

เอนไซม์โปรตีเอสและฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของแอกติโนมัยซีท  
จากดินนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี  
PROTEASE AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF  
ACTINOMYCETES FROM SALT FIELD SOIL, BAN LAEM  
PHETCHABURI



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ปีการศึกษา 2559

เอนไซม์โปรตีเอสและฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของแอคติโนมัยซีท  
จากดินนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี  
PROTEASE AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF  
ACTINOMYCETES FROM SALT FIELD SOIL, BAN LAEM  
PHETCHABURI



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา  
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PROTEASE AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF  
ACTINOMYCETES FROM SALT FIELD SOIL, BAN LAEM  
PHETCHABURI



Duangduen Ploymukda  
Nuntapop Pitijanyawong  
Pranapda Numprapai

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

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ

เอนไซม์โปรตีเอสและฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของแอกติโนมัยซีท  
จากดินนาเกลือตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี  
Protease and antimicrobial activity of Actinomycetes  
from salt field soil, Ban Laem Phetchaburi

ชื่อนักศึกษา

นางสาวดวงเดือน พลอยมุกดา รหัส 56050996

นายนั้นทภพ ปิติจรรยาวงศ์ รหัส 56051013

นางสาวประนันทดา นุ่มประไพ รหัส 56051019

ปริญญา

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา

ชีววิทยา

คณะ

วิทยาศาสตร์



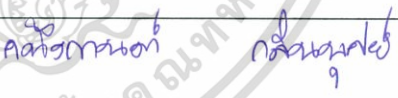
ปีการศึกษา

2559

อาจารย์ที่ปรึกษา

ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง(สจล.) อนุมัติให้  
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา  
อุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2559

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดร. จิตติ ทำไฉ ประธานกรรมการ	
ดร. สมพิศ สอนโยธา กรรมการ	
ดร. คณิงกานต์ กลั่นบุศย์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	เอนไซม์โปรติเอสและฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของแอคติโนมัยซีท จากดินนาเกลือตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี Protease and antimicrobial activity of Actinomycetes from salt field soil, Ban Laem Phetchaburi
ชื่อนักศึกษา	นางสาวดวงเดือน พลอยมุกดา รหัส 56050996 นายณัฐทพ ปิติจรรยาวงศ์ รหัส 56051013 นางสาวประนันทา นุ่มประไพ รหัส 56051019
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
ปีการศึกษา	2559
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์

### บทคัดย่อ

เชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวนทั้งหมด 41 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้จากดินนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี ด้วยอาหาร starch casein agar (SCA) ที่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 4.6 (w/v) สามารถจัดกลุ่มเชื้อแอคติโนมัยซีทได้ 5 กลุ่ม โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทเป็นเกณฑ์ แล้วนำไอโซเลททั้งหมดมาทดสอบความสามารถในการเจริญบนอาหาร starch casein agar (SCA) ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3, 5, 7, 9, 12 และ 15 พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 32 ไอโซเลทมีความสามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ได้ดีที่ร้อยละ 5 และที่ร้อยละ 15 (w/v) เชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถเจริญได้ จึงจัดให้เป็นชนิด halophilic จากนั้นนำมาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอส โดยคัดเลือกจากการเกิดบริเวณใส (clear zone) กว้างที่สุดบนอาหาร skim milk agar พบว่ามี 6 ไอโซเลท ได้แก่ MDB148, MDB632, MDB21210, MDB2433, MDB3222, MDB4123 และเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากดินนาเกลือ จังหวัดสมุทรสาครและฉะเชิงเทรา จากโครงการพิเศษของทิพย์วรรณ และคณะ (2558) จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ K6786-3, B8810-1 และ B8800-3 มาสกัดเอนไซม์โปรติเอส โดยนำมาเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 และ 30 ชั่วโมง เพื่อทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสด้วยวิธี azocasein method พบว่าค่าความเป็นกรดต่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ อยู่ระหว่าง 7 ถึง 10 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ถูกยับยั้งการทำงานด้วย ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) และมีความเสถียรภาพที่อุณหภูมิระหว่าง 40 ถึง 60 องศาเซลเซียส จากเชื้อทั้งหมด 9 ไอโซเลท พบว่า ไอโซเลท B8810-1 และ K6786-3 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูง จึงนำเชื้อแอคติโนมัยซีทมาทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพโดยวิธีการทดสอบขั้นต้น (pre-test) และเทคนิค agar disc diffusion พบว่า ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 6 สายพันธุ์ได้ ซึ่งได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Micrococcus luteus* TIRTR 2374 และ *Candida albicans* ATCC 90028

**คำสำคัญ :** แอคติโนมัยซีท, ดินนาเกลือ, เอนไซม์โปรติเอส, ฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ ใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Protease and antimicrobial activity of Actinomycetes from salt field soil, Ban Laem Phetchaburi
Students	Miss Duangduen Ploymukda Student ID 56050996 Mr. Nuntapop Pitijanyawong Student ID 56051013 Miss Pranapda Numprapai Student ID 56051019
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology Program)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2016
Advisor	Dr. Khanungkan Klanbut

### Abstract

A total of 41 actinomycetes were isolated from salt field soil of Ban laem, Petchaburi using Starch casein agar (SCA) with 4.6% (w/v) NaCl. And they could be grouped into 5 groups based on morphological characteristics and cultured characteristics. The ability of NaCl utilization were examined by using SCA media supplemented with NaCl concentration along the gradients of 3, 5, 7, 9, 12 and 15 % (w/v) and found that 32 isolates could be grown the best at 5% and at 15% (w/v) still found the growth which can suggest to be the halophilic strains. According to the proteolytic activity, 6 isolates were chosen by the highest clear zone on skim milk agar including MDB 148, MDB 632, MDB 21210, MDB 2433, MDB 3222, MDB 4123 and 3 isolates isolated by Thipawan *et al.* (2558) including K6786-3, B8810-1 and B8800-3. Then the submerge culture were incubated for 24 and 30 hours which aid to study the optimal conditions for protease activity by Azocasein method, the optimum pH and temperature values for protease activity were measured at pH value between 7.0 to 10.0 and 40<sup>o</sup>C respectively. Crude extractions were inhibited by ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and were stable at temperature between 40 to 60<sup>o</sup>C. Among 9 isolates, B8810-1 and K6786-3 showed the highest protease activity. Furthermore, the crude extractions and intracellular extractions were tested for antimicrobial activity by Pre-test and agar disc diffusion method, The results showed that both of the extractions could not inhibited *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Micrococcus luteus* TIRTR 2374 and *Candida albicans* ATCC 90028.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ดร. คณิงกานต์ กลั่นบุศย์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำความใส่ใจและความทุ่มเทในการให้ความช่วยเหลือตลอดการดำเนินงาน จนการตรวจทาน แก้ไขรูปเล่มโครงการพิเศษให้ลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. จิตติ ท่าไว ประธานกรรมการ และ ดร.สมพิศ สอนโยธา กรรมการ ที่กรุณาตรวจทานและพิจารณาโครงการเล่มนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่กรุณาอบรมสั่งสอนและให้คำปรึกษาแนะนำตลอดการศึกษา รวมทั้งขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการตึกจุฬารัตน์ ตึกวิทย์เก่า อาคารพระเจ้าเกล้า ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเปิดอุปกรณ์ต่างๆ และให้ยืมอุปกรณ์รวมทั้งเจ้าหน้าที่ธุรการและเจ้าหน้าที่ฝ่ายอาคารที่มีความอนุเคราะห์ในการใช้อาคารสถานที่ รวมทั้งให้คำแนะนำปรึกษาและให้ความรู้เพิ่มเติมตลอดการดำเนินงาน

ขอขอบพระคุณพี่ๆบัณฑิตที่ช่วยเหลือและให้คำปรึกษาแนะนำทุกด้าน ทำให้งานดำเนินผ่านไป ด้วยดี

ขอขอบคุณเพื่อนๆที่ให้การช่วยเหลือในระหว่างการทำงานและให้คำแนะนำในด้านต่างๆ รวมถึงคอยให้กำลังใจที่ดีมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ที่กรุณาอบรมสั่งสอนและให้การสนับสนุนในทุกๆด้านทำให้ผู้จัดทำสามารถสำเร็จการศึกษาได้ด้วยดี

ดวงเดือน พลอยมุกดา  
นันทภพ ปิติจรรยาวงศ์  
ประนัยปดา นุ่มประไพ

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ฉ
<b>บทที่ 1 บทนำ</b> .....	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ .....	1
1.2 วัตถุประสงค์ .....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b> .....	<b>3</b>
2.1 นาเกลือ.....	3
2.2 แหล่งผลิตเกลือในประเทศไทย.....	3
2.3 ฤดูกาลทำนาเกลือ .....	4
2.4 ชนิดของเกลือ.....	5
2.5 ประโยชน์ของนาเกลือ.....	6
2.6 แอคติโนมัซีท .....	7
2.7 สัณฐานวิทยาของแอคติโนมัซีท .....	8
2.8 การแยกและคัดเลือกแอคติโนมัซีทจากดินนาเกลือ .....	12
2.9 เอนไซม์โปรติเอส.....	13
2.10 การแบ่งชนิดของเอนไซม์โปรติเอส .....	14
2.11 เอนไซม์โปรติเอสในแอคติโนมัซีท.....	17
2.12 สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส .....	20
2.13 การประยุกต์ใช้เอนไซม์โปรติเอสในอุตสาหกรรม.....	21
2.14 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ .....	23
2.15 ฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของแอคติโนมัซีท .....	23
2.16 ประเภทของสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากแอคติโนมัซีท .....	25
2.17 กลไกการออกฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะ .....	28
2.18 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ.....	29
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย</b> .....	<b>31</b>
3.1 เครื่องมือ.....	31
3.2 อุปกรณ์.....	32
3.3 สารเคมี.....	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ .....	34
3.5 เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ.....	34
3.6 วิธีดำเนินการวิจัย .....	34
3.6.1 การเก็บตัวอย่างดิน.....	34
3.6.2 การคัดแยกเชื้อแอสคิตินอมัยซีท .....	35
3.6.3 การศึกษาการเจริญของเชื้อแอสคิตินอมัยซีทที่ความเข้มข้นของเกลือต่างๆ....	35
3.6.4 การหาสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่างดิน .....	35
3.6.4.1 การหาน้ำหนักดิน .....	35
3.6.4.2 การหาปริมาณความชื้น .....	35
3.6.4.3 การวัดค่าความเป็นกรดเบส.....	36
3.6.5 การเตรียมสารละลายสปอร์.....	36
3.6.6 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอสคิตินอมัยซีท ..	36
3.6.7 การศึกษาลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อแอสคิตินอมัยซีท .....	36
3.6.7.1 การตกตะกอนและการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนม .....	36
3.6.7.2 การย่อยสลายเจลาติน .....	37
3.6.7.3 การย่อยไนเตรท .....	37
3.6.7.4 การย่อยสลายแป้ง.....	37
3.6.8 Spore pre-germination ของเชื้อแอสคิตินอมัยซีท.....	37
3.6.9 การสกัดเอนไซม์ .....	38
3.6.10 การตรวจสอบค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์....	38
3.6.11 การตรวจสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ .....	38
3.6.12 การศึกษาสารยับยั้งที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์.....	38
3.6.13 การศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์.....	39
3.6.14 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธี การทดสอบขั้นต้น.....	39
3.6.15 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธี agar disc diffusion.....	39
3.6.15.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อแอสคิตินอมัยซีท.....	39
3.6.15.2 การสกัดสารทุติยภูมิจากน้ำหนักเชื้อแอสคิตินอมัยซีท .....	40
3.6.15.3 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ .....	40
3.6.15.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ .....	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล</b> .....	41
4.1 การหาคุณสมบัติทางกายภาพบางประการของดินตัวอย่าง .....	41
4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอสคิโนไมซีท .....	43
4.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอสคิโนไมซีท .....	43
4.2.2 ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอสคิโนไมซีท .....	69
4.3 การศึกษาเชื้อแอสคิโนไมซีทที่มีความสามารถในการเจริญบนอาหาร Starch casein agar ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ .....	71
4.4 การคัดเลือกแอสคิโนไมซีทที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ .....	74
4.5 การตรวจสอบค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ .....	78
4.6 การตรวจสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ .....	81
4.7 การศึกษาสารยับยั้งที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ .....	82
4.8 การศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์ .....	84
4.9 การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธีการ ทดสอบขั้นต้น .....	93
4.10 การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยเทคนิค agar disc diffusion .....	96
4.11 รวมผลการทดลองเชื้อแอสคิโนไมซีททั้ง 9 ไอโซเลท ที่ได้รับการคัดเลือก .....	105
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ</b> .....	117
5.1 สรุปผลการวิจัย .....	117
5.2 ข้อเสนอแนะ .....	120
<b>เอกสารอ้างอิง</b> .....	122
<b>ภาคผนวก</b> .....	129
ภาคผนวก ก .....	130
ภาคผนวก ข .....	134
ภาคผนวก ค .....	143
ภาคผนวก ง .....	145
ภาคผนวก จ .....	158
ภาคผนวก ฉ .....	161
ภาคผนวก ช .....	164
ภาคผนวก ซ .....	165
ภาคผนวก ฌ .....	170
<b>ประวัติผู้วิจัย</b> .....	182

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	แสดงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส .....	19
2.2	จำนวนของออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถผลิตจากแอกติโนมายซีทในแต่ละสกุล .	24
4.1	แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของตัวอย่างดิน A .....	41
4.2	แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของตัวอย่างดิน B .....	42
4.3	แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมายซีทจำนวน 41 ไอโซเลท .....	64
4.4	แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมายซีท .....	69
4.5	แสดงการเจริญของเชื้อแอกติโนมายซีทบนอาหาร Starch casein agar ที่ เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 3, 5, 7, 9, 12, 15 (w/v) .....	71
4.6	แสดงความกว้างของบริเวณใสของเชื้อแอกติโนมายซีทจำนวน 41 ไอโซเลท จากตัวอย่างดินบริเวณนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี .....	76
4.7	แสดงความกว้างของบริเวณใสของเชื้อแอกติโนมายซีทจำนวน 3 ไอโซทจาก ตัวอย่างดินบริเวณนาเกลือ ตำบลโคกขาม จังหวัดสมุทรสาคร และ ตำบลบางปะกง .....	77
4.8	แสดงผลของค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด ของเชื้อแอกติโนมายซีททั้งหมด 9 ไอโซเลท ที่เพาะเลี้ยงในระยะเวลา 24 และ 30 ชั่วโมง .....	80
4.9	แสดงผลการทดสอบเบื้องต้นของเชื้อแอกติโนมายซีทที่สามารถผลิตสารทุติยภูมิ ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ .....	93
4.10	แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆจากสารสกัดหยาบ ในชั้นของเอทิลอะซิเตตในระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเทคนิค agar disc diffusion .....	96
4.11	แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆจากสารสกัดหยาบ จากเซลล์และเส้นใยของแอกติโนมายซีทที่หมักด้วยเมทานอลระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเทคนิค agar - disc diffusion .....	97
ก	แสดงสารยับยั้ง 4 ชนิด .....	144
ข	แสดงกระดาษสีมาตรฐาน .....	145
ค(1)	แสดงปริมาณของน้ำหนักตัวอย่างดิน ครั้งที่ 1 ดิน A .....	170
ค(2)	แสดงปริมาณของน้ำหนักดินครั้งที่ 2 ดิน B .....	171
ค(3)	แสดงค่าเฉลี่ยของความเป็นกรดต่างตัวอย่างดินครั้งที่ 1 ดิน A .....	171
ค(4)	แสดงค่าเฉลี่ยของความเป็นกรดต่างตัวอย่างดินครั้งที่ 2 ดิน B .....	172
ค(5)	แสดงปริมาณความชื้นจากตัวอย่างดินครั้งที่ 1 ดิน A .....	173
ค(6)	แสดงปริมาณความชื้นจากตัวอย่างดินครั้งที่ 2 ดิน B .....	173
ค(7)	แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่เหมาะสมต่อความเป็นกรดต่างที่ 24 ชม...	174
ค(8)	แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่เหมาะสมต่อความเป็นกรดต่างที่ 30 ชม...	176

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ค(9) แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่เหมาะสมต่ออุณหภูมิ .....	178
ค(10) แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่มีผลต่อสารยับยั้งต่างๆ .....	179
ค(11) แสดงผลค่าเสถียรภาพของเอนไซม์นำไปบ่มที่อุณหภูมิและเวลาต่างกัน .....	180



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 แสดงภาพการทำนาเกลือที่บ้านแหลม .....	3
2.2 แสดงภาพการกลั่นนาเกลือ เพื่อปรับสภาพหน้าดิน .....	5
2.3 แสดงภาพลักษณะของเกลือ .....	6
2.4 แสดงภาพแอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากดิน .....	7
2.5 แสดงภาพการเจริญเป็นโคโลนีของแอกติโนมัยซีทบนอาหารแข็ง .....	9
2.6 แสดงภาพการสร้างสปอร์เดี่ยวของแอกติโนมัยซีทสกุลต่างๆ .....	10
2.7 แสดงภาพสปอร์เป็นสายของแอกติโนมัยซีทสายพันธุ์ต่างๆ .....	11
2.8 แสดงภาพการสร้างสปอร์สายยาวของ <i>Streptomyces</i> ในลักษณะต่างๆ .....	11
2.9 แสดงภาพกลไกการทำงานของ Serine protease.....	17
2.10 แสดงภาพการยับยั้งของเอนไซม์.....	21
2.11 แสดงภาพโครงสร้างทางเคมีของอิริโทรมัยซิน .....	25
2.12 แสดงภาพโครงสร้างทางเคมีของสเตรปโตไมซิน .....	26
2.13 แสดงภาพโครงสร้างทางเคมีของสารปฏิชีวนะกลุ่มเตตราไซคลิน .....	27
2.14 แสดงภาพโครงสร้างทางเคมีของสารปฏิชีวนะกลุ่มคลอแรมฟินิคอล .....	27
2.15 แสดงภาพโครงสร้างทางเคมีของนิสเททิน.....	28
4.1 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB31310 .....	43
4.2 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB548 .....	44
4.3 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB11210 .....	44
4.4 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB3422 .....	45
4.5 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB3528 .....	45
4.6 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB925 .....	46
4.7 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB148 .....	46
4.8 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB2739 .....	47
4.9 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB2839 .....	47
4.10 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB17310 .....	48
4.11 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB2029 .....	48
4.12 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB23310 .....	49
4.13 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB2433 .....	49
4.14 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB2639 .....	50
4.15 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB16310 .....	50
4.16 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB1829 .....	51
4.17 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB21210 .....	51
4.18 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB432 .....	52
4.19 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB732 .....	52
4.20 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB13310 .....	53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.21 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB14310 .....	53
4.22 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB37310 .....	54
4.23 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB38310.....	54
4.24 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB15310 .....	55
4.25 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB1929.....	55
4.26 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB2210 .....	56
4.27 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB2539 .....	56
4.28 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB2939 .....	57
4.29 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB30310.....	57
4.30 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB3222.....	58
4.31 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB3322 .....	58
4.32 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB40310 .....	59
4.33 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB4123 .....	59
4.34 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB822 .....	60
4.35 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB39310 .....	60
4.36 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB632.....	61
4.37 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB36310 .....	61
4.38 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB2510 .....	62
4.39 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB1025.....	62
4.40 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB1228.....	63
4.41 แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB342 .....	63
4.42 แสดงภาพความกว้างของบริเวณใสของเชื้อแอกติโนมัยซีททั้งหมด 9 ไอโซเลข....	74
4.43 แสดงภาพความสัมพันธ์ระหว่างความเป็นกรดต่างกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ที่เพาะเลี้ยงในระยะเวลาที่ 24 ชั่วโมง .....	78
4.44 แสดงภาพความสัมพันธ์ระหว่างความเป็นกรดต่างกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ที่เพาะเลี้ยงในระยะเวลาที่ 30 ชั่วโมง .....	79
4.45 แสดงภาพความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อแอกติโนมัยซีทที่บ่มอุณหภูมิต่างๆกับ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ .....	81
4.46 แสดงภาพความสัมพันธ์ระหว่างสารยับยั้งต่างๆกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ .....	82
4.47 แสดงภาพความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ เวลา และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ที่ไอโซเลข B8800-3 ที่เพาะเลี้ยงในระยะเวลา 30 ชั่วโมง.....	84
4.48 แสดงภาพความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ เวลา และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ที่ไอโซเลข B8810-1 ที่เพาะเลี้ยงในระยะเวลา 30 ชั่วโมง .....	85
4.49 แสดงภาพความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ เวลา และค่ากิจกรรมของเอนไซม์	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ไอโซเลขที่ K6786-3 ที่เพาะเลี้ยงในระยะเวลา 30 ชั่วโมง แต่ให้ไปใช้ประโยชน์ได้ 86 การค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.50 แสดงภาพความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ เวลา และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ที่ไอโซเลท MDB148 ที่เพาะเลี้ยงในระยะเวลา 30 ชั่วโมง.....	87
4.51 แสดงภาพความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ เวลา และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ที่ไอโซเลท MDB632 ที่เพาะเลี้ยงในระยะเวลา 30 ชั่วโมง.....	88
4.52 แสดงภาพความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ เวลา และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ที่ไอโซเลท MBD21210 ที่เพาะเลี้ยงในระยะเวลา 30 ชั่วโมง.....	89
4.53 แสดงภาพความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ เวลา และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ที่ไอโซเลท MDB2433 ที่เพาะเลี้ยงในระยะเวลา 24 ชั่วโมง.....	90
4.54 แสดงภาพความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ เวลา และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ที่ไอโซเลท MDB3222 ที่เพาะเลี้ยงในระยะเวลา 30 ชั่วโมง.....	91
4.55 แสดงภาพความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ เวลา และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ที่ไอโซเลท MDB4123 ที่เพาะเลี้ยงในระยะเวลา 30 ชั่วโมง.....	92
4.56 แสดงภาพผลการทดสอบเบื้องต้นของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท B8810-1.....	94
4.57 แสดงภาพผลการทดสอบเบื้องต้นของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท K6786-3.....	95
4.58 แสดงภาพผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Escherichia coil</i> 25922 ของเชื้อไอโซเลทที่ B8810-1.....	97
4.59 แสดงภาพผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Escherichia coil</i> 25922 ของไอโซเลทที่ K6786-3 .....	98
4.60 แสดงภาพผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ของไอโซเลทที่ B8810-1 .....	98
4.61 แสดงภาพผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ของไอโซเลทที่ K6786-3 .....	99
4.62 แสดงภาพผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i> ของเชื้อไอโซเลทที่ B8810-1.....	100
4.63 แสดงภาพผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i> ของไอโซเลทที่ K6786-3 .....	100
4.64 แสดงภาพผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> ของเชื้อไอโซเลทที่ B8810-1.....	101
4.65 แสดงภาพผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> ของไอโซเลทที่ K6786-3.....	102
4.66 แสดงภาพผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Micrococcus luteus</i> ของเชื้อไอโซเลทที่ B8810-1.....	102
4.67 แสดงภาพผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Micrococcus luteus</i> ของไอโซเลทที่ K6786-3 .....	103

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.68	แสดงภาพผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Candida albicans</i> ของเชื้อไอโซเลทที่ B8810-1.....	103
4.69	แสดงภาพผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Candida albicans</i> ของไอโซเลทที่ K6786-3.....	104
4.70	แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ B8800-3 .....	106
4.71	แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ B8810-1 .....	107
4.72	แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ K6786-3 .....	109
4.73	แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB148.....	110
4.74	แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB632.....	111
4.75	แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB21210.....	112
4.76	แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB2433.....	113
4.77	แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB3222.....	114
4.78	แสดงภาพลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB4123.....	116
ก	แสดงภาพลักษณะภูมิประเทศของบริเวณจุดเก็บตัวอย่างดินครั้งที่ 1 ดิน A.....	158
ข	แสดงภาพลักษณะภูมิประเทศของบริเวณจุดเก็บตัวอย่างดินครั้งที่ 2 ดิน B.....	158
ค	แสดงจุดเก็บตัวอย่างดิน A ตำแหน่งที่ 1-10.....	159
ง	แสดงภาพจุดเก็บตัวอย่างดิน B ตำแหน่งที่ 1-10 .....	160
จ(1)	แสดงภาพผลทดสอบการตกตะกอนในหลอดอาหาร skim milk.....	161
จ(2)	แสดงภาพทดสอบการย่อยสลายโปรตีนในอาหาร skim milk agar.....	161
จ(3)	แสดงภาพการทดสอบการย่อยสลายเจลาติน .....	162
จ(4)	แสดงภาพการทดสอบการย่อยสลายไนเตรทในอาหารเหลว Peptone .....	162
จ(5)	แสดงภาพการทดสอบการย่อยสลายแป้งในอาหาร Inorganic salts-staech agar .....	163
1(ช)	แสดงรูปร่างลักษณะของเชื้อ <i>Candida albicans</i> .....	165
2(ช)	แสดงภาพรูปร่างลักษณะเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i> .....	166
3(ช)	แสดงภาพรูปร่างลักษณะเชื้อ <i>Escherichia coil</i> .....	167
4(ช)	แสดงภาพรูปร่างลักษณะเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> .....	168
5(ช)	แสดงรูปร่างลักษณะของเชื้อ <i>Micrococcus luteus</i> .....	168
6(ช)	แสดงภาพรูปร่างลักษณะเชื้อ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	169

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โปรตีน (protein) เป็นสารประกอบอินทรีย์ ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยเป็นกรดอะมิโนจำนวนหลายโมเลกุลที่เชื่อมกันด้วยพันธะเปปไทด์ เรียงต่อกันเป็นพอลิเมอร์ โดยโครงสร้างของโปรตีนสามารถถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์ในกลุ่มโปรติเอส (protease) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการย่อยพันธะเปปไทด์ของโปรตีน ให้เป็นเปปไทด์สายสั้น หรือกรดอะมิโน (Mótyán *et al.*, 2013) โดยสามารถย่อยบริเวณปลาย N-terminal หรือ C-terminal ของสายโปรตีน (exopeptidases) (Nitta *et al.*, 2016) และสามารถย่อยพันธะเปปไทด์ภายในสายโปรตีนได้ (endopeptidases) โดยสามารถแบ่งกลุ่มของเอนไซม์โปรติเอสตามบริเวณเร่ง (active site) ที่เกิดปฏิกิริยา กลไกการทำงานของเอนไซม์ และค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงาน โดยเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง (Kamoun *et al.*, 2008) สามารถผลิตได้จากสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ได้แก่ พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ แต่ในปัจจุบันเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตโดยจุลินทรีย์มีบทบาทสำคัญและถูกนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอย่างแพร่หลายเช่นการนำอัลคาไลน์โปรติเอสมาเป็นส่วนประกอบของผงซักฟอก เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดคราบสกปรกที่เป็นโปรตีน การย่อยสลายโปรตีนในน้ำทิ้ง อุตสาหกรรมสิ่งทอ กระบวนการแปรรูปอาหาร อุตสาหกรรมยา และอุตสาหกรรมเครื่องหนัง (Mane *et al.*, 2013) เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วและสามารถผลิตเอนไซม์ได้ในสภาวะที่ควบคุมได้ โดยจุลินทรีย์ที่เป็นแหล่งของการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสที่สำคัญ ได้แก่ รา ยีสต์ และแบคทีเรีย เช่น แอคติโนมัยซีท (actinomycetes) หรือแอคติโนแบคทีเรีย (actinobacteria) ซึ่งเป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณของเบสกวานีนและไซโตซีนสูงมากกว่า 55 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณสารพันธุกรรม (Doroghazi and Metcalf, 2013) มีลักษณะเป็นเส้นใยคล้ายกับเชื้อรา แต่ขนาดของเส้นใยเล็กกว่ารา และมีการสร้างสปอร์ โดยเมื่อเจริญบนอาหารจะพบโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทซึ่งมีลักษณะคล้ายผงแป้งหรือกำมะหยี่อาจมีการสร้างรงควัตถุ (pigment) สีต่างๆ ได้แก่ แดง ส้ม เหลือง ครีမ် เป็นต้น ซึ่งพบบริเวณด้านบนของเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) (Dastager *et al.*, 2006) ซึ่งเป็นส่วนของเส้นใยที่สัมผัสกับอากาศ และส่วนของเส้นใยที่เจริญลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เรียกว่า เส้นใยอาหาร (substrate mycelium) นอกจากนี้แอคติโนมัยซีทยังเป็นแหล่งที่ดีของจุลินทรีย์ในการผลิตสารทุติยภูมิ (Secondary metabolite) ที่สำคัญที่มีคุณสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหรือทำลายเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคเช่น สารปฏิชีวนะด้านแบคทีเรีย รา ไวรัส สารต่อต้านมะเร็งและกำจัดวัชพืช สารที่ผลิตได้เหล่านี้มีความสำคัญทางด้านการแพทย์ ทางด้านเภสัชกรรม และนำไปใช้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ (Goodfellow *et al.*, 1988) โดยสามารถพบแอคติโนมัยซีทในดินทั่วไป รวมทั้งในดินที่มีสภาพเป็นด่าง เช่น ดินนาเกลือ ซึ่งเป็นพื้นที่สำหรับการผลิตเกลือ ส่วนใหญ่พบในบริเวณพื้นที่อยู่ติดกับทะเล เช่น อำเภอบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี ซึ่งเป็นบริเวณที่ทำนาเกลือมากที่สุดในประเทศไทย โดยดินในบริเวณนี้จะมีความเข้มข้นของเกลือสูง สามารถพบแบคทีเรียหลายกลุ่ม รวมทั้งแอคติโนมัยซีทในสกุล *Actinopolyspora* *Streptomyces* และ *Nocardiosis* (Ventosa *et al.*, 1998) โดยเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้เอกลักษณะเป็นเอกลาที่สงวนไว้สำหรับการเชิงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำมาไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จัดเป็นจุลินทรีย์ทนเค็ม ที่สามารถสร้างเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีและมีความเสถียรสูงในสภาวะที่เป็นต่าง ซึ่งมีคุณสมบัติที่ดีเหมาะต่อการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอก และอุตสาหกรรมต่างๆ ต่อไป ซึ่ง คาดว่างานวิจัยนี้จะคัดแยกได้แอกติโนมัยซีทที่อยู่ในกลุ่มอัลคาไลโนโปรติเอสด้วย

จุดประสงค์ของโครงการพิเศษนี้มุ่งเน้นในการศึกษาและคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจาก ดินนาเกลือที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการย่อยโปรตีน รวมทั้งการสกัดและศึกษาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส และฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อเก็บตัวอย่างและทำการคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากดินนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี
2. เพื่อศึกษาวิธีการสกัดและวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์โปรติเอส
3. เพื่อศึกษาสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส เช่น การหาค่าความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิ สารยับยั้ง (inhibitors) และความเสถียรของเอนไซม์
4. เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อแอกติโนมัยซีทต่อจุลินทรีย์ที่ทดสอบ

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

คัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากดินนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี ทำการหาคุณสมบัติทางกายภาพของดิน การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและชีวเคมี การศึกษาการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่ความเข้มข้นของเกลือต่างๆ การคัดเลือกแอกติโนมัยซีทที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ การสกัดเอนไซม์ การหาค่าความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ความเสถียรของเอนไซม์ การหาสารยับยั้ง (inhibitors) และการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพต่อเชื้อจุลินทรีย์

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากดินนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรีได้
2. สามารถสกัดเอนไซม์ที่ได้มาจากเชื้อแอกติโนมัยซีทและได้เรียนรู้วิธีการสกัดเอนไซม์และการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส
3. สามารถเรียนรู้ถึงสภาวะต่างๆของเอนไซม์โปรติเอสที่มีความเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์
4. ทราบถึงการออกฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อแอกติโนมัยซีทกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้

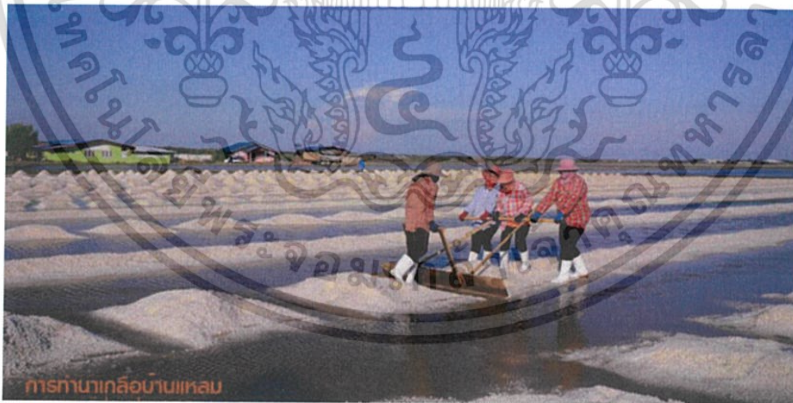
## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 นาเกลือ

วัฒนธรรมการทำนาเกลือหรือการผลิตเกลือสมุทรนับได้ว่า เป็นวัฒนธรรมประเภทหนึ่งที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อสังคมไทย เนื่องจากการประกอบอาชีพการทำนาเกลือเป็นส่วนหนึ่งของวิถีชีวิตของผู้คนที่อาศัยอยู่ในบริเวณลุ่มน้ำเค็มที่ได้สืบกันมานานนับร้อยปี จนมีการออกพระราชกฤษฎีกากำหนดอาชีพและวิชาชีพไว้สำหรับเฉพาะคนไทย เมื่อ ๒๔๗๒ ในสมัยรัฐบาลจอมพล ป. พิบูลสงคราม โดยได้กำหนดให้อาชีพทำนาเกลือเป็นอาชีพที่รัฐบาลสงวนไว้สำหรับคนไทยโดยเฉพาะ ดังนั้นอาชีพการทำนาเกลือจึงมีความสำคัญอย่างมากต่อคนไทยและสังคมไทยมาตั้งแต่สมัยโบราณ (ปิ่นฉัตร, 2553)

นาเกลือเป็นพื้นที่สำหรับผลิตเกลือ คล้ายนาข้าวแต่ไม่ได้ปลูกพืช มีมากในบริเวณพื้นที่ติดทะเล การทำนาเกลือ ถือเป็นอาชีพที่ต้องอาศัยภูมิปัญญา ประสบการณ์ และการสังเกตร่วมกับการพึ่งพาอาศัยธรรมชาติ โดยพื้นที่ที่เหมาะสมกับการทำนาเกลือ นั้น นอกจากเป็นพื้นที่ติดริมชายฝั่งทะเลแล้ว ลักษณะภูมิประเทศต้องเป็นที่ราบลุ่ม และที่สำคัญคือดินต้องเป็นดินเหนียว อุ่นน้ำได้ดี โดยเกลือสำหรับนักเคมีแล้วอาจหมายถึง สารประกอบไอออนิกที่เกิดจากโซเดียมซึ่งเป็นไอออนบวกมาสร้างพันธะทางเคมีร่วมกับคลอไรด์ที่เป็นไอออนลบ ที่เรียกว่า เกลือแกง หรือ โซเดียมคลอไรด์ แต่สำหรับในวิถีชีวิตของมนุษย์แล้ว เกลือคือผลึกสีขาวที่มากด้วยคุณค่า ทั้งการเป็นเครื่องปรุงรส วัตถุดิบในการถนอมอาหารและมีสรรพคุณทางยา (สุภาพรรณ, 2556)



รูปที่ 2.1 แสดงภาพการทำนาเกลือที่บ้านแหลม

ที่มา : <http://www.paiduaykan.com>

### 2.2 แหล่งผลิตเกลือในประเทศไทย (การท่องเที่ยวแห่งประเทศไทย, 2555)

แหล่งผลิตเกลือทะเลที่สำคัญของประเทศไทยตั้งแต่สมัยโบราณ ได้แก่ จังหวัด สมุทรสาคร สมุทรสงคราม และเพชรบุรี การทำนาเกลือทะเลหรือเกลือสมุทรใช้พื้นที่ประมาณ 30-40 ไร่ขึ้นไป โดยอาศัยแสงแดดช่วยเพิ่มความเค็มให้กับน้ำทะเลจนตกผลึกเป็นเม็ดเกลือ การทำนาเกลือจึงเป็นภูมิปัญญาที่ต้องพึ่งพาสายลม แสงแดด และคนเดินน้ำ ส่วนเกลือสินเธาว์ใช้วิธีการนำน้ำใต้ดินมาต้มเอกละอองเป็นเอกละอองที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



และแข็ง ชนิดที่ว่าหากย่ำลงไปจะไม่ปรากฏรอยเท้า

2.3.8 ชั้น 1 ค่าเดือน 1 ปลงนาปลง ถอดน้ำจากนาเชื้อที่บ่มไว้จนความเค็มได้ 23 ดีกรีเข้าไปยัง “นาปลง” ผ่านทาง “หุนา” บ่มด้วยความร้อนจากดวงอาทิตย์ เพียง 10-15 วัน ให้อหลัง พื้นที่ทุกตารางนิ้วของนาปลงก็จะขาวโพลนไปด้วยผลึกเกลือบริสุทธิ์

2.3.9 ชั้น 15 ค่าเดือน 1 ร่อนนา เมื่อผลึกเกลือหนาเท่าฝ่ามือจึง “ร่อนนา” โดยใช้ พลับขวย อีรูนสะทาศักแถว และสะทาสู่เกลือ สุ่มเกลือเป็นกองสามเหลี่ยมเรียงเป็นแถว ทิ้งไว้ ประมาณ 1-2 วันให้น้ำแห้งสนิท หลังจากนั้นชวานาเกลือจึงหาบใส่ยัง



รูปที่ 2.2 การกลิ้งนาเกลือ เพื่อปรับสภาพหน้าดิน

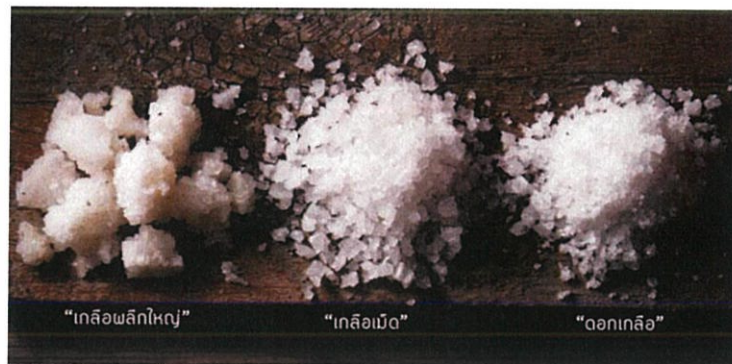
ที่มา: <http://www.manager.co.th>

#### 2.4 ชนิดของเกลือ (การท่องเที่ยวแห่งประเทศไทย, 2555)

เกลือมีสองชนิดคือ เกลือสมุทรหรือเกลือแกง เกิดจากกระบวนการผลิตแบบภูมิปัญญาชาวบ้าน ที่อาศัยการหมุนเวียนน้ำในนาเกลือที่ต่างระดับ ผลึกเกลือจะเกิดขึ้นก็ต่อเมื่อคนเดินน้ำทำงานสัมพันธ์ กับสายลมแสงแดด เกลือสมุทรมีแหล่งผลิตใหญ่อยู่ที่ จังหวัดสมุทรสงคราม สมุทรสาคร และเพชรบุรี เกลือชนิดนี้มีสารไอโอดีนผสมอยู่ด้วยตามธรรมชาติ

เกลือสินเธาว์ เป็นเกลือที่ได้จากการนำน้ำใต้ดินมาต้มหรือตาก ซึ่งส่วนใหญ่ทำกันในภาคอีสาน ถึงหน้าต้มเกลือตามแหล่งเกลือจะเป็นที่ชุมนุมของคนในท้องถิ่น งานต้มเกลือต้องอยู่กลางแจ้งและความร้อนจากเตาไฟตลอดวัน แต่เกลือที่ต้มนั้นจะเป็นเกลือที่มีคุณภาพดีที่สุดจะนำมาทำปลาร้า ปลา ส้มได้ดี ไม่น่า และเป็นเกลือที่มีรสขม (กลมกล่อม) มีกลิ่นหอมดิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 2.3** แสดงภาพลักษณะของเก็ล  
ที่มา : <http://www.goodlifeupdate.com>

## 2.5 ประโยชน์ของนาเก็ล

2.5.1 ช่วงฤดูฝนชวานาเก็ลจะได้เก็ลจี๊ด (ยิบซั่ม) ซึ่งเป็นผลึกสารแคลเซียมซัลเฟตที่เหลืออยู่ในเก็ลหลังจากที่ตักเก็ลออกไปจากนาเก็ลจนหมดแล้ว ซึ่งชวานาเก็ลจะชูดอกเสียก่อนที่จะปล่อยน้ำทะเลเข้ามาเพื่อทำนารอบใหม่ (สุภาพรณ, 2556) เก็ลจี๊ดมีคุณสมบัติช่วยลดความมันและผดผื่นคัน เก็ลจี๊ดที่ดีต้องสะอาดไม่มีดินปน กระบวนการเก็บเก็ลจี๊ดจากนานั้น เก็ลจี๊ดควรมีอายุ 2 ปี เกิดผลึกใหญ่กำลังพอดีไม่มีดินมาปะปน ชวานาเก็ลจึงเก็บเก็ลจี๊ดเพียงปีเว้นปี และเก็บโดยค่อยๆกวาดเนื้อเก็ลจากผิวดิน ไม่เช่นนั้นเศษดินจะคลุกวงใน แยกออกเป็นเก็ลจี๊ดบริสุทธิ์ได้ยาก (รพีภัทร์ และคณะ, 2557)

2.5.2 ช่วงฤดูร้อนในนาเก็ลจะมีดอกเก็ลอยู่ตามขอบคันนา ดอกเก็ลเกิดขึ้นเมื่อแดดและลมทำให้น้ำในนาเก็ลเริ่มระเหย จับตัวเป็นผงเล็กๆ เกะกันเป็นแพลอยอยู่ที่ผิวน้ำ ดอกเก็ลมีคุณสมบัติข่อนเร้นนอกเหนือไปจากเรื่องรสชาติ ก็คือเกี่ยวกับผิวพรรณ รักษาผิวน้ำ ทำชวานาทำสปา (รพีภัทร์ และคณะ, 2557; อัมพร, 2556)

2.5.3 ตีเก็ล การทำตีเก็ลจะทำแปลงเฉพาะไม่ปนกับแปลงนาเก็ล โดยนำน้ำจากการรื้อเก็ลแต่ละครั้งไปขังรวมกันไว้ ทั้งไว้ระยะหนึ่งก็จะมตีเก็ลขึ้นเกาะอยู่ตามพื้นนา เกษตรกรชวานาเก็ลจะเก็บตีเก็ลทุกวันในเวลาเช้าก่อนแดดออก (ถ้าแดดจัดเก็ลจะละลายไปกับน้ำ) ตีเก็ลชนิดนี้จะเป็นเม็ดสีขาวมีรสขม นำไปใช้ประกอบเป็นเครื่องยาไทยโบราณประเภทระบายหรือยาถ่าย และน้ำที่อยู่ในนา ตีเก็ลจะมีความเค็มจัดมากเรียกว่า “น้ำตีเก็ล” นำไปใช้เป็นส่วนประกอบในการทำเต้าหู้ เป็นสารทำให้เต้าหู้แข็งตัว

2.5.4 ชี้แดด เป็นส่วนที่อยู่บนผิวดินของเก็ล มีลักษณะเป็นแผ่นร้อนอยู่บนผิวนา ซึ่งเกษตรกรชวานาเก็ลต้องทำการเก็บชี้แดดก่อนทำการบดดิน ตอนต้นฤดูการทำนาเก็ล ชี้แดดนี้สามารถนำไปใช้เป็นปุ๋ยปลูกพืชได้

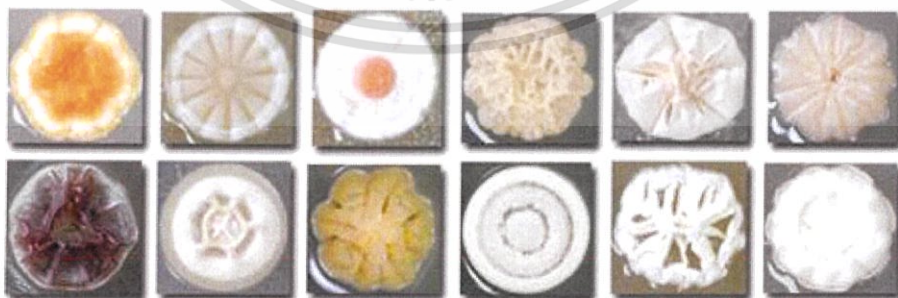
2.5.5 สัตว์น้ำทะเลต่างๆ เกษตรกรชวานาเก็ลที่มีพื้นที่กักเก็บน้ำทะเล (วัง) ก็จะมีสัตว์น้ำทะเลต่างๆ เช่น กุ้งขาว กุ้งแช่บ๊วย ปลาหมอเทศ ปลากระพง ปูทะเล ฯลฯ อยู่ภายในวัง เป็นการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบธรรมชาติเพื่อเป็นรายได้เสริมทางหนึ่ง (สุภาพรณ, 2556)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.6 แอคติโนมัยซีท (Actinomycetes)

แบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีท เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ จัดอยู่ในอันดับ *Actinomycetales* โดยมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลาย ตั้งแต่รูปร่างกลม เป็นท่อน และมีลักษณะเป็นเส้นใยคล้ายกับเชื้อรา (Miyadoh, 1997) ซึ่งเส้นใยที่สร้างมี 2 ประเภท คือ เส้นใยที่เจริญลงไปใต้ผิวอาหาร เรียกว่า เส้นใยอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใย อากาศ (aerial mycelium) นอกจากนี้แอคติโนมัยซีทสามารถสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศได้ (asexual spore) ซึ่งจะสร้างเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ แต่มีลักษณะสำคัญที่ แตกต่างจากเชื้อราคือ แอคติโนมัยซีทไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear membrane) เนื่องจากเป็น สิ่งมีชีวิตพวกโพรคาริโอต และเส้นใยของแอคติโนมัยซีทจะมีขนาดเล็กกว่าเชื้อรา โดยมีขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลางประมาณ 0.5-0.8 ไมโครเมตร (Teja *et al.*, 2014) เชื้อแอคติโนมัยซีทมีลักษณะจำเพาะที่ แตกต่างจากแบคทีเรียแกรมบวกชนิดอื่น คือ มีปริมาณของเบสกวานีนและไซโตซีนสูงกว่าร้อยละ 55 ของปริมาณสารพันธุกรรม (Doroghazi and Metcalf, 2013) นอกจากนี้โคโลนีจะมีลักษณะ คล้ายผงแป้ง (powdery) หรือกำมะหยี่ (velvet) ไม่มันวาว โดยเมื่อเจริญบนอาหารแข็ง เส้นใย อาหารจะแทงลงในเนื้อวุ้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อมามีการสร้างเส้นใยชูขึ้นบนอากาศ ทำให้กลุ่มของ เส้นใยอัดตัวแน่น เกิดเป็นโคโลนีที่มีขอบเขตชัดเจน

เชื้อแอคติโนมัยซีทสามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ทั้งในดิน แหล่งน้ำจืด น้ำเค็ม อากาศ เนื้อเยื่อพืช โดยส่วนใหญ่มักพบในดิน ตั้งแต่ดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ ดินป่าชายเลน ดินเพาะปลูกทำ การเกษตร สกุลที่พบมากที่สุด คือ *Streptomyces* ใช้ออกซิเจนในการเจริญ ส่วนใหญ่เป็นพวก mesophile ทำให้สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 ถึง 45 องศาเซลเซียส บางชนิดเป็นพวก psychrophile และ thermophile ดำรงชีวิตโดยการย่อยสลาย เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ไคติน รวมทั้งลิกนิน และดูดซึมสารอินทรีย์จากดินเป็นแหล่งอาหาร สามารถสร้างสารจีโอสมิน (geosmin) ได้ ซึ่งเป็นสารที่มีกลิ่นคล้ายกลิ่นดิน นอกจากนี้แอคติโนมัยซีทยังสามารถผลิตเนอโไซม์ ซึ่งสามารถ นำไปประยุกต์ใช้ได้ ในอุตสาหกรรม รวมทั้งเป็นจุลินทรีย์กลุ่มสำคัญที่สามารถผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่มีคุณสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้อย่างหลากหลาย ได้แก่ สารปฏิชีวนะต่อต้านเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส สารต้านมะเร็ง เป็นต้น (Procópio *et al.*, 2012)



รูปที่ 2.4 แอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากดิน

สืบค้นวันที่: 5 เมษายน 2560

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.7 สัณฐานวิทยาของแอกติโนมัยซีท

### 2.7.1 เส้นใยของแอกติโนมัยซีท

แอกติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นใยคล้ายกับเชื้อรา แต่เส้นใยของแอกติโนมัยซีทมีขนาดเล็กกว่าของเชื้อรา ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 0.5 ถึง 0.8 ไมโครเมตร โดยเส้นใยที่แอกติโนมัยซีทสร้าง สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

1) เส้นใยอาหาร (substrate mycelium) เป็นเส้นใยที่เจริญลงในเนื้อวุ้นของอาหารแข็ง ช่วยนำสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเข้าสู่เซลล์ โดยช่วงต้นของการเจริญเส้นใยประเภทนี้จะมีสีขาวหรือครีม เมื่อเจริญเต็มที่แล้วจะกลายเป็นสีต่างๆ เช่น เหลือง ส้ม ชมพู แดง หรือน้ำตาล เมื่อเพาะเลี้ยงแอกติโนมัยซีทบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เส้นใยอาหารจะเจริญอย่างรวดเร็วในระยะเวลา 4 ถึง 6 ชั่วโมง ต่อมาจะมีการพัฒนาเป็นเส้นใยที่ยาว และเส้นใยที่ซับซ้อนในที่สุด โดยเส้นใยอาหารมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.7 ไมโครเมตร (Manteca *et al.*, 2005)

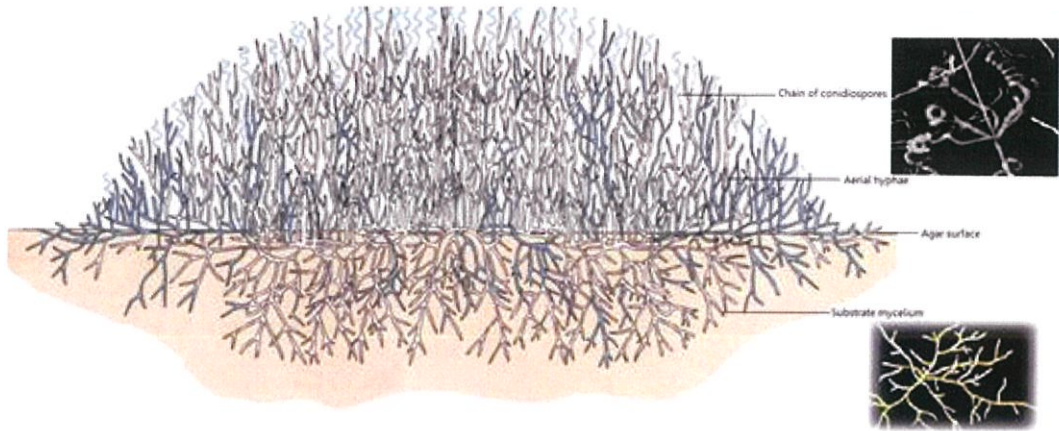
2) เส้นใยอากาศ (aerial mycelium) เป็นเส้นใยที่ชูขึ้นบนอากาศ เจริญเหนือผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ แอกติโนมัยซีทส่วนใหญ่มีการสร้างเส้นใยชนิดนี้ โดยเฉพาะใน *Streptomyces* แต่บางสกุล เช่น ใน *Frankia* ไม่สร้างเส้นใยอากาศ แอกติโนมัยซีทแต่ละสปีชีส์จะมีสีและลักษณะของเส้นใยอากาศแตกต่างกัน สามารถนำไปใช้ในการจัดหมวดหมู่ของแอกติโนมัยซีทได้ ในสกุลที่สร้างเส้นใยชนิดนี้เจริญปกคลุมโคโลนี จะทำให้โคโลนีมีลักษณะคล้ายผงแป้ง นอกจากนี้เส้นใยอากาศยังมีคุณสมบัติเป็นเส้นใยที่ไม่ชอบน้ำ มีการแตกแขนงน้อยกว่า แต่มีสีเข้มกว่าเส้นใยอาหาร และสามารถพัฒนาไปเป็นสปอร์ต่อไปได้ โดยเส้นใยอากาศของแอกติโนมัยซีทมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 จนถึง 1.4 ไมโครเมตร (จามจุรีและคณะ, 2555)

ทั้งเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศของแอกติโนมัยซีท มักมีการสร้างผนังกัน และเจริญยึดออกทางปลายของเส้นใย มีความหนาประมาณ 0.4 จนถึง 1.2 ไมโครเมตร ประกอบด้วยผนังเซลล์ ถัดมาเป็นส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ที่ห่อหุ้มไซโทพลาซึมไว้ ภายในไซโทพลาซึมประกอบด้วย ออร์แกเนลล์คือ ไรโบโซม สารพันธุกรรมทั้งดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ ตลอดจนสารต่างๆ ที่รวมอยู่ด้วยกัน ได้แก่ ไขมัน โพลีฟอสเฟต และโพลีแซคคาไรด์ นอกจากนี้ยังอาจพบมีโซโซมเชื่อมต่อกับส่วนของผนังเซลล์ด้วย

### 2.7.2 ลักษณะของโคโลนี

โคโลนีของแอกติโนมัยซีทมีลักษณะจำเพาะ และแตกต่างจากโคโลนีของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ เนื่องจากโคโลนีของแอกติโนมัยซีทเกิดจากการรวมกันของเส้นใยอย่างหนาแน่น เกิดเป็นโคโลนีที่มีขอบเขตชัดเจน โดยเส้นใยบางส่วนจะฝังลงในเนื้อวุ้นของอาหารแข็ง สำหรับการสร้างโคโลนีของแอกติโนมัยซีทจะเริ่มจากการถ่ายเชื้อลงบนอาหารแข็ง โดยอาจเป็นสปอร์เดี่ยว อับสปอร์ ส่วนของเส้นใยที่เกิดการแตกหัก หรือบางส่วนของโคโลนีเดิมเหล่านี้ จะเจริญเป็นเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) ฝังลงในเนื้อวุ้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในระยะนี้โคโลนีจะมีผิวเรียบ และพัฒนาเป็นเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) โดยโคโลนีของแอกติโนมัยซีทมักเจริญออกจากศูนย์กลางในลักษณะรัศมี (Li *et al.*, 2016) ต่อมาจะมีการเปลี่ยนแปลงของโคโลนี ได้แก่ การสร้างสปอร์ การสร้างผนังกันของเส้นใย โดยทั่วไปเส้นใยทั้งสองประเภทมักจะมีการสร้างผนังกัน ขั้นตอนการสร้างและเจริญเป็นโคโลนีของแอกติโนมัยซีทแสดงดังรูปที่ 2.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 2.5** การเจริญเป็นโคโลนีของแอคติโนมัยซีทบนอาหารแข็ง โดยเกิดการสร้างเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

ที่มา: Li *et al.*, (2016)

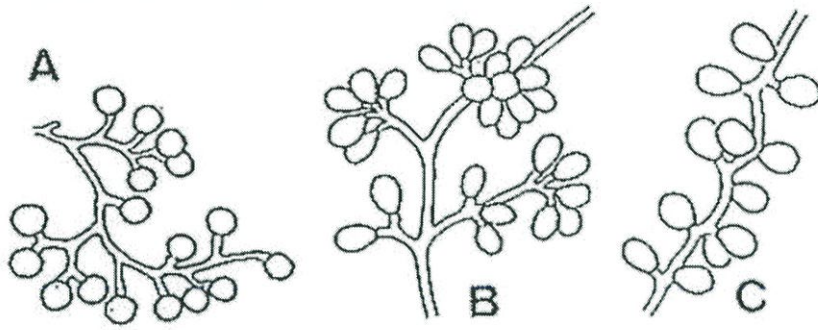
โคโลนีของแอคติโนมัยซีทมีความหลากหลาย โดยแต่ละสปีชีส์มีลักษณะแตกต่างกัน เช่น ใน *Sporichthya* มีการสร้างเส้นใยอากาศสั้นๆ ทำให้ไม่สามารถสังเกตเห็นส่วนของเส้นใยที่เจริญฝังลงในเนื้อของอาหารแข็ง ส่วนใน *Micromonospora Actinoplanes* และ *Salinispora* มีการสร้างเส้นใยอาหาร แต่ไม่สร้างเส้นใยอากาศ แต่โดยทั่วไปโคโลนีของแอคติโนมัยซีทมักมีการสร้างเส้นใยทั้ง 2 แบบ เช่น ใน *Streptomyces* มีการสร้างทั้งเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ (Wildermuth, 1970) โคโลนีอาจนูน (raise) หรือแบน (flat) และมีลักษณะคล้ายหนัง (leather) มีระดับความแข็งตั้งแต่นุ่มมาก เหนียว ไปจนถึงแข็ง ผิวของโคโลนีอาจเรียบ (smooth) ขรุขระ (rough) เป็นผงคล้ายแป้ง (powder) หรือเป็นเม็ด (granular) สีของโคโลนีมีหลากหลาย เช่น สีขาว เหลือง ส้ม ชมพู แดง ฟ้า ม่วง น้ำตาล และดำ ส่วนขนาดโคโลนีของแอคติโนมัยซีทขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ สปีชีส์ อายุ และสภาพในการเจริญ โดยขนาดของโคโลนีมีความแตกต่างกัน มีตั้งแต่เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีมีตั้งแต่ระดับมิลลิเมตรจนถึงเซนติเมตร (Dunca *et al.*, 2006)

### 2.7.3 ลักษณะการสร้างสปอร์ของแอคติโนมัยซีท

แอคติโนมัยซีทสามารถสร้างสปอร์ได้ โดยแบ่งออกเป็น 3 ประเภท คือ การสร้างสปอร์เดี่ยว สปอร์เป็นสาย และสปอร์ในอับสปอร์ ตามลักษณะของโครงสร้างภายนอก

#### 1) กลุ่มที่สร้างสปอร์เดี่ยว (monosporous)

การสร้างสปอร์เดี่ยว พบได้ในแอคติโนมัยซีทหลายสกุล เช่น ใน *Micromonospora* ส่วนของก้านชูสปอร์ (sporophore) จะเกิดขึ้นบนสายใยอาหาร สร้างสปอร์ติดอยู่ที่ฐาน โดยการสร้างสปอร์เริ่มจากเส้นใยเกิดการพองตัว จากนั้นมีการสร้างผนังกันระหว่างก้านชูสปอร์กับส่วนที่พองออกเป็นสปอร์ และสร้างผนังสปอร์ให้มีความหนาขึ้น ส่วนใน *Thermomonospora* มีการสร้างสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอากาศที่แตกแขนงหรือไม่แตกแขนง หากแตกแขนงจะทำให้เกิดกลุ่มสปอร์ และใน *Saccharomonospora* มีการสร้างสปอร์เดี่ยวรูปไข่บริเวณปลายเส้นใยอากาศ (ศิริรัตน์, 2552) การสร้างสปอร์เดี่ยวของแอคติโนมัยซีทสกุลต่างๆ แสดงดังรูปที่ 2.6



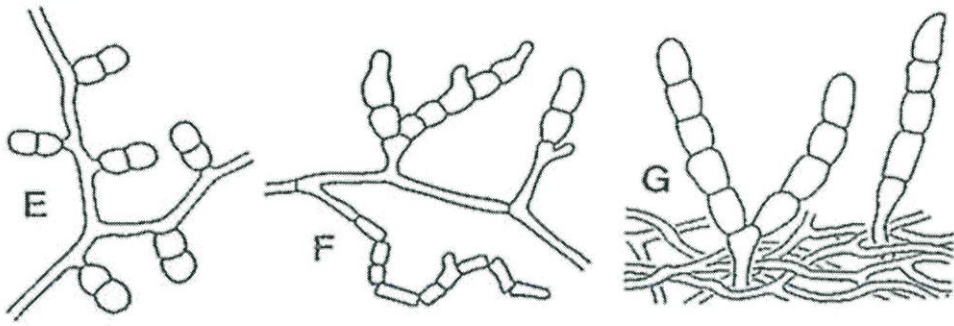
รูปที่ 2.6 การสร้างสปอร์เดี่ยว (monosporous) ของแอกติโนมัยซีทสกุลต่างๆ  
(A) *Micromonospora* (B) *Thermomonospora* (C) *Saccharomonospora*  
ที่มา: Li *et al.*, (2016)

## 2) กลุ่มที่สร้างสปอร์เป็นสาย

การสร้างสปอร์เป็นสาย เกิดจากการที่เส้นใยมีการแบ่งตัวเป็น segments ต่อมาแต่ละ segment สามารถพัฒนาเป็นสปอร์ได้ การสร้างสปอร์ในลักษณะนี้พบได้มากในแอกติโนมัยซีท โดยสามารถแบ่งกลุ่มของสายสปอร์ จากจำนวนหรือความยาวของสปอร์ ได้แก่ สปอร์คู่ (bisporous) สปอร์สายสั้น (oligosporous) และสปอร์สายยาว (polysporous)

2.1) สปอร์คู่ (bisporous) เป็นคู่ของสปอร์ที่ต่อกันตามยาว ลักษณะของสปอร์เช่นนี้พบได้ในแอกติโนมัยซีทสกุล *Actinobispora* นอกจากนี้ยังพบใน *Actinomadura rugatobispora* และในสกุล *Microbispora* ซึ่งสปอร์มีลักษณะเป็นคู่ทรงรี เกิดขึ้นบนเส้นใยอากาศหรือบนก้านชูสปอร์สั้นๆ (ศิริรัตน์, 2552)

2.2) สปอร์สายสั้น (oligosporous) ส่วนมากสายสปอร์จะประกอบด้วยสปอร์จำนวน 7 จนถึง 20 สปอร์ แต่สามารถพบได้น้อยที่สุด 3 สปอร์ และพบได้สูงสุดถึง 30 สปอร์ การสร้างสปอร์ในลักษณะนี้พบได้ใน *Nocardia brevicatena* ซึ่งสร้างสายสปอร์จำนวน 2 จนถึง 7 สปอร์ต่อสายบนส่วนของเส้นใยอาหาร รวมทั้งแอกติโนมัยซีทสกุล *Microtetraspera* และ *Actinomadura* จะสร้างสปอร์สายสั้นๆที่ประกอบด้วยสปอร์จำนวน 4 จนถึง 10-20 สปอร์ต่อสายบนเส้นใยอากาศ โดยสายสปอร์อาจมีลักษณะตรง (straight) เป็นขอ (hooked) เป็นเกลียวซ้อน (spiral) จำนวน 1 ถึง 4 ชั้น หรือเป็นวงเปิด (open loop) และในสกุล *Catellatospora* สายสปอร์จะมีลักษณะตรง จนถึงโค้งงอได้ โดยสายสปอร์อยู่บริเวณปลายก้านชูสปอร์ขนาดสั้นที่อาจแตกหรือไม่แตกแขนง (จามจุรีและคณะ, 2555) การสร้างสปอร์เป็นสายของแอกติโนมัยซีทสายพันธุ์ต่างๆ แสดงดังรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 การสร้างสปอร์เป็นสายของแอกติโนมัยซีทสายพันธุ์ต่างๆ

- (A) สปอร์คู่ (bisporous) ของ *Microbispora*  
 (B) สปอร์สายสั้น (oligosporous) ของ *Nocardia brevicatena*  
 (C) สปอร์สายสั้น (oligosporous) ของ *Catellatospora*

ที่มา: Li *et al.*, (2016)

