

การคัดกรองและลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากอาหารหมัก



นางสาวมุกษะรินทร์ พุทโธสวະโก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

ปีการศึกษา 2556

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตที่ส่งมาขึ้นทะเบียนที่สำนักงานบัณฑิตวิทยาลัย
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

SCREENING AND CHARACTERIZATION OF LIPASE PRODUCING BACTERIA FROM
FERMENTED FOODS

Miss Mukkharin Phoottosavako

The logo of Chulalongkorn University, featuring a central emblem with a sunburst and a tiered structure, set against a light background.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Food Technology

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดกรองและลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากอาหารหมัก
โดย	นางสาวมุกษะรินทร์ พุทธิสวัสดิ์โก
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.สุวิมล กীরติพิบูล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโท

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รณิ สวงวดีกุล)
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุวิมล กীরติพิบูล)
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ศาสตราจารย์ ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา)
.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.วรรณพ วิเศษสงวน)

มุกษะรินทร์ พุทธิสวาทโก : การคัดกรองและลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเพสจากอาหารหมัก. (SCREENING AND CHARACTERIZATION OF LIPASE PRODUCING BACTERIA FROM FERMENTED FOODS) อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร.สุวิมล กิรติพิบูล, อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ศ. ดร.สมบุรณ์ ธนาศุภวัฒน์, 134 หน้า.

การคัดแยกและคัดกรองแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเพสทั้งหมด 197 ไอโซเลทจากอาหารหมัก 56 ตัวอย่าง ได้แก่ ไส้กรอกเปรี้ยว แหนม ปลาจ๋า ปลาเจ้า ปลาจ่อม กุ้งจ่อม และหม่า พบว่ามีทั้งสิ้น 60 ไอโซเลทซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเพส อยู่ในช่วง 0.01 – 21.52 U/ml เมื่อนำมาศึกษาลักษณะทางฟิโนไทป์และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA gene พบว่า สามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรูปร่างกลม 14 ไอโซเลทอยู่ในสกุล *Staphylococcus* (13 ไอโซเลท) และ *Micrococcus* (1 ไอโซเลท) และพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็น *Staphylococcus* sp. (6 ไอโซเลท), *S. sciuri* (2 ไอโซเลท), *S. condimentii* (2 ไอโซเลท) และอย่างละ 1 ไอโซเลทของ *S. simulans*, *S. lentus*, *S. gallinarum* และ *M. yunnanensis* โดยมีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 99.55 – 100% จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรูปร่างแท่ง 10 ไอโซเลทอยู่ในสกุล *Bacillus* (7 ไอโซเลท), *Paenibacillus* (1 ไอโซเลท), *Brevibacterium* (1 ไอโซเลท) และ *Corynebacterium* (1 ไอโซเลท) และพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็น *B. cereus* (2 ไอโซเลท) และอย่างละ 1 ไอโซเลทของ *B. methylotrophicus*, *B. pumilus*, *B. flexus*, *B. subtilis*, *B. anthracis*, *Paenibacillus pasadenensis*, *Brevibacterium salitolerans* และ *Corynebacterium liquefaciens* โดยมีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 99.33 – 100 % และจัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีรูปร่างแท่ง 10 ไอโซเลท และพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็น *Proteus mirabilis* (9 ไอโซเลท) และ *Klebsiella pneumonia* (1 ไอโซเลท) โดยมีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 99.78 – 100 % นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 26 ไอโซเลท ซึ่งพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็น *Lactobacillus pentosus* (5 ไอโซเลท), *Lactobacillus* sp. (12 ไอโซเลท), *Pediococcus* sp. (3 ไอโซเลท) และอย่างละ 1 ไอโซเลทของ *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus lolii*, *Weissella thailandensis*, *W. cibaria*, *W. paramesenteroides* และ *Leuconostoc fallax* โดยมีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 99.78 – 100 % อีกด้วย จากผลการคัดกรองการผลิตเอนไซม์ไลเพส พบว่าไอโซเลท KM17-4 ซึ่งพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็น *S. condimentii* ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด จึงนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเพสในอาหารเหลว Nutrient ที่เติม Tween 80 ร้อยละ 1 พบว่าสามารถผลิตได้เหมาะสมที่พีเอช 7 และบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง นอกจากนี้เมื่อเลี้ยง *B. subtilis* SS48-5 ในอาหารที่เติม Tween 80 พีเอช 7.5 นาน 24 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมสูงสุด 3.23 U/ml พบว่าสายพันธุ์นี้ผลิตได้เหมาะสมที่พีเอช 7.5 เมื่อบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 30 ชั่วโมง ในขณะที่ *Proteus mirabilis* PR11-3 มีค่ากิจกรรมสูงสุด 0.57 U/tr และผลิตได้เหมาะสมที่พีเอช 8 เมื่อบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

ปีการศึกษา 2556

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5372305023 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORDS: SCREENING / LIPASE / BACTERIA / FERMENTED FOOD

MUKKHARIN PHOOTTOSAVAKO: SCREENING AND CHARACTERIZATION OF LIPASE PRODUCING BACTERIA FROM FERMENTED FOODS. ADVISOR: ASSOC. PROF. SUWIMON KEERATIPIBUL, Ph.D., CO-ADVISOR: PROF. SOMBOON THANASUPAWAT, Ph.D., 134 pp.

The isolation and screening of one hundred and ninety seven lipase-producing bacteria from 56 fermented food samples including *sai-krog-prieo*, *nham*, *pla-ra*, *pla-chao*, *pla-chom*, *kung-chom* and *mum* were carried out. The results revealed that 60 isolates showed lipase activity ranged from 0.01 - 21.52 U/ml. On the basis of their phenotypic characteristics and 16S rRNA gene sequence analysis, 14 isolates of Gram-positive cocci belonged to genera *Staphylococcus* (13 isolates) and *Micrococcus* (1 isolate) were identified as *Staphylococcus* sp. (6 isolates), *S. sciuri* (2 isolates), *S. condiment* (2 isolates) and each isolate of *S. simulans*, *S. lentus*, *S. gallinarum* and *Micrococcus yunnanensis* based on 99.55 – 100 % sequence similarity. Eleven isolates of Gram-positive rod shaped belonged to genera *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacterium* and *Corynebacterium* were identified as *B. cereus* (2 isolates) and each isolate of *B. methylotrophicus*, *B. pumilus*, *B. flexus*, *B. subtilis*, *B. anthracis*, *Paenibacillus pasadenensis*, *Brevibacterium salitolerans* and *Corynebacterium liquefaciens* based on 99.33 – 100 % sequence similarity. Eleven isolates of Gram-negative rod shaped were identified as *Proteus mirabilis* (9 isolates) and *Klebsiella pneumonia* (1 isolate) based on 99.78 – 100% sequence similarity). In addition, 26 isolates of lactic acid bacteria were identified as *Lactobacillus pentosus* (5 isolate), *Lactobacillus* sp. (12 isolates), *Pediococcus* sp. (3 isolates) and each isolate of *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus lolii*, *Weissella thailandensis*, *W. cibaria*, *W. paramesenteroides* and *Leuconostoc fallax* based on sequence 99.78 – 100 % similarity. The potent isolate KM17-4 identified as *Staphylococcus condimenti* was selected to determine the effects for lipase production. The results revealed that KM17-4 exhibited high lipase activity on Tween 80 at pH 7, 30 C° and incubated for 18 h. In addition, *B. subtilis* SS48-5 exhibited 3.23 U/ml of the highest activity when cultivated on Tween 80 at pH 7.5 for 24 h. The optimum temperature for lipase production this strain was at 40 °C after incubated for 30 h. Whereas, *Proteus mirabilis* PR11-3 exhibited 0.57 U/ml of the highest lipase production activity and the optimum temperature was at 37 °C, pH 8.0 after incubated for 18 h.

Department: Food Technology

Field of Study: Food Technology

Academic Year: 2013

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต และสามารถทำสำเร็จ ล่วงไปได้ด้วยดีนั้นเนื่องจากได้รับความกรุณาในการให้คำแนะนำ คำสอน ข้อคิดเห็น กำลังใจ ความช่วยเหลือตลอดการทำงานวิจัย จากรองศาสตราจารย์ ดร.สุวิมล กิรติพิบูล อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์หลัก และศาสตราจารย์ ดร.สมบูรณ์ ธนาสุขวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม และ ยังกรุณาช่วยตรวจทาน แก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่าง ยิ่ง

รวมทั้ง ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รมณี สงวนตีกุล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนาและ ดร.วรรณพ วิเศษสงวน ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ตรวจสอบ ให้คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยาและชีวเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือและห้องวิจัย เจ้าหน้าที่ทั้งในภาควิชาจุลชีววิทยาและชีวเคมี คณะเภสัช ศาสตร์ ทุกคน ที่ช่วยสอน แนะนำ ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวก ในการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์และห้องวิจัยและขอขอบคุณรุ่นพี่นิสิตปริญญาเอก รุ่นพี่ เพื่อน และรุ่นน้องนิสิตปริญญาโท ทั้งที่คณะเภสัชศาสตร์และคณะวิทยาศาสตร์ รวมถึงผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องที่ไม่ได้เอ่ยนามที่ให้ความ ช่วยเหลือในรูปแบบต่างๆ จนทำให้งานวิจัยฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (RES560530065-FW) ประจำปี 2556 ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัยครั้งนี้

ท้ายที่สุดขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ผู้มีพระคุณ ขอขอบคุณญาติ พี่ น้อง และเพื่อน สำหรับการสนับสนุนในการศึกษา ให้ความช่วยเหลือ และกำลังใจในทุกๆด้านแก่ผู้วิจัยเป็นอย่างดีตลอด มาจนสำเร็จการศึกษา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูปภาพ.....	ฏ
คำย่อ.....	ฑ
บทที่ 1.....	15
บทนำ.....	15
บทที่ 2.....	17
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	17
2.1 เอนไซม์ไลเปส (Lipase).....	18
2.1.1 แหล่งของเอนไซม์ไลเปส.....	20
2.1.2 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปส.....	21
2.2 การผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย.....	24
2.2.1 แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส.....	24
2.2.2 ปัจจัยต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย.....	25
2.2.3 การสกัดและการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์.....	29
บทที่ 3.....	35
วิธีการดำเนินการวิจัย.....	35
3.1 ตัวอย่าง อุปกรณ์และสารเคมี.....	35
3.1.1 ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย.....	35
3.1.2 อุปกรณ์เครื่องมือ.....	35
3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	36
3.1.4 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	36
3.2 ขั้นตอนและวิธีดำเนินงานวิจัย.....	38
3.2.1 การคัดแยกแบคทีเรียจากอาหารหมัก.....	38

3.2.2 การคัดกรองแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส.....	38
3.2.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ โดยอาศัยลักษณะทางพีโนไทป์	39
3.2.3.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา	39
3.2.3.2 ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา	39
3.2.3.3 ศึกษาลักษณะทางชีวเคมี	39
3.2.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ยีน 16S rRNA (sequencing) และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis).....	40
3.2.5 การศึกษาความไวรับของสารปฏิชีวนะต่อแบคทีเรีย	40
3.2.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส	41
3.2.6.1 ศึกษาผลของชนิดสารเหนี่ยวนำ.....	41
3.2.6.2 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการบ่ม.....	41
3.2.6.3 ศึกษาของผลค่า พีเอช.....	41
3.2.6.4 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการบ่ม	41
3.2.7 การผลิต การทำให้บริสุทธิ์และการวิเคราะห์เอนไซม์ไลเปส	41
3.2.7.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต.....	42
3.2.7.2 การจำกัดเกลือโดยการตะไลซิส.....	42
3.2.7.3 การวิเคราะห์เอนไซม์ไลเปสดังนี้.....	42
บทที่ 4	43
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	43
4.1 ผลการแยกแบคทีเรียจากอาหารหมัก	43
4.2 ผลการคัดกรองไลโปไลติกแบคทีเรียบนอาหารแข็ง	46
4.3 ผลการคัดกรองแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสในอาหารเหลว	50
4.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์	50
4.4.1 ผลการศึกษาลักษณะทางพีโนไทป์	50
4.4.2 ผลการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม.....	56
4.4.2.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rDNA (sequencing) และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis).....	56

4.5 ศึกษาความไวรับต่อสารปฏิชีวนะ	
4.6 ผลการผลิตเอนไซม์.....	
4.7 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส	
4.8 การผลิต การทำให้บริสุทธิ์และการวิเคราะห์เอนไซม์ไลเปส	
บทที่ 5	
สรุปผลการทดลอง.....	
รายการอ้างอิง	
ภาคผนวก.....	
ภาคผนวก ก.....	
สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี และบัฟเฟอร์	
ภาคผนวก ข.....	
ข้อมูลผลการทดลอง	
ภาคผนวก ค.....	
การวิเคราะห์.....	
ค.1 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ด้วยวิธี spectrophotometry โดยมี p-nitrophenyl palmitate (p-NPP) เป็นสารตั้งต้น (Lee et al., 2003).....	
ค.2 ปริมาณโปรตีนโดยใช้สารละลาย Coomassie brilliant blue R-250 (Bradford, 1976).....	
ค.3 การทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical test).....	
ค.4 การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต.....	
ภาคผนวก ง	
ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2. 1 ตัวอย่างเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์	21
ตารางที่ 2. 2 ประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสในอุตสาหกรรมต่างๆ	22
ตารางที่ 2. 3 สภาพที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย	27
ตารางที่ 2. 4 ขั้นตอนการทำให้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียให้บริสุทธิ์	32
ตารางที่ 4. 1 ชนิด แหล่งสถานที่เก็บอย่างจำนวนเชื้อ (CFU/ml) และรหัสไอโซเลท	42
ตารางที่ 4. 2 การเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ไลโปไลติกบนอาหารแข็งที่มีสารเหนียวแตกต่างกัน	46
ตารางที่ 4. 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา	49
ตารางที่ 4. 4 เพอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ยีน 16S rRNA ของสายพันธุ์ <i>Staphylococcus</i> และ <i>Micrococcus</i>	56
ตารางที่ 4. 5 ลักษณะทางฟีโนไทป์ที่แตกต่างกันของแบคทีเรียในกลุ่มที่ 1 <i>Staphylococcus</i> และ <i>Micrococcus</i>	57
ตารางที่ 4. 6 เพอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ยีน 16S rRNA ของสายพันธุ์ <i>Bacillus</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Brevibacterium</i> และ <i>Corynebacterium</i>	61
ตารางที่ 4. 7 ลักษณะทางฟีโนไทป์ที่แตกต่างกันของแบคทีเรียในกลุ่มที่ 2 <i>Bacillus</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Brevibacterium</i> และ <i>Corynebacterium</i>	62
ตารางที่ 4. 8 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ยีน 16S rRNA ของสายพันธุ์ <i>Proteus</i> และ <i>Klebsiella</i> (เปอร์เซ็นต์)	66
ตารางที่ 4. 9 ลักษณะทางฟีโนไทป์ที่แตกต่างกันของแบคทีเรียในกลุ่มที่ 3 <i>Proteus</i> และ <i>Klebsiella</i>	67
ตารางที่ 4. 10 เพอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ <i>Lactobacillus</i> , <i>Weissella</i> , <i>Leuconostoc</i> และ <i>Pediococcus</i>	70
ตารางที่ 4. 11 ลักษณะทางฟีโนไทป์ที่แตกต่างกันของแบคทีเรียในกลุ่มที่ 4 แบคทีเรียกรดแลคติก	71
ตารางที่ 4. 12 ทดสอบความไวรับต่อสารปฏิชีวนะของ <i>Staphylococcus</i> และ <i>Micrococcus</i> ...	75
ตารางที่ 4. 13 ทดสอบไวรับต่อสารปฏิชีวนะของ <i>Bacillus</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Brevibacterium</i> และ <i>Corynebacterium</i>	76
ตารางที่ 4. 14 ทดสอบการต้านสารต้านจุลชีพของ <i>Proteus</i> และ <i>Klebsiella</i>	77
ตารางที่ 4. 15 สรุปการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ KM 17-4 โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	94
ตารางที่ ข. 1 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียในอาหาร Nutrient Broth (NB) เติมสารเหนียว Tween 20, Tween 40, Tween 60 และ Tween 80	109
ตารางที่ ค. 1 ปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่เติมลงไปในการละลายโปรตีน 1 ลิตร	118

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่	หน้า
ภาพที่ 2. 1	ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสหรือการสังเคราะห์ไตรเอซิลกลีเซอรอลโดยเอนไซม์ไลเปส 17
ภาพที่ 2. 2	โครงสร้างของโมเลกุลของ (a.) Tributyrin (Butanoic acid,1,2,3-propanetriyl ester) (b.) polysorbate 80 (Tween 80) และกรดโอเลอิก..... 25
ภาพที่ 4. 1	Dendrogram ของแบคทีเรียรูปร่างกลม 53
ภาพที่ 4. 2	Dendrogram ของแบคทีเรียรูปร่างแท่ง..... 54
ภาพที่ 4. 3	แผนภาพต้นไม้วิวัฒนาการ ของกลุ่มสายพันธุ์ <i>Staphylococcus</i> และ <i>Micrococcus</i> และสายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์กัน..... 58
ภาพที่ 4. 4	ภาพ SEM ของ <i>Staphylococcus condimentii</i> (KM17-4) 59
ภาพที่ 4. 5	แผนภาพต้นไม้วิวัฒนาการ ของกลุ่มสายพันธุ์ <i>Bacillus</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Brevibacterium</i> และ <i>Corynebacterium</i> และสายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์กัน..... 63
ภาพที่ 4. 6	ภาพ SEM ของ <i>Bacillus subtilis subsp. Spizizenii</i> (SS48-5) 64
ภาพที่ 4. 7	แผนภาพต้นไม้วิวัฒนาการ ของกลุ่มสายพันธุ์ <i>Proteus</i> , <i>Klebsiella</i> และสายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์กัน..... 68
ภาพที่ 4. 8	แผนภาพต้นไม้วิวัฒนาการ ของกลุ่มสายพันธุ์ <i>Lactobacillus</i> , <i>Weissella</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pediococcus</i> และสายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์กัน..... 72
ภาพที่ 4. 9	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของกลุ่มที่ 1 <i>Staphylococcus</i> และ <i>Micrococcus</i> ใน Nutrient Broth (NB) ที่เติม Tween 20, Tween 40, Tween 60 และ Tween 80. 79
ภาพที่ 4. 10	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของกลุ่มที่ 2 <i>Bacillus</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Brevibacterium</i> และ <i>Corynebacterium</i> ใน NB ที่เติม Tween 20, Tween 40, Tween 60 และ Tween 80..... 80
ภาพที่ 4. 11	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของกลุ่มที่ 3 <i>Proteus</i> ในอาหาร NB ที่เติม Tween 20, Tween 40, Tween 60 และ Tween 80 81
ภาพที่ 4. 12	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของกลุ่มที่ 4 แบคทีเรียกรดแลคติก (รูปร่างแท่ง) ในอาหาร NB ที่เติม Tween20, Tween40, Tween60 และ Tween 80..... 82
ภาพที่ 4. 13	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของในกลุ่มที่ 4 แบคทีเรียกรดแลคติก (รูปร่างกลม) ในอาหาร NB ที่เติม Tween 20, Tween 40, Tween 60 และ Tween 80..... 83
ภาพที่ 4. 14	เปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย KM17-4 ระหว่าง Nutrient Broth (NB) ที่เติมและไม่เติม Tween 80 กับอาหาร Lipolytic broth (LB) ที่เติมและไม่เติม Tween 80..... 86
ภาพที่ 4. 15	เปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์จากแบคทีเรีย KM17-4 ในอาหาร NB ที่เติมสารเหนียวน้ำ (อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 7.4 เวลา 24 ชั่วโมง) 86
ภาพที่ 4. 16	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย KM 17-4 ที่ค่าพีเอชต่างๆ (Nutrient Broth ที่เติม Tween 80 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง)..... 87

ภาพที่ 4. 17	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเพสจากแบคทีเรีย KM17-4 ที่เวลาในการบ่มต่างๆ (NB ที่เติม Tween 80 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 7).....	87
ภาพที่ 4. 18	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเพสจากแบคทีเรีย KM17-4 ที่อุณหภูมิและเวลาในการบ่มต่างๆ (NB ที่เติม Tween 80 พีเอช 7).....	88
ภาพที่ 4. 19	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเพสจากแบคทีเรีย SS48-5 ที่ค่าพีเอชต่างๆ.....	89
ภาพที่ 4. 20	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเพสจากแบคทีเรีย SS48-5 ที่อุณหภูมิและเวลาในการบ่มต่างๆ (NB ที่เติม Tween 80 พีเอช 7.5).....	89
ภาพที่ 4. 21	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเพสจากแบคทีเรีย PR11-3 ที่ค่าพีเอชต่างๆ (NB ที่เติม Tween 80 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง).....	90
ภาพที่ 4. 22	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเพสจากแบคทีเรีย PR11-3 ที่อุณหภูมิและเวลาในการบ่มต่างๆ (NB ที่เติม Tween 80 พีเอช 8.0).....	91
ภาพที่ 4. 23	SDS-PAGE (1) โปรตีนมาตรฐาน และ (2) สารละลายเอนซ์หลังตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 40 - 80 เปอร์เซ็นต์.....	95
ภาพที่ ค. 1	กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ <i>p</i> -nitrophenyl แสดงสมการเส้นตรง $y = 0.0147x + 0.0129$, โดยแกน <i>y</i> เป็นค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ 405 nm และแกน <i>x</i> เป็นค่าความเข้มข้นของ <i>p</i> -nitrophenyl (μmole ของ <i>p</i> -nitrophenyl).....	113
ภาพที่ ค. 2	กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA) แสดงสมการเส้นตรง $y = 1.994x - 0.0108$, โดยแกน <i>y</i> เป็นค่าการดูดกลืนแสง(OD) ที่ 595 nm และแกน <i>x</i> เป็นค่าความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน BSA (mg/ml).....	115

คำย่อ

μg	ไมโครกรัม
μl	ไมโครลิตร
mg	มิลลิกรัม
ml	มิลลิลิตร
w/v	น้ำหนักต่อปริมาตร
v/v	ปริมาตรต่อปริมาตร
U/mg	ยูนิตต่อมิลลิกรัม
U/ml	ยูนิตต่อมิลลิลิตร
nmol/min	นาโนโมลต่อนาที
rpm	รอบต่อนาที
N	นอร์มอล
$^{\circ}\text{C}$	องศาเซลเซียส
%	เปอร์เซ็นต์
h.	ชั่วโมง
kD	กิโลดาลตัน
nm	นาโนเมตร
L	ลิตร

บทที่ 1

บทนำ

ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่กระตุ้นการย่อยสลายของไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ให้เป็นกลีเซอรอล (glycerol) และกรดไขมัน (fatty acid) มักถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการปรับปรุงกลิ่นรสของอาหารแทนการปรับปรุงกระบวนการทางเคมีที่ใช้กันอยู่เดิม เอนไซม์ไลเปสยังถูกนำมาใช้เพื่อการตัดแปรคุณสมบัติของน้ำมันโดยการแปรตำแหน่ง และชนิดของกรดไขมันที่เข้าจับกับกรีเซอรอลในโมเลกุลของไขมันเพื่อให้ได้คุณสมบัติตามที่ต้องการ ซึ่งวิธีการนี้ทำให้ได้น้ำมันชนิดใหม่และยังนำไปสู่การพัฒนาเป็นสารที่ให้กลิ่นรส (flavor) นอกจากนี้ยังมีการใช้ไลเปสจากจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น ผงซักฟอก อาหาร อุตสาหกรรมสารให้กลิ่นรส สารกระตุ้นชีวภาพทางเภสัชกรรม ใช้เป็นไบโอเซนเซอร์ ใช้ในเครื่องสำอาง และน้ำหอม เป็นต้น (2006) เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์จึงได้รับความสนใจและมีการพัฒนาเทคโนโลยีเอนไซม์อย่างรวดเร็ว ซึ่งไลโปไลติกแบคทีเรีย (Lipolytic bacteria) นั้นสามารถย่อยโมเลกุลของไขมันให้เป็นกลีเซอรอล (Jaeger et al., 1994)

เนื่องจากในประเทศไทยมีผลิตภัณฑ์อาหารหมักหลายประเภทซึ่งเป็นที่นิยมของคนไทยจำนวนมาก เช่น แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว และผลิตภัณฑ์ปลาหมัก ได้แก่ น้ำปลา กะปิ และปลาร้า เป็นต้น และการหมักเป็นรูปแบบหนึ่งของการยืดอายุการเก็บของอาหาร ซึ่งในปัจจุบันมีการศึกษาพัฒนาการในใช้แบคทีเรียกรดแลคติกอย่างแพร่หลาย ในการปรับปรุงรสเปรี้ยวในอาหารหมักเหล่านี้ แต่ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากเนื้อเช่น แหนม นั้นมีปริมาณของไขมันอยู่มาก ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบของไขมันและกรดไขมันโดยเอนไซม์ไลเปสในระหว่างการหมัก มีผลต่อเนื้อสัมผัสและกลิ่นรสเฉพาะตัวของผลิตภัณฑ์อาหารหมักเช่นกัน (Visessanguan, Benjakul, Riebroy, Yarchai, & Tapingkae, 2006) นอกจากนี้ในต่างประเทศก็มีการศึกษาการใช้เชื้อ *Staphylococcus* sp. ในการหมักผลิตภัณฑ์ประเภทไส้กรอก (sausages) โดยพบว่าการใช้เชื้อ *Staphylococcus* sp. ทำให้เนื้อมีสีแดงจากการรีดิวซ์ไนเตรท (M.C. Miralles, Flores, & Perez-Martinez, 1996) และช่วยลักษณะทางประสาทสัมผัสอื่นๆเช่น เนื้อสัมผัสและกลิ่นรสดีขึ้นด้วย (Hammes & Hertel, 1998) ซึ่งลักษณะดังกล่าวเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในระหว่างการหมักทำให้เกิดกรดไขมันอิสระ ซึ่งเป็นสารทำให้รสชาติโดยรวมของผลิตภัณฑ์มีความเฉพาะตัวและมีเนื้อสัมผัสที่ดีอีกด้วย (Montel, Masson, & Talon, 1998; Toldrá, Sanz, Flores, & 2001)

การศึกษาไลโปไลติกแบคทีเรียในประเทศไทยยังมีน้อยมาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงจะคัดแยกและคัดเลือกเอนไซม์แบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปส จากผลิตภัณฑ์อาหารหมักพื้นบ้านของไทย ซึ่งเอนไซม์ไลเปสที่ได้น่าจะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปปรับปรุงกลิ่นรสและเนื้อสัมผัสในผลิตภัณฑ์หมักและอาหารชนิดอื่นๆต่อไป หรือนำไปผลิตในอุตสาหกรรมต่อไป

1. เพื่อคัดแยก คัดกรองแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากอาหารหมักพื้นบ้านของไทย
2. ศึกษาลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้
3. วิเคราะห์คุณสมบัติเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้

1. หากเชื้อแบคทีเรียมีประสิทธิภาพดีก็จะนำไปใช้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ในอุตสาหกรรมอาหารหมักซึ่งจะทำให้ผลิตภัณฑ์มีคุณภาพดีและมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคมากขึ้น
2. ทำให้ทราบความหลากหลายของแบคทีเรียซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่คัดแยกได้จากอาหารหมักพื้นบ้านของไทย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การหมักเป็นวิธีการถนอมอาหารวิธีหนึ่งที่อยู่กันมาเป็นระยะเวลายาวนาน โดยช่วงแรกมีวัตถุประสงค์เพื่อการถนอมอาหารและยืดอายุการเก็บรักษา ผลิตภัณฑ์แปรรูปจากกระบวนการหมักหรือผลิตภัณฑ์อาหารหมัก (fermented food) ได้รับความนิยมน้อยแต่แพร่หลายในประเทศแถบตะวันออกเฉียงเหนือมากกว่าในประเทศแถบตะวันตก โดยเฉพาะในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น เวียดนาม ลาว กัมพูชา และไทย (Tanasupawat & Komagata, 2001) สำหรับประเทศไทย อาหารหมักแบบดั้งเดิม (ผลิตภัณฑ์ปลา เนื้อ และ ผัก) มีกระบวนการผลิตและการกินที่แตกต่างกัน ผลิตภัณฑ์อาหารหมักของไทยโดยมีทั้งผลิตภัณฑ์จาก เนื้อ นม ผัก และผลไม้ ผลิตภัณฑ์จากเนื้อหมักที่เป็นที่นิยม เช่น แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว และยังมีกรรมวิธีนำสัตว์น้ำ เช่น ปลา กุ้ง มาแปรรูปโดยการหมัก เช่น ปลาร้า ปลาสาม ปลาแจ่ว ปลาจ่อม กุ้งจ่อม กะปิ บูด เป็นต้น ส่วนใหญ่จะเป็นการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อให้มีรสเปรี้ยวและบ่มของอาหารเหล่านี้ (Tanasupawat & Komagata, 1995) แต่ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากเนื้อ เช่น แหนม ปลาร้า นั้นมีปริมาณของไขมันอยู่มาก ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของไขมันและกรดไขมันโดยเอนไซม์ไลเปสในระหว่างการหมัก ซึ่งมีผลต่อเนื้อสัมผัสและกลิ่นรสเฉพาะตัวของผลิตภัณฑ์อาหารหมักเช่นกัน (Visessanguan et al., 2006)

ปัจจุบันภาคอุตสาหกรรมอาหารได้ให้ความสนใจในการผลิตอาหารโดยใช้สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่มาจากธรรมชาติและหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีเติมลงไปในกระบวนการผลิต อาหารหมักประเภทเนื้อของไทย เช่น แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว และปลาร้า ได้รับความนิยมน้อยแต่แพร่หลายตั้งแต่ในอดีตจนถึงปัจจุบัน โดยพบว่า ในอดีตอาหารเหล่านี้มักใช้แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีอยู่ตามธรรมชาติที่ติดมากับวัตถุดิบในการหมักและควบคุมสภาวะการหมักให้เหมาะสม เพื่อให้แบคทีเรียกรดแลคติกชนิดที่ต้องการเจริญได้ดี ต่อมาได้มีการริเริ่มการผลิตในระดับกึ่งอุตสาหกรรมและอุตสาหกรรม โดยผู้ผลิตหันมาใช้เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์กันมากขึ้น (นภา โล่ทอง, 2535)

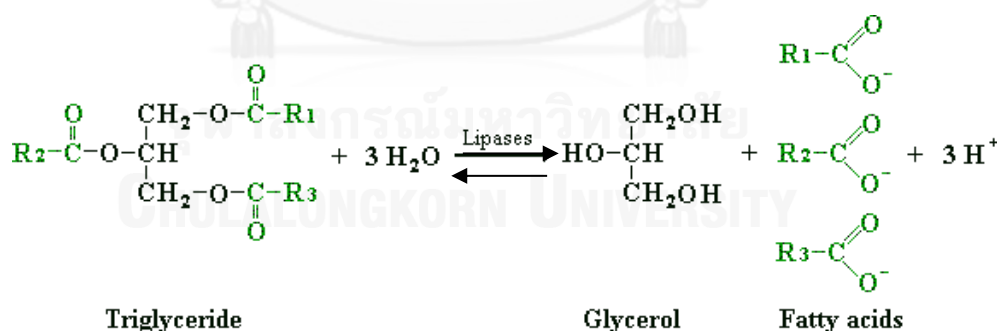
การพัฒนาและใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมักผลิตภัณฑ์จากเนื้อ เช่น ไส้กรอก (sausages) ได้แก่ *Staphylococcus xylosum*, *S. saprophyticus*, *S. equorum*, *S. carnosus* และ *S. simulans* (Annalisa, Francesco, Fide, & Yolanda, 2006) โดยแบคทีเรียชนิดนี้ช่วยทำให้เกิดลักษณะที่ต้องการ คือ ไขมันสีแดงจากการรีดิวซ์ไนเตรท ไนเตรทจะถูกรีดิวซ์ให้เป็นไนเตรต์ แล้วรีดิวซ์ต่อไปเป็นไนตริกออกไซด์ (NO) ไนตริกออกไซด์ทำปฏิกิริยากับไมโอโกลบินโดยตรงได้ ไนตริกออกไซด์ไมโอโกลบินซึ่งเป็นรงควัตถุสีแดงสดในเนื้อสัตว์ และเมื่อนำไปถูกความร้อนนี้จะกลายเป็นสีที่คงทนของไนโตรโซฮีโมโครม ซึ่งเป็นสีชมพูของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ (M. C. Miralles, Flores, & PerezMartinez, 1996) และพบว่า แบคทีเรียเหล่านี้มีส่วนช่วยปรับปรุงลักษณะทางประสาทสัมผัส เช่น เนื้อสัมผัสและกลิ่นรสให้ดีขึ้นด้วย (Hammes & Hertel, 1998) ซึ่งลักษณะดังกล่าวเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์จากกล้ามเนื้อและจากจุลินทรีย์ซึ่งเป็นเอนไซม์เฉพาะที่เกี่ยวข้องกับการเผาผลาญโปรตีนและไขมันในระหว่างการหมักแห้งไส้กรอก นั่นคือเอนไซม์โปรติเอส (protease) และเอนไซม์ไลเปส (lipase) ทำให้เกิดการสลายเปปไทด์ กรดอะมิโนอิสระ และกรดไขมันอิสระ (Montel

et al., 1998; Toldrá et al., 2001) ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้เป็นที่รู้จักกันดีว่ามีส่วนช่วยให้รสชาติโดยรวมของผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากเนื้อมีความเฉพาะตัวและยังเป็นสารตั้งต้นของสารหอมระเหยอื่นๆ อีกด้วย

2.1 เอนไซม์ไลเปส (Lipase)

เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ย่อยหนึ่งในเอนไซม์ลิโปไลติก เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่สามารถย่อยไขมันได้ ซึ่งจะประกอบด้วย เอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรส (carboxyl esterase; EC 3.1.1.1.) และ เอนไซม์ไลเปส (true lipase; EC 3.1.1.3) ความแตกต่างของสองเอนไซม์นี้คือ เอนไซม์เอสเทอเรสจะย่อยสลายพันธะเอสเทอร์สายสั้นในโมเลกุลที่สามารถละลายน้ำได้ทันที แต่เอนไซม์ไลเปส นั้นจะความจำเพาะต่อพันธะเอสเทอร์ของไตรกลีเซอไรด์ที่ต่อกับกรดไขมันสายยาวที่เป็นส่วนที่ไม่ละลายน้ำ และจะทำปฏิกิริยาได้ดีเมื่อไตรกลีเซอไรด์อยู่ในสภาพที่ไม่ละลายน้ำ หรือบริเวณที่มีการสัมผัสของน้ำและน้ำมันหรือภาวะรูปีมัลชัน (Arpigny & Jaeger, 1999; Hausmann & Jaeger, 2010)

เอนไซม์ไลเปสหรือกลีเซอรอลเอสเทอร์ไฮโดรเลสหรือไตรเอซิลกลีเซอรอลไฮโดรเลส (lipase: glycerol ester hydrolase: triacylglycerol hydrolase: E.C. 3.1.1.3) จัดเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มไฮโดรเลส (hydrolase) เป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการเร่งการย่อยสลายโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ให้เป็นกลีเซอรอล (glycerol) กรดไขมัน (fatty acid) และ partial glyceride โดยที่ไลเปสจะเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายตรงพันธะเอสเทอร์ที่พันธะระหว่างกรดไขมันสายยาวกับกลีเซอรอลของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (ภาพที่ 2.1) เอนไซม์ไลเปสจะทำปฏิกิริยาดังกล่าวได้ดีเมื่อไตรกลีเซอไรด์อยู่ในสภาพที่ไม่ละลายน้ำ (water-insoluble substrate) หรือบริเวณที่มีการสัมผัสของน้ำและน้ำมันหรือภาวะรูปีมัลชัน (oil-water interface) (Cihangir & Sarikaya, 2004) ซึ่งเรียกลักษณะการทำงานของเอนไซม์ไลเปสว่า “interfacial activation” (Jensen, 1983; Macrae, 1983; Schmid & Verger, 1998)



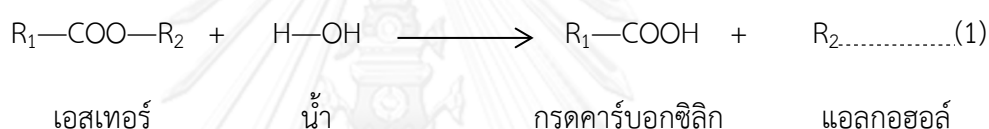
ภาพที่ 2. 1 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสหรือการสังเคราะห์ไตรเอซิลกลีเซอรอลโดยเอนไซม์ไลเปส

นอกจากนี้ เอนไซม์ไลเปสยังมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาอื่นๆได้อีกหลายปฏิกิริยา เช่น ไลเปสสามารถเร่งปฏิกิริยาย้อนกลับของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอสเทอร์และน้ำ หรือปฏิกิริยาที่มีการโยกย้ายหมู่เอซิล (acyl group) แอลกอฮอล์ (alcohol) เอสเทอร์ (ester) ไกลโคไซด์ (glycoside) และเอมีน (amines) ได้ (Gupta, Mehra, & Gupta, 2004; Schmidt-Dannert, Sztajer, StGcklein, Menge, & Schmid, 1994) โดยการปฏิกิริยาการทำงานของแสดงในสมการ (1) (2) และ (3)

การทำงานของเอนไซม์ไลเปส (Yamane, 1987)

เอนไซม์ไลเปสสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ 2 ชนิด

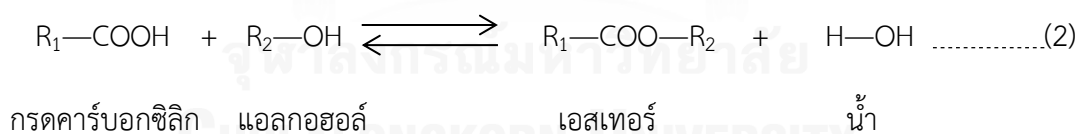
1. ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis)



ไลเปสจะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสลายเอสเทอร์ด้วยน้ำได้กรดคาร์บอกซิลิกและแอลกอฮอล์ เป็นผลิตภัณฑ์ เกิดในสารละลายที่มีน้ำ

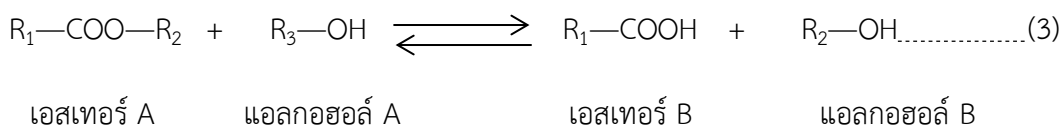
2. ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ (Synthesis)

- ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (Esterification)



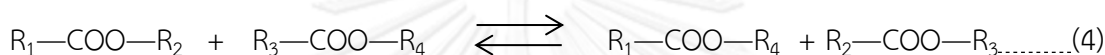
ไลเปสจะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ โดยการแทนที่หมู่ไฮดรอกซิล (OH group) ของกรดคาร์บอกซิลิกด้วยหมู่แอลคอกซิล (OR group) จากแอลกอฮอล์

- ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน (Transesterification)



ไลเปสจะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการแทนที่ของหมู่แอลคอกซิล (OR₂ group) จากเอสเทอร์ A ด้วย หมู่แอลคอกซิล (OR₃ group) อีกตัว จากแอลกอฮอล์ A ได้เอสเทอร์และแอลกอฮอล์ชนิดใหม่เกิดขึ้นเป็นผลิตภัณฑ์

- ปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเทอร์ฟิเคชัน (Interesterification)



ไลเปสจะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนหมู่แอลคอกซิล (OR₂ group และ OR₄ group) ระหว่างเอสเทอร์ 2 ชนิด ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอสเทอร์ใหม่ 2 ชนิด

2.1.1 แหล่งของเอนไซม์ไลเปส

เนื่องจากไลเปสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อเมตาบอลิซึมในการเจริญของสิ่งมีชีวิต จึงพบไลเปสได้ทั่วไปทั้งในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ (Sztajer, 1988)

เอนไซม์ไลเปสจากสัตว์ ไลเปสในสิ่งมีชีวิตยูคาริโอตจะมีส่วนร่วมในหลายกระบวนการของเมตาบอลิซึมของไขมัน ได้แก่ การย่อยอาหารชนิดไขมัน การดูดซึมไขมัน การคั้นรูป และเมตาบอลิซึมของไลโปโปรตีน (Sharma, Chisti, & Banerjee, 2001) พบได้ทั่วไปในเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ ของสัตว์ที่ เช่น หัวใจ ไต สมอง กล้ามเนื้อ ซีรัม (serum) และที่สำคัญคือ ตับอ่อน (pancreatic lipase) ซึ่งเป็นแหล่งแรกที่พบไลเปส โดยตับอ่อนมีหน้าที่ย่อยสลายโมเลกุลในระบบย่อยอาหารของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เอนไซม์ไลเปสโดยเฉพาะจากตับอ่อนของสุกร เนื่องจากมีความเข้มข้นสูงและสามารถนำกลับมาใช้ประโยชน์ได้อีก นอกจากนี้ยังมีการแยกเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนของหนู โค และกระปือ เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากน้ำนมได้มีรายงานเล็กน้อย (Chandan & Shahani, 1964) แต่การเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ไม่ค่อยประสบความสำเร็จนัก เนื่องจากคุณสมบัติไม่คงตัว (Shahani, 1975; Steiner & Williams, 2002)

เอนไซม์ไลเปสจากพืช มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นและมีคุณสมบัติพิเศษ ที่หาไม่ได้จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหรือในจุลินทรีย์ (Huang, Lin, & Wang, 1988) โดยพบในพืชจำพวก ข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต ข้าวไรย์ ฟ้าย ถั่วเหลือง และ ละหุ่ง (Arnold, Shahani, & Dwivedi, 1975) ผลปาล์ม เมล็ดข้าวโพด เมล็ดทานตะวัน มะกอก เป็นแหล่งสำคัญของไลเปสในพืช โดย Huang และคณะ (1988) รายงานว่า เมล็ดพืชจะสะสมไขมันไว้รูปของ lipid-bodies และ glyoxysome ซึ่งบริเวณเนื้อเยื่อ

ดังกล่าวก็สามารถพบไลเปสได้ ซึ่งในธัญพืชจะพบไลเปสที่รำ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าไลเปสในพืชตระกูลหญ้า (Gramineaceae) *Avena fountua* ซึ่งให้ค่าสูงถึง 93.3 U/g (Al-Widyan & Al-Shyoukh, 2002)

เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ผลิตได้จากทั้ง แบคทีเรีย รา และยีสต์ จุลินทรีย์ที่ผลิตไลเปสได้มีทั้งแบบที่ผลิตออกมาภายนอกเซลล์และภายในเซลล์ ซึ่งส่วนใหญ่จะละลายออกมานอกเซลล์และละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Taipa, Aires-Barros, & Cabral, 1992) ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์ที่มีการผลิตและใช้ในทางการค้า Jaeger และคณะ (1998) รายงานว่า ในปี 1994 บริษัท Novo Nordisk ได้ผลิตไลเปสเพื่อการค้าตัวแรก ในชื่อ Lipolase ซึ่งได้จากฟังไจสายพันธุ์ *Thermomyces lanuginosus* และ *Aspergillus oryzae* ในปี 1995 ไลเปสจากแบคทีเรีย 2 ตัวก็ถูกผลิตและแพร่หลายให้เป็นที่รู้จักในชื่อ Lumafast จากแบคทีเรีย *Pseudomonas mendocina* และ ไลเปสชื่อ Lipomax จาก *P. alcaligenes*

เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากพืชมักอยู่ในพบในเนื้อเยื่อที่ให้พลังงานและเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากสัตว์มักจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆของเมตาบอลิซึมของไขมัน เช่น กระบวนการย่อยสลายไขมัน การดูดซึมไขมัน และกระบวนการเชิงซ้อนของโปรตีนกับไขมัน (lipoprotein metabolism) ซึ่งทำให้ไลเปสจากแหล่งพืชและสัตว์นั้นถึงจะให้ปริมาณของไลเปสเข้มข้นสูงแต่มีข้อจำกัดและยุ่งยากต่อการสกัดเอนไซม์ประกอบกับเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์นั้น มีข้อดีคือสามารถเจริญเติบโตเร็วเพาะเลี้ยงได้ง่าย และยังสามารถเพิ่มผลผลิตให้รวดเร็วขึ้นจากการปรับปรุงพันธุกรรมและยังสามารถปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ได้ง่ายกว่าในพืชและสัตว์ จึงมีการศึกษาและนำเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ไปใช้อย่างแพร่หลายมากกว่า โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากแบคทีเรีย (Wiseman, 1995)

เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์มีคุณสมบัติเฉพาะที่สำคัญ 4 ประการ (Jaeger & Reetz, 1998) คือ

- 1) มีความคงทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์
- 2) ในการทำงานไม่ต้องการโคแฟกเตอร์ (cofactors)
- 3) มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นหลายชนิด
- 4) มี Enantioselectivity สูง

2.1.2 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปส

การใช้เอนไซม์ไลเปสในอุตสาหกรรมอาหารเริ่มตั้งแต่ศตวรรษที่ 20 เพื่อใช้ในการปรับปรุงกระบวนการทางเคมีที่ใช้กันอยู่เดิมในอุตสาหกรรมอาหาร สำหรับอุตสาหกรรมการผลิตไขมันและน้ำมัน เอนไซม์ไลเปสถูกนำมาใช้ในการตัดแปรคุณสมบัติของน้ำมันโดยการแปรตำแหน่งและชนิดของกรดไขมันที่เข้าจับกับกรีเซอร์อลในโมเลกุลของไขมันเพื่อให้ได้คุณสมบัติตามที่ต้องการ ซึ่งวิธีการนี้ทำให้ได้น้ำมันชนิดใหม่และยังนำไปสู่การพัฒนาเป็นสารที่ให้กลิ่นรส (flavor) (กัญภัทร จินดา, 2547)

กรดไขมันที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ไลเปส โดยเฉพาะกรดไขมันชนิดพวกที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและระเหยได้เช่น acetic acid, propionic acid, butyric acid, valeric acid

และ caproic acid เป็นกรดไขมันที่มีกลิ่นเฉพาะตัว และยังใช้ทำให้เกิดกลิ่นเฉพาะตัวของผลิตภัณฑ์อาหารชนิดอื่นๆได้ ดังนั้นเอนไซม์ไลเปสจึงมักถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมในการปรับปรุงกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆเช่นโยเกิร์ต เนยแข็งและไส้กรอก (Jaeger et al., 1994)

Udomsil และคณะ (2010) พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่ชอบเค็ม (Halophilic lactic acid bacteria) สายพันธุ์ของ *Tetragenococcus halophilus* ที่แยกได้จากน้ำปลา มีบทบาทสำคัญในการสร้างสารระเหยในระหว่างการหมักน้ำปลาโดยสารระเหยที่พบจาก *T. halophilus* สายพันธุ์ MS33 และ MRC5-5-2 คือ 1-propanol, 2-methylpropanal และ benzaldehyde นอกจากนี้ Udomsil และคณะ (2011) ยังพบอีกว่า *Tetragenococcus halophilus* มีศักยภาพเป็นเชื้อเริ่มต้นสำหรับการปรับปรุงรสชาติในการหมักน้ำปลา ซึ่งน้ำปลาหมักที่ได้มีปริมาณกรดอะมิโนสูงชัน และยังพบสารระเหยที่สำคัญในน้ำปลาคือ 2-methylpropanal, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal และ benzaldehyde เชื้อ *T. halophilus* ที่หมักในน้ำปลานั้นมีความสามารถในการลด dimethyl disulfide ดังนั้นการใช้ *T. halophilus* สำหรับการหมักน้ำปลาสามารถเพิ่มกรดอะมิโนและสารระเหยเช่นเดียวกับช่วยลดปริมาณ biogenic amine ของผลิตภัณฑ์น้ำปลาได้

ตารางที่ 2. 1 ตัวอย่างเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์ (Sharma et al., 2001)

ชนิด	สายพันธุ์	ประโยชน์	บริษัทผู้ผลิต
รา/ยีสต์	<i>Candida rugosa</i>	Organic synthesis	Amano, Biocatalysts, Boehringer Mannheim, Fluka, Genzyme, Sigma
	<i>Candida antarctica</i>	Organic synthesis	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk
	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Detergent additive	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk
	<i>Rhizomucor miehei</i>	Food processing	Novo Nordisk, Biocatalysts, Amano
แบคทีเรีย	<i>Burkholderia cepacia</i>	Organic synthesis	Amano, Fluka, Boehringer Mannheim
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Detergent additive	Genencor
	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Detergent additive	Genencor
	<i>Chromobacterium viscosum</i>	Organic synthesis	Asahi, Biocatalysts

ตารางที่ 2. 2 ประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสในอุตสาหกรรมต่างๆ

อุตสาหกรรม	นำมาใช้	ผลิตภัณฑ์หรือการใช้ประโยชน์
ผงซักฟอก	ไฮโดรไลซิสไขมัน	ขจัดไขมันออกจากเสื้อผ้า
ผลิตภัณฑ์นม	ไฮโดรไลซิสไขมันนมทำให้ชีสสุกและปรับปรุงไขมันในเนย	พัฒนากลิ่นรสของนม ชีส และเนย
ผลิตภัณฑ์เบอร์เกอร์เครื่องดื่ม	การปรับปรุงกลิ่นรส ปรับปรุงกลิ่น	ยืดอายุของผลิตภัณฑ์เบอร์เกอร์ เครื่องดื่มแอลกอฮอล์เช่น ไวน์
Food dressing	ปรับปรุงคุณภาพ	มายองเนส น้ำสลัด และวิปปิง
อาหารเพื่อสุขภาพ	ปฏิกิริยา Transesterification	อาหารเพื่อสุขภาพ
ไขมันและน้ำมัน	ปฏิกิริยา Transesterification และไฮโดรไลซิส	เนยรสโกโก้ มากา린 กรดไขมัน กลีเซอรอล โมโน-และไดกลีเซอรอล
เนื้อและปลา	ปรับปรุงกลิ่นรส	ผลิตภัณฑ์เนื้อและปลาปราศจากไขมัน
เคมี	การสังเคราะห์ Enantioselectivity	Chiral buiding block
ทางเภสัชกรรม	ปฏิกิริยา Transesterification และไฮโดรไลซิส	ไขมันชนิดพิเศษ ยาย่อยอาหาร สร้างสาร intermediates หลายชนิดที่ใช้ทางการแพทย์
เครื่องสำอาง	การสังเคราะห์เอสเทอร์	ผลิตภัณฑ์ที่เป็นอิมันซัลและสารให้ความชุ่มชื้น ครีมบำรุงผิว ครีทกันแดด
อุตสาหกรรมเชื้อเพลิง	ปฏิกิริยา Transesterification	การผลิตไบโอดีเซล
เคมีเกษตร	การสังเคราะห์เอสเทอร์	สารกำจัดวัชพืชพืชพวกพวงสาร phenoxypropionate
กระดาษ	ไฮโดรไลซิส	ปรับคุณภาพกระดาษ
เครื่องหนัง	ไฮโดรไลซิส	ผลิตภัณฑ์เครื่องหนัง
การทำความสะอาด	ไฮโดรไลซิส	กำจัดไขมัน
การควบคุมมลภาวะ	ปฏิกิริยา Transesterification และไฮโดรไลซิส ของไขมันและจารบี	กำจัดคราบและย่อยสารพวกไขมันและจารบี

ที่มา : (Verma, Thakur, and Bhatt (2012); Vulfson (1994))

มีการใช้เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมต่างๆเช่น ผงซักฟอก อาหาร อุตสาหกรรมของสารให้กลิ่นรส สารกระตุ้นชีวภาพทางเภสัชกรรม เอสเทอและอนุพันธ์กรดอะมิโนทำให้ปรับปรุงลักษณะทางเคมี ใช้เป็นสารเคมีชีวภาพ ใช้เป็นไบโอเซนเซอร์ ใช้ในเครื่องสำอางและน้ำหอม และยังพบว่าในอุตสาหกรรมอาหารและอาหารสัตว์ จะใช้เอนไซม์โปรตีเอส อะไมเลส ไลเปส และเซลลูเลสที่ใช้ในการทำความสะดวก รวมทั้ง ผงซักฟอก น้ำยาล้างจาน และสารเพื่อการทำความสะอาดอื่นๆ (Hasan et al., 2006; Ray, 2012) เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์จึงได้รับความสนใจและมีการพัฒนาเทคโนโลยีเอนไซม์อย่างรวดเร็ว ตารางที่ 2.2 แสดงประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสในอุตสาหกรรมต่างๆ

2.2 การผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย

2.2.1 แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส

แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส (Lipolytic bacteria) สามารถย่อยโมเลกุลของไขมันให้เป็นกลีเซอรอลได้ (Jaeger et al., 1994) บางชนิดเกิดปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชันกับกรดไขมันไม่อิ่มตัว (Unsaturated fatty acid) และแบคทีเรียบางชนิดเปลี่ยนกรดไขมันสายยาว (Long-chain fatty acid) ให้เป็นคีโตน อาหารเกิดกลิ่นได้ (Arpigny & Jaeger, 1999)

แบคทีเรียแกรมลบที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส เช่น *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas mendocina*, *Rhodospirillum rubrum*, *Vibrio cholera*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Aeromonas hydrophila*, *Dehalococcoides* sp., *Chromobacterium violaceum*, *Burkholderia glumae*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia thailandensis*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas luteola*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. aureofaciens*, *P. marginata*, *Serratia marcescens*, *Alcaligenes paradoxus*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* เป็นต้น

แบคทีเรียแกรมบวกที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส เช่น *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. clausii*, *B. thermocatenulatus*, *B. stearothermophilus*, *Geobacillus zalihae*, *G. kaustophilus*, *Staphylococcus hyicus*, *S. simulans*, *S. xylosus*, *S. epidermis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. aureus*, *Propionibacterium acnes*, *Corynebacterium glutamicum*, *S. saprophyticus*, *Micrococcus luteus*, *M. varians*, *Clostridium gloni*, *C. sporogenes*, *C. botulinum*, *C. aurantibutyricum* เป็นต้น (Arpigny & Jaeger, 1999; Hausmann & Jaeger, 2010)

แบคทีเรียแกรมบวก 2 สายพันธุ์ที่เป็นที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้คือ *Bacillus* และ *Staphylococcus* ไลเปสจาก *Bacillus* จาก *B. subtilis* and *B. pumilus* ซึ่งเป็น mesophilic strains ผลิตเอนไซม์ที่มีขนาดเล็กที่สุดในกลุ่มเอนไซม์ไลเปสคือประมาณประมาณ 20 กิโลดาลตัน และเอนไซม์มีความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนน้อยมากประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกัน

Bacillus สายพันธุ์อื่นๆ นอกจากนี้ *B. thermocatenulatus* และ *B. stearothermophilus* สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกัน และมีมวลโมเลกุลคือประมาณ 45 กิโลดาลตัน และให้ค่ากิจกรรมสูงสุดที่ พีเอช 9.0 และอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส (Kim, Park, Lee, & Oh, 1998; Schmidt-Dannert, Rua, Atomi, & Schmid, 1996) แบคทีเรียสายพันธุ์ *Staphylococcus* ผลิตเอนไซม์ไลเปสขนาดใหญ่กว่า คือประมาณ 75 กิโลดาลตัน ซึ่งพบว่าบางสายพันธุ์ผลิตเอนไซม์ไลเปสชนิด ฟอสโฟไลเปส (phospholipase) คือเอนไซม์ที่สลาย dipalmitoyl-phosphatidylcholin (DPPC) ได้เป็น dipalmitoylglycerol และ palmitate ซึ่งไลเปสจาก *Staphylococcus hyicus* แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ phospholipase อย่างเด่นชัดแต่ยังคงลักษณะจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสไว้ด้วย (van Oort et al., 1989)

2.2.2 ปัจจัยต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย

แบคทีเรียดังกล่าวส่วนใหญ่จะผลิตเอนไซม์ไลเปสและส่งออกนอกเซลล์ และในการผลิตเอนไซม์ไลเปสนั้นยังมีปัจจัยแหล่งสารอาหาร ปัจจัยทางกายภาพและทางเคมี เช่น พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสม ชนิดและปริมาณแหล่งคาร์บอนของแหล่งไนโตรเจน ไนโตรเจน ชนิดของ ไขมัน ความจำเพาะต่อไตรกลีเซอไรด์ กลีเซอรอล ความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันและสารตั้งต้น จำเพาะต่อไอโซเมอร์ โคเอนไซม์ อีออนของโลหะ ปริมาณออกซิเจน สารยับยั้ง เป็นต้น (Gupta, Gupta, & Rathi, 2004; Jaeger et al., 1994; Kim, Lee, Kim, & Oh, 1996; Sharma et al., 2001) โดยมีงานรายงานสมบัติการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆหลายงานวิจัย เช่น สรุปในตารางที่ 2.3

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสเสมือนนั้นคือแหล่งคาร์บอน มีผลต่อปริมาณการสร้างไลเปสและในการผลิตโดยทั่วไปต้องถูกกระตุ้นให้ผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยไขมัน เช่น น้ำมัน หรือสารเหนียวน้ำ (inducer) อื่นๆ เช่น triacylglycerols, กรดไขมัน, เอสเทอร์ของhydrolyzable, Tweens, กลีเซอรอล และกลีเซอรอล แต่การผลิตนั้นได้รับอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญจากแหล่งคาร์บอนอื่น ๆ เช่น น้ำตาล, น้ำตาลแอลกอฮอล์, polysaccharides, เวย์, กรด casamino และแหล่งเชิงซ้อนอื่น ๆ ด้วย (Gupta, Gupta, et al., 2004)

สารเหนียวน้ำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ไลเปส ในงานวิจัยนี้มีการใช้ Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 และ Tributyrin เป็น สารเหนียวน้ำ (Inducer) ทำให้เชื้อเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดย Tributyrin คือไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ธรรมชาติที่มีกลีเซอรอลต่อพันธะเอสเทอร์กับกรดบิวทีริก (butyric acid) 3 หน่วย Tween เป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดหนึ่ง โดย Tween 80 (Polysorbate 80) มีส่วนของ polysorbate และ oxyethylene 20 หน่วยต่อกับกรดไขมันอิสระคือกรดโอเลอิก (oleic acid) 1 หน่วยในโมเลกุล (ภาพที่ 2.2) ซึ่ง Tween 60, Tween 40 และ Tween 20 มีโครงสร้างโมเลกุลเหมือน Tween 80 แต่แตกต่างกันที่ชนิดของกรดไขมันอิสระ ซึ่งชนิดของกรดไขมันอิสระของ Tween 60 คือ กรดสเตียริก (stearic acid), Tween 40 คือ กรดปาล์มิติก (palmitic acid) และ Tween 20 คือ กรดลอริก (lauric acid) (Adamo et al., 2010; Nayak, Tan, Ihnat, Russell, & Grace, 2012)

Arora ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากตะกอนใต้ทะเลในอ่าวเบงกอล ประเทศอินเดีย ซึ่งพบว่าแบคทีเรีย SS-33 ที่แยกได้นั้นเป็นสายพันธุ์ใหม่มีความคล้ายคลึงกับสายพันธุ์ *Staphylococcus* โดยใช้ชื่อว่า *Staphylococcus lipolyticus* sp. nov. ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้และเอนไซม์ที่ได้นั้นยังสามารถย่อยแหล่งไขมันหรือสารเหนียวน้ำได้หลากหลาย ได้แก่ Tributyrin, น้ำมันมะกอก, Tween 20, Tween 40, Tween 60 และ Tween 80 ที่อุณหภูมิต่ำได้ มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ พีเอช 7 เมื่อทำให้เอนไซม์ให้บริสุทธิ์ปรากฏว่าโปรตีนเอนไซม์มีค่ามวลโมเลกุลคือ 67 กิโลดาลตัน โดยวิธี SDS-PAGE

ปี 1994 Schmidt-Dannert และคณะ ทำการคัดเลือก thermophilic *Bacillus* 15 สายพันธุ์ มี 5 สายพันธุ์ที่แสดงออกมามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส โดยสายพันธุ์ *Bacillus thermocatenulutus* (DSM 730) มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยการสกัดด้วย hexane ตกตะกอนด้วย methanol และผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีแลกเปลี่ยนประจุ Q-Sepharose และมีน้ำหนักโมเลกุลของไลเปส 16 กิโลดาลตัน โดยวิธี SDS-PAGE is 16 kDa. และให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ พีเอช 7.5-8.0 อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส และใช้น้ำมันมะกอกเป็นแหล่งไขมัน นอกจากนี้ Imamura และ Kitaura (2000) พบว่า *Bacillus* sp. H-257 สามารถผลิตเอนไซม์ monoacylglycerol lipase [MGLP, EC 3.1.1.23] ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลของไลเปสคือ 25 กิโลดาลตัน โดยวิธี SDS-PAGE สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคือ พีเอช 7.5 และ 75 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์นี้จะย่อย monoacylglycerols ซึ่งจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเมื่อใช้ 1-monolauroylglycerol และรองลงมาคือ Di- และ tri-acylglycerols

การศึกษากการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยแบคทีเรีย *Proteus* sp. มีการศึกษาการจำลองยีนของเอนไซม์ลงใน *Escherichia coli* อย่างแพร่หลาย เช่น ในปี 2009 Gao และคณะ ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากดินตัวอย่างในประเทศจีน วิจัยจำลองยีนของเอนไซม์ไลเปส K107 และพิสูจน์เอกลักษณ์จากวิธี genome-walking เป็น โดยสภาวะที่เหมาะสมคือ พีเอช 9.0 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ลงใน whole-cell ของ *Escherichia coli* เช่นเดียวกัน Kim และคณะ (1996) ศึกษาแบคทีเรียกลุ่ม facultatively anaerobic ที่สามารถผลิตเอนไซม์ extracellular alkaline lipase ซึ่งแยกได้จากดินใกล้โรงงานบำบัดน้ำเสียในประเทศเกาหลีใต้และพิสูจน์เอกลักษณ์เป็นสายพันธุ์ *Proteus vulgaris* ซึ่งไลเปส K180 ที่ได้นั้นเมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 31 กิโลดาลตัน โดยวิธี SDS-PAGE โดยพบว่า alkaline enzyme มีค่ากิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 10 สเลียร์ที่พีเอช 5 - 11 และได้นำยีนไลเปส K80 จำลองใน *Escherichia coli* ด้วยเช่นกัน

ตารางที่ 2. 3 สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย

Lipase microbial	pH	Temp. (°C)	Incubat. time (h)	Carbon source	Nitrogen source	Ref.
<i>Staphylococcus lipolyticus</i>	7.0	30	24	Tributyryn	Peptone,Beef extract, Yeast extract	Arora (2012)
<i>Staphylococcus simulans</i>	7.0	37	25	Glycerol, Oleic acid	Peptone,Yeast extract, beef extract	Sayari et al. (2001)
<i>Bacillus</i> sp. strain 398	7.2	55	12	Glycerol	Polypeptone, yeast extract, beef extract	Kim et al. (1994)
<i>Bacillus</i> strain A30-1 (ATCC 53841)	9.0	60	15-24	Corn oil	Ammonium chloride, yeast extract	Wang et al. (1995)
<i>Bacillus</i> sp. RSJ1	9.0	50	12	Tween 80 / olive oil	Peptone, yeast extract	Sharma et al. (2002)
<i>Bacillus</i> sp.	7.0	28	80	Olive oil	Peptone, yeast extract	Sugihara et al.(1991)

2.2.3 การสกัดและการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์

วิธีการสกัดและการทำให้เอนไซม์ให้บริสุทธิ์ที่ใช้อยู่โดยทั่วไปไม่ได้เป็นเทคนิคพิเศษ เช่น การตกตะกอน เจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี และโครมาโตกราฟีของการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอน เป็นต้น ความสัมพันธ์ของวิธีทางโครมาโตกราฟีถูกใช้ในบางกรณีเพื่อลดขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ที่เราต้องการด้วย ขั้นตอนในการทำให้เอนไซม์ให้บริสุทธิ์ที่ใช้อยู่โดยทั่วไปอาจไม่ได้มีลำดับขั้นตอนที่ชัดเจนหรือตายตัว แต่พอสรุปได้ดังนี้

ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ (Taipa et al., 1992)

2.2.3.1 แยกเซลล์ออกจากสารละลายเอนไซม์ โดยการปั่นเหวี่ยงหรือการกรอง

โดยเมื่อผลิตเอนไซม์ในสภาวะที่เหมาะสม โดยแบคทีเรียส่วนใหญ่จะผลิตเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการปั่นแยกเซลล์ออกโดยการปั่นเหวี่ยงหรือการกรอง เพื่อนำเอาสารละลายเอนไซม์ไปวิเคราะห์ต่อไป

2.2.3.2 ทำให้สารละลายเอนไซม์เข้มข้นขึ้น

- ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต
- สกัดหรือตกตะกอนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เช่น acetone, alcohol หรือ HCl

การตกตะกอนโปรตีนเอนไซม์ (Scopes, 1988)

การตกตะกอนโปรตีนนั้นถือเป็นวิธีการขั้นต้นในการแยกและทำให้โปรตีนหรือโปรตีนเอนไซม์บริสุทธิ์ โดยอาศัยสมบัติการละลายแยกโปรตีนแต่ละชนิดออกจากกัน

1) สมบัติการละลายของโปรตีน

โปรตีนแต่ละชนิดมีความสามารถในการละลายน้ำได้แตกต่างกัน ขึ้นอยู่สองปัจจัยคือ โครงสร้างโมเลกุลโปรตีนมี ส่วนของโมเลกุลโปรตีนที่มีส่วนที่ชอบน้ำ สามารถเกิดแรงกิริยากับน้ำได้เรียกส่วนนี้ว่า hydrophobic patches สามารถเกิดแรงดึงดูดทางไฟฟ้าเอาโมเลกุลของน้ำมาล้อมรอบโมเลกุลของโปรตีนได้ อีกปัจจัยหนึ่ง คือบนโมเลกุลของโปรตีนมีประจุไฟฟ้าสุทธิ (electrostatic repulsion) สูงกว่าแรงดึงดูดไฟฟ้าสถิตย์ ทำให้โมเลกุลของโปรตีนอยู่ห่างกัน จึงไม่สามารถรวมตัวเข้ามาอยู่ใกล้กันแล้วตกตะกอนลงมาได้ ดังนั้นปัจจัยใดก็ตามที่สามารถเพิ่มปฏิกริยาระหว่างโมเลกุลของโปรตีนด้วยกันเอง (protein - protein interaction) หรือการลดปฏิกริยาระหว่างโมเลกุลของโปรตีนและน้ำ (protein - water interaction) จะทำให้ความสามารถในการละลายน้ำของโปรตีนลดลง และตกตะกอนในที่สุด ความสามารถนี้จะสามารถแยกโปรตีนที่มีจุดตกตะกอนแตกต่างกัน สำหรับการตกตะกอนโปรตีนโดยวิธีที่ไม่ทำให้เกิดการเสียสภาพ 3 วิธี ได้แก่ การตกตะกอนที่จุดไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric Precipitation) การตกตะกอนโปรตีนแบบลำดับส่วนด้วยเกลือ (Salt fractionation precipitation) และการตกตะกอนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่อุณหภูมิต่ำ (Organic solvent precipitation)

การตกตะกอนที่จุดไอโซอิเล็กทริก

โปรตีนแต่ละชนิดมีค่า pH ที่ทำให้สมดุลของประจุสุทธิบนโมเลกุลเป็นศูนย์ เรียกว่า ค่านี้ว่า จุดไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric Point ; pI) เป็นค่าเฉพาะตัวของโปรตีนแต่ละชนิด เมื่อปรับค่าพีเอชของสารละลายโปรตีนจนมีค่าเท่ากับค่า pI ของโปรตีนที่ต้องการแยกโปรตีนนั้น จะเกิดการรวมตัวกันแล้วตกตะกอนลงมา เนื่องจากบนโมเลกุลของโปรตีนนั้นมีประจุสุทธิเป็นศูนย์ จึงไม่มีแรงผลักดันไฟฟ้าสถิตย์ระหว่างโมเลกุลของโปรตีนเอง โปรตีนจึงเข้าใกล้กันมากพอที่จะเกิดการรวมตัวกัน (Aggregate) ตกตะกอนลงมาได้ เรียกวิธีการนี้ว่า Isoelectric Precipitation

ข้อเสียของวิธีการนี้คือ ในทางปฏิบัติเมื่อมีโปรตีนหรือเอนไซม์ที่มีค่า pI ใกล้เคียงกัน การแยกตกตะกอนของเอนไซม์ทั้งสองจะแยกออกจากกันได้ไม่สมบูรณ์

การตกตะกอนแบบลำดับส่วนด้วยเกลือ

การตกตะกอนโปรตีนโดยใช้เกลือที่มีความเข้มข้นสูง เรียกว่า "Salting Out" เป็นการเติมเกลือลงไปในการละลายโปรตีน เพื่อเพิ่มความแรงไอออน (ionic strength) ของสารละลายสูงขึ้นจนไอออนของเกลือไปแย่งจับกับโมเลกุลของน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุลของโปรตีน ทำให้โมเลกุลของน้ำออกมาล้อมรอบโมเลกุลของเกลือแทน เป็นการแข่งขันการเกิดแรงกิริยาทางไฟฟ้ากับโมเลกุลของน้ำระหว่างโมเลกุลของโปรตีนและโมเลกุลของเกลือในนั่นเอง และถ้าแรงระหว่างโมเลกุลของโปรตีนกับน้ำมีค่าน้อยกว่าแรงกระทำระหว่างโมเลกุลของโปรตีนกับโปรตีน โปรตีนก็จะจับตัวกันตกตะกอนลงมา โดยเกิดจากการรวมตัวกันของส่วนที่ไม่ชอบน้ำบนโมเลกุลของโปรตีนแต่ละตัวเคลื่อนที่เข้าใกล้กันจนแรงดึงดูดระหว่างส่วนที่ไม่ชอบน้ำด้วยกัน เมื่อเกิดเป็นกลุ่มก้อนโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ขึ้น น้ำหนักสะสมเพิ่มขึ้น และตกตะกอนลงมาในที่สุด ซึ่งเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า "Salting Out Effect"

แอมโมเนียมซัลเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นเกลือที่นิยมใช้กันมากที่สุด เนื่องจากมีค่าการละลายน้ำสูงมาก และมีค่าสัมประสิทธิ์อุณหภูมิของการละลายต่ำ (temperature coefficient of solubility) ในช่วง 0 -30 องศาเซลเซียส ทำให้สามารถใช้ในการตกตะกอนโปรตีนที่อุณหภูมิต่ำได้ เพราะหากใช้อุณหภูมิสูงอาจทำให้เกิดการสลายตัวของโครงสร้างโปรตีนหรือเอนไซม์ที่ละลายตัวได้ง่ายที่อุณหภูมิสูงได้ นอกจากนี้ยังมีเกลือชนิดอื่น เช่น โซเดียมคลอไรด์ แมกนีเซียมซัลเฟต โพแทสเซียมซัลเฟต โซเดียมซัลเฟต เป็นต้น

ในกรณีที่มีโปรตีนผสมหลายๆชนิดรวมอยู่ด้วยกัน สามารถแยกตกตะกอนโปรตีนออกเป็นกลุ่มย่อยๆได้ โดยการทำให้ Salting Out ที่ความเข้มข้นของเกลือต่างๆกัน เรียกวิธีนี้ว่า "Salt fractionation" โดยเลือกตกตะกอนโปรตีนเป็นช่วงๆตามความเข้มข้น ทำให้โปรตีนต่างชนิดตกตะกอนมาในแต่ละช่วงต่างกัน

การตกตะกอนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่อุณหภูมิต่ำ

ตัวทำละลายอินทรีย์จะไปลดค่ากิจกรรมของน้ำ โดยมีผลต่อค่าคงที่ไดอิเล็กทริก (dielectric constant) ทำให้น้ำสารละลายเอนไซม์หรือโปรตีนนั้นมีความสามารถในการเป็นตัวทำละลายลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึงจุดที่แรงกระทำระหว่างโมเลกุลของ

โปรตีนในส่วนของพลังงานไฟฟ้าสถิตย์ มีแรงกระทำที่สูงกว่าแรงกระทำระหว่างโปรตีนกับน้ำ เกิดการเข้ามารวมตัวกันของโมเลกุลโปรตีนตกตะกอนลงมาได้

วิธีการตกตะกอนโดยตัวทำละลายอินทรีย์สามารถใช้ตกตะกอนเอนไซม์หรือโปรตีนได้เป็นกลุ่มๆ แต่ไม่สามารถตกตะกอนโปรตีนออกมาเป็นเดี่ยวๆได้ เนื่องจากคุณสมบัติของโปรตีนไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจน ตัวทำละลายที่นิยมใช้กันมาก คือ เอทานอล และ อะซีโตน ต้องทำ ในที่อุณหภูมิเพื่อป้องกันการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนหรือเอนไซม์ที่ต้องการ

2.2.3.3 วิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (Ion-exchanger chromatography)

เป็นกระบวนการแลกเปลี่ยนประจุระหว่างเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่เป็นของเหลว กับเฟสคงที่ (stationary phase) โดยที่เฟสคงที่บรรจุของแข็งไม่ละลายน้ำ เรียกว่า เมทริกซ์ (matrix) เป็นโพลีเมอร์ที่เหนียวน้ำให้มีประจุที่ รวมเรียกว่าตัวแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchanger) เมทริกซ์นี้อาจเรียกเป็น ตัวแลกเปลี่ยนประจุ หรือ เรซิน (resin) ก็ได้ เมื่อตัวแลกเปลี่ยนประจุถูกทำให้อิ่มตัวด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ หรือสารละลายเกลือใดๆ พบว่ามีส่วนของสารที่มีประจุที่เป็นองค์ประกอบในบัฟเฟอร์หรือสารละลายเกลือ เข้ามาล้อมรอบตัวแลกเปลี่ยนประจุเพื่อรักษาสภาพสมดุลย์ทางไฟฟ้า เรียกประจุเหล่านี้ว่า counter ion เป็นไอออนที่มีประจุตรงข้ามกับเมทริกซ์ สารตัวอย่างแต่ละชนิดย่อมมีประจุต่างกันสามารถเกิดแรงกระทำ ทางไฟฟ้ากับประจุในส่วน counter ion ได้ต่างกัน สารใดที่มีประจุตรงข้ามกับเมทริกซ์และมีความแรงประจุสูงก็จะไปแทนที่ counter ion แล้วเข้าไปยึดจับกับส่วนเมท ส่วนสารใดที่มีประจุชนิดเดียวกันกับตัวแลกเปลี่ยนประจุก็จะหลุดออกจากคอลัมน์ก่อนโดยแรงผลักทางไฟฟ้า ทำให้สามารถแยกสารผสมออกจากกันได้

ชนิดของเมทริกซ์

- แลกเปลี่ยนประจุลบ (anion exchange) : Diethylaminoethyl (DEAE), Aminoethyl (AE-), Quarternary aminoethyl (QAE-)
- แลกเปลี่ยนประจุบวก (cation exchange) : Carboxymethyl (CM), Sulphopropyl (SP-), Phospho

2.2.3.4 วิธีโครมาโตกราฟีแบบเจลฟิวเทชั่น (gel filtration chromatography)

เป็นเทคนิคการแยกสารโดยอาศัยคุณสมบัติความแตกต่างกันของ ขนาด มวล และรูปร่างของสารตัวอย่าง อาศัยคุณสมบัติของเม็ดเจลที่มีลักษณะช่องว่างภายในโพลีเมอร์ โดยภายในเม็ดเจลแต่ละเม็ดมีขนาดช่องว่างที่จำเพาะยอมให้สารที่มีขนาดโมเลกุลค่าหนึ่งผ่านเข้าไปในเม็ดเจลได้ ส่วนสารที่มีขนาดใหญ่กว่าไม่สามารถผ่านเข้าไปได้ถูกชะออกมากับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะหลุดออกจากคอลัมน์ก่อน จากหลักการข้างต้นเห็นได้ว่าสามารถแยกสารที่มีขนาดเล็กและใหญ่ออกจากกันได้ สารที่ใช้ทำเจล ได้แก่ เดกซ์แทรน (Dextran), Polyacrylamide และ Agarose

2.2.3.5 ทาหน้าหนักโมเลกุลของไลเปสด้วยวิธี SDS-PAGE

วิธี SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์หาหน้าหนักโมเลกุลของพอลิเพปไทด์สายเดี่ยว โดย sodium dodecyl sulfate (SDS) ซึ่งเป็น anionic detergent ที่มีประจุลบ จะเข้าจับกับพอลิเพปไทด์โปรตีนทำให้โปรตีนมีสภาพเป็นลบ และสามารถทำให้โปรตีนเสียสภาพจากทรงกลมเป็นเหยียดตรงแยกพอลิเพปไทด์ที่อยู่รวมกันออกเป็นสายเดี่ยวมีโครงสร้างเป็น แท่งและทุกสายมีประจุลบจึงเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก (SDS จับพอลิเพปไทด์โปรตีนคงที่ ด้วยอัตราส่วน 1.4 กรัม SDS / กรัมโปรตีน โดยมี *B*-mercaptoethanol เป็น reducing agent เพื่อใช้ทำลายพันธะ disulfide ในโปรตีน) ดังนั้นอัตราการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของพอลิเพปไทด์โปรตีนจะเร็วหรือช้าขึ้นกับความแตกต่างของขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลเพียงอย่างเดียว โดยจะเป็นการเคลื่อนที่จากขั้วไฟฟ้าลบไปสู่ขั้วไฟฟ้าบวก ผลของการแยกโปรตีน สามารถมองเห็นแถบพอลิเพปไทด์เมื่อย้อมสีด้วย Coomassie blue และ หน้าหนักโมเลกุลของพอลิเพปไทด์โดยสร้างกราฟความสัมพันธ์ ระหว่าง log ของน้ำหนักโมเลกุล กับอัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน และเมื่อทราบ อัตราเร็วของการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของพอลิเพปไทด์ตัวอย่างก็สามารถคำนวณหาหน้าหนัก โมเลกุลได้เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน นอกจากนี้การปรากฏของแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวใน SDS-PAGE ยังเป็นตัวบ่งชี้ถึงความบริสุทธิ์ของโปรตีนอีกด้วย (Walker, 2002)

ตารางที่ 2. 4 ขั้นตอนการทำให้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียให้บริสุทธิ์

Lipase microbial	Purification Method	Lipase M.W. (kDa)	Ref.
<i>Staphylococcus aureus S11</i>	1. ตกตะกอน ammonium sulfate 0- 30% ,30-70% saturated	45	Xie et al. (2012)
<i>Stapylococcus epidermis S2</i>	2. dialyzed ด้วย Spectra/Por 4 membrane 3. ทำให้เข้มข้นด้วย ultrafiltration kit Amicon PLGC 47 mm		
<i>Staphylococcus sp.</i>	1.ตกตะกอนด้วย acetone 70% (v/v) 2. Dialyed ด้วยบัฟเฟอร์ 20nM Tris-HCl	-	Kumar, Parihar, and Batra (2012)
<i>Stapylococcus aureus</i>	1. phenyl sepharose CL-4B column	49	Sarkar, Yamasaki, Basak, Bera, and Bag (2012)
<i>Stapylococcus warneri</i>	1. ตกตะกอน Ammonium sulfate 50% saturated 2. DEAE-Sepharose 3. phenyl-Sepharose	45	Talon, Dublet, Montel, and Cantonnet (1995)
<i>Stapylococcus lipolyticus sp. nov.</i>	1. ตกตะกอนด้วย cold acetone 70 %	67	Arora (2013)Arora (2012)
<i>Stapylococcus hyicus</i>	1. ตกตะกอนammonium sulphate 2. Sephadex G-100/G-25 column 3. DEAE-cellulose columns	46	van Oort et al. (1989)

Lipase microbial	Purification Method	Lipase M.W. (kDa)	Ref.
<i>Bacillus subtilis</i> Pa2	1. ตกตะกอนด้วย chilled acetone 60% (v/v)	19.2	Shah and Bhatt (2011)
<i>Bacillus sp. H-257</i>	1. Octyl-Sepharose CL-4B, Q-Sepharose FT, and Superose 12 columns	24	Imamura and Kitaura (2000)
<i>Bacillus thermocatenulatus</i>	1. สกัดด้วย methanol 30% (v/v) 2. Q-Sepharose	16	Schmidt-Dannert et al. (1994)
<i>Proteus sp. SW1</i>	1. His-tagged LipA exhibited	31.2	Whangsuk et al. (2013)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่าง อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารหมักพื้นบ้านของไทย 7 อย่าง คือ ไส้กรอกเปรี้ยว แหนม ปลา ร้า ปลาเจ่า ปลาจ่อม กุ้งจ่อม และหม่า เก็บตัวอย่างจากผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่จำหน่ายในตลาดท้องถิ่นของแหล่งตัวอย่าง

3.1.2 อุปกรณ์เครื่องมือ

1. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (Autoclave) รุ่น HA-3D, HIRAYAMA, Japan.
2. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (Spectrophotometer) รุ่น UV 160A, SHIMADZU, Japan
3. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CHS, OLYPUS OPTICAL, Japan
4. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น 6, PRECISSION THELCO, USA.
5. เครื่อง SDS (Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis) รุ่น Mini PROTEAN[®] Tetra cell , BIO-RAD, USA.
6. แผ่นเจลสำเร็จรูป รุ่น Mini PROTEAN[®] TGX[™] Precast Gel, BIO-RAD, USA.
7. เครื่อง Gel Electrophoresis รุ่น GE-100 , BIOER, China
8. เครื่อง PCR (Polymerase Chain Reaction) รุ่น Mastercycler[®] gradient, EPPENDORF, Germany
9. เครื่อง Microplate Reader รุ่น Wallac 1420, PERKINELMER, USA.
10. เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น Innova 4300, NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, USA.
11. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (Balance), SARTORIUS, USA.
12. เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter), METTLER TOLEDO, Switzerland
13. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge) รุ่น 2 K 15, SIGMA, Germany
14. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Waterbath), PRECISSION THELCO, USA.
15. เครื่องเขย่าผสม (Vortex mixer) รุ่น GENIE 2, SCIENTIFIC INDUSTRIES, USA.

16. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow) รุ่น BV-126, ISSCO, USA.
17. เครื่องคนสารละลายพร้อมฮอตเพลท (Hotplate Stirrer) รุ่น LAB-LINE PYRO-MAGNESTIR NO.1267, LAB-LINE INSTRUMENTS, India
18. ออโตปิเปต รุ่น P10 P20 P200 P1000, GILSON, France
19. ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รุ่น Hybrid cooling system , SHARP, Japan
20. ตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น FC27, SHARP, Japan
21. ตู้เย็นอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส รุ่น ULT1790-7-V12, REVCO, USA.
22. เครื่องตีปั่น (Stomacher) รุ่น the Stomacher® 400 Circulator, SEWARD, England
23. ถุงไดอะไลซิส (Dialysis bag) Molecular weight cut off 12,000-14,000 Da, Cellu Sep[®]

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. นิวเตรียนท์ บรอก (Nutrient Broth; NB), MERCK, Germany
2. เปปโตน (Peptone), DIFCO, USA
3. ทริปติก ซอย บรอก (Tryptic Soy Broth; TSB), DIFCO, USA.
4. TSI (Triple Sugar Iron Agar), DIFCO, USA.
5. อาหาร MR-VP broth, MERCK, Germany

3.1.4 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. กลูโคส (Glucose), CARLO ERBA, Italy
2. โซเดียมไคลอไรด์ (NaCl), CARLO ERBA, Italy
3. โซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO₃), AJAX FINECHEM, Australia
4. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl), CARLO ERBA, Italy
5. ทวิน 80 (Tween[®] 80), SIGMA-ALDRICH, USA.
6. ทวิน 60 (Tween[®] 60), SCHARLAU, Germany
7. ทวิน 40 (Tween[®] 40), SCHARLAU, Germany
8. ทวิน 20 (Tween[®] 20), SCHARLAU, Germany
9. Coomassie brilliant blue R-250, SIGMA-ALDRICH, USA.
10. Bio-Safe™ Coomassie G-250 Stain, BIO-RAD, USA.

