โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

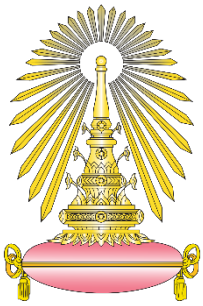
ชื่อโครงการ การคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่ผลิต โปรตีเนส อะไมเลสและไลเปส

ชื่อนิสิต นางสาวบัณฑิตา จิตบรรเจิด รหัสประจำตัว 6032329523

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่ผลิต โปรตีเนส อะไมเลสและ ไลเปส

Isolation of the proteinase, amylase and lipase producing photosynthetic bacteria

ชื่อนิสิต นางสาวบัณฑิตา จิตบรรเจิด เลขประจำตัว 6032329523

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ การคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่ผลิต โปรตีเนส อะไมเลสและ ไลเปส

โดย นางสาวบัณฑิตา จิตบรรเจิด รหัสประจำตัวนิสิต 6032329523

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ผศ.ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงงานวิทยาศาสตร์

..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา

(ศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ)

คณะกรรมการสอบโครงงาน

..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ชุลี ยมภักดี)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. นราพร สมบูรณ์นะ)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร. ชมพูนิกข์ กาญจนพังคะ)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร. สริสา ณ ป้อมเพ็ชร์)

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

เรื่อง

การคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่ผลิต โปรตีเนส อะไมเลสและ ไลเปส

Isolation of the proteinase, amylase and lipase producing photosynthetic bacteria

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์

นิสิตในโครงการ

นางสาวบัณฑิตา จิตบรรเจิด รหัสนิสิตประจำตัวนิสิต 6032329523

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของ

การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2563

ชื่อโครงการ การคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่ผลิต โปรตีเนส อะไมเลสและ ไลเปส

นิสิตผู้เสนอโครงการ นางสาวบัณฑิตา จิตบรรเจิด รหัสประจำตัวนิสิต 6032329523

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ผศ.ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงที่ไม่สะสมกำมะถัน (Purple non-sulfur bacteria, PNSB) สามารถสร้างสารที่มีคุณค่าและนำไปใช้ประโยชน์ต่างๆได้ เช่นรงควัตถุและเอนไซม์ ในปัจจุบัน เอนไซม์จากแบคทีเรียถูกใช้ประโยชน์ทางเทคโนโลยีชีวภาพและอุตสาหกรรมต่างๆ อย่างกว้างขวาง ในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะคัดแยก PNSB ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเนส อะไมเลส และไลเปส โดยได้คัดแยก PNSB จากแหล่งน้ำจืดในจังหวัดสมุทรสาครและสุพรรณบุรี เพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะ photoheterotroph ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว RCVB ที่ความเข้มแสง 3,000-3,500 ลักซ์ สามารถคัดแยก PNSB ได้ 66 ไอโซเลท เมื่อนำไปคัดกรองหาไอโซเลทที่สามารถผลิตโปรตีเนส อะไมเลส และไลเปส บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง skim milk, starch และ tributyrin ตามลำดับ ภายใต้ภาวะ chemoheterotroph พบว่ามี 6 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตอะไมเลส 12 ไอโซเลทที่สามารถผลิตโปรตีเนส และทั้ง 66 ไอโซเลท สามารถผลิตไลเปสได้ เมื่อเลือกสายพันธุ์ที่สามารถสร้างเอนไซม์แต่ละชนิดได้สูงสุด 5 สายพันธุ์แรกไปวิเคราะห์แอกทิวิตีเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อที่เลี้ยงทั้งภายใต้ภาวะ chemoheterotroph ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว RCVB ที่มี 1% starch soluble เป็นแหล่งคาร์บอน พบไอโซเลทที่ให้แอกทิวิตีของอะไมเลสได้สูงสุด คือ SP9 ได้เท่ากับ 0.518 ± 0.06 ยูนิต/มิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 8 วัน เมื่อคำนวณแอกทิวิตีจำเพาะของอะไมเลส พบว่า SP9 ยังเป็นสายพันธุ์ที่มีแอกทิวิตีจำเพาะสูงสุด เท่ากับ 176.11 ± 4.55 ยูนิต/กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และ พบว่า การเลี้ยงภายใต้ภาวะ chemoheterotroph จะให้แอกทิวิตีและแอคทิวิตีจำเพาะของอะไมเลสที่สูงกว่าการเลี้ยงในภาวะ photoheterotroph นอกจากนี้ สายพันธุ์ SP9 ยังสามารถสร้างเอนไซม์โปรตีเอสและไลเปสอีกด้วย

Project Isolation of the proteinase, amylase and lipase producing photosynthetic bacteria

Student Ms. Bantita Jitbanjead

ID no. 6032329523

Project advisor Kobchai Pattaragulwanit, Dr.rer.nat

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

---

Abstract

Purple non-sulfur bacteria (PNSB) can produce many valuable and useful products such as pigments and enzymes. Nowadays, enzymes from bacteria were widely used in various biotechnology and industrial processes. Therefore, the objective of this study was to isolate and screen for the proteinase, amylase and lipase producing purple non-sulfur bacteria. 66 PNSB strains were isolated from fresh water in Samut Sakhon and Suphanburi provinces by enrichment method under photoheterotroph condition in RCVB medium under light 3,000-3,500 lux. After screening for amylase, proteinase and lipase production on starch, skim milk, and tributyrin agar plates respectively. 6 isolates could produce amylase, 12 isolates produced proteinase and all of 66 PNSB isolates produced lipase under chemoheterotroph condition. The results showed that strain SP9 exhibited highest amylase activity of 0.518 ± 0.06 Unit/ml when cultured in RCVB medium containing 1% starch soluble under chemoheterotroph condition after 8 days cultivation. The highest specific amylase activity of 176.11 ± 4.55 Unit/g was obtained from SP9 isolate. Cultivation of SP9 under chemoheterotroph condition resulted in higher enzyme activity than under photoheterotroph condition. Moreover, SP9 was capable of producing proteinase amylase and lipase.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์นี้สำเร็จลงได้อย่างดีด้วยความกรุณาและช่วยเหลือจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาในโครงการ ที่ได้ให้คำแนะนำและคำปรึกษา แนวทางการแก้ปัญหา ตลอดจนตรวจแก้ไขโครงการการเรียนเพื่อเสริมประสบการณ์นี้จนเสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่คอยกรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา และให้เกียรติมาเป็นกรรมการในการสอบโครงการฉบับนี้

ขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ งบประมาณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่สนับสนุนทุนวิจัยสำหรับโครงการ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และพี่ๆในห้องปฏิบัติการทุกชั้นในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่คอยช่วยเหลือและให้คำแนะนำต่างๆ อีกทั้งยังอำนวยความสะดวกเป็นอย่างดีในการทำโครงการฉบับนี้

ขอขอบคุณเพื่อนและน้องระดับปริญญาบัณฑิตศึกษาทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาต่างๆ ตลอดจนคอยเป็นกำลังใจให้อย่างดีเสมอมา

ท้ายสุดนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ที่คอยสนับสนุนในการศึกษาและทุกๆอย่าง ช่วยเหลือและให้กำลังใจจนโครงการฉบับนี้สำเร็จไปด้วยดี

ด้วยความเคารพอย่างสูง

บัณฑิตา จิตบรรเจิด

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูปภาพ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 อุปกรณ์ สารเคมี	11
บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง	14
บทที่ 4 ผลการทดลอง	22
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	38
เอกสารอ้างอิง	45
ภาคผนวก ก	52
ภาคผนวก ข	55
ภาคผนวก ค	56

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 4.1 การเพาะเลี้ยง PNSB ใต้ภาวะ photoheterotroph วันนที่ 1 (ก) และ วันที่ 7 (ข) 24

รูปที่ 4.2 PNSB ไอโซเลทต่างๆที่เลี้ยงในภาวะ photoheterotroph ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว RCVB เป็นเวลา 7 วัน 25

รูปที่ 4.3 ลักษณะโคโลนีของ PNSB ที่คัดแยกโดยการ spread plate 25

รูปที่ 4.4 บริเวณใส (Clear zone) ของ PNSB สายพันธุ์ต่างๆที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส ผลควบคุมบวกคือ *Bacillus subtilis* ผลควบคุมลบคือ *Escherichia coli* และสายพันธุ์ที่ย่อยสลายได้ดีแสดงในกรอบสีแดง 26

รูปที่ 4.5 บริเวณใส (Clear zone) ของ PNSB สายพันธุ์ต่างๆที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเนส ผลควบคุมบวกคือ *Bacillus subtilis* ผลควบคุมลบคือ *Escherichia coli* และสายพันธุ์ที่ย่อยสลายได้ดีแสดงในกรอบสีแดง 28

รูปที่ 4.6 บริเวณใส (Clear zone) ของ PNSB สายพันธุ์ต่างๆที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส ผลควบคุมบวกคือ *Bacillus subtilis* ผลควบคุมลบคือ *Escherichia coli* และสายพันธุ์ที่ย่อยสลายได้ดีแสดงในกรอบสีแดง 31

รูปที่ 4.7 กราฟแสดงผลแอกทิวิตีของอะไมเลสของ PNSB สายพันธุ์ต่างๆที่เลี้ยงภายใต้ภาวะ chemoheterotroph 32

รูปที่ 4.8 กราฟแสดงผลแอกทิวิตีจำเพาะของอะไมเลสของ PNSB สายพันธุ์ต่างๆที่เลี้ยงภายใต้ภาวะ chemoheterotroph 33

รูปที่ 4.9 กราฟแสดงผลแอกทิวิตีของอะไมเลสของ PNSB สายพันธุ์ต่างๆที่เลี้ยงภายใต้ภาวะ photoheterotroph 35

รูปที่ 4.10 กราฟแสดงผลแอกทิวิตีจำเพาะของอะไมเลสของ PNSB สายพันธุ์ต่างๆที่เลี้ยงภายใต้ภาวะ photoheterotroph 36

รูป ค-1 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส วิเคราะห์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) 57

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 4.1 แสดงแหล่งที่เก็บตัวอย่างน้ำและลักษณะของตัวอย่างน้ำ 22

ตาราง 4.2 แสดงจำนวนและข้อมูลแต่ละไอโซเลทของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำแต่ละตัวอย่าง 24

ตาราง 4.3 ผลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง clear zone เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดโคโลนี และดัชนีเอนไซม์อะไมเลส 26

ตาราง 4.4 ผลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง clear zone เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดโคโลนี และดัชนีเอนไซม์โปรตีเนส 27

ตาราง 4.5 ผลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง clear zone เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดโคโลนี และดัชนีเอนไซม์ไลเปส 29

ตาราง 4.6 แอกทิวิตีของอะไมเลสของสายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะ chemoheterotroph 32

ตาราง 4.7 แอกทิวิตีจำเพาะของอะไมเลสของสายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะ chemoheterotroph 33

ตาราง 4.8 แอกทิวิตีของอะไมเลสของสายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะ photoheterotroph 35

ตาราง 4.9 แอกทิวิตีจำเพาะของอะไมเลสของสายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะ photoheterotroph 36

ตาราง ค-1 แสดงผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ของสารละลายกลูโคส ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) method 56

บทที่ 1

บทนำ

แบคทีเรียสังเคราะห์แสง (Photosynthetic Bacteria)

แบคทีเรียสังเคราะห์แสง เป็นแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนพลังงานแสงเป็นพลังงานทางชีวเคมีเพื่อใช้ในการเจริญได้ โดยมีแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ และแคโรทีนอยด์ เป็นรงควัตถุที่ช่วยจับพลังงานแสงและส่งให้แบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ใน reaction center เพื่อนำไปใช้ในการสังเคราะห์แสงต่อ การมีรงควัตถุหลายชนิดจะช่วยให้รับช่วงคลื่นแสงสีต่างๆที่แตกต่างกันได้มากขึ้น ทำให้มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงมากขึ้น แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน น้ำจืด น้ำเค็ม และน้ำเสีย (ศุภลักษณ์ สัตยสมิทสถิต, 2554) แบคทีเรียสังเคราะห์มีบทบาทสำคัญในห่วงโซ่อาหาร เนื่องจากการเป็นอาหารของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก มีการนำแบคทีเรียสังเคราะห์แสงมาใช้ในการบำบัดน้ำเสีย และยังใช้ประโยชน์ในการผลิตอาหารสัตว์ ผลิตสารกำจัดวัชพืช ช่วยทำให้พืชเจริญได้ดีขึ้น และสามารถสร้างภูมิคุ้มกันให้กับสัตว์ได้ (นภาวรรณ นพรัตนราภรณ์, 2549) สามารถจำแนกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงตามกลไกการสังเคราะห์แสงได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ oxygenic photosynthetic bacteria ซึ่งมีกระบวนการสังเคราะห์แสงที่ใช้น้ำเป็นตัวให้อิเล็กตรอนและได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ได้ ซึ่งคล้ายกับกระบวนการสังเคราะห์แสงโดยพืช แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่อยู่ในกลุ่มนี้คือพวก ไซยาโนแบคทีเรีย ส่วนอีกกลุ่มคือ anoxygenic photosynthetic bacteria มีกระบวนการสังเคราะห์แสงใช้สารอินทรีย์หรืออนินทรีย์เป็นตัวให้อิเล็กตรอนและไม่ได้ออกซิเจนออกมาเป็นผลิตภัณฑ์ แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่อยู่ในกลุ่ม anoxygenic photosynthetic bacteria ยังแบ่งได้เป็นสองกลุ่มตามรงควัตถุ ได้แก่ แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีเขียว และแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดง (จันทร์จิรา จอมสวัสดิ์, 2544)

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีเขียว (Green Photosynthetic Bacteria)

เป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีรงควัตถุคือ แบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ c d และ e เป็นหลัก ส่วนแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ a ก็มีเช่นกันแต่มีในปริมาณน้อย รงควัตถุอยู่ในโครงสร้างที่เรียกว่าคลอโรเบียม หรือคลอโรโซม เป็นโครงสร้างพิเศษที่อยู่ในไซโพลาสมิก หรือที่ผิวไซโตพลาสมิกเมมเบรน แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีเขียวจำแนกได้ 2 วงศ์ ตามลักษณะเมแทบอลิซึม ได้แก่ (จันทร์จิรา จอมสวัสดิ์, 2544; ศุภลักษณ์ สัตยสมิทสถิต, 2545; สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ, 2564)

- Family Chlorobiaceae เป็นพวกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีเขียวที่สะสมกำมะถัน มีการเจริญแบบ photolithoautotroph ใช้สารอนินทรีย์เช่น H_2, H_2S หรือ S เป็นตัวให้อิเล็กตรอน และใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน แบคทีเรียสังเคราะห์แสงในกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่สะสมซัลเฟอร์ไว้นอกเซลล์ ไม่สามารถเจริญได้ในที่ไม่มีแสง และไม่สามารถเจริญได้แบบ heterotroph มีลักษณะเป็นรูปท่อน รูปไข่ และบาง

ชนิดเป็นรูปดาว พบได้ในแหล่งน้ำพุร้อนที่มีไฮโดรเจนซัลไฟด์ (ศุภลักษณ์ สัตยสมิทสถิต, 2545; สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ, 2564)

- Family Chloroflexaeae เป็นพวกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีเขียวที่ไม่สะสมกำมะถัน มีการมีลักษณะเป็นสาย สามารถเจริญได้แบบ photoorganotroph เป็นหลัก แต่สามารถเจริญแบบ photolithotroph ได้ และสามารถเจริญแบบ chemoheterotroph ได้ (ศุภลักษณ์ สัตยสมิทสถิต, 2545; สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ, 2564)

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดง (Purple Photosynthetic Bacteria)

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงเป็นแบคทีเรียแกรมลบ สร้างพลังงานโดยการสังเคราะห์แสงในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนและมีแสง ใช้รงควัตถุได้แก่ แบคเทอริโอคลอโรฟิลล์เอ บี และแคโรทีนอยด์ โดยรงควัตถุให้สีที่ผสมกันแล้วได้สีออกมาเป็นสีม่วง จนถึงน้ำตาลแดง เจริญได้ดีในภาวะแบบ photolithotroph หรือ photoorganotroph ใช้ซัลไฟด์ สารประกอบของกำมะถัน หรือสารอินทรีย์เป็นตัวให้อิเล็กตรอน เพื่อการสังเคราะห์แสงตามลำดับ แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงยังสามารถแบ่งได้เป็น แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงที่สะสมกำมะถันในเซลล์ คือพวกที่อยู่ใน Family Chromatiaceae ใช้สารประกอบซัลเฟอร์เป็นตัวให้อิเล็กตรอน แต่มีบางชนิดที่สามารถใช้สารอินทรีย์เป็นตัวให้อิเล็กตรอนได้ จะพบพวกนี้ได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ และได้อีกประเภทคือแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีแดงที่ไม่สะสมกำมะถันซึ่งเป็นพวกที่อยู่ใน Family Rhodospirillaceae สามารถใช้ซัลเฟอร์เป็นตัวให้อิเล็กตรอนได้ และสะสมซัลเฟอร์เป็นสารมัธยันตร์อยู่ภายนอกเซลล์ สามารถเจริญได้แบบ photoorganoheterotroph โดยใช้สารอินทรีย์เป็นตัวให้อิเล็กตรอนและแหล่งคาร์บอนได้ และบางชนิดสามารถเจริญแบบ autotroph คือใช้ไฮโดรเจนซัลไฟด์เป็นตัวให้อิเล็กตรอน และตรึงคาร์บอนไดออกไซด์เป็นมวลเซลล์โดยกระบวนการ calvin cycle (ศุภลักษณ์ สัตยสมิทสถิต, 2545; Madigan and Jung, 2009)

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงที่ไม่สะสมกำมะถัน (Purple Non-Sulfur Photosynthetic Bacteria, PNSB) เป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีแดงที่เจริญได้ทั้งแบบ phototroph และ chemotroph ขึ้นกับสภาวะแวดล้อม (Lindquist, 2020) ในการเจริญแบบ phototroph แบคทีเรียจะเจริญใต้สภาวะไม่มีออกซิเจนและมีแสง มีไฮโดรเจน ไฮโดรเจนซัลไฟด์ และสารอินทรีย์เป็นตัวให้อิเล็กตรอนเพื่อสังเคราะห์แสง ไม่สะสมกำมะถัน ในการเจริญแบบ chemotroph จะเจริญภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนน้อยและไม่มีแสง ใช้สารอินทรีย์พวกแอลกอฮอล์ กรดไขมัน เป็นตัวให้อิเล็กตรอนและแหล่งคาร์บอนเพื่อสร้างพลังงานของเซลล์ ไม่สามารถใช้กำมะถันเป็นตัวให้อิเล็กตรอนได้ มีรูปร่างเซลล์ทั้งแบบกลม ท่อน และเกลียว แบคทีเรียสังเคราะห์แสงในกลุ่มนี้มี

แบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ เอ และแคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุที่สำคัญ (Chumpol, 2017) เมื่อเพาะเลี้ยงในภาวะ phototroph โคโลนีมีสีส้มน้ำตาล จนถึง สีม่วงแดง เมื่ออยู่ในภาวะ chemoheterotroph ที่มีออกซิเจน โคโลนีจะมีสีเหลือง ตัวอย่างของ PNSB ได้แก่เช่น Genus *Rhodobacter, Rhodosirillum*, *Rhodomicrobium* (ศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต, 2545) PNSB พบได้ตามแหล่งน้ำในช่วงที่มีแสงสว่างส่องถึงและมีสารอินทรีย์ พวกสระน้ำคลอง แหล่งน้ำที่สกปรก หรือดิน และพบได้ในแหล่งน้ำที่มีซัลไฟด์ความเข้มข้นต่ำ PNSB มีเมแทบอลิซึมที่หลากหลายกว่าพวกที่สะสมกำมะถัน ทนต่อสภาวะที่มีออกซิเจน จึงพบว่ามีการเจริญอย่างแพร่หลาย ได้รับความสนใจและมีการศึกษาเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในงานด้านต่างๆมากมาย (ศุภลักษณ์ สัตยสมิทสถิต, 2545; สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ, 2564)

