



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เอนไซม์โปรติเอสจากแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากดินป่าชายเลนจังหวัดชลบุรี
และคุณสมบัติบางประการในการเพาะเลี้ยงและการทดสอบสารออกฤทธิ์ยับยั้ง
ทางชีวภาพ

Protease form Actinomycetes isolated from mangrove forest soil from
Chonburi province with their culture characterization and antimicrobial activity

ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ

พ.ศ. 2559

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เอนไซม์โปรติเอสจากแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากดินป่าชายเลนจังหวัดชลบุรี
และคุณสมบัติบางประการในการเพาะเลี้ยงและการทดสอบสารออกฤทธิ์ยับยั้ง
ทางชีวภาพ

Protease form Actinomycetes isolated from mangrove forest soil from
Chonburi province with their culture characterization and antimicrobial activity

ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุญชัย

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ

พ.ศ. 2559

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชื่อโครงการ เอนไซม์โปรติเอสจากแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากดินป่าชายเลนจังหวัดชลบุรีและคุณสมบัติ
บางประการในการเพาะเลี้ยงและการทดสอบสารออกฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ

แหล่งเงิน ทุนสนับสนุนวิจัยด้วยเงินรายได้คณะ

ประจำปีงบประมาณ 2559 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี เริ่มตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2558 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2559

ชื่อ-สกุล ดร.คณีนกานต์ กลั่นนุศย์ สังกัดภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยี
พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (หัวหน้าโครงการ)

บทคัดย่อ

ในการศึกษาเพื่อหาเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสสามารถ
แยกเชื้อแอคติโนมัยซีทได้จำนวน 66 ไอโซเลท จากดินป่าชายเลน จังหวัดชลบุรี คัดเลือกไอโซเลท
ที่มีลักษณะแตกต่างกัน 20 ไอโซเลท เพื่อนำมาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์
โปรติเอส สังเกตจากการเกิดวงใสบนอาหารแข็ง Skim milk พบว่ามีเพียง 6 ไอโซเลท ที่เกิดวงใส
บนอาหาร โดยที่เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท NKB720 มีขนาดวงใสสูงที่สุด จึงเลือกเชื้อทั้ง 6 ไอ
โซเลท มาทำการศึกษาต่อไป นำเอา Crude enzyme มาศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์โดยวิธี
Azocasein พบว่าไอโซเลทที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดคือ NKB720 (30 ชั่วโมง) โดยมี
กิจกรรมสูงสุดที่ pH 8 อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 37 องศาเซลเซียส Crude enzyme สามารถถูกยับยั้ง
ด้วย Inhibitor คือ PMSP , 1,10-Phenantroline และ EDTA แต่เอนไซม์จะมีกิจกรรมสูงขึ้นประมาณ
3-4 เท่าเมื่อทดสอบกับ $KMnO_4$ แสดงว่าทั้ง 6 ไอโซเลท นี้เป็นชนิด metalloprotease protease จาก
การบ่มเอนไซม์ 1 ชั่วโมง มีความคงตัวของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 40 - 50 องศาเซลเซียส หลังจาก 80
องศาเซลเซียส เอนไซม์ได้เสียสภาพการทำงาน และไม่มีการยับยั้งเชื้อทดสอบ *Xanthomonas*
campestris, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans*, *Salmonella typhimurium*
TISTR 5562, *E. coli* และ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 เมื่อหยดสารสกัดปริมาตร 5 และ 30
ไมโครลิตร

คำสำคัญ : ป่าชายเลน, เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส, แอคติโนมัยซีท

Research Title: Protease form Actinomycetes isolated from mangrove forest soil from Chonburi province with their culture characterization and antimicrobial activity.

Researcher: Dr.Khanungkan Klanbut

Faculty: Science **Department:** Biology

ABSTRACT

A total of 66 actinomycetes were isolated from mangrove forest soil Chonburi province, choose 20 different characteristic actinomycetes to study ability of alkaline protease production by measuring the clear zone in skim milk agar 6 actinomycetes isolate were capable to digest skim milk by showing clear zone on the agar plate, NKB720 gave biggest clear zone. According to Azocasein assay, crude enzyme from NKB720 (30 hr.) had optimum pH at 8 and optimum temperature at 37°C. The enzyme activity was mostly inhibited by PMSP, 1,10-Phenanthroline and EDTA but enzyme activity will increase triple to quartuple when test by KMnO_4 6 actinomycetes isolate show were metalloprotease protease from the stability temperature at 40-50°C and after 80°C protease was unstable. And 6 actinomycetes isolate revealed the antimicrobial activity by could not inhibit *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans*, *Salmonella typhimurium* TISTR 5562, *E. coli* and *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 with the volume of 5 and 30 μl .

Keywords : Actinomycetes, Alkaline protease, Mangrove forest

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากทุนสนับสนุนวิจัยด้วยเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปีงบประมาณ 2559 ผู้วิจัย
ขอขอบคุณหน่วยงานดังกล่าวที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยตลอดการวิจัยในครั้งนี้

ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุญชัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 หลักการและเหตุผลของการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
2.1 ป่าชายเลน	6
2.1.1 การกระจายของป่าชายเลนในประเทศไทย	6
2.1.2 ประเภทของป่าชายเลน	6
2.1.3 องค์ประกอบของระบบนิเวศบริเวณป่าชายเลน	7
2.1.4 ห่วงโซ่อาหารในระบบนิเวศป่าชายเลน	7
2.2 แอคติโนมัยซีท	8
2.3 ชีวิตวิทยาทั่วไปของแอคติโนมัยซีท	10
2.3.1 ลักษณะโครงสร้างของเส้นใย	10
2.3.2 การสร้างผนังกันเส้นใย	11
2.3.3 ลักษณะสปอร์ของแอคติโนมัยซีท	11
2.3.4 ลักษณะการเกิดสปอร์แบบต่างๆ	13
2.3.5 โครงสร้างสำคัญที่ใช้ในการจำแนกในระดับสกุล	15

2.4 เอนไซม์โปรติเอส	19
2.5 เอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากจุลินทรีย์	20
2.6 เอนไซม์โปรติเอสจากแอคติโนมัยซีท	22
2.7.1 ชนิดของเอนไซม์	22
2.7.2 แหล่งที่พบ	22
2.8 สารออกฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ	23
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	26
3.1 ระเบียบวิธีวิจัย	26
3.1.1 การเก็บตัวอย่างดิน	26
3.1.2 การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท	26
3.1.3 การหาสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่างดิน	26
3.1.4 การแยกเชื้อและการเก็บรักษา	27
3.1.5 การเตรียม spore suspension	27
3.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานและชีวเคมีของเชื้อ	28
3.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญของเชื้อ	28
3.2.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ	28
3.3 การเตรียมสารละลายสปอร์เพื่อใช้ในการทดสอบการสร้างเอนไซม์	29
3.4 Spore pre-germination และการ inoculation	29
3.5 การสกัดเอนไซม์ Alkaline Protease	29
3.6 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสโดยใช้วิธี Azocasein method	30
3.7 การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ	31
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	32
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	86
เอกสารอ้างอิง	88
ภาคผนวก	94

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	95
ภาคผนวก ข สารเคมีและบัฟเฟอร์	98
ภาคผนวก ค Azocasein method	104
ภาคผนวก ง สูตรคำนวณ	107
ข้อมูลประวัติผู้วิจัย	110

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 แสดงสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่างดิน	32
4.2 แสดงสรีรวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 66 ไอโซเลท	34
4.3 แสดงความกว้างของวงใส (Clear zone) ของเชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 20 ไอโซเลท	42
4.4 แสดงค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเมื่อนำไปทดสอบกับ pH ต่างๆ	50
4.5 แสดงผล 6 ไอโซเลทที่ 24 ชั่วโมงและ 30 ชั่วโมงที่มีกิจกรรมที่สูงที่สุดกับชนิดของบัพเฟอร์ต่างๆและให้ค่าการดูดกลืนแสง	53
4.6 แสดงค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์เมื่อนำไปทดสอบกับ Inhibitor ชนิดต่างๆ	56
4.7 แสดงค่าเฉลี่ยเสถียรภาพของเอนไซม์เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิและเวลาที่แตกต่างกัน	58
4.8 แสดงผลของสารสกัดเอนไซม์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จากเชื้อแอกติโนมัยซีทที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจำนวน 6 ไอโซเลท	64

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ป่าชายเลน	8
2.2 ลักษณะโคโลนีของแอกติโนมัยซีท	9
2.3 ลักษณะโคโลนีของแอกติโนมัยซีท	9
2.4 ลักษณะผิวสปอร์ของแอกติโนมัยซีทแบบต่างๆ	12
2.5 ลักษณะของแฟลกเจลลารูปแบบต่างๆ	12
2.6 A และ B ลักษณะโคโลนีของ <i>Micromonospora</i>	13
2.7 ลักษณะโคโลนีของ <i>Actinomadura echinospora</i>	14
2.8 ลักษณะโคโลนีของ <i>Actinomadura rugatobispora</i>	14
2.9 A และ B ลักษณะโคโลนีของแอกติโนมัยซีทในสกุล <i>Actinoplane</i>	15
2.10 ลักษณะโคโลนีของ <i>Microbispora humi</i> sp. nov	16
2.11 ลักษณะโคโลนีของ <i>Microbispora rosea</i>	17
2.12 ลักษณะโคโลนีของ <i>Microtetraspora glauca</i> SF2091	17
2.13 ลักษณะโคโลนีของ <i>Amycolatopsis orientalis</i> ATCC 19795	18
2.14 ลักษณะโคโลนีของ <i>Actinosynnema mirum</i>	19
2.15 ลักษณะโคโลนีของ <i>Kibdelosporangium aridum</i>	19
2.16 สารยับยั้งทางชีวภาพที่ผลิตจาก <i>Streptomyces</i> sp. ซึ่งยับยั้งการเจริญของ <i>E. coli</i>	25
4.1 แสดงความกว้างของวงใส (Clear zone) ของเชื้อแอกติโนมัยซีททั้ง 6 ไอโซเลท บนอาหาร Skim milk agar	43
4.2 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทหมายเลขไอโซเลท NKB690	44
4.3 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทหมายเลขไอโซเลท NKB704	44
4.4 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทหมายเลขไอโซเลท NKB712	45
4.5 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทหมายเลขไอโซเลท NKB72	45
4.6 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทหมายเลขไอโซเลท NKB731	46
4.7 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทหมายเลขไอโซเลท NKB744	46
4.8 ไอโซเลท NKB690	47

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.9 ไอโซเลท NKB690 เลนส์ใกล้วัตถุ 40X	47
4.10 ไอโซเลท NKB704	47
4.11 ไอโซเลท NKB704 เลนส์ใกล้วัตถุ 40X	47
4.12 ไอโซเลท NKB712	48
4.13 ไอโซเลท NKB712 เลนส์ใกล้วัตถุ 40X	48
4.14 ไอโซเลท NKB720	48
4.15 ไอโซเลท NKB720 เลนส์ใกล้วัตถุ 40X	48
4.16 ไอโซเลท NKB720	49
4.17 ไอโซเลท NKB720 เลนส์ใกล้วัตถุ 40X	49
4.18 ไอโซเลท NKB720	49
4.19 ไอโซเลท NKB720 เลนส์ใกล้วัตถุ 40X	49
4.20 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง pH ต่างๆกับกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส จากแอคติโนมัยซีททั้ง 6 ไอโซเลท	52
4.21 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง pH ต่างๆกับกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส จากแอคติโนมัยซีททั้ง 6 ไอโซเลท (ต่อ)	52
4.22 แสดงความสัมพันธ์ของอุณหภูมิต่างๆ และกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส	55
4.23 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Inhibitor ชนิดๆต่างๆและกิจกรรมของเอนไซม์	56
4.24 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ, เวลา และกิจกรรมของเอนไซม์ ที่ได้จากไอโซเลท NKB720 (30 ชั่วโมง)	59
4.25 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ, เวลา และกิจกรรมของเอนไซม์ ที่ได้จากไอโซเลท NKB690 (30 ชั่วโมง)	60
4.26 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ, เวลา และกิจกรรมของเอนไซม์ ที่ได้จากไอโซเลท NKB704 (24 ชั่วโมง)	61
4.27 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ, เวลา และกิจกรรมของเอนไซม์ ที่ได้จากไอโซเลท NKB731 (24 ชั่วโมง)	61

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.28 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ, เวลา และกิจกรรมของเอนไซม์ ที่ได้จากไอโซเลท NKB712 (24 ชั่วโมง)	62
4.29 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ, เวลา และกิจกรรมของเอนไซม์ ที่ได้จากไอโซเลท NKB744 (30 ชั่วโมง)	62
4.30 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Xanthomonas campestris</i> จากเชื้อ แอกติโนมัยซีท ไอโซเลทที่ NKB690 และ NKB720	65
4.31 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Xanthomonas campestris</i> จากเชื้อ แอกติโนมัยซีท ไอโซเลทที่ NKB731 และ NKB744	66
4.32 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Xanthomonas campestris</i> จากเชื้อ แอกติโนมัยซีท ไอโซเลทที่ NKB704 และ NKB712	66
4.33 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 จากเชื้อแอกติโนมัยซีท ไอโซเลทที่ NKB690 และ NKB720	67
4.34 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 จากเชื้อแอกติโนมัยซีท ไอโซเลทที่ NKB704 และ NKB712	67
4.35 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 จากเชื้อแอกติโนมัยซีท ไอโซเลทที่ NKB731 และ NKB744	68
4.36 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Candida albicans</i> จากเชื้อแอกติโนมัยซีท ไอโซเลทที่ NKB690 และ NKB720	68
4.37 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Candida albicans</i> จากเชื้อแอกติโนมัยซีท ไอโซเลทที่ NKB704 และ NKB712	69
4.38 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Candida albicans</i> จากเชื้อแอกติโนมัยซีท ไอโซเลทที่ NKB731 และ NKB744	69
4.39 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Salmonella typhimurium</i> TISTR 5562 จากเชื้อแอกติโนมัยซีท ไอโซเลทที่ NKB690 และ NKB720	70

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.40 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Salmonella typhimurium</i> TISTR 5562 จากเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ NKB704 และ NKB712	70
4.41 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Salmonella typhimurium</i> TISTR 5562 จากเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ NKB731 และ NKB744	71
4.42 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>E. coli</i> จากเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ NKB704 และ NKB712	71
4.43 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>E. coli</i> จากเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ NKB731 และ NKB744	72
4.44 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>E. coli</i> จากเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ NKB690 และ NKB720	72
4.45 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> TISTR 1466 จากเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ NKB690 และ NKB720	73
4.46 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> TISTR 1466 จากเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ NKB704 และ NKB712	73
4.47 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> TISTR 1466 จากเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ NKB731 และ NKB744	74
4.48 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Xanthomonas campestris</i> จากเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ NKB690 และ NKB720	75
4.49 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Xanthomonas campestris</i> จากเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ NKB731 และ NKB712	75
4.50 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Xanthomonas campestris</i> จากเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ NKB744 และ NKB704	76
4.51 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 จากเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ NKB690 และ NKB720	76

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.52 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 จากเชื้อแอกติโนมัยซีท ไอโซเลทที่ NKB744 และ NKB704	77
4.53 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 จากเชื้อแอกติโนมัยซีท ไอโซเลทที่ NKB731 และ NKB712	77
4.54 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Candida albicans</i> จากเชื้อแอกติโนมัยซีท ไอโซเลทที่ NKB690 และ NKB720	78
4.55 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Candida albicans</i> จากเชื้อแอกติโนมัยซีท ไอโซเลทที่ NKB744 และ NKB704	78
4.56 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Candida albicans</i> จากเชื้อแอกติโนมัยซีท ไอโซเลทที่ NKB731 และ NKB712	79
4.57 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Salmonella typhimurium</i> TISTR 5562 จากเชื้อแอกติโนมัยซีท ไอโซเลทที่ NKB690 และ NKB720	79
4.58 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Salmonella typhimurium</i> TISTR 5562 จากเชื้อแอกติโนมัยซีท ไอโซเลทที่ NKB744 และ NKB704	80
4.59 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Salmonella typhimurium</i> TISTR 5562 จากเชื้อแอกติโนมัยซีท ไอโซเลทที่ NKB731 และ NKB712	80
4.60 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>E. coli</i> จากเชื้อแอกติโนมัยซีท ไอโซเลทที่ NKB744 และ NKB704	81
4.61 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>E. coli</i> จากเชื้อแอกติโนมัยซีท ไอโซเลทที่ NKB731 และ NKB712	81
4.62 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>E. coli</i> จากเชื้อแอกติโนมัยซีท ไอโซเลทที่ NKB690 และ NKB720	82
4.63 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> TISTR 1466 จากเชื้อแอกติโนมัยซีท ไอโซเลทที่ NKB690 และ NKB720	82

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.64 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> TISTR 1466 จากเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ NKB744 และ NKB704	83
4.65 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> TISTR 1466 จากเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ NKB731 และ NKB712	83
4.66 แสดงโครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ	84
4.67 แสดงโครงสร้างของ Peptidoglycan ในแบคทีเรีย	84

บทที่ 1

บทนำ

1.1 หลักการและเหตุผลของการวิจัย

แอกติโนมัยซีท (*Actinomycetes*) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Kalakoutsii & Agre, 1976) ที่สามารถสร้างเส้นใย (hyphae) เป็นสายยาวซึ่งโดยส่วนใหญ่จะสามารถสร้างเส้นใยได้ทั้งใต้ผิวอาหาร (substrate mycelium) และบนอาหาร (aerial mycelium) หรืออาจพบเฉพาะเส้นใยใต้ผิวอาหาร (Ruan, 1994) เป็นแบคทีเรียที่มีปริมาณ Mol % G+C ที่สูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวกชนิดอื่นๆ (Goodfellow & Simpson, 1987) โคลโลนิของแอกติโนมัยซีทมีลักษณะที่แตกต่างจาก โคลโลนิของแบคทีเรียอื่น ๆ คือมีลักษณะที่บ่งแสดงลักษณะเส้นใยที่เจริญเหนือผิวอาหารเรียงตัวกันแน่น แข็ง และเป็นผงเมื่อมองด้วยตาเปล่า หรือผิวโคลโลนิอาจเรียกคล้ายหนังสัตว์ หรือเป็นรอยขุ่นเป็นเส้นใยสั้นๆ เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าคล้ายกำมะหยี่สามารถสร้างรงควัตถุสีต่าง ๆ เช่น สีขาว เทา เขียว เหลืองส้ม แดง น้ำตาล ชมพู ม่วง และสีดำ เป็นต้น (Vobis, 1997) แบคทีเรียในกลุ่มแอกติโนมัยซีทพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมต่างๆ ส่วนใหญ่พบในดินซึ่งมีความอุดมสมบูรณ์ (Lechevalier, 1981) ปริมาณดินจำนวน 1 กรัมสามารถพบแอกติโนมัยซีทได้มากกว่า 1 ล้านเซลล์ซึ่งสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ด้วยการใช้สารอินทรีย์เพียงเล็กน้อยที่มีอยู่ในดิน (Alexander, 1977) อย่างไรก็ตามแอกติโนมัยซีทที่อยู่ในดินมักพบอยู่ในระยะพักตัวในลักษณะของสปอร์เมื่อปัจจัยสิ่งแวดล้อมเหมาะสมเช่น มีสารอาหารเพียงพอ อุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสมจะมีการงอกของสปอร์และสร้างเป็นเส้นใยได้ขณะเดียวกันในดินก็สามารถพบแบคทีเรียชนิดอื่นๆ เช่น เชื้อรา, สิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว รวมทั้งสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ได้อีกด้วย ซึ่งสิ่งมีชีวิตเหล่านี้สามารถช่วยทำให้ระบบนิเวศของดินมีความสมดุล ดังนั้นในการคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจึงจำเป็นต้องมีการยับยั้งการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ (รัตนภรณ์, 2013) ปัจจุบันแบคทีเรียหลายชนิดในกลุ่มแอกติโนมัยซีท ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เพราะนอกจากสามารถสร้างสารทุติยภูมิที่สำคัญหลายชนิด ซึ่งมีลักษณะ โครงสร้างและลักษณะทางพันธุกรรมที่หลากหลายแล้วแอกติโนมัยซีทยังสามารถสร้างเอนไซม์ที่ผลิตออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzymes) ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในหลายด้าน เช่น การนำเอนไซม์โปรตีเอสมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม เอนไซม์โปรตีเอสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยโปรตีนให้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ หรือกรดอะมิโนพบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์โปรตีเอสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ (Shampa, 2009) มีบทบาทในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมทอผ้า อุตสาหกรรมฟอกหนัง อุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ อุตสาหกรรมเคมี อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมถ้ำรูป การบำบัดของเสีย และโดยเฉพาะอุตสาหกรรมสารซักล้าง มีปริมาณการใช้และคิดเป็นมูลค่าสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอุตสาหกรรมอื่นๆ (Beg & Gupta, 2002) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำมาสะอาด โดยกำจัดโปรตีนจำพวกน้ำนม เลือด รอยเปื้อนของอาหาร และคราบสกปรกบนเนื้อผ้า (พิมล และคณะ, 2547) 2. แบคทีเรียหลายชนิดในกลุ่มแอก

แคติโนมัซซีท มีความสามารถในการสร้างสารแอนติไบโอติกที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด เช่น ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย รา ไวรัส โปรโตซัวรวมทั้งสารที่สามารถต้านเซลล์มะเร็ง หรือเซลล์เนื้องอก (Williams et al., 1989) นับว่าเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่มีความสำคัญทางการแพทย์และทางเภสัชกรรมเป็นอย่างมากในด้านการสร้างสารทุติยภูมิที่สำคัญของแคติโนมัซซีทนั้น สกุกที่พบว่ามีการสร้างสารแอนติไบโอติกและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่นำมาใช้ประโยชน์มากที่สุด (Hopwood et al., 2000) ได้แก่ สกุก *Streptomyces* sp. ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการสร้างของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ แล้ว แคติโนมัซซีทก็ยังคงเป็นกลุ่มที่มีการสร้างสารเหล่านี้เป็นจำนวนมากที่สุดด้วยเช่นกัน

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ที่จะศึกษาการแยกเชื้อแคติโนมัซซีทที่ได้จากตัวอย่างดินป่าชายเลนจังหวัดชลบุรี ศึกษาวิธีการสกัดและการหากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากแคติโนมัซซีท ศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เอนไซม์โปรติเอส เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรดต่าง inhibitors และเสถียรภาพของเอนไซม์ที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ผลิตจากแคติโนมัซซีท ศึกษาคุณสมบัติบางประการของแคติโนมัซซีทในการเพาะเลี้ยงและการเจริญร่วมกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นในดิน และศึกษาคุณสมบัติบางประการของแคติโนมัซซีทซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่น

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาถึงการแยกเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มแคติโนมัซซีทที่ได้จากดินป่าชายเลนจังหวัดชลบุรี รวมทั้งความสามารถของจุลินทรีย์ในกลุ่มแคติโนมัซซีทในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส เช่น อุณหภูมิ, ความเป็นกรดต่าง inhibitors และเสถียรภาพของเอนไซม์ที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ผลิตจากแคติโนมัซซีท ศึกษาคุณสมบัติบางประการของแคติโนมัซซีทในการเพาะเลี้ยงและการเจริญร่วมกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นในดิน และศึกษาคุณสมบัติบางประการของแคติโนมัซซีทซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่น

1.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย

ขั้นที่ 1 การเก็บตัวอย่างดินและการคัดแยกเชื้อแคติโนมัซซีท

ทำการเก็บตัวอย่างดินจากศูนย์การเรียนรู้เชิงอนุรักษ์ป่าชายเลน ตำบลคลองตำหรุ จังหวัดชลบุรี 10 ตำแหน่ง วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง แบ่งตัวอย่างดินใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์เพื่อให้ตัวอย่างแห้งทำการเตรียมอาหาร Starch casein agar สำหรับการเพาะเลี้ยงและเติม Cycloheximide ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยวิธีที่ 1 ทำการเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น นำระดับความเจือจางที่ 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} Spread ลงในอาหาร ที่ได้เตรียมไว้ และวิธีที่ 2 เตรียมหลอดใส่สารละลายฟีนอลความ

เข้มข้น 1.5% ทำการอบตัวอย่างดินที่พักไว้ 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้น
 ชั่งดินตัวอย่างดิน 1 กรัม ใส่หลอดสารละลายฟีนอล 9 มิลลิลิตร บ่มใน Waterbath 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา
 30 นาที นำมาทำการเจือจางที่ 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} แล้ว Spread ลงในอาหาร Starch casein agar ที่เตรียมไว้ บ่มเชื้อที่
 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสประมาณ 14 วัน (ตรวจเช็คการเจริญของเชื้อทุกๆ 3-4 วัน) เลือกลโคโลนีจากจาน
 อาหารมา Streak จนได้เชื้อบริสุทธิ์

ขั้นที่ 2 การหาสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่าง

หาน้ำหนักดิน โดยการเทสารแขวนลอยของดินในความเจือจางที่ 10^{-1} ที่เหลืออยู่ในบีกเกอร์ที่ ทราบ
 น้ำหนัก นำบีกเกอร์ไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสจนน้ำระเหยหมดและน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักของบีก
 เเกอร์อีกครั้ง การหาปริมาณความชื้น ชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ที่ทราบน้ำหนัก นำบีกเกอร์ไปอบใน
 ตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสจนน้ำหนักคงที่ การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ชั่งตัวอย่างดิน 2 กรัม ใส่บีกเกอร์
 ขนาด 50 มิลลิลิตร ค่อยๆ เติมน้ำกลั่นลงไปทีละน้อย โดยคนตัวอย่างไปด้วย ทิ้งไว้จนสังเกตเห็นฟิล์มบางบน
 ผิวจึงทำการวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ทำซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละตัวอย่าง

ขั้นที่ 3 การเตรียมสารละลายสปอร์เพื่อใช้ในการทดสอบการสร้างเอนไซม์ (จักรวาล และคณะ, 2550)

นำเชื้อแอสคิโนมัยซีที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร Mannitol salt agar ทำการเติมสารละลาย Tween-80
 0.1 % จากนั้นนำ suspension ของสปอร์มานับจำนวนสปอร์โดยใช้ Haemocytometer ให้ได้จำนวนสปอร์
 เท่ากับ 1×10^8 สปอร์ / มิลลิลิตร

ขั้นที่ 4 คัดเลือกแอสคิโนมัยซีที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์

นำสารละลายแขวนลอยของสปอร์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหาร Skim milk agar นำไป
 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 2 สัปดาห์ เลือกเฉพาะไอโซเลทที่เกิดวงใสมาทำการศึกษาในขั้นต่อไป

ขั้นที่ 5 Spore pre-germination (Khanungkan, 2013)

นำไอโซเลทที่ทำให้เกิดขนาดของวงใสบนอาหาร Skim milk agar คูดสารละลายสปอร์ของ ไอโซ
 เลทที่ต้องการ 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหาร Yeast extract Malt extract broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มใน
 สภาวะเขย่าที่ 250 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส 8 ชั่วโมง แล้วจึงนำอาหารเลี้ยงเชื้อไป Centrifuge ที่ 3000
 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เท Supernatant ที่ได้จากนั้นใส่น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร และ
 Vortex ให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer จากนั้นเข้าสู่ตร
 ค่าปริมาณเพื่อหาปริมาณของสปอร์เพื่อเป็นสปอร์ตั้งต้นในแต่ละ Flask

ขั้นที่ 6 การสกัดเอนไซม์ Alkaline Protease

คัดเลือกไอโซเลทที่ทำให้เกิดขนาดของวงใสกว้างที่สุดบนอาหาร Skim milk agar มาเพาะเลี้ยงใน
 อาหาร Yeast extract Malt extract agar (YEME) ปริมาตร 50 มิลลิลิตรจากนั้นทำการบ่มในสภาวะเขย่าโดยใช้

ความเร็ว 250 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำการเก็บส่วนใสที่ได้เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมในขั้นตอนต่อไป

ขั้นที่ 7 ตรวจสอบหา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

นำเอนไซม์สกัดหยาบมาตรวจสอบหา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงาน โดยใช้ น้ำกลั่นแทนเอนไซม์และ Buffer เป็น Control ด้วยวิธี Azocasein method ซึ่งใช้ Citrate - Phosphate buffer (pH 7), Phosphate buffer (pH 8), Borate buffer (pH 8), Borate buffer (pH 9), Tris – EDTA buffer (pH 9), Borate buffer (pH 10), Ammonium buffer (pH 10) และ Borate buffer (pH 11) จากนั้นทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร โดยใช้ Spectrophotometer

ขั้นที่ 8 ตรวจสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

นำเอนไซม์ที่ได้มาตรวจสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานด้วยวิธี Azocasein method โดยใช้ buffer pH ที่เอนไซม์มีกิจกรรมสูงที่สุด โดยนำมาบ่มที่อุณหภูมิต่างกัน ได้แก่ 30, 37, 40, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 nm โดยใช้ Spectrophotometer

ขั้นที่ 9 การหา Inhibitors ที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

นำเอนไซม์สกัดหยาบมาหา Inhibitor ที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ โดยใช้ inhibitor ดังนี้ PMSF, 1,10-phenantroline, EDTA และ KMnO_4 (ต้องแช่เย็นตลอดเวลา) จากนั้นทดสอบด้วยวิธี Azocasein method โดยใช้ buffer pH และอุณหภูมิที่เอนไซม์มีกิจกรรมสูงที่สุด แล้วนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร โดยใช้ Spectrophotometer โดยใช้ DMSO เป็น Positive control และน้ำเป็น Negative control

ขั้นตอนที่ 10 การหาเสถียรภาพของเอนไซม์

บ่มเอนไซม์สกัดหยาบ ที่อุณหภูมิต่างๆกันดังนี้ 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บเอนไซม์ทุกๆ 10 นาที ครั้งละ 20 ไมโครลิตร จนครบ 1 ชั่วโมง และทำการทดลองเช่นเดียวกับการหา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ และใช้ buffer ที่ได้จากขั้นตอนนี้โดยวิธี Azocasein method วัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร โดยใช้ Spectrophotometer โดย Control ไม่ต้องนำเอนไซม์ไปบ่ม และ Blank ใช้ น้ำกลั่นแทน buffer และเอนไซม์

ขั้นตอนที่ 11 การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ

เลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีทที่ผลิตเอนไซม์บนอาหาร Yeast extract Malt extract agar บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน แล้วเขี่ยเชื้อหนึ่งลูกลงใน Yeast extract Malt extract broth เลี้ยงในสภาวะเขย่า 250 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส 14 วัน (Chitti, 2010) กรองเซลล์จุลินทรีย์ด้วยกระดาษ Whatman เบอร์ 1 นำส่วนใสที่ได้ Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บ Supernatant เพื่อทำการทดสอบต่อไป (Valli et al., 2012)

เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบ ซึ่งได้แก่ *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans*, *Salmonella typhimurium* TISTR 5562, *E. coli* และ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 บนอาหาร NA บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อลงในสารละลาย NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์ เทียบความขุ่นให้ใกล้เคียงกับหลอด McFarlane's เบอร์ 0.5 (Pozzatti et al., 2010) ทำการ Swab ลงบนผิวหน้าอาหาร Mueller-Hinton agar นำ Supernatant ของอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์มาผสมกับตัวทำละลาย Ethyl Acetate อัตราส่วน 1:1 นำส่วนที่เป็นสารผสมมาเพิ่มความเข้มข้น โดยใช้เครื่องระเหยสูญญากาศ (Rotary Evaporator) (Phongsopitanun et al., 2014) นำ Crude ethyl acetate extract ที่ได้ผสมกับ Ethyl Acetate อัตราส่วน 1:1 จากนั้นหยดลงบน Disk Diffusion ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ทิ้งไว้จน Disk Diffusion แห้งและวางลงบนอาหาร Mueller-Hinton agar บ่มที่ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการตรวจสอบวงใสที่เกิดขึ้น (Mohseni et al., 2013)

ขั้นตอนที่ 12 จัดทำรูปเล่มรายงาน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากศูนย์การเรียนรู้เชิงอนุรักษ์ป่าชายเลน ตำบลคลองตำหรุ จังหวัดชลบุรี และสกัดเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสได้
2. เพื่อศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตได้ รวมทั้งสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส
3. เพื่อศึกษาถึงสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ
4. สามารถคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส และยังมีมีความสามารถในการผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ป่าชายเลน

ป่าชายเลนเป็นสังคมพืชที่ขึ้นอยู่กับบริเวณชายฝั่งทะเล ปากแม่น้ำ หรืออ่าว ซึ่งเป็นบริเวณที่มีระดับน้ำทะเลท่วมถึงในช่วงที่น้ำทะเลขึ้นสูงสุด หรือหมายถึง สังคมพืชที่ประกอบด้วยพรรณไม้หลายชนิด หลายตระกูล และเป็นพวกที่มีใบเขียวตลอดปี (Evergreen species) ซึ่งมีลักษณะทางสรีระวิทยาและความต้องการสิ่งแวดล้อมที่คล้ายกัน ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วยพรรณไม้ สกุล โกงกาง (Rhizophora) เป็นไม้สำคัญ และมีไม้ตระกูลอื่นปะปนอยู่บ้าง ป่าชายเลนพบได้ทั่วไปตามพื้นที่ชายฝั่งทะเล บริเวณปากแม่น้ำ อ่าว ทะเลสาบ ลำคลอง และเกาะที่มีน้ำทะเลท่วมถึง โดยพื้นที่ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเกิดป่าชายเลน คือ อ่าวที่มีน้ำนิ่งๆ และมีแม่น้ำสายใหญ่ๆ ไหลลงมา ดังนั้น เมื่อกระแสน้ำในแม่น้ำลำคลองไหลลงมาปะทะกับกระแสน้ำทะเล กระแสน้ำในแม่น้ำก็จะเบาลงและหยุดนิ่ง เมื่อน้ำนิ่งพวก โคลนเลนและตะกอนต่างๆ ที่ไหลปะปนมากับกระแสน้ำก็จะจมลง การตกตะกอนของดิน โคลนเหล่านี้จะทำให้เกิดแผ่นดิน โคลนหรือเลนบริเวณท้องอ่าว (สรยุทธ และ รุ่งสุริยา, 2554)

เป็นระบบนิเวศที่อุดมสมบูรณ์ประกอบไปด้วยพันธุ์พืช พันธุ์สัตว์ หลากหลายชนิดดำรงชีวิตร่วมกัน ในสภาพแวดล้อมที่เป็นดินเลน น้ำกร่อย และมีน้ำทะเลท่วมถึงอย่างสม่ำเสมอ จึงพบป่าชายเลนปรากฏอยู่ทั่วไปตามบริเวณที่เป็นชายฝั่งทะเล ปากแม่น้ำ ทะเลสาบ และรอบเกาะแก่งต่างๆ ในพื้นที่ชายฝั่งทะเล พันธุ์ไม้ที่มีมากและมีบทบาทสำคัญที่สุดในป่าชายเลน คือ ไม้โกงกาง ป่าชายเลนจึงมีชื่อเรียกอีกอย่างว่า ป่าโกงกาง ในระบบนิเวศป่าชายเลนประกอบด้วยสิ่งมีชีวิตและสิ่งไม่มีชีวิต สิ่งไม่มีชีวิต ประกอบไปด้วย พวกธาตุอาหาร เกลือแร่ น้ำ พวกซาก-พืช ซากสัตว์ รวมไปถึงสภาพภูมิอากาศ เช่น อุณหภูมิ แสง ฝน ความชื้น เป็นต้น (Xu et al., 2014)

2.1.1 การกระจายของป่าชายเลนในประเทศไทย

ประเทศไทยมีจังหวัดชายฝั่งทะเลทั้งหมด 24 จังหวัด แต่ป่าชายเลนในประเทศไทยกระจุกกระจายตามชายฝั่งทะเล ภาคตะวันออก ภาคกลาง และภาคใต้ รวม 23 จังหวัด (ยกเว้นจังหวัดนราธิวาส) จากข้อมูลพื้นที่ป่าชายเลน ปี พ.ศ. 2547 โดยกรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง พบว่า ประเทศไทยมีพื้นที่ป่าชายเลนทั้งสิ้น 2,758.05 ตารางกิโลเมตร โดยภาคตะวันออก มีพื้นที่ป่าชายเลน 227.49 ตารางกิโลเมตร ภาคกลางมีพื้นที่ป่าชายเลน 96.51 ตารางกิโลเมตร ภาคใต้ฝั่งอ่าวไทยมีพื้นที่ 715.51 ตารางกิโลเมตร และภาคใต้ฝั่งทะเลอันดามันมีพื้นที่ป่าชายเลน 1,718.54 ตารางกิโลเมตร โดยจังหวัดที่มีพื้นที่ป่าชายเลนมากที่สุด ได้แก่ จังหวัดพังงา มีพื้นที่ 417.11 ตารางกิโลเมตร รองลงมาได้แก่ จังหวัดสตูล มีพื้นที่ 347.21 ตารางกิโลเมตร และจังหวัดกระบี่ 350.14 ตารางกิโลเมตร (สนิทและสุรพล, 2534)