### 2.3) สปอร์สายยาว (polysporous)

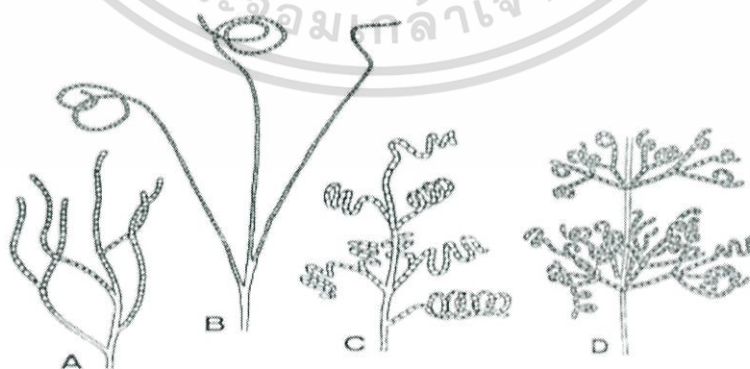
การสร้างสปอร์สายยาว (polysporous) พบได้ในแอกติโนมัยซีทสกุล *Streptomyces* ซึ่งสร้างสปอร์เป็นสายยาวมีจำนวนมากกว่า 50 สปอร์ต่อสาย โดยจะเรียกสปอร์ของ *Streptomyces* และแอกติโนมัยซีทชนิดอื่นที่สร้างสปอร์เป็นจำนวนมากกว่า “arthospore” ซึ่งสอดคล้องกับ arthospores ของราในกลุ่ม Deuteromycota ที่มีการสร้างสายสปอร์และมีการแตกหักของเส้นใย โดยความแตกต่างของลักษณะสาย สปอร์สามารถใช้ในการจัดจำแนกชนิดได้ ซึ่งการสร้างสปอร์ของ *Streptomyces* ในแต่ละสปีชีส์จะแตกต่างกัน สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ลักษณะคือ

2.3.1) Rectiflexbiles สายสปอร์จะมีลักษณะตรง หรือโค้งงอเพียงเล็กน้อย

2.3.2) Retinaculiaperti สายสปอร์มีลักษณะคล้ายขอ เป็นวงเปิด หรือเป็นเกลียวซ้อน 1 จนถึง 3 ชั้น

2.3.3) Spira สายสปอร์มีลักษณะเป็นเกลียว แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ เป็นเกลียวติดกันแน่นทำให้มีลักษณะเหมือนวงปิดและเป็นเกลียวที่ไม่ติดกันแน่นทำให้มีลักษณะเป็นวงเปิด

2.3.4) Verticillati สายสปอร์มีลักษณะขดคล้ายกันหอย และแตกแขนง (ศิริรัตน์, 2552)



รูปที่ 2.8 การสร้างสปอร์สายยาว (polysporous) ของ *Streptomyces* ในลักษณะต่างๆ

- (A) การสร้างสปอร์แบบ Rectiflexbiles (B) การสร้างสปอร์แบบ Retinaculiaperti  
 (C) การสร้างสปอร์แบบ Spira (D) การสร้างสปอร์แบบ Verticillati

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานที่ <http://www.ajph.com> ที่มา: Li *et al.*, (2016) ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3) กลุ่มที่สร้างสปอร์ในอับสปอร์

แอกติโนมัยซีทในหลายสกุลมีการสร้างสปอร์ภายในอับสปอร์ ซึ่งในอับสปอร์นั้นประกอบด้วยสปอร์จำนวนมาก โดยสามารถแบ่งกลุ่มการสร้างอับสปอร์ได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนเส้นใยอาหาร และกลุ่มที่สร้างสปอร์บนเส้นใยอากาศ

3.1) กลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนเส้นใยอาหาร ได้แก่ แอกติโนมัยซีทในสกุล *Actinoplans* ซึ่งอับสปอร์มีลักษณะกลม เกือบกลม หรือไม่เป็นรูปทรงที่แน่นอน โดยอับสปอร์อยู่บนเส้นใยอาหารโดยตรง มีสปอร์ต่อกันเป็นสายและแตกแขนงขดเป็นก้อนอยู่ภายในผนังท่อหุ้ม และในสกุล *Pilimelia* อับสปอร์ที่สร้างมีรูป ทรงกระบอก ทรงกลม แต่สปอร์มีรูปร่างเป็นแท่ง เรียงตัวกันเป็นแถว หรือเรียงตัวแบบไม่เป็นระเบียบ

3.2) กลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนเส้นใยอากาศ ได้แก่ แอกติโนมัยซีทในสกุล *Planomonospora* ซึ่งมีอับสปอร์เป็นรูปทรงกระบอก ภายในอับสปอร์ประกอบด้วยสปอร์เพียง 1 สปอร์ ส่วนในสกุล *Planobispora* มีสปอร์คู่ต่อกันอยู่ภายในอับสปอร์ นอกจากนี้ในสกุล *Streptosporangium* จะมีอับสปอร์รูปร่างทรงกลม มีการสร้างผนังกัน เป็นสปอร์เดี่ยวๆ ต่อกันเป็นเส้นใยยาวขดเป็นวงอยู่ภายในอับสปอร์ (จามจุรีและคณะ, 2555)

## 2.8 การแยกและคัดเลือกแอกติโนมัยซีทจากดินนาเกลือ

แอกติโนมัยซีทเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถพบได้ในแหล่งธรรมชาติทั่วไป ทั้งในดิน แหล่งน้ำจืด น้ำเค็ม โคลน และบริเวณรากพืช ส่วนใหญ่มักพบในดิน ซึ่งในดินสามารถพบแอกติโนมัยซีทได้มากเป็นอันดับสองรองจากแบคทีเรียทั่วไป มักเจริญอยู่บริเวณผิวดิน หรือในดินความลึกไม่เกิน 4 เซนติเมตร ปริมาณของแอกติโนมัยซีทที่พบขึ้นอยู่กับชนิด สภาพ คุณสมบัติทางกายภาพ ปริมาณของอินทรีย์วัตถุ และความเป็นกรด-ด่างของดิน (pH) โดยปกติในดินจะพบแอกติโนมัยซีทอยู่ในช่วง  $10^5$  จนถึง  $10^8$  เซลล์ต่อดิน 1 กรัม (Ashwathi, 2008) ซึ่งในดินที่มีสภาพเป็นด่างสามารถพบแอกติโนมัยซีทในสัดส่วนที่สูงกว่าดินที่มีสภาพเป็นกรด โดยดินที่มีค่าความเป็นกรดต่างอยู่ในช่วง 6.5 จนถึง 8 จะพบแอกติโนมัยซีทได้สูงถึงร้อยละ 95 ของจุลินทรีย์ในดินทั้งหมด ในขณะที่ดินที่มีสภาพเป็นกรดจะพบแอกติโนมัยซีทประมาณร้อยละ 80 ของจุลินทรีย์ในดินทั้งหมด แอกติโนมัยซีทที่พบมากที่สุดในดินคือ สกุล *Streptomyces* ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีความหนาแน่นและมีการกระจายตัวมากที่สุด สามารถย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะสารที่มีโครงสร้างโมเลกุลซับซ้อนและยากต่อการย่อยสลาย เช่น ไคติน ลิกนิน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส เป็นต้น จึงเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญต่อระบบนิเวศ ในการหมุนเวียนธาตุอาหาร ก่อให้เกิดความอุดมสมบูรณ์ของดิน (Nair and Padmavathy, 2014) การแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากตัวอย่างดิน โดยเฉพาะดินนาเกลือ จะต้องแยกจากตัวอย่างดินที่ปล่อยให้แห้ง จะช่วยในการกำจัดแบคทีเรียทั่วไป และมีการเติมสารปฏิชีวนะ เช่น นีสเตทิน (nystatin) เพื่อช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยสามารถพบทั้งแอกติโนมัยซีทในกลุ่ม *Streptomyces* และกลุ่มที่ไม่ใช่ *Streptomyces* (non-*Streptomyces*) หรือกลุ่มแอกติโนมัยซีทหายาก (rare actinomycetes) เช่น แอกติโนมัยซีทสกุล *Actinoalloteichus* และ *Pseudonocardia* ซึ่งแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกได้สามารถผลิตสารทุติยภูมิ ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราได้ (Jose et al., 2013)

Dhanasekaran และคณะ (2004) ทำการแยกแอกติโนมัยซีทจากตัวอย่างดินนาเกลือ ในเขตอำเภอชดดาเลอร์ (Cuddalore) และ Parangipettai ซึ่งอยู่ในบริเวณชายฝั่งตะวันออกเฉียงใต้ของเอกสารนเป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประเทศอินเดีย โดยใช้อาหาร Starch casein agar ที่มีการเติมสารปฏิชีวนะไซโคลเฮกซิมิด (cycloheximide) และเตตราไซคลิน (tetracycline) ความเข้มข้น 50 และ 20 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร เพื่อช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย ตามลำดับ จากนั้นนำตัวอย่าง ดินมาเจือจางโดยใช้วิธี serial dilution ให้มีความเจือจาง 1:10000000 เกลี่ยลงบนผิวหน้าอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ถึง 10 วัน ซึ่งสามารถแยกแอคติโนมัยซีท์ได้ ทั้งหมด 17 ไอโซเลท จากดินนาเกลืออำเภอชดดาเลอร์ (Cuddalore) จำนวน 9 ไอโซเลท และจาก Parangipettai จำนวน 8 ไอโซเลท ในจำนวน 17 ไอโซเลทมี 4 ไอโซเลท ในจำนวนนี้มี 3 ไอโซเลท เป็นแอคติโนมัยซีท์สกุล *Streptomyces* และ 1 ไอโซเลทเป็นแอคติโนมัยซีท์สกุล *Saccharomonospora* นอกจากนี้พบว่าทั้ง 4 ไอโซเลทสามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* และ *Vibrio cholera* ได้ดี

Saurav และ Kannabiran (2010) แยกแอคติโนมัยซีท์จากดินนาเกลือ ในเมืองมาร์คานัม (Marrakanam) และปูดุเชอร์รี (Puducherry) ซึ่งเป็นเมืองชายฝั่ง มีเขตแดนติดต่อกับอ่าวเบงกอล ซึ่งสามารถคัดแยกแอคติโนมัยซีท์ได้ 164 ไอโซเลท จากดินตัวอย่างทั้งหมด 39 ตัวอย่าง โดยใช้อาหาร International Streptomyces Project-1 (ISP-1), Starch Casein agar (SCA) และ Kuster's agar ได้ 46, 95 และ 23 ไอโซเลทตามลำดับ โดยเป็นแอคติโนมัยซีท์ในสกุล *Actinoplanes*, *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Actinopolyspora*, *Saccharopolyspora*, *Microbispora* และ ร้อยละ 42, 22, 8, 6, 13 และ 9 ตามลำดับ นอกจากนี้ *Streptomyces* VITSVK9 spp. มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC 25922) และ *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10273) และสามารถยับยั้งเชื้อราหรือยีสต์ *Aspergillus niger* (ATCC No 16404), *Aspergillus fumigatus* (ATCC 46645) และ *Candida albicans* ได้ดี

## 2.9 เอนไซม์โปรติเอส

โปรติเอสเป็นเอนไซม์ชนิดเดียวที่มีความสำคัญในทางการประยุกต์ใช้ทั้งทางสรีรวิทยาและเชิง การค้า ซึ่งเอนไซม์โปรติโอไลติก (Proteolytic) เป็นตัวกระตุ้นการแยกออกของพันธะเปปไทด์ใน โปรตีนต่างๆ ให้เป็นสายสั้น โปรติเอสคือเอนไซม์ที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการย่อยโปรตีนทั้งหมด และ ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีนให้เป็นโอลิโกเปปไทด์ (oligopeptide) และกรดอะมิโนต่างๆ โปรติเอสสามารถเรียกได้อีกชื่อหนึ่งว่า โปรติเนส (proteinase) (สมพิศ, 2559) ค่าประมาณปัจจุบัน ของทั่วโลก ยอดขายของอุตสาหกรรมเอนไซม์อยู่ที่ 1 พันล้านดอลลาร์ 75% เป็นพวกไฮโดรไลติก เอนไซม์โปรติเอสเป็นตัวแทนหนึ่งในสามของกลุ่มที่ใหญ่ที่สุดในอุตสาหกรรมเอนไซม์ประมาณ 60% ของการจำหน่ายเอนไซม์ทั่วโลกทั้งหมด เอนไซม์โปรติเอสสามารถทำหน้าที่ได้หลากหลายตั้งแต่ระดับ เซลล์ไปถึงระดับอวัยวะและสิ่งมีชีวิต

โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในหลายภาคอุตสาหกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ นอกจากนี้การใช้งานด้านการวิจัยจำนวนมาก (Mótyán *et al.*, 2013) ในทางการค้าเป้าหมายในการ พัฒนาเอนไซม์ในการเป็นยารักษาโรคที่ร้ายแรง เช่นโรคมะเร็งและโรคเอดส์ เอนไซม์โปรติเอสมี ประวัติอันยาวนานของการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ผงซักฟอก และอุตสาหกรรมเครื่องหนัง มีการพัฒนาที่ได้ให้ความสำคัญกับเทคโนโลยีชีวภาพเพิ่มมากขึ้น ความหลากหลายของโปรติเอสเองก็ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอญตให้ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ดึงดูดความสนใจทั่วโลกที่จะใช้ประโยชน์จากสรีรวิทยาและเทคโนโลยีชีวภาพของโปรติเอส (RAO *et al.*, 1998)

## 2.10 การแบ่งชนิดของเอนไซม์โปรติเอส (Protease)

เอนไซม์โปรติเอสมีลักษณะทางสรีรวิทยาที่จำเป็นสำหรับสิ่งมีชีวิตและมีอย่างแพร่หลายอยู่ในแหล่งกำเนิดที่ต่างกันเช่นพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ (RAO *et al.*, 1998) เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากพืช เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากสัตว์ เอนไซม์โปรติเอสที่มีบทบาทสำคัญที่สุดคือ เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ เนื่องจาก จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว สามารถเจริญเติบโตในพื้นที่ที่จำกัดได้ และเกิดสายพันธุ์ใหม่ๆที่ทำให้ได้เอนไซม์ชนิดใหม่เกิดขึ้นตามการนำมาประยุกต์ใช้ (Askar *et al.*, 2015) ซึ่งจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้มีทั้งเชื้อแบคทีเรีย รา และแอคติโนมัยซีท

2.10.1 แบ่งชนิดของเอนไซม์ตามจุดกำเนิดหรือการแบ่งตามแหล่งที่มาของเอนไซม์โดยสามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิดคือ เอนไซม์จากพืช สัตว์และจุลินทรีย์

### 2.10.1.1 เอนไซม์โปรติเอสจากพืช

การใช้พืชเป็นแหล่งกำเนิดของเอนไซม์โปรติเอสเป็นไปตามปัจจัยหลายประการ เช่นความพร้อมในการเพาะปลูกและความเหมาะสมของสภาพภูมิอากาศสำหรับการเจริญเติบโต การผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากพืชเป็นกระบวนการที่ต้องใช้เวลามาก เอนไซม์โปรติเอสที่เป็นที่รู้จักกันดีในแหล่งกำเนิดจากพืช เช่น ปาเปน โบรมิเลน เคราตินเนส และ ฟิซิน

ปาเปน เป็นเอนไซม์โปรติเอสจากพืชที่มีการใช้ตั้งแต่ดั้งเดิมเป็นระยะเวลานาน มันถูกสกัดจากยางมะละกอที่ปลูกในเขตร้อนของตะวันตก แอฟริกากลางและอินเดีย ประสิทธิภาพของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของพืชหรือสภาพภูมิอากาศสำหรับการเจริญเติบโตและวิธีการที่ใช้สำหรับการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์ เอนไซม์ทำงานได้ดีในช่วงความเป็นกรดต่าง (pH) 5 ถึง 9 และมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 80 หรือ 90 องศาเซลเซียส (RAO *et al.*, 1998) ปาเปน เป็นเอนไซม์ที่ย่อย โปรตีน (proteolytic enzyme) สามารถย่อยโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ให้เล็กลงได้อาจเรียกว่าเป็น vegetable pepsin ปาเปนจัดอยู่ในกลุ่มโปรตีนที่มีค่ากิจกรรมที่หลากหลาย รวมไปถึงเอนโดเพปติเดส อะมิโนเพปติเดส ไดเพปติดิลเพปติเดส และเอกโซและเอนโดเพปติเดส (วิราสิณี และ นพพล, 2557)

โบรมิเลน ได้มาจากเนื้อและแกนผลสับปะรด เอนไซม์จัดอยู่ในกลุ่ม ซีสเทอีนโปรติเอส (cysteine protease) และมีค่ากิจกรรมอยู่ในช่วงความเป็นกรดต่าง (pH) 5 ถึง 9 มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสซึ่งต่ำกว่าของปาเปน

เคราติน มีการผลิตในพืชหลากหลายชนิด เป็นเอนไซม์ที่ย่อยผมและขน และมีส่วนสำคัญในการผลิตกรดอะมิโนที่สำคัญ เช่น ไลซีน ป้องกันการอุดตันในระบบบำบัดน้ำเสีย

### 2.10.1.2 เอนไซม์โปรติเอสจากสัตว์

ส่วนใหญ่จะผลิตมาจากตับอ่อนของสัตว์เช่น ทริปซิน ไคโมทริปซิน เปปซินและ เรนินซึ่งในการผลิตนั้นมีข้อจำกัดคือความพร้อมของปศุสัตว์ในการฆ่าสัตว์ ซึ่งจะถูควบคุมโดยนโยบายทางการเมืองและทางการเกษตร

ทริปซินมาจากลำไส้ เป็นเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนและพอลิเพปไทด์ภายในกระเพาะอาหาร ซึ่งถูกไฮโดรไลซ์ต่อไปเป็นสายพอลิเพปไทด์ที่สั้นลง ที่ด้านหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนไลซีนและอาร์จินีน ทริปซินจัดอยู่ในกลุ่มเซอรีนโปรติเอส (serine protease) ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร การเตรียมอาหาร เอกสารเป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษานาน นโมอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์โดยไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียและประยุกต์ใช้ทางการแพทย์

โคโมทรอปซิน มาจากตับอ่อน ใช้ตรวจวินิจฉัยโรคและการวิเคราะห์ จึงทำให้เอนไซม์มีราคาแพง เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์โปรตีนที่พันธะเปปไทด์ในกลุ่มคาร์บอกซิลได้แก่ ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) , ไทโรซีน (tyrosine) หรือ ทริปโตเฟน (tryptophan)

เปปซิน พบในกระเพาะอาหารของสัตว์ เปปซินจัดอยู่ในกลุ่มแอสปาติกโปรตีเอส (aspartyl protease) ทำงานได้ดีในช่วงค่าความเป็นกรดต่าง (pH) 1 ถึง 2

เรนิน หรือมีชื่อสามัญว่า เรนเนต หรือ โคโมซิน มาจากกระเพาะของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม การใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมนม ผลิตนมเปรี้ยวที่มีรสชาติดี การทำงานของเอนไซม์จะมีความจำเพาะต่อการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ระหว่าง Phe<sub>105</sub> - Meth<sub>106</sub> ของโปรตีนนม (เคซีน) ซึ่งเติมแควนลอยอยู่อย่างคงตัวในนมลักษณะคอลลอยด์เมื่อโปรตีนถูกตัดสายพันธะเปปไทด์ ทำให้คอลลอยด์ไม่เสถียร โปรตีนจะแยกตัวออกมาเป็นตะกอน ผลผลิตที่เกิดจากการย่อยสลายคือ พารา-แคปทา-เคซีน (para-kappa-casein) หรือเคซีนสายสั้น (วิราวรรณ และ นพพล, 2557)

### 2.10.1.3 เอนไซม์โปรตีเอสจากจุลินทรีย์

ความสามารถของเอนไซม์โปรตีเอสจากพืชและสัตว์ไม่สามารถตอบสนองความต้องการของโลกในปัจจุบันทำให้เกิดความสนใจเอนไซม์โปรตีเอสจากเชื้อจุลินทรีย์มากขึ้น เพราะจุลินทรีย์มีความหลากหลายทางชีวเคมี การใช้เอนไซม์โปรตีเอสจากจุลินทรีย์คิดเป็น 40% ของทั่วโลก เอนไซม์โปรตีเอสที่ผลิตจากแบคทีเรียเช่น *Bacillus subtilis* หรือ *Serratia marcescens* (สมพิศ, 2559) แบคทีเรียชนิดอัลคาไลน์โปรตีเอสมีค่ากิจกรรมในช่วงค่า pH 10 อุณหภูมิที่เหมาะสม 60 องศาเซลเซียส คุณสมบัติเหล่านี้เหมาะสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอก เอนไซม์โปรตีเอสที่ผลิตจากเชื้อรา จะมีความหลากหลายมากกว่าเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย ตัวอย่างเช่น *Aspergillus oryzae* จะผลิต แอซิดโปรตีเอส , นิวทิลโปรตีเอส และ อัลคาไลน์โปรตีเอสทำงานได้ดีในช่วงความเป็นกรดต่าง (pH) 4 ถึง 11 ทนความร้อนได้ดีกว่าเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย มีประโยชน์อย่างยิ่งในอุตสาหกรรมการผลิตชีส (RAO *et al.*, 1998)

2.10.2 การแบ่งชนิดของเอนไซม์ตามลักษณะการตัดบนสายโพลีเปปไทด์ (Polypeptide) ได้เป็นสองชนิด (วัชโรบล, 2555)

2.10.2.1 เอกโซเปปติเดส (Exopeptidases) เป็นการย่อยพันธะเปปไทด์ตรงปลายสายโพลีเปปไทด์ (polypeptide) โดยแบ่งออกเป็น เอนไซม์โปรตีเอสที่ย่อยพันธะเปปไทด์ที่ปลายอะมิโน (N-terminal) ซึ่งเรียกว่า aminopeptidase ได้แก่ ลิวซีน อะมิโนเปปติเดส และ เอนไซม์โปรตีเอสที่ย่อยพันธะเปปไทด์ที่ปลายคาร์บอกซิล (C-terminal) ซึ่งเรียกว่าคาร์บอกซิลเปปติเดส (Carboxypeptidase) เช่น คาร์บอกซิลเปปติเดส เอ (carboxypeptidase A) เซอรีนคาร์บอกซิลเปปติเดส (Serine carboxypeptidase) จะมีกรดอะมิโนเซอรีนอยู่ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ และ metallo carboxypeptidase จะมีพวกไอออนของโลหะอยู่บริเวณเร่งของเอนไซม์ ซึ่งจะมีส่วนช่วยในการทำงานของเอนไซม์เป็นต้น เอกโซโปรตีเอส (Exopeptidases) ส่วนใหญ่จะทำหน้าที่ย่อยพันธะเปปไทด์ของสายเปปไทด์ที่เป็นสายสั้นๆหรือชิ้นส่วนของโปรตีนขนาดเล็กจึงมีชื่อเรียกว่า peptidase

2.10.2.2 เอ็นโดเปปติเดส (Endopeptidase) เป็นการย่อยพันธะเปปไทด์ที่อยู่ในสายโพลีเปปไทด์ (polypeptide) ที่ไม่ใช่บริเวณส่วนปลายสาย โดยที่เอ็นโดเปปติเดส (endopeptidase) จะทำหน้าที่ย่อยโปรตีน หรือโพลีเปปไทด์สายยาวจึงมีชื่อเรียกว่า proteinase

2.10.3 การแบ่งชนิดของเอนไซม์ตามลักษณะบริเวณเร่งหรือกลไกการทำงานของเอนไซม์  
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยามให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถแบ่งได้เป็น 4 ชนิด ดังนี้ (สมพิศ, 2559)

2.10.3.1 Serine proteases เอนไซม์กลุ่มนี้มีกรดอะมิโน Ser , His , Asp อยู่ที่บริเวณเร่ง เป็นเอนไซม์ที่ชอบด่าง (alkali proteases) มีช่วงพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานค่อนข้างกว้างระหว่าง 4.0 ถึง 11.0 ถูกยับยั้งปฏิกิริยาด้วยสาร diisopropyl fluorophosphates ( DFP) และ phenylmethylsulfonyl fluoride ( PMSF) อะตอมของโลหะแคลเซียมไอออนอาจช่วยให้เอนไซม์มีเสถียรภาพมากขึ้น มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 15 ถึง 30 กิโลดาลตัน อัลคาไลน์โปรติเอสส่วนใหญ่ผลิตจาก *Bacillus* spp. ได้แก่ *B. Licheniformis* , *B. subtilis* และ *alkaliphilic Bacillus* sp.

2.10.3.2 Cysteine protease เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า sulphydryl protease เป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในช่วงพีเอชค่อนข้างเป็นกลาง เอนไซม์กลุ่มนี้มีกรดอะมิโน Cys, His, Asp/Asn อยู่ที่บริเวณเร่ง ถูกเร่งปฏิกิริยาได้ดีเมื่อมีสารรีดิวซ์ ได้แก่ HCN หรือ กรดอะมิโนซิสตีน ถูกยับยั้งปฏิกิริยาโดยสารจำพวก sulphydryl reagent ได้แก่ p-chloromercury benzoate (PCMB) ส่วนสาร diisopropyl fluorophosphate (DFP) มีผลยับยั้งปฏิกิริยาเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ได้จากพืชชั้นสูง เช่น ปาเปน และโบรมีเลน และผลิตได้จากจุลินทรีย์บางชนิด เช่น *Clostridium* spp. และ *Streptococcus* spp.

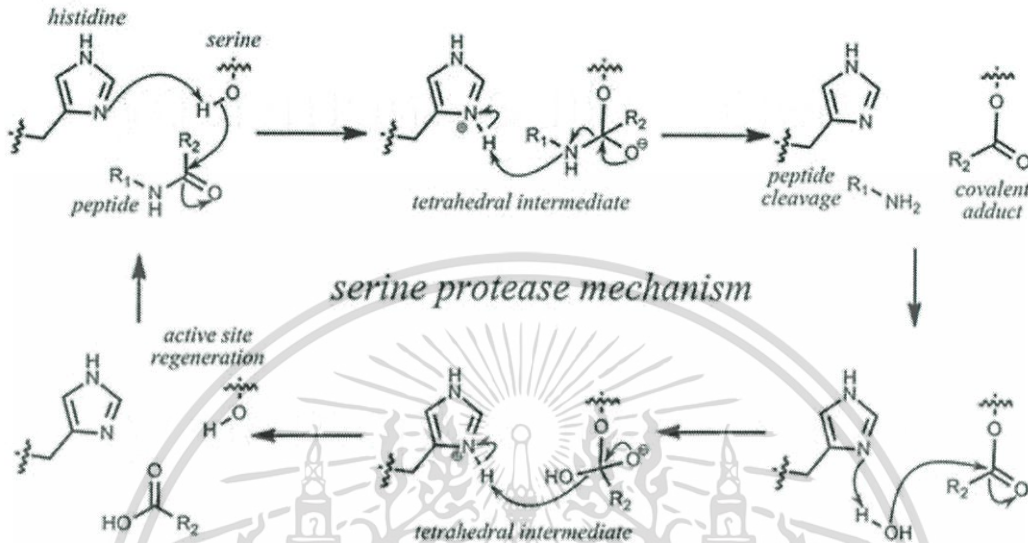
2.10.3.3 Acid protease เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า aspartic protease เนื่องจากมีหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนแอสปาร์ติกอยู่ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ เอนไซม์กลุ่มนี้มีกรดอะมิโน Asp ,Tyr, Asp อยู่ที่บริเวณเร่ง สามารถเกิดปฏิกิริยาจำเพาะได้ดีกับกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวน เอนไซม์มีค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ในช่วง 2.0 ถึง 4.0 มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 30 ถึง 40 กิโลดาลตัน ถูกยับยั้งการทำงานด้วยสาร diazoketone แต่ไม่ถูกยับยั้งด้วยสาร EDTA และ diisopropyl fluorophosphate (DFP) เอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ เรนิน และเปปซิน สามารถเกิดปฏิกิริยาจำเพาะได้ดี กับกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวน จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์นี้ส่วนใหญ่เป็นพวกราและยีสต์ แต่มีแบคทีเรียบางชนิด ผลิตได้ด้วย เชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์นี้ ได้แก่ เชื้อรา *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Mucor* spp. และ *Edothia* spp. เป็นต้น

2.10.3.4. Metalloprotease เป็น exopeptidases เกือบทั้งหมด เป็นโปรติเอสที่ต้องการไอออนของโลหะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์และ พบไอออนของโลหะที่บริเวณเร่ง แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

2.10.3.4.1 Neutral protease เป็นเอนไซม์ที่มีอะตอมของสังกะสี (Zn) อยู่ที่บริเวณเร่ง ทำงานได้ดีที่สภาวะเป็นกลาง และถูกยับยั้งการทำงานได้ด้วยสาร พวก metal-chelating agents เช่น ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) และ 1,10-phenantroline โมเลกุลของเอนไซม์จะมีเสถียรภาพเพิ่มขึ้นเมื่อมีแคลเซียมไอออน เชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ส่วนใหญ่อยู่ในสายพันธุ์ *Bacillus* เช่น *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. Thermoproteolyticus*, *B. thuringiensis*, *B. pumilus* และ *B. polymyxa* เป็นต้น

2.10.3.4.2 Alkaline-metalloprotease เป็นเอนไซม์ที่มีโลหะเป็นส่วนประกอบที่บริเวณเร่ง ทำงานได้ดีในช่วงความเป็นกรดต่าง (pH) 7.0 ถึง 9.0 และในการยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ด้วย EDTA นั้น ต้องใช้ EDTA ที่มีความเข้มข้นมากกว่า 10-2 โมลาร์ จึง สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับนิวทรัลโปรติเอส ที่ ใช้ EDTA ที่มีความเข้มข้นเพียง 10-3 เอกสารเป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอญาตเหนาไปไซประเขยชนดานการค้ำไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โมลาร์ ก็สามารถยับยั้งแอกติวิตีได้ เมื่อปมโปรตีนจาก *B. subtilis* ที่มีค่าความเป็นกรดต่าง (pH) 9.0 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง พบว่ายังคงมีแอกติวิตีสสมบูรณ์ นอกจากนี้เอนไซม์ยังทนต่อสารยับยั้งพวกสารประกอบฟอสเฟต และสาร ออกซิไดซ์ เช่น เปอร์บอเรตได้ดี



รูปที่ 2.9 แสดงกลไกการทำงานของ Serine protease

ที่มา: <https://yourmomislike.wordpress.com>

## 2.11 เอนไซม์โปรตีนในแอกติโนมัยซีท

ปวีณา และคณะ (2555) คัดแยกแอกติโนมัยซีทจากดินนาเกลือ ได้จำนวน 455 ไอโซเลท โดยเป็นไอโซเลทที่คัดแยกได้จากอาหารที่ผสมเกลือและไม่ผสมเกลือจำนวน 93 และ 362 ไอโซเลท ตามลำดับ จากการศึกษาชนิดของกรด diaminopimelic ที่เป็นองค์ประกอบ ของเซลล์และลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าแอกติโนมัยซีทกลุ่ม non-streptomycetes มีจำนวนมากกว่ากลุ่ม *streptomycetes* นำไอโซเลททั้งหมดมาตรวจสอบความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าแอกติโนมัยซีทจำนวน 50 ไอโซเลท (11 เปอร์เซ็นต์) สามารถยับยั้ง *Candida albicans* และจำนวน 239 ไอโซเลท (52 เปอร์เซ็นต์) สามารถสร้างเอนไซม์ L-asparaginase เมื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลท HA25-07 ซึ่งมีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงที่สุด พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA เหมือนกับ *Streptomyces variabilis* NBRC 12825T (100%)

Suthindhiran และคณะ (2014) ได้คัดแยกแอกติโนมัยซีท จากนาเกลือ ทางตอนใต้ของอินเดีย โดยคัดแยกเชื้อที่ชอบเค็ม (halophilic) อย่าง *Actinopolyspora* sp. โดยนำมาทำการทดสอบหาลักษณะฟีโนไทป์ ส่วนเอนไซม์โปรตีนจะทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต คอลัมน์โครมาโตกราฟี และ HPLC พบว่าเอนไซม์มีขนาดมวลโมเลกุล 22 กิโลดาลตัน ทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่ามีความเสถียรที่ค่าความเป็นกรดต่างอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในช่วง 4 ถึง 12 ที่อุณหภูมิ ระหว่าง 25 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้ด้วย PMSF และ DFP และพบว่าเอนไซม์ชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่มเซอร์อินโปรติเอส

Hameş และ Uzel (2007) ได้ทำการคัดแยกแอคติโนมัยซีทที่ได้จากตะกอนทะเล บริเวณอ่าวอิซเมียร์ ประเทศตุรกี และทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสายพันธุ์ MA1-1 โดยพบว่าแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ฟรุกโตส แป้ง มอลโตส ดิกลูโคส yeast extract, malt extract, beef extract และ เปปโตน มีการผลิตโปรติเอสสูง ส่วนแป้งมีประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตของเชื้อและการผลิตเอนไซม์สูงสุด โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 699 ยูนิต มก.<sup>-1</sup> การทำให้บริสุทธิ์โดยการดูดซับมีค่ากิจกรรมจำเพาะ 7618 ยูนิต มก.<sup>-1</sup> มีค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมคือ 9 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และมีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงที่สุดที่ความเป็นกรดต่าง (pH) 8.0 ถึง 13.0 ที่อุณหภูมิ 35 ถึง 50 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้ด้วย phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) ทำให้พบว่าเอนไซม์ชนิดนี้อยู่กลุ่มเซอร์อินโปรติเอส

Shaik และคณะ (2017) ได้ทำการคัดเลือกแอคติโนมัยซีทจำนวน 12 ไอโซเลทจากตะกอนทะเล โดยนำมาทำการทดสอบพบว่าแอคติโนมัยซีทที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้จำนวน 7 ไอโซเลท และพบว่ามี 5 ไอโซเลทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง L-asparaginase ในขณะที่ 5 ไอโซเลทสามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย และ 6 ไอโซเลทสามารถออกฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อรา จากการทดสอบพบว่ามีเพียง VMS-A10 ไอโซเลทเดียวที่ให้ประสิทธิภาพดีที่สุด โดยเอนไซม์โปรติเอสมีค่ากิจกรรม (19.26 ± 0.25 U/mL) และทำศึกษาลักษณะทางชีวเคมี สรีรวิทยาพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลท VMS-A10 เหมือนกับ *Streptomyces parvulus* สายพันธุ์ sankarensis-A10

Gulve และ Deshmukh (2011) ได้ศึกษาสภาพแวดล้อมทางทะเลที่ชายฝั่งของรัฐบาลราชภัฏและทำการคัดแยกแอคติโนมัยซีทได้จำนวน 107 ไอโซเลท ผลการวิจัยพบว่าแอคติโนมัยซีทที่พบเป็น *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Rhodococcus*, *Intrasporangium*, *Saccharopolyspora*, *Septosporangium*, *Saccharomonospora* และ *Nocardia* กิจกรรมเอนไซม์ของแอคติโนมัยซีทที่พบระบุได้ว่าสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ 84.44% เอนไซม์เจลาติเนส 77.78% เอนไซม์อะไมเลส 72.22% และผลิตเอนไซม์เซลลูเลส 37.78%

Tsuchiya และคณะ (1992) พบว่า *alkalophilic Thermoactinomyces sp.* HS682 เป็นเชื้อที่สร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 25 กิโลดัลตัน อุณหภูมิและค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสม ต่อกิจกรรมของเอนคือ 70 องศาเซลเซียส และ 11.5 ตามลำดับ

ตารางที่ 2.1 แสดง สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส

แบคทีเรีย	แอกติโนมัยซีท	เชื้อรา	ยีสต์
<i>Bacillus alcalophilus</i> ATCC 21522	<i>Dermatophilus congolensis</i>	<i>Aspergillus candidus</i>	<i>Candida lipolytica</i>
<i>B. circulans</i>	<i>Nocardiopsis</i> sp.	<i>A. flavus</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>
<i>B. firmus</i>	<i>N. dassonvillei</i>	<i>A. niger</i>	<i>Oerskovia xanthineolytica</i>
<i>B. lentus</i>	<i>Streptomyces moderatus</i>	<i>A. sojae</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>
<i>B. pumilus</i>	<i>S. diastaticus</i>	<i>Cephalosporium</i> sp. KSM 388	
<i>B. sphaericus</i>	<i>S. griseus</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	
<i>B. subtilis</i>	<i>S. corchorusii</i> ST36	<i>Paecilomyces marquandii</i>	
<i>Bacillus</i> sp.	<i>S. fradiae</i>	<i>Penicillium griseofulvum</i>	
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>S. pactum</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>	
<i>Thermus aquaticus</i>	<i>Thermoactinomyces</i> sp.	<i>Scedosporium apiospermum</i>	
<i>Staphylothermus marinus</i>		<i>Malbranchea pulchella</i>	
<i>Tolula thermophila</i>		<i>Tritirachium album</i>	
<i>Vibrio metschnikovi</i>		<i>Chrysosporium keratinophilum</i>	

ที่มา: สิริินภา (2550)

## 2.12 สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส (Inhibitor)

การยับยั้งเอนไซม์เป็นการศึกษาการยับยั้งที่เกี่ยวกับโครงสร้างและกลไกของเอนไซม์และเห็นได้ชัดเนื่องจาก สารซึ่งทำให้เอนไซม์ทำงานได้ช้าลง หรือหยุดการทำงาน เอนไซม์มีคุณสมบัติที่ตอบสนองต่อสารยับยั้งสารเคมีต่างๆ สารยับยั้งโปรติเอสเป็นสารในกลุ่มทริปซิน (trypsin) และสารยับยั้งไคโมทริปซิน (chymotrypsin) โดยจะมีน้ำหนักโมเลกุล 6000 – 10,000 ดาลตัน และมีพันธะไดซัลไฟด์ 7 คู่ ส่วนสารยับยั้งไคโมทริปซิน มีน้ำหนักโมเลกุล 20,000 ดาลตัน และมีพันธะไดซัลไฟด์ 2 คู่ ตามลำดับ สามารถพบสารยับยั้งโปรติเอสส่วนใหญ่ได้ในวัตถุดิบอาหารสัตว์กลุ่มพืชตระกูลถั่ว โดยเฉพาะถั่วเหลืองดิบจะพบในปริมาณที่สูงมาก (วัชโรบล, 2555) ซึ่งสามารถแบ่งรูปแบบการยับยั้งของเอนไซม์ออกเป็น 3 รูปแบบ (จิระพันธ์, 2011)

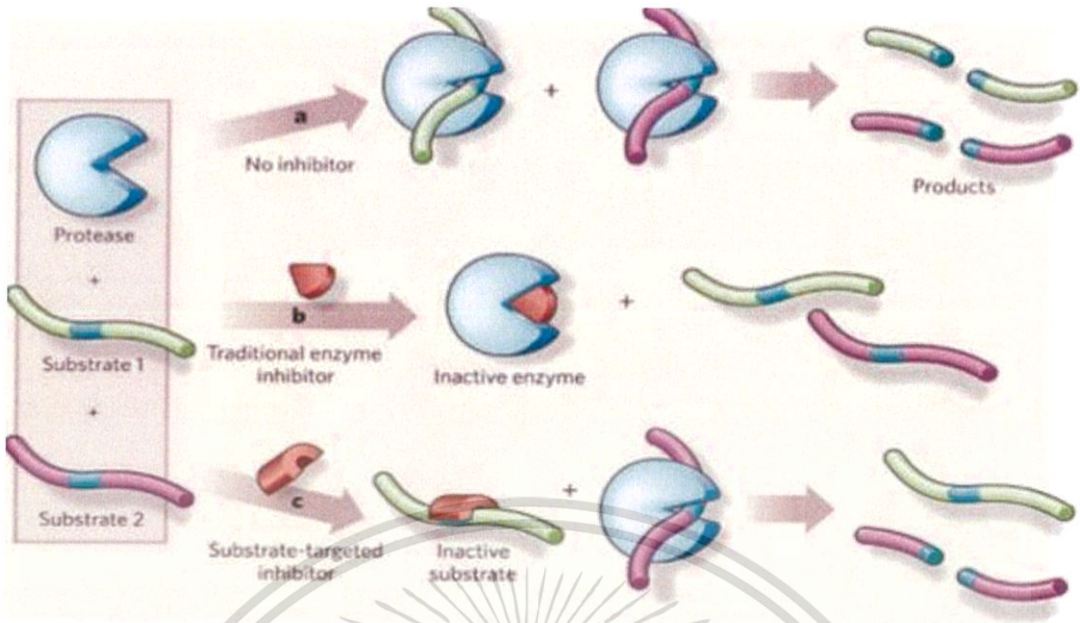
2.12.1. การยับยั้งแบบผันกลับไม่ได้ (Irreversible inhibition) ตัวยับยั้งเมื่อจับกับเอนไซม์แล้วอาจทำให้ซับสเตรทจับกับเอนไซม์ไม่ได้ตัวอย่างคือ diisopropylfluorophosphate (DFP) ซึ่งยับยั้งเอนไซม์ที่มีกลุ่มซีรีน เช่นเดียวกับ acetylcholinesterase อีกตัวอย่างหนึ่งคือโลหะหนักเช่น ตะกั่วหรือปรอทซึ่งทำปฏิกิริยากับกลุ่ม SH ในตำแหน่ง active site และจะไปทำลาย activity ของ E (จิระพันธ์, 2011) เอนไซม์ มีการใช้ประโยชน์ในการใช้งานเช่น clavulanic acid ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่สำคัญเนื่องจากยับยั้งการทำงานของ B-lactamases

### 2.12.2 การยับยั้งแบบทวนกลับ (Reversible inhibition)

2.12.2.1 การยับยั้งแบบแข่งขัน (Competitive inhibition) เกิดจากการที่ตัวยับยั้งจับกับเอนไซม์ได้เช่นเดียวกับซับสเตรท เพราะตัวยับยั้งนั้นมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับซับสเตรท จึงแย่งจับกับเอนไซม์นี้ ตัวยับยั้งจับกับเอนไซม์กลายเป็น EI ซึ่งไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาต่อไปได้ ขณะที่ซับสเตรทจับกับเอนไซม์แล้วได้ผลิตภัณฑ์ การยับยั้งแบบแข่งขันนี้ ทั้งซับสเตรทและตัวยับยั้งจะแข่งขันกันจับกับเอนไซม์การแก้ไขตัวยับยั้งแบบแข่งขันโดยการเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรท

2.12.2.2 การยับยั้งแบบไม่แข่งขันแบบที่ 1 (Non-competitive inhibition) เช่น  $Ag^+$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  จะจับกับ -SH ของ cysteine หรือ  $CN^-$  จับกับ iron porphyrin (heme) ของ cytochrome oxidase ไปยับยั้งการทำงาน สามารถแก้ไขได้โดยเติมสารไปจับ I เหล่านี้ให้หลุดจาก E ได้เช่น  $CN^-$ , ไปดึง metal ions ได้ I แบบนี้จะจับคนละตำแหน่งกับ active site ผลคือ  $K_m$  คงที่  $-V_{max}$  ลดลง

2.12.2.3 การยับยั้งแบบไม่แข่งขันแบบที่ 2 (Uncompetitive inhibition) พบน้อยมาก (เช่น hydrazine ยับยั้ง arylsulphatase) I แบบนี้จะจับกับ E ได้เฉพาะในรูป ES complex เท่านั้น ทำให้มีการลดลงทั้งค่า  $V_{max}$  และ  $K_m$



รูปที่ 2.10 แสดงการยับยั้งของเอนไซม์

ที่มา: <https://pt.slideshare.net/rasikawalunj1>

### 2.13 การประยุกต์ใช้เอนไซม์โปรติเอสในอุตสาหกรรม

โปรติเอสเป็นเอนไซม์กลุ่มที่สำคัญที่สุดของการนำเอนไซม์มาใช้ในอุตสาหกรรมประมาณ 60% ของตลาดเอนไซม์ทั้งหมด โปรติเอสมีมูลค่าเชิงพาณิชย์และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆอย่างแพร่หลาย เช่น การผลิตผงซักฟอก อาหาร อุตสาหกรรมยา และเครื่องหนัง เป็นต้น การนำเอนไซม์มาใช้ถือว่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ไม่เป็นพิษและไม่ก่อให้เกิดโรค (Sawnat and Nagendran, 2014)

#### 2.13.1 เอนไซม์โปรติเอสในอุตสาหกรรมอาหาร

อุตสาหกรรมอาหารเป็นอุตสาหกรรมหลักที่ใช้โปรติเอส (Sawnat and Nagendran, 2014) โปรติเอสบางชนิดถูกนำมาใช้ในการแปรรูปอาหารเป็นเวลาหลายศตวรรษมาแล้วและการค้นพบกิจกรรมต่างๆที่ได้หายไปในช่วงเวลาหนึ่ง Rennet (chymosin ส่วนใหญ่) ที่ได้จากกระเพาะอาหารส่วนที่ 4 (abomasum) ของลูกวัวระยะไม่หย่านมที่นำมาใช้เป็นแบบดั้งเดิมในการผลิตเนยแข็ง ในทำนองเดียวกัน papain พบได้ในใบและผลดิบของมะละกอ ยางมะละกอ (carica papaya) ได้ถูกนำมาใช้เพื่อทำให้เนื้อนุ่ม การค้นพบเหล่านี้ได้นำไปสู่การพัฒนาประยุกต์ใช้ในด้านอาหารต่างๆ สำหรับการนำโปรติเอสที่มาจากหลากหลายแหล่งและมักได้มาจากจุลินทรีย์

ในการทำเนยแข็งเป็นตัวอย่างของการย่อยสลายของพันธะเปปไทด์ที่เฉพาะเจาะจง ระหว่าง phenylalanine กับ methionine ของโปรตีนนม (เคซีน) ปฏิกิริยาของ k-casein ซึ่งเดิมแขวนลอยอยู่อย่างคงตัวในลักษณะคอลลอยด์ เมื่อโปรตีนถูกตัดสายพันธะเปปไทด์ ทำให้คอลลอยด์ไม่เสถียรแยกตัวเป็นตะกอน ผลผลิตที่คือนพารา-เคปป์-เคซีน (para-kappa-casein) หรือเคซีนสายสั้น เป็นตะกอนลิ่มนมที่ไม่ละลายน้ำ

กระบวนการ coagulation จะขึ้นอยู่กับ  $\text{Ca}^{2+}$  และอุณหภูมิสูง ( $Q_{10} = 11$ ) และสามารถควบคุมได้ง่าย ลูกวัวที่ไม่ย่อว้วส่วนใหญ่จะมี chymosin อยู่น้อย กว่าสัดส่วนของเปปซิน ซึ่งเอนไซม์มีราคาแพงเลยมีความพยายามที่จะหาเอนไซม์ที่มีความหลากหลายและหาทางเลือกที่ถูกกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่เชิงพาณิชย์ การค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยได้จากเชื้อจุลินทรีย์ โดยได้รับการพิสูจน์แล้วว่าประสบความสำเร็จเป็นอย่างมากและมีเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ rennets มาทำเนยแข็งประมาณ 70% ในอเมริกา และ 33% ในการผลิตเนยแข็งจากทั่วโลก (chaplin and bucke, 1990) นอกจากนี้เนยแข็งแล้ว ยังมีการนำมาแปรรูปปลาและอาหารทะเล เช่น ปลาปน การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ การแปรรูปโปรตีนจากสัตว์ทำให้การย่อยได้ดีขึ้น ลดความเป็นพิษ รสชาติดีขึ้นและเนื้อนุ่ม โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการปรับคุณสมบัติของโปรตีนในอาหาร ทำให้การย่อยได้ดีขึ้น คุณสมบัติทางกายภาพที่เปลี่ยนแปลงได้ เช่น การอิมัลชัน ความสามารถในการอุ้มน้ำ การจับกับไขมัน คุณสมบัติการเกิดฟอง เพิ่มรสชาติและความอร่อย การลดความหนืด (Williams, 2009)

การผลิตผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง โปรติเอสถูกนำมาใช้ตั้งแต่สมัยโบราณเพื่อเตรียมซีอิ๊ว และผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองอื่นๆ อัลคาไลน์ และ นิวทรัลโปรติเอส ของเชื้อรา มีบทบาทสำคัญในการแปรรูปซีอิ๊ว (naik, 2015)

อุตสาหกรรมเบเกอรี่ แป้งสาลีเป็นส่วนประกอบสำคัญของการอบ กระบวนการคือมันมีโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำเรียกว่า gluten ซึ่งจะเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติของแป้งเบเกอรี่ Endoproteinases และ exoproteinases จาก *Aspergillus oryzae* ถูกนำไปใช้ปรับเปลี่ยนโปรตีนจากข้าวสาลีด้วยวิธี proteolysis การเพิ่มโปรติเอสช่วยลดเวลาในการผสมแป้งและผลที่ได้คือเพิ่มปริมาณของผลิตภัณฑ์ แป้งที่เรียโปรติเอสถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงทำให้แป้งยืดและความแข็งของแป้งดีขึ้น (Sawnat and Nagendran, 2014)

#### 2.13.2 การใช้โปรติเอสในอุตสาหกรรมฟอกหนัง

อุตสาหกรรมเครื่องหนังมีส่วนที่สำคัญในผลิตภัณฑ์ของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสถูกนำมาใช้เพื่อกำจัดขนจากหนังสัตว์ กระบวนการนี้ปลอดภัยและมีความน่าพอใจมากกว่าวิธีดั้งเดิมที่มีการใช้โซเดียมซัลเฟตคือต้องมีการใช้เอนไซม์จำนวนมากและต้องมีการควบคุมกระบวนการอย่างใกล้ชิด เพื่อเลี่ยงการลดคุณภาพของการฟอกหนัง การกำจัดขนออกจากหนังสัตว์ เพื่อนำมาใช้ในการผลิตเครื่องหนังนุ่มๆ (chaplin and bucke, 1990)

#### 2.13.3 การใช้โปรติเอสในอุตสาหกรรมซักฟอก

อุตสาหกรรมผงซักฟอกได้เกิดขึ้นมีผู้บริโภคมากมายที่ใช้ไฮโดรไลติกเอนไซม์หลายชนิด ซึ่งทำปฏิกิริยาในช่วง pH เป็นต่าง การใช้โปรติเอสในผงซักฟอกมีอยู่ในตลาดต่างประเทศภายใต้ชื่อแบรนด์ที่หลากหลาย การใช้งานคือโปรติเอสเป็นสารเติมแต่งที่สามารถกำจัดคราบสกปรกของโปรตีน เอนไซม์ที่นำมาใช้ควรมีความเสถียรของค่าความกรดต่าง (pH) สูง และมีอุณหภูมิที่สูงกว่า 40 องศาเซลเซียส Phadatar และคณะ พบว่าอัลคาไลน์โปรติเอสจากเชื้อ *C. coronams* มีความเสถียรในสภาวะความเป็นต่าง 8.5 ที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส ซึ่งโปรติเอสสามารถย่อยสลายโปรตีนต่างๆได้ อีกทั้งยังกำจัดคราบเลือดได้อีกด้วย (Anwar and Saleemuddin, 1997)

#### 2.13.4 การใช้โปรติเอสในอุตสาหกรรมยา

ความหลากหลายและความจำเพาะของโปรติเอสเป็นข้อดีในการพัฒนาการรักษาโรคที่มีประสิทธิภาพ *Clostridial collagenase* หรือ *subtilisin* เป็นยาปฏิชีวนะในการรักษาแผลไฟไหม้และแผลเป็นหนอง *E. coli* ใช้ในการกำจัดแอสไพรินจากกระแสเลือดในรูปแบบของมะเร็งเม็ดเลือดขาว อัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Conidiobolus coronatus* สามารถแทนที่ trypsin ในเซลล์เพาะเลี้ยงสัตว์

#### 2.13.5 พันธุวิศวกรรมของจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์โปรติเอส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การโคลนยีนเป็นเทคโนโลยีที่ก้าวหน้าอย่างรวดเร็วเป็นเครื่องมือในการปรับปรุงโครงสร้างของระบบทางพันธุกรรมและเป็นวิธีที่ยอดเยียมสำหรับการจัดการและควบคุมยีนกว่า 50% ของเอนไซม์ที่สำคัญในอุตสาหกรรม ซึ่งจุลินทรีย์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมมาจากการดัดแปลงพันธุวิศวกรรม (RAO *et al.*, 1998)

## 2.14 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์สามารถวัดได้ในหน่วยต่างๆ เช่น วัดการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงต่อหน่วยเวลาต่อมิลลิกรัมโปรตีน แต่เพื่อความสะดวกจึงมีการกำหนดหน่วยในการวัดให้เป็นมาตรฐาน โดยหน่วยที่ใช้กันมากที่สุดคือยูนิต (unit) ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์จำเป็นต้องมีสารตั้งต้นที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา ซึ่งส่วนใหญ่นิยมวัดปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นมากกว่าปริมาณสารตั้งต้นที่ถูกย่อยสลายไป (อารี, 2555) ปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ได้แก่ ความเข้มข้นของสับเตรท ค่าความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิ ความคงทนต่อไอออน (Scopes, 2002) โดยยกตัวอย่างวิธีที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ สองวิธี

### 1) Azocasein method

วิธีนี้ยังคงเป็นหนึ่งในวิธีที่เชื่อถือได้มากที่สุดในการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เนื่องจากความเสถียรของสีไม่ต้องใช้ chromogenic reagents (Coelho *et al.*, 2016) หลักการคือเมื่อเกิดการย่อยโปรตีนในสับเตรทจะทำให้เห็นเป็นสีส้ม เมื่อเกิดการย่อยโปรตีนจะมีการแยกออกของ azocasein สารละลายสีส้มจะถูกปลดปล่อยออกมา หลังจากบ่มเป็นระยะเวลา 5 นาที ถึง 24 ชั่วโมง และจะหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมกรด trichloroacetic (TCA) ซึ่งจะทำให้โปรตีนย่อยสลาย จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร (Hoef *et al.*, 2011)

### 2) Folin ciocalteu method

วิธีการนี้ใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับวัดความเข้มข้นของสี (colorimetric determination) ที่เกิดจากปฏิกิริยาเคมีระหว่างโปรตีนกับสารที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร โดยเทียบปริมาณกับสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนแล้ว เช่นสารละลายโปรตีนมาตรฐานโดย bovine serum albumin ซึ่งวิธีนี้หาปริมาณโปรตีนได้ด้วยความเข้มข้นระดับไมโครกรัม และเป็นที่ทราบกันดีว่า Folin-Ciocalteu ไม่เพียงแต่ตอบสนองกับฟีนอลแต่ยังตอบสนองกับสารอื่นๆได้หลากหลาย (IKAWA *et al.*, 2003) การใช้ Folin ciocalteu โดยสารนี้จะถูกรีดิวซ์โดยไทโรซีน (tyrosine) และทริปโตเฟน (tryptophane) ที่เหลืออยู่ในสารเชิงซ้อนคอปเปอร์โปรตีนได้เป็นเฮตเตอโรโพลีเมอร์บลู (heteropolymolyptdenum blue) ซึ่งเป็นสารละลายสีน้ำเงิน (อารี, 2555)

## 2.15 ฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของแอกติโนมัยซีท

แอกติโนมัยซีทเป็นจุลินทรีย์กลุ่มสำคัญที่สามารถสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่มีคุณสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้อย่างหลากหลาย โดยสารเหล่านี้มีผลในการยับยั้งการเจริญ หรือทำลายเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งได้แก่ สารปฏิชีวนะต่อต้านเชื้อรา (antifungal drug) เชื้อแบคทีเรีย (antibacterial drug) เชื้อไวรัส (antiviral drug) นอกจากนี้ยังสามารถผลิตสารต้านมะเร็ง (antitumoral drug) สารกดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressants) รวมถึงสารลดความดัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โลหิต (antihypertensive drug) ซึ่งก่อให้เกิดประโยชน์ต่อด้านการแพทย์และเภสัชกรรม (Procópio *et al.*, 2012)

สารปฏิชีวนะหรือสารต้านจุลชีพ (antibiotic) เป็นสารอินทรีย์ที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ก่อโรคหรือชะลอการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ ซึ่งได้แก่ยาต้านแบคทีเรีย ยาต้านเชื้อรา ยาต้านเชื้อไวรัส รวมถึงยาต้านปรสิต โดยมักเป็นสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก และมีมวลโมเลกุลน้อย

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพส่วนมากถูกสร้างขึ้นจากแอคติโนมัยซีท โดยเฉพาะสารปฏิชีวนะพบว่าประมาณร้อยละ 80 ของสารปฏิชีวนะที่ใช้ในด้านการแพทย์ผลิตจากแอคติโนมัยซีท โดยสกุล *Streptomyces* เป็นแอคติโนมัยซีทกลุ่มสำคัญ เนื่องจากสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุด เช่น เตตราไซคลิน (tetracycline) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ มีกลไกการออกฤทธิ์ด้วยการแทรกแซงการสังเคราะห์โปรตีน นอกจากนี้สเตรปโตไมซิน (streptomycin) ที่ผลิตโดย *S. griseus* มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิด และใช้ในการรักษาโรคฉี่หนู ส่วน *S. fradiae* สามารถผลิตนีโอมัยซิน (neomycin) ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้หลายชนิด และนีสเตติน (nystatin) ซึ่งผลิตจาก *S. noursei* ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อรา โดยการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (Mason *et al.*, 2013)

ตารางที่ 2.2 จำนวนของออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถผลิตจากแอคติโนมัยซีทในแต่ละสกุล

สกุลของแอคติโนมัยซีท	จำนวนของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (ชนิด)
<b>Streptomycetaceae:</b>	
<i>Streptomyces</i>	8000
<i>Streptoverticillium</i>	258
<i>Kitasatosporia</i>	37
<i>Chainia</i>	30
<b>Micromonosporaceae: (Actinoplanetes)</b>	
<i>Micromonospora</i>	740
<i>Actinoplanes</i>	248
<i>Dactylosporangium</i>	58
<b>Pseudonocardiaceae:</b>	
<i>Saccharopolyspora</i>	131
<i>Amycalotopsis/ Nocardia</i>	120/ 357
<i>Kibdellosporangium</i>	34
<i>Pseudonocardia</i>	27
<b>Streptosporangiaceae: (Madulomycetes)</b>	
<i>Streptosporangium</i>	79
<i>Streptoalloteichus</i>	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 จำนวนของออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถผลิตจากแอคติโนมัยซีทในแต่ละสกุล

สกุลของแอคติโนมัยซีท	จำนวนของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (ชนิด)
<b>Thermomonosporaceae:</b>	
<i>Actinomodura</i>	345
<i>Saccharothrix</i>	68
<i>Microbispora</i>	54
<i>Actinosynnema</i>	51
<b>Mycobacteriaceae: (Actinobacteria)</b>	
<i>Nocardia</i>	357
<i>Mycobacterium</i>	57
<i>Arthrobacter</i>	25

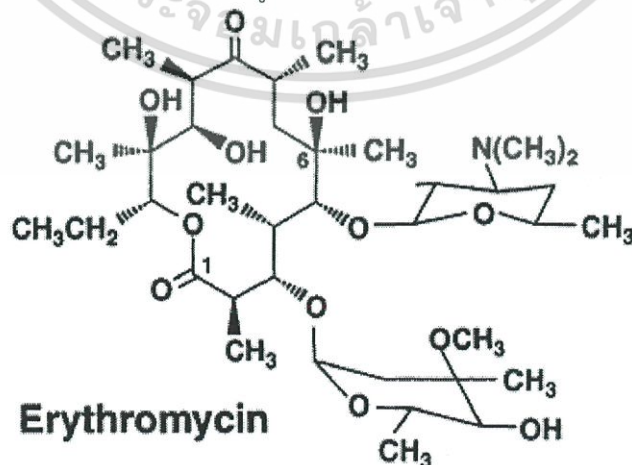
ที่มา: Raja and Prabakarana (2011)

### 2.16 ประเภทของสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากแอคติโนมัยซีท

สารปฏิชีวนะสามารถแบ่งออกเป็น 5 ประเภท ตามความแตกต่างกันของลักษณะโครงสร้างเคมี คือ สารปฏิชีวนะกลุ่มแมโครไลด์ อะมิโนไกลโคไซด์ เตตราไซคลิน คลอแรมฟินิคอล และพอลิเอน

#### 1) สารปฏิชีวนะกลุ่มแมโครไลด์ (macrolide)

สารปฏิชีวนะกลุ่มแมโครไลด์ที่มีการใช้และรู้จักอย่างแพร่หลายคือ อิริโทรมัยซิน (erythromycin) ซึ่งโครงสร้างทางเคมีของยานี้ประกอบด้วย วงแหวนแลคโตน (lactone ring) 14 วง มีศูนย์กลางไครัล (chiral center) จำนวน 10 ตำแหน่ง และเชื่อมต่อกับน้ำตาลอะมิโน 2 โมเลกุล คือ L-cladinose และ D-desosamine มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบบางชนิด นอกจากนี้ยังสามารถต้านสไปโรซิตที่ก่อโรค ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ได้อย่างกว้างคล้ายกับสารปฏิชีวนะเพนิซิลลิน แต่ต่างกันว่าสารปฏิชีวนะชนิดนี้ไม่สามารถทำลายด้วยเพนิซิลลินเนสได้ สารปฏิชีวนะอิริโทรมัยซินสามารถผลิตได้จากแอคติโนมัยซีท *Streptomyces erythreus* (Weber et al., 1985) โครงสร้างทางเคมีของอิริโทรมัยซิน แสดงดังรูปที่ 2.11



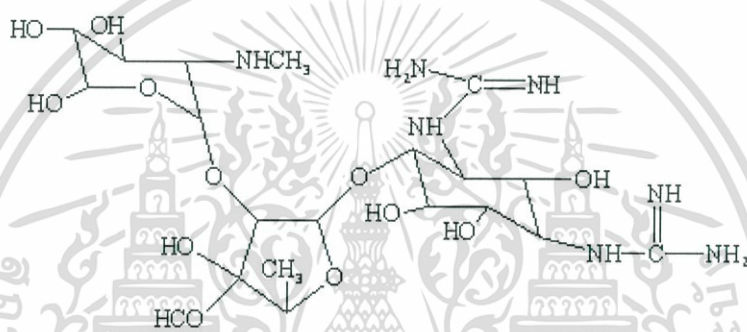
รูปที่ 2.11 โครงสร้างทางเคมีของอิริโทรมัยซิน (erythromycin)

ที่มา: Alvarez-Elcoro and Enzler (1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2) สารปฏิชีวนะกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ (aminoglycoside)

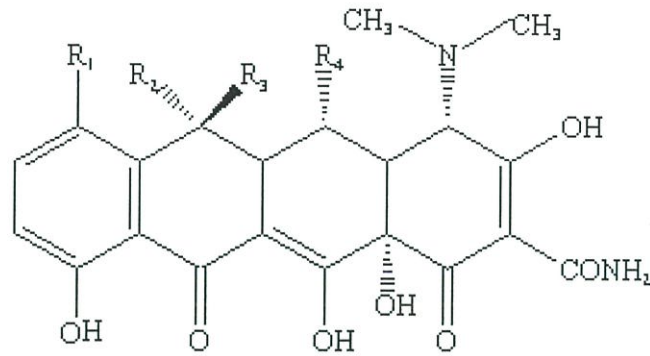
อะมิโนไกลโคไซด์ เป็นกลุ่มของสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรียด้วยการจับกับไรโบโซม สารในกลุ่มนี้มีโครงสร้างทางเคมีที่ประกอบด้วยน้ำตาลอะมิโนและโครงสร้างวงแหวนที่เรียกว่า อะมิโนไซคลิทอล (aminocyclitol) ซึ่งสารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ที่มีการใช้และรู้จักอย่างแพร่หลายคือ เจนตามิซิน (gentamicin) ผลิตจาก *Micromonospora purpurea* และ *M. echinospora*, กานาไมซิน (kanamycin) ผลิตโดย *Streptomyces kanamyceticus*, นีโอไมซิน (neomycin) ผลิตจาก *S. fradiae* และสเตรปโตไมซิน (streptomycin) ผลิตโดย *S. griseus* ซึ่งมีการค้นพบสารปฏิชีวนะชนิดนี้ในปี ค.ศ. 1944 โดยเซลแมน แวกสแมนและคณะ ก่อให้เกิดประโยชน์ในด้านการแพทย์เพราะมีผลในการต้านแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิด และใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อวัณโรค (Zumla *et al.*, 2013) โครงสร้างทางเคมีของสเตรปโตไมซิน (streptomycin) แสดงดังรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.12 โครงสร้างทางเคมีของสเตรปโตไมซิน (streptomycin)  
ที่มา: Todar (2008)