ประโยชน์ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงที่ไม่สะสมกำมะถัน

การบำบัดน้ำเสีย

แบคทีเรียพวก PNSB สามารถนำมาใช้บำบัดน้ำเสีย หรือใช้ควบคุมคุณภาพน้ำอย่างเช่น น้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งได้ ซึ่งได้รับความสนใจในการศึกษาเนื่องจากสามารถกำจัดสารอินทรีย์ในที่มีปริมาณสูงได้ นอกจากนี้ยังได้ชีวมวลที่สามารถนำไปรีไซเคิลเป็นผลพลอยได้ต่างๆที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจอีกด้วย (Chumpol, 2017; Bogarapu และคณะ, 2019; Chen และคณะ, 2020) ตัวอย่างของการศึกษาการใช้ PNSB ในการบำบัดน้ำเสีย เช่น การศึกษาของ Kim และคณะ (2004) ใช้ *Rhodopseudomonas palustris* บำบัดน้ำเสียจากฟาร์มสุกร พบว่าเมื่อเลี้ยงด้วยการบ่มในขวดที่ปิดผนึกด้วยจุกยาง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้แสงที่ความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ เมื่อผ่านไป 7 วัน ทำให้ค่า COD (Chemical Oxygen Demand) ลดลง 50% และฟอสเฟตลดลง 50% และยังทำให้กลิ่นไม่พึงประสงค์ลดลงได้ และการศึกษาของ Bogarapu และคณะ (2019) นำ *Rhodopseudomonas palustris* RSOU000 และ *Rhodopseudomonas thermotolerance* RSOU555 ใส่ลงในตัวอย่างน้ำที่เก็บมาจากทะเลสาบที่อินเดียเพื่อดูการลดมลพิษในน้ำ พบว่าค่า *Rps. palustris* RSOU000 สามารถลดค่า COD ได้ 50% และ BOD 40% ส่วน *Rps. thermotolerance* RSOU555 ลด COD ได้ถึง 68.18% และ BOD ลดลง 56.66%

การบำบัดดินที่มีการปนเปื้อนโลหะหนัก

จากที่ผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรมีความต้องการเพิ่มขึ้น ทำให้ต้องมีการทำให้ได้ผลผลิตที่เพิ่มมากขึ้น อย่างเช่นการใส่ปุ๋ย การใส่ปุ๋ยสังเคราะห์หรือสารอนินทรีย เมื่อใช้กับพืชแล้วสารอนินทรีย์จะเข้าถึงได้ง่ายและมีการสูญเสียจากการไหลไปตามผิวน้ำหรือน้ำใต้ดิน จึงมีการใช้สารอินทรีย์เป็นปุ๋ยแทน ซึ่งปกติทำจากผลิตภัณฑ์จากสัตว์หรือพืช ซึ่งมีการรายงานว่าการใช้ปุ๋ยอินทรีย์ธรรมดา ทำให้เกิดการสะสมของโลหะหนักได้ ทำให้ส่งผลต่อพืชและ

เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมรวมถึงมนุษย์ มีการใช้ PNSB มาช่วยบำบัดดินที่มีการปนเปื้อนของโลหะหนัก (Sakarika และคณะ, 2019) เช่น *Rhodopseudomonas rubrum* สามารถลดพิษของซีลีเนียมได้ หรือ *Rhodobacter sphaeroides* II 106 กำจัดฟอสฟอรัสจากดินตะกอนในฟาร์มหอยนางรมได้ (Peng และคณะ, 2018)

การใช้เป็นโปรตีนเซลล์เดียว (Single cell protein)

PNSB สามารถใช้เป็นโปรตีนเซลล์เดียวได้ เนื่องจากมวลเซลล์ของแบคทีเรียพวกนี้มีโปรตีนที่อุดมสมบูรณ์ โปรตีนเซลล์เดียวจากแบคทีเรียพวกนี้จะถูกนำไปใช้เป็นโปรตีนเสริมในอาหารสัตว์ อย่างเช่น อาหารปลา อาหารกุ้ง นอกจากนี้ยังมีสารต่างๆที่ทำให้สัตว์มีการเจริญดีขึ้น อัตราการรอดมากขึ้นด้วย ซึ่งการใช้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงที่ไม่สะสมกำมะถัน เป็นทั้งผู้ผลิตโปรตีนและยังจัดการกากของเสียได้ จึงเป็นสิ่งที่ประหยัดต้นทุนทางเศรษฐกิจและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมด้วย มีการศึกษา PNSB ที่เป็นแหล่งโปรตีนเซลล์เดียว เช่น *Rhodobacter capsulatus* และ *Rhodobacter sphaeroides* เป็นต้น (Sasikala และ Ramana, 1995; Chumpol, 2017; Fan และคณะ, 2017; LarTurner และคณะ, 2020)

การผลิตรงควัตถุ

การนำแคโรทีนอยด์ไปใช้เป็นอาหาร สีผสมอาหาร ยา และเครื่องสำอาง ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เพราะแคโรทีนอยด์มีประโยชน์ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นแหล่งของโปรวิตามินซึ่งช่วยในการเจริญและการสืบพันธุ์ และยังช่วยปกป้องระบบการมองเห็นของมนุษย์ได้ และมนุษย์ไม่สามารถจะสังเคราะห์รงควัตถุได้เอง และการสังเคราะห์รงควัตถุทางเคมีเป็นสิ่งที่ทำได้ยาก จึงมีความสนใจศึกษาการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ด้วยวิธีทางชีวภาพซึ่งก็คือการใช้จุลินทรีย์มากขึ้น แบคทีเรียพวก PNSB ได้รับความสนใจในการใช้ผลิตแคโรทีนอยด์ เนื่องจากแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ เป็นรงควัตถุที่สำคัญในการสังเคราะห์แสงของ PNSB อยู่แล้ว (ศุภลักษณ์ สัตยสมิทสถิต, 2545; Meng และคณะ, 2017) ตัวอย่าง PNSB ที่ใช้การผลิตแคโรทีนอยด์คือ *Rhodobacter sphaeroides* ซึ่งแคโรทีนอยด์ที่ได้นำไปใช้เป็นสีย้อมธรรมชาติได้ (Merugu และคณะ, 2012)

การสร้างสารที่ส่งเสริมการเจริญของพืช

PNSB สามารถผลิตสารที่ส่งเสรินการเจริญของพืชได้ คือกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก (ALA) และกรดอินโดล 3-อะซีติก (IAA) โดยสาร IAA เป็นสารที่อยู่ในกลุ่มออกซินที่มีความจำเป็นกับการควบคุมการเจริญของพืช โดย IAA

มีบทบาทในการกระตุ้นเซลล์รากและดูดแร่ธาตุ และยังช่วยให้พืชปรับตัวกับความเครียดได้ อย่างเช่น ความเครียดจากความเค็มและโลหะหนัก ตัวอย่าง PNSB ที่มีการศึกษาการผลิต IAA เช่นพบว่า *Rhodopseudomonas* sp. ผลิต IAA ผ่านวิถีอินโดล-3-ไพรูเวต และวิถีทริปตามีน (Sakarika และคณะ, 2019) ส่วนกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก เป็นสารที่ควบคุมการเจริญของพืชและช่วยในการดูดซึมแร่ธาตุเช่นกัน แต่ยังช่วยสังเคราะห์น้ำตาลที่ละลายน้ำและโปรตีนได้ด้วย อีกทั้งยังเป็นสารกำจัดวัชพืชและแมลง แต่ถ้า ALA มีปริมาณสูงก็อาจก่อให้เกิดความเครียดได้เช่นกัน (ศุภลักษณ์ สัตยสมิทสถิต, 2545; Merugu และคณะ,2012; Sakarika และคณะ, 2019) ตัวอย่าง PNSB ที่ผลิต ALA เช่น *Rhodobacter* ผลิต ALA ผ่านทางวิถี C4 หรือการศึกษา *Rhodopseudomonas palustris* ที่แยกจากนาข้าว พบว่าผลิต ALA ได้ถึง 4.11 มิลลิกรัมต่อลิตร (Merugu และคณะ,2012)

การผลิตโคเอนไซม์คิวเทน

โคเอนไซม์คิวเทนเป็นสารประกอบของควิโนนในไขมันชนิดหนึ่ง เป็นสารที่ถูกใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง อาหารเสริม รวมถึงอุตสาหกรรมยาด้วย เนื่องจากมีความจำเป็นต่อร่างกายมนุษย์ ซึ่งในร่างกายมนุษย์ก็มีโคเอนไซม์คิวเทน โดยจะอยู่ในอวัยวะพวก หัวใจ ปอด ตับ ไต ม้าม ตับอ่อน และต่อมหมวกไต แต่เมื่ออายุมากขึ้นจะมีปริมาณลดลง โคเอนไซม์คิวเทนเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยป้องกันโรคต่างๆเช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคมะเร็ง ความดันโลหิตสูง เป็นต้น และยังช่วยส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกัน (Fan และคณะ, 2017; Saini, 2011) พบว่าแบคทีเรียพวก Anoxygenic phototrophic bacteria สามารถผลิตโคเอนไซม์คิวเทน ตัวอย่างชนิดของ PNSB ที่มีการศึกษาว่าสามารถผลิตโคเอนไซม์คิวเทนได้เช่น *Rhodobacter sphaeroides* และ *Rhodobacter capsulatus* สามารถผลิตโคเอนไซม์คิวเทนได้โดยใช้โมลาส น้ำหมักข้าวโพด แอลกอฮอล์ สิ่งปฏิกูลและแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน โดยสร้างได้ทั้งในสภาวะแบบมีแสงไม่มีอากาศ และไม่มีแสงมีอากาศ (Sasikala และ Ramana, 1995)

ความสามารถในการผลิต Poly *β*-hydroxy butyrate (PHB)

เนื่องจากปัจจุบัน พลาสติกเป็นสิ่งที่ย่อยสลายได้ยากจึงไม่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม PHB เป็นเทอร์โม-พลาสติกที่สามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้และมีคุณสมบัติคล้ายพลาสติกทั่วไป แบคทีเรียพวก PNSB สามารถใช้ผลิต PHB ได้ เนื่องจาก PHB เป็นพอลิเมอร์ที่สะสมอยู่ในเซลล์และจะสะสมเมื่ออยู่ในสภาวะอาหารไม่สมดุล ช่วยให้ PNSB สามารถอยู่รอดได้เมื่อขาดสารอาหาร PHB ได้รับความสนใจมากขึ้นเนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่จะทดแทนพลาสติกปิโตรเคมีในอนาคตได้ สามารถใช้สำหรับงานที่หลากหลาย อีกทั้งยังสามารถใช้อาหารที่มีต้นทุนต่ำในการ

ผลิตได้ (Merugu และคณะ, 2012; Monroy และ Buitron, 2020) PNSB จะผลิต PHB ได้แตกต่างกันจากสภาวะการเลี้ยงที่ต่างกัน ตัวอย่าง PNSB ที่ผลิต PHB ได้เช่น มีการศึกษาพบว่า *Rhodobacter sphaeroides* สร้าง PHB ได้เป็นสารประกอบหลักถึง 97% (Brandl และคณะ, 1991)

การผลิตแก๊สไฮโดรเจน

การผลิตไฮโดรเจนโดยวิธีการทางชีวภาพ เป็นกระบวนการที่ดี เนื่องจากมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมที่ต่ำ และสามารถใช้ของเสียเป็นสารตั้งต้นในการผลิตได้ ทำให้ประหยัดต้นทุนและเป็นการนำสิ่งที่ไม่ใช้แล้วกลับมาทำให้เป็นประโยชน์ได้ PNSB ได้รับความสนใจในการเป็นตัวผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากมีการเผาผลาญที่หลากหลาย สามารถใช้เศษวัสดุทางการเกษตรหรือน้ำเสียมาผลิตได้ โดยการผลิตไฮโดรเจนด้วย PNSB จะต้องใช้แสง ได้ทั้งไฮโดรเจนซึ่งเป็นแหล่งพลังงานสะอาดและยังช่วยบำบัดสิ่งสกปรก เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (Bianchi และคณะ, 2010; Merugu และคณะ, 2012; Monroy และ Buitron, 2020) ตัวอย่างการศึกษาการผลิตไฮโดรเจน เช่น *Rhodopseudomobas palustris* AV33 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนได้ดีสุดเมื่อใช้แลคเทตเป็นแหล่งคาร์บอน (Bianchi และคณะ, 2010)

การผลิตเอนไซม์ต่างๆ

PNSB สามารถผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติกซึ่งสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆได้ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร เอนไซม์สามารถนำไปปรับปรุงรสสัมผัสหรือรสชาติอาหารได้ ซึ่งการผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์เป็นวิธีการที่ประหยัดต้นทุนและมีความก้าวหน้าเป็นอย่างมากในปัจจุบัน (Merugu และคณะ, 2012; Raveendran และคณะ, 2018) ตัวอย่างเอนไซม์จากจุลินทรีย์ เช่น โปรตีเอส มีการศึกษาว่าสามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Rhodocyclus gelatinosus* ได้ ซึ่งเอนไซม์สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตนมเปรี้ยว โดยสามารถดัดแปลงเคซีนหรือหางนมเพื่อป้องกันการตกตะกอนโปรตีนจากกรดได้ (Sasikala และ Ramana, 1995)

เอนไซม์

เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวเคมี เอนไซม์มีอยู่ทั่วไปในธรรมชาติ สามารถผลิตได้จากสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ สิ่งมีชีวิตผลิตเอนไซม์เพื่อช่วยสังเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ ย่อยอาหาร และช่วยดูดซึมอาหาร การผลิตเอนไซม์จากพืชและสัตว์มีข้อจำกัดอยู่หากต้องการในปริมาณมาก เช่น เรื่องพื้นที่ สภาพแวดล้อมที่เจริญเติบโต

เป็นต้น จุลินทรีย์จึงเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ที่น่าสนใจ เนื่องจากเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์สามารถแยกออกได้ง่าย ได้ปริมาณสูง มีความเสถียรในสภาวะที่รุนแรง และใช้ต้นทุนต่ำกว่า เทคโนโลยีการผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์ในปัจจุบันมีความก้าวหน้าอย่างมาก มีการนำเอนไซม์ที่ได้ไปใช้ในทางการค้าและอุตสาหกรรมต่างๆ โดยเอนไซม์ไฮโดรไลติกเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ถูกใช้มากที่สุด ส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นไปที่เอนไซม์อะไมเลส โปรตีเอส และไลเปส (Volesky และคณะ, 1984; Nigam, 2013; Anbu และคณะ, 2017; Gopinath และคณะ, 2017)

อะไมเลส

เอนไซม์อะไมเลสสามารถพบได้ทั่วไป อะไมเลสที่มาจากแหล่งที่ต่างกันก็จะมีคุณสมบัติแตกต่างกัน อะไมเลสจากจุลินทรีย์เป็นที่ต้องการอย่างมาก เนื่องจากทนต่อความร้อนสูงได้ อะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่จุลินทรีย์ผลิตเพื่อย่อยสลายแป้งให้ได้เป็นน้ำตาล แบ่งได้ 3 ประเภท ได้แก่ อัลฟาอะไมเลส, เบต้าอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส ซึ่งแต่ละชนิดก็จะทำปฏิกิริยากับแป้งแตกต่างกัน อัลฟาอะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่ทำปฏิริยากับแป้งแล้วได้ออกมาเป็นกลูโคส (monosaccharide) และมอลโตส (disaccharide) มีการนำอัลฟาอะไมเลสไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมมากขึ้น อย่างเช่นในอุตสาหกรรมอาหาร มีการนำไปผลิตกลูโคสไซรัป หรือใช้ในการทำขนมปัง โดยเอนไซม์จะย่อยแป้งโดกลายเป็นเดกซ์ตริน จากนั้นยีสต์จะเปลี่ยนเดกซ์ตรินไปเป็นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และแอลกอฮอล์ ทำให้แป้งฟูได้ ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ มีการนำอะไมเลสมาใช้ปรับขนาดของเส้นใย และในอุตสาหกรรมยา อะไมเลสถูกใช้เป็นยาช่วยย่อยและรักษาโรคทางเดินอาหาร แบคทีเรียที่นิยมนำมาผลิตอะไมเลสคือพวก *Bacillus* เช่น *Bacillus subtilis* และ *Bacillus licheniformis* เป็นต้น (วิสูต แก้วมหา, 2556; Nigam, 2013; Gopinath และคณะ, 2017; Martin และคณะ, 2019)

โปรตีเอส

โปรตีเอสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีน ได้ออกมาเป็นเปปไทด์สายสั้น กรดอะมิโน และโอลิโกเปปไทด์ (มนัสชนก โยชน์ชัยสาร, 2562) โปรตีเอสจากจุลินทรีย์สามารถแบ่งได้ตามคุณสมบัติความเป็นกรดกลาง และเบส อีกทั้งยังแบ่งได้ตามหมู่ฟังก์ชันและตำแหน่งของเปปไทด์ โดยโปรตีเอสจากจุลินทรีย์มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง เนื่องจากจุลินทรีย์โตได้เร็ว ใช้พื้นที่น้อยแต่ผลิตโปรตีเอสได้มาก จุลินทรีย์ที่ผลิตโปรตีเอสได้มีทั้งแบคทีเรีย รา และยีสต์ ในอุตสาหกรรมมีการใช้อัลคาไลน์โปรตีเอสมากที่สุด เพราะมีแอก ทิวิตีสูงและสามารถทำงานภายใต้ภาวะที่มี pH และอุณหภูมิที่สูงได้ ปกติแล้วจุลินทรีย์จะหลั่งอัลคาไลน์โปรตีเอสออกมานอกเซลล์มาอยู่ที่ส่วนของเหลวด้านนอก ทำให้ง่ายต่อการนำไปใช้ มีการนำโปรตีเอสไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น ใน

อุตสาหกรรมเครื่องหนัง ได้ใช้โปรตีเอสในขั้นตอนการเตรียมพื้นผิวของหนัง การแช่ การอบ และการขจัดขนออก หรือในอุตสาหกรรมสิ่งทอจะมีสารที่ทำให้เกิดโปรตีนที่เรียกว่าเซริซินขึ้น จะใช้อัลคาไลน์โปรตีเอสในการกำจัดออก และยังไม่ทำลายเส้นใยด้วย ในอุตสาหกรรมยาและทางการแพทย์พบว่า อัลคาไลน์ไฟบริโนไลติกโปรตีเอสสามารถย่อยสลายไฟบรินได้ ทำให้เอนไซม์นี้ละลายลิ่มเลือดได้ จึงมีการศึกษาเพื่อที่จะนำไปใช้สำหรับผลิตยารักษาลิ่มเลือดอุดตันได้ และตัวอย่างอุตสาหกรรมที่ใช้โปรตีเอสอีกอย่างคือ ผงซักฟอก มีรายงานว่า *Bacillus subtilis* สามารถผลิตโปรตีเอสซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นส่วนผสมของผงซักฟอกได้ นอกจากนี้ยังมีการนำไปใช้เป็นส่วนผสมสำหรับทำความสะอาดฟันปลอมและคอนแทคเลนส์อีกด้วย (Santhi, 2014; Razzaq และคณะ, 2019)

ไลเปส

ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยไตรกลีเซอไรด์ โดยจะทำลายพันธะเอสเทอร์ได้เป็นโมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ และกรดไขมันอิสระ เจอไลเปสมีอยู่ทั้งในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์ดีกว่า เนื่องจากไลเปสที่ได้ส่วนใหญ่สามารถทำหน้าที่ในอุณหภูมิและ pHที่หลากหลายได้ จุลินทรีย์ที่ผลิตไลเปสสามารถพบได้ในแหล่งที่อยู่อาศัยที่หลากหลาย เช่น ของเสียจากอุตสาหกรรมโรงงานแปรรูปน้ำมันพืช ดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน กองปุ๋ยหมัก หรือแม้แต่ที่น้ำพุร้อนก็สามารถพบได้ อีกทั้งไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์จะมีชนิดและคุณสมบัติแตกต่างกัน จึงมีการศึกษาเพื่อนำไปใช้ให้เหมาะสมกับอุตสาหกรรมแต่ละอย่าง ตัวอย่างการใช้งานไลเปส เช่น ในอุตสาหกรรมอาหาร ใช้ไลเปสดัดแปลงไขมันที่ไม่พึงประสงค์ให้กลายเป็นสารที่สามารถใช้ทดแทนโกโก้บัตเตอร์ซึ่งเป็นสิ่งที่มีมูลค่าสูงสำหรับใช้ในการผลิตช็อกโกแลตได้ ในอุตสาหกรรมยา จากที่ไลเปสมีบทบาทในการผลิตกรดแกมมาไลโนเลนิกซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acid, PUFA) ถูกนำมาผลิตเป็นยาเวชสำอางได้ หรือในอุตสาหกรรมการซักล้าง ไลเปสจะถูกใช้ถึงแม้ว่าจะมีความจำเพาะต่อสับสเตรตต่ำ แต่ก็สามารถคงทนต่อสารลดแรงตึงผิว อุณหภูมิสูง และความเป็นด่างได้ นอกจากนี้ยังมีการใช้งานในอุตสาหกรรมอื่นๆ อีกมากมาย อย่างเช่น อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมการเกษตร การสังเคราะห์สารอินทรีย์ และใช้เพื่อเร่งการย่อยสลายกากไขมันและโพลียูรีเทน โดยไลเปสส่วนใหญ่ที่ใช้ทางการค้าและได้จากจุลินทรีย์มักจะผลิตไลเปสนอกเซลล์ และส่วนใหญ่ได้มาจากแบคทีเรียและรา เช่น แบคทีเรีย *Burkholderia cepacia* ใช้ในการสังเคราะห์สารอินทรีย์ (Sharma และคณะ, 2001; Gupta และคณะ, 2004; พัชรนันท์ อมรรัตนพันธ์, 2557)