2.1.2 ประเภทของป่าชายเลน

ป่าชายเลนแบ่งออกเป็น 4 ชนิดคือ

1. Basin forest เป็นป่าชายเลนที่พบติดกับแผ่นดินใหญ่ตามลำน้ำ และได้รับอิทธิพลจากน้ำทะเลเล็กน้อยมาก น้ำทะเลจะท่วมถึงเฉพาะเวลาที่น้ำทะเลขึ้นสูงสุด
2. Riren forest เป็นป่าชายเลนที่พบบริเวณชายฝั่งแม่น้ำใหญ่ที่ติดกับทะเล ทะเลสาบ มีน้ำทะเลท่วมถึงทุกวัน
3. Fringe forest เป็นป่าชายเลนที่พบบริเวณชายฝั่งทะเลที่ติดกับแผ่นดินหรือรอบเกาะที่เป็นเกาะใหญ่ น้ำทะเลท่วมถึงเสมอเป็นประจำทุกวัน ยกเว้น ชายฝั่งทะเลของเกาะใหญ่น้ำทะเลท่วมถึงเมื่อน้ำทะเลขึ้นสูงสุด
4. Overwash forest เป็นป่าชายเลนที่พบตามเกาะเล็กๆ เมื่อน้ำทะเลขึ้นสูงสุดจะท่วมต้นไม้หมด พรรณไม้จะดีกว่าป่าคิ มีอัตราการเติบโตต่ำ (Kathiresan and Bingham, 2001)

2.1.3 องค์ประกอบของระบบนิเวศบริเวณป่าชายเลน

ป่าชายเลนเป็นพรรณไม้ที่ขึ้นอยู่บริเวณน้ำขึ้นน้ำลงในเขตร้อนและเขตกึ่งร้อน ดังนั้นพื้นที่ที่ป่าชายเลนเจริญเติบโตได้ดีจึงเป็นพื้นที่ในเขตร้อนหรือเขตใกล้เส้นศูนย์สูตร โดยเราพบป่าชายเลนขึ้นอยู่หนาแน่นบริเวณพื้นที่ชายฝั่งทะเลและบริเวณปากแม่น้ำที่เป็นดินเลน แม้ว่าป่าชายเลนส่วนใหญ่จะเจริญเติบโตได้ดีบนดินเลน แต่ต้นไม้ป่าชายเลนบางชนิดก็สามารถที่จะเจริญเติบโตได้บนดินทราย ทั้งนี้เนื่องจากการเติบโตของต้นไม้ป่าชายเลนขึ้นอยู่กับชนิดของพรรณไม้และระดับการท่วมถึงของน้ำทะเลในบริเวณนั้นมากกว่าปัจจัยอื่น เนื่องจากระบบนิเวศป่าชายเลนเป็นระบบนิเวศขนาดใหญ่ที่มีองค์ประกอบมากมายซึ่งโดยภาพรวมอาจจะกล่าวได้ว่าป่าชายเลนประกอบด้วยสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ ได้แก่ ต้นไม้ป่าชายเลน, สัตว์ที่อาศัยอยู่บนต้นไม้, พืชที่เกาะอยู่บนต้นไม้, สัตว์ที่อาศัยอยู่ใต้เปลือกไม้และภายในต้นไม้ที่ตายแล้ว, สัตว์และพืชที่อาศัยอยู่บนผิวเลนและดินทราย, สัตว์ที่อาศัยอยู่ใต้ดินเลนและดินทราย, สัตว์และพืชที่อาศัยอยู่ในน้ำบริเวณป่าชายเลน, แมลงในป่าชายเลน, นกในป่าชายเลนและ นกที่หาอาหารบริเวณรอบ ๆ ป่าชายเลน (สรยุทธ และ รุ่งสุริยา, 2554)

2.1.4 ห่วงโซ่อาหารในระบบนิเวศป่าชายเลน

ห่วงโซ่อาหารในป่าชายเลนมีการถ่ายทอดพลังงานและอาหารเช่นเดียวกับระบบนิเวศอื่นๆ มีการถ่ายทอดสารอาหารไปตามลำดับขั้นของการกินอาหารภายในระบบนิเวศ โดยผู้บริโภคได้รับพลังงานจากผู้ผลิต โดยการกินต่อกันเป็นทอดๆ ขบวนการนี้มีความสำคัญมากต่อสิ่งมีชีวิต เนื่องจากอาหารที่ถูกกินเข้าไปจะถูกนำไปใช้ ในการเจริญเติบโต และการสืบพันธุ์ รวมทั้งกระบวนการทำงานต่างๆ

ระบบนิเวศบริเวณป่าชายเลน เป็นเรื่องที่เกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม ประกอบด้วย ผู้ผลิต ผู้บริโภค และผู้ย่อยสลาย ผู้ผลิต เมื่อได้รับแสงจากดวงอาทิตย์จะเกิดการสังเคราะห์แสงเกิดขึ้น ทำให้ได้อินทรีย์วัตถุหลากหลายชนิด ผู้ผลิตบริเวณป่าชายเลน ได้แก่ พืชพันธุ์ไม้ต่างๆ ในป่าชายเลน รวมไปถึง ไดอะตอม แพลงก์ตอนพืช และสาหร่าย ผู้บริโภค คือ สิ่งมีชีวิตที่ไม่สามารถสร้างอาหารเองได้ ต้องพึ่งพาอาศัยพวกอื่น ได้แก่ พวกสัตว์หน้าดินขนาดเล็ก เช่น แพลงก์ตอนสัตว์ ปู ไส้เดือนทะเล และสัตว์น้ำชนิดอื่นๆ เช่น ปลา กุ้ง ปู รวมไปถึง นก สัตว์เลื้อยคลาน และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งบางชนิดเป็นพวกกินอินทรีย์สาร บางชนิดเป็นพวกกินพืช บางชนิดเป็นพวกกินสัตว์และบางชนิดเป็นพวกที่กินทั้งพืชและสัตว์ ส่วนประกอบของ

สิ่งมีชีวิตที่สำคัญในระบบนิเวศป่าชายเลนอีกอย่าง คือ ผู้ย่อยสลาย ซึ่งหมายถึง พวกจุลินทรีย์ทั้งหลายที่ช่วยในการทำลายหรือย่อยสลายซากพืชและซากสัตว์ให้เน่าเปื่อย ผุพัง จน ในที่สุดจะสลายตัวเป็นธาตุอาหารและปุ๋ย ซึ่งสะสมเป็นแหล่งอาหารในดินเพื่อเป็นประโยชน์ต่อ ผู้ผลิตต่อไป ซึ่งได้แก่ รา แบคทีเรีย ในป่าชายเลนผู้ย่อยสลายยังรวมถึง ปูและหอยบางชนิดด้วย มีรายงานวิจัยว่าดินบริเวณป่าชายเลนจำนวน 1 กรัม สามารถพบจุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนมัยซีท ได้สูงถึง 1 ล้านเซลล์เลยทีเดียว เช่น *Nonomuraea maheshkhaliensis* และ *Asanoa iriomotensis* เป็นต้น (Kui et al., 2009)



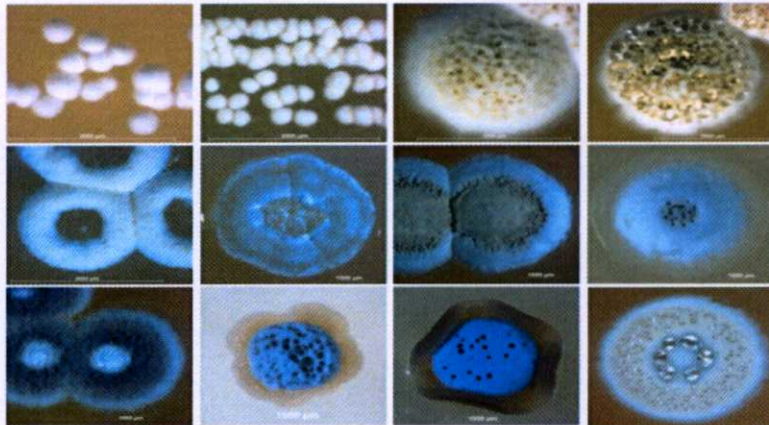
รูปที่ 2.1 ป่าชายเลน

แหล่งที่มา : (<http://www.vcharkarn.com/uploads/sites/6/2014/02/1-12.jpg>)

2.2 แอคติโนมัยซีท

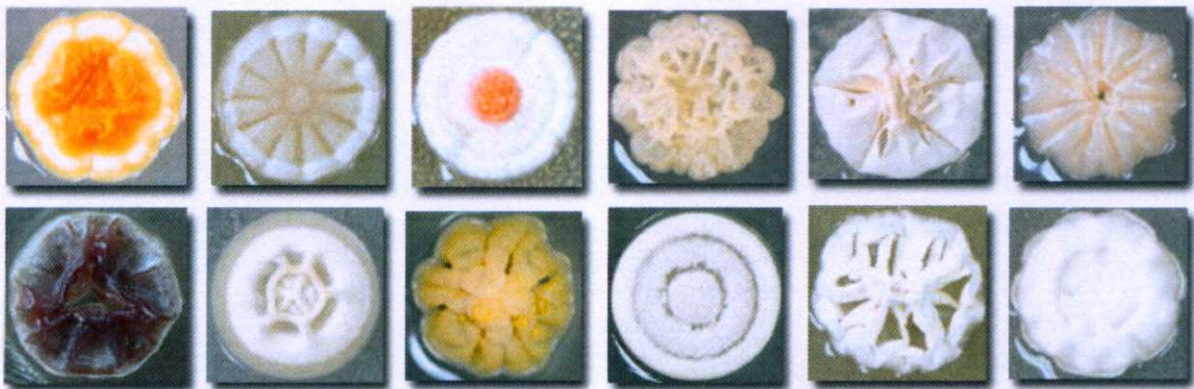
แอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีความหลากหลายของรูปร่างลักษณะเป็นอย่างมาก (Kalakoutsii & Agre, 1976) แอคติโนมัยซีทมีลักษณะคล้ายราซึ่งสามารถสร้างเส้นใยเป็นสายยาว ส่วนใหญ่สามารถสร้างได้ทั้ง vegetative mycelium (ทำหน้าที่ดูดซับสารอาหารสำหรับการเจริญเติบโต) และ aerial mycelium (ทำหน้าที่สร้างสปอร์สำหรับการสืบพันธุ์) เป็นแบคทีเรียที่มีปริมาณ Mol %G+C ที่สูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป (Goodfellow & Simpson, 1987) คือประมาณ 55-78 % โคลโลนิของแอคติโนมัยซีทมีลักษณะที่แตกต่างจากโคโลนิของแบคทีเรียอื่นๆคือ เส้นใยมีลักษณะทึบแสงและเป็นผงเมื่อมองด้วยตาเปล่า สามารถสังเกตได้ชัดเจน หรือผิวของโคโลนีอาจมีลักษณะเรียบคล้ายหนังสัตว์ หรือเป็นรอยย่น เป็นเส้นใยสั้นๆ เมื่อ

สังเกตด้วยตาเปล่ามีลักษณะคล้ายกำมะหยี่สามารถสร้างรังควัตถุสีต่างๆ เช่น สีขาว, เทา, เขียว, เหลือง, ส้ม, แดง, น้ำตาล, ชมพู, ม่วง และสีดำ เป็นต้น (Vobis, 1997) ความสำคัญของแบคทีเรียในกลุ่มแอกติโนมัยซีทคือสามารถสร้างสารแอนติไบโอติกที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลากหลายชนิด เช่น ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย, รา, ไวรัส และโปรโตซัว รวมทั้งสารที่สามารถต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งหรือเซลล์เนื้องอก (Williams et al., 1989) นับว่าเป็นแบคทีเรียกลุ่มสำคัญทางการแพทย์และทางเภสัชกรรมเป็นอย่างมาก



รูปที่ 2.2 ลักษณะโคโลนีของแอกติโนมัยซีท

แหล่งที่มา : (<http://microbelog.files.wordpress.com>)



รูปที่ 2.3 ลักษณะโคโลนีของแอกติโนมัยซีท

แหล่งที่มา : (<http://muou.sc.mahidol.ac.th/images/strepsoil.jpg>)

นอกจากนี้แอสคิโนไมซีทยังมีบทบาทที่สำคัญในทางนิเวศวิทยา ซึ่งช่วยให้มีการหมุนเวียนของสารต่างๆ ในธรรมชาติโดยการช่วยย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างๆ เพื่อนำกลับมาใช้ใหม่ได้ เช่น กรดฮิวมิก เป็นต้น แบคทีเรียในกลุ่มแอสคิโนไมซีทพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมต่างๆ ส่วนใหญ่พบในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ (Lechevalier, 1981) ดินที่อุดมสมบูรณ์ 1 กรัม สามารถพบแอสคิโนไมซีทได้มากกว่า 1 ล้านเซลล์ซึ่งมีชีวิตอยู่ได้ด้วยการใช้สารอินทรีย์เพียงเล็กน้อยที่มีอยู่ในดิน (Alexander, 1977)

แอสคิโนไมซีทที่อยู่ในดินมักพบอยู่ในระยะพักตัวในลักษณะของสปอร์ เมื่อมีปัจจัยที่เหมาะสม เช่น มีสารอาหารเพียงพอ มีอุณหภูมิและความชื้นเหมาะสม จะมีการงอกของสปอร์และสร้างเป็นเส้นใยขึ้น ขณะเดียวกันก็สามารถพบแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่อยู่ในดินได้อีกด้วย เช่น เชื้อรา ยีสต์ เป็นต้น โดยสิ่งมีชีวิตเหล่านี้มีหน้าที่ช่วยให้ระบบนิเวศในดินมีความสมดุล ดังนั้นในการคัดแยกเชื้อแอสคิโนไมซีทจึงจำเป็นต้องมีการยับยั้งการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ (รัตนกรณ, 2013)

ปัจจุบันแบคทีเรียหลายชนิดในกลุ่มแอสคิโนไมซีทเป็นแบคทีเรียที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากทั้งนักเทคโนโลยีชีวภาพ, นักชีววิทยาระดับโมเลกุล และนักนิเวศวิทยา เพราะนอกจากพบว่ามีการสร้างสารทุติยภูมิที่สำคัญหลายชนิด ที่มีลักษณะโครงสร้างและมีพันธุกรรมที่หลากหลายแล้ว แอสคิโนไมซีทยังสามารถสร้างเอนไซม์ซึ่งหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzymes) ได้อีกหลายชนิด สามารถนำความสามารถเหล่านี้มาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ได้หลายด้าน แอสคิโนไมซีทที่อาศัยอยู่ในธรรมชาติ พบว่าสามารถสร้างเอนไซม์หลายชนิด เพื่อย่อยสลายซากพืชซากสัตว์หรือเชื้อราที่ตายแล้วในดิน และมีความสำคัญต่อการหมุนเวียนของสารอาหารในธรรมชาติซึ่งสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้

2.3 ชีววิทยาทั่วไปของแอสคิโนไมซีท

2.3.1 ลักษณะโครงสร้างของเส้นใย (รัตนกรณ, 2556)

เส้นใยเดี่ยวๆ ของแอสคิโนไมซีท มีความหนาประมาณ 0.4-1.3 μm โดยปกติแล้วจะมีผนังกันและยึดยาวออกที่ส่วนปลายของเส้นใย ซึ่งสามารถแตกแขนงได้ โดยเฉพาะในระยะที่มีการเจริญ องค์ประกอบของเส้นใยเหมือนกับองค์ประกอบในเซลล์ของโปรคาริโอตต่างๆ ทั่วไปคือ มีไซโตพลาสซึมที่มี fibrillar DNA มี ribosome และโครงสร้างขนาดเล็กที่อยู่ภายในเซลล์หลากหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งโครงสร้างที่ทำหน้าที่สะสมอาหาร เช่น พอสโพลิปิด หรือสารโพลิแซคคาไรด์ นอกจากนั้นยังมีเยื่อหุ้มเซลล์ (plasmamembrane) และอาจมี mesosomes ซึ่งเชื่อมต่อกับโครงสร้างของผนังเซลล์

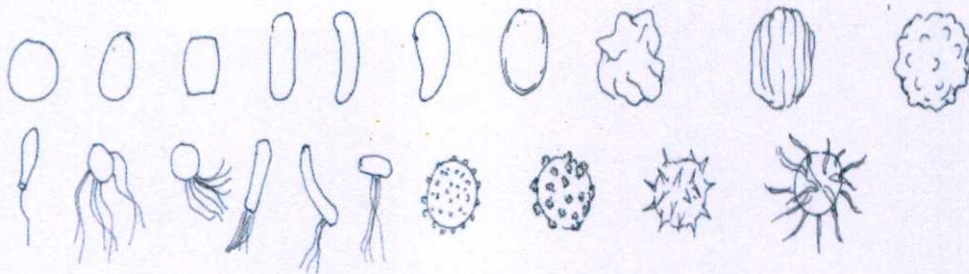
ผนังของเส้นใยจะประกอบด้วยผนังชั้นเดียวหนาประมาณ 10-20 nm เหมือนกับลักษณะของ vegetative mycelium ซึ่งกล่าวได้ว่าเป็นโครงสร้างผนังกันชนิดที่ 1 aerial mycelium ประกอบด้วย fibrous sheath ซึ่งเป็นชั้นบางๆ ที่ห่อหุ้มผนังเส้นใยอีกชั้นหนึ่ง สามารถพบได้ใน aerial mycelium ที่อยู่ในระยะที่มีการสร้างสปอร์เพื่อการสืบพันธุ์ เนื่องจากผิวของสปอร์มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับลักษณะของสปอร์แต่ละชนิดว่าจะมีลักษณะแบบใด

2.3.2 การสร้างผนังกันเส้นใย (รัตนากรณี, 2556)

การแบ่งเซลล์ของเส้นใยและการสร้างสปอร์ เริ่มจากการสร้างผนังกัน (cross wall) โดยทั่วไปเส้นใยที่มีผนังกันเพียงชั้นเดียวก็มีความแข็งแรงเพียงพอ อย่างไรก็ตามในบางกรณีที่มีผนังกันเป็นผนังชั้นเดียวและมีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับการสร้างสปอร์ เช่น ใน *Nocardiopsis dassonvillei* เมื่อ vegetative hyphae มีการแตกหักเป็นท่อนๆ ผนังกันอีกชนิดหนึ่งที่เรียกว่า split septum อาจเกิดขึ้นได้ ซึ่งผนังกันชนิดนี้มี 2 ชั้นสามารถสร้างเป็น polar wall ของห้องใหม่ใกล้ๆกันเกิดขึ้น จัดเป็นผนังกันชนิดที่ 2 ซึ่งการแตกหักของเส้นใยและการสร้างชิ้นส่วนที่คล้ายสปอร์ (spore-like element) ใน แอคติโนมัยซีทในกลุ่ม Nocardioform หลายชนิดก็มีโครงสร้างพื้นฐานของผนังกันในลักษณะแบบเดียวกันนี้ ในกรณีของ *Streptomyces* sp. มีการสร้างผนังกันทั้งหมด 4 แบบ ซึ่งอาจมีความสัมพันธ์กับผนังกันพื้นฐานทั้ง 2 ชนิดที่กล่าวมาข้างต้น แอคติโนมัยซีทบางชนิดมีกระบวนการสร้างผนังกันเส้นใยที่ซับซ้อน เช่น *Saccharopolyspora rectivirgula* เมื่อมีการสร้างสปอร์จะเกิดการย่อยสลายองค์ประกอบภายในผนังเซลล์ (autolysis) ซึ่งมีความสำคัญกับแอคติโนมัยซีทในสกุลที่สร้างสปอร์ได้ เช่น *Actinoplanes*, *Pilimelia*, *Dactylosporangium*, *Streptosporangium*, *Spirillospora* และ *Planomonospora* รวมทั้งในสกุลที่มีการสร้างสปอร์แบบเดี่ยวๆอีกด้วย เช่น *Micromonospora* การสร้างสปอร์เริ่มจากการสร้างผนังกัน จากนั้นจะทำการแยกผนังกันออก

2.3.3 ลักษณะสปอร์ของแอคติโนมัยซีท (รัตนากรณี, 2556)

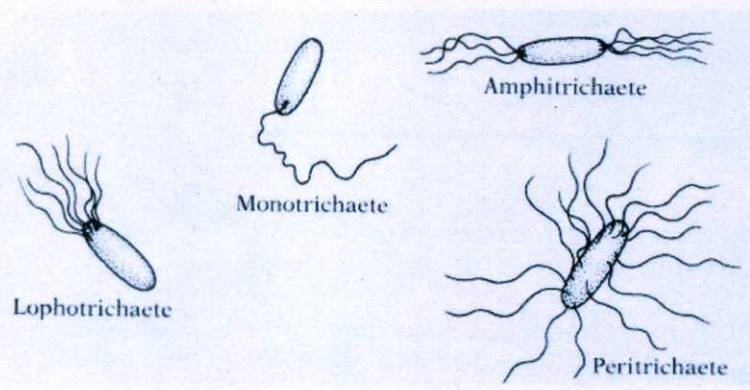
นอกจากการเจริญของเส้นใยแล้ว การสร้างสปอร์ก็เป็นปัจจัยที่สำคัญทางสัณฐานวิทยา ที่ทำให้สามารถจำแนกลักษณะของแอคติโนมัยซีทได้ สมัยก่อนหลายคนอาจคิดว่าการสร้างสปอร์นั้นจำกัดอยู่เพียงแอคติโนมัยซีทในกลุ่ม *Sporoactinomycetes* เท่านั้น ในขณะที่ขบวนการสร้างสปอร์นั้นเกิดขึ้นในส่วนของเส้นใย ซึ่งไม่รวมถึงการสร้างเส้นใยในกรณีของ Nocardioform actinomycetes ที่มีการแตกหักของเส้นใยเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ ซึ่งมีลักษณะกลมและเป็นแท่ง หลังจากนั้นจะเจริญไปเป็นเส้นใยใหม่ต่อไป นอกจากนี้ยังมีหลักฐานที่ทำให้ทราบว่าหน้าที่ของสปอร์ที่แท้จริงกับสปอร์ที่เกิดจากการแตกหักของเส้นใยนี้เหมือนกัน ซึ่งในบางสกุลก็ยากที่จะแยกความแตกต่างของสปอร์ทั้ง 2 ชนิดนี้ ด้วยเหตุผลนี้ขบวนการสร้างสปอร์จึงหมายถึงการแตกหักของเส้นใยเป็นท่อนๆด้วย สามารถพบได้จากแอคติโนมัยซีทในสกุล *Nocardia*, *Nocardiopsis*, *Oerskovia*, *Promicromonospora* และ *Intrasporangium* สปอร์อาจเกิดขึ้นเดี่ยวๆหรือเกิดเป็นสายสั้นๆ โดยทั่วไปสปอร์มีความหนามากกว่าเส้นใย แต่ในบางชนิดที่มีการสร้างสปอร์เป็นสายยาวๆ มักจะมีขนาดของสปอร์เท่ากับขนาดของเส้นใย สปอร์มีความหนาประมาณ 1-2 μm และมีรูปร่างหรือผิวสปอร์ที่แตกต่างกันไป



รูปที่ 2.4 ลักษณะสปอร์ของแอคติโนมัยซีทแบบต่างๆ
แหล่งที่มา : (<http://ncourse.buu.ac.th/download/actionmycete.pdf>)

สปอร์ที่เคลื่อนที่ไม่ได้ (aplanospore) อาจมีผิวเรียบหรือมีผิวที่ขรุขระ จากการศึกษาพบว่า *Streptomyces* มีลักษณะพื้นผิวของสปอร์หลากหลายรูปแบบ เช่น ผิวเรียบ, มีขน, เป็นหนามแหลม, เป็นปุ่มๆ, เขี้ยวข่น, หรือเป็นตุ่มเล็กๆ ซึ่งลักษณะของผิวสปอร์ที่กล่าวมาสามารถพบได้ในสกุล *Actinomadura*, *Microtetraspora* และ *Microbispora* ได้เช่นกัน ผิวของสปอร์ที่มีลักษณะเฉพาะ ที่เป็นตุ่มๆและมีดอกเล็กๆ จะพบได้ใน *Actinomadura verrucosospora* เท่านั้น ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับสปอร์ของ *Streptomyces torulosus* แต่ถ้าใน *Micromonospora* ลักษณะของสปอร์จะมีหนาม ซึ่งสร้างขึ้นที่เส้นใยได้ผิวอาหารและเป็นสปอร์ที่ไม่ได้ปกคลุมด้วย fibrous sheath

สปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ (planospores หรือ zoospores) จะมีผิวเรียบและมีแฟลกเจลลาซึ่งช่วยในการเคลื่อนที่ สปอร์ชนิด Monotrichous จะมีแฟลกเจลลา 1 เส้นที่ข้างใดข้างหนึ่งของสปอร์ เช่นใน *Sporichthya* แต่ถ้ามีแฟลกเจลลาหลายเส้นรอบสปอร์ จะเรียกสปอร์ชนิดนี้ว่า Peritrichous เช่นใน *Actinosynnema* หรือ *Catenuloplanes* ส่วนสปอร์ชนิด Lophotrichous นั้นจะมีแฟลกเจลลาหลายเส้นที่ข้างใดข้างหนึ่งของสปอร์ เช่นในสกุล *Actinoplanes* หรืออาจพบใกล้ๆ ขั้วเซลล์ เช่นใน *Spirillospora* หรืออยู่ที่บริเวณด้านข้างของเซลล์



รูปที่ 2.5 ลักษณะของแฟลกเจลลารูปแบบต่างๆ
แหล่งที่มา : (<http://coursewares.mju.ac.th:81/e-learning47>)

2.3.4 ลักษณะการเกิดสปอร์แบบต่างๆ (รัตนภรณ์, 2556)

2.3.4.1 สปอร์ที่ถูกสร้างขึ้นเดี่ยวๆ เรียกสปอร์ในลักษณะนี้ว่า monosporous ซึ่งพบได้ในหลากหลายสกุล เช่น **Micromonospora** ซึ่งมีก้านชูสปอร์อยู่บนเส้นใยใต้ผิวอาหาร หรือบางครั้งอาจเกิดเป็นสปอร์ชนิดที่ไม่มีก้าน หรือมีก้านสั้นๆ การเกิดของสปอร์มักเริ่มจากปลายเส้นใยซึ่งจะมีการขยายขนาดมากขึ้น จากนั้นจะมีการสร้างผนังกัน ในสกุล **Thermomonospora** มีสปอร์ที่ถูกสร้างขึ้นเดี่ยวๆ ที่ปลาย aerial hypha หรืออาจถูกสร้างขึ้นบน sporophore ที่มีการแตกแขนงหรือไม่แตกแขนงก็ได้ แต่เมื่อมีการแตกแขนงซ้ำๆ กันหลายครั้งและเป็นสปอร์ที่มีก้านสั้นจะทำให้สปอร์มีลักษณะเกาะกลุ่มรวมกันเป็นกระจุก



รูปที่ 2.6 A

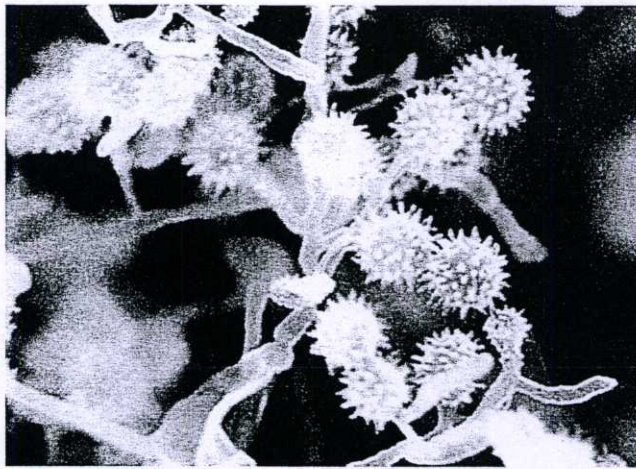


รูปที่ 2.6 B

รูปที่ 2.6 A และ B ลักษณะโคโลนีของ **Micromonospora**

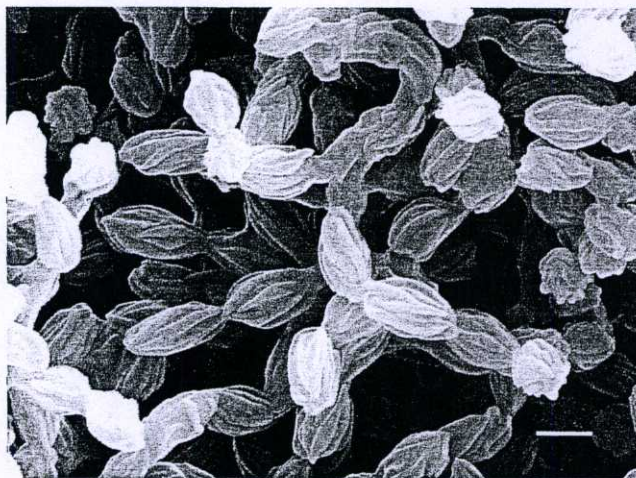
แหล่งที่มา : (<http://upload.wikimedia.org/wikipedia>) และ (<http://ijs.sgmjournals.org>)

2.3.4.2 สปอร์ที่สร้างต่อกันเป็นเส้นสาย แอคติโนมัยซีทส่วนใหญ่จะมีการสร้างสปอร์ในลักษณะนี้ การเรียกชื่อของสปอร์จะเรียกตามความยาวของสปอร์, ลักษณะของสปอร์ หรือจำนวนสปอร์ เช่น ถ้ามี 2 สปอร์ จะเรียกว่า disporous หรือ bisporous มีสปอร์จำนวน 7-20 สปอร์เรียก oligosporous หรือหากมีสปอร์เรียงตัวต่อกันเป็นสายยาวจะเรียกว่า polysporous สปอร์ที่มีการเรียงตัวตามยาวจำนวน 2 สปอร์พบได้ในสกุล **Microbispora** ซึ่งพบได้ยาก สปอร์จะมีลักษณะกลมหรือคล้ายรูปไข่ มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-3 μm และอาจพบสปอร์เรียงตัวอยู่ที่ Aerial hyphae อาจอยู่บนก้านชูสปอร์ที่มีลักษณะสั้น การสร้างสปอร์จะเริ่มจากการแตกหน่อที่ด้านข้างของ Aerial hyphae ซึ่งจะสร้างเป็นแขนงด้านข้างสั้นๆ และจะมีการเพิ่มขนาดขึ้นพร้อมกับการสร้างผนังกันห้อง ลักษณะการเรียงตัวของสปอร์แบบนี้ อาจพบได้ใน **Actinomadura echinospora** และ **Actinomadura rugatobispora**



รูปที่ 2.7 ลักษณะโคโลนีของ *Actinomadura echinospora*

แหล่งที่มา : (http://www0.nih.go.jp/saj/DigitalAtlas1/section_5)



รูปที่ 2.8 ลักษณะโคโลนีของ *Actinomadura rugatobispora*

แหล่งที่มา : (<http://www.actino.jp/DigitalAtlas/data/9/9-86.jpg>)

2.3.4.3 สปอร์ที่สร้างอยู่ภายในอับสปอร์ แอคติโนมัยซีทหลายสกุลมีการสร้างสปอร์อยู่ภายในอับสปอร์ที่มีลักษณะคล้าย Vesicle โดยสปอร์จะถูกปล่อยออกมาจากถุงนี้ อับสปอร์ของแอคติโนมัยซีทมีหลากหลายขนาด ตั้งแต่เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 2 ไมโครเมตร - 50 ไมโครเมตร ซึ่งขนาดของอับสปอร์ที่พบได้ทั่วไปคือ 10 ไมโครเมตร นอกจากนั้นอับสปอร์ของแอคติโนมัยซีทยังมีหลายรูปร่างอีกด้วย เช่น รูปทรงกระบอก รูปร่างคล้ายกระบอง รูปร่างคล้ายลูกแพร์ รูปร่างคล้ายระฆัง หรืออาจจะมีรูปร่างไม่แน่นอน เป็นต้น การเรียกชื่อของอับสปอร์จะเรียกตามจำนวนสปอร์ที่มีอยู่ภายใน เช่น อับสปอร์ที่มีจำนวนสปอร์ 2-3 จนถึง 5 สปอร์อยู่ภายใน เรียกว่า oligosporous sporangia อับสปอร์ที่มีจำนวนสปอร์ 1 สปอร์อยู่ภายใน เรียกว่า monosporous sporangia อับสปอร์ที่มีจำนวนสปอร์ 2 สปอร์อยู่ภายใน เรียกว่า bisporous sporangia และอับ

สปอร์ที่มีสปอร์จำนวนมากอยู่ภายใน เรียกว่า polysporous sporangia ลักษณะการเรียงตัวของสปอร์มีหลากหลายรูปแบบ เช่น บิดเป็นเกลียว เรียงตัวตามขนานลักษณะเป็นแถว เป็นต้น แอคติโนมัยซีทในสกุล **Actinoplanes** มีการสร้างสปอร์จำนวนมากและมีลักษณะที่หลากหลาย เช่น ลักษณะกลมและรูปร่างไม่แน่นอน ซึ่งอับสปอร์ของแอคติโนมัยซีทในกลุ่มนี้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 – 15 ไมโครเมตร และมักจะพบอับสปอร์บริเวณเส้นใยได้ผิวหนังอาหาร อย่างไรก็ตามสปอร์หลากหลายรูปแบบที่กล่าวมานี้ล้วนถูกห่อหุ้มอยู่ในอับสปอร์ทั้งสิ้น ยกเว้นแอคติโนมัยซีทในสกุล **Streptosporangium** และ **Kutzneria** ซึ่งภายในอับสปอร์ของแอคติโนมัยซีทสองสกุลนี้ จะสร้างสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้



รูปที่ 2.9 A



รูปที่ 2.9 B

รูปที่ 2.9 A และ B ลักษณะโคโลนีของแอคติโนมัยซีทในสกุล **Actinoplanes**

แหล่งที่มา : (<http://www0.nih.go.jp/saj>) และ (<http://vietsciences.free.fr/khaocuu>)

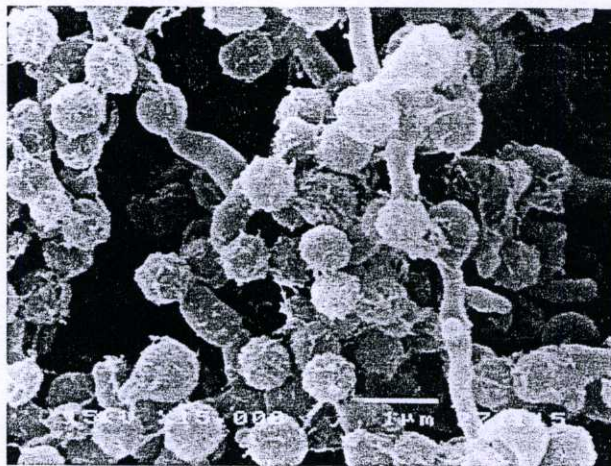
2.3.5 โครงสร้างสำคัญที่ใช้ในการจำแนกในระดับสกุล (Lechevalier, 1968 อ้างโดย Stanley et al., 1989; รัตนาภรณ์, 2556)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยซีท เป็นสิ่งสำคัญในการจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยซีทออกเป็นกลุ่มๆ โดยอาศัยกล้องจุลทรรศน์ และเลนส์ที่มีระยะในการทำงาน (Long working distance) โดยสังเกตจากการเจริญของเชือบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง (Holt et al., 1994) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ต้องพิจารณาในการจำแนกระดับสกุลมีดังต่อไปนี้

2.3.5.1. เส้นใย (Mycelium) แบ่งออกเป็นเส้นใยแบบคงสภาพ และเส้นใยที่สามารถแตกหักย่อยสลายได้ ถ้ามีเส้นใยที่มีการแตกหัก และมีวัชระที่ใช้ในการเคลื่อนที่จัดเป็น **Oerskovia** spp. ซึ่งส่วนของเส้นใยที่แตกออกมีแฟลกเจลลาเป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย หรือมีการสร้างเส้นใยทั้งหมดเพื่ออาหาร (Aerial mycelium) และได้ผิวหนังอาหาร (Substrate mycelium) ซึ่งสามารถพบได้ทั่วไป หรืออาจมีการสร้างเส้นใยเพียงชนิดเดียว ในบางสกุลอาจมีการสร้างถุงเล็กๆ (Vesicle) เช่นในสกุล **Intrasporangium** sp. ภายในเส้นใยซึ่งไม่ใช่สปอร์บนเส้นใย รวมทั้งดูการแตกแขนงของเส้นใยว่ามีลักษณะเป็นแบบใด นอกจากนั้นควรดูลักษณะและการติดของสปอร์ที่เส้นใยซึ่งอยู่เหนือผิวหนังอาหารและใต้ผิวหนังอาหารด้วย