11. ไตรบิวทีรีน (Tributyrin) , SCHARLAU, Germany
12. แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl₂), AJAX FINECHEM, Australia
13. พาราไนโตรฟีนอล ปาล์มิเตต (*p*-nitrophenyl palmitate; *p*-NPP), FLUKA, USA.
14. โปรตีนมาตรฐาน Precision Plus™ protein standards, BIO-RAD, USA.
15. Tris (hydroxymethyl) aminomethane, WAKO, Japan
16. OLAquick PCR Purification Kit, OIAGEN, Germany
17. Triton X, FLUKA, USA.
18. Gum Arabic, FLUKA, USA.
19. 10x Tris/Glycine/SDS buffer, BIO-RAD, USA.
20. 2x Leammli Sample Buffer, BIO-RAD, USA.
21. อะราบิโนส (Arabinose), SIGMA-ALDRICH, USA.
22. เซลโลไบโอส (Cellobiose), FLUKA, USA.
23. ฟรุคโตส (Fructose), FLUKA, USA.
24. กาแลคโตส (Galactose), DIFGO, USA.
25. กลูโคส (Glucose), MERCK, Germany
26. กลีเซอรอล (Glycerol), FISHER SCIENTIFIC, USA.
27. อินูลิน (Inulin), SIGMA-ALDRICH, USA.
28. แลคโตส (Lactose), MERCK, Germany
29. มอลโตส (Maltose), FLUKA, USA.
30. แมนนิทอล (Mannitol), FLUKA, USA.
31. แมนนอส (Mannose), FLUKA, USA.
32. เมลลิตอส (Melezitose), SIGMA-ALDRICH, USA.
33. เมลลิบิโอส (Melibiose), FLUKA, USA.
34. กลูโคไซด์ (Glucoside), FLUKA, USA.
35. ราฟฟิโนส (Raffinose), FLUKA, USA.
36. แรมโนส (Rhamnose), FLUKA, USA.
37. ไรบอส (Ribose), FLUKA, USA.
38. ซาลิซิน (Salicin), TRADEMARK, Japan

39. ซอร์บิทอล (Sorbitol), SIGMA-ALDRICH, USA.
40. ซูโครส (Sucrose), MERCK, Germany
41. ทรีฮาโลส (Trehalose), FLUKA, USA.
42. ไซโลส (Xylose), MERCK, Germany
43. ไลซีน (Lysine), FLUKA, USA.
44. ออร์นิธิน (Ornithin), FLUKA, USA.
45. ยูเรีย (Ureae), FLUKA, USA.
46. สตาร์ท (Soluble starch), AJAX FINECHEM, Australia

3.2 ขั้นตอนและวิธีดำเนินงานวิจัย

3.2.1 การคัดแยกแบคทีเรียจากอาหารหมัก

การแยกแบคทีเรียจากอาหารหมักพื้นบ้าน ได้แก่ แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว ปลาจ๋า ปลาแจ่ว ปลาจ่อม กุ้งจ่อม ฯลฯ จากจังหวัดต่างๆในประเทศไทย ได้แก่ อุดรดิตถ์ มหาสารคาม กรุงเทพฯ พิษณุโลก ระยอง บุรีรัมย์ ชลบุรี สุรินทร์ โดยนำตัวอย่างอาหารหมัก 25 กรัม ใส่ถุงด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ เติมน้ำเกลือละลายเปปโตเนอ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 225 มิลลิลิตร นำไปตีปั่นด้วยเครื่องตีปั่น (Stomacher) เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเจือจางด้วยสารละลายเปปโตเนอให้ได้ความเข้มข้นเป็น 10^{-1} ถึง 10^{-8} และปิเปตตัวอย่างอาหารแต่ละระดับความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy agar (TSA) เกลี่ยด้วยแท่งแก้วเพื่อให้ทั่วผิวหน้าอาหาร (Spread Plate Technique) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบจำนวนและตรวจดูลักษณะการเจริญของเชื้อ แยกเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะต่าง ๆ มาขีดซ้ำ (restreak) บนอาหาร TSA เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ย้อมสีแกรม ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ จนแน่ใจว่าได้เชื้อบริสุทธิ์ จึงถ่ายเชื้อลงบน TSA slant บ่มจนเจริญดี แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาในขั้นต่อไป (McLandsborough, 2005)

3.2.2 การคัดกรองแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

3.2.2.1 การคัดกรองไลโปไลติกแบคทีเรียบนอาหารแข็ง

นำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้มาขีด (streak) ลงบนอาหารที่เติมสารเหนียวนำแตกต่างกันดังนี้ Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 และ Tributyrin โดยเติมสารดังกล่าว 1 เปอร์เซ็นต์ในอาหาร Lipolytic Medium (Peptone 1 เปอร์เซ็นต์ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01 เปอร์เซ็นต์ และวุ้น 2 เปอร์เซ็นต์ (Barrow & Feltham, 1993) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ไลโปไลติกโดยเกิดวงขุ่นรอบโคโลนี (opaque) (Cardenas et al., 2001) โดยจะคัดกรองไอโซเลทของแบคทีเรียที่เกิดกิจกรรมเอนไซม์ไลโปไลติกในขั้นตอนนี้ไปคัดกรองในขั้นต่อไป

3.2.2.2 การคัดกรองแบคทีเรียที่ผลิตไลเปสได้ในอาหารเหลว

นำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผ่านการคัดกรองในอาหารแข็งในขั้นที่ 3.2.2.1 ทุกไอโซเลทที่เกิดกิจกรรมของเอนไซม์ไลโปไลติก ถ่ายแบคทีเรียบริสุทธิ์ลงในอาหาร Nutrient broth บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมงเพื่อเป็นหัวเชื้อเริ่มต้น จากนั้นนำ 1 เปอร์เซ็นต์ของหัวเชื้อเริ่มต้นถ่ายลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเหลว Nutrient broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 7.0 ซึ่งเติมสารเหนียวน้ำ Tween 20, Tween 40, Tween 60 และ Tween 80 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที 10 นาที นำส่วนใสมาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส ด้วยวิธี spectrophotometry ที่ 405 นาโนเมตร (Lee, Ahn, Kwak, Song, & Jeong, 2003) โดยในการวิเคราะห์ทั้งหมดจะทำการทดลอง 3 ซ้ำ คัดกรองเชื้อที่เกิดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในขั้นที่ 3.2.2.2 นำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ในขั้นต่อไป

คำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (ภาคผนวก ค.1) โดยกำหนดให้ เอนไซม์ 1 ยูนิต (U) คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่กระตุ้นการเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้น (*p*-nitrophenyl palmitate) 1 นาโนโมล ให้เป็น *p*-nitrophenol ต่ออนาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด (บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง)

3.2.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ โดยอาศัยลักษณะทางฟีโนไทป์

นำแบคทีเรียที่ผ่านการคัดกรองแล้วว่าเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส มาพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยศึกษาลักษณะทางลักษณะทางฟีโนไทป์ต่างๆ (Barrow & Feltham, 1993) ดังต่อไปนี้

3.2.3.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ได้แก่ การศึกษารูปร่างเซลล์ การติดสีแกรม ลักษณะทางการเจริญของโคโลนีและสีของโคโลนี ส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดาและกล้องจุลทรรศน์ส่องกราด

3.2.3.2 ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา

ได้แก่ การศึกษาความสามารถในการเจริญได้ที่ พีเอช 4.0, 5.0, 6.0, 8.0 และ 9.0 ที่อุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียส การเจริญที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 4, 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

3.2.3.3 ศึกษาลักษณะทางชีวเคมี

การทดสอบ ได้แก่ ทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรต (Nitrate reduction) ทดสอบ MR-VP ทดสอบการผลิตอินดอล (Indole test) ทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase test) ทดสอบการใช้ซิเตรท (Citrate utilization) ทดสอบสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase test) ทดสอบการย่อยเจลาติน (Gelatin) ทดสอบการย่อยสตาร์ช (Starch hydrolysis) ทดสอบการย่อยอาร์จินีน (Arginine test) การสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (Urea test) ทดสอบการสร้างเอนไซม์เฮโมลิติน

(Hemolysin test) ทดสอบการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (TSI test) ทดสอบไลซีน (Lysine decarboxylase test) ทดสอบออร์นิทีน (Ornithine decarboxylase Test) ทดสอบเอสคูลิน (Aesculin hydrolysis Test) และทดสอบการสร้างแก๊ส

ทดสอบความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรตจากสร้างกรดจากน้ำตาล 22 ชนิด ได้แก่ อะราบิโนส เซลโลไบโอส ฟรุคโตส กาแลคโตส กลูโคส กลูโคไซด์ กลีเซอรอล อินูลิน แลคโตส มอลโตส แมนนิทอล แมนนอส เมเลไซโทส เมลิไบโอส ราฟิโนส โรบอส แรมโนส ซาลิซิน ซอร์บิทอล ซูโครส ทรีฮาโลส และไซโลส ซึ่งตรวจสอบชนิดของเชื้อตามหลักเกณฑ์การพิจารณาใน Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (ภาคผนวก ค.3)

นำลักษณะทางฟีโนไทป์ของแต่ละไอโซเลททุกไอโซเลทมาใช้เครื่องมือทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS ช่วยในการจัดกลุ่มแบคทีเรียที่มีลักษณะทางฟีโนไทป์ใกล้เคียงกัน เพื่อนำตัวแทนกลุ่มไปวิเคราะห์หาสายพันธุ์ในระดับพันธุกรรมต่อไป

3.2.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ยีน 16S rRNA (sequencing) และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis)

พิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียโดยอาศัยลักษณะทางพันธุกรรม จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ยีน 16S rRNA และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) โดยเริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ด้วยเครื่องหาลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ โดยใช้ Forward primer คือ 20F (5'-AGTTTGATCCTGGCTC -3') และ Reverse primer คือ 1530R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC - 3') ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของ 16S rDNA นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR product) มาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการทำอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส และนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ OLAquick PCR Purification Kit, OIAGEN, Germany ส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท MacroGen® ประเทศเกาหลีใต้ โดยใช้ Universal primers คือ 27F (5'-GTTTGATCCTGGCTCAG-3') และ 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ที่ได้มา เปรียบเทียบข้อมูลยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) โดยใช้โปรแกรม Multiple Aligment Program CLUSTAL_X version 1.83 ((61)⁵⁵Thompson, Gibson et al. 1997) และศึกษา Phylogenetic analysis สร้างแผนภาพต้นไม้วิวัฒนาการ โดยใช้วิธี Neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987) ด้วยโปรแกรม MEGA version 5.05 (Tamura et al., 2011) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า Bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstein, 1985)

3.2.5 การศึกษาความไวรับของสารปฏิชีวนะต่อแบคทีเรีย

สารปฏิชีวนะ ได้แก่ Kanamycin, Penicillin - G, Sulphonamide, Vancomycin, Imipenem, Erythromycin, Streptomycin, Novobiocin, Gentamicin, Bacitracin, Tetracycline, Clindamycin, Amikacin, Sulpha/trimetho, Chloramphenicol, Levofloxacin,

Ampicillin, Amoycycin/Clavulanic, Carbenicillin, Cefotaxime, Cefoxitin, Cephalothin, Chloramphenico, Netilmicin, Piperacillin/Tazobactam, Tobramycin และ Vancomycin เลือกชนิดของสารต้านจุลชีพตามความเหมาะสม นำเอาแบคทีเรียมาเจือจางด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ Swab ลงบนอาหาร TSA ให้เรียบเสมอกัน จากนั้นวางดิסקยาสารต้านจุลชีพ นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนเคลียร์โซนรอบดิסקยา มีหน่วย เป็น มิลลิเมตร

3.2.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ได้คัดเลือกจากข้อ 3.2.2 ลงในอาหาร Nutrient broth บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมงเพื่อเป็นหัวเชื้อเริ่มต้น นำ 1 เปอร์เซ็นต์ของหัวเชื้อเริ่มต้นถ่ายลงในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มในเครื่อง เขย่าควบคุมอุณหภูมิความเร็ว 200 รอบต่อนาที

3.2.6.1 ศึกษาผลของชนิดสารเหนี่ยวนำ

ได้แก่ Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 และ Tributyrin 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่พีเอช 7.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.6.2 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการบ่ม

เติม Tween 80 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ พีเอช 7.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บผลทุก 6 ชั่วโมงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.2.6.3 ศึกษาของผลค่า พีเอช

ได้แก่ พีเอช 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 8.0, 8.5 และ 9.0 เติม Tween 80 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.6.4 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการบ่ม

ได้แก่ 20, 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส เติม Tween 80 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บผลทุก 6 ชั่วโมงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.2.7 การผลิต การทำให้บริสุทธิ์และการวิเคราะห์เอนไซม์ไลเปส

เพาะแบคทีเรียบริสุทธิ์ในอาหาร Nutrient broth ที่มี Tween 80 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง inoc ของเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ ลงในฟลาสก์ที่บรรจุอาหารเหลว Nutrient broth ที่มี Tween 80 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับ พีเอช เป็น 7.0 บ่มในเครื่องเขย่าควบคุม อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที 10 นาที นำส่วนใสมาตกตะกอนโปรตีน ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ในขั้นต่อไป

3.2.7.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

นำสารละลายมาตกตะกอนโปรตีนโดยเติมปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตโดยแบ่งเป็น 4 ระดับความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในรูปของเปอร์เซ็นต์อิ่มตัว (% saturation) ได้แก่ 0 - 20, 20 - 40, 40 - 60 และ 60 - 80 เปอร์เซ็นต์อิ่มตัว (ตารางภาคผนวก ค.1) โดยในการเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตจะค่อยๆเติมและกวนผสมอย่างช้าๆที่ 4 องศาเซลเซียส จนสารละลายมีความเข้มข้นของเปอร์เซ็นต์อิ่มตัวเกลือเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นกวนต่อเนื่องอีก 20 นาที จากนั้นนำสารละลายทั้งหมดไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที 15 นาทีเพื่อแยกตะกอนโปรตีน เก็บส่วนตะกอนโดยละลายในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8 และนำส่วนใสมาตกตะกอนต่อให้ได้ความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตมีเปอร์เซ็นต์อิ่มตัวเป็น 40, 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์อิ่มตัว และปั่นแยกตะกอนเช่นเดียวกันพร้อมเก็บตะกอนในแต่ละช่วงไปกำจัดเกลือออกและวิเคราะห์เอนไซม์ต่อในขั้นต่อไป

3.2.7.2 การกำจัดเกลือโดยการดIALYSIS

นำตะกอนเอนไซม์แต่ละช่วงที่ละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ Tris - HCl 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8 บรรจุในถุงไดอะไลซิส (Dialysis bag) ขนาดจุพุน 12,000 ดาลตัน นำไปแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris - HCl 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8 ในอัตราส่วนสารละลายเอนไซม์ต่อบัฟเฟอร์เป็น 1 ต่อ 100 ส่วนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กวนเพื่อให้เกิดการแพร่อย่างทั่วถึง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์ใหม่ทุกชั่วโมงใน 4 ชั่วโมงแรก เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำสารละลายในถุงไดอะไลซิสมานำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที 10 นาที เพื่อแยกตะกอนอื่นๆ นำส่วนใส partial purified enzyme ไปวิเคราะห์ในขั้นต่อไป

3.2.7.3 การวิเคราะห์เอนไซม์ไลเปสดังนี้

นำ partial purified enzyme วิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส ด้วยวิธี spectrophotometry โดยมีสารตั้งต้นคือ *p*-nitrophenyl palmitate (*p*-NPP) วัดค่าการเปลี่ยนแปลงสีด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ 405 นาโนเมตร (Lee et al., 2003) ปริมาณโปรตีนทั้งหมด ด้วยวิธี Coomassie brilliant blue R-250 (Bradford, 1976) และวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight) โดยวิธี Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) เตรียม partial purified enzyme ที่ได้ไปโหลดบนแผ่นเจลโพลีอะคริลามิด (Mini-PROTEAN® TGX™ precast gels) 12 เปอร์เซ็นต์ และย้อมด้วยคูแมสซีบลูบลู-250 (Bio-Safe™ Coomassie G-250) เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (Precision Plus™ protein standards) ตามวิธีของ Schägger and Jagow (1987)

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการแยกแบคทีเรียจากอาหารหมัก

ตัวอย่างอาหารที่ใช้ในงานวิจัยเป็นอาหารหมักพื้นบ้านของไทยที่มีปริมาณไขมันสูงและมีปริมาณเกลือต่ำ 7 ชนิด แสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ชนิด แหล่งสถานที่เก็บอย่างจำนวนเชื้อ (CFU/ml) และรหัสไอโซเลท

ชนิด	แหล่งสถานที่	รหัสตัวอย่าง	จำนวนเชื้อ (CFU/ml)	รหัสไอโซเลท	จำนวน
ไส้กรอกเปรี้ยว	อุตรดิตถ์	SS01	2.31×10^8	SS0-1, SS0-2, SS0-3, SS0-4, SS0-5, SS0-7, SS0-7, SS01-8, SS0-9, SS0-11, SS0-12	11
		SS48	2.10×10^9	SS48-1, SS48-2, SS48-3, SS48-4, SS48-5	5
		SS49	5.85×10^8	SS49-1, SS49-2, SS49-3, SS49-4	4
		SS50	2.09×10^9	SS50-1, SS50-2, SS50-3	3
		SS51	1.71×10^{10}	SS51-1, SS51-2	2
		SS52	1.42×10^9	SS52-1, SS52-2, SS52-3, SS52-4	4
		SS53	2.55×10^8	SS53-1, SS53-2, SS53-3, SS53-4, SS53-5	5
		SS54	6.9×10^9	SS54-1	1
		SS55	9.3×10^8	SS55-1, SS55-2, SS55-3	3
		SS56	2.05×10^8	SS56-1, SS56-2, SS56-3	3
แหนม	อุตรดิตถ์	NM03	2.87×10^8	NM03-1, NM03-2, NM03-3, NM03-4, NM03-5, NM03-6, NM03-7, NM03-8, NM03-10	9
	กรุงเทพฯ	NM04	1.23×10^8	NM04-3	1

ชนิด	แหล่ง สถานที่	รหัสตัวอย่าง	จำนวนเชื้อ (CFU/ml)	รหัสไอโซเลท	จำนวน	
แหนม	อุตรดิตถ์	NM05	5.23×10^8	NM05-2, NM05-3, NM05-6, NM05-8, NM05-10, NM05-12, NM05-14	7	
		NM06	2.78×10^8	NM06-2, NM06-3, NM06-4, NM06-5	4	
		NM07	1.01×10^8	NM07-1, NM07-3, NM07-4	3	
		NM08	2.63×10^8	NM08-1, NM08-2	2	
	พิษณุโลก	NM27	6.98×10^7	NM27-1, NM27-2, NM27-3, NM27-4, NM27-5, NM27-6	6	
		NM28	1.43×10^8	NM28-1, NM28-2, NM28-3, NM28-5	4	
		ระยอง	NM33	5.63×10^7	NM33-1, NM33-2, NM33-3	3
			กรุงเทพฯ	NM39	4.6×10^8	NM39-1, NM39-2
		NM40		1.66×10^8	NM40-1, NM40-2	2
		อุตรดิตถ์	NM41	1.54×10^8	NM41-1, NM41-2	2
NM42	1.2×10^9		NM42-1, NM42-2, NM42-3, NM42-4, NM42-5, NM42-6, NM42-7, NM42-8, NM42-9, NM42-10	10		
NM43	6.1×10^8		NM43-1, NM43-2, NM43-3, NM43-4, NM43-5	5		
อุตรดิตถ์	NM44		3.75×10^8	NM44-1, NM44-2, NM44-3, NM44-4, NM44-5, NM44-6, NM44-7	7	
	NM45		2.35×10^9	NM45-1, NM45-2, NM45-3, NM45-4, NM45-5, NM45-6, NM45-7	7	

ชนิด	แหล่ง สถานที่	รหัสตัวอย่าง	จำนวนเชื้อ (CFU/ml)	รหัสไอโซเลท	จำนวน
แหนม	กรุงเทพฯ	NM46	5.75×10^9	NM46-1, NM46-2, NM46-3, NM46-4	4
	กรุงเทพฯ	NM47	5.7×10^9	NM47-1, NM47-2, NM47-3, NM47-4, NM47-5	5
ปลาร้า	บุรีรัมย์	PR09	3.75×10^8	PR09-2	1
		PR10	1.2×10^8	PR10-1, PR10-2, PR10-3	3
		PR11	1.13×10^8	PR11-1, PR11-3, PR11-4	3
		PR12	2.33×10^7	PR12-1, PR12-2	2
	อุดรดิตถ์	PR26	5×10^6	PR26-1, PR26-2	2
		PR29	1.47×10^6	PR29-1, PR29-2	2
	ระยอง	PR30	1.5×10^6	PR30-1	1
		PR31	1.23×10^6	PR31-1	1
		PR32	1.3×10^6	PR32-1	1
		PR33	5.63×10^7	PR33-1, PR33-2, PR33-3	3
ชลบุรี	PR38	2.01×10^6	PR38-1	1	
ปลาเจ้า	อุดรดิตถ์	PJ02	4.33×10^6	PJ02-5, PJ02-6, PJ02-7	3
ปลาจ่อม	สุรินทร์	PM19	1.65×10^7	PM19-1	1
		PM21	2.21×10^7	PM21-2, PM21-3	2
		PM22	1.53×10^7	PM22-2	1
	PM24	1.13×10^7	PM24-1	1	
	อุดรดิตถ์	PM25	2.77×10^7	PM25-1, PM25-2, PM25-3, PM25-4, PM25-5	5
กุ้งจ่อม	บุรีรัมย์	KM13	2.7×10^7	KM13-1, KM13-2, KM13-4	3

ชนิด	แหล่ง สถานที่	รหัส ตัวอย่าง	จำนวนเชื้อ (CFU/ml)	รหัสไอโซเลท	จำนวน
กุ้งจ่อม	บุรีรัมย์	KM14	3.42×10^7	KM14-1, KM14-2, KM14-3, KM14-4, KM14-6	5
		KM15	2.5×10^6	KM15-1, KM15-2	2
		KM16	1.6×10^6	KM16-1, KM16-2	2
กุ้งจ่อม	บุรีรัมย์	KM17	3×10^8	KM17-1, KM17-2, KM17-3, KM17-4	4
		สุรินทร์	KM18	6×10^6	KM18-1, KM18-2, KM18-3, KM18-4
		KM20	3×10^6	KM20-1, KM20-2, KM20-3	3
		KM23	2.17×10^6	KM23-2	1
หม่า	เพชรบูรณ์	MA34	1.39×10^9	MA34-1, MA34-2, MA34-3	3
		MA35	1.12×10^9	MA35-1, MA35-2, MA35-3, MA35-4	4
		MA36	1.26×10^9	MA36-1, MA36-2, MA36-3, MA36-4, MA36-5	5
		MA37	9.35×10^8	MA37-1, MA37-2, MA37-3, MA37-4	4
<u>7</u>	<u>8</u>	<u>56</u>			<u>197</u>

ไส้กรอกเปรี้ยว แหนม ปลาจ่อม ปลาเจ้า ปลาจ่อม กุ้งจ่อม และหม่า เป็นชนิดของตัวอย่างที่ได้จากจังหวัดต่างๆ 8 จังหวัด คือ ชลบุรี นครสวรรค์ บุรีรัมย์ พิษณุโลก เพชรบูรณ์ ระยอง สุรินทร์ และอุดรดิตถ์ สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 197 ไอโซเลทจาก 56 ตัวอย่าง

4.2 ผลการคัดกรองไลโปไลติกแบคทีเรียบนอาหารแข็ง

เมื่อนำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ 197 ไอโซเลท ชีบบนอาหารที่เติมสารเหนียวหนา 1 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 และ Tributyrin ผลการคัดกรองแบคทีเรียที่เกิดกิจกรรมเอนไซม์ไลโปไลติกโดยเกิดวงขุ่น (opaque) รอบโคโลนี แสดงผลในตาราง 4.2

ตารางที่ 4. 2 การเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ไลโปไลติกบนอาหารแข็งที่มีสารเหนียวนำแตกต่างกัน

รหัส ไอโซเลท	กิจกรรมของเอนไซม์ไลโปไลติกในอาหารแข็ง (วงชุ่นรอบโคโลนี)				
	Tween 20	Tween 40	Tween 60	Tween 80	Tributylin
NM3-4	-	+	+	+	-
NM3-7	+	+	+	+	-
NM8-1	+	+	+	+	-
NM8-2	-	+	+	+	-
PR9-2	-	-	+	+	-
PR10-2	+	+	+	+	-
PR10-3	+	+	+	+	-
PR11-1	-	+	+	+	-
PR11-3	+	+	+	+	-
PR11-4	+	+	+	+	-
PR12-2	+	+	+	+	-
KM15-1	+	+	+	+	-
KM17-4	+	+	+	+	-
KM18-4	+	+	+	+	-
PM25-1	+	+	+	+	-
NM28-1	+	+	+	+	-
MA34-3	-	+	-	+	-
MA39-2	-	+	-	+	-
NM41-2	+	+	+	+	-
NM42-1	+	+	+	+	-
NM42-3	+	+	+	+	-
NM42-4	+	-	-	+	-
NM42-6	+	-	-	+	-
NM42-8	+	+	+	+	+

รหัส	กิจกรรมของเอนไซม์ไลโปไลติกในอาหารแข็ง (วงชุนรอบโคโลนี)				
	ไอโซเลข	Tween 20	Tween 40	Tween 60	Tween 80
NM42-10	+	+	+	+	+
NM43-1	-	+	-	+	-
NM43-2	+	-	-	+	-
NM43-5	-	-	+	+	-
NM44-2	-	+	+	+	-
NM44-3	+	+	+	+	-
NM44-4	+	+	-	+	-
NM44-5	+	+	+	+	-
NM44-6	+	+	-	+	-
NM45-2	+	-	-	+	-
NM45-3	+	+	+	+	-
NM45-4	+	+	-	+	-
NM45-5	+	+	+	+	-
NM45-6	-	+	+	+	-
NM46-2	-	-	-	+	-
NM46-3	+	+	+	+	-
NM47-1	-	-	+	+	-
NM47-2	-	+	-	+	-
NM47-3	+	+	+	+	-
SS48-2	+	+	-	+	-
SS48-4	+	+	+	+	-
SS48-5	+	-	+	+	-
SS49-1	+	+	+	+	-
SS49-2	-	+	+	+	-
SS49-3	-	-	-	+	-
SS49-4	+	+	+	+	-

รหัส ไอโซเลข	กิจกรรมของเอนไซม์ไลโปไลติกในอาหารแข็ง (วงชุ่นรอบโคโลนี)				
	Tween 20	Tween 40	Tween 60	Tween 80	Tributylin
SS50-1	+	+	+	+	-
SS50-2	+	+	+	+	-
SS50-3	-	+	-	+	-
SS51-2	+	+	-	+	-
SS52-1	+	-	-	+	-
SS52-3	+	-	+	+	-
SS52-4	+	+	-	+	-
SS55-3	-	+	+	+	-
SS56-1	+	+	+	+	-
SS56-3	+	-	+	+	-
	<u>43</u>	<u>47</u>	<u>42</u>	<u>60</u>	<u>2</u>

+ : เกิดวงชุ่นรอบโคโลนี , - : ไม่เกิด

ผลการเกิดกิจกรรมเอนไซม์ไลโปไลติกบนอาหารแข็ง พบว่า เมื่อขีดเชื้อแบคทีเรีย 197 ไอโซเลข โดยแต่ละไอโซเลขจะขีดลงบนอาหารแข็งที่มีการเติมสารเหนี่ยวนำแตกต่างกัน 5 ชนิดคือ Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 และ Tributyrin จากตารางที่ 4.2 ผลคือมีทั้งสิ้น 60 ไอโซเลขที่เกิดกิจกรรมคือเกิดวงชุ่นรอบโคโลนีบนอาหารแข็ง โดยแต่ละไอโซเลขจะเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ไลโปไลติกที่แตกต่างกันออกไป ไอโซเลขที่เกิดกิจกรรมที่เกิดบนอาหารที่เติม Tween 20 จำนวน 43 ไอโซเลข บนอาหารแข็งที่เติม Tween 40 จำนวน 47 ไอโซเลข บนอาหารแข็งที่เติม Tween 60 จำนวน 42 ไอโซเลข บนอาหารแข็งที่เติม Tween 80 จำนวน 60 ไอโซเลข และบนอาหารแข็งที่เติม Tributyrin จำนวน 2 ไอโซเลข โดยไอโซเลขที่สามารถเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ไลโปไลติกได้บนอาหารแข็งที่มีสารเหนี่ยวนำทั้ง 5 ชนิด คือ NM42-8 และ NM42-10 อาหารแข็งที่มีสารเหนี่ยวนำ Tween 80 เกิดกิจกรรมเอนไซม์ไลโปไลติกได้ทุกไอโซเลข แสดงว่า Tween 80 เป็นสารเหนี่ยวนำที่ทำให้แบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลโปไลติกย่อยไขมันได้ทุกไอโซเลข ซึ่งจะนำไปคัดกรองต่อว่าแบคทีเรียทั้ง 60 ไอโซเลขที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยไขมันนั้นเป็นเอนไซม์ไลเปสหรือไม่ในขั้นการคัดกรองด้วยอาหารเหลวต่อไป

4.3 ผลการคัดกรองแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสในอาหารเหลว

ผลการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส ด้วยวิธี spectrophotometric assay ที่ 405 นาโนเมตร โดยมี *p*-nitrophenyl palmitate (*p*-NPP) เป็นสารตั้งต้น ของเชื้อแบคทีเรีย 60 ไอโซเลทที่คัดกรองได้บนอาหารแข็ง เลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient Broth (NB) ที่เติม Tween 20, Tween 40, Tween 60 และ Tween 80 1 เปอร์เซ็นต์เป็นสารเหนียว นำ แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในหน่วยของยูนิต์ต่อไมโครมิลลิลิตร (U/ml) ในตารางที่ ข.1 ซึ่งค่าของกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากการคำนวณจากกราฟมาตรฐานในภาพที่ ค.1 และสูตรการคำนวณแสดงในสมการที่ ค.1 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตไลเปสจากอาหารหมักนั้น ในอาหารที่เติมสารเหนียวชนิด Tween 20 อยู่ในช่วง 0.00 – 3.07 U/ml ชนิด Tween 40 อยู่ในช่วง 0.03 – 4.25 U/ml ชนิด Tween 60 อยู่ในช่วง 0.04 – 6.70 U/ml และชนิด Tween 80 อยู่ในช่วง 0.03 – 21.52 U/ml จากการคัดกรองทั้งบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวจึงสรุปได้ว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างอาหารหมัก 197 ไอโซเลทมีทั้งสิ้น 60 ไอโซเลทที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้

4.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์

4.4.1 ผลการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์

จากศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า แบคทีเรีย 60 ไอโซเลทที่มีความสามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสที่คัดกรองได้จากชั้นที่ 4.2 และ 4.3 พบว่า เป็นแบคทีเรียรูปร่างกลม แกรมบวก 23 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียรูปร่างแท่ง แกรมบวก 27 ไอโซเลท และแกรมลบ 10 ไอโซเลท (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาสารีวิทยา

ลำดับ	รหัสไอโซเลท	รูปร่าง	ย้อมแกรม	สีของโคโลนี
1.	NM3-4	กลม	+	ขาวครีม
2.	NM3-7	แท่ง	-	ขาวใส
3.	NM8-1	แท่ง	+	ขาวครีม
4.	NM8-2	แท่ง	+	ขาวครีม
5.	PR9-2	แท่ง	+	ขาว
6.	PR10-2	แท่ง	-	ครีมใส
7.	PR10-3	แท่ง	-	ขาวใส
8.	PR11-1	แท่ง	+	ครีม
9.	PR11-3	แท่ง	-	ครีมใส

ลำดับ	รหัสไอโซเลท	รูปร่าง	ย้อมแกรม	สีของโคโลนี
10.	PR11-4	แท่ง	-	ครีมใส
11.	PR12-2	แท่ง	-	ขาวใส
12.	KM15-1	แท่ง	+	ขาวขุ่น
13.	KM17-4	กลม	+	เหลืองขุ่น
14.	KM18-4	กลม	+	ครีมขุ่น
15.	PM25-1	กลม	+	ครีม
16.	NM28-1	แท่ง	-	ครีมใส
17.	MA34-3	แท่ง	+	ใส
18.	MA39-2	แท่ง	+	ครีมใส
19.	NM41-2	กลม	+	เหลือง
20.	NM42-1	แท่ง	-	ขาว
21.	NM42-3	กลม	+	ครีม
22.	NM42-4	แท่ง	-	ขาวครีม
23.	NM42-6	กลม	+	ขาว
24.	NM42-8	แท่ง	-	ครีมใส
25.	NM42-10	แท่ง	-	ครีมใส
26.	NM43-1	แท่ง	+	ขาวใส
27.	NM43-2	แท่ง	+	ใส
28.	NM43-5	แท่ง	+	ใส
29.	NM44-2	แท่ง	+	ขาวใส
30.	NM44-3	กลม	+	ขาวขุ่น
31.	NM44-4	กลม	+	ขาวครีม
32.	NM44-5	กลม	+	เหลือง
33.	NM44-6	กลม	+	ครีมขุ่น
34.	NM45-2	กลม	+	ครีมใส
35.	NM45-3	แท่ง	+	ขาว
36.	NM45-4	กลม	+	ขาวครีม
37.	NM45-5	กลม	+	ขาว
38.	NM45-6	กลม	+	ขาว
39.	NM46-2	กลม	+	ใส

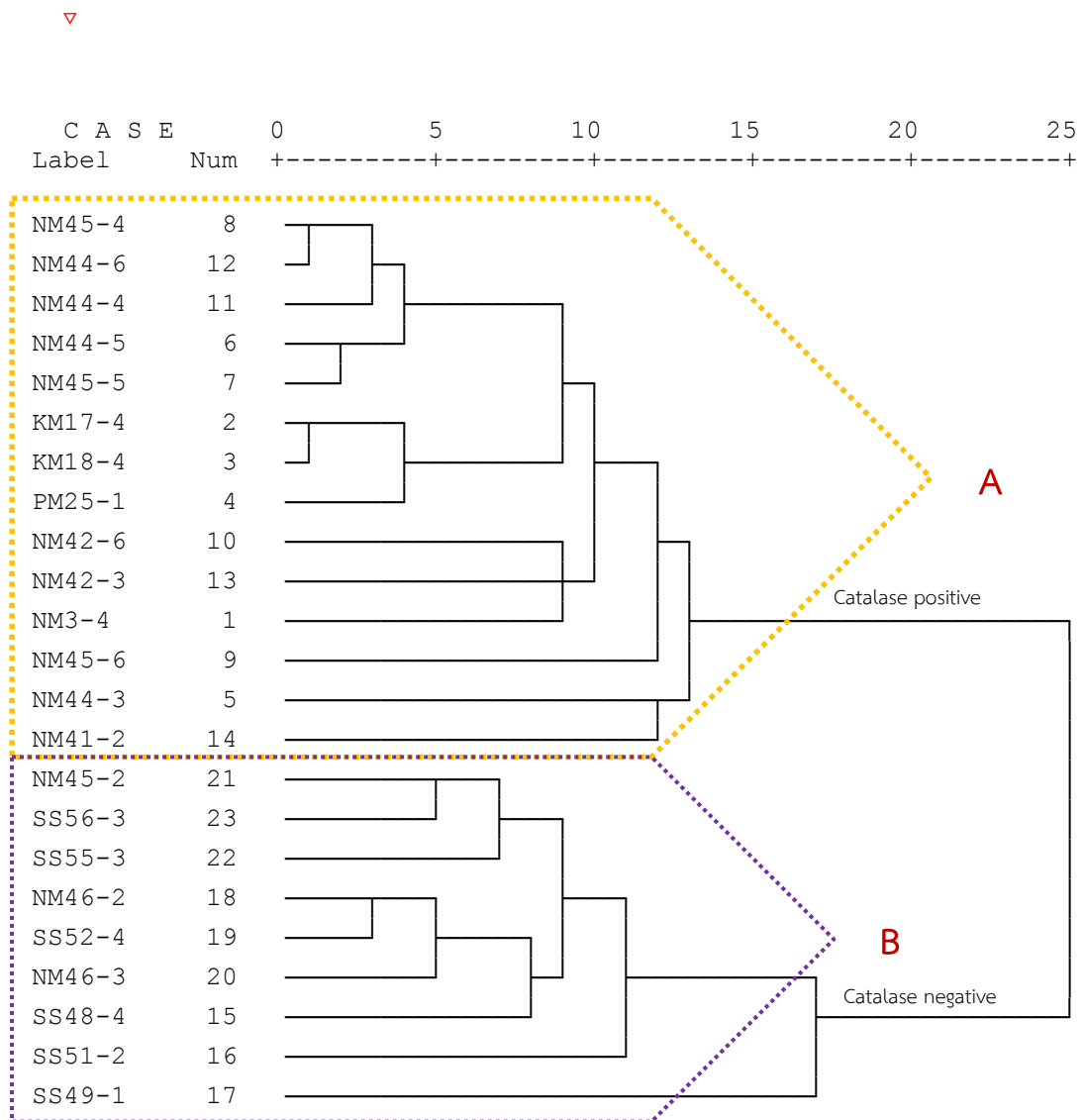
ลำดับ	รหัสไอโซเลท	รูปร่าง	ย้อมแกรม	สีของโคโลนี
40.	NM46-3	กลม	+	ใส
41.	NM47-1	แท่ง	+	ขาวใส
42.	NM47-2	แท่ง	+	เหลืองใส
43.	NM47-3	แท่ง	+	เหลือง
44.	SS48-2	แท่ง	+	ขาวใส
45.	SS48-4	กลม	+	ขาวใส
46.	SS48-5	แท่ง	+	ขาวขุ่น
47.	SS49-1	กลม	+	ขาวใส
48.	SS49-2	แท่ง	+	ครีม
49.	SS49-3	แท่ง	+	ขาวใส
50.	SS49-4	แท่ง	+	ขาว
51.	SS50-1	แท่ง	+	ขาวใส
52.	SS50-2	แท่ง	+	ขาวใส
53.	SS50-3	แท่ง	+	ขาว
54.	SS51-2	กลม	+	ครีมใส
55.	SS52-1	แท่ง	+	ครีมใส
56.	SS52-3	แท่ง	+	ใส
57.	SS52-4	กลม	+	ครีมใส
58.	SS55-3	กลม	+	ครีมใส
59.	SS56-1	แท่ง	+	ใส
60.	SS56-3	กลม	+	ขาวใส

จากการศึกษาศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและการศึกษาลักษณะทางชีวเคมี ผลการทดสอบพบว่า 60 ไอโซเลทของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้นั้น มี 39 ไอโซเลทที่ให้ผลบวกในการทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรต มี 3 ไอโซเลทที่ให้ผลบวกในทดสอบ MR 22 ไอโซเลทที่ให้ผลบวกในทดสอบ VP มี 5 ไอโซเลทที่ให้ผลบวกในการทดสอบการผลิตอินดอล มี 34 ไอโซเลทที่ให้ผลบวกในการทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลส มี 17 ไอโซเลทที่ให้ผลบวกในการทดสอบการใช้ซิเตรท ในการทดสอบสร้างเอนไซม์ออกซิเดสให้ผลบวก 4 ไอโซเลท มี 34 ไอโซเลทที่ให้ผลบวกในการทดสอบการย่อยเจลาติน มี 8 ไอโซเลทที่ให้ผลบวกในการทดสอบการย่อยสตาร์ช ทดสอบเอนไซม์เฮโมลัยซิน มีเพียง 3 ไอโซเลทเท่านั้นที่ให้ผลเป็นบวก และมี 12 ไอโซเลทที่ให้ผลบวกในการทดสอบการย่อยอาร์จินีน จากการทดสอบความสามารถในเจริญในเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นของเกลือ 4, 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ (v/v) พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญได้ 36, 29 และ 13 ไอโซเลทตามลำดับ เชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่ยังสามารถเจริญได้ที่พีเอช 5 – 9 แต่ที่สามารถเจริญได้ที่พีเอช 4 มีเพียง 6 ไอโซเลทเท่านั้น รวมถึงการเจริญที่อุณหภูมิสูงนั้นแบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีเพียง 17 ไอโซเลท เท่านั้นที่สามารถเจริญได้ และในการทดสอบการสร้างกรดจากน้ำตาล 15 ชนิด พบว่า แบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปส 60 ไอโซเลท เกือบทั้งหมดสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสเพื่อสร้างกรดได้ ยกเว้นไอโซเลท PR10-3 NM42-4 NM41-2 และ NM47-3 และส่วนใหญ่ไม่สามารถสร้างกรดจากน้ำตาลซอร์บิทอลและอินูลินได้

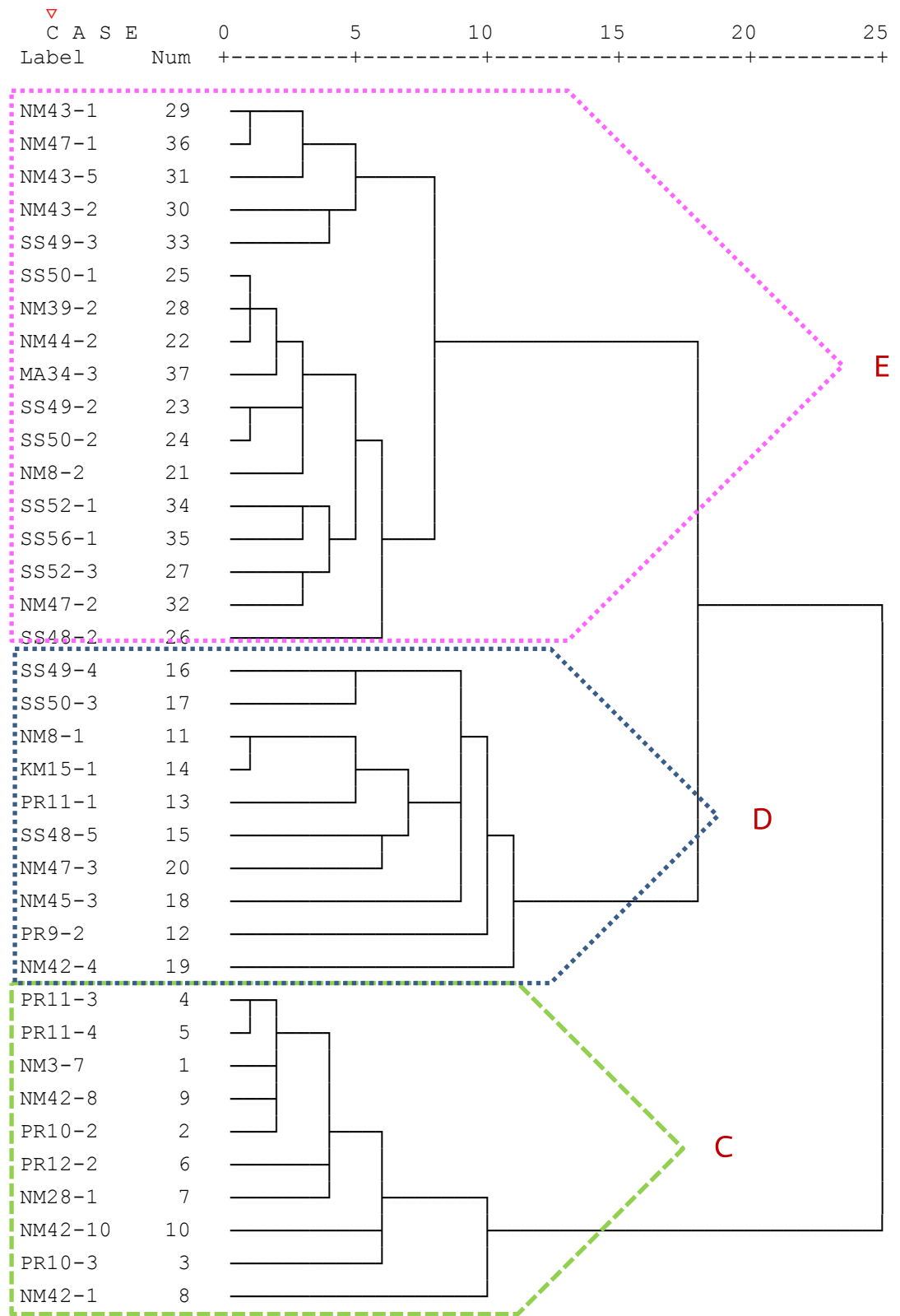
โดยนำผลลักษณะทางฟีโนไทป์ทั้งหมด มาคำนวณด้วยค่าทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS 14.0 เพื่อจับกลุ่มแบคทีเรียที่มีลักษณะทางฟีโนไทป์ใกล้เคียงกันโดยแสดง ของแบคทีเรียรูปกลม ดัง ภาพที่ 4.1 และแบคทีเรียรูปแท่ง ดัง ภาพที่ 4.2

แบคทีเรียรูปร่างกลม แกรมบวก 23 ไอโซเลท ซึ่งแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่คือกลุ่มที่ให้ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลสเป็นบวก 13 ไอโซเลทให้เป็นกลุ่มที่ A และทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลสเป็นลบ 10 ไอโซเลทเป็นกลุ่มที่ B (ภาพที่ 4.1)

จาก Dendrogram ภาพที่ 4.2 ของเชื้อรูปร่างแท่ง 37 ไอโซเลท แกรมลบ 27 ไอโซเลท แกรมลบ 10 ไอโซเลท ซึ่งจากภาพจะเห็นได้ว่าแบ่งเป็น 3 กลุ่มใหญ่คือกลุ่มที่เป็นแบคทีเรียรูปแท่งแกรมลบ 10 ไอโซเลทเป็นกลุ่ม C และแบคทีเรียรูปแท่งแกรมบวกซึ่งให้ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลสเป็นบวก 10 ไอโซเลทให้เป็นกลุ่มที่ D และกลุ่มที่ให้ผลทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลสเป็นลบ 17 ไอโซเลทเป็นกลุ่มที่ E เลือกตัวแทนไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rDNA เพื่อระบุสกุลและจัดกลุ่มแบคทีเรีย