ตัวอย่างการผลิตเอนไซม์ด้วยแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงที่ไม่สะสมกำมะถัน

Oda และคณะ (2004) แยก *Rubivivax gelatinosus* สายพันธุ์ KDDS1 จากแหล่งน้ำเสียของโรงงานอาหารทะเลและโรงงานยาง เมื่อนำมาเลี้ยงใน Glutamat-malate (GM) medium พบว่าสร้างเอนไซม์โปรตีเนสที่สภาวะที่มีอากาศน้อย มีแสง เมื่อทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์แล้วจะได้น้ำหนักโมเลกุล 32.5 กิโลดาลตัน มีแอกทิวิตีของเอนไซม์สูงสุดที่ 45 องศาเซลเซียส ที่ pH 9.6

Munjam และคณะ (2005) ศึกษาความสามารถในการผลิตไลเปสของ *Rhodopseudomonas palustris, Rhodobacter sphaeroides, Rhodocyclus gelatinosus* และ *Rhodocyclus tenuis* และดูความสามารถในการผลิตไลเปสในอาหารต่างๆ พบว่า *Rc. gelatinosus* และ *Rb. sphaeroides* ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดี โดย *Rc. gelatinosus* สามารถปรับเพื่อสร้างไลเปสได้ในอาหารต่างๆ

Yosuke และคณะ (2008) นำ *Rhodobacter sphaeroides* S ซึ่งเป็นที่นิยมในไปใช้บำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร นำมาเลี้ยงใน Glutamate-malate (GM) medium ที่มีน้ำมันสลัด พบว่าย่อยน้ำมันได้ 60% ในสภาวะที่มีออกซิเจน ไม่มีแสง แต่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน มีแสง น้ำมันถูกย่อยเพียงเล็กน้อย *Rb. sphaeroides* S สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เมื่อมีซับสเตรท เช่น กลูตาเมต-มาเลต และ กลูโคส ในการศึกษาผู้วิจัยทำการวิเคราะห์แอกทิวิตีของไลเปสในอาหารสามอย่าง ได้แก่ glutamate malate oil medium, glucose-oil และ oil basal medium ได้ผลว่า เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจนในที่มืด จะมีแอกมิวิตีของไลเปสมากที่สุด ในอาหาร glucose-oil medium หลังจากเลี้ยง 4 วัน ได้ 2.50 - 2.00 หน่วยต่อมิลลิลิตร

Merugu และคณะ (2010) ศึกษาเอนไซม์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ของ PNSB ผู้วิจัยได้แยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีแดงที่ไม่สะสมกำมะถัน ได้แก่ *Rhodobacter capsulatus* KU002 และ *Rhodopseudomonas acidophila* KU001 จากแหล่งน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมเครื่องหนัง นำมาบ่มที่สภาวะไม่มีออกซิเจน มีแสง พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ โดยสร้าง dextrinizing amylase สูงสุดเมื่อบ่ม 8 วัน ได้แอกทิวิตีของเอนไซม์ที่แสดงออกเป็นมิลลิกรัมของแป้งที่ย่อยเป็น 0.286 และ 0.180 ตามลำดับ และสร้าง saccharifying amylase ได้สูงสุดเมื่อบ่ม 8 วันเช่นกัน ได้เป็น 0.929 และ 0.418 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า *Rhodobacter capsulatus* KU002 สร้างเอนไซม์อะไมเลสได้มากกว่า *Rhodopseudomonas acidophila* KU001

เนื่องจากเอนไซม์อะไมเลส โปรตีเอส และไลเปส มีความสำคัญและมีประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมต่างๆอย่างมากมาย ซึ่งการผลิตเอนไซม์แต่ละชนิดจากจุลินทรีย์ได้รับความนิยมและมีการศึกษาอย่างกว้างขวาง และเมื่อพิจารณาประโยชน์ของแบคทีเรียสีม่วงแดงที่ไม่สะสมกำมะถันที่กล่าวมาก่อนหน้านี้แล้ว ทำให้มีความสนใจที่จะ

ศึกษา PNSB ที่สามารถผลิตเอนไซม์เหล่านี้ได้ เพื่อเพิ่มคุณค่าของแบคทีเรียที่จะใช้ในการผลิตเอนไซม์และยังสามารถสร้างสารต่างๆที่มีมูลค่าได้อีกในอนาคต

จากการศึกษาข้อมูลข้างต้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเนส อะไมเลส และไลเปส จากแหล่งน้ำในประเทศไทย ซึ่งเป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ประเทศไทยโดยการแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจากแหล่งน้ำที่เริ่มมีการเน่าเสีย หรือแหล่งน้ำที่มีการสะสมสารอินทรีย์จำนวนมาก บึง คลอง เนื่องจากแหล่งน้ำพวกนี้มีแหล่งคาร์บอนหรือไนโตรเจน สารอินทรีย์ต่ างๆ ที่แบคทีเรียสามารถใช้ในการสร้างเอนไซม์เหล่านี้ได้ งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่ผลิตเอนไซม์ทั้งสาม ได้แก่ โปรตีเนส อะไมเลส ไลเปส ในปริมาณสูง โดยมีเป้าหมายที่ต้องการใช้ PNSB ที่สามารถผลิตได้ทั้งอะไมเลส โปรตีเนส และไลเปล โดยใช้ทั้งเซลล์เพื่อนำไปผลิตอาหารสัตว์ หรือใช้ประโยชน์ในด้านอื่น

บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. หลอดแก้วฝาเกลียว ขนาด 20 มิลลิลิตร ของบริษัท BioMerieux, France
2. กระบอกตวง (Cylinder) ของบริษัท PYREX, USA
3. เครื่องชั่งหยาบ (Laboratory balance) รุ่น PG6002-S ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
4. เครื่องชั่งละเอียด (Analytical balance) รุ่น AG285 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
5. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น S20 SevenEasy ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
6. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ (Superspeed table-top centrifuge) รุ่น KUBOTA3700 ของบริษัท Kubota Corporation, Japan.
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (High speed refrigerated centrifuge) รุ่น Avanti J-301 ของบริษัท Beckman Coulter, USA
8. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Visible Spectrophotometer) รุ่น Genesys 30 และรุ่น 20 Genesys ของบริษัท Thermo Scientific, USA
9. เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA
10. หลอดเอพเพนดอร์ฟ (Eppendorf tube) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ของบริษัท AXYGEN, USA
11. จานเพาะเชื้อ (plastic petri dish) ของบริษัท QINGDAO AMA, China
12. กล่องสูญญากาศ (AnaeroPack Rectangular Jar) ขนาด 7 ลิตร ของบริษัท Mitsubishi Gas Chemical Company Inc. Japan.
13. ตู้นึ่งความดันไอฆ่าเชื้อแบบอัตโนมัติ (Autoclave) รุ่น SS-35 และรุ่น ES-315 ของบริษัท Tomy Seiko, Ltd., Japan. รุ่น MLS 3020 ของบริษัท Sanyo Co., Ltd., Japan. และ รุ่น HV-25 ของบริษัท Hirayama, Co., Ltd., Japan.
14. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow cabinet) รุ่น 25 Manometer ของบริษัท Dwyer Instrument, USA
15. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ของบริษัท Memmert, Germany
16. ตู้อบแห้ง (Oven) ของบริษัท Contherm Scientific, New Zealand.

17. ตู้แช่เยือกแข็ง (Deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ของบริษัท Sanyo Electric, Japan
18. หลอดไฟชนิดไส้ (Incandescent light bulb) ขนาด 60 วัตต์ ของบริษัท AXYGEN, USA
19. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ของบริษัท PYREX, USA
20. ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 100 200 1000 และ 5000 ไมโครลิตร ของบริษัท Gilson, France.
21. เครื่องเขย่า รุ่น Innova 2300 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA
22. หลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง (Cryotube) ของบริษัท Nalgene Nunc International, Denmark
23. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซิเทตขนาดรู 0.2 ไมโครเมตร ของบริษัท Sartorius Biolab Product, Germany
24. เข็มฉีดยาพลาสติกขนาด 20 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan
25. บีกเกอร์ (Beaker) ของบริษัท PYREX, USA
26. เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer) ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA
27. อ่างน้ำควบคุมอุณหูมิ (Water bath) ของบริษัท United Instrument, Thailand
28. เตาให้ความร้อน (Hot plate) ของบริษัท Torrey Pines Scientific, USA
29. ถุงมือยาง (Examination gloves) ของบริษัท Sri Trang Gloves, Thailand
30. ทิปไมโครปิเปต (Pipette Tios) ขนาด 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร ของบริษัท Hycon plastic
31. หลอดทดลอง (Test tube) ของบริษัท PYREX, USA

เคมีภัณฑ์

1. กรดมาลิก (DL-Malic acid) ของบริษัท Merck, Germany
2. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ของบริษัท Merck, Germany
3. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia
4. กรดบอริก (H_3BO_3) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia
5. ไดโซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($Na_2MoO_4{\cdot}2H_2O$) ของบริษัท Sigma, USA
6. แมกนีเซียมซัลเฟสเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4{\cdot}7H_2O$) ของบริษัท Merck, Germany
7. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
8. แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ของบริษัท Merck, Germany
9. ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4{\cdot}7H_2O$) ของบริษัท Sigma, USA

10. แมงกานีส (II) ซัลเฟตเตตระไฮเดรต ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$) ของบริษัท M.B. Laboratories, England
11. คอปเปอร์ (II) ไนเตรตไตรไฮเดรต ($Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$) ของบริษัท Sigma, USA
12. เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) ของบริษัท Sigma, USA
13. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) ของบริษัท Merck, Germany
14. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia
15. เอทิลีนไดอะมีนเตตราแอซิด (Ethylene diamine tetraacetic acid; EDTA) ของบริษัท Sigma, USA
16. ผงวุ้น (agar) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
17. โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต เตตระไฮเดรต ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia
18. เอทานอล (C_2H_5OH) ของบริษัท Merck, Germany
20. สารปฏิชีวนะนิสตาติน (Nystatin) ของบริษัท Bio Basic Inc., Canada
21. สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia
22. แป้ง (starch soluble) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia
23. เปปโตน (Peptone) ของบริษัท HiMedia, USA
24. หางนมผง (skim milk powder) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
25. กรด 3,5–ไดไนโตรซาลิไซลิค (3,5-Dinitrosalicylic acid) ของบริษัท Sigma, USA
26. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเฮปทะไฮเดรต ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$) ของบริษัท Merck, Germany
27. โมโนโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$) ของบริษัท Merck, Germany
28. กลีเซอรอลไตรบิวทิเรท (Glyceryl tributyrate) ของบริษัท Honeywell Fluka, Germany

บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 การคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

เก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำจืดเช่น คลอง แม่น้ำ ที่มีการปนเปื้อนสารอินทรีย์ แล้วนำตัวอย่างน้ำใส่ในอาหารเหลว RCVB (ภาคผนวก ก) ปริมาณ 16 มิลลิลิตร ที่อยู่ในหลอดฝาเกลียว ขนาด 20 มิลลิลิตร โดยเติมตัวอย่างน้ำให้เกือบเต็มหลอดเพื่อให้อยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจนน้อยและปิดฝาเกลียวให้สนิท เพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะ photoheterotroph โดยใช้แสงจากหลอดไฟแบบไส้ ที่ความเข้มแสงประมาณ 3,000-3,500 ลักซ์ (ใช้ขนาดไฟ 60 วัตต์ เป็นแหล่งกำเนิดแสง ระยะห่างประมาณ 30 เซนติเมตร วัดความเข้มแสงด้วย lux meter) ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7-12 วัน หรือจนกว่าจะมีสีแดง จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนเป็นสีชมพู สีแดง และสีน้ำตาล มา spread plate บนอาหารแข็ง RCVB บ่มภายใต้ภาวะเดียวกัน เป็นเวลา 2-7 วัน จากนั้นเลือกโคโลนีเดี่ยวที่แตกต่างกันจำนวน 3 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อไปขีดเชื้อ (streak plate) ที่อาหารแข็ง RCVB ใหม่ จนกว่าจะได้โคโลนีที่บริสุทธ์ คัดแยกจำนวนอย่างน้อย 50 สายพันธุ์ (ชื่นสุมน บุญเจริญ, 2559)

3.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงที่ไม่สะสมกำมะถัน

3.2.1 การเลี้ยงแบบภาวะ Photoheterotroph

ถ่ายโคโลนีเดี่ยวของแต่ละไอโซเลทของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงบนอาหารแข็ง RCVB ลงในอาหารเหลว RCVB ที่มีปริมาณ 20 มิลลิลิตร นำไปบ่มภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน ให้แสง 3,000-3,500 ลักซ์ อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 2-7 วัน เก็บรักษาสายพันธุ์โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยสารละลาย 0.85% NaCl เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว RCVB ที่เติมกลีเซอรอลปลอดเชื้อต่อเชื้อในอัตราส่วน 70 ต่อ 30 (ชื่นสุมน บุญเจริญ, 2559)

3.2.2 การเลี้ยงแบบภาวะ Chemoheterotroph

นำแต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว RCVB โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 5 มิลลิลิตร เขย่า

ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส ในที่ไม่มีแสง เป็นเวลา 2-5 วัน (ชื่นสุมน บุญเจริญ, 2559)

3.3 การคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่ผลิตโปรตีเนส อะไมเลส และไลเปสได้

นำเชื้อแต่ละไอโซเลทมาขีดลงบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสำหรับทดสอบการย่อยแป้ง (Starch agar) (Ranjekar และ Sridhar, 2002), อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสำหรับทดสอบการย่อยโปรตีน (Skim milk agar) (นุชจรินทร์ นนทรีย์ และคณะ, 2555), และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสำหรับทดสอบการย่อยไขมัน (Tributyrin agar) (Patel และคณะ, 2016) และใช้เชื้อควบคุมผลบวกคือ *Bacillus subtilis* ส่วนเชื้อควบคุมผลลบใช้ *Escherichia coli* บ่มที่ภาวะ Chemoheterotroph ตามข้อ 3.2.2 เป็นเวลา 3 วัน เพื่อทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ทั้งสามของเชื้อ โดยดูบริเวณใส (Clear zone) ที่เกิดขึ้น (Chumpol, 2017) วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสและเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี นำมาคำนวณความสามารถในการผลิตเอนไซม์เป็นค่าดัชนีเอนไซม์ (ดัชนีเอนไซม์ = เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส ÷ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี) (กุสุมาวดี ฐานเจริญ, 2561)

3.4 วิเคราะห์แอกทิวิตีของเอนไซม์

3.4.1 เตรียมหัวเชื้อสำหรับการทดสอบเอนไซม์ของเชื้อที่เจริญภายใต้ภาวะ chemoheterotroph

ดัดแปลงวิธีจาก อำพรรณ ชัยกุลเสรีวัฒน์ และสาวิตรี ล้ำเหลือหลาย (2553) นำไอโซเลทที่สามารถสร้างบริเวณใส (Clear zone) ขนาดใหญ่ที่สุด จำนวน 5 สายพันธุ์ เพื่อเตรียมหัวเชื้อ เขี่ยโคโลนีแต่ละไอโซเลทมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว RCVB ปริมาณ 50 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นปรับ O.D. ที่ 600 นาโนเมตร ให้ได้เท่ากับ 0.5

3.4.2 เตรียมหัวเชื้อสำหรับการทดสอบเอนไซม์ของเชื้อที่เจริญภายใต้ภาวะ photoheterotroph

นำเชื้อจากข้อ 3.4.1 มา 1 มิลลิลิตร เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว RCVB 19 มิลลิลิตร ในหลอดฝาเกลียว เลี้ยงภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน ให้แสง 3,000-3,500 ลักซ์ อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 2-5 วัน จนภายในหลอดมีสีชมพู แดง แดงน้ำตาล และแดงม่วง จากนั้นปรับ O.D. ที่ 660 นาโนเมตร ให้ได้เท่ากับ 0.5

3.4.3 การผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรตีเนส และไลเปส เมื่อเลี้ยงในภาวะ chemoheterotroph และ photoheterotroph

3.4.3.1 แอกทิวิตีของเอนไซม์อะไมเลส โปรตีเนส และไลเปส เมื่อเลี้ยงในภาวะ chemoheterotroph

ดัดแปลงวิธีจาก อำพรรณ ชัยกุลเสรีวัฒน์ และสาวิตรี ล้ำเหลือหลาย (2553) นำเชื้อที่ปรับ O.D. แล้ว จากข้อ 3.4.1 มา 10% (5 มิลลิลิตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 50 มิลลิลิตร โดยเป็นอาหารที่ดัดแปลงจากอาหาร RCVB แต่เติม starch soluble 1% เป็นแหล่งคาร์บอนแทน นำไปเลี้ยงเชื้อแบบบ่มเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่ 0, 2, 4, 6 และ 8 วัน เก็บเชื้อแต่ละวันมาใส่หลอดแอพเพนดอร์ฟ หลอดละ 1 มิลลิลิตร เพื่อนำไปทำให้เป็นเซลล์แห้ง ที่เหลือมานำไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสข้างบนไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปทดสอบแอกทิวิตีของเอนไซม์อะไมเลส (Samsrimuang และคณะ, 2011) ตามวิธีในข้อ 3.4.4

ดัดแปลงวิธีจาก มนัสชนก โยชน์ชัยสาร (2562) นำเชื้อที่ปรับ O.D. แล้ว จากข้อ 3.4.1 มา 10% (5 มิลลิลิตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 50 มิลลิลิตร โดยเป็นอาหารที่ดัดแปลงจากอาหาร RCVB แต่เติมเคซีน 1% นำไปเลี้ยงเชื้อแบบบ่มเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่ 0, 2, 4, 6 และ 8 วัน เก็บเชื้อแต่ละวันมาใส่หลอดแอพเพนดอร์ฟ หลอดละ 1 มิลลิลิตร เพื่อนำไปทำให้เป็นเซลล์แห้ง ที่เหลือนำไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสข้างบนไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปทดสอบ แอกทิวิตีของเอนไซม์ โปรตีเนส (Samsrimuang และคณะ, 2011) ตามวิธีในข้อ 3.4.5

ดัดแปลงวิธีจาก อลงกฎ แซมสีม่วง และคณะ (2554) นำเชื้อที่ปรับ O.D. แล้ว จากข้อ 3.4.1 มา 10% (5 มิลลิลิตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 50 มิลลิลิตร โดยเป็นอาหารที่ดัดแปลงจากอาหาร RCVB แต่เติมน้ำมันปาล์ม 1% นำไปเลี้ยงเชื้อโดยบ่มเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่ 0, 2, 4, 6 และ 8 วัน เก็บเชื้อแต่ละวันมาใส่หลอดแอพเพนดอร์ฟ หลอดละ 1 มิลลิลิตร เพื่อนำไปทำให้เป็นเซลล์แห้ง ที่เหลือนำไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสข้างบนไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปทดสอบแอกทิวิตีของเอนไซม์ไลเปส (Samsrimuang และคณะ, 2011) ตามวิธีในข้อ 3.4.6

3.4.3.2 แอกทิวิตีของเอนไซม์อะไมเลส โปรตีเนส และไลเปส เมื่อเลี้ยงในภาวะ photoheterotroph

ดัดแปลงวิธีจากอำพรรณ ชัยกุลเสรีวัฒน์ และสาวิตรี ล้ำเหลือหลาย (2553) นำเชื้อที่ปรับ O.D. แล้ว จากข้อ 3.4.2 มา 10% (2 มิลลิลิตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวภายในหลอดฝาเกลียว ขนาด 20 มิลลิลิตร เมื่อเติมเชื้อแล้วให้เติมอาหารจนให้อากาศเหลือน้อยที่สุดแล้วปิดด้วยฝาเกลียว อาหารที่ใช้เป็นอาหารที่ดัดแปลงจากอาหาร RCVB แต่เติม starch soluble 1% เป็นแหล่งคาร์บอนแทน นำไปเลี้ยงภายใต้ภาวะออกซิเจนน้อย ให้แสง 3,000-3,500 ลักซ์ อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 ± 2 องศาเซลเซียส) เก็บตัวอย่างที่ 0, 2, 4, 6 และ 8 วัน เชื้อแต่ละวันมาใส่หลอดแอพเพนดอร์ฟ หลอดละ 1 มิลลิลิตร เพื่อนำไปทำให้เป็นเซลล์แห้ง ที่เหลือนำไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสข้างบนไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปทดสอบแอกทิวิตีของเอนไซม์อะไมเลส (Samsrimuang และคณะ, 2011) ตามวิธีในข้อ 3.4.4