## 3) สารปฏิชีวนะกลุ่มเตตราไซคลิน (tetracycline)

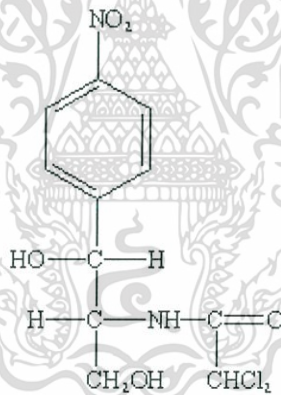
สารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ได้แก่ เตตราไซคลิน (tetracycline) ออกซิเตตราไซคลิน (oxytetracycline) คลอโรเตตราไซคลิน (chlortetracycline) มินอไซคลิน (minocycline) และดอกซีไซคลิน (doxycycline) สารทุกชนิดล้วนมีวงแหวนแนฟทาลีน (naphthalene ring) เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างทางเคมี แต่แตกต่างกันที่หมู่เคมีที่จับกับวงแหวน ซึ่งเตตราไซคลินมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ มีกลไกการออกฤทธิ์ด้วยการแทรกแซงการสังเคราะห์โปรตีน สามารถผลิตได้จากแอคติโนมัยซีตสกุล *Streptomyces* หลายสปีชีส์ (Asagbra *et al.*, 2005) โครงสร้างทางเคมีของสารปฏิชีวนะกลุ่มเตตราไซคลิน (tetracycline) แสดงดังรูปที่ 2.14



รูปที่ 2.13 โครงสร้างทางเคมีของสารปฏิชีวนะกลุ่มเตตราไซคลิน (tetracycline)  
ที่มา: Todar (2008)

4) สารปฏิชีวนะกลุ่มคลอแรมฟินิคอล (chloramphenicol)

สารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้มีโครงสร้างทางเคมีที่ง่ายเมื่อเปรียบเทียบกับสารปฏิชีวนะกลุ่มอื่นๆ สามารถออกฤทธิ์ได้อย่างกว้างขวาง โดยการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ผลิตได้จาก *Streptomyces venezuelae* ใช้ในการรักษาโรคไข้ไทฟอยด์ (Sood, 2016) โครงสร้างทางเคมีของสารปฏิชีวนะกลุ่มคลอแรมฟินิคอล (chloramphenicol) แสดงดังรูปที่ 2.15

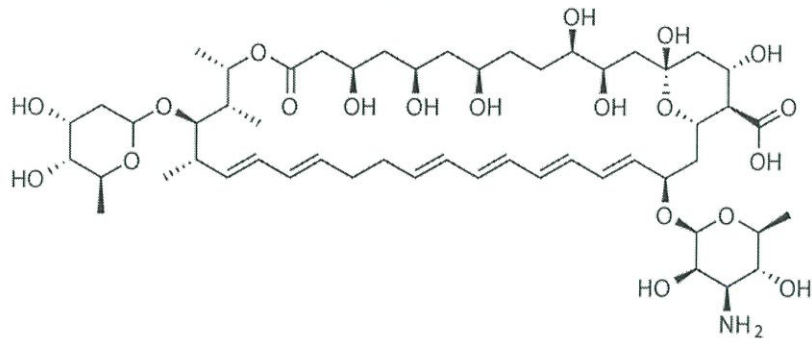


รูปที่ 2.14 โครงสร้างทางเคมีของสารปฏิชีวนะกลุ่มคลอแรมฟินิคอล (chloramphenicol)  
ที่มา: Todar (2008)

5) สารปฏิชีวนะกลุ่มพอลิเอน (polyene)

สารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้มีโครงสร้างทางเคมีเป็นสารประกอบขนาดใหญ่ ประกอบด้วยอะตอมคาร์บอนเชื่อมต่อกับพันธะโควาเลนต์คู่ ซึ่งสารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ที่มีการใช้และรู้จักอย่างแพร่หลายคือ แอมโฟเทอริซิน (amphotericin) ผลิตโดย *Streptomyces nodosus* และนีสเททิน (nystatin) ผลิตจาก *S. noursei* ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อรา โดยเฉพาะบริเวณปากผิวหนัง และการติดเชื้อ *Candida* ที่ช่องคลอด โดยการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (Mason et al., 2013) โครงสร้างทางเคมีของนีสเททิน (nystatin) แสดงดังรูปที่ 2.16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.15 โครงสร้างทางเคมีของนีสเททิน (nystatin)

ที่มา: Todar (2008)

## 2.17 กลไกการออกฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะ

สารปฏิชีวนะที่แอกติโนมัยซีทผลิตได้มีฤทธิ์ในการทำลายจุลินทรีย์หรือเชื้อก่อโรคต่างๆได้หลายวิธี ได้แก่ ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและกรดนิวคลีอิก และทำลายเยื่อหุ้มเซลล์

### 1) ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์

สารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ มีกลไกการทำงานโดยการแทรกแซงการทำงานของเอนไซม์ เพื่อยับยั้งการสร้างเพปทิโดไกลแคนซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรีย หากขาดเพปทิโดไกลแคน จะส่งผลให้แบคทีเรียสูญเสียความแข็งแรงที่โอบล้อมเซลล์ เมื่อดูดน้ำเข้าไปมากจะทำให้เซลล์บวม และแตกตายในที่สุด สารปฏิชีวนะที่มีกลไกการออกฤทธิ์เช่นนี้คือ สารในกลุ่มเบต้าแล็กแทม ได้แก่ เซฟาโลสปอริน (cephalosporin) และเพนิซิลลิน (penicillin) ทั้งสองชนิดมีกลไกการทำงานโดยยับยั้งในขั้นตอนการสร้างโครงข่ายเชื่อมโยงระหว่างลูกโซ่เพปทิโดไกลแคน ส่งผลให้แบคทีเรียไม่สามารถสร้างความแข็งแรงและไม่กลายเป็นผนังเซลล์ในที่สุด (Neu and Gootz, 1996)

### 2) ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและกรดนิวคลีอิก

สารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและกรดนิวคลีอิก มีกลไกการทำงานโดยการแทรกแซงการทำงานของปฏิกิริยาชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีน ดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ ซึ่งสารปฏิชีวนะสำคัญที่มีกลไกการออกฤทธิ์เช่นนี้คือ ไรฟาไมซิน (rifamycin) มีผลยับยั้งเอนไซม์ดีเอ็นเอ ดีเพนเดนต์ อาร์เอ็นเอ พอลิเมอเรส (DNA dependent RNA polymerase) ส่งผลให้เกิดการหยุดสังเคราะห์โปรตีน ส่วนเตตราไซคลิน (tetracycline) โดยจะรวมตัวเข้ากับหน่วยย่อย 30S ของไรโบโซม ส่งผลให้โมเลกุลของกรดอะมิโน-ทีอาร์เอ็นเอ (amino acid-tRNA) ไม่สามารถเกาะติดกับเอ็มอาร์เอ็นเอ-ไรโบโซม (mRNA-ribosome) ได้ และอิริโทรมัยซิน (erythromycin) จะรวมตัวกับหน่วยย่อย 50S ของไรโบโซม ส่งผลให้กรดอะมิโนไม่สามารถเชื่อมต่อกันเป็นโปรตีนได้ (Champney and Burdine, 1995)

### 3) ออกฤทธิ์ต่อเยื่อหุ้มเซลล์

สารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์เยื่อหุ้มเซลล์ มีกลไกการทำงานโดยทำให้ฟอสโฟลิปิดซึ่งเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์เสื่อมสลาย ส่งผลให้คุณสมบัติการเป็นเยื่อเลือกผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย ทำให้ของเหลวและสารที่จำเป็นซึมออกมานอกเซลล์ เป็นผลให้เซลล์ตายในที่สุด สารปฏิชีวนะสำคัญที่มีกลไกการออกฤทธิ์เช่นนี้คือ สารในกลุ่มพอลิเอน (polyene) ได้แก่ นีสเททิน (nystatin)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ การใช้งานเพื่อวัตถุประสงค์อื่นโดยไม่ได้รับอนุญาตจะถือว่าผิดกฎหมาย  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และแอมโฟเทอริซิน บี (amphotericin B) ส่งผลต่อสเตอรอลซึ่งเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ ไม่มีผลต่อแบคทีเรีย เนื่องจากแบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่มีสเตอรอลเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ แต่ส่งผลต่อรา ยีสต์ และสัตว์ที่มีสเตอรอลเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (Neu and Gootz, 1996)

## 2.18 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ

สารปฏิชีวนะหรือสารสกัดที่ผลิตโดยแอคติโนมัยซีท แต่ละชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้แตกต่างกันตามชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ สารปฏิชีวนะบางกลุ่มออกฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ในวงกว้าง แต่สารปฏิชีวนะบางกลุ่มมีลักษณะที่จำเพาะออกฤทธิ์ยับยั้งต่อจุลินทรีย์บางชนิด จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีการทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะในเบื้องต้นก่อนนำไปใช้จริงต่อไป

ประเภทของการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ (เลิศพงษ์, 2548)

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทำได้หลายวิธี โดยสามารถแบ่งเป็นวิธีการหลักๆ ได้ 2 วิธี คือ Diffusion test และ Dilution test

- 1) Diffusion test เป็นการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ ที่สามารถทำได้ง่าย และประหยัด เป็นการทดสอบที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย โดยประเมินผลจากขนาดของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) สามารถแบ่งออกเป็น Disc diffusion method และ Agar well diffusion method

### 1.1) Disc diffusion method (เลิศพงษ์, 2548)

การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพสามารถทำได้หลายวิธี แต่วิธีที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายคือ วิธี Disc diffusion method เนื่องจากประหยัด สะดวก และใช้ระยะเวลาสั้นกว่าวิธีอื่น ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีเชิงคุณภาพ (qualitative test) เนื่องจากไม่สามารถทราบความเข้มข้นต่ำสุดของสารปฏิชีวนะหรือสารสกัดที่ต้องการทดสอบ โดยอาศัยการแพร่ของสารสกัดออกมาครอบแผ่นทดสอบ (disc) ซึ่งมีชั้นตอนคือ ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ที่จะใช้ในการทดสอบ จากนั้นถ่ายเชื้อลงใน normal saline solution โดยปรับความขุ่นของเชื้อให้ได้เท่ากับ 0.5 และ 0.2 McFarland standard นำไม้พินสำลีปลอดเชื้อจุ่มเชื้อทดสอบ ทำการ swab ให้ทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วทิ้งไว้นาน 15 นาที จากนั้นเตรียมสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ หยดลงบนแผ่นทดสอบ รองนแห้ง จึงคืบมาวางบนผิวหน้าอาหารนำไปบ่มและตรวจวัดผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone)

### 1.2) Agar well diffusion method (Sadeghi-Nejad and Azish, 2013)

ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ที่จะใช้ในการทดสอบเป็นเวลานาน 18-24 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ จากนั้นถ่ายเชื้อลงใน normal saline solution โดยปรับให้ได้ระดับความขุ่น 0.5 และ 0.2 McFarland standard นำไม้พินสำลีปลอดเชื้อจุ่มเชื้อทดสอบ ทำการ swab ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar (MHA) สำหรับแบคทีเรีย และอาหาร Saburaund dextrose agar (SDA) สำหรับยีสต์ จากนั้นเจาะรูอาหารขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตรด้วย cork borer แล้วเติมสารสกัดที่ต้องการทดสอบลงในหลุม และใช้ยาปฏิชีวนะมาตรฐานเป็นชุดควบคุม นำไปบ่มและตรวจวัดผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone)

### 2) Dilution test (สุรวินท์, 2545)

การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพด้วยวิธีนี้ เป็นการทดสอบเชิงปริมาณ (quantitative test) เนื่องจากทำให้สามารถทราบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารปฏิชีวนะหรือสารสกัดที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) โดยการเจือจางสารสกัดลงในหลอดทดลองที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปเผยแพร่เป็นการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรจุอาหารเหลว โดยให้ความเข้มข้นของสารสกัดลงแบบ two fold dilution เช่น 4.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นต้น จากนั้นเติมเชื้อทดสอบลงไปปริมาณเท่าๆกันทุกหลอดนำไปบ่ม 18 ถึง 24 ชั่วโมง จากนั้นอ่านผลโดยตรวจผลจากหลอดที่มีความเข้มข้นของสารสกัดต่ำสุดและใส เนื่องจากไม่มีการเจริญของเชื้อทดสอบ นั่นคือค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ (MIC)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 เครื่องมือ

3.1.1 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)	TOMY รุ่น ES-315, JAPAN
3.1.2 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)	TELSTAR รุ่น Bio-II-Advance 4 TECHNOLOGY, Spain
3.1.3 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator) 30 องศาเซลเซียส	N-Biotech รุ่น NB-205Q
3.1.4 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator) 37 องศาเซลเซียส	Memmert รุ่น INB 500
3.1.5 ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่า (Incubator shaker) 30 องศาเซลเซียส	Unitron
3.1.6 ตู้อบด้วยความร้อนแห้ง (Hot air oven) 100 องศาเซลเซียส	Memmert รุ่น INB500
3.1.7 ตู้อบด้วยความร้อนแห้ง (Hot air oven) 180 องศาเซลเซียส	Memmert รุ่น UN110
3.1.8 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	Memmert
3.1.9 ตู้แช่แข็งระบบน้ำ	Panasonic SF-PC697
3.1.10 ตู้เย็น -4 องศาเซลเซียส	Distar freezer & Refrigerator รุ่น DR-082
3.1.11 ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส	PANASONIC รุ่น SF-PC697, Thailand
3.1.12 เครื่องปั่นแยกสาร (Centrifuge)	Hermle รุ่น Z 326 K, Germany
3.1.13 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex)	Scientific Industries รุ่น Vortex-Genie 2, 230VG56E
3.1.14 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)	SHIMADZU รุ่น UV-1601
3.1.15 เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter)	OHAUS รุ่น STARTER 3000, USA
3.1.16 เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter) เคลื่อนที่	SevenGo pro รุ่น SG-28
3.1.17 กล้องจุลทรรศน์	OLYMPUS รุ่น CH3, Japan
3.1.18 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	AND รุ่น GF-800, Japan
3.1.19 เครื่องไมโครเวฟ (Microwave)	Sharp รุ่น R-250
3.1.20 เครื่องปั๊มสุญญากาศ (Vacuum pump)	Gast รุ่น 0523-101QG588DX
3.1.21 เครื่องระเหยสุญญากาศ (Evaporator)	HEIDOLPH, Germany

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 3.2 อุปกรณ์

- 3.2.1 ห่วงเขี่ยเชื้อและเข็มเขี่ยเชื้อ (Loop and Needle)
- 3.2.2 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.2.3 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
- 3.2.4 หลอดทดลองและฝาปิด
- 3.2.5 ที่วางหลอดทดลอง (Test tube rack)
- 3.2.6 สไลด์และกระจกปิดสไลด์
- 3.2.7 ปิเปตและเครื่องดูดจ่ายสารละลาย (Pipette and Autopipette)
- 3.2.8 ลูกยางและทิวป์ (Pipette bulb and Tips)
- 3.2.9 ขวดฉีดย้ำกลั่น
- 3.2.10 ขวดฉีดย้ำแอลกอฮอล์
- 3.2.11 หลอดหยดสาร (Dropper)
- 3.2.12 ปีกเกอร์ (Beaker)
- 3.2.13 กระจกบอทวง (Cylinder)
- 3.2.14 ซ้อนตักสาร
- 3.2.15 แท่งแก้วคนสาร
- 3.2.16 แท่งแก้วรูปตัวแอล (Spreader)
- 3.2.17 ขวดรูปชมพู
- 3.2.18 ขวดแก้วเล็ก (Vial)
- 3.2.19 ขวดแก้วฟลาเกสตีว (Schott Duran)
- 3.2.20 เหล็กคีบ (Forcep)
- 3.2.21 แอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95
- 3.2.22 กระดาษกรอง Whatman No.1
- 3.2.23 แผ่น Paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร
- 3.2.24 Eppendorf tube
- 3.2.25 หลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge tube)
- 3.2.26 เวอร์เนียคาลิเปอร์ (Vernier caliper)
- 3.2.27 ชุดกรองสุญญากาศ (Vacuum filter set)
- 3.2.28 โถดูดความชื้น (Desiccator)
- 3.2.29 กระดาษทิชชู
- 3.2.30 กระดาษซังสาร
- 3.2.31 กระดาษฟอยล์
- 3.2.32 สำลีและผ้าก๊อซ
- 3.2.33 ไม้พันสำลี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.3 สารเคมี

3.3.1	วุ้น (Agar)	บริษัท Bio Agar
3.3.2	แอมโมเนียมซัลเฟต ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) MW 132.14 g/mol	บริษัท Merck
3.3.3	เคซีน (Casein)	บริษัท Fluka
3.3.4	เคซีน เอนไซม์มาติก ไฮโดรไลเซท (Casein enzymatic hydrolysate)	บริษัท Himedia
3.3.5	แคลเซียมคาร์บอเนต ( $\text{CaCO}_3$ ) MW 100.0869 g/mol	บริษัท Carlo erba
3.3.6	เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) MW 278.0146 g/mol	บริษัท Fluka
3.3.7	เจลาติน (Gelatin)	บริษัท Ajex Finechem
3.3.8	กลูโคส (Glucose) MW 180.1559 g/mol	บริษัท Fluka
3.3.9	แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ) MW 246.4746 g/mol	บริษัท Univar
3.3.10	สารสกัดจากมอลต์ (Malt extract)	บริษัท Himedia
3.3.11	แมงกานีสคลอไรด์เฮปตะไฮเดรต ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ) MW 197.90 g/mol	บริษัท Univar
3.3.12	เปปโตน (Peptone)	บริษัท Srichem
3.3.13	โพแทสเซียมไนเตรท ( $\text{KNO}_3$ ) MW 101.11 g/mol	บริษัท Fluka
3.3.14	หางนมผง (Skim milk powder)	บริษัท Himedia
3.3.15	โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) MW 58.44 g/mol	บริษัท Univar
3.3.16	สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) MW 40 g/mol	บริษัท Fisher
3.3.17	แป้งที่ละลายน้ำได้ (Soluble starch)	บริษัท Srichem
3.3.18	ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) MW 174.18 g/mol	บริษัท Univar
3.3.19	สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	บริษัท Scharlau
3.3.20	ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ) MW 287.54 g/mol	บริษัท Fluka
3.3.21	แอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 70 และ 95 (v/v)	
3.3.22	กลีเซอรอล	
3.3.23	สารละลายแกรมไอโอดีน	
3.3.24	สารละลายกรดซัลฟานิลิก	
3.3.25	สารละลาย N,N-dimethyl-L-naphthylamine	
3.3.26	Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)	
3.3.27	Phenyl methyl sulphonyl fluoride (PMSF)	

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่จัดทำขึ้นโดยคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.28 1,10-phenanthroline hydrate ( $C_{12}H_8N_2$ )

3.3.29 Potassium permanganate ( $KMnO_4$ )

### 3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.4.1 Starch casein agar (SCA)

3.4.2 Yeast extract-malt extract agar (YEME agar)

3.4.3 Yeast extract-malt extract broth (YEME broth)

3.4.4 International Streptomyces Project medium no.2 (ISP medium no. 2)

3.4.5 Inorganic salts starch agar (ISP medium no.4)

3.4.6 Bouillon gelatin broth

3.4.7 Peptone  $KNO_3$  broth

3.4.8 Peptonization and Coagulation test medium

3.4.9 Skim milk agar

3.4.10 Mueller-Hinton agar (MHA)

3.4.11 Sabourand dextrose agar (SDA)

### 3.5 เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

3.5.1 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

3.5.1.1 *Bacillus subtilis* ATCC 6633

3.5.1.2 *Escherichia coli* ATCC 25922

3.5.1.3 *Micrococcus luteus* TISTR 2374

3.5.1.4 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

3.5.1.5 *Staphylococcus aureus* TISTR 118

3.5.2 ยีสต์ที่ใช้ในการทดสอบ

3.5.2.1 *Candida albicans* ATCC 90028

### 3.6 วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.6.1 การเก็บตัวอย่างดิน (Klanbut, 2013)

เลือกเก็บตัวอย่างดินนาเกลือจากตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี ในลักษณะแบบสุ่มรูปพื้นปลา เพื่อกระจายการเก็บตัวอย่างดินให้ทั่วถึง โดยกวาดเศษกิ่งไม้บริเวณผิวหน้าดินออก จากนั้นขุดดินลึกลงไปจากหน้าดิน 2-3 เซนติเมตร ใช้ช้อนปลูกตักดินประมาณ 500 กรัม ใส่ลงในถุงพลาสติกใส โดยไม่รัดปากถุง จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงในหลุมทิ้งไว้นาน 30 นาที และวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของดินด้วยเครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter) โดยเลือกเก็บตัวอย่างดินจำนวน 10 จุด พร้อมบันทึกตำแหน่งของแต่ละจุดที่เก็บตัวอย่างดินและวาดภาพตามลักษณะที่เก็บ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.6.2 การคัดแยกเชื้อแอสคิโนมัยซีท (Jose and Jebakuma, 2013)

นำตัวอย่างดินที่เก็บจากแปลงนาเกลือ (ข้อ 3.6.1) มาคัดแยกเชื้อแอสคิโนมัยซีทโดยนำตัวอย่างดินมาเกลี่ยลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้เต็มจานเพาะเชื้อ แล้วผึ่งให้แห้งด้วยลมธรรมชาติ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน นำไปบดที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นชั่งน้ำหนักดิน 1 กรัม แล้วบดให้ละเอียดด้วยโกร่ง ใส่ลงในหลอดที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เข้มข้นร้อยละ 1 (ระดับความเจือจาง  $10^{-1}$ ) จากนั้นนำตัวอย่างดินที่ระดับความเจือจาง  $10^{-1}$  ทำส่วนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่องผสมสารละลาย (Vortex) จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปบดที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) นาน 6 นาที แล้วนำตัวอย่างดินที่ระดับความเจือจาง  $10^{-1}$  ไปทำการเจือจางต่อจนถึงระดับความเจือจางที่  $10^{-3}$  โดย  $10^{-2}$  และ  $10^{-3}$  ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นนำตัวอย่างดินที่ระดับความเจือจาง  $10^{-2}$  และ  $10^{-3}$  ไปบดที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) นาน 6 นาที เมื่อทำการเจือจางตัวอย่างเรียบร้อยแล้วให้นำตัวอย่างที่ระดับความเจือจางที่  $10^{-2}$  ถึง  $10^{-3}$  มาทำ spread plate technique ลงบนอาหาร Starch casein agar (SCA) ที่มีการเติม โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เข้มข้นร้อยละ 4.6 โดยอาหารจะมีการเติมยานีสเททิน (nystatin) เพื่อดำเนินการเจริญของเชื้อรา ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่ออาหาร 100 มิลลิตร ทำอย่างละ 2 ซ้ำ และนำไปเพาะเลี้ยงเชื้อแอสคิโนมัยซีทโดยการบดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 ถึง 14 วัน ขึ้นอยู่กับการเจริญของเชื้อแต่ละไอโซเลต

### 3.6.3 การศึกษาการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยซีทที่ความเข้มข้นของเกลือต่างๆ (Jose and Jebakuma, 2013)

นำเชื้อแอสคิโนมัยซีทบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากข้อ 3.6.2 มาศึกษาระดับความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมที่สุดในการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยซีทที่แยกได้จากดินนาเกลือโดยนำโคโลนีเดี่ยวที่ได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Starch casein agar (SCA) ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ร้อยละ 3, 5, 7, 9, 12 และ 15 จากนั้นนำไปบดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน และตรวจดูการเจริญของเชื้อ

### 3.6.4 การหาสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่างดิน (วสุ, 2554)

#### 3.6.4.1 การหาน้ำหนักดิน

เทสารแขวนลอยของดินความเจือจางตัวอย่างที่  $10^{-1}$  ที่เหลือจากการเจือจาง ลงในบีกเกอร์ที่ทราบน้ำหนัก นำบีกเกอร์ไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนน้ำระเหยหมดและน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักของบีกเกอร์อีกครั้ง คำนวณน้ำหนักของดินที่ใช้ในการแยกเชื้อจากผลต่างของน้ำหนักบีกเกอร์ก่อนและหลังอบ

#### 3.6.4.2 การหาปริมาณความชื้น

ชั่งตัวอย่างดินมา 1-2 กรัม ใส่ในถ้วยเซรามิคหรือบีกเกอร์ที่ทราบน้ำหนัก นำเซรามิคหรือบีกเกอร์ไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ คำนวณหาปริมาณความชื้นในดินตัวอย่างจากน้ำหนักดินที่หายไป

### 3.6.4.3 การวัดค่าความเป็นกรดเบส

ชั่งตัวอย่างดิน 2 กรัมใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ค่อยๆเติมน้ำกลั่นลงไปทีละน้อย โดยคนตัวอย่างไปด้วยในขณะเดียวกันด้วยข้อตักสารหรือแท่งแก้ว จนสังเกตเห็นแผ่นฟิล์มบางๆบนผิวน้ำ (ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง) จึงทำการวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ทำซ้ำ 3 ครั้ง รายงานผลในรูปของค่าเฉลี่ยจากการวัดทั้ง 3 ครั้ง

### 3.6.5 การเตรียมสารละลายสปอร์ (spore suspension) (Klantbut, 2013)

เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีทที่เจริญเติบโตอยู่บนอาหาร Starch casein agar (SCA) และนำไม้พ่นสำลีที่ปราศจากเชื้อชุดเอสปอร์ตที่บริเวณผิวน้ำของอาหารจนทั่ว แล้วจึงนำสารละลายเหลวหลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร ทำการผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้เส้นใยสปอร์ที่เกิดการแตกหักออกจากกัน จากนั้นนำไปกรองผ่านสำลีฆ่าเชื้อ เพื่อกรองเอาส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่อาจติดมากับสปอร์ออก แล้วนำสารละลายที่กรองถ่ายใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge tube) ขนาด 15 มิลลิลิตรหลอดใหม่ และทำการปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 ถึง 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้งไปและทำการผสมตะกอนของเชื้อที่ได้เป็นเวลาเล็กน้อยเพื่อให้เกิดการกระจายตัวของสปอร์ที่ยังคงเหลืออยู่ภายในหลอดทำการ resuspension ด้วย กลีเซอรอล 20% (w/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนำสปอร์ที่ได้ไปทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำเป็น stock culture

### 3.6.6 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีท (รัตนภรณ์, 2548)

นำเชื้อแอกติโนมัยซีทบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากข้อ 3.6.2 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยสังเกตสีและแรงควัตถุของโคโลนีที่เจริญบนผิวน้ำอาหารและใต้ผิวน้ำอาหารโดยการเปรียบเทียบกับระบบสี The NBS/IBCC Color System และสังเกตลักษณะเส้นใยอาหาร (Substrate mycerium) เส้นใยอากาศ (Aerial mycerium) และลักษณะของสปอร์ด้วยเทคนิค Slide culture โดยใช้ใบมีดหรือเข็มเขี่ยเชื้อตัดชิ้นอาหารแข็ง Yeast extract Malt extract broth (YEME) นำไปวางบนแผ่นสไลด์ที่อยู่ในจานแก้ว จากนั้นถ่ายเชื้อโดยใช้ needle ปลายงอเขี่ยเชื้อ นำไป inoculate ลงด้านข้างแต่ละด้านของก้อนวุ้นจนครบ 4 ด้าน แล้วจึงคืบแผ่นกระจกปิดสไลด์ที่ฆ่าเชื้อแล้วปิดลงบนก้อนวุ้นเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ให้กระดาษซับมีความชื้นทั่วแผ่น หลังจากนั้นพันรอบต่อของปากจานเพาะเลี้ยงให้รอบแผ่นพาราฟิล์ม (parafilm) เพื่อให้จานมีความชื้นป้องกันน้ำระเหย แล้วนำไปเพาะเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเชื้อสร้างสปอร์ (1 – 2 อาทิตย์) แล้วตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยกำลังขยายต่ำสุด 40 เท่า

### 3.6.7 การศึกษาลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยซีท (Buchanan *et al.*, 2558)

#### 3.6.7.1 การตกตะกอน (Coagulation) และการย่อยสลายโปรตีน (Casein hydrolysis) ใน นม (Skim milk) (Reynolds, 2011)

ถ่ายเชื้อแอกติโนมัยซีท 1 หลอดลงในอาหาร Skim milk ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นทำการตรวจผลการตกตะกอนในหลอดทดลอง (Coagulation) เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขีดเชื้อแอกติโนมัยซีทเป็นเส้นตรงยาวตามแนวนอนจากขอบด้านหนึ่งถึงขอบอีกด้านลงบนอาหาร Skim milk agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และตรวจสอบถ้ามีการย่อยสลาย โปรตีนในน้ำนมเกิดขึ้นโดยวัดจากความกว้างของบริเวณใส (Clear zone) โดยเลือกเฉพาะไอโซเลทที่เกิด บริเวณใสมากำการศึกษาในขั้นต่อไป (Casein hydrolysis)

### 3.6.7.2 การย่อยสลายเจลาติน (Gelatin liquefaction)

ลงเชื้อแอกติโนมัยซีท 1 ลูบเต็มในอาหารเหลว Bouillon Gelatin Broth 5 มิลลิลิตร ลงในหลอด ทดลอง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำหลอดทดลองที่เพาะเลี้ยงไว้มา แช่ในตู้เย็นอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เปรียบเทียบกับหลอดที่ไม่ได้ใส่เชื้อ ถ้ามีการย่อย สลายเจลาตินจะไม่เกิดการแข็งตัวของเจลาติน

### 3.6.7.3 การย่อยไนเตรท (Nitrate reduction)

เลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีทใน Peptone KNO<sub>3</sub> broth ในหลอดทดลอง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบผลโดยการเติมสารละลายกรดซัลฟานิลิกลงไป 2 หยดและ สารละลาย N,N-dimethyl-L-naphthylamine 3 หยด ถ้าเชื่อมีการเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ สารละลาย จะเปลี่ยนเป็นสีชมพูจนถึงสีแดง

### 3.6.7.4 การย่อยสลายแป้ง (Starch hydrolysis)

นำเชื้อแอกติโนมัยซีทมาขีดลงบนอาหาร Inorganic salts-starch agar (ISP4) จากนั้นนำไปบ่ม อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบผลโดยการเทราดด้วยสารละลายแกรมไอโอดีนลงบน อาหารที่เพาะเชื้อไว้ ถ้ามีการย่อยสลายแป้งเกิดขึ้นจะเกิดบริเวณใสรอบๆโคโลนีของเชื้อ แต่ถ้าไม่มีการย่อย สลายแป้งจะเกิดสีน้ำเงินแทน

### 3.6.8 Spore pre-germination ของเชื้อแอกติโนมัยซีท (Klanbut, 2013)

ดูสารละลายสปอร์ของไอโซเลทของแอกติโนมัยซีทที่ทำให้เกิดขนาดของวงใสบนอาหาร skim milk agar ที่ได้จากข้อ 3.6.7.1 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหาร Yeast extract Malt extract broth (YEME) ปริมาตร 50 มิลลิลิตรลงในพลาสติก Erlenmeyer ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นทำการบ่ม ในสภาวะเขย่าโดยใช้ความเร็วรอบ 250 rpm ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมงแล้วทำการ เก็บสารละลายและนำไป centrifuge ที่ 3000 rpm นาน 10 นาที แล้วนำสารละลายส่วนใสเททิ้งจากนั้น ใส่น้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ 10 มิลลิลิตรและผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว คลื่น 450 nm โดยใช้เครื่อง spectrophotometer จากนั้นเข้าสู่ตรรกานวนเพื่อหาปริมาณของสปอร์ตั้ง ต้นในแต่ละพลาสติก ดังนี้

$$C = (OD_{450} / 0.04) \times (4 \times 10^6 \text{ gs ml}^{-1}) = OD_{450} \times 10^8 \text{ gs ml}^{-1}$$

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

**หมายเหตุ** C คือ ความเข้มข้นที่ได้จากการนำส่วนใสของสารละลายสปอร์ไปทำการวัดกิจกรรม ของเอนไซม์ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer

V คือ ปริมาตรของสปอร์ตั้งต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.6.9 การสกัดเอนไซม์ Protease (Klanbut, 2013)

ดูปริมาณสปอร์ที่คำนวณได้จากข้อ 3.6.8 ใส่ลงในอาหาร Yeast extract Malt extract broth (YEME) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นทำการบ่มในสภาวะเขย่าโดยใช้ความเร็วรอบ 250 rpm ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างเชื้อเมื่อครบ 24 ชั่วโมงและ 30 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5000 rpm เป็นเวลา 10 นาที และเก็บส่วนใสที่ได้ (Supernatant) เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ในขั้นต่อไป

### 3.6.10 การตรวจสอบค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (คニングกานต์ และ อัญชลี, 2543; Cheng *et al.*, 2015)

นำเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.6.9 มาวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการทำงานด้วยวิธี Azocasein method (ภาคผนวก ค) โดยเติม Azocasein substrate 240 ไมโครลิตร ลงใน appendorf จากนั้นเติม 0.2 โมลาร์ บัฟเฟอร์ 5 ชนิด ซึ่งได้แก่ Citrate - phosphate buffer (pH 7), Boric acid – borax buffer (pH 8 และ 9), Tris – HCl buffer (pH 8 และ 9), Sodium borate buffer (pH 10) และ Sodium bicarbonate buffer (pH 10 และ 11) ลงใน appendorf หลอดละ 150 ไมโครลิตร โดยทำบัฟเฟอร์ละ 2 ซ้ำ ในส่วนของชุดการทดสอบควบคุมเติมน้ำกลั่น 150 ไมโครลิตร แทนการเติมบัฟเฟอร์ ต่อมาเติมเอนไซม์ที่สกัดได้จากข้อ 3.6.9 ลงใน appendorf ที่เติมบัฟเฟอร์และสับสเตรทหลอดละ 20 ไมโครลิตร (ระหว่างการทำต้องแช่ในน้ำแข็งตลอดเวลา เพื่อป้องกันเอนไซม์เสียสภาพ) ในส่วนของชุดการทดสอบควบคุมเติมน้ำกลั่น 20 ไมโครลิตร แทนการเติมเอนไซม์ เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส (cheng *et al.*, 2015) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมกรดไตรคลอโรอะซิติก (10% Trichloroacetic acid) ลงไป appendorf ละ 1.2 มิลลิลิตร ทันที เพื่อหยุดปฏิกิริยาทิ้งไว้ 15 นาทีเพื่อให้ตกตะกอน แล้วจึงนำไปปั่นแยกที่ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ปิเปิดเอาส่วนใสข้างบน 1.4 มิลลิลิตร มาใส่ลงในหลอดทดลองที่มี 1 M ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1.4 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน ต่อมานำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) และนำค่าที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของบัฟเฟอร์กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร ( $A_{440}$ )

### 3.6.11 การตรวจสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (คニングกานต์ และ อัญชลี, 2543; Cheng *et al.*, 2015)

วิเคราะห์หาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธี Azocasein method (ภาคผนวก ค) และใช้บัฟเฟอร์ที่ได้จากวิธีการที่ 3.6.10 มาทำการบ่มที่อุณหภูมิต่างกัน ได้แก่ 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

### 3.6.12 การศึกษาสารยับยั้ง (inhibitor) ที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (คニングกานต์ และ อัญชลี, 2543; Cheng *et al.*, 2015)

นำเอนไซม์ที่สกัดได้จากข้อ 3.6.9 มาบ่มด้วยตัวยับยั้งต่างๆ ดังนี้ 20 mM PMSF (Phenyl methyl sulphonyl fluoride), 20 mM EDTA (Ethylene diamine tetraacetic acid), 20 mM  $KMnO_4$  และ 20 mM 1,10-phenanthroline hydrate ( $C_{12}H_8N_2$ ) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษานี้เท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่หรือใช้ในการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)

### 3.6.13 การศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์ (คีนิงกานต์ และอัญชลี, 2543; Cheng *et al.*, 2015)

นำเอนไซม์ที่สกัดได้จากข้อ 3.6.9 ไปต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ที่อุณหภูมิต่างกันดังนี้ 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บเอนไซม์ทุกๆ 10 นาที ครั้งละ 20 ไมโครลิตร จนครบ 1 ชั่วโมง ทำการทดลองเช่นเดียวกับการหาความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์และใช้บัฟเฟอร์ที่ได้จากขั้นตอนการหาความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธี Azocasein method (ภาคผนวก ค) แล้วตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

\* Control ไม่ต้องนำเอนไซม์ไปต้มและ Blank ใช้น้ำกลั่นแทนบัฟเฟอร์และเอนไซม์

### 3.6.14 การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธีการทดสอบขั้นต้น (Pre-test) (Wadetwar and Patil, 2013)

ทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร Yeast extract-malt extract agar (YEME agar) โดยขีดเชื้อแอกติโนมัยซีทเป็นเส้นตรงเดี่ยวยาวตามแนวนอน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ 6 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Micrococcus luteus* TISTR 2374, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* TISTR 118 และ *Candida albicans* ATCC 90028 มาขีดเป็นเส้นตรงในลักษณะตั้งฉากกับแนวเชื้อแอกติโนมัยซีท จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง สำหรับเชื้อแบคทีเรีย และ เชื้อยีสต์ตามลำดับ ตรวจสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยวัดระยะห่างจากแนวของเชื้อแอกติโนมัยซีทถึงระยะที่เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบสามารถเจริญได้

### 3.6.15 การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยเทคนิค agar disc diffusion (Phongsopitanun *et al.*, 2014)

#### 3.6.15.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีท

นำเชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลตที่ B8810-1 และ K6786-3 ซึ่งเป็นไอโซเลตที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดเมื่อเทียบกับเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลตอื่นๆ มาทดสอบการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ โดยนำเชื้อแอกติโนมัยซีทที่เลี้ยงบนอาหาร Starch casein agar (SCA) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน จากนั้นนำลูบเชื้อเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่เจริญบนอาหารลงในอาหาร Yeast extract-malt extract broth (YEME broth) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงในสภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน แล้วนำมาถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปในอาหาร Yeast extract-malt extract broth (YEME broth) ที่มีการเติม 0.1% CaCO<sub>3</sub> ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงในสภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.6.15.2 การสกัดสารทุติยภูมิจากน้ำหมักเชื้อแอสกีโนมัยซีท

นำน้ำหมักเชื้อแอสกีโนมัยซีทจากขั้นตอนที่ 3.6.15.1 มาทำการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman no. 1 เพื่อแยกเอาเส้นใยของเชื้อแอสกีโนมัยซีท และ อาหารเหลวออกจากกัน จากนั้นนำน้ำหมักส่วนใสที่ปราศจากเส้นใยมาทำการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ คือ เอทิลอะซิเตท โดยทำการเติมเอทิลอะซิเตทลงในกรวยแยกในอัตราส่วน 1:1 (v/v) จากนั้นทำการพลิกกลับไปกลับมาเพื่อให้เฟสบนของเอทิลอะซิเตทที่มีสารมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์แยกตัวออกจากเฟสของน้ำ สำหรับเฟสของน้ำปล่อยทิ้ง โดยขั้นตอนนี้จะทำการพลิกกลับไปกลับมา 3 รอบ จากนั้นนำเฟสของเอทิลอะซิเตทนำไประเหยให้แห้งภายใต้การลดความดันด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะทำให้ได้สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตท จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปทำการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สำหรับเซลล์และเส้นใยที่ติดอยู่บนกระดาษกรองทำการล้างด้วยเมทานอลประมาณ 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มต่อในสภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำน้ำหมักเชื้อแอสกีโนมัยซีทที่ได้มาทำการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman no.1 เพื่อแยกเอาเส้นใยของเชื้อแอสกีโนมัยซีทและอาหารเหลวออกจากกัน จากนั้นนำไประเหยให้แห้งภายใต้การลดความดันด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะทำให้ได้สารสกัดหยาบในชั้นเมทานอล แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปทำการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

### 3.6.15.3 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Micrococcus luteus* TISTR 2374 บนอาหาร slant Mueller-Hinton agar (MHA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง และเลี้ยง *Candida albicans* ATCC 90028 บนอาหาร slant Sabouraud's dextrose agar (SDA) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 6 สายพันธุ์ผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่ปราศจากเชื้อ และปรับระดับความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับสารละลายมาตรฐานแมคฟาแลนหมายเลข 0.5 (0.5 McFarland Standard) ซึ่งมีจำนวนเซลล์โดยประมาณเท่ากับ  $1.0 \times 10^8$  CFU/ml

### 3.6.15.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

นำไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อ (Sterile swab) จุ่มลงในสารละลายเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบที่เตรียมไว้จากข้อ 3.6.15.3 นำมาทา (Swab) บนผิวหน้าอาหารแข็งด้วยวิธีปลอดเชื้อ (Aseptic technique) เพื่อให้เชื้อทดสอบเกิดการกระจายตัวบนผิวหน้าอาหารอย่างสม่ำเสมอและเตรียมสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตทและสารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของเชื้อแอสกีโนมัยซีทที่หมักด้วยเมทานอลจากข้อ 3.6.15.2 ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หยดลงบนแผ่นทดสอบที่เตรียมไว้บนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อรอจนแห้ง จากนั้นวางลงบนผิวหน้าอาหารที่ได้ทา (Swab) เชื้อเอาไว้แล้ว จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อทดสอบแบคทีเรีย สำหรับเชื้อยีสต์นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (Clear zone) ในหน่วยมิลลิเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

#### 4.1 การหาคุณสมบัติทางกายภาพบางประการของดินตัวอย่าง

จากการเก็บตัวอย่างดินบริเวณนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี ครั้งที่ 1 (ดิน A) เมื่อวันที่ 20 สิงหาคม 2559 และเก็บตัวอย่างดินนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี ครั้งที่ 2 (ดิน B) เมื่อวันที่ 17 กันยายน 2559 โดยทำการเก็บตัวอย่างดินครั้งละ 10 ตำแหน่ง นำมาหาคุณสมบัติทางกายภาพของตัวอย่างดิน (ดังวิธีการที่ 3.6.4) พบว่า ปริมาณของน้ำหนักดิน, ปริมาณความชื้นและค่าความเป็นกรด-ด่าง ได้ผลดังตารางที่ 4.1 และ 4.2 และนำตัวอย่างดินทำการคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจนได้เชื้อบริสุทธิ์ (ดังวิธีการที่ 3.6.2) และกำหนดหมายเลขไอโซเลทของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่บริสุทธิ์ต่อไป โดยกำหนดหมายเลขไอโซเลท ดังนี้ หมายเลขตัวแรก คือ ลำดับของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกได้, หมายเลขที่สอง คือ จุดที่เก็บจากตัวอย่างดิน และ หมายเลขที่สาม คือ ระดับความเจือจางที่สามารถคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทได้

ตารางที่ 4.1 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของตัวอย่างดิน A

ตัวอย่างดิน	น้ำหนักดิน (กรัม)	ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
จุดที่ 1	7.709	12.78	7.45
จุดที่ 2	7.186	12.63	7.49
จุดที่ 3	7.602	8.44	7.57
จุดที่ 4	7.717	8.42	7.80
จุดที่ 5	7.484	10.52	7.91
จุดที่ 6	7.617	9.33	7.54
จุดที่ 7	6.597	7.44	7.91
จุดที่ 8	7.637	14.14	7.64
จุดที่ 9	7.647	9.44	7.78
จุดที่ 10	7.829	11.56	7.51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของตัวอย่างดิน B

ตัวอย่างดิน	น้ำหนักดิน (กรัม)	ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)	ค่าความ เป็นกรด-ด่าง
จุดที่ 1	7.627	46.75	8.29
จุดที่ 2	7.159	49.31	8.37
จุดที่ 3	7.630	43.72	8.31
จุดที่ 4	7.772	39.85	8.24
จุดที่ 5	7.489	40.36	8.21
จุดที่ 6	7.723	46.68	8.41
จุดที่ 7	6.820	44.07	8.28
จุดที่ 8	7.490	44.55	8.18
จุดที่ 9	7.419	49.79	8.36
จุดที่ 10	8.067	39.73	8.21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากดินบริเวณนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี

### 4.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีท

จากการเก็บตัวอย่างดินบริเวณนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรีครั้งที่ 1 (ดิน A) เมื่อวันที่ 20 สิงหาคม 2559 และเก็บตัวอย่างดินนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี ครั้งที่ 2 (ดิน B) เมื่อวันที่ 17 กันยายน 2559 ได้นำตัวอย่างดินมาทำการเจือจางที่ระดับความเจือจาง  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  และ  $10^{-3}$  เพื่อคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทโดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เข้มข้นร้อยละ 1 และนำระดับความเจือจางที่  $10^{-2}$  และ  $10^{-3}$  มาทำ spread plate ลงบนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ที่มีการเติม 4.6% หรือ 4.6 g/L NaCl (Jose and Jebakuma, 2013) และ Nystatin ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน พบว่า จำนวนเชื้อแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกได้มีจำนวนทั้งหมด 41 ไอโซเลท และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยซีทโดยสังเกตสีและรงค์วัตถุของโคโลนีที่เจริญบนผิวอาหารและได้ผิวอาหารโดยการเปรียบเทียบกับระบบสี The NBS/IBCC Color System และสังเกตลักษณะเส้นใยอาหาร (Substrate mycerium) เส้นใยอากาศ (Aerial mycerium) และลักษณะของสปอร์ด้วยเทคนิค slide culture สามารถจัดกลุ่มเชื้อแอกติโนมัยซีทได้ 5 กลุ่ม ดังนี้

**กลุ่มที่ 1** เป็นกลุ่มแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish Pink มีสมาชิกทั้งหมด 1 ไอโซเลท ประกอบด้วย

- 1.1 เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท MDB31310 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Strong Yellowish Pink เส้นใยอาหารสี Vivid Reddish Orange ไม่สร้างรงค์วัตถุที่ละลายน้ำได้และสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Verticillati

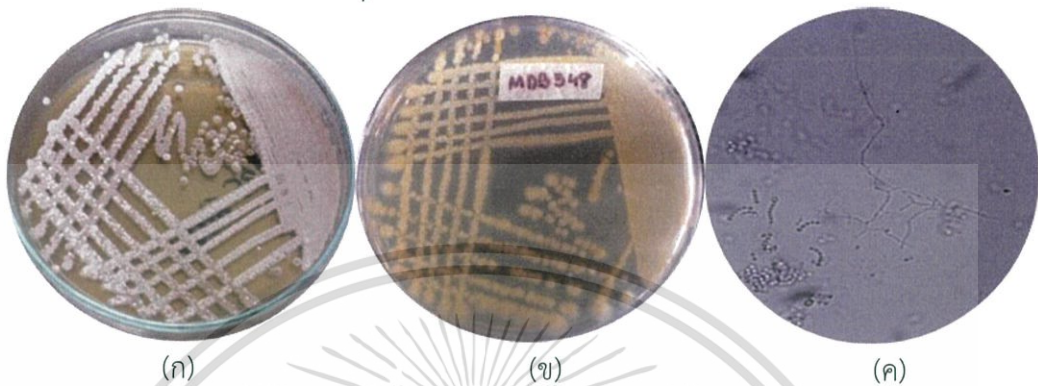


**รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB31310**

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB31310 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB31310 ได้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB31310 ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

**กลุ่มที่ 2** เป็นกลุ่มแอสโคไมซีตที่สร้างเส้นใยอากาศสี Yellow มีสมาชิกทั้งหมด 6 ไอโซเลท ประกอบด้วย

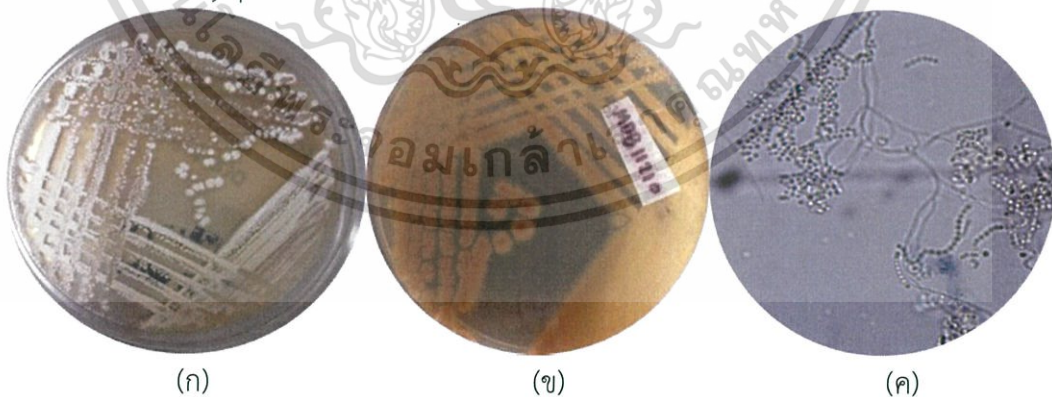
2.1 เชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท MDB548 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish White เส้นใยอาหารสี Brilliant Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้และสร้างสปอร์เล็กน้อย (Oligosporous) ลักษณะเหมือนกับ *Catellatospora*



**รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB548**

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB548 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB548 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB548 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

2.2 เชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท MDB11210 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish White เส้นใยอาหารสี Brilliant Yellow Green สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสี Dark Grayish Yellow และสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Verticillati



**รูปที่ 4.3 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB11210**

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB11210 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB11210 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB11210 ภายใต้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

- 2.3 เชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท MDB3422 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish White เส้นใยอาหารสี Grayish Reddish Brown สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสี Dark Grayish Yellow และสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporous) มีลักษณะเป็นแบบ Spira



**รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB3422**

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB3422 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB3422 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB3422 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)
- 2.4 เชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท MDB3528 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish White เส้นใยอาหารสี Grayish Reddish Brown สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสี Dark Grayish Yellow และสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporous) มีลักษณะเป็นแบบ Retinaculiaperti

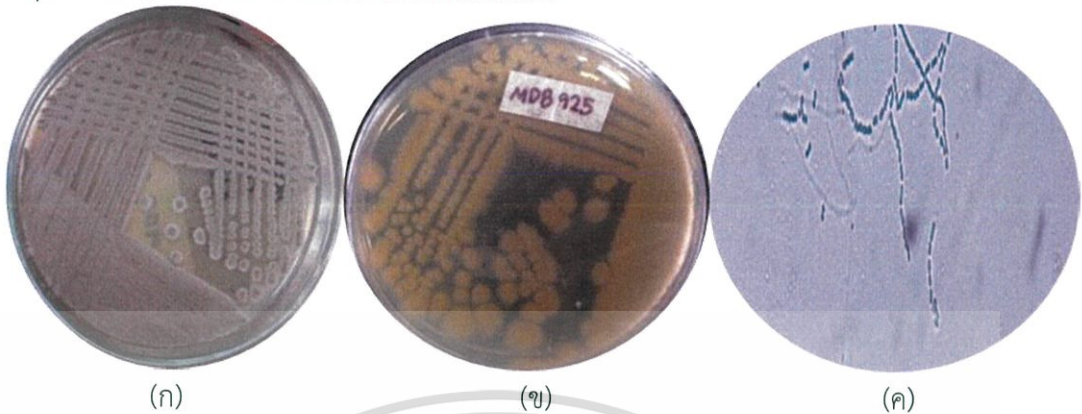


**รูปที่ 4.5 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB3528**

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB3528 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB3528 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB3528 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 2.5 เชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท MDB925 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish White เส้นใยอาหารสี Grayish Reddish Brown ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporous) มีลักษณะเป็นแบบ Rectiflexibiles



รูปที่ 4.6 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB925

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB925 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB925 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB925 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

- 2.6 เชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท MDB148 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Light Olive Brown เส้นใยอาหารสี Light Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ สร้างสปอร์แบบเดี่ยว (monosporous) และ สร้างสปอร์เล็กน้อย (oligosporous)

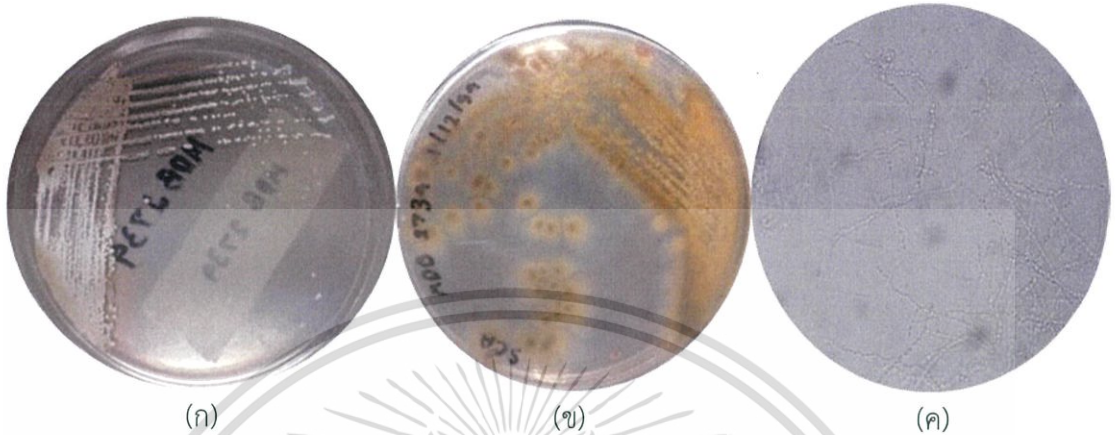


รูปที่ 4.7 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB148

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB148 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB148 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB148 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

**กลุ่มที่ 3** เป็นกลุ่มแอสโคดิโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Green มีสมาชิกทั้งหมด 2 ไอโซเลท ประกอบด้วย

- 3.1 เชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลท MDB2739 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Pale Green เส้นใยอาหารสี Grayish Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Rectiflexibles



**รูปที่ 4.8** แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB2739

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB2739 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB2739 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB2739 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)
- 3.2 เชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลท MDB2839 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Greenish Gray เส้นใยอาหารสี Grayish Red ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Verticillati



**รูปที่ 4.9** แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB2839

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB2839 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB2839 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB2839 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

**กลุ่มที่ 4** เป็นกลุ่มแอสโคดิโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Blue มีสมาชิกทั้งหมด 31 ไอโซเลทประกอบด้วย

4.1 เชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลท MDB17310 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Very Light Blue เส้นใยอาหารสี Light Olive ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporous) มีลักษณะเป็นแบบ Rectiflexibles



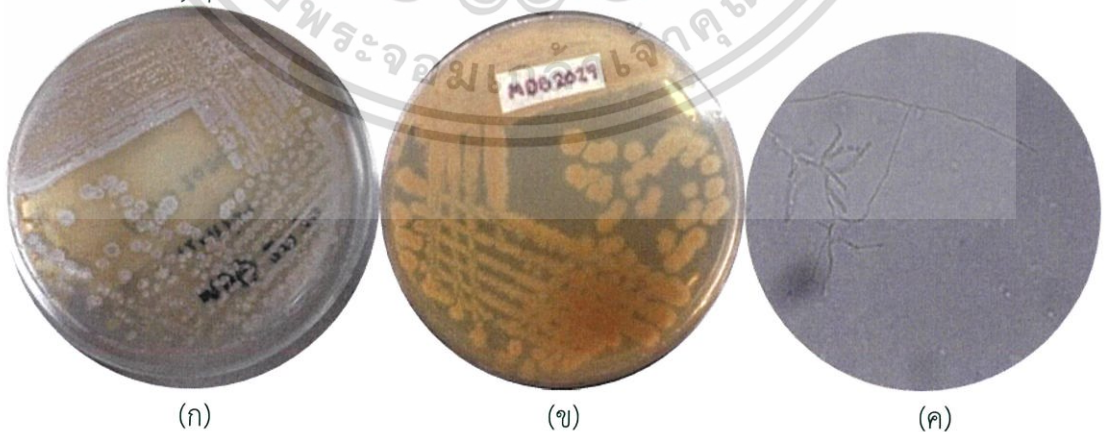
**รูปที่ 4.10** แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB17310

(ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB17310 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB17310 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB17310 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

4.2 เชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลท MDB2029 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Very Light Blue เส้นใยอาหารสี Light Yellowish Brown สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสี Dark Orange Yellow และสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporous) มีลักษณะเป็นแบบ Rectiflexibles

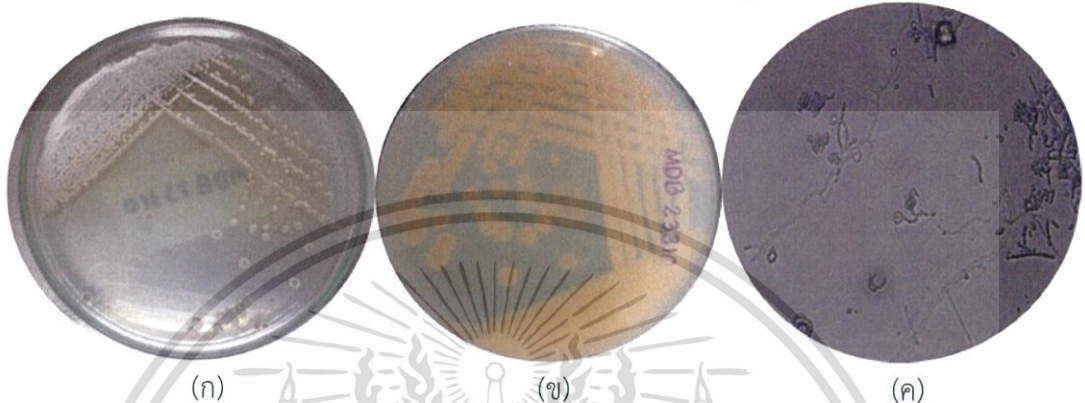


**รูปที่ 4.11** แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB2029

(ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB2029 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

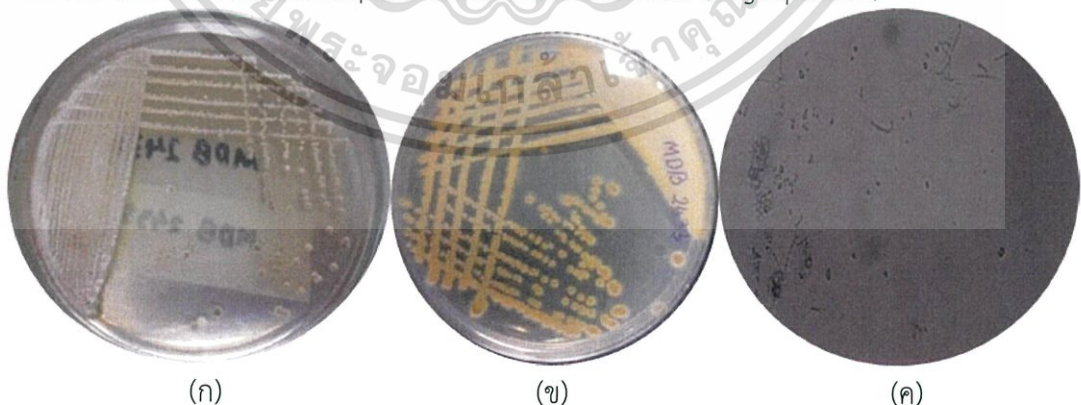
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลลาไอโซเลทที่ MDB2029 ได้ผิวน้ำอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสเพอร์จิลลาไอโซเลทที่ MDB2029 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)
- 4.3 เชื้อแอสเพอร์จิลลาไอโซเลท MDB23310 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Very Light Blue เส้นใยอาหารสี Moderate Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Retinaculiaperti และ สร้างสปอร์เล็กน้อย (oligosporous)



**รูปที่ 4.12 แสดงลักษณะของเชื้อแอสเพอร์จิลลาไอโซเลทที่ MDB23310**

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลลาไอโซเลทที่ MDB23310 บนผิวน้ำอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลลาไอโซเลทที่ MDB23310 ได้ผิวน้ำอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสเพอร์จิลลาไอโซเลทที่ MDB23310 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)
- 4.4 เชื้อแอสเพอร์จิลลาไอโซเลท MDB2433 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Very Light Blue เส้นใยอาหารสี Moderate Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Retinaculiaperti และ สร้างสปอร์เล็กน้อย (oligosporous)



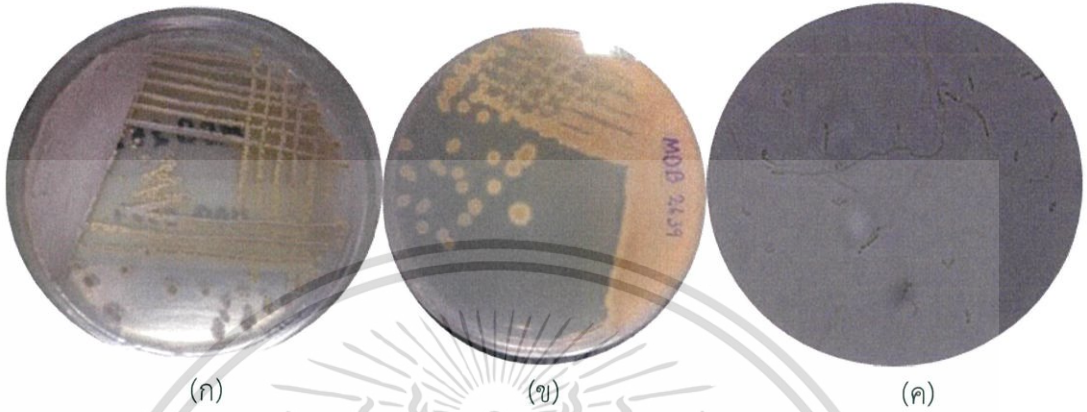
**รูปที่ 4.13 แสดงลักษณะของเชื้อแอสเพอร์จิลลาไอโซเลทที่ MDB2433**

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลลาไอโซเลทที่ MDB2433 บนผิวน้ำอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลลาไอโซเลทที่ MDB2433 ได้ผิวน้ำอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วันนั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB2433 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

- 4.5 เชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลท MDB2639 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Very Light Blue เส้นใยอาหารสี Deep Yellow สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสี Light Yellowish Brown สร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporous) มีลักษณะเป็นแบบ Retinaculiaperti และ สร้างสปอร์แบบคู่ (bisporous หรือ disporous)



**รูปที่ 4.14 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB2639**

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB2639 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน  
 (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB2639 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน  
 (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB2639 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

- 4.6 เชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลท MDB16310 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Very Pale Blue เส้นใยอาหารสี Deep Greenish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และ สร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporous) มีลักษณะเป็นแบบ Retinaculiaperti