ภาพที่ 4. 1 Dendrogram ของแบคทีเรียรูปร่างกลม



ภาพที่ 4.2 Dendrogram ของแบคทีเรียรูปร่างแท่ง

4.4.2 ผลการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม

4.4.2.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rDNA (sequencing) และ การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis)

จากผลการศึกษาลักษณะทางพีโนไทป์และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rDNA โดยใช้ตัวแทนจากการจัดกลุ่มแบคทีเรียในภาพที่ 4.1 และ 4.2 พบว่าแบคทีเรีย 60 ไอโซเลท สามารถจัดได้เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่ม *Staphylococcus* และ *Micrococcus* มี 14 ไอโซเลท จัดอยู่ในสกุล

Staphylococcus sp. 13 ไอโซเลท ได้แก่ NM3-4, KM17-4, KM18-4, PM25-1, NM42-3, NM42-6, NM44-3, NM44-4, NM44-5, NM44-6, NM45-4, NM45-5 และ NM45-6

Micrococcus sp. ได้แก่ NM41-2

จากผลของการศึกษาลักษณะทางพีโนไทป์ของกลุ่ม *Staphylococcus* และ *Micrococcus* ทุกไอโซเลทเป็นแบคทีเรียรูปกลม แกรมบวกที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสและพีเอช 6 – 9 แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่พีเอช 4 การทดสอบคะตะเลสให้ผลเป็นบวกแต่ให้ผลลบในการทดสอบย่อยสตาร์ช ทดสอบสร้างเอนไซม์ออกซิเดส ทดสอบเอสคูลิน ทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรต ทดสอบ MR และในการทดสอบยูเรีย ทุกไอโซเลทสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสและทรีฮาโลสในการสร้างกรดได้แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาลซอร์บิทอล อินูลินและไกลโคไซด์ในการสร้างกรดได้ โดยตารางที่ 4.5 แสดงลักษณะทางพีโนไทป์ที่แตกต่างกันของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ซึ่งสอดคล้องกับกลุ่ม A ใน Dendrogram ภาพที่ 4.1

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ *Staphylococcus* และ *Micrococcus* โดยมีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 99.55 – 100 เปอร์เซ็นต์ พบว่า มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงสายพันธุ์ *Staphylococcus sciuri* subsp. *Sciuri* 100 เปอร์เซ็นต์ 2 ไอโซเลท ได้แก่ NM3-4 (1370 bp) และ NM44-5 (1377 bp) คล้ายคลึงสายพันธุ์ *S. condimenti* 99.85 และ 99.93 เปอร์เซ็นต์ 2 ไอโซเลท ได้แก่ KM17-4 (1355 bp) และ KM18-4 (1370 bp) ไอโซเลท PM25-1 (1370 bp) มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงสายพันธุ์ *S. simulans* 99.64 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลท NM44-3 (1448 bp) มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงสายพันธุ์ *S. lentus* 99.72 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลท NM45-5 (1392 bp) มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงสายพันธุ์ *S. gallinarum* 99.93 เปอร์เซ็นต์ และมีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงสายพันธุ์ *Micrococcus yunnanensis* 99.55 เปอร์เซ็นต์ คือไอโซเลท NM41-2 (1344 bp) แสดงในตารางที่ 4.4 และนำไปสร้างแผนภาพต้นไม้วิวัฒนาการแสดงในภาพที่ 4.3 ซึ่งเป็นกลุ่มที่เคยมีรายงานความสามารถในการผลิตไลเปสอย่างแพร่หลาย (Gupta, Gupta, et al., 2004; Taipa et al., 1992) และภาพที่ 4.4 แสดงไอโซเลท KM17-4 เมื่อส่องผ่านกล้อง Scanning electron microscope (SEM)

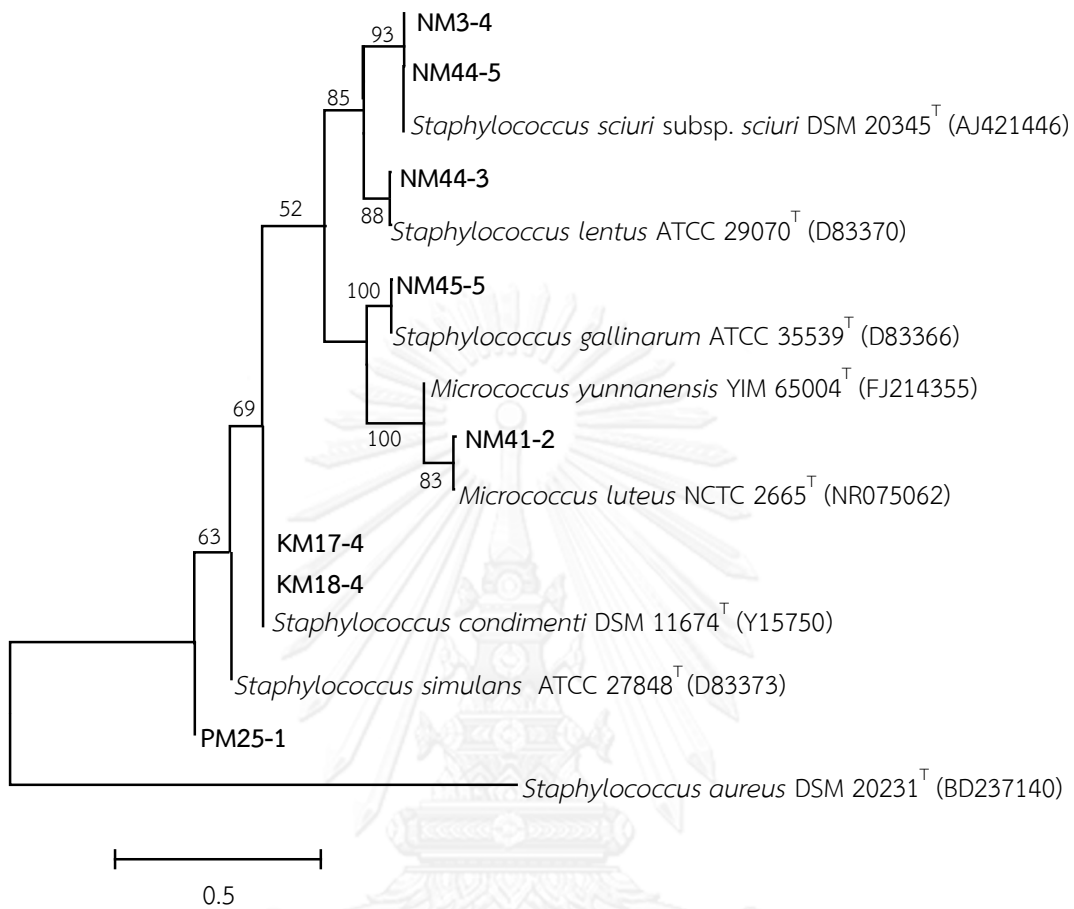
ตารางที่ 4. 4 เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ยีน 16S rRNA ของสายพันธุ์ *Staphylococcus* และ *Micrococcus*

No.	Strain	Nearest Relative	Base pair	% Similarity
1.	NM3-4	<i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>Sciuri</i> DSM 20345	1370	100
2.	NM44-5	<i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>Sciuri</i> DSM 20345	1377	100
3.	KM17-4	<i>Staphylococcus condimentii</i> DSM 11674	1355	99.85
4.	KM18-4	<i>Staphylococcus condimentii</i> DSM 11674	1370	99.93
5.	PM25-1	<i>Staphylococcus simulans</i> ATCC 27848	1370	99.64
6.	NM44-3	<i>Staphylococcus lentus</i> ATCC 29070	1448	99.72
7.	NM45-5	<i>Staphylococcus gallinarum</i> ATCC 35539	1392	99.93
8.	NM41-2	<i>Micrococcus yunnanensis</i> strain YIM 65004	1344	99.55

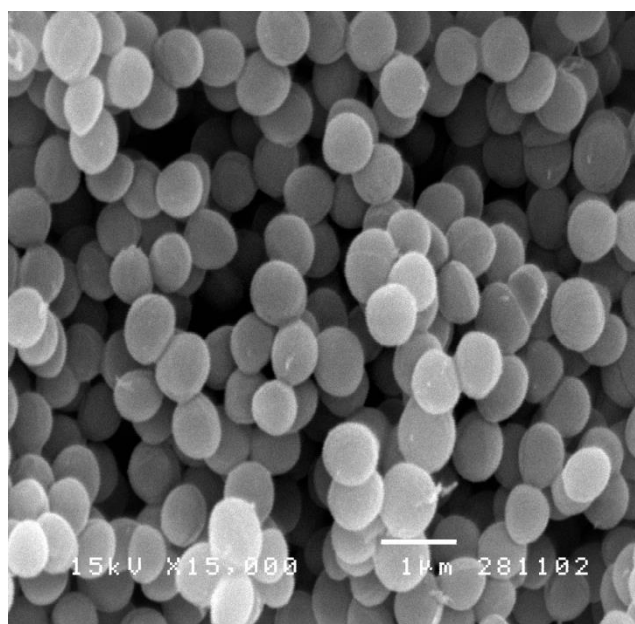
ตารางที่ 4. 5 ลักษณะทางฟีโนไทป์ที่แตกต่างกันของแบคทีเรียในกลุ่มที่ 1 *Staphylococcus* และ *Micrococcus*

Characteristics	<i>S. sciuri</i> (2 isolates)	<i>S. condimentii</i> (2 isolates)	<i>S. simulans</i>	<i>Staphylococcus</i> sp. (6 isolates)	<i>S. lentus</i>	<i>S. gallinarum</i>	<i>M.</i> <i>yunnanensis</i>
Cell shape	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci
Gelatin	+	+	+	+	+	+	-
Arginine	+(-1)	+	+	-	-	-	+
Citrate	-	-	+	-(+2)	-	+	-
Hemolysin	-	-	+	-	-	-	-
VP	+	+	+	+	+	+	-
Indole	-	-	-	-	-	-	+
Growth at 45°C	-	-	-	-	-	-	+
Growth at pH5	+(-1)	+	+	-	-	+	-
4%NaCl (w/v)	+	+	+	+(-2)	-	+	+
6%NaCl(w/v)	+	-	-	-(+3)	-	+	+
8%NaCl(w/v)	+	-	-	-(+3)	-	+	-
Acid from:							
L-Arabinose	+	-	-	+	-	+	-
L-Cellobiose	+(-1)	-	-	+	+	+	-
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	-
D-Galactose	+	+	-	+	-	+	-
Glycerol	+	+	+	+	+	+	-
Lactose	-	+	+	+	-	-	-
D-Maltose	+	-	-	+	+	+	-
D-Mannitol	+(-1)	-	-	+	+	+	-
D-Mannose	+	-	+	+	+	+	-
Melezitose	-	1/2	-	-	+	-	-
Melibiose	-	-	-	+(-2)	-	+	+
Raffinose	-	-	-	+(-2)	+	+	-
L-Rhamnose	-	-	-	-	+	-	-
D-Ribose	+	+	+	+	+	+	-
Salicin	+(-1)	+(-1)	-	+(-2)	+	+	-
Sucrose	+	+	+	+	+	+	-
D-Xylose	+	-	-	+	-	+	-

+, positive reaction; -, negative reaction. Numbers in parentheses indicate the number of strains showing a positive or negative reaction.



ภาพที่ 4.3 แผนภาพต้นไม้วิวัฒนาการ ของกลุ่มสายพันธุ์ *Staphylococcus* และ *Micrococcus* และสายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์กัน



ภาพที่ 4. 4 ภาพ SEM ของ *Staphylococcus condimentii* (KM17-4) ที่เจริญบนอาหาร TSA, Bar 1 ไมโครเมตร

กลุ่มที่ 2 กลุ่ม *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacterium* และ *Corynebacterium*

เป็นแบคทีเรียรูปแท่ง แกรมบวกจำนวน 10 ไอโซเลท จัดอยู่ในสกุล ที่สร้างสปอร์ ได้แก่

- *Bacillus* sp. 7 ไอโซเลท ได้แก่ NM8-1, PR9-2, PR11-1, KM15-1, SS48-5, SS49-4 และ SS50-3
- *Paenibacillus* sp. ได้แก่ NM45-3

เป็นแบคทีเรียรูปแท่ง แกรมบวกจำนวน 2 ไอโซเลท จัดอยู่ในสกุล ที่ไม่สร้างสปอร์ ได้แก่

- *Brevibacterium* sp. ได้แก่ NM42-4
- *Corynebacterium* sp. ได้แก่ NM47-3

จากผลของการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ของกลุ่ม *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacterium* และ *Corynebacterium* นี้เป็นแบคทีเรียรูปแท่ง แกรมบวก ทุกไอโซเลทเจริญได้ที่พีเอช 6 - 8 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่พีเอช 4 ให้ผลบวกเฉพาะทดสอบการย่อยเจลาติน การทดสอบปรีดิวิซในเตรต และทดสอบคตะเลสแต่ให้ผลลบในการทดสอบอาร์จินีน ทดสอบ TSI ทดสอบยูเรีย และการทดสอบ MR ในกลุ่มนี้ทุกไอโซเลทไม่สามารถใช้น้ำตาลซอร์บิทอล แรมโนส ราฟพิโนส กลูโคไซด์ เมลิไซโทส เมลิไปโอส และอินูลินในการสร้างกรดได้ นอกจากนี้ฟีโนไทป์ที่แตกต่างกันแสดงไว้ใน ตารางที่ 4.7 ซึ่งสอดคล้องกับกลุ่ม D ใน Dendrogram ภาพที่ 4.2

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของกลุ่ม *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacterium* และ *Corynebacterium* โดยมีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 99.33 - 100 เปอร์เซ็นต์ พบว่า มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงสายพันธุ์ *Bacillus methylotrophicus* 99.93 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลท NM8-1 (1352 bp) คล้ายคลึงสายพันธุ์ *B. cereus* 100 เปอร์เซ็นต์ 2 ไอโซเลท ได้แก่ KM15-1 (889 bp) และ SS49-4 (1502 bp) ไอโซเลท PR9-2 (1382 bp) มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงสายพันธุ์ *B. pumilus* 99.71 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลท PR11-1 (1386 bp) มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงสายพันธุ์ *B. flexus* 100 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลท SS48-5 (1481 bp) มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงสายพันธุ์ *B. subtilis subsp. Spizizenii* 99.93 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลท SS503 (1010 bp) มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงสายพันธุ์ *B. anthracis* 99.90 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลท NM42-4 (1336 bp) มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงสายพันธุ์ *Brevibacterium salitolerans* 99.33 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลท NM45-3 (1337 bp) มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงสายพันธุ์ *Paenibacillus pasadenensis* 99.55 เปอร์เซ็นต์ และมีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงสายพันธุ์ *Corynebacterium liquefaciens* 97.71 เปอร์เซ็นต์ คือไอโซเลท NM47-3 (1354 bp) แสดงในตารางที่ 4.6

และนำไปสร้างแผนภาพต้นไม้วิวัฒนาการแสดงในภาพที่ 4.5 ซึ่งเป็นกลุ่มที่เคยมีรายงานความสามารถในการผลิตไลเปส (Achamma, Manoj, Valsa, Mohan, & Manjula, 2003; Gayathri, Perumal, Mathew, & Prakash, 2013; Gupta, Gupta, et al., 2004; Miettinen,

Nyyssölä, Rokka, Kontkanen, & Kruus, 2013) และภาพที่ 4.6 แสดงไอโซเลท SS48-5 เมื่อส่องผ่านกล้อง Scanning electron microscope (SEM)

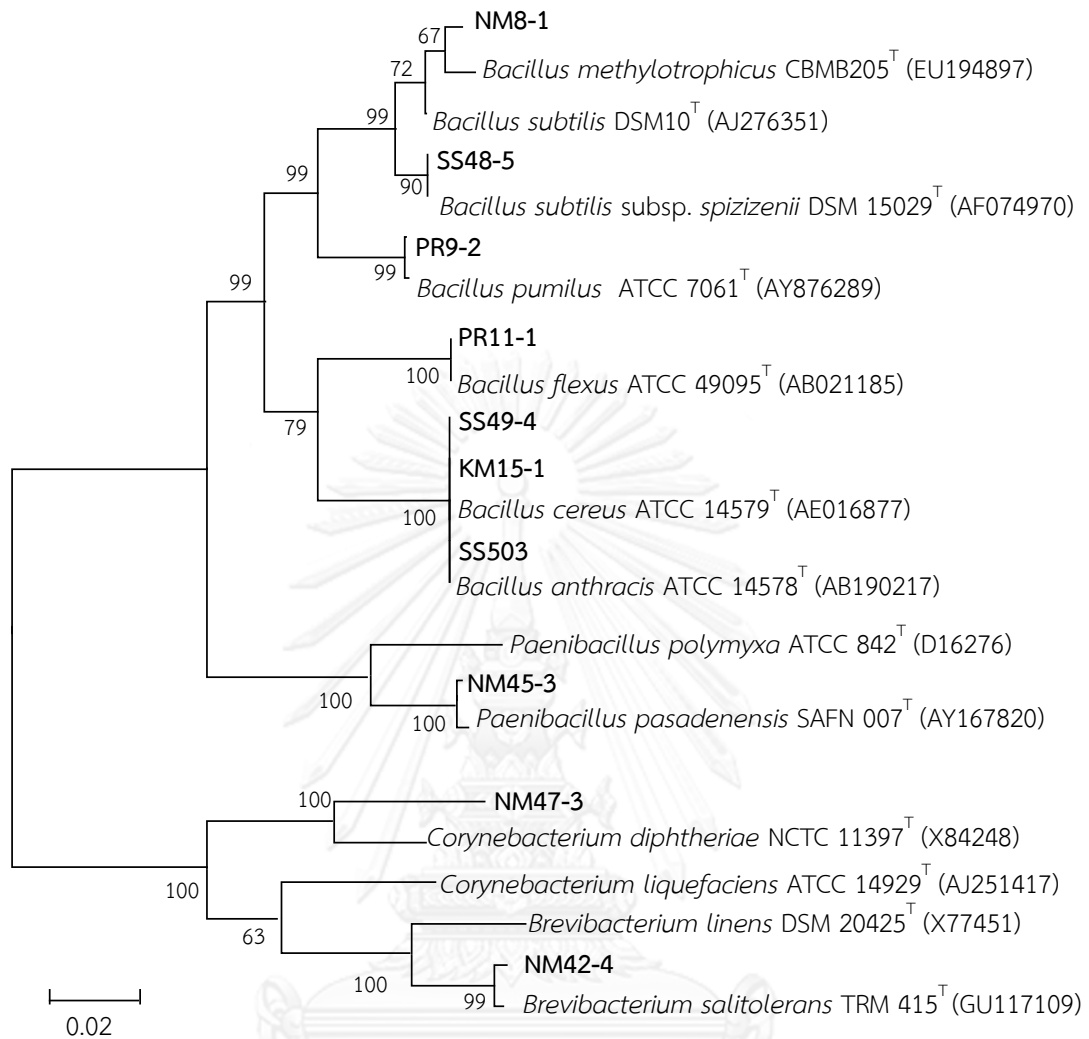
ตารางที่ 4. 6 เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ยีน 16S rRNA ของสายพันธุ์ *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacterium* และ *Corynebacterium*

No.	Strain	Nearest Relative	Base pair	% Similarity
1.	NM8-1	<i>Bacillus methylotrophicus</i> CBMB 205	1352	99.93
2.	PR9-2	<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061	1382	99.71
3.	PR11-1	<i>Bacillus flexus</i> IFO 15715	1386	100
4.	SS50-3	<i>Bacillus anthracis</i> ATCC 14578	1010	99.90
5.	KM15-1	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	889	100
6.	SS49-4	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	1502	100
7.	SS48-5	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Spizizenii</i> DSM 15029	1481	99.93
8.	NM45-3	<i>Paenibacillus pasadenensis</i> SAFN-007	1337	99.55
9.	NM42-4	<i>Brevibacterium salitolerans</i> TRM 415	1336	99.33
10.	NM47-3	<i>Corynebacterium liquefaciens</i> ATCC 14929	1354	97.71

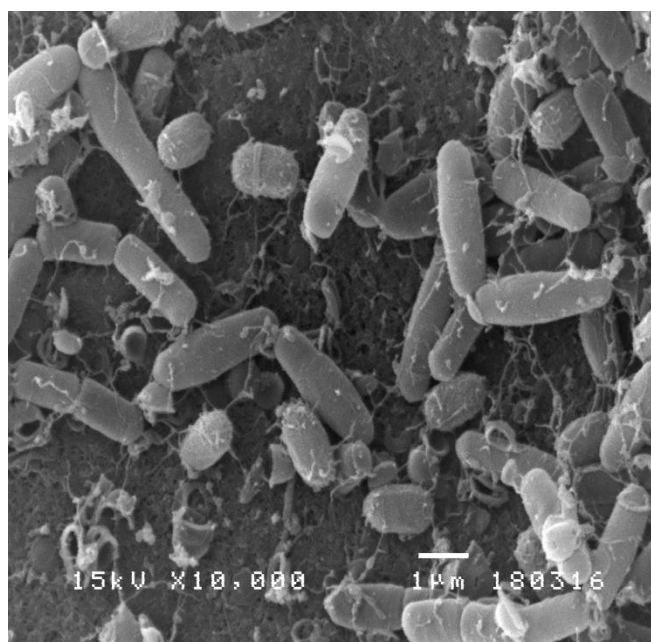
ตารางที่ 4. 7 ลักษณะทางฟีโนไทป์ที่แตกต่างกันของแบคทีเรียในกลุ่มที่ 2 *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacterium* และ *Corynebacterium*

Characteristics	<i>B. methylophilicus</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>B. flexus</i>	<i>B. cereus</i> (2 isolates)	<i>B. subtilis</i>	<i>B. anthracis</i>	<i>P. pasadenensis</i>	<i>Br. salitolerans</i>	<i>C. liquefaciens</i>
Cell shape	Rods	Rods	Rods	Rods	Rods	Rods	Rods	Rods	Rods
Starch	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Citrate utilization	+	-	-	+	-	+	-	+	-
Oxidase	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Hemolysin	-	-	-	-(+1)	-	+	-	-	-
Esculin	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Indole	-	-	-	-	-	-	-	+	+
VP	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Growth at 45°C	+	-	-	-(+1)	+	+	+	-	-
Growth at pH 5	+	-	-	-	+	+	+	-	-
Growth at pH 9	+	-	+	+	+	+	+	+	+
4% NaCl (w/v)	+	+	+	+(-1)	+	+	-	+	+
6% NaCl (w/v)	+	+	+	+(-1)	+	+	-	+	-
8% NaCl (w/v)	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Acid from:									
L-Arabinose	-	+	-	-	-	-	-	-	-
D-Cellobiose	-	+	-	-	-	+	+	+	-
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	-	-
D-Galactose	-	-	+	-	-	-	+	-	-
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Glycerol	-	-	-	-(+1)	-	-	-	+	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	+	-	-
D-Maltose	-	-	+	-(+1)	-	+	+	-	-
D-Mannitol	-	-	+	-(+1)	-	-	+	-	-
D-Mannose	-	+	-	-(+1)	+	+	-	-	-
D-Ribose	-	+	-	-(+1)	-	+	-	+	-
Salicin	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Sucrose	-	+	+	-	+	-	+	-	-
D-Trehalose	-	+	-	-(+1)	-	+	-	-	-
D-Xylose	-	-	-	-	-	+	-	-	-

+, positive reaction; -, negative reaction. Numbers in parentheses indicate the number of strains showing a positive or negative reaction.



ภาพที่ 4.5 แผนภาพต้นไม้วิวัฒนาการ ของกลุ่มสายพันธุ์ *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacterium* และ *Corynebacterium* และสายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์กัน



ภาพที่ 4. 6 ภาพ SEM ของ *Bacillus subtilis subsp. Spizizenii* (SS48-5) ที่เจริญบนอาหาร TSA, Bar 1 ไมโครเมตร

กลุ่มที่ 3 กลุ่ม *Proteus* และ *Klebsiella* 10 ไอโซเลท จัดอยู่ในสกุล

- *Proteus* sp. 9 ไอโซเลท ได้แก่ NM3-7, PR10-2, PR10-3, PR11-3, PR11-4, PR12-2, NM28-1, NM42-8 และ NM42-10
- *Klebsiella* sp. ได้แก่ NM42-1

จากผลของการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ ทุกไอโซเลทในกลุ่ม *Proteus* และ *Klebsiella* เป็นแบคทีเรียรูปร่างแท่ง แกรมลบ ที่ให้ผลบวกในการทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรต การทดสอบการย่อยเจลาติน การทดสอบการใช้ซิเตรท การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส การทดสอบยูเรีย และทดสอบ VP แต่ให้ผลลบในการทดสอบการย่อยสตาร์ช ทดสอบเอนไซม์เฮโมลิซิน การทดสอบการย่อยอาร์จินีน จากการทดสอบความสามารถในเจริญ ในเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นของเกลือ 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ช่วงพีเอช 6 – 9 และช่วงอุณหภูมิ 40 – 45 องศาเซลเซียส ทุกไอโซเลทสามารถเจริญได้และนอกจากนี้ยังสามารถนำน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส ไรโบส กลีเซอรอล และไซโรสไปใช้สร้างกรดได้แต่ใช้อินูลินและเมลิซิโตสในการสร้างกรดไม่ได้ ตารางที่ 4.9 แสดงลักษณะฟีโนไทป์ที่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับกลุ่ม C (ภาพที่ 4.2)

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ *Proteus* และ *Klebsiella* โดยมีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 99.78 – 100 เปอร์เซ็นต์ พบว่า มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงสายพันธุ์ *Proteus mirabilis* 9 ไอโซเลท ได้แก่ 99.93 เปอร์เซ็นต์ของ NM3-7 (1370 bp) 99.85 เปอร์เซ็นต์ของ PR10-2 (1362 bp) 99.85 เปอร์เซ็นต์ของ PR10-3 (1357 bp) 100 เปอร์เซ็นต์ของ PR11-3 (1360 bp) 99.78 เปอร์เซ็นต์ของ PR11-4 (1368 bp) 100 เปอร์เซ็นต์ของ PR12-2 (1357 bp) 99.93 เปอร์เซ็นต์ของ NM28-1 (1362 bp) 100 เปอร์เซ็นต์ของ NM42-8 (1346 bp) 100 เปอร์เซ็นต์ของ NM42-10 (1359 bp) และมีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงสายพันธุ์ *Klebsiella pneumoniae* subsp. *Ozaeae* 99.85 เปอร์เซ็นต์ คือไอโซเลท NM42-1 (1383 bp) แสดงในตารางที่ 4.8

และนำไปสร้างแผนภาพต้นไม้วิวัฒนาการแสดงในภาพที่ 4.7 ซึ่งเป็นกลุ่มที่เคยมีรายงานความสามารถในการผลิตไลเปส (Arpigny & Jaeger, 1999; Gao et al., 2009; Kim, Park, et al., 1996)

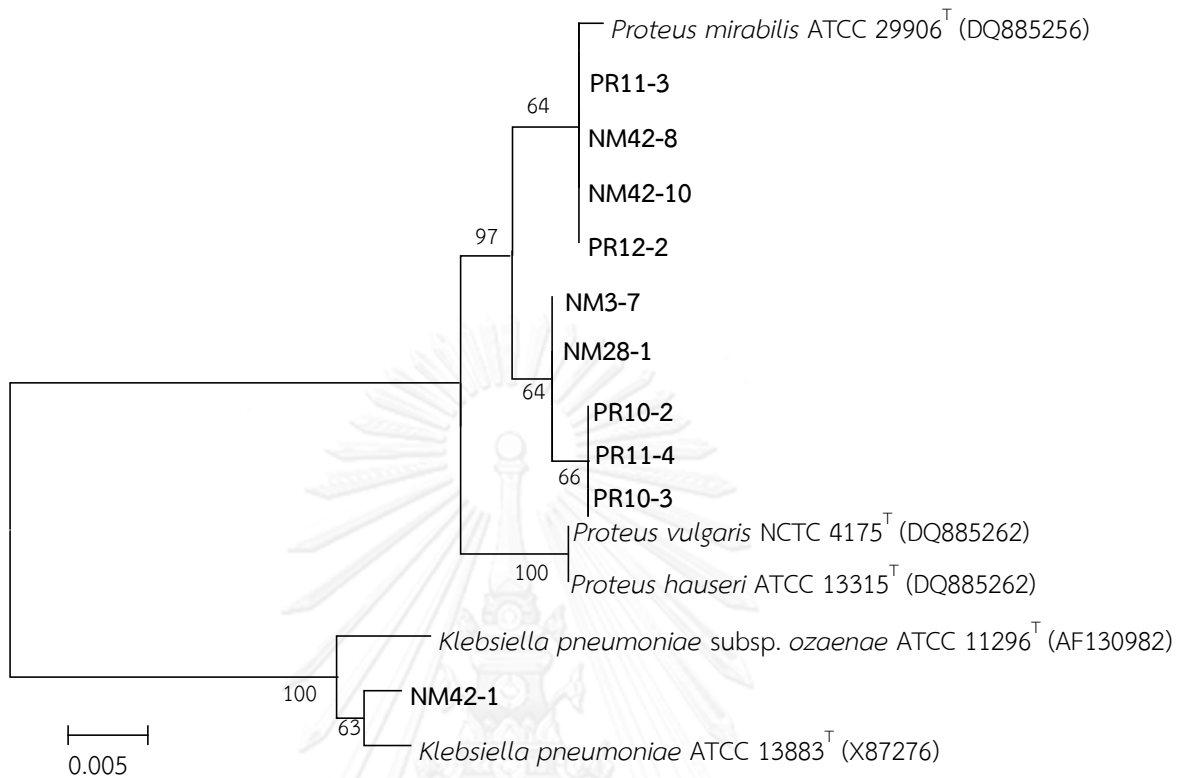
ตารางที่ 4. 8 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ยีน 16S rRNA ของสายพันธุ์ *Proteus* และ *Klebsiella* (เปอร์เซ็นต์)

No.	Strain	Nearest Relative	Base pair	% Similarity
1.	NM3-7	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	1370	99.93
2.	PR10-2	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	1362	99.85
3.	PR10-3	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	1357	99.85
4.	PR11-3	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	1360	100
5.	PR11-4	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	1368	99.78
6.	PR12-2	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	1357	100
7.	NM28-1	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	1362	99.93
8.	NM42-8	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	1346	100
9.	NM42-10	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	1359	100
10.	NM42-1	<i>Klebsiella pneumonia</i> subsp. <i>Ozaenae</i> ATCC 11296	1383	99.85

ตารางที่ 4. 9 ลักษณะทางฟีโนไทป์ที่ต่างกันของแบคทีเรียในกลุ่มที่ 3 *Proteus* และ *Klebsiella*

Characteristics	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Klebsiella pneumonia</i> (9 isolates)	
	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Klebsiella pneumonia</i>
Cell shape	Rods	Rods
Oxidase	-	+
Indole	-	+
MR	-(+3)	-
Ornithine	+	-
Esculin	-(+1)	+
Lysine	-	+
Growth at pH 4	-	+
Growth at pH 5	+(+1)	+
8%NaCl(w/v)	+(+3)	-
Acid from :		
L-Arabinose	-	+
D-Cellobiose	-(+1)	+
D-Fructose	-(+2)	+
D-Glucose	+(+1)	+
Lactose	-	+
D-Maltose	-	+
D-Mannitol	-(+1)	+
D-Mannose	-(+1)	-
Melibiose	-(+1)	+
Glucoside	-(+1)	+
Raffinose	-(+1)	+
L-Rhamnose	-(+1)	+
Salicin	-(+1)	+
Sorbitol	-(+1)	+
Sucrose	+(+3)	+
D-Trehalose	+(+1)	-

+, positive reaction; -, negative reaction. Numbers in parentheses indicate the number of strains showing a positive or negative reaction.



ภาพที่ 4.7 แผนภาพต้นไม้วิวัฒนาการ ของกลุ่มสายพันธุ์ *Proteus*, *Klebsiella* และสายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์กัน

กลุ่มที่ 4 กลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก 26 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียรูปร่างกลม แกรมบวก 9 ไอโซเลท ได้แก่

- *Pediococcus* sp. 5 ไอโซเลท ได้แก่ NM46-2, NM46-3, SS48-4, SS52-1 และ SS52-4
- *Weissella* sp. 3 ไอโซเลท ได้แก่ NM45-2, SS55-3 และ SS56-3
- *Leuconostoc* ได้แก่ ไอโซเลท SS49-1

เป็นแบคทีเรียรูปร่างแท่ง แกรมบวก 17 ไอโซเลท ได้แก่

- *Lactobacillus* spp. ได้แก่ NM8-2, MA34-3, NM39-2, NM43-1, NM43-2, NM43-5, NM44-2, NM47-1, NM47-2, SS48-2, SS49-2, SS49-3, SS50-1, SS50-2, SS51-2, SS52-3 และ SS56-1

จากผลของการศึกษาลักษณะทางพีโนไทป์แบคทีเรียในกลุ่มนี้ มีลักษณะเด่นคือให้ผลทดสอบการผลิตการสร้างกรดแลคติก โดยพบว่าการสร้างเคลิยร์โซนรอบโคโลนีบนอาหารแข็ง MRS เติมแคลเซียมคาร์บอเนต 0.05 เปอร์เซ็นต์ และผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลสเป็นลบ มีลักษณะพีโนไทป์ที่คล้ายคลึงกัน ดังนี้ คือให้ผลลบในการทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรต ทดสอบย่อยสลายซอสทดสอบการใช้ซิเตรท ทดสอบเอนไซม์เฮโมลิติน การทดสอบสร้างเอนไซม์ออกซิเดส และการทดสอบ MR-VP และทุกไอโซเลทสามารถใช้น้ำตาลฟรุกโตส กลูโคส แมนโนส และมอลโตสในการสร้างกรดได้ แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่เกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ โดยลักษณะพีโนไทป์ที่แตกต่างกันแสดงในตารางที่ 4.11 ซึ่งสอดคล้องกับกลุ่ม B ใน Dendrogram ภาพที่ 4.1 และ กลุ่ม E ใน Dendrogram ภาพที่ 4.2

พิสูจน์เอกลักษณ์ เป็น *Lactobacillus* *Pediococcus* *Weissella* และ *Leuconostoc* โดยมีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 99.78 – 100 เปอร์เซ็นต์ พบว่า มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงสายพันธุ์ *Lactobacillus pentosus* 5 ไอโซเลทได้ 100 เปอร์เซ็นต์ของ NM8-2 (1274 bp) 99.93 เปอร์เซ็นต์ของ NM44-2 (1388 bp) 100 เปอร์เซ็นต์ของ SS49-2 (1214 bp) 100 เปอร์เซ็นต์ของ SS50-1 (1398 bp) และ 99.93 เปอร์เซ็นต์ของ SS50-2 (1386 bp) ไอโซเลท SS48-4 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงสายพันธุ์ *Pediococcus pentosaceus* 99.64 เปอร์เซ็นต์ 100 เปอร์เซ็นต์ของ SS51-2 (1380 bp) มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงสายพันธุ์ *P. lolii* ไอโซเลท NM45-2 (1339 bp) มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงสายพันธุ์ *Weissella thailandensis* 99.78 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลท SS55-3 (1369 bp) มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงสายพันธุ์ *W. cibaria* 99.93 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลท SS56-3 (1400 bp) มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงสายพันธุ์ *W. paramesenteroides* 99.86 เปอร์เซ็นต์ และมีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงสายพันธุ์ *Leuconostoc fallax* 99.92 เปอร์เซ็นต์ คือไอโซเลท SS49-2 (1327 bp) แสดงในตารางที่ 4.10

และนำไปสร้างแผนภาพต้นไม้วิวัฒนาการแสดงในภาพที่ 4.8 ซึ่งเป็นกลุ่มที่เคยมีรายงานความสามารถในการผลิตไลเปส (Hasan et al., 2006; Lopes, Cunha, Clemente, Carrondo, & Crespo, 1999)

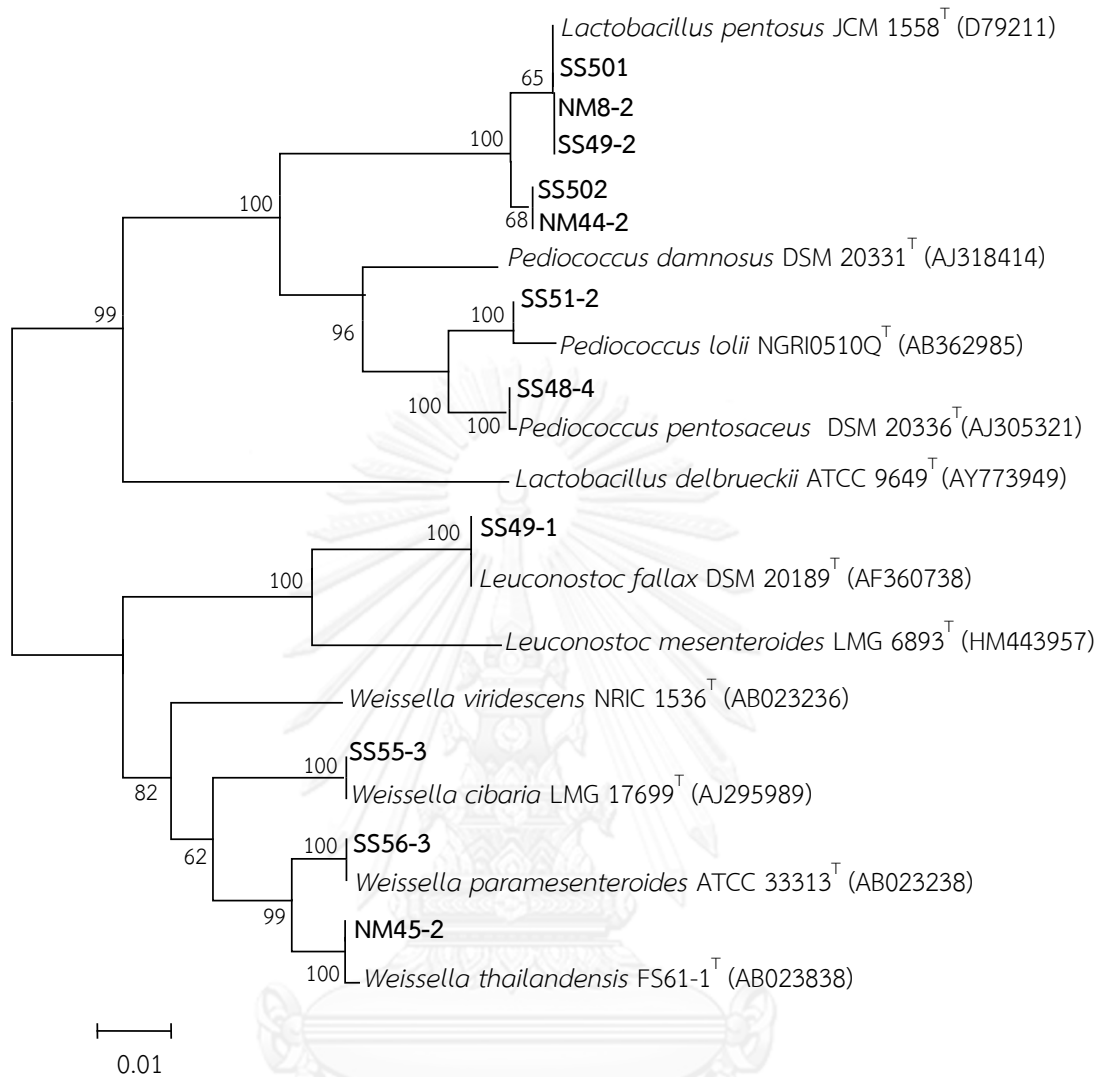
ตารางที่ 4. 10 เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *Lactobacillus*, *Weissella*, *Leuconostoc* และ *Pediococcus*

No.	Strain	Nearest Relative	Base pair	% Similarity
1.	NM8-2	<i>Lactobacillus pentosus</i> JCM 1558	1274	100
2.	NM44-2	<i>Lactobacillus pentosus</i> JCM 1558	1388	99.93
3.	SS49-2	<i>Lactobacillus pentosus</i> JMC 1558	1214	100
4.	SS50-1	<i>Lactobacillus pentosus</i> JCM 1558	1398	100
5.	SS50-2	<i>Lactobacillus pentosus</i> JCM 1558	1386	99.93
6.	SS48-4	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DSM 20336	1397	99.79
7.	SS51-2	<i>Pediococcus lolii</i> NGRI 0510Q	1380	100
8.	SS49-1	<i>Leuconostoc fallax</i> DSM 20189	1327	99.92
9.	NM45-2	<i>Weissella thailandensis</i> FS61-1	1339	99.78
10.	SS55-3	<i>Weissella cibaria</i> LMG 17699	1369	99.93
11.	SS56-3	<i>Weissella paramesenteroides</i> ATCC 33313	1400	99.86

ตารางที่ 4. 11 ลักษณะทางฟีโนไทป์ที่แตกต่างกันของแบคทีเรียในกลุ่มที่ 4 แบคทีเรียกรดแลคติก

Characteristics	<i>Pediococcus</i> sp. (3 isolates)	<i>P. pentosaceus</i>	<i>P. loli</i>	<i>Leuconostoc fallax</i>	<i>Weissella thailandensis</i>	<i>W. cibaria</i>	<i>W. paramesenteroides</i>	<i>Lactobacillus pentosus</i> (5 isolates)	<i>Lactobacillus</i> sp. (12 isolates)
Cell shape	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Rods	Rods
Indole	-	-	+	-	-	+	-	-	-
Gelatin	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Arginine	-	+	-	+	-	-	-	-	-(+4)
Gas product	-	-	-	+	+	+	+	-	-
Growth at 45°C	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Growth at 40°C	-	+	+	-	-	+	-	+	-(+4)
Growth at pH4	-	-	+	-	-	-	-	-(+2)	-(+2)
Growth at pH5	+(-1)	+	+	-	+	+	-	+(-1)	-(+5)
Growth at pH6	+(-1)	+	+	-	+	+	-	+	+(-5)
Growth at pH8	-	+	+	-	-	+	-	+(-1)	-(+5)
Growth at pH9	-	-	-	-	-	+	-	+(-1)	-(+3)
4%NaCl	-	-	+	+	+	+	+	+(-1)	+(-1)
6%NaCl	-	-	-	+	+	+	+	+(-1)	-
Acid from :									
L- Arabinose	+(-1)	+	+	-	+	+	+	+	-
D-Cellobiose	+	+	+	-	+	+	+	+	+
D-Galactose	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	+(-2)	-(+4)
Inulin	-	-	-	-	-	+	+	-	-(+6)
Lactose	+(-1)	-	+	-	-	+	+	+	-
D-Mannitol	-	-	-	+	+	+	+	+	-(+5)
Melezitose	-	-	-	-	-	-	-	+	+(-6)
Melibiose	+(-1)	+	+	-	+	-	+	+	-
Glucoside	-	+	+	+	-	-	-	+	-(+5)
Raffinose	+(-1)	+	+	-	-	-	-	+	-
L-Rhamnose	-	+	+	-	-	-	-	-	-(+5)
D-Ribose	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	+	-(+3)
Sucrose	+	+	+	-	+	+	+	+	+
D-Trehalose	+	+	+	-	-	-	-	+	-(+5)
D-Xylose	-	-	-	+	-	-	-	+(-2)	-

+, positive reaction; -, negative reaction. Numbers in parentheses indicate the number of strains showing a positive or negative reaction.