ดัดแปลงวิธีจาก มนัสชนก โยชน์ชัยสาร (2562) นำเชื้อที่ปรับ O.D. แล้ว จากข้อ 3.4.2 มา 10% (2 มิลลิลิตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวภายในหลอดฝาเกลียว ขนาด 20 มิลลิลิตร เมื่อเติมเชื้อแล้วให้เติมอาหารจน ให้อากาศเหลือน้อยที่สุดแล้วปิดด้วยฝาเกลียว อาหารที่ใช้เป็นอาหารที่ดัดแปลงจากอาหาร RCVB แต่เติมเคซีน 1% นำไปเลี้ยงภายใต้ภาวะออกซิเจนน้อย ให้แสง 3,000-3,500 ลักซ์ อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 ± 2 องศาเซลเซียส) เก็บตัวอย่างที่ 0, 2, 4, 6 และ 8 วัน เก็บเชื้อแต่ละวันมาใส่หลอดแอพเพนดอร์ฟ หลอดละ 1 มิลลิลิตร เพื่อนำไปทำให้เป็นเซลล์แห้ง ที่เหลือนำไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสข้างบนไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปทดสอบแอกทิวิตีของเอนไซม์ โปรตีเนส (Samsrimuang และคณะ, 2011) ตามวิธีในข้อ 3.4.5

ดัดแปลงวิธีจาก อลงกฎ แซมสีม่วง และคณะ(2011) นำเชื้อที่ปรับ O.D. แล้ว จากข้อ 3.4.2 มา 10% (2 มิลลิลิตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวภายในหลอดฝาเกลียว ขนาด 20 มิลลิลิตร เมื่อเติมเชื้อแล้วให้เติมอาหารจนให้อากาศเหลือน้อยที่สุดแล้วปิดด้วยฝาเกลียว อาหารที่ใช้เป็นอาหารที่ดัดแปลงจากอาหาร RCVB แต่เติมน้ำมันปาล์ม 1% นำไปเลี้ยงภายใต้สภาวะออกซิเจนน้อย ให้แสง 3,000-3,500 ลักซ์ อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 ± 2 องศาเซลเซียส) เก็บเชื้อที่ 0, 2, 4, 6 และ 8 วัน เก็บเชื้อแต่ละวันมาใส่หลอดแอพเพนดอร์ฟ หลอดละ 1 มิลลิลิตร เพื่อนำไปทำให้เป็นเซลล์แห้ง ที่เหลือนำไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกที่ความเร็วรอบ 10,000

รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสข้างบนไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปทดสอบแอกทิวิตีของเอนไซม์ไลเปส (Samsrimuang และคณะ, 2011) ตามวิธีในข้อ 3.4.6

3.4.4 ทดสอบแอกทิวิตีเอนไซม์อะไมเลส

ดัดแปลงวิธีจาก นิภาภรณ์ จิตเชาวนะและคณะ (2558) ใช้สารละลาย soluble starch เป็นสับสเตรท เข้มข้น 1% ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลายเอนไซม์ (ส่วนใส) 0.5 มิลลิลิตร บ่มต่ออีกเป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมสารละลาย 3,5 dinitrosalicylic acid (DNS) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อการหยุดปฏิกิริยา นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทำให้เย็นลงทันที เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง 540 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นแบลงค์ ชุดควบคุมให้เติม DNS ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในสารละลายเอนไซม์ 0.25 มิลลิลิตร เติม soluble starch 0.25 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 5 นาที เติมน้ำ 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง 540 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ในการทดลองมาหักลบด้วยค่าที่ได้ในชุดควบคุมแล้วเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส โดยกำหนดให้เอนไซม์ 1 ยูนิต หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนสับสเตรทใต้สภาวะที่กำหนด 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด คำนวณแอกทิวิตีของอะไมเลส (วิสูตร แก้วมหา, 2556) และแอกทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ จากสูตรดังนี้

$$\text{แอกทิวิตีของอะไมเลส (ยูนิต/มิลลิลิตร)} = \frac{[(A-B)xa]}{C} \boldsymbol{x} \frac{1000}{MW} \boldsymbol{x} \frac{1}{D} \boldsymbol{x} \frac{1}{E}$$

A = OD_{540} ของชุดทดลอง

B = OD_{540} ของชุดควบคุม

C = ค่าความชันของกราฟมาตรฐานกลูโคส

MW = มวลโมเลกุลของกลูโคส

a = ค่าเจือจาง

D = เวลาที่ทำปฏิกิริยา

E = ปริมาตรเอนไซม์ที่ทดลอง

$$\text{แอกทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ (ยูนิต/กรัม)} = \frac{\text{แอกทิวิตีอะไมเลส } \left(\frac{\text{ยูนิต}}{\text{มิลลิลิตร}}\right)}{\text{น้ำหนักแห้ง } \left(\frac{\text{กรัม}}{\text{มิลลิลิตร}}\right)}$$

3.4.5 ทดสอบแอกทิวิตีเอนไซม์โปรตีเนส

ใช้สารละลายเคซีนเป็นสับสเตรท 1% ในสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาเติม Trichloroacetic acid (TCA) เข้มข้น 110 มิลลิโมลาร์ เพื่อหยุดปฏิกิริยา ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสมา 1 มิลลิลิตร ผสมกับ สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.5 โมลาร์ 2 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย Folin's reagent 0.5 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร แบลงค์ใช้น้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5 มิลลิลิตร ส่วนชุดควบคุมใช้ส่วนใสจากแบคทีเรีย 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5 มิลลิลิตร เทียบกับกราฟมาตรฐานไทโรซีน กำหนดให้เอนไซม์ 1 ยูนิต เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตไทโรซีน 1 ไมโครโมล ต่อนาที คำนวณแอกทิวิตีของเอนไซม์โปรตีเนส และแอกทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ ตามสูตรดังนี้ (มนัสชนก โยชน์ชัยสาร., 2562)

$$\text{แอกทิวิตีของโปรตีเนส (ยูนิต/มิลลิลิตร)} = \frac{[AxBxC]}{DxExF}$$

A = ปริมาณไทโรซีนที่ถูกปล่อยออกมา (ไมโครโมลาร์)

B = ปริมาตรทั้งหมด (มิลลิลิตร)

C = ค่าเจือจาง

D = ปริมาตรเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลอง (มิลลิลิตร)

E = เวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยา (นาที)

F = ปริมาตรที่ใช้ในคูเวท (มิลลิลิตร)

$$\text{แอกทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ (ยูนิต/กรัม)} = \frac{\text{แอกทิวิตีอะไมเลส } \left(\frac{\text{ยูนิต}}{\text{มิลลิลิตร}}\right)}{\text{น้ำหนักแห้ง } \left(\frac{\text{กรัม}}{\text{มิลลิลิตร}}\right)}$$

3.4.6 ทดสอบแอกทิวิตีเอนไซม์ไลเปส

ดัดแปลงจาก พัชรนันท์ อมรรัตนพันธ์ (2557) เตรียมสารละลาย ก. โดยใช้ 4-nitrophenyl palmitate 30 มิลลิกรัม ละลายใน 2-propanol 10 มิลลิลิตร และเตรียมสารละลาย ข. โดยใช้ Triton X-100 0.4 กรัม และ Gum Arabic 0.10 กรัม ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ 90 มิลลิลิตร pH 7 นำ

สารละลาย ก. 0.2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย ข. 1.8 มิลลิลิตร เติมสารละลายเอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตร นำไปอุ่นในอ่างน้ำร้อน 37 องศาเซลเซียส 15 นาที จากนั้นเติมโซเดียมคาร์บอเนต 2.9 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร โดยใช้แบลงค์เป็นสารละลาย ข. และใช้ชุดควบคุมเป็นสารละลาย ข. ผสมกับเอนไซม์ นำไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน 4-nitrophenol กำหนดให้เอนไซม์ 1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณที่เอนไซม์ปล่อย 4-nitrophenol 1 ไมโครโมล จาก 4-nitrophenyl palmitate ในเวลา 1 นาที คำนวณแอกทิวิตีของเอนไซม์ไลเปส และแอกทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ ตามสูตรดังนี้

$$\text{แอกทิวิตีไลเปส (ยูนิต/มิลลิลิตร)} = \frac{\left[\frac{(A-B)}{C}\right]xD}{axbxc}$$

A = OD_{410} ของชุดทดลอง

B = OD_{410} ของชุดควบคุม

C = ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน 4-nitophenol

D = ปริมาตรทั้งหมดของสารละลาย

a = เวลา

b = ปริมาตรของเอนไซม์

c = มวลโมเลกุลของ 4-nitrophenol

$$\text{แอกทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ (ยูนิต/กรัม)} = \frac{\text{แอกทิวิตีอะไมเลส } \left(\frac{\text{ยูนิต}}{\text{มิลลิลิตร}}\right)}{\text{น้ำหนักแห้ง } \left(\frac{\text{กรัม}}{\text{มิลลิลิตร}}\right)}$$

3.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

3.5.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งที่เป็นโคโลนีและเซลล์ ดูลักษณะการติดสีแกรม ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อ ทั้งภายใต้ภาวะ photoheterotroph และ chemoheterotroph (ชื่นสุมน บุญเจริญ, 2559)

3.5.2 พิสูจน์เอกลักษณ์ของ PNSB โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16s rRNA

นำ PNSB ที่เลือก มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง RCVB บ่มภายใต้ภาวะ photoheterotroph อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-7 วัน จากนั้นส่งไปที่บริษัท Macrogen เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rRNA นำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) แล้วสร้างแผนภูมิต้นไม้โดยใช้โปรแกรม MEGA X (ชื่นสุมน บุญเจริญ, 2559)

บทที่4

ผลการทดลอง

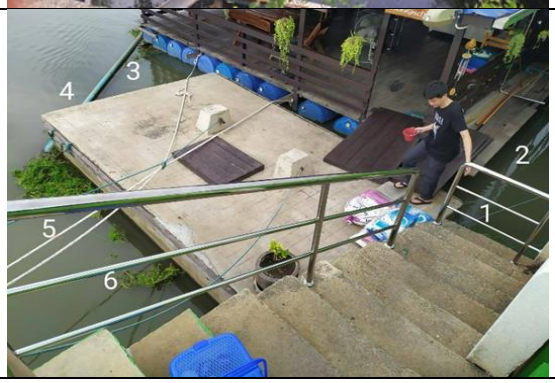
4.1 การคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

4.1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำบริเวณท่าน้ำที่วัดนางสาวและวัดบางปลา และคลองบริเวณชุมชนในอำเภอกระทุ่มแบน จังหวัดสมุทรสาคร และตัวอย่างจากท่าน้ำในอำเภอสองพี่น้อง จังหวัดสุพรรณบุรี โดยแต่ละแหล่งจะเก็บตัวอย่าง 4-6 จุด

ตารางที่ 4.1 แสดงแหล่งที่เก็บตัวอย่างน้ำและลักษณะของตัวอย่างน้ำ

แหล่งที่เก็บ	ภาพแหล่งเก็บ	บริเวณที่เก็บ	ลักษณะของน้ำ	pH	ตัวอย่างที่เก็บจากแหล่งนี้
1		ท่าน้ำที่วัดบางปลา จังหวัสมุทรสาคร	ขุ่น	7.45	A1, A2, A3, A4
2		ท่าน้ำที่วัดนางสาว จังหวัดสมุทรสาคร	ค่อนข้างใส	7.12	B1, B2, B3, B4

แหล่งที่เก็บ	ภาพแหล่งเก็บ	บริเวณที่เก็บ	ลักษณะของน้ำ	pH	ตัวอย่างที่เก็บจากแหล่งนี้
3		คลองแนวลิขิต จังหวัดสมุทรสาคร	ขุ่นดำ	7.50	C1, C2, C3, C4
4		คลองสองพี่น้อง จังหวัดสุพรรณบุรี	ค่อนข้างใส	6.97	D1, D2, D3, D4, D5, D6

ลักษณะสถานที่และตัวอย่างที่เก็บจากแหล่งที่หนึ่งคือ บริเวณท่าน้ำมีพืช น้ำค่อนข้างแห้งเป็นโคลน มีความขุ่น มีตะกอนดินเล็กๆจำนวนมาก ค่า pH เฉลี่ยเท่ากับ 7.45 ตัวอย่างที่เก็บจากแหล่งที่สอง บริเวณท่าน้ำมีลักษณะค่อนข้างใส มีปลาเนื่องจากมีคนคอยให้อาหารปลาเรื่อยๆ มีผักตบชวาค่อนข้างมาก ค่า pH เฉลี่ยเท่ากับ 7.12 ตัวอย่างที่เก็บจากแหล่งที่สาม บริเวณรอบคลองเป็นคันดิน มีพืชหลากหลาย น้ำค่อนข้างดำเนื่องจากมีการปล่อยน้ำเสียจากบ้านเรือนบริเวณนั้น ค่า pH เฉลี่ย 7.50 และตัวอย่างที่เก็บจากแหล่งที่สี่ เป็นท่าน้ำที่น้ำค่อนข้างใส มีตะกอนเล็กน้อย มีพืช ค่า pH เฉลี่ยเท่ากับ 6.97

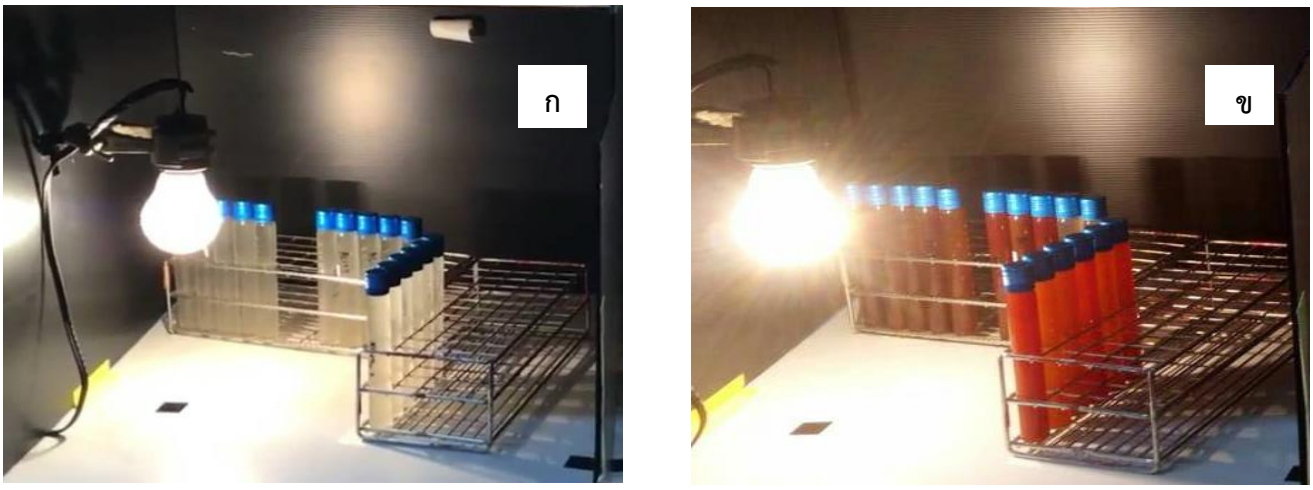
4.1.2 การคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงที่ไม่สะสมกำมะถัน

เมื่อนำตัวอย่างน้ำที่สุ่มเก็บมาจากแหล่งต่างๆในจังหวัดสมุทรสาครและสุพรรณบุรี 4 แหล่ง มาคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงที่ไม่สะสมกำมะถันโดยนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว RCVB (Weaver และคณะ, 1975) (ภาคผนวก ก.) ภายใต้ภาวะ photoheterotroph ที่ความเข้มแสง 3,000-3,500 ลักซ์ เป็นเวลา 3-7 วัน ตามวิธีในข้อ 3.1 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของสี จากไม่มีสีกลายเป็นสีชมพู แดง ม่วงแดง หรือน้ำตาลแดง จากนั้นนำหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเปลี่ยนเป็นชมพู แดง ม่วงแดง และน้ำตาลแดงไปคัดแยกเชื้อ

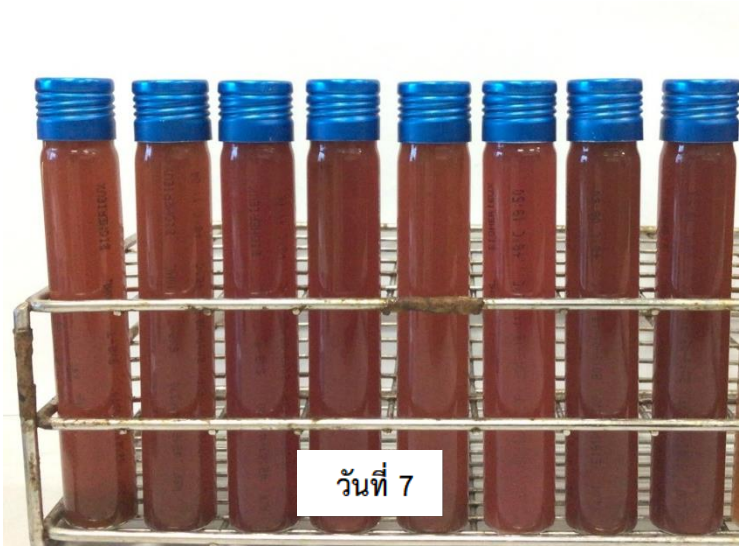
โดยการ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง RCVB แล้วเลี้ยงภายใต้สภาวะดังกล่าวข้างต้น พบว่ามีโคโลนีสีเหลือง ขาว แดง ชมพู ม่วงแดง และน้ำตาลแดงเกิดขึ้น จากนั้นเลือกเฉพาะโคโลนีสีชมพู แดง ม่วงแดง และน้ำตาลแดงจากจานเพาะเชื้อจานละ 3 โคโลนี นำไป streak plate บนอาหารเดียวกันจนได้เชื้อบริสุทธิ์ จากการคัดแยกสามารถคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงได้ทั้งหมด 66 ไอโซเลท โดยแยกได้จากท่าน้ำวัดบางปลา จ.สมุทรสาคร 8 ไอโซเลท ท่าน้ำวัดนางสาว จ.สมุทรสาคร 16 ไอโซเลท คลองลิขิต จ.สมุทรสาคร 15 ไอโซเลท และ คลองสองพี่น้อง จ.สุพรรณบุรี 27 ไอโซเลท ดังแสดงในตาราง 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงจำนวนและข้อมูลแต่ละไอโซเลทของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำแต่ละตัวอย่าง

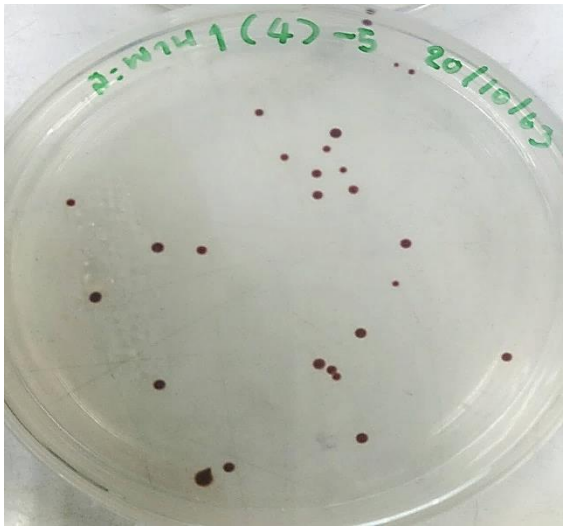
สถานที่เก็บตัวอย่าง	รหัสแบคทีเรีย
ท่าน้ำวัดบางปลา จ. สมุทรสาคร	SK1, SK2, SK3, SK4, SK15, SK19, SK20, SK21
ท่าน้ำวัดนางสาว จ. สมุทรสาคร	SK23, SK24, SK26, SK27, SK28, SK29, SK30, SK31, SK32, SK33, SK34, SK35, SK36, SK37, SK38, SK29
คลองแนวลิขิต จ. สมุทรสาคร	SK5, SK6, SK7, SK8, SK9, SK10, SK11, SK12, SK13, SK14, SK16, SK17, SK18, SK22, SK25
คลองสองพี่น้อง จ. สุพรรณบุรี	SP1-SP27



รูปที่ 4.1 การเพาะเลี้ยง PNSB ใต้ภาวะ photoheterotroph วันที่ 1 (ก) และ วันที่ 7 (ข)



รูปที่ 4.2 PNSB ไอโซเลทต่างๆที่เลี้ยงในภาวะ photoheterotroph ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว RCVB เป็นเวลา 7 วัน



รูปที่ 4.3 ลักษณะโคโลนีของ PNSB ที่คัดแยกโดยการ spread plate

4.2 การคัดกรองแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่ผลิตโปรตีเนส อะไมเลส และไลเปสได้

เมื่อนำแต่ละไอโซเลทที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำแต่ละแห่ง มาทดสอบการผลิตเอนไซม์อะไมเลส, โปรตีเนส และไลเปส โดย streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง starch agar, skim milk agar และ tributyrin agar ตามลำดับ ตามวิธีในข้อ 3.3 แล้วนำไปบ่มภายใต้ภาวะ chemoheterotroph อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3

