	1	กรัม
Agar	15	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 7.0 ± 0.2 (25°C)

*ทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธี Autoclave ที่ความดัน 15 psi อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

Yeast extract Malt extract broth (YEME)

<u>ส่วนประกอบ</u>

Yaest extract	3	กรัม
Malt extract	10	กรัม
Glucose	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 7.3

*ทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธี Autoclave ที่ความดัน 15 psi อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

Mueller-Hinton agar

<u>ส่วนประกอบ</u>

Beef infusion solids	2	กรัม
Casein hydrolysate	17.5	กรัม
Starch	1.5	กรัม
Agar	17	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 7.3 ± 0.2 (25°C)

*ทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธี Autoclave ที่ความดัน 15 psi อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

Sabouraud's dextrose agar

<u>ส่วนประกอบ</u>

Mycological peptone	10	กรัม
Dextrose	40	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 5.6 ± 0.2 (25°C)

*ทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธี Autoclave ที่ความดัน 15 psi อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมีและบัฟเฟอร์

1. Glycerol 10% (v/v)

Glycerol	10	มล.
น้ำกลั่น	100	มล.

2. Azocasein substrate: เตรียม 2% (w/v) azocasein

Azocasein	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	10	มล.

*ควรใช้ให้หมดวันต่อวัน

3. สารละลายไตรคลอโรแอซิติก (Trichloroacetic acid) : ความเข้มข้นร้อยละ 10

TCA	20	มล.
น้ำกลั่น	180	มล.

***เก็บใส่ขวดสีชา หรือเก็บให้พ้นแสง**

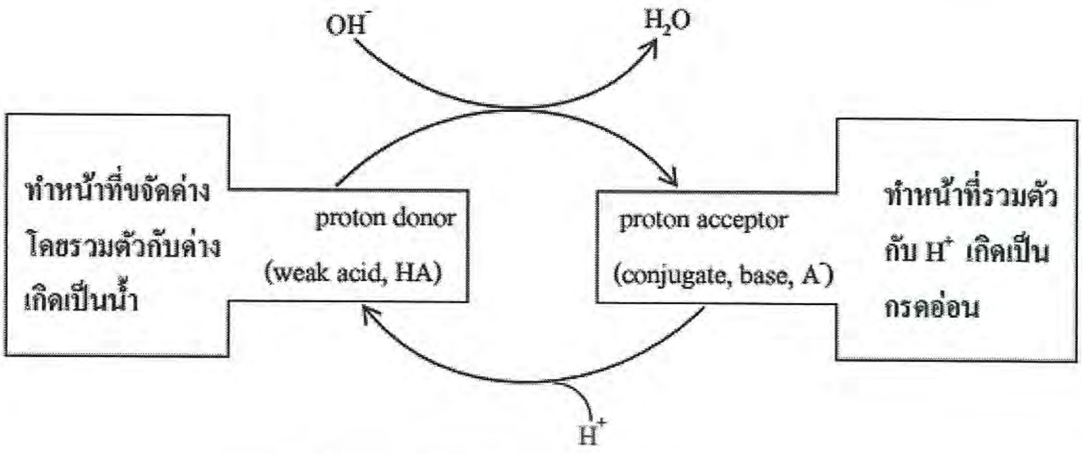
4. NaOH ความเข้มข้น 1 N

NaOH	8	กรัม
น้ำกลั่น	200	มล.

5. บัฟเฟอร์ (ชัยวัฒน์, 2555)

บัฟเฟอร์ คือ สารละลายที่สามารถต่อต้านการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด - ด่าง เมื่อเติมกรดหรือด่างปริมาณเล็กน้อยลงไป ในสารละลายบัฟเฟอร์ประกอบด้วยกรดอ่อน ซึ่งเป็นองค์ประกอบทำหน้าที่ให้โปรตอน (proton donor) และคู่เบสของกรดอ่อนนั้น (conjugate base) ซึ่งเป็นองค์ประกอบทำหน้าที่รับโปรตอน (proton acceptor) ทั้งสององค์ประกอบมีการทำงานที่สรุปได้ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ก แสดงการทำงานของบัฟเฟอร์

หลักการเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ทั่วไป

การที่จะเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ได้นั้นต้องอาศัยสมการที่สำคัญสมการหนึ่งที่เรียกว่าสมการ Henderson – Hasselbalch ซึ่งมีรูปสมการดังนี้

$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{conjugate base (proton acceptor)}]}{[\text{weak acid (proton donor)}]}$$

สมการนี้มีที่มาจากค่าสัมประสิทธิ์การแตกตัวของกรดอ่อน (K_a)

$$HA \overset{K_a}{\rightleftharpoons} H^+ + A^- \qquad K_a = \frac{[H^+] \times [A^-]}{[HA]}$$

$$\log K_a = \log \frac{[H^+] \times [A^-]}{[HA]}$$

$$= \log [H^+] + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad \text{(จากความสัมพันธ์ที่ว่า } \log xy = \log x + \log y\text{)}$$

$$-\log [H^+] = -\log K_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \qquad (pH = -\log [H^+] \text{ และ } pK_a = -\log K_a)$$

ในสมการจะระบุว่า พีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ขึ้นอยู่กับค่า pK_aของกรดอ่อน ดังนั้นการเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชใดพีเอชหนึ่ง สิ่งที่ควรพิจารณาอันดับแรก คือ การเลือกชนิดกรดอ่อน ซึ่งต้องมีค่า pK_aใกล้เคียงกับค่าพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้องการเตรียม ค่า pK_aนี้บ่งบอกถึงความแรงของกรด กรดอ่อนที่มีค่า K_a สูงจะมีการแตกตัวดีกว่าและเป็นกรดที่แรงกว่ากรดอ่อนที่มีค่า K_a ต่ำกรดอ่อนบางชนิดสามารถแตกตัวให้ H^+ได้หลายครั้ง เราเรียกกรดพวกนี้ว่า กรดหลายโปรตอน (polyprotic acid) เช่น กรดฟอสฟอริก ค่า pK_aของสารบางชนิดได้แสดงไว้ในตาราง ข.1