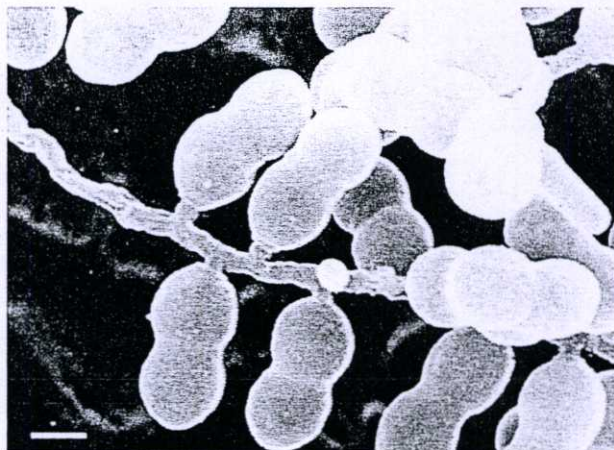
2.3.5.2 โคนิเดีย (Conidium) เป็นสปอร์ที่เกิดจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ซึ่งไม่ใช่คลาโมโดสปอร์ที่อยู่ระหว่างข้อปล้องของเส้นใย หรือสปอร์แรงจิโอสปอร์ แอคติโนมัยซีทสามารถสร้างโคนิเดียได้หลายชนิด โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น

2.3.5.2.1 โคนิเดียแบบเดี่ยวๆ (Single conidium) สามารถพบได้ในหลายสกุล เช่น *Thermoactinomyces* ซึ่งสร้างเอนโดสปอร์ที่สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงๆ ได้, *Saccharomonospora*, *Micromonospora*, *Promicromonospora* และ *Thermonospora* นอกจากนี้ในสกุล *Frankia*, *Dactylosporangium* และ *Intrasporangium* อาจจะมีการสร้าง Vesicles ที่ปลายเส้นใย ซึ่งคล้ายกับ *Actinomadura* ที่สามารถสร้าง Vesicles ได้เช่นกันหากเลี้ยงในสภาวะที่ไม่เหมาะสม



รูปที่ 2.10 ลักษณะโคโลนีของ *Microbispora humi* sp. nov
แหล่งที่มา : (<http://ijs.sgmjournals.org/content/61/5>)

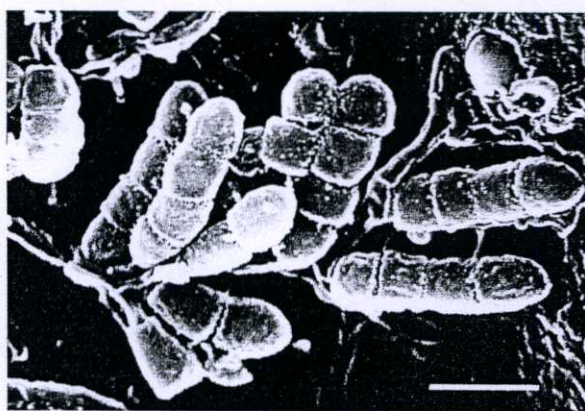
2.3.5.2.2 โคนิเดียคู่ (Pairs of conidium) เป็นโคนิเดียที่มีลักษณะติดกันเป็นคู่ๆตามยาว ซึ่งสร้างเฉพาะบนเส้นใยที่อยู่เหนือผิวอาหาร พบได้ในสกุล *Microbispora* และใน *Faenia* spp. อาจมีการสร้างโคนิเดียมทั้งบนเส้นใยที่อยู่เหนือผิวอาหารและใต้ผิวอาหาร



รูปที่ 2.11 ลักษณะโคโลนีของ *Microbispora rosea*

แหล่งที่มา : (<http://www0.nih.go.jp/>)

2.3.5.2.3 โคนิเดียที่เรียงต่อกันเป็นสายสั้นๆ (Short chain of conidium) โคนิเดียมีลักษณะนี้ยากที่จะบอกได้ว่ามีจำนวนสปอร์อยู่เท่าใด แต่จะพิจารณาจากความยาวของสปอร์ที่เรียงต่อกัน ถ้ามีการเรียงตัวของสปอร์ไม่เกิน 20 สปอร์ จัดว่าเป็นการเรียงตัวแบบสายสั้น โดยเชื้อที่สร้างสปอร์ในลักษณะนี้มีอยู่หลายชนิด บางชนิดสร้างสปอร์สั้นๆและมีถุงมาล้อมรอบ ซึ่งอาจสร้างอยู่บนเส้นใยที่อยู่เหนือผิวอาหาร หรือใต้ผิวอาหารก็ได้ เช่น *Nocardia*, *Pseudonocardia*, *Faenia*, *Saccharomonospora*, *Streptoverticillium*, *Sporichthya*, *Actinomadura*, *Microtetraspora*, *Streptoalloteichus* และ *Glycomyces*

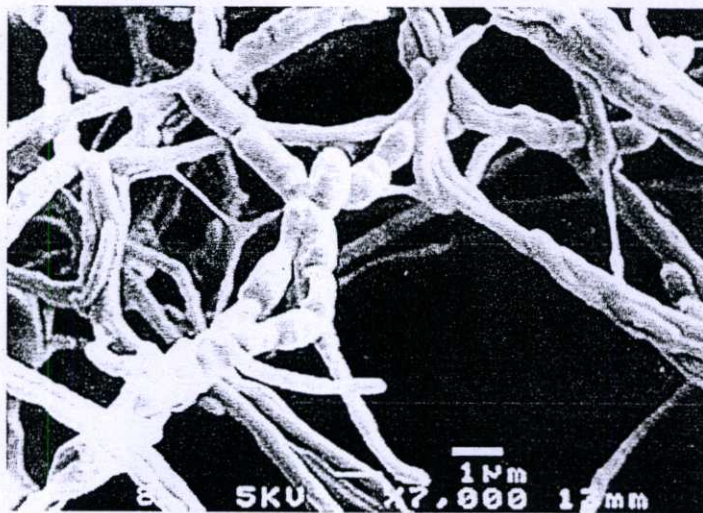


รูปที่ 2.12 ลักษณะโคโลนีของ *Microtetraspora glauca* SF2091

แหล่งที่มา : (<http://www.actino.jp/DigitalAtlas/data/9/9-21.jpg>)

2.3.5.2.4 โคนิเดียที่เรียงต่อกันเป็นสายยาว (Long chain of conidium) สามารถพบได้ในหลากหลายสกุล บางชนิดสามารถสร้างโคนิเดียที่เคลื่อนที่ได้ เช่น *Nocardioides*, *Actinosynnema*, *Kibdelosporangium*,

Pseudonocardia, *Faenia*, *Saccharomonospora*, *Streptoverticillium*, *Streptoalloteichus*, *Actinosynnema*, *Kitasatospora*, *Glycomyces*, *Nocardia*, *Streptomyces* และ *Amycolatopsis* เป็นต้น



รูปที่ 2.13 ลักษณะโคโลนีของ *Amycolatopsis orientalis* ATCC 19795

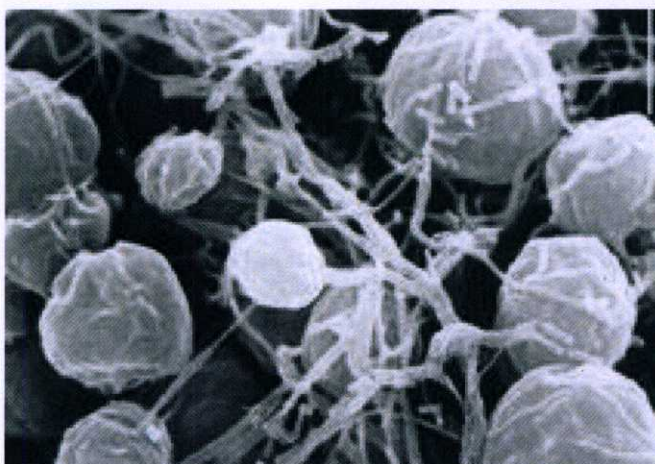
แหล่งที่มา : (<http://www0.nih.go.jp/saj/>)

2.3.5.3 อับสปอร์ (Sporangium) มีโครงสร้างเป็นถุงที่ภายในบรรจุสปอร์อยู่เป็นจำนวนมาก เกิดจากการพัฒนาของผนังเซลล์ในเส้นใยที่อยู่เหนือผิวอาหาร สามารถพบได้ใน *Kineosporia*, *Planomonospora*, *Spirillospora* และ *Planobispora* เป็นต้น

2.3.5.4 โครงสร้างอื่นๆ แอคติโนมัยซีทบางชนิดสามารถสร้างโครงสร้างที่แตกต่างออกไป เช่น บางชนิดสามารถสร้าง synnemata ที่มีสปอร์อยู่ภายใน (คล้าย fruiting body ของเชื้อราในกลุ่ม deuteromycetes) พบในสกุล *Actinosynnema* และในแอคติโนมัยซีทบางชนิดยังสามารถสร้างโครงสร้างที่เรียกว่า Multilocular sporangia ซึ่งมีลักษณะกลมบริเวณเส้นใย ภายในอาจจะไม่มีสปอร์บรรจุอยู่, มีเส้นใยอัดแน่นอยู่ภายใน หรือในบางกลุ่มอาจเป็นเพียงหยดน้ำที่ล้อมรอบสปอร์ที่มีลักษณะการเรียงตัวต่อกัน เช่นในสกุล *Kibdelosporangium* นอกจากนี้ในสกุล *Streptomyces* สามารถสร้างโครงสร้างที่เรียกว่า Sclerotia ซึ่งเป็นโครงสร้างรูปร่างกลม ภายประกอบด้วยเซลล์ที่มีลิปิดสะสมอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับเชื้อรา



รูปที่ 2.14 ลักษณะโคโลนีของ *Actinosynnema mirum*
แหล่งที่มา : (<http://www.standardsingenomics.org>)



รูปที่ 2.15 ลักษณะโคโลนีของ *Kibdelosporangium aridum*
แหล่งที่มา : (<http://www.actino.jp/DigitalAtlas>)

2.4 เอนไซม์โปรติเอส

เอนไซม์ เป็น โปรตีนที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาทางเคมี ซึ่งมีความสำคัญและจำเป็นสำหรับสิ่งมีชีวิต เนื่องจากปฏิกิริยาเคมีส่วนใหญ่ในเซลล์จะเกิดช้ามาก หรือหากไม่มีเอนไซม์อาจทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดเป็นสารเคมีชนิดอื่นที่เราไม่ต้องการได้ เซลล์บางชนิดถ้าขาดเอนไซม์ระบบการทำงานอาจเกิดความผิดปกติของเซลล์ เช่น การผ่าเหล่า (Mutation), การขาดหายไป (Deletion) เป็นต้น (<http://th.wikipedia.org/wiki/เอนไซม์>) นอกจากนี้ เอนไซม์ยังถือว่าเป็น “Green Chemicals” เนื่องจากมีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและใช้งานกันอย่างกว้างขวาง ในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับสินค้าในครัวเรือน (Mane et al., 2013)

โปรติเอสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์โปรตีนและพอลิเพปไทด์ ให้แตกตัวเป็นกรดอะมิโนและเพปไทด์สายสั้นๆ ซึ่งมีเอนไซม์ตัวที่สำคัญ 2 ตัวได้แก่ เอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์ไคโมทริปซิน

สามารถแบ่งกลุ่มของเอนไซม์โปรติเอสออกเป็น 6 กลุ่มใหญ่ๆ ได้ดังนี้

1. Serine proteases
2. Threonine proteases
3. Cysteine proteases
4. Aspartate proteases
5. Glutamic acid proteases
6. Metalloproteases

นอกจากนั้นยังสามารถแบ่งกลุ่มของเอนไซม์โปรติเอสออกเป็น 3 กลุ่มตาม pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานได้ดังนี้

1. Acid proteases
2. Neutral proteases
3. Alkaline proteases (Basic protease)

โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในอุตสาหกรรมมากมายหลายด้าน เช่น

-อุตสาหกรรมผลิตเบียร์

หลังจากการต้มข้าวมอลต์ในเวิร์ต เบียร์จะยังมีลักษณะขุ่นเนื่องจากมีโปรตีนของข้าวมอลต์ที่แขวนลอยอยู่ เอนไซม์โปรติเอสจะช่วยย่อยสลายโปรตีนให้มีขนาดเล็กลงหรือละลายในน้ำได้ดี จึงช่วยทำให้น้ำเบียร์ใสขึ้น

-อุตสาหกรรมผลิตเนยแข็ง ใช้เอนไซม์โปรติเอสตกตะกอนเคซีน ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีอยู่ในน้ำนมเพื่อใช้ผลิตเนย

-อุตสาหกรรมสารซักล้าง เป็นสารเติมแต่งสำหรับกระบวนการผลิตสารซักฟอก

-อุตสาหกรรมด้านเภสัชกรรม ช่วยย่อยอาหาร, รักษาแผลที่เป็นหนอง

-อุตสาหกรรมเนื้อสัตว์ ช่วยทำให้เนื้อสัตว์มีความนุ่มมากขึ้น

2.5 เอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากจุลินทรีย์

จุลินทรีย์เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่มีประสิทธิภาพ เนื่องจากมีความหลากหลายทางชีวเคมีและง่ายต่อการคัดแต่งพันธุกรรม เอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากจุลินทรีย์มีมากกว่า 40% ของปริมาณเอนไซม์โปรติเอสทั่วโลก

แบคทีเรีย เอนไซม์โปรติเอสทางการค้าเกือบทุกชนิด เช่น Neutral protease และ Alkaline protease ผลิตได้จากแบคทีเรียในجنัส *Bacillus* sp. เอนไซม์ในกลุ่ม Neutral protease มีช่วง pH ที่เหมาะสมต่อการทำงาน อยู่ที่ pH 5-8 และมีความสามารถในการทนความร้อนต่ำ เนื่องจากมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาอยู่ในระดับปานกลาง Neutral protease จากแบคทีเรียมีความรุนแรงในการเกิดปฏิกิริยาค่ากว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากสัตว์ จึงเหมาะแก่การใช้งานในอุตสาหกรรมอาหาร Neutrase เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Neutral protease ที่สามารถทนต่อสารยับยั้งจากพืช ซึ่งเหมาะแก่การใช้งานในอุตสาหกรรมผลิตเบียร์ ความสามารถในการทนความร้อนต่ำเป็นประโยชน์สำหรับการควบคุมความไวของการเกิดปฏิกิริยาในระหว่างการย่อยสลายในสถานะที่มีความสามารถในการทำงานต่ำ Neutral protease บางชนิดจัดอยู่ในกลุ่ม Metalloprotease ซึ่งต้องการไอออนของโลหะที่มีประจุบวกสองในการทำงาน ในขณะที่ Neutral protease ที่จัดอยู่ในกลุ่ม Serine protease ไม่มีปฏิกิริยาต่อ Chelating agent

เอนไซม์ในกลุ่ม Alkaline protease จากแบคทีเรียทำงานได้ดีในช่วง pH ที่เป็นด่าง เช่น pH 10 และสามารถใช้ยับยั้งได้ดีเฉพาะอย่าง อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ที่ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งมีคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับการใช้งานในอุตสาหกรรมสารซักล้าง

เชื้อรา ผลิตเอนไซม์ได้หลากหลายชนิดมากกว่าแบคทีเรีย เช่น *Aspergillus oryzae* สามารถผลิตได้ทั้ง Acid protease, Neutral protease และ Alkaline protease ซึ่งสามารถทำงานได้ในช่วง pH 4 - 11 อย่างไรก็ตาม เอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อราที่มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ต่ำ และทนความร้อนได้น้อยกว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากแบคทีเรีย เชื้อราจะผลิตเอนไซม์เมื่อเลี้ยงในอาหารแข็ง Acid protease มี pH ที่เหมาะสมระหว่าง 4 - 4.5 และมีความเสถียรมากที่สุดที่ pH 2.5 และ 6 จึงนิยมใช้ในการผลิตเนยแข็งเนื่องจากมีช่วง pH และอุณหภูมิที่จำเพาะ Neutral protease จากเชื้อราจัดอยู่ในกลุ่ม Metalloprotease ทำงานได้ดีที่ pH 7 และถูกยับยั้งได้ด้วยสารจำพวก Chelating agent หากวิเคราะห์จากการย่อยสลายโปรตีนและการทำงานที่จำเพาะในการย่อยสลายพันธะ Hydrophobic ของกรดอะมิโน Neutral protease จะช่วยเสริมการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสจากพืช, สัตว์ และแบคทีเรีย ซึ่งช่วยให้ความรุนแรงในการเกิดปฏิกิริยาให้ต่ำลง นอกจากนี้ Alkaline protease ยังสามารถใช้ตัดแปลงโปรตีนในอาหารได้อีกด้วย

ไวรัส เอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากไวรัส เป็นส่วนประกอบสำคัญในกระบวนการสร้างโปรตีนในไวรัส ซึ่งเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรค เช่น เอดส์ และมะเร็ง สามารถพบเอนไซม์ในกลุ่ม Serine protease, Aspartic protease และ Cysteine protease ได้ในไวรัสหลากหลายชนิด Aspartyl protease เป็นส่วนประกอบสำคัญในกระบวนการ Assembly และกระบวนการ Replication ของไวรัสในกลุ่ม Retroviral มีงานวิจัยหลากหลายงานที่ศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการแสดงออกมา, กระบวนการทำให้บริสุทธิ์ และกระบวนการวิเคราะห์เอนไซม์ ในกลุ่ม Aspartic protease ที่ได้จากไวรัส งานวิจัยส่วนใหญ่ให้ความสนใจโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์โปรติเอส และปฏิกิริยาระหว่างสารยับยั้งที่สังเคราะห์ขึ้น ซึ่งตรวจสอบได้จากการออกแบบสารยับยั้งที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแพร่กระจายของเชื้อ HIV

แอกติโนมัยซีท เป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ซึ่งมีชีวเคมีที่หลากหลาย เอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากแอกติโนมัยซีทเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Extracellular enzyme ซึ่งผลิตออกมาภายนอกเซลล์ จัดเป็นสารจำพวก Secondary metabolite เอนไซม์ที่ได้จะมีความบริสุทธิ์สูงเนื่องจากปราศจากสารพิษ และยังเป็นเอนไซม์ที่มีความปลอดภัยเหมาะแก่การใช้ทำเป็นยาในการรักษาอาการต่างๆ เช่น โรคทางช่องปาก เป็นต้น (Jeyadharshan, 2013)

2.6 เอนไซม์โปรติเอสจากแอกติโนมัยซีท

2.6.1 ชนิดของเอนไซม์ (Jignasha, 2007)

เอนไซม์ที่ผลิตได้จากแอกติโนมัยซีทส่วนใหญ่จะเป็นเอนไซม์ในกลุ่มอัลคาไลน์โปรติเอส (Alkaline protease) ซึ่งทำงานได้ดีที่ pH 8-13 เชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มแอกติโนมัยซีทที่สามารถผลิตเอนไซม์ ได้แก่ *Streptomyces clavuligerus*, *Streptomyces fungicidicus*, (Subramani et al., 2009) *Saccharomonospora viridis*, (Shilpa et al., 2012) *Actinomyces pyogenes* (Peter et al., 1989) และ *Nocardiosis kunsanensis* sp. nov. (Chun et al., 2000) เป็นต้น

2.6.2 แหล่งที่พบ

ดินเป็นแหล่งใหญ่ที่สุดที่พบแอกติโนมัยซีท โดยสามารถพบเป็นจำนวนประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของจุลินทรีย์ทั้งหมดที่มีอยู่ในดิน แอกติโนมัยซีทในดินส่วนใหญ่เป็นแซโพรไฟต์ (Saprophyte) ช่วยย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ และย่อยสลายสารประกอบจำพวก พอลิเมอร์ที่ซับซ้อน เช่น ลิกนิน ไคติน สามารถพบแอกติโนมัยซีทในดินที่มีฮิวมัสและแคลเซียมคาร์บอเนต เป็นจำนวนมากถึง 10^6 เซลล์ต่อน้ำหนักดินแห้ง ในขณะที่ดินที่มีน้ำขัง ไม่มีออกซิเจน และดินที่เป็นกรดจะพบแอกติโนมัยซีทในจำนวนที่น้อยกว่า คือ $10^2 - 10^3$ เซลล์ต่อน้ำหนักดินแห้ง (รัชณี, 2552) ชนินทร์ และคณะ (2546) รายงานการคัดแยก แอกติโนมัยซีทจากดินในป่าเบญจพรรณและป่าเต็งรัง เขตรักษาพันธุ์สัตว์หายากแห่ง โดยคัดแยกได้ แอกติโนมัยซีทได้ 160 และ 186 ไอโซเลทตามลำดับ ส่วนใหญ่เป็นแอกติโนมัยซีทในสกุล *Streptomyces* และพบแอกติโนมัยซีทในกลุ่มที่หายากจำนวน 10 สกุล คือ *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Amycolatopsis*, *Microbispora*, *Micromonospora*, *Microtetraspora*, *Nocardia*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora* และ *Streptosporangium* Wang et al. (2001) รายงานการค้นพบแอกติโนมัยซีทสกุล *Actinopolymorpha* จากดินในป่าเขตร้อน (Tropical rainforest) ในประเทศสิงคโปร์ นอกจากนี้สามารถพบแอกติโนมัยซีทจากดินในป่าต่างๆ เช่น ป่าสนในอเมริกาเหนือและอินเดีย ป่าฝนเขตร้อนในสิงคโปร์ ป่าภูเขาในญี่ปุ่น ป่าใบแข็งในออสเตรเลีย เป็นต้น (Jayasinghe and Parkinson, 2008) Wang et al. (2006) พบแอกติโนมัยซีทสกุล *Streptacidiphilus* ในดินนาข้าวของประเทศไทย ส่วน Zitouni et al. (2005) คัดแยกแอกติโนมัยซีทจากทะเลทรายซาฮารา ประเทศอัลจีเรีย พบแอกติโนมัยซีทสกุล *Nocardiosis* และ *Saccharothrix* จำนวน 54 และ 32 ไอโซเลทตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบแอกติโนมัยซีทสกุล *Pseudonocardia* ในดินเขตแอนตาร์กติกที่แห้งแล้งแถบขั้วโลกใต้ (Prabhar et al., 2004)

บริเวณรอบรากของพืช Gesheva (2002) คัดแยกแอกติโนมัยซีทสกุล *Streptomyces*, *Micromonospora* และ *Nocardia* จากดินบริเวณรอบรากพืชตระกูลส้ม Jiménez-Esquilín and Roane (2005) รายงานว่าจำนวนแอกติโนมัยซีทในดินบริเวณรอบรากพืชจำพวก *Artemisia* ซึ่งทั้งหมดจัดอยู่ในสกุล *Streptomyces*

น้ำเป็นอีกแหล่งหนึ่งที่สามารถพบแอกติโนมัยซีท ซึ่งสามารถพบได้ทั้งในแหล่งน้ำจืด แหล่งน้ำเค็ม (Subramani *et al.*, 2009) ดินตะกอนใต้ทะเล (Colquhoun *et al.*, 1998; Pathom-aree *et al.*, 2006) แอกติโนมัยซีทที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำที่มีรายงานไว้ส่วนใหญ่จัดอยู่ในสกุล *Micromonospora* และ *Streptomyces* (Jiang and Xu, 1996; Terkina *et al.*, 2002)

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า สามารถพบแอกติโนมัยซีทได้จากแหล่งอื่นๆ ได้แก่ ของเสียจากโรงฆ่าสัตว์, (Radhika *et al.*, 2008) พื้นผิวของหินในเหมืองหินชนวนยุคกลาง (Medieval slate mine) (Carlsohn *et al.*, 2007) และในไลเคน (González *et al.*, 2005) เป็นต้น

2.7 สารออกฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ

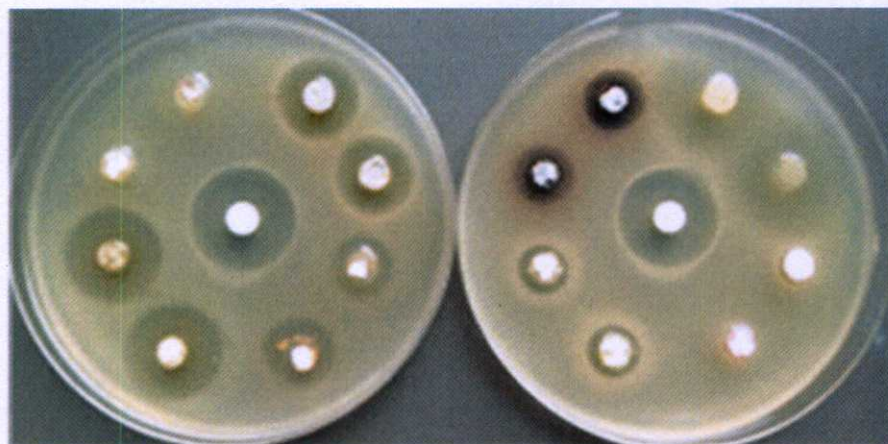
สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive compounds) คือสารจากสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติที่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ การออกฤทธิ์อาจจะก่อให้เกิดผลดีหรือผลเสียเกิดขึ้นได้ ขึ้นอยู่กับชนิดของสารและปริมาณที่ได้รับสาร (<http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2732/bioactive-ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ>) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพต้องมีความจำเพาะเจาะจง เช่น มีฤทธิ์จำเพาะต่อเซลล์ที่ผิดปกติ มีฤทธิ์จำเพาะต่อเชื้อจุลินทรีย์ในบางชนิด เป็นต้น (<http://www.vcharkarn.com/varticle/37351>)

แอกติโนมัยซีทเป็นจุลินทรีย์ที่ผลิตสารในกลุ่ม Secondary metabolite ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลายชนิด เช่น เครื่องสำอาง, วิตามิน, แร่ธาตุ, สารกำจัดวัชพืช, สารปฏิชีวนะ, ยาฆ่าแมลง, สารต้านปรสิติ และเอนไซม์ในกลุ่ม Cellulose และ Xylasase ซึ่งใช้ในกระบวนการบำบัดน้ำเสีย แอกติโนมัยซีทเป็นสิ่งมีชีวิตที่ดำรงชีวิตอย่างอิสระ, ย่อยสลายซากพืชที่เน่าเปื่อย และเป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักที่ผลิตสารยับยั้งทางชีวภาพ (Valli *et al.*, 2012). นักวิจัยให้ความสนใจจุลินทรีย์ในกลุ่มแอกติโนมัยซีทที่ได้จากสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน เนื่องจากสามารถผลิตสารในกลุ่ม Secondary metabolite ชนิดใหม่ได้ มีการรายงานว่แบคทีเรียในสกุล *Streptomyces* sp. สามารถผลิตสารยับยั้งทางชีวภาพและสารจำพวก Secondary metabolite ที่มีประสิทธิภาพหลากหลายชนิด ซึ่งสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้ประมาณ 80% มาจาก *Streptomyces* sp. ทั้งสิ้น (Thenmozhi *et al.*, 2011)

สารที่ได้จากธรรมชาติ ยังคงเป็นทางเลือกหนึ่งที่สำคัญสำหรับการผลิตยาชนิดใหม่ๆ แหล่งที่ผลิตสารจากธรรมชาติ ได้แก่ แบคทีเรีย รา ยีสต์ สาหร่าย โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มย่อยๆ ของสายวิวัฒนาการ (Paul *et al.*, 2005) ยกตัวอย่างเช่น เมื่อนำแบคทีเรียจำนวน 53 ชนิดมาทดสอบการสร้างสารยับยั้งทางชีวภาพ พบว่ามีแบคทีเรียเพียงแค่ 5 ชนิดเท่านั้นที่สามารถผลิตสารออกมาได้ แบคทีเรียจำนวน 5 ชนิดนี้อยู่ในกลุ่มแอกติโนมัยซีท ซึ่งสามารถผลิตสารได้มากกว่า 7000 ชนิด (Keller and Zengler, 2004)

แอสโคไมซีตเป็นสิ่งมีชีวิตที่ดำรงชีวิตอย่างอิสระ, ย่อยสลายซากพืชที่เน่าเปื่อย และเป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักที่ผลิตสารยับยั้งทางชีวภาพ (Valli *et al.*, 2012) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์กลุ่มสำคัญ ที่สามารถสร้างสารในกลุ่ม Secondary metabolite ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพหลากหลายชนิด ได้แก่ สารปฏิชีวนะที่ต่อต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส และยีสต์ ซึ่งมีความสำคัญทางการแพทย์ และเกษตรกรรมเป็นอย่างมาก นอกจากนี้ จุลินทรีย์ในกลุ่มแอสโคไมซีตยังสามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการปราบศัตรูพืช สารที่เป็นพิษต่อแมลง สารต้านมะเร็ง รวมไปถึงสารปราบวัชพืช และสารที่มีฤทธิ์ในการก่กระบวนภูมิคุ้มกัน เป็นต้น (Waksman and Lechevalire, 1962) จากงานวิจัยของ Shih (Shih *et al.*, 2003) แสดงให้เห็นว่าแอสโคไมซีตสามารถควบคุมเชื้อก่อโรคได้ โดยนำเมล็ดกะหล่ำมาเคลือบด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ของ *Streptomyces padanus* พบว่าสามารถลดการเกิดโรค Damping off ที่เกิดจาก *Rhizoctonia solani* ได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ *Streptomyces* sp. ในการควบคุมโรค Damping off และ Root rot ที่เกิดจาก *Rhizoctonia solani* ในถั่วและมะเขือเทศด้วยเช่นกัน มีการรายงานจาก Antibiotic Literature Database (ABL) ว่าสารออกฤทธิ์ที่สร้างจากจุลินทรีย์ 23,000 ชนิด พบว่ามาจากเชื้อรา 42 เปอร์เซ็นต์ มาจาก *Streptomyces* 32.1 เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ 10.8 เปอร์เซ็นต์ และแอสโคไมซีตที่หายากอีก 15.1 เปอร์เซ็นต์ และหากพิจารณาเฉพาะสารที่มีฤทธิ์ในการต่อต้านจุลินทรีย์ที่มีอยู่ประมาณ 8,000 ชนิด พบว่าผลิตได้จาก *Streptomyces* 45.6 เปอร์เซ็นต์ เชื้อรา 21.5 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรีย 16.9 เปอร์เซ็นต์ และแอสโคไมซีตที่หายากอีก 16 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแบ่งเป็น *Micromonosporaceae* 38.1 เปอร์เซ็นต์ *Pseudonocardiaceae* 15 เปอร์เซ็นต์ *Thermomonosporaceae* 14 เปอร์เซ็นต์ *Nocardia* 11 เปอร์เซ็นต์ *Streptosporangiaceae* 6 เปอร์เซ็นต์ *Nocardioidea* 2.6 เปอร์เซ็นต์ และอื่นๆ อีก 13.3 เปอร์เซ็นต์ (Lazzarini *et al.*, 2000) สารปฏิชีวนะที่ผลิตจากแอสโคไมซีตในสกุล *Streptomyces* sp. ได้แก่ สารต่อต้านการเจริญของแบคทีเรีย เช่น Ampicillin และ Penicillin-N ซึ่งมีโครงสร้างเป็นวงเบตาแลกแทม (β -lactam) ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการสร้างเพปติโดไกลแคนที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังพบว่า *S. clavuligerus* สามารถผลิต Clavams (Muller *et al.*, 1983) ซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เบตาแลกแทมเมส (β -lactamase) ที่ผลิตโดย *Staphylococci* และแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่นๆ ส่วน Streptomycin ที่ผลิตโดย *S. griseus* (Herzog, 1964) และ Neomycin ที่ผลิตโดย *S. fradiae* (Sasarman *et al.*, 1964) ออกฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียแกรมลบชนิดแท่ง (Bacilli) และกลม (Cocci) บางชนิด รวมถึงแบคทีเรียแกรมบวกชนิดกลมบางประเภท และยังมีผลต่อ *Mycobacterium tuberculosis* สารที่มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อราได้แก่ Nystatin, Polyoxin และ Anthracycline เป็นต้น สำหรับ Anthracycline นอกจากจะเป็นสารต้านการเจริญของเชื้อราแล้วยังเป็นสารต้านมะเร็งได้อีกด้วย ซึ่งไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Topoisomerase II ทำให้ไม่สามารถเกิดการจำลองตัวของดีเอ็นเอได้ (Goodfellow *et al.*, 1988) สารต่อต้านเชื้อรา และยีสต์ที่พบใน *Streptomyces* ส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่ม Polyene (Ball *et al.*, 1988) ซึ่งมีคุณสมบัติต่อต้านการเจริญของเชื้อราและยีสต์ แต่ไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Norman *et al.*, 1972) ในการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา และยีสต์ จะเข้าจับกับ Sterol บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ มีผลทำให้โครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้เซลล์สูญเสียความสามารถในการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารต่างๆ เซลล์จึงไม่สามารถรักษาสภาพไว้ได้ (Hamilton-Miller, 1973) สาร

ต่อต้านเชื้อราที่พบใน *Streptomyces* มีหลายชนิด เช่น Blastidicin S ซึ่งผลิตโดย *S. griseochromogens* (Takeuchi et al., 1958) Kasugamycin ผลิตโดย *S. kasugaensis* (Sato, 1983) และ Polomycin D ผลิตโดย *S. cacaoi* (Isono and Suzuki, 1979) เป็นต้น นักวิจัยให้ความสนใจจุลินทรีย์ในกลุ่มแอกติโนมัยซีทที่ได้จากสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน เนื่องจากสามารถผลิตสารในกลุ่ม Secondary metabolite ชนิดใหม่ได้ ซึ่งสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้ประมาณ 80เปอร์เซ็นต์ มาจาก *Streptomyces* sp. ทั้งสิ้น (Thenmozhi et al., 2011)



รูปที่ 2.16 สารออกฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. ซึ่งยับยั้งการเจริญของ *E. coli* โดยวิธี Agar well diffusion

แหล่งที่มา : (<http://www.biology.mcmaster.ca/fcl/elliott/web/research.html>)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3. ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่าง การแยกและการคัดแยกเชื้อ

3.1.1 การเก็บตัวอย่างดิน

ทำการเก็บตัวอย่างดินบริเวณป่าชายเลนที่มีความอุดมสมบูรณ์ในเขตพื้นที่ศูนย์ศึกษาธรรมชาติป่าชายเลน ตำบลคลองตำหรุ อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี โดยสุ่มเก็บตัวอย่างดินจำนวน 10 ตัวอย่าง โดยใช้พลั่วขุดหลุมลึกระดับ 0-15 เซนติเมตร ซึ่งเป็นความลึกระดับไทรพรวน ทำการวัดค่าความเป็นกรดเบสของดิน โดยบันทึกตำแหน่งจุดที่เก็บและค่าความเป็นกรดเบสที่วัดได้แต่ละจุดเก็บตัวอย่างละ 500 กรัม เก็บดินใส่ถุงเก็บตัวอย่างและนำตัวอย่างดินที่เก็บได้แต่ละตัวอย่าง (samples) มาทำการคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยซีท (Actinomycetes) ในห้องปฏิบัติการ

3.1.2 การคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีท

นำตัวอย่างดินข้อ 3.1.1 มาแยกเชื้อโดยวิธีด้วยการชั่งดินมา 1 กรัม จากตัวอย่างดินที่ตากทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์แล้วใส่ลงไปในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นหรือสารละลายฟีนอลปลอดเชื้อ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำส่วนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer) กำหนดเป็นระดับการเจือจางที่ 10^{-1} นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) นาน 6 นาที จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างในน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีระดับความเจือจางจนถึง 10^{-5} นำสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-3} , 10^{-4} และ 10^{-5} ใส่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน (เช็ครูการเจริญของเชื้อที่แยกได้ทุกสัปดาห์) ซึ่งเติม cycloheximide 100 ไมโครลิตรต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร บ่มงานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน (เช็ครูการเจริญของเชื้อที่แยกได้ทุกสัปดาห์)

3.1.3 การหาสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่าง

3.1.3.1 การหาน้ำหนักดิน

เทสารแขวนลอยของดินของความเจือจางที่ 10^{-1} ที่เหลืออยู่ลงในบีกเกอร์ที่ทราบน้ำหนัก นำบีกเกอร์ไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนน้ำระเหยหมดและน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักของบีกเกอร์อีกครั้ง คำนวณหาน้ำหนักของดินที่ใช้ในการแยกเชื้อจากผลต่างของน้ำหนักบีกเกอร์ก่อนและหลังอบ (ภาคผนวก ข)

3.1.3.2 การหาปริมาณความชื้น

ชั่งตัวอย่างดินมา 1-2 กรัมใส่ในถ้วยเซรามิกหรือบีกเกอร์ที่ทราบน้ำหนัก นำบีกเกอร์ไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสจนน้ำหนักคงที่ คำนวณหาปริมาณความชื้นในดินตัวอย่างจากน้ำหนักดินที่หายไป (ภาคผนวก ข)

3.1.3.3 การวัดค่าความเป็นกรดเบส

ชั่งตัวอย่างดิน 2 กรัมใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ค่อยๆ เติมน้ำกลั่นลงไปทีละน้อย โดยคนตัวอย่างไปด้วยในขณะเดียวกันด้วยข้อคนตักสารหรือแท่งแก้ว จนสังเกตเห็นแผ่นฟิล์มบางๆ บนผิว จึงทำการวัดค่าความเป็นกรด-เบส ทำซ้ำ 3 ครั้ง รายงานผลในรูปค่าเฉลี่ยจากการวัดทั้ง 3 ครั้ง