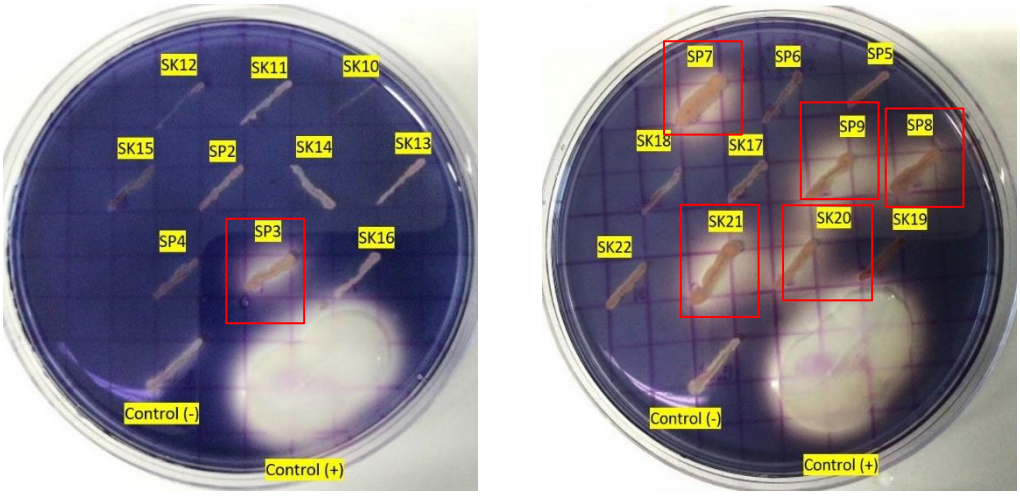
วัน จะพบว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่สามารถผลิตเอนไซม์มาย่อยสารตั้งต้นบนอาหารทั้ง 3 ชนิดได้จะเกิดบริเวณใส (Clear zone) รอบโคโลนีขึ้น

4.2.1 การคัดกรอง PNSB ที่สามารถผลิตอะไมเลสได้

จากผลการคัดกรองพบว่า จาก 66 ไอโซเลท มีไอโซเลทที่เกิดบริเวณใส (Clear zone) ขึ้นรอบโคโลนีบนอาหาร starch agar เป็นจำนวน 6 ไอโซเลท แสดงว่าสามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสมาย่อยสารตั้งต้นในอาหาร starch agar ได้ โดยเรียงลำดับจากบริเวณใสขนาดใหญ่ที่สุดไปเล็กที่สุดคือ SP9, SK20, SK21, SP3, SP8 และ SP7

ตารางที่ 4.3 ผลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง clear zone เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดโคโลนี และดัชนีเอนไซม์อะไมเลส

ไอโซเลท	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง clear zone (mm)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (mm)	ดัชนีเอนไซม์อะไมเลส
SP3	4.80	2.00	2.40
SP7	5.25	3.25	1.62
SP8	4.80	2.23	2.23
SP9	5.95	3.05	3.05
SK20	5.10	2.76	2.76
SK21	6.15	2.62	2.62



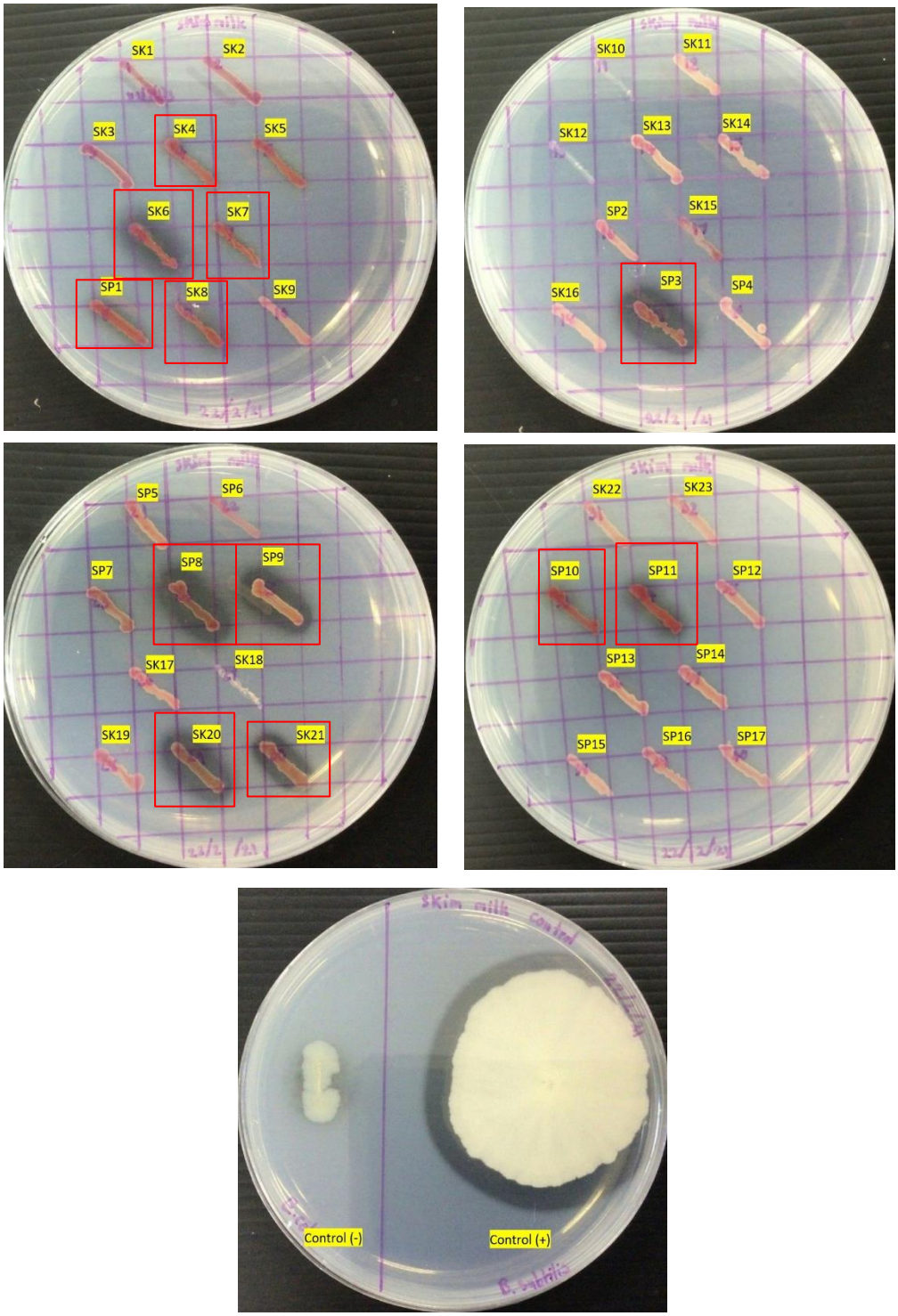
รูปที่ 4.4 บริเวณใส (Clear zone) ของ PNSB สายพันธุ์ต่างๆที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส ผลควบคุมบวกคือ *Bacillus subtilis* ผลควบคุมลบคือ *Escherichia coli* และสายพันธุ์ที่ย่อยสลายได้ดีแสดงในกรอบสีแดง

4.2.2 การคัดกรอง PNSB ที่สามารถผลิตโปรตีเนสได้

จากผลการคัดกรองพบว่า จาก 66 ไอโซเลท มีไอโซเลทที่เกิดบริเวณใส (Clear zone) ขึ้นรอบโคโลนีบนอาหาร skim milk agar เป็นจำนวน 12 ไอโซเลท แสดงว่าสามารถสร้างเอนไซม์โปรตีเนสมาย่อยสารตั้งต้นในอาหาร skim milk agar ได้ โดยเรียงลำดับจากบริเวณใสขนาดใหญ่ที่สุดไปเล็กที่สุดคือ SK6, SP3, SK20, SP9, SP8, SK21, SP11, SP10, SK8, SK7, SP1 และ SK4

ตารางที่ 4.4 ผลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง clear zone เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดโคโลนี และดัชนีเอนไซม์โปรตีเนส

ไอโซเลท	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง clear zone (mm)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (mm)	ดัชนีเอนไซม์โปรตีเนส
SK4	2.80	1.90	1.47
SK6	7.35	1.25	5.88
SK7	1.75	0.90	1.94
SP1	4.25	2.55	1.67
SK8	4.15	1.90	2.18
SP3	11.70	2.45	4.78
SK20	9.65	2.25	4.29
SK21	7.40	2.70	2.74
SP10	5.55	2.55	2.18
SP11	6.20	2.60	2.38
SP8	9.45	2.90	3.26
SO9	8.40	2.30	3.65



รูปที่ 4.5 บริเวณใส (Clear zone) ของ PNSB สายพันธุ์ต่างๆที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเนส ผลควบคุมบวกคือ *Bacillus subtilis* ผลควบคุมลบคือ *Escherichia coli* และสายพันธุ์ที่ย่อยสลายได้ดีแสดงในกรอบสีแดง

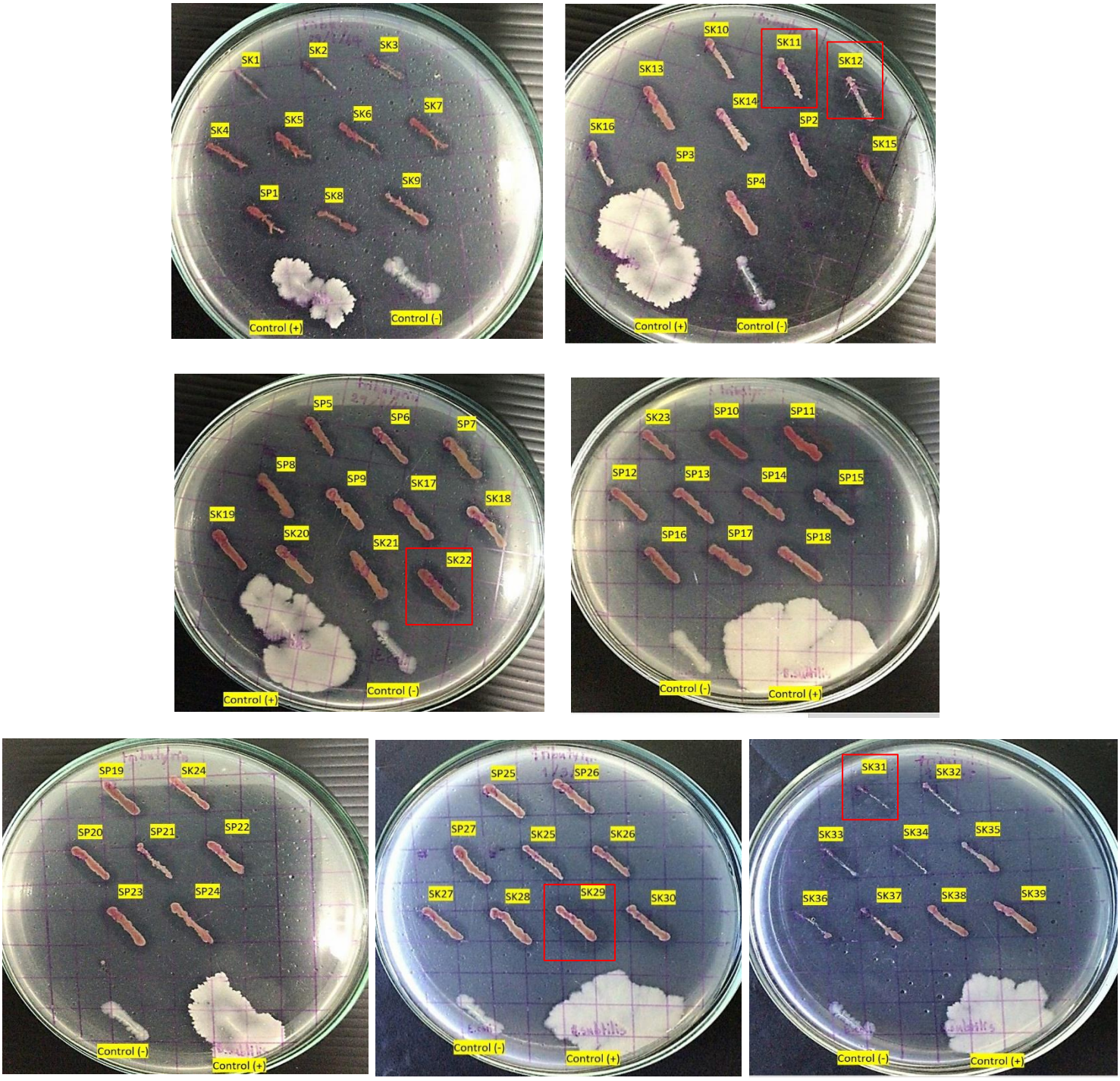
4.2.3 การคัดกรอง PNSB ที่สามารถผลิตไลเปสได้

จากผลการคัดกรองพบว่า ทั้ง 66 ไอโซเลท เกิดบริเวณใส (Clear zone) ได้ แสดงว่าสามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสย่อยสารตั้งต้นในอาหาร tributyrin agar ได้ โดย 5 ไอโซเลทแรกที่แสดงผลย่อยได้ดีที่สุดเรียงลำดับจากมากไปน้อย ได้แก่ SK31, SK12, SK29, SK21 และ SK11

ตารางที่ 4.5 ผลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง clear zone เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดโคโลนี และดัชนีเอนไซม์ไลเปส

ไอโซเลท	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง clear zone (mm)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (mm)	ดัชนีเอนไซม์ไลเปส	ไอโซเลท	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง clear zone (mm)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (mm)	ดัชนีเอนไซม์ไลเปส
SK1	4.15	0.90	4.61	SP4	8.10	2.40	3.38
SK2	2.70	1.25	2.10	SP5	6.30	2.30	2.74
SK3	3.00	1.45	2.07	SP6	6.30	1.75	3.60
SK4	6.30	1.25	5.04	SP7	8.80	2.50	3.52
SK5	7.65	1.70	4.50	SP8	12.25	2.25	5.57
SK6	5.85	1.25	4.68	SP9	9.45	3.00	3.15
SK7	6.65	1.25	5.32	SK17	7.30	2.25	3.24
SP1	5.85	1.80	3.25	SK18	8.45	2.20	3.84
SK8	5.45	1.25	4.36	SK19	5.10	2.75	1.85
SK9	6.35	1.35	4.68	SK20	8.55	2.45	3.49
SK10	6.25	1.20	5.20	SK21	10.00	2.35	4.26
SK11	8.75	1.30	6.73	SK22	9.75	2.35	4.15
SK12	11.50	1.35	8.52	SK23	6.90	2.00	3.45
SK13	7.00	3.00	2.33	SP10	8.30	2.35	3.53
SK14	7.25	2.20	3.30	SP11	9.00	3.55	2.54
SP2	8.20	1.65	4.97	SP12	6.85	2.20	3.11
SK15	6.25	2.00	3.12	SP13	7.65	2.30	3.33
SK16	5.15	1.05	4.90	SP14	7.80	2.45	3.18
SP3	7.00	2.00	3.50	SP15	9.55	3.00	3.18

ไอโซเลท	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง clear zone (mm)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (mm)	ดัชนีเอนไซม์ไลเปส	ไอโซเลท	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง clear zone (mm)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (mm)	ดัชนีเอนไซม์ไลเปส
SP16	9.70	2.55	3.80	SK28	7.10	2.50	2.84
SP17	8.00	2.85	2.81	SK29	16.10	2.25	7.16
SP18	7.75	2.60	2.98	SK30	6.55	2.05	3.20
SP19	8.20	2.80	2.93	SK31	9.20	0.40	23.00
SK24	7.65	2.35	3.26	SK32	6.50	1.75	3.71
SP20	8.30	2.30	3.61	SK33	5.65	1.05	5.38
SP21	6.60	0.95	6.95	SK34	3.30	0.70	4.71
SP22	7.50	2.20	3.41	SK35	5.40	1.55	3.48
SP23	8.25	2.35	3.51	SK36	7.30	1.25	5.84
SP24	7.65	2.35	3.25	SK37	5.90	1.40	4.21
SP25	7.30	2.45	2.98	SK38	6.35	1.60	3.97
SP26	6.10	1.50	4.07	SK39	6.50	1.25	5.20
SP27	7.45	2.05	3.63				
SK25	5.95	1.80	3.30				
SK26	5.35	1.30	4.11				
SK27	7.85	2.00	3.92				



รูปที่ 4.6 บริเวณใส (Clear zone) ของ PNSB สายพันธุ์ต่างๆที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส ผลควบคุมบวกคือ *Bacillus subtilis* ผลควบคุมลบคือ *Escherichia coli* และสายพันธุ์ที่ย่อยสลายได้ดีแสดงในกรอบสีแดง

4.3 การวิเคราะห์แอกทิวิตีของเอนไซม์ต่างๆ

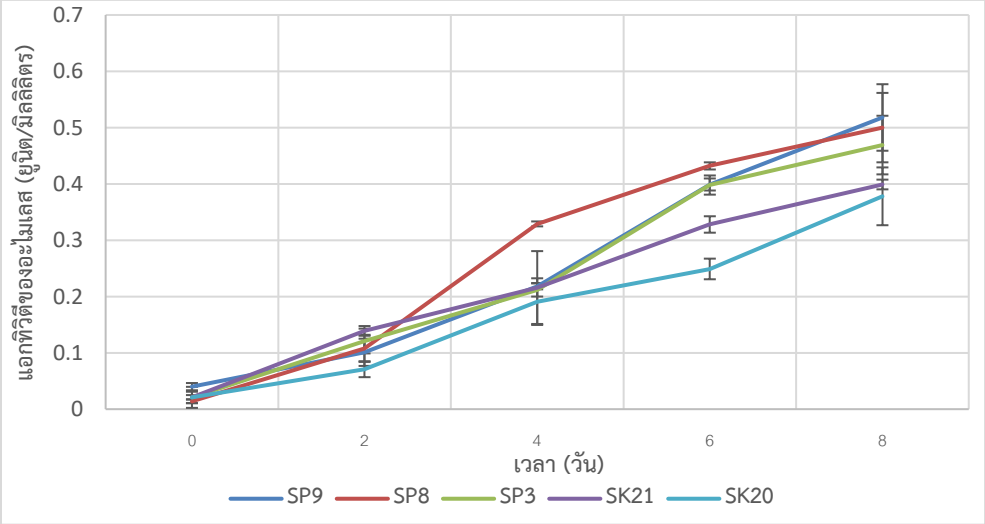
4.3.1 แอกทิวิตีของเอนไซม์ต่างๆ เมื่อเลี้ยงเซลล์ในภาวะ chemoheterotroph

4.3.1.1 แอกทิตีของเอนไซม์อะไมเลส

จากผลการคัดกรอง PNSB ที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้โดยสังเกตจากการเกิดเคลียร์โซน (Clear zone) บนอาหารแข็ง starch agar ได้เลือกไอโซเลทที่ให้ผลดัชนีสูงสุด 5 อันดับแรก เรียงจากมากไปน้อย ดังนี้ SP9, SK20, SK21, SP3 และ SP8 แล้วนำแต่ละไอโซเลทมาเตรียมเป็นหัวเชื้อแล้วเลี้ยงในอาหารที่ดัดแปลงจากอาหาร RCVB แต่เติม starch soluble 1% เป็นแหล่งคาร์บอนแทน เลี้ยงภายใต้ภาวะ Chemoheterotroph เก็บตัวอย่างที่ 0, 2, 4, 6, และ 8 วัน โดยนำเชื้อแต่ละวันมาทำเซลล์แห้งและวิเคราะห์แอกทิวิตีของเอนไซม์อะไมเลสได้ผลดังตารางที่ 4.6 พบว่าแต่ละไอโซเลทมีแอกทิวิตีอะไมเลสสูงสุดในวันที่ 8 โดยไอโซเลทที่มีแอกทิวิตีสูงสุดคือ SP9 ได้เท่ากับเท่ากับ 0.518 ± 0.06 ยูนิต/มิลลิลิตร

ตารางที่ 4.6 แอกทิวิตีของอะไมเลสของสายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะ chemoheterotroph

เวลา (วัน)	แอกทิวิตีของอะไมเลส (ยูนิต/มิลลิลิตร)				
	SP9	SP8	SP3	SK21	SK20
0	0.040 ± 0.01	0.014 ± 0.01	0.021 ± 0.02	0.021 ± 0.01	0.021 ± 0.01
2	0.101 ± 0.02	0.108 ± 0.02	0.121 ± 0.02	0.139 ± 0.01	0.071 ± 0.02
4	0.218 ± 0.01	0.329 ± 0.01	0.212 ± 0.01	0.216 ± 0.07	0.191 ± 0.04
6	0.399 ± 0.01	0.432 ± 0.01	0.398 ± 0.02	0.328 ± 0.01	0.249 ± 0.02
8	0.518 ± 0.06	0.500 ± 0.06	0.469 ± 0.05	0.399 ± 0.01	0.378 ± 0.05