ตาราง ก แสดงค่า pK_a ของกรดอ่อนบางชนิด

	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a3}
กรดฟอสฟอริก (H_3PO_4)			
จากการแตกตัวครั้งที่ 1 $H_3PO_4 \longrightarrow H^+ + H_2PO_4^-$	**2.1**		
จากการแตกตัวครั้งที่ 2 $H_2PO_4^- \longrightarrow H^+ + HPO_4^{2-}$		**6.8**	
จากการแตกตัวครั้งที่ 3 $HPO_4^{2-} \longrightarrow H^+ + PO_4^{3-}$			**12.3**
กรดคาร์บอนิก			
จากการแตกตัวครั้งที่ 1 $H_2CO_3 \longrightarrow H^+ + HCO_3^-$	**6.4**		
จากการแตกตัวครั้งที่ 2 $HCO_3^- \longrightarrow H^+ + CO_3^{2-}$		**10.3**	
ไกลซีน (H_2NCH_2COOH)			
จากการแตกตัวของ $H_3\overset{+}{N}CH_2COOH \longrightarrow H^+ + H_3\overset{+}{N}CH_2COO^-$	**2.4**		
จากการแตกตัวของ $H_3\overset{+}{N}CH_2COO^- \longrightarrow H^+ + H_2NCH_2COO^-$		**9.6**	
กรดแอซีติก			
จากการแตกตัว $CH_3COOH \longrightarrow H^+ + CH_3COO^-$	**4.8**		

เมื่อได้ชนิดของสารที่ใช้เตรียมบัฟเฟอร์แล้ว ลำดับต่อมาที่ต้องพิจารณาคือ การปรับอัตราส่วนของ conjugate base : กรด หรือ [A-]/[HA] ให้ได้พีเอชที่ต้องการโดยอาศัยสมการ Henderson – Hasselbalch อัตราส่วนของ conjugate base : กรดที่จะให้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีสมบัติต้านทานการเปลี่ยนแปลงพีเอชอยู่ระหว่าง 1/10–10/1 กล่าวได้ว่าบัฟเฟอร์ชนิดหนึ่งๆ จะมีช่วงพีเอชที่แสดงคุณสมบัติการต้านทานการเปลี่ยนแปลงพีเอชเท่ากับ $pK_a \pm 1$ ตัวอย่างเช่น แอซีเตทบัฟเฟอร์ที่เตรียมโดยใช้ค่า pK_aของกรดแอซีติก สามารถ ใช้เตรียมบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชอยู่ระหว่าง 3.8 – 5.8 เท่านั้น พ้นจากช่วงพีเอชนี้ไปแล้วสารละลายที่เตรียมขึ้นไม่ถือว่าเป็นสารละลายบัฟเฟอร์แต่อย่างใด เนื่องจากปริมาณกรดอ่อนหรือ conjugate base มีไม่เพียงพอต่อการต้านทานการเปลี่ยนแปลงพีเอชต่อการเติมกรดหรือด่าง เมื่อพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เตรียมขึ้นมีค่าเท่ากับ pK_aของกรดอ่อนที่ใช้เตรียมนั้น หรือความเข้มข้นของกรดอ่อนเท่ากับความเข้มข้นของ conjugate base สารละลายบัฟเฟอร์นี้มีประสิทธิภาพในการต่อต้านการเปลี่ยนแปลงพีเอชสูงสุดประสิทธิภาพในการต่อต้านการเปลี่ยนแปลงพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ (buffer capacity) นอกจากจะขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของ conjugate base (proton acceptor) ต่อกรดอ่อน (proton

เอกสารนี้เป็นเอกสารหลังงานวิจัยสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

donor) แล้ว ยังขึ้นอยู่กับปริมาณของ proton donor และ proton acceptor ที่รวมอยู่ในบัฟเฟอร์นั้น หรืออีกนัยหนึ่งคือ ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งเท่ากับผลรวมความเข้มข้นของ conjugate base และความเข้มข้นของกรดอ่อน โดยที่ประสิทธิภาพการต้านทานการเปลี่ยนแปลงพีเอชจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของบัฟเฟอร์

พีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ยังขึ้นอยู่กับความแรงไอออน (ionic strength) และอุณหภูมิโดยแท้ที่จริงแล้วสมการ Henderson – Hasselbalch มีรูปสมการที่ถูกต้องดังนี้คือ

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]\gamma_{A^-}}{[HA^-]\gamma_{HA}}$$

ซึ่งต้องมีการคูณค่า activity coefficient, γ ของทั้งกรดอ่อนและ conjugate base เข้าไปด้วย การละทิ้งเสียซึ่งค่า γ นี้ ซึ่งทำนายถึงค่าพีเอชของบัฟเฟอร์จะผันแปรกับความแรงไอออน ทำให้บางครั้งค่าพีเอชที่ได้จากการคำนวณไม่ตรงกับค่าพีเอชที่วัดได้ การเติมเกลือ เช่น เกลือโซเดียมคลอไรด์ หรือการเปลี่ยนแปลงปริมาตรของบัฟเฟอร์จะทำให้พีเอชของบัฟเฟอร์เปลี่ยนแปลงไป ผลกระทบนี้มีมากเมื่อเป็นพวกที่มีประจุสูง เช่น ซิเตรท และฟอสเฟต การเจือจางฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.6 จาก 0.5 โมลาร์ ไปเป็น 0.05 โมลาร์ พีเอชจะเพิ่มเป็น 6.9 บัฟเฟอร์ส่วนใหญ่ยังแสดงถึงความสัมพันธ์ของค่า pK_aที่ขึ้นกับอุณหภูมิ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับทริสบัฟเฟอร์ (Tris buffer) บัฟเฟอร์ชนิดนี้มีการเปลี่ยนแปลงประมาณ –0.03 หน่วย pK_a / องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิ 25°C วัดค่าพีเอชได้เป็น 8.08 จะเพิ่มเป็นประมาณ 8.7 ที่ 4°C และลดลงเป็นประมาณ 7.7 ที่ 37°C ข้อมูลปัจจัยเหล่านี้ที่มีผลต่อพีเอชของบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ หาและศึกษาเพิ่มเติมได้จากหนังสือประเภท Handbook of Biochemistry ทั่ว ๆ ไป

พระจอมเกล้าเจ้าคุณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

5.1 Citrate – phosphate buffer (pH 2.6 – pH 7.0)

A : 0.1 M Citric acid (ละลาย Citric acid 21.01 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

B : 0.2 M di-sodium hydrogen phosphate heptahydrate (ละลาย $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 53.65 กรัม หรือ $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 71.7 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

ผสม x มล. ของ A กับ Y มล. ของ B ปรับปริมาตรเป็น 100 มล.