ภาพที่ 4.8 แผนภาพต้นไม้วิวัฒนาการของกลุ่มสายพันธุ์ *Lactobacillus*, *Weissella*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* และสายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์กัน

4.5 ศึกษาความไวรับต่อสารปฏิชีวนะ

เนื่องจากแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมักในกลุ่มที่ 1 *Staphylococcus* และ *Micrococcus* กลุ่มที่ 2 *Bacillus Paenibacillus Brevibacterium* และ *Corynebacterium* และกลุ่มที่ 3 *Proteus* และ *Klebsiella* เป็นสกุลที่อาจก่อโรคจึงต้องศึกษาความไวรับต่อสารปฏิชีวนะ ซึ่งแสดงอยู่ในตารางที่ 4.12, 4.13 และ 4.14 ตามลำดับ

กลุ่มที่ 1 *Staphylococcus* และ *Micrococcus* ทดสอบกับสารปฏิชีวนะ 15 ชนิด ได้แก่ Ampicillin, Amoxycylin/Clavulanic, Bacitracin, Cephalothin, Clindamycin, Erythromycin, Gentamicin, Kanamycin, Novobiocin, Penicillin-G, Streptomycin, Sulpha/trimetho, Tetracycline, Tobramycin และ Vancomycin พบว่า ไอโซเลท KM17-4 PM25-1 และ NM44-3 สามารถต้านสารปฏิชีวนะชนิด Sulpha/trimetho ได้

กลุ่มที่ 2 *Bacillus, Paenibacillus, Brevibacterium* และ *Corynebacterium* ทดสอบกับสารปฏิชีวนะ 16 ชนิด ได้แก่ Amikacin, Bacitracin, Chloramphenicol, Clindamycin, Erythromycin, Gentamicin, Imipenem, Kanamycin, Levofloxacin, Novobiocin, Penicillin-G, Streptomycin, Sulphonamide, Sulpha/trimetho, Tetracycline และ Vancomycin พบว่า ไอโซเลท KM15-1 สามารถต้านสาร Bacitracin และ Penicillin-G ไอโซเลท SS49-4 สามารถต้านได้ 3 ชนิดคือ Penicillin-G, Sulphonamide และ Sulpha/trimetho ไอโซเลท NM42-2 และ NM47-3 สามารถต้านสาร Sulpha/trimetho ได้ และไอโซเลท SS50-3 สามารถต้านสารปฏิชีวนะได้ 2 ชนิด คือ Sulphonamide และ Sulpha/trimetho

กลุ่มที่ 3 *Proteus* และ *Klebsiella* ทดสอบกับสารปฏิชีวนะ 24 ชนิด ได้แก่ Ampicillin, Amikacin, Amoycylin/Clavulanic, Bacitracin, Carbenicillin, Cefotaxime, Cefoxitin, Cephalothin, Chloramphenicol, Clindamycin, Erythromycin, Gentamicin, Imipenem, Kanamycin, Netilmicin, Novobiocin, Penicillin-G, Piperacillin/Tazobactam, Streptomycin, Sulpha/trimetho, Sulphonamide, Tetracycline, Tobramycin และ Vancomycin พบว่า ทุกไอโซเลทสามารถต้านสารปฏิชีวนะ 4 ชนิดคือ Bacitracin, Clindamycin, Erythromycin และ Vancomycin และเกือบทุกไอโซเลทสามารถต้านสาร Tetracycline ได้ยกเว้น ไอโซเลท NM42-1 นอกจากนี้ยังมีไอโซเลทอื่นที่สามารถต้านสารปฏิชีวนะชนิดอื่นๆได้อีกดังนี้ ไอโซเลท PR10-2 และ PR10-3 สามารถต้านสารปฏิชีวนะได้ 6 ชนิด คือ Bacitracin, Clindamycin, Erythromycin, Novobiocin, Tetracycline และ Vancomycin ไอโซเลท PR11-4 สามารถต้านได้ 6 ชนิด คือ Amoycylin/Clavulanic, Bacitracin, Clindamycin, Erythromycin, Tetracycline และ Vancomycin ไอโซเลท NM28-1 สามารถต้านสารปฏิชีวนะ 8 ชนิด คือ Ampicillin Bacitracin, Cephalothin, Clindamycin, Erythromycin, Novobiocin, Tetracycline และ Vancomycin ไอโซเลท NM42-1 สามารถต้านได้ 9 ชนิด คือ Ampicillin, Bacitracin, Carbenicillin, Clindamycin, Erythromycin, Novobiocin, Penicillin-G, Tetracycline และ Vancomycin ไอโซเลท NM42-8 และ NM42-10 สามารถต้านสารปฏิชีวนะได้ 8 ชนิด คือ

Bacitracin, Clindamycin, Erythromycin, Streptomycin, Sulpha/trimetho, Sulphonamide, Tetracycline และ Vancomycin

ความไวรับต่อสารปฏิชีวนะหรือการต้านยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียเป็นปัญหาใหญ่และกระทบไปทั่วโลกในขณะนี้ โดยความรุนแรงและความชุกแต่ละพื้นที่ก็แตกต่างกันไป แบคทีเรียที่งานวิจัยนี้แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารหมักตามธรรมชาติและเมื่อจัดกลุ่มแบคทีเรีย ในกลุ่มนั้นมีบางสายพันธุ์เป็นแบคทีเรียก่อโรคอาจมีโอกาเสี่ยง งานวิจัยส่วนนี้จึงเป็นผลการรายงานการไวต่อสารปฏิชีวนะและการดื้อต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรีย จึงมั่นใจได้ว่าแบคทีเรียที่แยกได้ไม่มีรายงานว่าก่อโรคหรือบางสายพันธุ์เช่น *Proteus mirabilis* และ *Klebsiella pneumonia* subsp. *Ozaenae* เป็นเชื้อก่อโรคในกระเพาะปัสสาวะ แต่ก็มีสารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญได้



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 4. 12 ทดสอบความไวรับต่อสารปฏิชีวนะของ *Staphylococcus* และ *Micrococcus*

Antibiotics	Strain										
	NM3-4	KM17-4	KM18-4	PM25-1	NM44-3	NM44-5	NM45-5	NM45-4	NM45-6	NM41-2	
Ampicillin (10 ug)	39.6±0.3	41.3±0.4	50.0±0.1	64.8±0.3	32.7±0.1	10.4±0.2	38.8±1.0	38.7±0.4	43.7±0.4	46.6±0.2	
Amoxycilin/Clavulanic (2:1)	44.5±1.3	59.3±0.1	49.9±0.4	66.7±0.4	43.6±0.1	39.5±0.7	42.3±0.7	40.1±0.1	46.7±0.2	57.7±0.9	
Bacitracin (10 U)	22.3±0.4	25.15±0.1	20.9±0.8	15.0±0.8	17.3±0.3	9.8±0.6	23.7±0.3	27.7±0.2	15.1±0.1	48.8±1.1	
Cephalothin (30 ug)	43.2±0.1	58.9±0.1	45.9±0.9	59.9±0.1	45.3±0.4	13.5±0.5	48.2±0.5	45.6±0.6	51.1±0.7	49.0±0.8	
Clindamycin (2 ug)	24.8±0.4	37.4±0.1	37.5±0.3	37.7±0.4	25.9±0.1	22.5±0.0	29.0±0.3	29.6±0.4	32.9±0.2	37.6±0.1	
Erythromycin (10 ug)	32.9±0.1	40.2±0.3	39.1±0.6	44.1±0.4	36.0±0.6	32.1±0.1	32.6±0.6	33.0±0.5	36.2±0.5	51.4±0.1	
Gentamicin (10 ug)	32.6±0.3	36.3±0.8	32.9±0.6	39.8±0.3	38.4±0.2	25.5±0.1	30.2±0.2	36.0±0.0	37.4±0.4	44.2±0.1	
Kanamycin (30ug)	30.8±0.3	37.1±0.1	31.8±0.3	34.0±0.6	35.3±0.6	28.2±0.7	30.2±0.4	32.0±0.1	36.1±0.5	32.15±0.2	
Novobiocin (5 ug)	20.3±0.4	35.9±0.4	35.8±0.4	37.9±1.0	15.3±0.1	13.8±0.1	16.8±0.4	21.0±0.7	15.9±0.2	46.7±0.1	
Penicillin G (20 U)	39.4±0.8	68.6±0.6	52.1±1.3	68.6±0.6	34.6±0.6	12.0±0.4	38.7±0.3	38.4±0.5	42.0±0.1	51.9±1.1	
Streptomycin (10 ug)	21.2±0.2	26.1±0.7	22.6±0.4	27.7±1.0	25.3±0.3	21.3±0.0	22.7±0.5	23.4±0.6	26.8±0.3	22.3±0.4	
Sulpha/trimetho(Bactrim)	19.2±0.6	0.0±0.0	24.9±0.5	0.0±0.0	0.0±0.0	23.6±0.7	23.4±0.2	20.4±0.3	27.7±0.7	23.5±0.1	
Tetracycline (30 ug)	41.0±0.0	52.1±0.8	44.7±0.7	55.0±0.7	17.9±0.1	30.9±0.1	36.8±0.5	41.6±0.6	42.6±0.8	54.3±0.4	
Tobramycin (10 ug)	29.5±0.1	33.4±0.5	30.4±0.2	32.8±0.6	32.7±0.4	24.8±0.3	29.3±0.4	30.7±0.1	34.4±0.6	13.5±0.4	
Vancomycin (30 ug)	24.3±0.4	23.8±0.3	27.6±0.1	36.7±0.4	23.5±0.7	21.7±0.4	21.9±0.1	23.1±0.1	26.1±0.1	31.3±0.4	

แสดงเป็นเส้นผ่านศูนย์กลางของเคลียร์โซนรอบดิสก์ยา ในหน่วย มิลลิเมตร (mm)

ตารางที่ 4. 13 ทดสอบไวรัสต่อสารปฏิชีวนะของ *Bacillus, Paenibacillus, Brevibacterium* และ *Corynebacterium*

Antibiotics	Strain										
	NM8-1	PR9-2	PR11-1	KM15-1	NM41-2	NM42-4	NM47-3	NM45-3	SS48-4	SS49-4	SS503
Amikacin (30ug)	39.3±0.4	39.8±0.4	41.2±0.6	37.7±0.2	-	31.4±0.9	-	21.2±0.3	36.6±0.8	33.6±0.1	36.2±0.6
Bacitracin (10 U)	15.1±0.7	14.1±0.1	33.2±0.8	0.0±0.0	48.8±1.1	18.6±0.1	45.2±0.4	33.7±0.4	9.9±0.1	22.4±0.1	21.8±0.6
Chloramphenicol (30ug)	37.8±0.3	39.6±0.2	40.8±0.3	32.2±0.4	-	40.6±0.7	-	42.1±0.1	34.0±1.0	35.5±0.4	42.2±0.4
Clindamycin (2 µg)	31.9±0.1	37.9±0.6	31.0±0.2	37.3±0.3	37.6±0.1	17.2±0.4	39.6±0.1	33.7±0.2	21.3±0.4	31.5±0.3	30.5±0.0
Erythromycin (15 µg)	44.6±0.4	49.6±0.4	37.2±0.2	40.9±0.6	51.4±0.1	17.3±0.5	49.4±0.6	38.2±0.1	39.4±0.6	41.8±0.1	38.0±1.0
Gentamicin (10 µg)	39.4±0.5	42.1±0.4	39.0±0.4	29.8±0.1	44.2±0.1	28.6±0.1	42.0±0.1	30.5±0.3	38.3±0.4	31.2±0.1	34.8±0.4
Imipenem (10 µg)	61.9±0.1	60.3±0.4	50.4±0.6	50.2±0.4	-	36.9±0.6	-	49.0±0.4	57.2±0.3	45.8±0.0	56.9±0.2
Kanamycin (30 µg)	40.5±0.5	41.4±0.2	42.2±0.3	26.9±0.3	32.15±0.2	21.1±0.0	39.5±0.4	20.3±0.4	40.6±0.6	26.6±0.4	36.7±0.1
Levofloxacin (5 µg)	43.6±0.3	53.9±0.2	37.9±0.1	37.7±0.0	-	-	-	31.4±0.2	40.1±0.6	38.3±0.2	43.2±0.5
Novobiocin (5 µg)	25.5±0.4	34.6±0.2	24.8±0.4	20.2±0.1	46.7±0.1	27.9±0.1	36.9±0.8	34.2±0.2	27.6±0.6	22.7±0.1	30.5±0.6
Penicillin G (20 U)	49.1±0.1	55.7±0.1	49.7±0.4	0.0±0.0	51.9±1.1	32.0±0.1	47.9±0.9	57.3±0.4	31.6±0.6	0.0±0.0	20.4±0.4
Streptomycin (10 µg)	29.0±0.4	33.2±0.5	30.2±0.5	31.2±0.2	22.3±0.4	21.3±0.3	30.0±0.2	25.8±0.4	19.7±0.5	32.0±0.7	28.9±0.1
Sulphonamide (300 µg)	47.9±0.8	59.7±0.2	42.1±0.1	37.0±0.4	-	21.5±0.0	-	53.4±0.3	34.8±0.1	0.0±0.0	0.0±0.0
Sulpha/trimetho (Bactrim)	47.8±0.6	64.8±0.3	41.5±0.4	11.8±0.4	23.5±0.1	0.0±0.0	0.0±0.0	45.6±0.6	43.2±0.5	0.0±0.0	0.0±0.0
Tetracycline (30 µg)	21.8±0.7	52.2±0.5	39.7±0.1	9.3±0.4	54.3±0.4	38.0±0.0	48.3±0.1	48.9±0.5	36.1±0.1	30.4±0.5	31.5±0.2
Vancomycin (30 µg)	31.9±0.6	34.9±0.1	31.3±0.4	21.4±0.6	31.3±0.4	30.7±1.2	32.8±0.4	37.0±0.6	28.6±0.8	26.8±0.4	29.8±0.4

แสดงเป็นเส้นผ่านศูนย์กลางของเคลียร์โซนรอบปดิสก์ยา ในหน่วย มิลลิเมตร (mm)

ตารางที่ 4. 14 ทดสอบการต้านจุลชีพของ *Proteus* และ *Klebsiella*

Antibiotics	Strain									
	NM3-7	PR10-2	PR10-3	PR11-3	PR11-4	PR12-2	NM28-1	NM42-1	NM42-8	NM42-10
Ampicillin (10 ug)	28.9±0.1	28.1±1.1	19.8±0.4	22.6±0.4	24.6±0.6	22.8±0.4	0.0±0.0	0.0±0.0	24.9±0.2	17.5±0.2
Amikacin (30ug)	20.3±0.4	24.8±0.2	22.2±0.9	16.9±0.4	22.7±0.3	22.5±0.4	20.8±0.2	21.5±0.1	19.5±0.7	20.1±0.7
Amocycilin/Clavulanic (2:1)	29.6±0.3	30.8±0.3	32.6±0.3	20.5±0.6	0.0±0.0	26.7±0.2	28.2±0.3	30.8±0.4	29.8±0.2	26.4±0.6
Bacitracin (10 U)	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Carbenicillin (100 ug)	34.7±0.4	37.4±0.4	35.3±0.1	35.5±0.1	38.8±0.1	35.7±0.3	35.1±0.1	0.0±0.0	35.2±0.4	32.2±0.3
Cefotaxime (30 ug)	41.5±0.1	40.8±0.4	41.7±0.3	39.8±0.3	25.3±0.3	37.1±0.7	43.1±0.7	40.4±0.7	41.7±0.4	39.6±0.6
Cefoxitin (30 ug)	26.5±0.5	24.7±0.2	27.8±0.1	25.3±0.4	19.6±0.1	28.0±0.0	23.5±0.7	27.0±0.0	26.3±0.4	23.8±0.1
Cephalothin (30 ug)	34.3±0.5	30.9±1.1	18.4±0.2	25.4±0.6	27.9±0.1	33.9±0.1	0.0±0.0	23.7±0.4	22.3±0.1	21.3±0.2
Chloramphenicol (30ug)	27.6±0.6	14.4±0.1	10.1±0.2	22.6±0.2	26.8±0.0	26.4±0.5	18.9±0.1	14.9±0.3	10.9±0.5	10.4±0.2
Clindamycin (2 µg)	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Erythromycin (15 µg)	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Gentamicin (10 µg)	20.0±0.2	23.0±0.1	23.5±0.1	22.6±0.1	21.4±0.3	20.3±0.2	22.4±0.2	24.9±0.1	17.5±0.1	19.0±0.4
Imipenem (10 µg)	28.8±0.1	35.3±0.2	24.8±0.4	22.8±0.0	31.0±0.6	33.6±0.2	27.2±0.2	37.2±0.9	28.1±0.5	26.8±0.4
Kanamycin (30 µg)	25.6±0.4	25.4±0.2	24.3±0.2	23.5±0.2	20.9±0.2	27.1±0.4	26.0±0.1	28.9±0.1	19.6±0.0	21.6±0.1
Netilmicin (30 ug)	23.4±0.5	22.2±0.3	23.2±0.3	20.8±1.1	23.8±0.1	23.1±0.1	23.6±0.3	23.2±0.5	22.3±0.1	23.8±0.1
Novobiocin (5 µg)	14.7±0.1	0.0±0.0	0.0±0.0	12.3±0.0	11.7±0.1	19.9±0.1	17.0±0.5	0.0±0.0	11.2±0.2	10.5±0.1
Penicillin G (20 U)	26.5±0.3	31.0±0.5	25.7±0.2	18.1±0.0	29.2±0.5	30.5±0.8	0.0±0.0	0.0±0.0	12.8±0.4	8.3±0.3
Piperacillin/Tazobactam	36.6±0.3	36.3±0.4	35.4±0.4	33.7±1.0	30.7±0.2	30.0±0.4	38.3±0.1	35.5±0.6	36.2±0.2	32.9±0.4
Streptomycin (10 µg)	19.1±0.0	20.2±0.5	17.8±0.6	18.4±0.1	11.2±0.4	22.6±0.5	20.1±0.1	21.7±0.3	0.0±0.0	0.0±0.0
Sulpha/trimetho (Bactrim)	28.2±0.4	19.3±0.1	20.5±0.1	19.8±0.1	28.2±0.5	24.9±0.2	28.3±0.4	21.2±0.1	0.0±0.0	0.0±0.0
Sulphonamide (300µg)	28.3±0.1	18.8±2.4	23.4±0.3	26.1±0.1	12.4±0.1	29.5±0.7	31.9±0.1	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Tetracycline (30 µg)	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	25.8±0.1	0.0±0.0	0.0±0.0
Tobramycin (10 ug)	21.0±0.1	22.3±0.3	21.0±0.0	15.5±0.2	16.7±0.1	20.9±0.1	22.3±0.4	13.2±0.3	16.4±0.1	18.8±0.6
Vancomycin (30 ug)	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0

แสดงเป็นเส้นผ่านศูนย์กลางของเคลียร์ ในหน่วย มิลลิเมตร (mm)

4.6 ผลการผลิตเอนไซม์

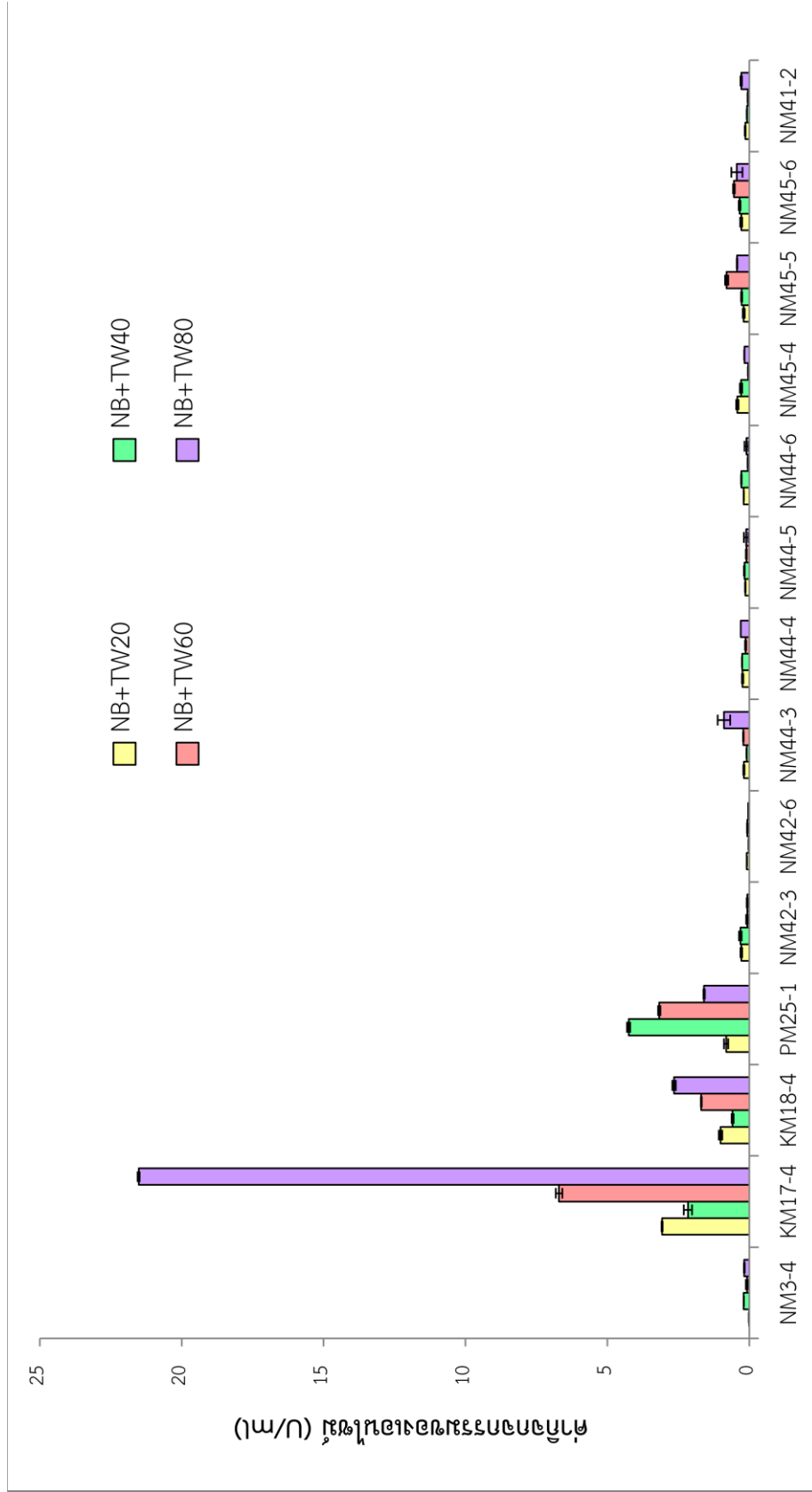
ผลการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส ด้วยวิธี spectrophotometric assay ที่ 405 นาโนเมตร โดยมี *p*-nitrophenyl palmitate (*p*-NPP) เป็นสารตั้งต้น ของแบคทีเรีย 60 ไอโซเลทที่คัดกรองได้ เลี้ยงใน Nutrient Broth (NB) พีเอช 7.0 ที่เติม Tween 20 (NB+TW20), Tween 40 (NB+TW40), Tween 60 (NB+TW60) และ Tween 80 (NB+TW80) 1 เปอร์เซ็นต์ ใช้เป็นสารเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ไลเปส บ่มในเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในหน่วยของยูนิต์ต่อไมโครมิลลิลิตร (U/ml) ในตารางที่ ข.1 ซึ่งค่าของกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากการคำนวณจากกราฟมาตรฐานในภาพที่ ค.1 และสูตรการคำนวณแสดงในสมการที่ ค.1

โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียจากอาหารหมักที่คัดแยกได้นั้น พบว่าในอาหารที่เติมสารเหนี่ยวนำชนิด Tween 20 อยู่ในช่วง 0.01 – 3.07 U/ml ชนิด Tween 40 อยู่ในช่วง 0.03 – 4.25 U/ml ชนิด Tween 60 อยู่ในช่วง 0.04 – 6.70 U/ml และชนิด Tween 80 อยู่ในช่วง 0.03 – 21.52 U/ml โดย ภาพที่ 4.9 – 4.13 แผนภูมิแสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย

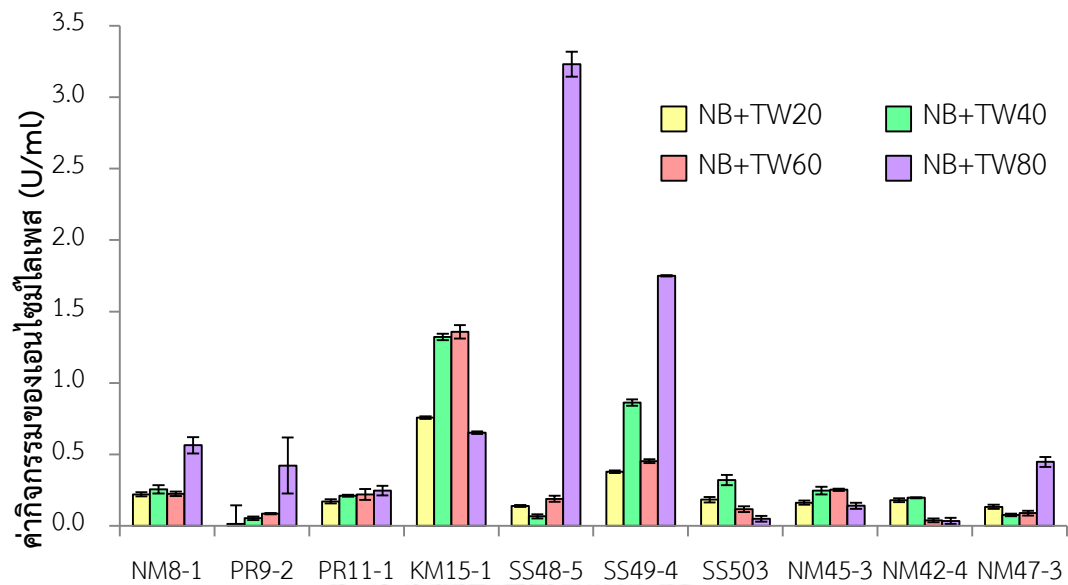
จากภาพที่ 4.9 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ในอาหารที่เติม Tween 20 อยู่ในช่วง 0.01 – 3.07 U/ml และในอาหารที่เติม Tween 40, Tween 60 และ Tween 80 อยู่ในช่วง 0.08 – 2.16 U/ml , 0.04 – 6.70 U/ml และ 0.11 – 21.52 U/ml ตามลำดับ และพบว่าไอโซเลท KM17-4 ในอาหารที่เติม Tween 80 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด คือ 21.52 U/ml จึงได้ให้ *Staphylococcus condimenti* (KM17-4) เป็นตัวแทนของแบคทีเรียกลุ่มที่ 1 *Staphylococcus* และ *Micrococcus* ในการศึกษาขั้นต่อไป

ภาพที่ 4.10 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในอาหารที่เติมสารเหนี่ยวนำทั้ง 4 ชนิดเช่นกันของแบคทีเรียในกลุ่มที่ 2 *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacterium* และ *Corynebacterium* โดยในอาหารที่เติม Tween 20 อยู่ในช่วง 0.01 – 0.76 U/ml และในอาหารที่เติม Tween 40, Tween 60 และ Tween 80 อยู่ในช่วง 0.05 – 1.32 U/ml, 0.09 – 1.36 U/ml และ 0.05 – 3.23 U/ml ตามลำดับ พบว่าไอโซเลท SS48-5 ในอาหารที่เติม Tween 80 คือ 3.23 U/ml ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุดของกลุ่ม จึงได้ให้ *Bacillus subtilis* subsp. *Spizizenii* (SS48-5) เป็นตัวแทนของแบคทีเรียกลุ่มที่ 2

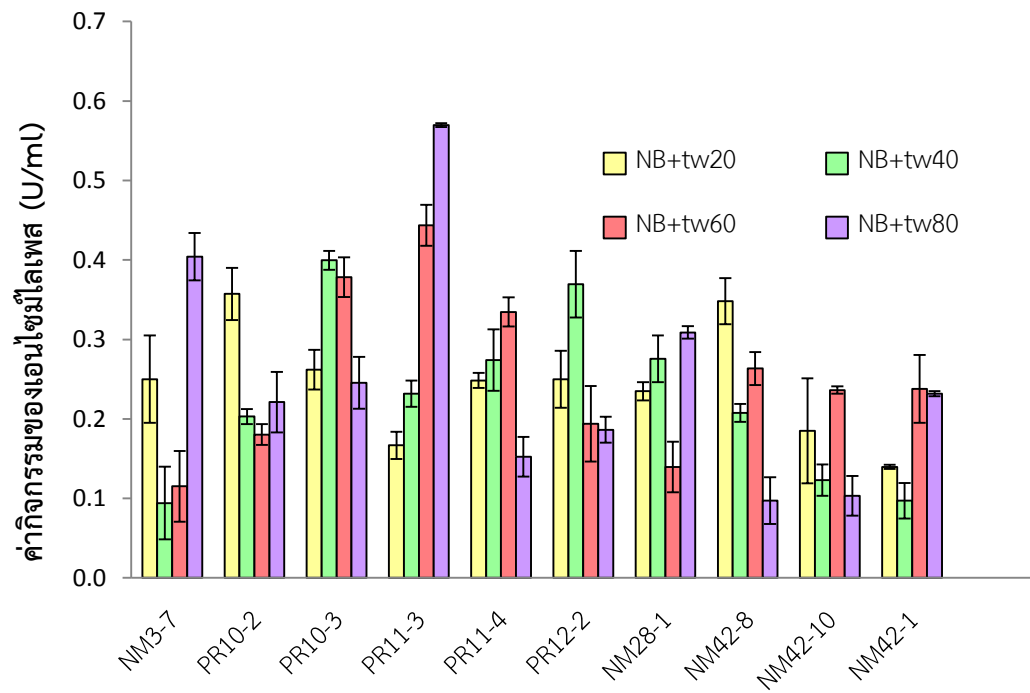
และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียกลุ่มที่ 3 กลุ่ม *Proteus* และ *Klebsiella* แสดงในภาพที่ 4.11 โดยในอาหารที่เติม Tween 20 อยู่ในช่วง 0.14 – 0.36 U/ml และในอาหารที่เติม Tween 40, Tween 60 และ Tween 80 อยู่ในช่วง 0.09 – 0.40 U/ml, 0.04 – 0.44 U/ml และ 0.04 – 0.57 U/ml ตามลำดับ และพบว่าไอโซเลท PR11-3 ในอาหารที่เติม Tween 80 คือ 0.57 U/ml ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุดของกลุ่ม จึงได้ให้ *Proteus mirabilis* (PR11-3) เป็นตัวแทนของแบคทีเรียกลุ่มที่ 3



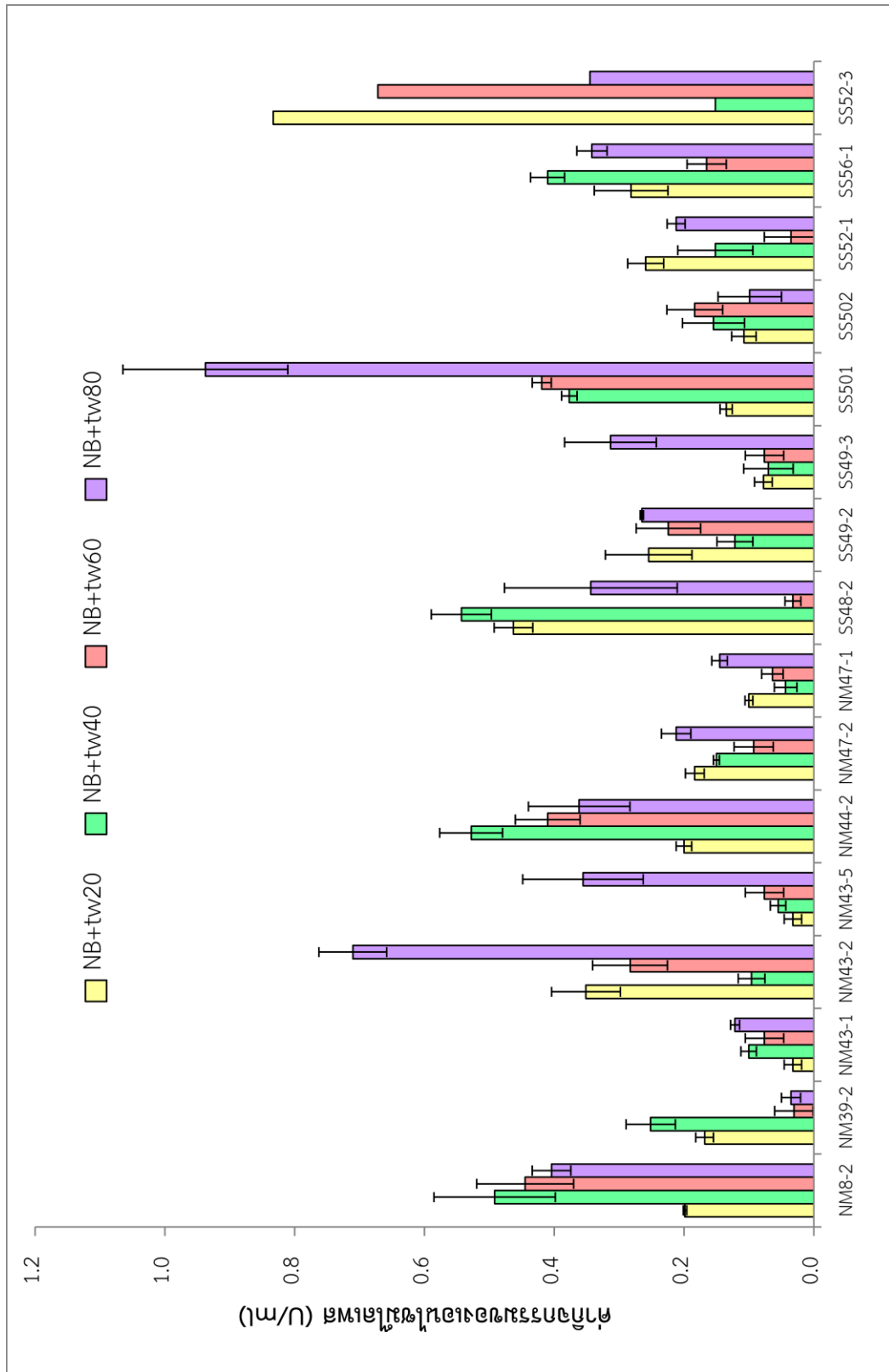
ภาพที่ 4. 9 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของกลุ่มที่ 1 Staphylococcus และ Micrococcus ใน Nutrient Broth (NB) ที่เติม Tween 20, Tween 40, Tween 60 และ Tween 80



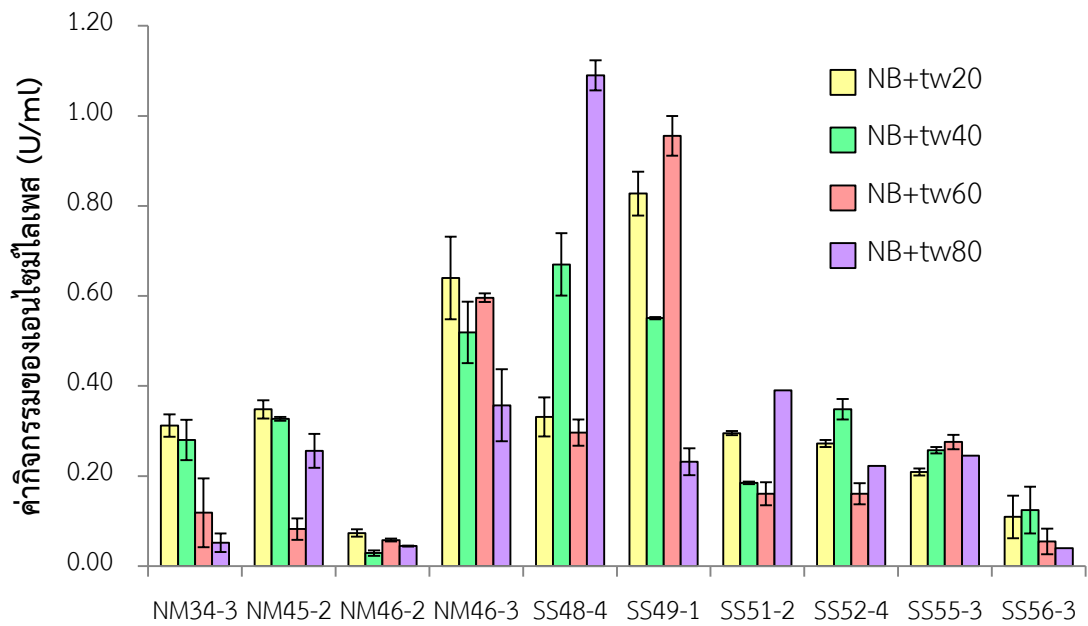
ภาพที่ 4. 10 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของกลุ่มที่ 2 *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacterium* และ *Corynebacterium* ใน NB ที่เติม Tween 20, Tween 40, Tween 60 และ Tween 80



ภาพที่ 4. 11 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของกลุ่มที่ 3 *Proteus* ในอาหาร NB ที่เติม Tween 20, Tween 40, Tween 60 และ Tween 80



ภาพที่ 4. 12 ค่ากิจกรรมของเอมัลชันไขมันของอนุภาคไขมัน 4 แบบที่เรียกว่าแคตติค (รูปร่างต่าง) ในอาหาร NB ที่เติม Tween20, Tween40, Tween60 และ Tween 80



ภาพที่ 4. 13 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของในกลุ่มที่ 4 แบคทีเรียกรดแลคติก (รูปร่างกลม) ในอาหาร NB ที่เติม Tween 20, Tween 40, Tween 60 และ Tween 80

ภาพที่ 4.12 และ 4.13 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากแบคทีเรียในกลุ่มที่ 4 แบคทีเรียกรดแลคติก โดยกลุ่ม *Lactobacillus* sp. ซึ่งเป็นกลุ่มใหญ่ที่สุด (17 ไอโซเลท) มีค่าอยู่ในช่วง 0.03 – 0.94 U/ml และให้ค่าสูงสุดโดย *Lactobacillus pentosus* (SS50-1) 0.94 U/ml ในอาหาร NB ที่เติม Tween 80 แบคทีเรียกรดแลคติกรูปร่างกลม ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในช่วง 0.03 – 1.09 U/ml ประกอบด้วย 3 สกุลคือ *Pediococcus*, *Leuconostoc* และ *Weissella* ซึ่งแบคทีเรียที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดของแต่ละสกุลคือ *Pediococcus pentosaceus* (SS48-4) ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ 1.09 U/ml ในอาหารที่เติม Tween 80 *Leuconostoc fallax* (SS49-1) ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ 0.96 U/ml ในอาหารที่เติม Tween 60 และ *Weissella thailandensis* (NM45-2) ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ 0.35 U/ml ในอาหารที่เติม Tween 40

จากการพิจารณาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยการเลี้ยงใน Nutrient Broth ที่เติม Tween 80 1 เปอร์เซ็นต์ จากแบคทีเรีย 60 ไอโซเลทจากตารางที่ ข.1 และภาพที่ 4.7 พบว่า ไอโซเลท KM17-4 เป็นแบคทีเรียที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด ซึ่งผลจากการศึกษาลักษณะทางพีโนไทป์ถูกจัดอยู่ในสกุล *Staphylococcus* ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด คือ 21.52 ± 0.04 Unit/ml และไอโซเลทที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสรองลงมาคือไอโซเลท KM18-4 และ PM25-1 คือ 2.65 ± 0.06 และ 1.59 ± 0.03 ตามลำดับ และไอโซเลท KM17-4 ก็ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดในอาหารที่เติม Tween 60 และ Tween 20 เช่นกันคือ 6.70 ± 0.11 และ 3.07 ± 0.02 แต่ในอาหารที่เติม Tween 40 ไอโซเลท PM25-1 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าคือ 4.25 ± 0.05 ซึ่งผลจากการศึกษาลักษณะทางพีโนไทป์ทั้ง 3 ไอโซเลทถูกจัดอยู่ในสกุล *Staphylococcus* ด้วย ดังนั้นจึงเลือกไอโซเลท KM17-4 ในอาหารที่เติม Tween 80 นำผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อไปศึกษาในขั้นการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไป

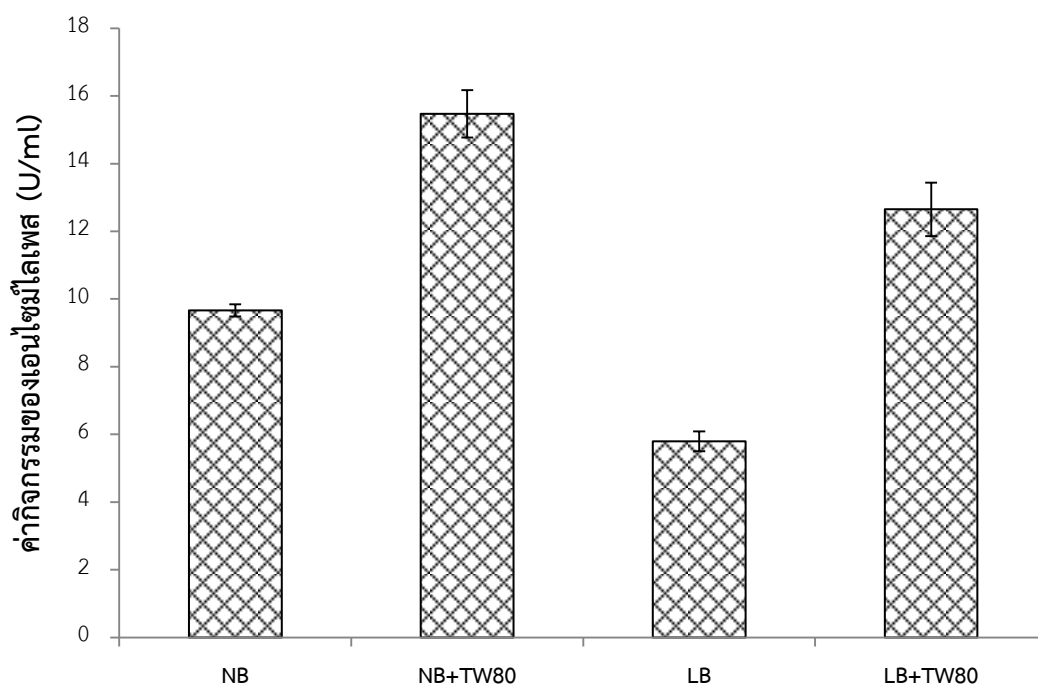
4.7 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ได้คัดเลือกได้จากข้อ 4.2 และ 4.5 โดยเลือกแบคทีเรียที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดในแต่ละกลุ่ม ได้แก่ ไอโซเลท KM17-4 เป็นตัวแทนกลุ่มที่ 1 *Staphylococcus* และ *Micrococcus* ไอโซเลท SS48-5 เป็นตัวแทนกลุ่มที่ 2 *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacterium* และ *Corynebacterium* และไอโซเลท PR11-3 เป็นตัวแทนกลุ่มที่ 3 *Proteus* และ *Klebsiella*