3.1.4 การแยกเชื้อและการเก็บรักษา

นำตัวอย่างเชื้อในอาหารที่ได้จากข้อ 3.1.2 ทำการแยกเชื้อเพื่อให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยว ด้วยเทคนิคการ cross streak บนอาหาร Starch - Casein agar ที่เติม cycloheximide 100 ไมโครลิตรต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน เพื่อให้เชื้อเจริญเติบโตเต็มที่ จากนั้นนำเชื้อที่คัดเลือกมา streak บนอาหารสูตร Soya Bean Flour - Mannitol agar (SFM agar) (ภาคผนวก ก) ที่เติม cycloheximide 100 ไมโครลิตรต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน เมื่อแยกได้เป็นโคโลนีเดี่ยวๆ แล้วทำการถ่ายเชื้อ (subculture) ลงบนหลอดอาหารแข็ง Hickey Tresner agar (ภาคผนวก ก) ที่ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนเชื้อเจริญเต็มที่เก็บไว้สำหรับทำการทดลองในขั้นต่อไป และทำการกำหนดหมายเลขไอโซเลต

3.1.5 การเตรียม spore suspension (Klanbut, 2013)

เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีท์ที่เจริญเติบโตเต็มที่ทุกไอโซเลตบนอาหาร Starch - Casein agar ที่เติม cycloheximide จากนั้นใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อชุบเอสปอร์บริเวณผิวหน้าอาหารจนทั่ว แล้วจึงทำการเทลง centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร ทำการผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้เส้นใยสปอร์เกิดการแตกหักออกจากกัน จากนั้นนำไปกรองผ่านสำลีมาเชื้อเพื่อกรองเอาส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่อาจติดมากับสปอร์ออก นำส่วนที่กรองถ่ายใส่ centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตรหลอดใหม่ ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5-10 นาที เทส่วนละลายใส่ทิ้งไป และทำการผสมตะกอนของเชื้อที่ได้เป็นเวลาเล็กน้อย เพื่อทำการกระจายตัวสปอร์ที่ยังคงเหลืออยู่ในหยดน้ำภายในหลอด แล้วจึงทำการ resuspension ด้วยกลีเซอรอล 20% (w/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำสปอร์ที่ได้ไปทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำเป็น stock culture

3.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานและชีวเคมีของเชื้อ (วิวัฒน์ และเอกภพ, 2549)

3.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญของเชื้อ (Morphological and Cultural characteristics)

ตรวจสอบลักษณะทางการเจริญ โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่กำหนดอยู่ใน International Streptomyces Project (ISP) ชนิด ISP medium no.2 (Yeast extract - malt extract agar) (ภาคผนวก ก) ด้วยวิธี crosshatch streak ที่ป้อมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบผลโดยการดูการเจริญ สีของโคโลนีด้านบน สีของโคโลนีด้านล่างและแรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBs/IBCC color system) (ภาคผนวก ค) และตรวจดูลักษณะของเส้นใยและสปอร์ด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนแผ่นสไลด์ (ภาคผนวก ง) แล้วทำการส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์

3.2.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ (Physiology and Biochemistry characteristics)

3.2.2.1 การตกตะกอน (Coagulation) และการย่อยสลายโปรตีน (Peptonization) ในน้ำนม (Skim milk)

เชี่ยเชื้อแอกติโนมัยซีททุกไอโซเลตจำนวนหนึ่งห่วงเชี่ยเชื้อ (loop) ลงบนอาหาร Skim milk 10% (ภาคผนวก ก) และ Skim milk agar (ภาคผนวก ก) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปป้อมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ถ้ามีการตกตะกอนของโปรตีนจะเกิดตะกอนในน้ำนมได้กั้นหลอดอาหาร Skim milk 10% และถ้ามีการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนมเกิดขึ้น น้ำนมซึ่งมีสีขาวขุ่นจะเปลี่ยนเป็นสารละลายใสบนอาหาร Skim milk agar

3.2.2.2 การย่อยสลายเจลาติน (Gelatin liquefaction)

เชี่ยเชื้อแอกติโนมัยซีททุกไอโซเลตลงในอาหารเหลว Bouillon gelatin broth (ภาคผนวก ก) ที่เตรียมไว้ในหลอดทดลอง จากนั้นนำไปป้อมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำหลอดทดลองที่เพาะเลี้ยงไว้มาแช่ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เปรียบเทียบกับหลอดที่ไม่ได้ใส่เชื้อ ถ้ามีการย่อยสลายเจลาตินจะไม่เกิดการแข็งตัวของเจลาติน

3.2.2.3 การย่อยสลายไนเตรท (Nitrate reduction)

เชี่ยเชื้อแอกติโนมัยซีททุกไอโซเลตลงในอาหารเหลว Peptone KNO_3 broth (ภาคผนวก ก) ที่เตรียมไว้ในหลอดทดลอง จากนั้นนำไปป้อมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบผลโดยการเติมสารละลายกรดซัลฟานิลิก (ภาคผนวก จ) ลงไป 2 หยดและสารละลาย N,N-dimethyl-L-naphthylamine (ภาคผนวก จ) ลงไป 3 หยด ถ้าเชื้อมีการเปลี่ยนไนเตรตเป็นไนไตรต์ สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูจนถึงสีแดงที่บริเวณผิวหน้าของอาหาร

3.2.2.4 การย่อยสลายแป้ง (Starch hydrolysis)

เชี่ยเชื้อแอกติโนมัยซีททุกไอโซเลตจำนวนหนึ่งห่วงเชี่ยเชื้อ (loop) ลงบนอาหาร ISP medium no.4 (Inorganic salts-starch agar) (ภาคผนวก ก) จากนั้นนำไปป้อมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็น

เวลา 14 วัน ตรวจสอบผลโดยการเติมสารละลายแกรมไอโอไดนลงบนอาหารที่เพาะเชื้อไว้ ถ้ามีการย่อยสลายแป้งเกิดขึ้นจะเกิดบริเวณใสรอบๆ โคโลนีของเชื้อ แต่ถ้าไม่มีการย่อยสลายแป้งจะเกิดสีน้ำเงินแทน

จากการศึกษาในข้อ 3.2 สามารถจัดกลุ่มเชื้อเป็นกลุ่มต่างๆ และนำตัวแทนของเชื้อแต่ละกลุ่มมาทำการศึกษาในขั้นต่อไป

3.3 การเตรียมสารละลายสปอร์เพื่อใช้ในการทดสอบการสร้างเอนไซม์เบื้องต้น (คณิงกานต์ และ อัญชติ, 2543)

3.3.1 คัดเลือกเชื้อจำนวน 20 ไอโซเลทที่แตกต่างกัน โดยนำโคโลนีเดี่ยวของแอคติโนมัยซีทที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Starch casein agar ทำการเติมสารละลาย Tween-80 0.1 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำ suspension ของสปอร์มานับจำนวนสปอร์โดยใช้ Haemocytometer ให้ได้จำนวนสปอร์เท่ากับ 1×10^8 สปอร์ / มิลลิลิตร

3.3.2 นำสารละลายแขวนลอยของสปอร์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหาร Skim milk agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 2 สัปดาห์ ตรวจสอบการผลิตเอนไซม์โดยวัดจากความกว้างของวงใส (Clear zone)

3.4 Spore pre-germination และการ Inoculation (Khanungkan, 2013)

ทำการดูด spore suspension 500 μ L ลงในอาหารเหลว 25 มิลลิลิตร International *Streptomyces* Project (ISP2) ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 230 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใส (supernatant) ทิ้งและเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 10 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer ที่ 450 นาโนเมตร

คำนวณค่าความเข้มข้นของสปอร์เพื่อทราบปริมาณของสปอร์เริ่มต้นที่เท่ากันคือ 3×10^6 pre-germinated spores (gs) ในการ inoculate ลงในอาหารเหลวต่อไป โดยคำนวณจากสูตร

$$C = (OD_{450} / 0.04) \times (4 \times 10^6) \text{ gs mL}^{-1}$$

$$= OD_{450} \times 10^8 \text{ gs mL}^{-1}$$

$$V = (3 \times 10^6 / C) \times 1000 \mu\text{L}$$

3.5 การสกัดเอนไซม์ Alkaline Protease

คัดเลือกไอโซเลทที่ทำให้เกิดขนาดของวงใสกว้างที่สุดบนอาหาร Skim milk agar มาเพาะเลี้ยงในอาหาร Yeast extract Malt extract agar (YEME) ปริมาตร 50 มิลลิลิตรจากนั้นทำการบ่มในสภาวะเขย่าโดยใช้ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที

เป็นเวลา 10 นาที ทำการเก็บส่วนใสที่ได้ (Supernatant) เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมในขั้นตอนต่อไป

3.6 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสโดยใช้วิธี Azocasein method (คณิงกานต์ และ อัญชลี, 2543)

3.6.1 ตรวจสอบหา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

นำเอนไซม์ที่ได้จากขั้นตอนที่ 3.4.6 มาหา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานโดยใช้วิธี Azocasein method ซึ่งใช้ Citrate - Phosphate buffer (pH 7), Phosphate buffer (pH 8), Borate buffer (pH 8), Borate buffer (pH 9), Tris – EDTA buffer (pH 9), Borate buffer (pH 10), Ammonium buffer (pH 10) และ Borate buffer (pH 11) จากนั้นทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร โดยใช้ Spectrophotometer

*Control เติมน้ำกลั่นแทนเอนไซม์และ Buffer

3.6.2 ตรวจสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

นำเอนไซม์ที่ได้จากขั้นตอนที่ 3.4.6 มาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานโดยใช้วิธี Azocasein method ใช้ buffer pH ที่เหมาะสมซึ่งได้จากการทดลองในขั้นตอนที่ 8 ทำการบ่มที่อุณหภูมิต่างกัน ได้แก่ 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร โดยใช้ Spectrophotometer

3.6.3 การหาความเสถียรของเอนไซม์

นำเอนไซม์ที่ได้จากขั้นตอนที่ 3.7.6 ไปบ่มใน Water bath ที่อุณหภูมิต่างๆกันดังนี้ 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บเอนไซม์ทุกๆ 10 นาที ครั้งละ 20 ไมโครลิตร จนครบ 1 ชั่วโมง ทำการทดลองเช่นเดียวกับการหา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ และใช้ buffer ที่ได้จากขั้นตอนการหา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงาน โดยใช้วิธี Azocasein method และนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร โดยใช้ Spectrophotometer

*Control ไม่ต้องนำเอนไซม์ไปบ่ม และ Blank ใช้น้ำกลั่นแทน buffer และเอนไซม์

3.6.4 การหา Inhibitors ที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

นำเอนไซม์ที่ได้จากขั้นตอนที่ 3.4.6 มาหา Inhibitor ที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ โดยใช้ inhibitor ดังนี้ PMSF, 1,10-phenantroline, EDTA และ KMnO_4 โดยเติม Inhibitor กับเอนไซม์ (ต้องแช่เย็นตลอดเวลา) จากนั้นทดสอบด้วยวิธี Azocasein method โดยใช้ buffer pH ที่เหมาะสมจากขั้นตอนที่ 3.4.7.1 และบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.7.2 แล้วนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร โดยใช้ Spectrophotometer

*หลอด Control DMSO = Positive control และ หลอด Control H_2O = Negative control

3.7 การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ

เลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีทที่ผลิตเอนไซม์บนอาหาร Yeast extract Malt extract agar (YEME) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน จากนั้นเจียเชื้อหนึ่งลูปใส่ลงใน Yeast extract Malt extract broth (YEME) เลี้ยงในสภาวะเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน (Chitti, 2010) กรองเซลล์จุลินทรีย์ด้วยกระดาษ Whatman เบอร์ 1 นำส่วนใสที่ได้ Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเก็บ Supernatant เพื่อทำการทดสอบต่อไป (Valli *et al.*, 2012)

วิธีที่ 1

เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบ ซึ่งได้แก่ *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans*, *Salmonella typhimurium* TISTR 5562, *E. coli* และ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 บนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเจียเชื้อหนึ่งลูปลงในอาหาร Mueller-Hinton broth (Merck) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คำนวณความเข้มข้นของเซลล์ให้มีค่าเท่ากับ 10^8 cfu/ml โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร จากนั้น Spread ลงบนอาหาร Mueller-Hinton agar รอให้ผิวหน้าอาหารแห้ง ทำการวาง Disk ลงบนอาหารและหยดสารละลายของแอกติโนมัยซีทปริมาตร 30 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการวัดขนาดของวงใส (Clear zone) (Mohseni *et al.*, 2013)

วิธีที่ 2

เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบ ซึ่งได้แก่ *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans*, *Salmonella typhimurium* TISTR 5562, *E. coli* และ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 บนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเจียเชื้อลงในสารละลาย NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์ เทียบความขุ่นให้ใกล้เคียงกับหลอด McFarlane's เบอร์ 0.5 (มีจำนวนเซลล์ประมาณ 1×10^7 เซลล์/มิลลิลิตร) (Pozzatti *et al.*, 2010) ทำการ Swab ลงบนผิวหน้าอาหาร Mueller-Hinton agar รอให้ผิวหน้าอาหารแห้ง นำ Supernatant ของอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์มาผสมกับตัวทำละลาย Ethyl Acetate อัตราส่วน 1:1 เขย่าให้ผสมกันในกรวยแยก นำส่วนที่เป็นสารผสมมาระเหยโดยใช้เครื่องระเหยสูญญากาศ (Rotary Evaporator) (Phongsopitanun *et al.*, 2014) นำ Crude ethyl acetate extract ที่ได้ผสมกับ Ethyl Acetate อัตราส่วน 1:1 จากนั้นหยดลงบน Disk Diffusion ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ทิ้งไว้จน Disk Diffusion แห้งและวางลงบนอาหาร Mueller-Hinton agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการตรวจสอบวงใสที่เกิดขึ้น

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การหาสมบัติทางกายภาพบางประการของดินตัวอย่าง

จากการเก็บตัวอย่างดินจากศูนย์ศึกษาธรรมชาติป่าชายเลน ตำบลคลองตำหรุ อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรีทั้งหมด 10 จุด (ภาคผนวก ข) นำมาหาคุณสมบัติของตัวอย่างดินตามวิธีการ 3.4.2 และภาคผนวก ก พบว่าน้ำหนักดินเฉลี่ยอยู่ที่ 0.5201 กรัม มีปริมาณความชื้นเฉลี่ย 45.7233 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 7.0 – 8.0 ซึ่งมีค่าเป็นกลางถึงด่างอ่อนได้ผลดังที่แสดงในตารางที่ 4.1 แล้วนำจึงนำตัวอย่างดินดังกล่าวมาทำการคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทตามวิธีการ 3.4.1 จากนั้นกำหนดไอโซเลทให้กับเชื้อที่บริสุทธิ์

ตารางที่ 4.1 แสดงสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่างดิน

ตัวอย่างดิน	น้ำหนักดิน (กรัม)	ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์)	ความเป็นกรด-ด่าง
1	0.4145	37.8539	6.64
2	0.6105	54.4603	7.71
3	0.584	44.6483	7.36
4	0.5475	51.7486	7.84
5	0.3950	39.1865	7.83
6	0.4995	48.8748	7.22
7	0.5305	49.7188	7.09
8	0.6720	51.8919	8.31
9	0.3710	31.9828	7.69
10	0.5760	46.8674	7.49
เฉลี่ย	0.5201	45.7233	7-8

4.2 ลักษณะของเชื้อแอสคิโนมัยซีทจำนวน 66 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินป่าชายเลน ตำบลคลองตำหรุ จังหวัดชลบุรี

จากการเก็บตัวอย่างดินบริเวณ ศูนย์อนุรักษ์ป่าชายเลนธรรมชาติ ต.คลองตำหรุ อ.เมือง จ.ชลบุรี (ภาคผนวก ข) และทำการพักดินไว้ 1 สัปดาห์ ทำเจือจางตัวอย่างดินเพื่อคัดแยกเชื้อในกลุ่มแอสคิโนมัยซีทโดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและสารละลายฟีนอลความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้น Spread plate ลงบนอาหาร Starch casein agar (ภาคผนวก ข) ซึ่งเติม Cycloheximide ปริมาณ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7-14 วันจากหัวข้อ 3.4.3 การเตรียมสารละลายสปอร์เพื่อใช้ในการทดสอบการสร้างเอนไซม์ พบว่ามีเชื้อในกลุ่มแอสคิโนมัยซีทเจริญบนอาหารและสามารถคัดแยกเชื้อได้จำนวน 66 ไอโซเลทโดยทำการสังเกตสีบนผิวและใต้ผิวอาหาร โคนทำการเปรียบเทียบกับ The NBS/IBCC Color System (ภาคผนวก ข) ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงสีรีวิทาของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทจำนวน 66 ไอโซเลท

หมายเลขไอโซเลท	เจริณบนอาหาร Starch casein agar	เส้นใยบนผิวอาหาร	เส้นใยใต้ผิวอาหาร	ลักษณะโคโลนี
NKB100	+	สีเทาอ่อน (Light Gray,#C2A894)	สีน้ำตาลอ่อน (Light Brown, #A86540)	นูนแข็ง
NKB110	+	สีเทาอ่อน (Light Gray,#C2A894)	สีน้ำตาลอ่อน (Light Brown, #A86540)	ก้อนนูน
NKB120	+	สีเขียวซีดมาก (Very Pale Green, #D8DEBA)	สีเทาอ่อน (Light Gray, #C2A894)	เรียบนูน
NKB135	+	สีชมพูอมเทา (Pinkish Gray, #C8A696)	สีชมพูอมขาว (Pinkish White, #F9DBC8)	เรียบนูน
NKB140	+	สีฟ้าอ่อน (Pale Blue,#919192)	สีเทาอ่อน (Light Gray,#C2A894)	ก้อนแข็ง
NKB150	+	สีเทาอ่อน (Light Gray,#C2A894)	สีเหลืองเข้ม (Strong Yellow, #E59E1F)	ก้อนแข็ง

ตารางที่ 4.2 แสดงสีรวิทย์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 66 ไอโซเลท (ต่อ)

หมายเลขไอโซเลท	เจริญบนอาหาร Starch casein agar	เส้นใยบนผิวอาหาร	เส้นใยใต้ผิวอาหาร	ลักษณะโคโลนี
NKB160	+	สีเหลืองอมขาว (Yellowish White, #FFE2B7)	สีน้ำตาลเข้ม (Strong Brown, #753313)	นูนแข็ง
NKB170	+	สีเทาอ่อน (Light Gray,#C2A894)	สีน้ำตาลอ่อน (Light Brown, #A86540)	ก้นแข็ง
NKB180	+	สีเทาอมม่วง (Grayish Violet, #46394B)	สีน้ำตาลเข้ม (Strong Brown, #753313)	แบน
NKB193	+	สีฟ้าอ่อน (Pale Blue,#919192)	สีเทาอ่อน (Light Gray,#C2A894)	ก้นแข็ง
NKB210	+	สีเทาอมม่วง (Grayish Violet, #46394B)	สีม่วงอมฟ้าซีด (Pale Purplish Blue, #8A7F8E)	เม็ดแข็ง
NKB220	+	สีฟ้าซีดมาก (Very Pale Blue, #C1CACA)	สีเหลืองอมเทา (Yellowish Gray, #CAA885)	ก้นแข็ง
NKB230	+	สีฟ้าซีดมาก (Very Pale Blue, #C1CACA)	สีเทาอมฟ้าสว่าง (Light Bluish Gray, #BEADA1)	นูนแข็ง
NKB240	+	สีเทาอ่อน (Light Gray,#C2A894)	สีเหลืองอมเทา (Yellowish Gray, #CAA885)	ก้นแข็ง
NKB250	+	สีเทาอ่อน (Light Gray,#C2A894)	สีน้ำตาลอ่อน (Light Brown, #A86540)	นูนแข็ง
NKB263	+	สีเทาอมกอกสว่าง (Light Olive Gray, #887359)	สีเหลืองเข้ม (Strong Yellow, #E59E1F)	ก้นแข็ง

ตารางที่ 4.2 แสดงสีรวิทยาของเชื้อแอดดีโนมัยซีทจำนวน 66 ไอโซเลท(ต่อ)

หมายเลขไอโซเลท	เจริญบนอาหาร Starch casein agar	เส้นใยบนผิวอาหาร	เส้นใยใต้ผิวอาหาร	ลักษณะโคโลนี
NKB310	+	สีฟ้าซีดมาก (Very Pale Blue, #C1CACA)	สีเหลืองเข้ม (Strong Yellow, #E59E1F)	เม็ดนูน
NKB324	+	สีเทาอ่อน (Light Gray,#C2A894)	สีชมพูอมขาว (Pinkish White ,#F9DBC8)	นูนแข็ง
NKB333	+	สีขาว (White, #FFC9D7)	สีชมพูอมขาว (Pinkish White ,#F9DBC8)	แบนแข็ง
NKB340	+	สีเทาอ่อน (Light Gray,#C2A894)	สีเหลืองอมเทา (Yellowish Gray, #CAA885)	เม็ดนูน
NKB350	+	สีส้มอมเหลืองปานกลาง (Moderate Orange Yellow, #F7943C)	สีขาว (White, #FFC9D7)	แบนเรียบ
NKB364	+	สีเทาอ่อน (Light Gray,#C2A894)	สีส้มเข้ม (Strong Orange ,#FF6F1A)	เรียบแบน
NKB400	+	สีเทาอ่อน (Light Gray,#C2A894)	สีเหลืองอมเทา (Yellowish Gray, #CAA885)	เรียบนูน
NKB412	+	สีเทาอ่อน (Light Gray,#C2A894)	สีมะกอกสว่าง (Light Olive,#846A20)	เรียบนูน
NKB420	+	สีเทาอ่อน (Light Gray,#C2A894)	สีน้ำตาลเข้ม (Deep Brown, #4D220E)	ก้อนนูน

ตารางที่ 4.2 แสดงสีรีรวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 66 ไอโซเลท(ต่อ)

หมายเลขไอโซเลท	เจริญบนอาหาร Starch casein agar	เส้นใยบนผิวอาหาร	เส้นใยใต้ผิวอาหาร	ลักษณะโคโลนี
NKB434	+	สีฟ้าซีดมาก (Very Pale Blue, #C1CACA)	สีชมพูอมขาว (Pinkish White ,#F9DBC8)	เม็คนูน
NKB440	+	สีเทาอ่อน (Light Gray,#C2A894)	สีขาว (White, #FFC9D7)	ก้อนแข็ง
NKB450	+	สีขาว (White, #FFC9D7)	สีเหลือง (Vivid Yellow,#FFB300)	นูนแข็ง
NKB460	+	สีส้มแดงเข้ม (Strong Reddish Orange,#FFB961)	สีส้มอมเหลืองปาน กลาง (Moderate Orange Yellow, #F7943C)	เรียบนูน
NKB514	+	สีส้มแดงเข้ม (Strong Reddish Orange,#FFB961)	สีชมพูอมขาว (Pinkish White ,#F9DBC8)	เรียบนูน
NKB522	+	สีเหลืองเข้ม (Strong Yellow, #E59E1F)	สีส้มอ่อน (Light Orange,#FFA161)	นูนแข็ง
NKB530	+	สีแดงเข้ม (Deep Red,)	สีแดงเข้มมาก (Very Deep Red, #4F0014)	เรียบแบน
NKB540	+	สีเทาอมเขียวออก เหลือง (Grayish Greenish Yellow, #C4A55F)	สีส้มอมเหลืองปาน กลาง (Moderate Orange Yellow, #F7943C)	แบน
NKB553	- +	สีน้ำตาลมะกอกสว่าง (Light Olive Brown, #945D0B)	สีส้มอ่อน (Light Orange,#FFA161)	เรียบนูน

ตารางที่ 4.2 แสดงสรีรวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 66 ไอโซเลท(ต่อ)

หมายเลข ไอโซเลท	เจริญบนอาหาร Starch casein agar	เส้นใยบนผิวอาหาร	เส้นใยใต้ผิวอาหาร	ลักษณะโคโลนี
NKB560	+	สีเทาอ่อน (Light Gray,#C2A894)	สีส้มอมเหลืองปานกลาง (Moderate Orange Yellow, #F7943C)	เรียบแบน
NKB570	+	สีเขียวมะกอกปานกลาง (Moderate Olive Green, #434B1B)	สีส้มอมเหลืองปานกลาง (Moderate Orange Yellow, #F7943C)	เรียบนูน
NKB614	+	สีส้มอ่อน (Light Orange,#FFA161)	สีขาว (White, #FFC9D7)	เรียบนูน
NKB623	+	สีเทาอมเขียวออกเหลือง (Grayish Greenish Yellow, #C4A55F)	สีขาว (White, #FFC9D7)	เรียบแบน
NKB630	+	สีเทาอ่อน (Light Gray,#C2A894)	สีเหลืองเข้ม (Strong Yellow, #E59E1F)	เรียบนูน
NKB640	+	สีเหลืองอมเทา (Yellowish Gray, #CAA885)	สีส้มอมเหลืองปานกลาง (Moderate Orange Yellow, #F7943C)	เรียบนูน
NKB650	+	สีเทาอ่อน (Light Gray,#C2A894)	สีน้ำตาลมะกอกสว่าง (Light Olive Brown, #945D0B)	เรียบนูน
NKB660	+	สีเหลืองอมเทา (Yellowish Gray, #CAA885)	สีชมพูอมขาว (Pinkish White, #F9DBC8)	กึ่งนูน
NKB670	+	สีฟ้าซีดมาก (Very Pale Blue, #C1CACA)	สีชมพูอมขาว (Pinkish White, #F9DBC8)	นูนแข็ง

ตารางที่ 4.2 แสดงสรีรวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 66 ไอโซเลท (ต่อ)

หมายเลขไอโซเลท	เจริญบนอาหาร Starch casein agar	เส้นใยบนผิวอาหาร	เส้นใยใต้ผิวอาหาร	ลักษณะโคโลนี
NKB690	+	สีส้มแดงเข้ม (Strong Reddish Orange,#FFB961)	สีเหลืองอมเขียวสว่าง (Vivid Greenish Yellow,#F4C800)	เรียบนูน
NKB704	+	สีส้มอมเหลืองซีด (Pale Orange Yellow, #FFCA86)	สีขาว (White, #FFC9D7)	ก้อนแข็ง
NKB712	+	สีชมพูอมขาว (Pinkish White ,#F9DBC8)	สีขาว (White, #FFC9D7)	เรียบนูน
NKB720	+	สีส้มอมเหลืองซีด (Pale Orange Yellow, #FFCA86)	สีขาว (White, #FFC9D7)	เรียบนูน
NKB731	+	สีขาว (White, #FFC9D7)	สีส้มอมเหลืองสว่าง (Light Orange Yellow, #FFB961)	ก้อนนูน
NKB744	+	สีเทาอ่อน (Light Gray,#C2A894)	สีขาว (White, #FFC9D7)	เรียบนูน
NKB750	+	สีขาว (White, #FFC9D7)	สีน้ำตาลมะกอกสว่าง (Light Olive Brown, #945D0B)	นูนแข็ง
NKB835	+	สีเทาอ่อน (Light Gray,#C2A894)	สีเทาเข้ม (Dark Gray, #49423D)	เรียบนูน
NKB874	+	สีเทาอ่อน (Light Gray,#C2A894)	สีขาว (White, #FFC9D7)	ก้อนแข็ง
NKB880	+	สีส้มแดงเข้ม (Strong Reddish Orange,#FFB961)	สีส้มอมเหลืองซีด (Pale Orange Yellow, #FFCA86)	ก้อนแข็ง

ตารางที่ 4.2 แสดงสรีรวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 66 ไอโซเลท (ต่อ)

หมายเลขไอโซเลท	เจริญบนอาหาร Starch casein agar	เส้นใยบนผิวอาหาร	เส้นใยใต้ผิวอาหาร	ลักษณะโคโลนี
NKB893	+	สีเทาอ่อน (Light Gray,#C2A894)	สีน้ำตาลเข้ม (Strong Brown, #753313)	เรียบแข็ง
NKB805	+	สีชมพูอมขาว (Pinkish White ,#F9DBC8)	สีน้ำตาลอมเทาเข้ม (Dark Grayish Brown,#32221A)	นูนแข็ง
NKB900	+	สีเทาอ่อน (Light Gray,#C2A894)	น้ำตาล-เหลือง (Light Brown, #A86540)	กึ่งนูนแข็ง
NKB935	+	สีเทาอ่อน (Light Gray,#C2A894)	สีเทาเข้ม (Dark Gray, #49423D)	เรียบนูน
NKB950	+	สีส้มสด (Brilliant Orange,#FFB841)	สีน้ำตาลเข้ม (Strong Brown, #753313)	นูนแข็ง
NKB805	+	สีชมพูอมขาว (Pinkish White ,#F9DBC8)	สีน้ำตาลอมเทาเข้ม (Dark Grayish Brown,#32221A)	นูนแข็ง
NKB900	+	สีเทาอ่อน (Light Gray,#C2A894)	น้ำตาล-เหลือง (Light Brown, #A86540)	กึ่งนูนแข็ง
NKB935	+	สีเทาอ่อน (Light Gray,#C2A894)	สีเทาเข้ม (Dark Gray, #49423D)	เรียบนูน
NKB950	+	สีส้มสด (Brilliant Orange,#FFB841)	สีน้ำตาลเข้ม (Strong Brown, #753313)	นูนแข็ง
NKB974	+	สีขาว (White, #FFC9D7)	สีเทาอ่อน (Light Gray,#C2A894)	เมื่คแข็ง
NKB980	+	สีส้มอมเหลืองปานกลาง (Moderate Orange Yellow, #F7943C)	สีส้มอ่อน (Light Orange, #FFA161)	เรียบแบน

ตารางที่ 4.2 แสดงสรีรวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 66 ไอโซเลท (ต่อ)

หมายเลขไอโซเลท	เจริญบนอาหาร Starch casein agar	เส้นใยบนผิวอาหาร	เส้นใยใต้ผิวอาหาร	ลักษณะโคโลนี
NKB993	+	สีเทาอมม่วง (Grayish Violet, #46394B)	สีม่วงอมฟ้าซีด (Pale Purplish Blue, #8A7F8E)	ก้อนแข็ง
NKB050	+	สีเทาอมเขียวออกเหลือง (Grayish Greenish Yellow, #C4A55F)	สีเทาอ่อน (Light Gray, #C2A894)	เรียบแบน
NKB064	+	สีเทาอ่อน (Light Gray, #C2A894)	สีน้ำตาลเข้ม (Strong Brown, #753313)	ก้อนแข็ง
NKB080	+	สีเขียวมะกอกปานกลาง (Moderate Olive Green, #434B1B)	สีเหลืองอมเขียวสว่าง (Vivid Greenish Yellow, #F4C800)	นูนแข็ง
NKB090	+	สีเทาอ่อน (Light Gray, #C2A894)	สีขาว (White, #FFC9D7)	เรียบนูน

***หมายเหตุ ผล + หมายถึง เจริญได้บนอาหาร Starch casein agar ได้

NKB หมายถึง รหัสนำหน้าหมายเลขไอโซเลท

เลขตัวที่ 1 หมายถึง ตัวอย่างดินที่ 1-10

เลขตัวที่ 2 หมายถึง ลำดับตัวอย่างเชื้อแอกติโนมัยซีท

เลขตัวที่ 3 หมายถึง ค่าการเจือจาง

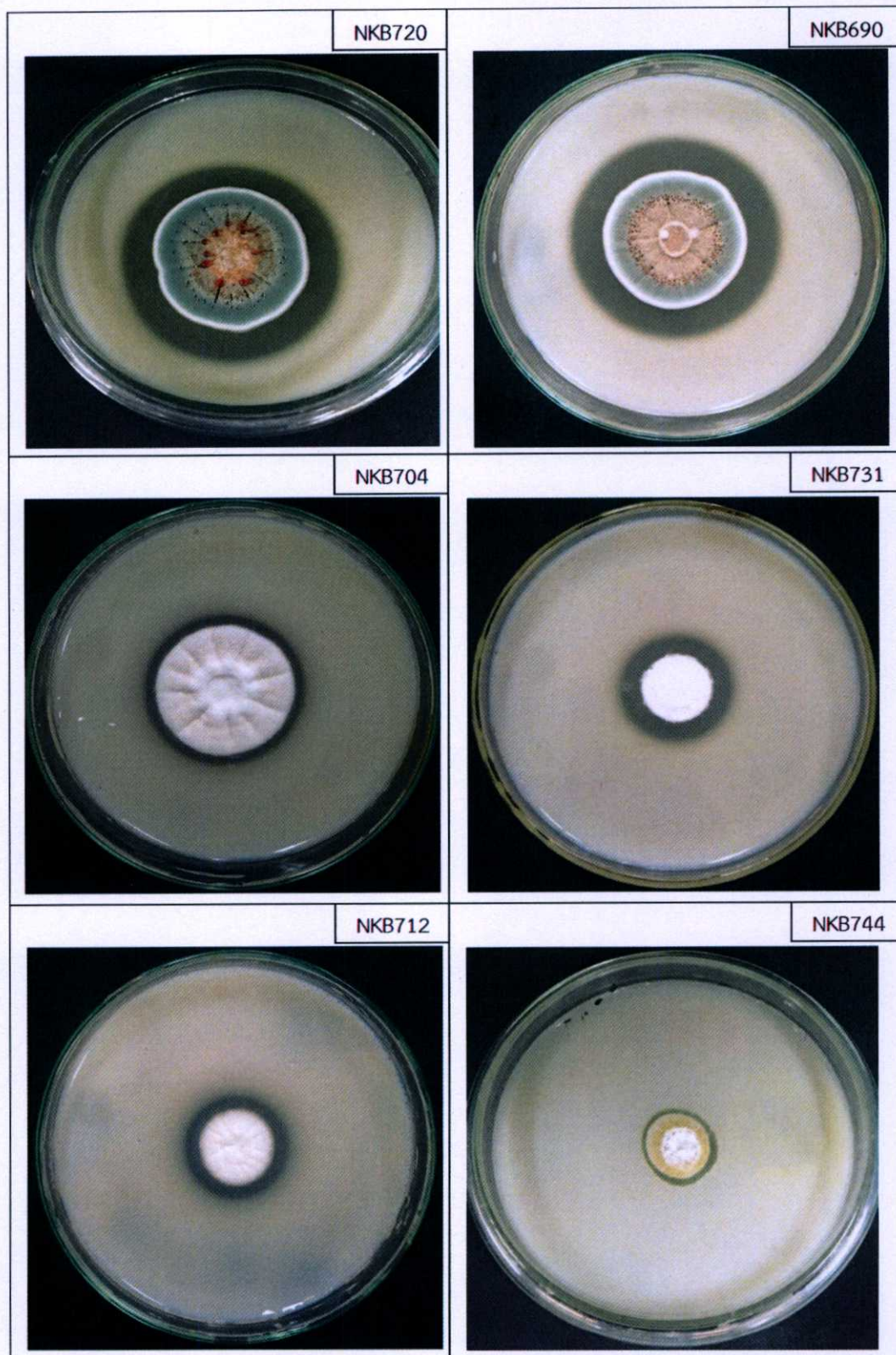
4.3 การคัดเลือกแอกติโนมัยซีทที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์

จากเชื้อแอกติโนมัยซีททั้งหมด 66 ไอโซเลทที่คัดแยกได้ ทำการคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 20 ไอโซเลท เพื่อทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์พบว่า มีเชื้อไอโซเลทที่ NKB720, NKB690, NKB704, NKB731, NKB712 และ NKB744 (รูปที่ 4.1) ที่เกิดโซนใส (Clear zone) บนอาหาร Skim milk agar (ภาคผนวก ฉ) ดังแสดงในตารางที่ 4.3 เนื่องจากเชื้อแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกได้ มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ย่อยโปรตีนที่มีอยู่ในอาหารได้ เช่น งานของ Shilpa *et al*, 2012 ที่สามารถคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจาก

น้ำพุร้อน, ดิน และสิ่งแวดล้อมต่างๆ เมื่อทดสอบบนอาหาร Skim Milk agar ก็สามารถพบโซนใสเกิดขึ้น (Clear zone) ได้เช่นกัน

ตารางที่ 4.3 แสดงความกว้างของวงใส (Clear zone) ของเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 20 ไอโซเลท