X (มล.)	Y (มล.)	พีเอช
44.6	5.4	2.6
42.2	7.8	2.8
39.8	10.2	3.0
37.7	12.3	3.2
35.9	14.1	3.4
33.9	16.1	3.6
32.3	17.7	3.8
30.7	19.3	4.0
29.4	20.6	4.2
27.8	22.2	4.4
26.7	23.3	4.6
25.2	24.8	4.8
24.3	25.7	5.0
23.3	26.7	5.2
22.2	27.8	5.4
21.0	29.0	5.6
19.7	30.3	5.8
17.9	32.1	6.0
16.9	33.1	6.2
15.4	34.6	6.4
13.6	36.4	6.6
9.1	40.9	6.8
6.5	43.6	7.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 Tris-HCl buffer (pH 7.0 – pH 9.0)

A : 0.2 M Tris (hydroxymethyl) aminomethane (24.2 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

B : 0.2 M HCl (ปิเปตกรดไฮโดรคลอริก 4.2 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

ผสม 50 มล. ของ A กับ X มล. ของ B ปรับปริมาตรเป็น 200 มล.

X มล.	พีเอช
93.2	7.0
91.4	7.1
89.4	7.2
86.8	7.3
84.0	7.4
80.0	7.5
77.0	7.6
73.2	7.7
69.0	7.8
64.0	7.9
58.4	8.0
52.4	8.1
45.8	8.2
39.8	8.3
34.4	8.4
25.4	8.5
24.4	8.6
20.0	8.7
17.0	8.8
14.0	8.9
11.4	9.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.3 Boric acid-borax buffer (pH 7.6 – pH 9.2)

A : 0.1 M Boric acid (12.4 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

B : 0.2 M Borax (19.05 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

ผสม 50 มล. ของ A กับ X มล. ของ B ปรับปริมาตรเป็น 200 มล.

X มล.	พีเอช
2.0	7.6
3.1	7.8
4.9	8.0
7.3	8.2
11.5	8.4
17.5	8.6
22.5	8.7
30.0	8.8
42.5	8.9
59.0	9.0
83.0	9.1
115.0	9.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.4 Sodium borate buffer (pH 9.2 – pH 10.8)

A : 0.025 M $Na_2B_4O_7.10H_2O$(9.5 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

B : 0.1 M NaOH (4 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

ผสม 100 มล. ของ A กับ X มล. ของ B ปรับปริมาตรเป็น 200 มล.

X มล.	พีเอช
1.8	9.2
7.2	9.3
12.4	9.4
17.6	9.5
22.2	9.6
26.2	9.7
30.0	9.8
33.4	9.9
36.6	10.0
39.0	10.1
41.0	10.2
42.6	10.3
44.2	10.4
45.4	10.5
46.6	10.6
47.6	10.7
48.5	10.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.5 Sodium bicarbonate buffer (pH 9.6 – pH 11.0)

A : 0.05 M $NaHCO_3$ (8.4 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

B : 0.1 M NaOH (4 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

ผสม 100 มล. ของ A กับ X มล. ของ B ปรับปริมาตรเป็น 200 มล.

X มล.	พีเอช
10.0	9.6
12.4	9.7
15.2	9.8
18.2	9.9
21.4	10.0
24.4	10.1
27.6	10.2
30.4	10.3
33.0	10.4
35.6	10.5
38.2	10.6
40.4	10.7
42.4	10.8
44.0	10.9
45.4	11.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. Inhibitors

6.1 EDTA 0.2 M

EDTA	5.84	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.

6.2 $KmnO_4$ 0.2 M

$KmnO_4$	3.16	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.

6.3 Papain

Papain	1	มก.
น้ำกลั่น	1	มล.

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
Azocasein method (คะนึงกานต์ และ อัญชลี, 2543)

1. การหาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์
   1) เติม Azocasein substrate 240 ไมโครลิตร ลงใน appendorf
   2) เติม 0.2M buffer 5 ชนิด ได้แก่

      Citrate – phosphate buffer (pH 7)

      Boric acid-borax buffer (pH 8 และ 9)

      Tris-HCl buffer (pH 8 และ 9)

      Sodium borate buffer (pH 10)

      Sodium bicarbonate buffer (pH 10 และ 11)

      ลงใน appendorf จากข้อ 1) หลอดละ 150 ไมโครลิตร โดยทำ buffer ละ 2 ซ้ำ

      *ชุดการทดลองควบคุมเติมน้ำกลั่น
   3) เอนไซม์โปรติเอสที่สกัดจากการเลี้ยงเชื้อในอาหาร NB 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มใน เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นำมาปั่นแยก แล้วปิเปตเอาส่วนใส (supernatant) ใส่ appendorf ละ 1 มิลลิลิตร เติมเอนไซม์ที่ได้นี้ลงใน appendorf จากข้อ 1) หลอดละ 20 ไมโครลิตร (ระหว่างทำการทดลองต้องแช่เอนไซม์ในน้ำแข็งตลอดเวลา เพื่อป้องการเอนไซม์เสื่อมสภาพ)

      *ชุดการทดลองควบคุมเติมน้ำกลั่น 20 ไมโครลิตร
   4) เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
   5) เติมกรด 10% TCA (Trichloroacetic acid) ลงไป appendorf ละ 1.2 มิลลิลิตร **ทันที** เพื่อเป็นการหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์
   6) ทิ้งไว้ 15 นาที เพื่อให้เกิดการตกตะกอน
   7) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
   8) ปิเปตเอาส่วนใสด้านบน 1.4 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มี 1 M ของ NaOH 1.4 มิลลิลิตร แล้วทำการเขย่าให้เข้ากัน
   9) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร โดยใช้ Spectrophotometer
   10) นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟระหว่าง pH ของ buffer กับค่าการดูดกลืนแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การหาอุณหภูมิที่เหมาะสม