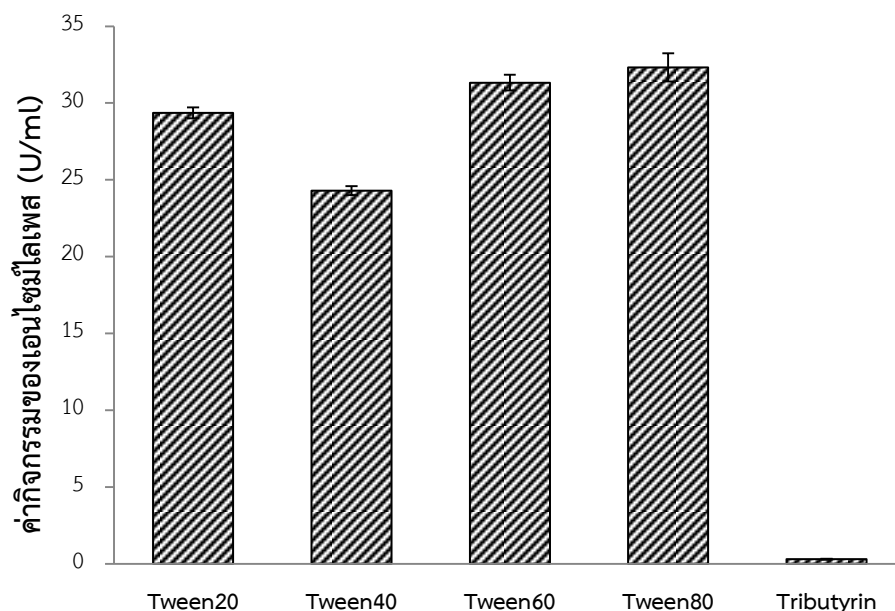
ผลของ *Staphylococcus condimentii* (KM17-4) ในการศึกษาเปรียบเทียบอาหาร 2 ชนิด คือ Nutrient Broth (NB) และ Lipolytic broth (LB) ในอาหาร Nutrient Broth ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงกว่าในอาหาร Lipolytic broth และจะสูงยิ่งขึ้นเมื่อมีการเติม Tween 80 เป็นสารเหนียวน้ำ อีกทั้งวิธีการเตรียมอาหาร Nutrient Broth ง่ายกว่าอาหาร Lipolytic broth จึงเลือกใช้ Nutrient Broth เป็นอาหารเหลวที่ใช้ในการทดลองหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ดังแสดงในภาพที่ 4.14 ซึ่งความแตกต่างของ 2 สูตรอาหารคือ ใน NB มีกลูโคสและยีสต์สกัดเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เพิ่มเข้ามา ซึ่งใน LB มีเปปโตเนนเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว แสดงให้เห็นว่า นอกจากการเติมสารเหนียวน้ำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ไลเปสแล้วแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนนั้นมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสด้วย (Gupta, Gupta, et al., 2004)

การศึกษาเปรียบเทียบชนิดของสารเหนียวน้ำ ได้แก่ Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 และ Tributyrin บ่มที่ พีเอช 7.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส 0.30, 29.37, 24.31, 31.33 และ 32.33 U/ml ตามลำดับ ซึ่งในอาหารที่เติม Tween 80 ให้ค่าสูงสุด คือ 32.33 U/ml แสดงใน ภาพที่ 4.15 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย KM17-4 ที่พีเอชแตกต่างกัน ได้แก่ พีเอช 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 8.0, 8.5 และ 9.0 ในอาหารที่เติม Tween 80 บ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้ผลดังใน ภาพที่ 4.16 ที่พีเอช 7.0 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดคือ 23.90 U/ml เวลาที่เหมาะสมในการบ่ม เมื่อเติม Tween 80 ร้อยละ 1 ในอาหาร บ่มที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บผลทุก 6 ชั่วโมงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แสดงผลใน ภาพที่ 4.17 คือในช่วง 6 ชั่วโมงแรกมีการสร้างเอนไซม์ไลเปสน้อยมาก แต่หลังจาก 6 ชั่วโมงนั้น ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและให้ค่าสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 18 คือ 44.50 U/ml และหลังจาก 18 ชั่วโมง ค่าจะลดต่ำลง ซึ่งสอดคล้องกับผลที่แสดงใน ภาพที่ 4.18 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่อุณหภูมิต่างกัน ได้แก่ 20 30 37 และ 40 องศาเซลเซียส ที่ใช้เวลาในการบ่มทั้งสิ้น 48 ชั่วโมง โดยเติม Tween 80 บ่มที่ พีเอช 7.0 เก็บผลทุก 6 ชั่วโมง พบว่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลาในการบ่ม 18 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ที่เวลาในการบ่ม 42 ชั่วโมง ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดคือ 21.44 และ 23.93 U/ml ตามลำดับ จาก 2 การทดลองดังกล่าวสรุปได้ว่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เวลาในการบ่ม 18 ชั่วโมง เหมาะสมกับการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อแบคทีเรีย KM17-4

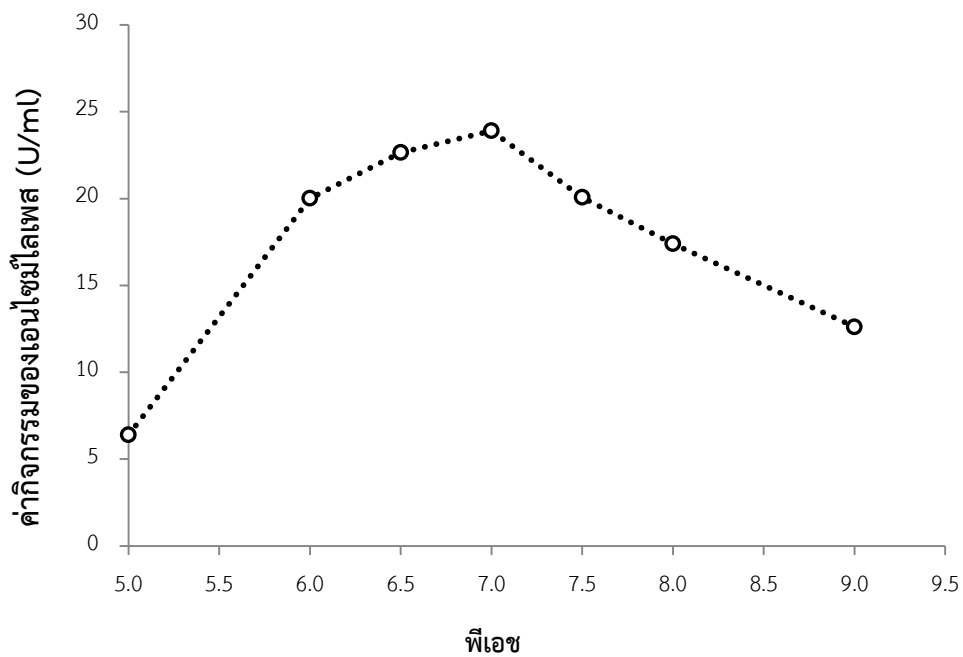
ดังนั้นจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย KM17-4 คือ เลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth เติม Tween 80 1 เปอร์เซ็นต์เป็นสารเหนียวน้ำ เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง



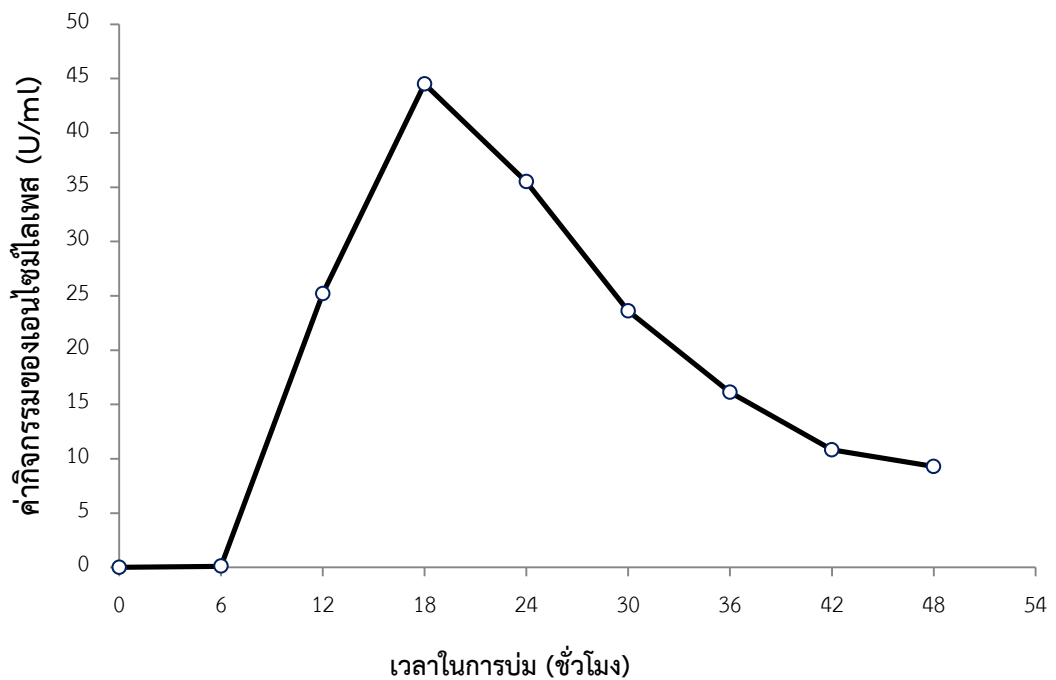
ภาพที่ 4. 14 เปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย KM17-4 ระหว่าง Nutrient Broth (NB) ที่เติมและไม่เติม Tween 80 กับอาหาร Lipolytic broth (LB) ที่เติมและไม่เติม Tween 80



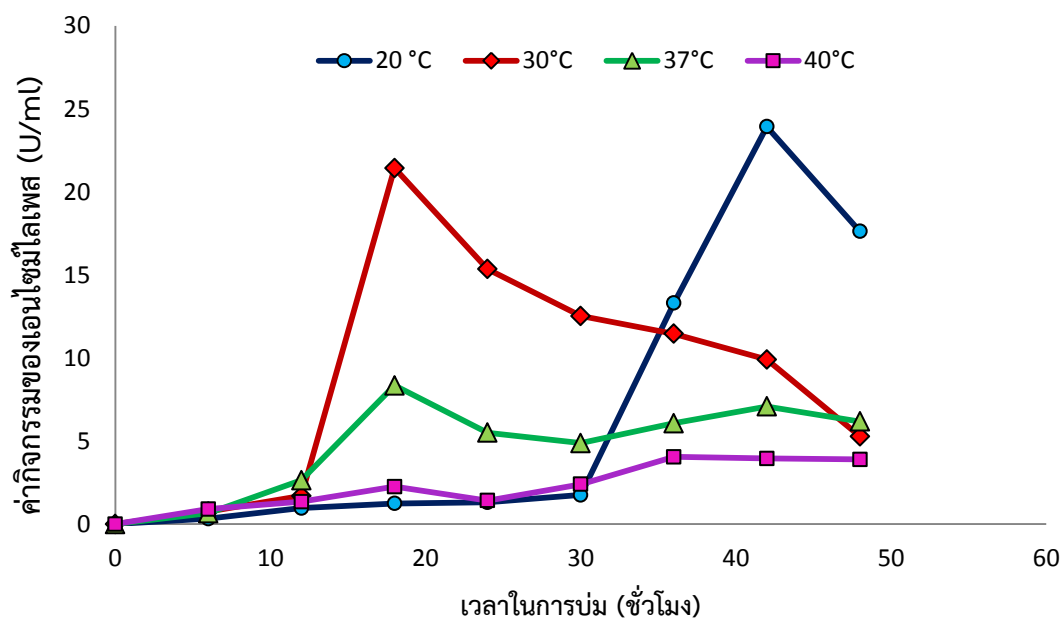
ภาพที่ 4. 15 เปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์จากแบคทีเรีย KM17-4 ในอาหาร NB ที่เติมสารเหนี่ยวนำ (อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 7.4 เวลา 24 ชั่วโมง)



ภาพที่ 4. 16 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย KM 17-4 ที่ค่าพีเอชต่างๆ (Nutrient Broth ที่เติม Tween 80 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง)



ภาพที่ 4. 17 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย KM17-4 ที่เวลาในการบ่มต่างๆ (NB ที่เติม Tween 80 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 7)



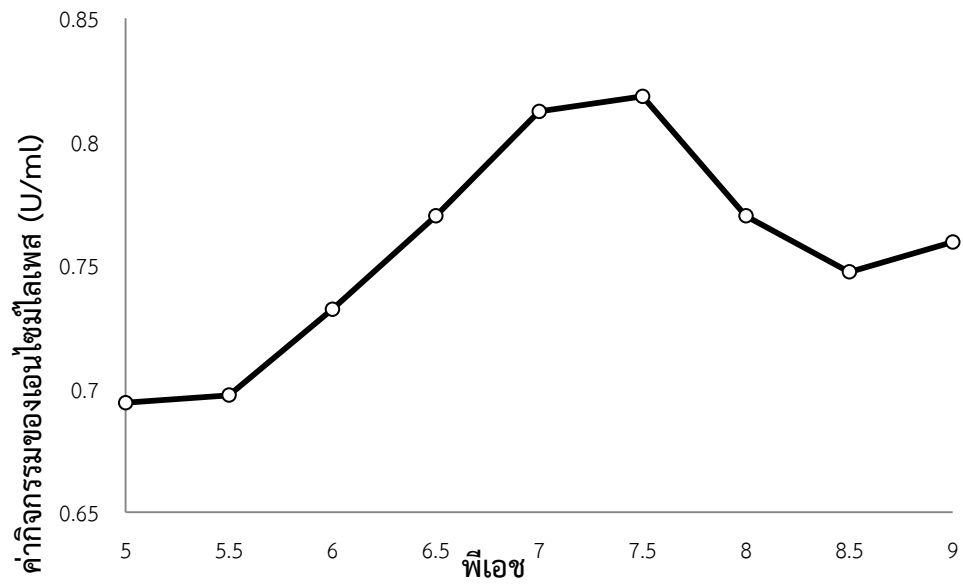
ภาพที่ 4. 18 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย KM17-4 ที่อุณหภูมิและเวลาในการบ่มต่างๆ (NB ที่เติม Tween 80 พีเอช 7)

ในการศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Bacillus subtilis* subsp. *Spizizenii* (SS48-5)

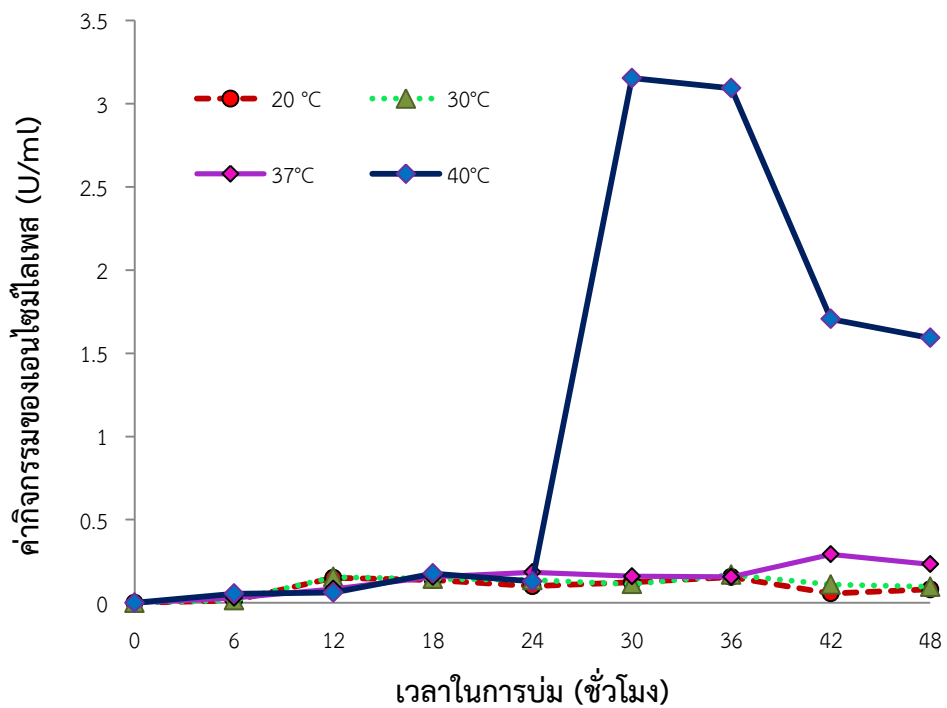
เมื่อทำการแปรค่าพีเอชตั้งแต่ 5.0, 5.5, 6.0, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม Tween 80 1 เปอร์เซ็นต์ใน Nutrient Broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่พีเอชที่ 7.5 และ 7.0 ให้ค่ากิจกรรมของไลเปสสูงสุด 0.82 และ 0.81 U/ml ตามลำดับ และค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงเมื่อค่าพีเอชน้อยกว่าพีเอช 7 หรือมากกว่าพีเอช 7.5 ดังแสดงใน ภาพที่ 4.19

จากภาพที่ 4.20 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่อุณหภูมิต่างกัน ได้แก่ 20, 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส ที่เวลาในการบ่มต่างๆ โดยเติม Tween 80 บ่มที่ พีเอช 7.5 เก็บผลทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เวลาในการบ่ม 30 ชั่วโมง ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดคือ 21.44 U/ml และยังให้ค่ากิจกรรมสูงที่เวลาในการบ่ม 36 ชั่วโมง คือ U/ml แต่หลังจาก 36 ชั่วโมง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดต่ำลง

ดังนั้นจากการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย SS48-5 คือ เลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth เติม Tween 80 1 เปอร์เซ็นต์เป็นสารเหนียวนำเขาที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พีเอช 7.5 เป็นเวลา 30 ชั่วโมง



ภาพที่ 4. 19 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคเนสจากแบคทีเรีย SS48-5 ที่ค่าพีเอชต่างๆ



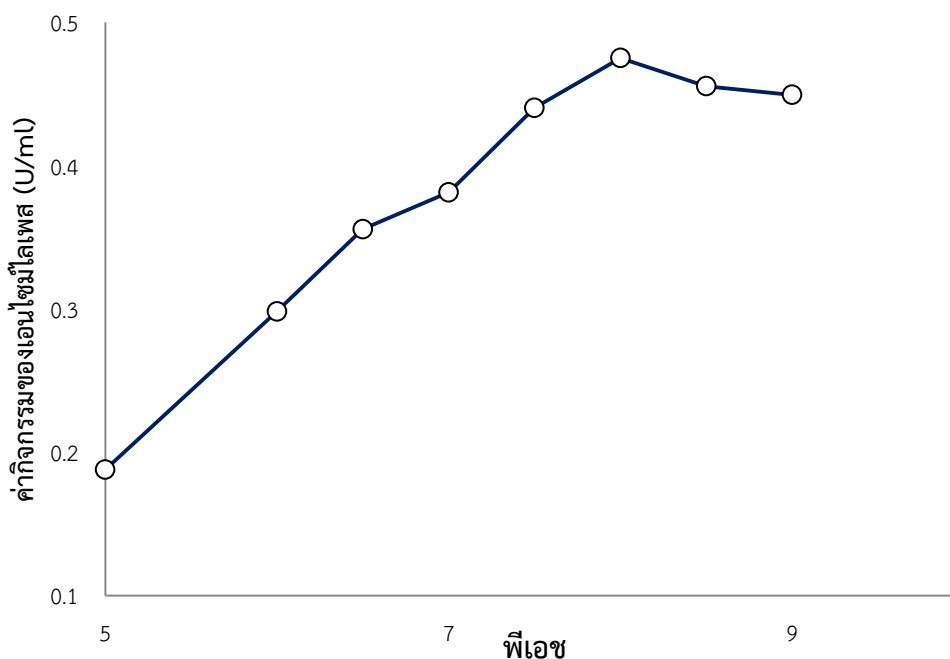
ภาพที่ 4. 20 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคเนสจากแบคทีเรีย SS48-5 ที่อุณหภูมิและเวลาในการบ่มต่างๆ (NB ที่เติม Tween 80 พีเอช 7.5)

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Proteus* PR11-3

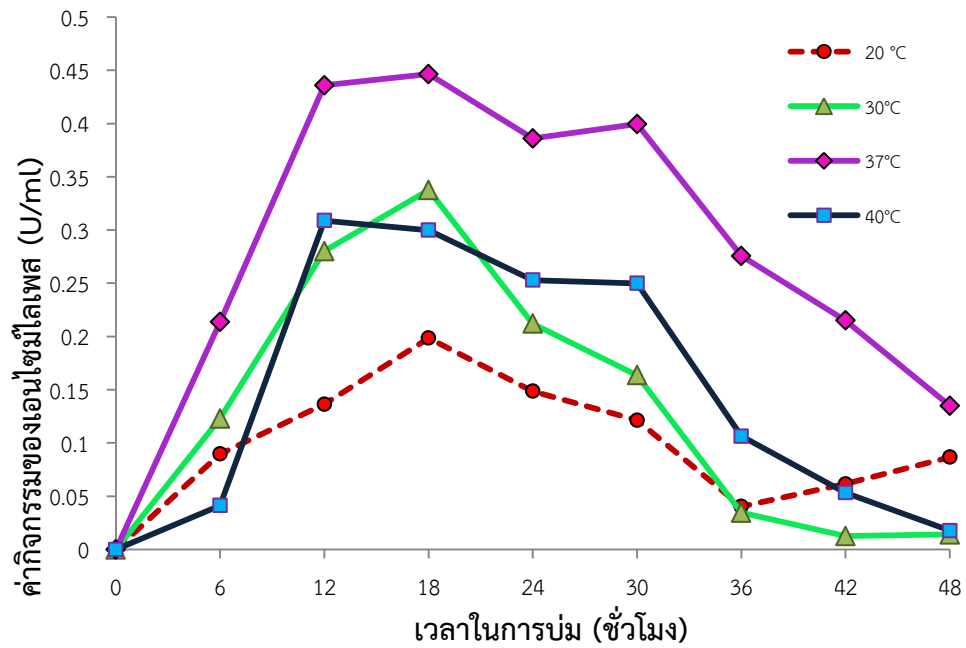
ทำการแปรค่าพีเอชตั้งแต่ 5.0, 5.5, 6.0, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม Tween 80 1 เปอร์เซ็นต์ในอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่พีเอชที่ 8.0 ให้ค่ากิจกรรมของไลเปสสูงสุด 0.48 U/ml ตามลำดับ และค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีค่าสูงขึ้นเรื่อยๆเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอชเป็นต่าง แสดงใน ภาพที่ 4.17

จากภาพที่ 4.18 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่อุณหภูมิต่างกัน ได้แก่ 20 30 37 และ 40 องศาเซลเซียส ที่เวลาในการบ่มต่างๆ โดยเติม Tween 80 บ่มที่ พีเอช 7.5 เก็บผลทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลาในการบ่ม 18 ชั่วโมง ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดคือ 0.45 U/ml

ดังนั้นจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย PR11-3 คือ เลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth เติม Tween 80 1 เปอร์เซ็นต์เป็นสารเหนียวนำเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 8.0 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง



ภาพที่ 4. 21 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย PR11-3 ที่ค่าพีเอชต่างๆ (NB ที่เติม Tween 80 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง)



ภาพที่ 4. 22 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย PR11-3 ที่อุณหภูมิและเวลาในการบ่มต่างๆ (NB ที่เติม Tween 80 พีเอช 8.0)

จากผลการทดลองศึกษาสภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส ปัจจัยที่ศึกษาคือ อุณหภูมิ พีเอช และระยะเวลาในการบ่ม รวมถึงแหล่งสารอาหารที่แบคทีเรียใช้ในการเจริญเติบโต และสารเหนียวทำให้แบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปส ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของ *Staphylococcus condimentii* (KM17-4) ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด คือ เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง มีแหล่งไนโตรเจน คือ Peptone และ Yeast extract และแหล่งคาร์บอน คือ กลูโคสและ Tween 80 เป็นสารเหนียว ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Arora ในปี 2012 ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Staphylococcus lipolyticus* ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 เวลาในการบ่ม 24 ชั่วโมง มีแหล่งไนโตรเจนคือ Peptone, Beef extract และ Yeast extract มี Tributyrin เป็นแหล่งคาร์บอนและสารเหนียว ในปี 2001 Sayari และคณะได้ศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Staphylococcus simulans* คือที่ พีเอช 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 ชั่วโมง มี Peptone, Yeast extract และ beef extract เป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้ Glycerol และ Oleic acid เป็นแหล่งคาร์บอน

ใช้กลุ่มของ *Bacillus* ก็เช่นกัน มีรายงานของ Kim และคณะ ในปี 1994 สภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสของ *Bacillus* sp. strain 398 คือที่ พีเอช 7.2 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส บ่มเป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยใช้ Glycerol เป็นแหล่งคาร์บอนและ Polypeptone, yeast extract, beef extract เป็นแหล่งไนโตรเจน Wang และคณะ (1995) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสของ *Bacillus* strain A30-1 (ATCC 53841) เช่นกัน โดยที่พีเอช 9.0 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15-24 ชั่วโมง มีการใช้น้ำมันข้าวโพดและ Ammonium chloride เป็นแหล่งไขมันและแหล่งไนโตรเจน และในปี 2002 Sharma และคณะศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสของ *Bacillus* sp. RSJ1 ที่พีเอช 9.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยใช้แหล่งไขมันคือน้ำมันมะกอก มี Peptone และ Yeast extract ใช้สารเหนียวคือ Tween 80 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้เช่นกัน การผลิตเอนไซม์ไลเปสของ *Bacillus subtilis* subsp. *Spizizenii* SS48-5 คือ เลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth ซึ่งมีกลูโคส, Peptone, Yeast extract และ Tween 80 เป็นแหล่งของสารอาหารและสารเหนียว เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พีเอช 7.5 เป็นเวลา 30 ชั่วโมง และ *Proteus mirabilis* PR11-3 เลี้ยงในอาหารเดียวกัน พบว่าสภาพที่เหมาะสมคือ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 8.0 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที

4.8 การผลิต การทำให้บริสุทธิ์และการวิเคราะห์เอนไซม์ไลเปส

การผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Staphylococcus condimentii* KM17-4 โดยถ่ายเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ ลงในพลาสติกบรรจุ Nutrient broth ที่มี Tween 80 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับ พีเอช เป็น 7.0 บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อปั่นแยกเซลล์ออกแล้วนำมาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ((NH₄)₂SO₄) (Talon et al., 1995; Xie et al., 2012) และใช้ Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8 เป็นบัฟเฟอร์ (Sarkar et al., 2012) นำ partial purified enzyme วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด วิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส และการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight) โดยวิธี Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamidegel electrophoresis (SDS-PAGE) เตรียม partial purified enzyme ที่ได้ไปโหลดบนแผ่นเจลโพลีอะคริลาไมด์ (Mini-PROTEAN® TGX™ precast gels) 12 เปอร์เซ็นต์ และย้อมด้วยคูแมสซีปรีลเลียน-บลูจี-250 (Bio-Safe™ Coomassie G-250) เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (Precision Plus™ protein standards) แสดงใน ภาพที่ 4.23

จากการทำให้เอนไซม์เข้มข้นด้วยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 4 ระดับความเข้มข้นเปอร์เซ็นต์อิ่มตัว (% saturation) ได้แก่ 0 – 20, 20 – 40, 40 – 60 และ 60 – 80 เปอร์เซ็นต์อิ่มตัว ปรากฏว่ามีการตกของตะกอน 2 ช่วง คือ ช่วง 20 – 40 (40 % saturated) และ 60 – 80 (80 % saturated) เปอร์เซ็นต์อิ่มตัว เมื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมดและค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของสารละลายเอนไซม์ก่อนตกตะกอน 1 ลิตร สารละลายตะกอนโปรตีนที่ตกที่ความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0 - 40 เปอร์เซ็นต์ และ 40 - 80 เปอร์เซ็นต์ อิ่มตัว ได้ปริมาณโปรตีนทั้งหมดคือ 12,390 , 5,840 และ 460 มิลลิกรัม (ตามลำดับ) มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส 15,470 , 190.00 และ 12,910 ยูนิต (ตามลำดับ) สามารถหาค่าแอกติวิตีเฉพาะของเอนไซม์ได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.15 ทำให้ทราบว่าเอนไซม์ไลเปสสามารถทำให้ตกตะกอนเกลือที่ 40 – 80 เปอร์เซ็นต์เข้มข้นอิ่มตัว และยังทำให้เอนไซม์มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเพิ่มค่าความบริสุทธิ์ขึ้น 28.06 เท่า และได้ผลผลิตร้อยละ 83.45

เมื่อวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE จากนำ partial purified enzyme หลังตกตะกอนด้วยที่ความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 40 - 80 เปอร์เซ็นต์ โหลดบนเจลโพลีอะคริลาไมด์ 12 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยคูแมสซีปรีลเลียน-บลูจี-250 แสดงใน ภาพที่ 4.23 ซึ่งเกิดแถบโปรตีนเกิดขึ้น 3 แถบเมื่อเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน ปรากฏว่า 3 แถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลคือ 41.75, 20.11 และ 10.59 กิโลดาลตัน ตามลำดับ

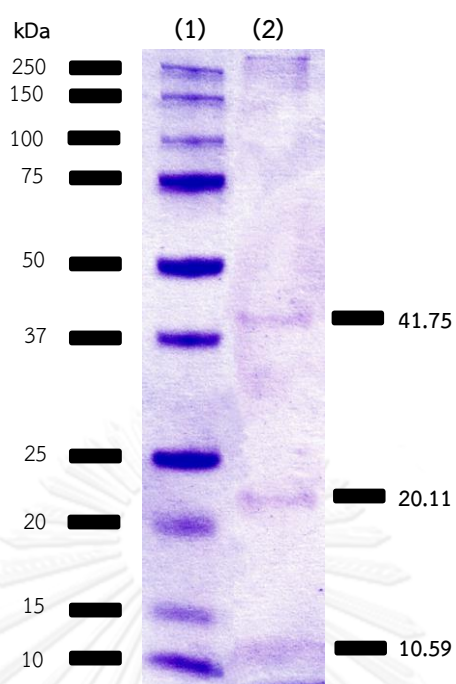
โดยมีรายงานเกี่ยวกับน้ำหนักโมเลกุลของไลเปสที่ได้จาก *Staphylococcus* sp.ไว้ดังนี้

Xie และคณะ(2012) ศึกษาลักษณะสมบัติของเอนไซม์ไลเปสของ *Staphylococcus epidermidis* S2 และ *Staphylococcus aureus* S11 ที่แยกได้จากต่อมไขมันจากผิวหนังของมนุษย์ พบว่า น้ำหนักโมเลกุลของทั้ง 2 เอนไซม์คือ 45 กิโลดาลตันโดยวิธี SDS-PAGE โดยไลเปส S2 ในปีเดียวกัน Sarkar และคณะ ทำการศึกษาเอนไซม์ไลเปส SAL-PP1 จาก *Staphylococcus aureus* ที่แยกได้จาก *Arachis hypogaea* rhizosphere ทำให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์คุณลักษณะ

ของเอนไซม์ SAL-PP1 มีน้ำหนักโมเลกุลคือ 49 กิโลดาลตัน และเอนไซม์ไลเปส SAL-PP1 สามารถย่อยไตรกลีเซอไรด์สายยาว พาราไนโตรฟีนิลเอสเทอร์ (*p*-nitrophenyl esters) และฟอสโฟไลปิด (phospholipids) หลายชนิดได้ Tolon และคณะ ในปี 1995 นำเอนไซม์ไลเปสของ *Staphylococcus wameri* มีมวลโมเลกุล 90 กิโลดาลตัน มาทำให้บริสุทธิ์ปรากฏว่าเอนไซม์ไลเปสที่ได้มีมวลโมเลกุล 45 กิโลดาลตัน ซึ่งเอนไซม์ไลเปสนี้ทำงานได้ดีที่พีเอช 9.0 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เสถียรที่พีเอช 5.0-9.0 และ Arora (2012) พบว่า *Staphylococcus lipolyticus* sp. nov. ผลิตเอนไซม์ที่ได้สามารถย่อยสารเหนียวหน้าที่หลากหลาย ได้แก่ Tributyrin น้ำมันมะกอก Tween 20, Tween 40, Tween 60 และ Tween 80 ที่อุณหภูมิต่ำได้ เมื่อทำให้บริสุทธิ์ปรากฏว่าโปรตีนเอนไซม์มีค่ามวลโมเลกุลคือ 67 กิโลดาลตัน โดยวิธี SDS-PAGE ดังนั้นเอนไซม์ไลเปสจาก *Staphylococcus* sp. มีขนาด 40 กิโลดาลตันขึ้นไป อย่างไรก็ตามจากผลการทดลอง แลบบรตีนที่ปรากฏก็ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็นเอนไซม์ไลเปสหรือมีน้ำหนักโมเลกุลเท่าไร จำเป็นต้องนำไปทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ในขั้นต่อไปเพื่อให้ได้แลบบรตีน 1 แลบบ

ตารางที่ 4. 15 สรุปการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ KM 17-4 โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

Purification step	Total Protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification fold	Yield (%)
Culture supernatant (1L)	12,390	15,470	1.24	1.00	100
Ammonium sulfate ppt.					
- Protein at 0 - 40 % satulated	5,840	190	0.03	0.02	1.22
- Protein at 40 - 80 % satulated	460	12,910	28.06	22.63	83.45



ภาพที่ 4. 23 SDS-PAGE (1) โปรตีนมาตรฐาน และ (2) สารละลายเอนซ์หลังตกตะกอนด้วย
เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 40 - 80 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

ในการศึกษานี้ใช้อาหารหมัก 7 ชนิด ได้แก่ ไส้กรอกเปรี้ยว แหนม ปลาาร้า ปลาเจ่า ปลาจ่อม กุ้งจ่อม และหม่า เป็นตัวอย่างจากต่างแหล่งกัน 56 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 285 ไอโซเลท เมื่อนำแบคทีเรียที่แยกได้มาคัดกรองบนอาหารแข็ง Lipolytic Medium ที่เติม 1 เปอร์เซ็นต์ของ Tributyrin, Tween 20, Tween 40, Tween 60 และ Tween 80 พบว่ามี 60 ไอโซเลทที่เกิดกิจกรรมของเอนไซม์ไลโปไลติกโดยเกิดวงขุ่น (opaque) รอบโคโลนี

เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 60 ไอโซเลทมาศึกษาลักษณะทางฟิโนไทป์โดยการทดสอบทางสัณฐานวิทยา ทางสรีระวิทยา ทางชีวเคมี และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA gene พบว่าสามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรูปร่างกลม 14 ไอโซเลทอยู่ในสกุล *Staphylococcus* (13 ไอโซเลท) และ *Micrococcus* (1 ไอโซเลท) และพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็น *Staphylococcus* sp. (6 ไอโซเลท) *S. sciuri* (2 ไอโซเลท), *S. condimenti* (2 ไอโซเลท) และแต่ละ 1 ไอโซเลทของ *S. simulans* *S. lentus*, *S. gallinarum* และ *M. yunnanensis* โดยมีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 99.55 – 100% จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรูปร่างแท่ง 10 ไอโซเลท อยู่ในสกุล *Bacillus* (7 ไอโซเลท), *Paenibacillus* (1 ไอโซเลท), *Brevibacterium* (1 ไอโซเลท) และ *Corynebacterium* (1 ไอโซเลท) และพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็น *B. cereus* (2 ไอโซเลท) และแต่ละ 1 ไอโซเลทของ *B. methylotrophicus*, *B. pumilus*, *B. flexus*, *B. subtilis*, *B. anthracis* *Paenibacillus pasadenensis*, *Brevibacterium salitolerans* และ *Corynebacterium liquefaciens* โดยมีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 99.33 – 100 % และจัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีรูปร่างแท่ง 10 ไอโซเลท และพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็น *Proteus mirabilis* (9 ไอโซเลท) และ *Klebsiella pneumonia* (1 ไอโซเลท) โดยมีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 99.78 – 100 % นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 26 ไอโซเลท ซึ่งพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็น *Lactobacillus pentosus* (5 ไอโซเลท) *Lactobacillus* sp. (12 ไอโซเลท), *Pediococcus* sp. (3 ไอโซเลท) และแต่ละ 1 ไอโซเลทของ *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus lolii*, *Weissella thailandensis*, *W. cibaria*, *W. paramesenteroides* และ *Leuconostoc fallax* โดยมีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 99.78 – 100 % อีกด้วย

ในกลุ่มที่ 1 *Staphylococcus* และ *Micrococcus* มี 3 ไอโซเลท ได้แก่ KM17-4 PM25-1 และ NM44-3 ด้านสารปฏิชีวนะชนิด Sulpha/trimetho ได้

กลุ่มที่ 2 *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibactrium* และ *Corynebacterium* เมื่อทดสอบความสามารถในการต้านสารปฏิชีวนะ พบว่า ไอโซเลท KM15-1 สามารถต้านสาร Bacitracin และ Penicillin G ไอโซเลท SS49-4 สามารถต้านได้ 3 ชนิดคือ Penicillin G Sulphonamide และ Sulpha/trimetho ไอโซเลท NM42-2 และ NM47-3 สามารถต้านสาร Sulpha/trimetho ได้ และไอโซเลท SS50-3 สามารถต้านสารปฏิชีวนะได้ 2 ชนิด คือ Sulphonamide และ Sulpha/trimetho

ในการทดสอบการต้านสารต้านจุลชีพ โดยกลุ่มที่ 3 *Proteus* และ *Klebsiella* ทุกไอโซเลทสามารถต้านสารต้านจุลชีพได้ 4 ชนิดคือ Bacitracin, Clindamycin, Erythromycin และ Vancomycin และเกือบทุกไอโซเลทสามารถต้านสาร Tetracycline ได้ยกเว้นไอโซเลท NM42-1 นอกจากนี้ยังมีเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทอื่นที่สามารถต้านสารต้านจุลชีพได้อีกดังนี้ ไอโซเลท PR10-2 และ PR10-3 สามารถต้านสารต้านจุลชีพได้ 6 ชนิด คือ Bacitracin, Clindamycin, Erythromycin, Novobiocin, Tetracycline และ Vancomycin ไอโซเลท PR11-4 สามารถต้านสารปฏิชีวนะได้ 6 ชนิด คือ Amoycylin/Clavulanic, Bacitracin, Clindamycin, Erythromycin, Tetracycline และ Vancomycin ไอโซเลท NM28-1 สามารถต้านสารต้านจุลชีพได้ 8 ชนิด คือ Ampicillin, Bacitracin, Cephalothin, Clindamycin, Erythromycin, Novobiocin, Tetracycline และ Vancomycin ไอโซเลท NM42-1 สามารถต้านสารปฏิชีวนะได้ 9 ชนิด คือ Ampicillin, Bacitracin, Carbenicillin, Clindamycin, Erythromycin, Novobiocin, Penicillin-G, Tetracycline และ Vancomycin ไอโซเลท NM42-8 และ NM42-10 สามารถต้านสารปฏิชีวนะได้ 8 ชนิด คือ Bacitracin, Clindamycin, Erythromycin, Streptomycin, Sulpha/trimetho, Sulphonamide, Tetracycline และ Vancomycin

60 ไอโซเลทมาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสโดยการเลี้ยงใน Nutrient Broth (NB) ที่เติม 1 เปอร์เซ็นต์ของ Tween 20, Tween 40, Tween 60 และ Tween 80 โดยวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงด้วยวิธี spectrophotometric assay ที่ 405 นาโนเมตร พบว่า มีทั้งสิ้น ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส อยู่ในช่วง 0.01 – 21.52 U/ml และจากผลการคัดกรองการผลิตเอนไซม์ไลเปส พบว่าไอโซเลท KM17-4 ซึ่งพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็น *S. condimentii* ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด จึงนำมาศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสในอาหารเหลว Nutrient ที่เติม Tween 80 ร้อยละ 1 พบว่าสามารถผลิตได้เหมาะสมที่พีเอช 7 และบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง นอกจากนี้เมื่อเลี้ยง *B. subtilis* SS48 -5 ในอาหารที่เติม Tween 80 พีเอช 7.5 นาน 24 ชั่วโมง มีกิจกรรมของสูงสุดที่ 3.23 U/ml พบว่าสายพันธุ์นี้ผลิตได้สูงสุดที่พีเอช 7.5 เมื่อบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 30 ชั่วโมง ในขณะที่ *Proteus mirabilis* PR11-3 มีกิจกรรมของสูงสุดที่ 0.57 U/ml และผลิตได้เหมาะสมที่พีเอช 8 เมื่อบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ในขั้นต่อไป เช่น การทำบริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนและแบบเจลฟิวเทชัน เพื่อให้ได้เอนไซม์ที่บริสุทธิ์และให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้น รวมถึงศึกษาข้อมูลจำเพาะของเอนไซม์และความเสถียรของเอนไซม์
2. ในงานวิจัยนี้สามารถตัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ น่าจะเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสที่น่าสนใจ แต่พบว่าให้ค่ากิจกรรมไลเปสต่ำมาก จึงควรปรับปรุงสูตรอาหารให้เหมาะสม



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รายการอ้างอิง

- Achamma, T., Manoj, M. K., Valsa, A., Mohan, S., & Manjula, R. (2003). Optimization of growth condition for the production of extra cellular lipase by *Bacillus mycooides*. *Indian Journal of Microbiology*, 43, 67-69.
- Adamo, M., Dick, L. W., Jr., Qiu, D., Lee, A. H., Devincendis, J., & Cheng, K. C. (2010). A simple reversed phase high-performance liquid chromatography method for polysorbate 80 quantitation in monoclonal antibody drug products. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 878(21), 1865-1870. doi: 10.1016/j.jchromb.2010.04.039
- Al-Widyan, M. I., & Al-Shyoukh, A. O. (2002). Experimental evaluation of the transesterification of waste palm oil into biodiesel. *Bioresource Technology*, 85(3), 253-256.
- Annalisa, C., Francesco, V., Fide, I. T., & Yolanda, S. (2006). Protease and esterase activity of staphylococci. *International Journal of Food Microbiology*, 112, 223-229.
- Arnold, R. G., Shahani, K. M., & Dwivedi, B. K. (1975). Application of Lipolytic Enzymes to Flavor Development in Dairy Products. *Journal of Dairy Science*, 58(8), 1127-1143.
- Arora, P. K. (2012). *Staphylococcus lipolyticus* sp. nov., a new cold-adapted lipase producing marine species. *Annals of Microbiology*, 63(3), 913-922. doi: 10.1007/s13213-012-0544-2
- Arpigny, J. L., & Jaeger, K. E. (1999). Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochemical Journal*, 343 Pt 1, 177-183. doi: Doi 10.1042/0264-6021:3430177
- Barrow, G. I., & Feltham, R. K. A. (1993). *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*, 3rd ed. Cambridge.
- Cardenas, F., Alvarez, E., de Castro-Alvarez, M. S., Sanchez-Montero, J. M., Valmaseda, M., Elson, S. W., & Sinisterra, J. V. (2001). Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 14(4-6), 111-123. doi: Doi 10.1016/S1381-1177(00)00244-7
- Chandan, R. C., & Shahani, K. M. (1964). Milk Lipases. A Review. *Journal of Dairy Science*, 47(5), 471-480.