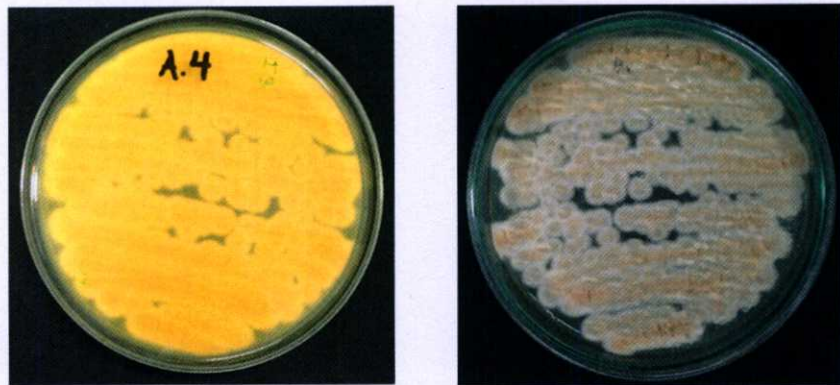
หมายเลขไอโซเลท	ขนาดของวงใส ซ้ำที่ 1 (mm)	ขนาดของวงใส ซ้ำที่ 2 (mm)	ค่าเฉลี่ย (mm)
NKB120	0	0	0
NKB140	0	0	0
NKB135	0	0	0
NKB193	0	0	0
NKB210	0	0	0
NKB220	0	0	0
NKB230	0	0	0
NKB263	0	0	0
NKB310	0	0	0
NKB333	0	0	0
NKB400	0	0	0
NKB522	0	0	0
NKB650	0	0	0
NKB670	0	0	0
NKB690	20	15	17.5
NKB704	5	2	3.5
NKB712	1	3.5	2.25
NKB720	25	20	22.5
NKB731	1.5	4	2.75
NKB744	0.75	1	0.875



รูปที่ 4.1 แสดงความกว้างของวงใส (Clear zone) ของเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 6 ไอโซเลท บนอาหาร
sim milk agar

4.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอสคิโนมัยซีททั้งหมด 6 ไอโซเลทที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้ปริมาณมากที่สุด

จากผลการทดลองที่ 4.3 จึงทำการคัดเลือกเชื้อแอสคิโนมัยซีท 6 ไอโซเลทที่ให้ค่าความกว้างของวงใสสูงที่สุดมาทำการทดลองต่อ โดยทำการศึกษาและสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อบนอาหาร Starch casein agar (ภาคผนวก ก) ดังแสดงในรูป รูปที่ 4.2-4.7



รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะของเชื้อแอสคิโนมัยซีทหมายเลขไอโซเลท NKB690

ลักษณะ โคลนินของเชื้อแอสคิโนมัยซีทหมายเลขไอโซเลท NKB690 มีลักษณะเรียบนูนขึ้นมาคล้ายหนังสัตว์เกาะติดกับผิวอาหาร เส้นใยที่เจริญได้ผิวอาหารมีสีเหลืองอมเขียวสว่าง ส่วนเส้นใยบนผิวอาหารมีสีส้มแดงเข้ม ขอบโคลนินมีลักษณะสีขาวเทา



รูปที่ 4.3 แสดงลักษณะของเชื้อแอสคิโนมัยซีทหมายเลขไอโซเลท NKB704

ลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทหมายเลขไอโซเลท NKB704 อนุจذبตัวกันเป็นก้อนแข็งเกาะติดกับผิวอาหาร เส้นใยที่เจริญได้ผิวอาหารมีสีขาวออกส้ม ส่วนเส้นใยบนผิวอาหารมีสีส้มอมเหลือง ขอบโคโลนีมีลักษณะสีขาว



รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทหมายเลขไอโซเลท NKB712

ลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทหมายเลขไอโซเลท NKB712 เป็นแบบผิวเรียบมีลักษณะนูนขึ้นมาบนผิวอาหาร เส้นใยที่เจริญได้ผิวอาหารมีสีขาวครีม ส่วนเส้นใยบนผิวอาหารมีสีชมพูอมขาว



รูปที่ 4.5 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทหมายเลขไอโซเลท NKB720

ลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทหมายเลขไอโซเลท NKB720 เป็นแบบผิวเรียบมีลักษณะนูนขึ้นมาบนผิวอาหาร เส้นใยที่เจริญได้ผิวอาหารมีสีขาว ส่วนเส้นใยบนผิวอาหารมีสีส้มอมเหลือง



รูปที่ 4.6 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทหมายเลขไอโซเลท NKB731

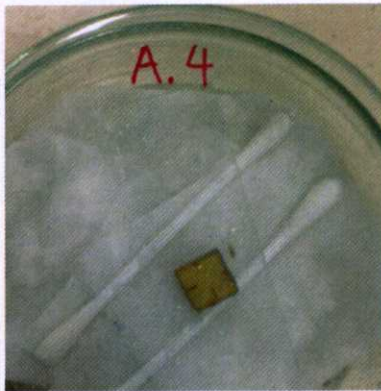
ลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทหมายเลขไอโซเลท NKB731 เจริญเป็นก้อนนูนแข็งเกาะติดกับผิวอาหาร เส้นใยที่เจริญได้ผิวอาหารมีสีส้มเหลือง ส่วนเส้นใยบนผิวอาหารมีสีขาว



รูปที่ 4.7 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทหมายเลขไอโซเลท NKB744

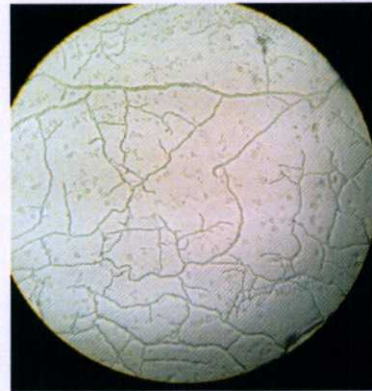
ลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทหมายเลขไอโซเลท NKB744 เป็นแบบเรียบนูนแข็งเกาะติดกับผิวอาหารอาหารเส้นใยที่เจริญได้ผิวอาหารมีสีขาว ส่วนเส้นใยบนผิวอาหารมีสีเทาอ่อน

หลังจากได้ทำการศึกษาผลของการทดลองที่ 4.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ แอกติโนมัยซีททั้งหมด 6 ไอโซเลทที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ปริมาณมากที่สุดโดยสังเกตด้วยตาเปล่า มาทำการศึกษาต่อเพื่อดูลักษณะของเส้นใยด้วย Slide culture technique บนอาหาร yeast extract malt extract แสดงผลดังรูปที่ 4.8-4.19



รูปที่ 4.8 ไอโซเลท NKB690

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทบน Slide Culture ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



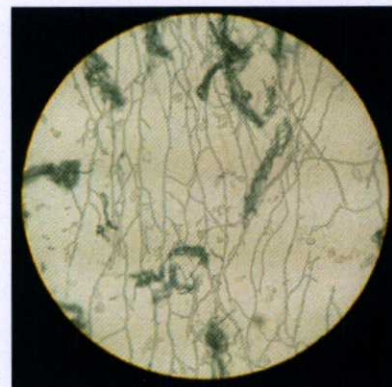
รูปที่ 4.9 ไอโซเลท NKB690 เลนส์ใกล้วัตถุ 40X

ลักษณะการเจริญของเส้นใย เส้นใยมีลักษณะเป็นสายยาว มีการแตกแขนงสั้นๆ ซึ่งสังเกตได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พื้นหลังสว่างที่กำลังขยายของเลนส์ใกล้วัตถุ 40X



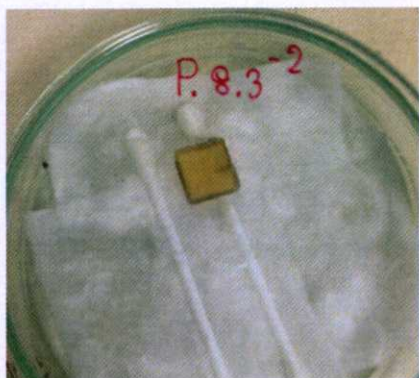
รูปที่ 4.10 ไอโซเลท NKB704

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทบน Slide Culture ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



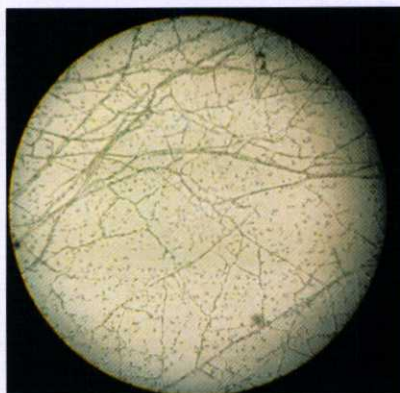
รูปที่ 4.11 ไอโซเลท NKB704 เลนส์ใกล้วัตถุ 40X

ลักษณะการเจริญของเส้นใย เส้นใยมีลักษณะเป็นสายยาว มีการแตกแขนงเป็นเส้นสายเรียงพาดกัน ซึ่งสังเกตได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พื้นหลังสว่างที่กำลังขยายของเลนส์ใกล้วัตถุ 40X



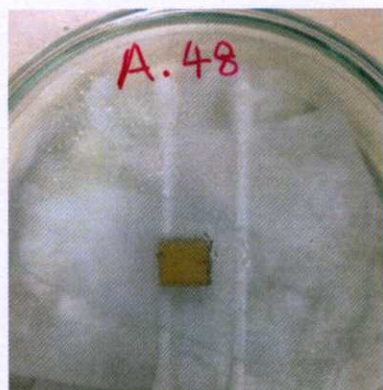
รูปที่ 4.12 ไอโซเลท NKB712

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทบน Slide Culture ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



รูปที่ 4.13 ไอโซเลท NKB712 เลนส์ใกล้วัตถุ 40X

ลักษณะของเส้นใย เส้นใยมีลักษณะเป็นสายยาว มีการแตกแขนงเป็นเส้นสายตรงชัดเจน ซึ่งสังเกตได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พื้นหลังสว่างที่กำลังขยายของเลนส์ใกล้วัตถุ 40X



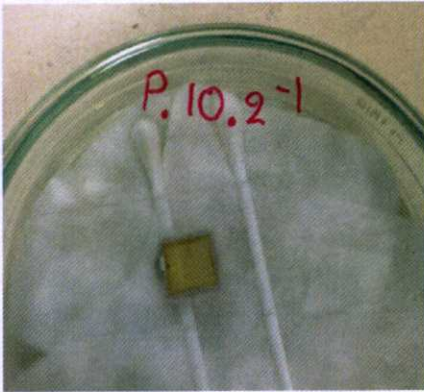
รูปที่ 4.14 ไอโซเลท NKB720

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทบน Slide Culture ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



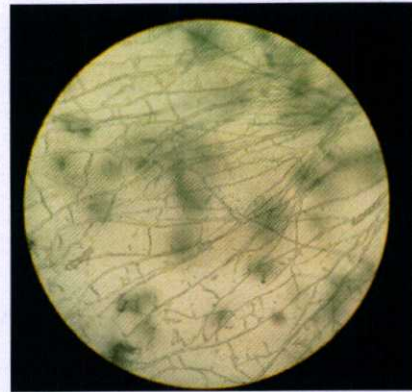
รูปที่ 4.15 ไอโซเลท NKB720 เลนส์ใกล้วัตถุ 40X

ลักษณะของเส้นใย เส้นใยมีลักษณะเป็นสายยาว มีการแตกแขนงเป็นเส้นสายมีทิศทางไม่ชัดเจนเรียงพาดกัน ซึ่งสังเกตได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พื้นหลังสว่างที่กำลังขยายของเลนส์ใกล้วัตถุ 40X



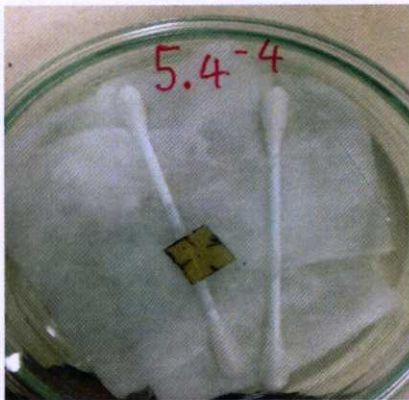
รูปที่ 4.16 ไอโซเลท NKB720

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทบน Slide Culture ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



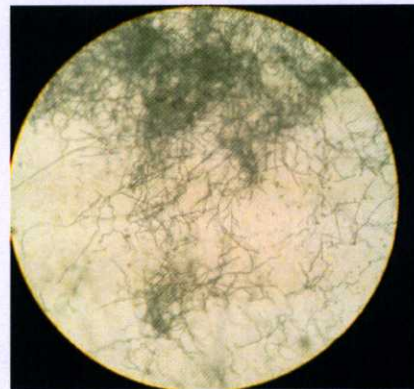
รูปที่ 4.17 ไอโซเลท NKB720 เลนส์ใกล้วัตถุ 40X

ลักษณะของเส้นใย เส้นใยมีลักษณะเป็นสายยาว มีการแตกแขนงเป็นเส้นสายมีลักษณะเป็นข้อปล้อง ซึ่งสังเกตได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พื้นหลังสว่างที่กำลังขยายของเลนส์ใกล้วัตถุ 40X



รูปที่ 4.18 ไอโซเลท NKB720

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทบน Slide Culture ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



รูปที่ 4.19 ไอโซเลท NKB720 เลนส์ใกล้วัตถุ 40X

ลักษณะของเส้นใย เส้นใยมีลักษณะเป็นเส้นสายขนาดเล็ก มีการแตกแขนงออกเป็นสายสั้นๆแบบไม่มีทิศทาง ซึ่งสังเกตได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พื้นหลังสว่างที่กำลังขยายของเลนส์ใกล้วัตถุ 40X

4.5 การตรวจสอบหา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

จากคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงบนอาหาร Skim milk agar จากนั้นทำการคำนวณหาปริมาณสปอร์ตั้งต้นของเชื้อที่ทำให้เกิดวงใสสูงที่สุดทั้ง 6 ไอโซเลทด้วยวิธีการ Spore pre-germination (ภาคผนวก ง) และสกัดเอนไซม์จากเชื้อ แอคติโนมัยซีทด้วยวิธีการจากหัวข้อ 3.4.7 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสโดยใช้วิธี Azocasein method (ภาคผนวก ค) และนำเอนไซม์ที่สกัดได้นั้น มาทำการทดสอบหา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ดังวิธีการจากหัวข้อ 3.4.7.1 ตรวจสอบหา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยใช้วิธี Azocasein method ซึ่งใช้ Citrate - Phosphate buffer (pH 7), Phosphate buffer (pH 8), Borate buffer (pH 8), Borate buffer (pH 9), Tris-EDTA buffer (pH 9), Borate buffer (pH 10), Ammonium buffer (pH 10) และ Borate buffer (pH 11) (ภาคผนวก ข) จากนั้นทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร โดยใช้ Spectrophotometer ผลแสดงดังในตารางที่ 4.4 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเมื่อนำไปทดสอบกับ pH ต่างๆ

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเมื่อนำไปทดสอบกับ pH ต่างๆ

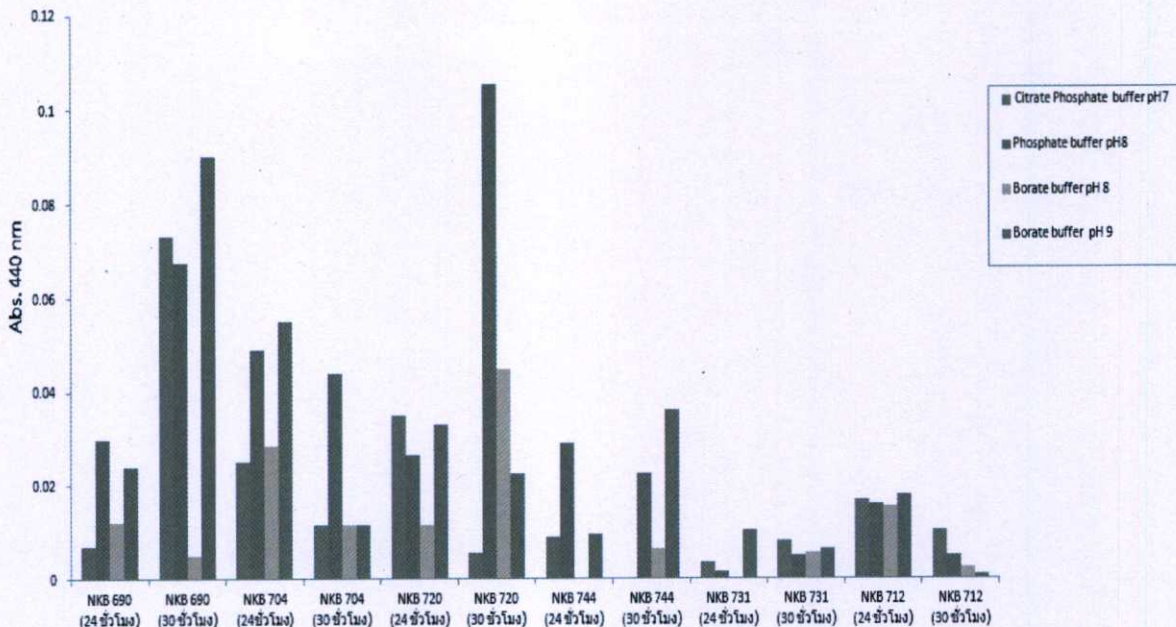
หมายเลขไอโซเลท	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร			
	Citrate Phosphate buffer (pH 7)	Phosphate buffer (pH 8)	Borate buffer (pH 8)	Borate buffer (pH 9)
NKB690(24 ชั่วโมง)	0.007	0.030	0.012	0.024
NKB690 (30 ชั่วโมง)	0.073	0.0675	0.005	0.090
NKB704 (24 ชั่วโมง)	0.025	0.049	0.0285	0.055
NKB704 (30 ชั่วโมง)	0.0115	0.044	0.0115	0.0115
NKB720 (24 ชั่วโมง)	0.035	0.0265	0.0115	0.033
NKB720 (30 ชั่วโมง)	0.0055	0.1055	0.045	0.0225
NKB744 (24 ชั่วโมง)	0.009	0.029	0	0.0095
NKB744 (30 ชั่วโมง)	0	0.0225	0.0065	0.036
NKB731 (24 ชั่วโมง)	0.0035	0.0015	0	0.0105
NKB731 (30 ชั่วโมง)	0.008	0.005	0.0055	0.0065
NKB712 (24 ชั่วโมง)	0.017	0.016	0.0155	0.018
NKB712 (30 ชั่วโมง)	0.0105	0.005	0.0025	0.0011

*Control เติมน้ำกลั่นแทนเอนไซม์และ buffer

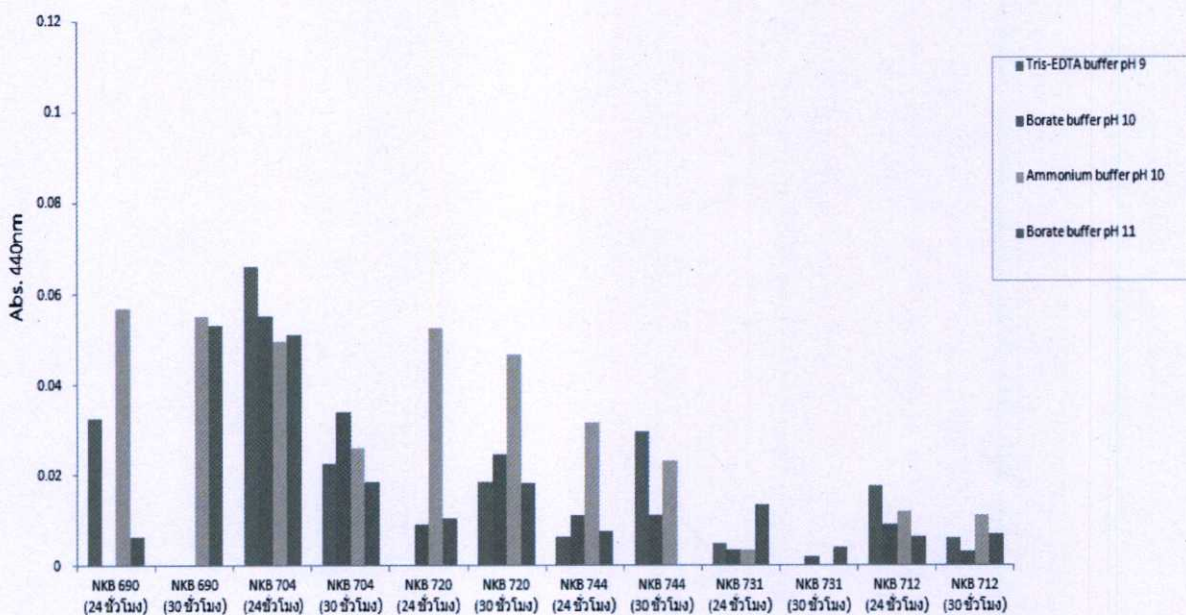
ตารางที่ 4.4 แสดงค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเมื่อนำไปทดสอบกับ pH ต่างๆ (ต่อ)

หมายเลขไอโซเลท	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร			
	Tris-EDTA buffer (pH 9)	Borate buffer (pH 10)	Ammonium buffer (pH 10)	Borate buffer (pH 11)
NKB690 (24 ชั่วโมง)	0.0325	0	0.057	0.0065
NKB690 (30 ชั่วโมง)	0	0	0.055	0.053
NKB704 (24 ชั่วโมง)	0.066	0.055	0.0495	0.051
NKB704 (30 ชั่วโมง)	0.0225	0.034	0.026	0.0185
NKB720 (24 ชั่วโมง)	0	0.009	0.0525	0.0105
NKB720 (30 ชั่วโมง)	0.0185	0.0245	0.0465	0.018
NKB744 (24 ชั่วโมง)	0.0065	0.011	0.0315	0.0075
NKB744 (30 ชั่วโมง)	0.0295	0.011	0.023	0
NKB731 (24 ชั่วโมง)	0.005	0.0035	0.0035	0.0135
NKB731 (30 ชั่วโมง)	0	0.002	0	0.004
NKB712 (24 ชั่วโมง)	0.0175	0.009	0.012	0.0065
NKB712 (30 ชั่วโมง)	0.006	0.003	0.011	0.007

*Control เติมน้ำกลั่นแทนเอนไซม์และ buffer



รูปที่ 4.20 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง pH ต่างๆกับกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากแอคติโนมัยซีททั้ง 6 ไอโซเลท



รูปที่ 4.21 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง pH ต่างๆกับกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากแอคติโนมัยซีททั้ง 6 ไอโซเลท (ต่อ)

การทดสอบหา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยได้คัดเลือกไอโซเลทที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้ ซึ่งมีจำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท NKB690, NKB704, NKB712, NKB720,

NKB731 และ NKB744 จากนั้นเก็บตัวอย่างเอนไซม์ 2 ครั้ง ที่เวลา 24 ชั่วโมง และ 30 ชั่วโมง และทดสอบกับบัฟเฟอร์ที่มี pH แตกต่างกัน 8 ชนิด ได้แก่ Citrate-Phosphate buffer (pH 7), Phosphate buffer (pH 8), Borate buffer (pH 8), Borate buffer (pH 9), Tris -EDTA buffer (pH 9), Borate buffer (pH 10), Ammonium buffer (pH 10) และ Borate buffer (pH 11) ได้ผลทั้ง 6 ไอโซเลทที่ 24 ชั่วโมงและ 30 ชั่วโมงที่มีกิจกรรมที่สูงที่สุดกับบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆและให้ค่าการดูดกลืนแสงดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 แสดงผล 6 ไอโซเลทที่ 24 ชั่วโมงและ 30 ชั่วโมงที่มีกิจกรรมที่สูงที่สุดกับชนิดของบัฟเฟอร์ต่างๆและให้ค่าการดูดกลืนแสง

หมายเลข ไอโซเลท	ชนิดของบัฟเฟอร์	pH	ค่าการดูดแสงที่ 440 นาโนเมตร
NKB690 (24 ชั่วโมง)	Tris-EDTA buffer	9	0.0325
NKB690 (30 ชั่วโมง)	Ammonium buffer	10	0.0550
NKB704 (24 ชั่วโมง)	Borate buffer	10	0.0550
NKB704 (30 ชั่วโมง)	Phosphate buffer	8	0.0440
NKB720 (24 ชั่วโมง)	Ammonium buffer	10	0.0525
NKB720 (30 ชั่วโมง)	Phosphate buffer	8	0.1055
NKB744 (24 ชั่วโมง)	Ammonium buffer	10	0.0315
NKB744 (30 ชั่วโมง)	Borate buffer	9	0.036
NKB731 (24 ชั่วโมง)	Borate buffer	11	0.0135
NKB731 (30 ชั่วโมง)	Citrate-Phosphate buffer	7	0.008
NKB712 (24 ชั่วโมง)	Tris -EDTA buffer	9	0.0175
NKB712 (30 ชั่วโมง)	Citrate - Phosphate buffer	7	0.0105

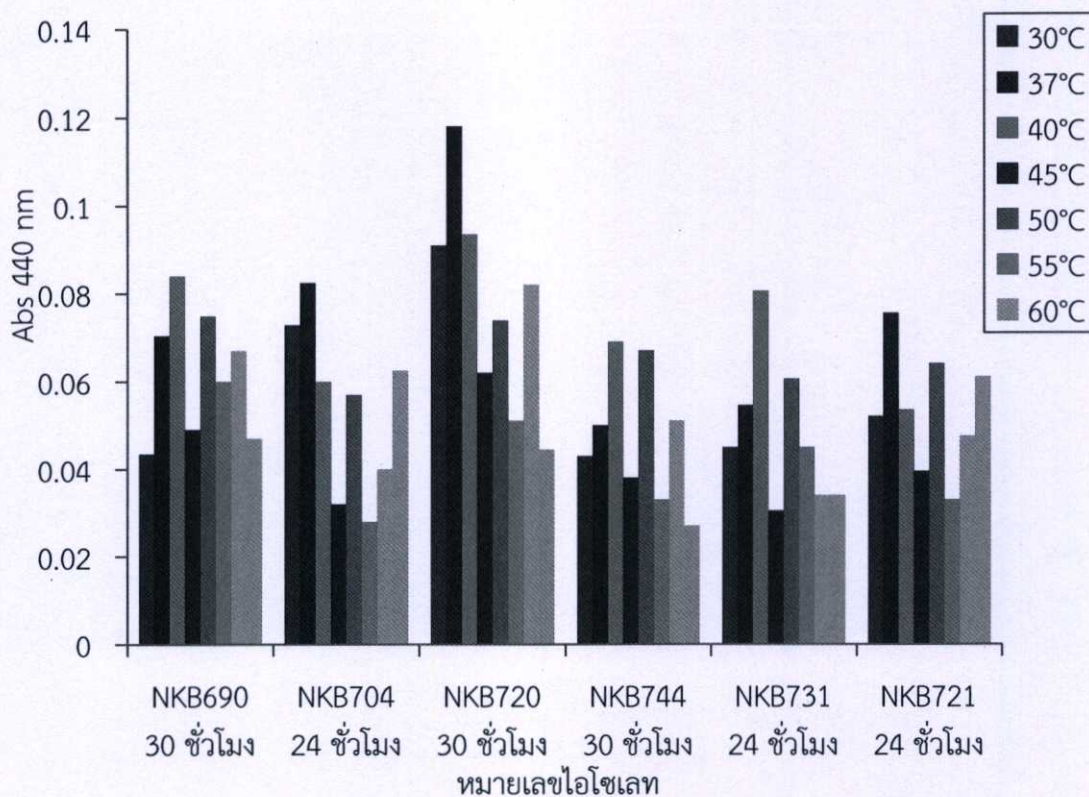
จากตารางแสดงผลที่ 4.5 พบว่าไอโซเลท NKB720 (30 ชั่วโมง) มีกิจกรรมเอนไซม์ที่สูงที่สุดเมื่อทำการทดสอบกับ Phosphate buffer (pH 8) ซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1055 และทำให้เราสามารถคัดเลือกเวลาที่เก็บเอนไซม์ที่ดีที่สุดของแต่ละไอโซเลทพร้อมทั้งชนิดของบัฟเฟอร์ที่ทำให้เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุด คือ NKB690 (30 ชั่วโมง) มีกิจกรรมที่สูงที่สุด เมื่อทดสอบกับ Ammonium buffer (pH 10), NKB704 (24 ชั่วโมง) มีกิจกรรมที่สูงที่สุด เมื่อทดสอบกับ Borate buffer (pH 10), NKB720 (30 ชั่วโมง) มีกิจกรรมที่สูงที่สุด เมื่อทดสอบกับ Phosphate buffer (pH 8), NKB744 (30 ชั่วโมง) มีกิจกรรมที่สูงที่สุด เมื่อทดสอบกับ Borate buffer (pH 9), ไอโซเลท NKB731 (24 ชั่วโมง) มีกิจกรรมที่สูงที่สุด เมื่อทดสอบกับ จาก

Borate buffer (pH 11) และ NKB712 (24 ชั่วโมง) มีกิจกรรมที่สูงที่สุด เมื่อทดสอบกับ Tris -EDTA buffer และ (pH 9) จากผลการทดลองนี้ใช้ในการวิเคราะห์คุณสมบัติเอนไซม์ขั้นต่อไป

ซึ่งการทดลองนี้คล้ายกับการทดลองของ E. Esin et al 2007, Luciana et al 2009, ซึ่ง E. Esin et al ได้ทำการศึกษาเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ได้ทำการคัดแยกมาจากตะกอนดินในทะเลในประเทศตุรกี พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส มีกิจกรรมของเอนไซม์ได้ในช่วงของ pH ที่ 8-13 ในส่วนของ Luciana et al ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส ที่ผลิตได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Cellulosimicrobium cellulans* ซึ่งแยกได้จากกากตะกอนของโรงงานอุตสาหกรรมผลิตแอลกอฮอล์ ซึ่งมีกิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่สามารถทำงานได้ดี โดยมีค่า Optimum pH เท่ากับ 8 โดยใช้ Phosphate buffer (pH 8) ซึ่งได้ค่าที่ใกล้เคียงกับผลการทดลองของไอโซเลท NKB720 (30 ชั่วโมง) มีกิจกรรมเอนไซม์ที่สูงที่สุดเมื่อทำการทดสอบกับ Phosphate buffer (pH 8) เช่นกัน

4.6 ตรวจสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

จากการทดสอบหา pH ที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธี Azocasein method (ภาคผนวก ง) โดยใช้ buffer pH 7 – 11 (3.4.7.1) เมื่อได้ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แล้ว จึงนำเอนไซม์ที่ได้จากการสกัดมาทำการวิเคราะห์อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานด้วยวิธี Azocasein method (ภาคผนวก ง) โดยใช้ buffer pH ที่เหมาะสมจากหัวข้อที่ 4.5 ที่ได้จากการตรวจสอบที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น ทำการทดสอบโดยบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่ 30 ถึง 65 องศาเซลเซียส (3.4.7.2) โดยคัดเลือกเชื้อที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดจาก 6 ไอโซเลท ที่ชั่วโมงการบ่ม 24 ชั่วโมง และ 30 ชั่วโมง pH เหมาะสมที่สุดได้ผลดังแสดงภาพที่ 4.21 ซึ่งดูจากกราฟแล้วจะเห็นได้ว่าเอนไซม์ที่ได้จากไอโซเลท NKB704 NKB720 และ NKB712 (0.0825 0.1180 และ 0.0755) สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเอนไซม์ที่ได้จากไอโซเลท NKB690 NKB744 และ NKB731 (0.0840 0.0690 และ 0.0805) สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยที่เอนไซม์จากไอโซเลท NKB720 ที่บ่มเป็นเวลา 30 ชั่วโมง มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดโดยให้ค่าการดูดกลืนแสงเป็น 0.1180 อุณหภูมิที่เอนไซม์ทำงานได้ดีและเหมาะสมที่สุดอยู่ที่ 37 องศาเซลเซียส ที่ pH 8 (Phosphate buffer)



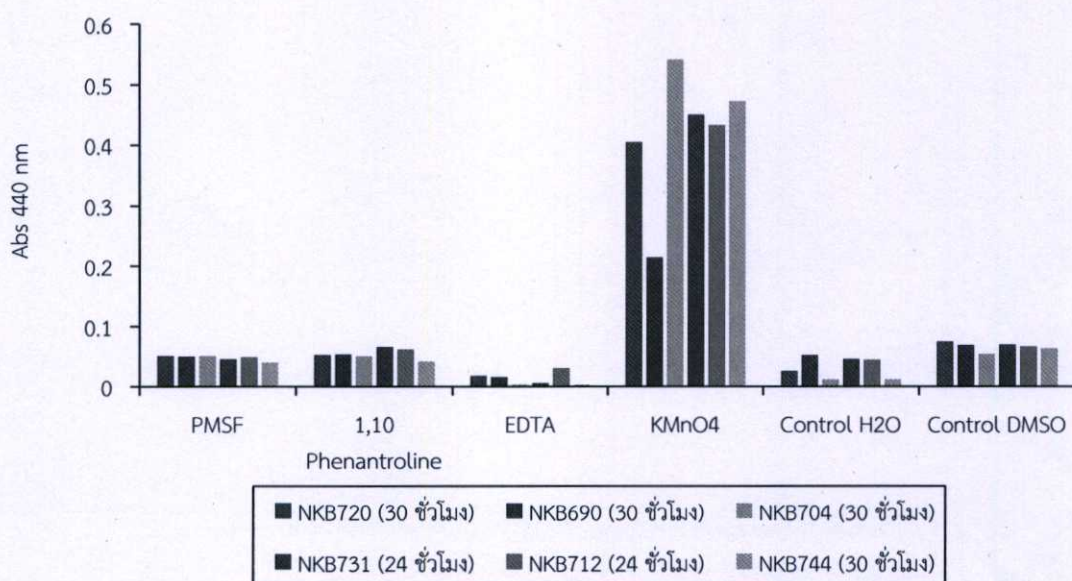
รูปที่ 4.22 แสดงความสัมพันธ์ของอุณหภูมิต่างๆ และกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส

4.7 การหา Inhibitors ที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

จากการนำเอนไซม์ที่สกัดได้ มาทดสอบหา Inhibitor ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดยใช้ Inhibitor 4 ชนิดด้วยกัน ได้แก่ Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1,10-phenantroline, Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) และ Potassium permanganate (KMnO_4) (ภาคผนวก ข) โดยทดสอบด้วยวิธี Azocasein method (ภาคผนวก ค) ซึ่งใช้ buffer pH ที่เหมาะสม จากขั้นตอนการหา pH ที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ (ข้อที่ 4.5) และบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากขั้นตอนการหาอุณหภูมิที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ (ข้อที่ 4.6) จากนั้นวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร โดยใช้ Spectrophotometer ดังวิธีในหัวข้อ 3.4.7 โดยใช้ Control H_2O เป็นตัวเปรียบเทียบกับ Inhibitor ที่ละลายใน H_2O และใช้ Control DMSO เป็นตัวเปรียบเทียบกับ Inhibitor ที่ละลายใน DMSO ซึ่งมีผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 แสดงค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์เมื่อนำไปทดสอบกับ Inhibitor ชนิดต่างๆ

หมายเลขไอ โซเลข	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เมื่อนำไปทดสอบกับ Inhibitor ชนิดต่างๆ					
	PMSF	1,10 Phenantroline	EDTA	KMnO ₄	Control H ₂ O	Control DMSO
NKB720 (30 ชั่วโมง)	0.0515	0.053	0.018	0.404	0.026	0.075
NKB690 (30 ชั่วโมง)	0.0505	0.054	0.016	0.2145	0.0525	0.069
NKB704 (30 ชั่วโมง)	0.0515	0.051	0.003	0.5405	0.0115	0.054
NKB731 (24 ชั่วโมง)	0.046	0.0665	0.006	0.4495	0.046	0.070
NKB712 (24 ชั่วโมง)	0.0495	0.062	0.031	0.432	0.0445	0.067
NKB744 (30 ชั่วโมง)	0.0405	0.042	0.003	0.472	0.0115	0.0635



รูปที่ 4.23 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Inhibitor ชนิดๆต่างๆและกิจกรรมของเอนไซม์

จากการทดลองพบว่า Inhibitor 3 ชนิดที่สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ได้ Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF), 1,10-Phenanthroline และ EDTA ซึ่ง PMSF เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่ม Serine protease และ Cysteine proteases บางชนิด PMSF จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงที่สุดเมื่อมีความเข้มข้นระหว่าง 0.1-1 มิลลิโมลาร์ ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ PMSF จะจับกับหมู่อะมิโน Serine บริเวณ Active site ทำให้ Substrate (Azocasein) ไม่สามารถเข้ามาจับกับบริเวณนี้ได้ กิจกรรมของเอนไซม์จึงลดลง 1,10-Phenanthroline สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่ม Metalloprotease ซึ่งจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงที่สุดเมื่อมีความเข้มข้นระหว่าง 1-10 มิลลิโมลาร์ (Gates, n.d.) EDTA เป็นสารในกลุ่ม Chelating agent สามารถจับกับไอออนของโลหะที่มีประจุบวก ซึ่งทำให้เอนไซม์ขาด Co-factor ในการทำงาน กิจกรรมของเอนไซม์จึงลดลง $KMnO_4$ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดหนึ่งซึ่งเปรียบเสมือนกับ Co-factor ของเอนไซม์ จะเข้าจับกับปริมาณ Active site และทำให้แอกติวิตีมีค่าสูงขึ้น