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการหาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ แต่ทำการเปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม ได้แก่ 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส เปลี่ยนไปใช้บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมจากกราฟระหว่าง pH ของบัฟเฟอร์กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตรโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer

3. การหาความเสถียรของเอนไซม์

นำเอนไซม์ที่สกัดได้ไปบ่มใน Water bath ที่อุณหภูมิต่างกันดังนี้ 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียสจากนั้นเก็บเอนไซม์ทุกๆ 10 นาทีครั้งละ 20 ไมโครลิตรจนครบ 1 ชั่วโมงทำการทดลองเช่นเดียวกับการหาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์และใช้บัฟเฟอร์ที่ได้จากขั้นตอนการหาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตรโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer

*ชุดทดลองควบคุม ไม่ต้องนำเอนไซม์ไปบ่ม และ Blank ใช้น้ำกลั่นแทน buffer และเอนไซม์

4. การหาสารยับยั้งที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

นำเอนไซม์ที่สกัดได้มาหาสารยับยั้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์ได้โดยใช้สารยับยั้งดังนี้ Ethylene-diamine-tetra-acetic acid (EDTA), $KmnO_4$และ Papain โดยเติมสารยับยั้งกับเอนไซม์ (ต้องแช่เย็นตลอดเวลา) จากนั้นทดสอบด้วยวิธี Azocasein method โดยใช้บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมจากขั้นตอนการหาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์และบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากขั้นตอนการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์และตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตรโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ทำการทดลองดังตารางที่ ค.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข แสดงสารยับยั้งทั้ง 3 ชนิด

Treatment	Enzyme (ไมโครลิตร)	Inhibitor (ไมโครลิตร)	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)	Incubate 4 องศาเซลเซียส 20 นาที	Substrate (ไมโครลิตร)	Buffer (ไมโครลิตร)
EDTA	15	4	2		229	150
$KmnO_4$	15	4	2		229	150
Papain	15	4	2		229	150
Control น้ำกลั่น	15	-	6		229	150
Blank	15	-	6		229	150

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

สูตรคำนวณ

1. Spore pre – germination

คัดเลือกไอโซเลตที่ทำให้เกิดวงใสบนอาหาร Skim milk agar จากนั้นดูดสารละลายสปอร์ของไอโซเลตที่ต้องการ 500 ไมโครลิตรใส่ลงในอาหาร Yeast extract Malt extract broth (YEME) ปริมาตร 50 มิลลิลิตรบ่มในสภาวะเขย่าโดยใช้ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8 ชั่วโมง ทำการเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาทีนาน 10 นาทีเทส่วนใส (Supernatant) ทิ้ง จากนั้นใส่น้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer จากนั้นคำนวณหาปริมาตรของสปอร์ตั้งต้นในแต่ละฟลาสก์

$$C = (OD\ 450/\ 0.04) \times (4x106\ gs\ ml^{-1})$$
$$= OD\ 450 \times 108\ gs\ ml^{-1}$$
$$V = (3 \times 106/C) \times 1000\ \mu l$$

C คือความเข้มข้นที่ได้จากการนำส่วนใสของสารละลายสปอร์ไปทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer
V คือปริมาตรของสปอร์ตั้งต้น

2. การหาน้ำหนักดิน

เทสารแขวนลอยของดินความเจือจางตัวอย่างดินที่ 10^{-1} ลงในบีกเกอร์ที่ทราบน้ำหนักนำบีกเกอร์ไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสจนน้ำระเหยหมดและน้ำหนักคงที่จากนั้นชั่งน้ำหนักของบีกเกอร์อีกครั้งคำนวณน้ำหนักของดินที่ใช้ในการแยกเชื้อจากผลต่างของน้ำหนักบีกเกอร์ก่อนและหลังอบ

$$\text{น้ำหนักดิน (กรัม)} = W_1 - W_2$$

W_1คือ น้ำหนักภาชนะก่อนอบ + น้ำหนักดินก่อนอบ
W_2คือ น้ำหนักภาชนะหลังอบ + น้ำหนักดินหลังอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การหาน้ำหนักตัวอย่างดิน

ตัวอย่างการคำนวณ เช่น ตัวอย่างดิน A

สามารถคำนวณได้ดังนี้ น้ำหนักดิน (กรัม) = $W_1 - W_2$

W_1 คือ น้ำหนักภาชนะก่อนอบ + น้ำหนักดินก่อนอบ

W_2 คือ น้ำหนักภาชนะหลังอบ + น้ำหนักดินหลังอบ

ตัวอย่างดิน 1 = 1.561 – 0.989
= 0.572 กรัม

ตัวอย่างดิน 2 = 1.359 – 0.797
= 0.562 กรัม

ตัวอย่างดิน 3 = 1.49 – 0.92
= 0.57 กรัม

ตัวอย่างดิน 4 = 1.557 – 0.975
= 0.582 กรัม

ตัวอย่างดิน 5 = 1.321 – 0.775
= 0.546 กรัม

ตัวอย่างดิน 6 = 1.365 – 0.739
= 0.626 กรัม

ตัวอย่างดิน 7 = 1.561 – 0.971
= 0.59 กรัม

ตัวอย่างดิน 8 = 1.683 – 1.085
= 0.598 กรัม

ตัวอย่างดิน 9 = 1.643 – 0.921
= 0.722 กรัม

ตัวอย่างดิน 10 = 1.664 – 1.006
= 0.658 กรัม

ตัวอย่างดิน 11 = 1.698 – 0.828
= 0.87 กรัม

3. **การหาปริมาณความชื้น**

ชั่งตัวอย่างดิน 1-2 กรัม ใส่ในถ้วยเซรามิกหรือบีกเกอร์ที่ทราบน้ำหนักนำเซรามิกหรือบีกเกอร์ไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่จากนั้นคำนวณหาปริมาณความชื้นในดินตัวอย่างจากน้ำหนักดินที่หายไป

การคำนวณ

$$\% \text{ ความชื้น} = \frac{(w1 - w2)\ x\ 100}{\text{น้ำหนักดินตัวอย่าง}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างดิน 1 = $\frac{(1.561-0.989)x\,100}{1.275}$