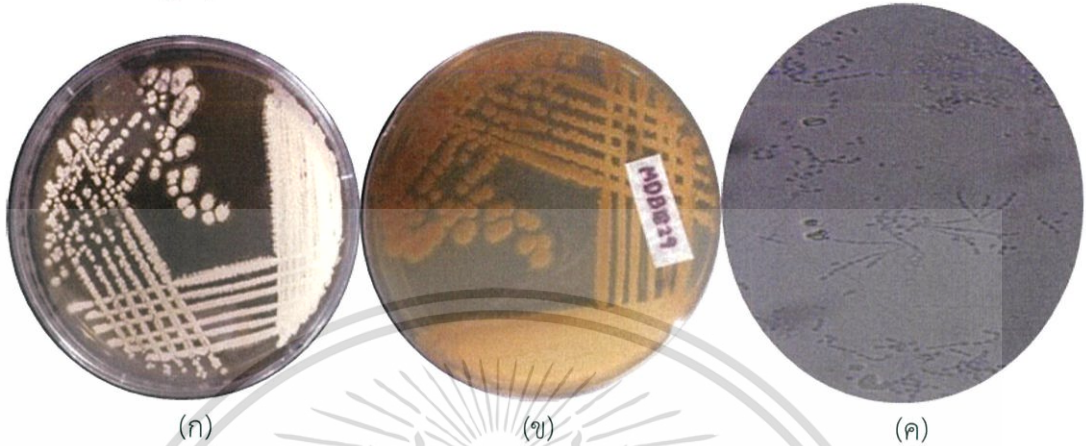
**รูปที่ 4.15 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB16310**

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB16310 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน  
 (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB16310 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

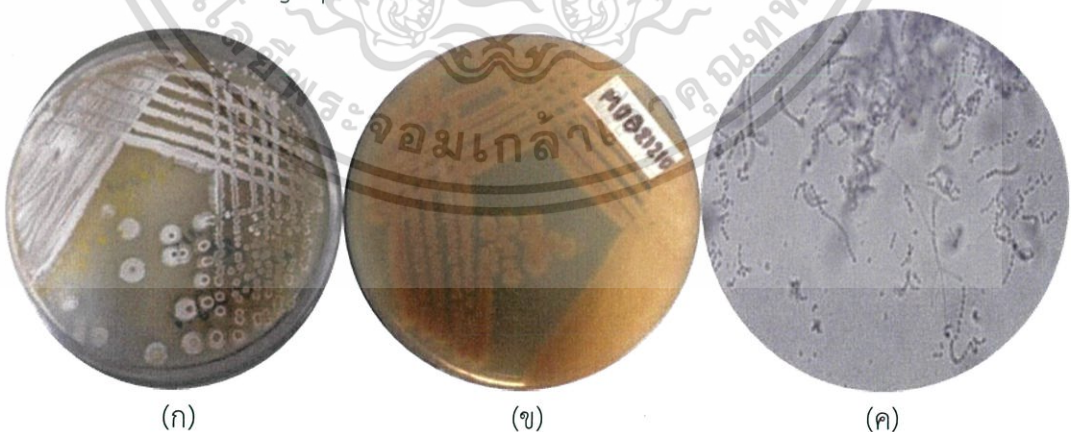
(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB16310 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

- 4.7 เชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลท MDB1829 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Very Pale Blue เส้นใยอาหารสี Grayish Yellow สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสี Moderate Greenish Yellow และ สร้างสปอร์เล็กน้อย (oligosporous)



**รูปที่ 4.16 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB1829**

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB1829 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน  
 (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB1829 ได้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน  
 (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB1829 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)
- 4.8 เชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลท MDB21210 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Very Pale Blue เส้นใยอาหารสี Light Grayish Yellowish Brown สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสี Strong Greenish Yellow และ สร้างสปอร์เล็กน้อย (oligosporous)



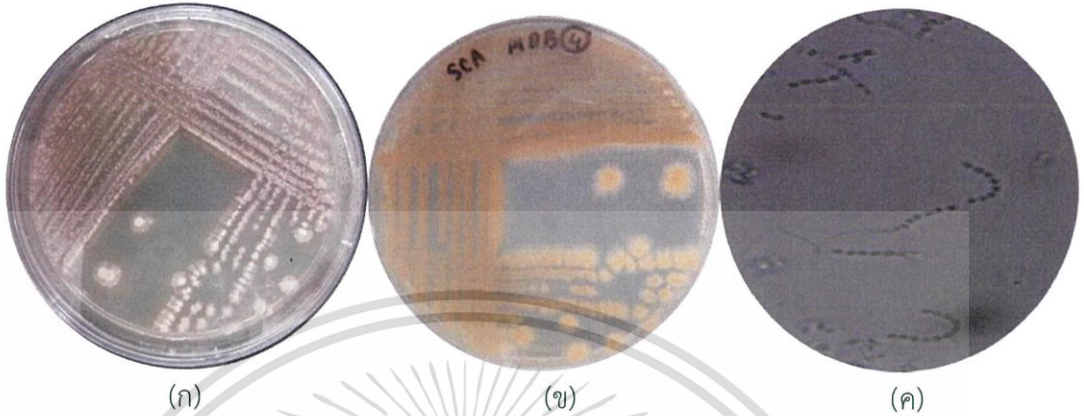
**รูปที่ 4.17 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB21210**

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB21210 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน  
 (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB21210 ได้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมยีสท์ไอโซเลทที่ MDB21210 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

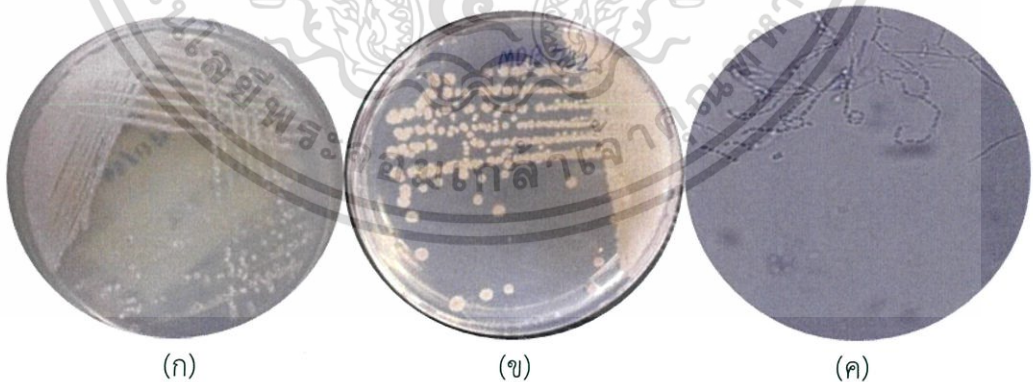
- 4.9 เชื้อแอสเพอร์จิลลินัมยีสท์ไอโซเลท MDB432 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Pale Blue เส้นใยอาหารสี Light Gray ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และ สร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporous) มีลักษณะเป็นแบบ Rectiflexibiles



**รูปที่ 4.18 แสดงลักษณะของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมยีสท์ไอโซเลทที่ MDB432**

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมยีสท์ไอโซเลทที่ MDB432 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมยีสท์ไอโซเลทที่ MDB432 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมยีสท์ไอโซเลทที่ MDB432 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

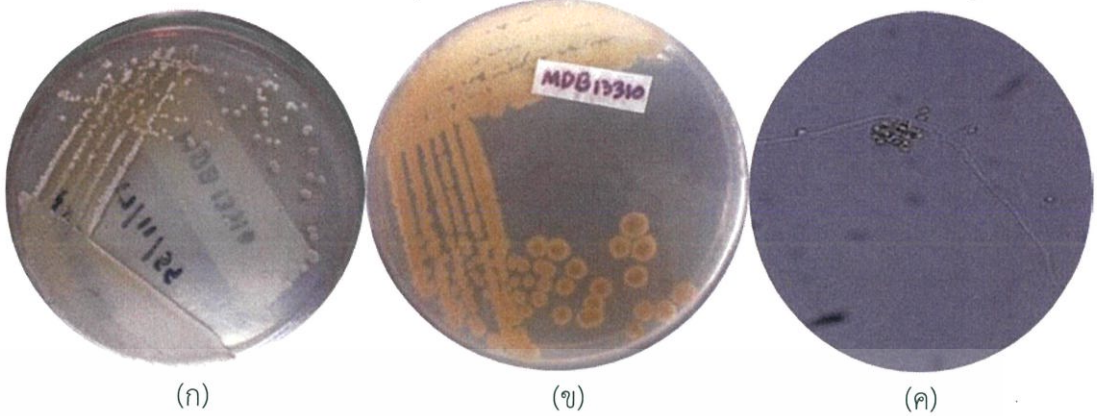
- 4.10 เชื้อแอสเพอร์จิลลินัมยีสท์ไอโซเลท MDB732 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Pale Blue เส้นใยอาหารสี Yellowish White ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และ สร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporous) มีลักษณะเป็นแบบ Retinaculiaperti



**รูปที่ 4.19 แสดงลักษณะของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมยีสท์ไอโซเลทที่ MDB732**

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมยีสท์ไอโซเลทที่ MDB732 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมยีสท์ไอโซเลทที่ MDB732 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมยีสท์ไอโซเลทที่ MDB732 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

- 4.11 เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท MDB13310 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Pale Blue เส้นใยอาหารสี Yellowish White ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และ สร้างสปอร์แบบเดี่ยว (monosporerous)



**รูปที่ 4.20 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB13310**

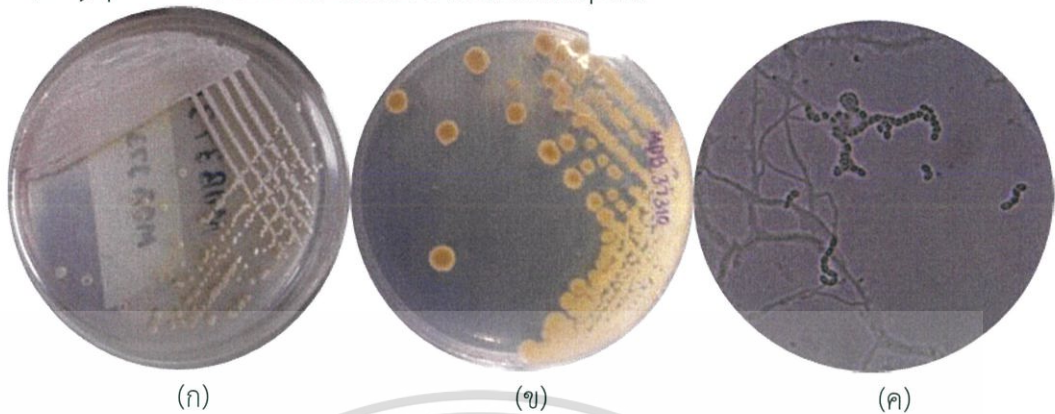
- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB13310 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB13310 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB13310 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)
- 4.12 เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท MDB14310 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Pale Blue เส้นใยอาหารสี Moderate Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และ สร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Retinaculiaperti



**รูปที่ 4.21 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB14310**

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB14310 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB14310 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB14310 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

- 4.13 เชื้อแอสคิโทไมซีตไอโซเลท MDB37310 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Pale Blue เส้นใยอาหารสี Moderate Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และ สร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Retinaculiaperti



รูปที่ 4.22 แสดงลักษณะของเชื้อแอสคิโทไมซีตไอโซเลทที่ MDB37310

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสคิโทไมซีตไอโซเลทที่ MDB37310 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสคิโทไมซีตไอโซเลทที่ MDB37310 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสคิโทไมซีตไอโซเลทที่ MDB37310 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)
- 4.14 เชื้อแอสคิโทไมซีตไอโซเลท MDB38310 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Pale Blue เส้นใยอาหารสี Moderate Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และ สร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Retinaculiaperti

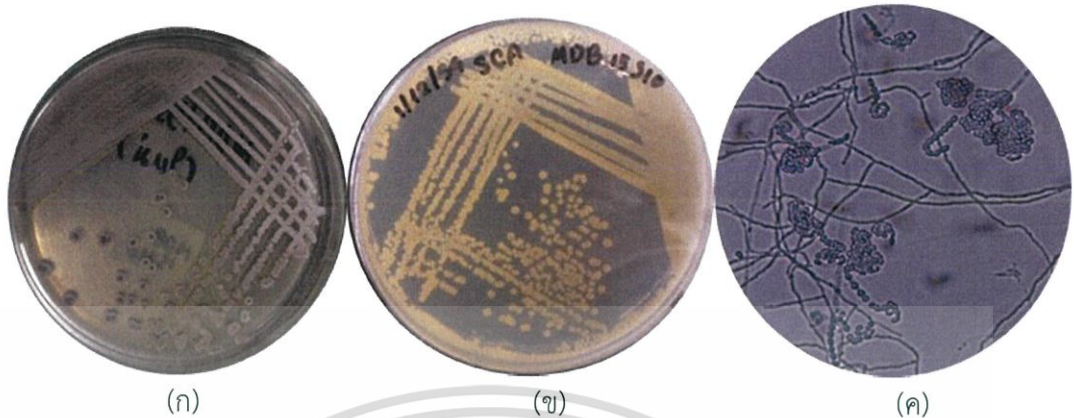


รูปที่ 4.23 แสดงลักษณะของเชื้อแอสคิโทไมซีตไอโซเลทที่ MDB38310

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสคิโทไมซีตไอโซเลทที่ MDB38310 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสคิโทไมซีตไอโซเลทที่ MDB38310 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสคิโทไมซีตไอโซเลทที่ MDB38310 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 4.15 เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท MDB15310 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Pale Blue เส้นใยอาหารสี Strong Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และ สร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Verticillati



**รูปที่ 4.24 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB15310**

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB15310 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB15310 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB15310 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)
- 4.16 เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท MDB1929 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Pale Blue เส้นใยอาหารสี Vivid Purplish Red สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสี Strong Greenish Yellow สร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Retinaculiaperti และ สร้างสปอร์แบบคู่ (bisporous)

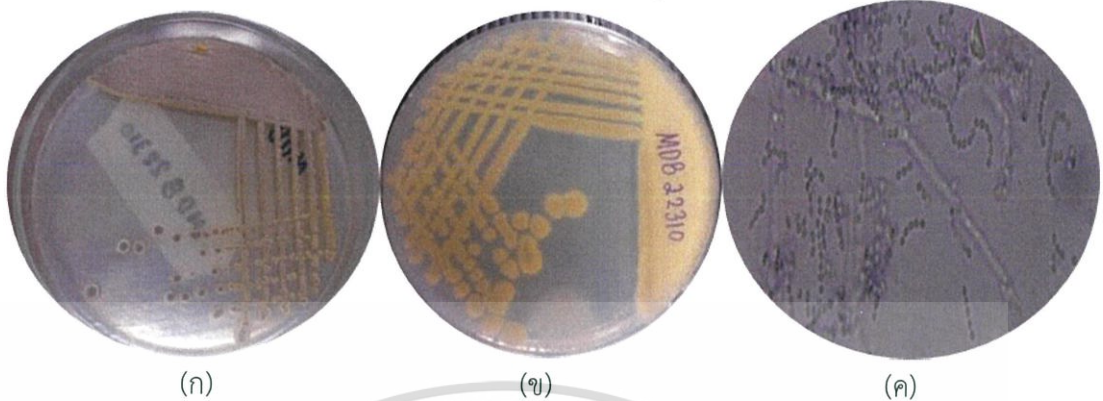


**รูปที่ 4.25 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB1929**

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB1929 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB1929 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB1929 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

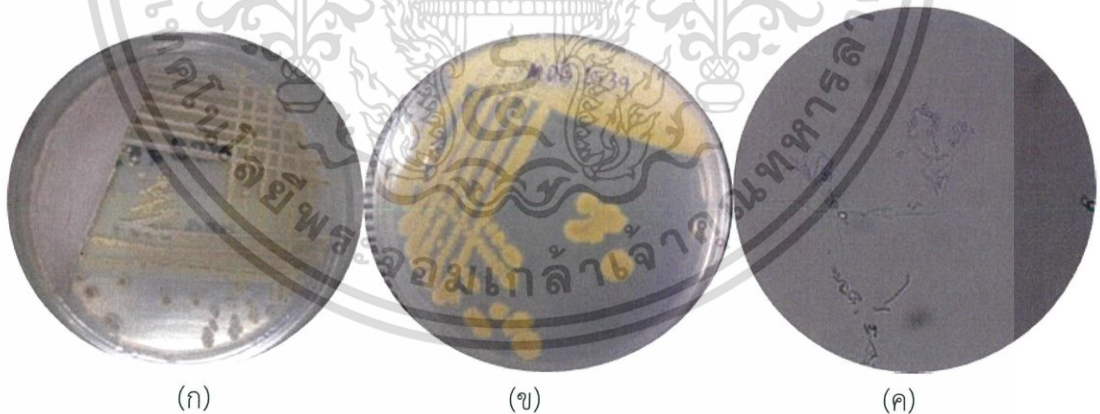
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 4.17 เชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลต MDB22310 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Pale Blue เส้นใยอาหารสี Brilliant Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สร้างสปอร์เล็กน้อย (oligosporous) และสร้างสปอร์บนสายใยอากาศ ลักษณะเหมือน *Nocardopsis*



รูปที่ 4.26 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลตที่ MDB22310

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลตที่ MDB22310 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลตที่ MDB22310 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลตที่ MDB22310 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)
- 4.18 เชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลต MDB2539 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Pale Blue เส้นใยอาหารสี Pale Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporous) มีลักษณะเป็นแบบ Verticillati

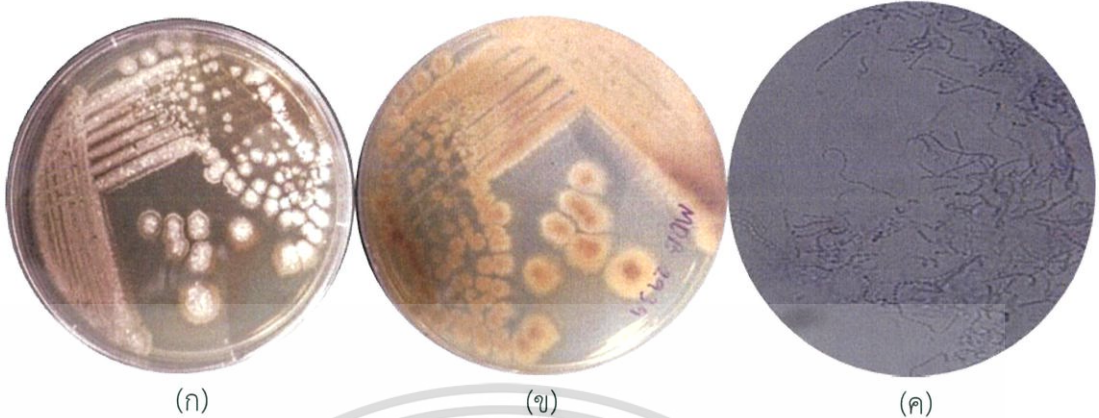


รูปที่ 4.27 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลตที่ MDB2539

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลตที่ MDB2539 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลตที่ MDB2539 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลตที่ MDB2539 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 4.19 เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท MDB2939 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Pale Blue เส้นใยอาหารสี Greenish Gray ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และ สร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporous) มีลักษณะเป็นแบบ Retinaculiaperti



รูปที่ 4.28 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB2939

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB2939 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB2939 ได้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB2939 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)
- 4.20 เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท MDB30310 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Pale Blue เส้นใยอาหารสี Strong Purplish Red สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสี Light Brown และสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporous) มีลักษณะเป็นแบบ Rectiflexibiles

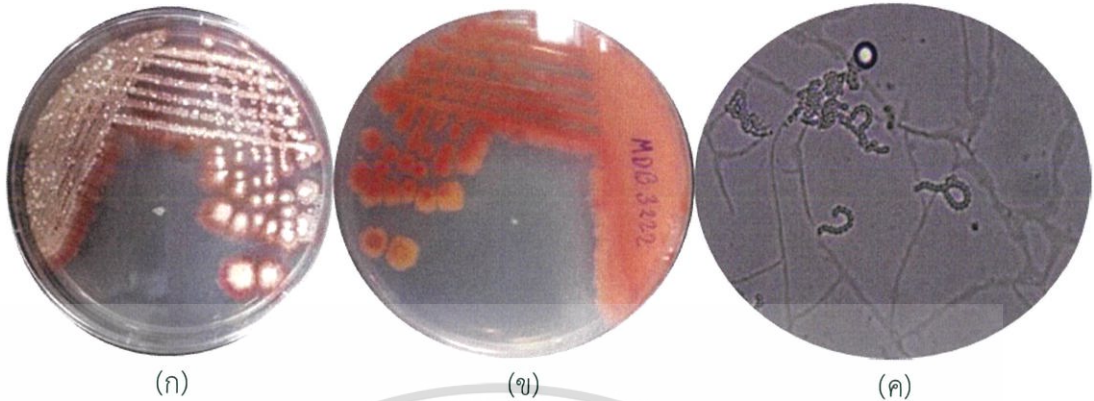


รูปที่ 4.29 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB30310

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB30310 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB30310 ได้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB30310 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 4.21 เชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลต MDB3222 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Pale Blue เส้นใยอาหารสี Moderate Red ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และ สร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporous) มีลักษณะเป็นแบบ Verticillati



รูปที่ 4.30 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลตที่ MDB3222

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลตที่ MDB3222 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลตที่ MDB3222 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลตที่ MDB3222 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)
- 4.22 เชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลต MDB3322 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Pale Blue เส้นใยอาหารสี Dark Grayish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และ สร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporous) มีลักษณะเป็นแบบ Verticillati

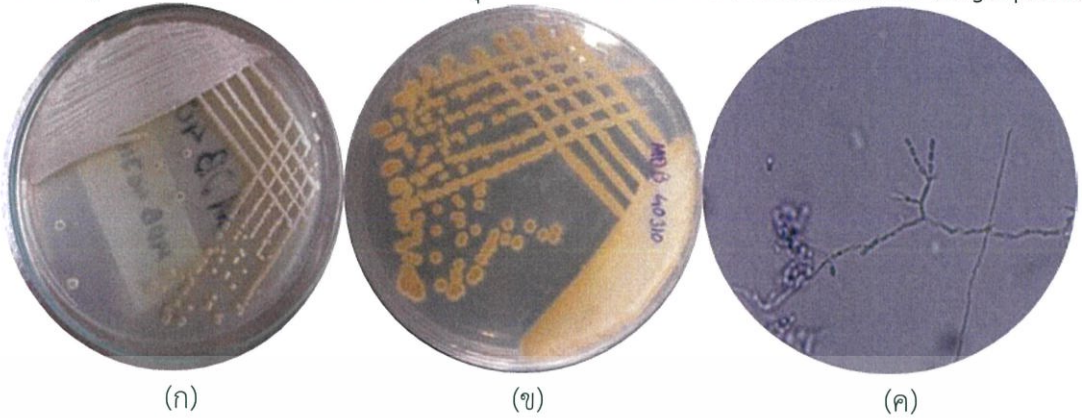


รูปที่ 4.31 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลตที่ MDB3322

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลตที่ MDB3322 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลตที่ MDB3322 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลตที่ MDB3322 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 4.23 เชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท MDB40310 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Pale Blue เส้นใยอาหารสี Strong Greenish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และ สร้างสปอร์เล็กน้อย (oligosporous)



**รูปที่ 4.32 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB40310**

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB40310 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB40310 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB40310 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)
- 4.24 เชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท MDB4123 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Graying Blue เส้นใยอาหารสี Deep Greenish Yellow สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสี Strong Greenish Yellow และ สร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Verticillati

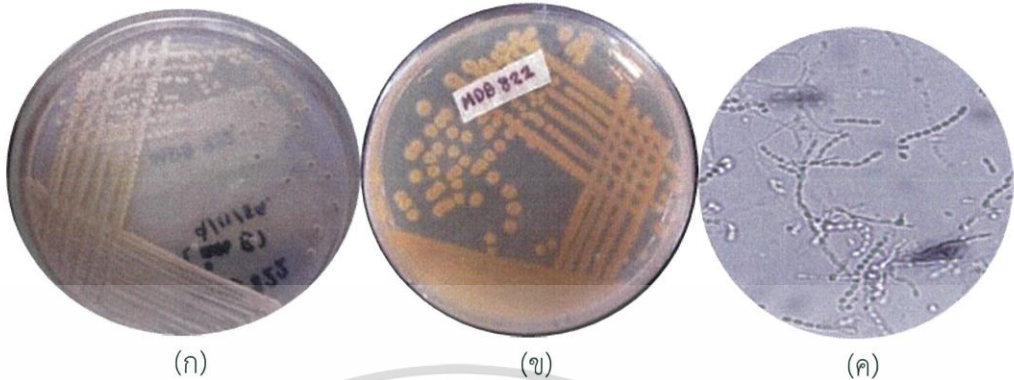


**รูปที่ 4.33 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB4123**

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB4123 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB4123 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB4123 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 4.25 เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท MDB822 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Graying Blue เส้นใยอาหารสี Deep Greenish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และ สร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporous) มีลักษณะเป็นแบบ Rectiflexibiles



รูปที่ 4.34 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB822

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB822 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB822 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB822 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)
- 4.26 เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท MDB39310 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Graying Blue เส้นใยอาหารสี Strong Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และ สร้างสปอร์เล็กน้อย (oligosporous)

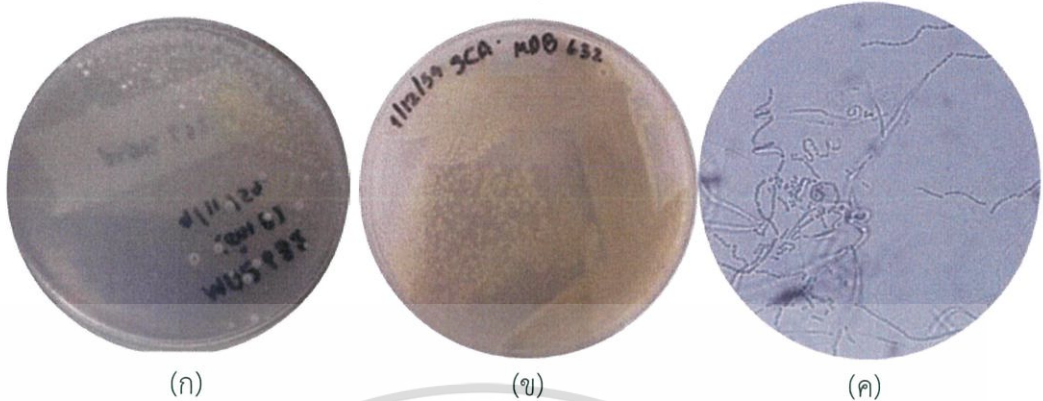


รูปที่ 4.35 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB39310

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB39310 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB39310 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB39310 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 4.27 เชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลท MDB632 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Graying Blue เส้นใยอาหารสี Strong Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และ สร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporous) มีลักษณะเป็นแบบ Retinaculiaperti



รูปที่ 4.36 แสดงลักษณะของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลทที่ MDB632

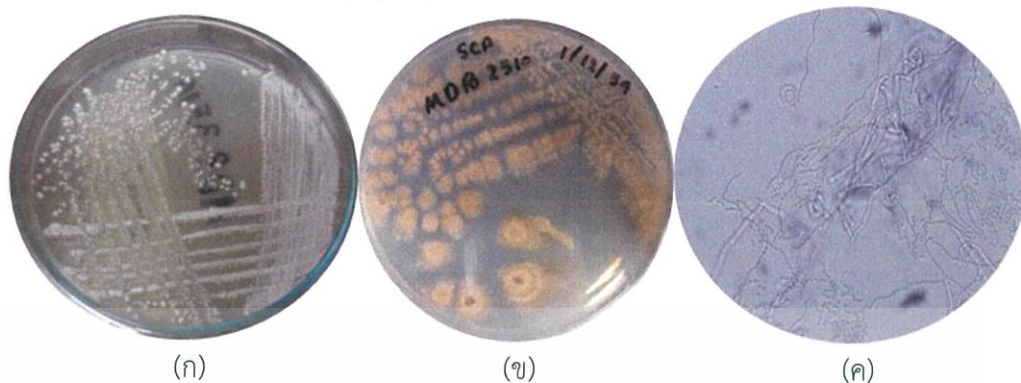
- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลทที่ MDB632 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลทที่ MDB632 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลทที่ MDB632 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)
- 4.28 เชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลท MDB36310 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Graying Blue เส้นใยอาหารสี Grayish Greenish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และ สร้างสปอร์แบบเดี่ยว (monosporous)



รูปที่ 4.37 แสดงลักษณะของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลทที่ MDB36310

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลทที่ MDB36310 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลทที่ MDB36310 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลทที่ MDB36310 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

- 4.29 เชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท MDB2510 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Graying Blue เส้นใยอาหารสี Bluish Gray ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้และสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporous) มีลักษณะเป็นแบบ Retinaculiaperti



รูปที่ 4.38 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB2510

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB2510 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB2510 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB2510 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)
- 4.30 เชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท MDB1025 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Dark Bluish Gray เส้นใยอาหารสี Deep Greenish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporous) มีลักษณะเป็นแบบ Retinaculiaperti และสร้างสปอร์เป็นสายแบบ Oligosporous ของ *Catellatospora*

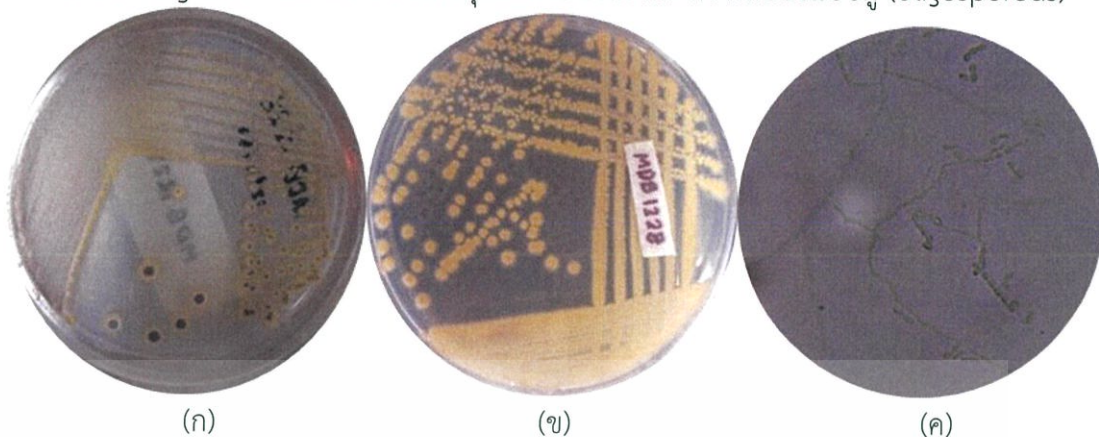


รูปที่ 4.39 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB1025

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB1025 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB1025 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB1025 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 4.31 เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท MDB1228 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Dark Bluish Gray เส้นใยอาหารสี Light Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และสร้างสปอร์แบบคู่ (oligosporous)

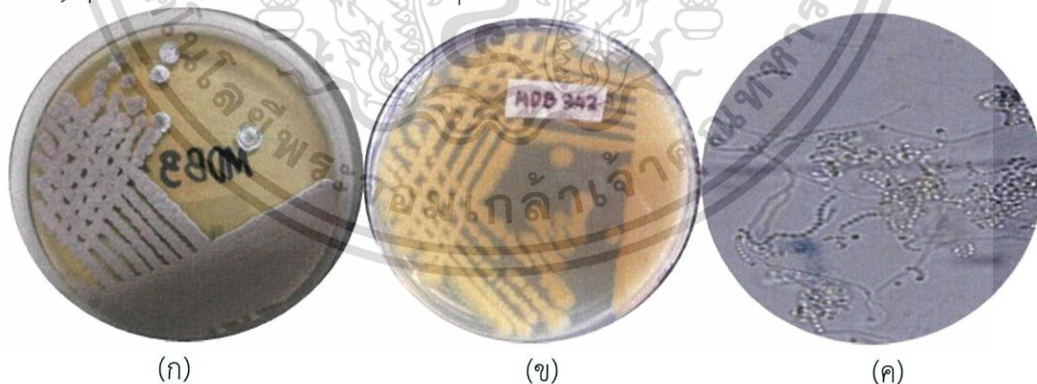


รูปที่ 4.40 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB1228

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB1228 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB1228 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB1228 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

**กลุ่มที่ 5** เป็นกลุ่มแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Purple มีสมาชิกทั้งหมด 1 ไอโซเลท ประกอบด้วย

- 5.1 เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท MDB342 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Purplish Gray เส้นใยอาหารสี Brilliant Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และ สร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Spira



รูปที่ 4.41 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB342

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB342 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB342 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB342 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงลักษณะสีฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 41 ไอโซเลท ด้วยระบบสี  
The NBS/IBCC Color System

กลุ่ม	หมายเลข ไอโซเลท	เจริญบน อาหาร Starch casein agar	สีเส้นใยบน ผิวหน้าอาหาร	สีเส้นใยใต้อาหาร	สีของรงค วัตถุ
1	MDB31310	+	#FF7A5C Strong Yellowish Pink	#F13A13 Vivid Reddish Orange	ไม่สร้างรงค วัตถุที่ละลาย น้ำได้
2	MDB548	+	#FFE2B7 Yellowish White	#CED23A Brilliant Yellow Green	ไม่สร้างรงค วัตถุที่ละลาย น้ำได้
	MDB11210	+	#FFE2B7 Yellowish White	#B07D2B Dark Yellow	#A47C45 Dark Grayish Yellow
	MDB3422	+	#FFE2B7 Yellowish White	#5E3830 Grayish Reddish Brown	#A47C45 Dark Grayish Yellow
	MDB3528	+	#FFE2B7 Yellowish White	#5E3830 Grayish Red- dish Brown	#A47C45 Dark Grayish Yellow
	MDB925	+	#404234 Olive Gray	#9B8127 Dark Greenish Yellow	ไม่สร้างรงค วัตถุที่ละลาย น้ำได้
	MDB148	+	#945DDB Light Olive Brown	#DCD36A Light Yellow Green	ไม่สร้างรงค วัตถุที่ละลาย น้ำได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงลักษณะสีฐานวิทยาของเชื้อแอสทีโนมัยซีทจำนวน 41 ไอโซเลท ด้วยระบบสี  
The NBS/IBCC Color System

กลุ่ม	หมายเลข ไอโซเลท	เจริญบน อาหาร Starch casein agar	สีเส้นใยบน ผิวหน้าอาหาร	สีเส้นใยใต้อาหาร	สีของรงควัตถุ
3	MDB2739	+	#8D917A Pale Green	#575E4E Grayish Green	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้
	MDB2839	+	#7A7666 Greenish Gray	#8C4743 Grayish Red	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้
4	MDB17310	+	#A6BDD7 Very Light Blue	#846A20 Light Olive	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้
	MDB2029	+	#A6BDD7 Very Light Blue	#BB8B54 Light Yellowish Brown	#C37629 Dark Orange Yellow
	MDB23310	+	#A6BDD7 Very Light Blue	#D79D41 Moderate Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้
	MDB2433	+	#A6BDD7 Very Light Blue	#D79D41 Moderate Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้
	MDB2639	+	#A6BDD7 Very Light Blue	#B57900 Deep Yellow	#BB8B54 Light Yellowish Brown
	MDB16310	+	#C1CACA Very Pale Blue	#9F8200 Deep Greenish Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้
	MDB1829	+	#C1CACA Very Pale Blue	#CEA262 Grayish Yellow	#C4A43D Moderate Greenish Yellow

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงลักษณะสีฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 41 ไอโซเลท ด้วยระบบสี  
The NBS/IBCC Color System

กลุ่ม	หมายเลข ไอโซเลท	เจริญบน อาหาร Starch casein agar	สีเส้นใยบน ผิวหน้าอาหาร	สีเส้นใยใต้อาหาร	สีของรงควัตถุ
4	MDB21210	+	#C1CACA Very Pale Blue	#B48764 Light Grayish Yellowish Brown	#CCA817 Strong Greenish Yellow
	MDB432	+	#919192 Pale Blue	#C2A894 Light Gray	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้
	MDB732	+	#919192 Pale Blue	#FFE2B7 Yellowish White	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้
	MDB13310	+	#919192 Pale Blue	#9B8127 Dark Greenish Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้
	MDB14310	+	#919192 Pale Blue	#8B8940 Moderate Yellow Green	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้
	MDB37310	+	#919192 Pale Blue	#8B8940 Moderate Yellow Green	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้
	MDB38310	+	#919192 Pale Blue	#8B8940 Moderate Yellow Green	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้
	MDB15310	+	#919192 Pale Blue	#7F8F18 Strong Yellow Green	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้
	MDB1929	+	#919192 Pale Blue	#05265B Vivid Purplish Red	#CCA817 Strong Greenish Yellow

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงลักษณะสีพื้นฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 41 ไอโซเลท ด้วยระบบสี  
The NBS/IBCC Color System

กลุ่ม	หมายเลข ไอโซเลท	เจริญบน อาหาร Starch casein agar	สีเส้นใยบน ผิวหน้าอาหาร	สีเส้นใยใต้อาหาร	สีของรงควัตถุ
4	MDB22310	+	#919192 Pale Blue	#CED23A Brilliant Yellow Green	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้
	MDB2539	+	#919192 Pale Blue	#FFDB8B Pale Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้
	MDB2939	+	#919192 Pale Blue	#7A7666 Greenish Gray	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้
	MDB30310	+	#919192 Pale Blue	#B32851 Strong Purplish Red	#A86540 Light Brown
	MDB3222	+	#919192 Pale Blue	#AB343A Moderate Red	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้
	MDB3322	+	#919192 Pale Blue	#A47C45 Dark Grayish Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้
	MDB40310	+	#919192 Pale Blue	#CCA817 Strong Greenish Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้
	MDB4123	+	#4A545C Graying Blue	#9F8200 Deep Greenish Yellow	#CCA817 Strong Greenish Yellow
	MDB822	+	#4A545C Graying Blue	#9F8200 Deep Greenish Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงลักษณะสีฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 41 ไอโซเลท ด้วยระบบสี  
The NBS/IBCC Color System

กลุ่ม	หมายเลข ไอโซเลท	เจริญบน อาหาร Starch casein agar	สีเส้นใยบน ผิวหน้าอาหาร	สีเส้นใยใต้อาหาร	สีของรงควัตถุ
4	MDB39310	+	#4A545C Graying Blue	#7F8F18 Strong Yellow Green	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้
	MDB632	+	#4A545C Graying Blue	#7F8F18 Strong Yellow Green	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้
	MDB36310	+	#4A545C Graying Blue	#C4A55F Grayish Greenish Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้
	MDB2510	+	#4A545C Graying Blue	#7D746D Bluish Gray	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้
	MDB1025	+	#464544 Dark Bluish Gray	#8F8200 Deep Greenish Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้
	MDB1228	+	#464544 Dark Bluish Gray	#FFD35F Light Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้
5	MDB342	+	#88706B Purplish Gray	#CED23A Brilliant Yellow Green	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.2.2 ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีท

สำหรับการศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากตัวอย่างบริเวณดินนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี (ดังวิธีการที่ 3.6.7) มีการทดสอบทางชีวเคมีทั้งหมด 5 การทดสอบ ได้แก่ การทดสอบการตกตะกอน (Coagulation) ในหลอดอาหาร 10% skim milk, การทดสอบการย่อยสลายโปรตีน (Casein hydrolysis) บนอาหาร Skim milk agar, การทดสอบการย่อยสลายเจลาติน (Gelatin liquefaction), การทดสอบการย่อยสลายไนเตรท (Nitrate reduction), และ การทดสอบการย่อยสลายแป้ง (Starch hydrolysis) ซึ่งจากการศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีท ตามวิธีดังกล่าวข้างต้น พบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีท 41 ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากดินนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี สามารถจัดกลุ่มเชื้อที่ให้ผลการทดสอบเป็น 5 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีท

กลุ่ม	หมายเลขไอโซเลท	Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Starch hydrolysis
		Casein hydrolysis	Coagulation			
1	MDB31310	-	-	w	w	-
2	MDB548	-	w	-	-	w
	MDB11210	w	-	+	-	+
	MDB3422	-	+	+	-	-
	MDB3528	-	w	+	-	-
	MDB925	-	+	+	-	+
	MDB148	+	+	-	w	w
3	MDB2739	-	-	+	+	-
	MDB2839	w	-	+	+	-
4	MDB17310	-	-	+	w	-
	MDB2029	-	w	+	-	-
	MDB23310	-	-	w	-	-
	MDB2433	+	w	w	-	-
	MDB2639	-	w	+	+	-
	MDB16310	-	w	+	-	-
	MDB1829	w	w	+	-	-
	MDB21210	+	w	+	-	w
	MDB432	w	+	+	-	+
	MDB732	-	+	-	+	w
	MDB13310	-	w	w	-	-

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีท

กลุ่ม	หมายเลข ไอโซเลท	Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Starch hydrolysis
		Casein hydrolysis	Coagulation			
4	MDB14310	-	+	-	+	-
	MDB37310	-	-	w	-	-
	MDB38310	-	-	+	-	-
	MDB15310	-	-	-	w	-
	MDB1929	-	-	w	-	-
	MDB22310	-	+	+	+	-
	MDB2539	-	w	-	-	+
	MDB2939	-	w	+	+	-
	MDB30310	-	w	+	w	-
	MDB3222	+	w	-	+	-
	MDB3322	w	-	+	-	-
	MDB40310	-	w	+	-	-
	MDB4123	+	-	+	-	-
	MDB822	-	+	-	-	-
	MDB39310	-	-	+	-	-
	MDB632	+	w	-	-	-
	MDB36310	-	-	-	w	-
	MDB2510	-	-	+	-	-
MDB1025	-	+	+	-	w	
MDB1228	-	w	+	-	-	
5	MDB342	-	+	w	-	-

หมายเหตุ : + = positive reaction , - = negative reaction , w = weakly positive reaction

ความแตกต่างของวิธีการทดสอบโดย Coagulation , Casein hydrolysis และ Gelatin liquefaction คือวิธี Coagulation เป็นการทดสอบการตกตะกอนเคซีนในน้ำนมสามารถแยกออกจากน้ำนมโดยการตกตะกอนด้วยเอนไซม์เรนนิ (rennin) ซึ่งเป็นเอนไซม์ (enzyme) ชนิดโปรติเอส (protease) สามารถย่อยเคซีนให้มีโมเลกุลเล็กลงโดยเรนนิจะย่อยเคซีน แล้วรวมกับแคลเซียมไอออน แยกตัวออกมาเป็นตะกอนขาวขุ่น (พิมพ์เพ็ญ, 2556) สำหรับวิธี Casein hydrolysis เป็นการทดสอบการย่อยสลายโปรตีน เพื่อดูว่าเชื้อสามารถผลิต exoenzyme ได้หรือไม่ โดยมีการใช้เอนไซม์ไคซิเนส เอนไซม์ไคซิเนสจะหลั่งออกมาจากเซลล์ (exoenzyme) เข้าไปในตัวกลางซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของโปรตีนนมที่เรียกว่าเคซีน และปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อจากเดิมที่มีความขุ่นของนม ทำให้โปรตีนเคซีนเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ที่ละลายได้และมีความโปร่งใส (วงใส) ซึ่งเคซีนถูกจัดให้เป็นโปรตีนชนิด ฟอสโฟโปรตีน (Reynolds, 2011) ส่วนการทดสอบการย่อยสลายเจลาติน ซึ่งเป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อในการผลิต proteolytic enzyme โดยการใช้เอนไซม์เจลาติเนส (gelatinase) ซึ่งเจลาตินนั้นเป็นไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนุพันธ์ของโปรตีนที่ได้จากคอลลาเจนซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่มโปรตีนเส้นใย (fibrous protein) เจลาตินสเปประกอบด้วย extracellular enzymes ที่ผลิตมาจากเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดเพื่อทำการย่อยสลายเจลาติน ตรวจสอบโดยเจลาตินจะเกิดการแข็งตัวของอาหาร ถ้าเจลาตินไม่แข็งตัวเกิดจากจุลินทรีย์ไม่มีการผลิตเอนไซม์ ( Leboffe and Pierce, 2011)

#### 4.3 การศึกษาเชื้อแอกติโนมัยซีทที่มีความสามารถในการเจริญบนอาหาร Starch casein agar ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3, 5, 7, 9, 12 และ 15

จากเชื้อแอกติโนมัยซีท 41 ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากตัวอย่างบริเวณดินนาเกลือ นำมาทำการศึกษาเชื้อแอกติโนมัยซีทที่มีความสามารถในการเจริญบนอาหาร Starch casein agar ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3, 5, 7, 9, 12 และ 15 พบว่า เชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 41 ไอโซเลทสามารถเจริญบนอาหาร Starch casein agar ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3, เชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 41 ไอโซเลทสามารถเจริญบนอาหาร Starch casein agar ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 5, เชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 39 ไอโซเลทสามารถเจริญบนอาหาร Starch casein agar ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 7, เชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 39 ไอโซเลทสามารถเจริญบนอาหาร Starch casein agar ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 9, เชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 35 ไอโซเลทสามารถเจริญบนอาหาร Starch casein agar ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 12 และ เชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 32 ไอโซเลทสามารถเจริญบนอาหาร Starch casein agar ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 15 ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 แสดงการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทบนอาหาร Starch casein agar ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 3, 5, 7, 9, 12 และ 15

กลุ่ม	หมายเลขไอโซเลท	ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (ร้อยละ)					
		3	5	7	9	12	15
1	MDB31310	++++	+++++	++++	++++	+++	++
	MDB548	+++	+++++	++++	+++	+++	++
2	MDB11210	++++	+++++	+++	++++	+++	++
	MDB3422	++	+++	+	+	-	-
	MDB3528	++++	+++	++	+	-	-
	MDB925	++++	+++++	+++	++++	+++	++
	MDB148	+++	+++++	+++	++++	+++	++
3	MDB2739	+	++	-	-	-	-
	MDB2839	+++	++++	+++++	+++	+++	++
4	MDB17310	+++	+++++	+++	++++	+++	+++
	MDB2029	++++	+++++	+++	++++	+++	++
	MDB23310	+++	+++++	++++	++++	+++	++
	MDB2433	+++	++++	+++	+++	++	-
	MDB2639	+++++	+++++	+++	++	+	++

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์อื่นใด

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทบนอาหาร Starch casein agar ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 3 , 5 , 7 , 9 , 12 และ 15

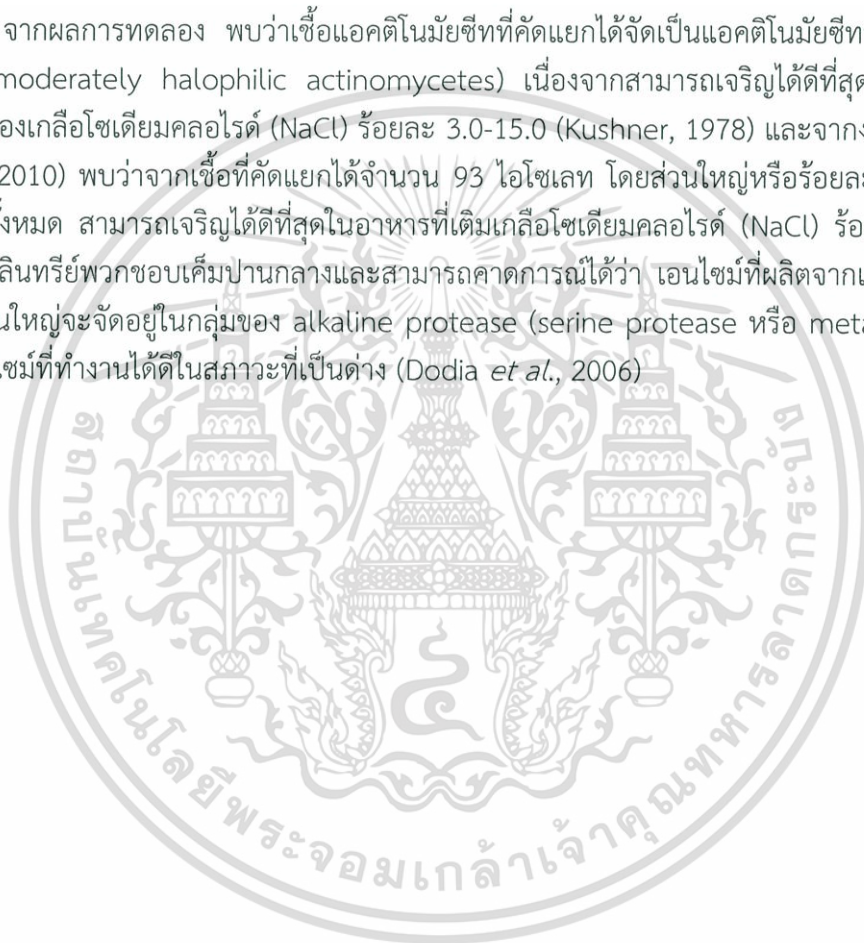
กลุ่ม	หมายเลขไอโซเลท	ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (ร้อยละ)					
		3	5	7	9	12	15
4	MDB16310	++++	+++++	++++	+++	++++	++
	MDB1829	++	+++++	++++	++++	+++	+++
	MDB21210	+++	++++	++	+++	++	-
	MDB432	++++	+++++	+++	++	+	-
	MDB732	+++	++++	+++	++	+++	++
	MDB13310	++++	+++++	+++	+++	++	+++
	MDB14310	+++	++++	+++++	++++	+++	++
	MDB37310	+++	++++	+++	+++	++	++
	MDB38310	++++	+++++	++++	++++	+++	++
	MDB15310	++++	+++++	++++	+++	++++	+++
	MDB1929	+++	++++	+++	+++	++	+++
	MDB22310	++++	+++++	++++	++++	+++	+++
	MDB2539	++++	+++++	+++	++++	+++	++
	MDB2939	+++	++++	+++	+++	++	++
	MDB30310	+++	+++++	++++	++	+++	+++
	MDB3222	+++	++++	+++	+++	++	++
	MDB3322	++++	+++++	++	+	-	-
	MDB40310	+++	+++++	++++	+++	++++	++
	MDB4123	++++	+++++	+++	++++	+++	++
	MDB822	+++	++++	+++	++++	+++	+++
MDB39310	+++	+++++	++++	++++	+++	+++	
MDB632	++	+++	-	-	-	-	
MDB36310	+++	++++	+++++	++++	+++	++	
MDB2510	+++	+++++	+++	+	-	-	
MDB1025	+++	++++	++	+++	+++	++	
MDB1228	++++	+++++	++++	+++	+++	++	
5	MDB342	++++	+++++	++++	+++	++++	+++

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

\*\*\* หมายเหตุ อัตราการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทบนอาหาร Starch casein agar ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์

- +++++ หมายถึง เชื้อแอคติโนมัยซีทเจริญได้ดีมาก
- ++++ หมายถึง เชื้อแอคติโนมัยซีทเจริญได้ดี
- +++ หมายถึง เชื้อแอคติโนมัยซีทเจริญได้ปานกลาง
- ++ หมายถึง เชื้อแอคติโนมัยซีทเจริญได้น้อย
- + หมายถึง เชื้อแอคติโนมัยซีทเจริญได้น้อยมาก
- หมายถึง เชื้อแอคติโนมัยซีทเจริญไม่ได้

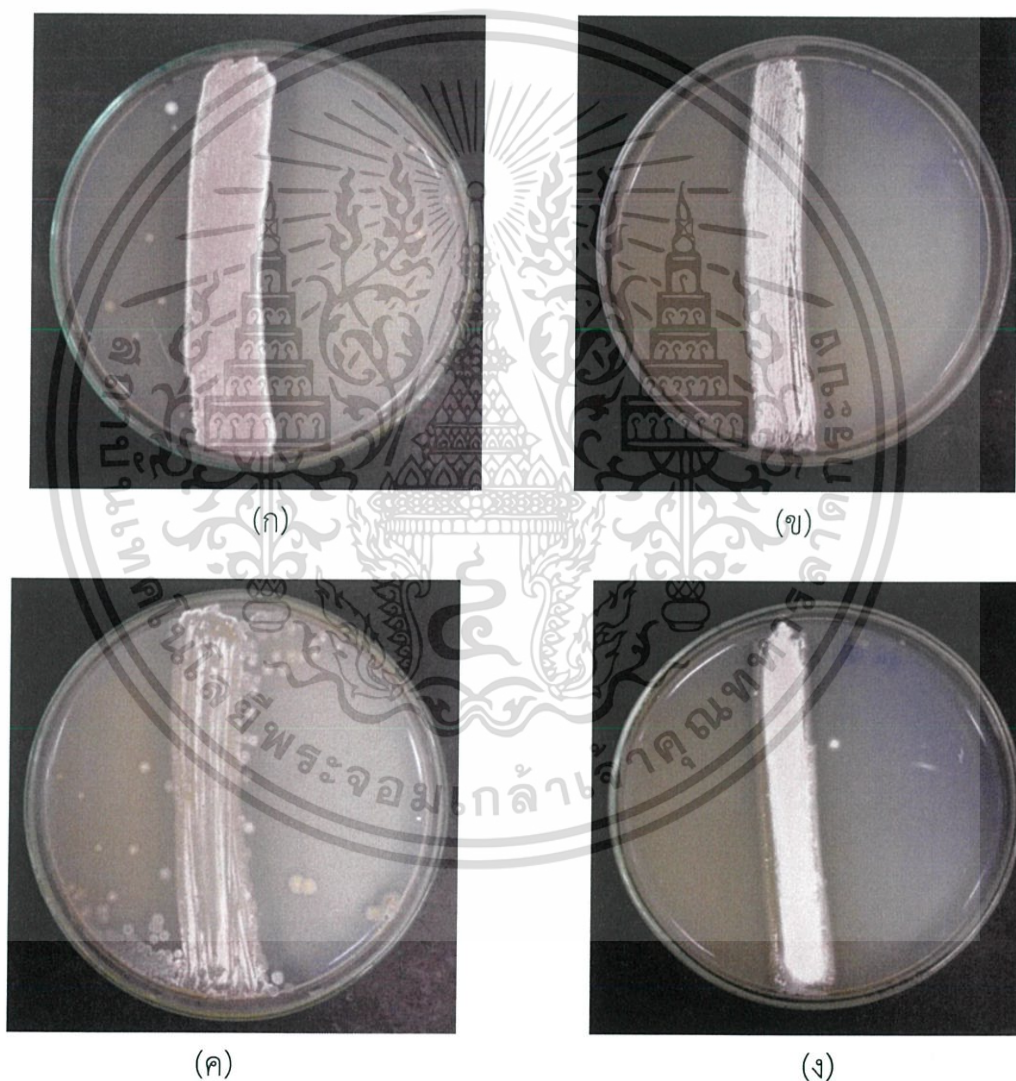
จากผลการทดลอง พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จัดเป็นแอคติโนมัยซีทพวกชอบเกลือปานกลาง (moderately halophilic actinomycetes) เนื่องจากสามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ร้อยละ 3.0-15.0 (Kushner, 1978) และจากงานวิจัยของ Rajan *et al.* (2010) พบว่าจากเชื้อที่คัดแยกได้จำนวน 93 ไอโซเลท โดยส่วนใหญ่หรือร้อยละ 75 ของเชื้อที่คัดแยกได้ทั้งหมด สามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ร้อยละ 3.0-10.0 จึงจัดเป็นจุลินทรีย์พวกชอบเค็มปานกลางและสามารถคาดการณ์ได้ว่า เอนไซม์ที่ผลิตจากแอคติโนมัยซีทชอบเกลือส่วนใหญ่จะจัดอยู่ในกลุ่มของ alkaline protease (serine protease หรือ metalloprotease) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง (Dodia *et al.*, 2006)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.4 การคัดเลือกแอสติโนมัยซีทที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์

จากเชื้อแอสติโนมัยซีทจำนวน 41 ไอโซเลทที่คัดแยกได้ นำมาทดสอบการย่อยสลายโปรตีน (Casein hydrolysis) ในอาหาร Skim milk agar เพื่อทำการคัดเลือกเชื้อแอสติโนมัยซีทที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส พบว่า เชื้อแอสติโนมัยซีทที่มีการเกิดบริเวณใส (clear zone) บนอาหาร Skim milk agar มีจำนวน 6 ไอโซเลท คือ เชื้อแอสติโนมัยซีทที่ MDB148, MDB632, MDB21210, MDB2433, MDB3222 และ MDB4123 สำหรับเชื้อแอสติโนมัยซีท 3 ไอโซเลท คือ K6786-3, B8810-1 และ B8800-3 เป็นเชื้อแอสติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากบริเวณดินนาเกลือ ตำบลโคกขาม จังหวัดสมุทรสาคร และ ตำบลบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา จากโครงการพิเศษของ ทิพย์วรรณ และคณะ, (2558) ดังแสดงรูปที่ 4.42 , ตารางที่ 4.6 และ 4.7 เนื่องจากเชื้อแอสติโนมัยซีทที่คัดแยกได้มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสเนื่องจากสามารถย่อยโปรตีนของ Skim milk ได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



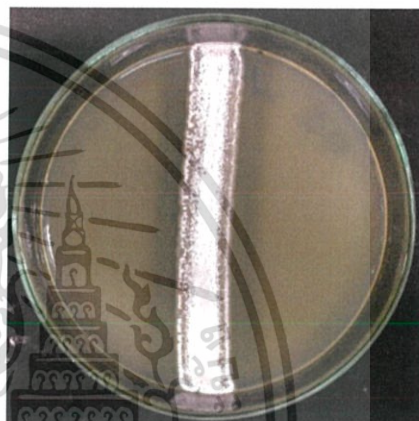
(จ)



(ข)



(ค)



(ง)



(ฉ)

รูปที่ 4.42 แสดงความกว้างของบริเวณใส (Clear zone ) เชื้อแอกติโนมัยซีททั้งหมด 9 ไอโซเลท ได้แก่ MDB148(ก) MDB632(ข) MDB21210(ค) MDB2433(ง) MDB3222(จ) MDB4123(ฉ) K6786-3(ช) B8810-1(ซ) และ B8800-3(ฅ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 แสดงความกว้างของบริเวณใส (Clear zone) ของเชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 41 ไอโซเลท จากตัวอย่างดินบริเวณนาเกลือ ตำบล บ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี

กลุ่ม	หมายเลข ไอโซเลท	ขนาดของ บริเวณใส ซ้ำที่ 1 (mm)	ขนาดของ บริเวณใส ซ้ำที่ 2 (mm)	ค่าเฉลี่ย (mm)
1	MDB31310	0.00	0.00	0.00
2	MDB548	0.00	0.00	0.00
	MDB11210	0.00	0.00	0.00
	MDB3422	0.00	0.00	0.00
	MDB3528	0.00	0.00	0.00
	MDB925	0.00	0.00	0.00
	MDB148	26.85	29.18	28.02
3	MDB2739	0.00	0.00	0.00
	MDB2839	0.00	0.00	0.00
4	MDB17310	0.00	0.00	0.00
	MDB2029	0.00	0.00	0.00
	MDB23310	0.00	0.00	0.00
	MDB2433	17.63	16.97	17.30
	MDB2639	0.00	0.00	0.00
	MDB16310	0.00	0.00	0.00
	MDB1829	0.00	0.00	0.00
	MDB21210	24.20	32.54	28.37
	MDB432	0.00	0.00	0.00
	MDB732	0.00	0.00	0.00
	MDB13310	0.00	0.00	0.00
	MDB14310	0.00	0.00	0.00
	MDB37310	0.00	0.00	0.00
	MDB38310	0.00	0.00	0.00
MDB15310	0.00	0.00	0.00	
MDB1929	0.00	0.00	0.00	
MDB22310	0.00	0.00	0.00	
MDB2539	0.00	0.00	0.00	
	MDB2939	0.00	0.00	0.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของสำนักงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 แสดงความกว้างของบริเวณใส (Clear zone) ของเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 41 ไอโซเลท จากตัวอย่างดินบริเวณนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี

กลุ่ม	หมายเลข ไอโซเลท	ขนาดของ บริเวณใส ซ้ำที่ 1 (mm)	ขนาดของ บริเวณใส ซ้ำที่ 2 (mm)	ค่าเฉลี่ย (mm)
4	MDB30310	0.00	0.00	0.00
	MDB3222	26.59	25.40	26.00
	MDB3322	0.00	0.00	0.00
	MDB40310	0.00	0.00	0.00
	MDB4123	19.17	20.49	19.83
	MDB822	0.00	0.00	0.00
	MDB39310	0.00	0.00	0.00
	MDB632	19.00	21.48	20.24
	MDB36310	0.00	0.00	0.00
	MDB2510	0.00	0.00	0.00
	MDB1025	0.00	0.00	0.00
	MDB1228	0.00	0.00	0.00
5	MDB342	0.00	0.00	0.00

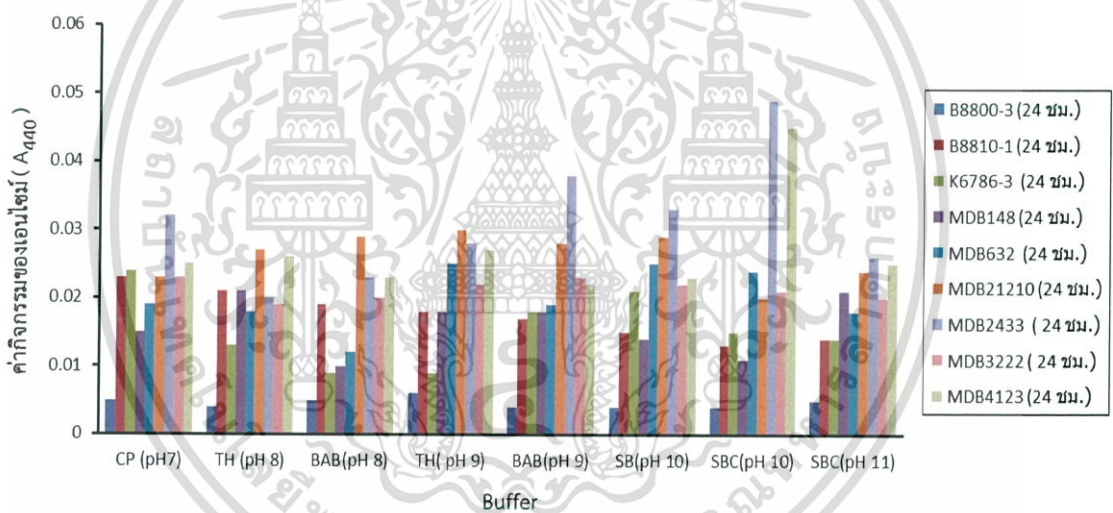
ตารางที่ 4.7 แสดงความกว้างของบริเวณใส (Clear zone) ของเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 3 ไอโซเลท จาก ตัวอย่างดินบริเวณนาเกลือ ตำบลโคกขาม จังหวัดสมุทรสาคร และ ตำบลบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา (ทิพย์วรรณ และคณะ, 2558)

หมายเลข ไอโซเลท	ขนาดของบริเวณใส ซ้ำที่ 1 (mm)	ขนาดของบริเวณใส ซ้ำที่ 2 (mm)	ค่าเฉลี่ย (mm)
B8800-3	29.94	28.78	29.36
B8810-1	45.94	48.97	47.46
K6786-3	26.43	35.28	30.86

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.5 การตรวจสอบค่าความเป็นกรดต่าง ( pH ) ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

จากการคัดเลือกเชื้อแอสกีโนมัยซีทที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยการเกิดบริเวณใส ( clear zone ) รอบโคโลนีของเชื้อแอสกีโนมัยซีทบนอาหาร Skim milk agar ได้นำเชื้อแอสกีโนมัยซีทมาทำการคำนวณหาสปอร์เริ่มต้นของเชื้อที่เกิดวงใสสูงที่สุดทั้งหมด 9 ไอโซเลท ด้วยวิธีการ Spore pre-germinate ตามวิธีการที่ 3.6.8 และสกัดเอนไซม์จากเชื้อแอสกีโนมัยซีทต่อไปตามวิธีการที่ 3.6.9 จากนั้นทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสด้วยวิธี Azocasein method (ภาคผนวก ค) เพื่อตรวจหาค่ากิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์โปรติเอสโดยนำเอนไซม์ที่สกัดได้มาทำการทดสอบหาความเป็นกรดต่าง ( pH ) ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ตามขั้นตอนที่ 3.9.10 ซึ่งบัฟเฟอร์ที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ Citrate-phosphate buffer (pH 7), Boric acid-borax buffer (pH 8), Tris-HCl buffer (pH 8), Tris-HCl buffer (pH 9), Boric acid-borax buffer (pH 9), Sodium borate buffer (pH 10), Sodium bicarbonate buffer (pH 10) และ Sodium bicarbonate buffer (pH 11) (ภาคผนวก ข) และทำการวัดค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer แสดงผลดังตารางที่ ค (๗) และตารางที่ ค (๘) (ภาคผนวก ฉ) และรูปที่ 4.43 และ 4.44