จากการเปรียบเทียบระหว่าง PMSF และ 1,10-Phenanthroline กับ Control DMSO ซึ่งเป็นตัวควบคุม พบว่า PMSF และ 1,10-Phenanthroline สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้เนื่องจากเอนไซม์มีกิจกรรมที่ลดลง และจากการเปรียบเทียบระหว่าง EDTA และ $KMnO_4$ กับ Control H_2O พบว่า EDTA ซึ่งเป็นสาร Chelating agent สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้ แต่ $KMnO_4$ ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะช่วยให้กิจกรรมของเอนไซม์มีค่าสูงขึ้นกว่าปกติประมาณ 3-4 เท่า ดังแสดงในรูป 4.23

4.8 การหาเสถียรภาพของเอนไซม์

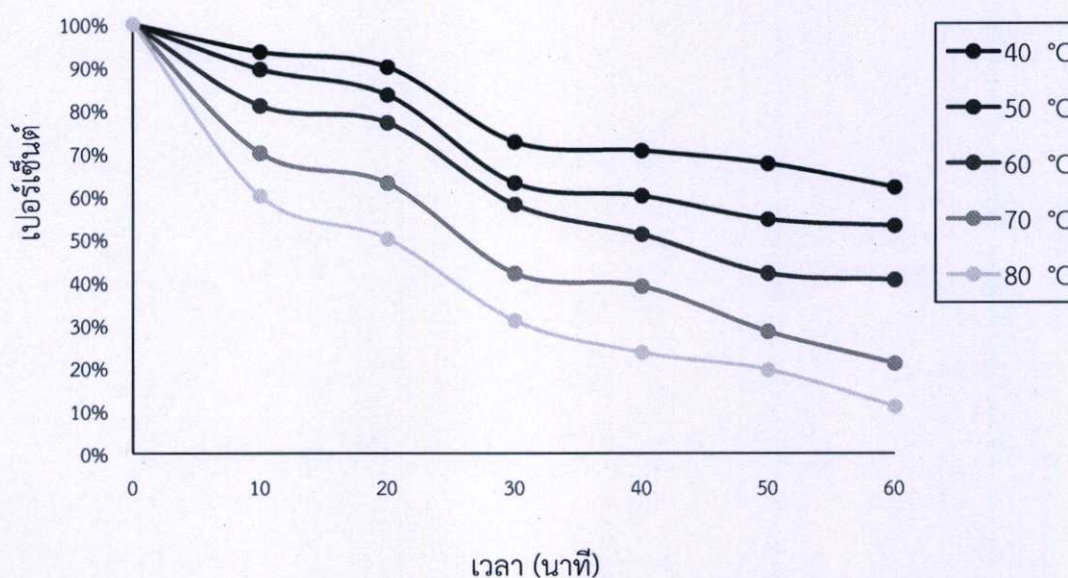
จากการนำเอนไซม์ที่สกัดได้ ไปบ่มใน Water bath ที่อุณหภูมิต่างๆกัน 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เก็บเอนไซม์ทุกๆ 10 นาที ครั้งละ 20 ไมโครลิตร จนครบ 1 ชั่วโมง และทำการทดสอบโดยวิธี Azocasein method (ภาคผนวก ค) ซึ่งใช้ buffer pH ที่เหมาะสม จากขั้นตอนหา pH (ข้อที่ 4.5) ที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ จากนั้นนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร โดยใช้ Spectrophotometer มีผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 แสดงค่าเฉลี่ยเสถียรภาพของเอนไซม์เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิและเวลาที่แตกต่างกัน

หมายเลขไอโซเลท	อุณหภูมิ/เวลา (นาที)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 nm					
		10	20	30	40	50	60
NKB720 (30 ชม.)	40 °C	0.0935	0.09	0.0725	0.0705	0.0675	0.062
	50 °C	0.0895	0.0835	0.063	0.06	0.0545	0.053
	60 °C	0.081	0.077	0.058	0.051	0.042	0.0405
	70 °C	0.07	0.063	0.042	0.039	0.0285	0.021
	80 °C	0.06	0.05	0.031	0.0235	0.0195	0.011
NKB690 (30 ชม.)	40 °C	0.089	0.083	0.08	0.0765	0.072	0.069
	50 °C	0.0855	0.081	0.0775	0.074	0.0705	0.065
	60 °C	0.0785	0.072	0.0685	0.0595	0.052	0.049
	70 °C	0.0715	0.065	0.05	0.042	0.039	0.0315
	80 °C	0.062	0.0535	0.032	0.0285	0.022	0.0135
NKB704 (24 ชม.)	40 °C	0.0833	0.08	0.077	0.073	0.071	0.068
	50 °C	0.0805	0.0785	0.0725	0.07	0.066	0.064
	60 °C	0.077	0.073	0.069	0.065	0.056	0.049
	70 °C	0.07	0.064	0.059	0.0415	0.033	0.02
	80 °C	0.058	0.054	0.04	0.0365	0.031	0.011
NKB731 (24 ชม.)	40 °C	0.0805	0.0785	0.077	0.075	0.0725	0.07
	50 °C	0.08	0.078	0.0725	0.07	0.066	0.062
	60 °C	0.077	0.0745	0.067	0.0615	0.057	0.0505
	70 °C	0.061	0.059	0.045	0.034	0.0305	0.0195
	80 °C	0.0565	0.05	0.038	0.0225	0.012	0.009

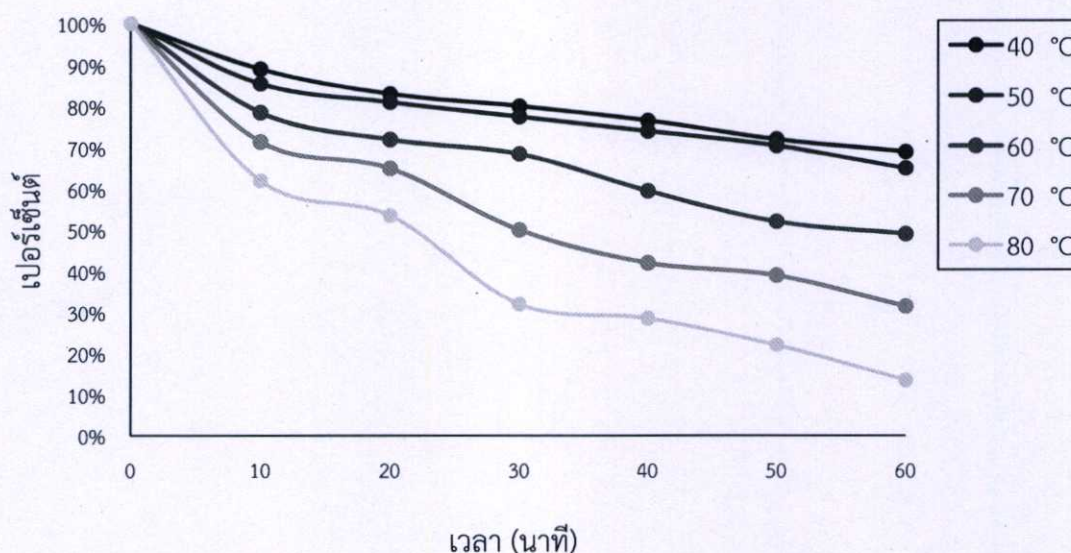
ตารางที่ 4.7 แสดงค่าเฉลี่ยเสถียรภาพของเอนไซม์เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิและเวลาที่แตกต่างกัน (ต่อ)

หมายเลขไอโซ เลข	อุณหภูมิ/ เวลา (นาที)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 nm					
		10	20	30	40	50	60
NKB712 (24 ชม.)	40 °C	0.0775	0.077	0.0735	0.07	0.067	0.0635
	50 °C	0.078	0.0725	0.069	0.0655	0.061	0.0585
	60 °C	0.072	0.0685	0.0525	0.05	0.0405	0.032
	70 °C	0.065	0.06	0.039	0.03	0.021	0.018
	80 °C	0.062	0.04	0.021	0.0175	0.01	0.0055
NKB744 (30 ชม.)	40 °C	0.067	0.067	0.0615	0.0565	0.0525	0.049
	50 °C	0.065	0.0625	0.0595	0.055	0.051	0.049
	60 °C	0.058	0.0525	0.044	0.041	0.0385	0.031
	70 °C	0.053	0.0395	0.037	0.0255	0.021	0.0175
	80 °C	0.034	0.0305	0.024	0.0155	0.0105	0.006



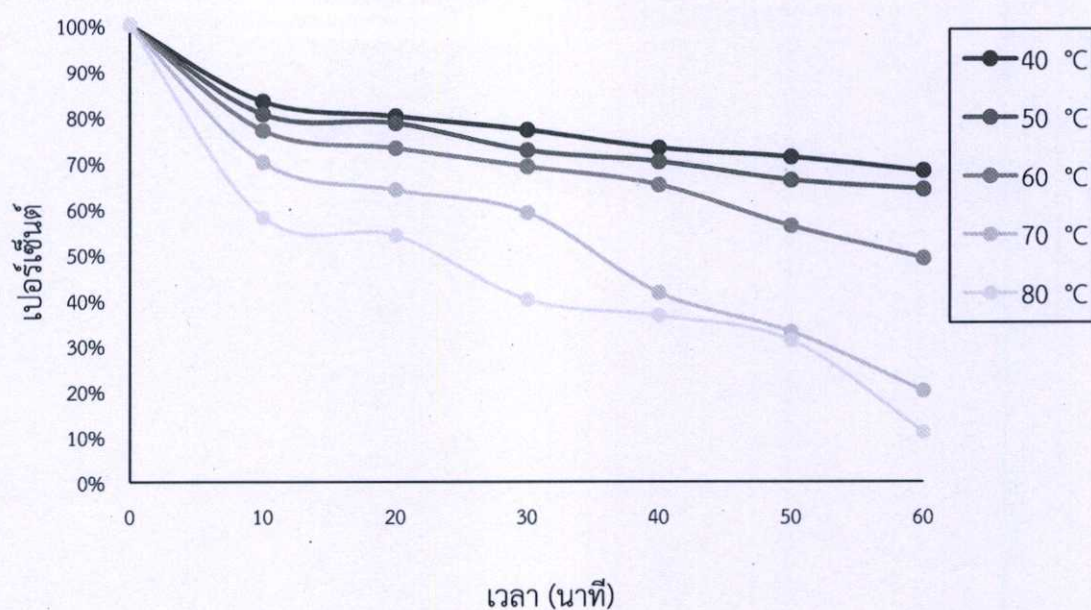
รูปที่ 4.24 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ, เวลา และกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากไอโซเลข NKB720 (30 ชั่วโมง)

NKB720 (30 ชั่วโมง) มีเสถียรภาพ เมื่ออบที่อุณหภูมิ 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แต่เมื่ออบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เอนไซม์จะเสถียรภาพ ทำให้กิจกรรมลดลงเป็นอย่างมาก



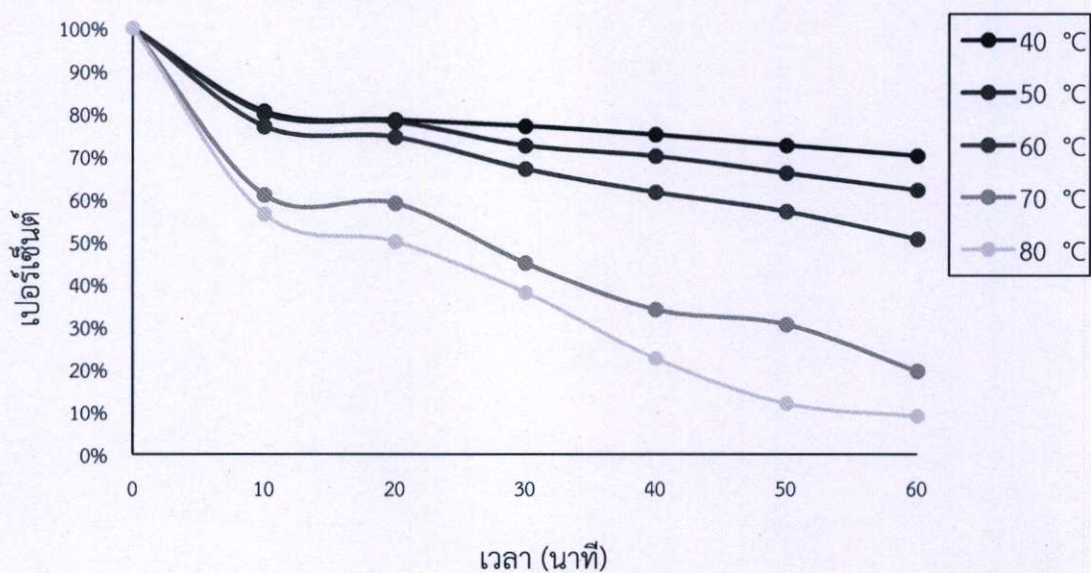
รูปที่ 4.25 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ, เวลา และกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากไอโซเลท NKB690 (30 ชั่วโมง)

NKB690 (30 ชั่วโมง) มีเสถียรภาพใกล้เคียงกันที่เมื่ออบที่อุณหภูมิ 40 และ 50 องศาเซลเซียส แต่เมื่ออบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส กิจกรรมจะค่อยๆ ลดลง เอนไซม์จะเสถียรภาพเมื่ออบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที



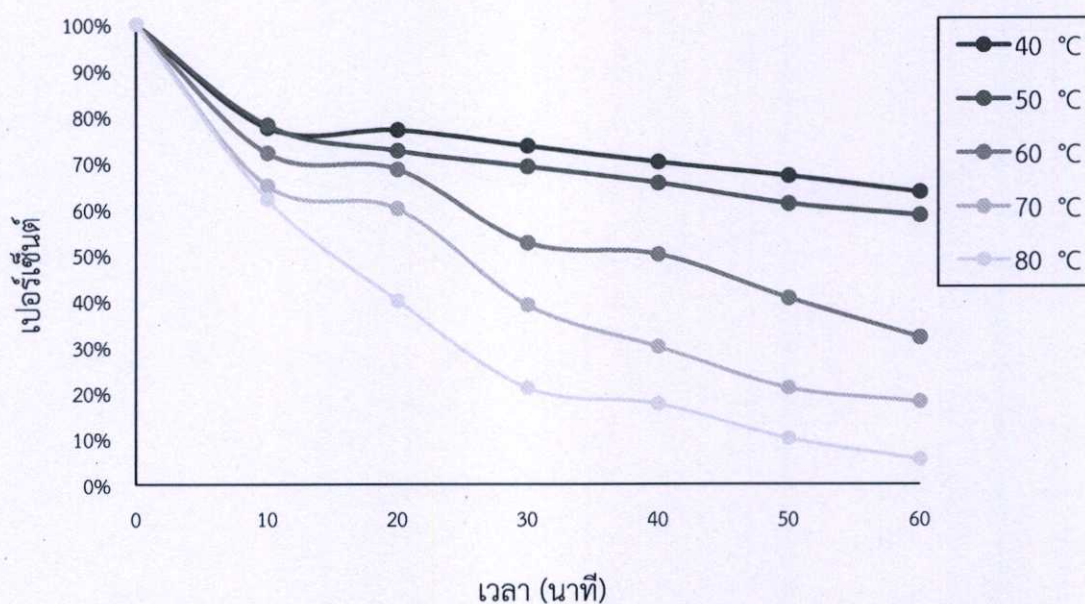
รูปที่ 4.26 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ, เวลา และกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากไอโซเลท NKB704 (24 ชั่วโมง)

NKB704 (24 ชั่วโมง) มีเสถียรภาพใกล้เคียงกันเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แต่เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 40 นาที และ 80 องศาเซลเซียส 30 นาที เอนไซม์จะเสถียรภาพซึ่งสังเกตได้จากกิจกรรมที่ลดลงอย่างเห็นได้ชัด



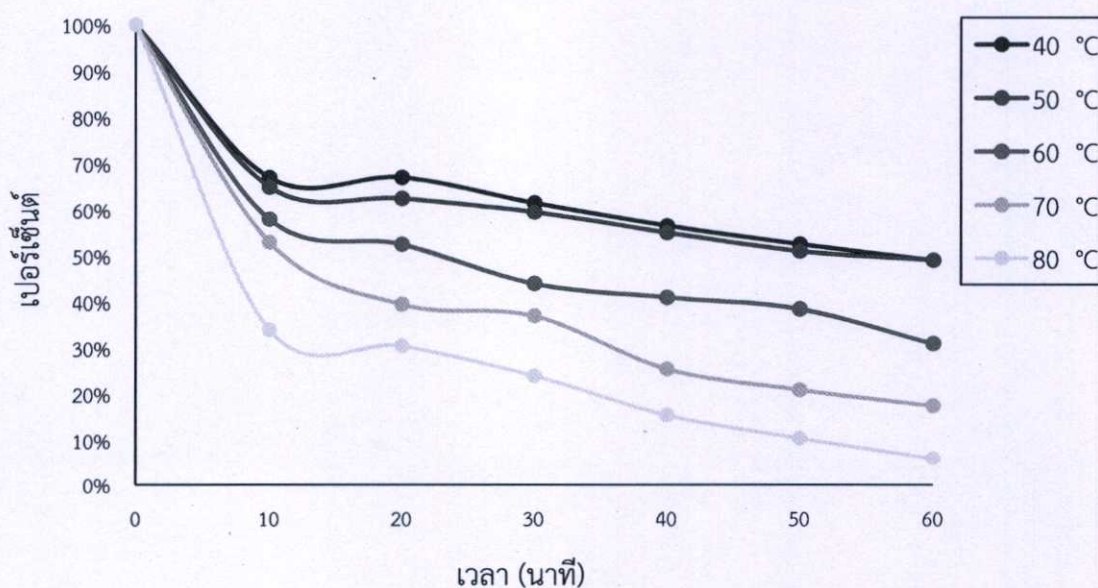
รูปที่ 4.27 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ, เวลา และกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากไอโซเลท NKB731 (24 ชั่วโมง)

NKB731 (24 ชั่วโมง) มีเสถียรภาพเมื่ออบที่อุณหภูมิ 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส แต่เอนไซม์จะมีกิจกรรมลดลงเป็นอย่างมากเมื่ออบที่อุณหภูมิ 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที



รูปที่ 4.28 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ, เวลา และกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากไอโซเลท NKB712 (24 ชั่วโมง)

NKB712 (24 ชั่วโมง) มีเสถียรภาพที่อุณหภูมิ 40 และ 50 องศาเซลเซียส แต่เมื่ออบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที กิจกรรมของเอนไซม์ค่อยๆ ลดลง และเมื่ออบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 และ 30 นาที เอนไซม์จะเสถียรภาพ



รูปที่ 4.29 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ, เวลา และกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากไอโซเลท NKB744 (30 ชั่วโมง)

NKB744 (30 ชั่วโมง) มีเสถียรภาพที่ใกล้เคียงกันเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 40 และ 50 องศาเซลเซียส แต่กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงเป็นอย่างมากเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที

จากผลการทดลองการหาเสถียรภาพของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส ที่สกัดได้จากเชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 6 ไอโซเลท ซึ่งคัดแยกได้จากดินป่าชายเลน ตำบลคลองตำหรุ จังหวัดชลบุรี พบว่า เอนไซม์ส่วนใหญ่มีเสถียรภาพเหลือมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที แต่เมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว โดยไอโซเลท NKB690 (30 ชั่วโมง) เหลือกิจกรรมสูงสุด ซึ่งเท่ากับ 0.0135 และไอโซเลท NKB712 (24 ชั่วโมง) เหลือกิจกรรมน้อยที่สุด ซึ่งเท่ากับ 0.0055

4.9 การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ

การทดสอบเพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งทางชีวภาพตามวิธีการ (3.4.8) ซึ่งแบ่งการทดสอบออกเป็น 2 วิธี วิธีที่ 1 เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อหนึ่งจุลปลงในอาหาร Mueller-Hinton บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะเขย่า 24 ชั่วโมง คำนวณความเข้มข้นของเซลล์ให้มีค่าเท่ากับ 10^8 cfu/ml โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร จากนั้น spread ลงบนอาหาร Mueller-Hinton agar วาง Disk ลงบนอาหารและหยดสารละลายของแอกติโนมัยซีท ปริมาตร 30 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Mohseni *et al.*, 2013) จากวิธีที่ 3.4.8.1 วิธีที่ 2 เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อลงในสารละลาย NaCl 0.85% เทียบความขุ่นให้ใกล้เคียงกับ McFarlane's เบอร์ 0.5 (Pozzatti *et al.*, 2010) ทำการ Swab ลงบนผิวหน้าอาหาร Mueller-Hinton agar แล้วนำ Supernatant ของอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์มาผสมกับตัวทำละลาย Ethyl Acetate นำส่วนที่เป็นสารผสมมาสกัดโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศ (Phongsopitanun *et al.*, 2014) นำ Crude ethyl acetate extract ที่ได้ผสมกับ Ethyl Acetate จากนั้นหยดลงบน Disk Diffusion ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ทิ้งไว้จน Disk Diffusion แห้งและวางลงบนอาหาร Mueller-Hinton agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากวิธีที่ 3.4.8.2

โดยหากมีการสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจะเกิดโซนใสขึ้นรอบ ๆ โคลโลนี จากการทดสอบพบว่าเชื้อทั้ง 6 ไอโซเลท (NKB704 , NKB720 , NKB712 , NKB690 , NKB744 และ NKB73) ไม่มีการผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งทางชีวภาพ เนื่องจากไม่พบการเกิดโซนใส (clear zone) ดังแสดงในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 แสดงผลของสารสกัดเอนไซม์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จากเชื้อ แอคติโนมัยซีทที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจำนวน 6 ไอโซเลท

วิธีที่ 1 (3.4.8.1)

หมายเลข ไอโซเลท	<i>X. campestris</i>	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>C. albicans</i>	<i>S. typhimurium</i> TISTR 5562	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i> TISTR 1466
NKB704	-	-	-	-	-	-
NKB720	-	-	-	-	-	-
NKB712	-	-	-	-	-	-
NKB690	-	-	-	-	-	-
NKB744	-	-	-	-	-	-
NKB731	-	-	-	-	-	-

วิธีที่ 2 (3.4.8.2)

หมายเลข ไอโซเลท	<i>X. campestris</i>	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>C. albicans</i>	<i>S. typhimurium</i> TISTR 5562	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i> TISTR 1466
NKB704	-	-	-	-	-	-
NKB720	-	-	-	-	-	-
NKB712	-	-	-	-	-	-
NKB690	-	-	-	-	-	-
NKB744	-	-	-	-	-	-
NKB731	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ

ระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากแอคติโนมัยซีทที่ใช้ในการทดสอบเท่ากับ 30 ไมโครลิตร เครื่องหมายของความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ ให้ดังนี้

ไม่มี Inhibition zone กำหนดให้เป็น -

มี Inhibition zone กว้าง 9-11 มิลลิเมตร กำหนดให้เป็น +

กว้าง 12-15 มิลลิเมตร กำหนดให้เป็น ++

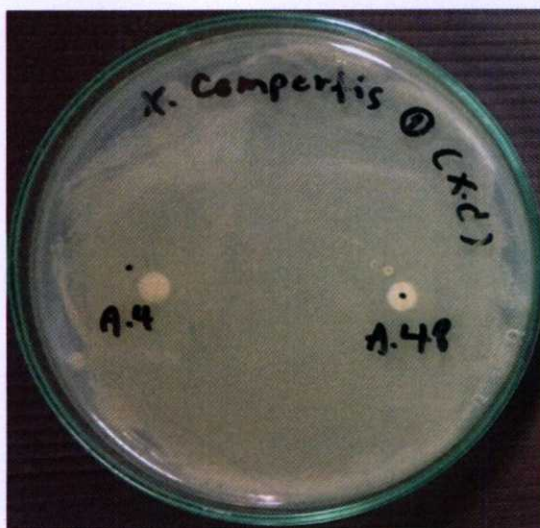
กว้าง 16-19 มิลลิเมตร กำหนดให้เป็น +++

กว้าง 20-23 มิลลิเมตร กำหนดให้เป็น ++++

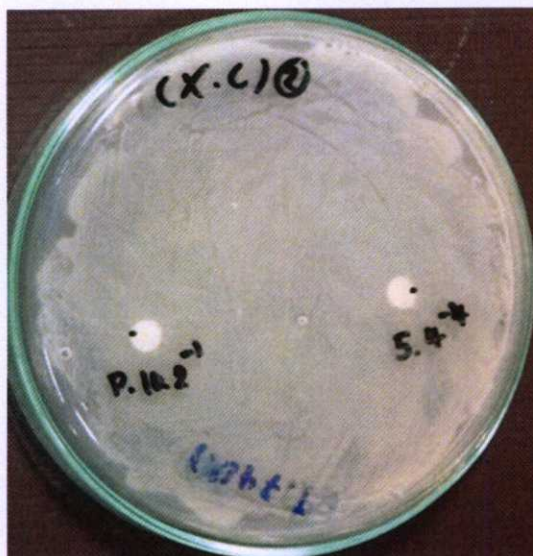
กว้างมากกว่า 23 มิลลิเมตร กำหนดให้เป็น +++++

วิธีที่ 1 เลียงเชื้อที่ต้องการทดสอบบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเจือเชื้อหนึ่งจุลปลงในอาหาร Mueller-Hinton บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะเขย่า 24 ชั่วโมง คำนวณความเข้มข้นของเซลล์ให้มีค่าเท่ากับ 10^8 cfu/ml โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm จากนั้น spread ลงบนอาหาร Mueller-Hinton agar วาง Disk ลงบนอาหารและหยดสารละลายของแอคติโนมัยซีทปริมาณ 30 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Mohseni et al., 2013) จากวิธีที่ 3.4.8.1

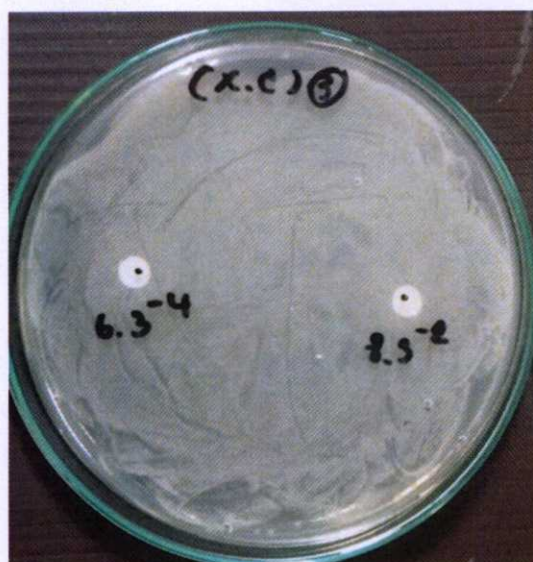
การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas campestris* พบว่าทั้ง 6 ไอโซเลท (NKB720, NKB744, NKB731, NKB721, NKB704 และ NKB690) ไม่มีการผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งทางชีวภาพ จะสังเกตเห็นว่าแต่ละโคโลนีนั้น ไม่พบการเกิดโซนใส (Clear zone) ที่เกิดจากการที่เชื้อนั้น ๆ ได้มีการผลิตสารบางชนิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas campestris* ได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.30 – 4.32



รูปที่ 4.30 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas campestris* จากเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ NKB690 และ NKB720



รูปที่ 4.31 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas campestris* จากเชื้อ แอคติโน
มัยซีทไอโซเลขที่ NKB731 และ NKB744



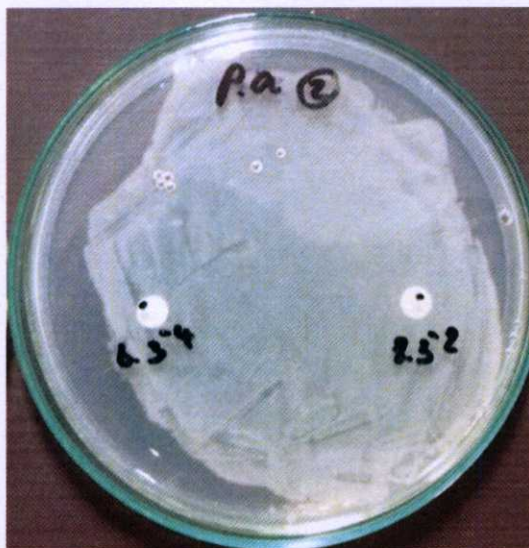
รูปที่ 4.32 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas campestris* จากเชื้อ แอคติโน
มัยซีทไอโซเลขที่ NKB704 และ NKB712

การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 พบว่าทั้ง 6 ไอโซเลข (NKB720, NKB744, NKB731, NKB721, NKB704 และ NKB690) ไม่มีการผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งทางชีวภาพ จะสังเกตได้ว่าแต่ละโคโลนีนั้น ไม่พบการเกิดโซนใส (clear zone) ที่เกิดจากการที่เชื้อนั้น ๆ ได้มีการ

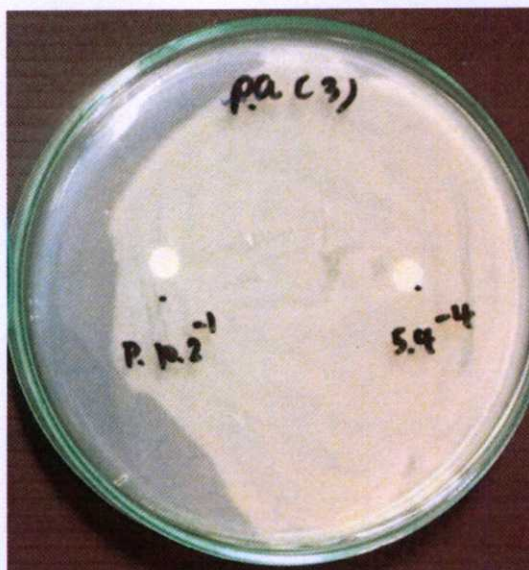
ผลิตสารบางชนิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.33 – 4.35



รูปที่ 4.33 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 จากเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ NKB690 และ NKB720

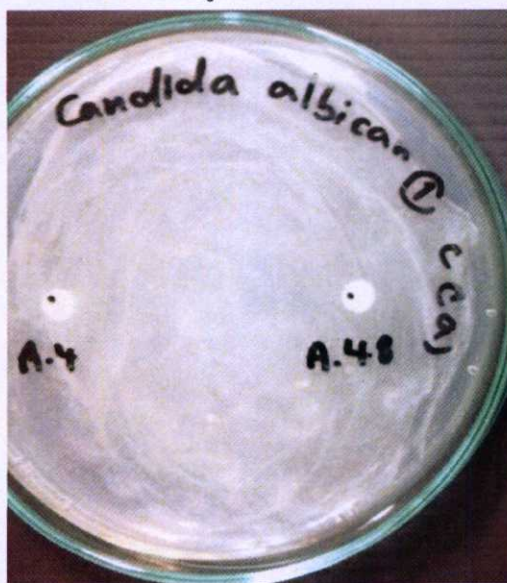


รูปที่ 4.34 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 จากเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ NKB704 และ NKB712

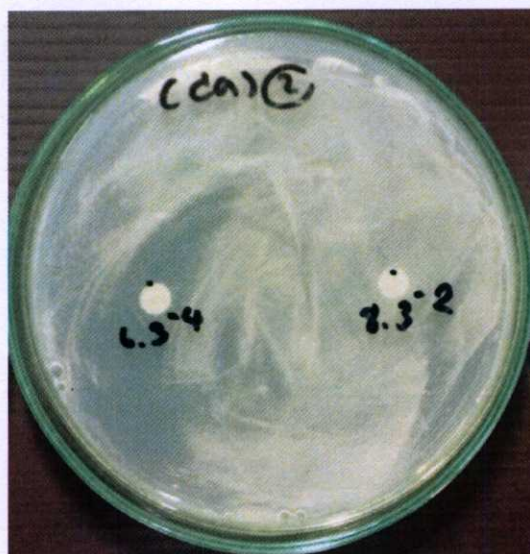


รูปที่ 4.35 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 จากเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ NKB731 และ NKB744

การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* พบว่าทั้ง 6 ไอโซเลข (NKB720, NKB744, NKB731, NKB721, NKB704 และ NKB690) ไม่มีการผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งทางชีวภาพ จะสังเกตได้ว่าแต่ละโคโลนีนั้น ไม่พบการเกิดโซนใส (clear zone) ที่เกิดจากการที่เชื้อนั้นๆ ได้มีการผลิตสารบางชนิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.36 – 4.38



รูปที่ 4.36 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* จากเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลขที่ NKB690 และ NKB720



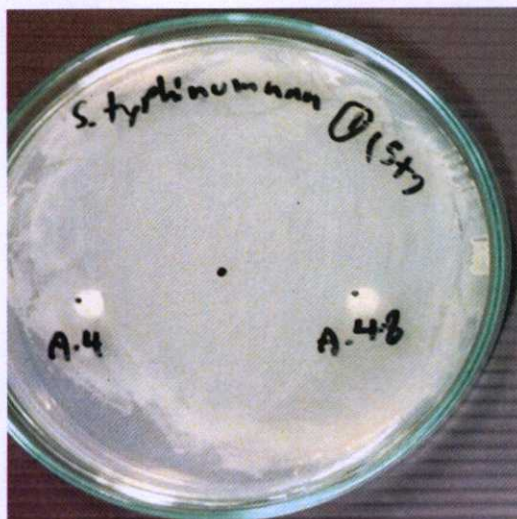
รูปที่ 4.37 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* จากเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลทที่ NKB704 และ NKB712



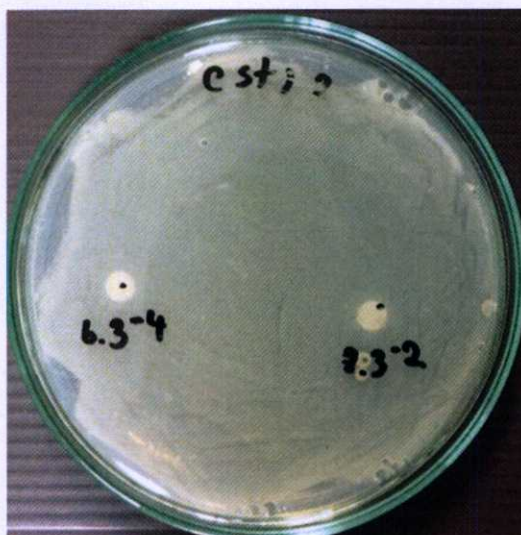
รูปที่ 4.38 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* จากเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลทที่ NKB731 และ NKB744

การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella typhimurium* TISTR 5562 พบว่าทั้ง 6 ไอโซเลท (NKB720 , NKB744 , NKB731 , NKB721 , NKB704 และ NKB690) ไม่มีการผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งทางชีวภาพ จะสังเกตได้ว่าแต่ละโคโลนีนั้น ไม่พบการเกิดโซนใส (clear zone) ที่เกิดจากการที่เชื้อนั้น ๆ ได้มีการ

ผลิตสารบางชนิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella typhimurium* TISTR 5562 ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.39-4.41



รูปที่ 4.39 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Salmonella typhimurium* TISTR 5562 จากเชื้อแอดติโนมัซิทไฮโซเลขที่ NKB690 และ NKB720



รูปที่ 4.40 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Salmonella typhimurium* TISTR 5562 จากเชื้อแอดติโนมัซิทไฮโซเลขที่ NKB704 และ NKB712

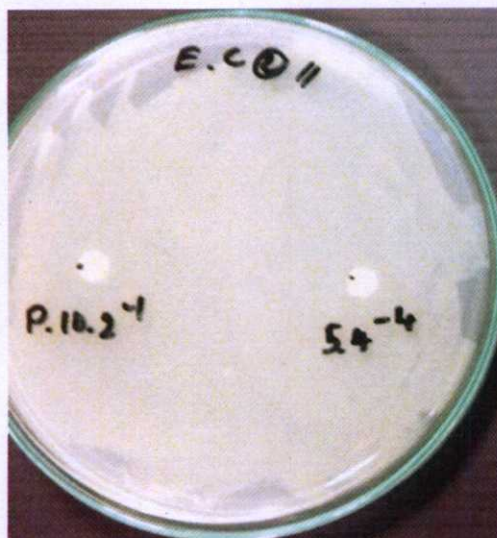


รูปที่ 4.41 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Salmonella typhimurium* TISTR 5562 จากเชื้อแอดดิโนมัซิทไอโซเลขที่ NKB731 และ NKB744

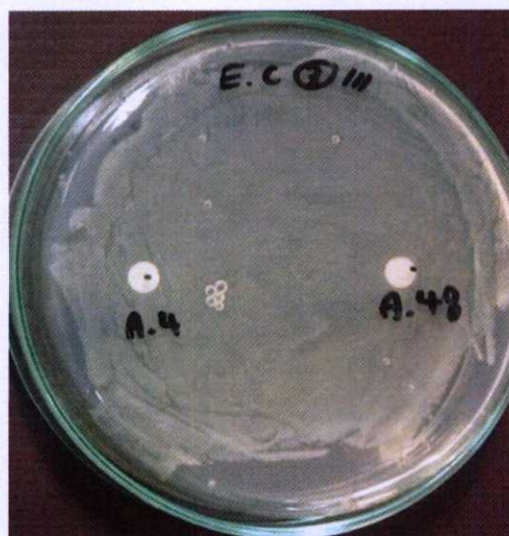
การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* พบว่าทั้ง 6 ไอโซเลข (NKB720, NKB744, NKB731, NKB721, NKB704 และ NKB690) ไม่มีการผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งทางชีวภาพ จะสังเกตได้ว่าแต่ละโคโลนีนั้น ไม่พบการเกิดโซนใส (clear zone) ที่เกิดจากการที่เชื้อนั้น ๆ ได้มีการผลิตสารบางชนิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.42 – 4.44