= 44.8627 เปอร์เซ็นต์

ตัวอย่างดิน 2 = $\frac{(1.359-0.797)x\,100}{1.078}$

= 47.3029 เปอร์เซ็นต์

ตัวอย่างดิน 3 = $\frac{(1.49-0.92)x\,100}{1.273}$

= 52.13358071 เปอร์เซ็นต์

ตัวอย่างดิน 4 = $\frac{(1.557-0.975)x\,100}{1.273}$

= 45.9715 เปอร์เซ็นต์

ตัวอย่างดิน 5 = $\frac{(1.321-0.775)x\,100}{1.22}$

= 52.0992 เปอร์เซ็นต์

ตัวอย่างดิน 6 = $\frac{(1.365-0.739)x\,100}{1.326}$

= 59.5057 เปอร์เซ็นต์

ตัวอย่างดิน 7 = $\frac{(1.561-0.971)x\,100}{1.105}$

= 46.6034 เปอร์เซ็นต์

ตัวอย่างดิน 8 = $\frac{(1.683-1.085)x\,100}{1.286}$

= 43.2080 เปอร์เซ็นต์

ตัวอย่างดิน 9 = $\frac{(1.643-0.921)x\,100}{1.333}$

= 55.6669 เปอร์เซ็นต์

ตัวอย่างดิน 10 = $\frac{(1.664-1.006)x\,100}{1.225}$

= 49.2883 เปอร์เซ็นต์

ตัวอย่างดิน 11 = $\frac{(1.698-0.828)x\,100}{1.252}$

= 68.8836 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ
กระดาษสีมาตรฐาน (the NBs/IBCC color system)
(Mundie,1995)

ตารางที่ ค แสดงกระดาษสีมาตรฐาน (the NBs/IBCC color system)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

61 Grayish Brown	5.5yr 3.5 1.8	#5A3D30	
62 Dark Grayish Brown	5.5yr 2.0 1.5	#32221A	
63 Light Brownish Gray	7.0yr 5.4 1.2	#8B6D5C	
64 Brownish Gray	5.65r 3.4 0.9	#503D33	
65 Brownish Black	7.8yr 0.6 0.9	#140F0B	
Orange Yellow, Yellowish Brown			
66 Vivid Orange Yellow	8.6yr 7.3 15.2	#FF8E00	
67 Brilliant Orange Yellow	0.1y 8.1 10.5	#FFB02E	
68 Strong Orange Yellow	9.1yr 7.1 11.6	#FF8E0D	
69 Deep Orange Yellow	8.6yr 6.0 12.1	#D76E00	
70 Light Orange Yellow	9.4yr 8.3 6.8	#FFB961	
71 Moderate Orange Yellow	8.7yr 7.2 8.3	#F7943C	
72 Dark Orange Yellow	9.3yr 6.0 7.9	#C37629	
73 Pale Orange Yellow	9.2yr 8.7 4.4	#FFCA86	
74 Strong Yellowish Brown	8.8yr 4.6 8.5	#95500C	
75 Deep Yellowish Brown	8.8yr 3.1 5.0	#593315	
76 Light Yellowish Brown	8.7yr 6.5 5.0	#BB8B54	
77 Moderate Yellowish Brown	9.5yr 4.4 3.9	#7D512D	
78 Dark Yellowish Brown	9.4yr 2.3 3.3	#3F2512	
79 Light Grayish Yellowish Brown	9.7yr 6.4 2.5	#B48764	
80 Grayish Yellowish Brown	9.5yr 4.6 2.1	#785840	
81 Dark Grayish Yellowish Brown	8.8yr 2.5 1.6	#3D2B1F	
Yellow, Olive Brown			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

126 Dark Olive Green	8.0gy 2.2 3.6	#232C16	
127 Grayish Olive Green	4.6gy 3.5 2.0	#48442D	
128 Dark Grayish Olive Green	5.4gy 2.0 1.8	#27261A	
129 Vivid Yellowish Green	1.1g 5.9 11.2	#379931	
Yellowish Green			
130 Brilliant Yellowish Green	0.3g 7.7 8.6	#8CCB5E	
131 Strong Yellowish Green	0.4g 5.4 8.7	#478430	
132 Deep Yellowish Green	0.9g 3.5 9.0	#00541F	
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	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ในการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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	
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			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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	
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	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

233 Purplish Gray	1.0rp 5.5 0.9	#88706B	
234 Dark Purplish Gray	1.0rp 3.6 1.0	#564042	
235 Purplish Black	9.54p 0.9 0.6	#1B1116	
Reddish Purple			
236 Vivid Reddish Purple	1.0rp 3.0 14.0	#7E0059	
237 Strong Reddish Purple	1.3rp 4.4 10.2	#9A366B	
238 Deep Reddish Purple	1.0rp 2.8 9.5	#641349	
239 Very Deep Reddish Purple	0.9rp 1.9 8.9	#470736	
240 Light Reddish Purple	0.7rp 6.0 6.9	#BB6C8A	
241 Moderate Reddish Purple	0.8rp 4.5 7.0	#8C4566	
242 Dark Reddish Purple	1.3rp 2.8 4.8	#4F273A	
243 Very Dark Reddish Purple	1.5rp 1.0 4.8	#270A1F	
244 Pale Reddish Purple	1.3rp 6.0 4.2	#AC7580	
245 Grayish Reddish Purple	1.0rp 4.5 4.2	#7D4D5D	
Purplish Pink, Purplish Red			
246 Brilliant Purplish Pink	6.0rp 8.5 11.0	#FF97BB	
247 Strong Purplish Pink	5.6rp 6.8 9.0	#F6768E	
248 Deep Purplish Pink	4.4rp 6.0 12.2	#EB5284	
249 Light Purplish Pink	4.6rp 8.0 5.5	#FFA8AF	
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	