รูปที่ 4.43 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรดต่างกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อแอสกีโนมัยซีททั้ง 9 ไอโซเลท ที่เพาะเลี้ยงในระยะเวลาที่ 24 ชั่วโมง



ชั่วโมง จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ pH 10 (Sodium bicarbonate buffer) แสดงให้เห็นว่าความเป็นกรดต่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ส่วนใหญ่ คือ pH 10 จากผลการทดลองข้างต้น จึงได้เลือกใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ที่ทำให้เกิดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้สูงสุดของแต่ละไอโซเลท เพื่อใช้ในการวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์ต่อไป ดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 แสดงผลของค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดของเชื้อแอคติโนมัยซีททั้งหมด 9 ไอโซเลท ที่เพาะเลี้ยงในระยะเวลา 24 และ 30 ชั่วโมง

หมายเลขไอโซเลท	เวลา (ชั่วโมง)	บัฟเฟอร์	pH	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (A <sub>440</sub> )
B8800-3	30	Citrate-phosphate buffer	7	0.017
B8810-1	30	Tris-HCl buffer	9	0.037
K6786-3	30	Citrate-phosphate buffer	7	0.029
MDB148	30	Sodium borate buffer	10	0.036
MDB632	30	Tris-HCl buffer	8	0.027
MDB21210	30	Boric acid borax buffer	8	0.043
MDB2433	24	Sodium bicarbonate buffer	10	0.049
MDB3222	30	Tris-HCl buffer	9	0.025
MDB4123	24	Sodium bicarbonate buffer	10	0.045

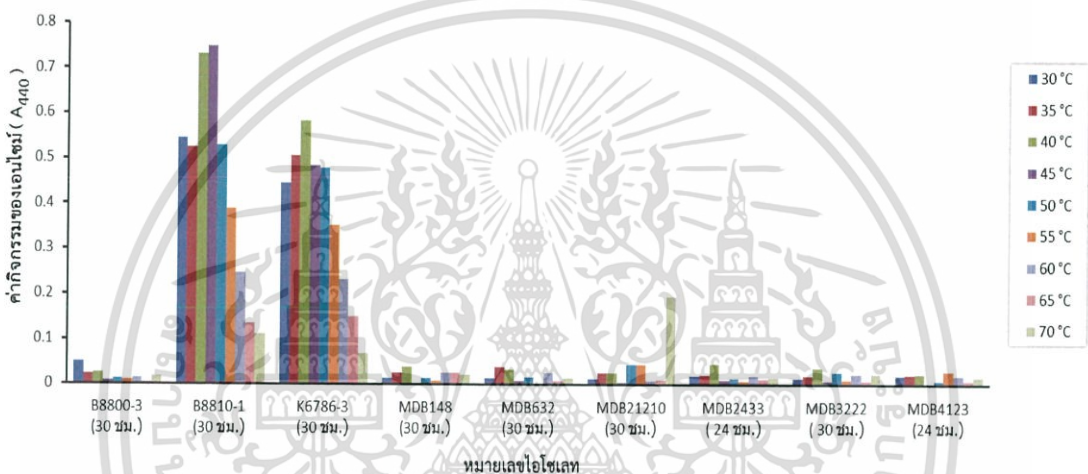
จากงานวิจัยของ Suthindhiran *et al.* (2013) พบว่า เอนไซม์ที่สกัดได้จากแอคติโนมัยซีทมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ pH 10 และค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีความสามารถในการทำงานได้ในช่วงค่าความเป็นกรดต่าง (pH) เท่ากับ 10 ถึง 12

สำหรับวิธี Azocasein method ที่ใช้สำหรับในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่า ไม่สามารถนำผลการทดลองที่ได้จากการวิเคราะห์มาคำนวณเป็นค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในหน่วยยูนิท (Unit/ml) โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนได้ (Standard curve) เนื่องจากวิธีนี้ได้กำหนดให้ 1 หน่วยของกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (Unit/ml) เท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร เพิ่มขึ้น 0.1 ภายใต้สภาวะที่ใช้วิเคราะห์ ดังนั้น สามารถนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตรจากการวิเคราะห์มาใช้ในการแสดงผลการทดลองได้ โดยไม่จำเป็นต้องคำนวณเป็นค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในหน่วยยูนิท (Unit/ml) และเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (Standard curve) (Uddin *et al.*, 2014) ซึ่งแตกต่างจากวิธี Lowry method ที่มีการเทียบกับสารละลายโปรตีนมาตรฐานของ bovine serum albumin และมีการคำนวณเป็นค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในหน่วยยูนิท (Unit/ml) (El-Khonezy *et al.*, 2015)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.6 การตรวจสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

จากการทดสอบหาความเป็นกรดต่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเอสด้วยวิธี Azocasein method จากนั้นนำเอนไซม์ที่สกัดได้จากวิธีการที่ 3.6.9 มาทำการวิเคราะห์อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ เพื่อตรวจหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีททั้งหมด 9 ไอโซเลทที่ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 24 และ 30 ชั่วโมง โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับขั้นตอนการตรวจสอบหาความเป็นกรดต่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ แต่ทำการเปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม ได้แก่ 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส และใช้บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมจากข้อ 4.5 จากนั้นทำการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer แสดงผลดังตารางที่ ค (๙) (ภาคผนวก ฅ) และรูปที่ 4.45



รูปที่ 4.45 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อแอคติโนมัยซีททั้งหมด 9 ไอโซเลท ที่บ่มอุณหภูมิต่างๆกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์

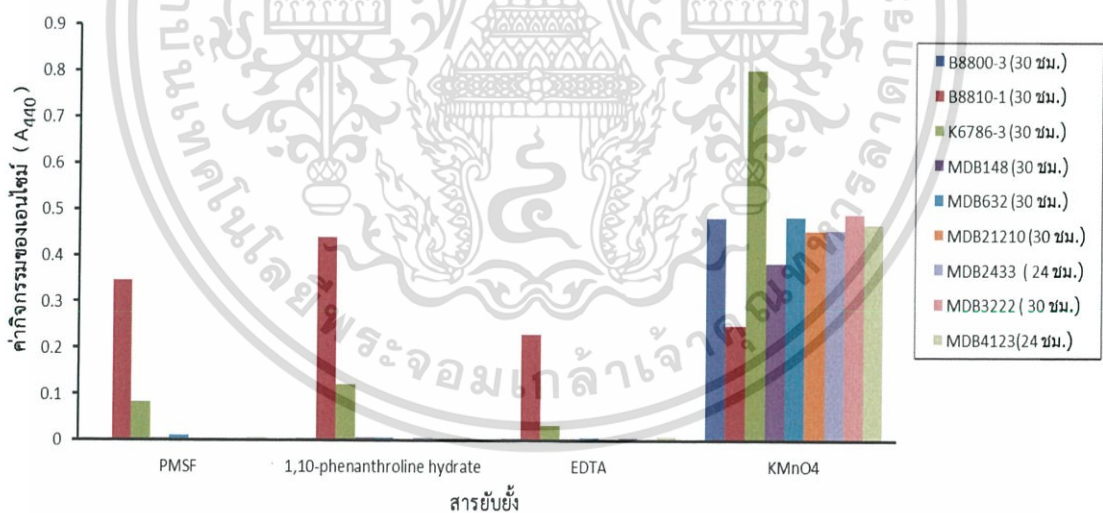
จากรูปที่ 4.45 พบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB2433 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 24 ชั่วโมง และเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ K6786-3, MDB148 และ MDB3222 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 30 ชั่วโมง มีความสามารถในการทำงานหรือค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สำหรับเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ B8800-3, MDB632, B8810-1, MDB4123 และ MDB21210 มีความสามารถในการทำงานหรือค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่แตกต่างกันไป ดังนี้ เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ B8800-3 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 30 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส, เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB632 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 30 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส, เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ B8810-1 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 30 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส, เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB4123 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 24 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB21210 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 30 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อ

การทำงานของเอนไซม์ส่วนใหญ่ คือ 40 องศาเซลเซียส จากงานวิจัยของ Vonothini *et al.* (2008) ระบุว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่า เอนไซม์ที่สกัดได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีทมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และจากงานวิจัยของ Karthik *et al.* (2011) พบว่า เอนไซม์ที่สกัดได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีทมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อแอคติโนมัยซีทและทำให้เอนไซม์โปรติเอสมีความสามารถในการทำงานได้เป็นอย่างดีเมื่อเทียบกับอุณหภูมิต่างๆ

#### 4.7 การศึกษาสารยับยั้ง (inhibitor) ที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

จากการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธี Azocasein method ตามวิธีการที่ 3.6.11 จากนั้นนำเอนไซม์ที่สกัดได้นำมาวิเคราะห์หาสารยับยั้งที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีการที่ 3.6.12 โดยใช้สารยับยั้ง (inhibitor) 4 ชนิด ได้แก่ phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF), 1,10-phenanthroline hydrate ( $C_8H_{12}N_2$ ), ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA) และ  $KMnO_4$  เพื่อตรวจสอบหาสารยับยั้งที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งเป็นคุณสมบัติอย่างหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการแบ่งกลุ่มของเอนไซม์ตามกลไกการทำงานหรือลักษณะบริเวณเร่งของเอนไซม์ได้ โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับขั้นตอนการตรวจสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสม และ ใช้บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมจากข้อ 4.5 จากนั้นนำมาวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer แสดงดังตารางที่ ค (๑๐) (ภาคผนวก ฉ) และรูปที่ 4.46



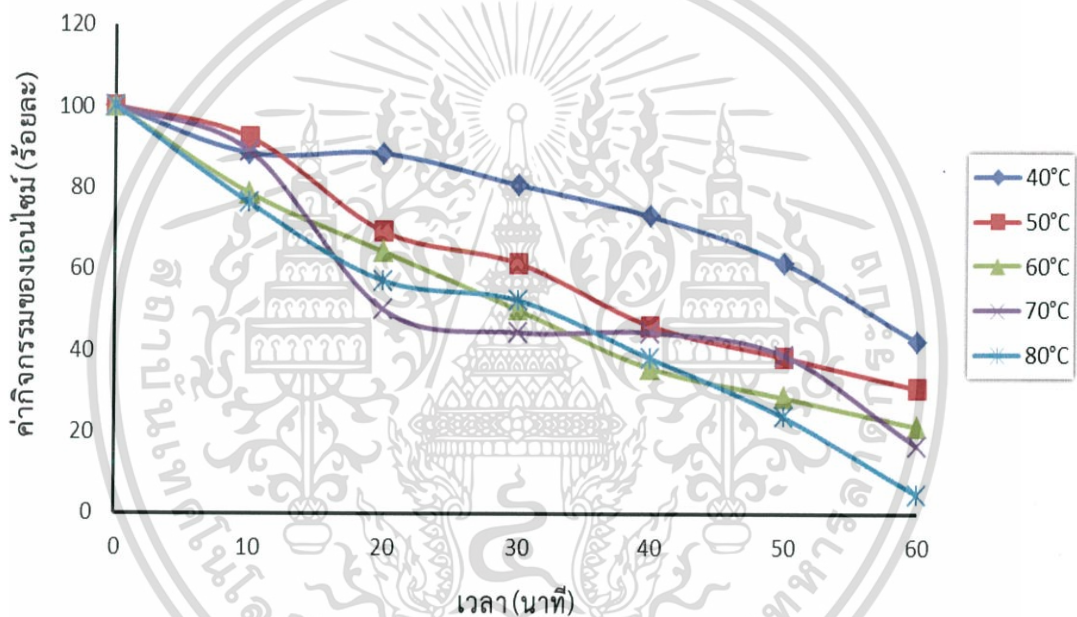
รูปที่ 4.46 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารยับยั้งต่างๆกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.46 พบว่า สารยับยั้งที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่ำสุด คือ ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) โดยเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อแอสคิตินัมยีสของไอโซเลทที่ MDB21210 และ MDB3222 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลา 30 ชั่วโมง ถูกยับยั้งโดยสารยับยั้ง ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) เป็นอย่างดี เนื่องจากมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์น้อยที่สุด คือ 0.004 สำหรับ สารยับยั้ง phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF) มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงรองมาจากสารยับยั้ง ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) โดยเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อแอสคิตินัมยีสของไอโซเลทที่ B8800-3 และ MDB3222 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลา 30 ชั่วโมง ถูกยับยั้งโดยสารยับยั้ง phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF) เป็นอย่างดี เนื่องจากมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์น้อยที่สุด คือ 0.002 สำหรับสารยับยั้ง 1,10-phenanthroline hydrate ( $C_8H_{12}N_2$ ) มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงรองมาจากสารยับยั้ง phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF) โดยเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อแอสคิตินัมยีสของไอโซเลทที่ MDB21210 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลา 30 ชั่วโมง ถูกยับยั้งโดยสารยับยั้ง 1,10-phenanthroline hydrate ( $C_8H_{12}N_2$ ) เป็นอย่างดี เนื่องจากมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์น้อยที่สุด คือ 0.004 และสารยับยั้ง  $KMnO_4$  เป็นสารยับยั้งที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด โดยเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อแอสคิตินัมยีสของไอโซเลทที่ B8810-1 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลา 30 ชั่วโมง ถูกยับยั้งโดยสารยับยั้ง  $KMnO_4$  เป็นอย่างดี เนื่องจากมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์น้อยที่สุด คือ 0.249 แสดงให้เห็นว่าสารยับยั้งที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ดีที่สุด คือ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF), 1,10-phenanthroline hydrate ( $C_8H_{12}N_2$ ) และ  $KMnO_4$  จากงานวิจัยของ THYS *et al.* (2004) พบว่า สารยับยั้ง EDTA และ 1,10-Phenanthroline สามารถยับยั้งเอนไซม์ที่สกัดได้เป็นอย่างดี แต่สารยับยั้ง phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF),  $pCMB$ , benzamidine และ pepstatin ไม่สามารถยับยั้งเอนไซม์ที่สกัดได้ ดังนั้น สารยับยั้ง ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) จึงมีผลต่อการยับยั้งเอนไซม์ที่สกัดได้จากเชื้อแอสคิตินัมยีสสูงที่สุดจึงสามารถจัดให้เอนไซม์ที่สกัดได้ดังกล่าวอยู่ในกลุ่มของ metalloprotease (Suthindhiran *et al.*, 2013)

#### 4.8 การศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์

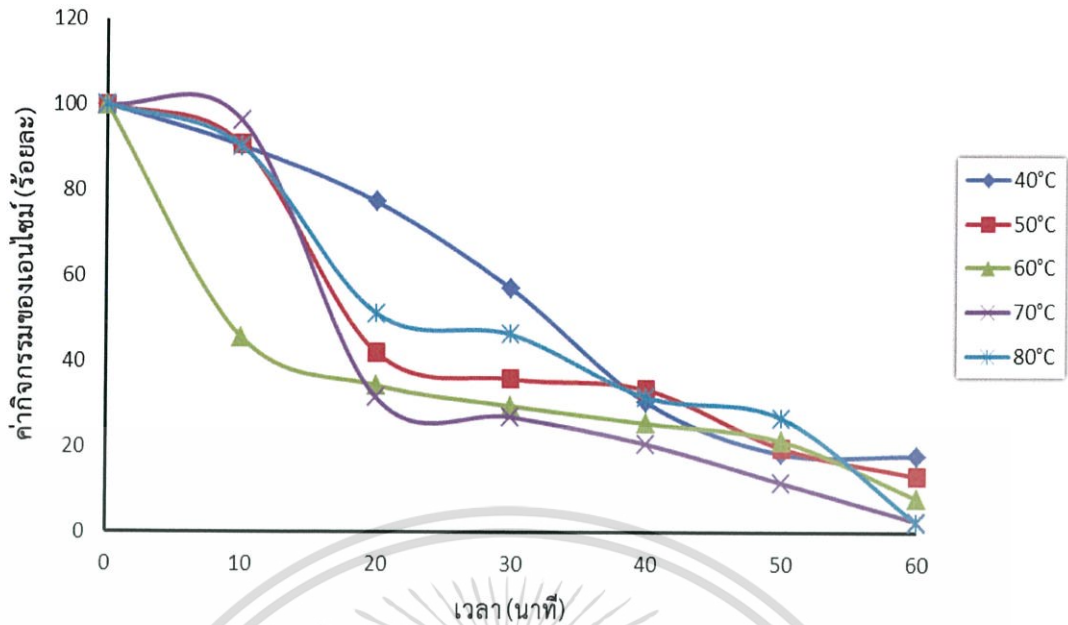
จากการนำเอนไซม์ที่สกัดได้จากเชื้อแอสคิโตโนมัยซีททั้ง 9 ไอโซเลท ได้แก่ B8800-3 (30 ชั่วโมง), B8810-1 (30 ชั่วโมง), K6786-3 (30 ชั่วโมง), MDB148 (30 ชั่วโมง), MDB632 (30 ชั่วโมง), MDB21210 (30 ชั่วโมง), MDB2433 (24 ชั่วโมง), MDB3222 (30 ชั่วโมง) และ MDB4123 (24 ชั่วโมง) มาบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บเอนไซม์ทุกๆ 10 นาที ครั้งละ 20 ไมโครลิตร จนครบ 1 ชั่วโมง โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับขั้นตอนการหาความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์และใช้บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมจากข้อ 4.5 เพื่อตรวจหาความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ เวลาและค่ากิจกรรมของเอนไซม์โดยศึกษาจากค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ณ อุณหภูมิหนึ่งเมื่อเวลาผ่านไป โดยตรวจวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ดังแสดงตารางที่ ค (๑๑) (ภาคผนวก ฉ) และ รูปที่ 4.47 ถึง 4.55



รูปที่ 4.47 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ, เวลา และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อแอสคิโตโนมัยซีทไอโซเลทที่ B8800-3 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 30 ชั่วโมง

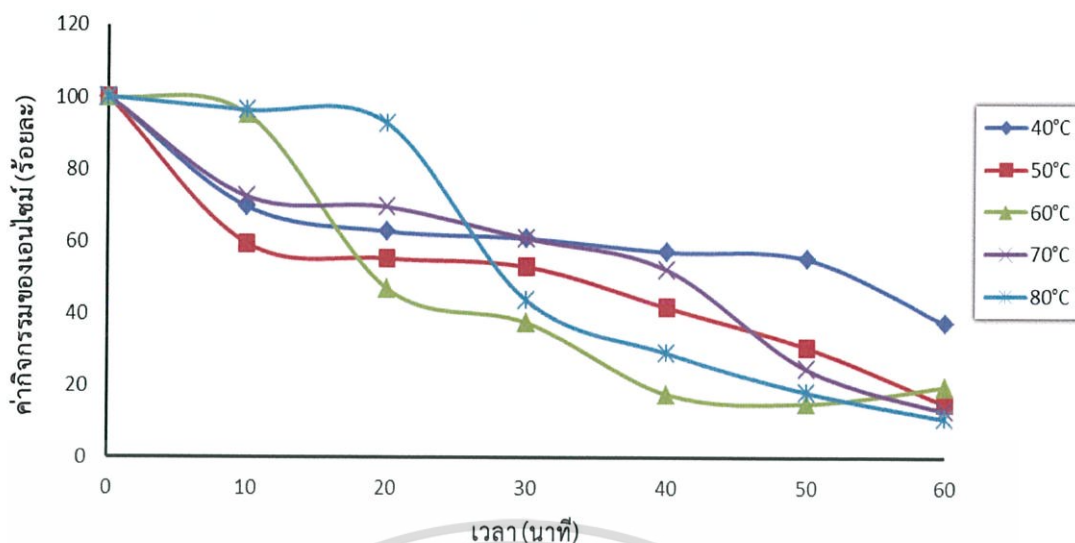
จากรูปที่ 4.47 แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์โปรตีนที่สกัดได้จากเชื้อแอสคิโตโนมัยซีทไอโซเลทที่ B8800-3 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 30 ชั่วโมง มีความสามารถในการทำงานลดลงแต่ละอุณหภูมิ และเวลาที่แตกต่างกัน ดังนี้ สำหรับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 42.31% สำหรับอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 30.77% สำหรับอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 21.43% สำหรับอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 16.67% และสำหรับอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 4.76%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



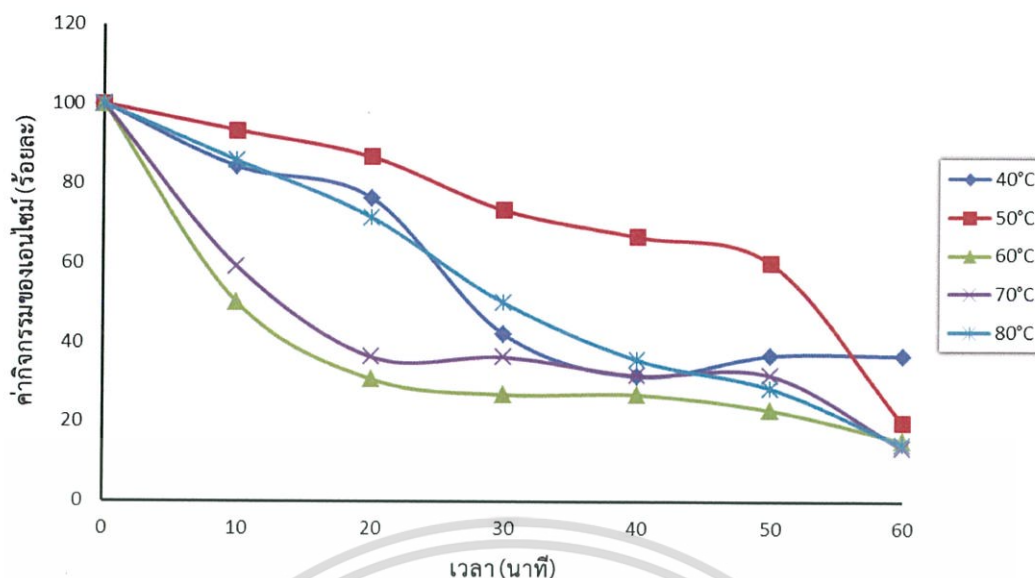
รูปที่ 4.48 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ, เวลา และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ B8810-1 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 30 ชั่วโมง

จากรูปที่ 4.48 แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ B8810-1 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 30 ชั่วโมง มีความสามารถในการทำงานลดลงแต่ละอุณหภูมิ และเวลาที่แตกต่างกัน ดังนี้ สำหรับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 18.06% สำหรับอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 13.23% สำหรับอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 8.10% สำหรับอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 2.7 % และ สำหรับอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 2.44



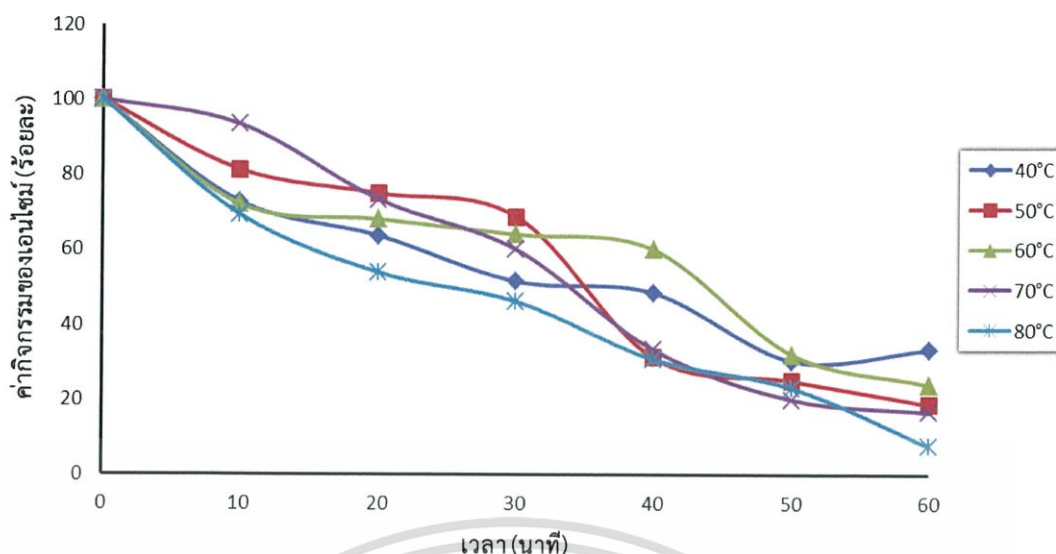
รูปที่ 4.49 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ, เวลา และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ K6786-3 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 30 ชั่วโมง

จากรูปที่ 4.49 แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดได้จากเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ K6786-3 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 30 ชั่วโมง มีความสามารถในการทำงานลดลงแต่ละอุณหภูมิ และเวลาที่แตกต่างกัน ดังนี้ สำหรับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 37.39% สำหรับอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 15.03% สำหรับอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 19.82% สำหรับอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 13.04% และสำหรับอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 10.91%



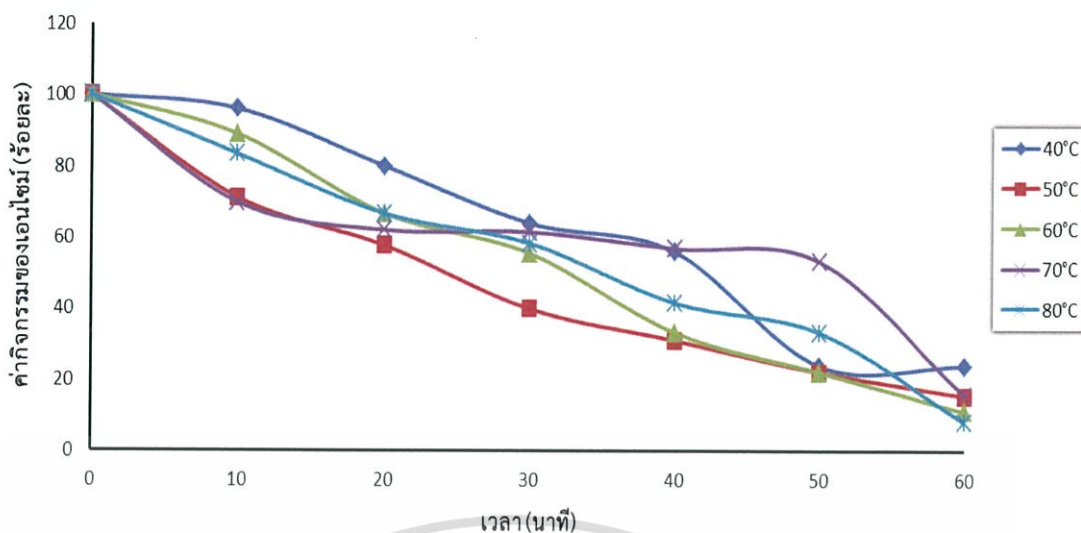
**รูปที่ 4.50 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ, เวลา และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB148 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 30 ชั่วโมง**

จากรูปที่ 4.50 แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดได้จากเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB148 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 30 ชั่วโมง มีความสามารถในการทำงานลดลงแต่ละอุณหภูมิ และเวลาที่แตกต่างกัน ดังนี้ สำหรับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 36.84% สำหรับอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 20% สำหรับอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 15.38% สำหรับอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 13.64% และ สำหรับอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 14.29%



รูปที่ 4.51 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ, เวลา และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB632 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 30 ชั่วโมง

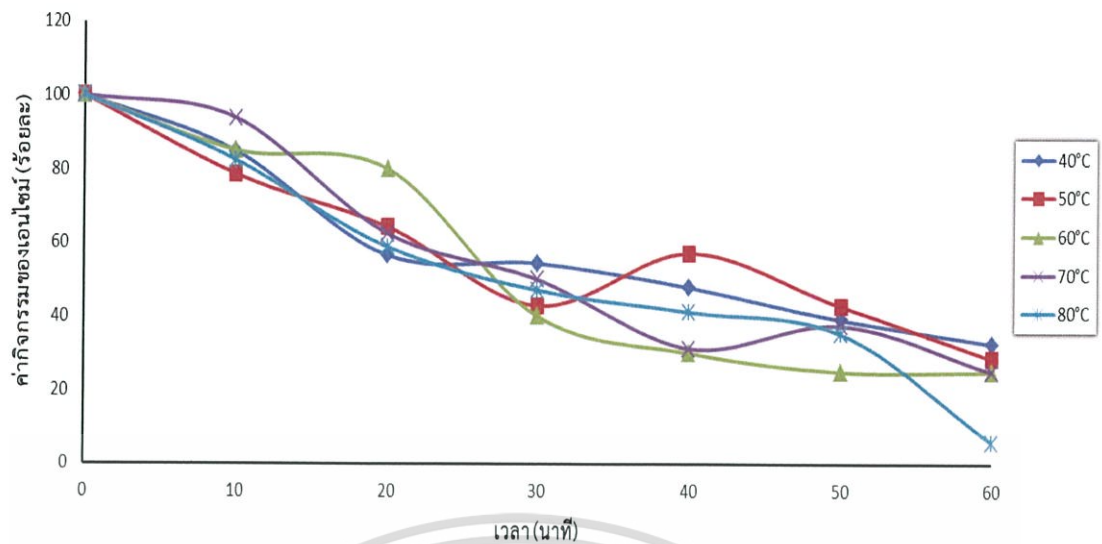
จากรูปที่ 4.51 แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดได้จากเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB632 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 30 ชั่วโมง มีความสามารถในการทำงานลดลงแต่ละอุณหภูมิ และเวลาที่แตกต่างกัน ดังนี้ สำหรับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 33.33% สำหรับอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 18.75% สำหรับอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 24 % สำหรับอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 16.67% และ สำหรับอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 7.69%



รูปที่ 4.52 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ, เวลา และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB21210 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 30 ชั่วโมง

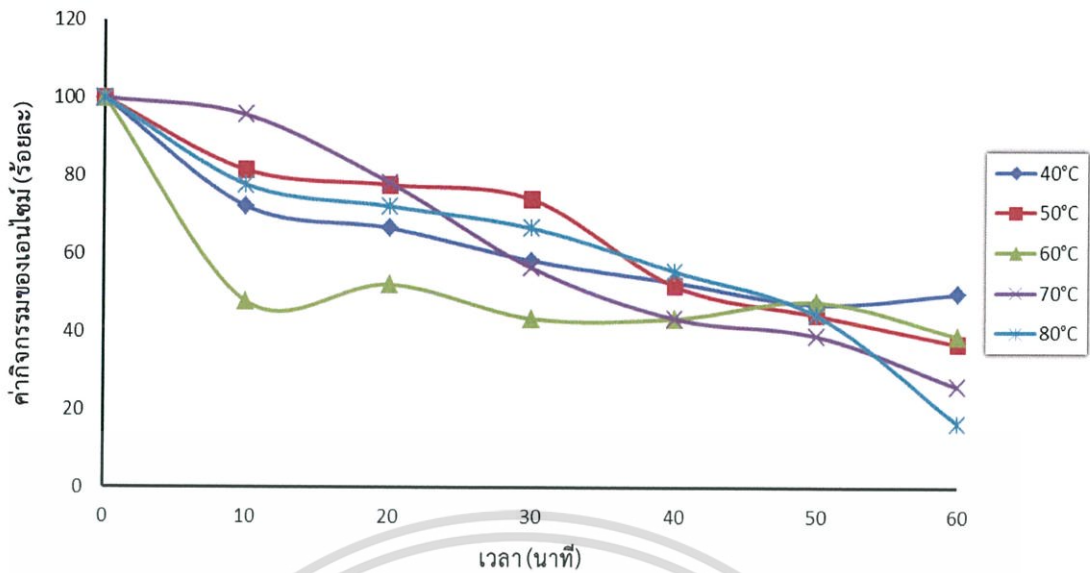
จากรูปที่ 4.52 แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB21210 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 30 ชั่วโมง มีความสามารถในการทำงานลดลงแต่ละอุณหภูมิและเวลาที่แตกต่างกัน ดังนี้ สำหรับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 24% สำหรับอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 15.56% สำหรับอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 11.11% สำหรับอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 15.9% และ สำหรับอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 8.33%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



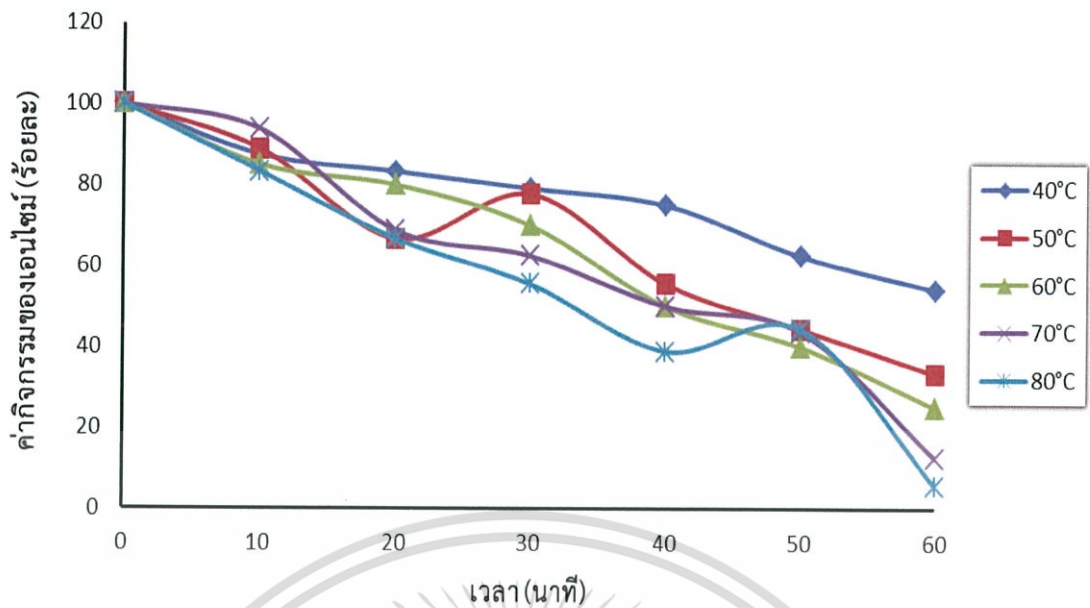
รูปที่ 4.53 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ, เวลา และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB2433 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 24 ชั่วโมง

จากรูปที่ 4.53 แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดได้จากเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB2433 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 24 ชั่วโมง มีความสามารถในการทำงานลดลงแต่ละอุณหภูมิ และเวลาที่แตกต่างกัน ดังนี้ สำหรับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 32.61% สำหรับอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 28.57% สำหรับอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 25% สำหรับอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 25% และ สำหรับอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 5.88%



รูปที่ 4.54 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ, เวลา และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียชนิด *Bacillus subtilis* รหัส MDB3222 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 30 ชั่วโมง

จากรูปที่ 4.54 แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดได้จากเชื้อแบคทีเรียชนิด *Bacillus subtilis* รหัส MDB3222 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 30 ชั่วโมง มีความสามารถในการทำงานลดลงแต่ละอุณหภูมิ และเวลาที่แตกต่างกัน ดังนี้ สำหรับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 50% สำหรับอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 37.04% สำหรับอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 39.13% สำหรับอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 26.09% และสำหรับอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 16.67%



รูปที่ 4.55 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ, เวลา และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB4123 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 30 ชั่วโมง

จากรูปที่ 4.55 แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดได้จากเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB4123 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 24 ชั่วโมง มีความสามารถในการทำงานลดลงแต่ละอุณหภูมิ และเวลาที่แตกต่างกัน ดังนี้ สำหรับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 54.17% สำหรับอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 33.33% สำหรับอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 25% สำหรับอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 12.5% และ สำหรับอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ณ เวลา 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 5.56%

จากผลการทดสอบหาความเสถียรภาพของเอนไซม์ พบว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่สกัดได้จากเชื้อแอกติโนมัยซีททั้ง 9 ไอโซเลทมีความคลาดเคลื่อนไม่เป็นไปตามทฤษฎีของ Cheng *et al.* (2015) ที่กล่าวว่า เมื่อเวลาผ่านไปค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อแอกติโนมัยซีทจะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลง เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นและเวลาที่มากขึ้น ทำให้เอนไซม์เสียสภาพการทำงาน จึงมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลง แสดงให้เห็นว่าผลการทดลองที่ได้ไม่ตรงตามทฤษฎี เนื่องจากการทดลองมีการใช้สาร azocasein เป็นสารตั้งต้น (substrate) โดยผู้วิจัยได้ทำการเตรียมสาร azocasein ในน้ำกลั่น ซึ่งส่งผลให้ azocasein บางส่วนละลายได้ไม่หมดและจับตัวเป็นก้อน เมื่อทำการเติมเอนไซม์โปรติเอสจึงทำให้เอนไซม์โปรติเอสสามารถจับหรือยึดเกาะกับ azocasein ได้บางส่วนและเมื่อทำการเติม Trichloroacetic acid เพื่อหยุดปฏิกิริยาและทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที พบว่า ตะกอนที่เอนไซม์โปรติเอสจับกับสับสเตรทบางส่วนหลงเหลืออยู่ที่บริเวณส่วนใส (supernatant) จึงทำให้เมื่อนำไปวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์พบว่าค่าที่วัดได้เกิดความคลาดเคลื่อนดังผลการทดลองข้างต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.9 การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธีการทดสอบขั้นต้น (Pre-Test)

จากเชื้อแอกติโนมัยซีททั้ง 9 ไอโซเลทที่ได้จากขั้นตอนการคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีทที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ นำมาทำการตรวจสอบค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ และ การตรวจสอบคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่า เอนไซม์ที่สกัดได้จากเชื้อแอกติโนมัยซีททั้ง 2 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลทที่ B8810-1 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 30 ชั่วโมง และ ไอโซเลทที่ K6786-3 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 30 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดเมื่อเทียบกับเอนไซม์ที่สกัดได้จากเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทอื่นๆ จึงสนใจที่จะนำเชื้อแอกติโนมัยซีททั้ง 2 ไอโซเลท มาทำการทดสอบการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Micrococcus luteus* TISTR 2374 และ *Candida albicans* ATCC 90028 ด้วยวิธีการทดสอบขั้นต้น (Pre-test) ดังวิธีการที่ 3.6.14 พบว่า เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ B8810-1 และ K6786-3 ไม่สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ ดังตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 แสดงผลการทดสอบเบื้องต้นของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สามารถผลิตสารทุติยภูมิซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

หมายเลขไอโซเลท	บริเวณยับยั้ง (inhibition zone, มิลลิเมตร)					
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>C. albicans</i>
	ATCC 25922	ATCC 27853	ATCC 6633	TISTR 118	TISTR 2374	ATCC 90028
B8810-1	-	-	-	-	-	-
K6786-3	-	-	-	-	-	-

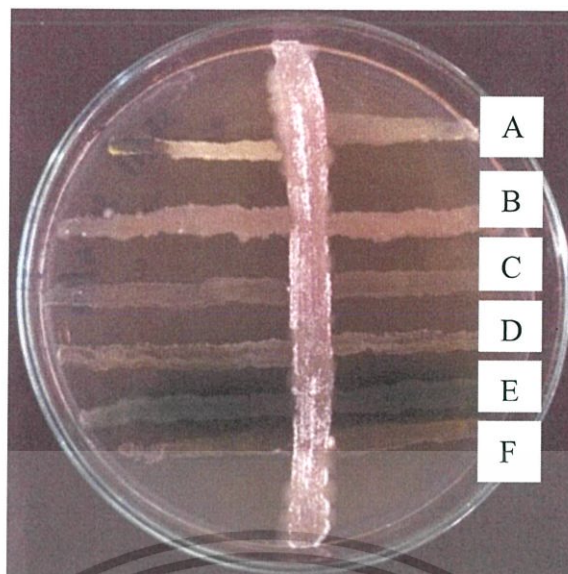
จากการทดสอบการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Micrococcus luteus* TISTR 2374 และ *Candida albicans* ATCC 90028 โดยวิธีการทดสอบขั้นต้น (Pre-test) พบว่า ไม่เกิดระยะห่างระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 6 สายพันธุ์กับเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ B8810-1 แสดงให้เห็นว่าเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ B8810-1 ไม่สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ ดังแสดงรูปที่ 4.56



รูปที่ 4.56 แสดงผลการทดสอบเบื้องต้นของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ B8810-1 ที่สามารถผลิตสารหุติยภูมิซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ 6 ชนิด ได้แก่ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 (A), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (B), *Escherichia coli* ATCC 25922 (C), *Staphylococcus aureus* TISTR 118 (D), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (E) และ *Candida albicans* ATCC 90028 (F)

จากการทดสอบการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Micrococcus luteus* TISTR 2374 และ *Candida albicans* ATCC 90028 โดยวิธีการทดสอบขั้นต้น (Pre-test) พบว่า ไม่เกิดระยะห่างระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 6 สายพันธุ์กับเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ K6786-3 แสดงให้เห็นว่าเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ K6786-3 ไม่สามารถผลิตสารหุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ ดังแสดงรูปที่ 4.57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.57 แสดงผลการทดสอบเบื้องต้นของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ K6786-3 ที่สามารถผลิตสารทุติยภูมิซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ 6 ชนิด ได้แก่ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 (A), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (B), *Escherichia coli* ATCC 25922 (C), *Staphylococcus aureus* TISTR 118 (D), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (E) และ *Candida albicans* ATCC 90028 (F)

จากการทดสอบหาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพจากเชื้อแอกติโนมัยซีททั้ง 2 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลทที่ B8810-1 และ K6786-3 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 30 ชั่วโมง โดยวิธีการทดสอบขั้นต้น (Pre-test) พบว่า เชื้อแอกติโนมัยซีททั้ง 2 ไอโซเลทไม่สามารถผลิตสารบางชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบต่างๆ ได้ เนื่องจากไม่พบการเกิดระยะห่างระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 6 ชนิดกับเชื้อแอกติโนมัยซีท จากงานวิจัยของ Sharma *et al.* (2014) พบว่า เชื้อแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกได้ไม่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ 6 สายพันธุ์ได้ แสดงให้เห็นว่า การเกิดหรือไม่เกิดระยะห่างระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 6 สายพันธุ์กับเชื้อแอกติโนมัยซีทจะขึ้นอยู่กับชนิดสายพันธุ์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่นำมาทดสอบ (Fitri *et al.*, 2010) เนื่องจากเชื้อแอกติโนมัยซีทบางสายพันธุ์จะไม่มีความสามารถที่จะมีการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ ดังนั้นจึงทำให้เชื้อแอกติโนมัยซีทที่นำมาทดสอบจึงไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้

#### 4.10 การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยเทคนิค agar disc diffusion

จากเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 2 ไอโซเลทที่ได้จากขั้นตอนการทดสอบเบื้องต้นของการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบของเชื้อแอคติโนมัยซีท มาทำการทดสอบการผลิตสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยเทคนิค agar disc diffusion เพื่อตรวจสอบสารสกัดทั้งจากน้ำหมักและภายในตัวเซลล์ที่ทราบความเข้มข้นแน่ชัด โดยนำเชื้อแอคติโนมัยซีทมาเพาะเลี้ยงเพื่อทำการสกัดน้ำหมักด้วยตัวทำละลายอินทรีย์คือ เอทิลอะซิเตต และสกัดน้ำหมักจากเซลล์และเส้นใยด้วยเมทานอล จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้มาทดสอบด้วยเทคนิค agar disc diffusion ตามวิธีการที่ 3.6.15 กับ จุลินทรีย์ทดสอบ 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Micrococcus luteus* TISTR 2374 และ *Candida albicans* ATCC 90028 โดยนำสารสกัดหยาบความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หยดลงบนแผ่น disc ปริมาตร 20 ไมโครลิตร พบว่า สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตและเมทานอลของเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 2 ไอโซเลท (B8810-1 และ K6786-3) ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้ เนื่องจากการทดสอบไม่เกิดวงใส (clear zone) แสดงดังตารางที่ 4.10 และ 4.11

ตารางที่ 4.10 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆจากสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตตในระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเทคนิค agar disc diffusion

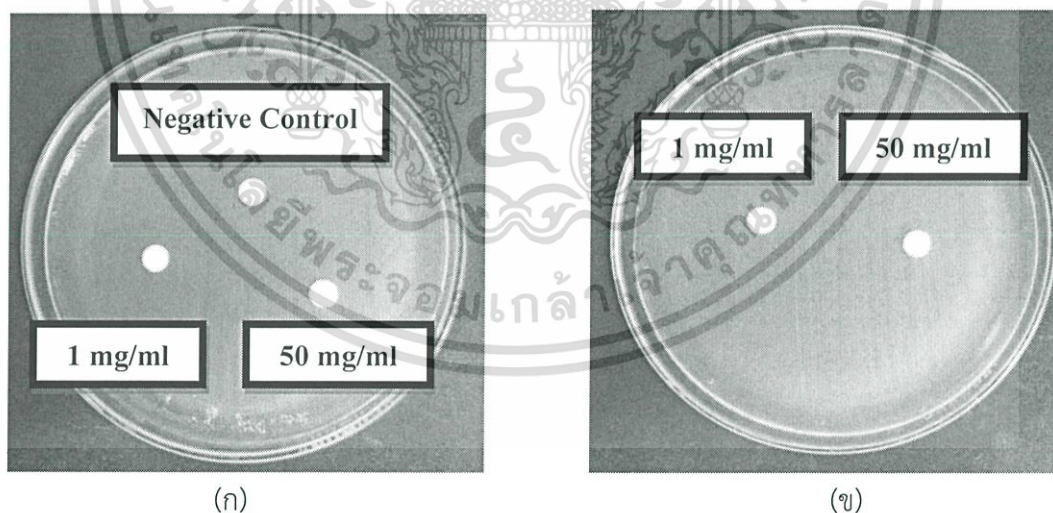
หมายเลขไอโซเลท	ความเข้มข้น (mg/ml)	บริเวณยับยั้ง (inhibition zone, มิลลิเมตร)					
		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>C. albicans</i>
		ATCC 25922	ATCC 27853	ATCC 6633	TISTR 118	TISTR 2374	ATCC 90028
B8810-1	1	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-
K6786-3	1	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆจากสารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของแอคติโนมัยซีทที่หมักด้วยเมทานอล ในระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเทคนิค agar disc diffusion

หมายเลขไอโซเลท	ความเข้มข้น (mg/ml)	บริเวณยับยั้ง (inhibition zone, มิลลิเมตร)					
		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>C. albicans</i>
		ATCC 25922	ATCC 27853	ATCC 6633	TISTR 118	TISTR 2374	ATCC 90028
B8810-1	1	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-
K6786-3	1	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-

จากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 พบว่า ไม่เกิดวงใส (clear zone) บนผิวหน้าอาหารจากสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต และ สารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่หมักด้วยเมทานอล ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ B8810-1 ไม่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพได้ ดังนั้น เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ B8810-1 จึงไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ดังแสดงรูปที่ 4.58

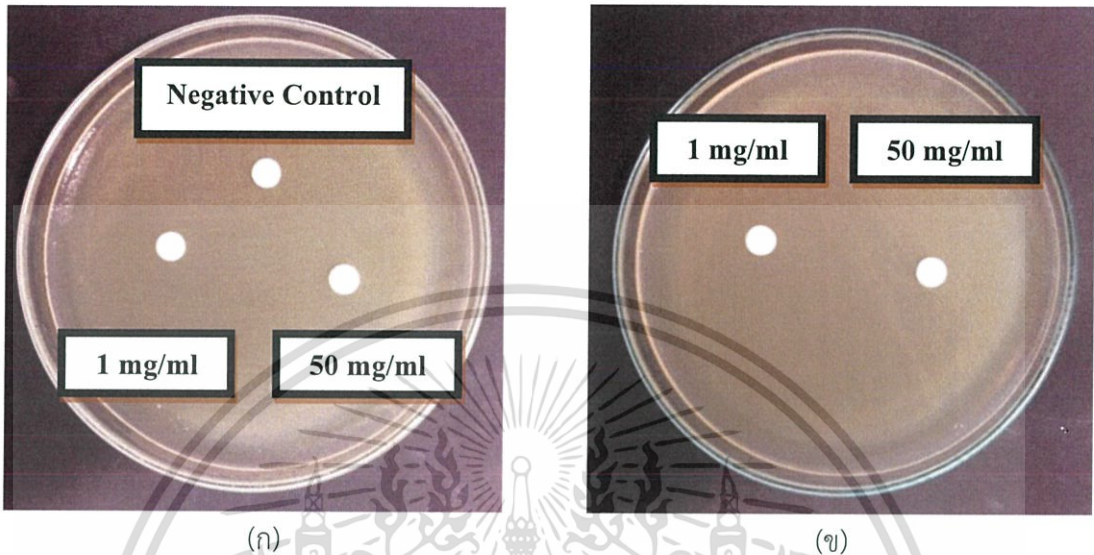


รูปที่ 4.58 แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 จากสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต ( ก) และสารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่หมักด้วยเมทานอล (ข) ของไอโซเลทที่ B8810-1 จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลา 30 ชั่วโมง ในระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 พบว่า ไม่เกิดวงใส (clear zone) บนผิวหน้าอาหารจากสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต และ สารสกัดหยาบจากเซลล์และ

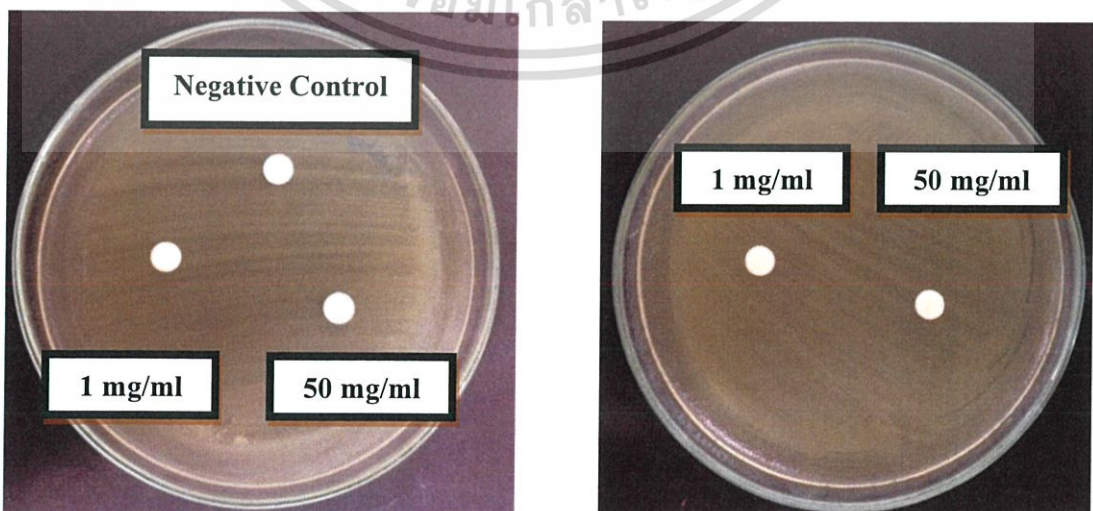
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เส้นใยของเชื้อแอสคิโนมัยซีที่หมักด้วยเมทานอลที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากเชื้อแอสคิโนมัยซีไอโซเลทที่ K6786-3 ไม่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพได้ ดังนั้น เชื้อแอสคิโนมัยซีไอโซเลทที่ K6786-3 จึงไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Esechrichia coli* ATCC 25922 ดังแสดงรูปที่ 4.59



รูปที่ 4.59 แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 จากสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต ( ก ) และสารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของเชื้อแอสคิโนมัยซีที่หมักด้วยเมทานอล (ข) ของไอโซเลทที่ K6786-3 จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลา 30 ชั่วโมง ในระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

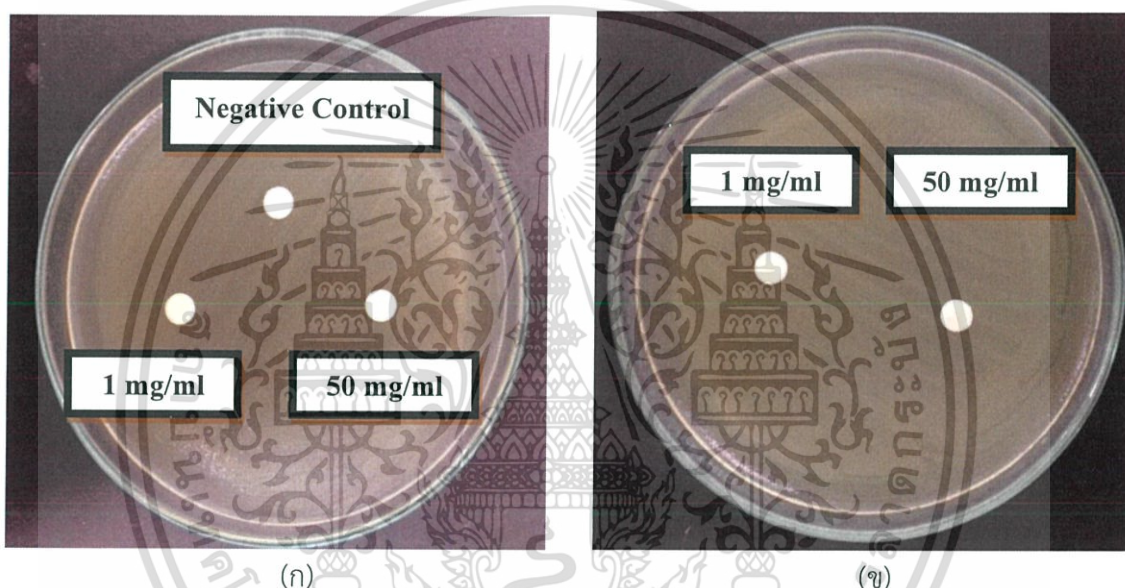
จากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 พบว่า ไม่เกิดวงใส (clear zone) บนผิวหน้าอาหารจากสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต และ สารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของเชื้อแอสคิโนมัยซีที่หมักด้วยเมทานอลที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากเชื้อแอสคิโนมัยซีไอโซเลทที่ B8810-1 ไม่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพได้ ดังนั้น เชื้อแอสคิโนมัยซีไอโซเลทที่ B8810-1 จึงไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ดังแสดงรูปที่ 4.60



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้拿去ใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.60 แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 จากสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต (ก) และสารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของ เชื้อแอสคิตโนมัยซีทที่หมักด้วยเมทานอล (ข) ของไอโซเลขที่ B8810-1 จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลา 30 ชั่วโมง ในระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

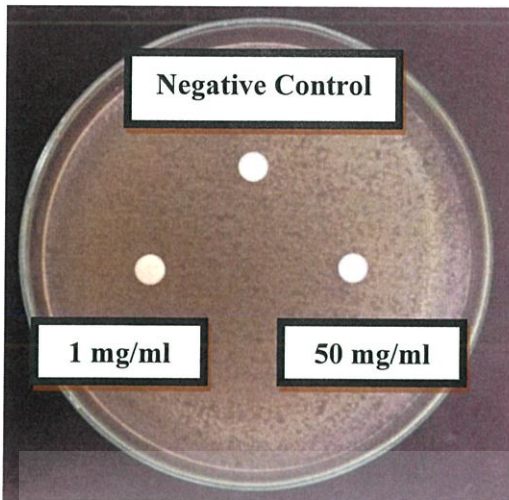
จากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 พบว่า ไม่เกิดวงใส (clear zone) บนผิวหน้าอาหารจากสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต และ สารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของเชื้อแอสคิตโนมัยซีทที่หมักด้วยเมทานอลที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากเชื้อแอสคิตโนมัยซีทไอโซเลขที่ K6786-3 ไม่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพได้ ดังนั้น เชื้อแอสคิตโนมัยซีทไอโซเลขที่ K6786-3 จึงไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ดังแสดงรูปที่ 4.61



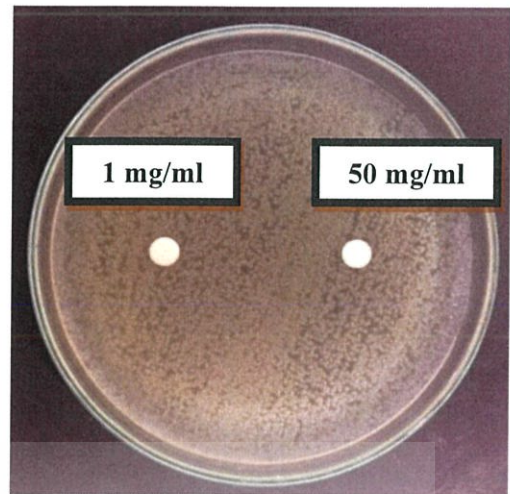
รูปที่ 4.61 แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 จากสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต (ก) และสารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของเชื้อแอสคิตโนมัยซีทที่หมักด้วยเมทานอล (ข) ของไอโซเลขที่ K6786-3 จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลา 30 ชั่วโมง ในระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 พบว่า ไม่เกิดวงใส (clear zone) บนผิวหน้าอาหารจากสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต และ สารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของเชื้อแอสคิตโนมัยซีทที่หมักด้วยเมทานอลที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากเชื้อแอสคิตโนมัยซีทไอโซเลขที่ B8810-1 ไม่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพได้ ดังนั้น เชื้อแอสคิตโนมัยซีทไอโซเลขที่ B8810-1 จึงไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ดังแสดงรูปที่ 4.62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



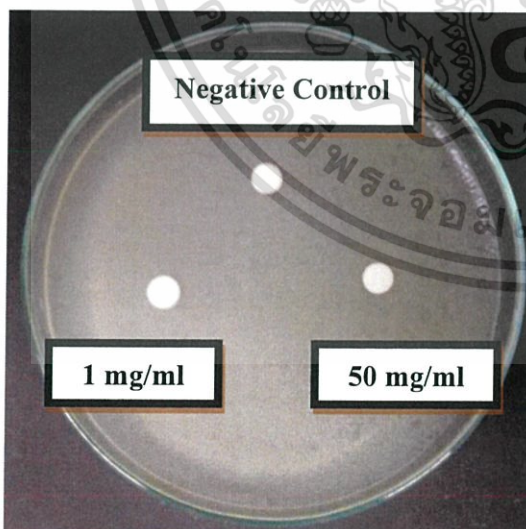
(ก)



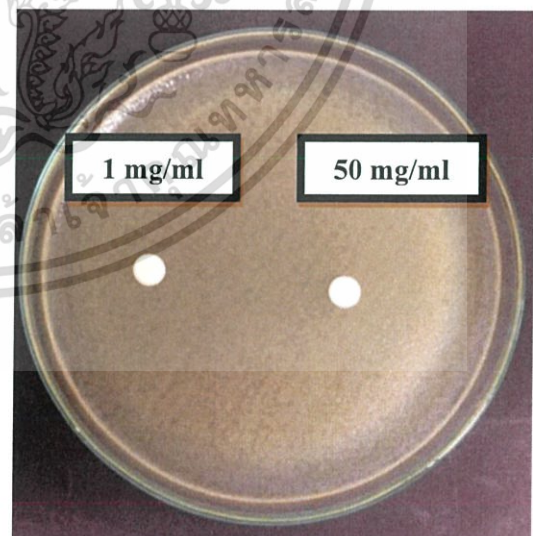
(ข)

รูปที่ 4.62 แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 จากสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต ( ก) และสารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่หมักด้วยเมทานอล (ข) ของไอโซเลทที่ B8810-1 จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลา 30 ชั่วโมง ในระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 พบว่า ไม่เกิดวงใส (clear zone) บนผิวหน้าอาหารจากสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต และ สารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่หมักด้วยเมทานอลที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ K6786-3 ไม่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพได้ ดังนั้น เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ K6786-3 จึงไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ดังแสดงรูปที่ 4.63



(ก)



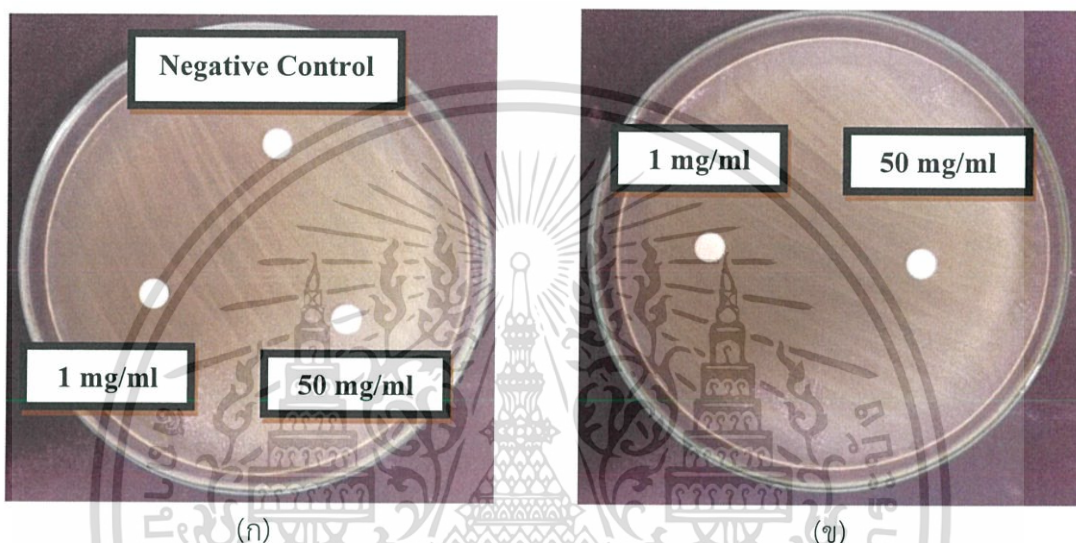
(ข)

รูปที่ 4.63 แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 จากสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต ( ก) และสารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

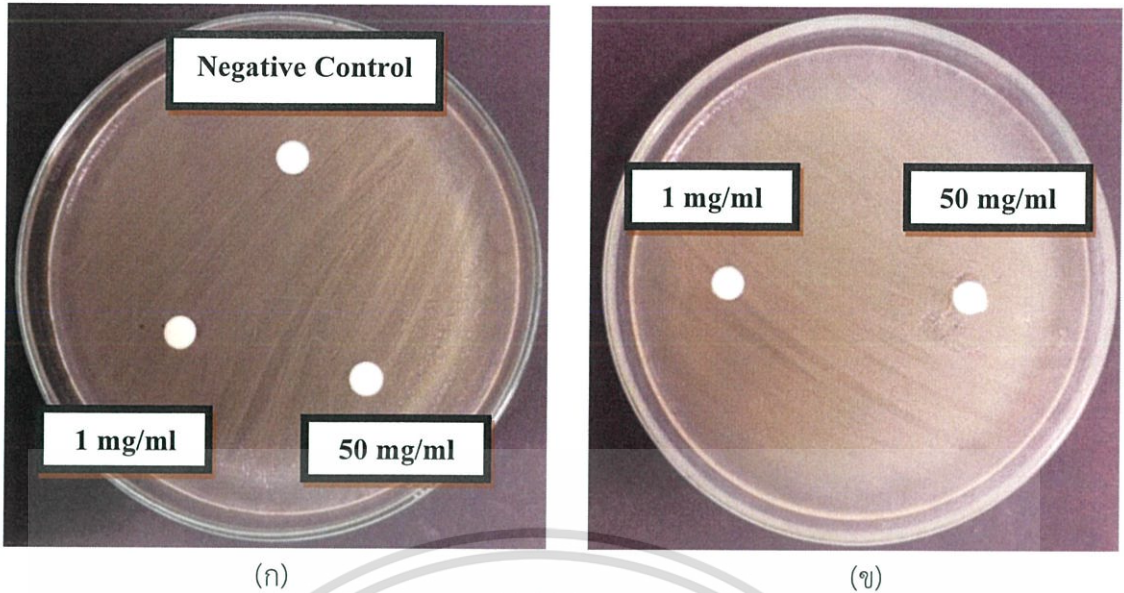
**หมักด้วยเมทานอล (ข) ของไอโซเลทที่ K6786-3 จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลา 30 ชั่วโมง ในระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร**

จากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 พบว่า ไม่เกิดวงใส (clear zone) บนผิวหน้าอาหารจากสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต และ สารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของเชื้อแอสคิโนมัซซีทที่หมักด้วยเมทานอลที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากเชื้อแอสคิโนมัซซีทไอโซเลทที่ B8810-1 ไม่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพได้ ดังนั้น เชื้อแอสคิโนมัซซีทไอโซเลทที่ B8810-1 จึงไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 ดังแสดงรูปที่ 4.64



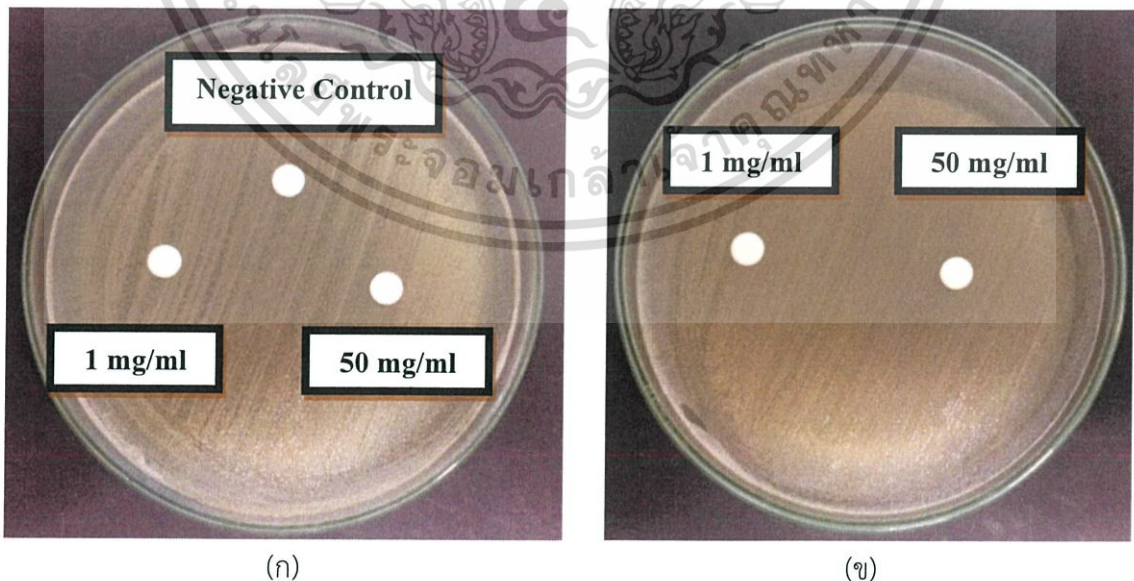
**รูปที่ 4.64 แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 จากสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต (ก) และสารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของเชื้อ แอสคิโนมัซซีทที่หมักด้วยเมทานอล (ข) ของไอโซเลทที่ B8810-1 จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลา 30 ชั่วโมง ในระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร**

จากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 พบว่า ไม่เกิดวงใส (clear zone) บนผิวหน้าอาหารจากสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต และ สารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของเชื้อแอสคิโนมัซซีทที่หมักด้วยเมทานอลที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากเชื้อแอสคิโนมัซซีทไอโซเลทที่ K6786-3 ไม่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพได้ ดังนั้น เชื้อแอสคิโนมัซซีทไอโซเลทที่ K6786-3 จึงไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 ดังแสดงรูปที่ 4.65



รูปที่ 4.65 แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 จากสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต ( ก ) และสารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของเชื้อ แอคติโนมัยซีทที่หมักด้วยเมทานอล ( ข ) ของไอโซเลทที่ K6786-3 จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลา 30 ชั่วโมง ในระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 พบว่า ไม่เกิดวงใส (clear zone) บนผิวหน้าอาหารจากสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต และ สารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่หมักด้วยเมทานอลที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ B8810-1 ไม่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพได้ ดังนั้น เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ B8810-1 จึงไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 ดังแสดงรูปที่ 4.66

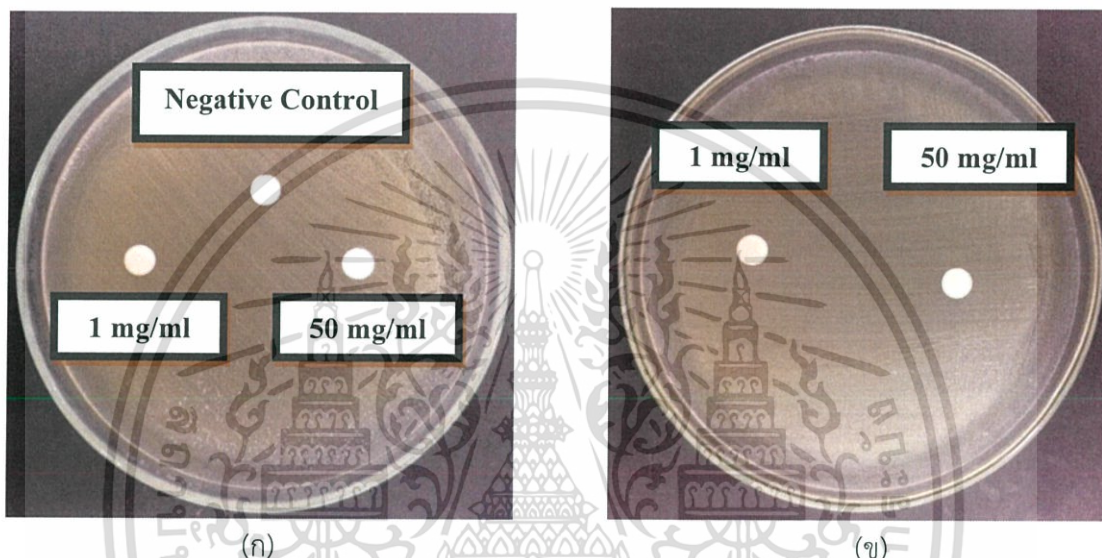


รูปที่ 4.66 แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 จากสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต ( ก ) และสารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของเชื้อ แอคติโนมัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

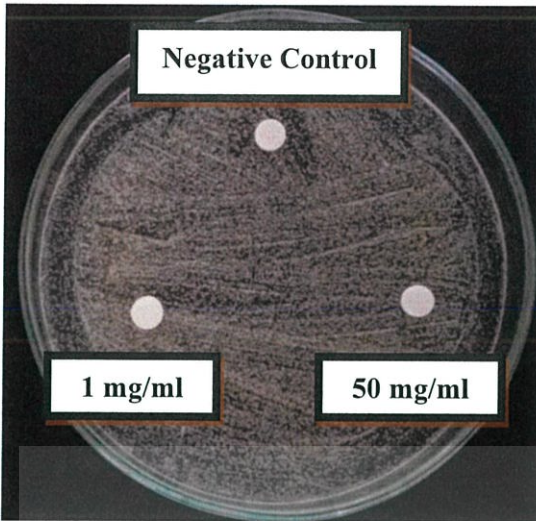
**ซีทที่หมักด้วยเมทานอล (ข) ของไอโซเลทที่ B8810-1 จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลา 30 ชั่วโมง ในระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร**

จากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 พบว่า ไม่เกิดวงใส (clear zone) บนผิวหน้าอาหารจากสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต และ สารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่หมักด้วยเมทานอลที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ K6786-3 ไม่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพได้ ดังนั้น เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ K6786-3 จึงไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 ดังแสดงรูปที่ 4.67

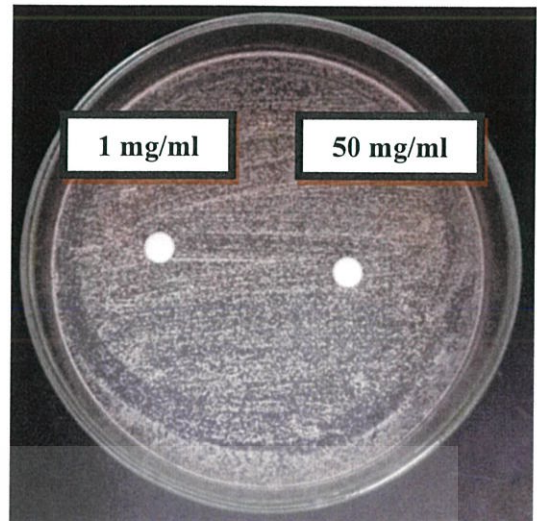


รูปที่ 4.67 แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 จากสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต (ก) และสารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของเชื้อ แอกติโนมัยซีทที่หมักด้วยเมทานอล (ข) ของไอโซเลทที่ K6786-3 จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลา 30 ชั่วโมง ในระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* ATCC 90028 พบว่า ไม่เกิดวงใส (clear zone) บนผิวหน้าอาหารจากสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต และ สารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่หมักด้วยเมทานอลที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ B8810-1 ไม่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพได้ ดังนั้น เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ B8810-1 จึงไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* ATCC 90028 ดังแสดงรูปที่ 4.68



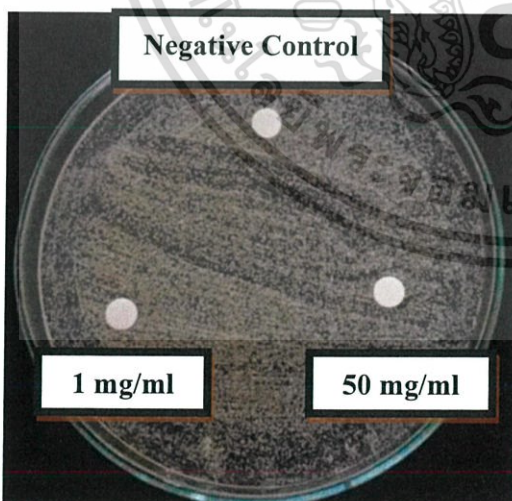
(ก)



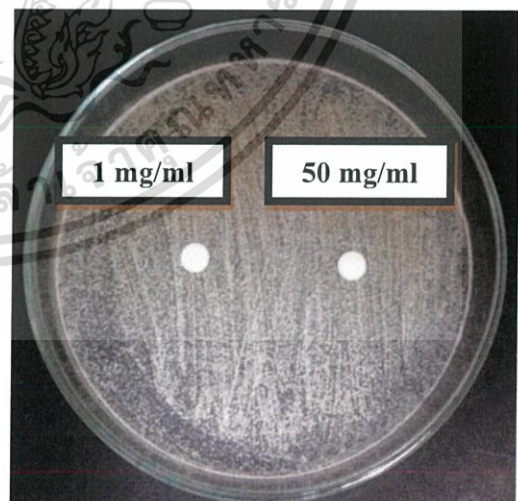
(ข)

รูปที่ 4.68 แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* ATCC 90028 จากสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต (ก) และสารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของเชื้อ แอคติโนมัยซีทที่หมักด้วยเมทานอล (ข) ของไอโซเลทที่ B8810-1 จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลา 30 ชั่วโมง ในระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* ATCC 90028 พบว่า ไม่เกิดวงใส (clear zone) บนผิวหน้าอาหารจากสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต และ สารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่หมักด้วยเมทานอลที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ K6786-3 ไม่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพได้ ดังนั้น เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ K6786-3 จึงไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* ATCC 90028 ดังแสดงรูปที่ 4.69



(ก)



(ข)

รูปที่ 4.69 แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* ATCC 90028 จากสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต (ก) และสารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของเชื้อ แอคติโนมัยซีทที่หมักด้วยเมทานอล (ข) ของไอโซเลทที่ K6786-3 จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลา 30 ชั่วโมง ในระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดสอบหาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพจากเชื้อแอสโตคตินโนมัยซีททั้ง 2 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลทที่ B8810-1 และ K6786-3 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 30 ชั่วโมง พบว่า เชื้อแอสโตคตินโนมัยซีททั้ง 2 ไอโซเลทไม่สามารถผลิตสารบางชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบต่างๆได้ เนื่องจากไม่พบการเกิดวงใส (clear zone) บนผิวหน้าอาหาร

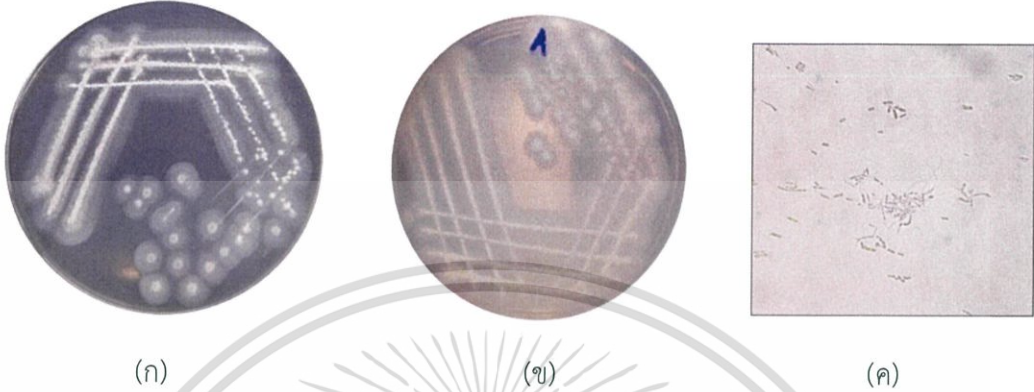
#### 4.11 รวมผลการทดลองของเชื้อแอสโตคตินโนมัยซีททั้ง 9 ไอโซเลท ที่ได้รับการคัดเลือก

จากการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสเบื้องต้นโดยการย่อยสลายโปรตีน (Casein hydrolysis) ในอาหาร Skim milk agar สามารถคัดเลือกเชื้อแอสโตคตินโนมัยซีทที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้ทั้งหมด 6 ไอโซเลท จากตัวอย่างดินบริเวณนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี และเชื้อแอสโตคตินโนมัยซีท 3 ไอโซเลท ที่ได้จากตัวอย่างดินบริเวณนาเกลือ ตำบลโคกขาม จังหวัดสมุทรสาคร และ ตำบลบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา ที่ได้จากโครงการงานพิเศษของรุ่นพี่ (ทิพย์วรรณ และคณะ, 2558) มาทำการสกัดเอนไซม์โปรตีนเอสที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 24 ชั่วโมง และ 30 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจสอบหาค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์, การตรวจสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์, การตรวจสอบหาสารยับยั้งที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์, การตรวจสอบหาความเสถียรภาพของเอนไซม์, การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธีการทดสอบขั้นต้น (Pre-test) จากเชื้อแอสโตคตินโนมัยซีทที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด และการทดสอบการผลิตสารต้านจุลินทรีย์ทดสอบโดยการสกัดสารสกัดหยาบจากน้ำหมักของเชื้อแอสโตคตินโนมัยซีทที่ได้จากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธีการทดสอบขั้นต้นโดยเชื้อแอสโตคตินโนมัยซีทที่คัดแยกได้ มีคุณสมบัติดังต่อไปนี้

หมายเลขไอโซเลท B8800-3 เป็นเชื้อแอสโตคตินโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณนาเกลือ ตำบลบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา ครั้งที่ 2 เมื่อวันที่ 9 มกราคม 2559 ณ จุดเก็บตัวอย่างที่ 4 โดยตัวอย่างดินมีคุณสมบัติทางกายภาพ ดังนี้ มีน้ำหนักของตัวอย่างดินอยู่ที่ 0.505 กรัม ปริมาณความชื้นอยู่ที่ 35.37% และค่าความเป็นกรดต่างอยู่ที่ 7.98 จากนั้นนำเชื้อแอสโตคตินโนมัยซีทมาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอสโตคตินโนมัยซีทโดยสังเกตสีและรูปร่างของโคโลนีที่เจริญบนผิวอาหารและใต้ผิวอาหารโดยการเปรียบเทียบกับระบบสี The NBS/IBCC Color System และสังเกตลักษณะของสปอร์ด้วยเทคนิค slide culture พบว่า เชื้อแอสโตคตินโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอาหารสี white, เส้นใยอากาศสี Greenish White, ไม่มีการสร้างสปอร์ และ มีลักษณะการสร้างสปอร์แบบ Allantoid เรียงต่อกันเป็นเส้นตรงสายยาว บนอาหาร ISP medium no 2 และทำการศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอสโตคตินโนมัยซีท พบว่า เชื้อแอสโตคตินโนมัยซีทมีความสามารถในการย่อยสลายเจลาติน, การเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์และการย่อยสลายโปรตีน สำหรับการย่อยสลายโปรตีนมีความกว้างของบริเวณใส (clear zone) อยู่ที่ 29.36 มิลลิเมตร ซึ่งเป็นการคัดเลือกเชื้อแอสโตคตินโนมัยซีทเบื้องต้นของการสร้างเอนไซม์โปรตีนเอส เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป แต่เชื้อแอสโตคตินโนมัยซีทไม่มีความสามารถตกตะกอนโปรตีนและการย่อยสลายแป้งได้ ต่อมาจึงนำเชื้อแอสโตคตินโนมัยซีทมาทำการสกัดเอนไซม์โปรตีนเอสที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 24 ชั่วโมง และ 30 ชั่วโมง และทำการตรวจสอบหาค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์, การตรวจสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์, การตรวจสอบหาสารยับยั้งที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และการตรวจสอบหาความเสถียรภาพของเอนไซม์ต่อไป โดยพบว่า เอนไซม์ที่สกัดได้จากเชื้อแอสโตคตินโนมัยซีทที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 30 ชั่วโมงสามารถทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดต่าง pH 7 (Citrate-phosphate buffer), อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 30 องศาเซลเซียส, สารยับยั้งที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ คือ phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF) และอุณหภูมิที่ 40-50 องศาเซลเซียส ณ เวลาผ่านไป 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานได้เป็นอย่างดี แต่อุณหภูมิที่ 60-80 องศาเซลเซียส ณ เวลาผ่านไป 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลง



**รูปที่ 4.70 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ B8800-3**

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ B8800-3 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ B8800-3 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท B8800-3 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

หมายเลขไอโซเลท B8810-1 เป็นเชื้อแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณนาเกลือ ตำบลบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา ครั้งที่ 2 เมื่อวันที่ 9 มกราคม 2559 ณ จุดเก็บตัวอย่างที่ 3 โดยตัวอย่างดินมีคุณสมบัติทางกายภาพ ดังนี้ มีน้ำหนักของตัวอย่างดินอยู่ที่ 0.457 กรัม ปริมาณความชื้นอยู่ที่ 29.63% และค่าความเป็นกรดต่างอยู่ที่ 8.10 จากนั้นนำเชื้อแอกติโนมัยซีทมาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทโดยสังเกตสีและรงควัตถุของโคโลนีที่เจริญบนผิวอาหารและใต้ผิวอาหารโดยการเปรียบเทียบกับระบบสี The NBS/IBCC Color System และสังเกตลักษณะของสปอร์ด้วยเทคนิค slide culture พบว่า เชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอาหารสี Pale Yellow, เส้นใยอากาศสี White, ไม่มีการสร้างรงควัตถุ และมีลักษณะการสร้างสปอร์แบบ Allantoid เรียงต่อกันเป็นเส้นตรงสายยาว บนอาหาร ISP medium no 2 และทำการศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยซีท พบว่า เชื้อแอกติโนมัยซีทมีความสามารถในการย่อยสลายเจลาติน, การเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์และการย่อยสลายโปรตีน สำหรับการย่อยสลายโปรตีนมีความกว้างของบริเวณใส (clear zone) อยู่ที่ 47.46 มิลลิเมตร ซึ่งเป็นการคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีทเบื้องต้นของการสร้างเอนไซม์โปรติเอส เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป แต่เชื้อแอกติโนมัยซีทไม่มีความสามารถตกตะกอนโปรตีนและการย่อยสลายแป้งได้ ต่อมาจึงนำเชื้อแอกติโนมัยซีททำการสกัดเอนไซม์โปรติเอสที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 24 ชั่วโมง และ 30 ชั่วโมง และทำการตรวจสอบหาค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์, การตรวจสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทำงานของเอนไซม์, การตรวจสอบหาสารยับยั้งที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และการตรวจสอบหาความเสถียรภาพของเอนไซม์ต่อไป โดยพบว่า เอนไซม์ที่สกัดได้จากเชื้อแอสคิตินอไมซีทที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 30 ชั่วโมงสามารถทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดต่าง pH 9 (Tris-HCl buffer), อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 40 องศาเซลเซียส, สารยับยั้งที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ คือ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) และอุณหภูมิที่ 40-50 องศาเซลเซียส ณ เวลาผ่านไป 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานได้เป็นอย่างดี แต่อุณหภูมิที่ 60-80 องศาเซลเซียส ณ เวลาผ่านไป 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลง

เนื่องจากเชื้อแอสคิตินอไมซีทไอโซเลท B8810-1 เป็นเชื้อที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด ดังนั้นจึงทำการทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Micrococcus luteus* TISTR 2374 และ *Candida albicans* ATCC 90028 ด้วยวิธีการทดสอบเบื้องต้น (Pre-test) พบว่า เชื้อแอสคิตินอไมซีทไอโซเลทที่ B8810-1 ไม่สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 6 สายพันธุ์ ด้วยวิธีการทดสอบเบื้องต้นได้ จึงนำมาทดสอบการผลิตสารต้านจุลินทรีย์ทดสอบอีกครั้งเพื่อทำการยืนยันผล โดยการสกัดสารสกัดหยาบจากน้ำหมักของเชื้อแอสคิตินอไมซีท พบว่า สารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต และ สารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของเชื้อแอสคิตินอไมซีทที่หมักด้วยเมทานอลที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Micrococcus luteus* TISTR 2374 และ *Candida albicans* ATCC 90028 ได้



#### รูปที่ 4.71 แสดงลักษณะของเชื้อแอสคิตินอไมซีทไอโซเลทที่ B8810-1

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสคิตินอไมซีทไอโซเลทที่ B8810-1 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสคิตินอไมซีทไอโซเลทที่ B8810-1 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสคิตินอไมซีทไอโซเลท B8810-1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเลขไอโซเลท K6786-3 เป็นเชื้อแอสโคไมซีตที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณนาเกลือ ตำบลโคกขาม จังหวัดสมุทรสาคร ครั้งที่ 1 เมื่อวันที่ 30 สิงหาคม 2558 ณ จุดเก็บตัวอย่างที่ 2 โดยตัวอย่างดินมีคุณสมบัติทางกายภาพ ดังนี้ มีน้ำหนักของตัวอย่างดินอยู่ที่ 0.599 กรัม ปริมาณความชื้นอยู่ที่ 35.84% และค่าความเป็นกรดต่างอยู่ที่ 7.85 จากนั้นนำเชื้อแอสโคไมซีตทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอสโคไมซีตโดยสังเกตสีและแรงคัวต์ของโคโลนีที่เจริญบนผิวอาหารและได้ผิวอาหารโดยการเปรียบเทียบกับระบบสี The NBS/IBCC Color System และสังเกตลักษณะของสปอร์ด้วยเทคนิค slide culture พบว่า เชื้อแอสโคไมซีตที่สร้างเส้นใยอาหารสี Yellowish White, เส้นใยอากาศสี Pale Violet, ไม่มีการสร้างสปอร์คัวต์ และมีลักษณะการสร้างสปอร์แบบ Oligosporous ของ Catellato spora หรือสายสปอร์ตรงจนถึงโค้งงอ 5-30 สปอร์ บนอาหาร ISP medium no 2 และทำการศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอสโคไมซีต พบว่า เชื้อแอสโคไมซีตมีความสามารถในการย่อยสลายเจลาติน, การเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์, การย่อยสลายแป้งและการย่อยสลายโปรตีน สำหรับการย่อยสลายโปรตีนมีความกว้างของบริเวณใส (clear zone) อยู่ที่ 30.86 มิลลิเมตร ซึ่งเป็นการคัดเลือกเชื้อแอสโคไมซีตเบื้องต้นของการสร้างเอนไซม์โปรติเอสเพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป แต่เชื้อแอสโคไมซีตไม่มีความสามารถตกตะกอนโปรตีน ต่อมาจึงนำเชื้อ แอสโคไมซีตทำการสกัดเอนไซม์โปรติเอสที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 24 ชั่วโมง และ 30 ชั่วโมง และทำการตรวจสอบหาค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์, การตรวจสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์, การตรวจสอบหาสารยับยั้งที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และการตรวจสอบหาความเสถียรภาพของเอนไซม์ต่อไป โดยพบว่า เอนไซม์ที่สกัดได้จากเชื้อแอสโคไมซีตที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 30 ชั่วโมงสามารถทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดต่าง pH 7 (Citrate-phosphate buffer), อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 40 องศาเซลเซียส, สารยับยั้งที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ คือ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) และอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส ณ เวลาผ่านไป 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานได้เป็นอย่างดี แต่อุณหภูมิที่ 50-80 องศาเซลเซียส ณ เวลาผ่านไป 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลง

เนื่องจากเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท K6786-3 เป็นเชื้อที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด ดังนั้นจึงทำการทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Micrococcus luteus* TISTR 2374 และ *Candida albicans* ATCC 90028 ด้วยวิธีการทดสอบเบื้องต้น (Pre-test) พบว่า เชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ K6786-3 ไม่สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 6 สายพันธุ์ ด้วยวิธีการทดสอบเบื้องต้นได้ จึงนำมาทดสอบการผลิตสารต้านจุลินทรีย์ทดสอบอีกครั้งเพื่อทำการยืนยันผล โดยการสกัดสารสกัดหยาบจากน้ำหมักของเชื้อแอสโคไมซีต พบว่า สารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต และ สารสกัดหยาบจากเฮกซ์และเส้นใยของเชื้อแอสโคไมซีตที่หมักด้วยเมทานอลที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Micrococcus luteus* TISTR 2374 และ *Candida albicans* ATCC 90028 ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 4.72 แสดงลักษณะของเชื้อแอสเพอริลลัสฟูมิกัสไอโซเลทที่ K6786-3**

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอริลลัสฟูมิกัสไอโซเลทที่ K6786-3 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอริลลัสฟูมิกัสไอโซเลทที่ K6786-3 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสเพอริลลัสฟูมิกัสไอโซเลท K6786-3 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

หมายเลขไอโซเลท MDB148 เป็นเชื้อแอสเพอริลลัสฟูมิกัสที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี ครั้งที่ 1 เมื่อวันที่ 20 สิงหาคม 2559 ณ จุดเก็บตัวอย่างที่ 8 โดยตัวอย่างดินมีคุณสมบัติทางกายภาพ ดังนี้ มีน้ำหนักของตัวอย่างดินอยู่ที่ 7.637 กรัม ปริมาณความชื้นอยู่ที่ 14.14% และค่าความเป็นกรดต่างอยู่ที่ 7.64 จากนั้นนำเชื้อแอสเพอริลลัสฟูมิกัสทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอสเพอริลลัสฟูมิกัสโดยสังเกตสีและรูปร่างของโคโลนีที่เจริญบนอาหารและใต้ผิวอาหารโดยการเปรียบเทียบกับระบบสี The NBS/IBCC Color System และสังเกตลักษณะของสปอร์ด้วยเทคนิค slide culture พบว่า เชื้อแอสเพอริลลัสฟูมิกัสที่สร้างเส้นใยอาหารสี Light Yellow Green, เส้นใยอากาศสี Light Olive Brown, ไม่มีการสร้างสปอร์ และ มีลักษณะการสร้างสปอร์แบบเดี่ยว (monosporous) และสร้างสปอร์เล็กน้อย (oligosporous) บนอาหาร ISP medium no 2 และทำการศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอสเพอริลลัสฟูมิกัส พบว่า เชื้อแอสเพอริลลัสฟูมิกัสมีความสามารถตกตะกอนโปรตีนและการย่อยสลายโปรตีน สำหรับการย่อยสลายโปรตีนมีความกว้างของบริเวณใส (clear zone) อยู่ที่ 28.02 มิลลิเมตร ซึ่งเป็นการคัดเลือกเชื้อแอสเพอริลลัสฟูมิกัสเบื้องต้นของการสร้างเอนไซม์โปรติเอส เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไปและเชื้อแอสเพอริลลัสฟูมิกัสมีความสามารถในการเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์และการย่อยสลายแป้งเล็กน้อย แต่เชื้อแอสเพอริลลัสฟูมิกัสไม่มีความสามารถในการย่อยสลายเจลาติน จากนั้นทำการศึกษาความสามารถในการเจริญบนอาหาร Strach casein agar (SCA) ที่ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3, 5, 7, 9, 12 และ 15 พบว่า เชื้อแอสเพอริลลัสฟูมิกัสมีความสามารถในการเจริญบนอาหาร SCA ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดที่ 15% ต่อมาจึงนำเชื้อ แอสเพอริลลัสฟูมิกัสทำการสกัดเอนไซม์โปรติเอสที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 24 ชั่วโมง และ 30 ชั่วโมง และทำการตรวจสอบหาค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์, การตรวจสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์, การตรวจสอบหาสารยับยั้งที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และการตรวจสอบหาความเสถียรภาพของเอนไซม์ต่อไป โดยพบว่า เอนไซม์ที่สกัดได้จากเชื้อแอสเพอริลลัสฟูมิกัสที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 30 ชั่วโมงสามารถทำงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ดีที่ค่าความเป็นกรดต่าง pH 10 (Sodium borate buffer), อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของ เอนไซม์ คือ 40 องศาเซลเซียส, สารยับยั้งที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ คือ phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF) และอุณหภูมิที่ 40-50 องศาเซลเซียส ณ เวลาผ่านไป 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานได้เป็นอย่างดี แต่อุณหภูมิที่ 60-80 องศาเซลเซียส ณ เวลาผ่านไป 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลง



**รูปที่ 4.73 แสดงลักษณะของเชื้อแอสคิตโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB148**

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสคิตโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB148 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสคิตโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB148 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสคิตโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB148 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

หมายเลขไอโซเลท MDB632 เป็นเชื้อแอสคิตโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี ครั้งที่ 2 เมื่อวันที่ 17 กันยายน 2559 ณ จุดเก็บตัวอย่างที่ 2 โดยตัวอย่างดินมีคุณสมบัติทางกายภาพ ดังนี้ มีน้ำหนักของตัวอย่างดินอยู่ที่ 7.159 กรัม ปริมาณความชื้นอยู่ที่ 49.31% และค่าความเป็นกรดต่างอยู่ที่ 8.37 จากนั้นนำเชื้อแอสคิตโนมัยซีททำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอสคิตโนมัยซีทโดยสังเกตสีและแรงควัตถุของโคโลนีที่เจริญบนผิวอาหารและใต้ผิวอาหารโดยการเปรียบเทียบกับระบบสี The NBS/IBCC Color System และสังเกตลักษณะของสปอร์ด้วยเทคนิค slide culture พบว่า เชื้อแอสคิตโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอาหารสี Strong Yellow Green, เส้นใยอากาศสี Graying Blue, ไม่มีการสร้างสปอร์ และ มีลักษณะการสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Retinaculiaprti บนอาหาร ISP medium no 2 และทำการศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอสคิตโนมัยซีท พบว่า เชื้อแอสคิตโนมัยซีทมีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีน สำหรับการย่อยสลายโปรตีนมีความกว้างของบริเวณใส (clear zone) อยู่ที่ 28.24 มิลลิเมตร ซึ่งเป็นการคัดเลือกเชื้อแอสคิตโนมัยซีทเบื้องต้นของการสร้างเอนไซม์โปรติเอส เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไปและเชื้อแอสคิตโนมัยซีทมีความสามารถในการตกตะกอนโปรตีนเล็กน้อย แต่เชื้อแอสคิตโนมัยซีทไม่มีความสามารถในการย่อยสลายเจลาติน, การเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์และการย่อยสลายแป้ง จากนั้นทำการศึกษาความสามารถในการเจริญบนอาหาร Strach casein agar (SCA) ที่ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3, 5, 7, 9, 12 และ 15 พบว่า เชื้อแอสคิตโนมัยซีทมีความสามารถในการเจริญบนอาหาร SCA ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดที่ 5% ต่อมาจึงนำเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอกติโนมัยซีททำการสกัดเอนไซม์โปรติเอสที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 24 ชั่วโมง และ 30 ชั่วโมง และทำการตรวจสอบหาค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์, การตรวจสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์, การตรวจสอบหาสารยับยั้งที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และการตรวจสอบหาความเสถียรภาพของเอนไซม์ต่อไป โดยพบว่า เอนไซม์ที่สกัดได้จากเชื้อแอกติโนมัยซีทที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 30 ชั่วโมงสามารถทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดต่าง pH 8 (Tris-HCl buffer), อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 35 องศาเซลเซียส, สารยับยั้งที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ คือ 1,10-phenanthroline hydrate และ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) และอุณหภูมิที่ 40-60 องศาเซลเซียส ณ เวลาผ่านไป 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานได้เป็นอย่างดี แต่อุณหภูมิที่ 70-80 องศาเซลเซียส ณ เวลาผ่านไป 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลง



รูปที่ 4.74 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB632

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB632 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB632 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB632 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

หมายเลขไอโซเลท MDB21210 เป็นเชื้อแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี ครั้งที่ 2 เมื่อวันที่ 17 กันยายน 2559 ณ จุดเก็บตัวอย่างที่ 10 โดยตัวอย่างดินมีคุณสมบัติทางกายภาพ ดังนี้ มีน้ำหนักของตัวอย่างดินอยู่ที่ 8.067 กรัม ปริมาณความชื้นอยู่ที่ 39.73% และค่าความเป็นกรดต่างอยู่ที่ 8.21 จากนั้นนำเชื้อแอกติโนมัยซีททำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทโดยสังเกตสีและรงควัตถุของโคโลนีที่เจริญบนผิวอาหารและใต้ผิวอาหารโดยการเปรียบเทียบกับระบบสี The NBS/IBCC Color System และสังเกตลักษณะของสปอร์ด้วยเทคนิค slide culture พบว่า เชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอาหารสี Light Grayish Yellowish Brown, เส้นใยอากาศสี Very Pale Blue, การสร้างรงควัตถุสี Strong Greenish Yellow และมีลักษณะการสร้างสปอร์เล็กน้อย (Oligosporous) บนอาหาร ISP medium no 2 และทำการศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยซีท พบว่า เชื้อแอกติโนมัยซีทมีความสามารถในการย่อยสลายเจลาตินและการย่อยสลายโปรตีน สำหรับการย่อยสลายโปรตีนมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความกว้างของบริเวณใส (clear zone) อยู่ที่ 28.37 มิลลิเมตร ซึ่งเป็นการคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีทเบื้องต้นของการสร้างเอนไซม์โปรติเอส เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไปและเชื้อแอกติโนมัยซีทมีความสามารถในการย่อยสลายแป้งและการตกตะกอนโปรตีนเล็กน้อย แต่เชื้อแอกติโนมัยซีทไม่มีความสามารถในการเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ จากนั้นทำการศึกษาศักยภาพในการเจริญบนอาหาร Strach casein agar (SCA) ที่ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3, 5, 7, 9, 12 และ 15 พบว่า เชื้อแอกติโนมัยซีทมีความสามารถในการเจริญบนอาหาร SCA ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดที่ 12% ต่อมาจึงนำเชื้อ แอกติโนมัยซีททำการสกัดเอนไซม์โปรติเอสที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 24 ชั่วโมง และ 30 ชั่วโมง และทำการตรวจสอบหาค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์, การตรวจสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์, การตรวจสอบหาสารยับยั้งที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และการตรวจสอบหาความเสถียรภาพของเอนไซม์ต่อไป โดยพบว่า เอนไซม์ที่สกัดได้จากเชื้อแอกติโนมัยซีทที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 30 ชั่วโมงสามารถทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดต่าง pH 8 (Boric acid-borax buffer), อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 70 องศาเซลเซียส, สารยับยั้งที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ คือ 1,10-phenanthroline hydrate และ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) และอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส ณ เวลาผ่านไป 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานได้เป็นอย่างดี แต่อุณหภูมิที่ 50-80 องศาเซลเซียส ณ เวลาผ่านไป 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลง

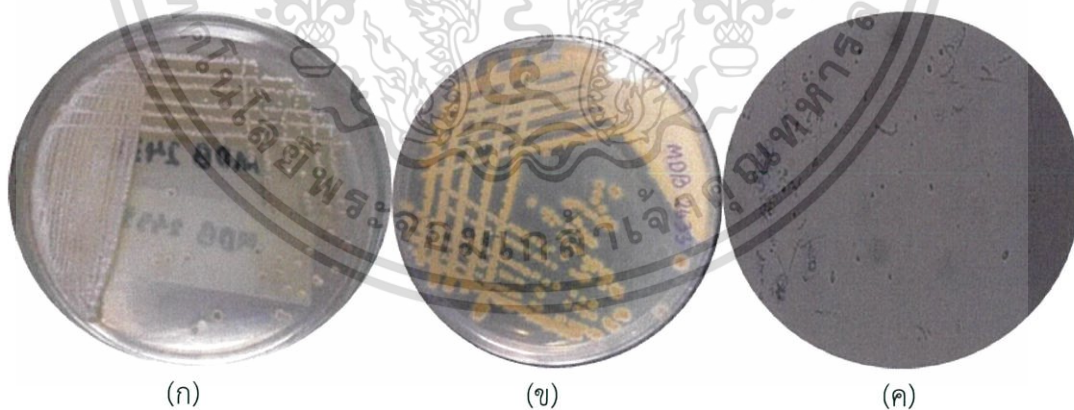


**รูปที่ 4.75 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB21210**

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB21210 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB21210 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB21210 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

หมายเลขไอโซเลท MDB2433 เป็นเชื้อแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี ครั้งที่ 2 เมื่อวันที่ 17 กันยายน 2559 ณ จุดเก็บตัวอย่างที่ 3 โดยตัวอย่างดินมีคุณสมบัติทางกายภาพ ดังนี้ มีน้ำหนักของตัวอย่างดินอยู่ที่ 7.630 กรัม ปริมาณความชื้นอยู่ที่ 43.72% และค่าความเป็นกรดต่างอยู่ที่ 8.31 จากนั้นนำเชื้อแอกติโนมัยซีททำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทโดยสังเกตสีและแรงควัตของโคโลนีที่เจริญบนผิวเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารและได้ผิวอาหารโดยการเปรียบเทียบกับระบบสี The NBS/IBCC Color System และสังเกตลักษณะของสปอร์ด้วยเทคนิค slide culture พบว่า เชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอาหารสี Moderate Yellow, เส้นใยอากาศสี Very Light Blue, ไม่มีการสร้างสปอร์ และ มีลักษณะการสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) ลักษณะแบบ Retinaculiaperti และสร้างสปอร์เล็กน้อย (oligosporous) บนอาหาร ISP medium no 2 และทำการศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยซีท พบว่า เชื้อแอกติโนมัยซีทมีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีน สำหรับการย่อยสลายโปรตีนมีความกว้างของบริเวณใส (clear zone) อยู่ที่ 17.30 มิลลิเมตร ซึ่งเป็นการคัดเลือกเชื้อ แอกติโนมัยซีทเบื้องต้นของการสร้างเอนไซม์โปรติเอส เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไปและเชื้อแอกติโนมัยซีทมีความสามารถในการย่อยสลายเจลาตินและการตกตะกอนโปรตีนเล็กน้อย แต่เชื้อแอกติโนมัยซีทไม่มีความสามารถในการเปลี่ยนไนโตรเจนเป็นไนไตรท์และการย่อยสลายแป้ง จากนั้นทำการศึกษาศักยภาพในการเจริญบนอาหาร Strach casein agar (SCA) ที่ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3, 5, 7, 9, 12 และ 15 พบว่า เชื้อแอกติโนมัยซีทมีความสามารถในการเจริญบนอาหาร SCA ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดที่ 12% ต่อมาจึงนำเชื้อ แอกติโนมัยซีททำการสกัดเอนไซม์โปรติเอสที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 24 ชั่วโมง และ 30 ชั่วโมง และทำการตรวจสอบหาค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์, การตรวจสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์, การตรวจสอบหาสารยับยั้งที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และการตรวจสอบหาความเสถียรภาพของเอนไซม์ต่อไป โดยพบว่า เอนไซม์ที่สกัดได้จากเชื้อแอกติโนมัยซีทที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 24 ชั่วโมงสามารถทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดต่าง pH 10 (Sodium bicarbonate buffer), อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 40 องศาเซลเซียส, สารยับยั้งที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ คือ Phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF) และอุณหภูมิที่ 40-70 องศาเซลเซียส ณ เวลาผ่านไป 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานได้เป็นอย่างดี แต่อุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส ณ เวลาผ่านไป 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลง

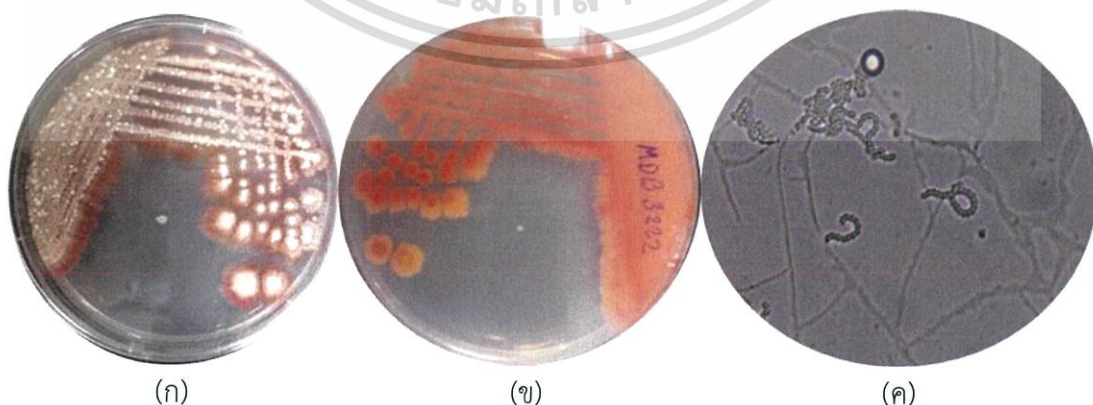


**รูปที่ 4.76 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB2433**

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB2433 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB2433 ได้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB2433 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเลขไอโซเลท MDB3222 เป็นเชื้อแอสโคไมซีตที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี ครั้งที่ 2 เมื่อวันที่ 17 กันยายน 2559 ณ จุดเก็บตัวอย่างที่ 2 โดยตัวอย่างดินมีคุณสมบัติทางกายภาพ ดังนี้ มีน้ำหนักของตัวอย่างดินอยู่ที่ 7.159 กรัม ปริมาณความชื้นอยู่ที่ 49.31% และค่าความเป็นกรดต่างอยู่ที่ 8.37 จากนั้นนำเชื้อแอสโคไมซีตมาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอสโคไมซีตโดยสังเกตสีและรงควัตถุของโคโลนีที่เจริญบนผิวอาหารและใต้ผิวอาหารโดยการเปรียบเทียบกับระบบสี The NBS/IBCC Color System และสังเกตลักษณะของสปอร์ด้วยเทคนิค slide culture พบว่า เชื้อแอสโคไมซีตที่สร้างเส้นใยอาหารสี Moderate Red, เส้นใยอากาศสี Pale Blue, ไม่มีการสร้างรงควัตถุ และมีลักษณะการสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporous) ลักษณะแบบ Verticillati บนอาหาร ISP medium no 2 และทำการศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอสโคไมซีต พบว่า เชื้อแอสโคไมซีตมีความสามารถในการเปลี่ยนไนโตรเจนเป็นไนไตรท์และย่อยสลายโปรตีน สำหรับการย่อยสลายโปรตีนมีความกว้างของบริเวณใส (clear zone) อยู่ที่ 30.00 มิลลิเมตร ซึ่งเป็นการคัดเลือกเชื้อ แอสโคไมซีตเบื้องต้นของการสร้างเอนไซม์โปรติเอส เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไปและเชื้อแอสโคไมซีตมีความสามารถในการตกตะกอนโปรตีนเล็กน้อย แต่เชื้อแอสโคไมซีตไม่มีความสามารถในการย่อยสลายเจลาตินและการย่อยสลายแป้ง จากนั้นทำการศึกษาความสามารถในการเจริญบนอาหาร Strach casein agar (SCA) ที่ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3, 5, 7, 9, 12 และ 15 พบว่า เชื้อแอสโคไมซีตมีความสามารถในการเจริญบนอาหาร SCA ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดที่ 15% ต่อมาจึงนำเชื้อ แอสโคไมซีตมาทำการสกัดเอนไซม์โปรติเอสที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 24 ชั่วโมง และ 30 ชั่วโมง และทำการตรวจสอบหาค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์, การตรวจสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์, การตรวจสอบหาสารยับยั้งที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และการตรวจสอบหาความเสถียรภาพของเอนไซม์ต่อไป โดยพบว่า เอนไซม์ที่สกัดได้จากเชื้อแอสโคไมซีตที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 30 ชั่วโมงสามารถทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดต่าง pH 9 (Tris-HCl buffer), อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 40 องศาเซลเซียส, สารยับยั้งที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ คือ Phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF) และอุณหภูมิที่ 40-60 องศาเซลเซียส ณ เวลาผ่านไป 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานได้เป็นอย่างดี แต่อุณหภูมิที่ 70-80 องศาเซลเซียส ณ เวลาผ่านไป 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลง



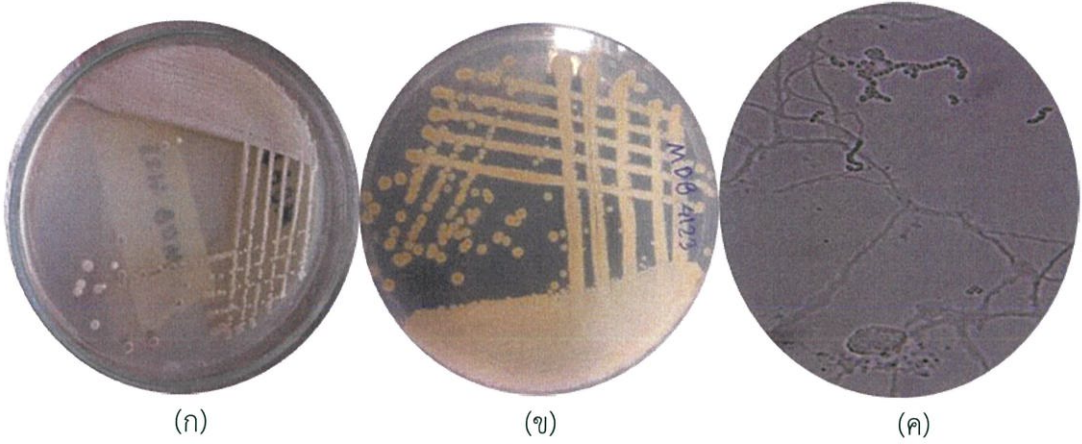
รูปที่ 4.77 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ MDB3222

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB3222 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB3222 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB3222 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

หมายเลขไอโซเลท MDB4123 เป็นเชื้อแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี ครั้งที่ 2 เมื่อวันที่ 17 กันยายน 2559 ณ จุดเก็บตัวอย่างที่ 2 โดยตัวอย่างดินมีคุณสมบัติทางกายภาพ ดังนี้ มีน้ำหนักของตัวอย่างดินอยู่ที่ 7.159 กรัม ปริมาณความชื้นอยู่ที่ 49.31% และค่าความเป็นกรดต่างอยู่ที่ 8.37 จากนั้นนำเชื้อแอกติโนมัยซีทมาการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทโดยสังเกตสีและรงควัตถุของโคโลนีที่เจริญบนผิวอาหารและใต้ผิวอาหารโดยการเปรียบเทียบกับระบบสี The NBS/IBCC Color System และสังเกตลักษณะของสปอร์ด้วยเทคนิค slide culture พบว่า เชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอาหารสี Deep Greenish Yellow, เส้นใยอากาศสี Graying Blue, มีการสร้างรงควัตถุสี Strong Greenish Yellow และมีลักษณะการสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporous) ลักษณะแบบ Verticillati บนอาหาร ISP medium no 2 และทำการศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยซีท พบว่า เชื้อแอกติโนมัยซีทมีความสามารถในการย่อยสลายเจลาตินและย่อยสลายโปรตีน สำหรับการย่อยสลายโปรตีนมีความกว้างของบริเวณใส (clear zone) อยู่ที่ 19.83 มิลลิเมตร ซึ่งเป็นการคัดเลือกเชื้อ แอกติโนมัยซีทเบื้องต้นของการสร้างเอนไซม์โปรติเอส เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป แต่เชื้อแอกติโนมัยซีทไม่มีความสามารถในการตกตะกอนโปรตีน, การเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์และการย่อยสลายแป้ง จากนั้นทำการศึกษาความสามารถในการเจริญบนอาหาร Strach casein agar (SCA) ที่ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3, 5, 7, 9, 12 และ 15 พบว่า เชื้อแอกติโนมัยซีทมีความสามารถในการเจริญบนอาหาร SCA ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดที่ 15% ต่อมาจึงนำเชื้อ แอกติโนมัยซีททำการสกัดเอนไซม์โปรติเอสที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 24 ชั่วโมง และ 30 ชั่วโมง และทำการตรวจสอบหาค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์, การตรวจสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์, การตรวจสอบหาสารยับยั้งที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และการตรวจสอบหาความเสถียรภาพของเอนไซม์ต่อไป โดยพบว่า เอนไซม์ที่สกัดได้จากเชื้อแอกติโนมัยซีทที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 24 ชั่วโมงสามารถทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดต่าง pH 10 (Sodium bicarbonate buffer), อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 55 องศาเซลเซียส, สารยับยั้งที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ คือ Phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF) และอุณหภูมิที่ 40-60 องศาเซลเซียส ณ เวลาผ่านไป 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานได้เป็นอย่างดี แต่อุณหภูมิที่ 70-80 องศาเซลเซียส ณ เวลาผ่านไป 60 นาที เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 4.78 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB4123**

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB4123 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB4123 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB4123 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

### 1.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาเอนไซม์โปรติเอสและฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี พบว่า สามารถคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทได้จำนวนทั้งหมด 41 ไอโซเลท จากการเก็บตัวอย่างดินนาเกลือ 2 แหล่ง ครั้งละ 10 จุด สำหรับการเก็บตัวอย่างดินนาเกลือ ครั้งที่ 1 ค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 7.45 - 7.91 มีปริมาณความชื้นโดยเฉลี่ยอยู่ที่ร้อยละ 10.47 และการเก็บตัวอย่างดินนาเกลือครั้งที่ 2 ค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 8.21 - 8.41 มีปริมาณความชื้นโดยเฉลี่ยอยู่ที่ร้อยละ 44.48 และทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทบน Starch casein agar พบว่า โดยเฉลี่ยสามารถเจริญและสร้างสปอร์ได้ดีในระยะเวลา 5 - 10 วัน นอกจากนี้เชื้อแอคติโนมัยซีทมีการสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycerium) และ เส้นใยอากาศ (Aerial mycerium) ซึ่งสามารถนำมาจัดกลุ่มได้ทั้งหมด 5 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish Pink มีสมาชิกทั้งหมด 1 ไอโซเลท ได้แก่ MDB31310

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Yellow มีสมาชิกทั้งหมด 6 ไอโซเลท ได้แก่ MDB548, MDB11210, MDB3422, MDB3528, MDB148 และ MDB925

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Green มีสมาชิกทั้งหมด 2 ไอโซเลท ได้แก่ MDB2739 และ MDB2839

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Blue มีสมาชิกทั้งหมด 31 ไอโซเลท ได้แก่ MDB17310, MDB2029, MDB23310, MDB2433, MDB2639, MDB16310, MDB1829, MDB21210, MDB432, MDB732, MDB13310, MDB14310, MDB37310, MDB38310, MDB15310, MDB1929, MDB22310, MDB2539, MDB2939, MDB30310, MDB3222, MDB3322, MDB40310, MDB4123, MDB822, MDB39310, MDB632, MDB36310, MDB2510, MDB1025 และ MDB1228

กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Purple มีสมาชิกทั้งหมด 1 ไอโซเลท ได้แก่ MDB342

จากการศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถคัดแยกได้ 41 ไอโซเลท พบว่า การทดสอบการตกตะกอน (Cogulation) โปรตีนในหลอดอาหาร 10% Skim milk ร้อยละ 39 ให้ผลการทดลองเป็น weak คือ เกิดการตกตะกอนโปรตีนในหลอดอาหาร 10% Skim milk เล็กน้อย การทดสอบการย่อยสลายโปรตีน (Casein hydrolysis) ในอาหาร Skim milk agar ร้อยละ 66 ให้ผลการทดลองเป็นลบ คือ ไม่เกิดการย่อยสลายโปรตีนในอาหาร Skim milk agar การทดสอบการย่อยสลายเจลาติน (Gelatin liquefaction) ในหลอดอาหารเหลว Bouillon Gelatin Broth ร้อยละ 59 ให้ผลการทดลองเป็นบวก คือ เกิดการย่อยสลายเจลาตินในหลอดอาหาร Bouillon Gelatin Broth การทดสอบการย่อยสลายไนเตรท (Nitrate reeduction) ในหลอดอาหารเหลว Peptone KNO<sub>3</sub> Broth ร้อยละ 69 ให้ผลการทดลองเป็นลบ คือ ไม่เกิดการย่อยสลายไนเตรทในหลอดอาหาร Peptone KNO<sub>3</sub> Broth และ การทดสอบการย่อยสลายแป้ง (Starch hydrolysis) ในอาหารเอกสารเป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Inorganic salts-starch agar (ISP4) ร้อยละ 78 ให้ผลการทดลองเป็นลบ คือ ไม่เกิดการย่อยสลาย แบ่งในอาหาร Inorganic salts-starch agar (ISP4) สำหรับการศึกษาเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีความสามารถในการเจริญบนอาหาร Starch casein agar ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 3, 5, 7, 9, 12 และ 15 พบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 32 ไอโซเลทสามารถเจริญบนอาหาร Starch casein agar ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 15 ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดของเกลือโซเดียมคลอไรด์

จากการศึกษาเอนไซม์โปรติเอส พบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 9 ไอโซเลทมีความสามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอส ดังนี้ เชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากบริเวณดินนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรีมีจำนวนทั้งหมด 6 ไอโซเลท ได้แก่ MDB148, MDB632, MDB21210, MDB2433, MDB3222 และ MDB4123 และเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากดินนาเกลือ ตำบลโคกขาม จังหวัดสมุทรสาคร และ ตำบลบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา จากโครงการพิเศษจาก ทิพย์กรรม และ คณะ, (2558) มีจำนวนทั้งหมด 3 ไอโซเลท ได้แก่ K6786-3, B8810-1 และ B8800-3 เนื่องจากการเกิดบริเวณใส (clear zone) บนอาหาร Skim milk agar จึงนำเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 9 ไอโซเลท มาทำการสกัดเอนไซม์โปรติเอสโดยการเก็บตัวอย่าง ณ เวลาที่เพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง และ 30 ชั่วโมง และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โดยการตรวจสอบค่าความเป็นกรดต่าง (pH), อุณหภูมิ, สารยับยั้ง และความเสถียรภาพของเอนไซม์ด้วยวิธี Azocasein method

สำหรับวิธี Azocasein method ที่ใช้สำหรับในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่า ไม่สามารถนำผลการทดลองที่ได้จากการวิเคราะห์หาค่าปริมาณเป็นค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในหน่วยยูนิต (Unit/ml) โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนได้ (Standard curve) เนื่องจากวิธีนี้ได้กำหนดให้ 1 หน่วยของกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (Unit/ml) เท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร เพิ่มขึ้น 0.1 ภายใต้สภาวะที่ใช้วิเคราะห์ ดังนั้น สามารถนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตรจากการวิเคราะห์มาใช้ในการแสดงผลการทดลองได้ โดยไม่จำเป็นต้องหาค่าปริมาณเป็นค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในหน่วยยูนิต (Unit/ml) (Uddin *et al.*, 2014)

จากการตรวจสอบค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ซึ่งมีความจำเพาะต่อเอนไซม์ที่สกัดได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 9 ไอโซเลท ที่ผ่านระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 24 และ 30 ชั่วโมง พบว่า ไอโซเลท B8800-3 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลา 30 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดอยู่ที่ 0.017 ในสารละลายบัฟเฟอร์ Citrate-phosphate buffer ที่มีค่าความเป็นกรดต่างอยู่ที่ pH 7 ไอโซเลท B8810-1 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลา 30 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดอยู่ที่ 0.037 ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl buffer ที่มีค่าความเป็นกรดต่างอยู่ที่ pH 9 ไอโซเลท K6786-3 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลา 30 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดอยู่ที่ 0.029 ในสารละลายบัฟเฟอร์ Citrate-phosphate buffer ที่มีค่าความเป็นกรดต่างอยู่ที่ pH 7 ไอโซเลท MDB148 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลา 30 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดอยู่ที่ 0.036 ในสารละลายบัฟเฟอร์ Sodium borate buffer ที่มีค่าความเป็นกรดต่างอยู่ที่ pH 10 ไอโซเลท MDB632 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลา 30 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดอยู่ที่ 0.027 ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl buffer ที่มีค่าความเป็นกรดต่างอยู่ที่ pH 8 ไอโซเลท MDB21210 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลา 30 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดอยู่ที่ 0.043 ในสารละลายบัฟเฟอร์ Boric acid borax buffer ที่มีค่าความเป็นกรดต่างอยู่ที่ pH 8 ไอโซเลท MDB2433 ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดอยู่ที่ 0.049 ในสารละลายบัฟเฟอร์ Sodium bicarbonate buffer ที่มีค่าความเป็นกรดต่างอยู่ที่ pH 10 ไอโซเลท MDB3222 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลา 30 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดอยู่ที่ 0.025 ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl buffer ที่มีค่าความเป็นกรดต่างอยู่ที่ pH 9 และ ไอโซเลท MDB4123 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดอยู่ที่ 0.045 ในสารละลายบัฟเฟอร์ Sodium bicarbonate buffer ที่มีค่าความเป็นกรดต่างอยู่ที่ pH 10 จากผลการทดลองดังกล่าวจึงสามารถกล่าวได้ว่า เอนไซม์ที่สกัดได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 9 ไอโซเลทสามารถทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) เท่ากับ 10

จากการตรวจสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่า ไอโซเลทที่ MDB2433 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 24 ชั่วโมงและไอโซเลทที่ K6786-3, MDB148 และ MDB3222 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่ 30 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สำหรับไอโซเลทที่ B8800-3, MDB632, B8810-1, MDB4123 และ MDB21210 มีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน ดังนั้นจึงสามารถกล่าวได้ว่า เอนไซม์ที่สกัดได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 9 ไอโซเลท สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

จากการทดสอบหาสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ พบว่า สารยับยั้ง ethylenetetraacetic acid (EDTA) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้เป็นอย่างดี สำหรับสารยับยั้ง phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) และ 1,10-phenanthroline hydrate ( $C_8H_{12}N_2$ ) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้เล็กน้อย แต่เมื่อทดสอบกับสารยับยั้ง Potassium permanganate ( $KMnO_4$ ) พบว่า ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์มีค่าสูงกว่าสารยับยั้งชนิดอื่นๆ แสดงให้เห็นว่าสารยับยั้ง Potassium permanganate ( $KMnO_4$ ) ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ ซึ่งทำให้สามารถจัดกลุ่มเอนไซม์ที่สกัดได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 9 ไอโซเลทให้อยู่ในกลุ่มของ metalloprotease เนื่องจากเอนไซม์ในกลุ่มนี้ถูกยับยั้งการทำงานได้เป็นอย่างดีโดยสารยับยั้ง ethylenetetraacetic acid (EDTA)

จากการทดสอบหาความเสถียรภาพของเอนไซม์โปรติเอส พบว่า เอนไซม์โปรติเอสสามารถทำงานได้เป็นอย่างดีในช่วงอุณหภูมิ 40-60 องศาเซลเซียส เนื่องจากมีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่สูง เมื่อเวลาผ่านไปทุกๆ 10 นาที จนครบเวลา 1 ชั่วโมง พบว่า อุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ลดลงเล็กน้อย และอุณหภูมิที่ 70-80 องศาเซลเซียส ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็ว แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์โปรติเอสมีการเสถียรภาพการทำงานที่อุณหภูมิที่สูงกว่า 70 องศาเซลเซียส

จากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Micrococcus luteus* TISTR 2374 และ *Candida albicans* ATCC 90028 ด้วยวิธีการทดสอบขั้นต้น (pre-test) พบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 2 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลทที่ B8810-1 และ K6786-3 ไม่สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ เนื่องจากไม่พบระยะห่างระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 6 สายพันธุ์กับเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 2 ไอโซเลท

จากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Micrococcus luteus* TISTR 2374 และ *Candida albicans* ATCC 90028 เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Micrococcus luteus* TISTR 2374 และ *Candida albicans* ATCC 90028 โดยเทคนิค agar disc diffusion พบว่า สารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต และ สารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่หมักด้วยเมทานอลที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของเชื้อแอกติโนมัยซีททั้ง 2 ไอโซเลท ไม่เกิดการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 6 สายพันธุ์ เนื่องจากไม่พบการเกิดวงใส (clear zone) บนผิวหน้าอาหาร

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 จากการศึกษางานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างดินบริเวณนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี 2 แหล่ง ซึ่งเป็นแหล่งที่มีสภาวะความเข้มข้นของเกลือสูง พบว่า สามารถคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวนที่หลากหลาย จึงควรมีการคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากดินนาเกลือในพื้นที่อื่นๆ และควรมีการเก็บตัวอย่างดินนาเกลือในแต่ละฤดูกาล เพื่อนำมาเปรียบเทียบความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อแอกติโนมัยซีท ว่าแต่ละพื้นที่และฤดูกาลมีความหลากหลายทางชีวภาพเหมือนหรือแตกต่างกันอย่างไรบ้าง

5.2.2 จากการศึกษาครั้งนี้ ทำให้สามารถคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทที่มีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่สูง จึงควรนำมาศึกษาเพิ่มเติมในระดับโมเลกุลเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อในการหาสกุลและสปีชีส์ เพื่อนำไปพัฒนาและวิจัยต่อยอดต่อไป

5.2.3 จากการศึกษางานวิจัยครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์โดยการหาค่าความเป็นกรดต่าง อนุหภูมิ ความเสถียรของเอนไซม์และการหารายยับยั้ง ซึ่งเป็นการทดสอบเพียงเบื้องต้น จึงควรนำเอนไซม์มาทำให้มีความจำเพาะและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น โดยการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ เพื่อสามารถนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมและการเพิ่มมูลค่าให้กับเอนไซม์ได้ต่อไป

5.2.4 จากการศึกษาวิจัยนี้ สามารถคัดแยกไอโซเลตของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ จึงควรมีการทดลองเพิ่มเติมในการนำเอนไซม์โปรติเอสไปประยุกต์ใช้จริง เช่น การทดสอบการใช้เอนไซม์ในการกำจัดขนออกจากหนังสัตว์ (dehairing) เพื่อสังเกตว่าเอนไซม์ที่สกัดได้มีประสิทธิภาพในการทำลายโปรตีนหรือไม่ นำไปสู่การพัฒนาเป็นเอนไซม์ทางการค้าหรือการใช้ในระดับอุตสาหกรรมในอนาคตต่อไป

5.2.5 หากต้องการจะนำเอนไซม์โปรติเอสจากงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ทางการค้า หรือในอุตสาหกรรม อาจต้องทำการเลี้ยงเชื้อในถังหมัก และศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ หรืออาจปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อโดยใช้ความรู้ด้านพันธุวิศวกรรม เช่น การโคลนยีน เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ในปริมาณที่สูงขึ้น

5.2.6 จากการศึกษาวิจัยนี้ ได้ทดสอบการสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ โดยทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียและยีสต์เท่านั้น โดยอาจทำการทดสอบเพิ่มเติม เช่น การทดสอบกับเชื้อรา เพื่อให้การทดลองมีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น หรืออาจทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ดีอื่นๆ เพื่อนำไปสู่การพัฒนาเป็นสารต้านจุลชีพที่มีประโยชน์ต่อการแพทย์และเกษตรกรรมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2.7 จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ สามารถสกัดได้เอนไซม์โปรติเอสที่อยู่ในรูปของเอนไซม์อิสระ จึงควรนำเอนไซม์ที่ทดสอบนั้นมาทำการตรึงเอนไซม์เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพ เพิ่มความเสถียรและอายุการใช้งานของเอนไซม์ให้ยาวนานขึ้น

5.2.8 จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ สามารถคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงถึงร้อยละ 15 ทำให้เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อแอคติโนมัยซีทอาจมีประสิทธิภาพในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนังได้ เนื่องจากกระบวนการผลิตของอุตสาหกรรมมีการใช้สารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 8 ถึง 10 ร่วมกับเอนไซม์โปรติเอสเพื่อช่วยเก็บและรักษาหนังดิบให้มีคุณภาพที่ดีและทำให้หนังเกิดการอ่อนนุ่มเพื่อใช้ในกระบวนการผลิตต่อไป ดังนั้นจึงควรนำเอนไซม์ที่สกัดได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีความสามารถทนทานต่อความเข้มข้นของเกลือสูงนำมาใช้ร่วมกับสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 8 ถึง 10 ในอุตสาหกรรมฟอกหนังต่อไป

5.2.9 จากการศึกษาวิจัยนี้ได้สกัดเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร Yeast extract - malt extract broth (YEME broth) ที่ไม่มีการเติมเกลือ (NaCl) แต่เนื่องจากผลการทดลองการหาปริมาณคกสิทธิ์ที่เหมาะสม พบว่า ที่เติมเกลือ NaCl ร้อยละ 5 เป็นสถานะที่ดีที่สุดในการทดลองครั้งต่อไปจึงควรเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ลงในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากอาจทำให้เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ปริมาณเพิ่มมากขึ้น



## เอกสารอ้างอิง

- การท่องเที่ยวแห่งประเทศไทย. 2555. “เกลือชมพูทรัพย์แห่งแผ่นดิน” กองส่งเสริมแหล่งท่องเที่ยว  
คณิงกานต์ กลั่นบุศย์ และ อัญชลี อ่อนเจริญ. 2543. “การศึกษาเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่ผลิตเอนไซม์  
โปรติเอสในการหมักถั่วเหลืองแบบพื้นบ้านในภาคเหนือ” วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุล  
ชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- คณิงกานต์ กลั่นบุศย์. 2558. **การเพาะเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีทในอาหารเหลวและการทดสอบลักษณะ  
ทางสัณฐานวิทยาของเชื้อเคมีบางประการของเชื้อ**. เอกสารประกอบวิชาปฏิบัติการสรีระวิทยา  
ของจุลินทรีย์. กรุงเทพฯ : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- จามจุรี เกตุบัวขาว, ณิชภา ชมพู และ สุพัตรา ชาวสวน. 2555. “การคัดแยกแอกติโนมัยซีทจากมูล  
สัตว์ เพื่อใช้ในการย่อยสลายวัสดุทางการเกษตรเบื้องต้น.” ปรินญาณิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต,  
สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.
- จิระพันธ์ กริ่งไกร. 2011. เอนไซม์. Cell Biology for Medical Students  
ชัยวัฒน์ วามวรรธน์. 2555. บัฟเฟอร์. หน้า 1-5 [Online]. Available : [http://www.biochem.  
flas.kps.ku.ac.th/01402312/01402312lab01buffer156.pdf](http://www.biochem.flas.kps.ku.ac.th/01402312/01402312lab01buffer156.pdf)
- ดวงพร คันธโชติ. 2537. **อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : โอ.  
เอส.พรินติ้ง เฮ้าส์.
- ทิพย์วรรณ เลื่อนศักดิ์, มณีรัตน์ วิเชียรรัตน์ และ รุจิโรจน์ ชยติมา. 2558. “การศึกษาสภาวะต่างๆใน  
การเพาะเลี้ยงแอกติโนมัยซีทบนเกลือจากดินนาเกลือ ตำบลโคกขาม จังหวัดสมุทรสาคร และ  
ตำบลบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา”. ปรินญาณิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา  
อุตสาหกรรม, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2547. **แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค**. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: ภาควิชาชีววิทยา  
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร.
- ผาสุข เปี่ยมสุวรรณมาศ. 2548. “สารยับยั้งสปอร์ P. L. larvae จากแบคทีเรียและแนวโนมการ  
ประยุกต์ใช้ควบคุมโรคอเมริกันฟาล์วบรูต”. วิทยานิพนธ์ปรินญาณิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยา, มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์. 2556. Casein [Online]. Available:  
<http://www.foodnetworksolution.com>
- ภัทรชัย กิรติสิน. 2549. **ตำราวิทยาแบคทีเรียการแพทย์**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : หจก. วี. เจ. พริน  
ติ้ง.
- รัตนภรณ์ ศรีวิบูลย์. 2548. **แอกติโนมัยซีท**. ชลบุรี: สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา.
- รพีภัทร์ อิงคสิทธิ์, ณิชชานันท์ กล้าหาญ และ ณิชกรณ อมรยางกูร. 2557. “จักรวาลสีขาว ดาวนาเกลือ  
เม็ด”. 38-43.
- โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ. 2551. การทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อสารต้าน  
จุลชีพ. หน้า 2-4 [Online]. Available : [http://www.hospital.tu.ac/LABWEBSITE  
/Work%20Instruction/WI%20-%202410%20-%20009.pdf](http://www.hospital.tu.ac/LABWEBSITE/Work%20Instruction/WI%20-%202410%20-%20009.pdf)

เลิศพงษ์ บุญชู. 2548. “การพัฒนากระบวนการวัดความไวของแบคทีเรียต่อสารต้านจุลชีพโดยเทคนิค Disc  
Diffusion.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาอุปกรณ์การแพทย์ ภาควิชาฟิสิกส์  
อุตสาหกรรมและอุปกรณ์การแพทย์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ส่งเสริมการวิจัยและพัฒนาเพื่อประโยชน์ของสังคมไทย โดยผู้จัดทำสงวนลิขสิทธิ์ในการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัชรโบล อัครพันธ์นิมิต.2555. “ผลของการเสริมเอนไซม์โปรติเอสต่อสมรรถภาพการผลิตของสุกร ระยะอนุบาล” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาโภชนศาสตร์และเทคโนโลยีอาหารสัตว์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิราสิณี จันท์เป็ง และ นพพล เล็กสวัสดิ์. 2557. “ปาเปน และเอนไซม์โคโมซิน.” สาขาวิศวกรรมกระบวนการอาหาร สำนักวิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วสุ ปฐมอารีย์. ปฏิบัติการแอคติโนมัยซีทเบื้องต้น. เชียงใหม่ : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ศิริรัตน์ ทองอ่อน. 2552. “การคัดกรองสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งจากแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเล.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมพิศ สอนโยธา. 2559. “Protease Microbial enzyme” เอกสารประกอบการเรียนวิชา เอนไซม์ สิริรินภา ช่วงโอภาส. 2550. “การทำให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus sp. A39*” วิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุกาญจน์ รัตนเลิศนุสรณ์. 2013. “การทำนาเกลือ”

[Online]. Available: <http://www.khogkham.rmutt.ac.th>

สุภาพพรรณ ม่วงพรม. 2556. “เกลือสมุทร...ที่สมุทรสาคร ” หน่วยงาน อุทยานการเรียนรู้สมุทรสาคร สังกัด อบจ.สมุทรสาคร

สุรัชย์ รัตนสุข. 2557. “ประสิทธิภาพของสมุนไพรพื้นบ้านในการยับยั้งการเจริญของ *Candida albicans*”. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สทวท.)*. 1(2): 33-40.