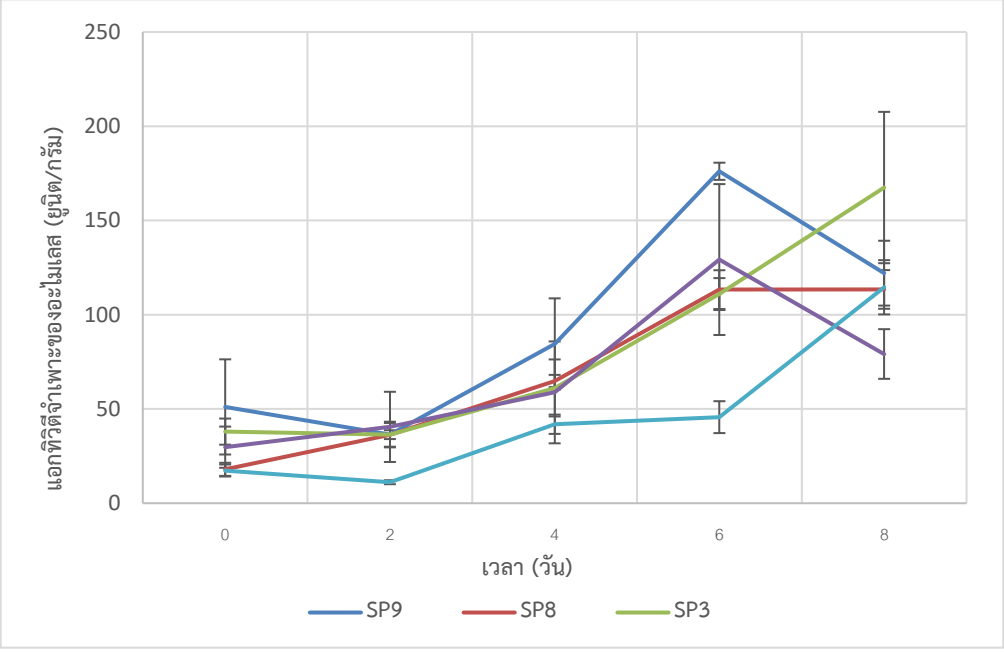
รูปที่ 4.7 กราฟแสดงผลแอกทิวิตีของอะไมเลสของ PNSB สายพันธุ์ต่างๆที่เลี้ยงภายใต้ภาวะ chemoheterotroph

4.3.1.2 แอกทิวิตีจำเพาะของอะไมเลส

เมื่อนำแอกทิวิตีของอะไมเลสและน้ำหนักแห้งมาคำนวณตามสูตรเพื่อหาแอกทิวิตีจำเพาะ (Specific Activity) ของอะไมเลสแล้วได้ผลตามตารางที่ 4.6 พบว่าส่วนใหญ่มีแอกทิวิตีจำเพาะของอะไมเลสมากในวันที่ 6 และ 8 โดยไอโซเลทที่มีแอกทิวิตีจำเพาะของอะไมเลสมากที่สุดยังคงเป็น SP9 โดยมีแอกทิวิตีจำเพาะของอะไมเลสสูงสุดในวันที่ 6 เท่ากับ 176.11 ± 4.55 ยูนิต/กรัมน้ำหนักแห้ง

ตารางที่ 4.7 แอกทิวิตีจำเพาะของอะไมเลสของสายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะ chemoheterotroph

เวลา (วัน)	แอกทิวิตีจำเพาะของอะไมเลส (ยูนิต/กรัมน้ำหนักแห้ง)				
	SP9	SP8	SP3	SK21	SK20
0	51.11 ± 25.24	18.00 ± 3.46	38.00 ± 6.93	29.75 ± 10.93	17.38 ± 3.18
2	36.45 ± 6.80	36.30 ± 6.30	36.40 ± 2.34	40.52 ± 18.61	11.16 ± 1.05
4	84.47 ± 24.23	65.04 ± 3.26	61.17 ± 15.12	58.81 ± 27.02	41.91 ± 5.12
6	176.11 ± 4.55	113.32 ± 10.29	110.97 ± 8.46	129.28 ± 40.03	45.69 ± 8.46
8	122.06 ± 17.20	112.54 ± 10.00	167.47 ± 40.14	79.17 ± 13.17	114.56 ± 14.39



รูปที่ 4.8 กราฟแสดงผลแอกทิวิตีจำเพาะของอะไมเลสของ PNSB สายพันธุ์ต่างๆที่เลี้ยงภายใต้ภาวะ chemoheterotroph

4.3.1.3 แอกทิวิตีของโปรตีเนส

ยกเลิกการทดลองเนื่องจากสถานการณ์โควิด

4.3.1.4 แอกทิวิตีจำเพาะของโปรตีเนส

ยกเลิกการทดลองเนื่องจากสถานการณ์โควิด

4.3.1.5 แอกทิวิตีของไลเปส

ยกเลิกการทดลองเนื่องจากสถานการณ์โควิด

4.3.1.6 แอกทิวิตีจำเพาะของไลเปส

ยกเลิกการทดลองเนื่องจากสถานการณ์โควิด

4.3.2 แอกทิวิตีของเอนไซม์ต่างๆในภาวะ photoheterotroph

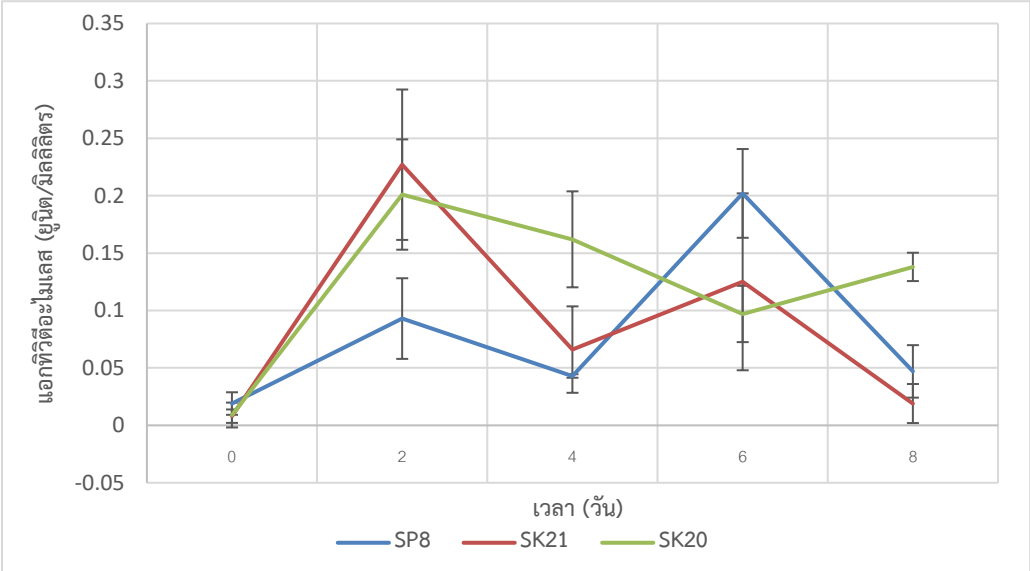
4.3.2.1 แอกทิวิตีของอะไมเลส

นำไอโซเลทที่ให้ผลดัชนีสูงสุด 5 อันดับแรก เรียงจากมากไปน้อย ดังนี้ SP9, SK20, SK21, SP3 และ SP8 นำแต่ละไอโซเลทมาเตรียมเป็นหัวเชื้อแล้วเลี้ยงในอาหารที่ดัดแปลงจากอาหาร RCVB แต่เติม starch soluble 1% เป็นแหล่งคาร์บอนแทน เลี้ยงภายใต้ภาวะ Photoheterotroph เก็บตัวอย่างที่ 0, 2, 4, 6, และ 8 วัน โดยนำเชื้อแต่ละวันมาทำเซลล์แห้งและวิเคราะห์แอกทิวิตีของเอนไซม์อะไมเลสได้ผลดังตารางที่ 4.3 โดยผลที่ได้จะมีแค่ 3 ไอโซเลท เนื่องจากในสถานการณ์โควิดจึงไม่สามารถวิเคราะห์ได้ทัน พบว่า SK21 ที่เจริญในวันที่ 2 แอกทิวิตีอะไมเลสสูงสุดเป็น 0.227 ± 0.07 ยูนิต/มิลลิลิตร ดังที่แสดงในตารางที่ 4.8 และรูปที่ 4.9

ตารางที่ 4.8 แอกทิวิตีของอะไมเลสของสายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะ photoheterotroph

เวลา (วัน)	แอกทิวิตีของอะไมเลส (ยูนิต/มิลลิลิตร)				
	SP9	SP8	SP3	SK21	SK20
0	ND	0.019 ± 0.01	ND	0.008 ± 0.01	0.009 ± 0.01
2	ND	0.093 ± 0.04	ND	0.227 ± 0.07	0.201 ± 0.05
4	ND	0.043 ± 0.01	ND	0.066 ± 0.04	0.162 ± 0.07
6	ND	0.202 ± 0.04	ND	0.125 ± 0.08	0.097 ± 0.02
8	ND	0.047 ± 0.09	ND	0.019 ± 0.02	0.138 ± 0.01

*ND = not detected = ไม่สามารถวิเคราะห์ได้



รูปที่ 4.9 กราฟแสดงผลแอกทิวิตีของอะไมเลสของ PNSB สายพันธุ์ต่างๆที่เลี้ยงภายใต้ภาวะ photoheterotroph

4.3.2.2 แอกทิวิตีจำเพาะของอะไมเลส

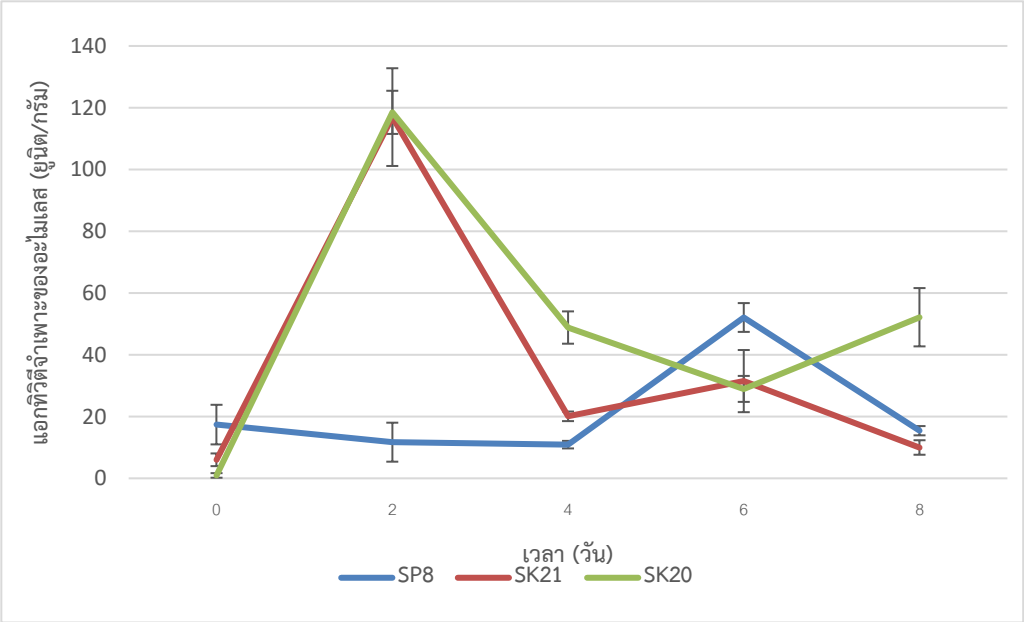
เมื่อนำแอกทิวิตีของอะไมเลสและน้ำหนักแห้งมาคำนวณตามสูตรเพื่อหาแอกทิวิตีจำเพาะ (Specific Activity) ของอะไมเลสของไอโซเลทที่เจริญภายใต้ภาวะ photoheterotrophแล้ว ได้ผลตามตารางที่ 4.9 พบว่าในวันที่ 2 จะได้แอกทิวิตีจำเพาะของอะไมเลสสูงสุดจาก SK21 และ SK20 ส่วน SP8 จะได้

แอกทิวิตีจำเพาะของอะไมเลสสูงสุดในวันที่ 6 โดยไอโซเลทที่ให้แอกทิวิตีจำเพาะของอะไมเลสสูงสุดคือ SK20 ในวันที่ 2 จะได้แอกทิวิตีจำเพาะของอะไมเลสเท่ากับ 118.51 ± 6.98 ยูนิต/กรัมของน้ำหนักแห้ง

ตารางที่ 4.9 แอกทิวิตีจำเพาะของอะไมเลสของสายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะ photoheterotroph

เวลา (วัน)	แอกทิวิตีจำเพาะของอะไมเลส (ยูนิต/กรัมน้ำหนักแห้ง)				
	SP9	SP8	SP3	SK21	SK20
0	ND	17.41 ± 6.41	ND	6.01 ± 2.06	0.94 ± 0.74
2	ND	11.71 ± 6.31	ND	116.97 ± 15.82	118.51 ± 6.98
4	ND	10.91 ± 1.22	ND	20.08 ± 1.55	48.83 ± 5.23
6	ND	52.09 ± 4.66	ND	31.49 ± 10.06	28.96 ± 4.20
8	ND	15.43 ± 1.50	ND	9.99 ± 2.35	52.17 ± 9.44

*ND = not detected = ไม่สามารถวิเคราะห์ได้



รูปที่ 4.10 กราฟแสดงผลแอกทิวิตีจำเพาะของอะไมเลสของ PNSB สายพันธุ์ต่างๆที่เลี้ยงภายใต้ภาวะ photoheterotroph

4.3.3.3 แอกทิวิตีของโปรตีเนส

ยกเลิกการทดลองเนื่องจากสถานการณ์โควิด

4.3.3.4 แอกทิวิตีจำเพาะของโปรตีเนส

ยกเลิกการทดลองเนื่องจากสถานการณ์โควิด

4.3.3.5 แอกทิวิตีของไลเปส

ยกเลิกการทดลองเนื่องจากสถานการณ์โควิด

4.3.3.6 แอกทิวิตีจำเพาะของไลเปส

ยกเลิกการทดลองเนื่องจากสถานการณ์โควิด

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

จากการคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงที่ไม่สะสมกำมะถัน (PNSB) โดยคัดแยกจากแหล่งน้ำในจังหวัดสมุทรสาครและสุพรรณบุรี เมื่อนำตัวอย่างน้ำที่เก็บมาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว RVCB เพื่อเสริมการเจริญของ PNSB แล้ว นำไปเลี้ยงภายใต้ภาวะ photoheterotroph พบว่าถ้ามีการเจริญของ PNSB จะสังเกตเห็นลักษณะที่สำคัญคือการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากตอนแรกที่มีไม่มีสีจะเปลี่ยนสีส้ม ชมพู แดง แดงน้ำตาล และม่วงแดง (KarSoon และคณะ, 2014) จากนั้นนำมาแยกเชื้อเดี่ยวโดยนำมา spread plate และ streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง RCVB สามารถแยกได้ทั้งหมด 66 โคโลนี แบ่งเป็นที่แยกได้จากจังหวัดสมุทรสาคร ที่ท่าน้ำวัดบางปลา 8 โคโลนี ท่าน้ำวัดนางสาว 16 โคโลนี คลองแนวลิขิต 15 โคโลนี และที่แยกได้จากจังหวัดสุพรรณบุรี ที่คลองสองพี่น้อง 27 โคโลนี โดยแหล่งน้ำแต่ละแหล่งที่เก็บมา มีค่า pH ของน้ำอยู่ในช่วง 6.97 ถึง 7.50 ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสมกับการเจริญของ PNSB (Montano และคณะ, 2009) พบลักษณะโคโลนีที่คล้ายคลึงกัน คือ โคโลนีกลม นูน แต่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและโทนสีที่สังเกตพบจากแต่ละไอโซเลทมีความแตกต่างกัน บางโคโลนีสีแดง บางโคโลนีก็สีม่วงแดง น้ำตาลแดง หรือชมพู

จากนั้นนำแต่ละไอโซเลทมาคัดกรองหาสายพันธุ์ที่สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลส โปรตีเนส และไลเปส จากการสังเกตการเกิดบริเวณใส (Clear zone) รอบโคโลนี บนอาหารที่ทดสอบเอนไซม์แต่ละชนิด ภายใต้ภาวะ chemoheterotroph ซึ่งจากผลการทดสอบการย่อยแป้งของ Sigmon (2008) ผลการทดสอบการย่อยโปรตีนของ Aryal (2018) และผลการทดสอบการย่อยไขมันจาก Sigma-Aldrich (2020) จึงเลือก *Bacillus subtilis* เป็นตัวควบคุมบวก และ *Escherichia coli* เป็นตัวควบคุมลบ โดยเอนไซม์อะไมเลสจะทดสอบบนอาหาร starch agar ซึ่งมี starch soluble เป็นสับสเตรทในอาหาร ไอโซเลทที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสมาย่อยสับสเตรทได้ ก็จะเห็นบริเวณใส (Clear zone) เกิดขึ้นเมื่อราดสารละลายไอโอดีนลงบนผิวหน้าอาหารที่ทดสอบ ซึ่งจากการทดสอบพบว่ามี 6 ไอโซเลท จาก 66 ไอโซเลท ที่สามารถเกิดบริเวณได้ ได้แก่ SP9, SK20, SK21, SP3, SP8 และ SP7 โดยตัวที่มีผลดัชนีเอนไซม์อะไมเลสมากที่สุดคือ SP9 ได้ดัชนีเอนไซม์เป็น 3.05 โดยทุกไอโซเลทยกเว้น SP7 มีค่าดัชนีเอนไซม์อะไมเลสสูงกว่าดัชนีของตัวควบคุมบวก ดังที่แสดงผลในตารางที่ 4.3 แสดงว่า PNSB ที่คัดแยกมาสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้ดีกว่า *B. subtilis*

ในส่วนของเอนไซม์โปรตีเนส จะทดสอบบนอาหาร skim milk agar โดยมี skim milk เป็นสับสเตรทในอาหาร ไอโซเลทที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเนสได้ก็จะสามารถย่อยสับสเตรทในอาหารได้ จึงเห็นบริเวณใสเกิดขึ้นรอบโคโลนี จากผลการทดสอบพบว่ามี 12 ไอโซเลท จาก 66 ไอโซเลท ที่พบบริเวณใสขึ้นรอบโคโลนี ซึ่งไอโซเลทที่มีผลดัชนีโปรตีเนสสูง 5 ไอโซเลทแรก ได้แก่ SK6, SP3, SK20, SP9 และ SP8 โดยตัวที่มีดัชนีเอนไซม์โปรตีเนสมากที่สุดคือ SK6 ได้ดัชนีเท่ากับ 5.88 และทั้ง 5 ไอโซเลทนี้ยังมีดัชนีเอนไซม์โปรตีเนสมากกว่า *B. subtilis* ที่เป็นตัวควบคุมบวกอย่างเห็นได้ชัดอีกด้วย แต่ในส่วนของตัวควบคุมลบซึ่งก็คือ *E. coli* พบว่ามีบริเวณใสเช่นกัน ซึ่งน่าจะเป็นเพราะต้นเชื้อที่นำมานั้น มีความเป็นไปได้ว่าจะมีการปนเปื้อนเชื้ออื่นที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเนสได้ หรืออาจจะปนเปื้อนเชื้อ *Bacillus* และการศึกษาก่อนหน้าหลายงานวิจัย ก็พบว่า *E. coli* ผลิตเอนไซม์โปรตีเนสไม่ได้ แต่จากการศึกษาของ Abed และคณะ (2016) ที่พบ *E. coli* ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะเป็น *E. coli* ที่เป็นตัวก่อโรค พบว่าสามารถที่จะผลิตเอนไซม์โปรตีเนสได้ โดยพบเกิดบริเวณใสบนอาหาร skim milk agar จึงน่าจะเป็นไปได้ว่าถ้าไม่ได้ปนเปื้อนก็อาจจะเป็นชนิดที่สามารถผลิตโปรตีเนสได้เช่นกัน

การทดสอบเอนไซม์ไลเปส จะทดสอบบน tributyrin agar มี glycerol tributyrate เป็นสับสเตรท ไอโซเลทที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ จะเกิดการย่อยสับสเตรทในอาหาร ก็จะพบบริเวณใสเกิดขึ้น จากผลการทดสอบพบว่าทั้ง 66 ไอโซเลท มีบริเวณใสเกิดขึ้นรอบโคโลนี โดยตัวที่มีผลดัชนีเอนไซม์ไลเปสมากที่สุด 5 อันดับแรกคือ SK31, SK12, SK29, SK21 และ SK11 โดยตัวที่มีดัชนีเอนไซม์ไลเปสมากสุดคือ SK31 ได้ดัชนีเอนไซม์เท่ากับ 23.00 และจากผลในตารางที่ 4.5 สังเกตเห็นว่าทุกไอโซเลทมีดัชนีเอนไซม์ไลเปสสูงกว่า *B. subtilis* ที่เป็นตัวควบคุมบวก แสดงว่า PNSB ที่คัดแยกได้ ก็น่าจะสามารถผลิตไลเปสได้ดีกว่า *B. subtilis*