- Cihangir, N., & Sarikaya, E. (2004). Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, *20*(2), 193-197. doi: Doi 10.1023/B:Wibi.0000021781.61031.3a
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, *39*, 224-229.
- Gao, B., Su, E., Lin, J., Jiang, Z., Ma, Y., & Wei, D. (2009). Development of recombinant *Escherichia coli* whole-cell biocatalyst expressing a novel alkaline lipase-coding gene from *Proteus* sp. for biodiesel production. *Journal of Biotechnology*, *139*(2), 169-175. doi: 10.1016/j.jbiotec.2008.10.004
- Gayathri, V. R., Perumal, P., Mathew, L. P., & Prakash, B. (2013). Screening and molecular characterization of extracellular lipase producing *Bacillus* species from coconut oil mill soil. *International Journal of Science and Technology*, *2*, 502-509.
- Gupta, R., Gupta, N., & Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *64*(6), 763-781. doi: 10.1007/s00253-004-1568-8
- Gupta, R., Mehra, G., & Gupta, R. (2004). A glycerol-inducible thermostable lipase from *Bacillus* sp.: medium optimization by a PlacketteBurman design and by response surface methodology. *Canadian Journal of Microbiology*, *50*, 361-368.
- Hammes, W. P., & Hertel, C. (1998). New developments in meat starter cultures. *Meat Science*, *49S1*, S125-138. doi: Doi 10.1016/S0309-1740(98)90043-2
- Hasan, F., Shah, A. A., & Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, *39*(2), 235-251. doi: DOI 10.1016/j.enzmictec.2005.10.016
- Hausmann, S., & Jaeger, E. K. (2010). *Lipolytic Enzymes from Bacteria* (K. N. Timmis Ed.). Verlag Berlin Heidelberg: Springer.
- Huang, A. H. C., Lin, Y., & Wang, S. (1988). Characteristics and biosynthesis of seed lipases in maize and other plant species. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *65*(6), 897-899.
- Imamura, S., & Kitaura, S. (2000). Purification and characterization of a monoacylglycerol lipase from the moderately thermophilic *Bacillus* sp. H-257. *J Biochem*, *127*(3), 419-425.
- Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., Heuvel, M. V., & Misset, O. (1994). Bacterial lipases. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, *15*, 29-63.

- Jaeger, K. E., & Reetz, M. T. (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol*, *16*(9), 396-403.
- Jensen, R. G. (1983). Selection and determination of lipase (acyl glycerolhydrolase) activity from various sources. *London Irish Business Society*, *18*(9), 650-657.
- Kim, H. K., Lee, J. K., Kim, H., & Oh, T. K. (1996). Characterization of an alkaline lipase from *Proteus vulgaris* K80 and the DNA sequence of the encoding gene. *Fems Microbiology Letters*, *135*(1), 117-121.
- Kim, H. K., Park, S. Y., Lee, J. K., & Oh, T. K. (1998). Gene cloning and characterization of thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *62*(1), 66-71.
- Kim, H. K., Park, Y. S., Kim, H., & Oh, T. K. (1996). Partial interfacial activation of *Proteus vulgaris* lipase overexpressed in *Escherichia coli*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, *60*(8), 1365-1367.
- Kumar, A., Parihar, S. S., & Batra, N. (2012). Enrichment, isolation and optimization of lipase-producing *Staphylococcus* sp. from oil mill waste (Oil cake). *Journal of Experimental Sciences*, *3*(8), 26-30.
- Lee, H. K., Ahn, M. J., Kwak, S. H., Song, W. H., & Jeong, B. C. (2003). Purification and characterization of cold active lipase from psychrotrophic *Aeromonas* sp LPB 4. *Journal of Microbiology*, *41*(1), 22-27.
- Lopes, M. F. S., Cunha, A. E., Clemente, J. J., Carrondo, M. J. T., & Crespo, M. T. B. (1999). Influence of environmental factors on lipase production by *LactoBacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *51*, 249-254.
- Macrae, A. R. (1983). Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *60*(2), 243A-246A.
- McLandsborough, L. (2005). *Food Microbiology Laboratory*. USA.: University of Massachusetts.
- Miettinen, H., Nyssölä, A., Rokka, S., Kontkanen, H., & Kruus, K. (2013). Screening of microbes for lipases specific for saturated medium and long-chain fatty acids of milk fat. *International Dairy Journal*, *32*, 61-67.
- Miralles, M. C., Flores, J., & Perez-Martinez, G. (1996). Biochemical tests for the selection of *Staphylococcus* strains as potential meat starter cultures. *Food Microbiology*, *13*, 227-236.
- Miralles, M. C., Flores, J., & PerezMartinez, G. (1996). Biochemical tests for the selection of *Staphylococcus* strains as potential meat starter cultures. *Food Microbiology*, *13*(3), 227-236. doi: DOI 10.1006/fmic.1996.0028

- Montel, M. C., Masson, F., & Talon, R. (1998). Bacterial role in flavour development. *Meat Science*, *49*(5), 111-123.
- Nayak, V. S., Tan, Z., Ilnat, P. M., Russell, R. J., & Grace, M. J. (2012). Evaporative Light Scattering Detection Based HPLC Method for the Determination of Polysorbate 80 in Therapeutic Protein Formulations. *Journal of Chromatographic Science* *2012*;50:21–25, 50(21-25).
- Ray, A. (2012). Application of Lipase in Industry. *Asian Journal of Pharmaceutical Technology and Innovation*, *2*(2), 33-37.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, *4*(4), 406-425.
- Sarkar, P., Yamasaki, S., Basak, S., Bera, A., & Bag, P. K. (2012). Purification and characterization of a new alkali-thermostable lipase from *Staphylococcus aureus* isolated from *Arachis hypogaea* rhizosphere. *Process Biochemistry*, *47*(5), 858-866. doi: DOI 10.1016/j.procbio.2012.02.023
- Sayari, A., Agrebi, N., Jaoua, S., & Gargouri, Y. (2001). Biochemical and molecular characterization of *Staphylococcus simulans* lipase. *Biochimie*, *83*(9), 863-871.
- Schägger, H., & Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, *166*(2), 368-379.
- Schmid, R. D., & Verger, R. (1998). Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie-International Edition*, *37*(12), 1609-1633.
- Schmidt-Dannert, C., Rua, M. L., Atomi, H., & Schmid, R. D. (1996). Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus*. I. molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, *1301*(1-2), 105-114.
- Schmidt-Dannert, C., Sztajer, H., StGcklein, W., Menge, U., & Schmid, R. D. (1994). Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenuatus*. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, *1214*, 43-53.
- Scopes, R. K. (1988). *Protein Purification: Principles and Practice* (3rd ed.). New York.
- Shah, K. R., & Bhatt, S. A. (2011). Purification and characterization of lipase from *Bacillus subtilis* Pa2. *Journal of Biochemical Technology*, *3*(3), 292-295.
- Shahani, K. W. (1975). *Lipase and esterases* (2nd ed.). New York: Academic Press.

- Sharma, R., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, *19*(8), 627-662.
- Steiner, J. M., & Williams, D. A. (2002). Purification of classical pancreatic lipase from dog pancreas. *Biochimie*, *84*(12), 1245-1253.
- Sztajer, H. (1988). Production of exogenous lipases by bacteria, fungi, and actinomycetes. *Enzyme and Microbial Technology*, *10*(8), 492-497.
- Taipa, M. A., Aires-Barros, M. R., & Cabral, J. M. (1992). Purification of lipases. *Journal of Biotechnology*, *26*(2-3), 111-142.
- Talon, R., Dublet, N., Montel, M. C., & Cantonnet, M. (1995). Purification and Characterization of Extracellular *Staphylococcus wameri* Lipase *Current Microbiology*, *30*, 11-16.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, *28*, 2731-2739.
- Tanasupawat, S., & Komagata, K. (1995). Lactic acid bacteria in fermented foods in Thailand. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, *11*(3), 253-256. doi: 10.1007/BF00367094
- Tanasupawat, S., & Komagata, K. (2001). Lactic acid bacteria in fermented foods in Southeast Asia. *Microbial diversity*, 43-59.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, *25*(24), 4876-4882.
- Toldrá, F., Sanz, Y., Flores, M., & (2001). *Meat fermentation technology* (Y. H. Hui, R. Shorthose, O. Young, M. Koohmaraie & R. Rogers Eds.). New York: Marcel Dekker INC.
- Udomsil, N., Rodtong, S., Choi, Y. J., Hua, Y., & Yongsawatdigul, J. (2011). Use of *Tetragenococcus halophilus* as a starter culture for flavor improvement in fish sauce fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(15), 8401-8408. doi: 10.1021/jf201953v
- Udomsil, N., Rodtong, S., Tanasupawat, S., & Yongsawatdigul, J. (2010). Proteinase-producing halophilic lactic acid bacteria isolated from fish sauce fermentation and their ability to produce volatile compounds. *International Journal of Food Microbiology*, *141*(3), 186-194. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.05.016

- van Oort, M. G., Deveer, A. M., Dijkman, R., Tjeenk, M. L., Verheij, H. M., de Haas, G. H., . . . Gotz, F. (1989). Purification and substrate specificity of *Staphylococcus hyicus* lipase. *Biochemistry*, 28(24), 9278-9285.
- Verma, N., Thakur, S., & Bhatt, A. K. (2012). Microbial Lipases: Industrial Applications and Properties (A Review). *International Journal of Biological Sciences*, 1(8), 88-92.
- Visessanguan, W., Benjakul, S., Riebroy, S., Yarchai, M., & Tapingkae, W. (2006). Changes in lipid composition and fatty acid profile of Nham, a Thai fermented pork sausage, during fermentation. *Food Chemistry*, 94(4), 580-588. doi: DOI 10.1016/j.foodchem.2004.11.051
- Vulfson, E. N. (1994). *Industrial applications of lipases* (P. Wooley & S. B. Petersen Eds. Lipases ed.). Cambridge, Great Britain: Cambridge University Press.
- Walker, J. M. (2002). *The Protein Protocols Handbook* (2nd Ed.). Totowa, New Jersey Humana Press Inc.
- Whangsuk, W., Sungkeeree, P., Thiengmag, S., Kerdwong, J., Sallabhan, R., Mongkolsuk, S., & Loprasert, S. (2013). Gene Cloning and Characterization of a Novel Highly Organic Solvent Tolerant Lipase from *Proteus* sp. SW1 and its Application for Biodiesel Production. *Molecular Biotechnology*, 53(1), 55-62. doi: DOI 10.1007/s12033-012-9518-7
- Wiseman, A. (1995). *Introduction to principles* (Padstow & Cornwall Eds. 3rd ed.). UK: Ellis Horwood Ltd., T.J. Press Ltd.
- Xie, W., Khosasih, V., Suwanto, A., & Kim, H. K. (2012). Characterization of lipases from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from human facial sebaceous skin. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(1), 84-91.
- Yamane, T. (1987). Enzyme technology for lipids industry: An engineering overview. *Journal of the American Chemical Society*, 64(2), 1657-1661.
- กัญภัทร จินดา. (2547). เอนไซม์ไลเปส I: แหล่งและประโยชน์ระดับอุตสาหกรรม. วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย, 24(3), 20-34.
- นภา โล่ทอง. (2535). กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต. กรุงเทพฯ: ฟันนี่พับบลิชซิ่ง.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี และบัฟเฟอร์

เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดแล้ว นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก.1 Trypticase soy agar (TSA)

Tryptic soy broth	30	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ก.2 สารละลายเปปโตเนเข้มข้นร้อยละ 0.1

เปปโตเน (peptone)	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ก.3 Lipolytic Medium (Barrow & Feltham, 1993)

เปปโตเน (peptone)	1	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนตไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.01	กรัม
วุ้น	2	กรัม
น้ำกลั่น	100	กรัม

โดยเติม สารเหนียวนำร้อยละ 1 (Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 และ Tributyrin)

ก.4 Nutrient broth

เปปโตเน	15	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
NaCl	6	กรัม
กลูโคส	1	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	กรัม

โดยเติม สารเหนียวนำร้อยละ 1 (Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 และ Tributyrin)

ก.5 Starch agar

Tryptic soy broth	30	กรัม
Starch	10	กรัม

วุ้น	1.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ก.6 Nutrient gelatin agar

Nutrient Broth	0.8	กรัม
เจลาติน	0.4	กรัม
วุ้น	1.5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ก.7 Nutrient agar for blood

Nutrient Broth	0.8	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.8	กรัม
เม็ดเลือดแดง	2	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	95	มิลลิลิตร

ก.8 Nitrate broth

Meat extract	3	กรัม
เปปโตเน	5	กรัม
โพแทสเซียมไนเตรต (Potassium nitrate)	1	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ก.9 Tryptone broth

ทริปโตเน (Tryptone)	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ก.10 สารละลาย 1M Tris-HCl พีเอช 8.0

ชั่งทริส ไฮดรอกซีเมทิล อะมิโนมีทาน (Tris hydroxymethyl aminomethane; Tris) 121.14 กรัมละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับค่า พีเอช ด้วยกรดไฮโดรคลอริก(HCl) เข้มข้น จนมี พีเอช 8.0 (ประมาณ 42 มิลลิลิตร) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นอีกครั้งจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

ก.11 สารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl พีเอช 8.0

Tris (MW 121.14)	6.057	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ พีเอช เป็น 8.0 ด้วยกรด HCl เข้มข้น

ก.12 อาหารทดสอบการสร้างกรดจากน้ำตาล

น้ำตาล หรือ แหล่งคาร์บอน	0.5	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม
เปปโตน	0.5	กรัม
Salt solution	0.25	มิลลิลิตร
Bromocresol Purple	0.005	กรัม

ปรับ พีเอช เป็น 6.8 ด้วย NaOH ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

ก.13 อาหารทดสอบอาร์จินีน

เปปโตน	1	กรัม
NaCl	5	กรัม
L(+) arginine HCl	10	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ พีเอช ให้เป็น 6.8 ด้วย NaOH และหยดสารละลาย Phenol red ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ โดยหยดจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีส้มแดง

ภาคผนวก ข

ข้อมูลผลการทดลอง

ตารางที่ ข. 1 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียในอาหาร Nutrient Broth (NB) เติมสารหนี้ยวน้ำ Tween 20, Tween 40, Tween 60 และ Tween 80

รหัสไอโซเลท	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (U/ml)			
	NB+Tween 20	NB+Tween 40	NB+Tween 60	NB+Tween 80
NM3-4	0.00±0.02	0.20±0.00	0.08±0.04	0.17±0.02
NM3-7	0.25±0.05	0.09±0.05	0.12±0.04	0.40±0.03
NM8-1	0.22±0.01	0.26±0.03	0.22±0.02	0.56±0.06
NM8-2	0.20±0.00	0.49±0.09	0.44±0.07	0.40±0.03
PR9-2	0.01±0.13	0.05±0.01	0.09±0.00	0.42±0.20
PR10-2	0.36±0.03	0.20±0.01	0.18±0.01	0.22±0.04
PR10-3	0.26±0.02	0.40±0.01	0.38±0.02	0.25±0.03
PR11-1	0.17±0.01	0.21±0.01	0.22±0.04	0.25±0.03
PR11-3	0.17±0.02	0.23±0.02	0.44±0.03	0.57±0.00
PR11-4	0.25±0.01	0.27±0.04	0.33±0.02	0.15±0.02
PR12-2	0.25±0.04	0.37±0.04	0.19±0.05	0.19±0.02
KM15-1	0.76±0.01	1.32±0.02	1.36±0.05	0.65±0.01
KM17-4	3.07±0.02	2.16±0.14	6.70±0.11	21.52±0.04
KM18-4	1.01±0.06	0.59±0.04	1.69±0.02	2.65±0.06
PM25-1	0.81±0.07	4.25±0.05	3.17±0.04	1.59±0.03
NM28-1	0.23±0.01	0.28±0.03	0.14±0.03	0.31±0.01
MA34-3	0.31±0.02	0.28±0.04	0.12±0.08	0.05±0.02
MA39-2	0.17±0.01	0.25±0.04	0.03±0.03	0.04±0.01
NM41-2	0.14±0.02	0.08±0.01	0.04±0.01	0.28±0.02
NM42-1	0.14±0.02	0.08±0.01	0.04±0.01	0.28±0.02
NM42-3	0.28±0.03	0.31±0.05	0.07±0.05	0.07±0.02
NM42-4	0.18±0.01	0.20±0.00	0.04±0.01	0.04±0.02

รหัสไอโซเลท	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (U/ml)			
	NB+Tween 20	NB+Tween 40	NB+Tween 60	NB+Tween 80
NM42-6	0.08±0.01	0.02±0.01	0.07±0.01	0.03±0.00
NM42-8	0.35±0.03	0.21±0.01	0.26±0.02	0.10±0.03
NM42-10	0.18±0.07	0.12±0.02	0.24±0.00	0.10±0.02
NM43-1	0.03±0.01	0.10±0.01	0.08±0.03	0.12±0.01
NM43-2	0.35±0.05	0.10±0.02	0.28±0.06	0.71±0.05
NM43-5	0.03±0.01	0.05±0.01	0.08±0.03	0.36±0.09
NM44-2	0.20±0.01	0.53±0.05	0.41±0.05	0.36±0.08
NM44-3	0.19±0.02	0.09±0.00	0.21±0.01	0.89±0.22
NM44-4	0.24±0.03	0.25±0.00	0.13±0.02	0.30±0.00
NM44-5	0.13±0.01	0.17±0.02	0.10±0.01	0.11±0.08
NM44-6	0.19±0.01	0.28±0.01	0.05±0.01	0.10±0.07
NM45-2	0.35±0.02	0.33±0.00	0.08±0.02	0.26±0.04
NM45-3	0.16±0.01	0.25±0.03	0.25±0.01	0.14±0.02
NM45-4	0.42±0.04	0.29±0.04	0.04±0.01	0.17±0.00
NM45-5	0.19±0.04	0.27±0.02	0.80±0.05	0.43±0.01
NM45-6	0.28±0.04	0.34±0.03	0.54±0.03	0.44±0.20
NM46-2	0.07±0.01	0.03±0.01	0.06±0.00	0.04±0.00
NM46-3	0.64±0.09	0.52±0.07	0.60±0.01	0.36±0.08
NM47-1	0.10±0.01	0.04±0.02	0.06±0.02	0.15±0.01
NM47-2	0.18±0.01	0.15±0.00	0.09±0.03	0.21±0.02
NM47-3	0.13±0.01	0.08±0.01	0.09±0.02	0.45±0.03
SS48-2	0.46±0.03	0.54±0.05	0.03±0.01	0.34±0.13
SS48-4	0.33±0.04	0.67±0.07	0.30±0.03	1.09±0.03
SS48-5	0.14±0.01	0.07±0.01	0.19±0.02	3.23±0.09
SS49-3	0.08±0.01	0.07±0.04	0.08±0.03	0.31±0.07
SS49-1	0.83±0.05	0.55±0.00	0.96±0.04	0.23±0.03

รหัสไอโซเลท	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (U/ml)			
	NB+Tween 20	NB+Tween 40	NB+Tween 60	NB+Tween 80
SS49-4	0.38±0.01	0.86±0.02	0.45±0.01	1.75±0.00
SS501	0.13±0.01	0.38±0.01	0.42±0.01	0.94±0.13
SS502	0.11±0.02	0.15±0.05	0.18±0.04	0.10±0.05
SS503	0.18±0.02	0.32±0.04	0.12±0.02	0.05±0.02
SS51-2	0.30±0.00	0.18±0.00	0.16±0.03	0.39±0.05
SS52-1	0.26±0.03	0.15±0.06	0.04±0.04	0.21±0.01
SS52-3	0.83±0.08	0.15±0.10	0.67±0.11	0.35±0.01
SS52-4	0.27±0.01	0.35±0.02	0.16±0.02	0.22±0.00
SS55-3	0.21±0.01	0.26±0.01	0.28±0.02	0.25±0.11
SS56-1	0.28±0.06	0.41±0.03	0.17±0.03	0.34±0.02
SS56-3	0.11±0.05	0.12±0.05	0.05±0.03	0.04±0.01

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์

ค.1 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ด้วยวิธี spectrophotometry โดยมี *p*-nitrophenyl palmitate (*p*-NPP) เป็นสารตั้งต้น (Lee et al., 2003)

สารเคมี

1. สารละลาย *p*-nitrophenyl palmitate (*p*-NPP) เป็นสารตั้งต้น
2. ละลาย *p*-NPP 30 มิลลิกรัม ใน Isopropyl alcohol และปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร
3. สารละลาย buffer, พีเอช 8.0
4. ผสม Triton-X-100 2 มิลลิลิตร Gum Arabic 0.1 กรัม เกลือ NaCl 0.5 กรัม และ Tris-HCl ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ จนมีค่า พีเอช 8 ในน้ำ DI และปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร
5. สารละลาย NaHCO₃ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เป็นตัวหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์

วิธีการทดสอบ

1. เตรียมหลอดทดลอง 4 หลอดต่อ 1 ชุดการทดสอบ คือ 3 หลอดสำหรับทดสอบ 3 ซ้ำและ 1 หลอดสำหรับ Blank

เติมสารเคมีในหลอดทดลองดังนี้

สารละลาย buffer, พีเอช 8.0	474	ไมโครลิตร
สารละลาย <i>p</i> -nitrophenyl palmitate (<i>p</i> -NPP)	26	ไมโครลิตร
ตัวอย่างเอนไซม์	500	ไมโครลิตร

2. นำหลอดทดลองไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย NaHCO₃ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ 1 มิลลิลิตร

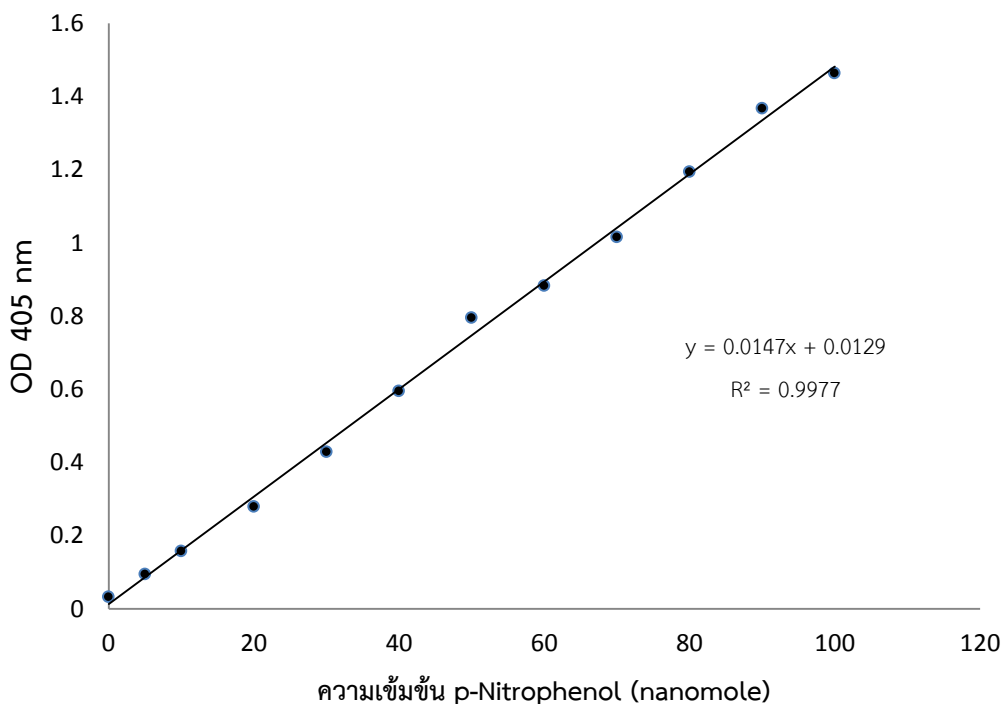
3. นำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส ด้วยวิธี spectrophotometric assay ที่ 405 นาโนเมตร คำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ โดยกำหนดให้ เอนไซม์ 1 ยูนิต (U) คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่กระตุ้นการเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้น (*p*-nitrophenyl palmitate) 1 นาโนโมล ให้เป็น *p*-nitrophenol ต่อ นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด (บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง)

หมายเหตุ ในหลอดทดลองที่ใช้เป็น Blank เติม NaHCO₃ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ 1 มิลลิลิตร ผสมกับตัวอย่างเอนไซม์ก่อนบ่มและเติม *p*-NPP และ buffer ภายหลัง

สูตรการคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ได้จากสมการเส้นตรง $y=1.5172x+0.0182$ จากกราฟมาตรฐานของ *p* - nitrophenol ในภาพที่ 4.2

$$\text{ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (U/ml)} = \frac{\text{ปริมาตรทั้งหมด (ml)} \times (x)}{\text{เวลาที่ใช้ในการบ่ม (นาที)} \times \text{ปริมาตรของเอนไซม์ (ml)}} \dots\dots\dots(\text{ค.1})$$

เมื่อ x = ค่าความเข้มข้นของ p -nitrophenyl (μmole ของ p -nitrophenol).



ภาพที่ ค. 1 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ p -nitrophenyl แสดงสมการเส้นตรง $y = 0.0147x + 0.0129$, โดยแกน y เป็นค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ 405 nm และแกน x เป็นค่าความเข้มข้นของ p -nitrophenyl (μmole ของ p -nitrophenyl).

ตัวอย่างการคำนวณ

สมมติให้ ค่า A405 ของ Blank = 0.150

ค่า A405 ของตัวอย่างเอนไซม์ = 0.350

y = ค่า A405 ของตัวอย่างเอนไซม์ - ค่า A405 ของ Blank = 0.350 - 0.150 = 0.200

สมการจากกราฟมาตรฐาน $y = 0.0147x + 0.0129$

เพราะฉะนั้น $x = \frac{y-0.0129}{0.0147} = \frac{0.2-0.0129}{0.0147} = 12.73$ nanomole/ml

จาก ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเพส (U/ml) = $\frac{\text{ปริมาตรทั้งหมด (ml)} \times (x) (\text{nano mole/ml})}{\text{เวลาที่ใช้ในการบ่ม (นาที)} \times \text{ปริมาตรของเอนไซม์ (ml)}} \dots\dots(4.1)$

เพราะฉะนั้น U/ml = $\frac{2 (\text{ml}) \times (12.73 \text{ nano mole/ml})}{60 (\text{นาที}) \times 0.5 (\text{ml})} = 0.85$

เพราะฉะนั้นค่ากิจกรรมของตัวอย่างเอนไซม์คิดเป็น 0.85 U/ml

*Unit(U) = nanomole/mins

ค.2 ปริมาณโปรตีนโดยใช้สารละลาย Coomassie brilliant blue R-250 (Bradford, 1976)

สารเคมี

1.) Bradford stock solution

Coomassie brilliant blue R-250	350	มิลลิกรัม
95% Ethanol	100	มิลลิลิตร
85% Phosphoric acid	200	มิลลิลิตร

ผสมและกวนทิ้งไว้บนเครื่อง Magnetic stirrer ข้ามคืน กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 (Whatman, England) แล้วเก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

2.) Bradford reagent : Bradford working buffer

Bradford stock solution	30	มิลลิลิตร
95% Ethanol	15	มิลลิลิตร
85% Phosphoric acid	30	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	425	มิลลิลิตร

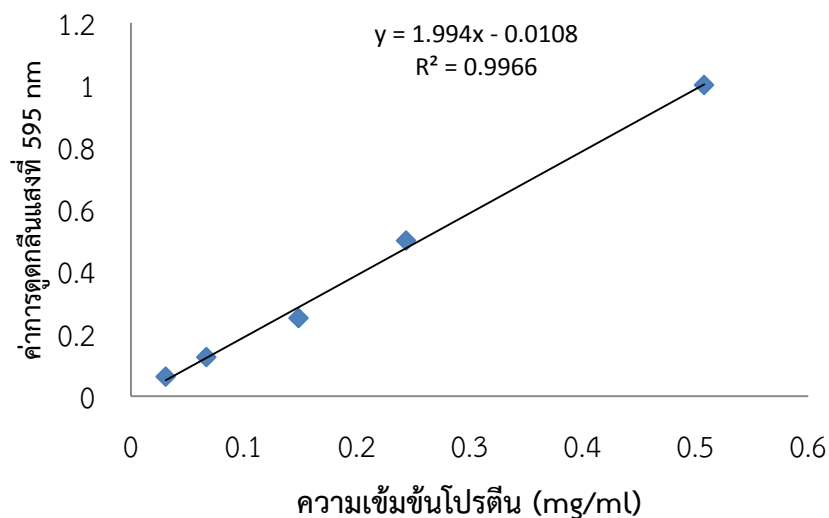
กวนผสมให้เข้ากัน

วิธีทดลอง

สร้างกราฟโปรตีนมาตรฐาน โดยใช้ Bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (สัดส่วนตามตารางที่ ค.1) 0, 1, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายมาตรฐาน 5 ไมโครลิตรลงใน 96-well microplate เติม Bradford reagent 195 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate Reader ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

- 1) เติมเอนไซม์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองที่มี Bradford reagent ปริมาตร 195 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง 96-well microplate ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร
- 2) คำนวณปริมาณโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน (รูปที่ ค.1)

จากสมการ $x =$ ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม) และ $y =$ ค่า A_{595}



ภาพที่ ค. 2 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA) แสดงสมการเส้นตรง $y = 1.994x - 0.0108$, โดยแกน y เป็นค่าการดูดกลืนแสง(OD) ที่ 595 nm และแกน x เป็นค่าความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน BSA (mg/ml)

ค.3 การทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical test)

- การย่อยสลายแป้งด้วยน้ำ (Hydrolysis of Starch)

ทดสอบเพื่อศึกษาความสามารถของเชื้อในการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายแป้ง โดยขีดเชื้อลงบน Starch agar นำไปบ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญแล้ว เทสารละลาย Gram's iodine (ที่เจือจางด้วยน้ำเป็น 1:2) ลงบนผิวหน้าของอาหาร

การตรวจผล เชื้อที่สร้างเอนไซม์อะไมเลส (amylase) จะแพร่เอนไซม์ออกมาอยู่รอบโคโลนีของเชื้อ และย่อยสลายแป้งบริเวณรอบโคโลนีให้เป็นน้ำตาลมอลโทสหรือกลูโคส ดังนั้น เมื่อเทสารละลาย ไอโอดีนรอบโคโลนีจะใส ส่วนเชื้อที่ไม่มีเอนไซม์อะไมเลสรอบโคโลนีจะเป็นสีน้ำเงิน เนื่องจากโมเลกุลของแป้งในอาหารจะไม่ถูกใช้ จึงทำปฏิกิริยากับไอโอดีนได้เป็นสีน้ำเงิน

- การย่อยสลายเจลาตินด้วยน้ำ (Hydrolysis of Gelatin)

ทดสอบเพื่อศึกษาความสามารถของเชื้อในการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเจลาติน โดยขีดเชื้อลงบน Nutrient gelatin agar นำไปบ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญแล้ว เทสารละลาย Trichloacetic 10 เปอร์เซ็นต์ ให้ทั่วผิวหน้าของอาหาร

การตรวจผล เชื้อที่สร้างเอนไซม์เจลาติเนส (gelatinase) รอบโคโลนีจะใส ส่วนเชื้อที่ไม่สร้างเอนไซม์นี้ รอบโคโลนีจะขุ่นเนื่องจากการตกตะกอนของเจลาตินที่ไม่ถูกย่อยสลาย

- **ทดสอบเอนไซม์เฮโมไลซิน (Hemolysin enzyme)**

ทดสอบเพื่อตรวจการสลายเอนไซม์ที่ทำลายเม็ดเลือดแดงโดยเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคบางชนิด โดยขีดเชื้อลงบนอาหาร Nutrient agar for blood นำไปบ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง

การตรวจผล อาหาร Nutrient agar for blood โดยปกติจะมีสีแดงทึบแสง หากเชื้อสร้างเอนไซม์เฮโมไลซินเซลล์เม็ดเลือดแดงจะถูกทำลายปรากฏเห็นส่วนใสโปร่งแสง (translucent) รอบโคโลนี ลักษณะการทำลายเม็ดเลือด

ชนิดเบต้า (Beta type hemolysis) คือ เม็ดเลือดแดงแตกและทำให้สีของฮีโมโกลบินหมดไป (decolorize hemoglobin)

ชนิดแอลฟา (Alpha type hemolysis) คือ เม็ดเลือดแดงแตกแต่ไม่ทำให้เลือดหมดสี เพียงแต่ทำให้สีเปลี่ยนเป็นสีเขียว (incomplete hemolysis)

- **ทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรต (Nitrate reduction)**

ทดสอบเพื่อศึกษาปฏิกิริยาการรีดิวซ์ไนเตรตโดยเชื้อแบคทีเรีย โดยเลี้ยงเชื้อใน Nutrient broth เมื่อเจริญแล้วนำมาเติมสารละลายกรดซัลฟานิลิก (sulfanilic acid) 3 หยด แล้วเติมสารละลาย dimethyl- α -naphthylamine ลงไป 2 หยด เขย่าให้เข้ากัน ถ้ามีสีแดงเกิดขึ้นแสดงว่ามีไนไตรต์

- **การทดสอบอินโดล (Indole test)**

ทดสอบเพื่อศึกษาการสร้างอินโดลในเชื้อแบคทีเรีย โดยเลี้ยงเชื้อใน Tryptone broth เมื่อเจริญแล้วเติมสารละลายโควาค (Kovac's solution) ลงไปที่ละหยด ให้เป็นชั้นของข้างบนอาหารเลี้ยงเชื้อให้สูงประมาณ ¼ ถึง ½ ของอาหาร ตั้งทิ้งไว้ ถ้ามีสีแดงเกิดขึ้นในชั้นรีเอเจนต์ แสดงว่ามีอินโดล

- **การทดสอบเมทิลเรด (Methyl Red; MR) และ Voges-Proskauer (VP)**

ทดสอบเพื่อศึกษาความแตกต่างในแบคทีเรียกลุ่ม coli-aerogenes โดยเลี้ยงเชื้อใน MR-VP broth 2 หลอด เมื่อเชื้อเจริญแยกไปทดสอบ

- ทดสอบ MR โดยการหยด methyl red ประมาณ 2-3 หยด สังเกตสีที่เกิดขึ้น หากมีสีแดงเกิดขึ้น แสดงว่าให้ผลบวกกับการทดสอบ methyl red แต่หากมีสีส้มหรือเหลือง แสดงว่าให้ผลลบ
- ทดสอบ VP โดยเติม α - naphthol solution 0.5 มิลลิลิตร และ KOH solution 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 5-10 นาที ถ้าเกิดสีชมพูหรือสีแดงเกิดขึ้น แสดงว่ามี acetylmethylcarbinol ให้ผลบวก

- การทดสอบคะตะเลส (Catalase test)

ทดสอบเพื่อตรวจหาเอนไซม์คะตะเลสในเชื้อแบคทีเรีย โดยการหยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ร้อยละ 3 ลงบนโคโลนีของเชื้อ ถ้ามีฟองแก๊สฟุ้งขึ้นมาจากโคโลนี แสดงว่ามีเอนไซม์คะตะเลส ให้ผลเป็นบวก

- การทดสอบ TSI (Triple sugar iron agar)

ทดสอบเพื่อใช้จำแนกแบคทีเรียในกลุ่ม *Enterobacteriaceae* และ Non fermentative gram negative bacteria โดยอาศัยคุณสมบัติของการหมักน้ำตาลกลูโคส แลคโตสและซูโครสของเชื้อ ทำให้ได้กรดหรือแก๊สเป็นผลผลิต และยังเป็นการทดสอบความสามารถในการผลิต H_2S

TSI ประกอบด้วยน้ำตาล 3 ชนิด คือ กลูโคส 0.1 % แลคโตส 10 % ซูโครส 10 % เมื่อเพาะเชื้อ ลงไปเชื้อที่ slant จะมีปริมาณมากกว่าบริเวณอื่น แบคทีเรียจะใช้น้ำตาลกลูโคสหมดก่อน ถ้าเชื้อไม่สามารถใช้แลคโตสและซูโครสได้ จะหันไปใช้โปรตีนที่มีอยู่ในอาหารแทน ทำให้ slant มีภาวะ เป็นด่าง เปลี่ยน Phenal red เป็นสีแดง

- ถ้าเชื้อสามารถใช้น้ำตาลได้ตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป จะทำให้อาหารทั้งหมดเป็นสีเหลือง
- ถ้าเชื้อไม่สามารถใช้น้ำตาลทั้ง 3 ชนิดได้เลย คือไม่มีการเปลี่ยนแปลง
- ถ้าเชื้อใช้น้ำตาลแล้วให้แก๊ส จะดันให้อาหารให้ยกตัวขึ้น หรือมีรอยแยกออกของอาหาร
- ถ้าเชื้อสร้าง H_2S จะทำปฏิกิริยากับ Ferrous ion ที่มีอยู่ในอาหารได้ตะกอนสีดำของ ferrous sulfide เกิดขึ้น

- การทดสอบการสร้างกรดจากน้ำตาล

ทดสอบเพื่อศึกษาความสามารถในใช้น้ำตาลเพื่อผลิตกรดของเชื้อ โดยใช้อินดิเคเตอร์ Bromocresol Purple ซึ่งจะเปลี่ยนสีในช่วง พีเอช ประมาณ 5.4 - 6.8 (เหลือง – ม่วง) ในอาหารที่ปรับพีเอชเป็น 6.8 เมื่อมีเชื้อมีการสร้างกรดจะลดค่าพีเอชทำให้สีของอินดิเคเตอร์เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

ค.4 การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

ในกรณีที่มีโปรตีนผสมหลายๆชนิดรวมอยู่ด้วยกัน สามารถแยกตกตะกอนโปรตีนออกเป็นกลุ่มย่อยๆได้ โดยการทำให้ Salting Out ที่ความเข้มข้นของเกลือต่างๆกัน เรียกริธีนี้ว่า " Salt fractionation " โดยเลือกตกตะกอนโปรตีนเป็นช่วงๆความเข้มข้น การเติมเกลือลงไปในน้ำปริมาตร 1 ลิตร ทำให้สารละลายมีความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในรูปของเปอร์เซ็นต์อิ่มตัว (% saturation) โดยปริมาณของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมลงไปในการทำ fractionation ตามตารางที่ ค.1

ตารางที่ ค. 1 ปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิมตัว (กรัม) ที่เติมลงไปในการละลายโปรตีน 1 ลิตร

From $S_1\%$	To $S_2\%$	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	
0		27	55	84	113	114	176	208	242	277	314	351	390	
	5		27	56	85	115	146	179	212	246	282	319	357	
	10			28	57	86	117	149	182	216	251	287	325	
	15				28	58	88	119	151	185	219	255	292	
	20					29	59	89	121	154	188	223	260	
	25						29	60	91	123	157	191	227	
	30							30	61	92	126	160	195	
	35								30	62	94	128	163	
	40									31	63	96	130	
	45										31	64	97	
	50											32	65	
	55												33	
	60													65
60	65	70	75	80	85	90	95	100						
390	430	472	516	561	608	657	708	761						
357	397	439	481	526	572	621	671	723						
325	364	405	447	491	537	584	634	685						
292	331	371	413	456	501	548	596	647						
260	298	337	378	421	465	511	559	609						
227	265	304	344	386	429	475	522	571						
195	232	270	309	351	393	438	485	533						
163	199	236	275	316	358	402	447	495						
130	166	202	241	281	322	365	410	457						
97	132	169	206	245	286	329	373	419						
65	99	135	172	210	250	292	335	381						
33	66	101	138	175	215	256	298	343						
	33	67	103	140	179	219	261	305						
65		34	69	105	143	183	224	266						
	70		34	70	107	146	186	228						
		75		35	72	110	149	190						
			80		36	73	112	152						
				85		37	75	114						
					90		37	76						
						95		38						

AGCAAGCGGAAGCTATAAAGTCTGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTA
GATCAGAATGTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGT
AGCTTAACCTTCGGG

- **Strain NM8-1 (1352 bp)**

GCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTT
GTTTGAACCGCATGGTTTACACATAAAAAGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGG
TAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTA
CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCG
TAAAGTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACT
ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGTGGCAAGCGTTGTCGGAAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAG
TCTGATGTGAAAGCCCCGGCTACCGGGGAGGGTCAATTGAAACTGGGAACTTGAGTGCAAGAGGAGAGTGGAAATCCACG
TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACCCAGTGGCGAAGGCAGCTCTGTTGCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAA
GCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAGTGTAGGGGTTTTCCGCCCTTAG
TGCTGACGTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACA
AGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTCTGACATCTAGAGATAGGAC
GTCCCTTCGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGTTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC
GCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTTAAGTGTACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGTGGGGATGACG
TCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTACAATGGACAGAAACAAAGGGCAGCGAAACCGGAGGTTAAGCC
AATCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGGGATCAGCA
TGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACACGAGAGTGTGTAACACCGGAAGTCGGTGAGGTA

- **Strain NM8-2 (1274 bp)**

CTGCCAGAAGCGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAGATG
GCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGCGTATTAGCTAGATGGTGGGTAACGGCTACCATGGCAATGATACGTAGCCG
ACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATG
GACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTTCGGCTCGTAAAACCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGA
GAGTAACTGTTTCAAGTATTGACGGTATTTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGTGGCA
AGCGTTGTCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAG
TGATCGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAA
CACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTCAGTGTGCAGTAAACGATTAAGCATTCCGCTG
GGGAGTACGGCCGAAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGGTGTAAATTCGAAGCTA
CGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGTGGTGC
ATGGTTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAT
TGGGCACTCTGGTGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTA
CACAGTGTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGT
AGGCTGCAACTCGCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAC
A

- **Strain PR9-2 (1382 bp)**

AGCTTGCTCCCGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGAAACCG
GAGCTAATACCGATAGTTCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGTTTTCGGCTGTCACCTACAGATGGACCCGCGGG
CATTAGTAGTTGGTGGGTAATGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGA
GACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGT
GATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAGAGTAAGTCTGCTCGCACCTTGACGGTACTTAAC

AGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCT
 CGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAG
 AGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTA
 ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGCTAAACGATGAGTGCTAAGTG
 TTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAG
 GAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAGGTCTTGACATCCCTCT
 GACAACCTAGAGATAGGGCTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGTCTGTGCTGAGATGTTG
 GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACC
 GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTAGACTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCTG
 CGAGACCGCAAGGTTTAGCGAATCCATAAATCTGTTCTCAGTTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCG
 CTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGAACA
 CCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATG

- Strain PR10-2 (1362 bp)

GCTTTCTGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTATGGGGATCTGCCGATAGAGGGGGATAACTACTGGAACCGTGGC
 TAATACCGCATAATGTCTACGGACCAAAGCAGGGGCTCTTCGGACCTTGCACTATCGGATGAACCCATATGGGATTAGCTAGTAG
 GTGGGTAAAGGCTCACCTAGGCGACGATCTCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGCGCCAGA
 CTCCTACGGGAGGCGAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCTGTATGAAGAAGGCCTTA
 GGGTTGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGATAAGGTTAATACCCTTATCAATTGACGTTACCCGAGAAAGAAGCACCGGC
 TAACTCCGTGCCAGCAGCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGAGGCGGTCA
 ATTAAGTCAGATGTGAAAGCCCCGAGCTTAACTGGGAATTGCATCTGAAACTGGTTGGCTAGAGTCTTGAGAGGGGGTAGAA
 TTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAGACTGACGCTCAG
 GTGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACAGATGTCGATTTAGAGGTTGTTGGTCTTGA
 ACCGTGGCTTCTGAGCTAACCGGTTAAATCGACCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGC
 CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACTACTTTGACATCCAGCGAATCCTTTAGAG
 ATAGAGGAGTGCCTTCGGGAACGCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTCTGTTGTGAAATGTTGGTTAAGTCCCGC
 AACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCACATAATGGTGGGAACTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTG
 GGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAGATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGA
 GAGCAAGCGGAACTCATAAAGTCTGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGT
 AGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGAAAAGAGTAGG
 TAGCTTA

- Strain PR10-3 (1357 bp)

TGCTTTCTGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTATGGGGATCTGCCGATAGAGGGGGATAACTACTGGAACCGTGGC
 CTAATACCGCATAATGTCTACGGACCAAAGCAGGGGCTCTTCGGACCTTGCACTATCGGATGAACCCATATGGGATTAGCTAGTA
 GGTGGGTAAAGGCTCACCTAGGCGACGATCTCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGCGCCAG
 ACTCCTACGGGAGGCGAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCTGTATGAAGAAGGCCTT
 AGGGTTGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGATAAGGTTAATACCCTTATCAATTGACGTTACCCGAGAAAGAAGCACCGG
 CTAACCTCCGTGCCAGCAGCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGAGGCGGTG
 AATTAAGTCAGATGTGAAAGCCCCGAGCTTAACTGGGAATTGCATCTGAAACTGGTTGGCTAGAGTCTTGAGAGGGGGTAGA
 ATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAGACTGACGCTCA
 GGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACAGATGTCGATTTAGAGGTTGTTGGTCTTG
 AACCGTGGCTTCTGGAGCTAACCGGTTAAATCGACCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGG
 CCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACTACTTTGACATCCAGCGAATCCTTTAGA
 GATAGAGGAGTGCCTTCGGGAACGCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTCTGTTGTGAAATGTTGGTTAAGTCCCG
 CAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCACATAATGGTGGGAACTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGT
 GGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAGATACAAAGAGAAGCGACCTCGCG
 AGAGCAAGCGGAACTCATAAAGTCTGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCG

TAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAAGAAGTAG
GT

- **Strain PR11-1 (1386 bp)**

TGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCG
GGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACATTTTCTTTGCATAAGAGAAAATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGC
CCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACT
GGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCC
GCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAACACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACAAGAGTAAGTCTTGTACCTTGACGGT
ACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGT
AAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTATTGAAACTGGGAACTTGGG
TGCGAAGAGAAAAGCGGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTTTT
GGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAGT
GCTAAGTGTAGAGGGTTCCGCCCTTTAGTGTGCGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAA
ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGTTTAATTGAAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTG
ACATCCTCTGACAACCTAGAGATAGAGCGTTCCTCCCTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTACGCTCGTGC
GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCC
GGTGACAAACCGGAGGAAGTGGGGTAGCCTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGT
ACAAAGGGCTGCAAGACCGGAGGTCAAGCCAATCCATAAAAACCATTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGA
AGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCAGGAG
AGTTTGAACACCCGAAGTCGGTGGGGTAA

- **Strain PR11-3 (1360bp)**

CTTGCTTTCTTGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTATGGGGATCTGCCGATAGAGGGGATAACTACTGAAAACGGTG
GCTAATACCGCATAATGTCTACGGACCAAAGCAGGGGCTTTCGGACCTTGCACTATCGGATGAACCCATATGGGATTAGCTAGT
AGGTGGGGTAAAGGCTCACCTAGGCGACGATCTCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA
GACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCTGTATGAAGAAGGCCT
TAGGGTTGTAAGTACTTTACGCGGGGAGGAAGGTGATAAGGTTAATACCCTTGCAATTGACGTTACCCGCAAGAAGCACCG
GCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGAGCGGCT
CAATTAAGTCAGATGTGAAAGCCCCGAGCTTAACCTGGGAATTGCATCTGAAACTGGTTGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGTAG
AATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGACGCTC
AGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGATGTCGATTAGAGGTTGTGGTCTT
GAACCGTGGCTTTCGGAGCTAACCGTAAATCGACCCCTGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGG
GCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACTACTCTTGACATCCAGCGAATCCTTTAG
AGATAGAGGAGTGCCTTCCGGAAACGCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTACGCTCGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCC
GCAACGAGCGCAACCTTATCCTTTGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGG
TGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAGATACAAAGAGAAGCGACCTCGC
GAGAGCAAGCGGAACTCATAAAGTCTGTCTAGTCCGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATC
GTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTGCAAAAAGAAGTAG
GTAG

- **Strain PR11-4 (1368 bp)**

AACAGGGGAAAGCTTGCTTTCTTGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTATGGGGATCTGCCGATAGAGGGGATAACT
ACTGAAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGGACCAAAGCAGGGGCTTTCGGACCTTGCACTATCGGATGAACCCATAT
GGGATTAGCTAGTAGTGGGGTAAAGGCTCACCTAGGCGACGATCTCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTG
AGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCTGTA

TGAAGAAGGCCTTAGGGTTGTAAGTACTTTACGCGGGGAGGAAGGTGATAAGGTTAATACCCTTATCAATTGACGTTACCCGCA
 GAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGGTCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCG
 CACGCAGGCGGTCAATTAAGTCAGATGTGAAAGCCCCGAGCTTAACCTGGGAATTGCATCTGAAACTGGTTGGCTAGAGTCTTGT
 AGAGGGGGTAGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAA
 AGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTAGA
 GGTTGTGGTCTTGAAACCGTGGCTTCTGGAGCTAACCGGTTAAATCGACCGCTGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAACCTCAAAT
 GAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACTACTCTTGACATCCAG
 CGAATCCTTTAGAGATAGAGGAGTGCCTTCGGGAACGCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGCTGCTCAGCTCGTGTGTGAAATGTT
 GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATCCTTTGTTGCCAGCACATAATGGTGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAA
 ACCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAGATACAAAGA
 GAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGAACTCATAAAGTCTGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGA
 ATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGT
 TGCAAAAAGAAGTA

- **Strain PR12-2 (1357 bp)**

TGCTTTCTGCTGACGAGCGGGACGGGTGAGTAATGTATGGGGATCTGCCCGATAGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGG
 CTAATACCGCATAATGTCTACGGACCAAAGCAGGGGCTCTTCGGACCTTGCACTATCGGATGAACCCATATGGATTAGCTAGTA
 GGTGGGGTAAAGGCTCACCTAGGCGACGATCTCTAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAG
 ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCCGGTGATGAAGAAGCCCTT
 AGGGTTGTAAAGTACTTTACGCGGGGAGGAAGGTGATAAGGTTAATACCCTTGCAATTGACGTTACCCGAGAAGAAGCACCGG
 CTAACCTCCGTGCCAGCAGCCGGTAATACGGAGGGTCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGAGCGGTC
 AATTAAGTCAGATGTGAAAGCCCCGAGCTTAACCTGGGAATTGCATCTGAAACTGGTTGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGTAGA
 ATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGACGCTCA
 GGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGATGTCGATTTAGAGGTTGTGGTCTTG
 AACCGTGGCTTCTGGAGCTAACCGGTTAAATCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGG
 CCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACTACTCTTGACATCCAGCGAATCCTTTAGA
 GATAGAGGAGTGCCTTCGGGAACGCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCC
 CAACGAGCGCAACCTTATCCTTTGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGT
 GGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAGATACAAAGAGAAGCGACCTCGCG
 AGAGCAAGCGAACTCATAAAGTCTGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCG
 TAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTGCAAAAAGAGTAGG
 TA

- **Strain KM15-1 (889 bp)**

GTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTGAACCGCA
 TGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACCTTATGGATGGACCCCGTCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC
 AAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
 GTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGTGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTGTTG
 TTAGGGAAGAACAAGTGTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTACGCGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC
 CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTTCTAAGTCTGATGTGAAAG
 CCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGAAAACCTGGGAGACTTGAAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGA
 AATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAG
 CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGTAAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTATGCTGCTGAAGT
 TAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGG
 AGCATGTGGTTAATTCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGG

- **Strain KM17-4 (1355 bp)**

CTGACGTTAGCGGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCTATAAGACTGGAATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATG
 CCGGATAATATGCGGAACCGCATGTTCCGCAATGAAAGACGGTTTTGCTGTCACTTATAGATGGACCCGCGCGTATTAGCTAG
 TTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCA
 GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCT
 TCGGATCGTAAAACCTGTTATTAGGGAAGAACAAGTGCAGTAACTATGCGCACCTTACCGGTACCTAATCAGAAAAGCCACG
 GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGGTT
 TTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGAGGGTTCATTGAAAAGTGGAAAAGTGGTGCAGAAGGAAAAGTGGA
 ATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGTCTGCAACTGACGCTGAT
 GTGCGAAAGCGTGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAATGTTGGGGTTTCCGC
 CCTTAGTGTGTCAGTAACGCATTAAAGCACTCCGCTGGGAGTACGGCCGAAGGCTGAAAAGTCAAAGGAATTGACGGGGACC
 CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAAATCTTGACATCCTTTGACCGCTCTAGAGA
 TAGAGTCTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG
 CAACGAGCGCAACCCTAACTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTTAAGTTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGG
 GGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACAGTGTACAATGGACAGTACAAGGGCAGCGAAACCGCGAG
 GTCAGCAAATCCATAAAGCTGTTCTCAGTTCGGATTGAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGTA
 GATCAGCATGTACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTCGTAACACCCGAAGCC

- **Strain KM18-4 (1370 bp)**

GAGCTTGCTCCTCTGACGTTAGCGGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCTATAAGACTGGAATAACTCCGGGAAAC
 GGGGCTAATGCGGATAATATGCGGAACCGCATGTTCCGCAATGAAAGACGGTTTTGCTGTCACTTATAGATGGACCCGCGCGG
 TATTAGCTAGTTGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTACG
 ACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTG
 ATGAAGGTCTTCGGATCGTAAAACCTGTTATTAGGGAAGAACAAGTGCAGTAACTATGCGCACCTTACCGGTACCTAATCA
 GAAAGCCACGGTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGC
 GTAGGCGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGAGGGTTCATTGAAAAGTGGAAAAGTGGAGTGCAGAAGA
 GAAAAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGCAAC
 TGACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAAGTGTTA
 GGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGTGTCAGCTAACGCATTAAAGCACTCCGCTGGGAGTACGGCCGAAGGCTGAAAAGTCAAAGGAA
 TTGACGGGGACCCGCAACGCGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAAATCTTGACATCCTTTGA
 CCGCTCTAGAGATAGAGTCTTCCCTTCGGGGACAAAGTGCAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTG
 GGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTAAGCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTTAAGTTGACTGCCGGTGACAAAC
 GGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACAGTGTACAATGGACAGTACAAGGGCAG
 CGAAACCGCGAGGTCAAGCAAATCCATAAAGCTGTTCTCAGTTCGGATTGAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGCTGGAATCG
 CTAGTAATCGTAGATCAGCATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTCGTAACA
 CCGAAGCCGG

- **Strain PM25-1 (1370 bp)**

TGCTCCTTTGACGTTAGCGGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGG
 TAATACCGGATAACACATAAAACCGCATGTTTTATGATGAAAGACGGTTTTGCTGTCACTTATAGATGGACCCGCGCGTATTA
 GCTAGTTGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTACGACAC
 GGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGA
 AGGTCTTCGGATCGTAAAACCTGTTATTAGGGAAGAACAAGGATGTAAGTAACTGTGCATCCCTTACGGGTACCTAATCAGAAA
 GCCACGGTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCTGA
 GGGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGAGGGTTCATTGAAAAGTGGAAAAGTGGAGTGCAGAAGAGGA
 AAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGCAACTGA
 CGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAAGTGTAGGG
 GGTTCGCCCTTAGTGTGTCAGCTAACGCATTAAAGCACTCCGCTGGGAGTACGGCCGAAGGCTGAAAAGTCAAAGGAATTG
 ACGGGGACCCGCAACGCGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAAATCTTGACATCCTTTGACAA
 CTCTAGAGATAGAGCTTCCCTTCGGGGACAAAGTGCAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGT

TAAGTCCCGAACGAGCGCAACCCTTAAGCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGTTGACTGCCGGTGACAAACCGGA
 GGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGCAGCGA
 ACCCGGAGGTCAAGCAAATCCATAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGCTA
 GTAATCGTAGATCAGCATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACCC
 GAAGCCGGTGGAG

- **Strain NM28-1 (1362 bp)**

GCTTGCTTTCTTGTGACGAGCGGGACGGGTGAGTAATGTATGGGGATCTGCCGATAGAGGGGATAACTACTGGAACGGT
 GGTAATACCCGATAATGTCTACGGACAAAGCAGGGGCTCTTCGGACCTTGCACTATCGGATGAACCCATATGGGATTAGCTAG
 TAGGTGGGGTAAAGGCTCACCTAGGCGACGATCTCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC
 AGACTCTACGGGAGGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCC
 TTAGGGTTGTAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGATAAGGTTAATACCCCTTATCAATTGACGTTACCCGAGAAGAAGCACC
 GGTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGAACGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGGCGG
 TCAATTAAGTCAGATGTAAAGCCCGAGCTTAACTTGGGAATTGCATCTGAAACTGGTTGGCTAGAGTCTTTAGAGGGGGTA
 GAATTCATGTGTAGCGGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTTGACAAAGACTGACGCT
 CAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTAGAGGTTGTGGTCT
 TGAACCGTGGCTTCTGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGG
 GGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACTCTTGACATCCAGCGAATCCTTTA
 GAGATAGAGGAGTGCCTTCGGGAACGCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCC
 CGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCGGTATAACCGGAGGAAG
 GTGGGGATGACGTCAGTCATCATGCCCCCTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAGATACAAAGAGAAGCGACCTCG
 CGAGAGCAAGCGGAACCTATAAAGTCTGTCGTAGTCCGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGTAGTAAT
 CGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAAGAAAGT
 AGGTAG

- **Strian NM41-2 (1344 bp)**

GCTGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTTAACTCTGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAA
 TACCGGATAGGAGCGCTACCCGATGGTGGGTGTTGGAAGATTTATCGGTTTTGGATGGACTCGCGCCTATCAGTCTGTTGGT
 GAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACT
 CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGG
 GTTGTAAACCTCTTTCAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG
 GTAATACGTAGGGTGCAGCGTTATCCGGAATTTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGCTGTGCTGAAAATCCG
 GGGCTTAAACCCGATCTCGGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATG
 CGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAA
 CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGACATTCCACGGTTTCCGCGCCGAGCTAA
 CGCATTAAAGTCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGGGAGCA
 TGGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTTCTCGATCGCCGTAGAGATACGGTTTCCCTTTGG
 GCGGGTTACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGTCTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAAGCGCAACCCCTCGTT
 CCATGTTGCCAGCAGTCTGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGAGGACGACGTCAAATCAT
 CATGCCCTTATGCTTGGGCTTACGCATGCTACAATGGCCGGTACAATGGGTTGCGATACTGTGAGGTGGAGCTAATCCAAA
 AAGCCGGTCTCAGTTCGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGG
 TGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCAAGTACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCTA

- **Strain NM42-1 (1383 bp)**

GCAGTCGAGCGGTAGCACAGAGAGCTTCTCGGGTACGAGCGGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGA

GGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAATGTCGCAAGACCAAAGTGGGGACCTTCGGGCTCATGCCATCAGA
 TGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCC
 AACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCC
 ATGCCCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTACGCGGGAGGAAGGCGATAAGGTTAATAACCTTGGCGATTG
 ACGTTACCCGAGAGAAGCACCAGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTG
 GCGTAAAGCGCACGAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTCGAAACTGGCAGG
 CTAGAGTCTTAGAGGGGGTAGAATCCAGGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGG
 CCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTGTAGTCCACGCCGTAACG
 ATGTGATTTGGAGTTGTGCCCTTGGAGCGTGGCTCCGGAGCTAACCGTTAAATCGACCGCTGGGAGTACGGCCGAAG
 GTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTG
 GTCTTGACATCCACAGAATTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAGTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG
 TGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTCAGCGGTCCGGCCGGGAAGTCAAAGGAGA
 CTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGTACAATGG
 CATATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACTCATAAAGTATGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTC
 CATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCGTCACACC
 ATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAG

- **Strian NM42-4 (1336 bp)**

AGCGCTTGCCTGGGTGGATTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTGACTGTGGGATAAGCCTGGGAAA
 CTGGGTCTAATACCGCATATGACGCGTCTCGCATGAGGGTGTGTGAAAGTATTTTTTCGGTTGGGGATGGGCTCGCGGCCTAT
 CAGCTTGTGGTGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGACGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGAC
 ACGGCCAGACTCCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGAAACCTGATGCAGCGACCGCGTGAGGGAT
 GACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTACGAGGGAAGAAGCCCCCTTTGGGGTACGGTACTGCAAAAAGTACCGCTAACT
 ACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTACAAGCGTTGTCCGAATTTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGCGTTCTCCGCTG
 CTGTGAAACGCAAGGCTCAACCTTGCCTGTCAGCGGTACGGGCTAACTAGAGTGCAGTAGGGAGTCTGGAATTCCTGGTG
 TAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGTGGCGAAGGCGGGACTCTGGGCTGTTACTGACGCTGAGGAGCGAAAG
 CATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGCTCATTCCACGAGTTCC
 GTGCCGAGCTAACGCATTAAGTCCCGCTGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCAC
 AAGCGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACTGGAATGTCCAGAGATGGT
 TCAGCTTTTTGAGCTGGTGTACAGGTGGTGCATGTTGTCTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC
 GCAACCCTCGTTCTATGTTGCCAGCAGTGAAGGTGGAACTCATAGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGTGGGGATG
 ACGTCAAATCATCATGCCCTTTATGCTTGGGCTTACGCGATGCTACAATGTCGTTACAAGGGTGGCGATACCGTGAAGTGGGA
 GCGAATCCAGAAAGCCGCTCAGTTCGGATCGTAGTCTGCAACTCGACTACGTGAAGTCGGAGTCCGATAGTAATCGCAGATCA
 GCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGTCACGAAAGTCGGTAAC

- **Strain NM42-8 (1346 bp)**

TGCTGACGAGCGGCGACGGGTGAGTAATGTATGGGATCTGCCGATAGAGGGGATAACTACTGAAACGGTGGCTAATACC
 GCATAATGTCTACGGACCAAAGCAGGGGCTCTTCGGACCTTGCACTATCGGATGAACCCATATGGGATTAGCTAGTAGGGGGT
 AAAGGCTCACCTAGGCGACGATCTCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACG
 GGAGGCGAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCTGTATGAAGAAGGCCCTTAGGGTTGTA
 AAGTACTTTACGCGGGGAGGAAGGTGATAAGGTTAATACCCCTGTCAATTGACGTTACCCGAGAGAAGCACCAGGCTAACTCCG
 TGCCAGCAGCCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGAGGGGTCAATTAAGTC
 AGATGTGAAAGCCCGAGCTTAACTTGGGAATTGCATCTGAAACTGGTTGGCTAGAGTCTGTAGAGGGGGTAGAATTCATGT
 GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGGAAA
 GCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGATGTCGATTAGAGGTTGTGGTCTTGAACCGTGGC
 TTCTGGAGCTAACCGTAAATCGACCGCTGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAA
 GCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACTACTTTGACATCCAGCGAATCTTTAGAGATAGAGGA
 GTGCCCTCGGGAACGCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG
 CAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCAGTAATGGTGGAACTCAAAGGAGACTGCCGGTGAATAACCGGAGGAAGTGGGGATGAC

GTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAGATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGC
GGAACCTATAAAGTCTGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGA
ATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAGAAGTA

- **Strain NM42-10 (1359 bp)**

GCTTTCTTGCTGACGAGCGGGGACGGGTGAGTAATGTATGGGGATCTGCCGATAGAGGGGGATAACTACTGGAACCGGTGGC
TAATACCGCATAATGTCTACGGACCAAAGCAGGGGCTCTTCGGACCTTGCACTATCGGATGAACCCATATGGGATTAGCTAGT
GTGGGGTAAAGGCTCACCTAGGCGACGATCTCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGA
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCCGTGTATGAAGAAGGCCTTA
GGGTTGTAAGTACTTTACGCGGGGAGGAAGGTGATAAGGTTAATACCCCTTGCAATTGACGTTACCCGAGAAGAAGCACCGGC
TAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGAGCGGGTCA
ATTAAGTCAGATGTGAAAGCCCCGAGCTTAACTTGGGAATTGATCTGAAACTGGTTGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGTAGAA
TTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGTGGCGAAGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAG
GTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTAGAGGTTGTGGTCTTGA
ACCGTGGCTTCTGGAGTAACGCGTTAAATCGACCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGC
CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGCGAATCCTTTAGAG
ATAGAGGAGTGCCTTCGGGAACGCTGAGACAGGTGCTGATGGCTGCTGCTCAGCTCGTGTGTAATGTTGGGTTAAGTCCCGC
AACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCAGTAATGGTGGGAACCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTG
GGGATGACGTCAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAGATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGA
GAGCAAGCGGAACCTATAAAGTCTGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGT
AGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAGAAGTAGG
TAGC

- **Strain NM44-3 (1448 bp)**

AACGCTGGCGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACAGATGAGAAGCTTGCTTCTCTGATGTTAGCGCGGACGGGTGAGT
AACACGTGGGTAACTACCTATAAGACTGGGATAACTCCGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAATATTTGAACCGCATGGTTC
AATATTGAAAGACGGTTTTCCGGCTGTCACTTATAGATGGACCCGCGCCTATTAGCTAGTTGGTAAGTAAATGGCTTACCAAGGCA
ACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG
AATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACCGCGGTGAGTATGAAGTCTTAGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGG
AAGAACAATTTGTTAGTAACTGAACAAGTCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGG
CTCAACCGTGGAGGGTCAATTGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCCG
AGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAG
GATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGTTTCCGCCCTTAGTGTGACGCTAACGCA
TTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGACAAGCGGTGGAGCATGTG
GTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAATCTTGACATCCTTTGACCGCTTAGAGATAGAGTTTTCCCTTCGGGGGA
CAAAGTACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAAGCT
TAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTTAGGTTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC
CCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATAATACAAAGGGCAGCGAACCCGCGAGGTCAAGCAAATCCCAAAAATT
ATTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGTGGAAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCATGCTACGGTGAATA
CGTTCCCGGGTCTTGTACACACCCGCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGCGGTGGAGTAACCTTTTATTAGGAGC
TAGCCGT

- **Strain NM44-2 (1388 bp)**

GTATTGATTGGTGCCTGCATCATGATTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAGCGG
 GGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAGATGGCTTCGGCTATCAC
 TTTTGGATGGTCCC GCGCGTATTAGCTAGATGGTGAGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAA
 TCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGAAAGTCTGATG
 GAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCCAGG
 TATTGACGGTATTTAACAGAAAGCCAGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGGATT
 TATTGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAACTGG
 GAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGG
 CGGCTGTCTGTTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAA
 CGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCGGCCCTTCACTGCTGAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGAGTACGGCCGCA
 AGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGTTTAATTGGAAGCTACCGGAAGAACCTTACC
 AGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGTTGTCGTAGCT
 CGTGTCTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGTTGAG
 ACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTACAATG
 GATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGCAACTCGCCT
 ACATGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTACAC
 CATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGTCGG

- **Strain NM44-5 (1377 bp)**

GCTTGCTTCTCTGATGTTAGCGGGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTACCTATAAGACTGGGATAAECTCCGGG
 AAACCGGGGCTAATACCGGATAAATTTTTGAACCGCATGGTTCAATAGTGAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTATAGA
 TGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGA
 TCGGCCCACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGGCGAAA
 GCCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAATTTGT
 TAGTAACTGAACAAGTCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCAGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTA
 GGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGG
 CTCAACCGTGGAGGGTCAATTGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGA
 AATGCGCAGAGATATGGAGGAACACAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGCG
 TGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGTTTCCGCC
 CTTAGTGCTGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGG
 GGACCCGCAACGGTGGAGCATGTGTTTAATTGAAAGCAACGCAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTTTGA
 CCGCTCTAGAGATAGAGTCTTCCCTTCGGGGGACAAAGTACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTAGCTCGTGTCTGTA
 GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTAAAGCTTAGTTGCCATCATTAAAGTGGGCACTTAGGTTGACT
 GCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGTACACACGTGCTAC
 AATGGATAATACAAAGGCGAGCAATCCGCGAGGCCAAGCAAATCCCATAAAATTATTCTCAGTTCCGATTGTAGTCT
 GCAACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGT
 ACACACCGCCCGTACACCAGAGAGTTTGTAAACCCGAAGCCGGTGGAGTAA

- **Strain NM45-5 (1392 bp)**

GAGCGAAAGATAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCTATAAGACTGGAAT
 AACTCCGGAAAACCGGGGCTAATGCCGGATAACATATAGAACCGCATGGTTCTATAGTGAAGATGGTTTTGCTATCACTTATAG
 ATGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCGACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTACGGCC
 AACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGAGCA
 ACGCCCGTGAAGTGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACATATGTGTAAGTAACTGTGCATCTTTG
 ACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTG
 GCGTAAAGCGCGCTAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGAAACTGGGAAAC
 TTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACAGTGGCGAAGGCGAC

TTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGAT
 GAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCCGAAGGT
 TGAAGCTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAAT
 CTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGGACAAAGTACAGGTGGTGCATGGTTGCTGCAGCTCG
 TGTCGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTAAGCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTTAGGTTGAC
 TGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGA
 CAATACAAAGGCAGCTAAACCGGAGGTGATGCAATCCCATAAAGTTGTTCTCAGTTCGGATTGATGCTGCAACTCGACTAC
 ATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTGTACACACCGCCCGTCACACCA
 CGAGAGTTTGTAAACCCGAAGCCGGTGGAGTAA

- Strain NM45-3 (1337bp)

GAGCGGATCTTGTCTTCGGGATGAGGTTAGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCCTCGAGACTGGGATAACC
 TCCGGAACCGGATGCTAATACCAGATACCGGATCTTCCCTCCTGGGGAGATCGGGAAAGACGGAGCAATCTGTTACTCGGGGAT
 GGCTGCGGCGCATAGCTAGTTGGTGGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCAC
 ACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGTAGGGAACTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAAC
 GCCCGTGTAGTGAGGAAGGCCCTCGGGTGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAAGCTTGGGAGAGTAACTGCTCCAAGGTGA
 CGGTACCTGAGAAGAAAGCCCGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCGGAAATTATTG
 GCGTAAAGCGCGCAGGCGGCTTTGTAAGTCCGGTGTAAATCTTGGGGCTCAACCCCAAGTCGCACGGGAAACTGCAAGGCT
 TGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACT
 TTCTGGGCTGTAACGTGAGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTACGCGCTAAACGATGAA
 TGCTAGGTGTTAGGGTTTCGATACCCTTGGTCCGAAGTTAACACAATAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGA
 AACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCTT
 GACATCCCTCTGAATCCGCTAGAGATAGCGCGGCTTCGGGACAGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGCTGCAGCTCGTGTG
 GTGAGATGTTGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTGAATTCAGTTGCCAGCACGTAAGGGTGGGCACTCTGAATTGACTG
 CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTACTACAATGGCCG
 GTACAACGGCCGGAAGCCGCGAGGCGGAGCAATCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGACAGCTGCAACTCGCTGCA
 TGAAGTCGGAATTGCTAGTAATCGGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGTCTGTACACACCGCCCGTCACACCA
 GAGAGTTTACAACCCGAAGTCGGTGGGTAACCCGCAAGGGA

- Strain NM47-3 (1354 bp)

CCCTGCTTGACGGTACTCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGACTTCGGGATAAGCTTGGGAACT
 GGGTCTAATACCGGATAGGACCGCATCATGGGTGGTGTGGTGGAAAGCTTTTGGGATGAGCTCGCGGCTATCAGCTT
 GTTGGTGGGTAATGGCCTACCAAGGCGTACGCGGTAGCCGCTGAGAGGGTGTACGGCCACATTGGGACTGAGATACGGCC
 CAGACTCCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGGGGATGACGGC
 CTTCCGGTTGTAACCTCCTTTCGCCAGGGACGAAGCGTAAGTACGGTACTGGATAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCA
 GCCCGGTAATACGTAGGGTGGGAGGCTTGTCCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGTTGTCGCGTCTGTTGTGA
 AGTCCACGGCTTAACTGTGGGACTGCAGGCGATACGGGCATAACTTGAAGTGTAGGGGAGACTGGAAATCCTGGTGTAGCGGT
 GAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACCCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCACTAAGTACGCTGAGAGCGAAAGCATGGGTA
 GCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACCGTGGGCGCTAGGTGTGAGTCCCTCCACGGGGTTCGTGCCGTAG
 CTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGGC
 ACATGTGGATTAATTCGATGCAACGGAAGAACCTTACCTGGGCTTACATACACCGACCGGGCCAGAGATGTTCTTCCCTTT
 GTGGCTGGTGTACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTG
 TCTTATGTTCCAGCACGTTGTGGTGGGACTCATGAGAGACTGCCGGGTTAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA
 TCATGCCCTTATGTCAGGGCTCACACATGCTACAATGGTGGTACAGCGCTGCGCGAGTTCGTGAGGATGAGCTAATCGCT
 GAAAGCCGGTCTAGTTCGGATTGGGCTGCAACTCGACCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGC
 GGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCGTCAGTCATGAAAGTTGGTAACCCGAAGCAGTGGCTCAAACCTG

- **Strain SS48-4 (1397 bp)**

TTAATTGATTATGACGTACTTGTACTGATTGAGATTTTAAACACGAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGC
 CCAGAAGTAGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAGAGAAAACCGCATGGTTTTCTTTAAAAGATGGCTC
 TGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGCTCACCAAGGCAGTGATACGTAGCCGACCTG
 AGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGC
 AAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACGTGGGTAAGAGTA
 ACTGTTTACCAGTGACGGTATTTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGTGGAAGCGT
 TATCCGGATTTATTGGCGTAAAGCGAGCGCAGCGCTTTTAAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCAT
 TGGAAACTGGGAGACTTGTAGTGCAGAAGAGGACAGTGAAGTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCA
 GTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTGATACCTGGTAGTCC
 ATGCCGTAACAGTATTACTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAAGTCTGAGTGCAGTAACGCATTAAGTAATCCGCTGGGGAG
 TACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGTACGCGAA
 GAACCTTACCAGTCTTGACATCTTCTGACAGTCTAAGAGATTAGAGGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGTGGTGCATGGTT
 GTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACGAGCGCAACCTTATTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCA
 CTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGTGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACG
 TGCTACAATGGATGGTACAACGAGTCCGAGACCCGAGGTTAAGCTAATCTCTTAAACCAATTCAGTTCGGACTGTAGGCTG
 CAACTCGCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCG
 CCCGTACACCATGAGAGTTTGAACACCCAAAGCCGGT

- **Strain SS48-5 (1481 bp)**

CGAGCGGACAGATGGGAGCTTGTCTCCCTGATGTTAGCGCGGACGCGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGA
 TAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCCTTAC
 AGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCG
 GCCACTTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAAGTCTGACGGA
 GCAACCGCGGTGAGTGTGAAGGTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTGGAATAGGGCGGTAC
 CTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGTGGAAGCGTTGTCGGAAATT
 ATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGAGGGTCAATTGGAAGTGG
 GGAATTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGAGGAACACCAGTGGCGAAG
 GCGACTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAA
 ACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGTTCCGCCCTTGTGCTGACGTAACGCATTAAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTCCG
 AAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAACGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGCAACCGAAGAACCTTACC
 AGGTCTTGACATCTCTGACAATCTAGAGATAGGACGTCCCTTCGGGGCAGAGTACAGGTTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCT
 CGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTTAAAGTG
 ACTGCCGTTGACAAACCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGTACACACGTGCTACAATG
 GACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGGAGGTTAAGCAATCCCAAACTCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACT
 GCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACAC
 CACGAGAGTTTGAACACCCGAAGTCGGT

- **Strain SS49-1 (1327 bp)**

GAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGACAACCTGCCTAAGCAGGGGATAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGTATAAC
 AACACATTTCCGATGAAGTGTGTTTAAAAGGGGCTTCGGCCTCACTTAGAGATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGAGGT
 AAAGGCTTACCAAGACGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAAACCTCAGC
 GGAGGCTGCAAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCTGATGGAGCAACGCCGCTGTGTGATGAAGGCTTTCGGGTCTGTA
 AAGCACTGTTGATGGGAAGAATAGTTAATGTAGGAAATGATGTTAATGTGACGGTACCATACCAGAAAGGGACGGCTAAATACG
 TGCCAGCAGCCGCGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGATTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTCGTTAAGTCT
 GAAGTGAAGCCACAGCTCAACTGTGGAATGGCTTTGAAACTGGCGAAGTTCAGTGCAGTAGAGGCAAGTGGAACTCCATGTG
 TAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGGCGCTTGTGACTGTAAGTACGTTGAGGCTCGAAAGT
 GTGGGTAGCAAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAGTGTAGGTTAGGAGGTTCCGCCTTATAGT
 GCCGGAGCTAACGCATTAAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGACAA

GCCGTTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGAAGATGTTAGAGATAATATT
 GTTCTCTTCGGAGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTCGTCTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC
 GCAACCCTTATGTTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGACAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGCGGGGATGACG
 TCAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAACGAGTTGCGAACCGGCGACGGTAAGCT
 AATCTCTTAAAGTACGTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCAT
 GCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGACACACCGCCCGTACACCATGAG

- **Strain SS49-2 (1214 bp)**

ATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAG
 CCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGACGAGTAGGGAATCTTCCACA
 ATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACCGCGGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAATATC
 TGAGAGTAACTGTTTCAAGTATTGACGGTATTTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAATACGTAGGTG
 GCAAGCGTTGTCGGATTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAG
 AAGTGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAA
 GAACACAGTGGCGAAGCGGCTGTCTGGTCTGTAACGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAACAGGATTAGATACCCCT
 GGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCGCCCTTCAGTGTGACGTAACGCATTAAGCATTCCGC
 CTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCAACGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAG
 CTACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGG
 TGCATGGTTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATTATCAGTTGCCAGCATT
 AGTTGGGCACTCTGGTGGAGTCCCGGTGACAAACCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGG
 CTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGAT
 TGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG
 TACACACCGCCCGTACACCATGAGA

- **Strain SS49-4 (1502 bp)**

GCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATA
 CCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATGAAAGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGATTAGCTAGTTGGTGAG
 GTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGGCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGC
 AGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAAGTGAAGGCTTTCGGGTCGTAACCTCTGTTGTTAG
 GGAAGAACAAGTCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACG
 TAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAG
 GGTCAATGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAAGT
 GGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAACGACACTGAGGCGGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCGTAAA
 CGATGAGTGTAAAGTGTAGAGGGTTTCGGCCCTTATGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGAGTACGGCCGAAGGCTGAA
 ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAACGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCTC
 TGAAAACCTAGAGATAGGGCTTCTCTTCGGGAGCAGAGTACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAG
 TCCCGCAACGAGCGCAACCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGTGGGGA
 TGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGTTACAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAAT
 CTCATAAAACGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAA
 TAGCTTCCCGGCCCTGTACACACCGCCCGTACACACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGGGGTA

- **Strain SS501 (1398 bp)**

GAACGAACTCTGGTATTGATTGGTCTTGATCATGATTTACATTTGAGTGAAGTGGCGAACTGGTGAAGTAAACGTTGGGAAACCTGCCAGAAG
 CGGGGATAACACCTGGAACAGATGCTAATACCGATAACAACCTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGG
 ATGGTCCCGCGCGTATTAGCTAGATGGTGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAAATCGGCCACATTTGG
 ACTGAGACACGCGCCAAACTCCTACGGGAGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGAGCAACGCGCGTGAAG
 AAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAATATCTGAGAGTACTGTTTCAAGTATGACGGTATTAACAGAAAGCCACGGCTAA
 CTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAATACGTAGGTGCAAGCGTTTCCGGATTATTGGGCGTAAAGCGAGCGGCGGTTTTTAAAGTCTGAT
 GTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAACTGGGAACTTGGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAA

TGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATT
 AGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGC
 CTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCTACGCGAA
 GAACCTTACCAGGCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGCTGCAGC
 TCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGGAGACTGCCGG
 TGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTT
 GCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTAAAGCCATTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT
 CGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCCAAAGTCGGT

- **Strain SS502 (1386bp)**

GGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAAGTAAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAGCGGGGATAA
 CACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGC
 GCGTATTAGCTAGATGGTGAAGTAAACGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACAC
 GGCCAACTCTACGGGAGGCGAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGGTTTCG
 GCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAATATCTGAGAGTAACTGTTCAAGTATTGACGGTATTAAACGAAAGCCACGGCTAACTACGTG
 CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGTGGCAAGCGTTGTCGGATTTATTGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAG
 CCTTCGGCTCAACCGAAGAGTGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
 ATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACC
 CTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCCGCTGGGGA
 GTACGGCCGAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGGGTTAATTGAAAGTACCGGAAGAACCTTA
 CCAGGCTTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGCTGCAGCTCGTGTG
 TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGGAGACTGCCGGTGACAAAC
 CGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTC
 GCGAGAGTAAGCTAATCTCTAAAGCCATTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATC
 AGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCCAAAGTC

- **Strain NM45-2 (1339 bp)**

GAGCTTGCTCTGATTTGATTTTATCTGACAAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAAACACGTGGGTAACCTACCTCTTAGCAGGGGATAACATTTGGA
 AACAGTGCTAATACCGTATAACTAACAACCGCATGGTTGTTAGTTGAAAGATGGTTCTGCTATCACTAAGAGATGGACCCGCGGTGCATTA
 GCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCGATGATGCGTAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCAATGGGACTGAGACACGGCCCATAC
 TCCTACGGGAGGCGAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCTGATGGAGCAACGCCGCTGTTGATGAAGGGTTTCGGCTCGTAAA
 ACAGTGTATAAGAGAAGAACGACATTGAGAGTAACTGTTCAAGTGTGACGGTATCTTATCAGAAAGAACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCC
 GCGGTAATACGTATGTTCCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTATTTAAGTCTGAAGTGAAGCCCTCAGCTC
 AACTGAGGAAGGGCTTTGAAACTGGATAACTTGAGTGCAGTAGAGGAAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAA
 GAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTTTCGGACTGTAAGTACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
 ACACCGTAAACGATGAGTGTAGATGTTCCGAGGTTTCCGCCCTTGGTGTGCGAGCTAACGCATTAAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCG
 CAAGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCT
 TGACATCCCTTGTAACTCTAGAAAATAGGATGTTCCCTTCGGGGACAAGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGCTGCAGCTCGTGTGATGATGT
 TGGGTTAAGTCCCAGCAGCGCAACCCTTATTATTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGTGAAGTGGGACTGCGGTTGACAAACCGGAGGAA
 GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATATACAACGAGTCGTAACCCGCGAGGGT
 ACGCTAATCTCTAAAGTATGCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCG
 GCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCCAAAGTC

- **Strain SS51-2 (1380 bp)**

GAATGAGATTTTAAACGAAGTGAAGTGGCGGACGGGTGAGTAAACACGTGGGTAACCTGCCAGAAGCAGGGGATAACACCTGGA
 AACAGATGCTAATACCGTATAACAGAGAAAACCGCTGGTTTTCTTTAAAAGATGGCTCTGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCG
 GCGCATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAACGGCTCACCAGGCGATGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACT
 GAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCGAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGA
 GTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAAGTGGGTGAGAGTAACTGTTACCCAGTACCGGATTTTAA
 CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCG

AGCGCAGGCGGTCTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGA
 AGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGCGGCTGTCTGGTCTGT
 AACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGATTACTAAGTG
 TTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGTCTGAGCTAACGCATTAAGTAATCCGCCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAA
 GAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGCTTGACATCTTC
 TGCCAACCTAAGAGATTAGGCGTTCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTCTGAGATGTT
 GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTACTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTTAGTGAGACTGCCGGTACAAAAC
 CGGAGGAAGTGGGGACGACGTCAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGTTACACGAGTC
 GCGAAACCGGAGGTTTAGCTAATCTCTTAAACCACTTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATC
 GCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGAAC
 ACCCAAAGCCGGTGGGTAAC

- **Strain SS55-3 (1369 bp)**

GATTTGAAGAGCTTGCTCAGATATGACGATGGACATTGCAAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGAACTACCTCTTA
 GCAGGGGATAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAATAGCAACCGCATGGTTGCTACTTAAAGATGGTTCTGCTAT
 CACTAAGAGATGGTCCCGCGTGCATTAGTTAGTTGGTGGAGTAATGGCTCACCAAGACGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGAC
 TGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAACTTCCACAATGGGCGAAAGCCT
 GATGGAGCAACGCCGCTGTGTGATGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACACTGTTTAAGAGAAGAATGACATTGAGAGTAACTGTT
 CAATGTGTGACGGTATCTTACCAGAAAGGAACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTATGTTCCAAGGTTATCCG
 GATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTATTTAAGTCTGAAGTGAAGCCCTCAGCTCAACTGAGGAATTGCTTTGGAAA
 CTGGATGACTTGAGTGCAGTAGAGAAAGTGAACCTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCG
 AAGGCGGCTTCTGACTGTAACGTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCG
 TAAACGATGAGTGTAGGTTTGGGGTTTCCGCCCTAAGTCCCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGAC
 CGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGGAAGAACCT
 TACCAGGCTTGACATCCCTTGACAACCTCAGAGATGGAGGTTCCCTTCGGGGACAAGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTC
 AGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTACTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAG
 TGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTAC
 AATGGCGTATAACAACGAGTTGCCAACCCGCGAGGGTGAGCTAATCTCTTAAAGTACGCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTC
 GCCTACATGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTGTACACACCGCCCGTC
 ACACCATGAG

- **Strain SS56-3 (1400 bp)**

GCTTTGCTTTAACTGATATGACGAGCTTGCTCTGATTTGATTTTATCTGACAAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGT
 AACCTACCTCTTAGCAGGGGATAACATTTGAAACAAGTGTAAATACCGTATAATACCAACAACCGCATGGTTGTTGGTTGAAAG
 ATGGTTCTGCTATCACTAAGAGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAATGATGCATAGC
 CGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAACTTCCACAAT
 GGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCTGTGTGATGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACACTGTTATAAGAGAAGAAGCGCACT
 GAGAGTAACTGTTCAAGTGTGACGGTATCTTACCAGAAAGGAACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTTT
 CAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTATTTAAGTCTGAAGTGAAGCCCTCAGCTCAACTGAGGA
 ATGGCTTTGAAACTGGATGACTTGAGTGCAGTAGAGGAAAGTGAACCTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAG
 AACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTTCTGGACTGTAACGTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCTG
 GTAGTCCACACCGTAAACGATGAGTGTAGATGTTTCGAGGGTTTCCGCCCTTGGAGTGTGCGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCC
 TGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGC
 AACCGGAAGAACCCTTACCAGGCTTGACATCCCTTGCTAATCCTAGAAATAGGACGTTCCCTTCGGGGACAAGGTGACAGGTGGT
 GCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATTAGTTGCCAGCATTTA
 GTTGGGCACTTAGTGAGACTGCCGGTACAAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCT
 TACACACGTGCTACAATGGCATATAACAACGAGTCGCCAACCCGCGAGGGTGCCTAATCTCTTAAAGTATGCTCAGTTCGGATT
 GTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTGT
 ACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGAACCCAAAG

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวมุกษะรินทร์ พุทธิโสวระโก เกิดเมื่อวันที่ 10 ตุลาคม 2530 ที่จังหวัดอุดรดิตถ์ ประเทศไทย สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาคชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เมื่อปีการศึกษา 2552 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภาคต้น ปีการศึกษา 2553

การนำเสนอผลงานทางวิชาการ

1. Mukkharin Phoottosavako, Somboon Tanasupawat, Wonnop Visessanguan and Suwimon Keeratipibul. 2013. Screening and characterization of lipase producing bacteria from fermented foods. Thai Society for Biotechnology (TSB2013): TSB International Forum 2013. August 28-30, 2013 at BITEC Bang Na Hall 101, Bangkok.