สุรวิทย์ สิมะรักษ์อำไพ. 2545. *วิทยาแบคทีเรีย*. สุรินทร์ : สถาบันราชภัฏสุรินทร์.

อัมพร โขยา. 2556. “วิถีปัญญาวิถีแห่งสุขบางขุนไทร”. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ : 17

อารี ฤทธิบุรณ์. 2555. “การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์” ปฏิบัติการเทคโนโลยีของเอนไซม์.

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง Alvarez-Elcoro, S. and Enzler, M.J. 1999. “The Macrolides: Erythromycin, Clarithromycin, and Azithromycin.” *Mayo Clinic Proceedings*. 74(6): 613-634.

Anwar, A. and Saleemuddin, M. 1997. “ALKALINE PROTEASES: A REVIEW” *Bioresource Technology*. 64: 175-183

Asagbra, A.E. Sanni, A.I. and Oyewole, O.B. 2005. “Solid-state fermentation production of tetracycline by *Streptomyces* strains using some agricultural wastes as substrate.” *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 21: 107-114.

Ashwathi, P. 2008. **Microorganisms Found in Soil**. [Online]. Available : <http://www.biologydiscussion.com/soil/7-microorganisms-found-in-soil-microbiology/66603>. 21(2): 107-114.

Askar, A.A. Rashad, Y.M. Hafez, E.E. Ghoneem, KM. Baka ZA. 2015. “characterization of alkaline protease produced by *Streptomyces griseorubens* E44G and its possibility for controlling *Rhizoctonia* root rot disease of corn.” *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 29(3): 457-462.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons. 1974. Order Actinomycetales, pp. 657-861. In S.T. Cowan, J.G. Holt, J. Liston, R.G.E. Murray, C.F. Neiven, A.W. Ravin and R.Y. Stanier, eds. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8 th ed. Wilkins, Baltimore.
- Champney, W.S. and Burdine, R. 1995. "50S Ribosomal Subunit Synthesis and Translation Are Equivalent Targets for Erythromycin Inhibition in *Staphylococcus aureus*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 4(5): 1301-1303.
- Chaplin, M.F. and Bucke C. 1990. "enzyme technology". 143-146.
- Cheng, G., He, L., Sun, Z., Cui, Z., Du, Y. and Kong, Y. 2015. "Purification and Biochemical Characterization of a Novel Fibrinolytic Enzyme from *Streptomyces* sp. P3." *J. Microbiol. Biotechnol.* 1449-1459.
- Coêlho, D.F., Saturnino, T.P., Fernandes, F.F., Mazzola, P.G., Silveira, E. and Tambourgi E.B. 2016. "Azocasein Substrate for Determination of Proteolytic Activity: 97 Reexamining a Traditional Method Using Bromelain Samples." *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International*.
- Dastager, S.G. Li, W.J. Dayanand, A. Tang, S.K. Tian, X.P. Zhi, X.Y. Xu, L.H. and Jiang, C.L. 2006. "Seperation, identification and analysis of pigment (melanin) production in *Streptomyces*." *African Journal of Biotechnology*. 5(8) : 1131-1134.
- Dhanasekaran, D. Rajakumar, G. Sivamani, P. Selvamani, S. Panneerselvam, A. and Thajuddin, N. 2004. "Screening of Salt Pans Actinomycetes for Antibacterial Agents." *The Internet Journal of Microbiology*. 2(1): 1-4.
- Dodia, M.S. Joshi, R.H. Patel, R.K. and Singh, S.P. 2006. "Characterization and Stability of Extracellular Alkaline Proteases from Halophilic and Alkaliphilic Bacteria Isolated from Saline Habitat of Coastal Gujarat, India." *Brazilian Journal of Microbiology*. 37(6) : 276-282.
- Doroghazi, J.R. and Metcalf, W.W. 2013. "Comparative genomics of actinomycetes with a focus on natural product biosynthetic genes." *BMC Genomics*. 11(14): 611.
- Dunca, S. Tănase, C. Ștefan, M. and cojocariu. 2016. "Characterization of the microbiota from different types of anthropogenic soils." *European Scientific Journal*. 14(3): 237-251.
- El-Khonezy, M.I., El-Gammal, E.W., Atwa, N.A. and El-Abd, M.A. 2015. "Partial Purification and Characterization of an Alkaline Serine Protease Produced by *Streptomyces griseus* NCRRT and its Antifungal Effect on *Fusarium solani*." *World Applied Sciences Journal*. 33(5): 831-842.
- Faiza, B., Kounouz, R., Robert, D., Be'atrice, L., Solange, K., Lynda, B., Sarra, B., Meriem, B., Houria, B. and Abderrahmane, B. 2016. "Optimization of alkaline protease

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- production by *Streptomyces* sp. strain isolated from saltpan environment.” *African Journal of Biotechnology*. 15(26): 1401-1412.
- Fitri, L. and Bustam, M. Betty 2010. “Screening of antimicrobial producing strains isolated from the soil of grassland rhizosphere in Pocut Meurah Intan Forest Park, Seulawah, Aceh Besar.” *Biodiversitas*. 11: 129-132.
- Googfellow, M., Williams, S. T. and Mordarski, M. 1988. **Actinomycetes in biotechnology**. Academic Press Limited. London.
- Gulve, R. M. and Deshmukh, A. M. 2011. “ENZYMATIC ACTIVITY OF ACTINOMYCETES ISOLATED FROM MARINE SEDIMENTES.” *Recent Research in Science and Technology*. 3(5): 80-83.
- HAMES, E.E. and Uzel, A. 2007. “Alkaline protease production by an actinomycete MA1-1 isolated from marine sediments.” *Annals of Microbiology*. 57(1): 71-75.
- Hoef, V , Breugelmanns, B. Spit, J. Simonet, G. Zels, S. Billen, J. and Vanden B.J. 2011. “Functional analysis of a pancreatic secretory trypsin inhibitor-like protein in insects: Silencing effects resemble the human pancreatic autodigestion phenotype.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 41: 688-695.
- IKAWA, M. SCHAPER, T.D. DOLLARD, C.A and SASNER, J.J. 2003. “Utilization of Folin-Ciocalteu Phenol Reagent for the Detection of Certain Nitrogen Compounds.” *Journal of Agricultural and food chemistry*. 51(7): 1811-1815.
- Jose, P.A. Robinson, S. and Jebakumar, D. 2013. “Phylogenetic appraisal of antagonistic, slow growing actinomycetes isolated from hypersaline inland solar salterns at Sambhar salt Lake, India.” *Frontiers in Microbiology*. 13(4): 1-9.
- Kamoun, A.S. Haddar, A. Ali, N.E.H. Frikha, B.G. Kanoun, S. and Nasri, M. 2008. “Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations.” *Microbiological Research*. 163(2008) : 299-306.
- Karthik, L., Kumar, G., Kumar, K.S., Thangaradjou, T. and Rao, B.K.V. 2011. “Isolation and characterization of protease producing actinobacteria from marine crab.” *BioTechnology*. 39: 5098-5102.
- Klanbut, K. 2013. “The role of phospholipids in the growth and development of *Streptomyces*.” A thesis for the degree of Doctor of philosophy. University of Strathclyde, UK.
- Kushner, D.J. 1978. **Microbial life in extreme environments**. London : Academic press.
- Leboffe, MJ., Pierce, B.E. 2011. “A Photographic Atlas for the Microbiology Laboratory.” GELATINASE TEST. 102.
- Li, Q. Chen, X. Jiang, Y. and Jiang, C. 2016. **Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications**: INTECH Open Access Publisher.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

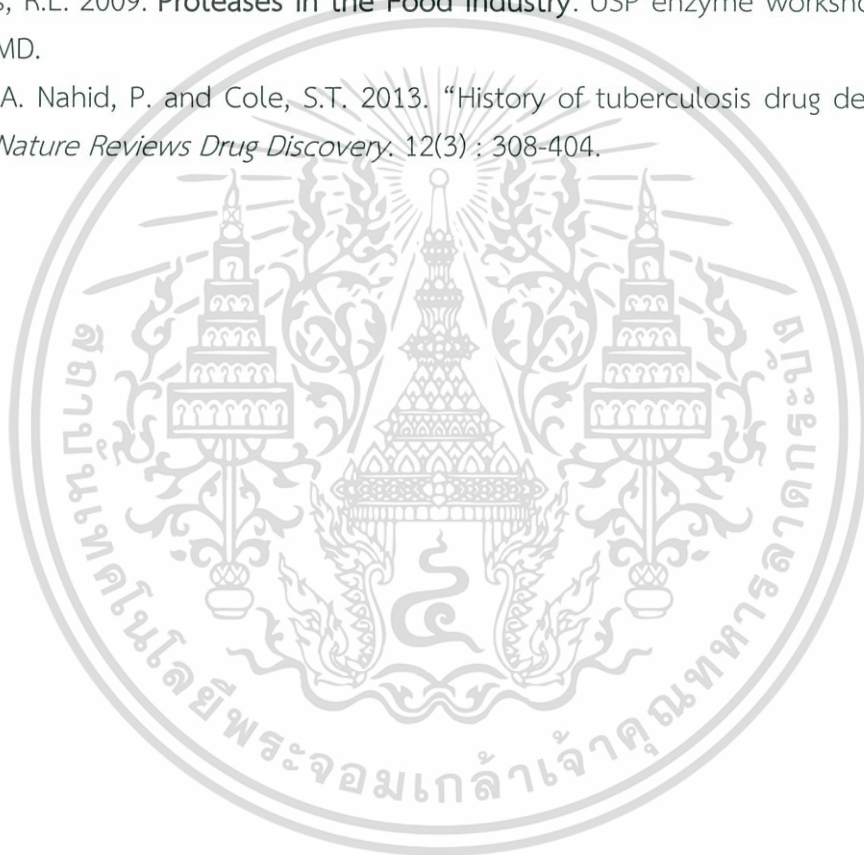
- Mane, M. Mahadic, K.R. and Kokare, C. 2013. "Purification, characterization and applications of thermostable alkaline protease from marine *Streptomyces* sp. D1." *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 4(1): 572-582.
- Manteca, A. Fernandez, M. and Sanchez, J. 2005. "Mycelium development in *Streptomyces antibioticus* ATCC11891 occurs in an orderly pattern which determines multiphase growth curves." *BioMed Central Microbiology*. 5(11) : 1-11.
- Miyadoh, S. 1997. **Atlas of Actinomycetes**. Tokyo: Asakura Publisher.
- Mótyán, J.A. Tóth, F. And Tozsér, J. 2013. "Research Applications of Proteolytic Enzymes I in Molecular Biology." *Biomolecules*. 3: 923-942.
- Mundie, D.A. 1995. **The NBS/ISCC Color System**. Pittsburgh, PA: Polymath Systems 535.6 dc-20. [Online]. Available: <http://www.tx4.us/nbs-iscc.htm>.
- Naik, M. 2015. **Protease**. [Online]. Available: <http://hao.rising.cn/?b=57>
- Nair, D.N. and Padmavathy, S. 2014. "Impact of Endophytic Microorganisms on Plants, Environment and Humans." *The Scientific World Journal*. 22(1) : 1-12.
- Neu, H.C. and Gootz, T.D. 1996. "Antimicrobial Chemotherapy." *Medical Microbiology*. 11(4): 21-41.
- Nitta, S. Komatsu, A. Ishii, T. Iwamoto, H. and Numata, K. 2016. "Synthesis of peptides with narrow molecular weight distributions via exopeptidase-catalyzed aminolysis of hydrophobic amino-acid alkyl esters." *Polymer Journal*. 48 : 955-961.
- Phongsopitanun, W., Suwanborirux, K. and Tanasupawat, S. 2014. "Identification and antimicrobial activity of *Streptomyces* strains from Thai mangrove sediment." *The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*. 38(1): 1-56.
- Procópio, R.E.L. Silva, I.R. Martins, M.K. Azevedo, J.L. and Araújo, J.M. 2012. "Antibiotics produced by *Streptomyces*." *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 16(5): 466-471.
- Raja, A. and Prabakarana, P. 2011. "Actinomycetes and Drug-An Overview." *American Journal of Drug Discovery and Development*. 10(1): 75-84.
- Rajan, L.A. Joseph, T.C. Thampuran, N. and James, R. (2010). "Studies on the microbial diversity of salted fishes under aerobic conditions." *Microbiology Research*. 2(4) : 22-25.
- RAO, MALA B. TANKSALE, A.M. GHATGE, M. S. and DESHPANDE, V.V. 1998. "Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases" *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*. 62(3). 597-635.
- Reynolds, J. 2011. "Casein hydrolysis." *BIOL Research*. 2(1) : 63-65.
- Sadeghi-Nejad, B. and Azish, M. 2013. "In vitro antibacterial and antifungal effect of some medicinal plants." *African Journal of Microbiology Research*. 7(29): 3802-3806.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Saurav, K. and Kannabiran, K. 2010. "Diversity and Optimization of process parameters for the growth of *Streptomyces* VITSVK9 spp. isolated from Bay of Bengal, India." *Journal of Natural & Environmental Sciences*. 1(2): 56-65.
- Sawant, R. and Nagendran, S. 2014. "PROTEASE: AN ENZYME WITH MULTIPLE INDUSTRIAL APPLICATIONS." *WORLD JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES*. 3(6): 568-579.
- Scopes, R.K. 2002. **Enzyme Activity and Assays**. La Trobe University, Bundoora, Victoria, Australia.
- Shaik, M. Sankar, G.G. Iswarya, M. Rajitha, P. 2017. "Isolation and characterization of bioactive metabolites producing marine *Streptomyces parvulus* strain sankarensis-A10." : 1-8.
- Sharma, C., Agarwal, A., Mehtani, P., Mathur, N. and Bhatnagar, P. 2014. "Characterization of Actinomycetes from Soil Sample of Nahargarh Hill Area, Jaipur, India for Production of Antimicrobial Compounds and Enzymes." *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*. 15(3): 304-312.
- Sood, S. 2016. "Chloramphenicol – A Potent Armament Against Multi-Drug Resistant (MDR) Gram Negative Bacilli." *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 10(2): 1-3.
- Suthindhiran, K., Jayasri, A. Mangalam, Dipali, D. and Prasar, A. 2013. "Screening and characterization of protease producing actinomycetes from marine saltern." *Journal of Basic Microbiology*. 54: 1098-1109.
- Teja, D.D. Devi, V.S. Harsha, N. Vishala, S.S. and Lakshmi, P.K.S. 2014. "Production of L-glutaminase from marine ecosystems and optimal conditions for maximal production by actinomycetes." *International Journal of Advanced Research*. 2(1): 485-491.
- Thys, R.C.S., Lucas, F.S., Riffel, A., Heeb, P. and Brandelli, A. 2004. "Characterization of a protease of a feather-degrading *Microbacterium* species." *Letters in Applied Microbiology*. 39: 181-186.
- Todar, K. 2008. **Antimicrobial Agents in the Treatment of Infectious Disease**. [Online]. Available: [http://textbookofbacteriology.net/antimicrobial\\_4.html](http://textbookofbacteriology.net/antimicrobial_4.html).
- Tsuchiya, K. Nakamaru, Y. Sakashita, H. and Kimura, T. 1992. "Purification and characterization of the most stable alkaline protease from alkalophilic *Thermoactinomyces* sp. HS682". *Biosci. Biotech. Biochem*. 56: 246-250.
- Uddin, E., Maitra, P., Faruquee, Md. H. and Alam, F. 2014. "Isolation and Characterization of protease enzyme from locally isolated *Bacillus* sp." . *American Journal of Life Sciences*. 2(6): 338-344.
- Ventosa, A. Nieto, J.J. and Oren, A. 1998. "Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria." *Microbiol Mol Biol Rev*. 62(2): 504-544.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Vonothini, G., Murugan, M., Sivakumar, K. and Sudha, S. 2008. "Optimization of protease production by an actinomycete Stain, PS-18A isolated from an estuarine shrimp pond." *African Journal of Biotechnology*. 7(18): 3225-3230.
- Wadetwar, R.N. and Patil, A.T. 2013. "Isolation and characterization of bioactive actinomycetes form soil in around Nagpur." *International Journal Phamaceutical Sciences and Research*. 4(4) : 1428-1433.
- Wierman, C.K. and Hutchinson, C.R. 1985. "Genetic analysis of erythromycin production in *Streptomyces erythreus*." *Journal of Bacteriology*. 164(1): 425-433.
- Wildermuth, H. 1970. "Development and Organization of the Aerial Mycelium in *Streptomyces coelicolor*." *J. gen. Microbiol.* 60(1): 43-50
- Williams, R.L. 2009. **Proteases in the Food Industry**. USP enzyme workshop, Rockville, MD.
- Zumla, A. Nahid, P. and Cole, S.T. 2013. "History of tuberculosis drug development." *Nature Reviews Drug Discovery*. 12(3) : 308-404.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้

#### International Streptomyces Project medium no. 2 (ISP-2)

##### ส่วนประกอบ

Malt extract	10.0	กรัม
Yeast extract	4.0	กรัม
Glucose	4.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร
pH 7.3		

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

#### Starch Casein Agar (SCA)

##### ส่วนประกอบ

Soluble starch	10.0	กรัม
Casein	0.3	กรัม
KNO <sub>3</sub>	2.0	กรัม
NaCl	4.6	กรัม
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05	กรัม
CaCO <sub>3</sub>	0.02	กรัม
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01	กรัม
Agar	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร
pH 7.0-7.2		

ละลาย KNO<sub>3</sub>, NaCl, Casein, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, CaCO<sub>3</sub> และ FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O ให้เข้ากันก่อน จากนั้นจึงเติมสารที่เหลือ และเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรตามที่ต้องการ

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

## Yeast extract Malt extract broth (YEME)

## ส่วนประกอบ

Malt extract	10.0	กรัม
Yeast extract	4.0	กรัม
Glucose	4.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร
pH 7.3		

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

## Bouillon Gelatin Broth

## ส่วนประกอบ

Peptone	10.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Malt extract	5.0	กรัม
Gelatin	150.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร
pH 7.0-7.2		

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

Peptone KNO<sub>3</sub> broth

## ส่วนประกอบ

Peptone	10.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
KNO <sub>3</sub>	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร
pH 7.0-7.2		

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## Inorganic salts – starch agar, ISP medium no.4

## ส่วนประกอบ

Soluble starch	10.0	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0	กรัม
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.0	กรัม
NaCl	1.0	กรัม
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.0	กรัม
CaCO <sub>3</sub>	2.0	กรัม
Trace salts solution	1.0	มิลลิลิตร
Agar	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.0-7.4

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

## Trace salts solution

## ส่วนประกอบ

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

## Peptonization and Coagulation test medium

## ส่วนประกอบ

Skim milk powder	28.0	กรัม
Casein enzymic hydrolysate	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.0-7.2

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### Mueller-Hinton agar

#### ส่วนประกอบ

Beef infusion solids	2.0	กรัม
Casein hydrolysate	17.5	กรัม
Starch	1.5	กรัม
Agar	17.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.3 ± 0.2 (25°C)

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

### Sabouraud's dextrose agar

#### ส่วนประกอบ

Mycological peptone	10.0	กรัม
Dextrose	40.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 5.6 ± 0.2 (25°C)

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



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

### การเตรียมสารเคมีและบัฟเฟอร์

#### 1. Glycerol 10% (v/v)

Glycerol	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

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

Azocasein	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	10.0	มิลลิลิตร

\*ควรใช้ให้หมดวันต่อวัน

#### 3. สารละลายไตรคลอโรแอซิดิก (Trichloroacetic acid) : ความเข้มข้นร้อยละ 10

TCA	20.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	180.0	มิลลิลิตร

\*เก็บใส่ขวดสีชา หรือเก็บให้พ้นแสง

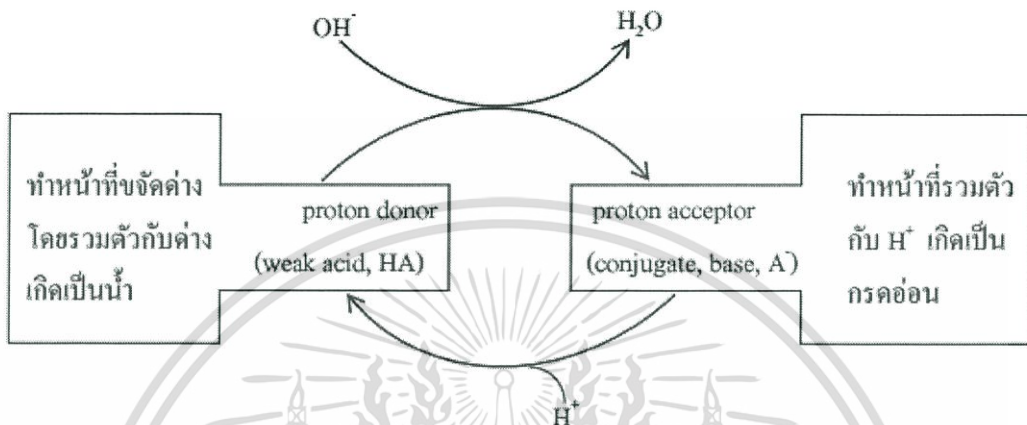
#### 4. NaOH ความเข้มข้น 1 N

NaCl	8.0	กรัม
น้ำกลั่น	200.0	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 5. บัฟเฟอร์ ( ชัยวัฒน์, 2555 )

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



น้ำหรือกรดอ่อนที่เกิดขึ้น มีผลทำให้พีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์เปลี่ยนแปลงน้อยมาก น้ำมีค่าการแตกตัว ( $K_w$ ) น้อยมากเท่ากับ  $10^{-14}$  การแตกตัวเป็น  $\text{H}^+$  มีปริมาณที่น้อยมาก ส่วนกรดอ่อนแม้ว่าจะแตกตัวเป็น  $\text{H}^+$  ได้อีก แต่การแตกตัวนั้นต้องเป็นไปตามค่าสัมประสิทธิ์การแตกตัว ( $K_a$ ) ของกรดนั้น  $\text{H}^+$  จึงมีปริมาณที่เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย

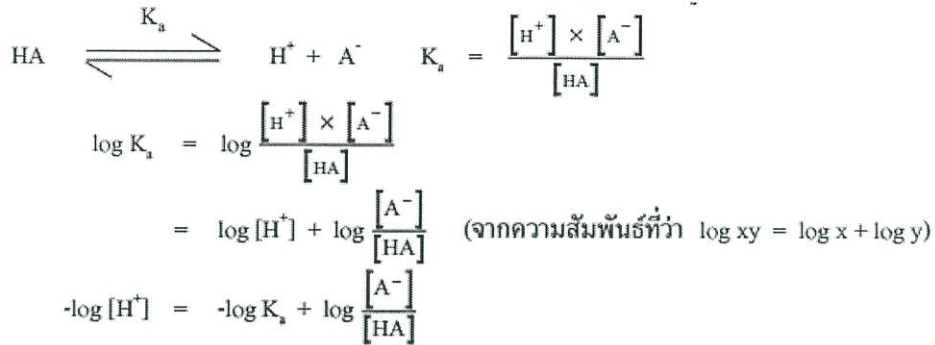
### การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

การที่จะเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ได้นั้นต้องอาศัยสมการที่สำคัญสมการหนึ่งๆที่เรียกว่า สมการ Henderson – Hasselbalch ซึ่งมีรูปสมการดังนี้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมการนี้มีที่มาจากค่าสัมประสิทธิ์การแตกตัวของกรดอ่อน ( $K_a$ )



$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

( $\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$  และ  $\text{p}K_a = -\log K_a$ )

ในสมการจะระบุว่า พีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ขึ้นอยู่กับค่า  $\text{p}K_a$  ของกรดอ่อน ดังนั้น การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชใดพีเอชหนึ่ง สิ่งที่ต้องพิจารณาคือ การเลือกชนิดกรดอ่อน ซึ่งต้องมีค่า  $\text{p}K_a$  ใกล้เคียงกับค่าพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ต้องการเตรียม ค่า  $\text{p}K_a$  นี้บ่งบอกถึงความแรงของกรด กรดอ่อนที่มีค่า  $K_a$  สูงจะมีการแตกตัวดีกว่าและเป็นกรดที่แรงกว่ากรดอ่อนที่มีค่า  $K_a$  ต่ำ กรดอ่อนบางชนิดสามารถแตกตัวให้  $\text{H}^+$  ได้หลายครั้ง เราเรียกรวมพวกนี้ว่า กรดหลายโปรตอน (polyprotic acid) เช่น กรดฟอสฟอริก ค่า  $\text{p}K_a$  ของสารบางชนิดได้แสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่า  $\text{p}K_a$  ของกรดอ่อนบางชนิด

	$\text{p}K_{a1}$	$\text{p}K_{a2}$	$\text{p}K_{a3}$
<b>กรดฟอสฟอริก (<math>\text{H}_3\text{PO}_4</math>)</b>			
จากการแตกตัวครั้งที่ 1 $\text{H}_3\text{PO}_4 \longrightarrow \text{H}^+ + \text{H}_2\text{PO}_4^-$	2.1		
จากการแตกตัวครั้งที่ 2 $\text{H}_2\text{PO}_4^- \longrightarrow \text{H}^+ + \text{HPO}_4^{2-}$		6.8	
จากการแตกตัวครั้งที่ 3 $\text{HPO}_4^{2-} \longrightarrow \text{H}^+ + \text{PO}_4^{3-}$			12.3
<b>กรดคาร์บอนิก</b>			
จากการแตกตัวครั้งที่ 1 $\text{H}_2\text{CO}_3 \longrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$	6.4		
จากการแตกตัวครั้งที่ 2 $\text{HCO}_3^- \longrightarrow \text{H}^+ + \text{CO}_3^{2-}$		10.3	
<b>ไกลซีน (<math>\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOH}</math>)</b>			
จากการแตกตัวของ $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COOH} \longrightarrow \text{H}^+ + \text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COO}^-$	2.4		
จากการแตกตัวของ $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COO}^- \longrightarrow \text{H}^+ + \text{H}_2\text{NCH}_2\text{COO}^-$		9.6	
<b>กรดอะซิติก</b>			
จากการแตกตัว $\text{CH}_3\text{COOH} \longrightarrow \text{H}^+ + \text{CH}_3\text{COO}^-$	4.8		

เมื่อได้ชนิดของสารที่ใช้เตรียมบัฟเฟอร์แล้ว ลำดับต่อมาที่ต้องพิจารณาคือ การปรับอัตรา ส่วนของ conjugate base : กรด หรือ  $[\text{A}^-]/[\text{HA}]$  ให้ได้พีเอชที่ต้องการโดยอาศัยสมการ Henderson – Hasselbalch อัตราส่วนของ conjugate base : กรดที่จะให้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีสมบัติต้านทาน

เอกลสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH 7.4 นี้เป็นบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วยกรดอะซิติกและเกลือโซเดียมอะซิเตตในอัตราส่วน 1:10 ซึ่งหมายความว่า กรดอะซิติกมีให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การ เปลี่ยนแปลงพีเอชอยู่ระหว่าง 1/10–10/1 กล่าวได้ว่าบัฟเฟอร์ชนิดหนึ่งๆ จะมีช่วงพีเอชที่แสดงคุณสมบัติ การต้านทานการเปลี่ยนแปลงพีเอช เท่ากับ  $pK_a \pm 1$  ตัวอย่างเช่น แอซีเตทบัฟเฟอร์ที่เตรียมโดยใช้ค่า  $pK_a$  ของกรดแอซีติก สามารถ ใช้เตรียมบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชอยู่ระหว่าง 3.8 – 5.8 เท่านั้น พ้นจากช่วงพีเอชนี้ไป แล้ว สารละลายที่เตรียมขึ้นไม่ถือว่าเป็นสารละลายบัฟเฟอร์แต่อย่างใด เนื่องจากปริมาณกรดอ่อนหรือ conjugate base มีไม่เพียงพอต่อการต้านทานการเปลี่ยนแปลงพีเอชต่อการเติมกรดหรือด่าง เมื่อพีเอชของ สารละลายบัฟเฟอร์ที่เตรียมขึ้นมีค่าเท่ากับ  $pK_a$  ของกรดอ่อนที่ใช้เตรียม นั้น หรือความเข้มข้นของกรดอ่อน เท่ากับความเข้มข้นของ conjugate base สารละลายบัฟเฟอร์นี้มีประสิทธิภาพในการต่อต้านการเปลี่ยนแปลงพีเอชสูงสุด

ประสิทธิภาพในการต่อต้านการเปลี่ยนแปลงพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ (buffer capacity) นอกจากจะขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของ conjugate base (proton acceptor) ต่อกรดอ่อน (proton donor) แล้ว ยังขึ้นอยู่กับปริมาณของ proton donor และ proton acceptor ที่รวมอยู่ในบัฟเฟอร์ นั้น หรืออีก นัยหนึ่งคือ ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งเท่ากับผลรวมความเข้มข้นของ conjugate base และ ความเข้มข้นของกรดอ่อน โดยที่ประสิทธิภาพการต้านทานการเปลี่ยนแปลงพีเอชจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของบัฟเฟอร์

พีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ยังขึ้นอยู่กับความแรงไอออน (ionic strength) และอุณหภูมิ โดยแท้ที่จริงแล้วสมการ Henderson - Hasselbalch มีรูปสมการที่ถูกต้องดังนี้คือ

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

ซึ่งต้องมีการคูณค่า activity coefficient,  $\gamma$  ของทั้งกรดอ่อนและ conjugate base เข้าไปด้วย การละทิ้งเสีย ซึ่งค่า  $\gamma$  นี้ ซึ่งทำนายถึงค่าพีเอชของบัฟเฟอร์จะผันแปรกับความแรงไอออน ทำให้บางครั้งค่าพีเอชที่ได้ จากการคำนวณไม่ตรงกับค่าพีเอชที่วัดได้ การเติมเกลือ เช่น เกลือโซเดียมคลอไรด์ หรือการเปลี่ยนแปลง ปริมาตรของบัฟเฟอร์จะทำให้พีเอชของบัฟเฟอร์เปลี่ยนแปลงไป ผลกระทบนี้มีมากเมื่อเป็นพวกที่มีประจุ สูง เช่น ซิเตรท และฟอสเฟต การเจือจางฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.6 จาก 0.5 โมลาร์ ไปเป็น 0.05 โม ลาร์ พีเอชจะเพิ่มเป็น 6.9 บัฟเฟอร์ส่วนใหญ่ยังแสดงถึงความสัมพันธ์ของค่า  $pK_a$  ที่ขึ้นกับอุณหภูมิ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับทริสบัฟเฟอร์(Tris buffer) บัฟเฟอร์ชนิดนี้มีการเปลี่ยนแปลง ประมาณ  $-0.03$  หน่วย  $pK_a$  / องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิ 25°ซ วัดค่าพีเอชได้เป็น 8.08 จะเพิ่มเป็นประมาณ 8.7 ที่ 4°ซ และ ลดลงเป็นประมาณ 7.7 ที่ 37°ซ

## การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

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

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

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

ผสม X มิลลิลิตรของ A กับ Y มิลลิลิตรของ B ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 5.2 Tris-HCl buffer (pH 7.0 – pH 9.0)

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

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

ผสม 50 มิลลิลิตรของ A กับ X มิลลิลิตรของ B ปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

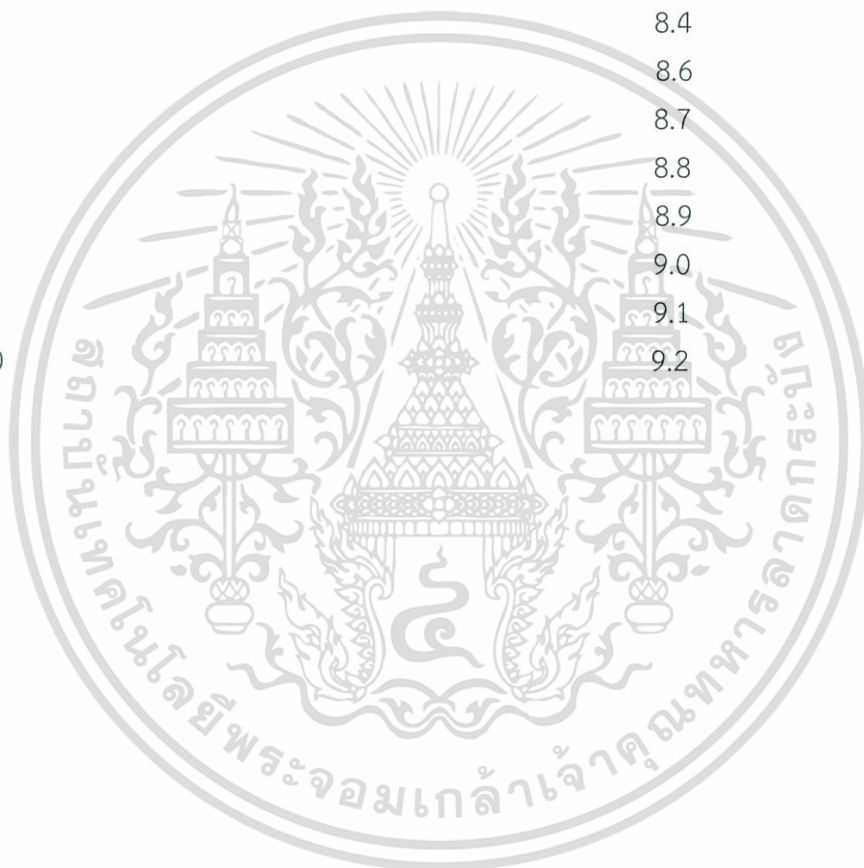
## 5.3 Boric acid-borax buffer (pH 7.6 – pH 9.2)

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

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

ผสม 50 มิลลิลิตรของ A กับ X มิลลิลิตรของ B ปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร

X (มิลลิลิตร)	pH
2.0	7.6
3.1	7.8
4.9	8.0
7.3	8.2
11.5	8.4
17.5	8.6
22.5	8.7
30.0	8.8
42.5	8.9
59.0	9.0
83.0	9.1
115.0	9.2



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 5.4 Sodium borate buffer (pH 9.2 – pH 10.8)

A : 0.025 M  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  (9.5 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

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

ผสม 100 มิลลิลิตรของ A กับ X มิลลิลิตรของ B ปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร

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



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 5.5 Sodium bicarbonate buffer (pH 9.6 – pH 11.0)

A : 0.05 M NaHCO<sub>3</sub> (8.4 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

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

ผสม 100 มิลลิลิตรของ A กับ X มิลลิลิตรของ B ปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร

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

## 6. Inhibitors

## 6.1 EDTA 0.2 M

EDTA	5.84	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

6.2 KMnO<sub>4</sub> 0.2 M

KMnO <sub>4</sub>	3.16	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

## 6.3 PMSP 0.2 M

PMSP	3.48	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

6.4 1,10-phenanthroline hydrate (C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>) 0.2 M

C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub>	3.96	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ค

### Azocasein method (คニングานต์ และ อัญชลี, 2543)

1, การหาความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

1) เติม Azocasein substrate 240  $\mu\text{l}$  ลงใน appendorf

2) เติม 0.2 M buffer 5 ชนิด ซึ่งได้แก่

Citrate - phosphate buffer (pH 7)

Boric acid – borax buffer (pH 8 และ 9)

Tris – HCl buffer (pH 8 และ 9)

Sodium borate buffer (pH 10)

Sodium bicarbonate buffer (pH 10 และ 11)

ลงใน appendorf หลอดละ 150  $\mu\text{l}$  โดยทำ buffer ละ 2 ขั้ว

\*\* ชุดการทดสอบควบคุมเติมน้ำกลั่น 150  $\mu\text{l}$

3) เอนไซม์ Protease ที่สกัดได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหาร Yeast extract Malt extract broth (YEME) 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นในสภาวะเขย่าโดยใช้ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมงและ 30 ชั่วโมง นำมาปั่นแยกแล้ว ปิเปตเอาส่วนใสใส่ appendorf ละ 1 ml เติมเอนไซม์ที่ได้ลงใน appendorf ที่เติม buffer และสับสเตรท หลอดละ 20  $\mu\text{l}$  (ระหว่างการทำต้องแช่ในน้ำแข็งตลอดเวลา เพื่อป้องกันเอนไซม์เสียสภาพ)

\*\* ชุดการทดลองควบคุมเติมน้ำกลั่น 20  $\mu\text{l}$

4) เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

5) เติมกรด 10% TCA (Trichloroacetic acid) ลงไป appendorf ละ 1.2 มิลลิลิตร ทันที เพื่อเป็นการหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์

6) ทิ้งไว้ 15 นาทีเพื่อให้ตกตะกอน

7) นำไปปั่นแยกที่ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที

8) ปิเปตเอาส่วนใสข้างบน 1.4 มิลลิลิตร มาใส่ลงในหลอดทดลองที่มี 1 M ของ NaOH 1.4 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน

9) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 nm โดยใช้เครื่อง spectrophotometer

10) นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟระหว่าง pH ของ buffer กับค่า absorbance

2. การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

วิเคราะห์หาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยใช้วิธี Azocasein method และใช้บัฟเฟอร์จากขั้นตอนการหาความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมมาทำการบ่มที่อุณหภูมิต่างกัน ได้แก่ 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3. การหา inhibitor ที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

นำเอนไซม์ที่สกัดได้มาบ่มด้วยตัวยับยั้งต่างๆ ดังนี้ 20 mM PMSF (Phenyl methyl sulphonyl fluoride) , 20 mM EDTA ( Ethylene diamine tetraacetic acid) , 20 mM  $\text{KMnO}_4$  และ 20 mM 1,10 – phenanthroline hydrate (  $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$ ) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer

#### ตารางที่ ก แสดงสารยับยั้งทั้ง 4 ชนิด

Treatment	Enzyme ( $\mu\text{l}$ )	Inhibitors ( $\mu\text{l}$ )	น้ำกลั่น ( $\mu\text{l}$ )	DMSO ( $\mu\text{l}$ )	Incubate 4°C 20 min	Substrate ( $\mu\text{l}$ )	Buffer ( $\mu\text{l}$ )
PMSF	15	2	2	2		229	150
1,10-phenanthroline	15	4	2	-		229	150
EDTA	15	4	2	-		229	150
$\text{KMnO}_4$	15	4	2	-		229	150
Control $\text{H}_2\text{O}$	15	-	6	-		229	150
Control DMSO	15	-	2	4		229	150
Blank	15	-	6	-		229	150











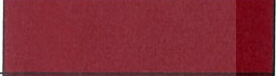




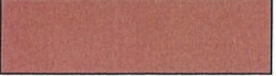
### 4. การหาเสถียรภาพของเอนไซม์

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



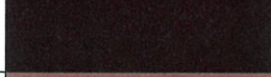



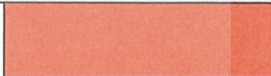





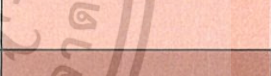

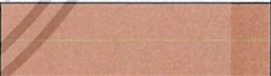
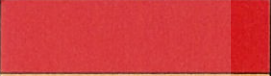
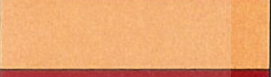
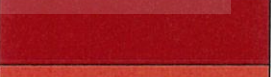




\* Control ไม่ต้องนำเอนไซม์ไปบ่มและ Blank ใช้น้ำกลั่นแทนบัฟเฟอร์และเอนไซม์

**ภาคผนวก ง**  
**กระดาศสีมาตรฐาน (the NBs/IBCC color system)**  
**(Mundie, 1995)**


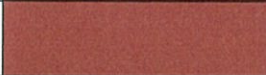


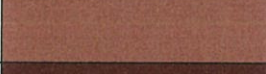

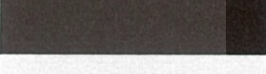










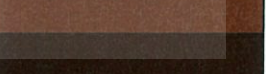




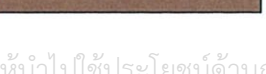
ตารางที่ ข แสดงกระดาศสีมาตรฐาน ( the NBs/IBCC color system)

Centroid	Munsell	RGB	Swatch
<b>Red, Pink</b>			
1 Vivid Pink	1r 8.0 13.0	#FF7E93	
2 Strong Pink	1.2r 6.9 8.2	#FD7B7C	
3 Deep Pink	2.1r 6.0 11.1	#F3545E	
4 Light Pink	2.6r 8.5 4.0	#FFBCAD	
5 Moderate Pink	2.8r 7.2 5.3	#EE9086	
6 Dark Pink	2.7r 5.9 6.1	#C76864	
7 Pale Pink	2.0r 8.7 2.1	#FFCBBB	
8 Grayish Pink	2.6r 7.2 2.3	#CF9B8F	
9 Pinkish White	5.8r 9.0 0.8	#F9DBC8	
10 Pinkish Gray	9.8r 7.4 1.0	#C8A696	
11 Vivid Red	5.0r 3.9 15.4	#C10020	
12 Strong Red	4.0r 4.4 12.1	#BF2233	
13 Deep Red	5.1r 2.8 10.1	#7B001C	
14 Very Deep Red	6.5r 1.7 8.4	#4F0014	
15 Moderate Red	3.8r 4.4 9.1	#AB343A	
16 Dark Red	4.0r 2.8 6.8	#681C23	
17 Very Dark Red	2.0r 1.2 4.8	#320A18	
18 Light Grayish Red	5.3r 5.9 3.5	#B17267	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

19 Grayish Red	4.0r 4.4 4.8	#8C4743	
20 Dark Grayish Red	2.9r 2.7 2.1	#482A2A	
21 Blackish Red	3.9r 0.8 1.7	#1F0E11	
22 Reddish Gray	7.0r 5.4 1.3	#8B6C62	
23 Dark Reddish Gray	6.0r 3.4 1.0	#523C36	
24 Reddish Black	2.0r 0.9 0.9	#1E1112	
<b>Yellowish Pink</b>			
25 Vivid Yellowish Pink	8.0r 8.0 13.0	#FF845C	
26 Strong Yellowish Pink	8.4r 7.0 9.5	#FF7A5C	
27 Deep Yellowish Pink	5.5r 5.8 12.1	#F64A46	
28 Light Yellowish Pink	1.9yr 8.2 4.6	#FFB28B	
29 Moderate Yellowish Pink	0.7yr 7.2 4.9	#EE9374	
30 Dark Yellowish Pink	7.0r 6.0 6.1	#CC6C5C	
31 Pale Yellowish Pink	4.2yr 8.6 2.2	#FFC8A8	
32 Grayish Yellowish Pink	1.3yr 7.2 2.4	#D39B85	
<b>Reddish Orange, Reddish Brown</b>			
33 Brownish Pink	7.0yr 7.1 2.3	#CD9A7B	
34 Vivid Reddish Orange	9.8r 5.4 14.5	#F13A13	
35 Strong Reddish Orange	9.3r 5.4 12.2	#FFB961	
36 Deep Reddish Orange	9.2r 3.9 12.1	#A91D11	
37 Moderate Reddish Orange	9.3r 5.5 9.2	#D35339	
38 Dark Reddish Orange	9.3r 4.0 9.1	#9B2F1F	
39 Grayish Reddish Orange	0.4yr 5.4 6.2	#B85D43	
40 Strong Reddish Brown	0.3yr 3.1 9.9	#7F180D	

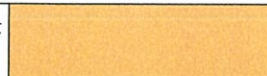
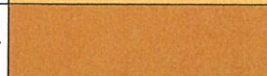
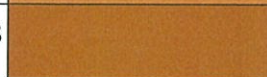

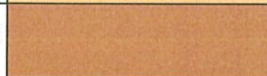


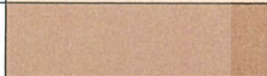







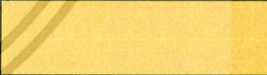


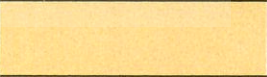




เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

41 Deep Reddish Brown	1.6yr 1.5 8.3	#490005	
42 Light Reddish Brown	0.5yr 5.5 4.1	#AA6651	
43 Moderate Reddish Brown	9.0r 3.4 5.2	#712F26	
44 Dark Reddish Brown	9.6r 1.3 3.6	#321011	
45 Light Grayish Reddish Brown	2.9yr 5.4 2.3	#966A57	
46 Grayish Reddish Brown	9.0r 3.4 2.4	#5E3830	
47 Dark Grayish Reddish Brown	9.0r 2.0 2.0	#371F1C	
<b>Orange Brown</b>			
48 Vivid Orange	4.1yr 6.5 15.0	#FF6800	
49 Brilliant Orange	4.0yr 9.0 12.0	#FFB841	
50 Strong Orange	4.3yr 6.5 12.2	#FF6F1A	
51 Deep Orange	4.1yr 5.1 11.3	#C34D0A	
52 Light Orange	4.8yr 7.8 7.2	#FFA161	
53 Moderate Orange	4.6yr 6.5 8.2	#E8793E	
54 Brownish Orange	4.1yr 5.0 8.0	#B15124	
55 Strong Brown	4.6yr 3.5 7.6	#753313	
56 Deep Brown	5.6yr 2.4 5.2	#4D220E	
57 Light Brown	5.4yr 5.4 4.8	#A86540	
58 Moderate Brown	5.6yr 3.5 3.9	#673923	
59 Dark Brown	5.3yr 1.6 3.4	#35170C	
60 Light Grayish Brown	6.4yr 5.4 2.2	#946B54	
61 Grayish Brown	5.5yr 3.5 1.8	#5A3D30	
62 Dark Grayish Brown	5.5yr 2.0 1.5	#32221A	
63 Light Brownish Gray	7.0yr 5.4 1.2	#8B6D5C	



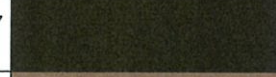




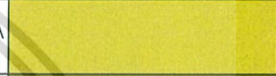
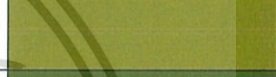
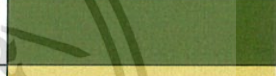

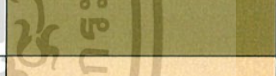


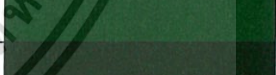



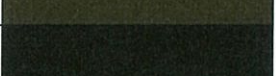



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

64 Brownish Gray	5.65r 3.4 0.9	#503D33	
65 Brownish Black	7.8yr 0.6 0.9	#140F0B	
<b>Orange Yellow, Yellowish Brown</b>			
66 Vivid Orange Yellow	8.6yr 7.3 15.2	#FF8E00	
67 Brilliant Orange Yellow	0.1y 8.1 10.5	#FFB02E	
68 Strong Orange Yellow	9.1yr 7.1 11.6	#FF8E0D	
69 Deep Orange Yellow	8.6yr 6.0 12.1	#D76E00	
70 Light Orange Yellow	9.4yr 8.3 6.8	#FFB961	
71 Moderate Orange Yellow	8.7yr 7.2 8.3	#F7943C	
72 Dark Orange Yellow	9.3yr 6.0 7.9	#C37629	
73 Pale Orange Yellow	9.2yr 8.7 4.4	#FFCA86	
74 Strong Yellowish Brown	8.8yr 4.6 8.5	#95500C	
75 Deep Yellowish Brown	8.8yr 3.1 5.0	#593315	
76 Light Yellowish Brown	8.7yr 6.5 5.0	#BB8B54	
77 Moderate Yellowish Brown	9.5yr 4.4 3.9	#7D512D	
78 Dark Yellowish Brown	9.4yr 2.3 3.3	#3F2512	
79 Light Grayish Yellowish Brown	9.7yr 6.4 2.5	#B48764	
80 Grayish Yellowish Brown	9.5yr 4.6 2.1	#785840	
81 Dark Grayish Yellowish Brown	8.8yr 2.5 1.6	#3D2B1F	
<b>Yellow, Olive Brown</b>			
82 Vivid Yellow	3.3y 8.0 14.3	#FFB300	
83 Brilliant Yellow	4.4y 8.7 8.9	#FFCF40	
84 Strong Yellow	3.7y 7.2 9.3	#E59E1F	
85 Deep Yellow	3.7y 5.9 9.1	#B57900	




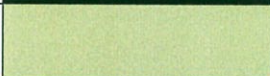



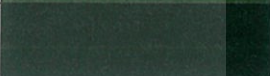

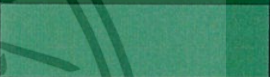








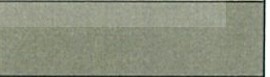




เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

86 Light Yellow	4.3y 8.8 6.8	#FFD35F	
87 Moderate Yellow	3.8y 7.1 6.5	#D79D41	
88 Dark Yellow	3.9y 6.0 6.4	#B07D2B	
89 Pale Yellow	4.7y 9.0 3.8	#FFDB8B	
90 Grayish Yellow	4.4y 7.2 3.8	#CEA262	
91 Dark Grayish Yellow	3.8y 5.9 4.0	#A47C45	
92 Yellowish White	4.5y 9.2 1.2	#FFE2B7	
93 Yellowish Gray	3.8y 7.4 1.4	#CAA885	
94 Light Olive Brown	2.1y 4.9 7.9	#945D0B	
95 Moderate Olive Brown	2.7y 3.6 5.5	#64400F	
96 Dark Olive Brown	2.0y 1.9 2.2	#302112	
<b>Greenish Yellow, Olive</b>			
97 Vivid Greenish Yellow	9.1y 8.2 12.0	#F4C800	
98 Brilliant Greenish Yellow	9.8y 8.8 9.5	#FFDC33	
99 Strong Greenish Yellow	9.2y 7.2 9.2	#CCA817	
100 Deep Greenish Yellow	9.2y 5.9 9.2	#9F8200	
101 Light Greenish Yellow	9.8y 8.9 7.0	#FFDE5A	
102 Moderate Greenish Yellow	9.5y 7.1 6.5	#C4A43D	
103 Dark Greenish Yellow	9.4y 5.9 6.3	#9B8127	
104 Pale Greenish Yellow	9.5y 9.0 4.2	#FFDF84	
105 Grayish Greenish Yellow	9.0y 7.2 3.9	#C4A55F	
106 Light Olive	8.2y 5.1 5.6	#846A20	
107 Moderate Olive	7.6y 3.8 5.4	#5E490F	
108 Dark Olive	8.9y 2.4 3.1	#362C12	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

109 Light Grayish Olive	7.85y 5.5 2.5	#8B734B	
110 Grayish Olive	8.0y 3.6 2.0	#52442C	
111 Dark Grayish Olive	9.7y 2.0 1.8	#2B2517	
112 Light Olive Gray	6.9y 5.5 1.3	#887359	
113 Olive Gray	8.1y 3.5 0.9	#4D4234	
114 Olive Black	9.0y 1.1 0.9	#121910	
<b>Yellow Green, Olive Green</b>			
115 Vivid Yellowish Green	5.4gy 6.8 11.2	#93AA00	
116 Brilliant Yellow Green	4.9gy 8.2 9.1	#CED23A	
117 Strong Yellow Green	5.4gy 6.0 8.7	#7F8F18	
118 Deep Yellow Green	7.4gy 4.2 7.1	#425E17	
119 Light Yellow Green	5.0gy 8.4 5.6	#DCD36A	
120 Moderate Yellow Green	4.8gy 6.0 5.0	#8B8940	
121 Pale Yellowish Green	3.4gy 8.7 2.4	#F0D698	
122 Grayish Yellowish Green	4.4gy 6.0 2.3	#90845B	
123 Strong Olive Green	4.0gy 3.0 11.0	#0A4500	
124 Deep Olive Green	4.0gy 1.5 11.0	#142300	
125 Moderate Olive Green	5.7gy 3.6 4.8	#434B1B	
126 Dark Olive Green	8.0gy 2.2 3.6	#232C16	
127 Grayish Olive Green	4.6gy 3.5 2.0	#48442D	
128 Dark Grayish Olive Green	5.4gy 2.0 1.8	#27261A	
129 Vivid Yellowish Green	1.1g 5.9 11.2	#379931	
<b>Yellowish Green</b>			
130 Brilliant Yellowish Green	0.3g 7.7 8.6	#8CCB5E	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

131 Strong Yellowish Green	0.4g 5.4 8.7	#478430	
132 Deep Yellowish Green	0.9g 3.5 9.0	#00541F	
133 Very Deep Yellowish Green	10.0gy 1.5 11.0	#002800	
134 Very Light Yellowish Green	0.2g 8.6 4.6	#C6DF90	
135 Light Yellowish Green	0.7g 7.4 5.2	#007BA7	
136 Moderate Yellowish Green	0.5g 5.5 4.8	#657F4B	
137 Dark Yellowish Green	0.6g 3.5 5.0	#304B26	
138 Very Dark Yellowish Green	0.3g 1.8 4.3	#132712	
<b>Green</b>			
139 Vivid Green	3.2g 4.9 11.1	#007D34	
140 Brilliant Green	6.2g 6.5 8.3	#47A76A	
141 Strong Green	5.8g 4.4 8.7	#006B3C	
142 Deep Green	5.1g 3.0 8.1	#004524	
143 Very Light Green	6.5g 7.8 4.9	#98C793	
144 Light Green	6.0g 6.4 5.1	#719B6E	
145 Moderate Green	6.3g 4.5 5.1	#386646	
146 Dark Green	6.6g 2.8 4.6	#203A27	
147 Very Dark Green	8.0g 1.8 3.0	#16251C	
148 Very Pale Green	7.3g 8.8 1.9	#D8DEBA	
149 Pale Green	7.6g 6.4 1.7	#8D917A	
150 Grayish Green	8.8g 4.5 1.8	#575E4E	
151 Dark Greenish Yellowish Green	1.0bg 2.9 1.8	#313830	
152 Blackish Green	10.0g 1.0 1.4	#141613	
153 Greenish White	10.0g 9.2 0.8	#F5E6CB	

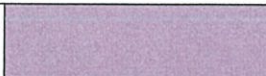



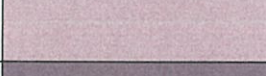









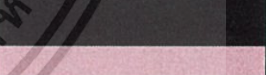

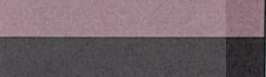
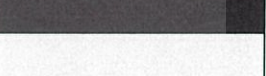




เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

154 Light Greenish Gray	3.0g 7.5 0.9	#BAAF96	
155 Greenish Gray	7.5g 5.5 1.0	#7A7666	
156 Dark Greenish Gray	1.5bg 3.5 0.9	#45433B	
157 Greenish Black	8.7g 1.0 0.7	#181513	
<b>Bluish Green</b>			
158 Vivid Bluish Green	5.0bg 5.0 13.0	#00836E	
159 Brilliant Bluish Green	2.9bg 6.0 9.6	#009B76	
160 Strong Bluish Green	4.6bg 4.5 8.5	#006D5B	
161 Deep Bluish Green	2.8bg 2.4 8.3	#00382B	
162 Very Light Bluish Green	4.4bg 8.3 4.6	#A0D6B4	
163 Light Bluish Green	4.6bg 6.5 4.9	#669E85	
164 Moderate Bluish Green	4.6bg 4.5 5.0	#2F6556	
165 Dark Bluish Green	4.9bg 2.7 5.0	#013A33	
166 Very Dark Bluish Green	3.6bg 1.2 4.0	#001D18	
167 Vivid Greenish Blue	5.0b 5.0 13.0	#007BA7	
<b>Greenish Blue</b>			
168 Brilliant Greenish Blue	4.6b 5.9 7.7	#2A8D9C	
169 Strong Greenish Blue	4.9b 4.5 8.4	#00677E	
170 Deep Greenish Blue	5.0b 5.0 13.0	#007BA7	
171 Very Light Greenish Blue	4.0b 8.0 4.0	#A3C6C0	
172 Light Greenish Blue	4.5b 6.5 5.4	#649A9E	
173 Moderate Greenish Blue	4.7b 4.5 5.2	#30626B	
174 Dark Greenish Blue	3.7b 2.7 5.0	#003841	
175 Very Dark Greenish Blue	5.0b 1.5 3.6	#022027	