รูปที่ 4.42 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E. coli* จากเชื้อแอดดิโนมัซิทไอโซเลขที่ NKB704 และ NKB712

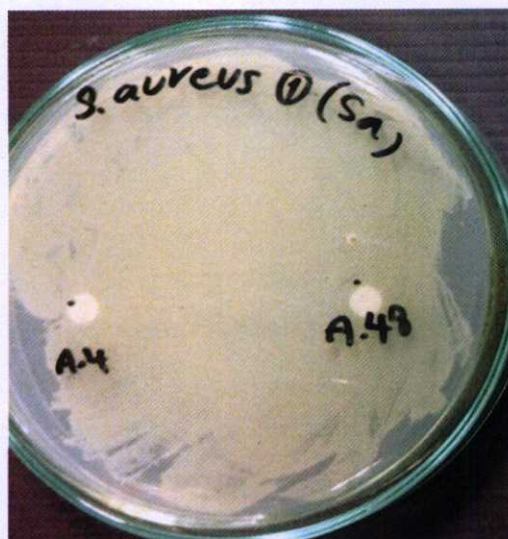


รูปที่ 4.43 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E. coli* จากเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ NKB731 และ NKB744

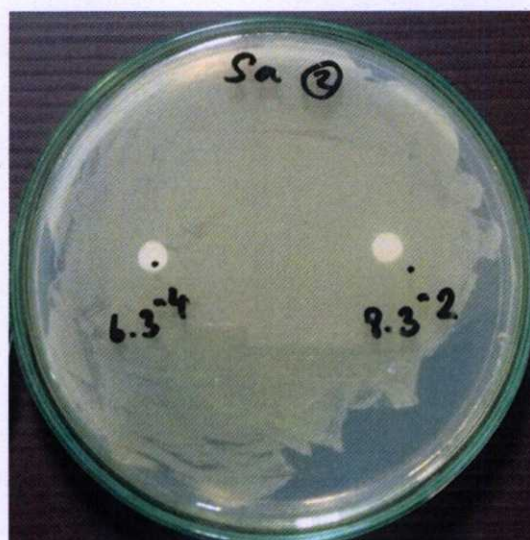


รูปที่ 4.44 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E. coli* จากเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ NKB690 และ NKB720

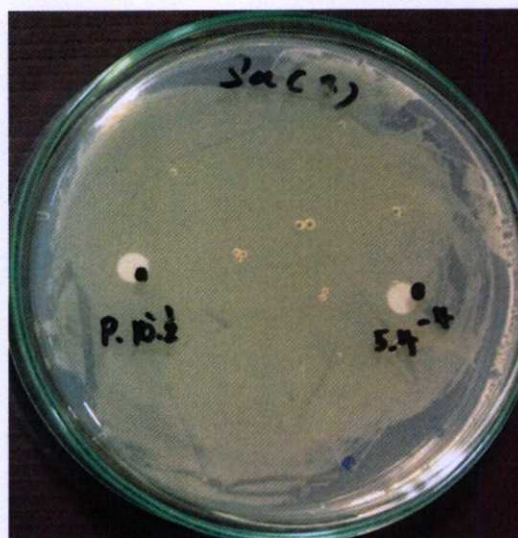
การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 พบว่าทั้ง 6 ไอโซเลข (NKB720 , NKB744 , NKB731 , NKB721 , NKB704 และ NKB690) ไม่มีการผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งทางชีวภาพ จะสังเกตได้ว่าแต่ละโคโลนีนั้น ไม่พบการเกิดโซนใส (clear zone) ที่เกิดจากการที่เชื้อนั้น ๆ ได้มีการผลิตสารบางชนิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.45 – 4.47



รูปที่ 4.45 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 จากเชื้อ แอคติ โนมัยซีทไอโซเลขที่ NKB690 และ NKB720



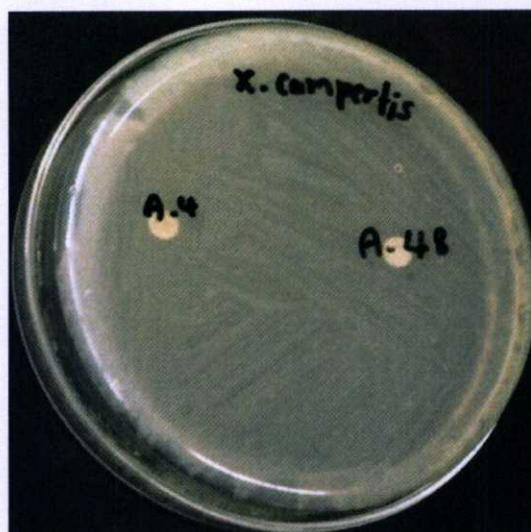
รูปที่ 4.46 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 จากเชื้อ แอคติ โนมัยซีทไอโซเลขที่ NKB704 และ NKB712



รูปที่ 4.47 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 จากเชื้อ แอคติโนไมซีทไอโซเลขที่ NKB731 และ NKB744

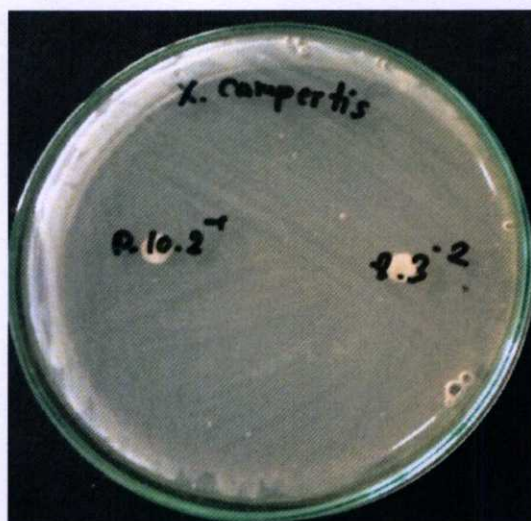
วิธีที่ 2 เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เทียบเชื้อลงในสารละลาย NaCl 0.85% เทียบความขุ่นให้ใกล้เคียงกับ McFarlane's เบอร์ 0.5 (Pozzatti et al., 2010) ทำการ Swab ลงบนผิวหน้าอาหาร Mueller-Hinton agar แล้วนำ Supernatant ของอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ มาผสมกับตัวทำละลาย Ethyl Acetate นำส่วนที่เป็นสารผสมมาสกัดโดยใช้เครื่องระเหยสูญญากาศ (Phongsopitanun et al., 2014) นำ Crude ethyl acetate extract ที่ได้ผสมกับ Ethyl Acetate จากนั้นหยดลงบน Disk Diffusion ปริมาตร 5 μ l ทิ้งไว้จน Disk Diffusion แห้งและวางลงบนอาหาร Mueller-Hinton agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากวิธีที่ 3.4.8.2

การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas campestris* พบว่าทั้ง 6 ไอโซเลข (NKB720 , NKB744 , NKB731 , NKB721 , NKB704 และ NKB690) ไม่มีการผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งทางชีวภาพ จะสังเกตได้ว่าแต่ละโคโลนีนั้น ไม่พบการเกิดโซนใส (clear zone) ที่เกิดจากการที่เชื้อนั้น ๆ ได้มีการผลิตสารบางชนิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas campestris* ดังแสดงในรูปที่ 4.48 – 4.50



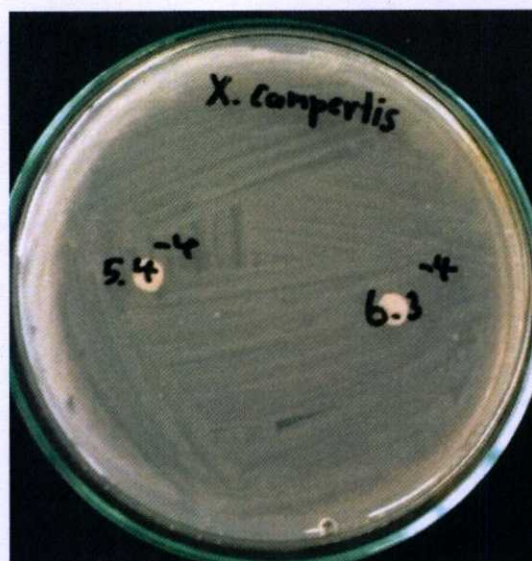
รูปที่ 4.48 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas campestris* จากเชื้อ
มัยซีทไอโซเลขที่ NKB690 และ NKB720

แอกติโน



รูปที่ 4.49 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas campestris* จากเชื้อ
มัยซีทไอโซเลขที่ NKB731 และ NKB712

แอกติโน



รูปที่ 4.50 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas campestris* จากเชื้อ แอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ NKB744 และ NKB704

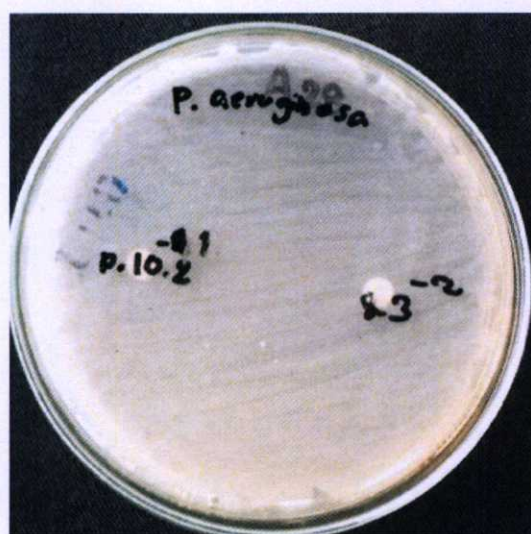
การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 พบว่าทั้ง 6 ไอโซเลข (NKB720, NKB744, NKB731, NKB721, NKB704 และ NKB690) ไม่มีการผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งทางชีวภาพ จะสังเกตได้ว่าแต่ละโคโลนีนั้น ไม่พบการเกิดโซนใส (clear zone) ที่เกิดจากการที่เชื้อนั้น ๆ ได้มีการผลิตสารบางชนิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.51 - 4.53



รูปที่ 4.51 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 จากเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ NKB690 และ NKB720



รูปที่ 4.52 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 จากเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ NKB744 และ NKB704



รูปที่ 4.53 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 จากเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ NKB731 และ NKB712

การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* พบว่าทั้ง 6 ไอโซเลท (NKB720 , NKB744 , NKB731 , NKB721 , NKB704 และ NKB690) ไม่มีการผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งทางชีวภาพ จะสังเกตได้ว่าแต่ละโคโลนีนั้น ไม่พบการเกิดโซนใส (clear zone) ที่เกิดจากการที่เชื้อนั้น ๆ ได้มีการผลิตสารบางชนิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ เชื้อ *Candida albicans* ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.54 – 4.56



รูปที่ 4.54 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* จากเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซ
เลขที่ NKB690 และ NKB720



รูปที่ 4.55 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* จากเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอ
โซเลขที่ NKB744 และ NKB704



รูปที่ 4.56 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* จากเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลทที่ NKB731 และ NKB712

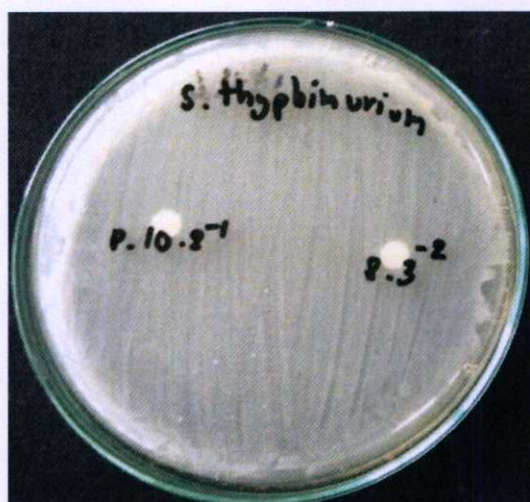
การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella typhimurium* TISTR 5562 พบว่าทั้ง 6 ไอโซเลท (NKB720 , NKB744 , NKB731 , NKB721 , NKB704 และ NKB690) ไม่มีการผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งทางชีวภาพ จะสังเกตได้ว่าแต่ละโคโลนีนั้น ไม่พบการเกิดโซนใส (clear zone) ที่เกิดจากการที่เชื้อนั้น ๆ ได้มีการผลิตสารบางชนิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella typhimurium* TISTR 5562 ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.57 – 4.59



รูปที่ 4.57 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Salmonella typhimurium* TISTR 5562 จากเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ NKB690 และ NKB720

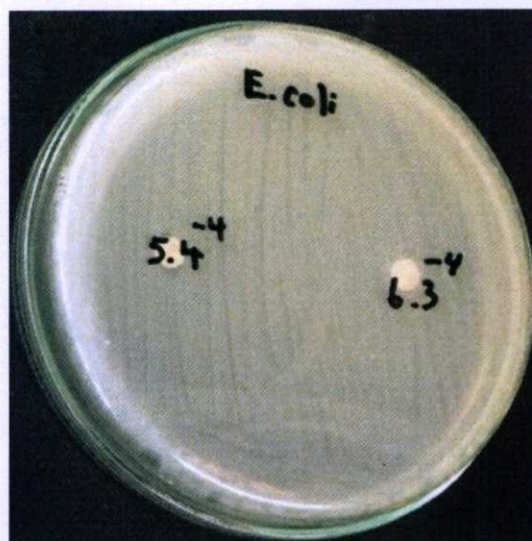


รูปที่ 4.58 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Salmonella typhimurium* TISTR 5562 จากเชื้อแอกติโนมายซีทไอโซเลขที่ NKB744 และ NKB704

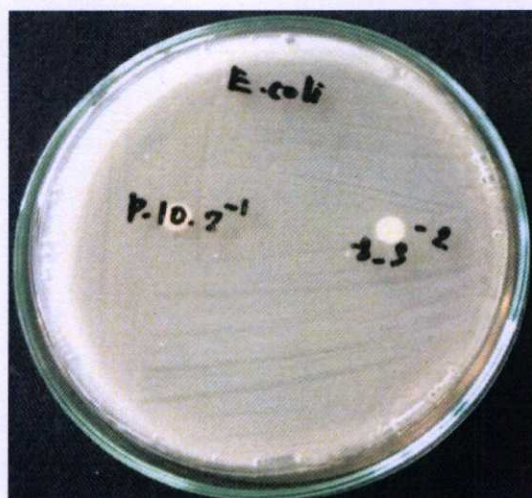


รูปที่ 4.59 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Salmonella typhimurium* TISTR 5562 จากเชื้อแอกติโนมายซีทไอโซเลขที่ NKB731 และ NKB712

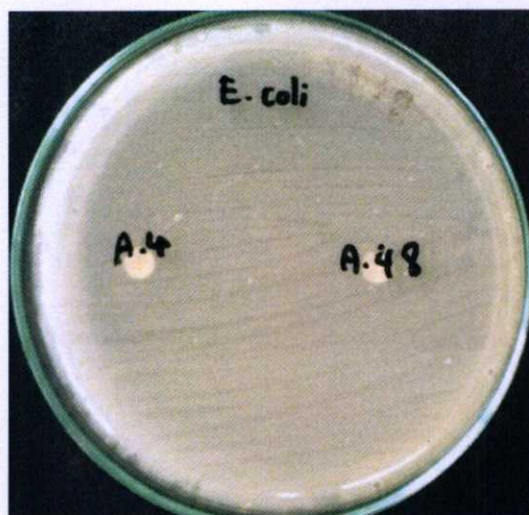
การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* พบว่าทั้ง 6 ไอโซเลข (NKB720 , NKB744 , NKB731 , NKB721 , NKB704 และ NKB690) ไม่มีการผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งทางชีวภาพ จะสังเกตได้ว่าแต่ละโคโลนีนั้น ไม่พบการเกิดโซนใส (clear zone) ที่เกิดจากการที่เชื้อนั้น ๆ ได้มีการผลิตสารบางชนิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.60 – 4.62



รูปที่ 4.60 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E. coli* จากเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ NKB744 และ NKB704

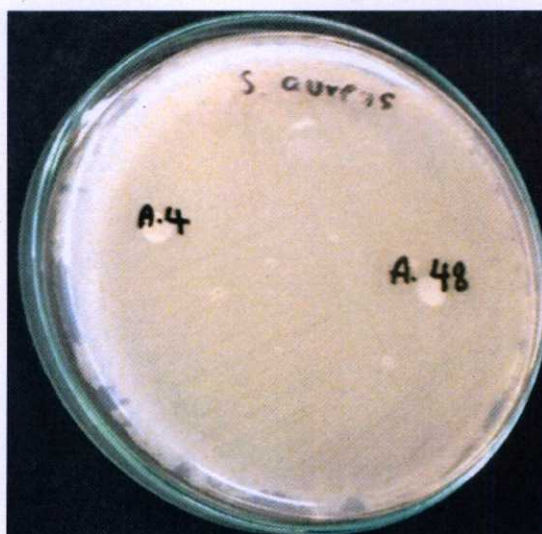


รูปที่ 4.61 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E. coli* จากเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ NKB731 และ NKB712

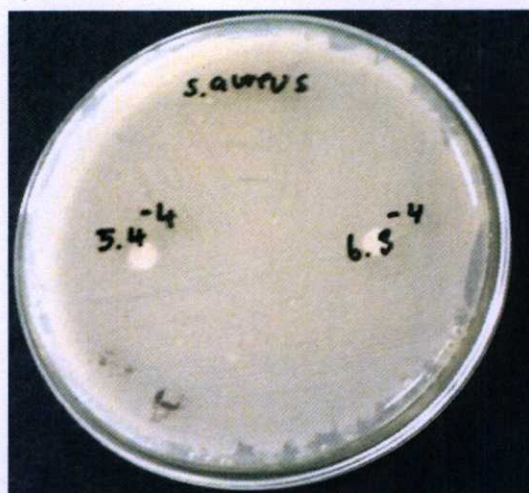


รูปที่ 4.62 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E. coli* จากเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ NKB690 และ NKB720

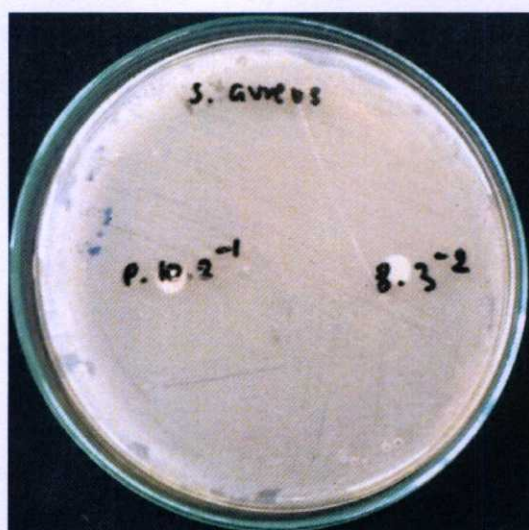
การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 พบว่าทั้ง 6 ไอโซเลข (NKB720 , NKB744 , NKB731 , NKB721 , NKB704 และ NKB690) ไม่มีการผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งทางชีวภาพ จะสังเกตได้ว่าแต่ละโคโลนินั้น ไม่พบการเกิดโซนใส (clear zone) ที่เกิดจากการที่เชื้อนั้น ๆ ได้มีการผลิตสารบางชนิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.63 – 4.65



รูปที่ 4.63 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 จากเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ NKB690 และ NKB720



รูปที่ 4.64 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 จากเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ NKB744 และ NKB704



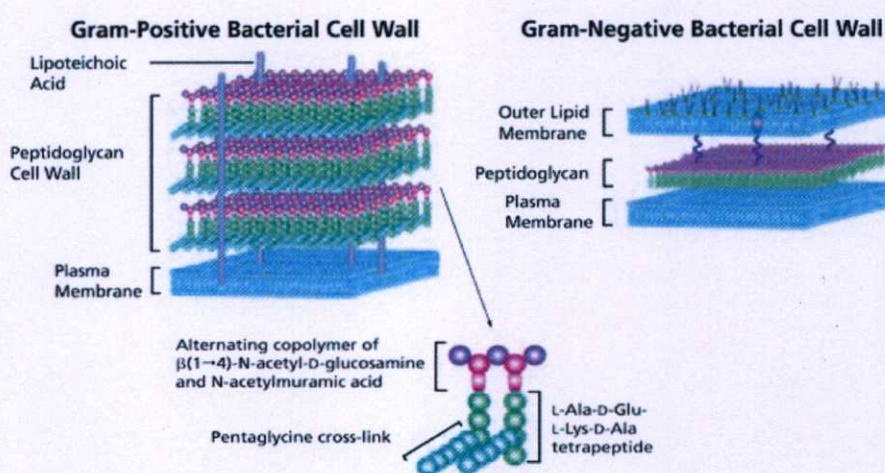
รูปที่ 4.65 แสดงการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 จากเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ NKB731 และ NKB712

หมายเหตุ ไอโซเลขในภาพจะตรงกับไอโซเลข ดังต่อไปนี้

A.48 = NKB720 , 5.4⁻⁴ = NKB744 , P.10.2⁻¹ = NKB731 ,

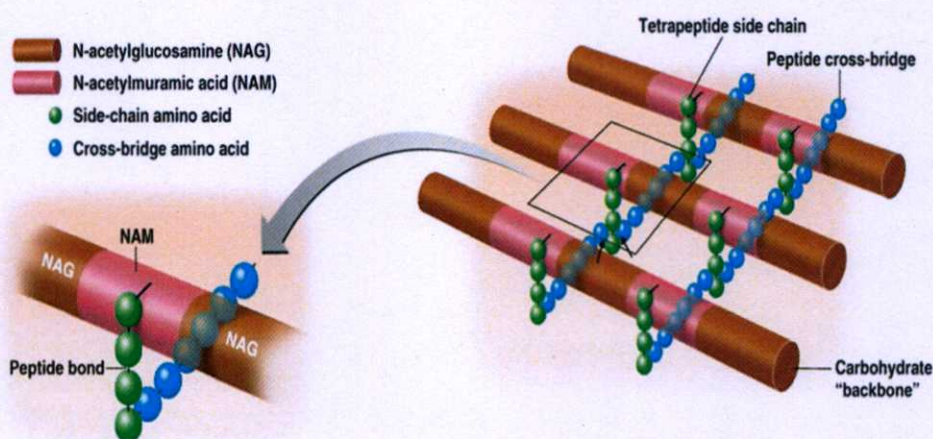
P.8.3⁻² = NKB721 , 6.3⁻⁴ = NKB704 และ A.4 = NKB690

งานวิจัยของลลิตา (2554) ที่ได้ทำการศึกษาการคัดกรอง และการพิสูจน์แอกติโนมัยซีทหายากที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ อธิบายว่าแอกติโนมัยซีทที่แยกได้ส่วนใหญ่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบและไม่มีเชื้อโคที่มีฤทธิ์ยับยั้งยีสต์ เนื่องจากความแตกต่างทางองค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียทั้งสองกลุ่ม โดยกลไกการออกฤทธิ์ของสารเมทาบอลิต์ที่แอกติโนมัยซีท สร้างขึ้น จะออกฤทธิ์ยับยั้งผนังเซลล์ มีผลต่อการสร้างเพปติโดไกลแคน เช่น ยับยั้งการสังเคราะห์สารตั้งต้นของเพปติโดไกลแคน และยับยั้ง transpeptidation เป็นต้น ซึ่งชั้นของเพปติโดไกลแคนนี้เองที่เป็น โครงสร้างส่วนใหญ่ที่พบได้ในผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก ส่วนแบคทีเรียแกรมลบจะมีชั้นของเพปติโดไกลแคนที่บางกว่า และมีผนังเซลล์นั้นนอกเป็น lipopolysaccharide ดังแสดงในรูปที่ 4.66



รูปที่ 4.66 แสดง โครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ

ที่มา : (<http://www.sigmaaldrich.com>)



รูปที่ 4.67 แสดง โครงสร้างของ Peptidoglycan ในแบคทีเรีย

ที่มา : (<http://classes.midlandstech.edu/carterp>)

จากการทดสอบเพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งทางชีวภาพพบว่าเชื้อทั้ง 6 ไอโซเลท (NKB704, NKB720, NKB712, NKB690, NKB744 และ NKB73) ไม่มีการเกิดโซนใส สาเหตุอาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของสารที่สกัดออกมาเพื่อใช้ในการทดลองมีปริมาณน้อยมาก หรือถูกเจือจางจนมีความเข้มข้นต่ำ โดยในวิธีที่ 1 นั้นได้ทำการทดสอบโดยนำน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 14 วัน ซึ่งอาจทำให้ปริมาณสารที่ได้มีปริมาณน้อย สังเกตได้จากการนำหมักที่เหลืออยู่ภายในขวด และมีการใช้อาหารไปเป็นจำนวนมาก เนื่องจากวิธีนี้เป็นการนำน้ำหมักที่ผ่านกรอง และปั่นเหวี่ยงแล้วมาใช้โดยตรง การใช้วิธี Agar well diffusion อาจให้ผลการทดลองที่ดีกว่าเนื่องจากสารสกัดที่ได้จะสัมผัสกับอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยตรง อาจทำให้สารที่สกัดได้ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้วิธี Disk Diffusion ส่วนวิธีที่ 2 ในขั้นตอนที่ทำให้ความเข้มข้นของสารที่สกัดได้มีความเข้มข้นขึ้น ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ เมื่อทำการระเหยเสร็จจนสารแห้งติดขวดกลั่นจึงนำ Crude ethyl acetate extract ที่ได้ผสมกับ Ethyl Acetate แต่เนื่องจากในขั้นตอนนี้ได้มีการเติม Ethyl Acetate ลงไปเพื่อทำการละลายสารที่ติดอยู่ภายในขวดกลั่นเลย โดยไม่ได้มีการชั่งหรือคำนวณปริมาณระหว่าง Crude ethyl acetate extract และ Ethyl Acetate ซึ่งควรจะผสมในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ทำให้ได้สารที่มีความเจือจางสูง และไม่ทราบความเข้มข้นของสารที่ได้แน่นอน จึงควรนำขวดกลั่นไปชั่งน้ำหนักก่อนจึงนำมาระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ เมื่อทำการระเหยจนสารที่สนใจแห้งจึงนำมาชั่งอีกครั้งเพื่อหาน้ำหนักของสาร แล้วจึงทำการผสมด้วย Ethyl Acetate ในอัตรา 1 ต่อ 1 ก็จะทำให้ทราบความเข้มข้นของสารที่จะนำไปใช้ในการทดสอบ จะทำให้ได้ผลการทดลองที่มีความน่าเชื่อถือและมีความแม่นยำมากยิ่งขึ้น

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการเก็บตัวอย่างดินจากป่าชายเลน ตำบลคลองตำหรุ จังหวัดชลบุรี ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตไม่ว่าจะเป็นพืชหรือสัตว์ เพื่อทำการคัดแยกเชื้อในกลุ่มแอกติโนมัยซีทและทดสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอส พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทได้จำนวน 66 ไอโซเลทด้วยกัน ซึ่งสังเกตลักษณะโคโลนีที่มีลักษณะคล้ายหนังสัตว์และนูนขึ้นมาบนผิวอาหาร Starch casein agar จากนั้นคัดเลือกแอกติโนมัยซีทที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันจำนวน 20 ไอโซเลท เพื่อทดสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอสบนอาหาร Skim milk agar พบว่ามีเชื้อจำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ NKB690, NKB704, NKB712, NKB720, NKB731 และ NKB744 ที่พบโซนใส (Clear zone) เกิดขึ้นบนอาหาร เนื่องจากสามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสที่ย่อยโปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในอาหารได้ จากนั้นสกัดเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากเชื้อจำนวน 6 ไอโซเลทและเก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลา 24 ชั่วโมง และ 30 ชั่วโมง เพื่อทดสอบหาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส, อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส, สารยับยั้งชนิดต่างๆที่มีผลต่อเอนไซม์โปรติเอส, เสถียรภาพของเอนไซม์โปรติเอส รวมถึงสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อแอกติโนมัยซีท

จากการทดลองการหาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส พบว่า NKB690 (30 ชั่วโมง) มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 10, NKB704 (24 ชั่วโมง) และ NKB731 (24 ชั่วโมง) มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 11, NKB720 (30 ชั่วโมง) มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 8, NKB744 (30 ชั่วโมง) และ NKB712 (24 ชั่วโมง) มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 9

จากการทดลองการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส พบว่า NKB690 (30 ชั่วโมง), NKB744 (30 ชั่วโมง) และ NKB731 (24 ชั่วโมง) มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส, NKB704 (24 ชั่วโมง), NKB720 (30 ชั่วโมง) และ NKB712 (24 ชั่วโมง) มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส

จากการทดลองการหา Inhibitor ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์พบว่าเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดได้จาก 6 ไอโซเลท ถูกยับยั้งได้โดย PMSP , 1,10-Phenantroline และ EDTA แต่เมื่อทดสอบกับ $KMnO_4$ เอนไซม์โปรติเอสมีกิจกรรมสูงเกินกว่าปกติประมาณ 3-4 เท่า

จากการทดลองการหาเสถียรภาพของเอนไซม์โปรติเอสพบว่า เอนไซม์โปรติเอสส่วนใหญ่มีเสถียรภาพที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แต่เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาทีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจะลดลงอย่างเห็นได้ชัด

และจากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพที่ได้จากแอคติโนมัยซีท กับแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคจำนวน 6 สกุล ทั้งสองวิธี พบว่าไม่มีเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทใดที่ก่อให้เกิดโซนใส (Clear zone) บนอาหารได้เลย จึงสรุปได้ว่าเชื้อที่นำมาทดสอบไม่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพได้

สรุปผลการวิจัย ไอโซเลทที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุดคือ เอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากไอโซเลท NKB720 ที่เวลา 30 ชั่วโมง โดยพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 8 และ 37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ Inhibitor ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส ได้แก่ PMSF, 1,10-Phenanthroline และ EDTA แต่เมื่อทดสอบกับ $KMnO_4$ ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์มีค่าเพิ่มมากขึ้น ความเสถียรของเอนไซม์อยู่ที่อุณหภูมิ 40 ถึง 50 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส เอนไซม์เสถียรภาพ และไม่สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพที่ได้จากไอโซเลทนี้

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัยนี้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อในกลุ่มแอคติโนมัยซีท ที่คัดแยกได้จากดินบริเวณป่าชายเลน ตำบลคลองตำหรุ จังหวัดชลบุรี และเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดได้จากเชื้อในกลุ่มแอคติโนมัยซีท โดยเอนไซม์ที่สกัดได้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ซึ่งการทำให้เอนไซม์โปรติเอสมีความบริสุทธิ์มากขึ้น จะสามารถนำไปใช้งานได้ในหลากหลายด้าน เนื่องจากเอนไซม์อัลคาลีนโปรติเอสที่ได้จากการทดลองมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ค่อนข้างต่ำ อาจทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วยวิธี Partial purification โดยใช้ Ammonium sulfate ที่ค่อยๆเพิ่มความเข้มข้นจาก 20 เปอร์เซ็นต์ - 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถแยกโปรตีนออกเป็นกลุ่มๆ ได้ ดังงานวิจัยของ Bijender *et al* 2011, ซึ่งสามารถนำเอนไซม์โปรติเอสไปใช้งานในด้านอุตสาหกรรม, ด้านการแพทย์ และด้านอาหาร หากมีการนำไปศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ โปรติเอสจากเชื้อในกลุ่มแอคติโนมัยซีท เช่น ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้มีความใกล้เคียงกับความเป็นกรด-ด่าง (pH) กับดินบริเวณป่าชายเลนมากที่สุด, อุณหภูมิ, ความชื้นเริ่มต้น, ปริมาณสปอร์เริ่มต้นในการเพาะเลี้ยง, และปัจจัยของสารอาหารเลี้ยงเชื้อที่นำมาใช้เลี้ยงเชื้อในกลุ่ม แอคติโนมัยซีท รวมไปถึงหากมีการศึกษาวิธีการสกัดเอนไซม์เพื่อให้ได้ออกมาในปริมาณของเอนไซม์ที่สูงขึ้น ความเข้มข้นของสารสกัดในกรณีการศึกษาการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ และทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาสภาวะต่างๆที่ทำให้เกิดความเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ เช่น ความเป็นกรด-ด่าง (pH), อุณหภูมิ และเสถียรภาพของเอนไซม์ ก็จะเป็นประโยชน์ต่อการนำเอนไซม์โปรติเอสไปใช้งานในด้านต่างๆต่อไป

ทั้งนี้เพื่อพัฒนาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์จากเชื้อในกลุ่มแอคติโนมัยซีท การคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์คัดลอกจนการตัดต่อพันธุกรรมเพื่อให้สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสในปริมาณที่สูงขึ้น ความสามารถในการทนอุณหภูมิสูง ความสามารถที่ทนสภาวะที่เป็นด่างได้ดียิ่งขึ้น ที่มักพบในอุตสาหกรรมโรงงาน เช่น อุตสาหกรรมผลิตสารซักล้าง เพื่อให้ได้เชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ โปรติเอสที่มีประสิทธิภาพสูง ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้งาน และได้ผลตอบแทนที่มีความคุ้มค่ากับการลงทุน

เอกสารอ้างอิง

- คณิงกานต์ กลั่นบุญชัย และ อัญชติ อ่อนเจริญ. 2543. การศึกษาเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสในการหมักถั่วเหลืองแบบพื้นบ้านในภาคเหนือ. ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- จักรวาล ไม้ทิพย์ และ เพ็ญพิศ อนุสิทธิ์วัฒนา. 2550. เอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อราซึ่งแยกได้จากถั่วเน่าอาหารพื้นบ้านของภาคเหนือที่เพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารแห้งชนิดต่างๆ. โครงการงานพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ชนินทร์ สุริยกุล ณ อยุธยา, น้าฝน ป้อมทอง, จรัญ เจตนะจิตร, พัชรี สุนทรนัน และ วิเชียร กิจปรีชาวนิช. 2546. เชื้อแอกติโนมัยสีทจากดินป่าเบญจพรรณ และป่าเต็งรังบริเวณสถานีวิจัยสัตว์ป่าเขานางรา เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง, น. 363-370. ใน รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41 (สาขาวิทยาศาสตร์สาขาการจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ธีรวุฒิ หวังอำนวยพร และ รัชณี ไสยประจง. 2550. ความสามารถในการต้านจุลินทรีย์และต้านสารอนุมูลอิสระของพืชสมุนไพรไทยบางชนิด. ISBN 978-974-677-644-8.
- รัชณี มิ่งมา. 2552. แอกติโนมัยสีทจากรากและดินรอบรากพืชตระกูลถั่วและการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคพืช. วิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- รัตนภรณ์ ศรีวิบูลย์. 2556. แอกติโนมัยสีท. สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี.
- ลลิตา วงษ์เงิน. 2554. “การคัดกรองและการพิสูจน์เอกลักษณ์แอกติโนมัยสีทหายากที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ”. วิทยาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยศิลปากร
- สนิท อักษรแก้ว และ สุรพล สุคารา. 2534. ป่าชายเลน. โครงการพัฒนาหนังสืออิเล็กทรอนิกส์ด้านการเกษตร เทิดพระเกียรติพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว. 1-34. ISBN 974-88684-9-4.
- สรยุทธ บุญยะเวชชีวิน และ รุ่งสุริยา บัวสาตี. 2554. ป่าชายเลน นิเวศวิทยาและพรรณไม้. กระดาษในดวงจันทร์, มูลนิธิ, 1-704.
- Alexander & Christopher. 1977. *A Pattern Language: Towns, Buildings, Construction*. Oxford University Press, USA. p. 1216. ISBN 0-19-501919-9.
- Balachandran,C.,Duraipandiyan, V. and Ignacimuthu,S. 2012. Purification and characterization of protease enzyme from actinomycetes and its cytotoxic effect on cancer cell line (A549). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 392-400.