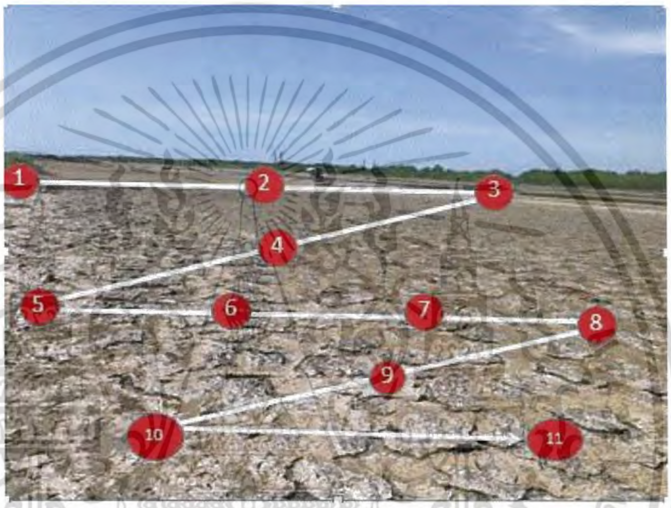
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

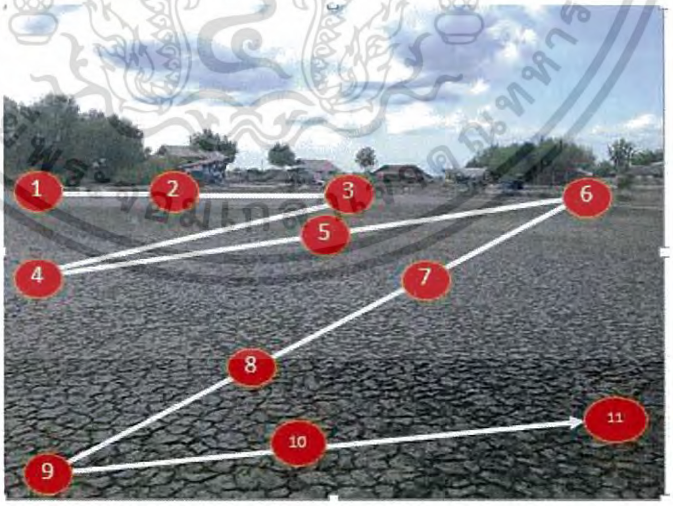
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ
ภาพถ่ายสถานที่เก็บตัวอย่างดิน

- จุดเก็บตัวอย่างดินครั้งที่ 1 (ดิน A) วันที่ 16 สิงหาคม 2558 เป็นตัวอย่างดินจากนาเกลือ ตำบลนาโคก จังหวัดสมุทรสาคร (Latitude 13.453801, Longitude 100.086242)
- จุดเก็บตัวอย่างดินครั้งที่ 2 (ดิน B) วันที่ 5 ตุลาคม 2558 เป็นตัวอย่างดินจากนาเกลือ ตำบลนาโคก จังหวัดสมุทรสาคร (Latitude 13.472713, Longitude 100.114523)



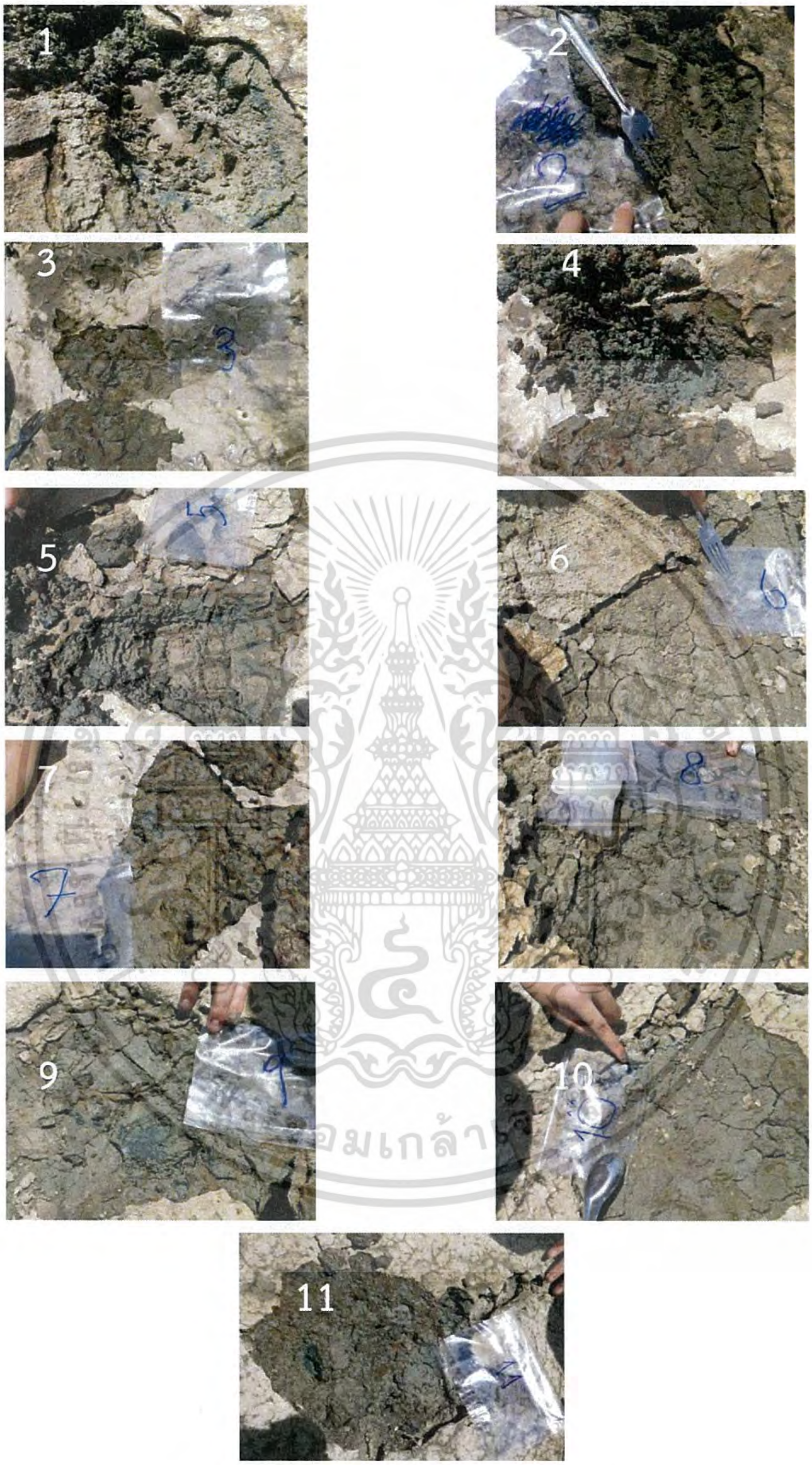
(A)