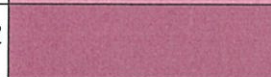


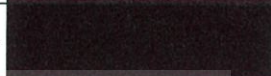

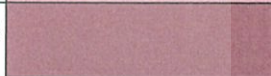

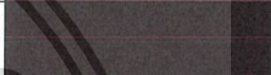


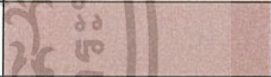


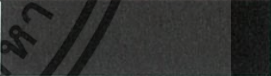







เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Blue			
176 Vivid Blue	5.0b 5.0 14.0	#007CAD	
177 Brilliant Blue	1.6pb 5.9 9.4	#4285B4	
178 Strong Blue	2.9pb 4.1 10.4	#00538A	
179 Deep Blue	2.8pb 2.5 7.9	#002F55	
180 Very Light Blue	2.7pb 7.9 6.0	#A6BDD7	
181 Light Blue	1.6pb 6.4 6.9	#6C92AF	
182 Moderate Blue	3.0pb 4.3 6.8	#395778	
183 Dark Blue	2.2pb 1.7 5.5	#002137	
184 Very Pale Blue	1.5pb 8.3 3.3	#C1CACA	
185 Pale Blue	0.6pb 6.5 2.6	#919192	
186 Grayish Blue	0.2pb 4.2 3.0	#4A545C	
187 Dark Grayish Blue	9.2b 2.7 2.0	#2C3337	
188 Blackish Blue	9.8b 1.3 1.5	#161A1E	
189 Bluish White	9.2b 9.1 1.2	#F9DFCF	
190 Light Bluish Gray	8.2b 7.5 1.0	#BEADA1	
191 Bluish Gray	8.9b 5.5 0.9	#7D746D	
192 Dark Bluish Gray	0.3pb 3.6 1.1	#464544	
193 Bluish Black	9.6b 1.1 0.8	#151719	
Purplish Blue			
194 Very Purplish Blue	7.8pb 2.0 12.5	#20155E	
195 Brilliant Purplish Blue	7.3pb 5.1 9.0	#62639B	
196 Strong Purplish Blue	8.0pb 4.0 10.9	#474389	
197 Deep Purplish Blue	7.8pb 1.5 8.0	#1A153F	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

198 Very Light Purplish Blue	7.4pb 7.6 5.2	#BAACC7	
199 Light Purplish Blue	7.3pb 6.0 6.5	#837DA2	
200 Moderate Purplish Blue	7.9pb 3.5 6.5	#423C63	
201 Dark Purplish Blue	8.0pb 1.3 4.3	#1A162A	
202 Very Pale Purplish Blue	7.0pb 8.0 3.7	#CBBAC5	
203 Pale Purplish Blue	7.0pb 6.0 3.9	#8A7F8E	
204 Grayish Purplish Blue	6.9pb 3.4 3.8	#413D51	
<b>Violet</b>			
205 Vivid Violet	2.0p 5.0 14.0	#884BAE	
206 Brilliant Violet	9.9pb 5.1 9.4	#755D9A	
207 Strong Violet	0.2p 3.7 10.1	#53377A	
208 Deep Violet	1.1p 1.2 8.6	#240935	
209 Very Light Violet	2.0p 8.5 7.0	#EEBEF1	
210 Light Violet	0.5p 5.6 7.1	#876C99	
211 Moderate Violet	1.4p 3.6 7.0	#543964	
212 Dark Violet	1.4p 1.3 4.9	#22132B	
213 Very Pale Violet	9.7pb 7.9 3.7	#D8B1BF	
214 Pale Violet	1.3p 6.0 4.0	#957B8D	
215 Grayish Violet	1.2p 3.3 3.9	#46394B	
<b>Purple</b>			
216 Vivid Purple	6.0p 4.5 14.0	#943391	
217 Brilliant Purple	6.0p 7.0 11.0	#DD80CC	
218 Strong Purple	6.5p 4.3 9.2	#803E75	
219 Deep Purple	6.3p 2.7 9.1	#531A50	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

220 Very Deep Purple	5.0p 1.5 8.0	#320B35	
221 Very Light Purple	6.5p 7.8 5.1	#E3A9BE	
222 Light Purple	6.2p 6.5 6.5	#BA7FA2	
223 Moderate Purple	6.6p 4.5 7.1	#7F4870	
224 Dark Purple	6.3p 2.8 4.9	#472A3F	
225 Very Dark Purple	6.9p 1.0 4.5	#230D21	
226 Very Pale Purple	5.5p 8.2 3.2	#E6BBC1	
227 Pale Purple	7.9p 6.4 3.1	#AE848B	
228 Grayish Purple	8.1p 4.5 2.7	#72525C	
229 Dark Grayish Purple	0.5rp 2.8 2.0	#452D35	
230 Blackish Purple	0.8rp 0.9 1.6	#1D1018	
231 Purplish White	2.5rp 9.0 0.8	#FADBC8	
232 Light Purplish Gray	0.3rp 7.5 1.1	#C8A99E	
233 Purplish Gray	1.0rp 5.5 0.9	#88706B	
234 Dark Purplish Gray	1.0rp 3.6 1.0	#564042	
235 Purplish Black	9.54p 0.9 0.6	#1B1116	
<b>Reddish Purple</b>			
236 Vivid Reddish Purple	1.0rp 3.0 14.0	#7E0059	
237 Strong Reddish Purple	1.3rp 4.4 10.2	#9A366B	
238 Deep Reddish Purple	1.0rp 2.8 9.5	#641349	
239 Very Deep Reddish Purple	0.9rp 1.9 8.9	#470736	
240 Light Reddish Purple	0.7rp 6.0 6.9	#BB6C8A	
241 Moderate Reddish Purple	0.8rp 4.5 7.0	#8C4566	
242 Dark Reddish Purple	1.3rp 2.8 4.8	#4F273A	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

243 Very Dark Reddish Purple	1.5rp 1.0 4.8	#270A1F	
244 Pale Reddish Purple	1.3rp 6.0 4.2	#AC7580	
245 Grayish Reddish Purple	1.0rp 4.5 4.2	#7D4D5D	
<b>Purplish Pink, Purplish Red</b>			
246 Brilliant Purplish Pink	6.0rp 8.5 11.0	#FF97BB	
247 Strong Purplish Pink	5.6rp 6.8 9.0	#F6768E	
248 Deep Purplish Pink	4.4rp 6.0 12.2	#EB5284	
249 Light Purplish Pink	4.6rp 8.0 5.5	#FFA8AF	
250 Moderate Purplish Pink	4.6rp 6.8 6.7	#E28090	
251 Dark Purplish Pink	6.4rp 5.9 7.0	#C76574	
252 Pale Purplish Pink	3.7rp 8.4 3.3	#FDBDBA	
253 Grayish Purplish Pink	3.7rp 7.0 3.5	#CC9293	
254 Vivid Purplish Red	7.6rp 4.9 13.6	#D5265B	
255 Strong Purplish Red	7.3rp 4.4 11.4	#B32851	
256 Deep Purplish Red	7.3rp 2.6 10.1	#6F0035	
257 Very Deep Purplish Red	6.8rp 1.7 8.0	#470027	
258 Moderate Purplish Red	7.1rp 4.5 9.0	#A73853	
259 Dark Purplish Red	7.1rp 2.7 6.0	#5B1E31	
260 Very Dark Purplish Red	6.6rp 0.9 4.8	#28071A	
261 Light Grayish Purplish Red	7.8rp 5.9 4.2	#B27070	
262 Grayish Purplish Red	7.0rp 4.5 5.1	#8C4852	
263 White	2.5pb 9.5 0.2	#FFC9D7	
264 Light Gray	6.7y 7.4 0.2	#C2A894	
265 Medium Gray	3.3gy 5.4 0.1	#817066	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

266 Dark Gray	2.5pb 3.5 0.0	#49423D	
267 Black	2.5pb 0.8 0.0	#131313	

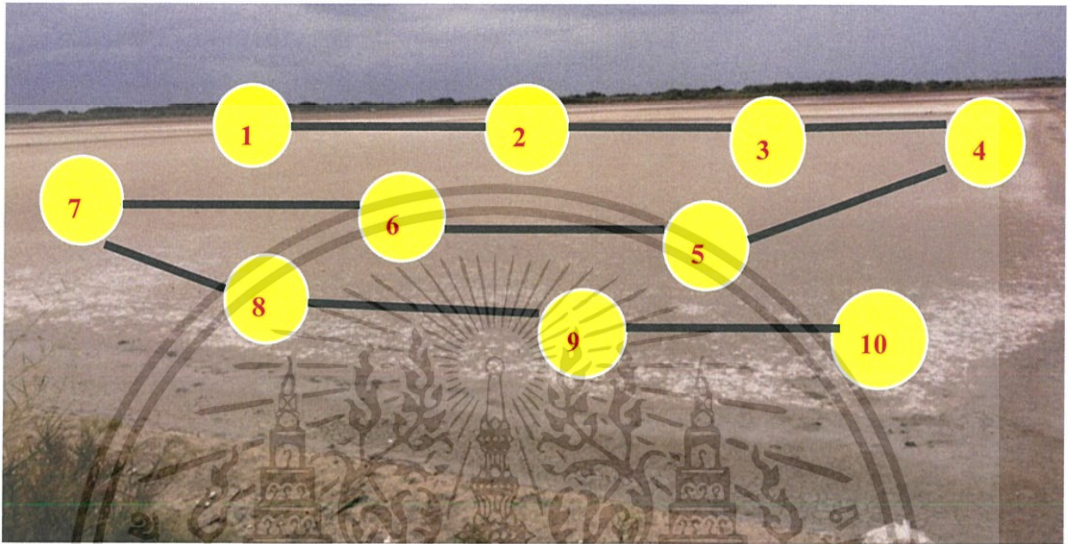


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก จ

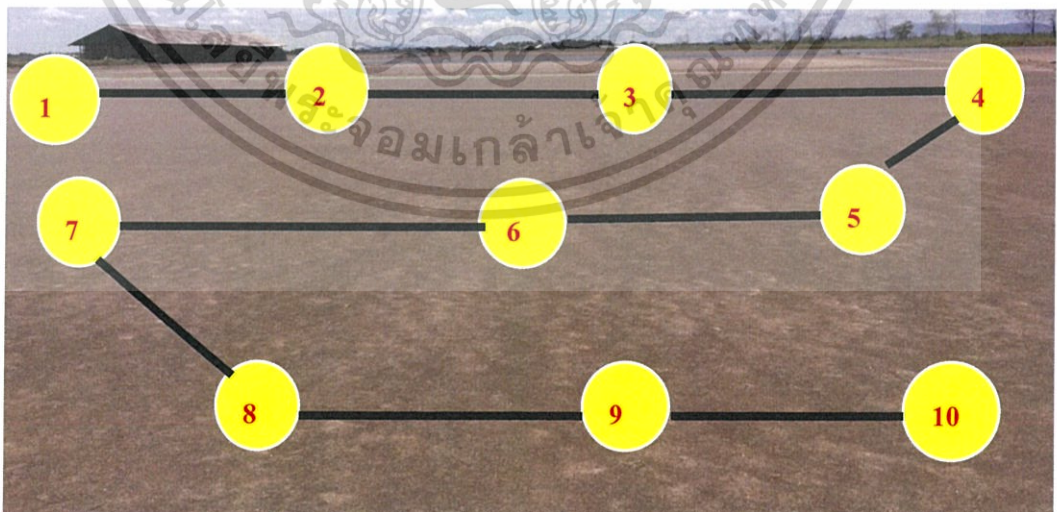
### ภาพถ่ายสถานที่เก็บตัวอย่างดิน

- จุดเก็บตัวอย่างดินครั้งที่ 1 (ดิน A) วันที่ 20 สิงหาคม 2559 เป็นตัวอย่างดินจากนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี



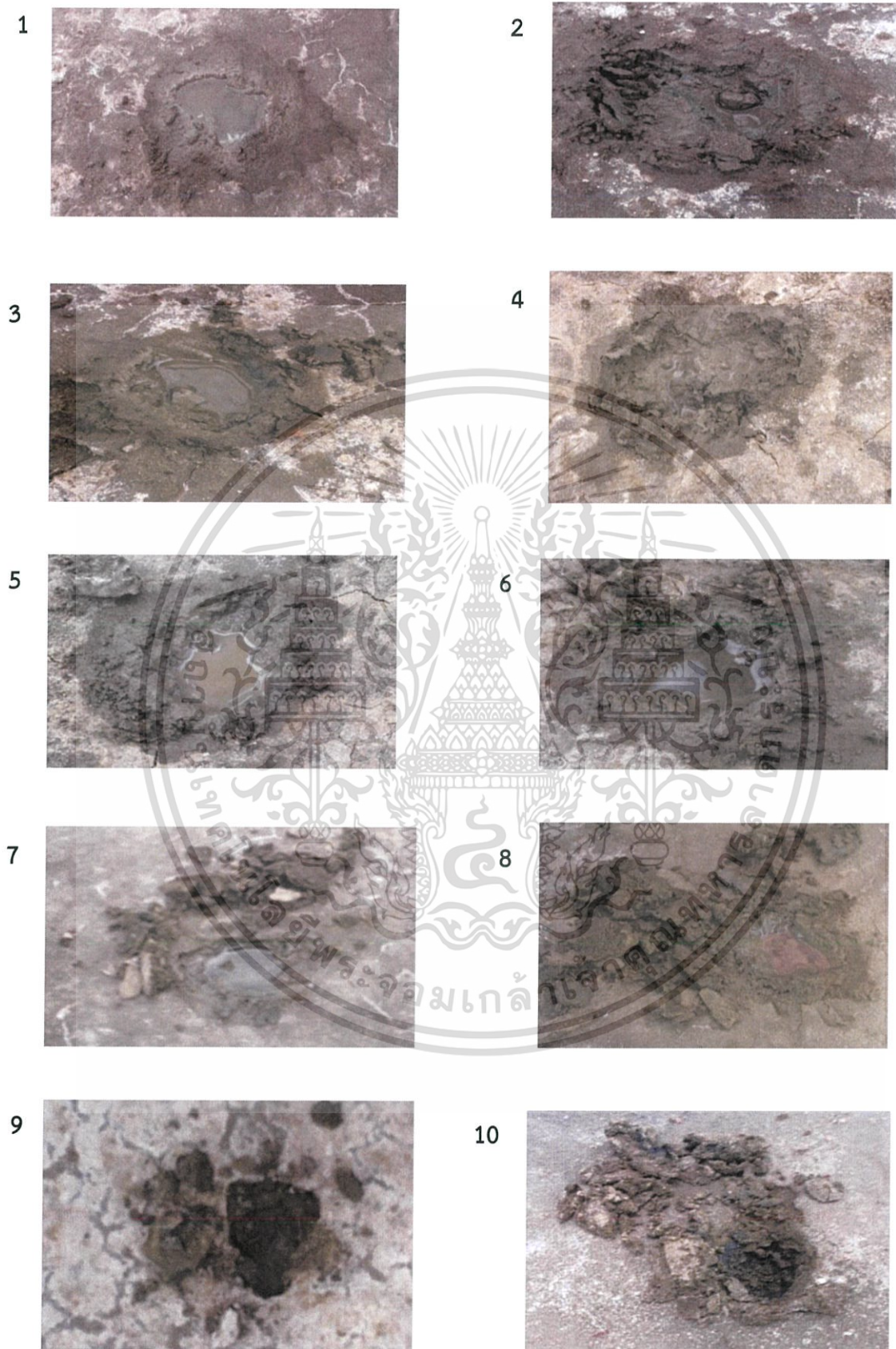
รูปที่ ก แสดงลักษณะภูมิประเทศของบริเวณจุดเก็บตัวอย่างดินครั้งที่ 1 (ดิน A) จากนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี

- จุดเก็บตัวอย่างดินครั้งที่ 2 (ดิน B) วันที่ 17 กันยายน 2559 เป็นตัวอย่างดินจากนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี



รูปที่ ข แสดงลักษณะภูมิประเทศของบริเวณจุดเก็บตัวอย่างดินครั้งที่ 2 (ดิน B) จากนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค แสดงจุดเก็บตัวอย่างดิน A ตำแหน่งที่ 1-10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ในเพื่อการศึกษาเท่านั้น มิอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ๓ แสดงจุดเก็บตัวอย่างดิน B ตำแหน่งที่ 1-10

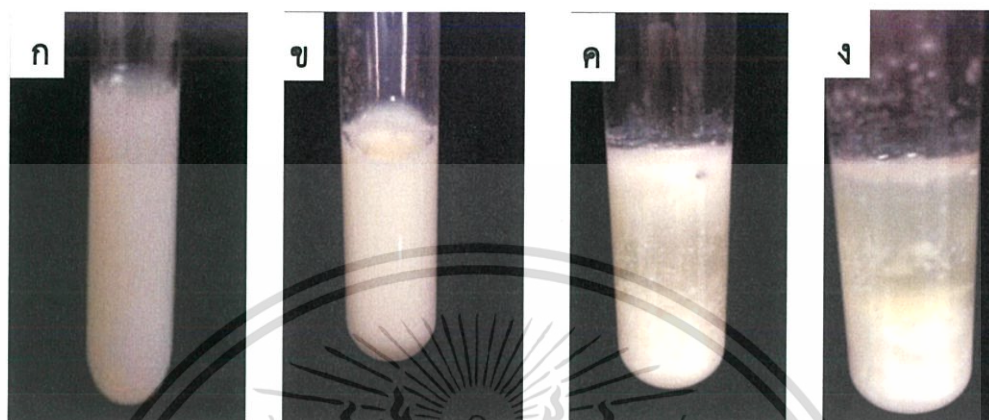
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ฉ

### ภาพแสดงตัวอย่างผลการทดสอบทางชีวเคมี

1. การทดสอบการตกตะกอน (Coagulation) และการย่อยสลาย (Peptonization) โปรตีนในน้ำนม

1.1 การทดสอบการตกตะกอน (Coagulation) ในหลอดอาหารเหลว Skim milk



รูปที่ จ (๑) แสดงผลทดสอบการตกตะกอน ในหลอดอาหารเหลว Skim milk

- (ก) ชุดควบคุมการทดสอบการตกตะกอนในหลอดอาหารเหลว Skim milk
- (ข) แสดงผล (-) ไม่เกิดการตกตะกอนของโปรตีนที่บริเวณก้นหลอด เมื่อเทียบกับชุดควบคุม
- (ค) แสดงผล (w) เกิดการตกตะกอนของโปรตีนเล็กน้อยที่บริเวณก้นหลอด เมื่อเทียบกับชุดควบคุม
- (ง) แสดงผล (+) เกิดการตกตะกอนของโปรตีนที่บริเวณก้นหลอด เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

1.2 การย่อยสลายโปรตีน (Peptonization) ในอาหาร Skim milk



รูปที่ จ (๒) แสดงผลทดสอบการย่อยสลายโปรตีนในอาหาร Skim milk agar

- (ก) แสดงผล (-) ไม่เกิดการย่อยสลายโปรตีน ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสีของอาหารจากสีขาวขุ่นเป็นลักษณะใสไม่มีสีและไม่เกิดวงกว้าง (clear zone)
- (ข) แสดงผล (w) เกิดการย่อยสลายโปรตีน มีการเปลี่ยนแปลงของสีของอาหารจากสีขาวขุ่นเป็นลักษณะใสไม่มีสีและเกิดวงกว้าง (clear zone) เล็กน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- (ค) แสดงผล (+) เกิดการย่อยสลายโปรตีน มีการเปลี่ยนแปลงของสีของอาหารจากสีขาวขุ่นเป็นลักษณะใสไม่มีสีและเกิดวงกว้าง (clear zone)

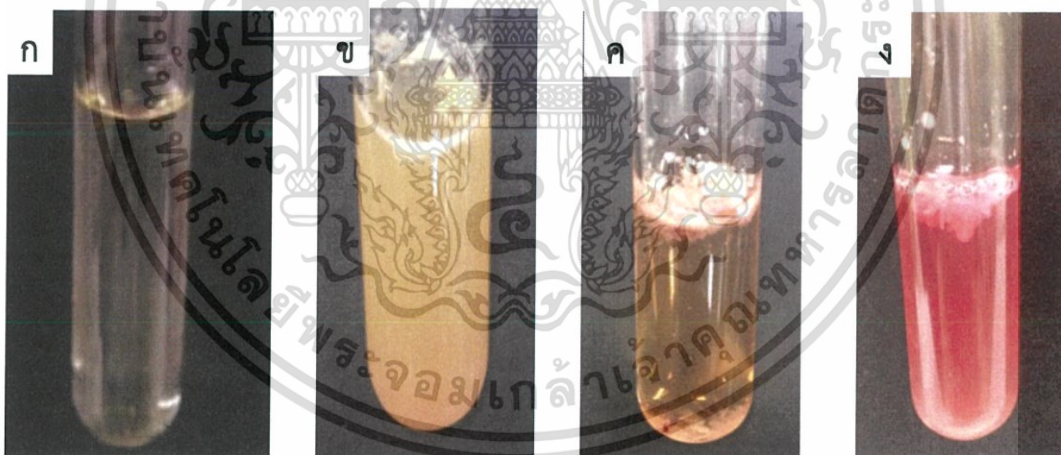
## 2. การทดสอบการย่อยสลายเจลาติน (Gelatin liquefaction)



### รูปที่ จ (๓) แสดงผลทดสอบการย่อยสลายเจลาตินในอาหารเหลว Bouillon Gelatin Broth

- (ก) ชุดควบคุมการทดสอบการย่อยสลายเจลาตินในอาหารเหลว Bouillon Gelatin Broth เมื่อเทียบกับชุดควบคุม
- (ข) แสดงผล (-) ไม่เกิดการย่อยสลายเจลาตินในอาหารเหลว Bouillon Gelatin Broth เมื่อเทียบกับชุดควบคุม
- (ค) แสดงผล (+) เกิดการย่อยสลายไนเตรตในอาหารเหลว Bouillon Gelatin Broth เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

## 3. การทดสอบการย่อยสลายไนเตรต (Nitrate reduction)

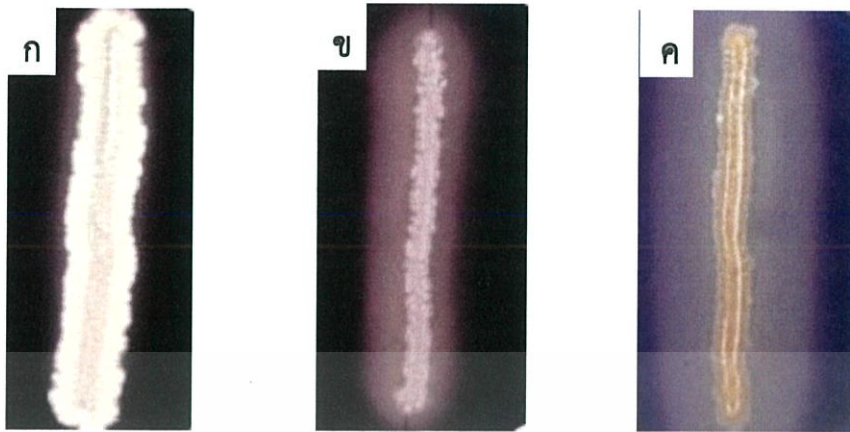


### รูปที่ จ (๔) แสดงผลทดสอบการย่อยสลายไนเตรตในอาหารเหลว Peptone KNO<sub>3</sub> broth

- (ก) ชุดควบคุมการทดสอบการย่อยสลายไนเตรตในอาหารเหลว Peptone KNO<sub>3</sub> broth
- (ข) แสดงผล (-) ไม่เกิดการย่อยสลายไนเตรตในอาหารเหลว Peptone KNO<sub>3</sub> broth
- (ค) แสดงผล (w) เกิดการย่อยสลายไนเตรตเล็กน้อยในอาหารเหลว Peptone KNO<sub>3</sub> broth
- (ง) แสดงผล (+) เกิดการย่อยสลายไนเตรตในอาหารเหลว Peptone KNO<sub>3</sub> broth

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3. การทดสอบการย่อยสลายแป้ง (Starch hydrolysis)



#### รูปที่ จ (๕) แสดงผลทดสอบการย่อยสลายแป้งในอาหาร Inorganic salts-starch agar (ISP4)

- (ก) แสดงผล (-) ไม่เกิดการย่อยสลายแป้งในอาหาร Inorganic salts-starch agar (ISP4)
- (ข) แสดงผล (w) เกิดการย่อยสลายแป้งเล็กน้อยในอาหาร Inorganic salts-starch agar (ISP4)
- (ค) แสดงผล (+) เกิดการย่อยสลายแป้งในอาหารเหลว Inorganic salts-starch agar (ISP4)



## ภาคผนวก ข

### การเตรียมสารละลาย McFarland standard No. 0.5

(โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ, 2555)

สารละลาย McFarland standard No. 0.5 ถูกนำมาใช้ในการเปรียบเทียบความขุ่นมาตรฐานของการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบสำหรับทดสอบกิจกรรมการต้านการเจริญของเชื้อซึ่งสารละลาย McFarland standard No. 0.5 สามารถเทียบเท่ากับจำนวนเซลล์โดยประมาณเท่ากับ  $1.0 \times 10^8$  ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร (ซึ่งเทียบเท่ากับการปรับระดับความขุ่นให้มีค่าอยู่ในช่วง 0.08 ถึง 0.1 โดยทำการวัดที่ความยาวคลื่น 624 นาโนเมตร)

#### ส่วนประกอบของสารละลาย McFarland standard No. 0.5

1% v/v Conc. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	99.50	มิลลิลิตร
1.175% v/v BaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.50	มิลลิลิตร

#### ขั้นตอนการเตรียม

1. ปิเปตกรดซัลฟิวริก 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรที่น้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร
2. ชั่งสารแบเรียมคลอไรด์ 1 กรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตรแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร
3. นำสารละลายจากข้อ 1 ปริมาตร 99.5 มิลลิลิตร และสารละลายในข้อ 2 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำสารละลาย McFarland standard No. 0.5 ที่ได้มาบรรจุใส่หลอดฝาเกลียวปิดสนิทกันการระเหย แล้วนำไปเก็บในที่มืดที่มีอุณหภูมิ 2-30 องศาเซลเซียส
4. ก่อนใช้งานต้องเขย่าสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน รวมทั้งตรวจสอบความขุ่นทุกเดือนโดยสารดังกล่าวนี้มีอายุการใช้งานประมาณ 6 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

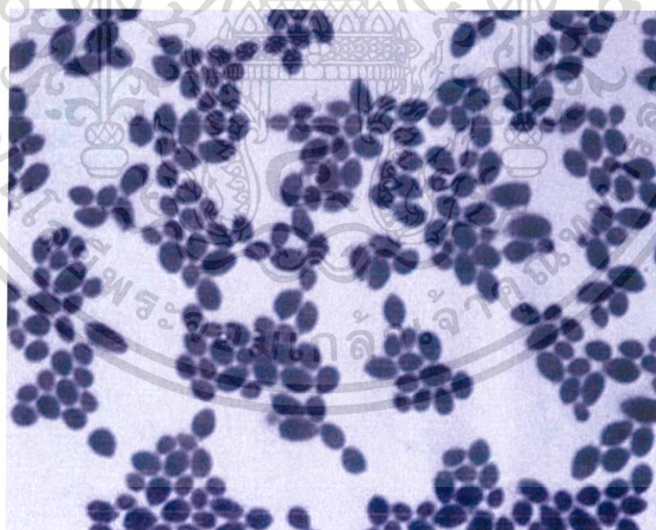
## ภาคผนวก ข

### เชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆสำหรับการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ เชื้อแอคติโนมัยซีท

เชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆที่ใช้สำหรับในการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีท ได้แก่

#### 1. *Candida albicans*

*Candida albicans* เป็นยีสต์ที่มีรูปร่างทั้งแบบวงรี (oval shape) และทรงไข่ (ellipsoidal shape) ที่ไม่มีแคปซูลหุ้ม เพิ่มจำนวนด้วยการแตกหน่อ (budding) สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 25-37 องศาเซลเซียส สามารถก่อโรคได้ทั้งในคนและสัตว์ บริเวณที่พบเชื้อนี้สามารถพบได้ทั้งบริเวณผิวหนัง เยื่อเมือกโดยเฉพาะเยื่อเมือกในทางเดินอาหารรวมถึงบริเวณของอวัยวะสืบพันธุ์ สำหรับเชื้อ *Candida albicans* เป็นเชื้อยีสต์ด้วยโอกาสก่อโรบบางชนิด ในสภาวะที่ร่างกายแข็งแรงสามารถพบเชื้อกลุ่มนี้ได้จากหู ตา ระบบทางเดินอาหาร อวัยวะสืบพันธุ์ ผิวหนังและช่องคลอด เป็นต้น ซึ่งพบว่าเชื้อกลุ่มนี้ได้ถูกจัดเป็นเชื้อประจำถิ่นที่มีความสำคัญต่อร่างกายของคนเรา แต่เมื่อร่างกายอ่อนแอลงจะทำให้เกิดสภาวะที่ไม่สมดุลของเชื้อประจำถิ่น ทำให้ *Candida albicans* เกิดการเพิ่มจำนวนขึ้นมากกว่าปกติทำให้เกิดการติดเชื้อ หรือ Candidiasis หรือ โรคติดเชื้อแคนดิดา ตัวอย่างของโรคที่เกิดจากเชื้อ *Candida albicans* เช่น โรคเอดส์ในปาก โรคลำไส้อักเสบและโรคปากอักเสบ ในลูกแมวและการติดเชื้อในระบบอวัยวะในสุนัขและม้า (สุรชัย, 2557)



รูปที่ 1(ข) แสดงรูปร่างลักษณะของเชื้อ *Candida albicans*

ที่มา:<http://www.microbeonline.com/candida-albicans-pathogenesis-diagnosis/>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2. *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างลักษณะแบบท่อนขนาดใหญ่ ไม่สร้างเส้นใย ย้อมติดสีแกรมบวก ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้โดยการใช้แฟลกเจลลา สามารถสร้างสปอร์ซึ่งสะท้อนแสงได้โดยสร้างเอนโดสปอร์รูปร่างรีและไม่ทำให้เซลล์บวม อยู่ตรงกลางเซลล์หรือค่อนไปทางปลายเซลล์ (subterminal) ทนความร้อนและสารเคมีบางชนิดได้ดี อาจมีแคปซูล เชื้อสายพันธุ์นี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีทั้งในที่มียอกซิเจน หรือในบรรยากาศธรรมดา และไม่มีออกซิเจน เป็นทั้งพวก aerobe จนถึง facultative anaerobe ส่วนใหญ่จะพบอยู่ตามธรรมชาติในดิน น้ำ และ อากาศ (ผาสุข, 2548) สำหรับเชื้อ *Bacillus subtilis* จะมีโคโลนีที่มีลักษณะเรียบหรือขรุขระ ทึบ สีครีมหรือน้ำตาล สามารถย่อยเพกติน และโพลีแซ็กคาไรด์ของเนื้อเยื่อของพืชได้ บางสายพันธุ์การสร้างรงควัตถุ ย่อยเจลาตินได้ ริควิลิตีมัสมีลล์ได้ สำหรับเชื้อสายพันธุ์นี้อยู่ในอาหารที่ซบซ้อนสามารถพบสปอร์ได้ทั่วไปในวัสดุที่ผ่านความร้อนมาเจริญในอาหารที่ไม่ใช่กรด (non acid food) ถ้ามีออกซิเจน เป็นสาเหตุทำให้ขนมปังเป็นเมือก (ดวงพร, 2537)



รูปที่ 2(ข) แสดงรูปร่างลักษณะของเชื้อ *Bacillus subtilis*

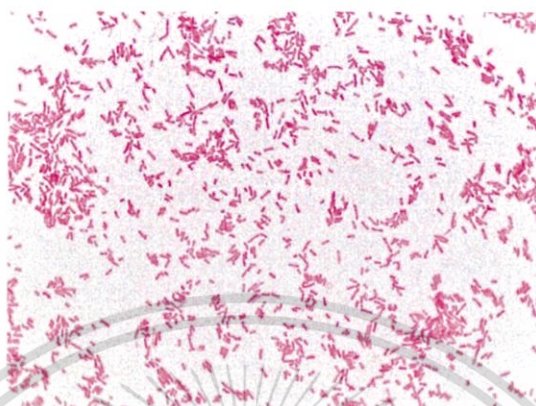
ที่มา:[http://www.webdb.dmhc.moph.go.th/ifc\\_nih/a\\_nih\\_3\\_002c.asp?info\\_id=237](http://www.webdb.dmhc.moph.go.th/ifc_nih/a_nih_3_002c.asp?info_id=237)

## 3. *Escherichia coli*

*Escherichia coli* เป็นเซลล์รูปท่อน แกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ อาจเคลื่อนที่ได้หรือไม่เคลื่อนที่ บางสายพันธุ์ที่แยกได้จากนอกลำไส้สร้างแคปซูลได้ ให้โคโลนีเรียบ ไม่มีสี มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตรในเวลา 8 ชั่วโมง แต่ถ้าเลี้ยงในอาหารที่แสดงความแตกต่าง (differential media) เช่น Mac Conkey agar โคโลนีมีสีแดงชมพู ขนาดใหญ่ เนื่องจากเฟอร์เมนต์แล็กโทส หรือเลี้ยงในอาหาร Eosin methylene blue agar (EMB) และ Endo agar โคโลนีมีสีมันวาวคล้ายโลหะ มีบางสายพันธุ์ที่เฟอร์เมนต์แล็กโทสได้ช้า สำหรับเชื้อสายพันธุ์นี้สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิช่วงกว้าง (15-45 องศาเซลเซียส) บางสายพันธุ์ทนความร้อน 60 องศาเซลเซียส 15 นาที หรือ 55 องศาเซลเซียส 60 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับ *Escherichia coli* เป็นเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ใหญ่ ปกติจะไม่ทำให้เกิดโรค แต่จะทำให้เกิดโรคได้ถ้าเชื้ออยู่นอกลำไส้ เช่น ในท่อน้ำปัสสาวะ ท่อน้ำดี ปอด เยื่อหุ้มปอด เยื่อหุ้มสมองและไขสันหลังในเด็กแรกเกิด เชื้อ *Escherichia coli* บางสายพันธุ์ทำให้เกิดโรคท้องร่วงในคนและสัตว์และทำให้เกิดโลหิตเป็นพิษ (septicemia) ได้ (นงลักษณ์, 2547)



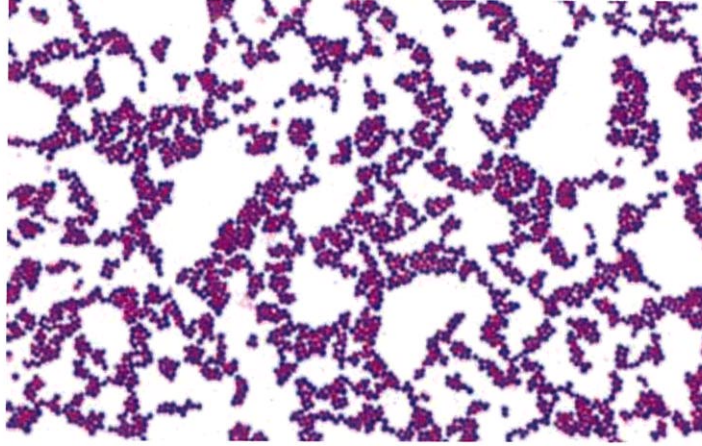
รูปที่ 3(ซ) แสดงรูปร่างลักษณะของเชื้อ *Escherichia coli*

ที่มา: <http://www.microbeworld.org/component/jlibrary/?view=article&id=13348>

#### 4. *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อแบคทีเรียมีลักษณะเป็นรูปทรงกลม แกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ เซลล์มีเส้นผ่าศูนย์กลางระหว่าง 0.5 - 1.5 ไมโครเมตร เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใหญ่ในสภาพที่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนเล็กน้อย (microaerophilic) เจริญเร็วที่สุดในที่ 37 องศาเซลเซียส แต่สร้างรงควัตถุที่สุดที่อุณหภูมิห้อง (20-25 องศาเซลเซียส) โคโลนิบนอาหารแข็งมีลักษณะกลม เรียบ ชุ่ม นูนเล็กน้อย และมีลักษณะสีเหลืองทอง เมื่อแบ่งเซลล์จะติดกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น เชื้อ *Staphylococcus aureus* ให้ผลการทดสอบคาตาเลส (catalase test) เป็นบวกและสามารถเฟอร์เมนต์คาร์โบไฮเดรตหลายชนิดได้กรดเล็กน้อยแต่ไม่ได้ออกแก๊ส สำหรับ *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญในคน ทำให้เกิดการติดเชื้อรุนแรงโดยเป็นสาเหตุสำคัญของโรคฝีหนองถึง 80% และถ้าผิวหนังเกิดรอยบาดแผลหรือถลอกหรือได้รับการผ่าตัด เชื้อนี้จะบุกรุกเข้าเนื้อเยื่อชั้นในได้ และเมื่อเข้ากระแสเลือดแล้ว จะทำให้เกิดเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบเฉียบพลัน และแพร่กระจายออกไป เชื้อ *Staphylococcus aureus* สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษา โดยเฉพาะเกิดการดื้อยาเพนิซิลลิน (penicillin) และเมธิซิลลิน (methicillin) ได้ นอกจากนี้เชื้อสายพันธุ์นี้ทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี สามารถมีชีวิตรอดได้เป็นสัปดาห์และสามารถทนความร้อน (ทน 50 องศาเซลเซียส ได้นาน 30 นาที) แต่จะตายถ้าใช้ความร้อน 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง รวมทั้งยังทนต่อสารเคมีที่ทำลายเชื้อ เช่น ฟีนอล เมอคิวริก คลอไรด์ โซเดียมคลอไรด์ 9% แต่ถูกยับยั้งด้วยสารเคมีบางชนิด เช่น เฮกซาคลอร์เฟน 3% และถูกทำลายด้วยกรดไขมันเข้มข้น (นงลักษณ์, 2547)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

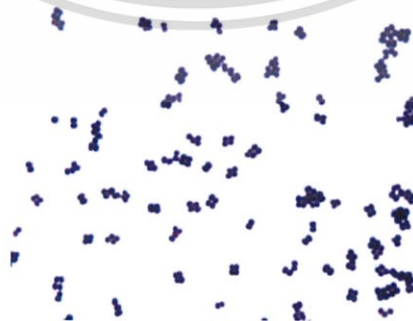


รูปที่ 4(ข) แสดงรูปร่างลักษณะของเชื้อ *Staphylococcus aureus*  
ที่มา:<http://www.microbe-canvas.com/Bacteria/gram-positive-cocci/Staphylococci/catalase-positive/Staphylococcus-aureus.html>

#### 5. *Micrococcus luteus*

*Micrococcus luteus* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม อยู่เดี่ยว หรือเป็นคู่ แบ่งตัวได้มากกว่าหนึ่งระนาบทำให้เกิดการเรียงตัวแบบต่างๆได้ โดยส่วนใหญ่พบอยู่เป็นกลุ่ม 4 เซลล์ ที่เรียกว่า tetrad เชื้อสายพันธุ์นี้ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ส่วนใหญ่จะดำรงชีวิตแบบ chemoorganotroph เป็นพวกที่มีเมแทบอลิซึม แบบ respiration สามารถดำรงชีวิตแบบ aerobe เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ไม่สร้างอินโดลแต่ให้ผลการทดสอบคาตาเลส (catalase) เป็นบวก (ดวงพร, 2537)

สำหรับเชื้อสายพันธุ์นี้เป็นเชื้อประจำถิ่นบนผิวหนังและเยื่อเมือกทุกผิว รวมถึงพบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป จึงสามารถพบเป็นเชื้อปนเปื้อนในสิ่งส่งตรวจได้บ่อยโดยเฉพาะเชื้อ *Micrococcus luteus* เชื้อสายพันธุ์นี้จะพบการก่อโรคในคนได้น้อย ส่วนใหญ่เป็นการติดเชื้อฉวยโอกาสในผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่องและสัมพันธ์กับการใส่อุปกรณ์การแพทย์เข้าสู่ร่างกาย สามารถก่อโรคติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจ ระบบประสาท และการติดเชื้อในกระแสเลือด เชื้อ *Micrococcus luteus* มีความสามารถไวต่อยาต้านเชื้อแบคทีเรียเป็นส่วนใหญ่ รวมถึง ยา penicillin (ภัทรชัย, 2549)



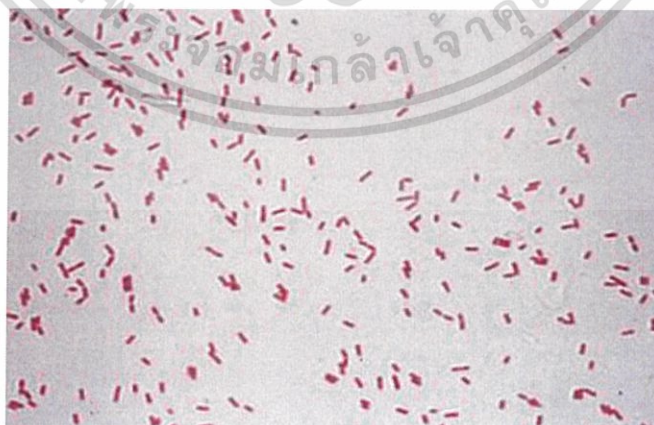
รูปที่ 5(ข) แสดงรูปร่างลักษณะของเชื้อ *Micrococcus luteus*  
ที่มา:<http://www.studyblue.com/notes/note/n/mlabsc-2212-study-guide-2013-14-wright/deck/8691070>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 6. *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* มีลักษณะเป็นรูปท่อนหรือโค้งเล็กน้อย เคลื่อนที่ด้วยแฟลจellar แฟลกเจลลา มีขนาด 0.5-1.0 X 1.5-5.0 ไมโครเมตร ติดสีแกรมลบ ผนังเซลล์ประกอบด้วยลิโปพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide, LPS) ที่มีโครงสร้างคล้ายของแบคทีเรียในตระกูลเอนเทอโรแบคทีเรียเอซี (Enterobacteriaceae) แต่มีสารเคมีบางหมู่ต่างกัน เชื้อสายพันธุ์นี้ดำรงชีวิตแบบใช้ออกซิเจน สามารถเจริญและได้พลังงานโดยได้แหล่งของไนโตรเจนและคาร์บอนจากสารอาหารธรรมดา เช่น แอมโมเนียและคาร์บอนไดออกไซด์ ในการเจริญจึงไม่ต้องการสารอาหารซับซ้อน สามารถมีชีวิตและเพิ่มจำนวนในช่วงอุณหภูมิกว้าง ตั้งแต่ 20-42 องศาเซลเซียส ในสภาพแวดล้อมต่างๆได้ รวมทั้งในสภาพที่มีเกลือสูงๆได้ โคลนินของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นโคลนขนาดใหญ่และแพร่กระจาย มีลักษณะเป็นมันเงาคัลลาลโลหะ (metallic sheen) เมื่อเลี้ยงในอาหารผสมเลือด แต่เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว จะจับกันเป็นแผ่นที่ผิวหน้าอาหาร (pellicle) ซึ่งแสดงว่าเชื้อชอบออกซิเจน เชื้อสายพันธุ์นี้จะมีการสร้างรงควัตถุสีเขียวซึ่งเกิดจากรงควัตถุไพโอไซยานิน (pyocyanin) ที่มีสีฟ้าและไพโอเวอดิน (pyoverdine) สีเหลืองที่เป็นสีเรืองแสง (fluorescens) นอกจากนี้เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* จะเป็นเชื้อชนิดหนึ่งที่ทำให้ผลบวกกับออกซิเดส และไม่เฟอร์เมนต์แล็กโทสเมื่อเลี้ยงในแมคคองกีอะการ์ (MacConkey agar)

สำหรับ *Pseudomonas aeruginosa* ไม่ค่อยทำให้เกิดโรคในคนที่มีสุขภาพดี แต่จะเป็นเชื้อฉวยโอกาสทำให้เกิดโรคได้ในคนที่มีภูมิคุ้มกันต่ำหรืออ่อนแอ หรือเมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกายในบริเวณที่ไม่มี ความต้านทานปกติ เช่น เยื่อเมือกและผิวหนังที่ถลอก ในคนไข้ในโรงพยาบาลจะมีการติดเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ได้ง่ายและรุนแรง โดยที่เชื้อเพิ่มจำนวนอยู่ในน้ำหรือที่มีความชื้นตาม เครื่องมือหรือเครื่องช่วยหายใจ การติดเชื้อจะเกิดขึ้นเมื่อมีการใช้เครื่องมือทางการแพทย์เพื่อตรวจหรือรักษา เช่น การใช้เครื่องสวนในหลอดเลือดหรือหลอดปัสสาวะ คนที่มีแผลเปื่อยอักเสบ แผลไฟไหม้ การติดเชื้อที่ตา คนไข้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำเนื่องจากสูงอายุ โรคที่ภูมิคุ้มกันถูกกด เช่น มะเร็งเม็ดเลือดขาว และคนที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกันมักเกิดการติดเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ได้ง่าย ทำให้เชื้อเข้าสู่ร่างกายและเกิดเซพติเมียและปอดบวมตามมา (นงลักษณ์, 2547)



รูปที่ 6(ซ) แสดงรูปร่างลักษณะของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*  
ที่มา: <http://www.textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ฅ

## ผลการทดลอง

## 1. การหาค่าปริมาณของน้ำหนักตัวอย่างดินที่ใช้ในการหาเชื้อแอกติโนมัยซีท

ตารางที่ ค (๑) แสดงปริมาณของน้ำหนักตัวอย่างดิน ครั้งที่ 1 (ดิน A) บริเวณตำบลบ้านแหลม  
จังหวัด เพชรบุรี

ตำแหน่ง ตัวอย่างดิน	น้ำหนักภาชนะ (กรัม)	น้ำหนักสารแขวนลอย ของดินที่เจือจาง (กรัม)	น้ำหนักสารแขวนลอยของดิน และภาชนะหลังอบ (กรัม)	น้ำหนักดิน (กรัม)
1	44.028	8.383	44.702	7.709
2	42.298	8.034	43.146	7.186
3	43.113	8.370	43.881	7.602
4	47.208	8.579	48.070	7.717
5	42.229	8.226	42.971	7.484
6	44.047	8.436	44.866	7.617
7	45.571	7.367	46.343	6.597
8	46.458	8.517	47.338	7.637
9	42.455	8.397	43.205	7.647
10	47.766	8.709	48.646	7.829

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค (๒) แสดงปริมาณของน้ำหนักดินตัวอย่างดินครั้งที่ 2 (ดิน B) บริเวณตำบลบ้าน  
แหลม จังหวัด เพชรบุรี

ตำแหน่ง ตัวอย่างดิน	น้ำหนักภาชนะ (กรัม)	น้ำหนักสารแขวนลอย ของดินที่เจือจาง (กรัม)	น้ำหนักสารแขวนลอยของดิน และภาชนะหลัองบ (กรัม)	น้ำหนักดิน (กรัม)
1	43.647	8.483	44.503	7.627
2	44.439	8.134	45.414	7.159
3	49.379	8.570	50.319	7.630
4	42.058	8.645	42.931	7.772
5	44.151	8.322	44.984	7.489
6	47.634	8.674	48.585	7.723
7	43.428	7.879	44.487	6.820
8	47.795	8.415	48.720	7.490
9	49.410	8.423	50.414	7.419
10	42.826	8.904	43.663	8.067

2. การวัดค่าความเป็นกรด-ด่างจากตัวอย่างดินที่ใช้ในการหาเชื้อแอกติโนมัยซีท

ตารางที่ ค (๓) แสดงค่าเฉลี่ยของความเป็นกรด-ด่างจากตัวอย่างดินครั้งที่ 1 (ดิน A)  
บริเวณตำบลบ้านแหลม จังหวัด เพชรบุรี

ตำแหน่ง ตัวอย่างดิน	ค่าความเป็นกรด-ด่าง			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
1	7.41	7.50	7.44	7.45
2	7.42	7.53	7.51	7.49
3	7.74	7.41	7.55	7.57
4	7.90	7.73	7.77	7.80
5	7.79	7.99	7.94	7.91
6	7.46	7.60	7.57	7.54
7	7.91	7.81	8.00	7.91
8	7.53	7.66	7.73	7.64
9	7.80	7.87	7.68	7.78
10	7.47	7.55	7.52	7.51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค (๔) แสดงค่าเฉลี่ยของความเป็นกรด-ต่างจากตัวอย่างดินครั้งที่ 2 (ดิน B)  
บริเวณตำบลบ้านแหลม จังหวัด เพชรบุรี

ตำแหน่ง ตัวอย่างดิน	ค่าความเป็นกรด-ต่าง			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
1	8.34	8.34	8.19	8.29
2	8.34	8.43	8.33	8.37
3	8.29	8.36	8.28	8.31
4	8.22	8.31	8.20	8.24
5	8.22	8.20	8.23	8.21
6	8.26	8.44	8.53	8.41
7	8.24	8.32	8.28	8.28
8	8.14	8.20	8.19	8.18
9	8.24	8.42	8.41	8.36
10	8.15	8.10	8.37	8.21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 3. การหาค่าปริมาณความชื้นจากตัวอย่างดินที่ใช้ในการหาเชื้อแอกติโนมัยซีท

ตารางที่ ค (๕) แสดงปริมาณความชื้นจากตัวอย่างดินครั้งที่ 1 (ดิน A) บริเวณตำบลบ้านแหลม  
จังหวัด เพชรบุรี

ตำแหน่ง ตัวอย่างดิน	น้ำหนักภาชนะ (กรัม)	น้ำหนักดิน ก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักดิน และภาชนะหลังอบ (กรัม)	น้ำหนักดิน หลังอบ (กรัม)	ปริมาณ ความชื้น (%)
1	46.370	2.520	48.568	2.198	12.78
2	56.335	2.051	58.127	1.792	12.63
3	42.888	2.866	45.512	2.624	8.44
4	42.467	2.256	44.533	2.066	8.42
5	41.179	2.129	43.084	1.905	10.52
6	43.188	2.391	45.356	2.168	9.33
7	45.212	2.002	47.065	1.853	7.44
8	47.059	2.058	48.826	1.767	14.14
9	49.254	2.236	51.279	2.025	9.44
10	47.701	2.586	49.988	2.287	11.56

ตารางที่ ค (๖) แสดงปริมาณความชื้นจากตัวอย่างดินครั้งที่ 2 (ดิน B) บริเวณตำบลบ้านแหลม  
จังหวัด เพชรบุรี

ตำแหน่ง ตัวอย่างดิน	น้ำหนักภาชนะ (กรัม)	น้ำหนักดิน ก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักดิน และภาชนะหลังอบ (กรัม)	น้ำหนักดิน หลังอบ (กรัม)	ปริมาณ ความชื้น (%)
1	43.773	2.34	45.019	1.246	46.75
2	43.718	2.245	44.856	1.138	49.31
3	42.889	2.175	44.113	1.224	43.72
4	43.473	2.286	44.848	1.375	39.85
5	42.115	2.292	43.482	1.367	40.36
6	42.588	2.183	43.752	1.164	46.68
7	42.347	2.312	43.64	1.293	44.07
8	56.33	2.22	57.561	1.231	44.55
9	48.59	2.426	49.808	1.218	49.79
10	44.594	2.142	45.885	1.291	39.73

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้拿去เพื่อประโยชน์ทางการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การตรวจสอบค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์  
 ตารางที่ ค (๗) แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่เหมาะสมต่อความเป็นกรดต่างที่เวลา 24 ชั่วโมง

หมายเลข ไอโซเลท	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ความยาวคลื่น 440 nm							
	Citrate- phosphate buffer (pH 7)	Tris-HCl buffer (pH 8)	Boric acid- bores buffer (pH 8)	Tris-HCl buffer (pH 9)	Boric acid- bores buffer (pH 9)	Sodium borate buffer (pH 10)	Sodium bicarbonate buffer (pH 10)	Sodium bicarbonate buffer (pH 11)
B8800-3 (24 ชั่วโมง)	0.005	0.004	0.005	0.006	0.004	0.004	0.004	0.005
B8810-1 (24 ชั่วโมง)	0.023	0.021	0.019	0.018	0.017	0.015	0.013	0.014
K6786-3 (24 ชั่วโมง)	0.024	0.013	0.009	0.009	0.018	0.021	0.015	0.014
MDB148 (24 ชั่วโมง)	0.015	0.021	0.01	0.018	0.018	0.014	0.011	0.021
MDB632 (24 ชั่วโมง)	0.019	0.018	0.012	0.025	0.019	0.025	0.024	0.018
MDB21210 (24 ชั่วโมง)	0.023	0.027	0.029	0.03	0.028	0.029	0.02	0.024

\*Control เติมน้ำกลั่นแทนเอนไซม์และสารละลายบัฟเฟอร์

ตารางที่ ค (๗) แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่เหมาะสมต่อความเป็นกรดต่างที่เวลา 24 ชั่วโมง

หมายเลข ไอโซเลท	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ความยาวคลื่น 440 nm							
	Citrate- phosphate buffer (pH 7)	Tris-HCl buffer (pH 8)	Boric acid- bores buffer (pH 8)	Tris-HCl buffer (pH 9)	Boric acid- bores buffer (pH 9)	Sodium borate buffer (pH 10)	Sodium bicarbonate buffer (pH 10)	Sodium bicarbonate buffer (pH 11)
MDB2433 (24 ชั่วโมง)	0.032	0.02	0.023	0.028	0.038	0.033	0.049	0.026
MDB3222 (24 ชั่วโมง)	0.023	0.019	0.02	0.022	0.023	0.022	0.021	0.02
MDB4123 (24 ชั่วโมง)	0.025	0.026	0.023	0.027	0.022	0.023	0.045	0.025

\*Control เติมน้ำกลั่นแทนเอนไซม์และสารละลายบัฟเฟอร์

ตารางที่ ค (๘) แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสที่เหมาะสมต่อความเป็นกรดต่างที่เวลา 30 ชั่วโมง

หมายเลข ไอโซเลท	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ความยาวคลื่น 440 nm							
	Citrate- phosphate buffer (pH 7)	Tris-HCl buffer (pH 8)	Boric acid- bores buffer (pH 8)	Tris-HCl buffer (pH 9)	Boric acid- bores buffer (pH 9)	Sodium borate buffer (pH 10)	Sodium bicarbonate buffer (pH 10)	Sodium bicarbonate buffer (pH 11)
B8800-3 (30 ชั่วโมง)	0.017	0.009	0.005	0.006	0.005	0.007	0.009	0.006
B8810-1 (30 ชั่วโมง)	0.034	0.025	0.031	0.037	0.036	0.027	0.029	0.02
K6786-3 (30 ชั่วโมง)	0.029	0.022	0.02	0.027	0.025	0.028	0.018	0.018
MDB148 (30 ชั่วโมง)	0.012	0.016	0.015	0.017	0.017	0.036	0.018	0.022
MDB632 (30 ชั่วโมง)	0.024	0.027	0.016	0.024	0.025	0.014	0.026	0.018
MDB21210 (30 ชั่วโมง)	0.028	0.037	0.043	0.041	0.033	0.038	0.039	0.041

\*Control เติมน้ำกลั่นแทนเอนไซม์และสารละลายบัฟเฟอร์

ตารางที่ ค (๘) แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่เหมาะสมต่อความเป็นกรดต่างที่เวลา 30 ชั่วโมง

หมายเลข ไอโซเลท	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ความยาวคลื่น 440 nm							
	Citrate- phosphate buffer (pH 7)	Tris-HCl buffer (pH 8)	Boric acid- bores buffer (pH 8)	Tris-HCl buffer (pH 9)	Boric acid- bores buffer (pH 9)	Sodium borate buffer (pH 10)	Sodium bicarbonate buffer (pH 10)	Sodium bicarbonate buffer (pH 11)
MDB2433 (24 ชั่วโมง)	0.016	0.014	0.012	0.01	0.014	0.019	0.015	0.02
MDB3222 (30 ชั่วโมง)	0.024	0.022	0.018	0.025	0.017	0.012	0.023	0.021
MDB4123 (24 ชั่วโมง)	0.029	0.028	0.03	0.031	0.025	0.032	0.036	0.028

\*Control เติมน้ำกลั่นแทนเอนไซม์และสารละลายบัฟเฟอร์

## 5. การตรวจสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

ตารางที่ ค (๙) แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่เหมาะสมต่ออุณหภูมิต่างๆ

หมายเลข ไอโซเลท	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ความยาวคลื่น 440 nm								
	30	35	40	45	50	55	60	65	70
B8800-3 (30 ชั่วโมง)	0.049	0.023	0.026	0.009	0.013	0.011	0.014	0.005	0.018
B8810-1 (30 ชั่วโมง)	0.546	0.525	0.731	0.748	0.529	0.389	0.247	0.135	0.111
K6786-3 (30 ชั่วโมง)	0.445	0.506	0.583	0.483	0.479	0.351	0.232	0.15	0.069
MDB148 (30 ชั่วโมง)	0.014	0.026	0.038	0.004	0.015	0.008	0.026	0.025	0.022
MDB632 (30 ชั่วโมง)	0.015	0.039	0.033	0.008	0.016	0.002	0.025	0.008	0.015
MDB21210 (30 ชั่วโมง)	0.013	0.026	0.025	0.005	0.045	0.045	0.009	0.011	0.195
MDB2433 ( 24 ชั่วโมง)	0.02	0.021	0.046	0.011	0.014	0.009	0.02	0.012	0.016
MDB3222 ( 30 ชั่วโมง)	0.015	0.02	0.036	0.008	0.027	0.01	0.023	0.008	0.023
MDB4123 (24 ชั่วโมง)	0.02	0.022	0.024	0.004	0.009	0.029	0.02	0.009	0.016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 6. การหาสารยับยั้งที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

ตารางที่ ค (๑๐) แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่มีผลต่อสารยับยั้งต่างๆ

หมายเลข ไอโซเลท	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ความยาวคลื่น 440 nm			
	PMSF	1,10-phenanthroline hydrate (C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> )	EDTA	KMnO <sub>4</sub>
B8800-3 (30 ชั่วโมง)	0.002	0.005	0.005	0.482
B8810-1 (30 ชั่วโมง)	0.345	0.441	0.23	0.249
K6786-3 (30 ชั่วโมง)	0.083	0.121	0.034	0.802
MDB148 (30 ชั่วโมง)	0.005	0.007	0.006	0.384
MDB632 (30 ชั่วโมง)	0.012	0.008	0.008	0.485
MDB21210 (30 ชั่วโมง)	0.005	0.004	0.004	0.454
MDB2433 (24 ชั่วโมง)	0.005	0.007	0.007	0.457
MDB3222 (30 ชั่วโมง)	0.002	0.006	0.004	0.491
MDB4123 (24 ชั่วโมง)	0.007	0.008	0.009	0.468

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 7. การหาความเสถียรภาพของเอนไซม์

ตารางที่ ค (๑๑) แสดงผลค่าเสถียรภาพของเอนไซม์เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิและเวลาที่แตกต่างกัน

หมายเลข ไอโซเลท	อุณหภูมิ/ เวลา (นาที)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ความยาวคลื่น 440 nm					
		10	20	30	40	50	60
B8800-3 (30 ชั่วโมง)	40	0.023	0.023	0.021	0.019	0.016	0.011
	50	0.012	0.009	0.008	0.006	0.005	0.004
	60	0.011	0.009	0.007	0.005	0.004	0.003
	70	0.016	0.009	0.008	0.008	0.007	0.003
	80	0.016	0.012	0.011	0.008	0.005	0.001
B8810-1 (30 ชั่วโมง)	40	0.661	0.565	0.417	0.223	0.135	0.132
	50	0.48	0.223	0.19	0.177	0.105	0.07
	60	0.113	0.085	0.073	0.063	0.053	0.02
	70	0.107	0.035	0.03	0.023	0.013	0.003
	80	0.037	0.021	0.019	0.013	0.011	0.001
K6786-3 (30 ชั่วโมง)	40	0.406	0.366	0.355	0.333	0.322	0.218
	50	0.285	0.265	0.254	0.2	0.147	0.072
	60	0.221	0.109	0.087	0.041	0.035	0.046
	70	0.05	0.048	0.042	0.036	0.017	0.009
	80	0.053	0.051	0.024	0.016	0.01	0.006
MDB148 (30 ชั่วโมง)	40	0.032	0.029	0.016	0.012	0.014	0.014
	50	0.014	0.013	0.011	0.01	0.009	0.003
	60	0.013	0.008	0.007	0.007	0.006	0.004
	70	0.013	0.008	0.008	0.007	0.007	0.003
	80	0.012	0.01	0.007	0.005	0.004	0.002
MDB632 (30 ชั่วโมง)	40	0.024	0.021	0.017	0.016	0.01	0.011
	50	0.013	0.012	0.011	0.005	0.004	0.003
	60	0.018	0.017	0.016	0.015	0.008	0.006
	70	0.014	0.011	0.009	0.005	0.003	0.0025
	80	0.009	0.007	0.006	0.004	0.003	0.001
MDB21210 (30 ชั่วโมง)	40	0.024	0.02	0.016	0.014	0.006	0.006
	50	0.032	0.026	0.018	0.014	0.01	0.007
	60	0.008	0.006	0.005	0.003	0.002	0.001
	70	0.136	0.121	0.12	0.111	0.104	0.031
	80	0.01	0.008	0.007	0.005	0.004	0.001

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค (๑๑) แสดงผลค่าเสถียรภาพของเอนไซม์เมื่อนำไปปรมที่อุณหภูมิและเวลาที่แตกต่างกัน

หมายเลข ไอโซเลท	อุณหภูมิ/ เวลา (นาท)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ความยาวคลื่น 440 nm					
		10	20	30	40	50	60
MDB2433 ( 24 ชั่วโมง)	40	0.039	0.026	0.025	0.022	0.018	0.015
	50	0.011	0.009	0.006	0.008	0.006	0.004
	60	0.017	0.016	0.008	0.006	0.005	0.005
	70	0.015	0.01	0.008	0.005	0.006	0.004
	80	0.014	0.01	0.008	0.007	0.006	0.001
MDB3222 ( 30 ชั่วโมง)	40	0.026	0.024	0.021	0.019	0.017	0.018
	50	0.022	0.021	0.02	0.014	0.012	0.01
	60	0.011	0.012	0.01	0.01	0.011	0.009
	70	0.022	0.018	0.013	0.01	0.009	0.006
	80	0.014	0.013	0.012	0.01	0.008	0.003
MDB4123 (24 ชั่วโมง)	40	0.021	0.02	0.019	0.018	0.015	0.013
	50	0.008	0.006	0.007	0.005	0.004	0.003
	60	0.017	0.016	0.014	0.01	0.008	0.005
	70	0.015	0.011	0.01	0.008	0.007	0.002
	80	0.015	0.012	0.01	0.007	0.008	0.001

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ประวัติผู้วิจัย

**ชื่อ-นามสกุล** นางสาวดวงเดือน พลอยมุกดา

**E-mail** ploymukda\_duen@hotmail.com

**ประวัติการศึกษา**

**2555** มัธยมศึกษา (วิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์) โรงเรียนดำนมะขามเตี้ยวิทยาคม  
จังหวัดกาญจนบุรี

**2560** ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
กรุงเทพมหานคร



**ชื่อ-นามสกุล** นายนันทภพ ปิติจรรยาวงศ์

**E-mail** nuntapop.pitijanyawong@hotmail.com

**ประวัติการศึกษา**

**2554** มัธยมศึกษา (วิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์) โรงเรียนทวีธาภิเศก  
กรุงเทพมหานคร

**2560** ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
กรุงเทพมหานคร



**ชื่อ-นามสกุล** นางสาวประนัยดา นุ่มประไพ

**E-mail** dada.\_pooh@hotmail.com

**ประวัติการศึกษา**

**2555** มัธยมศึกษา (วิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์) โรงเรียนอ่างทองปัทมโรจน์วิทยาคม  
จังหวัดอ่างทอง

**2560** ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
กรุงเทพมหานคร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้