- Ball, S., Bessell, C. J. and Mortimer, A., 1957. The production of polyenic antibiotics by soil *Streptomyces*. *Journal of general microbiology*. 17:96-100.
- Bijender, K. Bajaj and Sharma, P. 2011. An alkali-thermotolerant extracellular protease from a newly isolated *Streptomyces* sp. DP2. *New Biotechnology*. 28: 725-732.
- Carlsohn, M.R., Groth, I., Tan, G., Schütze, B., Saluz, H., Munder, T., Yang, J., Wink, J. and Goodfellow, M. 2007. *Amycolatopsis saalfeldensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a medieval alum slate mine. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 57: 1640-1646.
- Chun, J., Bae, K., Moon, E., Jung, S., Lee, H. and Kim, S. 2000. *Nocardiopsis kunsanensis* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete isolated from a saltern. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 1909-1913.
- Colquhoun, J.A., Mexson, J., Goodfellow, M., Ward, A.C., Horikoshi, K. and Bull., A.T. 1998. Novel rhodococci and other mycolate actinomycetes from the deep sea. *Antonie van Leeuwenhoek* 74: 27-40.
- Davies, H.G., Green, R.H., and Kelly, D.R. Biotransformations in preparative organic chemistry : the use of isolated enzymes and whole cell systems in synthesis. 1989. 1-268.
- Esin, E., Uzel, A. 2006. Alkaline protease production by an actinomycete MA1-1 isolated from marine sediments. *Annals of Microbiology* March 2007, Volume 57, Issue 1, PP 71-75.
- Gates, R. n.d. Protease Inhibition and Detection. *Life Science Biofile* 4(2).
- Gesheva, V. 2002. Rhizosphere microflora of some citrus as a source of antagonistic actinomycetes. *Eur. J. Soil Biol.* 38: 85-88.
- Godfrey, T. and West, S. 1996. *Industrial Enzymology*. 2nd Edn., *Macmillan Publishers Inc.*, New York.
- González, I., Ayuso-Sacido, A., Anderson, A. and Genilloud, O. 2005. Actinomycetes isolated from lichens: evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54: 401-415.
- Goodfellow, M. & Simpson, K.E. 1987. Ecology of *Streptomyces*. *Frontiers in Applied Microbiology* 2, 97-125.
- Goodfellow, M., Williams, S. T. and Mordarski, M. 1988. *Actinomycetes in biotechnology*. Academic Press Limited London. 12: 73-74.
- Greene, R.V., Griffin, I.-I.L. & Cotta, M.A. 1996. Utility of alkaline protease from marine shipworm bacterium in industrial cleansing applications. *Biotechnology Letters* 18, 759-764.

- Hamilton-Miller, J.M.I. 1973. Chemistry and Biology of the Polyene Macrolide. *Antibiot. Bacteriol. Rev.* 37(2) : 166-196.
- Herzog, A. 1964. The action of streptomycin on *Escherichia coli* ribosomes. *Archives Internationales de Physiologie, de Biochimie et Biophysique.* 72: 326-327.
- Holt, J.G., Noel, K.R., Peter, S.H.A. James, S.T. and Stanley, W.T. 1994. *Bergey's manual of Determinative Bacteriology.* Ninth Edition. Willian and Wikins Baltimore 4: 605-703.
- Hong, K., Gao, A., Xie, Q., Gao, H., Zhuang, L., Lin, H., Yu, H., Li, J., Yao, X., Goodfellow, M. and Ruan, J. 2009. Actinomycetes for Marine Drug Discovery Isolated from Mangrove Soils and Plants in China. *Marine Drugs* 2009, 7(1), 24-44.
- Hopwood, D. A., Buttner, M.J., Kieser T. and Charte. K.F. 2000. Antibiotic production by streptomycetes. *Pract. Streptomycetes Genet.* 1: 1-42.
- Isono, K. and Suzuki, S. 1970. The polyoxins: Pyrimidine nucleotide peptide antibiotics inhibiting fungal cell wall biosynthesis. *Heterocycles.* 14: 333-351.
- Jani, S., Chudasama, C., Patel, D., Bhatt, P. and Pate, H. 2012. Optimization of Extracellular Protease Production from Alkali Thermo Tolerant Actinomycetes: *Saccharomonospora viridis* SJ-21. 1(6): 84-92. ISSN 2277-1808.
- Jaouadi, B., Abdelmalek, B., Djamila Fodil, Ferradji, F., Rekik, H., Zaraï, N. and Bejar, S. 2010. Purification and characterization of a thermostable keratinolytic serine alkaline proteinase from *Streptomyces* sp. strain AB1 with high stability in organic solvents. *Bioresource Technology* 101: 8361-8369.
- Jayasinghe, B.A.T.D and D. Parkinson. 2008. Actinomycetes as antagonists of litter decomposer fungi. *Appl. Soil Ecol.* 38: 109-118.
- Jensen, P., Mincer, T., Williams, P. and Fenical, W. 2005. Marine actinomycete diversity and natural product discovery 87:43-48.
- Jeyadharshan, V.N. 2013. Production and Partial Purification of Protease by Actinomyces Species. 3(4), ISSN 2250-3153, 1-3.
- Jiang, C.L. and L.H. Xu. 1996. Diversity of aquatic actinomycetes in lakes of the middle plateau, Yunnan, China. *Appl. Microbiol.* 62: 249-253.
- Jignasha, T. Thumar and Satya, P. Singh. 2007. Secretion of an alkaline protease from a salt-tolerant and alkaliphilic, *Streptomyces clavuligerus* strain MIT-1. *Brazilian Journal of Microbiology* 38:766-772.

- Jiménez-Esquilín, A.E. and Roane, T.M. 2005. Antifungal activities of actinomycete strains associated with high-altitude sagebrush rhizosphere. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32: 378-381.
- Kathiresan, K. and B. L. Bingham. 2001. Biology of mangroves and mangrove Ecosystems. *Advances in Marine Biology*, 40, 81-251.
- Kalakoutsii, L.V. and Agre N. 1976. Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. *Bacteriol Rev.* 40(2): 469-524.
- Keller, M. and Zengler, K. 2004. Tapping into microbial diversity. *Nature Rev. Microbiol.* 2: 141-150.
- Kirk, O., Borchert, O. and Fuglsang, C. 2002. Industrial enzyme applications. 13:345-351.
- Klanbut, K. 2013. The role of phospholipids in the growth and development of *Streptomyces*. Ph.D. Thesis. Strathclyde Institute of Pharmacy and Biomedical Sciences, University of Strathclyde, Glasgow UK.
- Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G. and Marinelli, F. 2000. Rare genera of actinomyces as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek* 78, 399-405.
- Lechevalier, H.A. 1968. Identification of aerobic actinomyces of clinical importance. *Journal of Laboratory Clinic of Medicine* 71: 934-944
- Lechevalier, M.P. 1981. *Ecological associations involving actinomycetes*. Pp. 159-166. IN: K.P. Schaal and G. Pulverer (eds). *Actinomycetes*. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart.
- Mala, B., Aparna, M., Mohini, S., and Vasanti, V. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *American Society for Microbiology* 6(3): 597-635.
- Malathi, S. and Chakraborty, R. 1991. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 712-716.
- Michael, W., Biles, C., Droby, S., MoLaughlin, R., Wilson, C., and Chalutz, E. 1991. Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*. I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39: 245-258.
- Mohseni, M., Norouzi, H., Hamed, J. and Roohi, A. 2013. Screening of Antibacterial Producing Actinomycetes from Sediments of the Caspian Sea. *IJMCM* 2, 64-71.
- Muller, J.C., Toome, V., Pruess, D.L., Blount, J.F. and Weigle, M. 1983. A new clavam antibiotic from *Streptomyces clavuligerus*. III. Abs. *Journal of Antibiotics*. (Tokyo). 36: 217-225.
- Norman, A. W., Demel, R. A., Dekruyff, B. and Mvan-Deenen, L.L. 1972. Studies on the Biological properties of polyene antibiotics. *Journal of Biological Chemistry*. 247: 1918-1927.
- Patel, R.K., Dodia, M.S., Joshi, R.H. and Singh, S.P. 2006. Purification and characterization of alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp. *Process Biochem.* 41: 2002-2009.

- Pathom-aree, W., Stach, J., Ward, A., Horikoshi, K., Bull, A. and Goodfellow, M. 2006. Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. *Extremophiles* 10: 181-189.
- Pedersen, C. A., Caldwell, J. D., Walker, C., Ayers, G., and Mason, G. A. 1994. Oxytocin activates the postpartum onset of rat maternal behavior in the ventral tegmental and medial preoptic areas. *Behav. Neurosci.* 108. 1163-1171.
- Phongsopitanun, W., Suwanborirux, K. and Tanasupawat, S. 2014. *Identification and antimicrobial activity of Streptomyces strains from Thai mangrove sediment.* *TJPS* 38(1), 1-56.
- Pozzatti, P., Loreto, E.S., Mario, D.A., Rossato, L., Santurio, J.M. and Alves, S.H. 2010. Activities of essential oils in the inhibition of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* germ tube formation. (20): 185-189.
- Prabakar, V., Dube, S., Reddy, G. and Shivaji, S. 2004. *Pseudonocardia antarctica* sp. nov. an actinomycetes from McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Syst. Appl. Microbiol.* 27: 66-71.
- Radhika, T., Kiran, D., Ravi, P, Ravi, V., Manjusha, K., Nilima, K. and Lakshmi, M. 2008. Purification and characterization of an alkaline keratinase from *Streptomyces* sp. 99(6): 1596-1602.
- Ramesh, S., Rajesh, M. and Mathivanan, N. 2009. Characterization of a thermostable alkaline protease produced by marine *Streptomyces fungicidicus* MML1614.
- Rifaat, HM., Naser, NH. and Helmy, SM. 2006-2007. Taxonomical studies on certain *Streptomyces* isolated from Egyptian soils exhibiting antimicrobial activity. *Journal of Culture Collections.* 5:25-34.
- Santos, L., Hélia, H. 2009. Production of alkaline protease from *Cellulosimicrobium cellulans*. *Brazilian Journal of Microbiology.* 40:54-60.
- Schaufuss, P., Sting, R. and Lammler, C. 1989. Isolation and Characterization of an Extracellular Protease of *Actinomyces pyogenes*. *Zentralblatt für Bakteriologie.* 271(4): 452-459.
- Sasarman, A., Horodniceanu, T., Gritaenco, V., Antohi, M. and Surdeanu, M. 1964. Properties of dwarf colonies of *S. typhimurium* obtained with the use of neomycin and streptomycin. *Archives Roumaines de Pathologie Experimentale et de Microbiologie.* 23: 911-918.
- Shih, H., Liu, Y., Hsu, F., Mulabagal, V., Dodda, R. and Huang, J. 2003. Fungichromin: a substance from *Streptomyces padanus* with inhibitory effects on *Rhizoctonia solani*. *J. Agricult. Food Chem.* 51: 95-99.
- Sjodahl, J., Emmer, A., Vincent J., and Roeraade J. Characterization of proteinases from Antarctic krill (*Euphausia superba*). *Protein Expression and Purification,* 2002. 26:153-161.

- Stanley, T.W., Shaep, M.E., Holt, J.G., Murray, R.G.E., Brenner, J.D. and Holt, J.G. 1989. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 4. Baltimore, MD: William and Wilkins.
- Takeuchi, S., Hirayama, K., Ueda, K., Sakai, H. and Yonehara, H. 1958. Blastacin S, a new antibiotics. *J Antibiot (Tokyo)*. 11(1): 1-5.
- Taylor, G. T., Weiss, J., Rupich, R. 1987. Male rat behavior, endocrinology and reproductive physiology in a mixed-sex, socially stressful colony. *Physiol Behav* 39: 429-433.
- Terkina, I.A., Drukker, V.V., Parfenova, V.V. and Kostornova, T.Y. 2002. The biodiversity of actinomycetes in lake baikal. *Microbiology* 71: 346-349.
- Thawai, C. 2010. Isolation, Identification and Antimicrobial Activity of Micromonospora strains from Thai Marine Sediments. *The 8th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology*, 273-282.
- Valli, S., Sugasini, S., Aysha, O.S., Nirmala, P., Kumar, P. and Reena, A. 2012. Antimicrobial potential of Actinomycetes species isolated from marine environment. 2(6) : 469-473.
- Vobis, G., 1997. *Morphology of Actinomycetes In Atlas of Actinomycetes*. (Miyada. S., ed.).p. 180-191. The Society for Actinomycetes Japan. Japan.
- Waksman, S.A. and Lechevalier, H.A. 1962. The actinomycetes vol III: antibiotics of Actinomyces. The Williams & Wikins Company, Baltimore. Description of antibiotics. 206-307.
- Wang, Y.M., Zhang, Z.S., Xu, X.L., Ruan, J.S. and Wang, Y. 2001. *Actinopolymorpha singaporensis* gen. nov., sp. nov., a novel actinomycete from the tropical rainforest of Singapore. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 467-473.
- Ward, O.P. 1985. Proteolytic enzymes. *Com. Biotechnol.* 3: 789-818.
- Williams, S.T., Goodfellow, M. and Alderson, G. 1989. Genus *Stereptomyces*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Ed), Williams ST. Sharope ME. Holt JM. Baltimore: 2452-2492.
- Xu, D., Ye, W., Han, Y., Deng, Z. and Hong, K. 2014. Natural Products from Mangrove Actinomycetes. 12,2590-2613.
- Zitouni, A., Boudjella, H., Lamari, L., Badji, B., Mathieu, F., Lebrihi, A. and Sabaou, N. 2005. *Nocardiosis* and *Saccharothrix* genera in saharan soils in Algeria: Isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. *Res. Microbiol.* 156: 984-993.

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Starch casein agar

ส่วนประกอบ

Soluble starch	10	กรัม	เตรียมเป็นสารละลาย
KNO ₃	2	กรัม	
NaCl	2	กรัม	
Casein	2	กรัม	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05	กรัม	
CaCO ₃	0.02	กรัม	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	กรัม	
Agar	15	กรัม	
น้ำกลั่น	1	ลิตร	
pH 7.0-7.2			

ละลาย KNO₃, NaCl, Casein, MgSO₄·7H₂O, CaCO₃ และ FeSO₄·7H₂O ให้เข้ากันก่อน จากนั้นจึงเติมสารที่เหลือ และเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรตามที่ต้องการ

* ทำให้ปราศจากเชื้อ โดยวิธี Autoclave ที่ความดัน 15 psi อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

Manitol salt agar (MS agar หรือ SFM agar)

ส่วนประกอบ

Soyabean flour	20	กรัม
Manitol	20	กรัม
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
pH 7.0-7.2		

* ทำให้ปราศจากเชื้อ โดยวิธี Autoclave ที่ความดัน 15 psi อุณหภูมิ 121°C เวลา 30 นาที

Yeast extract malt extract agar (ISP-2)

ส่วนประกอบ

Yeast extract	4	กรัม
Malt extract	10	กรัม
Glucose	4	กรัม
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 7.3

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

Hickey tresner agar

ส่วนประกอบ

Soluble starch	2	กรัม
Peptone	0.4	กรัม
Beef extract	0.2	กรัม
Yeast extract	0.2	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 7.2

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

Skim milk agar

ส่วนประกอบ

Skin milk powder	28	กรัม
Casein enzymatic hydrolysate	5	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Glucose	1	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH (25 °C) 7.0 ± 0.2

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

Mueller-Hinton agar

ส่วนประกอบ

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

pH (25 °C) 7.3 ± 0.2

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

Nutrient agar

ส่วนประกอบ

Peptic digestion of animal tissue	5	กรัม
Beef extract	3	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH (25 °C) 6.8 ± 0.2

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

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีและบัฟเฟอร์

1. สารละลายฟีนอล ความเข้มข้น 1.5%

ฟีนอล	1.5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.

2. Tween 80 0.1%

Tween 80	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.

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

Azocasein	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	10	มล.

* เตรียมแล้วควรใช้ให้หมดวันต่อวัน

4. สารละลายไตรคลอโรแอซิติค (Trichloroacetic acid) : ความเข้มข้นร้อยละ 10

TCA	20	มล.
น้ำกลั่น	180	มล.

* เก็บใส่ขวดสีชา หรือห้ามโดนแสง

5. NaOH ความเข้มข้น 1 N

NaOH	8	กรัม
น้ำกลั่น	200	มล.

6. บัฟเฟอร์

6.1 Citrate-phosphate buffer (pH 7)

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

B : 0.2 M Dibasic sodium phosphate (ละลาย $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 53.65 กรัม หรือ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 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

6.2 Phosphate buffer (pH 8)

A : 0.2 M Monobasic sodium phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 31.2 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

B : 0.2 M Dibasic sodium phosphate (ละลาย $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 53.65 กรัม หรือ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.7 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

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

X (มล.)	Y (มล.)	พีเอช
93.5	6.5	5.7
92.0	8.0	5.8
90.0	10.0	5.9
87.7	12.3	6.0
85.0	15.0	6.1
81.5	18.5	6.2
77.5	22.5	6.3
73.5	26.5	6.4
68.5	31.5	6.5
62.5	37.5	6.6
56.5	43.5	6.7
51.0	49.0	6.8
45.0	55.0	6.9
39.0	61.0	7.0
33.0	67.0	7.1
28.0	72.0	7.2
23.0	77.0	7.3
19.0	81.0	7.4
16.0	84.0	7.5
13.0	87.0	7.6
10.5	90.5	7.7
8.5	91.5	7.8
7.0	93.0	7.9
5.3	94.7	8.0

6.3 Borate Buffer (pH 8 และ 9)

A : 0.05 M Sodium tetraborate decahydrate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 201.2193 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

B : 0.1 M Hydrochloric acid (HCl 36.4609 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

ผสม X มล. ของ A และปรับปริมาตรด้วย Y มล.ของ B จนครบ 100 มล

X (มล.)	Y (มล.)	พีเอช
53.40	46.60	7.8
54.65	45.35	7.9
55.85	44.15	8.0
57.15	42.85	8.1
58.65	41.35	8.2
60.70	39.30	8.3
62.95	37.05	8.4
65.25	34.75	8.5
68.00	32.00	8.6
71.20	28.80	8.7
75.50	24.50	8.8
80.50	19.50	8.9
85.60	14.40	9.0
91.90	8.10	9.1
98.10	1.90	9.2

6.4 Tris-EDTA buffer (pH 9)

A : 10 mM Tris base

B : 1 M EDTA

C : 0.05% Tween 20

ผสม Tris base 1.21 g กับ EDTA 0.37 g ละลายในน้ำ 1 ลิตร จากนั้นเติม Tween 20 0.5 มล. และคนให้ละลายเข้าด้วยกัน

6.5 Borate buffer (pH 10 และ 11)

A : 0.1 M NaOH (ละลาย NaOH 40 g ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

B : 0.05 M Sodium tetraborate decahydrate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 201.2193 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

ผสม X มล. ของ A และปรับปริมาตรด้วย Y มล. ของ B จนครบ 100 มล

X (มล.)	Y (มล.)	พีเอช
8.90	91.10	9.3
15.40	84.60	9.4
21.0	79.00	9.5
26.80	73.20	9.6
32.30	67.70	9.7
36.30	63.70	9.8
39.00	61.00	9.9
41.00	59.00	10.0
42.70	57.30	10.1
44.00	56.00	10.2
45.20	54.80	10.3
46.30	53.70	10.4
47.20	52.80	10.5
48.00	52.00	10.6
48.60	51.40	10.7
49.1	50.90	10.8
49.5	50.50	10.9
49.9	50.10	11.0

6.6 Ammonical buffer (pH 10)

A : Ammonium chloride (NH_4Cl)B : 28-30% Ammonium hydroxide (NH_4OH)

ชั่ง Ammonium chloride 90 กรัม ละลายใน 28-30% ของ Ammonium hydroxide ปริมาตร 375 มล.

7. Inhibitors

7.1 PMSF stock

PMSF	0.1742	กรัม
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	10	มิลลิลิตร

เขย่าให้เข้ากันและเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ

7.2 1,10-Phenantroline stock

Phenantroline	0.1982	กรัม
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	10	มิลลิลิตร

เขย่าให้เข้ากันและเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ

7.3 EDTA 0.2 M

EDTA	5.84	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

7.4 KMnO_4 0.2 M

KMnO_4	3.16	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ก

Azocasein method (คณิงกานต์ และ อัญชลี, 2543)

1. pH Optimum

1) เติม Azocasein substrate 240 ไมโครลิตร ลงใน appendorf

2) เติม 0.2M buffer 8 ชนิด ซึ่งได้แก่

Citrate - Phosphate buffer (pH 7)

Phosphate buffer (pH 8)

Borate buffer (pH 8)

Borate buffer (pH 9)

Tris - EDTA buffer (pH 9)

Borate buffer (pH 10)

Ammonium buffer (pH 10)

Borate buffer (pH 11)

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

*ชุดการทดลองควบคุมเติมน้ำกลั่น

3) เอนไซม์ Protease ที่สกัดจากการเลี้ยงเชื้อในอาหาร NB 50 มิลลิตร นำไปบ่มใน shaking incubator ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นำมาปั่นแยกแล้ว ปิเปิดเอา ส่วนใสใส่ appendorf ละ 1 มิลลิตร เติมเอนไซม์ที่ได้นี้ลงใน appendorf จากข้อ 1) หลอดละ 20 ไมโครลิตร (ระหว่างทำการทดลองต้องแช่ในน้ำแข็งตลอดเวลาเพื่อป้องกันเอนไซม์เสียสภาพ)

*ชุดการทดลองควบคุมเติมน้ำกลั่น 20 ไมโครลิตร

4) เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

5) เติมกรด 10 เปอร์เซ็นต์ TCA (Trichloroacetic acid) ลงไป appendorf ละ 1.2 มิลลิตร ทันทีเพื่อ เป็นการหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์

6) ทิ้งไว้ 15 นาทีเพื่อให้เกิดการตกตะกอน

7) นำไปปั่นเหวี่ยงแยกที่ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที

8) ปิเปิดเอาส่วนใสข้างบน 1.4 มิลลิตร มาใส่ลงในหลอดทดลองที่มี 1 M ของ NaOH 1.4 มิลลิตร แล้วทำการเขย่าให้เข้ากัน

9) นำไปวัดค่า Absorbance (OD) ที่ 440 นาโนเมตร โดยใช้ Spectrophotometer

10) นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟระหว่าง pH ของ buffer กับค่า absorbance

2. การหาอุณหภูมิที่เหมาะสม

ทำการทดลองเช่นเดียวกับ pH Optimum แต่ทำการเปลี่ยนอุณหภูมิที่ระดับต่างๆใช้ในการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆกัน คือ ได้แก่ 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการวัดค่า Absorbance (OD) 440 นาโนเมตร โดยใช้ Spectrophotometer เปลี่ยนไปใช้ buffer ของเชื้อแต่ละตัวที่เหมาะสมจากกราฟระหว่าง pH ของ buffer กับค่า absorbance ที่ 440 นาโนเมตร

3. การหาความเสถียรของเอนไซม์

นำเอนไซม์ที่ได้ไปบ่มใน Water bath ที่อุณหภูมิต่างๆกันดังนี้ 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บเอนไซม์ทุกๆ 10 นาที ครั้งละ 20 ไมโครลิตร จนครบ 1 ชั่วโมง และทำการทดลองเช่นเดียวกับการหา pH Optimum ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ และใช้ buffer ที่ได้จากกราฟระหว่าง pH ของ buffer กับค่า absorbance ที่ 440 นาโนเมตร และนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยการวัดค่า Absorbance (OD) 440 นาโนเมตร โดยใช้ Spectrophotometer

*ชุดทดลองควบคุม ไม่ต้องนำเอนไซม์ไปบ่ม และ Blank ใช้น้ำกลั่นแทน buffer และเอนไซม์

4. การหา Inhibitors ที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

นำเอนไซม์ที่ได้มาทำการหา Inhibitor ที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ โดยใช้ inhibitor ดังนี้ PMSF, 1,10-phenantroline, EDTA และ KMnO_4 โดยเติม Inhibitor กับเอนไซม์ (ต้องแช่เย็นตลอดเวลา) จากนั้นทดสอบด้วยวิธี Azocasein method โดยใช้ buffer pH ที่เหมาะสมจากขั้นตอนการหา pH Optimum และบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากขั้นตอนการหาอุณหภูมิที่เหมาะสม นำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยการวัดค่า Absorbance (OD) 440 นาโนเมตร โดยใช้ Spectrophotometer ทำการทดลองดังตารางที่ ค.1

ตารางที่ ค.1 แสดง Inhibitor ทั้ง 4 ชนิด

Treatment	Enzyme (ไมโครลิตร)	Inhibitors (ไมโครลิตร)	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)	DMSO (ไมโครลิตร)	Incubate 4 องศาเซลเซียส 20 นาที	Substrate (ไมโครลิตร)	Buffer (ไมโครลิตร)
PMSF	15	2	2	2		229	150
1,10-phenantroline	15	4	2	-		229	150
EDTA	15	4	2	-		229	150
KMnO ₄	15	4	2	-		229	150
Control H ₂ O	15	-	6	-		229	150
Control DMSO	15	-	2	4		229	150
Blank	15	-	6	-		229	150

ภาคผนวก ง

สูตรคำนวณ

1. Spore pre-germination

ทำการคัดเลือกเชื้อไอโซเลตที่ทำให้เกิดขนาดของวงใสบนอาหาร Skim milk agar จากนั้นคัดสารละลายสปอร์ของไอโซเลตที่ต้องการ 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหาร Yeast extract Malt extract broth (YEME) ปริมาตร 50 มิลลิตร บ่มในสภาวะเขย่าโดยใช้ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ทำการเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อและนำไป Centrifuge ที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เท Supernatant ที่ได้จากนั้นใส่น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 10 มิลลิตร และ Vortex ให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer จากนั้นเข้าสู่สูตรคำนวณเพื่อหาปริมาณของสปอร์เพื่อเป็นสปอร์ตั้งต้น

$$C = (OD_{450} / 0.04) \times 4 \times 10^6 \text{ gs ml}^{-1}$$

$$= OD_{450} \times 10^8 \text{ gs ml}^{-1}$$

$$V = (3 \times 10^6 / C) \times 1000 \mu\text{l}$$

C คือความเข้มข้นที่ได้จากการนำส่วนใสของสารละลายสปอร์ไปทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer

V คือปริมาณเริ่มต้นของสปอร์ที่เป็นสปอร์ตั้งต้น

2. การหาน้ำหนักดิน

หาน้ำหนักดินโดยหาจากสารแขวนลอยของดินในความเจือจางที่ 10^{-1} ที่เหลืออยู่ใน บีกเกอร์ที่ทราบน้ำหนัก นำบีกเกอร์ไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสจนน้ำระเหยหมดและน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักของบีกเกอร์อีกครั้ง คำนวณหาน้ำหนักของดินที่ใช้ในการแยกเชื้อจากผลต่างของน้ำหนักบีกเกอร์ก่อนและหลังอบ

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

W_1 คือ น้ำหนักถ้วยอบ + น้ำหนักดินก่อนอบ

W_2 คือ น้ำหนักถ้วยอบ + น้ำหนักดินหลังอบ

การนำหนักตัวอย่างดิน

สามารถคำนวณได้ดังนี้ น้ำหนักดิน (กรัม) = $W_1 - W_2$

W_1 คือ น้ำหนักถ้วยอบ + น้ำหนักดินก่อนอบ

W_2 คือ น้ำหนักถ้วยอบ + น้ำหนักดินหลังอบ

$$\text{ตัวอย่างดิน 1} = 2.2230 - 1.8085$$

$$= 0.4145 \text{ กรัม}$$

$$\text{ตัวอย่างดิน 2} = 2.5740 - 1.9635$$

$$= 0.6105 \text{ กรัม}$$

$$\text{ตัวอย่างดิน 3} = 3.0540 - 2.4700$$

$$= 0.5840 \text{ กรัม}$$

$$\text{ตัวอย่างดิน 4} = 2.4810 - 1.9335$$

$$= 0.5475 \text{ กรัม}$$

$$\text{ตัวอย่างดิน 5} = 2.1670 - 1.7720$$

$$= 0.3950 \text{ กรัม}$$

$$\text{ตัวอย่างดิน 6} = 2.0870 - 1.5875$$

$$= 0.4995 \text{ กรัม}$$

$$\text{ตัวอย่างดิน 7} = 2.2310 - 1.7005$$

$$= 0.5305 \text{ กรัม}$$

$$\text{ตัวอย่างดิน 8} = 2.4620 - 1.7900$$

$$= 0.6720 \text{ กรัม}$$

$$\text{ตัวอย่างดิน 9} = 2.3530 - 1.9820$$

$$= 0.3710 \text{ กรัม}$$

$$\text{ตัวอย่างดิน 10} = 3.3560 - 2.7800$$

$$= 0.5760 \text{ กรัม}$$

3. การหาปริมาณความชื้น

การวัดความชื้นโดยตรง (Direct method) เป็นการวัดปริมาณความชื้นที่มีอยู่ในอาหาร โดยตรง สามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การแยกเอาน้ำออกด้วยวิธีทางกายภาพ เช่น การอบแห้งทำให้น้ำระเหยออกไป การกลั่นแยกเอาน้ำออกจากอาหาร หรือการใช้วิธีการทางเคมี โดยการใช้สารเคมีทำปฏิกิริยากับน้ำ เป็นต้น วิธีการวัดโดยตรงเป็นการวัดที่ทำหลายตัวอย่าง แต่ละวิธีจะมีความถูกต้องแตกต่างกัน วิธีที่มีการยอมรับกันทั่วไปว่ามีความถูกต้องแม่นยำสูง จะนิยมใช้เป็นค่าความชื้นมาตรฐานเพื่อใช้เปรียบเทียบค่าที่ได้จากการวัดด้วยวิธีการอื่นๆ ก่อนนำค่าที่ได้ไปใช้ประโยชน์

การคำนวณ

$$\% \text{ ความชื้น} = \frac{(W1 - W2) \times (100)}{\text{น้ำหนักดินตัวอย่าง}} \times 100$$

W1 คือ น้ำหนักบีกเกอร์ + น้ำหนักดินตัวอย่างก่อนอบ

W2 คือ น้ำหนักบีกเกอร์ + น้ำหนักดินตัวอย่างหลังอบ

ปริมาณความชื้นของตัวอย่างดิน 1	=	$[(2.2230 - 1.8085) / 1.0950] \times 100$
	=	37.8539 เปอร์เซ็นต์
ปริมาณความชื้นของตัวอย่างดิน 2	=	$[(2.5740 - 1.9635) / 1.1210] \times 100$
	=	54.4603 เปอร์เซ็นต์
ปริมาณความชื้นของตัวอย่างดิน 3	=	$[(3.0540 - 2.4700) / 1.3080] \times 100$
	=	44.6483 เปอร์เซ็นต์
ปริมาณความชื้นของตัวอย่างดิน 4	=	$[(2.4810 - 1.9335) / 1.0580] \times 100$
	=	51.7486 เปอร์เซ็นต์
ปริมาณความชื้นของตัวอย่างดิน 5	=	$[(2.1670 - 1.7720) / 1.0080] \times 100$
	=	39.1865 เปอร์เซ็นต์
ปริมาณความชื้นของตัวอย่างดิน 6	=	$[(2.0870 - 1.5875) / 1.0220] \times 100$
	=	48.8748 เปอร์เซ็นต์
ปริมาณความชื้นของตัวอย่างดิน 7	=	$[(2.2310 - 1.7005) / 1.0670] \times 100$
	=	49.7188 เปอร์เซ็นต์
ปริมาณความชื้นของตัวอย่างดิน 8	=	$[(2.4620 - 1.7900) / 1.2950] \times 100$
	=	51.8919 เปอร์เซ็นต์
ปริมาณความชื้นของตัวอย่างดิน 9	=	$[(2.3530 - 1.9820) / 1.1600] \times 100$
	=	31.9828 เปอร์เซ็นต์
ปริมาณความชื้นของตัวอย่างดิน 10.	=	$[(3.3560 - 2.7800) / 1.2290] \times 100$
	=	46.8674 เปอร์เซ็นต์

ข้อมูลประวัติคณะผู้วิจัย

ประวัติส่วนตัว

ชื่อ-สกุล ดร.คณิงกานต์ กลั่นนุศย์

ตำแหน่งปัจจุบัน -

ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
PhD in Pharmacy and Biomedical Science	Molecular Microbiology	University of Strathclyde, UK	2557
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	ชีววิทยา	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	2547
วิทยาศาสตรบัณฑิต	จุลชีววิทยา	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	2544

สาขาวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)...การคัดแยกแอกติโนมัยซีทและยีนที่ควบคุมการสร้างฟอสโฟลิปิดของแอกติโนมัยซีท

ทุนการศึกษาและทุนวิจัยที่เคยได้รับ

ปี พ.ศ.	ทุนการศึกษาและทุนวิจัย	สถาบันที่ให้
2550	ทุนศึกษาต่อระดับปริญญาเอก ณ University of Strathclyde, UK	กระทรวงวิทยาศาสตร์

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์ที่ตีพิมพ์เผยแพร่ (ระดับชาติและนานาชาติ)

งานวิจัย

- 1) Panuwan Chantawannakul, Anchalee Oncharoen, Khanungkan Klanbut, Ekachai Chukeatirote and Saisamorn Lumyong, (2002) Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand. *ScienceAsia* 28: 241-245.

- 2) Khanuengkan Klanbut, Yuwadee Peerapornpisarn, Chartchai Khanongnuch and Masaharu Ishii. 2004. Phytase activity from thermophilic blue-green algae from hot spring in northern Thailand. *The Japanese Journal of Phycology* 52 (supplement): 57-60.
- 3) คณิงกานต์ กลั่นบุศย์, ยุวดี พีรพรพิศาล, ชาติชาย โจนงนุช และ Masaharu Ishii. 2547. การศึกษาเอนไซม์ไฟเตสที่สกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ทนอุณหภูมิสูงในน้ำพุร้อนบางแห่งบริเวณภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย. *วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์ (Section T) ปีที่ 3 ฉบับพิเศษ 1*: 237-244.
- 4) Khanuengkan Klanbut, Yuwadee Peerapornpisarn, Chartchai Khanongnuch and Masaharu Ishii. 2004. Phytase activity from thermotolerant blue-green algae from hot spring in northern Thailand. *The 15th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology "Sustainable Development of SMEs Through Biotechnology" and JSPS-NRCT Symposium "The Forefront of Bioinformatics Application"*: I-7.
- 5) Vinod Jyothikumar, Khanungkan Klanbut, John Tiong, James S. Roxburgh, Iain S. Hunter, Terry K. Smith and Paul R. Herron, (2012) Cardiolipin synthase is required for *Streptomyces coelicolor* morphogenesis. *Molecular Microbiology* 84 (1): 181-197.
- 6) Chitti Thawai, Nattawut Rungjindamai, Khanungkan Klanbut, Somboon Tanasupawat, (2017) *Nocardia xestospongiae* sp. nov., isolated from a marine sponge in the Andaman Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. pp.
- 7) Khanungkan Klanbut, Jakturong Owat, Naris Kueakupattana and Peerapol Tonghan, (2015) Antimicrobial activity and phospholipids of actinomycetes isolated from mangrove forest soil samples of Klongtamru Chonburi Thailand. The 13th International symposium on Biocontrol and Biotechnology abstracts and program on November 6-8th, 2015 in Shen Zhen, China: 57. (เป็นผู้ทำงานวิจัย)
- 8) Khanungkan Klanbut, (2016) Protease from Actinomycetes isolated from mangrove forest soil and sal field soil samples in Thailand with their culture characterization and antimicrobial activity. The 14th International symposium on Biocontrol and Biotechnology abstracts and program on November 6-9th 2016 in Saint Petersburg, Pushkin, Russian Federation
- 9) Khanungkan Klanbut, Siranan Klanbut, Charanyarut Sukphattanaudomchoke, Natticha Namboon and Sorawit Buraphawat, (2017) Phospholipids and antimicrobial activity of actinomycetes from mangrove forest soils in Eastern part of Thailand. Proceeding in The 29th Annual meeting of the Thai society for Biotechnology and International conference 23-25 November 2017.
- 10) Khanungkan Klanbut, Duangduen Ploymukda, Nuntapop Pitijanyawong and Pranapda Numprapai. (2018) Isolation and characterisation of actinomycetes from solar saltern soil, Thailand. Proceeding in

International Conference of Agriculture and Natural Resources, Hotel Windsor Suites & Convention Bangkok Thailand 26-28 April 2018.

ทุนวิจัยที่เคยได้รับ

1. หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย การศึกษา Phospholipids ของแบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากป่าชายเลนจังหวัดชลบุรี

The role of phospholipids in Actinomycetes bacteria from mangrove forest in Chonburi province.

แหล่งทุน คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยคล่องแล้วประมาณร้อยละ 100

2. หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย เอนไซม์โปรติเอสจากแอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากดินป่าชายเลนจังหวัดชลบุรีและคุณสมบัติบางประการในการเพาะเลี้ยงและการทดสอบสารออกฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ

Protease form Actinomycetes isolated from mangrove forest soil from Chonburi province with their culture characterization and antimicrobial activity

แหล่งทุน คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยคล่องแล้วประมาณร้อยละ 100

การเสนอผลงานวิชาการ

1. การนำเสนอโปสเตอร์เรื่อง Antimicrobial activity and phospholipids of actinomycetes isolated from mangrove forest soil samples of Klongtamrhu Chonburi Thailand ในงานประชุมวิชาการ The 13th International symposium on Biocontrol and Biotechnology abstracts and program วันที่ 6-8 พฤศจิกายน 2558 ณ เมือง Shen Zhen ประเทศจีน
2. การนำเสนอโปสเตอร์เรื่อง Protease from Actinomycetes isolated from mangrove forest soil and salt field soil samples in Thailand with their culture characterization and antimicrobial activity ในงานประชุมวิชาการ The 14th International symposium on Biocontrol and Biotechnology abstracts and program วันที่ 6-9 พฤศจิกายน 2559 ณ เมือง Saint-Petersberg ประเทศรัสเซีย