(B)

รูปที่ ข แสดงลักษณะภูมิประเทศของบริเวณจุดเก็บตัวอย่างดินครั้งที่ 1 (A) และครั้งที่ 2 (B) จากนาเกลือ ตำบลนาโคก จังหวัดสมุทรสาคร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค แสดงจุดเก็บตัวอย่างดิน A ตำแหน่งที่ 1-11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ง แสดงจุดเก็บตัวอย่างดิน B ตำแหน่งที่ 1-11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ช

ผลการทดลอง

ตารางที่ ง แสดงคุณสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่างดิน A

ตัวอย่างดิน	น้ำหนักถ้วยอบ (กรัม)	น้ำหนักดินก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักดินหลังอบ (กรัม)	ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)	pH
1	0.306	1.288	0.982	47.51552795	8.16
	0.267	1.122	0.907	42.95900178	8.11
2	0.285	1.009	0.724	56.49157582	8.32
	0.274	1.115	0.899	43.94618834	8.22
3	0.291	1.252	0.961	46.485623	8.2
	0.266	1.2	0.911	46.25	8.2
4	0.272	1.061	0.789	51.27238454	8.12
	0.254	1.002	0.745	50.99800399	8.15
5	0.281	1.139	0.858	49.34152766	8.22
	0.325	1.252	0.938	51.03833866	8.32
6	0.289	1.051	0.762	54.99524263	8.27
	0.272	1.174	0.899	46.59284497	8.25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง แสดงคุณสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่างดิน A (ต่อ)

ตัวอย่างดิน	น้ำหนักถ้วยอบ (กรัม)	น้ำหนักดินก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักดินหลังอบ (กรัม)	ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)	pH
7	0.287	1.155	0.868	49.6969697	8.12
	0.402	1.299	0.988	54.88837567	8.15
8	0.29	1.228	0.938	47.23127036	8.13
	0.244	1.3	0.999	41.92307692	8.17
9	0.28	1.273	0.993	43.99057345	7.99
	0.272	1.353	1.098	38.95048041	8
10	0.259	1.305	1.046	39.69348659	7.94
	0.273	1.226	0.867	51.5497553	7.98
11	0.29	1.174	0.884	49.40374787	8.01
	0.39	1.119	0.784	64.78999106	8.07

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ แสดงคุณสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่างดิน B

ตัวอย่างดิน	น้ำหนักถ้วยอบ (กรัม)	น้ำหนักดินก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักดินหลังอบ (กรัม)	ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)	pH
1	0.286	1.275	0.989	44.8627451	7.81
	0.28	1.27	0.963	46.22047244	7.91
2	0.281	1.078	0.797	52.13358071	8.08
	0.38	1.273	0.893	59.70149254	8.06
3	0.285	1.205	0.92	47.30290456	7.77
	0.308	1.273	0.993	46.19010212	7.87
4	0.291	1.266	0.975	45.97156398	7.85
	0.273	1.22	0.867	51.31147541	7.85
5	0.273	1.048	0.775	52.09923664	7.86
	0.373	1.326	1.097	45.39969834	7.76
6	0.313	1.052	0.739	59.50570342	7.89
	0.279	1.105	0.746	57.73755656	7.9
7	0.295	1.266	0.971	46.60347551	8
	0.203	1.286	0.869	48.21150855	8
8	0.299	1.384	1.085	43.20809249	7.86
	0.257	1.333	1.026	42.31057764	7.84
9	0.346	1.297	0.921	55.66692367	8
	0.359	1.225	0.975	49.71428571	8.04
10	0.329	1.335	1.006	49.28838951	8.03
	0.323	1.252	0.739	66.77316294	8.02
11	0.435	1.263	0.828	68.88361045	7.99
	0.259	1.325	1.115	35.39622642	8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ฉ แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส เมื่อนำไปทดสอบกับค่าความเป็นกรดด่าง

หมายเลขไอโซเลท	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ความยาวคลื่น 440 nm							
	Citrate-phosphate buffer (pH 7)	Tris-HCl buffer (pH 8)	Boric acid bores buffer (pH 8)	Tris-HCl buffer (pH9)	Boric acid-bores buffer (pH9)	Sodium borate buffer (pH10)	Sodium bicabonate buffer (pH 10)	Sodium bicabonate buffer (pH 11)
PPB 134 (24 ชั่วโมง)	0.047	0.026	0.03	0.025	0.16	0.045	0.026	0.029
	0.104	0.089	0.078	0.023	0.19	0.204	0.025	0.067
PPB 134 (30 ชั่วโมง)	0.063	0.051	0.082	0.075	0.061	0.061	0.07	0.091
	0.066	0.054	0.056	0.066	0.078	0.054	0.038	0.075
PPB 342 (24 ชั่วโมง)	0.024	0.05	0.025	0.022	0.029	0.015	0.017	0.042
	0.063	0.029	0.028	0.025	0.024	0.033	0.038	0.022
PPB 342 (30 ชั่วโมง)	0.031	0.03	0.177	0.07	0.088	0.064	0.05	0.078
	0.071	0.045	0.166	0.082	0.045	0.065	0.247	0.076
PPB 512 (24 ชั่วโมง)	0.019	0.028	0.12	0.123	0.073	0.082	0.063	0.031
	0.097	0.124	0.083	0.25	0.079	0.104	0.07	0.18
PPB 512 (30 ชั่วโมง)	0.056	0.09	0.062	0.114	0.085	0.055	0.083	0.04
	0.057	0.062	0.029	0.131	0.068	0.072	0.073	0.079