จากผลการคัดกรองหาไอโซเลทที่สามารถผลิตเอนไซม์ทั้งสามชนิด ก็ได้เลือกไอโซเลทที่มีดัชนีของเอนไซม์แต่ละชนิดสูงสุด 5 อันดับแรก มาวิเคราะห์แอกทิวิตีของเอนไซม์แต่ละชนิด โดยวิเคราะห์จาก PNSB ที่เลี้ยงภายใต้ภาวะ photoheterotroph และ chemoheterotroph เปรียบเทียบกัน ในส่วนของการวิเคราะห์แอกทิวิตีของอะไมเลส เมื่อเตรียมหัวเชื้อแล้ว ได้นำไปเลี้ยงในอาหารที่มี starch soluble 1% เป็นแหล่งคาร์บอน แล้วเลี้ยงในแต่ละสภาวะ จากผลการวิเคราะห์แอกทิวิตีอะไมเลส พบว่าในการเลี้ยงแบบภาวะ chemoheterotroph แต่ละไอโซเลท มีแอกทิวิตีเอนไซม์อะไมเลสที่มีแนวโน้มมากขึ้น และมากที่สุดในวันที่ 8 โดยตัวที่มีแอกทิวิตีอะไมเลสมากที่สุดคือ SP9 ได้เป็น 0.518 ± 0.06 ยูนิต/มิลลิลิตร แต่เมื่อนำไปคำนวณเป็น แอกทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์อะไมเลสแล้ว พบว่า ไอโซเลทส่วนใหญ่มีแอกทิวิตีจำเพาะของอะไมเลสในวันที่ 6 และ 8 ใกล้เคียงกัน ซึ่งแอกทิวิตีจำเพาะในการศึกษานี้ได้จากการนำค่าแอกทิวิตีของอะไมเลส (ยูนิต/มิลลิลิตร) ไปหารกับค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/

มิลลิลิตร) จึงทำให้คิดว่าการที่วันที่ 6 และ 8 มีแอกทิวิตีจำเพาะใกล้เคียงกัน น่าจะเป็นเพราะเชื้อแต่ละไอโซเลทเริ่มเข้าสู่ระยะ stationary จึงทำให้มีแอกทิวิตีของอะไมเลสค่อนข้างคงที่หรือเริ่มลดลง โดยไอโซเลทที่มีแอกทิวิตีจำเพาะของอะไมเลสสูงสุดยังคงเป็น SP9 แต่ได้แอกทิวิตีจำเพาะของอะไมเลสมากสุดในวันที่ 6 ได้เป็น 176.11 ± 4.55 ยูนิต/กรัมน้ำหนักแห้ง และในภาวะ photoheterotroph พบว่า SK20 และ SK21 มีแอกทิวิตีอะไมเลสมากสุดในวันที่ 2 และมีแนวโน้มลดลง เนื่องจากเชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะ death แต่ก็พบว่าในวันที่ 8 SK20 มีแอกทิวิตีของอะไมเลสสูงขึ้นมา ไม่เป็นไปตามแนวโน้ม จึงคาดว่าน่าจะมีการปนเปื้อนเชื้ออื่นที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ ทำให้มีแอกทิวิตีอะไมเลสสูงขึ้น ส่วน SP8 มีแอกทิวิตีของอะไมเลสมากสุดในวันที่ 6 และลดลงในวันที่ 8 จากการที่เชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะ death เช่นเดียวกัน โดยไอโซเลทที่มีแอกทิวิตีอะไมเลสมากสุดในภาวะ photoheterotroph คือ SK21 ในวันที่ 2 ได้เท่ากับ 0.227 ± 0.07 ยูนิต/มิลลิลิตร แต่เมื่อไปเทียบกับน้ำหนักเซลล์แห้งแล้ว ได้เป็นแอกทิวิตีจำเพาะของอะไมเลสออกมา ไอโซเลทที่มีแอกทิวิตีจำเพาะของอะไมเลสสูงสุดจะเป็น SK20 ในวันที่ 2 แอกทิวิตีจำเพาะของอะไมเลสเท่ากับ 118.51 ± 6.98 ยูนิต/กรัมของน้ำหนักแห้ง ส่วนแนวโน้มของแอกทิวิตีจำเพาะของอะไมเลสยังเป็นเหมือนของแอกทิวิตีอะไมเลส จากการวิเคราะห์ในทั้งสองสภาวะพบว่าแอกทิวิตีอะไมเลส มีความสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อ โดยถ้าเชื้อมาก ก็มีแอกทิวิตีอะไมเลสมาก และเมื่อเชื้อลดลงหรือเข้าสู่ระยะ death ก็จะมีแอกทิวิตีอะไมเลสลดลง ซึ่งเมื่อเทียบกันจากแอกทิวิตีและแอกทิวิตีจำเพาะของอะไมเลสแล้ว พบว่าในภาวะ chemoheterotroph มีแอกทิวิตีและแอกทิวิตีจำเพาะของอะไมเลสมากกว่าในภาวะ photoheterotroph เนื่องจากการเจริญภายใต้ภาวะ chemoheterotroph PNSB จะใช้สารอินทรีย์เป็นตัวที่ให้อิเล็กตรอนและสร้างพลังงาน จึงสร้างเอนไซม์ไปย่อยสารอินทรีย์เหล่านั้น แต่ถ้าภายใต้ภาวะ photoheterotroph นั้น PNSB จะใช้แสงในการสร้างพลังงาน และใช้สารอินทรีย์เป็นตัวให้อิเล็กตรอนเท่านั้น ไม่ได้ใช้สร้างพลังงาน โดยจะย่อยสารอินทรีย์ที่โมเลกุลใหญ่อย่างเช่น แป้ง ได้ยาก ส่วนใหญ่จะย่อยสารโมเลกุลเล็กอีกทั้งในภาวะนี้จะต้องใช้ ATP จำนวนมากในการสร้าง NADH และในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์จากสารอาหารเข้าสู่ calvin clycle เพื่อสร้างมวลเซลล์ มันจึงมีการเจริญค่อนข้างช้าหรือเจริญได้น้อยกว่าในภาวะ chemoheterotroph จึงทำให้พบเอนไซม์อะไมเลสในภาวะ photoheterotroph ได้น้อยกว่าภาวะ chemoheterotroph (Keppen และคณะ, 2012)

จากที่ได้แอกทิวิตีอะไมเลสสูงสุดในภาวะ chemoheterotroph ของ SP9 ได้เป็น 0.518 ± 0.06 ยูนิต/มิลลิลิตร เมื่อเทียบกับการศึกษาก่อนหน้าที่มีการวิเคราะห์แอกทิวิตีของอะไมเลสของเชื้ออื่น ซึ่งมีวิธีการวิเคราะห์ที่คล้ายกัน เช่น จากการศึกษาของ นิภาภรณ์ จิตเชาวนะ (2558) ที่ทั้งใช้หัวเชื้อ 10% เช่นเดียวกัน พบว่า

Staphylococcus aureus (JX84461) ที่เลี้ยงใน starch broth เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จะได้แอกทิวิตีอะไมเลสสูงสุดเป็น 0.731 ยูนิต/มิลลิลิตร และในงานเดียวกัน ได้วิเคราะห์แอกทิวิตีของ *Bacillus cereus* (HQ333012) อีกด้วย ซึ่งไม่ได้ระบุตัวเลขที่แน่ชัด แต่จากที่ดูผลจากกราฟในรายงานแล้ว พบว่ามีแอกทิวิตีอะไมเลสสูงสุดในชั่วโมงที่ 6 ได้เท่ากับประมาณ 0.4 ยูนิต/มิลลิลิตร จากการศึกษาที่กล่าวถึงนี้ ก็ทำให้ได้ทราบว่า ไอโซเลท SP9 ที่ได้แอกทิวิตีอะไมเลสสูงสุดในการศึกษานี้ เป็นตัวที่สร้างอะไมเลสได้ปานกลาง ยังมีสายพันธุ์ที่สร้างได้ดีกว่า แต่มีความเป็นไปได้ที่จะสร้างแอกทิวิตีอะไมเลสสูงกว่าพวก *Bacillus* ได้ อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์แอกทิวิตีอะไมเลสที่ทำนี้อาจจะไม่ใช่สภาวะที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ เพราะอย่างเช่น การศึกษาของ อำพรรณ ชัยกุลเสรีวัฒ์ และสาวิตรี ล้ำเหลือหลาย (2553) ที่ใช้หัวเชื้อ 10% เช่นเดียวกัน โดยเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. ไอโซเลท A ใน starch broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ pH 6.5 พบว่ามีแอกทิวิตีของอะไมเลสสูงสุดเมื่อทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งทดสอบแล้วว่าเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของอะไมเลสของเชื้อที่ทดสอบ โดยได้แอกทิวิตีของอะไมเลสเท่ากับ 1.23 ยูนิต/มิลลิลิตร ดังนั้น อาจจะต้องมีการศึกษาต่อไปถึงสภาวะที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส ของ SP9 ไม่ว่าจะเป็น อุณหภูมิ pH ปริมาณหัวเชื้อ และปริมาณสับสเตรทก่อน อีกทั้ง เอนไซม์ที่ได้จากการนำเชื้อไปปั่นเหวี่ยง เป็น crude enzyme อาจจะมีสารอื่นปนอยู่ที่ทำให้ค่าที่ได้คลาดเคลื่อนได้ ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบได้แค่เบื้องต้นเท่านั้น ควรนำไปทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ก่อนจึงจะเทียบได้จริงๆว่าสร้างมากน้อยต่างกันเท่าไหร่

เนื่องจากสถานการณ์โควิดในปัจจุบัน จึงทำให้ผู้วิจัยต้องหยุดทำการศึกษาไว้เพียงเท่านี้ ดังนั้นหากจะทำการศึกษาต่อจะทำดังนี้

1. วิเคราะห์แอกทิวิตีโปรตีเนส ของไอโซเลทที่มีดัชนีเอนไซม์โปรตีเนสสูงสุด 5 อันดับแรก โดยวิเคราะห์ทั้งแบบที่เลี้ยงในภาวะ chemoheterotroph และ photoheterotroph ดังที่กล่าวในวิธีดำเนินการทดลองข้อ 3.4.4

เนื่องจากตอนคัดกรอง ได้คัดกรอง PNSB ที่ผลิตโปรตีเนสได้บน skim milk agar ภายใต้ภาวะ chemoheterotroph ดังนั้นถ้านำไปวิเคราะห์แอกทิวิตีโปรตีเนส ก็คาดว่าจะพบแอกทิวิตีของโปรตีเนสได้ภายใต้ภาวะ chemoheterotroph ซึ่งแนวโน้มก็น่าจะเพิ่มขึ้นเมื่อเชื้อเจริญขึ้นเช่นเดียวกับที่วิเคราะห์แอกทิวิตีของอะไมเลส สอดคล้องกับการศึกษาของ Chumpol (2017) ที่คัดกรองบนอาหาร Frazier gelatin ภายใต้ภาวะ chemoheterotroph และนำ PNSB ที่เป็นเชื้อผสมไปวิเคราะห์แอกทิวิตีของ PNSB ที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารของกุ้ง (PNAB เจริญแบบ chemoheterotroph) พบว่ามีแอกทิวิตีจำเพาะของโปรตีเนสสูงสุดในวันที่ 60 ได้

เท่ากับ 0.345 ± 0.014 ยูนิต/กรัมของโปรตีน แต่จากการศึกษาของ Al-Azard และคณะ (2013) ที่ได้ศึกษาผลของแสงต่อแอกติวิตีของโปรตีเนสพบว่า *Afifella marina* ซึ่งเป็น PNSB ชนิดหนึ่ง มีแอกติวิตีของโปรตีเนสในที่ไม่มีแสงน้อยกว่าในที่มีแสง โดยมีแอกติวิตีดีสุดที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ได้เท่ากับ 74.67 ± 2.31 ยูนิต และจากการศึกษาของ ODA และคณะ (2003) พบว่า *Rubrivivax gelatinosus* KDDS1 มี ของโปรตีเนสภายใต้การเลี้ยงในภาวะ micro-aerobic light เป็นเวลา 48 ชั่วโมงเท่ากับ 0.08 ยูนิต/มิลลิกรัมของโปรตีน และไม่พบแอกทิวิตีของโปรตีเนสในภาวะที่มีอากาศ ไม่มีแสง โดยอธิบายไว้ว่า จากที่มีการศึกษาพบ SppA ซึ่งเป็นซีรีนโปรตีเนสที่เหนี่ยวนำด้วยแสง (light-inducible serine-type proteinase) ในพืชชนิดหนึ่ง เกี่ยวข้องกับการหมุนเวียนที่ขึ้นกับแสงของไทลาคอยด์เมมเบรน และมีการพบ FtsH ซึ่งเป็นโปรตีเนสที่ขึ้นกับแสง (light-dependent proteinase) ซึ่งเกี่ยวข้องกับไทลาคอยด์เมมเบรนเช่นกัน พบในใบเฟิร์น คณะผู้วิจัยในงานนี้ได้คาดว่าซีรีนโปรตีเนส (serine proteinase) ของ *Rvi. Gelatinosus* KDDS1 อาจจะเป็นโปรตีเนสที่เหนี่ยวนำด้วยแสง (light-inducible proteinase) หรือ โปรตีเนสที่ขึ้นกับแสง (light-dependent proteinase) ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้าที่กล่าวมาทั้งหมดนี้ ผู้วิจัยจึงคาดว่า โปรตีเนสที่ได้จาก PNSB น่าจะมีทั้งที่ผลิตได้ในภาวะ chemoheterotroph และ photoheterotroph โดยถ้าเทียบระหว่าง 2 สภาวะในการศึกษานี้ ก็อาจจะพบว่าในภาวะที่มีแสงจะมีแอกทิวิตีของโปรตีเนสมากกว่าก็เป็นได้ ซึ่งการศึกษาโปรตีเนสจาก PNSB ยังมีไม่มาก อาจจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมมากกว่านี้ก่อนจึงจะสรุปได้

2. วิเคราะห์แอกทิวิตีของไลเปส ของไอโซเลทที่มีดัชนีเอนไซม์ไลเปสสูงสุด 5 อันดับแรก โดยวิเคราะห์ทั้งแบบที่เลี้ยงในภาวะ chemoheterotroph และ photoheterotroph ดังที่กล่าวในวิธีดำเนินการทดลองข้อ 3.4.5

โดยคาดว่าผลการทดลองที่ได้ จะคล้ายกับผลการวิเคราะห์แอกทิวิตีของอะไมเลส มีแนวโน้มไปในทางเดียวกันกับอะไมเลส และเมื่อเทียบระหว่างการเลี้ยงแบบ chemoheterotroph และ photoheterotroph จะพบว่าการเลี้ยงในสภาวะ chemoheterotroph จะให้แอกทิวิตีของไลเปสมากกว่า อย่างเช่น ในการศึกษาของ Yamaoka และคณะ (2008) ที่ศึกษาการย่อยน้ำมันของ *Rhodobacter sphaeroides* S พบว่าถ้าเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำมันพืชเป็นสับสเตรท จะได้มีแอกทิวิตีของไลเปสเกิดขึ้น แต่อาหารที่ไม่ได้ใส่น้ำมันพืชเป็นสับสเตรท มีแอกทิวิตีไลเปสน้อยมาก คือน้อยกว่า 0.1 ยูนิต/มิลลิลิตร และอาหารที่มีแอกทิวิตีของไลเปสมากสุดคือ oil basal medium และที่ใกล้เคียงกันรองลงมาคือ glucose-oil medium โดยมีแอกทิวิตีของสูงสุดในวันที่ 2 ในสภาวะ aerobic dark ได้แอกทิวิตีของไลเปสในช่วง 3.00-2.25 ยูนิต/มิลลิลิตร และ 2.75-2.25 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ และมีแนวโน้มลดลงจนน้อยสุดในวันที่ 8 อีกทั้งยังเทียบระหว่าง 2 สภาวะ พบว่า สภาวะ aerobic dark ซึ่งเชื้อจะ

โตแบบ chemoheterotroph มีแอกทิวิตีของไลเปสสูงกว่าสภาวะ anaerobic light ซึ่งเชื้อจะโตแบบ photoheterotroph โดยในสภาวะ aerobic light จะได้แอกทิวิตของไลเปสสูงในวันที่ 2-4 และลดลงต่ำในวันที่ 6-8 ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์อะไมเลส

3. การดูลักษณะสัณฐานและพิสูจน์เอกลักษณ์ของ PNSB โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16s rRNA โดยจะเลือกไอโซเลทที่สามารถสร้างเอนไซม์ได้ทั้งอะไมเลส โปรตีเนส และไลเปส มาศึกษาลักษณ์สัณฐานทั้งบนอาหารแข็ง

ผลการทดลองที่คาดว่าจะเป็นคือ เมื่อศึกษาลักษณะสัณฐาน โคโลนีจะมีลักษณะกลมนูน ขอบเรียบ โดยถ้าเจริญในภาวะ photoheterotroph จะพบว่าโคโลนีมีสีส้ม แดง ถึงแดงม่วง (ชื่นสุมน บุญเจริญ, 2559) และถ้าเจริญในภาวะ chemoheterotroph จะมีโคโลนีสีเหลือง โดยถ้ามีการเปลี่ยนกลับไปมาระหว่างสองภาวะ เชื้อจะมีการปรับตัวก่อน ไม่ได้เปลี่ยนสีในทันที เช่น ถ้าเลี้ยงในภาวะ photoheterotroph แล้วเปลี่ยนมาเลี้ยงใน chemoheterotroph จากที่มีโคโลนีสีแดง เชื้อจะมีสีที่ค่อยๆอ่อนลงในการถ่ายเชื้อแต่ละครั้ง จนมีลักษณะเป็นโคโลนีสีเหลืองได้ (ชื่นสุมน บุญเจริญ, 2559) เมื่อส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ จะพบว่าเป็นแกรมลบ โดยเซลล์มีรูปร่างได้ทั้ง รูปท่อน ไข่ กลม บางชนิดอาจพบรูปร่างเกลียว และเนื่องจากมีชนิดที่มีแฟลกเจลลา และชนิดที่ไม่มีแฟลกเจลลา เหลือง (ศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต, 2545) จึงต้องศึกษาการเคลื่อนที่ของเชื้อในอาหารทดสอบการเคลื่อนที่ของเชื้อ (Motility test medium) ถ้ามีแฟลกเจลลา จะเคลื่อนที่ได้ จะเห็นการเจริญแบบแพร่กระจายในอาหาร (ชื่นสุมน บุญเจริญ, 2559) ในส่วนของการพิสูจน์เอกลักษณ์ จะส่งเชื้อไปวิเคราะห์ยีนบริเวณ 16s rDNA แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเชื่อมผ่านโปรแกรม BioEdit แล้วนำไปเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI คาดว่าจะพบว่ามีความคล้ายคลึงกับ PNSB ชนิดใดชนิดหนึ่ง จากนั้นจึงนำมาสร้างแผนภูมิต้นไม้ โดยใช้โปรแกรม MEGA X

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษานี้ ได้คัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงที่ไม่สะสมกำมะถัน ที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรตีเนส และไลเปส โดยสามารถคัดแยก PNSB จากแหล่งน้ำในจังหวัดสมุทรสาครและสุพรรณบุรีได้ 66 ไอโซเลท ได้เป็นตัวที่สามารถผลิตอะไมเลสได้ 6 ไอโซเลท ตัวที่ผลิตโปรตีเนส 12 ไอโซเลท และทั้ง 66 ไอโซเลท สามารถผลิตไลเปสได้ โดยจากการวิเคราะห์แอคติวิตีและแอกทิวิตีจำเพาะของอะไมเลส พบว่าภายใต้ภาวะ chemoheterotroph จะมีแอกทิวิตีมากกว่าภาวะ photoheterotroph ซึ่งไอโซเลทที่มีแอกทิวิตี

และแอกทิวิตีจำเพาะของอะไมเลสมากที่สุดคือ SP9 โดยเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 8 วัน จะมีแอกทิวิตีอะไมเลสเป็น 0.518 ± 0.06 ยูนิต/มิลลิลิตร แต่แอกทิวิตีจำเพาะของอะไมเลสจะสูงสุดในวันที่ 6 ได้เป็น 176.11 ± 4.55 ยูนิต/กรัมของน้ำหนักแห้ง และจากผลการคัดกรองเอนไซม์ทั้งสามชนิด พบว่า SP9 สามารถสร้างเอนไซม์ได้ทั้งสามชนิดอีกด้วย

ข้อเสนอแนะ

1. ในขั้นตอนการคัดกรองหาแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงที่ไม่สะสมกำมะถัน ควรทำการทดสอบภายใต้ภาวะ photoheterotroph ด้วย เพื่อเช็คว่าจะสามารถสร้างเอนไซม์ในที่มีแสง ไม่มีอากาศได้หรือไม่
2. ไม่ควรใส่ skim milk ในอาหาร skim milk agar มากเกินไป เนื่องจากจะต้องรอเป็นระยะเวลานาน กว่าที่จะสังเกตเห็นบริเวณใส
3. ในขั้นตอนการเสริมการเจริญของ PNSB จากแหล่งน้ำ อาจจะถ่ายเชื้อซ้ำ 1-2 รอบ เพื่อให้ PNSB มีการเจริญที่ดีขึ้น ทำให้แยกเชื้อได้ง่ายขึ้น

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

กุสุมาวดี ฐานเจริญ. (2561). การคัดเลือกยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากน้ำทิ้งโรงอาหาร: การประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียและผลิตไบโอดีเซล. วารสารเกษตรพระวรุณ, 15(1), 204-215.