ตารางที่ ช แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง

หมายเลขไอโซเลท	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)								
	30	35	40	45	50	55	60	65	70
PPB 134 (24 ชั่วโมง)	0.079	0.0665	0.054	0.0385	0.072	0.049	0.048	0.051	0.0525
PPB 134 (30 ชั่วโมง)	0.092	0.0685	0.0555	0.0715	0.073	0.052	0.0645	0.085	0.0835
PPB 342 (24 ชั่วโมง)	0.085	0.0475	0.0635	0.0665	0.0745	0.0535	0.068	0.046	0.054
PPB 342 (30 ชั่วโมง)	0.0605	0.0495	0.052	0.0695	0.0605	0.065	0.0435	0.086	0.0525
PPB 512 (24 ชั่วโมง)	0.087	0.055	0.079	0.053	0.0101	0.0615	0.054	0.076	0.054
PPB 512 (30 ชั่วโมง)	0.1295	0.0585	0.074	0.05	0.079	0.0665	0.043	0.078	0.0505

ตารางที่ ซ แสดงกิจกรรมของเอนไซม์เมื่อทดสอบกับสารยับยั้งชนิดต่างๆ

หมายเลขไอโซเลท	ค่ากิจกรรมเอนไซม์เมื่อนำไปทดสอบกับสารยับยั้งชนิดต่างๆ				
	EDTA	$KMnO_2$	Papain	Control น้ำกลั่น	Control DMSO
PPB 134 (24 ชั่วโมง)	0.017	0.266	0.082	0.007	0.079
	0.016	0.098	0.144	0.005	0.045
PPB 134 (30 ชั่วโมง)	0.015	0.113	0.037	0.102	0.088
	0.022	0.272	0.05	0.098	0.067
PPB 342 (24 ชั่วโมง)	0.043	0.287	0.266	0.007	0.079
	0.016	0.14	0.011	0.007	0.075
PPB 342 (30 ชั่วโมง)	0	0.199	0.182	0.112	0.054
	0.014	0.147	0.103	0.067	0.062
PPB 512 (24 ชั่วโมง)	0.026	0.377	0.115	0.006	0.09
	0.015	0.26	0.266	0.007	0.061
PPB 512 (30 ชั่วโมง)	0.013	0.207	0.266	0.086	0.081
	0.022	0.168	0.266	0.077	0.078

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ณ แสดงเสถียรภาพของเอนไซม์เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิและเวลาที่แตกต่างกัน

หมายเลขไอโซเลท	อุณหภูมิ/เวลา (นาที)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ความยาวคลื่น 440 nm					
		10	20	30	40	50	60
PPB 134 (30ชั่วโมง)	40	0.023	0.033	0.027	0.015	0.012	0.012
		0.014	0.017	0.022	0.011	0.013	0.012
	50	0.016	0.013	0.015	0.011	0.013	0.012
		0.015	0.012	0.013	0.013	0.011	0.015
	60	0.014	0.023	0.012	0.012	0.014	0.011
		0.019	0.011	0.013	0.016	0.018	0.010
	70	0.013	0.011	0.010	0.010	0.012	0.037
		0.015	0.012	0.018	0.020	0.018	0.033
	80	0.018	0.019	0.012	0.011	0.010	0.012
		0.011	0.020	0.016	0.010	0.015	0.019

ตารางที่ ณ แสดงเสถียรภาพของเอนไซม์เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิและเวลาที่แตกต่างกัน (ต่อ)

หมายเลขไอโซเลท	อุณหภูมิ/เวลา (นาที)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ความยาวคลื่น 440 nm					
		10	20	30	40	50	60
PPB 342 (24ชั่วโมง)	40	0.017	0.023	0.018	0.013	0.025	0.010
		0.020	0.024	0.011	0.012	0.012	0.014
	50	0.012	0.015	0.013	0.013	0.016	0.010
		0.016	0.014	0.012	0.018	0.013	0.009
	60	0.012	0.010	0.010	0.014	0.009	0.010
		0.016	0.020	0.014	0.013	0.010	0.008
	70	0.013	0.010	0.017	0.018	0.013	0.010
		0.025	0.015	0.009	0.009	0.009	0.008
	80	0.015	0.011	0.016	0.010	0.009	0.009
		0.011	0.011	0.008	0.011	0.011	0.033

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ซ แสดงเสถียรภาพของเอนไซม์เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิและเวลาที่แตกต่างกัน (ต่อ)

หมายเลขไอโซเลท	อุณหภูมิ/เวลา (นาที)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ความยาวคลื่น 440 nm					
		10	20	30	40	50	60
PPB 512 (30 ชั่วโมง)	40	0.025	0.015	0.011	0.013	0.011	0.011
		0.011	0.025	0.017	0.014	0.012	0.013
	50	0.013	0.014	0.016	0.011	0.013	0.013
		0.016	0.014	0.012	0.014	0.017	0.011
	60	0.015	0.015	0.014	0.015	0.014	0.013
		0.018	0.021	0.017	0.013	0.017	0.016
	70	0.016	0.015	0.014	0.014	0.015	0.019
		0.011	0.009	0.016	0.016	0.010	0.013
	80	0.016	0.017	0.015	0.014	0.018	0.015
		0.018	0.026	0.019	0.018	0.014	0.022

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล นางสาว ไพลิน พาสมบูรณ์ (ตาล)

E-mail e_chamm@hotmail.com

ประวัติการศึกษา

2553 มัธยมศึกษา (วิทยาศาสตร์ - คณิตศาสตร์) โรงเรียนมัธยมวัดธาตุทอง กรุงเทพมหานคร

2559 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังกรุงเทพมหานคร
กำลังศึกษาต่อวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร

ชื่อ-นามสกุล นางสาว ภรณ์ชนก มนตรี (ฝ้าย)

E-mail fai_49@hotmail.co.th

ประวัติการศึกษา

2554 มัธยมศึกษา (วิทยาศาสตร์ - คณิตศาสตร์) โรงเรียนชลบุรี "สุขบท"ชลบุรี

2559 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังกรุงเทพมหานคร

ชื่อ–นามสกุล นางสาว อรวรรณ แหยมนุช (นีออน)

E – Mail orawan_neon@hotmail.com

ประวัติการศึกษา

2552 มัธยมศึกษาตอนต้นโรงเรียนสวนกุหลาบวิทยาลัย สระบุรี

2554 มัธยมศึกษาตอนปลาย (วิทยาศาสตร์ - คณิตศาสตร์) โรงเรียนหนองแค สรกิจพิทยา สระบุรี

2559 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังกรุงเทพมหานคร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้