จันทร์จิรา จอมสวัสดิ์. (2544). การคัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงและการประยุกต์ใช้ในกุ้งกุลาดำ (Penaeus monodon). วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขา เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่นสุมน บุญเจริญ. (2559). แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงชนิดไม่สะสมกำมะถันจากแอกทิเวดสลัดจ์เพื่อการย่อยสลายดีเซล. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นภาวรรณ นพรัตนราภรณ์. (2549). “แบคทีเรีย”สิ่งมีชีวิตจิ๋วแต่แจ๋วในแปลงเกษตรและบ่อบำบัด. สืบค้นเมื่อวันที่ 18 พฤษภาคม 2563, จาก https://mgronline.com/science/detail/9490000004080

นุชจรินทร์ นนทรีย์ และคณะ. (2555). การคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพเพื่อการบำบัดน้ำเสียของโรงงานแปรรูปแป้งมัน. ปทุมธานี: สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชมงคลธัญบุรี

นิภาภรณ์ จิตเชาวนะ, ซัลไลลา แวมะยิ, วิชุดา กล้าเวช และ มณฑล เลิศวรปรีชา. (2558) การคัดแยกและจำแนกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการส้รางเอนไซม์อะไมเลสและไซลาเนสจากทางเดินอาหารของหนอนปลอก (Cremastopsyche pendula). การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 53. (หน้า 222- 229). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พัชรนันท์ อมรรัตนพันธ์. (2557). การโคลนและสมบัติของยีนไลเปสจาก *Bacillus* sp. ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสประสิทธิภาพสูง (รายงานผลการวิจัย). ชลบุรี: มหาวิทยาลัยบูรพา

มนัสชนก โยชน์ชัยสาร. (2562) การคัดเลือกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติกที่แยกจากดินในป่านาสีนวน จังหวัดมหาสารคาม. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขา เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

วิสูต แก้วมหา. (2556). การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ย่อยแป้งให้ได้ผลผลิตที่มีค่า DP จำเพาะ และการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยศิลปากร

สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. แบคทีเรียสังเคราะห์แสง (photosybthetic bacteria). สืบค้นเมื่อวันที่ 10 มีนาคม 2564, จากhttp://thaifarmer.lib.ku.ac.th/f/f285b32764a1bead78e0d6a1ba0e2f5d3c2c7466f869ee7f2f305b2940899a5c.pdf

ศุภลักษณ์ สัตยสมิทสถิต. (2545). สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต 5-อะมิโนลีวูลินิกแอซิดจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็ม *Rhodobacter capsulatus* SS3. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

อลงกฎ แซมสีม่วง, ศิริพรรณ สารินทร์ และจรูณ สารินทร์. (2554). การศึกษาการใช้แบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน. วารสารการวิจัยเพื่อพัฒนาชุมชน (มนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์) มหาวิทยาลัยนเรศวร, 4(2), 18-25

อำพรรณ ชัยกุลเสรีวัฒน์ และ สาวิตรี ล้ำเหลือหลาย. (2553) การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจาก *Bacillus* sp. ไอโซเลท A. วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม, 5(1), 47-54

ภาษาอังกฤษ

Abed, K.B., Authman, H.S., and Yassein, H.K. (2016) Optimal of extracellular protease extracted from *Escherichia coli*. *ejmr* **3**:113-118

Aryal, S. (2018) Casein Hydrolysis Test. Retrived December 18, 2020, from https://www.splammo.net/

Anbu, P., Gopinath, C.B.S., Chulagain, B.P., and Lakshmipriya, T.(2017) Microbial enzymes and their applications in industries and medicine 2016. *Biomed Res. Int* **2017**:1-3

Al-Azard, S., Soon, T.K. and Ransangun, J. (2013) Effect of light intensities and photoperiods on growth and proteolytic activity in purple non-sulfur marine bacterium, *Afifllea Marina* strain ME. *Adv Biosci Biotechnol* **4**:919-924

Bianchi, L., Manneli, F., Viti, C., Adessi, A., and Philippis, D.R. (2010) Hydrogen-producing purple non-sulfur bacteria isolated from the trophic lake Averno (Naples, Italy). *Int. J. Hydrog. Energy* **35**:12216-12223

Bogarapu, R., Kumar, S.R., Madanapally, D.U., and Nayak, B.J. (2019) Role of purple non-sulfur bacteria *Rhodopseudomonas palustris* RSOU000 and *Rhodopseudomona thermotolerance* RSOU555 in waste water treatment. *WJPPS* **5**:1379-1387

Brandl, H., R.Gross, R.Lenz, R.Lloyd, and R.C.Fuller (1991). The accumulation of poly (3-hydroxyalkanoates) in *Rhodobacter sphaeroides*. *Arch. Microbiol* **155**:337–34

Chumpol, S. (2017) The use of purple nonsulfur photosynthetic bacteria to maintain water quality, sources of single cell protein and bioactive compounds for shrimp cultivation. Doctor thesis. Philosophy in microbiology program. Prince of Songkla University.

Chen, J., et al. (2020) Photosynthetic bacteria-based technology is a potential alternative to meet sustainable wastewater treatment requirement. *Environ Int* **137**:1-19

Gopinath, C.B.S., et al. (2017) Biotechnological process in microbial amylase production. *Biomed Res. Int* **2017**:1-9

Gupta, R., Gupta, N., and Rathi, P. (2004) Bacterial lipase: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**:763-781

KarSoon, T., Al-Azad, S., and Ransangan, J. (2014) Isolation and characterization of purple non-sulfur bacteria, *Afifella marina*, producing large amount of carotenoids from mangrove microhabitats. *J. Microbiol. Biotechnol* **24**:1034-1043

Keppen, O.I., Keasill'nikova,E.N., Lebedeva, N.V., and Ivanovskii, R.N. (2013) Comparative study of metabolism of the purple photosynthetic bacteria grown in the light and in the dark under anaerobic and aerobic Conditions. *Microbiology* **82**:547-553

Kim, K.M., Choi, M.K., Yin, R.C., and Lee, Y.K. (2004) Odorous swine wastewater treatment by purple non-sulfur bacteria, *Rhodopseudpmonas palustris*, isolated from eutrophicated ponds. *Biotechnol Lett* **26**:819-822

LaTurner, W.Z., Bennett, N.G., San, K., and Stadler, B.L. (2020) Single cell protein production from food waste using purple non-sulfur bacteria shows economically viable protein products have higher environmental impacts. *J. Clean. Prod* **276**:4-10

Lindquist, J. (2020). Bacteriology 102: Enrichment and isolation of purple non-sulfur photosynthetic bacteria. Retrived May 10, 2020, from https://www.splammo.net/

Madigan, M.T.; Jung, D.O. An overview of purple bacteria: Systematics, physiology, and habitats. In The Purple Phototrophic Bacteria; Hunter, C.N., Daldal, F., Thurnauer, C., Beatty, J.T., Eds.; Springer: Dordrecht,The Netherlands, 2009; Volume 28, pp 1–15

Martin, M.F., Okpo, E.A., and Andy, I.E. (2019) Microbial amylases: A review. *WNOFNS* **22**:174-179

Meng, F., Yang, A., Zang, G., and Wang, H. (2017) Effects of dissolved oxygen concentration on

photosynthetic bacteria wastewater treatment: Pollutants removal, cell growth and pigments production. *Bioresour. Technol* **241**:993-997

Merugu, C. R., Girisham, S., and Reddy, S.M. (2010) Extracellular enzymes of two anoxygenic phototrophic bacteria isolated from leather industry effluents. *Biochem Ind J* **4**:86-88

Merugu, R., Rudra, M.P.P., Girisham, S., Reddy, S.M., 2012. Biotechnological applications of purple non sulphur phototrophic bacteria: a minireview. *Int. J. Appl. Biol. Pharm* **3**:376–384.

Monroy, I., and Buitron, G. (2020) Production of polyhydroxybutyrate by pure and mixed culture of purple non-sulfur bacteria: A review. *J. Biotechnol* **317**:39-47

Montano, L.G., Chan, S.J., Jarabelo, E.R., and Pastor, A.B. (2009) Isolation and characterization of purple nonsulfur bacteria (PNSB) from a rice paddy soil in bulacan, Philippines. *Philipp J. Syst. Biol* **3**:57-67

Munjam, S., and Sivadevuni, G. (2005) Production of lipases by four anoxygenic purple non-sulphur phototrophic bacteria. Hindustan *Antibiot Bull* **47**:32-35

Nigam, P.S. (2013) Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. *Biomolecules* **3**:597-611

ODA, K., Tanskul, S., Oyama, H., and Noparatnaraporn, N. (2003) Purification and characterization of alkaline serine proteinase from photosynthetic bacterium, *Rubrivivax gelatinous* KDDS1. *Biosci.Biotechnol.Biochem* **68**:650-655.

Patel, M., et al. (2016) Isolation and characterization of lipase producing bacteria from Vegetable oil spillage Site. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* **5**:214-232

Peng, W., Li, X., Song, J., Jing, W., Liu, Y., and Fan, Wenhong. (2018) Bioremediation of cadmium- and zinc-contaminated soil using *Rhodobacter sphaeroides*. *Chemospere* **197**:33-41

Ranjekar, M.K., and Sridhar, K.R. (2002) Occurrence and extracellular enzyme potential of actinomycetes of a thermal spring, southern India. *Asian Jr. of Microbiol. Biotech. Env. Sc.* **4:**59-64

Raveendran, S., et al (2018) Applications of microbial enzymes in food industry. *Food Technol Biotechnol* **56**:16-30

Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali Q., Sajjad, M., Malik, A., and Ashraf, M. (2019) Microbial protease applications. *Front Bioeng Biotechnol* **7**:1-20

Saini, R. J. (2011) Coenzyme Q10: the essential nutrient. *J Pharm. Bioallied Sci* **3**:466-467

Sakarika, M., et al. (2019) Purple non- sulfur bacteria and plant production: benefits for fertilization, stress resistance and the environment. *Microb. Biotechnol* **13**:1336-1365

Samsrimuang, A., Sarin, A., and Sarin, C. (2011) Study of biosurfactant and lipase producing bacteria for degradation fat oil and grease. *JCDR* **4**:18-25.

Santhi, R. (2014) Microbial production of protease by *Bacillus cereus* using cassava waste water. *Euro. J. Exp. Bio*. **4**:19-24

Sasikala, CH., and Ramana V.CH. (1995) Biotechnological potentials of anoxygenic phototrophic bacteria. I. Production of single-cell protein, vitamins, ubiquinones, hormones, and enzymes and use in waste treatment. *Adv Appl Microbiol* **41**:173-226

Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C. (2001) Production, purification, characterization, and applications of lipase. *Biotechnol. Adv* **19**:627-662

Sigma-aldrich. (2020) 91015 Tributyrin Agar. Retrived December 18, 2020, from https://www.splammo.net/

Sigmon, J. (2008) Starch hydrolysis test. Retrived December 18, 2020, from

https://www.asmscience.org/content/education/imagegallery/image.3172

Volesky, B., Luong, H.T.J., and Aunstrup, K. (1984) Microbial enzymes: production, purification, and isolation. *Crit. Rev. Biotechnol* **2**:119-146

Weaver, P.F., Wall, J.D., and Gest, H. (1975) Characterization of *Rhodopseudomonas capsulata*. *Arch. Microbiol* **105**:207-216

Yamaoka, Y., Takeno, K., Noparatnaraporn, N., and Sasaki, K. (2008) Oil degradation using a photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides S. Jpn J Water Treat Biol* **44**:29-39

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว RCVB (Weaver และคณะ, 1975)

กรดมาลิก (DL- Malic acid)	4.00 กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.75 กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.85 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟสเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.20 กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	4.00 กรัม
แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	1.00 กรัม
กรดบอริก (H_3BO_3)	2.80 มิลลิกรัม
ไดโซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0.75 มิลลิกรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.24 มิลลิกรัม
แมงกานีส (II) ซัลเฟตเตตระไฮเดรต ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)	2.10 มิลลิกรัม
คอปเปอร์ (II) ไนเตรตไตรไฮเดรต ($Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$)	0.04 มิลลิกรัม
เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	11.80 มิลลิกรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0.75 มิลลิกรัม
เอทิลีนไดอะมีนเตตราอะซีติก (Ethylene diamine tetraacetic acid; EDTA)	2.00 มิลลิกรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH เท่ากับ 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอมัล จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หากต้องการยับยั้งราและยีสต์ ให้เติมนิสตาติน ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม โดยเติมเมื่ออาหารเริ่มเย็นหลังจากฆ่าเชื้อด้วยความดันแล้ว

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง RCVB

นำส่วนผสมจากข้อ 1. มาเติมผงวุ้น 15 กรัม ปรับปริมาตรเท่ากับ 1 ลิตร ปรับ pH เท่ากับ 7.0 แล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับวิเคราะห์แอกทิวิตีของอะไมเลส (อำพรรณ ชัยกุลเสรีวัฒน์ และสาวิตรี ล้ำเหลือหลาย, 2553)

นำส่วนผสมจากข้อ 1. ซึ่งตัดกรดมาลิกออก แล้วเติมแป้ง (starch soluble) 10.00 กรัม ใส่แทนลงไป ให้ความร้อนเล็กน้อยจนส่วนผสมเข้ากันดี ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 นำไปฆ่าเชื้อด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสำหรับทดสอบการย่อยแป้ง (Starch agar) (Ranjeker และ Sridhar, 2002)

สารสกัดจากเนื้อวัว (Beef extract)	0.30 กรัม
แป้ง (Starch soluble)	1.00 กรัม
วุ้นผง	1.20 กรัม

นำสารสกัดจากเนื้อวัวและแป้งละลายให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น ให้ความร้อนเล็กน้อยเพื่อให้แต่ละส่วนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ใส่วุ้นผงแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสำหรับทดสอบการย่อยโปรตีน (Skim milk agar) (นุชจรินทร์ นนทรีย์ และคณะ, 2555)

เปปโตน (Peptone)	0.50 กรัม
สารสกัดจากเนื้อวัว (Beef extract)	0.30 กรัม
หางนม (Skim milk)	1.00 กรัม
วุ้นผง	1.50 กรัม

เตรียมส่วนหนึ่งคือนำหางนมมาละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร ให้ความร้อนเล็กน้อยเพื่อละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เตรียมส่วนที่สองโดยนำสารที่เหลือมาละลายเข้าด้วยกันในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 60 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทสารละลายทั้งสองส่วนผสมกัน

6. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสำหรับทดสอบการย่อยไขมัน (Tributyrin agar) (Patel และคณะ, 2016)

เปปโตน (Peptone)	0.5 กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	0.3 กรัม
กลีเซอรอลไตรบิวทิเรท (Glyceryl tributyrate)	1.00 มิลลิลิตร
วุ้นผง	1.50 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดยกเว้นกลีเซอรอลไตรบิวทิเรทเข้าด้วยกันในน้ำกลั่น ให้ความร้อนเล็กน้อยเพื่อให้ละลาย ใส่กลีเซอรอลไตรบิวทิเรท ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

วิธีการเตรียมสารเคมี

1. สารละลายไอโอดีน

ชั่งไอโอดีน 0.20 กรัม และชั่งโพแทสเซียมไอโอไดด์ 2.00 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นประมาณ 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดสีชา

2. สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเฮปทะไฮเดรต ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$) 0.2 โมลาร์

ชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเฮปทะไฮเดรต 53.65 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

3. โมโนโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$) 0.2 โมลาร์

ชั่งโมโนโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต 31.21 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

4. สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

นำสารละลายในข้อ 2. มา 30.5 มิลลิลตร และสารละลายในข้อ 3. มา 19.5 มิลลิลิตร ผสมเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

5. สารละลาย 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS)

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.60 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร แล้วชั่งสาร 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) 1.00 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร ค่อยๆใส่สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไปจนหมด นำไปอุ่นจนสารละลายใส ชั่งสารโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต เตตระไฮเดรต 30.00 กรัม แล้วค่อยๆเติมลงไปในสารละลายจนครบ ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา

ภาคผนวก ค

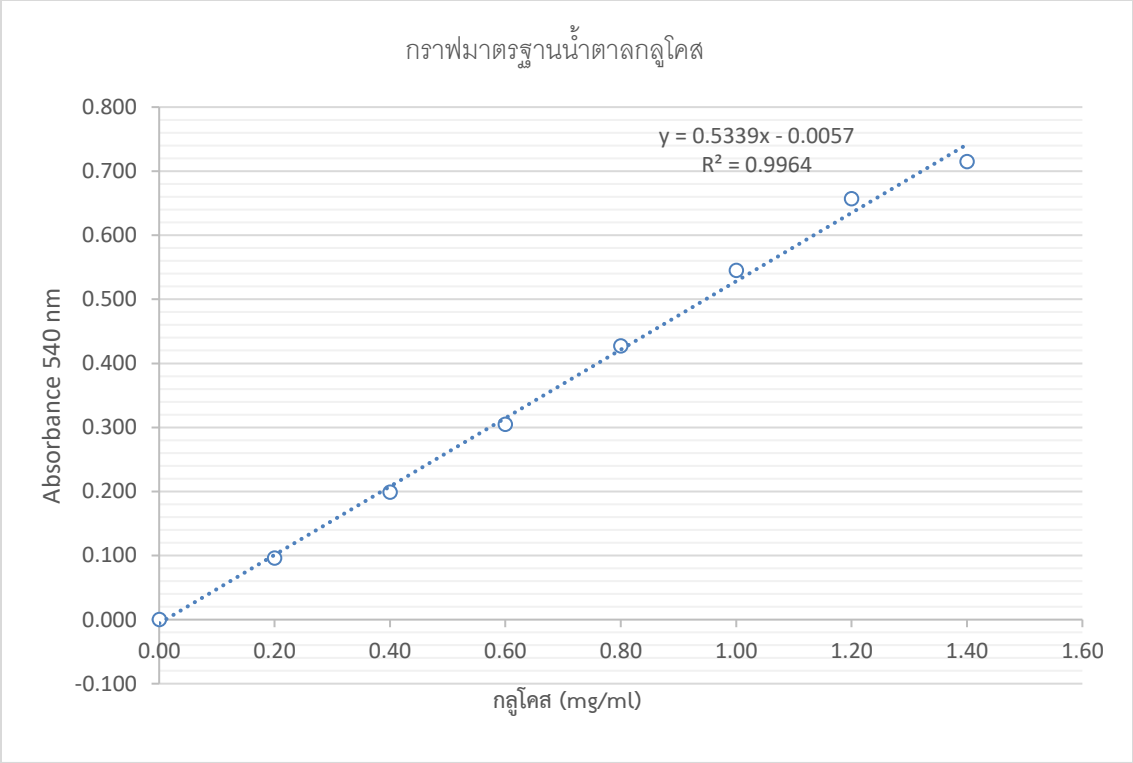
กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

วิธีเตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

1. เตรียมสารละลายกลูโคส ความเข้มข้น 0.00, 0.20, 0.04, 0.06, 0.08, 1.00, 1.20 และ 1.40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่น
2. นำกลูโคสแต่ละความเข้มข้นปิเปตลงในหลอดทดลองหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร
3. เติมสารละลาย DNS 0.5 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน
4. นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีด้วยการใส่ในอ่างน้ำแข็ง
5. เติมน้ำ 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
6. สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในกับความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส

ตาราง ค-1 แสดงผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ของสารละลายกลูโคส ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)

กลูโคส (mg/ml)	DO_{540}				
	ครั้งที่ 1	**ครั้งที่ 2**	**ครั้งที่ 3**	**ค่าเฉลี่ย**	**S.D.**
0.00	0.000	0.001	0.000	0.000	0.001
0.20	0.097	0.097	0.095	0.096	0.001
0.40	0.198	0.201	0.199	0.199	0.002
0.60	0.305	0.308	0.303	0.305	0.003
0.80	0.424	0.430	0.427	0.427	0.003
1.00	0.526	0.565	0.545	0.545	0.020
1.20	0.650	0.662	0.660	0.657	0.006
1.40	0.721	0.715	0.710	0.715	0.006



รูป ค-1 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส วิเคราะห์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)